

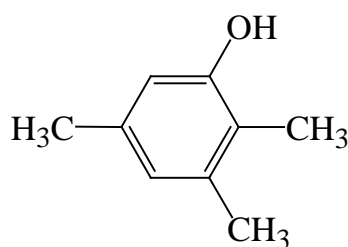
2, 3, 5-Trimethylphenol

2,3,5-トリメチルフェノール

[CAS No. 697-82-5]

Molecular formula: C₉H₁₂O

Molecular weight: 136.19



ABSTRACT

1. Material and method

Purity	: 99.8%
Test species/strain	: Rat/CrI:CD(SD)
Test method	: OECD Test Guideline 422
Route	: Oral (gavage)
Dosages	: 0, 100, 300, 1000 mg/kg
Dosages for recovery	: 0, 1000 mg/kg
Number of animals/group	: Males, 12 (5 for recovery) ; Females, 12 Satellite females, 5
Vehicle	: Olive oil
Administration period	: Males, 42 days Females, from 14 days before mating to day 4 of lactation Females (satellite), 42 days
Recovery period	: Males, 14 days Females (satellite), 14 days
Terminal killing	: Males, day 43 of treatment and 15 of recovery Females, day 5 of lactation Females (satellite), day 15 of recovery Offspring, day 4 after birth
GLP	: Yes

2. Results

Repeated dose toxicity

Two pregnant females in the 300 mg/kg- and 1000 mg/kg-dosed groups died during the administration period. Soiled perigenital region by urine was observed in both sexes given 300 mg/kg and above, and transient lethargy and ataxic gait were observed in the males given 1000 mg/kg and the females given 300 mg/kg and above. Body weight gain was retarded in the males given 300 mg/kg and above, and in the females given 1000 mg/kg.

Hematological examination revealed increases in reticulocytes in the males given 300 mg/kg and above. A decrease in RBC and an increase in reticulocytes were noted in the females given 1000 mg/kg. Plasma levels of total cholesterol and phospholipid were increased, together with an increase in ALT and a decrease in potassium in the males given 1000 mg/kg. Plasma levels of total protein and albumin were increased in the females given 300 mg/kg and above, and total cholesterol, phospholipid, ALT and ALP were increased in the females given 1000 mg/kg. Urinalysis revealed decreased protein and ketone body in the males given 300 mg/kg and above.

The measurement of organ weights showed that kidney and spleen weights were increased in the males given 300 mg/kg and above, while increased liver weight and decreased epididymides weight were noted in the males given 1000 mg/kg. Kidney weight was increased in the females given 300 mg/kg and above, and liver and spleen weights were increased in the females given 1000 mg/kg.

In the histopathological examination, compound-related lesions in testis, liver and spleen were found in the 1000 mg/kg-dose group. The testis lesions were characterized by the vacuolization in the seminiferous tubule and germ cell necrosis. The liver lesion of males was the centrilobular hypertrophy of hepatocytes. Deposition of hemosiderin and extramedullary hematopoiesis were increased in the spleen of both sexes. Extramedullary hematopoiesis was also observed in the liver of females.

Reproductive and developmental toxicity

Abnormal estrous cycle such as continued diestrous stage was noted in the 1000 mg/kg-dosed group, but no compound-related effect on copulation was observed. In this group, gestation length was prolonged, and the numbers of implantations and pups were decreased, but no effect of compound on delivery was observed.

Because one 300 mg/kg-dosed dam and one 1000 mg/kg-dosed dam neglected nursing care of pups, all of their litter pups died. But no compound-related effects including significant change in viability of pups and body weight of pups were observed. Additionally, no external abnormality of macroscopic findings at the time of necropsy was noted in any dosed group.

3. Evaluation

No observed effect level (NOEL)

For the repeated dose toxicity, several compound-related effects such as increase in reticulocytes and ataxic gait were noted in the males and females given 300 mg/kg and above, respectively. For the reproductive/developmental toxicity, several compound-related effects such as testes lesion and decrease in number of implantations were observed in the 1000 mg/kg-dosed group. This effect was based on the endpoint for the NOEL.

It was concluded that the NOEL for the repeated dose toxicity of 2,3,5-trimethylphenol was 100 mg/kg/day for males and females, and that the NOEL for the reproductive/developmental toxicity was 300 mg/kg/day.

No observed adverse effect level (NOAEL)

For the repeated dose toxicity, the endpoint for a NOAEL in males was an increase in reticulocytes in the 300 mg/kg and above groups, and the endpoint for a NOAEL in females was the ataxic gait in the 300 mg/kg and above groups. For the reproductive/developmental toxicity, the endpoint for a NOAEL was the testis lesions and the deceased number of implantations in the 1000 mg/kg-dosed group.

It was concluded that the NOAEL for the repeated dose toxicity of 2,3,5-trimethylphenol was 100 mg/kg/day for males and females, and that the NOAEL for the reproductive/developmental toxicity was 300 mg/kg/day.

2,3,5-トリメチルフェノールの
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

Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity
Screening Test of 2,3,5-Trimethylphenol
by Oral Administration in Rats

要約

2,3,5-トリメチルフェノールの反復投与毒性および生殖発生毒性を検討するために、OECD テストガイドライン 422 に基づき、試験を実施した。

本試験では、2,3,5-トリメチルフェノールを、0（媒体対照、オリブ油）、100、300 および 1000 mg/kg の用量で、CrI:CD(SD)ラットの雌雄（12 匹/群、10 週齢）に、雄では 42 日間、雌では哺育 4 日までの 42～46 日間、毎日、強制経口投与し、雌雄動物に対する反復投与の影響、ならびに親動物の生殖および哺育 4 日までの児動物の発生・発育に及ぼす影響を検討した。また、対照群と 1000 mg/kg 投与群については、雄では交配に供した 12 匹のうち 5 匹を、雌では交配に供した動物とは別にサテライト雌 5 匹を用意し、42 日間の反復投与終了後、2 週間の回復期間を設けた。結果は、以下のように要約される。

1. 反復投与毒性

300 mg/kg 群と 1000 mg/kg 群の妊娠雌各 1 例が死亡した。雌雄の 300 mg/kg 以上の群に外部生殖器周囲の尿による汚染が観察され、雄の 1000 mg/kg 群と雌の 300 mg/kg 以上の群には投与後に一過性の嗜眠と歩行失調が観察された。また、体重増加の抑制が雄の 300 mg/kg 以上の群と雌の 1000 mg/kg 群に認められた。

雄には 300 mg/kg 以上の群に網赤血球比の増加がみられ、雌には 1000 mg/kg 群に赤血球数の減少と網赤血球比の増加が認められた。血液生化学検査の結果、雄の 1000 mg/kg 群に総コレステロール・リン脂質濃度の増加、ALT 活性の上昇およびカリウムの減少が認められた。雌には 300 mg/kg 以上の群に総タンパク・アルブミン濃度の増加、1000 mg/kg 群に総コレステロール・リン脂質濃度の増加および ALT・ALP 活性の上昇が認められた。尿検査の結果、雄の 300 mg/kg 以上の群に蛋白とケトン体の減少が認められた。

器官重量測定の結果、雄では 300 mg/kg 以上の群に腎臓・脾臓重量の増加、1000 mg/kg 群に肝臓重量の増加と精巣上体重量の減少が認められた。雌では 300 mg/kg 以上の群に腎臓重量の増加、1000 mg/kg 群に肝臓・脾臓重量の増加が認められた。

病理組織学検査の結果、1000 mg/kg 群の雄には精巣の精細管内の空胞や生殖細胞の壊死、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大、脾臓のヘモジデリン沈着の増加や髄外造血が観察された。1000 mg/kg 群の雌には肝臓・脾臓に髄外造血がみられ、脾臓にはヘモジデリン沈着の増加が

認められた。

2. 生殖発生毒性

1000 mg/kg 群に異常性周期（発情休止期の持続）がみられたが、交尾への影響はなかった。また、1000 mg/kg 群には妊娠期間の延長や着床数と出産児数の減少がみられたが、分娩状態に異常はみられなかった。

哺育期間中の児動物の生存率や体重、また、児動物の外表や剖検所見に投与の影響は認められなかった。ただし、300 mg/kg 群と 1000 mg/kg 群の各 1 例の母動物には哺育不全がみられ、全児動物の死亡が認められた。

3. 無作用量（NOEL: No Observed Effect Level）

反復投与の影響として、300 mg/kg の用量から雄には網赤血球比の増加等、雌には歩行失調等の影響がみられた。また、生殖発生への影響としては 1000 mg/kg の用量で精巣障害や着床数減少等の影響がみられたため、これを NOEL 決定のエンドポイントとした。

よって、本試験における 2,3,5-トリメチルフェノールの NOEL は、反復投与毒性に関しては雌雄ともに 100 mg/kg/day であると結論される。また、生殖発生毒性に関しては、300 mg/kg/day であると結論される。


4. 無毒性量（NOAEL: No Observed Adverse Effect Level）

反復投与毒性に関しては、NOAEL 決定のエンドポイントとする毒性影響を、雄では 300 mg/kg の用量からみられた網赤血球比の増加とし、雌では 300 mg/kg の用量からみられた歩行失調と判断した。また、生殖発生毒性に関しては、NOAEL 決定のエンドポイントとする毒性影響を、1000 mg/kg の用量でみられた精巣障害と着床数減少と判断した。

よって、本試験における 2,3,5-トリメチルフェノールの NOAEL は、反復投与毒性に関しては、雌雄ともに 100 mg/kg/day であると結論される。また、生殖発生毒性に関しては、300 mg/kg/day であると結論される。

方法

1. 被験物質および投与検体の調製法

被験物質の 2,3,5-トリメチルフェノールは、 購入（ロット番号：6K4KE）したもので、純度 99.8% の白色粉末である。被験物質は、入手後、使用時まで室温で暗所に保管した。被験物質の同一性は、赤外

吸収スペクトルを赤外分光光度計（Shimadzu FTIR-8200PC）を用いて測定し、文献値と比較することにより確認した。また、被験物質の安定性は、使用開始前および使用終了後にクロマトグラムを高速液体クロマトグラフ（Agilent Technologies 1090）を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

媒体として選択したオリブ油（日本薬局方）は丸石製薬から購入（ロット番号：8X01）し、使用時まで室温で暗所に保管した。投与検体（溶解または懸濁液）は、被験物質をオリブ油と混和して、各用量の1回の投与用量が5 mL/kg 体重になるように調製した。投与検体は、日本バイオアッセイ研究センターで実施した8日間の安定性試験の結果に基づき、調製8日以内に使用した。投与検体中の被験物質の濃度および均一性は、初回調製時に高速液体クロマトグラフ（Agilent Technologies 1090）を用いて測定し、確認した。

2. 使用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）のCrI:CD(SD) ラット (SPF) の雌雄を8週齢で購入した。導入日を含む7日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、投与前の雌の性周期を観察するために、さらに、8日間の予備飼育を行った。これらの飼育期間中に、状態の変化や異常な性周期がみられなかった動物から、投与開始日の体重の中央値に近い雄48匹と雌58匹（投与開始時体重範囲、雄：370～430g、雌：217～260g）を選定し、試験に用いた。

群分けは、体重の重い動物から順に各群に1匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の合計体重を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることで、群間の体重の偏りを小さくする方法（適正層別方式）により実施した。

動物は、温度；23±2℃、湿度；55±15%、換気回数；15～17回/時、明暗サイクル；12時間点灯(8:00～20:00)/12時間消灯(20:00～8:00)に制御された飼育室でステンレス製網ケージに個別に収容して飼育した。ただし、妊娠18日以降の母動物は、床敷（ALPHA-dri™：Shepherd Specialty Papers）をいれたステンレス製分娩用ケージに収容した。固型飼料（CRF-1, 30KGγ-γ線照射滅菌：オリエンタル酵母工業）と飲料水（秦野市水道局供給の水道水をフィルターろ過した後、紫外線照射）は自由摂取としたが、解剖前日の夕方からは絶食させた。

3. 投与量の設定および投与方法

投与量は、用量設定試験の結果に基づいて設定した。用量設定試験の投与量は、OECD 化学品テストガイドラインに定められている1000 mg/kg を最高用量とし、以下、600 mg/kg、300 mg/kg、100 mg/kg に設定した。10週齢のCrI:CD(SD) ラット、1群あたり雌雄各5匹に、2,3,5-トリメチルフェノールを14日間、毎日、強制経口投与し、投与終了翌日に剖検した。その結果、1) 1000 mg/kg 群の雄1例が5回の投与で死亡したが死因および

