

2-tert-ブチルフェノールのラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 2-tert-Butylphenol in Rats

要約

2-tert-ブチルフェノールは、農業、香料、樹脂を製造する際の原料である¹⁾。今回、2-tert-ブチルフェノールを1群あたり雌雄各5匹のSD系ラットに1回経口投与し、その急性毒性を検討した。投与用量は雌雄ともに0、500、1000および2000 mg/kgとした。

その結果、1000 mg/kg群の雄1例および2000 mg/kg群の雄4例と雌全例が死亡した。死亡動物では、投与日に自発運動の低下、歩行失調、呼吸不整、腹臥位、側臥位および体温低下、第2日にはこの他にうずくまり、振戦、歩行異常、流涙がみられた。剖検では、腺胃のびらん/潰瘍が1000 mg/kg群の雄と2000 mg/kg群の雌雄、前胃の充血が2000 mg/kg群の雌雄、腹腔内の脂肪織の白色化および胸腔の脊椎周囲の出血巣が2000 mg/kg群の雄、空腸の黒色内容物が2000 mg/kg群の雌にみられた。病理組織学検査の結果、胃では前胃の重層扁平上皮の過形成と腺胃の胃腺上皮の変性・脱落が1000 mg/kg群の雄、前胃のびらん巣が2000 mg/kg群の雌雄、腺胃の壁細胞の空胞化が2000 mg/kg群の雄、胸部大動脈周囲脂肪組織の出血が2000 mg/kg群の雄に認められた。

生存動物では、投与日に500 mg/kg以上の投与群の雌雄で自発運動の低下、歩行失調、腹臥位、側臥位および体温低下がみられた。第2日以降には、1000 mg/kg群の雄で自発運動の低下および歩行異常が第4日まで、1000 mg/kg群の雌で歩行異常が第3日までみられた。体重の低値が1000および2000 mg/kg群の雄で第4日にみられた。剖検では、前胃の隆起巣が1000 mg/kg群の雄にみられ、病理組織学検査の結果、前胃の重層扁平上皮の過形成が認められた。

2-tert-ブチルフェノールを雌雄のラットに1回経口投与した結果、半数致死量(LD₅₀値)は、雄では1231 mg/kg(95%信頼限界 838~1808 mg/kg)、雌では1414 mg/kgと結論した。

方法

1. 被験物質

大日本インキ化学工業(株)(東京)から提供された2-tert-ブチルフェノール(ロット番号C169、純度99.97%)を室温、窒素封入条件下で保存し使用した。被験物質の安定性は、被験物質提供者より保証する資料を入手し、確認した。被験物質はオリブ油(丸石製薬(株))に溶解調製し、窒素封入した。投与液の調製は投与4日前に行い、投与

に供するまで冷蔵保存した。投与液中の被験物質の冷蔵保存条件下での8日間の安定性は、投与前に0.4から200 mg/mLの範囲で確認した。また、各用量群の投与液を分析し、被験物質の濃度が設定濃度±10%以内であることを確認した。

2. 試験動物および動物飼育

日本チャールス・リバー(株)からCrj:CD(SD)IGSラット(SPF)を入手し、6日間検疫・馴化した。1群の動物数は雌雄各5匹とし、投与前日に、体重層別化無作為抽出法によって各群の体重がほぼ均一となるように群分けした。投与日の週齢は5週齢、体重範囲は雄が128~147 g、雌が107~121 gであった。

検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通して、温度22±2°C(目標値)、相対湿度55±15%(目標値)、換気約12回/時(オールフレッシュエアー供給)、照明12時間/日(7:00-19:00)に自動調節した飼育室を使用した。動物は、実験動物用床敷(ベータチップ、日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに、群分け前はケージあたり5匹以下(同性)、群分け後はケージあたり5匹(同性)収容し、飼育した。動物には、実験動物用固型飼料(MF,オリエンタル酵母工業(株))と、5μmのフィルター濾過後、紫外線照射した水道水を自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

予備試験として、被験物質を0、500、1000および2000 mg/kgの用量で1群雌雄各3匹のSD系ラットに1回経口投与し、投与後7日間観察した。その結果、1000および2000 mg/kgの用量で雌全例が死亡した。1000および2000 mg/kgの用量の雄では投与日に重度の自発運動の低下がみられた。500 mg/kgの用量では重篤な変化はみられなかった。この結果から、本試験の用量は雌雄ともに2000 mg/kgを最高用量とし、以下公比2で1000および500 mg/kgの3用量を設定した。この他に溶媒のみを投与する対照群を設けた。投与前日より約18時間絶食させたラットに胃ゾンデを装着したシリンジを用いて1回強制経口投与し、投与後約3時間は飼料を与えなかった。投与液量は10 mL/kgとし、投与直前の体重に基づいて算出した。

4. 観察および検査方法

下記の項目を検査した。なお、日の表記は投与日を第1日とした。

1) 一般状態および体重

一般状態の観察は、投与日には15, 30分, 1, 3および6時間の5回、以後は1日1回14日間にわたって行った。生存動物の体重は、投与直前, 第4, 8および15日に測定した。また、死亡動物については発見時に測定した。

2) 病理学検査

観察終了後(第15日)に生存動物をチオペンタール・ナトリウムによる麻酔下で腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後剖検した。また、死亡動物については発見後速やかに剖検した。剖検時に異常のみられた1000 mg/kg群の雄2例および2000 mg/kg群の雄1例、雌2例の胃、2000 mg/kg群の雌1例の十二指腸～直腸、2000 mg/kg群の雄1例の腎臓、副腎および周囲の脂肪織と小腸、腸間膜および周囲の脂肪織、胸部脊椎および周囲の組織を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。また、採材した器官のうち、全例の胃、2000 mg/kg群の雄1例の脂肪織および胸部組織については、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、鏡検した。

5. 半数致死量(LD₅₀値)の算出

観察終了時の死亡率からVan der Waerden法で算出した。

結果

1. 死亡およびLD₅₀値(Table 1)

1000 mg/kg群の雄1例および2000 mg/kg群の雄4例と雌全例が投与後3時間から第2日までに死亡した。LD₅₀値は、雄では1231 mg/kg(95%信頼限界 838~1808 mg/kg)、雌では1414 mg/kgであった。

2. 一般状態

死亡動物では、投与日に投与後15分から症状が発現し、自発運動の低下、歩行失調、呼吸不整、腹臥位、側臥位および体温低下、第2日にはこの他にうずくまり、振戦、歩行異常、流涙がみられた。

生存動物では、投与日に500 mg/kg以上の投与群の雌雄で自発運動の低下、歩行失調、腹臥位、側臥位および体温低下がみられた。第2日以降には、1000 mg/kg群の雄で自発運動の低下および歩行異常が第4日まで、1000 mg/kg群の雌で歩行異常が第3日までみられた。

3. 体重

生存動物では、体重の低値が1000および2000 mg/kg群の雄で第4日にみられたが、以降の体重増加は対照群と同様に推移した。

4. 剖検所見

死亡動物で、腺胃のびらん/潰瘍が1000 mg/kg群の雄1例、2000 mg/kg群の雄1例と雌2例、前胃の充血が2000 mg/kg群の雌雄各1例、空腸の異常内容物(黒色)が

2000 mg/kg群の雌1例、腹腔内の脂肪織の白色化および胸腔の脊椎周囲の出血巣が2000 mg/kg群の雄1例にみられた。

生存動物では、1000 mg/kg群の雄1例に前胃の隆起巣がみられた。

5. 病理組織学所見

死亡動物では、剖検時にびらん/潰瘍および前胃の充血のみられた胃、腹腔内の白色化した脂肪織および胸腔の脊椎周囲の出血巣の検査を行った。その結果、胃では、前胃の重層扁平上皮の過形成と腺胃の胃腺上皮の変性・脱落が1000 mg/kg群の雄1例に、前胃のびらん巣が2000 mg/kg群の雌雄各1例に、腺胃の壁細胞の空胞化が2000 mg/kg群の雄1例に認められた。また、胸部大動脈周囲脂肪組織の出血が2000 mg/kg群の雄1例でみられた。なお、腹腔内脂肪織の白色化に対応する組織学的変化はみられなかった。

