

B-5805



## 最終報告書

2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールのラットを用いた2週間回復性観察を含む  
28日間反復経口投与毒性試験

試験番号：B-5805

試験期間：2006年8月30日-2007年9月21日

### 試験実施施設

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

### 試験委託者

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

株式会社ボゾリサーチセンター  
〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

2. 目次

2.	目次 .....	3
4.	要約 .....	9
5.	緒言 .....	10
6.	試験材料及び方法 .....	11
6.1	被験物質及び媒体 .....	11
6.1.1	被験物質 .....	11
6.1.2	媒体 .....	11
6.2	投与液の調製 .....	12
6.2.1	媒体の調製 .....	12
6.2.2	被験液の調製 .....	12
6.2.3	投与液の保存方法 .....	12
6.2.4	媒体中での安定性 .....	12
6.2.5	調製物の濃度・均一性確認 .....	12
6.3	試験動物種及び系統の選択理由 .....	13
6.4	試験動物及び群分け .....	13
6.5	飼育条件 .....	13
6.6	飼料及び飲料水中の混入物質 .....	14
6.7	動物の識別及びケージへの表示 .....	14
6.8	投与経路、投与期間、投与方法及び投与回数とそれらの選択理由 .....	14
6.9	投与量及びその設定根拠並びに群構成 .....	14
6.10	観察及び検査の方法 .....	15
6.10.1	一般状態の観察 .....	15

6.10.2	詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定 .....	15
6.10.2.1	詳細な一般状態の観察 .....	15
6.10.2.2	機能検査 .....	16
6.10.2.3	握力測定 .....	16
6.10.2.4	自発運動量の測定 .....	16
6.10.3	体重測定 .....	16
6.10.4	摂餌量測定 .....	16
6.10.5	尿検査 .....	17
6.10.6	血液学検査 .....	18
6.10.7	血液化学検査 .....	19
6.10.8	病理学検査 .....	19
6.10.8.1	剖検 .....	19
6.10.8.2	器官重量測定 .....	19
6.10.8.3	病理組織学検査 .....	20
6.11	統計解析 .....	20
7.	試験結果 .....	21
7.1	一般状態の観察 .....	21
7.2	詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量 .....	21
7.2.1	詳細な一般状態の観察 .....	21
7.2.2	機能検査 .....	22
7.2.3	握力測定 .....	22
7.2.4	自発運動量の測定 .....	22
7.3	体重 .....	22
7.4	摂餌量 .....	22
7.5	尿検査(摂水量含む) .....	23
7.6	血液学検査 .....	23
7.7	血液化学検査 .....	23
7.8	器官重量 .....	23
7.9	剖検所見 .....	24
7.10	病理組織学検査 .....	24
8.	考察 .....	26
9.	文献 .....	28

図

Fig. 1~4	自発運動量の測定
Fig. 5	体重
Fig. 6	摂餌量

表

Table 1-1~1-3	一般状態の観察
Table 2-1~2-18	詳細な一般状態の観察
Table 2-19、2-20	機能検査
Table 2-21、2-22	握力測定
Table 2-23、2-24	自発運動量の測定
Table 3-1、3-2	体重
Table 4-1、4-2	摂餌量
Table 5-1~5-8	尿検査（摂水量含む）
Table 6-1~6-4	血液学検査
Table 7-1~7-4	血液化学検査
Table 8-1~8-8	器官重量
Table 9-1、9-2	剖検所見
Table 10-1~10-4	病理組織学検査

#### 4. 要約

Sprague-Dawley系 SPF ラット [Cri:CD (SD)] を用いて、2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールの反復投与による毒性並びにその回復性を検討した。投与量は 0 (0.5w/v%メチルセルロース水溶液：対照群)、15、60 及び 250 mg/kg/day とし、28 日間反復強制経口投与した。1 群の動物数は対照群及び 250 mg/kg 投与群で雌雄各 12 匹、15 及び 60mg/kg 投与群で雌雄各 6 匹とした。このうち、対照群及び 250 mg/kg 投与群の雌雄各 6 例については、28 日間投与後 2 週間休薬させた。

##### 1) 一般状態、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定、体重並びに摂餌量

投与及び回復期間を通じ、いずれの検査項目にも、被験物質投与の影響は認められなかった。

##### 2) 尿検査（摂水量含む）

褐色尿が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。この変化は休薬により消失し、回復性が認められた。

##### 3) 血液学検査

血小板数及びフィブリノーゲン量の高値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が 250mg/kg 投与群の雌雄に、プロトロンビン時間の延長が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。これらの変化は休薬により消失あるいは軽減し、いずれも回復性が認められた。

##### 4) 血液化学検査

総コレステロール及び総たん白質の高値が 250mg/kg 投与群の雌雄に、カルシウムの高値が 250mg/kg 投与群の雄に、リン脂質の高値及び塩素の低値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。これらの変化は休薬により消失あるいは軽減し、いずれも回復性が認められた。

##### 5) 病理学検査

病理組織学検査における肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が 60mg/kg 以上の投与群の雌雄に、甲状腺の濾胞上皮細胞肥大が 60mg/kg 投与群の雄と 250mg/kg 投与群の雌雄に認められ、肝臓の変化は重量増加を伴った。これらの変化は、休薬により消失し、回復性が認められた。

以上の結果から、本試験条件下における 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールの無影響量は雌雄とも 15mg/kg/日と推定された。なお、認められた変化は、休薬により消失あるいは軽減し、いずれも回復性を示した。

B-5805

## 5. 緒言

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールをラットに 28 日間反復経口投与し、その影響を明らかにするとともに、2 週間休薬し、障害の回復性を調べた。その成績を報告する。なお、準拠する基準及びガイドラインなどは以下の通りである。

## 6. 試験材料及び方法

### 6.1 被験物質及び媒体

#### 6.1.1 被験物質

被験物質 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールはより供給された。当試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、試験成績を添付資料 1 に示した。

名称	:	2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol
CAS 番号	:	4130-42-1
示性式	:	$C_{20}H_{26}O$
ロット番号	:	HAU01
純度	:	99.0%(GC)
入手量	:	500g
性状	:	微黄色結晶性粉末
融点	:	45°C
沸点	:	272°C
分子量	:	234.38
安定性	:	動物試験終了後に丸善石油化学株式会社に返却し、安定であることが確認された。
保存方法	:	気密容器に入れ、冷暗所に保存（冷蔵庫内、実測値：4~8°C）
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	マスク、手袋を着用する。 取扱い場所及び周囲の火気を厳禁し、高温物及び強酸化剤との接触を避ける。
返却	:	被験物質 5g を保存試料として保存した。残量はすべて供給者に返却した <sup>注)</sup> 。

注) : 試験計画書では被験物質の残量は廃棄することになっていたが、実際には廃棄せず、すべての被験物質（分析用に小分けした被験物質を含む）の残量を供給者に返却した。

#### 6.1.2 媒体

名称	:	メチルセルロース（商品名；メトローズ SM-400）
ロット番号	:	411523
メーカー	:	信越化学工業株式会社
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所 第 1 研究棟被験物質調製室

## 6.2 投与液の調製

### 6.2.1 媒体の調製

- 調製方法 : メチルセルロース（メトローズ SM-400）を注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号；6A93）に溶解し、0.5w/v%メチルセルロース水溶液とした。
- 保存方法 : ガラス容器に入れ、冷所（冷蔵庫内、実測値；3~7°C）に保存した。なお、使用期限は調製後 10 日とした。

### 6.2.2 被験液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に採取し、0.5w/v%メチルセルロース水溶液に懸濁して規定量にメスアップした。被験液は週 1 回以上の頻度で調製し、調製後 8 日以内に使用した。

### 6.2.3 投与液の保存方法

投与液は 1 日の必要分ずつ褐色ガラス遮光瓶に分注し、使用時まで冷蔵庫内に保存した（実測温度：3~7°C）。

### 6.2.4 媒体中での安定性

0.5 及び 100 mg/mL 懸濁液は、褐色ガラス遮光瓶に入れ冷蔵庫内 8 日間保存後、室温 24 時間保存した時安定であることが株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で確認されている（試験番号：A-1907、添付資料 2）。

### 6.2.5 調製物の濃度・均一性確認

投与第 1 週と第 4 週の投与に用いる各濃度の被験液について、その濃度・均一性を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で HPLC 法を用いて確認した。その結果、表示値に対する濃度の割合は 98.8~102.4%（許容範囲：表示値±10%）、均一性は 0.7~2.4%（許容値：CV10%以内）であり、いずれも許容範囲内であった（添付資料 3 及び 4）。分析法の概略を次に示す。

1 濃度当たりの採取本数（採取量）

- : 3 本（上、中及び下層から採取）、1 本につき 10 mL
- 測定対象物質 : 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール

測定対象標準物質

- 名称 : 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノール
- ロット番号 : HAU01
- 保存方法 : 気密容器に入れ、冷暗所（冷蔵庫内、実測値：3~7°C）に保存

## B-5805

使用機器	:	HPLC システム (Waters Corporation)
HPLC	:	2690 セパレーションモジュール
検出器	:	2487 デュアルλ UV/VIS 検出器
データ処理装置	:	ミレニアム <sup>32</sup> クロマトグラフィーマネジャー

### HPLC 条件

カラム	:	L-column ODS (5 μm、4.6 mm I.D.×150 mm、財団法人 化学物質評価 研究機構)
カラム温度	:	40°C (カラム恒温槽設定温度)
移動相	:	アセトニトリル/精製水 (9:1、v/v)
流速	:	1 mL/min
検出	:	UV (測定波長 280 nm)
試料注入量	:	20 μL
試料温度	:	10°C (オートサンプラー設定温度)

### 6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験に使用される系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

### 6.4 試験動物及び群分け

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD (SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] 雌雄各 52 匹<sup>注)</sup> を 5 週齢で入手し、当所で 9 日間検疫・馴化飼育し、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (3 回) 及び詳細な一般状態の観察 (1 回) を行い、体重増加が順調で一般状態等に異常のみられない健康と思われる動物雌雄各 36 匹 (主群として雌雄各 24 匹、回復群として雌雄各 12 匹) を選び、6 週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で 200~223 g、雌で 136~158 g であった。

動物は、検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日 (投与開始の 2 日前) の体重に基づいて層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当て) により行った。また、余剰動物は投与開始日に試験系から除外した。

<sup>注)</sup> : 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 50 匹であったが、実際には雌雄各 52 匹が納入された。

### 6.5 飼育条件

動物は温度 22~25°C、相対湿度 45~61%、換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間 (07:00~19:00) の動物飼育室 (201 号室) で、ブラケット式金属製網ケージ (W 250×D

350×H 200mm：日本ケージ株式会社）に個別収容し、毎日 1 回の飼育室内の清掃を実施した。固形飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：060606、060706、060808）及び御殿場市営水道水を給水瓶により自由に摂取させた。

#### 6.6 飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用全ロットについて財団法人日本食品分析センターで分析を行い、また、飲料水については東芝機械環境センター株式会社で水道法に準拠する水質検査を定期的に（年 4 回）行った。これらの分析成績書を入手し、試験成績に影響がないことを確認した後、写しを保存した。

#### 6.7 動物の識別及びケージへの表示

動物は入所時に耳標を装着して個体識別した。入荷から群分け前までの間は試験番号、性別及び耳標番号を明記したケージラベルをつけた。群分け後は、性別及び用量ごと（対照群、低、中及び高用量群の順）に 4 桁の番号をつけた。この場合、1000 の位は群、100 の位は性（0 番を雄、1 番を雌）、10 と 1 の位は個体番号とした。各飼育ケージには、群分け前まで使用したケージラベルの裏に用量（群）ごとに色分けしたラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び剖検予定日を明記した。ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定中は、観察者に対して投与の情報を制限するためケージラベルを裏返して試験番号、性別及び耳標番号のみを表示した。

#### 6.8 投与経路、投与期間、投与方法及び投与回数とそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口投与を選択し、投与期間は 28 日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている 1 日 1 回（7 回/週）とした。回復期間は障害の可逆性を検討するのに適当と考えられる 2 週間（14 日間）とし、この間投与を行わなかった。投与容量は 10 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した（08:04~11:46 の間）。対照群の動物には媒体（0.5w/v%メチルセルロース水溶液）を同様に投与した。個体ごとの投与液量は最新の体重に基づいて算出した。

#### 6.9 投与量及びその設定根拠並びに群構成

2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールの 0 (0.5w/v%メチルセルロース水溶液)、125、250、500 及び 1000 mg/kg/day を 1 群雌雄各 5 匹のラットに 14 日間反復経口投与した結果<sup>1)</sup>、1000mg/kg 投与群の雄 4 例、雌 3 例に死亡動物が認められた。また、250 mg/kg 以上の投与群（中用量群）の器官重量において肝臓重量の高値が雌雄に、腎臓重量の高値が雄に認められた。したがって、本試験における投与量は、28 日間の反復経口投与により明らかな毒性変化が発現すると考えられる 250 mg/kg を高用量とし、以下公比約 4 で除して、60 及び 15 mg/kg の 3 用量を設定した。これに対照群を加え、計 4 群を設けた。主群では雌雄各 6 匹、回復群では対照群及び高用量群で雌雄各 6 匹とし

た。群構成表を次の表 1 に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	10	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	15	1.5	10	雄	6	2001~2006	-	—
				雌	6	2101~2106	-	—
中用量群	60	6	10	雄	6	3001~3006	-	—
				雌	6	3101~3106	-	—
高用量群	250	25	10	雄	6	4001~4006	6	4007~4012
				雌	6	4101~4106	6	4107~4112

