

# Wistar Hannover ラットにおける 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の長期投与による影響

立花滋博<sup>1</sup>, 古谷真美<sup>1</sup>, 加藤博康<sup>1</sup>, 根倉 司<sup>1</sup>, 高岡 裕<sup>1</sup>, 田面喜之<sup>2</sup>, 関 剛幸<sup>1</sup>,  
堀内伸二<sup>3</sup>, 稲田浩子<sup>4</sup>, 三枝克彦<sup>5</sup>, 渡辺卓穂<sup>6</sup>, 桑形麻樹子<sup>7</sup>

## Effect of long-term administration of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) in Wistar Hannover rats

Shigehiro TACHIBANA<sup>1</sup>, Mami FURUYA<sup>1</sup>, Hiroyasu KATO<sup>1</sup>, Tsukasa NEGURA<sup>1</sup>,  
Yutaka TAKAOKA<sup>1</sup>, Yoshiyuki TAZURA<sup>2</sup>, Takayuki SEKI<sup>1</sup>, Shinji HORIUCHI<sup>3</sup>,  
Hiroko INADA<sup>4</sup>, Katsuhiko SAEGUSA<sup>5</sup>, Takaho WATANABE<sup>6</sup>, Makiko KUWAGATA<sup>7</sup>

4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol, TBC), the existing chemical substances, is the similar structure of diethylstilbestrol having estrogenic activity. Previously, data for the 28-day repeated dose toxicity, the reproductive and developmental toxicity and the carcinogenesis study of TBC in rats has been reported.

In this study, to estimate sub-chronic and chronic toxicity of TBC, 3- and 6-month repeated oral dose toxicity study has examined. Wistar Hannover rats (CrI:WI(Han)) was administered 0 (5% gum arabic: vehicle), 100 or 500 mg/kg of TBC orally. At 3- and 6-month after treatment, animals were dissected, and a sperm analysis, organ weight, hematology and biochemistry analyses, urinary analysis, ophthalmologic and histopathological observations were examined.

No animals died. A Loose feces was observed in the both TBC groups.

In the 500 mg/kg group, liver weight was increased from 3-month treatment. A single cell necrosis of hepatocyte in the mid-lobular zone and hyperplasia of mucosal epithelial cells in the intestine were observed by histopathologically at 3- and 6-month treatment. By hematology and biochemistry analyses, a rate of monocyte was increased without change for the total number of white blood cell in the 500 mg/kg group at 3- and 6-month treatment. In this group, prothrombin time and activated partial thromboplastin time were prolonged, and total cholesterol level, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities were also increased.

With a progression of treatment period, renal involvement was detected such as degeneration of renal tubules, dilation of renal lumen in the 500 mg/kg group (6-month treatment). The concentration of urinal protein was also increased in this group. In addition, histopathological changes of intestine, liver and kidney were observed in the 100 mg/kg group at 6-month treatment.

However, there were no remarkable changes on sperm motility, the number of epididymal sperm, and gonadal histopathology after TBC treatment.

Thus, by a long-term exposure of TBC, effect on intestinal tract and lipid metabolism were detected, and these change were similar to changes of the 28-day repeated dose toxicity study. In addition, it was revealed that TBC has ability of damage of liver and kidney, and effect on blood coagulation system.

1 毒性部毒性学研究室

2 毒性部基準毒性試験室

3 試験研究管理部動物飼育管理室

4 毒性部検体調製室

5 試験研究管理部被験物質管理室

6 毒性部化学研究室

7 毒性部病理学研究室

## 緒言

既存化学物質である4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール；以下TBCと略す)は天然ゴムや合成ゴムの酸化防止剤として広く使用されており、ポリエチレンおよびポリプロピレンの劣化防止剤としても汎用されている。また、エストロゲン作用を有するビスフェノールAやジエチルスチルベストロールの構造類似物である。エストロゲン受容体結合性試験<sup>1)</sup>ではビスフェノールA ( $1.4 \times 10^{-5}$  M)とほぼ同濃度 ( $1.8 \times 10^{-5}$  M)にて、TBCはエストラジオールに拮抗してエストロゲン受容体に結合することが報告されている。また、卵巣摘出マウスでの4日間投与子宮増殖性試験<sup>1)</sup>では、60 mg/kg/day以上の投与量により子宮重量が増加していることから、TBCが生体内においてもエストロゲン活性を示すことが明らかとなっている。

28日間反復経口投与毒性試験<sup>2)</sup>では、250 mg/kgの投与量で小腸壁の肥厚および回腸粘膜の過形成、盲腸の拡張、盲腸および結腸粘膜での細胞浸潤、肝臓重量の増加および小葉中心性肝細胞肥大が報告されている。2ヵ月間混餌投与雄性生殖毒性試験<sup>1)</sup>では、155~230 mg/kgの投与量で雄性生殖器および副生殖器重量の減少、精子生産効率(精巣重量あたりの1日精子生産量)の低下や病理組織学的変化として精細管の剥離・脱落、間細胞の空胞化および過形成が認められている。また、経口投与簡易生殖毒性試験では、500 mg/kgのTBC投与により、消化管壁の肥厚が観察されたが、繁殖能への影響は認められていない。2年間混餌投与癌原性試験<sup>3)</sup>では、TBC 100~120 mg/kgの用量でも肝臓や消化管を含め各器官に腫瘍性変化は報告されていない。

