2, 2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール)の ラットにおける28日間反復投与毒性試験

-最終報告書-

試験実施施設 :株式会社パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所

目 次

頁

要 約	***************************************	1
緒言		2
試験材料及	び方法	2
試験成績		7
考察	***************************************	10
参考文献	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	12
Fig. 1	Mean body weight changes in male rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period	13
Fig. 2	Mean body weight changes in female rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period	14
Fig. 3	Mean food consumption in male rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period	15
Fig. 4	Mean food consumption in female rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period	16
Table 1	Body weights in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6- <i>tert</i> -butyl- <i>p</i> -cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period	17
Table 2	Food consumption in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period	18
Table 3	Urinary findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days	19

Table	4	Urinary findings in rats treated orally with $2,2'$ -methylenebis(6 -tert-butyl- p -cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period 2	2
Table	5	Hematological findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis($6-tert$ -butyl- p -cresol) for 28 days 2	5
Table	6	Hematological findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6 -tert-butyl- p -cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period	8
Table	7	Biochemical findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days 3	1
Table	8	Biochemical findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period	4
Table	9	Necropsy findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days 3	7
Table	10	Necropsy findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period 3	8
Table	11	Organ weights in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days 3	9
Table	12	Organ weights in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period	.2
Table	13	Histopathological findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days 4	:5
Table	14	Histopathological findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period	:6

要約

0ECD既存化学物質安全性点検に関わる毒性調査の一環として、2,2'ーメチレンビス (6-tert-ブチルー<math>p-クレゾール)の0(対照),50,200及び800mg/kgを1群雌雄各6匹のCrj:CD(SD系)ラットに28日間反復経口投与する毒性試験を実施し、以下の結果を得た。なお、対照群及び<math>800mg/kg群にはそれぞれ雌雄各6匹の14日間回復群も設けた。

投与期間及び回復期間を通して、雌雄いずれの群にも死亡はなく、一般状態の観察、体重、摂餌量、尿検査及び血液生化学的検査においても変化はみられなかった。

血液学的検査では、プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の延長 又は延長傾向が50mg/kg以上の群にみられた。

病理学的検査では、肝臓重量の増加又は増加傾向が50mg/kg以上の群でみられ、組織学的に肝小葉中心性の肝細胞の軽度の肥大が200mg/kg以上の群でみられた。精巣ではセルトリ細胞の空胞化及び精子分化の障害が200mg/kg以上の群でみられた。また、200mg/kg以上の群で副腎重量の増加がみられた。

上記の変化は、精巣の変化を除いていずれも回復するかその傾向を示した。しかし、精巣については、回復期間終了時に巨細胞の形成や精上皮細胞の減少などが800mg/kg群に新たに出現し、より重篤な変化を呈した。

以上の結果より、本試験条件下における無影響量は50mg/kg未満と考えられた。

緒 言

今回、0ECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として、2、2 ーメチレンビス(6-tert-ブチルーp-クレゾール)を雌雄ラットに28日間反復経口投与するとともに、投与終了後に14日間の休薬期間を設けて、その毒性及び回復性について検討したので報告する。

試験材料及び方法

1.被験物質

2. 使用動物及び飼育条件

5 週齢のCrj:CD(SD系)ラット(日本チャールス・リバー株式会社)を雌雄各45匹購入し、8 日間の検疫馴化を行った。この間に、全例について一般状態の観察及び体重測定を実施するとともに、雌雄各 3 匹を抜粋して剖検し、異常がないことを確認したのち、雌雄各36匹を選んで 6 週齢で試験に使用した。投与開始時の体重は、雄が $208.6\sim234.5g$ 、雌が $142.4\sim163.8g$ であった。動物は、温度 24 ± 2 C(許容範囲 $18\sim28$ C)、湿度 55 ± 10

%(許容範囲30~70%),照明12時間(午前7時~午後7時)及び換気回数13回/時に設定したバリアーシステム飼育室(82番)でステンレススチール製ハンガーケージ(W260×H200×D380mm)に,検疫馴化期間中は1ケージ当たり3匹ずつ,群分け後は個別に収容して飼育した。なお,試験期間中の温度の実測値は最高25℃,最低21℃,湿度の実測値は最高62%,最低50%であった。飼料は高圧蒸気滅菌処理した固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業株式会社)を,飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加(約2ppm)した井水を自動給水装置によりそれぞれ自由に摂取させた。飼料については財団法人日本食品分析センターにて,また,飲水については株式会社鶴城南九科研センターにて分析を行い,いずれも許容基準に適合していることを確認した。飼育器材は高圧蒸気滅菌したものを使用し,ケージは2週間に1回以上,受皿は週3回以上,ラックは4週間に1回以上交換するとともに,飼育室は毎日清掃し,消毒薬を浸したモップで清拭した。

3. 試験群構成,投与量設定の根拠及び群分け 試験群構成を下表に示した。

試験群	投与量 (mg/kg)	性別	使用動物数	動物番号
対照群	0	ੋ	6+6*	601~606, 607*~612*
刈炽矸	U	<u>우</u>	6+6*	641~646, 647*~652*
広田昌	50	♂	6	613~618
低用量群	90	우	6	653~658
小明田自郑	200	♂1	6	619~624
中間用量群	200	우	6	659~664
古口县 张	900	o [™]	6+6*	625~630, 631*~636*
高用量群	800	우	6+6*	665~670, 671*~676*

*:回復試験に使用した動物

投与量は,先に当研究所で実施した2週間反復投与毒性予備試験(投与量:0,250,500及び1000mg/kg)の結果から設定した。すなわち,雌のすべての被験物質投与群で,

総コレステロール量及びリン脂質量の高値、雌の500mg/kg以上の投与群ではグルコース量の低値が認められ、雌の1000mg/kg投与群ではカリウム量の高値が認められた。また、雌雄のすべての被験物質投与群で、肝臓重量の増加が認められた。したがって、本試験の投与量は明らかな毒性が発現すると考えられる800mg/kgを高用量とし、以下公比4で除して200及び50mg/kgを中間及び低用量に設定した。

試験群は、上記3用量群に対照群を加え計4群とした。1群当たりの動物数は、投与期間終了時の剖検例として各群とも雌雄各6匹とし、更に対照群及び800mg/kg群については回復期間終了時の剖検例として雌雄各6匹を設定した。

群分けは、投与開始前日に当日の体重を基に層別連続無作為化法で行い、群分け後の動物には動物番号を刻印した耳標を取り付けて個体識別した。また、各ケージには試験番号、動物番号、投与量及び性別を表示したケージラベルを付けて識別した。

4. 投与経路, 投与方法, 投与期間及び回復期間

投与経路は、化審法ガイドラインで指定されており、また、予想されるヒトへの曝露 経路の一つである経口投与とした。投与には胃管を用い、1日1回投与で28日間反復投 与した。投与容量は10ml/kgとし、個体ごとの投与液量は最新の体重を基に算出した。 対照群には5%アラビアゴム水溶液を同様に投与した。

回復試験に供した動物は、投与期間終了後に14日間無処置で飼育した。

5.被験物質と媒体との混合物調製法

被験物質を各濃度ごとに必要量秤量して磨砕後,5%アラビアゴム水溶液を徐々に加えて懸濁し,0.5,2及び8W/V%懸濁液を調製した。調製は週1回以上の頻度で,1日分ずつ別々に行い,調製した懸濁液は飼育区域内の検体保管室にて室温,遮光下に保管した。また,初回調製時に,各濃度の懸濁液について被験物質の濃度確認を実施し,設定濃度の許容範囲(±10%以内)にあることを確認した(添付資料2)。なお,本調製法による0.1,1及び10W/V%懸濁液は,室温,遮光下で調製後8日間安定であり,均一性についても問題ないことが確認されている(添付資料3)。

6. 観察,検査,分析及び測定の頻度及び方法

1)一般状態の観察,体重及び摂餌量の測定

投与期間中は毎日投与前及び投与後の計2回,回復期間中は毎日午前及び午後の計2回,一般状態及び死亡の有無を観察した。また,体重及び摂餌量を投与期間及び回復期間を通して週2回の割合で測定し,更に,体重は投与開始日の投与前にも測定した。

