

7. 試験結果

7.1 一般状態の観察

成績を Table 1-1~1-3 に示した。

いずれの動物においても、投与及び回復期間を通じて異常はみられなかった。

7.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量

7.2.1 詳細な一般状態の観察

(1) ホームケージ内観察

成績を Table 2-1~2-6 に示した。

1) 投与期間

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

2) 回復期間

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

(2) 手に持ったの観察

成績を Table 2-7~2-12 に示した。

1) 投与期間

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

2) 回復期間

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

(3) オープンフィールド内観察

成績を Table 2-13~2-18 に示した。

1) 投与期間

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

2) 回復期間

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

7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 に示した。

1) 投与第 4 週

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

2) 回復第 2 週

着地開脚幅の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雄に認められた。

7.2.3 握力測定

成績を Table 2-21、2-22 に示した。

1) 投与第 4 週

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

2) 回復第 2 週

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

7.2.4 自発運動量の測定

成績を Fig. 1~4 及び Table 2-23、2-24 に示した。

1) 投与第 4 週

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

2) 回復第 2 週

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

7.3 体重

成績を Fig.5 及び Table 3-1、3-2 に示した。

1) 投与期間

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

2) 回復期間

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

7.4 摂餌量

成績を Fig.6 及び Table 4-1、4-2 に示した。

1) 投与期間

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

2) 回復期間

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

7.5 尿検査(摂水量含む)

成績を Table 5-1~5-8 に示した。

1) 投与第4週

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

2) 回復第2週

浸透圧の有意な高値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。

7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-4 に示した。

1) 投与期間終了時

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

2) 回復期間終了時

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

7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 に示した。

1) 投与期間終了時

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

2) 回復期間終了時

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

7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 に示した。

1) 投与期間終了時

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

肝臓 : 絶対重量の有意な高値が 60mg/kg 投与群の雌と

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

2) 回復期間終了時

胸腺 : 絶対及び相対重量の有意な低値が 250mg/kg 投与群の雌に認められた。

7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 に示した。

1) 投与期間終了時

精巣 : 小型化が対照群と 15 及び 250mg/kg 投与群で各 1 例に認められた。

2) 回復期間終了時

腎臓 : 腎盂拡張が対照群の雄 1 例に認められた。

7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-4 に示した。

1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓及び甲状腺に認められた。

肝臓 : 軽微な微小肉芽腫が対照群の雄 4 例と雌全例、15mg/kg 投与群の雄 4 例と雌全例、60mg/kg 投与群の雄 1 例と雌全例、250mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 5 例に、軽微あるいは軽度な小葉中心性の肝細胞肥大が 60mg/kg 投与群の雄 5 例と雌全例、250mg/kg 投与群の雌雄全例に認められた。

甲状腺 : 軽微な異所性胸腺が対照群及び 15mg/kg 投与群の雌雄各 1 例、60mg/kg 投与群の雌 2 例、250mg/kg 投与群の雌 1 例に、軽微な鰓後体のう胞が対照群の雌雄各 4 例、15mg/kg 投与群の雄 4 例と雌 1 例、60mg/kg 投与群の雌 1 例、250mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例に、軽微な濾胞上皮細胞肥大が 60mg/kg 投与群の雄 1 例、250mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例に認められた。

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

精巣上体 : 軽微あるいは高度な管腔内の精子減少が対照群と 250mg/kg 投与群の各 1 例に認められた。

心臓 : 軽微な限局性の心筋炎が対照群の雄 1 例と雌 2 例、250mg/kg 投与群の雄 2 例に認められた。

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

2) 回復期間終了時

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

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

8. 考察

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

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

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

体重では、投与及び回復期間中を通じて被験物質投与の影響は認められなかった。

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

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

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

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

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

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

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

9. 文献

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

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

Sex	Dose mg/kg	Findings	Day of administration													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
60	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
250	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
Female	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
60	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
	No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
250	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	

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

Sex	Dose mg/kg	Findings	Day of administration													
			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Male	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Female	0	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	15	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	60	No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
		No abnormality	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250	No. of animals	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
		No abnormality	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12