

Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

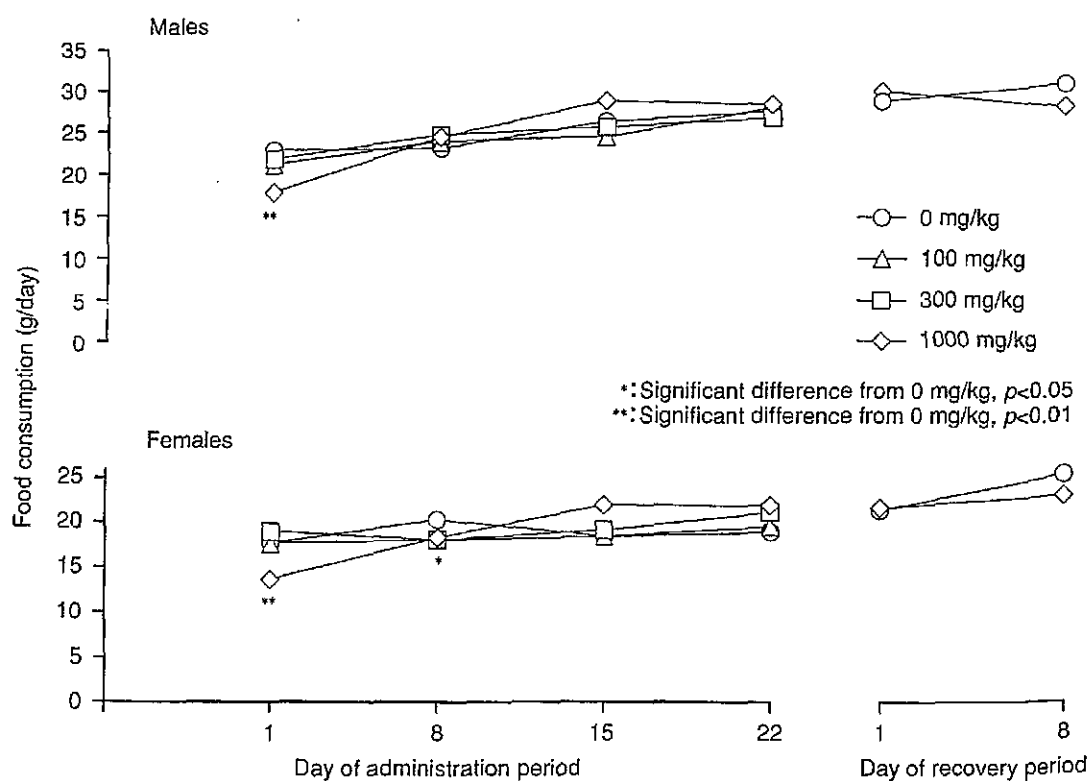


Fig. 3 Food consumption of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

骨髓に対する毒性影響はないと判断し、その他の群では検査を実施しなかった。

回復期間終了時の被験物質投与群では、雌の血色素量に有意な減少が認められたほか、ヘマトクリット値の有

意な減少が雌雄に、また、平均赤血球血色素濃度の有意な上昇が雄に認められた。一方、投与期間終了時にみられた血液凝固時間の延長は、雌雄とも認められなかった。

7. 血液生化学検査 (Table 4)

投与期間終了時の1000 mg/kg投与群では、ブドウ糖濃度の有意な低下が雄に、GPT活性の有意な上昇が雌雄に、 γ -GTP活性の有意な上昇が雌にそれぞれ認められた。また、雌では、総蛋白濃度の有意な上昇が1000 mg/kg投与群に、アルブミン濃度の有意な低下が100 mg/kg投与群にそれぞれ認められ、雌の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、雌に総コレステロール濃度の有意な上昇がみられ、雄にトリグリセライド濃度およびGOT活性の有意な低下が認められた。その他、300 mg/kg投与群の雄では、ナトリウム濃度の有意な上昇とアルカリフォスファターゼ活性の有意な低下が認められた。このうち、300 mg/kg以上の投与群の雄におけるGOT活性の変化は上昇ではなく、低下であること、また、300 mg/kg投与群の雄におけるナトリウム濃度の上昇およびアルカリフォスファターゼ活性の低下は、軽微で、用量に依存した変化ではないことから、いずれも毒性学的意義は乏しいものと考えられる。

回復期間終了時の被験物質投与群では、雄のA/G比が有意な低値を示し、雌でもその値は対照群と比較して低い傾向にあった。その他、被験物質投与群の雌では、無機リン濃度に有意な上昇がみられたが、その値は投与期間終了時の対照群の値と同程度であることから、被験物質投与およびその後続く回復期間に関連のない変化と考えられる。

8. 病理学検査

1) 肉眼所見

(1) 投与期間終了時解剖例

1000 mg/kg投与群の雄4例、雌3例では肝臓の暗色化がみられたほか、大型化が雌2例、雌1例に、また、小葉像の明瞭化が雌1例に認められた。腎臓では、腎盂の拡張が300 mg/kg投与群の雌1例に認められた。胃では、前胃壁の肥厚が1000 mg/kg投与群の雄1例に、また、漿膜面の赤色部が1000 mg/kg投与群の雄2例に認められた。その他、直腸中の軟便が1000 mg/kg投与群の雄1例に、また、肺の暗色点が1000 mg/kg投与群の雄1例に認められた。

