

資料 3 - 1 - 5

既存化学物質の人健康影響に関する情報（第一種特定化学物質審議関係②）

（平成 17 年 11 月 18 日）

- No. 6 1, 1-ビス (tert-ブチルジオキシ) -3, 3, 5-トリメチルシクロヘキサン ……p. 1
- No. 18 2, 4-ジ-tert-ブチル-6- (5-クロロ-2H-1, 2, 3-ベンゾトリアゾール-2-イル) フェノール……p. 62

6-1. 1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの 28 日間試験・Ames 試験・染色体異常試験

1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

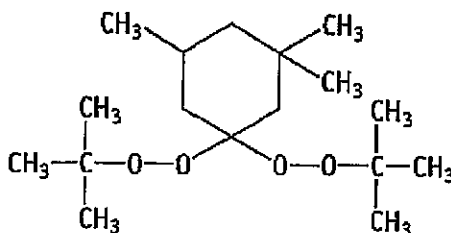
[CAS No. 6731-36-8]

1,1-Bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane

1,1-ビス(*tert*-ブチルペルオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

Molecular formula: $C_{17}H_{34}O_4$

Molecular weight: 302.45



ABSTRACT

A single dose oral toxicity test of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane revealed an LD_{50} value of more than 2000 mg/kg for both sexes.

1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane was studied for oral toxicity in rats in a 28-day repeat dose toxicity test at doses of 0, 100, 300 and 1000 mg/kg. One male animal in the 1000 mg/kg group died during the recovery period. Repeated administration of test substance caused centrilobular hypertrophy of hepatocytes in the female animals given 100 mg/kg and more, and in the male animals given 300 mg/kg and more. The female animals receiving 100 mg/kg and more also showed enhanced periportal fatty change and a decreased A/G ratio. In addition, in the 1000 mg/kg group, animals of both sexes demonstrated a prolonged blood coagulation time, and increased GPT activity, suggesting hepatic dysfunction. In the male animals given 100 mg/kg and more, intracytoplasmic eosinophilic inclusive bodies appeared in the proximal renal tubules, suggesting renal toxicity of the test substance. Thus, the NOEL for the 28-day repeat dose oral toxicity test of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane is considered to be less than 100 mg/kg/day for males and females.

Genotoxicity of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane was studied by the reverse mutation test in bacteria and by the chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster lung (CHL/IU) cells.

1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane was not mutagenic in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2 *uvrA*, with or without an exogenous metabolic activation system.

1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane did not induce chromosomal aberrations in CHL/IU cells, with and without an exogenous metabolic activation system.

SUMMARIZED DATA FROM THE STUDIES

1. Single Dose Oral Toxicity ¹⁾

Purity	: 97.9 %
Test species/strain	: Rat/Crj:CD(SD)IGS
Test method	: OECD Test Guideline 401
Route	: Oral (gavage)
Doses	: Males, 0 (vehicle), 1000, 2000 mg/kg Females, 2000 mg/kg
Number of animals/group	: Males, 5; females, 5
Vehicle	: Corn oil
GLP	: Yes

Test results:

No death occurred in any group. Clinical signs of diarrhea or soft feces were observed in all groups on the treatment day. No effects were found on body weight or autopsy findings.

The LD₅₀ value was concluded to be more than 2000 mg/kg for both sexes.

2. Repeat Dose Toxicity ¹⁾

Purity	: 97.9 %
Test species/strain	: Rat/Crj:CD(SD)IGS
Test method	: Guideline for 28-Day Repeated Dose Toxicity Test in Mammalian Species (Chemical Substances Control Law of Japan)
Route	: Oral (gavage)
Doses	: 0 (vehicle), 100, 300, 1000 mg/kg/day
Number of animals/group	: Males, 10; females, 10 (0, 1000 mg/kg) Males, 5; females, 5 (100, 300 mg/kg)
Vehicle	: Corn oil
Administration period	: Males and females, 28 days
Terminal kill	: Males and females, on days 29 and 43
GLP	: Yes

Test results:

