
2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)の
ラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験

最 終 報 告 書

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目次

	頁
要約	11
緒言	13
方法	
1.被験物質および媒体	13
2.投与検体および濃度確認	13
3.使用動物および飼育条件	14
4.投与経路，投与方法，群構成，投与量および投与期間	15
5.観察および検査項目	17
6.統計学的方法	20
結果	
I . 反復投与毒性	21
1 . 雄(P)に及ぼす影響	21
2 . 雌(P)に及ぼす影響	23
II . 生殖発生毒性	24
1 . 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響	24
2 . 新生児(F ₁)に及ぼす影響	25
考察	26
文献	28

Table 1-1	General signs of male rats (P) in preliminary reproduction	
~1-2	toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 32~33
Table 2	Body weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 34
Table 3	Food consumption of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 35
Table 4	Necropsy finding of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 36
Table 5	Organ weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 37
Table 6	Obsrvation of sperm in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 38
Table 7	Histopathological finding of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis (4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 39
Table 8	General signs of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 40
Table 9	General signs of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 41

Table 10	General signs of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 42
Table 11	Body weight of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 43
Table 12	Body weight of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 44
Table 13	Body weight of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 45
Table 14	Food consumption of female rats (P) during pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 46
Table 15	Food consumption of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 47
Table 16	Food consumption of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 48
Table 17	Necropsy finding of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 49
Table 18	Organ weight of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 50

Table 19	Histopathological finding of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 51
Table 20	Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 52
Table 21	Observation of pups (F1) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 53
Table 22	Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 54
Table 23	Necropsy finding of pups (F1) on day 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 55
Fig. 1	Chemical structure of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)	 56
Fig. 2	Body weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 57
Fig. 3	Food consumption of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 58
Fig. 4	Body weight of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 59
Fig. 5	Body weight of dams (P) during pregnancy and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration	 60

- Fig. 6 Food consumption of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration 61
- Fig. 7 Food consumption of dams (P) during pregnancy and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration 62
- Fig. 8 Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration 63

要約

2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)のラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験を行い、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与量は、800 mg/kgを最高用量とし、以下 200, 50 および 12.5 mg/kgとした。対照として媒体(5 %アラビアゴム水溶液)投与群を設けた。

I. 反復投与毒性

1. 雄(P)に及ぼす影響

一般状態：いずれの群とも死亡および瀕死例は認められなかった。なお、200 mg/kg以上の群で流涎が認められたが、毒性症状とはみなさなかった。

体重：投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

摂餌量：800 mg/kg群で一過性の低値がみられた。

剖検：200 mg/kg群で精巣および精巣上体の萎縮がみられた。800 mg/kg群で精巣、精巣上体および精囊の萎縮がみられた。

器官重量：200 mg/kg以上の群で精巣および精巣上体の絶対ならびに相対重量の低値がみられた。

精子検査：50 および 200 mg/kg群で活動精子率、生存精子率、生き残り精子率、精子数および精巣上体尾部 1 g当たりの精子数の低値、奇形精子率の増加がみられた。800 mg/kg群では、活動精子は認められず、奇形精子の増加傾向、精子数および精巣上体尾部 1 g当たりの精子数の低値がみられた。

病理組織学検査：50 mg/kg群で精巣に巨細胞形成が 2/12 例にみられた。200 mg/kg群で精巣に精細管の萎縮が 6/12 例、精細管の変性が 1/12 例、精子減少が 1/12 例と巨細胞形成が 2/12 例に、精巣上体に精子減少が 9/12 例にみられた。800 mg/kg群で精巣に精細管の萎縮および精巣上体に精子減少が各 12/12 例にみられた。

2. 雌(P)に及ぼす影響

一般状態：いずれの群とも死亡および瀕死例は認められなかった。なお、200 mg/kg以上の群で流涎が認められたが、毒性症状とはみなさなかった。

体重：200 mg/kg群では、哺育期に増加抑制がみられた。800 mg/kg群では、妊娠期および哺育期に増加抑制がみられた。

摂餌量：200 および 800 mg/kg群では、交配前、妊娠期および哺育期に低値がみられた。

剖検所見：投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

器官重量：投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

病理組織学検査：投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

精子検査：前述したように、50 mg/kg以上の群で精子に影響がみられた。

病理組織学検査：前述したように、50 mg/kg以上の群で精巣に変化がみられた。

発情回数，交尾率，交尾所要日数：各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。

受胎雌数，妊娠期間，分娩状態，哺育状態：投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

受胎率：各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。

黄体数，着床痕数，着床率：200 mg/kg群で黄体数および着床痕数の低値傾向がみられた。800 mg/kg群で黄体数および着床痕数の低値がみられた。

出産率：800 mg/kg群で新生児を分娩できなかった雌が 1/12 例，哺育期に新生児が全例死亡した母動物が 1/11 例認められた。

2. 新生児(F₁)に及ぼす影響

総出産児数，分娩率，哺育 0 日の新生児数，児の産出率，性比：200 mg/kg群では，哺育 0 日の新生児数および総出産児数の低値がみられた。800 mg/kg群では，哺育 0 日の新生児数および総出産児数の低値あるいは低値傾向がみられた。

死産児数，出生率：800 mg/kg群では，死産児数の高値傾向，出生率の低値傾向がみられた。

一般状態：各投与群とも投与による異常症状はみられなかった。

哺育 4 日の新生児数，生存率，性比：200 mg/kg群では，哺育 4 日の新生児数の低値がみられた。800 mg/kg群では，哺育 4 日の新生児数の低値傾向がみられた。

外表観察：投与に関連した変化はみられなかった。

体重：200 mg/kg群では，哺育 4 日に腹合計の体重の低値がみられた。800 mg/kg群では，哺育 4 日に雌雄別平均，腹平均および腹合計の体重の低値あるいは低値傾向がみられた。

剖検所見：投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

以上のように，2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)の一般毒性学的無影響量は，雄では 50 mg/kg投与により精子検査成績および精巣の病理組織学検査成績に影響が認められたことから 12.5 mg/kg/day，雌では 200 mg/kg投与により体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められたことから 50 mg/kg/dayと考えられる。また，生殖発生毒性学的な無影響量は，雄では 50 mg/kg投与により精子検査成績および精巣の病理組織学検査成績に影響が認められたことから 12.5 mg/kg/day，雌では 200 mg/kg投与により黄体数および着床痕数の低値傾向が認められたことから 50 mg/kg/day，児動物では 200 mg/kg投与により哺育 0 日および 4 日の新生児数の低値が認められたことから 50 mg/kg/dayと考えられる。

緒言

2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)が経口的に継続して人に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Preliminary Reproduction Toxicity Screening Testに従って、2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)を雄ラットに 1 日 1 回、50～52 日間および雌ラットに 1 日 1 回、40～48 日間経口投与した簡易生殖毒性試験を行い、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。

方法

1. 被験物質および媒体

被験物質の2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)(CAS No.119-47-1)は、Fig.1に示す化学構造を有し、分子量：340.49、融点：134 °Cであり、常温において白色粉末である。当試験には、1997 年 10 月 31 日に

から提供されたものを用いた(製造元：

Lot No.

純度：98.2 %，ただし、水0.2 wt%，4-メチル-2-tert-ブチルフェノール 0.1 wt%を含む)。入手後は少量ずつ分割し、試験施設の被験物質保管室の室温・遮光・防湿条件下の保管庫に保管した。なお、投与期間終了後に当試験施設での保管分を除いた残余被験物質は返却した。

媒体として、5 %アラビアゴム水溶液を用いた。

2. 投与検体および濃度確認

5 %アラビアゴム水溶液は、アラビアゴム末[小堺製薬株式会社，Lot No.BH-23(入手日：1997 年 12 月 3 日，使用期限：2002 年 12 月 2 日)，室温保管]を注射用水[局方，株式会社大塚製薬工場，Lot No.7E81(入手日：1997 年 7 月 24 日，使用期限：2002 年 5 月)，室温保管]に溶解させて調製した。5 %アラビアゴム水溶液は、冷蔵保管し、調製後 10 日以内に使用した。

2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)は、各濃度ごとに 5 %アラビアゴム水溶液で懸濁して調製した。被験物質は純度換算を行い、投与量は原体重量で表示した。対照群には 5 %アラビアゴム水溶液を投与した。なお、1, 10 および 100 mg/mLの調製液は、調製後冷蔵・遮光条件下で 7 日間、さらに室温・遮光条件下で 4 時間保存し

でも安定性に問題のないことが確認されていたため¹⁾(Attached table 1), 各濃度の調製液は調製後, 1 日分ごとに小分けし, 冷蔵・遮光条件下で保管し, 調製後 7 日以内に使用した。投与後の残余投与検体は廃棄した。

投与開始日および雄の投与期間終了日に使用した各濃度の投与検体中の被験物質濃度を試験施設内で高速液体クロマトグラフを用いて測定した。その結果, 被験物質濃度は表示濃度の 98.1~103.8 %であり, 設定した適正濃度範囲内(表示濃度の $\pm 10\%$ 以内)を示し, 濃度に問題はなかった(Attached table 2および 3)。

3. 使用動物および飼育条件

1) 動物種および系統

試験には, 毒性試験に汎用されているSprague-Dawley系雌雄ラット [(SPF), Crj: CD (SD)IGS] を用いた。動物は, 1998 年 1 月 14 日に日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター)から 8 週齢で雌雄各 73 匹を購入した。入手後 1 日の体重範囲は, 雄が 254~287 g, 雌が 179~213 gであった。

2) 検疫および馴化, 群分け法ならびに個体識別法

入手した動物は, 5 日間の検疫期間およびその後 7 日間の馴化期間を設けた。この間に, 3 回の体重測定および毎日一般状態の観察を, さらに雌は馴化期間中に 7 日間の性周期観察を行った。一般状態および体重推移に異常がみられず, また性周期観察で異常が認められなかった動物を群分けして試験に用いた。

群分けは, コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に, 無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与開始日に行った。群分け後の残余動物のうち, 検疫・馴化動物番号の若い順に雄 2 例を選び, 飼育期間終了時に微生物モニタリング検査に用いた。その他の残余雄および残余雌は, 投与開始日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に廃棄処分した。

動物は, 検疫・馴化期間中は入手日に油性インクによる記入法および色素による染毛法により, 群分け後は色素による染毛法および耳パンチ法を併用して識別した。さらに, 検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号, 入手年月日, 性別および検疫・馴化動物番号を記入したラベルを, 群分け後の各ケージには試験番号, 投与量, 性別および動物番号を記入し, 群ごとに色分けしたラベルを取り付けた。

3) 環境条件および飼育管理

動物は, 室温 20~26 °C(実測値: 20~22 °C), 湿度 40~70 %(実測値: 47~64 %), 明暗各 12 時間(照明: 午前 6 時~午後 6 時, ただし, 1998 年 1 月 25 日の午前 10 時 30 分~11 時 20 分の間消灯), 換気回数 12 回/時(フィルターにより除菌した新鮮空気)に維持されている飼育室(E棟 9 号室)で飼育した。

