

ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)のラットを用いる 単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of Pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) in Rats

要約

ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)は無色透明な液体で合成樹脂や塗料に使用されている。1群につき雌6匹のCD(SD)IGS系(SPF)ラットを用いて単回経口投与毒性試験を実施した。

ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)は、コーンオイルに溶解し、300および2000 mg/kgに相当する量を単回強制経口投与した。観察期間は14日間とし、一般状態の観察、死亡動物の確認、体重測定および病理学検査を実施した。

死亡動物は300および2000 mg/kg群ともに認められず、死亡率はいずれも0%であった。

一般状態の観察では300 mg/kg群の1例で下痢がみられたが、投与後4時間には回復した。その他の動物では一般状態に異常は認められなかった。

生存動物の体重は順調な増加を示した。

観察期間終了時の解剖においてはいずれの生存動物にも異常は認められなかった。

したがって、本試験条件下においてペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)のLD₅₀値は2000 mg/kg以上であり、GHS分類のCategory 5に分類された。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)[日本精化(大阪)、純度98.4%、Lot No. TOL-887]は無色透明の液体であり、室温・気密・遮光の条件下で被験物質保管庫に保管した。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ることを確認した。

投与液の調製においては、秤量した被験物質をコーンオイル[ナカライテスク]に溶解させた。調製濃度は300および2000 mg/kgで、それぞれ6および40 w/v%とした。調製後の投与液は室温に保存し、調製後72時間以内に使用した。なお、投与液中の被験物質は調製後72時間まで安定であることが確認されている。また、投与液中の被験物質濃度については、調製後に測定し、適切に調製されていたことが確認された。

2. 供試動物および飼育方法

7週齢のCrj:CD(SD)IGS系ラット(SPF)雌13匹を日

本チャールス・リバーから購入した。動物は検収後、試験環境への馴化のために9~16日間予備飼育し、8~9週齢で投与した。動物は、23 ± 3°C(実測値:23.5~24.2°C)、相対湿度55 ± 20%(実測値:48~81%)、照明時間12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)に制御された飼育室で、ステンレス製網目飼育ケージに1~3匹ずつ収容して飼育した。動物には、オリエンタル酵母工業製の固型飼料MF(Lot No. 040705, 041102)および水道水を自由に摂取させた。

3. 投与量の設定および投与方法

被験物質の毒性に関する情報がなかったため、初回投与は300 mg/kgを設定し、2回目以降の投与量の選択についてはOECD Test Guideline 423に示されたフローチャートの手順に従った。投与容量は体重100 g当たり0.5 mLとし、個体別に測定した体重に基づいて投与液量を算出した。投与回数は1回とし、投与前約16時間絶食させた動物に胃ゾンデを用いて強制経口投与した。給餌は、被験物質投与後約3時間に行った。

4. 群構成

初回絶食日に全例の体重を測定し、最も体重が大きい動物から順に3匹選び、これらを初回投与に用いた。2回目以降の投与も同様にして順次3匹ずつ選んだ。投与時の体重は191~214 gであった。

5. 観察および検査

中毒症状および生死の観察は、投与6時間までは1時間毎に、投与翌日からは1日1回、投与日を観察第1日として14日間にわたって実施した。体重は投与直前、投与後7および14日に測定した。観察期間終了時に全ての動物をエーテル麻酔後放血死させ解剖した。

結果

1. 死亡率

300および2000 mg/kgのいずれの用量においても死亡動物は認められず、死亡率は0%であった。

2. 一般状態

300 mg/kg群の1例で投与後1時間から下痢がみられたが、投与後4時間には回復した。その他の動物には異常が認められなかった。

3. 体重

全ての動物が観察期間中順調な体重増加を示した。

4. 病理所見

観察期間終了時の解剖においていずれの動物にも肉眼的な異常は認められなかった。

考察

ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)を300および2000 mg/kgの用量で8~9週齢のCrj:CD(SD)IGSラットの雌に単回経口投与し、投与後14日間観察した。

一般状態の観察では300 mg/kg群の1例で投与当日に下痢がみられたが、その他の動物に異常は認められず、死亡例は認められなかった。

観察期間終了時の解剖において、いずれの動物にも肉眼的な異常は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下においてペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)のLD₅₀値は2000 mg/kg以上であり、GHS分類のCategory 5に分類された。

連絡先

試験責任者: 藤島 敦

試験担当者: 保母真由美

（財）食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Atsushi Fujishima (Study director)

Mayumi Hobo

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (An-Pyo Center)

582-2 Shiohinden, Iwata, Shizuoka, 437-1213, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)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 Pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) by Oral Administration in Rats

要約

ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)は、比重が大きく乳化安定性に優れたエステル油剤であり、化粧品などに使用されている。

今回、OECD既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)の安全性確認の資料を得るために、ラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、親動物に対する反復投与の影響およびその回復性、ならびに新生児の生存性、発育および形態を含む生殖発生に及ぼす影響を検討した。0(溶媒対照、コーン油)、100、300および1000 mg/kgのペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)を雌雄のSprague-Dawley系ラット(各12匹/群)に反復経口投与した。投与2週間目に2週間を限度として交配させ、雄は交配期間終了2週間目に剖検した。雌は交配後、自然分娩させて母動物は哺育5日に、出生児は哺育4日に剖検した。また、0および1000 mg/kg投与群の各雄5匹および雌のサテライト群(0および1000 mg/kg)は42日間投与した後、14日間休薬させて剖検した。その結果を以下に要約した。

1. 反復投与毒性および回復性試験

死亡および切迫屠殺動物はいずれの群でもみられなかった。投与期間中の一般状態、体重推移および摂餌量に被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

投与期間終了時および14日間の休薬時の血液学検査、血液生化学検査、器官重量結果および病理検査にも、被験物質投与による影響と断定できる変化は認められなかった。また、詳細な症状観察および機能検査でも異常は認められず、神経毒性を示唆する所見はみられなかった。

2. 生殖発生毒性

生殖発生毒性に関しては、性周期、交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、分娩率に被験物質投与の影響は認められなかった。哺育児の観察については、生存、性比、および体重に被験物質投与の影響は認められなかった。また、被験物質投与に起因したと考えられる形態異常も認められなかった。

3. 無毒性量

以上の結果より、本試験条件下でのペンタエリスリ

トールテトラ(2-エチルヘキサノアート)の無毒性量は、反復投与毒性および生殖発生毒性のいずれに関しても、被験物質投与に起因した影響が認められなかったことから、1000 mg/kg/dayと判断された。

方法

1. 被験物質

被験物質として用いたペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)は、水に不溶、油に溶解する無色透明の液体である。本試験には日本精化(兵庫)から提供されたペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)(ロット番号TOL-887、含量96.4%)を用いた。被験物質は受領後、使用時まで密閉して遮光下室温保管し、被験物質の安定性は、試験開始前および試験終了後に提供元において実施された品質試験により確認した。

2. 使用動物および飼育方法

試験には日本チャールス・リバー厚木飼育センター生産のSprague-Dawley(SD)系(Crj:CD(SD)IGS, SPF)の雌雄ラットを使用した。動物は8週齢で購入し、入荷日を含めて14日間予備飼育した。検疫・馴化期間中、毎日一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した。また、雌全例の性周期を入荷翌日から13日間観察したほか、検疫終了日に雌雄全例の詳細な症状観察を実施した。試験には一般状態ならびに詳細な症状観察、体重ならびに性周期に異常の認められない動物を、検疫終了時の測定体重をもとに体重別層化無作為抽出法により、雄は1群12匹よりなる4群に、雌は1群12匹よりなる4群ならびに1群5匹よりなる2群(サテライト群)に群分けし使用した。

全飼育期間を通じ動物は金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し、許容温度21.0~25.0°C、許容湿度40.0~75.0%、換気回数約15回/時間、照明12時間(7時~19時点灯)に制御された飼育室で、固型飼料(CE-2、日本クレア)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。ただし、妊娠18日(陰栓あるいは精子発見日=妊娠0日)以降の母動物は、ラット用プラスチック製繁殖ケージに収容し、哺育4日(哺育0日=分娩日)まで紙パルプ製チップ(ペパークリーン、日本エスエルシー)を床敷として供給して飼育した。

