

最終報告書

試験表題：o-tert-ブチルフェノールのラットを用いた
経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号：R-1056

試験期間：2010年6月18日~2011年6月30日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

1. 目次	3
3. 要約	9
3.1 雌雄動物に対する影響	9
3.2 生殖発生に対する影響	9
4. 緒言	10
5. 試験材料及び方法	11
5.1 被験物質及び媒体	11
5.1.1 被験物質	11
5.1.2 媒体	12
5.2 投与液の調製及び保存方法	12
5.2.1 投与液の調製及び保存	12
5.2.2 投与液の安定性	12
5.2.3 投与液の濃度確認	12
5.3 試験動物種及び系統の選択理由	13
5.4 試験動物	13
5.5 群分け	13
5.6 飼育条件	14
5.7 動物の識別	14
5.8 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由	15

5.9	投与方法	15
5.10	投与量及び群構成	15
5.11	投与量の設定根拠	15
5.12	観察及び検査の方法	16
5.12.1	一般状態	16
5.12.2	体重	16
5.12.3	摂餌量	16
5.12.4	膣垢検査	16
5.12.5	交配	16
5.12.6	分娩及び哺育	17
5.12.7	出生児	17
5.12.8	病理学検査	17
5.13	統計解析	18
5.13.1	パラメータの算出	18
5.13.2	検定	18
6.	試験結果	20
6.1	一般状態 (Table 1-1~1-4、Appendix 1-1~1-16)	20
6.2	体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)	20
6.3	摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)	20
6.4	器官重量 (Table 4-1、4-2、Appendix 4-1~4-8)	20
6.5	剖検所見 (Table 5-1、5-2、Appendix 5-1~5-96)	20
6.6	病理組織学検査 (Table 6-1、6-2、Appendix 5-1~5-96)	20
6.7	性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)	21
6.8	交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-4)	21
6.9	分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-4)	21
6.10	出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-4)	21
6.11	出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-4)	21
6.12	出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-4)	21
6.13	出生児の生後4日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-4)	22
7.	考察	23
7.1	雌雄動物に対する影響	23
7.2	生殖発生に対する影響	23
8.	文献	25

R-1056

図

Fig. 1、2	体重
Fig. 3、4	摂餌量

表

Table 1-1~1-4	一般状態
Table 2-1~2-4	体重
Table 3-1~3-4	摂餌量
Table 4-1、4-2	器官重量
Table 5-1、5-2	剖検所見
Table 6-1、6-2	病理組織学検査
Table 7	性周期
Table 8	交配成績
Table 9	分娩成績
Table 10	出生児の性比及び外表観察
Table 11	出生児の生存率
Table 12	出生児の体重
Table 13	出生児の生後4日剖検所見

3. 要約

o-tert-ブチルフェノールを 0（対照群：オリーブ油）、20、100 及び 500 mg/kg/day の投与量で、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄に交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで、雌には交配前 14 日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳 4 日まで経口投与し、雌雄動物に対する影響、特に生殖発生毒性について概略的に検討した。

3.1 雌雄動物に対する影響

500 mg/kg 投与群において、雌雄ともに失調性歩行及び流涎、雌では更に自発運動の低下が散見され、雌雄ともに摂餌量の減少を伴った体重増加抑制が認められた。病理学検査では、同群において肝臓重量の増加とこれに関連する組織変化と考えられる小葉中心性肝細胞肥大が認められた。

3.2 生殖発生に対する影響

性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には被験物質投与の影響は認められず、雌雄内部生殖器の病理組織学検査では、被験物質投与に起因した変化は認められなかった。更に、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数、出生率及び性比に被験物質投与の影響は認められず、分娩及び哺育状態に異常は認められなかった。

出生児では、500 mg/kg 投与群において体重が低値傾向を示した。出生時の外表観察及び剖検所見並びに生後 4 日生存率に被験物質投与による変化は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下における *o-tert*-ブチルフェノールの雌雄動物及び生殖発生に対する無影響量及び無毒性量はいずれも 100 mg/kg/day と推定された。

R-1056

4. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室の委託により、*o-tert*-ブチルフェノールのラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験を実施したので、その成績を報告する。

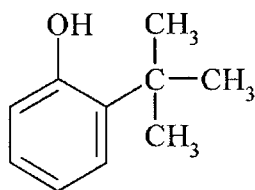
5. 試験材料及び方法

5.1 被験物質及び媒体

5.1.1 被験物質

o-*tert*-ブチルフェノールは 以下の情報とともに購入した。
また、試験開始前に赤外吸収スペクトルの測定により特性が確認されている。¹⁾

名称	:	<i>o</i> - <i>tert</i> -ブチルフェノール
英語名称	:	<i>o</i> - <i>tert</i> -Butylphenol
別名	:	2- <i>tert</i> -ブチルフェノール
CAS 番号	:	88-18-6
官報公示整理番号	:	3-503
構造式又は示性式	:	



分子式	:	C ₁₀ H ₁₄ O
分子量	:	150.22
常温における性状	:	微黄色透明液体
沸点	:	221℃
発火点	:	355℃
純度	:	99.9%
不純物	:	不明
比重(20/20)	:	0.9839
屈折率(n _{20/D})	:	1.5238
保存方法	:	密栓、冷暗所〔冷暗所として冷蔵庫内（許容温度：1~10℃、実測温度：3~7℃）に保存した。〕
保存場所	:	御殿場研究所被験物質保存室及び第2研究棟4階被験物質調製室
取扱い上の注意	:	作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。 取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。
安定性	:	投与期間終了後、残余被験物質の赤外吸収スペクトルを確認した結果、実験実施前に確認した参照スペクトル ¹⁾ とほぼ同様であり、投与期間を通して被験物質は安定であったと判断した。

残余被験物質の処理： 被験物質 5 g を保存試料として御殿場研究所被験物質保存室に保存し、残余被験物質はすべて焼却処分した。

5.1.2 媒体

名称： オリーブ油
製造者： 丸石製薬株式会社
ロット番号： 0420
保存方法： 室温
保存場所： 御殿場研究所第 2 研究棟被験物質調製室

なお、媒体については、先に実施された「2-*tert*-ブチルフェノールのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験」²⁾において投与液の媒体として用いられたオリーブ油を選択するとともに陰性対照物質として対照群の投与に使用した。

5.2 投与液の調製及び保存方法

5.2.1 投与液の調製及び保存

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に秤取し、媒体を加えて溶解した。本溶液をメスシリンダーに移し、更に媒体を加え規定濃度（4、20 及び 100 mg/mL）となるよう調製した。投与液は、最大 7 日分を一括して調製し、1 日使用分ごと褐色ガラス瓶に小分けして冷所（冷蔵庫内、許容温度：1~10°C、実測温度：4~8°C）に保存し、調製日を含め 8 日以内の投与に使用した。

5.2.2 投与液の安定性

本被験物質の 0.4 及び 200 mg/mL 溶液（媒体：オリーブ油）は、冷蔵保存で 8 日間安定であることが確認されている。²⁾

5.2.3 投与液の濃度確認

雄の投与 1 週と投与 6 週の 2 回、投与に用いる各濃度の投与液について、投与に使用する前に HPLC 法により濃度を確認した。その結果、規定濃度に対する各投与液の測定濃度の割合は 96.3~101.5%であり、いずれも許容範囲内（濃度：表示値に対する割合：100.0±10.0%）であった。なお、濃度測定は当試験施設において確立された分析法¹⁾に従い、用いた標準物質、HPLC システム及び測定条件は以下の如くであった。分析法の概略を以下に示す。

[標準物質]

被験物質の一部を標準物質として使用した。

[HPLC システム]

機器名及び型式		メーカー
HPLC	2690 セパレーションモジュール	Waters Corporation
検出器	2487 デュアルλ UV/VIS 検出器	
データ処理装置	ミレニアム ³² クロマトグラフィーマネジャー	

[HPLC 測定条件]

カラム : L-column ODS (4.6 mm I.D. × 150 mm、粒子径 5 μm、
 一般財団法人化学物質評価研究機構)
 カラム恒温槽設定温度 : 40°C
 移動相 : アセトニトリル／精製水混液 (7/3、v/v)
 流速 : 1 mL/min
 検出 : UV (測定波長 272 nm)
 注入量 : 5 μL
 オートサンプラー内設定温度 : 室温 (温度設定しない)

