

が短縮を示したが、軽微であり毒性学的に意義のある変化ではなかった。

[回復期間終了時]

対照群に比較して62.5 mg/kg群の雌雄で血小板数が高値を示した。また、62.5 mg/kg群の雄でヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、MCHおよびMCHCが低値、網赤血球比率が高値を示し、雌でフィブリノーゲン量が高値を示した。

その他、62.5 mg/kg群の雄で好酸球比率が低値を示したが軽微な変化であった。

5. 血液生化学検査 (Table 2)

[投与期間終了時]

対照群に比較して62.5 mg/kg群の雌雄、2.5および12.5 mg/kg群の雄で血糖値が高値を示した。62.5 mg/kg群の雄で総コレステロールおよび中性脂肪の濃度が高値を示した。12.5および62.5 mg/kg群の雄でアルブミン濃度が高値、各投与群の雄および62.5 mg/kg群の雌でA/G比が高値を示した。62.5 mg/kg群の雌雄および12.5 mg/kg群の雄でALT活性が高値、62.5 mg/kg群の雄でAST活性が高値を示した。12.5および62.5 mg/kg群の雄でALP活性が高値を示した。62.5 mg/kg群の雄で尿素窒素濃度が高値を示した。その他、0.5および2.5 mg/kg群の雄で総ビリルビン濃度が低値、2.5 mg/kg群の雄でナトリウム濃度が低値を示したがいずれも用量に依存した変化ではなかった。

[回復期間終了時]

対照群に比較して62.5 mg/kg群の雌雄でアルブミン濃度の高値および総ビリルビン濃度が低値を示した。雄では尿素窒素濃度、A/G比、ALTおよびALPの活性が、雌では血糖値、総コレステロールおよび総蛋白の濃度がいずれも高値を示した。

6. 尿検査 (Table 3)

[投与期間終了時]

対照群に比較して2.5 mg/kg群の雌で尿量が増加、尿浸透圧が低値を示したが用量に依存した変化ではなかった。

[回復期間終了時]

対照群に比較して62.5 mg/kg群の雌雄において検査したいずれの項目においても変化が認められなかった。

7. 器官重量 (Table 4)

[投与期間終了時]

対照群に比較して12.5および62.5 mg/kg群の雌雄、0.5および2.5 mg/kg群の雄で肝臓絶対重量が高値あるいは高値傾向を示した。62.5 mg/kg群の雄では腎臓絶対重量が高値を示した。

器官重量/体重比では、対照群に比較して12.5および62.5 mg/kg群の雌雄、0.5および12.5 mg/kg群の雄で肝

臓相対重量が高値を示した。また、62.5 mg/kg群の雄で腎臓相対重量が高値を示した。その他、62.5 mg/kg群の雌で脳および副腎の相対重量が低値を示したが絶対重量に差がみられなかった。また、0.5 mg/kg群の雌で腎臓相対重量が低値を示したが、用量に依存した変化ではなかった。

[回復期間終了時]

対照群に比較して62.5 mg/kg群の雌雄で肝臓絶対重量が高値を示した。その他、雄で精巣上体絶対重量が低値を示したが、この群の体重の低値に起因するものであった。

器官重量/体重比では、対照群に比較して62.5 mg/kg群の雌雄で肝臓相対重量が高値を示した。62.5 mg/kg群の雄で心臓および腎臓の相対重量が高値を示した。

8. 病理学検査

1) 剖検所見 (Table 5)

[投与期間終了時]

肝臓の肥大が0.5 mg/kg以上の群の雄および12.5 mg/kg以上の群の雌で増加した。また、肝臓の白色斑/区域が2.5 mg/kg以上の群の雄と62.5 mg/kg群の雌に観察された。その他に観察された所見は各投与群に散発性または単発性であった。

[回復期間終了時]

肝臓の肥大が62.5 mg/kg群の雄5例、雌2例に認められた。肝臓の褐色化が62.5 mg/kg群の雄5例に認められた。肝臓の赤色斑/区域および白色斑/区域が62.5 mg/kg群の雄にそれぞれ1および2例に観察された。その他に観察された所見は、対照群および62.5 mg/kg群に散発性または単発性であった。

2) 組織所見 (Table 6)

[投与期間終了時]

被験物質によると考えられる所見として、心臓の心筋変性が12.5 mg/kg以上の群の雌雄に、細胞浸潤が0.5 mg/kg以上の群の雄および62.5 mg/kg群の雌に、心筋肥大が12.5 mg/kg以上の群の雌雄に、脾臓の髄外造血が2.5 mg/kg以上の群の雄に、肝臓の小葉辺縁部の肝細胞の空胞変性が2.5 mg/kg以上の群の雄および62.5 mg/kg群の雌に、巣状壊死が2.5 mg/kg以上の群の雄に、肝細胞肥大が0.5 mg/kg以上の群の雄および12.5 mg/kg以上の群の雌に、分裂像増多が62.5 mg/kg群の雄および12.5 mg/kg以上の群の雌に、胆管増殖が0.5 mg/kg以上の群の雄および62.5 mg/kg群の雌に、腎臓の尿管好塩基化の程度の増強が62.5 mg/kg群の雌に、管腔拡張が62.5 mg/kg群の雌に、集合管の尿管管上皮肥大が12.5 mg/kg以上の群の雄および62.5 mg/kg群の雌に、甲状腺の濾胞細胞増生が62.5 mg/kg群の雌雄にそれぞれ観察された。その他、肝臓において色素沈着および好酸性細胞質内封入体が62.5 mg/kg群の雄に、肉芽形成が2.5 mg/kg群の雄に、髄外造血が12.5 mg/kg群

の雄でそれぞれ1例に観察された。一方、雄の対照群および雌の対照群と12.5 mg/kg群に認められた肝細胞の脂肪化は、0.5 mg/kg以上の群の雄および62.5 mg/kg群の雌では観察されなかった。また、雄の腎臓で近位尿管の硝子滴が対照群および0.5 mg/kg群で認められたが、2.5 mg/kg以上の群では認められなかった。

その他の所見は用量に依存しないか、対照群も含めて観察されたか、少数例あるいは散発性的のものであった。

[回復期間終了時]

