

最終報告書

3-メトキシ-3-メチルブタノールのラットを用いる
簡易生殖毒性試験

(試験番号：00-255)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目 次

要約	1
はじめに	2
目的	2
材料及び方法	
1. 被験物質	2
2. 動物及び飼育条件	2
3. 投与量の設定, 試験群の構成及び投与方法	3
4. 観察及び検査	
1) 親動物に関する項目	
(1) 一般状態観察	4
(2) 体重及び摂餌量測定	4
(3) 性周期検査	5
(4) 交配及び分娩状態観察	5
(5) 剖検及び器官重量測定	5
(6) 病理組織学検査	5
2) 出産児の観察	
(1) 産児数, 性比及び外表異常の観察	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	
1. 反復投与毒性	
1) 一般状態及び死亡	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	
(1) 生殖器系以外の器官	8
(2) 生殖器系器官	9
2. 生殖発生毒性	
1) 親動物に及ぼす影響	
(1) 性周期検査	9
(2) 交尾率及び受胎率	9
(3) 黄体数, 着床数及び着床率	10
(4) 出産率及び妊娠期間	10
(5) 分娩及び哺育状態	10

2) 新生児に及ぼす影響	
(1) 生存性及び体重	10
(2) 形態	10
考察	11
文献	13

添付資料

A. 図・群別平均値表

Figure	1, 2	体重	1
Figure	3, 4	摂餌量	3
Table	1	一般状態	5
Tables	2, 3	体重	6
Tables	4, 5	摂餌量	8
Tables	6, 7	剖検	10
Tables	8, 9	器官重量	12
Tables	10, 11	病理組織学検査所見	14
Table	12	生殖に及ぼす影響	17
Table	13	新生児に及ぼす影響	18
Table	14	新生児の外表面所見	19
Table	15	新生児の内臓所見	20

要 約

塗料、インキ、シンナー、染料、洗剤、剝離剤、農薬原料、可塑剤原料等に広く用いられている3-メトキシ-3-メチルブタノールについて、ラットを用い、0、8、40、200、及び1000mg/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（42～52日）まで投与した。

1. 反復投与毒性

雄親について、200及び1000mg/kg群で腎臓の絶対及び相対重量の有意な増加が認められた。しかしながら、腎臓の病理組織学検査では、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

雌親について、1000mg/kg群で腎臓及び肝臓の相対重量の有意な増加が認められた。病理組織学検査では、腎臓及び肝臓に被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。また、雌雄とも、一般状態、体重、摂餌量及び剖検においては、変化は認められなかった。

以上の結果から、3-メトキシ-3-メチルブタノールのラットへの反復投与により腎臓及び肝臓の相対重量増加が認められた。無影響量は、雄で40mg/kg/day、雌で200mg/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、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率並びに分娩及び哺育状態に変化は認められなかった。また、児動物に対しても、総出産児数、新生児数、性比、出生率、体重、形態及び哺育4日新生児生存率に変化は認められなかった。

したがって、雌雄親動物の生殖能及び児動物の発生に対する無影響量は、いずれも1000mg/kg/dayと結論された。

はじめに

3-メトキシ-3-メチルブタノールはイソブチレンとメタノールを原料として製造され、塗料、インキ、シンナー、染料、洗剤、剝離剤、農薬原料、可塑剤原料等に広く用いられている化学物質である。しかしながら、本物質の毒性について、これを調べた報告はみられず、殆ど知られていないのが現状である。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-メトキシ-3-メチルブタノール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する。

材料及び方法

1. 被験物質

被験物質の3-メトキシ-3-メチルブタノール（CAS No. 56539-66-3）は、分子量 118.18、融点 -50°C 以下、比重 0.927（20/20 $^{\circ}\text{C}$ ）の水に可溶な無色透明液体で、試験には

から提供されたロット番号

（純度 99.19%）を冷暗条件下（4 $^{\circ}\text{C}$ ）で保管し、使用した。本物質の詳細はAppendix 1 に示す。用いた被験物質は投与終了後に分析し、使用期間中安定であったことを確認した（Appendix 2）。投与液は、局方精製水（共栄製薬株式会社、ロット番号：181320及び181348）を用いて、所定の投与用量となる濃度の水溶液として調製した。本物質の10及び0.2%水溶液について安定性試験を実施した結果、冷（4 $^{\circ}\text{C}$ ）暗条件下で少なくとも7日間は安定であることが確認された（Appendix 3）。したがって、投与液の使用期間は調製後7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（4 $^{\circ}\text{C}$ ）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 4）。

2. 動物及び飼育条件（Appendices 4～6）

8週齢のSD系[Crj:CD(SD)IGS] 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）から搬入（雌雄各68匹）し、13日間試験環境に馴化させ、その間に臨床観察及び3回の体重測定による検疫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併せて行い、発育が順調で、一般健康状態及び雌の性周期に異常の認められなかった雌雄各60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(356～433)g, 雌 243(225～268)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ー方式）、照明 12時間/日（午前7時～午後7時）に設定したバリアースシステム動物室（第7室）で、個体別にステンレス製金網ケージ（260W×380D×180Hmm）に収容し、これをステンレス製5段のラックに配置して飼育した。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 13.9.27）を入れたポリカーボネート製ケージ〔265W×426D×200H(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 010780, 010877及び010963）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、それぞれ給餌器及び自動給水装置又は給水瓶（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、ラック及びケージへの標識札の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 $21.9 \sim 23.4^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $50 \sim 65\%$ の範囲で推移し（温度・湿度の測定結果：Appendix 5）、また飼料中の汚染物質の分析結果（Appendix 6）、飲料水の水質検査の結果（Appendix 7）及び巣作り材料中の汚染物質の分析結果（Appendix 8）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。