(2) 回復期間終了時解剖例

被験物質投与群の雄では、肝臓の淡色点および腎臓の大型化が各1例に認められた。

(3) 死亡例

回復第3日に死亡した1000 mg/kg投与群の雄では、貧血と少量の血性胸水の貯留があり、脳および脊髄の硬膜下、胸腺、膀胱、精巣、精巣上体、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節に出血がみられ、膀胱内には凝血塊が認められた。その他、胸腺、肝臓および腎臓の大型化、腎盂の拡張、前立腺の暗色化が認められた。

2) 器官重量 (Table 5)

投与期間終了時の被験物質投与群では、肝臓および腎臓の重量が用量に依存して増加した。すなわち、肝臓の

絶対重量は、1000 mg/kg投与群の雄および300 mg/kg以上の投与群の雌に、また、相対重量は、300 mg/kg以上の投与群の雄および100 mg/kg以上の投与群の雌に有意な増加が認められた。腎臓の絶対重量は、300 mg/kg以上の投与群の雌に、また、相対重量は、300 mg/kg以上の投与群の雄および1000 mg/kg投与群の雌に有意な増加が認められた。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有意な増加がみられ、相対重量においても有意な増加あるいは増加傾向が認められた。

回復期間終了時の被験物質投与群では、雌雄の肝臓および腎臓の相対重量に有意な増加がみられた。このほか、雄の脾臓および雌の脳の相対重量と、卵巣の絶対および相対重量に有意な増加が認められたが、いずれも投与期間終了時には変化がなく、その程度も軽度であった。

3) 病理組織学検査 (Table 6)

(1) 投与期間終了時解剖例

肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が、雄では300 mg/kg以上の投与群、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、雌では肝臓の門脈周囲性の脂肪化が被験物質投与群で増強した。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(PAS染色陰性)が観察され、用量に依存してその程度が増強し、さらに、好酸性小体も被験物質投与群の全例に観察された。また、300および1000 mg/kg投与群の雄の各3例には蛋白円柱が認められた。副腎では、雌の各被験物質投与群とも5例中4例に、束状帯細胞の細胞質肥大が認められた。その他、自然発生の所見が観察されたが、いずれも対照群と比較してその程度あるいは頻度に有意差のある変化ではなかった。なお、肉眼的に病変がみられた部位の所見として、胃の漿膜面に赤色部が観察された1000 mg/kg投与群の雄2例中1例では、前胃粘膜下織の出血が認められたが、他には組織学的に異常はなかった。

(2) 回復期間終了時解剖例

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、1例には蛋白円柱が認められた。なお、投与期間終了時に被験物質投与群の雌雄にみられた肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大、雄にみられた腎臓の近位尿細管の好酸性細胞質内封入体および雌にみられた副腎の束状帯細胞の細胞質肥大は、回復期間終了時の検査ではいずれも消失あるいは軽減する傾向にあった。

(3) 死亡例

回復第3日に死亡した1000 mg/kg投与群の雄では、腎臓の近位尿細管の好酸性細胞質内封入体と好酸性小体、好塩基性尿細管、蛋白円柱、鉍質沈着、腎盂拡張、リンパ球浸潤が認められた。また、肝臓では門脈周囲性の脂肪化、小葉中心性の肝細胞肥大、脾臓では髄外造血、褐色色素沈着、副腎では束状帯細胞質の脂肪顆粒の増加が観察された。さらに、脊髄硬膜下、胸腺、膀胱、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みられ、膀胱には好中球の浸潤が認められた。

考察

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、100, 300および1000 mg/kgの用量で雌雄のSprague-Dawley系ラットに28日間にわたって強制経口投与し、その後14日間の回復期間を設けた。

その結果、一般状態の変化としては流産が、雄では300 mg/kg以上の投与群に、また、雌では100 mg/kg以上の投与群に認められた。流産は、個体によっては投与時の保定の段階でみられることがあり、いずれも投与後1時間以内に消失する一過性のものではあった。その発症例数は用量に依存し、多くは投与第5日以降にみられ、回復期間中にはみられなかったことから、被験物質による味覚刺激等によって成立した条件反射によるものと考えられる。その他、回復第3日に死亡した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、血尿と考えられる赤色尿の排泄が観察されたが、後肢の麻痺は、後述する脳および脊髄の硬膜下の出血に起因し、血尿は、膀胱の出血によるものと考えられた。

体重および摂餌量の変化として、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、対照群と比較して低かったが、その後の体重および摂餌量には対照群との間で差は認められず、摂餌量の減少は投与初期のみに認められた変化であった。また、尿検査所見には、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。したがって、被験物質投与により、体重、摂餌量、尿性状には著しい影響を及ぼさないと考えられる。