5.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりげっ歯類を用いた試験が必要とされており、また、反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験に広く用いられ、背景資料が豊富である系統を選択した。

5.4 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] の雌雄各 62 匹をそれぞれ 8 週齢で入手^{注)} し、入荷日を馴化 1 日と起算して、3 日間の検疫期間を含む 19 日間、馴化飼育した。その間、一般状態を毎日 1 回観察し、体重を馴化 1、3、8、15 及び 19 日に測定した。雌については、更に膣垢を馴化 4~17 日の間採取し、多数の角化上皮細胞から成る膣垢像を発情の指標として 4~5 日の周期で回帰するものを正常とし、性周期異常の有無を調べた。その結果、雌 2 匹に性周期異常が認められたが、一般状態に異常は認められなかった。試験には、性周期異常の認められた雌 2 匹を除く雌雄より、順調な体重推移を示した各 48 匹をそれぞれ選択して 10 週齢で使用した。

注) : 試験計画書に従い、動物発注数は雌雄各 60 匹であったが、実際には各 62 匹が納入された。

5.5 群分け

前項に記載された馴化中の観察、検査結果に基づいて選抜された雌雄各 48 匹は、群分け当日の体重により各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群に割付けた。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組み合わせ

(ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた)で行った。投与開始時の体重は、雄で 375~432 g (平均体重: 401 g)、雌は 219~266 g (平均体重: 240 g) であり、雌雄とも平均値 $\pm$ 20%以内の体重範囲であった。群分けから除外された雄 14 匹及び性周期異常の雌 2 匹は、投与開始日に試験から除外した。残りの雌 12 匹は交配用無処置動物として継続飼育したが、交配に用いなかったため、交配終了後、試験から除外した。

5.6 飼育条件

飼育は、温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測値: $21\sim 26^{\circ}\text{C}$)、相対湿度 $50\pm 20\%$ (実測値: $40\sim 76\%$)、換気回数 10~15 回/h、照明 12 時間/日 (07:00~19:00) の動物飼育室 (飼育室番号: 901 号室) で行った。なお、飼育中に空調機の一時的な不調などにより、飼育室内の相対湿度の上昇がみられた。しかし、許容範囲を超えた時間は短く (約 10~30 分)、この間、動物に湿度上昇によると思われる異常はみられず、試験成績の信頼性に影響を及ぼす環境要因とはならなかった。動物は、交配中を除いてブラケット式金属製網ケージ (W254×D350×H170 mm: リードエンジニアリング株式会社) へ個別に収容した。なお、妊娠 17 日から授乳 4 日までは、床敷 (ホワイトフレーク: 日本チャールス・リバー株式会社) を入れたプラスチック製エコンケージ (W340×D400×H185 mm: 日本クレア株式会社) へ 1 腹ごと収容した。飼料は NMF 固形 (放射線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号: 100210、100309、100415、100518、100611) をステンレス製給餌器により自由に摂取させた。飲料水は水道水 (御殿場市営水道水) を自動給水装置又は給水瓶を用いて自由に摂取させた。飼料に関しては供試全ロットについて、床敷については、定期的 (年 6 回) にそれぞれ Eurofins Scientific Analytice あるいは財団法人日本食品分析センターで実施された混入物質の分析結果を入手した。飲料水については、芝浦セムテック株式会社 (旧社名: 東芝機械環境センター株式会社) に定期的 (年 4 回) に水質検査を依頼し、その結果を入手した。これらの検査結果より飼料、飲料水及び床敷中の混入物質が試験成績に影響を与える可能性のないことを確認した。

5.7 動物の識別

動物の個体識別は入荷時に 3 桁の番号が連番で刻印された小動物用耳標をつけて行った。群分け後は、性別及び投与量ごと (対照群、低、中及び高用量の順) に 4 桁の番号をつけた。なお、1000 の位は群、100 の位は性 (0 番を雄、1 番を雌)、10 と 1 の位は個体番号とした。飼育ケージには、投与量 (群) ごとに色分けされ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号、剖検予定日 (雄)、交尾成立日 (雌雄) 及び分娩日 (雌) を明記したラベルを付した。

5.8 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 421 に準じ、経口投与を選択した。投与期間は、雄では交配前 14 日間、交配期間 14 日間、その後剖検前日までの 14 日間の計 42 日間、雌では交配前 14 日間、交配期間及び妊娠期間を通して授乳 4 日までとした。なお、本試験では、分娩母動物については 41~49 日間、不妊動物（動物番号：2101、2103、2111、4107）については 42~45 日間の投与期間となった。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている 1 回/日（7 回/週）とした。

5.9 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与として一般的な強制経口投与とした。投与容量は 5 mL/kg 体重とし、1 日 1 回、09:07~11:56 の間にフレキシブル胃ゾンデを用いて投与液を投与した。ただし、投与時に分娩中であった動物は分娩終了を待って 14:33~15:28 の間に投与した。対照群には媒体（オリブ油^{*}）のみを同様に投与した。個体ごとの投与液量は、最近時の体重を基に mL 単位で小数第二位を四捨五入して算出した。

※ 試験計画書の該当箇所にコーン油と誤って記載されていたが、明らかな誤植であり、対照群には媒体として規定されたオリブ油を投与した。

5.10 投与量及び群構成

投与量は 20、100 及び 500 mg/kg/day の 3 用量とし、対照群を加え 4 群構成とした。1 群当たりの動物数は雌雄各 12 匹とした。群構成表を Text table 1. に示した。

Text table 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	被験液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
対 照 群	0	0	5	雄	12	1001~1012
				雌	12	1101~1112
低用量群	20	4	5	雄	12	2001~2012
				雌	12	2101~2112
中用量群	100	20	5	雄	12	3001~3012
				雌	12	3101~3112
高用量群	500	100	5	雄	12	4001~4012
				雌	12	4101~4112

5.11 投与量の設定根拠

本試験の投与量は、先に実施した「*o*-tert-ブチルフェノールのラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（投与量設定試験）」³⁾（投与量：250、500 及び 1000 mg/kg）の結果を参考に設定した。投与量設定試験では、1000 mg/kg 投与群で約半数例が死亡した。500 mg/kg 投与群で一般状態、体重及び摂餌量、血液化学検査、剖検並びに肝臓重量に被験物質投与の影響と考えられる変化が認められた。250 mg/kg 投与群では、血液学検査及び血液化学検査に軽度な影響はみられたものの一般状態、体重、摂餌量、器官重量及び剖検には被験物質投与の影響と考えられる変化が認められなかった。ま

た、28日間反復投与毒性試験²⁾（投与量：4、20、100及び500 mg/kg）において、無影響量は雌雄いずれも20 mg/kg/dayとの報告がある。したがって、本試験における投与量は投与期間を考慮し明らかな毒性兆候の発現が予想される500 mg/kgを高用量とし、以下公比約5で除して100及び20 mg/kgをそれぞれ中及び低用量に設定した。

5.12 観察及び検査の方法

試験日の起算は、投与開始日を投与1日、投与1日から7日を投与1週、交尾成立日を妊娠0日、分娩終了日を授乳0日とした。

5.12.1 一般状態

全個体について、検疫・馴化期間中は毎日1回、投与期間中は毎日3回（投与前、投与直後及び投与約1時間後）、それぞれ体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態における異常の有無を観察した。なお、妊娠期間中の動物を手にとっての定期的な観察は、妊娠0、7、14及び20日に行った。

5.12.2 体重

全個体について、雄は投与1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、42日及び剖検日に、雌は投与1、4、8、11、15日、交配期間中週2回（月曜、木曜）、妊娠0、4、7、11、14、17及び20日、授乳0及び4日並びに剖検日に体重を測定した。なお、午後に分娩の終了が確認された個体の授乳0日の体重を除いて、体重は午前中の投与前に測定した。

5.12.3 摂餌量

全個体について、雄は投与1、4、8、11、15、32、36、39及び42日に、雌は投与1、4、8、11及び15日、妊娠1、4、7、11、14、17及び20日並びに授乳2及び4日に残餌量を測定し、前日の給餌量との差を1日摂餌量として算出した。給餌量及び残餌量ともに午前中の投与前に測定した。

