
p-tert-ブチルトルエンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験

最 終 報 告 書

作成日 2000年8月29日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

表 題：p-tert-ブチルトルエンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号：100918

被験物質名：p-tert-ブチルトルエン (CAS No.98-51-1)

試験系：Sprague-Dawley系雌雄ラット (SPF) [Crj:CD(SD)IGS]

試験委託者：厚生省 生活衛生局

東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設：株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地

試験目的：p-tert-ブチルトルエンが継続的に人に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Preliminary Reproduction Toxicity Screening Testに従って、p-tert-ブチルトルエンを雌雄ラットに経口投与した簡易生殖毒性試験を行い、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。

なお、当試験は、「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」（化学物質GLP）（昭和59年3月31日環保業第39号環境庁企画調整局長、業発第229号厚生省薬務局長、59基局第85号通商産業省基礎産業局長連名通知）ならびにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE（OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準）（OECDのGLP基準）に従って実施した。

試験期間：1999年6月29日～2000年8月29日

試験実施日：雄動物入手日	1999年 6月30日
雌動物入手日	1999年 6月30日
雄の投与開始日	1999年 7月12日
雌の投与開始日	1999年 7月12日
交配開始日	1999年 7月26日
母動物および新生児の剖検開始日	1999年 8月22日
雌の投与終了日	1999年 8月25日
母動物および新生児の剖検終了日	1999年 8月26日
雄の投与終了日	1999年 9月 1日
雄の剖検日	1999年 8月31日～9月 2日
病理組織学検査終了日	1999年10月12日

資料，標本および被験物質の保管場所：

当試験の実施により得られたすべての資料，標本および保管すべき被験物質は，最終報告書提出後10年間は株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所の資料保管室，標本保管室および被験物質保管室に保管する．その後は，試験委託者と協議の上で決定する．

試験計画書に従わなかったこと：

- ①1999年7月13日に蒸気漏れ修理による空調停止のため，動物飼育室の湿度が設定範囲(40～70 %)を逸脱して最高74 %となった．しかし，空調機停止時間は短時間(約2時間)であり，試験成績に影響を及ぼすことはないと判断された．
 - ②死亡した雄の精巣および精巣上体ならびに雌の卵巣重量を参考のため測定した．なお，この逸脱は試験成績に影響を及ぼすことはないと判断された．
 - ③妊娠期に死亡した母動物(15 mg/kg群:No.353)の胎児の発育状況を推測するため胎児および胎盤の重量を測定した．なお，この逸脱は試験成績に影響を及ぼすことはないと判断された．
- その他には，試験計画書に従わなかったことはなかった．

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：

当試験の実施期間中に，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は認められなかった．

目次

要約	11
緒言	14
方法	
1.被験物質および媒体	14
2.投与検体および濃度確認	14
3.使用動物および飼育条件	15
4.投与経路, 投与方法, 群構成, 投与量および投与期間	16
5.観察および検査項目	17
6.統計学的方法	20
結果	
I. 反復投与毒性	21
1. 雄(P)に及ぼす影響	21
2. 雌(P)に及ぼす影響	23
II. 生殖発生毒性	25
1. 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響	25
2. 新生児(F ₁)に及ぼす影響	26
考察	26
文献	28

Attachment, Table, Fig.およびAppendixの目次

Attachment 1	Stability of toluene,p-tert-butyl- in dosing preparations	 29
Attachment 2	Stability of toluene,p-tert-butyl- in dosing preparations	 30
Attachment 3	Concentration of toluene,p-tert-butyl- in dosing preparations	 31
Attachment 4	Concentration of toluene,p-tert-butyl- in dosing preparations	 32
Table 1-1	General signs of male rats (P) in preliminary reproduction	
~1-4	toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 33~ 36
Table 2	Body weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 37
Table 3	Food consumption of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 38
Table 4	Necropsy findings of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 39
Table 5	Organ weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 40
Table 6	Obsrvation of sperm in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 41
Table 7-1	Histopathological findings of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 42
Table 7-2	Histopathological findings of dead male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 43
Table 8-1	General signs of female rats (P) in preliminary	
~8-2	reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 44~ 45

Table 9-1	General signs of dams (P) during pregnancy period in	
~9-2	preliminary reproduction toxicity screening test of	
	toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 46~ 47
Table 10	General signs of dams (P) during lactation period in	
	preliminary reproduction toxicity screening test of	
	toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 48
Table 11	Body weight of female rats (P) in preliminary	
	reproduction toxicity screening test of	
	toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 49
Table 12	Body weight of dams (P) during pregnancy period in	
	preliminary reproduction toxicity screening test of	
	toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 50
Table 13	Body weight of dams (P) during lactation period in	
	preliminary reproduction toxicity screening test of	
	toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 51
Table 14	Food consumption of female rats (P) in preliminary	
	reproduction toxicity screening test of	
	toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 52
Table 15	Food consumption of dams (P) during pregnancy period in	
	preliminary reproduction toxicity screening test of	
	toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 53
Table 16	Food consumption of dams (P) during lactation period in	
	preliminary reproduction toxicity screening test of	
	toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 54
Table 17	Necropsy findings of female rats (P) in preliminary	
	reproduction toxicity screening test of	
	toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 55
Table 18	Organ weight of female rats (P) in preliminary reproduction	
	toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by	
	oral administration	 56
Table 19-1	Histopathological findings of female rats (P) in	
	preliminary reproduction toxicity screening test of	
	toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 57
Table 19-2	Histopathological findings of dead female rats (P) in	
	preliminary reproduction toxicity screening test of	
	toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 58

Table 20	Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 59
Table 21	Observation of pups (F1) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 60
Table 22	Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 61
Table 23	Necropsy findings of pups (F1) on day 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 62
Fig. 1	Chemical structure of toluene,p-tert-butyl-	 63
Fig. 2	Body weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 64
Fig. 3	Food consumption of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 65
Fig. 4	Body weight of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 66
Fig. 5	Body weight of dams (P) during pregnancy and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 67
Fig. 6	Food consumption of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 68
Fig. 7	Food consumption of dams (P) during pregnancy and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 69
Fig. 8	Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration	 70

Appendix 1-1~ 1-5	Individual general signs of male rats (P)	71~ 90
Appendix 2-1~ 2-5	Individual body weight (g) of male rats (P)	91~ 95
Appendix 3-1~ 3-5	Individual food consumption (g/day) of male rats (P)	96~100
Appendix 4-1~ 4-5	Individual necropsy findings of male rats (P)	101~105
Appendix 5-1~ 5-5	Individual organ weight of male rats (P)	106~110
Appendix 6-1~ 6-5	Individual sperm analysis	111~125
Appendix 7-1~ 7-5	Individual histopathological findings of male rats (P)	126~132
Appendix 7-6	Individual histopathological findings of dead male rats (P)	133
Appendix 8-1~ 8-5	Individual general signs of female rats (P).....	134~143
Appendix 9-1~ 9-5	Individual general signs of dams (P) during pregnancy period	144~153
Appendix 10-1~10-5	Individual general signs of dams (P) during lactation period	154~158
Appendix 11-1~11-5	Individual body weight (g) of female rats (P).....	159~163
Appendix 12-1~12-5	Individual body weight (g) of dams (P) during pregnancy period	164~168
Appendix 13-1~13-5	Individual body weight (g) of dams (P) during lactation period	169~173
Appendix 14-1~14-5	Individual food consumption (g/day) of female rats (P)	174~178
Appendix 15-1~15-5	Individual food consumption (g/day) of dams (P) during pregnancy period	179~183
Appendix 16-1~16-5	Individual food consumption (g/day) of dams (P) during lactation period	184~188
Appendix 17-1~17-5	Individual necropsy findings of female rats (P) ...	189~193
Appendix 18-1~18-5	Individual organ weight of female rats (P)	194~198
Appendix 19-1~19-2	Individual histopathological findings of female rats (P)	199~200
Appendix 19-3~19-4	Individual histopathological findings of dead female rats (P)	201~202
Appendix 20-1~20-5	Individual estrous cases and reproductive performance of female rats (P) during pre-mating and mating periods	203~207
Appendix 21-1~21-5	Observation of pups (F1) from individual dams (P)	208~217

Appendix 22-1~22-5	Body weight (g, per dam) of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation from individual dams (P)	218~222
Appendix 23-1~23-5	Individual necropsy findings of pups (F1) on day 4 of lactation	223~227
Photo 1~ 2		228

要約

p-tert-ブチルトルエンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験を行い、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与量は、50 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3により15, 5および1.5 mg/kgとした。対照として媒体(コーンオイル)投与群を設けた。なお、各群の使用動物数は雌雄各12例とした。

I. 反復投与毒性

1. 雄(P)に及ぼす影響

一般状態：死亡は、50 mg/kg群で1例認められた。一般状態では、50 mg/kg群で体温低下、自発運動の低下、被毛の汚れおよび赤色尿がみられた。

体重：15および50 mg/kg群で低値がみられた。

摂餌量：50 mg/kg群で一過性の低値がみられた。

剖検：15および50 mg/kg群で精巣および精巣上体の萎縮がみられた。

器官重量：15 mg/kg群で精巣および精巣上体の絶対重量の低値あるいは低値傾向がみられた。50 mg/kg群で精巣および精巣上体の絶対ならびに相対重量の低値がみられた。

精子検査：15および50 mg/kg群で活動精子率、基準点移動速度、最短距離移動速度、総移動速度、生存精子率、生き残り精子率、精子数および左精巣上体尾部1 g当たりの精子数の低値、奇形精子率の高値がみられた。また、15 mg/kg群で頭部の横切り回数の高値がみられた。

病理組織学検査：15 mg/kg群で精巣に精細管の萎縮が4例とライディヒ細胞の過形成が2例、精巣上体に精子減少が4例みられた。50 mg/kg群で精巣に精細管の萎縮とライディヒ細胞の過形成が各11例、精巣上体に精子減少が11例みられた。

2. 雌(P)に及ぼす影響

一般状態：死亡は、15 mg/kg群で1例と50 mg/kg群で6例認められた。一般状態では、15 mg/kg群で体温低下および自発運動の低下、50 mg/kg群で体温低下、腹臥、自発運動の低下、よろめき歩行、立毛、被毛の汚れ、流涙、呼吸緩徐、下痢および筋弛緩がみられた。

体重：5および15mg/kg群では、妊娠期および哺育期に低値あるいは低値傾向がみられた。50 mg/kg群では、交配前に低値がみられた。

摂餌量：5 mg/kg群では、哺育期に低値がみられた。

剖検：死亡例においては、15 mg/kg群で腺胃粘膜暗赤色斑、50 mg/kg群で肝臓の白色化および胸腺の萎縮がみられた。生存例では、投与に起因する変化はみられなかった。

器官重量：投与に起因する変化はみられなかった。

病理組織学検査：卵巣に投与に起因する変化はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

精子検査：前述したように，15および50 mg/kg群で精子の活動性，生存性，形態および数に影響がみられた。

病理組織学検査：前述したように，15および50 mg/kg群で精巣および精巣上体に変化がみられた。

発情回数，交尾率，交尾所要日数：投与に起因する変化はみられなかった。

受胎雌数，妊娠期間，分娩状態，哺育状態：15 mg/kg群では，受胎雌数は減少した。50 mg/kg群では，受胎雌は1例も得られなかった。

受胎率：15および50 mg/kg群で低値がみられた。

妊娠黄体数，着床数，着床率：1.5，5および15 mg/kg群では，投与に起因する変化はみられなかった。

出産率：1.5，5および15 mg/kg群では，投与に起因する変化はみられなかった。

2. 新生児(F₁)に及ぼす影響

総出産児数，死産児数，哺育0日の新生児数，哺育0日の性比，分娩率，児の産出率，出生率：1.5および5 mg/kg群では，投与に起因する変化はみられなかった。15 mg/kg群では，総出産児数，哺育0日の新生児数，分娩率，児の産出率および出生率の低値あるいは低値傾向，死産児数の高値傾向がみられた。50 mg/kg群では，受胎雌がいないため，哺育0日の新生児は1例も得られなかった。

一般状態：投与に起因する変化はみられなかった。

哺育4日の生存児数，哺育4日の性比，哺育4日の生存率：1.5および5 mg/kg群では，投与に起因する変化はみられなかった。15 mg/kg群では，哺育4日の生存児数および哺育4日の生存率の低値傾向がみられた。

外表観察：投与に起因する変化はみられなかった。

体重：1.5 mg/kg群では，投与に起因する変化はみられなかった。5および15 mg/kg群では，哺育0および4日の雌雄別平均体重，腹平均体重，腹合計体重の低値あるいは低値傾向がみられた。