3. 投与量の設定、試験群の構成及び投与方法

投与量は、本試験よりやや先行して実施した、3-メトキシ-3-メチルブタノールの28日間反復投与毒性試験における、投与終了時の解剖までに得られた結果に基づいて設定

した。すなわち、0、15、60、250及び1000mg/kg/dayでの試験で、250mg/kg群の雄及び1000mg/kg群の雌雄に腎臓の相対重量の増加が、さらに1000mg/kg群の雌雄に肝臓の相対重量の増加及び塩素の低値が認められた。しかしながら、動物の一般状態、体重及び摂餌量には変化が認められなかった。以上の結果から、本試験における投与量については、親動物に対して確実に毒性影響が発現すると予測される1000mg/kg/dayを最高用量、毒性影響が発現しないと予測される8 mg/kg/dayを最低用量とし、これらの用量の間に公比5で200及び40mg/kg/dayの2用量を設け、計4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8 mg/kg/day投与群（8 mg/kg群）、③同 40mg/kg/day投与群（40mg/kg群）、④同 200mg/kg/day 投与群（200mg/kg群）、⑤同 1000mg/kg/day投与群（1000mg/kg 群）の5群とした。

投与方法は、投与液量を体重1 kg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、溶媒として用いた局方精製水を同様に投与した。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、雌は交配及び妊娠期間を経て分娩後の哺育4日まで、最短42日～最長52日間、1日1回、概ね午前中（9：00～12：15）に投与した。

4. 観察及び検査

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) 体重及び摂餌量測定

体重は、雄については投与1（投与開始日）、8、15、22、29、36、43及び47日、雌は投与1、8及び15日、妊娠0、7、14及び20日、哺育0及び4日に測定した。さらに、屠殺日にも測定した。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・検査期間に引き続き、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)交配及び分娩状態観察

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(%) $[(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100]$ 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。分娩状態の観察も同じ時刻に行い、分娩の完了が確認された日を哺育0日とした。交配及び分娩の観察結果から、各群について、受胎率(%) $[(\text{受胎雌数} / \text{交尾成立雌数}) \times 100]$ 及び出産率(%) $[(\text{生児出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100]$ を算出した。

(5)剖検及び器官重量測定

雄の計画屠殺動物は投与47日の翌日、雌では分娩し哺育も順調であった例は哺育5日、交配の成立しなかった例は交配期間終了後24日（投与52日の翌日）に、それぞれエーテル麻酔下で放血屠殺し、体表、開口部粘膜及び内部諸器官を肉眼的に観察した。また、雌雄の肝臓及び腎臓、雄の精巣及び精巣上体を秤量（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、卵巢の黄体数及び子宮の着床数を調べ、着床率(%) $[(\text{着床数} / \text{黄体数}) \times 100]$ を算出した。

(6)病理組織学検査

下記器官を採取し、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。

脳、下垂体、甲状腺、胸腺、気管、肺、胃、腸、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巢、子宮、脊髄（頸部・胸部・腰部）、坐骨神経、骨髓（大腿骨）、リンパ節（頸部リンパ節・腸間膜リンパ節）、乳腺、その他肉眼的異常部位

病理組織学検査は、対照群及び1000mg/kg群について、肝臓、腎臓、精巣、精巣上体、

卵巣及び肉眼的異常部位を検査した。また、交配の成立しなかった対の雄では前立腺及び精嚢、雌では子宮および下垂体も検査した。検査の結果、被験物質の投与に起因する変化が認められなかったので、8、40及び200mg/kg群については、肉眼的異常部位のみを検査した。検査は、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。

2) 出産児の観察

(1)産児数、性比及び外表異常の観察

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（％） $[(\text{総出産児数} / \text{着床率}) \times 100]$ を、また肛門と生殖突起の長短により性別を判定し、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、一般状態及び生死を確認し、出生率（％） $[(\text{出産確認時生児数} / \text{総出産児数}) \times 100]$ 及び新生児生存率（％） $[(\text{哺育4日の生児数} / \text{出産確認時生児数}) \times 100]$ を算出した。

(3)体重測定

新生児について、哺育0及び4日に、雌雄別に各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、胸部及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

得られた平均値或いは頻度について、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、妊娠期間、産児数）はBartlettの分散検定を行った。その結果、分散が一様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法或いはScheffe法（各群の標本数が異なる場合）により対照群との比較検定を

行った。分散が一様でない場合及びノンパラメトリックデータ（着床率，出生率，分娩率，新生児生存率，出産児の外表及び内臓検査における異常例の発現率）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型或いはScheffe型の検定を行った。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，剖検及び病理組織学検査における異常例の発現率）或いは χ^2 検定（交尾率，受胎率，出産率，児動物の性比）を用いた。なお，出産児に関するデータは1腹の平均を1標本とした。

結 果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態及び死亡 (Table 1, Appendices 9~12)

対照群及び被験物質投与各群とも、投与期間を通じて、一般状態の変化及び死亡は認められなかった。

2) 体重 (Figures 1, 2, Tables 2, 3, Appendices 13, 14)

投与期間における体重及び体重増加量において、対照群と被験物質投与各群との間に有意差は認められなかった。

3) 摂餌量 (Figures 3, 4, Tables 4, 5, Appendices 15, 16)

対照群と被験物質投与各群との間に、有意差は認められなかった。

4) 剖検 (Tables 6, 7, Appendices 17, 18)

被験物質の投与に起因する変化は、認められなかった。

なお、散発的に認められ、被験物質の投与とは無関係と考えられた所見としては、肺の黒色点が対照群の雌の1匹、8 mg/kg群の雄の1匹及び1000mg/kg群の雌の1匹、肝臓の横隔膜結節が対照群の雌の1匹、胸腺の赤色斑が8 mg/kg群の雄の1匹並びに精巣及び精巣上体の小型化（両側性）が1000mg/kg群の雄の1匹に認められた。さらに、40 mg/kg群に認められた1対の交尾不成立例の雄においても、精巣及び精巣上体の小型化（片側性）が認められた。交尾不成立例の雌には、変化は認められなかった。

5) 器官重量 (Tables 8, 9, Appendices 19~22)

200及び1000mg/kg群の雄で、腎臓の絶対及び相対重量の有意な増加が認められた。さらに、1000mg/kg群の雌で肝臓及び腎臓の相対重量の有意な増加が認められた。

6) 病理組織学検査 (Tables 10, 11, Appendices 17, 18)

