

# 最 終 報 告 書

(訂正版)

試験表題：2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの  
ラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号：R-1053

試験期間：2010年4月21日-2011年4月27日

作成日：2012年12月5日

## 試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所  
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

## 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室  
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター  
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

## 1. 目次

1. 目次 .....	2
4. 要約 .....	10
4.1 反復投与毒性 .....	10
4.2 生殖発生毒性 .....	10
5. 緒言 .....	11
6. 試験材料及び方法 .....	12
6.1 被験物質及び媒体 .....	12
6.1.1 被験物質 .....	12
6.1.2 媒体 .....	13
6.2 投与液の調製及び保存方法 .....	13
6.2.1 媒体の調製及び保存 .....	13
6.2.2 被験液の調製及び保存 .....	13
6.2.3 被験液の安定性 .....	14
6.2.4 被験液の濃度及び均一性確認 .....	14
6.3 試験動物種及び系統の選択理由 .....	17
6.4 試験動物 .....	17
6.5 飼育条件 .....	17
6.6 動物の識別 .....	18
6.7 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由 .....	18

6.8	投与方法	18
6.9	投与量及び群構成	18
6.10	投与量の設定根拠	19
6.11	観察及び検査の方法	19
6.11.1	一般状態の観察	19
6.11.2	体重測定	19
6.11.3	摂餌量測定	20
6.11.4	膣垢検査	20
6.11.5	交配方法	20
6.11.6	分娩及び哺育観察	20
6.11.7	病理学検査	21
6.12	統計解析	22
6.12.1	パラメータの算出	22
6.12.2	検定	23
7.	試験結果	24
7.1	一般状態 (Table 1-1~1-4、Appendix 1-1~1-16)	24
7.2	体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)	24
7.3	摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)	24
7.4	器官重量 (Table 4、Appendix 4-1~4-4)	24
7.5	剖検所見 (Table 5、Appendix 5-1~5-96)	24
7.6	病理組織学検査 (Table 6、Appendix 5-1~5-96)	24
7.7	性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)	24
7.8	交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-4)	25
7.9	分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-4)	25
7.10	出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-4)	25
7.11	出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-4)	25
7.12	出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-4)	25
7.13	出生児の生後4日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-4)	25
8.	考察	26
8.1	反復投与毒性	26
8.2	生殖発生毒性	26
9.	文献	27

図

Fig. 1、2	体重
Fig. 3、4	摂餌量

表

Table 1-1~1-4	一般状態
Table 2-1~2-4	体重
Table 3-1~3-4	摂餌量
Table 4	器官重量
Table 5	剖検所見
Table 6	病理組織学検査
Table 7	性周期
Table 8	交配成績
Table 9	分娩成績
Table 10	出生児の性比及び外表観察
Table 11	出生児の生存率
Table 12	出生児の体重
Table 13	出生児の生後 4 日剖検所見

## 4. 要約

2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの0 (対照群: 0.5 w/v%メチルセルロース溶液)、100、300及び1000 mg/kg/dayを、Sprague-Dawley系SPFラットの、雄には交配前14日間に加え交配期間を通して剖検前日まで(42日間)、雌には交配前14日間に加え交配期間及び妊娠期間を通して授乳4日まで(41~50日間)強制経口投与し、反復投与毒性及び生殖発生毒性の概略について検討した。

### 4.1 反復投与毒性

いずれの投与群においても死亡動物はみられず、雌雄の一般状態、体重、摂餌量、器官重量、剖検及び病理組織学検査では、被験物質投与の影響は認められなかった。

### 4.2 生殖発生毒性

性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には被験物質投与の影響は認められなかった。更に、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数、出生率及び性比に被験物質投与の影響は認められず、授乳期間中の哺育状態にも異常は認められないことから、1000 mg/kg投与群においても雌雄動物の交尾能、授精能及び受胎能、母動物の妊娠維持、分娩及び哺育行動などの生殖機能への影響はないと考えられた。

出生児では、出生時の外表観察及び生後4日剖検所見、出生時及び生後4日の雌雄体重、並びに生後4日生存率に被験物質投与による変化は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下において、2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの雌雄動物における反復投与毒性に対する無影響量及び無毒性量は、雌雄共に1000 mg/kg/day以上、雌雄親動物と児動物における生殖発生毒性に対する無影響量及び無毒性量はいずれも1000 mg/kg/day以上と判断した。

## 5. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室の委託により、2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールのラットを用いた経口投与による簡易生殖毒性試験を実施したので、その成績を報告する。

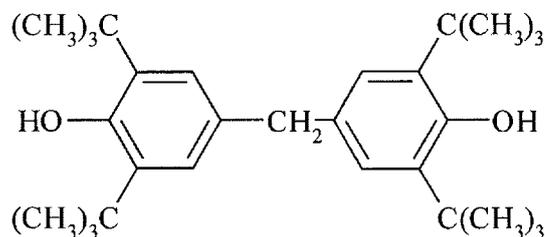
## 6. 試験材料及び方法

## 6.1 被験物質及び媒体

## 6.1.1 被験物質

2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールは以下の情報とともに購入した。また、試験開始前に赤外吸収スペクトルの測定により特性が確認されている（試験番号：A-2261、添付資料1）。

名称	:	2,2',6,6'-テトラ- <i>tert</i> -ブチル-4,4'-メチレンジフェノール
英語名称	:	2,2',6,6'-tetra- <i>tert</i> -butyl-4,4'-methylenediphenol
別名	:	4,4'-メチレンビス (2,6-ジ- <i>tert</i> -ブチルフェノール)
CAS 番号	:	118-82-1
官報公示整理番号	:	4-39
構造式又は示性式	:	



分子式	:	C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>
分子量	:	424.66
常温における性状	:	白色~うすい黄色結晶性粉末
沸点/沸騰範囲	:	289°C/5.3kPa
密度	:	1
溶解性	:	水に不溶 (<10mg/L 20°C)
オクタノール/水分配係数	:	6.24
純度 (GC)	:	99.1%
不純物	:	不明
融点	:	156.1°C
熱メタノール溶状	:	澄明
入手量	:	1000 g (500 g ; 2 本)
保存方法	:	密栓、冷暗所〔冷暗所として冷蔵庫内(許容値:1~10°C、実測値:3~9°C)に保存した。〕
保存場所	:	御殿場研究所被験物質保存室及び第2研究棟4階被験物質調製室
取扱い上の注意	:	作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護

- 安定性 : 手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。投与期間終了後に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所にて、残余被験物質の赤外吸収スペクトルを確認した結果、実験実施前に確認した参照スペクトルとほぼ同様であり安定性に問題はなかった。(添付資料 2)。
- 残量の処理 : 被験物質 5 g を保存試料として御殿場研究所被験物質保存室に保存した。動物試験及び分析終了後の残量はすべて焼却処分した。

### 6.1.2 媒体

- 名称 : 0.5 w/v%メチルセルロース溶液 (略称: 0.5 w/v%MC 溶液)

なお、媒体については、本試験に先立って実施した被験液中濃度測定法バリデーション及び安定性・均一性試験 (試験番号: A-2261) において、0.5 w/v%MC 溶液中での被験物質の安定性及び均一性に良好な結果が得られていることから、0.5 w/v%MC 溶液を選択した。

## 6.2 投与液の調製及び保存方法

### 6.2.1 媒体の調製及び保存

メチルセルロース (METOLOSE SM-400、日本薬局方、信越化学工業株式会社、ロット番号: 8105606) を注射用水 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: 9L85、0A98、0C80) に溶解して 0.5 w/v%MC 溶液とした。調製した媒体は、調製当日に被験液の調製に使用した。また、被験液調製当日の被験物質を取り扱う前に対照群投与液として、必要量の媒体を褐色ガラス瓶に分注し、投与に使用するまで被験液と同様に保存した。

### 6.2.2 被験液の調製及び保存

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に秤取した。媒体を少量ずつ添加し、乳鉢及び乳棒を用いて被験物質を媒体に懸濁させた。懸濁液をメスシリンダーに移すとともに、乳鉢及び乳棒を少量の媒体で数回洗い、その液もメスシリンダーに加えた。更に媒体をメスシリンダーに加えて規定量にメスアップし、所定の濃度液を調製した。調製は最大 7 日分を一括して行い、調製した被験液は褐色ガラス瓶に入れて冷所 (冷蔵庫内、許容値: 1~10°C、実測値: 4~10°C) に保存し、安定性の確認された範囲内で投与に使用した。残液はポリ瓶に回収又はペーパータオル等に吸着させて焼却処分した。

### 6.2.3 被験液の安定性

本被験物質の 1.00 及び 200 mg/mL 溶液（媒体：0.5 w/v%MC 溶液）は、褐色ガラス瓶に入れ冷所（冷蔵庫内、1~10°C）で 8 日間、その後保存室温で 24 時間安定であることが株式会社ボゾリサーチセンターで確認されている（株式会社ボゾリサーチセンター試験番号：A-2261、添付資料 3）。