5.12.4 膣垢検査

雌の全個体について、投与開始翌日から交尾が認められるまで毎日膣垢を採取し、交配前投与期間中は5.4 試験動物の項と同様に性周期異常の有無を調べるとともに発情回数及び発情から次の発情までの日数（性周期）を求めた。交配期間中は膣垢内の精子の有無を調べた。

5.12.5 交配

交配前投与期間終了後、同じ投与群の雌雄を1:1で終夜同居させ、翌朝、膣栓形成あるいは膣垢中に精子を確認したものを交尾成立とみなした。交配開始日を0日と起算して交尾までに要した日数を求めた。

5.12.6 分娩及び哺育

交尾が成立した雌動物は、妊娠 21 日から妊娠 25 日の午前まで 1 日 2 回（午前、午後）分娩の有無並びにその終了を確認し、交尾成立日より分娩終了までの間を妊娠期間として 1 日単位で求めた。分娩が終了した母動物については、胎盤及び羊膜の処理等を指標として分娩異常の有無を観察した後、授乳 4 日まで出生児を哺育させた。授乳期間中は児集め、営巣及び授乳の状態等を指標として哺育異常の有無を観察し、授乳 5 日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査（5.12.8 項）に供した。なお、妊娠 25 日の午前までに分娩認められなかった 20 mg/kg 投与群の 3 例（動物番号：2101、2103、2111）及び 500 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：4107）は、当日エーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査に供した。これら 4 例については、剖検時に子宮の着床の有無を確認した結果、いずれも着床が認められなかったため不妊とみなした。

5.12.7 出生児

母動物の分娩終了日を出生日（生後 0 日）とみなし、出生児数及び死産児数を数えた。出生児は外表異常の有無を観察し、性別を判定した後、体重を測定した。授乳期間中は毎日 1 回、死亡児の有無を観察した。生後 4 日に体重を測定した後、全例をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ、体外表、胸部・腹部を含む器官・組織の異常の有無を肉眼的に調べた。なお、出生児の体重は個別に測定し、雌雄別に各腹の平均値を算出した。

5.12.8 病理学検査

5.12.8.1 剖検及び器官重量

最終投与翌日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させた後、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、母動物については黄体数及び着床痕数を数えた。更に、雌雄の肝臓及び雄の精巣及び精巣上体については重量（絶対重量）を測定し、これらの器官について剖検日の体重から体重 100 g 当たりの相対重量を算出した。なお、精巣及び精巣上体の重量については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

5.12.8.2 病理組織学検査

全ての個体の肝臓、雄の精巣、精巣上体、前立腺及び精囊、雌の卵巣、子宮及び膈並びに肉眼的異常部位を個体識別部（耳標を装着した耳介）とともにリン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液で固定した（ただし、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後、リン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液に置換した。）。個体識別部を除くこれらの器官は、パラフィン包埋した後、切片とし、ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色標本作製した。鏡検は、まず対照群と高用量群の全個体並びに不妊雌動物の肝臓及び上記内部生殖器並びに全ての肉眼的異常部位について行った。なお、精巣、卵巣、精巣上体

及び精嚢は両側を、子宮は両角部を鏡検した。その結果、被験物質投与の影響が疑われた肝臓及び高用量群のみに変化が認められた精巣上体について、更に低及び中用量群の全個体を対象として検索した。

5.13 統計解析

5.13.1 パラメータの算出

以下の式により交尾率、授精率、受胎率及び出産率を群ごとに、妊娠期間、着床率、死産児率、外表異常率、出生率、生後 4 日生存率、生後 0 及び 4 日の性比を母動物ごとに算出した。なお、出生児の体重については母動物ごと雌雄別に平均値を求めた。

交尾率(%) = (交尾動物数/同居動物数) × 100

授精率(%) = (雌を妊娠させた雄の数/交尾した雄の数) × 100

受胎率(%) = (妊娠した雌の数/交尾した雌の数) × 100

妊娠期間(日) = 妊娠 0 日から分娩した日までの日数

出産率(%) = (出生児出産雌数/妊娠雌数) × 100

着床率(%) = (着床痕数/黄体数) × 100

死産児率(%) = (死産児数/出生児数及び死産児数) × 100

外表異常率(%) = (外表異常児数/出生児数) × 100

出生率(%) = (出生児数/着床痕数) × 100

生後 4 日生存率(%) = (生後 4 日生存児数/出生児数) × 100

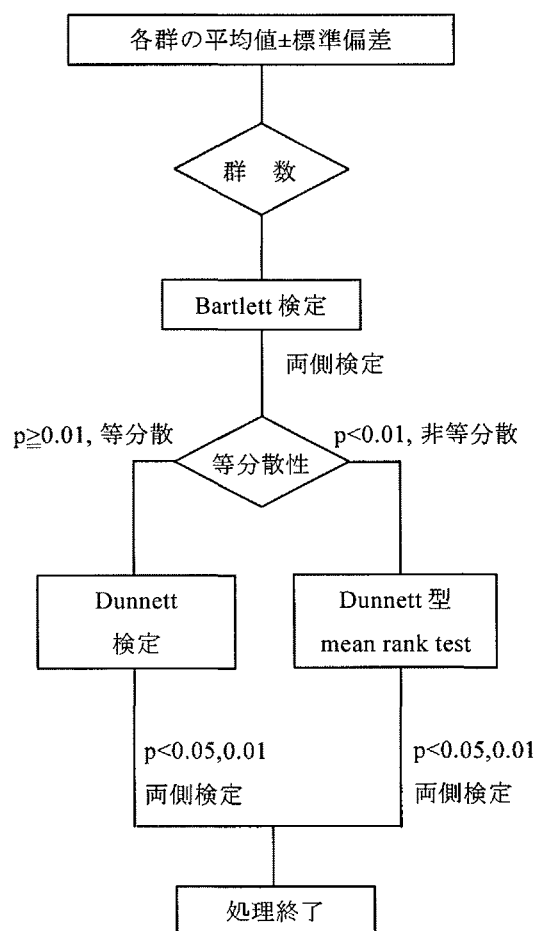
生後 0 日の性比 = 雄出生児数/出生児数

生後 4 日の性比 = 生後 4 日の雄生存児数/生後 4 日の生存児数

5.13.2 検定

データは対照群と各用量群との差について統計学的有意性の検定を行った。

体重、体重増加量（雄：投与 1~42 日、雌：投与 1~15 日、妊娠 0~20 日及び授乳 0~4 日、出生児：生後 0~4 日）、摂餌量、発情期像発現回数、性周期（発情周期）、交尾までに要した日数、妊娠期間、黄体数、着床痕数、生存児数、性比（生後 0 及び 4 日）及び器官重量（含、剖検時体重）は、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、次に示す模式図の方法に従って検定した。なお、交配期間中の雌の体重データ、不妊雌動物及び全哺育児が死亡した動物の器官重量データは統計解析より除外した。



着床率、死産児率、外表異常率、出生率及び生後 4 日生存率については、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、Dunnett 型 mean rank test により平均順位の差の検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った。

交尾率、授精率、受胎率、出産率は、各群の交尾動物数、雌を妊娠させた雄動物数、妊娠雌動物数、生存児出産雌動物数より算出し、Yeates の連続修正による χ^2 検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った。ただし、期待度数が 5 以下のセルがみられる場合には Fisher の直接確率計算法により検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った。

6. 試験結果

6.1 一般状態 (Table 1-1~1-4、Appendix 1-1~1-16)

死亡動物は何れの群においても発現しなかった。500 mg/kg 投与群において失調性歩行及び流涎が雄で 1~2 例及び 1~3 例、雌では 1~5 例及び 1 例に散見され、雌では更に自発運動の低下が 1~5 例、半閉眼が 1 例に散見された。100 mg/kg 以下の群では投与期間中を通して一般状態に異常は認められなかった。

6.2 体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)

500 mg/kg 投与群において、雄では投与 8 日以降、雌では投与 15 日以降、体重が対照群を有意に下回り、雄の投与期間中及び雌の交配前投与期間中並びに妊娠期間中の体重増加量が有意に低値となった。

