

5. 統計解析

各検査項目のうち、数値化した成績についてまず Bartlett法により各群の分散の均一性の検定を行った。その結果、分散が均一の場合には一元配置法による分散分析を行い、群間に有意差が認められたならば、Dunnnett法(各群の例数が等しいとき)または Scheffé法(各群の例数が異なるとき)を用いて対照群と各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が均一でない場合には、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、有意であれば Dunnnett型(各群の例数が等しいとき)または Scheffé型(各群の例数が異なるとき)を用いて対照群と各投与群との平均順位の差の検定を行った。検定はいずれも両側で、有意水準は5および1%とした¹⁾。

結果

1. 一般状態

死亡はみられず、いずれの動物にも異常はみられなかった。

2. 体重(Fig.1)

1) 投与期間

雌雄ともに、各投与群の体重は対照群と同様に推移した。

2) 回復期間

雌雄ともに、各投与群の体重は対照群と同様に推移した。

3. 摂餌量

1) 投与期間

雄では、250 mg/kg群で投与4日に対照群を有意に下回った。しかし、その後は対照群をやや上回って推移し、有意差もみられた。また、60 mg/kg群でも対照群をやや上回って推移し、有意差もみられた。雌では、250 mg/kg群で投与4日に対照群を有意に下回った。しかし、その後は対照群と同様に推移した。

2) 回復期間

雌雄ともに、各投与群の摂餌量は対照群と同様に推移した。

4. 血液学検査(Table 1)

1) 投与終了時

雄では、250 mg/kg群で血小板数の有意な増加がみられた。他に、プロトロンビン時間の有意な短縮が60 mg/kg群にみられたが、用量に関連した変化ではなかった。雌では、250 mg/kg群で血小板数および分葉核好中球比率の有意な増加とリンパ球比率の有意な減少がみられた。

2) 回復終了時

雌雄ともに、250 mg/kg群で血小板数の有意な増加がみられた。

5. 血液生化学検査(Table 2)