### 6.2.4 被験液の濃度及び均一性確認

雄の投与 1 週と投与 6 週の 2 回、投与に用いる各濃度の被験液について、投与に使用する前に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で HPLC 法により濃度及び均一性確認を実施した。その結果、各濃度液における表示値に対する被験物質の割合は 97.5~103.5%、変動係数は 0.5~4.6% であり、いずれも許容範囲内（濃度：表示値に対する割合；100.0±10.0%、均一性：CV10.0%以内）であった（添付資料 4、5）。分析法の概略を以下に示す。

#### [標準物質]

被験物質の一部を標準物質として使用した。

名称	:	2,2',6,6'-テトラ- <i>tert</i> -ブチル-4,4'-メチレンジフェノール
ロット番号	:	FHM7C
保存方法	:	密栓、冷暗所〔冷暗所として冷蔵庫内（許容値：1~10°C、実測値：2~9°C）に保存〕
保存場所	:	御殿場研究所被験物質保存室及び生化学部標準物質保存場所

#### [試薬]

試薬名	等級	メーカー
メタノール	HPLC 用	Thermo Fisher Scientific, Inc.
精製水	Milli-Q 水製造システム	

#### [使用機器]

##### 1) HPLC システム

機器名及び型式	メーカー
HPLC 2690 セパレーションモジュール	Waters Corporation
検出器 2487 デュアルλ UV/VIS 検出器	
データ処理装置 ミレニアム <sup>32</sup> クロマトグラフィーマネジャー	

##### 2) 天秤

機器名及び型式	メーカー
分析用上皿電子天秤 AE240	Mettler-Toledo AG

## 3) その他の機器

機器名及び型式	メーカー
マグネチックスターラーMGM-66	柴田科学株式会社
Milli-Q 水製造システム Milli-Q Advantage A10	Millipore Corporation

## [HPLC 移動相 [メタノール/精製水混液 (95/5、v/v)] の調製]

メタノール 2470 mL と精製水 130 mL を混合した。本試液は調製日の翌日まで使用した（使用期限：調製後 2 週間以内）。

## [標準原液の調製]

以下に示すように、標準原液を n=1 で用時調製した。

調製試料	採取試料	採取量 (g)	定容量 (mL)	調製濃度 (µg/mL)
標準原液	標準物質	0.0100	100	100

溶媒：メタノール

## [標準溶液の調製]

以下に示すように、標準溶液を n=1 で用時調製した。

調製試料	採取試料	採取量 (mL)	定容量 (mL)	調製濃度 (µg/mL)
標準溶液	標準原液	1	10	10.0

溶媒：HPLC 移動相

## [測定実測試料の調製]

20、60 及び 200 mg/mL 被験液をマグネチックスターラーで攪拌しながら、各被験液の上、中、下層より 1 回ずつ採取 (n=3) し、以下の表に示すように測定実測試料を用時調製した。なお、1 次希釈において被験物質が溶媒 (HPLC 移動相) に溶けにくい場合は、超音波を照射して溶解した。

濃度 (mg/mL)	1 次希釈		2 次希釈		希釈率
	採取量 (mL)	定容量 (mL)	採取量 (mL)	定容量 (mL)	
20	0.5	100	1	10	2000
60	0.5	100	1	30	6000
200	0.5	100	0.5	50	20000

溶媒：HPLC 移動相

## [HPLC 測定条件]

カラム : L-column ODS (4.6 mm I.D. × 150 mm、粒子径 5 µm、一般財団法人化学物質評価研究機構)

カラム恒温槽設定温度 : 40°C

移動相 : メタノール/精製水混液 (95/5、v/v)

R-1053 (訂正版)

流速 : 1 mL/min  
 検出 : UV (測定波長 254 nm)  
 注入量 : 50 μL  
 オートサンプラー内設定温度 : 室温 (温度設定しない)  
 注入順序 :

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液 (システム適合性用)
2	3	標準溶液 (定量用)
3	1	測定実測試料 (20 mg/mL-上層)
4	1	測定実測試料 (20 mg/mL-中層)
5	1	測定実測試料 (20 mg/mL-下層)
6	1	測定実測試料 (60 mg/mL-上層)
7	1	測定実測試料 (60 mg/mL-中層)
8	1	測定実測試料 (60 mg/mL-下層)
9	1	測定実測試料 (200 mg/mL-上層)
10	1	測定実測試料 (200 mg/mL-中層)
11	1	測定実測試料 (200 mg/mL-下層)

標準溶液及び測定実測試料の測定は、測定開始後 24 時間以内に実施に実施した。なお、バリデーション試験で、オートサンプラー内 24 時間の保存安定性が確認されている。

[システム適合性]

測定開始時に標準溶液を 3 回連続注入し、2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの保持時間及びピーク面積の再現性を確認した。評価基準は保持時間及びピーク面積の相対標準偏差が 5%以下とした。その結果、ピーク面積の相対標準偏差は 0.3%以下、保持時間の相対標準偏差は 0.4%以下であり、すべて判定基準を満たす結果であったことから、本測定の信頼性は保証された。

[被験液中 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール濃度の算出]

標準溶液を HPLC へ 3 回注入して 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールのピーク面積の平均値 (Qs) を求めた。別に測定実測試料を HPLC へ 1 回注入して 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールのピーク面積 (Qt) を求めた。以下の式により測定試料中の 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール濃度を求め、各被験液の上、中、下層の測定濃度を平均し、被験液濃度とした。また、得られた被験液濃度を用いて表示値 (100.0%) に対する割合、均一性として上、中、下層の測定濃度から変動係数 (CV) を算出した。

$$\text{測定試料中 2,2',6,6'-テトラ-}i{tert}\text{-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール濃度 (mg/mL)} = \frac{Q_t}{Q_s} \times A \times F \times \frac{1}{1000}$$

- Qt : 測定実測試料の 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールのピーク面積
- Qs : 標準溶液の 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの平均ピーク面積
- A : 標準溶液中の 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール濃度 (μg/mL)
- F : 希釈率

### 6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりげっ歯類を用いた試験が必要とされていることからラットを選択し、また、この試験に使用された系統のラットは一般毒性試験、生殖発生毒性試験に広く用いられ、その特性がよく知られており、背景資料が豊富であることから選択した。

### 6.4 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] の雌雄各 62 匹をそれぞれ 8 週齢で入手<sup>注)</sup>し、入荷日を馴化 1 日と起算して、3 日間の検疫期間を含む 18 日間の馴化飼育を行った。その間、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (馴化 1、3、8、15 及び 18 日の 5 回) 及び膣垢検査 (馴化 4 から 17 日の 14 日間) を実施し、それらの結果を基に、性周期異常の雌 2 例 (耳標番号: 626 及び 657) を除き、一般状態及び性周期にそれぞれ異常がなく、体重増加が良好な雌雄各 48 匹をそれぞれ選択し、10 週齢で投与に使用した。なお、性周期については、膣垢像を発情前期、発情期、発情後期及び発情休止期に分類し、それらの周期が 4~5 日ごとに繰り返されない場合を性周期異常とした。動物は検疫・馴化期間中の体重増加量 (検疫初回の体重~群分け時の体重) により選別後、群分け当日 (投与開始の前日) の体重により層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群に割付けた。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組み合わせ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた) で行った。また、各群の平均体重を均等にするため、投与開始日の投与前に動物入れ替えを実施した。投与開始時の体重範囲は雄で 392~449 g (平均体重: 422 g)、雌は 228~274 g (平均体重: 251 g) であった。群分けから除外された動物のうち、雄 14 匹と性周期異常の雌 2 匹は投与開始日に試験から除外し、有効利用を目的として動物管理責任者に移管した。残りの雌 12 匹は無処置動物として継続飼育した。なお、継続飼育した無処置動物の雌は、試験群で死亡などにより交配すべき相手がいない動物は認められず、交配に用いなかったため、交配期間終了後に試験から除外し、有効利用を目的として動物管理責任者に移管した。

注) : 試験計画書に従い、動物発注数は雌雄各 60 匹であったが、実際には雌雄各 62 匹が納入された。

### 6.5 飼育条件

動物は、温度 23±3°C (実測値: 23~25°C)、相対湿度 50±20% (実測値: 38~64%)、換気回数 10~15 回/h、照明 12 時間/日 (07:00~19:00) の動物飼育室 (飼育室番号: 905 号室) でブラケット式金属製網ケージ (W254×D350×H170 mm: リードエンジニアリング株式会社) に個別に、交配中は雌雄各 1 匹の計 2 匹を収容した。なお、妊娠 17 日から授乳 4 日までは、床敷 (ホワイトフレーク: 日本チャールス・リバー株式会社) を入れたプラスチック製エコケージ (W340×D400×H185 mm: 日本クリア株式会社)

