

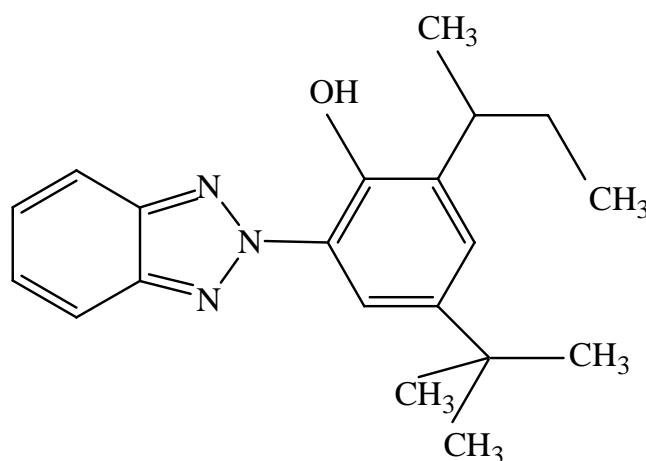
2-(2*H*-Benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol

2-(2*H*-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(*tert*-ブチル)-6-(*sec*-ブチル)フェノール

[CAS No. 36437-37-3]

Molecular formula: C₂₀H₂₅N₃O

Molecular weight: 323.44



ABSTRACT

1. Material and method

Purity	: 100 %
Test species/strain	: Rat/CrI:CD(SD)
Test method	: OECD Test Guideline 422
Route	: Oral (gavage)
Dosages	: 0, 0.5, 2.5, 12.5 mg/kg
Dosages for recovery	: 0, 12.5 mg/kg
Number of animals/group	: Males, 12 (5 for recovery) ; females, 12; satellite females, 5
Vehicle	: Olive oil
Administration period	: Males, 42 days Females, from 14 days before mating to day 4 of lactation Females (satellite), 42 days
Recovery period	: Males, 14 days Females (satellite), 14 days
Terminal killing	: Males, day 43 of treatment and 15 of recovery Females, day 5 of lactation Females (satellite), day 15 of recovery Offspring, 4 days after birth
GLP	: Yes

2. Results

Repeated dose toxicity

No changes were observed in clinical observations, reflex/reaction, grip strength, locomotor activity, body weight, food consumption, urinalysis and hematology.

The plasma level of triglyceride in the males given 0.5 mg/kg and above was decreased, and the levels of albumin, A/G ratio and ALP in the males given 12.5 mg/kg were increased. In the females, the levels of triglyceride and phospholipid were decreased in the 0.5 mg/kg and above group, and that of AST was increased in the 12.5 mg/kg group. These changes were not observed in the recovery groups of either sex, while a decreased plasma level of total cholesterol was noted in the satellite females given 12.5 mg/kg.

Both absolute and relative liver weights, and relative kidney weight were increased in the males given 12.5 mg/kg. These changes disappeared at the end of the recovery period. No compound-related findings were histopathologically recognized in any dosed group of either sex.

Reproductive and developmental toxicity

No effect of the compound was observed on the reproductive performances, such as the estrous cycle, copulation, fertility, delivery and lactation. No effect of the compound was observed on the implantation, the number of pups, sex ratio of pups, viability of the pups during 4 days of lactation and weights of the pups. No external abnormalities or macroscopic findings were detected in any pup.

3. Evaluation

No observed effect level (NOEL)

For the repeated dose toxicity, the endpoint for deciding NOEL in males was decreased plasma level of triglyceride in the males given 0.5 mg/kg and above and that in females was decreased triglyceride and phospholipid in the females given 0.5 mg/kg and above. For the reproductive/developmental toxicity, there was no effect in both sexes and the offspring in the 12.5 mg/kg-dosed group.

It was concluded that the NOEL for the repeated dose toxicity of 2-(2*H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol was below 0.5 mg/kg/day for males and females, and that the NOEL for the reproductive/developmental toxicity was 12.5 mg/kg/day for males, females and offspring.

No observed adverse effect level (NOAEL)

For the repeated dose toxicity, no adverse effect was observed in both sexes given 12.5 mg/kg. For the reproductive/developmental toxicity, there was no adverse effect in both sexes and offspring in the 12.5 mg/kg-dosed group.

It was concluded that the NOAEL for the repeated dose toxicity of 2-(2*H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol was 12.5 mg/kg/day for males and females, and that the NOAEL for the reproductive/developmental toxicity was 12.5 mg/kg/day for males, females and offspring.

2-(2*H*-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(*tert*-ブチル)-6-(*sec*-ブチル)フェノールの ラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2-(2*H*-Benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol by Oral Administration in Rats

要約

2-(2*H*-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(*tert*-ブチル)-6-(*sec*-ブチル)フェノールの反復投与毒性および生殖発生毒性を検討するために、OECD テストガイドライン 422 に基づき、試験を実施した。

本試験では、2-(2*H*-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(*tert*-ブチル)-6-(*sec*-ブチル)フェノールを、0 (媒体対照, オリーブ油), 0.5, 2.5 および 12.5 mg/kg の用量で、CrI:CD(SD)ラットの雌雄 (12 匹/群) に、雄では 42 日間、雌では哺育 4 日までの 41~55 日間、毎日、強制経口投与し、雌雄動物に対する反復投与の影響、ならびに親動物の生殖および哺育 4 日までの児動物の発生・発育に及ぼす影響を検討した。また、対照群と 12.5 mg/kg 投与群については、雄では交配に供した 12 匹のうち 5 匹を、雌では交配に供した動物とは別にサテライト雌 5 匹を用意し、42 日間の反復投与終了後、2 週間にわたり、回復性および遅発性変化の有無を観察した。結果は、以下のように要約される。

1. 反復投与毒性

一般状態、行動機能、反応性、握力、自発運動量、体重および摂餌量に被験物質投与の影響は認められなかった。

尿検査や血液学検査結果に被験物質投与の影響は認められなかった。

血液生化学検査の結果、雄では 0.5 mg/kg 以上の群にトリグリセリドの低下、12.5 mg/kg 群にアルブミン、A/G 比および ALP の増加がみられた。雌では 0.5 mg/kg 以上の群にトリグリセリドとリン脂質の低下がみられ、12.5 mg/kg 群に AST の増加がみられた。回復期間終了時にこれらの変化はみられなかったが、サテライト雌では総コレステロールが低下した。

雄の 12.5 mg/kg 群で、肝臓の絶対重量と相対重量および腎臓の相対重量の増加がみられたが、回復期間終了時には変化はなかった。なお、雌雄ともに、病理組織学的に被験物質投与の影響を示唆する病変は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

性周期に変化はみられず、交尾率、受胎率、交尾までの平均同居日数などの交配成績にも被験物質投与の影響は認められなかった。

妊娠期間、分娩および哺育についても、被験物質投与

の影響はみられず、受胎動物の全例が生児を出産した。妊娠黄体数、着床痕数、着床率、出生時の産児数、生存産児数、分娩率、出生率、性比および哺育 4 日までの児動物の生存率や体重、また、児動物の外表や剖検所見に被験物質投与の影響は認められなかった。

3. 無作用量 (NOEL: No Observed Effect Level)

反復投与毒性に関する NOEL 決定のエンドポイントは、雌雄ともに 0.5 mg/kg 以上の投与でみられたトリグリセリドの低下とした。また、生殖発生毒性に関しては、12.5 mg/kg 投与で雌雄親動物の生殖能および児動物に影響は認められなかった。

よって、本試験における 2-(2*H*-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(*tert*-ブチル)-6-(*sec*-ブチル)フェノールの NOEL は、反復投与毒性に関しては、雌雄ともに 0.5 mg/kg/day 未満であると結論される。また、生殖発生毒性に関しては、雌雄親動物、児動物ともに 12.5 mg/kg/day であると結論される。

4. 無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

反復投与毒性に関しては、雌雄ともに 12.5 mg/kg 投与で毒性影響はないと判断した。また、生殖発生毒性に関しても、12.5 mg/kg 投与で雌雄親動物の生殖能および児動物への毒性影響はないと判断した。

よって、本試験における 2-(2*H*-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(*tert*-ブチル)-6-(*sec*-ブチル)フェノールの NOAEL は、反復投与毒性に関しては、雌雄ともに 12.5 mg/kg/day であると結論される。また、生殖発生毒性に関しても、雌雄親動物、児動物ともに 12.5 mg/kg/day であると結論される。

方法

1. 被験物質および投与検体の調製法

本試験に使用した被験物質の 2-(2*H*-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(*tert*-ブチル)-6-(*sec*-ブチル)フェノールは、試験委託者から入手 (ロット番号: 01923JC4) したもので、純度 100% の淡黄色の粉末である。被験物質は、入手後、使用時まで室温で暗所に保管した。被験物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) を用いて測定し、文献値と比較することにより確認した。また被験物質の安定性は、使用開始前および使用終了後にクロマトグラムを高速

液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

媒体として選択したオリブ油 (日本薬局方) は丸石製薬から購入 (ロット番号: 5Y24) し、使用時まで室温で暗所に保管した。投与検体 (溶液) は、被験物質をオリブ油と混和して、各用量の 1 回の投与液量が 5 mL/kg 体重になるように調製した。投与検体は、日本バイオアッセイ研究センターで実施した 8 日間の安定性試験の結果に基づき、1 週に 1 回の頻度で調製し、室温で暗所に保管して調製 7 日以内に使用した。投与検体中の被験物質の濃度および均一性は、初回調製時に高速液体クロマトグラフ (Hewlett Packard 1090) を用いて測定し、確認した。

2. 使用動物および飼育方法

試験には、日本チャールス・リバー (厚木飼育センター) の CrI:CD(SD) ラット (SPF) の雌雄をそれぞれ 8 週齢で購入し、使用した。導入日を含む 7 日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、投与前の雌の性周期を観察するために、さらに、8 日間の予備飼育を行った。その結果、一般状態や性周期に異常を認めなかった動物から、投与開始日の体重の中央値に近い雄 48 匹と雌 58 匹 (投与開始時体重範囲、雄: 348~415g, 雌: 212~250g) を選定し、試験に用いた。

