

最終報告書

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)のラットを用いる 経口投与簡易生殖毒性試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター~~研究開発所~~

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729番

TEL 0463-82-4751

目次

要約.....	5
試験目的	6
動物愛護	6
材料と方法	6
1. 被験物質	6
2. 動物および飼育方法.....	7
3. 投与検体	8
4. 投与量の設定および投与方法.....	9
5. 検査法.....	10
1) 親動物 (F ₀)	10
2) 出生児 (F ₁)	12
6. データの解析法	12
試験成績	13
1. 親動物	13
1) 一般状態.....	13
2) 体重	13
3) 摂餌量	13
4) 器官重量.....	13
5) 剖検所見.....	13
6) 精子検査.....	13
7) 病理組織所見	14
2. 生殖能力.....	14
1) 性周期および交配成績	14
2) 出産率および妊娠期間.....	15
3) 分娩および哺育状態	15
4) 黄体数、着床数および着床率	15
3. 出生児.....	15
1) 生存	15
2) 体重	15
3) 出生児観察	15
考察.....	15
参考文献	17
Annexes	18
Tables	22

要約

今回、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の雌雄動物の生殖能力に対する影響および新生児の発育に及ぼす影響を検討することを目的として、簡易生殖毒性試験を OECD 化学物質試験法ガイドラインに従って実施した。雌雄の CrI:CD(SD)ラットに被験物質を 0(媒体:5%アラビアゴム溶液)、12、80 ならびに 500 mg/kg の用量で経口投与した。雄は 42 日間投与した後に剖検し、雌は交配前 2 週間および交配期間、妊娠期間を通して哺育 4 日まで連日投与した。なお、母動物は自然分娩させて、出生児は哺育 4 日、母動物は哺育 5 日に剖検した。

1. 親動物所見

雌雄いずれの群においても死亡動物は観察されなかった。一般状態の変化として、雌雄ともに 500 mg/kg 投与群で投与 2 日以降、解剖時まで軟便が認められた。雌では解剖日前日の絶食により、80 mg/kg 投与群においても翌日に軟便が認められた。投与開始直後の摂餌量が 500 mg/kg 投与群において対照群と比較して減少したが、その後の摂餌量には対照群と差はなく、体重推移および器官重量には被験物質投与による影響は認められなかった。剖検では、雄の 500 mg/kg 投与群、雌の 80 および 500 mg/kg 投与群において小腸および大腸壁の肥厚が観察され、病理組織学的検査では十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸および直腸の粘膜上皮細胞の過形成が認められ、一部の動物では粘膜下織に単核細胞浸潤が観察された。その他、精巣、精巣上体あるいは卵巣には被験物質投与による影響は認められなかった。また、精子検査の結果、精子運動能、精巣上体および精巣における精子頭部数に被験物質投与による影響は認められなかった。

2. 出生児所見

出生児の一般状態、生存性および体重には、被験物質投与による影響は認められなかった。また、剖検時にも内部器官に異常は観察されなかった。

3. 生殖能力所見

性周期、交配成績、妊娠期間、出産率、黄体数、着床数および着床率、分娩および哺育状態には、被験物質投与による影響は認められなかった。

4. 無毒性量

以上の結果から、本試験条件下における 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の親動物に対する一般毒性学的無毒性量は、その上の用量において軟便ならびに消化管粘膜上皮細胞の過形成が観察されたことから、雄では 80 mg/kg/day、雌では 12 mg/kg/day、生殖発生毒性学的な無毒性量ならびに次世代に対する無毒性量は 500 mg/kg/day であると判断される。

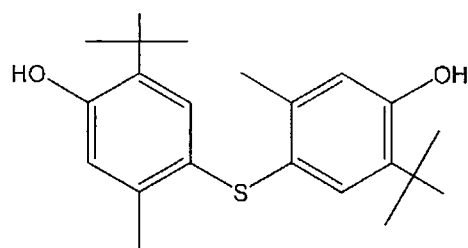
試験目的

雌雄ラットの交配前(2 週間)および交配期間中(最長 2 週間)ならびに雄では交配期間終了後 2 週間、雌では妊娠期間を通して周産期(哺育 4 日まで)に 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)を経口投与し、雌雄ラットに対する生殖毒性について検討した

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール) (別名: 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-3-methylphenol, CAS No.: 96-69-5、分子式: $C_{22}H_{30}O_2S$ 、分子量: 358.54、外観: 白色、結晶性粉末、純度: 99.4%、融点: 162.3℃、Annex A、以下、TBC)は 購入し(被験物質入手: 2009 年 9 月 25 日)、使用時まで室温・遮光下(実測値 16.1~22.9℃)にて保管した。TBC の構造式を次に示す。



被験物質の安定性は、本試験の投与開始前(2009 年 11 月 13 日)および投与期間終了後(2010 年 3 月 17 日)に、秦野研究所にてフーリエ変換赤外分光光度計(FTIR-8300、島津製作所)を使用し、臭化カリウム錠剤法にて、 4000 cm^{-1} ～ 400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを測定して調べ、2 つのスペクトルに変化がないことを確認した(Annex B)。

2. 動物および飼育方法

日本チャールス・リバー厚木飼育センターより 8 週齢の Sprague-Dawley 系[Crl:CD(SD)、SPF]雄ラット 62 匹、雌ラット 73 匹を購入し、4 号室に搬入した。入荷日も含めて 14 日間、検疫と飼育環境への馴化を兼ねて飼育し、その間毎日、動物の一般状態を観察し、入荷日および検疫終了時に体重を測定した。検疫・馴化期間中は動物の尾にフェルトペンで馴化番号を記し、飼育ケージに試験番号、性別、および馴化番号を記入した動物カードを掛けて識別した。また、雌動物については、入荷翌日から毎日、性周期を観察した。入荷日および検疫終了日(群分け日)の動物の体重は下記の通りであった。

動物入荷日	:2010 年 1 月 6 日
入荷時体重	:雄 241.8 ～ 275.7 g、雌 178.2 ～ 212.2 g
検疫終了日	:2010 年 1 月 19 日
検疫終了時体重	:雄 313.7 ～ 417.3 g、雌 211.9 ～ 273.8 g

検疫・馴化の結果、入荷した全ての動物において、検疫期間中の一般状態および体重推移に異常は認められなかった。雌動物で規則的な性周期の回帰が認められない 7 匹を除外し、体重別層化無作為抽出法により群分けを行った。群分けした動物には一連の動物番号を割り当て、フェルトペンで尾に動物番号を標識し、群ごとに色彩の異なった動物カードに試験番号、性別および動物番号を記入し、飼育ケージに掛けた。群分けから棄却された雄 10 匹、雌 14 匹および性周期の結果により除外した 7 匹は余剰動物とした。これらのうち、雄 5 匹はモニタリング動物として定期病原性微生物検査に使用し、雌 21 匹は他試験の検討にて使用した。残りの雄 5 匹は試験終了後に深麻酔下にて放血し、安楽死させた。