(1) 生殖器系以外の器官

被験物質の投与に起因する変化は、認められなかった。

被験物質の投与とは無関係な変化として、対照群及び1000mg/kg群の雌雄或いはそのいずれかに、肝臓では微小肉芽腫及び巣状壊死、腎臓では近位尿細管上皮の好酸体及び硝子滴、好塩基性尿細管、嚢胞形成、硝子円柱、皮質のリンパ球浸潤及び線維化、皮髄境界部の鉍質沈着並びに腎盂上皮の過形成が認められた。また、剖検で散発的に認められた肺の黒色点には出血或いはヘマトイジン結晶を伴った出血、胸腺の赤色斑には出血が認められた。

(2)生殖器官

被験物質の投与に起因する変化は、認められなかった。

被験物質の投与とは無関係な変化として、剖検で認められた1000mg/kg群の雄の1匹の小型化した精巣及び精巣上体（両側性）には精巣の精細管萎縮及び間質細胞の過形成並びに精巣上体の精巣上体管内精子の減少及び細胞崩壊物が認められた。40mg/kg群で認められた交尾不成立例では、雄の精巣に精細管萎縮が両側性に認められ、得に片側の変化は重度で精子形成が殆ど認められず、精巣上体管内精子も認められなかった。同例の前立腺及び精嚢並びに雌の卵巣、子宮及び下垂体には変化は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響 (Table 12, Appendices 23, 24)

(1)性周期検査

群分け時から交配前までにおいて、いずれの動物にも順調な発情回帰が確認され、被験物質投与各群の発情周期は、対照群と比べて有意差は認められなかった。しかしながら、交配開始後、40mg/kg群の1匹(動物番号:530)は、発情後期から発情休止期へ性周期像が移行し、交配期間終了時まで発情休止期が続いて、交尾不成立に終わった。

(2)交尾率及び受胎率

交尾は40mg/kg群の1対を除いて全例に成立し、成立に要する期間にも、有意な差は認められなかった。受胎率は、対照群及び被験物質投与各群とも100%であった。

(3) 黄体数，着床数及び着床率

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

(4) 出産率及び妊娠期間

出産率は，対照群及び被験物質投与各群とも100%であった。妊娠期間においても，対照群と被験物質投与各群の間に有意差は認められなかった。

(5) 分娩及び哺育状態

対照群及び被験物質投与各群とも，分娩及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 13, Appendix 25)

被験物質投与各群の1腹当たりの総出産児数，分娩率，新生児数，出生率，性比，哺育0日の体重，並びに哺育4日の生存率及び体重には，いずれも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 14, 15, Appendices 26, 27)

外表及び内臓異常は，いずれの児動物にも認められなかった。内臓変異については，胸腺の頸部残留及び左臍動脈遺残が各群に少数例認められたものの，いずれの投与群ともそれらの発現率に対照群との有意差は認められなかった。

考 察

1. 反復投与毒性について

3-メトキシ-3-メチルブタノールのラットの反復投与において認められた変化は腎臓及び肝臓重量の変化で、雄は200及び1000mg/kg群で腎臓の絶対及び相対重量に、雌では1000mg/kg群で肝臓及び腎臓の相対重量にいずれも有意な増加が認められた。しかしながら、これらの器官には被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。また、動物の一般状態、体重、摂餌量及び剖検所見においては、被験物質の投与による影響は認められなかった。

類似した結果は、15、60、250及び1000mg/kg/dayで実施した本物質のラットにおける28日間反復経口投与毒性試験においても認められており、主な毒性は250mg/kg群或いは1000mg/kg群で認められた腎臓及び肝臓の相対重量増加であった¹⁾。

2. 生殖発生毒性について

雄親及び雌親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。また、児動物の発生・発育に関する各指標においても、被験物質の投与による影響は認められなかった。

なお、40 mg/kg群に認められた交尾不成立の1対については、それまで順調であった雌の性周期が交配開始の翌朝に発情後期となった後、持続性の休止期が認められ、交尾は成立しなかった。病理組織学検査においては、この雌の卵巢、子宮及び下垂体などに変化は認められなかった。交尾不成立の雄は、精巣の精子形成異常が観察されたが、交尾不成立とは関係がないものと思われる。したがって、交尾不成立の原因は、膣垢検査の刺激により雌が偽妊娠を起こしたものと考えられ、被験物質投与の影響によるものではないと判断された。なお、精巣の精子形成異常は本例以外に1000 mg/kg群の1匹にも認められたが、これらの発現は散発的で、偶発的所見と判断された。

以上の結果から、3-メトキシ-3-メチルブタノールのラットの反復投与において認められた毒性は、肝臓及び腎臓に対する影響であった。また、親動物への反復投与におけ

る無影響量は雄で40mg/kg/day, 雌で200mg/kg/day, 雌雄親動物の生殖能及び児動物の発生に対する無影響量は, いずれも1000mg/kg/dayと判断された.

文 献

- 1) 伊藤義彦ら, 3-メトキシ-3-メチルブタノールのラットを用いる28日間反復投与毒性試験(2002), 財団法人 畜産生物科学安全研究所 所内資料.

3-メトキシ-3-メチルブタノールのラットを用いる
簡易生殖毒性試験

(試験番号：00-255)

最終報告書 添付資料A

(図・群別平均値表)