6.3 摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)

500 mg/kg 投与群において、雄では投与 1、4 及び 8 日、雌では投与 4 日、妊娠 7 及び 20 日の摂餌量が対照群と比べ有意な低値を示した。その他、100 mg/kg 投与群で雌の授乳 2 日、20 mg/kg 投与群で雌の投与 11 日及び妊娠 14 日の摂餌量が対照群と比べ有意な高値を示した。しかし、20 及び 100 mg/kg 投与群における摂餌量の変動は何れも一時的であり、両群の雄の摂餌量には、投与期間を通して対照群と比べ有意な差は認められなかった。

6.4 器官重量 (Table 4-1、4-2、Appendix 4-1~4-8)

500 mg/kg 投与群において、肝臓の相対重量が雌雄ともに対照群に比べ有意な高値を示し、雄では絶対重量も有意な高値を示した。また、同群では精巣及び精巣上体の相対重量が対照群と比べ有意な高値を示した。20 及び 100 mg/kg 投与群では肝臓、精巣及び精巣上体の絶対及び相対重量に対照群と比べ有意な差は認められなかった。

6.5 剖検所見 (Table 5-1、5-2、Appendix 5-1~5-96)

雄では、心臓の白色巣及び回腸の結節が 500 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号:4005)、精巣の小型化 (両側) が 20 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号:2003) に認められた。雌では、皮下結節及び腺胃の暗赤色巣が 20 mg/kg 投与群の雌 1 例 (動物番号:2108)、肺の暗赤色巣が 20 mg/kg 投与群の雌 1 例 (動物番号:2112) に認められた。

6.6 病理組織学検査 (Table 6-1、6-2、Appendix 5-1~5-96)

500 mg/kg 投与群において、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が雄で 6/12 例、雌では 7/12 例に認められた。その他、精巣上体の精子肉芽が 20 及び 100 mg/kg 投与群の各 1/12 例及び 500 mg/kg 投与群の 2/12 例に認められた。しかし、各群における精子肉芽の発現頻度は低く、本系統のラットにおいて偶発的に認められ得る所見であり、被験物質投与に関連しない変化と考えられ、雌雄の内部生殖器には被験物質投与に起因した変

化は認められなかった。

6.7 性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)

各群の全例に 14 日間の観察期間中に 4~5 日周期で正常な発情回帰が認められ、発情回数及び性周期ともに対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。

6.8 交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-4)

各群の雌雄全例において交尾が成立し、交尾までに要した日数には対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。雌が不妊であった雌雄が 20 mg/kg 投与群で 3 組 (動物番号：2001、2101、2003、2103、2011、2111) 及び 500 mg/kg 投与群で 1 例 (動物番号：4007、4107) みられたが、授精率及び受胎率に対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。

6.9 分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-4)

各群の妊娠動物全例が正常に分娩し、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率には対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。

6.10 出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-4)

出生児の生後 0 及び 4 日における性比には対照群と各用量群との間に有意な差は認められず、外表異常を有する出生児は何れの群にもみられなかった。

6.11 出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-4)

各群とも生後 4 日間までの生存性は良好であり、生後 4 日生存率に対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。

6.12 出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-4)

500 mg/kg 投与群において雌雄とも出生日の体重が統計学的な有意性は認められないものの対照群を下回る傾向を示し、当施設背景データの範囲 (雄：6.1~7.0 g、雌：5.9~6.7 g、2004~2009 年、16 試験) との比較においても低値な傾向を示した。また、同群の雄出生児では生後 4 日の体重が対照群と比べ有意な低値を示した。しかし、生後 4 日までの体重増加量に有意な差は認められなかった。20 mg/kg 投与群では雄出生児の生後 4 日までの体重増加量が対照群と比べ有意な低値を示した。しかし、100 mg/kg 投与群では、雌雄とも出生日及び生後 4 日の体重は対照群と同程度の値を示し、20mg/kg 投与群における体重増加量の低値は用量との関連性が無く、偶発的な変動と考えられた。

6.13 出生児の生後 4 日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-4)

20 mg/kg 投与群の雄 1 例に胸腺の頸部残留が認められたが、その他の各群の出生児には体外表、胸部・腹部を含む器官・組織に肉眼的異常はみられなかった。

7. 考察

o-tert-ブチルフェノールを 0（対照群：オリーブ油）、20、100 及び 500 mg/kg/day の用量で、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄に交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで、雌には交配前 14 日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳 4 日まで経口投与し、雌雄動物に対する影響、特に、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎及び分娩などの生殖発生に及ぼす影響を検討した。

7.1 雌雄動物に対する影響

500 mg/kg 投与群の雌雄において失調性歩行及び流涎、雌では更に自発運動の低下が散見され、雌雄ともに摂餌量の減少を伴った体重増加抑制が認められた。病理学検査では、同群において肝臓重量の増加とこれに関連する組織変化と考えられる小葉中心性肝細胞肥大が約半数例に認められた。一方、100 mg/kg 以下の用量群では、摂餌量の高値が散見された。しかし、摂餌量の変動には投与量との関連性がみられず、20 及び 100 mg/kg 投与群ともに対照群と同様な体重推移を示し、且つ、両群とも病理検査において被験物質投与の影響と考えられる異常は認められなかったことから、偶発的な変動と考えられた。

7.2 生殖発生に対する影響

雌の性周期並びに及び雌雄動物の交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。これら交配成績に加え、雌雄内部生殖器に関する病理組織学検査では、被験物質投与に起因した変化は認められなかったことから、*o*-tert-ブチルフェノールの 500 mg/kg/day 投与は、精子形成及び排卵などの性腺機能、交尾から受胎に至る雌雄動物の生殖機能に影響を及ぼさないと判断した。

妊娠動物はいずれの群においても正常に分娩し、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数、出生率及び性比に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められず、哺育状態に異常はみられなかった。したがって、*o*-tert-ブチルフェノールの 500 mg/kg/day 投与は、妊娠維持、分娩及び哺育などの妊娠母体の機能に対して影響を及ぼさないと判断した。

出生児に関し、500 mg/kg 投与群において出生日及び生後 4 日の体重が低値傾向を示した。しかし、生後の体重増加量に顕著な変化は認められず、500 mg/kg 投与群における出生児体重の変動は、胎生期発育に対する影響を示唆すると考えられた。一方、100 mg/kg 以下の用量群の出生児体重には被験物質投与の影響は認められなかった。生後 4 日生存率に被験物質投与の影響は認められず、出生児の外表及び剖検所見に被験物質投与に起因した異常は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下における *o-tert*-ブチルフェノールの雌雄動物に対する無影響量及び無毒性量は雌雄共に 100 mg/kg/day であり、本被験物質の 500 mg/kg 投与は交尾から受胎に至る雌雄動物の生殖機能並びに母体機能としての妊娠の維持、分娩及び哺育に影響は及ぼさないが、出生児の出生前発育に対する影響が示唆されたため、生殖発生毒性に対する無影響量及び無毒性量はいずれも 100 mg/kg/day と推定された。

8. 文献

- 1) HPLC を用いた 4,4'-メチレンビス (2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール) の被験液中濃度測定法バリデーション及び安定性・均一性試験 (媒体: 0.5 w/v% メチルセルロース水溶液) (株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号: A-2261、2010 年)
- 2) 2-*tert*-ブチルフェノールのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験, 化学物質毒性試験報告, vol.8 (1) pp.208-218 (2001)
- 3) o-*tert*-ブチルフェノールのラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験 (投与量設定試験) (株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号: C-R141、2010 年)

