

資料 3 - 1 - 5

既存化学物質の人健康影響に関する情報（第一種特定化学物質審議関係②）

（平成 17 年 11 月 18 日）

No. 6 1, 1-ビス (tert-ブチルジオキシ) -3, 3, 5-トリメチルシクロヘキサン ……p. 1

No. 18 2, 4-ジ-tert-ブチル-6-(5-クロロ-2H-1, 2, 3-ベンゾトリアゾール-2-イル)フェノール…p. 165

1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

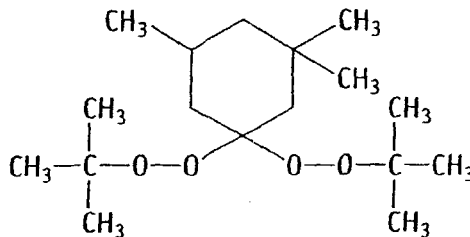
[CAS No. 6731-36-8]

1,1-Bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane

1,1-ビス(*tert*-ブチルペルオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

Molecular formula: C₁₇H₃₄O₄

Molecular weight: 302.45



ABSTRACT

A single dose oral toxicity test of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane revealed an LD₅₀ value of more than 2000 mg/kg for both sexes.

1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane was studied for oral toxicity in rats in a 28-day repeat dose toxicity test at doses of 0, 100, 300 and 1000 mg/kg. One male animal in the 1000 mg/kg group died during the recovery period. Repeated administration of test substance caused centrilobular hypertrophy of hepatocytes in the female animals given 100 mg/kg and more, and in the male animals given 300 mg/kg and more. The female animals receiving 100 mg/kg and more also showed enhanced periportal fatty change and a decreased A/G ratio. In addition, in the 1000 mg/kg group, animals of both sexes demonstrated a prolonged blood coagulation time, and increased GPT activity, suggesting hepatic dysfunction. In the male animals given 100 mg/kg and more, intracytoplasmic eosinophilic inclusive bodies appeared in the proximal renal tubules, suggesting renal toxicity of the test substance. Thus, the NOEL for the 28-day repeat dose oral toxicity test of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane is considered to be less than 100 mg/kg/day for males and females.

Genotoxicity of 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane was studied by the reverse mutation test in bacteria and by the chromosomal aberration test in cultured Chinese hamster lung (CHL/IU) cells.

1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane was not mutagenic in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2 *uvrA*, with or without an exogenous metabolic activation system.

1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane did not induce chromosomal aberrations in CHL/IU cells, with and without an exogenous metabolic activation system.

SUMMARIZED DATA FROM THE STUDIES

1. Single Dose Oral Toxicity ¹⁾

Purity	: 97.9 %
Test species/strain	: Rat/Crj:CD(SD)IGS
Test method	: OECD Test Guideline 401
Route	: Oral (gavage)
Doses	: Males, 0 (vehicle), 1000, 2000 mg/kg Females, 2000 mg/kg
Number of animals/group	: Males, 5; females, 5
Vehicle	: Corn oil
GLP	: Yes

Test results:

No death occurred in any group. Clinical signs of diarrhea or soft feces were observed in all groups on the treatment day. No effects were found on body weight or autopsy findings.

The LD₅₀ value was concluded to be more than 2000 mg/kg for both sexes.

2. Repeat Dose Toxicity ¹⁾

Purity	: 97.9 %
Test species/strain	: Rat/Crj:CD(SD)IGS
Test method	: Guideline for 28-Day Repeated Dose Toxicity Test in Mammalian Species (Chemical Substances Control Law of Japan)
Route	: Oral (gavage)
Doses	: 0 (vehicle), 100, 300, 1000 mg/kg/day
Number of animals/group	: Males, 10; females, 10 (0, 1000 mg/kg) Males, 5; females, 5 (100, 300 mg/kg)
Vehicle	: Corn oil
Administration period	: Males and females, 28 days
Terminal kill	: Males and females, on days 29 and 43
GLP	: Yes

Test results:

No deaths occurred during the administration period, but one male animal in the 1000 mg/kg group died on the 3rd day of the recovery period. On hematological examination, animals of both sexes in the 1000 mg/kg group showed a tendency for prolongation or significant prolongation of prothrombin and activated partial thromboplastin time. Regarding blood chemistry, male animals in the 1000 mg/kg group showed a significant decrease in plasma glucose and a significant increase in GPT activity. The female animals in this group showed significant increases in γ -GTP activity and total protein level in addition to increase in GPT activity. Females receiving 100 mg/kg showed a significant decrease in albumin level. The A/G ratio in the test substance groups was significantly decreased. Dose-dependent increases in organ weights of the liver and the kidneys were observed in the animals of both sexes of the test substance groups. Histopathological examination revealed centrilobular hypertrophy of hepatocytes which became evident dose-dependently in male animals given 300 mg/kg and more, and in the female animals given 100 mg/kg and more. Dose-dependent periportal fatty change was found in female animals. In the kidneys of all the male animals of

the test substance groups intracytoplasmic eosinophilic inclusion bodies and eosinophilic bodies were found in the proximal tubules and the degree of the former increased with increasing dose.

Thus, the NOEL for the 28-day repeat dose toxicity is considered to be less than 100 mg/kg/day for males and females.

3. Genetic Toxicity

3-1. Bacterial test ²⁾

Purity	:	97.9 %
Test species/strain	:	<i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA1535, TA98, TA1537, <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>
Test method	:	Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Chemical Substances Control Law of Japan) and OECD Test Guideline 471
Procedures	:	Pre-incubation method
Solvent	:	DMSO
Positive controls	:	-S9 mix; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (TA100, TA98, WP2 <i>uvrA</i>), Sodium azide (TA1535) and 9-Aminoacridine (TA1537) +S9 mix; 2-Aminoanthracene (all strains)
Doses	:	-S9 mix; 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 μ g/plate +S9 mix; 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 μ g/plate
S9	:	Rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone
Plates/test	:	3
Number of replicates	:	2
GLP	:	Yes

Test results:

This chemical did not induce gene mutations in the *S. typhimurium* and *E. coli* strains. Toxicity was not observed in any strain, with and without S9 mix.

Genotoxic effects:

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537

	+	?	-
Without metabolic activation:	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[]	[*]

Escherichia coli WP2 *uvrA*

	+	?	-
Without metabolic activation:	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[]	[*]

3-2. Non-bacterial *in vitro* test (chromosomal aberration test) ²⁾

Purity	: 97.9 %
Type of cell used	: Chinese hamster lung (CHL/IU) cells
Test method	: Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Chemical Substances Control Law of Japan) and OECD Test Guideline 473
Solvent	: DMSO
Positive controls	: -S9 mix; 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine +S9 mix; 3,4-Benz[<i>a</i>]pyrene
Doses	: -S9 mix (6 hr short-term treatment) : 0, 93.75, 187.5, 375, 750, 1500, 3000 $\mu\text{g/mL}$ +S9 mix (6 hr short-term treatment) : 0, 375, 750, 1500, 3000 $\mu\text{g/mL}$ -S9 mix (24 hr continuous treatment) : 0, 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$
S9	: Rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone
Plates/test	: 2
GLP	: Yes

Test results:

With 6 hr short-term treatment, chromosomal aberrations were not induced with and without S9 mix. Moreover, chromosomal aberrations were not induced after 24 hr continuous treatment without S9 mix.

Cytotoxicity was not observed in the 6 hr short-term treatment with and without S9 mix and the 24 hr continuous treatment without S9 mix.