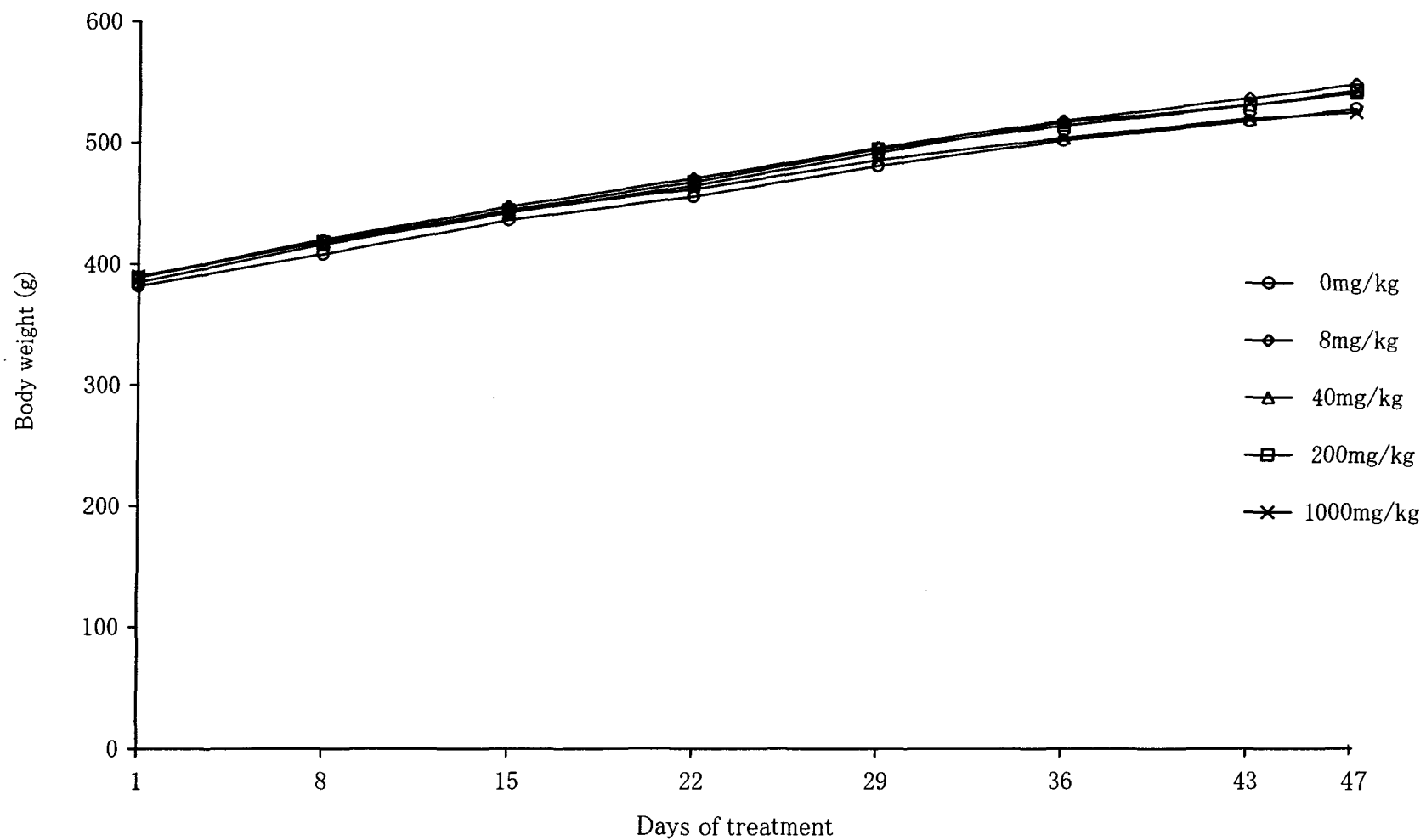


Fig. 1 Body weight change in male rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

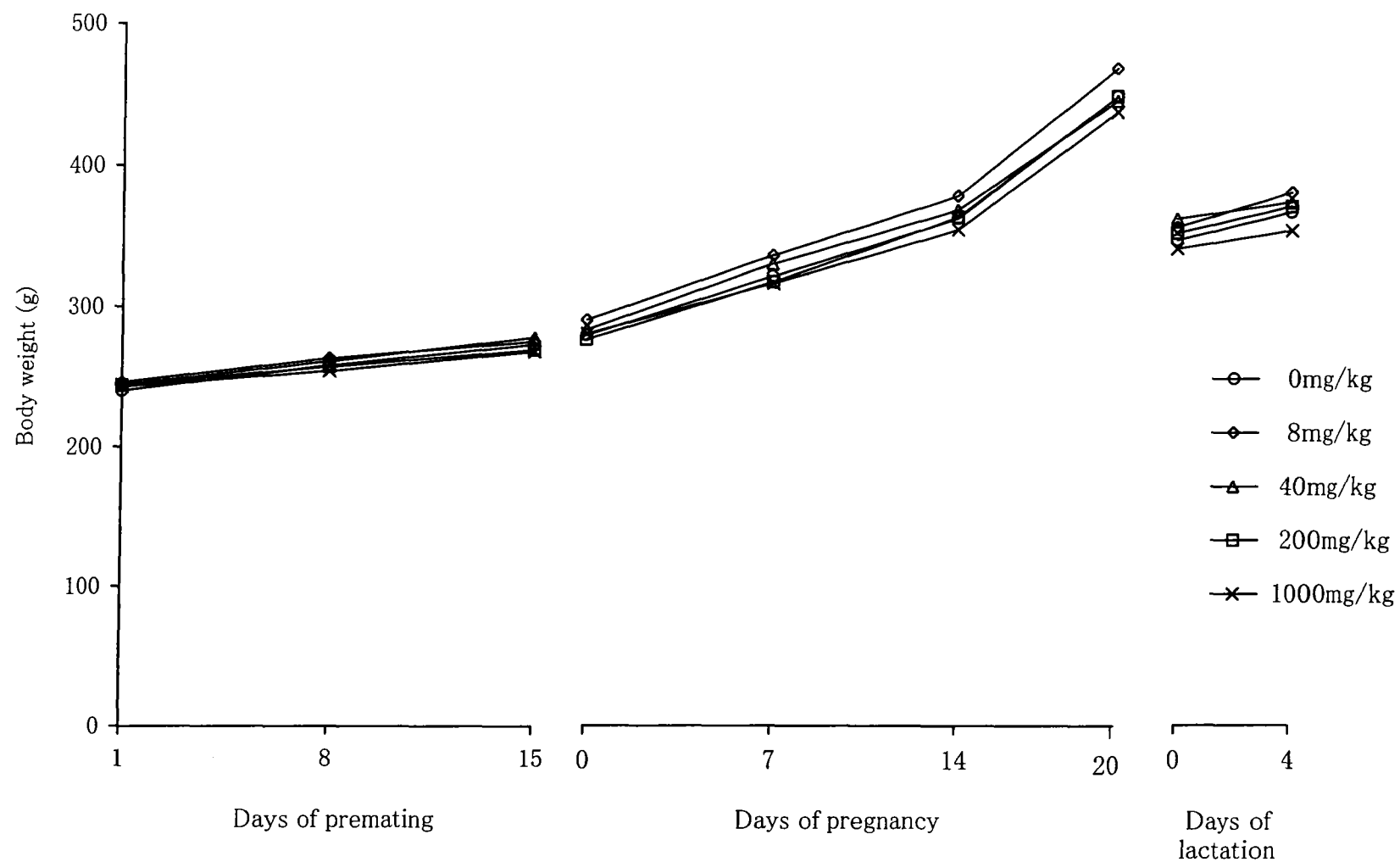


Fig. 2 Body weight change in female rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