3. 投与検体の調製

被験物質を秤量して媒体を加え、50 w/v%溶液を調製した。これを媒体で段階希釈して15および5 w/v%溶液を調製した。被験物質が水に不溶で油に溶解するため、媒体はコーン油(ロット番号V2P1825, ナカライテスク)を選択した。調製した投与検体は遮光下室温で保管した。

投与に先立ち本被験物質の50および5 w/v%溶液について遮光下室温における調製後8日間の安定性を確認し、また、初回投与時検体中の被験物質含量をガスクロマトグラフ法により測定し規定範囲内にあることを確認した。なお、投与検体は溶液のため均一性試験は実施しなかった。

4. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は予備試験の結果をもとに設定した。ペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)の100, 300および1000 mg/kgを雌雄ラットに14日間反復投与した結果、いずれの群においても、一般状態、体重推移および器官重量(肝臓、腎臓および脾臓)に被験物質投与の影響が認められなかったことから、本試験における高用量群の投与量を限度量の1000 mg/kgに設定し、以下、公比約3で除して中用量を300 mg/kg、低用量を100 mg/kgとした。

雄では交配前2週間から最長2週間の交配期間を経て剖検前日に至るまでの連続42日間、雌は交配前2週間、交尾までの交配期間、妊娠期間および哺育4日まで、サテライト群の雌は連続42日間、それぞれ毎日1回、ラット用胃管を用いて強制的に経口投与した。投与容量は2 mL/kgとし、雌雄とも最近時に測定した体重に基づいて各動物の投与液量を算出した。

回復試験動物として雄は対照群および高用量群のうち各5例、雌はサテライト群の全例を最終投与翌日(回復1日)から14日間休薬した。

5. 観察および検査

1) 一般状態の観察

全例について飼育期間中および回復期間中は毎日1回、投与期間中は投与前後の毎日2回観察した。

2) 詳細な症状観察

雄の詳細な症状観察は、投与7, 14, 21, 28, 35および42日、回復試験動物ではさらに回復7および14日に行った。雌については、投与7, 14, 21, 28, 35および42日に実施し、観察日が分娩中であった例は哺育0日に観察した。その他の分娩例は哺育0日から4日の間に1回観察し、さらにサテライト群は回復7および14日に観察した。観察はいずれも13時から16時の間に、スコアリング法により実施した。観察は、まずケージ越しでの観察(姿勢・体位、自発運動、発声、振戦、痙攣)を行った後、ケージから取り出す際に外表を観察し(取り出し易さ、扱い易さ、心拍動、体温、被毛、皮膚色、可視粘膜、流涙、眼球突出、瞳孔径、流涎)、作業台上で

の行動の正常性を観察(姿勢・体位、探索行動、身づくろい、発声、拳尾反応、歩行、常同行動、奇妙な行動、振戦、痙攣、立毛、眼裂)した。

3) 機能検査

雄では投与42日の詳細な症状観察に引き続き、各群の5例および回復試験動物について機能検査を実施し、回復試験動物は回復14日にも機能検査を実施した。雌では哺育4日に、実施日における投与日数が近い各群5匹について機能検査を行った。雌のサテライト群では投与42日および回復14日のそれぞれ詳細な症状観察に引き続き全例の機能検査を実施した。機能検査はプライエル反応、瞳孔反射、視覚定位、驚愕反応、後肢引込み反射、眼瞼(瞬目)反射、正向反射の有無を観察した。

4) 体重測定

雄および雌のサテライト群は全例について投与1(投与開始日)、7, 14, 21, 28, 35および42日に体重を測定し、回復試験動物はさらに回復1, 7および14日に体重を測定した。交配前の雌は、投与1, 7および14日、交尾確認後は妊娠0, 7, 14および20日、分娩後は哺育0および4日に体重を測定した。

5) 摂餌量測定

雄および雌のサテライト群は、投与1~2, 7~8, 14~15, 29~30, 35~36および41~42日、回復6~7および13~14日に、交配前の雌は、投与1~2, 7~8および14~15日、交尾確認後は妊娠0~1, 7~8, 14~15および20~21日、分娩後は哺育3~4日に、それぞれ給餌量および残餌量を測定し、その差から摂餌量を算出した。

6) 性周期

サテライト群を除く雌全例について、群分け前日までの性周期観察に引き続いて投与開始以降、膣スメア標本を毎日作製し、各動物の同居後交尾が確認されるまで性周期を観察した。

性周期は発情期、発情前期および発情休止期に分類し、投与開始後、4日間隔の性周期がそれ以外の性周期に変化した動物の頻度を群毎に算出した。

7) 交配

投与15日からサテライト群の雌を除く雌雄全例を、同群内の雌雄の組み合わせで連日1:1で同居させ交配を行った。交配は交尾を確認するまで2週間を限度として実施し、交尾の確認は膣スメアの中の精子の存在あるいは膣栓を確認することにより行い、交尾が確認された雌は雄から分離し個別に飼育した。

交配結果から、雌雄同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数、各群の交尾率[(交尾動物数/交配動物数)×100, %]および子宮に着床痕が確認された動物を妊娠例として受胎率[(受胎動物数/交尾動物数)×100, %]を算出した。

8) 分娩・哺育状態の観察

各群とも交尾した雌は全例を自然分娩させて哺育させた。

分娩の確認は妊娠21日から分娩が確認されるまで毎日行い、午前11時までに分娩が完了した例についてその日を哺育0日とした。分娩状態を直接観察できた例は異常の有無を断続的に観察し、直接観察できなかった例は分娩前後の一般状態および産児の状態から異常の有無を判断した。

分娩した全例の妊娠期間(妊娠0日から分娩日までの日数)を求め、各群の出産率[(生児出産雌数/受胎動物数)×100, %]を算出した。また、哺育1日から毎日、哺育状態を観察し、哺育5日の剖検時に観察した着床数および妊娠黄体数から着床率[(着床数/妊娠黄体数)×100, %]を算出した。

9) F₁出生児の観察

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

10) 剖検

雄の投与終了時剖検例は投与42日の翌日に、雌雄の回復試験動物は回復15日に、母動物は哺育4日の翌日にそれぞれ体重を測定後に解剖した。全例いずれも解剖前18~24時間絶食させた後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死あるいは採血後に放血致死させて解剖するとともに、血液学検査、血液生化学検査および病理学検査を実施した。なお、採血は腹部後大静脈から行い、雄の投与終了時剖検では各群の5例を、雌の投与終了時剖検では、分娩例について投与期間が近接した各群5例を選び、雌雄の回復試験動物は全例を対象とした。

出生児のうち、死亡児は発見後すみやかに剖検し、0.1Mリン酸緩衝10 vol%ホルマリン溶液に固定して保存した。生存児は全例を哺育4日にエーテル吸入により致死させ剖検した。

11) 血液学検査

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は抗凝固剤としてのクエン酸ナトリウムを用いて採取した血液から血漿を分離し、全自動血液凝固測定装置(CA-1000, 東亜医用電子)を用いて光散乱法によって測定した。また、抗凝固剤としてEDTA-2Kを用いて採取した血液により、血液自動分析装置(CELL-

DYN3500SL, ダイナボット)を用いて白血球数をフローサイトメトリー・レーザ光散乱法あるいは電気抵抗法で、白血球分類はフローサイトメトリー・レーザ光散乱法あるいは電気抵抗法で、血小板は電気抵抗法でそれぞれ測定した。同時に赤血球数ならびに平均赤血球容積を電気抵抗法で、血色素量を吸光度により測定し、ヘマトクリット値、平均赤血球血色素濃度および平均赤血球血色素量を計算した。