No deaths occurred during the administration period, but one male animal in the 1000 mg/kg group died on the 3rd day of the recovery period. On hematological examination, animals of both sexes in the 1000 mg/kg group showed a tendency for prolongation or significant prolongation of prothrombin and activated partial thromboplastin time. Regarding blood chemistry, male animals in the 1000 mg/kg group showed a significant decrease in plasma glucose and a significant increase in GPT activity. The female animals in this group showed significant increases in γ -GTP activity and total protein level in addition to increase in GPT activity. Females receiving 100 mg/kg showed a significant decrease in albumin level. The A/G ratio in the test substance groups was significantly decreased. Dose-dependent increases in organ weights of the liver and the kidneys were observed in the animals of both sexes of the test substance groups. Histopathological examination revealed centrilobular hypertrophy of hepatocytes which became evident dose-dependently in male animals given 300 mg/kg and more, and in the female animals given 100 mg/kg and more. Dose-dependent periportal fatty change was found in female animals. In the kidneys of all the male animals of

the test substance groups intracytoplasmic eosinophilic inclusion bodies and eosinophilic bodies were found in the proximal tubules and the degree of the former increased with increasing dose.

Thus, the NOEL for the 28-day repeat dose toxicity is considered to be less than 100 mg/kg/day for males and females.

3. Genetic Toxicity

3-1. Bacterial test ²⁾

Purity	:	97.9 %
Test species/strain	:	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537, <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>
Test method	:	Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Chemical Substances Control Law of Japan) and OECD Test Guideline 471
Procedures	:	Pre-incubation method
Solvent	:	DMSO
Positive controls	:	-S9 mix; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (TA100, TA98, WP2 <i>uvrA</i>), Sodium azide (TA1535) and 9-Aminoacridine (TA1537) +S9 mix; 2-Aminoanthracene (all strains)
Doses	:	-S9 mix; 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate +S9 mix; 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/plate
S9	:	Rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone
Plates/test	:	3
Number of replicates	:	2
GLP	:	Yes

Test results:

This chemical did not induce gene mutations in the *S. typhimurium* and *E. coli* strains. Toxicity was not observed in any strain, with and without S9 mix.

Genotoxic effects:

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537

	+	?	-
Without metabolic activation:	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[]	[*]

Escherichia coli WP2 *uvrA*

	+	?	-
Without metabolic activation:	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[]	[*]

3-2. Non-bacterial *in vitro* test (chromosomal aberration test) ²⁾

Purity	:	97.9 %
Type of cell used	:	Chinese hamster lung (CHL/IU) cells
Test method	:	Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Chemical Substances Control Law of Japan) and OECD Test Guideline 473
Solvent	:	DMSO
Positive controls	:	-S9 mix; 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine +S9 mix; 3,4-Benzo[<i>a</i>]pyrene
Doses	:	-S9 mix (6 hr short-term treatment) : 0, 93.75, 187.5, 375, 750, 1500, 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +S9 mix (6 hr short-term treatment) : 0, 375, 750, 1500, 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -S9 mix (24 hr continuous treatment) : 0, 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
S9	:	Rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone
Plates/test	:	2
GLP	:	Yes

Test results:

With 6 hr short-term treatment, chromosomal aberrations were not induced with and without S9 mix. Moreover, chromosomal aberrations were not induced after 24 hr continuous treatment without S9 mix.

Cytotoxicity was not observed in the 6 hr short-term treatment with and without S9 mix and the 24 hr continuous treatment without S9 mix.

Genotoxic effects:

	clastogenicity			polyploidy		
	+	?	-	+	?	-
Without metabolic activation:	[]	[]	[*]	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[]	[*]	[]	[]	[*]

- 1) The tests were performed by the Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523, Japan. Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627
- 2) The tests were performed by the Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology, 3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi, Kanagawa 229-1132, Japan. Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの ラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in Rats

要約

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの1000および2000 mg/kgを1群5匹からなる5週齢の雄ラットに、雌ラット5匹には2000 mg/kgを単回経口投与した。媒体対照として、雄5匹にコーン油を投与した。

全投与群で投与日に下痢便あるいは軟便の排泄がみられた。体重の推移および剖検所見には、変化は認められなかった。

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのLD₅₀値は、雌雄ともに2000 mg/kgを上回ると推定された。

方法

1. 被験物質

被験物質として、日本油脂(株)(愛知)より提供された無色透明の液体である1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン(Lot No.8X01, 純度97.9%)を用いた。受領物質は、使用時まで冷蔵保管した。なお試験終了後、残余被験物質を提供元で再分析し、被験物質が試験期間中安定であったことを確認した。