に 1 腹単位で収容した。飼料は NMF 固形（放射線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：100113、100210、100309）をステンレス製給餌器により自由に摂取させた。飲料水は水道水（御殿場市営水道水：自動給水装置使用）を自由に摂取させた。ただし、プラスチック製エコンケージに収容している間は給水瓶を使用した。飼料及び床敷中の混入物質等に関しては、供試飼料全ロットについて、Eurofins Scientific Analytice で実施した分析結果を入手し、床敷については、Eurofins Scientific Analytice で定期的（年 6 回）に実施した分析結果を入手した。飲料水については、水道法に準拠した水質の分析を東芝機械環境センター株式会社に定期的（年 4 回）に依頼し、結果を入手した。これらのデータにより飼料、飲料水及び床敷中の混入物質が試験成績に影響を与える可能性のないことを確認し、分析報告書の写しを保存した。

## 6.6 動物の識別

動物の個体識別は入荷時に小動物用耳標（雄：547~608、雌：609~670）をつけて行った。群分け後は、性別及び投与量ごと（対照群、低、中及び高用量の順）に 4 桁の番号をつけた。なお、1000 の位は群、100 の位は性（0 番を雄、1 番を雌）、10 と 1 の位は個体番号とした。飼育ケージに投与量（群）ごとに色分けしたケージラベルを付け、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号、剖検予定日（雄）、交尾成立日（雌雄）及び分娩日（雌）を明記した。

## 6.7 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 421 に準じ、経口投与を選択した。投与期間は、雄では 42 日間（交配前 14 日間、交配期間 14 日間、その後 14 日間）、雌では 41~50 日間（交配前 14 日間、交配期間及び妊娠期間を通して授乳 4 日まで）、不妊であった動物（動物番号：3112 及び 4105）については 53 日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている 1 回/日（7 回/週）とした。

## 6.8 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与に際して一般的な強制経口投与とした。投与容量は 5 mL/kg 体重とし、フレキシブル胃ゾンデを用いて投与液を 1 日 1 回、09:01~12:16 の間に強制経口投与した。ただし、投与時に分娩中であった動物は分娩終了を待って、14:17~15:19 の間に投与した。対照群には媒体（0.5 w/v%MC 溶液）のみを同様に投与した。個体ごとの投与液量（表示単位：0.1 mL、小数第二位を四捨五入）は、最近時の体重を基準に算出した。

## 6.9 投与量及び群構成

投与量は 100、300 及び 1000 mg/kg/day の 3 用量とし、媒体を投与する対照群を加え 4 群構成とした。1 群当たりの動物数は雌雄各 12 匹とした。群構成表を Text table 1. に示した。

Text table 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	被験液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	12	1001~1012
				雌	12	1101~1112
低用量群	100	20	5	雄	12	2001~2012
				雌	12	2101~2112
中用量群	300	60	5	雄	12	3001~3012
				雌	12	3101~3112
高用量群	1000	200	5	雄	12	4001~4012
				雌	12	4101~4112

## 6.10 投与量の設定根拠

本試験の投与量は、先に実施した「2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールのラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（投与量設定試験）」<sup>1)</sup>の結果（添付資料 6）を参考に設定した。投与量設定試験では、OECD Guideline for Testing of Chemicals 421 で投与限量とされている 1000 mg/kg において、毒性変化は認められなかった。したがって、簡易生殖毒性試験における投与量は毒性試験法ガイドラインにおける投与限量である 1000 mg/kg を高用量とし、以下公比約 3 で除して 300 及び 100 mg/kg をそれぞれ中及び低用量に設定した。

## 6.11 観察及び検査の方法

試験日の起算は、投与開始日を投与 1 日、投与 1 日から 7 日を投与 1 週、交尾成立日を妊娠 0 日、分娩終了日を授乳 0 日、出産日（出生日）を哺育 0 日（生後 0 日）とし、以下に示す項目について、それぞれ記載の時期に観察及び検査を実施した。

### 6.11.1 一般状態の観察

全個体について、検疫・馴化期間中は毎日 1 回、投与期間中は毎日 3 回（投与前、投与直後及び投与約 2 時間後）、それぞれ体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態における異常の有無を観察した。

### 6.11.2 体重測定

全個体について、馴化 1、3、8、15 及び 18 日に体重を測定した。雄は投与 1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、42 日及び剖検日に、雌は投与 1、4、8、11、15 日（未交尾動物は交配期間中の投与 18、22 及び 25 日）、妊娠 0、4、7、11、14、17 及び 20 日、授乳 0 及び 4 日並びに剖検日に体重を測定した。なお、午後の分娩観察時に分娩の終了が確認された個体の授乳 0 日の体重測定（14:00~16:57）を除き、08:36~11:12 の間に体重測定を行った。剖検日には相対器官重量算出に備えて、全個体の体重を 08:17~08:41 の間に測定した。

### 6.11.3 摂餌量測定

全個体について、雄は投与 1、4、8、11、15、32、36、39 及び 42 日に、雌は投与 1、4、8、11 及び 15 日、妊娠 1、4、7、11、14、17 及び 20 日並びに授乳 2 及び 4 日に残餌量を測定し、前日の給餌量との差から 1 匹当たりの 1 日摂餌量を算出した。給餌量及び残餌量の測定は 08:36~11:25 の間に行った。

### 6.11.4 膣垢検査

雌の全個体について、馴化期間中の 14 日間及び投与開始翌日から交尾が認められるまで毎日（午前中）膣垢を採取し、鏡検した。膣垢像を発情前期、発情期、発情後期及び発情休止期に分類し、馴化期間中は性周期異常の有無、交配前投与期間中は発情期像発現回数及び発情期から次の発情期までの日数（性周期）を調べ、交配期間中は膣垢内の精子の有無を調べた。

### 6.11.5 交配方法

交配前投与期間終了後、同じ投与群の雌雄を 1:1 で終夜同居させ、翌朝、膣栓形成あるいは膣垢中に精子を確認したものを交尾成立とみなした。交配開始日を 0 日と起算して交尾までに要した日数を調べた。同一雌雄による同居期間は最長 14 日間であった。交尾が確認されなかった 300 及び 1000 mg/kg 投与群の各 1 例（動物番号：3112 及び 4105）は交配期間終了日を妊娠 0 日として一般状態の観察、体重及び摂餌量測定並びに投与を行った。

### 6.11.6 分娩及び哺育観察

#### 1) 母動物の観察

交尾の確認された雌動物は全例自然分娩させ、分娩状態の異常の有無を観察した。分娩終了の確認（授乳 0 日の測定及び観察）は、妊娠 21 日から妊娠 25 日までの午前・午後、1 日 2 回（妊娠 25 日は午前 10 時までには 1 回）行い、妊娠期間を 0.5 日単位で表示し、1 日単位で算出した。分娩が 17 時までには終了していた場合、その日を授乳 0 日とした。分娩が終了した母動物は胎盤及び羊膜の処理の有無を観察後、授乳 4 日まで出生児を哺育させ、児集め、営巣及び授乳を指標として哺育状態を観察した。

分娩した母動物は、授乳 5 日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ病理学検査に供した。なお、妊娠 25 日の 10 時までには分娩が終了しなかった 300 及び 1000 mg/kg 投与群の各 1 例（動物番号：3112 及び 4105）は、エーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査に供した。妊娠の有無を確認した結果、着床が認められなかったため不妊とみなし、妊娠期間中のデータを統計解析より除外した。

#### 2) 出生児の観察

出生日（生後 0 日）に出生児数及び死産児数を数えた。出生児は外表異常の有無を観察<sup>註)</sup>し、性別を判定して体重を測定した後、母動物に哺育させた。出生児の生死の

観察を生後 4 日まで毎日 1 回行った。なお、死産児及び死亡児は廃棄した。

生後 4 日に体重を測定した後、全例をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ剖検を行い、体外表、胸部・腹部を含む器官・組織の異常の有無を調べた。なお、出生児の体重は個体別に測定し、各腹単位で雌雄別に平均値を算出した。

注) : 頭部の陥没や裂、顔面の鼻吻や上下顎、口唇のゆがみや裂、眼瞼や耳介の大きさ、形状、左右のバランス、胸胴部のゆがみや大きさ、内部臓器の突出、尾部の長さ、形状、数、欠損、四肢部の長さ、形状、指の数、欠損及び左右のバランスに注意して観察し、正常と異なる場合を異常とした。