Genotoxic effects:

	clastogenicity			polyploidy		
	+	?	-	+	?	-
Without metabolic activation:	[]	[]	[*]	[]	[]	[*]
With metabolic activation:	[]	[]	[*]	[]	[]	[*]

- 1) The tests were performed by the Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523, Japan. Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627
- 2) The tests were performed by the Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology, 3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi, Kanagawa 229-1132, Japan. Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの ラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in Rats

要約

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの1000および2000 mg/kgを1群5匹からなる5週齢の雄ラットに、雌ラット5匹には2000 mg/kgを単回経口投与した。媒体対照として、雄5匹にコーン油を投与した。

全投与群で投与日に下痢便あるいは軟便の排泄がみられた。体重の推移および剖検所見には、変化は認められなかった。

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのLD₅₀値は、雌雄ともに2000 mg/kgを上回ると推定された。

方法

1. 被験物質

被験物質として、日本油脂(株)(愛知)より提供された無色透明の液体である1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン(Lot No.8X01, 純度97.9%)を用いた。受領物質は、使用時まで冷蔵保管した。なお試験終了後、残余被験物質を提供元で再分析し、被験物質が試験期間中安定であったことを確認した。

投与検体の調製においては、各用量毎に被験物質を秤量し、所定濃度となるようにコーン油(Lot No.V8P7069, ナカライテスク(株))を加えて溶解し、投与時まで冷蔵・遮光下で保存し、調製3日後に使用した。なお、2および20 w/v%に調製した被験物質は、冷蔵、遮光条件下で12日間安定であることを確認した。また、各投与検体の含量を測定した(95.7~99.9%)。

2. 使用動物および飼育方法

4週齢のSprague-Dawley系(Crj:CD(SD)1GS)雌雄ラットを、日本チャールス・リバー(株)筑波飼育センターから購入し、検疫と馴化を兼ねて8日間予備飼育した。試験には、予備飼育中、動物の一般状態に異常が認められなかった雄15匹、雌5匹を用い、雄は検疫終了時の体重を基に体重別層化無作為抽出法により1群5匹からなる3群に分け、雌は無作為に5匹を選んで1群とした。投与開始時の週齢は雌雄ともに5週齢であり、体重は雄が123.8~144.3g、雌が109.6~121.4gであった。

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し、温度23~25℃、湿度50~65%、換気回数約15回/時、照明12時間(7時~19時点灯)に設定された

飼育室で、固型飼料(CE-2, 日本クレア(株))および水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。

3. 投与量の設定および投与方法

投与量は、文献調査(RTECS No.:SD8600000)の結果および本被験物質のラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験の予備試験の結果に基づいて決定した。すなわち、本被験物質のラットにおける単回投与時のLD₅₀値は12918 mg/kgであり、予備試験において1000 mg/kgを投与した雌で投与初期に体重の増加抑制が認められたことから、雄では、1000および2000 mg/kgの2用量を設定し、加えて媒体対照群としてコーン油を被験物質投与群と同容量投与する群を設けた。また、予備試験では明らかな性差は認められなかったことから、雌については、2000 mg/kgの1用量を設定した。

投与容量は体重1kg当たり10 mLとし、動物を約18時間絶食させた後、投与直前に測定した体重を基に投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて強制的に単回経口投与した。給餌は投与後約3時間に行った。

4. 観察および検査

観察第1日(投与日)から14日間にわたって死亡の有無を確認し、各動物の一般状態を観察した。観察は投与日においては投与直後から1時間まで連続して行い、その後は投与後6時間まで約1時間間隔で実施した。観察第2日から15日までは毎日1回行った。

体重は全例について、投与直前、観察第2, 4, 8, 11および15日に測定した。

剖検は、観察第15日に全例をペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血屠殺して実施した。

結果および考察

雌雄ともに、死亡例はなかった。

一般状態では全投与群で投与日に下痢便あるいは軟便の排泄がみられた。また、2000 mg/kg投与群の雄3例では投与日あるいは観察第2日に肛門周囲の汚れが観察された。

体重は、雌雄ともに順調に増加した。

剖検においても雌雄いずれの器官・組織にも変化は認められなかった。

以上の結果から、1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのLD₅₀値は、雌雄ともに2000 mg/kgを上回ると推定された。

文献

- 1) 三井雅之, 古川文夫, 鈴木順子, 榎並倫宣, 西川秋佳, 高橋道人, 国立衛生試験所報告, 110, 42(1992).

連絡先

試験責任者: 永田伴子
試験担当者: 勝村英夫, 松本浩孝, 堀内伸二,
三枝克彦, 稲田浩子, 安生孝子
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tomoko Nagata (Study director)
Hideo Katsumura,
Hirotaka Matsumoto,
Shinji Horiuchi, Katsuhiko Saegusa,
Hiroko Inada, Takako Anjo
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center,
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,
Japan.
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンのラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in Rats

要約

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系ラットを用いて実施した。投与量は雌雄とも0(対照群), 100, 300および1000 mg/kgとし, 0および1000 mg/kg投与群は回復試験の動物を含む1群10匹, 100および300 mg/kg投与群は1群5匹を使用して試験を行った。

その結果, 投与期間中に死亡例はみられなかったが, 回復第3日に1000 mg/kg投与群の雄1例が死亡した。

一般状態の変化としては, 投与第2日以降, 雄では300 mg/kg以上の投与群, 雌では100 mg/kg以上の投与群で, 投与後に一過性の流涎が認められた。また, 1000 mg/kg投与群の雌雄で投与第1週ないし2週の摂餌量が低値を示した。血液学検査では, 1000 mg/kg投与群の雌雄でプロトロンビン時間の延長あるいは延長傾向と活性部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。さらに, 1000 mg/kg投与群の雌では, 血色素量の減少がみられたが, 骨髓像には, 雌雄とも対照群と比較して著しい差は認められなかった。血液生化学検査では, 1000 mg/kg投与群において, ブドウ糖濃度の低下が雄に, GPT活性の上昇が雌雄に, γ -GTP活性の上昇が雌にそれぞれ認められた。また, 雌では, 総蛋白濃度の上昇が1000 mg/kg投与群に, アルブミン濃度の低下が100 mg/kg投与群にそれぞれ認められ, 被験物質投与群では, いずれもA/G比が有意な低値を示した。さらに, 300 mg/kg以上の投与群では, 雌で総コレステロール濃度の上昇がみられ, 雄でトリグリセライド濃度の低下が認められた。器官重量では, 雌雄とも用量に依存して肝臓および腎臓の重量が増加した。その他, 雌の被験物質投与群では, いずれも副腎の絶対重量に増加がみられ, 相対重量においても増加あるいは増加傾向が認められた。投与期間終了時の主な剖検所見としては, 1000 mg/kg投与群の一部の例に, 肝臓の暗色化, 大型化あるいは小葉像の明瞭化が観察された。病理組織学検査では, 肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が, 雄では300 mg/kg以上, 雌では100 mg/kg以上の投与群に観察され, 用量に依存してその程度が増強した。さらに, 肝臓の門脈周囲性の脂肪化が雌では用量に依存して増強した。腎臓では, 雄の被験物質投与群の全例に, 近位尿細管の好酸性細胞質内封入体と好酸性小体が観察され, 好酸性細胞質内封入体の程度は用量に依存して増強した。副腎では, 雌の被験物質投与群の多くの例に束状帯細胞の細胞

質肥大が観察された。

回復第3日の死亡例の主な所見としては, 投与期間終了時と同様な所見に加え, 脳および脊髄の硬膜下, 膀胱, 胸腺, 腸間膜リンパ節, 下顎リンパ節の出血のほか, 精巣, 精巣上体, 前立腺の間質に出血が認められた。

回復期間終了時の検査では, 被験物質投与群の雌雄でヘマトクリット値の減少がみられたほか, 血色素量の減少が雌に, また, 平均赤血球血色素濃度の上昇が雄に認められた。また, 被験物質投与群の雄では, 腎臓の好塩基性尿細管が観察される例が多く, その程度も増強した。しかし, 投与期間終了時にみられた他の変化は消失あるいは軽減する傾向にあった。

以上のことから, 本試験条件下における1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの無影響量は, 雌雄とも100 mg/kg未満であると判断された。

方法

1. 被験物質

被験物質として, 日本油脂(株)(愛知)より提供された1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン(ロット番号:8X01, 純度:97.9%)を用いた。提供された被験物質は, 使用時まで冷蔵保管した。なお, 被験物質の試験期間中の安定性は, 残余被験物質を提供元で再分析することにより確認した。

投与検体は, 用量ごとに被験物質を秤量し, 所定濃度となるようにコーン油(ロット番号:V8P7069, ナカライテスク(株))を加えて溶解して調製した。なお, 初回に調製した各濃度の投与検体の含量測定を実施した結果, 溶液中の被験物質の平均含量は, 所定濃度の96.9~101%であった。また, 動物試験に先立って, 被験物質の2および20 w/v%溶液の安定性を調べたところ, 調製後, 冷蔵, 遮光条件下で12日間は安定であることが確認されたため, 投与検体は1週に1回の割合で調製し, 使用時まで冷蔵, 遮光条件下で保管した。

2. 動物および飼育方法

試験には, 生後4週で購入し, 検疫を兼ねて9日間予備飼育した雌雄のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS, 日本チャールス・リバー(株))各30匹を使用した。

群分けは, 検疫期間中に異常がなかった動物を用い, 投与開始前日の体重に基づいて体重別層化無作為抽出法

により行った。動物数は、雌雄とも対照群および高用量群を各10匹とし、低および中用量群を各5匹とした。

動物は、温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度50~65%、換気回数約15回/時、照明12時間(7~19時点灯)に設定した飼育室内で、金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア(株))および水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。

3. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は、投与量設定のための予備試験の結果に基づき決定した。すなわち、1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンを0, 500および1000 mg/kgの用量で7日間反復投与することにより、雌雄とも500 mg/kg以上の投与群で、投与直後に一過性の流涎がみられ、1000 mg/kg投与群の雌では、投与初期に体重の軽度な増加抑制が認められたが、その他には被験物質投与に起因したと考えられる明らかな変化は認められなかった。以上のことから、1000 mg/kgは、28日間の反復投与に耐えうる用量であると判断し、本試験の用量は、雌雄とも高用量を1000 mg/kgとし、以下公比約3で除して300および100 mg/kgを中用量および低用量とした。また、雌雄とも媒体であるコーン油を投与する対照群を設けた。

投与経路は強制経口投与とし、1日1回、28日間、ラット用胃管を用いて投与した。投与容量は5 mL/kgとし、投与量は雌雄とも最近時の体重をもとに個別別に算出した。なお、回復期間は14日間とした。

4. 観察および検査

1) 一般検査

毎日(投与期間中は投与前および投与後)全例の一般状態を観察した。また、体重は、投与第1週に投与第1日の投与直前と4日、投与第2週以降回復期間終了週までは1週に2回の頻度で測定し、その他、投与期間終了日、回復期間終了日および剖検日ならびに死亡時にも測定した。摂餌量は、投与第1週では、投与第1日から2日にかけて1日あたりの摂餌量を測定し、以後回復期間終了週まで毎週1回の頻度で測定した。

2) 尿検査

各群とも生存している全例について、投与第4週および回復第2週に代謝ケージに収容して蓄尿し、約4時間の時点で採尿した。この4時間尿を用いて、pH、潜血、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンを試験紙法(クリニテック200+, バイエル・三共(株))により、また色調および濁度を視診により検査した。

3) 血液学検査

投与期間ないし回復期間終了日から翌日の剖検日にかけて定期解剖例全例を18から24時間絶食させ、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈よりEDTA 2Kを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コルターエレクトロニクス(株))によ

り赤血球数、白血球数、平均赤血球容積、血小板数(以上、電気抵抗法)および血色素量(吸光度法)を測定し、これらを基にヘマトクリット値、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)および網状赤血球比率(Brecher法)を求めた。また、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液をCA-1000(東亜医用電子(株))によりプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間(光散乱検出法)を測定した。さらに、定期解剖例全例の大腿骨骨髓塗抹標本(Wright-Giemsa染色)を作製し、投与期間終了時の対照群および高用量群について骨髓像検査を実施した。

4) 血液生化学検査

血液学検査用の採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロシュ・ダイアグノスティクス(株))により、総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD・DAOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ・G6PDH法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼ・G.L.DH法)、クレアチニン濃度(Jaffe法)、アルカリフォスファターゼ活性(GSCC法)、GOT活性(IFCC法)、GPT活性(IFCC法)、 γ -GTP活性(γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)、トリグリセライド濃度(GPO・DAOS法)、無機リン濃度(モリブデン酸直接法)、カルシウム濃度(OCPC法)を測定し、A/G比を算出した。また、全自動電解質分析装置(EA05, (株)A&T)により、ナトリウム濃度、カリウム濃度および塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

5) 病理学検査

上記の採血に引き続き、死亡例を除く全例を放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣または精巣、精巣上体の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、脳、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺、上皮小体、心臓、気管、気管支、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、前立腺、精囊、卵巣、子宮、陰、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、骨格筋(下腿部)、坐骨神経、大腿骨骨髓、脾臓、顎下腺、舌下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺、皮膚、病変部を0.1 mol/Lリン酸緩衝液10 vol%ホルマリン溶液(pH 7.2)に固定し、精巣、精巣上体はブアン液に固定した。心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胃、精巣、精巣上体、卵巣および病変部はパラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、先ず、対照群および高用量群について病理組織学検査を実施した。次いで、被験物質投与による影響が疑われた雌雄の肝臓、雄の腎臓および雌の副腎について、全例の病理組織学検査を実施し、さらに、対照群および高用量群の雄の全例の腎臓については、PAS染色標本作製して病理組織学検査を行った。その他、肉眼的異常が認め

られた器官・組織についても病理組織学検査を実施した。なお、死亡例は器官重量を測定せず、それ以外は屠殺例と同様の病理学検査を実施した。

5. 統計解析

体重、摂餌量および定期解剖例の血液学検査、血液生化学検査ならびに器官重量について、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群が3群以上の場合は、Dunnett法で多重比較を行い、2群の場合には、Studentのt検定ないしAspin-Welchのt検定を行った。さらに、病理組織学検査所見は、グレード分けしたデータについてMann-WhitneyのU検定を、陽性グレードの合計値についてFisher直接確率の片側検定を行った。なお、これら対照群および被験物質投与群との間の有意差検定はいずれの場合も有意水準を5%とした。

結果

1. 死亡例

投与期間中に死亡例はみられなかったが、回復第3日に1000 mg/kg投与群の雄1例が死亡した。

2. 一般状態

投与第2日以降、投与直後の一過性の流涎が、100 mg/kg投与群の雌1例、300 mg/kg投与群の雄1例、雌3例、1000 mg/kg投与群の雄7例、雌9例に認められた。この流涎は、個体によっては投与時の保定の段階でもみられることがあったが、いずれも投与後概ね1時間以内に消失した。回復第3日に死亡した1000 mg/kg投与群の雄1例では、死亡前日から後肢が麻痺し、歩行不能状態となり、鼻周囲の褐色の汚れ、血尿と考えられる赤色

尿の排泄、立毛が観察された。これらの他には、投与期間および回復期間を通して一般状態に変化は認められなかった。

3. 体重 (Fig. 1, 2)

観察期間中、被験物質投与群では、雌雄いずれにおいても対照群との間に体重の有意な差は認められなかった。

4. 摂餌量 (Fig. 3)

1000 mg/kg投与群の雄では投与第1週に、また、雌では投与第1週および2週に、摂餌量が対照群と比較して有意な低値を示したが、それ以降いずれの被験物質投与群においても摂餌量に有意な差は認められなかった。

5. 尿検査 (Table 1)

投与第4週および回復第2週の検査では、いずれの検査項目においても、被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

6. 血液学検査 (Table 2, 3)

投与期間終了時の1000 mg/kg投与群では、雄にプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。また、雌においても活性部分トロンボプラスチン時間の有意な延長がみられたほか、プロトロンビン時間も延長傾向にあった。さらに、雌では血色素量の有意な減少がみられたほか、白血球分類の好塩基球比率に有意な増加が認められた。骨髓像検査では、1000 mg/kg投与群の雌の組織球比率が増加し、形質細胞比率が減少した。一方、雌雄とも顆粒球系および赤芽球系いずれの比率にも有意な差はないことから、

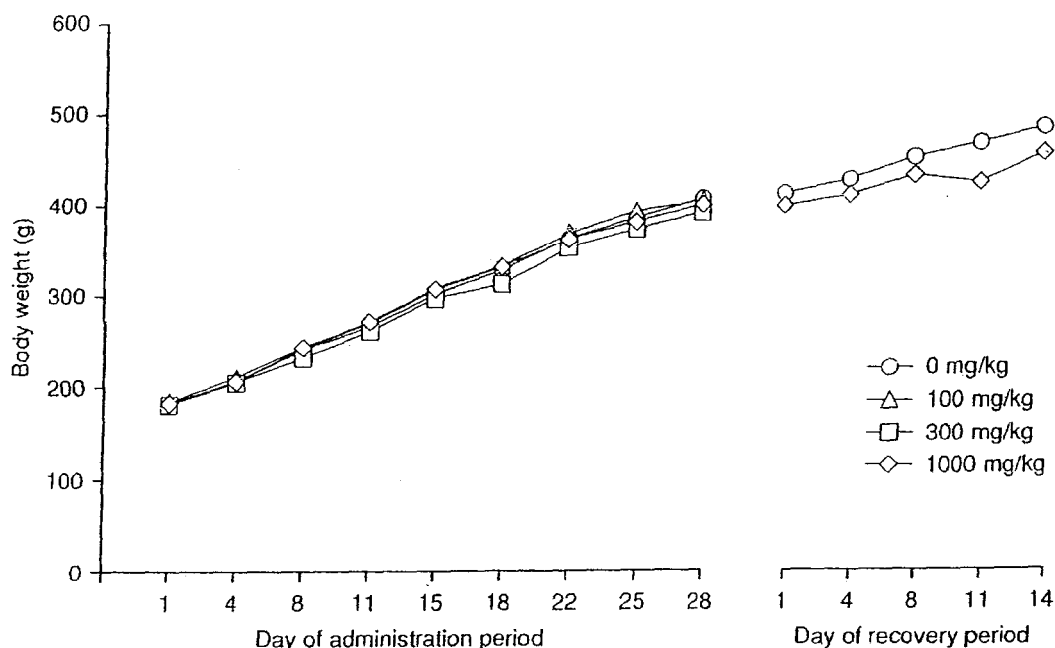


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butylidioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