投与との関連は不明であった。2) 雌雄の1000 mg/kg 群に投与初期の体重増加抑制が認められた。3) 雌雄の1000 mg/kg 群にALT 活性の上昇と脾臓・肝臓重量の増加が認められた。4) 雌雄の1000 mg/kg 群と雌の600 mg/kg 群に網赤血球比の増加が認められた。5) 300 mg/kg 群と100 mg/kg 群の雌雄ともに投与の影響は認められなかった。以上の結果から、本試験の高用量には1000 mg/kg を設定し、以下、中用量には300 mg/kg、低用量には100 mg/kg を設定した。

本試験では、対照群1群と投与群3群の計4群を設け、1群あたり雌雄各12匹の動物を用いた。なお、対照群と1000 mg/kg 群については、雄では12匹のうち各群5匹を回復動物とし、雌では交配をさせないサテライト動物（回復動物）として、各群5匹の雌を追加した。

各用量の投与検体は、雄には交配前14日間、交配期間14日間および交配期間終了後14日間の42日間、雌には交配前14日間、交配期間（交尾成立まで）、妊娠期間および哺育4日まで、計42～46日間、サテライト雌には42日間、毎日午後に投与した。ただし、分娩中および午前中に分娩が確認された雌にはその日の投与はしなかった。

対照群と1000 mg/kg 群の雌雄の回復動物については、投与期間終了後14日間の回復期間を設けた。

4. 観察および検査（反復投与毒性）

1) 一般状態の観察

投与期間中には毎日2回（投与前および投与後）、回復期間中には毎日1回行った。

2) 行動機能観察

(1) 詳細観察

投与・回復期間中に週1回行った。ただし、雌の投与6週の観察は、分娩および哺育時の動物への負荷を軽減するため、サテライト動物のみ行った。

詳細観察は、ケージから動物を取り出す際、ケージから動物を取り出した後および作業台上で実施した。ケージから動物を取り出す際には接触反応や取り出し易さを観察した。ケージから動物を取り出した後には、扱い易さ・体温・被毛状態・皮膚の色・眼の状態・流涎・排尿の有無・排糞の有無を観察した。作業台上では、姿勢・活動性・警戒/探索行動・歩行状態・常同行動・呼吸・振戦/攣縮/痙攣の有無を観察した。

(2) 反応性検査、握力測定および自発運動量測定

雄は全例について投与6週に行った。雌は分娩日の近い動物から各群5匹を選定し、解剖前日（分娩4日後）に行った。

反応性検査は、視覚・聴覚・痛覚・瞳孔反射・空中正向反射について行った。

握力は、握力測定装置（MK-380CM：室町機械）を用いて前肢・後肢ともに2回測定し、平均値をその個体の値とした。

自発運動量は、自発運動量測定装置（SCANET

MV-10：メルクエスト）を用いて 60 分間測定した。

3) 体重測定

雄の体重は、投与 1・8・15・22・29・36・42 日および回復 1・8・14 日に測定した。

雌の体重は、交配前の投与 1・8・15 日、妊娠 0・7・14・20 日および分娩日と分娩 4 日後（哺育 0 日と哺育 4 日）に測定した。サテライト雌は投与 1・8・15・22・29・36 日および回復 1・8・14 日に測定した。

なお、解剖日には絶食後の体重を測定した。

4) 摂餌量測定

摂餌量は、各測定期間に給餌量と残餌量を測定し、その値から 1 匹 1 日あたりの摂餌量を算出する方法で行った。

雄の摂餌量は、投与 1～8・8～15・29～36・36～42 日および回復 1～8・8～14 日に測定した。

雌の摂餌量は、交配前の投与 1～8・8～15 日、妊娠 0～7・7～14・14～20 日および哺育 0～4 日に測定した。サテライト雌は投与 1～8・8～15・29～36・36～43 日および回復 1～8・8～14 日に測定した。

5) 尿検査

投与 6 週と回復 2 週の投与前に雄の新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティスティックス：シーメンス）を用いて、pH・蛋白・グルコース・ケトン体・ビリルビン・潜血・ウロビリノーゲンを検査した。

6) 剖検

雄は、最終投与日（投与 42 日）の翌日と回復 14 日の翌日に剖検した。分娩した雌は分娩 5 日後、サテライト雌は回復 14 日の翌日に剖検した。死亡動物は死亡発見日に剖検した。

7) 血液学検査

解剖時にエーテル麻酔下で腹大動脈より EDTA-2 カリウム入り採血管およびクエン酸ナトリウム入り採血管（凝固検査用）に採血した血液を用いて血液学検査を行った。赤血球数・血小板数・網赤血球比・平均赤血球容積・白血球数・白血球分類（以上、光学的散乱法）、ヘモグロビン濃度（シアンメトヘモグロビン法）、ヘマトクリット値・平均赤血球ヘモグロビン量・平均赤血球ヘモグロビン濃度（以上、計算による）は総合血液学検査装置（ADVIA 120：シーメンス）を用いて、プロトロンビン時間（Quick 一段法）と活性化部分トロンボプラスチン時間（エラジン酸活性化法）は全自動血液凝固測定装置（Sysmex CA-5000：シスメックス）を用いて検査した。

8) 血液生化学検査

解剖時にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿について、総蛋白（ビウレット法）、アルブミン

（BCG 法）、A/G 比（計算による）、総ビリルビン（アゾビリルビン法）、グルコース（GlcK・G-6-PDH 法）、総コレステロール（CE・COD・POD 法）、トリグリセリド（MGLP・GK・GPO・POD 法）、リン脂質（PLD・ChOD・POD 法）、AST・ALT・LDH・ALP・ γ -GTP・CK（以上、JSCC 法）、尿素窒素（ウレアーゼ・GLDH 法）、クレアチニン（Jaffé 法）、ナトリウム・カリウム・クロール（以上、イオン選択電極法）、カルシウム（OCPC 法）および無機リン（PNP・XOD・POD 法）を自動分析装置（日立 7080：日立製作所）を用いて検査した。

9) 器官重量

胸腺・副腎・心臓・腎臓・脾臓・肝臓・脳・精巣・精巣上体の湿重量（絶対重量）を測定した。また、各器官の絶対重量の解剖時体重に対する百分率（相対重量）を算出した。

10) 病理組織学検査

雄の精巣・精巣上体・精囊・凝固線・前立腺（腹葉）および雌の卵巣は全例で、肝臓・腎臓・脾臓は対照群と 1000 mg/kg 群の雌雄全例で検査した。また、雄と分娩雌の各群 5 匹（動物番号の小さい順）および回復動物については、気管・肺・骨髄（大腿骨）・リンパ節（腋窩・鼠径等）・胸腺・脾臓・心臓・胃・小腸・大腸・肝臓・腎臓・膀胱・下垂体・甲状腺・上皮小体・副腎・子宮（回復動物）・腔・乳腺・脳・脊髄・末梢神経（坐骨神経）・筋肉・骨（大腿骨）を検査した。

上記組織を 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液またはブアン固定液（精巣・精巣上体のみ）で固定後、パラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色した標本について光学顕微鏡で観察した。

5. 観察および検査（生殖発生毒性）

1) 性周期の観察

投与開始日から交配開始日までの毎朝、雌動物（サテライト動物は除く）の陰垢を採取し、ギムザ染色した標本について観察した。

性周期は発情前期、発情期および発情休止期に分類し、発情期が 4 日から 6 日の間隔で回帰される例を正常とし、発情休止期が 7 日以上継続してみられる例は連続非発情とし異常とした。また、周期長が求められた個体について、平均性周期を算出した。

2) 交配

交配は、投与 15 日の夕方から交尾が確認されるまで（最長 6 日間）、同一群内の雌雄 1 匹ずつを同居させる方法で行った。毎朝、腔内の腔栓または腔垢中の精子の存在により交尾の有無を判定し、交尾が確認された日を妊娠 0 日と規定した。交尾した雌は直ちに雄から離し、個別に飼育した。

交配の結果から、交尾所要日数（交配開始から交尾成立までに要した日数）と交尾率〔（交尾成立ペア数／交配ペア数）×100〕を算出した。

3) 分娩・哺育

交尾した雌は、全例自然分娩させた。分娩の確認は妊娠 20 日から 25 日を限度に 1 日 2 回行い、16 時の時点で分娩が終了していた動物についてはその日を分娩日（哺育 0 日）と規定した。分娩中の動物については分娩状態を観察した。

これらの結果から、妊娠期間（妊娠日から分娩日までの日数）・受胎率〔（受胎動物数／交尾成立ペア数）×100〕・出産率〔（生児出産動物数／受胎動物数）×100〕を算出した。

4) 妊娠黄体数・着床痕数

解剖時に卵巣を摘出して実体顕微鏡により妊娠黄体を計数した。また、子宮は摘出して 10% 硫化アンモニウム溶液で染色し、翌日、着床痕を計数した。

これらの結果から、着床率〔（着床痕数／妊娠黄体数）×100〕を算出した。

5) 児動物の観察・検査

(1) 出生時の産児数、性および外表観察

出生時（哺育 0 日）に、産児（生存児・死亡児）の計数、性別確認および外表観察を行った。

これらの結果から、分娩率〔（産児数／着床痕数）×100〕、出生率〔（哺育 0 日の生存児数／着床痕数）×100〕、哺育 0 日の生存率〔（哺育 0 日の生存児数／産児数）×100〕、産児の性比（雄の産児数／雌雄の産児数）および生存児の性比（雄の生存児数／雌雄の生存児数）を算出した。

(2) 生存児数および一般状態の観察

哺育 4 日まで毎日、生存児の計数と一般状態の観察を行った。

この結果から、哺育 4 日の生存率〔（哺育 4 日の生存児数／哺育 0 日の生存児数）×100〕および哺育 4 日の生存児の性比（哺育 4 日の雄の生存児数／哺育 4 日の雌雄の生存児数）を算出した。

(3) 体重

哺育 0 日と哺育 4 日に、母動物（腹）毎に雌雄別にまとめた体重を測定し、児動物 1 匹あたりの平均値を算出した。

(4) 剖検

児動物は哺育 4 日に剖検した。死亡児は死亡発見日に剖検した。

6. 統計解析

交尾率・受胎率・出産率・尿検査・病理組織学検査の結果は、対照群と各投与群間で χ^2 検定を行った。

その他の検査で得られた数値データは、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行

い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett 型の多重比較を行った。なお、回復動物における数値データは、まず、F 検定を行い、分布の違いが認められなかった場合は、Student の t 検定を、分布の違いが認められた場合は Aspin-Welch の t 検定を用いて統計処理を行った。

各検定は 5% および 1% の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示した。

投与 32 日に 1000 mg/kg 群の雄 1 例で投与過誤があった。本例の投与過誤以降に測定・観察したデータは評価に使用しなかった。

結果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態

雄では外部生殖器周囲の尿による汚染が 300 mg/kg 群の 6 例と 1000 mg/kg 群の全例 (12 例) に観察された。300 mg/kg 群の本所見は交配開始後に一時的にみられたが、1000 mg/kg 群では投与初期から解剖時まで断続的に認められた。また、1000 mg/kg 群の 1 例には嗜眠と歩行失調が投与後に 1 回観察された。

雌では 300 mg/kg 群の妊娠雌 1 例と 1000 mg/kg 群の妊娠雌 1 例が、それぞれ妊娠 22 日（投与 39 日）と妊娠 23 日（投与 39 日）に死亡した。300 mg/kg 群の死亡例には投与中期に外部生殖器周囲の尿による汚染がみられたが、その後、異常は観察されなかった。また、1000 mg/kg 群の死亡例には死亡前日の投与後に自発運動減少と歩行失調が観察された。外部生殖器周囲の尿による汚染は 300 mg/kg 群の 5 例（死亡例を含む）と 1000 mg/kg 群の 10 例に観察された。300 mg/kg 群の本所見は交配開始後に一時的にみられたが、1000 mg/kg 群では投与初期から解剖時まで断続的に認められた。また、300 mg/kg 群の 7 例と 1000 mg/kg 群の 9 例（サテライト雌 2 例を含む）に歩行失調がみられ、300 mg/kg 群の 6 例と 1000 mg/kg 群の 6 例（サテライト雌 1 例を含む）には歩行失調と同時に嗜眠も観察された。ただし、歩行失調と嗜眠は 1000 mg/kg 群では投与中期から、300 mg/kg 群では投与後期の投与後にみられ、短時間で回復する変化であった。その他、1000 mg/kg 群の 1 例に一時的な糞量減少が観察された。