以下に示す投与終了時に観察されたと同様の所見が62.5 mg/kg群に観察された。心臓の心筋変性および細胞浸潤が雄に、脾臓の髄外造血が雄に、肝臓の肝細胞肥大および巣状壊死が雌雄に、肝細胞の空胞変性および胆管増生が雄に、甲状腺の濾胞細胞増生が雄にそれぞれ認められた。また少数例ではあるが肝臓の色素沈着が雌雄で、好酸性細胞質内封入体、肉芽形成および髄外造血が雄に認められた。一方、62.5 mg/kg群の雄では対照群で観察された肝臓の脂肪化および腎臓の近位尿管の硝子滴が認められなかった。

その他の所見は対照群と62.5 mg/kg群に観察されるものか、少数例あるいは散発性的のものであった。

考察

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を0, 0.5, 2.5, 12.5および62.5 mg/kgの用量で雌雄のCrj:CD(SD)IGS系ラットに28日間にわたって強制経口投与し、その後、対照群および最高用量群の5匹の動物については投与を休止して14日間の回復期間を設定した。

投与期間および回復期間を通して一般状態に異常は観察されず、対照群を含む各投与群で死亡例も認められなかった。

体重は、各投与群の雌雄において差が認められなかった。

摂餌量は、62.5 mg/kg群の雌雄で高値を示した週がみられ、総摂餌量も高値あるいは高値傾向であった。飼料効率は62.5 mg/kg群の雄で低値を示し、投与期間の平均飼料効率も低値であった。

血液学検査では、2.5 mg/kg以上の群の雄でヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数が低値を示した。さらに、12.5 mg/kg以上の群の雄でMCHCが低値を示した。また、62.5 mg/kg群の雄では血小板数が高値を示しており、いずれも被験物質の影響と考えられた。回復期間終了時にも62.5 mg/kg群の雄でヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数、MCHおよびMCHCが低値、網赤血球比率が高値を示した。また、62.5 mg/kg群の雌雄で血小板数が高値を示しており、休薬しても回復を示さないものと考えられた。

血液凝固能検査では、2.5 mg/kg以上の群の雄および62.5 mg/kg群の雌でフィブリノーゲン量が低値を示し、被験物質の影響と考えられた。回復期間終了時では、

フィブリノーゲン量が62.5 mg/kg群の雌で高値および雄では差がみられなかった。なお、12.5および62.5 mg/kg群の雌ではPTが短縮を示したが、短縮方向への変化であり毒性学的意義のない変化と考えられた。

血液生化学検査では、後述するALT、ASTおよびALPの活性増加が認められた。その他に、2.5 mg/kg以上の群の雄および62.5 mg/kg群の雌で血糖値、62.5 mg/kg群の雌で総コレステロールおよび中性脂肪の濃度がいずれも高値を示した。さらに、12.5 mg/kg以上の群の雄でアルブミン濃度、0.5 mg/kg以上の群の雄および62.5 mg/kg群の雌でA/G比が高値、62.5 mg/kg群の雄で尿素窒素濃度が高値を示した。これらの変化はいずれも被験物質の影響と考えられたがその機序を明らかにすることはできなかった。回復期間終了時には62.5 mg/kg群の雌雄でアルブミン濃度の高値および総ビリルビン濃度が低値を示した。また、雄では尿素窒素濃度、A/G比、ALTおよびALPの活性が、雌では血糖値、総コレステロールおよび総蛋白の濃度がいずれも高値を示し、休薬しても回復を示さないものと考えられた。

器官重量測定では、0.5 mg/kg以上の群の雄および12.5 mg/kg以上の群の雌で肝臓絶対重量が高値あるいは高値傾向を示した。62.5 mg/kg群の雄では腎臓絶対重量が高値を示した。回復期間終了時では62.5 mg/kg群の雌雄で肝臓絶対重量が高値を示した。器官重量/体重比では、0.5 mg/kg以上の群の雄および12.5 mg/kg以上の群の雌で肝臓相対重量が高値を示した。また、62.5 mg/kg群の雄で腎臓相対重量が高値を示した。回復期間終了時では62.5 mg/kg群の雌雄で肝臓相対重量が、雄で腎臓相対重量がいずれも高値を示しており、休薬しても回復を示さないものと考えられた。なお、雄で心臓相対重量が高値を示しており、後述する病理組織学所見と連動するものと考えられた。

病理学検査では、被験物質の影響と考えられる変化として、投与終了時解剖動物において器官重量で肝臓が増加し、肉眼観察で、肝臓の肥大が0.5 mg/kg以上の群の雄および12.5 mg/kg以上の群の雌に、肝臓の白色斑/区域が2.5 mg/kg以上の群の雄および62.5 mg/kg群の雌で観察された。病理組織学所見では、0.5 mg/kg以上の群の雄および12.5 mg/kg以上の群の雌で肝細胞肥大、肝細胞の空胞変性、分裂像増多および胆管増生があり、さらに雄で巣状壊死、肉芽形成、色素沈着および細胞質内封入体が認められた。肝細胞の肥大は壊死、変性などの障害性変化を随伴しており、血液生化学検査ではALT、ALP、ASTの活性の高値が認められたことから、被験物質の肝臓に対する障害性影響が示唆された。2.5 mg/kg以上の群の雄および12.5 mg/kg以上の群の雌で心筋変性、細胞浸潤および心筋肥大が認められた。心筋変性あるいは心筋肥大の発生機序としては被験物質作用の循環動態への影響、心筋への直接作用があると考えられるが^{4,5)}、その病理発生は不明であった。甲状腺の濾胞細胞増生は、肝細胞肥大に示される肝臓の薬物代謝酵素誘導による影響と考えられた^{4,5)}。また、62.5 mg/kg群の雌雄では集合管の尿管管上皮肥大、雄で尿管管好塩

基化および管腔拡張が観察され、尿管の拡張に伴い硝子円柱も一部の動物に認められた。これらの所見の病理発生は不明であったが、被験物質の影響と考えられた。脾臓では髓外造血が2.5 mg/kg以上の群の雄で認められた。血液学検査においてヘマトクリット値、ヘモグロビン量、赤血球数およびMCHCの低下が雄において観察されており、赤血球減少に対する代償性の造血亢進と考えられた。以上の結果からラットにおいては被験物質に対する感受性に性差があり、雄により強い影響が現れることが示唆された。その他の所見は対照群を含め観察され、また散発性または単発性の発生であり、明らかな用量に依存する変化ではないことから自然発生病変と考えられた。