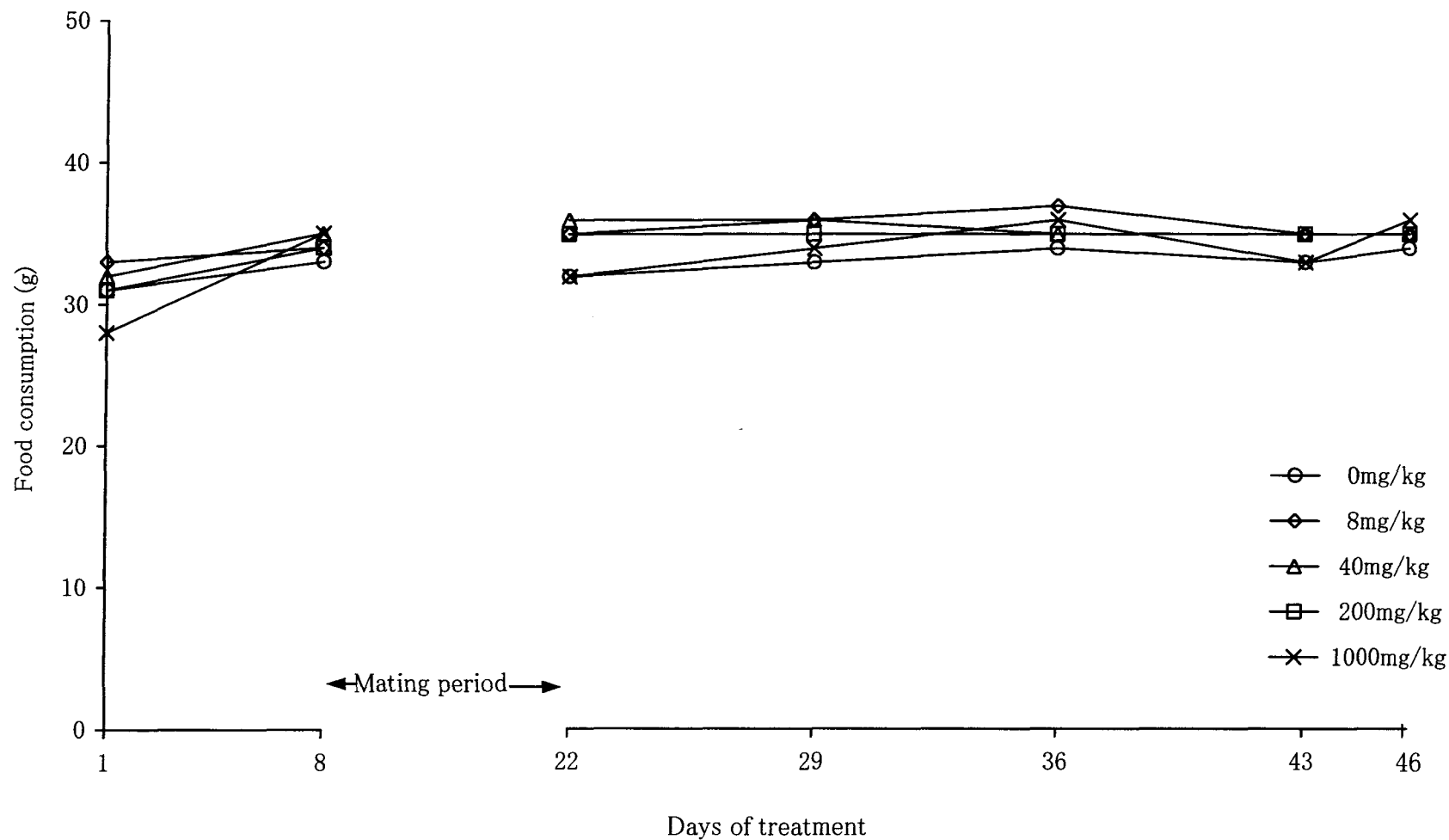


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

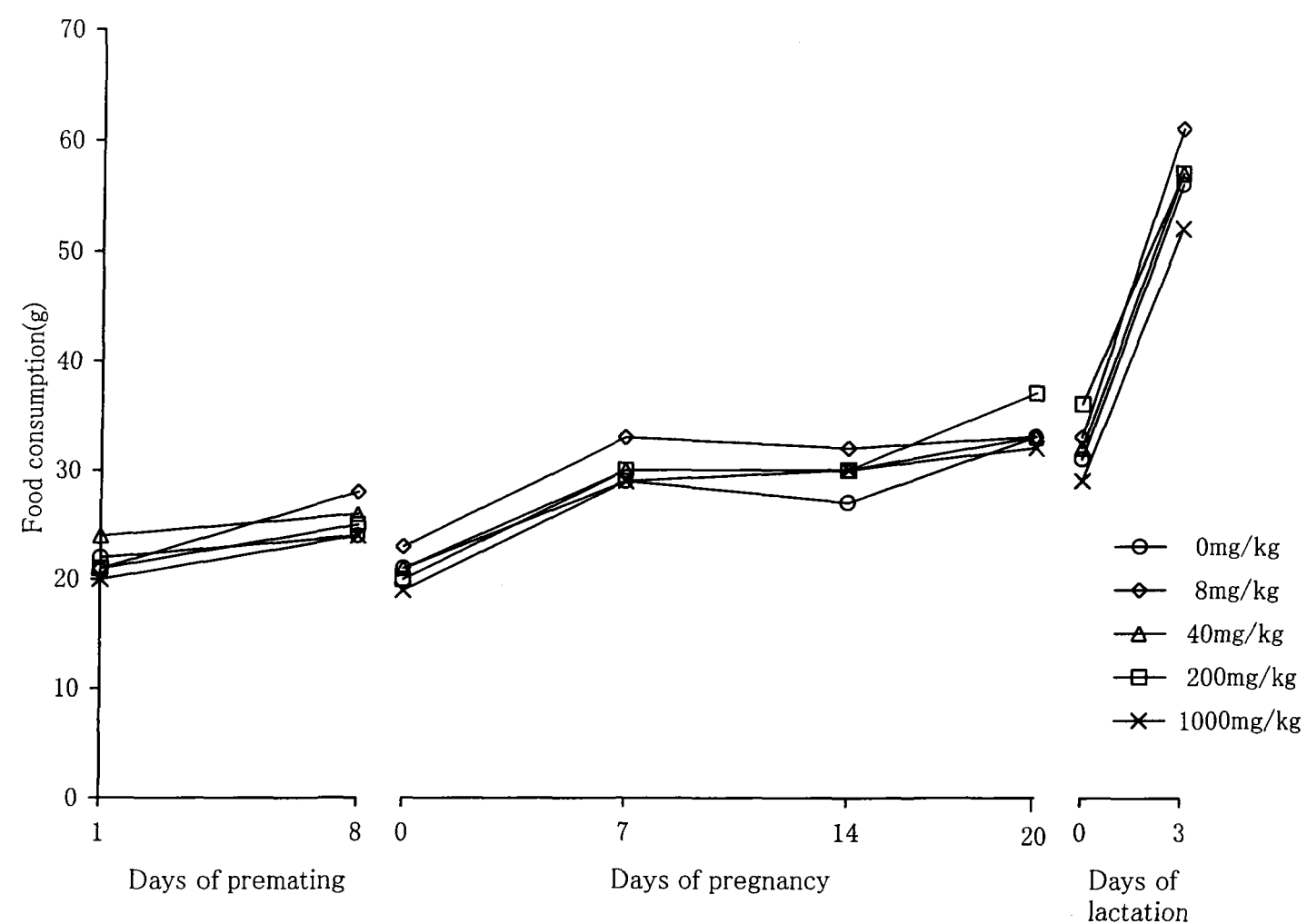


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

ॐ

Study No. 00-255

Table 2 Body weights of male rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in
the preliminary reproduction toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Days of treatment								Gain 1~47
	1	8	15	22	29	36	43	47	
0	382	408	436	455	480	501	517	527	145
	± 17	± 24	± 30	± 29	± 33	± 38	± 40	± 40	± 24
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
8	389	420	447	470	495	517	536	547	158
	± 20	± 27	± 29	± 32	± 37	± 40	± 44	± 46	± 32
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
40	385	416	442	464	491	516	530	540	155
	± 19	± 26	± 31	± 34	± 39	± 45	± 46	± 49	± 37
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
200	389	418	444	467	494	513	530	542	154
	± 23	± 30	± 35	± 40	± 43	± 44	± 46	± 45	± 27
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
1000	390	418	444	461	485	503	519	524	135
	± 22	± 24	± 31	± 31	± 34	± 39	± 47	± 44	± 30
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)

Each value is expressed as mean ± S.D.

(n): No. of animals

Table 3 Body weights of female rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	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	240	258	273	33	280	322	363	449	169	347	367	20
	± 12	± 15	± 18	± 11	± 19	± 19	± 28	± 43	± 32	± 27	± 28	± 11
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
8	246	263	275	29	291	337	379	469	179	356	381	25
	± 10	± 13	± 14	± 8	± 11	± 17	± 19	± 23	± 14	± 32	± 21	± 16
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
40	244	261	278	34	284	331	369	454	170	362	374	12
	± 9	± 14	± 16	± 10	± 21	± 24	± 25	± 36	± 21	± 27	± 20	± 21
	(12)	(12)	(12)	(12)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