なお、100 mg/kg 群の雌雄に異常は観察されなかった。

2) 行動機能観察

(1) 詳細観察

一般状態観察で 1000 mg/kg 群に観察された所見を除き、行動機能の詳細観察で新たにみられた異常はなかった。

(2) 反応性検査

雌雄の反応性に投与の影響は認められなかった。

(3) 握力 (Table 1)

雌雄の前肢・後肢の握力に投与の影響は認められなかった。

(4) 自発運動量 (Table 2)

雌雄の自発運動量に投与の影響は認められなかった。

3) 体重 (Fig. 1~3)

雄の 1000 mg/kg 群には投与・回復の全期間を通して体重増加の抑制が認められた。また、300 mg/kg 群の体重増加にも軽度な抑制（統計学的有意差なし）がみられた。なお、100 mg/kg 群の体重の推移に投与の影響は認められなかった。

雌の 1000 mg/kg 群には交配前・妊娠・哺育の全期間を通して、また 1000 mg/kg 群のサテライト雌にも投与・回復の全期間を通して体重増加の抑制が認められた。なお、100 mg/kg 群と 300 mg/kg 群の体重の推移に投与の影響は認められなかった。

4) 摂餌量 (Fig. 4~6)

雄では 300 mg/kg 群と 1000 mg/kg 群の摂餌量が投与 1 日～8 日に減少した。一方、1000 mg/kg 群の回復 1 日～8 日の摂餌量は増加した。100 mg/kg 群の摂餌量に投与の影響は認められなかった。

雌では 1000 mg/kg 群の摂餌量が投与 1 日～8 日に減少した。一方、1000 mg/kg 群のサテライト雌の摂餌量は投与 29 日～36 日、回復 1 日～8 日、回復 8 日～14 日に増加した。100 mg/kg 群と 300 mg/kg 群の摂餌量に投与の影響は認められなかった。

5) 尿検査 (雄) (Table 3)

投与期間最終週の尿検査において、300 mg/kg 群と 1000 mg/kg 群に蛋白とケトン体の減少が認められた（300 mg/kg 群の蛋白、両群のケトン体に統計学的有意差なし）。ケトン体の減少は回復期間終了時の 1000 mg/kg 群にも認められた（統計学的有意差なし）。

一方、100 mg/kg 群に蛋白の増加がみられたが、投与用量に対応していないため投与の影響ではないと判断した。また、回復期間終了時の 1000 mg/kg 群に僅かな pH の上昇がみられたが、投与期間終了時にはみられていないことから投与の影響ではないと判断した。

6) 血液学検査 (Table 4)

雄では 300 mg/kg 群と 1000 mg/kg 群に網赤血球比の増加が認められた。また、1000 mg/kg 群には MCV の増加も認められた。1000 mg/kg 群の網赤血球比と MCV の増加（統計学的有意差なし）は回復動物にもみられ、また、MCHC の減少も認められた。なお、100 mg/kg 群に投与の影響は認められなかった。

雌では 1000 mg/kg 群の分娩雌に赤血球数・ヘモグロビン濃度・MCHC の減少が認められ、また、MCV・

MCH・網赤血球比の増加が認められた。赤血球数とヘモグロビン濃度の減少は 1000 mg/kg 群のサテライト雌にも認められた。300 mg/kg 群の分娩雌に単球比の増加がみられたが、1000 mg/kg 群や雄にはみられない変化であることから投与の影響ではないと考える。また、100 mg/kg 群にも投与の影響は認められなかった。

7) 血液生化学検査 (Table 5)

雄では 1000 mg/kg 群に総コレステロール・リン脂質濃度の増加、ALT 活性の上昇、カリウムの減少が認められた。100 mg/kg 群と 300 mg/kg 群に投与の影響は認められなかった。なお、1000 mg/kg 群の回復動物に A/G 比と無機リン濃度の増加がみられたが、投与期間終了時には認められず、雌にない変化であることから投与の影響ではないと判断した。

雌では 300 mg/kg 群と 1000 mg/kg 群の分娩雌に総タンパク・アルブミン濃度の増加が認められた。また、300 mg/kg 群の分娩雌にカリウムの減少が認められ、1000 mg/kg 群の分娩雌には総コレステロール・リン脂質濃度の増加、ALT・ALP 活性の上昇が認められた。1000 mg/kg 群の分娩雌 3 例には総ビリルビンの増加がみられ、血漿が僅かに黄色を呈していた。100 mg/kg 群に投与の影響は認められなかった。1000 mg/kg 群のサテライト雌には AST・ALT 活性の上昇が認められた。

8) 病理学検査

(1) 剖検所見

雄に異常は認められなかった。

雌では 300 mg/kg 群の死亡例に異常は認められなかった。1000 mg/kg 群の死亡例には胸腺の萎縮と小腸の黒色液貯留が観察された。生存例では胸腺の萎縮が対照群と 300 mg/kg 群の各 1 例、1000 mg/kg 群の 3 例に観察された。

(2) 器官重量 (Table 6)

雄では 300 mg/kg 群と 1000 mg/kg 群に腎臓と脾臓の絶対重量・相対重量の増加が認められた（絶対重量に統計学的有意差なし）。1000 mg/kg 群には肝臓の絶対重量・相対重量の増加（絶対重量に統計学的有意差なし）、副腎・精巣・脳の相対重量の増加、精巣上体の絶対重量の減少も認められた。100 mg/kg 群の器官重量に投与の影響は認められなかった。1000 mg/kg 群の回復動物には副腎の絶対重量・相対重量と脳の相対重量の増加、精巣上体の絶対重量の減少が認められた。

雌では 300 mg/kg 群と 1000 mg/kg 群に腎臓の絶対重量・相対重量の増加（絶対重量に統計学的有意差なし）、肝臓と脳の相対重量の増加が認められた。1000 mg/kg 群には脾臓の絶対重量・相対重量の増加と心臓の相対重量の増加も認められた。100 mg/kg 群の器官重量に投与の影響は認められなかった。1000 mg/kg 群のサテライト雌には腎臓の絶対重量・相対重量の増加が認められた（絶対重量に統計学的有意差なし）。

(3) 病理組織学検査 (Table 7, 8)

雄の組織病変

肝臓には小葉中心性の肝細胞肥大が、投与期間終了時に解剖した 1000 mg/kg 群の 6 例全例に認められた。肥大した肝細胞の細胞質は周囲の肝細胞に比較して好塩基性の低下がみられた。また、回復期間終了時に解剖した 1000 mg/kg 群の 1 例に炎症性細胞集簇巣が認められた。本病変は、投与期間終了時に肝細胞肥大のみられた小葉中心域に観察された。

脾臓にはヘモジデリン沈着の増加が、投与期間終了時に解剖した 1000 mg/kg 群の 6 例中 5 例に認められた。本病変は回復期間終了時に解剖した 1000 mg/kg 群の 4 例にもみられ、1 例には髓外造血も認められた。

精巣には精細管内の空胞形成が、投与期間終了時に解剖した 1000 mg/kg 群の 6 例全例に認められた。空胞形成の多い 1 例の精細管には、生殖細胞の壊死や多核巨細胞の出現も認められた。また、本例の精巣上体には壊死した生殖細胞の残屑が認められた。精細管内の空胞形成は回復期間終了時に解剖した 1000 mg/kg 群の 5 例中 4 例にも認められ、空胞形成の多い 2 例の精細管には生殖細胞の壊死も認められた。また、この 2 例には精巣上体に壊死した生殖細胞の残屑が認められた。空胞は精細管の主に基底側にみられた。壊死した生殖細胞は主に精母細胞または精子細胞存在領域にみられ、核の濃縮・融解、細胞質のエオジン好性化がみられた。また、多核巨細胞は同領域にみられた。

投与期間終了時に解剖した 1000 mg/kg 群の 1 例に、小腸・大腸粘膜および粘膜固有層に好中球や単核球からなる炎症性細胞の浸潤が認められた。

その他の所見は偶発性病変であり投与の影響ではないと判断した。

雌の組織病変

300 mg/kg 群の死亡例には脾臓と胸腺の萎縮が認められた。また、1000 mg/kg 群の死亡例には脾臓と胸腺の萎縮がみられ、萎縮した脾臓にはヘモジデリン沈着の増加が認められた。

肝臓には髓外造血が 1000 mg/kg 群の 11 例中 4 例に認められた。また、回復期間終了時に解剖した 1000 mg/kg 群のサテライト雌 1 例に炎症性細胞集簇巣が認められた。本病変は肝小葉中心域に観察された。

脾臓にはヘモジデリン沈着の増加が 1000 mg/kg 群の 11 例中 3 例に認められ、髓外造血の増加が 11 例中 8 例に認められた。髓外造血の増加は対照群の 2 例と 100 mg/kg 群の 1 例にもみられた。ヘモジデリン沈着の増加は回復期間終了時に解剖したサテライト雌の対照群と 1000 mg/kg 群にみられたが、1000 mg/kg 群のヘモジデリン沈着の程度は対照群に比較して強かった。

1000 mg/kg 群の 5 例中 1 例に前胃の炎症と扁平上皮過形成（限局性）が認められた。本例の過形成は乳頭状に突出している部分も観察された。なお、扁平上皮過形成（限局性）は 300 mg/kg 群の 5 例中 1 例にも認められた。また、胸腺の萎縮が 300 mg/kg 群の 5 例中 1 例と 1000 mg/kg 群の 5 例中 2 例に認められた。

その他の所見は偶発性病変であり投与の影響ではな

いと判断した。

2. 生殖発生毒性

1) 性周期 (Table 9)

300 mg/kg 群の 1 例と 1000 mg/kg 群の 4 例に異常性周期（7 日間以上の連続非発情）が認められた。ただし、正常性周期を示した雌で算出した群毎の平均性周期に異常は認められなかった。

2) 交配成績 (Table 9)

全例の交尾が確認され、交尾率や交尾所要日数に投与の影響は認められなかった。

交尾が確認された雌のうち、1000 mg/kg 群の 1 例には分娩が認められず、妊娠 26 日相当日に剖検した結果、子宮に胎児や着床痕が観察されなかったことから、この 1 例は受胎不成立であると判断した。死亡した 300 mg/kg 群の妊娠雌 1 例と 1000 mg/kg 群の妊娠雌 1 例には、剖検により子宮内に胎児が確認された（胎児数 15 匹と 13 匹）ため、この 2 例は受胎成立と判断した。

その他の雌には受胎が確認され受胎率に投与の影響は認められなかった。

3) 分娩 (Table 9)

1000 mg/kg 群に妊娠期間（交尾から分娩日までの期間）の延長が認められた。これは、分娩雌 10 例中 5 例の妊娠期間が 23 日間であったことによる。ただし、分娩状態に異常のみられた例はなかった。

300 mg/kg 群と 1000 mg/kg 群で妊娠末期に死亡したそれぞれ 1 例の雌（妊娠 22 日または 23 日に死亡）では、膈口の開大や膈口からの粘液排出などの分娩徴候は認められなかった。

出産率に投与の影響は認められなかった。

4) 着床 (Table 10)

1000 mg/kg 群に着床痕数の減少が認められ、妊娠黄体数の減少傾向（統計学的有意差なし）もみられた。1000 mg/kg 群の 1 例に着床率の低下（35.7%）がみられたが、他の例に異常がなかったため、着床率に投与の影響はないと判断した。

100 mg/kg 群と 300 mg/kg 群の着床痕数および着床率に投与の影響は認められなかった。

5) 児動物と哺育 (Table 9, 10)

(1) 出生日（哺育 0 日）の児動物

1000 mg/kg 群では着床痕数の減少に対応して産児数の減少（統計学的有意差なし）と生存児数の減少が認められた。分娩率・哺育 0 日の生存率・出生率・性比に投与の影響は認められなかった。また、哺育 0 日の雌雄生存児の体重に投与の影響は認められなかった。

(2) 哺育状況と児動物の一般状態

300 mg/kg 群と 1000 mg/kg 群の各 1 例の母動物は授乳・哺育をしなかったため、児動物は体温低下の状態と

なり、哺育2日（分娩2日後）には全ての児動物が死亡した。100 mg/kg 群には児動物への授乳を含めて、哺育状況や児動物の一般状態に投与の影響は認められなかった。