動物の群分けは、動物を体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法 (適正層別方式) により実施した。

動物は、温度: 23±2℃, 湿度: 55±15%, 換気回数: 15~17 回/時, 明暗サイクル: 12 時間点灯 (8:00~20:00) / 12 時間消灯 (20:00~8:00) に制御された飼育室でステンレス製網ケージに個別に収容して飼育した。ただし、妊娠 18 日以降の母動物は、床敷 (ALPHA-dri™, Shepherd Specialty Papers) をいれたステンレス製分娩用ケージに収容した。固型飼料 (CRF-1, 30KGγ-線照射滅菌, オリエンタル酵母工業) と飲料水 (秦野市水道局供給の水道水をフィルターろ過した後、紫外線照射) は自由摂取としたが、解剖前日の夕方からは絶食させた。

3. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は、予備試験および本被験物質の類似物質である 2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールの 28 日間反復投与毒性試験¹⁾ とその用量設定試験の結果を基に設定した。

予備試験の投与量は、OECD 化学品テストガイドラインに定められている 1000 mg/kg を最高用量とし、以下、300 mg/kg, 100 mg/kg, 30 mg/kg を設定した。10 週齢の CrI:CD(SD) ラット、1 群当り雌雄各 5 匹に、2-(2*H*-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(*tert*-ブチル)-6-(*sec*-ブチル)フェノールを 14 日間、毎日、強制経口投与し、投

与終了翌日に剖検した。その結果、1000 mg/kg 群の雌雄ともに一般状態の悪化や体重増加の抑制がみられ、雄の全例および雌の 1 例が死亡した。血液学検査の結果、雄では 100 mg/kg 以上の群にヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の低下、雌では 300 mg/kg 以上の群に赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の低下がみられた。血液生化学検査の結果、雄では 30 mg/kg 以上の群にアルブミンと A/G 比の増加、100 mg/kg 以上の群に AST, ALT および LDH の増加がみられ、雌では 300 mg/kg 以上の群にアルブミンと A/G 比の増加、1000 mg/kg 群に AST と ALT の増加がみられた。器官重量測定の結果、雄では 30 mg/kg 以上の群に肝臓と腎臓の重量増加がみられ、雌では 300 mg/kg 以上の群に肝臓重量の増加と脾臓重量の低下がみられた。さらに、病理組織検査により雄の 30 mg/kg 以上、雌の 300 mg/kg 以上の群に肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。

本被験物質の類似物質である 2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールの 28 日間反復投与毒性試験¹⁾ の用量設定試験では、1000 mg/kg を最高用量とし、以下、300 mg/kg, 100 mg/kg を 5 週齢の CrI:CD(SD) ラットに 14 日間、毎日、強制経口投与した。その結果、雌雄ともに 100 mg/kg 以上の投与で肝臓重量が増加した。その増加率を指標として解析した結果、肝臓に影響のみられない用量を 1~3 mg/kg と推定、28 日間反復投与毒性試験の投与用量は 62.5 mg/kg を最高用量とし、以下、12.5 mg/kg, 2.5 mg/kg, 0.5 mg/kg を設定したと報告されている。28 日間反復投与毒性試験の結果は、雄では 0.5 mg/kg 以上、雌では 12.5 mg/kg 以上の投与で肝臓重量の増加と小葉中心性の肝細胞肥大が認められている。

これらの結果を基に試験委託者と協議した結果、本試験における高用量には類似物質である 2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールの 28 日間反復投与毒性試験¹⁾ の中間用量である 12.5 mg/kg を設定し、以下、中用量には 2.5 mg/kg, 低用量には 0.5 mg/kg を設定した。

本試験では、対照群 1 群と投与群 3 群の計 4 群を設け、1 群当り雌雄各 12 匹の動物を用いた。なお、対照群と 12.5 mg/kg 群については、雄では 12 匹のうち各群 5 匹を回復動物とし、雌では交配をさせないサテライト動物 (回復動物) として、各群 5 匹の雌を追加した。

各用量の投与検体は、雄には交配前 14 日間、交配期間 14 日間および交配期間終了後 14 日間の 42 日間、毎日投与した。また雌には交配前 14 日間、交配期間 (交尾成立まで)、妊娠期間および哺育 4 日まで、計 41~55 日間、毎日投与した。ただし、分娩中および午前中に分娩が確認された動物にはその日の投与はしなかった。なお、雌サテライト動物には、42 日間、毎日投与した。

対照群と 12.5 mg/kg 群の雌雄の回復動物については、投与期間終了後 14 日間の回復期間を設けた。

反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

4. 観察および検査（反復投与毒性）

1) 一般状態の観察

全例について、投与期間中には毎日2回（投与前および投与後）行い、回復期間中には毎日1回行った。

2) 行動機能観察

(1) 詳細観察

全例について、投与期間中は週に1回行った。ただし、雌の投与6週の観察は、分娩および哺育時の動物への負荷を軽減するため、サテライト動物のみ行った。

詳細観察は、ケージから動物を取り出す際、ケージから動物を取り出した後および作業台上で実施した。ケージから動物を取り出す際の観察では、接触反応、発声および取り出し易さを、ケージから動物を取り出した後の観察では、扱い易さ、体温、被毛状態、皮膚の色、眼の状態および流涎の有無を、作業台上での観察では、姿勢、活動性、警戒・探索行動、歩行状態、常同行動、呼吸、振戦・攣縮の有無および1分間における排尿数、排糞数、身繕い数および洗顔数の計数を行った。

(2) 反応性検査、握力測定および自発運動量測定

雄では全例について投与6週に行った。また、雌では群毎に同一分娩日または分娩日の近い動物5匹を選定し、解剖前日（分娩4日後）に行った。

反応性検査は、視覚、聴覚、痛覚、瞳孔反射および空中正向反射について行った。

握力測定は、握力測定装置（MK-380CM、室町機械）を用いて行った。測定は前肢、後肢ともに2回行い、平均値をその個体の値とした。

自発運動量の測定は、自発運動量測定装置（SCANET MV-10、メルクエスト）を用いて行った。なお、測定時間は60分間とした。

3) 体重測定

雄は、全例について、投与1, 8, 15, 22, 29, 36, 42日、回復動物ではさらに回復1, 8, 14日に測定した。

雌は、交配前期間は全例について、投与1, 8, 15日に測定した。交配開始以後は妊娠0, 7, 14, 20日および分娩日と分娩4日後（哺育0日と哺育4日）に測定した。サテライト雌は投与1, 8, 15, 22, 29, 36日および回復1, 8, 14日に測定した。

なお、全例について、解剖日には絶食後の体重を測定した。

4) 摂餌量測定

摂餌量は、各測定期間に給餌量と残餌量を測定し、その値から1匹1日当りの摂餌量を算出する方法で行った。

雄は、全例について、投与1~8, 8~15, 29~36, 36~42日、回復動物ではさらに回復1~8, 8~14日に測定した。

雌は、交配前期間は全例について、投与1~8, 8~15日に測定した。交配開始以後は妊娠0~7, 7~14, 14~20日および哺育0~4日に測定した。サテライト雌は投

与1~8, 8~15, 29~36, 36~43日および回復1~8, 8~14日に測定した。

5) 尿検査

雄とサテライト雌の全例について、投与6週の投与前に新鮮尿を採取し、尿試験紙（マルティスティックス、バイエル）を用いて、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンを検査した。

6) 剖検

雄は、回復動物を除き、投与42日の翌日に剖検し、回復動物は回復14日の翌日に剖検した。雌については、分娩した雌は分娩5日後、分娩しなかった雌は受胎の有無を確認するために妊娠26日相当日に剖検し、サテライト雌は回復14日の翌日に剖検した。

7) 血液学検査

全例について、解剖時にエーテル麻酔下で腹大動脈よりEDTA-2カリウム入り採血管およびクエン酸ナトリウム入り採血管（凝固検査用）に採血した血液を用いて血液学検査を行った。赤血球数、血小板数、網赤血球比、白血球数、平均赤血球容積（以上、光学的散乱法）、ヘモグロビン濃度（シアンメトヘモグロビン法）、ヘマトクリット値、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度（以上、計算による）は総合血液学検査装置（ADVIA 120：バイエル）、白血球分類（ライト染色による）は血液細胞自動分類装置（MICROX HEG-120NA：オムロン）、プロトロンビン時間（Quick一段法）と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）は全自動血液凝固測定装置（Sysmex CA-5000：シスメックス）を用いて検査した。

8) 血液生化学検査

全例について、解剖時にエーテル麻酔下で腹大動脈よりヘパリンリチウム入り採血管に採血した血液を遠心分離し、得られた血漿について、総蛋白（ビウレット法）、アルブミン（BCG法）、A/G比（計算による）、総ビリルビン（アゾビリルビン法）、グルコース（GlcK・G-6-PDH法）、総コレステロール（CE・COD・POD法）、トリグリセリド（MGLP・GK・GPO・POD法）、リン脂質（PLD・ChOD・POD法）、AST、ALT、 γ -GTP、CK（以上、JSCC法）、LDH（SFBC法）、ALP（GSCC法）、尿素窒素（ウレアーゼ・GLDH法）、クレアチニン（Jaffé法）、ナトリウム、カリウム、クロール（以上、イオン選択電極法）、カルシウム（OCPC法）および無機リン（PNP・XOD・POD法）を自動分析装置（日立7080：日立製作所）を用いて検査した。

9) 器官重量

全例について、胸腺、副腎、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、脳、精巣、精巣上体の湿重量（絶対重量）を測定した。また、各器官の絶対重量の搬出時体重に対する百分率（相対重量）を算出した。

