

## 4-エチルビフェニ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 4-Ethylbiphenyl in Rats

#### 要約

4-エチルビフェニルの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系ラットを用いて実施した。投与量は雌雄とも0(溶媒対照群), 20, 100, 500および1000 mg/kgとし, 20および100 mg/kg投与群は1群5匹, 0, 500および1000 mg/kg投与群は回復試験の動物を含む1群10匹を使用した。

投与期間中に1000 mg/kg投与群の雄5例および雌4例が死亡ないし瀕死状態のため切迫屠殺となった。また, 500 mg/kg投与群の雄1例が死亡した。

腎臓に関する所見として, 摂水量および尿量が500 mg/kg以上の投与群で増加した。同群では, 剖検時の検査で血漿中クレアチニン濃度が増加し, 腎臓の変色および腫大, 組織学的に乳頭壊死, 好塩基性尿細管の増加, 尿細管拡張, 蛋白性尿円柱等が観察された。好塩基性尿細管の増加は, 100 mg/kg以上の投与群の皮質でもみられた。その他, 切迫屠殺例では, 血漿中の尿素窒素濃度が増加した。

肝臓に関する所見として, 1000 mg/kg投与群では,  $\gamma$ -GTP, GPTおよびLDH活性の増加がみられ, 肉眼的に肝臓は腫大して暗色調を呈し, 組織学的に肝細胞は肥大してその細胞質は好酸性で顆粒状を呈し, 一部の例で肝臓の限局性壊死がみられた。この肝臓の肉眼的変化は500 mg/kg投与群から, 組織学的変化は, 100 mg/kg投与群から認められた。

消化管に関する所見として, 1000 mg/kg投与群では, 投与初期に黒色便が観察され, 組織学的には, 前胃粘膜上皮の過形成およびびらん, 腺胃のびらんおよび潰瘍等が散見された。この他, 粘膜下織の水腫が一部の例でみられた。黒色便および前胃粘膜の変化は500 mg/kg投与群から, 粘膜下織の水腫および腺胃の所見は100 mg/kg投与群から散見された。100 mg/kg以上の投与群で投与第2日から, 被験物質の刺激性によると推測される一過性の流涎が投与直後に認められた。

血液に関する所見として, 1000 mg/kg投与群で投与初期に皮膚色蒼白が散見され, 500 mg/kg以上の投与群で肝臓のクッパー細胞のヘモジデリン沈着および脾臓のヘモジデリン沈着の増加がみられた。切迫屠殺例では, 赤血球数, 血色素量およびヘマトクリット値が低く, 網状赤血球比率が高い傾向にあり, 剖検時に脾臓の小型化および淡色化が散見された。

この他, 500 mg/kg以上の投与群では体重が低い傾向にあり, 摂餌量も減少した。また, 同群では, 胸腺の萎

縮が認められた。

回復期間終了後, 多くの所見が軽減ないし消失したが, 腎乳頭壊死等は回復傾向が認められなかった。死亡および切迫屠殺例の主な変化は投与期間終了時屠殺例と同様であったが, 腎臓, 胃, 脾臓および胸腺ではより所見が強く, 投与初期の剖検例の肝臓の所見はより軽度であった。

以上のことから, 4-エチルビフェニルの反復投与により, 100 mg/kg以上の用量で, 主として腎臓の尿細管および乳頭が障害され, 1000 mg/kgでは, 重篤な個体は死亡することが明らかとなった。また, 100 mg/kg以上の用量で, 肝臓の代謝酵素を誘導する一方, 1000 mg/kgでは, 肝障害が示唆された。これらの腎臓および肝臓の変化は, 腎乳頭を除き, 投与中止により回復する傾向にあった。また, 被験物質は刺激性を有することが示唆され, これに起因すると考えられる胃を中心とした消化管粘膜の損傷も100 mg/kg以上の用量で生じた。これらのことから, 本試験条件下における4-エチルビフェニルの無影響量は雌雄とも20 mg/kg/dayであると考えられた。

#### 方法

##### 1. 被験物質および投与検体の調製法

被験物質には, 新日鐵化学(株)(東京)より提供された4-エチルビフェニル(ロット番号1-GOH, 純度97.998%)を使用し, 入手後, 試験開始まで室温で保管した。被験物質を用量毎に秤量し, 約40℃(融点34~35.5℃)に加温融解後, コーンオイル(ロット番号:V7R2020, ナカライテスク(株))に溶解して投与検体とし, 投与時まで遮光室温下で保管した。なお, 調製検体中の被験物質の安定性試験および含量試験結果から, 0.2および20 w/v%溶液は, 遮光, 室温保管の場合, 8日間は安定であり, 初回に調製した投与検体中の平均含量は, 所定濃度の99.6~100%であることを確認した。

##### 2. 動物および飼育方法

試験には, 生後4週で購入し, 検疫を兼ねて6日間予備飼育した雌雄のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD, SPF, 日本チャールス・リバー(株))各40匹を使用した。動物は, 温度24~24.5℃, 湿度52~58%, 換気回数約15回/時, 照明12時間(7~19時点灯)に制御した飼育室内で, 金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し, 固型飼料(CE-2, 日本クレア(株))および給水瓶に入れた水道水(秦

野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。

### 3. 群および群分け

本試験における投与量は、先に実施した予備試験の成績を参考にして決定した。即ち、雄では0, 100, 500および1000 mg/kgを、雌では0および1000 mg/kgをそれぞれ1群5匹に7日間連続投与した。その結果、反復投与開始初期の体重減少ないし増加抑制、血小板数の増加、アルカリフォスファターゼ活性の減少、GPT活性の増加、前胃粘膜の白濁および潰瘍、肝臓の暗色化および死亡例における脾臓の退色および小型化等が観察された。また、1000 mg/kgの用量を反復投与することにより死亡する場合があることも明らかとなった。しかし、500 mg/kg投与群では、前述の所見の多くが軽度かあるいは認められなかったため、本試験では、高用量を1000 mg/kgとし、死亡例の発生を想定して中用量に500 mg/kgを設け、以下の用量は公比5で100および20 mg/kgとした。なお、予備試験において、500 mg/kg以上の投与群全例の血漿が黄色調を呈したため、血漿中のビリルビン濃度を測定したが、増加は認められなかった。また、500 mg/kg以上の投与群では、他の群と比較して剖検時の麻酔導入に時間がかかった。

群分けは、検疫期間中に異常がなかった動物を用い、投与開始前日の体重に基づいて体重別層化無作為抽出法により行った。動物数は、雌雄とも0, 500および1000 mg/kg投与群を回復試験を予定した5匹を含め各群10匹とし、20および100 mg/kg投与群を各群5匹としたが、結果にも示したように投与期間中に死亡および切迫屠殺例があったため、回復試験は雌雄の溶媒対照群および雌の中用量2群では各5匹、雄の中用量2群では4匹、雌の高用量群では3匹を、それぞれ動物番号が若い方から選択して行った。生存例が5例となった雄の高用量群は、回復試験を実施しなかった。

