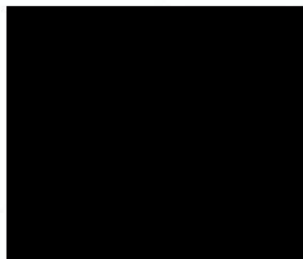
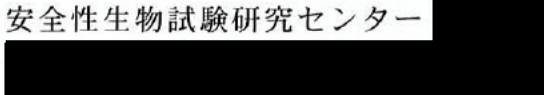


平成 29 年度 指定添加物（香料）の安全性に関する試験

ラットを用いた 2-(*l*-メントキシ)エタノールの
13 週間亜慢性反復経口投与毒性試験
(最終報告書)



国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター



【概要】

指定添加物（香料）として使用されている 2-(*l*-メントキシ)エタノールについて、ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験を実施した。

6 週齢の F344/DuCrI CrIj 系ラット雌雄各群 10 匹に、コーン油を溶媒として被験物質を 0、15、60、250 mg/kg 体重/日の用量で 13 週間強制経口投与した。試験期間を通じて、一般状態、体重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。血液学的検査では、ヘモグロビン量 (HGB)・ヘマトクリット値 (HCT)・平均赤血球容積 (MCV)・平均赤血球血色素量 (MCH) の減少および血小板数 (PLT) の増加が、雄 250 mg/kg 群に認められた。血清生化学的検査では、総コレステロール (T-Chol) の増加が雌雄の 250 mg/kg 群に、トリグリセリド (TG) の減少が雌 250 mg/kg 群に、総タンパク (TP) の増加が雄 250 mg/kg 群に認められ、被験物質による脂質代謝あるいはタンパク合成への影響が示唆された。臓器重量の検索では、肝臓の絶対・相対重量の増加が雌雄の 250 mg/kg 群に、副腎の絶対・相対重量の増加が雄 250 mg/kg 群に認められた。

病理組織学的検索では、雄 15 mg/kg 以上投与群に尿円柱等の慢性腎症を示唆する所見が認められ、関連する変化として雄 60 mg/kg 以上投与群に腎絶対・相対重量および血清クレアチニン (Cre) の増加がみられた。しかし、これらの症例の近位尿細管上皮細胞に認められた好酸性顆粒状物質は α_{2u} グロブリン抗体に陽性を示し、 α_{2u} グロブリン腎症の関与が示唆された。 α_{2u} グロブリンは雄ラットに特異的で、ヒトには外挿性がないとされていることから、本試験でみられた雄の腎臓への影響は毒性学的意義に乏しいものと考えられた。

以上の結果から、本試験における 2-(*l*-メントキシ)エタノールの無毒性量は雌雄ともに 60 mg/kg 体重/日と判断された。

【背景】

2-(*l*-メントキシ)エタノールは特有の香気を有する無色澄明の液体で、食品添加物（香料）として使用されている。我が国では食品衛生法に定める指定添加物において、脂肪族高級アルコール類に分類されている¹⁾。国際的には2009年、Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 会議において、メンソール関連物質として評価を受けた²⁾。本剤は香料構造クラスIに分類され、日本および欧米における摂取量（日本：データなし、欧州：0.01 µg/人/日、米国：12 µg/人/日）はクラスIの摂取許容量（1800 µg/人/日）を大きく下回ることから、香料としての使用において安全性の懸念はない（No safety concern）と判断されている²⁾。

本剤に係る安全性評価については、これまでに遺伝毒性試験として細菌を用いた復帰突然変異試験が実施され、陰性と報告されている²⁾。実験動物による試験としては、雌雄ラットを用いた急性毒性試験の結果（LD₅₀: > 2000 mg/kg 体重）があるのみで、反復経口投与試験は過去に実施されていない²⁾。

今回、2-(*l*-メントキシ)エタノールの安全性評価のため、本剤の毒性プロファイル解明および無毒性量の設定を目的とし、ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験を実施した。

【材料と方法】

1. 被験物質および投与方法

被験物質として、日本香料工業会から提供された2-(*l*-メントキシ)エタノール（2-(*l*-menthoxy)ethanol, CAS No. 38618-23-4）（XXXXXXXXXX、Lot No. XXXXXXXXXX 純度 99.9%）を用いた。

本剤は香料として使用される液体であり、混餌投与では時間経過により揮発することが懸念された。また、水に不溶であることから飲水投与は妥当ではないと考えられ、用時調製による強制経口投与を行うこととした。溶媒中における被験物質の安定性を、ガスクロマトグラフ法により確認した（食品環境検査協会、東京）。被験物質をコーン油（和光純薬工業、大阪）に4, 40, 400 mg/mLの濃度で溶解し、室温遮光下で2時間保存した後の残留率は、それぞれ96.8%、99.8%、96.5%であった。

本試験における投与量は、平成28年度に実施した予備試験の結果に基づいて設定した。被験物質を0、200、400、800 mg/kg 体重/日の用量で28日間強制経口投与した結果、雌雄の200 mg/kg 以上投与群に肝臓の絶対・相対重量の有意な増加が認められた。この結果に基づき、本試験での高用量群を250 mg/kg 体重/日（250 mg/kg 群）、中用量群を60 mg/kg 体重/日（60 mg/kg 群）、低用量群を15 mg/kg 体重/日（15 mg/kg 群）に設定した。投与方法は、投与液量を5 mL/kg 体重とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、1日1回、13週間にわたって胃内に投与した。対照群には、溶媒として用いたコーン油を同様に投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。

