

最終報告書

表 題：4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールのラットにおける 28 日間反復経口投与
毒性試験

試験番号：SR08226

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

	頁
表紙-----	1
目次-----	5
要約-----	12
緒言-----	13
材料および方法-----	13
成績-----	24
考察-----	28
参考資料-----	29

Figures

1 Body weight of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	31
2 Body weight of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	32
3 Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	33
4 Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) ---	34

Tables

1 General appearance of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) ---	35
2 General appearance of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) ---	36
3 Detailed clinical observation, in the cage, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	37
4 Detailed clinical observation, on the hand, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	38

5	Detailed clinical observation, in the open-field, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	39
6	Detailed clinical observation, in the cage, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	40
7	Detailed clinical observation, on the hand, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	41
8	Detailed clinical observation, in the open-field, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	42
9	Functional observation of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) ---	43
10	Functional observation of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	44
11	Grip strength and motor activity measurements of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	45
12	Grip strength and motor activity measurements of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	46
13	Body weight of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	47
14	Body weight of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	48
15	Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	49
16	Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) ---	50
17	Urinary findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	51
18	Urinary findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	52
19	Urinary findings of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	53
20	Urinary findings of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	54
21	Hematological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	55
22	Hematological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	57
23	Hematological findings of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	59

24	Hematological findings of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	60
25	Biochemical findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	61
26	Biochemical findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	63
27	Biochemical findings of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	65
28	Biochemical findings of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	66
29	Gross findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	67
30	Gross findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	68
31	Absolute and relative organ weights of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	69
32	Absolute and relative organ weights of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	70
33	Absolute and relative organ weights of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	71
34	Absolute and relative organ weights of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	72
35	Histopathological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	73
36	Histopathological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) -----	74

要 約

4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールの0(対照、トウモロコシ油)、15、60 および 250 mg/kg/day を1群雄雌各6匹のCr1:CD(SD)ラットに、28日間反復経口投与して毒性発現の有無およびその概要を検討した。さらに、0および250 mg/kg/day について1群雄雌各6匹の回復群を設け、投与終了の翌日から14日間観察を継続し投与終了後の回復性を併せて検討し、以下の成績を得た。

1. 一般状態では、250 mg/kg 群で、軟便が雄雌で認められた。
2. 尿検査では、250 mg/kg 群の雌で尿 pH の有意な低下が認められた。
3. 血液学的検査では、60 mg/kg 以上の群の雄でプロトロンビン時間、60 mg/kg 以上の群の雄および 250 mg/kg 群の雌で活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。
4. 血液化学的検査では、15 mg/kg 以上の群の雌および 60 mg/kg 以上の群の雄で総コレステロールの有意な高値、250 mg/kg 群の雄雌で総ビリルビンの有意な高値、雄で AST、ALT、アルカリホスファターゼおよび尿素窒素の有意な高値ならびにカリウムおよび無機リンの有意な低値、雌で α_1 -グロブリン分画比およびクレアチニンの有意な高値が認められた。
5. 剖検所見では、60 mg/kg 群の雄ならびに 250 mg/kg 群の雄雌で盲腸の水様内容物が認められた。
6. 器官重量では、15 mg/kg 以上の群の雌で肝臓の相対重量の有意な高値および 250 mg/kg 群の雌で絶対重量の有意な高値が認められた。
7. 病理組織学的検査では、250 mg/kg 群の雌で軽度な小葉中心性肝細胞肥大が認められた。
8. 1~7 で認められた変化にはいずれも回復性が認められた。
9. 詳細な状態観察、機能検査、体重および摂餌量では、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

これらのことから、本試験条件下における 4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールの無影響量(NOEL)は雄で 15 mg/kg/day、雌で 15 mg/kg/day 未満と考えられた。

緒 言

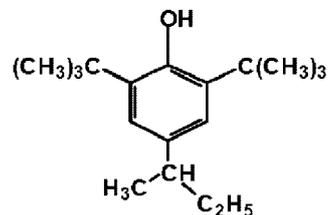
4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールの0(対照、トウモロコシ油)、15、60 および 250 mg/kg/day を1群雄雌各6匹のCr1:CD(SD)ラットに、28日間反復経口投与して毒性発現の有無およびその概要を検討した。さらに、0および250 mg/kg/day について1群雄雌各6匹の回復群を設け、投与終了の翌日から14日間観察を継続し投与終了後の回復性を併せて検討した。

材料および方法

1. 被験物質

名称 : 4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール ;
4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol
別名 : 2,6-di-tertiary-Butyl-4-sec-butylphenol
CAS No. : 17540-75-9
化審法官報公示整理番号 : (3)-540

示性式(構造式)¹⁾ :



分子式^{1,2)} : C₁₈H₃₀O
分子量²⁾ : 262.43
物理化学的性質²⁾ : 外観 ; 固体(または液体)
沸点 ; 141°C/1.3kPa
融点 ; 24°C (凝固点)
引火点 ; >110°C
密度 ; 0.90

純度 : 99.0% (GC、Appendix 1-1)
実験終了後に、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し、被験物質の安定性について確認した (Appendix 1-2)。

不純物の名称およびその濃度 : 記載なし

- 入手量 : 500 g(関連試験と共用)
- 安定性²⁾ : 通常の取扱い条件においては安定。特別な反応性は報告されていない。
- 保存条件²⁾ : 容器を密栓した後、冷暗所に保管した。火気や熱源などの着火源から遠ざけた。
- 保存場所 : 被験物質保存室の冷蔵室(実測範囲: 2~9℃)
- 保存期間 : 2009年4月28日(受入)~2011年2月21日(安定性確認)
- 取扱上の注意²⁾ : 取扱いは換気のよい場所で行った。適切な保護具を着用した。粉じんが飛散しないように取扱った。取扱い後は手や顔などをよく洗った。局所排気内で取扱い、粉塵やエアゾールが発生しないように取扱った。皮膚、眼および衣類との接触を避けた。
- サンプリング : 被験物質サンプルとして、約10 gを採取し、試験施設の資料保存室に保存した。
- 残余被験物質の処置 : 関連試験も含めすべての試験操作終了後、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。
- 有害性情報、他²⁾ : 眼、呼吸器および皮膚を刺激する。可燃性があるので、火気に注意した。

2. 媒体

- 名称 : トウモロコシ油
- ロット番号 : V0H3633
- 製造者 : ナカライテスク株式会社
- 保存条件 : 室温
- 保存場所 : 被験物質保存室
- 取扱上の注意 : 特になし。

3. 投与液の調製および化学分析

- 調製方法 : 被験物質を精秤し、所定の濃度となるように媒体を添加後、スターラーを用いて分散(溶解)させた。
- 調製頻度 : 8日間に1回以上
- 保存条件 : 室温(実測範囲: 22~24℃)
- 保存場所 : 被験物質保存室
- 保存期間 : 2010年10月12日(初回調製日)~2010年11月10日(最終回投与)
各投与液は調製後8日以内に使用した。
- 調製上の注意 : 被験物質はドラフト内で取扱い、調製の際にはマスク、手袋等を着用し、吸入、眼、皮膚および衣類等との接触を避けた。

- 残余投与液の処置 : 残余の投与液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。
- 投与液の安定性 : 0.3 および 100 mg/mL の調製液について、調製後室温保存 8 日間の安定性が確認されている (Appendix 2-1)。
- 投与液の濃度確認 : 被験物質の全濃度に関する投与液中の濃度を、初回および最終回投与に使用する投与液について計 2 回確認した (Appendix 2-2-1、2-2-2)。
- 濃度分析方法 : Appendix 3 に示す。

4. 試験方法

(1) 試験系

- 種・系統 : ラット、Cr1:CD(SD)
- 微生物統御 : SPF
- 生産業者 : 日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター
- 微生物モニタリング : 動物生産業者よりデータを入手した。
- 動物選定理由 : ラットは毒性試験等で通常用いられている動物種であり、当研究所での使用経験が豊富であることからこの系統を選定した。
- 発注動物数 : 雄雌各 38 匹
- 受人動物数 : 雄雌各 40 匹
- 発注動物週齢 : 雄雌とも 4 週齢
- 出荷体重基準 : 雄雌とも 50~110 g
- 受人時体重範囲 : 雄 88~103 g、雌 71~89 g
- 投与開始時週齢 : 雄雌とも 5 週齢
- 群数 : 雄雌各 6 群 (毒性試験群 ; 雄雌各 4 群、回復性試験群 ; 雄雌各 2 群)
- 各群動物数 : 雄雌各 6 匹

(2) 検疫および馴化

- 検疫方法 : 一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を受人時および群分け時 (投与開始前々日) に測定した。
- 期間 : 馴化 1 日 (受入口) から、雄は馴化 6 日までの 5 日間、雌は馴化 7 日までの 6 日間。
検疫および馴化期間中に雄雌とも異常は認められなかった。

(3) 群分け

検疫および馴化期間中に実施した一般状態観察および体重測定の結果を参考にして、動物の使用の適否を決定した。群分けは、投与開始前々日にその日の体重に基づいて層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように行った。群分け時の動物の体重範囲は、雄で 143~162 g、雌で 122~143 g であり、平均体重 (雄 154.6 g、雌 134.8 g) の $\pm 20\%$ 以内であることを確認した。なお、選抜から外れた雄雌各 4 匹は試験から除外し、標準操作手順書に従って適

切に取り扱った。選抜された動物について、投与開始前日に一般状態に異常がないことを確認した。

なお、投与開始時の体重範囲は、雄で 163～185 g、雌で 131～162 g であり、平均体重は雄で 175.0 g、雌で 147.7 g であった。

(4) 動物およびケージの識別

動物 : 群分け前は受入時に油性フェルトペンで尾部に印を付け、個体識別を行った。

群分け後は耳介に動物番号を入れ墨し、個体識別を行った。

飼育ケージ : 群分け前は性別毎に色分けしたラベルに試験番号および受入時の動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。

群分け後は性別毎に色分けしたラベルに試験番号、試験群および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

飼育室番号 : 305 号室
 温度・湿度 : 22±3℃(実測範囲 21～24℃)、50±20%(実測範囲 38～54%)
 換気回数 : 10～15 回/時間
 照明時間 : 人工照明 12 時間(8:00～20:00)

2) 飼育器材および飼育方法

ケージの種類 : ブラケット式金属製金網床ケージ(260W×380D×180H, mm)

1 ケージあたりの収容動物数 : 検疫および馴化期間中は 2 または 3 匹、群分け後は 1 匹とした。

ケージ交換 : 群分け時、投与 14 日および投与 28 日(回復群のみ)に実施した。

受皿交換 : 週 2 回実施した。

給餌器交換 : 群分け時、投与 14 日および投与 28 日(回復群のみ)に実施した。

自動給水装置の水抜き : 週 1 回実施した。

給水器交換 : 尿検査時にのみ使用した。

室内の清掃 : 1 日 1 回実施した。

室内の消毒 : 塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を 1 週間単位で交互に使用する清拭消毒を 1 日 1 回実施した。

3) 飼料

種類・名称 : 固型飼料、CRF-1

ロット番号 : 100706、100907

製造業者 : オリエンタル酵母工業株式会社

給餌方法 : 金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

汚染物質および微生物検査：試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロットの飼料について分析した。汚染物質の分析はEurofins Analytics社(分析報告書：AR-10-JP-000805-01、AR-10-JP-001058-01)が、微生物検査は飼料製造業者(分析試験報告書：No. 10G03-105、10G03-139)がそれぞれ行った。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった。

4) 飲料水

種類：札幌市水道水
 給水方法：自動給水装置あるいは給水器を用いて自由に摂取させた。
 汚染物質検査：試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、2010年10月1日および2011年1月4日に当該飼育室と同系統配管の最末端(301号室)から試料を採取して分析した。分析は日本衛生株式会社(水質検査結果表；No. A223085、A224281)が行い、分析データを入手した。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった。

(6) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

投与量：0、15、60 および 250 mg/kg/day
 設定理由：1群につき雄雌各群3匹のSD系ラット[Cr1:CD(SD)]に、トウモロコシ油に分散(溶解)させた被験物質の0(対照)、15、60、250 および 1000 mg/kg を14日間反復経口投与した予備試験(SR08226P)³⁾の結果、250 mg/kg 以上で雄雌に肝臓重量の増加が認められ、1000 mg/kg では、雄雌で体重増加抑制傾向、摂餌量の低下傾向、肝臓に関連した総ビリルビンの高値等、腎臓に関連した尿素窒素の高値等、消化管に関連した拡張等や軟便、生殖器に関連した精巣上体尾部の暗赤色化などの変化が認められた。このことから、予備試験における無影響量(NOEL)は、雄雌とも60 mg/kg/day と推察され、雄雌で肝臓重量の増加が認められている250 mg/kg を高用量とし、以下公比約4で順次除した60 および 15 mg/kg を中用量および低用量に設定した。なお、対照群および250 mg/kg の2用量については28日間反復投与後14日間の回復性を検討する回復群を設定した。