### 4. 投与方法

1日1回、28日間、毎日9時～12時の間にラット用胃管を用いて強制経口投与した。投与容量は5 mL/kgとし、投与液量は雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に算出した。なお、回復期間は14日間とした。

### 5. 検査項目

#### 1) 一般検査

毎日(投与期間中は投与前および投与後)全例の一般状態を観察した。また、体重は、投与第1週に投与第1日の投与直前と投与第2および4日、投与第2週以降回復期間終了週までは1週に2回の頻度で測定し、その他、投与期間終了日、回復期間終了日および剖検日、ならびに死亡時および切迫屠殺時にも測定した。摂餌量は、検疫終了日から投与第1日にかけて投与開始前の摂餌量を測定し、その後は回復期間終了週まで毎週1回の頻度で1日あたりの摂餌量を測定した。摂水量は、投与開始前の摂水量および毎週1回の1日あたりの摂水量を上記摂餌量と同日に測定し、その他、尿検査用に選抜した動物

について、投与第1, 4週および回復期間終了週の尿検査時に、代謝ケージ内に収容した状態での約24時間の摂水量を測定した。

#### 2) 尿検査

各群とも動物番号の若い方から5匹を選択して(生存例数が5匹以下の群は全例)、投与第1, 4週および回復期間終了週に代謝ケージに収容して蓄尿し、約4および24時間の時点で採尿した。この4時間尿を用いて、pH、潜血、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンおよび沈渣を試験紙法(クリニテック200+, バイエル・三共(株))および光学顕微鏡により検査し、24時間尿を用いて、尿量(天秤で重量を計測し、比重で除す)、色調および濁度(視診)、比重(単位体積あたりの重量を測定)を検査した。

#### 3) 血液学検査

投与期間ないし回復期間終了日から翌日の剖検日にかけて定期解剖例全例を18から24時間絶食させ、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈よりEDTA 2Kを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コールターエレクトロニクス(株))により赤血球数、白血球数、平均赤血球容積、血小板数(以上、電気抵抗法)および血色素量(吸光度法)を測定し、これらを基にヘマトクリット値、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)および網状赤血球比率(Brecher法)を求めた。また、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液を用いてプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間(光散乱検出法, CA-1000, 東亜医用電子(株))を測定した。また、切迫屠殺例でも可能な限り定期解剖例と同様の検査をしたが、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間は測定しなかった。骨髓像検査は、大腿骨骨髓を用いて塗抹標本を作製(Wright-Giemsa染色)し、投与期間終了時剖検例の溶媒対照群および高用量群、ならびに切迫屠殺例について実施した。

#### 4) 血液生化学的検査

血液学検査用の採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として死亡例を除く全例から採血し、血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロシュ・ダイアグノスティックス(株))により、総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD・DAOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ・G6PDH法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼ・GLDH法)、クレアチニン濃度(Jaffé法)、アルカリフォスファターゼ活性(GSCC法)、GOT活性(IFCC法)、GPT活性(IFCC法)、LDH活性(Wróblewski-La Due法)、カルシウム濃度(OCPC法)、無機リン濃度(モリブデン酸直接法)、トリグリセライド濃度(GPO・DAOS法)、 $\gamma$ -GTP活性( $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)を測定し、A/G比を算出した。また、全自動電解質

分析装置(EA05, (株)A&T)により, ナトリウム濃度, カリウム濃度および塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

### 5) 病理学検査

上記の採血に引き続き, 死亡例を除く全例を放血屠殺したのち, 器官および組織の肉眼的観察を行った。また, 各動物の脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 卵巣または精巣, 精巣上体の重量測定を行い, 各器官重量を剖検日の体重で除して, それぞれの相対重量を算出した。さらに, 脳, 脊髄, 下垂体, 眼球, ハーダー腺, 甲状腺(上皮小体を含む), 顎下腺(舌下腺を含む), 胸腺, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 結腸, 直腸, 卵巣または精巣, 精囊, 精巣上体, 膀胱, 前立腺, 大腿骨骨髓, 坐骨神経および下腿部骨格筋を0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン液(pH 7.2)に固定した。脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 胃, 精巣, 精巣上体, 卵巣, 骨髓(大腿骨)肉眼的に異常が認められた器官・組織は, パラフィン包埋後, ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し, 先ず, 溶媒対照群および高用量群について組織学検査を実施した。次いで, 被験物質投与による影響が疑われた胸腺, 肝臓, 腎臓, 脾臓および胃について, 全例の検査を行った。また, 肝臓および腎臓では組織学的検査で褐色色素沈着がみられたため, 全例のベルリンブルー染色標本を作製した。この他, 前立腺および精囊についても全例の追加検査を実施した。なお, 死亡例は器官重量を測定せず, それ以外は屠殺例と同様の病理学検査を行った。

### 6. 統計解析

体重, 摂餌量, 摂水量, 尿検査(半定量検査を除く)ならびに定期解剖例の血液学検査, 血液生化学検査および器官重量について, 群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また, 試験群が3群以上の場合は, Bartlettの方法による分散の一様性の検定, 一元配置型の分散分析ないしKruskal-Wallisの順位検定およびDunnettないしDunnett型の検定法で多重比較を行った。2群の場合には, Studentのt検定ないしAspin-Welchのt検定を行った。さらに, 病理組織学検査所見は, グレード分けしたデータについてMann-WhitneyU検定(両側検定)を, 陽性グレードの合計値についてFisher直接確率の片側検定を行った。なお, これら溶媒対照群および被験物質投与群との間の有意差検定はいずれの場合も有意水準を5%とした。

## 結果

### 1. 切迫屠殺例および死亡例

1000 mg/kg投与群では, 投与第4日に雄2例が死亡し, 雄1例および雌2例を切迫屠殺した。また, 投与第5日の投与前に雄1例が死亡し, 雌1例を切迫屠殺した。その後, 投与第13日に雌1例, 投与第19日に雄1例が死亡した。500 mg/kg投与群では投与第24日に雄1例が死亡した。