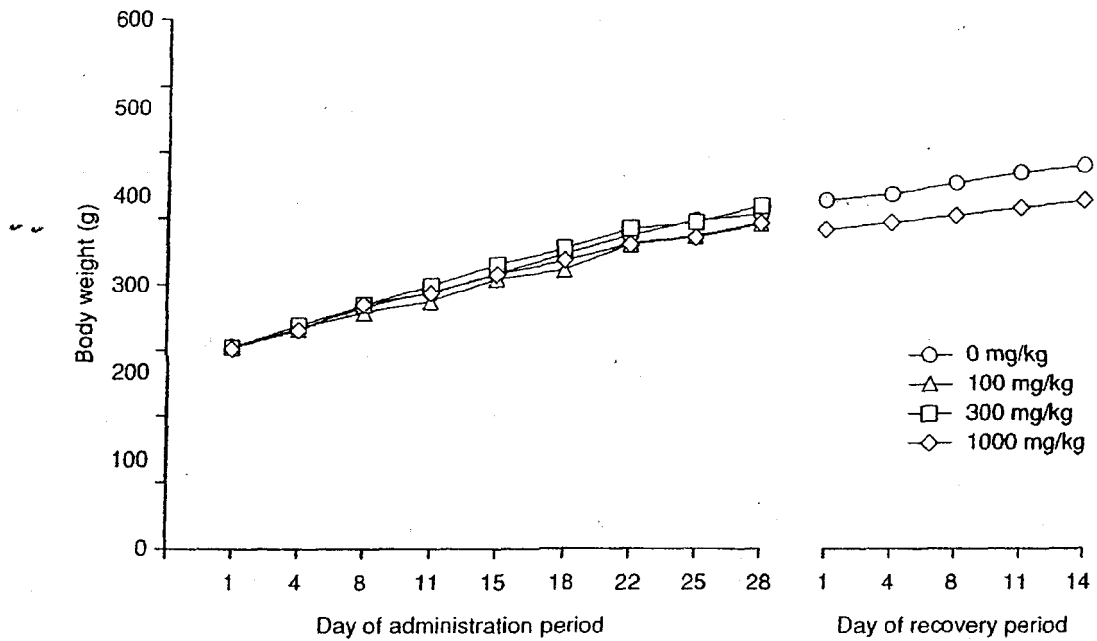


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

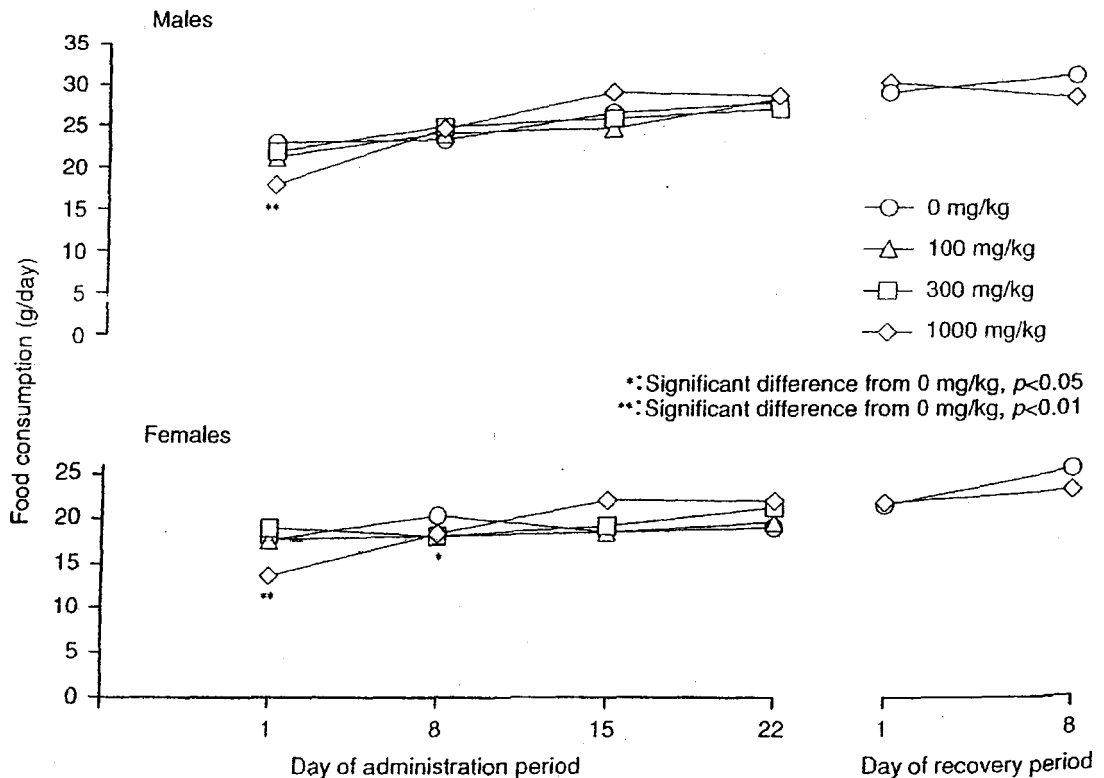


Fig. 3 Food consumption of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

骨髓に対する毒性影響はないと判断し、その他の群では検査を実施しなかった。

回復期間終了時の被験物質投与群では、雌の血色素量に有意な減少が認められたほか、ヘマトクリット値の有

意な減少が雌に、また、平均赤血球血色素濃度の有意な上昇が雄に認められた。一方、投与期間終了時にみられた血液凝固時間の延長は、雌雄とも認められなかった。

7. 血液生化学検査 (Table 4)

投与期間終了時の1000 mg/kg投与群では、ブドウ糖濃度の有意な低下が雄に、GPT活性の有意な上昇が雌雄に、 γ -GTP活性の有意な上昇が雌にそれぞれ認められた。また、雌では、総蛋白濃度の有意な上昇が1000 mg/kg投与群に、アルブミン濃度の有意な低下が100 mg/kg投与群にそれぞれ認められ、雌の被験物質投与群では、いずれもA/G比が有意な低値を示した。さらに、300 mg/kg以上の投与群では、雌に総コレステロール濃度の有意な上昇がみられ、雄にトリグリセライド濃度およびGOT活性の有意な低下が認められた。その他、300 mg/kg投与群の雄では、ナトリウム濃度の有意な上昇とアルカリフォスファターゼ活性の有意な低下が認められた。このうち、300 mg/kg以上の投与群の雄におけるGOT活性の変化は上昇ではなく、低下であること、また、300 mg/kg投与群の雄におけるナトリウム濃度の上昇およびアルカリフォスファターゼ活性の低下は、軽微で、用量に依存した変化ではないことから、いずれも毒性学的意義は乏しいものと考えられる。

回復期間終了時の被験物質投与群では、雄のA/G比が有意な低値を示し、雌でもその値は対照群と比較して低い傾向にあった。その他、被験物質投与群の雌では、無機リン濃度に有意な上昇がみられたが、その値は投与期間終了時の対照群の値と同程度であることから、被験物質投与およびその後続く回復期間に関連のない変化と考えられる。

8. 病理学検査

1) 肉眼所見

(1) 投与期間終了時解剖例

1000 mg/kg投与群の雄4例、雌3例では肝臓の暗色化がみられたほか、大型化が雄2例、雌1例に、また、小葉像の明瞭化が雌1例に認められた。腎臓では、腎盂の拡張が300 mg/kg投与群の雄1例に認められた。胃では、前胃壁の肥厚が1000 mg/kg投与群の雄1例に、また、漿膜面の赤色部が1000 mg/kg投与群の雄2例に認められた。その他、直腸中の軟便が1000 mg/kg投与群の雄1例に、また、肺の暗色点が1000 mg/kg投与群の雄1例に認められた。

(2) 回復期間終了時解剖例

被験物質投与群の雄では、肝臓の淡色点および腎臓の大型化が各1例に認められた。

(3) 死亡例

回復第3日に死亡した1000 mg/kg投与群の雄では、貧血と少量の血性胸水の貯留があり、脳および脊髄の硬膜下、胸腺、膀胱、精巣、精巣上体、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節に出血がみられ、膀胱内には凝血塊が認められた。その他、胸腺、肝臓および腎臓の大型化、腎盂の拡張、前立腺の暗色化が認められた。