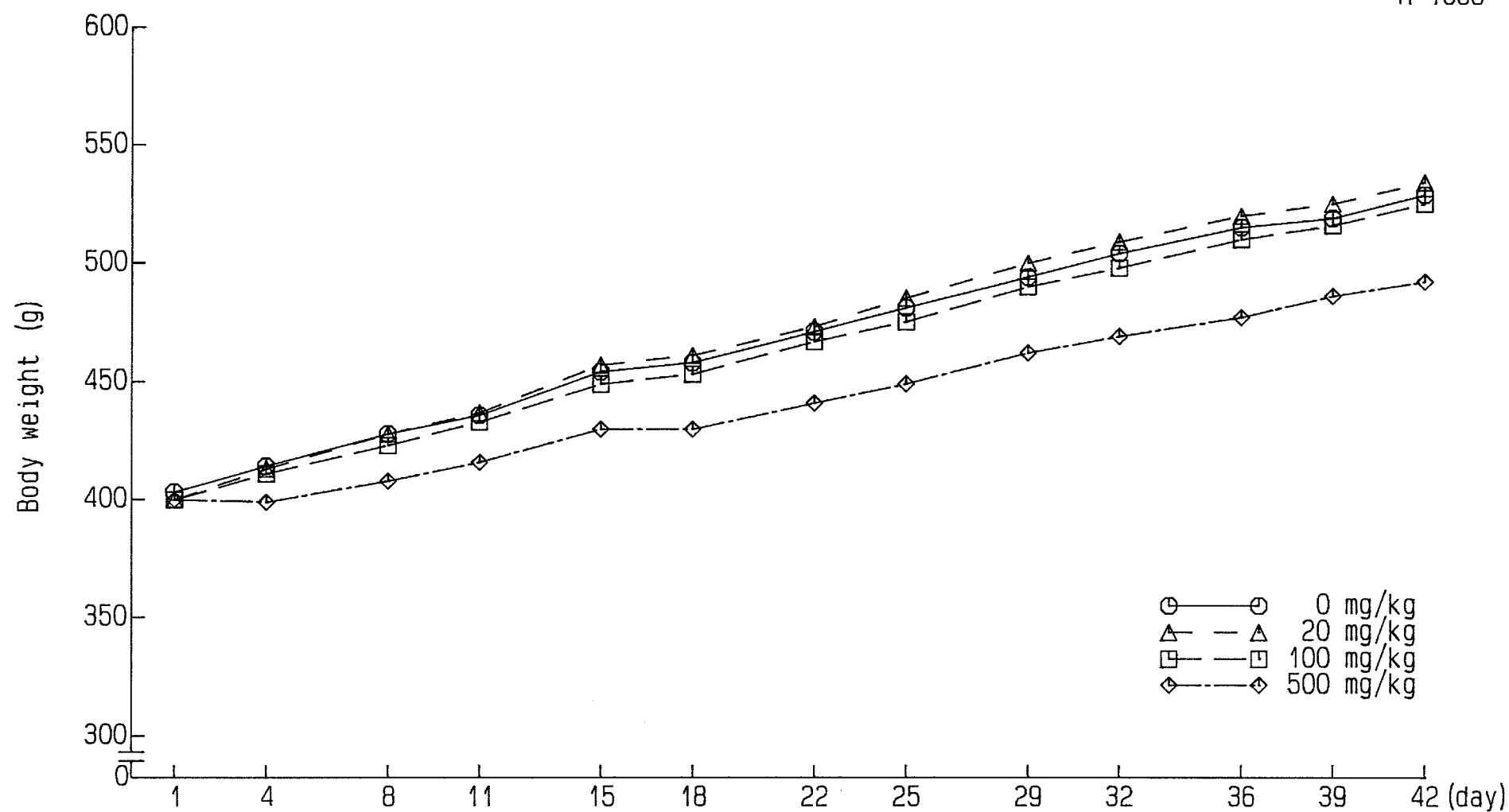


Fig.1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with o-tert-Butylphenol
Body weight of male rats

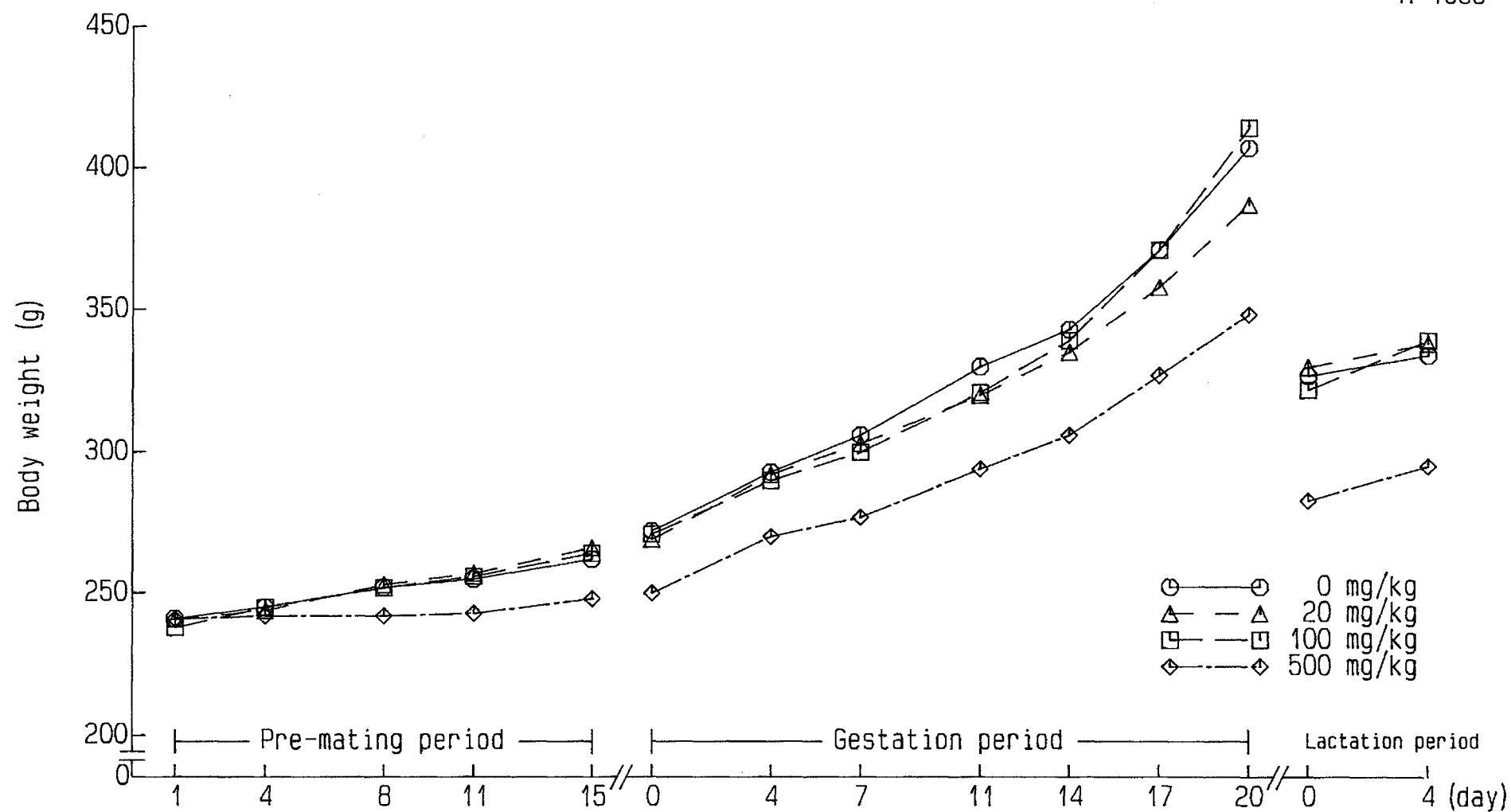


Fig.2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with o-tert-Butylphenol