試験群の構成

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数(動物番号)	
			雄	雌
< 毒性試験群 >				
対照群	0	0	6 (101~106)	6 (151~156)
低用量群	15	1.5	6 (201~206)	6 (251~256)
中用量群	60	6	6 (301~306)	6 (351~356)
高用量群	250	25	6 (401~406)	6 (451~456)
< 回復性試験群 >				
対照群	0	0	6 (107~112)	6 (157~162)
高用量群	250	25	6 (407~412)	6 (457~462)

対照群には、他の群と同様の方法で媒体のみを投与した。

2) 投与

投与方法および投与経路：ディスポーザブル胃ゾンデおよびディスポーザブルシリンジを用いて強制的に胃内に経口投与した。

投与回数 : 1日1回、28日間。

投与方法、投与経路および投与回数の選定理由：試験法ガイドラインに準拠して選定した。

投与時刻 : 9:00~12:00。尿検査時は11:30~12:00。

投与容量 : 10 mL/kgとした。各個体の投与液量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて算出した。

(7) 観察、測定および検査項目

1) 一般状態観察

例数 : 全例

期間 : 投与開始日を投与1日、投与28日の翌日を回復1日として起算し、投与1日から剖検日(投与28日あるいは回復14日の翌日)まで。

頻度 : 午前(投与期間中は投与前)および午後の1日2回。ただし、剖検日は午前中に1回。

観察方法 : 個々の生死、外観、行動等について観察した。

2) 詳細な一般状態観察

例数 : 全例

時期 : 投与開始前ならびに投与7、14、21および28日、回復7および14日。

観察方法 : あらかじめ定めたスコアリング基準を用いてスコア化した観察結果を記録した。

観察項目およびその方法 :

①体位・姿勢、呼吸状態、振戦・痙攣、常同行動(回転・旋回)、異常行動(自咬)をケージ外から観察した。

②取り出し易さ、取扱い易さ、筋収縮性、立毛、被毛の状態、

皮膚、眼・眼球および粘膜の外観、瞳孔径、流涙、流涎、
 その他分泌物の有無について、ケージから取り出す時に観察した。
 ③歩行、運動協調性、環境刺激に対する反応、探索行動(臭嗅ぎ・
 立上り)、排泄状態(排尿・排糞)、常同行動(身づくろい・くびふ
 り)、異常行動(後ずさり・異常発声)、攻撃性について、オーブ
 ンフィールド内で観察した。

3) 機能検査

例数 : 全例
 時期 : 投与4週および回復2週
 観察/測定方法 : あらかじめ定めたスコアリング基準を用いてスコア化した観察結果
 あるいは測定機器による測定値を記録した。
 観察項目およびその方法：
 ①刺激に対する感覚運動反応：検査台上で以下を観察した。
 視覚刺激、触覚刺激、聴覚刺激、痛覚刺激、固有受容器刺激、
 空中正向反射
 ②握力：
 CPU ゲージ(アイコーエンジニアリング株式会社)を用いて前肢お
 よび後肢について各3回測定し、1 g 単位で記録した。
 ③自発運動量：
 自発運動量測定装置(スーパーメックスおよびCompAct、室町機
 械株式会社)を用いて、上記に引き続き、10分間隔で1時間測定
 した。

4) 体重測定

例数 : 全例
 測定日 : 投与1、4、7、14、21 および28日の投与前、回復7および14日な
 らびに剖検日に測定した。
 測定方法 : 電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社 エー・アンド・デイ)を用いて
 測定し、1 g 単位で記録した。

体重増加量および体重増加率：以下の式により算出した。

$$\begin{aligned} & \text{投与期間} \\ \text{体重増加量(g)} &= \text{投与28日体重(g)} - \text{投与1日体重(g)} \\ \text{体重増加率(\%)} &= \frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{投与1日体重(g)}} \times 100 \\ & \text{回復期間} \\ \text{体重増加量(g)} &= \text{回復14日体重(g)} - \text{投与28日体重(g)} \\ \text{体重増加率(\%)} &= \frac{\text{体重増加量(g)}}{\text{投与28日体重(g)}} \times 100 \end{aligned}$$

5) 摂餌量測定

- 例数 : 全例
- 測定日 : 投与 1、4、7、14、21 および 28 日の投与前、回復 7 および 14 日。
- 測定方法 : 電子式上皿天秤 (GX-2000、株式会社 エー・アンド・デイ) を用いて、1 g 単位で記録した。投与開始前日に適当量を測定後ケージ毎に給与し、その後は測定日に残量および給与量を測定した。ただし、剖検前日は残量のみ測定した。以下の式により、摂餌量を算出した。なお、投与 21-28 日および回復 7-14 日の摂餌量は尿検査時の摂餌量を測定していないため、測定日の日数を 6 日間として算出した。

$$\text{摂餌量(g/rat/day)} = \frac{\text{給与量(g/rat)} - \text{残量(g/rat)}}{\text{測定日間の日数(day)}}$$

6) 尿検査

- 例数 : 全例
- 時期 : 投与 4 週 (投与 23~24 日) および回復 2 週 (回復 10~11 日)
- 採尿方法 : 非絶食下でラット用代謝ケージ (KN-646、B-1 型、夏目製作所) を用いて採尿し、投与直後から約 3 時間の蓄尿で①~⑧を、また約 21 時間の蓄尿で⑨、⑩を実施した。採取した尿は検査終了後廃棄した。

検査項目および検査方法 :

①pH	試験紙法
②蛋白 (Protein)	試験紙法
③糖 (Glucose)	試験紙法
④ケトン体 (Ketone body)	試験紙法
⑤ウロビリノーゲン (Urobilinogen)	試験紙法
⑥ビリルビン (Bilirubin)	試験紙法
⑦潜血反応 (Occult blood)	試験紙法
⑧色調 (Color)	肉眼観察
⑨尿量 (Urine Volume)	容量測定
⑩比重 (Specific gravity)	屈折計法

①~⑦ マルティスティックス、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス

⑩ 尿比重屈折計ユリコン-S、アタゴ

7) 血液学的検査

- 例数 : 全例
- 時期 : 剖検時に採血
- 検査方法 : 一晩の絶食下 (16~19 時間) でラットをエーテル麻酔し、腹部大動脈より採血した。検査項目のうち①~⑩について EDTA・2K (ベノジェクト II 真空採血管、テルモ株式会社) で処理した血液約 1 mL を用い、⑪および⑫については 3.8% クエン酸ナトリウムで処理した血液約 1~2 mL を 3500 回転/分で 10 分間遠心分離して得られた血漿を用いた。得られた血液および血漿は検

査終了後廃棄した。

なお、白血球塗抹標本(May-Grünwald-Giemsa 染色)を作製し、保存した。

白血球の分布に異常はみられなかったため、鏡検は行わなかった。

検査項目および検査方法：

①赤血球数(RBC)	電気抵抗検出法
②ヘマトクリット値(HCT)	電気抵抗検出法
③ヘモグロビン濃度(HGB)	SLS ヘモグロビン法
④平均赤血球容積(MCV)	RBC, HCT 値より算出
⑤平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)	RBC, HGB 値より算出
⑥平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)	HCT, HGB 値より算出
⑦網赤血球数(Reticulocyte)	フローサイトメトリー法
⑧血小板数(Platelet)	電気抵抗検出法
⑨白血球数(WBC)	フローサイトメトリー法
⑩白血球分画(Differential count of WBC)	フローサイトメトリー法
⑪プロトロンビン時間(PT)	トロンボプラスチン法
⑫活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)	エラジン酸法

①～⑩ 自動血球分析装置 XT-2000 iV、シスメックス

⑪⑫ 血液凝固自動測定装置 KC4 デルタ、トリニティ・バイオテック

8) 血液化学的検査

例数 : 全例

時期 : 剖検時に採血

検査方法 : 一晩の絶食下(16～19時間)でラットをエーテル麻酔し、腹部大動脈より採血した。検査項目のうち①および⑤については血液 1 mL あたりヘパリンナトリウム(ヘパリンナトリウム注N「味の素」、1000 単位/mL、味の素株式会社)約 20 単位で処理後、3500 回転/分で 10 分間の遠心分離で得られた血漿を用いて検査した。他の項目については分離剤入り試験管(セパクリーン A、栄研器材株式会社)に血液を採取し、3500 回転/分で 10 分間の遠心分離で得られた血清を用いて検査した。得られた血漿および血清は検査終了後、-20℃以下で凍結保存し、試験終了日に廃棄した。

検査項目および検査方法：

① AST	JSCC 法
② ALT	JSCC 法
③ アルカリホスファターゼ(ALP)	JSCC 法
④ γ -GTP	L- γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法
⑤ グルコース(Glucose)	ヘキソキナーゼ法
⑥ 総コレステロール(T-Cho)	酵素法
⑦ トリグリセリド(TG)	遊離グリセロール消去法
⑧ 総ビリルビン(T-Bil)	アゾビリルビン法
⑨ 尿素窒素(UN)	ウレアーゼ・GLDH 法
⑩ クレアチニン(Crea)	Jaffé 法
⑪ ナトリウム(Na)	イオン選択電極(ISE)法
⑫ カリウム(K)	イオン選択電極(ISE)法

⑬ クロール (Cl)	イオン選択電極 (ISE) 法
⑭ カルシウム (Ca)	OCPC 法
⑮ 無機リン (IP)	Fiske-Subba Row 法
⑯ 総蛋白 (TP)	ビウレット法
⑰ 蛋白分画 (Protein fraction)	セルロースアセテート膜電気泳動法
⑱ A/G 比 (A/G ratio)	蛋白分画より算出
⑲ アルブミン (Albumin)	総蛋白と蛋白分画より算出

①～⑯ 自動分析装置 7080 形、日立ハイテクノロジーズ

⑰～⑲ 自動電気泳動装置 AES320、三島オリンパス

9) 剖検

例数 : 全例

時期 : 投与 28 日の翌日あるいは回復 14 日の翌日に実施した。

検査方法 : 体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後、放血により安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。また、以下の器官・組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液に固定・保存した。なお、眼球およびハーダー腺はデビッドソン液で固定・保存し、精巣および精巣上体はブアン液で固定、70% エタノールに保存した。肺については固定液を注入後浸漬固定した。左右のある器官については、原則として左右とも固定・保存した。

器官・組織名 : 脳(大脳、小脳および延髄)、下垂体、脊髄、胸腺、甲状腺、上皮小体、副腎、脾臓、心臓、舌、食道、胃、肝臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節、顎下リンパ節、気管、肺、腎臓、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精囊(凝固腺含む)、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、大腿骨(骨髄含む、右) および坐骨神経

10) 器官重量測定

例数 : 全例

時期 : 剖検時

測定方法 : 電子式上皿天秤 (ER-180A、株式会社 エー・アンド・デイ) を用いて以下の器官の重量を測定した。左右のある器官については、左右合わせて測定した。

相対重量の算出 : 以下の式から相対重量を算出した。

$$\text{相対重量 (\% or } 10^{-3}\%) = \frac{\text{絶対重量 (g or mg)}}{\text{剖検日体重 (g)}} \times 100$$

器官名 : 脳、下垂体、甲状腺、副腎、脾臓、心臓、肝臓、腎臓、胸腺、精巣、精巣上体、前立腺、精囊(凝固腺含む)、卵巣、子宮

11) 病理組織学的検査

例数 : 剖検時に固定・保存した全例の全器官・組織について標本作製を実施

し、対照群および高用量群の全例について鏡検した。また、剖検時にみられた肉眼的異常部位について鏡検した。

鏡検の結果、被験物質投与の影響と考えられる変化が認められた肝臓について、その他の投与群の動物についても雄雌全例の鏡検を行った。

検査方法 : パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を製作して鏡検した。また、雄1例(No. 411)および雌5例(No. 152、162、251、352、454)の肝臓の脂肪化について Oil red O 染色(中性脂肪の確認)を施しそれぞれ陽性であることが確認された。雄3例(No. 105、107、410)の腎臓について抗 α_{2u} -グロブリン抗体による免疫組織学的染色を実施した。

5. 統計学的方法

- (1) 投与期間中は回復群の動物を合わせて集計した。
- (2) 握力、自発運動量、体重、体重増加量および増加率、摂餌量、尿量、血液学的検査、血液化学的検査、器官の絶対重量および相対重量の成績について平均値および標準偏差を算出し、Bartlett の検定法により等分散性を解析した。等分散($p > 0.05$)の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散($p \leq 0.05$)の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差がみられた場合($p \leq 0.10$)は Dunnett の検定法を用いて対照群との比較を行った。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差がみられた場合($p \leq 0.10$)は Mann-Whitney の U-検定法を用いて対照群との比較を行った。

