

Table 1 Hematology of rats treated orally with nonylphenol in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	4	15	60	250	0	60	250
Male								
No. of animals	6	6	6	6	6	6	5 ^{a)}	6
RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	766 \pm 24	784 \pm 32	753 \pm 13	740 \pm 25	746 \pm 24	780 \pm 33	795 \pm 35	793 \pm 32
Hb (g/l)	15.5 \pm 0.5	15.6 \pm 0.3	15.6 \pm 0.4	14.8 \pm 0.6	15.1 \pm 0.7	15.3 \pm 0.5	15.5 \pm 0.3	15.2 \pm 0.6
Ht (%)	46 \pm 2	46 \pm 1	46 \pm 2	44 \pm 2	44 \pm 1	45 \pm 2	46 \pm 2	45 \pm 2
MCV (μm^3)	59.6 \pm 0.7	59.1 \pm 1.8	61.4 \pm 1.8	59.0 \pm 1.6	58.9 \pm 1.0	57.6 \pm 1.8	57.2 \pm 0.8	56.5 \pm 1.0
MCH (pg)	20.2 \pm 0.3	19.9 \pm 0.9	20.7 \pm 0.3	20.0 \pm 0.6	20.2 \pm 0.5	19.6 \pm 0.8	19.4 \pm 0.6	19.1 \pm 0.5
MCHC (%)	33.9 \pm 0.3	33.7 \pm 0.8	33.8 \pm 0.6	33.9 \pm 0.4	34.3 \pm 0.7	34.1 \pm 0.8	33.9 \pm 0.8	33.9 \pm 0.6
Reticulocyte (%)	19 \pm 1	18 \pm 3	20 \pm 2	21 \pm 6	19 \pm 3	18 \pm 2	20 \pm 3	19 \pm 3
Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	122.6 \pm 8.9	107.5 \pm 8.1	111.5 \pm 7.8	115.5 \pm 16.1	117.9 \pm 11.3	95.0 \pm 11.7	103.7 \pm 10.7	109.3 \pm 11.7
WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	97 \pm 22	104 \pm 50	89 \pm 25	112 \pm 37	104 \pm 17	104 \pm 36	135 \pm 33	114 \pm 37
Differential leukocyte counts (%)								
Lymph	89.1 \pm 5.7	90.0 \pm 6.3	89.8 \pm 3.8	89.9 \pm 6.2	90.0 \pm 5.4	92.0 \pm 2.5	93.1 \pm 1.5	89.8 \pm 5.9
Stab	0.3 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3	0.3 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	0.3 \pm 0.3*	0.0 \pm 0.0
Seg	10.5 \pm 5.5	9.8 \pm 6.3	9.3 \pm 3.1	9.3 \pm 5.7	9.3 \pm 5.0	7.5 \pm 2.6	6.2 \pm 1.6	9.8 \pm 6.0
Eosino	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3	0.5 \pm 0.6	0.3 \pm 0.5	0.4 \pm 0.4	0.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.7	0.4 \pm 0.4
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	0.0 \pm 0.0
Mono	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0
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	0.0 \pm 0.0
PT (Sec.)	11.6 \pm 0.6	12.0 \pm 0.9	12.2 \pm 0.5	11.7 \pm 0.7	11.4 \pm 0.5	11.7 \pm 1.0	11.7 \pm 0.6	11.1 \pm 0.4
APTT (Sec.)	16.9 \pm 2.5	17.5 \pm 1.5	17.0 \pm 1.5	16.6 \pm 1.6	16.8 \pm 1.5	16.6 \pm 3.3	17.4 \pm 1.2	16.2 \pm 1.0
Female								
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	808 \pm 17	786 \pm 33	796 \pm 29	787 \pm 45	756 \pm 36	818 \pm 36	807 \pm 29	809 \pm 25
Hb (g/l)	15.8 \pm 0.5	15.7 \pm 0.3	16.0 \pm 0.6	15.8 \pm 0.5	14.8 \pm 0.7*	15.6 \pm 0.3	15.4 \pm 0.4	15.1 \pm 0.4
Ht (%)	47 \pm 2	46 \pm 1	47 \pm 1	47 \pm 2	44 \pm 2*	47 \pm 1	46 \pm 1	46 \pm 1
MCV (μm^3)	58.2 \pm 1.1	58.7 \pm 2.0	59.6 \pm 1.7	59.2 \pm 3.0	58.5 \pm 2.0	57.3 \pm 1.5	56.8 \pm 1.8	56.5 \pm 1.9
MCH (pg)	19.6 \pm 0.4	19.9 \pm 0.6	20.1 \pm 0.6	20.0 \pm 0.9	19.6 \pm 0.9	19.1 \pm 0.8	19.1 \pm 1.0	18.7 \pm 0.3
MCHC (%)	33.6 \pm 0.7	33.9 \pm 0.9	33.8 \pm 0.4	33.9 \pm 0.4	33.4 \pm 0.5	33.3 \pm 0.5	33.6 \pm 1.1	33.1 \pm 0.6
Reticulocyte (%)	17 \pm 3	19 \pm 3	17 \pm 2	17 \pm 3	17 \pm 2	17 \pm 2	19 \pm 3	18 \pm 3
Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	113.5 \pm 13.3	116.1 \pm 14.2	116.5 \pm 14.8	111.2 \pm 5.7	118.1 \pm 9.5	104.0 \pm 5.3	100.0 \pm 10.7	109.0 \pm 4.6
WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	74 \pm 18	84 \pm 22	98 \pm 26	101 \pm 27	109 \pm 33	67 \pm 14	77 \pm 18	74 \pm 22
Differential leukocyte counts (%)								
Lymph	90.3 \pm 5.2	87.5 \pm 3.3	92.0 \pm 5.3	90.3 \pm 4.4	92.3 \pm 2.4	88.2 \pm 3.5	90.2 \pm 5.1	85.4 \pm 6.0
Stab	0.3 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0	0.4 \pm 0.6	0.2 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	0.3 \pm 0.4	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3
Seg	8.6 \pm 5.2	11.4 \pm 3.0	7.4 \pm 5.4	9.3 \pm 4.2	7.0 \pm 2.4	10.9 \pm 2.8	8.8 \pm 4.9	13.3 \pm 5.7
Eosino	0.7 \pm 0.8	1.1 \pm 0.7	0.2 \pm 0.3	0.2 \pm 0.3	0.6 \pm 0.4	0.6 \pm 0.6	0.8 \pm 0.9	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	0.0 \pm 0.0
Mono	0.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.2
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	0.0 \pm 0.0
PT (Sec.)	11.0 \pm 0.2	11.0 \pm 0.4	10.9 \pm 0.2	10.8 \pm 0.7	10.8 \pm 0.7	10.8 \pm 0.3	10.9 \pm 0.3	10.9 \pm 0.7
APTT (Sec.)	14.1 \pm 1.3	14.2 \pm 2.5	14.1 \pm 0.7	14.4 \pm 0.5	13.1 \pm 1.8	14.7 \pm 0.9	14.4 \pm 0.8	14.5 \pm 1.3

Values are expressed as Mean \pm S.D.

