

既存化学物質の人健康影響に関する情報

(平成19年12月21日開催)

CAS No.	官報公示 整理番号	物質名称	試験名	ページ
103-44-6	2-372 2-575	2-エチルヘキシル=ビニル=エーテル	復帰突然変異試験	1
			染色体異常試験	23
			28日間反復経口投与毒性試験	47
4130-42-1	4-362	2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール	復帰突然変異試験	129
			染色体異常試験	157
			28日間反復経口投与毒性試験	187
2173-57-1	3-540	2-ナフチルイソブチルエーテル	復帰突然変異試験	269
			染色体異常試験	292
			28日間反復経口投与毒性試験	314

※ 本資料は試験受託機関より提出された最終報告書をもとに、要約あるいは抜粋等を行い作成したものである。

1. 要約

当該試験条件下において、2-ethylhexyl vinyl ether には遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

2-ethylhexyl vinyl ether の遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 株, TA98 株, TA1535 株および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理では、0.610~5000 µg/プレート of いずれの用量においても、ラット肝マイクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照の2倍を超えるような復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

また、用量設定試験、同追加試験および本試験により、試験結果の再現性が確認された。

2. 表題

2-ethylhexyl vinyl ether の細菌を用いる復帰突然変異試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討する。

4. 準拠したガイドラインおよび遵守した GLP

ガイドライン

- 新規化学物質等に係る試験の方法について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環保企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 471 (21st July 1997: Bacterial Reverse Mutation Test)

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17

5. 試験番号

9046 (115-197)

6. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

7. 試験委託者

〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

11. 試験日程

試験開始日：	平成17年7月13日
実験開始日：	平成17年7月27日
【用量設定試験】	
被験物質液調製日：	平成17年7月27日
被験物質処理日：	平成17年7月27日
コロニー計数日：	平成17年7月29日
【用量設定試験（追加試験）】	
被験物質液調製日：	平成17年8月10日
被験物質処理日：	平成17年8月10日
コロニー計数日：	平成17年8月12日
【本試験】	
被験物質液調製日：	平成17年8月23日
被験物質処理日：	平成17年8月23日
コロニー計数日：	平成17年8月25日
実験終了日：	平成17年8月25日
試験終了日：	平成18年9月11日

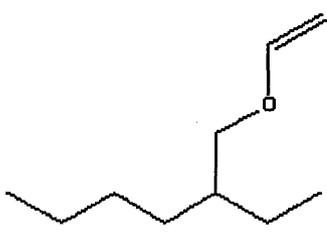
12. 被験物質

12.1. 被験物質名

2-ethylhexyl vinyl ether (2-エチルヘキシル=ビニル=エーテル)

12.2. ロット番号

05A001

- 12.3. 純度
99.9%
- 12.4. 提供元
日本カーバイド工業株式会社
- 12.5. 出荷年月日
2005年3月11日
- 12.6. 保存条件
遮光, 冷暗所 (1~9°C)
- 12.7. 保存場所
安評センター被験物質保管庫 (H-2 : 実測値 3.4~4.8°C, 2005年3月14日~2005年7月25日 ; 6号館2階被験物質調製室内バイオマルチクーラーch. 41 : 実測値 4.8~7.7°C, 2005年7月25日~2005年10月6日)
- 12.8. 化学名
2-ethylhexyl vinyl ether
- 12.9. CAS No.
103-44-6
- 12.10. 化学構造
- 
- The image shows the skeletal structure of 2-ethylhexyl vinyl ether. It consists of a six-carbon main chain (hexyl group) with an ethyl group attached to the second carbon. The first carbon of the main chain is part of a vinyl ether group, represented as a carbon atom double-bonded to another carbon atom and single-bonded to an oxygen atom, which is in turn single-bonded to the first carbon of the main chain.
- 12.11. 分子式
 $C_{10}H_{20}O$
- 12.12. 分子量
156.27
- 12.13. 物質の状態
無色透明液体
- 12.14. 溶解性
溶解度 : 0.05 g/100 g 水, 約 157 mg/mL DMSO (当施設の試験による)

12.15. 安定性／反応性

酸化剤, 重金属には不安定 (重合, 分解を起こす).
高温化では不安定.

12.16. 蒸気圧

3.3 kPa (25 mmHg)

12.17. 取り扱い上の注意

危険性: 可燃性液体で, 蒸気は爆発性ガスを作りやすい.

有害性: 蒸気は咽喉, 目, 鼻などの粘膜を刺激する.

軽度の麻酔作用がある.

液体が目に入ると粘膜を侵し, 炎症を起こす.

適切な保護具 (マスク・手袋等) を着用し, 吸い込んだり, 目, 皮膚および衣類に触れないようにした.

12.18. 毒性

急性経口毒性 (ラット): LD₅₀, 1350 mg/kg

12.19. 残余被験物質の処理

実験終了後, 1.0 g を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し, 残りは安定性分析のため, 被験物質等管理責任者を介して日本カーバイド工業株式会社に返却した. 分析の結果 (2005年11月22日付報告), 被験物質が試験期間中安定であったことが確認された.

13. 試験材料および方法

13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において遺伝毒性ガイドラインでは試験菌株が指定されていることから, 試験菌株として次の5種類の菌株を使用した.

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2 <i>uvrA</i>	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は1983年9月9日にカリフォルニア大学 (エイムス教授) から, また, 大腸菌については1983年3月16日に国立衛生試験所 (現 国立医薬品食品衛生研究所) から分与を受けた.

2004年9月6日~同年9月9日に菌株の特性検査を実施し, 規定の特性を保持して

いる菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド (DMSO, GC 用, 純度 99.9%, Lot No. K30049278, Merck) を容量比 80 : 7 の割合で添加した後, 凍結保存用チューブに 0.2 mL ずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後, 超低温フリーザー (MDF-U71V, 三洋電機バイオメディカ; 設定値: -80°C , 基準値: -60°C 以下) に保存した。

13.2. 培地の調製

13.2.1. 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 (2005 年 3 月 8 日製造, Lot No. ANI200CU, オリエンタル酵母工業) を試験に使用した。本プレートは, Vogel-Bonner 最少培地 E を含む溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示した。

硫酸マグネシウム七水和物	0.2	g
クエン酸一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
D(+) グルコース	20	g
寒天 (BA-30A, Lot No. 40721, 伊那食品工業)	10.5	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー

塩化ナトリウム 0.5 w/v% および寒天 (Bacto-agar, Lot No. 3069265, BD Diagnostic Systems) 0.6 w/v% を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した。ネズミチフス菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No. 308C2055, 関東化学) および 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 301C2275, 関東化学) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え, 大腸菌を用いる試験の場合, 0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. 008D2026 【用量設定試験】, Lot No. 211D2047 【本試験】 関東化学) 水溶液を同じく 1 容量加えた。

13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5 w/v% ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2, Lot No. 298714, Oxoid) 培養液を 25 mL 分注し, これに融解した菌懸濁液を 50 μL 接種した。フラスコをクールバスシェーカー (ML-10F, タイテック) に設置し, 培養開始までの間, 設定温度 4°C に静置した。その後, 37°C の条件で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し, 菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した。

ATPフォトメーター (ルミテスターK-100, キッコーマン) を用い, 試験菌株の生菌数が 1.0×10^9 /mL以上であることを確認した. 生菌数を次の表に示した.

試験	生菌数 ($\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
用量設定試験	3.50	3.22	4.70	3.92	1.47
追加試験	3.79	3.65	—	3.21	1.72
本試験	3.02	2.79	3.03	2.49	1.20

13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. FSM-523【用量設定試験および追加試験】, Lot No. FSM-526【本試験】, キッコーマン) を試験に使用した. 使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C , 基準値: -60°C 以下) に保存した.

13.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法を以下に示した.

	用量設定試験, 追加試験	本試験
ロット番号	RAA-523	RAA-526
製造年月日	2005 年 6 月 17 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)	2005 年 7 月 29 日 (同左)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系	
性/週齢	雄/7 週齢	
体重	207~243 g	215~259 g
臓器	肝臓	
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)	
投与量 および 投与回数	PB: 30 mg/kg 1回 (1日目), 60 mg/kg 3回 (2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回 (3日目)	
投与方法	腹腔内投与	
蛋白含量	26.05 mg/mL	25.58 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

S9	0.1	mL
MgCl ₂	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に難溶で DMSO に溶解することから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (Lot No. K31758278, Merck) に溶解し、調製原液とした。

用量設定試験では、使用直前に被験物質 400 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 6 mL の DMSO (使用溶媒) を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 8 mL に定容し、調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した。4.5 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 3 mL を加えることにより 20.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205 および 0.0819 mg/mL 溶液を調製した。調製後、速やかに使用した。また、用量設定試験 (追加試験) では、使用直前に被験物質 20.0 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 8 mL の DMSO (使用溶媒) を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 10 mL に定容し、調製原液 (2.00 mg/mL 溶液) を準備した。3 mL の DMSO にこの 2.00 mg/mL 調製原液 3 mL を加えることにより 1.00 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、0.500, 0.250, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0156 および 0.00781 mg/mL 溶液を調製した。調製後、速やかに使用した。

本試験では、使用直前に被験物質 300 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 4 mL の DMSO (使用溶媒) を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 6 mL に定容し、調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した。3.0 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 3.0 mL を加えることにより 25.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195, 0.0977, 0.0488, 0.0244, 0.0122 および 0.00610 mg/mL 溶液を調製した。調製後、速やかに使用した。

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質の溶媒である DMSO を使用した。

13.6.2. 陽性対照

調製済み陽性対照物質溶液 (保証期限: 2006 年 9 月 1 日, オリエンタル酵母工業) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した。陽性対照物質名および用量等を以下に示した。

AF-2 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
NaN₃ アジ化ナトリウム
9-AA 9-アミノアクリジン塩酸塩
2-AA 2-アミノアントラセン

《代謝活性化系非存在下: -S9 処理》

菌株	化合物名	陽性対照調製日	用量 (µg/プレート)	陽性対照溶液濃度 (µg/mL)	ロット番号
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2005.2.3	0.01	0.1	050203AF01
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2005.2.3	0.1	1.0	050203AF10
ネズミチフス菌 TA1535	NaN ₃	2005.2.2	0.5	5.0	050202N
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2005.2.3	80	800	050203A9
大腸菌 WP2uvrA	AF-2	2005.2.3	0.01	0.1	050203AF01

《代謝活性化系存在下: +S9 処理》

ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2005.2.2	1.0	10	050202A210
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2005.2.2	0.5	5.0	050202A205
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2005.2.2	2.0	20	050202A220
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2005.2.2	2.0	20	050202A220
大腸菌 WP2uvrA	2-AA	2005.2.2	10	100	050202A2100

なお, これらの用量は「安衛法における変異原性試験-テストガイドラインと GLP」(労働省安全衛生部化学物質調査課編, 1991 年) に準じて設定した。

13.6.3. 無菌試験

被験物質液(調製原液)ならびにS9 mixについては無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100 μ L あるいはS9 mix 500 μ L にトップアガーを2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で48時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。調製原液およびS9 mix のいずれについても2枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

2-ethylhexyl vinyl ether 調製原液ならびにS9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

13.7. 用量設定試験(予備試験)

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である5000 μ g/プレートを最高用量とし、以下2000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5 および8.19 μ g/プレートの計8用量を設定した。

13.7.2. 使用プレート数および識別方法

用量当たり3枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて試験菌株、S9 mix の有無および用量を明記することにより各プレートを識別した。

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 μ L、次いで代謝活性化系非存在下(-S9処理)の場合、0.1 mol/Lナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μ L、代謝活性化系存在下(+S9処理)の場合、S9 mixを500 μ L分注した。さらに前培養した試験菌株懸濁液100 μ Lを加えた後、ウォーターバスシェーカー(M-100^N, タイテック)を用いて37°Cの条件で20分間振盪(120回/分, プレインキュベーション)した。振盪終了後、トップアガー2 mLを添加し、内容物を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。恒温器(SSV-R11DA, 池田理化)を用い、各プレートを37°Cの条件で48時間培養した。

13.7.4. 析出等の観察

各処理法において、処理開始時およびコロニー数計測時に被験物質析出等の有無を肉眼で観察した。

13.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株(背景菌)の生育状態について実体顕微鏡($\times 40$)を用いて観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニー数を計数した。計測に際しては、コロニーアナライザー(CA-11, システムサイエンス)を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。

ただし、試験菌株に対する強度の生育阻害作用により、-S9 処理、TA100 株の 320 µg /プレート以上の用量ではコロニーアナライザーの使用は不適切と判断し、目視にて復帰コロニーの計数を実施した。

13.8. 用量設定試験 (追加試験)

用量設定試験の結果、両処理法の TA100 株、TA1535 株、TA98 株および TA1537 株において生育阻害が低用量までみられ、評価群数が 4 用量に満たなかったことから追加試験を実施した。

13.8.1. 用量

用量設定試験の結果を基に、生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量に、次の表に示した 6~7 用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
TA100	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
TA1535	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
TA98	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
TA1537	0.781	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)					
TA100	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200
TA1535	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200
TA98	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200
TA1537	6.25	12.5	25.0	50.0	100	200

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載の方法に準じた。

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載の方法に準じた。ただし、ウォーターバスシェーカーは MM-10 (タイテック) を用いた。

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載の方法に準じた。

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載の方法に準じた。

13.9. 本試験

13.9.1. 用量

用量設定試験および用量設定試験（追加試験）の結果、全ての試験菌株において生育阻害が認められた。また、変異原性は認められなかった。したがって、本試験では生育阻害が認められると考えられる用量を最高用量とし、次の表に示した6用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA100	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5
TA1535	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5
WP2 <i>uvrA</i>	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1
TA1537	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA100	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156
TA1535	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156
WP2 <i>uvrA</i>	78.1	156	313	625	1250	2500
TA98	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
TA1537	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156

13.9.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。ただし、ウォーターバスシェーカーはMM-10（タイテック）を用いた。

13.9.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.9.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.10. 試験成立条件

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は背景データから求めた基準値内であること。陽性対照のコロニー数は同時陰性対照値の2倍を超えること。以上の条

件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

13.11. 結果の解析

復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理の場合、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理および+S9 処理の全ての菌株において認められ、TA100 株、TA1535 株、TA98 株および TA1537 株では生育阻害を示さない用量が4用量に満たなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.2. 被験物質の析出等 (用量設定試験)

処理開始時に、+S9 処理の5000 µg/プレートの用量で油膜状の析出物が認められた。コロニー数計測時には、析出等の変化は観察されなかった。

14.3. 用量設定試験 (追加試験)

結果を Figure 6~9 および Table 3, 4 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理の場合、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、両処理の全ての菌株において高用量群で認められた。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.4. 用量設定試験 (追加試験)

処理開始時およびコロニー数計測時に、析出等の変化は観察されなかった。

14.5. 本試験

結果を Figure 10~14 および Table 5, 6 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理の場合、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、いずれも高用量群で認められた。

一方、陽性対照物質は、試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.6. 被験物質の析出等 (追加試験)

処理開始時およびコロニー数計測時に、析出等の変化は観察されなかった。

15. 考察および結論

2-ethylhexyl vinyl ether の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートあるいは試験菌株の生育を阻害する用量まで検討した結果、2-ethylhexyl vinyl ether 処理群では、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても、陰性対照の2倍を超えるような復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

これら両処理法での試験結果は、用量設定試験、同追加試験および本試験により再現性が確認された。

本被験物質 2-ethylhexyl vinyl ether についての遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はなかった。

類縁体すなわち、異性体である hexanol, 2-ethyl-および ethylhexyl acrylate の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告もなかった。

なお、陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ (Appendix 1) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、2-ethylhexyl vinyl ether 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。

16. 参考とした資料

- Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc Nat Acad Sci 1973; 70: 782-6.
- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens. a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Nat Acad Sci USA. 1973; 70 (8): 2281-5.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res 1975; 31: 347-64.
- Yahagi T. [Screening methods using microbes for the environmental carcinogens (author's transl)]. [Article in Japanese]. Protein, Nucleic Acid and Enzyme 1975; 20: 16-27.
- Ministry of Labor, Industrial Safety and Health Department. [Test Guidelines and GLP for Mutagenicity Test using Microorganisms in the Safety and Health Law]. Tokyo; Japan Industrial Safety and Health Association; 1991.
- Ishidate M Jr editor. [The data book for mutagenicity assay using microorganisms]. [Article in Japanese]. Life-science Information Center Press; 1991.

Table 1. Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	129	130	136	15	15	13	22	24	22	20	20	16	7	8	7
		[132	±	4]	[14	±	1]	[23	±	1]	[19	±	2]	[7	±	1]
	8.19	107	101	115	8	12	12	22	22	20	20	18	19	7	9	8
		[108	±	7]	[11	±	2]	[21	±	1]	[19	±	1]	[8	±	1]
	20.5	75*	69*	70*	7*	12*	8*	20	21	18	15*	18*	15*	6*	8*	7*
		[71	±	3]	[9	±	3]	[20	±	2]	[16	±	2]	[7	±	1]
	51.2	79*	64*	66*	5*	9*	9*	18	14	18	16*	16*	13*	5*	5*	5*
		[70	±	8]	[8	±	2]	[17	±	2]	[15	±	2]	[5	±	0]
	128	59*	65*	67*	7*	6*	6*	22	18	20	16*	18*	18*	5*	6*	3*
	[64	±	4]	[6	±	1]	[20	±	2]	[17	±	1]	[5	±	2]	
320	23*	27*	40*	7*	5*	7*	21	24	24	18*	12*	12*	6*	3*	4*	
	[30	±	9]	[6	±	1]	[23	±	2]	[14	±	3]	[4	±	2]	
800	18*	20*	15*	7*	4*	6*	20	19	22	12*	13*	12*	5*	5*	3*	
	[18	±	3]	[6	±	2]	[20	±	2]	[12	±	1]	[4	±	1]	
2000	13*	12*	20*	6*	6*	7*	20	18	23	13*	8*	8*	1*	4*	4*	
	[15	±	4]	[6	±	1]	[20	±	3]	[10	±	3]	[3	±	2]	
5000	16*	21*	15*	6*	8*	6*	16*	14*	15*	13*	14*	17*	3*	4*	4*	
	[17	±	3]	[7	±	1]	[15	±	1]	[15	±	2]	[4	±	1]	
Positive control		806	820	849 b)	589	511	562 c)	104	130	122 b)	596	530	535 d)	352	282	266 e)
		[825	±	22]	[554	±	40]	[119	±	13]	[554	±	37]	[300	±	46]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 µg/plate

d): AF-2, 0.1 µg/plate e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	104	122	114	15	10	13	25	26	22	28	34	33	16	14	21
		[113	\pm	9]	[13	\pm	3]	[24	\pm	2]	[32	\pm	3]	[17	\pm	4]
	8.19	116	121	115	17	14	13	21	21	22	33	29	29	15	13	14
		[117	\pm	3]	[15	\pm	2]	[21	\pm	1]	[30	\pm	2]	[14	\pm	1]
	20.5	124	117	111	15	11	11	16	20	20	27	26	24	14	11	14
		[117	\pm	7]	[12	\pm	2]	[19	\pm	2]	[26	\pm	2]	[13	\pm	2]
	51.2	116	119	106	16	15	18	21	21	18	30	24	27	14	16	21
		[114	\pm	7]	[16	\pm	2]	[20	\pm	2]	[27	\pm	3]	[17	\pm	4]
	128	74*	79*	67*	9*	5*	8*	23	25	20	23*	23*	20*	13*	15*	9*
	[73	\pm	6]	[7	\pm	2]	[23	\pm	3]	[22	\pm	2]	[12	\pm	3]	
320	63*	79*	76*	8*	9*	9*	20	27	25	19*	12*	19*	7*	12*	9*	
	[73	\pm	9]	[9	\pm	1]	[24	\pm	4]	[17	\pm	4]	[9	\pm	3]	
800	67*	70*	74*	6*	6*	5*	19	20	20	20*	16*	20*	9*	6*	10*	
	[70	\pm	4]	[6	\pm	1]	[20	\pm	1]	[19	\pm	2]	[8	\pm	2]	
2000	53*	59*	55*	6*	9*	7*	16*	20*	15*	22*	20*	17*	10*	7*	8*	
	[56	\pm	3]	[7	\pm	2]	[17	\pm	3]	[20	\pm	3]	[8	\pm	2]	
5000	48*	64*	56*	9*	10*	8*	20*	22*	15*	19*	21*	20*	8*	6*	6*	
	[56	\pm	8]	[9	\pm	1]	[19	\pm	4]	[20	\pm	1]	[7	\pm	1]	
Positive control		808	768	867 b)	286	252	276 c)	522	501	495 d)	321	360	337 e)	121	133	138 c)
		[814	\pm	50]	[271	\pm	17]	[506	\pm	14]	[339	\pm	20]	[131	\pm	9]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

Table 3. Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether (Additional study)
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	105	116	108	12	12	13				25	21	20	7	9	11
		[110	\pm	6]	[12	\pm	1]				[22	\pm	3]	[9	\pm	2]
	0.781	128	111	119	10	12	9				27	26	20	10	5	6
		[119	\pm	9]	[10	\pm	2]				[24	\pm	4]	[7	\pm	3]
	1.56	115	109	105	9	12	12				21	26	23	13	9	8
		[110	\pm	5]	[11	\pm	2]				[23	\pm	3]	[10	\pm	3]
	3.13	118	107	109	16	14	13				27	23	28	12	11	9
		[111	\pm	6]	[14	\pm	2]				[26	\pm	3]	[11	\pm	2]
6.25	100	109	109	12	10	11				27	25	24	12	9	11	
	[106	\pm	5]	[11	\pm	1]				[25	\pm	2]	[11	\pm	2]	
12.5	92*	98*	97*	10*	8*	7*				22	23	20	3*	6*	6*	
	[96	\pm	3]	[8	\pm	2]				[22	\pm	2]	[5	\pm	2]	
25.0	72*	66*	69*	5*	7*	7*				16*	15*	19*	7*	6*	4*	
	[69	\pm	3]	[6	\pm	1]				[17	\pm	2]	[6	\pm	2]	
50.0	60*	72*	65*	7*	8*	8*				12*	14*	13*	3*	3*	5*	
	[66	\pm	6]	[8	\pm	1]				[13	\pm	1]	[4	\pm	1]	
Positive control		732	797	778 b)	628	646	640 c)				638	660	595 d)	209	285	283 e)
		[769	\pm	33]	[638	\pm	9]				[631	\pm	33]	[259	\pm	43]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

Table 4. Summary data on dose-finding study of 2-ethylhexyl vinyl ether (Additional study)
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	121	118	113	12	12	15				33	28	29	13	17	16
		[117	\pm	4]	[13	\pm	2]				[30	\pm	3]	[15	\pm	2]
	6.25	110	116	109	11	9	13				25	31	34	13	15	12
		[112	\pm	4]	[11	\pm	2]				[30	\pm	5]	[13	\pm	2]
	12.5	105	103	106	12	10	9				29	32	27	17	19	11
		[105	\pm	2]	[10	\pm	2]				[29	\pm	3]	[16	\pm	4]
	25.0	102	109	107	11	16	10				28	31	29	17	16	14
	[106	\pm	4]	[12	\pm	3]				[29	\pm	2]	[16	\pm	2]	
50.0	107	111	111	12	11	16				34	28	30	16	12	14	
	[110	\pm	2]	[13	\pm	3]				[31	\pm	3]	[14	\pm	2]	
100	85*	92*	87*	6*	6*	9*				28	25	31	11*	13*	9*	
	[88	\pm	4]	[7	\pm	2]				[28	\pm	3]	[11	\pm	2]	
200	74*	68*	68*	7*	8*	7*				25*	27*	22*	10*	8*	8*	
	[70	\pm	3]	[7	\pm	1]				[25	\pm	3]	[9	\pm	1]	
Positive control		1048	980	1021 b)	370	359	392 c)				341	409	350 e)	106	115	130 c)
		[1016	\pm	34]	[374	\pm	17]				[367	\pm	37]	[117	\pm	12]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

Table 5. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]																			
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537							
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	107	106	106	11	12	13	21	26	22	25	20	24	12	8	12	[106 \pm 1]	[12 \pm 1]	[23 \pm 3]	[23 \pm 3]	[11 \pm 2]
	0.610	115	110	108	10	13	12							6	12	9	[111 \pm 4]	[12 \pm 2]			[9 \pm 3]
	1.22	106	112	101	9	10	9				20	26	21	10	13	11	[106 \pm 6]	[9 \pm 1]		[22 \pm 3]	[11 \pm 2]
	2.44	121	111	106	13	15	11				21	20	22	14	11	11	[113 \pm 8]	[13 \pm 2]		[21 \pm 1]	[12 \pm 2]
	4.88	104	110	106	14	14	11				21	21	21	10	10	8	[107 \pm 3]	[13 \pm 2]		[21 \pm 0]	[9 \pm 1]
	9.77	93*	83*	96*	6*	11*	8*				25	21	20	9*	6*	9*	[91 \pm 7]	[8 \pm 3]		[22 \pm 3]	[8 \pm 2]
	19.5	72*	67*	79*	6*	5*	4*				19*	20*	20*	7*	7*	6*	[73 \pm 6]	[5 \pm 1]		[20 \pm 1]	[7 \pm 1]
	39.1										16*	14*	18*							[16 \pm 2]	

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

Table 5. -Continued

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]															
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
2-ethylhexyl vinyl ether	156							20	24	24							
								[23	\pm	2]							
	313							22	20	21							
								[21	\pm	1]							
	625							20	25	25							
								[23	\pm	3]							
	1250							22	20	21							
								[21	\pm	1]							
	2500							21	22	22							
								[22	\pm	1]							
	5000							12*	14*	14*							
								[13	\pm	1]							
Positive control		827	768	790 b)	596	609	602 c)	121	106	118 b)	713	728	695 d)	254	231	244 e)	
		[795	\pm	30]	[602	\pm	7]	[115	\pm	8]	[712	\pm	17]	[243	\pm	12]	

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

Table 6. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	112	104	114	12	14	10	25	26	22	35	38	36	23	21	20
		[110	\pm	5]	[12	\pm	2]	[24	\pm	2]	[36	\pm	2]	[21	\pm	2]
	4.88	109	113	119	14	11	12							16	19	20
		[114	\pm	5]	[12	\pm	2]							[18	\pm	2]
	9.77	115	122	114	11	10	11				34	31	34	22	20	18
		[117	\pm	4]	[11	\pm	1]				[33	\pm	2]	[20	\pm	2]
	19.5	118	124	116	9	14	12				29	32	35	21	18	20
		[119	\pm	4]	[12	\pm	3]				[32	\pm	3]	[20	\pm	2]
	39.1	126	117	117	13	12	10				37	31	37	18	21	18
		[120	\pm	5]	[12	\pm	2]				[35	\pm	3]	[19	\pm	2]
78.1	92*	85*	81*	10*	7*	9*	23	28	24	38	36	31	16*	20*	19*	
	[86	\pm	6]	[9	\pm	2]	[25	\pm	3]	[35	\pm	4]	[18	\pm	2]	
156	74*	85*	80*	8*	10*	6*	22	23	21	28*	28*	26*	12*	16*	13*	
	[80	\pm	6]	[8	\pm	2]	[22	\pm	1]	[27	\pm	1]	[14	\pm	2]	
313							26	23	24	23*	26*	28*				
							[24	\pm	2]	[26	\pm	3]				
625							29	26	26							
							[27	\pm	2]							
1250							23	23	22							
							[23	\pm	1]							
2500							19*	20*	17*							
							[19	\pm	2]							
Positive control		1195	1163	1111 b)	434	460	414 c)	527	516	495 d)	403	424	441 e)	143	190	142 c)
		[1156	\pm	42]	[436	\pm	23]	[513	\pm	16]	[423	\pm	19]	[158	\pm	27]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

1. 要約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、2-ethylhexyl vinyl ether は染色体異常を誘起しないものと判断した。

2-ethylhexyl vinyl ether の変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に染色体異常試験の用量を設定した。染色体異常試験では短時間処理法-S9 処理ならびに同+S9 処理で 393, 785 および 1570 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、2-ethylhexyl vinyl ether 処理群の場合、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても、明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。以上の結果より、さらに、連続処理法 24 時間処理群においても 393, 785 および 1570 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施したが、同試験法においても、2-ethylhexyl vinyl ether 処理による染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法の陽性対照物質であるマイトマイシン C (MMC) ならびに同+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) 処理群では、染色体構造異常の出現頻度が上昇しており、陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な増加を示した。

2. 表題

2-ethylhexyl vinyl ether のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討する。

4. 準拠したガイドラインおよび遵守した GLP

ガイドライン

- 新規化学物質等に係る試験の方法について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環保企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 473 (21st July 1997: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test)

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17

5. 試験番号

9047 (115-198)

6. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

7. 試験委託者

〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

12. 試験日程

試験開始日：	平成 17 年 8 月 16 日
実験開始日：	平成 17 年 8 月 22 日
【細胞増殖抑制試験】	
被験物質液調製日：	平成 17 年 8 月 22 日
被験物質処理日：	平成 17 年 8 月 22 日
細胞生存率計測日：	平成 17 年 8 月 23 日
【染色体異常試験】	
被験物質液調製日：	平成 17 年 9 月 8 日
被験物質処理日：	平成 17 年 9 月 8 日
染色体標本作製日：	平成 17 年 9 月 9 日
染色体観察終了日：	平成 17 年 10 月 13 日
実験終了日：	平成 17 年 10 月 13 日
試験終了日：	平成 18 年 9 月 11 日

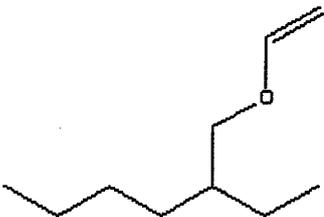
13. 被験物質

13.1. 被験物質名

2-ethylhexyl vinyl ether (2-エチルヘキシル=ビニル=エーテル)

13.2. ロット番号

05A001

- 13.3. 純度
99.9%
- 13.4. 提供元
日本カーバイド工業株式会社
- 13.5. 出荷年月日
2005年3月11日
- 13.6. 保存条件
遮光, 冷暗所 (1~9°C)
- 13.7. 保存場所
安評センター被験物質保管庫 (H-2 : 実測値 3.2~7.7°C, 2005年3月14日~2005年8月19日 ; 6号館2階被験物質調製室内バイオマルチクーラーch. 41 : 実測値 3.1~7.7°C, 2005年8月19日~2005年11月1日)
- 13.8. 化学名
2-ethylhexyl vinyl ether
- 13.9. CAS No.
103-44-6
- 13.10. 化学構造
- 
- The image shows the skeletal structure of 2-ethylhexyl vinyl ether. It consists of a six-carbon main chain (hexyl group) with an ethyl group attached to the second carbon. The first carbon of the main chain is part of a vinyl ether group, represented by a double bond to a terminal carbon and a single bond to an oxygen atom.
- 13.11. 分子式
 $C_{10}H_{20}O$
- 13.12. 分子量
156.27
- 13.13. 物質の状態
無色透明液体
- 13.14. 溶解性
溶解度 : 0.05 g/100 g 水, 約 157 mg/mL DMSO (当施設の試験による)

13.15. 安定性/反応性

酸化剤, 重金属には不安定 (重合, 分解を起こす).
高温化では不安定.

13.16. 蒸気圧

3.3 kPa (25 mmHg) (73°C)

13.17. 取り扱い上の注意

危険性: 可燃性液体で, 蒸気は爆発性ガスを作りやすい.

有害性: 蒸気は咽喉, 目, 鼻などの粘膜を刺激する.

軽度の麻酔作用がある.

液体が目に入ると粘膜を侵し, 炎症を起こす.

適切な保護具 (マスク・手袋等) を着用し, 吸い込んだり, 目, 皮膚および衣類に触れないようにした.

13.18. 毒性

急性経口毒性 (ラット): LD₅₀, 1350 mg/kg

13.19. 残余被験物質の処理

実験終了後, 1 g を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し, 残りは安定性分析のため, 被験物質等管理責任者を介して提供元に返却した. 分析の結果 (2005年11月22日付報告), 被験物質が試験期間中安定であったことが確認された.

14. 試験材料および方法

14.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において, 遺伝毒性ガイドラインで指定されていることから, チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を使用した. CHL/IU 細胞は 1984 年 11 月 15 日に国立衛生試験所 (現 国立医薬品食品衛生研究所) から分与を受け, ジメチルスルホキシド (DMSO, GC 用, 純度 99.9%, Lot No. K26414578, Merck) を容量比で 10% 添加した後, 液体窒素中に保存した. 試験に際しては, 凍結した細胞を融解した後, 3~5 日ごとに継代したものを使用した.

なお, 細胞増殖抑制試験では継代数 15 の細胞を, 染色体異常試験では継代数 20 の細胞を用いた.

凍結ロット毎にマイコプラズマ汚染検査 (陰性), 倍加時間の測定 (17.9 時間), 染色体数 (モード数 25 本の細胞が 82%) の測定ならびに陰性対照および陽性対照における構造異常出現頻度の確認を実施し, 異常のない細胞を試験に使用した.

14.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (IWAKI, Lot No. 519045, 旭テクノグラス) に非働化 (56°C, 30 分) 済みの仔牛血清 (Lot No. 54238545D, Invitrogen) を最終濃度で 10%になるよう添加した。調製後の培養液は使用時まで冷暗所 (15°C 以下) に保存した。

14.3. 培養条件

CO₂インキュベーター (三洋電機バイオメディカ) を用い, CO₂濃度 5%, 37°Cの条件で細胞を培養した。

14.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. CAM-526, キッコーマン) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した。

14.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法を以下に示す。

ロット番号	RAA-526
製造年月日	2005 年 7 月 29 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
体重	215~259 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB)および 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および 投与回数	PB: 30 mg/kg 1 回 (1 日目) 60 mg/kg 3 回 (2~4 日目) BF: 80 mg/kg 1 回 (3 日目)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	25.58 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の各内容物の量を以下に示す。

S9	0.3	mL
MgCl ₂	5	μmol/0.1mL
KCl	33	μmol/0.1mL
G-6-P	5	μmol/0.1mL
NADP	4	μmol/0.1mL
HEPES 緩衝液	4	μmol/0.2mL
蒸留水	0.1	mL

14.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に難溶で DMSO に溶解することから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (Lot No. K31758278, Merck) に溶解し、調製原液とした。

細胞増殖抑制試験では、使用直前に被験物質 314 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 1 mL の DMSO (使用溶媒) を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 2 mL に定容し、調製原液 (157 mg/mL 溶液) を準備した。DMSO 1 mL に対し、この 157 mg/mL 調製原液 1 mL に加えることにより 78.5 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、39.3, 19.6, 9.81, 4.91, 2.45, 1.23 および 0.613 mg/mL 溶液を調製した。

染色体異常試験では、使用直前に被験物質 314 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 1 mL の DMSO (使用溶媒) を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 2 mL に定容し、調製原液 (157 mg/mL 溶液) を準備した。DMSO 1 mL に対し、この 157 mg/mL 調製原液 1 mL を加えることにより 78.5 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、39.3 および 19.6 mg/mL 溶液を調製した。

調製後、速やかに処理を行った。

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質の溶媒である DMSO を使用した。

14.6.2. 陽性対照 (短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理)

注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. K3G77, 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC, Lot No. 415ACF, 協和醗酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液, Lot No. 4C87N, 大塚製薬工場) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、

凍結保存したものを試験に用いた。

用量は、短時間処理法で0.1 µg/mL、連続処理法で0.05 µg/mLとした。

14.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

注射用水 (Lot No. K3G77) 5 mL に溶解したシクロホスファミド (CP, Lot No. 4028, 塩野義製薬) を生理食塩液 (Lot No. 4C87N) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

用量は 12.5 µg/mL とした。

14.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

14.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 1570 µg/mL (10 mM 相当) を最高用量とし、以下、785, 393, 196, 98.1, 49.1, 24.5, 12.3 および 6.13 µg/mL の計 9 用量を細胞増殖抑制試験の用量とした。

14.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 用量当たり 2 ウェルを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

14.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート (細胞培養用マルチプレート 12F:住友ベークライト) の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.7.6. に記載する割合で溶媒および被験物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各ウェルの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 094K2331, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500 µL を加え、さらに 18 時間培養を続けた。

14.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.7.6. に記載する割合で溶媒および被験物質の処理を行った。

その後の操作は 14.7.3. に記載した方法に準じた。

14.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.7.6. に記載する割合で溶媒および被験物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた。

14.7.6. 処理量一覧

	陰性対照および被験物質		
	培養液	S9 mix	溶媒/ 被験物質液
-S9 処理	600 μ L	-	3 μ L
+S9 処理	500 μ L	100 μ L	3 μ L
24 時間処理	600 μ L	-	3 μ L

14.7.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウエルから培養液を除き、10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：Lot No. EWK9790, 和光純薬工業）を加えて10分間細胞を固定した。次いで、0.1%クリスタル・バイオレット（Lot No. K31134240, Merck）水溶液で10分間細胞を染色した。各プレートを水洗した後、乾燥させた。各ウエルに色素溶出液（30%エタノール、1%酢酸水溶液）を3 mL 加え、5分間放置した。各ウエルの溶出液を96ウエルのプレート（アッセイプレート, IWAKI）に各々300 μ L 分注し、マイクロプレートリーダー（モデル450, BIO・RAD）を用いて570 nm での吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（=細胞生存率）を各用量群について求めた。

14.8. 染色体異常試験

14.8.1. 用量

細胞増殖抑制試験の結果、いずれの処理においても最高用量の1570 μ g/mL（10 mM 相当）で細胞の増殖を50%以上抑制することはなかった。従って、染色体異常試験では1570 μ g/mL を最高用量とし、785, 393 および196 μ g/mL の計4用量を設定した。

処理法	用量 (μ g/mL)			
短時間処理法-S9 処理	196	<u>393</u>	<u>785</u>	<u>1570</u>
短時間処理法+S9 処理	196	<u>393</u>	<u>785</u>	<u>1570</u>
連続処理法 24 時間処理	196	<u>393</u>	<u>785</u>	<u>1570</u>

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

14.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

14.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mmのプレート（細胞培養用シャーレ：住友ベークライト）に 8×10^3 細胞/mLに調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6.に記載する割合で溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Lot No. 094K2331, Sigma-Aldrich）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mLを加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

14.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mLに調製した細胞浮遊液 5 mLを播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6.に記載する割合で溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理を行った。

その後の操作は 14.8.3.に記載した方法に準じた。

14.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mLに調製した細胞浮遊液 5 mLを播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6.に記載する割合で溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

14.8.6. 処理量一覧

	陰性対照および被験物質			陽性対照		
	培養液	S9 mix	溶媒/被 験物質液	培養液	S9 mix	陽性対照 物質液
-S9 処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.03 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

14.8.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.8.8. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に、最終濃度で $0.2 \mu\text{g/mL}$ となるようコルセミド溶液（Lot No. 1252976, Invitrogen）を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25%トリプシン溶液（Lot No. 1263419, Invitrogen）を用いてプレートから細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、 37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え、 37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液（メタノール 3 容：酢酸 1 容）で細胞を固定した。固定液を 2

回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とした。細胞密度を適切な濃度に調整し、細胞濃度確認のため染色体標本を1枚作製した。その後、染色体メタフェーズ展開装置 (HANABI) を用いて、スライドガラス上に細胞浮遊液を1滴滴下し、染色体標本を2枚作製した。スライド標本を十分に乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8 : Lot No. TP601474, Merck) を用いて希釈した1.2%ギムザ染色液 (Lot No. OB318388, Merck) で12分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

14.8.9. 細胞増殖抑制制度の測定

染色体標本作製時に、陰性対照群、各被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、ATP フォトメーター (ルミテスターC-100LU, キッコマン) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理した細胞液を 50 μ L 添加し、攪拌してから約 20 分間静置した。測定用チューブにこの混合液を 100 μ L 分注し、ATP 測定用試薬キット (ルシフェール 250, キッコマン) の発光試薬を 100 μ L 添加した後、相対発光量 (Relative Light Unit ; RLU) を測定した。陰性対照群における RLU に対する比 (=細胞生存率) を各用量群について求め、細胞増殖抑制制度とした。

14.8.10. 評価対象

観察用量としては、細胞増殖抑制試験および 14.8.9. の相対細胞増殖率がいずれの処理群においても 50% 以上であったことから、試験した最も高い用量を最高用量とした。いずれにおいても連続する 3 用量を評価対象とした。

14.8.11. 染色体の観察

短時間処理法と連続処理法のそれぞれの標本を分けてコード化した。始めに短時間処理法について染色体の観察を実施し、その結果、陰性結果が得られたため、引き続き連続処理法の標本についても観察を行った。

各プレート当たり 100 個、すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下 ($\times 600$) で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ (gap)、染色分体切断 (ctb)、染色分体切断 (csb)、染色分体交換 (cte)、染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として、1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

14.9. 試験成立条件

陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は背景データから求めた基準値内であり、かつ、いずれも5%未満であること。陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は上記の基準値内であり、かつ、10%以上であること。以上の条件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

14.10. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞については異常細胞数に含めないで判定した。

異常細胞の出現頻度を、Fisherの直接確率計算法(有意水準片側2.5%)を用いて検定した。また、用量依存性については、Cochran Armitageの傾向検定(有意水準片側2.5%)を用いて検定した。

陰性対照群と比較し、被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、用量に依存性が認められるか、あるいは再現性が確認された場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

15. 試験結果

15.1. 細胞増殖抑制試験

15.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示した。

短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理および連続処理法 24 時間処理では、いずれの被験物質処理においても、細胞生存率は陰性対照群の80%以上を示したことから、50%細胞増殖抑制濃度は算出できなかった。

15.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時、全ての処理の393 µg/mL以上の用量において油滴状の析出物が認められた。被験物質処理終了後、析出等の特筆すべき変化は認められなかった。

15.2. 染色体異常試験

15.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 1 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理群での染色体構造異常出現頻度は、393 µg/mL で2.0%、785 および1570 µg/mL で0.0%を示し、陰性対照群(0.5%)と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、393 µg/mL で0.0%、785 および1570 µg/mL で0.5%を示し、陰性対照群(0.0%)と同等であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は42.0% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 2 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 393 および 785 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5%, 1570 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 1.0% を示し, 陰性対照群 (0.0%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は, 393 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5%, 785 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 1.0%, 1570 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5% を示し, 陰性対照群 (0.5%) と同等であった。

一方, 陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 24.0% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Figure 5, Table 5 および Appendix 3 に示した。

2-ethylhexyl vinyl ether 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 393, 785 および 1570 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.0% を示し, 陰性対照群 (1.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は, 393 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5%, 785 および 1570 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.0% を示し, 陰性対照群 (1.0%) と同等であった。

一方, 陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され, その出現頻度は 24.5% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始時, 全ての処理の 393 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量において油滴状の析出物が認められた。被験物質処理終了後, 析出等の特筆すべき変化は認められなかった。

16. 考察および結論

2-ethylhexyl vinyl ether の変異原性, すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため, 培養細胞 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果を基に, 短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理ではガイドライン上定められた最高用量である 1570 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10 mM 相当) まで検討した。

その結果, 2-ethylhexyl vinyl ether 処理群の場合, 短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理のいずれにおいても染色体異常の誘発頻度は陰性対照群と同等の値を示し, 明確な染色体構造異常の誘発は認められなかった。

短時間処理法において陰性と判定されたことから, 連続処理法 24 時間処理の染色体の観察を実施した。その結果, いずれの用量においても明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

本被験物質 2-ethylhexyl vinyl ether についての遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はなかった。

類縁体すなわち、異性体である hexanol, 2-ethyl-および ethylhexyl acrylate の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告もなかった。

なお、陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも背景データ (Appendix 4) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において 2-ethylhexyl vinyl ether のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

17. 参考とした資料

- Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - A screening for chemical carcinogens. *Mutat Res* 1977; 48: 337-354.
- Ishidate M. Chromosome aberration test *in vitro* for chemical mutagens in our environment. *The Tissue Culture* 1979; 5: 115-122.
- Evans HJ. In: Hollaender A editor. Cytological methods of detecting chemical mutagens. *Chemical Mutagens*. New York Plenum press 1976; 4: 1-25.
- Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Jr. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutat Res* 1979; 66: 277-290.
- Ishidate M. Chromosomal aberration test *in vitro*. Tokyo: REALIZE INC. 1987.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research [editorial]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 22: 269-275.

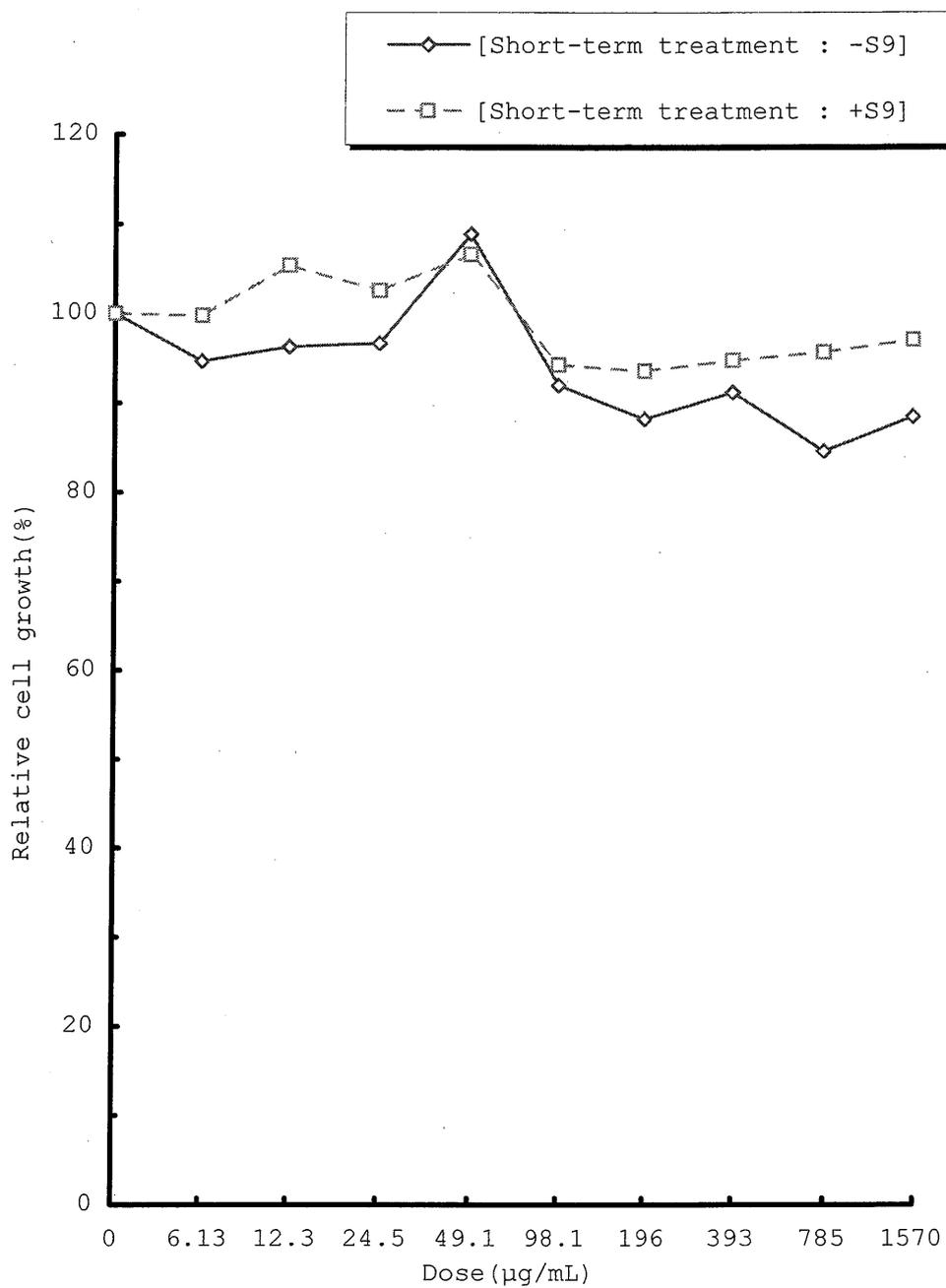


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether [Short-term treatment]

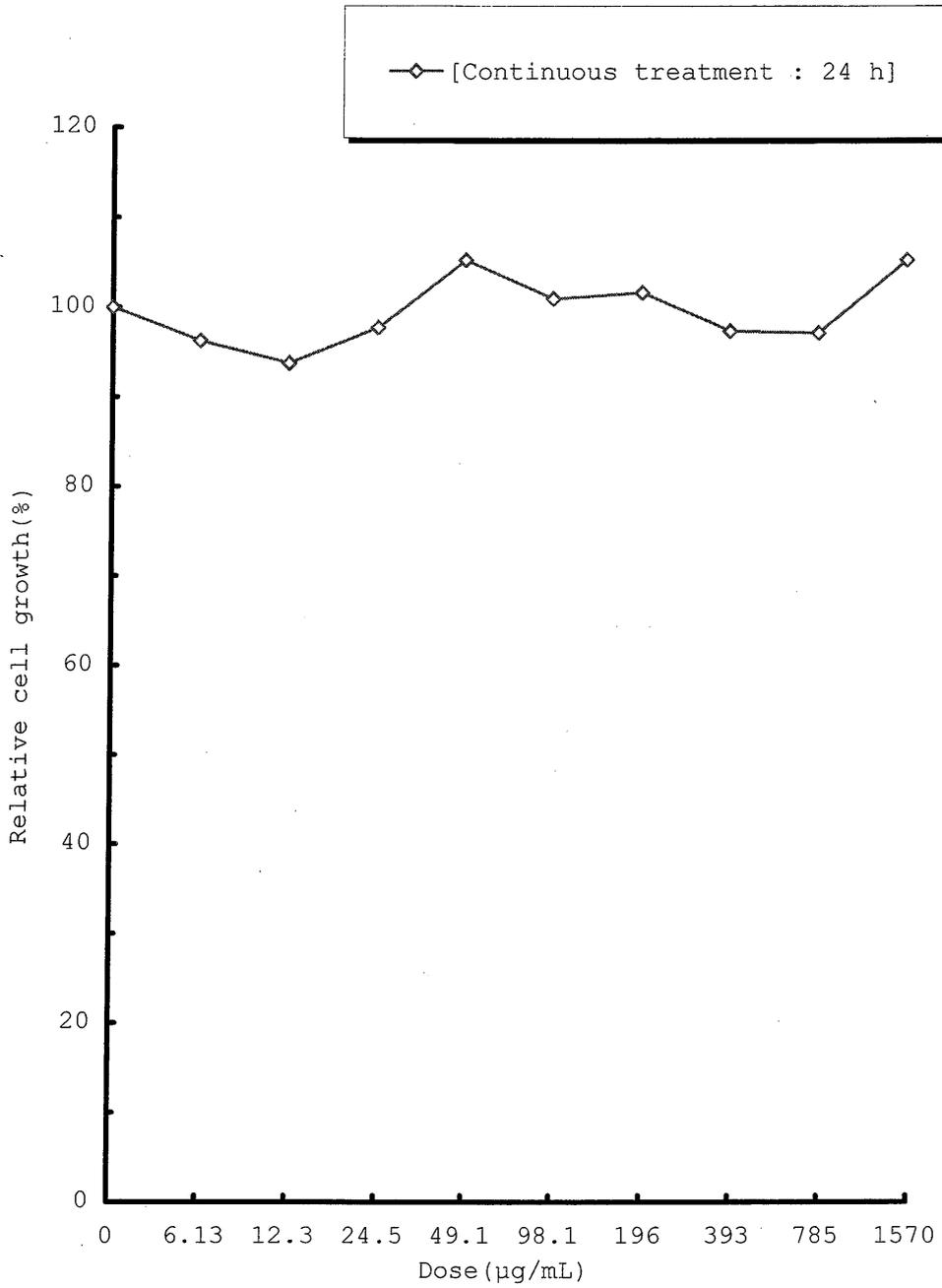


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether [Continuous treatment]

Table 1. Results of growth inhibition test of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Short-term treatment]

Exp. No. 9047 (115-198)

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]	Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	100.0 100.0	[100.0]	2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	6.13	94.3 95.0	[94.7]		6.13	99.8 99.8	[99.8]
	12.3	93.5 99.2	[96.4]		12.3	106.2 104.5	[105.4]
	24.5	97.9 95.5	[96.7]		24.5	103.4 101.7	[102.6]
	49.1	108.2 109.6	[108.9]		49.1	104.1 109.1	[106.6]
	98.1	90.4 93.6	[92.0]		98.1	94.6 93.9	[94.3]
	196	90.6 85.7	[88.2]		196	93.9 93.2	[93.6]
	393	93.6 88.8	[91.2]		393	99.0 90.6	[94.8]
	785	84.0 85.2	[84.6]		785	96.6 94.8	[95.7]
1570	87.4 89.5	[88.5]	1570	99.5 94.6	[97.1]		

50% Growth inhibition dose was as follows:
[short-term treatment : -S9] ——— Not inhibited
[short-term treatment : +S9] ——— Not inhibited
a): Negative control(Dimethyl sulfoxide,10 µL/mL)

Table 2. Results of growth inhibition test of 2-ethylhexyl vinyl ether
[Continuous treatment]

Exp. No. 9047 (115-198)

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	6.13	94.7 97.9	[96.3]
	12.3	94.0 93.5	[93.8]
	24.5	98.5 97.2	[97.9]
	49.1	99.6 110.9	[105.3]
	98.1	99.3 102.7	[101.0]
	196	101.8 101.5	[101.7]
	393	98.2 96.6	[97.4]
	785	103.8 90.6	[97.2]
	1570	106.5 104.0	[105.3]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[Continuous treatment : 24 h] ——— Not inhibited
a): Negative control (Dimethyl sulfoxide: 10 µL/mL)

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether
[Short-term treatment : -S9]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse				oth
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	6	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	393	6	89.9	200	3	1	3	0	0	0	4 (2.0)	200	0 (0.0)
	785	6	95.9	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
	1570	6	85.7	200	5	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
MMC b)	0.1	6	78.6	200	16	33	67	0	0	0	84 (42.0) *	200	1 (0.5)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control(Mitomycin C)

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether
[Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
	393	6	87.0	200	0	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	785	6	89.4	200	0	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	2 (1.0)
	1570	6	90.0	200	1	1	1	0	0	0	2 (1.0)	200	1 (0.5)
CP b)	12.5	6	89.0	200	5	8	43	0	0	0	48 (24.0) *	200	1 (0.5)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-ethylhexyl vinyl ether
[Continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Number of cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse				oth
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	24	100.0	200	0	2	1	0	0	0	3 (1.5)	200	2 (1.0)
	393	24	93.8	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
	785	24	95.8	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
	1570	24	91.6	200	2	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
MMC b)	0.05	24	86.3	200	9	12	38	0	2	0	49 (24.5) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control(Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$)

b): Positive control(Mitomycin C)

Appendix 1. Chromosome aberration test of 2-ethylhexyl vinyl ether
 [Short-term treatment : -S9]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)		
					gap	ctb	cte	csb	cse					oth	
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	6	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0	
		6	100.0	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0	
	393	6	94.3	100	1	0	2	0	0	0	1.0	2.0	100	0.0	
		6	85.4	100	2	1	1	0	0	0	1.0	2.0	100	0.0	
	785	6	93.2	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	1.0	
		6	98.6	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
	1570	6	84.3	100	3	0	0	0	0	0	3.0	0.0	100	1.0	
		6	87.0	100	2	0	0	0	0	0	2.0	0.0	100	0.0	
	MMC b)	0.1	6	75.6	100	7	17	30	0	0	0	3.0	39.0	100	1.0
			6	81.6	100	9	16	37	0	0	0	2.0	45.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
 -gap: total number of cells with aberrations except gap
 a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
 b): Positive control (Mitomycin C)

Appendix 2. Chromosome aberration test of 2-ethylhexyl vinyl ether
 [Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)		
					gap	ctb	cte	csb	cse					oth	
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0	
		6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
	393	6	86.4	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
		6	87.6	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	1.0	
	785	6	86.9	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	2.0	
		6	91.8	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
	1570	6	93.8	100	1	0	1	0	0	0	1.0	1.0	100	0.0	
		6	86.2	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	1.0	
	CP b)	12.5	6	86.1	100	4	4	23	0	0	0	1.0	27.0	100	1.0
			6	91.8	100	1	4	20	0	0	0	1.0	21.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
 -gap: total number of cells with aberrations except gap
 a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
 b): Positive control (Cyclophosphamide)

Appendix 3. Chromosome aberration test of 2-ethylhexyl vinyl ether
 [Continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 9047 (115-198)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
2-ethylhexyl vinyl ether	0 a)	24	100.0	100	0	1	1	0	0	0	0.0	2.0	100	2.0	
		24	100.0	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0	
	393	24	93.8	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0	
		24	93.8	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
	785	24	97.6	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
		24	94.0	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0	
	1570	24	91.3	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0	
		24	91.9	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0	
	MMC b)	0.05	24	83.9	100	6	8	20	0	1	0	2.0	27.0	100	0.0
			24	88.6	100	3	4	18	0	1	0	3.0	22.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
 -gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control (Mitomycin C)

B-5804

3. 試験実施概要

3.1 試験計画書

試験番号 : B-5804
試験表題 : 2-エチルヘキシルビニルエーテルのラットを用いた
2週間回復性観察を含む28日間経口投与毒性試験

3.2 試験目的

被験物質をラットに28日間経口投与し、その影響を明らかにするとともに、その後2週間の回復期間を設けて障害の可逆性を調べることを目的とした。なお、本試験は株式会社ボゾリサーチセンター動物実験委員会の承認を受けている。

3.3 試験委託者

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3.4 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

3.5 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

4. 要約

Sprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD (SD)〕を用いて、2-エチルヘキシルビニルエーテルの反復投与による毒性並びにその回復性を検討した。投与量は0(オリーブ油：対照群)、8、30及び125 mg/kg/dayとし、28日間反復強制経口投与した。1群の動物数は対照群及び125 mg/kg投与群で雌雄各12匹、8及び30mg/kg投与群で雌雄各6匹とした。このうち、対照群及び125 mg/kg投与群の雌雄各6例については、28日間投与後2週間休薬させた。

1) 一般状態の観察、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定、体重並びに摂餌量測定

投与及び回復期間を通じ、いずれの検査項目にも、被験物質投与の影響は認められなかった。

2) 尿検査(摂水量測定含む)

尿pHの低値傾向が125mg/kg投与群の雌雄に、潜血陽性例の増加傾向が125mg/kg投与群の雄に認められた。これらの変化は休薬によりいずれも消失し、回復性が認められた。

3) 血液学検査

いずれの検査項目にも、被験物質投与の影響は認められなかった。

4) 血液化学検査

ALPの高値が30mg/kg投与群の雄及び125 mg/kg投与群の雌雄に、総コレステロール及びリン脂質の高値が125mg/kg投与群の雌雄に認められた。これらの変化は休薬によりいずれも消失し、回復性が認められた。

5) 病理学検査

肝臓では、相対重量の高値と組織学検査で小葉中心性肝細胞肥大が30mg/kg投与群の雄及び125mg/kg投与群の雌雄に、単細胞壊死が125mg/kg投与群の雌雄に認められた。また、腎臓では、相対重量の高値と組織学検査で尿細管上皮細胞の好酸性小体の発現頻度の増加が125mg/kg投与群の雄に認められた。更に、精巣では、相対重量の高値が125mg/kg投与群に認められた。これらの変化は、精巣重量の高値を除く、いずれの変化も休薬により消失あるいは軽減し、回復性が認められた。

以上の結果から、2-エチルヘキシルビニルエーテルの本試験条件下における無影響量は雄で8mg/kg/day、雌で30mg/kg/dayと推定された。なお、精巣重量の高値を除く他の変化については、いずれも休薬により回復性が認められた。

5. 緒言

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、2-エチルヘキシルビニルエーテルをラットに 28 日間反復経口投与し、その影響を明らかにするとともに、2 週間休薬し、障害の回復性を調べたのでその成績を報告する。なお、本試験は、以下の基準を遵守及びガイドラインに準拠して実施した。

1) GLP

- ・ 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」
(平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 17 年 4 月 1 日 最終改正)

2) 毒性試験ガイドライン

- ・ 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
(平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成 17 年 4 月 1 日 最終改正)
- ・ 「OECD Guideline for Testing of Chemicals 407」
(OECD 理事会：1995 年 7 月 27 日)

3) 動物の福祉

- ・ 「動物の愛護及び管理に関する法律」
(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 17 年 6 月 22 日最終改正)
- ・ 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」
(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第八十八号)
- ・ 「動物実験に関する指針」
((社) 日本実験動物学会、昭和 62 年 5 月 22 日)

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

被験物質2-エチルヘキシルビニルエーテルは日本カーバイド工業株式会社より提供された。当試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、試験成績を添付資料1に記載した。

名称	:	2-エチルヘキシルビニルエーテル 2-Ethylhexyl vinyl ether
CAS 番号	:	103-44-6
構造式又は示性式	:	$\text{CH}_2=\text{CHO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$
ロット番号	:	06F002
純度	:	99.9%
入手量	:	500g
性状	:	無色透明液体
沸点	:	177°C
分子量	:	156.27
比重	:	0.81
溶解度	:	難溶（水）
安定性	:	動物試験終了後に日本カーバイド工業株式会社に返却し安定性の結果を添付資料2に記載した。
保存方法	:	室温暗所(安定剤 KOH 5ppm 含有)(実測値:17~27°C)
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	マスク、手袋を着用する。 取扱い場所及び周囲の火気を厳禁し、高温物及び強酸化剤との接触を避ける。
返却	:	被験物質 5g を保存試料として保存する。分析用に小分けした被験物質の残量は廃棄した。また、残量は提供者に返却し安定性を確認した ^{注)} 。

注) : 試験計画書では被験物質の残量は廃棄することになっていたが、すべての被験物質(分析用に小分けした被験物質を除く)の残量を提供者に返却した。

6.1.2 媒体

名称	:	オリブ油
ロット番号	:	6203
メーカー	:	丸石製薬株式会社
保存方法	:	室温

保存場所 : 御殿場研究所 第1研究棟被験物質調製室

6.2 投与液の調製

6.2.1 被験液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を正確にビーカーに採取し、オリーブ油を加え希釈させメスシリンダーで規定量にメスアップした。希釈液は週1回以上の頻度で調製し、調製後8日以内に使用した（ただし、8日間の安定性が確認されるまでは用時調製とした）。

6.2.2 投与液の保存方法

投与液（対照群投与液を含む）は1日の必要分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、使用時まで冷蔵庫内に保存した（実測温度：4～6℃）。

6.2.3 媒体中での安定性

1及び200 mg/mL 溶液（媒体：オリーブ油）は、褐色ガラス瓶に入れ冷蔵庫内8日間保存後、室温24時間保存する時安定であることが株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で確認されている（試験番号：A-1906、添付資料3）。

6.2.4 調製物の濃度確認

投与第1週と第4週の投与に用いる各濃度の被験液について、その濃度を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所でGC法を用いて確認した。その結果、表示値に対する濃度の割合は97.6～102.3%（許容範囲：表示値±10%）であり、許容範囲内であった（添付資料4-1、4-2）。分析法の概略を次に示す。

1濃度当たりの採取本数（採取量）

: 1本（10mL）

測定対象物質 : 2-エチルヘキシルビニルエーテル

測定対象標準物質

名称 : 2-エチルヘキシルビニルエーテル

ロット番号 : 06F002

保存方法 : 室温暗所（実測値：18～23℃）

使用機器 : GCシステム；Agilent Technologies Inc.

