

最終報告書

3-フェノキシトルエンのラットを用いる簡易生殖毒性試験

(試験番号：04-214-2)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目 次

要 約	1 頁
はじめに	2
目 的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 供試動物および飼育条件	2
3. 投与量の設定, 試験群の構成および投与方法	3
4. 観察および検査	4
1) 親動物に関する項目	4
(1) 一般状態観察	4
(2) 体重および摂餌量測定	4
(3) 性周期検査	5
(4) 交配および分娩状態観察	5
(5) 剖検および器官重量測定	5
(6) 病理組織学検査	5
2) 出産児の観察	6
(1) 産児数, 性比および外表観察	6
(2) 一般状態観察	6
(3) 体重測定	6
(4) 病理学検査	6
5. 統計解析	6
結 果	8
1. 反復投与毒性	8
1) 一般状態および死亡	8
2) 体重	8
3) 摂餌量	8
4) 剖検	8
5) 器官重量	8

6) 病理組織学検査	9
(1) 生殖器系以外の器官	9
(2) 生殖器系器官	9
2. 生殖発生毒性	9
1) 親動物に及ぼす影響	9
(1) 性周期検査	9
(2) 交尾率および受胎率	9
(3) 黄体数, 着床数および着床率	10
(4) 出産率および妊娠期間	10
(5) 分娩および哺育状態	10
2) 新生児に及ぼす影響	10
(1) 生存性および体重	10
(2) 形態	10
考 察	12
文 献	13

添付資料

A 図・群別平均値表

Figures 1, 2	体重	1
Figures 3, 4	摂餌量	3
Tables 1, 2	死亡率	5
Tables 3, 4	一般状態	7
Tables 5, 6	体重	9
Tables 7, 8	摂餌量	11
Tables 9, 10	剖検	13
Tables 11, 12	器官重量	15
Tables 13~15	病理組織学検査所見	17
Table 16	生殖に及ぼす影響	20
Table 17	新生児に及ぼす影響	21
Table 18	新生児の外表所見	22

Table	19	新生児の内臓所見	23
-------	----	----------------	----

要 約

農薬の原料や感圧複写紙用溶剤として使用されている 3-フェノキシトルエンについて、ラットを用い 0、25、100 および 400 mg/kg/day で簡易生殖毒性試験を実施した。動物は 1 群雌雄各 12 匹とし、被験物質は交配開始 14 日前から雄は 47 日間、雌は分娩後哺育 4 日（42～55 日）まで投与した。

1. 反復投与毒性

100 mg/kg 群で、雄に肝臓の絶対重量および相対重量の増加が認められた。

400 mg/kg 群では、雌雄に肝臓の絶対重量および相対重量の増加、病理組織学的に小葉中心性肝細胞肥大、並びに体重増加の抑制および摂餌量の減少が認められた。同群の雄に精巣上体の相対重量のみの高値が認められたが、病理組織学検査では変化は認められなかった。

以上の結果から、3-フェノキシトルエンのラットへの反復投与により、主に肝臓に対する毒性影響が認められ、無影響量は雄 25 mg/kg/day、雌 100 mg/kg/day と結論された。

2. 生殖発生毒性

親動物の性周期、交尾率、受胎率、黄体数、着床数、着床率、出産率並びに分娩および哺育状態に変化は認められなかった。

児動物の発生に対しては、400mg/kg 群で新生児体重の有意な低値が認められた。総出産児数、分娩率、新生児数、出生率、性比、生存率、体重および形態には変化は認められなかった。

以上の結果より、雌雄親動物の生殖能に対する無影響量は 400 mg/kg/day、児動物の発生に対する無影響量は 100 mg/kg/day と結論された。

はじめに

3-フェノキシトルエンは、農薬の原料や感圧複写紙用溶剤として使用されている化学物質である。本物質の毒性について、ラットへの28日間反復経口投与により肝臓および血液に対する毒性影響が認められている¹⁾。生殖発生毒性について検討した報告はみられない。本試験は、OECDの高生産量既存化学物質安全点検事業の一環として実施したものである。

目的

3-フェノキシトルエンを、ラットに反復経口投与し、本物質の生殖毒性について検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質の3-フェノキシトルエン (CAS No. 3586-14-9) は、分子量 184.24、沸点 272°Cの非水溶性の無色透明液体で、試験には

から購入したロット番号 (純度 98.3%) を冷暗条件下 (2~6°C) で保管し、使用した。本物質の特性は、Appendix 1 に示す。投与液は、0.1% Tween80 水溶液 (Tween80 : Difco laboratories・ロット番号 4293457、局方精製水 : 共栄製薬株式会社・ロット番号 181496) を用いて、所定の投与用量となる濃度の懸濁液に調製した。本物質の 20%(200mg/mL) および 0.2%(2mg/mL) 液について安定性試験を実施した結果、投与液中の被験物質は均一、かつ、冷暗条件下(4°C) で少なくとも 8 日間は安定であることが確認された (Appendix 2)。したがって、投与液の使用期間は調製後 8 日間とし、調製した投与液は 1 日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷所 (2~6°C) 遮光下で密栓して保管した。また、初回に調製した投与液について分析し、所定の濃度で調製されていることを確認した (Appendix 3)。

2. 供試動物および飼育条件 (Appendix 4~6)

8 週齢の SD 系 [Crj : CD (SD) IGS] の SPF ラットを日本チャールス・リバー株式会社 厚木生産場 (神奈川県厚木市下古沢 795 番地) から搬入 (雌雄各 55 匹)

し、13日間試験環境に馴化させ、その間に臨床観察および3回の体重測定による検査並びに雌については膣垢法による10日間の性周期観察も合わせて行い、発育が順調で、一般状態および雌の性周期に異常の認められなかった雌雄各48匹を10週齢で試験に用いた。1群の動物数は雌雄各12匹とし、群分けは投与開始前日の体重に基づく層化無作為抽出法を用いて行った。投与開始時の平均体重（体重範囲）は、雄385（355～419）g、雌237（218～261）gであった。

ラットは、温度 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、換気回数10回以上/時（オールフレッシュエア方式）、照明12時間/日（午前7時点灯、午後7時消灯）に設定されたバリアーシステム動物室（第7室）で、個体別にステンレス製金網ケージ〔260W×380D×180H（mm）〕に収容し、これをステンレス製5段のラックに設置して飼育した。ただし、交配の成立した雌は、巣作り材料（ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社、ロット番号16.10.28）を入れたポリカーボネート製ケージ〔265W×426D×180H（mm）〕に収容し、分娩後は児動物と同居させた。飼料（日本農産工業株式会社、固型飼料ラボMRストック、ロット番号041158-2、041278、050357）並びに飲料水（孔径 $1\mu\text{m}$ のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水）は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶（ポリカーボネートケージの場合）により自由に摂取させた。動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札貼付並びに耳パンチ法により行った。

なお、動物の飼育期間を通じて、動物室の温度は $21.2\sim 23.2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は49～62%の範囲で推移し（温度・湿度の測定結果：Appendix 4）、また飼料中の汚染物質の分析結果（Appendix 5）、飲料水の水質検査の結果（Appendix 6）および巣作り材料中汚染物質の分析結果（Appendix 7）は、いずれも当研究所が設定した許容範囲内の値であった。したがって、動物の飼育期間中において、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと考えられる環境要因の変化はなかったものと判断された。