Body weight of female rats

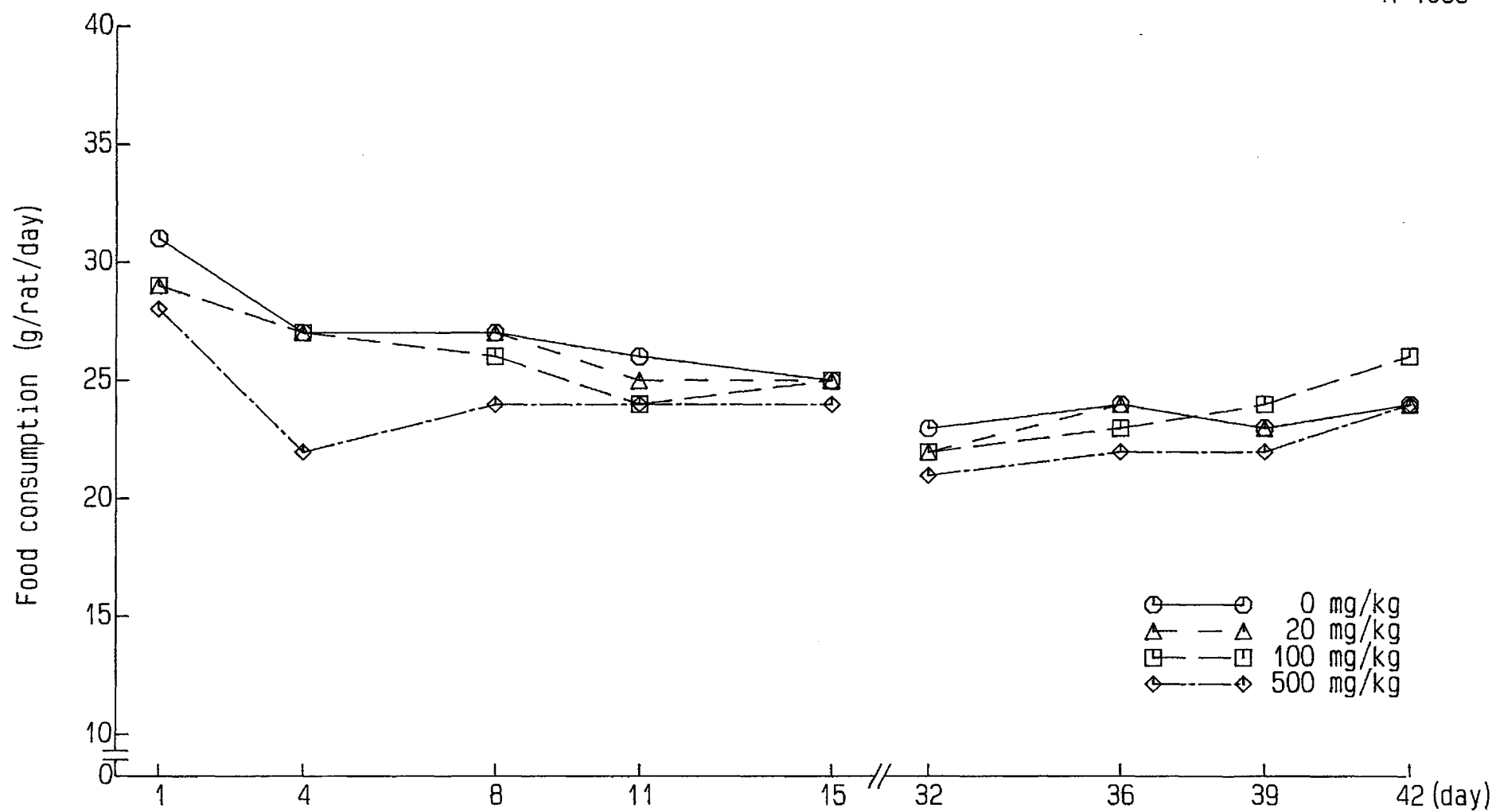


Fig.3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with o-tert-Butylphenol

Food consumption of male rats

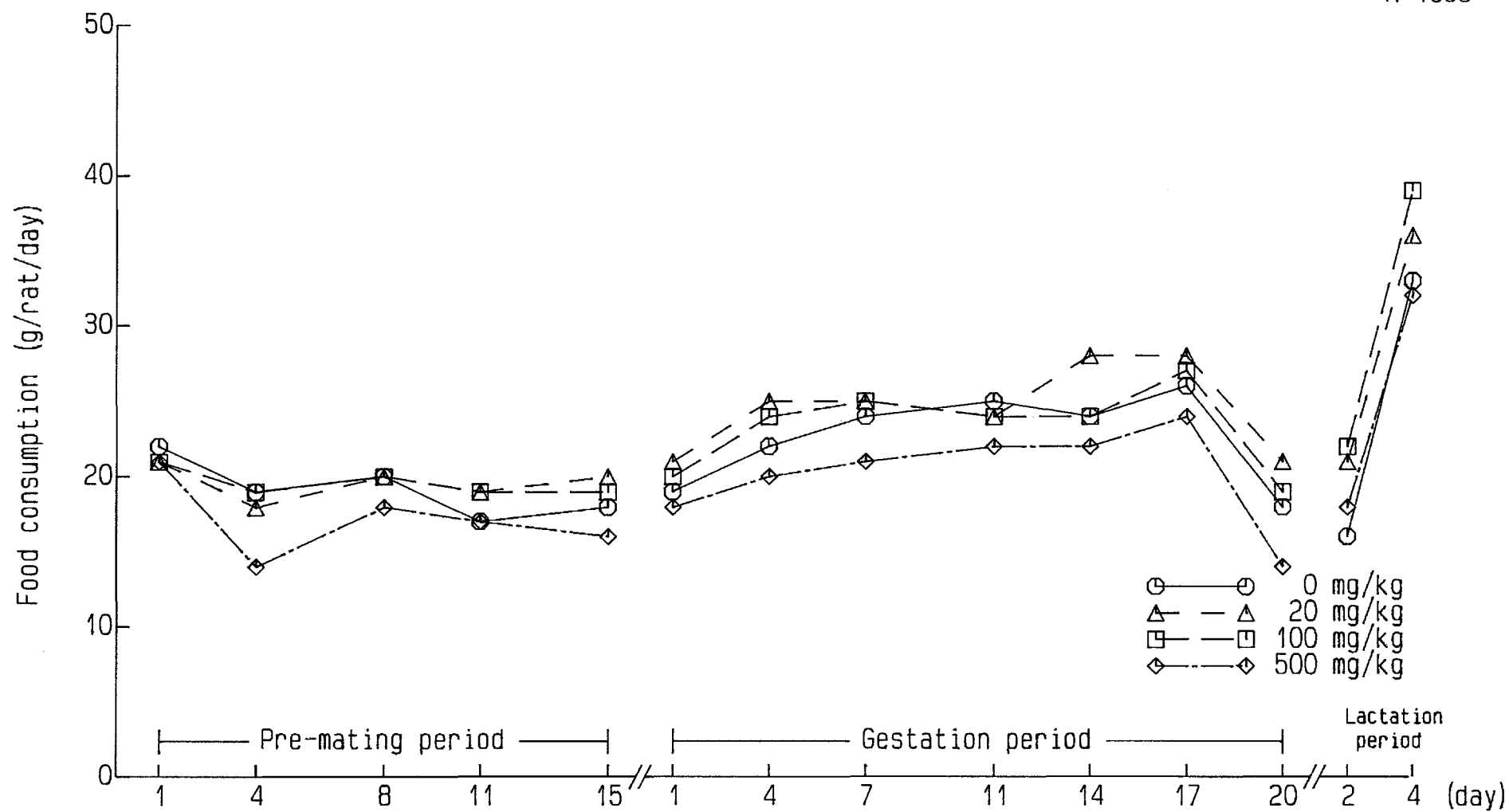


Fig.4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with o-tert-Butylphenol

Food consumption of female rats

Table 1-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol

Clinical signs in male rats

Dose mg/kg	Signs	Day of administration						
		1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43a)
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
20	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
100	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
500	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	2	0	1	0	0	3	0
	Ataxia	2	0	0	0	0	0	0
	Salivation	0	0	1	0	0	3	0

a): Day of necropsy

Clinical signs in female rats during the pre-mating period

[illegible]

Table 1-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol

Clinical signs in dams during the gestation period

Dose mg/kg	Signs	Administration																							
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23a)
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	5	0
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	No. of dams	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	3	1
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	0
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	No. of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	6	0
	No. of dams with abnormal findings	5	4	2	0	3	0	2	2	2	1	1	3	4	3	5	3	5	7	3	2	1	4	2	
	Ataxia	5	4	2	0	2	0	2	2	2	1	1	2	4	2	3	0	0	2	1	2	1	2	1	
	Decrease in spontaneous movement	3	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	2	1	2	3	5	5	2	0	0	2	1	

a): Gestation day

Table 1-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with o-tert-Butylphenol

Clinical signs in dams during the lactation period

Dose mg/kg	Signs	Administration					5a)
		0	1	2	3	4	
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
20	No. of dams	9	9	8 ^{b)}	8	8	8
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
100	No. of dams	12	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
500	No. of dams	11	11	11	11	11	11
	No. of dams with abnormal findings	1	3	4	4	6	0
	Ataxia	1	2	3	4	5	0
	Decrease in spontaneous movement	0	1	1	0	1	0

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on day 1 of lactation because all pups died.