200	244	257	269	25	277	318	364	449	172	352	371	18
	± 8	± 10	± 12	± 9	± 10	± 13	± 15	± 25	± 21	± 19	± 15	± 15
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
1000	243	254	268	25	281	317	355	438	157	341	354	14
	± 13	± 11	± 15	± 10	± 17	± 20	± 23	± 24	± 12	± 23	± 24	± 11
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)

Each value is expressed as mean ± S.D.

(n): No. of animals

Table 4 Food consumption of male rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Days of treatment						
	1	8	22	29	36	43	46
0	31 ± 3 (12)	33 ± 3 (12)	32 ± 3 (12)	33 ± 2 (12)	34 ± 4 (12)	33 ± 3 (12)	34 ± 3 (12)
8	33 ± 4 (12)	34 ± 4 (12)	35 ± 4 (12)	36 ± 4 (12)	37 ± 5 (12)	35 ± 5 (12)	35 ± 4 (12)
40	32 ± 3 (12)	35 ± 4 (12)	36 ± 3 (11)	36 ± 4 (12)	35 ± 5 (12)	35 ± 5 (12)	35 ± 4 (12)
200	31 ± 4 (12)	34 ± 3 (12)	35 ± 4 (12)	35 ± 4 (12)	35 ± 3 (12)	35 ± 4 (12)	35 ± 4 (12)
1000	28 ± 4 (12)	35 ± 2 (12)	35 ± 3 (11)	34 ± 3 (12)	36 ± 4 (12)	33 ± 5 (12)	36 ± 3 (12)

Each value is expressed as mean±S.D.
(n) : No. of animals

(g/rat/day)

Table 5 Food consumption of female rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg)	Days of pre mating		Days of pregnancy				Days of lactation	
	1	8	0	7	14	20	0	3
0	22	24	21	29	29	33	31	56
	± 4	± 3	± 4	± 3	± 4	± 6	± 7	± 9
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
8	21	28	23	33	32	34	33	61
	± 4	± 3	± 3	± 5	± 5	± 5	± 4	± 4
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
40	24	26	21	30	30	33	32	57
	± 3	± 4	± 4	± 3	± 3	± 3	± 7	± 7
	(12)	(12)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
200	21	25	20	30	30	37	36	57
	± 3	± 2	± 4	± 3	± 4	± 6	± 4	± 6
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)
1000	20	24	19	29	30	32	30	52
	± 2	± 4	± 6	± 4	± 5	± 3	± 5	± 5
	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)	(12)