また、本試験は、動物実験を科学的観点および倫理的な配慮の下に実施するために遵守すべき事項等を定めた、「財団法人 畜産生物科学安全研究所の動物実験実施規定」に従って行った。

3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

10週齢のラットを一群雌雄各4匹用い、100、400、600および1000 mg/kg/day

で 14 日間反復経口投与した結果、400mg/kg 以上の群で流涎、体重増加抑制または抑制傾向、および肝臓重量の高値が認められた。600 mg/kg 以上の群では自発運動低下および摂餌量の低値も認められ、1000mg/kg で死亡が認められた。

以上のことから、本試験における投与量については、確実に毒性影響が発現すると予測される 400 mg/kg/day を最高用量、毒性影響が発現しないと予測される 25 mg/kg/day を最低用量とし、これらの用量の間に 100 mg/kg/day の計 3 用量を設定した。

試験群の構成は、(1) 溶媒投与群（以下、対照群）、(2) 被験物質の 25 mg/kg/day 投与群（25 mg/kg 群）、(3) 同 100 mg/kg/day 投与群（100 mg/kg 群）、(4) 同 400 mg/kg/day 投与群（400 mg/kg 群）の 4 群とした。

投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を胃内に投与した。対照群には溶媒として用いた 0.1% Tween80 水溶液を同様に投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。投与期間は、雌雄とも交配開始 14 日前から、雄は 47 日間、雌は交配および妊娠期間を経て分娩後の哺育 4 日まで、最短 42 日～最長 55 日間、1 日 1 回、概ね午前中（9～12 時）に投与した。

4. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日、朝夕の少なくとも 2 回は、動物の生死、外観、行動等について観察した。特に、妊娠、出産、哺育の状態については、注意深く観察した。

(2) 体重および摂餌量測定

体重は、雄については投与 1（投与開始日）、8、15、22、29、36、43 および 47 日、雌は投与 1、8 および 15 日、妊娠 0、7、14 および 20 日、哺育 0 および 4 日に測定した。摂餌量は、体重測定日に合わせて、ケージごとに翌日までの 24 時間飼料消費量を測定した。ただし、摂餌量の最終測定日は、雄では投与 46 日、雌では哺育 3 日とした。交配期間中の投与 15 日には雌雄の全例、投与 22 日には交尾が成立していない雌雄の摂餌量は測定しなかった。

(3) 性周期検査

雌について、馴化・檢疫期間に引き続き、交尾が確認されるまで、Giemsa 染色による膣垢塗抹標本を作製し、鏡検により性周期段階の判定を行った。

(4) 交配および分娩状態観察

交配前 2 週間の投与を終了（投与 15 日の午後）した雌雄を同一群内で 1 対 1 の組み合わせを作り、2 週間を限度として交尾が確認されるまで連続同居させた。交配期間中は毎朝一定時刻（9：30 頃）に交尾の確認を行い、交尾率（%）〔（交尾動物数／同居動物数）×100〕を算出した。交尾は膣栓形成あるいは膣垢中の精子の有無により確認し、確認された日を妊娠 0 日とした。交配および分娩の観察結果から、各群について、受胎率（%）〔（受胎雌数／交尾成立雌数）×100〕および出産率（%）〔（生児出産雌数／妊娠雌数）×100〕を算出した。

(5) 剖検および器官重量測定

雄は投与 47 日の翌日、雌については、分娩し哺育も順調であった例は哺育 5 日、分娩予定日を過ぎても分娩が認められなかった例は、分娩予定の 4 日後まで観察を続けて翌日に、それぞれエーテル麻酔下で放血屠殺し、体表、開口部粘膜および内部諸器官を肉眼的に観察した。また、雌雄の肝臓および雄の精巣および精巣上体を秤量（絶対重量）し、屠殺日の体重に基づいて対体重比（相対重量）を算出した。雌については、卵巣の黄体数および子宮の着床数を調べ、着床率（%）〔（着床痕数／黄体数）×100〕を算定した。

(6) 病理組織学検査

全例について、肝臓、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮およびその他肉眼的異常部位を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液（精巣、精巣上体はブアン液で前固定）で固定し、保存した。

病理組織学検査は、対照群と最高用量群の全動物について、精巣、精巣上体および卵巣並びに剖検および器官重量において被験物質の投与による変化が認められた器官について行った。その他の群については、生存動物の雌雄各 5 匹について、最高用量群で変化の認められた器官について実施した。検査は常法に従ってパラフィン切片を作製し、H-E 染色を施して鏡検した。また、精巣については、精子形成サイクル検査（ステージ II・III、V、VII および XII）のため、PAS 染色も行った。

2) 出産児の観察

(1) 産児数、性比および外表観察

分娩完了の確認後、各腹の産児数（生産児と死亡児の合計）を調べ、分娩率（%） $[(\text{総出産児数}/\text{着床数}) \times 100]$ を、また肛門と生殖突起の距離の長短により雌雄を判別し、群ごとの性比を算出した。また、新生児について、口腔内を含む外表の異常を調べた。

(2) 一般状態観察

毎日、一般状態および生死を確認し、出生率（%） $[(\text{出産確認時生児数}/\text{総出産児数}) \times 100]$ および新生児生存率（%） $[(\text{哺育4日の生児数}/\text{出産確認時生児数}) \times 100]$ を算出した。

(3) 体重測定

新生児について、哺育0および4日に、雌雄別に腹ごとの体重を測定し、1匹当たりの平均体重を算出した。

(4) 病理学検査

死亡例はその都度、生存例は哺育4日にエーテル麻酔下で放血死させ、胸部および腹部における主要器官について肉眼的に観察した。

5. 統計解析

得られた平均値あるいは頻度について、被験物質投与各群と対照群との間の有意差（危険率5%以下）を、次の方法で検定した。すなわちパラメトリックデータ（体重、摂餌量、器官重量、黄体数、着床数、交尾成立期間、妊娠期間、産児数、死亡児数等）は、Bartlettの分散検定を行った。その結果、分散が一樣な場合は一元配置の分散分析を行い、有意差を認めた場合はDunnett法により対照群との比較検定を行った。分散が一樣でない場合およびノンパラメトリックデータ（性周期、着床率、出生率、分娩率、新生児生存率、出産児の外表および内臓検査における発現率等）はKruskal-Wallisの順位検定を行い、その結果有意差を認めた場合はDunnett型の検定を行った。2群間の比較（精子形成サイクル検査データ）については、F検定を行い、その結果分散が一樣な場合はStudentのt検定を、分散が一樣でない場合はAspin-Welchのt検定を行った。カテゴリカルデータには、Fisherの直接確率法（一般状態の観察、剖検、病理組織学検査における異常例の発現率、交尾率、受

胎率、出産率および児動物の性比等) を用いた。なお、出産児に関するデータは、1腹の平均値を1標本とした。

結 果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態および死亡 (Tables 1~4, Appendices 8~11)

