

最 終 報 告 書

2,5-ジメチル-2,5-ジ (tert-ブチルペルオキシ) ヘキサンのラットを用いる
28日間反復経口投与毒性試験
(試験番号 : 05-233)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目 次

要約	1 頁
目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 動物および飼育条件	2
3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法	3
4. 観察および検査	4
1) 一般状態観察	4
2) 機能観察総合検査	4
3) 体重および摂餌量	5
4) 尿検査	5
5) 血液学検査	6
6) 血液生化学検査	6
7) 剖検および器官重量	7
8) 病理組織学検査	7
5. 統計解析	8
結果	9
1. 一般状態および死亡	9
2. 詳細な臨床観察	9
3. 感覚機能検査	9
4. 握力および自発運動量	9
5. 体重	9
6. 摂餌量	9
7. 尿検査	10
8. 血液学検査	10
9. 血液生化学検査	10
10. 剖検	11
11. 器官重量	11

12. 病理組織学検査	11
考察	13
文献	16

A 図・群別平均値表

Figures 1, 2	体重	1
Tables 1, 2	一般状態および死亡率	3
Tables 3, 4	詳細な臨床観察	5
Tables 5, 6	感覚反射機能検査	19
Tables 7, 8	握力および自発運動量	23
Tables 9, 10	体重	27
Tables 11, 12	摂餌量	29
Tables 13, 14	尿検査	31
Tables 15, 16	血液学検査	35
Tables 17, 18	血液生化学検査	39
Tables 19, 20	剖検	43
Tables 21, 22	器官重量	45
Tables 23, 24	病理組織学検査	49

要 約

2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンについて、その反復投与毒性を検討するため、本物質を1群雌雄各5匹のSD系ラットに、0(媒体として用いたオリブ油のみ投与)、40、200および1000mg/kg/dayの用量、で28日間経口投与した。現れる変化の可逆性を調べるため、0および1000mg/kg/dayでは、投与終了後14日間の回復期間を設けたサテライト群を別に設けた。

投与直後の流涎が、200mg/kg群の雄および1000mg/kg群の雌雄に認められた。1000mg/kg群で、雄に投与期間中の体重増加量および投与28日の体重の低値が認められた。血液学検査では、1000mg/kg群で、雄雌に血色素量および活性化部分トロンボプラスチン時間の延長、雄にヘマトクリット値の低値、網状赤血球数および血小板数の高値並びにプロトロンビン時間の延長が認められた。血液生化学検査では、1000mg/kg群で、雌雄に γ -GTP活性の高値、雄にA/G比およびカリウム濃度の高値並びにトリグリセライド濃度の低値、雌にALT活性および総コレステロール濃度の高値が認められた。器官重量では、200mg/kg群で、雌に肝臓の絶対および相対重量の高値、1000mg/kg群では、雌雄に肝臓および甲状腺の絶対および相対重量の高値、雄に腎臓および副腎の相対重量の高値が認められた。病理組織学検査では、肝臓の肝細胞肥大および甲状腺の濾胞上皮細胞過形成が、1000mg/kg群の雌雄に認められた。また雄では、腎臓の近位尿細管上皮に好酸性小体の出現が200mg/kg以上の群、さらに1000mg/kg群には硝子滴および好塩基性尿細管の増加が認められ、雄ラット特有の α -2u-グロブリン腎症であることが α -2u-グロブリン免疫染色により確認された。さらに、1000mg/kg群の雄で、副腎の脂質症並びに脾臓の鬱血および髓外造血亢進傾向が認められた。これら投与期間中の観察あるいは投与期間終了時の検査で認められた変化は、回復期間中の観察あるいは回復期間終了時の検査では回復あるいは回復傾向にあることが確認された。また、遅発的な毒性影響は認められなかった。

以上の結果から、2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンのラットへの28日間反復経口投与において、雄は1000mg/kg群で肝臓、甲状腺、血液、副腎、脾臓などに対する影響が、また雌は200mg/kg群で肝臓に対する影響が認められた。無影響量(NOEL)および無毒性量(NOAEL)は、雄で200mg/kg/day、雌で40mg/kg/dayと結論された。

目的

2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンをラットに 28 日間経口投与し、本物質の反復投与毒性について検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質として用いた 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサン (CAS 番号 78-63-7) は、水に難溶、常温で透明な液体である。試験には、

入手して、冷暗所(2~6°C)，

密封下で保管し、使用した。保管した被験物質は投与終了後に、東京化成株式会社において分析 (GC 法) し、安定であったことを確認した。本物質の特性は、Appendix 1 に示す。

被験物質は、局方オリブ油 (宮澤薬品株式会社、ロット番号 BA26) を用いて、所定の投与用量になる濃度に懸濁し、投与液とした。被験物質調製液の安定性を調べた結果、7 日間保管しても安定性がある (初期値の 80% 以上) ことが確認された (Appendix 2) ので、投与液は、週 1 回調製して 1 日の使用量に小分けし、使用時まで冷所 (2~6°C)・遮光下で保管した。さらに、投与液の濃度確認として、初回に調製したそれぞれ 0.8、4.0 および 20 w/v% 溶液について分析し、所定の濃度で調製されていることを確認した (Appendix 3)。

2. 動物および飼育条件

動物は、SD 系 [Crl : CD(SD)] ラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター (神奈川県厚木市下古沢 795) から 4 週齢のものを搬入 (雌雄各 36 匹) し、雄で 7 日間、雌で 8 日間試験環境に馴化させ、その間に検疫を行い、発育が順調で、一般健康状態が良好な雌雄各 30 匹を、5 週齢で試験に用いた。

ラットは、温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数 10 回以上／時 (オールフレッシュユエア方式)、照明 12 時間／日 (午前 7 時点灯、午後 7 時消灯) に設定したバリアーシステム動物室 (第 5 室) で、個体別にステンレス製金網ケージ [260W × 380D × 180 H(mm)] に収容し、これをステンレス製 5 段のラックに配置して飼育した。飼料 (固

型飼料ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社、ロット番号 060659, 060873) および飲料水 (孔径 1 μm のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水) は、それぞれ給餌器および自動給水装置により、自由に摂取させた。

動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札の貼付並びに耳パンチ法により行った。

飼育期間中、動物室の温度は 22.2~22.8°C、湿度は 54~62% の範囲で推移 (Appendix 4) し、また飼料の汚染物質の分析結果 (Appendix 5) は、米国環境保護庁有害物質規正法の「飼料および媒体の汚染物質限度 (1979)」等を参考にして当研究所が設定した基準の許容範囲内にあり、飲料水は水道法に基づく水質基準に適合する (Appendix 6) ことが確認された。従って、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化は、なかったものと判断された。

本試験は、動物実験を科学的観点および倫理的な配慮の下に実施するために遵守すべき事項などを定めた、「財団法人 畜産生物科学安全研究所の動物実験実施規定」に従い、本施設の動物実験委員会の承認を得て行った。

3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

投与量設定試験として、1 群雌雄各 4 匹の SD 系 [Crl : CD(SD)] ラットに、被験物質を 0 (溶媒対照、局方オリブ油), 50, 100, 500 および 1000 mg/kg/day で 14 日間経口投与し、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、剖検、器官重量の測定を行った。その結果、500 mg/kg 以上の群で雌雄に肝臓重量、活性化部分トロンボプラスチン時間および γ -GTP のいずれも高値、雌に流涎、貧血所見並びにプロトロンビン時間の低値、さらに 1000 mg/kg 群では雄にも流涎が認められたほか、雌雄に血清 ALT の高値、雄に体重増加抑制が認められた。以上の結果から、本試験における投与量については、確実に反復投与毒性が発現すると予測される 1000 mg/kg/day を最高用量、毒性影響が発現しないと予測される 40 mg/kg/day を最低用量とし、これらの用量の間に 200 mg/kg/day の計 3 用量を設定した。現れる毒性変化の可逆性を調べる目的で投与終了後 14 日間の回復試験を行なうために、対照と 1000 mg/kg/day の群にはサテライト群を別に設けた。

試験群の構成は、①媒体投与群 (以下、対照群)、②対照群の回復群 (サテライト群)、

③被験物質の 40 mg/kg/day 投与群（40mg/kg 群）、④同 200 mg/kg/day 投与群（200 mg/kg 群）、⑤同 1000 mg/kg/day 投与群（1000 mg/kg 群）および⑥1000 mg/kg 群の回復群（サテライト群）の 6 群で、各群の動物数は雌雄各 5 匹とした。

動物の群分けは、投与開始前日に行った。健常と判断された動物について、雌雄それぞれ全動物の体重の平均値に近いものから必要数を選別し、体重により層別化した後、動物を無作為に各群に振り分け、各群の体重分布が均一となるようにした。投与開始時の平均体重(体重範囲)は、雄 152(144～170)g、雌 133(127～146)g であった。

投与方法は、投与液の液量を体重 1 kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、1 日 1 回（午前中 9：00～11：45）、28 日間にわたって、胃内に経口投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。対照群には、媒体として用いた局方オリブ油を同様に投与した。

4. 観察および検査

観察期間は、投与開始前日から投与期間の 28 日間およびサテライト群ではそれに続く回復期間の 14 日間とし、次の観察および検査を実施した。

1)一般状態観察

全例について、毎日、投与期間においては投与前、投与直後、投与後概ね 30 分～1 時間および 4 時間以降の 4 回、回復期間においては少なくとも 1 回、動物の生死、外観、行動などについて観察した。

2)機能観察総合検査

(1)詳細な臨床観察

サテライト群も含めて、投与開始前日およびその後は週 1 回、ケージからの出し易さ、ケージから出す時の扱い易さ、体躯緊張（弛緩～強直）、皮膚（色）、毛並み、立毛、眼・鼻分泌物、眼瞼閉鎖状態、眼球突出、流涙、流涎、下腹部被毛の尿による汚れ、肛門周囲の便による汚れ、発声、呼吸、姿勢、痙攣、振戦、探索行動（覚醒度）、歩行（よろめき）、異常行動（自咬、後ろ向き歩行など）、常同行動（過度の毛繕い、反復旋回運動など）、排尿および排糞について、ケージサイドに加えて、ケージから出す時およびケージ外のアルミ製オープンフィールド（370W×560D×40Hmm）で観察し、認められた変化を評点（Appendix 7）で記録した。動物には無作為化法で観察番号を付け、観

察者以外の者が群や動物番号を表示したケージの標識札を観察番号のみ表示した標識札に替え、観察者は観察番号順に観察を行うことにより、投与内容が不明な状態で観察した。

(2)感覚機能検査

投与期間終了時解剖動物は投与 4 週およびサテライト群については回復 2 週に、聴覚反応（ピンセットで軽くケージを叩く音に対する驚愕反応）、視覚反応（顔面に棒を近づけた場合の接近反応）、触覚反応（腰部に触れた場合の反応）、耳介反射（耳介に触れた場合の耳介の反射）、痛覚反応（尾根部をピンセットで摘んだ場合の逃避、発声などの反応）、瞳孔反射（光に対する瞳孔の反応）、同側屈筋反応（後肢の足趾をピンセットで摘んだ場合の屈筋の反応）、眼瞼反射（眼瞼に接触した場合の眼瞼の反応）および正向反射（面上で動物を背臥位にした場合の正常姿勢にもどる反応）を調べ、認められた反応を評点（Appendix 8）で記録した。

(3)握力および自発運動量

投与期間終了時解剖動物は投与 4 週およびサテライト群については回復 2 週に、自発運動量（自発運動量測定装置、SUPERMEX、室町機械株式会社、動物が発する遠赤外線をセンサーが感知し、測定装置内の区画間の 60 分間における移動回数を測定）並びに前肢および後肢の握力（ラット・マウス用握力測定装置、MK-380R/FR、室町機械株式会社）を測定した。

