

最 終 報 告 書

試験表題：2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールのラットを用いた
経口投与による簡易生殖毒性試験

試験番号：R-1059

試験期間：2010 年 6 月 14 日～2011 年 7 月 7 日

試験施設

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

試験委託者

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

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

1. 目次

1. 目次	3
3. 要約	9
3.1 雌雄動物に対する影響.....	9
3.2 生殖発生に対する影響.....	9
4. 緒言	10
5. 試験材料及び方法.....	11
5.1 被験物質及び媒体	11
5.1.1 被験物質	11
5.1.2 媒体.....	12
5.2 投与液の調製及び保存方法	12
5.2.1 投与液の調製及び保存.....	12
5.2.2 投与液の安定性.....	12
5.2.3 投与液の濃度及び均一性確認	13
5.3 試験動物種及び系統の選択理由.....	13
5.4 試験動物	13
5.5 群分け	14
5.6 飼育条件	14
5.7 動物の識別.....	15
5.8 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由	15

5.9	投与方法	15
5.10	投与量及び群構成	15
5.11	投与量の設定根拠	16
5.12	観察及び検査の方法	16
5.12.1	一般状態	16
5.12.2	体重	16
5.12.3	摂餌量	16
5.12.4	膣垢検査	17
5.12.5	交配	17
5.12.6	分娩及び哺育	17
5.12.7	出生児	17
5.12.8	病理学検査	17
5.13	統計解析	18
5.13.1	パラメータの算出	18
5.13.2	検定	19
6.	試験結果	20
6.1	一般状態 (Table 1-1~1-4、Appendix 1-1~1-16)	20
6.2	体重 (Fig. 1、2、Table 2-1~2-4、Appendix 2-1~2-16)	20
6.3	摂餌量 (Fig. 3、4、Table 3-1~3-4、Appendix 3-1~3-16)	20
6.4	器官重量 (Table 4-1、4-2、Appendix 4-1~4-12)	20
6.5	剖検所見 (Table 5-1、5-2、Appendix 5-1~5-96)	20
6.6	病理組織学検査 (Table 6-1~6-4、Appendix 5-1~5-96)	20
6.7	性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)	21
6.8	交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-4)	21
6.9	分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-4)	21
6.10	出生児の性比及び外表観察 (Table 10、Appendix 9-1~9-4)	21
6.11	出生児の生存率 (Table 11、Appendix 10-1~10-4)	21
6.12	出生児の体重 (Table 12、Appendix 11-1~11-4)	21
6.13	出生児の生後4日剖検所見 (Table 13、Appendix 12-1~12-4)	21
7.	考察	22
7.1	雌雄動物に対する影響	22
7.2	生殖発生に対する影響	22
8.	文献	24

R-1059

図

Fig. 1、2	体重
Fig. 3、4	摂餌量

表

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

3. 要約

2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールを 0（対照群：コーン油）、10、50 及び 250 mg/kg/day の用量で、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄に交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで、雌には交配前 14 日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳 4 日まで経口投与し、雌雄動物に対する影響、特に、生殖発生毒性について概略的に検討した。

3.1 雌雄動物に対する影響

250 mg/kg 投与群において雌 2 例が妊娠 23 日及び授乳 4 日にそれぞれ死亡し、雄には流産が散見された。同群の体重は雌雄ともに低体重推移の傾向を示し、病理学検査では、肝臓重量の増加とこれに関連する組織変化と考えられる小葉中心性肝細胞肥大、腎臓には尿細管の拡張、尿細管の好塩基性化、炎症性細胞浸潤及び顆粒円柱などが認められた。50 mg/kg 投与群では、死亡動物は発現せず、一般状態に異常は認められなかった。また、病理学検査では被験物質投与に起因した変化はみられなかった。

3.2 生殖発生に対する影響

性周期、交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率に被験物質投与の影響は認められず、雌雄内部生殖器の病理組織学検査では、被験物質投与に起因した変化は認められなかった。更に、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数及び着床率に被験物質投与の影響は認められず、分娩及び哺育状態に被験物質投与に起因した異常は認められなかった。しかし、250 mg/kg 投与群において出生率が低下し、死産児率は高値傾向、出生児数は低値傾向を示した。

出生児の生後 0 及び 4 日の体重及び性比並びに生後 4 日生存率に被験物質投与による変化は認められず、出生時の外表観察及び生後 4 日剖検所見では被験物質投与に起因した異常は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下における 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールの雌雄動物に対する無影響量及び無毒性量は共に 50 mg/kg/day であり、生殖発生毒性に対する無影響量及び無毒性量は雄ではいずれも 250 mg/kg/day、雌ではいずれも 50 mg/kg/day と推定された。

R-1059

4. 緒言

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

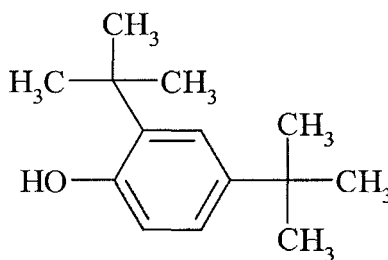
5. 試験材料及び方法

5.1 被験物質及び媒体

5.1.1 被験物質

2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールは、以下の情報とともに購入した。また、試験開始前に赤外吸収スペクトルの測定により特性が確認されている。¹⁾

名称	:	2,4-ジ- <i>tert</i> -ブチルフェノール
英語名称	:	2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol
CAS 番号	:	96-76-4
官報公示整理番号	:	3-521、3-526
構造式又は示性式	:	



分子式	:	C ₁₄ H ₂₂ O
分子量	:	206.32
常温における性状	:	白色~うすい黄色の結晶性粉末
臭い	:	フェノール臭
沸点	:	261°C
引火点	:	128°C
発火点	:	350°C
爆発限界下限	:	0.6%
蒸気圧	:	2.25Pa/25°C
蒸気密度	:	7.1
溶解性	:	可溶；メタノール、エタノール、ベンゼン、ヘキサン 不溶；水（35 mg/L 25°C）
オクタノール/水分配係数	:	5.19
純度（GC）	:	99.7%
不純物	:	不明
融点	:	57.6°C
メタノール溶状	:	澄明
保存方法	:	冷暗所〔冷暗所として冷蔵庫内（許容温度：1~10°C、 実測温度：3~7°C）に保存した。〕

保存場所	:	御殿場研究所被験物質保存室及び第 2 研究棟 4 階被験物質調製室
取扱い上の注意	:	作業場の換気を十分に行い、マスク、保護眼鏡、保護手袋等の適切な保護具を着用し、直接の接触を防ぐ。取り扱い後は、手、顔等を良く洗い、うがいをする。
安定性	:	投与期間終了後、残余被験物質の赤外吸収スペクトルを確認した結果、実験実施前に確認した参照スペクトル ¹⁾ とほぼ同様であり、投与期間を通して被験物質は安定であったと判断した。
残余被験物質	:	被験物質 5 g を保存試料として御殿場研究所被験物質保存室に保存した。動物試験及び分析終了後の残量はすべて焼却処分した。

5.1.2 媒体

名称	:	コーン油
製造者	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	STN0989
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所第 2 研究棟被験物質調製室

なお、媒体については、コーン油中における被験物質の安定性及び均一性に良好な結果が得られていることから¹⁾、これを媒体として選択するとともに陰性対照物質として対照群の投与に使用した。

5.2 投与液の調製及び保存方法

5.2.1 投与液の調製及び保存

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に秤取し、乳鉢中で磨砕して媒体と混合、懸濁させた後、メスシリンダーに移し、更に媒体を加え規定濃度（2、10 及び 50 mg/mL）となるよう調製した。投与液は、最大 7 日分を一括して調製し、1 日使用分ごと褐色ガラス瓶に小分けして冷所（冷蔵庫内、許容温度：1~10℃、実測温度：4~8℃）に保存し、調製日を含め 8 日以内の投与に使用した。

5.2.2 投与液の安定性

本被験物質の 1.00 及び 200 mg/mL 懸濁液(媒体:コーン油)は、褐色ガラス瓶に入れ冷所（冷蔵庫内）で 8 日間保存した後、室温で 24 時間保存した条件下で安定かつ均一であることが確認されている¹⁾。

5.2.3 投与液の濃度及び均一性確認

雄の投与 1 週と投与 6 週の 2 回、投与に用いる各濃度の投与液について、投与に使用する前に HPLC 法により濃度及び均一性を確認した。その結果、規定濃度に対する各投与液の測定濃度の割合は 98.7~106.0%、変動係数 (CV) は 0.9~2.4% であり、いずれも許容範囲内 (濃度：表示値に対する割合：100.0±10.0%、均一性：CV10.0%以内) であった。なお、濃度測定は当試験施設において確立された分析法¹⁾に従い、用いた標準物質、HPLC システム及び測定条件は以下の如くであった。分析法の概略を以下に示す。