剖検：投与に起因する変化はみられなかった。

以上のように，p-tert-ブチルトルエンの一般毒性学的無影響量は，雄では15 mg/kg投与により精子検査成績，精巣および精巣上体の病理組織学検査成績に影響が認められたことから5 mg/kg/day，雌では5 mg/kg投与により妊娠期および哺育期に体重の低値，哺育期に摂餌量の低値が認められたことから1.5 mg/kg/dayと考えられる。生殖発生毒性学的な無影響量は，雄では15 mg/kg投与により精子検査成績，精巣および精巣上体の病理組織学検査成績に影響が認められたことから5 mg/kg/day，雌では15 mg/kg投与により受胎率の低値が認められたことから5 mg/kg/day，児動物では5mg/kg投与により哺育0および4日に新生児体

重の低値が認められたことから1.5 mg/kg/dayと考えられる。

緒言

p-tert-ブチルトルエンが経口的に継続して人に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Preliminary Reproduction Toxicity Screening Testに従って、p-tert-ブチルトルエンを雄ラットに1日1回、50～52日間および雌ラットに1日1回、41～45日間経口投与した簡易生殖毒性試験を行い、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。

方法

1. 被験物質および媒体

被験物質のp-tert-ブチルトルエン (CAS No.98-51-1) は、Fig.1に示す化学構造を有し、分子量：148.25，融点：-41.4 °C，沸点：193 °Cであり、水に不溶，アセトンそしてDMSOと混和する特異臭を有する無色透明な液体である。当試験には、厚生省 生活衛生局企画課 生活化学安全対策室から提供されたものを用いた[製造元：

， Lot No. 1，純度：96.44 % (GLC面積%)，不純物として，m-TBT(3.39 %)，ターシャリブチルベンゼン(0.07 %：GLC面積%)を含む]。入手後は，試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温・遮光条件下で保管した。なお，投与期間終了後に当試験施設での保管分を除いた残余被験物質は扶桑化学工業株式会社に返却し，その一部について分析した結果，純度に問題はなかったことから使用期間中の安定性が確認された。

媒体として，コーンオイルを用いた。コーンオイル[片山化学工業株式会社，Lot No. A5932(入手日：1999年5月18日，使用期限：2004年5月17日)およびLot No. A7955(入手日：1999年7月22日，使用期限：2004年7月21日)]は，入手後，試験施設の被験物質保管室に室温条件下で保管した。

2. 投与検体および濃度確認

p-tert-ブチルトルエンは，各濃度ごとにコーンオイルで希釈溶解して調製した。なお，0.2，2，20および200 mg/mLの調製液は，室温・遮光条件下で7日間保存しても安定性に問題のないことが確認されていたため¹⁾(Attachment 1および2)，各濃度の調製液は調製後，1日分ごとに小分けし，室温・遮光条件下で保管し，調製後7日以内に使用した。投与後の残余投与検体は廃棄した。また，調製に際して，被験物質の純度による換算を実施した。

投与開始日および雄投与終了日に使用した各投与検体中の被験物質濃度を試験施設内で高速液体クロマトグラフを用いて測定した。その結果，被験物質濃度は表示濃度の93.1～99.1 %であり，濃度に問題はなかった(Attachment 3および4)。

3. 使用動物および飼育条件

1) 動物種および系統

試験には、毒性試験に汎用されているSprague-Dawley系雌雄ラット [(SPF), Crj: CD (SD)IGS] を用いた。動物は、1999年6月30日に日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター)から8週齢で雌雄各73匹を購入した。入手後1日の体重範囲は、雄が265~297 g、雌が189~226 gであった。

2) 検疫および馴化、群分け法ならびに個体識別法

入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後7日間の馴化期間を設けた。この間に、3回の体重測定および毎日一般状態の観察を、さらに雌は馴化期間中に7日間の性周期観察を行った。一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物を群分けして試験に用いた。

群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与開始日に行った。群分け後の残余動物のうち、検疫・馴化動物番号の若い順に雄2例を選び、飼育期間終了時に微生物モニタリング検査に用いた。その他の残余動物は、投与開始日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に廃棄処分した。

動物の個体識別は、検疫・馴化期間中は入手日に油性インクによる記入法および色素塗布法を、群分け後は色素塗布法および耳パンチ法を併用して行った。さらに、検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号、入手年月日、性別および検疫・馴化動物番号を記入したラベルを、群分け後の各ケージには試験番号、投与量、性別、動物番号および交尾成立日(雌のみ)を記入し、群ごとに色分けしたラベルを取り付けた。

3) 環境条件および飼育管理

動物は、室温20~26 °C(実測値: 21~25 °C)、湿度40~70 % [空調機の停止により動物飼育室の湿度の逸脱が1999年7月13日(最高74 %)にみられたが、その他の飼育期間中の湿度(実測値: 湿度50~67 %)は設定範囲内であった。なお、その湿度の逸脱幅はわずかであること、空調機の停止は短時間(約2時間)であることから、試験成績への影響はないと判断した]、明暗各12時間(照明: 午前6時~午後6時)、換気回数12回/時(フィルターにより除菌した新鮮空気)に維持されている飼育室(E棟10号室、ただし、検疫はE棟2号室)で飼育した。

検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージ(W: 240×D: 380×H: 200 mm)を用いて1ケージ当たり5匹までの雌雄別群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージ(W: 755×D: 210×H: 170 mm)を用いて個別飼育した。ただし、交配はステンレス製懸垂式ケージ内で行った。母動物は、妊娠18日以降オートクレーブ処理した床敷(サンフレーク、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ケージ(W: 310×D: 360×H: 175 mm)で個別飼育し、自然分娩および哺育させた。ケージの受け皿、給水瓶およびプラスチック製ケージの交換は1週間に2回以上、ステンレス製懸垂式ケージ、ステンレス製五連ケージおよび給餌器の交換は2週間に1回以上行った。なお、動物飼育室の清掃(床の掃き掃除)および0.02 %次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った。飼育

期間終了時に採血したモニタリング動物の血清検査において、感染を示唆するような異常はみられなかった。

床敷の微量金属および汚染物質の分析結果は、ほぼ6カ月ごとに財団法人日本食品分析センターで実施した成績を日本チャールス・リバー株式会社から入手した。その分析結果は、試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

4) 飼料および飲料水

飼料は、入手後3カ月以内の固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌器に入れ、自由に摂取させた。使用した飼料の分析結果は、財団法人日本食品分析センターおよびオリエンタル酵母工業株式会社から入手した。

飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。飲料水の水質検査結果は、ほぼ6カ月ごとに財団法人岐阜県公衆衛生検査センターで実施した成績を入手した。

飼料および飲料水の検査結果は、いずれも試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

4. 投与経路、投与方法、群構成、投与量および投与期間

1) 投与経路および投与方法

p-tert-ブチルトルエンは、継続して経口的に人に摂取される可能性が考えられるため、投与経路として経口投与を選択した。

投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスプレイ注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、雄では投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を基準とし、5 mL/kgで算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14および21日の体重を、授乳期間中は哺育0日の体重を基準とし、5 mL/kgで算出した。投与時刻は午前8時40分～11時58分の間で、投与回数は1日1回とした。

投与開始日の週齢は雌雄とも10週齢であり、体重範囲は雄が336～368 g、雌が221～252 gであった。

2) 群構成および投与量

群構成は、下記のように被験物質投与群として4群を設定し、その他に対照群を設けた。1群の動物数は、雌雄それぞれ12匹とした。

群	試験群	投与量	(濃度)	雄(動物番号)	雌(動物番号)
第1群	対照(コソイル)	0 mg/kg	(0 mg/mL)	12(001～012)	12(051～062)
第2群	p-tert-ブチルトルエン	1.5 mg/kg	(0.3 mg/mL)	12(101～112)	12(151～162)
第3群	p-tert-ブチルトルエン	5 mg/kg	(1 mg/mL)	12(201～212)	12(251～262)
第4群	p-tert-ブチルトルエン	15 mg/kg	(3 mg/mL)	12(301～312)	12(351～362)
第5群	p-tert-ブチルトルエン	50 mg/kg	(10 mg/mL)	12(401～412)	12(451～462)

当試験の投与量設定に際して、ラットにおける経口投与による一般毒性に関する資料が得られなかったため、最初にp-tert-ブチルトルエンのラットにおける単回経口投与毒性試

験(予備試験)²⁾(投与段階：0, 250, 500, 1000および2000 mg/kg, 使用動物数：各群雌雄各5例)を実施した。その結果を参考にして、p-tert-ブチルトルエンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験の予備試験¹⁾(投与段階：0, 125, 250, 500および750 mg/kg, 使用動物数：各群雄5例, 投与期間：14日間)を実施し、その結果に基づき決定した。すなわち、p-tert-ブチルトルエンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験の予備試験において、死亡例が125 mg/kg群で3例、250, 500および750 mg/kg群で各5例認められた。また、125 mg/kg群では、体重および摂餌量の低値、精巣および精巣上体の萎縮がみられた。そこで、当試験では、予備試験において死亡例の認められた125 mg/kgのほぼ半量に相当する50 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3により15, 5および1.5 mg/kgとした。また、対照として媒体(コーンオイル)のみを同容量投与する群を設けた。

3) 投与期間

投与期間は、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Preliminary Reproduction Toxicity Screening Testに従って、雄では交配前14日間とその後36～38日間(精子検査に3日間必要なため、雄の剖検を3日間に分けて実施)の合計50～52日間とし、雌では交配前14日間、交配期間中(最長14日間)、妊娠期間中および哺育3日までの合計41～45日間とした。なお、投与開始日を投与1日とした。

5. 観察および検査項目

1) 雄(P)

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回(ただし、剖検日は剖検前1回)観察した。

死亡例は、発見後速やかに剖検し、精巣および精巣上体の重量を測定し、ブアン液で約2～3時間固定後、90 %アルコールにて再固定した。前立腺、精囊および剖検で異常の認められた器官・組織[50 mg/kgの1例(No.412)の胃および胸腺]は、20 %中性緩衝ホルマリンで固定した。

(2) 体重測定

体重は、1週間に2回測定した(測定日：投与1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46, 49日および剖検日)。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間および交配期間終了後に1週間に2回測定した(残量測定日：投与3, 6, 10, 13, 31, 34, 38, 41, 45および48日)。

(4) 剖検

最終投与の翌日(投与51～53日)に各群の各4例(動物番号の若い順)をエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、精巣、精巣上体および精巣上体の尾部重量を測定した。なお、各器官重量(精巣上体の尾部を除く)を最終体重で除して相対重量も算出した。精巣および精巣上体の頭部は、ブアン液で2～3時間固定後、90 %アルコールに再固定した。前立腺および精囊は、20 %中性緩衝ホルマリンで固定した。

(5) 精子検査

右精巣上体の尾部は、37℃に加温した精子培養液(0.5%牛血清アルブミン加Medium 199)中で分割し、約5分間静置後、精子原液を作製した。この精子原液を用いて精子の活動性、精子の生存性および精子の形態の各検査を実施した。なお、各検査終了後、精子原液は廃棄した。

精子の活動性は、精子原液を精子培養液で希釈し、約30分間培養(炭酸ガス培養器:BNA-121D, タバイエスベック株式会社, 培養条件:37℃, 5%炭酸ガス, 95%空気)後に精子希釈液をサンプルチャンバー(MICROSLIDES, #HTR1099, VitroCom, Inc.)に入れ、HTM-IVOS(Hamilton Thorne Research)を用いて、活動精子率[Motility ratio]を算出するとともに、活動精子について基準点移動速度[Path velocity($\mu\text{m/s}$)], 最短距離移動速度[Straight line velocity($\mu\text{m/s}$)], 総移動速度[Curvilinear velocity($\mu\text{m/s}$)]および頭部の横切り回数[Beat cross frequency(Hz)]を算出した。ただし、一部(6例)の動物で希釈後の精子の状態が不良であったため、再調製した精子希釈液または精子原液を用いて検査した。その場合には、精子原液が炭酸ガス培養器で約30分間培養されているため、再調製した精子希釈液は調製後速やかに検査に用いた。

精子の生存性として、加藤らの方法³⁾に従い、マイクロウェルプレート内で精子原液を精子培養液にて約2~3倍希釈した後、Calcein acetoxymethyl esterとEthidium homodimer-1とで約2時間培養・染色(炭酸ガス培養器:BNA-121D, タバイエスベック株式会社, 培養条件:37℃, 5%炭酸ガス, 95%空気)した後、蛍光顕微鏡下で300個の精子を生存精子、途中死亡精子と死滅精子に分類し、生存精子率(Viability)と生き残り精子率(Survivability)を求めた。なお、生存、途中死亡および死滅精子の判定は、頭部~尾部にかけて緑色の蛍光発色が認められるものを生存精子、頭部には赤色の蛍光発色が、尾部には緑色の蛍光発色が認められるものを途中死亡精子、頭部には赤色の蛍光発色が認められるが、尾部には蛍光発色が認められないものを死滅精子とした。