### 6.11.7 病理学検査

#### 1) 剖検及び器官重量測定

全ての動物について、最終投与翌日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させた後、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録した。なお、授乳 5 日の剖検時には母動物の黄体数及び着床痕数を数えた。次いで、全例の精巣及び精巣上体の重量を測定し、それら器官重量（絶対重量）と剖検時の体重から体重 100 g 当たりの相対重量を算出した。なお、精巣及び精巣上体の重量については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

#### 2) 病理組織学検査

全ての個体について、以下に示す器官・組織をリン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液で固定、保存した（ただし、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後リン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液に置換し保存した）。次いで、パラフィン包埋した後、切片とし（下線を施した器官・組織は固定・保存のみとした）、ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色を行った。鏡検は、まず対照群及び高用量群の全個体並びに妊娠 25 日未分娩個体の全検査対象器官/組織、加えて全個体の肉眼的異常部位について行った。両側性の器官については両側を摘出し、精巣/卵巣、精巣上体及び精嚢は両側を、子宮は両角部を鏡検した。その結果、高用量群で被験物質投与による変化が疑われる器官/組織は認められなかったため、中及び低用量群については鏡検を実施しなかった。なお、精巣については H・E 染色標本で被験物質投与の影響が認められなかったため、PAS・ヘマトキシリン染色標本の作製及び精子形成サイクル（ステージⅦ又はⅧ）の観察は行わなかった。

精巣、精巣上体、卵巣、子宮、前立腺、精嚢、腔、肉眼的異常部位、個体識別部（耳標を装着した耳介）

## 6.12 統計解析

### 6.12.1 パラメータの算出

以下の式により交尾率、授精率、受胎率及び出産率を群ごとに、妊娠期間、着床率、死産児率、外表異常率、出生率、生後4日生存率、生後0及び4日の性比を母動物ごとに算出した。なお、出生児の体重については母動物ごと雌雄別に平均値を求めた。

$$\text{交尾率(\%)} = (\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100$$

$$\text{授精率(\%)} = (\text{雌を妊娠させた雄の数} / \text{交尾した雄の数}) \times 100$$

$$\text{受胎率(\%)} = (\text{妊娠した雌の数} / \text{交尾した雌の数}) \times 100$$

$$\text{妊娠期間(日)} = \text{妊娠0日から分娩した日までの日数}$$

$$\text{出産率(\%)} = (\text{出生児出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100$$

$$\text{着床率(\%)} = (\text{着床痕数} / \text{黄体数}) \times 100$$

$$\text{死産児率(\%)} = (\text{死産児数} / \text{出生児数及び死産児数}) \times 100$$

$$\text{外表異常率(\%)} = (\text{外表異常児数} / \text{出生児数}) \times 100$$

$$\text{出生率(\%)} = (\text{出生児数} / \text{着床痕数}) \times 100$$

$$\text{生後4日生存率(\%)} = (\text{生後4日生存児数} / \text{出生児数}) \times 100$$

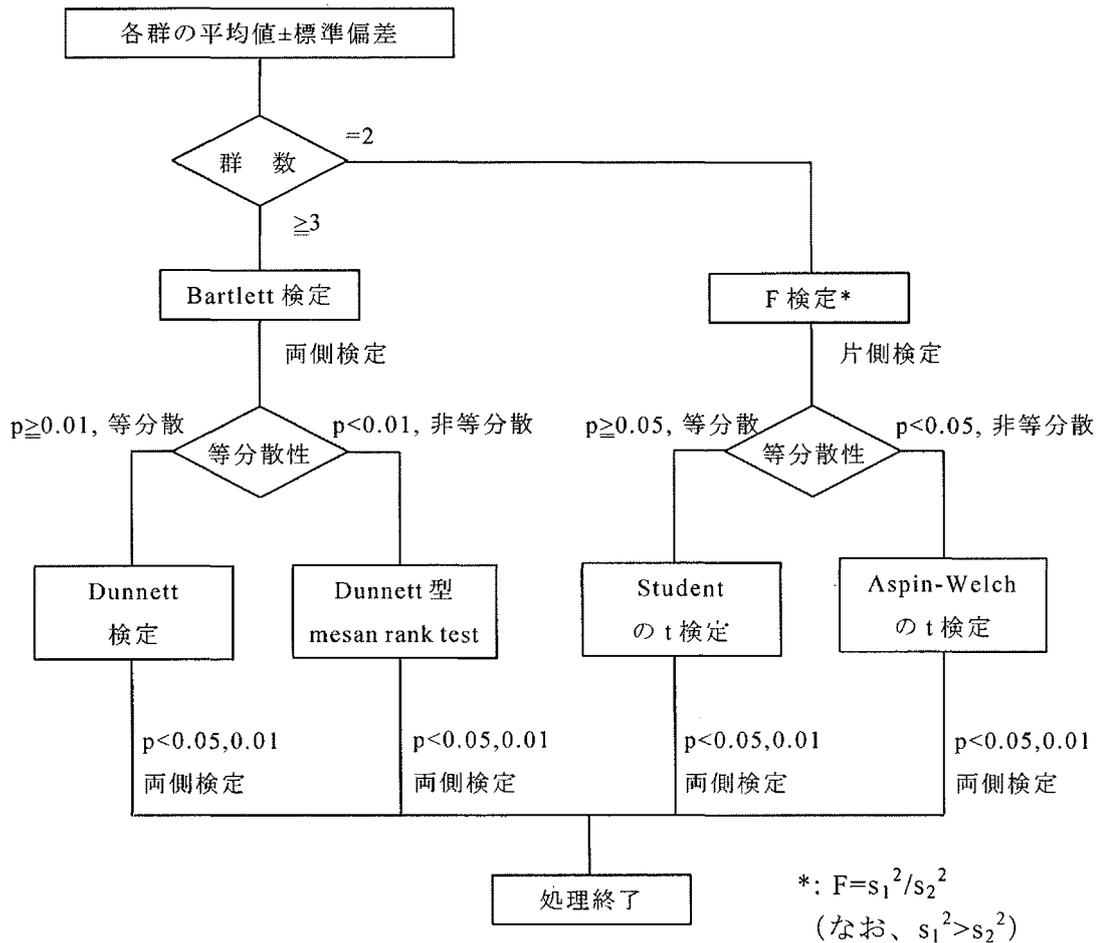
$$\text{生後0日の性比} = \text{雄出生児数} / \text{出生児数}$$

$$\text{生後4日の性比} = \text{生後4日の雄生存児数} / \text{生後4日の生存児数}$$

### 6.12.2 検定

データは対照群と各用量群との差について統計学的有意性の検定を行った。

体重、体重増加量（雄：投与 1~42 日、雌：投与 1~15 日、妊娠 0~20 日及び授乳 0~4 日、出生児：生後 0~4 日）、摂餌量、発情期像発現回数、性周期（発情周期）、交尾までに要した日数、妊娠期間、黄体数、着床痕数、生存児数、性比（生後 0 及び 4 日）及び器官重量（含、剖検時体重）は、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、次に示す模式図の方法に従って検定した<sup>2), 3), 4)</sup>。なお、未交尾雌は交尾率にのみ含め、交配期間中のデータは統計解析より除外した。



着床率、死産児率、外表異常率、出生率及び生後 4 日生存率については、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、Dunnett 型 mean rank test により平均順位の差の検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った<sup>4)</sup>。

交尾率、授精率、受胎率、出産率は、各群の交尾動物数、雌を妊娠させた雄動物数、妊娠雌動物数、生存児出産雌動物数より算出し、Yeates の連続修正による  $\chi^2$  検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った。ただし、期待度数が 5 以下のセルがみられる場合には Fisher の直接確率計算法により検定（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）を行った<sup>4)</sup>。

## 7. 試験結果

### 7.1 一般状態 (Table 1-1~1-4、Appendix 1-1~1-16)

いずれの投与群においても死亡動物はみられず、投与期間を通じて、哺育状態を含め一般状態に異常はみられなかった。

### 7.2 体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)

雌雄の体重は、いずれの被験物質投与群においても、投与期間を通じて対照群と同等の推移を示し、増加量を含め、対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

### 7.3 摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)

100 及び 300 mg/kg 投与群の雌雄並びに 1000 mg/kg 投与群の雄の摂餌量は、いずれも投与期間を通じて対照群と同等の値を示し、対照群との間に有意な差は認められなかった。

1000 mg/kg 投与群の雌で、投与 15 日、妊娠 1 及び 14 日に対照群と比べ有意な低値がみられたが、いずれの期間も体重推移に異常はなく、毒性学的意義のない変化と考えられた。