## 6.10 観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りである。

- 投与開始日 : 投与第 1 日 (day 1 of administration)
- 投与 1 から投与 7 日 : 投与第 1 週 (week 1 of administration)
- 回復開始日 (投与期間終了の翌日)
- 回復第 1 日 (day 1 of recovery)
- 回復 1 から回復 7 日 : 回復第 1 週 (week 1 of recovery)

### 6.10.1 一般状態の観察

投与期間中は毎日 3 回、投与前と投与直後及び投与約 2 時間後 (ただし、上曜及び休日は投与前と投与直後の 2 回)、回復期間中は毎日 1 回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。

### 6.10.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定

詳細な一般状態の観察は全個体について、投与開始前に 1 回、投与期間中及び回復期間中は毎週 1 回観察した。また、機能検査、握力及び自発運動量の測定は全個体について、投与第 4 週 (雄を投与第 26 日、雌を投与第 27 日) 及び回復第 2 週 (回復第 13 日) に行った。なお、観察及び検査は投与の情報を制限し、動物をランダムに配置した状態 (ブラインド) で行った。

なお、投与開始前 (検疫・馴化期間中) の詳細な一般状態の観察において異常は認められなかった。

#### 6.10.2.1 詳細な一般状態の観察

- 1) ホームケージ内観察
  - 姿勢、痙攣、異常行動

2) 手に持ったの観察

ケージからの取り出しやすさ、被毛・皮膚の状態、眼・鼻の分泌物、眼球（眼球突出、眼瞼閉鎖状態）、可視粘膜、自律神経機能（流涙、立毛、瞳孔径、流涎、異常呼吸）、ハンドリングに対する反応

3) オープンフィールド内観察

覚醒状態、痙攣、異常行動、常同行動、歩行、姿勢、身繕い、立ち上がり回数、排泄物（排糞数、排尿）

#### 6.10.2.2 機能検査

聴覚反応、接近反応、接触反応、痛覚反応、瞳孔反射、空中正向反射、着地開脚幅

#### 6.10.2.3 握力測定

CPU ゲージ MODEL-9502A（アイコーエンジニアリング株式会社）を用いて前肢及び後肢の握力を測定した。

#### 6.10.2.4 自発運動量の測定

実験動物用自発運動センサーNS-AS01（株式会社ニューロサイエンス）を用いて自発運動量を測定した。測定は1時間とし、10分間隔及び0~60分の測定値を集計した。

#### 6.10.3 体重測定

全個体について、投与 1、4、7、10、14、17、21、24 及び 28 日の投与前に、回復期間中は回復 1、3、7、10 及び 14 日に測定した。測定は 08:19~10:20 の間に行った。更に、全投与期間中及び回復期間中の体重増加量を算出した。剖検日には相対器官重量算出のため、前日から約 16 時間絶食させた後の体重を測定した。

#### 6.10.4 摂餌量測定

全個体について、投与期間中は投与 1、4、7、10、14、17、21、24 及び 28 日の投与前に、回復期間中は回復 3、7、10 及び 14 日に測定した。測定は 08:33~10:44 の間に行った。なお、投与期間中の投与 1 日は前日からの 1 日量、それ以降は 3~4 日間の累積量、回復期間中の回復 3 日は回復 1 日からの 2 日間の累積量、それ以降は 3~4 日間の累積量を測定し、1 匹 1 日量に換算表示した。

## 6.10.5 尿検査

投与第4週及び回復第2週に行った。

投与第4週（投与第22及び23日）は検査当日の投与後に全個体について、回復第2週（回復第11日及び12日）は回復群の全個体について、それぞれ採尿器をセットしたケージに収容し、絶食・自由摂水下で4時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の20時間尿を採取し、表2に記載した項目及び方法により検査した。また、摂水量は、採尿ケージに収容した状態で前日からの1日摂取量を、給水瓶を用いて測定した。

表2.尿検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 4時間尿についての検査		2) 20時間尿についての検査	
検査項目	測定方法	検査項目	測定方法
pH	オーションスティックス-7EA 試験紙 <sup>a)</sup> (アークレイ株式会社)	尿量 (20時間量) <sup>注)</sup>	メスシリンダーを用いた 容量測定 (単位: mL)
たん白質		浸透圧	氷点降下法 <sup>b)</sup> (単位: mOsm/kg)
ケトン体			
グルコース			
潜血			
ビリルビン			
ウロビリノーゲン			
色調	肉眼観察		
沈渣	鏡検法		
尿量 (4時間量) <sup>注)</sup>	日盛付スピッツ管を用いた 容量測定 (単位: mL)		
<b>使用測定機器</b>			
a) : AUTION MINI™ AM-4290 (アークレイ株式会社)			
b) : 自動浸透圧測定装置 オートアンドスタット OM-6030 (アークレイ株式会社)			
<b>備考</b>			
注) : 4時間の尿量と20時間の尿量を合計して24時間の尿量 (mL/24h) を算出した。			

## 6.10.6 血液学検査

投与期間及び回復期間終了の翌日の計画剖検時に、前日から一夜（約 16~20 時間）絶食させた全個体についてエーテル麻酔下に開腹し、腹大動脈から EDTA-2K 加採血瓶（SB-41：シスメックス株式会社）に血液を採取した。得られた血液について表 3-1) に記載した項目及び方法により検査した。また、3.8%クエン酸ナトリウム溶液加試験管（血液 9 容に対し 1 容の割合）に採取した試料を遠心分離（設定：約 3,000rpm、約 1,600×g、約 10 分間）し、得られた血漿について表 3-2) に記載した項目及び方法により検査した。

表 3.血液学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) EDTA-2K 加血液についての検査		
検査項目	測定方法	単 位
赤血球数	電気抵抗変化検出法 <sup>c)</sup>	10 <sup>4</sup> /μL
ヘモグロビン量	シアンメトヘモグロビン法 <sup>c)</sup>	g/dL
ヘマトクリット値	赤血球数及び平均赤血球容積から算出	%
平均赤血球容積	電気抵抗変化検出法 <sup>c)</sup>	fL
平均赤血球血色素量	赤血球数及びヘモグロビン量から算出	pg
平均赤血球血色素濃度	ヘモグロビン量及びヘマトクリット値から算出	%
網赤血球率	Brecher 法	%
血小板数	電気抵抗変化検出法 <sup>c)</sup>	10 <sup>4</sup> /μL
白血球数	電気抵抗変化検出法 <sup>c)</sup>	10 <sup>2</sup> /μL
白血球百分率	May-Giemsa 染色による鏡検法	%
2) クエン酸ナトリウム加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単 位
プロトロンビン時間	クロット法 <sup>d)</sup>	s
活性化部分トロンボ プラスチン時間	クロット法 <sup>d)</sup>	s
フィブリノーゲン量	トロンボプラスチン法 <sup>d)</sup>	mg/dL
使用測定機器		
<sup>c)</sup> : コールター全自動 8 項目血球アナライザー T890 (ベックマン・コールター株式会社)		
<sup>d)</sup> : 血液凝固自動測定装置 ACL 100 (Instrumentation Laboratory)		

### 6.10.7 血液化学検査

血液学検査用試料と同時に採取した血液を凝固促進剤入り試験管（ベノジェクト II-オートセップ：テルモ株式会社）に取り、遠心分離（設定：約 3,000rpm、約 1,600×g、約 10 分間）し、得られた血清について表 4-1) に示す項目について検査した。また、ヘパリン加試験管（血液 1mL 当たり約 20 単位のヘパリン）に採取した血液を遠心分離（設定：約 3,000rpm、約 1,600×g、約 10 分間）し、得られた血漿について表 4-2) に示す項目について検査した。

表 4.血液化学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 分離した血清についての検査		
検査項目	測定方法	単位
AIP	Bessey-Lowry 法 <sup>e)</sup>	IU/L
総コレステロール	CEH-COD-POD 法 <sup>e)</sup>	mg/dL
トリグリセライド	LPL-GK-GPO-POD 法 <sup>e)</sup>	mg/dL
リン脂質	PLD-ChOD-POD 法 <sup>e)</sup>	mg/dL
総ビリルビン	ビリルビンオキシダーゼ法 <sup>e)</sup>	mg/dL
グルコース	グルコースデヒドロゲナーゼ法 <sup>e)</sup>	mg/dL
尿素窒素	Urease-LEDH 法 <sup>e)</sup>	mg/dL
クレアチニン	Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase-POD 法 <sup>e)</sup>	mg/dL
ナトリウム	イオン選択電極法 <sup>e)</sup>	mmol/L
カリウム	イオン選択電極法 <sup>e)</sup>	mmol/L
塩素	イオン選択電極法 <sup>e)</sup>	mmol/L
カルシウム	OCPC 法 <sup>e)</sup>	mg/dL
無機リン	モリブデン酸法 <sup>e)</sup>	mg/dL
総たん白質	Biuret 法 <sup>e)</sup>	g/dL
アルブミン	BCG 法 <sup>e)</sup>	g/dL
A/G 比	総たん白質及びアルブミンから算出	
2) ヘパリン加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単位
AST (GOT)	UV-rate 法 <sup>e)</sup>	IU/L
ALT (GPT)	UV-rate 法 <sup>e)</sup>	IU/L
LDH	UV-rate 法 <sup>e)</sup>	IU/L
γ-GTP	γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド法 <sup>e)</sup>	IU/L
使用測定機器		
<sup>e)</sup> ：臨床化学自動分析装置 TBA-120FR 形（株式会社東芝）		

### 6.10.8 病理学検査

#### 6.10.8.1 剖検

すべての計画剖検動物について、採血後腹大動脈切断により放血致死させ、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録した。

#### 6.10.8.2 器官重量測定

すべての計画剖検動物について、次に示す器官の重量（絶対重量）を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重から体重 100g 当たりの相対重量を算出した。なお、

\*印を付した両側性の器官については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

脳、副腎\*、胸腺、脾臓、心臓、肝臓、腎臓\*、精巣\*、精巣上体\*、卵巣\*、子宮

### 6.10.8.3 病理組織学検査

すべての個体について次に示す器官・組織を採取し、リン酸緩衝 10%ホルマリン液で固定した。ただし、肺はリン酸緩衝 10%ホルマリン液を注入後、眼球及び視神経はリン酸緩衝液で調製した 3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン液で固定後、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後、リン酸緩衝 10%ホルマリン液で保存し、パラフィン包埋した。その後、切片としてヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、対照群及び高用量群（肉眼的異常部位については全群）について鏡検した。なお、被験物質投与の影響が疑われた雌雄の肝臓及び甲状腺については低及び中用量群並びに回復群の全個体についても鏡検した。また、雌の肝臓及び甲状腺については写真撮影を行った。

なお、\*で示した両側性器官については両側を摘出したが、鏡検は片側のみ行った。

大脳、小脳、脊髄（胸部）、坐骨神経、眼球\*、下垂体、甲状腺\*、上皮小体\*、副腎\*、胸腺、脾臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、心臓、気管、肺（気管支を含む）、胃、十二指腸、空腸、回腸（パイエル板を含む）、盲腸、結腸、直腸、肝臓、腎臓\*、膀胱、精巣\*、精巣上体\*、前立腺、卵巣\*、子宮、胸骨（骨髄を含む）、大腿骨（骨髄を含む）及び大腿部骨格筋

他に、視神経、ハーダー腺、胸大動脈、舌、食道、顎下腺、舌下腺、膵臓、腔、精嚢、乳腺（鼠径部）、皮膚（鼠径部）、個体識別部位（耳介）及び喉頭を摘出して保存した。

## 6.11 統計解析

オープンフィールド内観察の定量的項目、機能検査の定量的項目、握力測定、自発運動量の測定、体重（体重増加量を含む）、摂餌量、摂水量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液化学検査及び器官重量データについて、対照群と各投与群との間で統計解析を行った。まず、Bartlett法により分散性の検定を行った（有意水準：両側 1%）。分散が等しい場合は Dunnett法を用いて、非等分散の場合は Dunnett型の mean rank testを用いて、対照群と各投与群との間で検定を行った（有意水準：両側 5 及び 1%）。なお、回復群については、F検定により各群の分散の均一性の検定（有意水準：片側 5%）を行った。その結果、等分散性が認められた場合には対照群と被験物質投与群との平均値の差について Studentの t検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を、等分散性が認められなかった場合には Aspin-Welchの t検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を行った。

また、詳細な一般状態の観察及び機能検査のスコア化したデータについては基本的に検査のグレードが 2 項目の時は  $\chi^2$  検定法、3 項以上は Mann-Whitney の U 検定等を用いて検定を実施した（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）。<sup>2) 3)</sup>

## 7. 試験結果

### 7.1 一般状態の観察

成績を Table 1-1~1-3 に示した。

いずれの動物においても、投与及び回復期間を通じて異常はみられなかった。

### 7.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量

#### 7.2.1 詳細な一般状態の観察

##### (1) ホームケージ内観察

成績を Table 2-1~2-6 に示した。

##### 1) 投与期間

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

##### 2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、250mg/kg 投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

##### (2) 手に持つての観察

成績を Table 2-7~2-12 に示した。

##### 1) 投与期間

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

##### 2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、250mg/kg 投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

##### (3) オープンフィールド内観察

成績を Table 2-13~2-18 に示した。

##### 1) 投与期間

投与第 2 週に立ち上がり回数の有意な低値と排糞数の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に、投与第 4 週に立ち上がり回数の有意な低値が 250mg/kg 投与群の雌に、排糞数の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

