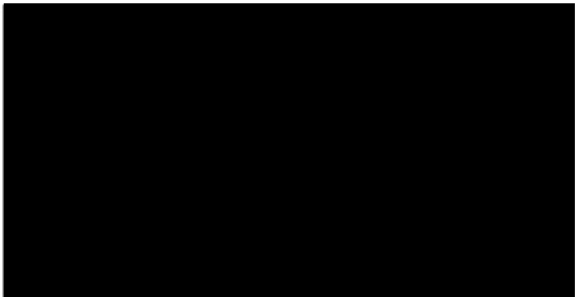


最終報告書

4-エテニル-2-メトキシフェノールのマウスを用いる小核試験

試験番号：



目次

目次.....	2
試験情報.....	4
最終報告書の作成.....	6
試験責任者及び試験従事者.....	7
1 要約.....	8
2 緒言.....	9
3 試験材料及び方法.....	9
3.1 被験物質.....	9
3.2 陽性対照物質.....	10
3.3 媒体.....	10
3.3.1 被験物質の調製に用いた媒体.....	10
3.3.2 陽性対照物質の調製に用いた媒体.....	11
3.4 供試動物.....	11
3.5 試験系選択理由.....	12
3.6 動物管理.....	12
3.6.1 飼育条件.....	12
3.6.2 収容ケージ及び床敷.....	12
3.6.3 飼料及び給餌方法.....	12
3.6.4 飲料水及び給水方法.....	13
3.6.5 個体識別法.....	13
3.7 投与方法.....	13
3.8 投与経路及び投与方法の選択理由.....	13
3.9 投与量及び群構成.....	14
3.9.1 用量設定試験.....	14
3.9.2 本試験.....	14
3.10 投与量の設定理由.....	14
3.11 投与回数及び標本採取時期とその選択理由.....	15
3.12 被験物質投与液の調製方法及び調製頻度.....	15
3.12.1 用量設定試験の投与液濃度及び調製量.....	15
3.12.2 本試験の投与液濃度及び調製量.....	15

3.13	陽性対照物質の投与液の調製方法	15
3.14	測定項目及び観察	15
3.14.1	一般状態	15
3.14.2	体重	16
3.14.3	用量設定試験の観察終了動物の処置	16
3.14.4	標本作製	16
3.14.5	標本観察	16
3.14.6	試験の成立条件	16
3.15	統計処理	16
3.16	判定基準	17
3.17	資料の保管	17
3.18	予見することができなかつた試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び 試験計画書に従わなかつたこと	17
4	試験結果	17
4.1	生存率及び一般状態	17
4.2	体重	18
4.3	小核標本観察結果	18
5	考察	18
6	総括表	20
TABLE 1	: 生存率	21
TABLE 2	: 一般状態	22
TABLE 3	: 体重	23
TABLE 4	: 小核標本観察結果	24
7	個体別表	25
APPENDIX A	: 一般状態	26
APPENDIX B	: 体重	27
APPENDIX C	: 小核標本観察結果	28
8	添付資料	
8.1	: 床敷中汚染物質分析試験成績書	29
8.2	: 飼料中汚染物質分析試験成績書	32
8.3	: 飲料水試験検査成績書	35
8.4	: Background Data for Micronucleus Tests	38
8.5	: 用量設定試験 総括表及び個体別表	40

試験情報

- 試験表題 : 4-エテニル-2-メトキシフェノールのマウスを用いる小核試験
- 試験番号 : [REDACTED]
- 試験目的 : 4-エテニル-2-メトキシフェノールの安全性に関する試験の一環として、4-エテニル-2-メトキシフェノールのマウスを用いる小核試験を行い、生体内での染色体異常誘発性の有無について検討することを目的とした。
- 実施基準 : 本試験は、GLPの対象外として取り扱うが、種々の操作、データの取り扱いなどは試験実施施設の標準操作手順書（SOP）に則って実施した。
- ガイドライン : 本試験は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」（平成8年3月22日付衛化第29号生活衛生局長通知）及び「OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS」に定める474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (29 July 2016)に準じて実施した。
- 動物愛護 : 「動物の愛護及び管理に関する法律」（令和元年6月法律第39号）、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成25年9月環境省告示第84号）、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」（平成18年6月日本学術会議）並びに厚生労働省及び農林水産省の定める動物実験等の実施に関する基本指針に基づいた [REDACTED] 動物実験指針（令和元年10月1日）に従って実施した。
- 試験委託者 : 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
[REDACTED]
- 試験実施施設 : [REDACTED]
- 試験開始日 : [REDACTED]

試験日程

用量設定試験

動物入荷日 :

群分け日 :

被験物質投与日 :

観察終了日 :

本試験

動物入荷日 :

群分け日 :

被験物質投与日 :

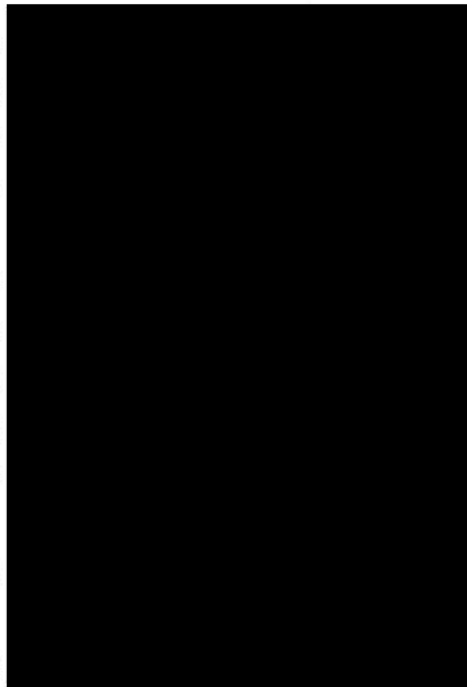
:

観察終了及び :

標本作製日 :

標本観察終了日 :

試験終了日 :



試験番号 : [REDACTED]

最終報告書の作成

試験表題 : 4-エテニル-2-メトキシフェノールのマウスを用いる小核試験

試験番号 : [REDACTED]

試験責任者 : [REDACTED]

[REDACTED]

試験責任者及び試験従事者

試験責任者 : [REDACTED]

試験主担当者 : [REDACTED]

動物飼育管理 : [REDACTED]

動物入荷・群分け : [REDACTED]

投与液の調製・投与 : [REDACTED]

一般状態観察 : [REDACTED]

体重測定 : [REDACTED]

標本作製 : [REDACTED]

標本観察 : [REDACTED]

集計処理 : [REDACTED]