生存動物では、剖検時に前胃の隆起巣がみられた1000 mg/kg群の雄1例の胃を検査した結果、重層扁平上皮の過形成がみられた。

考察

2-tert-ブチルフェノールを雌雄のラットに0, 500, 1000および2000 mg/kgの用量を1回経口投与した結果、1000 mg/kg群の雄1例および2000 mg/kg群の雄4例と雌全例が死亡した。本被験物質のLD₅₀値は、雄では1231 mg/kg(95%信頼限界 838~1808 mg/kg)、雌では1414 mg/kgと結論した。

文献

- 1) 化学工業日報社編, "1994年度版 新化学インデックス," 化学工業日報社, 東京, 1993, p.549.

連絡先

試験責任者: 山下弘太郎
試験担当者: 五十嵐佳代, 土谷 稔, 鈴木美江
(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Kotaro Yamashita (Study director)
Kayo Igarashi, Minoru Tsuchitani,
Yoshie Suzuki
Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety
Institute Ltd.
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-0255, Japan.
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Mortality and LD₅₀ values in rats after single oral administration of 2-tert-butylphenol

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Number of dead animals								Mortality ^{a)}	LD ₅₀ values (95 % confidence limits)			
			Day:	1	2	3	4	5	6	7			8-15		
Male	0	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	1231 mg/kg (838 - 1808 mg/kg)
	500	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1000	5		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1/5	
	2000	5		1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4/5	
Female	0	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	1414 mg/kg
	500	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1000	5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	2000	5		2	3									5/5	

a) number of dead animals/number of animals examined

2-tert-ブチルフェノールのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 2-tert-Butylphenol in Rats

要約

2-tert-ブチルフェノールは、農薬、香料、樹脂を製造する際の原料である¹⁾。今回、2-tert-ブチルフェノールを0, 4, 20, 100および500 mg/kgの用量で雌雄のSD系ラットに28日間反復経口投与し、その毒性和回復性を検討した。

一般状態において、投与期間中に歩行失調が500 mg/kg群の雌雄で、流涎が100および500 mg/kg群の雌雄で、器官重量において、投与期間終了時に肝臓相対重量の高値が500 mg/kg群の雌雄で、それぞれ認められた。これらの変化は、回復期間中あるいは終了時には認められなかった。

この他、体重測定、摂餌量測定、血液学検査、血液生化学検査、尿検査、剖検、病理組織学検査の結果には、被験物質投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。

以上、雌雄いずれも100および500 mg/kg群で被験物質投与に起因すると考えられる変化が認められた。一般状態において100 mg/kg群の雌雄で流涎がみられたことから、本試験条件下における2-tert-ブチルフェノールの無影響量(NOEL)は、雌雄いずれも20 mg/kg/dayと判断した。

方法

1. 被験物質

大日本インキ化学工業(株)(東京)から提供された2-tert-ブチルフェノール(ロット番号C169, 純度99.97%)を室温、窒素封入条件下で保存し使用した。被験物質の安定性は、被験物質提供者より保証する資料を入手し、確認した。被験物質はオリブ油(丸石製薬(株))に溶解調製し、窒素封入した。投与液の調製は週1回行い、投与に供するまで冷蔵保存した。投与液中の被験物質の冷蔵保存条件下での8日間の安定性は、投与開始前に0.4から200 mg/mLの範囲で確認した。また、初回調製時に各用量群の投与液を分析し、被験物質の濃度が設定濃度±10%以内であることを確認した。

2. 試験動物および動物飼育

日本チャールス・リバー(株)からCrj:CD(SD)IGSラット(SPF)を入手し、7日間検疫・馴化した。投与開始前日に、体重層別化無作為抽出法によって各群の体重がほぼ均一となるように群分けした。1群の動物数は、雌雄

各6匹とし、対照群、100および500 mg/kg群については雌雄各6匹の回復群(回復期間14日間)を設けた。投与開始時の週齢は5週齢、体重範囲は雄が154~185 g、雌が134~154 gであった。

検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通して、温度22±2℃、相対湿度55±15%、換気約12回/時(オールフレッシュエアー供給)、照明12時間/日(7:00~19:00)に自動調節した飼育室を使用した。動物を実験動物用床敷(ベータチップ、日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに群分け前はケージあたり5匹(同性)、群分け以降はケージあたり2匹(同性)収容し、飼育した。動物には、実験動物用固型飼料(MF、オリエンタル酵母工業(株))と、5μmのフィルター濾過後、紫外線照射した水道水を自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

予備試験として被験物質を500, 1000および2000 mg/kgの用量で単回経口投与した結果、1000および2000 mg/kgの雌全例が死亡し、両群の雄で重度の自発運動の低下が認められた。さらに0, 100, 300および500 mg/kgの用量をSD系ラットに12日間反復経口投与した結果、歩行失調が500 mg/kg群の雌雄および300 mg/kg群の雌、肝臓の絶対・相対重量の高値が500 mg/kg群の雄、肝臓および腎臓の相対重量の高値が500 mg/kg群の雌で認められた。これらの予備試験の結果から、本試験の高用量は500 mg/kgとし、以下公比5で100, 20および4 mg/kgの計4用量群を設定した。さらに溶媒(オリブ油)のみを投与する対照群を設けた。

投与期間は28日間とし、胃ゾンデを装着したシリンジを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与液量は10 mL/kgとし、至近日に測定した体重に基づいて算出した。

4. 観察および検査方法

下記の項目を検査した。なお、日と週の表記は投与開始日を第1日、第1~7日を第1週とした。また、第29日以降を回復期間とした。

1) 一般状態、体重および摂餌量

全例について一般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は投与開始日およびその後毎週1回測定した。摂餌量については各期間毎の1匹あたりの1日平均摂取量を算出した。

2) 血液学検査

第29日(最終投与日の翌日)および第43日(回復期間終了後)に全例を非絶食条件下で、チオペンタールナトリウムによる麻酔下で後大静脈より採血し、赤血球数(シースフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度(SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)、血小板数(シースフローDCインピーダンス検出法)、白血球数(RF/DCインピーダンス検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500, シスメックス(株))で、網赤血球率(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網赤血球測定装置(R-2000, シスメックス(株))で、プロトロンビン時間(PT; Quick一段法)および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)を血液凝固自動測定装置(KC 10A, アメルング社)で、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A, オムロン(株))で、それぞれ測定した。また、検査の結果から平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球血色素量(MCH), 平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。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の測定には凝固阻止剤として3.2%クエン酸三ナトリウム水溶液を使用し、遠心分離して得られた血漿を用いた。その他の項目の測定には、凝固阻止剤EDTA-2Kで処理した血液を用いた。

3) 血液生化学検査

第29日(最終投与日の翌日)および第43日(回復期間終了後)に採取した血液の一部を室温で約30分間静置後3000 rpmで10分間遠心分離し、得られた血清を用いて、ASAT(GOT; JSCC改良法), ALAT(GPT; JSCC改良法), γ GT(SSCC改良法), ALP(JSCC改良法), 総ビリルビン(BOD法), 尿素窒素(Urease-GLDH法), クレアチニン(Jaffé法), グルコース(GlcK-G6PDH法), 総コレステロール(CES-CO-POD法), トリグリセライド(LPL-GK-G3PO-POD法), 総蛋白(Biuret法), アルブミン(BCG法), カルシウム(OCPC法), 無機リン(PNP-XOD-POD法), ナトリウム, カリウム, クロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(日立736-10形; (株)日立製作所)により測定した。また、検査の結果からA/G比を算出した。