12) 血液生化学検査

抗凝固剤としてヘパリンを用いて採取した血液から血漿を分離し、遠心方式生化学自動分析装置(COBAS MIRA plus, ロッシュダイアグノスティックス)を用いて、総蛋白濃度はビュレット法で、アルブミン濃度はBCG法で、総コレステロール濃度はコレステロールオキシダーゼ・HDAOS法で、グルコース濃度はヘキサキナーゼ・G-6-PDH法で、尿素窒素濃度はウレアーゼGIDH法で、クレアチニン濃度はJaffé法で、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性はGSCC法で、AST活性、ALT活性およびγ-グルタミルトランスベプチダーゼ(γ-GTP)活性はIFCC法で、トリグリセライド濃度はGPO・HDAOS法で、無機リン濃度はモリブデン酸直接法で、総ビリルビン濃度は酵素法で、カルシウム濃度はOCPC法で測定し、A/G比は算出した。また、ヘパリン加血液からの血漿について全自動電解質分析装置(EA05, A&T)を用い、イオン電極法によってナトリウム、カリウムおよび塩素の各濃度を測定した。

13) 病理学検査

(1) 肉眼的観察

全例を剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行った。雌雄ともに血液学検査および血液生化学検査を実施した動物の脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体の重量(実重量)を測定し、相対重量を算出した。また、全例の脳、下垂体、脊髄、心臓、気管、肺(気管支を含む)、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、甲状腺および上皮小体、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣、精巣上体、前立腺腺葉、凝固腺を含む精囊、卵巣、子宮、陰、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿骨、骨髄、病変部を採取し、保存した。肺は0.1Mリン酸緩衝10 vol%ホルマリン溶液で注入固定してから採取した。子宮は着床数を数えて、分娩例の卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えた。採取した器官・組織のうち、精巣ならびに精巣上体はブアン液(長期保存は0.1Mリン酸緩衝10 vol%ホルマリン溶液を使用)に固定し、その他は0.1Mリン酸緩衝10 vol%ホルマリン溶液に固定した。

(2) 病理組織学検査

卵巣、精巣および精巣上体は全例について、肉眼的観察で変化がみられた病変部は該当動物のみについて、これ以外の器官・組織は雄の投与終了時剖検並びに母動物では対照群と高用量群のうち血液学検査および血液生化学検査を実施した各5例について、それぞれ病理組織学

検査を実施した。これらの器官・組織はパラフィン包埋して薄切しヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して、光学顕微鏡を用いて検査した。

6. 統計解析

性周期の変化した動物の頻度、受胎率ならびに出生児の形態異常の出現頻度についてはFisherの直接確率検定を行った。

病理組織学検査所見では、グレード分けしたデータはMann-WhitneyのU検定により、陽性グレードの合計値はFisherの直接確率の片側検定により対照群と被験物質投与群との間で有意差検定を行った。その他のデータのうち解析の対象が3群以上の場合は多重比較検定を行った。すなわち、個体ごとに得られた値あるいはlitterごとの平均値を1標本とし、パラメトリックなデータはまず、Bartlettの方法により等分散性の検定を行い、分散が一樣である場合は一元配置分散分析を行った。いずれかの群で分散が0となった場合、分散が等しくない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの順位検定を行った。群間に有意性が認められた場合は、Dunnnett法またはDunnnett型の検定法により群間の比較を行った。回復試験等、解析の対象が2群の場合にはまずF検定を行い、有意差が認められなければStudent's-t検定を、有意差が認められた場合は、Aspin-Welchの検定を行った。有意水準はいずれも5%とした。

結果

1. 反復投与毒性および回復性試験

1. 一般状態

死亡および瀕死動物はいずれの群でも認められなかった。

対照群の雌1例で削痂が投与40日(哺育1日)に認められたが、哺育2日には回復した。その他300 mg/kg投与群の雌1例で上顎切歯の欠損が投与25~32日に観察されたが、これは被験物質投与の影響ではなく物理的衝撃によるものとみられた。

上記以外の雄および雌には、投与期間中および回復期間中を通して一般状態の変化は認められなかった。

2. 詳細な症状観察

投与期間中および回復期間中ともに、いずれの群においても特記すべき変化は認められず、神経毒性を示唆する所見は観察されなかった。

3. 機能検査

投与期間終了時および回復期間終了時ともに、いずれの群においても異常は認められなかった。

4. 体重(Fig. 1, 2)

投与期間中、100 mg/kg投与群の雄で対照群に比較して体重が低値で推移したが、対照群との間に有意差は認められなかった。投与期間中の雌の体重には、いずれの被験物質投与群においても対照群との間に、有意差は認

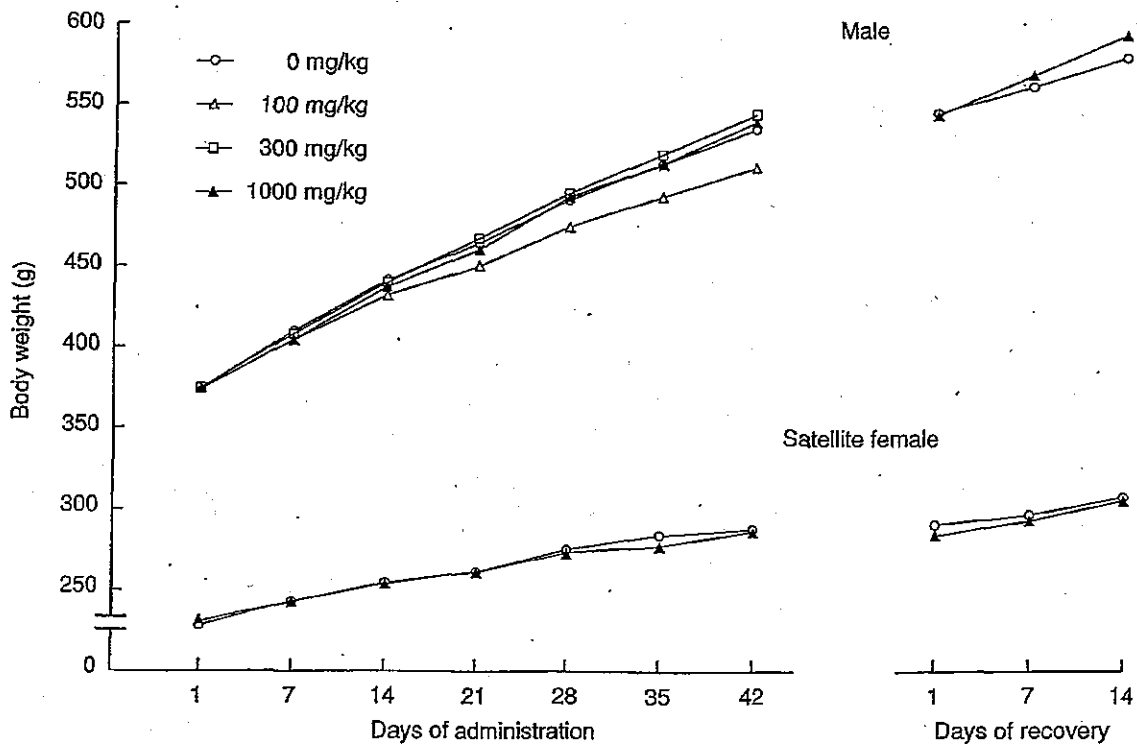


Fig. 1. Body weight changes of male and satellite female rats treated orally with pentaerythritol tetra (2-ethylhexanoate) in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test.