2) 器官重量 (Table 5)

投与期間終了時の被験物質投与群では、肝臓および腎臓の重量が用量に依存して増加した。すなわち、肝臓の

絶対重量は、1000 mg/kg投与群の雄および300 mg/kg以上の投与群の雌に、また、相対重量は、300 mg/kg以上の投与群の雄および100 mg/kg以上の投与群の雌に有意な増加が認められた。腎臓の絶対重量は、300 mg/kg以上の投与群の雌に、また、相対重量は、300 mg/kg以上の投与群の雄および1000 mg/kg投与群の雌に有意な増加が認められた。その他、雌の被験物質投与群では、いずれも副腎の絶対重量に有意な増加がみられ、相対重量においても有意な増加あるいは増加傾向が認められた。

回復期間終了時の被験物質投与群では、雌雄の肝臓および腎臓の相対重量に有意な増加がみられた。このほか、雄の脾臓および雌の脳の相対重量と、卵巣の絶対および相対重量に有意な増加が認められたが、いずれも投与期間終了時には変化がなく、その程度も軽度であった。

3) 病理組織学検査 (Table 6)

(1) 投与期間終了時解剖例

肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が、雄では300 mg/kg以上の投与群、雌では100 mg/kg以上の投与群に観察され、用量に依存してその程度が増強した。さらに、雌では肝臓の門脈周囲性の脂肪化が被験物質投与群で増強した。腎臓では、雄の被験物質投与群の全例に、近位尿細管の好酸性細胞質内封入体(PAS染色陰性)が観察され、用量に依存してその程度が増強し、さらに、好酸性小体も被験物質投与群の全例に観察された。また、300および1000 mg/kg投与群の雄の各3例には蛋白円柱が認められた。副腎では、雌の各被験物質投与群とも5例中4例に、束状帯細胞の細胞質肥大が認められた。その他、自然発生性の所見が観察されたが、いずれも対照群と比較してその程度あるいは頻度に有意差のある変化ではなかった。なお、肉眼的に病変がみられた部位の所見として、胃の漿膜面に赤色部が観察された1000 mg/kg投与群の雄2例中1例では、前胃粘膜下織の出血が認められたが、他には組織学的に異常はなかった。

(2) 回復期間終了時解剖例

被験物質投与群の雄では、腎臓の好塩基性尿細管が観察される例が多く、その程度も増強し、1例には蛋白円柱が認められた。なお、投与期間終了時に被験物質投与群の雌雄にみられた肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大、雄にみられた腎臓の近位尿細管の好酸性細胞質内封入体および雌にみられた副腎の束状帯細胞の細胞質肥大は、回復期間終了時の検査ではいずれも消失あるいは軽減する傾向にあった。

(3) 死亡例

回復第3日に死亡した1000 mg/kg投与群の雄では、腎臓の近位尿細管の好酸性細胞質内封入体と好酸性小体、好塩基性尿細管、蛋白円柱、鉍質沈着、腎盂拡張、リンパ球浸潤が認められた。また、肝臓では門脈周囲性の脂肪化、小葉中心性の肝細胞肥大、脾臓では髓外造血、褐色色素沈着、副腎では束状帯細胞質の脂肪顆粒の増加が観察された。さらに、脊髄硬膜下、胸腺、膀胱、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節の出血のほか、精巣、精巣上

体、前立腺の間質に出血がみられ、膀胱には好中球の浸潤が認められた。

考察

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンを、100、300および1000 mg/kgの用量で雌雄のSprague-Dawley系ラットに28日間にわたって強制経口投与し、その後14日間の回復期間を設けた。

その結果、一般状態の変化としては流涎が、雄では300 mg/kg以上の投与群に、また、雌では100 mg/kg以上の投与群に認められた。流涎は、個体によっては投与時の保定の段階で見られることがあり、いずれも投与後1時間以内に消失する一過性のものであった。その発症例数は用量に依存し、多くは投与第5日以降にみられ、回復期間中にはみられなかったことから、被験物質による味覚刺激等によって成立した条件反射によるものと考えられる。その他、回復第3日に死亡した1例では、死亡前日から後肢が麻痺し、歩行不能状態となり、血尿と考えられる赤色尿の排泄が観察されたが、後肢の麻痺は、後述する脳および脊髄の硬膜下の出血に起因し、血尿は、膀胱の出血によるものと考えられた。

体重および摂餌量の変化として、1000 mg/kg投与群の雌雄で投与第1週ないし2週の摂餌量が、対照群と比較して低かったが、その後の体重および摂餌量には対照群との間で差は認められず、摂餌量の減少は投与初期のみに認められた変化であった。また、尿検査所見には、被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。したがって、被験物質投与により、体重、摂餌量、尿性状には著しい影響を及ぼさないと考えられる。

血液学検査所見として、1000 mg/kg投与群の雌雄にプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。これらの所見に関連して、回復期間中に死亡した1000 mg/kg投与群の雄1例では、脳および脊髄の硬膜下、胸腺、膀胱など複数の器官に出血がみられた。一方、回復期間終了時の検査では、血液凝固時間の延長はみられなかったことから、これらの所見は可逆的変化と考えられる。その成因については、後述するように、1000 mg/kg投与群では肝障害が疑われるため、肝臓での血液凝固因子の生成が障害されたことにより、血液凝固時間の延長がみられた可能性が考えられる。回復期間中に死亡した1例でみられた出血も、同様な障害によって生じた可能性も考えられるが、肝障害の程度はいずれも比較的軽度であることから、その詳細は不明である。また、1000 mg/kg投与群の雌では、投与期間終了時の検査で、血色素量の減少が認められた。回復期間終了時の検査では、雌の血色素量に減少がみられたほか、ヘマトクリット値の減少が雌雄に、平均赤血球血色素濃度の上昇が雄に認められた。マウスに1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンを投与すると、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値および平均赤血球容積の減少がみられ、造血系への影響が示唆されている¹⁾。しかしながら、本試験の投与期間

終了時の骨髄像検査および脾臓の組織学検査では変化が認められなかったことから、本試験の結果からはその機序を明らかにすることはできなかった。

血液生化学検査所見として、1000 mg/kg投与群では、GPT活性の上昇が雌雄に、また、 γ -GTP活性の上昇が雌に、それぞれ認められた。これらは、後述する肝臓の組織所見と関連して、軽度な肝障害がある可能性が示唆された。また、1000 mg/kg投与群の雌に総蛋白濃度の上昇が、また、100 mg/kg投与群の雌にアルブミン濃度の低下が、それぞれ有意な差として認められ、雌の被験物質投与群では、いずれもA/G比が有意な低値を示し、グロブリン濃度の上昇が疑われた。さらに、1000 mg/kg投与群の雄にブドウ糖濃度の低下が認められた。この他、300 mg/kg以上の投与群では、雌に総コレステロール濃度の上昇がみられ、雄にトリグリセライド濃度の低下が認められた。一方、回復期間終了時の検査では、A/G比が被験物質投与群の雄で有意な低値を示し、雌でも対照群と比較して低い傾向にあったが、投与期間終了時にみられたA/G比以外の変化は認められなかった。これらの血液生化学的変化の成因には、肝臓における蛋白合成、脂質代謝あるいは糖代謝の変化が関与している可能性が考えられる。

病理学検査所見として、被験物質投与群では、雌雄とも用量に依存して肝臓の重量が増加し、組織学的には、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が、雄では300 mg/kg以上、雌では100 mg/kg以上の投与群に観察され、用量に依存してその程度が増強した。同様な変化はマウスでも認められ、薬物代謝酵素の誘導が示唆されている²⁾。今回の試験では、これらの変化に加えて、肝臓の門脈周囲性の脂肪化が雌の被験物質投与群では用量に依存して増強し、前述のように、1000 mg/kg投与群ではGPT活性あるいは γ -GTP活性の上昇が認められたことから、軽度ではあるが肝障害作用も示唆された。なお、肝臓の病理学的所見は、投与期間終了後、14日間の回復期間を経ることにより、消失あるいは軽減する傾向にあった。腎臓では、被験物質投与群で重量が増加し、雄の全例に近位尿細管の好酸性細胞質内封入体および好酸性小体が観察され、好酸性細胞質内封入体の程度は用量に依存して増強した。これらの変化に関しては、*tert*-ブチルシクロヘキサンをはじめ、多くの化学物質投与で、雄ラットにおいて同様の好酸性細胞質内封入体が出現する α_2 -globulin nephropathyが認められている³⁾ことから、本試験においても同様な変化が生じたものと考えられる。一方、回復期間終了時の検査では、これらの変化は消失あるいは対照群との差がなくなり、尿細管の再生像とみられる好塩基性尿細管が雄の被験物質投与群で頻度および程度とも増強した。したがって、雄ラットでは1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの投与により腎臓に毒性変化が現れるが、投与中止により、回復傾向を示すことが示唆された。また、雌の被験物質投与群でも腎臓重量の増加がみられたが、組織学的には著しい変化は認められず、重量増加の成因は、本試験では明らかにすることはできなかった。副腎では、雌

