

食薬セ研第10-1635号

2000年 8月14日

4-メトキシベンズアルデヒドの
ラットを用いる
反復経口投与毒性・生殖発生毒性
併合試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦 野 研 究 所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	3
方 法	4
1. 被験物質	4
2. 投与検体の調製	4
3. 使用動物および飼育条件	5
4. 群分けおよび個体識別	5
5. 投与量、群構成、投与期間および投与方法	5
6. 観察方法	6
7. 統計解析	10
結 果	11
1. 一般毒性所見	11
1) 一般状態	11
2) 体重	11
3) 摂餌量	11
4) 性周期	11
5) 尿検査	12
6) 血液学検査所見	12
7) 血液生化学検査所見	12
8) 病理学検査所見	12
2. 生殖発生毒性所見	14
1) 親動物所見	14
2) 出生児所見	15
考 察	16
文 献	19
Tables (Table 1~Table 21)	

Figures (Fig. 1~Fig. 2)

OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、4-メトキシベンズアルデヒド（以下 MBA）の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行った。すなわち、MBA の 0（媒体）、20、100 および 500 mg/kg を Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD) IGS] ラットの雌雄（各13匹／群）に交配前 2 週間ならびに交配期間 2 週間を通して経口投与し、さら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分娩後哺育 4 日まで投与を継続して、親動物に対する一般毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。結果は以下のように要約される。

1. 一般毒性所見

雌雄ともに、いずれの投与群においても死亡あるいは瀕死動物は認められなかった。投与後には一過性の流涎が 500 mg/kg 投与群の雄12例、雌11例で認められた。雌雄の 100 mg/kg 以上の投与群においては体重の増加傾向が投与初期から継続的にみられた。また、雄では 100 mg/kg 以上の投与群において、雌では 500 mg/kg 投与群において、摂餌量がそれぞれ有意に増加した。血液学検査所見では雄においては 500 mg/kg 投与群で、雌においては 100 mg/kg 以上の投与群で、それぞれ血小板数の有意な減少が認められた。

剖検の結果、500 mg/kg 投与群の雌雄で腺胃粘膜に黒色の点あるいは領域、黒色物の付着がみられ、雌の 100 mg/kg 投与群において少数例で前胃粘膜の肥厚、水腫ならびに腺胃粘膜の黒色点が認められた。病理組織学検査の結果、雄の 500 mg/kg 投与群、雌の 100 mg/kg 以上の投与群では前胃に扁平上皮の過形成が認められた。

雄では 500 mg/kg 投与群において肝臓の比体重値の有意な増加が認められ、雌では肝臓の実重量の有意な増加がみられた。また、病理組織学検査の結果、雌雄とも 500 mg/kg 投与群で小葉中心性の肝細胞肥大がみられ、血液生化学検査では、雄の 500 mg/kg 投与群において A/G 比、GOT 活性ならびに無機リン濃度の増加が認められた。

2. 生殖発生毒性所見

1) 親動物所見

500 mg/kg 投与群においては交尾はしたが不妊であった動物が増加し、受胎率が有意に

減少した。また、産児数、分娩率および出産生児数が対照群と比較して有意に減少し、生児出産率は減少する傾向を示した。しかし、性周期の観察結果に被験物質投与の影響は認められず全ての動物が交尾した。同居から交尾までに要した日数およびその間の発情回数には対照群と MBA 各投与群との間で有意差は認められなかった。また、500 mg/kg 投与群において精巣上体重量の有意な減少が認められ、精巣上体で結節が、卵巢では卵巢囊水腫がそれぞれ 1 例観察された以外、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、子宮および卵巢の病理学所見には異常はみられなかった。分娩および哺育状態の異常は観察されず、出産率、妊娠期間、妊娠黄体数、着床数および着床率には対照群と MBA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 出生児所見

出生児の体重、形態、性比および生後 4 日の生存率には被験物質投与の影響は認められなかったが、500 mg/kg 投与群においては、産児数、分娩率、出産生児数および哺育 4 日の生児数に減少がみられた。

3. 評価

以上の試験成績から本試験条件下では、MBA の一般毒性に関する無作用量は雌雄ともに 100 mg/kg 以上の投与群で体重の増加あるいは増加傾向が認められる事から 20 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無作用量は 500 mg/kg 投与群では受胎率ならびに妊娠母動物数の有意な減少がみられる事から雌雄とも 100 mg/kg/day、出生児に対する無作用量も 500 mg/kg 投与群では産児数、分娩率ならびに出産生児数の有意な減少が認められる事から 100 mg/kg/day であると判断される。また、被験物質の経口投与時の標的器官は胃ならびに肝臓であると推定される。

【緒 言】

4-メトキシベンズアルデヒド（以下 MBA）は、香料や化粧石鹸の原材料として使用されるほか¹⁾、日焼け防止を目的とするUV-Bブロッカーであるethyl-2-hexyl-methoxycinnamate 等の化学物質の原料として、近年需要が増加しており²⁾、1986年度ならびに1989年度のアメリ合衆国の総輸入量は約280 トンである。そのうち日本からの輸出量は2 トン程度に過ぎないとされている³⁾。

MBA のラットにおける単回経口投与時の LD_{50} 値は 1300 (1110 ~1540) mg/kg であることが報告されている⁴⁾ が、先に当研究所で実施した MBA のラットにおける急性経口投与毒性試験では雌雄とも 2000 mg/kg までの投与量で死亡は認められず、被験物質投与によると考えられる特異な一般状態の変化も認められなかった。

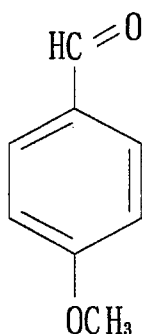
今回、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、MBA の反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験（以下、併合試験）を行い、同化合物の雌雄ラットに及ぼす一般毒性ならびに生殖発生毒性について検討したので、その結果を報告する。

【方 法】

1. 被験物質

被験物質として、4-メトキシベンズアルデヒド（以下 MBA と略記）を用いた。被験物質は、別名を *p*-アニスアルデヒドといい、英名は 4-methoxybenzaldehyde であり、CAS No.123-11-5、分子量 136.15、分子式 $C_8H_8O_2$ 、融点（凝固点） 0°C 、沸点 248°C （0.1 MPa）、蒸気圧 $<133.3\text{ Pa}$ （ 20°C ）の無色透明の液体である。MBA の構造式を以下に示す。

構造式



本試験には、より提供された MBA（ロット番号：純度：99.9 wt%）を用いた。受領した被験物質は、使用時まで被験物質保管室において、気密容器に入れて室温で保管した。試験に使用した被験物質の残余について、提供者により再度、品質試験を実施した結果、試験期間中の被験物質の安定性が確認された（Appendix E）。

2. 投与検体の調製

投与検体の調製においては用量毎に被験物質を秤量し、所定濃度となるようにコーン油（英名：Corn oil、商品名：トウモロコシ油、ロット番号：V8P7069、ナカライテスク株）を加えて溶解した。調製した検体は投与時まで室温、遮光条件下で保存し、調製後8日以内に投与した。なお、被験物質の 0.4 および 20 % (w/v) の濃度の調製液については、室温、遮光条件下で少なくとも8日間安定であることが、併合試験に先立って実施された「4-メトキシベンズアルデヒドのラットにおける急性経口投与毒性試験（試験計画番号 A-98-025）」において確認されており（Appendix A）、また、試験中に調製した投与検体[0.40, 2.00, 10.0 % (w/v)]には、所定濃度の MBA が含有されていたことを確認した（Appendix B）。コーン油中の MBA 濃度の測定法の概略を Appendix C に示した。なお、投与検体は溶液であることから均一性試験は実施しなかった。

3. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも7週齢にて購入（入荷日、雌雄ともに1999年2月3日）した日本チャールス・リバー(株)筑波飼育センター生産の Sprague-Dawley 系ラット (Crj:CD (SD) IGS、SPF) を使用した。購入した動物は入荷後2週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し試験に供した。なお、動物の入荷、検疫ならびに群分け時の体重範囲を Appendix Dに示した。

検疫期間中毎日、全ての雌動物の膣垢塗抹標本を作製し性周期を観察した。各動物は、基準温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、基準湿度50～65%、換気回数約15回/時ならびに照明12時間（午前7時～午後7時）に制御された飼育室で、金属製金網床ケージ（220×270×190 mm）に個別に収容し、固型飼料（CE-2、日本クレア(株)）および水道水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させた。妊娠14日（交尾確認日＝妊娠0日）以後の雌動物については、プラスチック製ラット用繁殖ケージ（350×400×180 mm）に収容し、床敷として紙パルプ製チップ（ALPHA-dri、加商(株)）を適宜供給した。なお、飼育期間中飼育室の温度は 23.5～25.5℃、湿度は 45～70%の範囲にあったが、基準温度ならびに基準湿度からの逸脱は、いずれも1時間以内であった。供給した飼料、飲料水および床敷には試験に支障を来す可能性のある混入物は認められなかった。

4. 群分けおよび個体識別

雄は検疫終了日の体重を基に、雌は規則的に4日あるいは5日で性周期を回帰している動物を選択し、さらに検疫終了日の体重を考慮して、体重別層化無作為抽出法により群分けし、各群とも雌雄各13匹を配した。

群分け後、これらの全ての動物は、耳パンチにより個体を識別した。また、個体識別を容易にする目的で、群毎に色の異なるカードを各飼育ケージに掛け、これに試験計画番号および個体識別番号を記入した。なお、産児は個体を識別しなかった。

5. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

MBA の投与量は、予備試験の結果を参考に設定した。予備試験では、MBA の0（コーン油）、250、500、1000 mg/kg を雌雄ラット [Crj:CD(SD) IGS] に、1日1回、14日間強制的に連続経口投与した。その結果、一般状態では投与後の流涎が、500 mg/kg 投与群の雌雄に認められ、1000 mg/kg 投与群では、雌雄で摂餌量の有意な抑制が、雄で体重増加の抑制傾向がそれぞれ認められた。血液学検査の結果、1000 mg/kg 投与群の雌