### 2. 一般状態

500 mg/kg以上の投与群で, 投与第2日から6日の間に排便量が減少し, 黒色便の排泄がみられた。同群では, 雌雄の一部で腹部ないしその周辺部の脱毛が認められた。また, 投与第2ないし6日から投与直後に一過性の流涎が認められ, 散発的ではあるものの, 死亡および切迫屠殺例の一部を除く全例でみられた。この流涎は投与の際の保定だけでみられることもあり, 100 mg/kg投与群においても散見された。この他, 1000 mg/kg投与群の雌雄で腹臥位姿勢, 皮膚色蒼白および呼吸深大等が散見され, 死亡および切迫屠殺例でより頻繁に認められた。死亡および切迫屠殺例では, 前述の所見の他に, 流涎, 体表温の減少および脱水状態が観察された。その他, 頭部および下腹部被毛の汚れが500 mg/kg投与群の雌2例および1000 mg/kg投与群の雌雄各2例で認められた。また, 500 mg/kg投与群の雄1例では, 投与第21日に鼻孔周囲の褐色の汚れが観察され, 翌日より排便量が減少し, 投与第24日に死亡が確認された。回復期間中は, 前述の腹部周辺部の脱毛が引き続きみられたが, これらは日数の経過とともに回復する傾向にあった。

### 3. 体重(Fig. 1)

1000 mg/kg投与群の雌雄の体重は, 投与第2日から投与第28日までの間, 溶媒対照群と比較して有意に低く, さらに回復試験を実施した雌では, 回復第8日まで有意に低かった。また, 500 mg/kg投与群でも雄で投与第11日から, 雌で第8日から有意に低くなり, 回復第1日の雌で有意差がみられなかったものの, この他の測定日では雌雄とも回復第14日まで有意に低い状態が続いた。20および100 mg/kg投与群では, 観察期間を通じて有意な変化はなかった。

### 4. 摂餌量(Fig. 2)

1000 mg/kg投与群の雌雄の摂餌量は, 投与第1週から溶媒対照群と比較して有意に減少し, 雄で第4週, 雌で第3週まで有意差を示した。また, 500 mg/kg投与群でも雄で投与第1, 2および4週, 雌で第1週に有意に減少したが, 500および1000 mg/kg投与群の回復期間ならびに20および100 mg/kg投与群では, 有意な変化は認められなかった。

### 5. 摂水量(Fig. 3)

1000 mg/kg投与群の雌雄では, 投与第1日の摂水量が有意に減少したが, その後増加に転じ, 雄で投与第1週の尿検査時から, 雌では投与第2週から有意に増加し, 回復試験を行わなかった雄で投与第4週の尿検査時まで, 雌では回復第2週まで続いた。また, 500 mg/kg投与群でも摂水量が増加する傾向がみられ, 雄で投与第2および3週, 雌で投与第2週から回復第1週までが有意に増加した。20および100 mg/kg投与群では, 観察期間を通じて有意な変化はなかった。

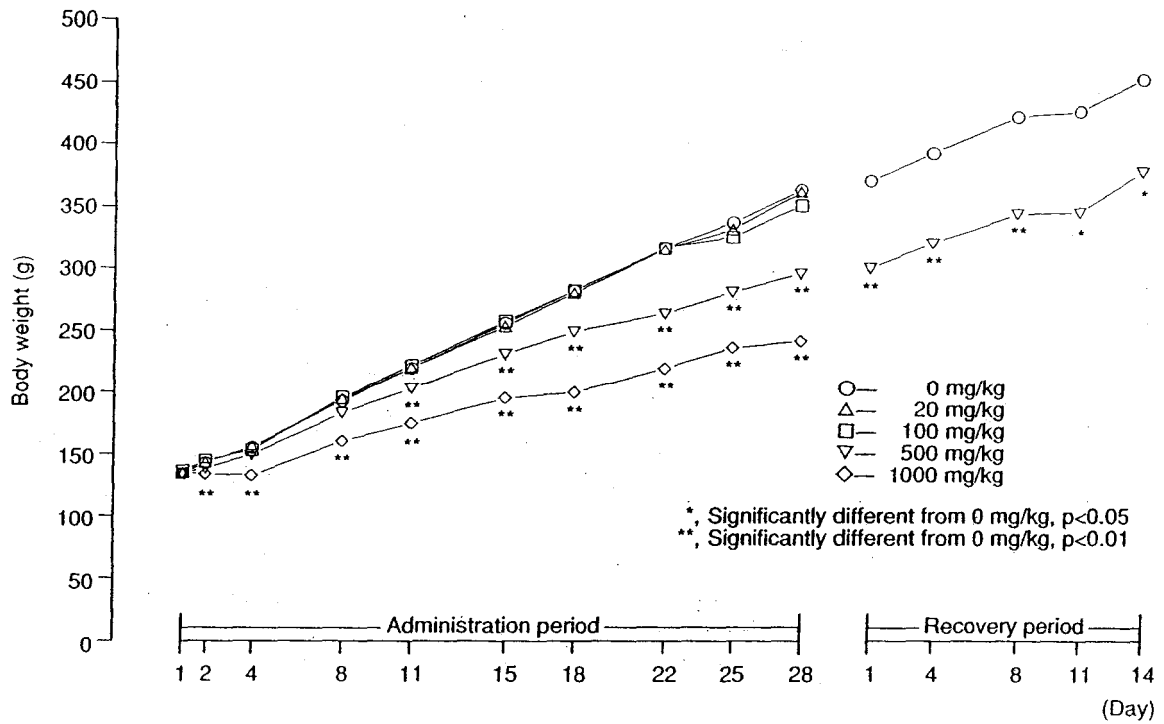


Fig. 1-1 Body weight changes of males in 28-day repeat dose oral toxicity test of 4-ethylbiphenyl in rats