[標準物質]

被験物質の一部を標準物質として使用した。

[HPLC システム]

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

[HPLC 測定条件]

カラム : COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 mm I.D. × 150 mm、粒子径 5 μm、ナカライテスク株式会社)

カラム恒温槽設定温度 : 40°C

移動相 : アセトニトリル／精製水混液 (8/2、v/v)

流量 : 1 mL/min

検出 : UV (測定波長 275 nm)

注入量 : 5 μL

オートサンプラー内設定温度 : 10°C

5.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりげっ歯類を用いた試験が必要とされており、また、反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験に広く用いられ、背景資料が豊富である系統を選択した。

5.4 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] の雌雄各 62 匹をそれぞれ 8 週齢で入手^{注)}し、入荷日を馴化 1 日と起算して、3 日間の検疫期間を含む 20 日間、馴化飼育した。その間、一般状態を毎日

1回観察し、体重を馴化1、3、8、15及び20日に測定した。雌については、更に膣垢を馴化4~17日の間採取し、多数の角化上皮細胞から成る膣垢像を発情の指標として4~5日の周期で発情が回帰するものを正常とし、性周期異常の有無を調べた。その結果、雌2匹に性周期異常が認められたが、一般状態に異常は認められなかった。試験には、性周期異常の認められた雌2匹を除く雌雄より、順調な体重推移を示した各48匹をそれぞれ選択して10週齢で使用した。

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

5.5 群分け

前項に記載された馴化中の観察、検査結果に基づいて選抜された雌雄各48匹は、群分け当日の体重により各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群に割付けた。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組み合わせ(ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた)で行った。投与開始時の体重は、雄で395~454 g(平均体重:421 g)、雌は229~287 g(平均体重:257 g)であり、雌雄とも平均値 $\pm 20\%$ 以内の体重範囲であった。群分けから除外された雄14匹及び性周期異常の雌2匹は投与開始日に試験から除外した。残りの雌12匹は交配用無処置動物として継続飼育したが、交配に用いなかったため、交配終了後、試験から除外した。

5.6 飼育条件

飼育は、温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測値:21~25 $^{\circ}\text{C}$)、相対湿度 $50\pm 20\%$ (実測値:41~74%)、換気回数10~15回/h、照明12時間/日(07:00~19:00)の動物飼育室(飼育室番号:902号室)で行った。なお、飼育中に空調機の一時的な不調などにより、飼育室内の相対湿度の上昇がみられた。しかし、許容範囲を超えた時間は短く(約5~10分)、この間、動物に湿度上昇によると思われる異常はみられず、試験成績の信頼性に影響を及ぼす環境要因とはならなかった。動物は、交配中を除いてブラケット式金属製網ケージ(W254×D350×H170 mm:リードエンジニアリング株式会社)へ個別に収容した。なお、妊娠17日から授乳4日までは、床敷(ホワイトフレーク:日本チャールス・リバー株式会社)を入れたプラスチック製エコンケージ(W340×D400×H185 mm:日本クレア株式会社)へ1腹ごと収容した。飼料はNMF固形(放射線滅菌、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号:100210、100309、100415、100518、100611)をステンレス製給餌器により自由に摂取させた。飲料水は水道水(御殿場市営水道水)を自動給水装置又は給水瓶を用いて自由に摂取させた。飼料に関しては供試全ロットについて、床敷については、定期的(年6回)にそれぞれEurofins Scientific Analyticeあるいは財団法人日本食品分析センターで実施された混入物質の分析結果を入手した。飲料水については、芝浦セムテック株式会社(旧社名:東芝機械環境センター株式会社)に定期的(年4回)に水質検査を依頼し、その結果を入手した。これらの検査結果より飼料、飲料水及び床敷中の混入物質が試験成績に影響を与える可能性のないこ

とを確認した。

5.7 動物の識別

動物の個体識別は入荷時に 3 桁の番号が連番で刻印された小動物用耳標をつけて行った。群分け後は、性別及び投与量ごと（対照群、低、中及び高用量の順）に 4 桁の番号をつけた。なお、1000 の位は群、100 の位は性（0 番を雄、1 番を雌）、10 と 1 の位は個体番号とした。飼育ケージには、投与量（群）ごとに色分けされ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号、剖検予定日（雄）、交尾成立日（雌雄）及び分娩日（雌）を明記したラベルを付した。

5.8 投与経路、投与期間及び投与回数とそれらの選択理由

投与経路は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 421 に準じ、経口投与を選択した。投与期間は、雄では交配前 14 日間、交配期間 14 日間、その後剖検前日までの 14 日間の計 42 日間、雌では交配前 14 日間、交配期間及び妊娠期間を通して授乳 4 日までとした。なお、本試験では、分娩母動物については 41~46 日間、不妊動物（動物番号：2110、3104）については 40 あるいは 53 日間の投与期間となった。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている 1 回/日（7 回/週）とした。

5.9 投与方法

投与方法は、げっ歯類の経口投与として一般的な強制経口投与とした。投与容量は 5 mL/kg 体重とし、1 日 1 回、09:07~12:02 の間にフレキシブル胃ゾンデを用いて投与液を投与した。ただし、投与時に分娩中であった動物は分娩終了を待って 14:01~16:05 の間に投与した。対照群には媒体（コーン油）のみを同様に投与した。個体ごとの投与液量は、最近時の体重を基に 0.1 mL 単位で小数第二位を四捨五入して算出した。

5.10 投与量及び群構成

投与量は 10、50 及び 250 mg/kg/day の 3 用量とし、対照群を加え 4 群構成とした。1 群当たりの動物数は雌雄各 12 匹とした。群構成表を Text table 1. に示した。

Text table 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	被験液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	動物数	動物番号
対 照 群	0	0	5	雄	12	1001~1012
				雌	12	1101~1112
低用量群	10	2	5	雄	12	2001~2012
				雌	12	2101~2112
中用量群	50	10	5	雄	12	3001~3012
				雌	12	3101~3112
高用量群	250	50	5	雄	12	4001~4012
				雌	12	4101~4112

5.11 投与量の設定根拠

本試験の投与量は、先に実施した「2,4-ジ-*tert*-ブ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(投与量設定試験)」²⁾(投与量:250、500及び1000 mg/kg)の結果を参考に設定した。投与量設定試験では、500及び1000 mg/kg投与群において死亡動物が発現し、500 mg/kg投与群で一般状態、体重、摂餌量、血液学・血液化学検査、器官重量及び剖検所見に明らかな被験物質投与の影響がみられた。250 mg/kg投与群では、雄の血液学・血液化学検査、精巣重量、雌雄の肝臓重量、雄の腎臓の剖検所見に被験物質投与の軽度な影響が認められた。また、28日間反復投与毒性試験³⁾(投与量:5、20、75及び300 mg/kg)において、無影響量は雄で75 mg/kg/day、雌で20 mg/kg/dayとの報告がある。したがって、本試験における投与量は、明らかな毒性兆候の発現が予想される250 mg/kgを高用量とし、以下公比約5で除して50及び10 mg/kgをそれぞれ中及び低用量に設定した。

5.12 観察及び検査の方法

試験日の起算は、投与開始日を投与1日、投与1日から7日を投与1週、交尾成立日を妊娠0日、分娩終了日を授乳0日とした。

5.12.1 一般状態

全個体について、投与期間中は毎日3回(投与前、投与直後及び投与約2時間後)、それぞれ体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態における異常の有無を観察した。死亡動物(動物番号:4104、4108)は発見後速やかに病理学検査(5.12.8項)に供した。なお、妊娠期間中の動物を手にとっての定期的な観察は、妊娠0、7、14及び20日に行った。

5.12.2 体重

全個体について、雄は投与1、4、8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、42日及び剖検日に、雌は投与1、4、8、11、15日、交配期間中週2回(火曜、金曜)、妊娠0、4、7、11、14、17及び20日、授乳0及び4日並びに剖検日に体重を測定した。なお、午後に分娩の終了が確認された個体の授乳0日の体重を除いて、体重は午前中の投与前に測定した。

5.12.3 摂餌量

全個体について、雄は投与1、4、8、11、15、32、36、39及び42日に、雌は投与1、4、8、11及び15日、妊娠1、4、7、11、14、17及び20日並びに授乳2及び4日に残餌量を測定し、前日の給餌量との差を1日摂餌量として算出した。給餌量及び残餌量ともに午前中の投与前に測定した。