(3) 哺育4日の児動物

300 mg/kg 群と1000 mg/kg 群の各1例（腹）に全児死亡がみられたため、両群ともに哺育4日の平均生存児数・生存率が対照群に比較して低下した。また、1000 mg/kg 群では産児数が少なかったため、哺育4日の生存児数はさらに低下した。ただし、両群ともに哺育4日の生存児の性比や体重に投与の影響は認められなかった。100 mg/kg 群には哺育4日の生存児の数と性比・生存率に投与の影響は認められなかった。また、哺育4日の雌雄生存児の体重にも投与の影響は認められなかった。

(4) 剖検

死産児を含めて哺育期間中に死亡し、剖検観察できた児動物に異常な病変は認められなかった。また、哺育4日の生存児の剖検でも投与群の児動物に異常な病変は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性

2,3,5-トリメチルフェノールは皮膚・眼・粘膜を強く刺激し、炎症や薬傷を起こす腐食性物質として分類されているが、動物実験による毒性情報は得られていない¹⁾。そこで2,3,5-トリメチルフェノールに類似した化合物のラットを用いた毒性試験である「2,4,6-トリメチルフェノ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」²⁾および「2,3,6-トリメチルフェノールのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験」³⁾の結果との比較により本試験結果を考察する。2,4,6-トリメチルフェノールでは一過性の歩行異常と前胃の扁平上皮過形成²⁾、2,3,6-トリメチルフェノールでは一過性の歩行失調、溶血、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大および前胃の扁平上皮過形成が認められたと報告されている³⁾。本試験でも同様な結果が得られたが、本化合物は類似化合物に比較して胃粘膜への刺激性が弱く精巣障害が認められたことが特徴であった。

雄の300 mg/kg以上の群と雌の1000 mg/kg群には、投与・回復期間に継続して体重増加の抑制が認められた。これらの体重は摂餌量とともに投与初期に抑制が強いことから、本化合物は投与初期に生体への負荷が大きいと考えられる。雌の300 mg/kg以上の群では投与後に一過性の嗜眠と歩行失調が観察され、雄でも1000 mg/kg群の1例で1回のみ認められた。この変化は投与後に一過性にみられた麻酔状態と考えられ、本化合物には一時的な中枢神経系抑制作用があると考えられる。投与後の夕方から測定した自発運動量や握力に低下がみられないことから一過性であることが示唆された。

妊娠末期に死亡した300 mg/kg群と1000 mg/kg群の各1例には死因と判断できる病変は認められなかった。妊娠末期の雌は、血中のホルモンや薬物代謝の変化、血流の増加など生理状態に大きな変動があり⁴⁾、さらに胎児の成長に伴う体重の著しい増加で体重値から算出される投与量が急激に増加する。また、2例ともに脾臓と胸腺の萎縮がみられたことから妊娠による強いストレスがあった可能性がある。これらに加えて、300 mg/kg以上の群の雌には投与後に一過性の麻酔状態もみられている。以上のような生体への負荷が死亡に関連した可能性はあるが、例数が少なく、死因を特定することはできなかった。

雌雄の300 mg/kg以上の群の多数例で外部生殖器周囲の尿による汚染が観察された。本所見は死亡前の状態悪化時によく観察される異常であるが、本試験では投与後にみられる一過性の麻酔状態を除いて自発運動減少などの状態異常はみられなかった。本所見を発症させる要因として多尿や尿失禁が考えられる。2,3,6-トリメチルフェノールの試験では外部生殖器周囲の尿による汚染は観察されていないが、1000 mg/kgの用量で雄ラットに尿量の増加がみられたと報告されている³⁾。本試験では雄の1000 mg/kg群と雌の300 mg/kg群に血中カリウムの減少がみられたことから、本化合物投与により尿の排泄が促進された可能性が考えられる。そして、300 mg/kg以上の群にみられた腎臓重量の増加は、尿量増加に伴う機能性肥大の可能性が考えられる。ただし、本試験では尿量を測定していないため実際に尿量が増加した証拠は得られていない。

雄の300 mg/kg以上の群にみられた網赤血球比の増加と1000 mg/kg群のMCVの増加、雌の1000 mg/kg群にみられた赤血球数・ヘモグロビン濃度・MCHCの減少とMCV・MCH・網赤血球比の増加から、雌雄ともに貧血傾向が示された。そして、この貧血は雌雄の1000 mg/kg群にみられた脾臓のヘモグデリン沈着の増加から、赤血球が破壊されることで起こる溶血性貧血であることが示された。貧血に対する代償性変化としての髄外造血が、雌では脾臓のみならず肝臓にも観察された。妊娠・分娩した雌は生理的に貧血状態になるため^{5,6)}、脾臓の髄外造血は対照群の妊娠雌にも頻繁に観察される所見である。しかし、肝臓の髄外造血は稀であるため、妊娠による貧血に本化合物で生じる貧血が加わった結果であることが示唆される。なお、1000 mg/kg群の分娩雌3例にみられた総ビリルビンの増加は赤血球溶血による結果と考える。

1000 mg/kg群の雄の肝臓には小葉中心性に肝細胞の肥大が観察された。肥大した肝細胞は周囲の肝細胞に比較して細胞質の塩基性が弱いという特徴を有していた。同群では肝臓重量の増加も認められている。一方、雌では1000 mg/kg群の肝臓重量の増加がみられたが、小葉中心性の肝細胞肥大は観察されていない。1000 mg/kg群では雌雄に共通して血中の総コレステロールとリン脂質の増加がみられた。血中の総コレステロールの増加は、フェノバルビタール投与による肝臓の薬物代謝酵素

誘導によりみられることが報告されている⁷⁾。また、リン脂質はコレステロールを運搬するためのリポ蛋白の表層成分であることから、総コレステロールの増加に付随して増加したと考える。2,3,6-トリメチルフェノールの試験報告では、1000 mg/kg の用量で肝臓重量の増加とともに小葉中心性の肝細胞肥大がみられたことから肝臓の薬物代謝酵素誘導を示唆している³⁾。また、2,4,6-トリメチルフェノールの試験では、300 mg/kg の用量で肝臓への影響はみられなかったが、2 週間の予備試験の1000 mg/kg の用量で血中の総コレステロールと肝臓重量に増加が認められている²⁾。さらに、2,4,6-トリメチルフェノールが肝臓に弱い薬物代謝酵素誘導作用があることは他の研究に報告されている⁸⁾。以上のことから、本化合物には肝臓の薬物代謝酵素誘導作用があると考えられる。

雌雄に共通して1000 mg/kg 群にはALT活性の上昇がみられた。この変化は2 週間予備試験における雌雄の1000 mg/kg 群にも認められた。また、本試験の1000 mg/kg 群の雌雄回復動物の各1 例には、雄に肝細胞肥大がみられた領域と一致して軽度の炎症性細胞集簇巣が認められている。この病変像から肝細胞には肥大だけでなく壊死等の病変があった可能性が考えられる。また、前述したように本化合物には赤血球の溶血作用があるため、ALT活性の上昇は溶血に起因した可能性も考えられる。なお、雌の1000 mg/kg 群にはALP活性の上昇もみられたが、雄にはみられない変化のため、その毒性的意義は不明である。

本化合物投与の特徴として1000 mg/kg 群に精巣病変が認められた。精細管内の主に基底側に空胞が出現し、空胞の多い例では精母細胞などの生殖細胞に壊死がみられ、減数分裂時の分裂異常に起因すると考えられる多核巨細胞⁹⁾も認められている。基底側にみられた空胞はセルトリ細胞の脱落による可能性があるが特定はできなかった。ラットでは精祖細胞から精子細胞が形成されるまで約2 ヶ月を要することから⁹⁾、投与終了2 週間後にみられた精巣病変は、投与期間中に障害された病変の残存であると考えられる。

2,3,6-トリメチルフェノールの試験では1000 mg/kg の用量で雌雄全例の前胃に扁平上皮のび慢性の過形成が観察され³⁾、2,4,6-トリメチルフェノールの試験では60 mg/kg 以上の用量で雌雄の少数例に前胃の扁平上皮過形成が観察されている²⁾。これらの結果は、類似化合物は胃粘膜に対して強い刺激性を有することを示唆している。本試験の雌の300 mg/kg 群と1000 mg/kg 群の各1 例にみられた前胃の扁平上皮過形成も、本化合物投与による胃粘膜への刺激により生じた可能性が考えられる。一方、本病変は雄には認められていない。雄1000 mg/kg 群の1 例に小腸・大腸粘膜下の炎症性細胞浸潤(軽度)が認められたが、粘膜上皮細胞に病変はみられないため、この炎症は化合物の刺激性による病変ではないと考える。以上から、本化合物は類似2 物質に比較して胃粘膜への刺激性が弱い可能性が示唆された。

以上のように、2,3,5-トリメチルフェノールの経口投

与により、雌雄の1000 mg/kg 群と雌の300 mg/kg 群に一過性の嗜眠と歩行失調、雌雄の1000 mg/kg 群と雄の300 mg/kg 群に溶血性貧血、雄の1000 mg/kg 群に精巣障害と小葉中心性の肝細胞肥大などの影響がみられ、本化合物の主な標的器官は中枢神経系、赤血球、精巣および肝臓であると考えられる。

2. 生殖発生毒性

交配前の性周期検査で300 mg/kg 群の1 例と1000 mg/kg 群の4 例は検査期間途中から発情休止期が持続した。しかし、これらの雌には雄との同居により交尾が確認されたため、交尾能に影響はないと考える。発情休止期の持続は偶発することもあり、300 mg/kg 群にみられた1 例については投与との関連は不明とした。1000 mg/kg 群では4 例にみられたため、本化合物には性周期異常を起こす作用があると考えられる。また、1000 mg/kg 群には妊娠期間の僅かな延長がみられた。分娩状態の異常はみられないことから妊娠期間の延長は分娩時間の延長した結果ではなく、分娩開始に遅延がみられたと考える。なお、1000 mg/kg 群で性周期異常のみられた4 例中の1 例には交尾は確認されたが着床床がないことから不妊とした。本例には反復投与毒性において特記すべき異常は認められなかった。また、交配相手の雄の精巣には精細管内の軽度な空胞形成がみられたのみであり、雄に不妊原因があるとは考えられない。

1000 mg/kg 群に着床数と出産児数の減少がみられた。その原因として本化合物を投与した雄の1000 mg/kg 群にみられた精巣障害が考えられる。しかし、精巣上体重量の低下はあったが精子減少はみられなかったこと、交配は投与開始2 週間後から行われ、障害された雄生殖細胞が受精に係る可能性は低いことから、着床数・出産児数の減少と精巣障害との関連性は低いと考えた。その他の原因として、性周期異常がみられたことから、卵巣機能低下による排卵数の減少も考えられる。

妊娠末期に死亡した300 mg/kg 群と1000 mg/kg 群の各1 例に分娩徴候は観察されなかった。また、剖検時の子宮内の胎児に過大や死亡などの異常は観察されなかった。よって、この2 例は分娩障害により死亡したとは判断しなかった。

300 mg/kg 群と1000 mg/kg 群の各1 例は出産後、授乳・哺育をしなかったため、児動物全例が死亡した。なお、児動物には剖検による異常は観察されなかった。2 例ともに分娩中に異常はみられず、分娩後の一般状態や体重・摂餌量にも著変はみられなかった。哺育不全による全児死亡は、反復投与により様々な影響がみられた中用量と高用量にみられた異常であるため、投与による影響の可能性を除外できないが、発生数が少ないことから偶発的と判断した。

以上のように、2,3,5-トリメチルフェノールの経口投与により、雄親動物には1000 mg/kg 群で精巣障害が認められ、雌親動物には1000 mg/kg 群で性周期異常、妊娠期間の延長、着床数・出産児数の減少がみられた。300 mg/kg 群と1000 mg/kg 群では各1 例の雌親動物に哺育

不全による全児死亡がみられたが、出生後の児動物に投与の影響は認められなかった。

3. 無作用量 (NOEL: No Observed Effect Level)

反復投与の影響として、300 mg/kg の用量から雄には網赤血球比の増加等、雌には歩行失調等の影響がみられた。また、生殖発生への影響としては 1000 mg/kg の用量で精巣障害や着床数減少等の影響がみられたため、これを NOEL 決定のエンドポイントとした。