3)体重および摂餌量

体重は、投与 1（投与開始直前）、7、14、21 および 28 日、回復 7 および 14 日並びに屠殺日に測定し、投与期間中の体重増加量を算出した。摂餌量は、毎週 1 回、雄は投与 5、12、19 および 26 日並びに回復 5 および 12 日、雌は投与 4、11、18 および 25 日並びに回復 4 および 11 日に、翌日までの 24 時間の摂餌量（飼料消費量）を測定した。

体重および摂餌量測定の測定には、電子天秤（FY-3000、エー・アンド・ディ株式会社）を用いた。

4)尿検査

投与期間終了時解剖動物は投与 4 週およびサテライト群については回復 2 週に実施した。まず腰部を刺激して新鮮尿を採取し、色調および濁度の観察、試験紙法（マルティスティックス、バイエルメディカル株式会社）による pH、潜血、タンパク、糖、ケト

ン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンの定性的検査を行った。さらに、代謝ケージに約3時間収容して得られた蓄尿について尿沈渣の検査をURI-CELL液（ケンブリッジケミカルプロダクト社）で染色して鏡検し、18時間収容して得られた蓄尿を用いて尿量（メスシリンダー）および比重（屈折計、エルマ光学株式会社）を測定した。

5) 血液学検査

投与期間および回復期間終了の翌日に、エーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より採血した。動物は前日の午後5時より除餌し、水のみを給与した。採取した血液は3分割し、その一部はEDTA-2Kで凝固阻止処理し、多項目自動血球計数装置（XT-2000iV、システムックス株式会社）により、赤血球数（電気抵抗検出法）、血色素量（ラウリル硫酸ナトリウム-ヘモグロビン法）、ヘマトクリット値（赤血球パルス高値検出法）、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度（以上、計算値）、血小板数（電気抵抗検出法）、白血球数、網状赤血球数および白血球百分率（以上、フローサイトメトリー法）を測定した。また、血液の一部を3.8%クエン酸ナトリウム液で凝固阻止処理して血漿を遠心分離し、血液凝固自動測定装置（KC-10A、米国アメルング社）により、プロトロンビン時間（Quick一段法）および活性化部分トロンボプラスチン時間（エラジン酸活性化法）を測定した。

6) 血液生化学検査

採取した血液の一部から血清を遠心分離し、生化学自動分析装置（JCA-BM8型クリナライザー、日本電子株式会社）により、総タンパク（ビューレット法）、アルブミン（BCG法）、A/G比（計算値）、血糖[酵素法（Glu¹⁾-G-6-PDH²⁾-UV系]、総コレステロール[（酵素法（CES³⁾-CO⁴⁾-POD⁵⁾系]、トリグリセライド[酵素法（LPL⁶⁾-GK⁷⁾-GPO⁸⁾-POD⁵⁾系]、総ビリルビン（ジアゾ法）、尿素窒素（ウレアーゼ・UV法）、クレアチニン（Jaffe法）、AST、ALT、ALP（以上、JSCC⁹⁾法）、γ-GTP（SSCC法¹⁰⁾、LDH（SFBC¹¹⁾法）、カルシウム（OCPC法）および無機リン[酵素法（PNP¹²⁾-XOD¹³⁾-POD⁵⁾系]を、また電解質自動分析装置（NAKL-132、東亜電波工業株式会社）により、ナトリウム、カリウムおよび塩素（以上、イオン電極法）を測定した。

測定法の注釈：¹⁾：グルコキナーゼ、²⁾：グルコース-6-リン酸脱水素酵素、³⁾：コレステロールエステラーゼ、⁴⁾：コレステロールオキシダーゼ、⁵⁾：ペルオキシダーゼ、⁶⁾：リポプロテインリパーゼ、⁷⁾：グリセロールキナーゼ、⁸⁾：L-α-グリセロリン酸オキシダーゼ、⁹⁾：日本臨床化学

会, ¹⁰⁾: スカンジナビア臨床化学会, ¹¹⁾: フランス臨床生物学会, ¹²⁾: プリンスクレオシドホス
フォリラーゼ, ¹³⁾: キサンチンオキシダーゼ

7)剖検および器官重量

所定の投与期間および回復期間終了翌日の採血に続いて放血屠殺し, 体表, 開口部粘膜および内部諸器官を肉眼的に観察した。また, 脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓さらに雄では精巣, 精巣上体, 雌では卵巣(絶対重量)し, 屠殺日の体重に基づいて対体重比(相対重量)を算出した。なお, 対器官は左右を一括して, 下垂体および甲状腺は固定後に秤量した。

8)病理組織学検査

全例について下記器官を採取し, 10%中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巣, 精巣上体はブアン液で前固定)で固定し, 保存した。

脳(大脳, 小脳, 橋を含む), 眼球, 下垂体, 甲状腺(上皮小体を含む), 脊髄(頸部, 胸部, 腰部), 心臓, 気管および肺(固定液を注入後浸漬), 肝臓, 腎臓, 胸腺, 脾臓, 副腎, 胃および腸(十二指腸から直腸, バイエル板を含む), 生殖器(精巣又は卵巣), 副生殖器(子宮, 膀胱又は前立腺, 精巣上体, 精囊), 膀胱, 坐骨神経, リンパ節(下頸リンパ節, 腸間膜リンパ節), 骨髄(大腿骨)

病理組織学検査は, 対照群および1000 mg/kg群の脳(大脳, 小脳, 橋を含む), 眼球, 下垂体, 甲状腺(上皮小体を含む), 脊髄(頸部, 胸部, 腰部), 心臓, 気管, 肺, 肝臓, 腎臓, 胸腺, 脾臓, 副腎, 胃, 腸(十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, バイエル板を含む), 生殖器(精巣又は卵巣), 副生殖器(子宮, 膀胱又は前立腺, 精巣上体, 精囊), 膀胱, 坐骨神経, リンパ節(下頸リンパ節, 腸間膜リンパ節), 骨髄(大腿骨)および肉眼的異常部位について実施した。1000 mg/kg群の検査で被験物質の投与に起因する変化が, 雌雄の肝臓および甲状腺並びに雄の腎臓, 副腎および脾臓に認められたので, 40および200 mg/kg群並びにサテライト群については雌雄の肝臓および甲状腺並びに雄の腎臓, 副腎および脾臓の検査を実施した。検査は, 常法に従ってパラフィン切片を作製し, H-E染色を施して鏡検した。また, 雄の一部の腎臓については沈着物を同定するため, α 2u-グロブリン免疫染色も行った。

5. 統計解析

パラメトリックデータ（握力・自発運動量・体重・体重増加量・摂餌量・尿量・尿比重・血液学検査データ・血液生化学検査データ・器官重量）については、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群が3群以上の場合は、Bartlettの分散検定を行い、その結果分散が一様な場合は一元配置の分散分析を行った。分散が一様でない場合およびノンパラメトリックデータ（白血球百分率・尿の定性的検査）は Kruskal-Wallis の順位検定を行った。それらの結果有意差を認めた場合、Dunnettないし Dunnett 型の検定法により多比重比較を行った。試験群が2群の場合は、パラメトリックデータについて F 検定を行い、その結果分散が一様な場合は Student の t 検定を、一様でない場合は Aspin-Welch の t 検定を行った。また、ノンパラメトリックデータは、Mann-Whitney の U 検定を行った。カテゴリカルデータ（一般状態の観察・詳細な臨床観察・感覚機能検査・剖検・病理組織学検査における異常例の発現率）には Fisher の直接確率法を用いた。有意水準は、いずれの検定法も 5%とした。

結 果

1. 一般状態および死亡 (Tables 1, 2, Appendices 9, 10)

投与期間および回復期間中において、死亡は認められなかった。

一般状態の変化として、投与期間中に流涎が、200 mg/kg で雄の 1/5 匹および 1000 mg/kg 群で雄の 9/10 匹、雌の 7/10 匹に観察され、1000 mg/kg 群の雌雄の発現率には有意差が認められた。流涎は投与直後から認められ、涎により湿潤した口周囲被毛は、概ね投与後 30 分には乾燥した。

回復期間においては、一般状態の変化は認められなかった。

2. 詳細な臨床観察 (Tables 3, 4, Appendices 11, 12)

投与期間および回復期間中の観察で、各項目に有意な変化は認められなかった。

3. 感覚機能検査 (Tables 5, 6, Appendices 13, 14)

投与期間中および回復期間中の検査で、各項目に有意な変化は認められなかった。

4. 握力および自発運動量 (Tables 7, 8, Appendices 15, 16)

投与期間中および回復期間中の検査で、握力および自発運動量ともに有意な変化は認められなかった。

5. 体重 (Figures 1, 2, Tables 9, 10, Appendices 17, 18)

投与期間中において、1000 mg/kg 群の雄の体重は対照群を下回って推移する傾向が認められ、投与 28 日の体重および投与期間中の体重増加量に有意差が認められた。雌の体重に変化は認められなかった。

回復期間においては、1000 mg/kg 群の雄の体重は対照群と概ね平行ないしやや回復する傾向で推移し、雌雄の体重および体重増加量に、有意な変化は認められなかった。

6. 摂餌量 (Tables 11, 12, Appendices 19, 20)

投与期間中および回復期間中の各測定時点とも、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。投与 2 週の測定において、1000 mg/kg 群の雌の測定値に有意な高値

が認められたが、平均値が対照群 18 g に対して、1000 mg/kg 群 20 g と僅かな差で、他の測定日では有意差は認められず、当該測定時点の対照群の各個体値のバラツキが小さかったことによる、偶発的変化と考えられた。

7. 尿検査 (Tables 13, 14, Appendices 21, 22)

投与期間中および回復期間中の検査で、各項目に有意な変化は認められなかった。

8. 血液学検査 (Tables 15, 16, Appendices 23, 24, 背景データ Appendices 31, 32)

投与期間終了時屠殺動物において、1000 mg/kg 群で雄に、血色素量およびヘマトクリット値の有意な低値、網状赤血球数および血小板数の有意な高値並びに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が認められた。1000 mg/kg 群の雌においても、血色素量の有意な低値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が認められた。また、1000 mg/kg 群の雌のプロトロンビン時間および 40 mg/kg 群の雌の白血球数に有意な短縮あるいは低値が認められた。

回復期間終了時屠殺動物において、1000 mg/kg 群の雌雄に血色素量および平均赤血球血色素濃度の有意な低値、さらに雌には赤血球数およびヘマトクリット値の有意な低値が認められた。

9. 血液生化学検査 (Tables 17, 18, Appendices 25, 26, 背景データ Appendices 31, 32)

投与期間終了時屠殺動物において、1000 mg/kg 群で、雌雄に γ -GTP 活性の有意かつ明らかな高値（雄で対照群の約 15 倍、雌で約 25 倍）、雄に A/G 比およびカリウム濃度の有意な高値並びにトリグリセライドの有意な低値、雌に ALT 活性および総コレステロール濃度の有意な高値が認められた。他に、40 mg/kg 群で雄に総コレステロール濃度の有意な低値が認められた。

回復期間終了時屠殺動物においては、1000 mg/kg 群で投与期間終了時屠殺動物に認められた変化のうち、雌に総コレステロールの有意な高値が認められたが、対照群との変動幅は縮小する傾向にあり、またその他の変化は認められなかった。回復期間終了時屠殺動物では投与期間終了時屠殺動物で認められなかった総ビリルビン濃度の有意な

高値が雄に、ALP 活性およびクレアチニン濃度の有意な低値が雌に認められた。

10.剖検 (Tables 19, 20, Appendices 27, 28)

投与期間終了時屠殺動物において、肝臓の大型化が 200 mg/kg 群で雌の 2 匹、1000 mg/kg 群で雄の 4 匹および雌の 5 匹に認められ、1000 mg/kg 群の雌雄の発現率に有意差が認められた。

回復期間終了時屠殺動物では、変化は認められなかった。

11.器官重量 (Tables 21, 22, Appendices 29, 30)