精子の形態は、精子原液をスライドガラスに塗抹し、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、1%エオジン染色液で染色し、顕微鏡下で300個の精子について観察した。奇形精子率は、精子300個当たりの奇形精子の割合を求めることにより算出した。

精子数は、左精巣上体尾部を凍結(-80℃)保存後、0.1%Triton X-100中でホモジナイズ(IKA, ULTRA-TURRAX T25basic)して作製した精子懸濁液をサンプルチャンバー(CELL-VU, Fertility Technologies, Inc.)に入れ、HTM-IVOS(Hamilton Thorne Research)を用いて算出した。なお、左精巣上体尾部1g当たりの精子数も算出した。

(6) 病理組織学検査

精巣、精巣上体の頭部、精嚢、前立腺および死亡例の剖検で異常の認められた器官・組織[50 mg/kgの1例(No.412)の胃および胸腺]は、常法に従ってパラフィン包埋標本作製した。なお、切り出し後の器官・組織は、10%中性緩衝ホルマリンで保存した。

対照群および50 mg/kg群の精巣、精巣上体の頭部、精嚢、前立腺および死亡例の剖検で異常の認められた器官・組織[50 mg/kgの1例(No.412)の胃および胸腺]についてHE染色組織標本作製し、病理組織学検査を実施した。50 mg/kg群の検査で対照群と比べて異常を示

す動物数に差があると考えられた精巣および精巣上体の頭部については、1.5, 5および15 mg/kg群についてもHE染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。なお、精巣については、PAS-ヘマトキシリン染色組織標本も作製したが、これらの標本について鏡検の必要を認めなかったため、検査に用いなかった。

2) 雌(P)

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回(ただし、剖検日は剖検前1回)観察した。

死亡例は、発見後速やかに剖検し、着床数および妊娠黄体数を数え、卵巣、胎児および胎盤の重量を測定した。卵巣、子宮、膣、胎児、胎盤および剖検で異常の認められた器官・組織[15 mg/kg群の1例(No.353)の胃、50 mg/kg群の1例(No.457)の肝臓および50 mg/kg群の1例(No.460)の胸腺]を20 %中性緩衝ホルマリンで固定した。

(2) 性周期

性周期は、投与開始日から交尾確認日あるいは交配期間終了日まで毎日1回観察した。なお、発情期が連続2日間にわたって観察された場合は1回として発情回数を計数した。

(3) 体重測定

体重は、交配開始前14日間および交配期間中は1週間に2回(測定日: 投与1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25および29日)、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14および21日に、哺育期間中は哺育0および4日にそれぞれ測定した。

(4) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間までは1週間に2回(残量測定日: 投与3, 6, 10および13日)、妊娠期間中は妊娠2, 9, 16および21日に、哺育期間中は哺育4日に測定した。

(5) 交尾不成立雌

交尾不成立雌は、交配期間終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床の有無を確認した。着床のみられない雌は、子宮を2 %KOH溶液により透明化させて着床痕の有無を調べ、卵巣の重量を測定し、卵巣、子宮および膣を20 %中性緩衝ホルマリンで固定し、保存した。なお、卵巣重量を最終体重で除して相対重量も算出した。

(6) 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ、分娩状態の異常の有無、分娩終了の確認を妊娠21日から妊娠25日の午前10時まで毎日行った。午前10時に分娩が終了していた場合、その日を哺育0日とした。

(7) 妊娠25日の午前10時までに分娩しなかった雌

妊娠25日の午前10時までに分娩しなかった雌は、エーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床の有無により妊娠の成否を確認した。着床のみられない雌は、子宮を2 %KOH溶液により透明化させて着床痕の有無を調べた。不妊雌は、卵巣の重量を測定し、卵巣、子宮および膣を20 %中性緩衝ホルマリンで固定した。なお、卵巣重量を最終体重で除して相対重量も算出した。

(8) 哺育状態の観察および剖検

母動物は、哺育状態を哺育4日まで毎日観察し、新生児が全例死亡した日あるいは哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床数および妊娠黄体数を数えた。卵巣は重量を測定し、卵巣、子宮および腔を20 %中性緩衝ホルマリンで固定した。なお、卵巣重量を最終体重で除して相対重量も算出した。

(9) 病理組織学検査

卵巣および死亡例の剖検で異常の認められた器官・組織[15 mg/kgの1例(No.353)の胃、50 mg/kgの1例(No.457)の肝臓および50 mg/kgの1例(No.460)の胸腺]は、常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。なお、切り出し後の器官・組織は、10 %中性緩衝ホルマリンで保存した。

対照群および50 mg/kg群の卵巣、死亡例の剖検で異常の認められた器官・組織[15 mg/kgの1例(No.353)の胃、50 mg/kgの1例(No.457)の肝臓および50 mg/kgの1例(No.460)の胸腺]についてHE染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。

3) 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

14日間投与した雌雄を同一群内で1対1に組み合わせて同居交配した。交配期間は14日を限度として、交尾を確認するまでの連続同居交配とした。なお、交配相手雌が死亡したため交配の組み合わせができなかった50 mg/kg群の雄1例は、交配に用いなかった。

交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い、腔垢内に精子または腔栓を確認した雌を交尾成立動物として、その日を妊娠0日として起算した。

4) 新生児(F₁)

(1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。死産児は、20 %中性緩衝ホルマリンで固定し、保存した。

(2) 新生児の観察

新生児は、一般状態および死亡の有無を毎日1回観察した。死亡児は、死後変化が著しい場合を除いて剖検後20 %中性緩衝ホルマリンで固定し、保存した。

(3) 体重測定

体重は、哺育0日(出生日)および4日に測定した。

(4) 剖検

生存児は、哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。剖検で異常の認められた出生児は、20 %中性緩衝ホルマリンで固定し、保存した。

6. 統計学的方法

有意差検定は以下に示したように、対照群と各投与群の間で行い、危険率を5 %とし、5 %未満($p < 0.05$)と1 %未満($p < 0.01$)とに分けて表示した。新生児の体重は一腹の平均値と合計値も算出した。なお、不受胎雌の交尾後の一般状態、体重および摂餌量は集計から除外した。交配期間に死亡した50 mg/kg群の2例(No.453および460)は、交尾率の集計には含めなかった。

〈検定方法〉

体重(親動物, 新生児), 摂餌量, 器官の絶対重量および相対重量, 精子の活動性の各項目, 奇形精子率[(奇形精子数/観察精子数)×100], 生存精子率[(生存精子数+途中死亡精子数/観察精子数)×100], 生き残り精子率[(生存精子数/観察精子数)×100], 精子数, 左精巣上体尾部1 g当たりの精子数[精子数/左精巣上体尾部重量(g)], 発情回数, 交尾所要日数, 妊娠期間[分娩日(哺育0日)-交尾確認日], 妊娠黄体数, 着床数, 着床率[(着床数/妊娠黄体数)×100], 総出産児数(新生児数+死産児数), 死産児数, 新生児数, 分娩率[(総出産児数/着床数)×100], 児の産出率[(哺育0日の新生児数/着床数)×100], 出生率[(哺育0日の新生児数/総出産児数)×100], 哺育4日の生存児数, 哺育4日の生存率[(哺育4日の生存児数/哺育0日の新生児数)×100], 性比(雄/雌), 外表異常の出現率[(外表異常児数/新生児数)×100] および哺育4日の生存児の剖検での異常の出現率[(剖検での異常児数/哺育4日の生存児数)×100] は, 各群で平均値および標準偏差を算出した. その後, Bartlett法による等分散性の検定を行い, 等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い, 有意ならばDunnett法により行った. 一方, 等分散と認められなかった場合は, 順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い, 有意ならば順位を利用したDunnett型の検定法により行った.

交尾率[(交尾成立動物数/同居動物数)×100], 受胎率[(受胎雌数/交尾成立動物数)×100] および出産率[(新生児出産雌数/受胎雌数)×100] は, χ^2 検定により行った.

なお, 病理組織学検査において, 50 mg/kg群で毒性学的影響が示唆され他の用量群についても検査を実施した精巣および精巣上体の所見については, 対照群との群間比較を上記の順位を利用したDunnett型の検定法を用いて行った. そこで対照群との間に有意差が認められた場合は, Cochran・Armitageの傾向検定を用いて用量反応性の検定を行った.

結果

I. 反復投与毒性

1. 雄(P)に及ぼす影響

1) 一般状態(Table 1-1~1-4, Appendix 1-1~1-5)

死亡は, 50 mg/kg群で1例(No.412:投与51日)認められた. 死亡例では, 投与2日以降の投与後に一過性の流涎, 投与49日以降に自発運動の低下, 被毛の汚れおよび赤色尿, 投与50日以降に体温低下がみられた.

生存例の一般状態観察において, 対照群では異常はみられなかった. 1.5 mg/kg群では, 投与8日以降の投与後に一過性の流涎が6例みられた. 5および15 mg/kg群では, 投与5日以降の投与後に一過性の流涎が各10例みられた. 50 mg/kg群では, 投与2日以降の投与後に一過性の流涎が11例, 投与2日に被毛の汚れが1例みられた.

2) 体重 (Table 2, Fig.2, Appendix 2-1~2-5)

1.5および5 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。15 mg/kg群では、対照群と比べて投与18~49日に体重の有意な低値がみられた。50 mg/kg群では、対照群と比べて投与4~49日に体重の有意な低値がみられた。

3) 摂餌量 (Table 3, Fig.3, Appendix 3-1~3-5)

1.5, 5および15 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。50 mg/kg群では、対照群と比べて投与48日に摂餌量の有意な低値がみられた。なお、同群では、対照群と比べて投与13日に摂餌量の有意な高値がみられたが、一過性の変化であり、投与によるものではないと考えられる。

4) 剖検 (Table 4, Appendix 4-1~4-5)

生存例においては、対照群、1.5および5 mg/kg群ではいずれにも異常はみられなかった。15 mg/kg群では、両側精巣の萎縮および両側精巣上体の萎縮が1例 (No.305) みられた。50 mg/kg群では、両側精巣の萎縮および両側精巣上体の萎縮がいずれも11例全例みられた。

50 mg/kg群の死亡例 (No.412) においては、胸腺の萎縮、前胃粘膜の潰瘍、両側精巣の萎縮、両側精巣上体の萎縮、精囊の萎縮および前立腺の萎縮がみられた。

5) 器官重量 (Table 5, Appendix 5-1~5-5)

剖検日の体重において、1.5および5 mg/kg群では対照群と比べて有意差はみられなかった。15および50 mg/kg群では、対照群と比べて剖検日の体重の有意な低値がみられた。

器官重量において、1.5および5 mg/kg群では対照群と比べて精巣および精巣上体の絶対ならびに相対重量に有意差はみられなかった。15 mg/kg群では、対照群と比べて精巣上体の絶対重量の有意な低値、精巣の絶対重量の低値傾向がみられた。50 mg/kg群では、対照群と比べて精巣および精巣上体の絶対ならびに相対重量の有意な低値がみられた。

6) 精子検査 (Table 6, Appendix 6-1~6-5)

1.5および5 mg/kg群では、対照群と比べて活動精子率、基準点移動速度、最短距離移動速度、総移動速度、頭部の横切り回数、奇形精子 (頭部、尾部およびそれらの合計) 率、生存精子率、生き残り精子率、精子数、左精巣上体尾部1 g当たりの精子数に有意差はみられなかった。

15 mg/kg群では、対照群と比べて活動精子率、基準点移動速度、最短距離移動速度、総移動速度、生存精子率、生き残り精子率、精子数および左精巣上体尾部1 g当たりの精子数の有意な低値がみられた。また、同群では、頭部の横切り回数、奇形精子 (頭部、尾部およびそれらの合計) 率の有意な高値がみられた。

50 mg/kg群では、対照群と比べて活動精子率、精子数および左精巣上体尾部1 g当たりの精子数の有意な低値がみられた。また、活動精子が少なく、基準点移動速度、最短距離移動速度、総移動速度および頭部の横切り回数、生存精子率、生き残り精子率の測定が可能であった動物は1例のみであったが、いずれの項目も低値であった。50 mg/kg群では、精子の形態観察が可能な動物は5例のみであったが、奇形精子 (頭部、尾部およびそれらの合計) 率の有意な高値がみられた。

7) 病理組織学検査

(1) 生存例(Table 7-1, Appendix 7-1~7-5)

精巣(Photo 1): 対照群, 1.5および5 mg/kg群では, 異常はみられなかった. 15 mg/kg群では, 精細管の萎縮が4例, ライディヒ細胞の過形成が2例, グループ3~4の精細管にステップ19精子細胞の残留が1例みられ, それらの程度は精細管の萎縮がごく軽度~軽度, ライディヒ細胞の過形成およびグループ3~4の精細管での精子細胞の残留がごく軽度であった. 50 mg/kg群では, 精細管の萎縮およびライディヒ細胞の過形成が各11例みられ, それらの程度は精細管の萎縮がごく軽度~軽度, ライディヒ細胞の過形成がごく軽度であった.