GC（HP6890N）

インジェクタ（G2613A）

オートサンプラトレイ（G2614A）

データ処理ソフト（GC ChemStation G2070AJ）

GC 測定条件

カラム	:	HP-1 (0.53 mm I.D.×15 m、膜厚 1.5 μm、Agilent Technologies Inc.)
キャリアガス	:	He
流量モード	:	コンスタントフローモード
キャリアガス流量	:	4.5 mL/min
注入口	:	スプリットレス注入口
注入口温度	:	200°C
検出器	:	Flame Ionization Detector (FID)
検出器温度	:	300°C
H ₂ 流量	:	40 mL/min
Air 流量	:	450 mL/min
オープン温度	:	100°C から 200°C の昇温プログラム (10°C/min)
試料注入量	:	1 μL

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験に使用される系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4 試験動物及び群分け

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD (SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] 雌雄各 52 匹^註を 5 週齢で入手し、当所で 8 日間検疫・馴化飼育した後、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (3 回) 及び詳細な一般状態 (1 回) を行い、体重増加が順調で一般状態等に異常のみられない健康と思われる動物雌雄各 36 匹 (主群として雌雄各 24 匹、回復群として雌雄各 12 匹) を選び、6 週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で 192~220 g、雌で 151~176 g であり、投与開始時の予定体重範囲 (雄: 100~190g、雌: 90~180g) を雄で上回ったが各群の平均体重とばらつきに差はなく試験成績には影響がないと判断した。

動物は、検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日 (投与開始の 2 日前) の体重に基づいて層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てる) により行った。また、余剰動物は投与開始時点で試験系から除外した。

^註: 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 50 匹であったが、実際には雌雄各 52 匹が納入された。

6.5 飼育条件

温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測値: $21 \sim 24^{\circ}\text{C}$)、相対湿度 $50 \pm 20\%$ (実測値: $52 \sim 59\%$)、換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間 (07:00~19:00) の動物飼育室 (301 号室) で、動物をブラケット式金属製網ケージ (W 250×D 350×H 200mm: 日本ケージ株式会社) に収容して個別に飼育し、毎日 1 回の清掃を実施した。固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号: 060411、060606) 及び御殿場市営水道水を給水瓶により自由に摂取させた。

6.6 飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用全ロットについて財団法人日本食品分析センターで分析を行い、また、飲料水については東芝機械環境センター株式会社で水道法に準拠する水質検査を定期的に (年 4 回) 行った。これらの分析成績書を入手し、試験成績に影響がないことを確認した後保存した。

6.7 動物の識別及びケージへの表示

動物は入所時に耳標を装着して個体識別した。入荷から群分け前までの間は試験番号、性別及び耳標番号を明記したケージラベルをつけた。群分け後は、性別及び用量ごと (対照群、低、中及び高用量群の順) に 4 桁の番号をつけた。この場合、1000 の位は群、100 の位は性 (0 番を雄、1 番を雌)、10 と 1 の位は個体番号になる。各飼育ケージには、群分け前まで使用したケージラベルの裏に用量 (群) ごとに色分けしたラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び剖検予定日を明記した。ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定中は、観察者に対して投与の情報を制限するためケージラベルを裏返して試験番号、性別及び耳標番号のみを表示した。

6.8 投与経路、投与期間、投与方法及び投与回数とそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口投与を選択し、投与期間は 28 日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている 1 日 1 回 (7 回/週) とした。回復期間は障害の可逆性を検討するのに適当と考えられる 2 週間 (14 日間) とし、この間投与を行わなかった。投与容量は 5 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した (8:06~11:45 の間)。対照群の動物には媒体 (オリブ油) を同様に投与した。個体ごとの投与液量は最新の体重に基づいて算出した。

6.9 投与量及びその設定根拠並びに群構成

2-エチルヘキシルビニルエーテルの 0 (オリブ油)、125、250、500 及び 1000 mg/kg/day を 1 群雌雄各 5 匹のラットに 14 日間反復経口投与した結果¹⁾、1000mg/kg 投与群の雌雄全例、500mg/kg 投与群の雄 3 例、雌 2 例が死亡した。また、最低用量の 125 mg/kg 投与群の雌雄で、血液化学検査において ALP の上昇と器官重量において肝臓重量の高

値が認められた。したがって、本試験における投与量は予備試験で影響が認められた 125 mg/kg を高用量とし、以下公比約 4 で除して、30 及び 8 mg/kg の 3 用量を設定した。これに対照群を加え、計 4 群を設けた。主群では雌雄各 6 匹、回復群では対照群及び高用量群で雌雄各 6 匹とした。群構成表を次の表 1 に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	8	1.6	5	雄	6	2001~2006	-	-
				雌	6	2101~2106	-	-
中用量群	30	6	5	雄	6	3001~3006	-	-
				雌	6	3101~3106	-	-
高用量群	125	25	5	雄	6	4001~4006	6	4007~4012
				雌	6	4101~4106	6	4107~4112

6.10 観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りである。

- 投与開始日 : 投与第 1 日 (day 1 of administration)
 投与 1 から投与 7 日 : 投与第 1 週 (week 1 of administration)
 回復開始日 (投与期間終了の翌日)
 : 回復第 1 日 (day 1 of recovery)
 回復 1 から回復 7 日 : 回復第 1 週 (week 1 of recovery)

6.10.1 一般状態の観察

投与期間中は毎日 3 回、投与前と投与直後及び投与約 2 時間後 (ただし、土曜及び休日は投与前と投与直後の 2 回)、回復期間中は毎日 1 回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。また、投与第 23 日の雄と投与第 24 日の雌の投与後約 2 時間後の観察は、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定を行ったため、それらの検査終了後に実施した (試験計画書の規定から逸脱したが、投与期間を通じて異常は観察されていないことから試験成績には影響はないと判断した)。

6.10.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定

詳細な一般状態の観察は全個体について、投与開始前に 1 回、投与期間中及び回復期間中は毎週 1 回観察した。また、機能検査、握力及び自発運動量の測定は全個体について、投与第 4 週 (雄で投与第 23 日、雌で投与第 24 日) 及び回復第 2 週 (回復第 10 日) に行った。なお、観察及び検査は投与の情報を制限し、動物をランダムに配置

した状態（ブラインド）で行った。

なお、投与開始前（検疫・馴化期間中）の詳細な一般状態の観察において異常は認められなかった。

6.10.2.1 詳細な一般状態の観察

1) ホームケージ内観察

姿勢、痙攣、異常行動

2) 手に持つての観察

ケージからの取り出しやすさ、被毛・皮膚の状態、眼・鼻の分泌物、眼球（眼球突出、眼瞼閉鎖状態）、可視粘膜、自律神経機能（流涙、立毛、瞳孔径、流涎、異常呼吸）、ハンドリングに対する反応

3) オープンフィールド内観察

覚醒状態、痙攣、異常行動、常同行動、歩行、姿勢、身繕い、立ち上がり回数、排泄物（排糞数、排尿）

6.10.2.2 機能検査

聴覚反応、接近反応、接触反応、痛覚反応、瞳孔反射、空中正向反射、着地開脚幅

6.10.2.3 握力測定

CPU ゲージ MODEL-9502A（アイコーエンジニアリング株式会社）を用いて前肢及び後肢の握力を測定した。

6.10.2.4 自発運動量の測定

実験動物用自発運動センサーNS-AS01（株式会社ニューロサイエンス）を用いて自発運動量を測定した。測定は1時間とし、10分間隔及び0～60分の測定値を集計した。

6.10.3 体重測定

全個体について、投与1、4、7、10、14、17、21、24及び28日の投与前に、回復期間中は回復1、3、7、10及び14日に測定した。測定は8:08～10:08の間に行った。更に、全投与期間中及び回復期間中の体重増加量を算出した。剖検日には相対器官重量算出のため、前日から約16時間絶食させた後の体重を測定した。

6.10.4 摂餌量測定

全個体について、投与期間中は投与1、4、7、10、14、17、21、24及び28日の投与前に、回復期間中は回復3、7、10及び14日に測定した。測定は08:31～11:03の間に行った。なお、投与期間中の投与1日は前日からの1日量、それ以降は3～4日間の

累積量、回復期間中の回復 3 日は回復 1 日からの 2 日間の累積量、それ以降は 3~4 日間の累積量を測定し、1 匹 1 日量に換算表示した。

6.10.5 尿検査

投与第 4 週及び回復第 2 週に行った。

投与第 4 週（投与第 25 及び 26 日）は検査当日の投与後に全個体について、回復第 2 週（回復第 11 日及び 12 日）は回復群の全個体について、それぞれ採尿器をセットしたケージに収容し、絶食・自由摂水下で 4 時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の 20 時間尿を採取し、表 2 に記載した項目及び方法により検査した。また、摂水量は、採尿ケージに収容した状態で前日からの 1 日摂取量を、給水瓶を用いて測定した。

表 2.尿検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 4 時間尿についての検査		2) 20 時間尿についての検査	
検査項目	測定方法	検査項目	測定方法
pH	オーションスティックス-7EA 試験紙 ^{a)} (アークレイ(株)) (単位: mEq/24hr)	尿量 (20 時間量) ^{注)}	メスシリンダーを用いた 容量測定 (単位: mL)
たん白質		浸透圧	氷点降下法 ^{b)} (単位: mOsm/kg)
ケトン体			
グルコース			
潜血			
ビリルビン			
ウロビリノーゲン			
色調	肉眼観察		
沈渣	鏡検法		
尿量 (4 時間量) ^{注)}	目盛付スピッツ管を用いた 容量測定 (単位: mL)		
使用測定機器			
a) : AUTION MINI™ AM-4290 (アークレイ株式会社)			
b) : 自動浸透圧測定装置 オートアンドスタット OM-6030 (アークレイ株式会社)			
備考			
注) : 4 時間の尿量と 20 時間の尿量を合計して 24 時間の尿量 (mL/24h) を算出した。			

6.10.6 血液学検査

投与期間及び回復期間終了の翌日の計画剖検時に、前日から一夜（約 16～20 時間）絶食させた全個体についてエーテル麻酔下に開腹し、腹大動脈から EDTA-2K 加採血瓶（SB-41：シスメックス株式会社）に血液を採取した。得られた血液について表 3-1) に記載した項目及び方法により検査した。また、3.8%クエン酸ナトリウム溶液加試験管（血液 9 容に対し 1 容の割合）に採取した試料を遠心分離（設定：約 3,000rpm、約 1,600×g、約 10 分間）し、得られた血漿について表 3-2) に記載した項目及び方法により検査した。

表 3.血液学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) EDTA-2K 加血液についての検査		
検査項目	測定方法	単 位
赤血球数	電気抵抗変化検出法 ^{c)}	10 ⁴ /μL
ヘモグロビン量	シアンメトヘモグロビン法 ^{c)}	g/dL
ヘマトクリット値	赤血球数及び平均赤血球容積から算出	%
平均赤血球容積	電気抵抗変化検出法 ^{c)}	fL
平均赤血球色素量	赤血球数及びヘモグロビン量から算出	pg
平均赤血球色素濃度	ヘモグロビン量及びヘマトクリット値から算出	%
網赤血球率	Brecher 法	%
血小板数	電気抵抗変化検出法 ^{c)}	10 ⁴ /μL
白血球数	電気抵抗変化検出法 ^{c)}	10 ² /μL
白血球百分率	May-Giemsa 染色による鏡検法	%
2) クエン酸ナトリウム加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単 位
プロトロンビン時間	クロット法 ^{d)}	s
活性化部分トロンボ プラスチン時間	クロット法 ^{d)}	s
フィブリノーゲン量	トロンボプラスチン法 ^{d)}	mg/dL
使用測定機器		
^{c)} : コールター全自動 8 項目血球アナライザー T890 (ベックマン・コールター株式会社)		
^{d)} : 血液凝固自動測定装置 ACL 100 (Instrumentation Laboratory)		

6.10.7 血液化学検査

血液学検査用試料と同時に採取した血液を凝固促進剤入り試験管（ベノジェクト II-オートセップ：テルモ株式会社）に取り、遠心分離（設定：約 3,000rpm、約 1,600×g、約 10 分間）し、得られた血清について表 4-1) に示す項目について検査した。また、ヘパリン加試験管（血液 1mL 当たり約 20 単位のヘパリン）に採取した血液を遠心分離（設定：約 3,000rpm、約 1,600×g、約 10 分間）し、得られた血漿について表 4-2) に示す項目について検査した。

表 4.血液化学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 分離した血清についての検査		
検査項目	測定方法	単 位
ALP	Bessey-Lowry 法 ^{e)}	IU/L
総コレステロール	CEH-COD-POD 法 ^{e)}	mg/dL
トリグリセライド	LPL-GK-GPO-POD 法 ^{e)}	mg/dL
リン脂質	PLD-ChOD-POD 法 ^{e)}	mg/dL
総ビリルビン	ビリルビンオキシダーゼ法 ^{e)}	mg/dL
グルコース	グルコースデヒドロゲナーゼ法 ^{e)}	mg/dL
尿素窒素	Urease-LEDH 法 ^{e)}	mg/dL
クレアチニン	Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase-POD 法 ^{e)}	mg/dL
ナトリウム	イオン選択電極法 ^{e)}	mmol/L
カリウム	イオン選択電極法 ^{e)}	mmol/L
塩素	イオン選択電極法 ^{e)}	mmol/L
カルシウム	OCPC 法 ^{e)}	mg/dL
無機リン	モリブデン酸法 ^{e)}	mg/dL
総たん白質	Biuret 法 ^{e)}	g/dL
アルブミン	BCG 法 ^{e)}	g/dL
A/G 比	総たん白質及びアルブミンから算出	
2) ヘパリン加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単 位
AST (GOT)	UV-rate 法 ^{e)}	IU/L
ALT (GPT)	UV-rate 法 ^{e)}	IU/L
LDH	UV-rate 法 ^{e)}	IU/L
γ-GTP	γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド法 ^{e)}	IU/L
使用測定機器		
e) : 臨床化学自動分析装置 TBA-120FR 形 (株式会社東芝)		

6.10.8 病理学検査

6.10.8.1 剖検

全ての計画剖検動物について、採血後腹大動脈切断により放血致死させ、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録した。

6.10.8.2 器官重量測定

全ての計画剖検動物について、次に示す器官の重量（絶対重量）を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重から体重 100g 当たりの相対重量を算出した。なお、*印

を付した両側性の器官については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

脳、副腎*、胸腺、脾臓、心臓、肝臓、腎臓*、精巣*、精巣上体*、卵巣*、子宮

6.10.8.3 病理組織学検査

全ての個体について次に示す器官・組織を採取し、リン酸緩衝 10%ホルマリン液で固定した。ただし、肺はリン酸緩衝 10%ホルマリン液を注入後、眼球及び視神経はリン酸緩衝液で調製した 3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン液で固定、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後、リン酸緩衝 10%ホルマリン液で保存後、パラフィン包埋した。その後、切片としてヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、対照群及び高用量群（肉眼的異常部位については全群）について鏡検した。なお、被験物質投与の影響が疑われた雄の腎臓及び雌雄の肝臓については低及び中用量群並びに回復群の対照群及び高用量群についても鏡検した。また、雄の肝臓及び腎臓については写真撮影を行った。

なお、*で示した両側性器官については両側を摘出したが、鏡検は片側のみ行った。

大脳、小脳、脊髄（胸部）、坐骨神経、眼球*、下垂体、甲状腺*、上皮小体*、副腎*、胸腺、脾臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、心臓、気管、肺（気管支を含む）、胃、十二指腸、空腸、回腸（パイエル板を含む）、盲腸、結腸、直腸、肝臓、腎臓*、膀胱、精巣*、精巣上体*、前立腺、卵巣*、子宮、胸骨（骨髄を含む）大腿骨（骨髄を含む）及び大腿部骨格筋

他に、視神経、ハーダー腺、胸大動脈、舌、食道、顎下腺、舌下腺、膵臓、腔、精囊、乳腺（鼠径部）、皮膚（鼠径部）、個体識別部位（耳介）及び喉頭を摘出して保存した。

6.11 統計解析

オープンフィールド内観察の定量的項目、機能検査の定量的項目、握力測定、自発運動量の測定、体重（体重増加量を含む）、摂餌量、摂水量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液化学検査及び器官重量データについて、対照群と各投与群との間で統計解析を行った。まず、Bartlett 法により分散性の検定を行った（有意水準：両側 1%）。分散が等しい場合は Dunnett 法を用いて、非等分散の場合は Dunnett 型の mean rank test を用いて、対照群と各投与群との間で検定を行った（有意水準：両側 5 及び 1%）。なお、回復群については、F 検定により各群の分散の均一性の検定（有意水準：片側 5%）を行った。その結果、等分散性が認められた場合には対照群と被験物質投与群との平均値の差について Student の t 検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を、等分散性が認められなかった場合には Aspin-Welch の t 検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を行った。

また詳細な一般状態の観察及び機能検査のスコア化したデータについては基本的に検査のグレードが 2 項目の時は χ^2 検定法、3 項以上は Mann-Whitney の U 検定等を用いて検定を実施した（有意水準：両側 5 及び 1%）。^{2) 3)}

7. 試験結果

7.1 一般状態の観察

成績を Table 1-1~1-3 に示した。

いずれの動物においても、投与及び回復期間を通じて異常はみられなかった。

7.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定

7.2.1 詳細な一般状態の観察

(1) ホームケージ内観察

成績を Table 2-1~2-6 に示した。

1) 投与期間

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、125mg/kg 投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

(2) 手に持つての観察

成績を Table 2-7~2-12 に示した。

1) 投与期間

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、125mg/kg 投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

(3) オープンフィールド内観察

成績を Table 2-13~2-18 に示した。

1) 投与期間

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、125mg/kg 投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 に示した。

1) 投与第 4 週目

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

2) 回復第 2 週目

いずれの検査項目においても異常はなく、125mg/kg 投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

7.2.3 握力測定

成績を Table 2-21、2-22 に示した。

1) 投与第 4 週目

被験物質投与群の雌雄の握力測定は、対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかった。

2) 回復第 2 週目

125mg/kg 投与群の雌雄の握力測定は、対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかった。

7.2.4 自発運動量の測定

成績を Fig. 1~4 及び Table 2-23、2-24 に示した。

1) 投与第 4 週目

125 mg/kg 投与群の雌で 50 から 60 分に有意な高値が認められた。

2) 回復第 2 週目

125 mg/kg 投与群の雌で 50 から 60 分に有意な高値が認められた。

7.3 体重測定

成績を Fig.5 及び Table 3-1、3-2 に示した。

1) 投与期間

被験物質投与群の雌雄の体重は、対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかったが、投与期間中の体重増加量で 8mg/kg 投与群の雄に有意な低値が認められた。

2) 回復期間

125mg/kg 投与群の雌雄の体重は、対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかった。

7.4 摂餌量測定

成績を Fig.6、7 及び Table 4-1、4-2 に示した。

1) 投与期間

8mg/kg 投与群の雄で投与第 10 日目に有意な低値が認められた。

2) 回復期間

125mg/kg 投与群の雌で回復第 14 日目に有意な高値が認められた。

7.5 尿検査(摂水量測定含む)

成績を Table 5-1～5-8 に示した。

1) 投与第 4 週目

定性項目で pH の低値傾向が 125mg/kg 投与群の雌雄で、潜血陽性例の増加傾向が 125mg/kg 投与群の雄で認められた。

2) 回復第 2 週目

定性及び定量項目とも対照群との間に明らかな差は認められなかった。

7.6 血液学検査

成績を Table 6-1～6-4 に示した。

1) 投与期間終了時

白血球百分率において単球比率の有意な高値が 125mg/kg 投与群の雌で認められた。

2) 回復期間終了時

網状赤血球率の有意な低値が 125mg/kg 投与群の雄に、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の有意な低値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な短縮と血小板数の有意な高値が 125mg/kg 投与群の雌に認められた。

7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1～7-4 に示した。

1) 投与期間終了時

ALP の有意な高値が 30mg/kg 投与群の雄と 125mg/kg 投与群の雌雄に、総コレステロール及びリン脂質の有意な高値が 125 mg/kg 投与群の雌雄に、無機リンの有意な高値が 8mg/kg 投与群の雌に認められた。

2) 回復期間終了時

総たん白質の有意な高値が 125mg/kg 投与群の雌雄に認められた。

7.8 器官重量

成績を Table 8-1～8-8 に示した。

1) 投与期間終了時

- | | | |
|----|---|---|
| 脳 | : | 相対重量の有意な高値が 8mg/kg 投与群の雌に認められた。 |
| 肝臓 | : | 相対重量の有意な高値が 30mg/kg 投与群の雄と 125mg/kg 投与群の雌雄に認められた。 |
| 脾臓 | : | 絶対重量の有意な低値が 8mg/kg 投与群の雄と 125mg/kg 投与群の雌に認められた。 |

B-5804

- 腎臓 : 相対重量の有意な高値が 125mg/kg 投与群の雄に認められた。
- 精巣 : 相対重量の有意な高値が 125mg/kg 投与群に認められた。
- 2) 回復期間終了時
- 肝臓 : 絶対重量の有意な高値が 125mg/kg 投与群の雌に相対重量の有意な高値が 125mg/kg 投与群の雌雄に認められた。
- 精巣 : 絶対及び相対重量の有意な高値が 125mg/kg 投与群に認められた。

7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 に示した。

1) 投与期間終了時

- 精巣上体 : 結節が対照群の 1 例に認められた。
- 腎臓 : 腎盂拡張が 30 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。
- 肝臓 : 一部小型化が 30mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。
- 子宮 : のう胞が対照群の 1 例に認められた。

2) 回復期間終了時

- 精巣上体 : 小型化が対照群の 1 例に認められた。
- 精巣 : 小型化が対照群の 1 例に認められた。

7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1～10-4 に示した。

1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓及び腎臓に認められた。

- 腎臓 : 軽微な尿細管ののう胞状拡張が 125mg/kg 投与群の雄 1 例に、軽微な尿細管の再生が 8mg/kg 投与群の雄 1 例に、軽微あるいは軽度な尿細管上皮細胞の好酸性小体が 125mg/kg 投与群の雄 3 例に認められた。剖検所見において腎盂拡張が認められた 30mg/kg 投与群の雄 1 例においては軽度な腎盂拡張が認められた。
- 肝臓 : 軽微あるいは軽度な肝細胞の小葉辺縁性空胞形成が対照群の雄 1 例と雌 3 例に、8mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 4 例に、30mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 4 例に、125mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例に、この内 30mg/kg 投与群の雄の 1 例は剖検所見において一部小型化が認められている。軽微な肝細胞の単細胞壊死が 125mg/kg 投与群

の雄 4 例と雌 2 例に、軽微な微小肉芽腫が対照群の雌 1 例に、125mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 4 例に、軽微及び軽度な限局性の線維化が、30 及び 125mg/kg 投与群の雄各 1 例に、この内 30mg/kg 投与群の雄 1 例は剖検所見において一部小型化が認められている。軽微あるいは軽度な小葉中心性肝細胞肥大が 30mg/kg 投与群の雄 1 例に、125mg/kg 投与群の雄 6 例と雌 3 例に認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも被験物質投与との関連性はないと判断した。

- | | | |
|------------|---|---|
| 精巣上体 | : | 軽度な精子肉芽腫が対照群及び 125mg/kg 投与群の各 1 例に認められた。この内の 1 例は剖検において結節が認められている。 |
| 眼球 | : | 軽度な網膜ロゼット形成が 125mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。 |
| 心臓 | : | 軽微な限局性の心筋炎が 125mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。 |
| 盲腸 | : | 軽微な粘膜の細胞浸潤が 125mg/kg 投与群の雌 1 例に認められた。 |
| 肺 | : | 軽微な動脈壁の石灰沈着が対照群の雄 1 例に、軽微な限局性の肺炎が、対照群と 125mg/kg 投与群の雄各 1 例に、軽微な骨化成が対照群の雄 1 例に認められた。 |
| 大腿部骨格筋 | : | 軽微な細胞浸潤が対照群の雌 1 例に認められた。 |
| 前立腺 | : | 軽微な間質性の細胞浸潤が対照群及び 125mg/kg 投与群の各 3 例に認められた。 |
| 脾臓 | : | 軽微な髓外造血が対照群の雄 1 例と雌 2 例に、125mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。 |
| 胃 | : | 軽微な粘膜の鉍質沈着が対照群の雄 1 例に認められた。 |
| 甲状腺 | : | 軽微な異所性胸腺が 125mg/kg 投与群の雄 1 例に、軽微な鰓後体のう胞が対照群の雌雄各 2 例に、125mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。 |
| 子宮 | : | 剖検所見においてのう胞が認められた対照群の 1 例については軽度なう胞が認められた。 |
| 2) 回復期間終了時 | | |
| 精巣上体 | : | 剖検所見において小型化が認められた対照群の 1 例においては軽度な精子の減少が対照群の 1 例に認められた。 |

B-5804

- 腎臓 : 軽微な尿細管上皮細胞の好酸性小体が対照群及び125mg/kg投与群の雄各1例に認められた。
- 肝臓 : 軽微あるいは軽度な肝細胞の小葉辺縁性空胞形成が対照群の雄3例と雌1例に、125mg/kg投与群の雌1例に、軽微な微小肉芽腫が対照群の雄3例と雌1例に、軽微な小葉中心性肝細胞肥大が125mg/kg投与群の雄1例に認められた
- 精巣 : 剖検所見において小型化が認められた対照群の1例においては精細管の萎縮が認められた。

8. 考察

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Cri:CD (SD)] に 2-エチルヘキシルビニルエーテルを 0 (オリーブ油：対照群)、8、30 及び 125 mg/kg/日の用量で 28 日間反復強制経口投与し、その毒性を検討するとともに、対照群及び 125 mg/kg 投与群はその後 2 週間休薬させ、変化の回復性について検討した。

投与及び回復期間を通じて死亡動物はみられず、一般状態、詳細な一般状態、機能検査及び握力測定で被験物質投与の影響は認められなかった。

自発運動量の測定では 125mg/kg 投与群の雌で投与第 4 週及び回復第 2 週の 50～60 分に高値が認められたが、0～60 分の測定値では自発運動量に変化が認められず、また、一過性の変化であることから被験物質投与との関連性はないと判断した。

体重では、投与期間中の体重増加量の低値が 8mg/kg 投与群の雄で認められたが、高用量群に同様な変化がみられていないことから被験物質投与との関連性はないと判断した。

摂餌量では、低値が 8mg/kg 投与群の雄で投与第 10 日目に認められたが、一過性の変化であり、被験物質投与との関連性はないと判断した。また、125mg/kg 投与群の雌で回復第 14 日目に高値が認められたが、投与期間に同様な変化が認められていないことから被験物質投与との関連性はないと判断した。

尿検査では、pH の低値傾向が 125mg/kg 投与群の雌雄に、潜血陽性例の増加傾向が 125mg/kg 投与群の雄に認められた。これらの変化は、いずれも発現機序は明らかではないものの被験物質投与との関連性が疑われた。また、上記の変化は回復期間には認められず、回復性が認められた。

血液学検査では、白血球百分率における単球比率の高値が 125mg/kg 投与群の雌で認められたが、白血球数及び他の白血球百分率には異常が認められていないことから被験物質投与との関連性はないと判断した。また、回復期間終了時において 125mg/kg 投与群の雄で網状赤血球率の低値が、125mg/kg 投与群の雌でヘモグロビン量及びヘマトクリット値の低値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮と血小板数の高値が認められたがいずれも投与期間終了時には同様な変化が認められていないことから被験物質投与との関連性はないと判断した。

血液化学検査では、ALP の高値が 30mg/kg 投与群の雄及び 125mg/kg 投与群の雌雄に、総コレステロール及びリン脂質の高値が 125mg/kg 投与群の雌雄に認められ、被験物質投与との関連性が示唆された。なお、これらの変化は回復期間には認められず、回復性が認められた。その他には、無機リンの高値が 8mg/kg 投与群の雌に認められたが、高用量群に同様な変化が認められていないことから被験物質投与との関連性はないと判断した。また、回復期間終了時において総たん白質の高値が 125mg/kg 投与群の雌雄に認められたが投与期間終了時には同様な変化が認められていないことから被験物質投与との関連性はないと判断した。

病理学検査では、血液化学検査の結果を反映し、肝臓の組織学検査において小葉中心性肝細胞肥大が 30mg/kg 投与群の雄と 125mg/kg 投与群の雌雄に、単細胞壊死が 125mg/kg 投与群の雌雄にみられ、相対重量の高値も認められた。また、腎臓の組織学検査において尿細管上皮細胞に好酸性小体の発現頻度の増加が 125mg/kg 投与群の雄にみられ、相対重量の高値も認められた。更に、精巣の相対重量の高値が 125mg/kg 投与群で認められ、組織学的には重量の高値を示唆する変化はみられなかったが、被験物質投与の影響が疑われた。これらの変化は回復期間終了時において、肝臓では絶対重量の高値が 125mg/kg 投与群の雌に相対重量の高値が 125mg/kg 投与群の雌雄にみられたものの、他の変化はいずれも消失あるいは軽減し、回復性が認められた。また、腎臓ではいずれの変化も消失あるいは軽減し、回復性が認められた。更に精巣では、絶対及び相対重量の高値が 125mg/kg 投与群で認められ、明らかな回復性は認められなかった。その他、脾臓重量の低値が 125mg/kg 投与群の雌で投与終了時に認められたが、組織学検査に変化が認められていないことから被験物質投与との関連性はないと判断した。上記の他、剖検所見あるいは器官重量にいくつかの変化が認められたが、それらの出現状況あるいは病理学的性状から、被験物質投与との関連性はないと判断した。

以上の結果から、本試験条件下における 2-エチルヘキシルビニルエーテルの無影響量は雄で 8mg/kg/day、雌で 30mg/kg/day と考えられた。なお、精巣重量の高値を除く他の変化については、いずれも休薬により回復性が認められた。

Table 1-1 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Clinical signs (Administration period)

Sex	Dose mg/kg	Findings	Day of administration														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Male	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	8	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	30	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	125	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	Female	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		8	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
			No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
30		No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
125		No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	

Table 1-2 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Clinical signs (Administration period)

Sex	Dose mg/kg	Findings	Day of administration														
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Male	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	8	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	30	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	125	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	Female	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		8	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
			No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
30		No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
125		No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	

Table 1-3 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Clinical signs (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg	Findings	Day of recovery													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	0	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	125	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Female	0	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	125	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Table 2-1 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 1)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	8	30	125	0	8	30	125
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-2 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 2)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	8	30	125	0	8	30	125
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-3 . A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 3)

Sex	Male				Female				
	Dose (mg/kg)	0	8	30	125	0	8	30	125
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture	Normal	12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion	None	12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior	None	12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-4

A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Detailed clinical signs : home cage observations (Week 4)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	8	30	125	0	8	30	125
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-5

A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Detailed clinical signs : home cage observations (Week 1 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
		Dose (mg/kg)	0	125	0
	No. of animals	6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-6 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 2 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female		
		Dose (mg/kg)	0	125	0	125
	No. of animals		6	6	6	6
Posture						
Normal			6	6	6	6
Convulsion						
None			6	6	6	6
Abnormal behavior						
None			6	6	6	6

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-7 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 1)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	8	30	125	0	8	30	125
		12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-8 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 2)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	8	30	125	0	8	30	125
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-9 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 3)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	8	30	125	0	8	30	125
		12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	5	6	12	12	6	6	11
Some resistance/avoidance		0	1	0	0	0	0	0	1
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	5	6	12	12	5	5	10
Slightly awkward		0	1	0	0	0	1	1	2

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-10 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 4)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	8	30	125	0	8	30	125
		12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		11	6	6	12	12	6	6	12
Some resistance/avoidance		1	0	0	0	0	0	0	0
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		11	6	6	12	12	5	6	12
Slightly awkward		1	0	0	0	0	1	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-11 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 1 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	125	0	125
	No. of animals	6	6	6	6
Ease of removal from cage					
Easy		6	5	6	6
Some resistance/avoidance		0	1	0	0
Fur condition					
Normal		6	6	6	6
Skin					
Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nose					
Absent		6	6	6	6
Exophthalmos					
Absent		6	6	6	6
Palpebral closure					
Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes					
Normal		6	6	6	6
Lacrimation					
Normal		6	6	6	6
Piloerection					
Absent		6	6	6	6
Pupil size					
Normal		6	6	6	6
Salivation					
None		6	6	6	6
Abnormal respiration					
Absent		6	6	6	6
Reactivity to handling					
Easy		6	5	6	6
Slightly awkward		0	1	0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-12 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 2 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	125	0	125
	No. of animals	6	6	6	6
Ease of removal from cage					
Easy		6	6	6	6
Fur condition					
Normal		6	6	6	6
Skin					
Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nose					
Absent		6	6	6	6
Exophthalmos					
Absent		6	6	6	6
Palpebral closure					
Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes					
Normal		6	6	6	6
Lacrimation					
Normal		6	6	6	6
Piloerection					
Absent		6	6	6	6
Pupil size					
Normal		6	6	6	6
Salivation					
None		6	6	6	6
Abnormal respiration					
Absent		6	6	6	6
Reactivity to handling					
Easy		6	6	6	6

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-13 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : open field observation (Week 1)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	8	30	125	0	8	30	125
Arousal Normal	12	6	6	12	12	6	6	12	
Convulsion None	12	6	6	12	12	6	6	12	
Abnormal behavior None	12	6	6	12	12	6	6	12	
Stereotypy None	12	6	6	12	12	6	6	12	
Gait Normal	12	6	6	12	12	6	6	12	
Posture Normal	12	6	6	12	12	6	6	12	
Grooming None	12	6	6	12	12	6	6	12	
Rearing count (Mean+S.D.)	2 _± 2	3 _± 2	5 _± 3	3 _± 2	6 _± 3	6 _± 1	5 _± 4	7 _± 2	
Defecation count (Mean+S.D.)	0 _± 0	0 _± 1	0 _± 0						
Urination None	10	4	6	10	12	6	5	12	
Small amount	2	2	0	2	0	0	1	0	

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-14 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : open field observation (Week 2)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	8	30	125	0	8	30	125
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		2	1	0	2	0	0	0	0
Normal		10	5	6	10	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		2± 2	4± 4	2± 2	3± 2	7± 3	7± 2	7± 4	8± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 1
Urination									
None		9	5	6	8	12	6	6	12
Small amount		3	1	0	3	0	0	0	0
Moderate amount		0	0	0	1	0	0	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-15 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : open field observation (Week 3)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	8	30	125	0	8	30	125
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		1	1	0	0	0	0	0	0
Normal		11	5	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		3± 3	4± 3	4± 2	3± 3	10± 3	11± 2	8± 3	11± 4
Defecation count (Mean±S.D.)		1± 1	1± 1	0± 0	1± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		9	5	6	9	12	6	5	12
Small amount		2	1	0	2	0	0	1	0
Moderate amount		1	0	0	0	0	0	0	0
Large/excessive amount		0	0	0	1	0	0	0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-16

A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : open field observation (Week 4)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	8	30	125	0	8	30	125
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior								a)	
None		12	6	6	12	12	6	5	12
Minor		0	0	0	0	0	0	1	0
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		1	1	2	2	0	0	0	0
Normal		11	5	4	10	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		4± 3	4± 3	4± 4	4± 3	10± 3	12± 3	10± 4	11± 3
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	1± 1	1± 1	1± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		6	5	6	11	12	6	6	12
Small amount		6	1	0	1	0	0	0	0

a): Jumping
No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-17

A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Detailed clinical signs : open field observation (Week 1 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	125	0	125
	No. of animals	6	6	6	6
Arousal					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6
Stereotypy					
None		6	6	6	6
Gait					
No/minimal location		1	1	0	0
Normal		5	5	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Grooming					
None		6	6	6	6
Rearing count (Mean+S.D.)		4 _± 3	5 _± 3	10 _± 1	10 _± 3
Defecation count (Mean+S.D.)		0 _± 0	0 _± 0	0 _± 0	0 _± 0
Urination					
None		6	5	6	6
Small amount		0	1	0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-18

A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 2 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	125	0	125
	No. of animals	6	6	6	6
Arousal					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6
Stereotypy					
None		6	6	6	6
Gait					
Normal		6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Grooming					
None		6	6	6	6
Rearing count (Mean±S.D.)		4± 2	6± 3	10± 2	10± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination					
None		3	5	5	6
Small amount		1	0	1	0
Moderate amount		2	1	0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-19 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Manipulative test (Week 4)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	8	30	125	0	8	30	125
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Auditory response									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Approach response									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Touch response									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Tail pinch response									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupillary reflex									
Pass, both		12	6	6	12	12	6	6	12
Aerial righting reflex									
(Total score: Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Landing foot splay (mm: Mean±S.D.)		73±20	67±24	68±14	80±14	69±20	66± 8	71± 9	56±16

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-20 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Manipulative test (Week 2 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	125	0	125
	No. of animals	6	6	6	6
Auditory response Normal		6	6	6	6
Approach response Normal		6	6	6	6
Touch response Normal		6	6	6	6
Tail pinch response Normal		6	6	6	6
Pupillary reflex Pass, both		6	6	6	6
Aerial righting reflex (Total score: Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Landing foot splay (mm: Mean±S.D.)		84±29	84±17	64±15	57±16

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-21

A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Grip strength (Week 4)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb g	Hind limb g
Male	0	No.	12	12
		Mean	806	483
		S.D.	110	125
	8	No.	6	6
		Mean	822	482
		S.D.	238	143
	30	No.	6	6
		Mean	909	584
		S.D.	145	35
	125	No.	12	12
		Mean	902	442
		S.D.	120	120
Female	0	No.	12	12
		Mean	796	571
		S.D.	134	138
	8	No.	6	6
		Mean	758	536
		S.D.	29	185
	30	No.	6	6
		Mean	702	578
		S.D.	158	152
	125	No.	12	12
		Mean	715	522
		S.D.	115	139

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-22 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Grip strength (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb g	Hind limb g
Male	0	No.	6	6
		Mean	1232	691
		S.D.	103	30
	125	No.	6	6
		Mean	1177	640
		S.D.	234	120
Female	0	No.	6	6
		Mean	932	570
		S.D.	97	117
	125	No.	6	6
		Mean	1043	646
		S.D.	98	98

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-23 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Motor activity (Week 4)

Sex	Dose mg/kg		Interval (minutes)						
			0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	Total(0-60)
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	393	309	271	190	151	158	1472
		S.D.	66	93	141	137	140	141	589
	8	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	368	322	183	140	138	74	1224
		S.D.	65	54	86	157	151	87	474
	30	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	429	370	324	291	169	68	1650
		S.D.	49	57	57	53	106	85	193
	125	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	396	357	310	253	236	213	1765
		S.D.	52	45	81	116	122	133	426
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	447	339	280	219	135	73	1493
		S.D.	66	78	102	108	125	96	364
	8	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	420	297	211	228	165	174	1495
		S.D.	54	104	149	143	93	112	547
	30	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	398	347	294	249	219	173	1679
		S.D.	47	75	48	123	129	91	319
	125	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	428	339	303	248	199	191*	1707
		S.D.	46	55	80	78	116	112D	363

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 2-24 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Motor activity (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg		Interval (minutes)						Total(0-60)
			0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	391	319	268	214	239	164	1595
		S.D.	20	44	85	57	70	145	254
	125	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	401	281	248	265	247	262	1704
		S.D.	39	78	57	62	110	77	222
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	370	306	264	248	180	94	1461
		S.D.	58	47	50	101	69	63	250
	125	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	360	335	294	244	212	210*	1654
		S.D.	21	40	70	101	110	88T	341

* : p<0.05 (Significant difference from control group)
T : Student's t-test

Table 3-1 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Body weight (Administration period)

Sex	Dose mg/kg		Day of administration								Gain 1-28	
			1	4	7	10	14	17	21	24		28
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	206	232	259	280	311	329	355	367	390	184
		S.D.	7	10	14	18	24	29	32	34	36	32
	8	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	206	228	251	270	295	307	329	337	351	145*
		S.D.	7	9	13	18	27	31	36	39	42	37D
	30	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	206	234	260	284	318	340	367	380	398	192
		S.D.	7	8	11	11	14	16	18	21	25	20
	125	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	205	229	254	274	304	321	345	355	372	167
		S.D.	7	8	11	14	19	22	25	28	31	26
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	165	174	186	196	212	215	228	237	246	81
		S.D.	8	8	8	10	12	16	18	17	18	13
	8	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	165	171	184	193	206	213	224	231	238	74
		S.D.	8	13	16	16	17	18	23	24	23	16
	30	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	162	172	183	193	208	208	222	237	243	81
		S.D.	9	11	14	13	12	8	9	14	15	12
	125	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	163	171	186	196	211	215	228	235	240	77
		S.D.	6	7	10	11	14	14	17	17	18	14

Unit : g

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 3-2 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Body weight (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Day of recovery					Gain 1-14
			1	3	7	10	14	
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	396	403	423	437	449	53
		S.D.	45	45	49	49	53	9
	125	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	387	395	412	426	441	54
		S.D.	35	36	37	38	38	6
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	238	248	253	260	264	26
		S.D.	16	17	18	20	22	7
	125	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	252	259	266	272	279	28
		S.D.	18	19	21	24	25	9

Unit : g

No significant difference between treated group and control group.

Table 4-1 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Food consumption (Administration period)

Sex	Dose mg/kg		Day of administration								
			1	4	7	10	14	17	21	24	28
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	24	23	24	25	24	23	24	21	23
		S.D.	1	2	2	2	3	3	3	2	2
	8	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	23	22	23	22*	22	21	22	19	20
		S.D.	2	2	2	2D	3	3	3	3	3
	30	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	23	23	23	24	25	24	24	22	24
		S.D.	2	2	2	2	2	2	2	2	3
	125	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	24	23	24	23	24	23	24	21	22
		S.D.	1	2	2	2	3	3	2	3	3
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	18	16	17	17	17	16	18	17	17
		S.D.	2	1	2	2	2	2	2	2	2
	8	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	19	16	17	16	16	16	17	17	18
		S.D.	2	3	2	2	2	2	3	3	4
	30	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	18	17	17	17	18	16	18	19	17
		S.D.	2	2	2	2	1	1	2	2	1
	125	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	18	16	17	17	17	17	18	17	17
		S.D.	3	1	2	2	2	2	2	2	2

Unit : g/rat/day

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 4-2 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Food consumption (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Day of recovery			
			3	7	10	14
Male	0	No.	6	6	6	6
		Mean	27	28	28	27
		S.D.	4	4	3	3
	125	No.	6	6	6	6
		Mean	27	28	28	28
		S.D.	2	3	3	3
Female	0	No.	6	6	6	6
		Mean	21	20	20	19
		S.D.	2	1	1	1
	125	No.	6	6	6	6
		Mean	23	22	21	21*
		S.D.	3	2	3	2T

Unit : g/rat/day

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 5-1 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 4)

Sex	Dose mg/kg	No.	pH									1) Protein					2) Ketone body					3) Glucose							
			5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++
Male	0	12	0	0	0	0	1	2	2	7	0	1	3	6	2	0	0	0	4	8	0	0	0	12	0	0	0	0	0
	8	6	0	0	0	1	1	2	1	1	0	0	0	5	1	0	0	1	4	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	30	6	0	0	0	0	0	1	3	2	0	0	0	6	0	0	0	1	2	3	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	125	12	0	0	1	5	0	2	3	1	0	1	2	6	3	0	0	1	2	9	0	0	0	12	0	0	0	0	0
Female	0	12	0	0	0	4	4	3	1	0	0	4	2	6	0	0	0	3	3	6	0	0	0	12	0	0	0	0	0
	8	6	0	0	0	2	1	1	2	0	0	1	2	2	1	0	0	1	2	3	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	30	6	0	0	1	4	1	0	0	0	0	1	2	2	0	1	0	1	1	4	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	125	12	0	0	1	10	0	1	0	0	0	4	2	4	2	0	0	3	3	6	0	0	0	12	0	0	0	0	0
1)	-	<10 mg/dL	+-	: 10 - 25 mg/dL	+	: 26 - 85 mg/dL	++	: 86 - 250 mg/dL	+++	: 251 - 600 mg/dL	++++	: >600 mg/dL																	
2)	-	<5 mg/dL	+-	: 5 - 7.5 mg/dL	+	: 7.6 - 30 mg/dL	++	: 31 - 70 mg/dL	+++	: 71 - 125 mg/dL	++++	: >125 mg/dL																	
3)	-	<30 mg/dL	+-	: 30 - 60 mg/dL	+	: 61 - 125 mg/dL	++	: 126 - 250 mg/dL	+++	: 251 - 750 mg/dL	++++	: >750 mg/dL																	

Table 5-2 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 4)

Sex	Dose mg/kg	No.	4) Occult blood				5) Bilirubin					6) Urobilinogen				7) Color				
			-	+-	+	++	+++	-	+	++	+++	++++	+-	+	++	+++	++++	LY	Y	DY
Male	0	12	12	0	0	0	0	11	1	0	0	0	10	1	1	0	0	0	12	0
	8	6	5	0	1	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0
	30	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0
	125	12	6	3	2	0	1	12	0	0	0	0	11	1	0	0	0	0	12	0
Female	0	12	12	0	0	0	0	10	2	0	0	0	8	4	0	0	0	0	12	0
	8	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	6	0
	30	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0
	125	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	9	3	0	0	0	0	12	0

4) - : <0.03 mg/dL +- : 0.03 - 0.05 mg/dL + : 0.06 - 0.15 mg/dL ++ : 0.16 - 0.75 mg/dL +++ : >0.75 mg/dL
5) - : <0.5 mg/dL + : 0.5 - 1.5 mg/dL ++ : 1.6 - 5.0 mg/dL +++ : 5.1 - 10.0 mg/dL ++++ : >10.0 mg/dL
6) +- : <2.0 mg/dL + : 2.0 - 3.5 mg/dL ++ : 3.6 - 7.0 mg/dL +++ : 7.1 - 12.0 mg/dL ++++ : >12.0 mg/dL
7) LY : Light yellow Y : Yellow DY : Dark yellow

Table 5-3 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 4)

Sex	Dose mg/kg	No.	URINE SEDIMENT																																
			RBC				WBC				SEC				SREC			Cast			CRYSTALLIZATION														
			-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++					
Male	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	9	3	0	0	0	12	0	0	0	0
	8	6	6	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0
	30	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0
	125	12	11	1	0	0	0	11	1	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	11	1	0	0	0	12	0	0	0	0
Female	0	12	12	0	0	0	0	11	1	0	0	0	0	12	0	0	0	11	1	0	0	0	12	0	0	10	2	0	0	0	12	0	0	0	0
	8	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	4	2	0	0	0	6	0	0	0	0
	30	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	125	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	8	4	0	0	0	12	0	0	0	0

SEC : Squamous Epithelial Cell - : Negative
 SREC : Small Round Epithelial Cell +- : Slight
 PS : Phosphate Salts + : Mild
 CO : Calcium Oxalate ++ : Moderate
 +++ : Severe

Table 5-4 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Water intake and urinalysis (Week 4)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg
Male	0	12	Mean	31	7.7	2018
			S.D.	6	3.4	397
	8	6	Mean	30	6.4	2188
			S.D.	4	2.3	552
	30	6	Mean	38	8.3	1879
			S.D.	7	3.3	437
	125	12	Mean	34	6.7	2127
			S.D.	6	3.0	512
Female	0	12	Mean	30	5.3	1999
			S.D.	6	2.4	580
	8	6	Mean	35	5.7	2096
			S.D.	11	5.1	527
	30	6	Mean	34	4.8	2133
			S.D.	6	2.6	467
	125	12	Mean	35	4.7	2293
			S.D.	8	1.5	490

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 5-5 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.	pH									1) Protein					2) Ketone body					3) Glucose							
			5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++
Male	0	6	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	2	4	0	0	0	1	2	3	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	125	6	0	0	0	0	0	1	1	3	1	0	2	4	0	0	0	2	3	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Female	0	6	0	0	0	0	1	2	1	2	0	5	1	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	125	6	0	0	0	1	2	1	1	1	0	3	3	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
1)	-	:	<10 mg/dL	+- : 10 - 25 mg/dL			+ : 26 - 85 mg/dL			++ : 86 - 250 mg/dL			+++ : 251 - 600 mg/dL			++++ : >600 mg/dL													
2)	-	:	<5 mg/dL	+- : 5 - 7.5 mg/dL			+ : 7.6 - 30 mg/dL			++ : 31 - 70 mg/dL			+++ : 71 - 125 mg/dL			++++ : >125 mg/dL													
3)	-	:	<30 mg/dL	+- : 30 - 60 mg/dL			+ : 61 - 125 mg/dL			++ : 126 - 250 mg/dL			+++ : 251 - 750 mg/dL			++++ : >750 mg/dL													

Table 5-6 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.	4) Occult blood				5) Bilirubin					6) Urobilinogen				7) Color						
			-	+-	+	++	+++	-	+	++	+++	++++	+-	+	++	+++	++++	LY	Y	DY		
Male	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0	
	125	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6	0
Female	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6	0
	125	6	6	0	0	0	0	5	0	1	0	0	0	5	1	0	0	0	0	0	6	0

4) - : <0.03 mg/dL +- : 0.03 - 0.05 mg/dL + : 0.06 - 0.15 mg/dL ++ : 0.16 - 0.75 mg/dL +++ : >0.75 mg/dL
5) - : <0.5 mg/dL + : 0.5 - 1.5 mg/dL ++ : 1.6 - 5.0 mg/dL +++ : 5.1 - 10.0 mg/dL ++++ : >10.0 mg/dL
6) +- : <2.0 mg/dL + : 2.0 - 3.5 mg/dL ++ : 3.6 - 7.0 mg/dL +++ : 7.1 - 12.0 mg/dL ++++ : >12.0 mg/dL
7) LY : Light yellow Y : Yellow DY : Dark yellow

Table 5-7 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.	URINE SEDIMENT																																				
			RBC			WBC			SEC			SREC			Cast		CRYSTALLIZATION																						
			-	+-	+	++	+++	+	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++																
Male	0	6	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	3	3	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	125	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Female	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	125	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	3	3	0	0	0	0	6	0	0	0	0

SEC : Squamous Epithelial Cell - : Negative
 SREC : Small Round Epithelial Cell +- : Slight
 PS : Phosphate Salts + : Mild
 CO : Calcium Oxalate ++ : Moderate
 +++ : Severe

Table 5-8 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Water intake and urinalysis (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg
Male	0	6	Mean	37	14.6	1765
			S.D.	7	6.0	360
	125	6	Mean	39	12.3	1942
			S.D.	5	3.1	250
Female	0	6	Mean	30	7.7	2076
			S.D.	13	3.9	325
	125	6	Mean	31	6.8	2368
			S.D.	6	1.2	271

No significant difference between treated group and control group.

Table 6-1 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (Day 28)

Sex	Dose mg/kg	No.		RBC	Hb	Ht	MCV	MCH	MCHC	Reticu- locyte	Plate- let	PT	APTT	Fibri- nogen
				X10 ⁴ /μL	g/dL	%	fL	pg	%	X10 ⁴ /μL	s	s	mg/dL	
Male	0	6	Mean	759	16.0	46	59.9	21.1	35.1	1.9	101.5	16.2	19.9	300
			S.D.	35	0.6	1	1.9	0.8	0.4	0.4	5.4	0.6	2.5	7
	8	6	Mean	773	16.1	46	59.8	20.8	34.8	2.0	96.1	17.9	21.9	296
			S.D.	20	0.4	1	1.0	0.4	0.5	0.1	4.1	2.8	3.0	31
	30	6	Mean	749	15.9	45	60.4	21.3	35.3	2.2	95.3	15.8	20.3	294
			S.D.	50	0.4	1	2.9	1.0	0.3	0.4	9.1	0.9	3.0	19
	125	6	Mean	771	16.2	46	59.8	21.0	35.2	2.1	90.5	17.1	19.7	308
			S.D.	20	0.7	2	1.9	0.6	0.5	0.4	12.7	1.2	1.8	24
Female	0	6	Mean	733	15.5	44	59.9	21.2	35.5	2.1	106.9	14.7	17.6	253
			S.D.	50	1.0	3	1.2	0.4	0.3	0.6	10.9	0.6	4.2	32
	8	6	Mean	748	15.5	44	58.6	20.7	35.3	2.1	111.5	14.7	16.4	245
			S.D.	32	0.3	1	2.0	0.8	0.4	0.5	6.6	0.2	0.9	18
	30	6	Mean	743	15.6	44	59.3	21.1	35.5	2.5	106.5	14.6	17.3	256
			S.D.	33	0.4	2	1.3	0.7	0.6	0.4	4.9	0.7	0.8	27
	125	6	Mean	749	15.6	44	58.6	20.8	35.6	1.9	93.7	14.5	16.5	272
			S.D.	40	0.6	2	1.0	0.5	0.4	0.3	13.5	0.3	1.4	23

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 6-2 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (Day 28)

Sex	Dose mg/kg	No.		WBC	Differential leukocyte counts (%)						Erythroblast counts (/200 leukocyte)	
				$\times 10^2/\mu\text{L}$	Lymph.	Stab	Seg.	Eosino.	Baso.	Mono.	Others	
Male	0	6	Mean	112	86.2	0.3	12.6	0.2	0.0	0.8	0.0	0
			S.D.	22	4.8	0.3	4.5	0.3	0.0	0.5	0.0	0
	8	6	Mean	93	81.9	0.3	16.3	0.5	0.0	0.9	0.0	0
			S.D.	32	8.1	0.4	8.0	0.4	0.0	0.4	0.0	0
	30	6	Mean	103	83.4	0.3	14.6	0.5	0.0	1.2	0.0	0
			S.D.	16	4.2	0.3	4.4	0.4	0.0	0.6	0.0	0
	125	6	Mean	101	84.7	0.4	13.3	0.7	0.0	1.0	0.0	0
			S.D.	15	4.4	0.2	4.4	0.4	0.0	0.4	0.0	0
Female	0	6	Mean	104	84.4	0.5	14.1	0.3	0.0	0.7	0.0	0
			S.D.	29	6.8	0.4	6.5	0.4	0.0	0.6	0.0	0
	8	6	Mean	101	90.2	0.3	7.6	0.8	0.0	1.1	0.0	0
			S.D.	25	2.3	0.3	1.7	0.4	0.0	0.4	0.0	0
	30	6	Mean	97	86.3	0.5	12.0	0.0	0.0	1.3	0.0	0
			S.D.	31	3.9	0.3	4.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0
	125	6	Mean	78	85.0	0.3	12.4	0.7	0.0	1.6*	0.0	0
			S.D.	22	4.6	0.3	4.2	0.7	0.0	0.7D	0.0	0

* : $p < 0.05$ (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 6-3 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		RBC	Hb	Ht	MCV	MCH	MCHC	Reticu- locyte	Plate- let	PT	APTT	Fibri- nogen
				X10 ⁶ /μL	g/dL	%	fL	pg	%	%	X10 ⁴ /μL	s	s	mg/dL
Male	0	6	Mean	799	16.1	45	56.8	20.1	35.5	2.5	115.0	15.0	22.4	266
			S.D.	23	0.6	2	1.6	0.7	0.5	0.5	0.5	7.2	1.0	2.1
	125	6	Mean	813	16.6	47	57.2	20.4	35.6	1.9*	113.5	16.2	22.4	317
			S.D.	23	0.4	1	1.1	0.5	0.5	0.3T	14.9	1.2	2.8	51
Female	0	6	Mean	743	15.9	45	59.7	21.4	35.8	2.3	99.9	13.2	17.5	223
			S.D.	24	0.4	1	0.9	0.4	0.4	0.3	0.3	5.4	0.7	1.2
	125	6	Mean	723	15.2*	43**	58.8	21.0	35.7	2.3	108.8*	12.5	15.0*	215
			S.D.	15	0.3T	1T	1.5	0.7	0.4	0.4	7.4T	1.0	2.3T	17

* : p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)
T : Student's t-test

Table 6-4 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		WBC	Differential leukocyte counts (%)						Erythroblast counts	
				$\times 10^2/\mu\text{L}$	Lymph.	Stab	Seg.	Eosino.	Baso.	Mono.	Others	(/200 leukocyte)
Male	0	6	Mean	112	89.4	0.3	9.1	0.3	0.0	0.9	0.0	0
			S.D.	10	1.0	0.3	1.2	0.3	0.0	0.6	0.0	0
	125	6	Mean	125	89.9	0.2	8.5	0.6	0.0	0.8	0.0	0
			S.D.	12	5.0	0.3	4.5	0.7	0.0	0.3	0.0	0
Female	0	6	Mean	70	82.7	0.4	15.4	0.8	0.0	0.7	0.0	0
			S.D.	15	4.6	0.4	4.8	0.4	0.0	0.3	0.0	0
	125	6	Mean	65	83.3	0.5	15.1	0.6	0.0	0.6	0.0	0
			S.D.	15	6.7	0.3	6.3	0.7	0.0	0.4	0.0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 7-1 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Blood chemistry (Day 28)

Sex	Dose mg/kg	No.		AST (GOT) IU/L	ALT (GPT) IU/L	LDH IU/L	γ -GTP IU/L	AlP IU/L	T.cho mg/dL	TG mg/dL	PL mg/dL	T.bili- rubin mg/dL	Glucose mg/dL	BUN mg/dL	Crea- tinine mg/dL
Male	0	6	Mean	60	28	69	1	721	50	49	93	0.1	129	11	0.26
			S.D.	5	3	26	0	125	9	20	11	0.0	9	1	0.02
	8	6	Mean	59	26	54	1	803	52	50	99	0.1	129	11	0.27
			S.D.	7	3	13	0	155	13	18	16	0.0	12	1	0.03
	30	6	Mean	55	25	58	1	1035*	55	60	103	0.1	141	10	0.26
			S.D.	4	1	13	0	266D	5	20	5	0.0	12	2	0.02
	125	6	Mean	67	34	60	1	1542**	64*	37	112*	0.1	131	13	0.25
			S.D.	16	11	16	0	259D	5D	18	5D	0.0	9	2	0.03
Female	0	6	Mean	55	22	50	1	472	62	13	119	0.1	118	13	0.29
			S.D.	7	3	8	0	123	14	4	24	0.0	5	3	0.02
	8	6	Mean	65	24	52	1	505	50	11	96	0.1	104	14	0.32
			S.D.	5	2	9	0	46	14	6	18	0.0	18	2	0.03
	30	6	Mean	53	20	50	1	436	68	10	124	0.1	123	15	0.30
			S.D.	2	2	6	0	65	8	4	13	0.0	11	1	0.04
	125	6	Mean	59	21	58	1	661*	86*	15	152*	0.1	124	14	0.30
			S.D.	15	2	18	0	173D	18D	11	29D	0.0	17	3	0.05

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 7-2 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Blood chemistry (Day 28)

Sex	Dose mg/kg	No.		Na	K	Cl	Ca	P	TP	Albumin	A/G
				mmol/L	mmol/L	mmol/L	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	
Male	0	6	Mean	143	4.7	107	9.5	8.3	6.0	2.6	0.76
			S.D.	1	0.3	1	0.2	0.3	0.2	0.0	0.04
	8	6	Mean	143	4.7	108	9.5	8.1	6.0	2.6	0.79
			S.D.	2	0.1	1	0.3	0.5	0.2	0.1	0.04
	30	6	Mean	142	4.6	106	9.7	8.4	6.0	2.7	0.80
			S.D.	2	0.1	1	0.2	0.6	0.2	0.1	0.03
	125	6	Mean	143	4.8	107	9.7	8.4	6.0	2.7	0.81
			S.D.	2	0.2	2	0.1	0.6	0.2	0.1	0.01
Female	0	6	Mean	143	4.4	109	9.9	7.6	6.2	2.8	0.82
			S.D.	2	0.2	2	0.1	0.4	0.1	0.1	0.04
	8	6	Mean	143	4.7	109	9.8	8.4*	6.1	2.7	0.80
			S.D.	2	0.4	2	0.2	0.3D	0.2	0.1	0.02
	30	6	Mean	144	4.2	110	9.7	7.8	6.3	2.8	0.82
			S.D.	1	0.2	1	0.1	0.7	0.2	0.1	0.04
	125	6	Mean	142	4.4	108	10.0	7.2	6.7	3.0	0.81
			S.D.	1	0.4	2	0.4	0.5	0.5	0.3	0.03

* : p<0.05 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 7-3 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Blood chemistry (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		AST (GOT) IU/L	ALT (GPT) IU/L	LDH IU/L	γ -GTP IU/L	AlP IU/L	T.cho mg/dL	TG mg/dL	PL mg/dL	T.bili- rubin mg/dL	Glucose mg/dL	BUN mg/dL	Crea- tinine mg/dL
Male	0	6	Mean	67	30	53	1	599	55	48	99	0.1	135	12	0.27
			S.D.	7	4	11	0	141	8	29	11	0.0	11	1	0.02
	125	6	Mean	59	27	51	1	614	60	57	108	0.1	141	13	0.26
			S.D.	7	2	11	0	161	9	23	15	0.0	15	1	0.03
Female	0	6	Mean	59	21	47	1	331	61	13	116	0.1	119	15	0.32
			S.D.	5	3	6	1	59	8	9	13	0.0	13	2	0.04
	125	6	Mean	57	24	47	1	262	71	15	132	0.1	122	14	0.31
			S.D.	8	5	11	0	52	11	8	16	0.0	18	2	0.03

No significant difference between treated group and control group.