の被験物質投与群に重量増加がみられ、組織学的には束状帯細胞の細胞質肥大が認められた。副腎に関する変化は、回復期間終了時には軽減したことから、被験物質投与に起因した変化と考えられるが、その毒性学的意義は不明であった。

以上のように、1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの反復投与により、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が雌では100 mg/kg以上、雄では300 mg/kg以上の用量でみられた。雌ではさらに100 mg/kg以上の用量で門脈周囲性の脂肪化の程度が増強したほか、A/G比の低下が認められた。その他、肝臓に関連する所見として、1000 mg/kgの用量では、雌雄で血液凝固時間の延長、GPT活性の上昇等が認められ、肝障害作用が示唆された。また、肝臓の他に、雄では100 mg/kg以上の用量で腎臓の近位尿細管に好酸性細胞質内封入体が出現し、腎毒性が示唆され、さらに、雌では100 mg/kg以上の用量で副腎の束状帯細胞の細胞質肥大が認められた。これらのことから、本試験条件下における1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサンの無影響量は、雌雄とも100 mg/kg/day未満であると判断された。

文献

- 1) 三井雅之, 古川文夫, 鈴木順子, 榎並倫宣, 西川秋佳, 高橋道人, 衛生試験所報告, **110**, 42(1992).
- 2) M. Mitsui, F. Furukawa, M. Sato, T. Enami, T. Imazawa, A. Nishikawa, M. Takahashi, *Fd Chem. Toxic.*, **31**, 929(1993).
- 3) G. M. Henningsen, K. O. Yu, R. A. Salomon, M. J. Ferry, I. Lopez, J. Roberts, M. P. Servé, *Toxicology Letter*, **39**, 313(1987).
- 4) L. D. Lehman-Mckeeman, α_2 u-Globulin Nephropathy, "Comprehensive Toxicology," Volume 7, Renal Toxicology, Vol. ed. by R. S. Goldstein, eds. by I. G. Sipes, C. A. McQueen, A. J. Gandolfi, Elsevier science Ltd., Oxford, 1997, pp.667-692.

連絡先

試験責任者：畔上二郎
 試験担当者：森村智美, 加藤博康, 関 剛幸,
 新藤智子, 永田伴子, 吉村慎介,
 堀内伸二, 稲田浩子, 三枝克彦,
 安生孝子

財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Jiro Azegami (Study Director)
 Tomomi Morimura, Hiroyasu Katoh,
 Takayuki Seki, Tomoko Shindo,
 Tomoko Nagata, Shinsuke Yoshimura,
 Shinji Horiuchi, Hiroko Inada,
 Katsuhiko Saegusa, Takako Anjo
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,
 Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

28日間反復投与毒性試験

Table 1 Urinalysis of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Dose(mg/kg)	On day 26 of administration period				On day 12 of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
Number of animals	10	5	5	10	5	4
Color	light yellow	9	5	5	10	5
	yellow	1	0	0	0	0
Turbidity ^a	+	0	0	0	0	0
Protein ^b	±	2	1	0	1	1
	+	8	3	4	7	3
	++	0	1	1	2	1
Ketone ^c	±	6	2	1	4	3
	+	0	1	3	2	1
Urobilinogen ^c	±	10	5	5	10	5
Female						
Number of animals	10	5	5	10	5	5
Color	light yellow	9	5	5	9	4
	yellow	1	0	0	1	1
Protein ^b	±	1	0	0	1	0
	+	0	1	3	2	1
Ketone ^c	±	0	1	2	2	1
	+	0	0	0	0	1
Urobilinogen ^c	±	10	5	5	10	4
	+	0	0	0	0	1

a) ±:trace, +:slight b) ±:trace, +:30 mg/dL, ++:100 mg/dL c) ±:0.1 E.U./dL, +:1.0 E.U./dL

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

Table 2 Hematological examination of rats treated orally with 1,1-bis (*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	4
RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	706 \pm 35	683 \pm 27	680 \pm 39	673 \pm 37	795 \pm 32	757 \pm 40
Hemoglobin (g/dL)	14.4 \pm 0.5	14.3 \pm 0.4	14.3 \pm 0.7	14.3 \pm 0.6	15.4 \pm 0.4	15.0 \pm 0.4
Hematocrit (%)	41.8 \pm 1.2	41.0 \pm 1.5	40.7 \pm 2.2	41.0 \pm 1.6	46.2 \pm 1.3	43.1 \pm 1.3**
MCV (μm^3)	59.3 \pm 1.2	60.1 \pm 2.1	59.9 \pm 1.7	61.1 \pm 2.7	58.2 \pm 3.1	57.0 \pm 3.3
MCH (pg)	20.4 \pm 0.6	20.9 \pm 0.8	21.1 \pm 0.7	21.3 \pm 0.7	19.5 \pm 0.8	19.8 \pm 0.9
MCHC (%)	34.5 \pm 0.6	34.8 \pm 0.4	35.3 \pm 0.9	34.7 \pm 0.4	33.4 \pm 0.4	34.8 \pm 0.5**
Reticulocyte (%)	3.0 \pm 0.5	2.6 \pm 0.6	2.7 \pm 0.5	2.5 \pm 0.3	2.4 \pm 0.9	2.5 \pm 0.8
Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	103.1 \pm 7.0	98.2 \pm 8.1	108.4 \pm 6.9	111.0 \pm 4.8	92.5 \pm 7.4	91.8 \pm 9.6
PT (sec)	14.0 \pm 1.4	14.7 \pm 1.6	16.0 \pm 1.8	38.9 \pm 17.9**	14.8 \pm 2.3	12.4 \pm 0.5
APTT (sec)	20.2 \pm 2.3	20.7 \pm 1.6	23.1 \pm 2.2	45.4 \pm 17.0**	18.4 \pm 0.9	18.9 \pm 0.9
WBC ($\times 100/\text{mm}^3$)	83 \pm 21	80 \pm 11	79 \pm 15	88 \pm 29	87 \pm 12	93 \pm 21
Differential leukocyte counts (%)						
Band neutrophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Segmented neutrophil	8 \pm 2	7 \pm 2	10 \pm 3	8 \pm 4	9 \pm 4	12 \pm 9
Eosinophil	0 \pm 1	0 \pm 1	1 \pm 1	0 \pm 0	1 \pm 1	0 \pm 1
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	1 \pm 1	2 \pm 1	1 \pm 0	1 \pm 1	1 \pm 2	2 \pm 2
Lymphocyte	90 \pm 3	91 \pm 2	89 \pm 2	90 \pm 4	89 \pm 5	87 \pm 8
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	701 \pm 15	662 \pm 65	664 \pm 24	678 \pm 20	768 \pm 50	715 \pm 34
Hemoglobin (g/dL)	14.7 \pm 0.3	14.3 \pm 0.7	14.0 \pm 0.4	13.8 \pm 0.4*	15.4 \pm 0.5	14.2 \pm 0.7*
Hematocrit (%)	42.4 \pm 1.3	40.7 \pm 2.9	39.3 \pm 1.0	39.8 \pm 1.8	44.3 \pm 1.6	40.6 \pm 2.0*
MCV (μm^3)	60.4 \pm 2.5	61.6 \pm 1.7	59.2 \pm 2.1	58.8 \pm 2.3	57.8 \pm 2.2	56.8 \pm 1.3
MCH (pg)	21.0 \pm 0.6	21.7 \pm 1.1	21.1 \pm 0.9	20.4 \pm 0.7	20.1 \pm 1.0	19.9 \pm 0.3
MCHC (%)	34.8 \pm 0.9	35.3 \pm 0.9	35.6 \pm 0.3	34.7 \pm 0.7	34.7 \pm 0.7	35.1 \pm 0.8
Reticulocyte (%)	1.6 \pm 0.6	2.8 \pm 1.4	1.9 \pm 0.4	1.9 \pm 0.3	2.3 \pm 0.8	2.2 \pm 0.3
Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	97.5 \pm 6.4	94.2 \pm 12.8	108.8 \pm 11.6	106.4 \pm 10.8	94.4 \pm 4.1	96.8 \pm 6.0
PT (sec)	11.6 \pm 0.3	11.5 \pm 0.4	11.1 \pm 0.3	15.5 \pm 2.4	11.1 \pm 0.3	11.0 \pm 0.4
APTT (sec)	17.8 \pm 1.2	18.4 \pm 1.7	18.7 \pm 1.4	25.8 \pm 3.4**	16.0 \pm 0.5	16.7 \pm 0.8
WBC ($\times 100/\text{mm}^3$)	45 \pm 15	49 \pm 12	42 \pm 14	48 \pm 10	54 \pm 17	47 \pm 7
Differential leukocyte counts (%)						
Band neutrophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Segmented neutrophil	10 \pm 6	11 \pm 5	7 \pm 3	8 \pm 5	7 \pm 4	6 \pm 5
Eosinophil	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	0 \pm 0	1 \pm 1
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	1 \pm 1*	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	2 \pm 2	3 \pm 3	3 \pm 2	2 \pm 1	0 \pm 0	2 \pm 1
Lymphocyte	87 \pm 7	85 \pm 7	89 \pm 3	89 \pm 5	93 \pm 4	91 \pm 5