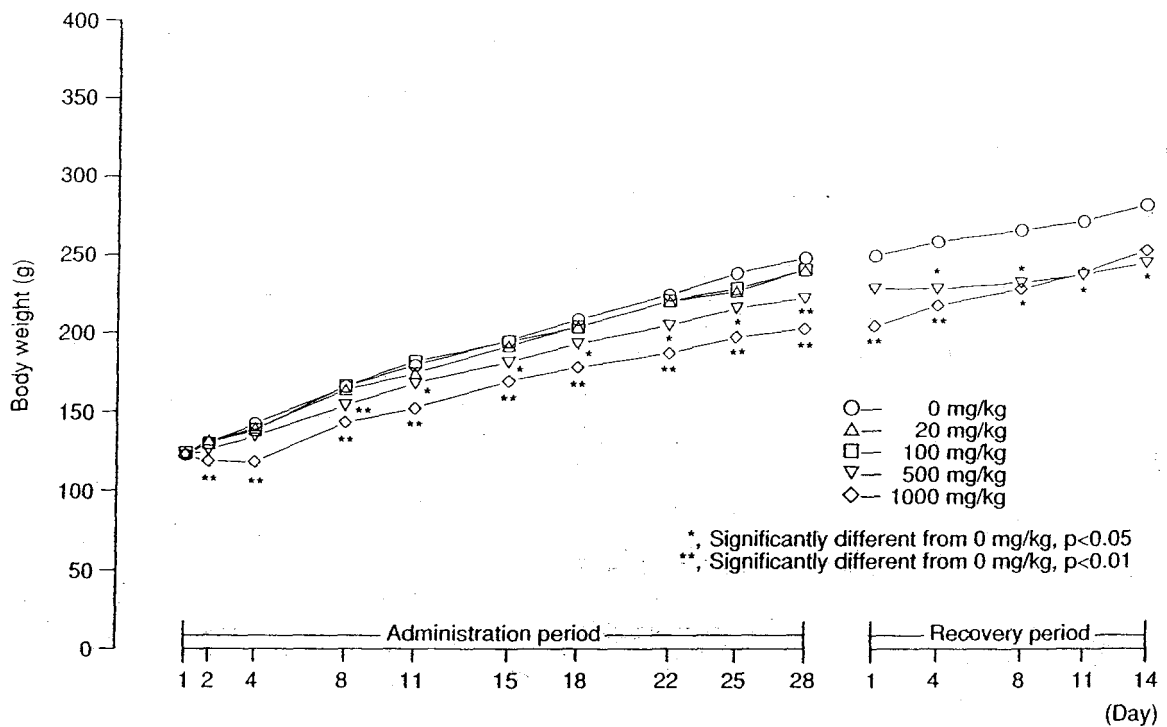


Fig. 1-2 Body weight changes of females in 28-day repeat dose oral toxicity test of 4-ethylbiphenyl in rats

#### 6. 尿検査 (Table 1)

尿量は、1000 mg/kg 投与群で増加し、雄で投与第1および4週、雌で投与第4週に溶媒対照群と比較して有意差を示した。500 mg/kg 投与群でも尿量が増加する傾向がみられ、雌で投与第4週に有意に増加した。さらに、

投与第1週の検査では、1000 mg/kg 投与群で、濁度+が雌雄各1例、尿蛋白++が雌雄各2例、潜血±または+が雄2例、沈渣中の結晶+が雌1例で認められ、このうち、尿蛋白++および潜血+と、濁度+、尿蛋白++および潜血±は、それぞれ同一個体の所見で、これら2例は新鮮

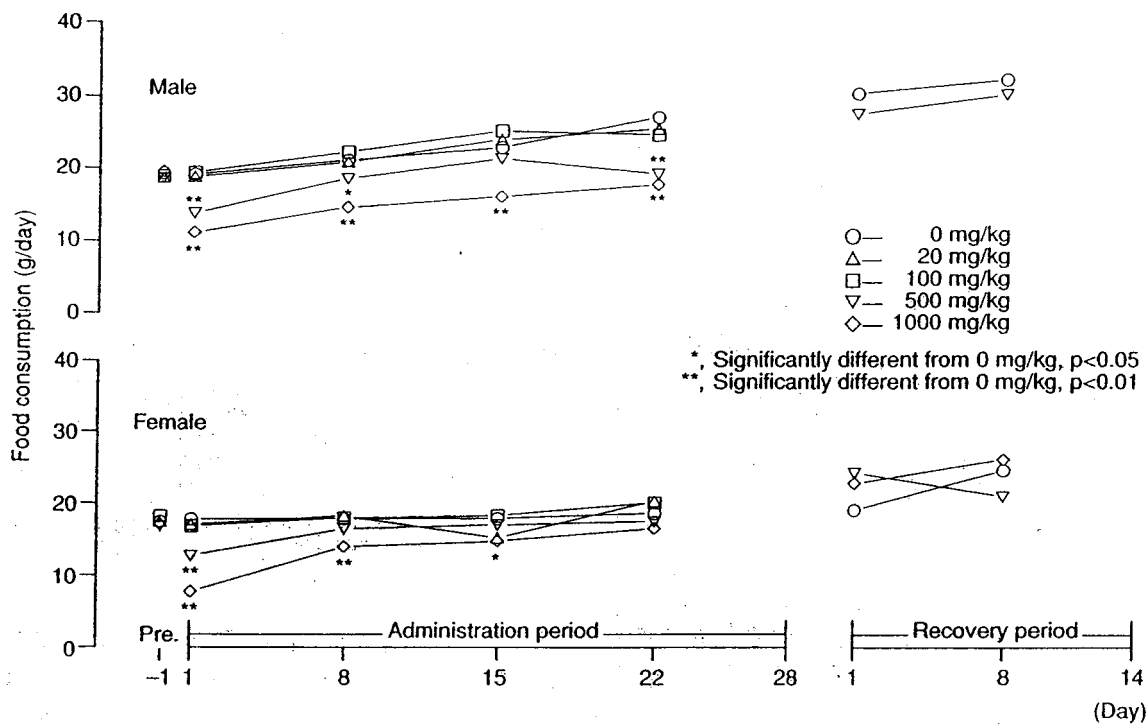


Fig. 2 Food consumption in 28-day repeat dose oral toxicity test of 4-ethylbiphenyl in rats

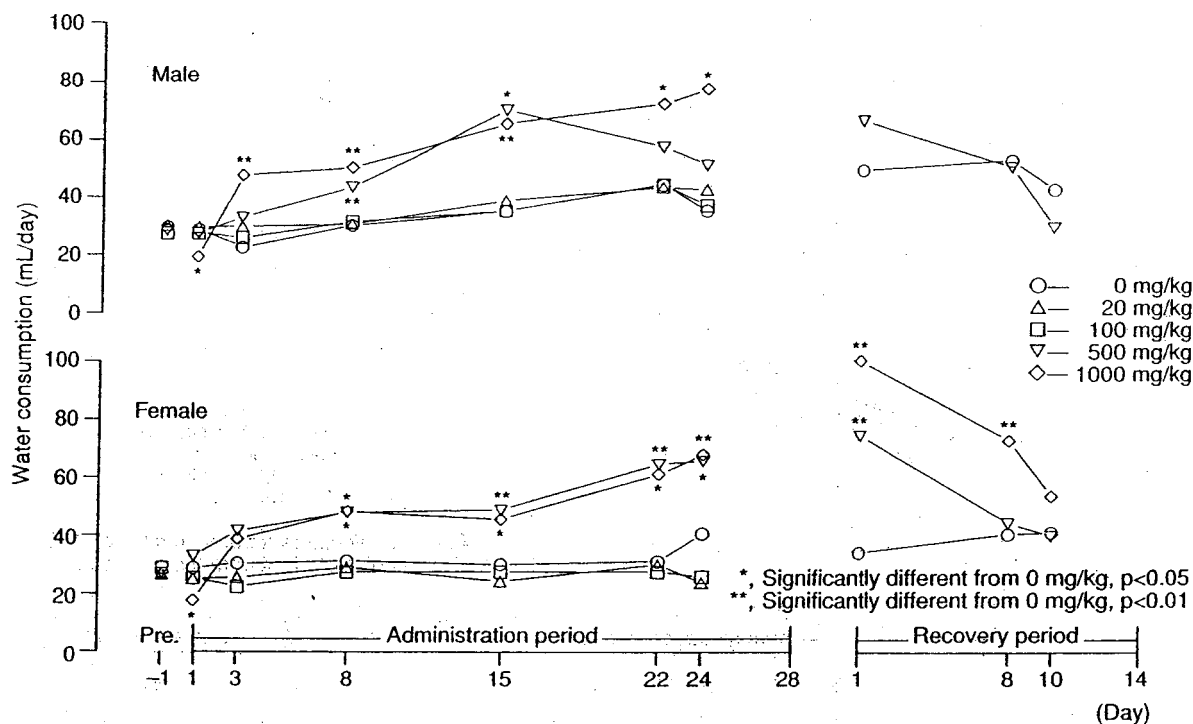


Fig. 3 Water consumption in 28-day repeat dose oral toxicity test of 4-ethylbiphenyl in rats