Table 2-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol
Body weight of male rats

Dose mg/kg		Pre-mating period					Mating period				Post-mating period				Gain 1-42
		1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	42a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	403	414	428	436	454	458	471	481	494	504	515	519	529	126
	S.D.	14	18	18	21	21	23	23	27	27	26	26	26	25	17
20	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	400	413	428	437	457	461	473	485	500	509	520	525	534	134
	S.D.	14	16	19	20	23	23	28	28	31	28	30	33	33	28
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	400	411	423	433	449	453	467	475	490	498	510	516	525	125
	S.D.	14	16	18	18	22	22	24	22	26	26	27	26	26	15
500	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	400	399	408*	416*	430*	430**	441*	449**	462*	469**	477**	486*	492**	92**
	S.D.	12	15	16D	17D	20D	20D	22D	23D	25D	23D	25D	26D	27D	20D

Unit: g

No.: No. of animals

a): Day of administration

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 2-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol

Body weight of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Day of administration					Gain 1-15
		1	4	8	11	15	
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	241	245	252	255	262	22
	S.D.	13	13	13	12	13	8
20	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	241	244	253	257	266	26
	S.D.	13	15	16	14	14	6
100	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	238	245	252	256	264	26
	S.D.	13	14	15	13	15	6
500	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	241	242	242	243	248*	7**
	S.D.	13	12	10	13	16D	7D

Unit: g

No.: No. of animals

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 2-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with o-tert-Butylphenol

Body weight of dams during the gestation period

Dose mg/kg		Administration							Gain 0-20
		0	4	7	11	14	17	20a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	272	293	306	330	343	371	407	136
	S.D.	17	17	18	20	22	28	30	19
20	No.	9	9	9	9	9	9	9	9
	Mean	267	293	304	325	346	375	416	149
	S.D.	14	19	19	23	27	28	34	32
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	271	290	300	321	339	371	414	142
	S.D.	17	18	20	21	23	29	35	21
500	No.	11	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	248**	270*	278**	295**	308**	331**	354**	106*
	S.D.	16D	18D	22D	23D	28D	31D	32D	24D

Unit: g

No.: No. of dams

a): Gestation day

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 2-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol

Body weight of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration		Gain 0-4
		0	4a)	
0	No.	12	12	12
	Mean	327	334	6
	S.D.	17	24	18
20	No.	9	8 ^{b)}	8
	Mean	330	338	10
	S.D.	31	26	13
100	No.	12	12	12
	Mean	322	339	17
	S.D.	22	22	15
500	No.	11	11	11
	Mean	283**	295**	12
	S.D.	26D	29D	7

Unit: g

No.: No. of dams

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 1 because all pups died.

** : $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 3-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol
Food consumption of male rats

Dose mg/kg		Pre-mating period					Post-mating period			
		1	4	8	11	15	32	36	39	42a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	31	27	27	26	25	23	24	23	24
	S.D.	3	2	3	3	2	3	2	2	3
20	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	29	27	27	25	25	22	24	23	24
	S.D.	2	2	2	2	3	2	2	3	3
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	29	27	26	24	25	22	23	24	26
	S.D.	2	3	3	1	2	2	2	2	4
500	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	28*	22**	24**	24	24	21	22	22	24
	S.D.	3D	3D	2D	3	3	4	2	2	3

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

a): Day of administration

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 3-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol

Food consumption of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Day of administration				
		1	4	8	11	15
0	No.	12	12	12	12	12
	Mean	22	19	20	17	18
	S.D.	4	3	3	2	2
20	No.	12	12	12	12	12
	Mean	21	18	20	19*	20
	S.D.	2	3	5	2D	3
100	No.	12	12	12	12	12
	Mean	21	19	20	19	19
	S.D.	4	2	3	3	2
500	No.	12	12	12	12	12
	Mean	21	14**	18	17	16
	S.D.	2	3D	2	3	3

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 3-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol

Food consumption of dams during the gestation period

Dose mg/kg		Administration						
		1	4	7	11	14	17	20a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	19	22	24	25	24	26	18
	S.D.	3	4	3	3	4	4	2
20	No.	9	9	9	9	9	9	9
	Mean	21	25	25	24	28*	28	21
	S.D.	2	3	2	4	3D	4	3
100	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	20	24	25	24	24	27	19
	S.D.	3	2	2	2	3	3	4
500	No.	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	18	20	21*	22	22	24	14*
	S.D.	3	4	3D	4	5	4	5D

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Gestation day

*: $p < 0.05$ (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 3-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol

Food consumption of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration	
		2	4a)
0	No.	12	12
	Mean	16	33
	S.D.	5	8
20	No.	8 ^{b)}	8
	Mean	21	36
	S.D.	3	6
100	No.	12	12
	Mean	22*	39
	S.D.	6D	8
500	No.	11	11
	Mean	18	32
	S.D.	6	7

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 1 because all pups died.

*: p<0.05 (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 4-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with o-tert-Butylphenol

Organ weight of male rats

		Dose mg/kg	Body weight g	Liver g(g/100g BW)	Testes (R+L) g(g/100g BW)	Epididymides (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	12	12	12	12
		Mean	530	18.15	3.26	1286
		S.D.	25	1.79	0.22	98
	20	No.	12	12	12	12
		Mean	536	18.30	3.23	1215
		S.D.	34	1.82	0.70	210
	100	No.	12	12	12	12
		Mean	527	18.98	3.38	1336
		S.D.	26	1.88	0.17	72
	500	No.	12	12	12	12
		Mean	496*	20.59**	3.45	1314
		S.D.	27D	1.58D	0.23	92
Relative	0	No.		12	12	12
		Mean		3.42	0.62	243
		S.D.		0.29	0.05	24
	20	No.		12	12	12
		Mean		3.41	0.61	228
		S.D.		0.18	0.13	44
	100	No.		12	12	12
		Mean		3.59	0.64	254
		S.D.		0.21	0.03	17
	500	No.		12	12	12
		Mean		4.16**	0.70**	265*
		S.D.		0.31D	0.04DT	18DT

*: p<0.05; **: p<0.01 (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

DT: Dunnett-type rank test

Table 4-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol
Organ weight of female rats

		Dose mg/kg		Body weight g	Liver g(g/100g BW)
Absolute	0	No.		12	12
		Mean		341	14.31
		S.D.		21	1.90
	20	No.		8	8
		Mean		336	15.01
		S.D.		30	1.00
	100	No.		12	12
		Mean		345	15.29
		S.D.		21	2.25
	500	No.		11	11
		Mean		307*	15.48
		S.D.		37D	2.47
Relative	0	No.			12
		Mean			4.19
		S.D.			0.43
	20	No.			8
		Mean			4.49
		S.D.			0.41
	100	No.			12
		Mean			4.43
		S.D.			0.48
	500	No.			11
		Mean			5.05**
		S.D.			0.48D

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (Significant difference from control group)
D: Dunnett's test

Table 5-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol
Gross pathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 12	20 12	100 12	500 12
Heart					
Focus, white		0	0	0	1
Intestine, ileum					
Nodule		0	0	0	1
Testis					
Small		0	1	0	0

M : Male

Table 5-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol

Gross pathological findings

Organs	Sex:	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 12	20 12	100 12	500 12
Lung(bronchus)					
Focus,dark red		0	1	0	0
Skin+Subcutis					
Nodule		0	1	0	0
Stomach					
Focus,dark red,glandular stomach		0	1	0	0