低用量のビスフェノールAがラットの1日精子生成能および精巣重量あたりの1日精子生成能を低下させるとの報告もあることから<sup>4)</sup>、TBCの雄性生殖器への影響が懸念される。TBCの毒性評価として、28日間投与毒性試験、生殖毒性試験および癌原性試験が実施されているものの、亜慢性および慢性毒性についての情報はない。そこで、TBCの3ヵ月および6ヵ月間の反復経口投与毒性試験を行い、生体に対する影響を検討した。

## 材料および方法

すべての動物実験操作は、「財団法人食品薬品安全センター秦野研究所動物実験に関する指針」に基づいて実施した。

### 1. 被験物質

TBC(CAS No. 96-69-5, 純度99.4%)は和光純薬工業(大阪)から購入し、使用時まで室温、遮光下で保管した。TBCは5%アラビアゴム水溶液に懸濁し、投与まで冷蔵、遮光下で保管した。懸濁液中のTBC濃度はHPLCで測定し、媒体中の安定性、含量および均一性を確認した。

### 2. 動物

雌雄のWistar Hannover (CrI:WI(Han))ラットは、日本チャールス・リバー(日野飼育センター、滋賀)より5週齢で入手し、1週間の検疫馴化期間後、6週齢で試験に使用した。動物は、金属製金網床ケージに個別に収容して飼育し、固型飼料CE-2(日本クレア、東京)と水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させた。また、温度21.0~25.0℃、湿度40.0~75.0%、換気回数約15回/時間、照明12時間サイクル(7時~19時点灯)に制御された飼育室で動物を飼育した。

### 3. 投与方法と投与量

動物は、投与開始前日の体重を基に体重別層化無作為抽出法により雌雄とも3群に分け、0(5%アラビアゴム水溶液)、100あるいは500 mg/kgのTBCを6ヵ月間強制経口投与した(各9匹/群)。また、対照群(0 mg/kg)および500 mg/kg投与群は投与後3ヵ月で途中解剖するサブグループを設定した(各9匹/群)。各群の投与容量は5 mL/kgとし、ラット用胃管を用い毎日(7回/週)投与した。既報<sup>1,2)</sup>において、肝臓、消化管および雄の生殖器官への影響が155~250 mg/kgの用量で認められている。500 mg/kgのTBC投与では、投与翌日から軟便を呈する動物が散見され、消化管壁の肥厚も観察されていることから、本試験の高用量群はTBCの毒性が確実に発現すると考えられる500 mg/kgとした。また、投与期間が長期であることを考慮して低用量群は弱い毒性反応が認められると考えられる100 mg/kgを設定した。

### 4. 検査項目

動物の一般状態を毎日観察し、体重および摂餌量を投与後3ヵ月までは毎週1回、それ以降は

2週に1回の頻度で測定した。眼科学検査を投与後3および6ヵ月に実施し、双眼倒像鏡(Vantage, Keeler, Windsor)およびスリットランプ(SL-14, 興和, 名古屋)を用いて、前眼房, 中間透光体および眼底を観察した。

尿検査を投与後3および6ヵ月に実施した。動物を代謝ケージに収容して、4および24時間尿を採取した。4時間尿でブドウ糖, ビリルビン, ケトン体, 潜血, pH, タンパク質およびウロビリノーゲンを半自動尿分析装置(オーションイレブンAE-4020, アークレイ, 京都)にて測定し、色調, 濁度および沈渣を観察した。24時間尿の尿量および比重を計測し、尿中電解質濃度を全自動電解質分析装置(EA05, エーアンドティ, 横浜)にて測定した。

投与後3および6ヵ月に、動物を18~24時間絶食させた後、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血液学検査(抗凝固剤: EDTA-2Kおよびクエン酸ナトリウム)および血液生化学検査(抗凝固剤: ヘパリン)に用いる血液をそれぞれ採取した。動物を放血致死後、精巣上部尾部を採取し、精子運動能解析システム(HTM-IVOS, Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA)を用いて精子運動能検査および精子数測定を行った。血液学検査は、赤血球数(RBC), 白血球数(WBC), 白血球分類, 網状赤血球比率, 血小板数, ヘマトクリット値, ヘモグロビン量, 平均赤血球容積, 平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度を血液自動分析装置(XT-2000iV, シスメックス, 神戸)にて測定し、プロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を全自動血液凝固測定装置(CA-1000, シスメックス, 神戸)にて測定した。血液生化学検査は、総タンパク濃度, アルブミン濃度, A/G比, グルコース濃度, 総コレステロール濃度, トリグリセライド濃度, 総ビリルビン濃度, 尿素窒素濃度(BUN), クレアチニン濃度, 無機リン濃度, カルシウム濃度, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)活性, アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性, アルカリフォスファターゼ(ALP)活性および $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ( $\gamma$ -GTP)活性を自動分析装置(JCA-BM6010, 日本電子, 昭島)