2)尿検査

投与4週目及び回復2週目に、すべての動物を代謝ケージに個別収容し、絶食、給水下で午前8時から12時までの時間帯に採取した新鮮尿について、比色試験紙(プレテスト8 a、和光純薬工業株式会社)を用いてpH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血及びウロビリノーゲンを検査した。更に、各時点の新鮮尿は1500回転/分で5分間遠心分離し、得られた尿沈渣について鏡検した。また、すべての時点で新鮮尿採取後に給餌、給水下で採取した24時間蓄積尿について、尿量、色調、浸透圧(氷点降下法;0SMOMETER 0M801, VOGEL社)及び比重(屈折率法;尿屈折計、株式会社 アタゴ)を測定した。

3)血液学的検査

投与期間終了後及び回復期間終了後に、すべての動物を18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウム30mg/kgを腹腔内投与して麻酔し、開腹後、腹部大静脈から採血を行った。採取した血液の一部はEDTA-2K処理(EDTA-2K加血液)して多項目自動血球計数装置(Sysmex CC-780型、東亜医用電子株式会社)を用いて、白血球数(電気抵抗検出方式)、赤血球数(電気抵抗検出方式)、ヘモグロビン量(オキシヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(血球バルス波高値検出方式)及び血小板数(電気抵抗検出方式)を測定し、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の測定結果を基にWintrobeの赤血球恒数[平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)及び平均赤血球血色素濃度(MCHC)]を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、May-Grünwald-Giemsa染色を施して白血球百分比を算出するとともに、網状赤血球率検査用のニューメチレンブルー超生体染色標本を作製して保管した。また、3.8%クエン酸ナトリウム

加血液を3000回転/分で15分間遠心分離し,得られた血漿を用いて全自動血液凝固測定装置(SysmexCA-5000型,東亜医用電子株式会社)により,プロトロンビン時間(散乱光検出方式)及び活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT,散乱光検出方式)を測定した。

4)血液生化学的検査

血液学的検査と同時に採取したすべての動物の血液を室温で約60分間放置後,3000回転/分で10分間遠心分離し,得られた血清を用いて自動分析装置(736-10型,株式会社 日立製作所)により,総蛋白質(T.protein, ビウレット法),アルブミン(BCG法),A/G比(総蛋白質及びアルブミンより算出),総ビリルビン(T.bilirubin, アルカリアゾビリルビン法),GOT(GOT, Karmen法),GPT(GPT, Wróblewski-LaDue法), γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP, L- γ -グルタミル-DBHA基質法),アルカリ性フォスファターゼ(ALP, p-ニトロフェニルリン酸基質法),総コレステロール(T.cholesterol, COD-DAOS法),トリグリセライド(GPO-DAOS法・グリセリン消去法),リン脂質(酵素法・DAOS発色法),グルコース(グルコキナーゼ・G-6-PDH法),尿素窒素(BUN, ウレアーゼ-G ℓ DH法),クレアチニン(Jaffé法),無機リン(モリブデン酸直接法)及びカルシウム(Ca, OCPC法)を測定した。また,電解質分析装置(PVA- α III,株式会社アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(Na, 電極法),カリウム(K, 電極法)及びクロール(C1, 電量滴定法)を測定した。

5) 剖検、器官重量の測定及び病理組織学的検査

投与期間終了後及び回復期間終了後に、すべての動物について採血を行ったのち、外側腸骨動脈を切断して放血死させ、解剖して諸器官及び組織の肉眼的観察を行った。剖検後、脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣及び卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに、剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。重量測定器官に加え、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、膵臓、胃、膀胱、大腿骨(骨髄を含む)及び肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン溶液に固定した。なお、10%中性緩衝ホルマリン溶液による固定に先だって、眼球は2.5%グルタールアルデヒド溶液で、また、精巣はブアン液でそれぞれ前固定した。投与期間終了時の対照群及び高用量群の心臓、肝臓、腎臓、脾

臓及び副腎については、常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施して光学顕微鏡下で観察した。投与期間終了時の検査で肝臓に変化がみられたため、投与期間終了時の中間及び低用量群並びに回復期間終了時の対照群及び高用量群についても同様に検査した。更に、精巣については本被験物質を使用した過去の毒性試験¹⁾において、明らかな毒性が認められていることから、投与期間終了時及び回復期間終了時の全例について同様に検査を実施した。

7. 統計学的処理

体重,摂餌量,尿検査(定性反応は除く),血液学的検査,血液生化学的検査,器官重量及び体重比器官重量について,各群ごとに平均値と標準偏差を求め,Bartlett法により分散の均一性を検定した。分散が均一な場合は一元配置型の分散分析を行い,この解析で群間に有意差が認められ,かつ各群の例数が同じ場合はDunnett法により,異なる場合はScheffé法により対照群に対する各群の一対比較検定を行った。分散が均一でない場合はKruskal-Wallis法によって順位検定を行い,この検定で群間に有意差が認められ,かつ各群の例数が同じ場合はDunnett型の,異なる場合はScheffé型の一対比較検定を行った。上述の分散分析あるいはKruskal-Wallis法による順位検定で群間に有意差が認められなかった場合は,各群間の多重比較は行わなかった。なお,いずれの場合も有意水準は5%とした。

試 験 成 績

1. 一般状態

投与期間及び回復期間を通して、雌雄のいずれの試験群にも一般状態に変化はなかった。

2. 体重

体重推移をFig.1,2及びTable 1並びにAppendix 1及び2に示した。

投与期間及び回復期間を通して, 雌雄とも全投与群が対照群と同様な体重推移を示した。

3. 摂餌量

摂餌量の推移をFig.3,4及びTable 2並びにAppendix 3及び4に示した。

800mg/kg群の雌では、投与初期に一過性の減少がみられ、後期に一過性の軽微な増加がみられた。50mg/kg群の雌では、投与期間の後期に一過性の軽微な増加がみられた。雄を含むその他の投与群は、投与期間及び回復期間を通して対照群と同様な摂餌量を示した。

4. 尿検査

投与4週目の検査結果をTable 3並びにAppendix 5及び6に,回復2週目の検査結果をTable 4並びにAppendix 7及び8に示した。

投与4週目では、雌雄ともにいずれの投与群にも変化はみられなかった。回復2週目では、800mg/kg群の雌で尿浸透圧及び尿比重の軽微な増加がみられた。同群の雄では、対照群との差はみられなかった。

5. 血液学的検查

投与期間終了時の検査結果をTable 5並びにAppendix 9及び10に,回復期間終了時の検査結果をTable 6並びにAppendix 11及び12に示した。

投与期間終了時の検査では、50mg/kg群の雄でヘモグロビンの軽微な減少が、800mg/kg群の雄で血小板数の軽微な増加がみられた。また、プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の延長又は延長傾向が、雄では50mg/kg以上の群に、雌では200mg/kg以上の群にみられ、いずれも用量が高くなるにつれて延長する傾向にあった。

回復期間終了時の検査では、800mg/kg群の雄でMCVの軽微な低値が、雌で好酸球百分比の軽微な高値がみられたのみであった。

6. 血液生化学的検査

投与期間終了時の検査結果をTable 7並びにAppendix 13及び14に,回復期間終了時の検査結果をTable 8並びにAppendix 15及び16に示した。

投与期間終了時には、雄の50mg/kg以上及び雌の200mg/kg以上の群で総蛋白質の増加 又は増加傾向がみられ、雄の800mg/kg及び雌の200mg/kg以上の群でアルブミンの増加又 は増加傾向がみられたが、いずれも極めて軽微であり、また背景データ(参考資料)内の

変動であり、生物学的意義はないと判断した。また、800mg/kg群の雌で軽微なGOTの低下及び尿素窒素の減少がみられた。

7. 剖検

投与期間終了時の検査結果をTable 9並びにAppendix 17及び18に,回復期間終了時の検査結果をTable 10並びにAppendix 19及び20に示した。

投与期間終了時には、雌雄のいずれの群にも変化はみられなかった。

回復期間終了時には、偶発的変化として、800mg/kg群の雄1例に精巣上体の黄白色結節がみられた。

8. 器官重量

投与期間終了時の検査結果をTable 11並びにAppendix 21及び22に,回復期間終了時の検査結果をTable 12並びにAppendix 23及び24に示した。

投与期間終了時には,雌雄の全投与群で肝臓の絶対及び相対重量の増加又は増加傾向がみられた。また,200mg/kg群の雌で副腎の相対重量の増加がみられ,絶対重量でも増加傾向がみられた。更に,800mg/kg群の雌でも副腎の絶対及び相対重量の増加傾向がみられた。このほか,雄の50mg/kg以上の群で肺の相対重量の減少又は減少傾向がみられたが,軽微な変動であった。