血液学検査所見として、1000 mg/kg投与群の雌雄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延長が認められた。これらの所見に関連して、回復期間中に死亡した1000 mg/kg投与群の雄1例では、脳および脊髄の硬膜下、胸腺、膀胱など複数の器官に出血がみられた。一方、回復期間終了時の検査では、血液凝固時間の延長はみられなかったことから、これらの所見は可逆的な変化と考えられる。その成因については、後述するように、1000 mg/kg投与群では肝障害が疑われるため、肝臓での血液凝固因子の生成が障害されたことにより、血液凝固時間の延長がみられた可能性が考えられる。回復期間中に死亡した1例でみられた出血も、同様な障害によって生じた可能性も考えられるが、肝障害の程度はいずれも比較的軽度であることから、その詳細は不明である。また、1000 mg/kg投与群の雌では、投与期間終了時の検査で、血色素量の減少が認められた。回復期間終了時の検査では、雌の血色素量に減少がみられたほか、ヘマトクリット値の減少が雌雄に、平均赤血球血色素濃度の上昇が雄に認められた。マウスに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投与すると、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値および平均赤血球容積の減少がみられ、造血系への影響が示唆されている¹⁾。しかしながら、本試験の投与期間

終了時の骨髓像検査および脾臓の組織学検査では変化が認められなかったことから、本試験の結果からはその機序を明らかにすることはできなかった。

血液生化学検査所見として、1000 mg/kg投与群では、GPT活性の上昇が雌雄に、また、 γ -GTP活性の上昇が雌に、それぞれ認められた。これらは、後述する肝臓の組織所見に関連して、軽度の肝障害がある可能性が示唆された。また、1000 mg/kg投与群の雌に総蛋白濃度の上昇が、また、100 mg/kg投与群の雌にアルブミン濃度の低下が、それぞれ有意な差として認められ、雌の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、グロブリン濃度の上昇が疑われた。さらに、1000 mg/kg投与群の雄にブドウ糖濃度の低下が認められた。この他、300 mg/kg以上の投与群では、雌に総コレステロール濃度の上昇がみられ、雄にトリグリセライド濃度の低下が認められた。一方、回復期間終了時の検査では、A/G比が被験物質投与群の雄で有意な低値を示し、雌でも対照群と比較して低い傾向にあったが、投与期間終了時にみられたA/G比以外の変化は認められなかった。これらの血液生化学的変化の成因には、肝臓における蛋白合成、脂質代謝あるいは糖代謝の変化が関与している可能性が考えられる。

病理学検査所見として、被験物質投与群では、雌雄とも用量に依存して肝臓の重量が増加し、組織学的には、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。同様な変化はマウスでも認められ、薬物代謝酵素の誘導が示唆されている^{1,2)}。今回の試験では、これらの変化に加えて、肝臓の門脈周囲性の脂肪化が雌の被験物質投与群では用量に依存して増強し、前述のように、1000 mg/kg投与群ではGPT活性あるいは γ -GTP活性の上昇が認められたことから、軽度ではあるが肝障害作用も示唆された。なお、肝臓の病理学的所見は、投与期間終了後、14日間の回復期間を経ることにより、消失あるいは軽減する傾向にあった。腎臓では、被験物質投与群で重量が増加し、雄の全例に近位尿管の好酸性細胞質内封入体および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。これらの変化に関しては、*tert*-ブチルシクロヘキサンをはじめ、多くの化学物質投与で、雄ラットにおいて同様の好酸性細胞質内封入体が出現する α_2 -globulin nephropathyが認められている^{3,4)}ことから、本試験においても同様な変化が生じたものと考えられる。一方、回復期間終了時の検査では、これらの変化は消失あるいは対照群との差がなくなり、尿管の再生像とみられる好塩基性尿管が雌の被験物質投与群で頻度および程度とも増強した。したがって、雄ラットでは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投与により腎臓に毒性変化が現れるが、投与中止により、回復傾向を示すことが示唆された。また、雌の被験物質投与群でも腎臓重量の増加がみられたが、組織学的には著しい変化は認められず、重量増加の成因は、本試験では明らかにすることはできなかった。副腎では、雌

の被験物質投与群に重量増加がみられ、組織学的には束状帯細胞の細胞質肥大が認められた。副腎に関する変化は、回復期間終了時には軽減したことから、被験物質投与に起因した変化と考えられるが、その毒性学的意義は不明であった。

以上のように、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反復投与により、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が雌では100 mg/kg以上、雄では300 mg/kg以上の用量でみられた。雌ではさらに100 mg/kg以上の用量で門脈周囲性の脂肪化の程度が増強したほか、A/G比の低下が認められた。その他、肝臓に関連する所見として、1000 mg/kgの用量では、雌雄で血液凝固時間の延長、GPT活性の上昇等が認められ、肝障害作用が示唆された。また、肝臓の他に、雄では100 mg/kg以上の用量で腎臓の近位尿管に好酸性細胞質内封入体が出現し、腎毒性が示唆され、さらに、雌では100 mg/kg以上の用量で副腎の束状帯細胞の細胞質肥大が認められた。これらのことから、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/day未満であると判断された。

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, 衛生試験所報告, **110**, 42(1992).
- 2) M. Mitsui, F. Furukawa, M. Sato, T. Enami, T. Imazawa, A. Nishikawa, M. Takahashi, *Fd Chem. Toxic.*, **31**, 929(1993).
- 3) G. M. Henningsen, K. O. Yu, R. A. Salomon, M. J. Ferry, I. Lopez, J. Roberts, M. P. Servé, *Toxicology Letter*, **39**, 313(1987).
- 4) L. D. Lehman-McKeeman, α_2 u-Globulin Nephropathy, "Comprehensive Toxicology," Volume 7, Renal Toxicology, Vol. ed. by R. S. Goldstein, eds. by I. G. Sipes, C. A. McQueen, A. J. Gandolfi, Elsevier science Ltd., Oxford, 1997, pp.667-692.