投与期間終了時屠殺動物において、1000 mg/kg 群で雌雄に肝臓および甲状腺の絶対および相対重量に共通した有意な高値が認められ、雌では、200 mg/kg 群においても肝臓の絶対および相対重量の有意な高値が認められた。また、雄では 1000 mg/kg 群で、解剖時体重の有意な低値並びに脳、腎臓、副腎および精巣の相対重量の有意な高値が認められた。

回復期間終了時屠殺動物においては、1000 mg/kg 群の雄で、心臓、腎臓および甲状腺の相対重量の有意な高値、雌に甲状腺の絶対および相対重量並びに肝臓の相対重量の有意な高値が認められたが、投与期間終了時において認められなかった心臓の変化を除いて、いずれも対照群との変動幅は縮小し、回復傾向が認められた。

12.病理組織学検査 (Tables 23, 24, Appendices 27, 28)

投与期間終了時屠殺動物において、被験物質の投与に起因する変化が、雌雄の肝臓および甲状腺、さらに雄の腎臓、副腎および脾臓に認められた。肝臓では、瀰漫性の肝細胞肥大が 1000 mg/kg 群で雌雄の各 5 匹に認められ、変化の程度は用量相関的に増強する傾向にあった。甲状腺では、濾胞上皮細胞の瀰漫性過形成が 1000 mg/kg 群で雌雄各 5 匹に認められた。1000 mg/kg 群における肝臓の肝細胞肥大および甲状腺の濾胞上皮細胞過形成の発現率には、雌雄とも有意差が認められた。これらの変化に加えて雄ではさらに、腎臓に、近位尿細管上皮の好酸性小体が 200 mg/kg 群で 4 匹および 1000 mg/kg 群で 4 匹に認められ、両群の発現率に有意差が認められた。さらに、近位尿細管上皮の硝子滴および好塩基性尿細管は対照群においても認められたが、1000 mg/kg 群では変化の有意な増強が認められた。好酸性小体および硝子滴とも α -2u-グロブリン免疫染色

陽性で、 α -2u-グロブリンの沈着像であることが確認された。また、1000 mg/kg 群の雄で、副腎の脂質症が 4 匹に認められ、その発現率には有意差が認められた。さらに、1000 mg/kg 群の雄で、発現率に有意差は認められなかったものの、脾臓に鬱血が 2 匹およびに髄外造血の亢進傾向が認められた。

回復期間終了時屠殺動物においては、投与期間終了時屠殺動物で認められた変化のうち、副腎の変化は認められなかった。肝臓および甲状腺の変化については、肝細胞肥大が雌の 2 匹、甲状腺の濾胞上皮胞細胞過形成が雌雄の各 1 匹に認められたのみで、明らかな回復傾向が確認された。腎臓においては、近位尿細管上皮の硝子滴および好酸性小体は対照群と同程度に回復した。好塩基性尿細管は、投与期間終了時屠殺動物で 5 匹に認められたのと同程度の変化が 4 匹に認められた。脾臓においては、鬱血は認められず、髄外造血の亢進も回復する傾向にあった。

以上の被験物質の投与に起因する変化のほかに、対照群にのみ、あるいは対照群と被験物質投与群に共通して、肺の骨化生が雌雄に、動脈壁鉱質沈着が雌に、心臓の心筋変性・線維化が雄に、肝臓の微小肉芽腫が雌雄に、巣状壊死が雌に、腎臓の皮質リンパ球浸潤および皮質線維化が雄に、胸腺の出血が雄に、甲状腺の鰓囊遺残が雌雄に、いずれも低い発現率で認められた。また、雌雄の脾臓の髄外造血および褐色色素沈着が高い発現率で認められたが、1000 mg/kg 群における発現率や変化の程度に対照群と差は認められなかった。1000 mg/kg 群にのみ、肺の泡沢細胞集簇が雄の 2 匹および前立腺のリンパ球間質浸潤が 1000 mg/kg 群の雄 1 匹に認められた。また、肝臓の門脈域肝細胞脂肪変性が 40 および 200 mg/kg 群の雌の各 1 匹、腎臓の孤立性囊胞が 40 mg/kg の雄および 1000 mg/kg 群の雌雄の各 1 匹に認められた。これらはいずれも発現率が低く、ラットに自然発生的に認められる変化¹⁾であることから、被験物質の投与とは無関係な自然発生病変と判断された。

考 察

2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの反復投与毒性を検討するために、本物質をラットに 0, 40, 200 および 1000 mg/kg/day の用量で 28 日間経口投与した。

本被験物質による主な毒性としては、雌雄の甲状腺、肝臓および血液並びに雄の腎臓、副腎および脾臓に対する影響が認められた。

甲状腺に対する影響について、甲状腺の絶対および相対重量の高値並びに病理組織学検査で甲状腺の濾胞上皮細胞の過形成が 1000 mg/kg 群の雌雄に認められた。

化学物質の投与による甲状腺の濾胞上皮細胞過形成は、一般に血中甲状腺ホルモン濃度の低下に伴って発現することが多く、このことがネガティブ・フィードバック機構により下垂体あるいは視床下部を介して甲状腺機能に対して促進的に作用すると考えられている¹⁾。特にげっ歯類はサイロキシン結合グロブリンが欠如するため、血漿タンパクと結合した T₃/T₄ が少なく、T₃/T₄ の半減期も短いため、血中レベルがヒトと比べて減少しやすい²⁾。

本被験物質による甲状腺に対する影響も、後述の酵素誘導を伴うと考えられる肝臓に対する影響と関連して血中甲状腺ホルモン濃度が低下し、発現しているものと考えられる。

肝臓に対する影響について、肝臓の絶対および相対重量の高値並びに病理組織学検査で肝細胞の肥大が 1000 mg/kg 群の雌雄に認められた。

フェノバルビタールのラットへの投与により、肝臓における重量の増加および肝細胞の肥大、γ-GTP 活性の上昇、血中甲状腺ホルモン濃度の低下、甲状腺重量の増加および濾胞上皮細胞の過形成などが発現することが知られており、フェノバルビタールによる血中甲状腺ホルモン濃度の低下は、肝臓における酵素誘導により甲状腺ホルモンの代謝分解が促進されることによると考えられている³⁾。

本試験において認められた肝細胞の肥大も、肝臓における酵素誘導を示唆する変化と考えられ、酵素誘導により甲状腺ホルモンの肝臓での代謝が促進され、その結果甲状腺ホルモンの血中濃度が低下し、甲状腺の形態的変化をもたらしたものと推察される。

なお、200 mg/kg 群での肝臓に対する影響は、肝機能に対する有害影響を示唆する変化を伴っていないが、1000 mg/kg 群では肝細胞の肥大に加えて、雌雄に γ-GTP 活性の

上昇および活性化部分トロンボプラスチン時間の延長、雄にプロトロンビン時間の延長およびA/G比の高値、雌にALT活性および総コレステロール濃度の高値が認められ、これらは肝機能に対する何らかの影響を示唆する変化と考えられた。これらの変化のなかでも、雌に認められたALT活性の高値は、肝障害を示唆する変化と考えられ、また γ -GTP活性の変化は雄で対照群の約15倍、雌で約25倍に達する顕著なものであった。

血液に対する影響について、1000 mg/kg群で、雄雌に血色素量、さらに雄にヘマトクリット値のいずれも低値が認められ、雄では網状赤血球数の高値を伴っていた。

これらの貧血所見と関連して、貧血傾向のより明らかであった雄において、病理組織学検査で脾臓に鬱血および髓外造血の亢進傾向、また血液生化学検査でカリウム濃度の高値が認められ、溶血性貧血の可能性が考えられた。

また、1000 mg/kg群の雄で認められた血小板数の高値は、貧血に対する反応性の変化としての造血亢進に伴う変化と推察される。

腎臓に対する影響について、雄の腎臓の近位尿細管上皮に、 α -2u-グロブリン免疫染色陽性好酸性小体の出現が200 mg/kg以上の群、さらに1000 mg/kg群には α -2u-グロブリン免疫染色陽性硝子滴および硝子滴の過剰形成により傷害された尿細管の再生過程の像と考えられる好塩基性尿細管が認められ、雄ラット特有の α -2u-グロブリン腎症と考えられた。

副腎に対する影響について、1000 mg/kg群で雄に副腎の相対重量の高値が認められ、病理組織学検査では副腎の脂質症が認められた。

副腎の脂質症は高齢ラットでは背景病変としてしばしば認められる変化である¹⁾。血液生化学検査でトリグリセライドの低値が認められ、脂質代謝に対する何らかの影響がうかがわれた。

1000 mg/kg群の雄に体重に対する影響が認められたが、毒性と関連した変化と考えられる。また、本被験物質はフリーラジカルのイニシаторとしての作用を有し⁴⁾、このことが前述の毒性発現に関与している可能性が考えられる。

なお、200 mg/kg群の雄および1000 mg/kg群の雌雄に認められた流涎については、投与直後に発現する一過性の変化で、被験物質の吸収による毒性影響と考え難く、機能観察総合検査においても、神経毒性を示唆する変化は認められなかったことから、毒性とは無関係な、投与液に対する忌避反応と判断された。

また、40 mg/kg 群で認められた雄の総コレステロール濃度の低値および雌の白血球数の低値について、変化に用量相関性は認められなかった。さらに、1000 mg/kg 群の雌で認められたプロトロンビン時間の短縮について、各個体値は背景データにおける基準値の範囲内の変化（Appendix 32 参照）で、関連する変化も認められなかった。従って、これらは被験物質の投与とは無関係な変化と判断された。

1000 mg/kg 群の雄に認められた脳および精巣の相対重量の高値についても、当該器官に病理組織学的变化は認められず、体重の低値に伴う見かけ上の変化と考えられた。

これら投与期間中の観察あるいは投与期間終了時の検査で認められた変化は、回復期間中の観察あるいは回復期間終了時の検査では回復あるいは回復傾向にあることが確認された。

ただし、貧血所見に関しては、回復期間終了時の検査においても、雌に赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値および平均赤血球血色素濃度の低値が認められ、被験物質の投与による影響が持続して認められた。雄では、貧血の程度は軽減する傾向にあった。従って、本被験物質による毒性は、可逆的であると判断された。

なお、回復期間終了時屠殺動物において、投与期間終了時の検査で認められなかった総ビリルビン濃度の高値が雄に、ALP 活性およびクレアチニン濃度の低値が雌に認められた。しかしながら、総ビリルビン濃度は背景データにおける基準値の範囲の変化（Appendix 31 参照）で、むしろ対照群の値が低値傾向にあった。また、ALP 活性およびクレアチニン濃度の低値は、毒性学的意義のない変化と考えられる。従って、これらは被験物質の遅発毒性を示唆する変化ではないと判断された。

以上の結果から、2,5-ジメチル-2,5-ジ（tert-ブチルペルオキシ）ヘキサンのラットへの 28 日間反復経口投与において、雄は 1000 mg/kg 群で肝臓、甲状腺、血液、副腎、脾臓等に対する影響毒が、また雌は 200 mg/kg 群で肝臓および甲状腺に対する影響が認められた。無影響量（NOEL）および無毒性量（NOAEL）は、雄で 200 mg/kg/day、雌で 40 mg/kg/day と結論された。

文 献

- 1) 日本毒性病理学会編：毒性病理組織学，435-440，日本毒性病理学会（2000）
- 2) S.Johnson; The effect on rat thyroid function of an hepatic microsomal enzyme inducer; *Hum Exp Toxicol.* 12, 153-158, 1993
- 3) B.A.Diwan; P-450 enzyme induction by 5-ethyl-5-phenyldantoin and 5,5-diethyhydantoin, analogues of barbiturate tumor promoters phenobarbital and barbital, and promotion of liver and thyroid carcinogenesis initiated by N-nitrosodiethylamine in rats; *Cancer Research* 48, 2492-2497, 1998
- 4) Y.Nabar et al; Production of starch foams by twin-screw extraction: effect of maleated poly(butylene adipate-co-terephthalate) as a compatibilizer; *Biomacromolecules* 2, 807-817, 2007