##### 2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、250mg/kg 投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。

B-5805

### 7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 に示した。

#### 1) 投与第4週

いずれの検査項目においても、異常はなく対照群とほぼ同様であり、有意差はみられなかった。

#### 2) 回復第2週

着地開脚幅の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

### 7.2.3 握力測定

成績を Table 2-21、2-22 に示した。

#### 1) 投与第4週

被験物質投与群の雌雄の握力は、対照群とほぼ同様な値を示し、有意差はみられなかった。

#### 2) 回復第2週

250mg/kg 投与群の雌雄の握力は、対照群とほぼ同様な値を示し、有意差はみられなかった。

### 7.2.4 自発運動量の測定

成績を Fig. 1~4 及び Table 2-23、2-24 に示した。

#### 1) 投与第4週

30~40 分の測定で有意な低値が 15 mg/kg 投与群の雄に認められた。

#### 2) 回復第2週

250mg/kg 投与群の雌雄の自発運動量は対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかった。

### 7.3 体重

成績を Fig.5 及び Table 3-1、3-2 に示した。

#### 1) 投与期間

被験物質投与群の雌雄の体重は、対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかった。

#### 2) 回復期間

250mg/kg 投与群の雌雄の体重は、対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかった。

### 7.4 摂餌量

成績を Fig.6 及び Table 4-1、4-2 に示した。

#### 1) 投与期間

投与 24 日の測定で有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

B-5805

2) 回復期間

250mg/kg 投与群の雌雄の摂餌量は、対照群とほぼ同様に推移し、有意差はみられなかった。

### 7.5 尿検査(摂水量含む)

成績を Table 5-1~5-8 に示した。

1) 投与第4週

250mg/kg 投与群の雄で摂水量の有意な高値が認められた。更に、250mg/kg 投与群の雄では色調で褐色尿が 12 例中 9 例に認められた。

2) 回復第2週

浸透圧の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。

### 7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-4 に示した。

1) 投与期間終了時

血小板数とフィブリノーゲン量の有意な高値と活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が 250mg/kg 投与群の雌雄に、プロトロンビン時間の有意な延長が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

2) 回復期間終了時

赤血球数及びヘマトクリット値の有意な低値と血小板数の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

### 7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 に示した。

1) 投与期間終了時

総コレステロール及び総たん白質の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雌雄に、カルシウムの有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に、AST 活性の有意な低値及びリン脂質の有意な高値並びに塩素の有意な低値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。

2) 回復期間終了時

総たん白質及びアルブミンの有意な低値が 250mg/kg 投与群の雄に、総コレステロールの有意な高値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。

### 7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 に示した。

1) 投与期間終了時

心臓 : 相対重量の有意な低値が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

肝臓 : 絶対重量の有意な高値が 60mg/kg 投与群の雌と

250mg/kg 投与群の雌雄に、相対重量の有意な高値が 60mg/kg 以上の投与群の雌雄に認められた。

- 2) 回復期間終了時  
 胸腺 : 絶対及び相対重量の有意な低値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。

## 7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 に示した。

- 1) 投与期間終了時  
 精巣 : 小型化が対照群と 15 及び 250mg/kg 投与群で各 1 例に認められた。
- 2) 回復期間終了時  
 腎臓 : 腎盂拡張が対照群の雄 1 例に認められた。

## 7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-4 に示した。

- 1) 投与期間終了時  
 被験物質投与によると考えられる変化が肝臓及び甲状腺に認められた。
- 肝臓 : 軽微な微小肉芽腫が対照群の雄 4 例と雌全例、15mg/kg 投与群の雄 4 例と雌全例、60mg/kg 投与群の雄 1 例と雌全例、250mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 5 例に、軽微あるいは軽度な小葉中心性の肝細胞肥大が 60mg/kg 投与群の雄 5 例と雌全例、250mg/kg 投与群の雌雄全例に認められた。
- 甲状腺 : 軽微な異所性胸腺が対照群及び 15mg/kg 投与群の雌雄各 1 例、60mg/kg 投与群の雌 2 例、250mg/kg 投与群の雌 1 例に、軽微な鰓後体のう胞が対照群の雌雄各 4 例、15mg/kg 投与群の雄 4 例と雌 1 例、60mg/kg 投与群の雌 1 例、250mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例に、軽微な濾胞上皮細胞肥大が 60mg/kg 投与群の雄 1 例、250mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例に認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも被験物質投与との関連性はないと判断した。

- 精巣上体 : 軽微あるいは高度な管腔内の精子減少が対照群と 250mg/kg 投与群の各 1 例に認められた。
- 心臓 : 軽微な限局性の心筋炎が対照群の雄 1 例と雌 2 例、250mg/kg 投与群の雄 2 例に認められた。

## B-5805

- 盲腸 : 軽微な粘膜固有層の細胞浸潤が 250mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に認められた。
- 腎臓 : 軽微な尿細管の嚢胞状拡張が対照群と 250mg/kg 投与群の雄各 1 例に、軽微な尿細管の再生が対照群の雄 1 例と雌 2 例、250mg/kg 投与群の雄 3 例に、軽微な髄質の鉍物質沈着が対照群の雄 1 例、250mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例に認められた。
- 肺(気管支を含む) : 軽微な細胞浸潤が対照群の雄 1 例に、軽微な泡沫細胞の集簇が対照群の雌 1 例、250mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。
- 前立腺 : 軽微な腹葉の細胞浸潤が対照群の 2 例、250mg/kg 投与群の 3 例に、軽微な背側葉の細胞浸潤が対照群の 1 例に認められた。
- 精巣 : 剖検所見において小型化が認められた対照群、15 及び 250mg/kg 投与群の各 1 例では軽微から高度の精細管の萎縮が認められた。

### 2) 回復期間終了時

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも被験物質投与との関連性はないと判断した。

- 腎臓 : 剖検所見で腎盂拡張が認められた対照群の雄 1 例において軽度な腎盂拡張、軽微な尿細管の再生及び髄質の鉍物質沈着が認められた。
- 肝臓 : 軽度な限局性壊死が 250mg/kg 投与群の雄 1 例に、軽微な微小肉芽腫が対照群の雄 5 例と雌全例、250mg/kg 投与群の雄 5 例と雌全例に認められた。
- 甲状腺 : 鰓後体のう胞が対照群の雄 2 例と雌 3 例、250mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例に認められた。

## 8. 考察

Sprague-Dawley系 SPF ラット [CrI:CD(SD)] に 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールを 0 (0.5w/v%メチルセルロース水溶液：対照群)、15、60 及び 250 mg/kg/day の用量で 28 日間反復強制経口投与し、その毒性を検討するとともに、対照群及び 250 mg/kg 投与群はその後 2 週間休薬させ、変化の回復性について検討した。

投与及び回復期間を通じて死亡動物はみられず、一般状態にも異常は認められなかった。

詳細な一般状態の観察では、オープンフィールド内観察における排糞数の高値が 250mg/kg 投与群の雄で投与第 2 及び 4 週に認められたが、通常みられる程度の僅かな差であることから、被験物質投与との関連性はないと判断した。更に、立ち上がり回数値の低値が 250mg/kg 投与群の雄で投与第 2 週に、250mg/kg 投与群の雌で投与 4 週に認められたが、自発運動量に変化はみられていないことから、被験物質投与との関連性はないと判断した。その他、自発運動量の低値が 15mg/kg 投与群の雄で投与第 4 週の 30~40 分に認められたが、高用量群に同様な変化はみられていないことから偶発性の変化と判断した。また、機能検査における着地開脚幅の高値が 250mg/kg 投与群の雄で回復第 2 週に認められたが、投与期間中に同様な変化が認められていないことから被験物質投与との関連性はないと判断した。

体重では、投与及び回復期間中を通じて被験物質投与の影響は認められなかった。

摂餌量では、高値が 250mg/kg 投与群の雄で投与第 24 日に認められたが、一過性の変化であり、被験物質投与との関連性はないと判断した。

尿検査では、摂水量の高値が 250mg/kg 投与群の雄で認められたが、尿量及び浸透圧等には変化が認められていないことから被験物質投与との関連性はないと判断した。また、褐色尿が 250mg/kg 投与群の雄に認められたが、定性項目等に変化はなく、病理組織学検査において腎臓等に異常は認められていないことから、被験物質投与との関連性は疑われたものの、毒性学的意義はないと判断した。なお、褐色尿は休薬により消失した。その他に、回復第 2 週に浸透圧の高値が 250mg/kg 投与群の雌に認められたが、投与期間中には同様な変化がみられていないことから、偶発性の変化と判断した。

血液学検査では、血小板数及びフィブリノーゲン量の高値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が 250mg/kg 投与群の雌雄に、プロトロンビン時間の延長が 250mg/kg 投与群の雄に認められ、発現機序は明らかではないものの、被験物質投与との関連性が疑われた。これらの変化は、休薬により消失あるいは軽減した。その他に、回復期間終了時に赤血球数及びヘマトクリット値の低値が 250mg/kg 投与群の雄に認められたが、投与期間終了時には同様な変化は認められていないことから、偶発性と判断した。

血液化学検査では、総コレステロール及び総たん白質の高値が 250mg/kg 投与群の雌雄に、リン脂質の高値が 250mg/kg 投与群の雌に認められ、被験物質投与による肝

## B-5805

臓への影響が疑われた。また、カルシウムの高値が 250mg/kg 投与群の雄に、塩素の低値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。上記でみられた変化はいずれも休薬により消失あるいは軽減した。他に、AST 活性の低値が 250mg/kg 投与群の雌に認められたが、器官・組織の障害を示唆する増加ではないことから、毒性学的意義はないと判断した。なお、回復期間終了時に総たん白質及びアルブミンの低値が 250 mg/kg 投与群の雄に認められたが、投与期間終了時には同様な変化が認められていないことから、偶発性の変化と判断した。

病理学検査では、肝臓の組織学検査における小葉中心性肝細胞肥大が 60mg/kg 以上の投与群の雌雄に認められ、重量の増加を伴った。また、甲状腺の組織学検査における濾胞上皮細胞肥大が 60mg/kg 投与群の雄と 250mg/kg 投与群の雌雄に認められ、被験物質投与との関連性が疑われた。これらの変化は休薬により消失した。上記の他に剖検所見、器官重量あるいは組織学検査においていくつかの変化が認められたが、それらの出現状況から、いずれも被験物質投与との関連性はないと判断した。

以上の結果から、本試験条件下における 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールの無影響量は雌雄とも 15mg/kg/日と考えられた。なお、認められた変化は、いずれも回復性が認められた。

B-5805

9. 文献

- 1) 鷹野正生 : 2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールのラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験 (予備試験) (株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号:C-B265、2006 年)
- 2) Shayne C. Gad and Carrol S. Weil (1994) : Chapter 7. Statistics for Toxicologists, *In Principles and Methods of Toxicology* (A. Wallace Hayes, ed.) , 3rd ed., pp. 221-274, Raven Press, Ltd., New York.
- 3) 佐久間昭 (1981) : 薬効評価－計画と解析－II 東京大学出版会, 東京.

