

最終報告書訂正版

p-エチルフェノールのラットを用いる 経口投与簡易生殖毒性試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729-1

TEL 0463-82-4751

目次

要約	5
試験目的	6
材料と方法	6
1. 被験物質	6
2. 動物および飼育方法	7
3. 投与検体	8
4. 投与量の設定および投与方法	8
5. 検査法	9
1) 親動物 (F_0)	9
2) 出生児 (F_1)	11
6. データの解析法	11
試験成績	12
1. 親動物	12
1) 一般状態	12
2) 体重	13
3) 摂餌量	13
4) 器官重量	13
5) 剖検所見	13
6) 病理組織学的検査	14
2. 生殖能力	16
1) 性周期および交配成績	16
2) 出産率および妊娠期間	16
3) 分娩および哺育状態	16
4) 黄体数、着床数および着床率	17
3. 出生児	17
1) 生存	17
2) 体重	17
3) 出生児観察	17
考察	17
参考文献	19
Tables	24

要約

今回、*p*-エチルフェノールの雌雄動物の生殖能力に対する影響および新生児の発育に及ぼす影響を検討することを目的として、簡易生殖毒性試験をOECD化学物質試験法ガイドラインに従って実施した。雌雄のCrI:CD(SD)ラットに被験物質を0(媒体:日局オリーブ油)、30、100ならびに300 mg/kgの用量で経口投与した。雄は42日間投与した後に剖検し、雌は交配前2週間および交配期間、妊娠期間を通して哺育4日まで連日投与した。なお、母動物は自然分娩させ、出生児は哺育4日、母動物は哺育5日に剖検した。

1. 親動物所見

雄に死亡動物は観察されなかったが、雌では300 mg/kg投与群の2例が周産期に死亡した。また、同群の別の2例では哺育期間に全哺育児が死亡した。これらの動物の病理組織学的検査の結果、肺の水腫、胸腺の萎縮、脾臓の赤脾髄および白脾髄領域の減少、肝臓の小葉中心帯の肝細胞細胞質の空胞化、腎臓に硝子円柱、近位尿細管に硝子様滴状物および空胞化、胃粘膜のびらん、穿孔、前胃粘膜固有層の水腫および扁平上皮細胞の過形成などが観察された。一般状態の変化として、雄雌とも300 mg/kg投与群で、投与後に自発運動の低下および一過性の流涎が試験期間を通して散見された。器官重量測定の結果、300 mg/kg投与群の肝臓の相対重量が有意に増加した。病理組織学的検査の結果、雌では100 mg/kg以上の投与群で前胃の粘膜固有層に水腫および扁平上皮細胞の過形成、十二指腸粘膜の肥厚が、雄では300 mg/kg投与群で前胃に扁平上皮細胞の過形成が認められた。

2. 出生児所見

300 mg/kg投与群において、生児出産率、出生率、および新生児出生率が低値傾向になった。また、同群の死亡産児数も対照群と比較して増加した。分娩率、体重、性比には被験物質投与による影響は認められなかった。

3. 生殖発生毒性学的所見

性周期、交配成績、妊娠期間、黄体数、着床数および着床率には被験物質投与による影響はみられなかった。300 mg/kg投与群で出産率は低下傾向を示した。

4. 無毒性量

以上の結果から、本試験条件下における*p*-エチルフェノールの親動物に対する一般毒性学的無毒性量は、雄では100 mg/kg/day、雌では30 mg/kg/day、生殖発生毒性学的な無毒性量は100 mg/kg/day、次世代に対する無毒性量は100 mg/kg/dayと判断される。

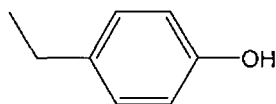
試験目的

雌雄ラットの交配前(2 週間)および交配期間中(最長 2 週間)、ならびに雄では交配期間終了後 2 週間、雌では妊娠期間を通して周産期(哺育 4 日まで)に p-エチルフェノールを経口投与し、雌雄ラットに対する生殖毒性について検討した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である p-エチルフェノール(別名:p-Ethylphenol、4-Hydroxyphenylethane、CAS No.:123-07-9、分子式: $C_8H_{10}O$ 、分子量:122. 17、外観:白色～褐色の塊、または融解時、無色～褐色、澄明の液体、純度:99.4%、沸点:約 219℃、凝固点:44℃、引火点:104℃、Annex A、以下、PEP)は、使用時まで冷蔵・遮光下(実測値 3～7℃)で保管した。PEP の構造式を次に示す。



被験物質の安定性は、投与開始前(2010年9月6日)および投与期間終了後(2011年1月21日)に秦野研究所にてフーリエ変換赤外分光光度計(FTIR-8300、島津製作所)を使用し、臭化カリウム錠剤法にて赤外吸収スペクトル(測定範囲:4000~400 cm^{-1})を測定して調べ、2つのスペクトルに変化がないことを確認した(Annex B)。なお、投与開始前のスペクトルは本被験物質を用いて先立って実施した試験(試験番号 R-10-002)で得られたスペクトルを使用した。

2. 動物および飼育方法

日本チャールス・リバー厚木飼育センターより8週齢の Sprague-Dawley (SD) 系 [CrI:CD(SD)、SPF] ラット雄 62 匹、雌 73 匹を購入し、3号室に収容した。入荷日も含めて14日間、検疫と飼育環境への馴化のため飼育した。その間毎日、動物の一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した。検疫・馴化期間中は動物の尾にフェルトペンで馴化番号を記し、飼育ケージに試験番号、性別および馴化番号を記入した動物カードを掛けて識別した。また、雌動物については、入荷翌日から毎日、性周期を観察した。入荷動物の入荷時および検疫終了時の体重は下記の通りであった。

動物入荷日	:2010年11月17日
入荷時体重	:雄 239.7~271.7 g、雌 175.1~201.3 g
検疫終了日	:2010年11月30日
検疫終了時体重	:雄 323.3~393.2 g、雌 206.2~259.4 g

検疫・馴化の結果、雄動物の1例(馴化動物番号 59 番)で指の損傷が見られたが、その他入荷した動物において、検疫期間中の一般状態および体重推移に異常は認められなかった。雄動物で一般状態に異常がみられた1匹、雌動物で規則的な4日の性周期の回帰が認められない6匹を除外し、体重別層化無作為抽出法により群分けを行った。群分けした動物には一連の動物番号を割り当て、フェルトペンで尾に動物番号を標識し、色彩の異なった動物カードに試験番号、性別および動物番号を記入して飼育ケージに掛けた。群分けから棄却した雄動物 10 匹、雌動物 15 匹および性周期の結果により除外した6匹は全て余剰動物とし、他目的に使用した。

動物は許容温度 21.0~25.0℃、許容湿度 40.0~75.0 %、換気設定約 15 回/時間、明暗サイクル 12 時間(7 時~19 時)点灯、12 時間(19 時~7 時)消灯に設定された飼育室内で、金属製金網床ケージ(220w×270d×190h mm)に1匹ずつ(交配時は2匹)収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した(ただし、雄動物および分娩した雌動物は、解剖前に絶食させた)。雌動物は全例について、妊娠 18 日から哺育 4 日までラット用プラスチック製繁殖ケージ(350w×400d×180h mm)に1匹ずつ収容し、床敷として紙パルプ製チップ(ペパークリーン、日本エスエルシー)を適宜供給した。飼育期間中に飼育環境の異常は認められず、動物室の温度は 21.5~23.5℃、

湿度は 44.0～67.0 %であった。また、供給した飼料、飲料水および床敷の分析結果は、いずれも標準操作手順書に記載の許容範囲内であることを確認した。

3. 投与検体

1) 調製

約 50℃以下で加温して溶かした PEP を秤量し、媒体に溶解させ、6 w/v%溶液を調製した。さらに 6 w/v%溶液を媒体によって希釈し、2 ならびに 0.6 w/v%溶液を段階的に調製した。調製した検体は冷蔵・遮光下(実測値 1～7℃)で保管し、安定性の保証期間内に使用した。

2) 安定性試験

秦野研究所で本被験物質を用いて先立って実施された試験(試験番号:R-10-002)において、0.6 および 6 w/v%濃度の投与検体は冷蔵、遮光条件下で 8 日間安定であることが確認されている(Annex C)。

3) 含量の測定

本試験の初回調製検体(調製日:2010 年 11 月 30 日)について、0.6、2 および 6 w/v%濃度の調製検体の含量を測定した。含量の判断基準は、平均含量が調製濃度の 90.0～110 %、また各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 90.0～110 %以内とした。その結果、平均含量は調製指示濃度の 101.7～105.3 %であり、各測定値のばらつきは平均値の 98.5～101.0 %で規定範囲内にあった(Annex D)。