投与直後に発現する一過性の流涎が、100 mg/kg 群では投与開始後 30 日以降、雄の 7 匹および雌の 3 匹に、また、400 mg/kg 群では投与開始後 3 日以降、雄の 12 匹 (全例) および雌の 11 匹に認められた。対照群および 25 mg/kg 群では、一般状態に変化は認められなかった。死亡は、いずれの投与群においても認められなかった。

2) 体重 (Figures 1, 2, Tables 5, 6, Appendices 12, 13)

400 mg/kg 群で、雄に投与 8 日以降、体重増加の抑制傾向がみられ、投与期間中の体重増加量に有意差が認められた。雌においても、投与 8 日以降、体重増加の抑制傾向がみられ、妊娠 7 日以降、哺育 4 日までの体重および妊娠期間中の体重増加量に有意差が認められた。25 および 100 mg/kg 群では、雌雄ともに体重および体重増加量に有意な変化は認められなかった。

3) 摂餌量 (Figures 3, 4, Tables 7, 8, Appendices 14, 15)

400 mg/kg 群で、雌雄に投与 1 日の摂餌量の有意な減少が認められた。雌ではさらに、妊娠 7 日以降減少傾向がみられ、妊娠 7 日および哺育 3 日の摂餌量に有意差が認められた。25 および 100 mg/kg 群では、雌雄ともに試験期間中を通して摂餌量に有意な変化は認められなかった。

4) 剖検 (Tables 9, 10, Appendices 16, 17)

肝臓の大型化が、400mg/kg 群で雄の 12 匹中 5 匹および雌の 12 匹中 1 匹に認められ、雄の発現率には有意差が認められた。

5) 器官重量 (Tables 11, 12, Appendices 19~22)

100 mg/kg 群で、雄に肝臓の絶対および相対重量の有意な増加が認められた。400mg/kg 群では、雄に解剖直前の最終体重に減少傾向が認められ、肝臓の絶対および相対重量並びに精巣上体の相対重量に有意な増加が認められた。同群の雌では、

最終体重に有意な減少、肝臓の絶対および相対重量に有意な増加が認められた。25 mg/kg 群では、最終体重および秤量器官の重量に有意な変化は認められなかった。

6) 病理組織学検査 (Tables 13~15, Appendices 16~18, Photos 1~3)

(1) 生殖器系以外の器官

小葉中心性の肝細胞肥大が 400 mg/kg 群で雄の全例および雌の 10 匹に、巣状壊死が同群の雌の 3 匹に認められた。巣状壊死については、被膜に近い肝実質における単発性の病変であった。これらの変化に加えて、投与とは無関係に、小葉周辺帯肝細胞脂肪変性が各投与群の雌雄に散見され、また、対照群で限局性胆管過形成が雄の 1 匹に、微小肉芽腫が雌の 1 匹に認められた。

(2) 生殖器系器官

精巣の精子形成サイクル検査を含め、雌雄ともに、投与に起因する変化は認められなかった。妊娠の成立しなかった 25 mg/kg 群および 400mg/kg 群の各 1 ペアにおいても、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、卵巣、子宮および雌の下垂体に異常は認められなかった。投与とは無関係な変化として、精巣の精細管萎縮（片側性）が対照群で 2 匹および 400 mg/kg 群で 1 匹、精巣上体における精子肉芽腫が対照群の 1 匹に認められた。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響 (Table 16, Appendices 23~25)

(1) 性周期検査

群分け時から交配前まで、対照群をはじめいずれの投与群においても、平均 4 日の性周期を示し、投与による影響は認められなかった。

(2) 交尾率および受胎率

交尾は全例で成立し、成立に要する期間にも、対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。25 および 400 mg/kg 群でそれぞれ 1 例の不妊が認められたが、対照群と被験物質投与各群との受胎率に有意差は認められなかった。なお、対照群の雌の 1 匹（動物番号 510）は、交配開始後、発情休止期が持続し、交配開始 11 日より発情休止期から発情前期へとスミア像が動き始め、交配開始 14 日（交配期間最終日）に交尾が確認された。この雌は、交配開始前までは正常な性

周期を示していたことから、交配開始後、偽妊娠を起こしたものと判断された。

(3) 黄体数、着床数および着床率

被験物質投与各群の黄体数、着床数および着床率は、対照群と比べて有意差は認められなかった。

(4) 出産率および妊娠期間

出産率は、いずれの投与群とも 100%であった。妊娠期間については、100 mg/kg 群で対照群との間に有意差が認められた。これは、妊娠期間が 23 日であった母動物が 12 匹中 9 匹と、対照群の 12 匹中 3 匹に比べ多かったことによるが、この 9 匹の母動物は妊娠 22 日の午後にはいずれも分娩開始が確認されており、分娩完了確認を午前中の一定時刻 (9:30 頃) と定めたことにより、23 日扱いになったものである。23 日はラットの妊娠期間 (21~23 日) の範囲内であり、変化に用量依存性も認められないことから、投与の影響を示すものではないと判断された。

(5) 分娩および哺育状態

対照群および被験物質投与各群とも、分娩および哺育状態に異常は認められなかった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重 (Table 17, Appendix 26)

400 mg/kg 群で、哺育 0 日の雌雄の体重および哺育 4 日の雌の体重に有意な低値が認められた。25 および 100 mg/kg 群では、体重を含め、一腹当たりの総出産児数、分娩率、新生児数、出生率、性比および哺育 4 日の生存率には、対照群と比べて有意差は認められず、新生児の一般状態にも異常は認められなかった。

(2) 形態 (Tables 18, 19, Appendices 27, 28)

対照群で脳の形成不全が 1 匹 (発現率 0.6%) 認められた他は、いずれの群においても外表および内臓異常を有する児動物は認められなかった。内臓変異については、胸腺の頸部残留が対照群で 2 例 (1.0%)、25 mg/kg 群で 2 例 (1.3%)、100 mg/kg 群で 2 例 (1.2%) および 400 mg/kg 群で 3 例 (1.7%)、左臍動脈遺残が 25 mg/kg 群で 1 例 (0.6%)、尿管屈曲が対照群で 1 例 (0.5%) および 400 mg/kg 群で 1 例 (0.5%) みられ、これらのいずれかの変異を有する児動物は、対照群で 3 匹 (1.5%)、25 mg/kg 群で 3 匹 (1.9%)、100 mg/kg 群で 2 匹 (1.2%) および 400 mg/kg 群で 4 匹 (2.2%)

であり、これらの発現率に有意差は認められず、また、用量依存的な増加傾向も認められなかった。

考 察

1. 反復投与毒性について

3-フェノキシトルエンの反復投与毒性については、ラットに、0、4、20、100 および 500 mg/kg/day で、28 日間経口投与して実施された反復投与毒性試験において、500 mg/kg 群で雌雄に投与後の流涎、摂水量、尿量、血清アルブミン、A/G 比および肝臓重量の高値並びに肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、さらに、雄に血液活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮、血清総コレステロール、トリグリセライドおよび無機リンの低値、雌に摂餌量、血小板数および血糖値の低値並びに血清アルカリフォスファターゼおよび尿素窒素の高値が認められ、また、100 mg/kg 群では、雄に流涎、雌に血小板数の低値が認められている¹⁾。