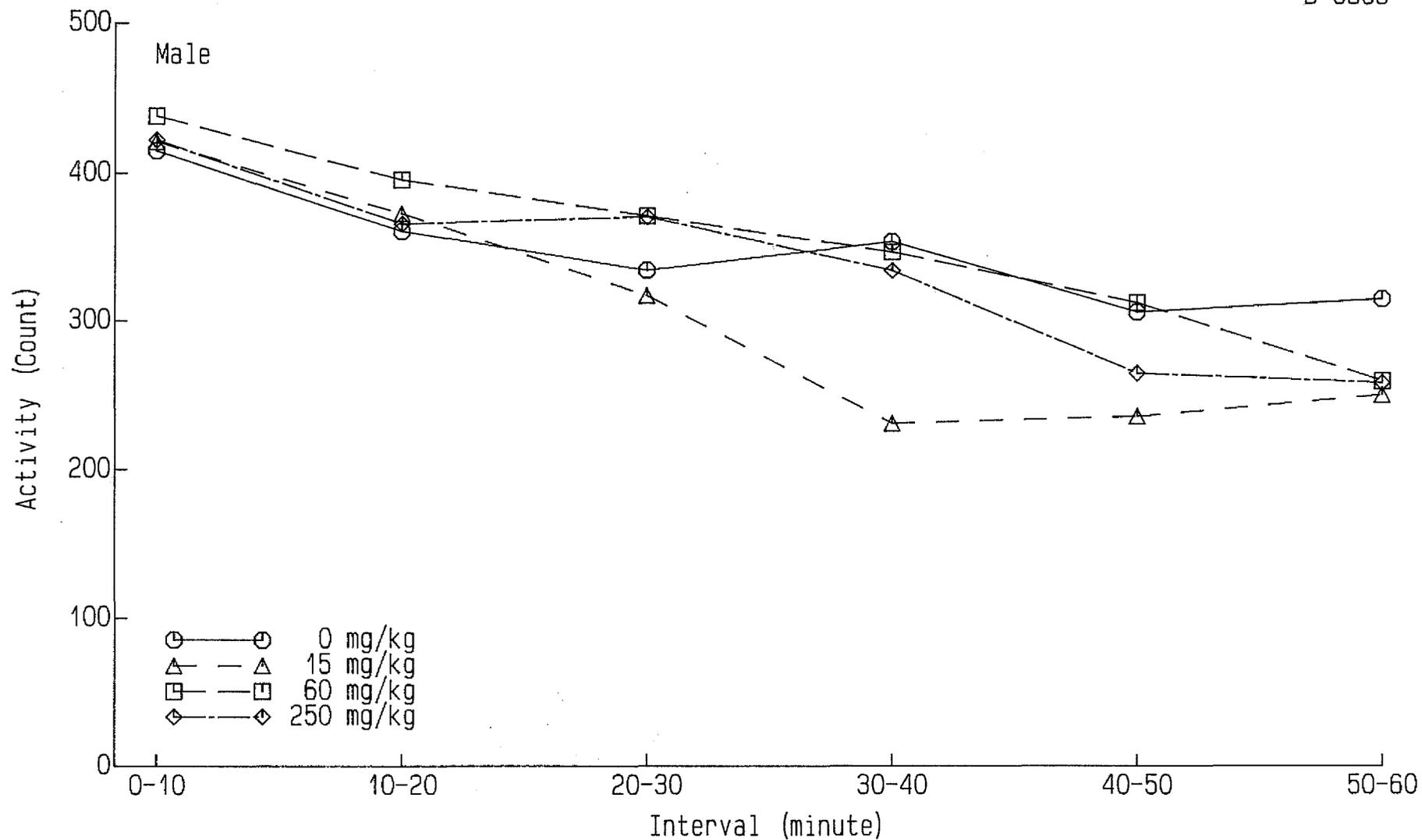


Fig.1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

— Motor Activity (Week 4) —

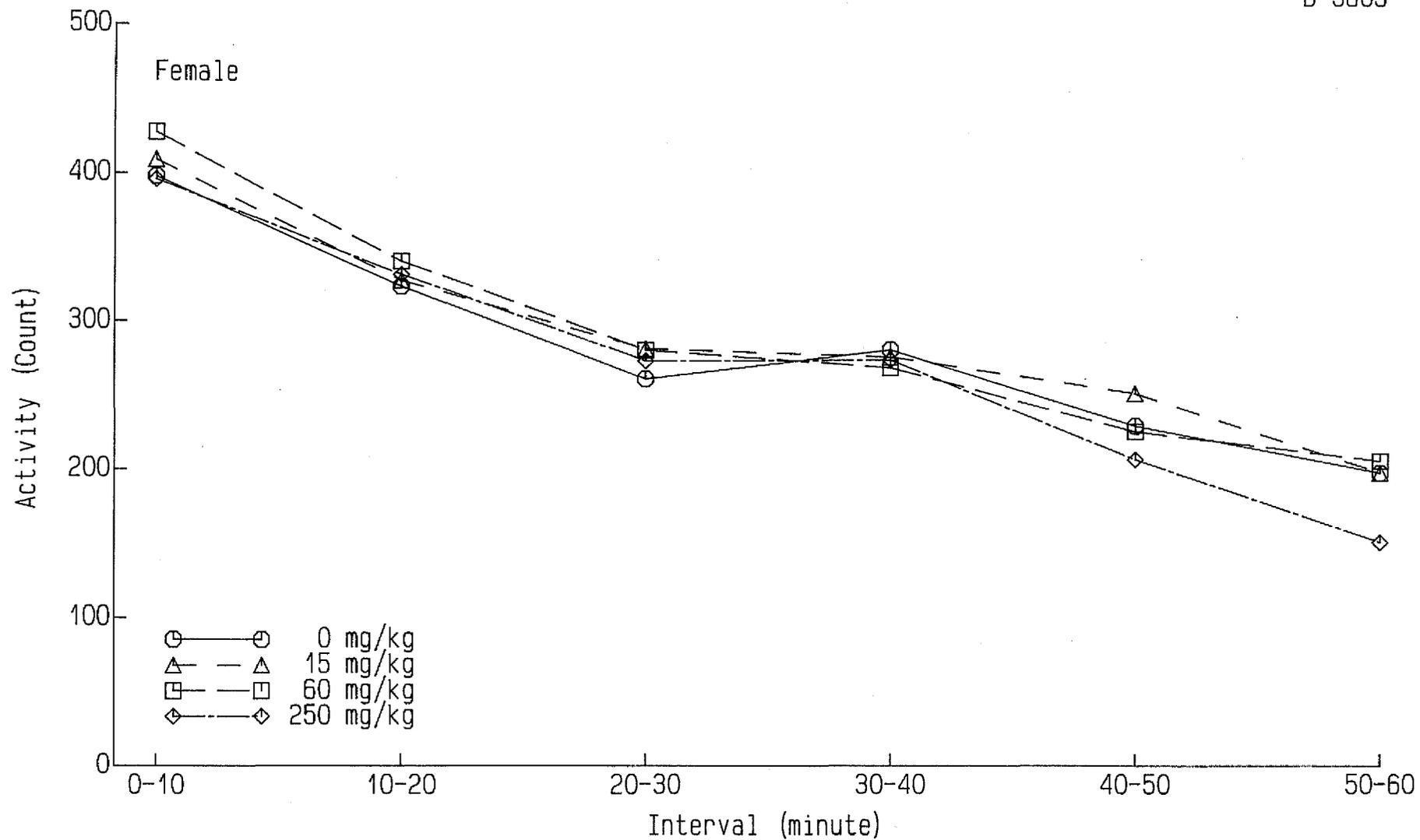


Fig.2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

— Motor Activity (Week 4) —

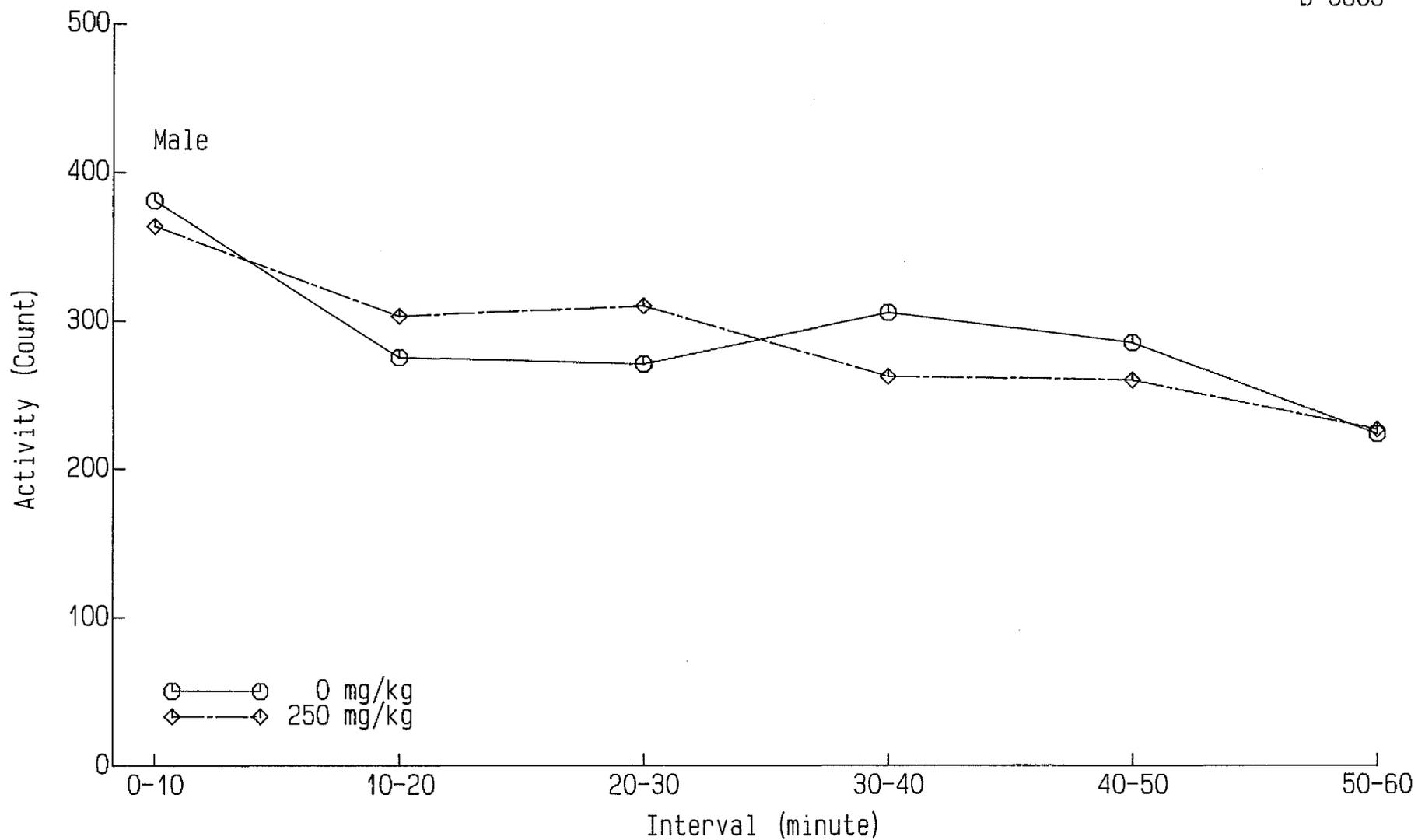


Fig.3 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

— Motor Activity (Week 2 of recovery) —

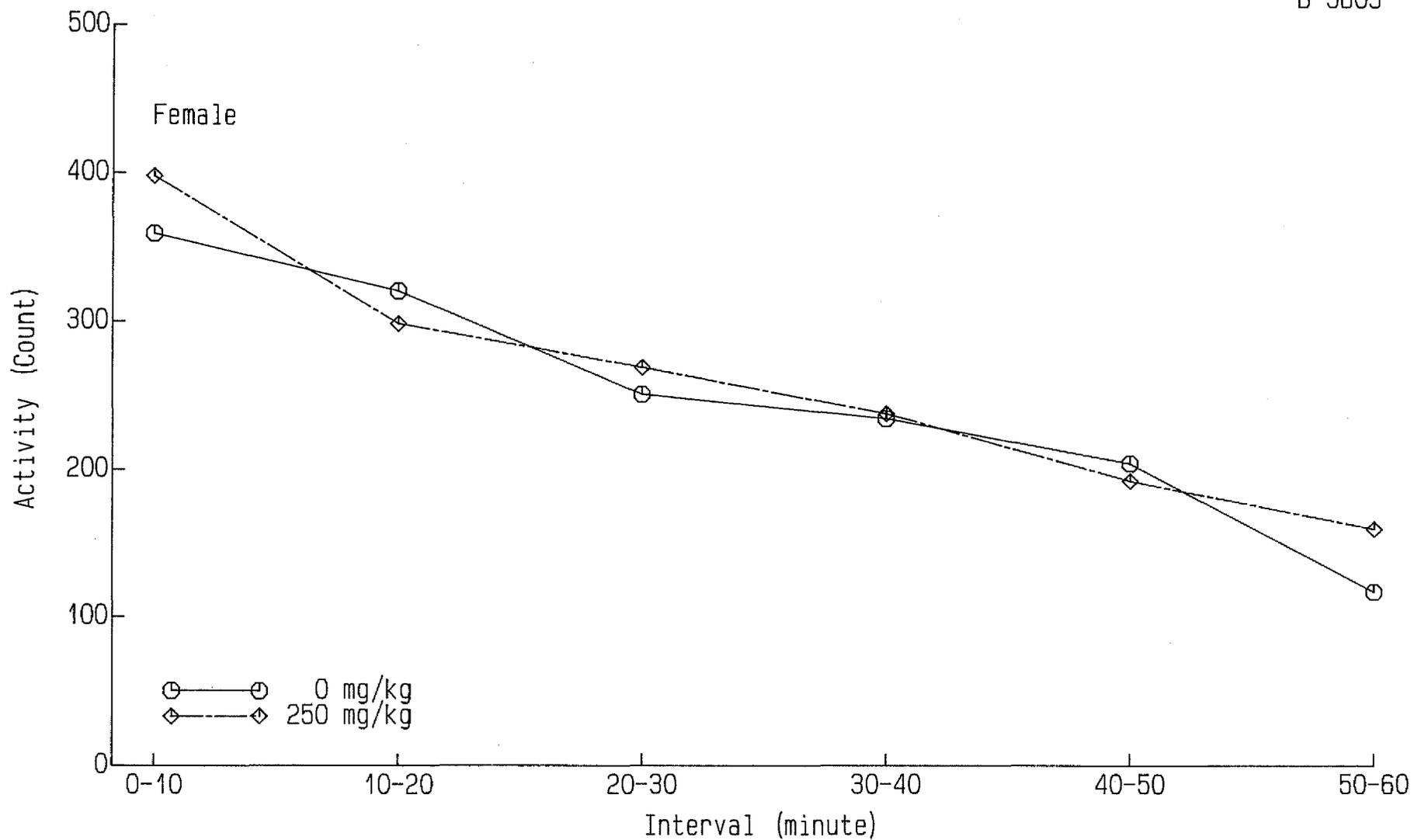


Fig.4 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

— Motor Activity (Week 2 of recovery) —

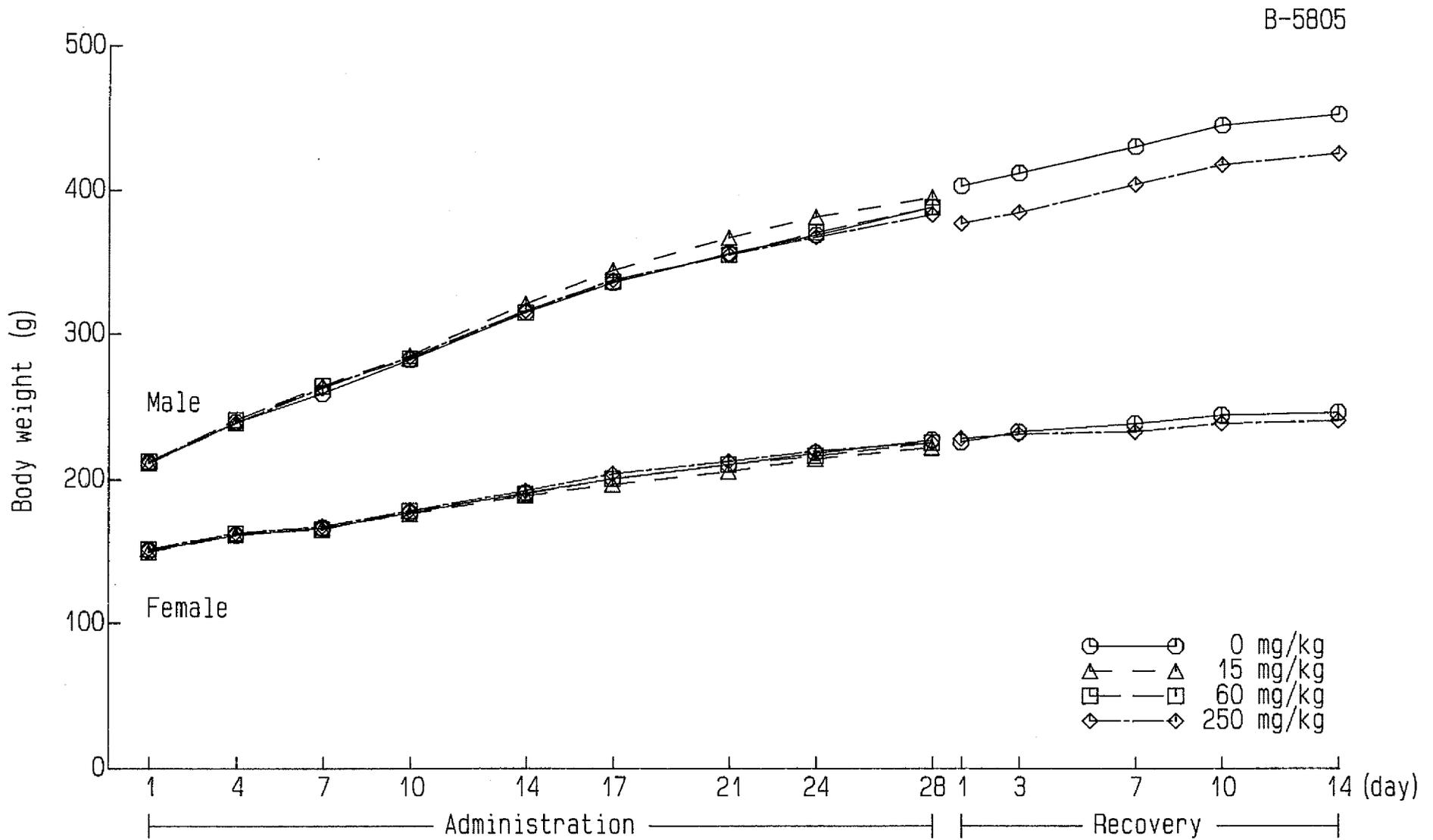


Fig.5 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

———— Body weight ————

B-5805

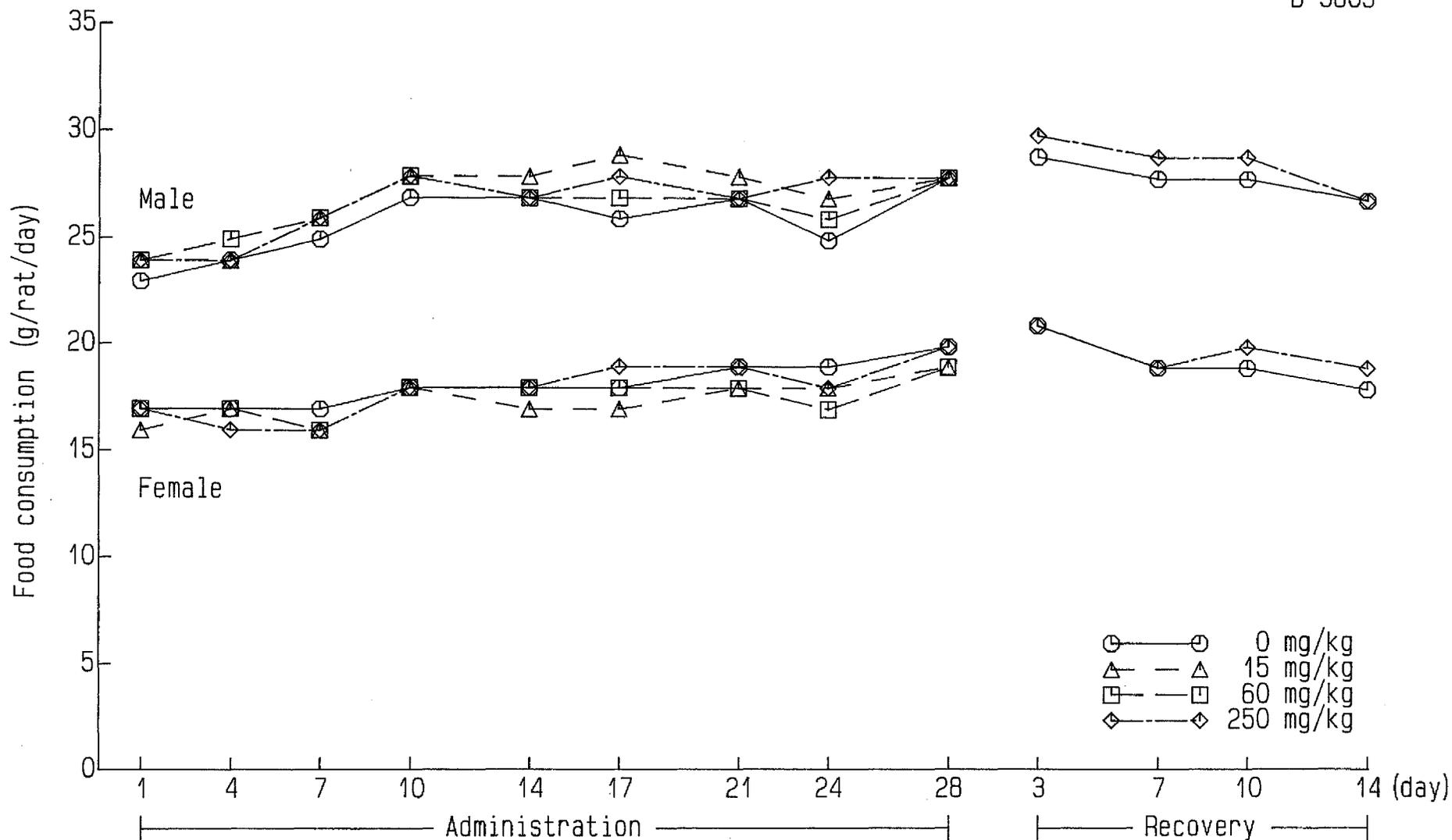


Fig.6 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

— Food consumption —







Table 2-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 1)

Sex	Male				Female				
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture	Normal	12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion	None	12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior	None	12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 2)

Parameter	Sex	Male				Female			
		Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-3

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 3)

Parameter	Sex	Male				Female			
		Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-4

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 4)

Sex	Male				Female				
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
Parameter	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-5

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Detailed clinical signs : home cage observations (Week 1 of recovery)

Sex	Male		Female	
	0	250	0	250
Dose (mg/kg)				
Parameter	No. of animals			
Posture				
Normal	6	6	6	6
Convulsion				
None	6	6	6	6
Abnormal behavior				
None	6	6	6	6

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-6                      A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : home cage observations (Week 2 of recovery)

Sex	Male		Female		
	0	250	0	250	
Parameter	No. of animals	6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-7 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 1)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	15	60	250	0	15	60	250
		12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage Easy		12	6	6	12	12	6	6	12
Fur condition Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-8 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 2)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	15	60	250	0	15	60	250
		12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	11	6	6	12
Some resistance/avoidance		0	0	0	0	1	0	0	0
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	12	6	6	12

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-9 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 3)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	15	60	250	0	15	60	250
		12	6	6	12	12	6	6	12
Ease of removal from cage									
Easy		12	6	6	12	11	6	5	12
Some resistance/avoidance		0	0	0	0	1	0	1	0
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	11	6	5	12
Slightly awkward		0	0	0	0	1	0	1	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-10 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 4)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	15	60	250	0	15	60	250
Ease of removal from cage									
Easy		11	6	6	12	12	5	6	12
Some resistance/avoidance		1	0	0	0	0	1	0	0
Fur condition									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Skin									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Secretions-Eye, Nose									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Exophthalmos									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Palpebral closure									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Mucosal membranes									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Lacrimation									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Piloerection									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupil size									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Salivation									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal respiration									
Absent		12	6	6	12	12	6	6	12
Reactivity to handling									
Easy		12	6	6	12	11	6	6	11
Slightly awkward		0	0	0	0	1	0	0	1

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-11 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 1 of recovery)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male		Female	