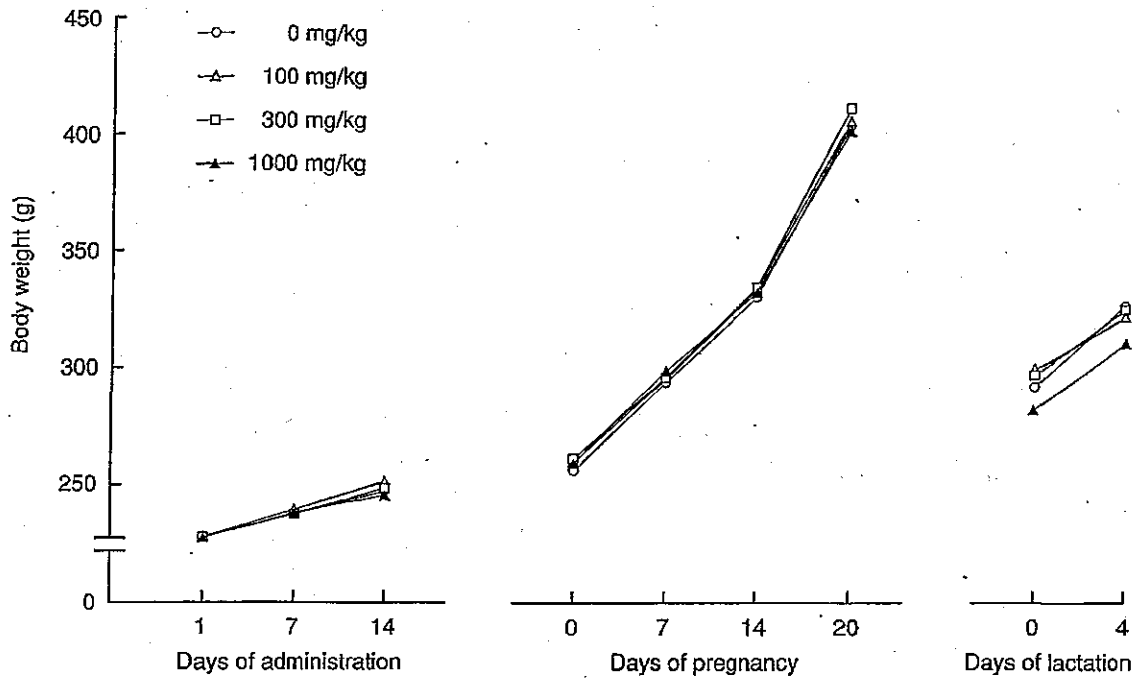


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

められなかった。回復期間中、1000 mg/kg投与群の雄では回復1~14日の累積体重増加量が対照群と比較して有意な高値を示したが、雌の体重には対照群と1000 mg/kg投与群の間に有意差は認められなかった。

5. 摂餌量 (Fig. 3, 4)

投与期間中、雌サテライトの1000 mg/kg投与群で投与29~30日の摂餌量が対照群と比較して有意な高値を示したが、それ以外の群の摂餌量には対照群との間に有意差は認められなかった。

回復期間中には、雌雄とも対照群と1000 mg/kg投与群との間に有意差は認められなかった。

6. 血液学検査 (Table 1)

投与期間終了時の検査では、100 mg/kg投与群の雌で血色素量およびヘマトクリット値が対照群と比較して有意に増加し、300 mg/kg投与群の雌でプロトロンビン時間が対照群と比較して有意に延長した。雄ではいずれの被験物質投与群も対照群との間に有意差は認められなかった。

回復期間終了時の検査では、雌雄とも対照群と1000 mg/kg投与群との間に有意差は認められなかった。

7. 血液生化学検査 (Table 2)

投与期間終了時の検査では、雌雄いずれの被験物質投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群の雌で尿素窒素濃度が対照群と比較して有意に増加した。雄では対照群と1000 mg/kg投与群との間に有意差は認め

られなかった。

8. 病理学検査

1) 器官重量 (Table 3)

投与期間終了時の検査では、300 mg/kg投与群の雌で脳の実重量が対照群と比較して有意に増加したが、相対重量には有意差は認められなかった。一方、雄ではいずれの被験物質投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群の雌で肝臓の相対重量が対照群と比較して有意に増加した。雄では対照群と1000 mg/kg投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 剖検所見

投与期間終了時の雌雄いずれの投与群にも異常所見は認められなかった。

回復試験期間終了時の雌雄では、対照群の雄1例で右後肢大腿骨に腫瘤が観察された他は異常所見は認められなかった。

3) 病理組織学所見 (Table 4)

精巣では、100 mg/kg投与群の3例、300 mg/kg投与群の1例に限局性の精細管萎縮が認められ、このうち3例の精巣上体では、管腔内に細胞残層が観察された。前立腺腺葉では上皮あるいは間質に好中球およびリンパ球の浸潤がみられたが、対照群と1000 mg/kg投与群との間に程度の差は認められなかった。卵巣では、1000 mg/kg投与群の1例(不妊例)に卵胞嚢腫および閉鎖状態にある卵胞の増加が認められたほか、これに伴って確認できる黄体は著しく減少していた。

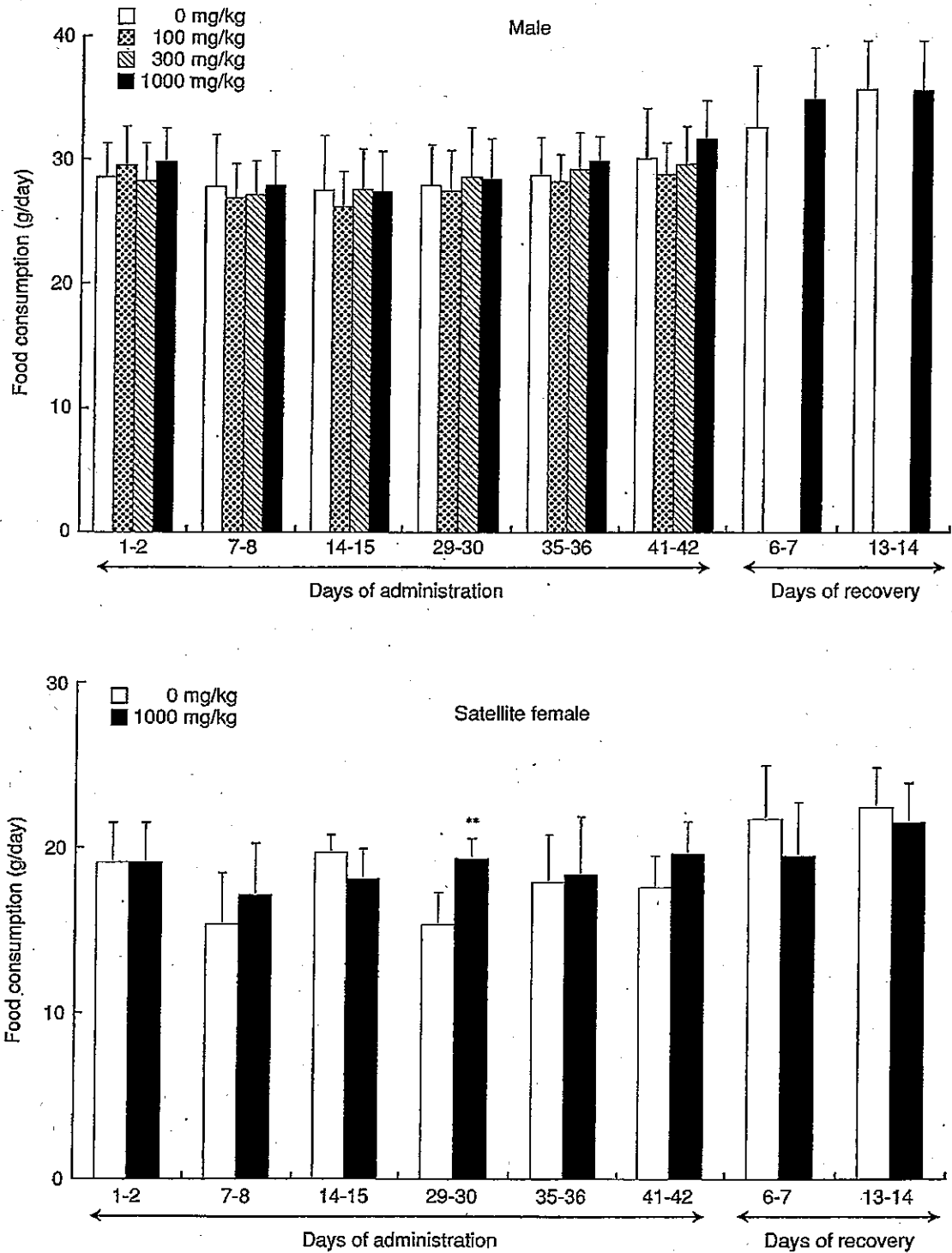


Fig. 3 Food consumption of male and satellite female rats treated orally with pentaerythritol tetra (2-ethylhexanoate) in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

