

## 4-エチルフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

### Reverse Mutation Test of 4-Ethylphenol on Bacteria

#### 要約

4-エチルフェノールについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537<sup>1)</sup>および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup>の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で1500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で抗菌性が認められたことから、本試験はS9 mix無添加試験および添加試験ともに62.5~2000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。

その結果、2回の本試験とも用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から4-エチルフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

#### 方法

##### 1. 被験物質

4-エチルフェノールは、白色結晶である。用いた被験物質は、ロット番号81029A、純度98.328%(キャピラリーGC)、製造丸善石油化学(株)(東京)であり、丸善石油化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

4-エチルフェノールは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号: ACQ2095, 和光純薬工業(株))に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

##### 2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌ごとに用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれTable中に示した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
(AF2, 和光純薬工業(株))

アジ化ナトリウム(SA, 和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン(9AA, Sigma Chem. Co.)

2-アミノアントラセン(2AA, 和光純薬工業(株))

AF2, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを-20℃で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

##### 3. 検定菌

*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

*S. typhimurium*の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA*株は1997年4月9日に日本バイオアッセイ研究センターの松島泰次郎博士から分与された。

検定菌は-80℃で凍結保存したものを、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)およびアンピシリン耐性因子pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロス2(Oxoid Ltd.)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

##### 4. 培地およびS9 mixの組成

###### 1) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地1Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	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
大洋寒天(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

###### 2) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)または(C)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco Lab.)	0.6 w/v %
塩化ナトリウム	0.5 w/v %
(B) <i>Salmonella typhimurium</i> 用	
L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L
(C) <i>Escherichia coli</i> 用	
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたりの組成は下記のとおりである。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol
NADH	4 $\mu$ mol
NADPH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu$ mol

\*:7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製したS9(キッコーマン株)を用いた。

5. 試験方法

プレインキュベーション法<sup>3)</sup>により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 mL)、検定菌液0.1 mLを混合し、37 °Cで20分間プレインキュベーションしたのち、約45 °Cに保温したトップアガー2 mLを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。同時に実施した試験については、陰性および陽性対照群を共通とした。

培養は37 °Cで48時間行い、生じた復帰変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈殿の有無は、肉眼により観察した。また、抗菌性の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。

用量設定試験は1回、本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。

6. 判定基準

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定することとした。

結果および考察

50.0~5000  $\mu$ g/plateの範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した。その結果、すべての検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験のいずれにおいても1500

$\mu$ g/plate以上の用量で抗菌性が認められた。被験物質に由来する沈殿はすべての用量で認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix無添加試験および添加試験とも2000  $\mu$ g/plateとした。

最高用量を2000  $\mu$ g/plateとして公比2で6用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、4-エチルフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

なお4-エチルフェノールは、当研究所で本試験と並行して実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では染色体の構造異常が誘発され、陽性であった<sup>4)</sup>。また、関連物質である4-(1-メチルプロピル)フェノールについては、復帰変異試験および染色体異常試験で陰性の結果が<sup>5, 6)</sup>、また、3-エチルフェノール<sup>7, 8)</sup>および*p-tert*-ブチルフェノール<sup>9, 10)</sup>については、復帰変異試験で陰性、染色体異常試験で陽性の結果が得られている。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp.273-285.
- 4) 山影康次, 化学物質毒性試験報告, **8**, 572(2001).
- 5) 澁谷徹, 化学物質毒性試験報告, **2**, 343(1995).
- 6) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **2**, 347(1995).
- 7) 澁谷徹, 化学物質毒性試験報告, **8**, 759(2001).
- 8) 山影康次, 化学物質毒性試験報告, **8**, 764(2001).
- 9) 澁谷徹, 化学物質毒性試験報告, **4**, 295(1996).
- 10) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **4**, 301(1996).

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：川上久美子，原 巧，山本明子，  
三枝克彦，加藤初美  
(財)食品薬品安全センター秦野研究所  
〒257-8523 秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)  
Kumiko Kawakami, Takumi Hara,  
Akiko Yamamoto, Katsuhiko Saegusa,  
Hatsumi Kato  
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

Table 1 Mutagenicity of 4-ethylphenol on bacteria (I)

With(+)or without(-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu$ g/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type						Frameshift type								
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98		TA1537			
S9 mix (-)	0	137	138	138	6	11	12	32	22	19	20	28	23	15	15	12
		(138 $\pm$ 0.6)			(10 $\pm$ 3.2)			(24 $\pm$ 6.8)			(24 $\pm$ 4.0)		(14 $\pm$ 1.7)			
	62.5	140	140	130	10	8	15	23	29	25	19	26	24	9	10	14
		(137 $\pm$ 5.8)			(11 $\pm$ 3.6)			(23 $\pm$ 3.1)			(23 $\pm$ 3.6)		(11 $\pm$ 2.6)			
	125	144	136	152	9	14	9	16	22	20	25	20	19	14	2	2
		(144 $\pm$ 8.0)			(11 $\pm$ 2.9)			(19 $\pm$ 3.1)			(21 $\pm$ 3.2)		(6 $\pm$ 6.9)			
	250	145	105	131	7	9	13	19	18	28	14	22	20	5	15	10
		(127 $\pm$ 20.3)			(10 $\pm$ 3.1)			(22 $\pm$ 5.5)			(19 $\pm$ 4.2)		(10 $\pm$ 5.0)			
500	141	129	140	9	10	8	15	20	20	18	25	18	14	14	11	
	(137 $\pm$ 6.7)			(9 $\pm$ 1.0)			(18 $\pm$ 2.9)			(20 $\pm$ 4.0)		(13 $\pm$ 1.7)				
1000	47*	49*	54*	5*	2*	2*	17	21	23	7*	16*	3*	4*	2*	0*	
	(50 $\pm$ 3.6)			(3 $\pm$ 1.7)			(20 $\pm$ 3.1)			(9 $\pm$ 6.7)		(2 $\pm$ 2.0)				
2000	0*	0*	0*	0*	0*	0	0*	0*	0	0*	0*	0	0*	0*	0	
	(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)		(0 $\pm$ 0.0)				
S9 mix (+)	0	176	146	154	8	10	10	25	28	27	38	29	26	9	14	19
		(159 $\pm$ 15.5)			(9 $\pm$ 1.2)			(27 $\pm$ 1.5)			(31 $\pm$ 6.2)		(14 $\pm$ 5.0)			
	62.5	174	182	172	10	12	12	34	31	24	36	23	23	15	17	14
		(176 $\pm$ 5.3)			(11 $\pm$ 1.2)			(30 $\pm$ 5.1)			(27 $\pm$ 7.5)		(15 $\pm$ 1.5)			
	125	157	175	179	8	11	13	29	27	19	34	32	33	15	16	12
		(170 $\pm$ 11.7)			(11 $\pm$ 2.5)			(25 $\pm$ 5.3)			(33 $\pm$ 1.0)		(14 $\pm$ 2.1)			
	250	181	163	188	12	16	15	23	28	21	27	29	34	10	14	11
		(177 $\pm$ 12.9)			(14 $\pm$ 2.1)			(24 $\pm$ 3.6)			(30 $\pm$ 3.6)		(12 $\pm$ 2.1)			
500	165	158	160	15	10	11	20	20	20	28	35	35	21	12	18	
	(161 $\pm$ 3.6)			(12 $\pm$ 2.6)			(20 $\pm$ 0.0)			(33 $\pm$ 4.0)		(17 $\pm$ 4.6)				
1000	136	132	119	3	9	7	18	20	16	22	20	23	5	12	9	
	(129 $\pm$ 8.9)			(6 $\pm$ 3.1)			(18 $\pm$ 2.0)			(22 $\pm$ 1.5)		(9 $\pm$ 3.5)				
2000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)		(0 $\pm$ 0.0)				
Positive control S9 mix(-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2		9AA			
	Dose( $\mu$ g/plate)	0.01			0.5			0.01			0.1		80			
	Number of colonies/plate	598	557	565	714	702	739	183	260	252	639	628	654	380	585	453
	(573 $\pm$ 21.7)			(718 $\pm$ 18.9)			(232 $\pm$ 42.3)			(640 $\pm$ 13.1)		(473 $\pm$ 103.9)				
Positive control S9 mix(+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA		2AA			
	Dose( $\mu$ g/plate)	1			2			10			0.5		2			
	Number of colonies/plate	980	1121	1117	459	402	408	777	891	969	490	535	485	348	395	364
	(1073 $\pm$ 80.3)			(423 $\pm$ 31.3)			(879 $\pm$ 96.6)			(503 $\pm$ 27.5)		(369 $\pm$ 23.9)				

The purity of the test substance was 98.328 %.

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

\*:Growth inhibition was observed.