10) 病理組織学検査

全例について、精巣、精巣上体、精嚢・凝固線、前立腺（腹葉）および卵巣、各群 5 匹（動物番号の小さい順、ただし、不妊雌を除く）および回復動物については、気管、肺、骨髄（大腿骨）、リンパ節（腋窩、腹壁等）、胸腺、脾臓、心臓、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、子宮（サテライト雌のみ）、陰、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、筋肉、骨（大腿骨）を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡による検査を実施した。

5. 観察および検査（生殖発生毒性）

1) 性周期の観察

雌（サテライト雌を除く）の全例について、投与開始日から交配開始日（投与 15 日）まで毎朝、陰垢を採取し、ギムザ染色を行い、光学顕微鏡により性周期を観察した。

2) 交配

投与 15 日から毎日、14 日間を限度として、同投与群内において、雌雄 1:1 で同居させることにより交配させた。交尾の確認は、毎朝、陰内の陰栓または陰垢中の精子の存在を調べるにより行い、これらが確認された日を妊娠 0 日とした。交尾した雌は直ちに雄から離し、個別に飼育した。

交配の結果から、交尾所要日数（交配開始から交尾成立までに要した日数）と交尾率〔（交尾成立ペア数／交配ペア数）×100〕を算出した。

3) 分娩

分娩は自然分娩とした。分娩完了の確認は、妊娠 20 日から 25 日を限度に、1 日 2 回以上行い、16 時の時点で分娩が終了していた動物については、その日を分娩日（哺育 0 日）とした。確認時に分娩中であった動物については、分娩状態の異常の有無についても観察した。

これらの結果から、妊娠期間、受胎率〔（受胎動物数／交尾成立ペア数）×100〕、出産率〔（生児出産動物数／受胎動物数）×100〕を算出した。

4) 妊娠黄体数および着床痕数

交尾した雌は、剖検時に卵巣を摘出して実体顕微鏡により妊娠黄体を計数した。また、子宮は摘出して 10% 硫化アンモニウム溶液で染色し、翌日、着床痕を計数した。

これらの結果から、着床率〔（着床痕数／妊娠黄体数）×100〕を算出した。

5) 児動物の観察・検査

(1) 数、性、外表および一般状態の観察

出生時（哺育 0 日）に、産児（生存児＋死亡児）の計数、性別確認および外表観察を行った。その後、哺育 4 日まで毎日、一般状態観察と児動物数の確認を行った。

これらの結果から、分娩率〔（産児数／着床痕数）×

100〕、出生率〔（哺育 0 日の生児数／着床痕数）×100〕、哺育 0 日の生存率〔（哺育 0 日の生児数／産児数）×100〕および哺育 4 日の生存率〔（哺育 4 日の生児数／哺育 0 日の生児数）×100〕を算出した。

(2) 体重

哺育 0 日と哺育 4 日に、母動物（腹）毎に雌雄単位でまとめた体重を測定し、児動物 1 匹当りの平均値を算出した。

(3) 剖検

哺育 4 日まで生存した全ての児動物は、エーテル麻酔下で開腹後、腹大動脈切断により放血死させ剖検した。途中死亡した児動物も剖検した。

6. 統計解析

交尾率、受胎率、出産率、尿検査および病理組織学検査は、対照群と各投与群間で χ^2 検定を行った。

その他の検査で得られた数値データは、対照群を基準群として、まず Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、その結果が等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett 型の多重比較を行った。なお、回復動物における数値データは、まず、F 検定を行い、分布の違いが認められなかった場合は、Student の t 検定を、分布の違いが認められた場合は Aspin-Welch の t 検定を用いて統計処理を行った。

各検定は 5% および 1% の有意水準で両側検定を行い、5% の有意水準を被験物質投与による影響の判断基準とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態

雄では、投与期間中に 12.5 mg/kg 群で眼血性分泌物と立毛が各 1 例に一時的に観察された。回復期間中には全例に一般状態の変化は観察されなかった。

雌では、投与期間中に 12.5 mg/kg 群で眼混濁が 1 例に観察された。回復期間中には全例に一般状態の変化は観察されなかった。

2) 行動機能観察（詳細観察）

雄では、12.5 mg/kg 群で眼血性分泌物と立毛が各 1 例に観察された。

雌では、12.5 mg/kg 群で眼混濁が 1 例に観察された。

3) 反応性検査

雌雄ともに、すべての検査項目に、異常所見は認めら

れなかった。

4) 握力 (Table 1)

雌雄ともに、前肢、後肢の握力に、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

5) 自発運動量 (Table 2)

雌雄の自発運動量に、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

6) 体重 (Fig. 1, 2, 3)

雌雄の体重に、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

7) 摂餌量 (Fig. 4, 5, 6)

雌雄の摂餌量に、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

8) 尿検査 (Table 3)

雌雄ともに、すべての検査項目に、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

9) 血液学検査 (Table 4)

雌雄ともに、すべての検査項目に、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

10) 血液生化学検査 (Table 5)

雄では、投与期間終了時に、0.5 mg/kg 以上の全投与群でトリグリセリドが対照群と比較して有意な低値、12.5 mg/kg 群でアルブミン、A/G 比および ALP が有意な高値を示した。回復期間終了時には、12.5 mg/kg 群で総ビリルビンが対照群と比較して有意な低値を示した。

雌では、投与期間終了時に、0.5 mg/kg 以上の全投与群でトリグリセリドが対照群と比較して有意な低値、また、0.5 mg/kg 以上の全投与群でリン脂質が低値を示し、0.5 mg/kg 群と 12.5 mg/kg 群では有意な低値を示した。12.5 mg/kg 群では AST が有意な高値を示した。回復期間終了時のサテライト雌では、12.5 mg/kg 群で総コレステロールが対照群と比較して有意な低値を示した。

11) 病理学検査

(1) 剖検所見

雄では、投与期間終了時に、対照群の 1 例に精巣上体の小型化がみられ、2.5 mg/kg 群の 1 例に精巣上体の結節がみられた。また、回復期間終了時には、12.5 mg/kg 群の 1 例に精巣上体の結節がみられた。

雌では、投与期間終了時に、2.5 mg/kg 群の 1 例の腎臓に嚢胞、12.5 mg/kg 群の 1 例に眼の白色化がみられた。回復期間終了時のサテライト雌には肉眼病変は認められなかった。

(2) 器官重量 (Table 6)

雄では、投与期間終了時に、12.5 mg/kg 群の腎臓の相

対重量が対照群と比較して有意な高値、肝臓の絶対重量と相対重量が有意な高値を示した。回復期間終了時には、対照群と被験物質投与群との間で有意差の認められた器官はなかった。

雌では、投与期間終了時と回復期間終了時の器官重量測定において、対照群と被験物質投与群との間で有意差の認められた器官はなかった。

(3) 病理組織学検査 (Table 7)

雄では全ての検査器官・組織において、被験物質投与の影響と考えられる所見は認められなかった。なお、投与期間終了時の剖検で対照群の 1 例にみられた小型化した精巣上体には、精上皮系細胞の残屑が認められ、2.5 mg/kg 群の 1 例と回復期間終了時の 12.5 mg/kg 群の 1 例にみられた精巣上体の結節はそれぞれ精子性肉芽腫と炎症と診断された。

雌では全ての検査器官・組織において、被験物質投与の影響と考えられる所見は認められなかった。なお、投与期間終了時の剖検で 2.5 mg/kg 群の 1 例にみられた腎臓の嚢胞は嚢胞として、12.5 mg/kg 群の 1 例にみられた眼の白色は眼球変形と診断された。

2. 生殖発生毒性

1) 性周期 (Table 8)

性周期の平均発情回帰日数に、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 交配成績 (Table 8)

全例が交尾し、交尾までの同居日数に対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。なお、0.5 mg/kg 群では、交尾した全例が受胎したが、対照群の 2 例、2.5 mg/kg 群および 12.5 mg/kg 群の各 1 例は受胎しなかった。受胎率には対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

3) 分娩および哺育状態 (Table 8, 9)

受胎動物の全例が生児を出産した。分娩時の状態が観察できた動物に分娩異常は認められなかった。また、全例に哺育異常は認められなかった。なお、妊娠期間に、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

4) 妊娠黄体数および着床痕数 (Table 9)

妊娠黄体数、着床痕数および着床率に、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

5) 児動物の所見 (Table 9)

(1) 出生時の観察

出生時の産児数、分娩率、生存産児数、出生率、哺育 0 日の生存率および性比に対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。また、外表異常も認められなかった。

(2) 哺育中の観察

哺育4日の生存率と性比に、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。また、一般状態の変化は観察されなかった。

(3) 体重

哺育0日と4日の雌雄の体重に、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

(4) 剖検所見

哺育期間中に途中死亡した児動物を含めて、異常所見がみられた例はなかった。

考察

1. 反復投与毒性

雌雄ともに死亡はなかった。一般状態の変化として、投与期間中に雄の12.5 mg/kg群で眼血性分泌物と立毛が各1例に、雌の12.5 mg/kg群で眼混濁が1例にみられたが、例数が少ないことから被験物質投与の影響ではないと考える。行動機能に関する詳細観察では、一般状態観察でみられた所見以外に変化はみられず、被験物質投与の影響はないと考える。視覚、聴覚等の反応性、握力および自発運動量には、雌雄ともに異常はなかった。また、雌雄の体重および摂餌量の推移にも被験物質投与の影響は認められなかった。