Table 7-4 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Blood chemistry (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		Na	K	Cl	Ca	P	TP	Albumin	A/G
				mmol/L	mmol/L	mmol/L	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	
Male	0	6	Mean	144	4.7	107	9.4	7.3	6.1	2.6	0.76
			S.D.	0	0.3	1	0.2	0.3	0.2	0.1	0.05
	125	6	Mean	143	4.7	106	9.6	7.5	6.3*	2.7	0.76
			S.D.	1	0.4	1	0.2	0.4	0.2T	0.1	0.03
Female	0	6	Mean	143	4.4	111	9.7	5.9	6.3	2.8	0.79
			S.D.	1	0.3	1	0.2	0.7	0.3	0.1	0.03
	125	6	Mean	143	4.3	110	9.6	5.6	6.8*	2.9	0.76
			S.D.	1	0.3	2	0.2	0.8	0.2T	0.2	0.04

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 8-1 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Day 28)
 Male

Dose mg/kg		Body weight		Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)
		g	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)				
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	364	2.02	530	1.13	10.63	0.73	2.67	61
		S.D.	30	0.06	122	0.10	1.27	0.14	0.26	6
	8	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	332	1.98	414	1.10	9.58	0.56*	2.40	55
		S.D.	39	0.05	121	0.15	1.76	0.06D	0.33	8
	30	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	376	2.02	462	1.13	12.01	0.66	2.74	55
		S.D.	22	0.06	58	0.06	1.06	0.10	0.16	5
	125	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	341	1.99	446	1.09	11.93	0.64	2.74	55
		S.D.	23	0.06	41	0.11	0.92	0.06	0.24	8
Relative	0	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.56	145	0.31	2.92	0.20	0.74	17
		S.D.		0.06	27	0.03	0.15	0.03	0.04	2
	8	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.60	124	0.33	2.87	0.17	0.72	17
		S.D.		0.08	30	0.02	0.24	0.02	0.02	2
	30	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.54	123	0.30	3.19*	0.17	0.73	15
		S.D.		0.03	17	0.02	0.14D	0.02	0.04	2
	125	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.59	131	0.32	3.50**	0.19	0.80**	16
		S.D.		0.05	10	0.02	0.09D	0.01	0.03D	2

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)
 D : Dunnett's test

Table 8-2 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Day 28)
 Male

Dose mg/kg			Testis	Epididymis
			(R+L) g(g/100g BW)	(R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	3.06	841
		S.D.	0.22	67
	8	No.	6	6
		Mean	3.01	752
		S.D.	0.21	47
	30	No.	6	6
		Mean	3.16	796
		S.D.	0.32	64
	125	No.	6	6
		Mean	3.29	827
		S.D.	0.28	71
Relative	0	No.	6	6
		Mean	0.84	232
		S.D.	0.04	14
	8	No.	6	6
		Mean	0.92	229
		S.D.	0.12	31
	30	No.	6	6
		Mean	0.84	212
		S.D.	0.06	10
	125	No.	6	6
		Mean	0.97*	243
		S.D.	0.09D	22

* : p<0.05 (Significant difference from control group)
 D : Dunnett's test

Table 8-3 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Day 28)
 Female

Dose mg/kg		Body weight g	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)	
			g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	242	1.86	499	0.85	7.24	0.53	1.89	70
		S.D.	12	0.07	107	0.08	0.71	0.06	0.15	12
	8	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	226	1.97	467	0.80	6.45	0.53	1.71	70
		S.D.	20	0.10	141	0.08	0.61	0.09	0.13	3
	30	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	227	1.87	511	0.83	7.04	0.46	1.76	70
		S.D.	14	0.14	45	0.06	0.59	0.07	0.21	7
	125	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	223	1.90	445	0.80	7.88	0.41*	1.82	62
		S.D.	19	0.08	115	0.09	0.60	0.04D	0.10	6
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.77	207	0.35	2.99	0.22	0.78	29	
		S.D.	0.06	42	0.02	0.16	0.02	0.04	5	
	8	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.88*	205	0.35	2.85	0.23	0.75	31	
		S.D.	0.08D	57	0.02	0.05	0.02	0.05	2	
	30	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.83	225	0.37	3.10	0.20	0.77	31	
		S.D.	0.05	15	0.02	0.15	0.04	0.09	4	
	125	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.86	198	0.36	3.54**	0.18	0.82	28	
		S.D.	0.05	37	0.03	0.16D	0.02	0.04	4	

* : p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)
 D : Dunnett's test

Table 8-4 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Day 28)
 Female

	Dose mg/kg		Ovary	Uterus
			(R+L) mg(mg/100g BW)	mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	85.6	486
		S.D.	7.7	91
	8	No.	6	6
		Mean	92.3	419
		S.D.	8.1	112
	30	No.	6	6
		Mean	92.5	499
		S.D.	4.2	95
	125	No.	6	6
		Mean	80.5	470
		S.D.	19.0	70
Relative	0	No.	6	6
		Mean	35.4	200
		S.D.	3.0	31
	8	No.	6	6
		Mean	41.1	185
		S.D.	5.6	44
	30	No.	6	6
		Mean	40.8	221
		S.D.	2.9	48
	125	No.	6	6
		Mean	36.1	213
		S.D.	7.9	43

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8-5

A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (Week 2 of recovery)

Male

Dose mg/kg	Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)	
									g
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	
		Mean	419	2.04	426	1.28	11.19	0.67	2.81
		S.D.	51	0.12	27	0.10	1.70	0.12	0.34
	125	No.	6	6	6	6	6	6	
		Mean	410	2.07	415	1.39	12.47	0.69	3.02
		S.D.	37	0.08	87	0.20	1.53	0.11	0.29
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.49	103	0.31	2.67	0.16	0.67	16
		S.D.	0.06	10	0.03	0.14	0.03	0.06	2
	125	No.	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.51	101	0.34	3.04**	0.17	0.74	14
		S.D.	0.04	15	0.03	0.14T	0.01	0.04	2

** : p<0.01 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 8-6 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Week 2 of recovery)
 Male

Dose			Testis (R+L) g(g/100g BW)	Epididymis (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	2.98	1020
		S.D.	0.32	104
	125	No.	6	6
		Mean	3.45*	1080
		S.D.	0.22T	87
Relative	0	No.	6	6
		Mean	0.72	246
		S.D.	0.07	28
	125	No.	6	6
		Mean	0.85*	264
		S.D.	0.10T	17

* : $p < 0.05$ (Significant difference from control group)
 T : Student's t-test

Table 8-7 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Week 2 of recovery)
 Female

Dose mg/kg	Body weight g	Brain g(g/100g BW)	Thymus mg(mg/100g BW)	Heart g(g/100g BW)	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidney (R+L) g(g/100g BW)	Adrenal (R+L) mg(mg/100g BW)									
									No.	Mean	S.D.	No.	Mean	S.D.	No.	Mean	S.D.
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6								
		Mean	244	1.95	445	0.86	6.31	0.54	1.80	70							
		S.D.	18	0.06	101	0.04	0.65	0.14	0.15	5							
	125	No.	6	6	6	6	6	6	6								
		Mean	260	2.02	432	0.89	7.27*	0.54	2.04	75							
		S.D.	22	0.07	58	0.10	0.68T	0.07	0.26	7							
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6									
		Mean	0.80	183	0.35	2.58	0.22	0.74	29								
		S.D.	0.04	43	0.02	0.12	0.05	0.04	2								
	125	No.	6	6	6	6	6	6									
		Mean	0.78	167	0.34	2.79**	0.21	0.78	29								
		S.D.	0.08	24	0.01	0.08T	0.02	0.06	3								

* : p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)
 T : Student's t-test

Table 8-8 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Week 2 of recovery)
 Female

	Dose mg/kg		Ovary	Uterus
			(R+L) mg(mg/100g BW)	mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	86.4	642
		S.D.	6.5	163
	125	No.	6	6
		Mean	88.6	587
		S.D.	13.1	142
Relative	0	No.	6	6
		Mean	35.5	263
		S.D.	3.4	64
	125	No.	6	6
		Mean	34.1	226
		S.D.	3.9	51

No significant difference between treated group and control group.

Table 9-1. A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Gross pathological findings (Day 28)

Organs Findings	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M	M	M	M	F	F	F	F
		0 6	8 6	30 6	125 6	0 6	8 6	30 6	125 6
Epididymis									
Nodule		1	0	0	0	-	-	-	-
Kidney									
Dilatation, pelvic		0	0	1	0	0	0	0	0
Liver									
Area, small		0	0	1	0	0	0	0	0
Uterus									
Cyst		-	-	-	-	1	0	0	0

- : Not applicable

Table 9-2

A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Gross pathological findings (Week 2 of recovery)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 6	M 125 6	F 0 6	F 125 6
Findings					
Epididymis					
Small		1	0	-	-
Testis					
Small		1	0	-	-

- : Not applicable

Table 10-1 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Histopathological findings (Day 28)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 6	M 8 6	M 30 6	M 125 6	F 0 6	F 8 6	F 30 6	F 125 6
Findings									
Adrenal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Bone+Bone marrow, femoral									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Bone+Bone marrow, sternal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Cerebellum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Cerebrum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Epididymis									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		5	0	0	5	-	-	-	-
Granuloma, spermatic mild		1	0	0	1	-	-	-	-
mild		1	0	0	1	-	-	-	-
Eye									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	5	6	0	0	6
Fold/rosette, retinal mild		0	0	0	1	0	0	0	0
mild		0	0	0	1	0	0	0	0
Heart									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	5	6	0	0	6
Myocarditis, focal minimal		0	0	0	1	0	0	0	0
minimal		0	0	0	1	0	0	0	0
Intestine, duodenum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, jejunum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, ileum(Peyer's patch)									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, cecum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	5
Cell infiltration, mucosal minimal		0	0	0	0	0	0	0	1
minimal		0	0	0	0	0	0	0	1
Intestine, colon									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, rectum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6

- : Not applicable

Table 10-2

A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Histopathological findings (Day 28)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 6	M 8 6	M 30 6	M 125 6	F 0 6	F 8 6	F 30 6	F 125 6
Kidney									
Number examined		6	6	6	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	5	5	3	6	0	0	6
Dilatation, pelvic		0	0	1	0	0	0	0	0
mild		0	0	1	0	0	0	0	0
Dilatation, tubular, cystic		0	0	0	1	0	0	0	0
minimal		0	0	0	1	0	0	0	0
Regeneration, tubular		0	1	0	0	0	0	0	0
minimal		0	1	0	0	0	0	0	0
Eosinophilic body, tubular cell		0	0	0	3	0	0	0	0
minimal		0	0	0	2	0	0	0	0
mild		0	0	0	1	0	0	0	0
Liver									
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6
Not remarkable		5	5	2	0	3	2	2	1
Vacuolation, hepatocyte, periportal		1	1	3	1	3	4	4	2
minimal		1	1	0	1	2	1	1	0
mild		0	0	3	0	1	3	3	2
Necrosis, single cell, hepatocytic		0	0	0	4	0	0	0	2
minimal		0	0	0	4	0	0	0	2
Microgranuloma		0	0	0	1	1	0	0	4
minimal		0	0	0	1	1	0	0	4
Fibrosis, focal		0	0	1	1	0	0	0	0
minimal		0	0	1	1	0	0	0	0
mild		0	0	1	0	0	0	0	0
Hypertrophy, hepatocytic, central		0	0	1	6	0	0	0	3
minimal		0	0	1	2	0	0	0	2
mild		0	0	0	4	0	0	0	1
Lung(bronchus)									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		4	0	0	5	6	0	0	6
Mineralization, arterial wall		1	0	0	0	0	0	0	0
minimal		1	0	0	0	0	0	0	0
Pneumonia, focal		1	0	0	1	0	0	0	0
minimal		1	0	0	1	0	0	0	0
Metaplasia, osseous		1	0	0	0	0	0	0	0
minimal		1	0	0	0	0	0	0	0
Lymph node, mesenteric									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Lymph node, submandibular									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Muscle, femoral									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	5	0	0	6
Cell infiltration		0	0	0	0	1	0	0	0
minimal		0	0	0	0	1	0	0	0
Ovary									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6
Parathyroid									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6

- : Not applicable

Table 10-3 A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
Histopathological findings (Day 28)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 6	8 6	30 6	125 6	0 6	8 6	30 6	125 6
Pituitary									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Prostate									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		3	0	0	3	-	-	-	-
Cell infiltration, interstitial		3	0	0	3	-	-	-	-
minimal		3	0	0	3	-	-	-	-
Sciatic nerve									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Spinal cord, thoracic									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Spleen									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		5	0	0	5	4	0	0	6
Hematopoiesis, extramedullary		1	0	0	1	2	0	0	0
minimal		1	0	0	1	2	0	0	0
Stomach									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		5	0	0	6	6	0	0	6
Mineralization, mucosal		1	0	0	0	0	0	0	0
minimal		1	0	0	0	0	0	0	0
Testis									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		6	0	0	6	-	-	-	-
Thymus									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Thyroid									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		4	0	0	4	4	0	0	6
Ectopic thymus		0	0	0	1	0	0	0	0
minimal		0	0	0	1	0	0	0	0
Cyst, ultimobranchial		2	0	0	1	2	0	0	0
minimal		2	0	0	1	2	0	0	0
Trachea									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Urinary bladder									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Uterus									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	5	0	0	6
Cyst		-	-	-	-	1	0	0	0
mild		-	-	-	-	1	0	0	0

- : Not applicable

Table 10-4

A 28-day oral toxicity study of 2-Ethylhexyl vinyl ether in rats with a recovery period of 2 weeks
 Histopathological findings (Week 2 of recovery)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 6	M 125 6	F 0 6	F 125 6
Findings					
Epididymis					
Number examined		1	0	-	-
Hypospermia		1	0	-	-
mild		1	0	-	-
Kidney					
Number examined		6	6	0	0
Not remarkable		5	5	0	0
Eosinophilic body.tubular cell		1	1	0	0
minimal		1	1	0	0
Liver					
Number examined		6	6	6	6
Not remarkable		0	5	4	5
Vacuolation.hepatocyte.periportal		3	0	1	1
minimal		0	0	1	0
mild		3	0	0	1
Microgranuloma		3	0	1	0
minimal		3	0	1	0
Hypertrophy.hepatocytic.central		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Testis					
Number examined		1	0	-	-
Atrophy.seminiferous tubular		1	0	-	-
severe		1	0	-	-

- : Not applicable

1. 要約

当該試験条件下において、2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol には遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 株, TA98 株, TA1535 株および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2*uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

その結果、2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理では、1.31~5000 µg/プレート のいずれの用量においても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

また、用量設定試験 (追加試験)、本試験および本試験 (確認試験) により、試験結果の再現性が確認された。

2. 表題

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の細菌を用いる復帰突然変異試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討する。

4. 準拠したガイドラインおよび遵守した GLP

ガイドライン

- 新規化学物質等に係る試験の方法について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環保企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 471 (21st July 1997: Bacterial Reverse Mutation Test)

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17

5. 試験番号

9048 (115-199)

6. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

7. 試験委託者

〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

【本試験 (確認試験)】

被験物質液調製日 : 平成 17 年 9 月 6 日
被験物質処理日 : 平成 17 年 9 月 6 日
コロニー計数日 : 平成 17 年 9 月 8 日
実験終了日 : 平成 17 年 9 月 8 日
試験終了日 : 平成 18 年 9 月 11 日

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (日本名 : 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール)

12.2. ロット番号

K630V

12.3. 純度

99.8%

残り 0.2%不明

12.4. 提供元

丸善油化商事株式会社

12.5. 特性分析年月日

2005 年 3 月 16 日

12.6. 保存条件

気密, 室温 (1~30°C)

12.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (H-3 : 実測値 23.8~25.3°C, 2005 年 5 月 11 日~2005 年 5 月 26 日; 6 号館 2 階被験物質調製室内スーパードライ ch. 40 (C-3) : 実測値 17.8~26.6°C, 2005 年 5 月 26 日~2005 年 11 月 29 日)

12.8. 化学名

2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール

2,6-Ditert-butyl-4-ethylphenol

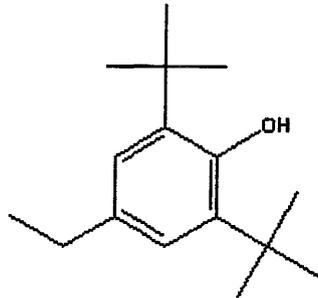
12.9. 別名

Phenol, 2,6-di-tert-butyl-4-ethyl-

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol

12.10. CAS No.
4130-42-1

12.11. 化学構造



12.12. 分子式
 $C_{16}H_{26}O$

12.13. 分子量
234.38

12.14. 物質の状態
形状：結晶性粉状
色：淡黄白色

12.15. 融点/沸点
融点：45.7°C/沸点：268.6°C

12.16. 引火点
132°C (クリーブランド開放式)

12.17. 溶解性
水に不溶
アルコール、トルエン、ヘプタン、クロロホルム、ガソリン、ベンゼンに可溶
DMSOに易溶 (>240 mg/mL：当施設の試験による)

12.18. 安定性
通常の取り扱い条件においては安定

12.19. 分配係数 (Octanol/Water)
Log Pow > 3.27

12.20. 取り扱い上の注意

適切な保護具（マスク・手袋等）を着用し，吸い込んだり，目，皮膚および衣類に触れたりしないようにする。

12.21. 急性毒性

経口投与における LD₅₀ は，雄ラットでは 4800 mg/kg，雌マウスでは 7450 mg/kg である。

12.22. 残余被験物質の処理

実験終了後，約 1 g を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し，残りは安定性分析のため，被験物質等管理責任者を介して被験物質提供元に返却した。分析の結果（2005 年 12 月 20 日付報告），被験物質が試験期間中安定であったことが確認された。

13. 試験材料および方法

13.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験において遺伝毒性ガイドラインでは試験菌株が指定されていることから、試験菌株として次の5種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2 <i>uvrA</i>	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は1983年9月9日にカリフォルニア大学(エイムス教授)から、また、大腸菌については1983年3月16日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。

2004年9月6日~同年9月9日および2005年8月30日~同年9月1日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。各菌株の菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO, GC用, 純度99.9%, Lot No. K30049278 および K31758278, Merck)を容量比80:7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー(MDF-U71V, 三洋電機バイオメディカ; 設定値:-80°C, 基準値:-60°C以下)に保存した。

13.2. 培地の調製

13.2.1. 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(2005年6月23日製造, Lot No. ANI510FU, オリエンタル酵母工業)を試験に使用した。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地 E を含む溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示した。

硫酸マグネシウム七水和物	0.2	g
クエン酸一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
D(+) グルコース	20	g
寒天(BA-30A, Lot No. 41201, 伊那食品工業)	12.0	g
精製水	1000	mL

13.2.2. トップアガー

塩化ナトリウム 0.5 w/v%および寒天 (Bacto-agar, Lot No. 3069265, BD Diagnostic Systems) 0.6 w/v%を含む水溶液をオートクレーブで滅菌した。ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No. 308C2055, 関東化学) および 0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 301C2275, 関東化学) 水溶液を寒天溶液 10 容量に対し 1 容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. 008D2026 【確認試験以外】、211D2047 【確認試験】、関東化学) 水溶液を同じく 1 容量加えた。

13.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2, Lot No. 298714, Oxoid) 培養液を 25 mL 分注し、これに融解した菌懸濁液を 50 μ L 接種した。フラスコをクールバスシェーカー (ML-10F, タイテック) に設置し、培養開始までの間、設定温度 4°C に静置した。その後、37°C の条件で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し、菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した。

ATPフォトメーター (ルミテスター-K-100, キッコーマン) を用い、試験菌株の生菌数が 1.0×10^9 /mL 以上であることを確認した。生菌数を次の表に示した。

試験	生菌数 ($\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	4.69	3.77	3.39	3.31	1.70
用量設定試験 (追加試験)	3.60	3.67	3.90	3.15	1.62
本試験	3.64	3.68	3.68	3.21	1.43
本試験 (確認試験)	3.01	2.41	2.98	2.09	1.23

13.4. S9 mix

製造後 6 カ月以内の S9 mix (Lot No. FSM-523 【確認試験以外】、FSM-526 【確認試験】、キッコーマン) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した。

13.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法等を次の表に示した。

	確認試験以外	確認試験
ロット番号	RAA-523	RAA-526
製造年月日	2005年6月17日(誘導物質投与開始後5日目)	2005年7月29日(誘導物質投与開始後5日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系	
性/週齢	雄/7週齢	雄/7週齢
体重	207~243 g	215~259 g
臓器	肝臓	
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)	
投与量および投与回数	PB: 30 mg/kg 1回(1日目) 60 mg/kg 3回(2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回(3日目)	
投与方法	腹腔内投与	
蛋白含量	26.05 mg/mL	25.58 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に不溶で DMSO に易溶 (>240 mg/mL) であり, DMSO と混合後, 4 時間以内では発熱, 発色, 発煙等の変化がなかった. したがって, 溶媒にはモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (GC 用, 純度 99.9%, Lot No. K31758278, Merck) を使用し, 調製後は 4 時間以内に使用した.

用量設定試験では, 使用直前に被験物質 400 mg を目盛付き試験管に精密に量り, 約 4 mL の DMSO (使用溶媒) を加え, 攪拌しながら溶解させた. さらに, DMSO を加えて 8 mL に定容し, 調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した. 4.5 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 3 mL を加えることにより, 20.0 mg/mL 溶液を調製した. 以下同様な希釈を順次行うことにより, 8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205 および 0.0819 mg/mL 溶

液を調製した。

用量設定試験（追加試験）では、使用直前に被験物質 200 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 2 mL の DMSO（使用溶媒）を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 4 mL に定容し、調製原液（50.0 mg/mL 溶液）を準備した。3 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 2 mL を加えることにより 20.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205, 0.0819, 0.0328 および 0.0131 mg/mL 溶液を調製した。

本試験および本試験（確認試験）では、使用直前に被験物質 400 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 4 mL の DMSO（使用溶媒）を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 8 mL に定容し、調製原液（50.0 mg/mL 溶液）を準備した。4 mL の DMSO にこの 50.0 mg/mL 調製原液 4 mL を加えることにより 25.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195 および 0.0977 mg/mL 溶液を調製した。

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性（溶媒）対照

被験物質の溶媒である DMSO を使用した。

13.6.2. 陽性対照

調製済み陽性対照物質溶液（保証期限：2006 年 9 月 1 日、オリエンタル酵母工業）を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー（設定値：-80°C，基準値：-60°C 以下）に保存した。陽性対照物質名および用量等を以下に示した。

AF-2 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN₃ アジ化ナトリウム

9-AA 9-アミノアクリジン塩酸塩

2-AA 2-アミノアントラセン

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	化合物名	陽性対照調製日	用量 (µg/プレート)	陽性対照溶液濃度 (µg/mL)	ロット番号
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2005.2.3	0.01	0.1	050203AF01
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2005.2.3	0.1	1.0	050203AF10
ネズミチフス菌 TA1535	NaN ₃	2005.2.2	0.5	5.0	050202N
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2005.2.3	80	800	050203A9
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	2005.2.3	0.01	0.1	050203AF01

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2005.2.2	1.0	10	050202A210
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2005.2.2	0.5	5.0	050202A205
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2005.2.2	2.0	20	050202A220
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2005.2.2	2.0	20	050202A220
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	2005.2.2	10	100	050202A2100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP」(労働省安全衛生部化学物質調査課編, 1991 年) に準じて設定した。

13.6.3. 無菌試験

被験物質液 (調製原液) ならびに S9 mix については無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 25 µL あるいは S9 mix 500 µL にトッパアガーを 2 mL 添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

13.7. 用量設定試験 (予備試験)

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートを最高用量とし、以下 2000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5 および 8.19 µg/プレートの計 8 用量を設定した。

13.7.2. 使用プレート数および識別方法

用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて試験菌株, S9 mix の有無および用量を明記することにより各プレートを識別した。

13.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に, 使用溶媒, 被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μ L を添加した。次いで代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の場合, 0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 500 μ L, 代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の場合, S9 mix を 500 μ L 分注した。さらに前培養した試験菌株懸濁液 100 μ L を加えた後, ウォーターバスシェーカー (MM-10, タイテック) を用いて 37°C の条件で 20 分間振盪 (120 回/分, プレインキュベーション) した。振盪終了後, トップアガー 2 mL を添加し, 内容物を混合した。その後, 混合液をプレート上に注ぎ一様に広げた。恒温器 (SSV-R11DA, 池田理化) を用い, 各プレートを 37°C の条件で 48 時間培養した。

13.7.4. 析出等の観察

各処理法において, 処理開始時およびコロニー数計測時に被験物質析出等の有無を肉眼で観察した。

13.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため, プレート上の試験菌株 (背景菌) の生育状態について実体顕微鏡 ($\times 40$) を用いて観察した。次いで, 復帰突然変異により生じたコロニー数を計数した。計測に際しては, コロニーアナライザー (CA-11, システムサイエンス) を用い, 面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。ただし, 析出物の影響により, -S9 処理および+S9 処理の 5000 μ g/プレートの用量ではコロニーアナライザーの使用が不適當であったため, 目視でコロニーを計数した。

13.8. 用量設定試験 (追加試験)

用量設定試験の結果において, 代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の TA98 株および TA1537 株についてのみ生育阻害が低用量までみられ, 他の菌株と乖離した結果が得られたことから, 追加試験を実施した。

13.8.1. 用量

用量設定試験の結果において, 代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の TA98 株および TA1537 株についてのみ生育阻害が低用量までみられたが, その他の菌株では 5000 μ g/プレートの用量においても生育阻害が認められなかった。したがって, 用量設定試験 (追加試験) における被験物質の用量として, 5000 μ g/プレートを最高用量に次表の 10 段階を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 mix》

菌株	用量 (µg/プレート)									
TA100	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
TA1535	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
WP2uvrA	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
TA98	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000
TA1537	1.31	3.28	8.19	20.5	51.2	128	320	800	2000	5000

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。

13.8.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.8.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.9. 本試験

13.9.1. 用量

用量設定試験および用量設定試験（追加試験）の結果、代謝活性化系非存在下（-S9 処理）の TA100 株、TA98 株および TA1537 株について生育阻害がみられたが、その他については 5000 µg/プレートの用量においても生育阻害が認められなかった。また、いずれの被験物質処理群においても変異原性は認められなかった。したがって、本試験では生育阻害が認められると考えられる用量あるいは 5000 µg/プレートを最高用量とし、次表に示す 6~7 用量（公比 2）を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)							
TA100	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	
TA1535	—	156	313	625	1250	2500	5000	
WP2uvrA	—	156	313	625	1250	2500	5000	
TA98	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	
TA1537	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625	

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)					
TA100	156	313	625	1250	2500	5000
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	156	313	625	1250	2500	5000
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000

13.9.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。

13.9.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.9.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。ただし、析出物の影響により、-S9 処理および+S9 処理の 2500 μg/プレート以上の用量ではコロニーアナライザーの使用が不適當であったため、目視でコロニーを計数した。

13.10. 本試験 (確認試験)

用量設定試験では、塩化ナトリウム濃度が規定値 (0.5 w/v%) と異なったトッブアガー (0.4 w/v%含有) を使用した上、さらに寒天の秤量値も生データ上で保証できない (風袋引きをした証拠がない) ことが判明したので、当該用量設定試験の結果を最終評価 (再現性確認) に採用することは出来ないと判断した。したがって、本試験との再現性をみる確認試験を実施した。

13.10.1. 用量

本試験の結果、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の TA100 株, TA98 株および TA1537 株について生育阻害がみられたが、その他については 5000 μg/プレートの用量においても生育阻害が認められなかった。また、変異原性は認められなかった。したがって、本試験 (確認試験) では、次表に示す 6~7 用量 (公比 2) を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	—	19.5	39.1	78.1	156	313	625
TA1535	—	156	313	625	1250	2500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	—	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	—	19.5	39.1	78.1	156	313	625
TA1537	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313	625

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	156	313	625	1250	2500	5000	
TA1535	156	313	625	1250	2500	5000	
WP2 <i>uvrA</i>	156	313	625	1250	2500	5000	
TA98	156	313	625	1250	2500	5000	
TA1537	156	313	625	1250	2500	5000	

13.10.2. 使用プレート数および識別方法

13.7.2.に記載した方法に準じた。

13.10.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

13.7.3.に記載した方法に準じた。

13.10.4. 析出等の観察

13.7.4.に記載した方法に準じた。

13.10.5. コロニー数計測

13.7.5.に記載した方法に準じた。

13.11. 試験成立条件

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、背景データから求めた基準値内であること。陽性対照のコロニー数は同時陰性対照値の2倍を超えること。以上の条件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

13.12. 結果の解析

復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

14. 試験結果

14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理の場合、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の TA98 株および TA1537 株についてのみ低用量まで認められ、生育阻害を示さない用量が 4 用量に満たなかった。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.1.1. 被験物質の析出等

処理開始時に、-S9 処理では 128 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白濁、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で白色の塊状、粉末状ならびに膜状の析出物が認められた。+S9 処理では 320 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色および透明油滴状の析出物および白濁が認められた。

コロニー数計測時には、-S9 処理および+S9 処理の両処理の 2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で透明油滴状、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で白色の塊状ならびに粉末状の析出物が認められた。

14.2. 用量設定試験 (追加試験)

結果を Figure 6~10 および Table 3 に示した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理の場合、いずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は TA100 株, TA98 株および TA1537 株の 320 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量についてのみ認められた。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.2.1. 被験物質の析出等

処理開始時に、128 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白濁、800 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色の粉末状ならびに膜状の析出物、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で白色塊状の析出物が認められた。プレインキュベーション終了後、800~2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で処理開始時に認められた白色粉末状が消失していた。

コロニー数計測時には、2000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で透明油滴状、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で白色の塊状ならびに粉末状の析出物が認められた。

14.3. 本試験

結果を Figure 11~15 および Table 4, 5 に示した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理の場合、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験

菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の TA100 株および TA98 株の 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1537 株の 156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量についてのみ認められた。

一方、陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.3.1. 被験物質の析出等

処理開始時に、-S9 処理では 156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白濁、625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色の粉末状ならびに膜状の析出物が認められた。+S9 処理では 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色および透明油滴状の析出物および白濁が認められた。プレインキュベーション終了後、-S9 処理では 2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色塊状の析出物が認められた。

コロニー数計測時においては、両処理の 1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で透明油滴状、2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色の塊状ならびに粉末状の析出物が認められた。

14.4. 本試験 (確認試験)

結果を Figure 16~20 および Table 6, 7 に示した。

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理の場合、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は-S9 処理の TA100 株および TA98 株の 625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA1537 株の 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量についてのみ認められた。

一方、陽性対照物質は、試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

14.4.1. 被験物質の析出等

処理開始時に、-S9 処理では 156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白濁、625 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色粉末状ならびに透明油滴状の析出物が認められた。+S9 処理では 156 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白濁、313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で透明油滴状の析出物が認められた。プレインキュベーション終了後、-S9 処理では 313 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で透明油滴状の、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色塊状の析出物が認められ、+S9 処理では 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色の塊状および粉末状の析出物が認められた。

コロニー数計測時においては、両処理の 1250 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で透明油滴状、2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で白色粉末状、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で白色塊状が認められた。

以上、用量設定試験 (追加試験)、本試験および本試験 (確認試験) により、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下の両処理法において再現性が確認された。

15. 考察および結論

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートあるいは生育阻害作用を示す用量まで検討した結果、2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群では、代謝活性化系非存在下および代謝活性化系存在下のいずれにおいても、陰性対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

用量設定試験（追加試験）、本試験および本試験（確認試験）によりこれら両処理法での試験結果の再現性が確認された。

これまでに2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はない。

類縁体である*p-tert*-ブチルフェノールについては、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性¹⁾、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陽性²⁾と報告されている。また、4-エチルフェノールについては、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性³⁾、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁴⁾と報告されている。

なお、陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ
当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 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。

16. 参考文献

- 1) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 4, 295-299, 1996.
- 2) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 4, 301-304, 1996.
- 3) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 8(1), 567-571, 2001.
- 4) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 8(1), 572-575, 2001.

17. 参考とした資料

- Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc Nat Acad Sci 1973; 70: 782-6.
- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens. a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc Nat Acad Sci USA. 1973; 70 (8): 2281-5.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res 1975; 31: 347-64.
- Yahagi T. [Screening methods using microbes for the environmental carcinogens (author's transl)]. [Article in Japanese]. Protein, Nucleic Acid and Enzyme 1975; 20: 16-27.
- Ministry of Labor, Industrial Safety and Health Department. [Test Guidelines and GLP for Mutagenicity Test using Microorganisms in the Safety and Health Law]. Tokyo; Japan Industrial Safety and Health Association; 1991.
- Ishidate M Jr editor. [The data book for mutagenicity assay using microorganisms]. [Article in Japanese]. Life-science Information Center Press; 1991.

Table 1. Summary data on dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	129 [130	124 ±	136 6]	14 [15	14 ±	18 2]	28 [23	21 ±	19 5]	24 [22	21 ±	21 2]	8 [9	12 ±	8 2]
	8.19	116 [117	120 ±	116 2]	14 [13	10 ±	14 2]	20 [22	25 ±	20 3]	15 [15	18 ±	13 3]	5 [6	7 ±	6 1]
	20.5	137 [127	123 ±	121 9]	7 [9	7 ±	13 3]	22 [24	28 ±	23 3]	16 [16	17 ±	14 2]	6 [7	5 ±	10 3]
	51.2	111 [115	115 ±	119 4]	16 [11	9 ±	9 4]	25 [21	20 ±	19 3]	15 [16	17 ±	16 1]	9 [8	6 ±	9 2]
	128	118 [126	130 ±	131 7]	15 [14	15 ±	12 2]	24 [24	26 ±	23 2]	18* [18	15* ±	20* 3]	6* [7	6* ±	8* 1]
	320	107 [107	106 ±	107 1]	11 [13	13 ±	15 2]	31 [29	23 ±	32 5]	21* [22	24* ±	20* 2]	12* [11	10* ±	10* 1]
	800	126 [118	129 ±	99 17]	15 [14	16 ±	12 2]	30 [27	22 ±	28 4]	20* [22	21* ±	24* 2]	7* [7	8* ±	5* 2]
	2000 +	109 [111	120 ±	104 8]	13 [11	10 ±	11 2]	20 [22	24 ±	22 2]	17* [20	22* ±	20* 3]	7* [7	8* ±	5* 2]
5000 +	101 [101	100 ±	103 2]	10 [8	7 ±	8 2]	23 [24	22 ±	26 2]	17* [15	16* ±	13* 2]	5* [3	2* ±	3* 2]	
Positive control		911 [897	894 ±	886 b) 13]	604 [582	557 ±	584 c) 24]	162 [156	158 ±	147 b) 8]	673 [665	674 ±	647 d) 15]	248 [259	247 ±	281 e) 19]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 µg/plate c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 µg/plate

d): AF-2, 0.1 µg/plate e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 µg/plate

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	129	136	132	14	11	13	24	28	29	31	27	28	24	26	23
		[132	\pm	4]	[13	\pm	2]	[27	\pm	3]	[29	\pm	2]	[24	\pm	2]
	8.19	131	129	145	14	19	16	28	23	22	28	24	26	18	18	14
		[135	\pm	9]	[16	\pm	3]	[24	\pm	3]	[26	\pm	2]	[17	\pm	2]
	20.5	131	139	141	16	14	14	27	31	26	33	38	34	16	16	15
		[137	\pm	5]	[15	\pm	1]	[28	\pm	3]	[35	\pm	3]	[16	\pm	1]
	51.2	120	127	128	13	12	10	24	25	21	21	30	28	13	16	19
		[125	\pm	4]	[12	\pm	2]	[23	\pm	2]	[26	\pm	5]	[16	\pm	3]
	128	112	105	106	9	7	8	23	28	21	28	32	26	14	15	16
	[108	\pm	4]	[8	\pm	1]	[24	\pm	4]	[29	\pm	3]	[15	\pm	1]	
320	106	108	105	10	8	8	24	23	23	29	24	26	17	14	17	
	[106	\pm	2]	[9	\pm	1]	[23	\pm	1]	[26	\pm	3]	[16	\pm	2]	
800	86	95	86	11	15	14	24	24	25	28	28	27	12	14	16	
	[89	\pm	5]	[13	\pm	2]	[24	\pm	1]	[28	\pm	1]	[14	\pm	2]	
2000 +	89	99	85	11	13	10	21	26	23	27	29	23	16	11	11	
	[91	\pm	7]	[11	\pm	2]	[23	\pm	3]	[26	\pm	3]	[13	\pm	3]	
5000 +	76	86	87	9	14	14	23	24	20	19	21	18	5	4	6	
	[83	\pm	6]	[12	\pm	3]	[22	\pm	2]	[19	\pm	2]	[5	\pm	1]	
Positive control		1013	1048	1101 b)	321	341	335 c)	498	510	494 d)	387	367	378 e)	180	179	196 c)
		[1054	\pm	44]	[332	\pm	10]	[501	\pm	8]	[377	\pm	10]	[185	\pm	10]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Summary data on dose-finding study of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (Additional study)
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	122	125	132	16	17	14	27	34	24	19	22	22	9	14	11
		[126	\pm	5]	[16	\pm	2]	[28	\pm	5]	[21	\pm	2]	[11	\pm	3]
	1.31	126	130	132	15	12	15	22	25	27	19	14	19	9	11	13
		[129	\pm	3]	[14	\pm	2]	[25	\pm	3]	[17	\pm	3]	[11	\pm	2]
	3.28	121	130	115	15	12	18	21	20	21	18	24	16	9	7	10
		[122	\pm	8]	[15	\pm	3]	[21	\pm	1]	[19	\pm	4]	[9	\pm	2]
	8.19	114	104	102	13	14	12	26	26	27	15	19	20	11	11	8
		[107	\pm	6]	[13	\pm	1]	[26	\pm	1]	[18	\pm	3]	[10	\pm	2]
20.5	113	113	123	17	18	14	27	24	28	12	12	19	12	9	8	
	[116	\pm	6]	[16	\pm	2]	[26	\pm	2]	[14	\pm	4]	[10	\pm	2]	
51.2	100	106	105	15	14	15	23	28	26	14	17	13	10	10	6	
	[104	\pm	3]	[15	\pm	1]	[26	\pm	3]	[15	\pm	2]	[9	\pm	2]	
128	106	113	103	12	16	8	18	21	20	17	20	18	12	11	9	
	[107	\pm	5]	[12	\pm	4]	[20	\pm	2]	[18	\pm	2]	[11	\pm	2]	
320	99*	95*	96*	10	13	12	15	20	20	16*	17*	21*	8*	12*	8*	
	[97	\pm	2]	[12	\pm	2]	[18	\pm	3]	[18	\pm	3]	[9	\pm	2]	

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

Table 3. Continued

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	800	99*	91*	102*	13	10	9	25	26	24	15*	14*	17*	9*	9*	12*
		[97	\pm	6]	[11	\pm	2]	[25	\pm	1]	[15	\pm	2]	[10	\pm	2]
	2000 +	102*	95*	103*	11	13	12	24	23	21	19*	14*	18*	8*	9*	6*
	[100	\pm	4]	[12	\pm	1]	[23	\pm	2]	[17	\pm	3]	[8	\pm	2]	
	5000 +	97*	98*	91*	9	12	10	18	25	20	10*	9*	13*	5*	5*	4*
	[95	\pm	4]	[10	\pm	2]	[21	\pm	4]	[11	\pm	2]	[5	\pm	1]	
Positive control		830	726	767 b)	516	592	553 c)	150	164	142 b)	679	700	649 d)	167	239	224 e)
		[774	\pm	52]	[554	\pm	38]	[152	\pm	11]	[676	\pm	26]	[210	\pm	38]

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 4. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1- -dimethylethyl)- -4-ethylphenol	0 a)	125	130	118	12	19	15	21	32	23	25	19	21	10	9	9
		[124	\pm	6]	[15	\pm	4]	[25	\pm	6]	[22	\pm	3]	[9	\pm	1]
	9.77	108	112	114							23	24	20	8	12	8
		[111	\pm	3]							[22	\pm	2]	[9	\pm	2]
	19.5	103	119	96							26	22	13	9	10	7
		[106	\pm	12]							[20	\pm	7]	[9	\pm	2]
	39.1	110	110	85							21	27	22	12	8	9
		[102	\pm	14]							[23	\pm	3]	[10	\pm	2]
78.1	111	102	97							25	22	30	9	8	8	
	[103	\pm	7]							[26	\pm	4]	[8	\pm	1]	
156	92	105	102	8	13	13	22	19	27	14	15	24	7*	7*	6*	
	[100	\pm	7]	[11	\pm	3]	[23	\pm	4]	[18	\pm	6]	[7	\pm	1]	
313	83	103	104	14	13	7	23	28	21	17	15	20	9*	5*	7*	
	[97	\pm	12]	[11	\pm	4]	[24	\pm	4]	[17	\pm	3]	[7	\pm	2]	
625	88*	103*	111*	8	15	8	28	25	22	23*	26*	22*	5*	7*	8*	
	[101	\pm	12]	[10	\pm	4]	[25	\pm	3]	[24	\pm	2]	[7	\pm	2]	

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

Table 4. Continued

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100		TA1535			WP2uvrA			TA98		TA1537				
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	1250 +	16	14	15	25	34	22									
		[15	\pm	1]	[27	\pm	6]									
	2500 +	8	11	9	21	12	23									
		[9	\pm	2]	[19	\pm	6]									
	5000 +	12	11	12	22	17	19									
		[12	\pm	1]	[19	\pm	3]									
Positive control		493	510	494 b)	565	570	592 c)	151	137	135 b)	713	673	658 d)	272	272	219 e)
		[499	\pm	10]	[576	\pm	14]	[141	\pm	9]	[681	\pm	28]	[254	\pm	31]

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 5. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	117	127	114	16	10	9	28	23	26	21	25	35	24	22	19
		[119	\pm	7]	[12	\pm	4]	[26	\pm	3]	[27	\pm	7]	[22	\pm	3]
	156	98	101	104	9	13	10	23	23	20	25	28	32	25	23	19
		[101	\pm	3]	[11	\pm	2]	[22	\pm	2]	[28	\pm	4]	[22	\pm	3]
	313	100	103	106	17	16	8	30	24	16	29	25	23	17	26	18
		[103	\pm	3]	[14	\pm	5]	[23	\pm	7]	[26	\pm	3]	[20	\pm	5]
	625	99	97	104	16	8	12	17	33	14	32	28	22	19	24	20
	[100	\pm	4]	[12	\pm	4]	[21	\pm	10]	[27	\pm	5]	[21	\pm	3]	
1250 +	87	94	80	16	12	16	18	17	24	27	35	26	13	11	17	
	[87	\pm	7]	[15	\pm	2]	[20	\pm	4]	[29	\pm	5]	[14	\pm	3]	
2500 +	90	88	83	12	10	6	21	18	15	23	19	23	9	8	6	
	[87	\pm	4]	[9	\pm	3]	[18	\pm	3]	[22	\pm	2]	[8	\pm	2]	
5000 +	86	73	85	7	6	10	18	16	20	23	21	20	9	8	6	
	[81	\pm	7]	[8	\pm	2]	[18	\pm	2]	[21	\pm	2]	[8	\pm	2]	
Positive control		939	842	954 b)	371	318	359 c)	482	559	561 d)	406	415	362 e)	120	150	142 c)
		[912	\pm	61]	[349	\pm	28]	[534	\pm	45]	[394	\pm	28]	[137	\pm	16]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 6. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
(Confirmative examination) [Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	121	119	110	16	12	12	19	19	17	29	22	34	14	15	14
		[117	\pm	6]	[13	\pm	2]	[18	\pm	1]	[28	\pm	6]	[14	\pm	1]
	9.77													15	13	14
														[14	\pm	1]
	19.5	124	102	118							22	30	29	8	16	17
		[115	\pm	11]							[27	\pm	4]	[14	\pm	5]
	39.1	122	102	116							22	26	22	16	11	16
	[113	\pm	10]							[23	\pm	2]	[14	\pm	3]	
78.1	120	114	108							26	27	22	16	10	16	
	[114	\pm	6]							[25	\pm	3]	[14	\pm	3]	
156	119	112	121	9	12	11	28	21	24	23	19	27	17	12	13	
	[117	\pm	5]	[11	\pm	2]	[24	\pm	4]	[23	\pm	4]	[14	\pm	3]	
313	100	107	106	8	11	12	24	19	21	27	26	21	14*	17*	8*	
	[104	\pm	4]	[10	\pm	2]	[21	\pm	3]	[25	\pm	3]	[13	\pm	5]	
625	116*	112*	113*	12	8	15	24	25	22	21*	22*	31*	11*	11*	14*	
	[114	\pm	2]	[12	\pm	4]	[24	\pm	2]	[25	\pm	6]	[12	\pm	2]	

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

Table 6. Continued

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]																			
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98		TA1537								
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	1250 +		14	9	11		22	15	16												
		[11	\pm	3]	[18	\pm	4]												
	2500 +		15	12	11		22	21	17												
		[13	\pm	2]	[20	\pm	3]												
	5000 +		6	9	9		20	20	17												
		[8	\pm	2]	[19	\pm	2]												
Positive control		677	699	722 b)	564	622	556 c)	155	156	141 b)	725	699	768 d)	173	221	167 e)					
		[699	\pm	23]	[581	\pm	36]	[151	\pm	8]	[731	\pm	35]	[187	\pm	30]

b): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 7. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
(Confirmative examination) [Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	117	123	119	17	10	8	22	28	19	26	40	28	34	27	24
		[120	\pm	3]	[12	\pm	5]	[23	\pm	5]	[31	\pm	8]	[28	\pm	5]
	156	96	101	106	7	8	12	20	23	23	36	27	27	32	29	34
		[101	\pm	5]	[9	\pm	3]	[22	\pm	2]	[30	\pm	5]	[32	\pm	3]
	313	84	84	74	10	12	7	16	16	24	28	24	36	23	23	21
		[81	\pm	6]	[10	\pm	3]	[19	\pm	5]	[29	\pm	6]	[22	\pm	1]
	625	108	89	96	12	17	13	20	17	21	31	35	40	23	16	19
	[98	\pm	10]	[14	\pm	3]	[19	\pm	2]	[35	\pm	5]	[19	\pm	4]	
1250 +	95	98	98	14	7	10	22	20	28	28	33	23	24	17	20	
	[97	\pm	2]	[10	\pm	4]	[23	\pm	4]	[28	\pm	5]	[20	\pm	4]	
2500 +	87	85	96	10	9	15	25	21	22	34	32	27	15	19	13	
	[89	\pm	6]	[11	\pm	3]	[23	\pm	2]	[31	\pm	4]	[16	\pm	3]	
5000 +	87	78	85	7	9	9	19	18	20	29	28	24	12	16	13	
	[83	\pm	5]	[8	\pm	1]	[19	\pm	1]	[27	\pm	3]	[14	\pm	2]	
Positive control		1027	1142	1047 b)	338	381	348 c)	558	499	524 d)	478	409	461 e)	162	169	200 c)
		[1072	\pm	61]	[356	\pm	23]	[527	\pm	30]	[449	\pm	36]	[177	\pm	20]

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

b): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

1. 要約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol は染色体異常を誘起する可能性があるもの（疑陽性）と判断した。

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株（CHL/IU）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に染色体異常試験の用量を設定した。短時間処理法-S9 処理では 35.0, 55.0 および 75.0 $\mu\text{g/mL}$ 、同+S9 処理では 25.0, 35.0, 45.0 および 55.0 $\mu\text{g/mL}$ の 3~4 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群の場合、短時間処理法-S9 処理では、明確な染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の誘発は認められなかった。しかしながら、+S9 処理では、染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の有意な増加が認められたが、その出現頻度が 10%未満と低いことから、明確な陽性反応と判断できないため確認試験を実施した。確認試験では、15.0, 25.0, 35.0, 45.0 および 55.0 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、再現性が得られたものの、狭い用量範囲での出現率の上昇であること、および出現頻度が 10%未満と低いことを考慮し、陽性反応と判断できなかった。さらに、類似化合物では連続処理法で明らかに倍数性細胞の誘発が認められていることから、連続処理法 24 時間処理群においても 35.0, 55.0 および 75.0 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施したが、同試験法においても、2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理による染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法の陽性対照物質であるマイトマイシン C (MMC) ならびに同+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) 処理群では、染色体構造異常の出現頻度が上昇しており、陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な増加を示した。

2. 表題

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討する。

4. 準拠したガイドラインおよび遵守した GLP

ガイドライン

- 新規化学物質等に係る試験の方法について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環保企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 473 (21st July 1997: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test)

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17

5. 試験番号

9049 (115-200)

6. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

7. 試験委託者

〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

Tel: 03-3595-2298 Fax: 03-3593-8913

実験終了日： 平成17年12月28日
試験終了日： 平成18年9月11日

13. 被験物質

13.1. 被験物質名

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (日本名：2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール)

13.2. ロット番号

K630V

13.3. 純度

99.8%

残り 0.2%不明

13.4. 提供元

丸善油化商事株式会社

13.5. 特性分析年月日

2005年3月16日

13.6. 保存条件

気密, 室温 (1~30°C)

13.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (H-3 : 実測値 23.8~25.3°C, 2005年5月11日~2005年5月26日 ; 6号館2階被験物質調製室内スーパードライ ch. 40 (C-3) : 実測値 17.8~26.6°C, 2005年5月26日~2005年11月29日)

13.8. 化学名

2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール

2,6-Ditert-butyl-4-ethylphenol

13.9. 別名

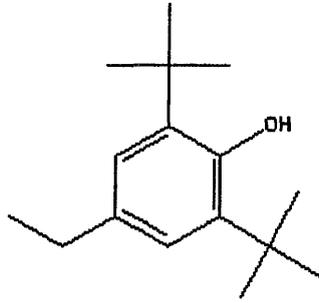
Phenol, 2,6-di-tert-butyl-4-ethyl-

2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol

13.10. CAS No.

4130-42-1

13.11. 化学構造



13.12. 分子式

C₁₆H₂₆O

13.13. 分子量

234.38

13.14. 物質の状態

形状：結晶性粉状

色：淡黄白色

13.15. 融点/沸点

融点：45.7°C/沸点：268.6°C

13.16. 引火点

132°C (クリーブランド開放式)

13.17. 溶解性

水に不溶

アルコール, トルエン, ヘプタン, クロロホルム, ガソリン, ベンゼンに可溶

DMSO に易溶 (> 240 mg/mL : 当施設の試験による)

13.18. 安定性

通常取り扱い条件においては安定

13.19. 分配係数 (Octanol/Water)

Log Pow > 3.27

13.20. 取り扱い上の注意

適切な保護具 (マスク・手袋等) を着用し, 吸い込んだり, 目, 皮膚および衣類に触れたりしないようにする.

13.21. 急性毒性

経口投与におけるLD₅₀は、雄ラットでは4800 mg/kg、雌マウスでは7450 mg/kgである。

13.22. 残余被験物質の処理

実験終了後、約1gを資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りは安定性分析のため、被験物質等管理責任者を介して被験物質提供元に返却した。分析の結果(2005年12月20日付報告)、被験物質が試験期間中安定であったことが確認された。

14. 試験材料および方法

14.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において遺伝毒性ガイドラインで指定されていることから、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU細胞)を使用した。CHL/IU細胞は1984年11月15日に国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受け、ジメチルスルホキシド(DMSO, GC用, 純度99.9%, Lot No. K26414578, Merck)を容量比で10%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては、凍結した細胞を融解した後、3~5日ごとに継代したものを使用した。

なお、細胞増殖抑制試験では継代数8の細胞(Lot No. CLC-001)を、染色体異常試験では継代数14の細胞(Lot No. CLC-001)を、染色体異常試験(追加試験)では継代数21の細胞(Lot No. CLC-001)、染色体異常試験(確認試験)では継代数3の細胞(Lot No. CLC-004)を用いた。

凍結ロット毎にマイコプラズマ汚染検査(陰性)、倍加時間の測定(Lot No. CLC-001 : 17.9時間, Lot No. CLC-004 : 15.2時間)、染色体数(モード数25本の細胞が, Lot No. CLC-001 : 82%, CLC-004 : 84%)の測定ならびに陰性対照および陽性対照における構造異常出現頻度の確認を実施し、異常のない細胞を試験に使用した。

14.2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(IWAKI : Lot No. 919084【細胞増殖抑制試験】, 519045【細胞増殖抑制試験以外】、旭テクノグラス)に非働化(56°C, 30分)済みの仔牛血清(Lot No. 511116【細胞増殖抑制試験】, 5423845D【細胞増殖抑制試験以外】、Invitrogen)を最終濃度で10%になるよう添加した。調製後の培養液は使用時まで冷暗所(15°C以下)に保存した。

14.3. 培養条件

CO₂インキュベーター(三洋電機バイオメディカ)を用い、CO₂濃度5%、37°Cの条件で細胞を培養した。

14.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. CAM-520 【確認試験以外】, CAM-526 【確認試験】, キッコーマン) を試験に使用した. 使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した.

14.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法を次に示す.

	確認試験以外	確認試験
ロット番号	RAA-520	RAA-526
製造年月日	2005 年 4 月 28 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)	2005 年 7 月 29 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系	
性/週齢	雄/7 週齢	
体重	193~237 g	215~259 g
臓器	肝臓	
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)	
投与量および投与回数	PB: 30 mg/kg 1 回 (1 日目) 60 mg/kg 3 回 (2~4 日目) BF: 80 mg/kg 1 回 (3 日目)	
投与方法	腹腔内投与	
蛋白含量	24.86 mg/mL	25.58 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の各内容物の量を以下に示す.

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol/0.1mL
KCl	33 μmol/0.1mL
G-6-P	5 μmol/0.1mL
NADP	4 μmol/0.1mL
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol/0.2mL
蒸留水	0.1 mL

14.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水に不溶で DMSO に易溶であり、DMSO と混合後、4 時間以内では発熱、発色、発煙等の変化がなかった。したがって、溶媒にはモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (GC 用、純度 99.9%、Lot No. K31758278, Merck) を使用し、調製後は 4 時間以内に処理を行った。

細胞増殖抑制試験では、使用直前に被験物質 1172 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 3 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液 (234.4 mg/mL 溶液) を準備した。1 mL の DMSO に対し、この 234.4 mg/mL 調製原液を 1 mL 加えることにより、117.2 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、58.6, 29.3, 14.7, 7.33, 3.66, 1.83, 0.916 および 0.458 mg/mL 溶液を調製した。

染色体異常試験では、使用直前に被験物質 85 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 6 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 10 mL に定容し、調製原液 (8.50 mg/mL 溶液) を準備した。この調製原液を以下に示す手順で、DMSO を用いて順次希釈し、各被験物質液を調製した。

被験物質液調製手順 (染色体異常試験)

設定濃度 (mg/mL)	被験物質液 採取元 (mg/mL)	採取量 (mL)	DMSO (mL)
7.50	8.50	3.0	0.4
6.50	7.50	2.6	0.4
5.50	6.50	2.2	0.4
4.50	5.50	1.8	0.4
3.50	4.50	1.4	0.4
2.50	3.50	1.0	0.4
1.50	2.50	0.6	0.4
0.50	1.50	0.2	0.4

追加試験では、使用直前に被験物質 75 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 6 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 10 mL に定容し、調製原液 (7.50 mg/mL 溶液) を準備した。この調製原液を次に示す手順で、DMSO を用いて順次希釈し、各被験物質液を調製した。

被験物質液調製手順 (追加試験)

設定濃度 (mg/mL)	被験物質液 採取元 (mg/mL)	採取量 (mL)	DMSO (mL)
6.50	7.50	2.6	0.4
5.50	6.50	2.2	0.4
4.50	5.50	1.8	0.4
3.50	4.50	1.4	0.4
2.50	3.50	1.0	0.4
1.50	2.50	0.6	0.4
0.50	1.50	0.2	0.4

確認試験では、使用直前に被験物質 65 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 6 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに DMSO を加えて 10 mL に定容し、調製原液 (6.50 mg/mL 溶液) を準備した。この調製原液を以下に示す手順で、DMSO を用いて順次希釈し、各被験物質液を調製した。

被験物質液調製手順 (確認試験)

設定濃度 (mg/mL)	被験物質液 採取元 (mg/mL)	採取量 (mL)	DMSO (mL)
5.50	6.50	2.2	0.4
4.50	5.50	1.8	0.4
3.50	4.50	1.4	0.4
2.50	3.50	1.0	0.4
1.50	2.50	0.6	0.4
0.50	1.50	0.2	0.4

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質の溶媒である DMSO を使用した。

14.6.2. 陽性対照 (短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理)

注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. K3G77, 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC, Lot No. 415ACF, 協和醗酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液, Lot No. 4C87N, 大塚製薬工場) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

用量は、短時間処理法で 0.1 µg/mL, 連続処理法で 0.05 µg/mL とした。

14.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

注射用水 (Lot No. K3G77 【確認試験以外】, K4D88 【確認試験】) 5 mL に溶解したシクロホスファミド (CP: Lot No. 4028, 塩野義製薬) を生理食塩液 (Lot No. 4C87N) を用いて希釈し, 1 mL ずつ分注した後, 凍結保存したものを試験に用いた.

用量は 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした.