5.12.4 膣垢検査

雌の全個体について、投与開始翌日から交尾が認められるまで毎日膣垢を採取し、交配前投与期間中は 5.4 試験動物の項と同様に性周期異常の有無を調べるとともに発情回数及び発情から次の発情までの日数（性周期）を求めた。交配期間中は膣垢内の精子の有無を調べた。

5.12.5 交配

交配前投与期間終了後、同じ投与群の雌雄を 1:1 で終夜同居させ、翌朝、膣栓形成あるいは膣垢中に精子を確認したものを交尾成立とみなした。交配開始日を 0 日と起算して交尾までに要した日数を求めた。なお、雌雄の同居期間は最長 14 日間とし、この間交尾が成立しなかった雌（動物番号：2110）については交配期間終了日を妊娠 0 日と仮定し、交尾雌動物に準じて観察及び検査を行った。

5.12.6 分娩及び哺育

交尾が成立した雌動物は、妊娠 21 日から妊娠 25 日の午前まで 1 日 2 回（午前、午後）分娩の有無並びにその終了を確認し、交尾成立日より分娩終了までの間を妊娠期間として 1 日単位で求めた。分娩が終了した母動物については、胎盤及び羊膜の処理等を指標として分娩異常の有無を観察した後、授乳 4 日まで出生児を哺育させた。授乳期間中は児集め、営巣及び授乳の状態等を指標として哺育異常の有無を観察し、授乳 5 日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査（5.12.8 項）に供した。なお、妊娠 25 日の午前までに分娩が認められなかった 1 例（動物番号:3104）は、当日エーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ、病理学検査に供した。本例については、剖検時に子宮の着床の有無を確認した結果、着床が認められなかったため不妊とみなした。

5.12.7 出生児

母動物の分娩終了日を出生日（生後 0 日）とみなし、出生児数及び死産児数を数えた。出生児は外表異常の有無を観察し、性別を判定した後、体重を測定した。授乳期間中は毎日 1 回、死亡児の有無を観察した。生後 4 日に体重を測定した後、全例をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ剖検を行い、体外表、胸部・腹部を含む器官・組織の異常の有無を肉眼的に調べた。なお、出生児の体重は個別に測定し、雌雄別に各腹の平均値を算出した。

5.12.8 病理学検査

5.12.8.1 剖検及び器官重量

最終投与翌日にエーテル麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させた後、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、母動物については黄体数及び着床痕数を数えた。更に、雌雄の肝臓及び腎臓並びに精巣及

び精巣上体については重量（絶対重量）を測定し、これらの器官について剖検日の体重から体重 100 g 当たりの相対重量を算出した。精巣、精巣上体及び腎臓の重量については左右別々に測定し、その合計値で評価した。なお、授乳 4 日に全ての出生児が死亡した母動物（動物番号：3109）についてはその時点で同様に検査を実施した。

5.12.8.2 病理組織学検査

全ての個体の肝臓、腎臓、精巣、精巣上体、前立腺及び精嚢、卵巣、子宮及び膈並びに肉眼的異常部位を個体識別部（耳標を装着した耳介）とともにリン酸緩衝 10 vol% ホルマリン液で固定した（ただし、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後リン酸緩衝 10 vol%ホルマリン液に置換した。）。個体識別部を除くこれらの器官は、パラフィン包埋した後、切片とし、ヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色標本作製するとともに、精巣については更に PAS 染色標本作製した。鏡検は、まず対照群と高用量群の全個体並びに死亡動物、未交尾雌動物、不妊雌動物及び全出生児死亡母体の肝臓、腎臓及び上記内部生殖器並びに全ての肉眼的異常部位について行った。なお、精巣、精巣上体、精嚢及び卵巣は両側を、子宮は両角部を鏡検した。その結果、被験物質投与の影響が疑われた肝臓及び腎臓については、更に低及び中用量群の全個体を対照として検索した。

5.13 統計解析

5.13.1 パラメータの算出

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

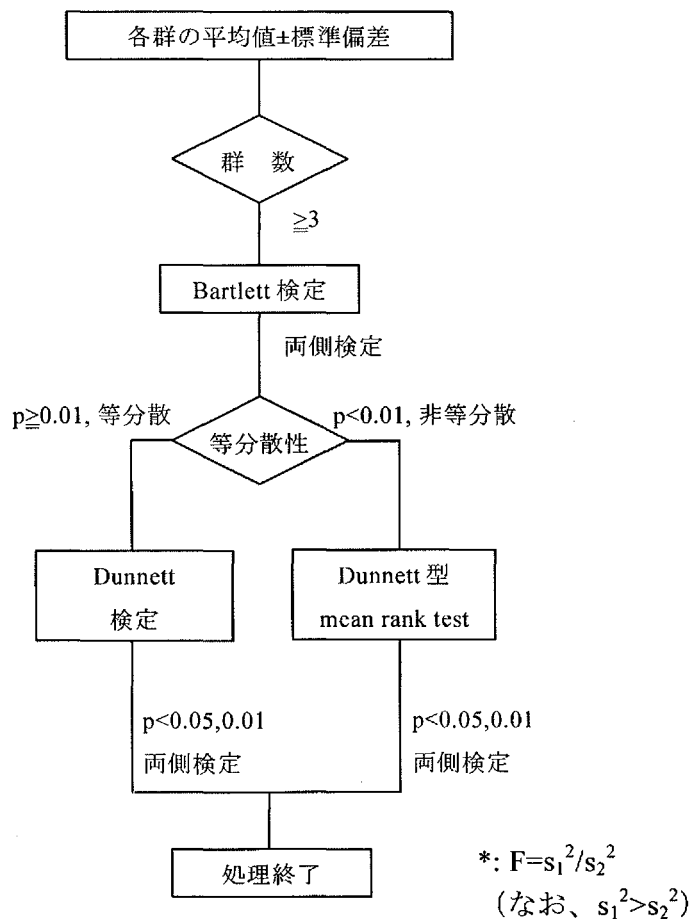
$$\text{生後 0 日の性比} = \text{雄出生児数} / \text{出生児数}$$

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

5.13.2 検定

データは対照群と各用量群との差について統計学的有意性の検定を行った。

体重、体重増加量（雄：投与 1~42 日、雌：投与 1~15 日、妊娠 0~20 日及び授乳 0~4 日、出生児：生後 0~4 日）、摂餌量、発情期像発現回数、性周期（発情周期）、交尾までに要した日数、妊娠期間、黄体数、着床痕数、生存児数、性比（生後 0 及び 4 日）及び器官重量（含、剖検時体重）は、群ごとに平均値及び標準偏差を求め、次に示す模式図の方法に従って検定した。なお、交配期間中の雌の体重データ、死亡動物、未交尾雌、不妊雌動物及び全児死亡母動物の器官重量データは統計解析より除外した。



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

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

6. 試験結果

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

雄では、250 mg/kg 投与群において流涎が 3 例に散見されたが、その他には異常は認められず、死亡動物も発現しなかった。雌では、投与期間中を通して一般状態に異常は認められなかったが、250 mg/kg 投与群において妊娠 23 日及び授乳 4 日に各 1 例（動物番号：4104、4108）が死亡した。50 mg/kg 投与群では、授乳 3 日に哺育行動の減少を示す母体が 1 例みられ、この母体の出生児の全例が死亡した。本例を除く、50 mg/kg 以下の群の雌雄には投与期間中を通して一般状態に異常は認められなかった。

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

250 mg/kg 投与群において雌雄とも徐々に体重が対照群を下回って推移する傾向を示した。しかし、対照群との差は僅かであり、有意な差は認められなかった。10 及び 50 mg/kg 投与群では、雌雄とも対照群と同様な体重推移を示した。

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

雌雄とも投与期間を通して対照群と各用量群の摂餌量に有意な差は認められなかった。

6.4 器官重量 (Table 4-1、4-2、Appendix 4-1~4-12)

250 mg/kg 投与群において雌雄の肝臓の絶対及び相対重量並びに雄の腎臓の相対重量が対照群に比べ有意な高値を示した。精巣及び精巣上体の重量には対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。

6.5 剖検所見 (Table 5-1、5-2、Appendix 5-1~5-96)

雄では、250 mg/kg 投与群において腎臓の白色巣が 6/12 例に認められ、50 及び 250 mg/kg 投与群において精巣上体の白色巣が各 1/12 例に認められた他、対照群の 1/12 例に精巣の小型化が認められた。

雌では、250 mg/kg 投与群において前胃の隆起巣及び胸腺の小型化が 1/12 例に認められた他、対照群において腎臓の嚢胞及び肺の暗赤色巣が各 1/12 例に認められた。