1) 投与終了時

雄では、250 mg/kg群で総コレステロールの有意な増加がみられた。雌では、60 mg/kg以上の投与群で無機

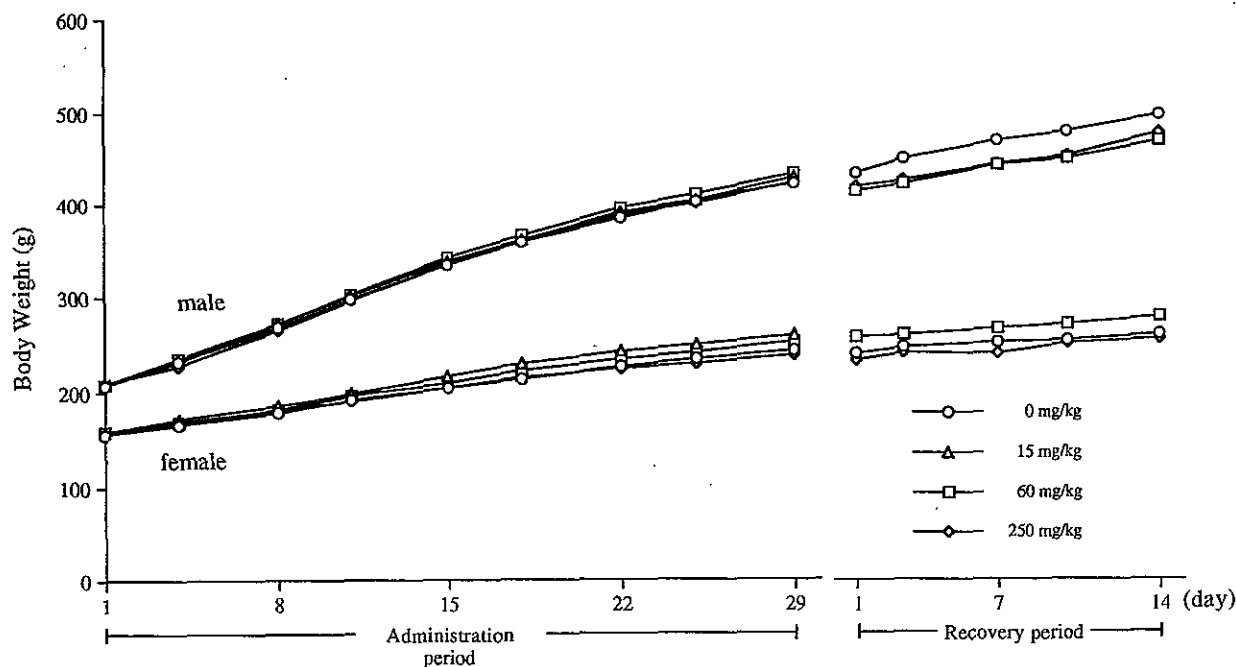


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Table 1 Hematology of rats treated orally with 4,4'-thiobis(6-*tert*-butyl-*m*-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	15	60	250	0	60	250
Male							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	800 \pm 38	791 \pm 28	790 \pm 38	793 \pm 27	806 \pm 21	812 \pm 28	801 \pm 15
Hb (g/l)	16.0 \pm 0.4	15.9 \pm 0.4	15.6 \pm 0.4	15.9 \pm 0.7	15.8 \pm 0.4	15.9 \pm 0.3	15.4 \pm 0.4
Ht (%)	48 \pm 2	48 \pm 1	47 \pm 2	48 \pm 2	47 \pm 1	47 \pm 1	46 \pm 1
MCV (μ^3)	59.8 \pm 1.9	60.4 \pm 0.6	59.8 \pm 2.1	60.0 \pm 0.9	58.1 \pm 1.0	58.1 \pm 2.4	57.6 \pm 2.5
MCH (pg)	20.0 \pm 0.7	20.1 \pm 0.5	19.8 \pm 0.7	20.0 \pm 0.3	19.6 \pm 0.2	19.6 \pm 0.8	19.3 \pm 0.8
MCHC (%)	33.5 \pm 0.4	33.2 \pm 0.6	33.2 \pm 0.4	33.3 \pm 0.4	33.8 \pm 0.4	33.8 \pm 0.4	33.4 \pm 0.3
Reticulocyte (%)	20 \pm 3	22 \pm 3	21 \pm 3	22 \pm 6	21 \pm 5	20 \pm 4	23 \pm 4
Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	118.0 \pm 7.3	122.2 \pm 8.1	116.5 \pm 11.9	135.0 \pm 9.2*	107.4 \pm 3.6	109.3 \pm 7.4	118.8 \pm 9.2*
WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	95 \pm 34	105 \pm 39	96 \pm 28	97 \pm 37	92 \pm 18	99 \pm 24	97 \pm 8
Differential leukocyte counts (%)							
Lymph	84.5 \pm 5.5	88.3 \pm 4.1	81.1 \pm 2.2	87.8 \pm 3.6	79.9 \pm 9.2	84.0 \pm 4.8	80.3 \pm 8.9
Stab	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3	0.2 \pm 0.3	0.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0
Seg	14.8 \pm 5.6	10.7 \pm 4.7	17.8 \pm 1.9	11.5 \pm 3.4	18.7 \pm 8.6	14.9 \pm 4.3	18.7 \pm 9.0
Eosino	0.4 \pm 0.6	0.9 \pm 0.8	0.8 \pm 1.0	0.3 \pm 0.4	0.9 \pm 0.4	0.6 \pm 0.5	0.7 \pm 0.6
Baso	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Mono	0.2 \pm 0.3	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	0.3 \pm 0.3	0.3 \pm 0.4	0.4 \pm 0.4	0.3 \pm 0.4
Others	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
PT (Sec.)	12.8 \pm 1.1	11.8 \pm 0.8	11.4 \pm 0.5*	13.6 \pm 1.3	12.3 \pm 1.5	12.5 \pm 1.1	12.1 \pm 0.8
APTT (Sec.)	19.4 \pm 1.8	18.0 \pm 1.2	17.3 \pm 1.4	21.3 \pm 1.8	19.8 \pm 2.4	19.0 \pm 1.4	18.9 \pm 1.8
Female							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	753 \pm 35	760 \pm 36	724 \pm 26	758 \pm 49	812 \pm 46	810 \pm 27	808 \pm 19
Hb (g/l)	15.5 \pm 0.5	16.1 \pm 0.6	15.3 \pm 0.4	15.8 \pm 0.8	15.6 \pm 0.3	15.8 \pm 0.5	15.5 \pm 0.2
Ht (%)	45 \pm 2	45 \pm 2	43 \pm 1	44 \pm 2	46 \pm 1	47 \pm 2	46 \pm 1
MCV (μ^3)	59.2 \pm 1.4	59.8 \pm 1.2	59.5 \pm 1.2	58.5 \pm 1.0	56.8 \pm 2.3	57.3 \pm 0.5	57.1 \pm 0.8
MCH (pg)	20.6 \pm 0.6	21.2 \pm 0.5	21.2 \pm 0.5	20.8 \pm 0.4	19.2 \pm 0.9	19.4 \pm 0.2	19.2 \pm 0.4
MCHC (%)	34.8 \pm 0.9	35.4 \pm 0.4	35.6 \pm 0.4	35.5 \pm 0.2	33.9 \pm 0.4	33.9 \pm 0.4	33.6 \pm 0.3
Reticulocyte (%)	22 \pm 4	17 \pm 5	19 \pm 3	19 \pm 4	20 \pm 2	23 \pm 5	22 \pm 5
Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	114.6 \pm 8.7	120.6 \pm 11.6	116.2 \pm 6.3	136.6 \pm 9.2**	113.3 \pm 10.8	112.4 \pm 8.3	128.1 \pm 7.2*
WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	66 \pm 10	76 \pm 18	86 \pm 23	93 \pm 37	84 \pm 32	100 \pm 23	80 \pm 26
Differential leukocyte counts (%)							
Lymph	86.0 \pm 3.1	84.3 \pm 3.2	83.2 \pm 6.8	73.0 \pm 9.0**	79.2 \pm 9.0	88.6 \pm 2.2	85.4 \pm 8.0
Stab	0.0 \pm 0.0	0.2 \pm 0.3	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.4	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.4	0.3 \pm 0.3
Seg	13.2 \pm 3.2	14.1 \pm 2.4	15.4 \pm 6.3	24.4 \pm 7.7**	19.6 \pm 8.8	9.9 \pm 1.7	13.3 \pm 7.9
Eosino	0.7 \pm 0.3	1.2 \pm 0.9	1.2 \pm 0.7	1.9 \pm 1.3	0.8 \pm 0.6	1.0 \pm 0.8	0.8 \pm 0.5
Baso	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Mono	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3	0.1 \pm 0.2	0.3 \pm 0.4	0.3 \pm 0.3	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3
Others	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
PT (Sec.)	10.6 \pm 0.5	10.9 \pm 0.3	10.5 \pm 0.7	10.0 \pm 0.3	10.7 \pm 0.5	10.5 \pm 0.6	10.8 \pm 0.3
APTT (Sec.)	14.0 \pm 0.9	13.7 \pm 0.5	14.1 \pm 1.4	14.3 \pm 1.6	16.6 \pm 1.4	16.3 \pm 1.9	16.4 \pm 1.2

Values are expressed as Mean \pm S.D.