簡易生殖毒性試験として、3-フェノキシトルエンの 0、25、100 および 400 mg/kg/day 用量をラットに投与して実施した本試験においては、100 mg/kg 以上の群で雌雄に流涎並びに雄に肝臓の絶対重量および相対重量の高値、さらに、400 mg/kg 群では雌にも肝臓の絶対重量および相対重量の高値が認められた他、雌雄に体重増加抑制、摂餌量の減少傾向、雄に精巣上体の相対重量のみの高値が認められ、病理組織学検査では雌雄の肝臓に小葉中心性の肝細胞肥大が観察された。

これらの結果は、前述の 28 日間反復投与毒性試験の結果¹⁾と概ね一致し、本物質の主な反復投与毒性は、肝臓に対する影響であることが確認された。

なお、肝臓において観察された小葉中心性肝細胞肥大は、化学物質の投与による薬物代謝酵素誘導に伴って発現することが知られている²⁾。

400 mg/kg 群の肝臓には、小葉中心性肝細胞肥大に加えて、軽度な巣状壊死が雌の 12 匹中 3 匹に認められた。巣状壊死はラットでは自然発生的に認められる病変である。400 mg/kg 群の雌で認められた発現率は、日常的に経験される頻度からみてやや高率であるが、3 匹とも自然発症例と同様の被膜に近い肝実質における単発性の病変で、統計学的には発現率に有意差が認められなかったこと、また、28 日間反復投与毒性試験においても被験物質の投与による発現率の増加は認められていないことから、被験物質の投与に起因する変化ではないと考えられた。

流涎については、投与直後の一過性の変化で、神経毒性を示唆する変化を伴っていないことから、単なる投与液の味に対する忌避反応と解せられ、28 日間反復投与毒性試験での評価と同様に、毒性影響を示唆する変化ではないと判断された。

精巣上体の相対重量のみの高値について、病理組織学検査で被験物質の投与に起因する変化が認められていないこと、また、変化に明確な用量相関性はなく、当研究所の背景データにおける正常範囲（絶対重量：1.01～1.72 g、相対重量：0.19～0.35%）内の値であることから、毒性影響を示唆するものではないと判断された。

2. 生殖発生毒性について

雌雄親動物の生殖能に対する影響について、観察した各指標とも対照群と比べて有意な変化は認められず、雌雄の生殖器官にも病理学的変化は認められなかった。

児の発生に対する影響について、400 mg/kg 群で雌雄の体重が有意に減少した。これは、投与の初期から妊娠期間を経て哺育期まで認められた母動物の体重増加抑制および妊娠初期以降に認められた摂餌量の低下による母動物の低栄養状態に起因する二次的な児の発育遅延と解される。

形態への影響については、自然発生的に認められる³⁾ごく少数例の内臓変異を認めたのみであり、催奇形性は示唆されなかった。

以上の結果から、3-フェノキシトルエンのラットを用いた簡易生殖毒性試験において、親動物への反復投与における無影響量は雄 25 mg/kg/day、雌 100 mg/kg/day、また、雌雄親動物の生殖能および児動物の発生に対する無影響量は、それぞれ 400 mg/kg/day および 100 mg/kg/day と判断された。

文 献

- 1) 3-フェノキシトルエンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験，化学物質毒性試験報告 Vol. 5, 677-687 (1997).
- 2) 日本毒性病理学会編，“毒性病理組織学”，182 (2000).
- 3) Morita, H., et al, Spontaneous malformations in laboratory animals. Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbits and mice, *Cong. Anom.*, 27, 147-206 (1987).

3-フェノキシトルエンのラットを用いる簡易生殖毒性試験

(試験番号：04-214-2)

最終報告書 添付資料A

(図・群別平均値表)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

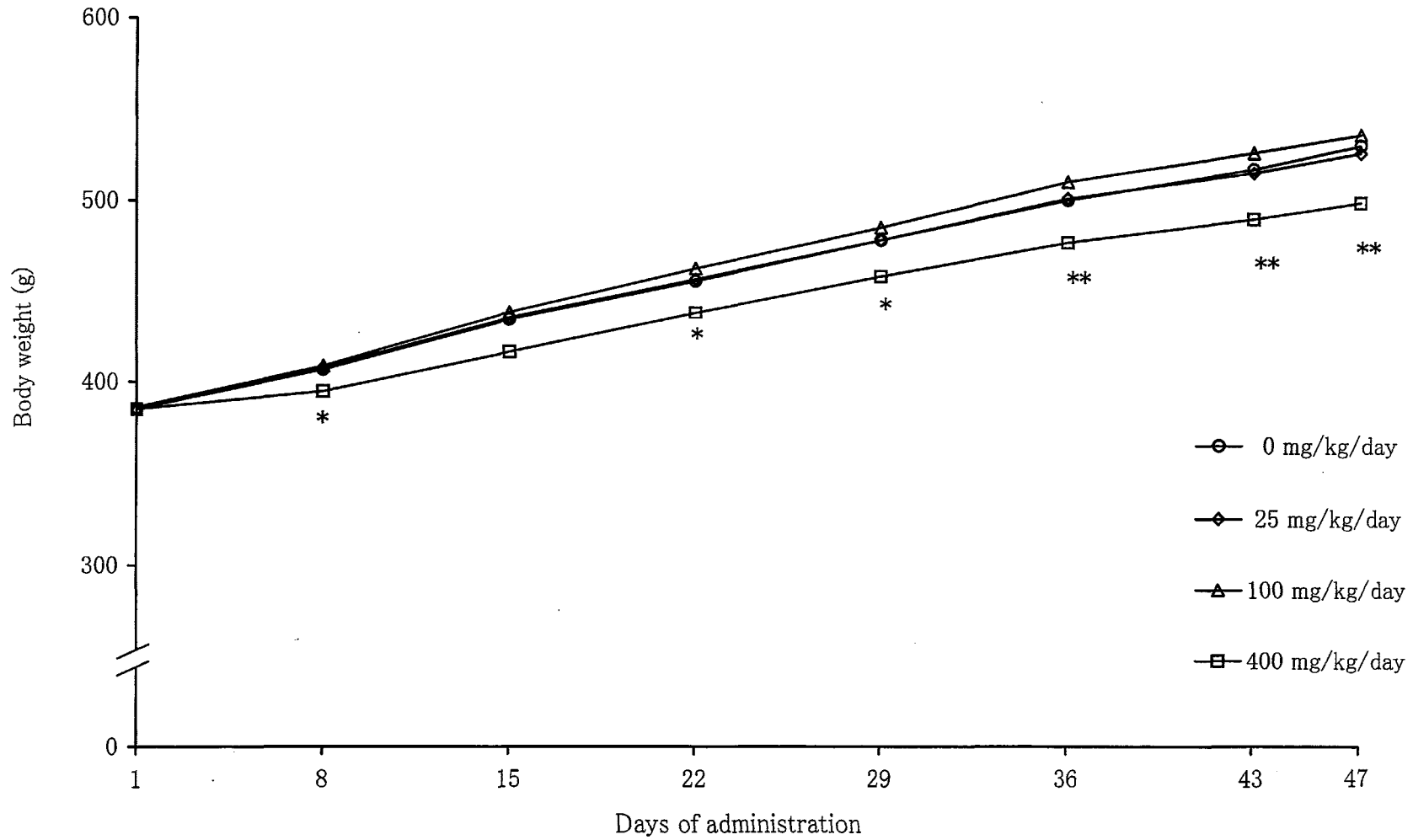


Fig. 1 Body weight changes in male rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