2,5-ジメチル-2,5-ジ (tert-ブチルペルオキシ) ヘキサンのラットを用いる
28日間反復経口投与毒性試験

(試験番号 : 05-233)

最終報告書 添付資料A
(図・群別平均値表)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

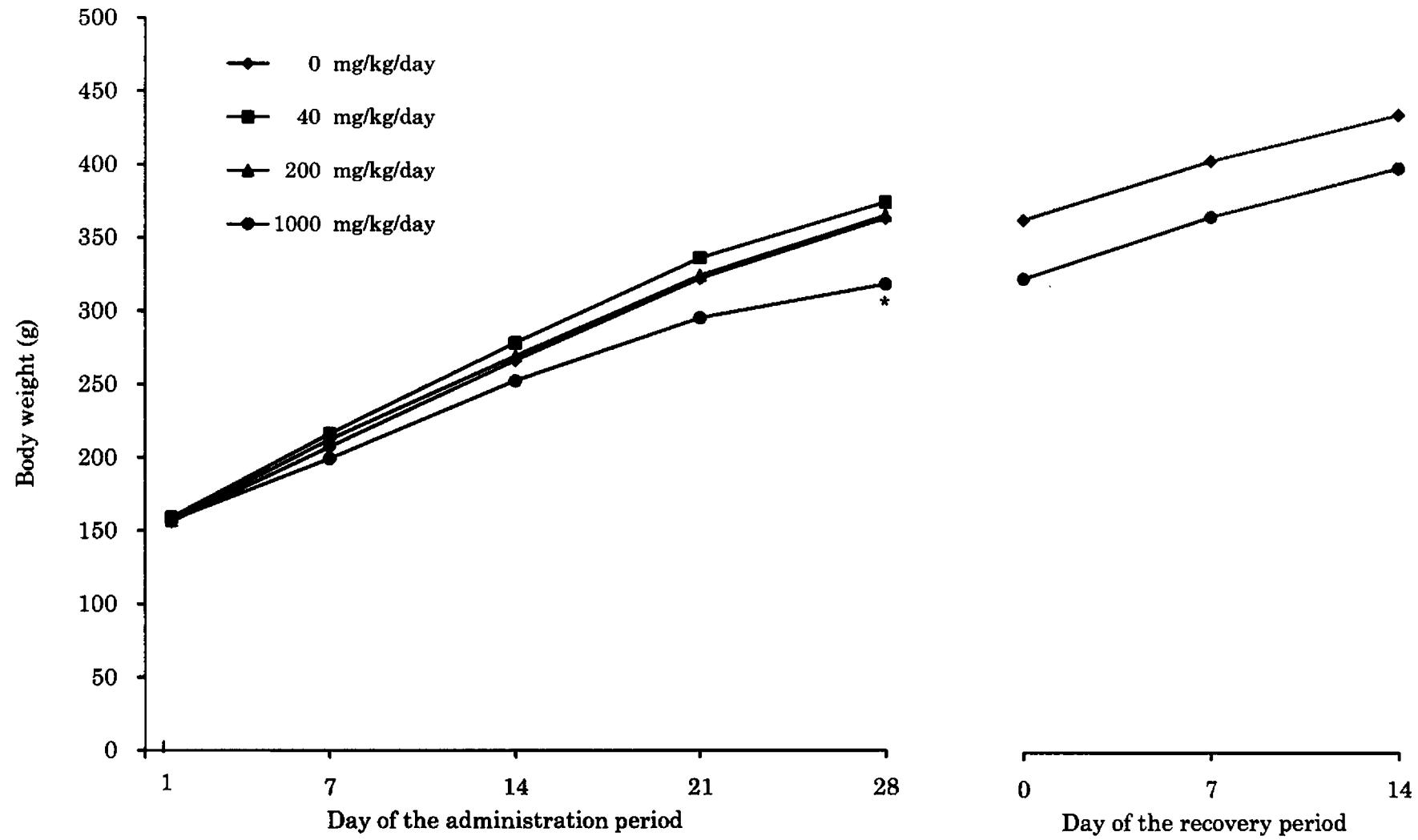


Fig.1

Body weight change of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

* : Significantly different from control at 5 % level of probability.

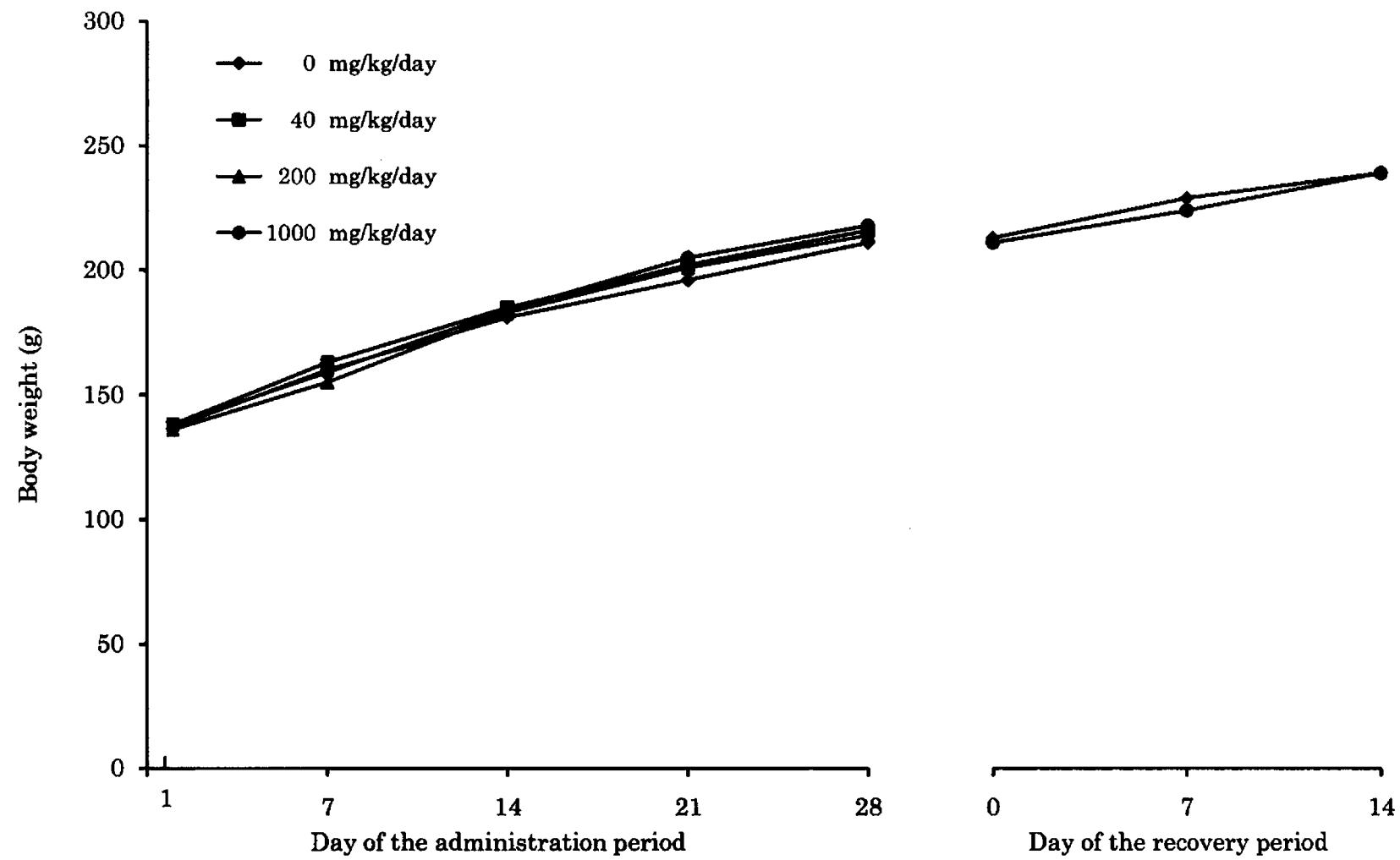


Fig.2 Body weight change of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Table 1 General conditions and mortality of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity

General conditions (Clinical signs)	Grade	No. of animals	Administration period						Recovery period			
			0			40		200			1000	
			KA	KR	Total	KA	KA	KA	KR	Total	KR	KR
Salivation	-		5	5	10	5	5	4	1	0	1	5
	+		0	0	0	0	1	4	5	9 **	0	0
Mortality (%)			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

KA : Killed by design at the end of administration period.

KR : Killed by design at the end of recovery period.

- : Negative.

+ : Slight.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 2 General conditions and mortality of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity

General conditions (Clinical signs)	Grade	No. of animals	Administration period									Recovery period		
			0			40			200			1000		
			KA	KR	Total	KA	KA	KA	KA	KR	Total	KR	KR	
Salivation	-		5	5	10	5	5	5	3	0	3	5	5	
	+		0	0	0	0	0	2	5	7 **	0	0	0	
	Mortality (%)			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

KA : Killed by design at the end of administration period.

KR : Killed by design at the end of recovery period.

- : Negative.

+ : Slight.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 3-1 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(Before the administration period)

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		9	4	5	9
	2 or more		1	1	0	1
Defecation	Color: Pale yellow	7/7	2/2	3/3	4/4	
	Not detected or 1	9	4	5	8	
	2 or more	1	1	0	2	
	Appearance:Normal	2/2	2/2	1/1	4/4	

Table 3-2 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 1 of the administration period)

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
Defecation	Color: Pale yellow	5/5	2/2	-	1/1	
	Not detected or 1	10	4	5	10	
	2 or more	0	1	0	0	
	Appearance:Normal	3/3	2/2	1/1	1/1	

Table 3-3 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 2 of the administration period)

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	4	5	10
	Temporally in handling		0	1	0	0
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		7	5	4	10
	2 or more		3	0	1	0
	Color: Pale yellow	5/5	1/1	1/1	3/3	
Defecation	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more	0	0	0	0	
	Appearance:Normal	2/2	1/1	-	1/1	

Table 3-4 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 3 of the administration period)

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected	9	5	5	9	
	Temporally in handling	1	0	0	1	
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1	8	5	5	10	
	2 or more	2	0	0	0	
	Color: Pale yellow	2/2	1/1	2/2	1/1	
Defecation	Not detected or 1	10	5	5	10	
	2 or more	0	0	0	0	
	Appearance:Normal	-	-	-	-	

Table 3-5 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 4 of the administration period)

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected	9	5	4	10	
	Temporally in handling	1	0	1	0	
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1	8	5	5	10	
	2 or more	2	0	0	0	
	Color: Pale yellow	2/2	1/1	1/1	-	
Defecation	Not detected or 1	10	3	5	10	
	2 or more	0	2	0	0	
	Appearance:Normal	2/2	3/3	-	-	

Table 3-6 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

⟨ On week 1 of the recovery period ⟩

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	1000
		No. of animals	5	5
Reactivity on removal from the cage	Normal		5	5
Reactivity on handling	Normal		5	5
Muscle tone	Normal		5	5
Skin	Normal		5	5
Fur	Normal		5	5
Piloerection	Not detected		5	5
Eye-nose discharge	Not detected		5	5
Palpebral closure	Not detected		5	5
Exophthalmos	Not detected		5	5
Lacrimation	Not detected		5	5
Salivation	Not detected		5	5
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		5	5
Blotted fur around anus with feces	Not detected		5	5
Vocalization	Not detected Temporally in handling		5 0	4 1
Breathing	Normal		5	5
Body position	Normal		5	5
Convulsion	Not detected		5	5
Tremor	Not detected		5	5
Exploration	Normal		5	5
Walk	Normal		5	5
Abnormal behavior	Not detected		5	5
Stereotypy	Not detected		5	5
Urination	Not detected or 1 2 or more Color: Pale yellow		4 1 1/1	5 0 1/1
Defecation	Not detected or 1 2 or more Appearance:Normal		5 0 -	5 0 1/1