被験物質管理責任者 : [REDACTED]

検疫管理責任者 : [REDACTED]

[REDACTED]

1 要約

4-エテニル-2-メトキシフェノールの安全性に関する試験の一環として、生体内での染色体異常誘発性の有無を、4-エテニル-2-メトキシフェノールのマウス (CrI:CD1(ICR)系の雄) を用いる小核試験において検討した。

小核試験の用量設定及び性別を設定するために雄雌マウス各3匹を各用量群に割り付け、4-エテニル-2-メトキシフェノールをコーン油に混合し、2000、1000、500及び0mg/kg (コーン油) の投与量で、1日1回の2日間、強制経口投与を行った。最終投与の翌日まで一般状態観察及び体重測定を実施した結果、1000 mg/kg 投与群の雄で1例、2000 mg/kg 投与群の雄雌で各々3例の死亡がみられた。一般状態においては、500 mg/kg 投与群の雄雌に浅速呼吸及び立毛が、1000 mg/kg 投与群の雄に自発運動の低下、緩徐呼吸及び立毛が、雌では立毛がみられた。2000 mg/kg 投与群の雄で腹臥位、自発運動の低下、緩徐呼吸及び立毛が、雌では腹臥位及び自発運動の低下がみられた。体重推移については、1000 mg/kg 投与群の雄雌及び2000 mg/kg 投与群の雄で4-エテニル-2-メトキシフェノール投与に起因すると思われる体重の減少傾向がみられた。

以上の結果より、500 mg/kg 投与群の雄雌では死亡例が認められず、毒性徴候がみられたことから、本試験では片性の雄を用いて500 mg/kg を最高投与量とし、以下公比2で250及び125 mg/kg の用量を設定した。

本試験では、4-エテニル-2-メトキシフェノール投与群及び陰性対照群とも24時間間隔で2回投与を実施した。また、陰性対照には媒体のコーン油を投与し、陽性対照にはマイトマイシンCを用い、1回腹腔内投与の2 mg/kg を設定した。骨髓細胞塗抹標本は、最終投与の投与後24時間に採取した骨髓について標本作製を行った。標本観察では、多染性赤血球 (PCE) を個体あたり4000個観察し、小核を有する多染性赤血球 (MNPCE) を分別し、その出現率を求めた。また、PCEと正染性赤血球 (NCE) を合わせて個体あたり1000個観察し、PCEの割合 $[PCE/(PCE+NCE)]$ を求めた。

本試験の結果、4-エテニル-2-メトキシフェノール投与群に死亡例はみられなかった。一般状態では、250 mg/kg 投与群で立毛が、500 mg/kg 投与群では自発運動の低下及び立毛がみられ毒性徴候が確認された。

体重では、4-エテニル-2-メトキシフェノール投与に起因すると思われる体重変動は観察されなかった。

標本観察では、いずれの4-エテニル-2-メトキシフェノール投与群においてもMNPCEの出現率(0.116~0.162%)は陰性対照背景データの上限(0.25%)を超えず、出現頻度(23~32)に関してもKastenbaumとBowmanの判定表に基づく条件付き二項検定において陰性対照群の出現頻度(24)との間に有意差は認められなかった。陽性対照群では、MNPCEの出現率(2.586%)は陰性対照背景データの上限(0.25%)を超え、MNPCEの出現頻度(517)についても陰性対照群との間に有意な差が認められた。また、陰性対照群及び各4-エテニル-2-メトキシフェノール投与群のMNPCEの出現頻度について、コクラン・アーミテッジの傾向検定を行い、用量相関関係が無いことを確認した。

同時に観察したPCEの割合において、各4-エテニル-2-メトキシフェノール投与群に有意な差は認められなかった。陽性対照群のPCEの割合は陰性対照群に対して統計学的に有意な差は認めら

試験責任者管理：実測値 3 ~ 7℃
 ([REDACTED])

取り扱い上の注意 : 火気厳禁。電気機器類、静電気、スパークなどによる着火源を生じないようにした。また、保護具（眼鏡、手袋、マスク等）を使用し、蒸気の吸入、皮膚への接触を避けた。

3.2 陽性対照物質

名称（略称） : 注射用マイトマイシン C [Mitomycin C (MMC)]
 ロット番号 : [REDACTED]
 外観及び性状 : 青紫色の結晶又は結晶性の粉末で、*N,N*-ジメチルアセトアミドに溶けやすく、水又はメタノールに溶けにくく、エタノールに極めて溶けにくい。
 安定性 : 結晶の状態では常温で安定である。水溶液の状態では pH8.0 では安定であるが、pH7.0 以下では安定性が低下する。
 試験責任者入手日 : [REDACTED]
 使用期限 : [REDACTED]
 規格（製造発売元） : 抗悪性腫瘍剤（協和キリン株式会社）
 純度 : 1 パイアル中に日局マイトマイシン C 2 mg（力価）含有
 保管条件 : 室温
 保管場所 : [REDACTED]（許容範囲 1~30℃）
 保管温度 : 被験物質管理責任者管理：実測値 18.0~22.5℃

([REDACTED])
 試験責任者管理：実測値 18.0~22.0℃
 ([REDACTED])

取り扱い上の注意 : 変異原性物質につき取り扱いに注意し、マスク、ゴム手袋を着用し、吸飲や直接接触を避けた。

3.3 媒体

3.3.1 被験物質の調製に用いた媒体

媒体の選択は、4-エテニル-2-メトキシフェノールの安全データシートに溶解度の情報がなかったため、小核試験で用いられる媒体の中から水、オリーブ油及びコーン油を用いて用量設定試験の最高投与量で使用する 20% (w/v) での調製検討を行った。

その結果、水では不均一な懸濁液に、オリーブ油及びコーン油では被験物質が均一に分散した状態（エマルジョン）であり、発泡、発熱、変色、沈殿等の物理変化がないことを確認した。さらに、オリーブ油およびコーン油を注射筒に充填したところ、オリーブ油はコーン油より粘度が高い溶液であった。したがって、安定性及び均一性の確認は行っていないが、投与液として問題はなく、投与液として取り扱いやすいコーン油を選択した。