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	15	60	250	0	60	250
Male							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
GOT (IU/l)	54 ± 9	57 ± 10	53 ± 5	60 ± 5	56 ± 11	57 ± 16	61 ± 17
GPT (IU/l)	36 ± 6	34 ± 4	35 ± 5	36 ± 9	41 ± 4	36 ± 8	33 ± 5
LDH (IU/l)	26 ± 5	25 ± 3	24 ± 6	27 ± 8	33 ± 9	25 ± 6	28 ± 12
AIP (IU/l)	289 ± 61	297 ± 38	312 ± 65	326 ± 69	232 ± 67	247 ± 56	244 ± 25
γ-GTP (IU/l)	1.5 ± 0.7	1.4 ± 0.5	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.4	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.8 ± 0.2
ChE (IU/l)	672 ± 39	707 ± 92	690 ± 74	787 ± 95	693 ± 89	802 ± 229	650 ± 52
TP (g/dl)	6.0 ± 0.2	6.0 ± 0.2	5.8 ± 0.2	5.7 ± 0.3	6.3 ± 0.1	6.2 ± 0.2	6.2 ± 0.2
Albumin (g/dl)	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.1
A/G (%)	1.39 ± 0.12	1.32 ± 0.09	1.41 ± 0.09	1.41 ± 0.13	1.19 ± 0.08	1.24 ± 0.13	1.22 ± 0.10
T. cho (mg/dl)	59 ± 13	62 ± 12	62 ± 15	81 ± 9*	66 ± 15	65 ± 14	67 ± 14
TG (mg/dl)	74 ± 23	94 ± 20	97 ± 22	77 ± 33	113 ± 36	110 ± 54	88 ± 38
PL (mg/dl)	113 ± 22	114 ± 15	122 ± 22	132 ± 11	125 ± 21	125 ± 26	123 ± 18
T. bilirubin (mg/dl)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.07	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.01
Glucose (mg/dl)	119 ± 22	118 ± 8	124 ± 10	106 ± 11	139 ± 15	127 ± 11	122 ± 4*
BUN (mg/dl)	12 ± 1	12 ± 1	13 ± 2	13 ± 1	14 ± 2	13 ± 1	16 ± 2
Creatinine (mg/dl)	0.57 ± 0.03	0.58 ± 0.03	0.58 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.56 ± 0.05	0.60 ± 0.05	0.62 ± 0.06
Na (mEq/l)	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 1	145 ± 1	145 ± 1	145 ± 1
K (mEq/l)	4.8 ± 0.4	4.6 ± 0.3	4.4 ± 0.3	4.6 ± 0.2	4.8 ± 0.3	4.7 ± 0.3	4.7 ± 0.3
Cl (mEq/l)	110 ± 1	110 ± 1	110 ± 1	110 ± 1	111 ± 1	112 ± 1	111 ± 2
Ca (mg/dl)	9.3 ± 0.2	9.2 ± 0.2	9.2 ± 0.3	9.3 ± 0.3	9.0 ± 0.2	8.9 ± 0.1	9.0 ± 0.2
P (mg/dl)	9.2 ± 0.5	9.2 ± 0.5	9.2 ± 0.5	9.8 ± 0.2	7.8 ± 0.5	7.8 ± 0.4	8.4 ± 0.4
Female							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
GOT (IU/l)	63 ± 10	59 ± 8	64 ± 4	57 ± 8	64 ± 5	69 ± 7	66 ± 11
GPT (IU/l)	36 ± 7	33 ± 3	35 ± 3	37 ± 9	34 ± 5	35 ± 8	31 ± 4
LDH (IU/l)	24 ± 17	20 ± 6	22 ± 7	26 ± 6	23 ± 6	24 ± 5	27 ± 10
AIP (IU/l)	192 ± 34	185 ± 26	198 ± 71	186 ± 25	142 ± 36	147 ± 32	131 ± 30
γ-GTP (IU/l)	1.7 ± 0.7	1.9 ± 0.7	1.5 ± 0.4	1.4 ± 0.8	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.6	1.3 ± 0.6
ChE (IU/l)	2610 ± 663	2268 ± 695	1857 ± 508	1832 ± 592	2410 ± 703	2665 ± 927	2275 ± 473
TP (g/dl)	6.4 ± 0.5	6.2 ± 0.3	6.1 ± 0.3	6.5 ± 0.4	6.7 ± 0.2	7.1 ± 0.4	6.9 ± 0.3
Albumin (g/dl)	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.7 ± 0.3	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.2
A/G (%)	1.36 ± 0.10	1.48 ± 0.10	1.35 ± 0.10	1.30 ± 0.08	1.18 ± 0.09	1.12 ± 0.10	1.12 ± 0.08
T. cho (mg/dl)	70 ± 14	68 ± 8	84 ± 16	101 ± 15**	62 ± 12	88 ± 18*	63 ± 15
TG (mg/dl)	32 ± 4	37 ± 9	36 ± 5	54 ± 28	39 ± 10	42 ± 7	36 ± 14
PL (mg/dl)	133 ± 24	134 ± 15	161 ± 30	192 ± 39**	138 ± 23	178 ± 20*	136 ± 30
T. bilirubin (mg/dl)	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.48 ± 0.38	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02
Glucose (mg/dl)	107 ± 12	104 ± 9	107 ± 9	83 ± 16**	108 ± 14	120 ± 18	105 ± 8
BUN (mg/dl)	14 ± 2	15 ± 1	13 ± 1	17 ± 3*	15 ± 2	14 ± 2	15 ± 2
Creatinine (mg/dl)	0.60 ± 0.06	0.60 ± 0.06	0.58 ± 0.04	0.63 ± 0.05	0.59 ± 0.04	0.61 ± 0.08	0.60 ± 0.05
Na (mEq/l)	141 ± 1	141 ± 1	140 ± 1	140 ± 2	142 ± 1	142 ± 0	142 ± 1
K (mEq/l)	4.8 ± 0.4	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.2 ± 0.6	5.1 ± 0.3	5.1 ± 0.3	5.2 ± 0.3
Cl (mEq/l)	112 ± 2	111 ± 1	112 ± 2	114 ± 2	114 ± 1	114 ± 1	114 ± 1
Ca (mg/dl)	9.0 ± 0.1	9.1 ± 0.2	8.9 ± 0.2	9.2 ± 0.4	9.2 ± 0.3	9.2 ± 0.2	9.1 ± 0.2
P (mg/dl)	8.2 ± 0.7	8.6 ± 0.6	9.2 ± 0.5*	9.2 ± 0.8*	8.2 ± 0.3	7.9 ± 0.7	8.3 ± 1.0