4) 尿検査

各群雌雄6匹の新鮮尿を第23日(投与期間最終週)に採取して、pH, 蛋白, グルコース, ケトン体, ビリルビン, 潜血, ウロビリノーゲン(試験紙法; マルティステイクス, バイエル・三共(株))を尿分析装置(クリニテック100, バイエル・三共(株))で測定した。

5) 病理学検査

第29日(最終投与日の翌日)および第43日(回復期間終了後)に全例について、採血後、腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後剖検した。全例の脳, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 副腎, 胸腺, 脾臓, 精巣, 卵巣, 子宮, 精巣上体, 下垂体, 甲状腺の重量を測定した。全例の脳, 脊

髄, 下垂体, 眼球およびハーダー腺, リンパ節(下顎・腸間膜), 胸腺, 気管, 肺および気管支, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 膵臓, 甲状腺および上皮小体, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 精巣, 精巣上体, 精囊, 前立腺腹葉, 卵巣, 子宮, 大腿骨および骨髄, 大腿筋および坐骨神経を採取し, 眼球とハーダー腺はダビドソン液で, 精巣および精巣上体はブアン液で, それ以外の器官・組織は10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し, 保存した。

投与期間終了時に採取した対照群と500 mg/kg群の雌雄全例の胸腺, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 精巣上体, 精囊, 卵巣, 脳, 脊髄(頸部, 胸部, 腰部), 坐骨神経, 大腿筋ならびに対照群を含む全動物の肉眼的異常部位は常法に従ってヘマトキシリン・エオジン(H.E)染色標本を作製し, 鏡検した。

5. 統計解析

計量データは, Bartlett法で等分散の検定を行い, 分散が等しい場合は一元配置分散分析, 分散が等しくない場合はKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合はDunnett法またはDunnett型の多重比較検定を行った。尿検査データおよび病理組織所見は, $a \times b$ の χ^2 検定を行い, 有意差が認められた場合はArmitageの χ^2 検定で対照群と各用量群を比較した。有意水準は5%とした。

結果

1. 一般状態

被験物質投与に起因する変化として, 歩行失調, 自発運動の低下, 流涎が認められた。歩行失調は投与期間中に500 mg/kg群で雄9例, 雌全例に散発的に認められた。本変化は第1日からみられ, 投与後に発現し, 投与後5時間以内に消失した。自発運動の低下は500 mg/kg群の雌2例に1度または散発的に認められた。本変化は投与後に発現し, 発現翌日の投与前までに消失した。流涎が100 mg/kg群の雄6例, 雌2例, 500 mg/kg群の雄全例, 雌11例にみられた。本変化は100 mg/kg群の雄で第13日, 雌で第14日, 500 mg/kg群の雌雄で第7日以降の投与後30分以内にみられる一過性の変化であった。また, 500 mg/kg群の雌1例では投与前の流涎がみられた。これらの変化は回復期間中にはみられなかった。

2. 体重(Fig. 1)

いずれの被験物質投与群においても, 対照群と同様に推移した。

3. 摂餌量(Fig. 2)

被験物質投与に起因すると思われる変化は認められなかった。

回復期間中の第36日に100および500 mg/kg群の雄で低値がみられたが, 投与期間中および回復終了時にみられない軽微な変化であり, 被験物質投与とは関連のない

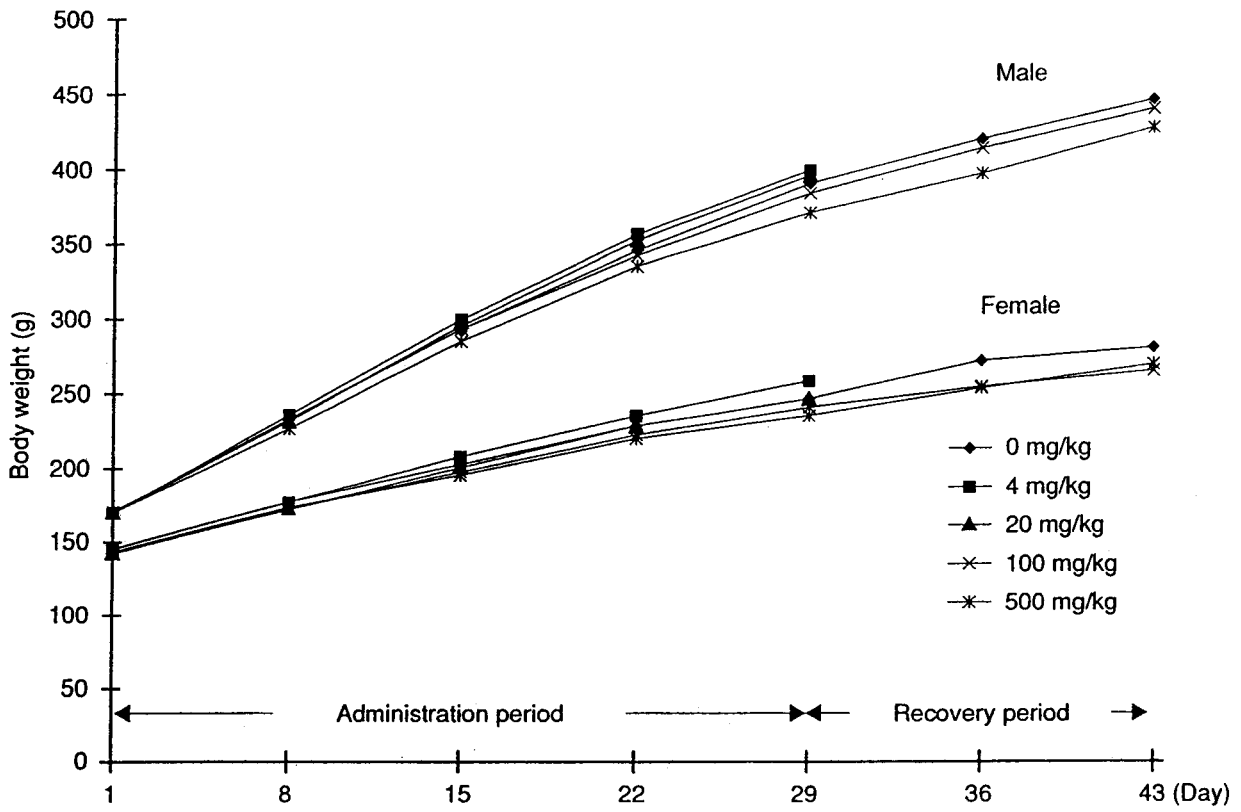


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with 2-tert-butylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