にて測定し、血漿中電解質濃度を全自動電解質分析装置にて測定した。

動物を剖検した後、脳, 下垂体, 顎下腺(舌下腺を含む), 甲状腺(上皮小体を含む), 胸腺, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 精巣, 精囊(凝固腺を含む), 精巣上部, 前立腺(腹側葉), 卵巣および子宮を摘出して重量を測定し、併せて比体重値(相対重量)を算出した。これに加えて、脊髄, 眼球, ハーダー腺, 視神経, 気管, 舌, 食道, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 顎下リンパ節, 腸間膜リンパ節, 膈, 膀胱, 骨および骨髄(大腿骨および胸骨), 下腿部骨格筋, 坐骨神経, 大動脈, 腹部皮膚および乳腺を摘出し、0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定した。精巣および精巣上部はブアン液に固定した。上記全ての器官・組織をパラフィン包埋し、薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し、組織学的検査を実施した。

## 5. 統計解析

群ごとに平均値および標準偏差を算出し、対照群との2群間の比較は、F検定を行った後、Studentのt検定あるいはAspin-Welchのt検定を行った。3群間の比較は、Bartlettの方法により分散の一様性について検定を行った後、一元配置型の分散分析あるいはKruskal-Wallisの順位検定を行った。その後、Dunnnett法あるいはDunnnett型の検定法で多重比較を行った。病理組織所見では、グレード分けしたデータはMann-WhitneyのU検定により、また陽性グレードの合計値はFisherの直接確率の片側検定により、有意差検定を行った。なお、いずれの検定においても有意水準は5%以下とした。

## 結果

### 1. 一般状態, 体重および摂餌量の変化

投与期間中、死亡動物は観察されなかった。軟便が500 mg/kg投与群の雄および雌でそれぞれ投与第20日および第7日から、投与期間を通じて散見された。軟便の発現例数は解剖前の絶食時に増える傾向があり、100 mg/kg投与群の雌でも絶食時に軟便が観察された。

投与初日に500 mg/kg投与群の雌雄とも摂餌量が有意に減少したが(図1)、これ以降の摂餌量

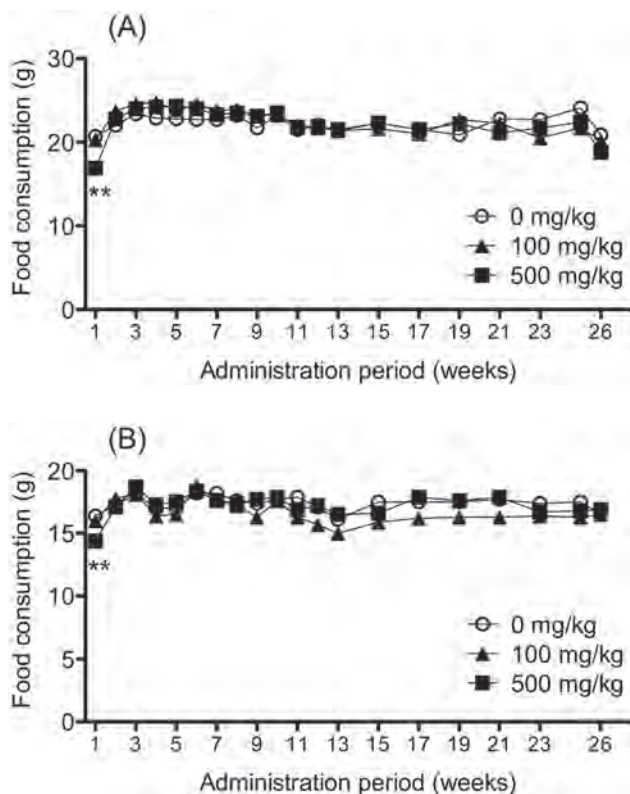


図1 TBCを3および6カ月間経口投与した雄(A)および雌(B)ラットの摂餌量推移

Symbols represent average.

\*\* $p < 0.01$ , compared with the control group.