調製検体中の被験物質濃度は以下の方法で測定した。調製検体の 0.5 mL を採取し、アセトンで希釈した後、アセトニトリルで希釈し、試料溶液を調製した(10 µg/mL 付近)。別に、約 50℃以下で加温して溶かした被験物質約 50 mg を量り、希釈液[アセトン/アセトニトリル混液(1:10 v/v)]に溶解して適宜希釈し、約 5、10 および 20 µg/mL の標準溶液を調製した。試料溶液および標準溶液を以下に示す高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により測定し、標準溶液から作成した検量線を用いて調製検体中の PEP 濃度を算出した。

HPLC 測定条件

分析カラム	Inertsil C8 (内径4.6mm、長さ150mm、粒子径5 µm、ジーエルサイエンス)
移動相	蒸留水/アセトニトリル混液(6:4 v/v)
流量	1 mL/min
カラム設定温度	40℃
試料設定温度	室温
測定波長	254 nm
試料注入量	10 µL
オートインジェクタ洗浄液	アセトン

4. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は、本被験物質を用いて行っている既報の「4-エチルフェノールのラットを用いる

28 日間反復経口投与毒性試験¹⁾の結果をもとに設定した。すなわち、100、300 および 1000 mg/kg の 4-エチルフェノールを雌雄各 7 匹の SD 系ラット(溶媒対照群および 1000 mg/kg 投与群では雌雄各 7 匹に 14 日間の回復群を設けている)に 28 日間、反復経口投与した結果、雌雄とも 1000 mg/kg 投与により、投与直後によりめき歩行、流涎が観察され、体重増加抑制および摂餌量の減少がみられた。また、器官重量測定では、雄で肝臓および腎臓の相対重量、雌で肝臓の相対重量が増加した。剖検では、雌雄とも前胃の粘膜肥厚が高頻度でみられ、病理組織学検査では、雌雄とも前胃に扁平上皮過形成が認められた。300 mg/kg 投与群では、雄で肝臓の絶対重量および相対重量が増加し、病理組織学検査では、雄で前胃に扁平上皮過形成が認められた。これらの結果から、本被験物質の 300 mg/kg 投与により親動物に発現する毒性変化は死に至る変化ではないと推察されたことから、本試験における高用量群の投与量を 300 mg/kg に設定し、以下、公比が約 3 になるように中用量を 100 mg/kg、低用量を 30 mg/kg とした。

雌動物は交配前 2 週間、交配期間、妊娠期間を通して分娩後の哺育 4 日まで、交尾が確認されなかった雌は剖検前日まで(総投与回数 42 回)、交尾は確認されたが分娩しなかった雌は剖検前日(妊娠 25 日相当日)まで、雄動物は交配前 2 週間、交配期間(14 日間)を通して剖検前日まで(総投与回数 42 回)、経口的に 1 日 1 回、1 週 7 回、午前中(9 時～11 時 43 分)に投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、雄および交配前ならびに交配中の雌、さらに交尾が確認されなかった雌では週 1 回測定する体重を基に、交尾が確認された雌では最新の測定日の体重を基準に算出した。なお、対照群には媒体である日局オリブ油を同様に投与した。投与経路は OECD 化学物質試験法ガイドライン[421]に拠り、ラット用胃管による強制経口投与とした。

本試験の群構成および動物番号を以下に示した。

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (w/v %)	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
					雄	雌
1	日局オリブ油(媒体)	0	0	5	M01001～M01013	F01001～F01013
2	PEP	30	0.6	5	M02001～M02013	F02001～F02013
3	PEP	100	2	5	M03001～M03013	F03001～F03013
4	PEP	300	6	5	M04001～M04013	F04001～F04013

5. 検査法

1) 親動物(F₀)

①一般状態の観察

全例について、飼育期間中は毎日 1 回、投与期間中は投与前後の毎日 2 回以上観察した。

②体重測定

雄動物は、投与 1、7、14、21、28、35、42 日および剖検日に測定した。雌動物は投与 1、7、14 日、妊娠 0、7、14、21 日、哺育 0、4 日および剖検日(哺育 5 日)に、さらに交尾が確認されなかった雌では投与 21、28、35、42 日および剖検日、分娩が確認されなかった動物では妊娠 26 日相当日にも測定した。

③摂餌量測定

雄動物は、投与 1～2、7～8、14～15、29～30、35～36、41～42 日に測定した。雌動物は投与 1～2、7～8、14～15 日および妊娠 0～1、7～8、14～15、20～21 日ならびに哺育 3～4 日、さらに交尾が確認されなかった雌では投与 29～30、35～36、41～42 日にも測定した。

④性周期観察

各群とも全例の雌について、動物入荷翌日から性周期を観察し、群分け後、投与開始以降も引き続き膣スメア標本を作製し、各動物の同居後、交尾が確認されるまで性周期を観察した。また、群ごとの平均発情回帰日数(個体ごとの発情期から発情期までの日数の平均)を算出した。なお、規則的に 4～5 日の間で性周期が回帰している動物は正常と判断した。

⑤交配

投与 15 日の夕方(16 時 7 分)より同群内の雌雄を 1 対 1 で同居させた。翌朝より毎朝、膣栓を確認し、同居中の雌の膣垢標本を作製して鏡検した。膣内に膣栓あるいは膣垢標本中に精子が確認された動物を交尾成立動物とし、この日を妊娠 0 日と起算して同居を解消し、個別に飼育した。交配結果および妊娠の成否により、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数、交尾率[(交尾動物数/交配に用いた動物数)×100, %]、妊娠率[(妊娠動物数/交尾した雌動物数)×100, %]を算出した。

⑥妊娠・分娩・哺育状態の観察

交尾が確認された全例を自然分娩させた。分娩の確認は、妊娠 21 日相当日から分娩が確認されるまで毎日行い、午前 11 時までには分娩が完了した例について、その日を哺育 0 日(分娩日)とした。分娩状態の直接観察は観察可能な動物について行い、直接観察できなかった動物についても、分娩後の一般状態および産児の状態から異常の有無を判断した。分娩後は、哺育状態を哺育 1～4 日の間、毎日観察した。分娩した全例の妊娠期間(妊娠 0 日から分娩日までの日数)を求め、各群の出産率[(生児出産雌数/妊娠動物数)×100, %]を算出し、哺育 4 日の剖検時に観察した着床数および妊娠黄体数から着床率[(着床数/妊娠黄体数)×100, %]を算出した。

⑦剖検および病理組織学的検査

雄動物は、投与 42 日の翌日に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させて剖検し、肝臓、精巣、精巣上体、前立腺(腹側葉)および精囊(凝固腺を含む)の重量を測定した。精巣および精巣上体はブアン液に固定(長期保存は 0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液)し、肝臓、胃、前立腺、精囊および乳腺は 0.1M リン酸緩衝 10% ホルマリン溶液に固定した。

精巣および精巣上体は対照群および 300 mg/kg 投与群について病理組織学的検査を実施した。100 mg/kg 投与群で精巣上体重量が有意に高値を示したが、相対重量には差がないことや、病理組織学的検査および生殖能力検査の結果を総合的に考慮した結果、100 mg/kg 以下の投与群について精巣および精巣上体の病理組織学的検査は必要ないと判断した。剖検時に異常の認められた対照群の肺、30 mg/kg 投与群の精巣および精巣上体、100 mg/kg 投与群の精巣上体、300 mg/kg 投与群の腎臓についても同様に固定し、病理組織学的検査を実施した。

雌動物のうち、死亡した雌(300 mg/kg 投与群の 2 例)は死亡確認日に、全哺育児が死亡した雌(300 mg/kg 投与群の 2 例)では全哺育児が死亡した日に、分娩した雌は哺育 5 日に、交尾しなかった雌(300 mg/kg 投与群の 1 例)は投与 42 日の翌日に、交尾はしたが分娩しなかった雌(100 mg/kg 投与群の 1 例)は妊娠 26 日相当日に、それぞれ、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させて剖検した。卵巣については実体顕微鏡下で妊娠黄体数を、子宮については着床数を数え、着床率[(着床数/妊娠黄体数)×100, %]を算出した。なお、死亡動物以外の雌について、肝臓および卵巣重量を測定した。

定期解剖(哺育 5 日)した雌動物は、肝臓、胃、卵巣、子宮、膣および乳腺を 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定した。卵巣は対照群および 300 mg/kg 投与群について病理組織学的検査を実施した。剖検時に異常の認められた 30 mg/kg 投与群の腎臓、100 および 300 mg/kg 投与群の小腸(十二指腸、空腸、回腸)についても同様に固定し、病理組織学的検査を実施した。