F : Female

Table 6-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol

Histopathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 12	M 20 12	M 100 12	M 500 12
Findings					
Epididymis					
Number examined		12	12	12	12
Not remarkable		12	10	11	10
Granuloma, spermatic		0	1	1	2
mild		0	1	1	2
Hypospermia		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Cell debris, lumen		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Heart					
Number examined		0	0	0	1
Fibrosis		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Intestine, ileum					
Number examined		0	0	0	1
Diverticulum		0	0	0	1
minimal		0	0	0	1
Liver					
Number examined		12	12	12	12
Not remarkable		2	2	0	1
Microgranuloma		10	10	12	10
minimal		10	10	12	10
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobula		0	0	0	6
minimal		0	0	0	6
Prostate					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		6	0	0	4
Cell infiltration		6	0	0	8
minimal		5	0	0	7
mild		1	0	0	1
Seminal vesicle					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		12	0	0	12
Testis					
Number examined		12	1	0	12
Not remarkable		11	0	0	11
Atrophy, seminiferous tubular		1	1	0	1
minimal		1	0	0	1
mild		0	1	0	0

M : Male

Table 6-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol

Histopathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 12	F 20 12	F 100 12	F 500 12
Findings					
Liver					
Number examined		12	12	12	12
Not remarkable		9	7	8	5
Necrosis, focal		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Microgranuloma		2	5	4	3
minimal		2	5	4	3
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobula		0	0	0	7
minimal		0	0	0	7
Lung(bronchus)					
Number examined		0	1	0	0
Hemorrhage, focal		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Mammary gland, inguinal					
Number examined		0	1	0	0
ADENOCARCINOMA		0	1	0	0
present		0	1	0	0
Ovary					
Number examined		12	4	0	12
Not remarkable		12	4	0	12
Stomach					
Number examined		0	1	0	0
Erosion, glandular stomach		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Uterus					
Number examined		12	4	0	12
Not remarkable		12	4	0	12
Vagina					
Number examined		12	4	0	12
Not remarkable		12	4	0	12

F : Female

Table 7 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol

Estrous cycle in female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg	No. of animals	Count of estrus					Mean duration of cycles Mean±S.D.
		0	1	2	3	4	
0	12	0	0	1	6	5	3.3±0.7 4.2±0.4
20	12	0	0	0	11	1	3.1±0.3 4.3±0.4
100	12	0	0	0	6	6	3.5±0.5 4.2±0.3
500	12	0	0	1	5	6	3.4±0.7 4.3±0.4

No significant difference in any treated groups from control group

Table 8 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol
Mating and fertility of animals

Dose mg/kg	Male				Female			
	No. of males	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Insemination index (%) b)	No. of females	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) c)
0	12	3.3±2.4	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	3.3±2.4	12/12(100.0)	12/12(100.0)
20	12	2.4±1.4	12/12(100.0)	9/12(75.0)	12	2.4±1.4	12/12(100.0)	9/12(75.0)
100	12	2.3±1.1	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.3±1.1	12/12(100.0)	12/12(100.0)
500	12	2.8±1.4	12/12(100.0)	11/12(91.7)	12	2.8±1.4	12/12(100.0)	11/12(91.7)

a): (No. of copulated animals / No. of mated animals) × 100

b): (No. of males which impregnated females / No. of copulated males) × 100

c): (No. of pregnant females / No. of copulated females) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 9 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with o-tert-Butylphenol

Delivery data on dams

Dose mg/kg		No. of pregnant females	No. of females with liveborns	Delivery index % a)	Gestation length in days	No. of corpora lutea	No. of implan- tation sites	Implan- tation index % b)	No. of stillborns (%)c)	No. of liveborns	Live birth index % d)
0	Total	12	12	100.0		184	172		2	148	
	Mean				21.9	15.3	14.3	93.4	(1.1)	12.3	85.7
	S.D.				0.3	1.6	2.2	9.1	(2.5)	3.3	18.1
20	Total	9	9	100.0		142	132		3	121	
	Mean				22.0	15.8	14.7	89.3	(6.9)	13.4	87.6
	S.D.				0.5	4.5	4.9	19.5	(16.4)	4.9	14.7
100	Total	12	12	100.0		194	190		1	174	
	Mean				21.9	16.2	15.8	97.2	(0.6)	14.5	91.0
	S.D.				0.5	3.5	3.6	5.0	(2.2)	3.6	8.1
500	Total	11	11	100.0		155	145		1	131	
	Mean				22.0	14.1	13.2	92.4	(0.6)	11.9	90.8
	S.D.				0.4	2.6	3.2	9.7	(2.1)	3.0	8.9

a): (No. of females which delivered liveborns / No. of pregnant females) × 100

b): (No. of implantation sites / No. of corpora lutea) × 100

c): (No. of stillborns / No. of liveborns and stillborns) × 100

d): (No. of liveborns / No. of implantation sites) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 10 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol
Sex ratio and external examination of pups

Dose mg/kg	No. of dams		Liveborns		Sex ratio of liveborns at birth a)	Day 4		Sex ratio of live pups on day 4 b)	External c) abnor- malities (%)d)
			No. of males	No. of females		No. of males	No. of females		
0	12	Total	84	64		80	61		0
		Mean	7.0	5.3	0.55	6.7	5.1	0.55	(0.0)
		S.D.	3.1	2.5	0.20	3.1	2.4	0.20	(0.0)
20	9	Total	67	54		66	51		0
		Mean	7.4	6.0	0.49	8.3	6.4	0.55	(0.0)
		S.D.	4.5	3.4	0.28	3.7	2.7	0.23	(0.0)
100	12	Total	87	87		86	86		0
		Mean	7.3	7.3	0.50	7.2	7.2	0.49	(0.0)
		S.D.	2.9	3.4	0.17	2.9	3.2	0.17	(0.0)
500	11	Total	64	67		58	62		0
		Mean	5.8	6.1	0.47	5.3	5.6	0.47	(0.0)
		S.D.	2.7	1.9	0.15	2.6	2.2	0.15	(0.0)

a): No. of liveborn males / No. of liveborns

b): No. of live males on day 4 / No. of live pups on day 4

c): No. of liveborns with external abnormalities

d): (No. of liveborns with external abnormalities / No. of liveborns) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 11 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol

Viability index of pups

Dose mg/kg		No. of dams	No. of live pups		Viability index on postnatal day 4 % a)
			Day 0	Day 4	
0	Total	12	148	141	
	Mean		12.3	11.8	96.1
	S.D.		3.3	3.1	9.1
20	Total	9	121	117	
	Mean		13.4	13.0	86.3
	S.D.		4.9	5.2	32.9
100	Total	12	174	172	
	Mean		14.5	14.3	98.8
	S.D.		3.6	3.6	2.8
500	Total	11	131	120	
	Mean		11.9	10.9	92.3
	S.D.		3.0	3.5	18.2

a): (No. of live pups on day 4 / No. of liveborns on day 0) × 100
No significant difference in any treated groups from control group

Table 12 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol
Body weight of pups

Dose mg/kg		Male			Female		
		0	4a)	Gain	0	4a)	Gain
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	6.7	10.7	4.0	6.3	9.7	3.4
	S.D.	0.8	1.7	1.0	0.7	1.4	0.9
20	No.	8 ^{b)}	8	8	9	8 ^{c)}	8
	Mean	6.4	9.3	2.9*	6.1	8.9	3.0
	S.D.	0.5	0.7	0.5D	0.7	0.7	0.4
100	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	6.5	10.0	3.5	6.2	9.7	3.6
	S.D.	0.5	1.3	0.9	0.7	1.8	1.2
500	No.	11	11	11	11	11	11
	Mean	6.1	9.3*	3.1	5.8	8.5	2.7
	S.D.	0.6	1.4D	0.9	0.7	1.4	0.9

Unit: g

No.: No. of dams

a): Postnatal day

b): Male pups were not born in one dam.

c): All pups in one dam died.

*: $p < 0.05$ (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 13 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with
o-tert-Butylphenol
Gross pathological findings in pups on postnatal day 4

	Dose (mg/kg)	0	20	100	500
Male					
No. of pups examined		80	66	86	58
No. of pups with abnormal findings		0	1	0	0
Thymic remnant in neck		0	1	0	0
Female					
No. of pups examined		61	51	86	62
No. of pups with abnormal findings		0	0	0	0