Table 2 Mutagenicity of 4-ethylphenol on bacteria (II)

With(+)or without(-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	134	163	129	13	13	11	26	22	31	24	26	19	7	12	7
		(142 $\pm$ 18.4)			(12 $\pm$ 1.2)			(26 $\pm$ 4.5)			(23 $\pm$ 3.6)			(9 $\pm$ 2.9)		
	62.5	156	124	142	10	8	11	28	12	21	29	18	27	11	17	7
		(141 $\pm$ 16.0)			(10 $\pm$ 1.5)			(20 $\pm$ 8.0)			(25 $\pm$ 5.9)			(12 $\pm$ 5.0)		
	125	157	145	159	16	12	15	13	12	14	24	27	16	16	11	9
		(154 $\pm$ 7.6)			(14 $\pm$ 2.1)			(13 $\pm$ 1.0)			(22 $\pm$ 5.7)			(12 $\pm$ 3.6)		
	250	175	159	113	10	17	4	22	20	16	24	17	18	10	9	8
		(149 $\pm$ 32.2)			(10 $\pm$ 6.5)			(19 $\pm$ 3.1)			(20 $\pm$ 3.8)			(9 $\pm$ 1.0)		
500	151	150	150	13	8	14	13	12	13	24	28	17	11	9	10	
	(150 $\pm$ 0.6)			(12 $\pm$ 3.2)			(13 $\pm$ 0.6)			(23 $\pm$ 5.6)			(10 $\pm$ 1.0)			
1000	59*	92*	75*	2*	5*	2*	17	18	15	5*	6*	12*	3*	2*	3*	
	(75 $\pm$ 16.5)			(3 $\pm$ 1.7)			(17 $\pm$ 1.5)			(8 $\pm$ 3.8)			(3 $\pm$ 0.6)			
2000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			
S9 mix (+)	0	148	144	132	8	12	12	28	19	20	31	34	34	10	18	16
		(141 $\pm$ 8.3)			(11 $\pm$ 2.3)			(22 $\pm$ 4.9)			(33 $\pm$ 1.7)			(15 $\pm$ 4.2)		
	62.5	162	168	152	11	10	14	29	31	27	42	35	29	18	17	17
		(161 $\pm$ 8.1)			(12 $\pm$ 2.1)			(29 $\pm$ 2.0)			(35 $\pm$ 6.5)			(17 $\pm$ 0.6)		
	125	193	185	186	16	21	11	25	25	29	25	27	45	14	6	11
		(188 $\pm$ 4.4)			(16 $\pm$ 5.0)			(26 $\pm$ 2.3)			(32 $\pm$ 11.0)			(10 $\pm$ 4.0)		
	250	176	157	160	13	10	15	18	26	21	24	26	28	20	19	17
		(164 $\pm$ 10.2)			(13 $\pm$ 2.5)			(22 $\pm$ 4.0)			(26 $\pm$ 2.0)			(19 $\pm$ 1.5)		
500	150	172	152	8	16	12	17	32	28	41	40	37	15	14	15	
	(158 $\pm$ 12.2)			(12 $\pm$ 4.0)			(26 $\pm$ 7.8)			(39 $\pm$ 2.1)			(15 $\pm$ 0.6)			
1000	130	124	119	1	5	10	32	29	23	33	20	30	5	17	13	
	(124 $\pm$ 5.5)			(5 $\pm$ 4.5)			(28 $\pm$ 4.6)			(28 $\pm$ 6.8)			(12 $\pm$ 6.1)			
2000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	637	601	526	792	701	662	260	236	212	622	586	637	507	568	625
	(588 $\pm$ 56.6)			(718 $\pm$ 66.7)			(236 $\pm$ 24.0)			(615 $\pm$ 26.2)			(567 $\pm$ 59.0)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	939	994	968	324	358	433	825	803	912	478	427	428	386	322	395
	(967 $\pm$ 27.5)			(372 $\pm$ 55.8)			(847 $\pm$ 57.6)			(444 $\pm$ 29.2)			(368 $\pm$ 39.8)			

The purity of the test substance was 98.328 %.

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

\*: Growth inhibition was observed.

*In Vitro* Chromosomal Aberration Test of 4-Ethylphenol  
on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

4-エチルフェノールの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理では0.15 mg/mL, S9 mix非存在下およびS9 mix存在下における短時間処理ではそれぞれ0.41 mg/mLおよび0.15 mg/mLであった。従って、各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度設定した。連続処理では、24時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間連続処理では0.075 mg/mL, S9 mix非存在下および存在下での短時間処理では0.20 mg/mLおよび0.075 mg/mLであったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理した群では、中濃度群(0.038 mg/mL)および高濃度群(0.075 mg/mL)において染色体の構造異常が誘発され、その頻度はそれぞれ6.5%および21.0%(gapを除く)であった。S9 mix非存在下の短時間処理では、いずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix存在下での短時間処理では、高濃度群(0.075 mg/mL)において染色体の構造異常が誘発され、その頻度は11.0%(gapを除く)であった。倍数性細胞の誘発作用については、傾向性検定で有意差( $p < 0.01$ )が認められたが、その誘発頻度が低いことから、陰性と判定した。

以上の結果より、本試験条件下で4-エチルフェノールは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月, 入手時:継代4代, 現在21代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、仔牛血清(CS, Cansera International)を10

vol%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

$2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. S9

S9(キッコーマン(株))は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

4-エチルフェノール(ロット番号:81029A, 丸善石油化学(株), 東京)は、白色結晶で、水に対しては100 mmol/L未滿, DMSOでは2 mol/L以上, アセトンでは50 mg/mL以上で溶解し、融点44.8°C, 沸点219°C, 蒸気圧2.7kPa(115°C)で、純度98.328%(不純物は不明)の物質で、室温で保存した。被験物質原体は、常温で安定であった。

6. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に用いた。溶媒はDMSO(ロット番号:ACL5008, 和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5 vol%になるように加えた。

7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%細胞増殖抑制濃度は0.15 mg/mL, S9 mix非存在下および存在下における

短時間処理では、それぞれ0.41 mg/mLおよび0.15 mg/mLであった (Fig. 1).

## 8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(連続処理およびS9 mix存在下での短時間処理:0.019, 0.038, 0.075, 0.15, 0.30 mg/mL, S9 mix非存在下での短時間処理:0.050, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 mg/mL). 陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、局方注射用水(株大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

## 9. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3 vol%ギムザ溶液で染色した。

## 10. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果 (Table 1, 2), 連続処理では0.075 mg/mLが、S9 mix非存在下およびS9 mix存在下での短時間処理では0.20 mg/mLおよび0.075 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会(MMS)<sup>21)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

## 11. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

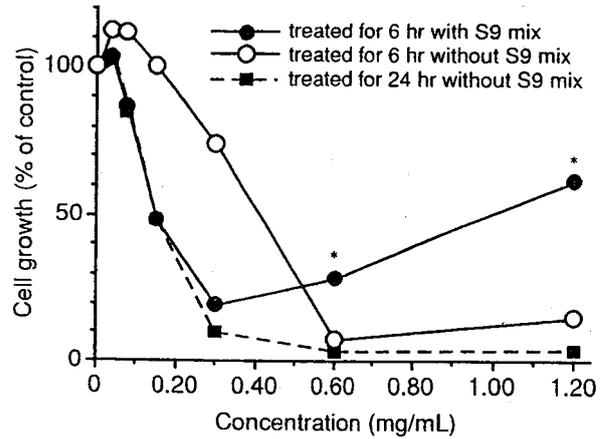


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4-ethylphenol

\*: Dead cells remained adhering onto the culture dishes.

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法<sup>21)</sup>により、有意差検定を実施した ( $p < 0.01$ ). また、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定<sup>31)</sup> ( $p < 0.01$ )を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

## 結果および考察

連続処理による染色体分析の結果を Table 1 に示した。4-エチルフェノールを加えて24時間連続処理した群では、中濃度群 (0.038 mg/mL) および高濃度群 (0.075 mg/mL) において染色体異常が誘発され、その頻度はそれぞれ6.5%および21.0% (gapを除く)であった。一方、倍数性細胞の誘発作用については、高濃度群 (0.075 mg/mL) では毒性のために800細胞の観察できず、それぞれの観察細胞数は722細胞であったが、すべての処理群において、有意な倍数性細胞の増加は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。4-エチルフェノールを加え、S9 mix非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix存在下で6時間処理した場合は、高濃度群 (0.075 mg/mL) で有意な染色体異常の増加が認められ、その頻度は11.0% (gapを除く)であった。また、中および高濃度群 (0.038 mg/mL および 0.075 mg/mL) において、倍数性細胞の出現頻度に有意差が認められ、傾向性検定 ( $p < 0.01$ ) でも有意差が認められたが、その誘発頻度が1.50~1.63%と低いことから、陰性と判定した。

従って、4-エチルフェノールは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

フェノール類のうち、側鎖に炭化水素を有している化合物の一つである4-(1-メチルプロピル)フェノールにつ

いては、染色体異常を誘発しないことが報告されている<sup>4)</sup>。一方、*p-tert*-ブチルフェノールは、染色体の構造異常を誘発することに加え、倍数性細胞の高頻度誘発(最高出現頻度:93.18%)が特徴的である<sup>5)</sup>。また、本試験と平行して実施した、3-エチルフェノールの染色体異常試験結果についても陽性の結果が得られている<sup>6)</sup>が、本物質の結果とは異なり、代謝活性化の処理系列においてのみ構造異常の誘発が認められている。これらのことから、側鎖に炭化水素を有するフェノール類は、炭化水素の結合位置および種類が染色体異常の発現と関わっており、発現する異常のタイプ(構造異常および倍数性細胞)または細胞に対する作用様式を決定している可能性が示唆された。

### 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 16-37.
- 2) 吉村功編, “毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ,” サイエンティスト社, 東京, 1987, pp. 76-78.
- 3) 吉村功, 大橋靖夫編, “毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析,” 地人書館, 東京, 1992, pp. 218-223.
- 4) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **2**, 347(1995).
- 5) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **4**, 301(1996).
- 6) 日下部博一, 化学物質毒性試験報告, **8**, 764(2001).