詳細な一般状態観察および機能検査の観察項目、尿検査の定性的項目および尿比重の成績について Kruskal-Wallis の検定法で解析し、有意差がみられた場合($p \leq 0.10$)は Mann-Whitney の U-検定法を用いて対照群との比較を行った。

対照群との比較検定については、有意水準を 5%とした。

なお、統計学的方法に関する表示方法を INDIVIDUAL DATA の冒頭に示す。

成 績

1. 一般状態

一般状態の成績を Table 1 および 2、INDIVIDUAL DATA 1-1-1~1-2-4 に示す。

[投与期間]

対照(0 mg/kg)群ならびに 15 および 60 mg/kg 群では、雄雌とも異常は認められなかった。

250 mg/kg 群では、雄で投与 26 日以降、雌で投与 25 日および剖検日に軟便が認められた。

他に、雄 1 例で投与 21 日以降に眼球突出が認められ、この例では剖検時に眼球の腫大が認められた。

[回復期間]

対照群では、雄雌ともに異常は認められなかった。

250 mg/kg 群では、雄で回復 1 日に軟便が認められたが、回復 2 日以降には異常は認められなかった。雌では異常は認められなかった。

2. 詳細な一般状態観察

詳細な一般状態観察の成績を Table 3~8、INDIVIDUAL DATA 2-1-1~4-14-2 に示す。

[投与期間]

対照群および各投与群の雄雌ともにいずれの検査時にも各観察項目に対照群と比較して有意な差は認められず、鎮静、興奮あるいは行動異常等の神経行動学的な異常は認められなかった。

[回復期間]

250 mg/kg 群の雄雌ともにいずれの検査時にも各観察項目に有意な差は認められず、鎮静、興奮あるいは行動異常等の神経行動学的な異常は認められなかった。

3. 機能検査

機能検査の成績を Table 9~12、INDIVIDUAL DATA 5-1-1~6-4-2 に示す。

[投与 4 週]

刺激に対する感覚運動反応および自発運動量では、各投与群の雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

握力では、15 mg/kg 群の雌で前肢にのみ有意な高値が認められたが、用量依存性のない変化であり、毒性学的な意義はないと判断した。雄には有意な変化は認められなかった。

[回復 2 週]

250 mg/kg 群では、刺激に対する感覚運動反応に関しては、雄雌ともに有意な変化は認められなかった。握力に関して雌で後肢にのみ有意な高値が、自発運動量に関して雌で測定開始後 30-40' および総運動量(0-60')に有意な低値が認められたが、いずれも投与終了時には認められ

ていない変化であり、毒性学的意義はないと判断した。

4. 体重

体重推移を Figure 1 および 2、Table 13 および 14、INDIVIDUAL DATA 7-1-1～7-2-4 に示す。

[投与期間]

各投与群の雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

[回復期間]

250 mg/kg の雄で回復 7 および 14 日に有意な低値が認められたが、回復期間の体重増加量および増加率では有意な高値が認められた。この変化は投与期間中には認められていない変化であり、毒性学的な意義はないと判断した。雌には有意な変化は認められなかった。

5. 摂餌量

摂餌量を Figure 3 および 4、Table 15 および 16、INDIVIDUAL DATA 8-1-1～8-2-4 に示す。

[投与期間]

各投与群の雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

[回復期間]

250 mg/kg 群の雄で回復 7-14 日に有意な高値が認められたが、高値であること、また、投与期間中には認められていない変化であることから、毒性学的な意義はないと判断した。雌には有意な変化は認められなかった。

6. 尿検査

尿検査の成績を Table 17～20、INDIVIDUAL DATA 9-1-1～9-4-2 に示す。

[投与 4 週]

15 mg/kg 群では、雄雌ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

60 mg/kg 群では、雄で尿蛋白 (Protein) の有意な低下が認められたが、用量依存性のない変化であり、毒性学的意義のない変化と判断した。雌には有意な変化は認められなかった。

250 mg/kg 群では、雌で尿 pH の有意な低下が認められた。雄には有意な変化は認められなかった。

なお、対照群の 1 例 (No. 162) の定性試料 (3 時間の蓄尿) に糞が混入していたため、統計学的処理から除外し参考データとした。

[回復 2 週]

250 mg/kg 群の雄雌とも有意な変化は認められなかった。

7. 血液学的検査

血液学的検査の成績を Table 21～24、INDIVIDUAL DATA 10-1-1～10-4-4 に示す。

[投与期間終了時]

15 mg/kg 群では、雌でリンパ球数(Lymphocyte)および好酸球数(Eosinophil)に対照群と比較して有意な低値が認められた。雄には有意な変化は認められなかった。

60 mg/kg 群では、雄でプロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の有意な延長、雌で白血球数(WBC)ならびにリンパ球数および好酸球数の有意な低値が認められた。

250 mg/kg 群では、雄でプロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長、雌で白血球数ならびにリンパ球数および好酸球数の有意な低値、活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。

[回復期間終了時]

250 mg/kg 群の雌でヘモグロビン濃度(HGB)およびヘマトクリット値(HCT)の有意な低値ならびに血小板数(Platelet)の有意な高値が認められたが、投与期間終了時には認められていない変化であり、毒性学的な意義はないと判断した。雄には有意な変化は認められなかった。

8. 血液化学的検査

血液化学的検査の成績を Table 25～28、INDIVIDUAL DATA 11-1-1～11-4-4 に示す。

[投与期間終了時]

15 mg/kg 群では、雄でナトリウム(Na)に対照群と比較して有意な高値が認められたが、用量依存性のない変化であった。雌では、総コレステロール(T-Cho)に有意な高値が認められた。

60 mg/kg 群では、雄雌で総コレステロールの有意な高値が認められた。

250 mg/kg 群では、雄雌で総ビリルビン(T-Bil)、総コレステロール(T-Cho)の有意な高値、さらに、雄でAST、ALT、アルカリホスファターゼ(ALP)および尿素窒素(UN)の有意な高値ならびにカリウム(K)および無機リン(IP)の有意な低値、雌で蛋白分画(Protein fraction)の α_1 -グロブリン分画比およびクレアチニン(Crea)の有意な高値が認められた。

[回復期間終了時]

250 mg/kg 群の雄雌ともに有意な変化は認められなかった。

9. 剖検

剖検所見を Table 29 および 30、INDIVIDUAL DATA 12-1-1～12-4-2 に示す。

[投与期間終了時]

対照群および 15 mg/kg 群では、雄雌とも異常所見は認められなかった。

60 mg/kg 群では、雄 1 例で盲腸の水様内容物が認められた。雌には異常所見は認められなかった。

250 mg/kg 群では、雄 6 例および雌 2 例で盲腸の水様内容物が認められた。他に、雄 1 例で眼球の腫大が認められた。

[回復期間終了時]

対照群および 250 mg/kg 群の雄雌ともに異常所見は認められなかった。

10. 器官重量

器官重量の成績を Table 31～34、INDIVIDUAL DATA 13-1-1～13-4-4 に示す。

[投与期間終了時]

15 および 60 mg/kg 群では、雌で肝臓の相対重量に対照群と比較して有意な高値が認められた。雄には有意な変化は認められなかった。

250 mg/kg 群では、雌で肝臓の絶対および相対重量、子宮の相対重量に有意な高値ならびに脾臓の絶対重量に有意な低値が認められた。雄には有意な変化は認められなかった。

[回復期間終了時]

250 mg/kg 群の雌で肝臓の相対重量に有意な高値が認められた。他に、雄で腎臓および精巣上体の相対重量に有意な高値、雌で副腎の絶対および相対重量に有意な高値が認められた。なお、雄では剖検時体重の有意な低値が認められた。

11. 病理組織学的検査

病理組織学的所見を Table 35 および 36、INDIVIDUAL DATA 14-1-1～14-4-2 に示す。

[投与期間終了時]

肝臓：250 mg/kg 群の雌 6 例(全例)で軽度な小葉中心性肝細胞肥大が認められたが、60 mg/kg 以下の投与群には同様の変化は認められなかった。他に、雄雌の各群で軽度な小肉芽腫、雌の各群で軽度な小葉周辺性脂肪化が認められたが、いずれも用量依存性は認められなかった。

その他の器官・組織：250 mg/kg 群の雄雌ともに、発現例数やグレードが対照群あるいは正常範囲を逸脱する変化は認められなかった。

剖検時に肉眼的所見の認められた例：盲腸の水様内容物が認められた 60 mg/kg 群の雄 1 例の盲腸に軽度な粘膜下組織の水腫が認められたが、同様の肉眼所見が認められている 250 mg/kg の雄 6 例には異常所見は認められなかった。眼球の腫大が認められた 250 mg/kg 群の雄 1 例の眼球には重度な網膜の萎縮ならびに軽度な硝子体内の出血が認められた。同群の他の 5 例ならびに雌 6 例には同様の変化は認められなかった。

[回復期間終了時]

肝臓：250 mg/kg 群の雌 6 例(全例)ともに投与終了時に認められた小葉中心性肝細胞肥大は確認されなかった。

その他の器官・組織：250 mg/kg 群の雄雌ともに、発現例数やグレードが対照群あるいは正常範囲を逸脱する変化は認められなかった。雄 3 例(No. 105、107、410)の腎臓について抗 α_{2u} -グロブリン抗体による免疫組織学的染色ではいずれも陽性反応が認められた。

考 察

4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノール；4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenolの0(対照、トウモロコシ油)、15、60 および 250 mg/kg/day を1群雄雌各6匹のCr1:CD(SD)ラットに、28日間反復経口投与して毒性発現の有無およびその概要を検討した。さらに、0 および 250 mg/kg/day について1群雄雌各6匹の回復群を設け、投与終了の翌日から14日間観察を継続し投与終了後の回復性を併せて検討した。

一般状態では、250 mg/kg 群で、投与期間中に軟便が雄8例(投与26日2例、投与27日5例、投与28日3例、剖検日6例)および雌3例(投与25日1例、剖検日2例)に認められ、回復1日にも雄3例で認められた。この軟便は投与期間終了週にのみみられ、投与期間終了とともに回復したこと、また、剖検所見で盲腸の水様内容物が60 mg/kg 群の雄1例ならびに250 mg/kg 群の雄6例および雌2例に認められていることから被験物質投与に関連した消化管に対する影響と考えられた。

尿検査では、250 mg/kg 群の雌で尿pHの有意な低下が認められた。腎臓に関連する検査項目としては250 mg/kg 群の雄で尿素窒素(UN)の有意な高値、雌でクレアチニン(Crea)の有意な高値が認められていることから、被験物質投与に関連した変化である可能性が考えられた。しかし、腎臓重量や病理組織学的検査には毒性を示唆する変化は認められていないことから、重篤な変化ではないと推察された。

血液学的検査では、60 mg/kg 以上の群の雄でプロトロンビン時間(PT)、60 mg/kg 以上の群の雄および250 mg/kg 群の雌で活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の有意な延長が認められた。これらの変化は類縁物質である2,4-ジ-tert-ブチルフェノールの毒性試験⁴⁾においても報告されていることから、発現機序については明らかでないが本試験においても被験物質投与に関連した変化と考えられた。

15 mg/kg 以上の群の雌でリンパ球数(Lymphocyte)および好酸球数(Eosinophil)、60 mg/kg 以上の群の雌で白血球数(WBC)の有意な低値が認められたが、対照群の2例でリンパ球数および白血球数に背景データを逸脱する高値が認められていることに関連した有意差と推察され、毒性学的な意義はないと考えられた。

血液化学的検査では、15 mg/kg 以上の群の雌および60 mg/kg 以上の群の雄で総コレステロール(T-Cho)の有意な高値が認められ、250 mg/kg 群では雄雌に総ビリルビン(T-Bil)の有意な高値、雄にAST、ALT、アルカリホスファターゼ(ALP)の有意な高値、雌に蛋白分画(Protein fraction)の α_1 -グロブリン分画比の有意な高値が認められた。これらの項目の変化より被験物質投与に関連した肝臓への影響が示唆された。肝臓では、雌で15 mg/kg 以上の群に相対重量の有意な高値が認められ、250 mg/kg 群には絶対重量の有意な高値ならびに病理組織学的な変化として軽度な

小葉中心性肝細胞肥大が認められた。総コレステロールの高値や肝臓重量の増加および小葉中心性肝細胞肥大は、先の類縁物質の毒性試験¹⁾にも報告され、本被験物質もそれらと同様に、脂質代謝への影響および薬物代謝酵素の誘導に起因した変化と考えられた。