2. 動物および飼育条件

5週齢のF344/DuCrI CrIj系ラット（SPF）雌雄各40匹を日本チャールス・リバー（神奈川）より購入し、1週間の馴化・検疫後、体重に基づき無作為に4群（10匹/群）に分け試験に供した。動物の飼育はバリアシステムの飼育室にて、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数18回/時（オールフレッシュ）、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物は透明なポリカーボネート製ケージに収容し、床敷は三協ラボサービス（東京）のソフトチップを用い、週2回交換した。

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に従って計画され、同所の動物実験委員会による審査・承認を経て、動物愛護に十分配慮して実施した。本試験を実施した国立医薬品食品衛生研究所動物実験施設はGLP適合施設ではないが、ヒューマンサイエンス振興財団動物実験実施施設認証センターの評価を受け、厚生労働省の通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に適合した施設であると認定されている。また、試験は「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」に可能な限り準拠して実施した³⁾。

3. 試験方法

2-(*l*-メントキシ)エタノールをコーン油に溶解し、雌雄各群10匹、計80匹のラットにそれぞれ0, 15, 60, 250 mg/kg体重/日の用量で、13週間強制経口投与した。飼料（固型CRF-1；オリエンタル酵母工業、東京）および水道水は自由摂取させた。試験期間中、動物の一般状態を毎日観察し、体重および摂餌量の測定を週1回実施した。

投与終了後、全動物を前日17時より絶食させた後、イソフルラン吸入麻酔下にて開腹、後大動脈より採血した。血液学的検索として、0.5% EDTA-2K処理後に自動血球計算装置（ProCyte Dxリサーチ；シスメックス、兵庫）を用いて、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン量（HGB）、ヘマトクリット値（HCT）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）、血小板数（PLT）および白血球数（WBC）の測定を、白血球に対しては好中球（Neut）、リンパ球（Lymph）、単球（Mono）、好酸球（Eosino）および好塩基球（Baso）について百分比の計数を併せて実施した。

血清生化学的検査として、総タンパク（TP）、アルブミン（Alb）、アルブミン/グロブリン比（A/G）、総ビリルビン（Bil）、グルコース、総コレステロール（T-Chol）、トリグリセリド（TG）、尿素窒素（BUN）、クレアチニン（Cre）、カルシウム（Ca）、無機リン（IP）、ナトリウム（Na）、カリウム（K）、クロール（Cl）、アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）、アラニントランスアミナーゼ（ALT）、アルカリフォスファターゼ（ALP）および γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（ γ -GTP）を、XXXXXXXXXXに委託して測定した。

採血後に後大動脈より放血死させ、剖検に供した。各動物の全身を肉眼的に観察後、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、精巣および卵巣を

摘出し重量を測定した。秤量臓器および鼻腔を含む頭蓋、下垂体、唾液腺（耳下腺、舌下腺、下顎腺）、気管、甲状腺、上皮小体、大動脈、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、前立腺、精嚢腺、凝固腺、精巣上体、卵管、子宮、膣、リンパ節（頸部および腸間膜）、胸骨、大腿骨、脊髄（頸、胸、腰部）、坐骨神経、三叉神経、皮膚（乳腺含む）および骨格筋を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した。眼球およびハーダー腺はダビッドソン液、精巣はブアン液でそれぞれ固定した。頭蓋、胸骨、大腿骨および脊椎は、10%蟻酸および10%ホルマリン混合液で脱灰処理を行った。雌雄の対照群および250 mg/kg群の全臓器について、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し病理組織学的検索を実施した。250 mg/kg群に投与の影響が疑われる所見が認められた臓器は、15および60 mg/kg群についても同様の検索を行った。また、雄の腎臓に認められた病理組織学的所見と $\alpha_2\mu$ グロブリン腎症との関連を検証するため、抗 $\alpha_2\mu$ グロブリン抗体（R&D Systems、米国）を用いた免疫組織化学的検索を実施した。

4. 統計処理

体重、摂餌量、血液学的・血清生化学的検査結果および臓器重量について、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置分散分析を、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法を用いて検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett の方法により対照群と各投与群との間で有意差検定を行った。病理組織学的検索では、発生頻度については Fisher の直接確率法を、各所見の程度については Mann-Whitney の検定をそれぞれ実施した。いずれの検定においても、 $P < 0.05$ の場合を統計学的に有意と判断した。

【結果】

1. 一般状態、体重および摂餌量

試験期間を通じて、死亡動物および一般状態の変化は認められなかった。雌雄とも体重の推移に群間差はなく（Table 1 および Fig. 1）、各群の摂餌量にも投与による毒性影響はみられなかった（Table 1 および Fig. 2）。

2. 血液学的および血清生化学的検査

血液学的検査結果を Table 2 に示す。雄 250 mg/kg 群で、HGB・HCT・MCV・MCH の減少および PLT の有意な増加が認められた。

血清生化学的検査結果を Table 3 に示す。統計学的に有意な変動として、TP・T-Chol・Ca の増加および Bil・ALP の減少が雄 250 mg/kg 群で、Cre の増加および A/G の減少が雄 60 mg/kg 群以上で、TG の増加および Cl の減少が雄 60 mg/kg 群で認められた。雌においては、T-Chol の増加および A/G・Bil・TG・AST・ALT の減少が 250 mg/kg 群に、Ca の増加および ALP の減少が 60 mg/kg 群以上に認められた。