投与検体の調製においては、各用量毎に被験物質を秤量し、所定濃度となるようにコーン油(Lot No.V8P7069, ナカライテスク(株))を加えて溶解し、投与時まで冷蔵・遮光下で保存し、調製3日後に使用した。なお、2および20 w/v%に調製した被験物質は、冷蔵、遮光条件下で12日間安定であることを確認した。また、各投与検体の含量を測定した(95.7~99.9%)。

2. 使用動物および飼育方法

4週齢のSprague-Dawley系(Crj:CD(SD)IGS)雌雄ラットを、日本チャールス・リバー(株)筑波飼育センターから購入し、検疫と馴化を兼ねて8日間予備飼育した。試験には、予備飼育中、動物の一般状態に異常が認められなかった雄15匹、雌5匹を用い、雄は検疫終了時の体重を基に体重別層化無作為抽出法により1群5匹からなる3群に分け、雌は無作為に5匹を選んで1群とした。投与開始時の週齢は雌雄ともに5週齢であり、体重は雄が123.8~144.3 g、雌が109.6~121.4 gであった。

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し、温度23~25℃、湿度50~65%、換気回数約15回/時、照明12時間(7時~19時点灯)に設定された

飼育室で、固型飼料(CE-2, 日本クレア(株))および水道水(栗野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。

3. 投与量の設定および投与方法

投与量は、文献調査(RTECS No.:SD8600000)の結果および本被験物質のラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験の予備試験の結果に基づいて決定した。すなわち、本被験物質のラットにおける単回投与時のLD₅₀値は12918 mg/kgであり、予備試験において1000 mg/kgを投与した雌で投与初期に体重の増加抑制が認められたことから、雄では、1000および2000 mg/kgの2用量を設定し、加えて媒体対照群としてコーン油を被験物質投与群と同容量投与する群を設けた。また、予備試験では明らかな性差は認められなかったことから、雌については、2000 mg/kgの1用量を設定した。

投与容量は体重1 kg当たり10 mLとし、動物を約18時間絶食させた後、投与直前に測定した体重を基に投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて強制的に単回経口投与した。給餌は投与後約3時間に行った。

4. 観察および検査

観察第1日(投与日)から14日間にわたって死亡の有無を確認し、各動物の一般状態を観察した。観察は投与日においては投与直後から1時間まで連続して行い、その後は投与後6時間まで約1時間間隔で実施した。観察第2日から15日までは毎日1回行った。

体重は全例について、投与直前、観察第2, 4, 8, 11および15日に測定した。

剖検は、観察第15日に全例をペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血屠殺して実施した。

結果および考察

雌雄ともに、死亡例はなかった。

一般状態では全投与群で投与日に下痢便あるいは軟便の排泄がみられた。また、2000 mg/kg投与群の雄3例では投与日あるいは観察第2日に肛門周囲の汚れが観察された。

体重は、雌雄ともに順調に増加した。

剖検においても雌雄いずれの器官・組織にも変化は認められなかった。

以上の結果から、1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのLD₅₀値は、雌雄ともに2000 mg/kgを上回ると推定された。

文献

- 1) 三井雅之, 古川文夫, 鈴木順子, 榎並倫宣, 西川秋佳, 高橋道人, 国立衛生試験所報告, 110, 42(1992).

連絡先

試験責任者: 永田伴子
試験担当者: 勝村英夫, 松本浩孝, 堀内伸二,
三枝克彦, 稲田浩子, 安生孝子
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tomoko Nagata (Study director)
Hideo Katsumura,
Hirotaka Matsumoto,
Shinji Horiuchi, Katsuhiko Saegusa,
Hiroko Inada, Takako Anjo
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center,
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,
Japan.
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのラットを用いる
28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test
of 1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in Rats

要約

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系ラットを用いて実施した。投与量は雌雄とも0(対照群), 100, 300および1000 mg/kgとし, 0および1000 mg/kg投与群は回復試験の動物を含む1群10匹, 100および300 mg/kg投与群は1群5匹を使用して試験を行った。