雌雄の尿検査所見および血液学検査所見に被験物質投与の影響は認められなかった。

血液生化学検査の結果、投与期間終了時に、雌雄の0.5 mg/kg以上の全投与群のトリグリセリドが有意な低値を示した。また、雌の0.5 mg/kg群と12.5 mg/kgではリン脂質も有意な低値を示し、2.5 mg/kg群でも低下傾向を示した。トリグリセリドの低下は雌雄に共通し、雌ではリン脂質も低下していることから、被験物質投与により、血中脂質の低下作用がみられたと考える。回復期間終了時にこれらの変化はみられなかったが、12.5 mg/kg群のサテライト雌では総コレステロールが有意な低値を示した。その他の検査項目では、雄の12.5 mg/kg群にALP、アルブミンおよびA/G比の有意な高値がみられ、雌の12.5 mg/kg群にASTの有意な高値がみられた。これらの変化は回復期間終了時にはみられなかった。なお、回復期間終了時の雄の12.5 mg/kg群で総ビリルビンが有意な低値を示したが、投与期間終了時にはみられなかった変化であるため、被験物質投与の影響ではないと考える。また、回復期間終了時にサテライト雌の対照群のAST、ALTおよびLDHの平均値が非常に高い値を示したが、これは1例に著しい高値がみられたためである。本例は病理組織学検査では肝臓に異常所見は認められず、原因については不明である。

器官重量では、投与期間終了時に、雄の12.5 mg/kg群の肝臓の絶対重量と相対重量および腎臓の相対重量が有意な高値を示した。ただし、回復期間終了時には対

照群との差はなく、回復性がみられた。雌には重量変化のみみられた器官はなかった。

病理組織学検査では、投与期間終了時および回復期間終了時の雌雄ともに被験物質投与の影響を示唆する所見はみられなかった。

以上のように、2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(tert-ブチル)-6-(sec-ブチル)フェノールの反復投与により、本試験条件下において毒性影響は認められなかった。しかし、投与の影響として、雌雄の0.5 mg/kg以上の投与でトリグリセリドの低下、雌の0.5 mg/kg以上でリン脂質の低下がみられ、12.5 mg/kgでは雄にALP、アルブミンおよびA/G比の増加、肝臓と腎臓重量の増加がみられ、雌にASTの増加がみられた。回復期間終了時には、雌にコレステロールの低下がみられた。

本試験の投与用量を設定する際に参考にした、本被験物質の類似物質である2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールでは、28日間反復投与毒性試験¹⁾の結果、雄では血液生化学検査で0.5 mg/kg以上の群にA/G比の増加、2.5 mg/kg以上の群に血糖値の増加、12.5 mg/kg以上の群にアルブミン濃度、ALTおよびALPの増加、62.5 mg/kg群にASTとBUNの増加がみられた。雌では62.5 mg/kg群に血糖値、総コレステロール、トリグリセリドおよびA/G比の増加がみられた。また、病理検査により雄では0.5 mg/kg以上の群、雌では12.5 mg/kg以上の群に肝臓重量の増加と小葉中心性の肝細胞肥大がみられたと報告されている。さらに、この28日間反復投与毒性試験¹⁾の結果を基に実施した52週間反復投与毒性試験²⁾は、雄で0.1、0.5および12.5 mg/kg、雌で0.5、2.5および12.5 mg/kgの投与用量で行い、その結果、雄では0.5 mg/kg以上の群、雌では12.5 mg/kg群に、肝臓の重量増加と小葉中心性の肝細胞肥大がみられ、2.5 mg/kg群の雄では肝細胞の巣状壊死の増加傾向もみられたと報告されている。

2. 生殖発生毒性

交配前に実施した性周期に異常はなく、全例が交尾し、対照群の2例、2.5 mg/kg群および12.5 mg/kg群の各1例を除いて受胎が成立していたことから、性周期、交尾能および受胎能に被験物質投与の影響はないと考える。

妊娠期間に異常のみみられた例はなく、受胎動物の全例が生児を出産し、分娩・哺育状態に異常のみみられた例もなかったことから、分娩および哺育状態に、被験物質投与の影響はないと考える。

妊娠黄体数、着床痕数、着床率、出生時の産児数、分娩率、生存産児数、出生率、哺育0日の生存率および性比に対照群と被験物質投与群との間に有意差はなく、被験物質投与の影響は認められなかった。また、哺育4日までの児動物の生存率や体重に被験物質投与の影響は認められなかった。出生児の外表異常や剖検による所見もみられなかった。

以上のように、2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(tert-ブチル)-6-(sec-ブチル)フェノールの反復投与により、雌雄親動物の生殖能および児動物には影響は

認められなかった。

3. 無作用量 (NOEL: No Observed Effect Level)

反復投与毒性に関する NOEL 決定のエンドポイントは、雌雄ともに 0.5 mg/kg 以上の投与でみられたトリグリセリドの低下とした。また、生殖発生毒性に関しては、12.5 mg/kg 投与で雌雄親動物の生殖能および児動物に影響は認められなかった。

よって、本試験における 2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(tert-ブチル)-6-(sec-ブチル)フェノールの NOEL は、反復投与毒性に関しては、雌雄ともに 0.5 mg/kg/day 未満であると結論される。また、生殖発生毒性に関しては、雌雄親動物、児動物ともに 12.5 mg/kg/day であると結論される。

4. 無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Level)

反復投与毒性に関しては、雌雄ともに 12.5 mg/kg 投与で毒性影響はないと判断した。また、生殖発生毒性に関しても、12.5 mg/kg 投与で雌雄親動物の生殖能および児動物への毒性影響はないと判断した。

よって、本試験における 2-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(tert-ブチル)-6-(sec-ブチル)フェノールの NOAEL は、反復投与毒性に関しては、雌雄ともに 12.5 mg/kg/day であると結論される。また、生殖発生毒性に関しても、雌雄親動物、児動物ともに 12.5 mg/kg/day であると結論される。

Japan Bioassay Research Center, Japan
Industrial Safety and Health Association
2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257-0015,
Japan
Tel +81-463-82-3911 Fax +81-463-82-3860

本報告書は、平成 19 年度ハザードデータ評価委員会
(独立行政法人 製品評価技術基盤機構) で評価後、修
正・加筆された。

文献

- 1) 渡修明ら：2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験。化学物質毒性試験報告。10 : 221-236 (2003)
- 2) 緒方英博ら：2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールのラットを用いる 52 週間反復経口投与毒性試験。化学物質毒性試験報告。13 : 191-202 (2006)

連絡先

試験責任者：

試験担当者：

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究
センター

〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445

Tel 0463-82-3911 Fax 0463-82-3860

Correspondence

Authors:

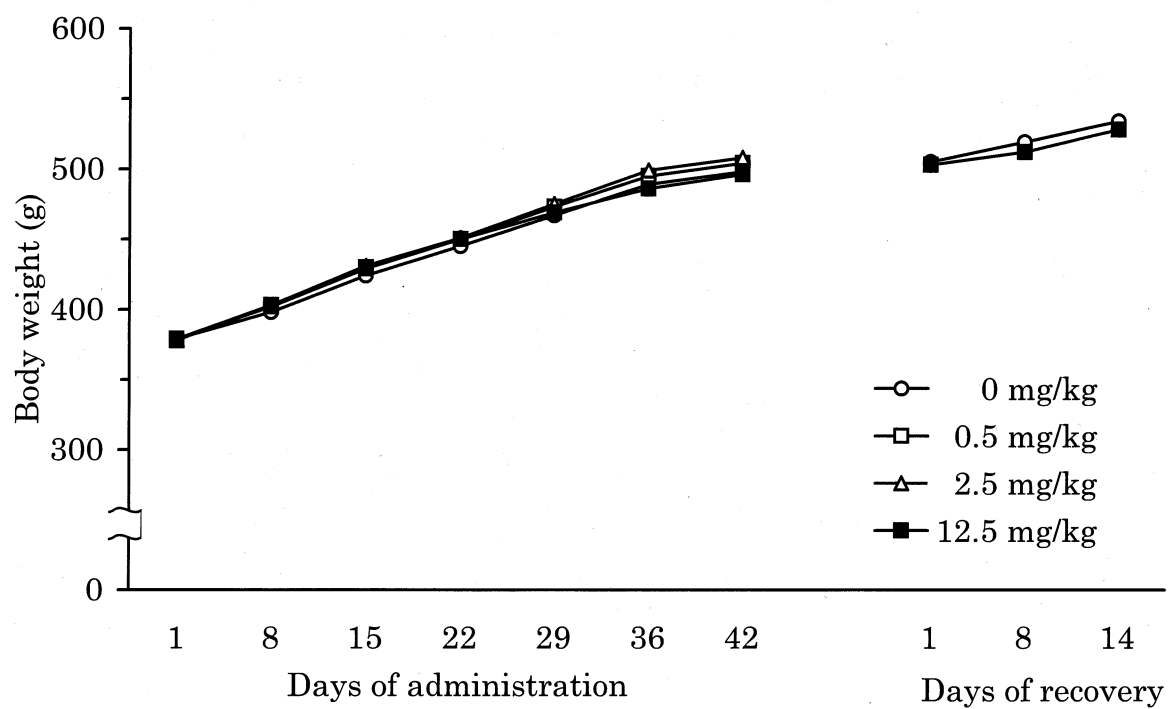


Figure 1 Body weight changes of male rats treated orally with 2-(2*H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