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

a): One sample was not available due to technical error at the time of blood collection.

5. 血液生化学検査 (Table 2)

1) 投与終了時

雄では、250 mg/kg群で尿素窒素および無機リンの有意な増加と塩素の有意な減少がみられた。雌では、250 mg/kg群で総蛋白およびトリグリセライドの有意な増加がみられた。

2) 回復終了時

雄では、250 mg/kg群で血糖の有意な減少がみられたが、その値は生理的範囲内のものであった。雌では、各投与群とも対照群との間に有意差はなかった。

6. 尿検査 (Table 3)

1) 投与第4週

雄では、250 mg/kg群で尿量の有意な増加および尿比重の有意な低下がみられた。雌では、250 mg/kg群で尿沈渣中への扁平上皮細胞の増加傾向がみられたほか、小円形上皮細胞が2例にみられ、さらに、摂水量と尿量の有意な増加および尿比重の有意な低下がみられた。

2) 回復第2週

雄では、各投与群で摂水量の有意な増加がみられたが、生理的範囲内の変動であった。雌では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。

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60 mg/kg群の雄に、絶対および相対重量の有意な増加が250 mg/kg群の雌雄にみられた。

腎臓で、絶対および相対重量の有意な増加が250 mg/kg群の雄にみられた。

他には被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

2) 回復終了時剖検例

腎臓において、相対重量の有意な増加が250 mg/kg群の雌雄にみられた。

他には被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

8. 剖検所見 (Table 5)

1) 投与終了時剖検例

250 mg/kg群において、盲腸の拡張が雄全例と雌5例にみられたほか、腎臓で雌1例に白色点散在(両側性)が、さらに、他の1例に白色点散在を伴う腫大(両側性)と腎盂拡張(片側性)が重複してみられた。

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肝臓、腎臓および膀胱にみられた。

肝臓：小葉中心帯肝細胞のごく軽度な肥大が250 mg/kg群の雄6例全例と雌5例にみられた。他に、微小肉芽腫、クッパー細胞の増殖と変異細胞巣がみられたが、出現状況とその病理学的性状から偶発所見と判断した。

腎臓：主な変化が皮髄境界部の近位尿細管、集合管および腎盂粘膜にみられた。皮髄境界部の近位尿細管では、ごく軽度から軽度な好塩基性化が250 mg/kg群の雄4例と雌2例にみられ、さらに、250 mg/kg群の雌2例ではごく軽度ながら単細胞性壊死もみられた。また、上記の好塩基性化あるいは壊死を示した動物のうち、雌の2例では間質にごく軽度から軽度な細胞浸潤が、雌1例では軽度な円柱もみられた。集合管では、ごく軽度から中等度の好塩基性化が250 mg/kg群の雌雄各6例全例にみられ、うち、雄2例と雌4例の集合管はごく軽度から軽度に拡張していた。腎盂粘膜では、ごく軽度な単純性過形成が250 mg/kg群の雌2例にみられた。また、肉眼的に腎盂拡張を示した250 mg/kg群の雌1例では、組織学的にも中等度な腎盂拡張が認められた。なお、肉眼的に白色点散在を示した250 mg/kg群の雌2例の腎実質における病変の程度は、他の個体と比べやや強かった。

膀胱：移行上皮のごく軽度から軽度な単純性過形成が250 mg/kg群の雄2例と雌6例全例にみられた。

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

肝臓：肝細胞の肥大は認められなかった。なお、微小肉芽腫が250 mg/kg群の雌1例にみられた。

腎臓：皮髄境界部における近位尿細管のごく軽度から軽度な好塩基性化と円柱が、250 mg/kg群の雄でそれぞれ5および4例に、集合管のごく軽度な拡張が250 mg/kg群の雌1例にみられた。

膀胱：移行上皮のごく軽度から軽度な単純性過形成が250 mg/kg群の雌6例全例にみられた。

他には被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

考察

一般状態の観察では、250 mg/kg群で投与直後あるいは2時間後に流涎がみられた。

体重では、250 mg/kg群の雄に増加抑制がみられた。一方、摂餌量には対照群と差がなかったことから、食餌効率の低下が示唆された。

尿検査では、250 mg/kg群で摂水量と尿量の増加、尿比重の低下がみられ、さらに雌では沈渣中への扁平上皮細胞の増加と小円形上皮細胞の出現がみられた。腎臓では、250 mg/kg群の雄で重量が増加し、組織学的には250 mg/kg群で皮髄境界部における近位尿細管の好塩基