に有意差はみられなかった。また、TBC投与群の体重は投与期間を通じて対照群と同様に推移した(図2)。

## 2. 眼科学検査所見

投与後3ヵ月および6ヵ月ともにTBC投与の影響は認められなかった。

## 3. 尿検査結果

尿検査結果を表1に示した。500 mg/kg投与群の雌雄で尿タンパクの増加傾向が投与後6ヵ月のみに認められた。その他、500 mg/kg投与群の雄で投与後3ヵ月にナトリウム排泄量の有意な減少が認められたが、同様の变化は投与後6ヵ月では観察されなかった。

## 4. 血液学検査結果

血液学検査結果を表2に示した。500 mg/kg投与群の雄のみで、投与後3ヵ月にAPTTの有意な延長がみられ、投与後6ヵ月にはPTおよびAPTTの延長傾向が認められた。白血球分類では、

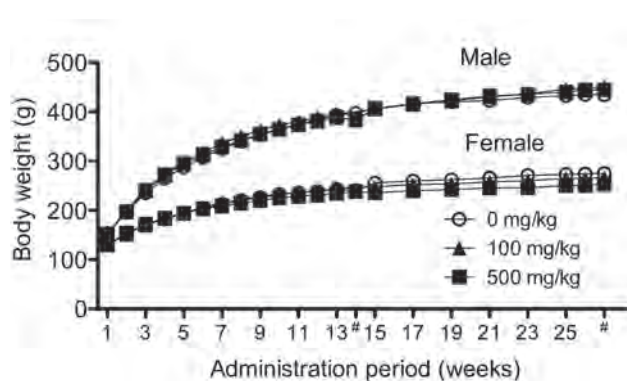


図2 TBCを3および6カ月間経口投与したラットの体重推移

Symbols represent average.

#, final administration day of 3- and 6-month of administration period.

500 mg/kg投与群の雄で投与後6ヵ月に、同群の雌で投与後3および6ヵ月に単球比率の有意な上昇がみられたほか、雌では投与後6ヵ月にリンパ球比率の有意な低下および好中球比率の増加傾向も認められた。白血球数とその百分比率から実数を算出して比較すると、500 mg/kg投与群の雌で、投与後3ヵ月に単球が増加し、投与後6ヵ月に好中球および単球が増加していた。

## 5. 血液生化学検査結果

血液生化学検査結果を表3に示した。500 mg/kg投与群の雌雄で投与後3および6ヵ月にALTおよびAST活性の有意な上昇あるいは上昇傾向がみられ、同群の雌では総ビリルビン濃度も有意に増加した。また、総コレステロール濃度の有意な増加が500 mg/kg投与群の雄で投与後3および6ヵ月にみられ、同群の雌でも投与後6ヵ月に増加した。その他、500 mg/kg投与群の雄で投与後3ヵ月にカリウムおよび塩素濃度が有意に増加したが、投与後6ヵ月では同様の变化は認められなかった。また、同群の雌で投与後6ヵ月に無機リン濃度の増加およびナトリウム濃度の減少がいずれも有意に認められたが、いずれもわずかな変化であった。

## 6. 精子検査結果

精子検査結果を表4に示した。投与後3および6ヵ月ともに、精子運動能および精巣上体尾部重量あたりの精子数に対照群とTBC投与群との間で有意差は認められなかった。

表1 TBCを3および6ヵ月間経口投与したラットの尿検査結果

Dose (mg/kg)	Male									
	3-month				6-month					
	0		500		0		100		500	
Number of animals	5		5		5		5		5	
Urine volume (mL/24hr)	14.0±	4.3 <sup>a</sup>	15.7±	5.2	11.2±	6.2	12.6±	3.8	14.9±	2.9
Specific gravity	1.062± 0.009		1.051± 0.010		1.067± 0.017		1.059± 0.006		1.060± 0.009	
Na (mEq/24hr)	1.58±	0.31	0.98±	0.38*	1.26±	0.61	1.21±	0.45	1.36±	0.19
K (mEq/24hr)	2.45±	0.74	2.39±	0.64	2.91±	0.91	2.94±	1.07	3.44±	0.36
Cl (mEq/24hr)	1.83±	0.27	1.94±	0.29	1.40±	0.65	1.52±	0.74	1.97±	0.23
Protein -	0 <sup>b</sup>		0		0		0		0	
±	0		0		1		0		0	
+	5		5		1		3		1	
2+	0		0		3		2		2	
3+	0		0		0		0		0	
4+	0		0		0		0		2	
Female										
Dose (mg/kg)	3-month				6-month					
	0		500		0		100		500	
Number of animals	5		5		5		5		5	
Urine volume (mL/24hr)	9.8±	5.8	18.0±	8.6	10.4±	4.0	14.8±	7.5	11.8±	6.8
Specific gravity	1.052± 0.018		1.041± 0.026		1.043± 0.021		1.037± 0.024		1.055± 0.018	
Na (mEq/24hr)	1.00±	0.46	0.96±	0.74	0.64±	0.34	0.54±	0.39	0.99±	0.45
K (mEq/24hr)	1.42±	0.90	1.68±	0.74	1.24±	0.47	1.67±	1.26	2.33±	1.10
Cl (mEq/24hr)	1.17±	0.63	1.30±	0.86	0.61±	0.43	0.78±	0.74	1.52±	0.77
Protein -	1		1		1		2		0	
±	2		1		3		1		0	
+	2		3		1		1		4	
2+	0		0		0		0		0	
3+	0		0		0		0		0	
4+	0		0		0		1		1	

<sup>a</sup> Values represent average ± S.D.