動物は、許容範囲:21.0～25℃、許容湿度:40.0～75.0%、換気設定約 15 回/時間、明暗サイクル 12 時間(7 時～19 時)点灯、12 時間(19 時～7 時)消灯に設定された飼育室内で、金属製金網床ケージ(220_w × 270_d × 190_h mm)に 1 匹ずつ(交配時は 2 匹)收容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した(ただし、雄動物および分娩した雌動物は解剖前に絶食させた)。雌動物は全例について妊娠 18 日から哺育 4 日まではラット用プラスチック製繁殖ケージ(350_w × 400_d × 180_h mm)に 1 匹ずつ收容し、床敷としてペーパークリーン(日本エスエルシー)を適宜供給した。飼育期間中、飼育環境に異常は認められず、動物室の温度の実測値は 21.5～24.5℃、湿度の

実測値は 49.0～70.5%であった。また、供給した飼料および飲料水、床敷の分析結果は、いずれも標準操作手順書に記載の許容範囲内であることを確認した。

3. 投与検体

1) 調製

被験物質を秤量し、媒体である 5%アラビアゴム溶液[アラビアゴム(和光純薬、製造番号 CDP6207)を注射用水(光製薬、製造番号 A89AA1)で溶解]を加えて懸濁させ、10.0 w/v%液を調製した。さらに、10.0 w/v%液を媒体で段階希釈して 1.60 および 0.240 w/v%液を調製した。調製した検体は冷蔵・遮光下で保管し(実測値 1～6℃)、安定性の保証期間以内に使用した。

2) 安定性試験

先立って実施した本被験物質の単回投与毒性試験(試験番号:A-09-023)において、20.0 ならびに 0.0500 w/v%の本被験物質の調製検体について、冷蔵、遮光条件下で 8 日間安定性であることが確認されている(Annex C)。

3) 含量および均一性の測定

初回調製時(2010 年 1 月 19 日)に、10.0、1.60 および 0.240 w/v%濃度の調製検体の含量および均一性を測定した。含量の判定基準は、平均含量が調製濃度の 85.0～115%、また各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 90.0～110%以内とした。その結果、平均含量は調製指示濃度の 96.1～102%であり、均一性も各測定値の平均値の 98.2～102%であった(Annex D)。

調製検体中の被験物質濃度は以下の方法で測定した。調製検体の 1 mL を採取し、水で希釈して試料溶液を調製した(1 µg/mL 付近)。別に被験物質 10 mg を精密に量り、水に溶解して適宜希釈し、約 0.5、1 および 4 µg/mL の標準溶液を調製した。試料溶液および標準溶液を、以下に示す高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により測定し、標準溶液から作成した検量線を用いて調製検体中の 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)濃度を算出した。

HPLC 条件

分析カラム	Inertsil ODS-2 (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 µm、ジーエルサイエンス㈱)
移動相	アセトニトリル/水混液(4:1 v/v)
流量	1.0 mL/min
カラム設定温度	40℃
試料設定温度	室温
測定波長	250 nm
試料注入量	10 µL
オートインジェクタ洗浄液	アセトニトリル/水混液(4:1 v/v)

4. 投与量の設定および投与方法

本試験に先立って実施した予備試験(試験番号:R-09-003)の結果をもとに、各用量を設定した。

予備試験の設定量は、「4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)を用いた 28 日間反復経口投与毒性試験」¹⁾および「2 ヶ月間混餌投与雄性生殖毒性試験」²⁾の既報を参考に設定した(投与量:0(5%アラビアゴム溶液)、100、200、300 mg/kg)。予備試験においては本試験と同様に、雌雄ともに交配前に 2 週間投与した後交配させ、雌では胚の生死が確認できる妊娠 12 日まで投与を行い、翌日、帝王切開を行った(妊娠 13 日、総投与回数 28~33 回)。雄では交配終了後、剖検前日(総投与回数 28 回)まで投与し、翌日に解剖して、雌雄の交配能力および受胎能力への影響を調べた。その結果、300 mg/kg までの TBC 投与では、雌雄ともに一般状態、体重に影響はなく、雄で測定した肝臓重量にも変化はなかった。200 mg/kg 以上の TBC 投与により、死亡胚・胎児数が増加傾向を示したが、剖検、交配能力着床数、黄体数には TBC 投与によると考えられる明らかな影響は認められなかった。

「4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)を用いた 28 日間反復経口投与毒性試験」¹⁾において、用量設定のために 2 週間反復投与試験が実施されているが、その試験では 1000 mg/kg の被験物質投与により動物が死亡することが報告されている。このことから、1000 mg/kg の反復投与は最大耐量を凌駕した用量であると考えられた。また、既報¹⁾では、250 および 60 mg/kg の反復投与により、肝臓および腸管に被験物質投与によると考えられる変化が認められ、無影響量は 15 mg/kg と報告している。しかし、250 mg/kg 投与群で 28 回反復投与により認められた影響は肝臓および消化管への変化であり、交配・妊娠維持に影響を与える変化ではないと考えられた。

一方、我々が実施した簡易生殖毒性試験予備試験では、300 mg/kg までの TBC の反復投与により雌雄動物への影響は認められなかったことから考察すると、250~300 mg/kg/day は雌雄動物への影響が発現する閾値に近い用量であることが推察された。

また、TBC と極めて近似した構造をもつ 6-tert-ブチル-m-クレゾール(以下 BP、CAS No.88-60-8)を用いて実施した、「6-tert-ブチル-m-クレゾール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」³⁾(投与量:0(コーン油)、2.5、12.5、60 mg/kg)において、60 mg/kg の BP 投与により、雌では摂餌量の減少を伴った体重増加抑制がみられ、雄では肝臓に BP 投与によると考えられる肝細胞腫大といった変化が認められており、BP の反復投与毒性に対する雌雄動物に対する無影響量は 12.5 mg/kg としている。BP の生殖発生毒性に関する無影響量は雄に対しては 60 mg/kg であったが、雌では 60 mg/kg 投与により、妊娠黄体数の減少傾向がみられている。また、生児出産率が減少したことから胚の子宮内致死作用が示唆されている。さらに産児では発育抑制が認められたことから、雌および産児に対しては、12.5 mg/kg と報告している。

これらの結果から判断すると、既報の 28 日間反復経口投与毒性試験¹⁾および TBC の構造類似物質である BP の反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験³⁾の結果から、TBC の簡易生殖毒性試験本試験の無毒性量も 10~15 mg/kg 付近にある可能性が高いと考えられた。

以上の結果から、高用量は、予備試験において 200 mg/kg 以上の TBC 投与により死亡胚・胎児数が増加傾向を示したことから、生殖への影響を明らかにするために 500 mg/kg に設定した。この用量は反

復投与により死亡が観察された 1000 mg/kg と雌雄動物への比較的弱い影響が発現する閾値に近い用量である 250～300 mg/kg の中間量にあたる。中間量以下は公比約 6 で除して、中間量には 80 mg/kg、低用量には 12 mg/kg を設定した。