よって、本試験における 2,3,5-トリメチルフェノールの NOEL は、反復投与毒性に関しては雌雄ともに 100 mg/kg/day であると結論される。また、生殖発生毒性に関しては、300 mg/kg/day であると結論される。

4. 無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

反復投与毒性に関しては、NOAEL 決定のエンドポイントとする毒性影響を、雄では 300 mg/kg の用量からみられた網赤血球比の増加とし、雌では 300 mg/kg の用量からみられた歩行失調と判断した。また、生殖発生毒性に関しては、NOAEL 決定のエンドポイントとする毒性影響を、1000 mg/kg の用量でみられた精巣障害と着床数減少と判断した。

よって、本試験における 2,3,5-トリメチルフェノールの NOAEL は、反復投与毒性に関しては、雌雄ともに 100 mg/kg/day であると結論される。また、生殖発生毒性に関しては、300 mg/kg/day であると結論される。

文献

- 1) 製品安全データシート。2,3,5-トリメチルフェノール。東京化成工業(株)。2007。
- 2) 星野信人ら。2,4,6-トリメチルフェノ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。経済産業省製造産業局。2007。
- 3) 大原直樹ら。2,3,6-トリメチルフェノールのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験。化学物質毒性試験報告。化学物質点検推進連絡協議会。1999。p.550-560
- 4) Ramsay MM (ed.). 2004. 武谷雄二 監訳:「妊娠時における母体評価と胎児評価」.エルゼビア・ジャパン, 東京。
- 5) Papworth TA, Clubb SK. 1995. Clinical pathology in the female rat during the pre- and postnatal period. *Comp Haematol Int* 5: 13-24.
- 6) Kim JC, Yun HI, Lim KH, Suh JE, Chung MK. 2000. Haematological values during normal pregnancy in Sprague-Dawley rats. *Comp*

Haematol Int 10: 74-79.

- 7) Kiyosawa N, Tanaka K, Hirao J, Ito K, Niio N, et al. 2004. Molecular mechanism investigation of phenobarbital-induced serum cholesterol elevation in rat livers by microarray analysis. *Arch Toxicol* 78: 435-442.
- 8) Hazardous Substances Databank (HSDB). 2003. HSDB Number 5677. 2,4,6-TRIMETHYLPHENOL. <http://www.toxnet.nlm.nih.gov/>
- 9) 高橋 道人編. 精巣毒性評価のための精細管アトラス—ラット, マウス, イヌ—。ソフトサイエンス社。1994。

連絡先

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター
〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445
Tel 0463-82-3911 Fax 0463-82-3860

Correspondence

Japan Bioassay Research Center, Japan Industrial Safety and Health Association
2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257-0015, Japan
Tel +81-463-82-3911 Fax +81-463-82-3860

本報告書は、平成 21 年度ハザードデータ評価委員会（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）で評価後、修正・加筆された。

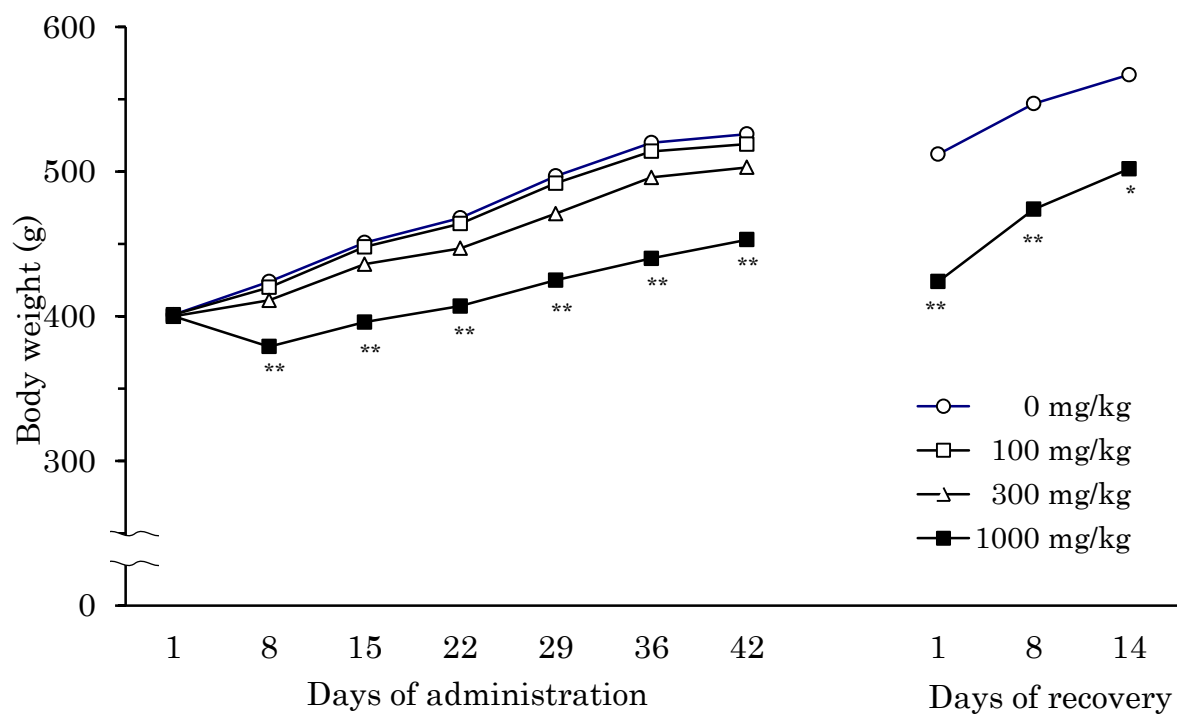


Figure 1 Body weight changes of male rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

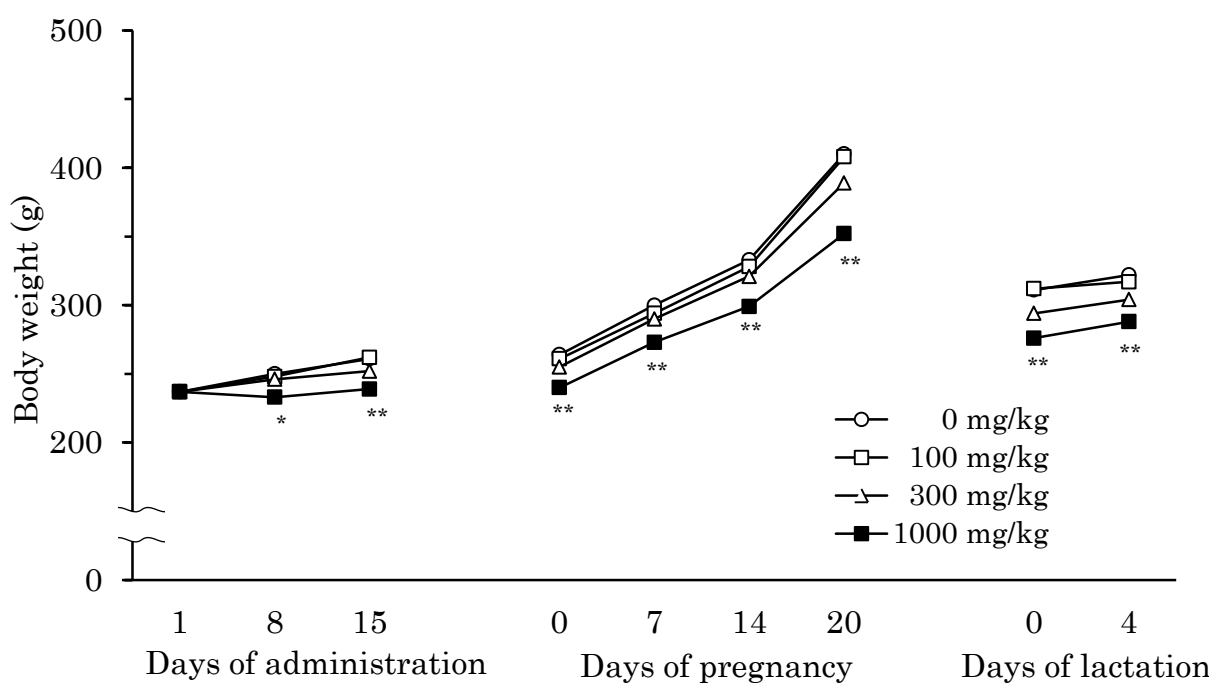


Figure 2 Body weight changes of female rats (dams) treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

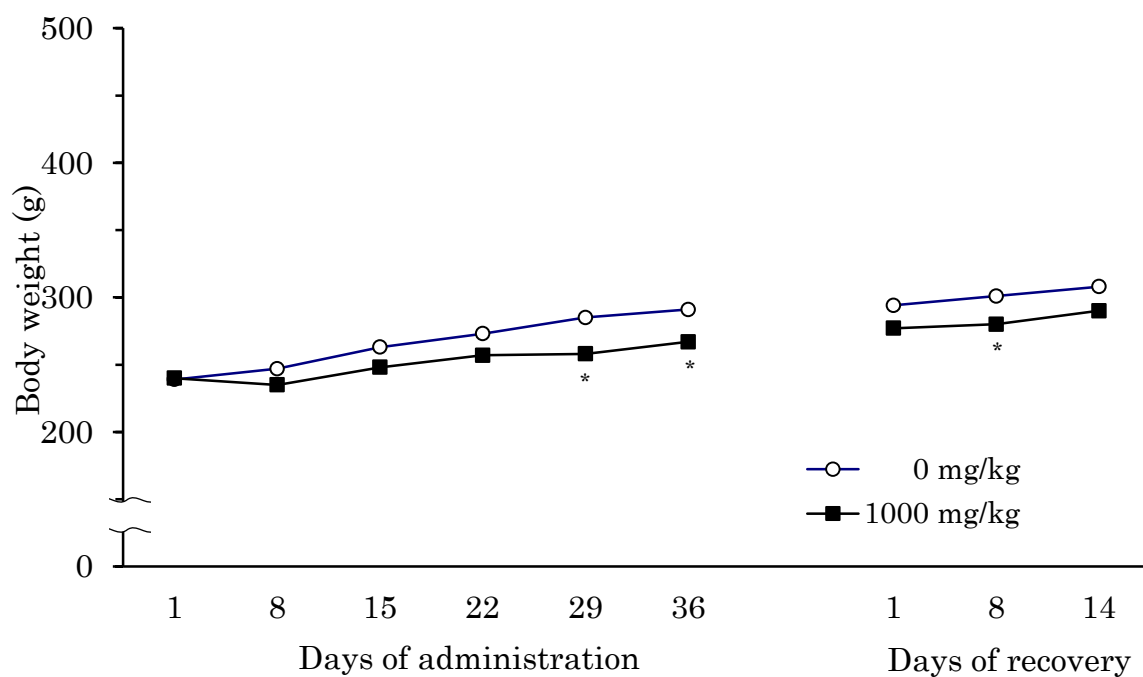


Figure 3 Body weight changes of satellite female rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$