精巣上体(頭部)(Photo 2): 対照群, 1.5および5 mg/kg群では, 異常はみられなかった. 15 mg/kg群では, 精子の減少が4例みられ, その程度は中等度~高度であった. 50 mg/kg群では, 精子の減少が11例みられ, その程度は高度であった.

なお, 精巣における精細管の萎縮および精巣上体における精子の減少は15および50 mg/kg群で, 精巣におけるライディヒ細胞の過形成は50 mg/kg群でいずれも対照群と比べて有意差が認められ, 用量相関性も確認された. しかし, 15 mg/kg群で観察されたグループ3~4の精細管での精子細胞の残留は1例のみであること, 50 mg/kg群で認められないことから, 偶発例と考えられる.

その他の変化として以下に示した所見が得られた.

前立腺: リンパ様細胞浸潤が対照群で6例, 50 mg/kg群で1例みられたが, それらの程度はごく軽度~軽度であり, 偶発的变化と判断される.

精囊: 対照群および50 mg/kg群とも, 異常はみられなかった.

(2) 死亡例(Table 7-2, Appendix 7-6)

50 mg/kg群の1例(No.412)において, 精巣で精細管の萎縮およびライディヒ細胞の過形成がごく軽度, 精巣上体で精子の減少が中等度と精巣上体管上皮の空胞化がごく軽度, 胸腺で萎縮が高度にみられた. なお, 精囊および前立腺ならびに剖検で異常の認められた胃の変化を検出できなかった.

2. 雌(P)に及ぼす影響

1) 一般状態(Table 8-1~8-2, 9-1~9-2および10, Appendix 8-1~8-5, 9-1~9-5および10-1~10-5)

死亡は, 15 mg/kg群で1例(No.353:妊娠23日), 50 mg/kg群で6例(No.451:投与2日, No.452:交尾後25日, No.453:投与21日, No.457:交尾後15日, No.460:投与29日およびNo.461:交尾後23日)認められた. 死亡例では, 15 mg/kg群で体温低下, 自発運動の低下および投与後に一過性の流涎がみられた. 50mg/kg群では, 体温低下が5例, 腹臥が2例, 自発運動の低下が5例, 立毛が2例, 被毛の汚れが1例, 投与後に一過性の流涎が5例, 呼吸緩徐が1例みられた.

生存例の一般状態観察において, 対照群, 1.5および5 mg/kg群では異常はみられなかった. 15 mg/kg群では, 投与6日以降の投与後に一過性の流涎が8例みられた. 50 mg/kg群では, 投与2日以降の投与後に一過性の流涎が6例みられ, 交尾後に体温低下が2例, 自発運動

の低下が3例，よろめき歩行が1例，流涙が1例，下痢が1例，筋弛緩が1例認められた．

2) 体重(Table 11~13, Fig.4および5, Appendix 11-1~11-5, 12-1~12-5および13-1~13-5)

交配開始前において，1.5，5および15 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった．50 mg/kg群では，対照群と比べて投与4~15日に体重の有意な低値がみられた．

妊娠期間中において，1.5 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった．5 mg/kg群では，対照群と比べて妊娠7および14日に体重の有意な低値がみられた．15 mg/kg群では，対照群と比べて妊娠7~21日に体重の有意な低値がみられた．

哺育期間中において，1.5 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった．5 mg/kg群では，対照群と比べて哺育4日に体重の有意な低値がみられた．15 mg/kg群の1例(No.357)では，哺育4日に体重の低値傾向がみられた．

3) 摂餌量(Table 14~16, Fig.6および7, Appendix 14-1~14-5, 15-1~15-5および16-1~16-5)

交配開始前において，1.5および5 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった．15および50 mg/kg群では，対照群と比べて投与6日に摂餌量の有意な高値がみられたが，一過性の変化であり，毒性学的影響とは考えられない．

妊娠期間中において，1.5，5および15 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった．

哺育期間中において，1.5 mg/kg群では対照群と比べて摂餌量に有意差はみられなかった．5 mg/kg群では，対照群と比べて哺育4日に摂餌量の有意な低値がみられた．15 mg/kg群の1例(No.357)では，哺育4日に摂餌量の低値傾向がみられた．

4) 剖検(Table 17, Appendix 17-1~17-5)

生存例においては，いずれの群とも異常はみられなかった．

死亡例においては，15 mg/kg群で腺胃粘膜暗赤色斑が1例(No.353)みられた．その動物では子宮内に胎児が2例と胎盤が2個認められた．50 mg/kg群では，4例(No.451:投与2日死亡，No.452:交尾後25日死亡，No.453:投与21日死亡，No.461:交尾後23日死亡)に異常はみられなかった．1例(No.457:交尾後15日死亡)では，肝臓の白色化がみられた．また，1例(No.460:投与29日)では，胸腺の萎縮がみられた．なお，交尾後に死亡した3例(No.452，457および461)はいずれも不妊であった．

5) 器官重量(Table 18, Appensix 18-1~18-5)

剖検日の体重において，1.5 mg/kg群では対照群と比べて有意差はみられなかった．5，15および50 mg/kg群では，対照群と比べて剖検日の体重の有意な低値がみられた．

器官重量において，1.5，5，15および50 mg/kg群とも対照群と比べて卵巣の絶対ならびに相対重量に有意差はみられなかった．

6) 病理組織学検査

(1) 生存例(Table 19-1, Appendix 19-1~19-2)

卵巣：対照群および50 mg/kg群とも，異常はみられなかった．

(2) 死亡例(Table 19-2, Appendix 19-3~19-4)

卵巣：50 mg/kg群の6例(No.451, 452, 453, 457, 460および461)において、異常はみられなかった。

肝臓：剖検で異常の認められた50 mg/kg群の1例(No.457)において、門脈周囲性の肝細胞の空胞化が中等度にみられた。

胸腺：剖検で異常の認められた50 mg/kg群の1例(No.460)において、萎縮が軽度に見られた。

胃：剖検で異常の認められた15 mg/kg群の1例(No.353)において、変化を検出できなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

1) 発情回数(Table 20, Appendix 20-1~20-5)

交配前の投与期間(14日間)の発情回数は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

2) 交尾所要日数、交尾率、受胎雌数および受胎率(Table 20, Appendix 20-1~20-5)

交尾所要日数は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

対照群、1.5, 5および15 mg/kg群では、全例で交尾が確認された。50 mg/kg群では、1組が交尾しなかった。交尾率は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

不受胎雌は、対照群、1.5および5 mg/kg群では認められなかった。不受胎雌は、15 mg/kg群で8例認められ、50 mg/kg群では受胎雌は1例も得られなかった。受胎率は、15および50 mg/kg群で対照群と比べて有意な低値がみられた。

3) 妊娠期間および分娩状態(Table 21, Appendix 21-1~21-5)

妊娠期間は、1.5, 5および15 mg/kg群では対照群と比べて有意差はみられなかった。

分娩状態は、対照群、1.5および5 mg/kg群ではいずれの母動物にも異常はみられなかった。15 mg/kg群の1例(No.359)では、出産児が全例死亡したため、新生児は得られなかった。

4) 妊娠黄体数、着床数および着床率(Table 21, Appendix 21-1~21-5)

1.5, 5および15 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠黄体数、着床数および着床率に有意差はみられなかった。

5) 出産率および哺育状態(Table 21, Appendix 21-1~21-5)

対照群、1.5および5 mg/kg群では出産率は100 %であった。15 mg/kg群では、1母動物(No.359)で新生児が得られなかったため出産率は66.7 %であった。

哺育状態において、対照群、1.5および5 mg/kg群では異常はみられなかった。15 mg/kg群では、1例(No.358)で哺育1日までに全新生児が死亡した。

2. 新生児(F₁)に及ぼす影響

1) 総出産児数, 死産児数, 哺育0日の新生児数, 哺育0日の性比, 分娩率, 児の産出率および出生率(Table 21, Appendix 21-1~21-5)

1.5および5 mg/kg群では, 対照群と比べて総出産児数, 死産児数, 哺育0日の新生児数, 哺育0日の性比, 分娩率, 児の産出率および出生率に有意差はみられなかった. 15 mg/kg群では, 対照群と比べて総出産児数および哺育0日の新生児数の有意な低値, 分娩率, 児の産出率および出生率の低値傾向, 死産児数の高値傾向がみられた.

2) 新生児の一般状態, 哺育4日の生存児数, 哺育4日の性比, 哺育4日の生存率および外表異常(Table 21, Appendix 21-1~21-5)

1.5および5 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育4日の生存児数, 哺育4日の性比および哺育4日の生存率に有意差はみられなかった. 15 mg/kg群では, 哺育1日までに全新生児が死亡した母動物が1例(No.358)みられ, 哺育4日の生存児数および哺育4日の生存率の低値傾向が認められた.

新生児の外表観察では, いずれの群とも異常はみられなかった.

新生児の一般状態では, 対照群, 5および15 mg/kg群では異常はみられなかった. 1.5 mg/kg群では, 尾の壊死が1例みられたが, 偶発例と考えられる.

3) 新生児の体重(Table 22, Fig.8, Appendix 22-1~22-5)

1.5 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育0および4日の雌雄別平均, 腹平均および腹合計の体重に有意差はみられなかった. 5 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育0および4日の雌雄別平均, 腹平均および腹合計の体重の有意な低値がみられた. 15 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育0および4日の雌雄別平均, 腹平均および腹合計の体重の低値傾向がみられた.

4) 生存児の剖検(Table 23, Appendix 23-1~23-5)

対照群, 5および15 mg/kg群では, 異常はみられなかった. 1.5 mg/kg群では, 一般状態観察時に認められた尾の壊死が雄1例みられたが, 対照群と比べて有意差は認められず, また投与量に依存したものではなかった.

5) 死亡児の剖検

いずれの群とも, 異常はみられなかった.

考察

p-tert-ブチルトルエンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験を行い, 雌雄動物の性腺機能, 交尾行動, 受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した. 投与量は, 50 mg/kgを最高用量とし, 以下公比約3により15, 5および1.5 mg/kgとした. 対照として媒体(コーンオイル)投与群を設けた.

雄に関しては, 死亡は50 mg/kg群で1例認められた. 一般状態では, 1.5, 5および15 mg/kg群で流涎, 50 mg/kg群で体温低下, 自発運動の低下, 被毛の汚れ, 流涎および赤色尿がみられた. なお, 各投与群で認められた流涎は, 投与後に一過性に認められたのみである

こと、一般状態観察において痙攣などの神経症状は認められないことから、被験物質の刺激性に基づく変化と判断され、毒性症状とはみなさなかった。体重において、15および50 mg/kg群で低値がみられた。また、摂餌量においては、50 mg/kg群で一過性の低値がみられた。剖検において、15および50 mg/kg群で精巣および精巣上体の萎縮がみられた。器官重量においても、15 mg/kg群で精巣および精巣上体の絶対重量の低値あるいは低値傾向、50 mg/kg群で精巣および精巣上体の絶対ならびに相対重量の低値がみられた。精子検査では、15および50 mg/kg群で活動精子率、基準点移動速度、最短距離移動速度、総移動速度、生存精子率、生き残り精子率、精子数および左精巣上体尾部1 g当たりの精子数の低値、奇形精子率の高値がみられた。また、15 mg/kg群では、頭部の横切り回数の高値もみられた。病理組織学検査において、15 mg/kg群で精巣に精細管の萎縮が4例とライディヒ細胞の過形成が2例、精巣上体に精子減少が4例、50 mg/kg群で精巣に精細管の萎縮とライディヒ細胞の過形成が各11例、精巣上体に精子減少が11例みられ、用量相関性も確認された。以上のように、p-tert-ブチルトルエンの一般毒性学的影響としては、雄では精巣および精巣上体への影響が顕著であった。