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

リンの有意な増加がみられたほか、250 mg/kg群で総コレステロール、リン脂質および尿素窒素の有意な増加と血糖値の有意な低下がみられた。

2) 回復終了時

雄では、血糖の有意な低下が250 mg/kg群でみられた。雌では、総コレステロールとリン脂質の有意な増加が60 mg/kg群でみられたが、用量に関連した変化ではなかった。

6. 尿検査 (Table 3)

1) 投与第4週

雄では、250 mg/kg群に尿pHの低下傾向と尿沈渣中のリン酸塩の増加傾向がみられた。雌では、60 mg/kg以上の投与群で尿pHの低下傾向、尿蛋白、ケトン体および尿沈渣中のリン酸塩の増加傾向がみられた。

2) 回復第2週

雄では、250 mg/kg群に尿蛋白の増加傾向がみられた。雌では、250 mg/kg群で尿pHの低下傾向がみられた。

7. 器官重量 (Table 4)

1) 投与終了時剖検例

肝臓で、相対重量の有意な増加が250 mg/kg群の雌雄にみられた。

2) 回復終了時剖検例

心臓で、相対重量の有意な増加が雄の各投与群にみられた。

他に、脳の絶対重量の有意な増加が雌の60 mg/kg群にみられたが、用量と関連した変化ではなかった。

8. 剖検所見 (Table 5)

1) 投与終了時剖検例

盲腸の拡張が250 mg/kg群の雄5例と雌4例に、小腸壁の肥厚が250 mg/kg群の雌雄各4例にみられた。他には被験物質投与によると考えられる変化はみられなかった。

2) 回復終了時剖検例

被験物質投与によると考えられる変化はみられなかった。

9. 病理組織学検査 (Table 6)

1) 投与終了時剖検例

被験物質投与によると考えられる変化が小腸、大腸、肝臓および腸間膜リンパ節にみられた。

回腸：腸絨毛のごく軽度な過形成が250 mg/kg群の雄1例と雌3例にみられた。本所見は、腸絨毛の丈の高さの増大として観察され、組織構築の変化あるいは炎症反応は認められなかった。

盲腸：吸収上皮細胞のごく軽度から軽度な空胞化が60 mg/kg群の雄3例と雌1例、250 mg/kg群の雌雄各5

例にみられた。また、粘膜におけるごく軽度から軽度な細胞浸潤が60 mg/kg群の雄5例と雌1例、250 mg/kg群の雌雄各3例にみられたが、吸収上皮細胞の空胞化を示す個体と細胞浸潤を示す個体とは必ずしも一致していなかった。

結腸：吸収上皮細胞のごく軽度な空胞化が60 mg/kg群の雌雄各1例、250 mg/kg群の雄1例と雌2例にみられた。また、粘膜におけるごく軽度な細胞浸潤が雌の60および250 mg/kg群でそれぞれ1および2例にみられた。