連絡先

試験責任者: 畔上二郎

試験担当者: 森村智美, 加藤博康, 関 剛幸,
新藤智子, 永田伴子, 吉村慎介,
堀内伸二, 稲田浩子, 三枝克彦,
安生孝子

〒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: Jiro Azegami (Study Director)

Tomomi Morimura, Hiroyasu Katoh,

Takayuki Seki, Tomoko Shindo,

Tomoko Nagata, Shinsuke Yoshimura,

Shinji Horiuchi, Hiroko Inada,

Katsuhiko Saegusa, 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

28日間反復投与毒性試験

Table 1 Urinalysis of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Dose(mg/kg)		On day 26 of administration period				On day 12 of recovery period	
		0	100	300	1000	0	1000
Male							
Number of animals		10	5	5	10	5	4
Color	light yellow	9	5	5	10	5	4
	yellow	1	0	0	0	0	0
Turbidity ^a		0	0	0	0	1	0
Protein ^b	±	2	1	0	1	1	1
	+	8	3	4	7	3	3
	++	0	1	1	2	1	0
Ketone ^c	±	6	2	1	4	3	3
	+	0	1	3	2	1	0
Urobilinogen ^c ±		10	5	5	10	5	4
Female							
Number of animals		10	5	5	10	5	5
Color	light yellow	9	5	5	9	4	5
	yellow	1	0	0	1	1	0
Protein ^b	±	1	0	0	1	0	1
	+	0	1	3	2	1	0
Ketone ^c ±		0	1	2	2	1	0
Urobilinogen ^c ±		10	5	5	10	4	5
+		0	0	0	0	1	0

a) ±:trace, +:slight b) ±:trace, +:30 mg/dL, ++:100 mg/dL c) ±:0.1 E.U./dL, +:1.0 E.U./dL

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

Table 2 Hematological examination of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Dose(mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	4
RBC($\times 10^6/\text{mm}^3$)	706 \pm 35	683 \pm 27	680 \pm 39	673 \pm 37	795 \pm 32	757 \pm 40
Hemoglobin(g/dL)	14.4 \pm 0.5	14.3 \pm 0.4	14.3 \pm 0.7	14.3 \pm 0.6	15.4 \pm 0.4	15.0 \pm 0.4
Hematocrit(%)	41.8 \pm 1.2	41.0 \pm 1.5	40.7 \pm 2.2	41.0 \pm 1.6	46.2 \pm 1.3	43.1 \pm 1.3**
MCV(μm^3)	59.3 \pm 1.2	60.1 \pm 2.1	59.9 \pm 1.7	61.1 \pm 2.7	58.2 \pm 3.1	57.0 \pm 3.3
MCH(pg)	20.4 \pm 0.6	20.9 \pm 0.8	21.1 \pm 0.7	21.3 \pm 0.7	19.5 \pm 0.8	19.8 \pm 0.9
MCHC(%)	34.5 \pm 0.6	34.8 \pm 0.4	35.3 \pm 0.9	34.7 \pm 0.4	33.4 \pm 0.4	34.8 \pm 0.5**
Reticulocyte(%)	3.0 \pm 0.5	2.6 \pm 0.6	2.7 \pm 0.5	2.5 \pm 0.3	2.4 \pm 0.9	2.5 \pm 0.8
Platelet($\times 10^4/\text{mm}^3$)	103.1 \pm 7.0	98.2 \pm 8.1	108.4 \pm 6.9	111.0 \pm 4.8	92.5 \pm 7.4	91.8 \pm 9.6
PT(sec)	14.0 \pm 1.4	14.7 \pm 1.6	16.0 \pm 1.8	38.9 \pm 17.9**	14.8 \pm 2.3	12.4 \pm 0.5
APTT(sec)	20.2 \pm 2.3	20.7 \pm 1.6	23.1 \pm 2.2	45.4 \pm 17.0**	18.4 \pm 0.9	18.9 \pm 0.9
WBC($\times 100/\text{mm}^3$)	83 \pm 21	80 \pm 11	79 \pm 15	88 \pm 29	87 \pm 12	93 \pm 21
Differential leukocyte counts(%)						
Band neutrophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Segmented neutrophil	8 \pm 2	7 \pm 2	10 \pm 3	8 \pm 4	9 \pm 4	12 \pm 9
Eosinophil	0 \pm 1	0 \pm 1	1 \pm 1	0 \pm 0	1 \pm 1	0 \pm 1
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	1 \pm 1	2 \pm 1	1 \pm 0	1 \pm 1	1 \pm 2	2 \pm 2
Lymphocyte	90 \pm 3	91 \pm 2	89 \pm 2	90 \pm 4	89 \pm 5	87 \pm 8
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC($\times 10^6/\text{mm}^3$)	701 \pm 15	662 \pm 65	664 \pm 24	678 \pm 20	768 \pm 50	715 \pm 34
Hemoglobin(g/dL)	14.7 \pm 0.3	14.3 \pm 0.7	14.0 \pm 0.4	13.8 \pm 0.4*	15.4 \pm 0.5	14.2 \pm 0.7*
Hematocrit(%)	42.4 \pm 1.3	40.7 \pm 2.9	39.3 \pm 1.0	39.8 \pm 1.8	44.3 \pm 1.6	40.6 \pm 2.0*
MCV(μm^3)	60.4 \pm 2.5	61.6 \pm 1.7	59.2 \pm 2.1	58.8 \pm 2.3	57.8 \pm 2.2	56.8 \pm 1.3
MCH(pg)	21.0 \pm 0.6	21.7 \pm 1.1	21.1 \pm 0.9	20.4 \pm 0.7	20.1 \pm 1.0	19.9 \pm 0.3
MCHC(%)	34.8 \pm 0.9	35.3 \pm 0.9	35.6 \pm 0.3	34.7 \pm 0.7	34.7 \pm 0.7	35.1 \pm 0.8
Reticulocyte(%)	1.6 \pm 0.6	2.8 \pm 1.4	1.9 \pm 0.4	1.9 \pm 0.3	2.3 \pm 0.8	2.2 \pm 0.3
Platelet($\times 10^4/\text{mm}^3$)	97.5 \pm 6.4	94.2 \pm 12.8	108.8 \pm 11.6	106.4 \pm 10.8	94.4 \pm 4.1	96.8 \pm 6.0
PT(sec)	11.6 \pm 0.3	11.5 \pm 0.4	11.1 \pm 0.3	15.5 \pm 2.4	11.1 \pm 0.3	11.0 \pm 0.4
APTT(sec)	17.8 \pm 1.2	18.4 \pm 1.7	18.7 \pm 1.4	25.8 \pm 3.4**	16.0 \pm 0.5	16.7 \pm 0.8
WBC($\times 100/\text{mm}^3$)	45 \pm 15	49 \pm 12	42 \pm 14	48 \pm 10	54 \pm 17	47 \pm 7
Differential leukocyte counts(%)						
Band neutrophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Segmented neutrophil	10 \pm 6	11 \pm 5	7 \pm 3	8 \pm 5	7 \pm 4	6 \pm 5
Eosinophil	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	0 \pm 0	1 \pm 1
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	1 \pm 1*	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	2 \pm 2	3 \pm 3	3 \pm 2	2 \pm 1	0 \pm 0	2 \pm 1
Lymphocyte	87 \pm 7	85 \pm 7	89 \pm 3	89 \pm 5	93 \pm 4	91 \pm 5

