

既存化学物質の人健康影響に関する情報(第二種監視化学物質審議関係)

(平成20年12月19日開催)

CAS No.	官報公示 整理番号	物質名称	単回	28日間	Reprotox	簡易生殖	Ames	染色体	小核	評価文書	頁
140-66-9	3-503	<i>p-tert</i> -オクチルフェノール		○			○	○			1

p-tert-オクチルフェノールのラットを用いた28日間反復投与毒性試験

28-Day Repeated Dose Toxicity Test of p-tert-Octylphenol in Rats

要約

p-tert-オクチルフェノールをSD系ラット (Crj:CD) の雌雄に15、70および300mg/kgの用量で28日間反復投与し、その毒性学的意義について検討した。対照群および高用量群については14日間の回復期間を設けた。

なお、本試験は化審法ガイドライン (1986年) に従って実施した。また化審法GLP (1984年) を満足している。

300mg/kg群において、雌雄ともに流涎、飲水量の増加、血清ナトリウムの増加、尿量の増加および尿比重の低下、尿中電解質の変化、腎臓の重量増加および灰白色斑が認められた。病理組織学的検査で腎臓の尿細管上皮に再生性変化が認められた。その他、雄で体重増加抑制および血清アルブミンの減少、雌で血中総コレステロールの減少、A/G比の低下、尿素窒素の増加、トリグリセライドの増加および肝重量の軽度の増加が認められた。

70 mg/kg群でも流涎が雌雄で、A/G比の低下が雌で認められた。

これら被験物質投与に起因する変化は投与休止により消失あるいは回復傾向を示した。

以上の結果より、本試験条件下におけるp-tert-オクチルフェノールの無影響量は雌雄とも15 mg/kgと考えられる。

緒言

p-tert-オクチルフェノールは、エチルセルロースの安定剤、酸化防止剤、界面活性剤および油性フェノール樹脂の製造などに利用されている。毒性に関する情報として、ヒトおよび実験動物で皮膚の白斑症を起こすといわれる。また、試験管内での実験でもチロシナーゼのクレゾラーゼ活性阻害、メラニン合成阻害を示すといわれる。ラットでの経口投与によるLD₅₀値は2160 mg/kgとの報告がある。

今回、ラットを用いてp-tert-オクチルフェノールの経口投与による28日間反復投与毒性試験を実施し、生体への毒性学的影響について検討したので報告する。

方法

1. 被験物質

日本化学工業協会より提供されたp-tert-オクチルフェノール (大日本インキ化学工業株式会社, Lot No. C162, 純度: 98.24%) を使用した。被験物質は白色の固体である。なお、本ロットについては投与開始前および投与終

了後に被験物質供給者が分析し、安定であることを確認した。

2. 試験動物

日本チャールス・リバー株式会社より1991年10月16日に入手したSD系 (Crj:CD) ラット (SPF) を使用した。

動物入荷後5日間馴化し、健康状態が良好なことを確認した後、5週齢で投与を開始した。

投与開始前に動物を体重別層化無作為抽出法により群分けした後、イヤバッチを用いて群および個体を識別した。投与開始時の体重範囲は、雄が128~148g、雌が118~146gであった。

3. 動物飼育

1) 飼育管理

馴化・検疫期間を含めた全飼育期間中、温度20~25℃、湿度40~70%R.H.、換気約12回/時、照明12時間 (7:00~19:00) に自動調節された飼育室を使用した。

実験動物用床敷 (ベータチップ: 日本チャールス・リバー株式会社) を敷いたポリカーボネート製ケージ (265W×426D×200Hmm) に1ケージ当たり2匹 (同性) で収容し、スチール製架台上で飼育した。ステンレス製の固型飼料用給餌器およびポリカーボネート製の給水瓶 (700 ml) を用いた。

ケージ (含床敷)、給餌器および給水瓶は、週1回の頻度でオートクレーブ滅菌したものと交換した。

2) 飼料

実験動物用固型飼料 (MF: オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させた。飼料は週1回の頻度で交換した。残留農薬等汚染物質の分析値が当社のSOPで定めた濃度以下であることが保証された飼料を使用した。

3) 飲水

5μmのフィルター濾過後、紫外線照射した水道水を自由摂取させた。飲水は週1回の頻度で交換した。なお、水道法に準拠した水質検査を定期的に行い、厚生省令56の別表に定める基準の範囲内であることを確認した。