雌動物は交配前 2 週間、交配期間、妊娠期間および分娩後の哺育 4 日まで、交尾が確認されなかった雌は剖検前日まで(総投与回数 42 回)、雄動物は交配前 2 週間、交配期間(14 日間)、剖検前日まで(雄:総投与回数 42 回)、経口的に 1 日 1 回、1 週 7 回、午前中(9 時 1 分～11 時 36 分)に投与した。投与容量は 5 mL/kg とし、雄および交配前ならびに交配中の雌では、週 1 回測定する体重を基に、交尾が確認された雌では最新の測定日の体重を基に算出した。なお、対照群には媒体である 5%アラビアゴム溶液を同様に投与した。投与経路は OECD 化学物質試験法ガイドライン[421]に拠り、ラット用胃管による強制経口投与とした。

本試験の群構成および動物番号を以下に示した。

群	投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (w/v%)	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
					雄	雌
1	5%アラビアゴム溶液	0	0	5	M01001～M01013	F01001～F01013
2	TBC	12	0.240	5	M02001～M02013	F02001～F02013
3	TBC	80	1.60	5	M03001～M03013	F03001～F03013
4	TBC	500	10.0	5	M04001～M04013	F04001～F04013

5. 検査法

1) 親動物 (F₀)

① 一般状態の観察

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

② 体重測定

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

③ 摂餌量測定

雄動物は、投与 1～2、7～8、13～14、29～30、35～36、41～42 日に測定した。雌動物は、投与 1～2、7～8、13～14 日および妊娠 0～1、7～8、14～15、20～21 日ならびに哺育 3～4 日、さらに交尾が確認されなかった雌では、投与 29～30、35～36、41～42 日にも測定した。

④ 性周期観察

各群とも全例の雌について、動物入荷翌日から性周期を観察し、群分け後、投与開始以降も引き続き膣スミア標本を毎日作製して、各動物の同居後、交尾が確認されるまで性周期を観察した。また、群

ごとの平均発情回帰日数(個体ごとの発情期から発情期までの日数の平均)を算出した。なお、規則的に4日～5日の間で回帰している動物は正常と判断した。

⑤交配

投与15日の夕方(17時50分)より同群内の雌雄を1対1で同居させた。翌朝より毎日、膣栓を確認し、同居中の雌の膣垢標本を作製して鏡検した。膣内に膣栓あるいは膣垢標本中に精子が確認された動物を交尾成立動物とし、この日を妊娠0日と起算して同居を解消し、個別に飼育した。交配結果および妊娠の成否により、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数、交尾率 $[(\text{交尾動物数}/\text{交配に用いた動物数}) \times 100, \%)$ 、妊娠率 $[(\text{妊娠動物数}/\text{交尾した雌動物数}) \times 100, \%)$ を算出した。

⑥妊娠・分娩・哺育状態の観察

交尾が確認された全例を自然分娩させた。分娩の確認は、妊娠21日相当日から分娩が確認されるまで毎日行い、午前11時までに分娩が完了した例についてその日を哺育0日(分娩日)とした。分娩状態の直接観察は観察可能な動物について行い、直接観察できなかった動物についても分娩後の一般状態および産児の状態から異常の有無を判断した。分娩後は、哺育状態を哺育1～4日の間、毎日観察した。分娩した全例の妊娠期間(妊娠0日から分娩日までの日数)を求め、各群の出産率 $[(\text{生児出産雌数}/\text{妊娠動物数}) \times 100, \%)$ を算出し、哺育5日目の剖検時に観察した着床数および妊娠黄体数から着床率 $[(\text{着床数}/\text{妊娠黄体数}) \times 100, \%)$ を算出した。

⑦剖検、精子検査および病理組織学的検査

雄動物は、投与42日の翌日に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させて剖検し、肝臓、精巣および精巣上体の重量を測定した。精巣および精巣上体はブアン液に固定(長期保存は0.1 M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液)し、肝臓、前立腺、精囊/凝固線および乳腺は0.1 M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定した。肝臓、精巣および精巣上体は対照群および500 mg/kg 投与群について病理組織学的検査を実施した。なお、対照群および高用量群の動物番号が若い順に各5例、さらに交尾が認められなかった雄2例について、精子運動能、精巣上体尾部および精巣における精子頭部数を調べた。また、剖検時に異常の認められた80 mg/kg 投与群の脳および精巣上体、500 mg/kg 投与群の大腸および小腸についても同様に固定し、病理組織学的検査を実施した。

雌動物のうち、分娩した雌は哺育5日に、2週間の交配期間中に交尾が確認されなかった雌(12 mg/kg 投与群の1例および80 mg/kg 投与群の1例)は投与42日の翌日に、それぞれペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させて剖検し、肝臓および卵巣重量を測定した。卵巣については実体顕微鏡下で妊娠黄体数を、子宮については着床数を数え、着床率 $[(\text{着床数}/\text{妊娠黄体数}) \times 100, \%)$ を算出した。また、乳腺、子宮、膣および卵巣は0.1 M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液に固定した。肝臓および卵巣は、対照群および1000 mg/kg 投与群について病理組織学的検査を実施した。

また、剖検時に異常の認められた80 mg/kg および500 mg/kg 投与群の小腸および大腸、500 mg/kg 投与群の脾臓についても同様に固定し、病理組織学的検査を実施した。

2) 出生児 (F₁)

① 出生児の観察

哺育 0 日に生存児数および死亡児数を雌雄別に数えて、性別および外表奇形の有無を観察し、分娩率[(産児数/着床痕数)×100, %]、生児出産率[(出產生児数/着床痕数)×100, %]、および出生率[(出產生児数/産児数)×100, %]を算出した。哺育 1～4 日まで、毎日、一般状態を観察し、生存児数と死亡児数を雌雄別に数え、新生児生存率[(哺育 4 日の生児数/哺育 0 日の生児数)×100, %]を算出した。生存児については、哺育 0 および 4 日に個別の体重を測定し、腹ごとに雌雄別の平均体重値を算出するとともに、哺育 0 日および 4 日における性比[(雄生児数/総生児数)×100, %]を算出した。

② 剖検

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

6. データの解析法

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

TBC 各投与群の病理組織学検査所見のうち、グレード分けした病理組織所見は、Mann-Whitney の U 検定により、また陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定により、500 mg/kg 投与群と対照群との間の有意差検定を行った(有意水準:5%)。ただし、雌においては、哺育 5 日に剖検した動物の成績のみ検定を実施した。

その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは litter ごとの平均値を 1 標本として、まず、Bartlett の方法により各群の分散の一樣性について検定(有意水準:5%)を行った。分散が一樣である場合には、一元配置型の分散分析(有意水準:5%)を行い、群間に有意性が認められる場合は、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%)。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画に従わなかったこと

試験期間中に、予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画に従わなかったことはなかった。

試験成績

1. 親動物

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

雌雄ともに死亡動物は観察されなかった。

500 mg/kg 投与群において、軟便が雄では投与 2 日 (投与開始＝投与 1 日)以降、解剖前日まで 1～5 例、雌では投与 2 日以降、交配前、交配期間中、妊娠期間および哺育期間中を含めて解剖前日まで 1～6 例に認められた。この軟便は解剖日前日の絶食により、同群の雄では 12 例に認められた。また、雌では絶食により 500 mg/kg 群では 13 例全例に、80 mg/kg 投与群では 7 例に観察された。