### 連絡先

試験責任者: 山影康次  
試験担当者: 日下部博一, 佐々木澄志, 高橋俊孝,  
若栗 忍, 橋本恵子  
財団法人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: Kohji Yamakage (Study director)  
Hirokazu Kusakabe, Kiyoshi Sasaki,  
Toshitaka Takahashi, Shinobu Wakuri,  
Keiko Hashimoto  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 4-ethylphenol (4EP)<sup>a)</sup> without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations								Others <sup>d)</sup>	No. of cells with aberrations		POL <sup>e)</sup> (%)	Trend test <sup>f)</sup>		Concurrent cytotoxicity <sup>g)</sup> (%)	Mitotic index <sup>h)</sup> (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>e)</sup>	total	TAG (%)		TA (%)	TA		POL			
Solvent <sup>b)</sup> 0		24	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—	
4EP 0.019		24	200	4	1	5	3	1	0	14	0	11 (5.5)	8 (4.0)	0.00			102.0	—	
4EP 0.038		24	200	3	6	7	0	1	0	17	3	16* (8.0)	13* (6.5)	0.13	+	-	89.0	—	
4EP 0.075		24	200	4	24	18	0	4	0	50	1	45* (22.5)	42* (21.0)	0.00 <sup>i)</sup>			68.5	1.4, 1.2	
4EP 0.15 <sup>j)</sup>		24	—														33.0	0.4, 0.0	
4EP 0.30 <sup>k)</sup>		24	—														6.5	—	
MC 0.05 μg/mL		24	200	2	49	119	2	3	10	185	0	105* (52.5)	104* (52.0)	0.00			—	—	

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, POL: polyploid, MC: mitomycin C.

a) Purity was 98.328%. b) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran-Armitage's trend test was done at  $p < 0.01$ . g) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater<sup>TM</sup>. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Seven hundred and twenty-two cells were analysed. j) Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity. k) Chromosome specimens were not made because of severe cytotoxicity.

\*: Significantly different from solvent control at  $p < 0.01$  by Fisher's exact probability test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4-ethylphenol (4EP)<sup>a)</sup> with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations								Others <sup>d)</sup>	No. of cells with aberrations		POL <sup>e)</sup> (%)	Trend test <sup>f)</sup>		Concurrent cytotoxicity <sup>g)</sup> (%)	Mitotic index <sup>h)</sup> (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>e)</sup>	total	TAG (%)		TA (%)	TA		POL			
Non-treatment				200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			—	—	
Solvent <sup>b)</sup> 0		-	6 (18)	200	0	2	0	0	1	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—	
4EP 0.050		-	6 (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			85.0	—	
4EP 0.10		-	6 (18)	200	1	2	2	0	0	0	5	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38		-	88.5	—	
4EP 0.20		-	6 (18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38			76.0	12.8, 9.8	
4EP 0.40 <sup>i)</sup>		-	6 (18)	—														2.0	—	
4EP 0.80 <sup>j)</sup>		-	6 (18)	—														19.0	—	
MC 0.1 μg/mL		-	6 (18)	200	1	53	131	7	1	0	193	3	101* (50.5)	100* (50.0)	0.00			—	—	
Solvent <sup>b)</sup> 0		+	6 (18)	200	0	1	0	2	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			100.0	—	
4EP 0.019		+	6 (18)	200	2	2	1	1	0	0	6	0	5 (2.5)	3 (1.5)	0.00			95.0	—	
4EP 0.038		+	6 (18)	200	2	2	7	5	0	0	16	1	10 (5.0)	8 (4.0)	1.50*	+	+	83.5	—	
4EP 0.075		+	6 (18)	200	1	13	35	2	0	10	61	0	22* (11.0)	22* (11.0)	1.63*			56.0	4.6, 6.8	
4EP 0.15 <sup>j)</sup>		+	6 (18)	—														38.0	2.0, 0.4	
4EP 0.30 <sup>k)</sup>		+	6 (18)	—														21.0	Tox, Tox	
CPA 5 μg/mL		+	6 (18)	200	11	45	193	3	1	0	253	1	124* (62.0)	121* (60.5)	0.00			—	—	

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, POL: polyploid, MC: mitomycin C, CPA: cyclophosphamide, Tox: cytotoxic.

a) Purity was 98.328%. b) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran-Armitage's trend test was done at  $p < 0.01$ . g) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater<sup>TM</sup>. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome specimens were not made because of severe cytotoxicity. j) Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity.

\*: Significantly different from solvent control at  $p < 0.01$  by Fisher's exact probability test.

## 4-エ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 4-Ethylphenol in Rats

#### 要約

4-エチルフェノールは、反応性高分子(ポリパラビニルフェノール)原料、酸化防止剤、医薬品・農薬・染料などの原料として使用されている。4-エチルフェノールを0(オリブ油)、100、300および1000 mg/kgの投与量で、1群当たり雌雄各7あるいは14匹のCrj:CD(SD)IGSラットに28日間反復経口投与してその毒性を検討した。さらに、0および1000 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて投与終了の翌日から14日間観察を継続して投与期間終了時にみられた毒性の回復性についても併せて検討した。

100 mg/kg群では、いずれの検査項目にも変化はみられなかった。

300 mg/kg群では、投与期間終了時に雄の肝臓の絶対重量および相対重量に高値がみられた。病理組織学検査では、雄で前胃に扁平上皮過形成が認められた。

1000 mg/kg群の一般状態は、投与期間を通して投与後約1時間までの間によるめき歩行または流涎が雌雄とも観察された。回復期間中には異常は観察されなかった。体重は、雄で投与7日から28日に、雌で投与14日から28日に低値がみられた。回復期間中は、雌雄とも体重は対照群より低値であったが、体重増加率は対照群を上回り、回復傾向がみられた。摂餌量は、雌雄とも投与期間中低値がみられた。投与4週の尿検査では、雌の尿量に高値がみられた。投与期間終了時の血液生化学検査では、雄でGPTの高値、雌で総コレステロールの高値がみられた。器官重量は、雄で肝臓および腎臓の相対重量、雌で肝臓の相対重量に高値がみられた。剖検では、雌雄とも前胃の粘膜肥厚が高頻度でみられ、病理組織学検査では、雌雄とも前胃に扁平上皮過形成が認められた。これらの変化は、回復期間終了時にはみられなかった。

以上のことから、本試験条件下における無影響量(NOEL)は、雄で100 mg/kg/day、雌で300 mg/kg/dayであると結論される。

#### 方法

##### 1. 被験物質および投与液の調製

4-エチルフェノール(純度:98.3%, Lot No. 81029A, 丸善石油化学(株), 東京)は、白色結晶で、融点が44.8℃、沸点が219℃、水に不溶、アセトン、DMSOおよびエーテルに可溶である。入手後の被験物質は遮光気密容器に入れ、冷所で保存した。残余被験物質を製造業者が分析し、投与期間中の被験物質の安定性を確認した。投与液

の調製は、投与量ごとに被験物質を精秤し、所定の濃度となるように溶媒である日本薬局方オリブ油(ヤクハン製薬(株))を加えて溶解することによって行った。調製液は、室温で3時間、冷暗所保存条件下で8日間安定であることが確認されていることから、調製後直ちに遮光気密容器に入れて冷蔵庫内(2~8℃)に保存し、調製後7日以内に使用した。投与に用いる初回および最終調製時の各濃度の調製液について被験物質の濃度を分析した結果、含有率は設定値の98.5~102%であり、調製液は規定の濃度を含有することを確認した。

##### 2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)よりSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS)の雌雄を4週齢で購入して雄は6日間、雌は7日間の検疫・馴化を行った後、健康な動物を雌雄各42匹選択して5週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は雄が150~168g、雌が122~147gであった。動物は、温度21~24℃、湿度37~61%、換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(8:00から20:00まで点灯)に制御されたバリアシステムの飼育室で、ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は5匹以内、群分け後は個別で飼育した。飼料はγ線照射固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて、飲料水は札幌市水道水を自動給水装置を用いてそれぞれ自由に摂取させた。

##### 3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では、0、250、500、1000および2000 mg/kg/dayの投与量で1群雌雄各5匹のSD系ラットに14日間経口投与した。その結果、2000 mg/kg群では投与3日までに雌雄とも全例死亡した。1000 mg/kg群では、雌1例の死亡、雌雄の体重および摂餌量の低値、前胃粘膜の肥厚、肝臓の相対重量の高値がみられた。血液生化学検査では、1000 mg/kg群の雄でGPTと総コレステロールの高値がみられた。500 mg/kg群の雄ではGPTの高値がみられた。250 mg/kg群には被験物質の投与によると思われる変化は認められなかった。以上のことから、28日間反復経口投与毒性試験の本試験では、雌雄のラットに確実に毒性が認められると予測される1000 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3で除して300および100 mg/kgの3用量群とし、これに溶媒(オリブ油)のみを同様に投与する対照群を含めた計4群を設定した。1群の動物数は雌雄とも7または14匹とし、投与前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行っ

た。

投与に際しては、ラット用胃ゾンデを用いて1日1回、28日間の計28回、強制的に胃内に投与した。投与容量を5 mL/kgとし、各動物の投与液量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて算出した。

#### 4. 検査項目

##### 1) 一般状態観察

投与期間および回復期間中、全例について1日1回以上の頻度で観察した。

##### 2) 体重および摂餌量測定

体重は全例について、投与1日(投与前)、投与2, 7, 14, 21および28日(投与終了日)、回復1, 7および14日ならびに剖検日に測定し、投与1日から28日、回復1日から14日の体重増加量および体重増加率を算出した。また、摂餌量は剖検日を除いて体重と同じ日に測定した。

##### 3) 尿検査

投与4週および回復2週に全例を代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行い、同時に採尿中の飲水量(重量)も測定した。約3時間の蓄尿についてpH, 蛋白, 糖, ケトン体, ウロビリノーゲン, ビリルビン, 潜血反応(以上, マルティスティックス, バイエル・三共)および色調(肉眼観察)ならびに沈渣(鏡検)を検査し, 21時間蓄尿について尿量(容量)および比重(屈折計法, アタゴ)を測定した。