3. 臓器重量

臓器重量の測定結果を Table 4 に示す。解剖時の最終体重は、雌雄とも群間に有意差は認められなかった。肝臓の絶対・相対重量の有意な増加が 250 mg/kg 群の雌雄で認められ、肝相対重量の増加は雄 60 mg/kg 群にもみられた。雄では腎臓の絶対・相対重量の有意な増加が 60 mg/kg 群以上で、副腎の絶対・相対重量の増加および脾臓・精巣の相対重量増加が 250 mg/kg 群で認められた。

4. 病理組織学的検索

病理組織学的検索結果を Table 5 に示す。剖検時に実施した肉眼的病理検査において、雄 250 mg/kg 群の 1 例の右側腎臓に、径 8 mm の白色結節が認められた。病理組織学的検索により、病変は未分化な腎上皮様腫瘍細胞の浸潤性増殖を特徴とし、腎芽腫と診断された。

全身諸臓器の病理組織学的検索では、雄の 15 mg/kg 以上投与群の腎臓において、好塩基性尿細管、尿円柱および間質における局所性炎症細胞浸潤の発生頻度ならびに病変の程度の有意な増加が認められた。これらの群の皮質から髓質外帯外層にかけての近位尿細管上皮細胞には、対照群と比較して好酸性顆粒状物質の増加が認められ、抗 α_{2u} グロブリン抗体を用いた免疫染色に対し陽性を示した (Fig. 3)。

他の臓器にみられた種々の病理組織学的所見については、群間での発生頻度に有意差はなく、被験物質投与とは関連しない偶発所見であると考えられた。

【考察】

雌雄の F344 ラットに 2-(*l*-メントキシ)エタノールを強制経口投与し、13 週間反復経口投与毒性試験を実施した。被験物質投与に起因すると考えられる変化が、血液学的・血清生化学的検査、臓器重量および病理組織学的検索において認められた。

血液学的検査において、雄 250 mg/kg 群に認められた HGB・HCT・MCV・MCH の減少および PLT の増加は、いずれも被験物質投与による影響と考えられた。

血清生化学的検査では、雄 60 mg/kg 以上の投与群に Cre の増加が認められ、後述する腎臓の病理組織学的変化に関連する所見と考えられた。雌雄の 250 mg/kg 群における T-Chol の増加、雌 250 mg/kg 群での TG の減少、および雄 250 mg/kg 群における TP の増加は、被験物質による脂質代謝あるいはタンパク合成への影響を否定できないと考えられた。その他に観察された変動は、毒性所見とは反対の増減 (雌雄 Bil・ALP および雌 AST・ALT)、明確な用量依存性を伴わない (雄 TG・Cl)、あるいはごく軽微な変化で関連パラメータの変動を伴わない (雌雄 A/G・Ca) など、いずれも毒性学的意義に乏しいものと判断された。

臓器重量の検索では、肝臓の絶対・相対重量の増加が雌雄の 250 mg/kg 群に認められた。肝臓において被験物質の投与に関連する病理組織学的所見は雌雄ともに認められなかったが、血清生化学的検索の結果から、被験物質による脂

質代謝およびタンパク合成への影響が示唆された。一方で、雄 60 mg/kg 群においても肝相対重量の増加が観察されたが、病理所見はみられず、絶対重量および関連する血清生化学的パラメータの変化も伴っていないことから、適応の範囲と考えられた。

雄 250 mg/kg 群における副腎の絶対・相対重量増加は、病理組織学的所見は伴わないものの、毒性影響の可能性を否定できないと考えられた。一方、同群における脾臓および精巣の相対重量増加は、絶対重量の増加がみられないことから、毒性学的意義に乏しい変化と判断された。

雄 250 mg/kg 群の 1 例に認められた右側腎臓の結節は、病理組織学的検索により腎芽腫であることが明らかとなった。本病変は若齢ラットにおける自然発生腎腫瘍として知られていること⁴⁾、また 1 例のみの発生であることから、被験物質の投与には関連しない偶発的な所見と考えられた。

60 mg/kg 以上投与群の雄において、腎臓の絶対・相対重量の増加が認められた。また、病理組織学的検索の結果、15 mg/kg 以上投与群の腎臓において再生尿細管、尿円柱および炎症細胞浸潤等、慢性腎症を示唆する所見がみられた。これらの症例において、皮質から髄質外帯外層にかけての近位尿細管上皮細胞に認められた好酸性顆粒状物質は α_{2u} グロブリン抗体に陽性を示し、 α_{2u} グロブリン腎症の関与が示唆された。 α_{2u} グロブリンは雄ラットに特異的で、ヒトには外挿できないとされており⁴⁾、本試験でみられた雄の腎臓への影響は毒性学的意義のないものと考えられた。

以上の結果から、2-(*l*-メントキシ)エタノールを雌雄の F344 ラットに 13 週間強制経口投与した本試験では、血液学的・血清生化学検査および臓器重量の検索において、被験物質投与による毒性影響が雌雄の 250 mg/kg 群に認められた。したがって、本試験の条件下における 2-(*l*-メントキシ)エタノールの無毒性量は、雌雄ともに 60 mg/kg 体重/日と判断された。

【参考文献】

- 1) 指定添加物リスト（食品衛生法施行規則別表第 1，18 類香料リスト），厚生労働省。
<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinzenbu/0000196569.pdf>（2018 年 3 月 23 日閲覧）
- 2) WHO Food Additives Series: 60, Safety evaluation of certain food additives, Sixty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44063/1/9789241660600_eng.pdf（2018 年 3 月 23 日閲覧）
- 3) 食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針－英訳版付き－追補版，厚生省生活衛生局食品化学課監修，日本食品添加物協会（2006 年）。
- 4) 新毒性病理組織学，日本毒性病理学会編，西村書店（2017 年）。

Table 1.Body weight and food intake data for F344 rats treated with 2-(*l*-menthoxy)ethanol for 13 weeks.