検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージ(W: 240 × D: 380 × H: 200 mm)を用いて 1 ケージ当たり 5 匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージ(W: 755 × D: 210 × H: 170 mm)を用いて個別飼育した。ただし、交配はステンレス製懸垂式ケージ内で行った。母動物は、妊娠 18 日にオートクレーブ処理した床敷(サンフレーク, 日本チャールス・リバー株式会社)を入れたプラスチック製ケージ(W: 310 × D: 360 × H: 175 mm)に個別に移し、自然分娩および哺育をさせた。ケージの受け皿, 給水瓶およびプラスチック製ケージの交換は 1 週間に 2 回以上, ステンレス製五連ケージおよび給餌器の交換は 2 週間に 1 回以上行った。なお、動物飼育室の清掃(床の掃き掃除)および 0.02 % 次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った。飼育期間終了時に採血したモニタリング動物の血清検査において、感染を示唆するような異常はみられなかった。

床敷の微量金属および汚染物質の分析結果は、ほぼ半年ごとに財団法人日本食品分析センターで実施した成績を日本チャールス・リバー株式会社から入手した。その結果、分析成績は当試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

4) 飼料および飲料水

飼料は、入手後 3 カ月以内の固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌器に入れ、自由に摂取させた。使用した飼料の分析結果は、財団法人日本食品分析センターおよびオリエンタル酵母工業株式会社から入手した。

飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。飲料水の水質検査結果は、ほぼ 6 カ月ごとに財団法人岐阜県公衆衛生検査センターで実施した成績を入手した。

飼料および飲料水の検査結果は、いずれも試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

4. 投与経路, 投与方法, 群構成, 投与量および投与期間

1) 投与経路および投与方法

2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)は、継続して経口的に人に摂取される可能性が考えられるため、投与経路として経口投与を選択した。

投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスプレイ注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、雄では投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を基準とし、10 mL/kgで算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を、妊娠期間中は妊娠 0, 7, 14 および 21 日の体重を、授乳期間中は哺育 0 日の体重を基準とし、10 mL/kgで算出した。投与時刻は午前 8 時 43 分～11 時 59 分の間で、投与回数は 1 日 1 回とした。

投与開始日の週齢は雌雄とも 10 週齢であり、体重範囲は雄が 332～383 g, 雌が 206～238 gであった。

2) 群構成および投与量

群構成は、以下に示したように被験物質投与群として 4 群を設定し、その他に対照群を設けた。1 群の動物数は、雌雄それぞれ 12 匹とした。

群	試験群	投与量	(濃度)	雄(動物番号)	雌(動物番号)
第1群	対照 (5 %アラビアゴム水溶液)	0	mg/kg (0 mg/mL)	12(001~012)	12(051~062)
第2群	2,2'-メチレンビス (6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)	12.5	mg/kg (1.25 mg/mL)	12(101~112)	12(151~162)
第3群	2,2'-メチレンビス (6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)	50	mg/kg (5 mg/mL)	12(201~212)	12(251~262)
第4群	2,2'-メチレンビス (6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)	200	mg/kg (20 mg/mL)	12(301~312)	12(351~362)
第5群	2,2'-メチレンビス (6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)	800	mg/kg (80 mg/mL)	12(401~412)	12(451~462)

投与量は、株式会社パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所で実施されたラットにおける 28 日間反復投与毒性試験²⁾(投与段階: 0, 50, 200 および 800 mg/kg)の結果により決定した。すなわち、800 mg/kg群でも一般状態、体重、摂餌量、尿検査および血液生化学検査成績に影響はみられなかったが、50 mg/kg以上の群で肝臓重量の増加またはその傾向が、200 mg/kg以上の群で精巣のセルトリ細胞の空胞化および精子分化の障害が認められた。そこで、当試験の投与量は、一般状態、体重および摂餌量に影響の認められないと考えられる 800 mg/kgを最高用量とし、以下公比 4 で除して 200, 50 および 12.5 mg/kgとした。また、対照として媒体(5 %アラビアゴム水溶液)のみを投与する群を設けた。

3) 投与期間

投与期間は、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Preliminary Reproduction Toxicity Screening Testに従って、雄では交配前 14 日間とその後 36~38 日間(精子検査に 3 日間必要なため、雄の剖検を 3 日間に分けて実施)の合計 50~52 日間とし、雌では交配前 14 日間、交配期間中(最長 8 日間)、妊娠期間中および哺育 4 日の剖検前日までの合計 40~48 日間とした。なお、投与開始日を投与 1 日とした。

5. 観察および検査項目

1) 雄(P)

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与期間中には投与前・後の 1 日 2 回(ただし、剖検日は剖検前 1 回)観察した。

(2) 体重測定

体重は、1週間に 2 回測定した(測定日: 投与 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46, 49日および剖検日)。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前 14 日間および交配期間終了後から 1 週間に 2 回測定した(残量測定日: 投与 3, 6, 10, 13, 27, 31, 34, 38, 41, 45 および 48 日)。

(4) 剖検

最終投与の翌日(投与 51~53 日)に 1 日当たり各群の各 4 例(動物番号の若い順)をエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、精巣、精巣上体および精巣上体の尾部重量を測定した。なお、各器官重量(精巣上体の尾部を除く)を最終体重で除して相対重量も算出した。精巣および精巣上体の頭部は、ブアン液に固定後、90 %アルコールにて保存した。前立腺および精嚢は、20 %中性緩衝ホルマリンに固定し、保存した。

(5) 精子検査

右精巣上体の尾部は、37 °C に加温した精子培養液(0.5 %牛血清アルブミン加Medium 199)中で分割し、約 5 分間静置後、精子原液とした。この精子原液を用いて精子の活動性、精子の生存性および精子の形態の検査を実施した。なお、各検査終了後、精子原液は廃棄した。

精子の活動性は、精子原液を精子培養液で希釈し、約 30 分間培養(使用炭酸ガス培養器: BNA-120D, タバイエスベック株式会社, 培養条件: 37 °C, 5 %炭酸ガス, 95 %空気)後に精子希釈液をサンプルチャンバー(MICROSLIDES #HTR1099, VitroCom, Inc.)に入れ、HTM-IVOS(Hamilton Thorne Research)を用いて、活動精子率[Motility ratio], 活動精子について基準点移動速度[Path velocity($\mu\text{m/s}$)], 最短距離移動速度[Straight line velocity($\mu\text{m/s}$)], 総移動速度[Curvilinear velocity($\mu\text{m/s}$)]および頭部の横切り回数[Beat cross frequency(Hz)]を算出した。ただし、一部(12 例)の動物では希釈後の精子の状態が不良であったため、再調製した精子希釈液を用いて検査した。その場合には、精子原液が炭酸ガス培養器で約 30 分間培養されているため、希釈液は調製後速やかに検査に用いた。

精子の生存性として、加藤らの方法³⁾に従い、マイクロウェルプレート内で精子原液を精子培養液にて約 3 倍希釈した後、16 μM のCalcein acetoxymethyl esterと 8 μM のEthidium homodimer-1 とで約 2 時間培養・染色(炭酸ガス培養器: BNA-120D, タバイエスベック株式会社, 培養条件: 37 °C, 5 %炭酸ガス, 95 %空気)した後、蛍光顕微鏡(励起波長: 490 nm)下で 300 個の精子を生存精子、途中死亡精子と死滅精子に分類し、生存精子率

(Viability)と生き残り精子率(Survivability)を求めた。なお、生存、途中死亡および死滅精子の判定は、頭部～尾部にかけて緑色の蛍光発色が認められるものを生存精子、頭部には赤色の蛍光発色が、尾部には緑色の蛍光発色が認められるものを途中死亡精子、頭部には赤色の蛍光発色が認められるが、尾部には蛍光発色が認められないものを死滅精子とした。

精子の形態は、精子原液と 10 %エオジン染色液をスライド上で等量混和した後、直ちにカバーガラスを用いて塗抹標本を作製して風乾し、顕微鏡下で 300 個の精子について観察した。奇形精子率は、精子 300 個当たりの奇形精子の割合を求めることにより算出した。

精子数は、左精巣上体尾部をホモジナイズ(IKA, ULTRA-TURRAX T25basic)し、精子懸濁液をサンプルチャンバー(CELL-VU, Fertility Technologies, Inc.)に入れ、HTM-IVOS (Hamilton Thorne Research)を用いて算出した。なお、左精巣上体尾部 1 g 当たりの精子数も算出した。

(6) 病理組織学検査

精巣および精巣上体は、常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。

対照群および最高用量(800 mg/kg)群の精巣および精巣上体の頭部、ならびに剖検時に異常の認められた精嚢(800 mg/kg群の 6 例)についてH-E染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。800 mg/kg群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた精巣および精巣上体の頭部については、12.5, 50 および 200 mg/kg群も同様に検査した。なお、精巣については、PASおよびH-Eの重染色組織標本も作製したが、これらの標本について検鏡の必要を認めなかったため、検査に供しなかった。

2) 雌(P)

(1) 一般状態および死亡の有無

一般状態および死亡の有無は、投与期間中には投与前・後の 1 日 2 回(ただし、剖検日は剖検前 1 回)観察した。

(2) 性周期

性周期は、投与開始日から交尾確認日まで毎日 1 回観察した。なお、発情期が連続 2 日間にわたって観察された場合は 1 回と計数した。

(3) 体重測定

体重は、交配開始前 14 日間および交配期間中には 1 週間に 2 回(測定日: 投与 1, 4, 8, 11, 15, 18 および 22 日)、妊娠期間中には妊娠 0, 7, 14 および 21 日に、哺育期間中には哺育 0 および 4 日にそれぞれ測定した。

(4) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前 14 日間までは 1 週間に 2 回測定した(残量測定日: 投与 3, 6, 10 および 13 日)。また、妊娠期間中は妊娠 2, 9, 16 および 21 日に、哺育期間中は哺育 4 日に測定した。

(5) 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ、分娩状態の異常の有無、分娩終了の確認を妊娠 21 日から妊娠

25 日の午前 10 時まで毎日行った。午前 10 時に分娩が終了していた場合、その日を哺育 0 日とした。

(6) 妊娠 25 日の午前 10 時までに分娩しなかった動物

妊娠 25 日の午前 10 時までに分娩しなかった雌は、エーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床の有無により妊娠の成否を確認した。着床のみられない雌は、子宮を 2 % KOH 溶液により透明化させて着床痕の有無を調べた。不妊雌は、卵巢の重量を測定し、卵巢、子宮および腔を 20 % 中性緩衝ホルマリンに固定し、保存した。妊娠雌は、着床痕数および黄体数を数え、卵巢重量を測定し、卵巢、子宮、腔、胎児および胎盤を 20 % 中性緩衝ホルマリンに固定し、保存した。不妊雌は、子宮を 2 % KOH 溶液により透明化させて着床痕の有無を調べた。また、不妊雌は、卵巢の重量を測定し、卵巢、子宮および腔を 20 % 中性緩衝ホルマリンに固定し、保存した。なお、卵巢重量を最終体重で除して相対重量も算出した。

(7) 哺育状態の観察および剖検

母動物は、哺育状態を哺育 4 日まで毎日観察し、新生児が全例死亡した日あるいは哺育 4 日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床痕数および黄体数を数えた。卵巢は重量を測定し、卵巢、子宮、腔および異常の認められた器官・組織を 20 % 中性緩衝ホルマリンに固定し、保存した。なお、卵巢重量を最終体重で除して相対重量も算出した。

(8) 病理組織学検査

卵巢および異常の認められた器官(対照群:No.061の腎臓)は、常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。