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with nonylphenol in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	4	15	60	250	0	60	250
Male								
No. of animals	6	6	6	6	6	6	5 ^{a)}	6
GOT (IU/l)	55 ± 6	52 ± 10	61 ± 5	65 ± 19	62 ± 13	57 ± 11	65 ± 8	65 ± 11
GPT (IU/l)	36 ± 2	35 ± 3	34 ± 3	36 ± 6	38 ± 6	38 ± 4	42 ± 5	38 ± 3
LDH (IU/l)	24 ± 5	24 ± 8	27 ± 4	39 ± 21	28 ± 10	30 ± 12	35 ± 5	29 ± 4
AIP (IU/l)	327 ± 62	349 ± 80	294 ± 41	301 ± 26	375 ± 154	253 ± 43	282 ± 76	214 ± 28
γ-GTP (IU/l)	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.7	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.4
ChE (IU/l)	745 ± 92	697 ± 54	782 ± 121	755 ± 98	742 ± 58	642 ± 60	732 ± 168	732 ± 111
TP (g/dl)	6.0 ± 0.2	6.0 ± 0.2	6.0 ± 0.2	5.8 ± 0.4	6.2 ± 0.4	6.2 ± 0.1	6.4 ± 0.2	6.2 ± 0.1
Albumin (g/dl)	3.3 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.3 ± 0.1
A/G (%)	1.24 ± 0.11	1.40 ± 0.08	1.37 ± 0.07	1.36 ± 0.13	1.31 ± 0.08	1.21 ± 0.12	1.18 ± 0.10	1.13 ± 0.06
T. cho (mg/dl)	73 ± 12	64 ± 15	64 ± 8	59 ± 13	80 ± 37	66 ± 9	67 ± 11	73 ± 12
TG (mg/dl)	111 ± 43	95 ± 34	109 ± 34	104 ± 7	106 ± 36	104 ± 38	107 ± 31	74 ± 14
PL (mg/dl)	132 ± 19	122 ± 25	122 ± 11	116 ± 14	150 ± 48	126 ± 12	124 ± 13	129 ± 9
T. bilirubin (mg/dl)	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02
Glucose (mg/dl)	139 ± 18	133 ± 19	144 ± 24	142 ± 24	129 ± 11	168 ± 19	166 ± 22	137 ± 18*
BUN (mg/dl)	11 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	14 ± 2**	14 ± 1	13 ± 2	15 ± 1
Creatinine (mg/dl)	0.59 ± 0.04	0.59 ± 0.05	0.63 ± 0.06	0.62 ± 0.05	0.64 ± 0.05	0.67 ± 0.07	0.67 ± 0.06	0.64 ± 0.03
Na (mEq/l)	144 ± 1	143 ± 1	143 ± 1	143 ± 1	143 ± 1	143 ± 1	142 ± 2	143 ± 1
K (mEq/l)	4.4 ± 0.3	4.3 ± 0.3	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.4 ± 0.2	4.4 ± 0.3	4.5 ± 0.3	4.8 ± 0.2
Cl (mEq/l)	110 ± 2	108 ± 2	109 ± 1	108 ± 1	106 ± 2**	109 ± 2	107 ± 2	109 ± 3
Ca (mg/dl)	9.1 ± 0.2	9.3 ± 0.3	9.3 ± 0.6	9.2 ± 0.2	9.5 ± 0.4	8.9 ± 0.3	8.9 ± 0.2	8.7 ± 0.3
P (mg/dl)	8.9 ± 0.4	9.0 ± 0.7	9.2 ± 0.6	8.6 ± 0.7	10.0 ± 0.7*	7.8 ± 0.4	8.1 ± 0.4	7.7 ± 0.4
Female								
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
GOT (IU/l)	67 ± 14	63 ± 3	62 ± 9	66 ± 12	58 ± 8	65 ± 7	66 ± 10	75 ± 10
GPT (IU/l)	32 ± 4	32 ± 5	29 ± 2	34 ± 9	34 ± 4	35 ± 11	34 ± 5	38 ± 10
LDH (IU/l)	18 ± 1	20 ± 3	21 ± 5	26 ± 6	19 ± 9	17 ± 3	16 ± 4	19 ± 7
AIP (IU/l)	167 ± 22	187 ± 43	176 ± 38	204 ± 42	221 ± 146	138 ± 26	157 ± 43	141 ± 27
γ-GTP (IU/l)	2.3 ± 0.7	2.3 ± 0.5	2.2 ± 0.6	2.3 ± 0.6	3.2 ± 1.0	1.8 ± 0.5	1.8 ± 0.4	1.4 ± 0.5
ChE (IU/l)	2002 ± 259	2158 ± 873	2148 ± 880	2230 ± 339	1513 ± 499	2705 ± 830	2598 ± 1470	1960 ± 451
TP (g/dl)	6.2 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.3 ± 0.3	6.2 ± 0.3	6.8 ± 0.5*	6.8 ± 0.4	6.5 ± 0.3	6.7 ± 0.5
Albumin (g/dl)	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.7 ± 0.3	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.7 ± 0.3
A/G (%)	1.30 ± 0.10	1.27 ± 0.12	1.29 ± 0.05	1.28 ± 0.10	1.18 ± 0.10	1.20 ± 0.07	1.19 ± 0.05	1.25 ± 0.09
T. cho (mg/dl)	73 ± 12	79 ± 22	63 ± 6	65 ± 11	71 ± 24	76 ± 15	76 ± 14	82 ± 19
TG (mg/dl)	32 ± 5	41 ± 17	37 ± 5	33 ± 7	47 ± 12*	38 ± 7	36 ± 7	35 ± 7
PL (mg/dl)	143 ± 16	152 ± 28	135 ± 10	132 ± 16	160 ± 31	159 ± 20	148 ± 20	164 ± 40
T. bilirubin (mg/dl)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.01
Glucose (mg/dl)	103 ± 5	108 ± 7	107 ± 7	105 ± 7	109 ± 5	129 ± 18	111 ± 15	114 ± 19
BUN (mg/dl)	15 ± 1	16 ± 2	15 ± 1	14 ± 2	20 ± 7	15 ± 1	15 ± 1	16 ± 2
Creatinine (mg/dl)	0.55 ± 0.06	0.58 ± 0.05	0.60 ± 0.07	0.59 ± 0.08	0.61 ± 0.12	0.66 ± 0.09	0.66 ± 0.07	0.65 ± 0.07
Na (mEq/l)	141 ± 1	141 ± 1	142 ± 0	141 ± 1	142 ± 1	142 ± 2	142 ± 1	142 ± 1
K (mEq/l)	4.5 ± 0.3	4.4 ± 0.6	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.2	4.7 ± 0.3	4.6 ± 0.3	4.6 ± 0.4
Cl (mEq/l)	112 ± 1	111 ± 1	111 ± 1	111 ± 2	110 ± 1	112 ± 1	113 ± 1	113 ± 1
Ca (mg/dl)	9.3 ± 0.3	9.4 ± 0.3	9.4 ± 0.3	9.2 ± 0.2	9.6 ± 0.2	9.2 ± 0.3	9.1 ± 0.4	9.2 ± 0.4
P (mg/dl)	8.7 ± 0.7	9.1 ± 0.5	9.1 ± 0.5	8.8 ± 0.9	8.8 ± 0.7	7.9 ± 0.8	8.0 ± 0.8	7.9 ± 1.1