Values represent mean \pm S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$

** : Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 3 Myelogram of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	End of administration period			
	Male		Female	
	Dose (mg/kg)		Dose (mg/kg)	
	0	1000	0	1000
Number of animals	5	5	5	5
Differential bone marrow cell counts (%)				
Total erythroid cells	30.2 ± 5.7	27.0 ± 2.4	24.0 ± 3.1	24.9 ± 8.9
Proerythroblast	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Basophilic erythroblast	4.5 ± 1.3	3.0 ± 1.1	4.1 ± 0.6	3.6 ± 2.0
Polychromatic erythroblast	16.5 ± 3.9	13.9 ± 2.7	10.5 ± 2.0	11.2 ± 3.6
Normoblast	9.1 ± 1.7	10.1 ± 1.7	9.2 ± 0.9	10.0 ± 3.4
Total myeloid cells	41.3 ± 4.6	47.0 ± 7.2	47.3 ± 8.3	43.6 ± 8.6
Myeloblast	2.2 ± 0.3	1.9 ± 0.9	2.4 ± 1.2	1.9 ± 0.7
Promyelocyte	2.0 ± 0.5	2.6 ± 1.3	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.7
Neutrophilic myelocyte	3.5 ± 0.6	3.2 ± 1.2	3.8 ± 1.0	3.4 ± 1.0
Neutrophilic metamyelocyte	10.8 ± 2.5	13.1 ± 2.3	13.8 ± 3.8	10.6 ± 2.3
Neutrophil	19.2 ± 3.7	22.1 ± 3.5	21.0 ± 3.6	20.6 ± 4.9
Eosinophilic myelocyte	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.6	0.9 ± 0.5	1.4 ± 0.7
Eosinophilic metamyelocyte	1.8 ± 0.8	1.8 ± 0.9	2.4 ± 1.0	2.4 ± 0.9
Eosinophil	0.5 ± 0.4	0.8 ± 0.6	1.2 ± 0.5	1.0 ± 0.7
Basophil, all types	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.8
Myeloid/erythroid ratio	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.4	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.9
Histocyte	3.0 ± 0.9	3.0 ± 1.6	1.9 ± 0.6	3.6 ± 0.8**
Lymphocyte	25.0 ± 4.3	22.4 ± 4.6	26.3 ± 6.2	27.7 ± 4.1
Plasma cell	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.1*
Megakaryocyte	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2
Mast cell	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1

Values represent mean ± S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

Table 4 Blood chemical examination of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	4
Total protein (g/dL)	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.2	5.4 ± 0.4	5.5 ± 0.4	5.7 ± 0.4
Albumin (g/dL)	3.0 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.9 ± 0.3
A/G	1.39 ± 0.26	1.45 ± 0.15	1.37 ± 0.10	1.24 ± 0.13	1.24 ± 0.07	1.02 ± 0.09**
Glucose (mg/dL)	141 ± 13	129 ± 18	121 ± 19	106 ± 19*	143 ± 19	142 ± 10
Total cholesterol (mg/dL)	45 ± 9	44 ± 8	43 ± 9	49 ± 4	44 ± 8	59 ± 15
Triglyceride (mg/dL)	60 ± 10	51 ± 22	31 ± 7**	34 ± 10*	61 ± 22	48 ± 8
BUN (mg/dL)	12 ± 2	12 ± 2	13 ± 3	16 ± 3	17 ± 2	18 ± 2
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1
Inorg. phos. (mg/dL)	6.8 ± 0.3	7.0 ± 0.4	6.5 ± 0.2	6.6 ± 0.4	7.2 ± 0.6	7.2 ± 0.4
Ca (mg/dL)	8.6 ± 0.2	8.9 ± 0.3	8.8 ± 0.2	8.9 ± 0.4	8.7 ± 0.3	9.0 ± 0.3
Na (mEq/L)	145.2 ± 0.6	145.5 ± 0.9	146.8 ± 1.3*	146.6 ± 1.0	144.5 ± 1.0	143.8 ± 0.6
K (mEq/L)	3.96 ± 0.23	3.95 ± 0.44	3.80 ± 0.13	3.88 ± 0.34	3.78 ± 0.16	3.88 ± 0.16
Cl (mEq/L)	106.0 ± 0.7	105.9 ± 1.6	106.0 ± 1.2	106.3 ± 0.9	106.6 ± 1.1	105.8 ± 1.4
ALP (U/L)	423 ± 45	342 ± 47	286 ± 72**	333 ± 61	318 ± 67	259 ± 20
GPT (U/L)	25 ± 3	24 ± 2	26 ± 1	32 ± 2**	28 ± 4	60 ± 73
GOT (U/L)	60 ± 4	54 ± 4	52 ± 5**	52 ± 2*	61 ± 6	93 ± 75
γGTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.2 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.4 ± 0.2	5.7 ± 0.3**	5.7 ± 0.3	6.0 ± 0.3
Albumin (g/dL)	3.5 ± 0.1	3.1 ± 0.3*	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.3
A/G	2.02 ± 0.12	1.60 ± 0.23**	1.46 ± 0.13**	1.39 ± 0.14***	1.45 ± 0.11	1.26 ± 0.18
Glucose (mg/dL)	116 ± 3	112 ± 4	113 ± 9	112 ± 8	156 ± 12	145 ± 10
Total cholesterol (mg/dL)	54 ± 8	57 ± 7	69 ± 6*	74 ± 8**	71 ± 9	72 ± 10
Triglyceride (mg/dL)	25 ± 4	25 ± 4	28 ± 6	20 ± 2	38 ± 7	35 ± 8
BUN (mg/dL)	13 ± 3	11 ± 1	12 ± 1	13 ± 1	18 ± 2	21 ± 4
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1
Inorg. phos. (mg/dL)	6.4 ± 0.4	6.1 ± 0.3	5.7 ± 0.4	5.9 ± 0.6	5.7 ± 0.4	6.3 ± 0.4*
Ca (mg/dL)	8.5 ± 0.2	8.4 ± 0.4	8.5 ± 0.3	8.4 ± 0.2	8.9 ± 0.2	8.9 ± 0.2
Na (mEq/L)	144.9 ± 0.8	145.7 ± 0.5	145.6 ± 1.0	145.8 ± 1.7	144.0 ± 0.5	144.3 ± 0.8
K (mEq/L)	3.41 ± 0.12	3.40 ± 0.18	3.36 ± 0.24	3.45 ± 0.24	3.70 ± 0.38	3.44 ± 0.21
Cl (mEq/L)	110.2 ± 1.0	110.4 ± 1.7	109.0 ± 0.9	108.6 ± 1.9	108.8 ± 0.8	108.0 ± 0.9
ALP (U/L)	204 ± 62	197 ± 21	215 ± 48	228 ± 22	206 ± 32	149 ± 57
GPT (U/L)	18 ± 3	20 ± 3	21 ± 3	26 ± 4**	22 ± 3	22 ± 6
GOT (U/L)	49 ± 3	53 ± 4	48 ± 5	50 ± 3	53 ± 6	55 ± 7
γGTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 1	1 ± 0	3 ± 1**	0 ± 0	1 ± 1