##### 4) 血液学検査

全例について剖検時に16~20時間絶食させた後, エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し, EDTA・2Kで処理した血液を用いて赤血球数, ヘマトクリット値, 血小板数, 白血球数(以上, 電気抵抗法), ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)(以上, 自動血球計数装置F-820, シスメックス), 平均赤血球容積(赤血球数, ヘマトクリット値より算出), 平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数, ヘモグロビン量より算出), 平均赤血球ヘモグロビン濃度(ヘマトクリット値, ヘモグロビン量より算出), 網赤血球数(Brecher法)および白血球百分比(May-Grünwald-Giemsa染色)を測定した。また, 3.8%クエン酸ナトリウムで処理した後, 3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いて, プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上, 血液凝固自動測定装置アメルングKC-10A, バクスター)を測定した。

##### 5) 血液生化学検査

血液学検査と同様に, 全例について腹部大動脈より採血し, ヘパリン処理した後, 3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いてGOT(IFCC法), 乳酸脱水素酵素(Wróblewski & La Due法)およびグルコース(ヘキソキナーゼ法)を測定し, 無処理血液を3000回転/

分で10分間遠心分離して得られた血清を用いてGPT(IFCC法), アルカリホスファターゼ(Bessey-Lowry法),  $\gamma$ -GTP(包接L- $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法), 総コレステロール(酵素法), トリグリセリド(遊離グリセロール消去法), 総ビリルビン(アゾビリルビン法), 尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法), クレアチニン(Jaffé法), カルシウム(OCPC法), 無機リン(Fiske-SubbaRow法), 総蛋白(ビウレット法)(以上, 自動分析装置7150形, 日立製作所), ナトリウム, カリウム(以上, 炎光光度法, 自動炎光光度計480型, コーニング), クロール(電量滴定法, クロライドカウンターCL-6M, 平沼産業), 蛋白分画およびA/G比(以上, セルロースアセテート膜電気泳動法, 全自動電気泳動装置CTE-150, 常光)を測定した。

##### 6) 剖検および器官重量測定

投与28日および回復14日の翌日に全例について, 体外表を観察し, エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。また, 脳, 肺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 下垂体, 胸腺, 甲状腺(上皮小体含む), 精巣, 精巣上体および卵巣の重量を測定するとともに, 絶対重量を剖検日の体重で除し100を乗じて相対重量を算出した。

##### 7) 病理組織学検査

全例について脳(大脳および小脳), 下垂体, 胸腺, 甲状腺, 上皮小体, 副腎, 脾臓, 心臓, 胸部大動脈, 舌, 食道, 胃(前胃および腺胃), 肝臓, 脾臓, 十二指腸, 空腸, 回腸(パイエル板含む), 盲腸, 結腸, 直腸, 喉頭, 気管, 肺(気管支含む), 腎臓, 膀胱, 前立腺, 精囊(凝固腺含む), 卵巣, 子宮(角部および頸部), 膈, 乳腺(原則として右腹部, 雌のみ), 皮膚(腹部), 胸骨(骨髓含む), 大腿骨(骨髓含む), 脊髄(頸部), 骨格筋(大腿部), 腸間膜リンパ節, 下顎リンパ節, 顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および坐骨神経を10%中性緩衝ホルマリン液で, 眼球およびハーダー腺をデビッドソン液で固定・保存し, 精巣および精巣上体をブアン液で固定後70%エタノールで保存した。これらの器官・組織を常法に従ってパラフィン包埋後, 薄切してヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し, 対照群および高用量群の全例を鏡検した。さらに前胃, 喉頭, 食道および腺胃は, その他の用量群の雌雄の動物全例, ならびに腎臓は雄全例を鏡検した。

#### 5. 統計解析

体重, 体重増加量, 体重増加率, 摂餌量, 尿検査の定量的項目, 血液学検査, 血液生化学検査, 器官の絶対重量および相対重量の結果についてBartlettの検定法を行い, 等分散性を解析した。等分散の場合は一元配置分散分析法で解析し, 不等分散の場合はKruskal-Wallisの検定法で解析した。一元配置分散分析の結果, 有意差がみられた場合は, Dunnettの検定法で解析した。Kruskal-Wallis法の解析の結果, 有意差がみられた場合は, Mann-WhitneyのU検定法で解析した。

尿比重および尿検査の定性的項目の結果については,

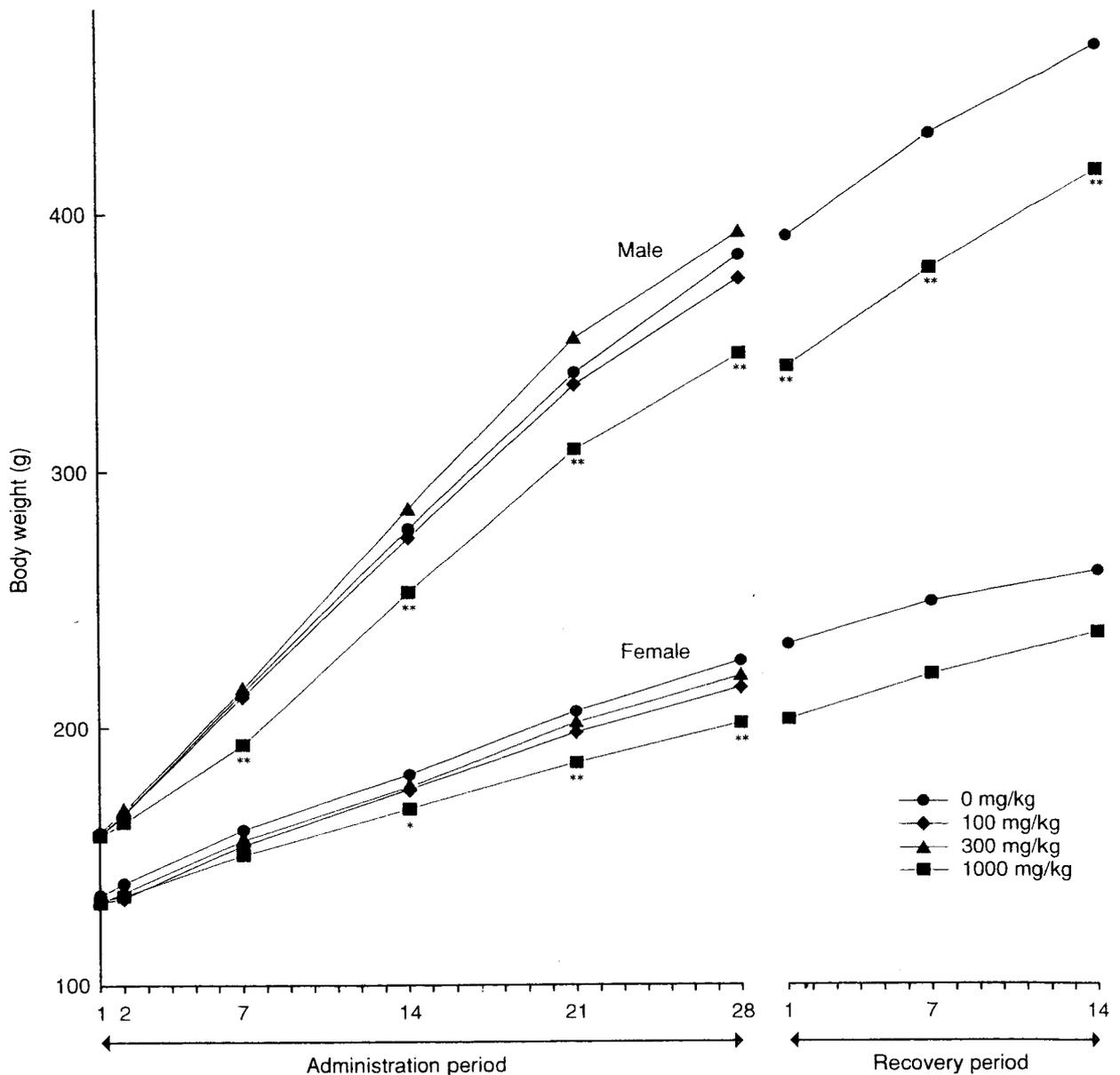


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test. Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Kruskal-Wallisの検定法で解析し、有意差がみられた場合は、Mann-WhitneyのU検定法を用いて解析した。

これら対照群と被験物質投与群との間の検定においては、いずれも有意水準を5%とした。

## 結果

### 1. 一般状態

1000 mg/kg群では、流涎が投与6日以降投与終了日までの期間中、雄で9例、雌で6例に投与直後から30分の間に観察された。また、よろめき歩行が雄で投与1, 3, 10, 17日に、雌で投与3, 14, 16日に各1例観察され、これらのうち、投与1日の雄1例および投与3日の雌1例には横臥も観察された。これらの症状は、投与後数分から発現し、発現後約1時間で消失した。その他に、外尿

道口周囲の被毛の汚れが雄で投与15日に1例観察され、雌では投与期間を通して散見された。回復期間にはいずれの動物にも変化は認められなかった。

### 2. 体重 (Fig. 1)

投与期間中、100および300 mg/kg群では雌雄とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。1000 mg/kg群では、雄で投与7日から28日まで、雌で投与14日から28日までの各測定日の体重に対照群と比較して有意な低値が認められた。投与期間中の体重増加量および体重増加率も雌雄とも有意な低値であった。

1000 mg/kg群の回復期間の体重は、期間を通して雄は有意な低値、雌は低値傾向を示した。しかし、雌雄とも体重増加量は対照群を上回り、体重増加率は有意な高値であった。