### 7.4 器官重量 (Table 4、Appendix 4-1~4-4)

いずれの被験物質投与群においても、精巣及び精巣上体の絶対及び相対重量の双方並びに剖検時の体重に対照群と比べ有意な差は認められなかった。

### 7.5 剖検所見 (Table 5、Appendix 5-1~5-96)

いずれの被験物質投与群にも、被験物質投与の影響と考えられる変化はみられなかった。

なお、精巣及び精巣上体の小型化 (片側性) が 1000 mg/kg 投与群の 1/12 例に、精巣上体の白色巣が 300 mg/kg 投与群の 1/12 例に、精巣の大型化 (片側性) が 100 mg/kg 投与群の 1/12 例に、回腸に憩室が 300 mg/kg 投与群の雌の 1/12 例にみられたが、出現頻度及び病理学的性状から偶発的变化と考えられた。

### 7.6 病理組織学検査 (Table 6、Appendix 5-1~5-96)

いずれの投与群の雌雄の器官・組織においても被験物質投与の影響と考えられる変化はみられなかった。なお、いくつかの器官・組織に種々の変化がみられたが、この系統の動物に背景的にみられる変化と質的及び頻度的な差はなく、その病理組織学的性状及び発現状況から、偶発性変化と判断した。

### 7.7 性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)

いずれの動物にも性周期の異常はみられなかった。また、発情期像発現回数及び平

均性周期日数には対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 7.8 交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-4)

未交尾の組み合わせは 300 及び 1000 mg/kg 投与群の各 1 組 (動物番号: 3012 及び 3112、4005 及び 4105) であった。残りの組み合わせは、交配開始後 9 日までに交尾が成立した。また、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 7.9 分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-4)

妊娠動物の分娩状態では、妊娠 21 又は 22 日に全例が正常に分娩し、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数及び出生率には対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 7.10 出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-4)

生後 0 及び 4 日の性比には対照群と各被験物質投与群との間に有意な差はなく、いずれの投与群においても外表異常を有する出生児はみられなかった。

#### 7.11 出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-4)

授乳期間中の死亡児は対照群で 7 例、100、300 及び 1000 mg/kg 投与群でそれぞれ 1、2 及び 9 例みられたのみであり、生後 4 日生存率には対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 7.12 出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-4)

出生時及び生後 4 日の雌雄体重並びに生後 0~4 日の間の体重増加量には対照群と各被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 7.13 出生児の生後 4 日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-4)

いずれの投与群の出生児にも体外表、胸部・腹部を含む器官・組織に肉眼的異常はみられなかった。

## 8. 考察

2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの0 (対照群: 0.5 w/v%MC 溶液)、100、300 及び 1000 mg/kg/day を、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄には交配前 14 日間に加え交配期間を通して剖検前日まで (42 日間)、雌には交配前 14 日間に加え交配期間及び妊娠期間を通して授乳 4 日まで (41~50 日間) 強制経口投与し、反復投与毒性及び生殖発生毒性の概略について検討した。

### 8.1 反復投与毒性

いずれの投与群においても死亡動物はみられず、一般状態、体重、摂餌量、器官重量、剖検及び病理組織学検査では、被験物質投与の影響は認められなかった。

### 8.2 生殖発生毒性

親動物では、性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には被験物質投与の影響は認められなかった。更に、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、死産児率、出生児数、出生率、生後 0 及び 4 日の性比に被験物質投与の影響は認められず、授乳期間中の哺育状態にも異常が認められないことから、1000 mg/kg 投与群においても雌雄動物の交尾能、授精能及び受胎能、母動物の妊娠維持、分娩及び哺育行動などの生殖機能への影響はないと判断した。

出生児では、出生時の外表観察及び剖検所見、出生時及び生後 4 日の雌雄体重、並びに生後 4 日の生存率に被験物質投与による影響は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下で 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールを反復経口投与することにより、如何なる影響も認められなかった。従って、本被験物質の雌雄動物における反復投与毒性に対する無影響量及び無毒性量は雌雄共に 1000 mg/kg/day 以上、雌雄親動物と児動物における生殖発生毒性に対する無影響量及び無毒性量はいずれも 1000 mg/kg/day 以上と判断した。

## 9. 文献

- 1) 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールのラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験 (投与量設定試験) (株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号 : C-R139、2009 年)
- 2) Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods, 8th ed. Ames: Iowa State University Press; 1989.
- 3) Dunnett CW. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J Am Stat Assoc 1955; 50: 1096-121.
- 4) 佐久間昭 (1981) : 薬効評価—計画と分析—II, pp.23-27, 387-389, 東京大学出版会, 東京.

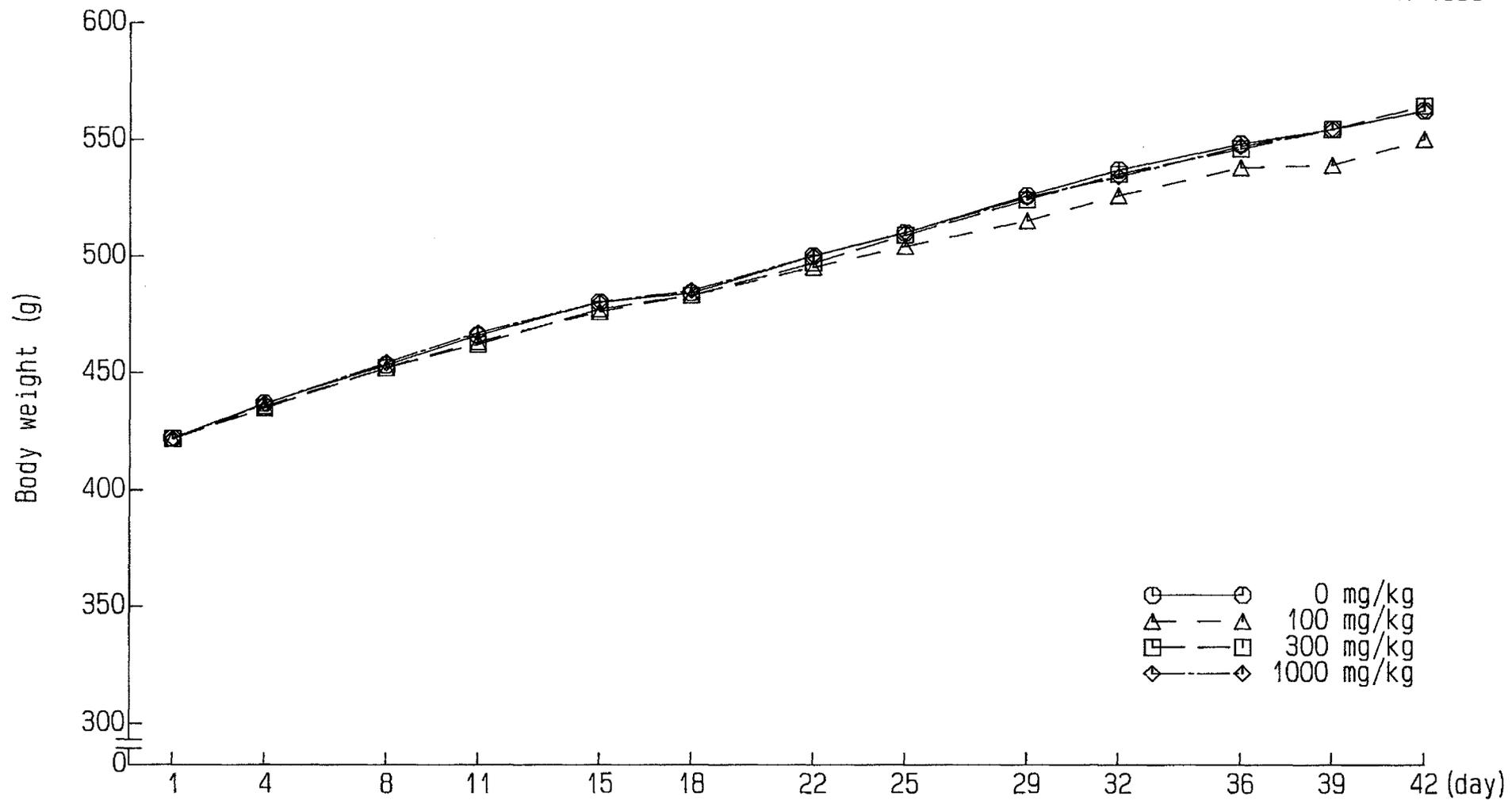


Fig.1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol  
Body weight of male rats