Table 3-7 Incidence of clinical signs in detailed observation of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

⟨ On week 2 of the recovery period ⟩

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	1000
		No. of animals	5	5
Reactivity on removal from the cage	Normal		5	5
Reactivity on handling	Normal		5	5
Muscle tone	Normal		5	5
Skin	Normal		5	5
Fur	Normal		5	5
Piloerection	Not detected		5	5
Eye-nose discharge	Not detected		5	5
Palpebral closure	Not detected		5	5
Exophthalmos	Not detected		5	5
Lacrimation	Not detected		5	5
Salivation	Not detected		5	5
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		5	5
Blotted fur around anus with feces	Not detected		5	5
Vocalization	Not detected Temporally in handling		5 0	4 1
Breathing	Normal		5	5
Body position	Normal		5	5
Convulsion	Not detected		5	5
Tremor	Not detected		5	5
Exploration	Normal		5	5
Walk	Normal		5	5
Abnormal behavior	Not detected		5	5
Stereotypy	Not detected		5	5
Urination	Not detected or 1 2 or more Color: Pale yellow		3 2 3/3	4 1 2/2
Defecation	Not detected or 1 2 or more Appearance:Normal		5 0 -	4 1 1/1

Table 4-1 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(Before the administration period)

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	5	5	9
	2 or more		0	0	0	1
Defecation	Color: Pale yellow	4/4	-	2/2	4/4	
	Not detected or 1	10	5	5	9	
	2 or more	0	0	0	1	
	Appearance:Normal	1/1	-	-	1/1	

Table 4-2 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 1 of the administration period)

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
Defecation	Color: Pale yellow	2/2	-	-	-	1/1
	Not detected or 1	10	5	5	10	
	2 or more	0	0	0	0	
	Appearance:Normal	1/1	-	-	-	-

Table 4-3 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

⟨ On week 2 of the administration period ⟩

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		9	5	5	10
	2 or more		1	0	0	0
	Color: Pale yellow		1/1	-	1/1	-
Defecation	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Appearance:Normal		-	-	-	-

Table 4-4 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 3 of the administration period)

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacration	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	10
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Color: Pale yellow		-	1/1	-	-
Defecation	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Appearance:Normal		-	-	-	-

Table 4-5 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 4 of the administration period)

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000
		No. of animals	10	5	5	10
Reactivity on removal from the cage	Normal		10	5	5	10
Reactivity on handling	Normal		10	5	5	10
Muscle tone	Normal		10	5	5	10
Skin	Normal		10	5	5	10
Fur	Normal		10	5	5	10
Piloerection	Not detected		10	5	5	10
Eye-nose discharge	Not detected		10	5	5	10
Palpebral closure	Not detected		10	5	5	10
Exophthalmos	Not detected		10	5	5	10
Lacrimation	Not detected		10	5	5	10
Salivation	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		10	5	5	10
Blotted fur around anus with feces	Not detected		10	5	5	10
Vocalization	Not detected		10	5	5	9
	Temporally in handling		0	0	0	1
Breathing	Normal		10	5	5	10
Body position	Normal		10	5	5	10
Convulsion	Not detected		10	5	5	10
Tremor	Not detected		10	5	5	10
Exploration	Normal		10	5	5	10
Walk	Normal		10	5	5	10
Abnormal behavior	Not detected		10	5	5	10
Stereotypy	Not detected		10	5	5	10
Urination	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Color: Pale yellow		1/1	-	-	1/1
Defecation	Not detected or 1		10	5	5	10
	2 or more		0	0	0	0
	Appearance:Normal		-	-	-	-

Table 4-6 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

⟨ On week 1 of the recovery period ⟩

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	1000
		No. of animals	5	5
Reactivity on removal from the cage	Normal		5	5
Reactivity on handling	Normal		5	5
Muscle tone	Normal		5	5
Skin	Normal		5	5
Fur	Normal		5	5
Piloerection	Not detected		5	5
Eye-nose discharge	Not detected		5	5
Palpebral closure	Not detected		5	5
Exophthalmos	Not detected		5	5
Lacrimation	Not detected		5	5
Salivation	Not detected		5	5
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		5	5
Blotted fur around anus with feces	Not detected		5	5
Vocalization	Not detected		5	5
Breathing	Normal		5	5
Body position	Normal		5	5
Convulsion	Not detected		5	5
Tremor	Not detected		5	5
Exploration	Normal		5	5
Walk	Normal		5	5
Abnormal behavior	Not detected		5	5
Stereotypy	Not detected		5	5
Urination	Not detected or 1		5	5
	2 or more		0	0
	Color: Pale yellow		-	1/1
Defecation	Not detected or 1		5	5
	2 or more		0	0
	Appearance: Normal		-	-

Table 4-7 Incidence of clinical signs in detailed observation of female rats treated with
2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(On week 2 of the recovery period)

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	1000
		No. of animals	5	5
Reactivity on removal from the cage	Normal		5	5
Reactivity on handling	Normal		5	5
Muscle tone	Normal		5	5
Skin	Normal		5	5
Fur	Normal		5	5
Piloerection	Not detected		5	5
Eye-nose discharge	Not detected		5	5
Palpebral closure	Not detected		5	5
Exophthalmos	Not detected		5	5
Lacrimation	Not detected		5	5
Salivation	Not detected		5	5
Blotted fur in the lower abdomen with urine	Not detected		5	5
Blotted fur around anus with feces	Not detected		5	5
Vocalization	Not detected		5	5
Breathing	Normal		5	5
Body position	Normal		5	5
Convulsion	Not detected		5	5
Tremor	Not detected		5	5
Exploration	Normal		5	5
Walk	Normal		5	5
Abnormal behavior	Not detected		5	5
Stereotypy	Not detected		5	5
Urination	Not detected or 1		5	5
	2 or more		0	0
Defecation	Color:Pale yellow	1/1	-	-
	Not detected or 1		5	5
	2 or more		0	0
	Appearance:Normal	-	-	-

Table 5-1 Incidence of responses in the sensory/reflex function test of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 4 of the administration period >

Items	Score	No. of animals	Dose(mg/kg/day)			
			0	40	200	1000
Eye sight reaction	Normal		5	5	5	5
Hearing reaction	Normal		5	5	5	5
Sense of touch reaction	Normal		5	5	5	5
Pain reaction	Normal		5	5	5	5
Pupil reflex	Normal		5	5	5	5
Righting reflex	Normal		5	5	5	5

Table 5-2 Incidence of responses in the sensory/reflex function test of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 2 of the recovery period >

Items	Score	No. of animals	Dose(mg/kg/day)	
			0	1000
Hearing reaction	Normal		5	5
Eye sight reaction	Normal		5	5
Sense of touch reaction	Normal		5	5
Pain reaction	Normal		5	5
Pupil reflex	Normal		5	5
Righting reflex	Normal		5	5

Table 6-1 Incidence of responses in the sensory/reflex function test of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 4 of the administration period >

Items	Score	Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000
		No. of animals	5	5	5	5
Eye sight reaction	Normal		5	5	5	5
Hearing reaction	Normal		5	5	5	5
Sense of touch reaction	Normal		5	5	5	5
Pain reaction	Normal		5	5	5	5
Pupil reflex	Normal		5	5	5	5
Righting reflex	Normal		5	5	5	5

Table 6-2 Incidence of responses in the sensory/reflex function test of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 2 of the recovery period >

Items	Score	No. of animals	Dose(mg/kg/day)	0	1000
				5	5
Eye sight reaction	Normal		5	5	
Hearing reaction	Normal		5	5	
Sense of touch reaction	Normal		5	5	
Pain reaction	Normal		5	5	
Pupil reflex	Normal		5	5	
Righting reflex	Normal		5	5	

Table 7-1 Grip strength and motor activity of male rats treated with
2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 4 of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Grip strength(g)		Motor activity (counts) 0~60min.
		Forelimb	Hindlimb	
0	5	699 ± 78	281 ± 32	12132 ± 2839
40	5	790 ± 138	332 ± 54	15283 ± 2087
200	5	773 ± 72	291 ± 76	15889 ± 2650
1000	5	650 ± 145	309 ± 25	14360 ± 2185

Each value is expressed as mean±S.D.

Table 7-2 Grip strength and motor activity of male rats treated with
2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 2 of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Grip strength(g)		Motor activity (counts) 0~60min.
		Forelimb	Hindlimb	
0	5	743 ± 185	390 ± 117	16490 ± 1065
1000	5	740 ± 162	373 ± 82	16748 ± 995

Each value is expressed as mean±S.D.

Table 8-1 Grip strength and motor activity of female rats treated with
2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

⟨ On week 4 of the administration period ⟩

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Grip strength(g)		Motor activity (counts) 0~60min.
		Forelimb	Hindlimb	
0	5	541 ± 104	287 ± 50	14172 ± 2737
40	5	608 ± 114	276 ± 37	13497 ± 3037
200	5	490 ± 87	258 ± 13	13038 ± 3079
1000	5	676 ± 174	342 ± 57	14270 ± 2122

Each value is expressed as mean±S.D.

Table 8-2 Grip strength and motor activity of female rats treated with
2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< On week 2 of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Grip strength(g)		Motor activity (counts) 0~60min.
		Forelimb	Hindlimb	
0	5	635 ± 110	273 ± 56	16419 ± 1276
1000	5	648 ± 160	253 ± 24	17189 ± 1302

Each value is expressed as mean±S.D.

Table 9 Body weight of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(g)

Dose (mg/kg/day)	Day of the administration period						Day of the recovery period				Gain 0~14
	1	7	14	21	28	Gain 1~28	0	7	14		
0	156 ± 8 (10)	207 ± 15 (10)	266 ± 25 (10)	322 ± 35 (10)	363 ± 41 (10)	207 ± 35 (10)	362 ± 50 (5)	402 ± 54 (5)	433 ± 57 (5)	70 ± 8 (5)	
40	159 ± 7 (5)	216 ± 8 (5)	278 ± 9 (5)	336 ± 9 (5)	374 ± 9 (5)	215 ± 6 (5)					
200	157 ± 8 (5)	212 ± 15 (5)	269 ± 21 (5)	324 ± 30 (5)	365 ± 32 (5)	208 ± 25 (5)					
1000	157 ± 8 (10)	199 ± 15 (10)	252 ± 19 (10)	295 ± 27 (10)	318 *	161 *	322 ± 32 (5)	364 ± 35 (5)	397 ± 31 (5)	76 ± 16 (5)	

Each value is expressed as mean±S.D.

(n) : No. of animals.

* : Significantly different from control at 5 % level of probability.

Table 10 Body weight of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Dose (mg/kg/day)	Day of the administration period						Day of the recovery period				Gain 0~14
	1	7	14	21	28	Gain 1~28	0	7	14		
0	137 ± 4 (10)	160 ± 11 (10)	181 ± 11 (10)	196 ± 14 (10)	211 ± 14 (10)	74 ± 12 (10)	213 ± 20 (5)	229 ± 25 (5)	239 ± 26 (5)	26 ± 8 (5)	
40	138 ± 6 (5)	163 ± 7 (5)	185 ± 6 (5)	202 ± 15 (5)	216 ± 20 (5)	78 ± 19 (5)					
200	136 ± 6 (5)	155 ± 6 (5)	183 ± 11 (5)	201 ± 16 (5)	214 ± 18 (5)	78 ± 14 (5)					
1000	138 ± 6 (10)	159 ± 9 (10)	184 ± 11 (10)	205 ± 19 (10)	218 ± 20 (10)	80 ± 17 (10)	211 ± 24 (5)	224 ± 28 (5)	239 ± 30 (5)	28 ± 7 (5)	

Each value is expressed as mean±S.D.