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

雌雄とも、体重には対照群と TBC 各投与群との間に有意差は認められなかった。

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

雌雄ともに、500 mg/kg 投与群の投与 1～2 日の摂餌量が対照群と比較して有意に($p<0.05$)減少した。さらに雄では投与 29～30 日の 12 mg/kg および 500 mg/kg 投与群の摂餌量が対照群と比較して、それぞれ有意に($p<0.01$ 、 $p<0.05$)増加し、雌では哺育 3～4 日の 12 mg/kg および 500 mg/kg 投与群の摂餌量が対照群と比較して有意に($p<0.05$)増加した。

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

雄の肝臓、精巣、精巣上体重量には、対照群と TBC 各投与群との間に有意差は認められなかった。また、雌の肝臓および卵巣重量にも、対照群と TBC 各投与群との間に有意差は認められなかった。

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

雄では、80 mg/kg 投与群の 1 例に側脳室の拡張がみられた。また、同群の 3 例の精巣上体では、両側(動物番号 M03001)あるいは片側(左、動物番号 M03010、M03011)に黄白色結節が観察され、そのうち 1 例(動物番号 M03010)では同側の精巣上体は小型であった。500 mg/kg 投与群の 1 例で肝臓が大型化を示し、6 例の小腸および大腸壁が肥厚していた。

雌では、80 mg/kg 投与群の 2 例で小腸壁の肥厚が観察され(動物番号 F03008、F03010)、このうち 1 例(動物番号 F03008)の腺胃粘膜に陥凹部(中央部黒色)が、別の 1 例(動物番号 F03010)の大腸壁に肥厚が観察された。500 mg/kg 投与群の 1 例の脾臓が大型化を示し、9 例の小腸および大腸壁が肥厚していた。

6) 精子検査 (Table 17, Appendix 17)

運動している精子数、前進している精子数、運動精子率(運動している精子数/観察した精子数、 $\times 100$ 、%)には対照群と 500 mg/kg 投与群との間に差はなかった。しかし、前進している精子の比率(前進している精子数/観察した精子数、 $\times 100$ 、%)は 500 mg/kg 投与群では対照群と比較して有意に($p<0.05$)低値を示した。

また、精巣上体尾部および精巣における精子頭部数には、対照群と 500 mg/kg 投与群との間に差はなかった。

交配期間中に交尾が確認されなかった 2 例(12 および 80 mg/kg の各 1 例)の精子検査の結果、12 mg/kg の 1 例(動物番号 M02005)では、精子運動能および精子数については対照群と比較して顕著な差はなかった。80 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 M03013)では、運動している精子数、また精巣および精巣上体中の精子頭部数には対照群との間に顕著な差は観察されなかったが、運動している精子数中の前進している精子数が少なく、その結果として前進精子率(前進している精子数/観察した精子数、 $\times 100$ 、%)が低値を示した。

7) 病理組織所見(Table 18, Table 19, Appendix 18, Appendix 19)

肝臓では、雄の対照群の 4 例および 500 mg/kg の 2 例、雌の対照群の 3 例および 500 mg/kg の 4 例に小肉芽腫が認められたが、雌雄ともに両群間に頻度および程度の差はなかった。また、雄の 500 mg/kg の 1 例および雌の対照群の 1 例に限局性の壊死が観察された。その他、雄の対照群の 2 例に肝細胞の脂肪変性が、1 例に限局性の線維化が認められたが、いずれもごく軽度な変化であった。剖検時に所見(大型化)が認められた動物には異常はみられなかった。

精巣では、対照群の 1 例(動物番号 M01010)および 500 mg/kg 投与群の 1 例(動物番号 M04011)に精細管の萎縮が観察された。

精巣上体では、精巣に精細管の萎縮が観察された 500 mg/kg 投与群の 1 例に管腔内に少数の細胞残屑が観察された。また、剖検時に肉眼的変化が観察された 80 mg/kg 投与群の 3 例(動物番号 M03001、M03010、M03011)では、精子肉芽腫が観察され、そのうち 1 例(動物番号 M03010)では管腔内に細胞残屑も観察された。なお、この 3 例の精巣には異常は認められなかった。

卵巣では、対照群および 500 mg/kg 投与群の全例に、病理組織学的な異常所見は観察されなかった。

剖検時に異常が観察された 80 mg/kg 投与群の雄の 1 例の脳では側脳室の拡張が観察された。同群で剖検時に腺胃粘膜に陥凹部および小腸壁の肥厚が観察された雌の 1 例では、腺胃の粘膜固有層にリンパ球浸潤および粘膜の潰瘍が観察され、また、十二指腸、空腸、回腸では腸粘膜上皮細胞の過形成が観察された。同群で小腸および大腸壁の肥厚が認められた雌の 1 例では、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸の腸粘膜上皮細胞の過形成が観察され、さらに、盲腸、空腸、結腸の粘膜固有層には単核細胞浸潤も観察された。

剖検時に小腸および大腸壁の肥厚が観察された 500 mg/kg 投与群の雄 6 例および雌の 9 例では、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸の腸粘膜上皮細胞の過形成が認められ、さらに、盲腸、空腸、結腸では粘膜固有層に単核細胞浸潤も観察された。

2. 生殖能力

1) 性周期および交配成績(Table 20, Table 21, Appendix 20, Appendix 21)

性周期には、TBC 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。

交配の結果、12 mg/kg(動物番号 F02005)および 80 mg/kg 投与群(動物番号 F03013)の各 1 組では 2 週間の交配期間中に交尾が確認されなかった。なお、交尾をした全ての動物は妊娠した。交尾率、受

胎率、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 TBC 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 出産率および妊娠期間 (Table 22, Appendix 22)

交尾が確認された全ての動物は妊娠 22～23 日に出産し、出産率および妊娠期間には対照群と TBC 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3) 分娩および哺育状態 (Table 22, Appendix 22)

出産した全ての動物の分娩および哺育状態に異常は観察されなかった。

4) 黄体数、着床数および着床率 (Table 22, Appendix 22)

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

3. 出生児

1) 生存 (Table 22, Appendix 22)

産児数、分娩率、生児出産率、出生率、生後 4 日までの新生児生存率には対照群と TBC 各投与群との間に有意差は認められなかった。80 mg/kg および 500 mg/kg 投与群の哺育 0 日および 4 日の性比(雄児数/雄および雌児数)が有意に($p < 0.05$)高い値を示した。

2) 体重 (Table 23, Appendix 23)

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

3) 出生児観察 (Table 24, Table 25, Appendix 24)

哺育 0～4 日における生存児に外表奇形は観察されなかった。

死亡児は、対照群を含む各投与群に認められたが、死亡時期および死亡児数に特定の傾向は認められなかった。

死亡児には母動物による食害により存在が不明になったと推察される児(不明児)、あるいは自己融解により内臓観察ができなかった死亡児を含むが、剖検が可能であった死亡児には外表奇形は観察されず、内臓観察が可能であった死亡児の内部器官には異常は認められなかった。