Group (mg/kg bw/day)	Body weight (g)		Food intake (g/rat/day)
	Initial	Final	
<i>Males</i>			
0	113.7 ± 4.7	330.2 ± 12.3	11.2
15	114.1 ± 4.6	332.5 ± 10.5	11.3
60	113.9 ± 4.0	325.2 ± 11.8	11.1
250	114.1 ± 4.0	320.3 ± 13.8	11.4
<i>Females</i>			
0	96.3 ± 3.5	175.6 ± 4.6	7.2
15	96.9 ± 3.2	177.3 ± 8.3	7.3
60	96.8 ± 3.4	181.7 ± 8.8	7.4
250	96.3 ± 3.6	183.2 ± 5.0	7.8

Values are mean ± S.D.

Table 2.

Hematology data for F344 rats treated with 2-(1-menthoxy)ethanol for 13 weeks.

Dose (mg/kg bw/day)		0	15	60	250
No. of animals examined		10	10	10	10
<i>Males</i>					
WBC	x10 ² /μl	33.6 ± 5.5	35.6 ± 8.6	36.5 ± 9.0	34.8 ± 6.4
RBC	x10 ⁴ /μl	880 ± 22	893 ± 24	871 ± 21	861 ± 19
HGB	g/dL	14.5 ± 0.3	14.7 ± 0.4	14.3 ± 0.3	14.0 ± 0.2**
HCT	%	43.1 ± 1.0	43.8 ± 1.3	42.4 ± 1.3	41.5 ± 0.9*
MCV	fL	49.0 ± 0.3	49.1 ± 0.3	48.7 ± 0.4	48.2 ± 0.3**
MCH	pg	16.5 ± 0.2	16.4 ± 0.1	16.4 ± 0.1	16.2 ± 0.1**
MCHC	g/dL	33.7 ± 0.1	33.5 ± 0.2	33.6 ± 0.3	33.7 ± 0.2
PLT	x10 ⁴ /μl	68.9 ± 3.4	70.1 ± 2.2	71.0 ± 3.1	76.2 ± 2.3**
<i>Differential cell count</i>					
Neut	%	22.5 ± 4.3	23.9 ± 2.7	23.7 ± 3.9	24.2 ± 4.4
Lymph	%	73.7 ± 5.3	71.9 ± 3.5	72.2 ± 4.5	71.1 ± 4.7
Mono	%	2.7 ± 0.9	3.1 ± 0.8	3.0 ± 0.8	3.4 ± 0.5
Eosino	%	0.7 ± 0.4	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.3
Baso	%	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.1
<i>Females</i>					
WBC	x10 ² /μl	24.6 ± 5.6	20.8 ± 2.9	22.2 ± 6.3	25.9 ± 5.2
RBC	x10 ⁴ /μl	818 ± 31	822 ± 24	817 ± 13	816 ± 32
HGB	g/dL	14.3 ± 0.6	14.4 ± 0.5	14.4 ± 0.2	14.1 ± 0.7
HCT	%	42.2 ± 1.9	42.7 ± 1.5	42.4 ± 0.6	41.6 ± 2.1
MCV	fL	51.6 ± 0.4	51.9 ± 0.7	51.9 ± 0.2	51.0 ± 0.9
MCH	pg	17.5 ± 0.2	17.6 ± 0.2	17.6 ± 0.1	17.3 ± 0.3
MCHC	g/dL	34.0 ± 0.3	33.9 ± 0.2	34.0 ± 0.1	33.9 ± 0.2
PLT	x10 ⁴ /μl	66.5 ± 5.3	64.0 ± 7.5	68.7 ± 5.4	71.5 ± 4.6
<i>Differential cell count</i>					
Neut	%	17.5 ± 3.1	17.4 ± 3.7	16.1 ± 1.6	20.2 ± 4.4
Lymph	%	77.7 ± 3.5	77.8 ± 4.0	80.0 ± 1.8	75.6 ± 4.5
Mono	%	2.9 ± 0.7	3.2 ± 0.8	2.6 ± 0.4	2.8 ± 0.4
Eosino	%	1.5 ± 1.0	1.2 ± 0.9	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.4
Baso	%	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.1

Values are mean ± S.D. * and **; Significantly different from the controls at $P < 0.05$ and < 0.01 , respectively.

Table 3.Serum biochemistry data for F344 rats treated with 2-(*l*-menthoxy)ethanol for 13 weeks.