対照群および最高用量(800 mg/kg)群の卵巢ならびに上記の腎臓についてH-E染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。

3) 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

14 日間投与した雌雄を同一群内で 1 対 1 に組み合わせて同居交配した。交配期間は 14 日を限度として、交尾を確認するまでの連続同居交配とした。

交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い、腔垢内に精子または腔栓を確認した雌を交尾成立動物として、その日を妊娠 0 日として起算した。

4) 新生児(F₁)

(1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。死産児は、20 % 中性緩衝ホルマリンに固定し、保存した。

(2) 新生児の観察

新生児は、一般状態および死亡の有無を生存期間中毎日 1 回観察した。死亡児は、剖検後 20 % 中性緩衝ホルマリンに固定し、保存した。

(3) 体重

体重は、哺育 0 日(出生日)および 4 日に測定した。

(4) 剖検

生存児は、哺育 4 日の観察終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

6. 統計学的方法

有意差検定は以下に示したように、対照群と 2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)の各投与群の間で行い、危険率を 5 %未満($p<0.05$)とし、5 %未満($p<0.05$)と 1 %未満($p<0.01$)とに分けて表示した。新生児の体重は一腹の平均値と腹重量を検定した。なお、不受胎雌の交尾後の一般状態、体重および摂餌量は集計から除外した。
(検定方法)

体重(親動物、新生児)、摂餌量、発情回数、交尾所要日数、妊娠期間[分娩日(哺育 0 日)-交尾確認日]、着床痕数、総出産児数(新生児数+死産児数)、新生児数、死産児数、分娩率[(総出産児数/着床痕数) $\times$ 100]、児の産出率[(哺育 0 日の新生児数/着床痕数) $\times$ 100]、黄体数、着床率[(着床痕数/黄体数) $\times$ 100]、出生率[(哺育 0 日の新生児数/総出産児数) $\times$ 100]、哺育 4 日の生存児数、哺育 4 日の生存率[(哺育 4 日の生存児数/哺育 0 日の新生児数) $\times$ 100]、外表異常出現率[(外表異常児数/新生児数) $\times$ 100]、性比(雄/雌)、器官の絶対重量および相対重量、精子の活動性、奇形精子率[(奇形精子数/観察精子数) $\times$ 100]、生存精子率[(生存精子数+途中死亡精子数/観察精子数) $\times$ 100]、生き残り精子率[(生存精子数/観察精子数) $\times$ 100]、精子数、左精巣上体尾部 1 g 当たりの精子数[精子数/左精巣上体尾部重量(g)]、新生児の剖検所見は、各群で平均値および標準偏差を算出した。その後、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならばDunnett法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い、有意ならば順位を利用したDunnett型の検定法により行った。

交尾率[(交尾成立動物数/同居動物数) $\times$ 100]、受胎率[(受胎雌数/交尾成立動物数) $\times$ 100]および出産率[(新生児出産雌数/受胎雌数) $\times$ 100]は、 χ^2 検定により行った。

なお、病理組織学検査において、最高用量群で毒性学的影響が示唆され他の用量群についても検査を実施した器官・組織の所見については、対照群との群間比較を上記の順位を利用したDunnett型の検定法を用いて行った。そこで対照群との間に有意差が認められた場合は、Cochran・Armitageの傾向検定を用いて用量反応性の検定を行った。

結果

I. 反復投与毒性

1. 雄(P)に及ぼす影響

1) 一般状態(Table 1-1 および 1-2, Appendix 1-1~1-5)

死亡および瀕死例は、いずれの群でも認められなかった。

一般状態観察において、200 mg/kg群では、流涎が投与 13 日以降に 8 例にみられた。800 mg/kg群では、流涎が投与 9 日以降に 11 例にみられた。なお、流涎は、200 および 800 mg/kg群とも、投与直後から約 40 分の間にみられたが、投与を継続すると流涎の持続時間は短くなった。その他には、対照群を含む各群で軟便が散見されたが、投与量との関連は認められなかった。

2) 体重(Table 2, Fig.2, Appendix 2-1~2-5)

各投与群とも、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

3) 摂餌量(Table 3, Fig.3, Appendix 3-1~3-5)

12.5, 50 および 200 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。800 mg/kg群では、対照群と比べて投与 3 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

4) 剖検(Table 4, Appendix 4-1~4-5)

対照群、12.5 および 50 mg/kg群ではいずれにも異常はみられなかった。200 mg/kg群では、両側精巣の萎縮および両側精巣上体の萎縮が各 4 例にみられた。800 mg/kg群では、両側精巣の萎縮および両側精巣上体の萎縮がいずれも 12 例全例に、精囊の萎縮が 6 例にみられた。

5) 器官重量(Table 5, Appendix 5-1~5-5)

各投与群とも、対照群と比べて剖検日の体重に有意差はみられなかった。

12.5 および 50 mg/kg群では、対照群と比べていずれの器官の絶対および相対重量にも有意差はみられなかった。200 および 800 mg/kg群では、対照群と比べて精巣および精巣上体の絶対ならびに相対重量の有意な低値がみられた。

6) 精子検査(Table 6, Appendix 6-1~6-5)

12.5 mg/kg群では、対照群と比べて活動精子率、基準点移動速度、最短距離移動速度、頭部の横切り回数、奇形精子率、生存精子率、生き残り精子率、精子数、精巣上体尾部 1

g当たりの精子数に有意差はみられなかった。なお、12.5 mg/kg群では、対照群と比べて総移動速度の有意な高値がみられたが、投与量に関連した変化ではないこと、精子の活動性に関する他の項目(活動精子率、基準点移動速度、最短距離移動速度および頭部の横切り回数)に変化は認められないことから、投与によるものではないと判断された。

50 mg/kg群では、対照群と比べて活動精子率、生存精子率、生き残り精子率、精子数および精巣上体尾部 1 g当たりの精子数の有意な低値、奇形精子率の有意な高値がみられた。なお、50 mg/kg群では、対照群と比べて頭部の横切り回数の有意な高値がみられたが、投与量に関連した変化ではないことから、投与によるものではないと判断された。

200 mg/kg群では、対照群と比べて活動精子率、生存精子率、生き残り精子率、精子数および精巣上体尾部 1 g当たりの精子数の有意な低値がみられた。また、200 mg/kg群では、6 例の活動精子率は 0 %であったが、対照群と比べて算出できた動物の基準点移動速度、最短距離移動速度および総移動速度に有意差はみられなかった。なお、200 mg/kg群では、対照群と比べて頭部の横切り回数の有意な低値がみられたが、ごく軽度な差であった。また、同群では、精子の形態観察が可能であった 7 例で対照群と比べて奇形精子率の有意な高値がみられた。

800 mg/kg群では、対照群と比べて精子数および精巣上体尾部 1 g当たりの精子数の有意な低値がみられた。800 mg/kg群では、いずれの動物とも活動精子率は 0 %であり、対照群と比べて有意差が認められ、基準点移動速度、最短距離移動速度、総移動速度および頭部の横切り回数の測定はできなかった。また、800 mg/kg群では、精子の形態観察が可能な動物は 1 例のみであったが、その大部分は奇形精子であった。なお、同群では、観察可能な精子が得られなかったため、生存精子率および生き残り精子率の算出ができなかった。

7) 病理組織学検査(Table 7, Appendix 7-1~7-5)

精巣(Photo 1~4): 精細管の萎縮が 200 mg/kg群で 6 例に、800 mg/kg群で 12 例全例にみられ、それらの程度は 200 mg/kg群でごく軽度~高度、800 mg/kg群で軽度~高度であった。精細管の変性が 200 mg/kg群で 1 例にみられ、その程度はごく軽度であった。精子の減少が 200 mg/kg群で 1 例にみられ、その程度はごく軽度であった。巨細胞の出現が 50 mg/kg群で 2 例に、200 mg/kg群で 2 例にみられ、それらの程度はいずれもごく軽度であった。

精巣上体(Photo 5 および 6): 精子の減少が 200 mg/kg群で 9 例に、800 mg/kg群で 12 例全例にみられ、それらの程度は 200 mg/kg群でごく軽度~高度、800 mg/kg群で高度であった。

なお、精巣における精細管の萎縮および精巣上体における精子の減少は、200 および 800 mg/kg群で対照群と比べて有意差が認められ、用量相関性も確認された。

剖検時に萎縮の認められた精囊(800 mg/kg群の 6 例)では、異常はみられなかった。

2. 雌(P)に及ぼす影響

1) 一般状態(Table 8~10, Appendix 8-1~8-5, 9-1~9-5 および 10-1~10-5)

死亡および瀕死例は、いずれの群でも認められなかった。

一般状態観察において、200 mg/kg群では、流涎が投与 13~18 日に 3 例に、妊娠 0~21 日に 9 例に、哺育 0~3 日に 3 例にみられた。800 mg/kg群では、流涎が投与 12~15 日に 5 例に、妊娠 0~24日に 9 例に、哺育 0~3 日に 2 例にみられた。なお、流涎は、200 および 800 mg/kg群とも、投与直後から約 40 分の間にみられた。その他には、対照群を含む各群で軟便が散見されたが、投与量との関連は認められなかった。

2) 体重(Table 11~13, Fig.4 および 5, Appendix 11-1~11-5, 12-1~12-5, 13-1~13-5)

交配開始前において、各投与群とも、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

妊娠期間中において、12.5, 50 および 200 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。800 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠 0~21 日に体重の有意な低値がみられた。

哺育期間中において、12.5 および 50 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。200 および 800 mg/kg群では、対照群と比べて哺育 4 日に体重の有意な低値がみられた。

3) 摂餌量(Table 14~16, Fig.6 および 7, Appendix 14-1~14-5, 15-1~15-5, 16-1~16-5)

交配開始前において、12.5 および 50 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。200 mg/kg群では、対照群と比べて投与 3 および 6 日に摂餌量の有意な低値がみられた。800 mg/kg群では、対照群と比べて投与 3 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

妊娠期間中において、12.5 および 50 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。200 および 800 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠 2 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

哺育期間中において、12.5 および 50 mg/kg群では、対照群と比べて摂餌量に有意差はみられなかった。200 および 800 mg/kg群では、対照群と比べて哺育 4 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

4) 剖検(Table 17, Appendix 17-1~17-5)

対照群では、腎盂拡張が 1 例(No.061)にみられた。各投与群とも、いずれにも異常はみられなかった。

5) 器官重量 (Table 18, Appendix 18-1~18-5)

剖検日の体重において、12.5 および 50 mg/kg群では対照群と比べて有意差はみられなかった。200 および 800 mg/kg群では、対照群と比べて剖検日の体重の有意な低値がみられた。

各投与群とも、対照群と比べて卵巢の絶対および相対重量に有意差はみられなかった。

6) 雌の病理組織学検査 (Table 19, Appendix 19-1~19-2)

卵巢において、対照群および 800 mg/kg群では異常はみられなかった。

剖検時に腎盂拡張の認められた腎臓 (対照群の 1 例: No.061) では、異常はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

1) 発情回数 (Table 20, Appendix 20-1~20-5)

交配前の投与期間 (14 日間) の発情回数は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

2) 交尾所要日数、交尾率、受胎雌数および受胎率 (Table 20, Appendix 20-1~20-5)

交配に用いた全例で交尾が確認されたため、各群の交尾率はいずれも 100 %であった。交尾所要日数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