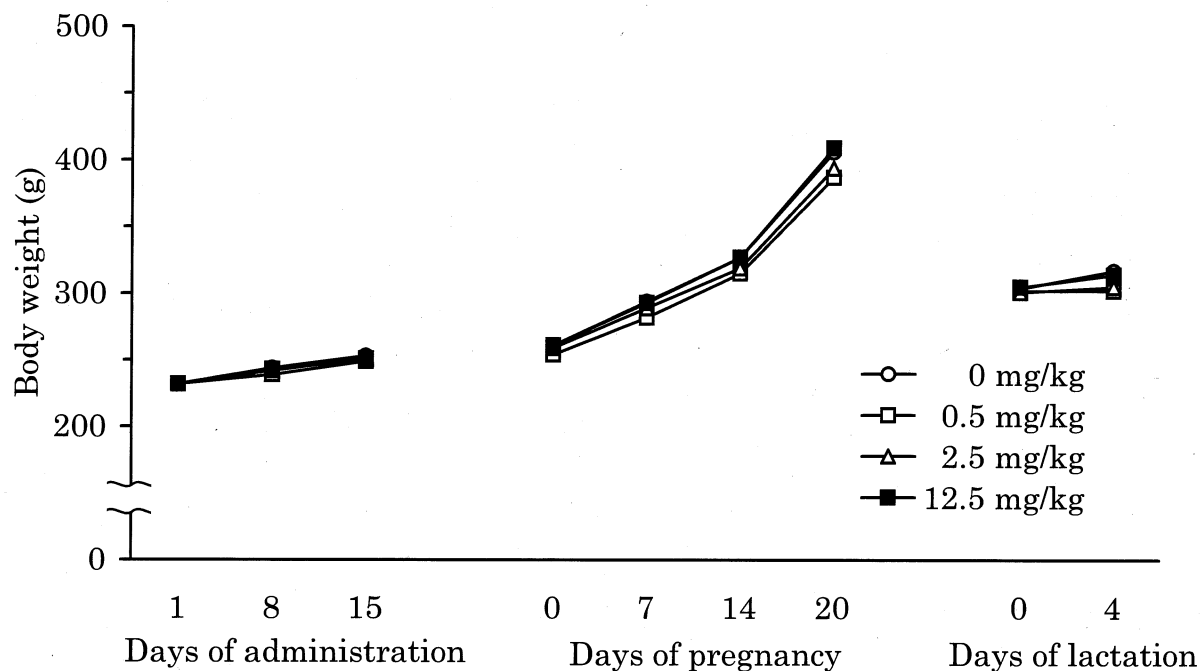


Figure 2 Body weight changes of female rats treated orally with 2-(2*H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

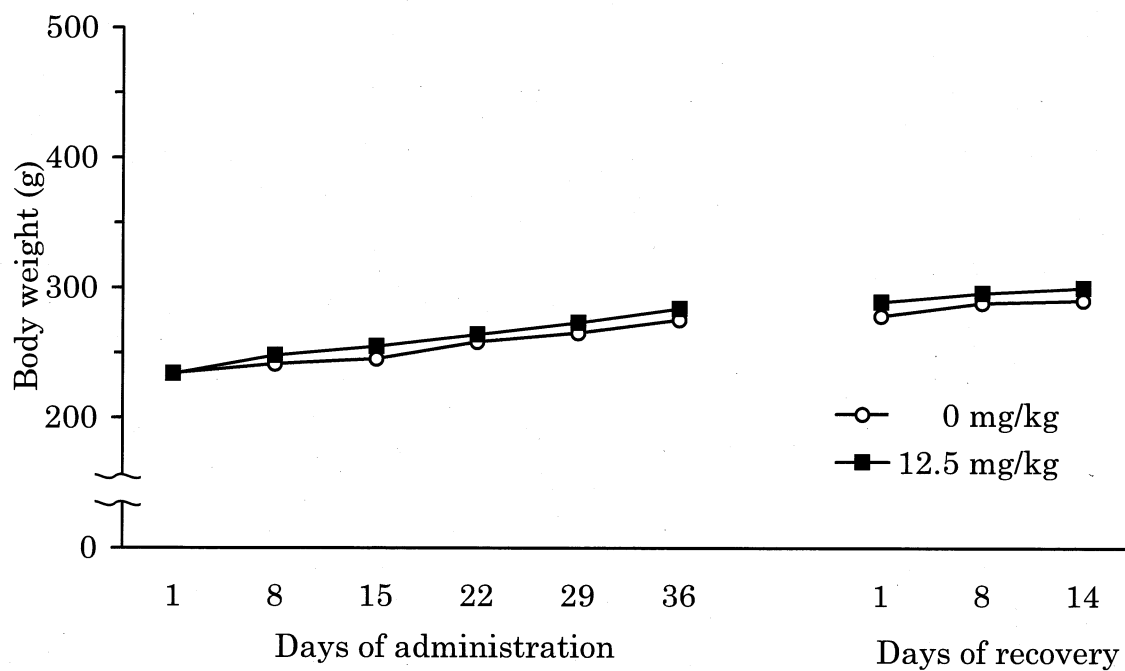


Figure 3 Body weight changes of satellite female rats treated orally with 2-(2*H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

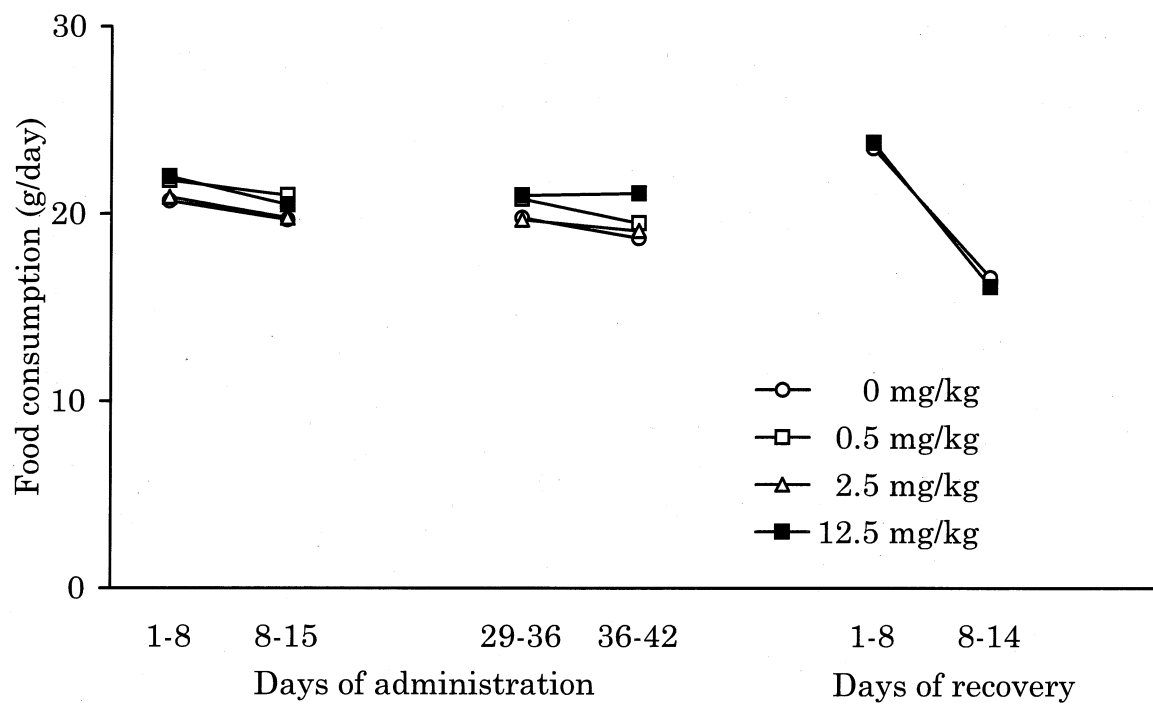


Figure 4 Food consumption changes of male rats treated orally with 2-(2*H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

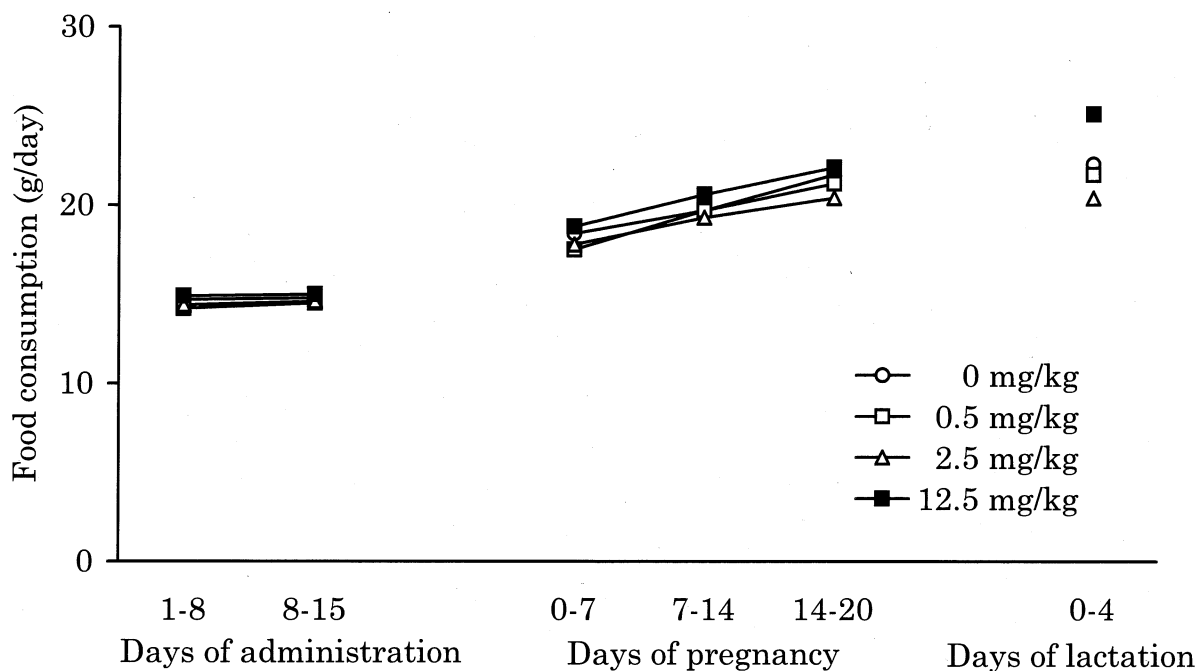


Figure 5 Food consumption changes of female rats treated orally with 2-(2*H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