3.5 試験系選択理由

マウスは、小核試験に多用されている動物種であり、また、本系統は微生物学的に統御され、遺伝的に安定であり、累積データが豊富であることから選択した。

3.6 動物管理

3.6.1 飼育条件

飼育室	: 用量設定試験 XXXXXXXXXX (検疫及び馴化期間も同様に XXXXXXXXXX で飼育) 本試験 XXXXXXXXXX (検疫及び馴化期間も同様に XXXXXXXXXX で飼育)
温度	: 実測値；用量設定試験 21.8~23.0℃ (設定温度；22±3℃) 本試験 21.1~22.7℃ (設定温度；22±3℃)
相対湿度	: 実測値；用量設定試験 46~53% (設定範囲；55±15%) 本試験 52~57% (設定範囲；55±15%)
照明時間	: 12 時間／日 (7:00~19:00)
換気回数	: 10 回以上／時間
飼育匹数	: 1 匹／ケージ (検疫・馴化期間中も 1 匹／ケージ)
ケージ (床敷) 交換頻度	: 1 回／週
給水瓶交換頻度	: 1 回／週

3.6.2 収容ケージ及び床敷

ケージ	: プラスチック製ケージ (W143×D293×H148 mm)
ケージ蓋	: ステンレス製
消毒方法	: プラスチック製ケージは常圧蒸気殺菌 ケージ蓋は高圧蒸気滅菌
床敷	: ソフトチップ (有限会社 原商店)
消毒方法	: 高圧蒸気滅菌
床敷中の環境汚染物質	: 中部科学資材株 (有限会社 原商店の代理店) より分析値を入手し、当研究所で定める最大許容濃度以下であり、試験への影響がないことを確認した (8 添付資料 8.1)。

3.6.3 飼料及び給餌方法

飼料	: オリエンタル酵母工業(株)製固型飼料 MF
ロット番号	: XXXXXXXXXX
給餌方法	: ケージ蓋に取り付けられている給餌器に入れ、自由摂取させた。
給餌器の消毒方法	: 高圧蒸気滅菌

飼料中の汚染物質 : オリエンタル酵母工業(株)より分析値を入手し、当研究所における最大許容濃度以下であり、試験への影響がないことを確認した (8 添付資料 8.2)。

3.6.4 飲料水及び給水方法

飲料水 : XXXXXXXXXX 上水道水
給水方法 : 透明な給水瓶を用いて自由摂取
給水瓶の消毒方法 : 給水瓶は常圧蒸気殺菌
給水栓はピューラックス (株)オーヤラックス) 消毒
飲料水中の汚染物質 : 下記の分析機関に分析を依頼し、分析値が当研究所における水質基準に適合していることを定期的 (年 2 回) に判定し、試験への影響がないことを確認した (8 添付資料 8.3)。
株式会社 環境科学研究所
XXXXXXXXXX

3.6.5 個体識別法

検疫及び馴化期間中 : ケージラベルに試験番号 (用量設定試験、本試験)、性別、仮動物番号及び検疫管理責任者名を明記した。動物の個体識別は、ケージラベル及び油性インク法 (尾部) により識別した。
群分け後 : ケージラベルに試験番号 (用量設定試験、本試験)、性別、群番号、被験物質名及び投与濃度 (投与濃度ごとに異なった色で表示を行い識別した)、動物番号、投与開始日、標本作製日 (ただし用量設定試験は観察終了日)、試験責任者名を明記した。動物の個体識別は、ケージラベル及び油性インク法 (尾部) により識別した。

3.7 投与方法

被験物質投与群及び陰性対照 (媒体) 群は、ディスポーザブル注射筒 (テルモ(株)、1 mL) にディスポーザブルマウス用経口ゾンデ (有)フチガミ器械) を装着して、強制経口投与を行った。投与間隔は 24 時間 (用量設定試験 +1 分、本試験 ±0 分) とし、1 日 1 回、2 日間投与を行った。

陽性対照群は、ディスポーザブル注射筒 (テルモ(株)、1 mL) にディスポーザブル注射針 (ニプロ(株)、25G) を装着して腹腔内に単回投与を行った。また、投与前日から標本作製までの間は、ディスポーザブルのインナーケージをプラスチック製ゲージに重ねて使用した。

投与量については投与日の体重に基づいて算出した。

3.8 投与経路及び投与方法の選択理由

投与経路は、ヒトが被験物質に暴露される可能性の高い経路である経口投与とし、強制経口投与方法を選択した。また、陽性対照物質は、通常小核試験で実施される腹腔内投与を選択した。

これらの投与方法は、規定量を確実に投与可能な投与方法であるため選択した。

3.9 投与量及び群構成

3.9.1 用量設定試験

投与前日に、雄雌マウス各 19 匹より各 12 匹の動物をコンピューターによる体重を基にした体重層別法により選び、次表の通り雄雌各 4 群（3 匹/群）にそれぞれ群分けした。各群の体重の分散が均一であることを Bartlett 法による等分散検定（5%水準）で確認した。投与開始時におけるマウスの体重範囲は、雄 32.7 g～38.2 g、雌で 25.9 g～29.0 g、平均体重の±20%以内であった。被験物質の投与量、投与容量、1 群当たりの匹数及び動物番号は、次表の通りとした。

性別	群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	匹数	動物番号
雄	11M	コーン油（媒体）	0	10	3	11M01~11M03
	12M	4-エテニル-2-メトキシフェノール	500	10	3	12M01~12M03
	13M	4-エテニル-2-メトキシフェノール	1000	10	3	13M01~13M03
	14M	4-エテニル-2-メトキシフェノール	2000	10	3	14M01~14M03
雌	11F	コーン油（媒体）	0	10	3	11F01~11F03
	12F	4-エテニル-2-メトキシフェノール	500	10	3	12F01~12F03
	13F	4-エテニル-2-メトキシフェノール	1000	10	3	13F01~13F03
	14F	4-エテニル-2-メトキシフェノール	2000	10	3	14F01~14F03

3.9.2 本試験

投与前日に、雄マウス 31 匹より 25 匹の動物をコンピューターによる体重を基にした体重層別法により選び、次表の通りに群分けした。各群の体重の分散が均一であることを Bartlett 法による等分散検定（5%水準）で確認した。投与開始時におけるマウスの体重範囲は、34.0～38.9 g で、平均体重の±20%以内であった。

被験物質の投与量、投与容量、1 群当たりの匹数及び動物番号は、次表の通とした。

性別	群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	匹数	動物番号
雄	01M	コーン油（媒体）	0	10	5	01M01~01M05
	02M	4-エテニル-2-メトキシフェノール	125	10	5	02M01~02M05
	03M	4-エテニル-2-メトキシフェノール	250	10	5	03M01~03M05
	04M	4-エテニル-2-メトキシフェノール	500	10	5	04M01~04M05
	05M	Mitomycin C	2	10	5	05M01~05M05