Dose (mg/kg bw/day)		0	15	60	250
No. of animals examined		10	10	10	10
<i>Males</i>					
TP	(g/dL)	6.2 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.5 ± 0.1**
Alb	(g/dL)	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1
A/G		2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1*	2.1 ± 0.1**
Bil	(mg/dL)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01*
Glucose	(mg/dL)	159 ± 19	163 ± 22	175 ± 26	171 ± 23
T-Chol	(mg/dL)	53.5 ± 5.7	55.1 ± 2.0	58.0 ± 3.2	60.0 ± 2.7**
TG	(mg/dL)	46.6 ± 8.1	56.4 ± 15.3	62.6 ± 12.5*	45.8 ± 16.4
BUN	(mg/dL)	18.8 ± 1.1	18.3 ± 1.9	19.9 ± 1.6	19.3 ± 1.3
Cre	(mg/dL)	0.36 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.41 ± 0.04*	0.43 ± 0.04**
Ca	(mg/dL)	10.1 ± 0.3	10.1 ± 0.2	10.3 ± 0.2	10.4 ± 0.2*
IP	(mg/dL)	5.4 ± 0.5	5.3 ± 0.5	5.5 ± 0.4	5.8 ± 0.5
Na	(mEq/L)	145 ± 1.0	145 ± 0.8	145 ± 0.9	145 ± 0.7
K	(mEq/L)	4.7 ± 0.3	4.7 ± 0.1	4.6 ± 0.2	4.7 ± 0.1
Cl	(mEq/L)	106 ± 0.8	106 ± 1.6	104 ± 2.5*	106 ± 1.6
AST	(IU/l)	84.1 ± 23.4	75.1 ± 11.3	78.4 ± 8.2	70.6 ± 6.8
ALT	(IU/l)	43.1 ± 8.0	42.0 ± 3.9	42.2 ± 5.6	39.1 ± 5.5
ALP	(IU/l)	433 ± 25	427 ± 35	429 ± 23	397 ± 35*
γ-GTP	(IU/l)	< 3	< 3	< 3	< 3
<i>Females</i>					
TP	(g/dL)	5.7 ± 0.2	5.8 ± 0.2	5.9 ± 0.3	5.9 ± 0.1
Alb	(g/dL)	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.2 ± 0.1
A/G		2.7 ± 0.1	2.6 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.5 ± 0.2*
Bil	(mg/dL)	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01*
Glucose	(mg/dL)	96 ± 18	95 ± 17	89 ± 13	97 ± 10
T-Chol	(mg/dL)	66.3 ± 4.6	65.8 ± 6.1	71.4 ± 7.2	80.4 ± 11.6*
TG	(mg/dL)	40.1 ± 17.1	32.2 ± 9.4	32.3 ± 9.9	24.1 ± 6.2*
BUN	(mg/dL)	17.5 ± 2.5	16.3 ± 1.8	16.5 ± 1.6	15.0 ± 1.6
Cre	(mg/dL)	0.37 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.34 ± 0.03
Ca	(mg/dL)	9.9 ± 0.2	9.9 ± 0.2	10.1 ± 0.2*	10.1 ± 0.2*
IP	(mg/dL)	4.9 ± 0.6	4.9 ± 0.7	5.1 ± 0.4	5.4 ± 0.4
Na	(mEq/L)	145 ± 1.0	146 ± 1.2	145 ± 1.5	145 ± 0.4
K	(mEq/L)	4.5 ± 0.2	4.3 ± 0.3	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.2
Cl	(mEq/L)	106 ± 1.9	107 ± 2.1	105 ± 3.3	107 ± 2.1
AST	(IU/l)	77.4 ± 6.5	76.3 ± 6.1	75.2 ± 9.6	68.9 ± 5.2*
ALT	(IU/l)	41.0 ± 4.6	38.0 ± 5.1	39.6 ± 8.1	33.1 ± 3.0**
ALP	(IU/l)	352 ± 72	302 ± 45	283 ± 27*	270 ± 25**
γ-GTP	(IU/l)	< 3	< 3	< 3	< 3

Values are mean ± S.D. * and **; Significantly different from the controls at $P < 0.05$ and < 0.01 , respectively.

Table 4.Organ weight data for F344 rats treated with 2-(*l*-menthoxy)ethanol for 13 weeks.