考察

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

試験期間中、雌雄ともに死亡動物は認められなかった。一般状態では雌雄ともに 500 mg/kg 投与群で投与 2 日以降、解剖時まで軟便が観察された。特に解剖前日の絶食時には、同群ではほぼ全例に軟便が観察され、さらに、中用量群である TBC 80 mg/kg 投与群の雌動物にも軟便が観察された。剖検の結果、消化管壁の肥厚が観察され、病理組織学的検査では消化管の粘膜上皮の過形成や粘膜固有層

に炎症細胞の浸潤といった TBS 投与によると考えられる変化(後述)が観察されていることから、80 mg/kg 以上の投与群に観察された軟便は TBC 投与による影響と考えられた。

投与開始直後の摂餌量(投与 1～2 日)が 500 mg/kg 投与群で対照群と比較して有意に低値を示した。投与初期の摂餌量の減少は、軟便が観察された時期とも一致することから TBC 投与による影響と考えられた。しかし、投与 29～30 日の 12 mg/kg および 500 mg/kg 投与群の雄、哺育 3～4 日の 12 mg/kg および 500 mg/kg 投与群の雌に認められた摂餌量の増加は僅かな変化であり、体重推移には試験期間中を通して TBC 投与による影響は認められていないことから、毒性学的に意味のない変化であると考えられた。

剖検時に、TBC 80 mg/kg および 500 mg/kg 投与群で小腸および大腸壁の肥厚が観察され、病理組織学的検査では、粘膜上皮細胞の過形成が認められた。一部の粘膜固有層には炎症細胞浸潤が観察された。28 日反復経口投与毒性試験¹⁾の 250 mg/kg 投与群の雌雄動物において、剖検時に小腸壁の肥厚が観察され、病理組織学的検査では回腸における腸絨毛の過形成、盲腸や結腸粘膜に細胞浸潤といった類似の変化が観察されていることから、本試験において観察された小腸および大腸の変化は TBC 投与による変化と考えられた。

500 mg/kg 投与群の雌の 1 例(動物番号 F04008)の脾臓が大型化を示した。病理組織学的検査の結果、髄外造血および褐色色素の沈着が認められたが、同週齢の雌に観察される程度と顕著な差はなかった。また、剖検時に、造血系に影響を及ぼしているような所見は観察されていない。28 日反復経口投与毒性試験¹⁾においても脾臓および造血系への影響を示唆する変化は認められていないことから、TBC 投与による影響ではないと推察された。その他、80 mg/kg 投与群の雄 1 例で脳室の拡張が観察されたが、病理組織学検査においても大脳皮質層の層構造に異常は認められず、また、この動物の一般状態には神経症状を示唆する変化もないこと、500 mg/kg 投与群には同様の変化は観察されていないことから偶発的な変化であると判断した。

また、500 mg/kg 投与群の雄の 1 例の肝臓が大型化を示した。28 日反復経口投与毒性試験¹⁾において、200 mg/kg 以上の投与により肝臓重量が増加することが報告されている。この報告¹⁾の血液生化学検査では肝障害を示唆する逸脱酵素に変化は認められず、肝臓の病理組織学的検査では中心静脈周囲の肝細胞の肥大が認められていることから、TBC により酵素誘導が起こったと考察している。同被験物質を用いた 2 ヶ月間混餌投与雄性生殖毒性試験²⁾においても、約 200 mg/kg/day の 61 日投与により、肝臓重量の増加が認められている。しかし、本試験においては雌雄ともにいずれの TBC 投与群の肝臓重量は対照群と比較して差はなく、病理組織検査においても、既報に認められた肝細胞の腫大といった変化は認められなかった。

80 mg/kg 投与群の 3 例の精巣上体で精子肉芽腫が観察され、このうち 1 例では精巣上体が小型であった。また、500 mg/kg 投与群の 1 例の精巣にて軽度であるが精細管の萎縮が観察された。しかし、精巣および精巣上体に異常が認められた 4 例の雄動物との間で交尾が確認された雌動物は、いずれも受胎し、産児数にも対照群と差はなかった。

対照群および 500 mg/kg の各 5 例で実施した精子検査では、500 mg/kg の精巣上体尾部から採取し

た精子の前進率(前進している精子数/検査した精子数 x100, %)が対照群と比較して僅かに低下した。しかし、500 mg/kg 投与群の受胎率は 100%であったことから、毒性学的な意味は無い変化と判断した。

2 ヶ月間混餌投与雄性生殖毒性試験²⁾における約 200 mg/kg/day の 61 日間反復投与により、精巣の病理組織学的検査では精上皮の剥離・脱落、間細胞の空胞化および過形成が報告されている。しかし、42 日間反復投与した本試験では精巣および精巣上体重量に TBC 投与による影響はなく、病理組織学的検査においても既報と同様の変化は観察されていない。投与期間の長期化に伴い精巣への影響が発現する可能性は考えられた。

交尾率、受胎率、黄体数、着床数および着床率には TBC 投与による影響は認められなかった。また、分娩および哺育に対しても TBC 投与による影響はなかった。

80 mg/kg および 500 mg/kg 投与群において出生児の性比が対照群と比較して有意に高値を示した。これらの群の出産児数は対照群との間に顕著な差はなかったが、わずかに雌児数が少なかったことに起因した変化であった。生児出産率および死亡児数に差はなかったことから、TBC 投与による性選択性のある致死が発現したのではなく偶発的な変化と考えられた。児の一般状態、生存率、体重、剖検の結果には、TBC 投与による影響はなかった。

以上の結果から、本試験条件下における TBC の親動物に対する一般毒性学的無毒性量は、雄では 80 mg/kg/day、雌では 12 mg/kg/day、生殖発生毒性学的な無毒性量は、500 mg/kg/day と考えられた。また、次世代に対する無毒性量も、500 mg/kg/day であると考えられた。

参考文献

- 1) 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)のラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験 (http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper96-69-5b.html)
- 2) Takahashi O and Oishi S (2006), Arch Toxicol., 80: 225-241.
- 3) 6-tert-ブチル-m-クレゾールのラットにおける反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper88-60-8d.html)

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 1. General conditions of male rats

[illegible]

Pre: Before administration. Post: after administration.