雌に関しては、死亡は15 mg/kg群で1例と50 mg/kg群で6例認められた。一般状態では、15 mg/kg群で体温低下、自発運動の低下および流涎、50 mg/kg群で体温低下、腹臥、自発運動の低下、よろめき歩行、流涎、立毛、被毛の汚れ、流涎、呼吸緩徐、下痢および筋弛緩がみられた。なお、15および50 mg/kg群で認められた流涎は、雄と同様に毒性症状とはみなさなかった。体重において、5および15 mg/kg群で妊娠期および哺育期に低値あるいは低値傾向、50 mg/kg群で交配前に低値がみられた。摂餌量では、5 mg/kg群で哺育期に低値、15 mg/kg群で哺育期に低値傾向がみられた。死亡例の剖検において、15 mg/kg群では腺胃粘膜暗赤色斑、50 mg/kg群では胸腺の萎縮および肝臓の白色化がみられたが、生存例では投与に起因する変化はみられなかった。また、生存例の卵巣の重量および病理組織学検査においても、投与に起因する変化はみられなかった。

したがって、当試験条件下におけるp-tert-ブチルトルエンの一般毒性学的無影響量は、雄が5 mg/kg/day、雌が1.5 mg/kg/dayと考えられる。

親動物の生殖発生に対しては、前述したように15および50 mg/kg群で精子検査成績に影響がみられ、精巣および精巣上体に病理組織学変化も認められた。発情回数、交尾率、交尾所要日数、妊娠期間、分娩状態および哺育状態では投与に起因する変化はみられなかった。15 mg/kg群では受胎雌数が少なく、また、50 mg/kg群では受胎雌は1例も得られず、15および50 mg/kg群とも受胎率の低値が認められた。1.5、5および15 mg/kg群では、妊娠黄体数、着床数、着床率および出産率に影響はみられなかった。したがって、当試験条件下におけるp-tert-ブチルトルエンの生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄とも5 mg/kg/dayと考えられる。

児動物に対しては、1.5および5 mg/kg群では総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、哺育0日の性比、分娩率、児の産出率、出生率、一般状態、哺育4日の生存児数、哺育4日の性比、哺育4日の生存率には投与による影響はみられなかった。15 mg/kg群では、総出産児数、哺育0および4日の新生児数、分娩率、児の産出率、出生率ならびに哺育4日の生存率の

低値あるいは低値傾向、死産児数の高値傾向がみられた。50 mg/kg群では、受胎雌がいな
いため、哺育0日の新生児は1例も得られなかった。新生児の外表観察において、投与に関
連した変化はみられなかった。児動物の体重では、1.5 mg/kg群では対照群との間に差はみ
られなかった。5 mg/kg群では、哺育0および4日の雌雄別平均体重、腹平均体重、腹合計体
重の低値がみられた。15 mg/kg群では、哺育0および4日の雌雄別平均体重、腹平均体重、
腹合計体重の低値傾向がみられた。児動物の剖検では、投与に起因する変化はみられなか
った。

したがって、当試験条件下におけるp-tert-ブチルトルエンの生殖発生毒性学的な無影響
量は、児動物では1.5 mg/kg/dayと考えられる。

以上のように、p-tert-ブチルトルエンの一般毒性学的無影響量は、雄では15 mg/kg投与
により精子検査成績、精巣および精巣上体の病理組織学検査成績に影響が認められたこと
から5 mg/kg/day、雌では5 mg/kg投与により妊娠期および哺育期に体重の低値、哺育期に
摂餌量の低値が認められたことから1.5 mg/kg/dayと考えられる。生殖発生毒性学的な無影
響量は、雄では15 mg/kg投与により精子検査成績、精巣および精巣上体の病理組織学検査
成績に影響が認められたことから5 mg/kg/day、雌では15 mg/kg投与により受胎率の低値が
認められたことから5 mg/kg/day、児動物では5mg/kg投与により哺育0および4日に新生児体
重の低値が認められたことから1.5 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 渡邊ゆかりほか：p-tert-ブチルトルエンの調製液の安定性確認試験(試験番号：
100918P)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)
- 2) 古橋忠和ほか：p-tert-ブチルトルエンのラットを用いる単回経口投与毒性試験(予備試
験)(試験番号：100918P1)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)
- 3) 古橋忠和ほか：p-tert-ブチルトルエンのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性
試験の予備試験(試験番号：100918P2)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研
究所)
- 4) Kato,M., et al.(1995): Congenital Anomalies 35:394

Table 1-1 General signs of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general signs	Days of administration																													
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af
Control	0	Number of males	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	12	
		Normal	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	12	
toluene, p-tert-butyl-	1.5	Number of males	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	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	9	12	8	12	12	12	11	12	12	12	10	12	8		
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	4	0	0	0	1	0	0	0	2	0	4	
	5	Number of males	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	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	12	9	12	9	12	10	12	9	12	8	12	9	12	11	12	11	12	8	12	9
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	0	3	0	2	0	3	0	4	0	3	0	1	0	1	0	4	0	3	
	15	Number of males	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	12	
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	10	12	7	12	9	12	11	12	6	12	10	12	11	12	9	12	11	12	7	12	6
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	5	0	3	0	1	0	6	0	2	0	1	0	3	0	1	0	5	0	6	
	50	Number of males	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	12	
		Normal	12	12	11	9	12	11	12	12	12	8	12	3	12	6	12	6	12	6	12	2	12	8	12	5	12	6	12	3	12	5
		Soiled fur	0	0	1	1	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	
		Salivation	0	0	0	3	0	1	0	0	0	4	0	9	0	6	0	6	0	6	0	10	0	4	0	7	0	6	0	9	0	7

Be: before administration, Af: after administration.

Table 1-2 General signs of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general signs	Days of administration																														
			16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	
Control	0	Number of males Normal	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	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	12	12	12	
toluene, p-tert-butyl-	1.5	Number of males Normal Salivation	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	12		
			12	11	12	11	12	12	12	12	12	10	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
			0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	Number of males Normal Salivation	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	12	12	
			12	10	12	11	12	12	12	11	12	10	12	11	12	12	12	11	12	11	12	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			0	2	0	1	0	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	15	Number of males Normal Salivation	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	12	12	
			12	8	12	11	12	11	12	11	12	8	12	10	12	12	12	10	12	9	12	10	12	11	12	11	12	8	12	8	12	9	
			0	4	0	1	0	1	0	1	0	4	0	2	0	0	0	2	0	3	0	2	0	1	0	1	0	4	0	4	0	3	
	50	Number of males Normal Salivation	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	12	12	
			12	6	12	5	12	7	12	7	12	4	12	7	12	6	12	7	12	2	12	4	12	5	12	6	12	7	12	5	12	8	
			0	6	0	7	0	5	0	5	0	8	0	5	0	6	0	5	0	10	0	8	0	7	0	6	0	5	0	7	0	4	

Be: before administration, Af: after administration.

Table 1-3 General signs of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general signs	Days of administration																			
			31		32		33		34		35		36		37		38		39		40	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af
toluene, p-tert-butyl-	0	Number of males Normal	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	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	1.5	Number of males Normal	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	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	5	Number of males Normal	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	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	8	12	9	12	9	12	8	12	9	12	9	12	10	12	11	12	11	12	11
	50	Salivation	0	4	0	3	0	3	0	4	0	3	0	3	0	2	0	1	0	1	0	1
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Be: before administration, Af: after administration.

Table 1-4 General signs of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of males and general signs	Days of administration														
			46		47		48		49		50		51		52		53
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4
toluene, p-tert-buty-	1.5	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4
	5	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4
	15	Number of males Normal Salivation	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4
			12	12	12	11	12	11	12	9	12	9	12	6	8	4	4
			0	0	0	1	0	1	0	3	0	3	0	2	0	0	0
	50	Number of males Normal Hypothermia Decrease in locomotor activity Soiled fur Salivation Reddish urine Death	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	7	3	3
			12	8	12	8	12	8	11	7	11	6	11	5	7	2	3
			0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
			0	4	0	4	0	4	0	4	0	5	0	2	0	1	0
			0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Be: before administration, Af: after administration.

Table 2 Body weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl-
by oral administration

Group (mg/kg)	Control		toluene,p-tert-butyl-					
	0		1.5		5		15	
Number of males	12		12		12		12	
Days of admin- istration								
1	351.9 ±	8.6	351.7 ±	7.2	351.3 ±	8.2	352.0 ±	8.4
4	358.4 ±	13.4	357.7 ±	11.6	359.0 ±	12.6	346.8 ±	14.1
8	370.4 ±	15.8	369.5 ±	13.4	368.7 ±	16.4	358.6 ±	20.6
11	380.5 ±	14.4	380.6 ±	11.8	377.8 ±	17.4	370.8 ±	24.6
15	396.2 ±	16.2	394.3 ±	15.3	392.8 ±	21.5	381.7 ±	29.7
18	407.9 ±	17.1	405.5 ±	15.6	401.8 ±	25.0	385.5 ±	30.3*
22	425.1 ±	16.1	420.4 ±	17.3	415.4 ±	27.8	396.8 ±	33.1*
25	439.3 ±	18.1	432.3 ±	18.1	428.3 ±	28.0	408.2 ±	37.0*
29	455.3 ±	19.2	447.8 ±	19.0	440.7 ±	30.2	417.9 ±	37.4**
32	465.7 ±	19.3	453.6 ±	21.8	451.2 ±	31.1	424.1 ±	39.7**
36	477.6 ±	21.8	464.8 ±	22.9	462.3 ±	32.2	430.0 ±	44.0**
39	488.9 ±	22.2	478.7 ±	24.1	474.9 ±	32.2	437.8 ±	44.2**
43	497.5 ±	21.3	488.8 ±	25.3	484.7 ±	32.3	446.7 ±	45.0**
46	505.2 ±	21.9	496.0 ±	25.2	494.5 ±	33.4	451.2 ±	44.4**
49	513.3 ±	23.3	504.9 ±	26.2	504.6 ±	33.1	458.8 ±	46.6**

Each value shows mean (g) ± S.D.

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

Table 3 Food consumption of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl-
by oral administration

Group (mg/kg)	Control		toluene,p-tert-butyl-									
	0		1.5		5		15		50			
Number of males	12		12		12		12		12		12	
Days of admin- istration												
3	19.9 ±	3.9	20.0 ±	2.3	20.2 ±	1.5	19.6 ±	2.5	17.3 ±	5.1		
6	21.3 ±	2.5	20.8 ±	2.4	20.8 ±	2.3	22.3 ±	2.8	21.8 ±	3.3		
10	22.4 ±	1.8	22.2 ±	1.9	22.1 ±	1.7	24.5 ±	3.4	24.4 ±	1.8		
13	21.8 ±	1.5	21.1 ±	1.9	22.0 ±	3.1	22.7 ±	4.1	24.3 ±	2.8*		
31	22.3 ±	1.7	20.8 ±	2.4	21.6 ±	2.7	20.0 ±	3.5	21.0 ±	4.9		
34	22.3 ±	2.1	21.4 ±	2.9	21.7 ±	2.2	20.9 ±	3.3	21.7 ±	5.6		
38	22.5 ±	2.5	20.8 ±	2.2	21.8 ±	1.2	21.0 ±	3.3	21.4 ±	5.2		
41	20.7 ±	1.6	20.7 ±	1.7	21.3 ±	1.5	20.3 ±	2.8	21.3 ±	4.3		
45	19.2 ±	1.9	19.3 ±	1.5	19.7 ±	1.4	19.8 ±	3.6	20.8 ±	2.7		
48	21.0 ±	1.5	20.3 ±	1.8	21.4 ±	1.8	20.5 ±	3.3	17.5 ±	3.6**		

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

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

Table 4 Necropsy findings of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	toluene,p-tert-butyl-			
	0	1.5	5	15	50
Number of males	12	12	12	12	11
Normal	12	12	12	11	0
Testis					
Atrophy	0	0	0	1	11
Epididymis					
Atrophy	0	0	0	1	11
Number of dead males	0	0	0	0	1
Normal	-	-	-	-	0
Thymus					
Atrophy	-	-	-	-	1
Forestomach (mucosa)					
Ulcer	-	-	-	-	1
Testis					
Atrophy	-	-	-	-	1
Epididymis					
Atrophy	-	-	-	-	1
Seminal vesicle					
Atrophy	-	-	-	-	1
Prostate					
Atrophy	-	-	-	-	1

Table 5 Organ weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl-
by oral administration

Group (mg/kg)	Control		toluene,p-tert-butyl-									
	0		1.5		5		15		50			
Number of males	12		12		12		12		11			
Body weight (g)	521.0 ± 22.8		514.0 ± 25.9		511.5 ± 32.3		463.6 ± 47.4**		431.0 ± 31.6**			
Testes (g)	3.358 ± 0.267		3.474 ± 0.305		3.532 ± 0.233		3.090 ± 0.755		1.537 ± 0.172**			
	(g%) 0.645 ± 0.049		0.678 ± 0.071		0.693 ± 0.057		0.670 ± 0.172		0.358 ± 0.047**			
Epididymides (g)	1.248 ± 0.116		1.288 ± 0.088		1.237 ± 0.089		1.097 ± 0.135**		0.822 ± 0.077**			
	(g%) 0.239 ± 0.022		0.251 ± 0.018		0.243 ± 0.021		0.238 ± 0.030		0.191 ± 0.026**			