6.6 病理組織学検査 (Table 6-1~6-4、Appendix 5-1~5-96)

肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が 250 mg/kg 投与群の雄 8/12 例、同群の雌 6/12 例に認められた。250 mg /kg 投与群では更に腎臓に尿細管の拡張、尿細管の好塩基性化、炎症性細胞浸潤及び顆粒円柱が雌雄にみられ、これらに加え、硝子円柱及び細胞性円柱が雄に、尿細管細胞の空胞化及び集合管の変性が雌に認められた。その他、50 mg/kg 投与群の雌 1 例（動物番号：3109）に広範囲な皮質尿細管の変性や壊死に加え、尿細管の好塩基性化や種々の尿円柱が認められた。雌雄の内部生殖器には被験物質投与の影響は認められなかった。

6.7 性周期 (Table 7、Appendix 6-1~6-4)

250 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号: 4110) を除く全例に 14 日間の観察期間中に 4~5 日周期で正常な発情回帰が認められ、発情回数及び性周期ともに対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。なお、正常な発情回帰が認められなかった 250 mg/kg 投与群の 1 例は連続発情期像を示した。

6.8 交配成績 (Table 8、Appendix 7-1~7-4)

10 mg/kg 投与群の雌雄 1 組 (動物番号: 2010、2110) を除く全例で交尾が成立し、交尾成立雌については 50 mg/kg 投与群の 1 例 (動物番号: 3104) を除いて妊娠が認められ、交尾に要した日数、交尾率、授精率及び受胎率には対照群と各用量との間に有意な差は認められなかった。

6.9 分娩成績 (Table 9、Appendix 8-1~8-4)

妊娠 23 日に死亡した 250 mg/kg 投与群の 1 例を除く妊娠動物全例が正常に分娩し、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数及び着床率には対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。しかし、250 mg/kg 投与群において出生率が対照群に比べ有意な低値を示した。

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

出生児の生後 0 及び 4 日における性比には対照群と各用量群との間に有意な差は認められず、外表異常を有する出生児は何れの群にもみられなかった。

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

生後 4 日生存率には対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。なお、生後 4 日までに 50 mg/kg 投与群の 1 腹 (動物番号: 3109) は 14 匹の出生児全てが死亡し、250 mg/kg 投与群の 1 腹 (動物番号: 4107) は 11 匹の出生児のうち 10 匹が死亡した。一方、これらを除く腹においては良好な生存性がみられた。

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

出生日及び生後 4 日における体重並びに生後 4 日までの体重増加量のいずれにも対照群と各用量群との間に有意な差は認められなかった。

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

いずれの群においても出生児の体外表、胸部・腹部を含む器官・組織に肉眼的異常は認められなかった。

7. 考察

2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールを 0（対照群：コーン油）、10、50 及び 250 mg/kg/day の用量で、Sprague-Dawley 系 SPF ラットの、雄に交配前 14 日間及び交配期間を通して剖検前日まで、雌には交配前 14 日間及び交配期間並びに妊娠期間を通して授乳 4 日まで経口投与し、雌雄動物に対する影響、特に、生殖発生毒性について概略的に検討した。

7.1 雌雄動物に対する影響

250 mg/kg 投与群の雌において妊娠 23 日及び授乳 4 日に各 1 例が死亡した。同群では、雄において流産が 3 例に散見され、体重は雌雄ともに対照群を下回って推移する傾向がみられた。病理学検査では、250 mg/kg 投与群の雌雄において肝臓重量の増加とこれに関連する組織変化と考えられる小葉中心性肝細胞肥大が認められた。また同群では、雄において腎臓重量の増加傾向と肉眼的所見として白色巣が認められ、更に、雌雄の腎臓に組織変化として尿細管の拡張、尿細管の好塩基性化、炎症性細胞浸潤及び顆粒円柱などが認められた。これらの肝臓及び腎臓に認められた変化は、先の 28 日間反復経口投与毒性試験³⁾において 300 mg/kg の用量で認められた変化と類似しており、2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールの影響と判断された。50 mg/kg 投与群では、病理組織学検査により雌において 1 例の腎臓に広範囲な皮質尿細管の変性や壊死に加え、尿細管の好塩基性化や種々の尿円柱が認められた。しかし、腎臓組織に認められた変化は、250 mg/kg 投与群で認められたネフロン単位での変化とは異なる状況であり、50 mg/kg 投与群の他の雌雄の腎臓には被験物質投与の影響を示唆する変化は認められない。更に、当該個体では生後 4 日までに全ての出生児が死亡したが、この出生児死亡も同群にあっては当該個体に限定された異常であることを考慮すると、妊娠、出産及び哺育の特殊な状況にあって個体特異的に認められた異常であり、偶発的な変化と考えられた。

7.2 生殖発生に対する影響

250 mg/kg 投与群において膣垢検査で連続発情期像を示す雌が 1 例みられた。しかし、他の雌の性周期に異常は認められず、雌雄動物の交尾までに要した日数、交尾率、授精率及び受胎率に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。これら交配成績に加え、雌雄内部生殖器に関する病理組織学検査では、被験物質投与に起因した変化は認められなかったことから、2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールの 250 mg/kg/day 投与は、精子形成及び排卵などの性腺機能、交尾から受胎に至る雌雄動物の生殖機能に影響を及ぼさないと考えられた。

妊娠動物は 250mg/kg 投与群の死亡動物を除いていずれの群においても正常に分娩し、出産率、妊娠期間、黄体数、着床痕数及び着床率に被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。しかし、250 mg/kg 投与群において出生率が低値を示し、

統計学的有意性は認められなかったが、同群の死産児率は当施設の背景データの範囲(0.0~5.9%、2004~2009年、16試験)を上回り、出生児数は背景データの範囲(12.4~14.8、2004~2009年、16試験)を下回った。したがって、2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールの 250 mg/kg/day 投与は、母動物の分娩に顕著な異常は認められないが、出産児の生存性を軽度低下させると考えられた。

出生児に関し、先に述べた如く、50 mg/kg 投与群の 1 腹は生後 4 日までに全ての出生児が死亡し、また、250 mg/kg 投与群の 1 腹では 11 匹の出生児のうち 10 匹が死亡した。しかし、50 及び 250 mg/kg 投与群では、これら 2 腹を除く各腹における出生児の生存率は 83.3%以上と良好な値を示し、且つ、両群における平均生存率は当施設の背景データの範囲(81.8~100%、2004~2009年、16試験)であることから、両投与群でみられた出生児の生存率が極度に低下した腹は被験物質投与に関連しない個体特異的な発現と考えられた。出生日及び生後 4 日の性比及び体重及び体重増加量に被験物質投与の影響は認められず、出生児の外表及び剖検所見に被験物質投与に起因した異常は認められなかった。

これらの結果から、本試験条件下における 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールの雌雄動物に対する無影響量及び無毒性量は共に 50 mg/kg/day であり、生殖発生毒性に対する無影響量及び無毒性量は雄ではいずれも 250 mg/kg/day、雌ではいずれも 50 mg/kg/day と判断した。

8. 文献

- 1) HPLC を用いた 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノールの被験液中濃度測定法バリデーション及び安定性・均一性試験（媒体：コーン油）（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：A-2270、2010 年）
- 2) 2,4-ジ-*tert*-ブ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（投与量設定試験）（株式会社ボゾリサーチセンター、試験番号：C-R144、2010 年）