250 mg/kg 群の雄でカリウム(K)および無機リン(IP)の有意な低値が認められたが、この変化は一般状態で軟便、尿検査で pH の低下、剖検所見で盲腸に水様内容物が観察されていることから、一般状態における軟便に関連した消化管からの喪失に起因するものと推察された。

他に、器官重量で 250 mg/kg 群の雌に脾臓の絶対重量に有意な低値、子宮の相対重量に有意な高値が認められたが、いずれも病理組織学的変化を伴わないこと、また、脾臓については体重推移等に被験物質の影響がなく栄養障害等も認められないことから、毒性学的な意義はないと推察された。

これらの変化は、回復期間終了時には 250 mg/kg 群の雌で肝臓の相対重量に有意な高値が認められるものの他はいずれも認められないことから回復性を示すものと推察された。

その他、詳細な状態観察、機能検査、体重および摂餌量については被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

以上のように、被験物質投与に関連した変化として以下が認められた。

消化管に対する影響として、一般状態で 250 mg/kg 群の雄雌に軟便が認められ、剖検所見で盲腸の水様内容物が 60 mg/kg 群の雄ならびに 250 mg/kg 群の雄雌に認められた。また、250 mg/kg 群の雄でカリウムおよび無機リンの有意な低値が認められた。

肝臓への影響として、15 mg/kg 以上群の雌で総コレステロールの有意な高値および相対重量の有意な高値、60 mg/kg 以上の群の雄雌で総コレステロールの有意な高値、250 mg/kg 群の雄雌で総ビリルビンの有意な高値、雄で AST、ALT、アルカリホスファターゼの有意な高値、雌で α_1 -グロブリン分画比の有意な高値および軽度な小葉中心性肝細胞肥大が認められた。

凝固系への影響として、60 mg/kg 以上の群の雄でプロトロンビン時間、60 mg/kg 以上の群の雄および 250 mg/kg 群の雌で活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。

腎臓への影響として、250 mg/kg 群の雌で尿 pH の有意な低下、雄で尿素窒素の有意な高値、雌でクレアチニンの有意な高値が認められた。

これらのことから、本試験条件下における 4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールの無影響量(NOEL)は雄で 15 mg/kg/day、雌で 15 mg/kg/day 未満と考えられた。

参考資料

1) SCHENECTADY INTERNATIONAL INC. TECHNICAL DATA SHEET. ISONOX[®] 132. 2,6-DI-TERTIARY-

BUTYL-4-SEC-BUTYLPHENOL.

- 2) 東京化成工業株式会社ホームページ. オンラインカタログおよび製品安全データシート. 東京化成工業株式会社.
- 3) 4-sec-ブチル-2,6-ジ-tert-ブチルフェノールのラットにおける 14 日間反復経口投与毒性予備試験 (SR08226P) 最終報告書. 株式会社 化合物安全性研究所. (2010)
- 4) 2,4-ジ-tert-ブチルフェノール. 英文要旨、単回投与毒性試験および 28 日間反復投与毒性試験. 既存化学物質毒性データベース (国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室).

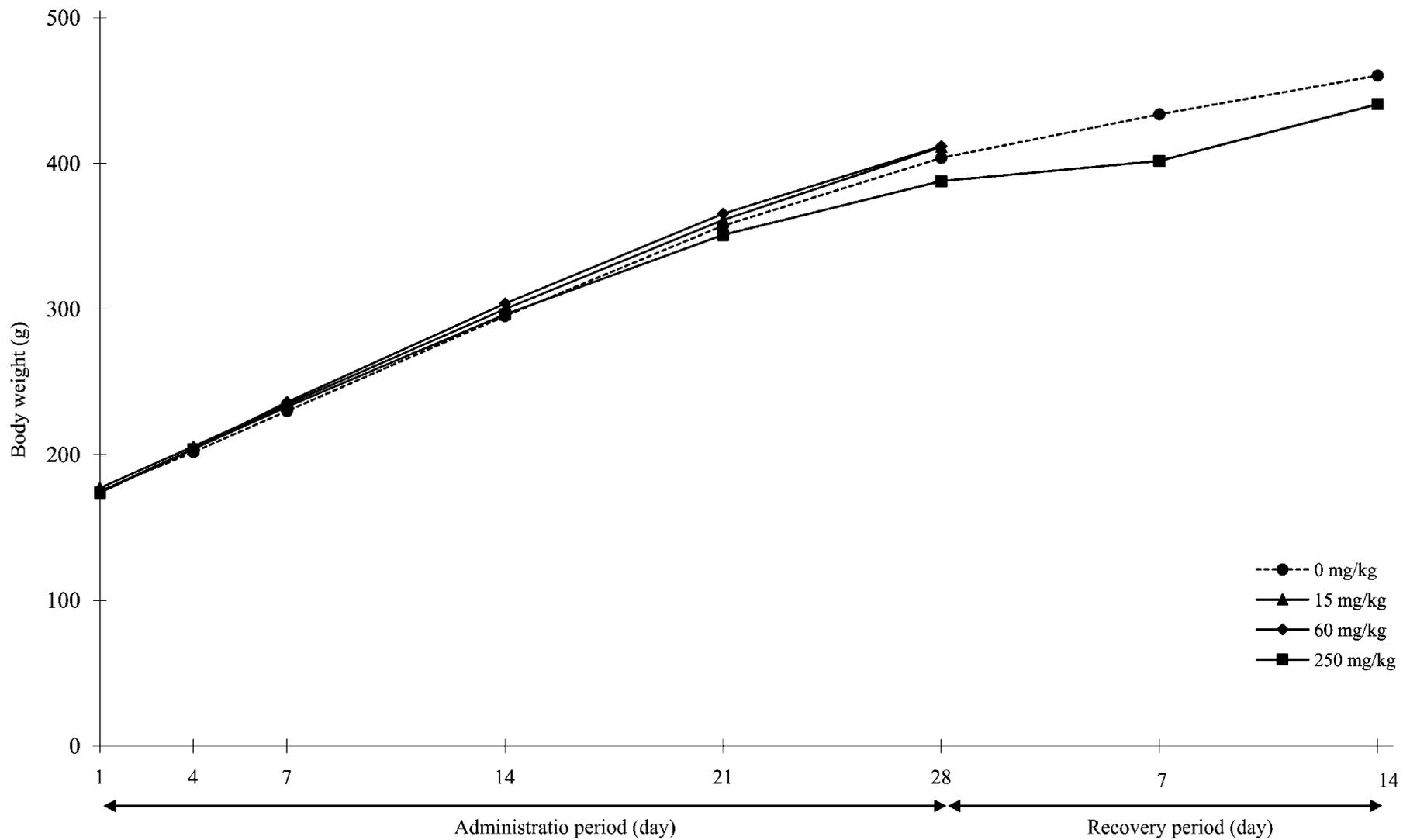


Figure 1 Body weight of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

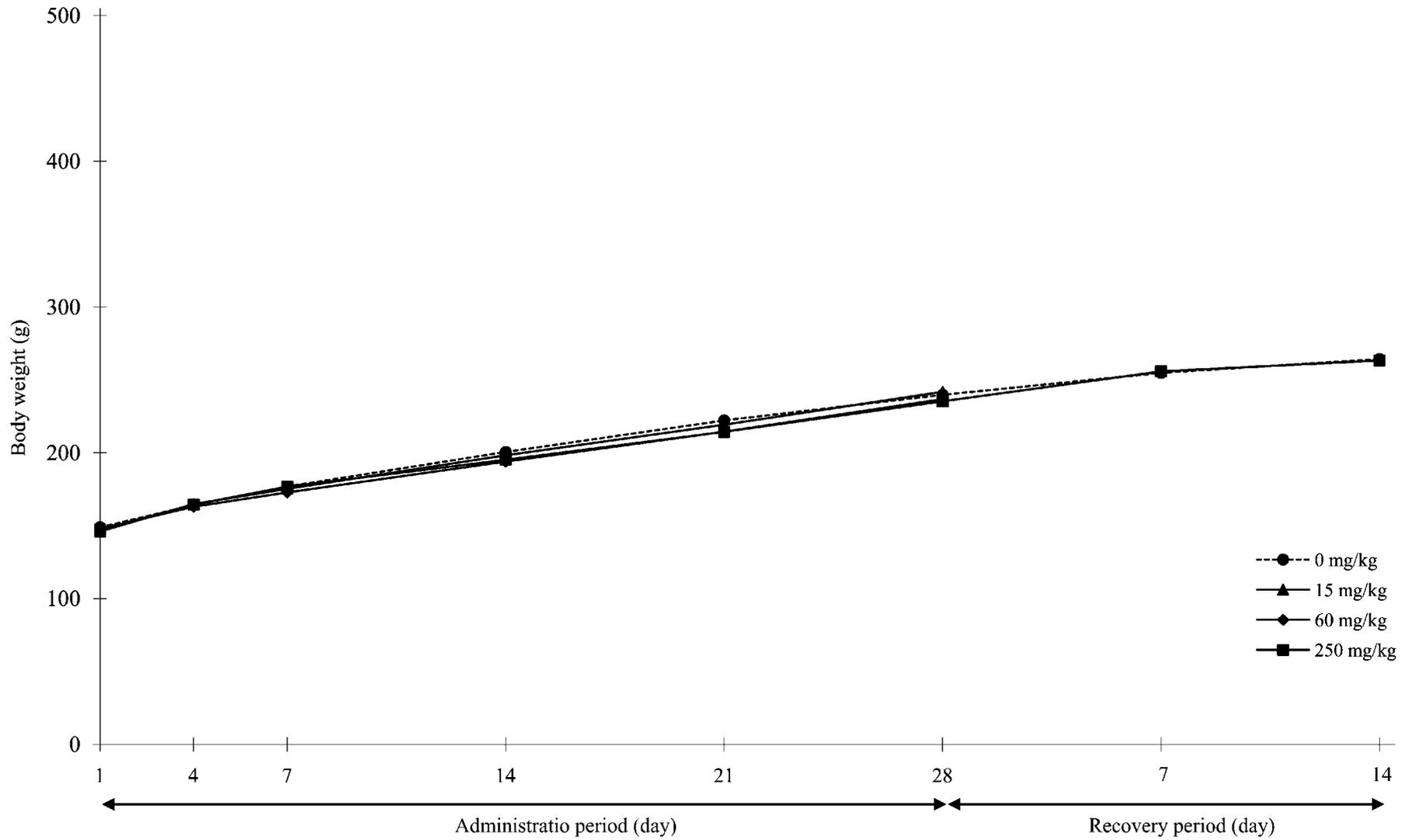


Figure 2 Body weight of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

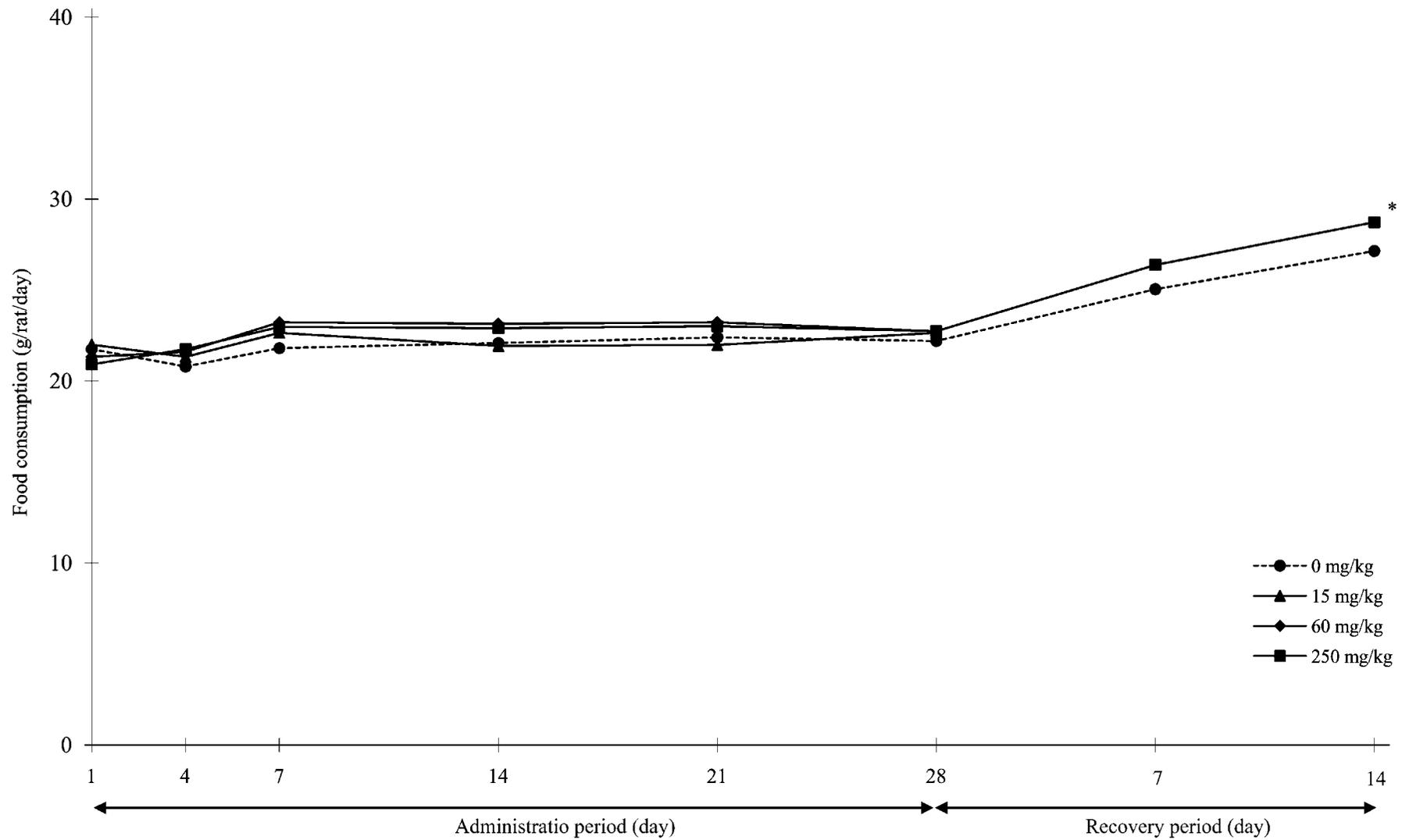


Figure 3 Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

* : Significantly different from 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