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Table 6 Observation of sperm in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		toluene,p-tert-butyl-									
	0		1.5		5		15		50			
Number of males	12		12		12		12		11			
Sperm motion parameters												
After 30 min. incubation												
Motility ratio(%)	89.83 ± 2.79		89.75 ± 3.58		88.25 ± 3.53		7.25 ± 21.33 **		0.36 ± 1.21 **			
Path velocity (μm/s)	158.27 ± 8.68		155.88 ± 9.76		159.28 ± 5.15		91.94 ± 41.05 ** (5)		56.70 (1)			
Straight line velocity (μm/s)	113.10 ± 6.93		109.36 ± 7.07		112.10 ± 3.77		49.08 ± 32.60 ** (5)		36.50 (1)			
Curvilinear velocity (μm/s)	361.57 ± 20.08		361.77 ± 28.60		364.10 ± 17.76		202.62 ± 93.31 * (5)		98.90 (1)			
Beat cross frequency (Hz)	31.92 ± 0.89		31.99 ± 0.69		32.09 ± 0.83		47.78 ± 13.15 ** (5)		21.60 (1)			
Morphology of sperm												
Total Abnormal ratio (%) ^{a)}	5.74 ± 5.16		4.14 ± 2.91		3.80 ± 2.09		89.09 ± 22.95 **		98.74 ± 1.02 ** (5)			
Head Abnormal ratio (%) ^{a)}	5.38 ± 5.25		3.83 ± 2.47		3.38 ± 1.96		78.64 ± 24.65 **		94.92 ± 2.38 ** (5)			
Tail Abnormal ratio (%) ^{a)}	0.36 ± 0.61		0.30 ± 0.49		0.42 ± 0.49		10.86 ± 7.89 **		4.12 ± 2.08 ** (5)			
Viability (%) ^{b)}	98.28 ± 2.02		98.77 ± 1.51		98.22 ± 1.21		27.05 ± 27.42 **		5.30 (1)			
Survivability (%) ^{c)}	83.99 ± 3.61		85.26 ± 4.02		81.08 ± 5.37		6.23 ± 16.08 **		0.00 (1)			
Number of sperms in left cauda epididymis (×10 ⁶)	298.56 ± 56.27		312.05 ± 85.45		284.58 ± 40.75		119.49 ± 59.40 **		33.29 ± 17.28 **			
Number of sperms / g (left cauda epididymis) (×10 ⁶)	1013.30 ± 136.04		1021.49 ± 216.10		948.74 ± 120.61		497.68 ± 227.07 **		196.07 ± 85.89 **			

Each value shows mean ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of males.

a): (Number of abnormal sperms / 300 sperms)×100.

b): ((Number of live sperms + number of dead sperms during the 2 hrs. incubation) / 300 sperms)×100.

c): (Number of live sperms after the 2 hrs. incubation / 300 sperms)×100.

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

Table 7-1 Histopathological findings of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl-
by oral administration

Group (mg/kg)	Control					toluene,p-tert-butyl-																										
	0					1.5					5					15					50											
Incidence & Grade	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+		
Findings																																
Testis	[12]						[12]						[12]						[12]						[11]							
Atrophy, seminiferous tubule	12	0					12	0					12	0					8	4	3	1	0	0	**	0	11	9	2	0	0	**##
Retention, spermatid, group																																
3-4, seminiferous tubule	12	0					12	0					12	0					11	1	1	0	0	0		11	0					
Hyperplasia, Leydig's cell	12	0					12	0					12	0					10	2	2	0	0	0		0	11	11	0	0	0	**##
Epididymis	[12]						[12]						[12]						[12]							[11]						
Decrease, sperm	12	0					12	0					12	0					8	4	0	0	2	2	**	0	11	0	0	0	11	**##
Prostate	[12]						[0]						[0]						[0]							[11]						
Cellular infiltration,																																
lymphoid cell	6	6	5	1	0	0																			10	1	0	1	0	0		
Seminal vesicle	[12]						[0]						[0]						[0]							[11]						
	12	0																							11	0						

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

N : No abnormality detected.

A : Abnormality detected.

[] : Number of males examined.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Significantly different by dose response test (##: P<0.01).

Table 7-2 Histopathological findings of dead male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)	toluene,p-tert-butyl-					
	50					
Incidence & Grade	N	A	±	+	2+	3+
Findings						
Testis	[1]					
Atrophy, seminiferous tubule	0	1	1	0	0	0
Hyperplasia, Leydig's cell	0	1	1	0	0	0
Epididymis	[1]					
Decerased, sperm	0	1	0	0	1	0
Vacuolization, tubular epithelium	0	1	1	0	0	0
Seminal vesicle	[1]					
	1	0				
Prostate	[1]					
	1	0				
Stomach	[1]					
	1	0				
Thymus	[1]					
Atrophy	0	1	0	0	0	1

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

N : No abnormality detected.

A : Abnormality detected.

[] : Number of males examined.

Table 8-1 General signs of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of females and general signs	Days of administration																											
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af
Control	0	Number of females	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
		Normal	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
toluene, p-tert-butyl-	1.5	Number of females	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
		Normal	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	
	5	Number of females	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
		Normal	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
	15	Number of females	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
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12	11	12	11	12	11	12	10	12	9	12	12	12	11	
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	2	0	3	0	0	0	1	
	50	Number of females	12	12	12	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
		Normal	12	12	11	10	11	10	11	11	11	9	11	5	11	7	11	7	11	4	11	5	11	4	11	2	11	5	11	7
		Salivation	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0	6	0	4	0	4	0	7	0	6	0	7	0	9	0	6	0	4
		Death	0	0	1	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

Be: before administration, Af: after administration.

Table 8-2 General signs of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of females and general signs	Days of administration																													
			15*		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26		27		28		29	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	
Control	0	Number of females Normal	12	12	10	10	6	6	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			12	12	10	10	6	6	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
toluene, p-tert-butyl-	1.5	Number of females Normal	12	12	9	9	3	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			12	12	9	9	3	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	Number of females Normal	12	12	11	11	7	7	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			12	12	11	11	7	7	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	Number of females Normal Salivation	12	12	10	10	6	6	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			12	9	10	6	6	5	2	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			0	3	0	4	0	1	0	1	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	Number of females Normal	11	11	8	8	6	6	5	5	4	4	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
			11	6	7	1	6	5	5	3	3	3	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
		Prone position	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
		Piloerection	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
		Soiled fur	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Salivation	0	5	0	7	0	1	0	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Be: before administration, Af: after administration.

*: commencement of pairing.

Table 9-1 General signs of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl-
by oral administration

Group (mg/kg)		Number of dams and general signs	Days of pregnancy																											
			0		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af
Control	0	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
		Normal	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
toluene, p-tert-butyl-	1.5	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
		Normal	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
	5	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
		Normal	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
	15	Number of dams	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Normal	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	7	6
		Salivation	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	Number of dams	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

Be: before administration, Af: after administration.

Table 9-2 General signs of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl-
by oral administration

Group (mg/kg)		Number of dams and general signs	Days of pregnancy																							
			14		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	
Control	0	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	2	0	0	0	0	0
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	2	-	-	-	-	-
toluene, p-tert-butyl-	1.5	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	0	0	0	0	0	0	0	0
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	0	0	0	0	0	0	0
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	-	-	-	-	-	-	-
	15	Number of dams Normal	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	2	2	1	0	0	0	0	0
			4	4	4	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	2	1	0	-	-	-	-	-
		Hypothermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-	-	-	-	-
		Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-	-	-	-	-
		Salivation	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
		Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-	-	-	-	-
50	Number of dams	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Be: before administration, Af: after administration.

Table 10 General signs of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)		Number of dams and general signs	Days of lactation									
			0		1		2		3		4	
			Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af	Be	Af
Control	0	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
toluene, p-tert-butyl-	1.5	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	5	Number of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15	Number of dams	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1
		Normal	3	2	2	1	1	1	1	0	1	1
		Salivation	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	50	Number of dams	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Be: before administration, Af: after administration.

Table 11 Body weight of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl-
by oral administration

Group (mg/kg)	Control		toluene,p-tert-butyl-							
	0		1.5		5		15		50	
Number of females	12		12		12		12		12	
Days of admin- istration										
1	235.8 ± 8.1		235.5 ± 9.1		235.6 ± 9.1		235.4 ± 8.0		235.7 ± 8.2	
4	238.8 ± 8.8		237.6 ± 6.3		235.5 ± 12.5		230.9 ± 10.9		224.5 ± 8.8**	(11)
8	243.3 ± 9.6		245.1 ± 6.1		239.9 ± 13.9		238.8 ± 11.0		226.3 ± 10.2**	(11)
11	246.8 ± 11.3		246.8 ± 8.9		244.4 ± 14.7		236.3 ± 16.4		232.5 ± 14.3*	(11)
15	251.1 ± 12.6		251.9 ± 8.5		248.1 ± 15.5		234.9 ± 19.0		228.6 ± 22.3*	(11)
18	258.3 ± 18.6	(3)	262.0	(1)	256.3 ± 16.5	(3)	255.0	(2)	222.6 ± 41.4	(5)
22									231.0	(2)
25									229.5	(2)
29									289.0	(1)

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of females.

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

Table 12 Body weight of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		toluene,p-tert-butyl-			
	0		1.5	5	15	50
Number of dams	12		12	12	4	0
Days of pregnancy						
0	259.5 ± 12.6		258.0 ± 10.3	253.1 ± 16.1	244.5 ± 6.7	—
7	297.1 ± 16.9		293.2 ± 12.4	278.0 ± 20.4**	275.8 ± 3.0**	—
14	328.8 ± 17.3		327.5 ± 15.0	305.2 ± 23.6**	300.3 ± 3.2**	—
21	413.8 ± 19.0		406.9 ± 18.5 (10)	393.6 ± 31.9 (11)	361.3 ± 28.9** (3)	—

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Table 13 Body weight of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		toluene,p-tert-butyl-			
	0	1.5	5	15	50	
Number of dams	12	12	12	3	0	
Days of lactation						
0	301.7 ± 22.1	304.1 ± 19.0	285.7 ± 25.0	289.7 ± 27.0	—	
4	323.0 ± 15.1	316.9 ± 16.4	280.5 ± 25.1**	298.0 (1)	—	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Table 14 Food consumption of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl-
by oral administration

Group (mg/kg)		Control		toluene,p-tert-butyl-									
		0		1.5		5		15		50			
Number of females		12		12		12		12		11			
Days of admin- istration		3	13.1 ± 2.0	13.8 ± 1.6	12.8 ± 2.2	14.3 ± 3.1	11.9 ± 2.4	6	13.3 ± 1.9	14.6 ± 2.0	14.8 ± 1.9	16.5 ± 1.5**	16.0 ± 1.8**
		10	15.5 ± 1.9	14.6 ± 2.0	15.7 ± 2.2	15.6 ± 3.0	14.5 ± 2.6	13	15.4 ± 3.4	15.2 ± 1.5	15.8 ± 2.8	15.4 ± 3.4	15.2 ± 3.6

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Table 15 Food consumption of dams (P) during pregnancy period in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl-
by oral administration

Group (mg/kg)	Control		toluene,p-tert-butyl-							
	0		1.5		5		15		50	
Number of dams	12		12		12		4		0	
Days of pregnancy										
2	19.4 ±	2.3	19.3 ±	1.8	18.8 ±	2.3	20.5 ±	2.9	—	
9	21.1 ±	2.6	20.8 ±	2.2	19.4 ±	2.3	20.8 ±	2.5	—	
16	20.2 ±	2.3	20.8 ±	1.8	20.8 ±	1.4	19.5 ±	2.4	—	
21	16.8 ±	3.0	16.3 ±	1.6 (10)	17.6 ±	3.2 (11)	19.0 ±	2.6 (3)	—	

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Table 16 Food consumption of dams (P) during lactation period in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl-
by oral administration

Group (mg/kg)	Control		toluene,p-tert-butyl-			
	0	1.5	5	15	50	
Number of dams	12	12	12	1	0	
Days of lactation 4	27.9 ± 3.7	27.8 ± 4.7	21.0 ± 4.3**	20.0	—	

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Table 17 Necropsy findings of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	toluene,p-tert-butyl-			
	0	1.5	5	15	50
Number of females	12	12	12	11	6
Normal	12	12	12	11	6
Number of dead females	0	0	0	1	6
Normal	-	-	-	0	4
Thymus					
Atrophy	-	-	-	0	1
Liver					
White	-	-	-	0	1
Glandular stomach (mucosa)					
Dark red spots	-	-	-	1	0

Table 18 Organ weight of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl-
by oral administration

Group (mg/kg)	Control		toluene,p-tert-butyl-							
	0		1.5		5		15		50	
Number of females	12		12		12		11		6	
Body weight (g)	323.0 ±	15.1	316.9 ±	16.4	280.5 ±	25.1**	265.2 ±	21.1**	230.3 ±	41.6**
Ovaries (mg)	97.04 ±	23.39	92.34 ±	24.39	83.87 ±	15.18	81.48 ±	15.76	80.32 ±	14.29
(mg%)	29.93 ±	6.47	29.08 ±	7.26	29.95 ±	5.13	30.73 ±	5.67	35.98 ±	9.55

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (**: P<0.01).