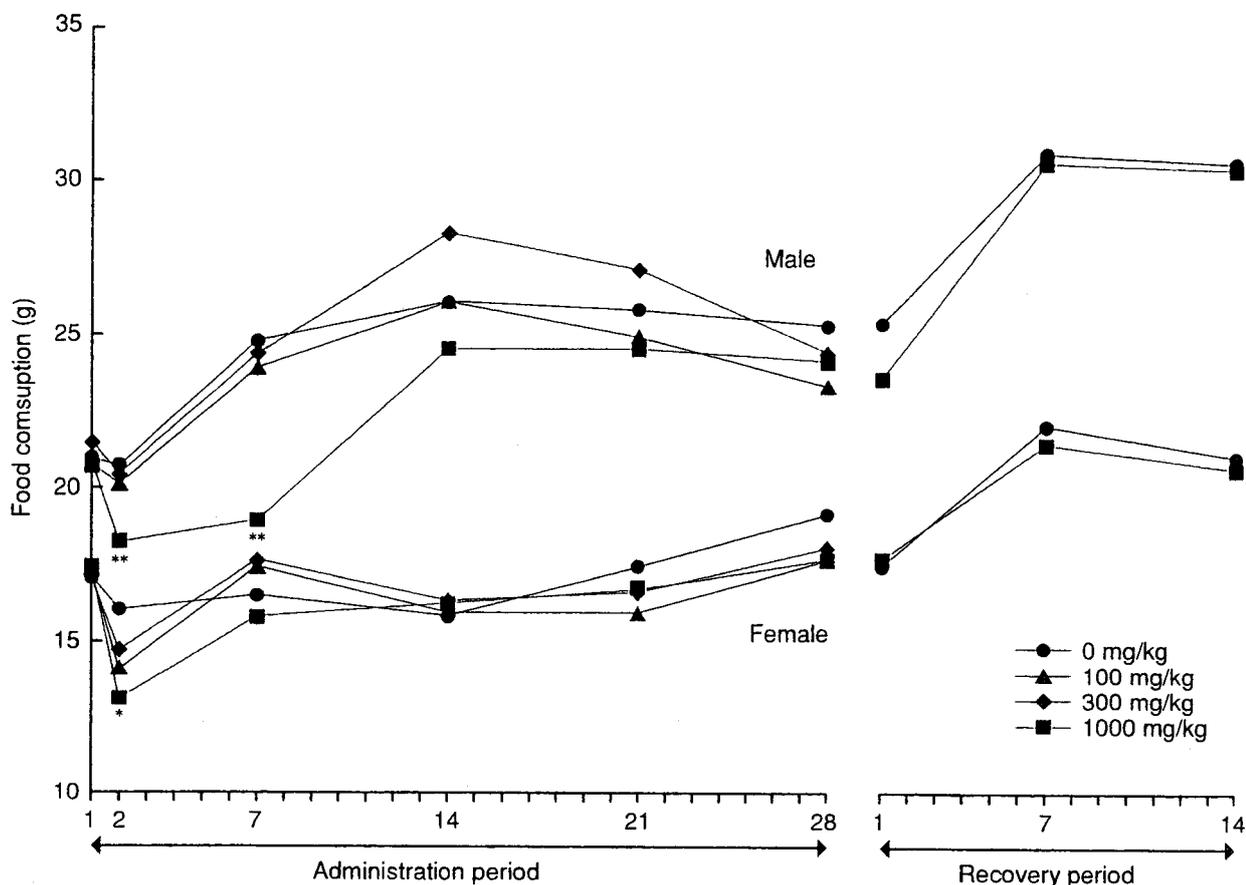


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test  
Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

### 3. 摂餌量 (Fig. 2)

投与期間中、100および300 mg/kg群では雌雄とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。1000 mg/kg群の摂餌量は、雄で投与2日および7日に、雌で投与2日に対照群と比較して有意な低値が認められた。

1000 mg/kg群の回復期間の摂餌量には、雌雄とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

### 4. 尿検査および飲水量

投与4週の検査では、1000 mg/kg群の雌で尿量が有意な高値であったこと以外、雌雄ともいずれの投与群においても、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

回復2週の検査では、いずれの検査項目にも変化は認められなかった。

### 5. 血液学検査 (Table 1, 2)

投与期間終了時の検査では、300 mg/kg群において、雄の平均赤血球容積および雌の桿状核好中球の比率が対照群と比較して有意な高値であったが、1000 mg/kg群におけるそれらの値は対照群とはほぼ同じであったことから偶発的な変動と考えられた。その他の検査項目では、いずれの投与群においても対照群と比較して有意な差は認められなかった。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群の雌で赤血球数

の有意な低値および平均赤血球ヘモグロビン量の有意な高値がみられたが、いずれも偶発的な変化と考えられた。

### 6. 血液生化学検査 (Table 3, 4)

投与期間終了時の検査では、100 mg/kg群の雄でアルブミン分画およびA/G比の低値、雌でナトリウムの高値、300 mg/kg群の雄でグルコースの高値がみられたが、これらはいずれも1000 mg/kg群では認められない変化であった。1000 mg/kg群では、雄でGPTが対照群と比較して有意な高値を示した。その他に $\gamma$ グロブリン分画およびナトリウムの有意な低値がみられたが、関連項目に明らかな変化のないことから、4-エチルフェノール投与と関連のない変化と考えられた。雌では、 $\gamma$ -GTP、総コレステロールおよびトリグリセリドに有意な高値がみられた。これらのうち $\gamma$ -GTPの高値は対照群の変動範囲が狭いことによるもの、トリグリセリドの高値は特に高値を示した個体が1例みられたことによる変動であり、4-エチルフェノール投与と関連のない変化と考えられた。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群で、雄の総ビリルビンおよび無機リンならびに雌のアルカリホスファターゼに有意な高値がみられたが、いずれも軽度な変化であり、偶発的な変動と考えられた。

## 7. 剖検

投与期間終了時には、100および300 mg/kg群では、雌雄とも異常は認められなかった。1000 mg/kg群では、前胃粘膜の肥厚が雄で5例、雌で6例にみられた。さらに同群の雌1例の腺胃粘膜に暗赤色斑がみられた。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群の雌雄とも異常は認められなかった。

## 8. 器官重量 (Table 5, 6)

投与期間終了時には、雄では、300 mg/kg群において肝臓の絶対重量および相対重量に对照群と比較して有意な高値が認められた。1000 mg/kg群では、肝臓の絶対重量に高値傾向がみられ、相対重量は有意な高値であった。また、腎臓の相対重量に有意な高値がみられた。雌では、1000 mg/kg群で肝臓の絶対重量に高値傾向がみられ、相対重量が有意な高値であった。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群の雄では、剖検日の体重が有意な低値を示し、肺、下垂体、胸腺および精巣の絶対重量に有意な低値がみられたが、相対重量には有意差はなかった。脳および精巣上体の相対重量は有意な高値であった。雌では、いずれの器官の重量にも对照群との間に有意な差はみられなかった。

## 9. 病理組織学検査 (Table 7, 8)

投与期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雌雄において消化管に変化が認められ、雄で、前胃境界線におけるびらんが1例と扁平上皮過形成が4例、前胃のその他の部位の扁平上皮の変性と粘膜下織の水腫が各2例、扁平上皮過形成が7例全例(軽度;4例、中等度;3例)にみられた。雌では、喉頭の粘膜固有層における好中球浸潤、喉頭のびらん、食道の扁平上皮過形成が各1例、前胃の扁平上皮の変性と粘膜下織の水腫が各2例、粘膜下織における肉芽形成が1例、扁平上皮過形成が6例(軽度;1例、中等度;5例)、潰瘍が1例にみられた。300 mg/kg群では、雄で前胃境界線における扁平上皮過形成、前胃のその他の部位の扁平上皮過形成(軽度)が各1例みられた。さらに、雄では近位尿細管上皮の硝子滴が、100、300および1000 mg/kg群でそれぞれ、3例、1例および4例みられた。これらの変化は、回復期間終了時には認められなかった。

## 考察

1000 mg/kg群では、一般状態の変化として雌雄ともよろめき歩行または流涎が投与直後から1時間の間に認められた。これらの症状は回復期間中にはみられなかった。体重は雌雄とも投与期間中増加が抑制され、低値がみられた。回復期間には雌雄とも体重は对照群より低値であったが、回復期間終了時の体重増加率は对照群を上回っており、回復傾向がみられた。摂餌量には投与期間中のみ雌雄で低値がみられた。

投与4週の尿検査で認められた雌の尿量の高値については、同時期に当試験施設で実施された3-メチルフェノールおよび3-アミノフェノールの28日間反復経口投与

毒性試験<sup>2,3)</sup>の高用量群の雄または雌において同様の変化が認められていることから、フェノール類に共通の変化であり、4-エチルフェノール投与に起因するものと考えられた。回復2週の検査では同じ変化はみられなかった。

投与期間終了時の血液生化学検査で雄のGPTおよび雌の総コレステロールの高値がみられた。雄のGPTの高値は、用量設定試験でも認められているが、GOT、アルカリホスファターゼ、 $\gamma$ -GTP、総ビリルビン等の肝機能検査に変化がないことから、肝障害に基づく変化ではないと考えられた。総コレステロールの高値は、用量設定試験では雄に、本試験では雌に認められ、4-エチルフェノールが脂質代謝系に対して影響を及ぼす可能性が考えられた。回復期間終了時には、投与期間終了時に変化のみられた項目にはいずれも異常はなく、回復性が認められた。

剖検では、前胃の粘膜肥厚が雌雄とも高頻度で発現し、病理組織学検査においても前胃に扁平上皮過形成が雄では全例に、雌では7例中6例にみられ、その他にびらん、扁平上皮の変性と粘膜下織の水腫、粘膜下織における肉芽形成または潰瘍等の変化がみられた。その他の消化管の病理組織学検査では雌で腺胃粘膜のびらん、喉頭の粘膜固有層における好中球浸潤、喉頭のびらん、食道の扁平上皮過形成が各1例認められた。これらの変化はいずれも、4-エチルフェノールが皮膚・粘膜に刺激性を持つことによるものと考えられた。回復期間終了時には、これらの変化は認められなかった。