14.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

14.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 10 mM 相当の 2344 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量とし, 以下 1172, 586, 293, 147, 73.3, 36.6, 18.3, 9.16 および 4.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 10 用量を細胞増殖抑制試験の用量とした.

14.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 用量当たり 2 ウェルを用いた.

油性インクを用いて, 試験番号, 処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した.

14.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート (細胞培養用マルチプレート 12F, 住友ベークライト) の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った. 6 時間培養を続けた後, 各ウェルの培養液を除去し, ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 064K2309, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した. 新鮮な培養液 500 μL を加え, さらに 18 時間培養を続けた.

14.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った.

その後の操作は 14.7.3. に記載した方法に準じた.

14.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行い, さらに 24 時間培養を続けた.

14.7.6. 処理量一覧

	陰性対照あるいは被験物質		
	培養液	S9 mix	溶媒/ 被験物質液
-S9 処理	600 μ L	-	6 μ L
+S9 処理	500 μ L	100 μ L	6 μ L
24 時間処理	600 μ L	-	6 μ L

14.7.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウエルから培養液を除き、10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用，Lot No. KLH9734，和光純薬工業）を加えて10分間細胞を固定した。次いで、0.1%クリスタル・バイオレット（Lot No. K31134240，Merck）水溶液で10分間細胞を染色した。各プレートを水洗した後、乾燥させた。各ウエルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を3 mL 加え、5分間放置した。各ウエルの溶出液を96ウエルのプレート（アッセイプレート，IWAKI）に各々300 μ L 分注し、マイクロプレートリーダー（モデル450，BIO・RAD）を用いて570 nm での吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（=細胞生存率）を各用量群について求めた。

さらに、全ての処理法において細胞増殖抑制が認められたため、プロビット法を用いて50%細胞増殖抑制濃度を算出した。算出には4.58~73.3 μ g/mL の5点（-S9 処理），18.3~73.3 μ g/mL の3点（+S9 処理）および9.16~73.3 μ g/mL の4点（24時間処理）を用いた。

14.8. 染色体異常試験，追加試験および確認試験

14.8.1. 用量

細胞増殖抑制試験の結果、全ての処理法において細胞毒性が認められ、50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ71.0（短時間処理法-S9 処理），34.3（短時間処理法+S9 処理）および52.0 μ g/mL（連続処理法24時間処理）と算出された。したがって、染色体異常試験では、細胞の増殖を50%以上抑制すると推定される用量，すなわち，-S9 処理で85.0 μ g/mL，+S9 処理で45.0 μ g/mL，24時間処理で65.0 μ g/mL をそれぞれ最高用量とし、次に示す5~6用量を設定した。

処理法	用量 (µg/mL)								
-S9 処理	—	—	—	<u>35.0</u>	45.0	<u>55.0</u>	65.0	<u>75.0</u>	85.0
+S9 処理	5.00	15.0	25.0	35.0	45.0	—	—	—	—
24 時間処理	—	—	25.0	35.0	45.0	55.0	65.0	—	—

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

染色体異常試験の短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理において、全ての用量で相対細胞増殖率が 50%以上を示し、細胞の増殖を 50%以上抑制する用量が得られなかった。したがって、+S9 処理および 24 時間処理について追加試験を実施した。追加試験では、以下に示す 6 用量を設定した。

処理法	用量 (µg/mL)								
+S9 処理	5.00	15.0	<u>25.0</u>	<u>35.0</u>	<u>45.0</u>	<u>55.0</u>	—	—	—
24 時間処理	—	—	25.0	<u>35.0</u>	45.0	<u>55.0</u>	65.0	<u>75.0</u>	—

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

追加試験の短時間処理法+S9 処理において、明確に陽性であると判断ができなかったため、+S9 処理について確認試験を実施した。確認試験では、以下に示す 7 用量を設定した。

処理法	用量 (µg/mL)							
+S9 処理	5.00	<u>15.0</u>	<u>25.0</u>	<u>35.0</u>	<u>45.0</u>	<u>55.0</u>	65.0	—

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

14.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

14.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート (細胞培養用シャーレ, 住友ベークライト) に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し, 3 日間培養した。培養終了後, 14.8.6. に記載する割合で溶媒, 被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後, 各プレートの培養液を除去し, ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 094K2331, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え, さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

14.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。

その後の操作は 14.8.3. に記載した方法に準じた。

14.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

14.8.6. 処理量一覧

	陰性対照あるいは被験物質			陽性対照		
	培養液	S9 mix	溶媒/ 被験物質液	培養液	S9 mix	陽性対照 物質液
-S9 処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.03 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

14.8.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.8.8. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に、最終濃度で $0.2 \mu\text{g/mL}$ となるようコルセミド溶液 (Lot No. 1252976, Invitrogen) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25% トリプシン溶液 (Lot No. 1233304 【染色体異常試験】、1263419 【追加試験および確認試験】、Invitrogen) を用いてプレートから細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え、37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) で細胞を固定した。固定液を 2 回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とした。細胞密度を適切な濃度に調整し、細胞濃度確認のため染色体標本を 1 枚作製した。その後、染色体メタフェーズ展開装置 (HANABI) を用いて、スライドガラス上に細胞浮遊液を 1 滴滴下し、染色体標本を 2 枚作製した。スライド標本を十分に乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8, Lot No. TP601474, Merck) を用いて希釈した 1.2% ギムザ染色液 (Lot No. OB408561 【染色体異常試験】、OB318388 【追加試験および確認試験】、Merck) で 12 分間染色した。ス

ライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

14.8.9. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に、陰性対照群、各被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、ATP フォトメーター（ルミテスターC-100LU、キッコーマン）を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理した細胞液を 50 μ L 添加し、攪拌してから約 20 分間静置した。測定用チューブにこの混合液を 100 μ L 分注し、ATP 測定用試薬キット（ルシフェール 250：キッコーマン）の発光試薬を 100 μ L 添加した後、相対発光量（Relative Light Unit：RLU）を測定した。陰性対照群における RLU に対する比（＝細胞生存率）を各用量群について求め、細胞増殖抑制度とした。

14.8.10. 評価対象

観察用量としては、14.8.9.における相対細胞増殖率が陰性対照群の 50%未満になる最も低い用量を最高用量とした。なお、+S9 処理および連続処理法については追加試験において作成した標本から評価対象を選択し、+S9 処理では高用量の細胞毒性領域での染色体異常誘発性を確認するため、連続する 4 用量を評価対象（観察用量）とした。さらに、確認試験では再現性を確認する事から、追加試験で観察した最高用量から連続する 5 用量を評価対象（観察用量）とした。-S9 処理および連続処理法においては連続する 3 用量では用量間隔が狭いため、間隔を空けて 3 用量を評価対象（観察用量）とした。

14.8.11. 染色体の観察

短時間処理法と連続処理法のそれぞれの標本を分けてコード化した。ただし、短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理の標本は、追加試験において作成した標本を採用した。また、確認試験の標本についてもコード化し、観察した。

各プレート当たり 100 個、すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下（ \times 600）で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ（gap）、染色分体切断（ctb）、染色分体切断（csb）、染色分体交換（cte）、染色体交換（cse）およびその他（oth）の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として、1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

14.9. 試験成立条件

陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は背景データから求めた基準値内であり、かつ、いずれも 5%未満であること。陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は上記の基準値内であり、かつ、10%以上であること。以上の条件を満たした場合に試

験は成立したと判断した。

14.10. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞については異常細胞数に含めないで判定した。

異常細胞の出現頻度を、Fisher の直接確率計算法（有意水準片側 2.5%）を用いて検定した。また、用量依存性については、Cochran Armitage の傾向検定（有意水準片側 2.5%）を用いて検定した。

陰性対照群と比較し、被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、用量に依存性が認められるか、あるいは再現性が確認された場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

15. 試験結果

15.1. 細胞増殖抑制試験

15.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示した.

50%細胞増殖抑制濃度は, 短時間処理法-S9 処理で 71.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 短時間処理法+S9 処理では 34.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 連続処理法 24 時間処理では 52.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった.

15.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時, 全ての処理の 147 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量において透明油滴状の析出物が認められ, さらに 586 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量では白色油滴状の析出物も認められた. 被験物質処理終了時, 全ての処理の 147 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量において透明油滴状の析出物が認められた.

15.2. 染色体異常試験

15.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 3, 4, Table 3 および Appendix 1 に示した.

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 35.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 2.0%, 55.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 1.5%, 75.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5%を示し, 陰性対照群 (1.0%) と比較し明確な増加は認められなかった. 倍数性細胞の出現頻度は, 35.0, 55.0 および 75.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.5%を示し, 陰性対照群 (0.0%) と同等であった. また, 用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され, 染色体異常評価群中の高用量である 75.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での細胞生存率は 49.0%であった.

一方, 陽性対照物質 MMC で処理した細胞では, 染色体構造異常が多数観察され, その出現頻度は 38.0% ($p \leq 0.025$) であった.

15.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 3, 4, Table 4 および Appendix 2 に示した.

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 2.0%, 35.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 5.5%, 45.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 8.5% ($p \leq 0.025$), 55.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 8.0% ($p \leq 0.025$) を示し, 陰性対照群 (1.5%) と比較し有意な増加 ($p \leq 0.025$) が認められた. 倍数性細胞の出現頻度は, 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 1.5%, 35.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 5.5% ($p \leq 0.025$), 45.0 および 55.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 5.0% ($p \leq 0.025$) を示し, 陰性対照群 (0.5%) と比較し有意な増加 ($p \leq 0.025$) が認められた. しかしながら, これらの出現頻度が 10%未満と低いことから, 明確な陽性反応と判断できなかった. また, 用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され, 染色体異常評価群中の高用量である 55.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での細胞生存率は 37.9%であつ

た。

一方、陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 38.5% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Figure 7, 8, Table 6 および Appendix 4 に示した。

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は、35.0 および 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%, 75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%を示し、陰性対照群 (1.0%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%, 75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%を示し、陰性対照群 (0.0%) と同等であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 27.0% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始および処理終了時、75.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において白色膜状の析出物が認められた。

15.3. 染色体異常試験 (確認試験)

15.3.1. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 5, 6, Table 5 および Appendix 3 に示した。

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群での染色体構造異常出現頻度は 15.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 45.0 $\mu\text{g/mL}$ で 6.0% ($p \leq 0.025$), 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 4.5% ($p \leq 0.025$) を示し、陰性対照群 (0.5%) と比較し有意な増加 ($p \leq 0.025$) が認められた。倍数性細胞の出現頻度は、15.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 35.0 $\mu\text{g/mL}$ で 7.0% ($p \leq 0.025$), 45.0 $\mu\text{g/mL}$ で 8.0% ($p \leq 0.025$), 55.0 $\mu\text{g/mL}$ で 7.0% ($p \leq 0.025$) を示し、陰性対照群 (0.0%) と比較し有意な増加 ($p \leq 0.025$) が認められた。しかしながら、染色体異常試験と再現性が得られたものの、狭い用量範囲での出現頻度の上昇であること、および出現頻度が 10%未満と低いことを考慮し、陽性反応と判断できなかった。また、用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 55.0 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 22.9%であった。

一方、陽性対照物質 CP で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 47.0% ($p \leq 0.025$) であった。

15.3.2. 析出等の観察

被験物質処理開始および処理終了時、析出あるいは培養液の色変化等の特筆すべき変化が認められなかった。

16. 考察および結論

2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の変異原性, すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため, 培養細胞 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した.

細胞増殖抑制試験結果を基に, 短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理では細胞毒性が顕著に認められる用量まで検討した.

その結果, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol 処理群の場合, 短時間処理法-S9 処理では, 明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった. しかしながら, +S9 処理では, 染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の有意な増加が認められたが, その出現頻度が 10%未満と低いことから, 明確な陽性反応と判断できないため確認試験を実施した.

確認試験の結果, 染色体異常試験との再現性が得られたものの, 狭い用量範囲での出現頻度の上昇であること, および出現頻度が 10%未満と低いことを考慮すると明確な陽性反応であると判断できなかつた. さらに, 類似化合物では連続処理法で明らかに倍数性細胞の誘発が認められている¹⁾ことから, 連続処理法の標本についても追加観察したが, 明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった.

なお, 陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも背景データ (Appendix 5) から求めた基準値内であり, 試験成立条件を満たしたことから, 当該試験は適切な条件でなされたと判断された.

これまでに 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はない.

類縁体である *p-tert*-ブチルフェノールについては, 細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性²⁾, CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陽性 (構造異常および倍数性細胞の出現頻度の上昇)¹⁾と報告されている. また, 4-エチルフェノールについては, 細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性³⁾, CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陽性 (構造異常の出現頻度の上昇)⁴⁾と報告されている. このことから, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenolの当該試験におけるCHL/IU細胞への作用は, これら類縁物質の反応性に類似しているが, 弱いものであると考えられた.

以上の試験結果から, 当該試験条件下において 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は疑陽性と判定した.

17. 参考文献

- 1) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 4, 301-304, 1996.
- 2) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 4, 295-299, 1996.
- 3) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 8(1), 567-571, 2001.
- 4) 化学物質毒性試験報告書 Vol. 8(1), 572-575, 2001. 労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質調査課 監修 “労働安全衛生法 有害性調査制度に基づく 既存化学物質 変異原性試験データ集”, 日本化学物質安全・情報センター, 1996

18. 参考とした資料

- Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - A screening for chemical carcinogens. *Mutat Res* 1977; 48: 337-354.
- Ishidate M. Chromosome aberration test *in vitro* for chemical mutagens in our environment. *The Tissue Culture* 1979; 5: 115-122.
- Evans HJ. In: Hollaender A editor. Cytological methods of detecting chemical mutagens. *Chemical Mutagens*. New York Plenum press 1976; 4: 1-25.
- Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Jr. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutat Res* 1979; 66: 277-290.
- Ishidate M. Chromosomal aberration test *in vitro*. Tokyo: REALIZE INC. 1987.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research [editorial]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 22: 269-275.

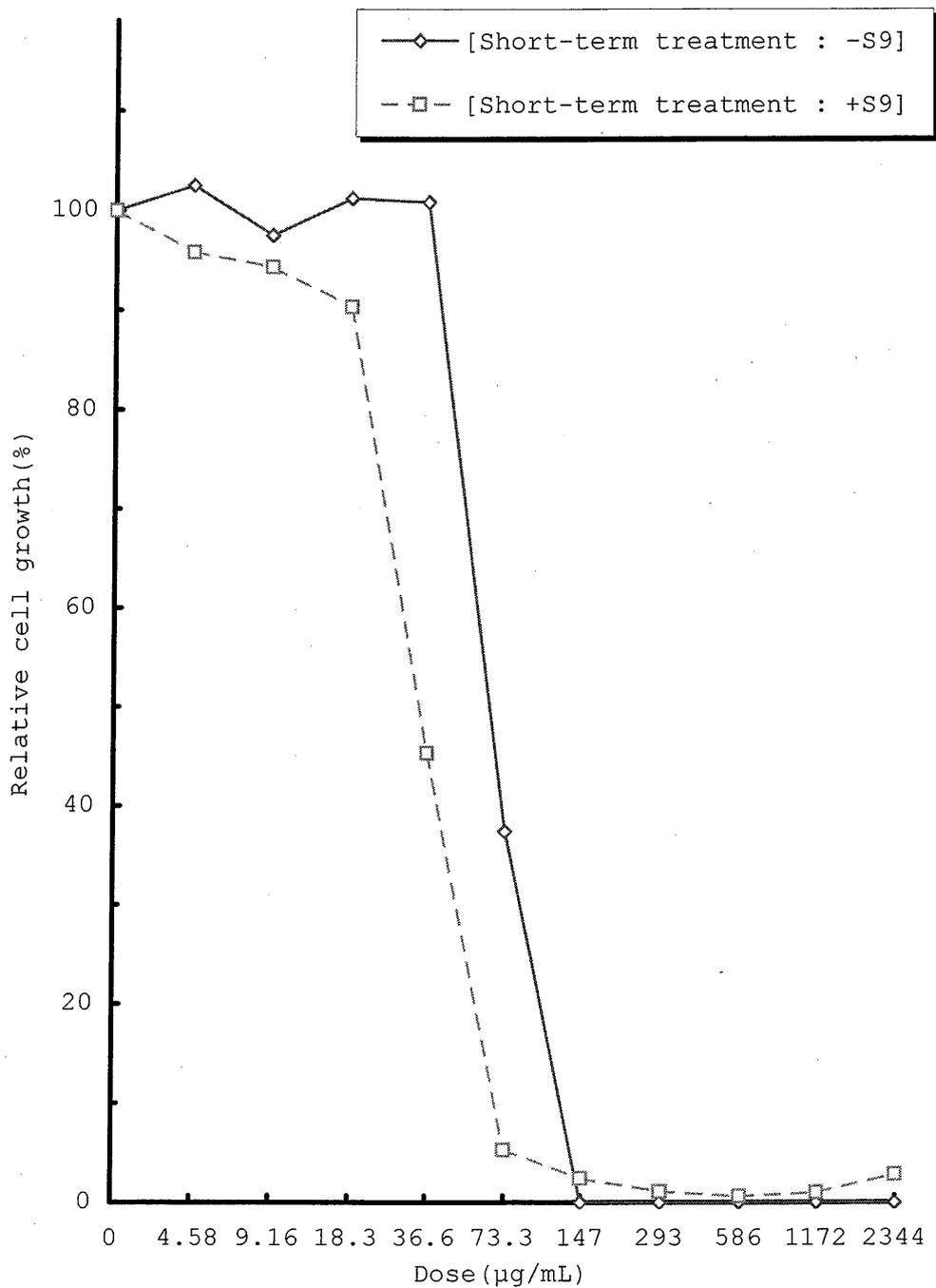


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Short-term treatment]

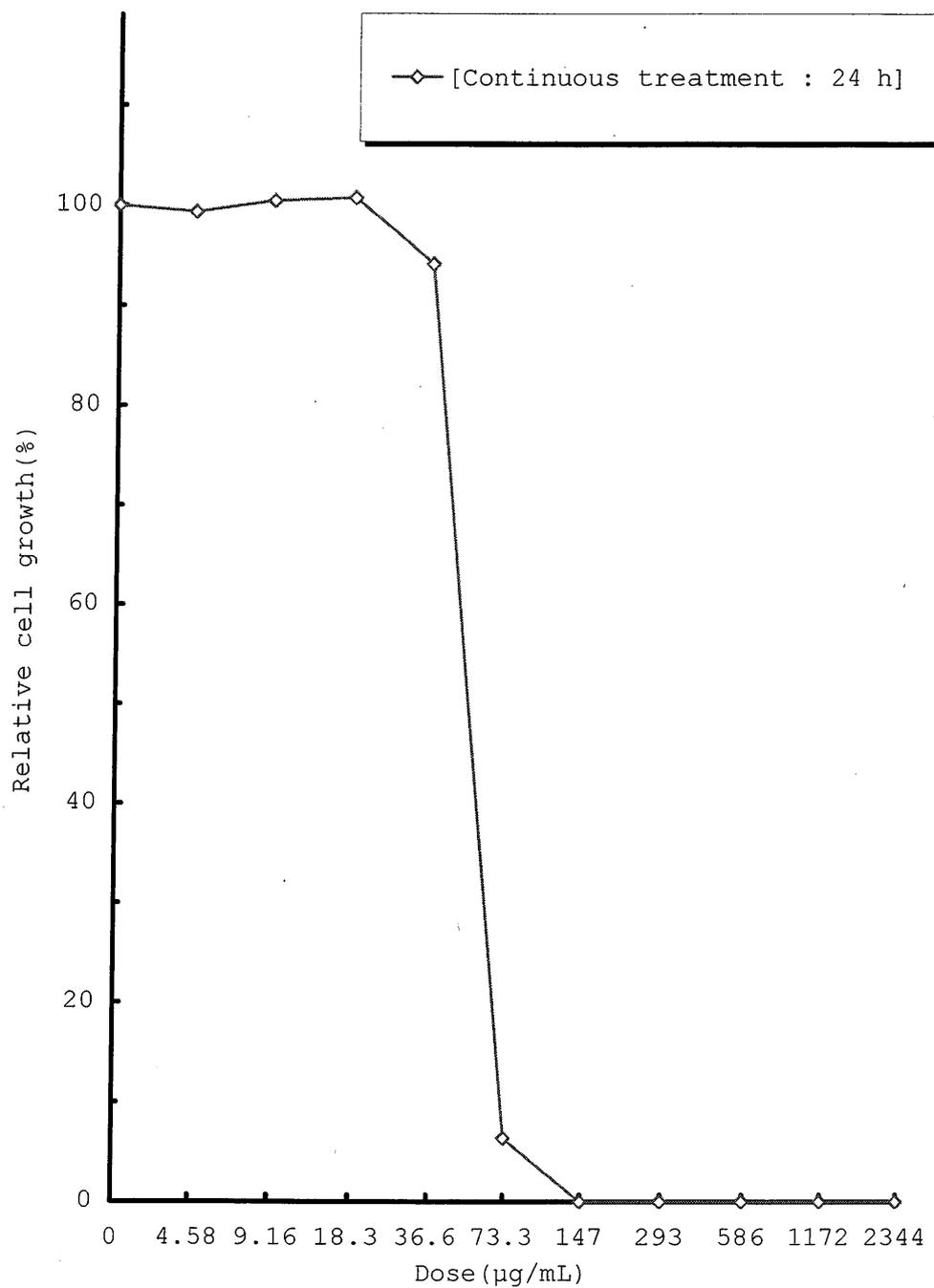


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol [Continuous treatment]

Table 1. Results of growth inhibition test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Short-term treatment]

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (µg/mL)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (µg/mL)	Survival (%)	[Mean]
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	100.0 100.0	[100.0]	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	4.58	101.3 103.8	[102.6]	4.58	98.7 92.9	[95.8]	
	9.16	97.7 97.2	[97.5]	9.16	96.3 92.3	[94.3]	
	18.3	101.2 101.1	[101.2]	18.3	93.0 87.7	[90.4]	
	36.6	105.4 96.2	[100.8]	36.6	41.2 49.3	[45.3]	
	73.3	38.6 36.1	[37.4]	73.3	5.3 5.2	[5.3]	
	147 d)	0.0 0.0	[0.0]	147 d)	1.3 3.4	[2.4]	
	293 d)	0.0 0.0	[0.0]	293 d)	0.7 1.4	[1.1]	
	586 d)	0.0 0.0	[0.0]	586 d)	0.8 0.3	[0.6]	
	1172 d)	0.0 0.0	[0.0]	1172 d)	0.0 2.0	[1.0]	
2344 d)	0.0 0.0	[0.0]	2344 d)	2.0 3.6	[2.8]		

50% Growth inhibition dose was as follows:

[Short-term treatment : -S9] ——— 71.0 (µg/mL)

[Short-term treatment : +S9] ——— 34.3 (µg/mL)

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 2. Results of growth inhibition test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Continuous treatment]

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (µg/mL)	Survival (%)	[Mean]
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	4.58	98.5 100.3	[99.4]
	9.16	98.9 102.1	[100.5]
	18.3	100.6 100.9	[100.8]
	36.6	103.8 84.5	[94.2]
	73.3	5.4 7.3	[6.4]
	147 d)	0.0 0.0	[0.0]
	293 d)	0.0 0.0	[0.0]
	586 d)	0.0 0.0	[0.0]
	1172 d)	0.0 0.0	[0.0]
2344 d)	0.0 0.0	[0.0]	

50% Growth inhibition dose was as follows:
[Continuous treatment : 24 h] ——— 52.0 (µg/mL)

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Short-term treatment : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse				oth
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	6	100.0	200	1	2	0	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	35.0	6	130.6	200	0	1	2	1	0	0	4 (2.0)	200	1 (0.5)
	55.0	6	120.0	200	0	1	2	0	0	0	3 (1.5)	200	1 (0.5)
	75.0 d)	6	49.0	200	1	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	85.0 d)	6	20.1	NA									
MMC b)	0.1	6	78.6	200	12	34	54	0	0	0	76 (38.0) *	200	2 (1.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

NA: Not analyzed

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Mitomycin C)

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	6	100.0	200	2	2	1	0	0	0	3 (1.5)	#	200	1 (0.5) #
	25.0	6	88.1	200	2	3	1	0	0	0	4 (2.0)		200	3 (1.5)
	35.0	6	89.0	200	2	5	7	0	0	0	11 (5.5)		200	11 (5.5) *
	45.0	6	50.2	200	4	10	10	1	0	0	17 (8.5)	*	200	10 (5.0) *
	55.0	6	37.9	200	3	6	14	0	0	0	16 (8.0)	*	200	10 (5.0) *
CP b)	12.5	6	118.9	200	5	27	64	0	0	0	77 (38.5)	*	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

:Significant difference from control (Chochran-Armitage trend test): $p \leq 0.025$

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
(Confirmative examination) [Short-term treatment : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse				oth
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	6	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5) #	200	0 (0.0) #
	15.0	6	81.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	25.0	6	71.9	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	2 (1.0)
	35.0	6	65.0	200	1	0	2	0	0	0	2 (1.0)	200	14 (7.0) *
	45.0	6	36.4	200	3	5	11	0	0	0	12 (6.0) *	200	16 (8.0) *
	55.0	6	22.9	200	0	3	8	0	0	0	9 (4.5) *	200	14 (7.0) *
	65.0	6	6.1	Toxic									
CP b)	12.5	6	119.1	200	4	18	86	0	1	0	94 (47.0) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break; cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

:Significant difference from control (Chochran-Armitage trend test): $p \leq 0.025$

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 6. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Continuous treatment : 24 h]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse				oth
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	24	100.0	200	2	1	1	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	35.0	24	102.5	200	0	2	1	0	0	0	3 (1.5)	200	1 (0.5)
	55.0	24	104.7	200	0	3	0	0	0	0	3 (1.5)	200	3 (1.5)
	75.0 d)	24	35.6	200	2	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
MMC b)	0.05	24	138.5	200	12	18	46	0	0	0	54 (27.0) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Mitomycin C)

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Appendix 1. Chromosome aberration test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
 [Short-term treatment : -S9]

Exp. No. 9049 (115-200)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	6	100.0	100	1	1	0	0	0	0	1.0	1.0	100	0.0	
		6	100.0	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0	
	35.0	6	129.3	100	0	1	1	0	0	0	0.0	2.0	100	0.0	
		6	131.8	100	0	0	1	1	0	0	0.0	2.0	100	1.0	
	55.0	6	110.3	100	0	1	1	0	0	0	0.0	2.0	100	1.0	
		6	129.7	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0	
	75.0 d)	6	46.4	100	1	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0	
		6	51.5	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0	
	85.0 d)	6	28.1	NA											
		6	12.1	NA											
	MMC b)	0.1	6	71.4	100	6	16	27	0	0	0	3.0	38.0	100	1.0
			6	85.8	100	6	18	27	0	0	0	2.0	38.0	100	1.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
 -gap: total number of cells with aberrations except gap
 a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
 b): Positive control (Mitomycin C)
 d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.
 NA: Not analyzed

Appendix 2. Chromosome aberration test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
 [Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 9049 (115-200)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	6	100.0	100	1	1	1	0	0	0	1.0	2.0	100	1.0	
		6	100.0	100	1	1	0	0	0	0	1.0	1.0	100	0.0	
	25.0	6	71.9	100	0	2	0	0	0	0	0.0	2.0	100	1.0	
		6	104.2	100	2	1	1	0	0	0	2.0	2.0	100	2.0	
	35.0	6	85.7	100	0	3	4	0	0	0	0.0	6.0	100	7.0	
		6	92.3	100	2	2	3	0	0	0	2.0	5.0	100	4.0	
	45.0	6	50.7	100	3	5	3	0	0	0	2.0	7.0	100	6.0	
		6	49.6	100	1	5	7	1	0	0	1.0	10.0	100	4.0	
	55.0	6	44.7	100	2	4	7	0	0	0	2.0	8.0	100	8.0	
		6	31.1	100	1	2	7	0	0	0	1.0	8.0	100	2.0	
	CP b)	12.5	6	137.3	100	2	7	29	0	0	0	1.0	34.0	100	0.0
			6	100.4	100	3	20	35	0	0	0	1.0	43.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
 -gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Appendix 3. Chromosome aberration test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
(Confirmative examination) [Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 9049 (115-200)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	6	100.0	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
		6	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0
	15.0	6	83.5	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	1.0
		6	78.4	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
	25.0	6	67.1	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
		6	76.6	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
	35.0	6	63.1	100	1	0	1	0	0	0	1.0	1.0	100	8.0
		6	66.9	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	6.0
	45.0	6	37.9	100	1	3	5	0	0	0	0.0	6.0	100	5.0
		6	34.9	100	2	2	6	0	0	0	1.0	6.0	100	11.0
	55.0	6	17.1	100	0	2	5	0	0	0	0.0	6.0	100	9.0
		6	28.6	100	0	1	3	0	0	0	0.0	3.0	100	5.0
	65.0	6	5.0	Toxic										
		6	7.2	Toxic										
CP b)	12.5	6	125.4	100	2	9	36	0	1	0	1.0	41.0	100	0.0
		6	112.8	100	2	9	50	0	0	0	1.0	53.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap
a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
b): Positive control (Cyclophosphamide)

Appendix 4. Chromosome aberration test of 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol
[Continuous treatment : 24 h]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
2,6-Bis(1,1 -dimethylethyl) -4-ethylphenol	0 a)	24	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0	
		24	100.0	100	1	1	1	0	0	0	1.0	2.0	100	0.0	
	35.0	24	95.6	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	1.0	
		24	109.4	100	0	1	1	0	0	0	0.0	2.0	100	0.0	
	55.0	24	109.2	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0	
		24	100.2	100	0	2	0	0	0	0	0.0	2.0	100	3.0	
	75.0 d)	24	29.6	100	2	0	0	0	0	0	2.0	0.0	100	0.0	
		24	41.6	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0	
	MMC b)	0.05	24	139.4	100	5	9	20	0	0	0	3.0	24.0	100	0.0
			24	137.6	100	7	9	26	0	0	0	4.0	30.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Mitomycin C)

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

B-5805

3. 試験実施概要

3.1 試験計画書

試験番号 : B-5805
試験表題 : 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールのラットを用いた
2週間回復性観察を含む28日間反復経口投与毒性試験

3.2 試験目的

被験物質をラットに28日間反復経口投与し、その影響を明らかにするとともに、その後2週間の回復期間を設けて障害の可逆性を調べることを目的とした。なお、本試験は株式会社ボゾリサーチセンター動物実験委員会の承認を受けている。

3.3 試験委託者

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3.4 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

3.5 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター

- 1) 動物試験及び病理標本作製
株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284
- 2) 病理標本観察
株式会社ボゾリサーチセンター 函南研究所
〒419-0101 静岡県田方郡函南町桑原三本松 1308-125

4. 要約

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD (SD)] を用いて、2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールの反復投与による毒性並びにその回復性を検討した。投与量は 0 (0.5w/v%メチルセルロース水溶液：対照群)、15、60 及び 250 mg/kg/day とし、28 日間反復強制経口投与した。1 群の動物数は対照群及び 250 mg/kg 投与群で雌雄各 12 匹、15 及び 60mg/kg 投与群で雌雄各 6 匹とした。このうち、対照群及び 250 mg/kg 投与群の雌雄各 6 例については、28 日間投与後 2 週間休薬させた。

1) 一般状態、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定、体重並びに摂餌量

投与及び回復期間を通じ、いずれの検査項目にも、被験物質投与の影響は認められなかった。

2) 尿検査（摂水量含む）

褐色尿が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。この変化は休薬により消失し、回復性が認められた。

3) 血液学検査

血小板数及びフィブリノーゲン量の高値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が 250mg/kg 投与群の雌雄に、プロトロンビン時間の延長が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。これらの変化は休薬により消失あるいは軽減し、いずれも回復性が認められた。

4) 血液化学検査

総コレステロール及び総たん白質の高値が 250mg/kg 投与群の雌雄に、カルシウムの高値が 250mg/kg 投与群の雄に、リン脂質の高値及び塩素の低値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。これらの変化は休薬により消失あるいは軽減し、いずれも回復性が認められた。

5) 病理学検査

病理組織学検査における肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が 60mg/kg 以上の投与群の雌雄に、甲状腺の濾胞上皮細胞肥大が 60mg/kg 投与群の雄と 250mg/kg 投与群の雌雄に認められ、肝臓の変化は重量増加を伴った。これらの変化は、休薬により消失し、回復性が認められた。

以上の結果から、本試験条件下における 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールの無影響量は雌雄とも 15mg/kg/日と推定された。なお、認められた変化は、休薬により消失あるいは軽減し、いずれも回復性を示した。

5. 緒言

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールをラットに 28 日間反復経口投与し、その影響を明らかにするとともに、2 週間休薬し、障害の回復性を調べた。その成績を報告する。なお、準拠する基準及びガイドラインなどは以下の通りである。

1) GLP

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」
(平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 17 年 4 月 1 日 最終改正)

2) 毒性試験ガイドライン

- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
(平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成 17 年 4 月 1 日 最終改正)
- 「OECD Guideline for Testing of Chemicals 407」
(OECD 理事会：1995 年 7 月 27 日)

3) 動物の福祉

- 「動物の愛護及び管理に関する法律」
(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 17 年 6 月 22 日最終改正)
- 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」
(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号)
- 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」
(日本学術会議 平成 18 年 6 月 1 日)

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

被験物質 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールは丸善石油化学株式会社より供給された。当試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、試験成績を添付資料1に示した。

名称	:	2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol
CAS 番号	:	4130-42-1
示性式	:	$C_{2}H_{5}C_{6}H_{2}(C_{4}H_{9})_{2}OH$
ロット番号	:	HAU01
純度	:	99.0%(GC)
入手量	:	500g
性状	:	微黄色結晶性粉末
融点	:	45°C
沸点	:	272°C
分子量	:	234.38
安定性	:	動物試験終了後に丸善石油化学株式会社に返却し、安定であることが確認された。
保存方法	:	気密容器に入れ、冷暗所に保存（冷蔵庫内、実測値：4~8°C）
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	マスク、手袋を着用する。 取扱い場所及び周囲の火気を厳禁し、高温物及び強酸化剤との接触を避ける。
返却	:	被験物質 5g を保存試料として保存した。残量はすべて供給者に返却した ^{注)} 。

注) : 試験計画書では被験物質の残量は廃棄することになっていたが、実際には廃棄せず、すべての被験物質（分析用に小分けした被験物質を含む）の残量を供給者に返却した。

6.1.2 媒体

名称	:	メチルセルロース（商品名；メトローズ SM-400）
ロット番号	:	411523
メーカー	:	信越化学工業株式会社
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所 第1研究棟被験物質調製室

6.2 投与液の調製

6.2.1 媒体の調製

- 調製方法 : メチルセルロース (メトローズ SM-400) を注射用水 (株式会社大塚製薬工場、ロット番号 ; 6A93) に溶解し、0.5w/v%メチルセルロース水溶液とした。
- 保存方法 : ガラス容器に入れ、冷所 (冷蔵庫内、実測値 ; 3~7°C) に保存した。なお、使用期限は調製後 10 日とした。

6.2.2 被験液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に採取し、0.5w/v%メチルセルロース水溶液に懸濁して規定量にメスアップした。被験液は週 1 回以上の頻度で調製し、調製後 8 日以内に使用した。

6.2.3 投与液の保存方法

投与液は 1 日の必要分ずつ褐色ガラス遮光瓶に分注し、使用時まで冷蔵庫内に保存した (実測温度 : 3~7°C)。

6.2.4 媒体中での安定性

0.5 及び 100 mg/mL 懸濁液は、褐色ガラス遮光瓶に入れ冷蔵庫内 8 日間保存後、室温 24 時間保存した時安定であることが株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で確認されている (試験番号 : A-1907、添付資料 2)。

6.2.5 調製物の濃度・均一性確認

投与第 1 週と第 4 週の投与に用いる各濃度の被験液について、その濃度・均一性を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で HPLC 法を用いて確認した。その結果、表示値に対する濃度の割合は 98.8~102.4% (許容範囲 : 表示値 \pm 10%)、均一性は 0.7~2.4% (許容値 : CV10%以内) であり、いずれも許容範囲内であった (添付資料 3 及び 4)。分析法の概略を次に示す。

1 濃度当たりの採取本数 (採取量)

- : 3 本 (上、中及び下層から採取)、1 本につき 10 mL
- 測定対象物質 : 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール

測定対象標準物質

- 名称 : 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール
- ロット番号 : HAU01
- 保存方法 : 気密容器に入れ、冷暗所 (冷蔵庫内、実測値 : 3~7°C) に保存

使用機器	:	HPLC システム (Waters Corporation)
HPLC	:	2690 セパレーションモジュール
検出器	:	2487 デュアルλ UV/VIS 検出器
データ処理装置	:	ミレニアム ³² クロマトグラフィーマネジャー

HPLC 条件

カラム	:	L-column ODS (5 μm、4.6 mm I.D.×150 mm、財団法人 化学物質評価 研究機構)
カラム温度	:	40°C (カラム恒温槽設定温度)
移動相	:	アセトニトリル/精製水 (9:1、v/v)
流速	:	1 mL/min
検出	:	UV (測定波長 280 nm)
試料注入量	:	20 μL
試料温度	:	10°C (オートサンプラー設定温度)

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験に使用される系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4 試験動物及び群分け

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD (SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] 雌雄各 52 匹^{注)} を 5 週齢で入手し、当所で 9 日間検疫・馴化飼育し、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (3 回) 及び詳細な一般状態の観察 (1 回) を行い、体重増加が順調で一般状態等に異常のみられない健康と思われる動物雌雄各 36 匹 (主群として雌雄各 24 匹、回復群として雌雄各 12 匹) を選び、6 週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で 200~223 g、雌で 136~158 g であった。

動物は、検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日 (投与開始の 2 日前) の体重に基づいて層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てる) により行った。また、余剰動物は投与開始日に試験系から除外した。

^{注)} : 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 50 匹であったが、実際には雌雄各 52 匹が納入された。

6.5 飼育条件

動物は温度 22~25°C、相対湿度 45~61%、換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間 (07:00~19:00) の動物飼育室 (201 号室) で、ブラケット式金属製網ケージ (W 250×D

350×H200mm：日本ケージ株式会社)に個別収容し、毎日1回の飼育室内の清掃を実施した。固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号:060606、060706、060808) 及び御殿場市営水道水を給水瓶により自由に摂取させた。

6.6 飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用全ロットについて財団法人日本食品分析センターで分析を行い、また、飲料水については東芝機械環境センター株式会社で水道法に準拠する水質検査を定期的に(年4回)行った。これらの分析成績書を入手し、試験成績に影響がないことを確認した後、写しを保存した。

6.7 動物の識別及びケージへの表示

動物は入所時に耳標を装着して個体識別した。入荷から群分け前までの間は試験番号、性別及び耳標番号を明記したケージラベルをつけた。群分け後は、性別及び用量ごと(対照群、低、中及び高用量群の順)に4桁の番号をつけた。この場合、1000の位は群、100の位は性(0番を雄、1番を雌)、10と1の位は個体番号とした。各飼育ケージには、群分け前まで使用したケージラベルの裏に用量(群)ごとに色分けしたラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び剖検予定日を明記した。ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定中は、観察者に対して投与の情報を制限するためケージラベルを裏返して試験番号、性別及び耳標番号のみを表示した。

6.8 投与経路、投与期間、投与方法及び投与回数とそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口投与を選択し、投与期間は28日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回(7回/週)とした。回復期間は障害の可逆性を検討するのに適当と考えられる2週間(14日間)とし、この間投与を行わなかった。投与容量は10 mL/kg体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した(08:04~11:46の間)。対照群の動物には媒体(0.5w/v%メチルセルロース水溶液)を同様に投与した。個体ごとの投与液量は最新の体重に基づいて算出した。

6.9 投与量及びその設定根拠並びに群構成

2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールの0(0.5w/v%メチルセルロース水溶液)、125、250、500及び1000 mg/kg/dayを1群雌雄各5匹のラットに14日間反復経口投与した結果¹⁾、1000mg/kg投与群の雄4例、雌3例に死亡動物が認められた。また、250 mg/kg以上の投与群(中用量群)の器官重量において肝臓重量の高値が雌雄に、腎臓重量の高値が雄に認められた。したがって、本試験における投与量は、28日間の反復経口投与により明らかな毒性変化が発現すると考えられる250 mg/kgを高用量とし、以下公比約4で除して、60及び15 mg/kgの3用量を設定した。これに対照群を加え、計4群を設けた。主群では雌雄各6匹、回復群では対照群及び高用量群で雌雄各6匹とし

た。群構成表を次の表 1 に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	10	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	15	1.5	10	雄	6	2001~2006	-	—
				雌	6	2101~2106	-	—
中用量群	60	6	10	雄	6	3001~3006	-	—
				雌	6	3101~3106	-	—
高用量群	250	25	10	雄	6	4001~4006	6	4007~4012
				雌	6	4101~4106	6	4107~4112

6.10 観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りである。

- 投与開始日 : 投与第 1 日 (day 1 of administration)
 投与 1 から投与 7 日 : 投与第 1 週 (week 1 of administration)
 回復開始日 (投与期間終了の翌日)
 : 回復第 1 日 (day 1 of recovery)
 回復 1 から回復 7 日 : 回復第 1 週 (week 1 of recovery)

6.10.1 一般状態の観察

投与期間中は毎日 3 回、投与前と投与直後及び投与約 2 時間後 (ただし、土曜及び休日は投与前と投与直後の 2 回)、回復期間中は毎日 1 回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。

6.10.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定

詳細な一般状態の観察は全個体について、投与開始前に 1 回、投与期間中及び回復期間中は毎週 1 回観察した。また、機能検査、握力及び自発運動量の測定は全個体について、投与第 4 週 (雄を投与第 26 日、雌を投与第 27 日) 及び回復第 2 週 (回復第 13 日) に行った。なお、観察及び検査は投与の情報を制限し、動物をランダムに配置した状態 (ブラインド) で行った。

なお、投与開始前 (検疫・馴化期間中) の詳細な一般状態の観察において異常は認められなかった。

6.10.2.1 詳細な一般状態の観察

- 1) ホームケージ内観察
 姿勢、痙攣、異常行動

2) 手に持つての観察

ケージからの取り出しやすさ、被毛・皮膚の状態、眼・鼻の分泌物、眼球（眼球突出、眼瞼閉鎖状態）、可視粘膜、自律神経機能（流涙、立毛、瞳孔径、流涎、異常呼吸）、ハンドリングに対する反応

3) オープンフィールド内観察

覚醒状態、痙攣、異常行動、常同行動、歩行、姿勢、身繕い、立ち上がり回数、排泄物（排糞数、排尿）

6.10.2.2 機能検査

聴覚反応、接近反応、接触反応、痛覚反応、瞳孔反射、空中正向反射、着地開脚幅

6.10.2.3 握力測定

CPU ゲージ MODEL-9502A（アイコーエンジニアリング株式会社）を用いて前肢及び後肢の握力を測定した。

6.10.2.4 自発運動量の測定

実験動物用自発運動センサーNS-AS01（株式会社ニューロサイエンス）を用いて自発運動量を測定した。測定は1時間とし、10分間隔及び0~60分の測定値を集計した。

6.10.3 体重測定

全個体について、投与1、4、7、10、14、17、21、24及び28日の投与前に、回復期間中は回復1、3、7、10及び14日に測定した。測定は08:19~10:20の間に行った。更に、全投与期間中及び回復期間中の体重増加量を算出した。剖検日には相対器官重量算出のため、前日から約16時間絶食させた後の体重を測定した。

6.10.4 摂餌量測定

全個体について、投与期間中は投与1、4、7、10、14、17、21、24及び28日の投与前に、回復期間中は回復3、7、10及び14日に測定した。測定は08:33~10:44の間に行った。なお、投与期間中の投与1日は前日からの1日量、それ以降は3~4日間の累積量、回復期間中の回復3日は回復1日からの2日間の累積量、それ以降は3~4日間の累積量を測定し、1匹1日量に換算表示した。

6.10.5 尿検査

投与第4週及び回復第2週に行った。

投与第4週（投与第22及び23日）は検査当日の投与後に全個体について、回復第2週（回復第11日及び12日）は回復群の全個体について、それぞれ採尿器をセットしたケージに收容し、絶食・自由摂水下で4時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の20時間尿を採取し、表2に記載した項目及び方法により検査した。また、摂水量は、採尿ケージに收容した状態で前日からの1日摂取量を、給水瓶を用いて測定した。

表2.尿検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 4時間尿についての検査		2) 20時間尿についての検査	
検査項目	測定方法	検査項目	測定方法
pH	オーシヨンスティックス-7EA 試験紙 ^{a)} (アークレイ株式会社)	尿量 (20時間量) ^{注)}	メスシリンダーを用いた 容量測定 (単位: mL)
たん白質		浸透圧	氷点降下法 ^{b)} (単位: mOsm/kg)
ケトン体			
グルコース			
潜血			
ビリルビン			
ウロビリノーゲン			
色調	肉眼観察		
沈渣	鏡検法		
尿量 (4時間量) ^{注)}	目盛付スピッツ管を用いた 容量測定 (単位: mL)		
使用測定機器			
a) : AUTION MINI™ AM-4290 (アークレイ株式会社)			
b) : 自動浸透圧測定装置 オートアンドスタット OM-6030 (アークレイ株式会社)			
備考			
注) : 4時間の尿量と20時間の尿量を合計して24時間の尿量 (mL/24h) を算出した。			

6.10.6 血液学検査

投与期間及び回復期間終了の翌日の計画剖検時に、前日から一夜（約 16~20 時間）絶食させた全個体についてエーテル麻酔下に開腹し、腹大動脈から EDTA-2K 加採血瓶（SB-41：シスメックス株式会社）に血液を採取した。得られた血液について表 3-1) に記載した項目及び方法により検査した。また、3.8%クエン酸ナトリウム溶液加試験管（血液 9 容に対し 1 容の割合）に採取した試料を遠心分離（設定：約 3,000rpm、約 1,600×g、約 10 分間）し、得られた血漿について表 3-2) に記載した項目及び方法により検査した。

表 3.血液学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) EDTA-2K 加血液についての検査		
検査項目	測定方法	単 位
赤血球数	電気抵抗変化検出法 ^{c)}	10 ⁴ /μL
ヘモグロビン量	シアンメトヘモグロビン法 ^{c)}	g/dL
ヘマトクリット値	赤血球数及び平均赤血球容積から算出	%
平均赤血球容積	電気抵抗変化検出法 ^{c)}	fL
平均赤血球血色素量	赤血球数及びヘモグロビン量から算出	pg
平均赤血球血色素濃度	ヘモグロビン量及びヘマトクリット値から算出	%
網赤血球率	Brecher 法	%
血小板数	電気抵抗変化検出法 ^{c)}	10 ⁴ /μL
白血球数	電気抵抗変化検出法 ^{c)}	10 ² /μL
白血球百分率	May-Giemsa 染色による鏡検法	%
2) クエン酸ナトリウム加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単 位
プロトロンビン時間	クロット法 ^{d)}	s
活性化部分トロンボ プラスチン時間	クロット法 ^{d)}	s
フィブリノーゲン量	トロンボプラスチン法 ^{d)}	mg/dL
使用測定機器		
^{c)} : コールター全自動 8 項目血球アナライザー T890 (ベックマン・コールター株式会社)		
^{d)} : 血液凝固自動測定装置 ACL 100 (Instrumentation Laboratory)		

6.10.7 血液化学検査

血液学検査用試料と同時に採取した血液を凝固促進剤入り試験管（ベノジェクト II-オートセップ：テルモ株式会社）に取り、遠心分離（設定：約 3,000rpm、約 1,600×g、約 10 分間）し、得られた血清について表 4-1) に示す項目について検査した。また、ヘパリン加試験管（血液 1mL 当たり約 20 単位のヘパリン）に採取した血液を遠心分離（設定：約 3,000rpm、約 1,600×g、約 10 分間）し、得られた血漿について表 4-2) に示す項目について検査した。

表 4.血液化学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 分離した血清についての検査		
検査項目	測定方法	単位
AIP	Bessey-Lowry 法 ^{e)}	IU/L
総コレステロール	CEH-COD-POD 法 ^{e)}	mg/dL
トリグリセライド	LPL-GK-GPO-POD 法 ^{e)}	mg/dL
リン脂質	PLD-ChOD-POD 法 ^{e)}	mg/dL
総ビリルビン	ビリルビンオキシダーゼ法 ^{e)}	mg/dL
グルコース	グルコースデヒドロゲナーゼ法 ^{e)}	mg/dL
尿素窒素	Urease-LEDH 法 ^{e)}	mg/dL
クレアチニン	Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase-POD 法 ^{e)}	mg/dL
ナトリウム	イオン選択電極法 ^{e)}	mmol/L
カリウム	イオン選択電極法 ^{e)}	mmol/L
塩素	イオン選択電極法 ^{e)}	mmol/L
カルシウム	OCPC 法 ^{e)}	mg/dL
無機リン	モリブデン酸法 ^{e)}	mg/dL
総たん白質	Biuret 法 ^{e)}	g/dL
アルブミン	BCG 法 ^{e)}	g/dL
A/G 比	総たん白質及びアルブミンから算出	
2) ヘパリン加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単位
AST (GOT)	UV-rate 法 ^{e)}	IU/L
ALT (GPT)	UV-rate 法 ^{e)}	IU/L
LDH	UV-rate 法 ^{e)}	IU/L
γ-GTP	γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド法 ^{e)}	IU/L
使用測定機器		
^{e)} ：臨床化学自動分析装置 TBA-120FR 形（株式会社東芝）		

6.10.8 病理学検査

6.10.8.1 剖検

すべての計画剖検動物について、採血後腹大動脈切断により放血致死させ、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録した。

6.10.8.2 器官重量測定

すべての計画剖検動物について、次に示す器官の重量（絶対重量）を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重から体重 100g 当たりの相対重量を算出した。なお、

*印を付した両側性の器官については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

脳、副腎*、胸腺、脾臓、心臓、肝臓、腎臓*、精巣*、精巣上体*、卵巢*、子宮

6.10.8.3 病理組織学検査

すべての個体について次に示す器官・組織を採取し、リン酸緩衝 10%ホルマリン液で固定した。ただし、肺はリン酸緩衝 10%ホルマリン液を注入後、眼球及び視神経はリン酸緩衝液で調製した 3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン液で固定後、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後、リン酸緩衝 10%ホルマリン液で保存し、パラフィン包埋した。その後、切片としてヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、対照群及び高用量群（肉眼的異常部位については全群）について鏡検した。なお、被験物質投与の影響が疑われた雌雄の肝臓及び甲状腺については低及び中用量群並びに回復群の全個体についても鏡検した。また、雌の肝臓及び甲状腺については写真撮影を行った。

なお、*で示した両側性器官については両側を摘出したが、鏡検は片側のみ行った。

大脳、小脳、脊髄（胸部）、坐骨神経、眼球*、下垂体、甲状腺*、上皮小体*、副腎*、胸腺、脾臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、心臓、気管、肺（気管支を含む）、胃、十二指腸、空腸、回腸（パイエル板を含む）、盲腸、結腸、直腸、肝臓、腎臓*、膀胱、精巣*、精巣上体*、前立腺、卵巢*、子宮、胸骨（骨髄を含む）、大腿骨（骨髄を含む）及び大腿部骨格筋

他に、視神経、ハーダー腺、胸大動脈、舌、食道、顎下腺、舌下腺、膵臓、膈、精嚢、乳腺（鼠径部）、皮膚（鼠径部）、個体識別部位（耳介）及び喉頭を摘出して保存した。

6.11 統計解析

オープンフィールド内観察の定量的項目、機能検査の定量的項目、握力測定、自発運動量の測定、体重（体重増加量を含む）、摂餌量、摂水量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液化学検査及び器官重量データについて、対照群と各投与群との間で統計解析を行った。まず、Bartlett法により分散性の検定を行った（有意水準：両側 1%）。分散が等しい場合は Dunnett 法を用いて、非等分散の場合は Dunnett 型の mean rank test を用いて、対照群と各投与群との間で検定を行った（有意水準：両側 5 及び 1%）。なお、回復群については、F 検定により各群の分散の均一性の検定（有意水準：片側 5%）を行った。その結果、等分散性が認められた場合には対照群と被験物質投与群との平均値の差について Student の t 検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を、等分散性が認められなかった場合には Aspin-Welch の t 検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を行った。

また、詳細な一般状態の観察及び機能検査のスコア化したデータについては基本的に検査のグレードが 2 項目の時は χ^2 検定法、3 項以上は Mann-Whitney の U 検定等を用いて検定を実施した（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）。^{2) 3)}

7. 試験結果

7.1 一般状態の観察

成績を Table 1-1~1-3 に示した。

いずれの動物においても、投与及び回復期間を通じて異常はみられなかった。

7.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量

7.2.1 詳細な一般状態の観察

(1) ホームケージ内観察

成績を Table 2-1~2-6 に示した。

1) 投与期間

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、250mg/kg 投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

(2) 手に持ったの観察

成績を Table 2-7~2-12 に示した。

1) 投与期間

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、250mg/kg 投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

(3) オープンフィールド内観察

成績を Table 2-13~2-18 に示した。

1) 投与期間

投与第 2 週に立ち上がり回数の有意な低値と排糞数の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に、投与第 4 週に立ち上がり回数の有意な低値が 250mg/kg 投与群の雌に、排糞数の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、250mg/kg 投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 に示した。

1) 投与第 4 週

いずれの検査項目においても、異常はなく対照群とほぼ同様であり、有意差はみられなかった。

2) 回復第 2 週

着地開脚幅の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

7.2.3 握力測定

成績を Table 2-21、2-22 に示した。

1) 投与第 4 週

被験物質投与群の雌雄の握力は、対照群とほぼ同様な値を示し、有意差はみられなかった。

2) 回復第 2 週

250mg/kg 投与群の雌雄の握力は、対照群とほぼ同様な値を示し、有意差はみられなかった。

7.2.4 自発運動量の測定

成績を Fig. 1~4 及び Table 2-23、2-24 に示した。

1) 投与第 4 週

30~40 分の測定で有意な低値が 15 mg/kg 投与群の雄に認められた。

2) 回復第 2 週

250mg/kg 投与群の雌雄の自発運動量は対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかった。

7.3 体重

成績を Fig.5 及び Table 3-1、3-2 に示した。

1) 投与期間

被験物質投与群の雌雄の体重は、対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかった。

2) 回復期間

250mg/kg 投与群の雌雄の体重は、対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかった。

7.4 摂餌量

成績を Fig.6 及び Table 4-1、4-2 に示した。

1) 投与期間

投与 24 日の測定で有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

2) 回復期間

250mg/kg 投与群の雌雄の摂餌量は、対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかった。

7.5 尿検査(摂水量含む)

成績を Table 5-1~5-8 に示した。

1) 投与第4週

250mg/kg 投与群の雄で摂水量の有意な高値が認められた。更に、250mg/kg 投与群の雄では色調で褐色尿が 12 例中 9 例に認められた。

2) 回復第2週

浸透圧の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。

7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-4 に示した。

1) 投与期間終了時

血小板数とフィブリノーゲン量の有意な高値と活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が 250mg/kg 投与群の雌雄に、プロトロンビン時間の有意な延長が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

2) 回復期間終了時

赤血球数及びヘマトクリット値の有意な低値と血小板数の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 に示した。

1) 投与期間終了時

総コレステロール及び総たん白質の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雌雄に、カルシウムの有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に、AST 活性の有意な低値及びリン脂質の有意な高値並びに塩素の有意な低値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。

2) 回復期間終了時

総たん白質及びアルブミンの有意な低値が 250mg/kg 投与群の雄に、総コレステロールの有意な高値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。

7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 に示した。

1) 投与期間終了時

心臓 : 相対重量の有意な低値が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

肝臓 : 絶対重量の有意な高値が 60mg/kg 投与群の雌と

250mg/kg 投与群の雌雄に、相対重量の有意な高値が 60mg/kg 以上の投与群の雌雄に認められた。

2) 回復期間終了時

胸腺 : 絶対及び相対重量の有意な低値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。

7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 に示した。

1) 投与期間終了時

精巣 : 小型化が対照群と 15 及び 250mg/kg 投与群で各 1 例に認められた。

2) 回復期間終了時

腎臓 : 腎盂拡張が対照群の雄 1 例に認められた。

7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-4 に示した。

1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓及び甲状腺に認められた。

肝臓 : 軽微な微小肉芽腫が対照群の雄 4 例と雌全例、15mg/kg 投与群の雄 4 例と雌全例、60mg/kg 投与群の雄 1 例と雌全例、250mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 5 例に、軽微あるいは軽度な小葉中心性の肝細胞肥大が 60mg/kg 投与群の雄 5 例と雌全例、250mg/kg 投与群の雌雄全例に認められた。

甲状腺 : 軽微な異所性胸腺が対照群及び 15mg/kg 投与群の雌雄各 1 例、60mg/kg 投与群の雌 2 例、250mg/kg 投与群の雌 1 例に、軽微な鰓後体のう胞が対照群の雌雄各 4 例、15mg/kg 投与群の雄 4 例と雌 1 例、60mg/kg 投与群の雌 1 例、250mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例に、軽微な濾胞上皮細胞肥大が 60mg/kg 投与群の雄 1 例、250mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例に認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも被験物質投与との関連性はないと判断した。

精巣上体 : 軽微あるいは高度な管腔内の精子減少が対照群と 250mg/kg 投与群の各 1 例に認められた。

心臓 : 軽微な限局性の心筋炎が対照群の雄 1 例と雌 2 例、250mg/kg 投与群の雄 2 例に認められた。

- 盲腸 : 軽微な粘膜固有層の細胞浸潤が 250mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に認められた。
- 腎臓 : 軽微な尿細管の嚢胞状拡張が対照群と 250mg/kg 投与群の雄各 1 例に、軽微な尿細管の再生が対照群の雄 1 例と雌 2 例、250mg/kg 投与群の雄 3 例に、軽微な髓質の鉍物質沈着が対照群の雄 1 例、250mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例に認められた。
- 肺(気管支を含む) : 軽微な細胞浸潤が対照群の雄 1 例に、軽微な泡沫細胞の集簇が対照群の雌 1 例、250mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。
- 前立腺 : 軽微な腹葉の細胞浸潤が対照群の 2 例、250mg/kg 投与群の 3 例に、軽微な背側葉の細胞浸潤が対照群の 1 例に認められた。
- 精巣 : 剖検所見において小型化が認められた対照群、15 及び 250mg/kg 投与群の各 1 例では軽微から高度の精細管の萎縮が認められた。

2) 回復期間終了時

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも被験物質投与との関連性はないと判断した。

- 腎臓 : 剖検所見で腎盂拡張が認められた対照群の雄 1 例において軽度な腎盂拡張、軽微な尿細管の再生及び髓質の鉍物質沈着が認められた。
- 肝臓 : 軽度な限局性壊死が 250mg/kg 投与群の雄 1 例に、軽微な微小肉芽腫が対照群の雄 5 例と雌全例、250mg/kg 投与群の雄 5 例と雌全例に認められた。
- 甲状腺 : 鰓後体のう胞が対照群の雄 2 例と雌 3 例、250mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例に認められた。

8. 考察

Sprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD(SD)〕に2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールを0(0.5w/v%メチルセルロース水溶液：対照群)、15、60及び250mg/kg/dayの用量で28日間反復強制経口投与し、その毒性を検討するとともに、対照群及び250mg/kg投与群はその後2週間休薬させ、変化の回復性について検討した。

投与及び回復期間を通じて死亡動物はみられず、一般状態にも異常は認められなかった。

詳細な一般状態の観察では、オープンフィールド内観察における排糞数の高値が250mg/kg投与群の雄で投与第2及び4週に認められたが、通常みられる程度の僅かな差であることから、被験物質投与との関連性はないと判断した。更に、立ち上がり回数の高値が250mg/kg投与群の雄で投与第2週に、250mg/kg投与群の雌で投与4週に認められたが、自発運動量に変化はみられていないことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。その他、自発運動量の低値が15mg/kg投与群の雄で投与第4週の30~40分に認められたが、高用量群に同様な変化はみられていないことから偶発性の変化と判断した。また、機能検査における着地開脚幅の高値が250mg/kg投与群の雄で回復第2週に認められたが、投与期間中に同様な変化が認められていないことから被験物質投与との関連性はないと判断した。

体重では、投与及び回復期間中を通じて被験物質投与の影響は認められなかった。

摂餌量では、高値が250mg/kg投与群の雄で投与第24日に認められたが、一過性の変化であり、被験物質投与との関連性はないと判断した。

尿検査では、摂水量の高値が250mg/kg投与群の雄で認められたが、尿量及び浸透圧等には変化が認められていないことから被験物質投与との関連性はないと判断した。また、褐色尿が250mg/kg投与群の雄に認められたが、定性項目等に変化はなく、病理組織学検査において腎臓等に異常は認められていないことから、被験物質投与との関連性は疑われたものの、毒性学的意義はないと判断した。なお、褐色尿は休薬により消失した。その他に、回復第2週に浸透圧の高値が250mg/kg投与群の雌に認められたが、投与期間中には同様な変化がみられていないことから、偶発性の変化と判断した。

血液学検査では、血小板数及びフィブリノーゲン量の高値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が250mg/kg投与群の雌雄に、プロトロンビン時間の延長が250mg/kg投与群の雄に認められ、発現機序は明らかではないものの、被験物質投与との関連性が疑われた。これらの変化は、休薬により消失あるいは軽減した。その他に、回復期間終了時に赤血球数及びヘマトクリット値の低値が250mg/kg投与群の雄に認められたが、投与期間終了時には同様な変化は認められていないことから、偶発性と判断した。

血液化学検査では、総コレステロール及び総たん白質の高値が250mg/kg投与群の雌雄に、リン脂質の高値が250mg/kg投与群の雌に認められ、被験物質投与による肝

臓への影響が疑われた。また、カルシウムの高値が 250mg/kg 投与群の雄に、塩素の低値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。上記でみられた変化はいずれも休薬により消失あるいは軽減した。他に、AST 活性の低値が 250mg/kg 投与群の雌に認められたが、器官・組織の障害を示唆する増加ではないことから、毒性学的意義はないと判断した。なお、回復期間終了時に総たん白質及びアルブミンの低値が 250 mg/kg 投与群の雄に認められたが、投与期間終了時には同様な変化が認められていないことから、偶発性の変化と判断した。

病理学検査では、肝臓の組織学検査における小葉中心性肝細胞肥大が 60mg/kg 以上の投与群の雌雄に認められ、重量の増加を伴った。また、甲状腺の組織学検査における濾胞上皮細胞肥大が 60mg/kg 投与群の雄と 250mg/kg 投与群の雌雄に認められ、被験物質投与との関連性が疑われた。これらの変化は休薬により消失した。上記の他に剖検所見、器官重量あるいは組織学検査においていくつかの変化が認められたが、それらの出現状況から、いずれも被験物質投与との関連性はないと判断した。

以上の結果から、本試験条件下における 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールの無影響量は雌雄とも 15mg/kg/日と考えられた。なお、認められた変化は、いずれも回復性が認められた。

9. 文献

- 1) 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールのラットを用いた14日間反復経口投与毒性試験(予備試験)(株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号:C-B265、2006年)
- 2) Shayne C. Gad and Carrol S. Weil (1994) : Chapter 7. Statistics for Toxicologists, *In Principles and Methods of Toxicology* (A. Wallace Hayes, ed.) , 3rd ed., pp. 221-274, Raven Press, Ltd., New York.
- 3) 佐久間昭 (1981) : 薬効評価－計画と解析－II 東京大学出版会, 東京.