Dose (mg/kg bw/day)	0	15	60	250
No. of animals examined	10	10	10	10
<i>Males</i>				
Body weight (g)	321.5 ± 12.2	323.5 ± 8.9	315.5 ± 11.4	310.4 ± 13.6
<i>Absolute (g)</i>				
Brain	1.99 ± 0.05	1.98 ± 0.03	1.98 ± 0.02	1.99 ± 0.03
Thymus	0.178 ± 0.012	0.178 ± 0.013	0.169 ± 0.016	0.174 ± 0.009
Lung	0.98 ± 0.05	0.99 ± 0.05	0.95 ± 0.06	1.02 ± 0.09
Heart	0.898 ± 0.049	0.868 ± 0.039	0.870 ± 0.029	0.885 ± 0.048
Spleen	0.579 ± 0.043	0.597 ± 0.022	0.603 ± 0.018	0.623 ± 0.035
Liver	7.35 ± 0.51	7.37 ± 0.29	7.64 ± 0.36	8.43 ± 0.49**
Adrenals	0.035 ± 0.005	0.036 ± 0.005	0.035 ± 0.006	0.042 ± 0.003*
Kidneys	1.81 ± 0.15	1.89 ± 0.08	2.07 ± 0.08*	2.50 ± 0.27**
Testes	3.01 ± 0.32	3.11 ± 0.12	3.11 ± 0.10	3.25 ± 0.29
<i>Relative (%)</i>				
Brain	0.62 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.63 ± 0.02	0.64 ± 0.03
Thymus	0.055 ± 0.004	0.055 ± 0.004	0.054 ± 0.005	0.056 ± 0.003
Lung	0.305 ± 0.019	0.306 ± 0.019	0.300 ± 0.024	0.327 ± 0.025
Heart	0.280 ± 0.019	0.268 ± 0.009	0.276 ± 0.006	0.285 ± 0.008
Spleen	0.180 ± 0.010	0.185 ± 0.007	0.191 ± 0.004	0.201 ± 0.004**
Liver	2.28 ± 0.09	2.28 ± 0.08	2.42 ± 0.08**	2.71 ± 0.07**
Adrenals	0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.002	0.013 ± 0.001**
Kidneys	0.562 ± 0.034	0.585 ± 0.024	0.658 ± 0.018**	0.803 ± 0.071**
Testes	0.94 ± 0.09	0.96 ± 0.02	0.99 ± 0.05	1.05 ± 0.08**
<i>Females</i>				
Body weight (g)	170.8 ± 4.9	172.0 ± 7.9	175.8 ± 8.1	176.7 ± 4.3
<i>Absolute (g)</i>				
Brain	1.81 ± 0.03	1.82 ± 0.04	1.82 ± 0.03	1.83 ± 0.03
Thymus	0.152 ± 0.008	0.143 ± 0.014	0.157 ± 0.010	0.149 ± 0.010 ^a
Lung	0.70 ± 0.05	0.69 ± 0.05	0.68 ± 0.05	0.71 ± 0.04
Heart	0.558 ± 0.030	0.550 ± 0.026	0.549 ± 0.028	0.566 ± 0.033
Spleen	0.372 ± 0.032	0.365 ± 0.024	0.388 ± 0.026	0.363 ± 0.027
Liver	3.65 ± 0.09	3.66 ± 0.23	3.80 ± 0.21	4.21 ± 0.09**
Adrenals	0.037 ± 0.004	0.039 ± 0.003	0.039 ± 0.003	0.040 ± 0.004
Kidneys	1.05 ± 0.04	1.02 ± 0.05	1.04 ± 0.08	1.06 ± 0.08
Ovaries	0.048 ± 0.005	0.044 ± 0.007	0.047 ± 0.005	0.048 ± 0.005
<i>Relative (%)</i>				
Brain	1.06 ± 0.03	1.06 ± 0.04	1.04 ± 0.05	1.04 ± 0.03
Thymus	0.089 ± 0.006	0.083 ± 0.007	0.089 ± 0.004	0.084 ± 0.005 ^a
Lung	0.412 ± 0.027	0.401 ± 0.033	0.388 ± 0.037	0.402 ± 0.030
Heart	0.327 ± 0.019	0.320 ± 0.015	0.313 ± 0.015	0.320 ± 0.015
Spleen	0.218 ± 0.019	0.212 ± 0.013	0.221 ± 0.012	0.205 ± 0.015
Liver	2.14 ± 0.06	2.13 ± 0.08	2.16 ± 0.08	2.38 ± 0.08**
Adrenals	0.022 ± 0.002	0.023 ± 0.002	0.022 ± 0.001	0.023 ± 0.002
Kidneys	0.614 ± 0.025	0.593 ± 0.023	0.591 ± 0.033	0.602 ± 0.046
Ovaries	0.028 ± 0.003	0.026 ± 0.004	0.027 ± 0.003	0.027 ± 0.003

Values are mean ± S.D. * and **; Significantly different from the controls at $P < 0.05$ and < 0.01 , respectively. ^a; The number of effective animals was reduced to nine due to failure of tissue sampling.

Table 5.
Histopathological findings for F344 rats treated with 2-(1-menthoxy)ethanol for 13 weeks.