不受胎雌は、200 mg/kg群で 1 例みられたため、各群の受胎雌数は 11~12 例となった。しかし、受胎率には各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。

3) 妊娠期間および分娩状態 (Table 21, Appendix 21-1~21-5)

妊娠期間は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。対照群、12.5, 50 および 200 mg/kg群では、いずれの母動物の分娩状態にも異常はみられなかった。

800 mg/kg群の 1 例 (No.456) は、妊娠 25 日までに出産できなかった (剖検で子宮内に胎児 1 例と胎盤 1 個を確認)。また、他の 1 例 (No.459) は、出産児が全例死亡 (9 例の死亡児を確認) したため、生児は得られなかった。

4) 黄体数、着床痕数および着床率 (Table 21, Appendix 21-1~21-5)

12.5 および 50 mg/kg群では、対照群と比べて黄体数、着床痕数および着床率に有意差はみられなかった。200 mg/kg群では、対照群と比べて有意差は認められないものの、黄体数および着床痕数の低値傾向がみられた。800 mg/kg群では、対照群と比べて黄体数および着床痕数の有意な低値がみられた。

5) 出産率および哺育状態 (Table 21, Appendix 21-1~21-5)

対照群, 12.5, 50 および 200 mg/kg群では出産率は 100 %であった。800 mg/kg群では, 2 母動物 (No.456 および 459) で新生児が得られなかったため出産率は 83.3 %であった。対照群および各投与群とも, 哺育状態に異常はみられなかった。

2. 新生児 (F₁) に及ぼす影響

1) 総出産児数および分娩率 (Table 21, Appendix 21-1~21-5)

12.5 および 50 mg/kg群では, 対照群と比べて総出産児数および分娩率に有意差はみられなかった。200 および 800 mg/kg群では, 対照群と比べて総出産児数の有意な低値がみられた。なお, 200 mg/kg群では, 対照群と比べて分娩率の有意な低値がみられたが, 800 mg/kg群では有意差が認められないことから, 投与によるものではないと判断される。

2) 出生率, 児の産出率および性比 (Table 21, Appendix 21-1~21-5)

12.5 および 50 mg/kg群では, 対照群と比べて児の産出率, 哺育 0 日の新生児数, 死産児数, 出生率および性比に有意差はみられなかった。200 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育 0 日の新生児数の有意な低値がみられた。800 mg/kg群では, 対照群と比べて有意差は認められないものの, 哺育 0 日の新生児数および出生率の低値傾向, 死産児数の高値傾向がみられた。

3) 新生児の一般状態, 哺育 4 日の生存児数, 哺育 4 日の生存率および外表異常の観察 (Table 21, Appendix 21-1~21-5)

12.5 および 50 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育 4 日の生存児数, 哺育 4 日の生存率および性比に有意差はみられなかった。200 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育 4 日の生存児数の有意な低値がみられた。800 mg/kg群では, 対照群と比べて有意差は認められないものの, 哺育 4 日の生存児数の低値傾向がみられた。

新生児の外表観察では, 各群とも生存児に異常はみられなかった。

新生児の一般状態では, 各群とも異常はみられなかった。

4) 新生児の体重 (Table 22, Fig.8, Appendix 22-1~22-5)

12.5 および 50 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育 0 日および 4 日の雌雄別平均, 腹平均および腹合計の体重に有意差はみられなかった。200 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育 4 日の腹合計の体重の有意な低値がみられた。なお, 200 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育 0 日の雌雄別平均および腹平均の体重の有意な高値がみられたが, 800 mg/kg群では有意差が認められないことから, 投与によるものではないと判断される。800 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育 4 日の雄平均および腹合計の体重の有意な低値, 有意差は認められないものの, 哺育 4 日の雌平均および腹平均の体重の低値傾向がみられた。

5) 生存児の剖検 (Table 23, Appendix 23-1~23-5)

各群とも、いずれにも異常はみられなかった。

6) 死亡児および母動物が死亡した新生児の剖検

各群とも、いずれにも異常はみられなかった。

考察

2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)のラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験を行い、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与量は、800 mg/kgを最高用量とし、以下 200, 50 および 12.5 mg/kgとした。対照として媒体(5 %アラビアゴム水溶液)投与群を設けた。

雄(P)に関しては、死亡および瀕死例はいずれの群にも認められなかった。200 mg/kg以上の群で投与直後に一過性の流涎がみられたが、一般状態観察において痙攣などの神経症状は認められないことから、被験物質の刺激性に基づく変化と判断され、毒性症状とはみなさなかった。摂餌量において、800 mg/kg群で投与 3 日に一過性の低値がみられたが、体重推移に異常は認められない軽微な変化と考えられる。剖検において、200 mg/kg群で精巣および精巣上体の萎縮が、800 mg/kg群で精巣、精巣上体および精囊の萎縮がみられた。また、器官重量では、200 mg/kg以上の群で精巣および精巣上体の絶対ならびに相対重量の低値がみられた。精子検査において 50 および 200 mg/kg群で活動精子率、生存精子率、生き残り精子率、精子数および精巣上体尾部 1 g当たりの精子数の低値、奇形精子率の増加がみられた。800 mg/kg群では、活動精子は認められず、奇形精子の増加傾向、精子数および精巣上体尾部 1 g当たりの精子数の低値がみられた。また、病理組織学検査において 50 mg/kg群で精巣に巨細胞形成が、200 mg/kg群で精巣に精細管の萎縮、精細管の変性、精子減少と巨細胞形成がならびに精巣上体に精子減少が、800 mg/kg群で精巣に精細管の萎縮ならびに精巣上体に精子減少がみられた。なお、800 mg/kg群で精巣に巨細胞形成がみられなかったのは、精細管の萎縮が顕著で、生殖細胞がほとんど脱落しているため、形成された細胞も同様に脱落し認められなくなったものと考えられた。したがって、50 mg/kgの投与で精巣の精子形成に影響を及ぼすと考えられる。なお、ラットにおける 28 日間反復投与毒性試験²⁾では、800 mg/kg投与しても精巣重量に変化は認められず、200 mg/kg以上の群で精巣のセルトリ細胞の空胞化および精子分化の障害が認められているが、精細管の萎縮はみられていない。したがって、2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)では、投与期間が長い方が精巣に及ぼす影響は強くなることが示唆された。

雌(P)に関しては、死亡および瀕死例はいずれの群とも認められなかった。一般状態観察において、雄の場合と同様に 200 mg/kg以上の群で認められた流涎は毒性症状とはみなさ

なかった。体重では、200 mg/kg群で哺育期に増加抑制が、800 mg/kg群で妊娠期および哺育期に増加抑制がみられた。また、摂餌量では、200 および 800 mg/kg群で交配前、妊娠期および哺育期に低値がみられた。しかし、剖検および卵巣重量では、投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

したがって、当試験条件下における 2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)の一般毒性学的無影響量は、雄が 12.5 mg/kg/day、雌が 50 mg/kg/dayと考えられる。

親動物(P)の生殖発生に対しては、前述したように 50 mg/kg以上の群で精子検査成績に影響がみられ、精巣に病理組織学変化が認められた。しかし、交配開始日までの 14 日間の投与では、いずれの群とも交尾率および受胎率に影響は認められなかった。

発情回数、交尾所要日数、受胎雌数、妊娠期間、分娩状態および哺育状態では、投与に起因すると思われる変化はみられなかった。しかし、200 mg/kg群で黄体数および着床痕数の低値傾向が、800 mg/kg群で黄体数および着床痕数の低値がみられた。また、800 mg/kg群で新生児を分娩できなかった雌および哺育期に新生児が全例死亡した母動物が各 1 例認められた。なお、着床痕数の低値は黄体数の低値に伴う変化と考えられる。

新生児(F₁)に対しては、200 mg/kg群では哺育 0 日の新生児数、総出産児数および哺育 4 日の新生児数の低値がみられた。800 mg/kg群では、哺育 0 日の新生児数、総出産児数、出生率および哺育 4 日の新生児数の低値あるいは低値傾向、死産児数の高値傾向がみられた。また、200 mg/kg群では、哺育 4 日に腹合計の体重の低値がみられた。800 mg/kg群では、哺育 4 日に雌雄別平均、腹平均および腹合計の体重の低値あるいは低値傾向がみられた。なお、200 および 800 mg/kg群で認められた哺育 4 日の腹合計の体重の低値は、生存児数あるいは平均体重の減少に伴う変化と考えられる。外表観察では、各投与群とも投与による影響はみられなかった。一般状態では、各投与群とも投与による異常症状はみられなかった。

したがって、当試験条件下における 2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)の生殖発生毒性学的な無影響量は、雄の生殖に関しては 12.5 mg/kg/day、雌の生殖に関しては 50 mg/kg/day、児動物に関しては 50 mg/kg/dayと推察される。

以上のように、2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)の一般毒性学的無影響量は、雄では 50 mg/kg投与により精子検査成績および精巣の病理組織学検査成績に影響が認められたことから 12.5 mg/kg/day、雌では 200 mg/kg投与により体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められたことから 50 mg/kg/dayと考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雄では 50 mg/kg投与により精子検査成績および精巣の病理組織学検査成績に影響が認められたことから 12.5 mg/kg/day、雌では 200 mg/kg投与により黄体数および着床痕数の低値傾向が認められたことから 50 mg/kg/day、児動物では 200 mg/kg投与により哺育 0 日および 4 日の新生児数の低値が認められたことから 50 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 「2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)の調製液の安定性確認試験」(試験番号: 091917P)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)
- 2) 「2,2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-*p*-クレゾール)のラットにおける28日間反復投与毒性試験」株式会社パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所 (試験番号: 29431) 最終報告書
- 3) Kato, M., et al. (1995): Congenital Anomalies 35:394

Table 1-1 General signs of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general signs	Days of administration																									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Control	0	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	10	12	12	12
		Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	0	0	0
2,2'-methylenebis (4-methyl-6- tert-butylphenol)	12.5	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	10	11	11
		Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1
	50	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	8	7	9
		Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	5	3	0
	200	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	10	11	12	12	9	8	10	11	12	10	11	11
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1
		Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	1	0	0	1	0	0
	800	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	10	10	11	10	9	8	9	9	11	12	6	3	2	4	10	7	7	6
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	2	3	4	3	3	1	0	0	3	5	4	2	4	3	6
		Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	8	4	1	1	2	0

Table 1-2 General signs of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general signs	Days of administration																																#Total
			27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53						
Control	0	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	4	12				
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	4	-				
		Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5			
2,2'-methylenebis (4-methyl-6- tert-butylphenol)	12.5	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	4	12				
		Normal	11	11	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	4	-				
		Loose stool	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3			
	50	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	4	12			
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	4	-			
		Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7			
	200	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	4	12			
		Normal	11	11	9	11	12	10	11	10	9	10	11	10	10	11	11	8	12	11	9	12	11	11	10	11	11	7	4	-					
		Salivation	1	1	2	1	0	2	1	2	3	2	1	2	2	1	1	4	0	1	3	0	1	1	2	1	1	1	0	8					
		Loose stool	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6			
	800	Number of males	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	4	12			
		Normal	7	9	8	9	11	9	8	9	8	7	9	8	10	8	6	5	9	10	6	6	6	4	4	8	9	7	4	-					
		Salivation	5	2	3	3	1	3	4	3	4	5	3	4	2	4	6	7	3	2	6	6	6	8	8	4	3	1	0	11					
		Loose stool	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11			

#: Number of males showing abnormal signs at least once from days 1 to 53 of administration.