回復終了時の62.5 mg/kg群の雌雄において肝臓の絶対重量および相対重量が増加し、病理組織所見として肝細胞肥大および巣状壊死があり、さらに雄では肝細胞の空胞変性および胆管増成、心臓の心筋変性および細胞浸潤および脾臓の髓外造血、甲状腺の濾胞細胞増生が観察された。しかし、投与終了時解剖例と比較して病変の程度に増強あるいは減弱は認められなかった。以上より、2週間の回復期間では62.5 mg/kg群に明らかな回復性を示す所見はみられなかった。

以上の結果、本試験条件下における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無影響量は、雌では12.5 mg/kg群で肝臓の絶対重量および相対重量の高値、肝臓の肥大、肝細胞肥大が認められたことから2.5 mg/kg/day、また、雄では0.5 mg/kg群で肝臓絶対重量の高値傾向および相対重量の高値、肝臓の肥大、肝細胞肥大が認められたことから0.5 mg/kg/day未満と判断された。

文献

- 1) 佐野正樹, 岡山佳弘, 医薬安全性研究会会報, 32, 21 (1990).
- 2) M. Yoshida, *J. Jap. Soc. Comp. Stat.* 1, 111 (1988).
- 3) 倍味繁, 稲葉太一, 医薬安全性研究会会報, 40, 33 (1994).
- 4) 伊東信行編, "最新毒性病理学," 中山書店, 1994, p.183, 291.
- 5) 日本毒性病理学会編, "毒性病理組織学," 日本毒性病理学会, 2000, p.228, 437.

連絡先

試験責任者: 渡 修明
 試験担当者: 各務 進, 田代 淳, 杉山 豊,
 細井理代, 大橋信之
 (財)食品農医薬品安全性評価センター
 〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜
 582-2
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Nobuaki Watari (Study director)
 Susumu Kakamu, Jun Tashiro,
 Yutaka Sugiyama, Masayo Hosoi,
 Nobuyuki Ohashi
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
 Pesticides (An-pyo Center)
 582-2 Arahama, Shiohinden, Fukude-cho, Iwata-
 gun, Shizuoka, 437-1213, Japan
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

28日間反復投与毒性試験

Table 1 Hematology of rats treated orally with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	0.5	2.5	12.5	62.5	0	62.5
Male							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
HCT(%)	45.6 ± 1.8	44.6 ± 1.5	42.5 ± 2.4*	41.9 ± 1.2**	40.7 ± 0.9**	44.6 ± 1.0	40.1 ± 2.7**
HGB(g/dL)	15.2 ± 0.4	14.8 ± 0.5	13.9 ± 0.8**	13.6 ± 0.3**	13.2 ± 0.3**	15.3 ± 0.3 N	13.2 ± 0.9**
RBC(× 10 ⁶ /mm ³)	7.89 ± 0.18	7.65 ± 0.32	7.23 ± 0.33*	7.18 ± 0.27*	7.16 ± 0.46**	8.26 ± 0.16	7.65 ± 0.38*
MCV(μm ³)	57.8 ± 1.9	58.3 ± 1.5	58.7 ± 1.2	58.3 ± 1.7	57.0 ± 2.7	54.0 ± 1.6	52.5 ± 2.6
MCH(pg)	19.3 ± 0.7	19.4 ± 0.6	19.3 ± 0.4	19.0 ± 0.9	18.4 ± 0.9	18.5 ± 0.5	17.3 ± 0.9*
MCHC(%)	33.4 ± 0.7	33.2 ± 0.5	32.8 ± 0.2	32.5 ± 0.7*	32.3 ± 0.3*	34.2 ± 0.3	32.9 ± 0.6**
PLT(× 10 ⁹ /mm ³)	1202 ± 75 N	1265 ± 107	1280 ± 116	1572 ± 430	1639 ± 227*	1196 ± 145	1502 ± 134**
WBC(× 10 ⁹ /mm ³)	8.2 ± 2.1	6.6 ± 1.8	7.5 ± 0.8	8.6 ± 3.0	8.2 ± 0.8	10.8 ± 4.2	11.7 ± 4.8
Differential leukocyte counts (%)							
NEUT	11 ± 3	16 ± 3	13 ± 4	15 ± 2	13 ± 5	9 ± 3	12 ± 4
LYMPH	86 ± 2	81 ± 4	83 ± 4	82 ± 2	83 ± 4	87 ± 3	85 ± 4
MONO	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 1*	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1
EOSN	1 ± 1	1 ± 0	0 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Reticulocyte (%)	2.8 ± 0.3	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.3	3.9 ± 0.5*	3.2 ± 1.0	2.5 ± 0.4	4.4 ± 0.2**
PT(sec.)	17.6 ± 2.4	18.0 ± 2.3	16.4 ± 1.7	15.4 ± 0.9	17.5 ± 2.2	15.7 ± 1.0	16.9 ± 0.5
APTT(sec.)	24.2 ± 1.3	24.0 ± 3.0	23.4 ± 2.5	20.8 ± 2.1	25.4 ± 4.7	23.4 ± 1.9	20.3 ± 3.5
Fibrinogen (mg/dL)	249 ± 13	224 ± 8	189 ± 15**	198 ± 21**	193 ± 20**	240 ± 24	214 ± 13
Female							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
HCT(%)	43.7 ± 1.7	43.5 ± 3.1	44.0 ± 1.3	43.1 ± 1.8	41.6 ± 1.6	42.2 ± 1.0	40.6 ± 1.6
HGB(g/dL)	15.1 ± 0.9	14.9 ± 1.3	15.2 ± 0.4	14.8 ± 0.7	14.1 ± 0.6	14.9 ± 0.5	14.2 ± 0.6
RBC(× 10 ⁶ /mm ³)	7.81 ± 0.38	7.62 ± 0.61	7.79 ± 0.22	7.46 ± 0.30	7.49 ± 0.30	7.80 ± 0.27	7.64 ± 0.38
MCV(μm ³)	56.0 ± 1.1	57.1 ± 1.6	56.4 ± 0.8	57.7 ± 1.4	55.6 ± 1.0	54.2 ± 0.8	53.2 ± 1.8
MCH(pg)	19.3 ± 0.4	19.6 ± 0.6	19.5 ± 0.4	19.8 ± 0.5	18.9 ± 0.4	19.1 ± 0.3	18.6 ± 0.6
MCHC(%)	34.5 ± 0.8	34.3 ± 0.8	34.5 ± 0.4	34.4 ± 0.3	34.0 ± 0.4	35.2 ± 0.3	35.1 ± 0.4
PLT(× 10 ⁹ /mm ³)	1295 ± 118	1360 ± 155	1367 ± 79	1368 ± 138	1350 ± 194	1166 ± 64	1410 ± 95**
WBC(× 10 ⁹ /mm ³)	6.1 ± 1.7	7.3 ± 2.2	8.4 ± 4.5	8.4 ± 2.1	8.4 ± 2.4	6.1 ± 1.4	5.6 ± 1.6
Differential leukocyte counts (%)							
NEUT	11 ± 5 N	17 ± 8	17 ± 12	10 ± 4	8 ± 3	13 ± 4	10 ± 3
LYMPH	86 ± 5 N	79 ± 8	80 ± 12	86 ± 4	88 ± 2	82 ± 4	87 ± 3
MONO	1 ± 0	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 0	2 ± 1
EOSN	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	1 ± 1**
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Reticulocyte (%)	2.1 ± 0.4 N	3.5 ± 1.7	2.6 ± 0.4	2.5 ± 0.2	2.4 ± 0.3	2.7 ± 0.4	2.6 ± 0.3
PT(sec.)	15.5 ± 0.4	15.4 ± 0.7	15.2 ± 0.6	14.4 ± 0.7*	14.2 ± 0.3**	16.5 ± 1.0	15.8 ± 1.1
APTT(sec.)	19.0 ± 0.8	18.9 ± 1.5	19.2 ± 2.0	17.8 ± 1.5	19.4 ± 1.5	14.3 ± 1.6	15.0 ± 2.7
Fibrinogen (mg/dL)	193 ± 11 N	222 ± 46	186 ± 9	184 ± 29	155 ± 10*	210 ± 7	241 ± 7**