途中死亡および全哺育児が死亡した雌動物では、肝臓、胃、卵巣、病変部(肺、副腎、脾臓、胸腺)の他に、脳、肺、心臓、腎臓も同様に固定し、病理組織学的検査を実施した。

なお、器官重量および剖検の結果から、雌雄動物ともに、肝臓および胃は対照群を含む全投与群について病理組織学的検査を実施した。

2) 出生児(F₁)

① 出生児の観察

哺育 0 日に生存児数および死亡児数を雌雄別に数えて、性別および外表奇形の有無を観察し、分娩率[(産児数/着床痕数)×100, %]、生児出産率[(出產生児数/着床痕数)×100, %]、出産率[(生児出産雌数/妊娠動物数)×100, %]および出生率[(出產生児数/産児数)×100, %]を算出した。また、哺育 0～4 日まで、毎日、一般状態を観察し、生存児数と死亡児数を雌雄別に数え、新生児生存率[(哺育 4 日の生児数/哺育 0 日の生児数)×100, %]を算出した。生存児については、哺育 0 および 4 日に個別の体重を測定し、腹ごとに雌雄別の平均体重を算出するとともに、哺育 0 日および 4 日における性比[(雄生児数/総生児数)×100, %]を算出した。

② 剖検

死亡児は外表奇形の有無を観察して剖検し、0.1 M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定して保存した。生存児は哺育 4 日に外表奇形の有無を観察してセボフルラン吸入麻酔下に放血致死させて剖検し、内部器官の異常の有無を観察した。外表に異常が観察された児も同様に固定して保存した。

6. データの解析法

性周期の変化した動物の頻度、交尾率、受胎率については Fisher の直接確率検定を行った(有意水準:5%)。

PEP 各投与群の病理組織学検査所見のうち、グレード分けした病理組織所見は、Mann-Whitney の U 検定により、また陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定により、300 mg/kg 投与群と対照群との間の有意差検定を行った(有意水準:5%)。ただし、雌においては、哺育 5 日に剖検した動物の

成績に関してのみ検定を実施した。

その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは litter ごとの平均値を1標本として、先ず、Bartlettの方法により各群の分散の一樣性について検定(有意水準:5%)を行った。分散が一樣であった場合には、一元配置型の分散分析(有意水準:5%)を行い、群間に有意性が認められた場合は、Dunnett 法により多重比較を行った(有意水準:5%)。一方、いずれかの群で分散が 0 となった場合および分散が一樣でなかった場合には、Kruskal-Wallis の順位検定(有意水準:5%)を行い、群間に有意性が認められる場合には、Dunnett 型の検定法により多重比較を行った(有意水準:5%)。

試験成績

1. 親動物

1) 一般状態 (Table 1~Table 4, Appendix 1~Appendix 4)

雄では、300 mg/kg 投与群で投与後に自発運動の低下が投与 1 日(投与開始日)から投与 37 日までの間に、一過性の流涎が投与 8 日から投与 37 日までの間に、それぞれ 1~2 例で散見された。

雌では、300 mg/kg 投与群で妊娠 22 日に 1 例(動物番号 F04002)、妊娠 23 日の分娩中に 1 例(動物番号 F04008)が死亡した。また、同群では、投与後に自発運動の低下が投与 1 日から交配期間、妊娠期間、哺育期間を通じて 1~4 例で散見され、一過性の流涎が投与 8 日から投与 17 日までの間に 1~2 例で散見された。さらに、300 mg/kg 投与群では交配開始後(投与 16~17 日)に下腹部の汚れが 5 例で散見された。下腹部の汚れは、当該動物の交尾が確認され同居が終了した後には 4 例で回復したが、1 例では、引き続き、妊娠 0~1 日にも観察された。

雌雄とも、自発運動の低下は投与後約 4 時間までに回復した。しかし、300 mg/kg 投与群の哺育 0 日の 1 例(動物番号 F04006)は、投与後約 6 時間まで回復しなかった。妊娠 21 日に観察された 2 例(動物番号 F04008、F04011)および妊娠 22 日に観察された 1 例(動物番号 F04007)では、投与後約 6 時間経過しても回復が認められなかった。

2) 体重 (Table 5～Table 8, Appendix 5～Appendix 8)

雄では、全試験期間を通じて対照群と PEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

雌では、100 mg/kg 投与群で妊娠 20 日に有意な低下 ($P<0.05$) が認められた。しかし、交配前、妊娠期間、哺育期間の体重には、対照群と PEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3) 摂餌量 (Table 9～Table 12, Appendix 9～Appendix 12)

雌雄とも、全試験期間を通じて対照群と PEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

4) 器官重量 (Table 13, Table 14, Appendix 13～Appendix 14)

雌雄とも 300 mg/kg 投与群の肝臓の相対重量が有意に増加 (雄: $P<0.05$ 、雌: $P<0.01$) した。また、雄において 100 mg/kg 投与群の精巣上体の実重量が有意に増加 ($P<0.05$) した。その他、精巣、前立腺、精囊、卵巣重量には、実重量および相対重量ともに対照群と PEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

5) 剖検所見 (Table 15, Table 16, Appendix 15～Appendix 16)

雄では、対照群の 1 例 (動物番号 M01002) の前胃粘膜にシストがみられ、別の 1 例 (動物番号 M01008) の肺には暗赤色領域が散在していた。30 mg/kg 投与群では 1 例 (動物番号 M02006) で両側の精巣および精巣上体が小型化を呈し、100 mg/kg 投与群では 1 例 (動物番号 M03013) の左側精巣上体尾部に黄白色結節が認められた。300 mg/kg 投与群では、1 例 (動物番号 M04001) の右側精巣上体尾部に黄白色結節が、別の 1 例 (動物番号 M04002) では左側の精巣および精巣上体の小型化、両側の腎臓の大型化が認められた。

雌では、対照群では肉眼的な異常は観察されなかった。30 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号 F02002) では、両側の腎臓が淡色化を呈し表面が粗造であった。100 mg/kg 投与群では、3 例 (動物番号 F03006、F03008、F03012) で前胃粘膜が水腫様を呈し、別の 1 例 (動物番号 F03010) では前胃粘膜が肥厚していた。また、小腸壁の肥厚が 3 例 (動物番号 F03008、F03012、F03013) にみられた。このうち 2 例は前胃粘膜が水腫様を呈していた動物であった。300 mg/kg 投与群では、3 例 (動物番号 F04004、F04006、F04010) で前胃粘膜が水腫様を呈し、このうち 1 例 (動物番号 F04004) の腺胃粘膜には暗色物の付着が、2 例 (動物番号 F04004、F04010) では小腸壁の肥厚が観察された。さらに 1 例 (動物番号 F04010) で空腸と回腸の間に憩室がみられた。

300 mg/kg 投与群に認められた 2 例の死亡動物のうち、妊娠 22 日に死亡した 1 例の雌 (動物番号 F04002) では、鼻周囲の汚れ (赤色)、両側副腎の淡色化、腺胃粘膜に黒色物の付着、肺に暗赤色領域の散在、脾臓の淡色化、胸腺の小型化が認められた。この例の子宮内には死亡胎児 (雄 6 匹、雌 10 匹) が観察された。妊娠 23 日に分娩中に死亡した 1 例の雌 (動物番号 F04008) では、鼻周囲、外陰部周囲に被毛の汚れが観察され、両側副腎の大型化、肺の水腫様、退縮不全および暗赤色領域の散在、脾臓の小型化および淡色化が認められた。この動物では、10 匹 (雄 5 匹、雌 5 匹) が生まれていたが、いずれも死亡していた。さらに右子宮角内に 8 例の死亡胎児 (雄 2 匹、雌 6 匹) が観察された。なお、胎児および産児の外表には異常は認められなかった。

さらに同群で哺育期間中に全児が死亡した 2 例のうち、分娩日に全ての産児が死亡した 1 例の雌 (動

物番号 F04011)では脾臓が小型化を呈していた。哺育 1 日に全ての出生児が死亡した 1 例の雌(動物番号 F04007)では、前胃粘膜の水腫様、小腸壁の肥厚、脾臓の淡色化が認められた。

妊娠 25 日相当日まで出産が確認されなかった 100 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号:F03003)は、子宮に 2 つの胎盤遺残が認められた(後述)が、それ以外の内部器官に異常は認められなかった。

交配期間中に交尾が確認されなかった 300 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号:F04013)では、剖検した結果、子宮に着床痕は認められず、それ以外の内部器官にも異常は認められなかった。

6)病理組織学的検査(Table 17, Table 18, Appendix 17～Appendix 18)