Table 2 Body weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control		2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)			
	0		12.5	50	200	800
Number of males	12		12	12	12	12
Days of administration	1	356.3 ± 12.0	357.8 ± 11.6	357.8 ± 11.3	358.3 ± 12.2	357.7 ± 12.9
	4	371.6 ± 15.3	376.5 ± 15.5	377.2 ± 12.4	378.2 ± 15.5	371.9 ± 15.7
	8	393.8 ± 20.5	399.6 ± 18.8	398.1 ± 13.5	401.0 ± 19.3	394.3 ± 12.7
	11	408.9 ± 24.8	414.7 ± 23.2	412.5 ± 16.9	415.6 ± 23.1	410.6 ± 13.9
	15	425.8 ± 29.8	432.4 ± 26.9	430.5 ± 18.7	425.4 ± 22.7	428.5 ± 18.5
	18	431.8 ± 29.6	434.0 ± 26.3	433.9 ± 18.7	428.7 ± 21.8	423.8 ± 19.0
	22	445.7 ± 30.8	448.0 ± 25.7	446.9 ± 21.6	445.5 ± 22.4	442.6 ± 18.9
	25	453.3 ± 30.9	453.0 ± 29.7	455.5 ± 20.9	456.3 ± 23.4	452.0 ± 21.2
	29	466.1 ± 31.7	466.1 ± 29.4	469.6 ± 23.5	472.8 ± 28.8	471.8 ± 21.5
	32	474.8 ± 33.8	477.0 ± 31.3	481.4 ± 25.1	481.0 ± 28.8	481.1 ± 23.5
	36	488.8 ± 34.8	490.8 ± 34.5	497.2 ± 24.8	493.8 ± 30.8	490.9 ± 20.5
	39	497.6 ± 37.9	498.8 ± 32.8	506.8 ± 26.9	502.0 ± 32.4	497.7 ± 22.2
	43	512.3 ± 36.3	512.8 ± 32.7	523.4 ± 27.2	514.4 ± 32.5	508.9 ± 20.8
	46	519.1 ± 38.4	514.5 ± 29.2	527.7 ± 29.1	519.4 ± 32.7	510.3 ± 21.6
	49	526.3 ± 39.8	525.3 ± 32.6	535.2 ± 31.2	526.6 ± 34.1	511.1 ± 27.0

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 3 Food consumption of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group		Control		2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)							
(mg/kg)		0		12.5		50		200		800	
Number of males		12		12		12		12		12	
Days of admin- istration	3	26.6 ±	2.0	25.9 ±	2.0	27.6 ±	2.1	26.5 ±	1.9	22.9 ±	1.6**
	6	27.0 ±	2.5	27.9 ±	2.2	28.1 ±	2.2	26.9 ±	2.5	27.3 ±	2.2
	10	26.8 ±	3.3	26.9 ±	2.6	27.4 ±	2.6	27.8 ±	2.9	28.3 ±	2.1
	13	26.7 ±	2.9	27.6 ±	3.0	27.6 ±	2.7	27.3 ±	3.1	27.8 ±	2.4
	27	28.0 ±	3.0	29.1 ±	2.8	30.1 ±	3.0	30.6 ±	2.1	30.1 ±	2.7
	31	28.9 ±	1.7	30.3 ±	2.1	29.8 ±	1.9	29.8 ±	1.9	30.2 ±	2.4
	34	28.8 ±	1.7	30.2 ±	2.3	29.8 ±	2.2	28.9 ±	2.3	29.3 ±	1.8
	38	28.3 ±	2.2	29.8 ±	1.5	29.0 ±	2.0	29.3 ±	2.2	28.4 ±	2.8
41	28.1 ±	3.1	28.1 ±	2.5	28.6 ±	1.9	28.7 ±	2.9	28.6 ±	2.1	
45	29.0 ±	3.2	29.6 ±	1.8	29.1 ±	2.9	29.8 ±	2.6	28.8 ±	3.8	
48	28.3 ±	3.0	29.8 ±	2.4	28.8 ±	2.5	29.9 ±	2.4	27.9 ±	3.1	

Each value shows mean (g/day) ± S.D.
Significantly different from control (**: P<0.01).

Table 4 Necropsy finding of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenabis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control	2,2'-methylenabis(4-methyl-6-tert-butylphenol)			
	0	12.5	50	200	800
Number of males	12	12	12	12	12
Normal	12	12	12	8	0
Testis					
Atrophy	0	0	0	4	12
Epididymis					
Atrophy	0	0	0	4	12
Seminal vesicle					
Atrophy	0	0	0	0	6

Table 5 Organ weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control		2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)							
	0		12.5		50		200		800	
Number of males	12		12		12		12		12	
Body weight (g)	535.8 ± 41.7		536.5 ± 33.5		544.3 ± 31.4		539.7 ± 35.7		514.0 ± 34.4	
Testes (g)	3.550 ± 0.333		3.598 ± 0.320		3.558 ± 0.302		2.983 ± 0.767*		1.736 ± 0.263**	
(g%)	0.666 ± 0.082		0.674 ± 0.072		0.655 ± 0.046		0.557 ± 0.157*		0.338 ± 0.050**	
Epididymides (g)	1.255 ± 0.143		1.343 ± 0.118		1.196 ± 0.113		1.108 ± 0.125*		0.924 ± 0.100**	
(g%)	0.235 ± 0.034		0.250 ± 0.024		0.220 ± 0.018		0.205 ± 0.027*		0.180 ± 0.020**	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 6 Observation of sperm in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control	2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)			
	0	12.5	50	200	800
Number of males	12	12	12	12	12
Sperm motion parameters					
After 30 min. incubation					
Motility ratio(%)	71.96 ± 9.69	74.92 ± 7.81	60.42 ± 10.26 **	14.50 ± 21.75 **	0.00 ± 0.00 **
Path velocity (μm/s)	149.45 ± 10.72	157.08 ± 6.58	155.81 ± 9.56	128.07 ± 40.54 (6)	—
Straight line velocity (μm/s)	100.28 ± 13.08	108.18 ± 6.58	105.81 ± 11.07	83.88 ± 27.65 (6)	—
Curvilinear velocity (μm/s)	348.95 ± 20.87	369.08 ± 16.17 *	364.94 ± 18.14	301.08 ± 104.59 (6)	—
Beat cross frequency (Hz)	30.64 ± 1.77	30.16 ± 1.59	32.91 ± 1.70 **	29.98 ± 10.51 * (6)	—
Morphology of sperm					
Abnormal ratio (%) ^{a)}	1.55 ± 3.63	0.55 ± 0.55	8.11 ± 6.33 **	56.33 ± 29.03 ** (7)	91.70 (1)
Viability (%) ^{b)}	98.57 ± 2.04	99.56 ± 0.47	89.19 ± 11.47 **	71.68 ± 9.31 ** (4)	—
Survivability (%) ^{c)}	83.29 ± 6.87	86.44 ± 3.27	66.03 ± 17.79 **	39.03 ± 15.16 ** (4)	—
Number of sperms in left epididymis cauda (×10 ⁶)	207.41 ± 60.16	222.42 ± 49.26	128.00 ± 39.88 **	60.73 ± 29.17 **	30.30 ± 15.98 **
Number of sperms / g (left epididymis cauda) (×10 ⁶)	707.85 ± 153.02	704.85 ± 154.64	503.29 ± 159.44 **	238.88 ± 102.42 **	138.92 ± 83.31 **

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (*: P<0.05, **: P<0.01).

Figures in parentheses indicate number of males.

a): (Number of abnormal sperms / 300 sperms)×100.

b): ((Number of live sperms + number of died sperms during the 2 hrs. incubation) / 300 sperms)×100.

c): (Number of live sperms / 300 sperms)×100.

Table 7 Histopathological finding of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control				2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)																									
	0				12.5				50				200				800													
Incidence & Grade	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+						
Findings																														
Testis	[12]				[12]				[12]				[12]				[12]													
Atrophy, seminiferous tubule	12	0					12	0					12	0					6	6	1	2	2	1**	0	12	0	1	10	1** ##
Degeneration, seminiferous tubule	12	0					12	0					12	0					11	1	1	0	0	0	12	0				
Decrease, sperm	12	0					12	0					12	0					11	1	1	0	0	0	12	0				
Giant cell formation	12	0					12	0					10	2	2	0	0	0	10	2	2	0	0	0	12	0				
Epididymis	[12]				[12]				[12]				[12]				[12]													
Decrease, sperm	12	0					12	0					12	0					3	9	2	2	1	4**	0	12	0	0	0	12** ##

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

N : No abnormality detected.

A : Abnormality detected.

[] : Examined number of males.

No remarkable changes were seen in seminal vesicle.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Significantly different by dose response test (##: P<0.01).

Table 8 General signs of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)		Number of females and general signs	Days of administration																						#Total
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15*	16	17	18	19	20	21	22	
Control	0	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	5	3	0	0	0	0	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	5	3	-	-	-	-
2,2'-methylenebis (4-methyl-6- tert-butylphenol)	12.5	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	5	2	0	0	0	0	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	5	2	-	-	-	-	-
	50	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	7	3	0	0	0	0	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	9	7	3	-	-	-	-	-
	200	Number of females Normal Salivation	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	7	3	1	1	1	1	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	10	9	6	2	1	1	1	1	-
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	3
	800	Number of females Normal Salivation	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	2	1	1	0	0	0	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	9	11	9	4	2	1	1	-	-	-	-
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	3	0	0	0	0	-	-	-	5

*: Commencement of pairing.

#: Number of females showing abnormal signs at least once from days 1 to 22 of administration.

Table 9 General signs of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)		Number of dams and general signs	Days of pregnancy																											
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	*Total	
Control	0	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	1	0	0	0	12	
		Normal	12	12	12	12	10	11	9	9	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	1	-	-	-	-	
		Loose stool	0	0	0	0	2	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	5
2,2'-methylenebis (4-methyl-6- tert-butylphenol)	12.5	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	0	0	0	12	
		Normal	12	12	12	12	12	11	12	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	-	-	-	-	-	
		Loose stool	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	2
	50	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	0	0	0	12	
		Normal	12	12	12	11	11	11	10	11	12	12	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	4	-	-	-	-	
		Loose stool	0	0	0	1	1	1	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	4
	200	Number of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	5	0	0	0	11	
		Normal	7	9	6	6	5	5	7	9	6	9	6	9	10	10	9	8	9	9	11	10	10	10	5	-	-	-	-	
		Salivation	4	2	4	4	3	3	2	1	4	2	5	2	1	1	2	3	2	2	0	1	1	1	0	-	-	-	-	9
	800	Loose stool	0	0	2	5	4	5	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	8
		Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	5	1	1	1	12	
		Normal	10	9	9	6	8	6	6	7	5	5	9	9	7	7	7	8	9	7	9	10	10	9	3	0	0	1	-	
		Salivation	2	2	1	1	2	5	2	3	5	6	2	3	4	4	4	4	3	5	3	2	2	2	2	1	1	0	9	
	800	Loose stool	0	1	2	5	3	3	5	3	5	5	2	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10

#: Number of dams showing abnormal signs at least once from days 0 to 25 of pregnancy.