		0	250	0	250
Ease of removal from cage					
Easy		5	6	6	6
Some resistance/avoidance		1	0	0	0
Fur condition					
Normal		6	6	6	6
Skin					
Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nose					
Absent		6	6	6	6
Exophthalmos					
Absent		6	6	6	6
Palpebral closure					
Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes					
Normal		6	6	6	6
Lacrimation					
Normal		6	6	6	6
Piloerection					
Absent		6	6	6	6
Pupil size					
Normal		6	6	6	6
Salivation					
None		6	6	6	6
Abnormal respiration					
Absent		6	6	6	6
Reactivity to handling					
Easy		6	6	6	6

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-12

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Detailed clinical signs : in-the-hand observations (Week 2 of recovery)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male		Female	
		0	250	0	250
		6	6	6	6
Ease of removal from cage					
Easy		5	4	6	6
Some resistance/avoidance		1	0	0	0
Difficult		0	2	0	0
Fur condition					
Normal		6	6	6	6
Skin					
Normal		6	6	6	6
Secretions-Eye, Nose					
Absent		6	6	6	6
Exophthalmos					
Absent		6	6	6	6
Palpebral closure					
Normal		6	6	6	6
Mucosal membranes					
Normal		6	6	6	6
Lacrimation					
Normal		6	6	6	6
Piloerection					
Absent		6	6	6	6
Pupil size					
Normal		6	6	6	6
Salivation					
None		6	6	6	6
Abnormal respiration					
Absent		6	6	6	6
Reactivity to handling					
Easy		5	3	6	6
Slightly awkward		0	3	0	0
Difficult		1	0	0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-13

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : open field observation (Week 1)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		0	0	0	1	0	0	0	0
Normal		12	6	6	11	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		5± 3	5± 2	4± 3	4± 3	7± 2	4± 2	7± 2	6± 3
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 1	0± 1	0± 1	1± 1	0± 0	0± 0	0± 0	0± 1
Urination									
None		9	3	5	10	12	6	4	11
Small amount		3	3	1	2	0	0	2	1

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-14 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : open field observation (Week 2)

Parameter	Sex	Male				Female			
		Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior						a)			
None		12	6	6	12	11	6	6	12
Minor		0	0	0	0	1	0	0	0
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		0	0	1	2	0	0	0	0
Normal		12	6	5	10	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean+S.D.)		5 <sub>±</sub> 3	4 <sub>±</sub> 2	4 <sub>±</sub> 3	2 <sub>±</sub> 2*D	7 <sub>±</sub> 4	6 <sub>±</sub> 4	9 <sub>±</sub> 4	6 <sub>±</sub> 3
Defecation count (Mean+S.D.)		0 <sub>±</sub> 0	0 <sub>±</sub> 0	0 <sub>±</sub> 0	1 <sub>±</sub> 1**DT	0 <sub>±</sub> 0	0 <sub>±</sub> 0	1 <sub>±</sub> 1	0 <sub>±</sub> 1
Urination									
None		10	6	6	10	12	6	6	9
Small amount		2	0	0	1	0	0	0	3
Moderate amount		0	0	0	1	0	0	0	0

a) Career

\* : p<0.05 ; \*\* : p<0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

DT : Dunnett-type rank test

Table 2-15

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : open field observation (Week 3)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	5	6	12
Increased alertness		0	0	0	0	0	1	0	0
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	5	11
Minor		0	0	0	0	0	0	1	1
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		1	1	0	1	0	0	0	0
Normal		11	5	6	11	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		4± 3	2± 2	3± 3	3± 4	7± 3	5± 3	10± 5	6± 4
Defecation count (Mean±S.D.)		1± 2	1± 1	0± 0	2± 2	0± 1	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		10	4	5	8	12	6	6	10
Small amount		2	2	1	4	0	0	0	2

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-16 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : open field observation (Week 4)

Parameter	Sex Dose (mg/kg) No. of animals	Male				Female			
		0	15	60	250	0	15	60	250
Arousal									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Convulsion									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Abnormal behavior									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Stereotypy									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Gait									
No/minimal location		2	1	1	0	0	0	0	0
Normal		10	5	5	12	12	6	6	12
Posture									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Grooming									
None		12	6	6	12	12	6	6	12
Rearing count (Mean±S.D.)		5± 3	4± 2	4± 3	5± 2	10± 3	8± 3	10± 4	7± 3*D
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	1± 1**DT	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination									
None		11	6	6	9	12	6	6	12
Small amount		1	0	0	3	0	0	0	0