回復期間終了時には、雌雄の800mg/kg群で肝臓の絶対及び相対重量の増加がみられたが、その程度は投与期間終了時に比べて小さかった。また、雄の800mg/kg群で脳の絶対重量の軽微な減少がみられ、雌の800mg/kg群で腎臓の絶対及び相対重量の軽微な増加がみられた。

9. 病理組織学的検査

投与期間終了時の検査結果をTable 13並びにAppendix 25及び26に,回復期間終了時の検査結果をTable 14並びにAppendix 27及び28に示した。また,肝臓,腎臓,心臓,脾臓,副腎及び精巣の光学顕微鏡写真をPhoto.1~15に示した。

投与期間終了時には、800mg/kg群の雄1例及び雌2例並びに200mg/kg群の雌雄各1例

の肝臓に小葉中心性の肝細胞の軽度の肥大がみられた。また,雄では200mg/kg以上の群の全例に精巣の精子分化の障害及びセルトリ細胞の空胞化がみられ,800mg/kg群で精子分化の障害の程度が強かった。そのほか,投与期間終了時の腎臓,心臓,脾臓及び副腎には雌雄のいずれの群にも変化はみられなかった。

回復期間終了時には,雄では800mg/kg群の5例にセルトリ細胞の空胞化がみられ,軽度ないし中等度の巨細胞形成,精子細胞の核の空胞化あるいは軽度の精上皮細胞の減少を示す例もあった。更に,他の1例には重度の巨細胞の形成及び精上皮細胞の減少及び軽度の精子細胞の核の空胞化がみられた。なお,投与期間終了時にみられた肝臓の変化は,休薬することによって回復した。

考察

一般状態では、雌雄のいずれの試験群にも変化はみられず、体重も全投与群が対照群と同様な推移を示し、投与の影響はみられなかった。摂餌量では、200mg/kg群の雄及び800 mg/kg群の雌に減少又は増加がみられたが、一過性の軽微な変動であり、また一定の傾向もないことから、毒性学的意義はないものと考えられた。

尿検査では、投与4週目の検査で雌雄のいずれにも変化はみられなかった。

血液学的検査では,投与期間終了時の検査でプロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の延長又は延長傾向が,雄では50 mg/kg以上の群に,雌では200 mg/kg以上の群にみられ,いずれも用量が高くなるにつれて程度が強くなる傾向にあり,本被験物質の凝固系への影響が窺われた。本被験物質を使用した混餌投与による試験 2)でも,プロトロンビン時間及び活性化部分トロンボプラスチン時間の延長がみられており,同様の結果が得られた。

血液生化学的検査では、投与4週目の検査で雌雄のいずれにも変化はみられなかった。 病理学的検査では、投与期間終了時に全投与群の雌雄で肝臓の絶対及び相対重量の増加 あるいは増加傾向がみられ、組織学的には雌雄の800mg/kg群及び200mg/kg群の少数例に肝 小葉中心性の軽度の肝細胞肥大がみられた。また、精巣では、投与期間終了時にセルトリ 細胞の空胞化及び精子分化の障害が200mg/kg以上の群にみられ、精子分化の障害の程度は800mg/kg群で強かった。肝臟重量の増加は、本被験物質の混餌投与による試験¹'でもみられており、また本被験物質の類似物質である2,2'ーメチレンピス(4ーエチルー6ーtertーブチルフェノール)をラットに4週間混餌投与すると、肝臓の相対重量が増加し、薬物代謝酵素の一つであるNADPH cytochrome c reductaseが増加することが知られている³'ことから、本試験の場合もこれと同様の現象である可能性が示唆された。精巣に対する影響は、本被験物質の混餌投与による試験¹'でもみられているが、本試験における変化の程度はやや弱いものであった。また、投与期間終了時には、雌の200mg/kg以上の群で副腎の絶対及び相対重量の増加又は増加傾向がみられたが、組織学的変化はみられず、回復期間終了時には重量の変動もなかったことから、毒性学的には重篤な変化とは思われなかった。

回復期間終了時には、これらの変化は、精巣の変化を除いていずれも回復するかその傾向を示しており、いずれも可逆性の変化と考えられた。精巣は、回復期間終了時には800 mg/kg群で精細管の荒廃が進行し、巨細胞の形成、精子細胞の核の空胞化あるいは精上皮細胞の減少を示す例もあり、より重篤な形態学的変化を呈した。

上記のほか、投与期間終了時の変化として、血液学的検査で50mg/kg群の雄にヘモグロビンの軽微な減少が、800mg/kg群の雄に血小板数の軽微な増加がみられ、血液生化学的検査で800mg/kg群の雌にGOTの低下及び尿素窒素の減少がみられたが、極めて軽微な変化であること,片性のみの変化であることあるいは関連する他のパラメータに変化がみられないことから、被験物質投与による変化とは考えられなかった。また、回復2週目あるいは回復期間終了時では、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検及び器官重量測定において軽微な変動がみられたが、投与4週目あるいは投与期間終了時の検査では変化はみられないことや関連する他のパラメーターに変化がないことから、毒性学的意義のない変化と思われた。

以上のように、本試験における毒性は、既に実施された混餌投与による毒性試験の結果とほぼ同様であった。また、本試験条件下における無影響量は、50mg/kg群において器質的変化はみられなかったものの、肝臓重量の増加又は増加傾向がみられたことから、50mg/kg未満と考えられた。

参考文献

- 1) Takagi, A., Takada, K., Sai, K., Ochiai, T., Matsumoto, K., Sekita, K., Momma, J., Aida, Y., Saitoh, M., Naitoh, K., Furuya, T., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y.(1994): Acute, subchronic and chronic toxicity studies of a synthetic antioxidant, 2,2'-methylenebis(4-methyl-6-tert-butylphenol) in rats. J. Toxicol. Sci., 19, 77-89.
- 2) Takahashi, O. and Hiraga, K.(1981): Effects of four bisphenolic antioxidants on prothrombin levels of rat plasma. Toxicol. Lett., 7, 405-408.
- 3) Takagi, A., Kawasaki, N., Momma, J., Aida, Y., Ohno, Y., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y.(1993): Toxicity studies of a synthetic antioxidant, 2,2'-methylenebis(4-ethyl-6-tert-butylphenol) in rats. 2. Uncoupling effect on oxidative phosphorylation of liver mitochondria. J. Toxicol. Sci., 18, 49-55.

<u>ــ</u> ن

Fig. 1 Mean body weight changes in male rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period.

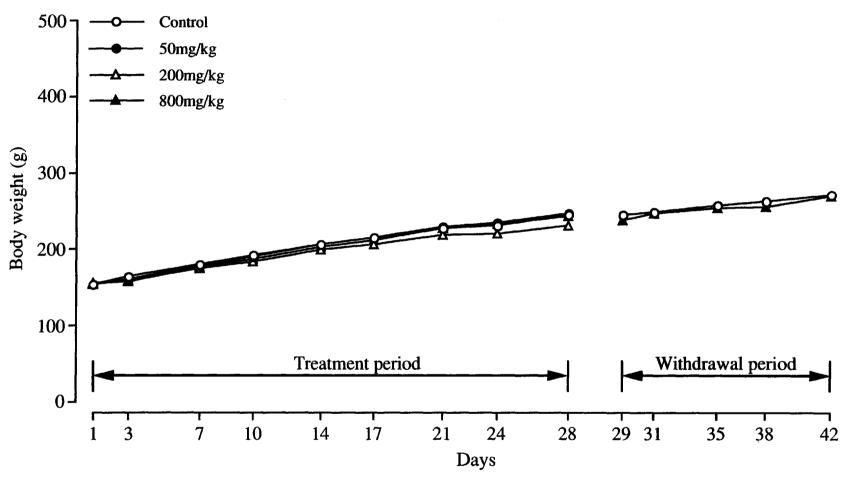


Fig. 2 Mean body weight changes in female rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period.