28日間反復投与毒性試験

4. 投与

1) 投与用量および設定理由

被験物質を100、300、500および1000 mg/kgの用量でSD系ラットに7日間反復経口投与した結果、500 mg/kg以上で体重増加抑制および死亡が認められた。また、300 mg/kgでは流涎が認められた。この結果を基に、高用量を300 mg/kgとし、以下中用量を70 mg/kg、低用量を15 mg/kgとした。この他に溶媒（オリーブ油）のみを投与する対照群を設けた。

2) 投与期間

28日間、毎日1回、午前中に投与した。

3) 投与方法

胃ゾンデを装着した注射筒を用いて強制経口投与した。投与量は5 ml/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。

5. 投与液の調製

乳鉢を用いて被験物質とオリーブ油（日本薬局方）を混和し40℃以下で加湯溶解させ、所定の濃度に調製した。投与液の調製は10日以内に1度実施し、投与直前まで冷暗所で保存した。

投与液の安定性については本研究所において分析し、冷暗所保存下で調製後14日間は安定であることを確認した。

6. 回復期間

投与終了後、対照群および高用量群に14日間の回復期間を設けた。

7. 群構成

群名	用量 (mg/kg)	動物数 (匹)			
		28日後解剖 ^{a)}		回復後解剖 ^{b)}	
		雄	雌	雄	雌
対照群	0	6	6	6	6
低用量群	15	6	6		
中用量群	70	6	6		
高用量群	300	6	6	6	6

a) 最終投与日の翌日に解剖した。

b) 14日間の回復期間終了後に解剖した。

8. 観察および検査方法

1) 一般状態観察

全例について生死および外観・行動等について毎日観察した。更に、毎週1回、触診を含む詳しい観察を行った。

2) 体重

全例について投与開始日（投与0日）およびその後毎週1回測定した。測定には電子上皿天秤（EB-5000：株式会社島津製作所）を使用した。

3) 摂餌量

全ケージについて投与開始日およびその後毎週1回風袋込み重量を測定し、各期間毎の1匹あたりの1日の平均摂餌量を算出した。測定には前記天秤を使用した。

4) 飲水量

投与初期の観察から高用量群で飲水量の増加傾向がみられたため、全ケージについて投与開始後1週以降、毎週1回風袋込み重量を測定し、各期間毎の1匹あたりの1日の平均飲水量を算出した。測定には前記天秤を使用した。

5) 血液学的検査

各計画殺時の生存動物について、ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液：ダイナボット株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採血し、以下の項目について検査した。凝固阻止剤として、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間測定用には3.13%クエン酸ナトリウム水溶液を、それ以外の項目の測定にはEDTA-2Kを用いた。なお、採血に際し絶食は行わなかった。

a) 赤血球数	レーザー光散乱法
b) 白血球数	同上
c) 血小板数	同上
d) ヘモグロビン濃度	シアンメトヘモグロビン法
e) ヘマトクリット値	マイクロヘマトクリット法
f) 白血球百分率	ライト染色塗抹標本について測定
g) 網状赤血球数	ニューメチレンブルー染色後ライト染色した塗抹標本について測定
h) プロトロンビン時間 (PT)	Quick一段法
i) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	活性化セファロプラスチン法
j) 平均赤血球容積 (MCV)	a)、e)より算出
k) 平均赤血球血色素量 (MCH)	a)、d)より算出
l) 平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	d)、e)より算出

a)~d)は自動血液分析装置（ELT-8/ds：オルソインスツルメンツ社）、e)はヘマトクリット用遠心機（MC-201：株式会社日立製作所）、f)、g)は血液細胞自動分析装置（MICROX HEG-70A：立石電機株式会社）、h)、i)は血液凝固計（KC-10：アメルング社）により測定した。

6) 血液生化学的検査

血液学的検査に用いた残りの血液を室温で約30分間放置した後、3,000r.p.m.で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて以下の項目を自動分析装置（日立736-10形：株式会社日立製作所）により測定した。

a) 総蛋白	Biuret法
b) アルブミン	BCG法
c) A/G比	a)およびb)より算出
d) グルコース	酵素-UV法 (GK-G6PDH法)
e) トリグリセライド	酵素法 (LPL-GK-G3PO-POD法)
f) 総コレステロール	酵素法 (CES-CO-POD法)
g) 尿素窒素	酵素-UV法 (Urease-GLDH法)
h) クレアチニン	Jaffe法
i) カルシウム	O-CPC法
j) 無機リン	UV法
k) GOT (AST)	UV-Rate法 (SSCC改良法)
l) GPT (ALT)	UV-Rate法 (SSCC改良法)
m) γ -GTP	γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法 (SSCC改良法)
n) ALP	p-ニトロフェニルリン酸基質法 (GSCC改良法)