Table 10 General signs of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)		Number of dams and general signs	Days of lactation					#Total
			0	1	2	3	4	
Control	0	Number of dams	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	-
2,2'-methylenebis (4-methyl-6- tert-butylphenol)	12.5	Number of dams	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	-
	50	Number of dams	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	-
	200	Number of dams	11	11	11	11	11	11
		Normal	9	11	10	10	11	-
		Salivation	2	0	1	1	0	3
	800	Number of dams	10	10	10	10	10	10
		Normal	9	9	9	9	10	-
		Salivation	1	1	1	1	0	2

#: Number of dams showing abnormal signs at least once from days 0 to 4 of lactation.

Table 11 Body weight of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control		2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)			
	0		12.5	50	200	800
Number of females	12		12	12	12	12
Days of admin- istration						
1	221.8 ± 8.3		221.3 ± 9.0	221.8 ± 8.4	221.7 ± 9.3	222.1 ± 9.4
4	224.1 ± 8.6		225.3 ± 8.5	226.0 ± 7.2	223.6 ± 7.8	218.9 ± 7.3
8	233.9 ± 8.1		235.8 ± 9.1	235.1 ± 7.0	231.3 ± 7.5	230.0 ± 7.8
11	240.1 ± 10.8		242.0 ± 10.6	241.0 ± 11.4	235.5 ± 8.7	234.2 ± 9.9
15	244.6 ± 13.3		247.8 ± 13.7	249.9 ± 12.3	241.0 ± 10.5	239.2 ± 10.7
18	249.7 ± 13.6 (3)		252.5 (2)	249.3 ± 7.6 (3)	244.0 ± 10.4 (3)	261.0 (1)
22					259.0 (1)	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of females.

Table 12 Body weight of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control	2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)			
	0	12.5	50	200	800
Number of dams	12	12	12	11	12
Days of pregnancy					
0	251.3 ± 11.0	250.5 ± 13.5	254.3 ± 10.9	242.5 ± 10.8	239.3 ± 11.2*
7	277.5 ± 12.8	277.3 ± 11.8	281.8 ± 14.9	267.9 ± 11.4	261.1 ± 13.6*
14	306.5 ± 13.9	313.4 ± 14.5	313.6 ± 15.8	297.1 ± 11.6	288.6 ± 15.8*
21	394.8 ± 23.2	404.3 ± 21.6	407.5 ± 23.7	377.2 ± 13.7	363.8 ± 21.8** (11)

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

Table 13 Body weight of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control		2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)			
	0	12.5	50	200	800	
Number of dams	12	12	12	11	11	
Days of lactation	0	282.0 ± 13.1	289.3 ± 21.5	291.7 ± 22.6	278.9 ± 17.1	264.5 ± 22.7
	4	310.4 ± 12.3	312.2 ± 18.9	310.7 ± 17.2	288.5 ± 13.3*	278.2 ± 22.4** (10)

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 14 Food consumption of female rats (P) during pre-mating period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control		2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)							
	0		12.5		50		200		800	
Number of females	12		12		12		12		12	
Days of admin- istration	3	15.8 ± 1.8	16.9 ± 2.1		15.9 ± 1.7		13.4 ± 2.0**		12.3 ± 1.5**	
	6	17.9 ± 2.0	18.1 ± 1.7		17.8 ± 1.8		15.8 ± 1.7*		16.2 ± 2.5	
	10	18.0 ± 2.0	18.1 ± 2.1		18.4 ± 2.1		16.3 ± 1.8		17.9 ± 2.1	
	13	17.9 ± 1.8	18.0 ± 1.8		19.0 ± 2.4		17.9 ± 2.3		17.0 ± 1.8	

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 15 Food consumption of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control		2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)					
	0		12.5		50		200	
Number of dams	12		12		12		11	
Days of pregnancy								
2	21.5 ±	1.8	18.9 ±	2.0	20.3 ±	3.6	16.5 ±	2.6**
9	23.5 ±	3.4	25.3 ±	1.9	24.9 ±	1.8	23.8 ±	1.5
16	23.9 ±	2.4	25.5 ±	1.9	25.8 ±	2.0	25.3 ±	3.0
21	22.2 ±	1.8	22.8 ±	2.3	22.9 ±	3.5	21.2 ±	2.7
							20.8 ±	2.5

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Table 16 Food consumption of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control	2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)			
	0	12.5	50	200	800
Number of dams	12	12	12	11	10
Days of lactation 4	32.8 ± 5.2	31.9 ± 3.1	32.7 ± 4.0	27.4 ± 5.7*	26.3 ± 5.1**

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 17 Necropsy finding of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of
2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control	2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)			
	0	12.5	50	200	800
Number of females	12	12	12	12	12
Normal	11	12	12	12	12
Kidney Dilatation of renal pelvis	1	0	0	0	0

Table 18 Organ weight of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control		2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)							
	0		12.5		50		200		800	
Number of females	12		12		12		12		12	
Body weight (g)	310.4 ± 12.3		312.2 ± 18.9		310.7 ± 17.2		287.4 ± 13.3**		281.9 ± 22.9**	
Ovaries (mg)	94.50 ± 12.06		91.43 ± 10.00		89.88 ± 8.77		89.69 ± 16.74		88.78 ± 14.65	
(mg%)	30.51 ± 4.20		29.36 ± 3.40		28.90 ± 1.90		31.23 ± 5.75		31.44 ± 3.93	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Table 19 Histopathological finding of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of
2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control				2,2'-methylenebis (4-methyl-6-tert-butylphenol)							
	0				800							
Incidence & Grade	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+
Ovary	[12] 12 0						[12] 12 0					

N : No abnormality detected.

A : Abnormality detected.

[] : Examined number of females.

No remarkable changes were seen in kidney.

Table 20 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control	2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)			
	0	12.5	50	200	800
Number of females	12	12	12	12	12
Number of estrous cases before mating (14 days) Mean±S.D.	3.3 ± 0.5	3.5 ± 0.5	3.5 ± 0.5	3.7 ± 0.5	3.2 ± 0.6
Number of pairs	12	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation Copulation index (%) ^{a)}	12 100.0	12 100.0	12 100.0	12 100.0	12 100.0
Number of conceiving days Mean±S.D.	2.3 ± 1.3	2.3 ± 1.1	2.6 ± 1.2	3.1 ± 1.8	1.7 ± 1.2
Conceiving days 1-5	12	12	12	11	12
Conceiving days ≥6	0	0	0	1	0
Number of pregnant females Fertility index (%) ^{b)}	12 100.0	12 100.0	12 100.0	11 91.7	12 100.0
Number of pregnant females with live pups	12	12	12	11	10

a): (Number of pairs with successful copulation / number of pairs)×100.

b): (Number of pregnant females / number of pairs with successful copulation)×100.

Table 21 Observation of pups (F1) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control	2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)			
	0	12.5	50	200	800
Number of dams	12	12	12	11	11
Length of gestation (days)	22.08 ± 0.29	22.00 ± 0.00	22.33 ± 0.49	22.45 ± 0.52	22.27 ± 0.65
Pregnancy days ≤ 21	0	0	0	0	1
Pregnancy days = 22	11	12	8	6	6
Pregnancy days ≥ 23	1	0	4	5	4
Corpora lutea	16.4 ± 3.0	16.4 ± 2.6	16.3 ± 1.5	15.1 ± 1.4	14.1 ± 1.6 *
Implantation scars	14.3 ± 3.0	14.7 ± 1.1	15.2 ± 1.3	13.5 ± 1.4	13.1 ± 1.5 *
Implantation index (%) ^{a)}	86.9 ± 14.7	91.0 ± 12.8	93.6 ± 7.4	90.1 ± 8.5	93.1 ± 7.2
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0	83.3
Live pups born	13.1 ± 3.2	13.3 ± 0.8	14.3 ± 1.3	11.5 ± 1.0 **	11.3 ± 4.1
Sex ratio at birth ^{c)}	0.70 ± 0.45	1.02 ± 0.37	1.43 ± 0.92	1.03 ± 0.70	1.25 ± 0.68
Sex ratio on day 4 of lactation ^{c)}	0.70 ± 0.45	1.02 ± 0.37	1.43 ± 0.92	1.02 ± 0.71	1.25 ± 0.68 (10)
Birth index (%) ^{d)}	90.7 ± 9.4	91.2 ± 4.8	94.7 ± 4.4	86.0 ± 9.6	83.8 ± 28.8
Dead pups on day 0 of lactation	0.4 ± 0.7	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.5	0.2 ± 0.6	0.9 ± 2.7
Pups born	13.5 ± 3.3	13.5 ± 1.0	14.8 ± 1.3	11.7 ± 1.4 **	12.2 ± 1.8 *
Delivery index (%) ^{e)}	93.5 ± 8.9	92.2 ± 5.2	97.3 ± 3.3	87.2 ± 10.5 *	92.8 ± 5.7
Live birth index (%) ^{f)}	97.1 ± 4.6	98.9 ± 2.5	97.2 ± 3.5	98.8 ± 3.9	89.9 ± 30.0
Live pups on day 4 of lactation	13.1 ± 3.2	13.3 ± 0.8	14.3 ± 1.4	11.4 ± 1.0 **	12.4 ± 1.8 (10)
Viability index (%) ^{g)}	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	99.4 ± 2.0	98.5 ± 3.4	100.0 ± 0.0 (10)
External anomalies (%) ^{h)}	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 (10)

Each value shows mean ± S.D. per dam.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (*: P<0.05, **: P<0.01).

a): (Number of implantation scars / number of corpora lutea)×100.

c): Number of male pups / number of female pups.

e): (Number of pups born / number of implantation scars)×100.

g): (Number of live pups on day 4 / number of live pups born)×100.

b): (Number of dams with live pups / number of pregnant dams)×100.

d): (Number of live pups born / number of implantation scars)×100.

f): (Number of live pups born / number of pups born)×100.

h): (Number of pups with external anomalies / number of live pups)×100.

Table 22 Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control	2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)			
	0	12.5	50	200	800
Number of dams	12	12	12	11	10
Male weight					
Days of lactation					
0	6.78 ± 0.40	6.81 ± 0.23	6.90 ± 0.50	7.60 ± 0.52 **	6.97 ± 0.71
4	11.02 ± 0.83	11.05 ± 0.77	10.58 ± 1.11	11.29 ± 1.14	9.68 ± 1.72 *
Female weight					
Days of lactation					
0	6.43 ± 0.37	6.40 ± 0.17	6.53 ± 0.44	7.25 ± 0.49 **	6.61 ± 0.66
4	10.33 ± 0.81	10.36 ± 0.67	10.20 ± 1.15	10.77 ± 1.04	9.30 ± 1.64
Mean pups weight					
Days of lactation					
0	6.58 ± 0.36	6.60 ± 0.15	6.72 ± 0.44	7.41 ± 0.50 **	6.81 ± 0.70
4	10.58 ± 0.81	10.71 ± 0.66	10.41 ± 1.13	11.03 ± 1.08	9.49 ± 1.72
Litter weight					
Days of lactation					
0	85.34 ± 20.42	88.02 ± 5.66	96.04 ± 9.03	85.45 ± 8.55	83.53 ± 9.86
4	137.10 ± 31.76	142.57 ± 11.81	147.17 ± 11.39	124.95 ± 13.75 **	115.13 ± 10.21 **

Each value shows mean (g) ± S.D. per dam.