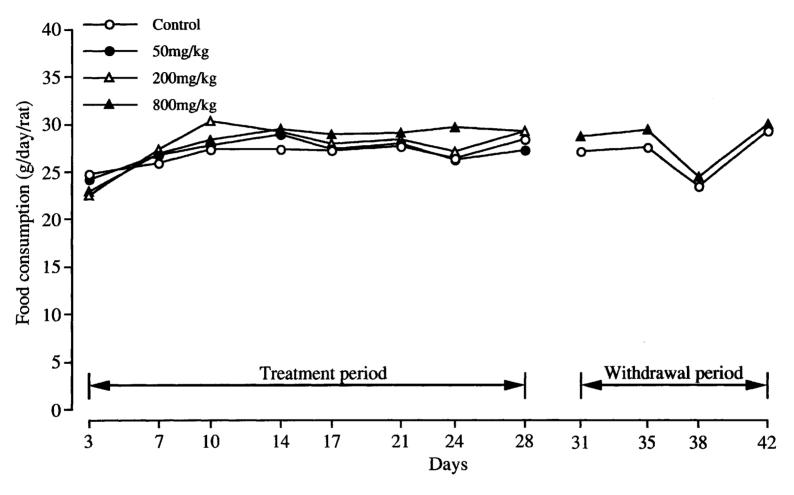


Fig. 3 Mean food consumption in male rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period.

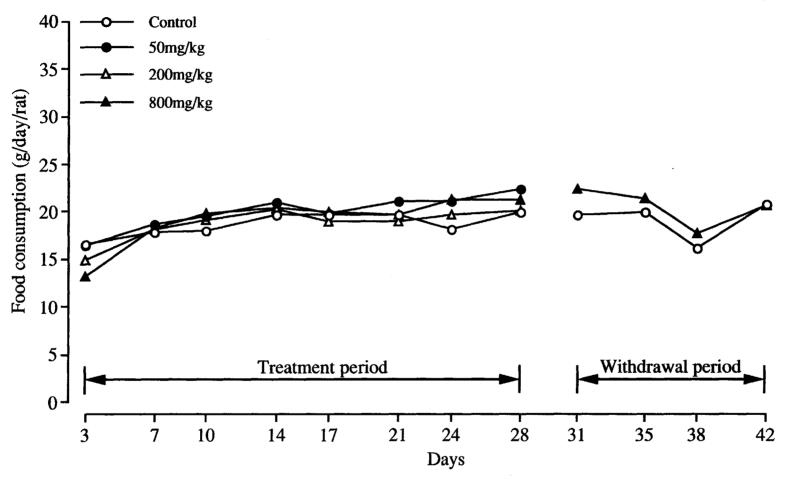


Fig. 4 Mean food consumption in female rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period.

Table 1 Body weights in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period

C	Group							Во	dy weight	(g) on day						
Sex	and dose		0	2	6	9	13	16	20	23	27	28	30	34	37	41
Male	Control	N Mean S.D.	12 221.8 ±7.0	12 240.5 ±7.8	12 274.7 ±9.5	12 297.4 ±11.1	12 325.5 ±12.8	12 344.2 ±13.3	12 366.7 ±15.1	12 376.5 ±16.1	12 397.8 ±18.5	6 409.2 ±13.2	6 416.3 ±10.5	6 434.0 ±11.4	6 442.1 ±12.8	6 465.2 ±13.4
	50mg/kg	N Mean S.D.	6 218.8 ±7.8	6 236.9 ±7.5	6 273.2 ±10.3	6 296.9 ±12.8	6 325.2 ±13.3	6 342.8 ±15.1	6 362.3 ±19.4	6 371.7 ±22.3	6 390.9 ±21.0					
	200mg/kg	N Mean S.D.	6 221.3 ±8.1	6 238.7 ±10.3	6 276.3 ±14.0	6 304.0 ±17.3	6 337.1 ±20.8	6 359.0 ±22.9	6 381.4 ±28.9	6 391.8 ±30.1	6 411.8 ±34.4					
	800mg/kg	N Mean S.D.	12 220.3 ±7.1	12 234.6 ±9.0	12 271.5 ±11.7	12 298.6 ±16.9	12 330.9 ±23.9	12 351.5 ±29.3	12 374.9 ±33.8	12 388.1 ±35.5	12 408.8 ±39.8	6 416.9 ±51.9	6 421.1 ±51.8	6 439.8 ±54.1	6 449.6 ±56.9	6 47 0.2 ±52.5
Female	e Control	N Mean S.D.	12 153.0 ±2.9	12 163.3 ±3.5	12 180.0 ±6.3	12 192.2 ±6.5	12 206.0 ±7.3	12 215.0 ±7.6	12 227.7 ±9.5	12 231.2 ±10.6	12 243.8 ±12.0	6 245.0 ±10.0	6 247.8 ±14.5	6 256.5 ±15.8	6 261.5 ±15.4	6 271.8 ±15.2
	50mg/kg	N Mean S.D.	6 153.5 ±6.4	6 160.4 ±4.4	6 178.4 ±5.6	6 190.3 ±8.3	6 205.8 ±11.1	6 215.5 ±15.8	6 229.1 ±17.4	6 234.2 ±15.4	6 247.3 ±16.6					
	200mg/kg	N Mean S.D.	6 152.4 ±5.8	6 159.0 ±7.4	6 174.8 ±7.6	6 183.2 ±11.3	6 198.1 ±12.4	6 205.9 ±15.8	6 218.1 ±16.3	6 220.8 ±15.9	6 231.4 ±18.1					
	800mg/kg	N Mean S.D.	12 154.1 ±6.7	12 157.1 ±7.3	12 176.6 ±8.6	12 186.6 ±12.4	12 203.0 ±13.9	12 212.0 ±11.7	12 227.4 ±14.0	12 231.7 ±13.2	12 242.5 ±14.0	6 237.4 ±12.1	6 246.0 ±13.1	6 253.9 ±13.8	6 256.1 ±16.1	6 269.4 ±17.4

Table 2 Food consumption in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period

C	Group						Food	consumptio	on (g) on d	ay				
Sex	and dose	Date	2	6	9	13	16	20	23	27	30	34	37	41
Male	Control	N Mean S.D.	12 24.7 ±1.9	12 25.8 ±1.9	12 27.3 ±2.1	12 27.2 ±1.5	12 27.1 ±1.5	12 27.5 ±1.9	12 26.3 ±2.5	12 28.2 ±1.6	6 27.0 ±2.0	6 27.4 ±1.8	6 23.4 ±3.2	6 29.1 ±2.1
	50mg/kg	N Mean S.D.	6 24.2 ±1.0	6 26.7 ±2.0	6 27.7 ±1.9	6 28.8 ±1.5	6 27.2 ±2.8	6 27.8 ±3.0	6 26.2 ±2.4	6 27.1 ±2.4				
	200mg/kg	N Mean S.D.	6 22.4 ±1.7	6 27.3 ±2.8	6 30.2 ±3.5	6 29.1 ±2.2	6 27.8 ±2.7	6 28.3 ±3.2	6 27.0 ±2.6	6 29.1 ±2.4				
	800mg/kg	N Mean S.D.	12 22.9 ±2.1	12 26.9 ±1.9	12 28.2 ±2.2	12 29.4 ±3.2	12 28.8 ±3.5	12 29.0 ±3.5	12 29.5 ±3.5	12 29.1 ±2.8	6 28.5 ±3.8	6 29.3 ±3.4	6 24.3 ±4.5	6 29.9 ±2.7
Pemale	Control	N Mean S.D.	12 16.6 ±0.8	12 17.8 ±1.3	12 18.0 ±1.7	12 19.7 ±2.1	12 19.6 ±1.9	12 19.6 ±1.8	12 18.1 ±1.9	12 19.9 ±2.4	6 19.7 ±3.5	6 19.9 ±2.7	6 16.1 ±3.2	6 20.8 ±2.0
	50mg/kg	N Mean S.D.	6 16.4 ±1.2	6 18.6 ±1.3	6 19.5 ±1.7	6 20.9 ±2.9	6 19.8 ±1.6	6 21.1 ±2.6	6 21.1* ±2.2	6 22.3 ±3.0				
	200mg/kg	N Mean S.D.	6 14.8 ±2.2	6 18.1 ±1.9	6 19.1 ±1.4	6 20.2 ±2.6	6 19.0 ±2.9	6 19.0 ±2.6	6 19.7 ±2.0	6 20.1 ±3.6				
	800mg/kg	N Mean S.D.	12 13.1** ±1.8	12 18.2 ±1.8	12 19.8 ±2.9	12 20.3 ±1.9	12 19.9 ±2.6	12 19.7 ±2.1	12 21.2** ±2.1	12 21.2 ±2.9	6 22.3 ±2.1	6 21.3 ±1.8	6 17.7 ±3.4	6 20.7 ±2.6

^{*:} P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control). Values are mean±S.D.