①雄の観察期間終了時屠殺例

肝臓では、対照群を含む各投与群に門脈周囲性の肝細胞の脂肪化および小肉芽腫が観察されたが、PEP 各投与群と対照群との間に程度および頻度の差は認められなかった。

胃では、300 mg/kg 投与群の 3 例(動物番号 M04004、M04010、M04013)の前胃に扁平上皮細胞の過形成が観察された。剖検時に、前胃粘膜にシストが観察された対照群の 1 例(動物番号 M01002)では、前胃粘膜固有層にごく軽度な水腫が認められた。

精巣では、300 mg/kg 投与群の 4 例(動物番号 M04001、M04002、M04006、M04011)および対照群の 1 例(動物番号 M01003)の両側あるいは片側に限局性の精細管萎縮が観察された。300 mg/kg 投与群の 4 例のうち、剖検時に小型化が認められた 1 例(動物番号 M04002)では、片側が顕著に萎縮しており、ライディヒ細胞のびまん性の過形成も伴っていた。剖検時に両側の精巣および精巣上体が小型化を呈していた 30 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 M02006)には、組織学的な異常所見は観察されなかった。

精巣上体では、剖検時に小型化が認められた例(動物番号 M04002)では、管腔内に細胞残屑および明らかな精子の減少が観察され、精巣上体尾部に黄白色結節が認められた 100 mg/kg (動物番号 M03013)および 300 mg/kg 投与群(動物番号 M04001)の各 1 例では、精子肉芽腫が観察された。

その他、剖検時に肉眼的な異常所見が認められた対照群の肺(動物番号 M01008)では、褐色色素の沈着を伴う限局性の出血、肺泡に泡沫細胞の集簇および動脈周囲の好酸球浸潤が観察された。また、両側の腎臓に大型化が認められた 300 mg/kg 投与群の例(動物番号 M04002)では、組織学的な異常所見は観察されなかった。

②雌の観察期間終了時屠殺例(哺育 5 日剖検)

哺育 5 日に剖検を実施した動物数は、対照群 13 例、30 mg/kg 投与群 13 例、100 mg/kg 投与群 12 例、100 mg/kg 投与群 8 例であった。

肝臓では、対照群を含む各群に小肉芽腫が観察されたが、対照群と PEP 各投与群との間に程度および頻度の差は認められなかった。また、対照群および 300 mg/kg 投与群の各 1 例の被膜下に限局性の壊死巣が、対照群の 2 例に門脈周囲性の肝細胞の脂肪化が観察された。その他、30 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 F02002)の小葉中間帯の肝細胞に細胞質の空胞化がみられた。

胃では、100 mg/kg 投与群の 3 例および 300 mg/kg 投与群の全例(8 例)の前胃に扁平上皮細胞の過形成が観察された。このうち、100 mg/kg 投与群の 2 例および 300 mg/kg 投与群の 5 例には前

胃粘膜固有層には水腫も認められ、300 mg/kg 投与群では、さらに2例にびらんも認められた。また、100 mg/kg 投与群の別の2例には前胃粘膜固有層に水腫が認められた。なお、剖検時に胃粘膜に水腫様変化が観察された100 mg/kg 投与群の3例のうち1例(動物番号 M03012)では病理組織学的変化は認められなかった。なお、300 mg/kg 投与群で観察された前胃の粘膜固有層の水腫および扁平上皮細胞の過形成の発現頻度は、対照群と比較して有意に高く($p<0.01$)なり、程度も有意(粘膜固有層の水腫: $P<0.05$, 扁平上皮細胞の過形成: $P<0.01$)に強く認められた。

卵巣では、対照群および300 mg/kg 投与群に組織学的な異常所見は認められなかった。

剖検時に肉眼的異常として、小腸壁の肥厚が認められた100 mg/kg 投与群の3例および300 mg/kg 投与群の2例のうち、100 および 300 mg/kg 投与群の各2例の十二指腸では粘膜の肥厚が観察された。空腸ならびに回腸には組織学的な変化は観察されなかった。残りの100 mg/kg 投与群の1例では、十二指腸、空腸および回腸には組織学的変化は観察されなかった。また、空腸と回腸の間に憩室が認められた300 mg/kg 投与群の1例(動物番号 F04010)では、筋層が部分的に欠如した憩室が観察された。両側の腎臓が淡色、表面粗造であった30 mg/kg 投与群の1例(動物番号 F02002)では、皮質および髄質に多数の好塩基性尿細管が観察されたほか、皮質および髄質に硝子円柱、皮質の近位尿細管上皮に変性/壊死、皮質の遠位尿細管管腔の拡張がみられた。

③観察期間中に死亡した母動物

300 mg/kg 投与群で妊娠22日に1例(動物番号 F04002)、妊娠23日の分娩中に1例(動物番号 F04008)、母動物が死亡した。

肝臓では、2例ともに小葉中間帯の肝細胞細胞質に空胞化が観察され、クッパー細胞がび漫性に増生していた。胃では、前胃(動物番号 F04008)あるいは腺胃(動物番号 F04002)の粘膜のびらんが、それぞれ観察された。腎臓では、2例ともに皮質および髄質に多数の硝子円柱がみられたほか、皮質の近位尿細管の細胞質に硝子様の滴状物および空胞化が認められた。脾臓では、2例ともに赤脾髄および白脾髄領域が減少していた。褐色色素の沈着は認められたが、髄外造血はごく軽度にしかな観察されなかった。肺では、2例ともに水腫を呈していた。卵巣、脳および心臓には組織学的な異常所見は認められなかった。剖検時に肉眼的異常として胸腺の小型化および副腎の淡色が認められた例(動物番号 F04002)では、胸腺ではリンパ球の核濃縮を伴う明らかな萎縮が、副腎では皮質の類洞に限局性のうっ血が観察された。

④全哺育児が死亡した母動物

300 mg/kg 投与群で、哺育0日(動物番号 F04011)および哺育1日(動物番号 F04007)に全哺育児が死亡した腹が各1例観察された。

肝臓では、1例(動物番号 F04007)の小葉中間帯の肝細胞細胞質に空胞化が観察されたが、他の1例(動物番号 F04011)には、組織学的な異常所見は認められなかった。胃では、1例(動物番号 F04011)の前胃に穿孔が認められ、粘膜固有層には水腫が観察された。また、他の1例(動物番号 F04007)の前胃粘膜にはびらんが認められ、扁平上皮は過形成を呈していた。腎臓では、2例ともに皮質に近位尿細管の細胞質の空胞化がみられた。このうち1例(動物番号 F04011)には皮質および髄質

に硝子円柱が観察された。脾臓では、2 例ともに赤脾髄および白脾髄領域が減少しており、褐色色素の沈着は両例に認められたが、髄外造血は 1 例(動物番号 F04011)にしか観察されなかった。肺では、1 例(動物番号 F04007)の肺胞に泡沫細胞の集簇が観察されたが、他の1例(動物番号 F04011)には、組織学的な異常所見は認められなかった。卵巣、脳および心臓、剖検時に肉眼的異常が認められた小腸(壁肥厚、動物番号 F04007)には、組織学的な異常所見は認められなかった。

⑤未交尾あるいは未分娩雌動物

交配期間中に交尾が確認されなかった 300 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 F04013)の卵巣、肝臓および胃の病理組織学的検査の結果、卵巣に異常組織所見は認められなかったが、肝臓に小肉芽腫および胃の前胃粘膜に扁平上皮の過形成が観察された。

妊娠 26 日相当日に剖検した 100 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 F03003)の肝臓、胃、脳、心臓、肺、腎臓の病理組織学的検査の結果、異常所見は認められなかった。

2. 生殖能力

1)性周期および交配成績(Table 19, Table 20, Appendix 19～Appendix 20)

性周期には、PEP 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。交配の結果、交配期間中に交尾が確認されなかった動物が 300 mg/kg 投与群に 1 例(動物番号 F04013)認められたが、交尾率および受胎率には PEP 投与の影響はみられなかった。また、交尾までの日数およびその間の発情回数にも、対照群と PEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2)出産率および妊娠期間(Table 21, Appendix 21)

妊娠期間には対照群と PEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

出産率は対照群と PEP 各投与群との間に有意差は認められなかったが、300 mg/kg 投与群では妊娠末期に妊娠動物が 2 例死亡し、別の 1 例では出産日に全産児が死亡した。

3)分娩および哺育状態(Table 21, Appendix 21)