Significantly different from control (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 23 Necropsy finding of pups (F1) on day 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

Group (mg/kg)	Control	2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)			
	0	12.5	50	200	800
Number of males	59	78	90	59	64
Normal	59	78	90	59	64
Number of females	98	82	81	66	60
Normal	98	82	81	66	60

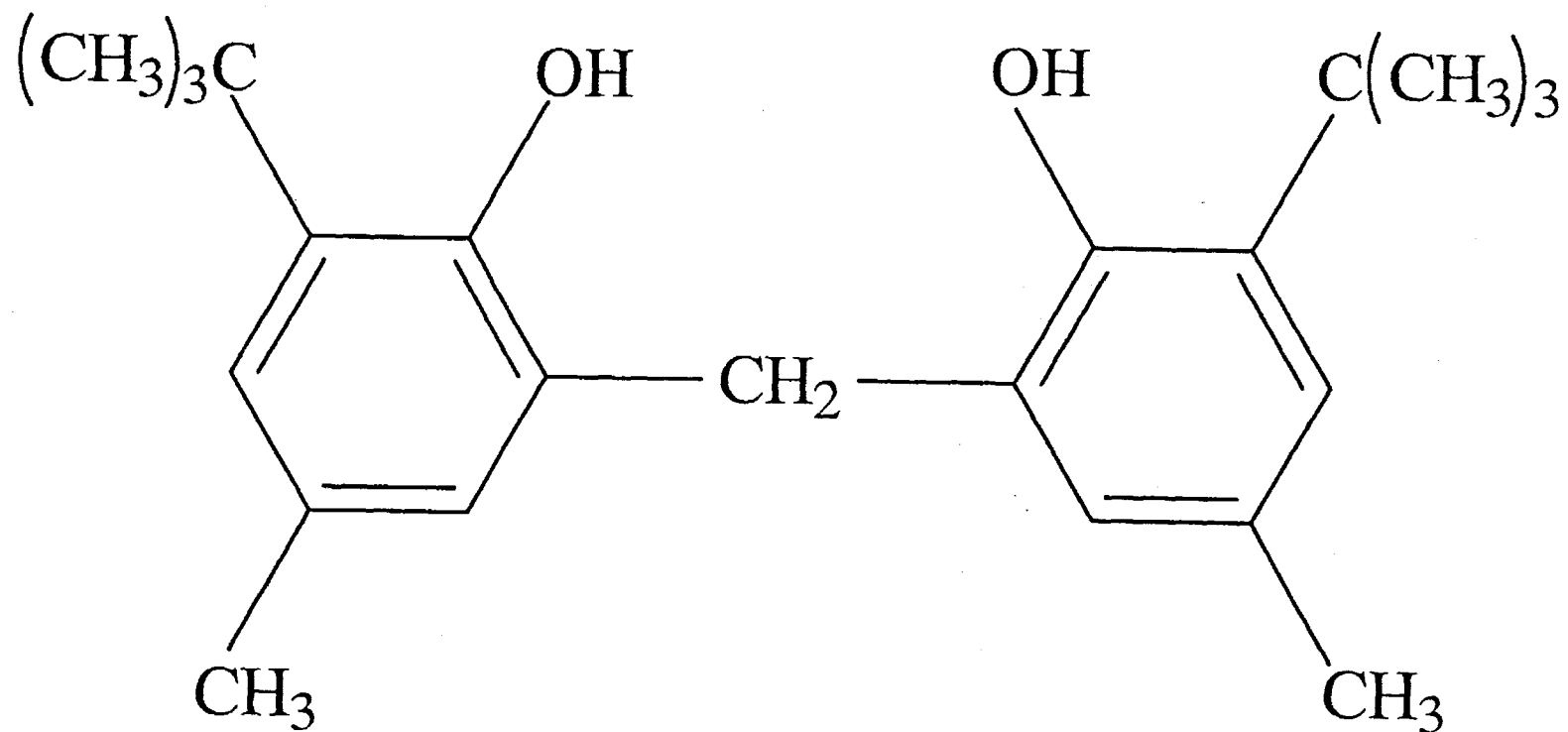


Fig. 1 Chemical structure of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol)