器官重量は、投与期間終了時に雌雄の肝臓の重量および相対重量に高値傾向または高値がみられた。雄では、さらに腎臓の相対重量に有意な高値がみられた。しかし、雌雄の肝臓および雄の腎臓には4-エチルフェノール投与に起因すると考えられる病理組織学的異常は認められなかった。回復期間終了時に雄で肺、下垂体、胸腺および精巣の絶対重量の低値、脳および精巣上体の相対重量の高値がみられたが、体重の低値に伴った変化と考えられた。

その他の1000 mg/kg群における病理組織学的所見のうち、投与期間終了時に雄において腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴の発現率が对照群の0%に対して57.1%と高かったが、変化の程度が軽度であること、自然発生で認められることが知られている<sup>4,5)</sup>こと、ならびに当試験施設の過去5年間9試験での背景データにおける発現率(0~71.4%)の範囲内であることから、毒性学的意義は低いと考えられた。100および300 mg/kg群では、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴の発現の増加は認められなかった。

300 mg/kg群では、雄において投与期間終了時に、肝臓の絶対重量と相対重量に有意な高値がみられ、前胃に病理組織学的に扁平上皮過形成が認められた。これらはいずれも1000 mg/kg群でみられている変化であることから、4-エチルフェノール投与に起因するものと考えられた。

100 mg/kg群では、いずれの検査項目にも変化はみられなかった。

以上のことから、本試験条件下における無影響量 (NOEL) は、雄で100 mg/kg/day, 雌で300 mg/kg/day であると結論される。

#### 文献

- 1) “13398の化学商品,” 化学工業日報社, 東京, 1998, p. 613.
- 2) 藤井咲子, 化学物質毒性試験報告, 8, 460(2001).
- 3) 須永昌男, 化学物質毒性試験報告, 8, 486(2001).
- 4) 田中寿子, “実験動物の病理組織,” 榎本真, 林裕造, 田中寿子 編, ソフトサイエンス社, 東京, 1981, pp. 380-398.
- 5) 高橋道人 監訳, “毒性病理学の基礎-実験動物の病理,” ソフトサイエンス社, 東京, 1992, pp. 155-170.

#### 連絡先

試験責任者: 藤井咲子  
試験担当者: 堀川裕尚, 咲間正志, 平田真理子,  
古川正敏, 山本美代子  
(株)化合物安全性研究所  
〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24  
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

#### Correspondence

Authors: Sakiko Fujii (Study director)  
Hironao Horikawa, Masashi Sakuma,  
Mariko Hirata, Masatoshi Furukawa,  
Miyoko Yamamoto  
Safety Research Institute for Chemical  
Compounds Co., Ltd.  
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,  
004-0839, Japan  
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Hematological findings of male rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	777.4 $\pm$ 24.7	784.9 $\pm$ 41.2	758.6 $\pm$ 26.3	765.9 $\pm$ 28.8	820.3 $\pm$ 46.0	835.9 $\pm$ 34.2
Hematocrit (%)	47.60 $\pm$ 0.83	47.61 $\pm$ 2.31	48.34 $\pm$ 1.84	47.03 $\pm$ 1.60	47.07 $\pm$ 2.61	48.39 $\pm$ 1.65
Hemoglobin (g/dL)	15.81 $\pm$ 0.25	15.77 $\pm$ 0.50	16.00 $\pm$ 0.60	15.56 $\pm$ 0.53	16.04 $\pm$ 0.79	16.36 $\pm$ 0.51
MCV (fL)	61.27 $\pm$ 1.66	60.69 $\pm$ 1.33	63.73 $\pm$ 1.26*	61.43 $\pm$ 1.47	57.41 $\pm$ 1.77	57.94 $\pm$ 2.25
MCH (pg)	20.37 $\pm$ 0.58	20.10 $\pm$ 0.64	21.09 $\pm$ 0.50	20.31 $\pm$ 0.49	19.59 $\pm$ 0.79	19.57 $\pm$ 0.63
MCHC (g/dL)	33.21 $\pm$ 0.44	33.16 $\pm$ 0.85	33.11 $\pm$ 0.73	33.09 $\pm$ 0.82	34.11 $\pm$ 0.86	33.81 $\pm$ 0.50
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	123.0 $\pm$ 36.5	139.1 $\pm$ 48.0	146.1 $\pm$ 31.7	134.4 $\pm$ 41.5	109.7 $\pm$ 28.9	117.7 $\pm$ 21.8
Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	122.11 $\pm$ 17.85	119.30 $\pm$ 13.38	112.63 $\pm$ 7.71	118.29 $\pm$ 8.66	107.37 $\pm$ 8.67	108.71 $\pm$ 6.89
Reticulocyte (%)	28.3 $\pm$ 6.2	23.7 $\pm$ 5.7	26.9 $\pm$ 7.5	30.3 $\pm$ 7.6	20.9 $\pm$ 4.0	19.1 $\pm$ 3.3
PT (sec)	13.90 $\pm$ 0.66	15.29 $\pm$ 1.53	15.04 $\pm$ 1.63	14.33 $\pm$ 0.79	14.61 $\pm$ 1.57	14.39 $\pm$ 1.52
APTT (sec)	23.24 $\pm$ 2.09	26.10 $\pm$ 2.66	25.39 $\pm$ 3.42	24.96 $\pm$ 2.46	26.27 $\pm$ 2.24	24.29 $\pm$ 3.02
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophils						
Stab form	0.9 $\pm$ 1.2	1.3 $\pm$ 1.1	1.9 $\pm$ 1.6	2.6 $\pm$ 2.0	2.1 $\pm$ 1.2	2.0 $\pm$ 1.5
Segmented	7.3 $\pm$ 2.8	5.6 $\pm$ 3.1	7.6 $\pm$ 3.9	4.0 $\pm$ 1.7	7.3 $\pm$ 2.5	5.6 $\pm$ 2.2
Eosinophils	1.1 $\pm$ 1.1	1.0 $\pm$ 1.2	0.9 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 1.2	0.9 $\pm$ 1.1	1.0 $\pm$ 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
Monocytes	0.7 $\pm$ 1.0	0.7 $\pm$ 1.3	0.6 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 1.1	1.1 $\pm$ 0.9
Lymphocytes	90.0 $\pm$ 3.5	91.4 $\pm$ 4.9	89.1 $\pm$ 4.6	91.6 $\pm$ 3.5	88.4 $\pm$ 1.6	90.3 $\pm$ 2.8

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

Table 2 Hematological findings of female rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	769.4 $\pm$ 46.4	782.6 $\pm$ 41.5	765.0 $\pm$ 36.6	772.3 $\pm$ 46.4	793.7 $\pm$ 28.2	752.1 $\pm$ 28.0*
Hematocrit (%)	45.86 $\pm$ 3.20	45.93 $\pm$ 2.05	45.43 $\pm$ 1.88	45.71 $\pm$ 2.18	44.51 $\pm$ 1.63	42.94 $\pm$ 2.24
Hemoglobin (g/dL)	15.63 $\pm$ 0.90	15.69 $\pm$ 0.61	15.56 $\pm$ 0.58	15.69 $\pm$ 0.58	15.47 $\pm$ 0.57	15.09 $\pm$ 0.61
MCV (fL)	59.57 $\pm$ 1.35	58.73 $\pm$ 1.48	59.43 $\pm$ 1.59	59.24 $\pm$ 1.70	56.10 $\pm$ 0.97	57.07 $\pm$ 1.48
MCH (pg)	20.31 $\pm$ 0.45	20.07 $\pm$ 0.68	20.34 $\pm$ 0.51	20.34 $\pm$ 0.71	19.49 $\pm$ 0.44	20.06 $\pm$ 0.45*
MCHC (g/dL)	34.13 $\pm$ 0.63	34.17 $\pm$ 0.41	34.24 $\pm$ 0.48	34.34 $\pm$ 1.07	34.79 $\pm$ 0.47	35.16 $\pm$ 1.14
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	92.6 $\pm$ 17.9	72.7 $\pm$ 20.0	71.6 $\pm$ 14.7	100.3 $\pm$ 35.0	78.9 $\pm$ 16.5	84.1 $\pm$ 29.6
Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	121.40 $\pm$ 10.06	119.86 $\pm$ 14.04	121.86 $\pm$ 18.87	113.46 $\pm$ 11.26	102.49 $\pm$ 9.24	95.79 $\pm$ 6.78
Reticulocyte (%)	24.9 $\pm$ 3.1	25.4 $\pm$ 6.2	26.1 $\pm$ 3.7	23.6 $\pm$ 6.2	19.4 $\pm$ 3.8	21.9 $\pm$ 4.3
PT (sec)	14.20 $\pm$ 0.46	13.99 $\pm$ 0.61	13.73 $\pm$ 0.58	13.93 $\pm$ 0.50	13.77 $\pm$ 0.38	13.50 $\pm$ 0.43
APTT (sec)	20.76 $\pm$ 2.61	20.20 $\pm$ 1.37	20.30 $\pm$ 1.28	21.24 $\pm$ 0.98	19.60 $\pm$ 1.70	20.11 $\pm$ 1.56
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophils						
Stab form	0.6 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 1.2	2.4 $\pm$ 1.7**	0.9 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 2.1	1.4 $\pm$ 1.3
Segmented	5.3 $\pm$ 2.3	5.4 $\pm$ 2.4	6.6 $\pm$ 3.2	4.3 $\pm$ 3.4	4.0 $\pm$ 2.3	7.6 $\pm$ 6.5
Eosinophils	1.0 $\pm$ 1.2	0.4 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.9	0.4 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 1.2	1.7 $\pm$ 1.7
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
Monocytes	1.0 $\pm$ 1.2	1.1 $\pm$ 0.9	0.6 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.8	1.1 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.8
Lymphocytes	92.1 $\pm$ 3.2	92.1 $\pm$ 3.8	89.6 $\pm$ 4.1	93.9 $\pm$ 3.6	92.0 $\pm$ 3.5	88.6 $\pm$ 7.6