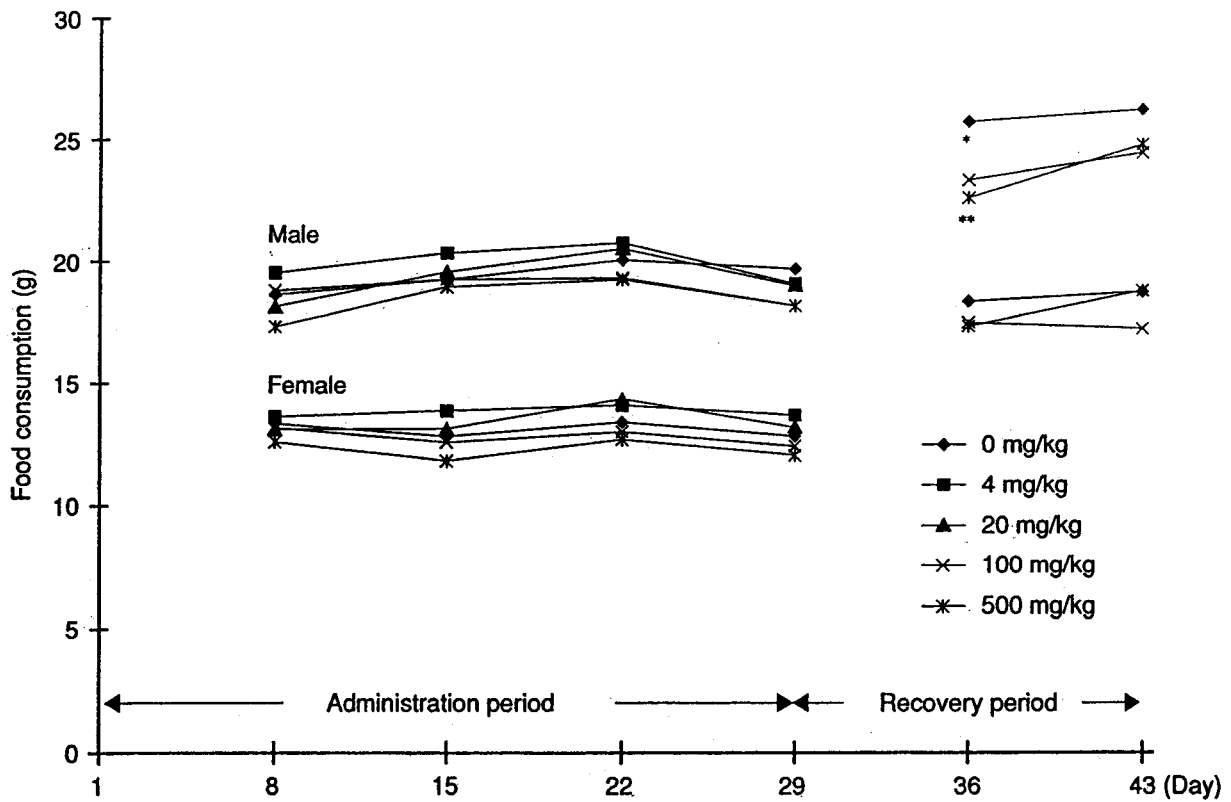


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with 2-tert-butylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

変化と判断した。

4. 血液学検査 (Table 1)

投与期間終了時および回復期間終了時の検査で、被験物質投与に起因すると思われる変化は認められなかった。

回復期間終了時に500 mg/kg群の雄で白血球数の高値がみられたが、軽微な変化であり、投与期間終了時にはみられないことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

5. 血液生化学検査 (Table 2)

投与期間終了時および回復期間終了時の検査で、被験物質投与に起因すると思われる変化は認められなかった。

ALPの低値が投与期間終了時に4, 100, 500 mg/kg群の雄で、回復期間終了時に500 mg/kg群の雄で認められた。しかし、いずれも軽微な変化であり、正常範囲内の変動であることから、被験物質投与と関連のない変化と判断した。

6. 尿検査 (Table 3)

投与期間最終週の検査で、変化は認められなかった。

7. 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時に肝臓相対重量の高値が500 mg/kg群の雌雄で認められた。回復期間終了時には、本変化はみられなかった。

投与期間終了時に胸腺相対重量の低値が4および500 mg/kg群の雌でみられたが、いずれも軽微な変化であり、絶対重量には有意な差はみられないこと、正常範囲内の変動であることから、被験物質投与と関連のない変化と判断した。

8. 剖検所見

投与期間終了時の検査で被験物質投与に起因すると思われる変化は認められなかった。

投与期間終了時および回復期間終了時に被験物質投与群で胸腺の頸部残留、腎臓ののう胞、肺の褐色斑、子宮の膨満、甲状腺の小型が散発的に認められた。これらはいずれもラットで認められる偶発病変であり、その発現に用量との関連がないことから被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

9. 病理組織学所見 (Table 5)

投与期間終了時の解剖動物の500 mg/kg群の雌雄に被験物質投与に起因すると思われる変化は認められなかった。

被験物質投与群で心臓の炎症性細胞浸潤巣、肝臓の門脈周囲性の肝細胞脂肪化、小肉芽腫および壊死巣、腎臓の好塩基性尿細管、のう胞、線維化巣、近位尿細管上皮の硝子滴および乳頭部の鉍質沈着、精巣上体の炎症性細胞浸潤巣、肺の炎症性細胞浸潤巣、子宮腔の拡張が認め

られたが、いずれもラットを用いた毒性試験でしばしば自然発生性に認められる変化であり、その発現に用量との関連がないことから、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

考察

2-tert-ブチルフェノールを0, 4, 20, 100および500 mg/kgの用量で雌雄のSD系ラットに28日間反復経口投与し、その毒性と回復性を検討した。

一般状態において、投与期間中に歩行失調が500 mg/kg群の雌雄、流涎が100および500 mg/kg群の雌雄に認められた。歩行失調は投与後5時間以内にみられる一過性の変化であった。類似化合物であるフェノールでは、吸入暴露によりラットに一過性の協調運動失調を起こすことが報告されている²⁾。また、有機溶剤の大量投与では、一過性の中樞神経障害により協調運動失調が起こることが知られている³⁾。病理組織学的検査では、歩行失調に関連すると思われる変化は認められなかった。流涎は、主に投与後短時間に発現する一過性の変化であり、被験物質の直接的な刺激による可能性が考えられるが、500 mg/kg群では歩行失調と併せてみられることから、中樞神経障害に起因する可能性も否定できない。この他に投与期間中に500 mg/kg群の雌で自発運動の低下が散見された。これらの症状は回復期間中にはみられなかった。

器官重量測定において、投与期間終了時に肝臓相対重量の高値が500 mg/kg群の雌雄で認められた。しかし、肝臓の絶対重量には有意な変化はなく、病理組織学的にも相対重量の変動に関連する変化は認められなかった。回復期間終了時には、本変化はみられなかった。

体重測定、摂餌量測定、血液学検査、血液生化学検査、尿検査、剖検、病理組織学検査の結果には、被験物質投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

以上、雌雄いずれも100および500 mg/kg群で被験物質投与に起因すると思われる変化が認められた。一般状態において100 mg/kg群の雌雄で流涎がみられたことから、本試験条件下における2-tert-ブチルフェノールの無影響量(NOEL)は、雌雄いずれも20 mg/kg/dayと判断した。

文献

- 1) 化学工業日報社編, “1994年度版 新化学インデックス,” 化学工業日報社, 東京, p.549.
- 2) C. W. Flickinger, *American Industrial Hygiene Association Journal*, **37**, 596 (1976).
- 3) L. S. Andrews, R. Sunder, “トキシコロジー,” eds. by C. D. Klaassen, M. O. Amdur, J. Doull, 3, 同文書院, 東京, 1988, pp.659-692.

連絡先

試験責任者：山下弘太郎

試験担当者：伊勢記代子，涌生ゆみ，豊田直人，
鈴木美江

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Kotaro Yamashita (Study director)

Kiyoko Ise, Yumi Wako, Naoto Toyota,

Yoshie Suzuki

Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety
Institute Ltd.

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-0255, Japan.