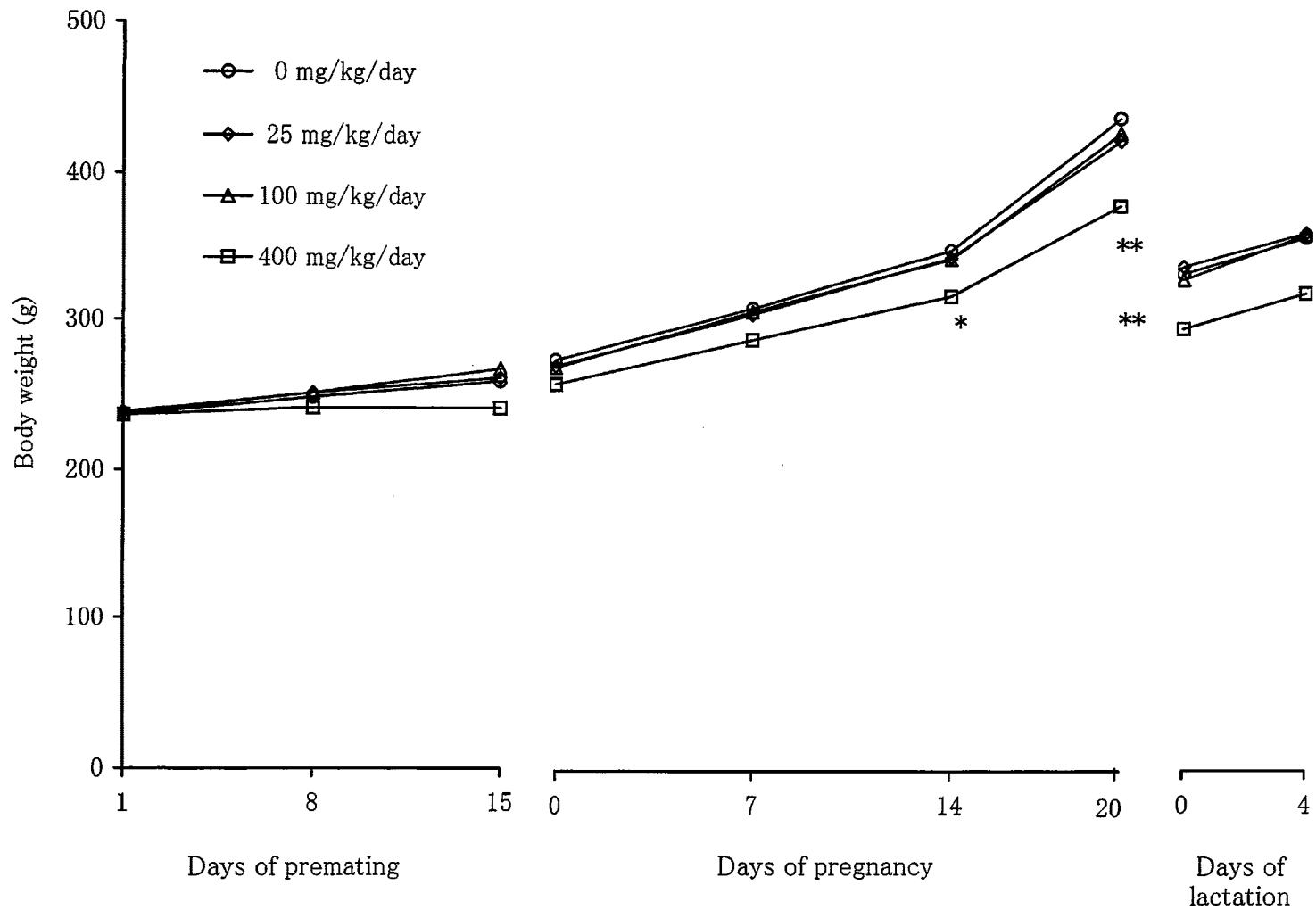


Fig. 2 Body weight changes in female rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