3.10 投与量の設定理由

用量設定試験の投与量は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」及び「OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS」を参考に最高投与量は 2000 mg/kg を設定し、以下公比 2 で 1000 及び 500 mg/kg を設定した。陰性対照は媒体のコーン油を投与した。

本試験の投与量は、用量設定試験に基づいて設定した。用量設定試験では、1000 mg/kg 投与群の雄で 1 例（1/3）、2000 mg/kg 投与群の雄雌で各々 3 例（3/3）の死亡がみられた。一般状態にお

いて、500 mg/kg 投与群の雄雌に浅速呼吸及び立毛がみられ、1000 mg/kg 投与群の雄では自発運動の低下、緩徐呼吸及び立毛が、雌では立毛がみられた。したがって、500 mg/kg 投与群の雄雌で死亡例が認められず、毒性徴候がみられたことから、本試験では片性の雄を用い 500 mg/kg を最高投与量と設定し、以下公比 2 で 250 及び 125 mg/kg の用量を設定した。陰性対照として媒体のコーン油を投与し、陽性対照には Mitomycin C を用い、陽性反応の得られる用量として 2 mg/kg を投与した。

3.11 投与回数及び標本採取時期とその選択理由

投与回数は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」及び OECD のガイドラインを参考に、被験物質投与群と陰性対照群とも 24 時間間隔で 2 回とし、標本採取は最終投与から 24 時間後に行った。陽性対照群は単回投与で、標本採取は投与 24 時間後に行った。

3.12 被験物質投与液の調製方法及び調製頻度

次表に従い必要量の被験物質を電子天秤 CPA124S 型（ザルトリウス株）を用いて、メスシリンダーに量り取り、コーン油を加え所定量にメスアップ後、転倒混和を繰り返し均一にした。なお、投与液は用時調製とし、投与液の濃度確認は実施しなかった。

3.12.1 用量設定試験の投与液濃度及び調製量

群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (%)	被験物質質量 (mg)	調製量 (mL)
12M,12F	4-エテニル-2-メトキシフェノール	500	5	250	5
13M,13F	4-エテニル-2-メトキシフェノール	1000	10	500	5
14M,14F	4-エテニル-2-メトキシフェノール	2000	20	1000	5

3.12.2 本試験の投与液濃度及び調製量

群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (%)	被験物質質量 (mg)	調製量 (mL)
02M	4-エテニル-2-メトキシフェノール	125	1.25	125	10
03M	4-エテニル-2-メトキシフェノール	250	2.5	250	10
04M	4-エテニル-2-メトキシフェノール	500	5	500	10

3.13 陽性対照物質の投与液の調製方法

マイトマイシン C、1 バイアル (2 mg) を注射用水 5 mL で溶解後、生理食塩液で 10 mL にメスアップした。調製は用時調製とし、投与液の安定性については、陽性結果が得られたことをもって確認した。

3.14 測定項目及び観察

3.14.1 一般状態

投与日は、投与前 1 回、投与後 2 回 (1-3 時間後・5-6 時間後) の計 3 回、投与終了日の翌日は 1 回 (午前)、投与された動物について一般行動、中毒症状、生死などについて観察し、個体別

に記録した。

3.14.2 体重

全生存動物について、本試験では投与開始日から標本作製日まで毎日、用量設定試験では、最終投与の翌日まで、電子天秤 LA4200 型（ザルトリウス株）を用いて個体別に体重を測定した。

3.14.3 用量設定試験の観察終了動物の処置

最終観察終了後の生存動物は、試験系から除外した。

3.14.4 標本作製

本試験の最終投与の 24 時間後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、大腿骨の両端を骨剪刀で切断し、骨髓細胞を牛胎仔血清（CORNING、FBS、ロット： [REDACTED]）1.0 mL で遠心管に洗い出し攪拌した。骨髓細胞を含む FBS を遠心分離した（日立小型冷却遠心機、CF7D2；日立工機株式会社）（1000 rpm[207.9×g]、5 min）。パストゥールピペットを用いて上清を除去した後、残液を攪拌することにより骨髓細胞を再浮遊させ、この浮遊液より塗抹標本を 2 枚作製した。

乾燥させた塗抹標本をメタノール（富士フイルム和光純薬株式会社、ロット番号： [REDACTED]）で 5 分間固定後、リン酸緩衝液（株）LSI メディエンス、ロット番号： [REDACTED] で 3% に希釈したギムザ液（和光純薬工業株、ロット番号： [REDACTED]）で 30 分間染色し、リン酸緩衝液で洗浄した後、0.004% クエン酸水溶液（富士フイルム和光純薬株式会、ロット番号： [REDACTED]）に数秒間浸し、純水で洗浄を行い自然乾燥させた。

3.14.5 標本観察

小核標本の観察は、仮動物番号にてブラインド化した標本について 10 倍の接眼レンズと 100 倍の油浸対物レンズのセットされた顕微鏡を用いて観察した。

赤芽球増殖抑制の程度の有無を判定するために個体あたり、多染性赤血球（PCE：polychromatic erythrocyte）と正染性赤血球（NCE：normochromatic erythrocyte）をあわせて 1000 個観察し、PCE の割合 $[PCE/(PCE+NCE)]$ を求めた。また、PCE を個体あたり 4000 個観察し、その内で小核を有する多染性赤血球（MNPCE：micronucleated polychromatic erythrocyte）が出現した数をカウントした。

3.14.6 試験の成立条件

陰性対照群の MNPCE 出現率（ $0.122 \pm 0.041\%$ ）を試験施設の陰性対照群の背景データ（8 添付資料 8.4）と比較した。その結果、陰性対照群の MNPCE 出現率は背景データの平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差（0.01~0.25%）の範囲内であり、また陽性対照群の MNPCE 出現率（ $2.586 \pm 0.459\%$ ）はこれを超え、試験系に影響した要因が無かったことより試験は成立したと判断した。

3.15 統計処理

体重については、統計処理は実施しせず集計のみ行った。

小核標本におけるいずれの測定値[MNPCE の出現率、 $PCE/(PCE+NCE)$]とも、各群で平均値及び標準偏差を算出した。MNPCE の出現頻度についての有意差判定は、Kastenbaum と Bowman (Mutation Res., 9, pp 527-549, 1970) の判定表を用い、条件付き二項検定を危険率 5% ($P < 0.05$) で

行なった。陰性対照群及び被験物質投与群の MNPCE の出現頻度について、コクラン・アーミテッジの傾向検定を行い、用量相関関係の有無を検定した（有意水準片側 5% ($P < 0.05$)）。