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Hematology of rats treated orally with 2-tert-butylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Sex	Administration period					Recovery period			
	Dose level (mg/kg)	0	4	20	100	500	0	100	500
Male									
Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
RBC($\times 10^4/\mu\text{L}$)	749.8 \pm 34.4	727.5 \pm 26.7	735.3 \pm 30.3	732.2 \pm 15.0	755.0 \pm 27.0	789.5 \pm 27.5	784.7 \pm 19.1	801.2 \pm 41.7	
Hemoglobin(g/dL)	14.50 \pm 0.40	14.70 \pm 0.51	14.38 \pm 0.64	14.72 \pm 0.33	14.85 \pm 0.35	14.85 \pm 0.52	14.95 \pm 0.38	15.05 \pm 0.23	
Hematocrit (%)	41.97 \pm 0.98	41.95 \pm 1.24	41.77 \pm 1.24	42.52 \pm 1.39	43.32 \pm 1.65	41.97 \pm 1.63	42.30 \pm 0.82	42.23 \pm 0.80	
MCV (fL)	56.02 \pm 1.72	57.70 \pm 2.02	56.85 \pm 2.15	58.05 \pm 1.07	57.38 \pm 1.85	53.18 \pm 1.28	53.93 \pm 1.14	52.78 \pm 2.17	
MCH (pg)	19.38 \pm 0.61	20.23 \pm 0.74	19.57 \pm 0.86	20.10 \pm 0.11	19.67 \pm 0.57	18.82 \pm 0.55	19.05 \pm 0.54	18.82 \pm 0.81	
MCHC (%)	34.55 \pm 0.45	35.03 \pm 0.73	34.42 \pm 0.52	34.63 \pm 0.52	34.32 \pm 0.68	35.40 \pm 0.54	35.35 \pm 0.48	35.62 \pm 0.28	
Reticulocyte(%)	30.92 \pm 4.15	30.97 \pm 3.46	30.17 \pm 4.28	28.70 \pm 3.41	31.23 \pm 2.08	24.42 \pm 2.39	25.10 \pm 1.81	25.07 \pm 4.61	
Platelet($\times 10^3/\mu\text{L}$)	94.87 \pm 8.62	88.67 \pm 6.55	94.57 \pm 10.00	90.17 \pm 18.19	88.75 \pm 5.19	92.92 \pm 7.71	93.08 \pm 11.59	91.80 \pm 11.00	
PT(sec)	13.58 \pm 0.21	13.65 \pm 0.45	13.13 \pm 0.26	13.27 \pm 0.30	13.28 \pm 0.29	14.32 \pm 0.42	14.62 \pm 0.43	14.32 \pm 0.22	
APTT(sec)	16.10 \pm 1.04	15.85 \pm 1.18	16.23 \pm 0.58	15.30 \pm 1.98	16.32 \pm 1.77	17.00 \pm 0.89	16.87 \pm 1.26	16.93 \pm 0.99	
WBC($\times 10^3/\mu\text{L}$)	108.18 \pm 21.35	119.88 \pm 34.28	97.73 \pm 20.91	99.72 \pm 19.94	116.25 \pm 20.30	102.17 \pm 12.82	101.43 \pm 8.46	124.02 \pm 13.87*	
Differential leukocyte counts(%)									
Lymphocytes	84.8 \pm 6.0	86.3 \pm 6.3	87.8 \pm 4.0	88.7 \pm 4.5	86.2 \pm 4.2	85.3 \pm 4.6	85.2 \pm 4.4	87.5 \pm 3.7	
Neutrophils									
Segmented	9.7 \pm 5.3	8.7 \pm 5.1	7.5 \pm 3.0	6.7 \pm 3.4	8.5 \pm 3.2	8.0 \pm 3.2	9.5 \pm 4.0	7.8 \pm 3.4	
Band	0.0 \pm 0.0	0.3 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5	0.2 \pm 0.4	0.3 \pm 0.5	0.5 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5	0.2 \pm 0.4	
Eosinophils	0.3 \pm 0.5	0.5 \pm 1.2	0.3 \pm 0.5	0.5 \pm 0.5	0.3 \pm 0.5	1.3 \pm 1.0	1.2 \pm 0.8	0.7 \pm 0.8	
Basophils	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	
Monocytes	5.2 \pm 2.3	4.2 \pm 4.1	4.0 \pm 1.8	4.0 \pm 1.9	4.7 \pm 2.9	4.8 \pm 3.0	3.8 \pm 1.9	3.8 \pm 2.2	
Female									
Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
RBC($\times 10^4/\mu\text{L}$)	710.0 \pm 24.7	687.3 \pm 17.7	737.0 \pm 30.6	719.7 \pm 22.6	720.8 \pm 8.8	727.5 \pm 56.5	751.8 \pm 39.6	760.7 \pm 12.8	
Hemoglobin(g/dL)	14.30 \pm 0.68	14.08 \pm 0.45	14.83 \pm 0.48	14.55 \pm 0.16	14.20 \pm 0.31	14.23 \pm 1.14	14.80 \pm 0.96	14.83 \pm 0.30	
Hematocrit (%)	40.40 \pm 1.42	40.02 \pm 1.06	41.70 \pm 1.59	40.92 \pm 0.75	40.42 \pm 1.34	39.15 \pm 2.96	41.27 \pm 2.55	41.77 \pm 0.78	
MCV (fL)	56.93 \pm 1.45	58.23 \pm 1.45	56.58 \pm 1.01	56.90 \pm 1.00	56.07 \pm 2.15	53.83 \pm 1.26	54.90 \pm 2.37	54.90 \pm 0.74	
MCH (pg)	20.13 \pm 0.94	20.48 \pm 0.57	20.12 \pm 0.50	20.23 \pm 0.50	19.68 \pm 0.53	19.57 \pm 0.56	19.72 \pm 0.97	19.52 \pm 0.35	
MCHC (%)	35.40 \pm 0.85	35.20 \pm 0.32	35.60 \pm 0.64	35.60 \pm 0.44	35.15 \pm 0.48	36.33 \pm 0.43	35.87 \pm 0.46	35.52 \pm 0.70	
Reticulocyte(%)	24.10 \pm 2.10	26.37 \pm 3.70	21.40 \pm 1.65	24.98 \pm 1.81	24.65 \pm 4.78	24.02 \pm 8.95	22.20 \pm 3.54	29.78 \pm 6.62	
Platelet($\times 10^3/\mu\text{L}$)	87.27 \pm 10.11	84.45 \pm 9.46	82.60 \pm 4.73	88.33 \pm 9.14	91.28 \pm 13.28	80.62 \pm 17.41	77.03 \pm 8.13	84.95 \pm 7.41	
PT(sec)	14.18 \pm 0.34	14.12 \pm 0.48	13.85 \pm 0.65	13.93 \pm 0.69	13.77 \pm 0.61	15.18 \pm 0.72	14.68 \pm 1.05	14.83 \pm 0.39	
APTT(sec)	13.95 \pm 1.03	13.87 \pm 1.64	12.62 \pm 0.56	13.77 \pm 1.05	14.28 \pm 0.52	14.87 \pm 1.10	14.43 \pm 2.09	13.32 \pm 1.46	
WBC($\times 10^3/\mu\text{L}$)	84.30 \pm 22.91	77.23 \pm 13.45	75.02 \pm 4.33	72.82 \pm 9.93	78.90 \pm 5.55	83.28 \pm 25.86	104.20 \pm 11.67	91.72 \pm 15.45	
Differential leukocyte counts(%)									
Lymphocytes	88.0 \pm 3.3	85.8 \pm 4.3	89.3 \pm 3.9	83.8 \pm 7.3	86.5 \pm 3.1	84.3 \pm 6.3	87.0 \pm 4.7	85.2 \pm 3.9	
Neutrophils									
Segmented	7.7 \pm 3.2	6.3 \pm 2.3	6.0 \pm 3.0	10.5 \pm 7.3	8.5 \pm 2.2	8.5 \pm 6.4	5.5 \pm 3.4	8.3 \pm 3.4	
Band	0.2 \pm 0.4	0.5 \pm 0.8	0.2 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	0.8 \pm 1.0	0.0 \pm 0.0	0.2 \pm 0.4	0.2 \pm 0.4	
Eosinophils	0.8 \pm 1.2	1.8 \pm 1.8	0.5 \pm 0.8	0.7 \pm 0.5	1.2 \pm 1.5	0.7 \pm 1.2	1.5 \pm 1.0	1.0 \pm 0.6	
Basophils	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	
Monocytes	3.3 \pm 1.8	5.5 \pm 2.7	4.0 \pm 3.2	5.0 \pm 1.8	3.0 \pm 2.4	6.5 \pm 2.9	5.8 \pm 2.3	5.3 \pm 3.7	