NEUT: Neutrophil, LYMPH: Lymphocyte, MONO: Monocyte, EOSN: Eosinophil, BASO: Basophil, LUC: Large unstained cells
 Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

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

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	0.5	2.5	12.5	62.5	0	62.5
Male							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
Glucose (mg/L)	122 ± 13	132 ± 15	170 ± 18**	170 ± 10**	156 ± 16**	166 ± 13	182 ± 22
T.cholesterol (mg/L)	59 ± 11	46 ± 9	45 ± 4	49 ± 13	52 ± 20	62 ± 13	55 ± 19
Triglyceride (mg/L)	25.5 ± 8.4 N	24.3 ± 4.5	34.5 ± 7.1	44.8 ± 20.9	45.8 ± 12.5	68.0 ± 52.0	47.5 ± 26.6
BUN (mg/L)	13.0 ± 2.5	12.9 ± 0.5	15.5 ± 1.7	15.8 ± 1.3	17.2 ± 2.4**	14.5 ± 2.4	19.0 ± 1.9*
Creatinine (mg/L)	0.25 ± 0.05	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.21 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.04
T.bilirubin (mg/L)	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.01**	0.02 ± 0.01**	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.01**
T.protein (g/dL)	5.84 ± 0.34	5.52 ± 0.10	5.55 ± 0.24	5.72 ± 0.22	5.86 ± 0.40	6.02 ± 0.19	5.95 ± 0.49
Albumin (g/dL)	3.78 ± 0.22	3.90 ± 0.17	4.06 ± 0.20	4.43 ± 0.18**	4.40 ± 0.41**	3.75 ± 0.10 N	4.22 ± 0.45*
A/G	1.85 ± 0.18	2.43 ± 0.23*	2.75 ± 0.29**	3.47 ± 0.25**	3.05 ± 0.55**	1.66 ± 0.11 N	2.46 ± 0.34**
Sodium (mmol/L)	145.7 ± 0.6	145.5 ± 0.8	144.1 ± 0.8*	145.0 ± 0.6	144.7 ± 0.9	144.1 ± 0.9	144.6 ± 1.3
Potassium (mmol/L)	4.37 ± 0.27	4.49 ± 0.23	4.71 ± 0.22	4.20 ± 0.15	4.47 ± 0.22	4.56 ± 0.16	4.85 ± 0.41
Chloride (mmol/L)	108.9 ± 0.9	109.1 ± 1.2	108.3 ± 1.5	108.0 ± 1.2	108.5 ± 1.6	106.3 ± 1.2	106.5 ± 1.0
Calcium (mg/dL)	10.06 ± 0.24	9.85 ± 0.08	9.95 ± 0.27	10.16 ± 0.25	9.84 ± 0.35	10.11 ± 0.42	10.05 ± 0.29
Lphosphorus (mg/dL)	8.10 ± 1.03	8.24 ± 1.01	8.18 ± 0.28	8.60 ± 0.52	7.82 ± 0.38	7.45 ± 0.55	8.17 ± 0.54
AST (U/L)	72 ± 7 N	71 ± 11	65 ± 5	83 ± 22	115 ± 16*	61 ± 7 N	68 ± 22
ALT (U/L)	30 ± 5	28 ± 4	32 ± 3	42 ± 5*	48 ± 10**	25 ± 5 N	49 ± 29**
ALP (U/L)	757 ± 175	992 ± 220	1089 ± 168	1569 ± 427**	1462 ± 250**	622 ± 123	906 ± 169*
γ-GTP (U/L)	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2
Female							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
Glucose (mg/L)	110 ± 15	120 ± 20	114 ± 16	127 ± 22	151 ± 8**	117 ± 8	149 ± 16**
T.cholesterol (mg/L)	49 ± 10	59 ± 5	50 ± 7	54 ± 6	84 ± 16**	63 ± 6	91 ± 14**
Triglyceride (mg/L)	12.3 ± 5.6	12.1 ± 2.6	8.8 ± 3.7	12.2 ± 1.1	31.9 ± 4.8**	18.8 ± 7.6	37.7 ± 18.8
BUN (mg/L)	16.1 ± 4.3	15.5 ± 1.5	16.6 ± 3.8	15.8 ± 2.4	16.9 ± 1.3	16.6 ± 1.2	16.8 ± 0.8
Creatinine (mg/L)	0.30 ± 0.05	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.07	0.30 ± 0.07	0.25 ± 0.04	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.03
T.bilirubin (mg/L)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01**
T.protein (g/dL)	5.68 ± 0.14	5.61 ± 0.18	5.53 ± 0.19	5.93 ± 0.33	5.85 ± 0.19	5.91 ± 0.29	6.50 ± 0.30*
Albumin (g/dL)	3.81 ± 0.23	3.67 ± 0.43	3.72 ± 0.12	4.12 ± 0.14	4.21 ± 0.18	3.85 ± 0.32 N	4.27 ± 0.10*
A/G	2.04 ± 0.26	1.95 ± 0.44	2.09 ± 0.27	2.30 ± 0.25	2.59 ± 0.29*	1.89 ± 0.25	1.93 ± 0.18
Sodium (mmol/L)	143.5 ± 0.3 N	143.6 ± 1.4	143.0 ± 0.7	143.8 ± 0.5	142.5 ± 1.5	144.3 ± 0.9	143.7 ± 0.8
Potassium (mmol/L)	4.06 ± 0.11	3.98 ± 0.29	4.18 ± 0.40	4.24 ± 0.26	4.14 ± 0.38	4.13 ± 0.24	4.35 ± 0.32
Chloride (mmol/L)	110.3 ± 1.2	109.6 ± 1.9	109.5 ± 1.8	109.9 ± 1.9	108.6 ± 2.2	109.3 ± 2.2 N	108.1 ± 0.2
Calcium (mg/dL)	10.06 ± 0.15	9.84 ± 0.33	9.71 ± 0.20	10.19 ± 0.23	10.14 ± 0.40	9.85 ± 0.31	10.14 ± 0.35
Lphosphorus (mg/dL)	7.15 ± 0.61	7.11 ± 0.43	7.02 ± 0.76	7.62 ± 1.03	7.84 ± 1.15	6.08 ± 0.66	6.08 ± 0.49
AST (U/L)	68 ± 5	69 ± 11	66 ± 7	68 ± 9	76 ± 12	66 ± 13	85 ± 19
ALT (U/L)	21 ± 2	22 ± 4	23 ± 3	27 ± 4	33 ± 6**	25 ± 4 N	36 ± 21
ALP (U/L)	490 ± 110	409 ± 86	414 ± 85	433 ± 83	633 ± 199	381 ± 138	247 ± 63
γ-GTP (U/L)	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.3	0.6 ± 0.1