Table 1-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Clinical signs (Administration period)

Sex	Dose mg/kg	Findings	Day of administration													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
60	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
250	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
Female	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
60	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
250	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	

Table 1-2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Clinical signs (Administration period)

Sex	Dose mg/kg	Findings	Day of administration													
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Male	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Female	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Table 1-3 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Clinical signs (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg	Findings	Day of recovery													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	0	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Female	0	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Table 2-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 1)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior None		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 2)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-3

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Detailed clinical signs : home cage observations (Week 3)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-4 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 4)

Parameter	Sex	Male				Female			
		Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture	Normal	12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion	None	12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior	None	12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-5 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 1 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female		
		Dose (mg/kg)	0	250	0	250
	No. of animals		6	6	6	6
Posture						
Normal			6	6	6	6
Convulsion						
None			6	6	6	6
Abnormal behavior						
None			6	6	6	6

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-6 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 2 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
		Dose (mg/kg)	0	250	0
	No. of animals	6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-7

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 1)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	15	60	250	0	15	60	250
		12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-8

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 2)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	11	6	6	12
Some resistance/avoidance		0	0	0	0	1	0	0	0
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-9 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 3)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	11	6	5	12
Some resistance/avoidance		0	0	0	0	1	0	1	0
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	11	6	5	12
Slightly awkward		0	0	0	0	1	0	1	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-10 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 4)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		11	6	6	12	12	5	6	12
Some resistance/avoidance		1	0	0	0	0	1	0	0
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	11	6	6	11
Slightly awkward		0	0	0	0	1	0	0	1

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-11

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 1 of recovery)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male		Female	
		0	250	0	250
		6	6	6	6
Ease of removal from cage					
Easy		5	6	6	6
Some resistance/avoidance		1	0	0	0
Fur condition					
Normal		6	6	6	6
Skin					
Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nose					
Absent		6	6	6	6
Exophthalmos					
Absent		6	6	6	6
Palpebral closure					
Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes					
Normal		6	6	6	6
Lacrimation					
Normal		6	6	6	6
Piloerection					
Absent		6	6	6	6
Pupil size					
Normal		6	6	6	6
Salivation					
None		6	6	6	6
Abnormal respiration					
Absent		6	6	6	6
Reactivity to handling					
Easy		6	6	6	6

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-12

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 2 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	250	0	250
	No. of animals	6	6	6	6
Ease of removal from cage					
Easy		5	4	6	6
Some resistance/avoidance		1	0	0	0
Difficult		0	2	0	0
Fur condition					
Normal		6	6	6	6
Skin					
Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nose					
Absent		6	6	6	6
Exophthalmos					
Absent		6	6	6	6
Palpebral closure					
Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes					
Normal		6	6	6	6
Lacrimation					
Normal		6	6	6	6
Piloerection					
Absent		6	6	6	6
Pupil size					
Normal		6	6	6	6
Salivation					
None		6	6	6	6
Abnormal respiration					
Absent		6	6	6	6
Reactivity to handling					
Easy		5	3	6	6
Slightly awkward		0	3	0	0
Difficult		1	0	0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-13

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Detailed clinical signs : open field observation (Week 1)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		0	0	0	1	0	0	0	0
Normal		12	6	6	11	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		5± 3	5± 2	4± 3	4± 3	7± 2	4± 2	7± 2	6± 3
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 1	0± 1	0± 1	1± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 1
Urination									
None		9	3	5	10	12	6	4	11
Small amount		3	3	1	2	0	0	2	1

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-14 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : open field observation (Week 2)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior						a)			
None		12	6	6	12	11	6	6	12
Minor		0	0	0	0	1	0	0	0
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		0	0	1	2	0	0	0	0
Normal		12	6	5	10	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		5± 3	4± 2	4± 3	2± 2*D	7± 4	6± 4	9± 4	6± 3
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	1± 1**DT	0± 0	0± 0	1± 1	0± 1
Urination									
None		10	6	6	10	12	6	6	9
Small amount		2	0	0	1	0	0	0	3
Moderate amount		0	0	0	1	0	0	0	0

a) Career
* : p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test
DT : Dunnett-type rank test

Table 2-15

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 3)

Parameter	Sex	Male				Female			
		Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	5	6	12
Increased alertness		0	0	0	0	0	1	0	0
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	5	11
Minor		0	0	0	0	0	0	1	1
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		1	1	0	1	0	0	0	0
Normal		11	5	6	11	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		4± 3	2± 2	3± 3	3± 4	7± 3	5± 3	10± 5	6± 4
Defecation count (Mean±S.D.)		1± 2	1± 1	0± 0	2± 2	0± 1	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		10	4	5	8	12	6	6	10
Small amount		2	2	1	4	0	0	0	2

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-16

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 4)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		2	1	1	0	0	0	0	0
Normal		10	5	5	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		5± 3	4± 2	4± 3	5± 2	10± 3	8± 3	10± 4	7± 3*D
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	1± 1**DT	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		11	6	6	9	12	6	6	12
Small amount		1	0	0	3	0	0	0	0

* : p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

DT : Dunnett-type rank test

Table 2-17

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Detailed clinical signs : open field observation (Week 1 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	250	0	250
	No. of animals	6	6	6	6
Arousal					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6
Stereotypy					
None		6	6	6	6
Gait					
Normal		6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Grooming					
None		6	6	6	6
Rearing count (Mean+S.D.)		6± 2	4± 2	8± 2	7± 3
Defecation count (Mean+S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination					
None		5	5	6	6
Small amount		0	1	0	0
Moderate amount		1	0	0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-18

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

Detailed clinical signs : open field observation (Week 2 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	250	0	250
	No. of animals	6	6	6	6
Arousal					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6
Stereotypy					
None		6	6	6	6
Gait					
Normal		6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Grooming					
None		6	6	6	6
Rearing count (Mean±S.D.)		5± 2	5± 2	8± 3	7± 2
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination					
None		4	6	6	6
Small amount		1	0	0	0
Moderate amount		1	0	0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-19 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Manipulative test (Week 4)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Auditory response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Approach response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Touch response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Tail pinch response Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupillary reflex Pass, both		12	6	6	12	12	6	6	12
Aerial righting reflex (Total score: Mean+S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Landing foot splay (mm: Mean+S.D.)		78±16	89±15	91±16	89±17	62±13	61±19	64±28	68±14

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-20 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Manipulative test (Week 2 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	250	0	250
	No. of animals	6	6	6	6
Auditory response					
Weak		0	1	0	1
Normal		6	5	6	5
Approach response					
Normal		6	6	6	6
Touch response					
Normal		6	6	6	6
Tail pinch response					
Normal		6	6	6	6
Pupillary reflex					
Pass, both		6	6	6	6
Aerial righting reflex (Total score: Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Landing foot splay (mm: Mean±S.D.)		72±14	91±13*T	52± 9	65±18

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 2-21. A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Grip strength (Week 4)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb g	Hind limb g
Male	0	No.	12	12
		Mean	906	534
		S.D.	95	71
	15	No.	6	6
		Mean	965	620
		S.D.	199	98
	60	No.	6	6
		Mean	912	583
		S.D.	164	89
	250	No.	12	12
		Mean	1021	533
		S.D.	252	139
Female	0	No.	12	12
		Mean	902	426
		S.D.	114	72
	15	No.	6	6
		Mean	808	472
		S.D.	138	94
	60	No.	6	6
		Mean	857	390
		S.D.	190	57
	250	No.	12	12
		Mean	925	455
		S.D.	189	89

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-22 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Grip strength (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb g	Hind limb g
Male	0	No.	6	6
		Mean	1398	653
		S.D.	204	135
	250	No.	6	6
		Mean	1362	665
		S.D.	95	108
Female	0	No.	6	6
		Mean	1032	540
		S.D.	79	99
	250	No.	6	6
		Mean	1134	571
		S.D.	94	75

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-23 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Motor activity (Week 4)

Sex	Dose mg/kg		Interval (minutes)						Total(0-60)
			0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	415	361	335	355	308	317	2090
		S.D.	46	44	70	67	101	148	339
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	421	373	318	232*	237	252	1832
		S.D.	35	79	80	131D	171	193	622
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	438	396	372	348	314	261	2128
		S.D.	26	47	37	54	100	147	201
	250	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	422	366	371	335	266	260	2019
		S.D.	27	30	60	91	134	153	384
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	398	324	262	282	231	199	1695
		S.D.	48	84	73	100	121	124	337
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	409	328	282	277	253	199	1748
		S.D.	34	50	84	126	121	99	367
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	427	341	281	270	227	207	1753
		S.D.	48	30	49	51	129	105	283
	250	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	396	332	274	275	208	152	1637
		S.D.	47	42	83	127	129	129	442

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 2-24

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Motor activity (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	Interval (minutes)							
		0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	Total(0-60)	
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	381	276	272	307	287	226	1747
		S.D.	62	82	76	61	106	136	394
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	364	304	311	264	262	229	1732
		S.D.	56	62	39	57	100	108	276
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	359	321	252	236	206	118	1492
		S.D.	64	20	79	50	149	106	330
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	398	299	270	239	194	161	1561
		S.D.	50	127	69	127	127	129	418

No significant difference between treated group and control group.

Table 3-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Body weight (Administration period)

Sex	Dose mg/kg		Day of administration								Gain 1-28	
			1	4	7	10	14	17	21	24		28
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	212	240	260	283	316	337	358	371	391	179
		S.D.	7	7	10	12	13	15	18	21	20	19
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	212	240	265	286	322	346	369	384	398	187
		S.D.	5	7	10	13	17	21	25	25	28	24
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	213	242	265	284	316	338	357	373	391	179
		S.D.	7	11	16	21	30	36	41	46	53	47
	250	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	213	240	264	285	317	339	357	370	386	174
		S.D.	8	9	12	16	20	23	25	27	30	25
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	151	162	167	178	192	202	212	220	229	78
		S.D.	5	8	8	12	13	15	17	19	21	18
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	150	162	167	177	190	198	207	216	224	74
		S.D.	8	7	6	7	9	12	13	13	14	10
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	152	163	166	179	191	202	212	218	227	75
		S.D.	7	6	4	9	11	12	12	13	14	10
	250	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	152	163	168	179	193	205	214	221	227	76
		S.D.	3	3	4	7	10	11	11	11	12	11

Unit : g
No significant difference in any treated groups from control group.

Table 3-2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Body weight (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Day of recovery					Gain 1-14
			1	3	7	10	14	
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	406	415	434	449	457	51
		S.D.	10	11	13	13	14	8
	250	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	380	388	408	422	430	50
		S.D.	33	31	37	40	40	11
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	228	235	241	247	249	21
		S.D.	27	29	29	32	33	9
	250	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	230	233	235	241	243	13
		S.D.	11	9	11	14	11	3

Unit : g

No significant difference between treated group and control group.

Table 4-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Food consumption (Administration period)

Sex	Dose mg/kg		Day of administration								
			1	4	7	10	14	17	21	24	28
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	23	24	25	27	27	26	27	25	28
		S.D.	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	24	24	26	28	28	29	28	27	28
		S.D.	1	1	1	1	1	2	2	1	2
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	24	25	26	28	27	27	27	26	28
		S.D.	2	2	3	3	4	4	4	4	5
	250	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	24	24	26	28	27	28	27	28*	28
		S.D.	2	1	2	2	2	2	2	3D	2
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	17	17	17	18	18	18	19	19	20
		S.D.	2	2	1	2	2	2	2	3	2
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	16	17	16	18	17	17	18	18	19
		S.D.	2	1	1	1	1	1	1	1	1
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	17	17	16	18	18	18	18	17	19
		S.D.	2	1	2	2	2	2	1	1	1
	250	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	17	16	16	18	18	19	19	18	20
		S.D.	1	1	1	2	1	1	1	2	2

Unit : g/rat/day

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 4-2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Food consumption (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Day of recovery			
			3	7	10	14
Male	0	No.	6	6	6	6
		Mean	29	28	28	27
		S.D.	1	2	2	2
	250	No.	6	6	6	6
		Mean	30	29	29	27
		S.D.	2	3	3	3
Female	0	No.	6	6	6	6
		Mean	21	19	19	18
		S.D.	3	3	3	3
	250	No.	6	6	6	6
		Mean	21	19	20	19
		S.D.	2	2	2	1

Unit : g/rat/day

No significant difference between treated group and control group.

Table 5-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 4)

Sex	Dose mg/kg	No.	pH									1) Protein					2) Ketone body					3) Glucose							
			5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++
Male	0	12	0	0	0	0	0	0	5	7	0	3	7	2	0	0	0	9	3	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
	15	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	5	1	0	0	0	4	2	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	60	6	0	0	0	0	0	1	1	4	0	4	2	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	250	12	0	0	0	0	0	0	2	8	2	2	5	4	1	0	0	9	2	1	0	0	0	12	0	0	0	0	0
Female	0	12	0	0	0	1	2	1	3	4	1	11	0	1	0	0	0	11	1	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
	15	6	0	0	0	0	1	0	0	4	1	4	2	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	60	6	0	0	0	0	1	3	1	1	0	4	1	1	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	250	12	0	0	0	1	0	1	3	5	2	8	3	1	0	0	0	10	2	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0

1)	- :	<10 mg/dL	+- :	10 - 25 mg/dL	+	:	26 - 85 mg/dL	++ :	86 - 250 mg/dL	+++ :	251 - 600 mg/dL	++++ :	>600 mg/dL
2)	- :	<5 mg/dL	+- :	5 - 7.5 mg/dL	+	:	7.6 - 30 mg/dL	++ :	31 - 70 mg/dL	+++ :	71 - 125 mg/dL	++++ :	>125 mg/dL
3)	- :	<30 mg/dL	+- :	30 - 60 mg/dL	+	:	61 - 125 mg/dL	++ :	126 - 250 mg/dL	+++ :	251 - 750 mg/dL	++++ :	>750 mg/dL

Table 5-2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 4)

Sex	Dose mg/kg	No.	4) Occult blood				5) Bilirubin					6) Urobilinogen				7) Color					
			-	+-	+	++	+++	-	+	++	+++	++++	+-	+	++	+++	++++	LY	Y	DY	
Male	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0
	15	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	60	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	250	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	3	9
Female	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0
	15	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	60	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	250	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0

4) - : <0.03 mg/dL +- : 0.03 - 0.05 mg/dL + : 0.06 - 0.15 mg/dL ++ : 0.16 - 0.75 mg/dL +++ : >0.75 mg/dL
5) - : <0.5 mg/dL + : 0.5 - 1.5 mg/dL ++ : 1.6 - 5.0 mg/dL +++ : 5.1 - 10.0 mg/dL ++++ : >10.0 mg/dL
6) +- : <2.0 mg/dL + : 2.0 - 3.5 mg/dL ++ : 3.6 - 7.0 mg/dL +++ : 7.1 - 12.0 mg/dL ++++ : >12.0 mg/dL
7) LY : Light yellow Y : Yellow DY : Dark yellow

Table 5-3 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 4)

Sex	Dose mg/kg	No.	URINE SEDIMENT																																
			RBC				WBC				SEC				SREC			Cast			CRYSTALLIZATION														
			-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	-	+-	+	++	+++	-	+-	+	++	+++					
Male	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	5	7	0	0	0	12	0	0	0	0
	15	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	4	2	0	0	0	6	0	0	0	0
	60	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	250	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	11	1	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	8	4	0	0	0	12	0	0	0	0
Female	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	11	1	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	8	4	0	0	0	12	0	0	0	0
	15	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	3	3	0	0	0	6	0	0	0	0
	60	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	3	3	0	0	0	6	0	0	0	0
	250	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	4	8	0	0	0	12	0	0	0	0

SEC : Squamous Epithelial Cell - : Negative
 SREC : Small Round Epithelial Cell +- : Slight
 PS : Phosphate Salts + : Mild
 CO : Calcium Oxalate ++ : Moderate
 +++ : Severe

Table 5-4 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Water intake and urinalysis (Week 4)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg
Male	0	12	Mean	37	11.6	1871
			S.D.	6	3.8	286
	15	6	Mean	38	12.6	1784
			S.D.	5	6.4	307
	60	6	Mean	40	13.7	1914
			S.D.	7	3.9	391
	250	12	Mean	51**	14.0	1635
			S.D.	12D	5.2	486
Female	0	12	Mean	32	8.7	2142
			S.D.	15	6.7	786
	15	6	Mean	25	6.3	2056
			S.D.	4	1.6	288
	60	6	Mean	28	4.8	2432
			S.D.	6	1.5	456
	250	12	Mean	26	5.9	2010
			S.D.	6	3.4	324

** : p<0.01 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 5-5 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.	pH									1) Protein					2) Ketone body					3) Glucose							
			5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++
Male	0	6	0	0	0	0	0	1	2	2	1	1	4	1	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	250	6	0	0	0	0	0	0	3	2	1	1	3	2	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Female	0	6	0	0	0	1	1	1	0	3	0	4	0	2	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	250	6	0	0	0	1	0	0	2	2	1	0	4	2	0	0	0	1	4	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0

1)	-	<10 mg/dL	+-	: 10 - 25 mg/dL	+	: 26 - 85 mg/dL	++	: 86 - 250 mg/dL	+++	: 251 - 600 mg/dL	++++	: >600 mg/dL
2)	-	<5 mg/dL	+-	: 5 - 7.5 mg/dL	+	: 7.6 - 30 mg/dL	++	: 31 - 70 mg/dL	+++	: 71 - 125 mg/dL	++++	: >125 mg/dL
3)	-	<30 mg/dL	+-	: 30 - 60 mg/dL	+	: 61 - 125 mg/dL	++	: 126 - 250 mg/dL	+++	: 251 - 750 mg/dL	++++	: >750 mg/dL

Table 5-6 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.	4) Occult blood					5) Bilirubin					6) Urobilinogen					7) Color		
			-	+-	+	++	+++	-	+	++	+++	++++	+-	+	++	+++	++++	LY	Y	DY
Male	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	250	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
Female	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	250	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0

4) - : <0.03 mg/dL +- : 0.03 - 0.05 mg/dL + : 0.06 - 0.15 mg/dL ++ : 0.16 - 0.75 mg/dL +++ : >0.75 mg/dL
5) - : <0.5 mg/dL + : 0.5 - 1.5 mg/dL ++ : 1.6 - 5.0 mg/dL +++ : 5.1 - 10.0 mg/dL ++++ : >10.0 mg/dL
6) +- : <2.0 mg/dL + : 2.0 - 3.5 mg/dL ++ : 3.6 - 7.0 mg/dL +++ : 7.1 - 12.0 mg/dL ++++ : >12.0 mg/dL
7) LY : Light yellow Y : Yellow DY : Dark yellow

Table 5-7 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Urinalysis (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.	URINE SEDIMENT																																
			RBC					WBC					SEC					SREC					Cast			CRYSTALLIZATION									
			-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++
Male	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	3	3	0	0	0	6	0	0	0	0
	250	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	3	3	0	0	0	6	0	0	0	0
Female	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	4	2	0	0	0	6	0	0	0	0
	250	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	3	3	0	0	0	6	0	0	0	0

SEC : Squamous Epithelial Cell - : Negative
 SREC : Small Round Epithelial Cell +- : Slight
 PS : Phosphate Salts + : Mild
 CO : Calcium Oxalate ++ : Moderate
 +++ : Severe

Table 5-8 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Water intake and urinalysis (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg
Male	0	6	Mean	40	13.4	1910
			S.D.	5	4.7	220
	250	6	Mean	51	16.3	1644
			S.D.	12	6.2	500
Female	0	6	Mean	32	7.8	1862
			S.D.	10	3.2	237
	250	6	Mean	33	5.9	2254*
			S.D.	7	2.4	309T

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 6-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (Day 28)

Sex	Dose mg/kg	No.		RBC ×10 ⁴ /μL	Hb g/dL	Ht %	MCV fL	MCH pg	MCHC %	Reticu- loocyte %	Plate- let ×10 ⁴ /μL	PT s	APTT s	Fibri- nogen mg/dL
Male	0	6	Mean	769	15.8	47	60.4	20.5	33.9	2.3	100.8	16.5	25.2	280
			S.D.	33	0.7	2	0.8	0.4	0.7	0.4	4.3	2.4	2.5	31
	15	6	Mean	773	16.1	47	61.0	20.8	34.2	2.0	106.3	16.3	25.2	319
			S.D.	22	0.3	1	1.6	0.5	0.5	0.2	11.3	2.2	4.6	19
	60	6	Mean	770	15.8	46	59.7	20.6	34.4	2.2	111.5	18.5	26.8	321
			S.D.	39	0.5	2	1.7	0.6	0.7	0.3	11.3	2.4	3.0	30
	250	6	Mean	778	15.8	46	58.9	20.3	34.5	2.4	120.6**	24.1**	36.7**	411**
			S.D.	44	0.5	2	1.7	0.5	0.5	0.6	12.4D	2.2D	3.8D	31D
Female	0	6	Mean	757	15.9	45	59.5	20.9	35.2	2.0	113.2	12.0	15.9	239
			S.D.	32	0.5	2	0.6	0.3	0.5	0.3	6.5	0.7	2.3	18
	15	6	Mean	772	16.0	45	58.7	20.7	35.2	2.0	117.7	12.0	18.9	240
			S.D.	15	0.5	1	1.2	0.5	0.4	0.4	5.8	0.4	2.9	21
	60	6	Mean	753	15.6	45	59.0	20.8	35.1	1.9	119.3	11.7	18.0	253
			S.D.	36	0.8	2	1.6	0.8	0.6	0.4	9.2	0.6	2.6	23
	250	6	Mean	757	15.4	44	58.1	20.4	35.1	2.0	127.3*	13.9	23.6**	308**
			S.D.	47	0.9	2	0.9	0.3	0.3	0.5	10.5D	1.9	3.9D	29D

* : p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 6-2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (Day 28)

Sex	Dose mg/kg	No.		WBC	Differential leukocyte counts (%)						Erythroblast counts	
				$\times 10^2/\mu\text{L}$	Lymph.	Stab	Seg.	Eosino.	Baso.	Mono.	Others	(/200 leukocyte)
Male	0	6	Mean	93	83.1	0.3	15.0	0.6	0.0	1.0	0.0	0
			S.D.	22	7.2	0.4	7.2	0.5	0.0	0.6	0.0	0
	15	6	Mean	88	87.1	0.3	10.9	0.4	0.0	1.3	0.0	0
			S.D.	26	3.7	0.3	3.8	0.5	0.0	0.7	0.0	0
	60	6	Mean	95	86.7	0.4	11.5	0.4	0.0	1.0	0.0	0
			S.D.	27	3.8	0.2	3.9	0.5	0.0	0.5	0.0	0
	250	6	Mean	99	89.3	0.3	9.4	0.3	0.0	0.8	0.0	0
			S.D.	35	4.1	0.3	4.1	0.4	0.0	0.5	0.0	0
Female	0	6	Mean	76	86.3	0.4	12.1	0.7	0.0	0.6	0.0	0
			S.D.	8	6.3	0.4	5.8	0.7	0.0	0.6	0.0	0
	15	6	Mean	76	82.8	0.5	15.4	0.6	0.0	0.7	0.0	0
			S.D.	12	3.4	0.3	3.4	0.4	0.0	0.6	0.0	0
	60	6	Mean	69	84.2	0.5	14.1	0.5	0.0	0.8	0.0	0
			S.D.	19	2.9	0.3	2.4	0.6	0.0	0.7	0.0	0
	250	6	Mean	85	84.5	0.4	13.6	0.6	0.0	0.9	0.0	0
			S.D.	16	7.6	0.6	6.7	0.7	0.0	0.4	0.0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 6-3

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		RBC X10 ⁶ /μL	Hb g/dL	Ht %	MCV fL	MCH pg	MCHC %	Reticu- loocyte %	Plate- let X10 ⁴ /μL	PT s	APTT s	Fibri- nogen mg/dL
Male	0	6	Mean	815	16.4	47	57.0	20.1	35.3	2.2	95.2	15.0	24.3	344
			S.D.	23	0.3	1	1.1	0.5	0.6	0.4	4.4	1.7	1.6	32
	250	6	Mean	777*	16.0	45*	57.9	20.6	35.5	2.5	105.5**	16.5	22.6	311
			S.D.	23T	0.5	1T	1.0	0.4	0.3	0.3	4.2T	3.8	2.7	38
Female	0	6	Mean	772	15.5	44	57.3	20.1	35.2	2.3	107.0	11.5	15.3	221
			S.D.	19	0.4	1	1.0	0.4	0.5	0.4	7.7	0.4	1.6	30
	250	6	Mean	764	15.7	44	57.7	20.5	35.5	2.2	106.0	11.1	15.8	249
			S.D.	27	0.2	1	1.8	0.7	0.3	0.5	8.6	0.7	2.7	43

* : p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 6-4 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Hematology (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		WBC	Differential leukocyte counts (%)						Erythroblast counts	
				X10 ³ /μL	Lymph.	Stab	Seg.	Eosino.	Baso.	Mono.	Others	(/200 leukocyte)
Male	0	6	Mean	105	87.8	0.2	11.0	0.5	0.0	0.6	0.0	0
			S.D.	18	5.5	0.3	5.3	0.3	0.0	0.5	0.0	0
	250	6	Mean	99	87.3	0.3	11.4	0.5	0.0	0.4	0.0	0
			S.D.	22	1.6	0.3	1.5	0.8	0.0	0.4	0.0	0
Female	0	6	Mean	87	84.2	0.3	14.3	0.8	0.0	0.5	0.0	0
			S.D.	19	6.1	0.3	5.8	0.6	0.0	0.6	0.0	0
	250	6	Mean	72	86.3	0.3	12.0	0.8	0.0	0.8	0.0	0
			S.D.	7	3.9	0.3	3.6	0.6	0.0	0.4	0.0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 7-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Blood chemistry (Day 28)

Sex	Dose mg/kg	No.		AST (GOT) IU/L	ALT (GPT) IU/L	LDH IU/L	γ -GTP IU/L	ALP IU/L	T.cho mg/dL	TG mg/dL	PL mg/dL	T.bili- rubin mg/dL	Glucose mg/dL
Male	0	6	Mean	67	27	62	1	685	47	40	94	0.0	134
			S.D.	6	4	9	0	96	11	19	17	0.0	11
	15	6	Mean	66	31	60	1	734	59	54	106	0.0	125
			S.D.	4	3	9	0	112	6	16	9	0.0	4
	60	6	Mean	68	31	57	1	754	59	37	101	0.0	131
			S.D.	8	6	5	0	82	9	14	14	0.0	20
	250	6	Mean	60	29	61	1	661	65*	29	107	0.0	120
			S.D.	2	4	11	0	147	17D	11	15	0.0	11
Female	0	6	Mean	70	27	62	2	419	61	10	112	0.0	95
			S.D.	11	2	7	1	29	13	3	15	0.0	9
	15	6	Mean	60	23	55	1	483	61	12	107	0.0	101
			S.D.	7	3	11	1	131	13	5	18	0.0	9
	60	6	Mean	62	22	56	2	413	73	10	118	0.0	89
			S.D.	7	1	15	1	59	7	5	5	0.0	4
	250	6	Mean	58*	27	52	2	362	97**	17	150**	0.0	98
			S.D.	7D	7	4	1	41	23D	5	25D	0.0	7

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 7-2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Blood chemistry (Day 28)

Sex	Dose mg/kg	No.		BUN mg/dL	Crea- tinine mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mg/dL	P mg/dL	TP g/dL	Albumin g/dL	A/G
Male	0	6	Mean	12	0.24	143	4.8	107	9.8	8.1	5.9	2.7	0.87
			S.D.	2	0.03	1	0.5	2	0.2	0.4	0.2	0.1	0.05
	15	6	Mean	12	0.26	144	4.7	106	9.9	8.2	6.1	2.8	0.86
			S.D.	2	0.03	2	0.2	2	0.3	0.6	0.2	0.1	0.05
	60	6	Mean	11	0.25	144	4.7	108	9.8	7.7	6.0	2.7	0.82
			S.D.	1	0.02	2	0.1	2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.04
	250	6	Mean	10	0.23	143	4.8	106	10.3**	7.7	6.4**	2.9	0.81
			S.D.	1	0.03	1	0.3	1	0.2D	0.5	0.2D	0.1	0.03
Female	0	6	Mean	17	0.32	142	4.4	110	10.0	7.6	6.1	2.9	0.89
			S.D.	2	0.02	1	0.4	1	0.2	0.4	0.1	0.1	0.06
	15	6	Mean	16	0.29	142	4.5	110	9.8	7.6	6.1	2.8	0.88
			S.D.	2	0.03	1	0.3	1	0.3	0.6	0.2	0.2	0.06
	60	6	Mean	16	0.30	143	4.4	109	10.0	7.5	6.2	2.9	0.90
			S.D.	3	0.05	2	0.5	2	0.2	0.8	0.1	0.1	0.04
	250	6	Mean	14	0.27	143	4.4	107**	10.3	7.7	6.6**	3.0	0.86
			S.D.	1	0.02	1	0.2	2D	0.2	0.3	0.2D	0.1	0.07

** : p<0.01 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 7-3

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

Blood chemistry (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		AST (GOT) IU/L	ALT (GPT) IU/L	LDH IU/L	γ -GTP IU/L	ALP IU/L	T.cho mg/dL	TG mg/dL	PL mg/dL	T.bili- rubin mg/dL	Glucose mg/dL
Male	0	6	Mean	64	28	51	1	585	57	54	105	0.1	150
			S.D.	7	4	10	0	107	9	20	11	0.0	16
	250	6	Mean	67	29	47	1	499	58	40	108	0.1	140
			S.D.	4	3	5	0	52	10	19	15	0.0	17
Female	0	6	Mean	59	23	41	2	283	62	15	118	0.1	118
			S.D.	6	4	10	1	101	4	3	8	0.0	22
	250	6	Mean	63	23	39	2	280	71*	13	124	0.1	116
			S.D.	6	6	5	1	52	9T	5	12	0.0	16

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 7-4 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Blood chemistry (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		BUN mg/dL	Crea- tinine mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mg/dL	P mg/dL	TP g/dL	Albumin g/dL	A/G
Male	0	6	Mean	12	0.28	142	4.6	106	9.9	6.8	6.3	2.9	0.83
			S.D.	1	0.04	1	0.4	1	0.2	0.5	0.2	0.1	0.05
	250	6	Mean	13	0.29	144	4.4	108	9.7	6.6	6.0*	2.7*	0.85
			S.D.	2	0.03	2	0.2	2	0.3	0.6	0.2T	0.1T	0.03
Female	0	6	Mean	16	0.33	142	4.2	110	10.0	6.7	6.2	3.0	0.91
			S.D.	2	0.03	1	0.4	2	0.3	0.8	0.2	0.1	0.07
	250	6	Mean	14	0.32	142	4.3	109	10.0	6.9	6.3	2.9	0.87
			S.D.	2	0.03	2	0.3	2	0.2	0.6	0.2	0.1	0.04

* : p<0.05 (Significant difference from control group)

T : Student's t-test

Table 8-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Day 28)
 Male

Dose mg/kg		Body weight g	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)	
			g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	354	1.97	499	1.27	10.12	0.67	2.72	66
		S.D.	25	0.05	94	0.21	0.90	0.13	0.32	4
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	371	1.98	565	1.21	11.23	0.64	2.77	60
		S.D.	25	0.07	122	0.09	0.75	0.08	0.15	6
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	363	1.99	500	1.23	11.63	0.62	2.78	57
		S.D.	46	0.11	105	0.21	2.08	0.10	0.42	15
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	366	2.05	439	1.12	14.27**	0.65	2.95	64
		S.D.	24	0.07	97	0.09	1.68D	0.09	0.25	8
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.56	141	0.36	2.86	0.19	0.77	18	
		S.D.	0.04	26	0.03	0.14	0.03	0.08	1	
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.54	152	0.33	3.03	0.17	0.75	16	
		S.D.	0.03	28	0.02	0.10	0.01	0.04	2	
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.56	137	0.34	3.19*	0.17	0.76	16	
		S.D.	0.05	21	0.04	0.21D	0.01	0.03	4	
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.56	119	0.31*	3.89**	0.18	0.81	18	
		S.D.	0.05	22	0.02D	0.23D	0.02	0.04	2	

* : p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)
 D : Dunnett's test

Table 8-2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Day 28)
 Male

Dose			Testis (R+L) g(g/100g BW)	Epididymis (R+L) mg(mg/100g BW)
mg/kg				
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	2.79	761
		S.D.	0.50	118
	15	No.	6	6
		Mean	3.00	763
		S.D.	0.22	104
	60	No.	6	6
		Mean	3.08	805
		S.D.	0.21	66
	250	No.	6	6
		Mean	2.96	791
		S.D.	0.33	95
Relative	0	No.	6	6
		Mean	0.79	216
		S.D.	0.14	37
	15	No.	6	6
		Mean	0.81	207
		S.D.	0.10	35
	60	No.	6	6
		Mean	0.86	224
		S.D.	0.07	24
	250	No.	6	6
		Mean	0.81	218
		S.D.	0.10	33

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8-3

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (Day 28)

Female

Dose mg/kg		Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)	
		g	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	215	1.83	408	0.75	5.86	0.42	1.62	61
		S.D.	12	0.06	84	0.06	0.46	0.06	0.07	8
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	210	1.85	443	0.76	6.16	0.46	1.74	65
		S.D.	13	0.10	54	0.04	0.50	0.09	0.12	9
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	213	1.86	417	0.77	6.91*	0.46	1.76	68
		S.D.	14	0.05	108	0.06	0.61D	0.05	0.09	6
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	215	1.83	444	0.77	9.61**	0.47	1.75	70
		S.D.	16	0.05	65	0.05	1.00D	0.05	0.11	10
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean		0.85	189	0.35	2.73	0.20	0.75	28
		S.D.		0.05	32	0.02	0.14	0.02	0.06	3
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.88	212	0.36	2.94	0.22	0.83	31
		S.D.		0.03	26	0.01	0.25	0.03	0.07	3
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.88	196	0.36	3.25**	0.22	0.83	32
		S.D.		0.05	48	0.02	0.19D	0.01	0.06	4
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.85	207	0.36	4.47**	0.22	0.81	33
		S.D.		0.08	31	0.03	0.32D	0.02	0.03	4

* : p<0.05 ; ** : p<0.01 (Significant difference from control group)
D : Dunnett's test

Table 8-4 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Day 28)
 Female

Dose mg/kg		Ovary (R+L)	Uterus	
		mg(mg/100g BW)	mg(mg/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	78.9	422
		S.D.	6.5	85
	15	No.	6	6
		Mean	77.8	439
		S.D.	12.7	134
	60	No.	6	6
		Mean	78.1	463
		S.D.	10.5	87
	250	No.	6	6
		Mean	83.2	439
		S.D.	6.6	92
Relative	0	No.	6	6
		Mean	36.8	196
		S.D.	2.5	32
	15	No.	6	6
		Mean	37.0	209
		S.D.	4.5	62
	60	No.	6	6
		Mean	36.8	219
		S.D.	4.8	48
	250	No.	6	6
		Mean	38.7	207
		S.D.	2.2	57

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8-5 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Week 2 of recovery)
 Male

Dose mg/kg			Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)
			g	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	430	2.07	439	1.40	12.15	0.69	3.05	64
		S.D.	10	0.08	102	0.12	0.97	0.11	0.20	7
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	400	2.02	453	1.34	11.77	0.73	2.91	62
		S.D.	37	0.04	141	0.12	1.23	0.11	0.37	7
Relative	0	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.48	102	0.33	2.83	0.16	0.71	15
		S.D.		0.02	22	0.03	0.21	0.02	0.04	2
	250	No.		6	6	6	6	6	6	6
		Mean		0.51	114	0.33	2.95	0.19	0.72	16
		S.D.		0.04	39	0.02	0.20	0.02	0.04	2

No significant difference between treated group and control group.

Table 8-6 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Week 2 of recovery)
 Male

Dose mg/kg			Testis	Epididymis
			(R+L) g(g/100g BW)	(R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	3.27	1142
		S.D.	0.16	66
	250	No.	6	6
		Mean	3.23	1130
		S.D.	0.16	58
Relative	0	No.	6	6
		Mean	0.76	266
		S.D.	0.03	20
	250	No.	6	6
		Mean	0.82	284
		S.D.	0.10	19

No significant difference between treated group and control group.

Table 8-7 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Week 2 of recovery)
 Female

Dose mg/kg	Body weight g	Brain g(g/100g BW)	Thymus mg(mg/100g BW)	Heart g(g/100g BW)	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidney (R+L) g(g/100g BW)	Adrenal (R+L) mg(mg/100g BW)	
									No.
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	
		Mean	234	1.83	427	0.84	6.37	0.51	1.71
		S.D.	28	0.05	95	0.08	0.94	0.14	0.19
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	227	1.88	315*	0.82	6.62	0.47	1.74
		S.D.	9	0.10	77T	0.05	0.54	0.05	0.06
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.79	182	0.36	2.73	0.22	0.73	32
		S.D.	0.09	30	0.02	0.13	0.04	0.05	5
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	0.83	139*	0.36	2.92	0.21	0.77	33
		S.D.	0.07	35T	0.02	0.23	0.03	0.04	3

* : p<0.05 (Significant difference from control group)
 T : Student's t-test

Table 8-8 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Absolute and relative organ weight (Week 2 of recovery)
 Female

	Dose mg/kg		Ovary	Uterus
			(R+L) mg(mg/100g BW)	mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	85.8	501
		S.D.	13.1	78
	250	No.	6	6
		Mean	88.0	478
		S.D.	13.4	56
Relative	0	No.	6	6
		Mean	37.0	215
		S.D.	6.1	22
	250	No.	6	6
		Mean	39.0	211
		S.D.	6.6	28

No significant difference between treated group and control group.

Table 9-1

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Gross pathological findings (Main group)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg):	0	15	60	250	0	15	60	250
	Number:	6	6	6	6	6	6	6	6
Testis									
Small		1	1	0	1	-	-	-	-

Table 9-2

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Gross pathological findings (Recovery group)

Organs	Dose (mg/kg):	Sex: Number:	M	M	F	F
Findings			0 6	250 6	0 6	250 6
Kidney Dilatation, pelvic			1	0	0	0

Table 10-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Histopathological findings (Main group)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 6	15 6	60 6	250 6	0 6	15 6	60 6	250 6
Adrenal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Bone+Bone marrow, femoral									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Bone+Bone marrow, sternal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Cerebellum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Cerebrum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Epididymis									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		5	0	0	5	-	-	-	-
Decreased sperm, luminal		1	0	0	1	-	-	-	-
minimal		1	0	0	0	-	-	-	-
severe		0	0	0	1	-	-	-	-
Eye									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Heart									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		5	0	0	4	4	0	0	6
Myocarditis, focal		1	0	0	2	2	0	0	0
minimal		1	0	0	2	2	0	0	0
Intestine, cecum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	5	6	0	0	5
Cell infiltration, lamina propria		0	0	0	1	0	0	0	1
minimal		0	0	0	1	0	0	0	1
Intestine, colon									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, duodenum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, ileum(Peyer's patch)									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, jejunum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, rectum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6

-: Not applicable

Table 10-2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
Histopathological findings (Main group)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 6	M 15 6	M 60 6	M 250 6	F 0 6	F 15 6	F 60 6	F 250 6
Kidney									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		3	0	0	2	4	0	0	5
Dilatation,tubular,cystic		1	0	0	1	0	0	0	0
minimal		1	0	0	1	0	0	0	0
Regeneration,tubular		1	0	0	3	2	0	0	0
minimal		1	0	0	3	2	0	0	0
Mineralization,medullary		1	0	0	2	0	0	0	1
minimal		1	0	0	2	0	0	0	1
Liver									
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6
Not remarkable		2	2	1	0	0	0	0	0
Microgranuloma		4	4	1	3	6	6	6	5
minimal		4	4	1	3	6	6	6	5
Hypertrophy,hepatocyte,									
centrilobular		0	0	5	6	0	0	6	6
minimal		0	0	5	0	0	0	6	0
mild		0	0	0	6	0	0	0	6
Lung(bronchus)									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		5	0	0	5	5	0	0	6
Cell infiltration		1	0	0	0	0	0	0	0
minimal		1	0	0	0	0	0	0	0
Accumulation,foamy cell		0	0	0	1	1	0	0	0
minimal		0	0	0	1	1	0	0	0
Lymph node,mesenteric									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Lymph node,submandibular									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Ovary									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6
Parathyroid									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	5
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	5
No sample		0	0	0	0	0	0	0	1
Pituitary									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Prostate									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		3	0	0	3	-	-	-	-
Cell infiltration,ventral lobe		2	0	0	3	-	-	-	-
minimal		2	0	0	3	-	-	-	-
Cell infiltration,dorsolateral lobe		1	0	0	0	-	-	-	-
minimal		1	0	0	0	-	-	-	-
Sciatic nerve									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Skeletal muscle,femoral									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6

-: Not applicable

Table 10-3

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Histopathological findings (Main group)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 6	15 6	60 6	250 6	0 6	15 6	60 6	250 6
Spinal cord, thoracic									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Spleen									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Stomach									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Testis									
Number examined		6	1	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		5	0	0	5	-	-	-	-
Atrophy, seminiferous tubular		1	1	0	1	-	-	-	-
minimal		1	0	0	0	-	-	-	-
moderate		0	1	0	0	-	-	-	-
severe		0	0	0	1	-	-	-	-
Thymus									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Thyroid									
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6
Not remarkable		2	2	5	2	2	4	3	4
Ectopic thymus		1	1	0	0	1	1	2	1
minimal		1	1	0	0	1	1	2	1
Cyst, ultimobranchial		4	4	0	2	4	1	1	1
minimal		4	4	0	2	4	1	1	1
Hypertrophy, follicular cell		0	0	1	3	0	0	0	2
minimal		0	0	1	3	0	0	0	2
Trachea									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Urinary bladder									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Uterus									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6

-: Not applicable

Table 10-4 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks
 Histopathological findings (Recovery group)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 6	M 250 6	F 0 6	F 250 6
Kidney					
Number examined		1	0	0	0
Dilatation, pelvic		1	0	0	0
mild		1	0	0	0
Regeneration, tubular		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Mineralization, medullary		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Liver					
Number examined		6	6	6	6
Not remarkable		1	1	0	0
Necrosis, focal		0	1	0	0
mild		0	1	0	0
Microgranuloma		5	5	6	6
minimal		5	5	6	6
Thyroid					
Number examined		6	6	6	6
Not remarkable		4	3	3	4
Cyst, ultimobranchial		2	3	3	2
minimal		2	3	3	2

要 約

当該試験条件下において、2-ナフチルイソブチルエーテルには遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判断した。

2-ナフチルイソブチルエーテルの遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 株, TA98 株, TA1535 株および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2*uvrA* 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

その結果、2-ナフチルイソブチルエーテル処理では、0.105~5000 μg /プレートのおいづれの用量においても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

陽性対照物質は、各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

また、用量設定試験、同一追試験および本試験により、試験結果の再現性が確認された。

1. 表題

2-ナフチルイソブチルエーテルの細菌を用いる復帰突然変異試験

2. 試験目的

被験物質の遺伝子突然変異誘発性を検討するため、細菌を用いた復帰突然変異試験を実施する。

3. 遵守した GLP および準拠したガイドライン

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17 ガイドライン
- 新規化学物質等に係る試験の方法について(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 471 (21st July 1997: Bacterial Reverse Mutation Test)

4. 試験番号

9889 (115-208)

5. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

実験終了日： 平成 18 年 8 月 17 日
試験終了日： 平成 19 年 8 月 16 日

13. 被験物質

13.1. 被験物質名

2-ナフチルイソブチルエーテル

13.2. ロット番号

GI01

13.3. 純度

99.1%

13.4. 製造元

東京化成工業株式会社

13.5. 購入年月日

平成 18 年 4 月 24 日

13.6. 購入量

500 g

13.7. 保存条件

冷蔵・遮光・除湿

13.8. 保存場所

安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫

- 7号館2階被験物質調製室 B 内プレハブ低温庫 ch. 72

保存期間：2006 年 4 月 24 日～同年 7 月 10 日

実測値：3.0～7.4°C

- 6号館2階被験物質調製室内バイオマルチクーラー ch. 41

保存期間：2006 年 7 月 10 日～同年 8 月 15 日（最終使用日）

実測値：5.0～6.6°C

13.9. 一般名

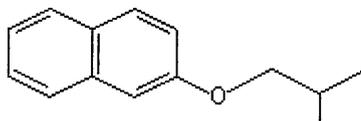
2-イソブトキシナフタレン

13.10. 化学名

2-Naphthylisobutyl ether

13.11. CAS No.
2173-57-1

13.12. 化学構造



13.13. 分子式
 $C_{14}H_{16}O$

13.14. 分子量
200.28

13.15. 物質の状態
白色結晶塊

13.16. 融点
32.4°C (凝固点)

13.17. 引火点
68°C

13.18. 溶解性
水：不溶
DMSO：可溶 (50 mg/mL 以上)

13.19. 安定性
通常の取り扱い条件においては安定.

13.20. 取り扱い上の注意
酸化剤との接触に注意する。引火性が強く、燃焼しやすい液体。
取り扱いは換気の良い場所で行い、粉塵が飛散しないように注意する。
適切な保護具を着用し、吸い込んだり、目、皮膚および衣類に触れないようにする。

13.21. 安定性分析

13.21.1. 安定性の確認方法

実験終了後に純度分析を実施した結果、純度が 99.6% (判定基準：98%以上) であったことから、被験物質の実験期間中の安定性が確認された。

純度分析の詳細を Reference data 1 に示す。

13.21.2. 安定性分析用被験物質の保存条件

安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫

- 7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch. 72

保存期間：2006年4月24日～同年9月13日（最終使用日）

実測値：3.0～7.7℃

13.22. 残余被験物質の処理

実験終了後、1.0 g の被験物質を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りは専用の容器に廃棄した。

14. 試験材料および方法

14.1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験のガイドラインで指定されている次の5種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2 <i>invA</i>	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)

ネズミチフス菌は1983年9月6日にカリフォルニア大学（エイムス教授）から、また、大腸菌については1983年3月16日に国立衛生試験所（現 国立医薬品食品衛生研究所）から分与を受けた。

2005年8月30日～同年9月1日に菌株の特性検査を実施し、規定の特性を保持している菌株を試験に使用した。

各菌株の保存は、菌懸濁液にジメチルスルホキシド（DMSO, GC用, 純度99.9%, Lot No. K31758278, Merck）を容量比80：7の割合で添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mL ずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結した後、超低温フリーザー（MDF-U71V, 三洋電機；設定値：-80℃, 基準値：-60℃以下）に保存した。

14.2. 培地の調製

14.2.1. 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（2006年4月1日製造, Lot No. ANI330DV, オリエンタル酵母工業）を試験に使用した。本プレートは、Vogel-Bonner 最少培地 E を含む溶液 30 mL を無菌的にシャーレに分注したものである。

最少グルコース寒天平板培地の組成を以下に示す。

硫酸マグネシウム七水和物	0.2	g
クエン酸一水和物	2	g
リン酸水素二カリウム	10	g
リン酸二水素アンモニウム	1.92	g
水酸化ナトリウム	0.66	g
D(+) グルコース	20	g
寒天 (BA-30A, Lot No. 51115, 伊那食品工業)	10.4	g
精製水	1000	mL

14.2.2. トップアガー

0.5 w/v%塩化ナトリウム/0.6 w/v%寒天 (Bacto-agar, Lot No. 4246218, BD Diagnostic Systems) 水溶液をオートクレーブで滅菌した。この寒天溶液 10 容量に、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン (Lot No. 308C2055, 関東化学) /0.5 mmol/L D-ビオチン (Lot No. 702W2180, 関東化学) 水溶液を 1 容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン (Lot No. 211D2047, 関東化学) 水溶液を 1 容量加えた。

14.3. 試験菌株の前培養

内容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに 2.5 w/v%ニュートリエントブロス (Nutrient Broth No. 2, Lot No. 298714, Oxoid) 培養液を 25 mL 分注し、これに融解した菌懸濁液 50 μ L を接種した。フラスコをクールバスシェーカー (ML-10F, タイテック) に設置し、培養開始までの間、設定温度 4°C に静置した。その後、37°C の条件で 8 時間振盪 (100 回/分) 培養した。試験毎に菌株の培養を実施し、菌懸濁液は培養終了後速やかに使用した。

ATP フォトメーター (ルミテスター-K-100, キッコーマン) を用い、試験菌株の生菌数が 1.0×10^9 /mL 以上であることを確認した。生菌数を次の表に示す。

試験	生菌数 ($\times 10^9$ /mL)				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
用量設定試験	3.71	3.05	4.37	4.18	1.57
同一追試験	4.11	4.67	-	3.03	2.09
本試験	4.05	4.53	4.23	3.66	1.67

14.4. S9 mix

製造後 6 カ月以内の S9 mix (Lot No. FSM-543, キッコーマン) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値: -80°C, 基準値: -60°C 以下) に保存した。

14.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法を次の表に示す.

ロット番号	RAA-543
製造年月日	2006年5月12日 (誘導物質投与開始後5日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7週齢
体重	209~246 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および 投与回数	PB: 30 mg/kg 1回 (1日目) 60 mg/kg 3回 (2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回 (3日目)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	25.94 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す.

S9	0.1	mL
MgCl ₂	8	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADPH	4	μmol
NADH	4	μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100	μmol

14.5. 被験物質液の調製

被験物質は, 水に不溶で, DMSOには可溶であることから, 被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったDMSO (SeccoSolv[®], 純度≥99.5%, Lot No. K32997731 【用量設定試験, 同一追試験】, 純度≥99.5%, Lot No. K35364331 【本試験】, Merck) に溶解させた.

用量設定試験では, 使用直前に被験物質 350 mg を精密に量り, 目盛付き試験管に移した後, DMSO 約 6 mL を加え, 攪拌しながら溶解させた. さらに, DMSO を加えて 7 mL に定容し, 調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した. この 50.0 mg/mL 調製原液 3 mL を DMSO 4.5 mL に加えることにより, 20.0 mg/mL 溶液を調製した. 以下同様に希釈を

行い、8.00, 3.20, 1.28, 0.512, 0.205 および 0.0819 mg/mL 溶液を調製した。

用量設定試験（追試験）では、使用直前に被験物質 20.0 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液（4.00 mg/mL 溶液）を準備した。この 4.00 mg/mL 調製原液 2 mL を DMSO 3 mL に加えることにより、1.60 mg/mL 溶液を調製した。以下同様に希釈を行い、0.64, 0.256, 0.102, 0.0410, 0.0164, 0.00655, 0.00262 および 0.00105 mg/mL 溶液を調製した。

本試験では、使用直前に被験物質 250 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液（50.0 mg/mL 溶液）を準備した。この 50.0 mg/mL 調製原液 3.5 mL を DMSO 3.5 mL に加えることにより、25.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様に希釈を行い、12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195, 0.0977, 0.0488, 0.0244, 0.0122, 0.00610 および 0.00305 mg/mL 溶液を調製した。

いずれの試験においても調製後、被験物質液を速やかに使用した。なお、被験物質液（調製後 3.5 時間）に発熱、発泡、発煙等の変化は認められなかった。

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性（溶媒）対照

被験物質液調製に用いる溶媒である DMSO を使用した。

14.6.2. 陽性対照

下記の陽性対照物質を試験に使用した。AF-2, 9-AA および 2-AA は、DMSO (Lot No. K30049278, Merck) を用いて調製し、 NaN_3 は、注射用水（日本薬局方注射用水, Lot No. 5F77N, 大塚製薬工場）を用いて調製した。各調製液を凍結保存用チューブに 0.5 mL ずつ分注し、凍結（設定値： -80°C 、基準値： -60°C 以下）保存したものを試験に用いた（使用期限：2007 年 12 月 28 日）。

AF-2	2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (含量 99.5%, Lot No. PKE1831, 和光純薬工業)
NaN_3	アジ化ナトリウム (純度 99.5%, Lot No. KLH1033, 和光純薬工業)
9-AA	9-アミノアクリジン塩酸塩 (純度 99.3%, Lot No. 16323JR, Sigma-Aldrich)
2-AA	2-アミノアントラセン (含量 95.0%, Lot No. KLH1058, 和光純薬工業)

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	陽性対照物質	陽性対照溶液調製日	用量 (µg/プレート)	陽性対照物質溶液濃度 (µg/mL)
ネズミチフス菌 TA100	AF-2	2006.5.29	0.01	0.1
ネズミチフス菌 TA98	AF-2	2006.5.29	0.1	1.0
ネズミチフス菌 TA1535	NaN ₃	2006.5.29	0.5	5.0
ネズミチフス菌 TA1537	9-AA	2006.5.29	80	800
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	2006.5.29	0.01	0.1

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	陽性対照物質	陽性対照溶液調製日	用量 (µg/プレート)	陽性対照物質溶液濃度 (µg/mL)
ネズミチフス菌 TA100	2-AA	2006.5.29	1.0	10
ネズミチフス菌 TA98	2-AA	2006.5.29	0.5	5.0
ネズミチフス菌 TA1535	2-AA	2006.5.29	2.0	20
ネズミチフス菌 TA1537	2-AA	2006.5.29	2.0	20
大腸菌 WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	2006.5.29	10	100

なお、これらの用量は「安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP」(労働省安全衛生部化学物質調査課編, 1991 年) に準じて設定した。

14.6.3. 無菌試験

被験物質液 (調製原液) ならびに S9 mix については無菌試験を実施した。すなわち、調製原液 100 µL あるいは S9 mix 500 µL にトップアガー 2 mL を添加し、プレート上に注いだ。37°C の条件で 48 時間培養した後、雑菌汚染の有無を確認した。調製原液および S9 mix のいずれについても 2 枚のプレートを用いて無菌試験を実施した。

2-ナフチルイソブチルエーテル調製原液ならびに S9 mix の無菌試験において、菌の増殖は認められなかった。

14.7. 用量設定試験 (予備試験)

14.7.1. 用量

用量設定試験における被験物質の用量として、ガイドライン上定められた 5000 µg/プレートを最高用量とし、以下、2000, 800, 320, 128, 51.2, 20.5 および 8.19 µg/プレートを設定した。

14.7.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 3 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、試験菌株、S9 mixの有無および用量を明記することにより各プレートを識別した。

14.7.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

試験管に使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を 100 μ L、次いで、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) の場合は、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.4) 500 μ L を、代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の場合は、S9 mix 500 μ L を分注した。さらに、前培養した試験菌株懸濁液 100 μ L を加えた後、ウォーターバスシェーカー (MM-10, タイテック) を用いて 37°C, 120 回/分の条件で 20 分間振盪した (プレインキュベーション)。振盪終了後、トップアガー 2 mL を添加し、内容物を混合した。その後、混合液をプレート上に注ぎ、一様に広げた。恒温器 (SSV-R11DA, 池田理化) を用い、各プレートを 37°C の条件で 48 時間培養した。

14.7.4. 析出等の観察

各処理法において、処理開始時およびコロニー数計測時に被験物質析出等の有無を肉眼で観察した。

14.7.5. コロニー数計測

被験物質の生育阻害作用を確認するため、プレート上の試験菌株 (背景菌) の生育状態について実体顕微鏡 ($\times 40$) を用いて観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニー数を計測した。計測に際しては、コロニーアナライザー (CA-11, システムサイエンス) を用い、面積補正ならびに数え落とし補正を実施してコロニー数を算出した。

生育阻害あるいは析出物によりコロニーアナライザーの使用が不適当な場合は、目視でコロニー数を計数した。

14.8. 用量設定試験 (追試験)

14.8.1. 用量

用量設定試験で、-S9 処理の WP2*uvrA* 株以外の菌株ならびに+S9 処理の TA100 株、TA1535 株および TA1537 株において、低用量まで生育阻害が認められ、生育阻害を示さなかった用量は 4 用量未満あるいは 4 用量以下しか得られなかった。したがって、さらに低用量を設定し、用量設定試験 (追試験) を実施した。用量設定試験 (追試験) における被験物質の用量として、次表に示す 7 用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
TA100	0.105	0.262	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6
TA1535	0.105	0.262	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6
TA98	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6	64.0	160
TA1537	0.105	0.262	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (µg/プレート)						
TA100	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6	64.0	160
TA1535	0.655	1.64	4.10	10.2	25.6	64.0	160
TA1537	1.64	4.10	10.2	25.6	64.0	160	400

14.8.2. 使用プレート数および識別方法

14.7.2.に記載した方法に準じた。

14.8.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

14.7.3.に記載した方法に準じた。

14.8.4. 析出等の観察

14.7.4.に記載した方法に準じた。

14.8.5. コロニー数計測

14.7.5.に記載した方法に準じた。

14.9. 本試験

14.9.1. 用量

用量設定試験および用量設定試験（追試験）の結果、-S9 処理および+S9 処理のいずれの試験菌株においても変異原性は認められなかった。試験菌株に対する生育阻害作用は、用量設定試験で-S9 処理および+S9 処理の WP2uvrA 株以外の菌株において、低用量または中用量まで認められた。また、用量設定試験（追試験）においては、実施した全ての試験菌株（-S9 処理の TA100 株, TA98 株, TA1535 株, TA1537 株, +S9 処理の TA100 株, TA1535 株, TA1537 株）の高用量（菌株により 10.2~400 µg/プレート）で生育阻害が認められた。したがって、本試験における被験物質の用量として、WP2uvrA 株においては、5000 µg/プレートを最高用量とし、それ以外の菌株においては、生育阻害作用が認められると考えられる用量を最高用量として、次表に示す 6 または 7 用量を設定した。

《代謝活性化系非存在下：-S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	0.305	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5
TA1535	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5	39.1
WP2 _{uvrA}	-	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
TA1537	0.305	0.610	1.22	2.44	4.88	9.77	19.5

《代謝活性化系存在下：+S9 処理》

菌株	用量 (μg/プレート)						
TA100	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
TA1535	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313
WP2 _{uvrA}	-	156	313	625	1250	2500	5000
TA98	19.5	39.1	78.1	156	313	625	1250
TA1537	4.88	9.77	19.5	39.1	78.1	156	313

14.9.2. 使用プレート数および識別方法

14.7.2.に記載した方法に準じた。

14.9.3. 被験物質あるいは対照物質の処理および培養条件

14.7.3.に記載した方法に準じた。ただし、プレインキュベーションにはウォーターバスシェーカー (M-100^N, タイテック) を用いた。

14.9.4. 析出等の観察

14.7.4.に記載した方法に準じた。

14.9.5. コロニー数計測

14.7.5.に記載した方法に準じた。

14.10. 試験成立条件

- a. 陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、背景データから求めた基準値内であること
 - b. 陽性対照のコロニー数は、同時に実施する陰性対照値の2倍を超えること
- 上記の条件を満たした場合に、試験は成立したと判断した。

14.11. 結果の解析

平均復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

15. 試験結果

15.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示す.