では血小板数が有意に減少し、血液生化学検査の結果 1000 mg/kg 投与群では、雄のアルカリフォスファターゼ活性ならびに雌雄のGPT 活性の有意な増加、雌雄のGOT 活性の増加傾向が認められ、被験物質投与による肝臓に対する影響が疑われた。剖検の結果、胃粘膜面の肥厚、水腫、赤色調あるいは暗色点が 1000 mg/kg 投与群の雌雄、500 mg/kg 投与群の雌ならびに 250 mg/kg 投与群の雄に認められた。また、器官重量測定の結果、肝臓重量の増加が絶対重量では雌雄の 500 mg/kg 以上の投与群で、相対重量では雄の 500 mg/kg 以上、雌の 250 mg/kg 以上の投与群でそれぞれ認められた。以上の予備試験の結果、MBA を14日間反復投与することにより、雌雄のいずれにも重量ならびに GOT やGPT 活性の変化が認められたことから、肝臓に対して影響があるものと判断した。また、本試験での投与期間を考慮した場合、被験物質の 500 mg/kg の投与は死亡を発現させずかつ明らかな毒性を示す用量であると判断し、高用量を 500 mg/kg に、以下公比5で除して 100 および 20 mg/kg を中用量および低用量に設定した。

なお、対照群にはコーン油を MBA 投与群と同一条件にて投与した。以下に群構成を示す。

群番号	被験物質	投与量 (mg/kg)	匹数（動物番号）	
			雄	雌
1	媒体（コーン油）	0	13 (MX01001～MX01013)	13 (FB01001～FB01013)
2	MBA	20	13 (MX02001～MX02013)	13 (FB02001～FB02013)
3	MBA	100	13 (MX03001～MX03013)	13 (FB03001～FB03013)
4	MBA	500	13 (MX04001～MX04013)	13 (FB04001～FB04013)

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前2週間と交配期間（2週間）および交配期間終了後2週間（剖検日前日までの連続42日間）、また、雌に対しては交配前2週間と最長2週間の交配期間中（交尾まで）、ならびに交尾した雌では妊娠期間を通して分娩の後、哺育4日（分娩日＝哺育0日）まで、交尾はしたが分娩しなかった雌では妊娠24日相当日まで、毎日1回ラット用胃管を用いて経口投与した（投与開始日、雌雄ともに1999年2月17日）。毎日の投与は午前11時から午後2時の間に行い、各動物に投与する液量（体重1 kg 当たり 5 mL）は最新時の体重を基に算出した。

6. 観察方法

1) 親動物

① 一般状態の観察

雌雄とも全例について、飼育期間中毎日1回以上、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

雄は全例について、投与1（投与初日）、7、14、21、28、35、42日および解剖日に、雌は全例について、投与1、7、14日に測定し、交配までに期間を要した雌では、投与21ならびに28日にも体重を測定した。また、交尾した雌では、妊娠0、7、14、20日に、分娩した雌では哺育0、4日ならびに解剖日に体重を測定した。交尾は確認されたが分娩しなかった雌は、妊娠25日相当日（解剖日）に体重を測定した。

③ 摂餌量測定

雄では投与1、7、13、29、35および41日に、雌では投与1、7、13日にそれぞれ給餌量を測定し、翌日までの摂餌量を測定した。2週間の交配期間中の摂餌量は測定しなかった。さらに、交尾した雌では妊娠0、7、14、20日の、分娩した雌では、哺育0、3日のそれぞれ翌日までの摂餌量を測定した。

④ 性周期

全例の雌について、交尾が確認されるまで膣垢塗抹標本を作製した。膣垢像より性周期を観察し、平均発情日数、発情の型を算出した。

⑤ 尿検査

各投与群の動物番号の若い方から雌雄各5例について、投与6週に動物を代謝ケージに収容し、約4時間尿あるいは新鮮尿を採取して、pH、潜血、蛋白、糖、ウロビリノーゲン、ケトン体、ビリルビンについて試験紙法（クリニテック 200+、バイエル・三共㈱）により、色調ならびに混濁度を視診により、それぞれ検査した。

⑥ 交配

交配は、投与15日の夕方から最長2週間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾の確認は、毎朝、膣栓および膣垢標本中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配の結果から、交尾率 $[(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100]$ 、受胎率 $[(\text{受胎動物数} / \text{交尾動物数}) \times 100]$ 、同居開始から交尾までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

⑦ 分娩および哺育状態の観察

交尾を確認した雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態が直接観察できた動物についてはその状態を観察し、直接観察できなかった動物についても、分娩後の徴候から分娩困難

や遅延などの分娩障害の有無を判断して記録した。分娩後は哺育状態を毎日観察した。

⑧ 分娩日の規定

分娩の確認は午前9時～11時に実施し、この時間帯に分娩が終了していることを確認した動物については、その日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎてから分娩を終了した動物については、翌日を分娩日とした。

分娩を確認した全例について、妊娠期間（妊娠0日から分娩日までの日数）を算定し、出産率〔（生児出産雌数／受胎動物数）×100〕を各群について求めた。

⑨ 血液学検査

雄全例は投与42日の翌日に、分娩した雌は哺育4日の翌日に、交配したが分娩しなかった雌は妊娠25日相当日に、それぞれ前日より18～24時間絶食させた後、剖検に先立ちペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈より、抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いて採血し、プロトロンビン時間ならびに活性部分トロンボプラスチン時間を測定した。続いて腹部後大静脈より抗凝固剤としてEDTA-2Kを用いて採血し、以下に示すその他の項目について検査した。なお、網状赤血球比率は対照群ならびに高用量群について測定した。

項 目	測 定 法	使 用 機 器
赤血球数 (RBC)	自動 (電気抵抗法)	Coulter Counter Model S-PLUS IV (コルターエレクトロニクス株)
白血球数 (WBC)	同上 (同上)	同上
血小板数	同上 (同上)	同上
血色素量 (Hb)	同上 (吸光度法)	同上
平均赤血球容積 (MCV)	同上 (電気抵抗法)	同上
ヘマトクリット値 (Ht)	計算 (RBC×MCV×0.001)	
平均赤血球血色素量 (MCH)	同上 (Hb×1000/RBC)	
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	同上 (Hb×100/Ht)	
白血球分類	視算 (静脈血塗抹標本, Wright-Giemsa 染色)	光学顕微鏡
網状赤血球比率	Brecher 法	同上
プロトロンビン 時間 (PT)	光散乱検出法	CA-1000 (東亜医用電子株)
活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	同上	同上

⑩ 血液生化学検査

全例について、血液学検査のための採血に引き続き、腹部後大静脈より抗凝固剤としてヘパリンを用いて採血し、血漿を分離して以下の項目について検査を行った。

項	目	測 定 法	使 用 機 器
総蛋白濃度		ビウレット法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS- FARA (ロシュ株)
アルブミン濃度		BCG法	同上
総コレステロール濃度		COD・DAOS法	同上
ブドウ糖濃度		グルコキナーゼG6PDH 法	同上
尿素窒素濃度(BUN)		ウレアーゼG.DH 法	同上
クレアチニン濃度		Jaffé 法	同上
アルカリフォスファターゼ活性(ALP)		GSCC法	同上
GOT活性		IFCC 法	同上
GPT活性		同上	同上
γ-GTP活性		γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法	同上
トリグリセライド濃度		GPO・DAOS法	同上
無機リン濃度(Inorg. phos.)		モリブデン酸直接法	同上
総ビリルビン濃度		Jendrassik/Grof 法	同上
カルシウム濃度		OCPC法	同上
A/G比		計算	
ナトリウム濃度		イオン電極法	全自動電解質分析装置 EA05 (株A&T)
カリウム濃度		同上	同上
塩素濃度		同上	同上

⑪ 病理学検査

採血後、全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行った。その際、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓および副腎、雄ではさらに精巣および精巣上体の重量を測定し、併せて比体重値(相対重量)を算出した。雌では卵巢および子宮を摘出し、卵巢は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を、子宮は着床数をそれぞれ数え、着床率[(着床数/妊娠黄体数)×100]を算出した。全例の脳、下垂体、脊髄、消化管、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、膵臓、心臓、胸腺、甲状腺、気管、肺、膀胱、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節、坐骨神経、大腿骨髄、全ての雄動物の精囊ならびに前立腺腹葉および全ての雌動物の膣、卵巢ならびに子宮は10%リン酸緩衝ホルマリン液に固定した。肺は注入固定を行った。全ての雄動物の精巣および精巣上体はブアン液に固定して保存し、その後、長期保存のために10%リン酸緩衝ホルマリン液に置換した。対照群および高用量群の雌雄各5例の固定した器官、ならびに残りの全ての雄動物の精巣および精巣上体、残りの全ての雌動物の卵巢、高用量群で不妊あるいは全胚吸収であった8例(動物番号 FB04001, FB04002, FB04003, FB04005, FB04009, FB04010, FB04011, FB04013)の子宮ならびに膣、これら不妊あるいは全胚吸収例の交尾相手の雄(動物番号 MX04001, MX04002, MX04003, MX04005, MX04009, MX04010, MX04011, MX04013)の精囊および前立腺は、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って、病理組織学検査を実施した。また、高用量群の病理組

組織学検査の結果、変化が疑われた雌雄の肝臓および胃については全ての動物の、雄の心臓については雄全例の、該当器官についても病理組織学検査を実施した。

2) F₁ 出生児

① 産児数の算定

哺育0日に産児数（生児+死亡児）を調べ、分娩率 $[(\text{産児数}/\text{着床痕数}) \times 100]$ および生児出産率 $[(\text{出產生児数}/\text{着床痕数}) \times 100]$ を求めた。産児については、外表奇形の有無および性別を調べ、生児の性比 $[(\text{雄の生児数}/\text{出產生児数}) \times 100]$ を算出した。

② 死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ、出生率 $[(\text{出產生児数}/\text{産児数}) \times 100]$ および新生児の4日の生存率 $[(\text{哺育4日の生児数}/\text{哺育0日の生児数}) \times 100]$ を求めた。死亡児は剖検した。