直腸：粘膜におけるごく軽度な細胞浸潤が250 mg/kg群の雌雄各1例にみられた。

肝臓：小葉中心帯肝細胞のごく軽度な肥大が250 mg/kg群の雌雄各5例にみられた。

腸間膜リンパ節：傍皮質領域において、核崩壊物を容れたマクロファージ“tingible body macrophage”の出現が、対照群で雄1例(ごく軽度)、15 mg/kg群で雌雄各1例(いずれもごく軽度)、60 mg/kg群で雄1例と雌2例(いずれもごく軽度)にみられたのに対し、250 mg/kg群では雄で2例(1例がごく軽度、残る1例が軽度)と雌で5例(4例がごく軽度、残る1例が軽度)にみられ、250 mg/kg群の雌で例数がやや多かった。

上記以外の所見は出現状況とその病理学的性状からいづれも偶発所見と判断した。

2) 回復終了時剖検例

回腸：腸絨毛のごく軽度から軽度な過形成が、250 mg/kg群の雌雄各2例にみられた。

盲腸：吸収上皮細胞の変化は認められなかった。なお、粘膜におけるごく軽度から軽度な細胞浸潤が対照群で雌雄各2例、60 mg/kg群で雄2例と雌1例、250 mg/kg群で雄3例と雌4例にみられた。

直腸：粘膜におけるごく軽度な細胞浸潤が60 mg/kg群の雌1例、250 mg/kg群の雄1例にみられた。

肝臓：肝細胞の肥大は認められなかった。なお、ごく軽度な微小肉芽腫が対照群の雌雄各1例、250 mg/kg群の雄1例にみられた。

十二指腸、空腸、結腸および腸間膜リンパ節には異常所見は認められなかった。

考察

試験期間を通じて死亡はみられず、また、一般状態および体重にも被験物質投与による変化は認められなかった。

摂餌量では、250 mg/kg群の雌雄で投与開始4日に減少を示したが、雄ではその後対照群をやや上回った。60 mg/kg群でも雄の摂餌量は対照群をやや上回った。これらの投与群の体重は、対照群とほぼ同様であったことから、食餌効率は低下しているものと考えられ、後述の腸管に対する障害がその要因と推察される。

尿検査では、60 mg/kg以上の投与群で尿pHの低下、尿蛋白およびケトン体の増加が主として雌にみられた。同時に、血液生化学検査において、雌で尿素窒素や無機

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	15	60	250	0	60	250
Male							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
Volume (ml)	9.9 ± 3.6	9.3 ± 5.3	12.9 ± 5.4	13.5 ± 5.0	10.4 ± 3.3	9.2 ± 6.5	8.9 ± 6.0
Specific gravity	1.072 ± 0.012	1.073 ± 0.018	1.063 ± 0.015	1.058 ± 0.011	1.079 ± 0.019	1.074 ± 0.017	1.078 ± 0.019
Water intake (ml)	40 ± 8	41 ± 6	45 ± 4	51 ± 12	44 ± 5	41 ± 8	42 ± 4
pH	7.5	0	0	1	0	0	0
	8	0	0	2	0	0	0
	8.5	1	4	2	1	0	1
	9	5	2	4	2	6	5
Protein	-	1	1	0	1	0	1
	-/+	4	3	3	1	3	0
	1+	1	1	2	3	3	5
	2+	0	1	1	1	0	0
Ketons	-	6	5	5	6	6	5
	-/+	0	1	1	0	0	1
	1+	0	0	0	0	0	0
Glucose	-	6	6	6	6	6	6
Occult blood	-	4	5	5	5	3	4
	-/+	1	1	0	0	1	1
	1+	1	0	0	0	1	1
	2+	0	0	1	0	1	0
	3+	0	0	0	1	0	0
Bilirubin	-	6	6	6	6	6	6
Urobilinogen	-/+	6	6	6	6	6	6
	1+	0	0	0	0	0	0
Color	Yellow	6	6	6	5	6	6
	Dark yellow	0	0	0	1	0	0
RBC	-	6	6	6	5	6	6
	-/+	0	0	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	1	0	0
WBC	-	6	6	6	6	6	6
SEC	-	0	0	0	0	0	0
	-/+	6	6	6	6	6	6
	3+	0	0	0	0	0	0
SREC	-	6	6	6	6	6	6
Cast	-	6	6	6	6	6	6
PS	-	6	4	5	3	3	4
	-/+	0	2	1	2	3	2
	1+	0	0	0	1	0	0
Co	-	6	6	6	6	6	6

Values of volume, specific gravity and water intake are expressed as Mean ± S.D., other values are expressed as No. of animals

Table 3 (Continued)