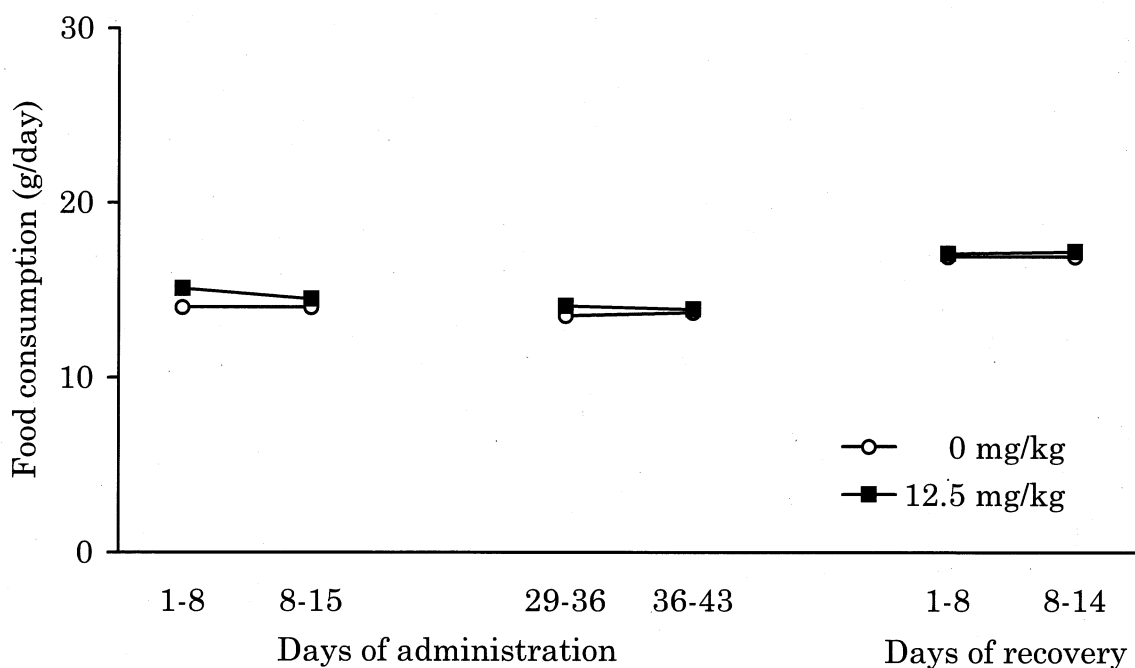


Figure 6 Food consumption changes of satellite female rats treated orally with 2-(2*H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Table 1 Grip strength of rats treated orally with 2-(2 *H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	0.5	2.5	12.5
Male				
No. of animals examined	12	12	12	12
Forelimb grip strength (g)	425 ± 86	410 ± 109	456 ± 119	436 ± 76
Hindlimb grip strength (g)	141 ± 33	136 ± 31	143 ± 29	144 ± 28
Female				
No. of animals examined	5	5	5	5
Forelimb grip strength (g)	291 ± 96	325 ± 23	253 ± 130	373 ± 52
Hindlimb grip strength (g)	107 ± 12	146 ± 24	111 ± 24	137 ± 43

Data represent mean ± S.D.

Table 2 Locomotor activity of rats treated orally with 2-(2 *H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	0.5	2.5	12.5
Male				
No. of animals examined	12	12	12	12
Interval count (min)				
0 – 10	2582 ± 992	2445 ± 601	2746 ± 790	2201 ± 788
10 – 20	1557 ± 892	1521 ± 908	1950 ± 1309	987 ± 679
20 – 30	1159 ± 915	1083 ± 794	963 ± 788	962 ± 503
30 – 40	595 ± 515	1052 ± 615	727 ± 1027	770 ± 844
40 – 50	640 ± 596	826 ± 651	519 ± 834	390 ± 448
50 – 60	586 ± 735	1131 ± 922	484 ± 952	434 ± 399
Total count (60 min)	7117 ± 2877	8058 ± 2745	7389 ± 4121	5744 ± 2416
Female				
No. of animals examined	5	5	5	5
Interval count (min)				
0 – 10	2194 ± 257	1035 ± 403	1318 ± 1268	2044 ± 913
10 – 20	963 ± 838	132 ± 183	614 ± 772	326 ± 203
20 – 30	499 ± 656	164 ± 225	276 ± 534	294 ± 566
30 – 40	786 ± 1145	7 ± 4	549 ± 757	571 ± 761
40 – 50	997 ± 1017	22 ± 24	421 ± 540	178 ± 247
50 – 60	604 ± 1136	146 ± 140	457 ± 519	449 ± 761
Total count (60 min)	6043 ± 2037	1506 ± 442	3635 ± 3193	3863 ± 2411

Data represent mean ± S.D.

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with 2-(2 *H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		0	0.5	2.5	12.5
Male					
No. of animals examined		12	12	12	12
pH	7.0	0	0	0	1
	7.5	0	0	0	0
	8.0	2	1	2	0
	8.5	10	11	10	11
Protein	—	0	0	0	0
	±	3	2	2	1
	+	2	1	5	5
	2+	6	7	5	6
	3+	1	2	0	0
Glucose	—	12	12	12	12
Ketone body	—	7	3	7	7
	±	2	2	2	3
	+	1	4	2	2
	2+	1	3	1	0
	3+	1	0	0	0
Bilirubin	—	12	12	12	12
Occult blood	—	12	12	12	12
Urobilinogen	±	12	12	12	12
Satellite female					
No. of animals examined		5	-	-	5
pH	7.5	1	-	-	0
	8.0	1	-	-	1
	8.5	3	-	-	4
Protein	—	0	-	-	0
	±	2	-	-	3
	+	3	-	-	2
Glucose	—	5	-	-	5
Ketone body	—	5	-	-	4
	±	0	-	-	1
Bilirubin	—	5	-	-	5
Occult blood	—	5	-	-	5
Urobilinogen	±	5	-	-	5

Grade; —: negative, ±: trace, +: slight, 2+: moderate, 3+: marked.

Table 4 Hematology of rats treated orally with 2-(2 *H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	0.5	2.5	12.5	0	12.5
Male						
No. of animals examined	7	12	12	7	5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.83 \pm 0.33	8.69 \pm 0.38	8.68 \pm 0.30	8.49 \pm 0.40	8.56 \pm 0.28	8.34 \pm 0.14
Hemoglobin (g/dL)	15.8 \pm 0.5	15.7 \pm 0.5	15.8 \pm 0.6	15.1 \pm 0.6	16.0 \pm 0.7	15.8 \pm 0.3
Hematocrit (%)	44.6 \pm 1.9	44.2 \pm 1.5	44.0 \pm 1.8	42.8 \pm 1.5	43.1 \pm 1.6	42.4 \pm 0.9
MCV (fL)	50.5 \pm 0.9	50.9 \pm 1.7	50.7 \pm 1.5	50.5 \pm 1.4	50.4 \pm 1.1	50.9 \pm 1.8
MCH (pg)	17.9 \pm 0.3	18.1 \pm 0.5	18.2 \pm 0.6	17.8 \pm 0.4	18.7 \pm 0.4	18.9 \pm 0.7
MCHC (g/dL)	35.4 \pm 0.6	35.6 \pm 0.3	35.8 \pm 0.4	35.2 \pm 0.4	37.1 \pm 0.5	37.2 \pm 0.4
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1071 \pm 77	1053 \pm 107	1064 \pm 158	1053 \pm 132	1057 \pm 111	1108 \pm 144
Reticulocyte (%)	1.9 \pm 0.4	2.0 \pm 0.2	1.9 \pm 0.2	1.9 \pm 0.3	1.9 \pm 0.3	2.0 \pm 0.2
PT (sec)	15.0 \pm 3.6	14.4 \pm 1.6	15.2 \pm 2.1	18.0 \pm 2.7	13.0 \pm 1.0	18.0 \pm 5.7
APTT (sec)	24.6 \pm 3.1	22.8 \pm 2.1	25.0 \pm 4.0	27.0 \pm 1.8	22.5 \pm 4.0	23.8 \pm 2.6
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	13.33 \pm 5.86	12.41 \pm 2.32	13.15 \pm 2.85	12.57 \pm 4.11	10.52 \pm 2.29	10.01 \pm 3.13
Differential WBC (%)						
Neutrophil, band	0 \pm 1	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 1	0 \pm 0	1 \pm 1
Neutrophil, segment	14 \pm 5	16 \pm 6	18 \pm 5	16 \pm 6	14 \pm 2	15 \pm 4
Eosinophil	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1	1 \pm 1
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	3 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1	2 \pm 2
Lymphocyte	82 \pm 6	80 \pm 7	79 \pm 5	79 \pm 6	81 \pm 4	81 \pm 4
Others	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Pregnant female						
No. of animals examined	10	12	11	11	Satellite female	
					5	5
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6.72 \pm 0.39	7.04 \pm 0.46	6.90 \pm 0.47	6.84 \pm 0.33	7.99 \pm 0.40	8.10 \pm 0.22
Hemoglobin (g/dL)	13.0 \pm 0.5	13.3 \pm 0.7	13.3 \pm 0.7	13.1 \pm 0.6	15.8 \pm 0.6	16.1 \pm 0.4
Hematocrit (%)	36.4 \pm 1.7	37.1 \pm 1.6	37.1 \pm 1.8	36.7 \pm 1.5	41.5 \pm 1.4	41.7 \pm 0.8
MCV (fL)	54.3 \pm 3.2	52.8 \pm 2.7	53.9 \pm 2.5	53.7 \pm 1.5	52.0 \pm 1.9	51.5 \pm 0.8
MCH (pg)	19.4 \pm 1.0	18.9 \pm 0.7	19.2 \pm 0.7	19.1 \pm 0.6	19.8 \pm 0.6	19.9 \pm 0.3
MCHC (g/dL)	35.8 \pm 0.4	35.9 \pm 0.8	35.7 \pm 0.6	35.7 \pm 0.5	38.0 \pm 0.8	38.5 \pm 0.4
Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1371 \pm 153	1293 \pm 194	1476 \pm 250	1318 \pm 142	1109 \pm 98	1023 \pm 51
Reticulocyte (%)	6.8 \pm 1.7	5.9 \pm 2.2	6.8 \pm 2.2	7.0 \pm 1.4	1.7 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1
PT (sec)	12.2 \pm 0.5	12.5 \pm 0.6	12.1 \pm 0.5	12.4 \pm 0.3	11.4 \pm 0.7	11.6 \pm 0.4
APTT (sec)	17.9 \pm 1.6	17.8 \pm 2.0	17.3 \pm 2.4	17.9 \pm 1.7	16.4 \pm 0.8	16.2 \pm 1.2
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11.49 \pm 4.36	12.00 \pm 3.12	11.46 \pm 2.60	13.08 \pm 2.64	5.22 \pm 1.34	6.26 \pm 0.99
Differential WBC (%)						
Neutrophil, band	1 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1	1 \pm 2	0 \pm 0	1 \pm 1
Neutrophil, segment	25 \pm 13	30 \pm 7	34 \pm 6	32 \pm 8	15 \pm 6	12 \pm 5
Eosinophil	0 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1
Basophil	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte	3 \pm 1	5 \pm 2	4 \pm 2	3 \pm 2	3 \pm 1	3 \pm 1
Lymphocyte	69 \pm 13	64 \pm 7	60 \pm 5	63 \pm 8	79 \pm 7	82 \pm 6
Others	0 \pm 1	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	1 \pm 1	1 \pm 1

Data represent mean \pm S.D.