Values are expressed as Mean \pm S.D.Significantly different from 0 mg/kg group; * p <0.05

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with 2-tert-butylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Sex	Administration period					Recovery period			
	Dose level (mg/kg)	0	4	20	100	500	0	100	500
Male									
Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
GOT (U/L)	83.3±12.6	71.2±7.9	74.5±5.0	67.0±15.3	68.8±8.3	91.5±13.1	91.0±8.9	80.0±11.1	
GPT (U/L)	42.3±10.1	40.7±5.4	42.0±6.6	33.5±1.5	38.7±4.3	35.2±4.6	32.5±4.4	31.0±4.2	
γ-GT (U/L)	0.2±0.4	0.3±0.5	0.2±0.4	0.3±0.8	0.3±0.5	0.2±0.4	0.0±0.0	0.2±0.4	
ALP (U/L)	1151.7±273.9	887.2±150.4*	936.8±116.2	763.5±157.0**	813.7±111.4**	704.8±54.9	738.8±85.8	560.7±75.6**	
Total bilirubin (mg/dL)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.02±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	
Urea nitrogen (mg/dL)	12.13±1.66	12.35±2.45	12.97±2.14	13.23±2.63	12.65±1.36	16.40±2.37	16.33±3.07	17.27±1.80	
Creatinine (mg/dL)	0.40±0.00	0.40±0.00	0.40±0.00	0.38±0.08	0.38±0.04	0.45±0.05	0.45±0.05	0.45±0.05	
Glucose (mg/dL)	151.3±13.7	151.8±7.4	145.3±8.1	150.2±13.2	152.5±8.7	146.3±11.0	141.0±3.5	139.3±9.7	
Total chol. (mg/dL)	66.0±8.3	65.7±9.0	62.7±5.9	71.8±8.5	73.0±6.0	57.3±5.7	62.8±6.8	66.3±9.1	
Triglyceride (mg/dL)	104.0±76.8	81.2±34.7	60.3±18.5	89.7±36.9	71.2±37.5	114.8±43.3	98.8±33.5	104.8±48.4	
Total protein (g/dL)	6.42±0.21	6.53±0.20	6.53±0.20	6.58±0.32	6.67±0.23	6.75±0.45	6.78±0.26	6.87±0.42	
Albumin (g/dL)	3.33±0.08	3.38±0.04	3.35±0.08	3.35±0.10	3.42±0.12	3.38±0.08	3.38±0.12	3.38±0.15	
A/G ratio	1.083±0.038	1.075±0.060	1.055±0.045	1.040±0.057	1.052±0.052	1.015±0.103	0.995±0.067	0.975±0.059	
Calcium (mg/dL)	9.45±0.19	9.55±0.33	9.48±0.31	9.53±0.29	9.57±0.34	9.95±0.49	9.97±0.21	9.98±0.46	
Inorganic phos. (mg/dL)	8.52±0.17	8.33±0.71	8.67±0.62	8.23±0.49	8.22±0.39	8.75±0.33	8.37±0.27	8.50±0.37	
Na (mmol/L)	143.7±1.4	143.0±1.3	143.8±1.0	143.8±0.4	143.3±0.5	143.5±0.5	143.2±0.8	143.8±1.2	
K (mmol/L)	4.48±0.19	4.43±0.22	4.45±0.24	4.32±0.17	4.43±0.12	4.47±0.19	4.57±0.21	4.47±0.25	
Cl (mmol/L)	99.5±1.0	98.8±1.0	99.0±0.9	99.2±1.5	98.2±1.2	98.8±1.5	99.2±1.0	100.0±1.3	
Female									
Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
GOT (U/L)	66.8±7.4	67.8±7.7	74.7±19.4	67.5±10.3	74.8±19.1	72.2±12.9	70.0±8.9	70.5±11.4	
GPT (U/L)	24.8±3.9	26.3±5.3	25.7±5.0	23.8±3.3	22.5±3.2	28.3±2.3	27.2±4.8	27.7±4.4	
γ-GT (U/L)	0.0±0.0	0.2±0.4	0.2±0.4	0.2±0.4	0.2±0.4	0.0±0.0	0.2±0.4	0.3±0.5	
ALP (U/L)	512.3±180.8	551.5±170.5	487.8±134.2	530.5±110.9	396.0±100.0	316.3±97.6	325.3±37.3	394.0±170.3	
Total bilirubin (mg/dL)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.02±0.04	0.00±0.00	0.00±0.00	
Urea nitrogen (mg/dL)	13.85±1.39	14.02±1.80	12.65±2.65	14.23±3.34	12.83±1.75	17.20±2.29	17.73±2.28	17.55±1.31	
Creatinine (mg/dL)	0.48±0.04	0.47±0.05	0.47±0.05	0.45±0.05	0.45±0.08	0.53±0.05	0.53±0.05	0.55±0.05	
Glucose (mg/dL)	151.2±6.0	162.5±11.9	162.0±13.5	160.7±6.6	155.5±11.9	148.0±5.9	147.8±10.6	149.5±9.4	
Total chol. (mg/dL)	64.2±6.5	61.0±8.1	62.3±10.8	70.0±7.5	76.0±8.3	83.2±12.9	75.5±9.6	78.5±8.9	
Triglyceride (mg/dL)	16.0±5.8	15.0±7.3	32.0±25.3	21.3±11.2	24.7±10.2	51.0±50.2	31.2±14.2	52.3±48.1	
Total protein (g/dL)	6.67±0.25	6.53±0.16	6.53±0.30	6.72±0.22	6.68±0.42	7.07±0.58	7.15±0.28	7.02±0.26	
Albumin (g/dL)	3.48±0.15	3.42±0.10	3.47±0.12	3.52±0.08	3.58±0.19	3.53±0.29	3.58±0.10	3.52±0.08	
A/G ratio	1.093±0.043	1.098±0.050	1.133±0.066	1.102±0.048	1.158±0.056	1.000±0.027	1.007±0.053	1.008±0.066	
Calcium (mg/dL)	9.12±0.19	9.07±0.12	9.27±0.16	9.12±0.16	9.12±0.29	9.88±0.17	9.85±0.30	9.82±0.38	
Inorganic phos. (mg/dL)	7.63±0.29	7.52±0.26	7.63±0.41	7.45±0.39	7.17±0.22	7.43±0.55	7.88±0.38	7.37±0.32	
Na (mmol/L)	142.8±0.8	142.3±1.0	142.5±1.0	142.5±1.0	141.7±0.8	143.0±1.3	143.0±1.3	142.0±1.1	
K (mmol/L)	4.05±0.31	4.05±0.29	4.17±0.16	3.92±0.21	4.05±0.22	4.07±0.33	4.03±0.26	4.07±0.10	
Cl (mmol/L)	101.2±1.0	101.0±1.3	100.2±1.3	99.7±1.2	100.0±1.8	100.5±2.0	100.8±1.5	99.8±2.6	

Values are expressed as Mean±S.D.
Significantly different from 0 mg/kg group; *p<0.05, **p<0.01