\* : p<0.05 ; \*\* : p<0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

DT : Dunnett-type rank test

Table 2-17

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Detailed clinical signs : open field observation (Week 1 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
		Dose (mg/kg)	0	250	0
	No. of animals	6	6	6	6
Arousal					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6
Stereotypy					
None		6	6	6	6
Gait					
Normal		6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Grooming					
None		6	6	6	6
Rearing count (Mean±S.D.)		6± 2	4± 2	8± 2	7± 3
Defecation count (Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination					
None		5	5	6	6
Small amount		0	1	0	0
Moderate amount		1	0	0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-18 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Detailed clinical signs : open field observation (Week 2 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
	Dose (mg/kg)	0	250	0	250
	No. of animals	6	6	6	6
Arousal					
Normal		6	6	6	6
Convulsion					
None		6	6	6	6
Abnormal behavior					
None		6	6	6	6
Stereotypy					
None		6	6	6	6
Gait					
Normal		6	6	6	6
Posture					
Normal		6	6	6	6
Grooming					
None		6	6	6	6
Rearing count (Mean+S.D.)		5± 2	5± 2	8± 3	7± 2
Defecation count (Mean+S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Urination					
None		4	6	6	6
Small amount		1	0	0	0
Moderate amount		1	0	0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-19

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Manipulative test (Week 4)

Parameter	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg)	0	15	60	250	0	15	60	250
	No. of animals	12	6	6	12	12	6	6	12
Auditory response									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Approach response									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Touch response									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Tail pinch response									
Normal		12	6	6	12	12	6	6	12
Pupillary reflex									
Pass, both		12	6	6	12	12	6	6	12
Aerial righting reflex									
(Total score: Mean±S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Landing foot splay (mm: Mean±S.D.)		78±16	89±15	91±16	89±17	62±13	61±19	64±28	68±14

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-20

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Manipulative test (Week 2 of recovery)

Parameter	Sex	Male		Female	
		Dose (mg/kg)	0	250	0
	No. of animals	6	6	6	6
Auditory response					
Weak		0	1	0	1
Normal		6	5	6	5
Approach response					
Normal		6	6	6	6
Touch response					
Normal		6	6	6	6
Tail pinch response					
Normal		6	6	6	6
Pupillary reflex					
Pass, both		6	6	6	6
Aerial righting reflex (Total score: Mean+S.D.)		0± 0	0± 0	0± 0	0± 0
Landing foot splay (mm: Mean+S.D.)		72±14	91±13*T	52± 9	65±18

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

T : Student's t-test

Table 2-21. A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Grip strength (Week 4)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb g	Hind limb g
Male	0	No.	12	12
		Mean	906	534
		S.D.	95	71
	15	No.	6	6
		Mean	965	620
		S.D.	199	98
	60	No.	6	6
		Mean	912	583
		S.D.	164	89
	250	No.	12	12
		Mean	1021	533
		S.D.	252	139
Female	0	No.	12	12
		Mean	902	426
		S.D.	114	72
	15	No.	6	6
		Mean	808	472
		S.D.	138	94
	60	No.	6	6
		Mean	857	390
		S.D.	190	57
	250	No.	12	12
		Mean	925	455
		S.D.	189	89

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 2-22

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Grip strength (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg		Fore limb g	Hind limb g
Male	0	No.	6	6
		Mean	1398	653
		S.D.	204	135
	250	No.	6	6
		Mean	1362	665
		S.D.	95	108
Female	0	No.	6	6
		Mean	1032	540
		S.D.	79	99
	250	No.	6	6
		Mean	1134	571
		S.D.	94	75

No significant difference between treated group and control group.

Table 2-23

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Motor activity (Week 4)

Sex	Dose mg/kg		Interval (minutes)						Total(0-60)
			0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	415	361	335	355	308	317	2090
		S.D.	46	44	70	67	101	148	339
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	421	373	318	232*	237	252	1832
		S.D.	35	79	80	131D	171	193	622
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	438	396	372	348	314	261	2128
		S.D.	26	47	37	54	100	147	201
	250	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	422	366	371	335	266	260	2019
		S.D.	27	30	60	91	134	153	384
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	398	324	262	282	231	199	1695
		S.D.	48	84	73	100	121	124	337
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	409	328	282	277	253	199	1748
		S.D.	34	50	84	126	121	99	367
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	427	341	281	270	227	207	1753
		S.D.	48	30	49	51	129	105	283
	250	No.	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	396	332	274	275	208	152	1637
		S.D.	47	42	83	127	129	129	442

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

D : Dunnett's test

Table 2-24

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Motor activity (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg		Interval (minutes)						Total(0-60)
			0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	381	276	272	307	287	226	1747
		S.D.	62	82	76	61	106	136	394
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	364	304	311	264	262	229	1732
		S.D.	56	62	39	57	100	108	276
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	359	321	252	236	206	118	1492
		S.D.	64	20	79	50	149	106	330
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	398	299	270	239	194	161	1561
		S.D.	50	127	69	127	127	129	418

No significant difference between treated group and control group.

Table 3-1

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Body weight (Administration period)

Sex	Dose mg/kg		Day of administration								Gain 1-28	
			1	4	7	10	14	17	21	24		28
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	212	240	260	283	316	337	358	371	391	179
		S.D.	7	7	10	12	13	15	18	21	20	19
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	212	240	265	286	322	346	369	384	398	187
		S.D.	5	7	10	13	17	21	25	25	28	24
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	213	242	265	284	316	338	357	373	391	179
		S.D.	7	11	16	21	30	36	41	46	53	47
	250	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	213	240	264	285	317	339	357	370	386	174
		S.D.	8	9	12	16	20	23	25	27	30	25
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	151	162	167	178	192	202	212	220	229	78
		S.D.	5	8	8	12	13	15	17	19	21	18
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	150	162	167	177	190	198	207	216	224	74
		S.D.	8	7	6	7	9	12	13	13	14	10
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	152	163	166	179	191	202	212	218	227	75
		S.D.	7	6	4	9	11	12	12	13	14	10
	250	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	152	163	168	179	193	205	214	221	227	76
		S.D.	3	3	4	7	10	11	11	11	12	11

Unit : g

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 3-2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Body weight (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Day of recovery					Gain 1-14
			1	3	7	10	14	
Male	0	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	406	415	434	449	457	51
		S.D.	10	11	13	13	14	8
	250	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	380	388	408	422	430	50
		S.D.	33	31	37	40	40	11
Female	0	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	228	235	241	247	249	21
		S.D.	27	29	29	32	33	9
	250	No.	6	6	6	6	6	6
		Mean	230	233	235	241	243	13
		S.D.	11	9	11	14	11	3

Unit : g

No significant difference between treated group and control group.

Table 4-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Food consumption (Administration period)

Sex	Dose mg/kg		Day of administration								
			1	4	7	10	14	17	21	24	28
Male	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	23	24	25	27	27	26	27	25	28
		S.D.	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	24	24	26	28	28	29	28	27	28
		S.D.	1	1	1	1	1	2	2	1	2
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	24	25	26	28	27	27	27	26	28
		S.D.	2	2	3	3	4	4	4	4	5
	250	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	24	24	26	28	27	28	27	28*	28
		S.D.	2	1	2	2	2	2	2	3D	2
Female	0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	17	17	17	18	18	18	19	19	20
		S.D.	2	2	1	2	2	2	2	3	2
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	16	17	16	18	17	17	18	18	19
		S.D.	2	1	1	1	1	1	1	1	1
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	17	17	16	18	18	18	18	17	19
		S.D.	2	1	2	2	2	2	1	1	1
	250	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		Mean	17	16	16	18	18	19	19	18	20
		S.D.	1	1	1	2	1	1	1	2	2

Unit : g/rat/day

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

D : Dunnett's test

Table 4-2

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Food consumption (Recovery period)

Sex	Dose mg/kg		Day of recovery			
			3	7	10	14
Male	0	No.	6	6	6	6
		Mean	29	28	28	27
		S.D.	1	2	2	2
	250	No.	6	6	6	6
		Mean	30	29	29	27
		S.D.	2	3	3	3
Female	0	No.	6	6	6	6
		Mean	21	19	19	18
		S.D.	3	3	3	3
	250	No.	6	6	6	6
		Mean	21	19	20	19
		S.D.	2	2	2	1

Unit : g/rat/day

No significant difference between treated group and control group.

Table 5-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Urinalysis (Week 4)

Sex	Dose mg/kg	No.	pH									1) Protein					2) Ketone body					3) Glucose							
			5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++			
Male	0	12	0	0	0	0	0	0	5	7	0	3	7	2	0	0	0	9	3	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
	15	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	5	1	0	0	0	4	2	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	60	6	0	0	0	0	0	1	1	4	0	4	2	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	250	12	0	0	0	0	0	0	2	8	2	2	5	4	1	0	0	9	2	1	0	0	0	12	0	0	0	0	0
Female	0	12	0	0	0	1	2	1	3	4	1	11	0	1	0	0	0	11	1	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
	15	6	0	0	0	0	1	0	0	4	1	4	2	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	60	6	0	0	0	0	1	3	1	1	0	4	1	1	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	250	12	0	0	0	1	0	1	3	5	2	8	3	1	0	0	0	10	2	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
1)	-	<10 mg/dL	+-	: 10 - 25 mg/dL	+	: 26 - 85 mg/dL	++	: 86 - 250 mg/dL	+++	: 251 - 600 mg/dL	++++	: >600 mg/dL																	
2)	-	<5 mg/dL	+-	: 5 - 7.5 mg/dL	+	: 7.6 - 30 mg/dL	++	: 31 - 70 mg/dL	+++	: 71 - 125 mg/dL	++++	: >125 mg/dL																	
3)	-	<30 mg/dL	+-	: 30 - 60 mg/dL	+	: 61 - 125 mg/dL	++	: 126 - 250 mg/dL	+++	: 251 - 750 mg/dL	++++	: >750 mg/dL																	

Table 5-2 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Urinalysis (Week 4)

Sex	Dose mg/kg	No.	4) Occult blood					5) Bilirubin					6) Urobilinogen					7) Color		
			-	+-	+	++	+++	-	+	++	+++	++++	+-	+	++	+++	++++	LY	Y	DY
Male	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0
	15	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	60	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	250	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	3	9
Female	0	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0
	15	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	60	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	250	12	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	12	0

4) - : <0.03 mg/dL    +- : 0.03 - 0.05 mg/dL    + : 0.06 - 0.15 mg/dL    ++ : 0.16 - 0.75 mg/dL    +++ : >0.75 mg/dL  
5) - : <0.5 mg/dL    + : 0.5 - 1.5 mg/dL    ++ : 1.6 - 5.0 mg/dL    +++ : 5.1 - 10.0 mg/dL    ++++ : >10.0 mg/dL  
6) +- : <2.0 mg/dL    + : 2.0 - 3.5 mg/dL    ++ : 3.6 - 7.0 mg/dL    +++ : 7.1 - 12.0 mg/dL    ++++ : >12.0 mg/dL  
7) LY : Light yellow    Y : Yellow    DY : Dark yellow



Table 5-4 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Water intake and urinalysis (Week 4)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg
Male	0	12	Mean	37	11.6	1871
			S.D.	6	3.8	286
	15	6	Mean	38	12.6	1784
			S.D.	5	6.4	307
	60	6	Mean	40	13.7	1914
			S.D.	7	3.9	391
	250	12	Mean	51**	14.0	1635
			S.D.	12D	5.2	486
Female	0	12	Mean	32	8.7	2142
			S.D.	15	6.7	786
	15	6	Mean	25	6.3	2056
			S.D.	4	1.6	288
	60	6	Mean	28	4.8	2432
			S.D.	6	1.5	456
	250	12	Mean	26	5.9	2010
			S.D.	6	3.4	324

\*\* :  $p < 0.01$  (Significant difference from control group)  
D : Dunnett's test

Table 5-5 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Urinalysis (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.	pH									1) Protein					2) Ketone body					3) Glucose							
			5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++	-	+-	+	++	+++	++++
Male	0	6	0	0	0	0	0	1	2	2	1	1	4	1	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	250	6	0	0	0	0	0	0	3	2	1	1	3	2	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
Female	0	6	0	0	0	1	1	1	0	3	0	4	0	2	0	0	0	4	1	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	250	6	0	0	0	1	0	0	2	2	1	0	4	2	0	0	0	1	4	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0
1)	-	<10 mg/dL	+-	: 10 - 25 mg/dL			+	: 26 - 85 mg/dL			++	: 86 - 250 mg/dL			+++	: 251 - 600 mg/dL			++++	: >600 mg/dL									
2)	-	<5 mg/dL	+-	: 5 - 7.5 mg/dL			+	: 7.6 - 30 mg/dL			++	: 31 - 70 mg/dL			+++	: 71 - 125 mg/dL			++++	: >125 mg/dL									
3)	-	<30 mg/dL	+-	: 30 - 60 mg/dL			+	: 61 - 125 mg/dL			++	: 126 - 250 mg/dL			+++	: 251 - 750 mg/dL			++++	: >750 mg/dL									

Table 5-6

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Urinalysis (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.	4) Occult blood					5) Bilirubin					6) Urobilinogen					7) Color		
			-	+-	+	++	+++	-	+	++	+++	++++	+-	+	++	+++	++++	LY	Y	DY
Male	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	250	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
Female	0	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0
	250	6	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	6	0