2-ナフチルイソブチルエーテル処理では, -S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても, 復帰変異コロニー数の増加は認められなかった. また, -S9 処理および+S9 処理の大腸菌 WP2uvrA 株を除く 4 菌株では, 低用量あるいは中用量以上の用量において試験菌株に対する生育阻害作用が認められた. なお, -S9 処理の TA100 株における 800 μg /プレート以上の用量で, 強い生育阻害の影響により, コロニーアナライザーでは栄養要求性菌株のコロニーと変異株のコロニーが判別できなかったため, 目視によりコロニー数を計数した.

陽性対照物質は, 各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

15.2. 被験物質の析出等 (用量設定試験)

処理開始時に, -S9 処理では 51.2 μg /プレート以上の用量で反応液に白濁が生じ, さらに, 800 μg /プレート以上の用量では透明油滴状の析出物が観察された. +S9 処理では 320 μg /プレート以上の用量で反応液に白濁が生じ, さらに, 800 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物および透明油滴状の析出物が観察された.

コロニー数計測時には, -S9 および+S9 処理ともに 2000 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物がみられ, さらに, 5000 μg /プレートでは透明油滴状の析出物が観察された.

TA100 株の 800 μg /プレートにおいて, 強い生育阻害の影響により, コロニーアナライザーでは栄養要求性菌株のコロニーと変異株のコロニーとが判別できなかったため, 目視によりコロニー数を計数した. また, 析出物の影響により, -S9 処理の 2000 μg /プレート以上の用量および+S9 処理の 5000 μg /プレートでは, コロニーアナライザーの使用が不適当と判断し, 目視によりコロニー数を計数した.

15.3. 用量設定試験一追試験

結果を Figure 6~9 および Table 3, 4 に示す.

2-ナフチルイソブチルエーテル処理では, 復帰変異コロニー数の増加は認められなかった. また, 試験菌株に対する生育阻害作用は, -S9 処理, TA100 株および TA1537 株の 10.2 μg /プレート以上の用量, TA1535 株の 25.6 μg /プレート, TA98 株の 160 μg /プレートならびに+S9 処理, TA100 株および TA1535 株の 160 μg /プレート, TA1537 株の 160 μg /プレート以上の用量で認められた.

陽性対照物質は, 試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した.

15.4. 被験物質の析出等 (用量設定試験—追試験)

処理開始時、-S9 処理の 64.0 μg /プレート以上の用量および+S9 処理の 400 μg /プレートで反応液に白濁が生じたが、コロニー数計測時には、析出等の変化は観察されなかった。

15.5. 本試験

結果を Figure 10~14 および Table 5, 6 に示す。

2-ナフチルイソブチルエーテル処理では、-S9 処理ならびに+S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理、TA100 株の 19.5 μg /プレート、TA1535 株の 39.1 μg /プレート、TA98 株の 156 μg /プレート以上の用量、TA1537 株の 9.77 μg /プレート以上の用量ならびに+S9 処理、TA100 株の 78.1 μg /プレート以上の用量、TA1535 株および TA1537 株の 156 μg /プレート以上の用量、TA98 株の 1250 μg /プレートで認められた。

陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

15.6. 被験物質の析出等 (本試験)

処理開始時に、-S9 処理では 78.1 μg /プレート以上の用量で反応液に白濁が生じ、さらに、625 μg /プレート以上の用量では透明油滴状の析出物が観察された。+S9 処理では 313 μg /プレート以上の用量で反応液に白濁が生じ、さらに、625 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、1250 μg /プレート以上の用量では透明油滴状の析出物も観察された。

コロニー数計測時において、-S9 処理では 1250 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、さらに、2500 μg /プレート以上の用量で透明油滴状の析出物が観察された。+S9 処理では 2500 μg /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、さらに、5000 μg /プレートで透明油滴状の析出物が観察された。

析出物の影響により、-S9 処理の 1250 μg /プレート以上の用量および+S9 処理の 5000 μg /プレートではコロニーアナライザーの使用が不適当であったため、目視でコロニーを計数した。

16. 考察および結論

2-ナフチルイソブチルエーテルの遺伝子突然変異誘発性を検討するため、細菌（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートあるいは試験菌株の生育を阻害する用量を設定し、試験を行った。その結果、2-ナフチルイソブチルエーテル処理群では、-S9 処理および+S9 処理の全ての試験菌株において、陰性対照と比較し、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

これら両処理法での試験結果は、用量設定試験、同一追試験および本試験により、再現性が確認された。

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ (Appendix 1) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、2-ナフチルイソブチルエーテルの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定された。

なお、これまでに2-ナフチルイソブチルエーテルの遺伝毒性および発がん性に関する報告はない。類縁体であるnaphthaleneは、細菌およびヒト細胞株での遺伝子突然変異試験で陰性、CHO細胞、リンパ球および着床前のマウス胚を用いた染色体異常試験で陽性との報告がある¹⁾。さらに、マウス骨髄での染色体異常誘発は認められないが、ショウジョウバエの翅毛スポット試験で陽性反応が認められている¹⁾。1-Methylnaphthaleneおよび2-methylnaphthaleneは、ヒトリンパ球において姉妹染色分体交換を誘発し、さらに、1-methylnaphthaleneは、弱いながらも染色体異常も誘発すると報告されている²⁾。2-Naphthylamineは、マウス骨髄小核試験で明確な陽性反応がみられている³⁾。Glycidil 1-naphthyl etherは、細菌を用いた復帰変異試験で陽性⁴⁾、マウスリンパ球での染色体異常試験で陽性、マウス骨髄での染色体異常試験で陽性との報告もある⁵⁾

17. 参考文献

- 1) Schreiner CA.: Genetic toxicity of naphthalene: a review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2003, 6(2): 161-183.
- 2) Kulka U, Schmid E, Huber R, Bauchinger M.; Analysis of the cytogenetic effect in human lymphocytes induced by metabolically activated 1- and 2-methylnaphthalene. *Mutat. Res.* 1988, 208(3-4): 155-158.
- 3) Mirkova E, Ashby J.: Activity of the human carcinogens benzidine and 2-naphthylamine in male mouse bone marrow micronucleus assays. *Mutagenesis* 1988 Sep, 3(5): 437-439.
- 4) Einisto P, Hooberman BH, Sinsheimer JE.: Base-pair mutations caused by six aliphatic epoxides in *Salmonella typhimurium* TA100, TA104, TA4001, and TA4006. *Environ Mol Mutagen.* 1993, 21(3): 253-257.
- 5) Das L, Das SK, Chu EH, Sinsheimer JE.: Chromosomal aberrations in mouse lymphocytes exposed in vivo and in vitro to aliphatic epoxides. *Mutat. Res.* 1993, 299(1): 19-24.

18. 参考とした資料

- Ames BN, Lee FD, Durston WE. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Nat Acad Sci* 1973; 70: 782-6.
- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogens are mutagens. a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1973; 70 (8): 2281-5.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31: 347-64.
- Yahagi T. [Screening methods using microbes for the environmental carcinogens (author's transl)]. [Article in Japanese]. *Protein, Nucleic Acid and Enzyme* 1975; 20: 16-27.
- Ministry of Labor, Industrial Safety and Health Department. [Test Guidelines and GLP for Mutagenicity Test using Microorganisms in the Safety and Health Law]. Tokyo; Japan Industrial Safety and Health Association; 1991.
- Ishidate M Jr editor. [The data book for mutagenicity assay using microorganisms]. [Article in Japanese]. Life-science Information Center Press; 1991.

Table 1. Summary data on dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	103	100	84	9	7	9	22	20	22	16	22	14	10	13	9
		[96	\pm	10]	8	\pm	1]	21	\pm	1]	17	\pm	4]	11	\pm	2]
2-naphthylisobutyl ether	8.19	89	89	92	11	11	12	20	24	17	12	12	15	7	7	9
		[90	\pm	2]	11	\pm	1]	20	\pm	4]	13	\pm	2]	8	\pm	1]
	20.5	79*	89*	80*	7*	12*	7*	23	21	32	13	23	17	6*	8*	4*
		[83	\pm	6]	9	\pm	3]	25	\pm	6]	18	\pm	5]	6	\pm	2]
	51.2	67*	83*	72*	6*	8*	11*	18	26	15	23	15	16	8*	5*	3*
		[74	\pm	8]	8	\pm	3]	20	\pm	6]	18	\pm	4]	5	\pm	3]
	128	53*	54*	52*	9*	14*	10*	21	25	24	12*	19*	19*	6*	3*	3*
		[53	\pm	1]	11	\pm	3]	23	\pm	2]	17	\pm	4]	4	\pm	2]
	320	48*	47*	42*	8*	6*	9*	18	14	13	14*	18*	14*	3*	7*	5*
		[46	\pm	3]	8	\pm	2]	15	\pm	3]	15	\pm	2]	5	\pm	2]
	800	4*	4*	3*	6*	10*	13*	19	21	22	22*	21*	24*	6*	6*	7*
		[4	\pm	1]	10	\pm	4]	21	\pm	2]	22	\pm	2]	6	\pm	1]
	2000 +	1*	2*	0*	6*	6*	5*	19	16	16	11*	14*	17*	3*	1*	3*
		[1	\pm	1]	6	\pm	1]	17	\pm	2]	14	\pm	3]	2	\pm	1]
	5000 +	3*	0*	0*	10*	2*	2*	17	12	7	15*	14*	9*	2*	1*	1*
		[1	\pm	2]	5	\pm	5]	12	\pm	5]	13	\pm	3]	1	\pm	1]
Positive control compound		AF-2			NaN ₃			AF-2			AF-2			9-AA		
Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Revertant colonies per plate		677	694	724	616	616	644	105	105	99	631	717	672	311	465	342
		[698	\pm	24]	625	\pm	16]	103	\pm	3]	673	\pm	43]	373	\pm	81]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide NaN₃: Sodium azide 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	104	92	116	12	9	12	31	20	27	28	27	29	25	15	20
		[104	\pm	12]	11	\pm	2]	26	\pm	6]	28	\pm	1]	20	\pm	5]
2-naphthylisobutyl ether	8.19	114	133	119	15	20	10	23	25	19	23	30	26	13	17	13
		[122	\pm	10]	15	\pm	5]	22	\pm	3]	26	\pm	4]	14	\pm	2]
	20.5	119	112	110	12	17	13	19	17	20	31	24	30	10	11	19
		[114	\pm	5]	14	\pm	3]	19	\pm	2]	28	\pm	4]	13	\pm	5]
	51.2	98	112	116	13	8	15	16	21	21	25	24	23	20	14	13
		[109	\pm	9]	12	\pm	4]	19	\pm	3]	24	\pm	1]	16	\pm	4]
	128	86*	75*	91*	15	6	8	18	24	19	20	25	17	13*	10*	11*
		[84	\pm	8]	10	\pm	5]	20	\pm	3]	21	\pm	4]	11	\pm	2]
	320	63*	68*	77*	6*	6*	7*	21	15	15	22	28	29	11*	6*	13*
		[69	\pm	7]	6	\pm	1]	17	\pm	3]	26	\pm	4]	10	\pm	4]
	800	59*	56*	59*	6*	5*	4*	20	14	19	29*	20*	17*	4*	4*	6*
		[58	\pm	2]	5	\pm	1]	18	\pm	3]	22	\pm	6]	5	\pm	1]
	2000 +	49*	58*	64*	12*	5*	13*	16	19	27	24*	31*	21*	12*	11*	16*
		[57	\pm	8]	10	\pm	4]	21	\pm	6]	25	\pm	5]	13	\pm	3]
	5000 +	29*	39*	35*	11*	8*	5*	8	16	12	9*	11*	12*	2*	1*	3*
		[34	\pm	5]	8	\pm	3]	12	\pm	4]	11	\pm	2]	2	\pm	1]
Positive control compound		2-AA			2-AA			2-AA			2-AA			2-AA		
Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		1			2			10			0.5			2		
Revertant colonies per plate		1149	1062	1013	355	381	330	561	614	623	343	357	388	146	127	161
		[1075	\pm	69]	355	\pm	26]	599	\pm	34]	363	\pm	23]	145	\pm	17]

2-AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Summary data on dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether
(Additional study)[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]											
		TA100			TA1535			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	88	93	104	12	13	15	18	26	30	5	9	8
		[95	\pm	8]	[13	\pm	2]	[25	\pm	6]	[7	\pm	2]
2-naphthylisobutyl ether	0.105	107	117	105	9	13	9				9	11	12
		[110	\pm	6]	[10	\pm	2]	[[11	\pm	2]
	0.262	99	114	109	5	9	6				9	5	6
		[107	\pm	8]	[7	\pm	2]	[[7	\pm	2]
	0.655	118	105	108	8	16	11	20	21	20	13	8	12
		[110	\pm	7]	[12	\pm	4]	[20	\pm	1]	[11	\pm	3]
	1.64	96	105	107	15	11	13	29	30	31	10	13	11
		[103	\pm	6]	[13	\pm	2]	[30	\pm	1]	[11	\pm	2]
	4.10	77	93	103	5	9	8	27	24	20	11	10	8
		[91	\pm	13]	[7	\pm	2]	[24	\pm	4]	[10	\pm	2]
	10.2	70*	88*	75*	7	9	8	20	25	24	8*	5*	4*
		[78	\pm	9]	[8	\pm	1]	[23	\pm	3]	[6	\pm	2]
	25.6	71*	77*	76*	3*	5*	9*	26	21	22	5*	2*	7*
		[75	\pm	3]	[6	\pm	3]	[23	\pm	3]	[5	\pm	3]
	64.0							16	21	14			
		[[[17	\pm	4]	[
	160							21*	22*	16*			
		[[[20	\pm	3]	[
Positive control compound		AF-2			NaN ₃			AF-2			9-AA		
Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.01			0.5			0.1			80		
Revertant colonies		606	573	583	573	535	554	590	589	575	321	373	346
per plate	[587	\pm	17]	[554	\pm	19]	[585	\pm	8]	[347	\pm	26]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide NaN₃: Sodium azide 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride
a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)
* : Growth inhibition was observed.

Table 4. Summary data on dose-finding study of 2-naphthylisobutyl ether
(Additional study)[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]								
		TA100			TA1535			TA1537		
DMSO a)	0	106	96	103	7	9	9	15	16	12
		[102	\pm	5]	8	\pm	1]	14	\pm	2]
2-naphthylisobutyl ether	0.655	100	106	87	8	6	8			
		[98	\pm	10]	7	\pm	1]			
	1.64	114	123	109	9	7	10	21	23	18
		[115	\pm	7]	9	\pm	2]	21	\pm	3]
	4.10	115	128	139	15	11	12	22	20	25
		[127	\pm	12]	13	\pm	2]	22	\pm	3]
	10.2	124	117	127	10	8	12	23	21	26
		[123	\pm	5]	10	\pm	2]	23	\pm	3]
	25.6	97	103	116	8	5	6	17	21	23
		[105	\pm	10]	6	\pm	2]	20	\pm	3]
	64.0	98	90	104	11	7	6	16	23	16
		[97	\pm	7]	8	\pm	3]	18	\pm	4]
	160	75*	68*	75*	7*	8*	6*	16*	15*	14*
		[73	\pm	4]	7	\pm	1]	15	\pm	1]
	400							5*	12*	15*
								[11	\pm	5]
Positive control compound		2-AA			2-AA			2-AA		
Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)		1			2			2		
Revertant colonies		1007	973	905	356	323	349	126	122	119
per plate	[962	\pm	52]	343	\pm	17]	122	\pm	4]

2-AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

Table 5. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-naphthylisobutyl ether
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	94	101	96	9	14	20	20	22	19	21	20	16	12	12	15
		[97	\pm	4]	14	\pm	6]	20	\pm	2]	19	\pm	3]	12	\pm	2]
2-naphthylisobutyl ether	0.305	92	100	105										13	16	8
		[99	\pm	7]										[12	\pm	4]
	0.610	89	98	96	12	8	19							12	8	11
		[94	\pm	5]	13	\pm	6]							[10	\pm	2]
	1.22	96	107	93	16	14	24							15	17	19
		[99	\pm	7]	18	\pm	5]							[17	\pm	2]
	2.44	102	92	93	13	10	27							15	11	13
		[96	\pm	6]	17	\pm	9]							[13	\pm	2]
	4.88	89	89	109	13	18	14				20	24	24	21	15	18
		[96	\pm	12]	15	\pm	3]				[23	\pm	2]	18	\pm	3]
	9.77	82	84	80	9	12	14				19	14	24	19*	16*	11*
		[82	\pm	2]	12	\pm	3]				[19	\pm	5]	15	\pm	4]
	19.5	84*	91*	79*	11	5	13				25	15	18	9*	5*	17*
		[85	\pm	6]	10	\pm	4]				[19	\pm	5]	10	\pm	6]
	39.1				5*	10*	15*				24	20	21			
					[10	\pm	5]				[22	\pm	2]			
	78.1										16	12	18			
											[15	\pm	3]			
	156							17	17	16	16*	13*	23*			
								[17	\pm	1]	17	\pm	5]			
	313							20	12	14	16*	16*	14*			
								[15	\pm	4]	15	\pm	1]			
	625							21	19	18						
								[19	\pm	2]						

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

Table 5. -Continued

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100		TA1535		WP2uvrA			TA98			TA1537				
2-naphthylisobutyl ether	1250 +							16	13	24						
								[18	\pm	6]						
	2500 +							12	18	22						
								[17	\pm	5]						
	5000 +							10	13	16						
								[13	\pm	3]						
Positive control compound		AF-2		NaN ₃		AF-2			AF-2			9-AA				
Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		0.01		0.5		0.01			0.1			80				
Revertant colonies per plate [531	602	550	585	603	627	110	92	107	806	743	805	334	390	317
		561	\pm	37]	605	\pm	21]	103	\pm	10]	785	\pm	36]	347	\pm	38]
AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide		NaN ₃ : Sodium azide					9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride									
+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.																

Table 6. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-naphthylisobutyl ether
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	99	112	96	16	12	13	15	22	18	28	23	32	21	22	19
		[102	\pm	9]	14	\pm	2]	18	\pm	4]	28	\pm	5]	21	\pm	2]
2-naphthylisobutyl ether	4.88	136	128	131	7	15	13							22	18	19
	[132	\pm	4]	12	\pm	4]								[20	\pm	2]
	9.77	118	116	112	16	13	16							25	22	23
	[115	\pm	3]	15	\pm	2]								[23	\pm	2]
	19.5	93	108	110	13	13	15				22	28	26	21	15	18
	[104	\pm	9]	14	\pm	1]				[25	\pm	3]	18	\pm	3]	
	39.1	105	118	104	9	7	16				25	18	25	16	14	11
	[109	\pm	8]	11	\pm	5]				[23	\pm	4]	14	\pm	3]	
	78.1	81*	86*	86*	8	10	12				23	25	23	22	12	21
	[84	\pm	3]	10	\pm	2]				[24	\pm	1]	18	\pm	6]	
	156	70*	67*	87*	6*	11*	8*	22	25	23	20	22	28	12*	13*	13*
	[75	\pm	11]	8	\pm	3]	23	\pm	2]	23	\pm	4]	13	\pm	1]	
	313	54*	58*	53*	14*	13*	9*	23	20	20	19	21	24	16*	13*	12*
	[55	\pm	3]	12	\pm	3]	21	\pm	2]	21	\pm	3]	14	\pm	2]	
	625							22	16	14	23	26	32			
								[17	\pm	4]	27	\pm	5]			
	1250							21	25	22	27*	19*	22*			
								[23	\pm	2]	23	\pm	4]			
	2500 +							17	10	20						
								[16	\pm	5]						
	5000 +							17	19	20						
								[19	\pm	2]						
Positive control compound		2-AA			2-AA			2-AA			2-AA			2-AA		
Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)		1			2			10			0.5			2		
Revertant colonies per plate	[934	924	980	361	387	372	507	530	509	398	408	349	162	149	175
		946	\pm	30]	373	\pm	13]	515	\pm	13]	385	\pm	32]	162	\pm	13]

2-AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 $\mu\text{L}/\text{plate}$)

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

要 約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、2-ナフチルイソブチルエーテルは、染色体異常を誘起しないものと判定された

2-ナフチルイソブチルエーテルの染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/TU 細胞) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果に基づいて、濃度設定を行った。染色体異常試験では、短時間処理法-S9 処理で 76.8, 96.0 および 120 µg/mL ならびに同+S9 処理で 16.1, 20.1 および 25.2 µg/mL のそれぞれ 3 濃度について顕微鏡観察を実施した。その結果、2-ナフチルイソブチルエーテル処理群では、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても、明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

以上の結果より、連続処理法 24 時間処理群について 61.4, 76.8, 96.0 および 120 µg/mL の 4 濃度について顕微鏡観察を実施したが、同試験法においても、2-ナフチルイソブチルエーテル処理による染色体異常の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の陽性対照物質マイトマイシン C (MMC) ならびに短時間処理法+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) では、いずれも染色体構造異常を陰性対照と比較して高頻度に誘発した。

1. 表題

2-ナフチルイソブチルエーテルのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2. 試験目的

被験物質の染色体異常誘発性をほ乳類培養細胞を用いて検討する。

3. 遵守した GLP および準拠したガイドライン

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17 ガイドライン
- 新規化学物質等に係る試験の方法について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 473 (21st July 1997: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test)

4. 試験番号

9890 (115-209)

5. 試験施設

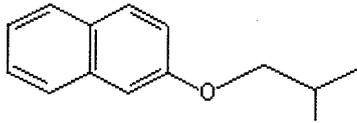
〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

13. 被験物質
- 13.1. 被験物質名
2-ナフチルイソブチルエーテル
- 13.2. ロット番号
GI01
- 13.3. 純度
99.1%
- 13.4. 製造元
東京化成工業株式会社
- 13.5. 購入年月日
平成 18 年 4 月 24 日
- 13.6. 購入量
500 g
- 13.7. 保存条件
冷蔵・遮光・除湿
- 13.8. 保存場所
安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫
- 7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch. 72
保存期間：2006年4月24日～同年7月10日
実測値：3.0～7.4℃
 - 6号館2階被験物質調製室内バイオマルチクーラー ch. 41
保存期間：2006年7月10日～同年8月3日（最終使用日）
実測値：5.0～6.6℃
- 13.9. 一般名
2-イソブトキシナフタレン
- 13.10. 化学名
2-Naphthylisobutyl ether
- 13.11. CAS No.
2173-57-1

13.12. 化学構造



13.13. 分子式

$C_{14}H_{16}O$

13.14. 分子量

200.28

13.15. 物質の状態

白色結晶塊

13.16. 融点

32.4°C (凝固点)

13.17. 引火点

68°C

13.18. 溶解性

水：不溶

DMSO：可溶 (50 mg/mL 以上)

13.19. 安定性

通常の取り扱い条件においては安定。

13.20. 取り扱い上の注意

酸化剤との接触に注意する。引火性が強く、燃焼しやすい液体。

取扱いは換気の良い場所で行い、粉塵が飛散しないように注意する。

適切な保護具を着用し、吸い込んだり、目、皮膚および衣類に触れないようにする。

13.21. 安定性分析

13.21.1. 安定性の確認方法

実験終了後に純度分析を実施した結果、純度が99.6% (判定基準：98%以上) であったことから、被験物質の実験期間中の安定性が確認された。

純度分析の詳細を Reference data 1 に示す。

13.21.2. 安定性分析用被験物質の保存場所

安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫

- 7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch. 72

保存期間：2006年4月24日～同年9月13日（最終使用日）

実測値：3.0～7.7°C

13.22. 残余被験物質の処理

実験終了後、1.0 g の被験物質を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りは専用の容器に廃棄された。

14. 試験材料および方法

14.1. 試験細胞株

遺伝毒性ガイドラインは乳類培養細胞を用いる染色体試験法で指定されている、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を使用した。CHL/IU 細胞は、1984年11月15日に国立衛生試験所（現 国立医薬品食品衛生研究所）から分与を受け、ジメチルスルホキシド（DMSO, GC 用, 純度 99.9%, Lot No. K31758278, Merck）を容量比で 10% 添加された後、液体窒素中に保存された。試験には、凍結した細胞を融解した後、3～5 日ごとに継代し、細胞増殖抑制試験では継代数 21 の細胞を、染色体異常試験では継代数 27 の細胞を用いた。

なお、凍結ロット毎にマイコプラズマ汚染検査を独立行政法人 医薬基盤研究所で実施した結果、汚染は認められなかった（細胞 Lot No. CLC-004, 2005 年 6 月 27 日, 試験結果報告書 NB-0001）。さらに、当該試験に使用した細胞は、2005 年 5 月 30 日～同年 6 月 1 日および 2005 年 6 月 6～8 日に細胞の特性検査が実施され、倍加時間（15.2 時間）、染色体数（25 本保有細胞 84%）等に異常は認められていない。

14.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（IWAKI, Lot No. 501095, 旭テクノグラス）に非働化（56°C, 30 分）済みの仔牛血清（Lot No. 542384, Invitrogen）を最終濃度で 10% になるよう添加した。調製後の培養液は、使用時まで冷蔵所（15°C 以下）に保存された。

14.3. 培養条件

CO₂ インキュベーター（三洋電機）を用い、CO₂ 濃度 5%, 温度 37°C の条件で細胞を培養した。

14.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix（Lot No. CAM-540, キッコーマン）を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー（設定値：-80°C, 基準値：-60°C 以下）に保存した。

14.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法を下表に示す。

ロット番号	RAA-540
製造年月日	2006年3月17日 (誘導物質投与開始後5日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7週齢
体重	191~240 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB)および5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および投与回数	PB: 30 mg/kg 1回 (1日目) 60 mg/kg 3回 (2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回 (3日目)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	26.46 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す。

S9	0.3	mL
MgCl ₂	5	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADP	4	μmol
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4	μmol

14.5. 被験物質液の調製

被験物質は、水に不溶で、DMSOには可溶であることから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったDMSO (SeccoSolv[®], 純度≥99.5%, Lot No. K32997731 【細胞増殖抑制試験】, 純度≥99.5%, Lot No. K35364331 【染色体異常試験】, Merck) に溶解させた。

細胞増殖抑制試験では、使用直前に被験物質 1001.4 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液 (200.3 mg/mL 溶液) を準備した。この 200.3 mg/mL 調製原液 1 mL を DMSO 1 mL に加えることにより、100.2 mg/mL 溶液を調製した。以下、同様に希釈を行い、50.1, 25.0, 12.5, 6.26, 3.13 および 1.56 mg/mL 液を調製した。

染色体異常試験では、使用直前に被験物質 75.0 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液 (15.0 mg/mL 溶液) を準備した。この 15.0 mg/mL 調製原液 4 mL を DMSO 1 mL に加えることにより、12.0 mg/mL 溶液を調製した。以下、同様な希釈を行い、9.60, 7.68, 6.14, 4.92, 3.93, 3.15, 2.52, 2.01, 1.61, 1.29 および 1.03 mg/mL 液を調製した。

いずれの試験においても調製後、被験物質液を速やかに使用した。なお、被験物質液 (調製後 3.5 時間) に発熱、発泡、発煙等の変化は認められなかった。

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質液調製に用いる溶媒である DMSO を使用した。

14.6.2. 陽性対照 (短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理)

注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. K5F73, 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC, 2 mg 力価/バイアル, Lot No. 459AEA, 協和発酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液, Lot No. 4C87N, 大塚製薬工場) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

処理濃度は、短時間処理法で 0.1 µg/mL, 連続処理法で 0.05 µg/mL とした。

14.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

注射用水 (Lot No. K5F73) 5 mL に溶解したシクロホスファミド (CP, 100 mg/バイアル, Lot No. 4066, 塩野義製薬) を生理食塩液 (Lot No. 4C87N) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

処理濃度は、12.5 µg/mL とした。

14.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

14.7.1. 処理濃度

細胞増殖抑制試験における被験物質の濃度として、ガイドラインで定められた 2003 µg/mL (10 mM 相当) を最高濃度とし、以下、1002, 501, 250, 125, 62.6, 31.3 および 15.6 µg/mL を設定した。

14.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 濃度当たり 2 ウェルを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

14.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F, 住友ベークライト）の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った. 6 時間培養を続けた後, 各ウェルの培養液を除去し, ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 115K2343, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した. 新鮮な培養液 500 μ L を加え, さらに 18 時間培養を続けた.

14.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った.
その後の操作は, 14.7.3. に記載した方法に準じた.

14.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行い, さらに 24 時間培養を続けた.

14.7.6. 処理量一覧

	溶媒あるいは被験物質		
	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	600 μ L	-	6 μ L
+S9 処理	500 μ L	100 μ L	6 μ L
24 時間処理	600 μ L	-	6 μ L

14.7.7. 析出等の観察

各処理法において, 処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した.

14.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウェルから培養液を除き, 10%中性緩衝ホルマリン液 (組織固定用, Lot No. DPR8664, 和光純薬工業) を加えて 10 分間細胞を固定した. 次に, クリスタル・バイオレット (Lot No. K31134240, Merck) の 0.1% 水溶液で 10 分間細胞を染色した. 各プレートを水洗した後, 乾燥させた. 各ウェルに色素溶出液 (30% エタノール, 1% 酢酸水溶液) 3 mL を加え, 5 分間放置した. 各ウェルの溶出液を 96 ウェルのプレート (アッセイプレート, IWAKI) に各々 300 μ L 分注し, マイクロプレートリーダー (モデル 450, BIO・RAD) を用いて 570 nm での吸光度を測定した. 陰性対照群での吸光度に対する比 (相対細胞増殖率) を各濃度群について求めた.

細胞増殖抑制が認められたため、50%細胞増殖抑制濃度を算出した。

14.8. 染色体異常試験

14.8.1. 処理濃度

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法-S9 処理、短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理で細胞毒性が認められ、50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ 99.1, 33.2 および 106 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。したがって、染色体異常試験では、細胞の増殖を 50% 以上抑制すると推定される濃度、すなわち、-S9 処理および 24 時間処理では 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+S9 処理では 49.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ をそれぞれ最高濃度とし、下表に示す 7 または 8 濃度を設定した。

処理法	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)							
-S9 処理	—	39.3	49.2	61.4	<u>76.8</u>	<u>96.0</u>	<u>120</u>	150
+S9 処理	10.3	12.9	<u>16.1</u>	<u>20.1</u>	<u>25.2</u>	31.5	39.3	49.2
24 時間処理	—	39.3	49.2	<u>61.4</u>	<u>76.8</u>	<u>96.0</u>	<u>120</u>	150

下線を付した濃度について染色体異常の観察を実施した。

14.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 濃度当たり 2 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

14.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート（細胞培養用シャーレ、住友ベークライト）に 8×10^3 細胞/ mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Lot No. 016K2433, Sigma-Aldrich）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

14.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/ mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。

その後の操作は、14.8.3. に記載した方法に準じた。

14.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/ mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。

培養終了後、14.8.6.に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行い、さらに24時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

14.8.6. 処理量一覧

	溶媒および被験物質			陽性対照		
	培養液	S9 mix	処理液	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.03 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

14.8.7. 析出等の観察

各処理法において、処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.8.8. 標本の作製

染色体標本作製のおよそ2時間前に、最終濃度 0.2 µg/mL となるようコルセミド溶液 (Lot No. 1305832, Invitrogen) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25%トリプシン溶液 (Lot No. 1300409, Invitrogen) を用いてプレートより細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で5分間遠心分離して培養液を除いた後、37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液 5 mL を加え、37°C の条件下で16分間の低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。固定液を2回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とした。細胞密度を適切な濃度に調整し、細胞濃度確認のため染色体標本を1枚作製した。染色体メタフェーズ展開装置 (HANABI) を用いて、スライドガラス上に細胞浮遊液を1滴滴下し、染色体標本を2枚作製した。スライド標本は十分に乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8, Lot No. TP794874, Merck) を用いて1.2 v/v%に希釈したギムザ液 (Lot No. OB408561, Merck) で12分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

14.8.9. 相対細胞増殖率の測定

染色体標本作製時に陰性対照、各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて、ATP フォトメーター (ルミテスターC-100LU, キッコーマン) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理を開始した細胞液 50 µL を添加し、攪拌した。測定用チューブにこの混合液 100 µL を分注した。細胞液添加から約20分経過後、測定用チューブにATP測定用試薬キット(ルシフェール250, キッコーマン)の発光試薬液 100 µL を添加し、相対発光量(Relative Light Unit : RLU) を測定した。陰性対照群における RLU に対する比 (相対細胞増殖率)

を各濃度群について求めた。

14.8.10. 評価対象

短時間処理法では、14.8.9.における相対細胞増殖率が陰性対照群の50%未満になる最も低い濃度を最高濃度とした3濃度を評価対象（観察濃度）とした。連続処理法24時間処理では、相対細胞増殖率が陰性対照群の50%未満になる濃度（120 µg/mL）では観察可能な分裂像が減少していたため、120 µg/mLを最高濃度とし、連続する4濃度を評価対象（観察濃度）とした。

14.8.11. 染色体の観察

短時間処理法および連続処理法のそれぞれの標本を分けてコード化した。短時間処理法について染色体の観察を実施し、その結果、陰性結果が得られたため、引き続き連続処理法の標本についても観察を行った。

各プレート当たり100個、すなわち、1濃度当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下（×600）で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ（gap）、染色分体切断（ctb）、染色分体切断（csb）、染色分体交換（cte）、染色体交換（cse）およびその他（oth）の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合は、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ、本来の軸からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として、1濃度当たり200個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

14.9. 試験成立条件

- a. 陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は、背景データから求めた基準値内であり、かつ、いずれも5%未満であること
- b. 陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は、上記の基準値内であり、かつ、10%以上であること

上記の条件を満たした場合に、試験は成立したと判断した。

14.10. 結果の解析

異常細胞の出現頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満、かつ、再現性が認められた場合に疑陽性、10%以上、かつ、再現性あるいは被験物質の濃度に依存性が認められた場合は、陽性と判定した。なお、ギャップのみ保有する細胞については、異常細胞数から除外して判定した。

統計学的手法を用いた検定は、実施しなかった。

15. 試験結果

15.1. 細胞増殖抑制試験

15.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示す.

短時間処理法-S9 処理および+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理の全てにおいて、濃度依存性を伴った細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、それぞれ 99.1, 33.2 および 106 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された.

15.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時、全ての処理の 62.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において白色粉末状の析出物が認められた. さらに、短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理では、125 および 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において白色膜状の析出物、501 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で白色油滴状の析出物も認められた. 短時間処理法+S9 処理では、125~501 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において白色膜状の析出物、1002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で白色油滴状の析出物が認められた.

被験物質処理終了時、短時間処理法の 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度および連続処理法 24 時間処理の 501 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において白色油滴状の析出物が認められた.

15.2. 染色体異常試験

15.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Table 3 および Appendix 1 に示す.

2-ナフチルイソブチルエーテル処理群での染色体構造異常出現頻度は、76.8, 96.0 および 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 0.0, 1.5 および 2.5%であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった. 倍数性細胞の出現頻度は、76.8, 96.0 および 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 0.0, 0.0 および 0.5%であり、陰性対照群 (0.0%) と同等であった. また、濃度に依存した細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での細胞増殖率は 24.1%であった.

陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 44.0%であった.

15.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Table 4 および Appendix 2 に示す.

2-ナフチルイソブチルエーテル処理群での染色体構造異常出現頻度は、16.1, 20.1 および 25.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 0.0, 0.0 および 1.5%であり、陰性対照群 (0.0%) と比較し明確な増加は認められなかった. 倍数性細胞の出現頻度は、16.1, 20.1 および 25.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 0.5, 0.0 および 1.0%であり、陰性対照群 (0.5%) と同等であった. また、

濃度に依存した細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 25.2 µg/mL での細胞増殖率は 40.2%であった。

陽性対照物質 CP で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 17.0%であった。

15.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Table 5 および Appendix 3 に示す。

2-ナフチルイソブチルエーテル処理群での染色体構造異常出現頻度は 61.4, 76.8, 96.0 および 120 µg/mL でそれぞれ 1.0, 0.5, 1.0 および 2.2%であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、61.4, 76.8, 96.0 および 120 µg/mL でそれぞれ 0.0, 0.0, 0.0 および 0.0%であり、陰性対照群 (0.5%) と同等であった。また、濃度に依存した細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 120 µg/mL での細胞増殖率は 40.3%であった。最高濃度の 120 µg/mL では強い分裂阻害がみられ、分析可能な分離中期像は 182 細胞であった。

陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 42.0%であった。

15.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始時、全ての処理法の 39.3µg/mL 以上の濃度において白色粉末状の析出物が認められた。さらに、短時間処理法-S9-処理および連続処理法 24 時間処理では、120 µg/mL 以上の濃度において白色膜状の析出物も認められた。

被験物質処理終了時、全ての処理法とも、析出は認められなかった。

16. 考察および結論

2-ナフチルイソプチルエーテルの染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理では, 細胞の増殖を 50%以上抑制する濃度まで検討した。

その結果, 2-ナフチルイソプチルエーテル処理群では, 短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理のいずれにおいても, 染色体異常の誘発頻度は, 陰性対照群と同等の値を示し, 明確な染色体構造異常の誘発は認められなかった。

短時間処理法において陰性と判定されたことから, 連続処理法 24 時間処理の染色体の観察を実施した。その結果, いずれの濃度においても明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも背景データ (Appendix 4) から求めた基準値内であり, 試験成立条件を満たしたことから, 当該試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から, 当該試験条件下において, 2-ナフチルイソプチルエーテルのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定された。

なお, これまでに2-ナフチルイソプチルエーテルの遺伝毒性および発がん性に関する報告はない。類縁体であるnaphthaleneは, 細菌およびヒト細胞株での遺伝子突然変異試験で陰性, CHO細胞, リンパ球および着床前のマウス胚を用いた染色体異常試験で陽性との報告がある¹⁾。さらに, マウス骨髄での染色体異常誘発は認められないが, ショウジョウバエの翅毛スポット試験で陽性反応が認められている¹⁾。1-Methylnaphthaleneおよび2-methylnaphthaleneは, ヒトリンパ球において姉妹染色分体交換を誘発し, さらに, 1-methylnaphthaleneは, 弱いながらも染色体異常も誘発すると報告されている²⁾。2-Naphthylamineは, マウス骨髄小核試験で明確な陽性反応がみられている³⁾。Glycidyl 1-naphthyl etherは, 細菌を用いた復帰変異試験で陽性⁴⁾, マウスリンパ球での染色体異常試験で陽性, マウス骨髄での染色体異常試験で陽性との報告もある⁵⁾

17. 参考文献

- 1) Schreiner CA.: Genetic toxicity of naphthalene: a review. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2003, 6(2): 161-183.
- 2) Kulka U, Schmid E, Huber R, Bauchinger M.; Analysis of the cytogenetic effect in human lymphocytes induced by metabolically activated 1- and 2-methylnaphthalene. Mutat. Res. 1988, 208(3-4): 155-158.
- 3) Mirkova E, Ashby J.: Activity of the human carcinogens benzidine and 2-naphthylamine in male mouse bone marrow micronucleus assays. Mutagenesis 1988 Sep, 3(5): 437-439.
- 4) Einisto P, Hooberman BH, Sinsheimer JE.: Base-pair mutations caused by six aliphatic epoxides in Salmonella typhimurium TA100, TA104, TA4001, and TA4006. Environ Mol Mutagen. 1993, 21(3): 253-257.
- 5) Das L, Das SK, Chu EH, Sinsheimer JE.: Chromosomal aberrations in mouse lymphocytes exposed in vivo and in vitro to aliphatic epoxides. Mutat. Res. 1993, 299(1): 19-24.

18. 参考とした資料

- Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - A screening for chemical carcinogens. Mutat Res 1977; 48: 337-354.
- Ishidate M. Chromosome aberration test *in vitro* for chemical mutagens in our environment. The Tissue Culture 1979; 5: 115-122.
- Evans HJ. In: Hollaender A editor. Cytological methods of detecting chemical mutagens. Chemical Mutagens. New York Plenum press 1976; 4: 1-25.
- Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Jr. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. Mutat Res 1979; 66: 277-290.
- Ishidate M. Chromosomal aberration test *in vitro*. Tokyo: REALIZE INC. 1987.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research [editorial]. Toxicol Appl Pharmacol 1972; 22: 269-275.

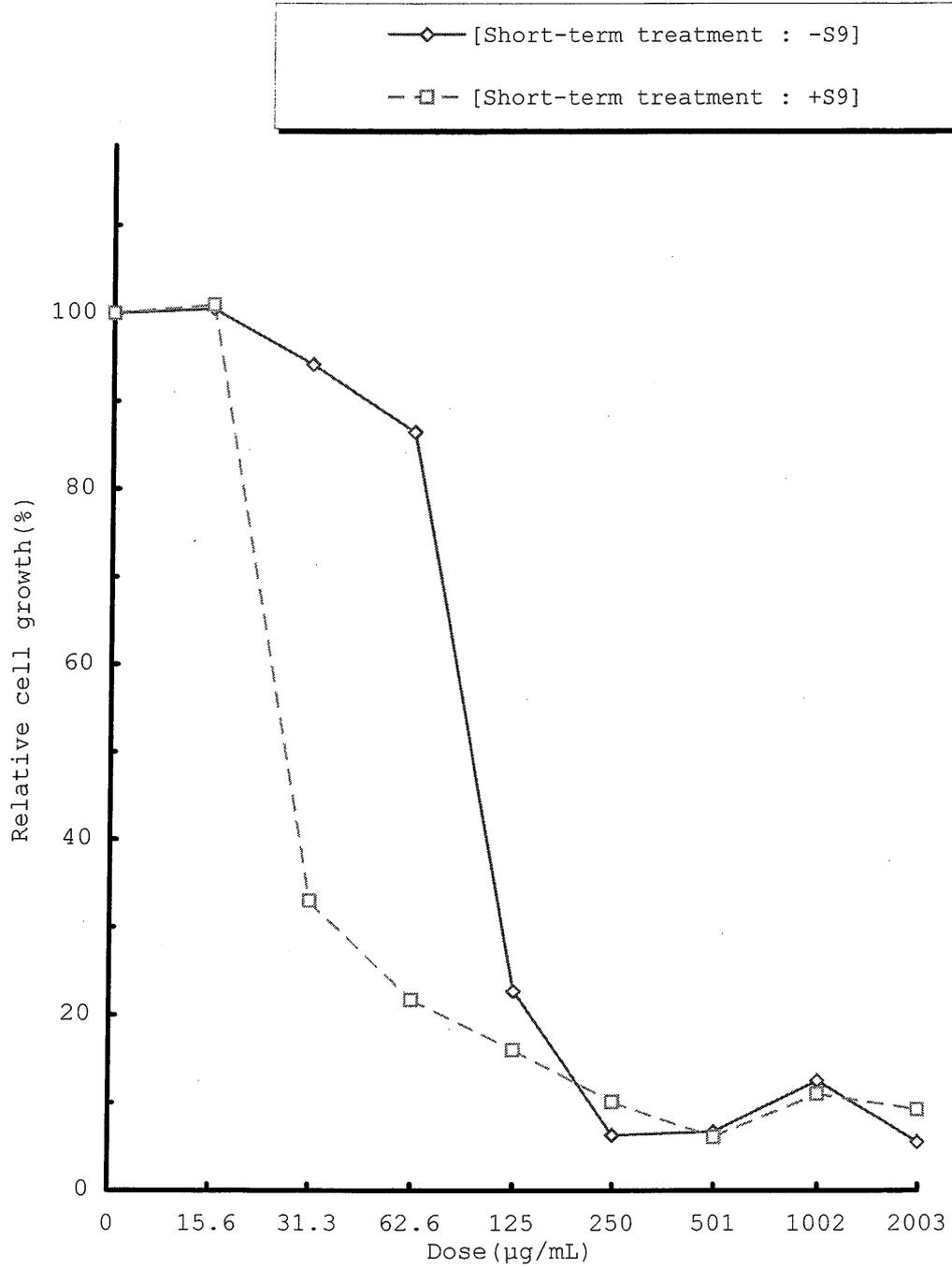


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with 2-naphthylisobutyl ether [Short-term treatment]

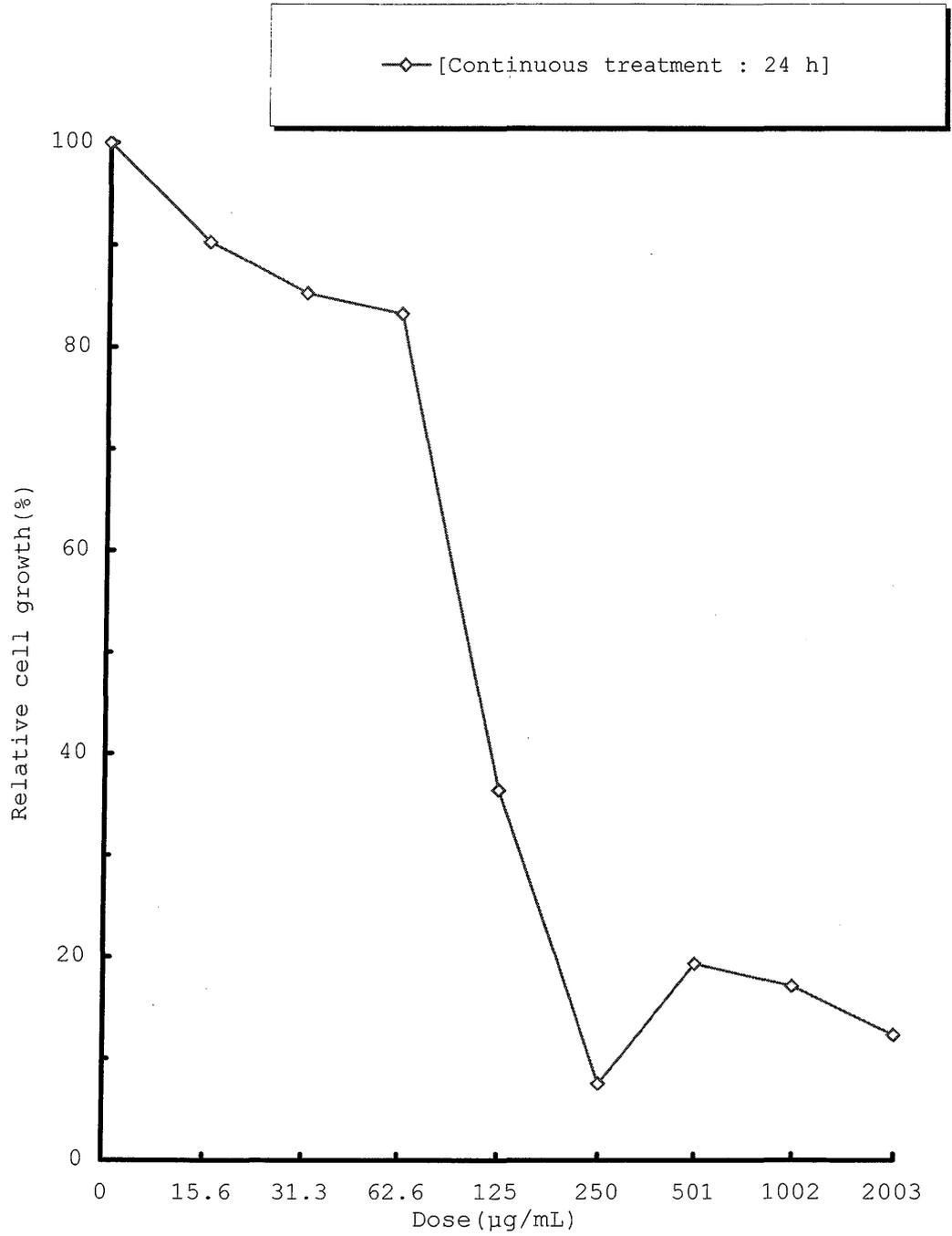


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with 2-naphthylisobutyl ether [Continuous treatment]

Table 1. Results of growth inhibition test of 2-naphthylisobutyl ether [Short-term treatment]

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]	Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
2-Naphthylisobutyl ether	15.6	100.2 100.8	[100.5]	2-Naphthylisobutyl ether	15.6	103.9 98.0	[101.0]
	31.3	91.1 97.2	[94.2]		31.3	31.4 34.6	[33.0]
	62.6	89.7 83.3	[86.5]		62.6	22.9 20.4	[21.7]
	125	28.3 17.1	[22.7]		125	15.9 16.0	[16.0]
	250 d)	7.5 5.1	[6.3]		250 d)	6.6 13.6	[10.1]
	501 d)	6.0 7.3	[6.7]		501 d)	6.1 6.1	[6.1]
	1002 d)	12.9 12.0	[12.5]		1002 d)	11.1 10.8	[11.0]
	2003 d)	6.6 4.4	[5.5]		2003 d)	10.7 7.6	[9.2]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[Short-term treatment : -S9] --- 99.1 µg/mL

[Short-term treatment : +S9] --- 33.2 µg/mL

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 2. Results of growth inhibition test of 2-naphthylisobutyl ether [Continuous treatment]

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
2-Naphthylisobutyl ether	15.6	90.9 89.6	[90.3]
	31.3	92.3 78.3	[85.3]
	62.6	87.0 79.6	[83.3]
	125	46.5 26.3	[36.4]
	250	7.2 7.7	[7.5]
	501 d)	15.9 22.6	[19.3]
	1002 d)	12.8 21.4	[17.1]
2003 d)	14.0 10.6	[12.3]	

50% Growth inhibition dose was as follows:
[Continuous treatment : 24 h] --- 106 µg/mL

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-naphthylisobutyl ether
 [Short-term treatment : -S9]

Exp. No. 9890(115-209)

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative Number of cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	6	100.0	200	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
2-Naphthylisobutyl ether	76.8	6	77.2	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
	96.0	6	53.5	200	0	2	1	0	0	0	3 (1.5)	200	0 (0.0)
	120	6	24.1	200	0	2	4	0	0	0	5 (2.5)	200	1 (0.5)
	150	6	11.0	NA									
MMC b)	0.1	6	85.6	200	2	30	69	0	1	0	88 (44.0)	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

NA: Not analyzed

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control: Mitomycin C

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-naphthylisobutyl ether
 [Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 9890(115-209)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative Number of cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
2-Naphthylisobutyl ether	16.1	6	64.3	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
	20.1	6	56.2	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
	25.2	6	40.2	200	0	1	2	0	0	0	3 (1.5)	200	2 (1.0)
	31.5	6	14.6	NA									
CP b)	12.5	6	88.0	200	3	8	28	0	0	0	34 (17.0)	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

NA: Not analyzed

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Cyclophosphamide

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2-naphthylisobutyl ether
 [Continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 9890(115-209)

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative Number of cell growth cells (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	24	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
2-Naphthylisobutyl ether	61.4	24	72.5	200	0	2	0	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	76.8	24	83.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	96.0	24	66.5	200	1	2	0	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	120	24	40.3	182	2	3	1	0	0	0	4 (2.2)	200	0 (0.0)
	150	24	26.3	Toxic									
MMC b)	0.05	24	123.1	200	5	33	68	0	0	0	84 (42.0)	200	1 (0.5)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
 -gap: total number of cells with aberrations except gap
 a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
 b): Positive control: Mitomycin C

要 約

2-ナフチルイソブチルエーテルの毒性学的性質を評価するため、当該物質の0（溶媒のコーンオイルのみ投与）、20、100 および 500 mg/kg/day を CrI:CD(SD)系ラットの雌雄各5例に28日間反復経口投与した。また、0 mg/kg（対照群）および500 mg/kg 群には、雌雄各5例の回復群を設け、28日間の反復投与終了後、14日間の休薬による毒性の回復性についても検討した。

試験期間を通じて、一般状態の観察、機能観察総合検査（FOB）、体重および摂餌量の測定を行い、投与期間および回復期間終了時に、臨床検査（血液学検査、血液凝固能検査、血液生化学検査、血清蛋白電気泳動検査および尿検査）および病理学検査（器官重量測定、肉眼観察および病理組織学検査）を実施した。

その結果の要約は、次の通りである。

500 mg/kg 群の雌で Day 6 および 7 の投与前に各1例が死亡した。

投与後の一般状態の変化として、500 mg/kg 群の雌雄で流涎、軟便、粘液便および水様下痢が観察された。

体重では、500 mg/kg 群の雌雄で体重増加抑制が認められ、雄では回復期間終了時にも低体重が認められたものの、休薬による回復傾向が認められた。

摂餌量では、500 mg/kg 群の雌雄で投与期間中に減少が認められた。

機能観察総合検査（FOB）では、投与期間中に500 mg/kg 群の雄で自発運動量の減少および反応性の低下が認められた。

尿検査では、投与期間終了時に500 mg/kg 群の雌雄で尿量の増加および尿浸透圧の低下、同群の雄でナトリウムおよびカリウム排泄量の減少、尿 pH の中性化が認められた。

血液学検査では、投与期間終了時に500 mg/kg 群の雌で貧血が認められた。

血液生化学検査では、投与期間終了時に500 mg/kg 群の雌で総蛋白が低下、中性脂肪およびALPが上昇し、回復期間終了時に500 mg/kg 群の雄で総蛋白が低下、雌で中性脂肪および総コレステロールが上昇を示し、蛋白・脂質代謝系への影響が示唆された。また、500 mg/kg 群の雄で投与期間終了時および回復期間終了時に血糖が低下した。

病理学検査では、主に脾臓、前胃、盲腸、結腸、肝臓および副腎に対する影響が認められた。500 mg/kg 群の雌雄あるいは雌雄のいずれかで、脾臓の鬱血および色素沈着、前胃の扁平上皮過形成、出血、繊維化、浮腫および潰瘍、盲腸の粘膜上皮細胞の好塩基化および核分裂像増加、結腸の粘膜上皮細胞の好塩基化および核分裂像増加、肝臓の肝細胞好酸性化および小葉中心帯肝細胞肥大、副腎の血管拡張、空胞変性、壊死、マクロファージ集簇および皮質肥大が観察された。なお、結腸の粘膜上皮細胞の核分裂像増加

は、100 mg/kg 群の雄でも観察された。消化管および肝臓での変化は、休薬による回復性が認められた。脾臓および副腎での変化については、休薬による回復傾向は認められたものの、変化は継続していた。

以上のことから、当該試験条件下において、2-ナフチルイソブチルエーテルの反復投与に起因する変化が、雄では100 mg/kg/day 以上の投与で、雌では500 mg/kg/day の投与で認められたことから、無毒性量は、雄では20 mg/kg/day、雌では100 mg/kg/day と判断された。また、14 日間の回復期間後、雄の体重および病理学検査における雌雄の脾臓および副腎に投与の影響は残ったものの、概ね回復傾向を示した。

1. 表題

2-ナフチルイソブチルエーテルのラットにおける 28 日間反復投与毒性試験

2. 試験目的

既存化学物質の毒性学的性質を評価する一環として、ラットを用いる反復経口投与毒性試験を行い、一般毒性学的影響を検討する。また、2 週間の休薬期間を設け、一般毒性学的影響に対する回復性を検討する。

3. 準拠したガイドラインと遵守した GLP および動物実験関連規則

毒性試験ガイドライン

OECD テストガイドライン 407 (1995 年 7 月 27 日)

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号)

- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17

動物実験関連規則

動物の飼育および動物の取り扱いについては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、
「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「財団法人 食品農
医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針」を遵守し、動物を適正に使用し
た。

4. 試験番号

9933 (115-212)

5. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1293

6. 試験委託者

〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

Tel: 03-3253-1111 Fax: 03-3593-8913

11. 試験日程

試験開始日 :	平成 18 年 7 月 6 日
投与液の安定性分析	
調製直後 :	平成 18 年 7 月 10 日
保存 10 日後 :	平成 18 年 7 月 20 日
動物搬入日 :	平成 18 年 7 月 19 日
群分け日 :	平成 18 年 7 月 26 日
投与開始日 (実験開始日) :	平成 18 年 7 月 26 日
解剖日 (毒性試験群) :	平成 18 年 8 月 23 日
回復性試験終了日 (解剖日) :	平成 18 年 9 月 6 日
被験物質の安定性分析 :	平成 18 年 9 月 13 日
実験終了日 :	平成 19 年 1 月 26 日
試験終了日 :	平成 19 年 11 月 12 日

12. 試験材料および方法

12.1. 被験物質

被験物質として使用した 2-ナフチルイソブチルエーテル (CAS No. 2173-57-1, Lot No. GI01, 純度 99.1%, 分子量 200.28, 東京化成工業) は, 白色の結晶塊であり, 安評センター 7 号館 2 階被験物質調製室 B 内プレハブ低温庫 ch. 72 に保存した. 被験物質の受領日から最終使用日までの保管庫温度実測値は 3.0~7.9°C であった. 受領時の被験物質の品質について, 分析結果を Reference data 1 に示した. 試験期間中の被験物質の安定性を確認するため, 投与期間終了後に被験物質の純度分析を実施した. その結果, 純度は 99.6% であり, 安定性評価の判定基準 (純度 98% 以上) を満たしていた. したがって, 試験期間中の被験物質が安定であることが確認された (Reference data 2).

被験物質を約 40°C に温めたコーンオイル (Lot No. V5R8265, V6A8960, V6F9868, ナカライテスク) に溶解し, 2, 10 および 50 mg/mL の投与液を調製した.

投与液の濃度および均一性分析は, 初回調製時に調製した全ての試験群の投与液について行った. その結果, 設定濃度 (2, 10 および 50 mg/mL) に対する割合が, それぞれ 103.4, 102.1 および 103.1%, 相対標準偏差がそれぞれ 0.5, 0.4 および 0.4% であり, 濃度/均一性評価の判定基準 (濃度平均値 : 設定濃度の 90~110% 以内, 相対標準偏差 : 10% 以下) を満たしていた (Reference data 3). したがって, 投与液は適切に調製されていることが確認された.