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

N: Non parametric analysis

28日間反復投与毒性試験

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	0.5	2.5	12.5	62.5	0	62.5
Male							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
Volume (mL)	7.5 ± 1.6	11.8 ± 6.1	9.6 ± 4.3	10.6 ± 2.1	11.5 ± 3.7	11.6 ± 4.1	9.8 ± 2.1
Osmotic pressure	1916 ± 170	1656 ± 513	2085 ± 455	2088 ± 220	2111 ± 406	2201 ± 420	2252 ± 170
Color	Slight yellow	4	4	3	4	4	5
	Yellow-brown	1	1	2	1	1	0
pH	7	0	0	0	1	1	1
	7.5	2	0	0	1	2	0
	8	0	0	2	1	1	0
	8.5	1	5	3	1	1	4
	≥9	2	0	0	1	0	0
Occult Blood	-	3	3	2	5	2	4
	+/-	2	2	2	0	1	1
	1+	0	0	1	0	1	0
	3+	0	0	0	0	1	0
Ketones	-	2	0	0	0	0	0
	+/-	1	2	1	0	2	1
	1+	1	2	3	5	3	4
	2+	1	1	1	0	0	0
Glucose (g/dL)	-	4	4	3	5	3	5
	0.1	1	1	2	0	2	0
	Protein	1	0	0	0	0	0
(mg/dL)	30	1	3	0	2	1	0
	100	1	1	2	1	2	5
	≥300	2	1	3	2	2	0
	Bilirubin	2	1	1	0	0	3
1+	1	3	2	2	3	2	4
	2+	2	1	2	3	2	0
	Urobilinogen	3	4	2	2	2	4
(E.U./dL)	1.0	2	1	3	3	1	2
Erythrocytes	-	5	5	5	5	4	5
	2+	0	0	0	0	1	0
Leukocytes	-	5	5	5	5	5	5
Epith. Cells	-	5	5	5	5	5	5
Casts	-	5	5	5	5	5	5
Fat glob.	-	5	5	5	5	5	5
M. threads	-	4	2	4	1	2	3
+	1	3	1	4	3	2	0
Others	+	5	5	5	5	5	5

Epith. Cells: Epithelium cells, Fat glob.: Fat globule, M. threads: Mucous threads, Other: Crystals

Values of volume and osmotic pressure are expressed as Mean ± S.D., the other values are expressed as No. of animals

Significant difference from control group: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

Table 3 (Continued)

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	0.5	2.5	12.5	62.5	0	62.5
Female							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
Volume (mL)	74 ± 4.4	11.1 ± 2.6	14.6 ± 4.7*	8.9 ± 1.9	8.1 ± 2.8	13.4 ± 7.0	11.6 ± 6.8
Osmotic pressure	1983 ± 639	1465 ± 389	1138 ± 429*	1697 ± 267	2023 ± 490	1681 ± 518	1912 ± 688
Color	Slight yellow	5	5	5	5	4	5
	Yellow-brown	0	0	0	0	1	0
pH	6.5	0	1	0	0	0	0
	7	2	0	2	0	0	0
	7.5	0	0	1	0	1	0
	8	2	1	2	1	1	0
	8.5	1	3	0	4	3	4
Occult Blood	-	3	4	3	3	2	4
	+/-	2	0	2	2	3	1
	1+	0	1	0	0	0	0
stones	-	2	0	3	0	0	1
	+/-	2	3	1	5	4	4
	1+	1	2	1	0	1	0
Glucose (g/dL)	-	3	4	5	4	5	5
	0.1	2	1	0	1	0	0
Protein (mg/dL)	-	1	0	1	0	0	0
	+/-	1	0	1	0	0	1
	30	1	3	1	2	0	0
	100	0	1	1	2	3	4
Bilirubin	≥300	2	1	1	1	2	0
	-	2	1	3	1	2	4
	1+	1	3	2	3	1	1
Urobilinogen (E.U./dL)	0.1	3	3	3	4	4	1
	1.0	2	2	2	1	1	4
Erythrocytes	-	5	5	5	5	5	5
Leukocytes	-	5	5	5	5	5	5
Epith. Cells	-	5	5	5	5	5	5
Casts	-	5	5	5	5	5	5
Fat glob.	-	5	5	5	5	5	5
M. threads	-	4	3	4	4	3	5
	+	1	2	1	1	2	0
Others	-	0	0	1	0	0	0
	+	5	5	4	5	5	5