Values represent mean \pm S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$

**: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

28日間反復投与毒性試験

Table 3 Myelogram of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	End of administration period			
	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	1000	0
Number of animals	5	5	5	5
Differential bone marrow cell counts (%)				
Total erythroid cells	30.2 ± 5.7	27.0 ± 2.4	24.0 ± 3.1	24.9 ± 8.9
Proerythroblast	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Basophilic erythroblast	4.5 ± 1.3	3.0 ± 1.1	4.1 ± 0.6	3.6 ± 2.0
Poikilocytic erythroblast	16.5 ± 3.9	13.9 ± 2.7	10.5 ± 2.0	11.2 ± 3.6
Normoblast	9.1 ± 1.7	10.1 ± 1.7	9.2 ± 0.9	10.0 ± 3.4
Total myeloid cells	41.3 ± 4.6	47.0 ± 7.2	47.3 ± 8.3	43.5 ± 8.6
Myeloblast	2.2 ± 0.3	1.9 ± 0.9	2.4 ± 1.2	1.9 ± 0.7
Promyelocyte	2.0 ± 0.5	2.6 ± 1.3	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.7
Neutrophilic myelocyte	3.5 ± 0.6	3.2 ± 1.2	3.8 ± 1.0	3.4 ± 1.0
Neutrophilic metamyelocyte	10.8 ± 2.5	13.1 ± 2.3	13.8 ± 3.8	10.6 ± 2.3
Neutrophil	19.2 ± 3.7	22.1 ± 3.5	21.0 ± 3.6	20.6 ± 4.9
Eosinophilic myelocyte	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.6	0.9 ± 0.5	1.4 ± 0.7
Eosinophilic metamyelocyte	1.8 ± 0.8	1.8 ± 0.9	2.4 ± 1.0	2.4 ± 0.9
Eosinophil	0.5 ± 0.4	0.8 ± 0.6	1.2 ± 0.5	1.0 ± 0.7
Basophil, all types	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.8
Myeloid/erythroid ratio	1.4 ± 0.4	1.8 ± 0.4	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.9
Histiocyte	3.0 ± 0.9	3.0 ± 1.6	1.9 ± 0.6	3.6 ± 0.8**
Lymphocyte	25.0 ± 4.3	22.4 ± 4.6	25.3 ± 6.2	27.7 ± 4.1
Plasma cell	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.1*
Megakaryocyte	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2
Mast cell	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1