同時に観察した多染性赤血球の割合[PCE/(PCE+NCE)]を、陰性対照群と被験物質投与群（01M 群と 02M、03M、04M）及び陰性対照群と陽性対照群（01M 群と 05M 群）との統計学的な有意差検定を行い、危険率 5% ($P < 0.05$) 又は 1% ($P < 0.01$) のレベルで判定した。被験物質投与群（02M、03M、04M）との有意差検定は 5%有意水準で Bartlett 法による等分散検定を行い、等分散であったため、パラメトリックの Dunnett 法による両側検定を行った。陽性対照群（05M）との有意差検定は F 検定を行い、等分散であったため Student の t 検定（両側）を行った。

3.16 判定基準

被験物質について、少なくとも 1 つの被験物質投与群で小核出現頻度が有意に増加し、さらに、傾向検定により用量相関性が認められた場合に陽性と判定した。一方、いずれの被験物質投与群においても小核出現頻度に有意な増加が認められなければ陰性と判定した。

3.17 資料の保管

本試験で発生した試験計画書及び試験計画変更書（原本）、最終報告書（原本）、動物、被験物質、飼育環境及び試験成績に係る記録類、標本類、その他本試験に係る記録文書は、最終報告書提出後 5 年間、XXXXXXXXXX の資料保管室にて保管する。保管期間満了後は、試験委託者と協議の上、決定する。

3.18 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

特記すべき事項は無かった。

4 試験結果

4.1 生存率及び一般状態

各群の生存動物数を Table 1 に、一般状態を Table 2 に、個体別の一般状態を Appendix 1 に示した。また、用量設定試験の生存動物数及び一般状態は添付資料（8 添付資料 8.5）にまとめた。

用量設定試験では、4-エテニル-2-メトキシフェノールの 1000 mg/kg 投与群の雄で 1 例（1/3）、2000 mg/kg 投与群の雄雌で各々 3 例（3/3）の死亡がみられた。一般状態においては、500 mg/kg 投与群の雄雌で浅速呼吸及び立毛が各々 1 例（1/3）にみられた。1000 mg/kg 投与群の雄では自発運動の低下が 2 例（2/3）、緩徐呼吸が 1 例（1/3）及び立毛が 3 例（3/3）、雌では立毛が 2 例（2/3）にみられた。2000 mg/kg 投与群の雄では腹臥位が 1 例（1/3）、自発運動の低下が 2 例（2/3）、緩徐呼吸が 2 例（2/3）及び立毛が 1 例（1/3）、雌では腹臥位が 1 例（1/3）及び自発運動の低下が 2 例（2/3）にみられた。

本試験では、4-エテニル-2-メトキシフェノール投与群に死亡例はみられなかった。一般状態においては、4-エテニル-2-メトキシフェノールの 250 mg/kg 投与群で投与 1 回目の投与 1～3 時間後にのみ立毛が 1 例（1/5）にみられた。500 mg/kg 投与群では、投与 1 回目の投与 1～3 時間後以降に自発運動の低下が 1 例（1/5）及び立毛が 1 例（1/5）にみられ、投与 2 回目の投与前の観察時に

は症状は消失していたものの、投与2回目の投与1～3時間後以降、標本採取まで立毛が1例(1/5)に継続してみられた。

なお、125 mg/kg 投与群では特記すべき症状は観察されなかった。

4.2 体重

各群の平均体重及び標準偏差を Table 3 に、個体別の値を Appendix 2 に示した。また、用量設定試験の体重は添付資料(8 添付資料 8.5)にまとめた。

用量設定試験では、4-エテニル-2-メトキシフェノールの1000 mg/kg 投与群の雄雌及び2000 mg/kg の雄で体重の減少傾向がみられた。

本試験では、4-エテニル-2-メトキシフェノール投与に起因すると思われる体重変動は観察されなかった。

4.3 小核標本観察結果

小核標本観察結果を Table 4 に、個体別の値を Appendix 3 に示した。

MNPCE の出現率は Table 4 に示す様に、陰性対照群では $0.122 \pm 0.041\%$ で被験物質投与群では500、250 及び 125 mg/kg 投与群においてそれぞれ $0.162 \pm 0.036\%$ 、 $0.116 \pm 0.050\%$ 及び $0.132 \pm 0.030\%$ であった。これらの MNPCE の出現率は、陰性対照背景データの分布から推定した MNPCE の上限(0.25%)を超えなかった。陽性対照群では、MNPCE の出現率は $2.586 \pm 0.459\%$ であり、陰性対照背景データの分布から推定した MNPCE の上限(0.25%)を超えた。

MNPCE の出現頻度は、Kastenbaum と Bowman の判定表に基づく条件付き二項検定において、被験物質投与群(MNPCE:23～32)では陰性対照群(MNPCE:24)と比較して有意差は認められなかったが、陽性対照群(MNPCE:517)においては陰性対照群との間に有意差が認められた。また、陰性対照群及び被験物質投与群のデータについて、コクラン・アーミテッジの傾向検定を行い、用量相関関係の無いことを確認した。

同時に観察したPCEの割合においては、陰性対照群の49.64%に対して被験物質投与群では49.10～50.46%であり、統計学的に有意差は認められなかった。また、陰性対照背景データの範囲内(45.01～53.25%)であった。陽性対照群のマイトマイシンCの割合は46.88%で陰性対照群に対して統計学的に有意差は認められなかったが、減少傾向が認められた。

5 考察

4-エテニル-2-メトキシフェノールのマウスを用いる小核試験を行い、生体内での染色体異常誘発性の有無について検討した。

小核試験に使用する用量及び性別を設定するため、4-エテニル-2-メトキシフェノールをコーン油に混合して2000、1000、500 及び 0 mg/kg (コーン油)の投与量で各々の群の雄雌マウス各3匹に、1日1回の2日間(投与間隔は24時間)強制経口投与を行った。最終投与の翌日(午前)まで一般状態及び体重測定を行った結果、1000 mg/kg 投与群の雄で1例(1/3)、2000 mg/kg 投与群の雄雌で各々3例(3/3)の死亡がみられた。一般状態においては、500 mg/kg 投与群の雄雌で浅速呼吸及び立毛がみられた。1000 mg/kg 投与群の雄で自発運動の低下、緩徐呼吸及び立毛が、雌では立毛がみられた。2000 mg/kg 投与群の雄で腹臥位、自発運動の低下、緩徐呼吸及び立毛が、雌では腹臥位及び自発運動の低下がみられた。体重推移については、4-エテニル-2-メトキシフェノー