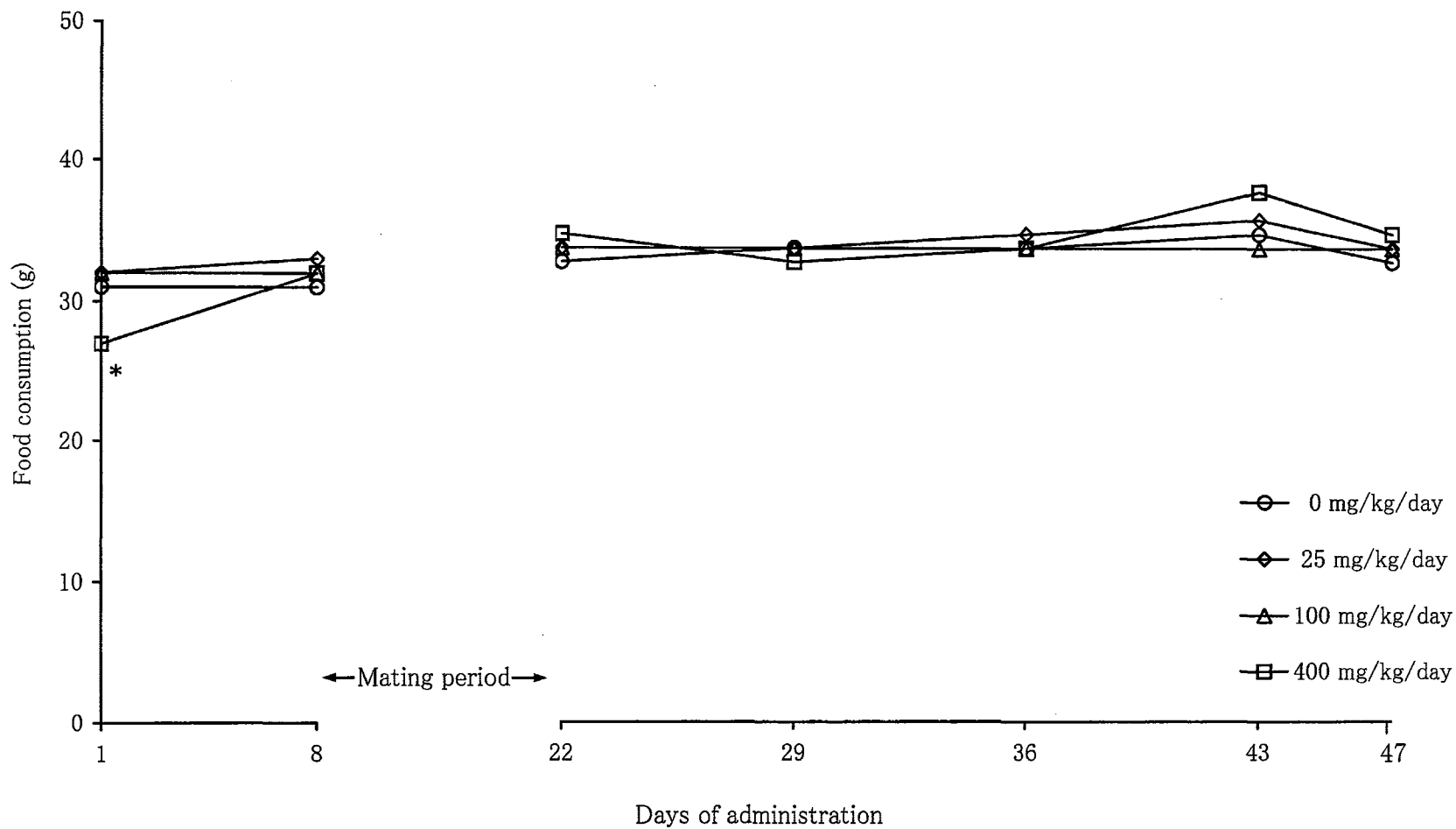


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

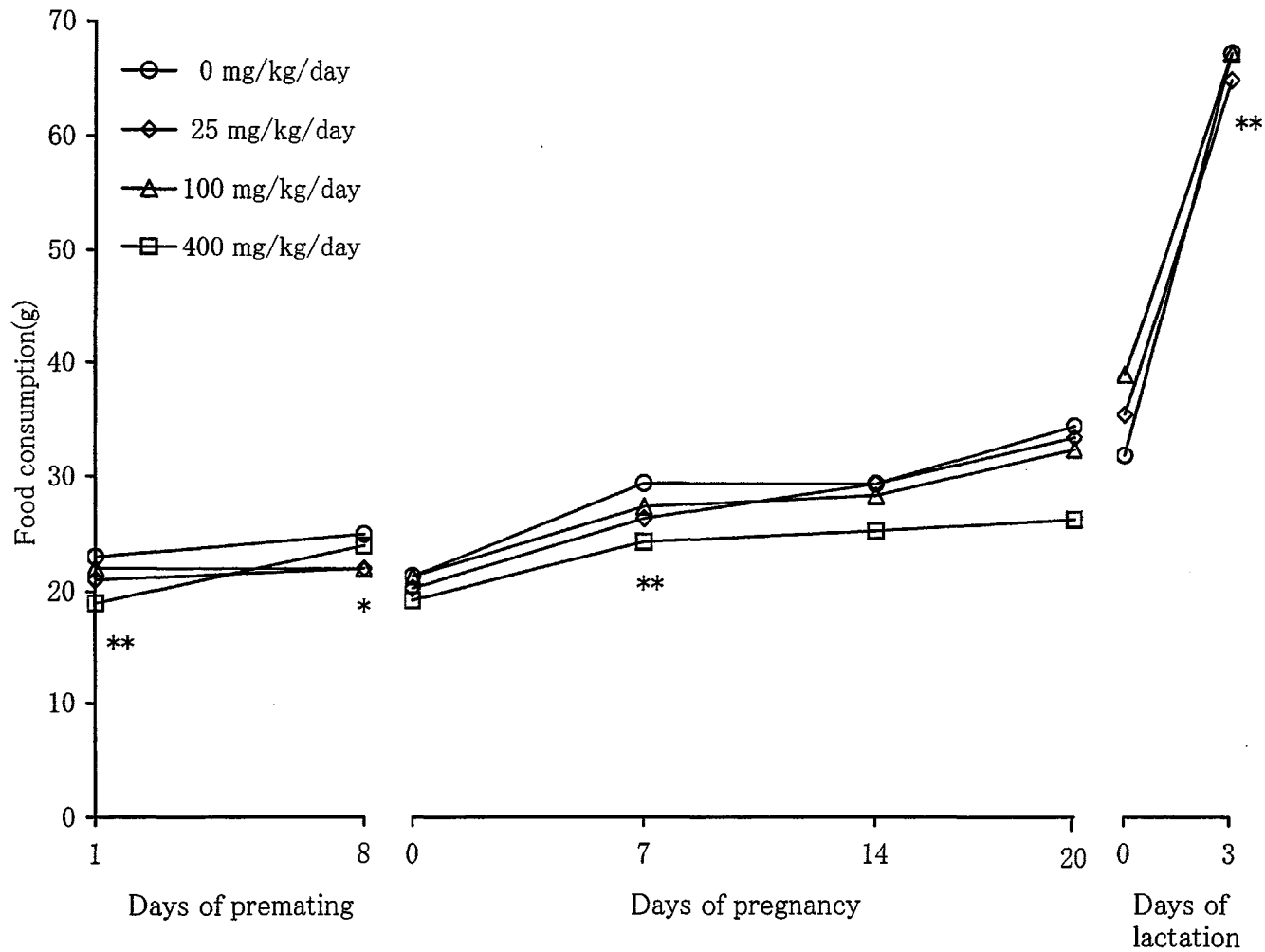


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 1 Mortality rate of male rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	25	100	400
No. of animals examined	12	12	12	12
No. of animals that died	0	0	0	0
Mortality (%)	0	0	0	0

Table 2 Mortality rate of female rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	25	100	400
No. of animals examined	12	12	12	12
No. of animals that died	0	0	0	0
Mortality (%)	0	0	0	0

Table 3 General conditions of male rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

General conditions		Dose (mg/kg/day)	0			25			100		400			
		Fate	TK	TK	FP	(Total)	TK	TK	FP	(Total)	TK	FP	(Total)	
(Clinical signs)	Grade	No. of animals	12	11	1	(12)	12	11	1	(12)	12	11	1	(12)
Salivation	-		12	11	1	(12)	5	0	0	0				
	+		0	0	0	(0)	7	6	1	(7)				
	++		0	0	0	(0)	0	5	0	(5)				

TK : Terminal killing.

FP : Failed to cause pregnancy, killed at the termination.

- : Negative. + : Slight. ++ : Moderate.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 4 General conditions of female rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

General conditions		Dose (mg/kg/day)	0	25			100	400			
(Clinical signs)		Fate	TK	TK	NP	(Total)	TK	TK	NP	(Total)	
Grade		No. of animals	12	11	1	(12)	12	11	1	(12)	
Salivation	-		12	11	1	(12)	9	1	0	(1)	
	+		0	0	0	(0)	3	7	1	(8)	
	++		0	0	0	(0)	0	3	0	(3)	
] (0)] (0)] (11)**		

TK : Terminal kill on day 5 after perturbation.

NP : Non-pregnant, killed on 27 days after copulation.

- : Negative. + : Slight. ++ : Moderate.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 5 Body weights of male rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Days of the administration								Gain 1~47
	1	8	15	22	29	36	43	47	
0	385	407	435	457	480	502	519	532	147
	± 19	± 22	± 28	± 27	± 29	± 29	± 30	± 30	± 22
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
25	385	408	436	458	480	503	517	528	143
	± 19	± 21	± 25	± 24	± 29	± 33	± 35	± 37	± 23
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
100	386	409	439	464	487	512	528	538	152
	± 19	± 22	± 25	± 30	± 36	± 40	± 45	± 45	± 30
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
400	385	395	417	439	460	479	492	501	117 *
	± 18	± 20	± 27	± 30	± 35	± 39	± 42	± 44	± 34
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)

Each value is expressed as mean ± S.D.