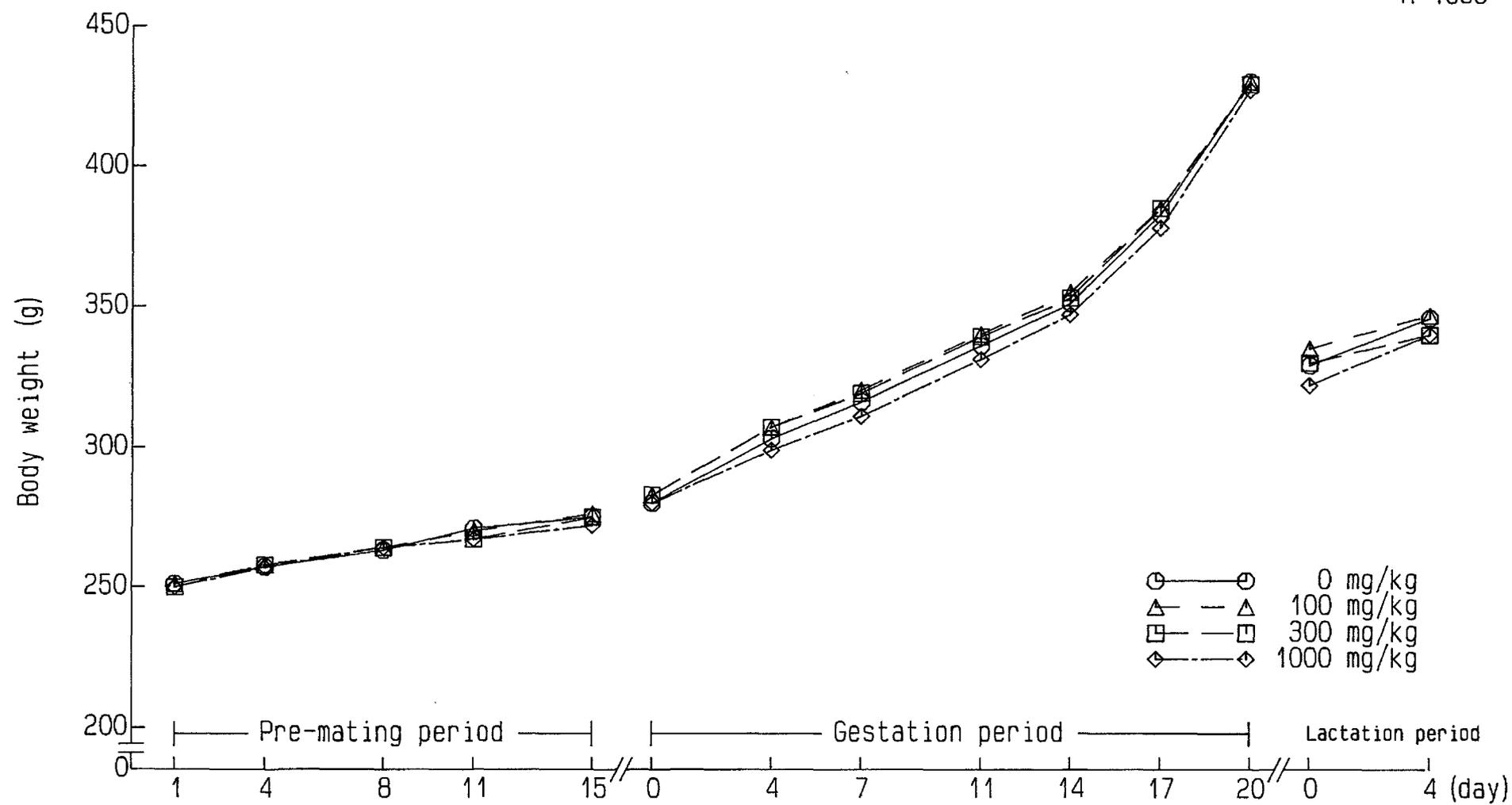


Fig.2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Body weight of female rats

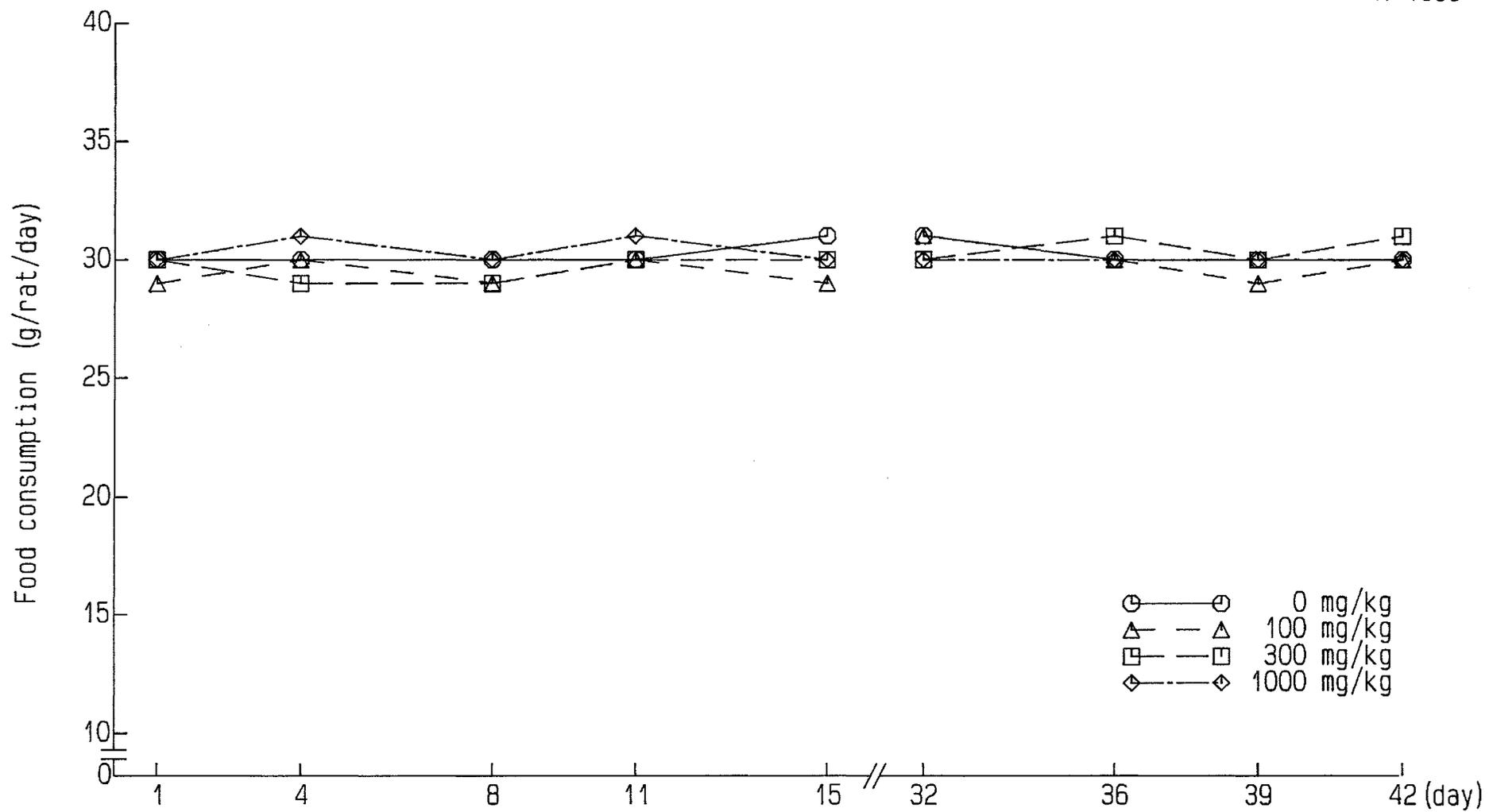


Fig.3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol  
Food consumption of male rats