100 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 F03003)は出産しなかった(後述)。

300 mg/kg 投与群の 2 例が妊娠 22 日あるいは妊娠 23 日の分娩中に死亡した(前述)。

300 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 F04007)において、分娩終了後に出生児を集めず、児を舐めるといった哺育行動が観察されなかった。児にも腹部にミルクスポット(母乳が貯留している様子)はみられず、授乳している状態ではないと考えられたため分娩状態不良と判断した。この動物は哺育 1 日に全児が死亡した。また、別の 1 例(動物番号 F04011)では哺育 0 日に全児(雄 8 匹、雌 4 匹)が死亡した。死亡児の多くは、身体の一部に母動物による食害が認められたことから、分娩不良と判断した。30 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 F02002)は、母動物の一般状態および哺育行動に異常は認められなかったが、哺育期間中に体重が減少し、餌はほとんど摂取していなかった。また、死亡児が哺育 2 日から観察され、生存哺育児の体重も増加しなかった。さらに、母動物の剖検所見および病理組織所見(前述)から腎機能の異常が示唆された。

他の妊娠動物は妊娠 22～23 日に出産し、分娩状態および哺育状態に異常は認められなかった。ま

た、妊娠期間および出産率には対照群と PEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

4) 黄体数、着床数および着床率 (Table 21, Appendix 21)

100 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号 F03003) では、妊娠 25 日までに分娩が確認されなかった。剖検の結果、着床痕 (右:1、左:1) および黄体 (右:6、左:11) が確認されたものの、胎盤遺残よりも大きな死亡児は認められず、早期全胚吸収例であったと判断した。この動物の黄体数は妊娠黄体と胚吸収後の排卵による黄体との区別が困難であることから、評価から除外した。

黄体数、着床数および着床率には、対照群と PEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3. 出生児

1) 生存 (Table 21, Appendix 21)

分娩率、生児出産率、出生率、新生児生存率および性比には、対照群と PEP 各投与群との間に有意差は認められなかったが、300 mg/kg 投与群の 1 例で全産児が出産日に死亡し、哺育 4 日までに別の 1 例で全哺育児が死亡した。

2) 体重 (Table 22, Appendix 22)

哺育 0 および 4 日における出生児の体重には、対照群と PEP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3) 出生児観察 (Table 23, Table 24, Appendix 23)

30 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号 F02012) では、哺育 0 日の外表奇形観察時に無尾および鎖肛が 1 例の雄出生児に観察された。この児は哺育 4 日の剖検時まで生存していた。剖検した結果、直腸の低形成が観察された。その他の生存児には哺育 0～4 日に外表奇形は観察されなかった。また、哺育 4 日に剖検した結果、異常は認められなかった。

死亡児は対照群を含む各投与群に認められたが、300 mg/kg 投与群の 2 腹で全児死亡、30 mg/kg 投与群の 1 例の母動物で哺育不良があったために、総死亡数が対照群と比較して多かった。死亡児には、母動物の食害により存在が不明になったと推察される児 (不明児)、あるいは死後経過が進み自己融解により内臓観察ができなかった児を含むが、剖検が可能であった死亡児には外表奇形は観察されず、内臓観察が可能であった死亡児についても内臓に異常は認められなかった。

考察

雌雄ラットの交配前 (2 週間) および交配期間中ならびに、雄では交配期間終了後を通して計 42 日間、雌では交配期間終了後、妊娠期間を通して周産期 (哺育 4 日まで) に PEP の 30、100 および 300 mg/kg を経口投与し、雌雄ラットに対する生殖毒性について検討した。

前述の通り、300 mg/kg 投与群では妊娠末期に 2 例の母動物が死亡し、哺育期間中に 2 例で全哺育児が死亡した。これらの母動物では、投与開始後に PEP の投与によると考えられる一般状態の変化が認められていた。肺、胸腺、胃、脾臓、肝臓、腎臓に観察された病理組織所見から、強度のストレス、循

環障害、貧血状態であったことや肝および腎機能の異常が示唆された。また、胃の病理組織学所見には投与終了時に解剖した動物の変化と同様な変化も認められていた。これらのことから、妊娠期間中から観察されていた一般状態の変化に加え、妊娠・出産という負荷がかかり母動物の状態が悪化し、母動物が死亡あるいは哺育が維持できなかったと考えられた。

30 mg/kg 投与群の 1 例では、哺育期間中の母動物体重および哺育児体重の増加抑制、摂餌量の減少がみられ、母動物の剖検および病理組織学的検査の結果から、腎機能の異常が示唆された。しかし、他の動物には同様な変化は認められていないことや、既報¹⁾の結果および本試験の投与終了時の剖検および病理組織学的検査の結果から考えると、この動物に認められた腎臓の異常は PEP による変化ではないと考えられた。

一般状態観察では、300 mg/kg 投与群において雌雄ともに自発運動の低下および流涎がみられた。本被験物質の 28 日間反復経口投与毒性試験¹⁾において、100、300 および 1000 mg/kg の PEP を雌雄ラットに反復経口投与した結果、雌雄とも 1000 mg/kg 投与により、投与直後によるめき歩行、流涎が観察されている。本試験での一般状態の変化は、28 日反復経口投与毒性試験において認められた変化と類似した変化であり、PEP 投与による影響と考えられた。

雌の 100 mg/kg 投与群の妊娠 20 日の体重が有意に低下したが、これは子宮内に 2 つの胎盤遺残のみが観察された 1 例の妊娠期間中期以降の体重が小さかったためであると考えられた。しかし、他の 100 および 300 mg/kg 投与群の雌動物では、早期吸収胚が増加する傾向は認められず、着床率および分娩率にも対照群と PEP 各投与群との間に差は認められていないことから、PEP 投与による妊娠期間中の体重増加抑制あるいは早期胚致死作用はないと判断した。

器官重量測定では、雌雄ともに 300 mg/kg 投与群で肝臓の相対重量の増加がみられた。肝臓重量の増加は既報¹⁾においても認められていることから PEP 投与による影響と考えられた。しかし、既報¹⁾と同様に、肝臓の病理組織学検査では重量の増加を示唆する変化は認められなかった。また、100 mg/kg 投与群で精巣上体重量の増加がみられたが、相対重量には差は認められていないこと、300 mg/kg 投与群では同様な変化はみられず、剖検および病理組織学的検査においても変化がみられなかったことから偶発的な変化と考えられた。

投与終了時の解剖時に、雌では 100 mg/kg 以上の投与群で前胃粘膜の水腫様変化および小腸壁の肥厚が認められ、病理組織学的検査では、雌では 100 mg/kg 以上の投与群で前胃の粘膜固有層に水腫および扁平上皮細胞の過形成、十二指腸粘膜の肥厚が、雄では 300 mg/kg 投与群で前胃に扁平上皮細胞の過形成が認められた。PEP が皮膚、粘膜に刺激性を持つこと²⁾や、既報¹⁾の 300 mg/kg 以上の投与群においても同様な変化が認められていることから、本試験の 100 および 300 mg/kg 投与群に観察された胃および十二指腸粘膜の変化は PEP 投与による影響であると考えられる。

雄では、100 および 300 mg/kg 投与群の少数例で精巣、精巣上体に病理組織学的変化が認められたが、いずれの動物も妊娠し、産児数にも PEP 投与による影響が認められていないことから、雄生殖器系への影響はないと考えられた。

交配期間中に 300 mg/kg 投与群の 1 組で交尾が確認されなかった。この雌の性周期は交配前の投与期間では性周期は規則的に回帰していたが、交配後は性周期が回帰しなかった。また、この雌雄の生殖器官に病理組織学的異常はなく、一般状態にも異常はなかったことから、同居により、一時的に性周期が回帰しなくなったと考えられた。なお、同群の他の動物では全て交尾が確認され、受胎している。したがって、性周期、交配成績に PEP による影響はないと判断した。

妊娠期間、黄体数、着床数および着床率、産児数、分娩率には PEP 投与による影響は認められなかった。出生児の性比、一般状態、体重にも PEP 投与による影響はみられなかった。300 mg/kg 投与群において、2 例が周産期に死亡し、2 例で全哺育児が死亡したことから、分娩状態、哺育状態、出生児の生存性に PEP 投与による影響が示唆されたが、生存児には被験物質による影響が認められないことから、出生児の死亡は、児動物に対する直接的な影響ではなく、親動物への影響によるものと考えられる。哺育 0 日の外表奇形観察時に、30 mg/kg 投与群の 1 例で無尾および鎖肛が観察されたが、その他の児に同様の異常は観察されなかったことから、自然発生奇形と推察された。

以上の結果から、本試験条件下における PEP の親動物に対する一般毒性学的無毒性量は、雄では 100 mg/kg/day、雌では 30 mg/kg/day、生殖発生毒性学的な無毒性量は 100 mg/kg/day、次世代に対する無毒性量は 100 mg/kg/day と考えられた。