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with nonylphenol in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	4	15	60	250	0	60	250
Male								
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Volume (ml)	8.0 ± 3.8	9.0 ± 3.4	10.3 ± 5.2	9.9 ± 2.7	15.4 ± 3.9**	12.2 ± 4.8	14.3 ± 7.1	14.4 ± 2.1
Specific gravity	1.079 ± 0.018	1.074 ± 0.010	1.064 ± 0.010	1.078 ± 0.007	1.043 ± 0.011**	1.075 ± 0.015	1.071 ± 0.015	1.057 ± 0.005
Water intake (ml)	45 ± 7	41 ± 5	47 ± 11	42 ± 3	54 ± 7	38 ± 6	46 ± 7*	51 ± 4**
pH	7	0	1	0	0	0	0	0
	7.5	0	0	0	1	0	0	0
	8	1	0	0	0	4	1	0
	8.5	3	2	3	1	1	0	2
	9	2	3	3	4	1	5	4
Protein	-	1	0	1	0	0	0	0
	-/+	3	2	3	2	0	1	1
	1+	1	3	2	4	6	4	3
	2+	1	1	0	0	0	1	2
Ketons	-	6	6	6	5	6	6	6
	-/+	0	0	0	1	0	0	0
Glucose	-	6	6	6	6	6	6	6
Occult blood	-	4	5	5	6	5	6	4
	-/+	1	1	0	0	0	0	1
	1+	0	0	0	0	0	0	1
	2+	1	0	1	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	1	0	0
Bilirubin	-	6	6	6	6	6	6	6
Urobilinogen	-/+	6	6	6	6	6	6	6
Color	Yellow	6	6	6	6	6	6	6
	Dark yellow	0	0	0	0	0	0	0
RBC	-	6	6	6	6	6	6	6
WBC	-	6	6	6	6	6	6	6
SEC	-	0	0	0	0	0	0	0
	-/+	6	6	6	6	5	6	6
	1+	0	0	0	0	1	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0	0
SREC	-	6	6	6	6	6	6	6
Cast	-	6	6	6	6	6	6	6
PS	-	5	6	4	3	5	5	2
	-/+	1	0	2	1	1	1	3
	1+	0	0	0	2	0	0	1
Co	-	6	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
Significant difference from control group; *: P < 0.05 ** : P < 0.01

Table 3 (Continued)

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	4	15	60	250	0	60	250
Female								
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Volume (ml)	4.2 ± 3.0	6.4 ± 4.3	5.5 ± 1.3	5.0 ± 2.2	28.4 ± 6.7**	7.3 ± 3.5	4.2 ± 1.4	6.6 ± 2.4
Specific gravity	1.081 ± 0.029	1.077 ± 0.019	1.070 ± 0.011	1.074 ± 0.016	1.021 ± 0.004**	1.060 ± 0.013	1.071 ± 0.017	1.062 ± 0.012
Water intake (ml)	28 ± 5	31 ± 6	31 ± 6	30 ± 8	64 ± 13**	35 ± 3	30 ± 4	30 ± 7
pH	6	0	0	1	0	0	0	0
	6.5	1	0	1	0	0	3	0
	7	0	1	2	0	2	1	1
	7.5	0	0	0	1	1	0	0
	8	3	1	0	0	1	1	0
	8.5	2	4	3	3	2	0	2
	9	0	0	0	1	1	1	3
Protein	-	0	0	4	0	3	2	1
	-/+	1	3	0	3	3	2	3
	1+	5	3	2	2	0	2	2
	2+	0	0	0	1	0	0	0
Ketons	-	5	4	6	6	6	6	6
	-/+	0	2	0	0	0	0	0
	1+	1	0	0	0	0	0	0
Glucose	-	6	6	6	6	4	6	6
	-/+	0	0	0	0	2	0	0
Occult blood	-	4	4	5	6	4	6	6
	-/+	1	1	1	0	0	0	0
	1+	1	1	0	0	2	0	0
Bilirubin	-	6	6	6	6	6	6	6
Urobilinogen	-/+	6	6	6	6	6	6	6
Color	Yellow	6	6	6	6	6	6	6
RBC	-	6	6	6	6	6	6	6
WBC	-	6	6	6	6	6	6	6
SEC	-	0	0	0	0	0	0	0
	-/+	6	5	6	6	2	6	6
	1+	0	1	0	0	4	0	0
SREC	-	6	6	6	6	4	6	6
	-/+	0	0	0	0	2	0	0
Cast	-	6	6	6	6	6	6	6
PS	-	4	5	5	5	6	4	6
	-/+	1	1	1	1	0	1	0
	1+	1	0	0	0	0	1	0
Co	-	6	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
Significant difference from control group; *: P < 0.01