** $p < 0.01$

肝臓では、1000 mg/kg 投与群および対照群の検査指定動物の全例に門脈周囲性の脂肪化、ほとんどの例に小肉芽腫がみられたが、両群間に程度および頻度の差は認められなかった。

腎臓では好酸性小体が対照群の雄全例および1000

mg/kg 投与群の雄3例で、皮質の好塩基性尿管が対照群の雄2例および1000 mg/kg 投与群の雄4例、雌1例でみられたが、いずれの例もごく軽度な変化であり対照群と1000 mg/kg 投与群との間に発現頻度および程度の差は認められなかった。また、雌で対照群と1000 mg/kg

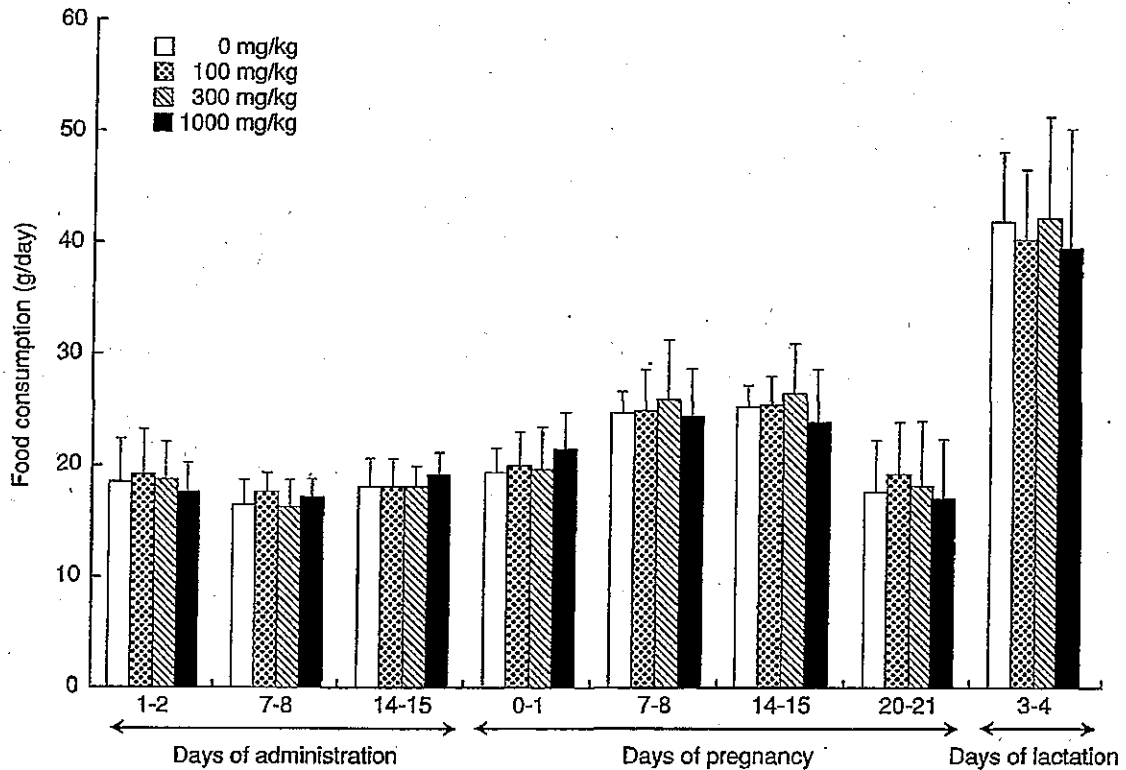


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

投与群の各1例に鉍質沈着が見られたが、いずれの例もごく軽度な変化であった。

脾臓では、対照群および1000 mg/kg投与群の検査指定動物全例で髓外造血および褐色色素の沈着がみられたが、対照群と1000 mg/kg投与群との間に程度の差は認められなかった。

また、心臓で限局性の心筋の変性あるいは線維化が、肺では肺胞に限局性の泡沫細胞の集簇と動脈壁に鉍質沈着が、胸腺では萎縮が対照群および1000 mg/kg投与群で観察されたが、両群間に発現頻度および程度に差は認められなかった。病理組織学検査を実施したその他の器官には異常所見は認められなかった。

一方、回復試験期間終了時の雌雄では、対照群の雄1例で剖検時に腫瘍が認められた右後肢大腿骨には、骨折による骨膜の増生および膜内骨化が観察された。卵巣では、1000 mg/kg投与群の1例に卵胞嚢腫が認められた。

II. 生殖発生毒性

1. 性周期

交配前の投与期間中、4/5周期を示した動物が300 mg/kg投与群で1例、5日周期を示した動物が100 mg/kg投与群で1例認められたが、いずれの投与群においても投与による性周期への影響は認められなかった。

2. 交配成績

いずれの群においても全例の交尾が確認されたが、1000 mg/kg投与群の1例で不妊が認められた。しかし、

受胎率、交尾までの日数およびその間の発情回数に有意差は認められなかった。

3. 分娩および哺育所見 (Table 5)

妊娠動物の全例が生児を出産し、妊娠期間は、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。一方、直接観察できなかったものの、臍周囲の汚れから分娩状態が不良であったと判断された動物が対照群の1例で観察された。この動物は分娩翌日に哺乳した形跡が認められなかったが、哺育2日以降には哺育状態の異常は観察されなかった。その他の動物では、分娩および哺育状態の異常は観察されなかった。

4. 黄体数および着床数 (Table 5)

黄体数および着床数ともに、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

5. 出生児所見 (Table 5)

産児数、分娩率、出産生児数、生児出生率、出生率、性比および哺育4日の生児数および新生児生存率には対照群と被験物質投与群との間で差は認められなかった。また、哺育児体重にも対照群と被験物質投与群との間で差は認められなかった。

哺育0日の生存産児の形態観察では、1000 mg/kg投与群の雌1例で曲尾が観察されたが、同群の他の生存産児には形態異常は認められないことから、自然発生奇形と考えられた。

考察

1. 反復投与毒性および回復性試験

死亡および瀕死動物はいずれの群でも認められず、被験物質の影響を示唆する一般状態の変化も認められなかった。また、詳細な症状観察や機能検査でも、神経毒性を示唆する所見は観察されなかった。回復期間中の体重増加量が1000 mg/kg投与群の雄で有意な高値を示したが、投与期間中の体重さらには投与期間中および回復期間中の摂餌量にも被験物質投与の影響を示唆する変化はみられなかったことから、偶発的な変化と推測される。

投与期間終了時の検査では、100 mg/kg投与群の雌で血色素量およびヘマトクリット値が対照群に比較して有意に増加し、300 mg/kg投与群の雌でプロトロンビン時間が対照群に比較して有意に延長したが、いずれも用量に依存した変化ではないことから、被験物質の影響ではないと判断した。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群の雌で尿素窒素濃度の増加や、肝臓の相対重量の増加がみられたが、投与期間終了時の検査で、腎臓および肝臓に被験物質投与によると推定される変化が認められていないことから、偶発的な変化と考えられる。

2. 生殖発生毒性

性周期の観察では、4日周期が4/5あるいは5日周期に変化した動物が300および100 mg/kg投与群で各1例認められたが、1000 mg/kg投与群では全例が4日周期であったことから、被験物質の性周期への影響を示唆するものではないと考えられる。交配成績では、1000 mg/kg投与群で不妊が1例認められ、同例の卵巣には、卵胞嚢腫および閉鎖状態にある卵胞の増加が認められた。しかし、その他の動物は全て妊娠し、黄体数、着床数、妊娠期間、分娩および哺育状態に被験物質の影響を示唆する異常は観察されなかったこと、また、1000 mg/kg投与群の精巣の組織検査でも、異常所見は認められなかったことから、生殖毒性を示唆するものではないと考えられる。

出生児に関しても、産児数、出産児数、生児出産率、出生率、性比および哺育4日の生児数および新生児生存率、さらには哺育児体重および形態に、被験物質投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

3. 無毒性量

以上の結果より、本試験条件下でのペンタエリスリトールテトラ(2-エチルヘキサノアート)の無毒性量は、反復投与毒性および生殖発生毒性のいずれに関しても、被験物質投与に起因した影響が認められなかったことから、1000 mg/kg/dayと判断された。

文献

- 1) Katherine LM, Virginia CM: Utility of a neurobehavioral screening battery for differentiating the effects of two pyrethroids, permethrin and cypermethrin. *Neurotoxicol Teratol*, 15:71-83(1993).