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	15	60	250	0	60	250
Female							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
Volume (ml)	8.4±3.0	10.2 ± 7.1	4.8 ± 2.4	5.6 ± 3.7	6.1 ± 3.2	7.2 ± 3.6	6.6 ± 4.1
Specific gravity	1.070 ± 0.018	1.060 ± 0.016	1.079 ± 0.018	1.066 ± 0.026	1.068 ± 0.013	1.066 ± 0.018	1.072 ± 0.023
Water intake (ml)	35 ± 7	41 ± 8	39 ± 25	41 ± 12	30 ± 7	31 ± 8	42 ± 12
pH	5.5	0	0	0	1	0	0
	6	0	1	0	1	0	0
	6.5	0	0	3	1	0	1
	7	0	1	1	0	0	1
	7.5	1	0	0	2	1	0
	8	2	2	1	0	1	1
	8.5	2	2	0	1	3	2
	9	1	0	1	0	2	3
Protein	-	5	4	2	1	3	0
	-/+	1	1	0	0	1	4
	1+	0	1	2	4	1	0
	2+	0	0	2	1	1	2
Ketons	-	6	5	3	2	5	6
	-/+	0	1	2	3	1	0
	1+	0	0	1	1	0	0
Glucose	-	6	6	6	6	6	6
Occult blood	-	5	5	6	4	6	6
	-/+	0	0	0	1	0	0
	1+	1	1	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	1	0	0
Bilirubin	-	6	6	6	6	6	6
Urobilinogen	-/+	6	6	6	6	5	6
	1+	0	0	0	0	1	0
Color	Yellow	6	6	6	4	6	6
	Dark yellow	0	0	0	2	0	0
RBC	-	6	6	6	6	6	6
WBC	-	6	6	6	6	6	6
SEC	-	0	0	0	0	0	0
	-/+	6	6	6	6	6	6
SREC	-	6	6	5	6	6	6
	-/+	0	0	1	0	0	0
Cast	-	6	6	6	6	6	6
PS	-	6	5	4	3	1	3
	-/+	0	1	2	3	5	3
	1+	0	0	0	0	0	1
Co	-	6	6	6	6	6	6

Values of volume, specific gravity and water intake are expressed as Mean±S.D., other values are expressed as No. of animals

Table 4 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	15	60	250	0	60	250
Male							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
Body weight (g)	375 ± 19	401 ± 26	415 ± 42	378 ± 18	475 ± 35	447 ± 40	455 ± 17
Absolute organ weight							
Brain (g)	2.01 ± 0.07	2.04 ± 0.05	2.03 ± 0.05	2.00 ± 0.03	2.10 ± 0.04	2.11 ± 0.12	2.12 ± 0.05
Thymus (mg)	535 ± 74	647 ± 105	553 ± 77	464 ± 76	468 ± 78	475 ± 136	489 ± 52
Heart (g)	1.27 ± 0.10	1.32 ± 0.11	1.32 ± 0.09	1.31 ± 0.20	1.43 ± 0.09	1.41 ± 0.11	1.44 ± 0.07
Lung (g)	1.29 ± 0.03	1.33 ± 0.12	1.39 ± 0.11	1.35 ± 0.07	1.47 ± 0.09	1.46 ± 0.11	1.50 ± 0.09
Liver (g)	11.65 ± 1.08	12.63 ± 1.30	13.07 ± 1.94	13.78 ± 1.64	14.63 ± 1.59	13.43 ± 1.26	14.67 ± 0.85
Spleen (g)	0.69 ± 0.07	0.72 ± 0.12	0.70 ± 0.11	0.73 ± 0.04	0.80 ± 0.13	0.73 ± 0.15	0.74 ± 0.12
Kidneys (g)	2.87 ± 0.22	2.96 ± 0.25	3.02 ± 0.27	2.98 ± 0.27	3.24 ± 0.20	3.09 ± 0.26	3.25 ± 0.18
Adrenals (mg)	60 ± 8	67 ± 11	63 ± 6	61 ± 9	64 ± 7	66 ± 5	65 ± 10
Testes (g)	3.15 ± 0.19	3.35 ± 0.18	3.27 ± 0.29	3.29 ± 0.28	3.36 ± 0.24	3.47 ± 0.61	3.22 ± 0.11
Relative organ weight							
Brain (%)	0.54 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.49 ± 0.05	0.53 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.47 ± 0.05	0.47 ± 0.02
Thymus (%)	143 ± 19	162 ± 26	134 ± 19	123 ± 20	99 ± 19	107 ± 29	108 ± 11
Heart (%)	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.35 ± 0.05	0.30 ± 0.01	0.32 ± 0.01*	0.32 ± 0.01*
Lung (%)	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.01
Liver (%)	3.10 ± 0.14	3.15 ± 0.13	3.14 ± 0.22	3.64 ± 0.33**	3.07 ± 0.16	3.02 ± 0.31	3.23 ± 0.15
Spleen (%)	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02
Kidneys (%)	0.77 ± 0.03	0.74 ± 0.05	0.73 ± 0.03	0.79 ± 0.07	0.69 ± 0.04	0.69 ± 0.06	0.72 ± 0.04
Adrenals (%)	16 ± 2	17 ± 3	15 ± 2	16 ± 2	14 ± 2	15 ± 2	14 ± 3
Testes (%)	0.84 ± 0.05	0.84 ± 0.06	0.80 ± 0.13	0.87 ± 0.09	0.71 ± 0.08	0.78 ± 0.14	0.71 ± 0.05
Female							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
Body weight (g)	228 ± 12	243 ± 15	227 ± 8	220 ± 12	249 ± 29	264 ± 29	238 ± 17
Absolute organ weight							
Brain (g)	1.84 ± 0.06	1.86 ± 0.05	1.84 ± 0.07	1.86 ± 0.06	1.86 ± 0.04	1.99 ± 0.15*	1.88 ± 0.08
Thymus (mg)	420 ± 108	447 ± 68	434 ± 87	460 ± 97	341 ± 50	384 ± 57	339 ± 85
Heart (g)	0.85 ± 0.08	0.84 ± 0.05	0.83 ± 0.04	0.78 ± 0.04	0.86 ± 0.09	0.94 ± 0.11	0.84 ± 0.04
Lung (g)	1.09 ± 0.05	1.07 ± 0.10	1.06 ± 0.08	1.04 ± 0.07	1.08 ± 0.08	1.11 ± 0.09	1.05 ± 0.10
Liver (g)	6.75 ± 0.76	6.86 ± 0.34	6.87 ± 0.58	7.65 ± 0.86	6.84 ± 0.93	7.49 ± 1.08	7.00 ± 0.65
Spleen (g)	0.51 ± 0.06	0.49 ± 0.03	0.47 ± 0.04	0.50 ± 0.05	0.51 ± 0.07	0.52 ± 0.08	0.50 ± 0.04
Kidneys (g)	1.72 ± 0.21	1.86 ± 0.11	1.84 ± 0.13	1.74 ± 0.14	1.81 ± 0.14	1.87 ± 0.22	1.74 ± 0.16
Adrenals (mg)	72 ± 8	75 ± 8	76 ± 10	74 ± 5	70 ± 6	76 ± 5	78 ± 10
Ovaries (mg)	81.3 ± 9.8	96.6 ± 14.9	98.0 ± 15.5	97.4 ± 10.2	88.3 ± 13.0	92.4 ± 9.9	96.0 ± 12.5
Relative organ weight							
Brain (%)	0.81 ± 0.04	0.77 ± 0.04	0.81 ± 0.04	0.85 ± 0.04	0.75 ± 0.08	0.76 ± 0.09	0.80 ± 0.07
Thymus (%)	184 ± 42	185 ± 33	192 ± 41	210 ± 49	138 ± 18	147 ± 22	142 ± 34
Heart (%)	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.01
Lung (%)	0.48 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.47 ± 0.04	0.47 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.44 ± 0.02
Liver (%)	2.96 ± 0.26	2.83 ± 0.12	3.02 ± 0.19	3.46 ± 0.20**	2.75 ± 0.13	2.83 ± 0.13	2.94 ± 0.12
Spleen (%)	0.23 ± 0.04	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.23 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.01
Kidneys (%)	0.76 ± 0.07	0.77 ± 0.05	0.81 ± 0.04	0.79 ± 0.05	0.73 ± 0.05	0.71 ± 0.01	0.74 ± 0.06
Adrenals (%)	32 ± 3	31 ± 4	33 ± 5	34 ± 3	28 ± 3	29 ± 3	33 ± 5
Ovaries (%)	35.7 ± 4.3	40.0 ± 6.2	43.3 ± 7.6	44.3 ± 4.7	36.0 ± 6.8	35.1 ± 1.4	40.4 ± 4.6