Table 4 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with nonylphenol in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	4	15	60	250	0	60	250
Male								
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Body weight (g)	400 ± 17	393 ± 17	417 ± 29	413 ± 23	382 ± 37	472 ± 30	509 ± 21	433 ± 31
Absolute organ weight								
Brain (g)	2.03 ± 0.10	2.05 ± 0.08	2.05 ± 0.06	2.06 ± 0.04	2.06 ± 0.07	2.13 ± 0.06	2.10 ± 0.05	2.08 ± 0.11
Thymus (mg)	555 ± 85	591 ± 133	605 ± 207	687 ± 308	576 ± 150	464 ± 92	606 ± 161	439 ± 114
Heart (g)	1.25 ± 0.04	1.35 ± 0.06	1.29 ± 0.08	1.27 ± 0.10	1.17 ± 0.11	1.54 ± 0.21	1.56 ± 0.20	1.34 ± 0.13
Lung (g)	1.33 ± 0.10	1.32 ± 0.04	1.39 ± 0.09	1.35 ± 0.07	1.35 ± 0.15	1.50 ± 0.10	1.55 ± 0.12	1.40 ± 0.10
Liver (g)	12.85 ± 0.80	12.39 ± 1.01	14.13 ± 2.42	14.75 ± 1.20	15.68 ± 2.37*	14.74 ± 1.92	16.54 ± 1.24	13.37 ± 1.42
Spleen (g)	0.67 ± 0.05	0.67 ± 0.09	0.68 ± 0.08	0.91 ± 0.55	0.68 ± 0.07	0.82 ± 0.07	1.86 ± 0.13	0.84 ± 0.21
Kidneys (g)	3.06 ± 0.16	2.99 ± 0.26	2.95 ± 0.17	3.22 ± 0.13	3.57 ± 0.27**	3.07 ± 0.23	3.47 ± 0.25	3.47 ± 0.44
Adrenals (mg)	66 ± 12	66 ± 6	68 ± 8	67 ± 9	69 ± 11	69 ± 9	67 ± 6	67 ± 6
Testes (g)	3.15 ± 0.20	3.25 ± 0.14	3.12 ± 0.17	3.32 ± 0.26	3.21 ± 0.30	3.17 ± 0.23	2.89 ± 0.92	3.22 ± 0.22
Relative organ weight								
Brain (%)	0.51 ± 0.03	0.53 ± 0.02	0.50 ± 0.04	0.50 ± 0.03	0.55 ± 0.04	0.45 ± 0.02	0.41 ± 0.02*	0.48 ± 0.02
Thymus (%)	139 ± 19	150 ± 34	146 ± 52	167 ± 75	151 ± 35	98 ± 16	119 ± 32	102 ± 28
Heart (%)	0.31 ± 0.02	0.35 ± 0.02*	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.31 ± 0.02
Lung (%)	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.02
Liver (%)	3.21 ± 0.16	3.16 ± 0.20	3.38 ± 0.35	3.58 ± 0.19*	4.09 ± 0.25**	3.12 ± 0.22	3.25 ± 0.22	3.09 ± 0.17
Spleen (%)	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.22 ± 0.15	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.04
Kidneys (%)	0.77 ± 0.04	0.76 ± 0.05	0.71 ± 0.03	0.79 ± 0.04	0.94 ± 0.05**	0.65 ± 0.03	0.68 ± 0.05	0.80 ± 0.09**
Adrenals (%)	17 ± 2	17 ± 2	17 ± 2	17 ± 3	18 ± 2	15 ± 3	13 ± 1	16 ± 2
Testes (%)	0.79 ± 0.06	0.83 ± 0.04	0.76 ± 0.09	0.81 ± 0.09	0.85 ± 0.09	0.67 ± 0.04	0.57 ± 0.18	0.75 ± 0.05
Female								
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Body weight (g)	222 ± 8	245 ± 21	239 ± 10	222 ± 22	221 ± 11	256 ± 21	249 ± 20	240 ± 20
Absolute organ weight								
Brain (g)	1.87 ± 0.07	1.87 ± 0.08	1.91 ± 0.10	1.82 ± 0.05	1.83 ± 0.07	1.94 ± 0.03	1.91 ± 0.07	1.91 ± 0.11
Thymus (mg)	379 ± 75	449 ± 113	453 ± 114	383 ± 66	351 ± 44	338 ± 66	338 ± 99	324 ± 36
Heart (g)	0.80 ± 0.04	0.88 ± 0.09	0.83 ± 0.06	0.80 ± 0.09	0.78 ± 0.07	0.89 ± 0.09	0.88 ± 0.05	0.87 ± 0.10
Lung (g)	1.01 ± 0.01	1.05 ± 0.08	1.06 ± 0.06	1.06 ± 0.06	1.01 ± 0.07	1.07 ± 0.09	1.07 ± 0.07	1.06 ± 0.08
Liver (g)	6.44 ± 0.25	7.11 ± 0.95	6.80 ± 0.35	6.79 ± 0.75	8.25 ± 0.59**	7.09 ± 0.85	6.91 ± 0.68	7.19 ± 1.03
Spleen (g)	0.49 ± 0.06	0.51 ± 0.10	0.50 ± 0.07	0.52 ± 0.12	0.49 ± 0.04	0.50 ± 0.08	0.53 ± 0.05	0.49 ± 0.05
Kidneys (g)	1.69 ± 0.08	1.78 ± 0.19	1.81 ± 0.13	1.78 ± 0.08	2.11 ± 0.36	1.74 ± 0.13	1.74 ± 0.18	1.83 ± 0.17
Adrenals (mg)	66 ± 8	75 ± 11	72 ± 3	78 ± 4*	60 ± 3	75 ± 11	79 ± 10	72 ± 3
Ovaries (mg)	89.1 ± 11.8	87.6 ± 13.8	89.3 ± 7.3	96.9 ± 17.1	80.5 ± 12.8	102.0 ± 22.0	102.7 ± 12.9	92.4 ± 12.1
Relative organ weight								
Brain (%)	0.84 ± 0.04	0.77 ± 0.04	0.80 ± 0.08	0.83 ± 0.10	0.83 ± 0.03	0.76 ± 0.07	0.77 ± 0.05	0.80 ± 0.07
Thymus (%)	170 ± 32	182 ± 35	190 ± 51	172 ± 23	159 ± 18	132 ± 28	137 ± 42	137 ± 21
Heart (%)	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.03
Lung (%)	0.45 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.44 ± 0.03	0.48 ± 0.06	0.46 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.43 ± 0.02	0.44 ± 0.03
Liver (%)	2.90 ± 0.15	2.89 ± 0.17	2.84 ± 0.10	3.06 ± 0.21	3.74 ± 0.21**	2.76 ± 0.13	2.78 ± 0.14	2.99 ± 0.23
Spleen (%)	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.04	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.03
Kidneys (%)	0.76 ± 0.05	0.73 ± 0.04	0.76 ± 0.07	0.81 ± 0.05	0.95 ± 0.14	0.68 ± 0.03	0.70 ± 0.03	0.77 ± 0.07*
Adrenals (%)	30 ± 3	31 ± 3	30 ± 2	36 ± 5**	27 ± 2	29 ± 3	32 ± 2	30 ± 3
Ovaries (%)	40.2 ± 5.5	35.6 ± 2.8	37.5 ± 4.3	43.5 ± 5.7	36.4 ± 4.9	39.8 ± 7.2	41.4 ± 5.6	38.9 ± 6.5

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

Item	Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
			0	4	15	60	250	0	60	250
Male										
	No. of animals necropsied		6	6	6	6	6	6	6	6
Spleen										
	Enlargement with disseminated white spots		0	0	0	1	0	0	0	0
	White spot		0	0	0	0	0	0	0	1
Stomach										
	Dark red spot in gl. stomach		0	0	0	0	0	1	0	0
Large intestine										
	Dilatation of cecum		0	0	0	0	6	0	0	0
Testis										
	Small in size (bilateral)		0	0	0	0	0	0	1	0
Epididymis										
	Small in size (bilateral)		0	0	0	0	0	0	1	0
Female										
	No. of animals necropsied		6	6	6	6	6	6	6	6
Kidney										
	Disseminated white spots (bilateral)		0	0	0	0	1	0	0	0
	Enlargement with white spots (bilateral) and dilatation of pelvis (unilateral)		0	0	0	0	1	0	0	0
Stomach										
	Dark red spot in gl. stomach		1	0	0	0	0	0	0	1
Large intestine										
	Dilatation of cecum		0	0	0	0	5	0	0	0