参考文献

- 1) 4-エチルフェノールのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験
(http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper123-07-9b.html)
- 2) Chemical book, 4-ethylphenol (123-07-9) (<http://www.chemicalbook.com/>)

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 1. General conditions of male rats

Group	Number of males and general conditions	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		
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post			
Olive oil (vehicle)	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13			
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13				
	Mouth, Salivation	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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Behavior, Decrease in locomotor activity	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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
PEP 30 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	Mouth, Salivation	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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Behavior, Decrease in locomotor activity	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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
PEP 100 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	Mouth, Salivation	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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Behavior, Decrease in locomotor activity	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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
PEP 300 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	11	13	12	13	12	13	13	13	13	13	13	13	13	11	13	12	13	13	13	13	13	13	13	13	13	12	13	11	13	11	13	11	13	12	13	13	12	13	11	13	13	13	13	12	13	13	13			
	Mouth, Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	0	1	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0			
	Behavior, Decrease in locomotor activity	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0				
Pre: Before administration, Post: After administration.																																																				

Pre: Before administration, Post: After administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 1 (continued). General conditions of male rats

Group	Number of males and general conditions	Days of administration																																			
		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		39		40		41		42		43	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Olive oil (vehicle)	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	Mouth, Salivation	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	0	0	0	0	0	0	
	Behavior, Decrease in locomotor activity	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	0	0	0	0	0	0	
PEP 30 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	Mouth, Salivation	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	0	0	0	0	0	0	
	Behavior, Decrease in locomotor activity	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	0	0	0	0	0	0	
PEP 100 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	Mouth, Salivation	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	0	0	0	0	0	0	
	Behavior, Decrease in locomotor activity	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	0	0	0	0	0	0	
PEP 300 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	12	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	12	13	12	13	11	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	Mouth, Salivation	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Behavior, Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Pre: Before administration, Post: After administration.

Table 2. General conditions of female rats

Pre: Before administration, Post: After administration.

Table 2 (continued). General conditions of female rats

Pre: Before administration, Post: After administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 3. General conditions of dams during pregnancy

Group	Number of dams and general conditions	Days of pregnancy																											
		0		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Olive oil (vehicle)	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	Behavior, Decrease in locomotor activity	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
	Anorectal region, Soiled perineal region	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
PEP 30 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	Behavior, Decrease in locomotor activity	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
	Anorectal region, Soiled perineal region	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
PEP 100 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	Behavior, Decrease in locomotor activity	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
	Anorectal region, Soiled perineal region	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
PEP 300 mg/kg	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	12	12	12	12	12	12
	General appearance, No abnormality	11	10	11	8	12	11	12	11	12	11	12	11	12	12	12	12	12	11	12	10	12	11	12	12	12	12	12	12
	Behavior, Decrease in locomotor activity	0	1	0	3	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0
	Anorectal region, Soiled perineal region	1	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

Pre: Before administration, Post: After administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 3 (continued). General conditions of dams during pregnancy

Group	Number of dams and general conditions	Days of pregnancy																											
		14		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26			
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Olive oil (vehicle)	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Behavior, Decrease in locomotor activity	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	
	General appearance, Death	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	
PEP 30 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Behavior, Decrease in locomotor activity	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	
	General appearance, Death	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	
PEP 100 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	5	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Behavior, Decrease in locomotor activity	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	
	General appearance, Death	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	
PEP 300 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	General appearance, No abnormality	12	12	12	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	12	8	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Behavior, Decrease in locomotor activity	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	General appearance, Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	

Pre: Before administration, Post: After administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 4. General conditions of dams during lactation

Group	Number of dams and general conditions	Days of lactation										
		0		1		2		3		4		5
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre
Olive oil (vehicle)	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	Behavior, Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEP 30 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	Behavior, Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEP 100 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Behavior, Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEP 300 mg/kg	Number of dams	10	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8
	General appearance, No abnormality	10	7	9	8	8	8	8	7	8	8	8
	Behavior, Decrease in locomotor activity	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Pre: Before administration, Post: After administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 5. Body weights of male rats

Group		Olive oil (vehicle)	PEP 30 mg/kg	PEP 100 mg/kg	PEP 300 mg/kg
Number of males		13	13	13	13
Days of administration					
	1	363.5 ± 15.0	359.7 ± 12.1	362.2 ± 12.5	359.9 ± 12.6
	7	386.3 ± 16.7	383.8 ± 14.1	386.9 ± 15.3	380.4 ± 18.2
	14	409.1 ± 19.3	407.2 ± 13.7	406.7 ± 17.8	403.5 ± 21.9
	21	428.1 ± 22.1	425.4 ± 14.8	429.6 ± 19.0	422.2 ± 24.4
	28	454.2 ± 23.7	454.6 ± 22.6	454.6 ± 21.7	445.0 ± 25.2
	35	476.0 ± 24.7	477.5 ± 28.0	473.1 ± 25.0	465.2 ± 28.0
	42	488.5 ± 24.6	495.9 ± 29.1	492.9 ± 26.1	483.1 ± 29.6

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 6. Body weights of female rats

Group	Olive oil (vehicle)	PEP 30 mg/kg	PEP 100 mg/kg	PEP 300 mg/kg
Number of females	13	13	13	13
Days of administration				
1	232.4 ± 10.1	230.4 ± 5.0	229.2 ± 10.8	233.2 ± 10.5
7	239.3 ± 9.2	238.9 ± 10.1	237.4 ± 11.7	244.5 ± 14.2
14	244.8 ± 12.1	245.9 ± 10.2	241.9 ± 13.1	254.0 ± 15.8

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 7. Body weights of dams during pregnancy

Group	Olive oil (vehicle)	PEP 30 mg/kg	PEP 100 mg/kg	PEP 300 mg/kg
Number of dams	13	13	13	12
Days of pregnancy				
0	255.2 ± 16.2	257.6 ± 12.0	248.8 ± 14.2	257.7 ± 12.8
7	290.8 ± 14.8	296.5 ± 13.9	282.1 ± 15.3	292.5 ± 15.7
14	328.5 ± 18.1	333.3 ± 18.3	318.4 ± 16.3	326.6 ± 20.6
20	409.0 ± 22.5	415.7 ± 26.2	384.7 ± 23.8 *	399.8 ± 20.9

Each value shows mean ± S.D. (g).

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 8. Body weights of dams during lactation

Group	Olive oil (vehicle)	PEP 30 mg/kg	PEP 100 mg/kg	PEP 300 mg/kg
Number of dams	13	13	12	10
Days of lactation				
0	304.9 ± 21.6	304.5 ± 21.6	286.8 ± 20.0	291.8 ± 23.2
4	325.5 ± 24.5	323.2 ± 35.7	312.7 ± 16.7	313.6 ± 26.5 (8)

Each value shows mean ± S.D. (g).

Figures in parentheses indicate number of dams.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 9. Food consumption of male rats

Group		Olive oil (vehicle)	PEP 30 mg/kg	PEP 100 mg/kg	PEP 300 mg/kg
Number of males		13	13	13	13
Days of administration					
	1	25.5 ± 2.3	25.3 ± 3.6	26.1 ± 2.3	23.5 ± 2.6
	7	23.1 ± 2.6	22.7 ± 1.5	23.9 ± 2.0	23.2 ± 2.4
	14	23.1 ± 2.6	22.7 ± 2.0	23.6 ± 1.5	22.4 ± 3.9
	29	23.4 ± 2.3	24.1 ± 2.8	23.8 ± 2.1	24.2 ± 2.4
	35	22.5 ± 3.1	23.5 ± 3.2	23.7 ± 2.0	23.5 ± 2.3
	41	25.0 ± 2.5	25.8 ± 2.8	26.6 ± 2.1	25.9 ± 2.3

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 10. Food consumption of female rats

Group	Olive oil (vehicle)	PEP 30 mg/kg	PEP 100 mg/kg	PEP 300 mg/kg
Number of females	13	13	13	13
Days of administration				
1	16.7 ± 3.2	18.1 ± 3.2	17.7 ± 3.1	17.2 ± 3.5
7	16.0 ± 2.9	16.7 ± 4.2	14.3 ± 3.7	17.2 ± 3.4
14	18.6 ± 2.6	19.0 ± 3.7	17.7 ± 2.9	20.8 ± 1.7

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 11. Food consumption of dams during pregnancy

Group	Olive oil (vehicle)	PEP 30 mg/kg	PEP 100 mg/kg	PEP 300 mg/kg
Number of dams	13	13	13	12
Days of pregnancy				
0	17.3 ± 4.4	21.6 ± 5.6	17.3 ± 2.4	18.8 ± 3.4
7	23.3 ± 2.1	24.0 ± 2.6	21.9 ± 2.8	24.4 ± 3.1
14	24.1 ± 2.3	23.3 ± 2.6	22.3 ± 1.8	24.4 ± 2.9
20	19.2 ± 3.7	16.7 ± 5.2	17.9 ± 4.3	14.6 ± 6.9

Each value shows mean ± S.D. (g).