- o) ナトリウム イオン選択電極法
p) カリウム イオン選択電極法
q) クロライド イオン選択電極法

7) 尿検査

投与期間終了前に生存動物の新鮮尿を採取し、以下のa)~g)の項目について検査した。飲水量の変化から尿量の増加が推察されたため、尿沈渣および16時間尿のi)~m)の項目について検査した。ただし尿沈渣については雄は各群6例ずつ、雌は対照群と高用量群6例ずつ検査した。また回復期間終了前にも、投与期間終了前の検査で異常がみられなかった尿沈渣を除き同様の検査を実施した。

- | | |
|-------------|---|
| a) pH | } 試験紙法 (N-マルチスティックス
SG: マイルス・三共株式会社) |
| b) 潜血 | |
| c) 蛋白 | |
| d) 糖 | |
| e) ケトン体 | |
| f) ビリルビン | |
| g) ウロビリノーゲン | |
| h) 尿沈渣 | 鏡検法 (Sternheimer-Malbin染色) |
| i) 尿量 | メスシリンダーにて測定 |
| j) ナトリウム | 炎光光度法 |
| k) カリウム | 炎光光度法 |
| l) クロライド | 電量滴定法 |
| m) 比重 | 屈折法 |

a)~g)は尿分析器 (クリニテック10: 株式会社マイルス・三共)、j)、k)は全自動炎光光度計 (FLAME30-C/AD-3型: 日本分光メディカル)、l)はクロライドメーター (Model 925: コーニングメディカル株式会社)、m)は尿比重計 (ユリコン-S: 株式会社アタゴ) により測定した。

8) 病理学的検査

(1) 病理解剖学的検査

各計画殺時の生存動物について採血後に腹大動脈を切断して放血し、致死さ剖検を行った。

(2) 器官重量

各計画殺時の全生存動物について以下の器官の重量を測定した。測定には電子上皿天秤 (ED-H60: 株式会社島津製作所) を用いた。更に、解剖日の体重を基に対体重比についても算出した。

脳、肝臓、腎臓、副腎、精巣または卵巣

(3) 病理組織学的検査

全動物について以下の器官を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液にて固定後保存した。ただし、眼球およびハーダー腺はDavidsonの溶液にて固定した。

脳、下垂体、眼球 (付属腺を含む)、肺、胃、甲状腺 (上皮小体を含む)、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精巣または卵巣、骨髄 (大腿骨)

採取した器官のうち、28日後解剖動物の対照および高用量群の心臓、肝臓、腎臓、副腎および脾臓を対象に、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し鏡検した。この結果、腎臓で被験物質の影響が認められたため、低、中用量群および回復後解剖動物についても検査した。また剖検時に肉眼的変化の認められた器官についても同様に処理して鏡検した。

9. 統計学的解析

計量的データについては、Bartlett法による等分散の検定を行い、分散が一樣の場合は一元配置分散分析を、一樣でない場合はKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合で各群の例数が一定の場合はDunnettの方法、不定ならばScheffeの方法により平均値あるいは順位多重比較検定を行った。尿の定性検査および尿沈渣については、Armitageの χ^2 検定を用いた。

結果

1. 死亡動物

雌雄とも死亡は認められなかった。

2. 一般状態

雌雄とも、流涎が70 mg/kg群の少数例、300 mg/kg群の全例に認められた。一部には投与直前から流涎するものもあり、300 mg/kg群の雄2例には回復期間でも観察された。また、投与開始後1週に300 mg/kg群の雄1例に自発運動量の減少がみられた。

3. 体重 (Fig.1)

300 mg/kg群の雄で体重増加抑制が認められた。回復期間では回復傾向がみられた。

4. 摂餌量

300 mg/kg群の雄で回復後1週に高値がみられたが、その他は各被験物質投与群とも対照群と同様な推移を示した。

5. 飲水量 (Fig.2,3)