尿採取後、24時間尿を採取する前に死亡した。500 mg/kg 投与群の雌でも2例で沈渣中の結晶が+となった。その他、1000 mg/kg 投与群の雌雄各1例では、通常みられるリン酸アンモニウムマグネシウム結晶の他に、その形状から尿酸ナトリウム結晶と考えられるものも認められた。投与第4週の検査では、1000 mg/kg 投与群の雄1

例、500 mg/kg 投与群の雄2例、雌1例および100 mg/kg 投与群の雄1例で尿蛋白が++となり、500 mg/kg 投与群の雄1例で沈渣中の結晶が+、雌1例で顆粒円柱が観察された。投与第1週の検査で認められた尿酸ナトリウム結晶と同様の結晶は、500 mg/kg 投与群の雌雄各1例および1000 mg/kg 投与群の雌1例でもみられた。回復第2

週の検査では、500 mg/kg 投与群の雌1例で尿蛋白が++となった。その他、各検査項目とも、溶媒対照群と比較して被験物質投与群におけるその出現頻度および程度に差はみられなかった。

#### 7. 血液学検査 (Table 2)

投与期間終了時屠殺例では、500 mg/kg 以上の投与群の雄で平均赤血球容積が有意に減少し、100 mg/kg 投与群の雄で平均赤血球色素濃度が有意に増加したが、他の項目で関連する変化がみられなかったことから、毒性的に意義のある変化ではないと考えられた。また、20 mg/kg 投与群の雄で活性部分トロンボプラスチン時間が有意に延長したが、用量依存的ではなく、他のパラメータとの関連もみられなかったため、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。また、成績を示していないが、骨髄像検査では、1000 mg/kg 投与群の雄で骨髄芽球、好酸性後骨髄球、好酸球、総顆粒球、多染性赤芽球、赤芽球およびリンパ球比率の減少ないし増加が、雌で好酸球比率の増加がそれぞれ有意となった。しかし、その変動を項目間でみると関連がなく、骨髄機能が変化している可能性が示唆されなかったため、その他の群では検査を実施しなかった。

回復期間終了時屠殺例では、1000 mg/kg 投与群の雌で赤血球数、色素量およびヘマトクリット値が有意に減少し、500 mg/kg 投与群の雌でも色素量が有意に減少した。また、500 mg/kg 投与群の雄では、平均赤血球容積が有意に減少し、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間が有意に短縮した。その他の検査項目では、いずれの時点の検査でも有意な変化は認められなかった。なお、これらの変化は、投与期間終了時の変化と関連するものではなかったため、投与を中止したことによる変化ではないと考えられた。

切迫屠殺例では、投与第5日に屠殺した1000 mg/kg 投与群の雌1例を除き、雌雄とも赤血球数、色素量およびヘマトクリット値が減少傾向を示し、網状赤血球比率が増加傾向を示した。白血球比率では、分葉核好中球比率が増加し、リンパ球比率が減少傾向を示した。一方、投与第5日に屠殺した1000 mg/kg 投与群の雌1例では、色素量、血小板数およびヘマトクリット値が増加した。

#### 8. 血液生化学検査 (Table 3)

投与期間終了時屠殺例では、500 mg/kg 以上の投与群の雄でA/G比が、雌雄でクレアチニン濃度が有意に上昇した。また、1000 mg/kg 投与群では、雌雄で $\gamma$ -GTP活性、雄でGPT活性、雌でLDH活性が有意に上昇し、雌のGPT活性と雄のLDH活性も上昇する傾向にあり、さらに、雄でナトリウム濃度が、雌で無機リンおよびカルシウム濃度がそれぞれ有意に増加した。この他、20 mg/kg 以上の投与群の雄でブドウ糖濃度が有意に減少し、100 mg/kg 以上の投与群の雄で塩素濃度が有意に増加した。その他、雄で総コレステロール濃度に有意差がみられたものの用量依存的ではなく、被験物質投与に起

因した変化ではないと考えられた。なお、500 mg/kg 以上の投与群の血漿は、雌雄とも黄色調を呈しており、これは1000 mg/kg 投与群においてより強い傾向にあった。また、1000 mg/kg 投与群では、剖検時に麻酔した際、他の群と比較して麻酔の導入が悪かった。これらの変化のうち、ブドウ糖濃度減少の有意差については、この他の毒性変化は性差が明らかでないにもかかわらず、これは雄にのみ認められたこと、20 mg/kg 投与群では他の項目で関連すると考えられる変化が認められなかったこと、また、溶媒対照群のブドウ糖濃度が当研究所のバックグラウンドデータの値と比較して高いと考えられたことから、溶媒対照群の血糖値が高かったことに原因があると考えた。

回復期間終了時屠殺例では、1000 mg/kg 投与群の雌でトリグリセライド濃度、ナトリウム濃度および $\gamma$ -GTP活性が有意に増加し、総蛋白濃度が有意に減少した。また、500 mg/kg 投与群の雄でブドウ糖濃度が有意に減少し、無機リン濃度が有意に増加した。その他に有意な変化は認められなかったが、個別別にみて、1000 mg/kg 投与群の雌1例でLDH、GPTおよびGOT活性が高値を示した。

切迫屠殺例では、全体的に尿素窒素濃度が増加し、その他、A/G比、クレアチニン濃度、無機リン濃度、カリウム濃度、GPT活性および $\gamma$ -GTP活性が増加した個体ならびにカルシウム、ナトリウム、カリウムおよび塩素濃度が減少した個体が散見された。