③ 体重測定

哺育0日および4日に個別に体重を測定した。

④ 剖検

哺育4日に全例を剖検した。

7. 統計解析

交尾率ならびに受胎率については Fisher の直接確率検定を行った（有意水準：5 %）。MBA 投与群の病理組織学検査所見のうち、グレード分けしたデータはMann-WhitneyのU検定（有意水準：5 %）により、陽性グレードの合計値はFisherの直接確率の片側検定（有意水準：5 %）により対照群との間で有意差検定を行った。その他の、体重、摂餌量ならびに定期解剖例の血液学、血液生化学検査の値および器官重量は、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様性について検定（有意水準：5 %）を行い、分散が一樣である場合には、一元配置型の分散分析（有意水準：5 %）を実施し、群間に有意性が認められる場合は、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となる場合および分散が一樣でない場合には、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 %）。

【結 果】

1. 一般毒性所見

1) 一般状態 (Tables 1、2; Appendices 1-1~2-4)

雌雄ともに、いずれの投与群においても死亡あるいは瀕死動物は認められなかった。投与後の一過性の流涎が 500 mg/kg 投与群の雄12例、雌11例で認められた。

2) 体重

① 雄 (Table 3; Appendices 3-1~3-4; Fig. 1)

100 mg/kg 以上の投与群において増加傾向が投与初期から継続的にみられたが、対照群との間に有意差は認められなかった。

② 雌 (Table 4; Appendices 4-1~4-4; Fig. 2)

a) 交配前

500 mg/kg 投与群においては投与初期から継続的に増加傾向がみられたが、対照群との間に有意差は認められなかった。

b) 妊娠期

500 mg/kg 投与群の体重は、妊娠 0 ならびに 7 日には対照群に比較して有意に増加したが、妊娠14日以降の体重は個体差が著しく有意差は認められなかった。100 mg/kg 以下の投与群の体重は、対照群と同様に推移した。

c) 哺育期

100 mg/kg 以上の投与群の哺育 0 日の体重は、対照群と比較して有意に増加し、500 mg/kg 投与群の哺育 4 日の体重には、増加傾向が認められた。

3) 摂餌量

① 雄 (Table 5; Appendices 5-1~5-4)

100 mg/kg 投与群においては投与35日の、500 mg/kg 投与群においては投与 7 日以降の摂餌量がそれぞれ有意に増加した。

② 雌 (Table 6; Appendices 6-1~6-4)

500 mg/kg 投与群においては、投与 7 および13日の摂餌量が有意に増加した。

4) 性周期 (Table 7; Appendices 7-1~7-4)

性周期の観察結果に被験物質投与の影響は認められなかった。

5) 尿検査 (Table 8; Appendices 8-1~8-2)

雌雄とも尿検査結果に被験物質投与の影響は認められなかった。

6) 血液学検査所見 (Tables 9, 10; Appendices 9-1~10-4)

雄においては 500 mg/kg 投与群で、雌においては 100 mg/kg 以上の投与群で、それぞれ血小板数の有意な減少が認められた。

一方、雄においては 100 mg/kg 以上の投与群で赤血球数の有意な減少がみられ、雌においては 100 mg/kg 投与群で平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の有意な増加がみられたが、雌雄ともヘマトクリット値や血色素量には著明な変化はみられないこと、認められた変化においても雌雄に共通するものでないこと、ならびに網状赤血球数の測定結果や骨髓、脾臓等の病理組織学検査結果にも血液学検査の変化に関連すると考えられる変化はみられないこと等から、赤血球系に関する変化はいずれも偶発的なものと考えられた。

7) 血液生化学検査所見 (Tables 11, 12; Appendices 11-1~12-4)

雄の 500 mg/kg 投与群においては、A/G 比、GOT 活性ならびに無機リン濃度の有意な増加が認められた。一方、雌の 100 mg/kg 投与群においては、アルブミン濃度および A/G 比の減少ならびに塩素濃度の増加がみられたが、用量に依存した変化ではないことから、被験物質の投与による影響ではないと判断した。雌の 500 mg/kg 投与群においては、ブドウ糖濃度の増加ならびにカルシウム濃度の減少がそれぞれ有意に認められた。

8) 病理学検査所見

① 雄

a) 剖検所見 (Table 13, Appendix 13)

500 mg/kg 投与群では腺胃粘膜に黒色点が、精巢上体に結節が各 1 例みられたほか、異常は認められなかった。その他、対照群の 1 例の肺に暗赤色点がみられた。

b) 器官重量 (Table 14, Appendix 14-1~14-4)

500 mg/kg 投与群においては、肝臓の比体重値の有意な増加ならびに精巢上体の実重量および比体重値の有意な減少が認められた。

c) 病理組織学検査所見 (Tables 15-1 ~15-2, Appendices 15-1~15-2)

精巢では、500 mg/kg 投与群の精細管の間質に肉芽組織が、100 mg/kg 投与群および対照群の精細管に萎縮がそれぞれ 1 例みられたが、500 mg/kg 投与群においてみられた不妊（後述）の原因になったと考えられる異常は認められなかった。精巢上体では 100 mg/kg 投与群の 1 例の片側に精子肉芽腫が認められた。その他、前立腺では

500mg/kg 投与群および対照群の間質にリンパ球浸潤がみられたが、両群間の頻度および程度に差は認められなかった。精囊には異常はみられなかった。

胃では 500 mg/kg 投与群の全例、100 mg/kg 投与群の 3 例の前胃に扁平上皮の過形成が認められた (Photo 1, 2) ほか、20 mg/kg 投与群の 1 例の筋層にリンパ球および好中球の浸潤がみられた。

肝臓では 500 mg/kg 投与群の全例に小葉中心性の肝細胞肥大がみられた (Photo 3, 4)。また、各群のほとんどの例に門脈周囲性の肝細胞の脂肪化がみられたが、500 mg/kg 投与群では、対照群と比較して脂肪化の程度の強い例が減少していた。

心臓では、各群に心筋の変性／線維化がみられ、中および低用量群についても検査を行ったが、対照群と各投与群との間で発現頻度および程度に差は認められなかった。

脾臓では、500 mg/kg 投与群および対照群の全例に髄外造血および褐色色素の沈着がみられたが、両群間の頻度および程度に差は認められなかった。

その他、腎臓には eosinophilic body や皮質に好塩基性尿細管が、肺には泡沫細胞の集簇がみられ、甲状腺には異所性の胸腺組織が、膵臓には腺房細胞の限局性の萎縮が認められた。観察した他の器官では異常は認められなかった。

② 雌

a) 剖検所見 (Table 16, Appendix 16)

500 mg/kg 投与群の腺胃粘膜には 3 例に暗色あるいは黒色の点や領域が、1 例に黒色物の付着がみられた。また、100 mg/kg 投与群の前胃粘膜には 2 例に肥厚が認められ、そのうち 1 例は水腫を伴っており、他の 1 例には腺胃粘膜に黒色点がみられた。

卵巣では 500 mg/kg 投与群で卵巣囊水腫、100 mg/kg 投与群で右側に囊胞が、膣では 100 mg/kg 投与群の腔内で白色のゼラチン状内容物の貯留がそれぞれ 1 例みられたほか、異常は認められなかった。

その他、100 mg/kg 投与群では肺に暗赤色点、20 mg/kg 投与群では肝臓に尾状葉の暗色化、回腸に憩室、腎臓の形態異常が、対照群には胸腺の小型化がみられた。

b) 器官重量 (Table 17, Appendix 17-1~17-4)

500 mg/kg 投与群においては絶食後体重の有意な増加が認められた。また、肝臓の実重量の有意な増加がみられたが、比体重値においては対照群との間に有意差は認められなかった。

c) 病理組織学検査所見 (Table 18-1~18-2, Appendix 18-1~18-2)

膣では対照群の1例の粘膜固有層に嚢胞がみられたが、500 mg/kg 投与群における卵巣および子宮に、不妊（後述）の原因となったと考えられる異常は認められなかった。

胃では 500 mg/kg 投与群の全例、100 mg/kg 投与群の5例の前胃に扁平上皮の過形成が認められ、500 mg/kg 投与群の3例、100 mg/kg 投与群の5例の粘膜下織に水腫がみられた。その他、水腫は 20 mg/kg 投与群および対照群の各1例にもみられたほか、100 mg/kg 投与群および対照群の腺胃粘膜にリンパ球浸潤が観察された。

肝臓では 500 mg/kg 投与群の3例に小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。また、各群のほとんどの例に門脈周囲性の肝細胞の脂肪化がみられたが、各群間の頻度および程度に明らかな差は認められなかった。

腎臓では 500 mg/kg 投与群の2例、対照群の1例の皮質に好塩基性尿細管がみられ、そのうち 500 mg/kg 投与群の1例は他の例に比較して程度が強く、近位尿細管に空胞変性も観察されたが、500 mg/kg 投与群の他の例に同様の変化は認められなかった。

脾臓では、500 mg/kg 投与群および対照群の全例に髄外造血および褐色色素の沈着がみられたが、両群間の頻度および程度に差は認められなかった。

その他、肺には泡沫細胞の集簇が、甲状腺には異所性の胸腺組織がみられた。他の観察器官では異常は認められなかった。

2. 生殖発生毒性所見

1) 親動物所見

① 交配成績 (Tables 7, 19; Appendices 7-1~7-4, 19-1~19-4)

全ての動物が交尾した。

同居から交尾までに要した日数およびその間の発情回数には、対照群と MBA 各投与群との間に有意差は認められなかった。500 mg/kg 投与群においては交尾はしたが不妊であった動物が増加し、受胎率が有意に減少した。

② 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態の異常は観察されなかった。

③ 出産率および妊娠期間 (Table 20; Appendices 20-1~20-4)

対照群の1例（動物番号：FB01004）が妊娠25日に出産した。この1例では分娩日に全産児が死亡した。他の動物は妊娠22~23日に出産した。出産率および妊娠期間には対照群と

MBA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

④ 妊娠黄体数、着床数および着床率 (Table 20; Appendices 20-1~20-4)

妊娠黄体数、着床数および着床率には、対照群と MBA 各投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。

2) 出生児所見

① 生存性 (Table 20; Appendices 20-1~20-4)

500 mg/kg 投与群の産児数、分娩率および出産生児数が対照群と比較して有意に減少し、生児出産率は減少する傾向を示した。性比には、対照群と MBA 各投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。死亡児は対照群に 5 例、20 mg/kg 投与群に 1 例、500 mg/kg 投与群に 5 例みられたが、死亡時期および死亡児の性別に一定の傾向は認められなかった。新生児の 4 日の生存率には、対照群と MBA 各投与群との間に有意差は認められなかった。