連絡先

試験責任者: 太田 亮

試験担当者: 宮原 敬, 関 剛幸, 丸茂秀樹,
堀内伸二, 稲田浩子, 三枝克彦,
安生孝子, 古谷真美

(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: Ryo Ohta (Study director)

Takashi Miyahara, Takayuki Seki,
Hideki Marumo, Shinji Horiuchi,
Hiroko Inada, Katsuhiko Saegusa,
Takako Anjo, Mami Furuya

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523,
Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Hematological examination in rats treated orally with pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	End of the administration period				End of the recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	768 \pm 48	821 \pm 46	797 \pm 41	809 \pm 33	808 \pm 37	819 \pm 30
Hemoglobin (g/dL)	14.1 \pm 0.5	14.9 \pm 0.9	14.2 \pm 0.9	14.6 \pm 0.4	14.5 \pm 0.5	14.6 \pm 0.5
Hematocrit (%)	42.3 \pm 1.1	44.3 \pm 2.4	42.8 \pm 2.8	43.7 \pm 1.8	43.5 \pm 1.6	43.5 \pm 1.6
MCV (fL)	55.2 \pm 2.3	54.0 \pm 0.9	53.7 \pm 1.3	54.1 \pm 0.9	53.9 \pm 2.9	53.1 \pm 0.4
MCH (pg)	18.3 \pm 0.7	18.1 \pm 0.4	17.8 \pm 0.5	18.1 \pm 0.4	18.0 \pm 1.0	17.7 \pm 0.2
MCHC (g/dL)	33.2 \pm 0.4	33.5 \pm 0.4	33.1 \pm 0.3	33.4 \pm 0.6	33.4 \pm 0.2	33.4 \pm 0.4
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	104.9 \pm 11.7	106.6 \pm 3.3	111.1 \pm 4.9	105.2 \pm 12.7	111.2 \pm 14.9	114.3 \pm 14.8
PT (sec)	16.0 \pm 2.4	20.3 \pm 6.2	19.9 \pm 4.4	20.8 \pm 1.9	17.5 \pm 2.8	18.0 \pm 3.9
APTT (sec)	22.7 \pm 2.1	23.7 \pm 2.0	23.8 \pm 2.0	24.7 \pm 1.1	22.5 \pm 1.9	23.4 \pm 1.6
WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	92.9 \pm 24.7	76.8 \pm 23.9	89.0 \pm 29.8	73.5 \pm 11.4	94.3 \pm 13.1	119.2 \pm 20.3
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophil	15 \pm 5	21 \pm 4	18 \pm 8	17 \pm 5	15 \pm 5	11 \pm 2
Eosinophil	1 \pm 0	1 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1	1 \pm 0	1 \pm 1
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	4 \pm 1	5 \pm 1	7 \pm 5	3 \pm 1	5 \pm 2	4 \pm 1
Lymphocyte	81 \pm 7	73 \pm 4	74 \pm 12	78 \pm 6	79 \pm 5	84 \pm 2
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	651 \pm 36	728 \pm 39	686 \pm 26	665 \pm 64	750 \pm 44	743 \pm 20
Hemoglobin (g/dL)	13.1 \pm 0.7	14.1 \pm 0.5*	13.5 \pm 0.3	12.9 \pm 0.8	14.2 \pm 0.9	13.9 \pm 0.4
Hematocrit (%)	38.9 \pm 2.0	42.2 \pm 1.5*	40.5 \pm 0.9	38.3 \pm 2.6	42.1 \pm 2.5	41.5 \pm 1.5
MCV (fL)	59.7 \pm 1.0	57.9 \pm 2.0	59.1 \pm 1.8	57.7 \pm 2.2	56.1 \pm 0.2	55.9 \pm 1.4
MCH (pg)	20.1 \pm 0.2	19.4 \pm 0.6	19.6 \pm 0.7	19.4 \pm 0.8	18.9 \pm 0.2	18.7 \pm 0.5
MCHC (g/dL)	33.6 \pm 0.4	33.5 \pm 0.2	33.2 \pm 0.4	33.6 \pm 0.5	33.7 \pm 0.3	33.5 \pm 0.3
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	124.3 \pm 16.8	120.4 \pm 6.4	121.4 \pm 7.7	129.5 \pm 27.3	102.2 \pm 9.1	99.0 \pm 9.3
PT (sec)	12.1 \pm 0.5	13.1 \pm 0.5	13.2 \pm 0.7*	12.6 \pm 0.5	11.9 \pm 0.3	11.7 \pm 0.5
APTT (sec)	18.3 \pm 0.6	19.2 \pm 0.4	20.3 \pm 2.1	19.0 \pm 0.8	19.5 \pm 1.8	19.8 \pm 1.0
WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	81.9 \pm 19.1	99.5 \pm 21.8	108.5 \pm 23.6	105.4 \pm 21.5	43.3 \pm 9.6	54.4 \pm 16.5
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophil	16 \pm 4	20 \pm 4	22 \pm 5	19 \pm 8	13 \pm 5	16 \pm 5
Eosinophil	1 \pm 0	1 \pm 1	1 \pm 0	1 \pm 0	2 \pm 1	2 \pm 1
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	7 \pm 2	10 \pm 5	5 \pm 2	6 \pm 2	3 \pm 1	5 \pm 3
Lymphocyte	76 \pm 5	69 \pm 8	72 \pm 4	75 \pm 9	82 \pm 5	78 \pm 7

Values represent mean \pm S.D.