(n): No. of animals.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 6 Body weights of female rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Days of pre mating			Gain 1~15	Days of pregnancy				Gain 0~20	Days of lactation		Gain 0~4
	1	8	15		0	7	14	20		0	4	
0	236 ± 9 (12)	248 ± 13 (12)	259 ± 14 (12)	23 ± 7 (12)	274 ± 19 (12)	309 ± 19 (12)	349 ± 22 (12)	439 ± 27 (12)	165 ± 14 (12)	333 ± 29 (12)	358 ± 25 (12)	25 ± 11 (12)
25	238 ± 11 (12)	251 ± 11 (12)	261 ± 9 (12)	23 ± 6 (12)	270 ± 18 (11)	308 ± 16 (11)	348 ± 18 (11)	436 ± 25 (11)	165 ± 17 (11)	338 ± 21 (11)	361 ± 30 (11)	23 ± 22 (11)
100	237 ± 12 (12)	251 ± 13 (12)	267 ± 17 (12)	31 ± 13 (12)	269 ± 14 (12)	307 ± 18 (12)	343 ± 20 (12)	429 ± 24 (12)	160 ± 13 (12)	329 ± 24 (12)	360 ± 23 (12)	31 ± 9 (12)
400	236 ± 12 (12)	241 ± 12 (12)	252 ± 13 (12)	16 ± 10 (12)	258 ± 12 (11)	290 * ± 15 (11)	322 ** ± 15 (11)	389 ** ± 26 (11)	131 ** ± 22 (11)	296 ** ± 20 (11)	320 ** ± 20 (11)	25 ± 7 (11)

Each value is expressed as mean ± S.D.

(n): No. of animals.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 7 Food consumption of male rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Days of the administration							
	1	8	22	29	36	43	46	
0	31 ± 4 (12)	31 ± 3 (12)	33 ± 3 (11)	34 ± 2 (12)	34 ± 2 (12)	35 ± 3 (12)	33 ± 3 (12)	
25	32 ± 3 (12)	33 ± 5 (12)	34 ± 4 (12)	34 ± 3 (12)	35 ± 3 (12)	36 ± 4 (12)	34 ± 3 (12)	
100	32 ± 2 (12)	32 ± 4 (12)	34 ± 3 (12)	34 ± 3 (12)	34 ± 5 (12)	34 ± 4 (12)	34 ± 3 (12)	
400	27* ± 4 (12)	32 ± 3 (12)	35 ± 3 (12)	33 ± 4 (12)	34 ± 3 (12)	38 ± 6 (12)	35 ± 6 (12)	

Each value is expressed as mean ± S.D.

(n) : No. of animals.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 8 Food consumption of female rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	(g/rat/day)							
	Days of pre mating		Days of pregnancy				Days of lactation	
	1	8	0	7	14	20	0	3
0	23 ± 2 (12)	25 ± 2 (12)	21 ± 2 (12)	29 ± 4 (12)	29 ± 4 (12)	34 ± 6 (12)	27 ± 9 (12)	57 ± 6 (12)
25	21 ± 4 (12)	22 ± 3 (12)	20 ± 2 (11)	26 ± 2 (11)	29 ± 6 (11)	33 ± 6 (11)	30 ± 5 (11)	55 ± 5 (11)
100	22 ± 3 (12)	22 ± 4 (12)	21 ± 3 (12)	27 ± 6 (12)	28 ± 3 (12)	32 ± 3 (12)	33 ± 6 (12)	57 ± 8 (12)
400	19 ** ± 3 (12)	24 ± 3 (12)	19 ± 3 (11)	24 ** ± 2 (11)	25 ± 6 (11)	26 ± 9 (11)	29 ± 8 (11)	44 ** ± 7 (11)

Each value is expressed as mean ± S.D.

(n) : No. of animals.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 9

Incidence of necropsy findings of male rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy-
in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organs	: Findings	Dose(mg/kg/day)	0		25			100	400		
			Fate	TK	TK	FP	Total	TK	TK	FP	Total
		No. of animals examined	12	11	1	12	12	11	1	12	
Liver	: Large	-	12	12	1	12	12	6	1	7	
		+	0	0	0	0	0	5	0	5*	

- : Negative. + : Slight. TK : Terminal killing. FP : Failed to cause pregnancy.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 10

Incidence of necropsy findings of female rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy-
in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organs	: Findings	Dose(mg/kg/day) Fate No. of animals examined	0	25		100	400			
			TK	TK	NP	Total	TK	TK	NP	Total
			12	11	1	12	12	11	1	12
Liver	: Large	-	12	12		12	10	1	11	
		+	0	0		0	1	0	1	

- : Negative. + : Slight.

TK : Terminal killing.

NP : Non- pregnant.

Table 11 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg/day)	No.of Animals	B.W. (g)	Liver (g)	Testis (g)	Epididymis (g)
Absolute	0	12	533	18.06	3.56	1.39
			31	1.94	0.20	0.07
	25	12	532	17.09	3.52	1.46
			36	1.78	0.24	0.09
	100	12	543	20.71 *	3.35	1.40
			45	2.47	0.42	0.13
	400	12	504	25.90 **	3.65	1.43
			44	2.79	0.25	0.11
Relative @	0	12	533	3.38	0.67	0.26
			31	0.20	0.07	0.02
	25	12	532	3.36	0.66	0.28
			36	0.17	0.05	0.01
	100	12	543	3.81 **	0.62	0.26
			45	0.23	0.09	0.03
	400	12	504	5.14 **	0.73	0.28 *
			44	0.29	0.05	0.02

Each value is expressed as mean \pm S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 12 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg/day)	No. of Animals	B.W. (g)	Liver (g)
Absolute	0	12	358	17.46
			25	1.42
	25	12	359	17.10
			19	1.12
100	12	358	18.66	
		20	1.19	
400	12	314 **	20.80 **	
		20	2.15	
Relative @	0	12	358	4.88
			25	0.35
	25	12	359	4.77
			19	0.22
	100	12	358	5.22
			20	0.33
	400	12	314 **	6.61 **
			20	0.48

Each value is expressed as mean \pm S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 13

Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy-
in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organs	: Findings	Dose(mg/kg/day) Fate No. of animals	0	25		100	400		
			TK 12	TK 5	FP 1	TK 5	TK 11	FP 1	Total 12
Liver	: Degeneration, fatty, hepatocyte, periportal	-	11	4	#	4	10	1	11
		+	1	1	#	1	1	0	1
	Hyperplasia, hepatocyte, centrilobular	-	12	5	#	5	0	0	0
		+	0	0	#	0	11	1	12**
	Hyperplasia, bile duct, focal	-	11	5	#	5	11	1	12
		+	1	0	#	0	0	0	0
Epididymis	: Granuloma, spermatic, unilateral	-	11	#	1	#	11	1	12
		+	1	#	0	#	0	0	0
Testis	: Atrophy, seminiferous tubule, focal, unilateral	-	10	#	1	#	10	1	11
		+	2	#	0	#	1	0	1
Prosate and seminal vesicle	: Abnormality	-	#	#	1	#	#	1	1
		+	#	#	0	#	#	0	0