4) - : <0.03 mg/dL    +- : 0.03 - 0.05 mg/dL    + : 0.06 - 0.15 mg/dL    ++ : 0.16 - 0.75 mg/dL    +++ : >0.75 mg/dL  
5) - : <0.5 mg/dL    + : 0.5 - 1.5 mg/dL    ++ : 1.6 - 5.0 mg/dL    +++ : 5.1 - 10.0 mg/dL    ++++ : >10.0 mg/dL  
6) +- : <2.0 mg/dL    + : 2.0 - 3.5 mg/dL    ++ : 3.6 - 7.0 mg/dL    +++ : 7.1 - 12.0 mg/dL    ++++ : >12.0 mg/dL  
7) LY : Light yellow    Y : Yellow    DY : Dark yellow



Table 5-8 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Water intake and urinalysis (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		Water intake mL/24h	Urine volume mL/24h	Osmolality mOsm/kg
Male	0	6	Mean	40	13.4	1910
			S.D.	5	4.7	220
	250	6	Mean	51	16.3	1644
			S.D.	12	6.2	500
Female	0	6	Mean	32	7.8	1862
			S.D.	10	3.2	237
	250	6	Mean	33	5.9	2254*
			S.D.	7	2.4	309T

\* : p<0.05 (Significant difference from control group)  
T : Student's t-test

Table 6-1

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Hematology (Day 28)

Sex	Dose mg/kg	No.		RBC ×10 <sup>4</sup> /μL	Hb g/dL	Ht %	MCV fL	MCH pg	MCHC %	Reticu- loocyte %	Plate- let ×10 <sup>4</sup> /μL	PT s	APTT s	Fibri- nogen mg/dL
Male	0	6	Mean	769	15.8	47	60.4	20.5	33.9	2.3	100.8	16.5	25.2	280
			S.D.	33	0.7	2	0.8	0.4	0.7	0.4	0.4	4.3	2.4	2.5
	15	6	Mean	773	16.1	47	61.0	20.8	34.2	2.0	106.3	16.3	25.2	319
			S.D.	22	0.3	1	1.6	0.5	0.5	0.2	0.2	11.3	2.2	4.6
	60	6	Mean	770	15.8	46	59.7	20.6	34.4	2.2	111.5	18.5	26.8	321
			S.D.	39	0.5	2	1.7	0.6	0.7	0.3	0.3	11.3	2.4	3.0
	250	6	Mean	778	15.8	46	58.9	20.3	34.5	2.4	120.6**	24.1**	36.7**	411**
			S.D.	44	0.5	2	1.7	0.5	0.5	0.6	0.6	12.4D	2.2D	3.8D
Female	0	6	Mean	757	15.9	45	59.5	20.9	35.2	2.0	113.2	12.0	15.9	239
			S.D.	32	0.5	2	0.6	0.3	0.5	0.3	0.3	6.5	0.7	2.3
	15	6	Mean	772	16.0	45	58.7	20.7	35.2	2.0	117.7	12.0	18.9	240
			S.D.	15	0.5	1	1.2	0.5	0.4	0.4	0.4	5.8	0.4	2.9
	60	6	Mean	753	15.6	45	59.0	20.8	35.1	1.9	119.3	11.7	18.0	253
			S.D.	36	0.8	2	1.6	0.8	0.6	0.4	0.4	9.2	0.6	2.6
	250	6	Mean	757	15.4	44	58.1	20.4	35.1	2.0	127.3*	13.9	23.6**	308**
			S.D.	47	0.9	2	0.9	0.3	0.3	0.3	0.5	10.5D	1.9	3.9D

\* : p<0.05 ; \*\* : p<0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 6-2

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Hematology (Day 28)

Sex	Dose mg/kg	No.		WBC ×10 <sup>2</sup> /μL	Differential leukocyte counts (%)						Erythroblast counts (/200 leukocyte)	
					Lymph.	Stab	Seg.	Eosino.	Baso.	Mono.		Others
Male	0	6	Mean	93	83.1	0.3	15.0	0.6	0.0	1.0	0.0	0
			S.D.	22	7.2	0.4	7.2	0.5	0.0	0.6	0.0	0
	15	6	Mean	88	87.1	0.3	10.9	0.4	0.0	1.3	0.0	0
			S.D.	26	3.7	0.3	3.8	0.5	0.0	0.7	0.0	0
	60	6	Mean	95	86.7	0.4	11.5	0.4	0.0	1.0	0.0	0
			S.D.	27	3.8	0.2	3.9	0.5	0.0	0.5	0.0	0
	250	6	Mean	99	89.3	0.3	9.4	0.3	0.0	0.8	0.0	0
			S.D.	35	4.1	0.3	4.1	0.4	0.0	0.5	0.0	0
Female	0	6	Mean	76	86.3	0.4	12.1	0.7	0.0	0.6	0.0	0
			S.D.	8	6.3	0.4	5.8	0.7	0.0	0.6	0.0	0
	15	6	Mean	76	82.8	0.5	15.4	0.6	0.0	0.7	0.0	0
			S.D.	12	3.4	0.3	3.4	0.4	0.0	0.6	0.0	0
	60	6	Mean	69	84.2	0.5	14.1	0.5	0.0	0.8	0.0	0
			S.D.	19	2.9	0.3	2.4	0.6	0.0	0.7	0.0	0
	250	6	Mean	85	84.5	0.4	13.6	0.6	0.0	0.9	0.0	0
			S.D.	16	7.6	0.6	6.7	0.7	0.0	0.4	0.0	0

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 6-3

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Hematology (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		RBC	Hb	Ht	MCV	MCH	MCHC	Reticu- loocyte	Plate- let	PT	APTT	Fibri- nogen
				$\times 10^4/\mu\text{L}$	g/dL	%	fL	pg	%	%	$\times 10^4/\mu\text{L}$	s	s	mg/dL
Male	0	6	Mean	815	16.4	47	57.0	20.1	35.3	2.2	95.2	15.0	24.3	344
			S.D.	23	0.3	1	1.1	0.5	0.6	0.4	4.4	1.7	1.6	32
	250	6	Mean	777*	16.0	45*	57.9	20.6	35.5	2.5	105.5**	16.5	22.6	311
			S.D.	23T	0.5	1T	1.0	0.4	0.3	0.3	4.2T	3.8	2.7	38
Female	0	6	Mean	772	15.5	44	57.3	20.1	35.2	2.3	107.0	11.5	15.3	221
			S.D.	19	0.4	1	1.0	0.4	0.5	0.4	7.7	0.4	1.6	30
	250	6	Mean	764	15.7	44	57.7	20.5	35.5	2.2	106.0	11.1	15.8	249
			S.D.	27	0.2	1	1.8	0.7	0.3	0.5	8.6	0.7	2.7	43

\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  (Significant difference from control group)  
T : Student's t-test

Table 6-4 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Hematology (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		WBC	Differential leukocyte counts (%)							Erythroblast counts
				X10 <sup>2</sup> /μL	Lymph.	Stab	Seg.	Eosino.	Baso.	Mono.	Others	(/200 leukocyte)
Male	0	6	Mean	105	87.8	0.2	11.0	0.5	0.0	0.6	0.0	0
			S.D.	18	5.5	0.3	5.3	0.3	0.0	0.5	0.0	0
	250	6	Mean	99	87.3	0.3	11.4	0.5	0.0	0.4	0.0	0
			S.D.	22	1.6	0.3	1.5	0.8	0.0	0.4	0.0	0
Female	0	6	Mean	87	84.2	0.3	14.3	0.8	0.0	0.5	0.0	0
			S.D.	19	6.1	0.3	5.8	0.6	0.0	0.6	0.0	0
	250	6	Mean	72	86.3	0.3	12.0	0.8	0.0	0.8	0.0	0
			S.D.	7	3.9	0.3	3.6	0.6	0.0	0.4	0.0	0

No significant difference between treated group and control group.

Table 7-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Blood chemistry (Day 28)

Sex	Dose mg/kg	No.		AST (GOT) IU/L	ALT (GPT) IU/L	LDH IU/L	$\gamma$ -GTP IU/L	ALP IU/L	T.cho mg/dL	TG mg/dL	PL mg/dL	T.bili- rubin mg/dL	Glucose mg/dL
Male	0	6	Mean	67	27	62	1	685	47	40	94	0.0	134
			S.D.	6	4	9	0	96	11	19	17	0.0	11
	15	6	Mean	66	31	60	1	734	59	54	106	0.0	125
			S.D.	4	3	9	0	112	6	16	9	0.0	4
	60	6	Mean	68	31	57	1	754	59	37	101	0.0	131
			S.D.	8	6	5	0	82	9	14	14	0.0	20
	250	6	Mean	60	29	61	1	661	65*	29	107	0.0	120
			S.D.	2	4	11	0	147	17D	11	15	0.0	11
Female	0	6	Mean	70	27	62	2	419	61	10	112	0.0	95
			S.D.	11	2	7	1	29	13	3	15	0.0	9
	15	6	Mean	60	23	55	1	483	61	12	107	0.0	101
			S.D.	7	3	11	1	131	13	5	18	0.0	9
	60	6	Mean	62	22	56	2	413	73	10	118	0.0	89
			S.D.	7	1	15	1	59	7	5	5	0.0	4
	250	6	Mean	58*	27	52	2	362	97**	17	150**	0.0	98
			S.D.	7D	7	4	1	41	23D	5	25D	0.0	7

\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  (Significant difference from control group)  
D : Dunnett's test

Table 7-2

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Blood chemistry (Day 28)

Sex	Dose mg/kg	No.		BUN mg/dL	Crea- tinine mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mg/dL	P mg/dL	TP g/dL	Albumin g/dL	A/G
Male	0	6	Mean	12	0.24	143	4.8	107	9.8	8.1	5.9	2.7	0.87
			S.D.	2	0.03	1	0.5	2	0.2	0.4	0.2	0.1	0.05
	15	6	Mean	12	0.26	144	4.7	106	9.9	8.2	6.1	2.8	0.86
			S.D.	2	0.03	2	0.2	2	0.3	0.6	0.2	0.1	0.05
	60	6	Mean	11	0.25	144	4.7	108	9.8	7.7	6.0	2.7	0.82
			S.D.	1	0.02	2	0.1	2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.04
	250	6	Mean	10	0.23	143	4.8	106	10.3**	7.7	6.4**	2.9	0.81
			S.D.	1	0.03	1	0.3	1	0.2D	0.5	0.2D	0.1	0.03
Female	0	6	Mean	17	0.32	142	4.4	110	10.0	7.6	6.1	2.9	0.89
			S.D.	2	0.02	1	0.4	1	0.2	0.4	0.1	0.1	0.06
	15	6	Mean	16	0.29	142	4.5	110	9.8	7.6	6.1	2.8	0.88
			S.D.	2	0.03	1	0.3	1	0.3	0.6	0.2	0.2	0.06
	60	6	Mean	16	0.30	143	4.4	109	10.0	7.5	6.2	2.9	0.90
			S.D.	3	0.05	2	0.5	2	0.2	0.8	0.1	0.1	0.04
	250	6	Mean	14	0.27	143	4.4	107**	10.3	7.7	6.6**	3.0	0.86
			S.D.	1	0.02	1	0.2	2D	0.2	0.3	0.2D	0.1	0.07

\*\* : p<0.01 (Significant difference from control group)

D : Dunnett's test

Table 7-3

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Blood chemistry (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		AST (GOT) IU/L	ALT (GPT) IU/L	LDH IU/L	$\gamma$ -GTP IU/L	AlP IU/L	T.cho mg/dL	TG mg/dL	PL mg/dL	T.bili- rubin mg/dL	Glucose mg/dL
Male	0	6	Mean	64	28	51	1	585	57	54	105	0.1	150
			S.D.	7	4	10	0	107	9	20	11	0.0	16
	250	6	Mean	67	29	47	1	499	58	40	108	0.1	140
			S.D.	4	3	5	0	52	10	19	15	0.0	17
Female	0	6	Mean	59	23	41	2	283	62	15	118	0.1	118
			S.D.	6	4	10	1	101	4	3	8	0.0	22
	250	6	Mean	63	23	39	2	280	71*	13	124	0.1	116
			S.D.	6	6	5	1	52	9T	5	12	0.0	16

\* : p<0.05 (Significant difference from control group)  
 T : Student's t-test

Table 7-4 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Blood chemistry (Week 2 of recovery)

Sex	Dose mg/kg	No.		BUN mg/dL	Crea- tinine mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mg/dL	P mg/dL	TP g/dL	Albumin g/dL	A/G
Male	0	6	Mean	12	0.28	142	4.6	106	9.9	6.8	6.3	2.9	0.83
			S.D.	1	0.04	1	0.4	1	0.2	0.5	0.2	0.1	0.05
	250	6	Mean	13	0.29	144	4.4	108	9.7	6.6	6.0*	2.7*	0.85
			S.D.	2	0.03	2	0.2	2	0.3	0.6	0.2T	0.1T	0.03
Female	0	6	Mean	16	0.33	142	4.2	110	10.0	6.7	6.2	3.0	0.91
			S.D.	2	0.03	1	0.4	2	0.3	0.8	0.2	0.1	0.07
	250	6	Mean	14	0.32	142	4.3	109	10.0	6.9	6.3	2.9	0.87
			S.D.	2	0.03	2	0.3	2	0.2	0.6	0.2	0.1	0.04

\* : p<0.05 (Significant difference from control group)  
T : Student's t-test

Table 8-1

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (Day 28)