Table 5 Biochemistry of rats treated orally with 2-(2 *H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	0.5	2.5	12.5	0	12.5
Male						
No. of animals examined	7	12	12	7	5	5
Total protein (g/dL)	6.2 ± 0.1	6.2 ± 0.3	6.2 ± 0.4	6.0 ± 0.4	6.1 ± 0.2	6.3 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.9 ± 0.3 *	3.4 ± 0.1	3.5 ± 0.2
A/G ratio	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.3 **	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1
Total bilirubin (mg/dL)	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01 **
Glucose (mg/dL)	177 ± 15	175 ± 15	173 ± 16	167 ± 10	176 ± 18	189 ± 16
Total cholesterol (mg/dL)	54 ± 3	52 ± 8	52 ± 10	48 ± 12	59 ± 12	68 ± 14
Triglyceride (mg/dL)	62 ± 26	41 ± 18 *	38 ± 11 *	35 ± 19 *	46 ± 34	46 ± 15
Phospholipid (mg/dL)	95 ± 5	88 ± 12	86 ± 12	88 ± 19	94 ± 17	104 ± 19
AST (IU/L)	64 ± 8	63 ± 10	68 ± 11	65 ± 9	62 ± 5	66 ± 21
ALT (IU/L)	30 ± 4	28 ± 5	33 ± 11	31 ± 4	26 ± 4	29 ± 8
LDH (IU/L)	135 ± 37	151 ± 56	199 ± 81	150 ± 57	112 ± 27	137 ± 40
ALP (IU/L)	266 ± 67	278 ± 53	267 ± 63	450 ± 117 **	184 ± 35	207 ± 33
γ-GTP (IU/L)	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
CK (IU/L)	94 ± 19	99 ± 20	138 ± 134	78 ± 15	82 ± 18	80 ± 9
BUN (mg/dL)	12.7 ± 1.8	11.1 ± 1.3	12.7 ± 1.8	13.0 ± 1.6	14.5 ± 1.3	13.8 ± 1.4
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0
Na (mEq/L)	144 ± 1	144 ± 2	144 ± 2	144 ± 1	143 ± 1	143 ± 1
K (mEq/L)	3.9 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2	4.1 ± 0.2	3.7 ± 0.3	3.5 ± 0.2
Cl (mEq/L)	106 ± 1	106 ± 2	106 ± 2	106 ± 1	105 ± 2	105 ± 2
Ca (mg/dL)	10.1 ± 0.2	10.1 ± 0.3	10.1 ± 0.4	10.0 ± 0.3	9.9 ± 0.3	9.9 ± 0.2
IP (mg/dL)	6.1 ± 0.7	6.5 ± 0.5	6.6 ± 0.5	6.4 ± 0.7	5.5 ± 0.7	5.6 ± 0.2
Pregnant female				Satellite female		
No. of animals examined	10	12	11	11	5	5
Total protein (g/dL)	6.2 ± 0.4	6.0 ± 0.3	6.0 ± 0.4	6.0 ± 0.3	6.8 ± 0.5	6.5 ± 0.2
Albumin (g/dL)	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.2	4.2 ± 0.5	4.1 ± 0.1
A/G ratio	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.1
Total bilirubin (mg/dL)	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.01
Glucose (mg/dL)	147 ± 10	141 ± 16	144 ± 11	144 ± 13	156 ± 14	159 ± 16
Total cholesterol (mg/dL)	66 ± 15	53 ± 9	59 ± 11	55 ± 12	79 ± 8	67 ± 8 *
Triglyceride (mg/dL)	98 ± 33	50 ± 22 **	61 ± 21 **	60 ± 27 **	36 ± 21	34 ± 39
Phospholipid (mg/dL)	131 ± 20	108 ± 16 *	116 ± 20	108 ± 18 *	150 ± 22	128 ± 19
AST (IU/L)	77 ± 18	85 ± 13	77 ± 13	94 ± 15 *	161 ± 245	57 ± 9
ALT (IU/L)	48 ± 9	50 ± 9	48 ± 11	56 ± 8	62 ± 91	21 ± 4
LDH (IU/L)	150 ± 45	156 ± 50	141 ± 39	174 ± 65	244 ± 363	90 ± 53
ALP (IU/L)	206 ± 65	165 ± 35	207 ± 50	216 ± 59	70 ± 17	103 ± 29
γ-GTP (IU/L)	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0
CK (IU/L)	87 ± 21	81 ± 20	91 ± 25	89 ± 10	60 ± 7	63 ± 12
BUN (mg/dL)	21.8 ± 4.7	22.9 ± 5.6	17.6 ± 4.0	19.4 ± 3.6	15.5 ± 0.9	15.4 ± 2.0
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0
Na (mEq/L)	143 ± 2	144 ± 2	144 ± 1	143 ± 2	142 ± 1	142 ± 1
K (mEq/L)	3.4 ± 0.3	3.3 ± 0.3	3.3 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.1 ± 0.1	3.2 ± 0.1
Cl (mEq/L)	105 ± 2	107 ± 2	106 ± 2	106 ± 2	106 ± 2	105 ± 1
Ca (mg/dL)	11.1 ± 0.2	10.8 ± 0.3	10.9 ± 0.5	10.8 ± 0.3	10.2 ± 0.5	10.0 ± 0.2
IP (mg/dL)	8.2 ± 0.8	8.1 ± 1.2	7.8 ± 1.2	8.5 ± 0.8	4.0 ± 0.5	4.2 ± 0.4

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$.