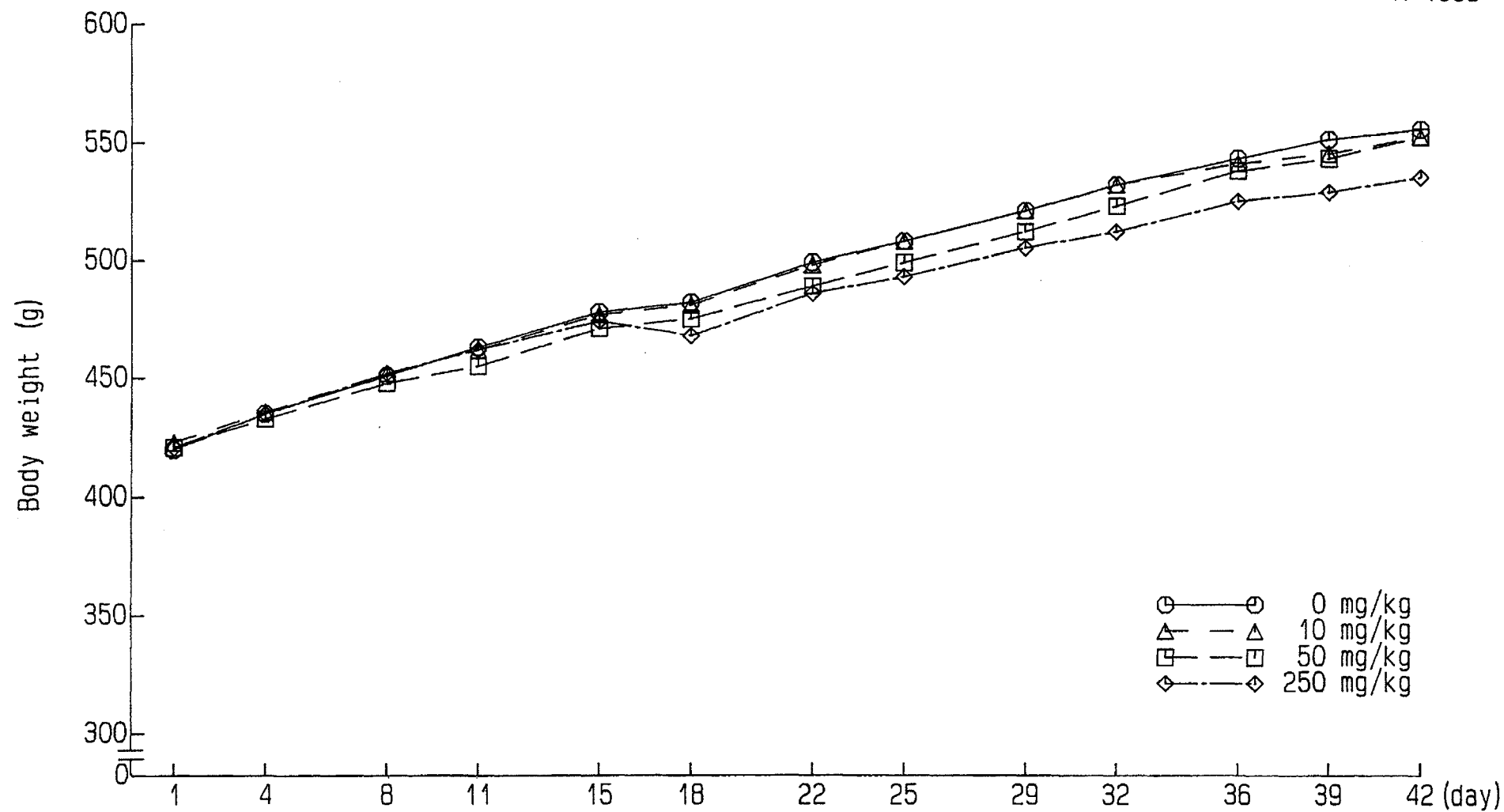


Fig.1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol

Body weight of male rats

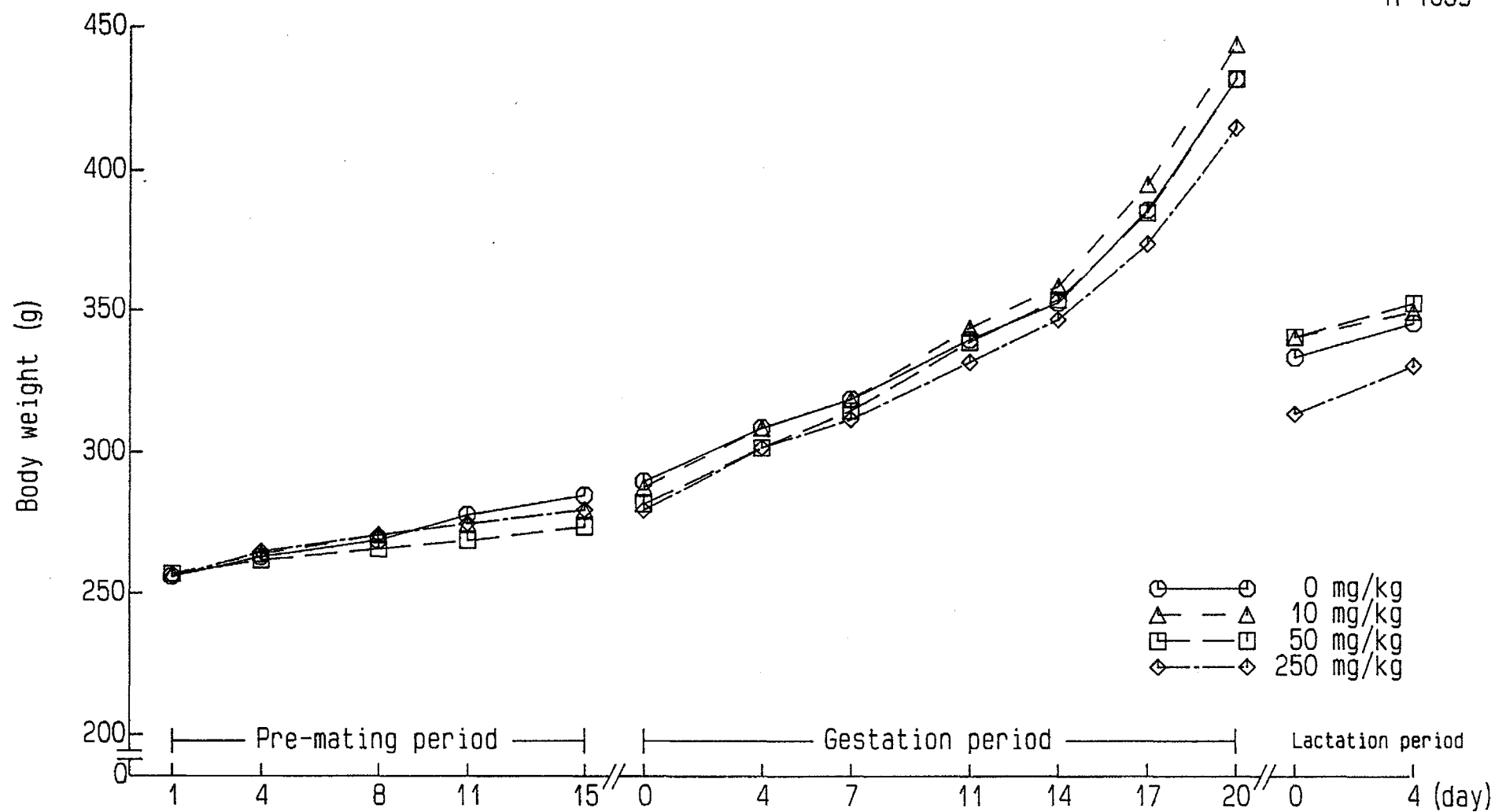


Fig.2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol

Body weight of female rats

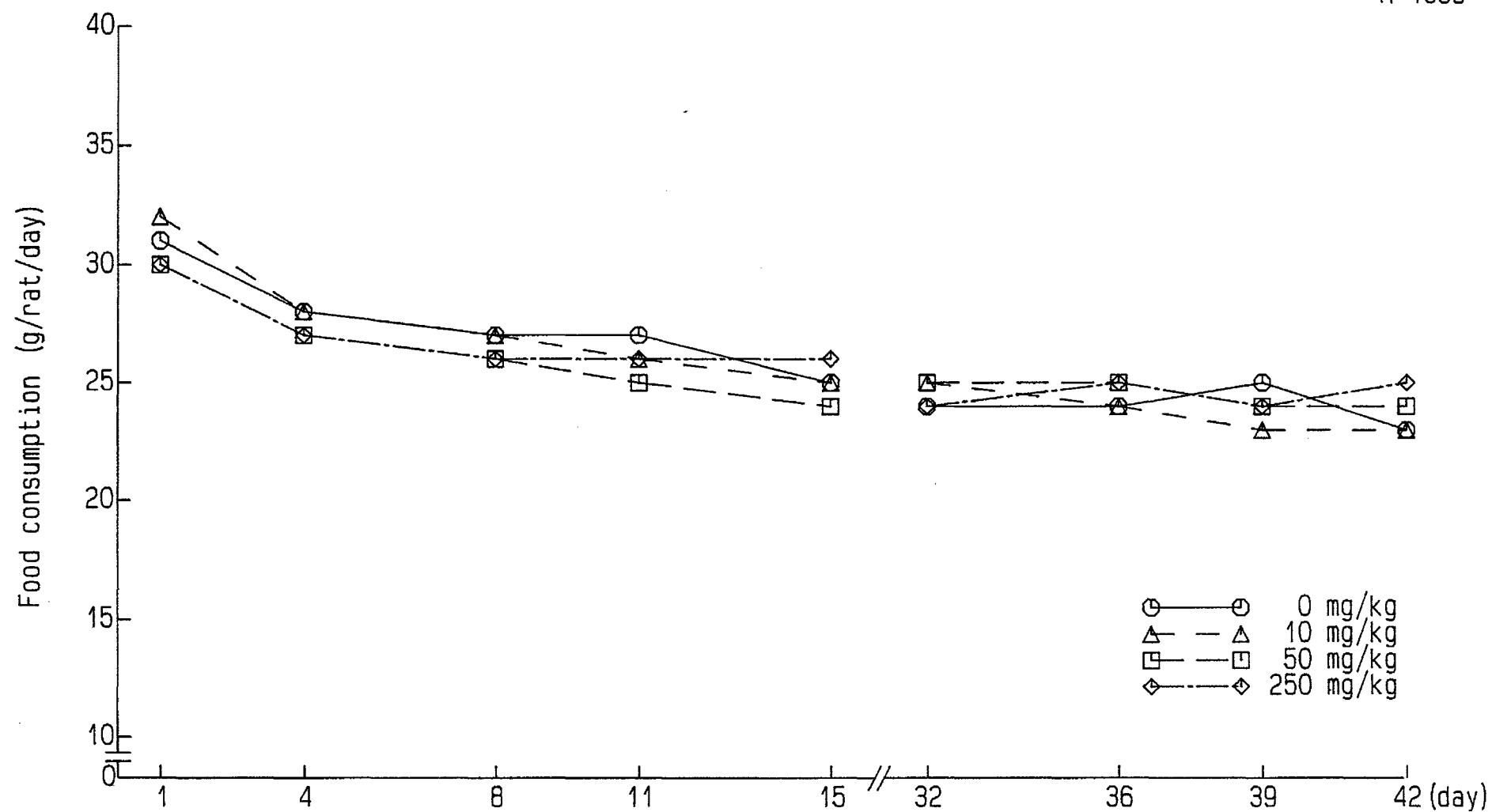


Fig.3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol

Food consumption of male rats

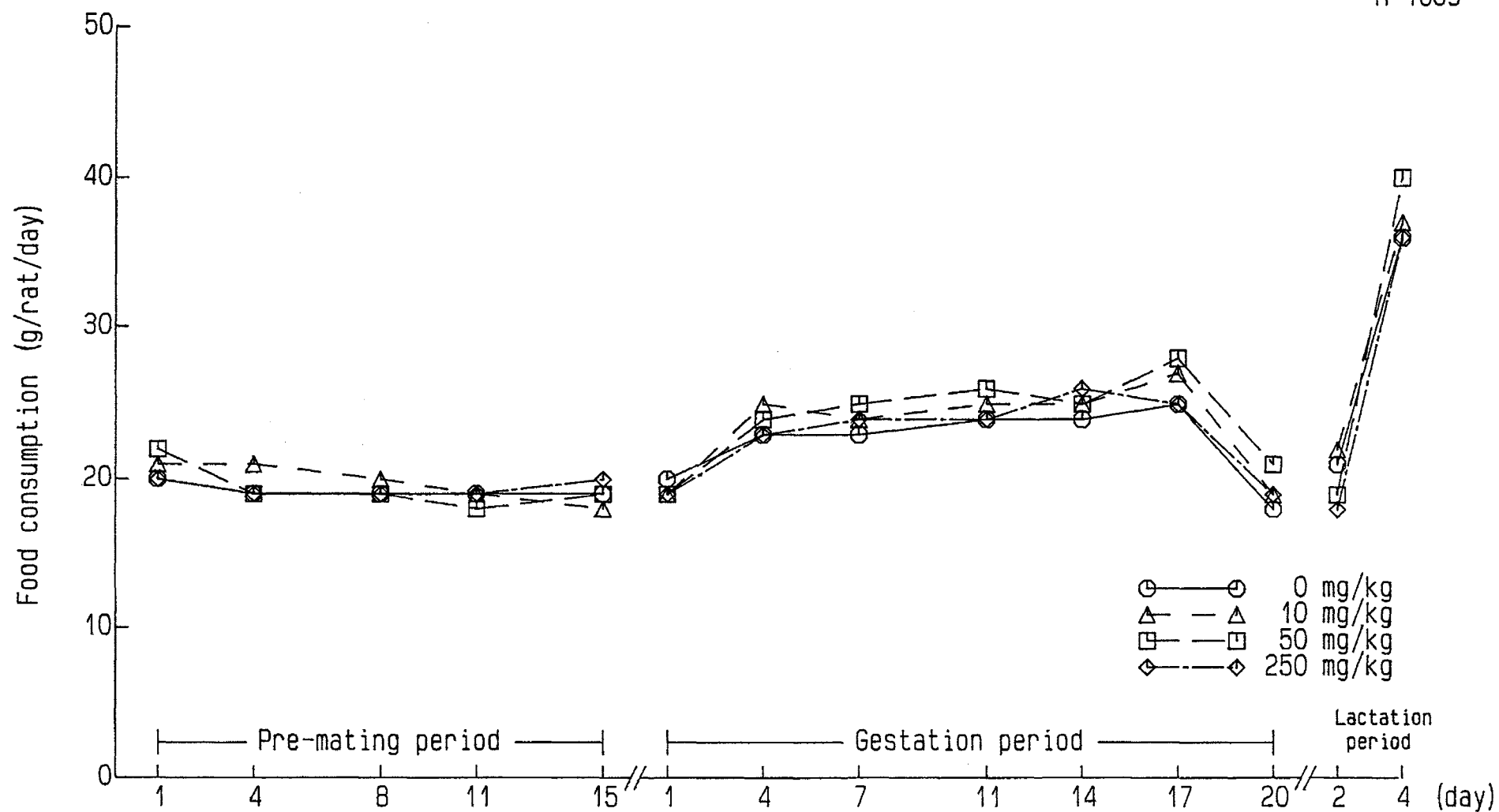


Fig.4 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol

Food consumption of female rats

Table 1-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Clinical signs in male rats

Dose mg/kg	Signs	Day of administration						
		1-7	8-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43a)
0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
10	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
50	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0
250	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12
	No. of animals with abnormal findings	0	0	2	2	3	0	0
	Salivation	0	0	2	2	3	0	0

a):Day of necropsy

Clinical signs in female rats during the pre-mating period

[illegible]

Table 1-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol
Clinical signs in dams during the gestation period

Dose mg/kg	Signs	Administration																							
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23a)
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	1	0
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	No. of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	0
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	No. of dams	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	0
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	No. of dams	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	5	1
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

a): Gestation day

Table 1-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Clinical signs in dams during the lactation period

Dose mg/kg	Signs	Administration					
		0	1	2	3	4	5a)
0	No. of dams	12	12	12	12	12	12