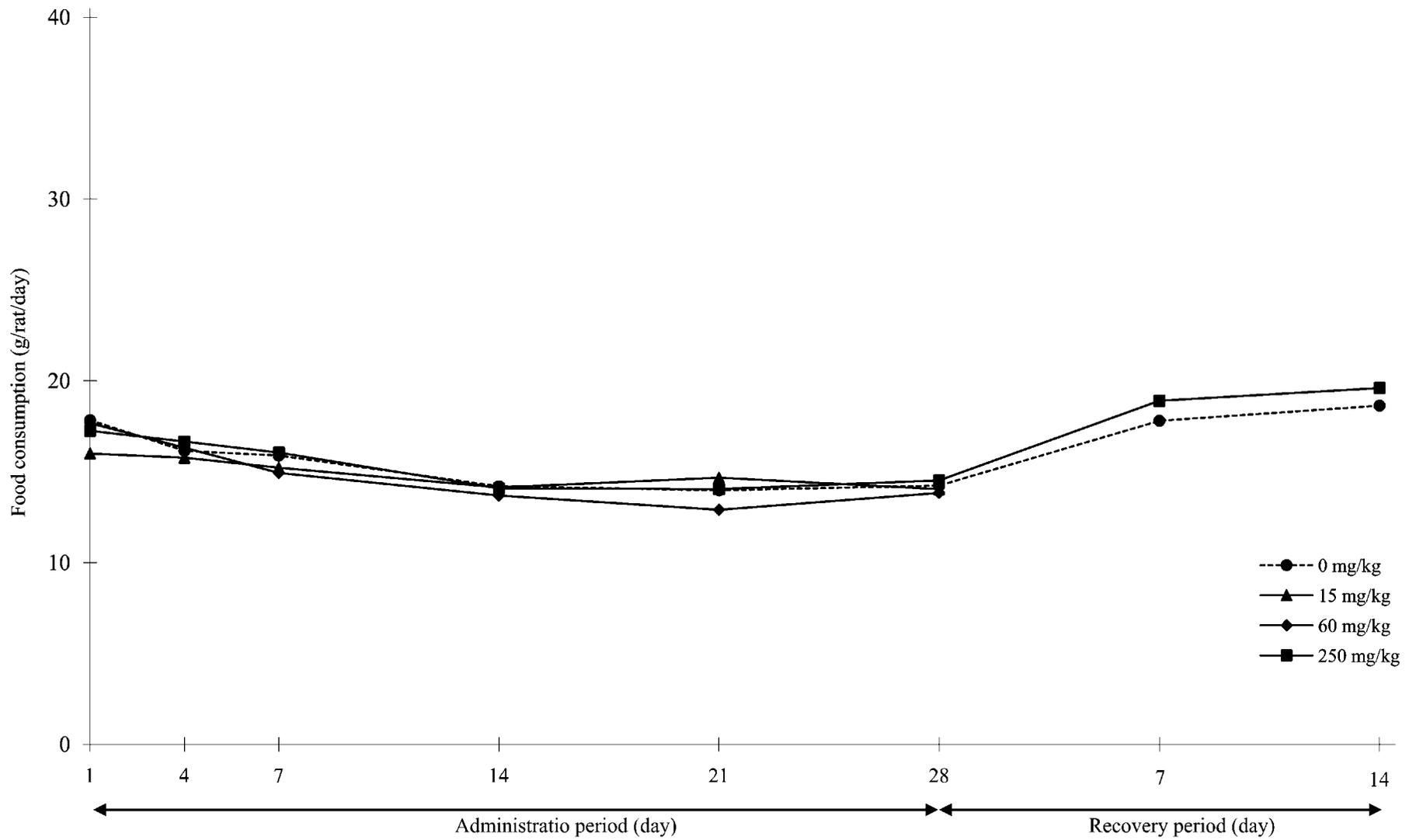


Figure 4 Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Table 1 General appearance of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Findings	Administration period (day)					Autopsy day	Recovery period (day)		Autopsy day
		1-20	21-25	26	27	28		1	2 - 14	
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	6	6	6	6
	No abnormal findings	12	12	12	12	12	6	6	6	6
15 mg/kg	Number of animals examined	6	6	6	6	6	6	-	-	-
	No abnormal findings	6	6	6	6	6	6	-	-	-
60 mg/kg	Number of animals examined	6	6	6	6	6	6	-	-	-
	No abnormal findings	6	6	6	6	6	6	-	-	-
250 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	12	12	6	6	6	6
	No abnormal findings	12	11	11	7	8	0	3	6	6
	Exophthalmos	0	1	1	1	1	1	0	0	0
	Soft feces	0	0	1	5	3	6	3	0	0

Values are number of animals with findings.

- : Blank.

Table 2 General appearance of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Findings	Administration period (day)			Autopsy day	Recovery period (day)		Autopsy day
		1-24	25	26-28		1 - 14		
0 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	6	6	6	
	No abnormal findings	12	12	12	6	6	6	
15 mg/kg	Number of animals examined	6	6	6	6	-	-	
	No abnormal findings	6	6	6	6	-	-	
60 mg/kg	Number of animals examined	6	6	6	6	-	-	
	No abnormal findings	6	6	6	6	-	-	
250 mg/kg	Number of animals examined	12	12	12	6	6	6	
	No abnormal findings	12	11	12	4	6	6	
	Soft feces	0	1	0	2	0	0	

Values are number of animals with findings.

- : Blank.

Table 3 Detailed clinical observation, in the cage, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Period	Group	Number of animals	Category	Body position/ Posture	Respiratory pattern	Tremor/ Convulsion	Stereotype		Bizarre behavior
							Rolling	Repetitive circling	Biting/ Selfmutilation
				1	1	1	0	0	1
Pre	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 7	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 14	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 21	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 28	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
R-Day 7	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
R-Day 14	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

Table 4 Detailed clinical observation, on the hand, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Period	Group	Number of animals	Category	Ease of				Piloerection	Fur	Eyes	Mucous membranes	Skin	Pupil size	Lacrimation	Salivation	Secretions/ Excretions
				Removal	Handling	Muscle tone										
				1	1	2	1	1	1	0	1	1	1	1	0	
Pre	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
Day 7	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
Day 14	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
Day 21	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
Day 28	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
R-Day 7	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
R-Day 14	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

Table 5 Detailed clinical observation, in the open-field, of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Period	Group	Number of animals	Category	Reactivity to environmental stimuli								Stereotype		Bizarre behavior		
				Gait	Co-ordination of movement	Searching	Urination	Defecation	Excessive grooming	Unusual head movement	Walking backward	Vocalization	Aggression			
				1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1
Pre	0 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	9	3	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	5	1	4	2	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	4	2	5	1	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	10	2	11	1	12	12	12	12	12
Day 7	0 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	11	1	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	4	2	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	5	1	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	11	1	12	12	12	12	12
Day 14	0 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	10	2	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	11	1	12	12	12	12	12
Day 21	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	0	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	11	1	12	12	12	12	12
Day 28	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	11	1	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	11	1	12	12	12	12	12
R-Day 7	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	5	1	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	2	6	6	6	6	6
R-Day 14	0 mg/kg	6		6	6	6	6	5	1	6	0	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	5	1	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

Table 6 Detailed clinical observation, in the cage, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Period	Group	Number of animals	Category	Body position/ Posture	Respiratory pattern	Tremor/ Convulsion	Stereotype		Bizarre behavior
							Rolling	Repetitive circling	Biting/ Selfmutilation
				1	1	1	0	0	1
Pre	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 7	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 14	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 21	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
Day 28	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
R-Day 7	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
R-Day 14	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

Table 7 Detailed clinical observation, on the hand, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Period	Group	Number of animals	Category	Ease of		Muscle tone	Piloerection	Fur	Eyes	Mucous membranes	Skin	Pupil size	Lacrimation	Salivation	Secretions/ Excretions
				Removal	Handling										
				1	1	2	1	1	1	0	1	1	1	1	0
Pre	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Day 7	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Day 14	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Day 21	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Day 28	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
R-Day 7	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
R-Day 14	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

Table 8 Detailed clinical observation, in the open-field, of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Period	Group	Number of animals	Category	Gait	Co-ordination of movement	Reactivity to environmental stimuli	Searching	Urination				Defecation			Stereotype		Bizarre behavior				
								0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
Pre	0 mg/kg	12		12	12	12	12	9	3	12	0	12	0	12	0	12	12	12	12		
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	3	3	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	9	3	12	0	12	0	12	0	12	12	12	12		
Day 7	0 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	12	0	12	0	12	0	12	12	12	12		
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	12	0	12	0	12	0	12	12	12	12		
Day 14	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	0	12	0	12	0	12	12	12	12		
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	0	12	0	12	0	12	12	12	12		
Day 21	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	0	12	0	12	0	12	12	12	12		
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	0	12	0	12	0	12	12	12	12		
Day 28	0 mg/kg	12		12	12	12	12	11	1	12	0	12	0	12	0	12	12	12	12		
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	0	12	0	12	0	12	0	12	12	12	12		
R-Day 7	0 mg/kg	6		6	6	6	6	5	1	6	0	5	1	6	0	6	6	6	6		
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	4	2	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		
R-Day 14	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	0	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	5	1	6	0	6	0	6	0	6	6	6	6		

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Pre : Pre-administration.

Day 14 : Day 14 of administration.

Day 28 : Day 28 of administration.

R-Day 14 : Day 14 of recovery.

Day 7 : Day 7 of administration.

Day 21 : Day 21 of administration.

R-Day 7 : Day 7 of recovery.

Table 9 Functional observation of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Period	Group	Number of animals	Category	Reactivity					Righting reflex
				Visual	Touch	Auditory	Pain	Proprioceptive	
				4	2	1	2	1	1
Week 4	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12
R-Week 2	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Week 4 : Week 4 of administration.

R-Week 2 : Week 2 of recovery.

Visual reactivity: approach response.

Touch reactivity: touch response.

Auditory reactivity: response to Galton's whistle.

Pain reactivity: tail pinch response.

Proprioceptive reactivity: returning from enforced posture.

Righting reflex: landing performance from 30 cm above.

Table 10 Functional observation of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Period	Group	Number of animals	Category	Reactivity					Righting reflex	
				Visual	Touch	Auditory	Pain	Proprioceptive	1	2
Week 4	0 mg/kg	12		12	12	12	12	12	12	0
	15 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	0
	60 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	0
	250 mg/kg	12		12	12	12	12	12	11	1
R-Week 2	0 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	0
	250 mg/kg	6		6	6	6	6	6	6	0

Values are expressed as the number of animals.

Category : The category number observed in each item.

Week 4 : Week 4 of administration.

R-Week 2 : Week 2 of recovery.

Visual reactivity: approach response.

Touch reactivity: touch response.

Auditory reactivity: response to Galton's whistle.

Pain reactivity: tail pinch response.

Proprioceptive reactivity: returning from enforced posture.

Righting reflex: landing performance from 30 cm above.