ル投与が起因すると思われる体重の減少傾向が、1000 mg/kg 投与群の雄雌及び2000 mg/kg 投与群の雄でみられた。

以上の結果より、500 mg/kg 投与群の雄雌で死亡例が認められず、雄雌に軽度の毒性徴候がみられたことから、本試験では片性の雄を用いて500 mg/kg を最高投与量とし、以下公比2で250及び125 mg/kg を設定した。陰性対照には媒体のコーン油を投与し、陽性対照のマイトマイシン C は、明確な陽性反応の得られる用量として、2 mg/kg を設定した。投与回数は、用量設定試験と同様に4-エテニル-2-メトキシフェノール投与群及び陰性対照群とも24時間間隔で2回投与とした。骨髓細胞塗抹標本は、最終投与の投与後24時間に採取した骨髓について標本作製を行った。標本観察では、多染性赤血球(PCE)を個体あたり4000個観察し、小核を有する多染性赤血球(MNPCE)を分別し、その出現率を求めた。また、PCEと正染性赤血球(NCE)を合わせて個体あたり1000個観察し、PCEの割合 $[PCE/(PCE+NCE)]$ を求めた。

その結果、4-エテニル-2-メトキシフェノール投与群に死亡例はみられなかった。一般状態では、4-エテニル-2-メトキシフェノールの250 mg/kg 投与群で立毛が、500 mg/kg 投与群では自発運動の低下及び立毛がみられ毒性徴候が確認された。

体重では、4-エテニル-2-メトキシフェノール投与に起因すると思われる体重変動は観察されなかった。

標本観察では、いずれの4-エテニル-2-メトキシフェノール投与群においてもMNPCEの出現率は(0.116~0.162%)陰性対照背景データの上限(0.25%)を超えず、出現頻度(23~32)に関してもKastenbaumとBowmanの判定表に基づく条件付き二項検定において陰性対照群の出現頻度(24)との間に有意差は認められなかった。陽性対照群では、MNPCEの出現率(2.586%)は陰性対照背景データの上限(0.25%)を超え、MNPCEの出現頻度(517)についても陰性対照群との間に有意な差が認められた。また、陰性対照群及び各4-エテニル-2-メトキシフェノール投与群のMNPCEの出現頻度について、コクラン・アーミテッジの傾向検定を行い、用量相関関係が無いことを確認した。

同時に観察したPCEの割合において、各4-エテニル-2-メトキシフェノール投与群に有意な差は認められなかった。しかし、陽性対照群のPCEの割合は陰性対照群に対して統計学的に有意差は認められなかったが、減少傾向が認められた。

以上の結果よりICR系(Crl:CD1)マウスを用いた本試験条件下において、4-エテニル-2-メトキシフェノールの染色体異常誘発性は陰性であると判定した。



6 総括表

Table 1 Survival rate - Daily

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Day		
				1	2	3
Male	01M	Corn oil	0	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)
	02M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	125	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)
	03M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	250	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)
	04M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)
	05M	Mitomycin C	2	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)	5 / 5 (100.0)

Number of surviving / Total number of animals (Survival rate)



Table 2 General clinical observation

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Findings	(Frequency or time)	Day						
						1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Male	01M	Corn oil	0	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
				Normal		5	5	5	5	5	5	5
	02M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	125	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
				Normal		5	5	5	5	5	5	5
	03M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	250	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
				Normal		5	4	5	5	5	5	5
				Piloerection		0	1	0	0	0	0	0
	04M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
				Normal		5	4	4	5	4	4	4
				Decrease in locomotor activity		0	1	1	0	0	0	0
				Piloerection		0	1	1	0	1	1	1
	05M	Mitomycin C	2	No. of animals		5	5	5	5			
Normal					5	5	5	5				



Table 3 Body weights (g) - Group mean values (mean \pm S.D.)

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	No. of animals	Initial B.W.	Day	
						2	3
Male	01M	Corn oil	0	5	36.6 \pm 1.8	36.7 \pm 1.8	36.4 \pm 1.9
	02M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	125	5	36.6 \pm 1.8	36.8 \pm 1.8	37.0 \pm 2.0
	03M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	250	5	36.4 \pm 1.2	36.5 \pm 1.2	36.5 \pm 1.1
	04M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	5	36.8 \pm 1.6	36.8 \pm 1.7	37.1 \pm 1.8
	05M	Mitomycin C	2	5	36.7 \pm 1.1	36.6 \pm 1.7	

Table 4 Results of micronucleus observation

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	No. of animals	MNPCE ^{a)}	Incidence of MNPCE ^{a)} (%)	Judgement	PCE/(PCE+NCE) (%)
Male	01M	Corn oil	0	5	24	0.122 ± 0.041	-	49.64 ± 2.24
	02M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	125	5	26	0.132 ± 0.030	-	49.10 ± 1.76
	03M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	250	5	23	0.116 ± 0.050	-	49.42 ± 2.87
	04M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	5	32	0.162 ± 0.036	-	50.46 ± 1.71
	05M	Mitomycin C	2	5	517 [#]	2.586 ± 0.459	+	46.88 ± 1.86

MNPCE : micronucleated polychromatic erythrocyte

a) : Based on 4000 polychromatic erythrocytes per animal.

PCE/(PCE+NCE) : polychromatic erythrocytes/(polychromatic erythrocytes + normochromatic erythrocytes)

- : Negative

+ : Positive

: Significantly different from control group at P<0.05. (Kastenbaum and Bowman)

7 個体別表

Appendix 1 General clinical observation - Individual values

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	(Frequency or time)	Day						
							1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Male	01M	Corn oil	0	01M01			-	-	-	-	-	-	-
				01M02			-	-	-	-	-	-	-
				01M03			-	-	-	-	-	-	-
				01M04			-	-	-	-	-	-	-
				01M05			-	-	-	-	-	-	-
	02M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	125	02M01			-	-	-	-	-	-	-
				02M02			-	-	-	-	-	-	-
				02M03			-	-	-	-	-	-	-
				02M04			-	-	-	-	-	-	-
				02M05			-	-	-	-	-	-	-
	03M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	250	03M01			-	-	-	-	-	-	-
				03M02			-	-	-	-	-	-	-
				03M03			-	-	-	-	-	-	-
				03M04			-	b	-	-	-	-	-
				03M05			-	-	-	-	-	-	-
	04M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	04M01			-	-	-	-	-	-	-
				04M02			-	-	-	-	-	-	-
				04M03			-	-	-	-	-	-	-
				04M04			-	ab	ab	-	b	b	b
				04M05			-	-	-	-	-	-	-
05M	Mitomycin C	2	05M01			-	-	-	-	-	-	-	
			05M02			-	-	-	-	-	-	-	
			05M03			-	-	-	-	-	-	-	
			05M04			-	-	-	-	-	-	-	
			05M05			-	-	-	-	-	-	-	