Table 19-1 Histopathological findings of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control		toluene,p-tert-butyl-	
	0		50	
Incidence & Grade	N	A	N	A
Findings				
Ovary	[12] 12	0	[6] 6	0

N : No abnormality detected.

A : Abnormality detected.

[] : Number of females examined.

Table 19-2 Histopathological findings of dead female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)	toluene,p-tert-butyl-											
	15						50					
Incidence & Grade	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+
Findings												
Ovary	[0]						[6]					
							6	0				
Liver	[0]						[1]					
Vacuolar degeneration, hepatocyte, periportal							0	1	0	0	1	0
Stomach	[1]						[0]					
	1	0										
Thymus	[0]						[1]					
Atrophy							0	1	0	1	0	0

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

N : No abnormality detected.

A : Abnormality detected.

[] : Number of females examined.

Table 20 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	toluene,p-tert-butyl-			
	0	1.5	5	15	50
Number of females	12	12	12	12	11
Number of estrous cases before mating (14 days) Mean±S.D.	3.6 ± 0.5	3.7 ± 0.5	3.6 ± 0.5	3.6 ± 0.5	3.1 ± 0.7
Number of pairs	12	12	12	12	9
Number of pairs with successful copulation	12	12	12	12	8
Copulation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0	88.9
Number of conceiving days Mean±S.D.	2.6 ± 1.1	2.1 ± 0.9	2.8 ± 1.0	2.7 ± 1.4	2.4 ± 1.5
Conceiving days 1-5	12	12	12	11	8
Conceiving days ≥6	0	0	0	1	0
Number of pregnant females	12	12	12	4	0
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	33.3 **	0.0 **
Number of dead pregnant females	0	0	0	1	-
Number of live pregnant females at delivery	12	12	12	3	0
Number of pregnant females with live pups	12	12	12	2	0

a): (Number of pairs with successful copulation / number of pairs)×100.

b): (Number of pregnant females / number of pairs with successful copulation)×100.

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

Table 21 Observation of pups (F1) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	toluene,p-tert-butyl-			
	0	1.5	5	15	50
Number of dams	12	12	12	3	0
Length of gestation (days)	22.17 ± 0.39	22.00 ± 0.00	21.92 ± 0.29	22.00 ± 1.00	—
Pregnancy days ≤ 21	0	0	1	1	—
Pregnancy days = 22	10	12	11	1	—
Pregnancy days ≥ 23	2	0	0	1	—
Corpora lutea	16.5 ± 1.9	15.8 ± 1.7	15.3 ± 1.6	14.0 ± 1.7	—
Implantation scars	15.4 ± 1.6	14.8 ± 2.4	14.6 ± 1.4	13.0 ± 1.7	—
Implantation index (%) ^{a)}	93.8 ± 6.7	93.3 ± 10.0	95.2 ± 5.1	92.7 ± 0.6	—
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	66.7	—
Pups born	14.5 ± 1.7	13.8 ± 2.5	14.3 ± 1.7	10.7 ± 2.1 *	—
Stillbirths	0.1 ± 0.3	0.4 ± 0.7	0.6 ± 0.8	4.7 ± 7.2	—
Live pups born	14.4 ± 1.6	13.4 ± 2.3	13.8 ± 1.5	6.0 ± 5.3 **	—
Sex ratio at birth ^{c)}	1.41 ± 1.03	1.38 ± 0.60	1.48 ± 0.69	3.63 (2)	—
(Total male/total female)	91 / 82	90 / 71	92 / 73	9 / 9	—
Delivery index (%) ^{d)}	94.1 ± 6.6	93.8 ± 7.2	98.1 ± 3.5	82.7 ± 16.2	—
Birth index (%) ^{e)}	93.6 ± 6.3	91.2 ± 8.1	94.3 ± 5.6	49.3 ± 46.0	—
Live birth index (%) ^{f)}	99.5 ± 1.7	97.3 ± 4.3	96.2 ± 5.1	63.0 ± 54.8	—
Live pups on day 4 of lactation	14.3 ± 1.6	13.1 ± 2.2	13.3 ± 1.6	4.5 (2)	—
Sex ratio on day 4 of lactation ^{c)}	1.41 ± 1.04	1.42 ± 0.61	1.51 ± 0.80	0.29 (1)	—
(Total male/total female)	90 / 81	89 / 68	88 / 71	2 / 7	—
Viability index (%) ^{g)}	98.8 ± 2.8	97.8 ± 4.3	96.4 ± 5.6	45.0 (2)	—
External anomalies (%) ^{h)}	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 (2)	—

Each value shows mean ± S.D. per dam.

Figures in parentheses indicate number of dams.

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

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

c): Number of male pups / number of female pups.

e): (Number of live pups born / number of implantation scars)×100.

g): (Number of live pups on day 4 / number of live pups born)×100.

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

d): (Number of pups born / number of implantation scars)×100.

f): (Number of live pups born / number of pups born)×100.

h): (Number of pups with external anomalies / number of live pups)×100.

Table 22 Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	toluene,p-tert-butyl-			
	0	1.5	5	15	50
Number of dams	12	12	12	2	0
Male weight					
Days of lactation					
0	6.57 ± 0.53	6.40 ± 0.40	5.84 ± 0.35 **	4.45	—
4	10.61 ± 1.26	11.06 ± 1.05	8.89 ± 0.86 **	9.20 (1)	—
Female weight					
Days of lactation					
0	6.04 ± 0.46	6.23 ± 0.31	5.58 ± 0.31 **	4.10	—
4	10.04 ± 1.12	10.79 ± 1.06	8.58 ± 0.86 **	9.00 (1)	—
Mean pups weight					
Days of lactation					
0	6.32 ± 0.48	6.34 ± 0.31	5.73 ± 0.34 **	4.30	—
4	10.34 ± 1.20	10.95 ± 1.02	8.73 ± 0.81 **	9.00 (1)	—
Litter weight					
Days of lactation					
0	90.53 ± 6.74	84.64 ± 12.88	78.48 ± 7.20 *	39.75	—
4	146.13 ± 12.97	141.65 ± 18.35	115.25 ± 15.49 **	81.40 (1)	—

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

Figures in parentheses indicate number of dams.

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

Table 23 Necropsy findings of pups (F1) on day 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

Group (mg/kg)	Control	toluene,p-tert-butyl-			
	0	1.5	5	15	50
Number of males	90	89	88	2	0
Normal	90	88	88	2	-
Tail Necrosis	0	1	0	0	-
Number of females	81	68	71	7	0
Normal	81	68	71	7	-

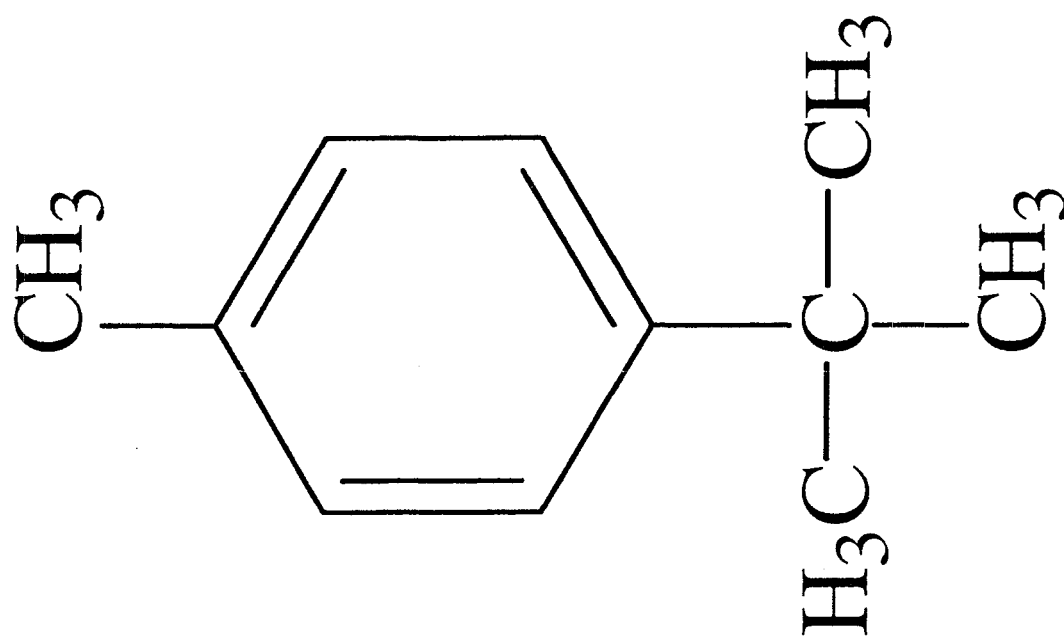


Fig. 1 Chemical structure of toluene,p-tert-butyl-

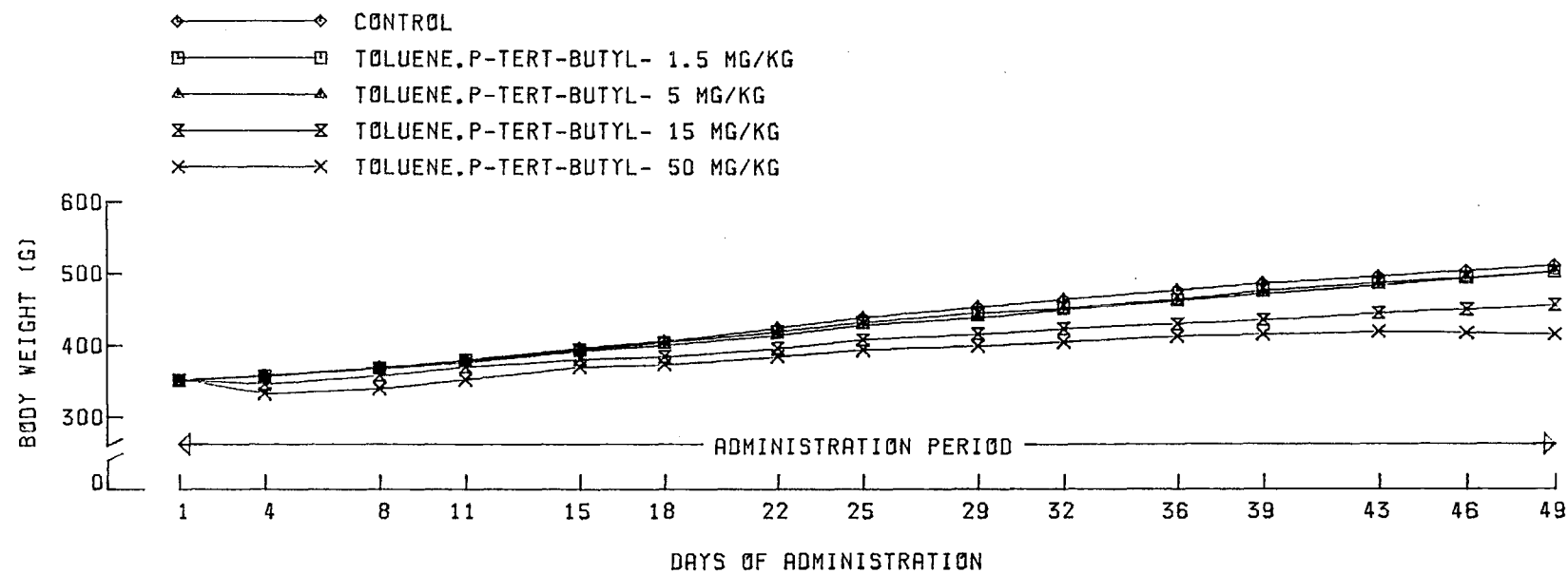


Fig. 2 Body weight of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene, p-tert-butyl- by oral administration