その結果, 投与期間中に死亡例はみられなかったが, 回復第3日に1000 mg/kg投与群の雄1例が死亡した。

一般状態の変化としては, 投与第2日以降, 雄では300 mg/kg以上の投与群, 雌では100 mg/kg以上の投与群で, 投与後に一過性の流涎が認められた。また, 1000 mg/kg投与群の雌雄で投与第1週ないし2週の摂餌量が低値を示した。血液学検査では, 1000 mg/kg投与群の雌雄でプロトロンビン時間の延長あるいは延長傾向と活性部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。さらに, 1000 mg/kg投与群の雌では, 血色素量の減少がみられたが, 骨髓像には, 雌雄とも対照群と比較して著しい差は認められなかった。血液生化学検査では, 1000 mg/kg投与群において, ブドウ糖濃度の低下が雄に, GPT活性の上昇が雌雄に, γ -GTP活性の上昇が雌にそれぞれ認められた。また, 雌では, 総蛋白濃度の上昇が1000 mg/kg投与群に, アルブミン濃度の低下が100 mg/kg投与群にそれぞれ認められ, 被験物質投与群では, いずれもA/G比が有意な低値を示した。さらに, 300 mg/kg以上の投与群では, 雌で総コレステロール濃度の上昇がみられ, 雄でトリグリセライド濃度の低下が認められた。器官重量では, 雌雄とも用量に依存して肝臓および腎臓の重量が増加した。その他, 雌の被験物質投与群では, いずれも副腎の絶対重量に増加がみられ, 相対重量においても増加あるいは増加傾向が認められた。投与期間終了時の主な剖検所見としては, 1000 mg/kg投与群の一部の例に, 肝臓の暗色化, 大型化あるいは小葉像の明瞭化が観察された。病理組織学検査では, 肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が, 雄では300 mg/kg以上, 雌では100 mg/kg以上の投与群に観察され, 用量に依存してその程度が増強した。さらに, 肝臓の門脈周囲性の脂肪化が雌では用量に依存して増強した。腎臓では, 雄の被験物質投与群の全例に, 近位尿細管の好酸性細胞質内封入体と好酸性小体が観察され, 好酸性細胞質内封入体の程度は用量に依存して増強した。副腎では, 雌の被験物質投与群の多くの例に束状帯細胞の細胞

質肥大が観察された。

回復第3日の死亡例の主な所見としては, 投与期間終了時と同様な所見に加え, 脳および脊髄の硬膜下, 膀胱, 胸腺, 腸間膜リンパ節, 下顎リンパ節の出血のほか, 精巣, 精巣上体, 前立腺の間質に出血が認められた。

回復期間終了時の検査では, 被験物質投与群の雌雄でヘマトクリット値の減少がみられたほか, 血色素量の減少が雌に, また, 平均赤血球血色素濃度の上昇が雄に認められた。また, 被験物質投与群の雄では, 腎臓の好塩基性尿細管が観察される例が多く, その程度も増強した。しかし, 投与期間終了時にみられた他の変化は消失あるいは軽減する傾向にあった。

以上のことから, 本試験条件下における1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの無影響量は, 雌雄とも100 mg/kg未満であると判断された。

方法

1. 被験物質

被験物質として, 日本油脂(株)(愛知)より提供された1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのロット番号:8X01, 純度:97.9%)を用いた。提供された被験物質は, 使用時まで冷蔵保管した。なお, 被験物質の試験期間中の安定性は, 残余被験物質を提供元で再分析することにより確認した。

投与検体は, 用量ごとに被験物質を秤量し, 所定濃度となるようにコーン油(ロット番号:V8P7069, ナカライテスク(株))を加えて溶解して調製した。なお, 初回に調製した各濃度の投与検体の含量測定を実施した結果, 溶液中の被験物質の平均含量は, 所定濃度の96.9~101%であった。また, 動物試験に先立って, 被験物質の2および20 w/v%溶液の安定性を調べたところ, 調製後, 冷蔵, 遮光条件下で12日間は安定であることが確認されたため, 投与検体は1週に1回の割合で調製し, 使用時まで冷蔵, 遮光条件下で保管した。

2. 動物および飼育方法

試験には, 生後4週で購入し, 検査を兼ねて9日間予備飼育した雌雄のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS, 日本チャールス・リバー(株))各30匹を使用した。

群分けは, 検査期間中に異常がなかった動物を用い, 投与開始前日の体重に基づいて体重別層化無作為抽出法

により行った。動物数は、雌雄とも対照群および高用量群を各10匹とし、低および中用量群を各5匹とした。

動物は、温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度50~65%、換気回数約15回/時、照明12時間(7~19時点灯)に設定した飼育室内で、金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア(株))および水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。

3. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は、投与量設定のための予備試験の結果に基づき決定した。すなわち、1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンを0、500および1000 mg/kgの用量で7日間反復投与することにより、雌雄とも500 mg/kg以上の投与群で、投与直後に一過性の流涎がみられ、1000 mg/kg投与群の雌では、投与初期に体重の軽度な増加抑制が認められたが、その他には被験物質投与に起因したと考えられる明らかな変化は認められなかった。以上のことから、1000 mg/kgは、28日間の反復投与に耐えうる用量であると判断し、本試験の用量は、雌雄とも高用量を1000 mg/kgとし、以下公比約3で除して300および100 mg/kgを中用量および低用量とした。また、雌雄とも媒体であるコーン油を投与する対照群を設けた。

投与経路は強制経口投与とし、1日1回、28日間、ラット用胃管を用いて投与した。投与容量は5 mL/kgとし、投与量は雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に算出した。なお、回復期間は14日間とした。

4. 観察および検査

1) 一般検査

毎日(投与期間中は投与前および投与後)全例の一般状態を観察した。また、体重は、投与第1週に投与第1日の投与直前と4日、投与第2週以降回復期間終了週までは1週に2回の頻度で測定し、その他、投与期間終了日、回復期間終了日および剖検日ならびに死亡時にも測定した。摂餌量は、投与第1週では、投与第1日から2日にかけて1日あたりの摂餌量を測定し、以後回復期間終了週まで毎週1回の頻度で測定した。

2) 尿検査

各群とも生存している全例について、投与第4週および回復第2週に代謝ケージに収容して蓄尿し、約4時間の時点で採尿した。この4時間尿を用いて、pH、潜血、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンを試験紙法(クリニテック200+, バイエル・三共(株))により、また色調および濁度を視診により検査した。

3) 血液学検査

投与期間ないし回復期間終了日から翌日の剖検日にかけて定期解剖例全例を18から24時間絶食させ、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈よりEDTA 2Kを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コールターエレクトロニクス(株))によ

り赤血球数、白血球数、平均赤血球容積、血小板数(以上、電気抵抗法)および血色素量(吸光度法)を測定し、これらを基にヘマトクリット値、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)および網状赤血球比率(Brecher法)を求めた。また、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液をCA-1000(東亜医用電子(株))によりプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間(光散乱検出法)を測定した。さらに、定期解剖例全例の大腸骨骨髓塗抹標本(Wright-Giemsa染色)を作製し、投与期間終了時の対照群および高用量群について骨髓像検査を実施した。

4) 血液生化学検査

血液学検査用の採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロシュ・ダイアグノスティックス(株))により、総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD・DAOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ・G6PDH法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼ・GLDH法)、クレアチニン濃度(Jaffé法)、アルカリフォスファターゼ活性(GSCC法)、GOT活性(IFCC法)、GPT活性(IFCC法)、 γ -GTP活性(γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)、トリグリセライド濃度(GPO・DAOS法)、無機リン濃度(モリブデン酸直接法)、カルシウム濃度(OCPC法)を測定し、A/G比を算出した。また、全自動電解質分析装置(EA05, (株)A&T)により、ナトリウム濃度、カリウム濃度および塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

5) 病理学検査

上記の採血に引き続き、死亡例を除く全例を放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣または精巣、精巣上体の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、脳、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺、上皮小体、心臓、気管、気管支、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、前立腺、精囊、卵巣、子宮、陰、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、骨格筋(下腿部)、坐骨神経、大腿骨骨髓、膵臓、顎下腺、舌下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺、皮膚、病変部を0.1 mol/Lリン酸緩衝10 vol%ホルマリン溶液(pH 7.2)に固定し、精巣、精巣上体はブアン液に固定した。心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胃、精巣、精巣上体、卵巣および病変部はパラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、まず、対照群および高用量群について病理組織学検査を実施した。次いで、被験物質投与による影響が疑われた雌雄の肝臓、雄の腎臓および雌の副腎について、全例の病理組織学検査を実施し、さらに、対照群および高用量群の雄の全例の腎臓については、PAS染色標本を作製して病理組織学検査を行った。その他、肉眼的異常が認め

られた器官・組織についても病理組織学検査を実施した。なお、死亡例は器官重量を測定せず、それ以外は屠殺例と同様の病理学検査を実施した。

5. 統計解析

体重、摂餌量および定期解剖例の血液学検査、血液生化学検査ならびに器官重量について、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群が3群以上の場合は、Dunnett法で多重比較を行い、2群の場合には、Studentのt検定ないしAspin-Welchのt検定を行った。さらに、病理組織学検査所見は、グレード分けしたデータについてMann-WhitneyのU検定を、陽性グレードの合計値についてFisher直接確率の片側検定を行った。なお、これら対照群および被験物質投与群との間の有意差検定はいずれの場合も有意水準を5%とした。