(n) : No. of animals.

Table 11 Food consumption of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

(g/rat/day)

Dose (mg/kg/day)	Week of the administration period				Week of the recovery period	
	1	2	3	4	1	2
0	26 ± 3 (10)	27 ± 3 (10)	28 ± 3 (10)	28 ± 3 (10)	31 ± 3 (5)	34 ± 2 (5)
40	29 ± 2 (5)	28 ± 2 (5)	30 ± 3 (5)	29 ± 2 (5)		
200	27 ± 3 (5)	27 ± 2 (5)	27 ± 3 (5)	28 ± 3 (5)		
1000	26 ± 3 (10)	28 ± 2 (10)	28 ± 2 (10)	27 ± 4 (10)	33 ± 3 (5)	35 ± 3 (5)

Each value is expressed as mean±S.D.

(n) : No. of animals.

Table 12 Food consumption of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Dose (mg/kg/day)	Week of the administration period				Week of the recovery period		(g/rat/day)	
	1		2		1			
	1	2	3	4	1	2		
0	18 ± 2 (10)	18 ± 1 (10)	19 ± 1 (10)	19 ± 2 (10)	23 ± 1 (5)	23 ± 4 (5)		
40	19 ± 2 (5)	18 ± 2 (5)	19 ± 2 (5)	18 ± 2 (5)				
200	19 ± 2 (5)	19 ± 1 (5)	19 ± 1 (5)	18 ± 2 (5)				
1000	21 ± 2 (10)	20 * ± 2 (10)	21 ± 2 (10)	21 ± 2 (10)	26 ± 2 (5)	23 ± 4 (5)		

Each value is expressed as mean±S.D.

(n) : No. of animals.

* : Significantly different from control at 5 % level of probability.

Table 13-1

Urinary findings of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the 28-day repeated dose oral toxicity study

< On week 4 of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Color PY	Cloudy		pH						Protein					Glucose			
			-	+	5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+	3+	-	1+	2+
0	5	5		5					2	2	1			4	1		5		
40	5	5		5					1	3	1			3	2		5		
200	5	5		5					5					3	2		5		
1000	5	5		5					1	4				4	1		5		
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Ketone body					Occult blood					Urobilinogen					Bilirubin		
		-	±	1+	2+	3+	-	±	1+	2+	3+	0.1	1	2	4	8	-	1+	2+
0	5	3	2				5					5					5		
40	5	4	1				5					5					5		
200	5	2	3				5					5					5		
1000	5	3	2				5					5					5		

Color : PY(pale yellow).

Cloudy : -(negligible), +(cloudy).

Protein : -(negligible), ±(15~30mg/dL), 1+(30mg/dL), 2+(100mg/dL), 3+(300mg/dL).

Glucose : -(negligible), 1+(100mg/dL), 2+(250mg/dL), 3+(500mg/dL).

Ketone body : -(negligible), ±(5mg/dL), 1+(15mg/dL), 2+(40mg/dL), 3+(80mg/dL).

Occult blood : -(negligible), ±(trace), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked).

Urobilinogen : Ehrlich unit/dL.

Bilirubin : -(negligible), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked).

Table 13-2

Urinary findings of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the 28-day repeated dose oral toxicity study

< On week 2 of the recovery period >																					
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Color		Cloudy		pH						Protein					Glucose				
		PY		-	+	5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+
0	5	5		5							1	2	2			3	2		5		
1000	5	5		5							1	2	2			5		5			
Ketone body																					
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	-	±	1+	2+	3+	-	±	1+	2+	3+	-	0.1	1	2	4	8	-	1+	2+	3+
0	5	3	2				5						5					5			
1000	5	4	1				5						5					5			

Color : PY(pale yellow).

Cloudy : - (negligible), + (cloudy).

Protein : - (negligible), ±(15~30mg/dL), 1+(30mg/dL), 2+(100mg/dL), 3+(300mg/dL).

Glucose : - (negligible), 1+(100mg/dL), 2+(250mg/dL), 3+(500mg/dL).

Ketone body : - (negligible), ±(5mg/dL), 1+(15mg/dL), 2+(40mg/dL), 3+(80mg/dL).

Occult blood : - (negligible), ±(trace), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked).

Urobilinogen : Ehrlich unit/dL.

Bilirubin : - (negligible), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked).

Table 14-1

Urinary findings of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the 28-day repeated dose oral toxicity study

< On week 4 of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Color PY	Cloudy		pH						Protein					Glucose		
			-	+	5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+	3+	-	1+
0	5	5		5						1	3	1			3	2		5
40	5	5		5						1	1	2	1		1	3	1	5
200	5	5		5						2	2	1			3	2		5
1000	5	5		5						1	1	3			3	2		5

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Ketone body					Occult blood					Urobilinogen					Bilirubin		
		-	±	1+	2+	3+	-	±	1+	2+	3+	0.1	1	2	4	8	-	1+	2+
0	5	4	1				5					5					5		
40	5	4	1				5					5					5		
200	5	3	2				5					5					5		
1000	5	3	2				5					5					5		

Color : PY(pale yellow).

Cloudy : -(negligible), +(cloudy).

Protein : -(negligible), ±(15~30mg/dL), 1+(30mg/dL), 2+(100mg/dL), 3+(300mg/dL).

Glucose : -(negligible), 1+(100mg/dL), 2+(250mg/dL), 3+(500mg/dL).

Ketone body : -(negligible), ±(5mg/dL), 1+(15mg/dL), 2+(40mg/dL), 3+(80mg/dL).

Occult blood : -(negligible), ±(trace), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked).

Urobilinogen : Ehrlich unit/dL.

Bilirubin : -(negligible), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked).

Table 14-2

Urinary findings of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the 28-day repeated dose oral toxicity study

< On week 2 of the recovery period >																		
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Color PY	Cloudy		pH						Protein				Glucose			
			-	+	5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	1+	2+	3+	-	1+
0	5	5		5					1	4			3	2				5
1000	5	5		5					1	4			1	2	1	1		5
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Ketone body					Occult blood					Urobilinogen				Bilirubin		
		-	±	1+	2+	3+	-	±	1+	2+	3+	0.1	1	2	4	8	-	1+
0	5	5			5							5					5	
1000	5	5			5							5					5	

Color : PY(pale yellow).

Cloudy : -(negligible), +(cloudy).

Protein : -(negligible), ±(15~30mg/dL), 1+(30mg/dL), 2+(100mg/dL), 3+(300mg/dL).

Glucose : -(negligible), 1+(100mg/dL), 2+(250mg/dL), 3+(500mg/dL).

Ketone body : -(negligible), ±(5mg/dL), 1+(15mg/dL), 2+(40mg/dL), 3+(80mg/dL).

Occult blood : -(negligible), ±(trace), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked).

Urobilinogen : Ehrlich unit/dL.

Bilirubin : -(negligible), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked).

Table 15-1

Hematological findings of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the 28-day repeated dose oral toxicity study

< At end of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	PT (sec)
0	5	791 \pm 35	15.7 \pm 0.6	47.6 \pm 1.2	60 \pm 3	19.9 \pm 0.6	33.0 \pm 1.2	28.7 \pm 6.2	12.6 \pm 0.5
40	5	782 \pm 28	15.4 \pm 0.4	47.4 \pm 1.3	61 \pm 1	19.7 \pm 0.4	32.5 \pm 0.3	24.4 \pm 4.4	13.3 \pm 0.4
200	5	768 \pm 14	15.2 \pm 0.2	46.6 \pm 0.8	61 \pm 1	19.8 \pm 0.4	32.7 \pm 0.2	28.2 \pm 3.0	13.3 \pm 0.8
1000	5	762 \pm 30	14.5 ** \pm 0.6	44.4 ** \pm 2.0	58 \pm 2	19.1 \pm 0.8	32.7 \pm 0.2	46.8 ** \pm 8.4	15.4 ** \pm 1.0
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	APTT (sec)	Plat. ($10^4/\mu\text{L}$)	WBC ($10^2/\mu\text{L}$)	Baso.	Eosin.	Neutro.	Lymph.	Mono.
0	5	19.2 \pm 1.9	142 \pm 17	92 \pm 23	0.0 \pm 0.0	0.9 \pm 0.3	12.9 \pm 1.9	83.4 \pm 2.2	2.9 \pm 1.1
40	5	20.2 \pm 1.2	134 \pm 21	65 \pm 16	0.0 \pm 0.0	1.4 \pm 1.0	15.2 \pm 3.9	80.0 \pm 3.3	3.4 \pm 0.4
200	5	21.4 \pm 1.9	134 \pm 17	67 \pm 21	0.0 \pm 0.0	0.8 \pm 0.5	15.6 \pm 3.5	80.4 \pm 4.3	3.2 \pm 0.9
1000	5	27.4 ** \pm 3.6	171 * \pm 13	93 \pm 18	0.0 \pm 0.0	0.8 \pm 0.4	15.8 \pm 3.2	80.9 \pm 3.7	2.5 \pm 1.0

Each value is expressed as mean \pm S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 15-2

Hematological findings of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the 28-day repeated dose oral toxicity study

< At end of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	PT (sec)
0	5	835 ± 46	15.8 ± 0.5	46.7 ± 0.8	56 ± 3	18.9 ± 0.6	33.8 ± 0.7	25.7 ± 3.7	13.1 ± 0.3
1000	5	792 ± 53	14.9 * ± 0.6	45.6 ± 1.9	58 ± 3	18.9 ± 0.8	32.8 * ± 0.6	38.5 ± 13.7	13.1 ± 0.2
<hr/>									
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	APTT (sec)	Plat. ($10^4/\mu\text{L}$)	WBC ($10^2/\mu\text{L}$)	Baso.	Eosin.	Neutro.	Lymph.	Mono.
0	5	21.9 ± 1.4	134 ± 14	80 ± 8	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.3	12.7 ± 3.4	84.0 ± 4.0	2.3 ± 0.9
1000	5	22.3 ± 1.4	141 ± 8	62 ± 17	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.4	16.0 ± 3.8	80.1 ± 3.9	2.9 ± 0.4

Each value is expressed as mean±S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 16-1

Hematological findings of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the 28-day repeated dose oral toxicity study

< At end of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	RBC (10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	PT (sec)
0	5	753 ± 46	14.7 ± 0.5	44.4 ± 1.7	59 ± 3	19.6 ± 0.7	33.1 ± 0.8	23.1 ± 3.5	13.0 ± 0.4
40	5	764 ± 29	15.1 ± 0.5	45.2 ± 1.3	59 ± 1	19.8 ± 0.4	33.5 ± 0.7	20.1 ± 2.2	13.1 ± 0.6
200	5	729 ± 42	14.1 ± 0.5	42.8 ± 2.0	59 ± 2	19.4 ± 0.7	33.0 ± 0.5	20.0 ± 2.0	12.8 ± 0.7
1000	5	695 ± 35	13.7 * ± 0.6	41.9 ± 1.7	61 ± 2	19.7 ± 0.5	32.8 ± 0.3	24.9 ± 2.6	12.1 * ± 0.4
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	APTT (sec)	Plat. (10 ³ /μL)	WBC (10 ³ /μL)	Baso.	Eosin.	Neutro.	Lymph.	Mono.
0	5	17.9 ± 1.4	132 ± 18	53 ± 11	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3	12.7 ± 3.9	83.6 ± 4.1	2.6 ± 0.5
40	5	19.5 ± 0.9	127 ± 9	34 * ± 7	0.0 ± 0.0	1.8 ± 1.2	14.9 ± 3.4	80.4 ± 4.2	2.9 ± 0.6
200	5	19.3 ± 1.9	136 ± 16	39 ± 11	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.4	13.3 ± 3.6	82.5 ± 3.4	2.6 ± 0.6
1000	5	21.9 ** ± 1.3	152 ± 12	66 ± 14	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.3	10.4 ± 1.5	85.9 ± 2.0	2.5 ± 0.7