Table 11 Grip strength and motor activity measurements of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Period	Group	Number of animals	Grip strength		Motor activity measurements (count)							
			Forelimb (g)	Hindlimb (g)	0'-10'	10'-20'	20'-30'	30'-40'	40'-50'	50'-60'	Total	
Week 4	0 mg/kg	12	Mean	1023.58	307.83	435.1	324.7	247.3	156.0	149.0	119.3	1431.4
			S.D.	156.88	54.62	228.8	195.5	165.5	131.4	102.7	158.9	888.2
	15 mg/kg	6	Mean	1080.50	342.05	286.0	212.3	96.8	91.2	121.3	53.0	860.7
			S.D.	164.71	39.86	108.6	94.7	71.2	97.4	74.2	51.6	296.5
60 mg/kg	6	Mean	1064.70	307.65	456.5	327.7	194.3	194.0	143.2	83.8	1399.5	
		S.D.	162.00	59.21	260.8	130.0	101.8	103.1	95.3	81.0	398.6	
250 mg/kg	12	Mean	1001.13	290.48	382.7	295.7	182.4	154.5	139.4	68.5	1223.2	
		S.D.	102.88	43.17	151.0	113.9	112.7	105.9	102.8	62.5	518.7	
R-week 2	0 mg/kg	6	Mean	1450.95	360.35	578.2	378.8	257.2	146.8	101.8	122.3	1585.2
			S.D.	265.99	54.56	277.5	218.4	165.9	129.8	107.4	213.1	1049.8
	250 mg/kg	6	Mean	1343.67	413.40	466.0	297.2	226.2	97.0	100.0	78.5	1264.8
			S.D.	114.78	74.03	242.6	177.1	176.4	115.2	86.4	67.2	791.3

Week 4 : Week 4 of administration.

R-week 2 : Week 2 of recovery.

Table 12 Grip strength and motor activity measurements of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Period	Group	Number of animals	Grip strength		Motor activity measurements (count)							
			Forelimb (g)	Hindlimb (g)	0'-10'	10'-20'	20'-30'	30'-40'	40'-50'	50'-60'	Total	
Week 4	0 mg/kg	12	Mean	796.63	298.43	726.3	581.8	472.4	387.7	345.8	221.4	2735.3
			S.D.	85.37	40.75	259.0	199.1	239.3	254.0	202.1	128.7	1170.0
	15 mg/kg	6	Mean	968.23**	300.07	514.3	468.2	267.5	275.0	216.7	141.8	1883.5
			S.D.	141.40	30.29	193.4	194.1	175.7	287.4	241.9	145.4	1163.1
60 mg/kg	6	Mean	780.72	310.57	709.5	566.5	429.5	378.2	295.2	205.3	2584.2	
		S.D.	83.21	100.18	274.8	180.2	217.2	218.9	199.3	194.5	1126.7	
250 mg/kg	12	Mean	835.04	307.52	518.8	457.8	416.0	273.9	270.8	204.0	2141.2	
		S.D.	73.28	65.11	198.3	218.2	228.5	168.0	114.8	128.4	926.2	
R-week 2	0 mg/kg	6	Mean	1056.82	339.07	940.2	713.3	502.0	338.5	288.8	234.5	3017.3
			S.D.	187.34	32.70	317.7	236.7	157.1	207.7	123.6	145.0	816.8
	250 mg/kg	6	Mean	1146.12	416.60**	763.2	533.2	367.3	127.0*	172.5	168.0	2131.2*
			S.D.	106.17	44.94	130.5	188.0	184.5	99.0	97.8	81.2	525.5

Week 4 : Week 4 of administration.

R-week 2 : Week 2 of recovery.

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 13 Body weight of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals	Body weight (g)							Body weight gain		Body weight (g)		Body weight gain	
		Administration period (day)							1-28		Recovery period (day)		0-14	
		1	4	7	14	21	28	g	%	7	14	g	%	
0 mg/kg	12	Mean	175.1	201.8	229.9	295.2	357.3	403.8	228.7	130.517	(6)	(6)	(6)	(6)
		S.D.	5.5	6.3	8.5	12.8	20.2	26.6	23.2	11.313	433.7	460.3	63.5	16.063
15 mg/kg	6	Mean	177.2	205.7	234.5	300.0	361.2	411.2	234.0	131.808	-	-	-	-
		S.D.	7.7	11.2	13.9	24.7	32.1	38.8	32.9	14.834	-	-	-	-
60 mg/kg	6	Mean	174.7	204.0	236.0	303.8	365.5	411.8	237.2	135.983	-	-	-	-
		S.D.	6.5	8.3	10.8	13.9	20.3	24.6	24.4	15.683	-	-	-	-
250 mg/kg	12	Mean	173.9	203.9	232.8	296.3	350.9	387.8	213.9	122.926	(6)	(6)	(6)	(6)
		S.D.	4.4	6.8	10.1	15.1	24.4	32.2	30.2	16.381	401.7**	440.7*	78.0*	21.538**

Values in parentheses are number of animals.

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

- : Blank.

Table 14 Body weight of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals	Body weight (g)							Body weight gain		Body weight (g)		Body weight gain	
		Administration period (day)							1-28		Recovery period (day)		0-14	
		1	4	7	14	21	28	g	%	7	14	g	%	
0 mg/kg	12	Mean	148.9	164.1	176.8	200.6	222.2	239.8	90.9	61.015	(6)	(6)	(6)	(6)
		S.D.	9.1	11.5	12.7	14.4	18.7	21.8	16.6	10.485	254.8	264.3	28.7	11.918
15 mg/kg	6	Mean	146.0	164.8	175.3	198.3	219.3	241.8	95.8	65.808	-	-	-	-
		S.D.	5.5	4.4	6.3	13.1	18.6	19.5	20.0	14.479	-	-	-	-
60 mg/kg	6	Mean	147.8	163.0	172.8	194.0	214.5	236.8	89.0	60.162	-	-	-	-
		S.D.	5.7	9.8	11.1	7.8	10.7	17.6	14.6	9.152	-	-	-	-
250 mg/kg	12	Mean	147.2	164.4	176.7	195.2	214.4	235.3	88.1	59.684	(6)	(6)	(6)	(6)
		S.D.	6.9	8.4	10.2	15.9	21.4	24.4	20.4	12.978	255.8	263.3	16.3	6.618

Values in parentheses are number of animals.

- : Blank.

Table 15 Food consumption of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals	Food consumption (g/rat/day)								
		Administration period (day)						Recovery period (day)		
		0-1	1-4	4-7	7-14	14-21	21-28	0-7	7-14	
0 mg/kg	12	Mean	21.75	20.80	21.81	22.09	22.40	22.20	(6)	(6)
		S.D.	1.22	1.06	1.25	1.19	1.77	1.88	25.05	27.15
15 mg/kg	6	Mean	22.00	21.33	22.65	21.93	21.98	22.65	-	-
		S.D.	1.10	1.38	1.88	2.39	2.82	3.03	-	-
60 mg/kg	6	Mean	21.33	21.62	23.23	23.15	23.23	22.73	-	-
		S.D.	1.21	1.33	1.63	1.63	1.62	1.86	-	-
250 mg/kg	12	Mean	20.92	21.75	22.98	22.91	23.02	22.74	(6)	(6)
		S.D.	0.90	1.31	1.57	1.70	2.02	2.57	26.38	28.73*

Values in parentheses are number of animals.

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

- : Blank.

Table 16 Food consumption of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals	Food consumption (g/rat/day)								
		Administration period (day)						Recovery period (day)		
		0-1	1-4	4-7	7-14	14-21	21-28	0-7	7-14	
0 mg/kg	12	Mean	17.83	16.15	15.88	14.19	13.98	14.23	(6)	(6)
		S.D.	2.04	1.50	1.65	1.11	1.26	1.43	17.80	18.63
15 mg/kg	6	Mean	16.00	15.77	15.22	14.13	14.67	14.03	-	-
		S.D.	1.26	0.98	1.70	2.04	2.07	1.16	-	-
60 mg/kg	6	Mean	17.67	16.32	14.93	13.68	12.90	13.83	-	-
		S.D.	0.52	1.83	1.13	0.80	1.31	1.83	-	-
250 mg/kg	12	Mean	17.25	16.66	16.05	14.08	14.04	14.52	(6)	(6)
		S.D.	1.66	1.55	2.07	2.37	2.82	2.45	18.90	19.60
								2.98	2.51	

Values in parentheses are number of animals.

- : Blank.

Table 17 Urinary findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals	pH						Protein				Glucose	Ketone body	Urobilinogen	Bilirubin	Occul	Color A
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+						
0 mg/kg	12	0	0	1	0	2	9	0	0	5	7	12	12	12	12	12	12
15 mg/kg	6	0	0	0	0	2	4	0	0	4	2	6	6	6	6	6	6
60 mg/kg	6	0	0	0	0	2	4	[0	2	4	0]+	6	6	6	6	6	6
250 mg/kg	12	1	1	0	1	5	4	0	1	5	6	12	12	12	12	12	12

Group	Number of animals	Specific gravity					Urine volume (mL/21hr, mean±S.D.)
		1.011- 1.020	1.021- 1.030	1.031- 1.040	1.041- 1.050	1.050<	
0 mg/kg	12	0	2	1	4	5	8.83 ± 3.79
15 mg/kg	6	0	1	1	3	1	8.42 ± 1.46
60 mg/kg	6	0	0	3	2	1	11.17 ± 3.39
250 mg/kg	12	2	0	0	3	7	13.38 ± 13.30

Values are number of animals with findings.

- ; Normal, ± ; Slight, 1+ ; Moderate, 2+ ; Severe.

Color : A; Pale yellow or yellow.

[]+ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 18 Urinary findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals	pH					Protein			Glucose -	Ketone body -	Urobilinogen 0.1 EU/dL	Bilirubin -	Occult blood -	Color A
		6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+						
0 mg/kg	11	1	0	0	4	6	4	1	6	11	11	11	11	11	11
15 mg/kg	6	1	0	2	1	2	0	1	5	6	6	6	6	6	6
60 mg/kg	6	1	1	1	2	1	1	0	5	6	6	6	6	6	6
250 mg/kg	12	[4	2	2	4	0]++	1	6	5	12	12	12	12	12	12

Group	Number of animals	Specific gravity						Urine volume (mL/21hr, mean±S.D.)
		1.000-1.010	1.011-1.020	1.021-1.030	1.031-1.040	1.041-1.050	1.050<	
0 mg/kg	12	0	1	2	1	2	6	7.58 ± 8.20
15 mg/kg	6	0	1	0	1	2	2	9.50 ± 6.87
60 mg/kg	6	0	0	0	2	1	3	4.50 ± 1.41
250 mg/kg	12	1	1	0	2	5	3	10.58 ± 10.86

Values are number of animals with findings.

- ; Normal, ± ; Slight, 1+ ; Moderate, 2+ ; Severe.

Color : A; Pale yellow or yellow.

[]++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 19 Urinary findings of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals	pH		Protein				Glucose -	Ketone body -	Urobilinogen 0.1 EU/dL	Bilirubin -	Occult blood -	Color A
		8.0	8.5	-	±	1+	2+						
0 mg/kg	6	2	4	0	0	4	2	6	6	6	6	6	6
250 mg/kg	6	2	4	0	0	5	1	6	6	6	6	6	6

Group	Number of animals	Specific gravity				Urine volume (mL/21hr, mean±S.D.)
		1.021-1.030	1.031-1.040	1.041-1.050	<1.050	
0 mg/kg	6	0	1	4	1	13.08 ± 3.11
250 mg/kg	6	1	0	0	5	14.17 ± 9.74

Values are number of animals with findings.

- ; Normal, ± ; Slight, 1+ ; Moderate, 2+ ; Severe.

Color : A; Pale yellow or yellow.

Table 20 Urinary findings of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals	pH					Protein			Glucose -	Ketone body -	Urobilinogen 0.1 EU/dL	Bilirubin -	Occult blood -	Color A
		6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+						
0 mg/kg	6	1	0	1	1	3	2	1	3	6	6	6	6	6	6
250 mg/kg	6	1	0	0	2	3	0	3	3	6	6	6	6	6	6

Group	Number of animals	Specific gravity				Urine volume (mL/21hr, mean±S.D.)
		1.021-1.030	1.031-1.040	1.041-1.050	<1.050	
0 mg/kg	6	2	0	3	1	13.00 ± 7.84
250 mg/kg	6	0	2	1	3	9.92 ± 4.85

Values are number of animals with findings.

- ; Normal, ± ; Slight, 1+ ; Moderate.

Color : A; Pale yellow or yellow.