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table 3 Blood chemical findings of male rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	5.69 ± 0.18	5.79 ± 0.20	5.76 ± 0.05	5.66 ± 0.21	5.54 ± 0.19	5.44 ± 0.16
A/G	1.314 ± 0.084	1.204 ± 0.095*	1.209 ± 0.035	1.237 ± 0.092	1.101 ± 0.067	1.130 ± 0.070
Protein fraction (%)						
Albumin	56.86 ± 1.52	54.69 ± 1.94*	54.80 ± 0.70	55.37 ± 1.86	52.50 ± 1.52	53.14 ± 1.55
$\alpha_1$ -globulin	19.77 ± 1.84	22.00 ± 2.01	21.74 ± 1.41	21.69 ± 1.74	23.61 ± 2.40	22.79 ± 2.15
$\alpha_2$ -globulin	9.37 ± 1.05	9.06 ± 0.71	8.69 ± 0.62	9.76 ± 0.81	9.43 ± 0.81	9.74 ± 0.66
$\beta$ -globulin	12.87 ± 1.10	12.87 ± 0.73	13.43 ± 1.01	12.56 ± 0.60	12.77 ± 0.92	12.30 ± 1.09
$\gamma$ -globulin	1.13 ± 0.44	1.39 ± 0.32	1.34 ± 0.47	0.63 ± 0.18*	1.69 ± 0.76	2.03 ± 1.15
GOT (IU/L)	60.6 ± 3.6	60.9 ± 3.0	61.4 ± 4.4	62.0 ± 7.0	71.4 ± 12.4	66.9 ± 7.8
GPT (IU/L)	24.4 ± 3.3	23.6 ± 1.1	27.7 ± 3.0	40.6 ± 8.8**	31.3 ± 11.8	28.1 ± 3.5
ALP (IU/L)	496.4 ± 61.2	504.1 ± 98.8	534.4 ± 99.5	455.1 ± 87.1	308.3 ± 59.7	380.6 ± 87.3
LDH (IU/L)	267.7 ± 67.0	257.0 ± 56.0	302.7 ± 110.2	300.3 ± 40.1	318.4 ± 104.6	284.3 ± 64.2
$\gamma$ -GTP (IU/L)	0.77 ± 0.28	0.81 ± 0.20	0.73 ± 0.14	0.89 ± 0.23	0.39 ± 0.12	0.46 ± 0.22
Total bilirubin (mg/dL)	0.060 ± 0.006	0.059 ± 0.007	0.057 ± 0.005	0.064 ± 0.011	0.061 ± 0.007	0.074 ± 0.013*
Glucose (mg/dL)	148.0 ± 21.3	164.0 ± 8.9	171.4 ± 6.9*	149.9 ± 15.3	178.1 ± 27.4	153.9 ± 17.2
Total cholesterol (mg/dL)	65.9 ± 5.7	58.0 ± 8.2	63.4 ± 9.1	67.9 ± 9.2	66.3 ± 8.0	65.7 ± 22.5
Triglyceride (mg/dL)	45.9 ± 18.7	51.7 ± 11.5	72.6 ± 27.0	40.3 ± 23.5	52.0 ± 23.5	37.7 ± 12.4
Urea nitrogen (mg/dL)	13.71 ± 0.89	13.79 ± 1.12	13.31 ± 1.99	14.21 ± 2.17	16.17 ± 2.14	17.44 ± 2.16
Creatinine (mg/dL)	0.430 ± 0.019	0.429 ± 0.023	0.434 ± 0.024	0.409 ± 0.023	0.474 ± 0.044	0.441 ± 0.037
Sodium (mEq/L)	142.86 ± 1.14	141.79 ± 0.95	141.93 ± 0.53	140.57 ± 1.48**	143.79 ± 1.63	143.14 ± 1.57
Potassium (mEq/L)	4.813 ± 0.309	4.991 ± 0.313	4.730 ± 0.256	5.044 ± 0.298	4.526 ± 0.416	4.871 ± 0.175
Chlorine (mEq/L)	106.3 ± 1.8	105.7 ± 1.4	104.7 ± 1.4	104.3 ± 1.4	106.6 ± 1.6	107.6 ± 1.8
Calcium (mg/dL)	9.10 ± 0.21	9.11 ± 0.41	9.21 ± 0.24	8.97 ± 0.33	9.53 ± 0.26	9.50 ± 0.24
Inorganic phosphorous (mg/dL)	8.79 ± 0.71	8.77 ± 0.64	8.74 ± 0.61	9.50 ± 0.84	7.04 ± 0.61	7.66 ± 0.36*

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table 4 Blood chemical findings of female rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	5.54 ± 0.22	5.56 ± 0.20	5.61 ± 0.18	5.79 ± 0.29	5.73 ± 0.56	5.59 ± 0.31
A/G	1.410 ± 0.063	1.436 ± 0.041	1.434 ± 0.094	1.471 ± 0.057	1.426 ± 0.059	1.313 ± 0.139
Protein fraction (%)						
Albumin	58.57 ± 1.11	59.01 ± 0.69	58.96 ± 1.61	59.61 ± 0.93	58.84 ± 1.01	56.71 ± 2.83
α <sub>1</sub> -globulin	19.14 ± 0.91	19.51 ± 0.73	18.77 ± 1.43	18.16 ± 0.87	19.17 ± 1.64	19.29 ± 0.98
α <sub>2</sub> -globulin	8.27 ± 0.76	8.14 ± 0.86	8.50 ± 1.14	8.40 ± 0.84	8.56 ± 1.09	8.83 ± 0.62
β-globulin	12.47 ± 1.03	11.71 ± 0.84	12.31 ± 1.59	12.06 ± 1.17	11.24 ± 1.09	12.39 ± 2.81
γ-globulin	1.54 ± 0.38	1.61 ± 0.39	1.46 ± 0.45	1.77 ± 0.43	2.19 ± 0.52	2.79 ± 0.93
GOT (IU/L)	65.6 ± 19.5	54.6 ± 2.6	59.3 ± 2.9	59.7 ± 4.6	57.3 ± 6.9	66.4 ± 11.1
GPT (IU/L)	22.3 ± 8.4	20.7 ± 1.9	20.3 ± 1.8	26.6 ± 4.1	20.6 ± 2.7	23.4 ± 4.0
ALP (IU/L)	269.6 ± 43.1	310.0 ± 99.4	281.9 ± 50.7	292.1 ± 51.8	156.3 ± 44.7	218.6 ± 53.8*
LDH (IU/L)	287.7 ± 60.1	239.7 ± 50.1	262.9 ± 60.0	276.4 ± 50.4	316.3 ± 94.8	280.0 ± 37.0
γ-GTP (IU/L)	0.83 ± 0.10	1.00 ± 0.20	0.99 ± 0.23	1.13 ± 0.28*	0.53 ± 0.26	0.60 ± 0.23
Total bilirubin (mg/dL)	0.061 ± 0.007	0.054 ± 0.008	0.056 ± 0.008	0.061 ± 0.011	0.083 ± 0.014	0.079 ± 0.020
Glucose (mg/dL)	130.3 ± 10.2	135.6 ± 14.5	127.6 ± 12.4	124.0 ± 16.6	140.4 ± 28.9	122.0 ± 13.2
Total cholesterol (mg/dL)	61.4 ± 13.1	69.1 ± 9.9	65.4 ± 5.1	81.6 ± 14.3**	78.9 ± 17.7	80.7 ± 18.9
Triglyceride (mg/dL)	11.7 ± 6.4	17.4 ± 10.1	12.1 ± 4.1	24.4 ± 14.0*	38.1 ± 49.1	17.4 ± 7.9
Urea nitrogen (mg/dL)	16.89 ± 2.29	16.97 ± 2.02	16.33 ± 1.92	16.86 ± 1.41	18.67 ± 2.08	17.99 ± 2.35
Creatinine (mg/dL)	0.427 ± 0.042	0.417 ± 0.024	0.430 ± 0.035	0.413 ± 0.027	0.484 ± 0.037	0.469 ± 0.033
Sodium (mEq/L)	140.64 ± 1.31	141.57 ± 0.67*	140.71 ± 0.39	140.79 ± 0.70	140.71 ± 0.70	140.93 ± 1.24
Potassium (mEq/L)	4.771 ± 0.113	4.564 ± 0.265	4.546 ± 0.382	4.754 ± 0.272	4.410 ± 0.286	4.496 ± 0.311
Chlorine (mEq/L)	108.6 ± 0.5	109.1 ± 0.7	108.1 ± 0.9	107.9 ± 0.7	108.1 ± 1.9	109.0 ± 2.0
Calcium (mg/dL)	8.96 ± 0.35	8.91 ± 0.24	8.89 ± 0.31	9.24 ± 0.17	9.34 ± 0.35	9.14 ± 0.42
Inorganic phosphorous (mg/dL)	7.56 ± 0.67	6.86 ± 0.86	7.34 ± 0.82	7.49 ± 0.74	5.84 ± 0.75	6.04 ± 0.30