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

(n) : No. of animals

Table 6 Incidence of necropsy findings of male rats treated orally with 1-butanol,3-methoxy-3-methyl-
in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organ : Findings	Grade	Dose (mg/kg) No. of animals	0	8	40	200	1000
			12	12	12	12	12
Lung : Black spots	-		12	11	12	12	12
	+		0	1	0	0	0
Testis : Small, unilateral	-		12	12	11	12	12
	+		0	0	1	0	0
Small, bilateral	-		12	12	12	12	11
	+		0	0	0	0	1
Epidydimis : Small, unilateral	-		12	12	11	12	12
	+		0	0	1	0	0
Small, bilateral	-		12	12	12	12	11
	+		0	0	0	0	1

- : Negative; + : Slight

Table 7 Incidence of necropsy findings of female rats treated orally with 1-butanol,3-methoxy-3-methyl-
in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organ : Findings	Grade	Dose (mg/kg) No. of animals	0	8	40	200	1000
			12	12	12	12	12
Lung : Black spot	-		11	12	12	12	11
	+		1	0	0	0	1
Liver : Diaphragmatic nodule	-		11	12	12	12	12
	+		1	0	0	0	0
Thymus : Red spots	-		12	11	12	12	12
	+		0	1	0	0	0

- : Negative; + : Slight

Table 9 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	No.of Animals	B.W. (g)	Liver (g)	Kidney (g)
Absolute	0	12	372 ±31	17.18 ±1.67	2.10 ±0.25
	8	12	383 ±21	18.06 ±1.25	2.27 ±0.18
	40	11	378 ±20	18.30 ±1.30	2.28 ±0.15
	200	12	372 ±19	17.51 ±1.76	2.20 ±0.17
	1000	12	357 ±23	18.30 ±1.32	2.27 ±0.13
Relative @	0	12	372 ±31	4.62 ±0.25	0.57 ±0.05
	8	12	383 ±21	4.72 ±0.26	0.59 ±0.04
	40	11	378 ±20	4.84 ±0.24	0.60 ±0.03
	200	12	372 ±19	4.70 ±0.40	0.59 ±0.03
	1000	12	357 ±23	5.13 ** ±0.25	0.64 ** ±0.05

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight

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

Table 8 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	No.of Animals	B.W. (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Testis (g)	Epidid. (g)
Absolute	0	12	526 ±37	17.47 ±2.38	3.10 ±0.28	3.39 ±0.35	1.40 ±0.16
	8	12	550 ±47	18.36 ±2.52	3.26 ±0.35	3.52 ±0.30	1.46 ±0.14
	40	12	542 ±50	17.51 ±2.68	3.25 ±0.32	3.38 ±0.36	1.43 ±0.21
	200	12	544 ±46	17.35 ±2.64	3.50 * ±0.23	3.48 ±0.36	1.46 ±0.14
	1000	12	527 ±47	17.83 ±2.51	3.68 ** ±0.47	3.37 ±0.58	1.42 ±0.20
Relative @	0	12	526 ±37	3.31 ±0.25	0.59 ±0.04	0.65 ±0.09	0.27 ±0.04
	8	12	550 ±47	3.33 ±0.22	0.59 ±0.05	0.65 ±0.07	0.27 ±0.04
	40	12	542 ±50	3.22 ±0.29	0.60 ±0.06	0.63 ±0.08	0.27 ±0.05
	200	12	544 ±46	3.18 ±0.23	0.65 * ±0.04	0.64 ±0.07	0.27 ±0.03
	1000	12	527 ±47	3.37 ±0.22	0.70 ** ±0.04	0.64 ±0.12	0.27 ±0.04

Each value is expressed as mean ± 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 10-1 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organ : Findings	Grade	Dose (mg/kg) No. of animals	0 12	8 12	40 12	200 12	1000 12
Liver : Microgranuloma	-		11	-	-	-	12
	+		1	-	-	-	0
Kidney : Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	-		9	-	-	-	11
	+		1) (3)	-	-	-	0) (1)
	++		2)	-	-	-	1)
Hyaline droplet, tubular epithelium	-		1) (11)	-	-	-	3) (12)
	+		10)	-	-	-	9)
	++		1	-	-	-	0
Basophilic tubules	-		7) (11)	-	-	-	8) (12)
	+		4)	-	-	-	4)
	++		1	-	-	-	0
Cyst, solitary	-		11	-	-	-	11
	+		1	-	-	-	1
Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	-		11	-	-	-	11
	+		1	-	-	-	1
Fibrosis, cortex	-		11	-	-	-	12
	+		1	-	-	-	0
Cast, hyaline	-		12	-	-	-	11
	+		0	-	-	-	1

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; - : Not examined

Table 10-2 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organ : Findings	Grade	Dose (mg/kg) No. of animals	0 12	8 12	40 12	200 12	1000 12
Testis : Atrophy, seminiferous tubules, bilateral	- +/++		12 0	-- --	0/1 ^a 1/1	-- --	11 1
Hyperplasia, interstitial cell	- +		12 0	-- --	0/1 1/1	-- --	11 1
Epidydimis : Decrease, sperm	- +/+++		12 0	-- --	0/1 1/1	-- --	11 1
Cell debris, lumen	- +		12 0	-- --	1/1 0/1	-- --	11 1
Lung : Hemorrhage	- +		-- --	0/1 ^a 1/1	-- --	-- --	-- --

- : Negative; + : Slight; ++ : Moderate; +++ : Severe; -- : Not examined

a : Examined the animal with a macroscopical abnormality

Table 11 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organ	Findings	Grade	Dose (mg/kg) No. of animals	0 12	8 12	40 12	200 12	1000 12
Liver	Microgranuloma	-		11	-	-	-	9
		+		1	-	-	-	3
	Necrosis, focal	-		12	-	-	-	11
		+		0	-	-	-	1
Kidney	Basophilic tubules	-		9	-	-	-	8
		+		3	-	-	-	4
	Cyst, solitary	-		11	-	-	-	12
		+		1	-	-	-	0
	Cast, hyaline	-		12	-	-	-	11
		+		0	-	-	-	1
	Mineralization, cortico- medullary junction	-		11	-	-	-	12
		+		1	-	-	-	0
Lung	Hyperplasia, pelvic epithelium	-		11	-	-	-	12
		+		1	-	-	-	0
Lung	Hemorrhage/hemorrhage with hematoidin crystals	-		0/1 ^a	-	-	-	0/1 ^a
		+		1/1	-	-	-	1/1
Thymus	Hemorrhage	-		-	0/1 ^a	-	-	-
		+		-	1/1	-	-	-

- : Negative; + : Slight; - : Not examined

a : Examined the animal with a macroscopical abnormality

No abnormalitise were detected of the ovary from animals of control and 1000mg/kg groups.