<sup>b</sup> Values represent as number of animals.

\*p<0.05, compared with the control group.

### 7. 器官重量結果

器官重量測定結果を表5に示した。投与後3ヵ月では、500 mg/kg投与群の雌雄で肝臓の相対重量の有意な増加がみられ、雌では肝臓の絶対重量も増加した。投与後6ヵ月においても500 mg/kg投与群の雌雄で肝臓重量の増加がみられ、雌では有意な変化であった。500 mg/kg投与群で投与後3ヵ月に子宮重量の減少が有意に認められたが、病理組織学検査に異常は認められず、投与後6ヵ月では同様の変化はみられなかった。また、500

mg/kg投与群の雌で投与後6ヵ月に脳の絶対重量が有意に減少したが、相対重量に差はみられず、病理組織学検査にも異常は認められなかった。

### 8. 剖検所見および病理組織学的所見

投与後3および6ヵ月の剖検で、500 mg/kg投与群の雌雄で小腸壁および大腸壁の肥厚が観察された。

病理組織学的所見を表6および7に示した。投与後3および6ヵ月ともに、500 mg/kg投与群の雌雄で十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸および直腸の粘膜上皮細胞の過形成が認められた。さら

表2 TBCを3および6カ月間経口投与したラットの血液学検査結果

Dose (mg/kg)	Male									
	3-month				6-month					
	0		500		0		100		500	
Number of animals	9		8		9		9		9	
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	949 ±	71	926 ±	61	886 ±	62	908 ±	43	884 ±	51
Hemoglobin (g/dL)	16.2 ±	0.9	16.1 ±	1.1	15.3 ±	0.8	15.2 ±	0.7	14.6 ±	0.7
Hematocrit (%)	47.0 ±	2.1	47.8 ±	2.8	43.9 ±	2.1	43.6 ±	2.0	43.0 ±	1.9
Reticulocyte (%)	2.6 ±	0.3	2.8 ±	0.3	2.7 ±	0.5	2.7 ±	0.3	2.7 ±	0.2
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	39.8 ±	8.9	41.0 ±	14.2	33.5 ±	15.3	32.6 ±	9.6	39.8 ±	9.8
Differential leukocyte count (%)										
Neutrophil	23.0 ±	7.2	27.1 ±	14.4	38.3 ±	17.9	29.8 ±	6.3	35.3 ±	17.6
Eosinophil	1.7 ±	0.4	1.9 ±	1.6	2.5 ±	2.0	2.1 ±	0.6	2.1 ±	1.0
Basophil	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0
Monocyte	2.8 ±	0.8	3.1 ±	1.0	2.7 ±	0.8	3.7 ±	0.5	3.8 ±	1.2*
Lymphocyte	72.5 ±	7.5	67.9 ±	16.4	56.4 ±	20.1	64.5 ±	6.1	58.8 ±	18.5
Platelet (x10 <sup>4</sup> /μL)	78.7 ±	10.3	83.7 ±	9.2	72.5 ±	10.6	78.4 ±	9.1	86.0 ±	13.6
PT (sec)	16.8 ±	2.3	19.7 ±	4.0	21.1 ±	7.0	22.4 ±	5.8	25.5 ±	9.8
APTT (sec)	23.2 ±	1.8	27.8 ±	5.2*	22.6 ±	2.4	23.1 ±	2.5	26.3 ±	4.7
Dose (mg/kg)	Female									
	3-month				6-month					
	0		500		0		100		500	
Number of animals	8		7		9		9		7	
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	816 ±	49	810 ±	60	782 ±	34	773 ±	30	786 ±	44
Hemoglobin (g/dL)	14.8 ±	0.6	14.7 ±	0.8	15.0 ±	0.4	14.7 ±	0.6	14.9 ±	0.8
Hematocrit (%)	43.7 ±	1.4	43.4 ±	2.2	41.9 ±	0.9	41.3 ±	1.7	42.1 ±	1.8
Reticulocyte (%)	3.2 ±	0.5	3.3 ±	0.8	3.1 ±	0.4	3.1 ±	0.5	3.2 ±	0.5
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	24.8 ±	4.8	35.5 ±	17.2	19.8 ±	3.1	20.3 ±	3.8	28.0 ±	12.1
Differential leukocyte count (%)										
Neutrophil	23.9 ±	15.5	30.7 ±	24.4	26.8 ±	8.0	38.0 ±	16.2	45.2 ±	17.7
Eosinophil	2.4 ±	2.8	3.8 ±	3.1	2.1 ±	0.5	3.2 ±	1.0	1.5 ±	0.5
Basophil	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0	0.0 ±	0.0
Monocyte	2.4 ±	0.6	3.9 ±	1.6*	2.9 ±	1.0	3.3 ±	0.9	4.9 ±	1.4**
Lymphocyte	71.3 ±	18.0	61.6 ±	24.1	68.3 ±	8.9	55.5 ±	16.7	48.5 ±	18.4*
Platelet (x10 <sup>4</sup> /μL)	75.6 ±	8.9	88.6 ±	15.2	60.8 ±	9.4	68.7 ±	11.0	69.5 ±	12.9
PT (sec)	11.7 ±	0.8	11.2 ±	0.2	12.6 ±	0.4	12.5 ±	0.4	12.2 ±	0.3
APTT (sec)	17.7 ±	0.9	16.7 ±	2.7	16.8 ±	1.5	16.6 ±	1.0	16.3 ±	1.6

Values represent average ± S.D.