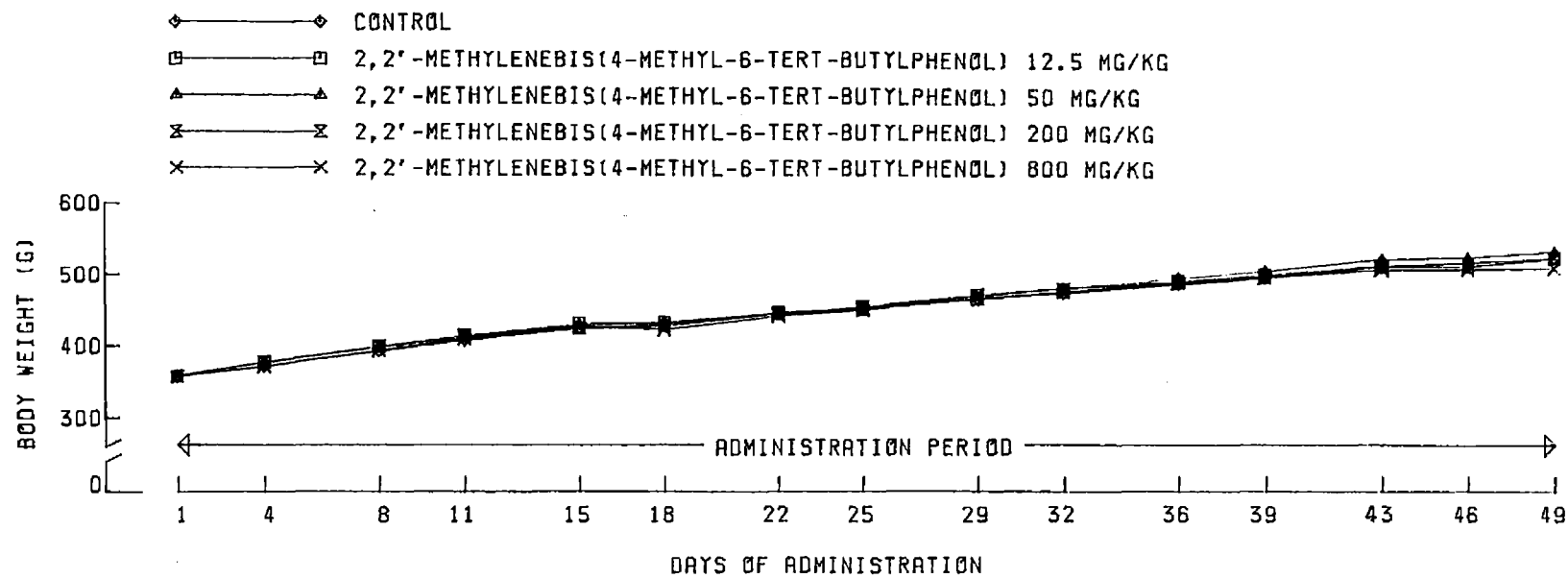


Fig. 2 Body weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

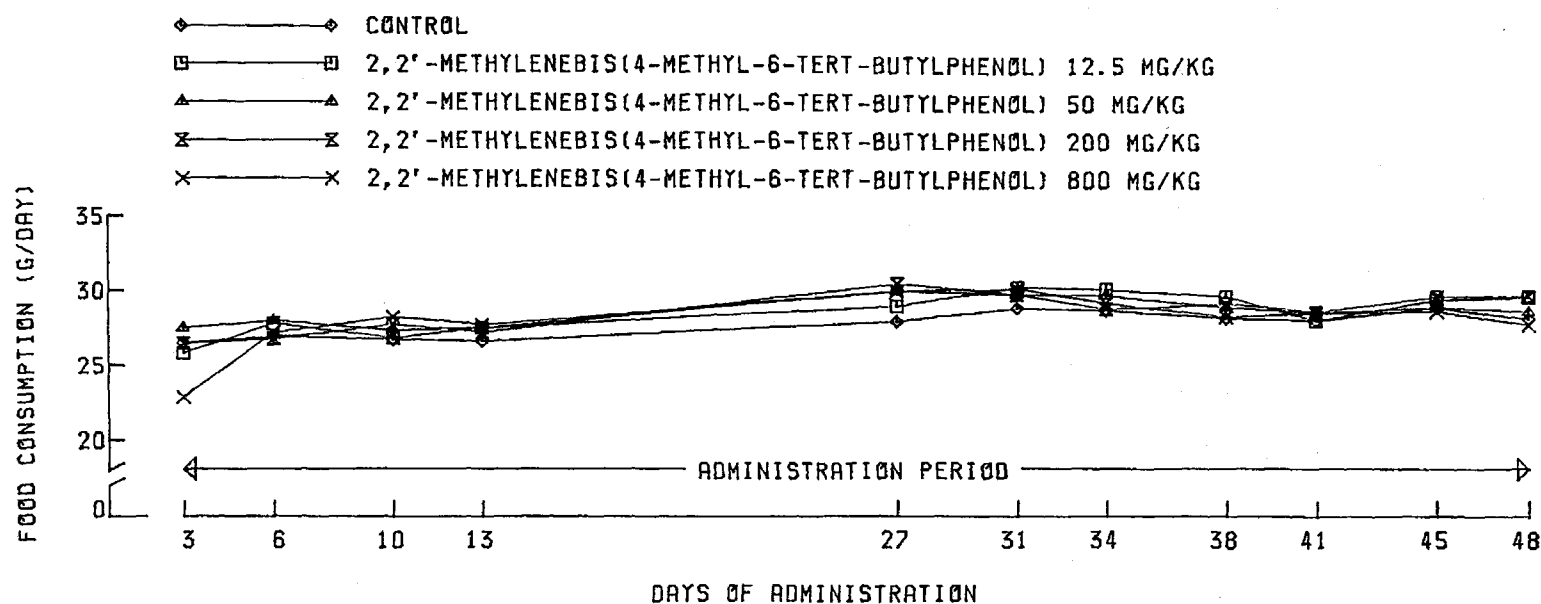


Fig. 3 Food consumption of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

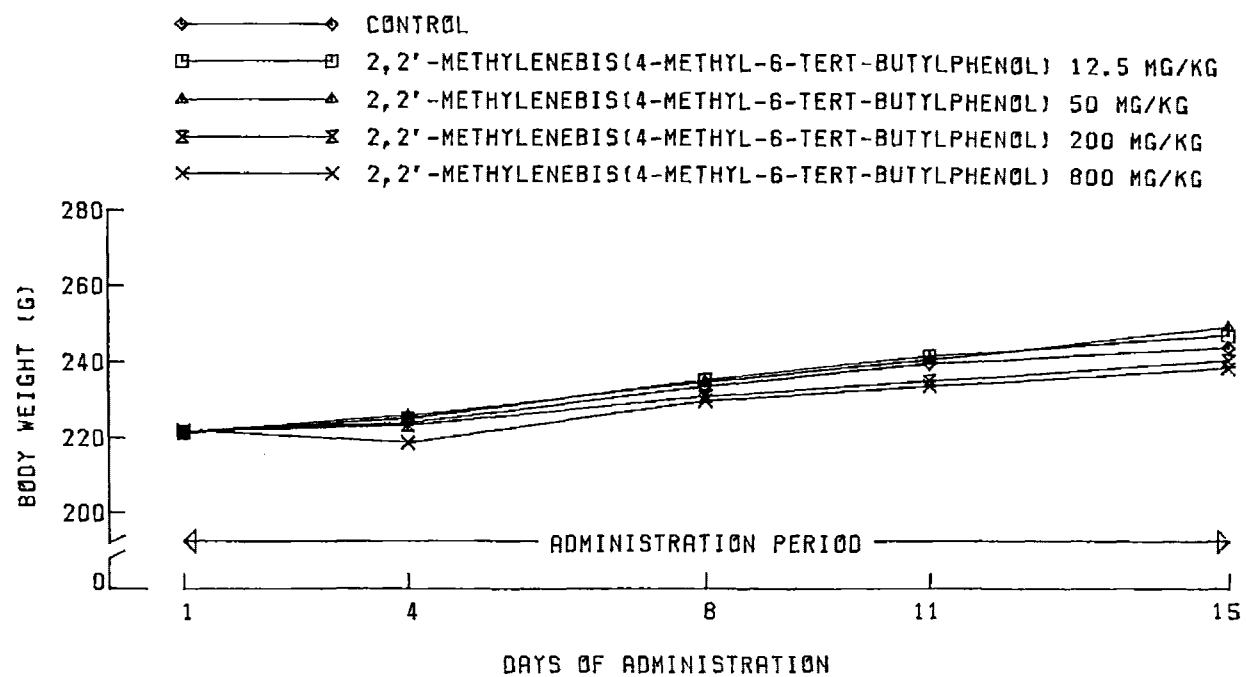


Fig. 4 Body weight of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

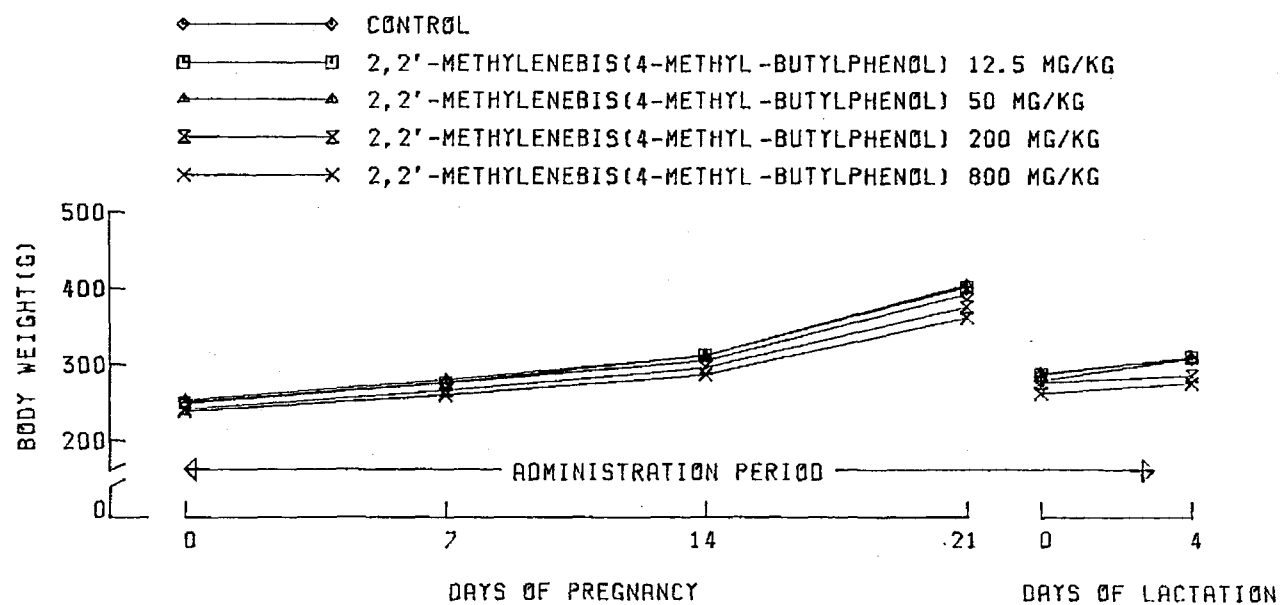


Fig. 5 Body weight of dams (P) during pregnancy and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

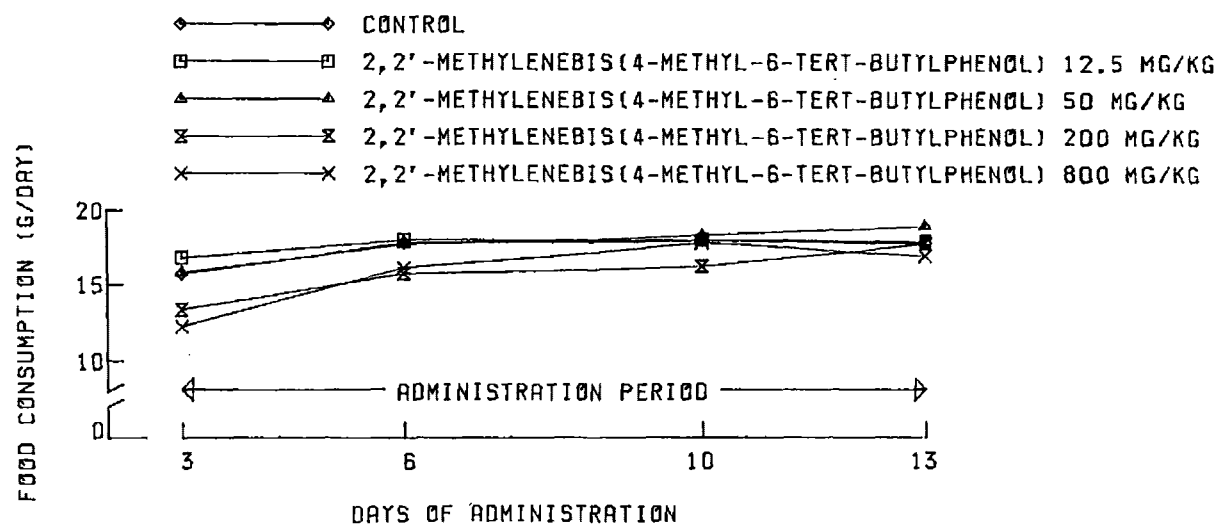


Fig. 6 Food consumption of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

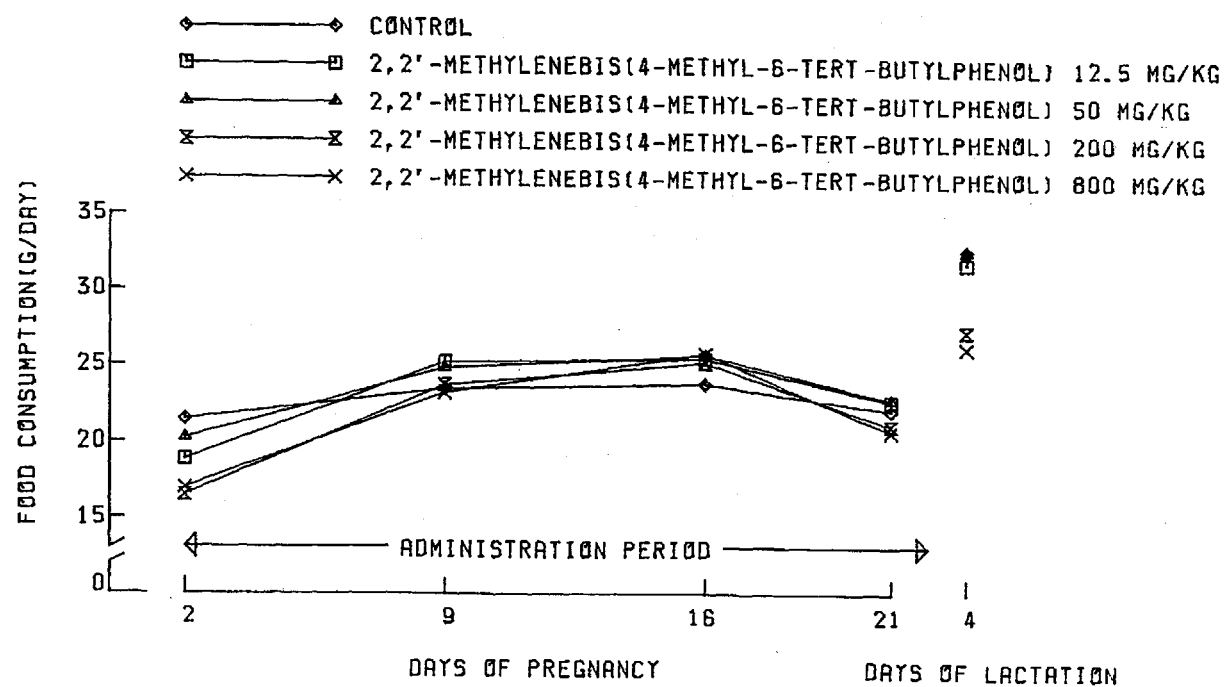


Fig. 7 Food consumption of dams (P) during pregnancy and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration

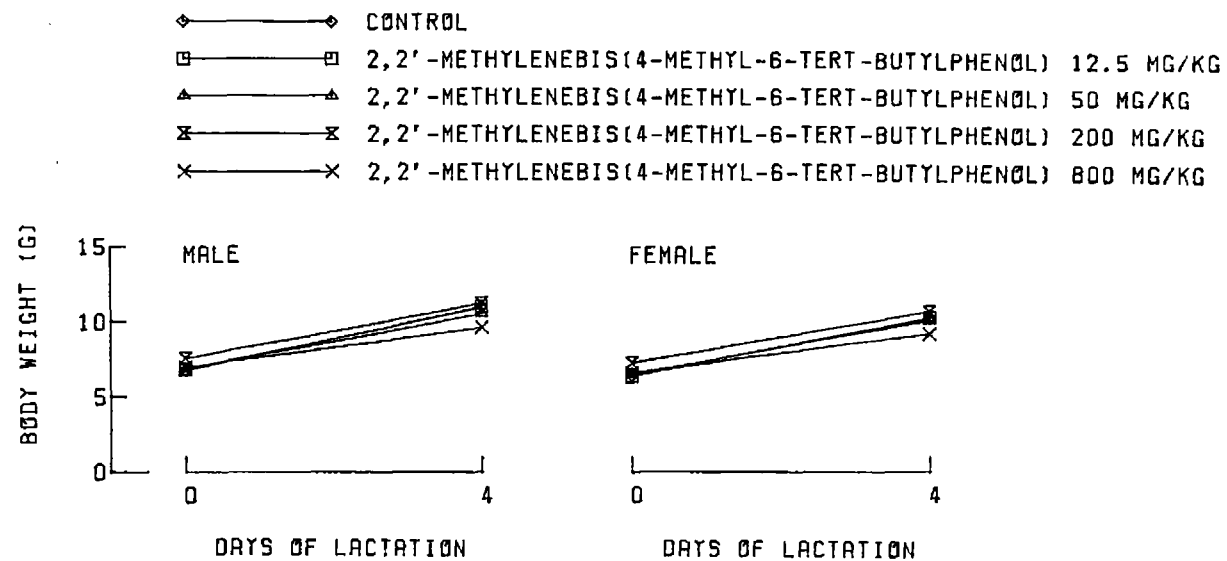


Fig. 8 Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) by oral administration