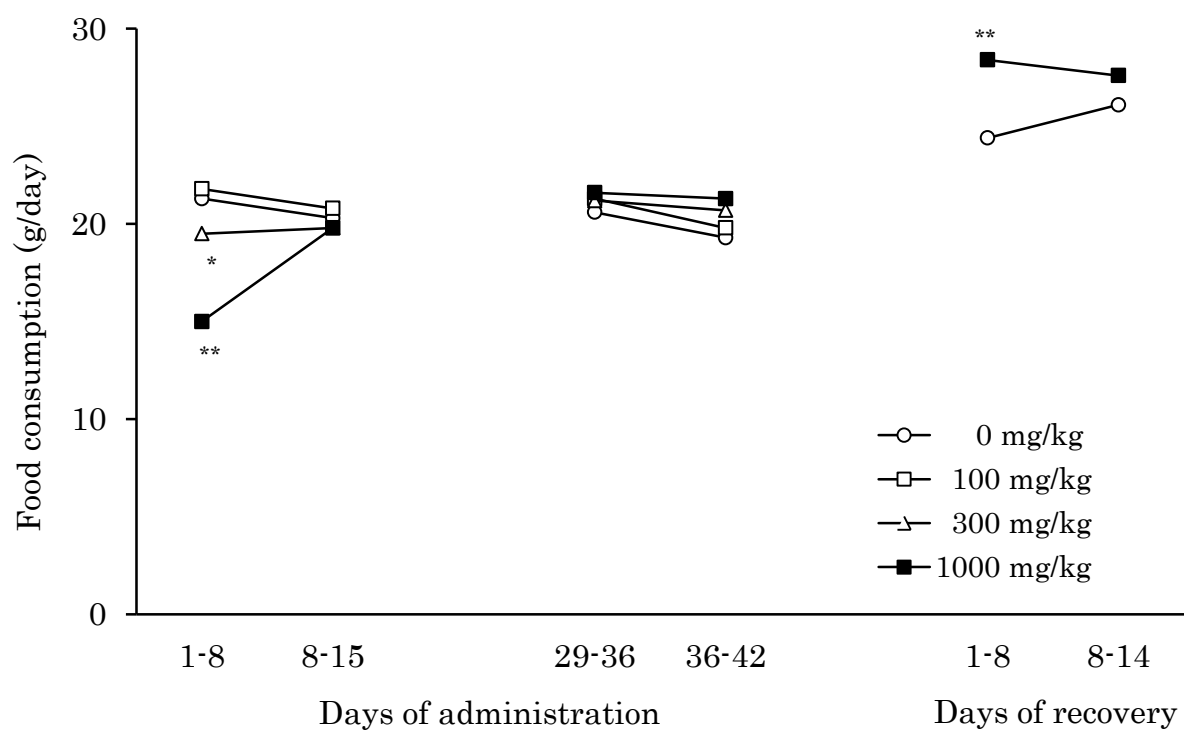


Figure 4 Food consumption changes of male rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

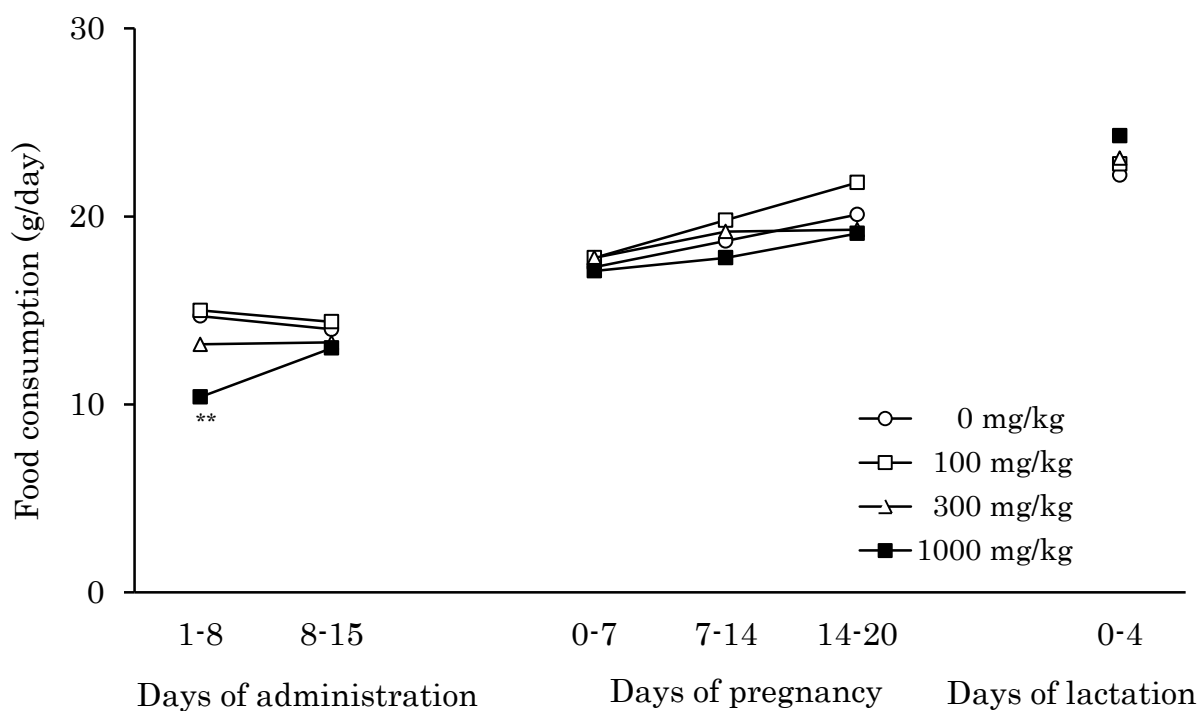


Figure 5 Food consumption changes of female rats (dams) treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significant difference from the control group, ** $p \leq 0.01$

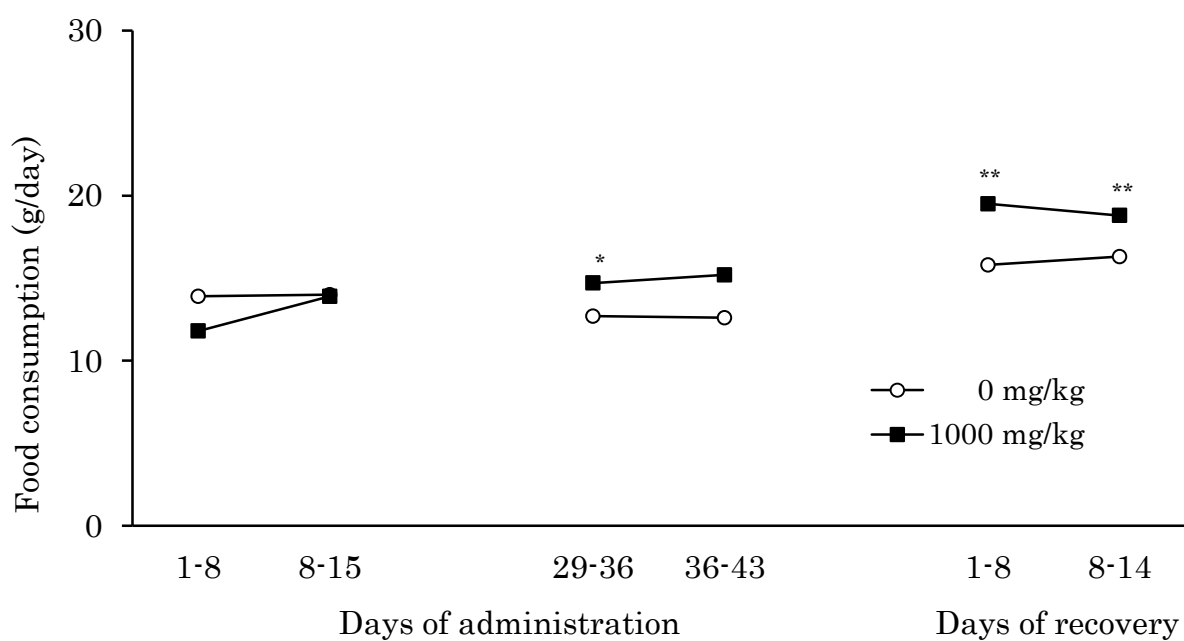


Figure 6 Food consumption changes of satellite female rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

Table 1 Grip strength of rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	100	300	1000
Male				
No. of animals examined	12	12	12	11
Forelimb grip strength (g)	328 \pm 103	294 \pm 123	293 \pm 86	258 \pm 45
Hindlimb grip strength (g)	308 \pm 69	250 \pm 86	325 \pm 67	275 \pm 67
Female (dam)				
No. of animals examined	5	5	5	5
Forelimb grip strength (g)	260 \pm 63	248 \pm 86	297 \pm 25	236 \pm 86
Hindlimb grip strength (g)	257 \pm 55	268 \pm 41	236 \pm 67	250 \pm 47

Data represent mean \pm S.D.

Table 2 Locomotor activity of rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	100	300	1000
Male				
No. of animals examined	12	12	12	11
Interval count				
0 – 10 (min)	2258 ± 573	1563 ± 834	2394 ± 1077	2152 ± 1530
10 – 20 (min)	1365 ± 514	1061 ± 809	1215 ± 951	1103 ± 1139
20 – 30 (min)	998 ± 774	413 ± 619	1011 ± 899	831 ± 982
30 – 40 (min)	642 ± 462	536 ± 595	1205 ± 1047	796 ± 1081
40 – 50 (min)	789 ± 758	636 ± 753	290 ± 300	351 ± 548
50 – 60 (min)	584 ± 640	713 ± 742	420 ± 755	528 ± 788
Total count				
0 – 60 (min)	6636 ± 2304	4922 ± 2845	6535 ± 3193	5761 ± 4330
Female (dam)				
No. of animals examined	5	5	5	5
Interval count				
0 – 10 (min)	1677 ± 1200	1607 ± 764	910 ± 711	956 ± 783
10 – 20 (min)	1015 ± 438	1436 ± 1114	1203 ± 984	242 ± 291
20 – 30 (min)	419 ± 679	878 ± 1171	193 ± 318	142 ± 199
30 – 40 (min)	980 ± 633	928 ± 1162	487 ± 434	801 ± 1141
40 – 50 (min)	563 ± 707	1184 ± 1351	115 ± 189	508 ± 1110
50 – 60 (min)	70 ± 84	38 ± 36	527 ± 713	650 ± 644
Total count				
0 – 60 (min)	4723 ± 2944	6070 ± 4934	3436 ± 1533	3300 ± 2436

Data represent mean ± S.D.

Table 3 Urinalysis of male rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		Administration period				Recovery period	
		0	100	300	1000	0	1000
No. of animals examined		12	12	12	11	5	5
pH	6.0	0	0	0	1	0	0
	8.0	3	3	2	3	3	0
	8.5	9	9	10	7	2	5
						} *	
Protein	—	0	0	0	0	0	0
	±	0	0	0	0	1	0
	+	4	0	8	9	0	2
	2+	8	12	4	2	4	3
						} *	
Glucose		12	12	12	11	5	5
Ketone body	—	3	1	6	8	1	3
	±	8	11	6	3	0	2
	+	1	0	0	0	3	0
	2+	0	0	0	0	1	0
Bilirubin		12	12	12	11	5	5
Occult blood	—	11	12	12	11	5	5
	2+	1	0	0	0	0	0
Urobilinogen		12	12	12	11	5	5

Grade: —: negative, ±: trace, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked.

Data represent the number of animals.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$.