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 12. Food consumption of dams during lactation

Group	Olive oil (vehicle)	PEP 30 mg/kg	PEP 100 mg/kg	PEP 300 mg/kg
Number of dams	13	13	12	8
Days of lactation	3			
	41.1 ± 4.8	36.8 ± 11.9	39.8 ± 4.1	36.4 ± 11.5

Each value shows mean ± S.D. (g).

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 13. Organ weights of male rats

Group		Olive oil (vehicle)		PEP 30 mg/kg		PEP 100 mg/kg		PEP 300 mg/kg	
Number of males		13		13		13		13	
Body weight	(g)	466.7	± 25.3	471.9	± 27.2	469.6	± 25.1	459.3	± 28.1
Liver	(mg)	12551.8	± 978.0	12789.1	± 1278.3	13026.4	± 1193.6	13121.4	± 1326.3
	(mg/g)	26.886	± 1.326	27.066	± 1.607	27.720	± 1.772	28.528	± 1.612 *
Testes	(mg)	3185.2	± 345.3	3344.5	± 370.3	3270.9	± 276.4	3262.6	± 369.8
	(mg/g)	6.846	± 0.843	7.122	± 1.016	6.984	± 0.709	7.115	± 0.793
Epididymides	(mg)	1151.8	± 103.6	1230.5	± 85.5	1261.6	± 73.3 *	1203.4	± 112.6
	(mg/g)	2.477	± 0.286	2.622	± 0.300	2.689	± 0.143	2.628	± 0.274
Prostate, ventral	(mg)	584.3	± 140.8	567.1	± 84.8	643.0	± 110.2	621.6	± 107.7
	(mg/g)	1.250	± 0.285	1.204	± 0.184	1.370	± 0.233	1.359	± 0.252
Seminal vesicles	(mg)	1609.7	± 327.2	1668.7	± 300.9	1850.6	± 207.3	1565.7	± 222.2
	(mg/g)	3.450	± 0.683	3.541	± 0.622	3.943	± 0.421	3.421	± 0.524

Each value shows mean ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 14. Organ weights of female rats

Group		Olive oil (vehicle)		PEP 30 mg/kg		PEP 100 mg/kg		PEP 300 mg/kg	
Number of females		13		13		12		8	
Body weight	(g)	290.2	± 18.7	290.5	± 28.7	280.8	± 11.8	277.7	± 17.1
Liver	(mg)	9529.2	± 636.3	9788.6	± 997.6	9124.2	± 535.1	10058.2	± 1042.6
	(mg/g)	32.854	± 1.367	33.731	± 1.621	32.506	± 1.488	36.208	± 2.896 **
Ovaries	(mg)	94.2	± 12.8	100.9	± 13.8	96.7	± 12.1	98.4	± 9.5
	(mg/g)	0.325	± 0.045	0.349	± 0.044	0.345	± 0.045	0.354	± 0.029

Each value shows mean ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 15. Macroscopic findings of male rats

Findings	Group	Olive oil (vehicle)		PEP 30 mg/kg		PEP 100 mg/kg		PEP 300 mg/kg	
	Grade	-	P	-	P	-	P	-	P
Epididymis									
Nodule, yellowish-white, caudal, unilateral		13	0	13	0	12	1	12	1
Small, unilateral/bilateral		13	0	12	1	13	0	12	1
Forestomach									
Cyst, mucosa		12	1	13	0	13	0	13	0
Kidney									
Enlargement, bilateral		13	0	13	0	13	0	12	1
Lung									
Dark colored spot/area, scattered		12	1	13	0	13	0	13	0
Testis									
Small, unilateral/bilateral		13	0	12	1	13	0	12	1

Notes) - : No abnormal changes P : Non-graded change

Numerals represent the number of animals.

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 16. Macroscopic findings of female rats

Findings	Group	Olive oil (vehicle)		PEP 30 mg/kg		PEP 100 mg/kg		PEP 300 mg/kg	
	Grade	-	P	-	P	-	P	-	P
Forestomach									
Edematous, mucosa		13	0	13	0	9	3	5	3
Thickening, mucosa		13	0	13	0	11	1	8	0
Glandular stomach									
Attachment, dark colored content, mucosa		13	0	13	0	12	0	7	1
Kidney									
Discoloration, pale colored, bilateral		13	0	12	1	12	0	8	0
Rough surface, bilateral		13	0	12	1	12	0	8	0
Small intestine									
Diverticulum ^{a)}		13	0	13	0	12	0	7	1
Thickening, wall		13	0	13	0	9	3	6	2

Notes) - : No abnormal changes P : Non-graded change

a) between jejunum and ileum

Numerals represent the number of animals.

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 17. Histopathological findings of male rats

Findings	Group Grade	Olive oil (vehicle)							PEP 30 mg/kg							PEP 100 mg/kg							PEP 300 mg/kg							
		-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	
Liver																														
Fatty change, hepatocyte, periportal		2	8	3	0	0			4	7	2	0	0			1	11	1	0	0			5	8	0	0	0			
Microgranuloma		5	8	0	0	0			3	10	0	0	0			2	11	0	0	0			5	7	1	0	0			
Stomach																														
Edema, lamina propria, forestomach		12	1	0	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			
Hyperplasia, squamous cell, forestomach		13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			10	3	0	0	0			
Testis																														
Atrophy, seminiferous tubule, focal, unilateral/bilateral		12	1	0	0	0			1	0	0	0	0									9	3	0	0	0	1			
Hyperplasia, Leydig cell, unilateral		13	0	0	0	0			1	0	0	0	0									12	0	1	0	0				
Epididymis																														
Cell debris, lumen, unilateral		13	0	0	0	0			1	0	0	0	0			1	0	0	0	0			12	0	1	0	0			
Decrease, sperm, lumen, unilateral		13	0	0	0	0			1	0	0	0	0			1	0	0	0	0			12	0	0	0	0	1		
Granuloma, spermatic, unilateral		13	0	0	0	0			1	0	0	0	0			0	0	1	0	0			12	0	1	0	0			
Kidney																														
																						1								
Lung																														
Accumulation, foam cell, alveolus		0	0	1	0	0																								
Cellular infiltration, eosinophil, periarterial		0	0	1	0	0																								
Hemorrhage, focal, with deposition of the brown pigment		0	0	1	0	0																								

Notes) -: No abnormal changes ±: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked

P: Non-graded change NE: Not examined

Numerals represent the number of animals.

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 18. Histopathological findings of female rats

Findings	Group Grade	Olive oil (vehicle)							PEP 30 mg/kg							PEP 100 mg/kg							PEP 300 mg/kg						
		-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE
Liver																													
Fatty change, hepatocyte, periportal		11	2	0	0	0			13	0	0	0	0			12	0	0	0	0			8	0	0	0	0		
Microgranuloma		8	5	0	0	0			8	4	1	0	0			8	4	0	0	0			2	6	0	0	0		
Necrosis, focal, subserosa		12	1	0	0	0			13	0	0	0	0			12	0	0	0	0			7	1	0	0	0		
Vacuolation, cytoplasmic, hepatocyte, midlobular		13	0	0	0	0			12	0	1	0	0			12	0	0	0	0			8	0	0	0	0		
Stomach																													
Edema, lamina propria, forestomach		13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			8	4	0	0	0			3	4	1	0	0	*	##
Erosion, mucosa, forestomach		13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			12	0	0	0	0			6	1	1	0	0		
Hyperplasia, squamous cell, forestomach		13	0	0	0	0			13	0	0	0	0			9	3	0	0	0			0	7	1	0	0	**	##
Ovary		13																				8							
Duodenum																													
Thickening, mucosa																1	2	0	0	0			0	1	1	0	0		
Ileum																3							2						
Jejunum																													
Diverticulum, partial deficit of muscular layer																3					0		1					1	
Kidney																													
Basophilic tubule, cortex/medulla									0	0	0	1	0																
Cast, hyalin, cortex/medulla									0	0	1	0	0																
Degeneration/necrosis, proximal tubular epithelium, cortex									0	0	1	0	0																
Dilatation, lumen, distal tubule, cortex									0	0	1	0	0																

Notes) -: No abnormal changes ±: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked

P: Non-graded change NE: Not examined

Numerals represent the number of animals.