\*p<0.05 and \*\*p<0.01, compared with the control group.

表3 TBCを3および6カ月間経口投与したラットの血液生化学検査結果

Dose (mg/kg)	Male					
	3-month		6-month			
	0	500	0	100	500	
Number of animals	9	8	9	9	9	
Total protein (g/dL)	5.3 ± 0.1	5.2 ± 0.4	5.4 ± 0.2	5.5 ± 0.2	5.5 ± 0.2	
Albumin (g/dL)	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.3	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.3	
A/G ratio	2.02 ± 0.21	2.08 ± 0.26	1.73 ± 0.26	1.75 ± 0.07	1.76 ± 0.33	
Glucose (g/dL)	127 ± 18	137 ± 15	138 ± 20	136 ± 26	137 ± 12	
Total cholesterol (g/dL)	38 ± 7	56 ± 9**	49 ± 9	49 ± 7	88 ± 56**	
Triglyceride (g/dL)	44 ± 14	41 ± 16	38 ± 20	38 ± 11	58 ± 50	
Na (mEq/L)	141.6 ± 0.7	141.1 ± 0.7	143.7 ± 0.9	143.2 ± 0.7	144.0 ± 0.8	
K (mEq/L)	4.34 ± 0.25	4.73 ± 0.35*	3.81 ± 0.24	4.00 ± 0.36	4.23 ± 0.62	
Cl (mEq/L)	106.2 ± 0.9	107.6 ± 1.3*	107.2 ± 1.4	107.5 ± 1.7	108.8 ± 1.3	
ALP (U/L)	188 ± 36	177 ± 41	183 ± 36	170 ± 42	155 ± 26	
ALT (U/L)	25 ± 2	88 ± 103	26 ± 5	27 ± 4	65 ± 36**	
AST (U/L)	54 ± 5	133 ± 133	52 ± 11	58 ± 9	88 ± 39*	
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	
Total bilirubin (mg/dL)	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.04	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02	
BUN (mg/dL)	25 ± 2	27 ± 2	22 ± 2	23 ± 3	25 ± 4	
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2	
Inorga. Phos. (mg/dL)	6.6 ± 1.3	6.8 ± 1.6	3.8 ± 1.1	4.3 ± 0.4	4.8 ± 1.0	
Ca (mg/dL)	9.1 ± 0.3	9.0 ± 0.2	7.8 ± 2.9	8.8 ± 0.2	9.1 ± 0.3	

Dose (mg/kg)	Female					
	3-month		6-month			
	0	500	0	100	500	
Number of animals	9	8	9	9	9	
Total protein (g/dL)	5.1 ± 0.3	4.8 ± 0.5	5.6 ± 0.2	5.7 ± 0.3	5.7 ± 0.5	
Albumin (g/dL)	3.6 ± 0.4	3.3 ± 0.4	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.3	
A/G ratio	2.37 ± 0.50	2.06 ± 0.30	2.10 ± 0.17	2.01 ± 0.30	2.09 ± 0.27	
Glucose (g/dL)	104 ± 11	106 ± 17	115 ± 11	111 ± 14	105 ± 15	
Total cholesterol (g/dL)	40 ± 16	44 ± 10	40 ± 6	53 ± 17	58 ± 15**	
Triglyceride (g/dL)	24 ± 12	18 ± 4	18 ± 8	26 ± 22	30 ± 21	
Na (mEq/L)	144.4 ± 1.3	144.4 ± 1.8	142.7 ± 1.6	141.7 ± 0.9	140.2 ± 2.6*	
K (mEq/L)	3.99 ± 0.29	4.28 ± 0.50	3.73 ± 0.26	3.90 ± 0.42	4.02 ± 0.36	
Cl (mEq/L)	110.0 ± 1.2	111.9 ± 3.5	107.7 ± 1.2	108.4 ± 1.4	108.8 ± 3.2	
ALP (U/L)	87 ± 31	89 ± 27	92 ± 32	69 ± 27	70 ± 20	
ALT (U/L)	20 ± 3	42 ± 17**	29 ± 17	21 ± 4	57 ± 23	
AST (U/L)	49 ± 7	76 ± 16**	61 ± 17	48 ± 8	81 ± 27	
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 2	0 ± 1	1 ± 1	
Total bilirubin (mg/dL)	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.02**	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.55 ± 0.41**	
BUN (mg/dL)	26 ± 3	26 ± 6	31 ± 4	28 ± 5	30 ± 4	
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	
Inorga. Phos. (mg/dL)	6.4 ± 1.8	6.6 ± 1.5	3.5 ± 1.0	3.9 ± 0.9	4.8 ± 0.6**	
Ca (mg/dL)	8.7 ± 0.5	7.9 ± 1.2	9.1 ± 0.2	8.9 ± 0.2	9.0 ± 0.4	

Values represent average ± S.D.