結果

1. 死亡例

投与期間中に死亡例はみられなかったが、回復第3日に1000 mg/kg投与群の雄1例が死亡した。

2. 一般状態

投与第2日以降、投与直後の一過性の流涎が、100 mg/kg投与群の雌1例、300 mg/kg投与群の雄1例、雌3例、1000 mg/kg投与群の雄7例、雌9例に認められた。この流涎は、個体によっては投与時の保定の段階でもみられることがあったが、いずれも投与後概ね1時間以内に消失した。回復第3日に死亡した1000 mg/kg投与群の雄1例では、死亡前日から後肢が麻痺し、歩行不能状態となり、鼻周囲の褐色の汚れ、血尿と考えられる赤色

尿の排泄、立毛が観察された。これらの他には、投与期間および回復期間を通して一般状態に変化は認められなかった。

3. 体重(Fig. 1, 2)

観察期間中、被験物質投与群では、雌雄いずれにおいても対照群との間に体重の有意な差は認められなかった。

4. 摂餌量(Fig. 3)

1000 mg/kg投与群の雄では投与第1週に、また、雌では投与第1週および2週に、摂餌量が対照群と比較して有意な低値を示したが、それ以降いずれの被験物質投与群においても摂餌量に有意な差は認められなかった。

5. 尿検査(Table 1)

投与第4週および回復第2週の検査では、いずれの検査項目においても、被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

6. 血液学検査(Table 2, 3)

投与期間終了時の1000 mg/kg投与群では、雌にプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。また、雌においても活性部分トロンボプラスチン時間の有意な延長がみられたほか、プロトロンビン時間も延長傾向にあった。さらに、雌では血色素量の有意な減少がみられたほか、白血球分類の好塩基球比率に有意な増加が認められた。骨髓像検査では、1000 mg/kg投与群の雌の組織球比率が増加し、形質細胞比率が減少した。一方、雌雄とも顆粒球および赤芽球系いずれの比率にも有意な差はないことから、

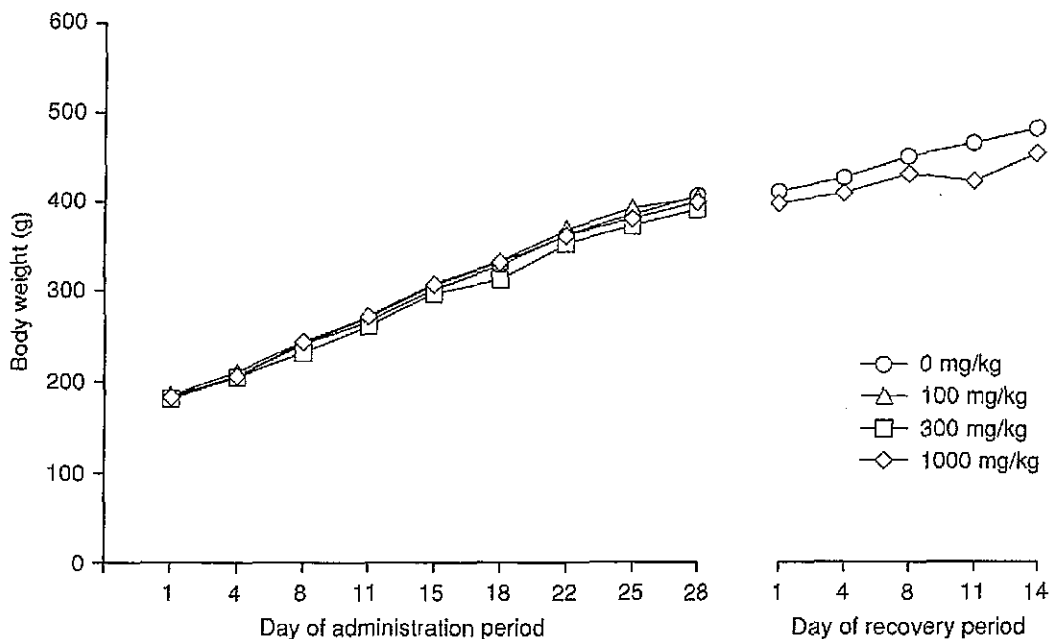


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butylidioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test