② 体重 (Table 21; Appendices 21-1~21-4)

出生児の体重には被験物質投与の影響は認められなかった。

③ 形態

全ての産児には外表奇形は認められず、哺育 4 日の剖検においても内部器官に異常は認められなかった。また、死亡児の剖検でも異常は観察されなかった。

【考 察】

雌雄とも、500 mg/kg 投与群においては、投与直後の一過性の流涎がみられたが、100 mg/kg 以下の投与群には認められなかった。

雌雄の 100 mg/kg 以上の投与群において体重の増加傾向が投与初期から継続的にみられた。また、雄では 100 mg/kg 以上の投与群において、雌では 500 mg/kg 投与群において、摂餌量がそれぞれ有意に増加した。

血液学検査では雄においては 500 mg/kg 投与群で、雌においては 100 mg/kg 以上の投与群で、それぞれ血小板数の有意な減少が認められた。血小板数の減少は、本試験の用量設定のための予備試験においても、14日間の投与で雌の 1000 mg/kg 投与群にみられており、MBA 投与による影響と判断される。MBA に比較的構造が近似している物質において反復投与時に血小板数の減少が報告されているか否かの文献検索を行ったが、パラニトロアニソール、パラプロピルアニソール、パラミノアニソール、パラフェニルアニソール、パラメチルアニソール、パラブロモアニソール、パラニトロメトキシアニソール、ベンツアルデヒド、4-プロピルベンズアルデヒド、4-フェノキシベンズアルデヒド、4-ハイドロキシベンズアルデヒド、4-エトキシベンズアルデヒド、3-メトキシベンズアルデヒド等では報告されていない。本試験においては骨髓に変化は認められず、また、著しい出血等もみられないことから、血小板数の減少の機序は明らかではない。

剖検の結果、500 mg/kg 投与群の雌雄では腺胃粘膜に黒色の点あるいは領域、黒色物の付着がみられ、雌の 100 mg/kg 投与群においても少数例で、前胃粘膜の肥厚、水腫ならびに腺胃粘膜の黒色点がみられた。また、病理組織学検査の結果、雄の 500 mg/kg 投与群、雌の 100 mg/kg 以上の投与群では前胃に扁平上皮の過形成が認められた。被験物質は局所刺激性を有することが報告されており、前胃粘膜は刺激性物質によりしばしば増殖性変化を起こすことは良く知られているところであることから⁵⁾、前胃粘膜の過形成は被験物質の刺激による変化と考えられる。

500 mg/kg 投与群において、雄では肝臓の比体重値の有意な増加が認められ、雌では肝臓の実重量の有意な増加がみられた。また、病理組織学検査の結果、雌雄とも 500 mg/kg 投与群で小葉中心性の肝細胞肥大がみられ、血液生化学検査では雄の 500 mg/kg 投与群において、A/G 比、GOT 活性の増加が認められることから、被験物質による肝臓に対する影響が疑われる。

以上の結果、MBA の 100 mg/kg 以上の投与では、被験物質投与の影響によると考えら

れる体重の増加（雌雄）、前胃粘膜上皮の過形成（雌）、血小板数の減少（雌）が認められることから、被験物質の一般毒性学的変化に関する無作用量は雌雄とも 20 mg/kg と推定される。また、被験物質の経口投与時の標的器官は胃ならびに肝臓であると推定される。

500 mg/kg 投与群においては交尾はしたが不妊であった動物が増加し、受胎率が有意に減少した。また、産児数、分娩率および出産児数が対照群と比較して有意に減少し、生児出産率は減少する傾向を示した。しかし、性周期の観察結果に被験物質投与の影響は認められておらず、交尾は全ての動物が行い、同居から交尾までに要した日数およびその間の発情回数に対照群と MBA 各投与群との間で有意差は認められなかった。また、500 mg/kg 投与群において精巣上体に有意な減少が認められ、精巣上体で結節が、卵巢では卵巢囊水腫がそれぞれ 1 例観察された以外、精巣、精囊、前立腺、子宮および卵巢の病理学所見には被験物質投与によると考えられる異常は認められなかった。本試験における不妊の原因としては、雄では精子形成以降の精子の運動性や成熟に対する影響、雌では受精から着床までの段階で被験物質の何らかの影響が及んだ可能性が考えられるが、本試験のみからは確定することはできなかった。ベンズアルデヒドや MBA 等の芳香族アルデヒドは、分離肝ミクロソームを用いた *in vitro* の検討によって、クエン酸回路の反応を阻害することが明らかになっている⁶⁾。心筋や精子尾部等の大量の ATP を消費する部位の近傍にはミトコンドリアが豊富なことが知られており⁷⁾、精子の運動エネルギーは解糖系とともにミトコンドリアの呼吸から得られるとされている⁸⁾。被験物質により電子伝達系に対する影響が生じた場合には、これが精子の運動性に影響を与える可能性が示唆されるものの確証は得られていない。一方、近年、MBA はチロシンを酸化脱水して L-DOPA を合成し、さらにはドーパキノンを経てメラニンの合成を行うチロシナーゼ（カテコールオキシダーゼの一種）活性を阻害することが報告されている⁹⁾。ブチロフェノン誘導体やスルピリド等のドーパミン受容体拮抗作用を有する薬物は、視床下部－脳下垂体の機能抑制を介して下垂体からのゴナドトロピン分泌を抑制し、二次的に生殖器の組織・器官に変化を起こすことが知られている。しかし、ドーパミン作動性神経細胞におけるチロシンからの L-DOPA 合成は、主にチロシン水酸化酵素（チロシン-3-モノオキシゲナーゼ）によって行われており、MBA のチロシナーゼ活性阻害作用が、直ちに脳内あるいは末梢神経でのドーパミンやそれを基に合成されるノルアドレナリン等のカテコールアミン量に変化を与える事には直結しない。本試験においては雌雄とも生殖器における病理組織学所見に明確な変化はみられないことから、高用量群にみられた不妊の原因が中枢でのドーパミン量の

減少によるゴナドトロピンの分泌抑制に基づくものとは考え難い。

その他、分娩および哺育状態の異常は観察されず、出産率、妊娠期間、妊娠黄体数、着床数および着床率には対照群と MBA 各投与群との間に有意差は認められなかったことから、MBA の親動物の生殖能に対する無作用量は雌雄とも 100 mg/kg と考えられる。

出生児の体重、形態、性比および新生児の 4 日の生存率には被験物質投与の影響は認められなかったが、500 mg/kg 投与群においては、産児数、分娩率、出産生児数および哺育 4 日の生児数に減少が認められることから、MBA の出生児における無作用量は 100 mg/kg と考えられる。

以上の試験成績から本試験条件下では、MBA の一般毒性に関する無作用量は雌雄ともに 100 mg/kg 以上の投与群で体重の増加あるいは増加傾向が認められることから 20 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無作用量は雌雄とも 500 mg/kg 投与群では受胎率ならびに妊娠母動物数の有意な減少が認められることから 100 mg/kg/day、出生児に対する無作用量は 500 mg/kg 投与群では産児数、分娩率、出産生児数の有意な減少がみられることから 100 mg/kg/day であると判断される。また、被験物質には雌雄いずれが主原因であるか不明であるが、生殖毒性が認められ、経口投与時の主たる標的器官は胃ならびに肝臓であると推定される。

【文 献】

- 1) The Merck index. 12th edition. Merck & Co., Inc. Rahway (1996) pp.699
- 2) Chemical marketing reporter. July 24 (1989) pp.35-36
- 3) Chemical marketing reporter. January 11 (1988) pp.20
- 4) Jenner, P.M., Hagan, E.C., Taylor, J.M., Cook, E.L., Fitzhugh, O.G. : Food flavourings and compounds of related structure I. Acute Oral Toxicity. Food and Cosmetic Toxicology. 2 : 327-343 (1964)
- 5) Glaister, J.R. : 毒性病理学の基礎 ソフトサイエンス社 東京 (1992) pp.87
- 6) Wolf, C.R., Harmon, H., Schiller, C.M. : Interaction of aromatic aldehydes with isolated rat liver mitochondria. Biochemical Pharmacology 31 : 2025-2029 (1982)
- 7) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. : The mitochondrion. in Molecular biology of the cell. 3rd. edition. Garland Publishing Inc. New York (1994) pp.655
- 8) Ford, W.C.L., Rees, J.M. : The bioenergetics of mammalian sperm motility. in Controls of sperm motility: biological and clinical aspects. CRC press, Boca Raton (1990) pp.195
- 9) Kubo, I., Kinst-Hori, I. : Tyrosinase inhibitors from anise oil. J. agric. Food Chem. 46 : 1268-1271 (1998)

【TABLE INDEX】
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity
screening test of MBA in rats

Table no.	(Appendix no.)	Table title
1	(1-1 ~ 1-4)	Clinical signs in males
2	(2-1 ~ 2-4)	Clinical signs in females
3	(3-1 ~ 3-4)	Body weight changes in males
4	(4-1 ~ 4-4)	Body weight changes in females
5	(5-1 ~ 5-4)	Food consumption in males
6	(6-1 ~ 6-4)	Food consumption in females
7	(7-1 ~ 7-4)	Estrous cycles in females
8	(8-1 ~ 8-2)	Urinalysis values in animals
9	(9-1 ~ 9-4)	Hematological findings in males
10	(10-1 ~10-4)	Hematological findings in females
11	(11-1 ~11-4)	Biochemical findings in males
12	(12-1 ~12-4)	Biochemical findings in females
13	(13)	Macroscopic findings in males
14	(14-1 ~14-4)	Absolute and relative organ weight in males
15-1 ~15-2	(15-1 ~15-2)	Histopathological findings in males
16	(16)	Macroscopic findings in females
17	(17-1 ~17-4)	Absolute and relative organ weight in females
18-1 ~18-2	(18-1 ~18-2)	Histopathological findings in females
19	(19-1 ~19-4)	Reproductive performance in animals
20	(20-1 ~20-4)	Development of pups up to day 4 of lactation
21	(21-1 ~21-4)	Body weight of pups up to day 4 of lactation

Table 1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Clinical signs in males