Table 21 Hematological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals		WBC 10 ² /μL	RBC 10 ⁴ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	Platelet 10 ⁴ /μL
0 mg/kg	6	Mean	115.60	790.0	15.22	44.60	56.50	19.28	34.12	130.77
		S.D.	14.68	34.5	0.66	1.53	1.46	0.56	0.38	12.15
15 mg/kg	6	Mean	129.82	810.2	15.55	45.72	56.48	19.22	34.00	116.05
		S.D.	25.51	36.1	0.52	0.95	1.76	0.48	0.59	21.68
60 mg/kg	6	Mean	121.43	790.7	15.43	45.33	57.37	19.53	34.03	126.10
		S.D.	21.88	32.1	0.54	2.08	2.75	0.90	0.52	17.11
250 mg/kg	6	Mean	136.07	811.2	15.60	46.53	57.40	19.25	33.53	130.67
		S.D.	24.81	33.2	0.41	1.38	1.48	0.36	0.48	16.40

(to be continued)

Table 21 Hematological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) (continued)

Group	Number of animals		Reticulo-cyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC ($10^2/\mu\text{L}$)				
						Neutrophil	Lymphocyte	Monocyte	Eosinophil	Basophil
0 mg/kg	6	Mean	4.182	18.48	27.38	19.38	91.98	3.47	0.77	0.00
		S.D.	0.511	2.29	3.30	12.34	11.16	1.05	0.44	0.00
15 mg/kg	6	Mean	4.555	22.58	32.37	17.53	108.78	2.65	0.82	0.03
		S.D.	0.857	7.06	5.45	6.23	21.84	0.95	0.46	0.05
60 mg/kg	6	Mean	4.037	27.17++	43.62++	15.70	101.50	3.35	0.83	0.05
		S.D.	0.638	2.52	3.21	3.74	21.92	1.42	0.41	0.05
250 mg/kg	6	Mean	4.633	39.95++	68.55++	17.70	114.13	3.20	1.03	0.00
		S.D.	0.589	8.74	12.18	4.84	21.57	0.79	0.12	0.00

++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 22 Hematological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals		WBC 10 ² /μL	RBC 10 ⁴ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	Platelet 10 ⁴ /μL
0 mg/kg	6	Mean	112.95	794.7	15.10	43.28	54.55	19.03	34.90	127.18
		S.D.	31.44	45.9	0.76	2.38	2.55	0.63	0.67	13.95
15 mg/kg	6	Mean	78.32	817.7	15.47	43.98	53.78	18.92	35.17	136.88
		S.D.	26.31	22.8	0.58	1.77	1.77	0.59	0.34	23.03
60 mg/kg	6	Mean	69.17*	815.2	15.38	44.13	54.22	18.88	34.85	126.33
		S.D.	18.09	50.3	0.64	1.71	2.45	0.66	0.54	10.50
250 mg/kg	6	Mean	68.07*	780.3	14.48	42.12	54.03	18.58	34.40	144.92
		S.D.	18.37	33.8	0.29	1.15	1.68	0.51	0.54	26.12

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

(to be continued)

Table 22 Hematological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) (continued)

Group	Number of animals		Reticulo-cyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC ($10^2/\mu\text{L}$)				
						Neutrophil	Lymphocyte	Monocyte	Eosinophil	Basophil
0 mg/kg	6	Mean	3.215	16.68	21.82	15.45	94.47	1.85	1.17	0.02
		S.D.	0.874	0.92	1.32	9.01	24.43	0.61	0.36	0.04
15 mg/kg	6	Mean	3.253	15.78	21.18	11.27	64.98*	1.43	0.63*	0.00
		S.D.	0.616	0.81	1.12	6.07	20.37	0.87	0.16	0.00
60 mg/kg	6	Mean	2.975	15.30	23.00	9.82	57.50*	1.12	0.73*	0.00
		S.D.	0.810	0.78	1.07	2.71	16.83	0.29	0.29	0.00
250 mg/kg	6	Mean	3.402	17.47	33.48++	9.10	57.25*	1.08	0.62**	0.02
		S.D.	0.940	2.09	6.18	3.80	17.61	0.58	0.30	0.04

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 23 Hematological findings of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals		WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	Platelet
			10 ² /μL	10 ⁴ /μL	g/dL	%	fL	pg	g/dL	10 ⁴ /μL
0 mg/kg	6	Mean	133.58	849.0	15.80	45.28	53.42	18.63	34.88	129.15
		S.D.	21.68	34.2	0.36	0.94	2.43	0.82	0.53	26.51
250 mg/kg	6	Mean	125.18	888.7	15.87	45.42	51.13	17.87	34.93	134.42
		S.D.	26.18	28.2	0.67	1.58	1.14	0.31	0.50	9.47

Group	Number of animals		Reticulo-cyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC (10 ² /μL)				
						Neutrophil	Lymphocyte	Monocyte	Eosinophil	Basophil
0 mg/kg	6	Mean	3.715	22.03	28.17	16.70	111.77	3.75	1.35	0.02
		S.D.	0.565	2.19	1.48	5.15	21.04	0.81	0.48	0.04
250 mg/kg	6	Mean	4.173	24.77	27.28	16.30	104.05	3.67	1.12	0.05
		S.D.	0.602	6.14	3.39	3.25	25.77	0.53	0.21	0.05

Table 24 Hematological findings of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals		WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	Platelet
			10 ² /μL	10 ⁴ /μL	g/dL	%	fL	pg	g/dL	10 ⁴ /μL
0 mg/kg	6	Mean	80.40	861.3	16.03	45.32	52.70	18.65	35.37	113.95
		S.D.	27.02	41.5	0.45	1.33	2.74	0.79	0.60	10.30
250 mg/kg	6	Mean	75.63	833.2	15.13*	42.55*	51.08	18.17	35.58	129.32*
		S.D.	18.62	24.9	0.54	1.77	1.91	0.55	0.75	9.26

Group	Number of animals		Reticulo-cyte %	PT sec	APTT sec	Differential count of WBC (10 ² /μL)				
						Neutrophil	Lymphocyte	Monocyte	Eosinophil	Basophil
0 mg/kg	6	Mean	3.230	17.92	18.83	7.75	70.00	1.62	1.03	0.00
		S.D.	0.892	1.18	0.93	2.25	24.94	0.28	0.63	0.00
250 mg/kg	6	Mean	3.233	17.97	19.17	8.92	63.53	2.15	1.03	0.00
		S.D.	0.997	0.60	1.09	4.09	14.64	0.77	0.56	0.00

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

Table 25 Biochemical findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	A/G ratio	Protein fraction %					AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	γ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL
						Albumin	Globulin								
							α_1	α_2	β	γ					
0 mg/kg	6	Mean	5.50	2.955	1.165	53.75	19.97	7.03	15.90	3.35	58.8	25.7	625.2	0.43	0.045
		S.D.	0.19	0.171	0.079	1.68	2.22	0.37	0.73	0.68	8.4	2.7	169.5	0.15	0.008
15 mg/kg	6	Mean	5.55	3.033	1.208	54.67	19.13	7.25	15.77	3.18	64.8	30.7	710.5	0.48	0.045
		S.D.	0.10	0.118	0.096	1.97	2.39	0.76	0.53	0.24	5.0	5.9	136.4	0.12	0.008
60 mg/kg	6	Mean	5.52	2.930	1.138	53.17	21.13	7.10	15.48	3.12	61.3	30.3	668.7	0.38	0.053
		S.D.	0.19	0.158	0.061	1.36	1.26	0.51	1.25	0.44	4.4	3.5	194.3	0.12	0.015
250 mg/kg	6	Mean	5.43	2.883	1.133	53.12	19.78	7.25	16.63	3.22	70.2*	31.7*	916.7*	0.52	0.088**
		S.D.	0.28	0.166	0.063	1.38	3.38	0.69	1.41	0.64	10.9	2.2	244.7	0.16	0.012

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

(to be continued)

Table 25 Biochemical findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) (continued)

Group	Number of animals		Glucose mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
0 mg/kg	6	Mean	174.0	57.0	68.5	9.42	0.502	143.2	4.947	104.5	10.03	8.63
		S.D.	16.5	4.5	34.9	1.42	0.026	0.8	0.222	1.5	0.34	0.49
15 mg/kg	6	Mean	166.7	52.5	62.5	9.57	0.503	144.5*	4.788	105.8	10.00	8.48
		S.D.	11.4	10.7	22.3	1.74	0.034	0.5	0.363	1.2	0.24	0.15
60 mg/kg	6	Mean	173.3	73.7++	78.0	9.22	0.522	144.2	4.720	104.5	10.00	8.42
		S.D.	26.3	4.1	17.9	1.06	0.048	1.0	0.168	1.9	0.13	0.45
250 mg/kg	6	Mean	169.0	75.8++	61.8	12.42**	0.527	144.0	4.352**	105.3	10.07	7.70**
		S.D.	19.9	19.6	15.2	1.86	0.033	0.9	0.248	0.8	0.27	0.45

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

Table 26 Biochemical findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	A/G ratio	Protein fraction %					AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	γ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL
						Albumin	Globulin								
							α_1	α_2	β	γ					
0 mg/kg	6	Mean	5.62	3.252	1.375	57.95	16.08	7.23	14.98	3.75	69.3	26.7	536.2	0.73	0.045
		S.D.	0.29	0.188	0.057	0.99	0.91	0.58	0.43	0.38	5.6	5.9	125.1	0.38	0.008
15 mg/kg	6	Mean	5.77	3.268	1.312	56.58	17.72	7.07	14.82	3.82	63.7	24.5	458.8	0.60	0.052
		S.D.	0.36	0.234	0.127	2.29	1.74	0.83	0.70	0.54	5.2	5.2	96.0	0.35	0.008
60 mg/kg	6	Mean	5.93	3.328	1.277	56.05	17.33	7.22	15.32	4.08	62.8	22.3	567.8	0.78	0.053
		S.D.	0.23	0.112	0.042	0.76	1.38	0.47	0.86	0.76	5.2	4.1	154.3	0.25	0.008
250 mg/kg	6	Mean	6.02	3.363	1.268	55.87	18.55*	7.57	14.52	3.50	62.2	29.3	539.0	1.17	0.118++
		S.D.	0.19	0.137	0.068	1.31	1.12	0.66	0.69	0.87	7.8	5.1	165.3	0.38	0.072

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

++ : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney's U-test).

(to be continued)

Table 26 Biochemical findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226) (continued)

Group	Number of animals		Glucose mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
0 mg/kg	6	Mean	141.0	48.3	10.3	11.83	0.562	144.0	4.590	106.8	9.58	7.18
		S.D.	13.7	5.5	3.2	1.91	0.044	1.4	0.261	1.6	0.29	0.48
15 mg/kg	6	Mean	142.7	66.5*	11.7	12.37	0.548	144.0	4.482	105.5	9.78	7.15
		S.D.	17.5	9.9	6.6	0.83	0.038	1.1	0.298	1.2	0.31	0.46
60 mg/kg	6	Mean	149.2	67.8*	14.8	11.50	0.575	143.7	4.550	106.0	9.87	7.27
		S.D.	13.8	9.2	4.1	1.42	0.016	1.0	0.429	0.6	0.16	0.67
250 mg/kg	6	Mean	153.5	82.0**	15.0	13.70	0.633*	142.8	4.598	105.8	9.77	6.88
		S.D.	15.8	17.4	7.3	4.83	0.061	0.8	0.174	0.8	0.16	0.40

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 27 Biochemical findings of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	A/G ratio	Protein fraction %					AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	γ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL
						Albumin	Globulin								
							α_1	α_2	β	γ					
0 mg/kg	6	Mean	5.43	2.767	1.038	50.88	21.17	7.88	15.87	4.20	67.5	27.8	586.0	0.65	0.055
		S.D.	0.23	0.191	0.102	2.44	3.18	0.69	0.66	1.12	5.8	4.3	132.1	0.10	0.010
250 mg/kg	6	Mean	5.52	2.923	1.132	53.00	20.05	7.75	15.02	4.18	70.3	30.5	594.3	0.65	0.060
		S.D.	0.13	0.092	0.123	2.50	3.15	0.53	1.00	0.69	8.0	4.0	99.1	0.15	0.013

Group	Number of animals		Glucose mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
S.D.	8.9	9.6	18.6	1.59	0.016	1.5	0.282	0.5	0.23	0.65		
250 mg/kg	6	Mean	158.3	62.8	49.3	12.83	0.520	144.2	4.890	105.5	9.65	7.55
		S.D.	22.3	10.5	18.2	1.56	0.019	0.4	0.448	1.6	0.18	0.34

Table 28 Biochemical findings of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals		TP g/dL	Albumin g/dL	A/G ratio	Protein fraction %					AST IU/L	ALT IU/L	ALP IU/L	γ -GTP IU/L	T-Bil mg/dL
						Albumin	Globulin								
							α_1	α_2	β	γ					
0 mg/kg	6	Mean	5.87	3.325	1.322	56.68	16.30	7.00	14.40	5.62	58.5	22.2	352.2	0.92	0.082
		S.D.	0.16	0.227	0.168	3.13	2.10	0.55	1.07	1.78	9.3	5.1	73.1	0.08	0.022
250 mg/kg	6	Mean	6.12	3.322	1.188	54.27	18.32	6.58	15.52	5.32	65.3	23.2	288.0	0.93	0.082
		S.D.	0.39	0.269	0.077	1.59	1.73	0.83	1.24	0.53	11.2	2.5	83.0	0.24	0.021

Group	Number of animals		Glucose mg/dL	T-Cho mg/dL	TG mg/dL	UN mg/dL	Crea mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	Ca mg/dL	IP mg/dL
S.D.	13.4	10.0	4.2	1.47	0.040	1.2	0.121	1.5	0.23	0.69		
250 mg/kg	6	Mean	138.5	78.8	11.8	15.77	0.610	143.7	4.663	106.2	9.63	5.73
		S.D.	11.2	19.7	8.7	2.27	0.055	1.9	0.352	1.7	0.27	0.48

Table 29 Gross findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

	Period Group Dose (mg/kg)	End of administration				End of recovery	
		Control	4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol			Control	4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol
		0	15	60	250	0	250
Number of animals examined		6	6	6	6	6	6
No abnormal findings		6	6	5	0	6	6
Organ : Findings							
Cecum : Watery contents		0	0	1	6	0	0
Eyeball : Swelling		0	0	0	1	0	0

Values are expressed as the number of animals.