性化，集合管の好塩基性化と拡張がみられたほか，雌では皮髄境界部の近位尿細管に単細胞性壊死，間質の細胞浸潤，円柱，腎盂拡張もみられ，雌の少数例では肉眼的にも白色点などが認められた。従って，上述の検査所見は，腎実質（特に皮髄境界部の近位尿細管と集合管）に対する障害と関連した変化と考えられる。また，250 mg/kg群の膀胱では移行上皮の単純性過形成がみられ，さらに，雌では腎盂粘膜にも過形成がみられ，腎実質のみならず移行上皮から成る尿路系も本被験物質の標的器官と考えられた。

血液学検査では，250 mg/kg群の雌にヘモグロビンとヘマトクリット値の低下が認められ，赤血球に対する影響が示唆された。

血液生化学検査では，250 mg/kg群の雌に総蛋白質およびトリグリセライドの増加がみられたほか，雄では腎障害の反映と考えられる尿素窒素と無機リンの増加および塩素の減少がみられた。

病理学検査では，既に述べた腎臓と膀胱のほかに，肝臓と盲腸に変化がみられた。肝臓では，重量増加が60 mg/kg群の雄と250 mg/kg群の雌雄にみられ，組織学的には，小葉中心帯肝細胞の肥大が250 mg/kg群にみられ

た。血液生化学検査では，GOTやGPT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。また，盲腸では肉眼的な拡張が250 mg/kg群にみられたが，組織学的変化は認められなかった。

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群において，腎臓で重量の増加，皮髄境界部における近位尿細管の好塩基性化，円柱および集合管の拡張，また，膀胱で移行上皮の単純性過形成がみられたが，その他の変化は認められず，被験物質投与によって惹起された変化は概ね可逆性のものと考えられた。また，回復終了時の腎臓でみられた近位尿細管の好塩基性化は，障害を受けた尿細管の再生像と考えられることから，腎臓の変化も本質的には可逆性のものと推定された。

以上の如く，ノニルフェノールをラットに28日間反復投与した結果，主な変化が250 mg/kg群の腎臓，膀胱および肝臓にみられ，本被験物質の標的器官は腎臓，膀胱および肝臓と考えられた。また，60 mg/kg群では，肝臓相対重量の増加がみられたが，15 mg/kg以下の投与群では変化は認められなかった。これらの結果から，

Table 6 Summary of histopathological findings in rats treated orally with nonylphenol in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	4	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	1 2 3 P	1 2 3 P
Male								
No. of animals necropsied	6	6	6	6	6	6	6	6
Heart	(6)	(0)	(0)	(0)	(6)	(0)	(0)	(0)
myocarditis/focal	0 0 0 0	-----	-----	-----	1 0 0 0	-----	-----	-----
Trachea	(6)	(0)	(0)	(0)	(6)	(0)	(0)	(0)
cellular infiltratin/mucosa	0 0 0 0	-----	-----	-----	1 0 0 0	-----	-----	-----
Cecum	(6)	(0)	(0)	(0)	(6)	(0)	(0)	(0)
cellular infiltration/mucosa	0 1 0 0	-----	-----	-----	1 1 0 0	-----	-----	-----
Rectum	(6)	(0)	(0)	(0)	(6)	(0)	(0)	(0)
cellular infiltration/mucosa	1 0 0 0	-----	-----	-----	1 0 0 0	-----	-----	-----
Liver	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(0)	(6)
hypertrophy/hepatocyte/ centrilobular	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	6 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	0 0 0 0	-----	0 0 0 0
proliferation/kupffer cell	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 1 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	-----	0 0 0 0
Spleen	(6)	(0)	(0)	(1)	(6)	(0)	(0)	(0)
granloma	0 0 0 0	-----	-----	0 1 0 0	0 0 0 0	-----	-----	-----
hematopoiesis/ extramedullary/ increased	0 0 0 0	-----	-----	0 1 0 0	0 0 0 0	-----	-----	-----
Kidney	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
basophilic change/ proximal tubule/ cortico-medullary junction	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	3 1 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 3 0 0
basophilic change/ proximal tubule/ focal	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0
basophilic change/ collecting tubule	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	6 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
dilatation/ collecting tubule	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
cast	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	3 1 0 0
Urinary bladder	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
hyperplasia/ transitional cell/ simple	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
Prostate	(6)	(0)	(0)	(0)	(6)	(0)	(0)	(0)
inflammation	0 0 0 0	-----	-----	-----	1 0 0 0	-----	-----	-----
Female								
No. of animals necropsied	6	6	6	6	6	6	6	6
Cecum	(6)	(0)	(0)	(0)	(6)	(0)	(0)	(0)
cellular infiltration/ mucosa	0 1 0 0	-----	-----	-----	0 2 0 0	-----	-----	-----
Liver	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
hypertrophy/ hepatocyte/ centrilobular	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	5 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
microgranuloma	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0
altered hepatocellular foci	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 1	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
Kidney	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
basophilic change/ proximal tubule/ cortico-medullary junction	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 2 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
basophilic change/ collecting tubule	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 2 2 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
dilatation/ collecting tubule	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 3 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0
necrosis/ single cell/ proximal tubule/ cortico-medullary junction	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
cast	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 1 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
hyperplasia/ pelvic mucosa/ simple	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
cellular infiltration/ interstitium	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	1 1 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
dilatation/ pelvis	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 1 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
basophilic change/ proximal tubule/ focal	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0
Urinary bladder	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
hyperplasia/ transitional cell/ simple	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	4 2 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	5 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.

平均値は15 mg/kg/day、雌では60 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. 95-98.