また、2 および 50 mg/mL 濃度の投与液を遮光条件下で 10 日間室温放置した後、濃度分析を行った。その結果、調製直後の被験物質濃度の平均値に対する割合が、投与液の安定性の判定基準（90%以上）を満たしていたことから、安定であることが確認された（Reference data 3）。したがって、投与液は、投与まで遮光・室温条件下で保存（保存場所：被験物質調製室 A 内室温保管庫 ch. 67）し、調製後 10 日以内に使用した。

被験物質は、投与終了後に 2 g を安評センターに保存し、残りは廃棄された。

12.2. 使用動物および飼育条件

日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センターから生後 4 週齢の Crl:CD(SD)系 SPF ラット雌雄各 36 匹を購入し、試験に雌雄各 30 匹を使用した。

購入した動物は 7 日間検疫・馴化飼育した。検疫・馴化期間中の体重推移および一般状態に異常は認められなかった。

動物は、温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ （実測値： $22.4\sim 23.3^{\circ}\text{C}$ ）、湿度 $55\pm 20\%$ （実測値： $52\sim 70\%$ ）、換気回数 10 回以上/h、空気差圧外気+2 mmH₂O 以上、照明時間 12 時間（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）に設定されたバリアシステムの 101 号飼育室（W 8.0 × D 8.0 × H 2.5 m, 160.0 m³）で飼育した。株式会社 東京技研サービスの自動水洗式飼育機を使用し、アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ（W 15.8 × D 25.0 × H 16.0 cm, 6,320.0 cm³）に動物を 1 匹ずつ収容し飼育した。飼育ケージは隔週 1 回、給餌器は週 1 回交換した。

飼料は、放射線滅菌固型飼料（CRF-1, Lot No. 051202, オリエンタル酵母工業）を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。飲水は、水道水（磐田市上水）を給水ノズルより自由に摂取させた。供給した飼料および水に、試験に支障を来す可能性のある汚染物質の混在はなかった。

したがって、飼育期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

12.3. 群分け

群分けは、雌雄ともに検疫・馴化期間終了後の投与開始日に行った。

群分け日の動物の体重は、平均体重の 20% 以内に収まっており、群分け終了時の体重は、雄で 134～153 g、雌で 110～122 g の範囲にあった。投与開始日の体重を基に、無作為抽出法により対照群および高用量群に各 10 匹（その内の各 5 匹は回復性試験用動物）、低および中用量群に各 5 匹を振り分けた。

余剰動物は、群分け後に炭酸ガス吸入により安楽死させた。

12.4. 個体識別

動物の個体識別は、機能観察総合検査（Functional Observational Battery : FOB）を盲検法で実施するため、動物入荷時に雌雄別に通し番号を割り付け、検疫・馴化期間中に動

物の耳介にその通し番号（仮動物番号）を入れ墨した。群分け時に仮動物番号カードと群分け後の動物識別番号カード（ID カード）を用意し、群分け終了時に動物識別番号カードを表にし、対となる仮動物番号カードと重ね、個別飼育ケージに付けて動物を識別した。機能観察総合検査以外の観察、測定および検査は動物識別番号に基づき実施した。

12.5. 投与量, 群構成, 投与期間および投与方法

投与用量は、本被験物質の毒性に関する情報として、Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS)にラットに対する経口投与でのLD₅₀が 5,930 mg/kgと記載（RTECS番号: KO1255000）されていることから、当該試験に先立って0, 30, 100, 300 および1,000 mg/kg/dayの用量で、2週間投与予備試験（試験番号9960）を実施し、その結果を参考に設定した。予備試験では、1,000 mg/kg群の雄で4/5例、雌で5例（全例）が投与後4から7日の間に死亡した。投与後の症状として、雄の100 mg/kg以上および雌の300 mg/kg以上の投与群で軟便、雌雄の1,000 mg/kg群で下痢、雌雄の300 mg/kg以上の投与群で流涎が認められ、雄の300 mg/kg群で体重増加抑制傾向が認められた。血液生化学検査では、雄の300 mg/kg群で血糖の低値およびカリウムの高値、雌の300 mg/kg群でASTの低値およびγ-GTPの高値が認められた。病理学検査では、雌の300 mg/kg群で肝臓および腎臓の相対重量が高値を示したが、剖検所見としては、被験物質投与に関連する異常所見は認められなかった。以上の結果から、当該試験では、明らかに毒性影響が発現すると考えられる500 mg/kg/dayを最高用量に設定し、以下公比5で除し、100および20 mg/kg/dayを設けた。

投与経路は、OECD ガイドライン407で指示されている投与経路に準じて強制経口投与とした。

投与容量は、体重100 g当たり1 mLとし、個体別に測定した最新体重に基づいて算出した。投与液は、胃ゾンデを用いて、1日1回、午前8時30分～11時34分に強制経口投与した。対照群には媒体（コーンオイル）のみを投与した。

投与期間は、雌雄ともに28日間とした。回復性試験用動物の投与期間は、連続28日間とし、その後の休薬期間は14日間とした。

13. 観察および検査方法

下記の項目について観察および検査を行った。投与開始日をDay 1、Day 1～7を投与1週とした。また、Day 29以降を回復期間とし、Day 29～36を回復1週とした。

13.1. 一般状態の観察

全動物について、毎日、投与前、投与30～60分後および3～4時間後を含む3回以上（剖検日は動物搬出前に1回）観察し、観察所見を記録するとともに生死の確認を行っ

た。

13.2. 機能観察総合検査 (FOB)

機能観察総合検査は、全生存動物について、詳細な症状観察を投与開始前に1回、投与開始後は毎週1回実施した。反応性検査、握力および自発運動量測定は、投与4週目および回復2週目に行った。投与開始後の観察および検査は盲検法で行った。

投与開始前の検査は、仮動物番号の若い順に動物を飼育管理者からFOBの実施者に引き渡して実施した。投与期間中は、まず、動物の投与後に飼育管理者が個別別飼育ケージからIDカードを外し、仮動物番号の若い順にFOBの実施者に飼育ケージごと引き渡した。FOBの実施者は、投与後約30分から検査を実施した。飼育管理者は検査には加わらなかった。検査が終了し、FOBの実施者が飼育室から退室した後、飼育管理者が仮動物番号と動物識別番号の対比表に基づき、個別別飼育ケージにIDカードを付けた。

13.2.1. 詳細な症状観察

詳細な症状観察では、ケージから動物を取り出す際の反応として、出し易さおよび異常発声について、手にとつての詳細観察として、筋緊張、体温低下、立毛、毛の汚れ、被毛粗剛、皮膚の色、流涙、眼球突出、瞳孔径および流涎について観察し、記録した。さらに、アリーナ [ポリカーボネイト製エコンケージ (W 31.0 × D 36.0 × H 17.5 cm, 19,530.0 cm³)] 内に動物を移し、姿勢、活動性、呼吸、眼瞼状態、歩行状態、振戦、攣縮、痙攣 (強直性、間代性)、常同行動および異常行動について3分間観察し、記録した。また、最初の1分間の糞・尿のプール数も記録した。

13.2.2. 反応性検査

接近反応、触覚反応、聴覚反応、痛覚反応、瞳孔反射および空中正向反射を検査し、記録した。

13.2.3. 握力 (前後肢)

前後肢の握力については、デジタルプッシュプルゲージ (アイコーエンジニアリング) を用いて、それぞれ2回測定し、平均値を記録した。

13.2.4. 自発運動量測定

CAS (東洋産業) を用いて個別に測定した。13.2.1.から13.2.3.項の検査終了後 (投与後約40分) に測定を開始した。測定時間は1時間とし、測定データを1分間隔で収集し、10分毎に集計した。測定環境の照明は、点灯状態とし、測定中の騒音レベルは、ホワイトノイズ発生装置 (PA-1, 永島医科機械) でおおよそ70 dB とした。普通騒音計 (S-11, 横河北辰電機) を用いて、騒音レベルを測定し、記録した。

13.3. 体重

全動物について、Day 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 および 28 の投与前に測定した。また、Day 1 から Day 28 までの体重増加量を算出した。回復性試験群の動物は、Day 29, 32, 36, 39 および 42 に測定し、Day 29 から Day 42 までの体重増加量を算出した。

死亡動物については発見時に、投与終了時の解剖動物および回復試験群の動物については解剖当日 (Day 29 および 43) にも測定した。ただし、解剖日の体重は、相対重量の算出にのみ用いて、体重値の集計には含めなかった。測定は、電子天秤 (XS4001S, メトラー・トレド) を用いて行い、記録した。

13.4. 摂餌量

全動物について、Day 1, 8, 15, 22 および 28 の投与前に給餌および残餌の餌重量を測定した。回復性試験群の動物は、Day 29, 36 および 42 に測定した。餌重量は、電子天秤 (XS4001S) を用いて測定し、測定日間の平均 1 日摂餌量 (g/day) を算出した。

13.5. 臨床検査

計画解剖時 (Day 29 および Day 43) の全生存動物について、血液学検査、血液凝固能検査、血液生化学検査および血清蛋白電気泳動検査を実施した。

動物は、採血にあたり、採血前日の午後 5 時頃に給餌器を取り除いて絶食させた。採血は、エーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から実施した。

また、Day 23-24 および Day 37-38 (回復群) に、検査時の全生存動物について、尿検査を実施した。

13.5.1. 血液学検査

抗凝固剤 (EDTA-2K) 入り採血管 (インセパック II-D, 積水化学工業) に新鮮血を採取し、総合血液学検査装置 (ADVIA 120, バイエル) を用いてヘマトクリット値 (HCT : RBC, MCV より算出), ヘモグロビン量 (HGB : シアンメトヘモグロビン変法), 赤血球数 (RBC : 2 角度レーザーフローサイトメトリー法), 平均赤血球容積 (MCV : 2 角度レーザーフローサイトメトリー法), 平均赤血球血色素量 (MCH : HGB, RBC より算出), 平均赤血球血色素濃度 (MCHC : HGB, HCT より算出), 白血球数 (WBC : 2 角度レーザーフローサイトメトリー法), 白血球百分率 (ペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメトリー法および 2 角度レーザーフローサイトメトリー法) および好中球数 (NEUT), リンパ球数 (LYMPH), 単球数 (MONO), 好酸球数 (EOSN), 好塩基球数 (BASO), 大型非染色球数 (LUC), 血小板数 (PLT : 2 角度レーザーフローサイトメトリー法) および網赤血球率 (Reticulocyte : RNA 染色によるレーザーフローサイトメトリー法) を測定した。

白血球百分率は、前述の機器で測定したが、別途血液塗抹標本を作製し、メイ・グリュ

ンワルド・ギムザ染色を行い保存した。

13.5.2. 血液凝固能検査

抗凝固剤 (3.13%クエン酸ナトリウム水溶液) 入り採血管 (ベノジェクト II, テルモ) に血液を採取した後, 冷却多本架遠心機 (H-700FR, コクサン) を用いて, 20°C, 1,700 × g で 13 分間, 遠心分離して得た血漿を検査に用いた。全自動血液凝固線溶測定装置 (STA Compact, ロシユ) を用いて, プロトロンビン時間 (PT: 粘度変化検知方式) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT: 粘度変化検知方式) を測定した。

13.5.3. 血液生化学検査

高速凝固促進剤・分離剤入り採血管 (インセパック II-D) に血液を採取した後, 多本架冷却遠心機 (EX-126, トミー精工) を用いて, 20°C, 1,700 × g で 7 分間, 遠心分離して得た血清を検査に用いた。多項目生化学自動分析装置 (日立 7170, 日立製作所) を用いて総蛋白 (T. protein: Biuret 法), 血糖 (Glucose: HK-G-6-PDH 法), 中性脂肪 (Triglyceride: GK-GPO 遊離グリセロール消去法), 総コレステロール (T. cholesterol: コレステロールオキシダーゼ HDAOS 法), 尿素窒素 (BUN: ウレアーゼ GLDH 法), クレアチニン (Creatinine: 酵素法), 総ビリルビン (T. bilirubin: パナジン酸酸化法), 総胆汁酸 (Total bile acid: 酵素サイクリング法), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST: 酵素-UV 法), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT: 酵素-UV 法), アルカリホスファターゼ (ALP: *p*-ニトロフェニルリン酸基質法), γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (Gamma-GTP: L- γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-NA 法), カルシウム (Calcium: MXB 法), 無機リン (I. phosphorus: PNP-XDH 法) を, 全自動電解質分析装置 (EA06R, アットウィル) を用いてナトリウム (Sodium: イオン選択電極法), カリウム (Potassium: イオン選択電極法) および塩素 (Chloride: イオン選択電極法) を測定した。

13.5.4. 血清蛋白電気泳動検査

13.5.3. で採取した血清を検査に用いた。全自動電気泳動分析装置 (エパライザ, ヘレナ研究所) を用い, タイタンIII-Tセルローズアセテート膜を支持体として電気泳動を行った。泳動終了後, ポンソー-S-T溶液で染色し, 同装置のデンストメーターを用いて, 各分画の比率 (Albumin, Alpha₁, Alpha₂, Beta, Gamma) を測定するとともにA/Gを算出した。さらに, 各分画の比率および血液生化学検査で求めた総蛋白量を用いて, 各分画の濃度 (g/dL) を算出した {[分画比率 (%) × 総蛋白 (g/dL)] / 100}。

13.5.5. 尿検査

給餌・給水の条件下で, 採尿ケージを用いて, 新鮮尿 (放尿後 3 時間以内の尿) および 24 時間尿 (午前 10 時頃から翌日午前 10 時頃まで) を採取した。

pH, 潜血 (Occult blood), ケトン体 (Ketone bodies), 糖 (Glucose), 蛋白 (Protein), ビリルビン (Bilirubin) およびウロビリノーゲン (Urobilinogen) について, 新鮮尿を用いて検査した. 測定は, エームス尿検査試験紙 (N-マルティスティックス SG, バイエル メディカル) を用い, 自動尿分析装置 (CLINITEK500, バイエル) で判定を行った.

24 時間尿について, 尿量 (計量) および色調 (目視) の検査後, 卓上多本架遠心機 (LC-06SP, トミー精工) を用いて, 尿を約 400 × g で 5 分間遠心し, 上清および残渣に分離した. 上清を用いて, 全自動電解質分析装置 (EA06R) でナトリウム, カリウムおよび塩素濃度を測定 (イオン選択電極法) し, さらに, 尿量を用いてナトリウム, カリウムおよび塩素の総排泄量を算出した. 尿浸透圧 (Osmotic Pressure) は, 自動浸透圧測定装置 (Osmotic Pressure AUTO&STAT OM-6030, アークレイファクトリー) で測定 (氷点降下法) した. また, 残渣を用いて, 新ステルンハイマー法による染色を施し, 尿沈渣標本を作製し, 鏡検した. なお, 上皮細胞が 1+を示した動物については, 扁平上皮細胞・移行上皮細胞・腎尿細管上皮細胞に分類した.

13.6. 病理学検査

13.6.1. 剖検および器官重量

死亡動物 (動物番号 2301, 2305) は, 発見後直ちに剖検した. 計画解剖動物は, エーテル麻酔下で採血し, 放血により安楽死させた後に剖検した.

剖検では, 動物の体表, 自然開口部, 体腔および諸器官について観察し, 全ての肉眼所見を記録した.

計画解剖動物について, 脳, 胸腺, 下顎腺 (舌下腺を含む), 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 精巣上体および卵巣重量を, 電子天秤 (PE160, メトラー・トレド) を用いて測定し, 剖検日の体重から器官重量/体重比 (相対重量: 器官重量 / 剖検日体重 × 100) を算出した.

また, 解剖した全ての動物について, 皮膚, 乳腺 (雌), リンパ節 (腸間膜, 下顎), 舌下腺, 下顎腺, 胸骨, 大腿骨, 骨髄 (胸骨, 大腿骨), 胸腺, 気管, 肺 (気管支を含む: 左側注入および浸漬固定), 心臓, 甲状腺, 上皮小体, 舌, 食道, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 肝臓, 脾臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 精囊, 前立腺, 精巣上体, 卵巣, 卵管, 子宮, 膣, 眼球, 視神経, ハーダー腺, 脳, 下垂体, 脊髄 (頸髄, 胸髄, 腰髄), 骨格筋 (大腿部), 坐骨神経および大動脈を 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液で, 精巣はホルマリン・酢酸液 (FA 液) で前固定した後, 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液で固定した.

13.6.2. 病理組織学検査

13.6.1. で固定した器官・組織について, 常法に従ってパラフィン包埋し, 薄切後, へ

マトキシリン・エオジン染色標本を作製した。病理組織学検査は、毒性試験群および回復性試験群の対照群および高用量群ならびに死亡動物の固定した器官・組織、低および中用量の肉眼異常部位について実施した。また、心臓、肝臓、脾臓、副腎、胃、盲腸、結腸、精囊、前立腺および精巣上体については、高用量群で被験物質投与の影響が疑われたため、低および中用量群についても検査を実施した。鏡検では、病変の種類、程度について記録した。

13.7. 統計解析

体重、体重増加量、摂餌量、FOB計量データ（握力、自発運動量）、血液学検査値、血液凝固能検査値、血液生化学検査値、血清蛋白泳動検査値、尿検査値（尿量、尿浸透圧および尿電解質）、器官重量および相対重量については、最初にBartlettの等分散検定²⁾を実施し、等分散の場合は、Dunnettの多重比較検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。Bartlettの等分散検定で不等分散の場合は、Steelの検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。

FOB 計数データ（排糞数、排尿数）は、Kruskal-Wallis の検定を実施し、有意差が認められた場合は、Steel の検定で対照群と各投与群の有意差を検定した。

剖検所見および病理組織学検査所見の発生率は、Fisher の直接確率検定法で対照群と各投与群の有意差を検定した。病理組織学所見のうち被験物質投与群で程度の増強が認められた所見は、-を「1」、+1（軽度）を「2」、+2（中等度）を「3」、+3（高度）を「4」に割り当て、Mann-Whitney のU検定を実施した。

一般状態の所見についての統計解析は行わなかった。

有意水準は、Bartlett の等分散検定については5%、その他の検定は5%および1%の両側検定で実施した。

14. 試験結果

14.1. 死亡および一般状態 (Table 1, Appendix 1)

死亡動物が、雌の 500 mg/kg 群で Day 6 および 7 の投与前に各 1 例 (動物番号 2301, 2305) に認められた。死亡動物には、一般状態の変化として、軟便、粘液便、鼻周囲の汚れおよび被毛の汚れ (生殖器肛門周囲) が観察されていた。雄では死亡動物は認められなかった。

投与期間中の一般状態の変化として、雌雄の 500 mg/kg 群で、全例に軟便および粘液便の発現が認められ、少数例では水様下痢も認められた。さらに、流涎が 500 mg/kg 群の雄で全例、雌で多数例に認められた。その他、雌の 20 mg/kg 群で搔創 (頸部)、500 mg/kg 群で紅涙および被毛の汚れ (生殖器肛門周囲) が認められたが、単発的な発現であることから、被験物質投与と関連のない変化と考えられた。

回復期間中の一般状態の変化として、雌雄とも 500 mg/kg 群で Day 29 (回復期間開始日) に軟便あるいは粘液便が認められたが、Day 30 以降に一般状態の変化は認められなかった。

14.2. 体重 (Figure 1, 2, Table 2, Appendix 2)

雄では、500 mg/kg 群で Day 4 以降投与期間終了時まで、統計学的に有意な低値が認められ、Day 1 から 28 の体重増加量も有意な低値を示した。500 mg/kg 群では、回復期間 (Day 29 から 42) においても有意な低値を示した。しかし、回復期間中の体重増加量は有意な高値を示した。

雌では、500 mg/kg 群で Day 4 から 11 に有意な低値を示した。回復期間では、対照群と 500 mg/kg 群で差は認められず、回復期間の体重増加量にも対照群と差は認められなかった。

14.3. 摂餌量 (Figure 3, 4, Table 3, Appendix 3)

雄では、500 mg/kg 群で Day 1-8, Day 15-22 および Day 22-28 の平均 1 日摂餌量が有意な低値を示した。回復期間では、500 mg/kg 群で Day 29-36 の平均 1 日摂餌量が有意な高値を示した。また、20 mg/kg 群で Day 8-15 および Day 15-22 の平均 1 日摂餌量が有意な高値を示したが、体重に影響のない軽微な変化であり、被験物質投与に関連した変化ではないと考えた。

雌では、500 mg/kg 群で Day 1-8 の平均 1 日摂餌量が有意な低値を示した。回復期間では、500 mg/kg 群で Day 29-36 の平均 1 日摂餌量が有意な高値を示した。

14.4. 機能観察総合検査 (FOB)

14.4.1. 詳細な症状観察 (Table 4, 5, 6, Appendix 4, 5, 6)

投与期間中の観察において、雄では、ケージから取り出す際の反応に異常は認められなかった。手にとつての詳細な観察では、「軽度」の流涎が、20 mg/kg 群で投与2週目に1例、500 mg/kg 群で投与2, 3および4週目に、それぞれ2, 7および6例に認められた。さらに、500 mg/kg 群では、投与4週目に「重度」の流涎も2例に認められた。アリーナ内での行動観察では、歩行状態の「無関心による不動」が100 mg/kg 群で投与1週目に1例に認められた。排糞数および排尿数では、対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。なお、詳細な症状観察で20および100 mg/kg 群で認められた症状については、単発的な発現であり、且つ用量に関連しない変化であることから、被験物質投与との関連はないと判断した。

雌では、ケージからの出し易さの項目について、「若干困難」が500 mg/kg 群で投与1週目に1例に認められたが、他の観察日はいずれも「非常に簡単」あるいは「簡単」であり、被験物質投与との関連性は無いと判断した。手にとつての詳細な観察では、「軽度」の流涎が、500 mg/kg 群で投与1, 2, 3および4週目に、それぞれ1, 3, 3および2例に観察された。また、被毛の「非常に汚れている」が500 mg/kg 群で投与1週目に2例に観察された。アリーナ内での行動の観察では、活動性の「低い」が500 mg/kg 群で投与1週目に1例に観察された。なお、被毛の「非常に汚れている」および活動性の「低い」は、投与1週目のFOB翌日に死亡した動物(動物番号2305)で観察された。排糞数および排尿数には、対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。その他、軟便が500 mg/kg 群で投与1週目に1例に観察された。

回復期間中の観察においては、雌雄とも、いずれの観察項目にも異常は認められず、排糞数および排尿数にも、対照群との間に差は認められなかった。

14.4.2. 反応性検査 (Table 4, Appendix 4)

投与4週目に実施した反応性検査において、雄では、接近反応検査で、「反応なし」が500 mg/kg 群で1例に認められた。触覚反応検査では、「反応なし」および「身を固くする」が500 mg/kg 群で各1例に認められた。痛覚反応検査では、「緩慢に振り返る」が対照群で1例に観察された。雌では、いずれの検査項目においても異常反応は認められなかった。

回復2週目の反応性検査において、雄では、いずれの検査項目にも異常反応は認められなかった。雌では、痛覚反応検査で、「刺激から逃げようと前方に歩く」が対照群で2例、「緩慢に振り返る」が500 mg/kg 群で1例に観察された。

14.4.3. 握力 (前後肢) (Table 7, Appendix 7)

雌雄とも、投与4週目および回復2週目のいずれの検査においても、対照群と被験物質投与各群との間で前肢および後肢の握力に差は認められなかった。

14.4.4. 自発運動量 (Table 8, Appendix 8)

雄では、投与4週目の検査において、500 mg/kg 群で測定開始後20分以降60分までの10分毎の自発運動量が有意な低値を示し、総運動量も有意な低値を示した。回復2週目の検査では、対照群と500 mg/kg 群で差は認められなかった。

雌では、投与4週目および回復2週目のいずれの検査においても、対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

14.5. 臨床検査

14.5.1. 血液学検査

14.5.1.1. 投与期間終了時 (Table 9-1, Appendix 9-1)

雄では、500 mg/kg 群で網赤血球率が上昇傾向を示した。また、同群で単球比率および単球数が有意な上昇ならびに増加を示したが、軽微な変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

雌では、500 mg/kg 群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数およびMCHCが有意な低下ならびに減少、網赤血球率が上昇傾向を示した。

14.5.1.2. 回復期間終了時 (Table 9-2, Appendix 9-2)

雄では、500 mg/kg 群で赤血球数およびMCHCが有意な減少ならびに低下、MCVおよびMCHが有意な増加を示した。

雌では、500 mg/kg 群で好塩基球数が有意な増加を示したが、軽微な変化であり被験物質投与の影響とは判断しなかった。

14.5.2. 血液凝固能検査 (Table 10-1, 10-2, Appendix 10-1, 10-2)

雌雄とも、投与期間終了時および回復期間終了時で、いずれの検査項目においても対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

14.5.2.1. 血液生化学検査

14.5.2.2. 投与期間終了時 (Table 11-1, Appendix 11-1)

雄では、500 mg/kg 群で血糖が有意な低下、ALTが有意な上昇を示した。その他、500 mg/kg 群で総ビリルビン、総胆汁酸および γ -GTPが高値傾向、20 mg/kg 群でALTが有意な上昇を示したが、いずれも軽微な変化であり被験物質投与の影響とは判断しなかった。

雌では、500 mg/kg 群で総蛋白が有意な低下、中性脂肪およびALPが有意な上昇を示

した。その他、500 mg/kg 群で総ビリルビンおよび γ -GTP が高値傾向、100 mg/kg 群でカリウムが有意な低下を示したが、用量に対応しない変化であり被験物質投与の影響とは判断しなかった。

14.5.2.3. 回復期間終了時 (Table 11-2, Appendix 11-2)

雄では、500 mg/kg 群で血糖が有意な低下を示した。その他、500 mg/kg 群でALP および無機リンが有意な上昇、総蛋白が有意な低下を示したが、投与終了時には認められない変化であり被験物質投与の影響とは判断しなかった。

雌では、500 mg/kg 群で中性脂肪および総コレステロールが有意な上昇を示した。その他、500 mg/kg 群で塩素が有意な低下を示したが、投与終了時には認められない変化であり被験物質投与の影響とは判断しなかった。

14.5.3. 血清蛋白電気泳動検査

14.5.3.1. 投与期間終了時 (Table 12-1, Appendix 12-1)

雄では、500 mg/kg 群で α_2 グロブリン分画比率および濃度が有意な上昇を示した。また、20 mg/kg 群で α_1 グロブリン分画比率および濃度が有意な低下を示したが、用量に対応しない変化であり被験物質投与の影響とは判断しなかった。

雌では、いずれの検査項目においても対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

14.5.3.2. 回復期間終了時 (Table 12-2, Appendix 12-2)

雄では、500 mg/kg 群でアルブミン分画比率が有意な上昇を示したが、アルブミン濃度に変化は認められなかったため、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

雌では、いずれの検査項目においても対照群との間に差は認められなかった。

14.5.4. 尿検査

14.5.4.1. 投与期間終了時 (Table 13-1, Appendix 13-1)

雄では、500 mg/kg 群で尿量が増加傾向、尿浸透圧、ナトリウム濃度および総排泄量、カリウム濃度および総排泄量が有意な低下ならびに減少を示した。さらに、500 mg/kg 群では、尿色調が黄褐色または暗褐色、pH が中性、ケトン体が陰性、蛋白が陰性または擬陽性、ビリルビンが陽性 (1+または 2+) を示す例数が増加した。なお、尿色調については、100 mg/kg 群においても黄褐色を呈した例数が増加した。その他、500 mg/kg 群で塩素濃度が有意な低値を示したが、塩素総排泄量に変化は認められず、被験物質投与の影響とは判断しなかった。尿沈渣の検査で認められた所見は、いずれも軽微な変化であり、被験物質投与の影響は認められなかった。

雌では、500 mg/kg 群で尿量および塩素総排泄量が有意な増加、尿浸透圧、ナトリウ

ム濃度およびカリウム濃度が有意な低下を示した。さらに、500 mg/kg 群では、尿色調が黄褐色、ビリルビンが陽性 (1+) を示す例数が増加した。なお、尿色調については、100 mg/kg 群においても黄褐色を呈した例数が増加した。尿沈渣の検査で認められた所見は、いずれも軽微な変化であり、被験物質投与の影響は認められなかった。

14.5.4.2. 回復期間終了時 (Table 13-2, Appendix 13-2)

雄では、いずれの検査項目においても対照群との間に差は認められなかった。

雌では、500 mg/kg 群でナトリウム総排泄量が有意な増加を示したが、軽微な変化であり被験物質投与の影響とは判断しなかった。

14.6. 病理学検査

14.6.1. 器官重量

14.6.1.1. 投与期間終了時 (Table 14-1, 15-1, Appendix 14-1, 15-1)

雄では、500 mg/kg 群で腎臓の実重量が有意な減少、100 および 500 mg/kg 群で腎臓の相対重量が有意な増加、500 mg/kg 群で肝臓、脾臓および副腎の相対重量が有意な増加を示した。その他、500 mg/kg 群で心臓、胸腺、精巣上体および下顎腺の実重量が有意な減少、脳および下顎腺の相対重量が有意な増加を示したが、いずれも剖検日の低体重に起因する変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

雌では、100 および 500 mg/kg 群で肝臓の相対重量が有意な増加、500 mg/kg 群で脾臓の相対重量が有意な増加、心臓の実重量および相対重量が増加傾向を示した。その他、500 mg/kg 群で脳の相対重量が有意な増加を示したが、剖検日の低体重に起因する変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

14.6.1.2. 回復期間終了時 (Table 14-2, 15-2, Appendix 14-2, 15-2)

雄では、500 mg/kg 群で脾臓の相対重量が有意な増加を示した。その他、心臓および肝臓の絶対重量が有意な減少、脳の相対重量が有意な増加を示したが、いずれも剖検時の低体重に起因した変化と判断した。

雌では、500 mg/kg 群で肝臓の相対重量が有意な増加を示した。

14.6.2. 剖検所見

14.6.2.1. 投与期間終了時 (Table 16-1, Appendix 16)

主な変化として、500 mg/kg 群の雄で前立腺および精嚢の小型が各 4 例に観察され、対照群に比べ有意な発現例数の増加が認められた。さらに、500 mg/kg 群の雄で胃の白色斑が 3 例、精巣の小型および副腎の癒痕が各 1 例、500 mg/kg 群の雌雄で脾臓の暗色が各 2 例、胃の赤色斑/区域が各 1 例に観察された。また、500 mg/kg 群の雌 1 例 (動物番号 2303) で、心臓の肥大、白色結節および癒痕、脾臓の白色斑/区域および肝臓

の暗色化が観察された。

その他に投与期間終了時剖検で観察された所見は、いずれも単発性の所見であり、自然発生性の変化と考えた。

14.6.2.2. 回復期間終了時 (Table 16-3, Appendix 16)

500 mg/kg 群の雄 1 例 (動物番号 1310) で精巢の小型、前立腺の小型および精嚢の小型が観察された。

その他に回復期間終了時剖検で観察された所見は、いずれも単発性あるいは対照群にも認められる所見であり、自然発生性の変化と考えた。

14.6.2.3. 死亡動物 (Table 16-2, Appendix 16)

500 mg/kg 群の雌で認められた死亡動物では、脾臓の小型化 (2/2 例)、胸腺の萎縮 (1/2 例)、胃の黒色斑 (1/2 例) および副腎の肥大 (2/2 例) が認められた。

14.6.3. 組織所見

被験物質投与の関与が疑われた変化が、脾臓、胃 (前胃、腺胃)、盲腸、結腸、肝臓、前立腺、精嚢および副腎に認められた。

14.6.3.1. 投与期間終了時 (Table 17-1, Appendix 17)

脾臓では、500 mg/kg 群の雌雄で鬱血が観察され、雌では、対照群に比べ有意な発生例数の増加が認められた。500 mg/kg 群の雌雄で色素沈着が観察され、発生例数が雌で有意に増加し、雄で増加傾向が認められた。また、白脾髄の萎縮が 500 mg/kg 群の雌で観察された。

前胃では、500 mg/kg 群の雌雄で扁平上皮過形成 (一部に過角化を伴う、雌では中等度の所見、Photo. 1) が観察され、雄で発生例数の増加傾向が認められた。500 mg/kg 群の雄で出血および線維化、雌で浮腫 (Photo. 1) および潰瘍が観察された。

腺胃では、500 mg/kg 群の雌で浮腫が観察された。

盲腸では、500 mg/kg 群の雄で粘膜上皮細胞の核分裂像増加および好塩基化 (中等度の所見を含む) が観察され、有意な発生例数の増加または増加傾向が認められた。

結腸では、500 mg/kg 群の雌雄で粘膜上皮細胞の好塩基化 (Photo. 2) が観察され、雄では中等度の所見も含まれており、有意な発生例数の増加および程度の増強が認められた。100 mg/kg 群の雄および 500 mg/kg 群の雌雄で、粘膜上皮細胞の核分裂像増加 (Photo. 2) が観察され、500 mg/kg 群の雄では有意な発生例数の増加が認められた。

肝臓では、500 mg/kg 群の雌雄で肝細胞好酸性化が観察され、有意な発生例数の増加が認められた。また、500 mg/kg 群の雌雄で小葉中心帯肝細胞肥大が観察され、雄で有意に発生例数が増加した。

前立腺では、500 mg/kg 群の雄で腺房の萎縮が観察され、発生数が高値傾向を示した。

精嚢では、500 mg/kg 群の雄で腺房の萎縮（中等度の所見を含む）が観察され、有意な発生例数の増加および程度の増強が認められた。

副腎では、500 mg/kg 群の雌雄で血管拡張（Photo. 3）、空胞変性（Photo. 3）、壊死、マクロファージ集簇および皮質肥大が観察され、有意な発生例数の増加または増加傾向が認められ、いくつかの所見では中等度の所見が含まれており、程度の増強も認められた。なお、血管拡張、空胞変性、壊死等の病変は、主に皮質の内側（網状層と束状層の境界付近）から生じていた。

その他、500 mg/kg 群の雌1例（動物番号2303）に、心臓の心筋の肥大、線維化、心外膜炎および肺動脈弁の粘液様変化、脾臓の被膜炎、肝臓の鬱血が肉眼所見に対応して認められた。心臓と脾臓との所見の関連は明らかではないが、肝臓の鬱血は心臓の影響によると考えられた。500 mg/kg 群の他の雌動物では心臓に同様の所見はみられなかった。20 および 100 mg/kg 群についても心臓の組織学検査を行ったが、動物番号2303と類似の所見は認められなかったため、動物番号2303で認められた所見は自然発生の病変で、被験物質投与に関連する変化ではないと考えた。また、心臓の単核細胞浸潤も、対照群および投与群に関わらず多くの例で認められたことから、自然発生病変であると考えられた。

なお、その他に被験物質投与群で認められた所見は、種類あるいは発生例数から、いずれも被験物質投与とは関連のない変化と考えられた。

14.6.3.2. 回復期間終了時（Table 17-3, Appendix 17）

脾臓では、500 mg/kg 群の雌雄で軽度の色素沈着が観察され、有意な発生例数の増加が認められた。

副腎では、500 mg/kg 群の雌雄で血管拡張が観察され、雌で発生例数の増加および程度の増強が認められた。さらに、500 mg/kg 群では、雄でマクロファージ集簇の有意な発生例数の増加が、雌雄で空胞変性の増加傾向が認められた。また、500 mg/kg 群の雄で中等度の壊死および皮質肥大が観察された。

精巣上体では、500 mg/kg 群の雄で精子減少が観察された。

精嚢では、500 mg/kg 群の雄で腺房の萎縮が観察された。

その他に500 mg/kg 群で認められた所見は、種類あるいは発生例数から、いずれも被験物質投与とは関連のない変化と考えられた。

14.6.3.3. 死亡動物（Table 17-2, Appendix 17）

死亡動物では、脾臓の萎縮および下顎腺の好酸性顆粒減少が2例全例に、胸腺の萎縮、心臓の単核細胞浸潤、肺の泡沫細胞集簇、腺胃の潰瘍、副腎の鬱血、空胞変性、壊死および皮質肥大が各1例に認められた。腺胃および副腎の所見は、被験物質の直接的影響が疑われ、その他の所見は全身状態の悪化に伴う二次的変化あるいは自然発生の病変

と考えられた。

15. 考察および結論

雌の 500 mg/kg 群で 2 例が死亡した。死亡した動物では、一般状態および FOB において、全身状態の悪化に関連した症状および反応性の低下が観察され、体重が著しく減少し、組織学検査では、1 例で腺胃の潰瘍および副腎の壊死等の所見が認められた。死因としては、被験物質投与に起因した全身状態の悪化に伴う衰弱死が考えられた。

本被験物質と類似骨格を有する 2-ナフトールは、刺激性を有し、反復投与において投与後の流涎および自発運動低下、病理学検査における前胃粘膜扁平上皮の過形成が報告され¹⁾、単回投与においては、下痢、前胃の出血、炎症および暗色尿が報告されている²⁾。被験物質は、2-ナフトールと同様に刺激性を有することが考えられ、FOBを含めた一般状態の変化で認められた流涎、病理学検査で前胃に認められた扁平上皮過形成等の所見は、被験物質投与の影響と判断した。また、機能観察総合検査では、自発運動量の測定において、500 mg/kg群の雄で減少が認められた。症状観察では、自発運動の低下等の所見は認められなかったが、反応性検査において、少数例ではあるが、反応性の低下を示す動物も認められており、2-ナフトールでの反復投与結果と同様に、自発運動量の減少は被験物質投与の影響と考えられた。なお、被験物質の神経系に及ぼす作用を示唆する変化は認められなかった。さらに、一般状態の変化として、500 mg/kg群で投与期間中に認められた軟便、粘液便および水様下痢は、休薬直後から発現が消失したこと、および2-ナフトールの単回投与結果から被験物質の直接影響が考えられた。病理学検査においては、500 mg/kg群で盲腸および結腸に粘膜上皮細胞の好塩基化および核分裂像増加が多数例に認められた。特に、核分裂像増加は、結腸において、1 例ではあるが 100 mg/kg群の雄で認められ、用量依存性に発生していることから被験物質投与の影響と考えられ、被験物質が消化管に対して影響を及ぼすことが示唆された。消化管に対する組織変化の機序は不明であるが、回復期間終了時では認められなかったことから、可逆性の変化と考えられた。また、これらの消化管に対する影響も軟便等の発現の一要因と考えられた。被験物質投与による消化管への影響および継続した軟便等の変化は、特に雄で顕著に認められた摂餌量の低下ならびに体重抑制との関連性も示唆された。500 mg/kg群の雄では、病理学検査において、投与期間終了時に、肉眼所見で精巣、前立腺および精囊の小型、組織所見で前立腺および精囊の腺房の萎縮が多数例に認められた。組織学検査において、これらの器官の細胞に変性、脱落等の障害は認められず、生殖関連器官の小型化は被験物質投与に起因した低体重および全身状態の悪化により、成長が阻害されて生じた二次的影響であると考えた。なお、500 mg/kg群の 1 例(動物番号 1310)では、回復期間終了時でも精巣および副生殖器の小型が認められ、体重も低値であり、成長阻害が継続していると考えられた。しかしながら、回復期間の体重増加量は高値を

示し、病理学検査においても、休薬により生殖関連器官が正常状態に戻った動物が多く、休薬による回復傾向が示唆された。

病理学検査において、被験物質投与の影響が、前述の消化管の他、脾臓、肝臓および副腎に認められた。脾臓では、500 mg/kg 群で投与期間終了時に色素沈着、鬱血および白脾髄の萎縮が認められた。色素沈着は、回復期間終了時においても雌雄の多数例に認められた。500 mg/kg 群の雌では、投与期間終了時の血液学検査で、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数および MCHC が減少し、網赤血球率が増加傾向を示したことから、溶血性貧血が示唆された。500 mg/kg 群の雄では、投与期間終了時に網赤血球率が増加傾向、回復期間終了時に赤血球数および MCHC が減少、MCV および MCH が増加を示した。脾臓における鬱血は、被験物質による溶血等の障害に起因した老廃赤血球の処理亢進に伴う変化と考えられた。色素沈着は、鬱血と同様の発生機序が考えられ、投与終了後も蓄積が継続したために回復期間終了時で発生数が増加したものと推測された。また、脾臓重量の増加および肉眼所見での暗色は、色素沈着あるいは鬱血に対応する変化と考えられた。脾臓の萎縮は、投与期間終了時では雌 1 例のみの発現であったが、途中死亡した雌 2 例にも認められ、被験物質投与との関連が疑われた。

肝臓では、投与期間終了時に 500 mg/kg 群の雌雄で相対重量が増加し、組織学的に肝細胞の小葉中心帯肥大および好酸性化が認められ、被験物質投与による薬物代謝亢進に伴う反応と考えられた。また、500 mg/kg 群の雄では、血液生化学検査で ALT の上昇が認められ、肝細胞障害が示唆された。これらの所見は、回復期間終了時には認められなかったことから、可逆性の変化と考えられた。

副腎では、500 mg/kg 群の全動物で影響が認められ、特に投与期間終了時では著しい変化であった。死亡例においても皮質に広範の壊死巣が認められたが、発生機序は不明であった。回復期間終了時では、壊死および皮質肥大の発生数は減少したものの、マクロファージの集簇が増加し、壊死組織の処理機能が亢進したと考えられた。しかし、血管拡張および空胞変性の発生数は、投与期間終了時と回復期間終了時で大差はなく、障害反応の継続あるいは遅延、または変化の未修復と考えられた。

血液生化学検査において、投与期間終了時に 500 mg/kg 群の雌で総蛋白が低下、中性脂肪および ALP が上昇し、回復期間終了時に 500 mg/kg 群の雄で総蛋白が低下、雌で中性脂肪および総コレステロールが上昇を示し、肝臓での蛋白・脂質代謝系への影響が示唆された。また、500 mg/kg 群の雄で投与期間終了時に血糖が低下し、回復期間終了時でも同様の変化が認められた。雄での血糖低下は予備試験においても認められ、被験物質投与の影響が疑われた。

尿検査では、投与期間終了時に 500 mg/kg 群の雌雄で尿量の増加および尿浸透圧の低下、500 mg/kg 群の雄でナトリウムおよびカリウム総排泄量の減少、pH の中性化が認め

られ、腎臓への影響が示唆された。しかしながら、病理学検査では、腎臓重量（相対重量）の高値傾向は認められたものの、組織学検査で関連する変化は認められなかった。なお、回復期間終了時の尿検査ではこれらの変化は認められず、回復性が認められた。

その他、雌雄とも 500 mg/kg 群で回復 1 週目の摂餌量が高値を示し、被験物質投与期間の摂餌抑制に対する代償性の変化と考えられた。

血液生化学検査において、毒性試験群には認められない変化であったが、回復性試験群の雄で無機リンが上昇した。しかし、カルシウムに変化は認められず、腎機能に関連するパラメータに異常が認められないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

血清蛋白電気泳動検査において、毒性試験群の雄の 500 mg/kg 群で α_2 グロブリン分画が増加したが、軽度な変化であり、総蛋白および脂質量に変化は認められないことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

尿検査において、投与期間終了時に 500 mg/kg 群の雄でケトン体および蛋白の陰性化が認められたが、尿量の増加により希釈されたと考えられ、被験物質投与に関連しない変化と考えられた。雌の 500 mg/kg 群で塩素総排泄量が増加したが、軽微な変化であり毒性学的意義は低いと考えられた。また、100 および 500 mg/kg 群の雌雄で尿色が褐色調を示し、雌雄の 500 mg/kg 群でビリルビン陽性例が認められたが、色調との対応は明らかではなかった。回復期間終了時では尿色の変化は認められなかったことから、被験物質自身あるいは代謝物による着色が疑われたが、毒性影響とは考えなかった。

以上のことから、当該試験条件下において、2-ナフチルイソブチルエーテルの反復投与に起因する変化が、雄では 100 mg/kg/day 以上の投与で、雌では 500 mg/kg/day の投与で認められたことから、無毒性量は、雄では 20 mg/kg/day、雌では 100 mg/kg/day と判断された。また、14 日間の回復期間後、雄の体重および病理学検査において雌雄の脾臓および副腎に投与の影響は残ったものの、概ね回復傾向を示した。

16. 参考文献

- 1) 代田真理子ら：2-ナフトールのラットを用いる一世代生殖毒性試験。化学物質毒性試験報告, 8 : 669-684 (2001) .
- 2) IUCLID (International Uniform Chemical Information Database). (2006) .

Table 1.

Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		1----->			2----->			3----->			4----->			5----->			6----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 2-NIBE 20	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 2-NIBE 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 2-NIBE 500	normal	-	10	10	10	10	9	9	5	7	6	2	8	8	4	9	10	7	10	10
		Total	10	10	10	10	9	9	5	7	6	2	8	8	4	9	10	7	10	10
	Salivation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Loose stool	-	10	10	10	10	9	9	5	7	6	4	8	9	5	10	10	7	10	10
		+	0	0	0	0	1	1	5	3	4	6	2	1	5	0	0	3	0	0
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Watery diarrhea	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	10	9	9	9	10	10	10	10
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	1	0	0	0	0
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mucous feces	-	10	10	10	10	10	9	5	7	6	2	8	8	4	9	10	7	10	10
		+	0	0	0	0	0	1	5	3	4	8	2	2	6	1	0	3	0	0
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		7----->			8----->			9----->			10----->			11----->			12----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 2-NIBE 20	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 2-NIBE 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 2-NIBE 500	normal	-	10	9	10	10	7	10	9	8	10	10	6	10	10	7	9	10	7	9
		Total	10	9	10	10	7	10	9	8	10	10	6	10	10	7	9	10	7	9
	Salivation	-	10	9	10	10	7	10	10	8	10	10	6	10	10	7	9	10	7	9
		+ Total	0 10	1 10	0 10	0 10	3 10	0 10	0 10	2 10	0 10	0 10	4 10	0 10	0 10	3 10	1 10	0 10	3 10	1 10
	Loose stool	-	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		+ Total	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	1 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10
	Watery diarrhea	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		+ Total	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10								
	Mucous feces	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		+ Total	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10	0 10								

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		13----->			14----->			15----->			16----->			17----->			18----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 2-NIBE 20	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 2-NIBE 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 2-NIBE 500	normal	-	7	8	9	3	2	7	4	3	7	2	3	9	1	2	8	2	3	8
		Total	7	8	9	3	2	7	4	3	7	2	3	9	1	2	8	2	3	8
	Salivation	-	10	8	9	10	2	7	10	3	7	10	3	9	10	2	8	10	3	8
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Loose stool	-	7	10	10	6	10	10	4	10	10	2	10	10	1	10	10	2	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Watery diarrhea	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mucous feces	-	7	10	10	4	10	10	6	10	10	4	10	10	3	10	10	3	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																					
		19----->			20----->			21----->			22----->			23----->			24----->						
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3				
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 2-NIBE 20	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 2-NIBE 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 2-NIBE 500	normal	-	1	3	8	4	3	8	4	1	8	4	3	7	5	3	10	1	2	10			
		Total	1	3	8	4	3	8	4	1	8	4	3	7	5	3	10	1	2	10			
	Salivation	-	10	3	8	10	3	8	10	1	8	10	3	7	10	3	10	10	2	10			
		+	0	7	2	0	7	2	0	9	2	0	7	3	0	7	0	0	8	0			
	Loose stool	-	1	10	10	4	10	10	4	10	10	4	10	10	5	10	10	1	10	10			
		+	9	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	5	0	0	9	0	0			
	Watery diarrhea	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10			
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	Mucous feces	-	3	10	10	8	10	10	6	10	10	5	10	10	6	10	10	6	10	10			
		+	7	0	0	2	0	0	4	0	0	5	0	0	4	0	0	4	0	0			
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment													
		25----->			26----->			27----->			28----->			29	
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 2-NIBE 20	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 2-NIBE 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 2-NIBE 500	normal	-	1	2	10	1	5	9	2	6	10	3	2	10	0
		Total	1	2	10	1	5	9	2	6	10	3	2	10	0
	Salivation	-	10	2	10	10	5	9	10	6	10	10	2	10	10
		+	0	8	0	0	5	1	0	4	0	0	8	0	0
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Loose stool	-	1	10	10	1	10	10	2	10	10	3	9	10	0
		+	9	0	0	9	0	0	8	0	0	7	1	0	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Watery diarrhea	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mucous feces	-	6	10	10	4	10	10	3	10	10	4	10	10	0
		+	4	0	0	6	0	0	7	0	0	6	0	0	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment															
		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
01 control 0	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 2-NIBE 500	normal	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Loose stool	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		+	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Mucous feces	-	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
+		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		1----->			2----->			3----->			4----->			5----->			6----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 2-NIBE 20	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Scratched wound Neck	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 2-NIBE 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		1----->			2----->			3----->			4----->			5----->			6----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
04 2-NIBE 500	normal	-	10	10	10	10	10	7	6	8	6	1	8	7	2	6	7	5	7	7
	Total		10	10	10	10	10	7	6	8	6	1	8	7	2	6	7	5	7	7
	Soiled fur Anogenital region	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8	7	7	7
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
	Reddish tear	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
	Smudge of perinasal area	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8	8	8	8
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	1	1
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
	Salivation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
	Loose stool	-	10	10	10	10	10	7	6	8	6	3	8	7	3	8	10	5	9	9
		+	0	0	0	0	0	3	4	2	4	7	2	3	7	2	0	4	0	0
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
	Watery diarrhea	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8	10	10	9	10	10	9	9	9
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
	Mucous feces	-	10	10	10	10	10	7	6	8	6	3	8	7	2	8	10	5	9	9
		+	0	0	0	0	0	3	4	2	4	7	2	3	8	2	0	4	0	0
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																					
		7----->			8----->			9----->			10----->			11----->			12----->						
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3				
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 2-NIBE 20	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Scratched wound Neck	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 2-NIBE 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		7----->			8----->			9----->			10----->			11----->			12----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
04 2-NIBE 500	normal	-	6	6	7	7	6	7	6	3	7	4	4	6	6	5	7	7	4	7
	Total		6	6	7	7	6	7	6	3	7	4	4	6	6	5	7	7	4	7
	Soiled fur Anogenital region	-	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		+	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Reddish tear	-	8	8	8	8	8	8	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8	8	7
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Total		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Smudge of perinasal area	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Salivation	-	8	7	8	8	6	7	8	3	7	8	4	6	8	6	7	8	4	7
		+	0	1	0	0	2	1	0	5	1	0	4	2	0	2	1	0	4	1
	Total		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Loose stool	-	7	8	8	7	8	8	6	8	8	4	8	8	6	7	8	7	8	8
		+	1	0	0	1	0	0	2	0	0	4	0	0	2	1	0	1	0	0
	Total		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Watery diarrhea	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Mucous feces	-	7	8	8	7	8	8	6	8	8	5	8	8	8	8	8	7	8	8
		+	1	0	0	1	0	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0
	Total		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																			
		13----->			14----->			15----->			16----->			17----->			18----->				
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 2-NIBE 20	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Scratched wound Neck	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
03 2-NIBE 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		13----->			14----->			15----->			16----->			17----->			18----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
04 2-NIBE 500	normal	-	4	5	5	2	5	5	4	4	5	3	4	6	0	5	6	1	5	4
		Total	4	5	5	2	5	5	4	4	5	3	4	6	0	5	6	1	5	4
	Soiled fur Anogenital region	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Reddish tear	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Smudge of perinasal area	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Salivation	-	8	5	5	8	5	5	8	4	5	8	4	6	8	5	6	8	5	4	
	+	0	3	3	0	3	3	0	4	3	0	4	2	0	3	2	0	3	4	
	Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Loose stool	-	4	8	8	4	8	8	4	8	8	4	8	8	1	8	8	1	8	8	
	+	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	7	0	0	7	0	0	
	Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Watery diarrhea	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	8	8	7	8	8	8	8	8	
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
	Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Mucous feces	-	6	8	8	4	8	8	5	8	8	5	8	8	1	8	8	2	8	8	
	+	2	0	0	4	0	0	3	0	0	3	0	0	7	0	0	6	0	0	
	Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		19----->			20----->			21----->			22----->			23----->			24----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 2-NIBE 20	normal	-	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Total	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Scratched wound Neck	-	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		+	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
03 2-NIBE 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		19----->			20----->			21----->			22----->			23----->			24----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
04 2-NIBE 500	normal	-	1	5	5	3	5	7	3	3	7	5	4	7	1	4	8	4	5	8
	Total		1	5	5	3	5	7	3	3	7	5	4	7	1	4	8	4	5	8
	Soiled fur Anogenital region	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Reddish tear	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Smudge of perinasal area	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Salivation	-	8	5	5	8	5	7	8	3	7	8	4	7	8	4	8	8	5	8
		Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Loose stool	-	1	8	8	3	8	8	3	8	8	5	8	8	1	8	8	4	8	8
		Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Watery diarrhea	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Mucous feces	-	2	8	8	4	8	8	3	8	8	5	8	8	4	8	8	5	8	8
		Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

-348-

-47-

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment													
		25----->			26----->			27----->			28----->			29	
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 2-NIBE 20	normal	-	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5
		Total	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5
	Scratched wound Neck	-	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5
		+	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 2-NIBE 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment													
		25----->			26----->			27----->			28----->			29	
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
04 2-NIBE 500	normal	-	4	5	8	2	4	7	1	6	8	1	4	8	2
		Total	4	5	8	2	4	7	1	6	8	1	4	8	2
	Soiled fur	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Anogenital region	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Reddish tear	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Smudge of perinasal area	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Salivation	-	8	5	8	8	4	7	8	6	8	8	4	8	8	
	+	0	3	0	0	4	1	0	2	0	0	4	0	0	
	Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Loose stool	-	4	8	8	2	8	8	1	8	8	1	8	8	2	
	+	4	0	0	6	0	0	7	0	0	7	0	0	6	
	Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Watery diarrhea	-	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
Mucous feces	-	5	8	8	3	8	8	1	8	8	4	8	8	3	
	+	3	0	0	5	0	0	7	0	0	4	0	0	5	
	Total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment														
		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
01 control 0	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 2-NIBE 500	normal	-	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Loose stool	-	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		+	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mucous feces	-	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		+	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 2.

Body weight

Exp.No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment										Gain 1-28	Unit:g
		1	4	8	11	15	18	22	25	28			
01 control 0	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	142	162	191	212	240	265	291	312	330	330	188	
	S.D.	5	6	14	13	17	16	19	21	22	22	21	
02 2-NIBE 20	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Mean	144	163	195	217	249	272	300	319	339	339	195	
	S.D.	6	7	6	7	7	10	9	11	14	14	9	
03 2-NIBE 100	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Mean	145	164	195	217	245	264	289	305	319	319	174	
	S.D.	6	6	7	9	12	16	21	25	27	27	31	
04 2-NIBE 500	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	143	130##	164**	180**	202**	216**	230**	243**	256**	256**	113**	
	S.D.	6	15	14	17	22	24	31	30	34	34	30	

Significantly different from 01 group ## P $\frac{W}{W}$ 0.01 (Steel)
 Significantly different from 01 group ** P $\frac{W}{W}$ 0.01 (Dunnett)
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 2. -continued Body weight

Exp.No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Group No. Dose	mg/kg	N	Day of experiment					Gain 29-42	Unit:g
			29	32	36	39	42		
01 control	0	N	5	5	5	5	5	5	
		Mean	333	346	357	367	375	41	
		S.D.	19	20	20	22	19	7	
04 2-NIBE	500	N	5	5	5	5	5	5	
		Mean	252**	271**	293*	307*	317*	65**	
		S.D.	43	44	47	46	43	9	

Significantly different from 01 group * P ≤ 0.05 , ** P ≤ 0.01 (Dunnett)
2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 2.

-continued Body weight

Exp.No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment									Gain 1-28	Unit:g
		1	4	8	11	15	18	22	25	28		
01 control 0	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Mean	116	129	142	153	161	167	178	184	191	75	
	S.D.	4	4	6	6	10	10	11	12	11	11	
02 2-NIBE 20	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Mean	114	126	140	153	162	169	181	187	193	79	
	S.D.	4	6	9	10	12	11	12	15	13	11	
03 2-NIBE 100	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Mean	117	130	149	160	171	178	188	193	201	84	
	S.D.	4	6	8	10	11	13	15	14	15	12	
04 2-NIBE 500	N	10	10	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Mean	116	105**	132*	141*	154	164	173	178	188	73	
	S.D.	4	8	7	11	10	10	14	15	19	18	

Significantly different from 01 group * P \leq 0.05 , ** P \leq 0.01 (Dunnett)

2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 2. -continued Body weight

Exp.No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose	mg/kg	Day of experiment					Gain 29-42	Unit:g
		29	32	36	39	42		
01 control	N	5	5	5	5	5	5	
	Mean	191	199	204	206	209	19	
	S.D.	16	16	13	12	15	4	
04 2-NIBE	N	5	5	5	5	5	5	
	Mean	191	199	206	210	215	25	
	S.D.	20	22	21	22	22	5	

2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 3.

Food consumption

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment						Unit:g/animal/day
		1 => 8	8 => 15	15 => 22	22 => 28	29 => 36	36 => 42	
01 control 0	N	10	10	10	10	5	5	
	Mean	18	19	20	19	24	23	
	S.D.	1	1	1	1	1	1	
02 2-NIBE 20	N	5	5	5	5			
	Mean	19	21#	21#	20			
	S.D.	1	1	1	1			
03 2-NIBE 100	N	5	5	5	5			
	Mean	18	20	20	19			
	S.D.	1	2	2	2			
04 2-NIBE 500	N	10	10	10	10	5	5	
	Mean	13##	19	17#	16*	29**	25	
	S.D.	3	3	4	3	3	2	

Significantly different from 01 group # P \lll 0.05, ## P \lll 0.01 (Steel)
 Significantly different from 01 group * P \lll 0.05, ** P \lll 0.01 (Dunnett)
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 3.

-continued Food consumption

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment						Unit:g/animal/day
		1 => 8	8 => 15	15 => 22	22 => 28	29 => 36	36 => 42	
01 control 0	N	10	10	10	10	5	5	
	Mean	14	14	14	13	18	18	
	S.D.	1	1	1	1	1	1	
02 2-NIBE 20	N	5	5	5	5			
	Mean	14	15	14	13			
	S.D.	3	1	2	1			
03 2-NIBE 100	N	5	5	5	5			
	Mean	15	15	15	13			
	S.D.	1	1	2	1			
04 2-NIBE 500	N	8	8	8	8	5	5	
	Mean	11##	14	14	14	23##	20	
	S.D.	2	2	2	2	3	4	

Significantly different from 01 group ## P \leq 0.01 (Steel)
 2-NIBE: 2-Naphthylisobutyl ether

Table 4. Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)					Recovery period (Week)			
		B. G.	1	2	3	4	1	2		
No. of animals	0	10	10	10	10	10	5	5		
	20	5	5	5	5	5	-	-		
	100	5	5	5	5	5	-	-		
	500	10	10	10	10	10	5	5		
REMOVAL FROM CAGE Ease of removal	Very easy	0	8	8	10	8	8	5	5	
		20	4	4	5	5	3	-	-	
		100	5	3	5	4	4	-	-	
		500	5	6	9	10	9	5	5	
	Easy	0	2	2	0	2	2	0	0	
		20	1	1	0	0	2	-	-	
		100	0	2	0	1	1	-	-	
		500	5	4	1	0	1	0	0	
	Vocalization	None	0	10	10	10	10	10	5	5
			20	5	5	5	5	5	-	-
			100	5	5	5	5	5	-	-
			500	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Male

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
			1	2	3	4	1	2	
HANDLING OBSERVATIONS									
Muscle tone	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Subnormal temperature	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Piloerection	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Staining hair	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Unkempt hair	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Skin color	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Lacrimation	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Male

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
			1	2	3	4	1	2	
Exophthalmos	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Pupillary size	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Salivation	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	4	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	8	3	2	5	5
	Slight	0	0	0	0	0	0	0	0
		20	0	0	1	0	0	-	-
		100	0	0	0	0	0	-	-
		500	0	0	2	7	6	0	0
	Marked	0	0	0	0	0	0	0	0
		20	0	0	0	0	0	-	-
		100	0	0	0	0	0	-	-
		500	0	0	0	0	2	0	0

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Male

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
			1	2	3	4	1	2	
OBSERVATIONS IN ARENA									
Posture	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Motor activity	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Respiration	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Lid closure	Wide open	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Gait	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	4	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
	Indifference immobile	0	0	0	0	0	0	0	0
		20	0	0	0	0	0	-	-
		100	0	1	0	0	0	-	-
		500	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Male

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
			1	2	3	4	1	2	
Twitch	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Convulsion	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Stereotypic behavior	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5
Abnormal behavior	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)			
		B. G.	1	2	3	4	1	2	
SENSORIMOTOR FUNCTION									
Approach contact	No reaction	0				0		0	
		20				0		-	
		100				0		-	
		500				1		0	
	Normal a)	0				10		5	
		20				5		-	
		100				5		-	
		500				9		5	
	Touch response	No reaction	0				0		0
			20				0		-
			100				0		-
			500				1		0
Moderate reaction		0				10		5	
		20				5		-	
		100				5		-	
		500				8		5	
Freezing		0				0		0	
		20				0		-	
		100				0		-	
		500				1		0	
Pinna response	Normal	0				10		5	
		20				5		-	
		100				5		-	
		500				10		5	

B. G. : Before grouping

a) Rat slowly approaches and sniffs at object or turns away

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2
Pain response(Tail pinch)	Slowly turns	0				1		0
		20				0		-
		100				0		-
		500				0		0
	Normal	0				9		5
		20				5		-
		100				5		-
		500				10		5
Pupillary reflex	Normal	0				10		5
		20				5		-
		100				5		-
		500				10		5
Air righting reflex	Normal	0				10		5
		20				5		-
		100				5		-
		500				10		5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Female

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
			1	2	3	4	1	2	
No. of animals	0	10	10	10	10	10	5	5	
	20	5	5	5	5	5	-	-	
	100	5	5	5	5	5	-	-	
	500	10	9	8	8	8	5	5	
REMOVAL FROM CAGE									
Ease of removal	Very easy	0	8	10	7	10	10	5	5
		20	3	5	3	5	5	-	-
		100	4	5	4	5	5	-	-
		500	9	7	6	7	8	5	5
	Easy	0	2	0	3	0	0	0	0
		20	2	0	2	0	0	-	-
		100	1	0	1	0	0	-	-
		500	1	1	2	1	0	0	0
	Moderately difficult	0	0	0	0	0	0	0	0
		20	0	0	0	0	0	-	-
		100	0	0	0	0	0	-	-
		500	0	1	0	0	0	0	0
Vocalization	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Female

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
			1	2	3	4	1	2	
HANDLING OBSERVATIONS									
Muscle tone	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5
Subnormal temperature	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5
Piloerection	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5
Staining hair	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	7	8	8	8	5	5
	Very soiled	0	0	0	0	0	0	0	0
		20	0	0	0	0	0	-	-
		100	0	0	0	0	0	-	-
		500	0	2	0	0	0	0	0
Unkempt hair	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5
Skin color	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Female

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)					Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2	
Lacrimation	Absent	0	10	10	10	10	5	5	
		20	5	5	5	5	-	-	
		100	5	5	5	5	-	-	
		500	10	9	8	8	5	5	
Exophthalmos	Absent	0	10	10	10	10	5	5	
		20	5	5	5	5	-	-	
		100	5	5	5	5	-	-	
		500	10	9	8	8	5	5	
Pupillary size	Normal	0	10	10	10	10	5	5	
		20	5	5	5	5	-	-	
		100	5	5	5	5	-	-	
		500	10	9	8	8	5	5	
Salivation	Absent	0	10	10	10	10	5	5	
		20	5	5	5	5	-	-	
		100	5	5	5	5	-	-	
		500	10	8	5	5	5	5	
	Slight	0	0	0	0	0	0	0	
		20	0	0	0	0	-	-	
		100	0	0	0	0	-	-	
		500	0	1	3	3	2	0	0

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Female

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
			1	2	3	4	1	2	
OBSERVATIONS IN ARENA									
Posture	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5
Motor activity	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	8	8	8	8	5	5
	Low	0	0	0	0	0	0	0	0
		20	0	0	0	0	0	-	-
		100	0	0	0	0	0	-	-
		500	0	1	0	0	0	0	0
Respiration	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5
Lid closure	Wide open	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5
Gait	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5
Tremor	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Female

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
			1	2	3	4	1	2	
Twitch	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5
Convulsion	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5
Stereotypic behavior	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5
Abnormal behavior	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		20	5	5	5	5	5	-	-
		100	5	5	5	5	5	-	-
		500	10	9	8	8	8	5	5
Other	Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0
		20	0	0	0	0	0	-	-
		100	0	0	0	0	0	-	-
		500	0	1	0	0	0	0	0

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Female

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2
SENSORIMOTOR FUNCTION								
Approach contact	Normal a)	0				10		5
		20				5		-
		100				5		-
		500				8		5
Touch response	Moderate reaction	0				10		5
		20				5		-
		100				5		-
		500				8		5
Pinna response	Normal	0				10		5
		20				5		-
		100				5		-
		500				8		5
Pain response(Tail pinch)	Slowly turns	0				0		0
		20				0		-
		100				0		-
		500				0		1
	Walk away from stimulus	0				0		2
		20				0		-
		100				0		-
		500				0		0
	Normal	0				10		3
		20				5		-
		100				5		-
		500				8		4
Pupillary reflex	Normal	0				10		5
		20				5		-
		100				5		-
		500				8		5

B. G. : Before grouping

a) Rat slowly approaches and sniffs at object or turns away

Table 4. -continued Detailed clinical observations and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex : Female

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2
Air righting reflex	Normal							
	0					10		5
	20					5		-
	100					5		-
	500					8		5

B. G. : Before grouping

Table 5. Summary of number of defecation

Exp. No. 9933(115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	B. G.	Administration period (week)				Recovery period (week)	
				1	2	3	4	1	2
Male	0	10	0.3 ± 0.7 a)	0.4 ± 0.8	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 (5)	0.0 ± 0.0 (5)
	20	5	0.6 ± 0.9	0.6 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.9	0.2 ± 0.4		
	100	5	0.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0		
	500	10	1.0 ± 1.1	0.9 ± 1.5	0.4 ± 1.3	0.5 ± 1.6	0.0 ± 0.0	1.4 ± 1.9 (5)	0.0 ± 0.0 (5)
Female	0	10	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 (5)	0.6 ± 0.9 (5)
	20	5	1.0 ± 1.4	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
	100	5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4		
	500	10	0.3 ± 0.7	0.6 ± 0.9 (9)	0.5 ± 1.1 (8)	0.0 ± 0.0 (8)	0.0 ± 0.0 (8)	0.6 ± 1.3 (5)	0.0 ± 0.0 (5)

B. G. : Before grouping

a) Mean ± S.D.