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
10	No. of dams	11	11	11	11	11	11
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	0	0
50	No. of dams	11	11	11	11	11	10 ^{b)}
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	1	0	0
	Decrease in nursing behavior	0	0	0	1	0	0
250	No. of dams	11	11	11	11	11	10
	No. of dams with abnormal findings	0	0	0	0	1	0
	Dead	0	0	0	0	1	0

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 4 because all pups died.

Table 2-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol

Body weight of male rats

Dose mg/kg		Pre-mating period					Mating period				Post-mating period				Gain 1-42
		1	4	8	11	15	18	22	25	29	32	36	39	42a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	420	435	451	463	478	482	499	508	521	532	543	551	555	136
	S.D.	15	16	16	17	17	20	20	19	19	18	21	22	23	17
10	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	423	436	452	462	477	481	498	508	521	532	541	545	552	129
	S.D.	14	14	16	21	25	27	29	33	36	39	44	46	47	39
50	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	421	433	448	455	471	475	489	499	512	523	538	543	552	131
	S.D.	17	16	18	18	18	18	22	23	24	26	25	26	27	25
250	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	421	435	452	462	474	468	486	493	505	512	525	529	535	114
	S.D.	17	17	20	20	22	27	27	29	30	30	31	31	32	24

Unit: g

No.: No. of animals

a): Day of administration

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Body weight of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Day of administration					Gain 1-15
		1	4	8	11	15	
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	256	263	269	278	285	28
	S.D.	14	12	11	13	15	17
10	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	257	264	271	275	280	22
	S.D.	14	13	13	13	13	8
50	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	257	262	266	269	274	17
	S.D.	11	12	12	14	13	10
250	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	256	265	271	275	280	23
	S.D.	15	13	14	12	13	10

Unit: g

No.: No. of animals

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-3 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol

Body weight of dams during the gestation period

Dose mg/kg		Administration							Gain 0-20
		0	4	7	11	14	17	20a)	
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	290	309	319	340	353	386	432	143
	S.D.	17	17	19	20	21	26	25	16
10	No.	11	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	288	309	319	344	359	395	444	156
	S.D.	17	16	19	19	23	28	31	17
50	No.	11	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	282	302	315	339	354	385	432	150
	S.D.	13	15	17	20	22	24	28	20
250	No.	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	280	302	312	332	347	374	415	135
	S.D.	15	15	17	19	22	25	26	15

Unit: g

No.: No. of dams

a): Gestation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 2-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Body weight of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration		Gain 0-4
		0	4a)	
0	No.	12	12	12
	Mean	334	346	12
	S.D.	27	24	14
10	No.	11	11	11
	Mean	341	350	9
	S.D.	29	25	13
50	No.	11	10 ^{b)}	10
	Mean	341	353	9
	S.D.	28	19	12
250	No.	11 ^{c)}	10 ^{d)}	10
	Mean	314	331	16
	S.D.	26	41	31

Unit: g

No.: No. of dams

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 4 because all pups died.

c): One dam died on gestation day 23.

d): One dam died on lactation day 4.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Food consumption of male rats

Dose mg/kg		Pre-mating period					Post-mating period			
		1	4	8	11	15	32	36	39	42a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	31	28	27	27	25	24	24	25	23
	S.D.	2	2	1	3	2	2	2	3	3
10	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	32	28	27	26	25	25	24	23	23
	S.D.	2	2	2	3	3	3	3	4	3
50	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	30	27	26	25	24	25	25	24	24
	S.D.	3	3	3	2	2	3	4	2	3
250	No.	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	30	27	26	26	26	24	25	24	25
	S.D.	4	2	2	2	1	3	3	3	2

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

a): Day of administration

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Food consumption of female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg		Day of administration				
		1	4	8	11	15
0	No.	12	12	12	12	12
	Mean	20	19	19	19	19
	S.D.	3	2	3	2	2
10	No.	12	12	12	12	12
	Mean	21	21	20	19	18
	S.D.	4	2	3	2	1
50	No.	12	12	12	12	12
	Mean	22	19	19	18	19
	S.D.	3	3	3	3	3
250	No.	12	12	12	12	12
	Mean	20	19	19	19	20
	S.D.	4	2	2	2	2

Unit: g/rat/day

No.: No. of animals

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Food consumption of dams during the gestation period

Dose mg/kg		Administration						
		1	4	7	11	14	17	20a)
0	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	20	23	23	24	24	25	18
	S.D.	2	3	3	4	3	3	2
10	No.	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	19	25	24	25	25	27	19
	S.D.	2	2	3	2	3	4	5
50	No.	11	11	11	11	11	11	11
	Mean	19	24	25	26	25	28	21
	S.D.	4	3	4	3	3	3	3
250	No.	12	12	12	12	12	12	12
	Mean	19	23	24	24	26	25	19
	S.D.	3	3	3	4	5	5	4

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Gestation day

No significant difference in any treated groups from control group

Table 3-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Food consumption of dams during the lactation period

Dose mg/kg		Administration	
		2	4a)
0	No.	12	12
	Mean	21	36
	S.D.	6	6
10	No.	11	11
	Mean	22	37
	S.D.	4	5
50	No.	11	10 ^{b)}
	Mean	19	40
	S.D.	10	8
250	No.	11 ^{c)}	10 ^{d)}
	Mean	18	36
	S.D.	11	15

Unit: g/rat/day

No.: No. of dams

a): Lactation day

b): One dam was necropsied on lactation day 4 because all pups died.

c): One dam died on gestation day 23.

d): One dam died on lactation day 4.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 4-1

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Organ weight of male rats

		Dose mg/kg		Body weight g	Liver g(g/100g BW)	Kidneys (R+L) g(g/100g BW)	Testes (R+L) g(g/100g BW)	Epididymides (R+L) mg(mg/100g BW)
Absolute	0	No.		12	12	12	12	12
		Mean		559	20.16	3.38	3.39	1312
		S.D.		23	2.65	0.20	0.37	128
	10	No.		12	12	12	12	12
		Mean		555	19.93	3.32	3.47	1351
		S.D.		47	2.38	0.19	0.25	95
	50	No.		12	12	12	12	12
		Mean		554	20.65	3.39	3.66	1391
		S.D.		26	2.07	0.28	0.22	109
	250	No.		12	12	12	12	12
		Mean		537	23.50**	3.72	3.42	1339
		S.D.		32	2.49D	0.54	0.25	114
Relative	0	No.			12	12	12	12
		Mean			3.60	0.60	0.61	235
		S.D.			0.37	0.03	0.07	23
	10	No.			12	12	12	12
		Mean			3.58	0.60	0.63	245
		S.D.			0.19	0.03	0.06	24
	50	No.			12	12	12	12
		Mean			3.72	0.61	0.66	251
		S.D.			0.26	0.03	0.05	22
	250	No.			12	12	12	12
		Mean			4.37**	0.69*	0.64	250
		S.D.			0.33D	0.10DT	0.06	25

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

D: Dunnett's test

DT: Dunnett-type rank test

Table 4-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol

Organ weight of female rats

		Dose mg/kg		Body weight g	Liver g(g/100g BW)	Kidneys (R+L) g(g/100g BW)
Absolute	0	No.		12	12	12
		Mean		358	16.19	2.17
		S.D.		22	1.73	0.20
	10	No.		11	11	11
		Mean		364	15.67	2.23
		S.D.		23	1.82	0.17
	50	No.		10	10	10
		Mean		368	16.62	2.26
		S.D.		22	1.12	0.10
	250	No.		10	10	10
		Mean		343	19.28**	2.26
		S.D.		45	3.13D	0.24
Relative	0	No.			12	12
		Mean			4.52	0.61
		S.D.			0.37	0.06
	10	No.			11	11
		Mean			4.30	0.62
		S.D.			0.36	0.06
	50	No.			10	10
		Mean			4.52	0.62
		S.D.			0.29	0.04
	250	No.			10	10
		Mean			5.62**	0.67
		S.D.			0.45D	0.12

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

D: Dunnett's test

Table 5-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
 with 2,4-Di-tert-butylphenol
 Gross pathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 12	M 10 12	M 50 12	M 250 12
Findings					
Epididymis					
Focus,white		0	0	1	1
Kidney					
Focus,white		0	0	0	6
Testis					
Small		1	0	0	0

M : Male

Table 5-2 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol
Gross pathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 12	F 10 12	F 50 12	F 250 12
Findings					
Kidney					
Cyst		1	0	0	0
Lung(bronchus)					
Focus,dark red		1	0	0	0
Stomach					
Focus,raised,forestomach		0	0	0	1
Thymus					
Small		0	0	0	1

F : Female

Table 6-1 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol
Histopathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	M 0 12	M 10 12	M 50 12	M 250 12
Findings					
Epididymis					
Number examined		12	0	1	12
Not remarkable		11	0	0	10
Granuloma, spermatic		1	0	1	2
mild		1	0	1	2
Hypospermia		1	0	0	0
severe		1	0	0	0
Cell debris, lumen		1	0	0	0
mild		1	0	0	0
Kidney					
Number examined		12	12	12	12
Not remarkable		11	10	9	0
Cyst		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Dilatation, tubular		0	0	0	12
minimal		0	0	0	4
mild		0	0	0	4
moderate		0	0	0	4
Basophilia, tubular		1	2	2	12
minimal		1	2	2	0
mild		0	0	0	5
moderate		0	0	0	7
Urinary cast, hyaline		0	0	0	12
minimal		0	0	0	8
mild		0	0	0	4
Urinary cast, granular		0	0	0	12
minimal		0	0	0	11
mild		0	0	0	1
Urinary cast, cellular		0	0	0	1
minimal		0	0	0	1
Cell infiltration, inflammatory		1	1	2	12
minimal		1	1	2	1
mild		0	0	0	6
moderate		0	0	0	5
Liver					
Number examined		12	12	12	12
Not remarkable		12	11	12	4
Microgranuloma		0	1	0	0
minimal		0	1	0	0
Hypertrophy, hepatocytic, central		0	0	0	8
minimal		0	0	0	6
mild		0	0	0	2
Prostate					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		2	0	0	6
Cell infiltration, inflammatory		10	0	0	6
minimal		5	0	0	4
mild		5	0	0	2
Seminal vesicle					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		12	0	0	12
Testis					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		10	0	0	12
Atrophy, seminiferous tubular		1	0	0	0
severe		1	0	0	0