Urinary findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days Table 3

Sex	Group and dose	Number of animals	Urine volume (ml/24hr)	Osmotic pressure (Osm/kg)	Specific gravity	Нф
Male	Control	12	15.7 ±4.0	1.368 ±0.295	1.044 ±0.011	8.0 ±0.2
	50mg/kg	6	13.0 ±3.9	1.597 ±0.420	1.053 ±0.015	8.0 ±0.0
	200mg/kg	6	17.2 ±4.2	1.340 ±0.303	1.044 ±0.011	7.8 ±0.3
	800mg/kg	12	22.2 ±15.6	1.218 ±0.405	1.039 ±0.014	7.9 ±0.2
Female	Control	12	8.6 ±2.0	1.372 ±0.338	1.043 ±0.010	8.1 ±0.2
	50mg/kg	6	7.6 ±3.0	1.423 ±0.331	1.044 ±0.011	7.7 ±0.4
	200mg/kg	6	9.2 ±2.1	1.268 ±0.322	1.040 ±0.011	$\substack{8.1 \\ \pm 0.2}$
	800mg/kg	12	9.4 ±4.6	1.509 ±0.350	1.048 ±0.013	7.9 ±0.4

Urinary findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days Table 3 - continued

Sex	Group and dose	Number of animals	Со	lor]	Prote	ein		Glucose	Ketone body	Bilirubin	0c	cult	blo	od	Urobil (mg/	inogen 'dl)
			РУ	Y	-	±	+	#	~	-	-		+	#	**	<1	1
Male	Control	12	6	6	2	5	4	1	12	12	12	9	2	0	1	9	3
	50mg/kg	6	2	4	1	4	1	0	6	6	6	6	0	0	0	6	0
	200mg/kg	6	2	4	0	5	1	0	6	6	6	5	1	0	0	6	0
	800mg/kg	12	8	4	2	7	3	0	12	12	12	10	0	2	0	11	1
Pemale	Control	12	3	9	10	2	0	0	12	12	12	11	0	0	1	9	3
	50mg/kg	6	1	5	3	1	2	0	6	6	6	5	1	0	0	4	2
	200mg/kg	6	2	4	6	0	0	0	6	6	6	6	0	0	0	5	1
	800mg/kg	12	2	10	5	2	5	0	12	12	12	12	0	0	0	8	4

Abbreviation; PY, pale yellow; Y, yellow.
Grade sign; -, none; ±, trace; +, slight; *, moderate; **, severe; **, very severe.

Table 3 - continued

Urinary findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days

0	Group	Number		<u> </u>	•	Urinary:	sediment				
Sex	and dose	of animals	Epithelial cells	Erythro	ocytes	Leuco	cytes	Casts	Cr;	/sta	ls
			-	-	#	-	+	-	-	+	#
Male	Control	12	12	11	1	12	0	12	8	3	1
	50mg/kg	6	6	6	0	6	0	6	5	1	0
	200mg/kg	6	6	6	0	6	0	6	5	1	0
	800mg/kg	12	12	12	0	11	1	12	9	2	1
Female	Control	12	12	12	0	12	0	12	11	1	0
	50mg/kg	6	6	6	0	6	0	6	5	1	0
	200mg/kg	6	6	6	0	6	0	6	6	0	0
	800mg/kg	12	12	12	0	11	1	12	8	4	0

Grade signs are as follows. Epithelial cells: -, < 3/field; +, $3/field \le and < 10/field$; +, $10/field \le and < 20/field$; +, $\ge 20/field$. Erythrocytes : -, < 10/field; +, $10/field \le and < 30/field$; +, $30/field \le and < 100/field$; +, countless. Leucocytes : -, < 3/field; +, $3/field \le and < 20/field$; +, $20/field \le and < 40/field$; +, $\ge 40/field$. Casts : -, none; +, $\ge 1/all$ field. Crystals : -, < 10/field; +, $10/field \le and < 20/field$; +, $20/field \le and < 30/field$; +, countless.

Study No.29431

Table 4 Urinary findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	Urine volume (ml/24hr)	Osmotic pressure (Osm/kg)	Specific gravity	На
Male	Control	6	19.8 ±4.5	1.220 ±0.239	1.039 ±0.008	7.8 ±0.3
	800mg/kg	6	17.8 ±4.1	1.335 ±0.506	1.044 ±0.017	7.8 ±0.3
Female	Control	6	11.2 ±4.0	1.220 ±0.251	1.038 ±0.008	7.9 ±0.4
	800mg/kg	6	8.2 ±1.5	1.770** ±0.240	1.055** ±0.007	8.1 ±0.2

^{**:} P<0.01 (significantly different from control). Values are mean±S.D.

Study No.29431 Urinary findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period Table 4 - continued

Sex	Group and dose	Number of animals	Со	lor	Pi	rote:	in	Glucose	Ketone body	Bilirubin	Occult blood	Urobi (mg	linogen /dl)
			PY	Y		±	+	-	-	-	-	<1	1
Male	Control	6	4	2	3	3	0	6	6	6	6	6	0
	800mg/kg	6	1	5	2	2	2	6	6	6	6	5	1
Female	Control	6	1	5	5	1	0	6	6	6	6	5	1
	800mg/kg	6	0	6	4	1	1	6	6	6	6	3	3

Abbreviation; PY, pale yellow; Y, yellow.
Grade sign; -, none; ±, trace; +, slight; +, moderate; +, severe; +, very severe.

Table 4 - continued

Urinary findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period

C	Group	Number			Urinary sediment				
Sex	and dose	of animals	Epithelial cells	Erythrocytes	Leucocytes	Casts	Cr	ysta	ls
			-	-	-	-		+	#
Male	Control	6	6	6	6	6	4	1	1
	800mg/kg	6	6	6	6	6	4	1	1
Female	Control	6	6	6	6	6	6	0	0
	800mg/kg	6	6	6	6	6	6	0	0

Grade signs are as follows.

Epithelial cells: -, < 3/field; +, 3/field \leq and < 10/field; +, 10/field \leq and < 20/field; +, \geq 20/field. Erythrocytes : -, < 10/field; +, 10/field \leq and < 30/field; +, 30/field \leq and < 100/field; +, countless. Leucocytes : -, < 3/field; +, 3/field \leq and < 20/field; +, 20/field \leq and < 40/field; +, \geq 40/field. Casts : -, none; +, \geq 1/all field. Crystals : -, < 10/field; +, 10/field \leq and < 20/field; +, 20/field \leq and < 30/field; +, countless.

Table 5

Hematological findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days

C	Group	Number	Leucocyte	Erythrocyte	Hemoglobin	Hematocrit	Platelet	MCV	MCH	
Sex	and dose	of animals	$(10^2/\mu 1)$	$(10^4/\mu 1)$	(g/dl)	(%)	$(10^4/\mu 1)$	(fl)	(pg)	
Male	Control	6	72 ±20	800 ±18	15.0 ±0.3	47.2 ±1.4	101.8 ±7.0	59 ±2	18.8 ±0.5	····
	50mg/kg	6	67 ±17	769 ±37	14.3* ±0.3	45.3 ±1.1	104.0 ±10.6	59 ±2	18.6 ±0.6	
	200mg/kg	6	82 ±16	773 ±30	14.5 ±0.4	45.3 ±1.2	109.1 ±9.1	59 ±3	18.7 ±0.8	
	800mg/kg	6	69 ±15	772 ±37	14.5 ±0.6	45.4 ±1.7	116.9* ±8.4	59 ±2	18.8 ±0.6	
Female	Control	6	57 ±16	760 ±35	14.6 ±0.5	45.3 ±2.1	108.2 ±9.1	60 ±1	19.2 ±0.5	
	50mg/kg	6	63 ±15	7 4 5 ±35	14.0 ±0.5	43.7 ±2.2	104.8 ±4.6	59 ±2	18.8 ±0.7	
	200mg/kg	6	46 ±7	729 ±63	13.7 ±0.4	42.9 ±1.3	102.3 ±12.6	59 ±4	18.9 ±1.2	
	800mg/kg	6	61 ±6	727 ±31	14.1 ±0.7	43.6 ±2.3	111.5 ±8.7	60 ±1	19.4 ±0.5	

^{*:} P<0.05 (significantly different from control). Values are mean±S.D.