Table 1 (continued). General conditions of male rats

Group	Number of males and general conditions	Days of administration																																			
		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		39		40		41		42		43	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
5% gum arabic	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
	Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
TBC 12 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
	Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
TBC 80 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13			
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
	Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
TBC 500 mg/kg	Number of males	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13		
	General appearance, No abnormality	10	10	9	9	9	9	9	9	11	11	11	11	11	11	11	10	10	9	9	8	8	11	11	9	9	11	11	8	8	10	10	10	10	1		
	Excretion, Loose stool	3	3	4	4	4	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4	4	5	5	2	2	4	4	2	2	5	5	3	3	3	3	12		

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 2. General conditions of female rats

Group	Number of females and general conditions	Days of administration																																																							
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25							
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post								
5% gum arabic	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	11	11	7	7	7	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	11	11	7	7	7	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
TBC 12 mg/kg	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	8	8	8	8	8	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	8	8	8	8	8	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
TBC 80 mg/kg	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	11	11	10	10	10	6	6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	11	11	10	10	10	6	6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
	Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
TBC 500 mg/kg	Number of females	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	9	9	8	8	8	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	General appearance, No abnormality	13	13	9	9	9	9	11	11	11	11	9	9	10	10	10	10	9	9	10	10	12	12	10	10	11	11	11	11	10	10	6	6	6	6	6	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Excretion, Loose stool	0	0	4	4	4	4	2	2	2	2	4	4	3	3	3	3	4	4	3	3	1	1	3	3	2	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Pre: Before administration. Post: after administration.

Table 2 (continued). General conditions of female rats

[illegible]

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 3. General conditions in dams during pregnancy

Group	Number of dams and general conditions	Days of pregnancy																											
		0		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
5% gum arabic	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TBC 12 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TBC 80 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TBC 500 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	10	10	11	11	10	10	11	11	9	9	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	8	8	9	9	12	12	12	12
	Excretion, Loose stool	3	3	2	2	3	3	2	2	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	5	5	4	4	1	1	1	1

Pre: Before administration, Post: after administration.

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

Group		Number of dams and general conditions	Days of pregnancy																			
			14		15		16		17		18		19		20		21		22		23	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
5% gum arabic		Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	10	5	1	
		General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	10	5	1	
		Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TBC 12 mg/kg		Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	4	4	
		General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	4	4	
		Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TBC 80 mg/kg		Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	5	1	
		General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	7	5	1	
		Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
TBC 500 mg/kg		Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	6	2	1	
		General appearance, No abnormality	9	9	12	12	12	12	11	11	12	12	12	12	10	10	8	8	3	2	1	
		Excretion, Loose stool	4	4	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	3	3	5	5	3	0	0	

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 4. General conditions in dams during lactation

Group	Number of dams and general conditions	Days of lactation											
		0		1		2		3		4		5	
		Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
5% gum arabic	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TBC 12 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TBC 80 mg/kg	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	General appearance, No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	5	
	Excretion, Loose stool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	
TBC 500 mg/kg	Number of dams	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
	General appearance, No abnormality	7	7	8	8	9	9	11	11	10	10	0	
	Excretion, Loose stool	6	6	5	5	4	4	2	2	3	3	13	

Pre: Before administration, Post: after administration.

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 5. Body weights of male rats

Group	5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of males	13	13	13	13
Days of administration				
1	364.2 ± 12.9	368.5 ± 12.9	367.3 ± 13.1	365.6 ± 16.1
7	390.2 ± 17.5	396.7 ± 13.6	391.6 ± 18.7	386.2 ± 18.1
14	416.0 ± 20.3	424.4 ± 16.2	420.3 ± 25.4	411.9 ± 22.3
21	432.5 ± 24.3	445.6 ± 16.9	440.8 ± 30.0	432.3 ± 27.6
28	459.5 ± 27.4	471.7 ± 19.6	467.4 ± 34.3	458.4 ± 30.9
35	483.0 ± 29.7	497.7 ± 19.2	492.8 ± 39.3	480.5 ± 33.9
42	498.9 ± 35.0	515.9 ± 20.6	512.3 ± 44.3	497.2 ± 33.8

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 6. Body weights of female rats

Group	5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of females	13	13	13	13
Days of administration				
1	248.5 ± 10.4	246.2 ± 9.9	246.9 ± 8.9	246.7 ± 7.7
7	261.6 ± 10.7	261.1 ± 11.2	259.5 ± 7.4	260.8 ± 11.7
14	274.1 ± 13.9	274.6 ± 17.7	271.7 ± 8.3	271.1 ± 13.2

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 7. Body weights of dams during pregnancy

Group	5% gum arabic 0 mg/kg	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of dams	13	12	12	13
Days of pregnancy				
0	285.6 ± 11.5	284.4 ± 18.7	285.9 ± 14.1	282.7 ± 11.9
7	320.8 ± 11.4	319.8 ± 22.5	322.2 ± 12.2	316.2 ± 14.7
14	358.3 ± 15.2	358.1 ± 25.4	357.0 ± 16.6	355.6 ± 19.4
21	447.8 ± 22.2	454.6 ± 25.2	448.8 ± 20.3	440.7 ± 29.8

Each value shows mean ± S.D. (g).

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 8. Body weights of dams during lactation

Group	5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of dams	13	12	12	13
Days of lactation				
0	324.0 ± 19.1	326.5 ± 26.3	324.0 ± 23.3	328.9 ± 22.1
4	346.0 ± 13.8	354.2 ± 20.7	350.1 ± 16.7	356.5 ± 23.3

Each value shows mean ± S.D. (g).

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 9. Food consumption of male rats

Group	5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of males	13	13	13	13
Days of administration				
1	27.4 ± 2.9	27.3 ± 3.8	27.2 ± 2.2	20.6 ± 3.2 **
7	29.1 ± 2.1	30.2 ± 2.9	28.2 ± 2.7	30.9 ± 3.6
13	27.8 ± 1.8	28.7 ± 2.4	28.9 ± 2.3	29.5 ± 1.4
29	28.8 ± 2.2	32.4 ± 2.6 **	30.2 ± 3.1	31.3 ± 2.5 *
35	29.9 ± 2.9	30.7 ± 3.6	30.4 ± 3.4	30.7 ± 2.0
41	28.7 ± 3.0	31.1 ± 3.3	31.3 ± 3.3	31.6 ± 2.2

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 10. Food consumption of female rats

Group	5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of females	13	13	13	13
Days of administration				
1	20.9 ± 2.2	21.2 ± 3.1	19.6 ± 3.4	17.2 ± 2.7 **
7	21.2 ± 2.1	21.8 ± 3.4	23.2 ± 2.2	23.1 ± 2.6
13	22.5 ± 2.3	21.5 ± 4.4	21.7 ± 3.1	22.3 ± 3.5

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 11. Food consumption of dams during pregnancy

Group	5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of dams	13	12	12	13
Days of pregnancy				
0	22.2 ± 2.8	21.4 ± 2.7	21.8 ± 2.1	23.4 ± 2.9
7	28.3 ± 2.8	26.7 ± 2.4	28.3 ± 3.2	28.8 ± 3.4
14	27.4 ± 3.3	27.8 ± 2.7	28.1 ± 2.9	30.1 ± 3.4
20	21.8 ± 2.8	24.5 ± 4.2	23.4 ± 2.5	24.2 ± 3.6

Each value shows mean ± S.D. (g).

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 12. Food consumption of dams during lactation

Group	5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of dams	13	12	12	13
Days of lactation	3			
	42.4 ± 6.2	49.6 ± 5.1 *	46.8 ± 3.6	49.1 ± 8.6 *

Each value shows mean ± S.D. (g).