Each value is expressed as mean±S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 16-2

Hematological findings of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the 28-day repeated dose oral toxicity study

< At end of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	RBC ($10^4/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (%)	PT (sec)
0	5	800 \pm 22	15.0 \pm 0.4	43.5 \pm 0.8	54 \pm 1	18.8 \pm 0.2	34.5 \pm 0.7	22.6 \pm 4.9	13.5 \pm 0.5
1000	5	752 * \pm 25	13.9 ** \pm 0.3	41.7 * \pm 1.0	56 \pm 2	18.4 \pm 0.5	33.2 ** \pm 0.5	28.6 \pm 5.5	13.2 \pm 0.1
<hr/>									
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	APTT (sec)	Plat. ($10^4/\mu\text{L}$)	WBC ($10^2/\mu\text{L}$)	Baso.	Eosin.	Neutro.	Lymph.	Mono.
0	5	19.0 \pm 1.3	129 \pm 17	42 \pm 11	0.0 \pm 0.0	1.4 \pm 0.8	14.5 \pm 3.4	81.6 \pm 3.8	2.5 \pm 0.7
1000	5	18.6 \pm 2.2	132 \pm 18	41 \pm 8	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.4	14.7 \pm 4.7	81.6 \pm 5.2	2.4 \pm 0.5

Each value is expressed as mean \pm S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 17-1

Blood biochemical findings of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the 28-day repeated dose oral toxicity study

< At end of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	LDH (IU/L)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	T.P. (g/dL)	Alb. (g/dL)	A/G	T-Chol. (mg/dL)	T.G. (mg/dL)
0	5	293 ± 84	64 ± 5	34 ± 6	1008 ± 203	0.56 ± 0.26	5.95 ± 0.31	2.97 ± 0.19	0.99 ± 0.03	77 ± 16	82 ± 6
40	5	415 ± 181	69 ± 12	32 ± 4	793 ± 261	0.61 ± 0.07	5.81 ± 0.14	2.92 ± 0.17	1.01 ± 0.08	57 * ± 10	79 ± 21
200	5	249 ± 142	58 ± 4	31 ± 3	774 ± 258	1.65 ± 1.15	5.84 ± 0.20	2.93 ± 0.23	1.01 ± 0.10	71 ± 11	105 ± 49
1000	5	208 ± 31	64 ± 7	55 ± 15	871 ± 184	8.88 ** ± 4.14	6.10 ± 0.28	3.30 ± 0.32	1.18 * ± 0.14	59 ± 9	28 * ± 10
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Glu. (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea. (mg/dL)	T-Bil. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	
0	5	165 ± 16	14.0 ± 2.3	0.40 ± 0.05	0.34 ± 0.03	9.6 ± 0.3	8.2 ± 0.1	146 ± 2	5.02 ± 0.55	106 ± 2	
40	5	149 ± 10	11.7 ± 2.0	0.37 ± 0.03	0.41 ± 0.04	9.4 ± 0.3	8.8 ± 0.6	148 ± 1	4.97 ± 0.26	105 ± 1	
200	5	132 ± 17	11.8 ± 1.4	0.39 ± 0.02	0.43 ± 0.05	9.4 ± 0.2	8.2 ± 0.4	147 ± 1	4.85 ± 0.18	104 ± 2	
1000	5	153 ± 35	10.8 ± 1.5	0.46 ± 0.07	0.35 ± 0.08	9.7 ± 0.3	8.8 ± 0.8	147 ± 2	6.89 * ± 0.79	105 ± 2	

Each value is expressed as mean±S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 17-2

Blood biochemical findings of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the 28-day repeated dose oral toxicity study

< At end of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	LDH (IU/L)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	T.P. (g/dL)	Alb. (g/dL)	A/G	T-Chol. (mg/dL)	T.G. (mg/dL)
0	5	214 ± 65	67 ± 9	38 ± 3	615 ± 79	0.63 ± 0.22	6.22 ± 0.32	3.01 ± 0.18	0.94 ± 0.02	82 ± 16	96 ± 25
1000	5	221 ± 105	107 ± 96	68 ± 70	559 ± 98	1.39 ± 0.98	5.90 ± 0.24	2.87 ± 0.17	0.95 ± 0.04	77 ± 10	87 ± 25
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Glu. (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea. (mg/dL)	T-Bil. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	
0	5	169 ± 20	15.4 ± 2.5	0.47 ± 0.03	0.30 ± 0.06	10.0 ± 0.4	7.3 ± 0.4	146 ± 1	4.88 ± 0.19	107 ± 2	
1000	5	153 ± 6	16.0 ± 1.6	0.43 ± 0.03	0.38 * ± 0.03	9.9 ± 0.3	8.0 ± 0.9	147 ± 2	5.79 ± 0.83	105 ± 1	

Each value is expressed as mean±S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 18-1

Blood biochemical findings of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the 28-day repeated dose oral toxicity study

< At end of the administration period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	LDH (IU/L)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	T.P. (g/dL)	Alb. (g/dL)	A/G	T-Chol. (mg/dL)	T.G. (mg/dL)
0	5	389 \pm 114	73 \pm 11	29 \pm 4	507 \pm 92	0.80 \pm 0.45	5.89 \pm 0.19	3.05 \pm 0.25	1.08 \pm 0.13	65 \pm 10	23 \pm 13
40	5	355 \pm 70	73 \pm 22	25 \pm 6	429 \pm 100	1.65 \pm 0.98	6.09 \pm 0.48	3.32 \pm 0.57	1.22 \pm 0.30	73 \pm 14	29 \pm 11
200	5	271 \pm 84	81 \pm 17	28 \pm 3	480 \pm 102	3.34 \pm 0.80	6.15 \pm 0.11	3.07 \pm 0.15	1.00 \pm 0.08	69 \pm 11	22 \pm 12
1000	5	320 \pm 54	72 \pm 10	50 ** \pm 10	425 \pm 127	19.69 ** \pm 6.27	6.33 \pm 0.29	3.21 \pm 0.31	1.03 \pm 0.12	117 ** \pm 19	74 \pm 69
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Glu. (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea. (mg/dL)	T-Bil. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	
0	5	143 \pm 9	13.9 \pm 3.5	0.46 \pm 0.05	0.26 \pm 0.03	9.1 \pm 0.4	7.2 \pm 0.7	146 \pm 2	4.99 \pm 0.62	107 \pm 2	
40	5	130 \pm 17	12.9 \pm 3.7	0.41 \pm 0.02	0.26 \pm 0.03	9.2 \pm 0.5	7.0 \pm 0.9	147 \pm 1	4.76 \pm 0.23	108 \pm 1	
200	5	117 \pm 16	15.8 \pm 2.1	0.44 \pm 0.02	0.23 \pm 0.03	9.3 \pm 0.2	7.8 \pm 0.4	148 \pm 1	5.07 \pm 0.29	107 \pm 2	
1000	5	132 \pm 28	12.7 \pm 1.4	0.45 \pm 0.07	0.27 \pm 0.04	9.7 \pm 0.3	8.1 \pm 0.9	147 \pm 2	5.81 \pm 1.10	106 \pm 1	

Each value is expressed as mean \pm S.D.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 18-2

Blood biochemical findings of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the 28-day repeated dose oral toxicity study

< At end of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of animals	LDH (IU/L)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	T.P. (g/dL)	Alb. (g/dL)	A/G	T-Chol. (mg/dL)	T.G. (mg/dL)
0	5	375 \pm 111	76 \pm 16	28 \pm 5	384 \pm 11	1.11 \pm 0.41	6.21 \pm 0.38	3.06 \pm 0.31	0.97 \pm 0.09	66 \pm 6	18 \pm 3
1000	5	422 \pm 226	66 \pm 11	29 \pm 6	264 ** \pm 40	1.95 \pm 0.73	6.50 \pm 0.27	3.40 \pm 0.42	1.11 \pm 0.23	87 ** \pm 8	24 \pm 10
Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Glu. (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea. (mg/dL)	T-Bil. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	
0	5	137 \pm 23	15.7 \pm 2.0	0.52 \pm 0.03	0.25 \pm 0.02	9.8 \pm 0.2	6.3 \pm 0.8	147 \pm 2	4.66 \pm 0.53	108 \pm 2	
1000	5	135 \pm 13	16.0 \pm 1.1	0.47 * \pm 0.03	0.22 \pm 0.03	9.8 \pm 0.4	6.7 \pm 0.6	147 \pm 2	4.91 \pm 0.27	107 \pm 2	

Each value is expressed as mean \pm S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 19 Incidence of necropsy findings of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Organ	: Findings	Grade	At the end of administration period				At the end of recovery period	
			Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000	0
			Fate	KA	KA	KA	KA	KR
			No.of animals	5	5	5	5	5
Liver	: Large	-		5	5	5	1	5
		+		0	0	0	4 *	0

KA : Killed by design at the end of administration period.

KR : Killed by design at the end of recovery period.

Grade, - : Negative; + : Slight.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 20 Incidence of necropsy findings of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Organ	: Findings	Grade	At the end of administration period				At the end of recovery period	
			Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000	0
			Fate	KA	KA	KA	KA	KR
			No.of animals	5	5	5	5	5
Liver	: Large	-		5	5	3	0	5
		+		0	0	2	0	0
		++		0	0	0	5 **	0

KA : Killed by design at the end of administration period.

KR : Killed by design at the end of recovery period.

Grade, - : Negative; + : Slight; ++ : Moderate.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 21-1 Absolute and relative organ weights of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the administration period >

	Dose (mg/kg/day)	No. of Animals	Body weight (g)	Brain (g)	Thymus (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Adrenal gland (mg)	Spleen (g)	Testis (g)	Epididy- mis (g)	Pituitary gland (mg)	Thyroid gland (mg)
Absolute	0	5	327 ± 33	1.87 ± 0.04	0.48 ± 0.03	1.08 ± 0.10	10.72 ± 1.79	2.57 ± 0.32	58.2 ± 6.3	0.63 ± 0.15	3.04 ± 0.27	0.83 ± 0.07	11.2 ± 1.4	24.4 ± 3.5
	40	5	342 ± 7	1.92 ± 0.04	0.48 ± 0.04	1.19 ± 0.10	11.32 ± 0.80	2.78 ± 0.10	57.2 ± 11.2	0.66 ± 0.09	3.36 ± 0.29	0.84 ± 0.07	12.3 ± 0.4	22.5 ± 3.5
	200	5	331 ± 29	1.95 ± 0.10	0.50 ± 0.08	1.09 ± 0.11	11.47 ± 1.46	2.79 ± 0.30	58.5 ± 6.1	0.64 ± 0.09	3.17 ± 0.25	0.80 ± 0.07	10.8 ± 1.5	27.2 ± 2.5
	1000	5	281 * ± 25	1.85 ± 0.10	0.39 ± 0.06	0.96 ± 0.14	14.01 ** ± 0.80	2.73 ± 0.56	62.8 ± 9.7	0.64 ± 0.07	3.23 ± 0.10	0.78 ± 0.05	10.1 ± 1.3	30.6 * ± 2.5
Relative @	0	5	327 ± 33	0.58 ± 0.06	0.15 ± 0.01	0.33 ± 0.02	3.27 ± 0.34	0.78 ± 0.04	17.8 ± 1.8	0.19 ± 0.04	0.94 ± 0.15	0.26 ± 0.04	3.4 ± 0.2	7.4 ± 0.6
	40	5	342 ± 7	0.56 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.35 ± 0.03	3.31 ± 0.18	0.81 ± 0.04	16.7 ± 3.3	0.19 ± 0.03	0.98 ± 0.09	0.24 ± 0.02	3.6 ± 0.1	6.6 ± 1.0
	200	5	331 ± 29	0.59 ± 0.05	0.15 ± 0.02	0.33 ± 0.02	3.45 ± 0.25	0.84 ± 0.06	17.6 ± 1.2	0.19 ± 0.01	0.96 ± 0.02	0.24 ± 0.01	3.2 ± 0.3	8.2 ± 1.1
	1000	5	281 * ± 25	0.66 * ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.34 ± 0.04	5.00 ** ± 0.33	0.97 ** ± 0.14	22.4 * ± 3.1	0.23 ± 0.02	1.16 * ± 0.12	0.28 ± 0.04	3.6 ± 0.3	10.9 ** ± 0.9