Values represent mean ± S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$

**: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

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

Table 4 Blood chemical examination of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Dose(mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	4
Total protein(g/dL)	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.4	5.5 ± 0.4	5.7 ± 0.4
Albumin(g/dL)	3.0 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.9 ± 0.3
A/G	1.39 ± 0.26	1.45 ± 0.15	1.37 ± 0.10	1.24 ± 0.13	1.24 ± 0.07	1.02 ± 0.09**
Glucose(mg/dL)	141 ± 13	129 ± 18	121 ± 19	106 ± 19*	143 ± 19	142 ± 10
Total cholesterol(mg/dL)	45 ± 9	44 ± 8	43 ± 9	49 ± 4	44 ± 8	59 ± 15
Triglyceride(mg/dL)	60 ± 10	51 ± 22	31 ± 7**	34 ± 10*	61 ± 22	48 ± 8
BUN(mg/dL)	12 ± 2	12 ± 2	13 ± 3	16 ± 3	17 ± 2	18 ± 2
Creatinine(mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1
Inorg. phos.(mg/dL)	6.8 ± 0.3	7.0 ± 0.4	6.5 ± 0.2	6.6 ± 0.4	7.2 ± 0.6	7.2 ± 0.4
Ca(mg/dL)	8.6 ± 0.2	8.9 ± 0.3	8.8 ± 0.2	8.9 ± 0.4	8.7 ± 0.3	9.0 ± 0.3
Na(mEq/L)	145.2 ± 0.6	145.5 ± 0.9	146.8 ± 1.3*	146.6 ± 1.0	144.5 ± 1.0	143.8 ± 0.6
K(mEq/L)	3.96 ± 0.23	3.95 ± 0.44	3.80 ± 0.13	3.88 ± 0.34	3.78 ± 0.16	3.88 ± 0.16
Cl(mEq/L)	106.0 ± 0.7	105.9 ± 1.6	106.0 ± 1.2	106.3 ± 0.9	106.6 ± 1.1	105.8 ± 1.4
ALP(U/L)	423 ± 45	342 ± 47	286 ± 72**	333 ± 61	318 ± 67	259 ± 20
GPT(U/L)	25 ± 3	24 ± 2	26 ± 1	32 ± 2**	28 ± 4	60 ± 73
GOT(U/L)	60 ± 4	54 ± 4	52 ± 5**	52 ± 2*	61 ± 6	93 ± 75
γ-GTP(U/L)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein(g/dL)	5.2 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.7 ± 0.3**	5.7 ± 0.3	6.0 ± 0.3
Albumin(g/dL)	3.5 ± 0.1	3.1 ± 0.3*	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.3
A/G	2.02 ± 0.12	1.60 ± 0.23**	1.46 ± 0.13**	1.39 ± 0.14***	1.45 ± 0.11	1.26 ± 0.18
Glucose(mg/dL)	116 ± 3	112 ± 4	113 ± 9	112 ± 8	156 ± 12	145 ± 10
Total cholesterol(mg/dL)	54 ± 8	57 ± 7	69 ± 6*	74 ± 8**	71 ± 9	72 ± 10
Triglyceride(mg/dL)	25 ± 4	25 ± 4	28 ± 6	20 ± 2	38 ± 7	35 ± 8
BUN(mg/dL)	13 ± 3	11 ± 1	12 ± 1	13 ± 1	18 ± 2	21 ± 4
Creatinine(mg/dL)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1
Inorg. phos.(mg/dL)	6.4 ± 0.4	6.1 ± 0.3	5.7 ± 0.4	5.9 ± 0.6	5.7 ± 0.4	6.3 ± 0.4*
Ca(mg/dL)	8.5 ± 0.2	8.4 ± 0.4	8.5 ± 0.3	8.4 ± 0.2	8.9 ± 0.2	8.9 ± 0.2
Na(mEq/L)	144.9 ± 0.8	145.7 ± 0.5	145.6 ± 1.0	145.8 ± 1.7	144.0 ± 0.5	144.3 ± 0.8
K(mEq/L)	3.41 ± 0.12	3.40 ± 0.18	3.36 ± 0.24	3.45 ± 0.24	3.70 ± 0.38	3.44 ± 0.21
Cl(mEq/L)	110.2 ± 1.0	110.4 ± 1.7	109.0 ± 0.9	108.6 ± 1.9	108.8 ± 0.8	108.0 ± 0.9
ALP(U/L)	204 ± 62	197 ± 21	215 ± 48	228 ± 22	206 ± 32	149 ± 57
GPT(U/L)	18 ± 3	20 ± 3	21 ± 3	26 ± 4**	22 ± 3	22 ± 6
GOT(U/L)	49 ± 3	53 ± 4	48 ± 5	50 ± 3	53 ± 6	55 ± 7
γ-GTP(U/L)	0 ± 0	0 ± 1	1 ± 0	3 ± 1**	0 ± 0	1 ± 1