		Dose (mg/kg bw/day)			
		0	15	60	250
Organs and findings		No. of animals	10	10	10
<i>Males</i>					
Liver	Microgranuloma (±)	3	-	-	2
	Necrosis, focal (±)	1	-	-	0
Kidney	Basophilic tubules (±, +, ++)	1 (1, 0, 0)	10** (0, 10, 0) [‡]	10** (0, 7, 3) [‡]	10** (0, 3, 7) [‡]
	Hyaline casts (±, +, ++)	0	9** (4, 5, 0) [‡]	10** (0, 0, 10) [‡]	10** (0, 0, 10) [‡]
	Inflammation, interstitial, focal (±, +, ++)	4 (4, 0, 0)	10* (9, 1, 0) [‡]	10* (1, 6, 3) [‡]	10* (0, 5, 5) [‡]
	Mineralization (±)	0	0	0	4
	Nephroblastoma, unilateral	0	0	0	1
Heart	Mononuclear cell infiltration, focal (±)	6	-	-	3
Lung	Mineralization (±)	5	-	-	5
Forestomach	Inflammation, focal (±)	1	-	-	0
Pancreas	Mononuclear cell infiltration, focal (±)	0	-	-	2
Parotid gland	Mononuclear cell infiltration, focal (±)	2	-	-	0
	Basophilic cell foci	4	-	-	3
Testis	Atrophy, tubular, unilateral	1	-	-	0
	Dilation, tubular, unilateral	0	-	-	1
Epididymis	Atrophy, ductal, unilateral	1	-	-	0
	Epithelial degeneration with inflammation (±)	2	-	-	0
	Sperm stasis, unilateral	0	-	-	1
Prostate	Mononuclear cell infiltration, focal (±)	1	-	-	3
Urinary bladder	Mononuclear cell infiltration, focal (±)	0	-	-	1
Thyroid gland	Ultimobranchial cyst	1	-	-	2
Nasal cavity	Chronic inflammation, focal (±, +)	6 (5, 1)	-	-	4 (4, 0)
	Mucous cell metaplasia, respiratory epithelium (±)	0	-	-	4
Harderian gland	Mononuclear cell infiltration, focal (±)	0	-	-	1
<i>Females</i>					
Liver	Microgranuloma (±)	3	-	-	3
Kidney	Basophilic tubules (±)	0	-	-	1
	Inflammation, interstitial, focal (±)	1	-	-	0
	Mineralization (±)	3	-	-	1
	Hydronephrosis, bilateral	0	-	-	1
Heart	Mononuclear cell infiltration, focal (±)	1	-	-	3
Lung	Mineralization (±)	5	-	-	5
Tongue	Inflammation, focal (+)	1	-	-	0
Pancreas	Mononuclear cell infiltration, focal (±)	1	-	-	1
Parotid gland	Mononuclear cell infiltration, focal (±)	1	-	-	0
	Basophilic cell foci	0	-	-	1
Pituitary gland	Cyst, pars distalis	2	-	-	0
	Cyst, pars intermedia	0	-	-	1
Thyroid gland	Ultimobranchial cyst	1	-	-	2
Bone marrow	Granuloma	1	-	-	1
Nasal cavity	Chronic inflammation, focal (±, +)	7 (6, 1)	-	-	8 (6, 2)
	Mucous cell metaplasia, respiratory epithelium (±)	2	-	-	2
Eye	Retinal atrophy	1	-	-	0
Harderian gland	Mononuclear cell infiltration, focal (±, +, ++)	3 (2, 0, 1)	-	-	1 (0, 1, 0)

-; Not evaluated. ±, +, and ++; Slight, mild, and moderate, respectively. * and **; Significantly different from the controls at $P < 0.05$ and < 0.01 , respectively (Fisher's exact test). [‡]; Significantly different from the controls at $P < 0.01$ (Mann-Whitney test).

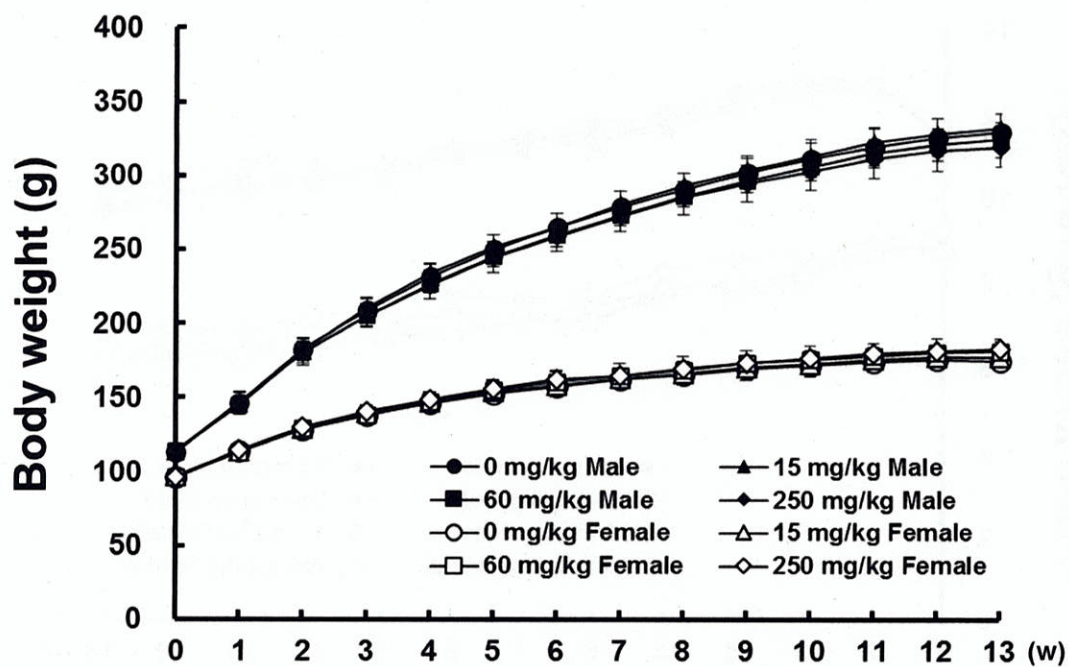


Fig. 1. Body weight data for male and female F344 rats treated with 2-(l-menthoxy)ethanol for 13 weeks.