Male

Dose mg/kg		Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)	
		g	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	g(g/100g BW)	mg(mg/100g BW)	
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	354	1.97	499	1.27	10.12	0.67	2.72	66
		S.D.	25	0.05	94	0.21	0.90	0.13	0.32	4
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	371	1.98	565	1.21	11.23	0.64	2.77	60
		S.D.	25	0.07	122	0.09	0.75	0.08	0.15	6
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	363	1.99	500	1.23	11.63	0.62	2.78	57
		S.D.	46	0.11	105	0.21	2.08	0.10	0.42	15
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6	6
		Mean	366	2.05	439	1.12	14.27**	0.65	2.95	64
		S.D.	24	0.07	97	0.09	1.68D	0.09	0.25	8
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.56	141	0.36	2.86	0.19	0.77	18	
		S.D.	0.04	26	0.03	0.14	0.03	0.08	1	
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.54	152	0.33	3.03	0.17	0.75	16	
		S.D.	0.03	28	0.02	0.10	0.01	0.04	2	
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.56	137	0.34	3.19*	0.17	0.76	16	
		S.D.	0.05	21	0.04	0.21D	0.01	0.03	4	
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.56	119	0.31*	3.89**	0.18	0.81	18	
		S.D.	0.05	22	0.02D	0.23D	0.02	0.04	2	

\* : p<0.05 ; \*\* : p<0.01 (Significant difference from control group)  
D : Dunnett's test

Table 8-2

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (Day 28)

Male

Dose mg/kg			Testis (R+L) g(g/100g BW)	Epididymis (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	2.79	761
		S.D.	0.50	118
	15	No.	6	6
		Mean	3.00	763
		S.D.	0.22	104
	60	No.	6	6
		Mean	3.08	805
		S.D.	0.21	66
	250	No.	6	6
		Mean	2.96	791
		S.D.	0.33	95
Relative	0	No.	6	6
		Mean	0.79	216
		S.D.	0.14	37
	15	No.	6	6
		Mean	0.81	207
		S.D.	0.10	35
	60	No.	6	6
		Mean	0.86	224
		S.D.	0.07	24
	250	No.	6	6
		Mean	0.81	218
		S.D.	0.10	33

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8-3

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks

Absolute and relative organ weight (Day 28)

Female

Dose mg/kg	Body weight g	Brain g(g/100g BW)	Thymus mg(mg/100g BW)	Heart g(g/100g BW)	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidney (R+L) g(g/100g BW)	Adrenal (R+L) mg(mg/100g BW)									
									No.	Mean	S.D.	No.	Mean	S.D.	No.	Mean	S.D.
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6								
		Mean	215	1.83	408	0.75	5.86	0.42	1.62	61							
		S.D.	12	0.06	84	0.06	0.46	0.06	0.07	8							
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6								
		Mean	210	1.85	443	0.76	6.16	0.46	1.74	65							
		S.D.	13	0.10	54	0.04	0.50	0.09	0.12	9							
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6								
		Mean	213	1.86	417	0.77	6.91*	0.46	1.76	68							
		S.D.	14	0.05	108	0.06	0.61D	0.05	0.09	6							
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6								
		Mean	215	1.83	444	0.77	9.61**	0.47	1.75	70							
		S.D.	16	0.05	65	0.05	1.00D	0.05	0.11	10							
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6									
		Mean	0.85	189	0.35	2.73	0.20	0.75	28								
		S.D.	0.05	32	0.02	0.14	0.02	0.06	3								
	15	No.	6	6	6	6	6	6	6								
		Mean	0.88	212	0.36	2.94	0.22	0.83	31								
		S.D.	0.03	26	0.01	0.25	0.03	0.07	3								
	60	No.	6	6	6	6	6	6	6								
		Mean	0.88	196	0.36	3.25**	0.22	0.83	32								
		S.D.	0.05	48	0.02	0.19D	0.01	0.06	4								
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6								
		Mean	0.85	207	0.36	4.47**	0.22	0.81	33								
		S.D.	0.08	31	0.03	0.32D	0.02	0.03	4								

\* : p<0.05 ; \*\* : p<0.01 (Significant difference from control group)  
D : Dunnett's test

Table 8-4

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Absolute and relative organ weight (Day 28)

Female

Dose mg/kg			Ovary (R+L) mg(mg/100g BW)	Uterus mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	78.9	422
		S.D.	8.5	85
	15	No.	6	6
		Mean	77.8	439
		S.D.	12.7	134
	60	No.	6	6
		Mean	78.1	463
		S.D.	10.5	87
	250	No.	6	6
		Mean	83.2	439
		S.D.	6.6	92
Relative	0	No.	6	6
		Mean	36.8	196
		S.D.	2.5	32
	15	No.	6	6
		Mean	37.0	209
		S.D.	4.5	62
	60	No.	6	6
		Mean	36.8	219
		S.D.	4.8	48
	250	No.	6	6
		Mean	38.7	207
		S.D.	2.2	57

No significant difference in any treated groups from control group.

Table 8-5 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Absolute and relative organ weight (Week 2 of recovery)  
 Male

Dose mg/kg	Body weight	Brain	Thymus	Heart	Liver	Spleen	Kidney (R+L)	Adrenal (R+L)		
									g	g(g/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6		
		Mean	430	2.07	439	1.40	12.15	0.69	3.05	64
		S.D.	10	0.08	102	0.12	0.97	0.11	0.20	7
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	400	2.02	453	1.34	11.77	0.73	2.91	62
		S.D.	37	0.04	141	0.12	1.23	0.11	0.37	7
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6		
		Mean	0.48	102	0.33	2.83	0.16	0.71	15	
		S.D.	0.02	22	0.03	0.21	0.02	0.04	2	
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6	
		Mean	0.51	114	0.33	2.95	0.19	0.72	16	
		S.D.	0.04	39	0.02	0.20	0.02	0.04	2	

No significant difference between treated group and control group.

Table 8-6

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Absolute and relative organ weight (Week 2 of recovery)

Male

	Dose mg/kg		Testis	Epididymis
			(R+L) g(g/100g BW)	(R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	3.27	1142
		S.D.	0.16	66
	250	No.	6	6
		Mean	3.23	1130
		S.D.	0.16	58
Relative	0	No.	6	6
		Mean	0.76	266
		S.D.	0.03	20
	250	No.	6	6
		Mean	0.82	284
		S.D.	0.10	19

No significant difference between treated group and control group.

Table 8-7

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Absolute and relative organ weight (Week 2 of recovery)  
 Female

Dose mg/kg	Body weight g	Brain g(g/100g BW)	Thymus mg(mg/100g BW)	Heart g(g/100g BW)	Liver g(g/100g BW)	Spleen g(g/100g BW)	Kidney (R+L) g(g/100g BW)	Adrenal (R+L) mg(mg/100g BW)						
									No.	Mean	S.D.	No.	Mean	S.D.
Absolute	0	No.	6	6	6	6	6	6	6					
		Mean	234	1.83	427	0.84	6.37	0.51	1.71	76				
		S.D.	28	0.05	95	0.08	0.94	0.14	0.19	15				
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6					
		Mean	227	1.88	315*	0.82	6.62	0.47	1.74	75				
		S.D.	9	0.10	77T	0.05	0.54	0.05	0.06	7				
Relative	0	No.	6	6	6	6	6	6						
		Mean	0.79	182	0.36	2.73	0.22	0.73	32					
		S.D.	0.09	30	0.02	0.13	0.04	0.05	5					
	250	No.	6	6	6	6	6	6	6					
		Mean	0.83	139*	0.36	2.92	0.21	0.77	33					
		S.D.	0.07	35T	0.02	0.23	0.03	0.04	3					

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

T : Student's t-test

Table 8-8

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Absolute and relative organ weight (Week 2 of recovery)  
 Female

Dose mg/kg		Ovary (R+L) mg(mg/100g BW)		Uterus
				mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.	6	6
		Mean	85.8	501
		S.D.	13.1	78
	250	No.	6	6
		Mean	88.0	478
		S.D.	13.4	56
Relative	0	No.	6	6
		Mean	37.0	215
		S.D.	6.1	22
	250	No.	6	6
		Mean	39.0	211
		S.D.	6.6	28

No significant difference between treated group and control group.

Table 9-1

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Gross pathological findings (Main group)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg):	0	15	60	250	0	15	60	250
	Number:	6	6	6	6	6	6	6	6
Testis									
Small		1	1	0	1	-	-	-	-

Table 9-2

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Gross pathological findings (Recovery group)

Organs	Sex:	M	M	F	F
Findings	Dose (mg/kg): Number:	0 6	250 6	0 6	250 6
Kidney					
Dilatation, pelvic		1	0	0	0

Table 10-1 A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
Histopathological findings (Main group)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 6	15 6	60 6	250 6	0 6	15 6	60 6	250 6
Adrenal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Bone+Bone marrow, femoral									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Bone+Bone marrow, sternal									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Cerebellum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Cerebrum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Epididymis									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		5	0	0	5	-	-	-	-
Decreased sperm, luminal		1	0	0	1	-	-	-	-
minimal		1	0	0	0	-	-	-	-
severe		0	0	0	1	-	-	-	-
Eye									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Heart									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		5	0	0	4	4	0	0	6
Myocarditis, focal		1	0	0	2	2	0	0	0
minimal		1	0	0	2	2	0	0	0
Intestine, cecum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	5	6	0	0	5
Cell infiltration, lamina propria		0	0	0	1	0	0	0	1
minimal		0	0	0	1	0	0	0	1
Intestine, colon									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, duodenum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, ileum(Peyer's patch)									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, jejunum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Intestine, rectum									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6

-: Not applicable

Table 10-2

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Histopathological findings (Main group)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 6	15 6	60 6	250 6	0 6	15 6	60 6	250 6
<b>Kidney</b>									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		3	0	0	2	4	0	0	5
Dilatation, tubular, cystic		1	0	0	1	0	0	0	0
minimal		1	0	0	1	0	0	0	0
Regeneration, tubular		1	0	0	3	2	0	0	0
minimal		1	0	0	3	2	0	0	0
Mineralization, medullary		1	0	0	2	0	0	0	1
minimal		1	0	0	2	0	0	0	1
<b>Liver</b>									
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6
Not remarkable		2	2	1	0	0	0	0	0
Microgranuloma		4	4	1	3	6	6	6	5
minimal		4	4	1	3	6	6	6	5
Hypertrophy, hepatocyte,									
centrilobular		0	0	5	6	0	0	6	6
minimal		0	0	5	0	0	0	6	0
mild		0	0	0	6	0	0	0	6
<b>Lung(bronchus)</b>									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		5	0	0	5	5	0	0	6
Cell infiltration		1	0	0	0	0	0	0	0
minimal		1	0	0	0	0	0	0	0
Accumulation, foamy cell		0	0	0	1	1	0	0	0
minimal		0	0	0	1	1	0	0	0
<b>Lymph node, mesenteric</b>									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
<b>Lymph node, submandibular</b>									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
<b>Ovary</b>									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6
<b>Parathyroid</b>									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	5
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	5
No sample		0	0	0	0	0	0	0	1
<b>Pituitary</b>									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
<b>Prostate</b>									
Number examined		6	0	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		3	0	0	3	-	-	-	-
Cell infiltration, ventral lobe		2	0	0	3	-	-	-	-
minimal		2	0	0	3	-	-	-	-
Cell infiltration, dorsolateral lobe		1	0	0	0	-	-	-	-
minimal		1	0	0	0	-	-	-	-
<b>Sciatic nerve</b>									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
<b>Skeletal muscle, femoral</b>									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6

-: Not applicable

Table 10-3

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Histopathological findings (Main group)

Organs	Sex:	M	M	M	M	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 6	15 6	60 6	250 6	0 6	15 6	60 6	250 6
Spinal cord, thoracic									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Spleen									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Stomach									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Testis									
Number examined		6	1	0	6	-	-	-	-
Not remarkable		5	0	0	5	-	-	-	-
Atrophy, seminiferous tubular		1	1	0	1	-	-	-	-
minimal		1	0	0	0	-	-	-	-
moderate		0	1	0	0	-	-	-	-
severe		0	0	0	1	-	-	-	-
Thymus									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Thyroid									
Number examined		6	6	6	6	6	6	6	6
Not remarkable		2	2	5	2	2	4	3	4
Ectopic thymus		1	1	0	0	1	1	2	1
minimal		1	1	0	0	1	1	2	1
Cyst, ultimobranchial		4	4	0	2	4	1	1	1
minimal		4	4	0	2	4	1	1	1
Hypertrophy, follicular cell		0	0	1	3	0	0	0	2
minimal		0	0	1	3	0	0	0	2
Trachea									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Urinary bladder									
Number examined		6	0	0	6	6	0	0	6
Not remarkable		6	0	0	6	6	0	0	6
Uterus									
Number examined		-	-	-	-	6	0	0	6
Not remarkable		-	-	-	-	6	0	0	6

-: Not applicable

Table 10-4

A 28-day oral toxicity study of 2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol in rats with a recovery period of 2 weeks  
 Histopathological findings (Recovery group)

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 6	M 250 6	F 0 6	F 250 6
<b>Kidney</b>					
Number examined		1	0	0	0
Dilatation, pelvic		1	0	0	0
mild		1	0	0	0
Regeneration, tubular		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Mineralization, medullary		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
<b>Liver</b>					
Number examined		6	6	6	6
Not remarkable		1	1	0	0
Necrosis, focal		0	1	0	0
mild		0	1	0	0
Microgranuloma		5	5	6	6
minimal		5	5	6	6
<b>Thyroid</b>					
Number examined		6	6	6	6
Not remarkable		4	3	3	4
Cyst, ultimobranchial		2	3	3	2
minimal		2	3	3	2