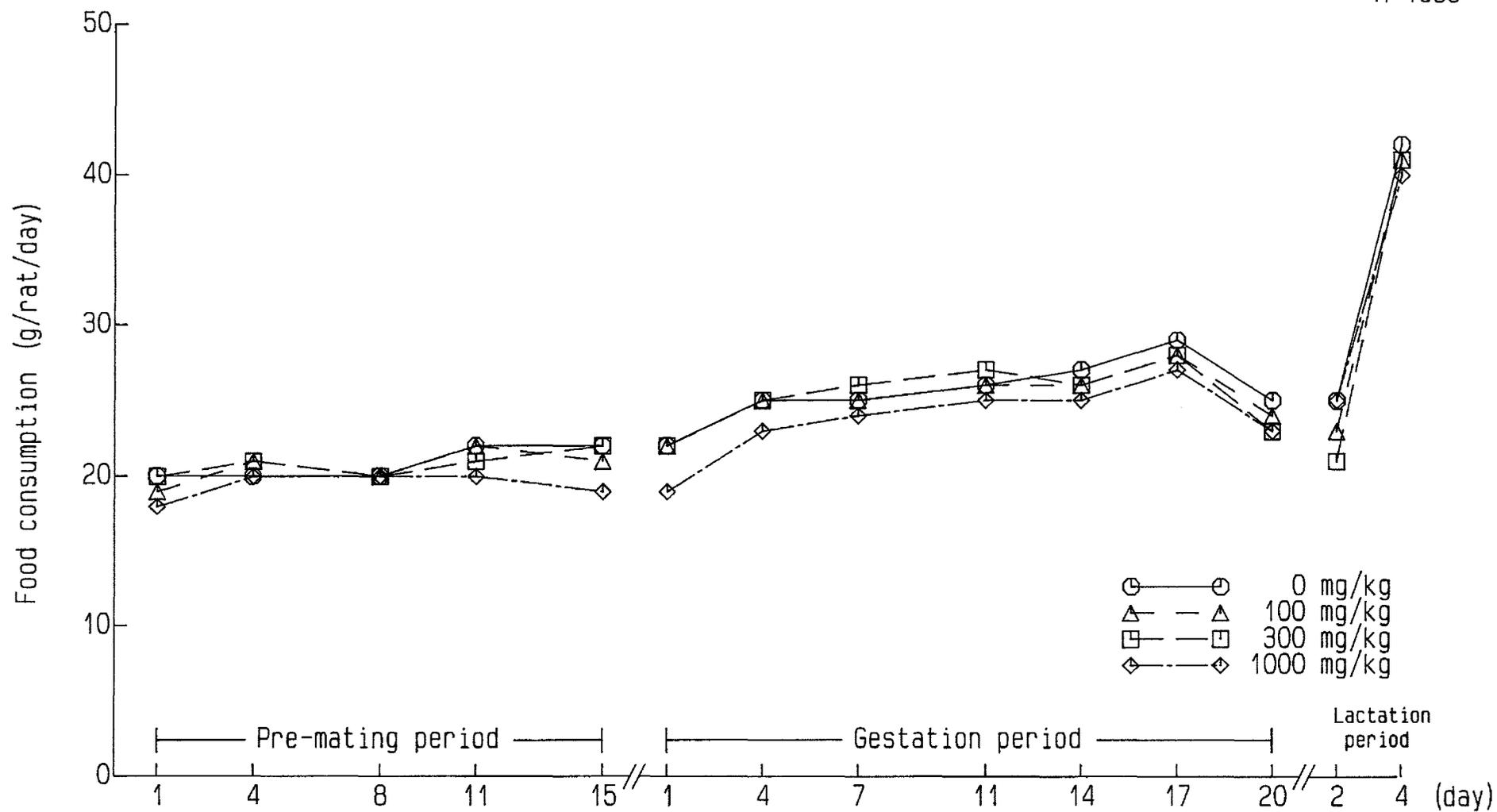


Fig.4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol.

Food consumption of female rats

Table 1-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol  
Clinical signs in male rats

Dose mg/kg	Signs	Day of administration					
		1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
100	No. of animals	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
300	No. of animals	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
1000	No. of animals	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0



Table 1-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Clinical signs in dams during the gestation period

Dose mg/kg	Signs	Administration																						
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22a)
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	No. of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	5
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	No. of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	3
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a): Gestation day

Table 1-4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol  
Clinical signs in dams during the lactation period

Dose mg/kg	Signs	Administration					
		0	1	2	3	4	5a)
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
100	No. of dams	12	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
300	No. of dams	11	11	11	11	11	11
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
1000	No. of dams	11	11	11	11	11	11
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0

a): Lactation day

Table 2-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Body weight of male rats

Dose mg/kg		Pre-mating period					Mating period				Post-mating period				Gain 1-42
		1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	42a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	422	437	453	466	480	484	500	510	526	537	548	554	562	140
	S.D.	14	15	20	20	21	22	25	24	27	28	29	31	32	20
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	422	436	452	463	476	483	495	504	515	526	538	539	550	127
	S.D.	17	17	20	21	22	24	23	29	28	30	29	33	33	20
300	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	422	435	452	462	477	483	497	509	524	535	546	554	564	142
	S.D.	15	17	20	23	26	26	27	29	30	31	33	33	34	25
1000	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	422	437	454	467	480	485	500	510	525	534	547	554	562	140
	S.D.	16	18	17	19	17	17	19	17	21	20	22	25	23	15

Unit: g

No.: No. of animals

a): Day of administration

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Body weight of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Day of administration					Gain 1-15
		1	4	8	11	15	
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	251	257	263	271	275	25
	S.D.	10	8	7	7	8	7
100	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	251	258	264	270	276	25
	S.D.	13	9	13	13	13	11
300	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	250	258	264	267	275	24
	S.D.	10	9	9	9	11	8
1000	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	250	257	264	267	272	22
	S.D.	7	9	9	9	11	11

Unit: g

No.: No. of animals

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Body weight of dams during the gestation period

Dose mg/kg		Administration							Gain 0-20
		0	4	7	11	14	17	20a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	280	303	316	336	351	383	430	150
	S.D.	9	10	10	13	16	15	20	13
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	283	307	320	340	355	385	430	147
	S.D.	17	15	15	14	15	17	14	20
300	No.	11	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	283	307	319	339	353	385	429	146
	S.D.	11	10	13	14	16	17	17	14
1000	No.	11	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	280	299	311	331	347	378	427	147
	S.D.	11	14	15	16	18	20	22	15

Unit: g

No.: No. of dams

a): Gestation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Body weight of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration		Gain 0-4
		0	4a)	
0	No.	12	12	12
	Mean	329	346	17
	S.D.	20	14	18
100	No.	12	12	12
	Mean	335	347	13
	S.D.	25	15	23
300	No.	11	11	11
	Mean	330	340	10
	S.D.	21	21	11
1000	No.	11	11	11
	Mean	322	340	19
	S.D.	23	27	18

Unit: g

No.: No. of dams

a): Lactation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Food consumption of male rats

Dose mg/kg		Pre-mating period					Post-mating period			
		1	4	8	11	15	32	36	39	42a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	30	30	30	30	31	31	30	30	30
	S.D.	3	2	3	2	3	3	3	2	3
100	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	29	30	29	30	29	31	30	29	30
	S.D.	3	3	3	3	2	4	3	3	3
300	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	30	29	29	30	30	30	31	30	31
	S.D.	3	3	3	3	4	3	3	3	3
1000	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	30	31	30	31	30	30	30	30	30
	S.D.	3	2	3	3	2	2	2	3	2

Unit: g/rat/day

No.: NO. of animals

a): Day of administration

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Food consumption of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Day of administration				
		1	4	8	11	15
0	No.	12	12	12	12	12
	Mean	20	20	20	22	22
	S.D.	3	3	3	2	2
100	No.	12	12	12	12	12
	Mean	19	21	20	22	21
	S.D.	3	3	4	4	2
300	No.	12	12	12	12	12
	Mean	20	21	20	21	22
	S.D.	4	3	3	3	3
1000	No.	12	12	12	12	12
	Mean	18	20	20	20	19*
	S.D.	2	2	3	3	3D

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

\*: p<0.05 (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 3-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Food consumption of dams during the gestation period

Dose mg/kg		Administration						
		1	4	7	11	14	17	20a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	22	25	25	26	27	29	25
	S.D.	3	2	2	3	3	3	2
100	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	22	25	25	26	26	28	24
	S.D.	3	2	3	3	2	3	2
300	No.	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	22	25	26	27	26	28	23
	S.D.	3	3	3	3	2	2	3
1000	No.	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	19*	23	24	25	25*	27	23
	S.D.	3D	3	2	2	2D	3	2

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Gestation day

\*: p<0.05 (Significant difference from control group)

D: Dunnett's test

Table 3-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Food consumption of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration	
		2	4a)
0	No.	12	12
	Mean	25	42
	S.D.	8	4
100	No.	12	12
	Mean	23	41
	S.D.	7	8
300	No.	11	11
	Mean	21	41
	S.D.	6	4
1000	No.	11	11
	Mean	25	40
	S.D.	9	6

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Lactation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol  
Organ weight of male rats

Dose mg/kg			Body weight g	Testes (R+L) g(g/100g BW)	Epididymides (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	12	12	12
		Mean	563	3.42	1352
		S.D.	32	0.18	93
	100	No.	12	12	12
		Mean	551	3.54	1391
		S.D.	32	0.33	93
	300	No.	12	12	12
		Mean	568	3.52	1360
		S.D.	31	0.25	69
	1000	No.	12	12	12
		Mean	564	3.40	1332
		S.D.	26	0.38	127
Relative	0	No.		12	12
		Mean		0.61	241
		S.D.		0.05	22
	100	No.		12	12
		Mean		0.64	253
		S.D.		0.07	23
	300	No.		12	12
		Mean		0.62	240
		S.D.		0.05	14
	1000	No.		12	12
		Mean		0.60	237
		S.D.		0.06	21