300 mg/kg群の雌雄とも増加が認められた。しかし回復期間には回復する傾向を示した。

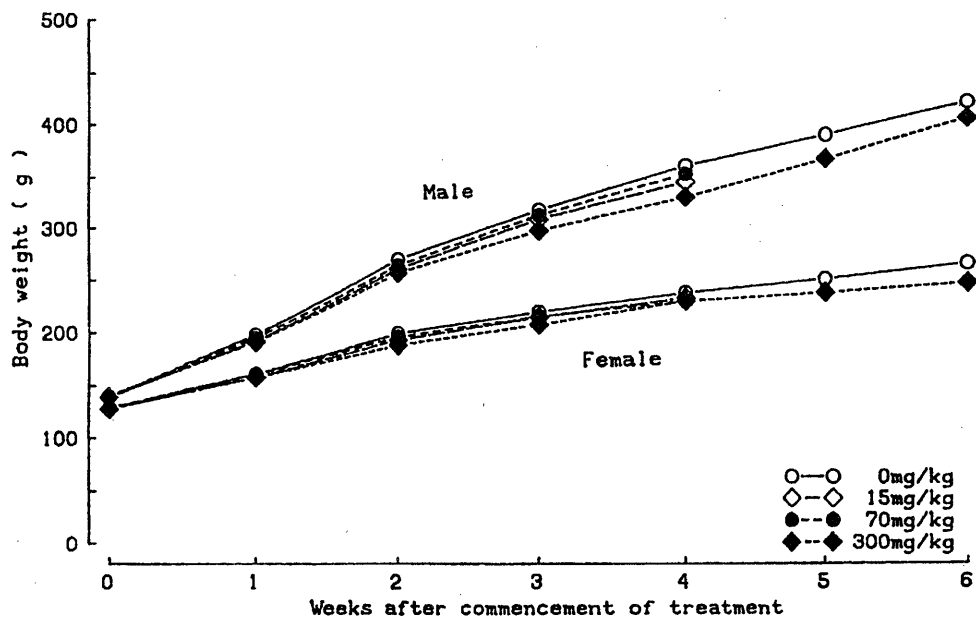


Fig.1 Body weight change of rats treated with *p-tert-Octylphenol*

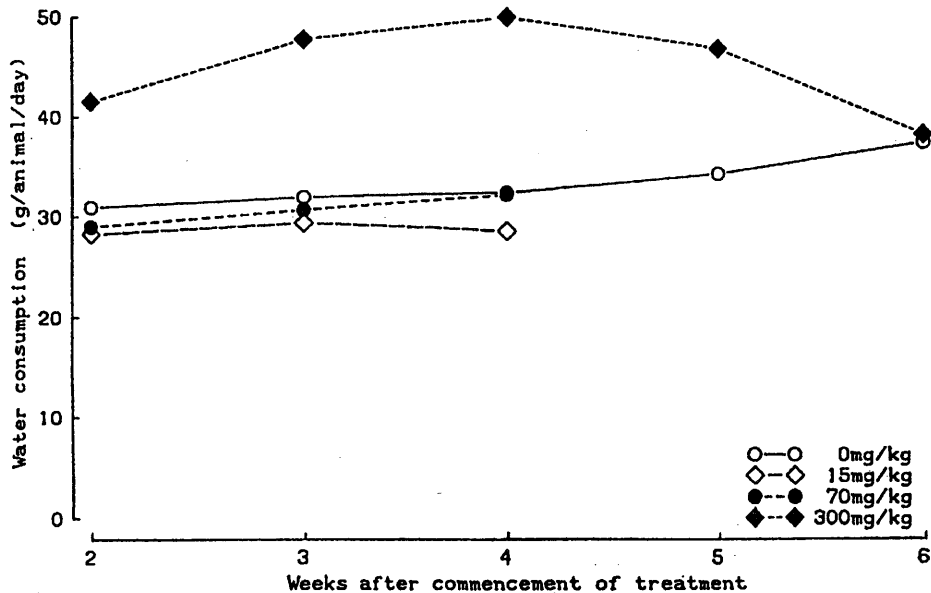


Fig.2 Water consumption change of male rats treated with *p-tert-Octylphenol*

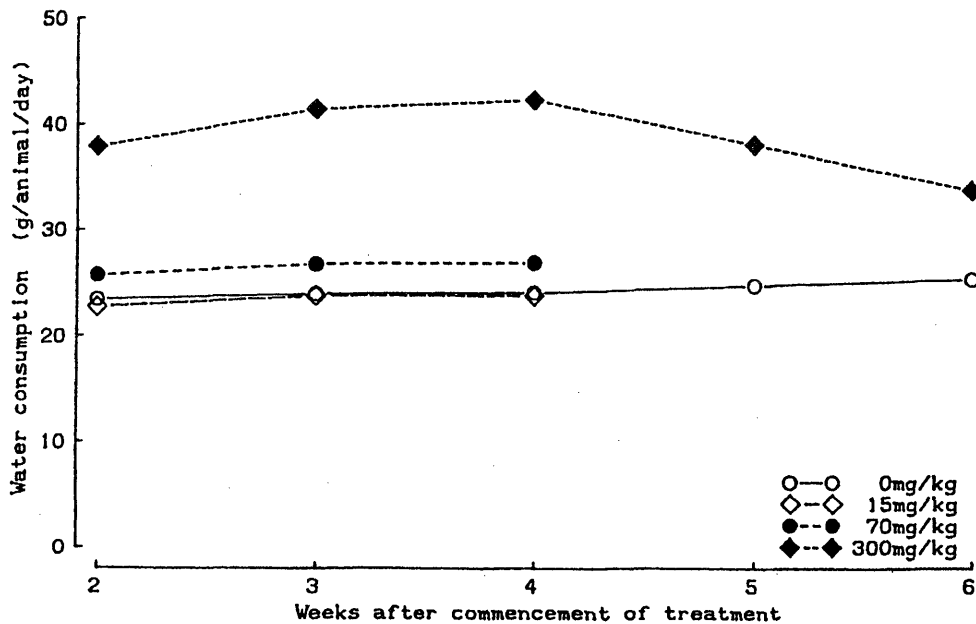


Fig. 3 Water consumption change of female rats treated with p-tert-Octylphenol

6. 血液学的検査 (Table 1)

赤血球指数、ヘマトクリット値および白血球百分率で有意な変化がみられたが、用量依存性がないか、あるいは生理的変動範囲内の変化であったことから、被験物質投与とは関連のない偶発的変化と判断した。

7. 血液生化学的検査 (Table 2)

投与終了時の検査では、300 mg/kg群において血中ナトリウムの増加が雌雄に、総コレステロールの減少、トリグリセライドおよび尿素窒素の増加が雌に、アルブミンの減少が雄に認められた。またA/G比の低下が70および300 mg/kg群の雌に認められた。

その他、総蛋白およびアルブミンの増加が15 mg/kg群の雌に、GPTの低下が70 mg/kg群の雌にみられたが、これらはいずれも用量依存性のない変化であるため、偶発的変化と判断した。