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 13. Organ weights of male rats

Group		5% gum arabic		TBC 12 mg/kg		TBC 80 mg/kg		TBC 500 mg/kg	
Number of males		13		13		13		13	
Body weight	(g)	469.6	± 33.7	482.3	± 18.8	479.4	± 41.1	457.1	± 32.2
Liver	(mg)	12107.0	± 1627.5	12438.8	± 967.3	11958.1	± 1517.6	12284.2	± 1144.7
	(mg/g)	25.697	± 1.887	25.774	± 1.339	24.880	± 1.397	26.863	± 1.389
Testes	(mg)	3426.4	± 222.1	3204.1	± 190.9	3359.3	± 196.4	3266.3	± 294.4
	(mg/g)	7.329	± 0.677	6.653	± 0.470	7.050	± 0.659	7.182	± 0.850
Epididymides	(mg)	1247.4	± 67.4	1194.5	± 80.0	1219.7	± 135.5	1175.0	± 109.2
	(mg/g)	2.669	± 0.237	2.480	± 0.192	2.560	± 0.346	2.582	± 0.298

Each value shows mean ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 14. Organ weights of female rats

Group		5% gum arabic		TBC 12 mg/kg		TBC 80 mg/kg		TBC 500 mg/kg	
Number of females		13		12		12		13	
Body weight	(g)	308.1	± 14.0	315.4	± 22.8	311.2	± 19.5	306.1	± 22.3
Liver	(mg)	9980.2	± 749.8	9981.3	± 988.7	9974.9	± 896.1	10593.5	± 1007.3
	(mg/g)	32.421	± 2.399	31.622	± 1.655	32.094	± 2.744	34.631	± 2.508
Ovaries	(mg)	101.4	± 10.3	111.6	± 13.5	100.1	± 11.5	112.4	± 13.8
	(mg/g)	0.330	± 0.038	0.355	± 0.042	0.322	± 0.030	0.369	± 0.051

Each value shows mean ± S.D.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 15. Macroscopic findings in male rats

Findings	Group Grade	5% gum arabic		TBC 12 mg/kg		TBC 80 mg/kg		TBC 500 mg/kg	
		-	P	-	P	-	P	-	P
Brain									
Dilatation, ventricle, cerebral		13	0	13	0	12	1	13	0
Epididymis									
Nodule, bilateral/unilateral		13	0	13	0	10	3	13	0
Small, unilateral		13	0	13	0	12	1	13	0
Large intestine									
Wall									
Thickening		13	0	13	0	13	0	7	6
Liver									
Enlargement		13	0	13	0	13	0	12	1
Small intestine									
Wall									
Thickening		13	0	13	0	13	0	7	6

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

Numerals represent the number of animals.

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 16. Macroscopic findings in female rats

Findings	Group Grade	5% gum arabic		TBC 12 mg/kg		TBC 80 mg/kg		TBC 500 mg/kg	
		-	P	-	P	-	P	-	P
Glandular stomach									
Depression, mucosa, dark spot		13	0	12	0	11	1	13	0
Large intestine									
Wall									
Thickening		13	0	12	0	11	1	4	9
Small intestine									
Wall									
Thickening		13	0	12	0	10	2	4	9
Spleen									
Enlargement		13	0	12	0	12	0	12	1

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

Numerals represent the number of animals.

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 17. Sperm analysis in male rats

Group	5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of males examined	5	1	1	5
<u>Sperm motility</u>				
No. of sperm examined	383.4 ± 206.0 ^{a)}	476	524	502.0 ± 110.9
No. of motile sperm	349.6 ± 183.9	435	431	460.4 ± 106.6
% of motile sperm	91.6 ± 3.0	91.4	82.3	91.6 ± 3.0
No. of progressive sperm	246.4 ± 131.3	204	91	255.2 ± 42.8
% of progressive sperm	65.2 ± 5.7	42.9	17.4	51.9 ± 8.7 *
<u>Caudal epididymal sperm counts</u>				
Caudal epididymis weight (g)	0.2766 ± 0.0277	0.2446	0.2980	0.2806 ± 0.0248
No. of sperm per caudal epididymis (million)	226.0 ± 51.2	155	218	190.0 ± 42.6
No. of sperm per caudal epididymis weight (million/g)	815.6 ± 158.0	633.7	731.5	672.4 ± 109.1
<u>Testicular sperm head counts</u>				
Sperm head counts / denuded testis weight (million/g)	152.2 ± 42.3	127.9	113.5	130.6 ± 13.2

a) Each value shows mean(g)±S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.00)

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 18. Histopathological findings in male rats

Findings	Group Grade	5% gum arabic							TBC 12 mg/kg							TBC 80 mg/kg							TBC 500 mg/kg						
		-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE
Liver																													
Fatty change, hepatocyte, periportal		11	2	0	0	0											13	0	0	0	0								
Fibrosis, focal		12	1	0	0	0											13	0	0	0	0								
Microgranuloma		9	4	0	0	0											11	2	0	0	0								
Necrosis, focal		13	0	0	0	0											12	1	0	0	0								
Testis																													
Atrophy, seminiferous tubule, bilateral		12	1	0	0	0									3	0	0	0	0		10	12	0	1	0	0			
Epididymis																													
Cell debris, lumen, unilateral/bilateral		13	0	0	0	0									2	1	0	0	0		10	12	1	0	0	0			
Granuloma, spermatic, unilateral/bilateral		13	0	0	0	0									0	0	3	0	0		10	13	0	0	0	0			
Brain																													
Dilatation, lateral ventricle															0	0	1	0	0		12								
Duodenum																													
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa																		0	6	0	0	0							7
Jejunum																													
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa																		0	6	0	0	0							7
Ileum																													
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa																		0	6	0	0	0							7
Cecum																													
Cellular infiltration, mononuclear cell, lamina propria																		0	6	0	0	0							7
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa																		0	6	0	0	0							7
Colon																													
Cellular infiltration, mononuclear cell, lamina propria																		0	6	0	0	0							7
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa																		0	6	0	0	0							7
Rectum																													
Cellular infiltration, mononuclear cell, lamina propria																		0	6	0	0	0							7
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa																		0	6	0	0	0							7

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

P: Non-graded change NE: Not examined

Numerals represent the number of animals.

Not significantly different from control.

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 19. Histopathological findings in female rats

Findings	Group Grade	5% gum arabic							TBC 12 mg/kg							TBC 80 mg/kg							TBC 500 mg/kg						
		-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE	-	±	+	2+	3+	P	NE
Liver																													
Microgranuloma		10	3	0	0	0																	9	4	0	0	0		
Necrosis, focal		12	1	0	0	0																	13	0	0	0	0		
Ovary		13																					13						
Spleen																													
Hematopoiesis, extramedullary																							0	0	1	0	0		12
Diposit, pigment, brown																							0	1	0	0	0		12
Glandular stomach																													
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria																0	1	0	0	0		11							
Erosion, mucosa																0	1	0	0	0		11							
Duodenum																													
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa																0	2	0	0	0		10	0	9	0	0	0		4
Jejunum																													
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa																0	2	0	0	0		10	0	9	0	0	0		4
Ileum																													
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa																0	2	0	0	0		10	0	9	0	0	0		4
Cecum																													
Cellular infiltration, mononuclear cell, lamina propria																0	0	1	0	0		11	0	7	2	0	0		4
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa																0	1	0	0	0		11	0	9	0	0	0		4
Colon																													
Cellular infiltration, mononuclear cell, lamina propria																0	1	0	0	0		11	0	9	0	0	0		4
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa																0	1	0	0	0		11	0	9	0	0	0		4
Rectum																													
Cellular infiltration, mononuclear cell, lamina propria																0	1	0	0	0		11	0	9	0	0	0		4
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa																0	1	0	0	0		11	0	8	1	0	0		4

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

P: Non-graded change NE: Not examined

Numerals represent the number of animals.