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *:P < 0.05 **:P < 0.01

Table 5 Summary of gross findings of rats treated orally with 4,4'-thiobis(6-*tert*-butyl-*m*-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Organ Findings	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
		0	15	60	250	0	60	250
Male								
	No. of animals necropsied	6	6	6	6	6	6	6
Small intestine								
	Thickening of wall	0	0	0	4	0	0	0
Large intestine								
	Dilatation of cecum	0	0	0	5	0	0	0
Testes								
	Enlargement (unilateral)	0	0	0	0	0	1	0
Epididymis								
	Yellow nodule (unilateral)	0	0	0	0	0	0	1
Female								
	No. of animals necropsied	6	6	6	6	6	6	6
Thyroid								
	Enlargement (bilateral)	0	1	0	0	0	0	0
Small intestine								
	Thickening of wall	0	0	0	4	0	0	0
Large intestine								
	Dilatation of cecum	0	0	0	4	0	0	0

リンの増加がみられたことから、尿蛋白の増加は本被験物質の腎臓に対する影響と考えられるが、腎臓では組織学的変化は認められなかった。また、250 mg/kg群の雌の血糖値は低下していたことから、尿中ケトン体の増加は、血糖値の低下に伴い、エネルギー源としての脂質要求が増大したためと推察される。

血液学検査では、血小板数の増加、リンパ球比率の減少と分葉核好中球比率の増加が250 mg/kg群の主として雌にみられた。250 mg/kg群の雌におけるリンパ球および分葉核好中球の実数を、白血球数とその分画比率から求めると、リンパ球数は対照群平均値の約20%増、分葉核好中球数は対照群平均値の約160%増であったことから、本試験における白血球分画比率の変化は、分葉核好中球の実質的な増加に起因し、大腸粘膜での細胞浸潤との関連性が示唆される。

血液生化学検査では、既に述べた血糖、尿素窒素および無機リンの変動のほか、総コレステロールとリン脂質の増加が250 mg/kg群にみられ、脂質代謝への影響も示唆された。

病理学検査では、小腸、大腸、腸間膜リンパ節および肝臓に変化がみられた。小腸では、肉眼的な壁の肥厚が250 mg/kg群にみられ、組織学的には、回腸で腸絨毛の過形成がみられた。既に述べた如く、60 mg/kg以上の投与群では食餌効率の低下が示唆されたが、小腸における形態学的変化は、消化・吸収能の低下に対する適応的な生体反応と考えられる。また、大腸では、肉眼的な盲腸の拡張が250 mg/kg群にみられ、組織学的には盲腸および結腸で吸収上皮細胞の空胞化および粘膜の細胞浸潤