Clinical signs	Groups	Number of animals examined	Number of animals showing clinical signs							Total
			1~7 ^{a)}	8~14	15~21	22~28	29~35	36~42	43	
Salivation c)	0 mg/kg b)	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	500 mg/kg	13	0	0	0	9	5	9	0	12

a). days of administration

b). vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

c). salivation occurred just after administration

Table 2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Clinical signs in females

Clinical signs	Groups	Number of animals examined	Number of animals showing clinical signs							Total
			1~7 ^{a)}	8~14	15~21	22~28	29~35	36~42	43~	
Salivation c)	0 mg/kg b)	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	100 mg/kg	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	500 mg/kg	13	0	0	5	10	9	0	0	11

a). days of administration

b). vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

c). salivation occurred just after administration

Table 3

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Body weight changes in males, g, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		MBA							
Groups	(mg/kg)	0 a)	20		100		500		
Days of administration									
1 (initial body weight)		381.8 $\pm$ 12.0 (13)	385.1 $\pm$ 13.2 (13)		383.2 $\pm$ 13.5 (13)		384.4 $\pm$ 13.4 (13)		
7		406.3 $\pm$ 17.1 (13)	407.9 $\pm$ 20.3 (13)		413.8 $\pm$ 21.1 (13)		413.1 $\pm$ 21.3 (13)		
14		431.7 $\pm$ 24.1 (13)	434.7 $\pm$ 20.3 (13)		440.4 $\pm$ 28.3 (13)		442.9 $\pm$ 27.4 (13)		
21		451.8 $\pm$ 27.2 (13)	458.0 $\pm$ 21.8 (13)		467.8 $\pm$ 30.9 (13)		469.1 $\pm$ 32.5 (13)		
28		480.4 $\pm$ 33.8 (13)	490.2 $\pm$ 25.6 (13)		498.9 $\pm$ 33.9 (13)		499.5 $\pm$ 35.6 (13)		
35		507.9 $\pm$ 38.5 (13)	518.7 $\pm$ 31.6 (13)		527.6 $\pm$ 39.4 (13)		529.0 $\pm$ 42.2 (13)		
42		525.8 $\pm$ 44.6 (13)	537.5 $\pm$ 38.7 (13)		547.4 $\pm$ 44.1 (13)		549.2 $\pm$ 45.8 (13)		

a), vehicle control, corn oil (5mL/kg)

Table 4

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Body weight changes in females, g, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		MBA							
Groups (mg/kg)	0 a)		20		100		500		
Days of administration									
1	236.5 $\pm$ 8.4	(13)	237.4 $\pm$ 10.8	(13)	237.0 $\pm$ 9.6	(13)	237.9 $\pm$ 9.8	(13)	
7	247.1 $\pm$ 10.9	(13)	251.2 $\pm$ 12.4	(13)	252.1 $\pm$ 13.1	(13)	257.5 $\pm$ 16.2	(13)	
14	254.5 $\pm$ 13.0	(13)	259.6 $\pm$ 15.4	(13)	260.4 $\pm$ 16.4	(13)	271.4 $\pm$ 19.4	(13)	
21							303.3	(1)	
Days of pregnancy									
0	262.1 $\pm$ 14.3	(12)	269.2 $\pm$ 16.0	(12)	271.6 $\pm$ 13.0	(12)	294.9 $\pm$ 15.2 **	(6)	
7	302.4 $\pm$ 11.7	(12)	307.7 $\pm$ 16.5	(12)	309.7 $\pm$ 16.3	(12)	325.8 $\pm$ 19.3 *	(6)	
14	340.7 $\pm$ 14.8	(12)	346.8 $\pm$ 15.8	(12)	349.0 $\pm$ 18.9	(12)	359.9 $\pm$ 29.6	(6)	
20	412.2 $\pm$ 31.7	(12)	420.4 $\pm$ 15.5	(12)	414.1 $\pm$ 30.3	(12)	416.6 $\pm$ 61.9	(6)	
Days of lactation									
0	306.7 $\pm$ 14.7	(12)	317.7 $\pm$ 20.2	(12)	331.5 $\pm$ 21.9 **	(12)	352.3 $\pm$ 14.1 **	(5)	
4	337.4 $\pm$ 16.9	(12)	335.7 $\pm$ 12.5	(12)	338.7 $\pm$ 15.9	(12)	352.1 $\pm$ 11.7	(5)	

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 5

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Food consumption in males, g, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		MBA					
Groups (mg/kg)		0 a)	20		100		500
Days of administration							
1		23.8 $\pm$ 3.8 (13)	24.3 $\pm$ 2.1 (13)		25.1 $\pm$ 2.2 (13)		22.2 $\pm$ 2.5 (13)
7		20.9 $\pm$ 2.6 (13)	22.4 $\pm$ 2.5 (13)		22.8 $\pm$ 4.2 (13)		25.1 $\pm$ 2.5 ** (13)
13		22.1 $\pm$ 2.4 (13)	23.1 $\pm$ 2.3 (13)		23.9 $\pm$ 3.9 (13)		26.1 $\pm$ 2.5 ** (13)
29		24.7 $\pm$ 3.5 (13)	27.3 $\pm$ 2.2 (13)		26.2 $\pm$ 2.4 (13)		29.6 $\pm$ 4.6 ** (13)
35		23.4 $\pm$ 2.8 (13)	25.1 $\pm$ 2.9 (13)		26.1 $\pm$ 3.3 *	(13)	28.4 $\pm$ 1.9 ** (13)
41		24.3 $\pm$ 4.2 (13)	26.0 $\pm$ 3.0 (13)		25.9 $\pm$ 3.6 (13)		28.9 $\pm$ 3.1 ** (13)

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 6

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Food consumption in females, g, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		MBA					
Groups (mg/kg)	0 a)		20		100		500
Days of administration							
1	13.5 $\pm$ 4.1	(13)	14.2 $\pm$ 3.0	(13)	15.0 $\pm$ 3.8	(13)	14.8 $\pm$ 2.0 (13)
7	16.3 $\pm$ 2.4	(13)	16.9 $\pm$ 3.5	(13)	18.5 $\pm$ 2.6	(13)	19.5 $\pm$ 3.6 * (13)
13	14.1 $\pm$ 3.2	(13)	15.7 $\pm$ 3.8	(13)	16.0 $\pm$ 3.6	(13)	19.3 $\pm$ 3.7 ** (13)
Days of pregnancy							
0	16.7 $\pm$ 2.8	(12)	18.6 $\pm$ 2.1	(12)	18.4 $\pm$ 3.6	(12)	19.7 $\pm$ 4.4 (6)
7	23.2 $\pm$ 2.5	(12)	22.5 $\pm$ 3.2	(12)	24.2 $\pm$ 1.9	(12)	26.0 $\pm$ 3.2 (6)
14	18.0 $\pm$ 3.0	(12)	17.8 $\pm$ 2.9	(12)	18.0 $\pm$ 3.3	(12)	20.2 $\pm$ 2.4 (6)
20	16.7 $\pm$ 3.1	(12)	18.4 $\pm$ 3.6	(12)	20.0 $\pm$ 3.6	(12)	19.8 $\pm$ 3.4 (6)
Days of lactation							
0	13.4 $\pm$ 4.4	(12)	13.4 $\pm$ 4.4	(12)	17.8 $\pm$ 5.8	(12)	19.5 $\pm$ 4.6 (5)
3	40.2 $\pm$ 10.4	(12)	40.9 $\pm$ 6.3	(12)	38.1 $\pm$ 7.5	(12)	32.5 $\pm$ 7.0 (5)

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 7

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Estrous cycles in females

Compound		MBA			
Groups (mg/kg)		0 ^{a)}	20	100	500
Number of females examined		13	13	13	13
Mean length of estrous cycle in days					
Before administration, Mean $\pm$ S.D.		4.2 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.4
Administration period, Mean $\pm$ S.D.		4.3 $\pm$ 0.6	4.0 $\pm$ 0.0	4.2 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.4
Number of animals showed normal estrous cycle		12	12	13	12
Number of animals showed irregular estrous cycle					
(Before administration) (Administration period)					
Normal	→ Irregular	1	0	0	1
Irregular	→ Normal	0	1	0	0
Days until copulation, Mean $\pm$ S.D. (N)		2.7 $\pm$ 1.1 (13)	2.5 $\pm$ 1.2 (13)	2.7 $\pm$ 1.2 (13)	2.9 $\pm$ 2.5 (13)
Mean times of vaginal estrus during mating period, Mean $\pm$ S.D. (N)		1.0 $\pm$ 0.0 (13)	1.0 $\pm$ 0.0 (13)	1.0 $\pm$ 0.0 (13)	1.1 $\pm$ 0.3 (13)

^{a)} ,vehicle control, corn oil (5mL/kg)

A normally cycling rat is defined as being 4 to 5 days in one cycle.