Epith. Cells: Epithelium cells, Fat glob.: Fat globule, M. threads: Mucous threads, Other: Crystals
 Values of volume and osmotic pressure are expressed as Mean ± S.D., the other values are expressed as No. of animals
 Significant difference from control group; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

28日間反復投与毒性試験

Table 4 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups(mg/kg)					14 days recovery groups(mg/kg)	
	0	0.5	2.5	12.5	62.5	0	62.5
Male							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	323 ± 12	328 ± 29	338 ± 45	332 ± 22	329 ± 31	402 ± 40	357 ± 30
Absolute organ weight							
Brain (g)	2.02 ± 0.08	2.03 ± 0.07	2.12 ± 0.06	2.08 ± 0.05	2.06 ± 0.09	2.10 ± 0.10	2.07 ± 0.10
Heart (g)	1.09 ± 0.09	1.10 ± 0.11	1.17 ± 0.14	1.18 ± 0.07	1.23 ± 0.19	1.20 ± 0.10	1.28 ± 0.16
Liver (g)	9.40 ± 0.58 N	11.65 ± 1.90	17.11 ± 3.46*	21.64 ± 2.73*	24.47 ± 5.06*	11.80 ± 1.64	20.61 ± 3.36**
Kidneys (g)	2.43 ± 0.22	2.54 ± 0.17	2.74 ± 0.29	2.88 ± 0.40	3.04 ± 0.45*	2.83 ± 0.23	2.91 ± 0.40
Spleen (g)	0.61 ± 0.06	0.56 ± 0.08	0.62 ± 0.10	0.62 ± 0.16	0.57 ± 0.08	0.68 ± 0.11	0.68 ± 0.13
Adrenals (mg)	51 ± 7	45 ± 9	53 ± 4	44 ± 4	47 ± 7	59 ± 15	50 ± 12
Testes (g)	2.90 ± 0.16	2.84 ± 0.12	2.88 ± 0.15	2.91 ± 0.15	2.92 ± 0.14	3.13 ± 0.11	3.07 ± 0.18
Thyroid (mg)	17 ± 4	17 ± 2	21 ± 5	21 ± 3	21 ± 4	23 ± 2	22 ± 3
Pituitary (mg)	11 ± 2	12 ± 2	13 ± 2	12 ± 2	13 ± 4	11 ± 2	12 ± 3
Thymus (mg)	578 ± 133	439 ± 84	546 ± 106	657 ± 219	496 ± 127	418 ± 95	411 ± 83
Epididymides (mg)	657 ± 47 N	649 ± 7	630 ± 11	636 ± 16	623 ± 55	917 ± 59 N	858 ± 15*
Relative organ weight							
Brain (%)	0.624 ± 0.009 N	0.622 ± 0.038	0.633 ± 0.062	0.628 ± 0.044	0.630 ± 0.046	0.527 ± 0.046	0.580 ± 0.034
Heart (%)	0.337 ± 0.026	0.336 ± 0.028	0.346 ± 0.011	0.355 ± 0.017	0.374 ± 0.028	0.298 ± 0.008	0.356 ± 0.016**
Liver (%)	2.908 ± 0.139 N	3.533 ± 0.296*	5.045 ± 0.506*	6.507 ± 0.536*	7.413 ± 1.283*	2.930 ± 0.133 N	5.746 ± 0.527**
Kidneys (%)	0.753 ± 0.075	0.775 ± 0.046	0.814 ± 0.053	0.855 ± 0.080	0.927 ± 0.119**	0.706 ± 0.046	0.814 ± 0.066*
Spleen (%)	0.188 ± 0.015	0.169 ± 0.012	0.183 ± 0.017	0.184 ± 0.038	0.173 ± 0.025	0.169 ± 0.019	0.190 ± 0.023
Adrenals (%)	0.016 ± 0.002	0.014 ± 0.003	0.016 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.014 ± 0.001	0.015 ± 0.003	0.014 ± 0.003
Testes (%)	0.901 ± 0.080	0.871 ± 0.084	0.865 ± 0.121	0.879 ± 0.046	0.891 ± 0.068	0.787 ± 0.099	0.861 ± 0.043
Thyroid (%)	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.000	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001
Pituitary (%)	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001
Thymus (%)	0.178 ± 0.039	0.134 ± 0.022	0.162 ± 0.027	0.196 ± 0.056	0.150 ± 0.026	0.103 ± 0.018	0.115 ± 0.017
Epididymides (%)	0.204 ± 0.019	0.199 ± 0.018	0.189 ± 0.023	0.192 ± 0.011	0.190 ± 0.013	0.231 ± 0.038	0.241 ± 0.018
Female							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	209 ± 19	217 ± 8	216 ± 7	232 ± 13	226 ± 15	239 ± 25	244 ± 28
Absolute organ weight							
Brain (g)	1.94 ± 0.10	1.92 ± 0.08	1.95 ± 0.07	1.90 ± 0.12	1.90 ± 0.03	1.99 ± 0.02	1.94 ± 0.05
Heart (g)	0.75 ± 0.07	0.77 ± 0.03	0.75 ± 0.02	0.78 ± 0.05	0.84 ± 0.06*	0.79 ± 0.04	0.87 ± 0.06
Liver (g)	6.39 ± 0.87	6.84 ± 0.63	6.73 ± 0.26	8.67 ± 1.16**	12.43 ± 0.89**	6.80 ± 0.86	8.85 ± 0.99**
Kidneys (g)	1.70 ± 0.14	1.61 ± 0.08	1.71 ± 0.09	1.72 ± 0.11	1.87 ± 0.19	1.77 ± 0.18	1.86 ± 0.13
Spleen (g)	0.46 ± 0.02	0.48 ± 0.11	0.45 ± 0.05	0.47 ± 0.09	0.43 ± 0.05	0.53 ± 0.06	0.49 ± 0.03
Adrenals (mg)	70 ± 14 N	66 ± 7	64 ± 4	66 ± 3	56 ± 9	67 ± 3	72 ± 7
Ovaries (mg)	87 ± 22	96 ± 18	82 ± 11	97 ± 9	89 ± 18	88 ± 12	101 ± 11
Thyroid (mg)	18 ± 1	16 ± 3	17 ± 2	19 ± 3	19 ± 2	21 ± 3	21 ± 3
Pituitary (mg)	14 ± 2	15 ± 2	13 ± 3	12 ± 3	15 ± 2	14 ± 3	14 ± 4
Thymus (mg)	496 ± 60	412 ± 88	519 ± 120	460 ± 106	514 ± 87	382 ± 51	483 ± 90
Relative organ weight							
Brain (%)	0.931 ± 0.053	0.884 ± 0.012	0.901 ± 0.052	0.857 ± 0.046	0.841 ± 0.058*	0.838 ± 0.086	0.802 ± 0.084
Heart (%)	0.357 ± 0.019	0.356 ± 0.008	0.348 ± 0.007	0.351 ± 0.009	0.371 ± 0.024	0.333 ± 0.022	0.357 ± 0.028
Liver (%)	3.053 ± 0.178	3.146 ± 0.197	3.112 ± 0.107	3.885 ± 0.324**	5.497 ± 0.172**	2.835 ± 0.076	3.626 ± 0.117**
Kidneys (%)	0.816 ± 0.057	0.742 ± 0.033*	0.789 ± 0.029	0.776 ± 0.040	0.827 ± 0.042	0.744 ± 0.075	0.766 ± 0.070
Spleen (%)	0.222 ± 0.017	0.218 ± 0.041	0.210 ± 0.033	0.209 ± 0.033	0.190 ± 0.023	0.224 ± 0.037	0.203 ± 0.022
Adrenals (%)	0.033 ± 0.005	0.030 ± 0.003	0.030 ± 0.002	0.030 ± 0.001	0.025 ± 0.003**	0.028 ± 0.004	0.030 ± 0.003
Ovaries (%)	0.041 ± 0.007	0.044 ± 0.008	0.038 ± 0.005	0.044 ± 0.005	0.039 ± 0.008	0.037 ± 0.004	0.041 ± 0.003
Thyroid (%)	0.009 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.009 ± 0.002	0.008 ± 0.001
Pituitary (%)	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001
Thymus (%)	0.239 ± 0.035	0.191 ± 0.045	0.240 ± 0.055	0.205 ± 0.039	0.227 ± 0.031	0.160 ± 0.020	0.199 ± 0.038