Table 12 Reproduction results of rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	0	8	40	200	1000
Estrus cycle (days, Mean $\pm$ S.D.)		4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.1
No. of pairs mated		12	12	12	12	12
No. of pairs with successful copulation		12	12	11	12	12
Copulation index (%)		100	100	91.7	100	100
Pairing days until copulation (days, Mean $\pm$ S.D.)		2.3 $\pm$ 0.9	3.2 $\pm$ 0.8	2.0 $\pm$ 1.0	2.3 $\pm$ 1.2	3.3 $\pm$ 1.8
No. of pregnant females		12	12	11	12	12
Fertility index (%)		100	100	100	100	100
No. of corpora lutea (Mean $\pm$ S.D.)		18.7 $\pm$ 2.7	19.5 $\pm$ 2.2	18.2 $\pm$ 1.9	17.8 $\pm$ 2.1	18.3 $\pm$ 2.1
No. of implantation sites (Mean $\pm$ S.D.)		17.0 $\pm$ 2.6	18.1 $\pm$ 1.8	16.6 $\pm$ 3.0	16.4 $\pm$ 1.2	16.7 $\pm$ 2.4
Implantation index (%), Mean $\pm$ S.D.)		91.4 $\pm$ 9.0	93.0 $\pm$ 6.2	90.9 $\pm$ 8.9	92.7 $\pm$ 6.5	91.7 $\pm$ 11.5
No. of pregnant females with parturition		12	12	11	12	12
Gestation length (days, Mean $\pm$ S.D.)		22.5 $\pm$ 0.5	22.4 $\pm$ 0.5	22.5 $\pm$ 0.5	22.2 $\pm$ 0.4	22.4 $\pm$ 0.5
No. of pregnant females with live pups		12	12	11	12	12
Gestation index (%)		100	100	100	100	100
No. of pregnant females with live pups on day 4		12	12	11	12	12

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 living pregnant females) $\times$ 100

Table 13 Litter results of rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0	8	40	200	1000
No. of pups born	15.2 ± 3.9	16.7 ± 2.3	15.4 ± 3.3	15.3 ± 1.7	14.9 ± 2.1
Delivery Index	89.5 ± 19.8	92.1 ± 8.6	92.0 ± 7.4	93.3 ± 7.1	89.9 ± 8.1
No. of pups alive on day 0 of lactation					
Total	15.2 ± 3.9	16.7 ± 2.3	15.3 ± 3.2	15.3 ± 1.7	14.5 ± 2.5
Male	7.8 ± 2.3	7.5 ± 2.8	7.7 ± 2.8	8.3 ± 2.5	7.3 ± 2.9
Female	7.4 ± 2.5	9.2 ± 2.3	7.5 ± 2.7	7.1 ± 1.6	7.2 ± 1.9
Live birth Index(%)	100 ± 0	100 ± 0	99.5 ± 1.6	100 ± 0	97.2 ± 9.6
Sex ratio(Male/Female)	1.04	0.82	1.04	1.16	1.01
No. of pups alive on day 4 of lactation					
Total	14.9 ± 3.7	16.3 ± 2.3	14.9 ± 3.2	15.0 ± 2.0	14.1 ± 2.6
Male	7.8 ± 2.3	7.4 ± 2.9	7.4 ± 3.0	8.0 ± 2.6	7.1 ± 3.0
Female	7.2 ± 2.4	8.9 ± 2.0	7.5 ± 2.7	7.0 ± 1.8	7.0 ± 1.9
Viability Index(%)	98.6 ± 2.6	98.1 ± 4.4	97.6 ± 4.9	97.7 ± 4.5	97.1 ± 4.5
Body weight of live pups(g) on day 0					
Male	7.2 ± 0.6	7.1 ± 0.8	7.3 ± 0.8	7.0 ± 0.5	6.7 ± 0.6
Female	6.9 ± 0.8	6.7 ± 0.9	7.0 ± 0.8	6.4 ± 0.5	6.5 ± 0.4
on day 4					
Male	11.7 ± 1.7	11.7 ± 1.7	11.6 ± 2.3	11.5 ± 0.8	11.0 ± 1.1
Female	11.4 ± 1.8	11.0 ± 1.6	11.0 ± 1.9	10.8 ± 0.7	10.7 ± 1.1

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 No. of male pups/Total No. of female pups
Each value is expressed as Mean ± S.D., except sex ratio

Table 14 External findings of rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0	8	40	200	1000
No. of pups examined	182	200	169	184	179
No. of pups with external anomalies	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

():No. of pups (Mean $\pm$ S.D. of individual litter percentages)

Table 15 Visceral findings of rats treated orally with 1-butanol, 3-methoxy-3-methyl- in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0	8	40	200	1000
No. of pups examined	181	199	166	183	173
No. of pups with visceral anomalies	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
No. of pups with visceral variations	4 (2.2±4.2)	11 (5.7±6.5)	4 (3.5±6.3)	2 (1.2±2.8)	2 (1.5±3.5)
Thymic remnant in neck	3 (1.7±4.1)	4 (2.2±4.1)	0 (0)	2 (1.2±2.8)	0 (0)
Persistent left umbilical artery	1 (0.5±1.8)	7 (3.6±6.0)	4 (3.5±6.3)	0 (0)	2 (1.5±3.5)

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