#### 9. 病理学検査

##### 1) 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時屠殺例では、500 mg/kg 以上の投与群において、雌雄の胸腺重量および雄の脾臓の絶対重量が有意に減少し、肝臓の絶対および相対重量が1000 mg/kg 投与群の雄の絶対重量を除き有意に増加した。同群では、腎臓の相対重量が有意に増加し、1000 mg/kg 投与群の雌では絶対重量も有意に増加した。また、精巣では、1000 mg/kg 投与群で絶対重量が有意に減少したが、500 mg/kg 以上の投与群で相対重量が有意に増加した。その他に1000 mg/kg 投与群の雄で副腎の相対重量が有意に増加した。これらのうち、肝臓の相対重量は、100 mg/kg 投与群の雌でも有意に増加した。この他、500 mg/kg 以上の投与群では、脳および心臓の絶対重量の有意な減少あるいは相対重量の有意な増加が散見されたが、これらの群では、剖検時体重が有意に低かったこと、これらの器官で重量の変化に関連する所見が全体としては認められなかったことから、被験物質投与が直接関係した変化ではないと考えられた。

回復期間終了時屠殺例では、500 mg/kg 以上の投与群の雌で肝臓の相対重量が増加し、500 mg/kg 投与群の雌雄および1000 mg/kg 投与群の雌で腎臓の相対重量が有意に増加した。その他、有意な変化が散見されたが、いずれも投与期間終了時に認められた変化とは関連がなかった。また、切迫屠殺例では、明らかな変化は認められなかった。

## 2) 剖検所見

投与期間終了時屠殺例の剖検において、500ないし1000 mg/kg投与群では、削瘦、肝臓の暗色化および腫大、腎臓の淡色化、軟弱化、腫大および皮質や髄質の変色域、腎乳頭の黄色化、前胃粘膜の潰瘍や陥凹部および水腫あるいは潰瘍の修復像と考えられる小突起等の変化、副腎の腫大、腺胃粘膜の潰瘍、肥厚、菲薄化および淡色化が散見された。このうち肝臓の暗色化は、500 mg/kg以上の投与群の雌雄全例で認められ、100 mg/kg投与群の一部の例でもみられた。この他、雄では、1000 mg/kg投与群で精巣上体、前立腺および精囊の小型化が散見され、500 mg/kg投与群の1例でも前立腺の小型化がみられた。その他、被験物質投与群で腺胃粘膜の暗色点が見られた。これら以外に被験物質投与に関連すると考えられる所見はなかった。なお、腺胃粘膜の暗色点は、20 mg/kg投与群でも雌1例で観察されたが、この程度の暗色点は投与の際のストレス等でも生じること、組織学的に変化がみられなかったことおよび発現例数が1例のみであったことから、被験物質の作用による変化ではないと判断した。

回復期間終了時屠殺例の剖検では、被験物質投与群の所見として、雌雄で肝臓の暗色化、腎臓の腫大、淡色化あるいは淡色領域、1000 mg/kg投与群の雌で前胃部と腹腔内臓器との癒着、500 mg/kg投与群の雌で腺胃粘膜の暗色点などがみられた。

死亡例および切迫屠殺例では、各群で、腎臓の淡色化、軟弱化および腫大、腎乳頭の淡色化あるいは黄色化、脾臓の小型化ないし淡色化、出血によると考えられる腸内容の暗色化、胸腺の小型化および混濁が散見された。また、1000 mg/kg投与群では、肝臓の暗色化、前胃粘膜の潰瘍あるいは修復像と考えられる陥凹部、白濁、肥厚、白斑、腺胃の陥凹部もみられた。その他、少数例で前胃の肝臓および脾臓等との癒着、肺の暗色化あるいは暗色領域、卵巣、前立腺および精囊の小型化等も認められた。

## 3) 病理組織学検査 (Table 5)

## ① 投与期間終了時屠殺例

肝臓では、500 mg/kg以上の投与群の雌雄で肝細胞が肥大し、その細胞質は好酸性で顆粒状を呈しており、その程度および発現頻度(陽性例数)が有意差を示した。また、クッパー細胞にヘモジデリン沈着がみられ、1000 mg/kg投与群の雌雄でその程度ないし発現頻度が有意に増加した。雄では限局性壊死が散見された。100 mg/kg投与群では、同様の肝細胞の変化が雌雄で散見され、雌1で限局性壊死が認められた。

腎臓では、500 mg/kg以上の投与群の雌雄で乳頭壊死がみられ、壊死部に鉍質沈着を伴う例もあった。また、髄質に好塩基性尿細管がみられ、1000 mg/kg投与群の雌でその程度および発現頻度も有意に増加した。同群の雌雄では、皮質あるいは髄質の尿細管拡張および蛋白性尿円柱がみられ、このうち1000 mg/kg投与群の雌で皮質の尿細管拡張が、500 mg/kg投与群の雄で蛋白性尿

円柱が、それぞれその程度および発現頻度も有意に増加した。この他、溶媒対照群を含む各群で皮質に好塩基性尿細管がみられたが、100 mg/kg以上の投与群の雌雄ではその程度が有意に増加した。その他、溶媒対照群および一部の被験物質投与群で皮髓境界部に鉍質沈着がみられ、その頻度は、500 mg/kg投与群の雄で有意に増加し、雌で有意に減少した。

前胃では、1000 mg/kg投与群の雄数例で粘膜のびらんが、500 mg/kg以上の投与群の雌雄で修復像と考えられる上皮の過形成が認められ、1000 mg/kg投与群の雌において上皮の過形成の頻度が有意差を示した。この他、100 mg/kg投与群の雌および500 mg/kg以上の投与群の雄で粘膜下織の水腫が、1000 mg/kg投与群の雄で粘膜下織の出血が散見された。

腺胃では、100 mg/kg以上の投与群の雌および1000 mg/kg投与群の雄でびらんないし潰瘍がみられ、1000 mg/kg投与群の雌ではびらんの程度および発現頻度が有意に増加した。また、びらんや潰瘍に伴って粘膜下織の水腫または粘膜下織および漿膜の炎症が散見された。

脾臓では、溶媒対照群を含む各群でヘモジデリン沈着がみられたが、その程度は1000 mg/kg投与群の雌雄で有意に増加し、500 mg/kg投与群の雌雄でもやや増加した。この他、溶媒対照群を含む全例で髄外造血がみられたが、1000 mg/kg投与群の雄ではその程度が有意に減少した。

胸腺では、500 mg/kg以上の投与群の雌雄で萎縮がみられ、1000 mg/kg投与群の雌雄では、その程度および頻度も有意に増加した。

その他、肉眼的病変部がみられた各器官では、肺の暗色領域での出血、好中球浸潤、肺泡マクロファージの増加および胸膜の線維化、前立腺および精囊の萎縮、皮膚脱毛部の被毛の変性等が認められた。この他、いくつかの器官・組織で変化がみられたが、被験物質投与によると考えられる変化ではなかった。

## ② 回復期間終了時屠殺例

肝臓では、被験物質投与群の雌雄で、クッパー細胞にヘモジデリン沈着があり、1000 mg/kg投与群の雌でその程度および頻度が有意に増加した。脾臓に壊死がみられた500 mg/kg投与群の雄1例ではクッパー細胞の肥大が認められた。また、被験物質投与群の雌では限局性の線維化または被膜の線維化が散見された。なお、いずれの群でも投与期間終了時屠殺例でみられたような肝細胞の肥大は認められなかった。