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

N: Non parametric analysis

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

Table 5 Summary of gross findings of rats treated orally with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)	
		0	0.5	2.5	12.5	62.5	0	62.5
Male								
	No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5	5
RESPIRATORY SYSTEM								
lung	brown patch/zone	0	0	0	0	0	0	1
DIGESTIVE SYSTEM								
stomach	black patch/zone	0	0	1	0	0	0	0
	white patch/zone	0	0	0	1	0	0	0
liver	brown	0	0	0	0	0	0	5**
	brown patch/zone	0	0	0	0	0	1	0
	enlarged	0	2	5**	5**	5**	0	5**
	hepatodiaphragmatic nodule	0	0	0	0	0	1	0
	red patch/zone	0	0	0	0	1	0	1
	white patch/zone	0	0	2	2	3	0	2
URINARY SYSTEM								
kidney	cyst	0	0	0	0	0	0	0
	dilated pelvis	0	0	0	0	1	0	0
	scarred	0	0	0	0	0	2	0
Female								
	No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5	5
DIGESTIVE SYSTEM								
stomach	black patch/zone	0	0	0	1	0	0	0
	white patch/zone	0	0	0	0	0	0	0
liver	enlarged	0	0	0	3	5**	0	2
	red patch/zone	0	0	0	0	0	0	0
	white patch/zone	0	0	0	0	3	0	0
URINARY SYSTEM								
kidney	cyst	0	0	0	0	1	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM								
ovary	cyst	0	0	0	0	0	1	0
uterus	dilated lumen	1	1	2	0	0	0	0
INTEGUMENTARY SYSTEM								
skin	ulcer	0	1	0	0	0	0	0

Significant difference from control group; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