* $p < 0.05$

Table 2 Blood chemical examination in rats treated orally with pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	End of the administration period				End of the recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein(g/dL)	5.7 ± 0.2	5.7 ± 0.3	5.6 ± 0.2	5.6 ± 0.3	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.3
Albumin(g/dL)	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.8 ± 0.1	3.7 ± 0.3
A/G	1.77 ± 0.18	1.73 ± 0.15	1.75 ± 0.30	1.78 ± 0.18	1.72 ± 0.15	1.68 ± 0.18
BUN(mg/dL)	18 ± 1	18 ± 2	18 ± 2	19 ± 4	15 ± 1	16 ± 2
Creatinine(mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Glucose(mg/dL)	198 ± 48	168 ± 23	160 ± 20	171 ± 10	184 ± 18	180 ± 17
Total cholesterol(mg/dL)	50 ± 12	47 ± 11	50 ± 7	44 ± 5	55 ± 19	50 ± 12
Triglyceride(mg/dL)	30 ± 7	22 ± 6	22 ± 13	24 ± 12	39 ± 21	45 ± 23
ALP(U/L)	180 ± 52	220 ± 34	170 ± 24	186 ± 62	165 ± 34	155 ± 45
ALT(U/L)	30 ± 4	34 ± 7	33 ± 8	29 ± 6	27 ± 6	26 ± 5
AST(U/L)	71 ± 6	68 ± 11	71 ± 13	63 ± 7	59 ± 5	59 ± 10
γ-GTP(U/L)	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 0	1 ± 1
Total bilirubin(mg/dL)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Inorg. phos.(mg/dL)	6.2 ± 0.6	6.8 ± 0.8	6.5 ± 1.1	6.3 ± 0.6	6.1 ± 0.9	6.1 ± 0.8
Ca(mg/dL)	9.3 ± 0.1	9.3 ± 0.3	9.4 ± 0.3	9.2 ± 0.2	9.2 ± 0.3	9.3 ± 0.4
Na(mEq/L)	146.8 ± 1.0	147.0 ± 1.1	145.8 ± 1.2	145.4 ± 0.5	144.4 ± 0.9	143.8 ± 0.8
K(mEq/L)	4.30 ± 0.35	4.60 ± 0.39	4.56 ± 0.56	4.54 ± 0.21	4.08 ± 0.12	4.01 ± 0.14
Cl(mEq/L)	108.0 ± 1.2	107.8 ± 1.2	107.3 ± 1.7	106.7 ± 1.5	107.4 ± 0.6	107.0 ± 1.4
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein(g/dL)	6.0 ± 0.2	6.2 ± 0.5	6.3 ± 0.3	6.1 ± 0.3	6.2 ± 0.3	6.3 ± 0.3
Albumin(g/dL)	4.0 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.0 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.3	4.2 ± 0.3
A/G	1.93 ± 0.15	2.12 ± 0.31	1.70 ± 0.14	1.77 ± 0.14	1.89 ± 0.25	2.08 ± 0.18
BUN(mg/dL)	14 ± 4	14 ± 1	14 ± 2	14 ± 1	19 ± 2	23 ± 2*
Creatinine(mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Glucose(mg/dL)	155 ± 17	159 ± 29	141 ± 24	128 ± 17	153 ± 19	170 ± 25
Total cholesterol(mg/dL)	58 ± 21	66 ± 4	53 ± 5	65 ± 19	62 ± 5	72 ± 6
Triglyceride(mg/dL)	34 ± 17	40 ± 36	29 ± 12	27 ± 13	18 ± 8	28 ± 12
ALP(U/L)	74 ± 28	87 ± 64	95 ± 32	87 ± 44	75 ± 22	76 ± 30
ALT(U/L)	44 ± 11	36 ± 5	65 ± 42	140 ± 203	25 ± 12	32 ± 7
AST(U/L)	85 ± 22	69 ± 11	128 ± 74	242 ± 306	65 ± 24	64 ± 14
γ-GTP(U/L)	3 ± 1	3 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 0
Total bilirubin(mg/dL)	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.00
Inorg. phos.(mg/dL)	7.3 ± 0.7	7.3 ± 1.6	7.5 ± 1.3	6.8 ± 0.8	3.9 ± 0.7	4.5 ± 1.0
Ca(mg/dL)	9.6 ± 0.2	9.8 ± 0.6	9.6 ± 0.4	9.4 ± 0.4	9.0 ± 0.3	9.4 ± 0.2
Na(mEq/L)	143.3 ± 1.8	142.9 ± 1.5	143.3 ± 0.8	143.5 ± 1.3	143.1 ± 0.5	142.6 ± 0.9
K(mEq/L)	4.16 ± 0.07	5.82 ± 2.15	5.55 ± 2.48	4.09 ± 0.37	4.06 ± 0.22	4.01 ± 0.38
Cl(mEq/L)	106.7 ± 0.5	106.5 ± 1.5	107.4 ± 1.5	107.6 ± 2.0	109.6 ± 0.7	109.5 ± 1.8

Values represent mean ± S.D.

*p<0.05

Table 3 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	End of the administration period				End of the recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Terminal body weight (g)	494.9 ± 36.3	466.3 ± 33.8	521.9 ± 61.8	489.6 ± 38.4	539.1 ± 54.2	548.2 ± 30.6
Brain (g)	2.00 ± 0.03	1.98 ± 0.05	2.04 ± 0.10	2.06 ± 0.11	2.06 ± 0.06	2.02 ± 0.08
(g%)	0.41 ± 0.03	0.43 ± 0.02	0.40 ± 0.04	0.42 ± 0.02	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.02
Thymus (mg)	342.7 ± 99.4	330.9 ± 69.1	344.3 ± 79.6	350.3 ± 36.6	226.7 ± 23.7	269.8 ± 60.7
(mg%)	69.0 ± 17.7	71.4 ± 16.6	66.4 ± 15.4	72.0 ± 10.5	42.3 ± 5.1	49.1 ± 10.0
Heart (g)	1.42 ± 0.10	1.43 ± 0.22	1.49 ± 0.11	1.51 ± 0.11	1.49 ± 0.10	1.50 ± 0.15
(g%)	0.29 ± 0.01	0.31 ± 0.05	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.02
Liver (g)	13.94 ± 1.18	12.64 ± 1.45	14.75 ± 2.39	13.90 ± 1.91	14.80 ± 2.06	16.21 ± 2.32
(g%)	2.83 ± 0.25	2.71 ± 0.13	2.82 ± 0.20	2.83 ± 0.21	2.74 ± 0.13	2.95 ± 0.29
Kidneys (g)	3.12 ± 0.19	3.23 ± 0.31	3.35 ± 0.12	3.36 ± 0.27	3.45 ± 0.11	3.49 ± 0.33
(g%)	0.63 ± 0.05	0.69 ± 0.03	0.65 ± 0.09	0.69 ± 0.04	0.65 ± 0.05	0.63 ± 0.03
Spleen (g)	0.77 ± 0.19	0.69 ± 0.06	0.85 ± 0.10	0.87 ± 0.10	0.73 ± 0.18	0.88 ± 0.14
(g%)	0.15 ± 0.04	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.02
Adrenal glands (mg)	58.9 ± 3.6	55.7 ± 2.7	64.4 ± 14.7	64.6 ± 13.4	61.5 ± 11.8	67.9 ± 10.2
(mg%)	12.0 ± 1.2	12.0 ± 0.6	12.4 ± 2.6	13.1 ± 2.0	11.4 ± 1.6	12.4 ± 2.0
Testes (g)	3.23 ± 0.15	3.24 ± 0.25	3.44 ± 0.47	3.33 ± 0.47	3.74 ± 0.33	3.41 ± 0.12
(g%)	0.66 ± 0.07	0.70 ± 0.08	0.66 ± 0.05	0.68 ± 0.06	0.70 ± 0.12	0.62 ± 0.05
Epididymides (g)	1.19 ± 0.10	1.18 ± 0.12	1.28 ± 0.08	1.26 ± 0.14	1.32 ± 0.07	1.30 ± 0.03
(g%)	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.01
Female						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Terminal body weight (g)	282.8 ± 23.5	295.2 ± 14.9	297.1 ± 24.8	279.5 ± 17.4	281.6 ± 8.9	280.5 ± 18.4
Brain (g)	1.81 ± 0.06	1.87 ± 0.07	1.93 ± 0.06**	1.84 ± 0.04	1.89 ± 0.10	1.90 ± 0.04
(g%)	0.65 ± 0.06	0.63 ± 0.02	0.66 ± 0.07	0.66 ± 0.05	0.67 ± 0.02	0.68 ± 0.05
Thymus (mg)	182.8 ± 122.0	201.1 ± 44.5	205.3 ± 94.8	198.9 ± 70.1	245.4 ± 43.9	261.9 ± 50.7
(mg%)	62.7 ± 39.3	67.8 ± 12.1	67.7 ± 27.1	70.5 ± 21.5	87.1 ± 15.1	93.8 ± 19.6
Heart (g)	0.91 ± 0.15	0.93 ± 0.08	0.99 ± 0.18	0.91 ± 0.05	0.93 ± 0.12	0.91 ± 0.05
(g%)	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.05	0.33 ± 0.03
Liver (g)	9.75 ± 1.20	10.84 ± 1.46	10.30 ± 0.94	9.95 ± 1.55	7.58 ± 0.44	7.95 ± 0.64
(g%)	3.44 ± 0.20	3.67 ± 0.43	3.47 ± 0.24	3.55 ± 0.36	2.69 ± 0.08	2.83 ± 0.09*
Kidneys (g)	1.94 ± 0.29	1.99 ± 0.23	2.03 ± 0.20	1.88 ± 0.21	1.92 ± 0.16	1.97 ± 0.25
(g%)	0.68 ± 0.09	0.67 ± 0.06	0.69 ± 0.06	0.67 ± 0.05	0.68 ± 0.05	0.71 ± 0.09
Spleen (g)	0.59 ± 0.10	0.62 ± 0.02	0.69 ± 0.16	0.60 ± 0.13	0.48 ± 0.03	0.52 ± 0.05
(g%)	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.02
Adrenal glands (mg)	65.9 ± 7.0	76.1 ± 14.6	68.4 ± 7.8	75.0 ± 6.4	66.8 ± 6.4	65.6 ± 11.3
(mg%)	23.5 ± 3.6	25.8 ± 5.0	23.1 ± 2.4	26.9 ± 3.1	23.7 ± 1.9	23.3 ± 3.1