Table 8
Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats
Urinalysis values in animals

Sex	Groups (mg/kg)	Number of animals	Color ^{b)}	Turbidity		pH								Protein ^{d)}				Glucose ^{a)}				Ketone ^{c)}				Bilirubin ^{c)}		Occult blood ^{c)}		Urobilinogen ^{f)}	
			ly	—	+	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	—	±	+	++	—	—	±	+	—	+	—	±	±	+				
Male	0 ^{a)}	5	5	4	1	0	0	1	0	1	0	0	3	0	0	2	3	5	0	2	3	5	0	5	0	3	2				
	20	5	5	5	0	0	0	1	0	2	0	1	1	1	0	3	1	5	1	0	4	5	0	5	0	5	0				
	100	5	5	5	0	0	1	1	0	2	0	0	1	0	1	4	0	5	0	2	3	5	0	5	0	4	1				
	500	5	5	5	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1	1	3	0	5	1	2	2	5	0	4	1	5	0				
Female	0 ^{a)}	5	5	5	0	1	0	0	1	2	1	0	0	0	1	4	0	5	0	5	0	5	0	5	0	0	5				
	20	5	5	5	0	0	1	0	1	0	1	1	1	3	1	1	0	5	4	1	0	5	0	5	0	3	2				
	100	5	5	5	0	0	0	0	1	3	1	0	0	2	2	1	0	5	4	1	0	4	1	5	0	3	2				
	500	5	5	5	0	0	0	0	1	2	0	2	0	3	1	0	1	5	4	1	0	4	1	5	0	4	1				

a) vehicle control, corn oil(5 mL/kg)

b) ly, light yellow

c) -, negative; ±, trace; +, slight

d) -, negative; ±, trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL

e) -, negative

f) ±, 0.1 E.U./dL; +, 1.0 E.U./dL

Table 9

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Hematological findings in males

Groups (mg/kg)	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)	WBC ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	PT (sec)	APTT (sec)	Reticulocyte (%)
0 a)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	811	15.2	44.6	55.0	18.8	34.2	73	0	11	0	0	3	85	91.6	14.6	20.9	2.0
	35	0.6	1.8	1.9	0.6	0.5	12	0	4	1	0	3	7	7.4	1.5	1.6	0.5
20	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	N.E.
	801	15.2	44.3	55.3	19.0	34.3	77	0	11	0	0	4	85	94.7	14.5	21.4	
	33	0.5	2.1	1.3	0.5	0.8	36	0	6	1	0	3	7	11.5	1.4	2.3	
100	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	N.E.
	771	** 14.8	43.1	55.9	19.2	34.3	69	0	15	0	0	4	81	86.2	14.4	21.4	
	33	0.8	1.9	1.9	0.6	0.6	24	0	5	1	0	3	7	7.7	1.1	1.5	
500	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	779	* 14.9	43.3	55.6	19.1	34.4	81	0	14	0	0	3	83	82.4	* 13.8	19.7	2.3
	23	0.4	1.5	1.7	0.6	0.6	27	0	5	0	0	2	6	8.6	1.0	1.9	1.0

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

Parameter, (number of animals)

Mean
S.D.*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

N.E., not examined

Table 10

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Hematological findings in females

Groups (mg/kg)	RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)	WBC ($\times 100/\text{mm}^3$)	Band neutrophil (%)	Segmented neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	PT (sec)	APTT (sec)	Reticulocyte (%)
0 a)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	684	13.3	39.8	58.2	19.4	33.3	72	0	18	0	0	4	78	108.6	13.0	17.9	6.0
	48	0.8	2.4	1.5	0.6	0.5	19	0	8	0	0	3	7	11.5	0.5	1.2	2.3
20	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	N.E.
	649	13.0	38.8	59.8	20.0	33.5	70	0	23	0	0	5	72	111.2	12.7	17.1	
	44	0.8	2.0	2.0	0.6	0.6	16	0	10	0	0	3	10	9.3	0.6	1.5	
100	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	N.E.
	649	13.2	39.1	60.3	20.3	33.6	61	0	25	0	0	4	70	96.6	12.5	16.9	
	67	1.3	4.0	2.3	0.7	0.6	14	0	13	0	0	3	12	11.8	0.6	0.9	
500	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	712	14.0	41.5	58.4	19.7	33.8	61	0	16	0	0	2	81	87.3	12.9	16.8	3.1
	69	1.1	3.5	1.9	0.7	0.6	19	0	8	0	0	2	9	8.9	0.7	0.8	1.9

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)
 Parameter, (number of animals)
 Mean
 S.D.

*, significantly different from control, $p < 0.05$
 **, significantly different from control, $p < 0.01$

N.E., not examined

Table 11

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Biochemical findings in males

Groups (mg/kg)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ -GTP (U/L)	Total bilirubin (mg/dL)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0 a)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	5.4	3.0	1.23	13	0.6	143	46	39	211	30	62	0	0.10	6.3	8.6	145.9	3.81	108.7
	0.3	0.2	0.19	2	0.1	13	8	10	68	4	7	0	0.03	0.3	0.3	0.8	0.20	1.9
20	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	5.4	3.1	1.37	14	0.6	147	43	46	243	27	57	0	0.11	6.5	8.8	145.2	3.87	108.3
	0.2	0.2	0.12	3	0.1	17	6	10	47	4	5	0	0.03	0.5	0.2	0.8	0.21	0.8
100	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	5.3	3.0	1.30	13	0.6	139	43	41	210	31	67	0	0.09	6.2	8.4	145.9	3.78	108.1
	0.3	0.2	0.14	6	0.1	15	8	18	44	5	10	0	0.02	0.4	0.2	0.8	0.17	1.0
500	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	5.2	3.1	1.42	12	0.7	158	45	47	248	39	84	0	0.11	6.7	8.6	145.9	3.86	108.8
	0.2	0.2	0.16	4	0.1	17	10	12	66	16	46	0	0.02	0.7	0.2	0.6	0.18	1.4

a) vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

Parameter, (number of animals)

Mean
S.D.*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 12

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Biochemical findings in females

Groups (mg/kg)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Tri- glyceride (mg/dL)	ALP (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ -GTP (U/L)	Total bilirubin (mg/dL)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0 a)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	5.5	3.2	1.44	15	0.6	124	48	43	113	42	77	1	0.08	6.3	8.8	143.6	3.51	108.1
	0.4	0.3	0.16	3	0.1	20	9	21	22	15	18	1	0.03	0.9	0.3	1.7	0.45	1.9
20	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	5.5	3.1	1.37	15	0.6	122	48	43	123	38	68	0	0.06	6.1	8.9	143.8	3.48	107.9
	0.4	0.2	0.18	3	0.1	10	10	15	98	8	9	1	0.02	0.6	0.3	1.6	0.23	1.8
100	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	5.3	2.9	*	1.24	**	16	49	32	125	40	74	0	0.06	6.0	8.7	144.6	3.50	110.4
	0.3	0.2	0.08	3	0.1	11	7	10	34	12	16	0	0.02	0.8	0.3	2.8	0.31	2.4
500	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)	(13)
	5.2	3.1	1.54	13	0.7	140	55	37	124	38	67	0	0.08	6.1	8.5	145.2	3.79	109.0
	0.2	0.2	0.20	3	0.1	19	6	8	35	20	26	1	0.02	0.6	0.3	1.7	0.38	1.3

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

Parameter, (number of animals)

Mean

S.D.

*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 13

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Macroscopic findings in males

Compound		MBA							
Groups (mg/kg)		0 a)		20		100		500	
Grade		-	+	-	+	-	+	-	+
(Stomach)		[13]		[13]		[13]		[13]	
	Spot, black, mucosa, glandular stomach	13	0	13	0	13	0	12	1
(Epididymides)		[13]		[13]		[13]		[13]	
	Nodule, left side	13	0	13	0	13	0	12	1
(Lung)		[13]		[13]		[13]		[13]	
	Spot, dark red	12	1	13	0	13	0	13	0

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 14

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Absolute and relative organ weight in males, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		MBA							
Groups (mg/kg)		0 a)		20		100		500	
Final body weight	(g)	502.0 $\pm$ 41.9	(13)	512.4 $\pm$ 38.5	(13)	521.4 $\pm$ 40.8	(13)	512.7 $\pm$ 44.0	(13)
Brain	(g)	2.07 $\pm$ 0.08	b) (13)	2.03 $\pm$ 0.11	(13)	2.04 $\pm$ 0.07	(13)	2.07 $\pm$ 0.08	(13)
		0.41 $\pm$ 0.04	c) (13)	0.40 $\pm$ 0.03	(13)	0.39 $\pm$ 0.03	(13)	0.41 $\pm$ 0.04	(13)
Heart	(g)	1.41 $\pm$ 0.15	(13)	1.43 $\pm$ 0.13	(13)	1.42 $\pm$ 0.10	(13)	1.43 $\pm$ 0.15	(13)
		0.28 $\pm$ 0.02	(13)	0.28 $\pm$ 0.01	(13)	0.27 $\pm$ 0.01	(13)	0.28 $\pm$ 0.03	(13)
Thymus	(mg)	349.0 $\pm$ 55.7	(13)	336.7 $\pm$ 53.4	(13)	311.9 $\pm$ 120.6	(13)	321.7 $\pm$ 82.1	(13)
		70.1 $\pm$ 13.3	(13)	66.3 $\pm$ 13.2	(13)	59.1 $\pm$ 19.4	(13)	62.7 $\pm$ 13.9	(13)
Liver	(g)	13.61 $\pm$ 1.62	(13)	14.76 $\pm$ 1.96	(13)	14.03 $\pm$ 1.96	(13)	15.41 $\pm$ 1.70	(13)
		2.71 $\pm$ 0.18	(13)	2.87 $\pm$ 0.23	(13)	2.68 $\pm$ 0.24	(13)	3.00 $\pm$ 0.17	** (13)
Kidneys	(g)	3.24 $\pm$ 0.27	(13)	3.28 $\pm$ 0.26	(13)	3.26 $\pm$ 0.24	(13)	3.34 $\pm$ 0.24	(13)
		0.65 $\pm$ 0.03	(13)	0.64 $\pm$ 0.04	(13)	0.63 $\pm$ 0.05	(13)	0.65 $\pm$ 0.03	(13)
Spleen	(g)	0.81 $\pm$ 0.13	(13)	0.81 $\pm$ 0.11	(13)	0.81 $\pm$ 0.14	(13)	0.79 $\pm$ 0.16	(13)
		0.16 $\pm$ 0.02	(13)	0.16 $\pm$ 0.02	(13)	0.15 $\pm$ 0.02	(13)	0.16 $\pm$ 0.03	(13)
Adrenal glands	(mg)	56.2 $\pm$ 8.1	(13)	54.9 $\pm$ 8.6	(13)	57.2 $\pm$ 9.3	(13)	54.1 $\pm$ 5.4	(13)
		11.2 $\pm$ 1.8	(13)	10.8 $\pm$ 1.9	(13)	11.0 $\pm$ 2.0	(13)	10.6 $\pm$ 0.9	(13)
Testes	(g)	3.50 $\pm$ 0.35	(13)	3.52 $\pm$ 0.31	(13)	3.45 $\pm$ 0.21	(13)	3.25 $\pm$ 0.25	(13)
		0.70 $\pm$ 0.07	(13)	0.69 $\pm$ 0.08	(13)	0.67 $\pm$ 0.06	(13)	0.64 $\pm$ 0.06	(13)
Epididymides	(g)	1.27 $\pm$ 0.11	(13)	1.29 $\pm$ 0.10	(13)	1.30 $\pm$ 0.09	(13)	1.15 $\pm$ 0.13	* (12)
		0.25 $\pm$ 0.03	(13)	0.25 $\pm$ 0.02	(13)	0.25 $\pm$ 0.02	(13)	0.22 $\pm$ 0.02	** (12)