Values in parentheses are expressed no. of animals examined

Table 6. Summary of number of pools of urine

Exp. No. 9933(115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	B. G.	Administration period (week)				Recovery period (week)	
				1	2	3	4	1	2
Male	0	10	0.3 ± 0.5 a)	0.6 ± 0.8	0.2 ± 0.6	0.1 ± 0.3	0.4 ± 0.7	0.0 ± 0.0 (5)	0.0 ± 0.0 (5)
	20	5	0.4 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.9	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4		
	100	5	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.5		
	500	10	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.8	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0 (5)	0.0 ± 0.0 (5)
Female	0	10	0.5 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4 (5)	0.2 ± 0.4 (5)
	20	5	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
	100	5	0.8 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
	500	10	0.2 ± 0.6	0.4 ± 0.5 (9)	0.4 ± 0.5 (8)	0.1 ± 0.4 (8)	0.1 ± 0.4 (8)	0.0 ± 0.0 (5)	0.0 ± 0.0 (5)

B. G. : Before grouping

a) Mean ± S.D.

Values in parentheses are expressed no. of animals examined

Table 7. Summary of grip strength

Exp. No. 9933(115-212)

4 week of administration					Unit : g
Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Forelimb		Hindlimb
Male	0	10	944 ± 197 a)		389 ± 81
	20	5	968 ± 220		450 ± 34
	100	5	877 ± 277		527 ± 180
	500	10	813 ± 185		417 ± 91
Female	0	10	802 ± 69		465 ± 61
	20	5	868 ± 145		549 ± 83
	100	5	743 ± 95		492 ± 91
	500	8	692 ± 168		473 ± 78

a) Mean ± S.D.

Table 7. -continued Summary of grip strength

Exp. No. 9933 (115-212)

2 week of recovery					Unit : g
Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Forelimb	Hindlimb	
Male	0	5	1125 ± 118 a)	652 ± 96	
	500	5	1210 ± 373	672 ± 113	
Female	0	5	768 ± 209	422 ± 141	
	500	5	655 ± 119	417 ± 106	

a) Mean ± S.D.

Table 8. Summary of motor activity

Exp. No. 9933 (115-212)

4 week of administration

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Motor activity (counts)						Total (0-60)
			0-10 a)	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
Male	0	10	176 ± 54 b)	147 ± 33	138 ± 42	105 ± 36	105 ± 42	91 ± 41	760 ± 202
	20	5	173 ± 45	134 ± 20	127 ± 35	117 ± 21	94 ± 37	66 ± 41	710 ± 111
	100	5	164 ± 43	99 ± 57	111 ± 44	87 ± 48	66 ± 39	42 ± 50	571 ± 203
	500	10	155 ± 50	99 ± 52	66 ± 43**	41 ± 28**	17 ± 24**	20 ± 18**	397 ± 165**
Female	0	10	128 ± 28	93 ± 41	85 ± 37	69 ± 31	71 ± 28	75 ± 27	520 ± 141
	20	5	126 ± 25	90 ± 29	80 ± 40	80 ± 30	80 ± 47	58 ± 19	513 ± 124
	100	5	132 ± 14	84 ± 27	93 ± 30	92 ± 12	82 ± 40	86 ± 21	570 ± 83
	500	8	140 ± 31	90 ± 33	75 ± 27	67 ± 38	48 ± 33	58 ± 45	478 ± 163

a) interval time (minutes)

b) Mean ± S.D.

Significantly different from control group **: $p \leq 0.01$ (Dunnett)

Table 8. -continued Summary of motor activity

Exp. No. 9933 (115-212)

2 week of recovery

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Motor activity (counts)						Total (0-60)
			0-10 a)	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
Male	0	5	170 ± 59 b)	128 ± 46	96 ± 47	84 ± 34	77 ± 30	41 ± 34	595 ± 176
	500	5	194 ± 32	137 ± 43	112 ± 36	101 ± 37	90 ± 33	55 ± 31	689 ± 141
Female	0	5	118 ± 22	79 ± 21	66 ± 33	101 ± 22	84 ± 24	72 ± 23	520 ± 119
	500	5	127 ± 44	105 ± 44	82 ± 28	79 ± 25	73 ± 24	64 ± 25	529 ± 160

a) interval time (minutes)

b) Mean ± S.D.

Table 9-1. Hematology
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	HCT (%)	HGB (g/dL)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	5	41.8 \pm 1.5	15.2 \pm 0.4	7.53 \pm 0.22	55.6 \pm 2.2	20.2 \pm 0.5	36.3 \pm 0.6
	20	5	41.8 \pm 0.5	15.2 \pm 0.2	7.47 \pm 0.18	56.0 \pm 1.2	20.3 \pm 0.4	36.3 \pm 0.4
	100	5	42.0 \pm 0.5	15.3 \pm 0.3	7.63 \pm 0.23	55.0 \pm 1.2	20.1 \pm 0.4	36.5 \pm 0.3
	500	5	41.8 \pm 3.2	14.9 \pm 1.3	7.39 \pm 0.55	56.7 \pm 3.3	20.2 \pm 1.1	35.7 \pm 0.5
Female	0	5	40.5 \pm 1.5	15.1 \pm 0.5	7.77 \pm 0.37	52.2 \pm 1.7	19.5 \pm 0.6	37.4 \pm 0.3
	20	5	39.5 \pm 1.3	14.8 \pm 0.4	7.48 \pm 0.23	52.8 \pm 0.9	19.7 \pm 0.4	37.3 \pm 0.5
	100	5	40.1 \pm 1.1	15.0 \pm 0.3	7.39 \pm 0.27	54.2 \pm 1.1	20.3 \pm 0.5	37.5 \pm 0.3
	500	3	36.0 \pm 0.9**	13.1 \pm 0.4**	6.81 \pm 0.27**	52.8 \pm 1.3	19.2 \pm 0.4	36.4 \pm 0.4**

Mean \pm S.D.

Significantly different from control group;

** : $P \leq 0.01$ (Dunnett)

Table 9-1. -continued Hematology
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Differential leukocyte counts (%)					
				NEUT	LYMPH	MONO	EOSN	BASO	LUC
Male	0	5	12.23 \pm 2.20	14.9 \pm 5.2	81.8 \pm 5.6	2.0 \pm 0.4	0.7 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
	20	5	12.55 \pm 2.07	15.3 \pm 6.2	81.4 \pm 6.4	2.1 \pm 0.4	0.4 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.7 \pm 0.3
	100	5	12.22 \pm 2.88	13.4 \pm 1.7	83.6 \pm 2.4	1.8 \pm 0.7	0.6 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
	500	5	13.66 \pm 1.33	20.3 \pm 7.5	75.5 \pm 8.0	3.1 \pm 0.4**	0.5 \pm 0.2	0.1 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1
Female	0	5	7.13 \pm 2.09	17.0 \pm 3.8	78.7 \pm 3.2	2.3 \pm 0.5	1.4 \pm 0.6	0.1 \pm 0.0	0.5 \pm 0.2
	20	5	6.32 \pm 2.01	15.3 \pm 6.8	81.6 \pm 6.3	1.6 \pm 0.7	0.9 \pm 0.4	0.1 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1
	100	5	7.39 \pm 3.66	13.3 \pm 3.1	83.7 \pm 2.7	1.4 \pm 0.3	0.9 \pm 0.5	0.1 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2
	500	3	9.01 \pm 1.43	17.3 \pm 4.8	79.3 \pm 5.6	2.0 \pm 0.7	0.9 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells
 Mean \pm S.D.
 Significantly different from control group; **: $P \leq 0.01$ (Dunnett)

Table 9-1. -continued Hematology
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	NEUT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	LYMPH ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	MONO ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	EOSN ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	BASO ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	LUC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
Male	0	5	1.86 ± 0.89	9.96 ± 1.57	0.25 ± 0.08	0.08 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.02
	20	5	1.90 ± 0.71	10.25 ± 2.11	0.26 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.08 ± 0.02
	100	5	1.63 ± 0.37	10.23 ± 2.56	0.21 ± 0.06	0.07 ± 0.04	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.02
	500	5	2.75 ± 1.01	10.32 ± 1.70	0.42 ± 0.06**	0.08 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.02
Female	0	5	1.19 ± 0.37	5.64 ± 1.75	0.17 ± 0.07	0.09 ± 0.03	0.00 ± 0.01	0.03 ± 0.02
	20	5	0.87 ± 0.25	5.25 ± 1.94	0.11 ± 0.07	0.06 ± 0.04	0.00 ± 0.01	0.03 ± 0.01
	100	5	0.97 ± 0.46	6.21 ± 3.16	0.10 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.04
	500	3	1.57 ± 0.53	7.12 ± 1.13	0.18 ± 0.08	0.08 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.01

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells
 Mean ± S.D.
 Significantly different from control group; **: P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 9-1. -continued Hematology
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Reticulocyte (%)
Male	0	5	1252 \pm 166	3.1 \pm 0.4
	20	5	1194 \pm 74	3.3 \pm 0.2
	100	5	1337 \pm 156	2.9 \pm 0.7
	500	5	1235 \pm 133	6.5 \pm 2.3
Female	0	5	1248 \pm 63	1.9 \pm 0.3
	20	5	1156 \pm 123	2.1 \pm 0.3
	100	5	1305 \pm 95	2.4 \pm 0.4
	500	3	1289 \pm 199	4.9 \pm 2.8

Mean \pm S.D.

Table 9-2. Hematology
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	HCT (%)	HGB (g/dL)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	5	42.8 \pm 1.8	16.3 \pm 0.6	8.20 \pm 0.32	52.2 \pm 1.8	19.9 \pm 0.5	38.1 \pm 0.3
	500	5	42.9 \pm 1.0	16.2 \pm 0.4	7.67 \pm 0.33*	56.0 \pm 2.6*	21.1 \pm 0.9*	37.6 \pm 0.2*
Female	0	5	40.0 \pm 1.3	15.7 \pm 0.5	7.73 \pm 0.13	51.7 \pm 1.0	20.2 \pm 0.4	39.1 \pm 0.4
	500	5	41.9 \pm 1.7	16.1 \pm 0.6	7.82 \pm 0.25	53.6 \pm 2.0	20.6 \pm 0.9	38.4 \pm 0.7

Mean \pm S.D.

Significantly different from control group; *: $P \leq 0.05$ (Dunnett)

Table 9-2. -continued Hematology
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Differential leukocyte counts (%)					
				NEUT	LYMPH	MONO	EOSN	BASO	LUC
Male	0	5	11.37 \pm 2.07	13.6 \pm 4.0	82.4 \pm 4.9	2.3 \pm 0.8	0.9 \pm 0.3	0.1 \pm 0.0	0.7 \pm 0.6
	500	5	9.82 \pm 2.46	13.4 \pm 2.8	82.1 \pm 3.4	2.7 \pm 0.9	1.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2
Female	0	5	6.27 \pm 1.05	14.2 \pm 4.6	81.6 \pm 4.4	2.4 \pm 0.8	1.2 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.5 \pm 0.3
	500	5	7.94 \pm 2.32	14.1 \pm 5.2	81.2 \pm 5.6	2.3 \pm 0.7	1.5 \pm 0.6	0.2 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells
 Mean \pm S.D.

Table 9-2. -continued Hematology
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	NEUT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)		LYMPH ($\times 10^3/\text{mm}^3$)		MONO ($\times 10^3/\text{mm}^3$)		EOSN ($\times 10^3/\text{mm}^3$)		BASO ($\times 10^3/\text{mm}^3$)		LUC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	
Male	0	5	1.60 ±	0.66	9.29 ±	1.23	0.27 ±	0.13	0.10 ±	0.05	0.01 ±	0.01	0.09 ±	0.09
	500	5	1.33 ±	0.50	8.05 ±	1.90	0.27 ±	0.12	0.10 ±	0.03	0.02 ±	0.01	0.06 ±	0.04
Female	0	5	0.87 ±	0.20	5.13 ±	1.03	0.15 ±	0.06	0.08 ±	0.02	0.00 ±	0.00	0.03 ±	0.02
	500	5	1.07 ±	0.42	6.50 ±	2.23	0.18 ±	0.05	0.12 ±	0.07	0.01 ±	0.01*	0.05 ±	0.00

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells
 Mean ± S.D.
 Significantly different from control group; *: $P \leq 0.05$ (Dunnett)

Table 9-2. -continued Hematology
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Reticulocyte (%)
Male	0	5	1117 \pm 125	2.1 \pm 0.4
	500	5	1065 \pm 134	2.4 \pm 0.5
Female	0	5	1229 \pm 48	1.9 \pm 0.4
	500	5	1208 \pm 83	1.4 \pm 0.5

Mean \pm S.D.

Table 10-1. Coagulation
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)
Male	0	5	17.7 ± 0.9	26.0 ± 2.0
	20	5	18.0 ± 1.5	25.1 ± 0.8
	100	5	17.9 ± 1.6	26.4 ± 2.9
	500	5	17.3 ± 1.1	25.2 ± 5.3
Female	0	5	16.0 ± 0.3	17.4 ± 1.5
	20	5	16.2 ± 0.6	16.9 ± 1.2
	100	5	16.0 ± 0.6	18.2 ± 2.5
	500	3	16.2 ± 0.5	15.9 ± 1.8

Mean ± S.D.

Table 10-2. Coagulation
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)
Male	0	5	18.9 ± 2.2	25.4 ± 1.3
	500	5	17.2 ± 0.9	23.6 ± 1.6
Female	0	5	17.4 ± 0.6	18.0 ± 2.0
	500	5	17.0 ± 0.6	19.4 ± 1.1

Mean ± S.D.

Table 11-1. Blood chemistry
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	T.protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	T.cholesterol (mg/dL)
Male	0	5	5.65 ± 0.21	154 ± 16	55.8 ± 27.6	61 ± 5
	20	5	5.52 ± 0.19	152 ± 5	64.7 ± 13.1	61 ± 10
	100	5	5.52 ± 0.13	145 ± 10	33.1 ± 16.0	58 ± 8
	500	5	5.75 ± 0.15	135 ± 11*	45.2 ± 22.1	56 ± 12
Female	0	5	5.78 ± 0.22	117 ± 26	13.4 ± 7.2	62 ± 13
	20	5	5.54 ± 0.07	113 ± 14	14.3 ± 6.4	52 ± 7
	100	5	5.64 ± 0.09	108 ± 12	19.8 ± 11.4	69 ± 7
	500	3	5.33 ± 0.30**	97 ± 10	38.1 ± 11.1**	62 ± 14

Mean ± S.D.

Significantly different from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 11-1. -continued Blood chemistry
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	T.bilirubin (mg/dL)	Total bile acid (μ mol/L)
Male	0	5	9.0 \pm 1.0	0.21 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	19.2 \pm 14.4
	20	5	8.4 \pm 0.9	0.20 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	18.9 \pm 15.4
	100	5	9.5 \pm 1.5	0.20 \pm 0.04	0.03 \pm 0.00	24.9 \pm 10.5
	500	5	10.5 \pm 1.5	0.24 \pm 0.02	0.06 \pm 0.04	46.1 \pm 45.6
Female	0	5	11.6 \pm 1.7	0.23 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01	12.3 \pm 5.8
	20	5	12.5 \pm 1.8	0.25 \pm 0.05	0.03 \pm 0.01	25.1 \pm 12.5
	100	5	12.2 \pm 3.0	0.25 \pm 0.11	0.02 \pm 0.01	16.1 \pm 9.9
	500	3	11.2 \pm 3.0	0.19 \pm 0.04	0.06 \pm 0.03	16.7 \pm 4.1

Mean \pm S.D.

Table 11-1. -continued Blood chemistry
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	AST (U/L)		ALT (U/L)		ALP (U/L)	Gamma-GTP (U/L)
Male	0	5	78 ±	5	25 ±	2	762 ± 156	0.6 ± 0.1
	20	5	81 ±	9	30 ±	4#	828 ± 183	0.7 ± 0.1
	100	5	74 ±	5	34 ±	8	908 ± 295	0.6 ± 0.2
	500	5	73 ±	4	45 ±	12#	724 ± 156	1.3 ± 0.4
Female	0	5	84 ±	11	23 ±	2	505 ± 70	0.8 ± 0.1
	20	5	86 ±	13	22 ±	3	468 ± 105	0.9 ± 0.1
	100	5	76 ±	6	23 ±	5	455 ± 157	0.9 ± 0.1
	500	3	88 ±	5	40 ±	24	804 ± 265*	2.0 ± 0.7

Mean ± S.D.

Significantly different from control group;
 Significantly different from control group;

*: $P \leq 0.05$ (Dunnett)
 #: $P \leq 0.05$ (Steel)

Table 11-1. -continued Blood chemistry
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Calcium (mg/dL)	I.phosphorus (mg/dL)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	5	9.79 ± 0.16	8.61 ± 1.06	141.4 ± 1.3	4.64 ± 0.29	106.6 ± 1.7
	20	5	9.70 ± 0.26	8.81 ± 0.67	142.3 ± 0.7	4.67 ± 0.29	106.9 ± 1.7
	100	5	9.83 ± 0.29	8.58 ± 0.62	141.9 ± 1.1	4.60 ± 0.23	106.4 ± 0.6
	500	5	10.04 ± 0.37	9.69 ± 0.94	140.2 ± 0.9	5.06 ± 0.25	106.8 ± 2.1
Female	0	5	9.80 ± 0.43	8.06 ± 1.28	141.3 ± 0.9	4.59 ± 0.25	108.9 ± 1.4
	20	5	9.51 ± 0.25	7.98 ± 0.69	142.3 ± 1.1	4.28 ± 0.11	110.4 ± 0.9
	100	5	9.53 ± 0.24	7.27 ± 0.38	142.1 ± 1.7	4.26 ± 0.17*	108.6 ± 1.3
	500	3	9.61 ± 0.33	8.41 ± 0.73	141.1 ± 2.3	4.82 ± 0.23	107.4 ± 1.4

Mean ± S.D.

Significantly different from control group;

*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

Table 11-2. Blood chemistry
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	T.protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	T.cholesterol (mg/dL)
Male	0	5	5.98 ± 0.22	161 ± 8	55.5 ± 12.0	72 ± 16
	500	5	5.65 ± 0.22*	142 ± 10*	48.8 ± 10.6	60 ± 12
Female	0	5	5.82 ± 0.18	116 ± 20	11.2 ± 4.4	69 ± 10
	500	5	5.78 ± 0.17	127 ± 11	30.7 ± 14.5#	89 ± 8**

Mean ± S.D.

Significantly different from control group;
 Significantly different from control group;

*: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01 (Dunnett)
 #: P ≤ 0.05 (Steel)

Table 11-2. -continued Blood chemistry
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	T.bilirubin (mg/dL)	Total bile acid (μ mol/L)
Male	0	5	12.5 \pm 2.0	0.22 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01	20.4 \pm 13.5
	500	5	12.9 \pm 1.4	0.23 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	35.7 \pm 19.3
Female	0	5	16.5 \pm 2.4	0.25 \pm 0.03	0.04 \pm 0.02	14.5 \pm 8.2
	500	5	16.0 \pm 0.8	0.26 \pm 0.04	0.03 \pm 0.01	20.3 \pm 21.1

Mean \pm S.D.

Table 11-2. -continued Blood chemistry
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Gamma-GTP (U/L)
Male	0	5	78 ± 13	31 ± 4	487 ± 94	0.6 ± 0.1
	500	5	75 ± 6	30 ± 6	631 ± 71*	0.8 ± 0.3
Female	0	5	88 ± 7	26 ± 3	354 ± 91	1.1 ± 0.4
	500	5	87 ± 17	27 ± 3	307 ± 80	1.1 ± 0.3

Mean ± S.D.

Significantly different from control group; *: P ≤ 0.05 (Dunnett)

Table 11-2. -continued Blood chemistry
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Calcium (mg/dL)	I.phosphorus (mg/dL)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	5	10.05 ± 0.22	7.57 ± 0.35	142.0 ± 0.6	4.64 ± 0.48	106.2 ± 0.8
	500	5	9.99 ± 0.19	8.35 ± 0.17**	143.3 ± 1.5	4.63 ± 0.16	106.7 ± 1.9
Female	0	5	9.55 ± 0.16	6.60 ± 0.93	141.7 ± 1.1	4.73 ± 0.21	111.0 ± 1.2
	500	5	9.71 ± 0.13	6.97 ± 0.77	141.4 ± 1.2	4.44 ± 0.31	109.1 ± 1.0*

Mean ± S.D.

Significantly different from control group;

*: P ≤ 0.05

** : P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 12-1. Electrophoresis
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (%)	Alpha-1 (%)	Alpha-2 (%)	Beta (%)	Gamma (%)	A/G
Male	0	5	52.9 ± 1.1	19.9 ± 0.9	8.1 ± 0.3	15.4 ± 0.7	3.8 ± 1.2	1.12 ± 0.05
	20	5	54.2 ± 0.7	17.9 ± 0.8*	8.2 ± 0.6	15.6 ± 0.4	4.2 ± 0.7	1.18 ± 0.03
	100	5	53.9 ± 0.7	19.1 ± 0.7	8.5 ± 1.2	14.7 ± 0.9	3.7 ± 0.8	1.17 ± 0.03
	500	5	51.4 ± 1.1	19.1 ± 1.8	10.5 ± 1.2**	15.7 ± 0.9	3.3 ± 0.7	1.06 ± 0.05
Female	0	5	53.8 ± 1.1	18.2 ± 0.9	7.7 ± 0.2	15.2 ± 1.1	5.0 ± 1.2	1.17 ± 0.05
	20	5	54.1 ± 0.9	18.5 ± 1.2	7.6 ± 0.5	15.3 ± 0.2	4.4 ± 0.7	1.18 ± 0.04
	100	5	55.9 ± 1.9	17.2 ± 2.5	8.2 ± 0.9	14.7 ± 0.6	3.9 ± 1.4	1.27 ± 0.10
	500	3	53.2 ± 4.0	19.3 ± 2.4	9.3 ± 1.6	15.1 ± 0.8	3.1 ± 0.3	1.15 ± 0.17

Mean ± S.D.
 Significantly different from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 12-1. -continued Electrophoresis
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (g/dL)	Alpha-1 (g/dL)	Alpha-2 (g/dL)	Beta (g/dL)	Gamma (g/dL)
Male	0	5	2.99 ± 0.08	1.12 ± 0.06	0.46 ± 0.03	0.87 ± 0.05	0.21 ± 0.08
	20	5	2.99 ± 0.08	0.99 ± 0.07*	0.45 ± 0.03	0.86 ± 0.02	0.23 ± 0.04
	100	5	2.98 ± 0.10	1.06 ± 0.05	0.47 ± 0.07	0.81 ± 0.03	0.21 ± 0.04
	500	5	2.96 ± 0.07	1.10 ± 0.13	0.60 ± 0.06**	0.90 ± 0.05	0.19 ± 0.04
Female	0	5	3.11 ± 0.11	1.05 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.88 ± 0.07	0.29 ± 0.08
	20	5	3.00 ± 0.05	1.03 ± 0.07	0.42 ± 0.03	0.85 ± 0.01	0.24 ± 0.04
	100	5	3.16 ± 0.08	0.97 ± 0.14	0.46 ± 0.05	0.83 ± 0.04	0.22 ± 0.08
	500	3	2.85 ± 0.35	1.02 ± 0.07	0.49 ± 0.08	0.81 ± 0.05	0.17 ± 0.01

Mean ± S.D.

Significantly different from control group;

*: P ≤ 0.05

** : P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 12-2. Electrophoresis
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (%)	Alpha-1 (%)	Alpha-2 (%)	Beta (%)	Gamma (%)	A/G
Male	0	5	47.6 ± 3.1	22.3 ± 3.8	9.2 ± 1.3	16.1 ± 0.9	4.9 ± 1.1	0.91 ± 0.12
	500	5	51.6 ± 2.1*	19.3 ± 2.2	8.8 ± 1.1	15.6 ± 0.9	4.7 ± 0.6	1.07 ± 0.09
Female	0	5	51.0 ± 4.2	19.1 ± 3.6	6.9 ± 0.6	17.1 ± 1.2	6.0 ± 1.3	1.05 ± 0.18
	500	5	50.8 ± 3.0	20.0 ± 1.6	8.2 ± 1.3	15.7 ± 1.0	5.3 ± 1.0	1.04 ± 0.13

Mean ± S.D.

Significantly different from control group; *: P ≤ 0.05 (Dunnett)

Table-12-2. -continued Electrophoresis
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (g/dL)	Alpha-1 (g/dL)	Alpha-2 (g/dL)	Beta (g/dL)	Gamma (g/dL)
Male	0	5	2.85 ± 0.17	1.33 ± 0.24	0.55 ± 0.08	0.96 ± 0.04	0.29 ± 0.08
	500	5	2.91 ± 0.06	1.09 ± 0.16	0.49 ± 0.06	0.88 ± 0.07	0.27 ± 0.04
Female	0	5	2.96 ± 0.22	1.11 ± 0.23	0.40 ± 0.03	1.00 ± 0.09	0.35 ± 0.08
	500	5	2.94 ± 0.25	1.16 ± 0.10	0.47 ± 0.06	0.90 ± 0.05	0.30 ± 0.05

Mean ± S.D.

Table 13-1. Urinalysis
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (mL)	Osmotic pressure (mOsm/kg)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	10	7.6 ± 3.2	1761 ± 545	166 ± 59	303.6 ± 92.9	222.0 ± 71.1
	20	5	6.8 ± 2.4	2044 ± 364	183 ± 43	343.4 ± 72.5	249.1 ± 49.0
	100	5	7.0 ± 2.5	1915 ± 351	168 ± 39	231.9 ± 31.1	235.1 ± 59.1
	500	10	16.7 ± 10.6	874 ± 367**	29 ± 16##	88.3 ± 35.6##	100.8 ± 41.5**
Female	0	10	5.7 ± 2.2	1692 ± 471	125 ± 40	246.2 ± 64.3	181.7 ± 52.8
	20	5	6.2 ± 0.9	1625 ± 346	134 ± 26	223.4 ± 53.6	178.6 ± 49.0
	100	5	8.2 ± 6.0	1778 ± 928	122 ± 74	197.4 ± 90.5	193.1 ± 97.8
	500	8	13.1 ± 4.6##	925 ± 283##	41 ± 27**	93.8 ± 29.3**	122.1 ± 36.7

Mean ± S.D.

Significantly different from control group;
 Significantly different from control group;

** : P ≤ 0.01 (Dunnett)
 ## : P ≤ 0.01 (Steel)

Table 13-1. -continued Urinalysis
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Sodium (mmol/day)	Potassium (mmol/day)	Chloride (mmol/day)
Male	0	10	1.11 ± 0.21	2.08 ± 0.39	1.51 ± 0.26
	20	5	1.17 ± 0.16	2.20 ± 0.25	1.60 ± 0.22
	100	5	1.13 ± 0.29	1.59 ± 0.45	1.58 ± 0.42
	500	10	0.44 ± 0.29**	1.27 ± 0.57**	1.36 ± 0.53
Female	0	10	0.69 ± 0.29	1.31 ± 0.38	0.98 ± 0.33
	20	5	0.81 ± 0.11	1.34 ± 0.19	1.07 ± 0.14
	100	5	0.68 ± 0.15	1.19 ± 0.25	1.14 ± 0.18
	500	8	0.53 ± 0.40	1.18 ± 0.45	1.49 ± 0.40**

Mean ± S.D.

Significantly different from control group;

** : P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 13-1. -continued Urinalysis
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Color											pH							Occult blood				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	≥ 9	-	+/-	1+
Male	0	10	10																		10				
	20	5	5																		4 1				
	100	5	2 3											1							5				
	500	10	6 2											1 2 2 3 2							10				
Female	0	10	10											1 1 1 6 1							9 1				
	20	5	5											3 1 1							5				
	100	5	3 2											1 1 1 1 1							4 1				
	500	8	1 7											2 2 1 3							8				

Color : 1= Colorless, 2= Slight yellow, 3= Yellow-brown, 4= Red, 5= Red-brown, 6= Dark red, 7= Dark brown,
 8= Brown-black, 9= Milky white, 10= Fluorescent green, 11= Blue
 Occult blood : -(negative), +/- (trace), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked)

Table 13-1. -continued Urinalysis
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Ketone bodies					Glucose (g/dL)					Protein (mg/dL)				
			-	+/-	1+	2+	3+	-	0.1	0.25	0.5	≥ 1.0	-	+/-	30	100	≥ 300
Male	0	10		3	6	1	7	3						4	6		
	20	5		1	2	2	5						1	3	1		
	100	5		1	3	1	4	1					1	4			
	500	10	4	3	3		9	1				1	6	3			
Female	0	10	6	2	2		10					3	4			3	
	20	5	4		1		5					2	2			1	
	100	5	2	1	2		5				1		2	2			
	500	8	3	5			8				4	4					

Ketone bodies : -(negative), +/- (5 mg/dL), 1+ (15 mg/dL), 2+ (40 mg/dL), 3+ (≥ 80 mg/dL)

Table 13-1. -continued Urinalysis
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Bilirubin				Urobilinogen (E.U./dL)					
			-	1+	2+	3+	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	≥ 12
Male	0	10	8	1	1		3	5	2			
	20	5	1	4			1	3	1			
	100	5	1	3	1		1	3	1			
	500	10	2	4	4		6	4				
Female	0	10	9	1			6	3	1			
	20	5	4	1			4	1				
	100	5	4	1			2	3				
	500	8	3	5			5	3				

Bilirubin : -(negative), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked)

Table 13-1. -continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes			Leukocytes			Epithelial cells			Casts		Fat globules		Mucous threads		Crystals		
			-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+	-	1	2+	3+	-	+	-	+	-	+
Male	0	10	10			10			10			10		10		10			10	
	20	5	5			5			4	1		5		5		5			5	
	100	5	5			5			5			5		5		5			5	
	500	10	10			10			9	1		10		10		10			10	
Female	0	10	10			7	3		10			10		10		9	1		1	9
	20	5	5			5			5			5		5		5			5	
	100	5	5			5			4	1		5		5		5			2	3
	500	8	8			8			5	3		8		8		8			3	5

Erythrocytes, Leukocytes and Epithelial cells (cells/ μ L) : -(0-4), 1+(5-14), 2+(15-29), 3+(30 or more)
 Casts, Fat globules, Mucous threads and Crystals : -(not observed), +(observed)

Table 13-2. Urinalysis
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (mL)	Osmotic pressure (mOsm/kg)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	5	13.4 ± 3.6	1535 ± 227	107 ± 10	228.5 ± 33.9	145.9 ± 17.5
	500	5	13.9 ± 4.4	1680 ± 489	120 ± 33	242.9 ± 73.5	156.1 ± 47.7
Female	0	5	15.8 ± 8.9	1216 ± 575	90 ± 45	165.6 ± 73.1	114.2 ± 55.3
	500	5	14.9 ± 7.1	1549 ± 542	118 ± 40	212.0 ± 66.9	146.8 ± 48.9

Mean ± S.D.

Table 13-2. -continued Urinalysis
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Sodium (mmol/day)	Potassium (mmol/day)	Chloride (mmol/day)
Male	0	5	1.41 ± 0.25	2.98 ± 0.45	1.92 ± 0.37
	500	5	1.57 ± 0.32	3.15 ± 0.64	2.03 ± 0.47
Female	0	5	1.15 ± 0.12	2.18 ± 0.39	1.49 ± 0.32
	500	5	1.53 ± 0.33*	2.78 ± 0.64	1.91 ± 0.46

Mean ± S.D.

Significantly different from control group; *: P ≤ 0.05 (Dunnett)

Table 13-2. -continued Urinalysis
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Color											pH								Occult blood				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	≥ 9	-	+/-	1+	2+
Male	0	5	5																			5				
	500	5	5																			5				
Female	0	5	5																			5				
	500	5	5																			5				

Color : 1= Colorless, 2= Slight yellow, 3= Yellow-brown, 4= Red, 5= Red-brown, 6= Dark red, 7= Dark brown,
 8= Brown-black, 9= Milky white, 10= Fluorescent green, 11= Blue
 Occult blood : -(negative), +/- (trace), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked)

Table 13-2. -continued Urinalysis
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Ketone bodies					Glucose (g/dL)					Protein (mg/dL)				
			-	+/-	1+	2+	3+	-	0.1	0.25	0.5	≥ 1.0	-	+/-	30	100	≥ 300
Male	0	5	1	3	1		4	1						3	2		
	500	5	3	2			5						1	2	2		
Female	0	5	3	2			4	1					3	1	1		
	500	5	2	3			5						1	2	2		

Ketone bodies : -(negative), +/- (5 mg/dL), 1+(15 mg/dL), 2+(40 mg/dL), 3+(≥ 80 mg/dL)

Table 13-2. -continued Urinalysis
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Bilirubin				Urobilinogen (E.U./dL)					
			-	1+	2+	3+	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	≥ 12
Male	0	5	4	1			2	3				
	500	5	2	3			2	3				
Female	0	5	5				3	2				
	500	5	5				2	3				

Bilirubin : -(negative), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked)

Table 13-2. -continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes			Leukocytes			Epithelial cells			Casts		Fat globules		Mucous threads		Crystals	
			-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+	-	+	-	+	-
Male	0	5	5			5			5			5		5		5			5
	500	5	5			5			5			5		5		5			5
Female	0	5	5			5			4	1		5		5		4	1		5
	500	5	5			5			5			5		5		5			5

Erythrocytes, Leukocytes and Epithelial cells (cells/ μ L) : -(0-4), 1+(5-14), 2+(15-29), 3+(30 or more)
 Casts, Fat globules, Mucous threads and Crystals : -(not observed), +(observed)

Table 14-1. Organ weight
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidneys (g)
Male	0	5	307 ± 25	2.00 ± 0.07	1.14 ± 0.10	10.36 ± 0.95	2.33 ± 0.12
	20	5	316 ± 12	2.07 ± 0.05	1.15 ± 0.06	10.44 ± 0.29	2.47 ± 0.23
	100	5	295 ± 24	2.05 ± 0.06	1.07 ± 0.06	10.21 ± 1.10	2.50 ± 0.28
	500	5	225 ± 16**	1.96 ± 0.08	0.88 ± 0.11**	9.70 ± 0.75	2.00 ± 0.12*
Female	0	5	183 ± 11	1.90 ± 0.07	0.72 ± 0.04	5.88 ± 0.29	1.47 ± 0.12
	20	5	184 ± 11	1.90 ± 0.07	0.72 ± 0.08	5.87 ± 0.44	1.50 ± 0.13
	100	5	187 ± 15	1.90 ± 0.04	0.77 ± 0.06	6.68 ± 0.80	1.60 ± 0.13
	500	3	158 ± 4*	1.87 ± 0.06	0.81 ± 0.39	6.45 ± 0.43	1.49 ± 0.14

Mean ± S.D.
 Significantly different from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 14-1. -continued Organ weight
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (g)	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)	Thymus (mg)
Male	0	5	0.59 ± 0.09	50 ± 9	3.02 ± 0.24		559 ± 95
	20	5	0.59 ± 0.07	44 ± 6	2.92 ± 0.28		492 ± 61
	100	5	0.55 ± 0.02	44 ± 3	2.84 ± 0.22		515 ± 136
	500	5	0.65 ± 0.20	51 ± 8	2.49 ± 0.50		389 ± 102*
Female	0	5	0.39 ± 0.02	55 ± 5		76 ± 5	427 ± 77
	20	5	0.36 ± 0.04	52 ± 10		77 ± 4	430 ± 90
	100	5	0.42 ± 0.08	58 ± 5		86 ± 19	415 ± 106
	500	3	0.47 ± 0.06	55 ± 15		63 ± 12	338 ± 46

Mean ± S.D.

Significantly different from control group; *: P ≤ 0.05 (Dunnett)

Table 14-1. -continued Organ weight
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Epididymides (mg)	Mandibular gland (mg)
Male	0	5	631 ± 42	490 ± 27
	20	5	673 ± 68	500 ± 39
	100	5	628 ± 63	511 ± 17
	500	5	473 ± 97**	420 ± 43*
Female	0	5		357 ± 27
	20	5		362 ± 27
	100	5		365 ± 23
	500	3		319 ± 22

Mean ± S.D.
 Significantly different from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 14-2. Organ weight
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidneys (g)
Male	0	5	354 ± 23	2.12 ± 0.08	1.22 ± 0.04	10.69 ± 0.80	2.56 ± 0.09
	500	5	295 ± 44*	2.14 ± 0.07	1.06 ± 0.13*	8.86 ± 1.42*	2.23 ± 0.36
Female	0	5	198 ± 12	1.94 ± 0.06	0.73 ± 0.02	5.64 ± 0.30	1.59 ± 0.11
	500	5	200 ± 21	1.90 ± 0.06	0.79 ± 0.07	6.45 ± 1.02	1.60 ± 0.08

Mean ± S.D.
 Significantly different from control group; *: P ≤ 0.05 (Dunnet)

Table 14-2. -continued Organ weight
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (g)	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)	Thymus (mg)
Male	0	5	0.63 ± 0.09	48 ± 6	3.23 ± 0.16		452 ± 127
	500	5	0.66 ± 0.10	47 ± 6	2.71 ± 0.82		499 ± 56
Female	0	5	0.45 ± 0.06	59 ± 5		76 ± 12	352 ± 66
	500	5	0.48 ± 0.10	65 ± 5		79 ± 22	393 ± 92

Mean ± S.D.

Table 14-2. -continued Organ weight
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Epididymides (mg)	Mandibular gland (mg)
Male	0	5	903 ± 86	581 ± 71
	500	5	704 ± 236	506 ± 84
Female	0	5		362 ± 17
	500	5		388 ± 69

Mean ± S.D.

Table 15-1. Organ weight per body weight
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Heart (%)	Liver (%)	Kidneys (%)
Male	0	5	307 ± 25	0.658 ± 0.073	0.374 ± 0.033	3.378 ± 0.124	0.763 ± 0.042
	20	5	316 ± 12	0.656 ± 0.035	0.366 ± 0.017	3.309 ± 0.106	0.782 ± 0.075
	100	5	295 ± 24	0.699 ± 0.068	0.365 ± 0.038	3.455 ± 0.187	0.846 ± 0.049*
	500	5	225 ± 16**	0.874 ± 0.056**	0.392 ± 0.039	4.314 ± 0.097**	0.889 ± 0.022**
Female	0	5	183 ± 11	1.042 ± 0.039	0.397 ± 0.027	3.225 ± 0.117	0.809 ± 0.070
	20	5	184 ± 11	1.037 ± 0.049	0.389 ± 0.025	3.198 ± 0.122	0.818 ± 0.057
	100	5	187 ± 15	1.018 ± 0.071	0.414 ± 0.032	3.557 ± 0.161*	0.854 ± 0.065
	500	3	158 ± 4*	1.187 ± 0.066**	0.511 ± 0.229	4.089 ± 0.382**	0.943 ± 0.115

Mean ± S.D.

Significantly different from control group;

*: P ≤ 0.05

** : P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 15-1. -continued Organ weight per body weight
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (%)	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)	Thymus (%)
Male	0	5	0.192 ± 0.028	0.016 ± 0.003	0.987 ± 0.072		0.184 ± 0.040
	20	5	0.186 ± 0.028	0.014 ± 0.002	0.926 ± 0.117		0.156 ± 0.018
	100	5	0.188 ± 0.014	0.015 ± 0.000	0.969 ± 0.133		0.176 ± 0.052
	500	5	0.286 ± 0.073#	0.023 ± 0.003#	1.102 ± 0.144		0.173 ± 0.041
Female	0	5	0.213 ± 0.017	0.030 ± 0.002		0.042 ± 0.004	0.234 ± 0.040
	20	5	0.196 ± 0.024	0.028 ± 0.005		0.042 ± 0.003	0.233 ± 0.036
	100	5	0.225 ± 0.027	0.031 ± 0.002		0.046 ± 0.009	0.221 ± 0.056
	500	3	0.296 ± 0.044**	0.035 ± 0.010		0.040 ± 0.008	0.214 ± 0.029

Mean ± S.D.

Significantly different from control group;

Significantly different from control group;

** : P ≤ 0.01 (Dunnett)

: P ≤ 0.05 (Steel)

Table 15-1. -continued Organ weight per body weight
 ---Administration period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Epididymides (%)	Mandibular gland (%)
Male	0	5	0.206 ± 0.007	0.160 ± 0.011
	20	5	0.213 ± 0.017	0.158 ± 0.011
	100	5	0.214 ± 0.029	0.174 ± 0.018
	500	5	0.209 ± 0.033	0.187 ± 0.015*
Female	0	5		0.196 ± 0.007
	20	5		0.198 ± 0.017
	100	5		0.195 ± 0.010
	500	3		0.202 ± 0.009

Mean ± S.D.
 Significantly different from control group; *: P ≤ 0.05 (Dunnett)

Table 15-2. Organ weight per body weight
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Heart (%)	Liver (%)	Kidneys (%)
Male	0	5	354 ± 23	0.603 ± 0.052	0.345 ± 0.023	3.024 ± 0.129	0.728 ± 0.060
	500	5	295 ± 44*	0.736 ± 0.110*	0.362 ± 0.018	2.996 ± 0.108	0.755 ± 0.019
Female	0	5	198 ± 12	0.983 ± 0.060	0.372 ± 0.019	2.855 ± 0.091	0.803 ± 0.032
	500	5	200 ± 21	0.958 ± 0.083	0.395 ± 0.014	3.215 ± 0.256*	0.804 ± 0.054

Mean ± S.D.

Significantly different from control group; *: P ≤ 0.05 (Dunnett)

Table 15-2. -continued Organ weight per body weight
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (%)	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)	Thymus (%)
Male	0	5	0.177 ± 0.018	0.014 ± 0.001	0.918 ± 0.094		0.128 ± 0.035
	500	5	0.225 ± 0.025**	0.016 ± 0.002	0.902 ± 0.202		0.171 ± 0.027
Female	0	5	0.227 ± 0.025	0.030 ± 0.003		0.039 ± 0.005	0.178 ± 0.030
	500	5	0.239 ± 0.026	0.033 ± 0.005		0.039 ± 0.009	0.196 ± 0.037

Mean ± S.D.

Significantly different from control group; **: P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 15-2. -continued Organ weight per body weight
 ---Recovery period---

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Epididymides (%)	Mandibular gland (%)
Male	0	5	0.257 ± 0.034	0.164 ± 0.018
	500	5	0.234 ± 0.064	0.172 ± 0.017
Female	0	5		0.184 ± 0.010
	500	5		0.193 ± 0.019

Mean ± S.D.

Table 16-1.

Summary of gross findings
(sacrificed, administration period)

Exp. No. 9933 (115-212)

Dose level (mg/kg)	No. of animals necropsied	Male animals				Female animals			
		0	20	100	500	0	20	100	500
Organ	Findings	5	5	5	5	5	5	5	3
CARDIOVASCULAR SYSTEM									
heart	hypertrophic	0	0	0	0	0	0	0	1
	nodule	0	0	0	0	0	0	0	1
	scarred	0	0	0	0	0	0	0	1
HEMATOPOIETIC SYSTEM									
spleen	dark	0	0	0	2	0	0	0	2
	white patch/zone	0	0	0	0	0	0	1	1
RESPIRATORY SYSTEM									
lung	brown patch/zone	0	0	0	0	0	0	0	1
DIGESTIVE SYSTEM									
stomach	black patch/zone	0	0	0	0	0	0	1	0
	red patch/zone	0	0	0	1	0	0	0	1
	white patch/zone	0	0	0	3	0	0	0	0
liver	dark	0	0	0	0	0	0	0	1
	white patch/zone	0	0	0	0	0	0	0	1
URINARY SYSTEM									
kidney	cyst	0	1	0	0	0	0	0	0
	dark	0	0	0	1	0	0	0	0
	scarred	0	0	1	0	0	0	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM									
testis	small	0	0	0	1	-	-	-	-
prostate	small	0	0	0	4*	-	-	-	-
seminal vesicle	small	0	0	0	4*	-	-	-	-
uterus	dilated lumen	-	-	-	-	0	1	1	0
ENDOCRINE SYSTEM									
adrenal gland	scarred	0	0	0	1	0	0	0	0

Significantly different from control group; * : $P \leq 0.05$ (Fisher)

Table 16-2.

Summary of gross findings
(dead, administration period)

Exp. No. 9933 (115-212)

Dose level (mg/kg)	No. of animals necropsied	Female animals			
		0	20	100	500
Organ	Findings				
HEMATOPOIETIC SYSTEM					
spleen	small	-	-	-	2
thymus	atrophic	-	-	-	1
DIGESTIVE SYSTEM					
stomach	autolysis	-	-	-	1
	black patch/zone	-	-	-	1
small intestine	autolysis	-	-	-	2
large intestine	autolysis	-	-	-	2
liver	autolysis	-	-	-	2
ENDOCRINE SYSTEM					
adrenal gland	hypertrophic	-	-	-	2
NERVOUS SYSTEM					
brain	autolysis	-	-	-	2

Table 16-3.

Summary of gross findings
(sacrificed, recovery period)

Exp. No. 9933 (115-212)

Dose level (mg/kg)	No. of animals necropsied	Male animals		Female animals	
		0	500	0	500
Organ	Findings	5	5	5	5
RESPIRATORY SYSTEM					
lung	black patch/zone	0	1	0	0
DIGESTIVE SYSTEM					
stomach	nodule	1	0	0	0
	white patch/zone	1	1	0	0
liver	hepatodiaphragmatic nodule	0	0	1	0
URINARY SYSTEM					
kidney	scarred	1	0	0	0
	white patch/zone	0	0	1	0
REPRODUCTIVE SYSTEM					
testis	small	0	1	-	-
prostate	small	0	1	-	-
seminal vesicle	small	0	1	-	-

Table 17-1.

Summary of histological findings
(sacrificed, administration period)

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				20				100				500			
No. of animals necropsied	5				5				5				5			
No. of animals examined histologically	5				5				5				5			
Organ	Findings															
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T
CARDIOVASCULAR SYSTEM																
heart	(5)				(5)				(5)				(5)			
cellular infiltration, mononuclear	0	0	0	0	3	0	0	3	1	1	0	2	0	1	0	1
HEMATOPOIETIC SYSTEM																
spleen	(5)				(5)				(5)				(5)			
congestion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
deposit, pigment	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
increase, extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
RESPIRATORY SYSTEM																
lung	(5)				(0)				(0)				(5)			
accumulation of foamy cells	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
cellular infiltration, mixed	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
osseous metaplasia	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
DIGESTIVE SYSTEM																
forestomach	(5)				(5)				(5)				(5)			
edema, intraepithelial	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
hemorrhage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
fibrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
squamous hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
cecum	(5)				(5)				(5)				(5)			
basophilic change	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	3
cellular infiltration, eosinophile	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
cellular infiltration, mixed	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
increase in mitosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5***
colon	(5)				(5)				(5)				(5)			
hemorrhage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
basophilic change	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	4*#
cellular infiltration, eosinophile	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
increase in mitosis	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	5	0	0	5***
rectum	(5)				(0)				(0)				(5)			
cellular infiltration, mixed	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
liver	(5)				(5)				(5)				(5)			
eosinophilic change, hepatocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4*#
microgranuloma	3	0	0	3	3	0	0	3	3	0	0	3	2	0	0	2
hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4*#

1: slight 2: moderate 3: marked T: total
 (): No. of animals examined microscopically at this site.
 Significantly different from control group; *: P≤0.05
 Significantly different from control group; #: P≤0.05

-: Not applicable.
 **: P≤0.01 (Fisher)
 ##: P≤0.01 (Mann-Whitney)

Table 17-1. -continued Summary of histological findings
(sacrificed, administration period)

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				20				100				500			
No. of animals necropsied	5				5				5				5			
No. of animals examined histologically	5				5				5				5			
Organ	Findings															
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T
URINARY SYSTEM																
kidney	(5)				(1)				(1)				(5)			
basophilic tubule	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
degeneration, vacuolar, tubule	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
dilatation, tubule	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
cellular infiltration, lymphocyte	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM																
prostate	(5)				(5)				(5)				(5)			
atrophy	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
cellular infiltration, lymphocyte	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
seminal vesicle	(5)				(5)				(5)				(5)			
atrophy	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	4*#
ENDOCRINE SYSTEM																
adrenal gland	(5)				(5)				(5)				(5)			
angiectasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
degeneration, vacuolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	3
accumulation of macrophage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
hypertrophy, cortex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3

1: slight 2: moderate 3: marked T: total
 (): No. of animals examined microscopically at this site.
 Significantly different from control group; *: P≤0.05 (Fisher)
 Significantly different from control group; #: P≤0.05 (Mann-Whitney)

-: Not applicable.

(Fisher)
(Mann-Whitney)

Table 17-1. -continued Summary of histological findings
(sacrificed, administration period)

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				20				100				500			
No. of animals necropsied	5				5				5				3			
No. of animals examined histologically	5				5				5				3			
Organ	Findings				Findings				Findings				Findings			
	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T
CARDIOVASCULAR SYSTEM																
heart	(5)				(5)				(5)				(3)			
myxoid change	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
cellular infiltration, mononuclear	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
pericarditis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
fibrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
hypertrophy, myocardium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
HEMATOPOIETIC SYSTEM																
spleen	(5)				(5)				(5)				(3)			
congestion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3*#
atrophy	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
deposit, pigment	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3*#
capsulitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
increase, extramedullary hematopoiesis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
RESPIRATORY SYSTEM																
lung	(5)				(0)				(0)				(3)			
accumulation of foamy cells	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
accumulation of macrophage	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM																
forestomach	(5)				(5)				(5)				(3)			
edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
ulcer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
squamous hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
glandular stomach	(5)				(5)				(5)				(3)			
edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
colon	(5)				(5)				(5)				(3)			
basophilic change	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
hyperplasia, lymphoid tissue	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
increase in mitosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
liver	(5)				(5)				(5)				(3)			
congestion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
eosinophilic change, hepatocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3*#
vacuolation in hepatocyte	4	0	0	4	1	0	0	1	0	0	0	0*#	1	0	0	1
microgranuloma	5	0	0	5	5	0	0	5	3	0	0	3	2	0	0	2
hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

1: slight 2: moderate 3: marked T: total
 (): No. of animals examined microscopically at this site.
 Significantly different from control group; *: P≤0.05
 Significantly different from control group; #: P≤0.05

-: Not applicable.
 (Fisher)
 (Mann-Whitney)

Table 17-1. -continued Summary of histological findings
(sacrificed, administration period)

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				20				100				500			
No. of animals necropsied	5				5				5				3			
No. of animals examined histologically	5				5				5				3			
Organ	Findings				1 2 3 T				1 2 3 T				1 2 3 T			
URINARY SYSTEM																
kidney	(5)				(0)				(0)				(3)			
basophilic tubule dilatation, tubule mineralization	2	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	2	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	2
REPRODUCTIVE SYSTEM																
uterus	(5)				(1)				(1)				(3)			
dilatation, lumen	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																
adrenal gland	(5)				(5)				(5)				(3)			
angiectasis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
degeneration, vacuolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3*#
necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3*#
accumulation of macrophage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
hypertrophy, cortex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2

1: slight 2: moderate 3: marked T: total
 (): No. of animals examined microscopically at this site.
 Significantly different from control group; *: P≤0.05 (Fisher)
 Significantly different from control group; #: P≤0.05 (Mann-Whitney)

-: Not applicable.

Table 17-2.

Summary of histological findings
(dead, administration period)

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				20				100				500							
No. of animals necropsied	0				0				0				2							
No. of animals examined histologically	0				0				0				2							
Organ	Findings				1 2 3 T				1 2 3 T				1 2 3 T							
CARDIOVASCULAR SYSTEM																				
heart															(2)					
cellular infiltration, mononuclear	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
HEMATOPOIETIC SYSTEM																				
spleen															(2)					
atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	2
thymus															(2)					
atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
RESPIRATORY SYSTEM																				
lung															(2)					
accumulation of foamy cells	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
DIGESTIVE SYSTEM																				
glandular stomach															(2)					
ulcer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
mandibular gland															(2)					
decrease, eosinophilic granule	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	2
ENDOCRINE SYSTEM																				
adrenal gland															(2)					
congestion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
degeneration, vacuolar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1
necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	1
hypertrophy, cortex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1

1: slight 2: moderate 3: marked T: total
(): No. of animals examined microscopically at this site.

-: Not applicable.

Table 17-3.

Summary of histological findings
(sacrificed, recovery period)

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				500				
No. of animals necropsied	5				5				
No. of animals examined histologically	5				5				
Organ	Findings	1	2	3	T	1	2	3	T
CARDIOVASCULAR SYSTEM									
heart		(5)				(5)			
	necrosis	1	0	0	1	0	0	0	0
	cellular infiltration, mononuclear	2	0	0	2	0	0	0	0
	fibrosis	1	0	0	1	0	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM									
spleen		(5)				(5)			
	deposit, pigment	0	0	0	0	5	0	0	5***##
RESPIRATORY SYSTEM									
lung		(5)				(5)			
	accumulation of foamy cells	2	0	0	2	1	0	0	1
	cellular infiltration, mixed	0	0	0	0	1	0	0	1
DIGESTIVE SYSTEM									
glandular stomach		(5)				(5)			
	ectopic tissue	1	0	0	1	0	0	0	0
	epidermal cyst	1	0	0	1	0	0	0	0
jejunum		(5)				(5)			
	mineralization	1	0	0	1	0	0	0	0
colon		(5)				(5)			
	hyperplasia, lymphoid tissue	0	0	0	0	1	0	0	1
liver		(5)				(5)			
	microgranuloma	4	0	0	4	5	0	0	5
URINARY SYSTEM									
kidney		(5)				(5)			
	dilatation, tubule	1	0	0	1	0	0	0	0
	mineralization	3	0	0	3	1	0	0	1
	cellular infiltration, lymphocyte	1	0	0	1	1	0	0	1
REPRODUCTIVE SYSTEM									
epididymis		(5)				(5)			
	decrease, sperm	0	0	0	0	1	0	0	1
prostate		(5)				(5)			
	cellular infiltration, lymphocyte	1	1	0	2	1	0	0	1

1: slight 2: moderate 3: marked T: total
 (): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.
 Significantly different from control group; **: P≤0.01 (Fisher)
 Significantly different from control group; ##: P≤0.01 (Mann-Whitney)

Table 17-3. -continued Summary of histological findings
(sacrificed, recovery period)

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Male

Dose level (mg/kg)	0				500			
No. of animals necropsied	5				5			
No. of animals examined histologically	5				5			
Organ	Findings							
	1	2	3	T	1	2	3	T
REPRODUCTIVE SYSTEM								
seminal vesicle	(5)				(5)			
atrophy	0	0	0	0	1	0	0	1
ENDOCRINE SYSTEM								
adrenal gland	(5)				(5)			
angiectasis	0	0	0	0	1	0	0	1
degeneration, vacuolar	0	0	0	0	3	0	0	3
necrosis	0	0	0	0	0	1	0	1
accumulation of macrophage	0	0	0	0	5	0	0	5***##
hypertrophy, cortex	0	0	0	0	1	0	0	1

1: slight 2: moderate 3: marked T: total
 (): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.
 Significantly different from control group; **: P≤0.01 (Fisher)
 Significantly different from control group; ##: P≤0.01 (Mann-Whitney)

Table 17-3. -continued Summary of histological findings
(sacrificed, recovery period)

Exp. No. 9933 (115-212)

Sex: Female

Dose level (mg/kg)	0				500				
No. of animals necropsied	5				5				
No. of animals examined histologically	5				5				
Organ	Findings	1	2	3	T	1	2	3	T
HEMATOPOIETIC SYSTEM									
spleen		(5)				(5)			
	deposit, pigment	0	0	0	0	4	0	0	4*#
RESPIRATORY SYSTEM									
lung		(5)				(5)			
	accumulation of foamy cells	2	0	0	2	0	0	0	0
	osseous metaplasia	2	0	0	2	0	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM									
liver		(5)				(5)			
	vacuolation in hepatocyte	1	0	0	1	0	0	0	0
	microgranuloma	5	0	0	5	5	0	0	5
	hepatodiaphragmatic nodule	1	0	0	1	0	0	0	0
URINARY SYSTEM									
kidney		(5)				(5)			
	mineralization	2	0	0	2	0	0	0	0
	fibrosis	1	0	0	1	0	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM									
thyroid gland		(5)				(5)			
	ultimobranchial remnant	0	0	0	0	1	0	0	1
adrenal gland		(5)				(5)			
	angiectasis	0	0	0	0	3	2	0	5***##
	degeneration, vacuolar	0	0	0	0	3	0	0	3
	accumulation of macrophage	0	0	0	0	2	0	0	2

1: slight 2: moderate 3: marked T: total
(): No. of animals examined microscopically at this site.
Significantly different from control group; *: P<0.05
Significantly different from control group; #: P<0.05

-: Not applicable.
 **: P<0.01 (Fisher)
 **#: P<0.01 (Mann-Whitney)