No significant difference in any treated groups from control group

Table 5

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

## Gross pathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg):	0	100	300	1000	0	100	300	1000
	Number:	12	12	12	12	12	12	12	12
Epididymis									
Small, unilateral		0	0	0	1	-	-	-	-
Focus, white		0	0	1	0	-	-	-	-
Intestine, ileum									
Diverticulum		0	0	0	0	0	0	1	0
Testis									
Large, unilateral		0	1	0	0	-	-	-	-
Small, unilateral		0	0	0	1	-	-	-	-

M : Male, F : Female  
- : Not applicable

Table 6

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

## Histopathological findings

Organs	Sex: Dose (mg/kg): Number:	M				F			
		0	100	300	1000	0	100	300	1000
Findings		12	12	12	12	12	12	12	12
Epididymis									
Number examined		12	0	1	12	-	-	-	-
Not remarkable		12	0	0	10	-	-	-	-
Granuloma, spermatic		0	0	1	1	-	-	-	-
mild		0	0	1	1	-	-	-	-
Hypospermia		0	0	0	1	-	-	-	-
mild		0	0	0	1	-	-	-	-
Cell debris, intraductal		0	0	0	1	-	-	-	-
mild		0	0	0	1	-	-	-	-
Intestine, ileum									
Number examined		0	0	0	0	0	0	1	0
Diverticulum		0	0	0	0	0	0	1	0
minimal		0	0	0	0	0	0	1	0
Ovary									
Number examined		-	-	-	-	12	0	1	12
Not remarkable		-	-	-	-	12	0	1	12
Prostate									
Number examined		12	0	0	12	-	-	-	-
Not remarkable		5	0	0	4	-	-	-	-
Cell infiltration, inflammatory		7	0	0	8	-	-	-	-
minimal		7	0	0	7	-	-	-	-
mild		0	0	0	1	-	-	-	-
Seminal vesicle									
Number examined		12	0	0	12	-	-	-	-
Not remarkable		12	0	0	12	-	-	-	-
Testis									
Number examined		12	1	0	12	-	-	-	-
Not remarkable		11	0	0	10	-	-	-	-
Atrophy, seminiferous tubular		1	0	0	2	-	-	-	-
minimal		0	0	0	1	-	-	-	-
mild		1	0	0	0	-	-	-	-
moderate		0	0	0	1	-	-	-	-
Dilatation, seminiferous tubular		0	1	0	0	-	-	-	-
mild		0	1	0	0	-	-	-	-
Uterus									
Number examined		-	-	-	-	12	0	1	12
Not remarkable		-	-	-	-	12	0	1	12
Vagina									
Number examined		-	-	-	-	12	0	1	12
Not remarkable		-	-	-	-	12	0	1	12

M : Male, F : Female

- : Not applicable

Table 7                    A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol  
 Estrous cycle in female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg	No. of animals	Count of estrus					Mean±S.D.	Mean duration of cycles Mean±S.D.
		0	1	2	3	4		
0	12	0	0	0	8	4	3.3±0.5	4.0±0.0
100	12	0	0	0	9	3	3.3±0.5	4.2±0.3
300	12	0	0	1	7	4	3.3±0.6	4.1±0.3
1000	12	0	0	0	5	7	3.6±0.5	4.1±0.3

No significant difference in any treated groups from control group

Table 8 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol  
Mating and fertility of animals

Dose mg/kg	Male				Female			
	No. of males	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Insemination index (%) b)	No. of females	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) c)
0	12	2.2±0.9	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.2±0.9	12/12(100.0)	12/12(100.0)
100	12	2.8±2.2	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.8±2.2	12/12(100.0)	12/12(100.0)
300	12	2.3±1.5	11/12( 91.7)	11/11(100.0)	12	2.3±1.5	11/12( 91.7)	11/11(100.0)
1000	12	2.9±1.0	11/12( 91.7)	11/11(100.0)	12	2.9±1.0	11/12( 91.7)	11/11(100.0)

a): (No. of copulated animals / No. of mated animals) × 100

b): (No. of males which impregnated females / No. of copulated males) × 100

c): (No. of pregnant females / No. of copulated females) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 9 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Delivery data on dams

Dose mg/kg		No. of pregnant females	No. of females with liveborns	Delivery index % a)	Gestation length in days	No. of corpora lutea	No. of implantation sites	Implantation index % b)	No. of stillborns (%c)	No. of liveborns	Live birth index % d)
0	Total	12	12	100.0		202	195		3	176	
	Mean				21.7	16.8	16.3	96.7	( 1.5)	14.7	90.4
	S.D.				0.5	1.1	1.1	5.1	( 3.7)	1.9	11.3
100	Total	12	12	100.0		206	187		1	169	
	Mean				21.9	17.2	15.6	91.3	( 0.5)	14.1	90.0
	S.D.				0.3	1.5	1.7	11.4	( 1.8)	2.4	9.1
300	Total	11	11	100.0		176	173		2	166	
	Mean				21.7	16.0	15.7	98.2	( 1.2)	15.1	96.0
	S.D.				0.5	1.5	1.7	3.1	( 2.7)	1.8	5.1
1000	Total	11	11	100.0		178	174		6	162	
	Mean				21.8	16.2	15.8	97.9	( 4.2)	14.7	92.5
	S.D.				0.4	2.2	2.1	3.7	( 6.4)	2.9	9.9

a): (No. of females which delivered liveborns / No. of pregnant females) × 100

b): (No. of implantation sites / No. of corpora lutea) × 100

c): (No. of stillborns / No. of liveborns and stillborns) × 100

d): (No. of liveborns / No. of implantation sites) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 10

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Sex ratio and external examination of pups

Dose mg/kg	No. of dams		Liveborns		Sex ratio of liveborns at birth a)	Day 4		Sex ratio of live pups on day 4 b)	External c) abnor- malities (%)d)
			No. of males	No. of females		No. of males	No. of females		
0	12	Total	82	94		77	92		0
		Mean	6.8	7.8	0.47	6.4	7.7	0.46	( 0.0)
		S.D.	2.2	2.3	0.14	2.2	2.3	0.13	( 0.0)
100	12	Total	76	93		76	92		0
		Mean	6.3	7.8	0.45	6.3	7.7	0.45	( 0.0)
		S.D.	2.2	2.5	0.15	2.2	2.4	0.15	( 0.0)
300	11	Total	81	85		79	85		0
		Mean	7.4	7.7	0.48	7.2	7.7	0.48	( 0.0)
		S.D.	2.2	1.7	0.11	1.9	1.7	0.11	( 0.0)
1000	11	Total	80	82		77	76		0
		Mean	7.3	7.5	0.50	7.0	6.9	0.51	( 0.0)
		S.D.	2.0	2.5	0.11	1.9	2.6	0.12	( 0.0)

a): No. of liveborn males / No. of liveborns

b): No. of live males on day 4 / No. of live pups on day 4

c): No. of liveborns with external abnormalities

d): (No. of liveborns with external abnormalities / No. of liveborns) × 100

No significant difference in any treated groups from control group

Table 11 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol

Viability index of pups

Dose mg/kg		No. of dams	No. of live pups		Viability index on postnatal day 4 % a)
			Day 0	Day 4	
0	Total	12	176	169	96.2
	Mean		14.7	14.1	
	S.D.		1.9	2.2	
100	Total	12	169	168	99.4
	Mean		14.1	14.0	
	S.D.		2.4	2.4	
300	Total	11	166	164	98.9
	Mean		15.1	14.9	
	S.D.		1.8	1.8	
1000	Total	11	162	153	94.8
	Mean		14.7	13.9	
	S.D.		2.9	2.7	

a): (No. of live pups on day 4 / No. of liveborns on day 0) × 100  
 No significant difference in any treated groups from control group

Table 12 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol  
Body weight of pups

Dose mg/kg		Male			Female		
		0	4a)	Gain	0	4a)	Gain
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	6.5	9.7	3.2	6.1	9.0	3.0
	S.D.	0.5	1.0	0.8	0.4	0.8	0.7
100	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	6.6	10.0	3.4	6.3	9.4	3.2
	S.D.	0.3	0.7	0.7	0.3	0.6	0.6
300	No.	11	11	11	11	11	11
	Mean	6.4	9.4	3.0	6.1	9.1	3.0
	S.D.	0.6	1.2	0.7	0.5	1.2	0.8
1000	No.	11	11	11	11	11	11
	Mean	6.4	9.7	3.3	6.0	9.2	3.2
	S.D.	0.4	1.2	0.9	0.3	1.2	1.0

Unit: g

No.: No. of dams

a): Postnatal day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 13                      A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with  
2,2',6,6'-tetra-tert-butyl-4,4'-methylenediphenol  
Gross pathological findings in pups on postnatal day 4

	Dose (mg/kg)	0	100	300	1000
Male					
No. of pups examined		77	76	79	77
No. of pups with abnormal findings		0	0	0	0
Female					
No. of pups examined		92	92	85	76
No. of pups with abnormal findings		0	0	0	0