- : Negative. + : Slight. TK : Terminal killing. FP : Failed to cause pregnancy. # : Not examined.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 14 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Organs	Findings	Dose(mg/kg/day)	0		25			100	400		
			Fate	TK	TK	NP	Total	TK	TK	NP	Total
		No. of animals	12	4	1	5	5	11	1	12	
Liver	: Degeneration, fatty, hepatocyte, periportal	-	4	1	1	2	3	5	1	6	
		+	8	3	0	3	2	6	0	6	
	Small granuloma	-	11	4	1	5	5	11	1	12	
		+	1	0	0	0	0	0	0	0	
	Hyperplasia, hepatocyte, centrilobular	-	12	4	1	5	5	1	1	2	
		+	0	0	0	0	0	10	0	10 **	
Necrosis, focal	-	12	4	1	5	5	8	1	9		
	+	0	0	0	0	0	3	0	3		
Ovary	: Abnormality	-	12	#	1	1	#	11	1	12	
		+	0	#	0	0	#	0	0	0	
Uterus and pituitary	: Abnormality	-	#	#	1	1	#	#	1	1	
		+	#	#	0	0	#	#	0	0	

- : Negative. + : Slight. TK : Terminal killing. NP : Non-pregnant. # : Not examined.
 ** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 15

The number of cells in seminiferous epithelia assessed by the individual examination in male rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	No. of animals		Stage II-III			Stage V			Stage VII			Stage X II	
			G	P	T	G	P	T	G	R/P	T	G	Z/P
0	12	Mean	0.48	2.04	5.87	0.66	2.01	5.97	0.08	3.45	6.15	0.10	4.68
		S.D.	0.10	0.14	0.37	0.08	0.13	0.29	0.01	0.29	0.48	0.01	0.39
400	12	Mean	0.47	2.07	6.16	0.66	2.06	6.23	0.08	3.55	6.32	0.09	4.49
		S.D.	0.05	0.20	0.49	0.06	0.17	0.36	0.01	0.31	0.57	0.02	0.31

G : spermatogonia.

P : pachytene spermatocyte.

R : preleptotene spermacyte.

Z : zygotene spermacyte.

T : round spermatid.

Table 16 Reproduction results of rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	25	100	400
Estrous cycle (days, Mean \pm S.D.)	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs with successful copulation	12	12	12	12
Copulation index (%)	100	100	100	100
Pairing days until copulation (days, Mean \pm S.D.)	3.8 \pm 3.5	2.9 \pm 1.1	2.0 \pm 1.0	2.7 \pm 1.2
No. of pregnant females	12	11	12	11
Fertility index (%)	100	91.7	100	91.7
No. of corpora lutea (Mean \pm S.D.)	16.4 \pm 1.7	16.1 \pm 1.6	15.5 \pm 1.9	15.7 \pm 2.6
No. of implantation sites (Mean \pm S.D.)	16.1 \pm 1.8	15.2 \pm 1.5	15.2 \pm 1.9	15.0 \pm 2.8
Implantation index (% , Mean \pm S.D.)	98.0 \pm 4.0	94.5 \pm 5.5	97.9 \pm 3.1	95.1 \pm 6.5
No. of pregnant females with parturition	12	11	12	11
Gestation length (days, Mean \pm S.D.)	22.3 \pm 0.5	22.2 \pm 0.4	22.8 \pm 0.5 *	22.6 \pm 0.5
No. of pregnant females with live pups	12	11	12	11
Gestation index (%)	100	100	100	100
No. of pregnant females with live pups on day 4	12	11	12	11

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated) \times 100.

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation) \times 100.

Gestation index = (No. of females with live pups/No. of pregnant females) \times 100.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 17 Litter results of rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	25	100	400
No. of pups born	15.2 ± 2.1	14.3 ± 1.4	14.4 ± 2.0	13.4 ± 3.0
Delivery index (%)	94.2 ± 7.5	94.2 ± 6.7	95.1 ± 6.6	89.5 ± 13.3
No. of pups alive on day 0 of lactation				
Total	14.8 ± 2.1	14.3 ± 1.4	14.1 ± 1.8	13.2 ± 3.2
Male	7.8 ± 2.8	6.6 ± 2.1	7.1 ± 1.4	6.5 ± 2.6
Female	7.1 ± 2.3	7.6 ± 1.7	7.0 ± 1.9	6.7 ± 2.7
Live birth index (%)	97.9 ± 4.2	100 ± 0	97.9 ± 3.2	98.3 ± 4.0
Sex ratio(Male/Female)	1.07	0.87	1.01	0.97
No. of pups alive on day 4 of lactation				
Total	14.8 ± 2.3	14.1 ± 1.4	14.1 ± 1.8	13.1 ± 3.1
Male	7.7 ± 2.8	6.5 ± 2.2	7.1 ± 1.4	6.5 ± 2.6
Female	7.1 ± 2.3	7.6 ± 1.7	7.0 ± 1.9	6.6 ± 2.5
Viability index (%)	99.3 ± 2.4	98.8 ± 4.0	100.0 ± 0	99.4 ± 1.9
Body weight of live pups (g)				
on day 0				
Male	6.9 ± 0.6	6.9 ± 0.4	7.4 ± 0.6	6.2 ± 0.9 *
Female	6.7 ± 0.7	6.6 ± 0.4	7.0 ± 0.7	5.9 ± 0.8 *
on day 4				
Male	11.2 ± 1.4	11.0 ± 1.0	11.8 ± 1.5	10.0 ± 1.6
Female	11.1 ± 1.4	10.6 ± 0.8	11.4 ± 1.7	9.5 ± 1.5 *

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites) × 100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born) × 100.

Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0) × 100.

Sex ratio = Total number of male pups/Total number of female pups.

Each value is expressed as Mean ± S.D., except sex ratio.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 18 External findings of pups from pregnant rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg/day)	0	25	100	400
No. of pups examined	182	157	173	147
No. of pups with external malformations [#]	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

External malformations [#]	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

: No. of pups (Mean ± S.D. of individual litter percentages).

Table 19 Visceral findings of pups from pregnant rats treated orally with benzene, 1-methyl-3-phenoxy- in the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg/day)	0	25	100	400
No. of pups examined	181	157	173	146
No. of pups with visceral malformations	1 (0.6±1.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Visceral malformations [#]				
Hypoplasia of brain	1 (0.6±1.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
No. of pups with visceral variations [#]	3 (1.5±3.6)	3 (1.9±3.4)	2 (1.2±2.9)	4 (2.2±5.1)
Visceral variations [#]				
Thymic remnant in neck	2 (1.0±2.4)	2 (1.3±3.0)	2 (1.2±2.9)	3 (1.7±4.3)
Persistent left umbilical artery	0 (0)	1 (0.6±2.0)	0 (0)	0 (0)
Bending ureter	1 (0.5±1.6)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5±1.7)

: No. of pups (Mean±S.D. of individual litter percentages).