a : Decrease in locomotor activity; b : Piloerection

- : Normal

Appendix 2 Body weights (g) - Individual values

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	Initial B.W.	Day	
							2	3
Male	01M	Corn oil	0	01M01		37.8	37.5	37.3
				01M02		34.0	34.1	33.8
				01M03		35.7	35.9	35.5
				01M04		38.7	38.9	38.8
				01M05		36.8	36.9	36.5
				Mean		36.6	36.7	36.4
				S.D.		1.8	1.8	1.9
	02M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	125	02M01		38.9	39.0	39.4
				02M02		34.2	34.1	34.0
				02M03		37.5	37.0	37.2
				02M04		36.7	37.6	38.1
				02M05		35.8	36.2	36.4
				Mean		36.6	36.8	37.0
				S.D.		1.8	1.8	2.0
	03M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	250	03M01		35.1	35.0	34.9
				03M02		37.0	37.8	37.8
				03M03		35.3	35.5	36.0
				03M04		37.9	37.4	37.2
				03M05		36.6	36.9	36.8
				Mean		36.4	36.5	36.5
S.D.					1.2	1.2	1.1	
04M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	04M01		36.1	36.3	36.6	
			04M02		37.6	38.0	38.0	
			04M03		37.4	37.7	38.8	
			04M04		34.5	34.0	34.2	
			04M05		38.5	38.1	37.7	
			Mean		36.8	36.8	37.1	
			S.D.		1.6	1.7	1.8	
05M	Mitomycin C	2	05M01		36.9	36.0		
			05M02		35.8	35.4		
			05M03		35.5	35.2		
			05M04		37.0	37.2		
			05M05		38.3	39.3		
			Mean		36.7	36.6		
			S.D.		1.1	1.7		



Appendix 3 Results of micronucleus observation - Individual values

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	MNPCE ^{a)}	Incidence of MNPCE ^{a)} (%)	PCE/(PCE+NCE) (%)
Male	01M	Corn oil	0	01M01	7	0.18	50.8
				01M02	3	0.08	46.2
				01M03	6	0.15	51.7
				01M04	4	0.10	50.9
				01M05	4	0.10	48.6
				Total	24		
				N		5	5
				Mean		0.122	49.64
				S.D.		0.041	2.24
	02M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	125	02M01	3	0.08	48.6
				02M02	5	0.13	47.8
				02M03	6	0.15	47.7
				02M04	6	0.15	49.4
				02M05	6	0.15	52.0
				Total	26		
				N		5	5
				Mean		0.132	49.10
				S.D.		0.030	1.76
	03M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	250	03M01	6	0.15	50.7
				03M02	7	0.18	49.1
				03M03	4	0.10	48.5
				03M04	2	0.05	45.5
				03M05	4	0.10	53.3
				Total	23		
			N		5	5	
			Mean		0.116	49.42	
			S.D.		0.050	2.87	
04M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	04M01	5	0.13	51.1	
			04M02	8	0.20	53.2	
			04M03	5	0.13	49.4	
			04M04	6	0.15	49.2	
			04M05	8	0.20	49.4	
			Total	32			
			N		5	5	
			Mean		0.162	50.46	
			S.D.		0.036	1.71	
05M	Mitomycin C	2	05M01	78	1.95	49.3	
			05M02	102	2.55	45.0	
			05M03	129	3.23	45.0	
			05M04	100	2.50	47.5	
			05M05	108	2.70	47.6	
			Total	517			
			N		5	5	
			Mean		2.586	46.88	
			S.D.		0.459	1.86	

MNPCE : micronucleated polychromatic erythrocyte

a) : Based on 4000 polychromatic erythrocytes per animal.

PCE/(PCE+NCE) : polychromatic erythrocytes/(polychromatic erythrocytes + normochromatic erythrocytes)

8 添付資料

8.1 床敷中汚染物質分析試験成績書

8 添付資料

8.2 飼料中汚染物質分析試験成績書



8 添付資料

8.3 飲料水試験検査成績書

8 添付資料

8.4 Background Data for Micronucleus Tests

Background Data for Micronucleus Tests

Animal used: Mouse (SPF), CD1 (ICR), male, 7-8 week old.
 Supplier of animal : Charles River Japan Inc.
 Accumulation of data : 2013~2018

Group	Item	MNPCE (%)	PCE / (PCE+NCE) (%)
Negative control (n = 109)	MEAN ± S.D.	0.13 ± 0.06	49.13 ± 2.06
	min / max	0.03 / 0.35	44.8 / 53.2
	Control limits (MEAN ± 2×S.D.)	0.01 ~ 0.25	45.01 ~ 53.25
Positive control Mitomycin C 2 mg/kg i.p. (n = 109)	MEAN ± S.D.	3.57 ± 1.07	46.68 ± 3.05
	min / max	0.95 / 6.95	39.8 / 54.5
	Control limits (MEAN ± 2×S.D.)	1.43 ~ 5.71	40.58 ~ 52.78

8 添付資料

8.5 用量設定試験 総括表及びび個別別表

Attachment table 1 Survival rate - Daily

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Day		
				1	2	3
Male	11M	Corn oil	0	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)
	12M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)
	13M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	1000	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)	2 / 3 (66.7)
	14M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	2000	3 / 3 (100.0)	0 / 3 (0.0)	0 / 3 (0.0)
Female	11F	Corn oil	0	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)
	12F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)
	13F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	1000	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)	3 / 3 (100.0)
	14F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	2000	1 / 3 (33.3)	0 / 3 (0.0)	0 / 3 (0.0)

Number of surviving / Total number of animals (Survival rate)

Attachment table 2 General clinical observation

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Findings (Frequency or time)	Day							
					1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)	
Male	11M	Corn oil	0	No. of animals	3	3	3	3	3	3	3	3
				Normal	3	3	3	3	3	3	3	
12M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	No. of animals	3	3	3	3	3	3	3	3	
			Normal	3	2	3	3	2	2	3		
			Panting	0	0	0	0	0	1	0		
			Piloerection	0	1	0	0	1	1	0		
13M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	1000	No. of animals	3	3	3	3	3	3	3		
			Normal	3	2	2	2	1	0	0		
			Found dead	0	0	0	0	0	0	1		
			Decrease in locomotor activity	0	0	1	1	2	2	0		
			Bradypnea	0	0	0	1	1	1	0		
			Piloerection	0	1	0	1	2	3	2		
14M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	2000	No. of animals	3	3	3	3	1				
			Normal	3	1	0	0	0				
			Found dead	0	0	0	2	1				
			Prone position	0	0	1	0	0				
			Decrease in locomotor activity	0	1	1	1	0				
			Bradypnea	0	0	1	1	0				
			Piloerection	0	1	1	1	0				