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with 2-tert-butylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg)	Sex	Administration period									
		Male					Female				
		0	4	20	100	500	0	4	20	100	500
Number of animals		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
pH	6.0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	6.5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	7.0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
	8.0	2	2	2	2	2	3	2	2	2	1
	8.5	4	4	4	4	4	2	2	4	3	2
	>=9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Protein (mg/dL)	-	0	0	0	0	0	2	2	3	2	1
	+/-	1	0	1	0	0	1	1	0	1	3
	30	2	0	2	0	1	2	2	2	2	1
	100	3	6	3	6	5	1	1	1	1	1
	>=300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucose (g/dL)	-	6	6	6	5	6	6	5	5	6	6
	0.1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	>=1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketones (mg/dL)	-	0	0	1	0	0	3	2	3	3	1
	5	3	1	3	3	5	3	3	3	2	4
	15	2	5	2	3	1	0	1	0	1	1
	40	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	>=80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bilirubin	-	5	3	6	5	4	6	6	6	6	6
	1+	1	3	0	1	2	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Occult blood	-	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Urobilinogen (EU/dL)	0.1	4	5	6	6	6	6	6	6	5	4
	1	2	1	0	0	0	0	0	0	1	2

Grade; -:negative, +/-:trace, 1+:slight, 2+:moderate, 3+:severe

Table 4 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 2-*tert*-butylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Sex	Administration period					Recovery period			
	Dose level (mg/kg)	0	4	20	100	500	0	100	500
Male									
Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Final body weight (g)	395.2±39.1	397.7±30.8	393.7±23.5	386.2±22.8	373.0±33.1	444.0±32.1	437.7±22.1	425.2±17.6	
Absolute organ weight									
Brain (g)	2.088±0.060	2.048±0.095	2.105±0.062	2.070±0.085	2.042±0.062	2.138±0.072	2.147±0.064	2.097±0.053	
Pituitary (mg)	16.15±1.69	15.82±1.19	16.23±1.63	14.58±1.08	14.50±2.03	15.82±1.48	16.27±1.32	15.95±0.81	
Thyroids (mg)	34.40±7.93	31.70±6.86	30.80±4.69	32.57±5.12	28.98±2.42	33.42±3.21	37.08±5.69	31.07±4.11	
Thymus (mg)	558.3±82.2	607.0±129.2	609.2±93.6	624.2±69.7	543.7±96.0	509.5±131.6	517.0±122.7	529.5±77.5	
Lungs (g)	1.428±0.094	1.497±0.127	1.468±0.083	1.467±0.091	1.420±0.119	1.462±0.063	1.507±0.065	1.427±0.037	
Heart (g)	1.300±0.092	1.315±0.150	1.363±0.073	1.390±0.157	1.330±0.100	1.447±0.182	1.432±0.084	1.313±0.082	
Liver (g)	16.315±2.977	16.197±2.243	16.137±1.318	16.565±2.089	18.173±1.797	16.235±1.200	15.877±1.076	14.945±1.073	
Spleen (g)	0.810±0.114	0.832±0.081	0.845±0.125	0.727±0.107	0.750±0.096	0.855±0.076	0.912±0.083	0.783±0.103	
Kidneys (g)	2.735±0.308	2.760±0.352	2.852±0.220	2.850±0.329	2.835±0.155	3.122±0.271	2.965±0.169	2.898±0.165	
Adrenals (mg)	47.45±6.67	53.15±8.21	50.38±5.83	51.75±5.64	45.30±8.26	50.60±8.59	53.93±10.89	49.77±1.60	
Testes (g)	3.048±0.293	3.058±0.220	3.192±0.247	3.063±0.194	3.177±0.123	3.212±0.180	3.285±0.141	3.123±0.130	
Epididymides (g)	0.803±0.050	0.807±0.040	0.783±0.085	0.792±0.065	0.753±0.042	1.118±0.071	1.137±0.054	1.083±0.040	
Relative organ weight									
Brain (%)	0.533±0.044	0.517±0.037	0.537±0.031	0.538±0.039	0.550±0.039	0.480±0.023	0.493±0.024	0.495±0.022	
Pituitary (×10 ⁻³ %)	4.10±0.45	3.98±0.32	4.12±0.39	3.78±0.21	3.88±0.44	3.55±0.21	3.73±0.38	3.78±0.31	
Thyroids (×10 ⁻³ %)	8.72±1.98	7.97±1.47	7.82±0.93	8.50±1.68	7.83±1.14	7.60±1.18	8.47±0.96	7.35±1.18	
Thymus (×10 ⁻³ %)	142.20±23.38	151.78±22.87	154.67±21.33	161.42±12.13	145.07±16.57	114.25±24.82	117.90±25.85	124.77±20.02	
Lungs (%)	0.365±0.026	0.375±0.020	0.373±0.023	0.382±0.013	0.380±0.014	0.332±0.016	0.343±0.015	0.337±0.015	
Heart (%)	0.328±0.023	0.330±0.020	0.345±0.010	0.360±0.022	0.362±0.044	0.327±0.031	0.328±0.031	0.310±0.018	
Liver (%)	4.103±0.349	4.058±0.278	4.100±0.227	4.280±0.365	4.870±0.172**	3.660±0.139	3.628±0.118	3.512±0.156	
Spleen (%)	0.205±0.015	0.210±0.011	0.215±0.033	0.187±0.023	0.202±0.028	0.193±0.016	0.208±0.020	0.183±0.026	
Kidneys (%)	0.692±0.035	0.692±0.043	0.725±0.062	0.740±0.064	0.765±0.071	0.705±0.052	0.678±0.024	0.682±0.034	
Adrenals (×10 ⁻³ %)	12.03±1.27	13.40±2.26	12.80±1.24	13.43±1.80	12.13±1.84	11.38±1.63	12.33±2.52	11.72±0.35	
Testes (%)	0.777±0.109	0.773±0.092	0.810±0.026	0.793±0.044	0.858±0.085	0.725±0.055	0.753±0.059	0.735±0.052	
Epididymides (g)	0.207±0.031	0.203±0.020	0.198±0.013	0.207±0.023	0.203±0.027	0.253±0.019	0.258±0.015	0.255±0.019	

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; **p*<0.05, ***p*<0.01

Table 4 (continued)