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

ノニルフェノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Nonylphenol on Bacteria

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、ノニルフェノールの変異原性について遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535およびTA1537株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA株を用いる復帰突然変異試験を行った。予備的な試験の結果を基に、試験用量を設定した。すなわち、直接法(-S9 mix)ならびに代謝活性化法(+S9 mix)の各菌株についてそれぞれ、0.195-200 μg /プレートの6用量を設定し試験した。その結果、直接法および代謝活性化法のいずれにおいても、ラット肝ミクロソーム(S9)添加の有無にかかわらず、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められず、再現性も確認された。一方、各系での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。従って、本試験条件下において、ノニルフェノールは微生物に対し遺伝子突然変異を誘起しないものと判断した。

材料および方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537¹⁾ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2uvrA²⁾の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所から分与を受けた。平成6年11月25日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK社)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mlずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

日清製粉(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸カルシウム・無水塩, 0.192%

リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム [いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID社: No.1)を加え, 30 mlをシャーレに分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

Bacto-agar(DIFCO社)0.6%を含む0.5%塩化ナトリウム水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mM D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mlの円筒容器(ストレージボトル: Corning Costar社)に2.5%ニュートリエントブロス(OXOID社)溶液を25 ml分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μl 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック(株))を用い、37℃で8時間振盪(往復振盪:120回/分)培養し、試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1ml中の量
S9	0.1 ml
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
リン酸緩衝Na-液(pH 7.4)	100 μmol

5. 被験物質

被験物質のノニルフェノール(ロット番号:F1132, CAS No.:25154-52-3)は分子式C₁₅H₂₄O、分子量220.36、純度99.0%以上の無色~黄色の粘調液体である。三井東圧化学(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質溶液の調製

DMSOに被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 試験用量の設定

8.00, 40.0, 200, 1000および5000 μg /プレートの用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、直接法でネズミチフス菌の8.00 μg /プレート以上およびWP2uvrAの40.0 μg /プレート以上の用量において試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。また、代謝活性化法ではTA100, TA1535およびTA1537の40.0 μg /プレート以上, WP2uvrAおよびTA98の200 μg /プレート以上の用量において同作用が観察された。従って、本試験においては直接法のネズミチフス菌で12.5 μg /プレートおよびWP2uvrAで50.0 μg /プレートを、代謝活性化法ではTA100, TA1535およびTA1537で50.0 μg /プレート, WP2uvrAおよびTA98で200 μg /プレートを最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20°C)した。

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

アジ化ナトリウム(NaN_3 : 和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン(ACR:ALDRICH社)

2-アミノアントラセン(2-AA: 和光純薬工業(株))

9. 試験方法

Amesらの原法の改良法であるプレインキュベーション法に準じて、直接法および代謝活性化法それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を100 μl 、次いで直接法の場合、0.1M ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μl 、代謝活性化法の場合、S9 mixを500 μl および試験菌液100 μl を加え、37°Cで20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、トップアガーを2 ml添加し、混合液をプレート上に重層した。37°Cの条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡($\times 60$)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11: システムサイエンス(株))を用いた。独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

試験結果を Table 1-4 に示した。直接法(-S9 mix)ならびに代謝活性化法(+S9 mix)のいずれとも高用量群において、ノニルフェノール処理による生育阻害作用が観察された。また、復帰突然変異コロニー数については、直接法、代謝活性化法とも溶媒対照と同等の値であり、増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、S9 mix添加時試験管内で反応液が僅かに白濁したが、コロニー計数時には特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から、本試験条件下においてノニルフェノールの微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, 38, 3 (1976).

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 北沢倫世, 板倉真由実

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-12 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: Madoka Nakajima (Study director)

Michiyo Kitazawa, Mayumi Itakura

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho, Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1. Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (1st trial) [direct method: -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	85	95	97	13	17	19	17	17	23	24	31	33	10	10	6
		[92 \pm 6]			[16 \pm 3]			[19 \pm 3]			[29 \pm 5]			[9 \pm 2]		
Test sub.	0.195	111	84	91	17	14	11	-	-	-	26	27	28	13	8	8
		[95 \pm 14]			[14 \pm 3]			-			[27 \pm 1]			[10 \pm 3]		
	0.391	92	102	89	13	23	17	-	-	-	28	22	26	7	9	7
		[94 \pm 7]			[18 \pm 5]			-			[25 \pm 3]			[8 \pm 1]		
	0.781	95	109	101	10	17	12	-	-	-	31	16	27	9	8	5
		[102 \pm 7]			[13 \pm 4]			-			[25 \pm 8]			[7 \pm 2]		
	1.56	86	95	84	21	14	16	24	15	17	27	16	28	8	6	6
		[88 \pm 6]			[17 \pm 4]			[19 \pm 5]			[24 \pm 7]			[7 \pm 1]		
	3.13	92	92	107	13	11	9	18	23	17	30*	13*	32*	11*	10*	12*
		[97 \pm 9]			[11 \pm 2]			[19 \pm 3]			[25 \pm 10]			[11 \pm 1]		
	6.25	84*	84*	82*	10*	10*	11*	17	22	17	19*	15*	24*	7*	6*	4*
		[83 \pm 1]			[10 \pm 1]			[19 \pm 3]			[19 \pm 5]			[6 \pm 2]		
	12.5	83*	61*	75*	13*	9*	10*	16	27	16	17*	16*	25*	2*	1*	4*
		[73 \pm 11]			[11 \pm 2]			[20 \pm 6]			[19 \pm 5]			[\pm 2]		
	25.0	-	-	-	-	-	-	20*	14*	16*	-	-	-	-	-	-
		-			-			[17 \pm 3]			-			-		
	50.0	-	-	-	-	-	-	14*	22*	14*	-	-	-	-	-	-
		-			-			[17 \pm 5]			-			-		
Positive control		466	378	397 ^{a)}	517	517	487 ^{b)}	112	117	116 ^{a)}	575	543	551 ^{c)}	465	551	438 ^{d)}
		[414 \pm 46]			[507 \pm 17]			[115 \pm 3]			[556 \pm 17]			[485 \pm 59]		