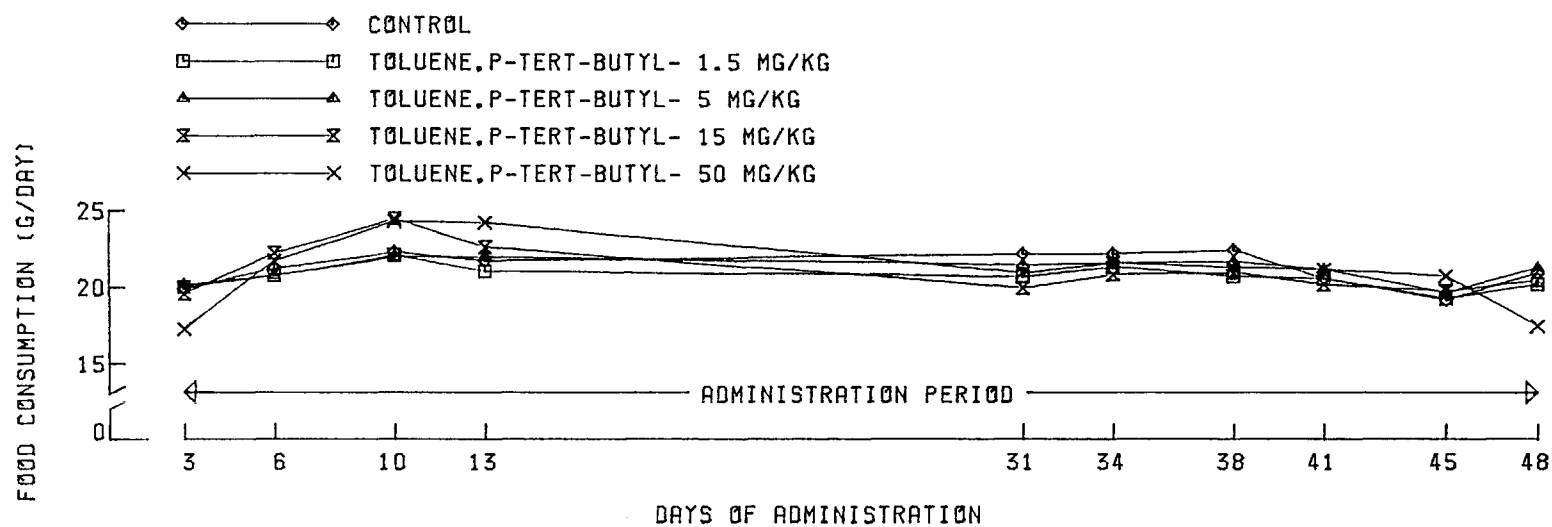


Fig. 3 Food consumption of male rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene, p-tert-butyl- by oral administration

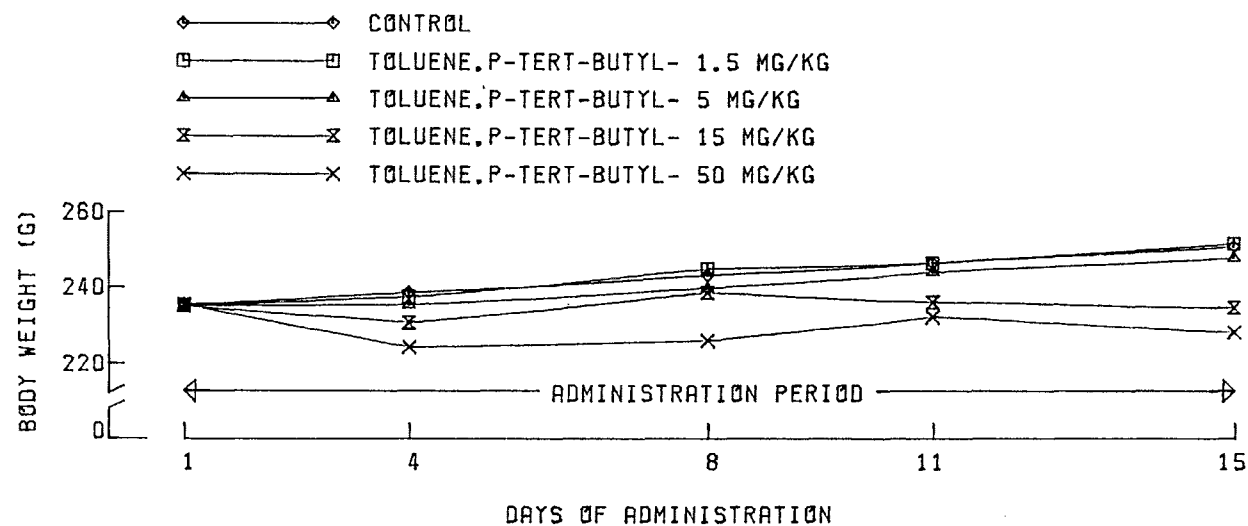


Fig. 4 Body weight of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene, p-tert-butyl- by oral administration

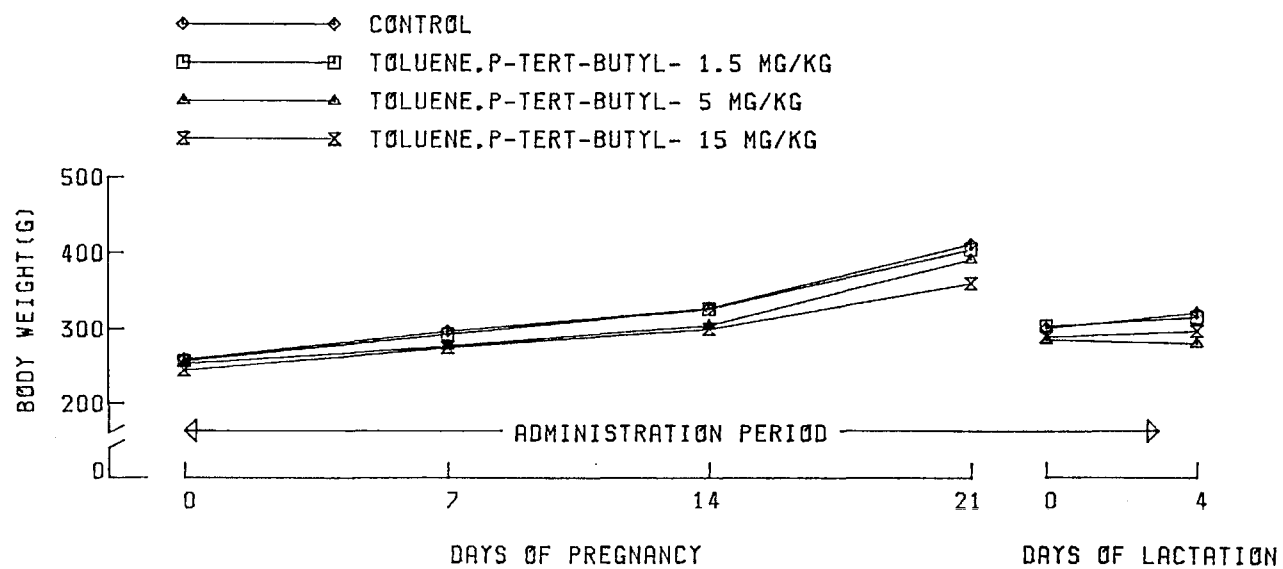


Fig. 5 Body weight of dams (P) during pregnancy and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

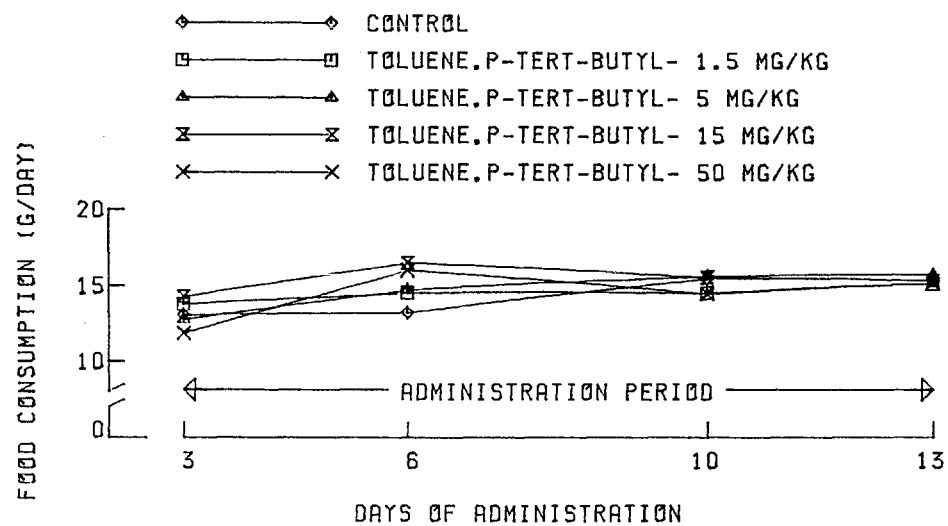


Fig. 6 Food consumption of female rats (P) in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

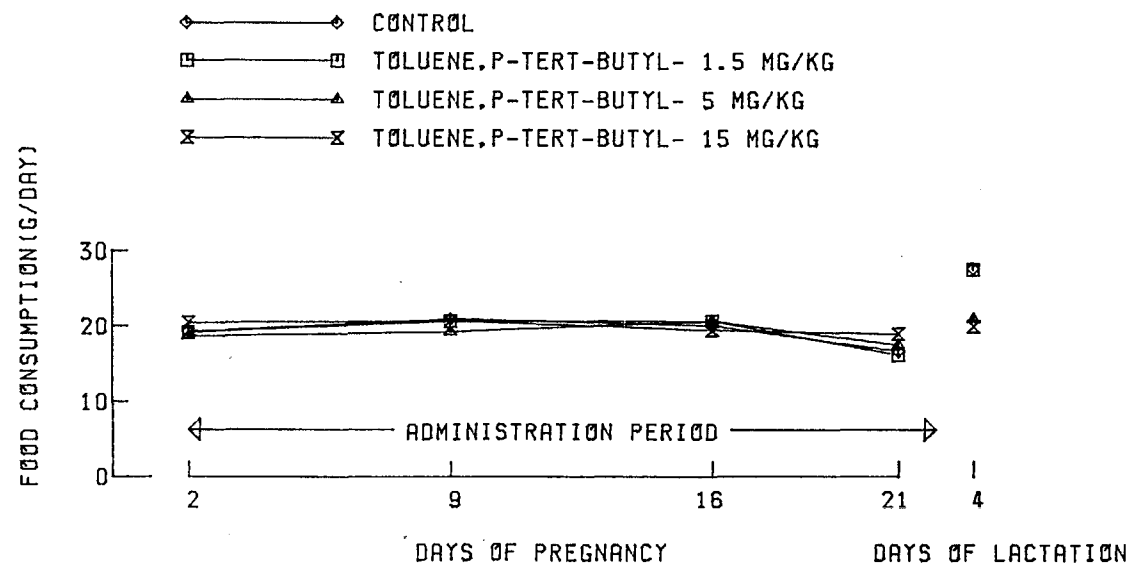


Fig. 7 Food consumption of dams (P) during pregnancy and lactation periods in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration

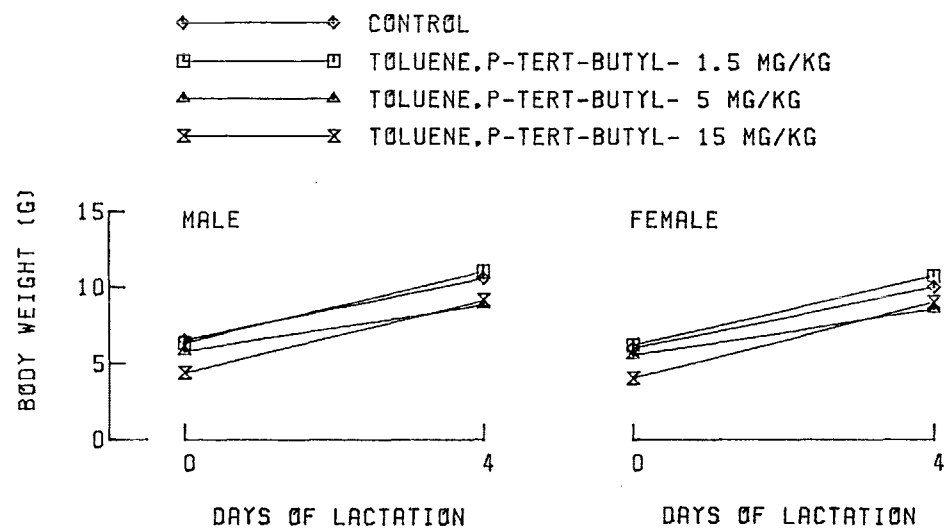


Fig. 8 Body weight of pups (F1) on days 0 and 4 of lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of toluene,p-tert-butyl- by oral administration