Table 4 Hematology of rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
No. of animals examined	7	12	12	6	5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.55 \pm 0.29	8.72 \pm 0.40	8.42 \pm 0.34	8.21 \pm 0.37	8.68 \pm 0.26	8.29 \pm 0.29
Hemoglobin (g/dL)	16.3 \pm 0.5	16.4 \pm 0.6	16.1 \pm 0.5	16.0 \pm 0.3	16.0 \pm 0.5	15.6 \pm 0.8
Hematocrit (%)	42.0 \pm 1.0	42.0 \pm 1.3	42.1 \pm 1.3	42.0 \pm 0.8	42.2 \pm 1.2	41.9 \pm 1.6
MCV (fL)	49.2 \pm 1.6	48.3 \pm 1.5	50.0 \pm 1.1	51.3 \pm 2.1 *	48.6 \pm 1.1	50.6 \pm 2.3
MCH (pg)	19.0 \pm 0.7	18.8 \pm 0.7	19.2 \pm 0.5	19.5 \pm 0.7	18.4 \pm 0.4	18.8 \pm 1.0
MCHC (g/dL)	38.8 \pm 0.3	38.9 \pm 0.8	38.4 \pm 0.8	38.1 \pm 0.7	37.8 \pm 0.2	37.1 \pm 0.5 *
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1255 \pm 105	1224 \pm 88	1219 \pm 123	1172 \pm 86	1169 \pm 242	1257 \pm 107
Reticulocyte (%)	1.6 \pm 0.3	1.7 \pm 0.3	2.3 \pm 0.2 **	2.4 \pm 0.4 **	1.8 \pm 0.4	2.1 \pm 0.4
PT (sec)	14.6 \pm 1.9	15.6 \pm 2.4	16.1 \pm 2.0	14.2 \pm 2.3	15.1 \pm 1.4	15.6 \pm 3.0
APTT (sec)	23.7 \pm 2.4	23.4 \pm 2.0	22.9 \pm 2.0	21.9 \pm 4.0	22.4 \pm 0.9	22.3 \pm 3.0
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	13.46 \pm 3.72	11.66 \pm 3.14	14.55 \pm 2.85	13.99 \pm 5.49	10.37 \pm 3.66	13.40 \pm 2.30
Differential WBC (%)						
Neutrophil	17.6 \pm 4.3	19.5 \pm 6.9	18.8 \pm 6.4	22.1 \pm 5.8	21.0 \pm 7.2	17.7 \pm 4.0
Lymphocyte	76.4 \pm 5.2	75.0 \pm 7.4	76.1 \pm 6.4	73.2 \pm 6.9	73.5 \pm 8.4	77.3 \pm 3.5
Monocyte	2.7 \pm 1.0	2.5 \pm 0.7	2.3 \pm 0.9	2.0 \pm 0.8	2.7 \pm 1.0	2.3 \pm 0.8
Eosinophil	1.1 \pm 0.3	1.2 \pm 0.6	1.0 \pm 0.3	1.0 \pm 0.5	1.3 \pm 0.5	0.9 \pm 0.2
Basophil	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2
Others	1.9 \pm 0.7	1.6 \pm 0.5	1.4 \pm 0.3	1.4 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	1.5 \pm 0.5
Female (dam)						
No. of animals examined	12	12	11	10	5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6.57 \pm 0.43	6.27 \pm 0.77	6.33 \pm 0.65	5.50 \pm 0.74 **	7.98 \pm 0.22	7.52 \pm 0.31 *
Hemoglobin (g/dL)	13.3 \pm 0.8	13.1 \pm 1.1	13.1 \pm 0.8	11.9 \pm 1.4 **	15.6 \pm 0.3	15.0 \pm 0.3 *
Hematocrit (%)	34.9 \pm 2.0	33.9 \pm 2.2	34.8 \pm 1.7	32.6 \pm 2.4	40.5 \pm 0.9	39.4 \pm 1.4
MCV (fL)	53.1 \pm 1.8	54.6 \pm 3.8	55.3 \pm 3.7	59.9 \pm 4.5 **	50.8 \pm 1.6	52.4 \pm 1.5
MCH (pg)	20.2 \pm 0.7	21.0 \pm 1.2	20.8 \pm 1.2	21.6 \pm 0.8 **	19.6 \pm 0.6	19.9 \pm 0.6
MCHC (g/dL)	38.2 \pm 1.4	38.5 \pm 0.9	37.7 \pm 1.1	36.2 \pm 2.1 *	38.5 \pm 0.4	38.1 \pm 0.8
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1388 \pm 137	1470 \pm 207	1493 \pm 247	1656 \pm 283	1337 \pm 108	1294 \pm 47
Reticulocyte (%)	5.9 \pm 1.7	7.0 \pm 3.7	6.7 \pm 3.3	11.3 \pm 5.0 *	1.6 \pm 0.5	1.7 \pm 0.5
PT (sec)	11.8 \pm 0.3	11.6 \pm 0.6	11.9 \pm 0.4	12.1 \pm 0.7	11.5 \pm 0.6	11.4 \pm 0.6
APTT (sec)	17.0 \pm 2.8	16.6 \pm 1.9	17.5 \pm 2.3	17.3 \pm 4.1	17.8 \pm 2.5	17.5 \pm 2.2
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	13.26 \pm 2.33	14.35 \pm 3.19	14.91 \pm 4.87	15.28 \pm 3.14	5.67 \pm 2.41	6.98 \pm 3.18
Differential WBC (%)						
Neutrophil	37.0 \pm 8.5	39.9 \pm 9.5	36.9 \pm 11.8	43.5 \pm 6.1	12.7 \pm 6.0	17.1 \pm 7.1
Lymphocyte	57.8 \pm 8.1	54.3 \pm 10.5	55.9 \pm 11.1	50.3 \pm 5.5	81.8 \pm 6.4	76.7 \pm 6.0
Monocyte	2.7 \pm 1.0	3.5 \pm 1.5	4.5 \pm 2.0 *	3.7 \pm 1.1	2.5 \pm 0.7	3.0 \pm 0.7
Eosinophil	0.6 \pm 0.2	0.6 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2	0.6 \pm 0.3	1.4 \pm 0.5	1.5 \pm 0.4
Basophil	0.8 \pm 0.8	0.4 \pm 0.3	0.6 \pm 0.4	0.5 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
Others	1.1 \pm 0.6	1.3 \pm 0.4	1.5 \pm 0.7	1.4 \pm 0.5	1.4 \pm 0.2	1.5 \pm 0.5

Data represent mean \pm S.D.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Table 5 Biochemistry of rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
No. of animals examined	7	12	12	6	5	5
Total protein (g/dL)	6.4 ± 0.2	6.4 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.4 ± 0.4	6.5 ± 0.3	6.2 ± 0.4
Albumin (g/dL)	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.3	3.3 ± 0.3	3.4 ± 0.1
A/G ratio	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2 *
Total bilirubin (mg/dL)	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Glucose (mg/dL)	194 ± 20	216 ± 42	212 ± 31	188 ± 21	170 ± 14	172 ± 17
Total cholesterol (mg/dL)	63 ± 12	64 ± 12	61 ± 10	86 ± 14 **	73 ± 11	58 ± 11
Triglyceride (mg/dL)	74 ± 39	61 ± 25	54 ± 16	86 ± 42	65 ± 17	61 ± 30
Phospholipid (mg/dL)	110 ± 20	110 ± 15	105 ± 15	155 ± 30 **	113 ± 9	97 ± 17
AST (IU/L)	83 ± 45	63 ± 9	60 ± 11	63 ± 12	58 ± 9	62 ± 7
ALT (IU/L)	39 ± 26	29 ± 7	32 ± 5	59 ± 19 **	24 ± 4	28 ± 4
LDH (IU/L)	114 ± 74	103 ± 40	98 ± 44	72 ± 25	103 ± 75	86 ± 44
ALP (IU/L)	461 ± 94	407 ± 92	400 ± 66	461 ± 146	273 ± 37	354 ± 89
γ-GTP (IU/L)	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
CK (IU/L)	93 ± 23	101 ± 18	103 ± 30	91 ± 16	107 ± 43	116 ± 14
BUN (mg/dL)	11.7 ± 2.1	11.4 ± 1.2	11.5 ± 1.2	12.0 ± 1.5	13.4 ± 2.2	12.7 ± 2.0
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0
Na (mEq/L)	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 0	141 ± 2	142 ± 1
K (mEq/L)	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.4	4.2 ± 0.3	3.7 ± 0.2 *	3.7 ± 0.3	3.8 ± 0.3
Cl (mEq/L)	106 ± 1	105 ± 2	106 ± 2	105 ± 1	105 ± 2	105 ± 2
Ca (mg/dL)	10.3 ± 0.2	10.3 ± 0.3	10.1 ± 0.2	10.0 ± 0.4	10.3 ± 0.2	10.3 ± 0.3
IP (mg/dL)	6.8 ± 0.4	7.2 ± 1.0	7.5 ± 1.0	6.9 ± 0.7	6.7 ± 0.3	7.9 ± 0.7 **
Female (dam)						
No. of animals examined	12	12	11	10	Satellite female 5	5
Total protein (g/dL)	6.3 ± 0.3	6.4 ± 0.3	6.5 ± 0.6 *	6.6 ± 0.2 *	7.1 ± 0.2	6.9 ± 0.7
Albumin (g/dL)	3.5 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.3 **	3.7 ± 0.3 *	4.1 ± 0.4	4.0 ± 0.3
A/G ratio	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.2
Total bilirubin (mg/dL)	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.19 ± 0.05	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.03
Glucose (mg/dL)	150 ± 24	164 ± 20	163 ± 29	151 ± 28	146 ± 17	148 ± 24
Total cholesterol (mg/dL)	70 ± 9	70 ± 9	74 ± 17	87 ± 15 *	73 ± 13	76 ± 17
Triglyceride (mg/dL)	61 ± 32	66 ± 36	97 ± 51	70 ± 34	17 ± 5	13 ± 5
Phospholipid (mg/dL)	140 ± 16	145 ± 16	160 ± 34	179 ± 30 **	135 ± 21	137 ± 23
AST (IU/L)	92 ± 23	85 ± 14	84 ± 17	93 ± 26	48 ± 6	60 ± 7 *
ALT (IU/L)	48 ± 11	47 ± 7	61 ± 20	80 ± 20 **	17 ± 2	23 ± 5 *
LDH (IU/L)	94 ± 41	93 ± 32	79 ± 34	113 ± 64	49 ± 17	51 ± 17
ALP (IU/L)	256 ± 69	267 ± 49	348 ± 157	394 ± 107 **	140 ± 58	169 ± 51
γ-GTP (IU/L)	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 0	2 ± 1
CK (IU/L)	94 ± 16	90 ± 17	93 ± 22	106 ± 28	62 ± 7	79 ± 26
BUN (mg/dL)	15.9 ± 3.3	14.9 ± 3.8	14.6 ± 4.5	13.8 ± 4.4	13.9 ± 1.2	15.5 ± 3.2
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Na (mEq/L)	142 ± 2	142 ± 1	142 ± 2	142 ± 1	141 ± 2	141 ± 1
K (mEq/L)	3.5 ± 0.5	3.4 ± 0.4	3.0 ± 0.3 **	3.6 ± 0.3	3.3 ± 0.4	3.7 ± 0.2
Cl (mEq/L)	105 ± 2	105 ± 2	104 ± 3	105 ± 2	107 ± 1	105 ± 2
Ca (mg/dL)	10.9 ± 0.4	10.9 ± 0.2	10.9 ± 0.8	11.2 ± 0.6	10.4 ± 0.3	10.6 ± 0.4
IP (mg/dL)	8.9 ± 1.3	8.7 ± 1.1	8.6 ± 1.4	9.7 ± 1.6	5.8 ± 0.5	7.9 ± 1.8