Not significantly different from control.

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 20. Results of observations about estrous cycle

Group	5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of animals examined	13	13	13	13
<u>Pre-treatment period</u>				
Number of animals showing the each type of regular estrous cycle				
4-day cycle	11	12	12	13
4 and 5-day cycle	1	0	0	0
5-day cycle	1	1	1	0
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D.	4.1 ± 0.3	4.2 ± 0.4	4.1 ± 0.3	4.0 ± 0.0
<u>Treatment period</u>				
Number of animals showing each type of cycle				
4-day cycle	12	11	12	13
4 and 5-day cycle	0	1	0	0
5-day cycle	0	1	1	0
Irregular	1	0	0	0
Mean length of estrous cycle in days; Mean±S.D.	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.0 ± 0.0
Frequency of animals of which type of estrus cycle was changed after the treatment	2 / 13	2 / 13	0 / 13	0 / 13
Mean times of vaginal estrus during mating period; Mean±S.D.	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.6	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.0

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 21. Results of observations about reproductive performance

Group	5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of mated pairs [A]	13	13	13	13
Number of copulated pairs [B]	13	12	12	13
Copulation index [(B/A)×100,%]	100.0	92.3	92.3	100.0
Number of fertile males [C]	13	12	12	13
Fertility index [(C/B)×100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Pairing days until copulation ; Mean±S.D. (N)	2.8 ± 1.2 (13)	2.3 ± 1.1 (12)	3.8 ± 3.1 (12)	2.5 ± 1.2 (13)

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 22. Observation of offspring (F₁)

Group	5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of dams	13	12	12	13
Gestation length (days)				
Mean ± S.D. per dam	22.4 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.4 ± 0.5	22.2 ± 0.4
Number of corpora lutea				
Total	224	224	192	231
Mean ± S.D. per dam	17.2 ± 1.7	18.7 ± 1.7	16.0 ± 2.6	17.8 ± 2.6
Number of implantation scars				
Total	205	198	178	203
Mean ± S.D. per dam	15.8 ± 2.2	16.5 ± 1.3	14.8 ± 2.6	15.6 ± 3.2
Implantation index (%) ^{a)}	91.4 ± 7.5	88.6 ± 5.7	93.0 ± 8.8	87.7 ± 13.8
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of offspring at birth				
Total	195	184	171	188
Mean ± S.D. per dam	15.0 ± 2.7	15.3 ± 1.4	14.3 ± 2.8	14.5 ± 3.6
Number of live offspring at birth				
Male	82	82	95	110
Female	112	99	76	76
Total	194	181	171	186
Mean ± S.D. per dam	14.9 ± 2.7	15.1 ± 1.4	14.3 ± 2.8	14.3 ± 3.6
Sex ratio ^{c)}				
Mean ± S.D. per dam	0.43 ± 0.12	0.45 ± 0.11	0.55 ± 0.10 *	0.59 ± 0.08 **
Number of stillbirths				
Total	1	3	0	2
Mean ± S.D. per dam	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4
Delivery index ^{d)}				
Mean% ± S.D. per dam	94.7 ± 5.9	93.1 ± 6.3	95.9 ± 7.2	91.9 ± 9.4
Birth index ^{e)}				
Mean% ± S.D. per dam	94.2 ± 5.7	91.6 ± 7.2	95.9 ± 7.2	90.9 ± 9.5
Live birth index ^{f)}				
Mean% ± S.D. per dam	99.5 ± 1.7	98.4 ± 3.9	100.0 ± 0.0	99.0 ± 2.5
Number of offspring on day 4				
Male	80	82	95	108
Female	109	97	75	76
Sex ratio ^{c)}				
Mean ± S.D. per dam	0.43 ± 0.12	0.46 ± 0.12	0.56 ± 0.10 *	0.58 ± 0.08 **
Viability index ^{g)}				
Mean% ± S.D. per dam	97.3 ± 4.5	98.9 ± 2.6	99.4 ± 2.0	99.1 ± 2.2
Number of external abnormalities ^{h)}	0	0	0	0

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

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

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

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

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

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

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

h): (Number of live offspring 21 days after birth/number of live offspring after culling)×100.

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 23. Body weights of offspring (F₁)

Group		5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Number of dams		13	12	12	13
Male					
Days after birth					
	0	6.9 ± 0.8	6.6 ± 0.6	7.0 ± 0.9	6.6 ± 0.6
	4	10.9 ± 1.8	10.7 ± 0.9	11.3 ± 2.0	10.4 ± 1.3
Female					
Days after birth					
	0	6.5 ± 0.8	6.3 ± 0.7	6.7 ± 0.8	6.2 ± 0.5
	4	10.2 ± 1.8	10.3 ± 0.8	10.8 ± 1.9	10.0 ± 1.4

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

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

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 24. General conditions in offspring (F₁)

Group	Number of offspring and general conditions	Days after birth				
		0	1	2	3	4
5% gum arabic	Number of offspring	194	194	191	189	189
	General appearance, No abnormality	194	191	189	189	189
	General appearance, Death		3	2		
TBC 12 mg/kg	Number of offspring	181	181	180	179	179
	General appearance, No abnormality	181	180	179	179	179
	General appearance, Death		1	1		
TBC 80 mg/kg	Number of offspring	171	171	170	170	170
	General appearance, No abnormality	171	170	170	170	170
	General appearance, Death		1			
TBC 500 mg/kg	Number of offspring	186	186	184	184	184
	General appearance, No abnormality	186	184	184	184	184
	General appearance, Death		2			

Reproduction/developmental toxicity screening test of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) by oral administration in rats.

Table 25. Morphological findings of offspring (F₁)

Group	5% gum arabic	TBC 12 mg/kg	TBC 80 mg/kg	TBC 500 mg/kg
Dead offspring				
Number of dead offspring ^{a)}	6	5	1	4
Number of missing offspring	3	0	1	1
Number of dead offspring examined	3	5	0	3
Number of dead offspring with external changes	0	0	0	0
Number of dead offspring with visceral changes	0	0	0	0
Live offspring				
Number of live offspring examined (postnatal day 0)	194	181	171	186
Number of live offspring with external changes	0	0	0	0
Number of live offspring examined (postnatal day 4)	189	179	170	184
Number of live offspring with external changes	0	0	0	0
Number of live offspring with visceral changes	0	0	0	0

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

^{a)} including missing offspring