腎臓では、各被験物質投与群で乳頭壊死がみられ、1000 mg/kg投与群の雌では腎乳頭に鉍質沈着を伴っていた。また、溶媒対照群を含む各群で皮質に好塩基性尿細管がみられたが、被験物質投与群でその程度が有意に増加した。被験物質投与群の雌では、好塩基性尿細管が髄質にもみられ、1000 mg/kg投与群でその程度および発現頻度が有意差を示した。この他、蛋白性尿円柱が各被験物質投与群でみられたが、皮質の尿細管拡張は500 mg/kg投与群の雌1例でみられたのみであった。

前胃では、1000 mg/kg投与群の雌1例の漿膜に線維化

がみられた。

脾臓では、被験物質投与群の雌雄で、溶媒対照群と比較してヘモジデリン沈着の程度がやや強かったが、髄外造血の程度に差はなかった。その他、500 mg/kg 投与群の雄1例では、脾臓に壊死がみられた。

投与期間終了時屠殺例でみられた上記所見の多くが、回復期間終了時屠殺例において程度および発現頻度が軽減ないし消失したが、いくつかの所見は回復傾向が認められなかった。その他、2例の脱毛部位のうち、1例で被毛の変性がみられたが、他の1例では異常が認められなかった。この他には、溶媒対照群の雄1例で胸腺に出血がみられたのみであった。

### ③ 死亡例および切迫屠殺例

肝臓では、全例の肝細胞が肥大し、細胞質は好酸性の顆粒状を呈していた。クッパー細胞には、ヘモジデリン沈着が認められた。また、腺胃に筋層の壊死と漿膜の炎症がみられた症例では被膜に炎症が認められた。

腎臓では、全例で腎乳頭の壊死がみられた。また、皮質および髄質には好塩基性尿細管がみられ、ほとんどの例で同時に尿細管上皮の壊死が認められたことから、これら好塩基性尿細管の多くは尿細管上皮の再生像であると考えられた。また、皮質および髄質での尿細管の拡張が散見され、変性物を含む顆粒状の尿円柱が認められる例もあった。

前胃では、1000 mg/kg 投与群の雌雄で潰瘍が散見され、上皮の過形成や漿膜の炎症を伴っていた。

腺胃では、びらん、粘膜の鉍質沈着、漿膜の炎症および筋層の壊死が散見された。

脾臓では、1000 mg/kg 投与群で雌2例を除く全例に萎縮がみられた。また、多くの例でヘモジデリン沈着が観察された。その他、前胃に潰瘍があり、脾臓との間に癒着がみられた例では、被膜に炎症が認められた。

胸腺では、全例にリンパ球の壊死がみられ、軽度であった1例を除き、主に皮質のリンパ球が広範囲に壊死していた。また、出血も数例でみられた。

死亡および切迫屠殺例では、肝臓を除き、多くの所見の程度が投与期間終了時屠殺例と比較して増加した。その他、心筋変性や精細管の多核巨細胞、肺の赤色ないし暗色領域の水腫、前立腺および精囊の萎縮、腸間膜リンパ節の萎縮等がみられたが、これらはいずれも死亡ないし瀕死状態につながると考えられる変化ではなかった。

## 考察

4-エチルピフェニルをコーンオイルに溶解して20, 100, 500および1000 mg/kgの用量で雌雄の Sprague-Dawley系ラットに28日にわたって強制経口投与し、その後14日間の回復期間を設けた。その結果、主として腎臓、肝臓および消化管に被験物質投与に起因したと考えられる毒性変化が生じ、500 mg/kg 投与群の雄および1000 mg/kg 投与群の雌雄で死亡および切迫屠殺例があった。

1000 mg/kg 投与群で摂水量および尿量の増加、尿蛋

白陽性、混濁、潜血、沈渣中の結晶の増加および尿酸ナトリウム結晶析出等の尿性状の変化、血漿クレアチニン濃度の増加等が認められた。同群の腎臓は腫大し、淡色化、軟弱化、皮質および髄質の変色等が散見され、組織学的には、好塩基性尿細管の増加および尿細管の拡張、蛋白性尿円柱、腎乳頭壊死および鉍質沈着等も認められた。これらの変化の多くが500 mg/kg 投与群でもみられ、好塩基性尿細管は100 mg/kg 投与群の皮質でも認められた。死亡および切迫屠殺例では、組織学的に尿細管上皮の壊死、顆粒状尿円柱などもみられ、血漿中尿素窒素濃度の増加もあった。この死亡および切迫屠殺例で尿細管上皮の壊死がみられたことから、好塩基性尿細管の多くが再生尿細管であると考えられた。また、尿量の増加とそれに伴う血漿中電解質濃度の変化は、再吸収機能が未熟な再生尿細管が増加したことにより生じたと考えられ、尿細管の拡張は、この尿量増加に加え、腎乳頭損傷時にみられる尿のうっ滞が一因であると考えられた。これらのことから、反復投与による主な死因は急性腎不全であると考えられる。回復期間では、ほとんど再生されないりとされる腎乳頭の損傷には回復傾向がみられなかったが、尿量、摂水量および尿細管拡張には回復傾向がみられたことから、腎障害は、乳頭壊死を除き、投与中止により回復することが示唆された。ところで、4-イソプロピルピフェニルを投与することにより、本試験と同様の腎乳頭壊死を伴う腎毒性が生じることが知られており、この物質の主な代謝産物である $\gamma$ -メチル-4-フェニルマンデリン酸を250 mg/kgの用量で単回腹腔内投与することにより、腎臓に高濃度に蓄積されて同様の腎毒性を示すことが報告されている<sup>2)</sup>。このことおよび後述の肝臓に関する変化から、本試験で認められた腎毒性も代謝産物による可能性を考慮する必要がある。なお、1,1'-ピフェニルを0.5%の濃度で60日間反復混餌投与することでも本試験と同様の尿量の増加を伴う尿細管の拡張が報告されているが<sup>3)</sup>、この試験では、腎炎がみられるものの、本試験のような腎乳頭壊死はなく、また、溶解性が低い1,1'-ピフェニルの代謝産物が腎臓で濾過されることによる管腔内浸透圧に関わる変化であると考察されており、本試験の腎障害とは異なる変化であると考えられた。