28日間反復投与毒性試験

Table 6 Summary of histopathological findings of rats treated orally with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)												14 days recovery groups (mg/kg)								
		0			0.5			2.5			12.5			62.5			0			62.5		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Male																						
No. of animals necropsied		5			5			5			5			5			5			5		
CARDIOVASCULAR SYSTEM																						
heart		(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)		
	degeneration of myocardium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0	0	4	0	0
	cellular infiltration	0	0	0	1	0	0	5	0	0	4	0	0	4	0	0	1	0	0	3	0	0
	hypertrophy, myocardium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM																						
spleen		(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)		
	deposit, pigment	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0
	hematopoiesis, extramedullary	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0
lymph node		(5)			(0)			(0)			(0)			(5)			(0)			(0)		
	dilatation, sinus	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-
thymus		(5)			(0)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)		
	Kuersteiner's duct/cyst	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	1	0	0	1	0	0
RESPIRATORY SYSTEM																						
lung		(5)			(0)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)		
	accumulation of foamy cells	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0	1	0	0	4	0	0
	hypertrophy, media, artery	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	0	0	1	0	0
DIGESTIVE SYSTEM																						
stomach		(5)			(0)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)		
	dilatation, gland	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	1	0	0	1	0	0
	microgranuloma	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	1	0	0	0	0	0
exocrine pancreas		(5)			(0)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)		
	degeneration, vacuolar	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	1	0	0	0	0	0
rectum		(5)			(0)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)		
	microgranuloma	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	1	0	0	1	0	0
liver		(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)		
	degeneration, vacuolar	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0	0	4	0	0
	deposit, pigment	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0
	fatty change	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
	inclusion body, intracytoplasmic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	necrosis, focal	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	4	0	0	0	0	0	3	0	0
	cellular infiltration, lymphocyte	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	granulation	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	microgranuloma	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	hematopoiesis, extramedullary	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	hypertrophy, hepatocyte	0	0	0	3	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	1	0	0	0	0	0
	increase in mitosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	5	0	0
	proliferation, bile duct	0	0	0	1	0	0	1	0	0	4	0	0	4	0	0	0	0	0	4	0	0
	foci/area of cellular alteration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
URINARY SYSTEM																						
kidney		(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)		
	basophilic tubules	2	0	0	3	0	0	4	0	0	3	0	0	3	2	0	4	0	0	4	0	0
	cast, hyaline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0
	dilatation, tubules	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0
	hyaline droplet	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
	mineralization	2	0	0	1	0	0	3	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0
	cellular infiltration, lymphocyte	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
	dilatation, renal pelvis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	hypertrophy, tubular epithelium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	fibrosis, scar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Grade of histopathological finding; 1:slight, 2:moderate, 3:marked
 Numbers in parenthesis indicate No. of animals examined microscopically at this site.
 -:Not examined

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

Table 6 (Continued)

Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)															14 days recovery groups (mg/kg)					
		0			0.5			2.5			12.5			62.5			0			62.5		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Male																						
	No. of animals necropsied	5			5			5			5			5			5			5		
REPRODUCTIVE SYSTEM																						
	epididymis	(5)			(0)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)		
	cellular infiltration, lymphocyte	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	prostate	(5)			(0)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)		
	cellular infiltration, lymphocyte	3	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	4	0	0	2	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																						
	pituitary gland	(5)			(0)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)		
	cyst	1	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	increase in castration cell	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	1	0	0	1	0	0
	thyroid gland	(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)		
	cellular infiltration, lymphocyt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	follicular cell hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0
	ultimobranchial remnant	2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	2	0	0
	adrenal gland	(5)			(0)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)		
	degeneration, vacuolar	1	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	1	0	0	1	0	0

Grade of histopathological finding: 1: slight, 2: moderate, 3: marked
 Numbers in parenthesis indicate No. of animals examined microscopically at this site.
 -: Not examined

28日間反復投与毒性試験

Table 6 (Continued)

Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)															
		0			0.5		2.5		12.5		62.5		0			62.5						
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Female	No. of animals necropsied	5			5			5			5			5			5					
CARDIOVASCULAR SYSTEM																						
	heart	(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)					
	degeneration of myocardium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	cellular infiltration	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	hypertrophy, myocardium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM																						
	spleen	(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)					
	deposit, pigment	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	3	0	0
	microgranuloma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	hematopoiesis, extramedullary	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	thymus	(5)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)					
	Kuersteiner's duct/cyst	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	2	0	0	1	0	0
RESPIRATORY SYSTEM																						
	lung	(5)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)					
	accumulation of foamy cells	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0	1	0	0	1	0	0
	microgranuloma	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	hypertrophy, media, artery	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	0	0	1	0	0
DIGESTIVE SYSTEM																						
	liver	(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)					
	degeneration, vacuolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	deposit, pigment	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	fatty change	5	0	0	5	0	0	5	0	0	3	0	0	0	0	0	5	0	0	4	0	0
	necrosis, focal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	cellular infiltration, lymphocyte	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0
	microgranuloma	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
	hypertrophy, hepatocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0	0	3	0	0
	increase in mitosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	proliferation, bile duct	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
URINARY SYSTEM																						
	kidney	(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)					
	basophilic tubules	1	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	4	0	0	4	0	0
	cast, hyaline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	dilatation, tubules	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	mineralization	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0	3	0	0	3	0	0
	cellular infiltration, lymphocyte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	hypertrophy, tubular epithelium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM																						
	ovary	(5)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)					
	cyst, brusa	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	deposit, pigment	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	1	0	0	1	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																						
	thyroid gland	(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)					
	ectopic thymus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	follicular cell hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	ultimobranchial remnant	4	0	0	4	0	0	2	0	0	2	0	0	3	0	0	5	0	0	1	0	0
	adrenal gland	(5)			(0)			(0)			(5)			(5)			(5)					
	hypertrophy, zona fasciculata	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Grade of histopathological finding: 1:slight, 2:moderate, 3:marked
 Numbers in parenthesis indicate No. of animals examined microscopically at this site.
 -:Not examined

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細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 2-(2'-Hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole in Bacteria

要約

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について細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537^{uvrA}および*Escherichia coli* WP2 *uvrAの5菌株を用い、S9 mix無添加条件および添加条件のいずれも、用量設定試験で生育阻害が認められなかったことから、本試験はS9 mix無添加条件および添加条件ともに313~5000 μg/plateの範囲で実施した。*

その結果、用いた5種の検定菌のいずれの用量においても、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から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は、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

方法

1. 被験物質

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は、淡黄色粉末固体である。用いた被験物質は、ロット番号S4-034-1、純度100% (LC面積百分率)、製造シプロ化成(株)(福井)であり、シプロ化成(株)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。本ロットについては、試験期間中安定であることが確認された。

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は、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:SEG4422, 和光純薬工業(株))に懸濁して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。調製時に、発熱、発泡、変色等の変化はみられなかった。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌ごとに用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれTable中に示した。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを-20℃で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

3. 検定菌

試験には、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

*S. typhimurium*の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA*株は1997年4月9日に日本バイオアッセイ研究センターの松島泰次郎博士から分与された。

検定菌は-80℃で凍結保存したものを、各菌株の特性確認は凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)、アンピシリン耐性因子pKM101(プラスミド)の有無および陰性対照群と陽性対照群の復帰変異コロニー数について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントプロスNo. 2(Oxoid Ltd.)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

4. 培地およびS9 mixの組成

1) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地1 Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
大洋寒天(清水食品(株))	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

2) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)または(C)を容量比10:1の割合で混合した。