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

b), absolute weight

c), relative weight (g or mg per 100g body weight)

*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 15-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Histopathological findings in males

Compound		MBA																							
Groups (mg/kg)		0 a)						20						100						500					
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Testes)		[13]						[13]						[13]						[13]					
	Atrophy, seminiferous tubule	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0
	Granulation tissue, interstitium	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1
(Epididymides)		[13]						[13]						[13]						[13]					
	Spermatic granuloma, unilateral	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0
(Prostate)		[5]						[0]						[0]						[11]					
	Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	3	1	1	0	0	2	[0]						[0]						6	3	2	0	0	5
(Seminal vesicle)		[5]						[0]						[0]						[11]					
	No remarkable change	[13]						[13]						[13]						[13]					
(Stomach)																									
	Squamous hyperplasia, forestomach	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	10	3	0	0	0	3	0	11	2	0	0	** 13 ##
	Cellular infiltration, lymphocyte & neutrophil, muscular layer, forestomach	13	0	0	0	0	0	12	1	0	0	0	1	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0
(Liver)		[13]						[13]						[13]						[13]					
	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	7	6	0	0	** 13 ##
	Fatty change, periportal	0	2	8	3	0	13	0	0	7	6	0	13	0	1	11	1	0	13	1	12	0	0	0	** 12
(Heart)		[13]						[13]						[13]						[13]					
	Myocardial degeneration/fibrosis	4	7	2	0	0	9	3	8	2	0	0	10	5	7	1	0	0	8	1	6	6	0	0	12
(Spleen)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	Hematopoiesis, extramedullary	0	1	4	0	0	5													0	2	3	0	0	5
	Deposit, pigment, brown	0	2	3	0	0	5													0	2	3	0	0	5
(Kidneys)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	Eosinophilic body	4	1	0	0	0	1													5	0	0	0	0	0
	Basophilic tubule, cortex	1	4	0	0	0	4													4	1	0	0	0	1
(Lung)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	Accumulation, foam cell	3	2	0	0	0	2													5	0	0	0	0	0
(Thyroid gland)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	Ectopic thymus	4	1	0	0	0	1													4	1	0	0	0	1
(Pancreas)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	Atrophy, acinar cell, focal	5	0	0	0	0	0													4	1	0	0	0	1

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

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

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

Table 15-2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Histopathological findings in males

Compound		MBA																							
Groups (mg/kg)		0 a)						20						100						500					
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Brain)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					
(Spinal cord)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					
(Mandibular lymph nodes)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					
(Thymus)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					
(Trachea)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					
(Esophagus)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					
(Intestine)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					
(Urinary bladder)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					
(Mesenteric lymph node)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					
(Adrenal glands)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					
(Pituitary gland)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					
(Sciatic nerve)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					
(Bone marrow of femur)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[5]					

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

Table 16

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Macroscopic findings in females

Compound		MBA									
Groups (mg/kg)		0 a)		20		100		500			
Grade		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
(Stomach)		[13]		[13]		[13]		[13]			
	Edema, mucosa, forestomach	13	0	13	0	12	1	13	0		
	Thickening, mucosa, forestomach	13	0	13	0	11	2	13	0		
	Area/spot, dark/black, mucosa, glandular stomach	13	0	13	0	12	1	10	3		
	Deposit, black content, mucosa, glandular stomach	13	0	13	0	13	0	12	1		
(Ovaries)		[13]		[13]		[13]		[13]			
	Cyst, right side	13	0	13	0	12	1	13	0		
	Cystic ovarian bursa	13	0	13	0	13	0	12	1		
(Liver)		[13]		[13]		[13]		[13]			
	Dark, caudate lobe	13	0	12	1	13	0	13	0		
(Intestine)		[13]		[13]		[13]		[13]			
	Diverticulum, ileum	13	0	12	1	13	0	13	0		
(Kidneys)		[13]		[13]		[13]		[13]			
	Abnormal formation	13	0	12	1	13	0	13	0		
(Thymus)		[13]		[13]		[13]		[13]			
	Small	12	1	13	0	13	0	13	0		
(Vagina)		[13]		[13]		[13]		[13]			
	Retention, content, whitish gelatinous, lumen	13	0	13	0	12	1	13	0		
(Lung)		[13]		[13]		[13]		[13]			
	Spot, dark red	13	0	13	0	12	1	13	0		

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

-, Negative; +, Positive

[], Number of animals examined

Table 17

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Absolute and relative organ weight in females, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound		MBA							
Groups (mg/kg)		0 a)		20		100		500	
Final body weight	(g)	302.4 $\pm$ 12.2	(12)	305.8 $\pm$ 13.8	(12)	310.5 $\pm$ 16.6	(12)	325.5 $\pm$ 16.0 *	(5)
Brain	(g)	1.91 $\pm$ 0.09 b)	(12)	1.95 $\pm$ 0.08	(12)	1.93 $\pm$ 0.07	(12)	1.93 $\pm$ 0.08	(5)
		0.63 $\pm$ 0.04 c)	(12)	0.64 $\pm$ 0.03	(12)	0.62 $\pm$ 0.03	(12)	0.60 $\pm$ 0.03	(5)
Heart	(g)	0.97 $\pm$ 0.07	(12)	0.99 $\pm$ 0.08	(12)	1.00 $\pm$ 0.06	(12)	1.05 $\pm$ 0.01	(5)
		0.32 $\pm$ 0.02	(12)	0.32 $\pm$ 0.02	(12)	0.32 $\pm$ 0.01	(12)	0.32 $\pm$ 0.01	(5)
Thymus	(mg)	220.9 $\pm$ 73.4	(12)	248.6 $\pm$ 62.1	(12)	243.9 $\pm$ 75.1	(12)	184.4 $\pm$ 32.1	(5)
		72.8 $\pm$ 23.3	(12)	81.1 $\pm$ 19.7	(12)	78.7 $\pm$ 24.6	(12)	56.4 $\pm$ 7.6	(5)
Liver	(g)	9.67 $\pm$ 0.92	(12)	10.09 $\pm$ 0.43	(12)	10.32 $\pm$ 1.39	(12)	11.28 $\pm$ 0.37 **	(5)
		3.19 $\pm$ 0.26	(12)	3.30 $\pm$ 0.14	(12)	3.32 $\pm$ 0.36	(12)	3.47 $\pm$ 0.18	(5)
Kidneys	(g)	1.90 $\pm$ 0.09	(12)	2.01 $\pm$ 0.16	(12)	2.08 $\pm$ 0.28	(12)	2.04 $\pm$ 0.20	(5)
		0.63 $\pm$ 0.03	(12)	0.66 $\pm$ 0.04	(12)	0.67 $\pm$ 0.07	(12)	0.62 $\pm$ 0.03	(5)
Spleen	(g)	0.65 $\pm$ 0.07	(12)	0.71 $\pm$ 0.09	(12)	0.64 $\pm$ 0.07	(12)	0.63 $\pm$ 0.08	(5)
		0.22 $\pm$ 0.02	(12)	0.23 $\pm$ 0.03	(12)	0.21 $\pm$ 0.02	(12)	0.19 $\pm$ 0.02	(5)
Adrenal glands	(mg)	78.3 $\pm$ 13.8	(12)	78.1 $\pm$ 11.7	(12)	75.4 $\pm$ 19.4	(12)	73.7 $\pm$ 10.1	(5)
		25.9 $\pm$ 4.5	(12)	25.7 $\pm$ 4.3	(12)	24.1 $\pm$ 5.2	(12)	22.6 $\pm$ 2.5	(5)

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

b), absolute weight

c), relative weight (g or mg per 100g body weight)

*, significantly different from control, $p < 0.05$ **, significantly different from control, $p < 0.01$

Table 18-1

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Histopathological findings in females

Compound		MBA																							
Groups (mg/kg)		0 a)						20						100						500					
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Ovaries)	No remarkable change	[13]						[13]						[13]						[13]					
(Uterus)	No remarkable change	[5]						[0]						[0]						[10]					
(Vagina)	Cyst, lamina propria	[5]	4	0	0	0	1	[0]						[0]						[10]	10	0	0	0	0
(Stomach)	Squamous hyperplasia, forestomach	[13]	13	0	0	0	0	[13]	13	0	0	0	0	[13]	8	5	0	0	0	[13]	0	7	5	1	0
	Edema, submucosa, forestomach		12	0	1	0	0		12	0	1	0	0		8	3	2	0	0		10	2	1	0	0
	Cellular infiltration, lymphocyte, mucosa, glandular stomach		12	1	0	0	0		13	0	0	0	0		11	0	2	0	0		13	0	0	0	0
(Liver)	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	[13]	13	0	0	0	0	[13]	13	0	0	0	0	[13]	13	0	0	0	0	[13]	10	3	0	0	0
	Fatty change, periportal		1	10	2	0	0		2	11	0	0	0		0	10	3	0	0		0	7	6	0	0
	Necrosis, focal		12	1	0	0	0		13	0	0	0	0		13	0	0	0	0		13	0	0	0	0
(Spleen)	Hematopoiesis, extramedullary	[5]	0	1	4	0	0	[0]						[0]						[5]	0	2	3	0	0
	Deposit, pigment, brown		0	3	2	0	0														0	0	4	1	0
(Kidneys)	Basophilic tubule, cortex	[5]	4	1	0	0	0	[0]						[0]						[5]	3	1	0	1	0
	Degeneration, vacuolar, proximal tubule		5	0	0	0	0														4	0	1	0	0
(Lung)	Accumulation, foam cell	[5]	4	1	0	0	0	[0]						[0]						[5]	4	1	0	0	0
(Thyroid gland)	Ectopic thymus	[5]	4	1	0	0	0	[0]						[0]						[5]	5	0	0	0	0

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

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

#, Significantly different from control, p<0.05 (One-tailed Fisher exact test)

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

Table 18-2

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Histopathological findings in females

Compound

Compound		MBA																							
Groups (mg/kg)		0 a)						20						100						500					
Grade		-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
(Brain)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Spinal cord)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Mandibular lymph nodes)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Pancreas)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Thymus)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Trachea)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Heart)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Esophagus)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Intestine)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Urinary bladder)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Mesenteric lymph node)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Adrenal glands)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Pituitary gland)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Sciatic nerve)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								
(Bone marrow of femur)		[5]						[0]						[0]						[5]					
	No remarkable change																								

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[], Number of animals examined

Table 19

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Reproductive performance in animals

Compound	MBA				
	0 ^{a)}	20	100	500	
Groups (mg/kg)					
Number of mated pairs	13	13	13	13	
Number of copulated pairs	13	13	13	13	
Copulation index	100	100	100	100	
Number of pregnant animals	12	12	12	6	
Fertility index	92.3	92.3	92.3	46.2 *	

^{a)} , vehicle control, corn oil (5mL/kg)

Copulation index=(number of copulated pairs/number of mated pairs)×100, %

Fertility index=(number of pregnant animals/number of copulated pairs)×100, %

*, significantly different from control, p<0.05

Table 20

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Development of pups up to day 4 of lactation, Mean $\pm$ S.D.