1000 mg/kg 投与群で、肝重量が増加し、肉眼的には暗色調および腫大が認められ、組織学的には肝細胞が肥大し、細胞質が好酸性で顆粒状を呈していた。これらの所見は、100および500 mg/kg 投与群でもみられたが、いずれも投与中止により消失した。この好酸性顆粒は、色調および形状から、ライソゾームないしペルオキシゾームであると考えられる。さらに、1000 mg/kg 投与群では、ペントバルビタールナトリウム麻酔の導入が悪く、薬物代謝酵素の誘導が示唆された。その他、100 mg/kg 投与群の雌および500 mg/kg 以上の投与群の雄で限局性壊死が認められ、1000 mg/kg 投与群では、 $\gamma$ -GTP活性、GPT活性およびLDH活性が増加した。これらの変化の多くが回復期間終了時屠殺例では軽減ないし消失していたことから、肝臓が受けた影響は、投与中止により



軽減することが示唆された。なお、500 mg/kg以上の投与群では血漿が黄色を呈したが、ビリルビンによるものではないことは予備試験で確認されており、詳細は明らかでないが、血中に分布した被験物質またはその代謝物に由来する可能性がある。

消化管では、500 mg/kg以上の投与群において、前胃粘膜の潰瘍や陥凹部および水腫あるいは潰瘍の修復像と考えられる小突起などが散見され、粘膜上皮のびらんおよびその修復像と考えられる上皮の過形成が認められた。100 mg/kg以上の投与群では粘膜下織の水腫および粘膜下織の出血等も散見された。本試験では、100 mg/kg以上の投与群の多数例で投与に伴い一過性の流涎が観察され、500 mg/kg以上の投与群では、投与の際の保定のみでも観察される場合があったことから、被験物質が苦味ないし局所刺激性を有し、反復投与することにより反射的に流涎が生じた可能性が考えられた。さらに、前胃は刺激性物質に対する変化がよく発現する部位として知られており<sup>4)</sup>、今回の所見は局所刺激性を有する物質の投与による粘膜損傷を示唆するものであった。一方、本試験では、100 mg/kg以上の投与群の一部の例で腺胃のびらんないし潰瘍がみられ、びらんや潰瘍に伴って粘膜下織の水腫または粘膜下織および漿膜の炎症が散見された。腺胃粘膜は粘液細胞から分泌される粘液に保護されているため前胃と比べて刺激による損傷を受けにくいとされているが、被験物質がこの粘液層を通過し、粘膜に刺激を与えた可能性も考えられる。しかし、ストレスや化学物質的作用によっても腺胃粘膜傷害は生じるため、本試験結果からは、いずれの機序によるものであるのか判断できなかった。その他、一般状態で投与初期に黒色便が観察されたが、その多くが前胃および腺胃粘膜のびらんおよび潰瘍に伴う出血によるものであると考えられた。

1000 mg/kg投与群で投与初期に皮膚色蒼白が散見され、死亡および切迫屠殺例では、脾臓の小型化ないし淡色化および組織学的検査により萎縮が観察されて、さらに切迫屠殺例ではヘマトクリット値および血色素量が減少したことから、貧血が示唆された。一方、投与期間終了時屠殺例では、病理組織学的に500 mg/kg以上の投与群の雌雄で、クッパー細胞にヘモジデリンが沈着しており、脾臓でもヘモジデリン沈着が増加したため、貧血の原因には消化管出血だけではなく、溶血の関与が示唆された。しかし、肝臓および脾臓でみられたヘモジデリン沈着は顕著なものではなかったこと、予備試験で血漿中ビリルビン濃度の増加がみられなかったことから、溶血は軽度であったと考えられた。また、投与期間終了時屠殺例では貧血、骨髄毒性を示唆する所見はなかったこと、切迫屠殺例では貧血に伴い、網状赤血球比率が増加したことから、投与初期の貧血は速やかに回復したと考えられる。

胸腺では、死亡および切迫屠殺例でリンパ球壊死および壊死後の変化と推測される萎縮がみられ、血液中のリンパ球比率が減少した。投与期間終了時屠殺例でも500 mg/kg以上の投与群で胸腺萎縮が認められた。このよ

うな変化は、ストレスによる非特異的な変化として知られており、一因として、コルチゾルによるTリンパ球のアポトーシスの亢進などが考えられている<sup>5)</sup>。これらのことから、この胸腺の変化は投与期間初期の腎臓および消化管の障害による急激な状態の悪化に伴う二次的变化であることが示唆された。この他、500 mg/kg以上の投与群でみられた体重増加抑制、摂餌量の減少、腹臥位姿勢および呼吸深大等の一般状態の変化も同様の原因によるものと考えられ、剖検時の生殖器の萎縮も個体別にみて、胸腺に変化がみられた例とほぼ一致していることから、発育期のストレス負荷による二次的变化であると考えられた。

その他、500 mg/kg以上の投与群で散見された腹部周囲の脱毛は、他の群ではみられず、投与中止により回復傾向がみられたことから、被験物質投与に起因した変化である可能性が示唆されたが、その原因は明らかとはならなかった。

以上のことから4-エチルピフェニルの反復投与により、100 mg/kg以上の用量で、主として腎臓の尿細管および乳頭が損傷され、1000 mg/kgでは重篤な腎不全に至った個体は死亡することが明らかとなった。また、100 mg/kg以上の用量では、肝臓で酵素誘導をひきおこす可能性がある一方、1000 mg/kgの用量では、肝障害も示唆された。これらの腎臓および肝臓の変化は、腎乳頭の障害を除き、投与中止により回復する傾向が認められた。また、被験物質は刺激性を有することが示唆され、これに起因すると考えられる、前胃を中心とした消化管粘膜の損傷も100 mg/kg以上の用量で生じた。これらのことから、本試験条件下における4-エチルピフェニルの無影響量は雌雄とも20 mg/kg/dayであると考えられた。

## 文献

- 1) I. G. Sipes, C. A. McQueen, A. J. Gandolfi, "Comprehensive toxicology, Volume 7 Renal toxicology" Elsevier science Ltd., Oxford, 1997, pp. 289-291
- 2) G. C. Todd, D. G. Hoffman, N. R. Bernhard, G. F. Kiplinger, *Vet. Pathol.* 12(1), 69(1975)
- 3) N. B. Albert, M. A. Anthony, D. Floyd, and J. C. Albin Jr., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 3, 560(1961)
- 4) J. R. Glaister, 高橋道人監訳, "毒性病理学の基礎," ソフトサイエンス社, 東京, 1992, pp. 87
- 5) I. G. Sipes, C. A. McQueen, A. J. Gandolfi, "Comprehensive toxicology, Volume 5 Toxicology of the immune system" Elsevier science Ltd., Oxford, 1997, pp. 49

連絡先

試験責任者：大原直樹  
試験担当者：森村智美，加藤博康，関 剛幸，  
笠間菊子，吉村愼介  
（助）食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Naoki Ohara (Study Director)  
Tomomi Morimura, Hiroyasu Katoh,  
Takayuki Seki, Kikuko Kasama,  
Shinsuke Yoshimura  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,  
Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627