Hematological findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days

Sex	Group and	Number of	MCHC	Prothrombin time	APTT
	dose	animals	(%)	(sec)	(sec)
Male	Control	6	31.8 ±0.7	15.9 ±3.6	21.6 ±2.4
	50mg/kg	6	31.5 ±0.4	19.6 ±3.3	24.4 ±3.1
	200mg/kg	6	31.9 ±0.3	24.1** ±2.8	26.5** ±1.6
	800mg/kg	6	31.9 ±0.4	31.9** ±3.6	30.5 ** ±1.8
Female	Control	6	32.2 ±0.7	10.7 ±0.6	18.0 ±1.6
	50mg/kg	6	32.0 ±0.7	10.8 ±0.5	18.1 ±1.4
	200mg/kg	6	32.0 ±0.5	11.9 ±1.1	20.9** ±1.7
	800mg/kg	6	32.4 ±0.6	17.3** ±2.3	24.0** ±1.2

^{**:} P<0.01 (significantly different from control). Values are mean±S.D.

Table 5 - continued Hematological findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days

Con	Group	Number			Differential 1	eucocyte count			
Sex	and dose	of animals	Eosinophil	Neutro-Stab.	Neutro-Seg.	Lymphocyte	Basophil	Monocyte	
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
Male	Control	6	0.7 ±1.2	0.3 ±0.8	11.8 ±1.9	85.0 ±3.3	0.0 ±0.0	2.2 ±1.3	
	50mg/kg	6	0.3 ±0.5	0.0 ±0.0	15.3 ±4.8	83.0 ±4.6	$\substack{0.0\\ \pm 0.0}$	1.3 ±0.8	
	200mg/kg	6	0.5 ±0.5	0.0 ±0.0	13.5 ±2.5	85.0 ±2.8	$\substack{0.0\\ \pm 0.0}$	1.0 ±0.9	
	800mg/kg	6	0.2 ±0.4	0.3 ±0.5	15.3 ±2.7	82.3 ±2.5	$\substack{0.0\\ \pm 0.0}$	1.8 ±1.7	
Female	Control	6	0.2 ±0.4	0.3 ±0.5	10.7 ±3.2	87.8 ±4.1	0.0 ±0.0	1.0 ±1.3	
	50mg/kg	6	0.7 ±0.8	0.2 ±0.4	16.7 ±8.1	81.2 ±7.7	$\substack{0.0\\ \pm 0.0}$	1.3 ±0.8	
	200mg/kg	6	0.3 ±0.5	0.2 ±0.4	16.5 ±6.5	81.2 ±6.4	0.0 ±0.0	1.8 ±1.3	
	800mg/kg	6	0.7 ±0.8	0.3 ±0.8	16.8 ±8.2	81.5 ±9.1	0.0 ±0.0	0.7 ±0.8	

Study No.29431 Hematological findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period Table 6

Cov	Group	Number of	Leucocyte	Erythrocyte	Hemoglobin	Hematocrit	Platelet	MCY	MCH	
Sex	and dose	animals	$(10^2/\mu 1)$	$(10^4/\mu 1)$	(g/dl)	(%)	$(10^4/\mu 1)$	(f1)	(pg)	
Male	Control	6	80 ±12	819 ±37	14.9 ±0.6	47.6 ±2.5	98.8 ±11.3	58 ±2	18.3 ±0.5	
	800mg/kg	6	83 ±12	826 ±30	14.6 ±0.5	46.0 ±1.8	106.9 ±18.2	56* ±2	17.7 ±0.5	
Female	Control	6	64 ±18	773 ±30	14.4 ±0.5	45.6 ±2.0	100.1 ±14.4	59 ±2	18.6 ±0.4	
	800mg/kg	6	55 ±8	746 ±31	14.0 ±0.3	44.6 ±1.1	109.4 ±9.8	60 ±1	18.8 ±0.4	

^{*:} P<0.05 (significantly different from control). Values are mean±S.D.

Table 6 - continued Hematological findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and dose	Number of animals	MCHC (%)	Prothrombin time (sec)	APTT (sec)		
Ma La						 	
Male	Control	6	31.4 ±0.9	14.1 ±0.9	21.2 ±1.7		
	800mg/kg	6	31.8 ±0.4	14.7 ±3.1	21.9 ±3.0		
			±0.4	±3.1	±3.0		
Female	Control	6	31.6 ±0.9	10.6	18.6 ±2.4		
			±0.9	±0.4	±2.4		
	800mg/kg	6	31.4 ± 0.2	10.5 ±0.3	17.2 ±0.7		
			10.Ζ	±υ.δ	± 0.1		

Table 6 - continued Hematological findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Carr	Group	Number			Differential 1	eucocyte count		
Sex	and dose	of · animals	Eosinophil	Neutro-Stab.	Neutro-Seg.	Lymphocyte	Basophi l	Monocyte
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Male	Control	6	0.3 ±0.5	0.2 ±0.4	14.0 ±7.1	83.0 ±6.5	0.0 ±0.0	2.5 ±1.6
	800mg/kg	6	$^{0.3}_{\scriptscriptstyle{\pm0.8}}$	0.0 ±0.0	15.0 ±6.7	82.5 ±8.3	0.0 ±0.0	2.2 ±1.3
Female	Control	6	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	13.7 ±4.1	85.3 ±4.1	0.0 ±0.0	1.0 ±0.9
	800mg/kg	6	1.2* ±1.5	0.0 ±0.0	14.0 ±8.5	82.7 ±8.8	0.0 ±0.0	2.2 ±1.0

^{*:} P<0.05 (significantly different from control). Values are mean±S.D.

Table 7 Biochemical findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days

G	Group	Number	T.protein	Albumin	A/G ratio	T.bilirubin	GOT	GPT	r-GTP	ALP	
Sex	and dose	and of dose animals (g/dl) (g/dl)				(mg/dl)	(IU/1)	(IU/I)	(I\/I)	(IU/I)	
Male	Control	6	4.8 ±0.1	3.5 ±0.1	2.70 ±0.33	0.0 ±0.0	85 ±14	24 ±5	0.0 ±0.1	336 ±59	
	50mg/kg	6	5.1** ±0.2	3.6 ±0.2	$\substack{2.41 \\ \pm 0.28}$	0.0 ±0.0	90 ±6	27 ± 4	$\substack{0.2\\ \pm 0.2}$	366 ±51	
	200mg/kg	6	5.1** ±0.1	3.6 ±0.1	2.58 ±0.27	0.0 ±0.0	82 ±9	24 ±2	0.1 ±0.1	328 ±30	
	800mg/kg	6	5.1** ±0.2	3.8* ±0.1	2.95 ±0.27	0.0 ±0.0	83 ±7	25 ±5	0.1 ±0.1	349 ±50	
Female	Control	6	4.8 ±0.3	3.6 ±0.3	2.82 ±0.48	0.0 ±0.0	96 ±11	18 ±5	0.2 ±0.2	223 ±45	
	50mg/kg	6	4.9 ±0.1	3.6 ±0.2	2.84 ±0.51	$\substack{0.0\\\pm0.0}$	104 ±10	19 ±3	0.1 ±0.1	194 ±27	
	200mg/kg	6	5.2 ±0.4	4.0* ±0.3	3.29 ±0.49	$\substack{0.0\\\pm0.0}$	92 ±9	22 ±3	0.1 ±0.1	184 ±39	
	800mg/kg	6	5.2 ±0.1	3.9 ±0.2	3.01 ±0.57	$\substack{0.0\\ \pm 0.0}$	81* ±6	20 ±1	0.3 ±0.3	192 ±56	

^{*:} P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control). Values are mean±S.D.

Carr	Group		T.cholesterol	Triglycerides	Phospholipids	Glucose	BUN	Creatinine	IP	Ca	
Sex	and of dose animals (mg/dl)		(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)		
Male	Control	6	41 ±7	28 ±10	28 73 ±10 ±10		16.3 ±1.3	0.4 ±0.1	7.6 ±0.5	9.5 ±0.3	
	50mg/kg	6	40 ±4	28 ±4	73 ±11	118 ±16	14.4 ±1.7	0.3 ±0.1	7.6 ±0.5	9.5 ±0.2	
	200mg/kg	6	49 ±6	28 ±8	82 ±9	111 ±6	$\substack{14.3\\\pm0.9}$	0.3 ±0.1	7.5 ±0.5	9.5 ±0.2	
	800mg/kg	6	45 ±5	24 ±5	78 ±5	117 ±9	16.5 ±1.6	0.4 ±0.1	7.4 ±0.3	9.4 ±0.2	
Female	Control	6	46 ±14	14 ±6	83 ±21	111 ±16	20.2 ±2.8	0.4 ±0.1	8.1 ±0.7	9.5 ±0.3	
	50mg/kg	6	42 ±10	12 ±4	75 ±17	104 ±15	20.0 ±3.1	0.4 ±0.1	8.0 ±0.5	9.4 ±0.1	
	200mg/kg	6	57 ±6	13 ±4	94 ±11	114 ±19	20.8 ±2.2	0.4 ±0.1	8.6 ±0.7	9.7 ±0.4	
	800mg/kg	6	59 ±9	16 ±4	97 ±8	99 ±6	16.4* ±1.8	0.3 ±0.1	7.8 ±0.6	9.5 ±0.3	

^{*:} P<0.05 (significantly different from control). Values are mean±S.D.