**, P<0.01: Significantly different from control (Two-tailed Mann-Whitney U test).

*, P<0.05: Significantly different from control (Two-tailed Mann-Whitney U test).

##, P<0.01: Significantly different from control (One-tailed Fisher exact test).

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 19. Results of observations about estrous cycle

Dose	Olive oil(vehicle)	PEP 30mg/kg	PEP 100mg/kg	PEP 300mg/kg
Number of animals examined	13	13	13	13
<u>Pre-treatment period</u>				
Number of animals showing type of cycle				
4-day cycle	12	12	12	10
4 and 5-day cycle	0	0	0	2
5-day cycle	1	1	1	1
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D. (N)	4.1 ± 0.3 (13)	4.1 ± 0.3 (13)	4.1 ± 0.3 (13)	4.2 ± 0.3 (13)
<u>Treatment period</u>				
Number of animals showing each type of cycle				
4-day cycle	12	12	12	8
4 and 5-day cycle	1	0	1	3
5-day cycle	0	1	0	1
irregular	0	0	0	1
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D. (N)	4.0 ± 0.1 (13)	4.1 ± 0.3 (13)	4.0 ± 0.1 (13)	4.2 ± 0.3 (12)
Frequency of animals of which type of estrus cycle was changed after the treatment	1 / 13	0 / 13	1 / 13	4 / 13
Mean times of vaginal estrus during mating period; Mean±S.D. (N)	1.0 ± 0.0 (13)	1.2 ± 0.4 (13)	1.0 ± 0.0 (13)	0.9 ± 0.3 (13)

Significantly different from the control group (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$).

Figure in parentheses indicate the number of animal.

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 20. Results of observations about reproductive performance

Dose	Olive oil(vehicle)	PEP 30mg/kg	PEP 100mg/kg	PEP 300mg/kg
Number of mated pairs [A]	13	13	13	13
Number of copulated pairs [B]	13	13	13	12
Copulation index [(B/A)×100,%]	100.0	100.0	100.0	92.3
Number of fertile males [C]	13	13	13	12
Fertility index [(C/B)×100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Pairing days until copulation ; Mean±S.D.(N)	2.5 ± 1.1 (13)	3.2 ± 2.1 (13)	1.8 ± 1.0 (13)	2.2 ± 0.8 (12)

Significantly different from the control group (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$).

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in ratsTable 21. Observation of offspring (F₁)

Group	Olive oil (vehicle)	PEP 30 mg/kg	PEP 100 mg/kg	PEP 300 mg/kg
Number of dams	13	13	12	10
Gestation length (days)				
Mean ± S.D. per dam	22.1 ± 0.3	22.3 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.3 ± 0.5
Number of corpora lutea				
Total	209	213	182	195
Mean ± S.D. per dam	16.1 ± 2.1	16.4 ± 1.4	15.2 ± 1.5	16.3 ± 1.4 (12)
Number of implantation scars				
Total	194	204	175	190
Mean ± S.D. per dam	14.9 ± 1.3	15.7 ± 1.6	13.5 ± 3.8 (13)	15.8 ± 1.7 (12)
Implantation index (%) ^{a)}	93.5 ± 7.2	95.9 ± 7.0	95.1 ± 5.6	96.8 ± 3.4
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	92.3	75.0
Number of offspring at birth				
Total	186	188	163	144
Mean ± S.D. per dam	14.3 ± 1.7	14.5 ± 2.1	13.6 ± 2.2	14.4 ± 1.7
Number of live offspring at birth				
Male	96	90	82	75
Female	90	94	79	55
Total	186	184	161	130
Mean ± S.D. per dam	14.3 ± 1.7	14.2 ± 2.1	13.4 ± 2.1	13.0 ± 4.9
Sex ratio ^{c)}				
Mean ± S.D. per dam	0.52 ± 0.13	0.49 ± 0.16	0.52 ± 0.16	0.58 ± 0.09 (9)
Number of dead offspring				
Total	0	4	2	14
Mean ± S.D. per dam	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.6	0.2 ± 0.4	1.4 ± 3.8
Delivery index ^{d)}				
Mean% ± S.D. per dam	95.8 ± 6.5	92.1 ± 8.2	94.1 ± 8.1	92.5 ± 8.2
Birth index ^{e)}				
Mean% ± S.D. per dam	95.8 ± 6.5	90.2 ± 9.0	93.0 ± 8.7	83.2 ± 30.4
Live birth index ^{f)}				
Mean% ± S.D. per dam	100.0 ± 0.0	97.9 ± 4.5	98.8 ± 2.8	88.6 ± 31.4
Number of offspring on day 4				
Male	96	87	80	65
Female	88	88	77	49
Sex ratio ^{g)}				
Mean ± S.D. per dam	0.52 ± 0.13	0.49 ± 0.17	0.52 ± 0.16	0.56 ± 0.08 (8)
Viability index ^{h)}				
Mean% ± S.D. per dam	98.8 ± 2.9	94.9 ± 12.7	97.6 ± 6.7	85.8 ± 32.9 (9)
Number of external abnormalities ⁿ	0	1	0	0
Mean% ± S.D. per dam	0.0 ± 0.0	0.5 ± 1.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 (8)

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

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

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

c): Number of male offspring/(number of male offspring + number of female offspring).

d): (Number of offspring at birth/Number of implantation scars)×100.

e): (Number of live offspring at birth/number of implantation scars)×100.

f): (Number of live offspring at birth/number of offspring at birth)×100.

g): (Number of live offspring 4 days after birth/number of live offspring at birth)×100.

h): Number of external abnormalities in live offspring at birth.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 22. Body weights of offspring (F₁)

Group		Olive oil (vehicle)	PEP 30 mg/kg	PEP 100 mg/kg	PEP 300 mg/kg	
Number of dams		13	13	12	9	
Male						
Days after birth						
	0	6.4 ± 0.5	6.5 ± 0.5	6.5 ± 0.6	6.2 ± 0.5	
	4	10.5 ± 1.4	10.3 ± 1.8	11.0 ± 1.2	9.7 ± 1.2	(8)
Number of dams		13	13	12	9	
Female						
Days after birth						
	0	6.0 ± 0.6	6.3 ± 0.5	6.3 ± 0.6	5.8 ± 0.4	
	4	10.0 ± 1.4	10.1 ± 1.8	10.6 ± 1.1	9.2 ± 0.9	(8)

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

Figures in parentheses indicate number of dams.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in rats

Table 23. General conditions in offspring (F₁)

Group	Number of offspring and general conditions	Days after birth				
		0	1	2	3	4
Olive oil (vehicle)	Number of offspring	186	186	185	184	184
	General appearance, No abnormality	186	185	184	184	184
	General appearance, Death		1	1		
PEP 30 mg/kg	Number of offspring	185	185	184	179	178
	General appearance, No abnormality	184	183	178	177	175
	General appearance, Death		1	5	1	2
	Abnormal findings of offspring, Anal atresia ^{a)}	1	1	1	1	1
	Abnormal findings of offspring, Acaudate ^{a)}	1	1	1	1	1
PEP 100 mg/kg	Number of offspring	161	161	159	157	157
	General appearance, No abnormality	161	159	157	157	157
	General appearance, Death		2	2		
PEP 300 mg/kg	Number of offspring	130	130	117	117	117
	General appearance, No abnormality	130	117	117	117	114
	General appearance, Death		13			3

a): These abnormalities were observed in the same offspring.

Reproduction/developmental toxicity screening test of *p*-ethylphenol by oral administration in ratsTable 24. Morphological findings of offspring (F₁)

Dose	Olive oil (vehicle)	PEP 30 mg/kg	PEP 100 mg/kg	PEP 300 mg/kg
Dead offspring				
Number of dead offspring ^{a)}	2	13	6	30
Number of missing offspring	2	5	4	2
Number of dead offspring examined	0	8	2	28
Number of dead offspring with external changes	0	0	0	0
Number of dead offspring with visceral changes ^{b)}	0	0 (5) ^{c)}	0 (1) ^{c)}	0 (27) ^{c)}
Live offspring				
Number of live offspring examined (postnatal day 0)	186	184	161	130
Number of live offspring with external changes	0	1	0	0
Number of live offspring examined (postnatal day 4)	184	175	157	114
Number of live offspring with external changes	0	1	0	0
Anal atresia	0	1	0	0
Acaudate	0	1	0	0
Number of live offspring with visceral changes	0	1	0	0
Rectal hypoplasia	0	1	0	0

Significantly different from the control group (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

a) including missing offspring

b) Dead offspring showing visceral autolysis were not included.

c) Parentheses indicate the number of offspring showing visceral autolysis.