Compound	MBA									
Groups (mg/kg)	0 a)			20			100			500
Number of pregnant females	12			12			12			6
Number of females with live pups	12			12			12			5
Gestation index	100			100			100			83.3
Gestation length in days	22.8 $\pm$ 0.9	(12)		22.3 $\pm$ 0.5	(12)		22.8 $\pm$ 0.5	(12)		23.0 $\pm$ 0.0 (5)
Number of corpora lutea	17.8 $\pm$ 3.0	(12)		18.0 $\pm$ 2.1	(12)		16.3 $\pm$ 2.1	(12)		13.3 $\pm$ 5.4 (6)
Number of implantation sites	14.8 $\pm$ 4.6	(12)		15.6 $\pm$ 2.0	(12)		13.0 $\pm$ 4.8	(12)		12.0 $\pm$ 5.5 (6)
Implantation index	82.3 $\pm$ 26.3	(12)		87.0 $\pm$ 9.5	(12)		79.1 $\pm$ 25.1	(12)		86.4 $\pm$ 11.3 (6)
Day 0 of lactation										
Number of pups born	14.0 $\pm$ 4.5	(12)		14.3 $\pm$ 1.4	(12)		11.8 $\pm$ 4.3	(12)		9.3 $\pm$ 5.2 * (6)
Delivery index	94.7 $\pm$ 5.4	(12)		92.2 $\pm$ 9.5	(12)		90.9 $\pm$ 8.0	(12)		66.5 $\pm$ 33.9 ** (6)
Number of live pups	13.8 $\pm$ 4.8	(12)		14.2 $\pm$ 1.6	(12)		11.8 $\pm$ 4.3	(12)		10.6 $\pm$ 2.5 * (5)
Birth index	85.3 $\pm$ 27.9	(12)		91.6 $\pm$ 9.7	(12)		90.9 $\pm$ 8.0	(12)		76.0 $\pm$ 13.0 (5)
Live birth index	90.5 $\pm$ 28.8	(12)		99.3 $\pm$ 2.4	(12)		100.0 $\pm$ 0.0	(12)		95.4 $\pm$ 10.3 (5)
Sex ratio on day 0	42.5 $\pm$ 34.0	(11)		49.4 $\pm$ 14.5	(12)		51.7 $\pm$ 18.4	(12)		48.3 $\pm$ 15.2 (5)
Day 4 of lactation										
Number of live pups	14.8 $\pm$ 2.2	(11)		14.2 $\pm$ 1.6	(12)		11.8 $\pm$ 4.3	(12)		10.2 $\pm$ 2.8 * (5)
Viability index	98.7 $\pm$ 3.0	(11)		100.0 $\pm$ 0.0	(12)		100.0 $\pm$ 0.0	(12)		96.0 $\pm$ 8.9 (5)
Sex ratio on day 4	43.3 $\pm$ 15.6	(11)		49.4 $\pm$ 14.5	(12)		51.7 $\pm$ 18.4	(12)		45.8 $\pm$ 15.9 (5)

a), vehicle control, corn oil (5 mL/kg)

*, Significantly different from control, $p < 0.05$ (by multiple comparisons)**, Significantly different from control, $p < 0.01$ (by multiple comparisons)Gestation index = (number of females with live pups / number of pregnant females) $\times$ 100, %Implantation index = (number of implantation sites / number of corpora lutea) $\times$ 100, %Delivery index = (number of pups born / number of implantation sites) $\times$ 100, %Birth index = (number of live pups on day 0 / number of implantation sites) $\times$ 100, %Live birth index = (number of live pups on day 0 / number of pups born) $\times$ 100, %Sex ratio on day 0 = (number of male live pups on day 0 / number of live pups on day 0) $\times$ 100, %Viability index = (number of live pups on day 4 / number of live pups on day 0) $\times$ 100, %Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4 / number of live pups on day 4) $\times$ 100, %

Table 21

Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

Body weight of pups up to day 4 of lactation, mean $\pm$ S.D. (N)

Compound				MBA								
Groups (mg/kg)	0 a)			20		100			500			
Day 0 of lactation												
Number of live pups	15.0 ±	2.1	(11)	14.2 ±	1.6	(12)	11.8 ±	4.3	(12)	10.6 ±	2.5 *	(5)
Male	6.4 ±	2.4		7.0 ±	2.2		6.0 ±	2.7		5.4 ±	2.7	
Female	8.6 ±	2.6		7.2 ±	2.0		5.8 ±	3.1 *		5.2 ±	0.8 *	
Weight of pup (g)												
Male	7.0 ±	0.7		7.0 ±	0.6		7.4 ±	1.2		6.6 ±	0.7	
Female	6.5 ±	0.6		6.6 ±	0.4		7.0 ±	0.9		6.1 ±	0.6	
Day 4 of lactation												
Number of live pups	14.8 ±	2.2	(11)	14.2 ±	1.6	(12)	11.8 ±	4.3	(12)	10.2 ±	2.8 *	(5)
Male	6.4 ±	2.4		7.0 ±	2.2		6.0 ±	2.7		5.0 ±	2.9	
Female	8.5 ±	2.9		7.2 ±	2.0		5.8 ±	3.1 *		5.2 ±	0.8	
Weight of pup (g)												
Male	11.3 ±	1.3		11.3 ±	1.4		12.7 ±	3.0		11.3 ±	1.3	
Female	10.8 ±	1.1		10.9 ±	1.1		12.3 ±	2.8		11.1 ±	0.9	

a), vehicle control, corn oil (5mL/kg)

* , Significantly different from control, $p < 0.05$

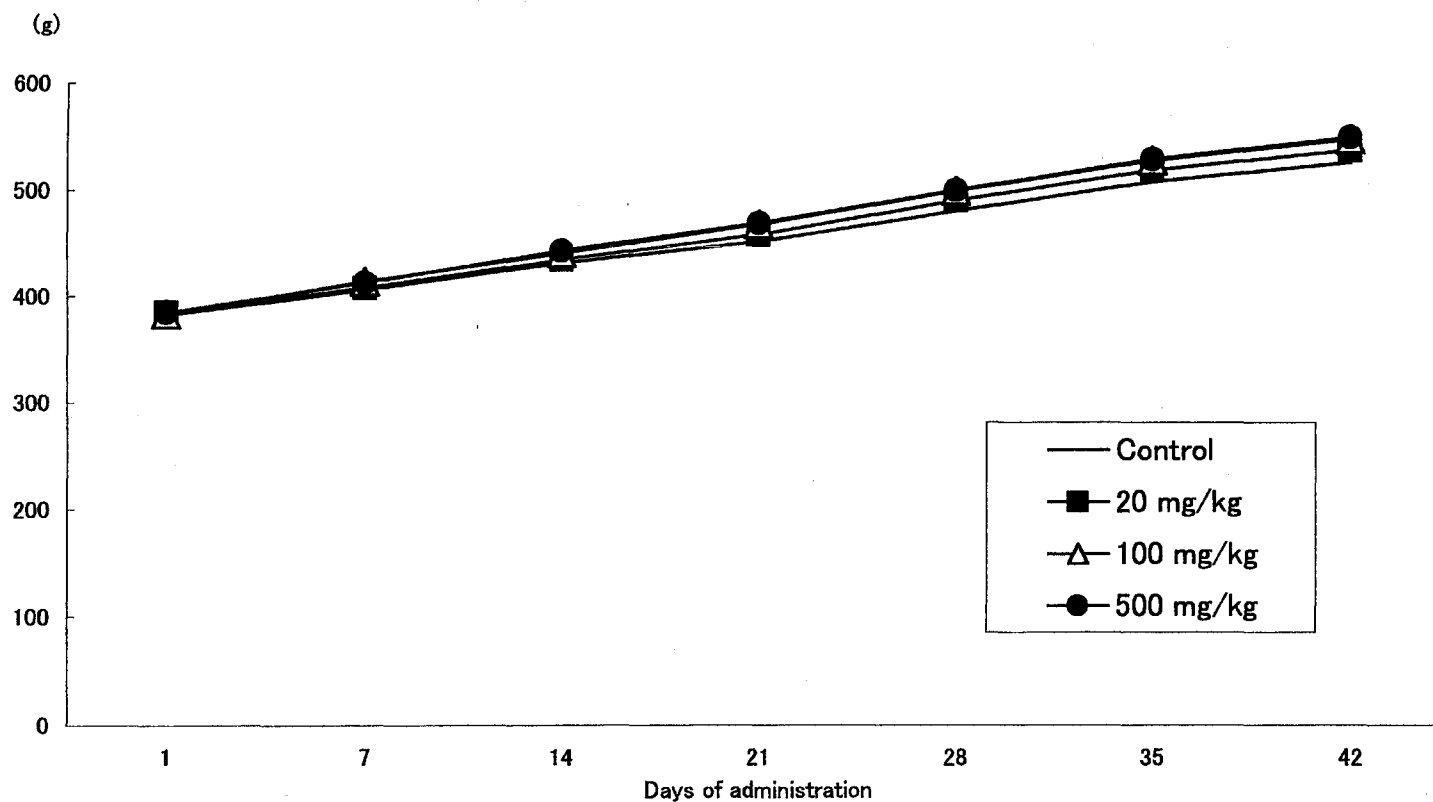


Fig.1 Body weight changes of male rats in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test of MBA in rats