Values represent mean ± S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$

**: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

28日間反復投与毒性試験

Table 5 Organ weights of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Dose(mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	4
Body weight (g)	375.8±25.3	380.9±43.7	362.1±27.3	362.7±10.3	447.3±39.6	420.3±41.6
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1886.7±79.9	1938.9±48.4	1947.4±60.2	1943.8±79.8	1987.5±68.9	1936.6±52.1
Thymus	656.7±126.9	730.7±179.9	699.4±204.1	617.3±208.3	522.5±51.0	446.7±63.7
Heart	1211.3±132.4	1182.1±129.9	1232.0±147.0	1122.9±83.0	1327.2±96.6	1294.2±127.8
Liver	12210.8±1086.5	13089.8±2126.3	14086.4±1269.4	17279.6±1331.4**	13337.4±1723.3	14888.1±2627.8
Kidneys	2724.1±275.4	2800.1±227.2	2960.1±235.5	3104.7±304.4	2914.7±147.8	3413.0±495.4
Spleen	823.8±71.9	839.4±142.1	713.3±21.9	664.9±87.7	842.0±183.5	1082.0±271.5
Adrenal glands	52.5±6.5	50.7±6.0	54.0±3.3	47.8±3.5	54.4±18.0	61.5±1.5
Testes	3117.6±213.2	3215.9±271.5	3295.5±236.0	3222.4±243.7	3444.6±171.1	3252.1±242.5
Epididymides	740.6±48.1	769.3±23.9	751.3±63.1	738.7±49.3	1060.6±61.7	1017.6±57.4
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	5.037±0.363	5.149±0.657	5.400±0.403	5.364±0.289	4.468±0.391	4.636±0.388
Thymus	1.750±0.341	1.917±0.398	1.929±0.520	1.697±0.546	1.178±0.183	1.069±0.160
Heart	3.221±0.237	3.106±0.080	3.395±0.205	3.099±0.253	2.975±0.176	3.083±0.165
Liver	32.478±1.488	34.232±1.965	38.929±2.394**	47.605±2.800**	29.735±1.861	35.263±3.317*
Kidneys	7.239±0.379	7.382±0.459	8.195±0.662*	8.551±0.670**	6.548±0.550	8.146±1.052*
Spleen	2.197±0.198	2.207±0.346	1.981±0.194	1.832±0.221	1.878±0.358	2.559±0.465*
Adrenal glands	0.140±0.016	0.135±0.026	0.150±0.018	0.132±0.010	0.121±0.033	0.147±0.016
Testes	8.316±0.657	8.579±1.612	9.143±0.942	8.879±0.521	7.767±1.017	7.773±0.657
Epididymides	1.974±0.122	2.045±0.280	2.088±0.274	2.039±0.162	2.383±0.214	2.429±0.108
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	229.5±17.8	227.5±9.0	240.0±14.8	227.5±19.5	265.2±25.1	240.2±13.4
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1809.0±86.4	1794.3±106.4	1827.3±65.4	1811.1±101.7	1826.3±86.7	1864.1±79.8
Thymus	460.6±77.8	449.2±96.4	621.8±159.6	479.3±84.7	525.2±141.9	378.3±81.4
Heart	792.8±53.5	774.5±62.4	788.9±69.7	770.9±79.0	838.4±61.0	804.6±78.1
Liver	6795.4±624.9	7973.9±292.9	10724.9±412.6*	13379.8±1316.2**	7162.0±824.4	8269.3±690.5
Kidneys	1639.4±103.8	1751.6±92.4	1904.2±60.4**	1946.0±164.1**	1850.4±120.3	1876.2±182.7
Spleen	483.2±42.7	563.8±27.2	587.9±120.0	472.6±47.4	577.8±96.4	522.9±81.4
Adrenal glands	55.3±5.1	67.9±2.2**	67.6±8.8**	73.3±4.1**	67.3±6.9	63.3±5.6
Ovaries	84.7±11.8	87.9±10.8	89.3±14.9	94.1±8.6	84.0±7.4	122.0±29.1*
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	7.915±0.646	7.885±0.314	7.637±0.536	8.000±0.712	6.927±0.648	7.774±0.415*
Thymus	2.010±0.338	1.968±0.376	2.577±0.564	2.097±0.223	1.964±0.424	1.573±0.308
Heart	3.468±0.313	3.403±0.220	3.284±0.108	3.394±0.283	3.170±0.171	3.345±0.198
Liver	29.593±0.909	35.064±1.196**	44.780±2.333**	58.861±3.595**	26.973±1.008	34.398±1.466**
Kidneys	7.178±0.715	7.699±0.318	7.960±0.573	8.565±0.442**	6.996±0.322	7.811±0.621*
Spleen	2.112±0.206	2.479±0.099	2.435±0.375	2.091±0.279	2.180±0.328	2.171±0.269
Adrenal glands	0.242±0.032	0.299±0.015*	0.282±0.032	0.324±0.034**	0.254±0.014	0.263±0.021
Ovaries	0.369±0.049	0.386±0.049	0.372±0.053	0.417±0.064	0.318±0.033	0.506±0.107*

Values represent mean ± S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

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

Table 6 Histopathological findings of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