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 21-2 Absolute and relative organ weights of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No.of Animals	Body weight (g)	Brain (g)	Thymus (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Adrenal gland (mg)	Spleen (g)	Testis (g)	Epididy- mis (g)	Pituitary gland (mg)	Thyroid gland (mg)	
Absolute	0	5	394	1.97	0.44	1.25	12.01	2.67	64.8	0.74	3.42	1.07	12.7	26.4
			± 50	± 0.07	± 0.08	± 0.13	± 2.92	± 0.40	± 8.4	± 0.11	± 0.30	± 0.07	± 1.8	± 7.1
1000	5	359	1.90	0.42	1.24	11.09	2.69	59.8	0.72	3.44	1.03	12.4	31.2	
		± 31	± 0.12	± 0.02	± 0.11	± 1.34	± 0.39	± 9.3	± 0.14	± 0.27	± 0.04	± 1.5	± 5.2	
Relative @	0	5	394	0.51	0.11	0.32	3.01	0.68	16.4	0.19	0.88	0.27	3.2	6.6
		± 50	± 0.06	± 0.01	± 0.01	± 0.36	± 0.03	± 0.9	± 0.03	± 0.13	± 0.05	± 0.3	± 1.0	
1000	5	359	0.53	0.12	0.35 *	3.09	0.75 *	16.7	0.20	0.96	0.29	3.5	8.7 *	
		± 31	± 0.03	± 0.01	± 0.02	± 0.18	± 0.06	± 2.6	± 0.04	± 0.11	± 0.01	± 0.4	± 1.2	

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

Table 22-1 Absolute and relative organ weights of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the administration period >

	Dose (mg/kg/day)	No. of Animals	Body weight (g)	Brain (g)	Thymus (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Adrenal gland (mg)	Spleen (g)	Ovary (mg)	Pituitary gland (mg)	Thyroid gland (mg)
Absolute	0	5	195 ± 11	1.80 ± 0.07	0.39 ± 0.06	0.74 ± 0.05	5.87 ± 0.30	1.53 ± 0.06	68.7 ± 1.6	0.42 ± 0.06	79.5 ± 14.2	12.9 ± 2.5	17.9 ± 1.3
	40	5	200 ± 17	1.75 ± 0.06	0.39 ± 0.08	0.71 ± 0.06	6.17 ± 0.74	1.61 ± 0.10	64.1 ± 15.0	0.44 ± 0.05	81.4 ± 24.1	12.1 ± 0.5	18.5 ± 1.3
	200	5	200 ± 19	1.77 ± 0.05	0.45 ± 0.09	0.74 ± 0.07	7.38 * ± 0.89	1.60 ± 0.09	69.7 ± 11.1	0.47 ± 0.08	74.0 ± 6.6	13.8 ± 2.0	19.6 ± 3.0
	1000	5	204 ± 20	1.75 ± 0.03	0.44 ± 0.12	0.68 ± 0.05	11.98 ** ± 0.92	1.68 ± 0.13	73.8 ± 8.8	0.43 ± 0.03	86.2 ± 11.8	12.3 ± 1.0	26.0 ** ± 3.3
	0	5	195 ± 11	0.93 ± 0.08	0.20 ± 0.02	0.38 ± 0.02	3.02 ± 0.15	0.79 ± 0.03	35.4 ± 2.4	0.21 ± 0.02	40.9 ± 7.1	6.6 ± 1.0	9.2 ± 0.8
	40	5	200 ± 17	0.88 ± 0.05	0.20 ± 0.02	0.35 ± 0.03	3.08 ± 0.17	0.81 ± 0.04	31.9 ± 6.2	0.22 ± 0.02	40.4 ± 10.1	6.0 ± 0.3	9.3 ± 1.0
	200	5	200 ± 19	0.89 ± 0.05	0.22 ± 0.04	0.37 ± 0.03	3.69 ** ± 0.24	0.81 ± 0.05	35.3 ± 7.4	0.23 ± 0.02	37.4 ± 5.2	6.9 ± 0.7	9.8 ± 1.0
	1000	5	204 ± 20	0.87 ± 0.07	0.22 ± 0.04	0.34 ± 0.03	5.89 ** ± 0.81	0.83 ± 0.09	36.3 ± 4.7	0.21 ± 0.01	42.5 ± 6.5	6.1 ± 0.8	12.8 ** ± 1.4

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 22-2 Absolute and relative organ weights of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane
in the repeated dose 28-day oral toxicity study

< At end of the recovery period >

Dose (mg/kg/day)	No. of Animals	Body weight (g)	Brain (g)	Thymus (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Adrenal gland (mg)	Spleen (g)	Ovary (mg)	Pituitary gland (mg)	Thyroid gland (mg)
Absolute	0	5 ± 21	219 ± 21	1.83 ± 0.06	0.35 ± 0.06	0.80 ± 0.05	6.02 ± 0.73	1.63 ± 0.15	70.1 ± 6.5	0.49 ± 0.10	93.4 ± 16.4	13.8 ± 1.9
	1000	5 ± 28	218 ± 28	1.76 ± 0.06	0.38 ± 0.10	0.81 ± 0.07	7.14 ± 0.16	1.65 ± 0.19	63.2 ± 7.6	0.53 ± 0.04	83.8 ± 9.5	13.3 ± 1.2
Relative @	0	5 ± 21	219 ± 21	0.84 ± 0.10	0.16 ± 0.02	0.37 ± 0.02	2.75 ± 0.16	0.75 ± 0.05	32.5 ± 5.9	0.22 ± 0.03	42.5 ± 4.8	6.3 ± 0.4
	1000	5 ± 28	218 ± 28	0.82 ± 0.11	0.17 ± 0.03	0.37 ± 0.02	3.26 ** ± 0.23	0.76 ± 0.04	29.1 ± 2.8	0.24 ± 0.02	38.5 ± 2.1	6.1 ± 0.5

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

Table 23-1 Incidence of histopathological findings of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Organ	Findings	Grade	At the end of administration period				At the end of recovery period	
			Dose(mg/kg/day)					KR
				No. of animals	0	40	200	KR
Lung	: Accumulation, foam cell	-			5	#	#	3
		+			0	#	#	2
	Metaplasia, osseous	-			4	#	#	5
		+			1	#	#	0
Heart	: Myocardial degeneration/fibrosis	-			4	#	#	5
		+			1	#	#	0
Liver	: Hypertrophy, hepatocyte, diffuse	-			5	5	5	0
		+			0	0	0	0
		++			0	0	0	5 **
	Necrosis, focal	-			4	4	5	4
		+			1	1	0	1
Kidney	: Microgramuloma	-			4	4	3	4
		+			1	1	2	1
Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	-			2	1	0	0
		+			2	3	5	0
		++			1	1	0	0
		+++			0	0	0	5 **
Kidney	Basophilic tubule	-			2	3	3	0
		+			3	2	2	0
		++			0	0	0	5 **
Kidney	Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	-			4	4	4	5
		+			1	1	1	0
Kidney	Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	-			5	5	1	1
		+			0	0	3	2
		++			0	0	1	2

KA : Killed by design at the end of administration period, KR : Killed by design at the end of recovery period, #:Not examined.

Grade, - : Negative, + : Slight; ++ : Moderate; +++ : Severe.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

No abnormalities were detected in the brain, pituitary, thyroid, parathyroid, trachea, stomach, small intestine, large intestine, urinary bladder, testis, epididymis, seminal vesicle, spinal cord, sciatic nerve, bone marrow, lymph nodes and eye ball from animals of control and 1000 mg/kg group.

Table 23·2 Incidence of histopathological findings of male rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Organ	Findings	Grade	At the end of administration period				At the end of recovery period		
			Dose(mg/kg/day)					KR	
				Fate	KA No.of animals	0 5	40 5	1000 5	
Kidney (Continued)	: Fibrosis, cortex, focal	-				4	5	4	5
		+				1	0	1	0
	: Cyst, solitary	-				5	4	5	4
		+				0	1	0	1
Thymus	: Hemorrhage	-				3	#	#	#
		+				2	#	#	#
Spleen	: Congestion	-				5	5	3	5
		+				0	0	0	0
	: Hematopoiesis, extramedullary	-				0	0	0	0
		+				4	5	5	5
		++				1	0	3	2
	: Deposit, pigment, brown	-				0	0	0	0
		+				5	5	5	5
Adrenal gland	: Lipidosis	-				5	5	5	5
		+				0	0	0	0
Thyroid	: Hyperplasia, follicular cell, diffuse	-				5	5	0	5
		+				0	0	4	0
		++				0	0	1	0
	: Ultimobranchial remnant	-				4	5	4	5
		+				1	0	1	0
Prostate	: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	-				5	#	#	#
		+				0	#	#	#

KA : Killed by design at the end of administration period, KR : Killed by design at the end of recovery period, #:Not examined.

Grade, - : Negative; + : Slight; ++ : Moderate.

* : Significantly different from control at 5% level of probability.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

No abnormalities were detected in the brain, pituitary, thyroid, parathyroid, trachea, stomach, small intestine, large intestine, urinary bladder, testis, epididymis, seminal vesicle, spinal cord, sciatic nerve, bone marrow, lymph nodes and eye ball from animals of control and 1000 mg/kg group.

Table 24 Incidence of histopathological findings of female rats treated with 2,5-dimethyl-2,5-di(tert-butylperoxy)hexane in the repeated dose 28-day oral toxicity study

Organ	Findings	Grade	At the end of administration period				At the end of recovery period	
			Dose(mg/kg/day)		0	40	200	1000
			Fate	No.of animals	KA 5	KA 5	KA 5	KA 5
Lung	: Mineralization, artery	-			3	#	#	5
		+			2	#	#	0
	: Metaplasia, osseous	-			4	#	#	5
		+			1	#	#	0
Liver	: Hypertrophy, hepatocyte, diffuse	-			5	5	5	0
		+			0	0	0	0
		++			0	0	0	5 **
	: Necrosis, focal	-			5	5	5	4
		+			0	0	0	1
	: Microgramuloma	-			4	4	5	5
		+			1	1	0	0
	: Degeneration, fatty, hepatocyte, periportal	-			5	4	4	5
Kidney		+			0	1	1	0
	: Basophilic tubule	-			4	#	#	4
		+			1	#	#	1
	: Cyst, solitary	-			5	#	#	4
		+			0	#	#	1
Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary	-			0	#	#	0
		+			5	#	#	5
	: Deposit, pigment, brown	-			0	#	#	0
		+			5	#	#	5
Thyroid	: Hyperplasia, follicular cell, diffuse	-			5	5	5	0
		+			0	0	0	5 **
	: Ultimobranchial remnant	-			4	5	5	5
		+			1	0	0	1

KA : Killed by design at the end of administration period, KR : Killed by design at the end of recovery period, #:Not examined.

Grade, - : Negative; + : slight; ++ : Moderate.

** : Significantly different from control at 1% level of probability.

No abnormalities were brain, parathyroid, thymus, trachea, heart, stomach, small intestine, large intestine, adrenal, urinary bladder, ovary, uterus, vagina, spinal cord, sciatic nerve, bone marrow, lymph nodes and eye ball from animals of control and 1000 mg/kg group.