Sex	Group and	Number of	Na	K	Cl
JGA	dose	animals	(mEq/l)	(mEq/1)	(mEq/l)
Male	Control	6	145.9 ±0.6	4.12 ±0.09	107.3 ±1.3
	50mg/kg	6	145.9 ±0.9	4.13 ±0.10	$^{106.9}_{\pm0.7}$
	200mg/kg	6	145.2 ±0.7	4.21 ±0.08	107.2 ±1.0
	800mg/kg	6	146.0 ±1.0	4.21 ±0.17	$^{106.9}_{\pm0.9}$
Female	Control	6	146.8 ±0.9	4.11 ±0.17	109.1 ±1.9
	50mg/kg	6	147.5 ±1.3	4.10 ±0.12	110.2 ±0.8
	200mg/kg	6	147.7 ±0.7	4.27 ±0.25	110.0 ±1.1
	800mg/kg	6	147.1 ±0.9	4.05 ±0.13	109.7 ±1.8

Study No.29431
Table 8 Biochemical findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and	Number of	T.protein	Albumin	A/G ratio	T.bilirubin	GOT	GPT	7-GTP	ALP
JCA	dose	animals	(g/dl)	(g/dl)		(mg/dl)	(IU/I)	(10/1)	(IU/1)	(IU/1) 295 ±14 267
Male	Control	6	5.0 ±0.2	3.5 ±0.1	2.50 ±0.46	0.0 ±0.0	92 ±13	23 ±2	0.3 ±0.1	295 ±14
	800mg/kg	6	5.3* ±0.3	3.7 ±0.2	2.27 ±0.17	0.0 ±0.1	91 ±12	25 ±5	0.1* ±0.2	267 ±60
Female	Control	6	5.2 ±0.4	3.7 ±0.3	2.57 ±0.30	0.0 ±0.0	83 ±12	19 ±4	0.3 ±0.1	188 ±25
	800mg/kg	6	5.2 ±0.3	3.8 ±0.3	2.64 ±0.27	$\substack{0.0\\ \pm 0.0}$	77 ±10	18 ±2	0.3 ±0.2	165 ±25

^{*:} P<0.05 (significantly different from control). Values are mean±S.D.

Table 8 - continued Biochemical findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period

C	Group		T.cholesterol	Triglycerides	Phospholipids	Glucose	BUN	Creatinine	IP	Ca
Sex	and dose	of animals	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
Male	Control	6	36 ±9	27 ±6	67 ±12	134 ±11	15.7 ±1.4	0.5 ±0.1	7.1 ±0.3	9.4 ±0.4
	800mg/kg	6	43 ±7	28 ±8	77 ±7	135 ±9	17.5 ±2.3	0.5 ±0.2	7.1 ±0.4	9.5 ±0.3
Female	Control	6	42 ±9	12 ±3	79 ±18	112 ±22	20.9 ±1.7	0.5 ±0.1	7.8 ±1.2	9.7 ±0.5
	800mg/kg	6	49 ±11	13 ±3	88 ±20	122 ±7	20.7 ±2.4	0.4 ±0.1	8.0 ±0.4	9.8 ±0.3

Values are mean±S.D.

Table 8 - continued

Biochemical findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and	Number of	Na	K	Cl		
Sex	dose	animals	(mEq/1)	(mEq/1)	(mEq/1)		
Male	Control	6	145.7 ±1.0	4.18 ±0.21	105.7 ±1.5		
	800mg/kg	6	145.9 ±0.7	4.26 ±0.13	104.0 ±2.2		
Female	Control	6	145.9 ±1.0	4.05 ±0.25	107.5 ±1.2	·	
	800mg/kg	6	146.1 ±1.3	4.09 ±0.20	108.0 ±0.8		

Values are mean±S.D.

Table 9 Necropsy findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days

\	Sex		M	ale			Fe	male	
	Group and dose	Control	50mg/kg	200mg/kg	800mg/kg	Control	50mg/kg	200mg/kg	800mg/kg
Organs and findings	\ Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
All organs and tissues		NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

NR: no remarkable change.

Study No.29431

Necropsy findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period Table 10

	Sex	M	ale	Fe	male
	Group and dose	Control	800mg/kg	Control	800mg/kg
Organs and findings	Number of animals	6	6	6	6
Genital system Epididymis Light yellow nodules		0	1	NA	NA

NA: not applicable. No appreciable changes in all other organs and tissues.

(3) (0)

Table 11 Organ weights in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days

Sex	Group and		Final Body Weight		Brain	1	Heart	.]	Lungs	
	dose		(g)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	
Male	Control	N Mean S.D.	6 356.6 ±21.1	6 2.04 ±0.03	6 0.58 ±0.04	6 1.30 ±0.17	6 0.37 ±0.06	6 1.33 ±0.11	6 0.37 ±0.02	
	50mg/kg	N Mean S.D.	6 359.7 ±20.6	6 2.11 ±0.04	6 0.59 ±0.03	6 1.49 ±0.13	6 0.42 ±0.02	6 1.23 ±0.10	6 0.3 4 * ±0.02	
	200mg/kg	N Mean S.D.	6 375.8 ±31.4	6 2.10 ±0.07	6 0.56 ±0.05	6 1.35 ±0.07	6 0.36 ±0.02	6 1.30 ±0.11	6 0.35 ±0.02	
	800mg/kg	N Mean S.D.	6 369.4 ±28.0	6 2.10 ±0.12	6 0.57 ±0.04	6 1.41 ±0.14	6 0.38 ±0.03	6 1.25 ±0.09	6 0.34* ±0.02	
'emale	Control	N Mean S.D.	6 225.0 ±10.3	1.96 ±0.06	6 0.87 ±0.05	6 0.90 ±0.05	6 0.40 ±0.03	6 1.05 ±0.06	6 0.47 ±0.02	
	50mg/kg	N Mean S.D.	6 225.8 ±13.9	1.93 ±0.03	6 0.86 ±0.06	0.93 ±0.10	6 0.41 ±0.05	6 1.01 ±0.08	6 0.45 ±0.03	
	200mg/kg	N Mean S.D.	6 212.1 ±15.8	6 1.95 ±0.03	6 0.93 ±0.08	6 0.92 ±0.08	6 0.44 ±0.06	6 1.02 ±0.07	6 0.48 ±0.04	
	800mg/kg	N Mean S.D.	6 225.6 ±13.7	6 1.97 ±0.07	6 0.87 ±0.04	6 0.98 ±0.14	6 0.43 ±0.05	6 1.03 ±0.08	6 0.46 ±0.03	

^{*:} P<0.05 (significantly different from control).