Sex	Administration period					Recovery period			
	Dose level (mg/kg)	0	4	20	100	500	0	100	500
Female									
Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Final body weight (g)	242.0±10.3	257.8±21.4	246.0±21.1	243.0±22.7	231.7±9.2	279.8±27.0	264.5±17.2	268.7±31.4	
Absolute organ weight									
Brain (g)	1.913±0.059	1.882±0.079	1.918±0.064	1.907±0.059	1.943±0.074	1.970±0.106	1.937±0.094	1.930±0.026	
Pituitary (mg)	16.35±1.56	18.13±1.58	16.72±2.48	17.13±2.77	16.37±0.85	18.47±3.15	18.92±2.45	20.27±1.66	
Thyroids (mg)	23.67±3.71	23.35±5.20	26.15±3.24	24.98±3.67	25.03±3.97	26.30±3.25	26.13±2.91	24.50±4.26	
Thymus (mg)	586.3±161.7	464.8±39.8	517.3±65.9	534.7±95.7	423.0±59.6	427.0±93.9	481.3±100.3	449.2±55.9	
Lungs (g)	1.078±0.081	1.078±0.121	1.090±0.094	1.083±0.099	1.097±0.072	1.188±0.072	1.145±0.075	1.135±0.077	
Heart (g)	0.860±0.127	0.892±0.100	0.888±0.040	0.838±0.073	0.813±0.072	0.958±0.097	0.898±0.066	0.943±0.056	
Liver (g)	8.863±0.633	9.450±1.121	9.080±1.176	9.062±0.818	9.993±0.726	9.980±1.217	8.830±0.835	9.658±1.347	
Spleen (g)	0.525±0.076	0.543±0.083	0.528±0.055	0.502±0.065	0.548±0.057	0.812±0.531	0.623±0.108	0.605±0.080	
Kidneys (g)	1.648±0.092	1.733±0.062	1.698±0.121	1.722±0.173	1.738±0.099	1.822±0.131	1.768±0.087	1.867±0.117	
Adrenals (mg)	64.10±8.21	66.93±9.72	63.77±6.33	59.32±7.86	54.83±5.97	62.93±8.35	66.10±6.61	65.40±10.75	
Ovaries (mg)	86.03±8.66	90.02±11.12	88.68±23.24	85.88±5.81	81.20±8.98	94.00±13.50	82.98±6.36	97.25±13.88	
Uterus (g)	0.662±0.244	0.550±0.299	0.393±0.067	0.480±0.222	0.580±0.198	0.527±0.291	0.423±0.052	0.485±0.144	
Relative organ weight									
Brain (%)	0.790±0.032	0.733±0.059	0.787±0.089	0.790±0.078	0.840±0.042	0.707±0.042	0.735±0.060	0.728±0.081	
Pituitary (×10 ⁻³ %)	6.75±0.72	7.05±0.77	6.82±0.86	7.08±1.06	7.07±0.61	6.65±1.27	7.20±1.14	7.68±1.39	
Thyroids (×10 ⁻³ %)	9.77±1.32	9.03±1.72	10.63±0.55	10.30±1.20	10.83±1.82	9.48±1.57	9.85±0.80	9.22±1.88	
Thymus (×10 ⁻³ %)	240.97±60.69	180.73±15.00*	211.80±32.15	221.07±40.03	182.67±25.18*	153.03±30.49	181.80±35.74	168.22±22.00	
Lungs (%)	0.443±0.025	0.418±0.019	0.443±0.019	0.445±0.018	0.472±0.021	0.427±0.025	0.433±0.036	0.427±0.037	
Heart (%)	0.357±0.048	0.347±0.026	0.362±0.025	0.347±0.023	0.355±0.027	0.345±0.048	0.340±0.017	0.357±0.056	
Liver (%)	3.663±0.217	3.660±0.204	3.683±0.165	3.737±0.227	4.315±0.304**	3.572±0.361	3.337±0.224	3.588±0.103	
Spleen (%)	0.218±0.026	0.212±0.019	0.215±0.023	0.208±0.024	0.238±0.029	0.295±0.209	0.235±0.033	0.225±0.015	
Kidneys (%)	0.682±0.037	0.675±0.034	0.697±0.078	0.708±0.030	0.752±0.049	0.652±0.036	0.670±0.046	0.703±0.094	
Adrenals (×10 ⁻³ %)	26.50±3.09	26.15±4.52	26.02±2.57	24.40±1.82	23.65±1.88	22.53±2.67	25.00±2.11	24.73±5.58	
Ovaries (×10 ⁻³ %)	35.57±3.44	34.97±3.89	35.80±7.23	35.52±3.09	35.02±3.34	33.55±3.21	31.52±3.37	36.42±5.33	
Uterus (%)	0.273±0.096	0.210±0.101	0.160±0.028	0.198±0.095	0.250±0.091	0.192±0.113	0.160±0.021	0.185±0.061	

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; ***p*<0.01

Table 5 Summary of histopathological findings of rats treated orally with 2-tert-butylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period					Recovery period		
			0	4	20	100	500	0	100	500
	Finding	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Male			(Grade)							
	Heart		<6>	<0>	<0>	<0>	<6>	<0>	<0>	<0>
	Inflammatory cell infiltration, focal	1+	2				2			
	Spleen		<6>	<0>	<0>	<0>	<6>	<0>	<0>	<0>
	Increase in hematopoietic cell, erythrocytic	1+	1				0			
	Lung		<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<1>	<0>	<0>
	Inflammatory cell infiltration, focal	1+						1		
	Liver		<6>	<0>	<0>	<0>	<6>	<0>	<0>	<0>
	Microgranuloma	1+	1				0			
	Necrosis, focal	1+	0				1			
	Kidney		<6>	<0>	<1>	<1>	<6>	<0>	<0>	<0>
	Basophilic tubule	1+	2		1	0	2			
	Cyst	1+	3		1	1	1			
	Fibrosis, focal	1+	0		1	0	0			
	Hyaline droplet, tubular epithelium, proximal	1+	5		1	1	5			
	Mineralization, papilla	1+	1		0	0	1			
	Epididymis		<6>	<0>	<0>	<0>	<6>	<0>	<0>	<0>
	Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, focal	1+	1				1			
Female			(Grade)							
	Spleen		<6>	<0>	<0>	<0>	<6>	<1>	<0>	<0>
	Congestion	1+	0				0	1		
	Lung		<1>	<0>	<0>	<0>	<1>	<0>	<0>	<0>
	Foreign body granuloma	1+	1				0			
	Inflammatory cell infiltration, focal	1+	0				1			
	Liver		<6>	<0>	<0>	<0>	<6>	<0>	<0>	<0>
	Fatty change, hepatocyte, periportal	1+	1				1			
	Microgranuloma	1+	1				1			
	Kidney		<6>	<0>	<0>	<0>	<6>	<1>	<0>	<0>
	Basophilic tubule	1+	2				3	0		
	Cyst	1+	2				1	0		
	Mineralization, papilla	1+	0				1	0		
	Dilatation, pelvis	1+	0				0	1		
	Uterus		<3>	<2>	<0>	<1>	<2>	<1>	<0>	<1>
	Dilatation, lumen	1+	3	2		1	2	1		1

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight

2-tert-ブチルフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 2-tert-Butylphenol on Bacteria

要約

2-tert-ブチルフェノールの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

試験は、指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、S9 mix 非存在(直接法)および存在(代謝活性化法)下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験の結果から菌の生育阻害が認められる用量を最高用量とし、直接法および代謝活性化法ともに6.25~200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲(公比2)で設定した。

試験を2回行った結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害については、直接法の場合、*S. typhimurium* では100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で、WP2 *uvrA* では200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で認められ、代謝活性化法の場合は、TA100 および TA1535 では100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で、TA98, TA1537 および WP2 *uvrA* では200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で認められた。

以上の成績から、2-tert-ブチルフェノールの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

方法

1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および *E. coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を解凍後、その25 μL をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の懸濁菌液は濁度を測定し、濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり 1×10^9 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、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。

2. 被験物質

2-tert-ブチルフェノール(ロット番号C169, 大日本イソキ化学工業(株)(東京)提供)は、無色透明の液体で、水に難溶、ジメチルスルホキシド(DMSO)、アルコールおよびアセトンに易溶であり、純度99.97%(不純物として、フェノール0.03%を含む)の物質である。被験物質は、冷暗所(4℃)で密栓(窒素充填)保管した。

実験終了後、残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

3. 被験物質供試液の調製

溶媒にDMSO(和光純薬工業(株))を用い、被験物質を溶解して最高用量の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。供試液は、用時調製した。

4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

AF-2 : 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))

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

NaN₃ : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9-AA : 9-アミノアクリジン(Aldrich Chemical Co.)

AF-2 および 2-AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に、NaN₃ および 9-AA は蒸留水(株)大塚製薬工場)に溶解した。

5. 培地

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディアAN培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。培地1 Lあたりの組成は下記のとおりであり、径90 mmのシャーレ1枚あたりに30 mLを分注したものである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	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
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

2) アミノ酸添加軟寒天培地(トップアガー)

0.6 w/v% 寒天粉末(Difco Laboratories) および 0.5 w/v% 塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、