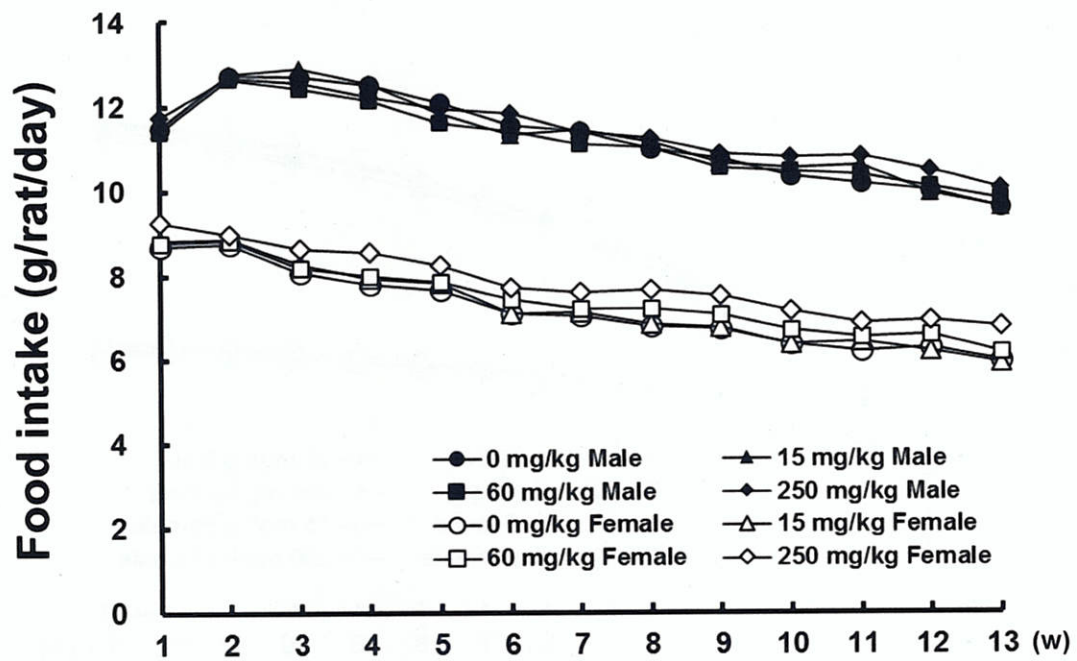


Fig. 2. Daily food intake for male and female F344 rats treated with 2-(*l*-menthoxy)ethanol for 13 weeks.

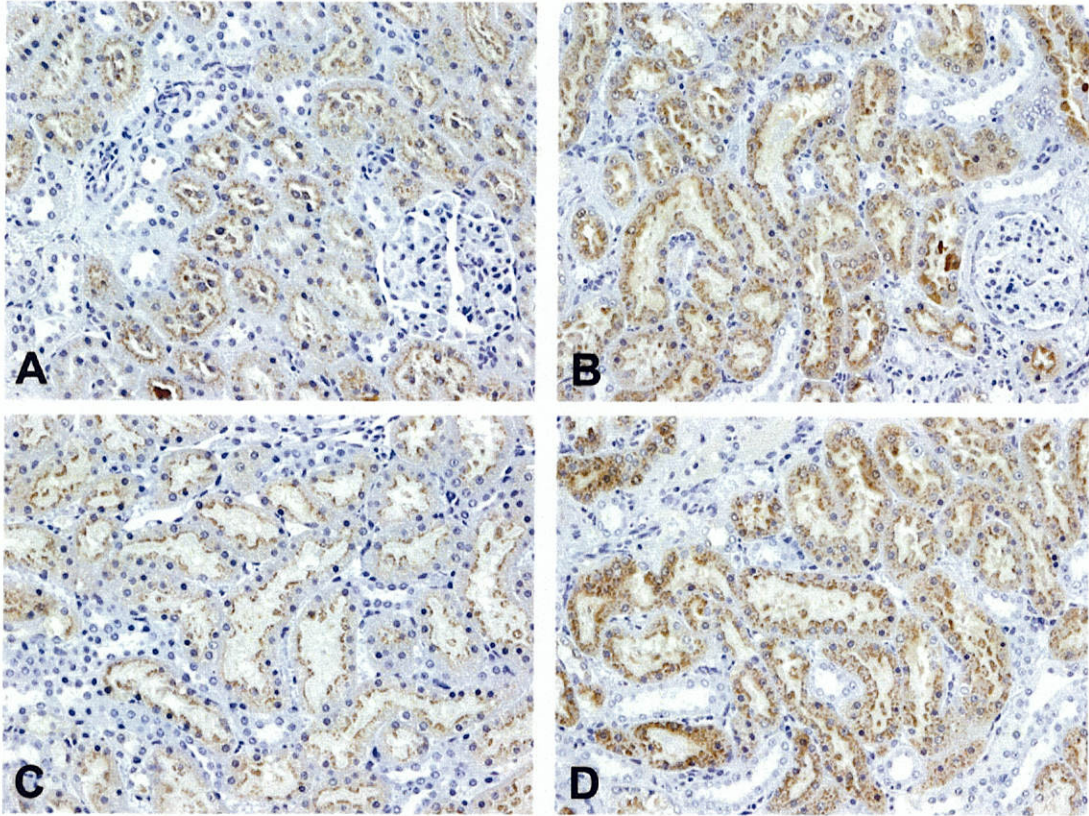


Fig. 3. Immunohistochemistry for α_{2u} -globulin in the kidney of male F344 rats treated with 2-(*l*-menthoxy)ethanol for 13 weeks. (A and B) Cortex of control (A) and 250 mg/kg (B) groups. (C and D) Outer stripe of the outer medulla of control (C) and 250 mg/kg (D) groups.