Table 6 Organ weights of rats treated orally with 2-(2*H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		At the end of administration period				At the end of recovery period	
		0	0.5	2.5	12.5	0	12.5
Male							
No. of animals examined		7	12	12	7	5	5
Body weight	(g)	470 ± 46	480 ± 37	483 ± 43	469 ± 27	505 ± 49	497 ± 32
Thymus	(g)	0.419 ± 0.042	0.418 ± 0.056	0.437 ± 0.094	0.403 ± 0.075	0.508 ± 0.071	0.439 ± 0.070
	(%)	0.090 ± 0.011	0.087 ± 0.010	0.091 ± 0.023	0.086 ± 0.015	0.101 ± 0.013	0.089 ± 0.017
Adrenals	(g)	0.068 ± 0.011	0.073 ± 0.008	0.073 ± 0.007	0.073 ± 0.007	0.060 ± 0.005	0.070 ± 0.014
	(%)	0.014 ± 0.002	0.015 ± 0.002	0.015 ± 0.001	0.015 ± 0.001	0.012 ± 0.001	0.014 ± 0.003
Heart	(g)	1.415 ± 0.129	1.430 ± 0.120	1.412 ± 0.131	1.427 ± 0.105	1.472 ± 0.160	1.489 ± 0.117
	(%)	0.302 ± 0.021	0.299 ± 0.020	0.293 ± 0.018	0.305 ± 0.025	0.292 ± 0.020	0.300 ± 0.031
Kidneys	(g)	2.730 ± 0.395	2.754 ± 0.212	2.868 ± 0.320	3.103 ± 0.302	2.900 ± 0.287	3.023 ± 0.426
	(%)	0.579 ± 0.044	0.575 ± 0.034	0.593 ± 0.039	0.662 ± 0.051 **	0.575 ± 0.026	0.608 ± 0.082
Spleen	(g)	0.673 ± 0.143	0.679 ± 0.123	0.724 ± 0.175	0.720 ± 0.101	0.802 ± 0.136	0.742 ± 0.070
	(%)	0.143 ± 0.030	0.142 ± 0.027	0.150 ± 0.035	0.154 ± 0.020	0.158 ± 0.019	0.150 ± 0.016
Liver	(g)	12.332 ± 2.382	12.475 ± 1.728	13.669 ± 1.818	17.236 ± 3.582 **	12.366 ± 1.908	13.452 ± 1.213
	(%)	2.604 ± 0.242	2.594 ± 0.235	2.826 ± 0.245	3.666 ± 0.657 **	2.439 ± 0.168	2.706 ± 0.206
Brain	(g)	2.035 ± 0.094	2.064 ± 0.065	2.087 ± 0.061	2.072 ± 0.069	2.113 ± 0.104	2.095 ± 0.051
	(%)	0.435 ± 0.036	0.432 ± 0.026	0.435 ± 0.040	0.443 ± 0.023	0.422 ± 0.045	0.422 ± 0.023
Testes	(g)	3.136 ± 0.588	3.239 ± 0.200	3.415 ± 0.198	3.112 ± 0.359	3.422 ± 0.278	3.458 ± 0.307
	(%)	0.668 ± 0.110	0.678 ± 0.058	0.710 ± 0.048	0.664 ± 0.066	0.679 ± 0.023	0.697 ± 0.068
Epididymides	(g)	1.109 ± 0.181	1.142 ± 0.103	1.179 ± 0.081	1.164 ± 0.067	1.223 ± 0.119	1.429 ± 0.474
	(%)	0.237 ± 0.040	0.239 ± 0.025	0.245 ± 0.018	0.249 ± 0.018	0.242 ± 0.015	0.288 ± 0.099
Pregnant female							
No. of animals examined		10	12	11	11	Satellite female 5	5
Body weight	(g)	294 ± 13	285 ± 19	287 ± 16	295 ± 11	271 ± 13	283 ± 12
Thymus	(g)	0.243 ± 0.051	0.244 ± 0.058	0.251 ± 0.086	0.246 ± 0.060	0.316 ± 0.083	0.363 ± 0.077
	(%)	0.083 ± 0.016	0.085 ± 0.019	0.087 ± 0.028	0.083 ± 0.018	0.116 ± 0.028	0.128 ± 0.026
Adrenals	(g)	0.079 ± 0.009	0.083 ± 0.009	0.081 ± 0.007	0.083 ± 0.006	0.070 ± 0.011	0.073 ± 0.006
	(%)	0.027 ± 0.003	0.029 ± 0.004	0.028 ± 0.003	0.028 ± 0.002	0.026 ± 0.005	0.026 ± 0.003
Heart	(g)	0.975 ± 0.061	0.972 ± 0.060	0.938 ± 0.081	0.996 ± 0.059	0.868 ± 0.083	0.868 ± 0.037
	(%)	0.332 ± 0.019	0.342 ± 0.024	0.327 ± 0.024	0.337 ± 0.016	0.320 ± 0.020	0.307 ± 0.021
Kidneys	(g)	1.860 ± 0.150	1.822 ± 0.161	1.762 ± 0.140	1.938 ± 0.146	1.689 ± 0.155	1.664 ± 0.060
	(%)	0.634 ± 0.056	0.640 ± 0.056	0.616 ± 0.057	0.658 ± 0.058	0.622 ± 0.035	0.588 ± 0.025
Spleen	(g)	0.678 ± 0.120	0.635 ± 0.108	0.607 ± 0.123	0.651 ± 0.084	0.450 ± 0.054	0.483 ± 0.043
	(%)	0.231 ± 0.039	0.225 ± 0.049	0.212 ± 0.044	0.220 ± 0.024	0.166 ± 0.013	0.171 ± 0.022
Liver	(g)	9.828 ± 0.872	9.228 ± 0.834	9.198 ± 0.791	9.850 ± 0.652	6.692 ± 0.967	6.526 ± 0.430
	(%)	3.347 ± 0.252	3.242 ± 0.301	3.207 ± 0.235	3.338 ± 0.189	2.461 ± 0.255	2.308 ± 0.166
Brain	(g)	1.913 ± 0.073	1.918 ± 0.069	1.917 ± 0.066	1.900 ± 0.128	1.878 ± 0.044	1.934 ± 0.048
	(%)	0.653 ± 0.035	0.675 ± 0.045	0.670 ± 0.048	0.644 ± 0.045	0.694 ± 0.026	0.684 ± 0.035

Data represent mean ± S.D.

Significant difference from the control group, ** $p \leq 0.01$.

Table 7 Histopathological findings of rats treated orally with 2-(2 *H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	Male						Female					
	At the end of administration period				At the end of recovery period		At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	0.5	2.5	12.5	0	12.5	0	0.5	2.5	12.5	0	12.5
No. of animals examined	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
(Kidney)	(Grade)											
eosinophilic body	+	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
regeneration:	+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
proximal tubule	2+	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
(Heart)												
inflammatory cell nest	+	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
(Lung)												
accumulation of foamy cells	+	3	2	1	5	1	2	1	1	1	2	2
	2+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
inflammation	+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
(Spleen)												
deposit of hemosiderin	+	0	0	0	0	1	0	0	0	0	5	4
(Thyroid)												
ultimibranial body	+	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
remanet												
(Pituitary)												
Rathke pouch	+	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. of animals examined	<7>	<12>	<12>	<7>	<5>	<5>	<—>	<—>	<—>	<—>	<—>	<—>
(Testis)												
germ cell necrosis	+	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
	2+	2	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
(Epididymis)												
debris of spermatic elements	+	1	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
	2+	1	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
spermatogenic granuloma	+	0	0	1	0	0	—	—	—	—	—	—
inflammation	3+	0	0	0	0	1	—	—	—	—	—	—
(Prostate)												
inflammation	+	1	4	2	2	1	—	—	—	—	—	—
	2+	1	2	2	0	1	—	—	—	—	—	—

Grade; +: slight, 2+: moderate, 3+: marked.

Table 8 Estrous cycle and reproductive performance of rats treated orally with
2-(2 *H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose
and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	0.5	2.5	12.5
Estrous cycle				
No. of animals examined	12	12	12	12
Type of cycle				
4-day	10	11	10	11
5-day	0	0	0	0
Others	2	1	2	1
Length (day) ^{a)}	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.2 ± 0.4	4.1 ± 0.3
Reproductive performance				
No. of mated pairs	12	12	12	12
No. of copulated pairs	12	12	12	12
Copulation index (%)	100	100	100	100
No. of pregnant females	10	12	11	11
Fertility index (%)	83.3	100	91.7	91.7
Pairing days until copulation ^{a)}	2.6 ± 1.1	2.8 ± 1.5	2.8 ± 1.2	3.7 ± 3.4
Parturition and lactation				
Non-remarkable	10	12	11	11

^{a)} Data represent mean ± S.D.

Copulation index = (No. of copulated pairs / No. of mated pairs) × 100.

Fertility index = (No. of pregnant females / No. of copulated pairs) × 100.

Table 9 Summary of development of pups from dams treated orally with
2-(2 *H*-benzotriazol-2-yl)-4-(*tert*-butyl)-6-(*sec*-butyl)phenol in the combined repeated dose
and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		0.5		2.5		12.5	
No. of pregnant females	10		12		11		11	
No. of pregnant females with live pups	10		12		11		11	
Gestation index (%)	100		100		100		100	
Gestation length (days)	22.1 ± 0.6	(10)	21.9 ± 0.3	(12)	22.1 ± 0.3	(11)	22.0 ± 0.0	(11)
No. of corpora lutea	15.9 ± 2.1	(10)	15.3 ± 1.9	(12)	15.2 ± 2.2	(11)	16.0 ± 1.5	(11)
No. of implantations	14.9 ± 2.0	(10)	14.0 ± 1.4	(12)	13.7 ± 3.0	(11)	15.3 ± 1.7	(11)
Implantation index (%)	94.0 ± 7.0	(10)	91.9 ± 9.2	(12)	90.3 ± 15.1	(11)	95.5 ± 6.4	(11)
Day 0 of lactation								
No. of pups born	13.7 ± 1.6	(10)	13.2 ± 1.6	(12)	13.0 ± 2.9	(11)	14.5 ± 1.6	(11)
Delivery index (%)	92.5 ± 8.5	(10)	94.0 ± 5.9	(12)	94.9 ± 3.5	(11)	95.4 ± 6.0	(11)
No. of live pups	13.7 ± 1.6	(10)	13.1 ± 1.6	(12)	12.6 ± 3.1	(11)	14.5 ± 1.6	(11)
Birth index (%)	92.5 ± 8.5	(10)	93.4 ± 6.4	(12)	91.6 ± 6.3	(11)	94.8 ± 5.9	(11)
Live birth index (%)	100.0 ± 0.0	(10)	99.4 ± 2.2	(12)	96.6 ± 6.1	(11)	99.4 ± 1.9	(11)
Pups weight (g)								
Male	6.7 ± 0.5	(10)	6.6 ± 0.5	(12)	6.8 ± 0.5	(11)	6.7 ± 0.4	(11)
Female	6.3 ± 0.5	(10)	6.2 ± 0.4	(12)	6.4 ± 0.6	(11)	6.2 ± 0.4	(11)
Sex ratio on day 0	0.55 ± 0.13	(10)	0.47 ± 0.14	(12)	0.54 ± 0.19	(11)	0.47 ± 0.08	(11)
Day 4 of lactation								
No. of live pups	13.6 ± 1.6	(10)	13.0 ± 1.6	(12)	12.5 ± 2.9	(11)	14.4 ± 1.7	(11)
Viability index (%)	99.3 ± 2.2	(10)	99.4 ± 2.0	(12)	98.9 ± 3.6	(11)	99.2 ± 2.5	(11)
Pups weight (g)								
Male	10.3 ± 0.8	(10)	10.4 ± 1.0	(12)	10.2 ± 1.8	(11)	10.2 ± 0.9	(11)
Female	10.0 ± 0.8	(10)	9.9 ± 0.9	(12)	9.9 ± 1.8	(11)	9.7 ± 0.8	(11)
Sex ratio on day 4	0.56 ± 0.13	(10)	0.47 ± 0.14	(12)	0.54 ± 0.18	(11)	0.47 ± 0.08	(11)

Data represent mean ± S.D.

Parentheses represent the number of litters examined.

Gestation index = (No. of pregnant females with live pups / No. of pregnant females) × 100.

Implantation index = (No. of implantations / No. of corpora lutea) × 100.

Delivery index = (No. of pups born / No. of implantations) × 100.

Birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of implantations) × 100.

Live birth index = (No. of live pups on day 0 / No. of pups born) × 100.

Sex ratio on day 0 = No. of male live pups on day 0 / No. of live pups on day 0.

Viability index = (No. of live pups on day 4 / No. of live pups on day 0) × 100.

Sex ratio on day 4 = No. of male live pups on day 4 / No. of live pups on day 4.