M : Male

Table 6-2

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 12	10 12	50 12	250 12
Testis (continued)					
Arteritis		1	0	0	0
minimal		1	0	0	0
Testis(PAS stain)					
Number examined		12	0	0	12
Not remarkable		12	0	0	12

M : Male

Table 6-3

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Histopathological findings

Organs	Sex: Dose(mg/kg): Number:	F 0 12	F 10 12	F 50 12	F 250 12
Findings					
Kidney					
Number examined		12	12	12	12
Not remarkable		11	12	11	3
Cyst		1	0	0	0
mild		1	0	0	0
Dilatation,tubular		0	0	0	5
minimal		0	0	0	3
mild		0	0	0	2
Vacuolation,tubular cell		0	0	0	2
minimal		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Basophilia,tubular		1	0	1	6
minimal		1	0	0	2
mild		0	0	1	4
Urinary cast,hyaline		0	0	1	0
mild		0	0	1	0
Urinary cast,granular		0	0	1	3
minimal		0	0	0	3
mild		0	0	1	0
Degeneration,collecting duct		0	0	0	2
minimal		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Degeneration,tubular cell,cortex		0	0	1	0
moderate		0	0	1	0
Urinary cast,bloody		0	0	1	0
minimal		0	0	1	0
Necrosis,tubular cell		0	0	1	0
mild		0	0	1	0
Cell infiltration,inflammatory		1	0	0	3
minimal		1	0	0	3
Liver					
Number examined		12	12	12	12
Not remarkable		11	12	12	6
Microgranuloma		1	0	0	1
minimal		1	0	0	1
Hypertrophy,hepatocytic,central		0	0	0	6
minimal		0	0	0	6
Lung(bronchus)					
Number examined		1	0	0	0
Not remarkable		1	0	0	0
Ovary					
Number examined		12	1	2	12
Not remarkable		12	1	2	12
Stomach					
Number examined		0	0	0	1
Ulcer,forestomach		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Thymus					
Number examined		0	0	0	1
Atrophy		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Uterus					
Number examined		12	1	2	12
Not remarkable		12	1	1	12
Thrombus		0	0	1	0
mild		0	0	1	0

F : Female

Table 6-4

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Histopathological findings

Organs	Sex:	F	F	F	F
Findings	Dose(mg/kg): Number:	0 12	10 12	50 12	250 12
Vagina					
Number examined		12	1	2	12
Not remarkable		12	1	2	12

F : Female

Table 7

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol

Estrous cycle in female rats during the pre-mating period

Dose mg/kg	No. of animals	Count of estrus						Mean duration of cycles Mean±S.D.
		0	1	2	3	4	Mean±S.D.	
0	12	0	0	0	8	4	3.3±0.5	4.0±0.0
10	12	0	0	0	6	6	3.5±0.5	4.0±0.1
50	12	0	0	0	7	5	3.4±0.5	4.2±0.4
250	12	0	1	0	6	5	3.3±0.9	4.2±0.3

No significant difference in any treated groups from control group

Table 8

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Mating and fertility of animals

Dose mg/kg	Male				Female			
	No. of males	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Insemination index (%) b)	No. of females	Days until copulation Mean±S.D.	Copulation index (%) a)	Fertility index (%) c)
0	12	2.6±1.2	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.6±1.2	12/12(100.0)	12/12(100.0)
10	12	2.5±1.1	11/12(91.7)	11/11(100.0)	12	2.5±1.1	11/12(91.7)	11/11(100.0)
50	12	2.6±1.4	12/12(100.0)	11/12(91.7)	12	2.6±1.4	12/12(100.0)	11/12(91.7)
250	12	2.4±0.9	12/12(100.0)	12/12(100.0)	12	2.4±0.9	12/12(100.0)	12/12(100.0)

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

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

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

No significant difference in any treated groups from control group

Table 9 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol

Delivery data on dams

Dose mg/kg		No. of pregnant females	No. of females with liveborns	Delivery index % a)	Gestation length in days	No. of corpora lutea	No. of implan- tation sites	Implan- tation index % b)	No. of stillborns (%)c)	No. of liveborns	Live birth index % d)
0	Total	12	12	100.0		188	180		2	174	
	Mean				22.0	15.7	15.0	96.1	(1.2)	14.5	96.6
	S.D.				0.0	1.7	1.2	4.7	(2.8)	1.6	5.4
10	Total	11	11	100.0		184	172		1	165	
	Mean				22.0	16.7	15.6	94.2	(0.6)	15.0	96.0
	S.D.				0.0	2.5	1.4	6.7	(2.0)	1.5	4.4
50	Total	11	11	100.0		170	164		3	151	
	Mean				21.8	15.5	14.9	95.6	(1.9)	13.7	92.1
	S.D.				0.4	2.1	3.1	10.6	(3.2)	3.1	6.7
250	Total	12e)	11	91.7		169	159		10	134	
	Mean				22.0	15.4	14.5	94.1	(6.3)	12.2	85.0*
	S.D.				0.6	2.4	2.6	8.1	(13.2)	3.0	17.7DT

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

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

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

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

e): One dam died on gestation day 23.

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

DT: Dunnett-type rank test

Table 10

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol

Sex ratio and external examination of pups

Dose mg/kg	No. of dams		Liveborns		Sex ratio of liveborns at birth a)	Day 4		Sex ratio of live pups on day 4 b)	External c) abnor- malities (%)d)
			No. of males	No. of females		No. of males	No. of females		
0	12	Total	90	84		89	82		0
		Mean	7.5	7.0	0.51	7.4	6.8	0.52	(0.0)
		S.D.	2.2	1.7	0.11	2.1	1.8	0.12	(0.0)
10	11	Total	98	67		98	67		0
		Mean	8.9	6.1	0.60	8.9	6.1	0.60	(0.0)
		S.D.	2.1	3.0	0.16	2.1	3.0	0.16	(0.0)
50	11	Total	84	67		78	58		0
		Mean	7.6	6.1	0.55	7.8	5.8	0.57	(0.0)
		S.D.	3.3	2.3	0.16	3.3	2.2	0.16	(0.0)
250	11	Total	64	70		52	55		0
		Mean	5.8	6.4	0.48	5.2	5.5	0.45	(0.0)
		S.D.	1.7	1.7	0.09	2.5	2.4	0.18	(0.0)

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

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

c): No. of liveborns with external abnormalities

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

No significant difference in any treated groups from control group

Table 11 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol

Viability index of pups

Dose mg/kg		No. of dams	No. of live pups		Viability index on postnatal day 4 % a)
			Day 0	Day 4	
0	Total	12	174	171	
	Mean		14.5	14.3	98.3
	S.D.		1.6	1.7	4.3
10	Total	11	165	165	
	Mean		15.0	15.0	100.0
	S.D.		1.5	1.5	0.0
50	Total	11	151	136	
	Mean		13.7	12.4	90.3
	S.D.		3.1	5.1	30.0
250	Total	10	119	107	
	Mean		11.9	10.7	89.2
	S.D.		3.0	4.6	28.6

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

Table 12 A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally with 2,4-Di-tert-butylphenol

Body weight of pups

Dose mg/kg		Male			Female		
		0	4a)	Gain	0	4a)	Gain
0	No.	12	12	12	12	12	12
	Mean	6.6	9.6	3.0	6.2	9.1	2.9
	S.D.	0.5	0.9	0.8	0.4	0.9	0.7
10	No.	11	11	11	11	11	11
	Mean	6.7	9.8	3.0	6.3	9.5	3.1
	S.D.	0.5	0.9	0.5	0.4	0.7	0.5
50	No.	11	10 ^{b)}	10	11	10 ^{b)}	10
	Mean	6.5	10.1	3.6	6.2	9.8	3.6
	S.D.	0.4	1.1	0.9	0.5	1.3	0.9
250	No.	11	9 ^{c)}	9	11	10 ^{d)}	10
	Mean	6.5	9.9	3.2	6.1	8.9	2.8
	S.D.	0.7	2.4	2.0	0.5	2.4	2.0

Unit: g

No.: No. of dams

a): Postnatal day

b): All pups in one dam died.

c): One dam died on lactation day 4 and all male pups in one dam died.

d): One dam died on lactation day 4.

No significant difference in any treated groups from control group

Table 13

A reproduction/developmental toxicity screening test in rats treated orally
with 2,4-Di-tert-butylphenol

Gross pathological findings in pups on postnatal day 4

	Dose (mg/kg)	0	10	50	250
Male					
No. of pups examined		89	98	78	52
No. of pups with abnormal findings		0	0	0	0
Female					
No. of pups examined		82	67	58	55
No. of pups with abnormal findings		0	0	0	0