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Table 6 Organ weights of rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
No. of animals examined	7	12	12	6	5	5
Body weight	(g) 497 ± 28	496 ± 30	476 ± 26	431 ± 36 **	537 ± 34	466 ± 30 **
Thymus	(g) 0.447 ± 0.088	0.417 ± 0.069	0.397 ± 0.077	0.363 ± 0.081	0.406 ± 0.111	0.454 ± 0.084
	(%) 0.090 ± 0.018	0.084 ± 0.012	0.083 ± 0.015	0.084 ± 0.015	0.076 ± 0.020	0.097 ± 0.013
Adrenals	(g) 0.071 ± 0.007	0.072 ± 0.009	0.073 ± 0.005	0.071 ± 0.005	0.072 ± 0.007	0.084 ± 0.006 *
	(%) 0.014 ± 0.001	0.015 ± 0.002	0.015 ± 0.001	0.016 ± 0.001 *	0.014 ± 0.002	0.018 ± 0.002 **
Heart	(g) 1.409 ± 0.134	1.387 ± 0.088	1.403 ± 0.112	1.349 ± 0.112	1.508 ± 0.126	1.429 ± 0.061
	(%) 0.284 ± 0.022	0.280 ± 0.023	0.295 ± 0.023	0.314 ± 0.030	0.281 ± 0.024	0.307 ± 0.012
Kidneys	(g) 2.898 ± 0.257	2.955 ± 0.258	3.107 ± 0.205	3.110 ± 0.151	3.113 ± 0.314	3.030 ± 0.290
	(%) 0.583 ± 0.031	0.596 ± 0.053	0.653 ± 0.036 **	0.724 ± 0.035 **	0.580 ± 0.052	0.651 ± 0.061
Spleen	(g) 0.707 ± 0.129	0.677 ± 0.076	0.811 ± 0.118	0.777 ± 0.164	0.765 ± 0.142	0.780 ± 0.099
	(%) 0.142 ± 0.023	0.137 ± 0.017	0.171 ± 0.028 *	0.179 ± 0.027 *	0.142 ± 0.023	0.167 ± 0.020
Liver	(g) 12.899 ± 1.704	13.245 ± 0.927	12.922 ± 0.756	13.378 ± 1.795	13.670 ± 1.439	11.982 ± 1.293
	(%) 2.589 ± 0.216	2.669 ± 0.104	2.717 ± 0.152	3.099 ± 0.260 **	2.541 ± 0.165	2.564 ± 0.142
Brain	(g) 2.126 ± 0.084	2.131 ± 0.086	2.142 ± 0.094	2.118 ± 0.057	2.091 ± 0.106	2.187 ± 0.067
	(%) 0.429 ± 0.027	0.430 ± 0.024	0.451 ± 0.030	0.495 ± 0.051 **	0.390 ± 0.013	0.470 ± 0.021 **
Testes	(g) 3.296 ± 0.297	3.260 ± 0.241	3.420 ± 0.268	3.251 ± 0.472	3.307 ± 0.521	3.304 ± 0.243
	(%) 0.664 ± 0.056	0.658 ± 0.053	0.719 ± 0.056	0.758 ± 0.117 *	0.615 ± 0.085	0.709 ± 0.049
Epididymides	(g) 1.312 ± 0.053	1.296 ± 0.105	1.326 ± 0.095	1.112 ± 0.121 **	1.347 ± 0.110	1.184 ± 0.091 *
	(%) 0.265 ± 0.017	0.262 ± 0.022	0.279 ± 0.019	0.259 ± 0.029	0.251 ± 0.021	0.255 ± 0.029
Female (dam)						
No. of animals examined	12	12	11	10	5	5
Body weight	(g) 300 ± 16	293 ± 20	279 ± 32	264 ± 20 **	286 ± 10	270 ± 14
Thymus	(g) 0.250 ± 0.059	0.211 ± 0.058	0.203 ± 0.078	0.183 ± 0.060	0.322 ± 0.084	0.329 ± 0.048
	(%) 0.083 ± 0.018	0.072 ± 0.016	0.071 ± 0.024	0.069 ± 0.019	0.112 ± 0.026	0.122 ± 0.019
Adrenals	(g) 0.077 ± 0.008	0.076 ± 0.009	0.073 ± 0.011	0.072 ± 0.011	0.076 ± 0.010	0.071 ± 0.009
	(%) 0.026 ± 0.003	0.026 ± 0.004	0.026 ± 0.005	0.027 ± 0.005	0.027 ± 0.003	0.026 ± 0.003
Heart	(g) 0.949 ± 0.076	0.951 ± 0.097	0.961 ± 0.113	0.944 ± 0.091	0.964 ± 0.068	0.923 ± 0.137
	(%) 0.317 ± 0.024	0.325 ± 0.032	0.345 ± 0.034	0.359 ± 0.033 **	0.337 ± 0.020	0.341 ± 0.035
Kidneys	(g) 1.754 ± 0.143	1.706 ± 0.160	1.820 ± 0.155	1.817 ± 0.149	1.706 ± 0.091	1.806 ± 0.158
	(%) 0.585 ± 0.038	0.583 ± 0.047	0.659 ± 0.099 **	0.690 ± 0.045 **	0.596 ± 0.038	0.669 ± 0.034 *
Spleen	(g) 0.628 ± 0.085	0.666 ± 0.180	0.659 ± 0.162	0.907 ± 0.221 **	0.533 ± 0.073	0.480 ± 0.069
	(%) 0.210 ± 0.028	0.228 ± 0.064	0.236 ± 0.057	0.345 ± 0.083 **	0.186 ± 0.028	0.177 ± 0.017
Liver	(g) 9.325 ± 0.765	9.666 ± 0.672	9.714 ± 1.333	9.609 ± 1.199	6.881 ± 0.657	6.944 ± 0.811
	(%) 3.111 ± 0.174	3.309 ± 0.265	3.475 ± 0.316 **	3.639 ± 0.310 **	2.404 ± 0.235	2.568 ± 0.181
Brain	(g) 1.939 ± 0.046	1.893 ± 0.084	1.970 ± 0.053	1.978 ± 0.078	1.991 ± 0.071	1.992 ± 0.090
	(%) 0.649 ± 0.032	0.648 ± 0.043	0.714 ± 0.085 *	0.755 ± 0.078 **	0.695 ± 0.030	0.740 ± 0.040

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Table 7 Histopathological findings of male rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		At the end of administration period				At the end of recovery period	
		0	100	300	1000	0	1000
No. of animals examined		<7>	<5>	<5>	<6>	<5>	<5>
(Liver)	(Grade)						
hepatocellular hypertrophy: central	+	0	0	0	6 **	0	0
inflammatory cell nest	+	0	0	0	0	0	1
(Spleen)							
deposit of hemosiderin	+	0	0	0	5 **	0	4 **
extramedullary hematopoiesis	+	0	0	0	0	0	1
No. of animals examined		<7>	<12>	<12>	<6>	<5>	<5>
(Testis)							
germ cell necrosis	+	0	0	0	0	0	2
	2+	0	0	0	1	0	0
vacuolization: seminiferous tubule	+	0	0	0	5	0	2
	2+	0	0	0	1	0	2
					**		**
multinucleated giant cell formation	2+	0	0	0	1	0	0
atrophy	+	0	2	1	0	1	0
(Epididymis)							
spermatogenic granuloma	+	0	1	0	0	0	0
debris of spermatogenic elements	+	0	0	0	1	0	2
(Prostate)							
inflammation	+	3	2	3	0	1	0
No. of animals examined		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
(Heart)							
inflammatory cell nest	+	2	2	0	0	2	0
(Lung)							
inflammatory infiltration	+	1	0	0	0	0	0
(Parathyroid)							
cyst	+	1	0	0	0	0	0
(Small intestine)							
inflammatory infiltration	+	0	0	0	1	0	0
(Large intestine)							
inflammatory infiltration	+	0	0	0	1	0	0

Grade; +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

Data represent the number of animals.

Significant difference from the control group, ** $p \leq 0.01$.

Table 8 Histopathological findings of female rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		At the end of administration period				Dead		At the end of recovery period	
		0	100	300	1000	(300)	(1000)	0	1000
No. of animals examined		<12>	<5>	<5>	<11>	<1>	<1>	<5>	<5>
(Liver)	(Grade)								
extramedullary hematopoiesis	+	0	0	0	4 *	0	0	0	0
inflammatory cell nest	+	0	0	0	0	0	0	0	1
(Kidney)									
inflammation: pelvis	+	1	0	0	0	0	0	0	0
vacuolic change: proximal tubule	+	0	0	1	0	0	0	0	0
(Spleen)									
deposit of hemosiderin	+	0	0	0	3	0	1	5	0
	2+	0	0	0	0	0	0	0	5
extramedullary hematopoiesis	+	2	1	0	7	0	0	0	0
	2+	0	0	0	1	0	0	0	0
atrophy	2+	0	0	0	0	1	1	0	0
No. of animals examined		<5>	<5>	<5>	<5>	<1>	<1>	<5>	<5>
(Lung)									
accumulation of foamy cells	+	0	0	0	1	0	0	0	0
(Thymus)									
atrophy	+	0	0	0	1	0	0	0	0
	2+	0	0	0	1	1	1	0	0
	3+	0	0	1	0	0	0	0	0
(Stomach)									
squamous cell hyperplasia: forestomach	+	0	0	1	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	1	0	0	0	0
inflammation: forestomach	2+	0	0	0	1	0	0	0	0

Grade; +: slight, 2+: moderate, 3+: marked

Data represent the number of animals.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Table 9 Estrous cycle and reproductive performance of rats treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	100	300	1000
Estrous cycle				
No. of animals examined	12	12	12	12
Normal ^{a)}	12	12	11	8
Abnormal ^{a), c)}	0	0	1	4
Cycle (days) ^{b), d)}	4.0 ± 0.1	4.2 ± 0.4	4.2 ± 0.4	4.2 ± 0.4
Reproductive performance				
No. of mated pairs	12	12	12	12
No. of copulated pairs	12	12	12	12
Copulation index (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Pairing days until copulation ^{b)}	2.3 ± 1.2	1.8 ± 0.6	2.9 ± 0.9	2.9 ± 1.5
No. of pregnant females	12	12	12	11
Fertility index (%)	100.0	100.0	100.0	91.7
No. of females with complete parturition	12	12	11	10
Gestation index (%)	100.0	100.0	91.7	90.9
Gestation length (days) ^{b)}	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0	22.1 ± 0.3	22.5 ± 0.5 **
Findings in parturition ^{a)}				
No abnormalities detected	12	12	11	10
Findings in lactation ^{a)}				
No abnormalities detected	12	12	10	9
Neglect of nursing care	0	0	1	1

^{a)} Data represent the number of animals.

^{b)} Data represent mean ± S.D.

^{c)} Continuous 7-day or longer diestrus.

^{d)} Data was calculated except for animals showing abnormal estrous cycles.

Copulation index = (No. of copulated pairs / No. of mated pairs) × 100.

Fertility index = (No. of pregnant females / No. of copulated pairs) × 100.

Gestation index = (No. of females with complete parturition / No. of pregnant females) × 100.

Significant difference from the control group, ** p ≤ 0.01.

Table 10 Summary of implantation and development of pups from dams treated orally with 2,3,5-trimethylphenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		100		300		1000	
No. of corpora lutea	15.3 ± 1.8	(12)	14.8 ± 1.7	(12)	15.8 ± 1.4	(12)	13.8 ± 1.0	(11)
No. of implantations	14.8 ± 1.9	(12)	14.3 ± 1.7	(12)	15.1 ± 1.4	(12)	12.6 ± 2.7 *	(11)
Implantation index (%)	97.3 ± 4.4	(12)	96.8 ± 4.3	(12)	95.8 ± 5.1	(12)	91.6 ± 18.9	(11)
Postnatal day 0								
No. of pups born	14.0 ± 2.1	(12)	13.1 ± 1.6	(12)	13.5 ± 1.0	(11)	11.3 ± 2.9	(10)
No. of males per group	95	(12)	73	(12)	70	(11)	56	(10)
No. of females per group	72	(12)	84	(12)	77	(11)	57	(10)
Sex ratio of pups born	0.57 ± 0.12	(12)	0.47 ± 0.16	(12)	0.47 ± 0.15	(11)	0.49 ± 0.09	(10)
Delivery index (%)	94.2 ± 5.1	(12)	91.8 ± 9.5	(12)	90.1 ± 6.8	(11)	89.2 ± 10.6	(10)
No. of live pups	13.9 ± 2.2	(12)	13.0 ± 1.5	(12)	13.2 ± 1.0	(11)	10.6 ± 3.0 **	(10)
No. of males per group	95	(12)	73	(12)	68	(11)	52	(10)
No. of females per group	72	(12)	83	(12)	77	(11)	54	(10)
Sex ratio of live pups	0.57 ± 0.12	(12)	0.47 ± 0.16	(12)	0.46 ± 0.15	(11)	0.49 ± 0.11	(10)
Birth index (%)	93.7 ± 5.5	(12)	91.2 ± 9.2	(12)	88.6 ± 9.7	(11)	84.0 ± 13.0	(10)
Live birth index (%)	99.4 ± 2.0	(12)	99.4 ± 2.0	(12)	98.2 ± 6.0	(11)	94.3 ± 10.5	(10)
Pups weight (g)								
Male	6.5 ± 0.4	(12)	6.8 ± 0.3	(12)	6.4 ± 0.9	(11)	6.6 ± 1.1	(10)
Female	6.2 ± 0.4	(12)	6.4 ± 0.2	(12)	6.1 ± 0.8	(11)	6.2 ± 1.0	(10)
Postnatal day 4								
No. of live pups	13.8 ± 2.1	(12)	13.0 ± 1.5	(12)	12.0 ± 4.1	(11)	9.6 ± 4.4 *	(10)
No. of males per group	95	(12)	73	(12)	62	(11)	48	(10)
No. of females per group	70	(12)	83	(12)	70	(11)	48	(10)
Sex ratio of live pups	0.57 ± 0.11	(12)	0.47 ± 0.16	(12)	0.46 ± 0.16	(10)	0.50 ± 0.11	(9)
Viability index (%)	98.8 ± 2.7	(12)	100.0 ± 0.0	(12)	90.2 ± 30.0	(11)	89.2 ± 31.4	(10)
Pups weight (g)								
Male	9.9 ± 1.0	(12)	10.8 ± 0.9	(12)	10.3 ± 1.7	(10)	11.5 ± 1.9	(9)
Female	9.5 ± 1.1	(12)	10.3 ± 0.8	(12)	9.9 ± 1.7	(10)	10.9 ± 1.9	(9)

Data represent mean ± S.D.

Parentheses represent the number of litters examined.

Implantation index = (No. of implantations / No. of corpora lutea) × 100.

Sex ratio of pups born = No. of male pups born / No. of male and female pups born.

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

Sex ratio on day 0 = No. of male live pups on day 0 / No. of live pups on day 0.

Birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of implantations) × 100.

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

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

Sex ratio on day 4 = No. of male live pups on day 4 / No. of live pups on day 4.

Significant difference from the control group, * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01.