\*p<0.05 and \*\*p<0.01, compared with the control group.

表4 TBCを3および6カ月間経口投与したラットの精子検査結果

Dose (mg/kg)	3-month				6-month			
	0		500		0		500	
Number of animals	5		5		5		5	
Motile sperm (%)	91.6 ± 3.7	92.4 ± 3.3	81.6 ± 33.2	90.3 ± 5.4	90.6 ± 4.6			
Progressive sperm (%)	63.4 ± 10.0	63.3 ± 9.4	51.5 ± 25.7	51.4 ± 13.5	50.6 ± 11.3			
Sperm counts/cauda epididymis weight (x10 <sup>6</sup> /g)	1091.3 ± 362.7	1077.3 ± 287.9	851.9 ± 405.2	1089.1 ± 423.5	956.5 ± 265.2			

Values represent average ± S.D.

表5 TBCを3および6ヵ月間経口投与したラットの器官重量結果

Dose (mg/kg)	Male									
	3-month				6-month					
	0		500		0		100		500	
Body weight (g)	372.6 ± 41.5	354.6 ± 20.6	413.1 ± 38.2	428.8 ± 44.2	421.5 ± 36.6					
<u>Absolute organ weight (mg)</u>										
Brain	1970.2 ± 117.8	1907.3 ± 82.1	1981.5 ± 85.5	1960.8 ± 99.1	1921.7 ± 106.4					
Thymus	308.4 ± 62.7	287.4 ± 42.4	209.8 ± 57.3	213.6 ± 34.6	199.6 ± 67.1					
Heart	984.5 ± 148.2	896.4 ± 62.3	988.4 ± 74.8	973.0 ± 131.5	995.1 ± 101.0					
Liver	8899.3 ± 962.3	9645.6 ± 591.0	9995.4 ± 1098.9	9847.9 ± 969.0	11111.9 ± 1886.7					
Kidneys	2059.6 ± 292.9	2042.1 ± 141.4	2173.7 ± 160.1	2194.5 ± 246.3	2219.5 ± 383.1					
Spleen	682.7 ± 127.5	673.8 ± 50.4	755.7 ± 155.3	761.8 ± 119.2	803.9 ± 155.7					
Testes	3360.7 ± 261.0	3415.4 ± 250.6	3346.3 ± 1104.5	3543.3 ± 237.0	3580.3 ± 336.6					
Epididymides	1205.6 ± 64.6	1182.7 ± 66.3	1206.1 ± 306.7	1329.3 ± 107.4	1274.2 ± 153.7					
Prostate, ventral	492.1 ± 83.5	520.9 ± 110.6	448.6 ± 110.6	399.5 ± 90.5	425.3 ± 106.4					
Seminal vesicles	1122.1 ± 91.4	1186.5 ± 147.8	1235.0 ± 284.0	1088.0 ± 161.7	1125.1 ± 214.9					
Thyroid gland	24.4 ± 6.2	19.8 ± 3.2	19.6 ± 3.5	19.7 ± 3.7	19.3 ± 3.2					
Adrenal glands	55.0 ± 10.2	52.5 ± 5.3	48.2 ± 7.7	43.0 ± 6.6	47.4 ± 6.2					
<u>Relative organ weight (mg/g)</u>										
Brain	5.319 ± 0.351	5.393 ± 0.358	4.831 ± 0.463	4.622 ± 0.584	4.581 ± 0.358					
Thymus	0.825 ± 0.113	0.808 ± 0.088	0.508 ± 0.131	0.500 ± 0.078	0.471 ± 0.135					
Heart	2.638 ± 0.202	2.531 ± 0.167	2.407 ± 0.247	2.265 ± 0.123	2.363 ± 0.157					
Liver	23.911 ± 0.922	27.230 ± 1.398**	24.238 ± 2.200	22.993 ± 0.984	26.329 ± 3.473					
Kidneys	5.516 ± 0.256	5.763 ± 0.309	5.281 ± 0.389	5.121 ± 0.284	5.265 ± 0.749					
Spleen	1.838 ± 0.309	1.906 ± 0.180	1.850 ± 0.472	1.774 ± 0.193	1.910 ± 0.334					
Testes	9.095 ± 1.006	9.654 ± 0.821	8.200 ± 2.844	8.359 ± 1.191	8.515 ± 0.684					
Epididymides	3.258 ± 0.244	3.341 ± 0.195	2.934 ± 0.730	3.119 ± 0.300	3.028 ± 0.327					
Prostate, ventral	1.330 ± 0.251	1.470 ± 0.304	1.086 ± 0.240	0.941 ± 0.234	1.004 ± 0.213					
Seminal vesicles	3.029 ± 0.254	3.353 ± 0.433	2.992 ± 0.641	2.548 ± 0.359	2.665 ± 0.425					