Table 30 Gross findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study and 14-day recovery study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

	Period Group Dose (mg/kg)	End of administration			End of recovery		
		Control	4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol			Control	4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol
		0	15	60	250	0	250
Number of animals examined		6	6	6	6	6	6
No abnormal findings		6	6	6	4	6	6
Organ : Findings							
Cecum : Watery contents		0	0	0	2	0	0

Values are expressed as the number of animals.

Table 31 Absolute and relative organ weights of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals		Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Pituitary gland	
				g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %
0 mg/kg	6	Mean	386.0	12.942	3.352	2.748	0.715	0.647	0.165	1.330	0.345	2.077	0.542	11.22	2.907
		S.D.	33.1	1.605	0.214	0.206	0.070	0.120	0.022	0.124	0.037	0.048	0.044	1.71	0.370
15 mg/kg	6	Mean	381.7	13.093	3.432	2.673	0.702	0.710	0.185	1.222	0.318	2.098	0.555	10.18	2.652
		S.D.	36.9	1.256	0.132	0.285	0.058	0.152	0.028	0.185	0.038	0.079	0.068	2.19	0.423
60 mg/kg	6	Mean	385.3	14.168	3.663	2.730	0.710	0.652	0.170	1.338	0.347	2.083	0.542	10.80	2.815
		S.D.	23.8	2.112	0.359	0.198	0.039	0.101	0.028	0.120	0.024	0.084	0.035	1.21	0.396
250 mg/kg	6	Mean	382.7	13.657	3.573	2.737	0.715	0.673	0.175	1.257	0.327	2.103	0.550	12.40	3.243
		S.D.	23.1	0.955	0.230	0.143	0.027	0.100	0.023	0.128	0.034	0.091	0.036	1.89	0.470

Group	Number of animals		Thymus		Thyroid		Adrenal		Testis		Epididymis		Prostate		Seminal vesicle	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	g	%
0 mg/kg	6	Mean	514.3	132.588	17.27	4.483	58.7	15.303	3.118	0.813	0.785	0.203	402.8	105.718	1.288	0.338
		S.D.	91.5	15.097	1.46	0.312	6.6	2.255	0.185	0.076	0.081	0.021	117.8	35.441	0.233	0.087
15 mg/kg	6	Mean	591.7	154.508	18.70	4.860	57.0	14.978	3.195	0.843	0.762	0.200	431.5	115.163	1.392	0.370
		S.D.	124.2	27.596	4.19	0.758	7.3	1.810	0.129	0.069	0.077	0.028	90.0	33.191	0.231	0.081
60 mg/kg	6	Mean	615.0	159.663	19.32	5.008	56.2	14.478	3.205	0.832	0.773	0.200	528.0	136.692	1.300	0.335
		S.D.	85.0	20.007	2.76	0.573	14.2	2.967	0.229	0.039	0.073	0.014	163.0	40.267	0.279	0.069
250 mg/kg	6	Mean	626.0	162.700	18.20	4.767	54.3	14.235	3.323	0.870	0.763	0.200	394.7	103.407	1.272	0.332
		S.D.	157.7	33.688	2.41	0.647	6.0	1.720	0.223	0.071	0.043	0.014	52.3	14.074	0.138	0.023

Table 32 Absolute and relative organ weights of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity study of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals	Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Pituitary gland		
			g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	
0 mg/kg	6	Mean	232.5	6.943	2.982	1.740	0.750	0.518	0.222	0.872	0.377	1.868	0.805	12.50	5.363
		S.D.	12.1	0.760	0.199	0.110	0.027	0.049	0.017	0.040	0.005	0.100	0.054	1.69	0.500
15 mg/kg	6	Mean	227.3	7.523	3.315*	1.692	0.743	0.483	0.215	0.782	0.342	1.933	0.857	12.72	5.633
		S.D.	18.1	0.490	0.145	0.184	0.059	0.071	0.029	0.131	0.040	0.047	0.081	1.33	0.883
60 mg/kg	6	Mean	224.7	8.123	3.607**	1.672	0.745	0.442	0.198	0.812	0.363	1.937	0.863	12.83	5.698
		S.D.	16.6	0.976	0.185	0.118	0.031	0.032	0.015	0.051	0.027	0.116	0.067	2.09	0.693
250 mg/kg	6	Mean	207.7	9.238**	4.448**	1.570	0.760	0.395**	0.192	0.738	0.360	1.908	0.932	11.35	5.508
		S.D.	29.2	1.541	0.333	0.178	0.066	0.065	0.026	0.106	0.054	0.073	0.135	1.49	0.674

Group	Number of animals	Thymus		Thyroid		Adrenal		Ovary		Uterus		
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	
0 mg/kg	6	Mean	501.2	215.588	13.77	5.952	66.8	28.713	93.3	40.198	0.470	0.202
		S.D.	95.7	39.056	2.07	1.046	9.7	3.727	9.3	4.104	0.140	0.050
15 mg/kg	6	Mean	525.0	228.135	14.57	6.363	72.2	31.742	103.8	45.793	0.598	0.263
		S.D.	161.6	54.501	2.64	0.680	7.2	1.700	13.8	5.925	0.129	0.056
60 mg/kg	6	Mean	450.2	199.642	15.13	6.753	70.5	31.293	104.3	46.688	0.437	0.193
		S.D.	70.5	21.516	1.17	0.547	10.1	2.747	15.1	7.773	0.111	0.040
250 mg/kg	6	Mean	381.3	178.563	14.07	6.910	70.0	34.193	96.7	47.313	0.583	0.277*
		S.D.	170.6	60.837	2.61	1.662	9.0	5.816	17.5	10.282	0.172	0.047

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 33 Absolute and relative organ weights of male rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals	Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Pituitary gland		
			g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	
0 mg/kg	6	Mean	431.0	11.968	2.778	2.948	0.683	0.675	0.157	1.440	0.335	2.148	0.498	11.22	2.602
		S.D.	10.2	0.825	0.185	0.172	0.031	0.077	0.019	0.129	0.029	0.077	0.015	1.45	0.309
250 mg/kg	6	Mean	407.7*	11.772	2.893	2.998	0.737*	0.680	0.168	1.440	0.355	2.140	0.527	11.23	2.753
		S.D.	18.6	0.537	0.149	0.211	0.045	0.090	0.017	0.109	0.031	0.099	0.029	1.66	0.382

Group	Number of animals	Thymus		Thyroid		Adrenal		Testis		Epididymis		Prostate		Seminal vesicle		
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	g	%	
0 mg/kg	6	Mean	575.0	133.423	23.02	5.347	61.7	14.312	3.287	0.762	1.032	0.238	486.2	112.538	1.527	0.355
		S.D.	79.4	18.294	3.85	0.936	12.5	2.879	0.187	0.048	0.070	0.017	119.9	25.866	0.235	0.060
250 mg/kg	6	Mean	530.2	129.587	20.92	5.117	59.8	14.637	3.200	0.788	1.088	0.268**	531.8	129.697	1.440	0.352
		S.D.	101.9	21.000	2.91	0.553	9.8	2.002	0.153	0.071	0.098	0.015	122.9	26.887	0.176	0.041

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnnett's test).

Table 34 Absolute and relative organ weights of female rats in 14-day recovery study following 28-day repeated oral dose of 4-sec-Butyl-2,6-di-tert-butylphenol (SR08226)

Group	Number of animals	Body weight g	Liver		Kidney		Spleen		Heart		Brain		Pituitary gland		
			g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	
0 mg/kg	6	Mean	244.5	6.520	2.670	1.710	0.703	0.547	0.222	0.887	0.367	1.983	0.820	13.68	5.557
		S.D.	35.9	0.988	0.172	0.207	0.050	0.145	0.034	0.078	0.033	0.154	0.102	3.16	0.752
250 mg/kg	6	Mean	246.2	7.310	2.970**	1.820	0.738	0.505	0.205	0.868	0.355	1.973	0.803	14.88	6.078
		S.D.	17.0	0.610	0.128	0.193	0.047	0.076	0.028	0.069	0.029	0.107	0.060	1.00	0.649

Group	Number of animals	Thymus		Thyroid		Adrenal		Ovary		Uterus		
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	
0 mg/kg	6	Mean	450.3	181.493	14.43	5.982	57.3	23.548	98.3	40.665	0.515	0.220
		S.D.	140.3	32.283	2.73	1.348	8.0	2.419	22.8	10.035	0.168	0.097
250 mg/kg	6	Mean	411.2	165.237	16.15	6.565	71.2*	29.023*	96.0	39.168	0.485	0.197
		S.D.	107.8	33.901	3.41	1.315	8.0	3.863	8.2	4.602	0.084	0.039

* : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.05$ (Dunnnett's test).

** : Significantly different from the 0 mg/kg group at $p \leq 0.01$ (Dunnnett's test).

Table 35 Histopathological findings of male rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of 4-sec-Butyl-2, 6-di-tert-butylphenol (SR08226)

	Grade	End of administration				End of recovery	
		0 mg/kg	15 mg/kg	60 mg/kg	250 mg/kg	0 mg/kg	250 mg/kg
Number of animals examined		6	6	6	6	6	6
Organ: Findings							
Lung: Mineralization, artery	+	0	-	-	0	1	1
Metaplasia, osseous, alveoli	+	0	-	-	0	1	1
Cecum: Edema, submucosa	+	0	-	1 (1)	0	0	0
Liver: Fatty change, periportal	+	0	0	0	0	0	1
Microgranuloma	+	2	2	1	1	2	2
Heart: Myocardial degeneration, focal	+	0	-	-	1	0	0
Kidney: Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	+	2	-	-	0	2	1
Regeneration, tubular epithelium	+	1	-	-	0	2	0
Prostate: Cellular infiltration, inflammatory cell	+	1	-	-	0	1	0
Pituitary gland: Tubular hyperplasia, pars nervosa	+	0	-	-	0	1	0
Cyst, pars nervosa	+	0	-	-	1	1	0
Eyeball: Mineralization, cornea	+	0	-	-	1	0	0
Atrophy, retina	+++	0	-	-	1	0	0
Hemorrhage, vitreum	+	0	-	-	1	0	0

Values are number of animals with findings.

Values in parentheses are number of animals examined.

-: Blank.

Grade; +: slight change, +++: severe change.

Table 36 Histopathological findings of female rats in 28-day repeated dose oral toxicity test and 14-day recovery test of 4-sec-Butyl-2, 6-di-tert-butylphenol (SR08226)

		End of administration				End of recovery	
		0 mg/kg	15 mg/kg	60 mg/kg	250 mg/kg	0 mg/kg	250 mg/kg
Number of animals examined		6	6	6	6	6	6
Organ: Findings	Grade						
Lung: Aggregation, macrophage, alveolar	+	1	-	-	-	0	0
Mineralization, artery	+	1	-	-	-	0	0
Glandular stomach: Erosion, pyloric part	+	0	-	-	1	0	0
Cecum: Edema, submucosa	+	1	-	-	0	0	0
Liver: Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	+	0	0	0	6	0	0
Fatty change, periportal	+	3	5	2	1	1	0
Microgranuloma	+	3	3	3	2	3	5
Kidney: Regeneration, tubular epithelium	+	0	-	-	-	1	0
Cyst	+	0	-	-	-	1	0

Values are number of animals with findings.

-: Blank.

Grade; +: slight change.