#: Solvent control * : The background lawn was thin - : Not tested
 a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) : AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) : ACR; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2. Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (1st trial) [activation method: +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	87	94	97	9	15	12	32	36	24	37	34	36	15	15	19
		[93 \pm 5]			[12 \pm 3]			[31 \pm 6]			[36 \pm 2]			[16 \pm 2]		
Test sub.	1.56	105	94	92	11	21	14	-	-	-	-	-	-	19	13	12
		[97 \pm 7]			[15 \pm 5]			-			-			[15 \pm 4]		
	3.13	112	116	114	15	18	23	-	-	-	-	-	-	17	18	22
		[114 \pm 2]			[19 \pm 4]			[19 \pm 3]			-			-		
	6.25	126	95	91	13	16	9	25	21	31	38	36	32	17	12	9
		[104 \pm 19]			[13 \pm 4]			[26 \pm 5]			[35 \pm 3]			[13 \pm 4]		
	12.5	124	105	100	16	13	16	17	20	33	35	34	36	17	18	7
		[110 \pm 13]			[15 \pm 2]			[23 \pm 9]			[35 \pm 1]			[14 \pm 6]		
	25.0	100	114	94	16	8	12	25	17	30	54	50	57	9	12	17
		[103 \pm 10]			[12 \pm 4]			[24 \pm 7]			[54 \pm 4]			[13 \pm 4]		
	50.0	87*	97*	95*	8*	10*	16*	21	28	29	46	42	38	9*	17*	14*
		[93 \pm 5]			[11 \pm 4]			[26 \pm 4]			[42 \pm 4]			[13 \pm 4]		
	100	-	-	-	-	-	-	30*	24*	31*	34*	32*	31*	-	-	-
		-			-			[28 \pm 4]			[32 \pm 2]			-		
	200	-	-	-	-	-	-	16*	15*	18*	25*	25*	29*	-	-	-
		-			-			[16 \pm 2]			[26 \pm 2]			-		
Positive control		866	793	819 ^{a)}	483	592	538 ^{b)}	811	845	824 ^{c)}	374	306	338 ^{d)}	186	149	170 ^{b)}
		[826 \pm 37]			[538 \pm 55]			[827 \pm 17]			[339 \pm 34]			[168 \pm 19]		

#: Solvent control * : The background lawn was thin - : Not tested
 a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) : 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) : 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3. Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (2nd trial) [direct method: -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	106	93	98	11	10	12	27	19	24	18	26	24	10	7	9
		[99 \pm 7]			[11 \pm 1]			[23 \pm 4]			[23 \pm 4]		[9 \pm 2]			
Test sub.	0.195	100	108	103	14	14	13	-	-	-	24	29	31	10	12	8
		[104 \pm 4]			[14 \pm 1]						[28 \pm 4]		[10 \pm 2]			
	0.391	105	105	109	16	15	13	-	-	-	25	29	32	10	12	9
		[106 \pm 2]			[15 \pm 2]						[29 \pm 4]		[10 \pm 2]			
	0.781	103	106	102	15	11	15	-	-	-	27	28	32	9	7	7
		[104 \pm 2]			[14 \pm 2]						[29 \pm 3]		[8 \pm 1]			
	1.56	94	107	99	16	14	16	15	14	16	30	23	25	10	5	6
		[100 \pm 7]			[15 \pm 1]			[15 \pm 1]			[26 \pm 4]		[7 \pm 3]			
	3.13	101*	104*	101*	13	13	14	23	19	21	24	25	33	7*	9*	13*
	[102 \pm 2]			[13 \pm 1]			[21 \pm 2]			[27 \pm 5]		[10 \pm 3]				
6.25	79*	83*	85*	11*	14*	14*	20	24	19	20*	14*	20*	6*	5*	4*	
	[82 \pm 3]			[13 \pm 2]			[21 \pm 3]			[18 \pm 3]		[5 \pm 1]				
12.5	82*	76*	85*	5*	8*	10*	19	21	23	16*	16*	22*	3*	6*	3*	
	[81 \pm 5]			[8 \pm 3]			[21 \pm 2]			[18 \pm 3]		[4 \pm 2]				
25.0	-	-	-	-	-	-	16*	18*	15*	-	-	-	-	-	-	
							[16 \pm 2]									
50.0	-	-	-	-	-	-	12*	13*	13*	-	-	-	-	-	-	
							[13 \pm 1]									
Positive control		432	403	397 ^{a)}	460	557	453 ^{b)}	127	134	100 ^{b)}	526	527	473 ^{c)}	613	591	463 ^{d)}
		[411 \pm 19]			[490 \pm 58]			[120 \pm 18]			[509 \pm 31]		[556 \pm 81]			

#: Solvent control *: The background lawn was thin -: Not tested

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): ACR; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of nonylphenol (2nd trial) [activation method: +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	97	91	102	16	18	15	29	32	22	40	39	29	17	16	16
		[97 \pm 6]			[16 \pm 2]			[28 \pm 5]			[36 \pm 6]		[16 \pm 1]			
Test sub.	1.56	102	99	105	16	14	16	-	-	-	-	-	17	14	17	
		[102 \pm 3]			[15 \pm 1]								[16 \pm 2]			
	3.13	97	100	110	14	15	14	-	-	-	-	-	14	19	14	
		[102 \pm 7]			[14 \pm 1]								[16 \pm 3]			
	6.25	99	106	100	14	17	14	32	25	34	40	31	41	17	14	17
		[102 \pm 4]			[15 \pm 2]			[30 \pm 5]			[37 \pm 6]		[16 \pm 2]			
	12.5	114	102	96	15	17	16	21	33	29	37	33	31	13	16	15
		[104 \pm 9]			[16 \pm 1]			[28 \pm 6]			[34 \pm 3]		[15 \pm 2]			
25.0	105*	101*	107*	15	14	7	36	30	33	40	44	34	13	13	12	
	[104 \pm 3]			[12 \pm 4]			[33 \pm 3]			[39 \pm 5]		[13 \pm 1]				
50.0	102*	101*	94*	8*	11*	11*	31	31	32	30	29	35	14*	8*	9*	
	[99 \pm 4]			[10 \pm 2]			[31 \pm 1]			[31 \pm 3]		[10 \pm 3]				
100	-	-	-	-	-	-	24*	21*	23*	28*	22*	37*	-	-	-	
							[23 \pm 2]			[29 \pm 8]						
200	-	-	-	-	-	-	24*	23*	21*	33*	22*	24*	-	-	-	
							[23 \pm 2]			[26 \pm 6]						
Positive control		646	660	634 ^{a)}	360	414	432 ^{b)}	611	786	719 ^{c)}	316	276	335 ^{d)}	140	127	127 ^{b)}
		[647 \pm 13]			[402 \pm 37]			[705 \pm 88]			[309 \pm 30]		[131 \pm 8]			

#: Solvent control *: The background lawn was thin -: Not tested

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$