Values represent mean ± S.D.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 4 Histopathological examination in rats treated orally with pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Sex	Male						Female						
		End of the administration period				End of the recovery period		End of the administration period				End of the recovery period		
		Dose (mg/kg)		0	100	300	1000	0	1000	0	100	300	1000	0
(Testis)		[7]	[12]	[12]	[7]	[5]	[5]							
Atrophy, seminiferous tubule, focal	±	0	2	1	0	0	0							
	+	0	1	0	0	0	0							
	Total	0	3	1	0	0	0							
(Epididymis)		[7]	[12]	[12]	[7]	[5]	[5]							
Cell debris, lumen	±	0	1	1	0	0	0							
	+	0	1	0	0	0	0							
	Total	0	2	1	0	0	0							
(Prostate)		[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]							
Cellular infiltration, lymphocyte & neutrophil, epithelium/interstitium	±	1			1									
	+	1			0									
	++	0			1									
	Total	2			2									
(Ovary)								[12]	[12]	[12]	[12]	[5]	[5]	
Cyst, follicular	+							0	0	0	0	0	1	
	++							0	0	0	1	0	0	
	Total							0	0	0	1	0	1	
Increase, atrecia, follicle	++							0	0	0	1	0	0	
	Total							0	0	0	1	0	0	
Decrease, corpus luteum	+++							0	0	0	1	0	0	
	Total							0	0	0	1	0	0	
(Liver)		[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	
Fatty change, hepatocyte, periportal	±	1			3			5			5			
	+	3			2			0			0			
	++	1			0			0			0			
	Total	5			5			5			5			
Microgranuloma	±	4			5			5			4			
	Total	4			5			5			4			
(Kidney)		[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	
Eosinophilic body proximal tubule, cortex	±	5			3			0			0			
	Total	5			3			0			0			
Basophilic tubule, cortex	±	2			4			0			1			
	Total	2			4			0			1			
Mineralization	±	0			0			1			1			
	Total	0			0			1			1			

Grade of histopathological finding; ±:very slight, +:slight, ++:moderate, +++:severe.
Total:total of positive grade.

Table 4 (continued)

	Sex	Male								Female					
		End of the administration period				End of the recovery period				End of the administration period				End of the recovery period	
		0	100	300	1000	0	1000	0	100	300	1000	0	1000		
(Spleen)		[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]		
Hematopoiesis, extramedullary	+	4			2			0			1				
	++	1			3			5			4				
	Total	5			5			5			5				
Deposit, pigment, brown	+	3			5			2			2				
	++	2			0			3			3				
	Total	5			5			5			5				
(Heart)		[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]		
Degeneration/fibrosis, myocardium, focal	±	1			2			1			0				
	Total	1			2			1			0				
(Lung & Bronchus)		[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]		
Accumulation, foam cell, focal, alveolus	±	1			3			0			0				
	Total	1			3			0			0				
Mineralization, arterial wall, lung	±	3			1			1			1				
	Total	3			1			1			1				
(Thymus)		[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]		
Atrophy	±	0			0			1			1				
	+	0			0			1			0				
	Total	0			0			2			1				
(Bone of right thigh)		[0]	[0]	[0]	[0]	[1]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]		
Ossification, intramembranous	+					1									
	Total					1									
Proliferation, periosteum	++					1									
	Total					1									

Grade of histopathological finding; ±:very slight, +:slight, ++:moderate, +++:severe.
Total: total of positive grade.

Table 5. Summar of development of pups from dams treated orally with pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate) in combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0	100	300	1000
Number of pregnant females	12	12	12	11
Number of pregnant females with pups alive	12	12	12	11
Gestation index ^{a)}	100	100	100	100
Gestation length in days	22.5 ± 0.5 (12)	22.5 ± 0.5 (12)	22.3 ± 0.5 (12)	22.5 ± 0.5 (11)
Number of corpora lutea	16.4 ± 2.8 (12)	15.5 ± 1.7 (12)	15.8 ± 1.8 (12)	16.2 ± 1.0 (11)
Number of implantation sites	14.4 ± 2.8 (12)	15.3 ± 1.5 (12)	15.3 ± 1.7 (12)	15.5 ± 1.0 (11)
Implantation index ^{b)}	88.8 ± 18.7 (12)	98.5 ± 3.5 (12)	97.0 ± 4.7 (12)	95.6 ± 5.2 (11)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	13.8 ± 2.7 (12)	13.5 ± 2.4 (12)	14.3 ± 2.1 (12)	14.4 ± 1.3 (11)
Delivery index ^{c)}	96.2 ± 5.0 (12)	88.4 ± 13.2 (12)	93.2 ± 6.8 (12)	93.0 ± 6.8 (11)
Number of pups alive	13.6 ± 2.8 (12)	13.2 ± 2.4 (12)	14.2 ± 2.2 (12)	14.0 ± 1.6 (11)
Birth index ^{d)}	94.6 ± 8.1 (12)	86.3 ± 14.2 (12)	92.1 ± 6.7 (12)	90.5 ± 7.7 (11)
Live birth index ^{e)}	98.2 ± 4.5 (12)	97.7 ± 6.3 (12)	98.9 ± 3.8 (12)	97.3 ± 5.0 (11)
Pups weight in grams				
Male	6.6 ± 0.5 (12)	7.1 ± 0.8 (12)	6.7 ± 0.9 (12)	6.7 ± 0.6 (11)
Female	6.4 ± 0.6 (12)	6.7 ± 0.8 (12)	6.3 ± 0.8 (12)	6.3 ± 0.5 (11)
Sex ratio on day 0 ^{f)}	1.0 ± 0.6 (12)	1.4 ± 0.9 (12)	1.1 ± 0.5 (12)	1.0 ± 0.7 (11)
Day 4 of lactation				
Number of pups alive	13.4 ± 3.0 (12)	13.1 ± 2.5 (12)	14.1 ± 2.2 (12)	13.7 ± 1.6 (11)
Viability index ^{g)}	98.6 ± 4.8 (12)	99.4 ± 2.2 (12)	99.4 ± 2.2 (12)	98.2 ± 4.5 (11)
Pups weight in grams				
Male	10.6 ± 0.8 (12)	11.7 ± 2.0 (12)	10.6 ± 1.6 (12)	10.5 ± 1.2 (11)
Female	10.7 ± 1.4 (12)	11.2 ± 1.9 (12)	10.1 ± 1.6 (12)	10.0 ± 1.1 (11)
Sex ratio on day 4 ^{h)}	1.0 ± 0.6 (12)	1.4 ± 0.8 (12)	1.1 ± 0.5 (12)	1.0 ± 0.7 (11)

Values represent mean ± S.D., and parentheses indicate number of litters evaluated.

a) Gestation index=(Number of females with alive pups/Number of pregnant females)×100, %

b) Implantation index=(Number of implantation sites/Number of corpora lutea)×100, %

c) Delivery index=(Number of pups born/Number of implantation sites)×100, %

d) Birth index=(Number of live pups on day 0/Number of implantation sites)×100, %

e) Live birth index=(Number of live pups on day 0/Number of pups born)×100, %

f) Sex ratio on day 0=Number of male live pups on day 0/Number of female live pups on day 0

g) Viability index=(Number of live pups on day 4/Number of live pups on day 0)×100, %

h) Sex ratio on day 4=Number of male live pups on day 4/Number of female live pups on day 4