回復期間終了時の検査では、300 mg/kg群の雄に血中カリウムの減少がみられたが、生理的変動範囲内の変化であるため被験物質投与とは関連のない偶発的変化と判断した。

8. 尿検査 (Table 3)

投与終了前の検査では、300 mg/kg群において尿量の増加および尿比重の低下が雌雄ともに認められた。また、尿中ナトリウムおよびクロライドの減少が雌雄で、カリウムの減少が雄で認められた。

ケトン体の減少が300 mg/kg群の雌雄に、尿蛋白の減少が雌に、また、尿沈渣でリン酸アンモニウムマグネシウムの減少が15および300 mg/kg群の雄に、赤血球数の減少が300 mg/kg群の雄でみられたが、これらは尿量増加により希釈されたために得られた二次的変化と考えられる。その他、カリウムおよびクロライドの減少が15 mg/kg群の雄に、またpHの低下が70 mg/kg群の雌にみられたが、用量依存性がなく偶発的なものと考えられる。

回復期間終了前での検査では異常は認められなかった。

9. 器官重量 (Table 4)

投与終了時の検査では、300 mg/kg群の雌雄の腎臓および雌の肝臓重量に増加の傾向がみられ、対体重比では有意差が認められた。

その他、300 mg/kg群の雄で脳および精巣の対体重比に増加がみられたが、実重量ではほとんど差がないことから、体重差が反映した見掛け上の変化と考えられる。

回復期間終了時の検査では、300 mg/kg群の雌に腎臓および副腎の対体重比で増加が認められたが、実重量では差がなかった。

10. 病理解剖学的検査 (Table 5)

投与終了時解剖動物では両側腎臓の表面、割面における灰白色斑が300 mg/kg群の雄の1例および雌の2例に認められた。回復期間終了時解剖動物でも300 mg/kg群の雄の1例に同様な変化が認められた。