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table 5 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Body weight (g)	352.1 ± 27.3	347.9 ± 20.1	363.4 ± 15.6	329.4 ± 28.8	425.6 ± 28.9	380.6 ± 25.7**
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.073 ± 0.073	2.121 ± 0.038	2.089 ± 0.037	2.019 ± 0.048	2.107 ± 0.054	2.084 ± 0.088
Lungs (g)	1.326 ± 0.084	1.361 ± 0.124	1.397 ± 0.100	1.277 ± 0.073	1.423 ± 0.093	1.297 ± 0.112*
Heart (g)	1.216 ± 0.132	1.256 ± 0.092	1.314 ± 0.085	1.229 ± 0.132	1.394 ± 0.133	1.279 ± 0.118
Liver (g)	11.023 ± 1.183	11.414 ± 0.878	12.603 ± 1.059*	11.783 ± 1.181	12.487 ± 1.413	11.043 ± 1.477
Kidneys (g)	2.821 ± 0.285	2.737 ± 0.226	2.874 ± 0.193	2.930 ± 0.308	3.044 ± 0.126	2.910 ± 0.359
Spleen (g)	0.671 ± 0.093	0.699 ± 0.099	0.746 ± 0.075	0.659 ± 0.064	0.759 ± 0.135	0.684 ± 0.078
Adrenals (mg)	54.6 ± 7.1	55.4 ± 6.8	55.6 ± 7.1	51.4 ± 6.0	63.9 ± 8.1	57.4 ± 9.2
Pituitary gland (mg)	11.39 ± 1.84	11.69 ± 2.05	12.06 ± 1.55	10.36 ± 1.26	13.96 ± 1.47	12.19 ± 1.35*
Thymus (mg)	592.4 ± 118.3	673.6 ± 80.7	642.4 ± 139.7	567.1 ± 135.8	553.9 ± 60.8	484.7 ± 48.2*
Thyroids (mg)	21.96 ± 4.89	21.26 ± 4.15	19.43 ± 2.42	20.04 ± 4.78	23.51 ± 5.36	25.46 ± 7.04
Testes (g)	3.099 ± 0.204	3.146 ± 0.323	3.127 ± 0.212	2.934 ± 0.182	3.516 ± 0.466	3.029 ± 0.283*
Epididymides (g)	0.716 ± 0.073	0.740 ± 0.067	0.727 ± 0.043	0.709 ± 0.057	0.960 ± 0.060	0.964 ± 0.078
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.591 ± 0.062	0.613 ± 0.043	0.574 ± 0.021	0.616 ± 0.045	0.496 ± 0.026	0.549 ± 0.039*
Lungs (g%)	0.377 ± 0.019	0.391 ± 0.025	0.384 ± 0.027	0.389 ± 0.021	0.336 ± 0.019	0.340 ± 0.021
Heart (g%)	0.344 ± 0.019	0.360 ± 0.017	0.360 ± 0.019	0.373 ± 0.027	0.327 ± 0.023	0.336 ± 0.020
Liver (g%)	3.129 ± 0.176	3.283 ± 0.178	3.461 ± 0.161**	3.577 ± 0.171**	2.929 ± 0.195	2.891 ± 0.229
Kidneys (g%)	0.800 ± 0.045	0.787 ± 0.047	0.791 ± 0.046	0.890 ± 0.030**	0.719 ± 0.052	0.764 ± 0.073
Spleen (g%)	0.190 ± 0.021	0.199 ± 0.023	0.204 ± 0.017	0.199 ± 0.015	0.179 ± 0.035	0.180 ± 0.013
Adrenals (mg%)	15.500 ± 1.621	15.944 ± 1.836	15.317 ± 2.042	15.621 ± 1.323	15.074 ± 2.273	15.123 ± 2.401
Pituitary gland (mg%)	3.219 ± 0.320	3.356 ± 0.518	3.319 ± 0.430	3.146 ± 0.300	3.289 ± 0.371	3.213 ± 0.379
Thymus (mg%)	168.367 ± 31.665	194.710 ± 29.527	176.601 ± 35.232	171.761 ± 37.547	130.874 ± 18.764	128.313 ± 19.821
Thyroids (mg%)	6.199 ± 1.030	6.084 ± 0.949	5.344 ± 0.629	6.116 ± 1.436	5.499 ± 1.042	6.707 ± 1.845
Testes (g%)	0.883 ± 0.062	0.904 ± 0.081	0.861 ± 0.076	0.894 ± 0.071	0.830 ± 0.118	0.799 ± 0.075
Epididymides (g%)	0.203 ± 0.021	0.213 ± 0.029	0.200 ± 0.018	0.214 ± 0.010	0.229 ± 0.018	0.254 ± 0.016*

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table 6 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Body weight (g)	200.9±12.8	198.3±14.7	204.7±9.7	185.0±17.6	211.9±41.9	219.9±14.1
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.921±0.020	1.884±0.040	1.883±0.068	1.883±0.076	1.946±0.105	1.940±0.083
Lungs (g)	0.934±0.046	0.919±0.056	0.949±0.083	0.909±0.084	1.024±0.116	0.957±0.078
Heart (g)	0.781±0.070	0.770±0.070	0.761±0.023	0.736±0.068	0.857±0.099	0.830±0.078
Liver (g)	6.173±0.598	5.911±0.384	6.380±0.166	6.434±0.773	6.887±1.359	6.504±0.427
Kidneys (g)	1.650±0.135	1.669±0.162	1.694±0.124	1.624±0.123	1.841±0.264	1.754±0.183
Spleen (g)	0.443±0.068	0.393±0.026	0.434±0.086	0.396±0.085	0.473±0.090	0.476±0.058
Adrenals (mg)	62.7±9.5	59.1±8.5	67.3±5.9	55.6±8.1	63.9±8.5	60.3±10.2
Pituitary gland (mg)	12.94±1.34	12.57±2.08	13.40±0.96	11.56±1.61	13.89±1.59	13.16±1.17
Thymus (mg)	463.9±83.5	443.7±50.2	453.0±68.0	403.0±81.1	490.9±101.3	410.7±81.4
Thyroids (mg)	14.17±3.31	14.44±2.87	15.97±4.84	14.40±2.50	16.91±1.60	15.40±2.97
Ovaries (mg)	81.0±15.5	79.3±11.1	83.6±11.1	74.9±8.2	80.3±14.3	85.3±7.5
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.959±0.064	0.954±0.061	0.920±0.048	1.026±0.109	0.821±0.117	0.886±0.058
Lungs (g%)	0.464±0.017	0.464±0.023	0.463±0.038	0.490±0.026	0.427±0.048	0.434±0.020
Heart (g%)	0.390±0.026	0.389±0.029	0.373±0.020	0.399±0.017	0.357±0.033	0.377±0.022
Liver (g%)	3.070±0.172	2.986±0.153	3.121±0.116	3.474±0.212**	2.841±0.147	2.961±0.121
Kidneys (g%)	0.821±0.036	0.843±0.056	0.826±0.046	0.880±0.052	0.764±0.043	0.799±0.066
Spleen (g%)	0.220±0.025	0.200±0.019	0.211±0.043	0.214±0.047	0.197±0.039	0.217±0.025
Adrenals (mg%)	31.367±5.384	29.964±4.909	32.877±2.611	29.994±2.692	26.857±4.679	27.589±5.655
Pituitary gland (mg%)	6.453±0.631	6.340±0.908	6.554±0.522	6.243±0.591	5.850±0.953	6.001±0.640
Thymus (mg%)	230.357±35.020	224.364±26.085	221.616±33.626	216.154±25.600	206.383±49.790	186.273±32.202
Thyroids (mg%)	7.121±1.894	7.311±1.489	7.783±2.196	7.849±1.599	7.153±1.324	7.003±1.275
Ovaries (mg%)	40.451±8.158	40.147±6.134	40.736±4.323	40.571±3.755	33.646±6.213	38.980±4.758

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (\*\*p<0.01)

Table 7 Histopathological findings of male rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Grade	End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals examined		7	7	7	7	7	7
Organ: Findings	Grade						
Lung: Accumulation, foam cell	+	0	*	*	1	0	0
Forestomach							
Limiting ridge: Erosion	+	0	0	0	1	0	0
Hyperplasia, squamous cell	+	0	0	1	4	0	0
Other part: Degeneration, squamous cell	+	0	0	0	2	0	0
Edema, submucosa	++	0	0	0	2	0	0
Hyperplasia, squamous cell	Total	0	0	1	7	0	0
	+	0	0	1	4	0	0
	++	0	0	0	3	0	0
Pancreas: Atrophy, acinar cell	+	0	*	*	0	1	1
Liver: Microgranuloma	+	3	*	*	1	1	2
Kidney: Cast, hyaline	+	0	0	0	0	1	1
Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	+	0	2	1	0	0	0
Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	+	0	3	1	4	1	0
Regeneration, tubular epithelium	+	1	0	1	1	2	1
Epididymis: Cell debris, lumen	+	0	*	*	0	0	1
Prostate: Cellular infiltration, lymphocyte	+	1	*	*	1	0	1
Pituitary gland: Cyst	<+>	0	*	*	1	0	0

Values are number of animals with findings

Grade of histopathological finding; +: slight, ++: moderate, &lt;+&gt;: detected

\*: not examined

Table 8 Histopathological findings of female rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Grade	End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals examined		7	7	7	7	7	7
Organ: Findings	Grade						
Lung: Accumulation, foam cell	+	2	*	*	1	0	1
Larynx: Cellular infiltration, neutrophil, lamina propria	+	0	0	0	1	0	0
Erosion	+	0	0	0	1	0	0
Esophagus: Hyperplasia, squamous cell	+	0	0	0	1	0	0
Forestomach:							
Degeneration, squamous cell	+	0	0	0	2	0	0
Edema, submucosa	++	0	0	0	2	0	0
Granulation, submucosa	+	0	0	0	1	0	0
Hyperplasia, squamous cell	Total	0	0	0	6	0	0
	+	0	0	0	1	0	0
	++	0	0	0	5	0	0
Ulcer	+	0	0	0	1	0	0
Glandular stomach: Erosion	+	0	0	0	1	0	0
Liver: Microgranuloma	+	0	*	*	1	2	2
Kidney: Cyst	<+>	0	*	*	2	0	0
Mineralization, cortico-medullary junction	+	0	*	*	1	0	0

Values are number of animals with findings

Grade of histopathological finding; +: slight, ++: moderate, &lt;+&gt;: detected

\*: not examined