が60 mg/kg以上の投与群にみられ、大腸に対する障害性が示唆された。ただし、吸収上皮細胞の変化を示す個体と細胞浸潤を示す個体とは必ずしも一致せず、両者の関連性は明らかでなかった。腸間膜リンパ節では、傍皮質領域における“tingible body macrophage”が250 mg/kg群にやや多くみられた。この変化は、頸部リンパ節や胸腺、脾臓など他のリンパ器官では認められなかったことから、腸管障害と関連した所見であり、リンパ系器官に対する直接的な作用ではないと考えられる。なお、投与終了時剖検例のうち、250 mg/kg群の雌雄各1例に、直腸粘膜の細胞浸潤がみられたが発現例数が少なく、また、この種の動物では背景的に観察されることから、被験物質投与との関連性はないと判断された。

肝臓では、250 mg/kg群で重量が増加し、組織学的には小葉中心帯肝細胞の肥大が認められた。血液生化学検査では、GOTやGPTの上昇など肝機能障害を示す所見はみられなかったことから、肝臓の組織所見は、薬物代謝酵素の誘導を示唆するものと推察される。

回復群においては、被験物質投与に関連すると考えられる変化のうち、250 mg/kg群の尿pHの低下、尿蛋白の増加、血小板数の増加および回腸における腸絨毛の過形成を除く所見は認められず、概ね可逆性の変化と考えられた。

以上の如く、4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール)をラットに28日間反復投与した結果、主な変化が60 mg/kg以上の投与群の大腸に、さらに250 mg/kg群では小腸および肝臓にみられ、本被験物質の主な標的器官は

Table 6 Summary of histopathological findings of rats treated orally with 4,4'-thiobis (6-tert-butyl-m-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)																							
	0			15			60			250			0			60			250									
	1	2	3	P	1	2	3	P	1	2	3	P	1	2	3	P	1	2	3	P	1	2	3	P				
Male																												
No. of animals necropsied	6				6				6				6				6				6							
Ileum	(6)				(6)				(6)				(6)				(6)				(6)							
hyperplasia/ villus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Cecum	(6)				(6)				(6)				(6)				(6)				(6)							
vacuolization/cytoplasmic/absorptive epithelial cell	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cellular infiltration/mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	2	1	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	2	1	0	0
Colon	(6)				(6)				(6)				(6)				(0)				(0)							
vacuolization/cytoplasmic/absorptive epithelial cell	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rectum	(6)				(6)				(6)				(6)				(6)				(6)							
cellular infiltration/mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Liver	(6)				(6)				(6)				(6)				(6)				(0)							
hypertrophy/hepatocyte/centrilobular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0
altered hepatocellular foci	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0
microgranuloma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-	-	-	-	1	0	0	0
Mesenteric lymph node	(6)				(6)				(6)				(6)				(0)				(0)							
tingible body macrophage/paracortical/increased	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kidney	(6)				(0)				(0)				(6)				(0)				(0)							
basophilic change/proximal tubule/focal	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prostate	(6)				(0)				(0)				(6)				(0)				(0)							
inflammation	1	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Female																												
No. of animals necropsied	6				6				6				6				6				6							
Ileum	(6)				(6)				(6)				(6)				(6)				(6)							
hyperplasia/villus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Cecum	(6)				(6)				(6)				(6)				(6)				(6)							
vacuolization/cytoplasmic/absorptive epithelial cell	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cellular infiltration/mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	2	2	0	0
Colon	(6)				(6)				(6)				(6)				(0)				(0)							
vacuolization/cytoplasmic/absorptive epithelial cell	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cellular infiltration/mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rectum	(6)				(6)				(6)				(6)				(6)				(6)							
cellular infiltration/mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Liver	(6)				(6)				(6)				(6)				(6)				(0)							
hypertrophy/hepatocyte/centrilobular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0
microgranuloma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0
Thyroid (Parathyroid)	(6)				(1)				(0)				(6)				(0)				(0)							
hyperplasia/follicle cell/diffuse	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mesenteric lymph node	(6)				(6)				(6)				(6)				(0)				(0)							
tingible body macrophage/paracortical/increased	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	4	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1:Slight 2:Mild 3:Moderate P:Present (grading of severity was not done, such as case in the neoplastic lesion)

Numbers in parenthesis indicate No. of animals examined microscopically at this site.

腸管と肝臓と考えられた。一方、15 mg/kg群では変化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4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の無影響量は雌雄とも15 mg/kg/dayと考えられた。

文献

- 1) S. C. Gad and C. S. Weil, "Principles and Methods of Toxicology," 2, ed. by A. Wallace Hayes, Raven Press, Ltd., New York, 1989, pp. 435-483.
- 2) J. R. Glaister. "毒性病理学の基礎," 高橋道人監訳, ソフトサイエンス社, 東京, 1992, pp.85-98.

連絡先

試験責任者：岡崎修三
試験担当者：榎並倫宣, 中村英明, 畠山和久,
田村一利, 沼田弘明, 勝亦俱慶
(株)ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412 静岡県御殿場市かまど1284
Tel. 0550-82-2000 Fax. 0550-82-2379

Correspondence

Authors: Shuzo Okazaki (Study director)
Tomonori Enami, Hideaki Nakamura,
Kazuhisa Hatayama, Kazutoshi Tamura,
Hiroaki Numata, Tomoyoshi Katsumata
Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.
1284, Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka, 412, Japan
Tel.+81-550-82-2000 Fax.+81-550-82-2379