	Sex	Male						Female						
		End of administration period				End of recovery period		End of administration period				End of recovery period		
		Dose (mg/kg)	0	100	300	1000	0	1000	0	100	300	1000	0	1000
Number of animals examined		5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5
(Liver)														
Fatty change,	±	2	5	2	1	2	2	3	1	0	0	3	1	
periportal	+	3	0	3	4	2	0	0	2	2	4	0	2	
	++	0	0	0	0	1	0	0	2	3	1	0	0	
	Total	5	5	5	5	5	2	3	5*	5**	5**	3	3	
Hypertrophy,	±	0	0	4	2	0	0	0	3	0	0	0	2	
hepatocyte,	+	0	0	1	2	0	0	0	1	2	0	0	0	
centrilobular	++	0	0	0	1	0	0	0	0	3	5	0	0	
	Total	0	0	5***##	5***##	0	0	0	4#	5***##	5***##	0	2	
Granuloma	±	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	3	
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	++	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
	Total	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	4	
Number of animals examined		5	5	5	5	5	4	5	0	0	5	0	0	
(Kidney)														
Inclusion body,	±	0	0	0	0	1	0	3			3			
intracytoplasmic, eosinophilic,	+	0	5	3	0	0	0	0			0			
proximal tubule	++	0	0	2	5	0	0	0			0			
	Total	0	5***##	5***##	5***##	1	0	3			3			
Eosinophilic body,	±	0	3	3	2	2	1	0			0			
proximal tubule	+	0	2	2	3	0	0	0			0			
	Total	0	5***##	5***##	5***##	2	1	0			0			
Basophilic tubule	±	1	1	3	3	1	2	3			3			
	+	2	2	2	1	0	0	0			0			
	++	0	0	0	1	0	2	0			0			
	Total	3	3	5	5	1	4*#	3			3			
Cast, proteinous	±	0	0	3	0	0	0	1			1			
	+	0	0	0	3	0	1	0			0			
	Total	0	0	3	3	0	1	1			1			
Cellular infiltration,	±	4	4	5	3	0	0	2			1			
lymphocyte	+	0	0	0	0	0	0	1			0			
	Total	4	4	5	3	0	0	3			1			
Mineralization, cortico-medullary	±	0	0	0	0	0	0	1			2			
junction	Total	0	0	0	0	0	0	1			2			
Number of animals examined		5	0	0	5	0	0	5	5	5	5	5	5	
(Adrenal gland)														
Hypertrophy, cytoplasm,	±	0			0			0	3	2	1	0	1	
zona fasciculata	+	0			0			0	1	2	3	0	0	
	Total	0			0			0	4#	4#	4#	0	1	

Grade of histopathological finding: ±: very slight, +: slight, ++: moderate, total: total of positive grade

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)

**: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)

#: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test)

##: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test)

28日間反復投与毒性試験

Table 6 (continue)

	Sex	Male						Female					
		End of administration period				End of recovery period		End of administration period				End of recovery period	
		Dose (mg/kg)	0	100	300	1000	0	1000	0	100	300	1000	0
Number of animals examined		5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
(Spleen)													
Deposit, pigment, brown	±	4			5			2			0		
	+	1			0			3			5		
	Total	5			5			5			5		
Hematopoiesis,	±	0			0			5			5		
extramedullary	+	5			5			0			0		
	Total	5			5			5			5		
Congestion	±	0			0			0			0		
	+	0			1			0			1		
	Total	0			1			0			1		
(Stomach)													
Hemorrhage, submucosa,	±	0			1			0			0		
forestomach	Total	0			1			0			0		

Grade of histopathological finding; ± :very slight, + :slight, total :total of positive grade

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 細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane on Bacteria

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遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

試験は、指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、S9 mix 非存在(直接法)および存在(代謝活性化法)下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験の結果、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ までの用量で直接法および代謝活性化法ともに全ての菌株において生育阻害が認められなかったため、313~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲(公比2)で設定した。

試験を2回行った結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められず、また、菌の生育阻害も認められなかった。

以上の成績から、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細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

方法

1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および *E. coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を解凍後、その25 μL をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の懸濁液は濁度を測定し、濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり 1×10^8 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

2. 被験物質

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(ロット番号8X01, 日本油脂(株)(東京)提供)は、無色ないし淡黄色透明の液体で、水およびジメチル

スルホキシド(DMSO)に不溶、アセトンに易溶であり、純度97.9%(不純物として、原料である3,3,5-トリメチルシクロヘキサン約1.89%を含む)の物質である。被験物質は、冷暗所(4℃)で密栓保管した。

実験終了後、残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

3. 被験物質供試液の調製

溶媒にアセトン(和光純薬工業(株))を用い、被験物質を溶解して最高用量の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。供試液は、用時調製した。

4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

NaN₃ : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9-AA : 9-アミノアクリジン(Aldrich Chemical Co.)

AF-2 および 2-AA は DMSO(和光純薬工業(株))に、NaN₃ および 9-AA は蒸留水(味大塚製薬工場)に溶解した。

5. 培地

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。培地1 Lあたりの組成は下記のとおりであり、径90 mmのシャーレ1枚あたりに30 mLを分注したものである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

2) アミノ酸添加軟寒天培地(トップアガー)

0.6 w/v% 寒天粉末(Difco Laboratories)および0.5 w/v% 塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、*S. typhimurium* 用には0.5 mM D-ビオチンおよび0.5 mM L-ヒスチジン水溶液、*E. coli* 用には0.5 mM L-トリプトファン水溶液を1/10容加え、トップアガーとした。