Sex	Group and		Ti	hymus	L	iver	Si	pleen	K	idneys
	dose	-	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)
Male	Control	N Mean S.D.	6 0.57 ±0.13	6 0.16 ±0.03	6 10.31 ±0.68	6 2.89 ±0.15	0.71 ±0.13	6 0.20 ±0.03	6 2.60 ±0.18	0.73 ±0.06
	50mg/kg	N Mean S.D.	0.51 ±0.06	6 0.14 ±0.01	6 11.76 ±0.89	6 3.27** ±0.08	0.71 ±0.15	6 0.20 ±0.03	2.74 ±0.21	0.76 ±0.02
	200mg/kg	N Mean S.D.	6 0.56 ±0.13	6 0.15 ±0.04	6 12.89** ±1.45	6 3.43** ±0.19	0.71 ±0.09	6 0.19 ±0.03	6 2.74 ±0.20	6 0.73 ±0.03
	800mg/kg	N Mean S.D.	6 0.53 ±0.07	6 0.14 ±0.02	6 13.43** ±1.78	6 3.62** ±0.28	0.68 ±0.10	6 0.18 ±0.02	$\begin{array}{c} 6\\2.73\\\pm0.30\end{array}$	6 0.74 ±0.08
Female	Control	N Mean S.D.	6 0.52 ±0.12	6 0.23 ±0.05	6 6.79 ±0.35	6 3.02 ±0.13	6 0.49 ±0.06	6 0.22 ±0.03	6 1.70 ±0.12	6 0.76 ±0.04
	50mg/kg	N Mean S.D.	6 0.56 ±0.09	6 0.25 ±0.05	6 7.35 ±0.32	3.26 ±0.16	0.50 ±0.05	6 0.22 ±0.02	6 1.82 ±0.17	6 0.81 ±0.05
	200mg/kg	N Mean S.D.	6 0.46 ±0.08	6 0.22 ±0.03	6 7.65* ±0.67	6 3.61** ±0.23	0.43 ±0.04	6 0.20 ±0.01	6 1.66 ±0.16	6 0.78 ±0.03
	800mg/kg	N Mean S.D.	6 0.53 ±0.11	6 0.24 ±0.04	6 8.83** ±0.43	6 3.92** ±0.18	6 0.50 ±0.05	6 0.22 ±0.01	6 1.74 ±0.08	6 0.77 ±0.04

^{*:} P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Table 11 - continued Organ weights in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol)for 28 days

Sex	Group and		Adı	renals	Т	estes	0	varies	
	dose	-	(mg)	(mg/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(mg)	(mg/100gB.W.)	
Male	Control	N Mean S.D.	6 68.9 ±14.8	6 19.3 ±3.5	3.14 ±0.26	6 0.88 ±0.10			
	50mg/kg	N Mean S.D.	6 69.7 ±6.4	6 19.5 ±2.5	6 3.28 ±0.28	0.91 ±0.07			
	200mg/kg	N Mean S.D.	6 60.3 ±5.2	6 16.1 ±0.8	6 3.31 ±0.23	6 0.89 ±0.08			
	800mg/kg	N Mean S.D.	6 74.1 ±11.9	6 20.0 ±2.6	6 3.33 ±0.28	6 0.91 ±0.07			
Female	Control	N Mean S.D.	6 73.7 ±8.8	6 32.8 ±3.9			6 92.1 ±17.6	6 40.8 ±6.3	
	50mg/kg	N Mean S.D.	6 69.0 ±6.1	6 30.6 ±2.7			6 89.4 ±10.7	6 39.6 ±3.7	
	200mg/kg	N Mean S.D.	6 80.7 ±10.5	6 38.1* ±4.0			6 85.5 ±9.8	6 40.5 ±5.6	
	800mg/kg	N Mean S.D.	6 83.3 ±9.6	6 36.9 ±3.4			6 93.7 ±12.9	6 41.8 ±7.1	

^{*:} P<0.05 (significantly different from control).

Table 12 Organ weights in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and		Final Body Weight	E	Brain	1	Heart		Lungs	
	dose		(g)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	
Male	Control	N Mean S.D.	6 425.7 ±12.7	6 2.17 ±0.07	0.51 ±0.02	6 1.35 ±0.07	6 0.32 ±0.01	6 1.31 ±0.05	6 0.31 ±0.01	
	800mg/kg	N Mean S.D.	6 430.4 ±50.2	2.08* ±0.06	6 0.49 ±0.05	6 1.37 ±0.09	6 0.32 ±0.03	6 1.38 ±0.11	6 0.32 ±0.02	
Female	Control	N Mean S.D.	6 246.5 ±13.0	6 1.98 ±0.06	6 0.80 ±0.03	6 0.88 ±0.07	6 0.36 ±0.03	6 1.08 ±0.08	0.44 ±0.02	
	800mg/kg	N Mean S.D.	6 244.1 ±15.4	1.99 ±0.03	6 0.82 ±0.04	0.89 ±0.07	6 0.37 ±0.02	6 1.14 ±0.14	6 0.46 ±0.03	

^{*:} P<0.05 (significantly different from control).

Study No.29431
Table 12 - continued Organ weights in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and		T	hymus	L	iver	S	pleen	Kidneys		
	dose	-	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	
Male	Control	N Mean S.D.	6 0.47 ±0.04	6 0.11 ±0.01	6 11.42 ±0.63	6 2.68 ±0.08	0.73 ±0.12	6 0.17 ±0.03	2.93 ±0.20	6 0.69 ±0.04	
	800mg/kg	N Mean S.D.	6 0.47 ±0.16	6 0.11 ±0.03	6 13.16 ±2.32	6 3.04* ±0.24	6 0.74 ±0.18	6 0.17 ±0.03	2.93 ±0.41	6 0.68 ±0.04	
Female	Control	N Mean S.D.	0.50 ±0.06	6 0.20 ±0.03	6.70 ±0.35	6 2.72 ±0.09	6 0.57 ±0.10	6 0.23 ±0.03	6 1.70 ±0.08	0.69 ±0.04	
	800mg/kg	N Mean S.D.	6 0.47 ±0.07	6 0.19 ±0.03	6 7.60** ±0.39	6 3.12** ±0.20	6 0.57 ±0.05	6 0.24 ±0.03	6 1.84* ±0.11	6 0.75** ±0.03	

^{*:} P<0.05, **: P<0.01 (significantly different from control).

Study No.29431
Table 12 - continued Organ weights in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period

Sex	Group and		Adı	renals	T	estes	0	varies	
	dose	-	(mg)	(mg/100gB.W.)	(g)	(g/100gB.W.)	(mg)	(mg/100gB.W.)	
Male	Control	N Mean S.D.	6 69.7 ±13.7	6 16.4 ±3.1	6 3.17 ±0.21	6 0.75 ±0.06			
	800mg/kg	N Mean S.D.	6 82.0 ±32.3	6 19.0 ±6.4	6 2.81 ±0.49	6 0.66 ±0.15			
Female	Control	N Mean S.D.	6 73.6 ±11.8	6 29.9 ±4.1			6 92.6 ±19.8	6 37.4 ±6.7	
	800mg/kg	N Mean S.D.	6 78.9 ±4.8	6 32.3 ±1.7			6 95.3 ±8.3	6 39.1 ±3.8	

Histopathological findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days Table 13

\ Sex		Ma	ıle			Fe	male	
Group and dose	Control	50mg/kg	200mg/kg	800mg/kg	Control	50mg/kg	200mg/kg	800mg/kg
Organs and findings Number of animals	6 - + # ##	- + # #	6 + # #	6 - + # #	6 + # #	- + # #	- + # #	6 - + # #
Digestive system Liver Hypertrophy, centrilobular	(6) 6 0 0 0	(6) 6 0 0 0	(6) 5 1 0 0	(6) 5 1 0 0	(6) 6 0 0 0	(6) 6 0 0 0	(6) 5 1 0 0	(6) 4 2 0 0
Genital system Testis Yacuolation, Sertoli cells Spermiogenesis, disturbance	$\begin{array}{cccc} & (6) \\ 6 & 0 & 0 & 0 \\ 6 & 0 & 0 & 0 \end{array}$	$\begin{pmatrix} 6 & 0 & 0 & 0 \\ 6 & 0 & 0 & 0 \\ 6 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$	(6) 0 6 0 0 0 6 0 0	(6) 0 6 0 0 0 0 6 0	NA	NA	NA	NA

Grade sign: -, none; +, mild; #, moderate; #, marked.
Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

NA: not applicable.

No remarkable changes were observed in the spleen, heart, kidney and adrenal in the control and 800mg/kg groups.

Study No.29431 Histopathological findings in rats treated orally with 2,2'-methylenebis(6-tert-butyl-p-cresol) for 28 days followed by 14-day withdrawal period Table 14

\	Sex	Male		Female	
	Group and dose	Control	800mg/kg	Control	800mg/kg
Organs and findings	Number of animals	- + # #	6 - + # #	6 + # #	6 - + # #
Digestive system Liver Hypertrophy, centrilobular		(6) 6 0 0 0	(6) 6 0 0 0	(6) 6 0 0 0	(6) 6 0 0 0
Genital system Testis Vacuolation, Sertoli cells Giant cell formation Nuclear vacuolation, spermatids Germ cells, decreased		(6) 6 0 0 0 6 0 0 0 6 0 0 0 6 0 0 0	(6) 1 5 0 0 2 2 1 1 2 3 1 0 4 1 0 1	NA	NA

Grade sign: -, none; +, mild; #, moderate; #, marked.

NA: not applicable.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.