Attachment table 2 General clinical observation (Continued)

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Findings	(Frequency or time)	Day						
						1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Female	11F	Corn oil	0	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3
				Normal		3	3	3	3	3	3	3
12F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3	
			Normal		3	2	3	2	2	2	3	
			Panting		0	0	0	0	1	1	0	
			Piloerection		0	1	0	1	1	1	0	
13F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	1000	No. of animals		3	3	3	3	3	3	3	
			Normal		3	2	3	3	1	1	1	
			Found dead		0	0	0	0	0	0	0	
			Decrease in locomotor activity		0	0	0	0	0	0	0	
			Bradypnea		0	0	0	0	0	0	0	
Piloerection		0	1	0	0	2	2	2				
14F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	2000	No. of animals		3	3	3	1				
			Normal		3	1	0	0				
			Found dead		0	0	2	1				
			Prone position		0	0	1	0				
			Decrease in locomotor activity		0	2	0	0				
			Bradypnea		0	0	0	0				
Piloerection		0	0	0	0							

Attachment table 3 Body weights (g) - Group mean values (mean \pm S.D.)

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	No. of animals	Initial B.W.	Day 2	3
Male	11M	Corn oil	0	3	34.5 \pm 1.9	34.8 \pm 2.2	35.0 \pm 2.1
	12M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	3	36.0 \pm 2.0	34.5 \pm 3.1	34.8 \pm 3.8
	13M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	1000	3	35.9 \pm 1.3	33.8 \pm 1.3	33.1 \pm 0.8
	14M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	2000	3	36.1 \pm 0.6	32.9 (1)	
Female	11F	Corn oil	0	3	27.6 \pm 0.8	27.6 \pm 1.0	27.6 \pm 1.5
	12F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	3	27.3 \pm 1.4	26.5 \pm 1.7	25.7 \pm 2.1
	13F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	1000	3	27.3 \pm 0.5	25.7 \pm 0.6	24.0 \pm 0.4
	14F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	2000	3	28.0 \pm 1.0		

Number in parentheses indicates the number of animals examined.



Attachment appendix 1 General clinical observation - Individual values

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	(Frequency or time)	Day						
							1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Male	11M	Corn oil	0	11M01			-	-	-	-	-	-	-
				11M02			-	-	-	-	-	-	-
				11M03			-	-	-	-	-	-	-
	12M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	12M01			-	f	-	-	f	ef	-
				12M02			-	-	-	-	-	-	-
				12M03			-	-	-	-	-	-	-
	13M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	1000	13M01	FD (3)		-	f	c	cdf	cdf	cdf	a
				13M02			-	-	-	-	cf	cf	f
				13M03			-	-	-	-	-	f	f
	14M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	2000	14M01	FD (2)		-	f	f	cdf	a		
				14M02	FD (2)		-	-	b	a			
				14M03	FD (2)		-	c	cd	a			

a : Found dead; b : Prone position; c : Decrease in locomotor activity; d : Bradypnea; e : Panting; f : Piloerection
 FD : Found dead
 - : Normal



Attachment appendix 1 General clinical observation - Individual values (Continued)

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	(Frequency or time)	Day						
							1(Before)	1(1-3h)	1(5-6h)	2(Before)	2(1-3h)	2(5-6h)	3(AM)
Female	11F	Corn oil	0	11F01			-	-	-	-	-	-	-
				11F02			-	-	-	-	-	-	-
				11F03			-	-	-	-	-	-	-
	12F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	12F01			-	f	-	f	ef	ef	-
				12F02			-	-	-	-	-	-	-
				12F03			-	-	-	-	-	-	-
	13F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	1000	13F01			-	-	-	-	f	f	f
				13F02			-	f	-	-	-	-	-
				13F03			-	-	-	-	f	f	f
	14F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	2000	14F01	FD (1)		-	c	a				
				14F02	FD (2)		-	-	b	a			
				14F03	FD (1)		-	c	a				

a : Found dead; b : Prone position; c : Decrease in locomotor activity; e : Panting; f : Piloerection

FD : Found dead

- : Normal

Attachment appendix 2 Body weights (g) - Individual values

Sex	Group number	Test article	Dose (mg/kg)	Animal number	Mode of death(day)	Initial B.W.	Day	
							2	3
Male	11M	Corn oil	0	11M01		34.5	34.9	35.0
				11M02		36.4	36.9	37.1
				11M03		32.7	32.5	32.9
				Mean		34.5	34.8	35.0
				S.D.		1.9	2.2	2.1
	12M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	12M01		34.2	31.4	31.1
				12M02		38.2	37.6	38.7
				12M03		35.6	34.5	34.7
				Mean		36.0	34.5	34.8
				S.D.		2.0	3.1	3.8
	13M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	1000	13M01	FD (3)	37.3	34.8	33.9
				13M02		34.9	34.3	33.0
				13M03		35.4	32.4	32.3
				Mean		35.9	33.8	33.1
S.D.					1.3	1.3	0.8	
14M	4-ethenyl-2-methoxyphenol	2000	14M01	FD (2)	35.5	32.9		
			14M02	FD (2)	36.6			
			14M03	FD (2)	36.2			
			Mean		36.1	32.9		
			S.D.		0.6			
Female	11F	Corn oil	0	11F01		27.0	27.1	27.3
				11F02		27.2	27.0	26.3
				11F03		28.5	28.7	29.2
				Mean		27.6	27.6	27.6
				S.D.		0.8	1.0	1.5
	12F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	500	12F01		25.9	24.6	23.3
				12F02		27.5	27.1	26.9
				12F03		28.6	27.9	27.0
				Mean		27.3	26.5	25.7
				S.D.		1.4	1.7	2.1
	13F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	1000	13F01		27.7	26.1	24.1
				13F02		26.8	25.0	24.3
				13F03		27.3	26.0	23.6
				Mean		27.3	25.7	24.0
				S.D.		0.5	0.6	0.4
14F	4-ethenyl-2-methoxyphenol	2000	14F01	FD (1)	29.0			
			14F02	FD (2)	27.0			
			14F03	FD (1)	28.0			
			Mean		28.0			
			S.D.		1.0			

FD : Found dead