Values represent mean ± S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$

** : Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

28日間反復投与毒性試験

Table 5 Organ weights of rats treated orally with 1,1-bis (tert-butyl)di-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	4
Body weight (g)	375.8±25.3	380.9±43.7	362.1±27.3	362.7±10.3	447.3±39.6	420.3±41.6
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1886.7±79.9	1938.9±48.4	1947.4±60.2	1943.8±79.8	1987.5±68.9	1936.6±52.1
Thymus	656.7±126.9	730.7±179.9	699.4±204.1	617.3±208.3	522.5±51.0	446.7±63.7
Heart	1211.3±132.4	1182.1±129.9	1232.0±147.0	1122.9±83.0	1327.2±96.6	1294.2±127.8
Liver	12210.8±1086.5	13089.8±2126.3	14086.4±1269.4	17279.6±1331.4**	13337.4±1723.3	14888.1±2627.8
Kidneys	2724.1±275.4	2800.1±227.2	2960.1±235.5	3104.7±304.4	2914.7±147.8	3413.0±495.4
Spleen	823.8±71.9	839.4±142.1	713.3±21.9	664.9±87.7	842.0±183.5	1082.0±271.5
Adrenal glands	52.5±6.5	50.7±6.0	54.0±3.3	47.8±3.5	54.4±18.0	61.5±1.5
Testes	3117.6±213.2	3215.9±271.5	3295.5±236.0	3222.4±243.7	3444.6±171.1	3252.1±242.5
Epididymides	740.6±48.1	769.3±23.9	751.3±63.1	738.7±49.3	1060.6±61.7	1017.6±57.4
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	5.037±0.363	5.149±0.657	5.400±0.403	5.364±0.289	4.468±0.391	4.636±0.388
Thymus	1.750±0.341	1.917±0.398	1.929±0.520	1.697±0.546	1.178±0.183	1.069±0.160
Heart	3.221±0.237	3.106±0.080	3.395±0.205	3.099±0.253	2.975±0.176	3.083±0.165
Liver	32.478±1.488	34.232±1.965	38.929±2.394**	47.605±2.800**	29.735±1.861	35.263±3.317*
Kidneys	7.239±0.379	7.382±0.459	8.195±0.662*	8.551±0.670**	6.548±0.550	8.146±1.052*
Spleen	2.197±0.198	2.207±0.346	1.981±0.194	1.832±0.221	1.878±0.358	2.559±0.465*
Adrenal glands	0.140±0.016	0.135±0.026	0.150±0.018	0.132±0.010	0.121±0.033	0.147±0.016
Testes	8.316±0.657	8.579±1.612	9.143±0.942	8.879±0.521	7.767±1.017	7.773±0.657
Epididymides	1.974±0.122	2.045±0.280	2.088±0.274	2.039±0.162	2.383±0.214	2.429±0.108
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	229.5±17.8	227.5±9.0	240.0±14.8	227.5±19.5	265.2±25.1	240.2±13.4
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1809.0±86.4	1794.3±106.4	1827.3±65.4	1811.1±101.7	1826.3±86.7	1864.1±79.8
Thymus	460.6±77.8	449.2±96.4	621.8±159.6	479.3±84.7	525.2±141.9	378.3±81.4
Heart	792.8±53.5	774.5±62.4	788.9±69.7	770.9±79.0	838.4±61.0	804.6±78.1
Liver	6795.4±624.9	7973.9±292.9	10724.9±412.6*	13379.8±1316.2**	7162.0±824.4	8269.3±690.5
Kidneys	1639.4±103.8	1751.6±92.4	1904.2±60.4**	1946.0±164.1**	1850.4±120.3	1876.2±182.7
Spleen	483.2±42.7	563.8±27.2	587.9±120.0	472.6±47.4	577.8±96.4	522.9±81.4
Adrenal glands	55.3±5.1	67.9±2.2**	67.6±8.8**	73.3±4.1**	67.3±6.9	63.3±5.6
Ovaries	84.7±11.8	87.9±10.8	89.3±14.9	94.1±8.6	84.0±7.4	122.0±29.1*
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	7.915±0.646	7.885±0.314	7.637±0.536	8.000±0.712	6.927±0.648	7.774±0.415*
Thymus	2.010±0.338	1.968±0.376	2.577±0.564	2.097±0.223	1.964±0.424	1.573±0.308
Heart	3.468±0.313	3.403±0.220	3.284±0.108	3.394±0.283	3.170±0.171	3.345±0.198
Liver	29.593±0.909	35.064±1.196**	44.780±2.333**	58.861±3.595**	26.973±1.008	34.398±1.466**
Kidneys	7.178±0.715	7.699±0.318	7.960±0.573	8.565±0.442**	6.996±0.322	7.811±0.621*
Spleen	2.112±0.206	2.479±0.099	2.435±0.375	2.091±0.279	2.180±0.328	2.171±0.269
Adrenal glands	0.242±0.032	0.299±0.015*	0.282±0.032	0.324±0.034**	0.254±0.014	0.263±0.021
Ovaries	0.369±0.049	0.386±0.049	0.372±0.053	0.417±0.064	0.318±0.033	0.506±0.107*

Values represent mean ± S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$

** : Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

1,1-ビス(*tert*-ブチルジオキシ)-3,3,5-トリメチルシクロヘキサン

Table 6 Histopathological findings of rats treated orally with 1,1-bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane in 28-day repeat dose toxicity test

	Sex	Male						Female					
		End of administration period				End of recovery period		End of administration period				End of recovery period	
		Dose (mg/kg)	0	100	300	1000	0	1000	0	100	300	1000	0
Number of animals examined (Liver)		5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5
Fatty change, periportal	±	2	5	2	1	2	2	3	1	0	0	3	1
	+	3	0	3	4	2	0	0	2	2	4	0	2
	++	0	0	0	0	1	0	0	2	3	1	0	0
	Total	5	5	5	5	5	2	3	5*	5**	5**	3	3
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	±	0	0	4	2	0	0	0	3	0	0	0	2
	+	0	0	1	2	0	0	0	1	2	0	0	0
	++	0	0	0	1	0	0	0	0	3	5	0	0
	Total	0	0	5**##	5**##	0	0	0	4#	5**##	5**##	0	2
Granuloma	±	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	3
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	4
Number of animals examined (Kidney)		5	5	5	5	5	4	5	0	0	5	0	0
Inclusion body, intracytoplasmic, eosinophilic, proximal tubule	±	0	0	0	0	1	0	3			3		
	+	0	5	3	0	0	0	0			0		
	++	0	0	2	5	0	0	0			0		
	Total	0	5**##	5**##	5**##	1	0	3			3		
Eosinophilic body, proximal tubule	±	0	3	3	2	2	1	0			0		
	+	0	2	2	3	0	0	0			0		
	Total	0	5**##	5**##	5**##	2	1	0			0		
Basophilic tubule	±	1	1	3	3	1	2	3			3		
	+	2	2	2	1	0	0	0			0		
	++	0	0	0	1	0	2	0			0		
	Total	3	3	5	5	1	4*#	3			3		
Cast, proteinous	±	0	0	3	0	0	0	1			1		
	+	0	0	0	3	0	1	0			0		
	Total	0	0	3	3	0	1	1			1		
Cellular infiltration, lymphocyte	±	4	4	5	3	0	0	2			1		
	+	0	0	0	0	0	0	1			0		
	Total	4	4	5	3	0	0	3			1		
Mineralization, cortico-medullary junction	±	0	0	0	0	0	0	1			2		
	Total	0	0	0	0	0	0	1			2		
Number of animals examined (Adrenal gland)		5	0	0	5	0	0	5	5	5	5	5	5
Hypertrophy, cytoplasm, zona fasciculata	±	0			0			0	3	2	1	0	1
	+	0			0			0	1	2	3	0	0
	Total	0			0			0	4#	4#	4#	0	1

Grade of histopathological finding; ±: very slight, +: slight, ++: moderate, total: total of positive grade
 *: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)
 **: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$ (Two-tailed Mann-Whitney U test)
 #: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$ (One-tailed Fisher exact test)
 ##: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$ (One-tailed Fisher exact test)

28日間反復投与毒性試験

Table 6 (continue)

	Sex	Male						Female					
		End of administration period				End of recovery period		End of administration period				End of recovery period	
		Dose (mg/kg)	0	100	300	1000	0	1000	0	100	300	1000	0
Number of animals examined (Spleen)		5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
Deposit, pigment, brown	±	4			5			2			0		
	+	1			0			3			5		
	Total	5			5			5			5		
Hematopoiesis, extramedullary	±	0			0			5			5		
	+	5			5			0			0		
	Total	5			5			5			5		
Congestion	±	0			0			0			0		
	+	0			1			0			1		
	Total	0			1			0			1		
(Stomach)													
Hemorrhage, submucosa, forestomach	±	0			1			0			0		
	Total	0			1			0			0		

Grade of histopathological finding; ± : very slight, + : slight, total : total of positive grade