Thyroid gland	0.066 ± 0.017	0.056 ± 0.009	0.048 ± 0.010	0.046 ± 0.008	0.046 ± 0.005					
Adrenal glands	0.147 ± 0.020	0.149 ± 0.021	0.117 ± 0.020	0.101 ± 0.019	0.113 ± 0.014					
<hr/>										
Dose (mg/kg)	Female									
	3-month				6-month					
	0		500		0		100		500	
Body weight (g)	222.4 ± 16.1	215.3 ± 17.5	258.3 ± 23.1	250.8 ± 25.3	240.0 ± 15.9					
<u>Absolute organ weight (mg)</u>										
Brain	1798.5 ± 69.4	1822.2 ± 56.2	1919.6 ± 79.9	1863.3 ± 64.2	1815.2 ± 73.9*					
Thymus	326.9 ± 114.3	279.5 ± 41.2	236.9 ± 68.7	219.5 ± 27.6	198.5 ± 43.1					
Heart	684.8 ± 63.7	638.9 ± 72.1	743.1 ± 82.0	707.8 ± 64.9	701.3 ± 94.1					
Liver	5628.2 ± 561.0	6280.3 ± 554.3*	5907.1 ± 626.4	6274.2 ± 759.6	6772.4 ± 629.7*					
Kidneys	1426.4 ± 138.8	1381.5 ± 162.4	1514.6 ± 154.3	1520.3 ± 150.1	1437.5 ± 145.0					
Spleen	601.4 ± 121.8	527.6 ± 67.7	628.7 ± 130.7	569.3 ± 110.7	559.1 ± 105.4					
Ovaries	89.7 ± 14.3	93.0 ± 16.2	91.5 ± 11.8	86.7 ± 10.0	86.3 ± 19.5					
Uterus	529.6 ± 127.4	372.3 ± 134.3*	590.9 ± 208.1	466.9 ± 137.5	487.3 ± 166.0					
Thyroid gland	17.2 ± 3.0	18.3 ± 3.5	20.5 ± 3.1	21.2 ± 4.1	20.0 ± 6.0					
Adrenal glands	64.9 ± 7.9	65.8 ± 10.0	69.4 ± 9.9	61.0 ± 7.4	63.0 ± 11.2					
<u>Relative organ weight (mg/g)</u>										
Brain	8.117 ± 0.567	8.496 ± 0.494	7.473 ± 0.569	7.485 ± 0.656	7.581 ± 0.386					
Thymus	1.455 ± 0.465	1.299 ± 0.177	0.906 ± 0.193	0.879 ± 0.113	0.828 ± 0.168					
Heart	3.080 ± 0.182	2.969 ± 0.260	2.877 ± 0.175	2.831 ± 0.194	2.912 ± 0.225					
Liver	25.340 ± 2.311	29.257 ± 2.831**	22.867 ± 1.259	25.143 ± 3.359	28.215 ± 1.778**					
Kidneys	6.419 ± 0.509	6.416 ± 0.533	5.861 ± 0.209	6.103 ± 0.767	5.985 ± 0.402					
Spleen	2.701 ± 0.495	2.456 ± 0.294	2.430 ± 0.409	2.263 ± 0.341	2.323 ± 0.363					
Ovaries	0.404 ± 0.063	0.431 ± 0.062	0.356 ± 0.054	0.348 ± 0.046	0.361 ± 0.088					
Uterus	2.394 ± 0.603	1.724 ± 0.610*	2.331 ± 0.956	1.853 ± 0.432	2.047 ± 0.746					
Thyroid gland	0.078 ± 0.011	0.085 ± 0.015	0.079 ± 0.009	0.085 ± 0.015	0.083 ± 0.023					
Adrenal glands	0.294 ± 0.047	0.307 ± 0.054	0.269 ± 0.030	0.243 ± 0.016	0.263 ± 0.048					

Values represent average for nine animals ± S.D.

\* p<0.05 and \*\* p<0.01, compared with the control group.



表6 TBCを3ヵ月間経口投与したラットの病理組織学的所見

Findings	Sex Dose (mg/kg) Grade	Male					Female														
		0					500														
		-	±	+	2+	3+	-	±	+	2+	3+	-	±	+	2+	3+					
Liver																					
Single cell necrosis, midlobular		9	0	0	0	0	3	2	2	2	0	9	0	0	0	0	3	3	3	0	0
Duodenum, Jejunum, Ileum																					
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa		9	0	0	0	0	8	1	0	0	0	9	0	0	0	0	7	2	0	0	0
Cecum																					
Cellular infiltration, mononuclear cell, lamina propria		9	0	0	0	0	6	3	0	0	0	9	0	0	0	0	7	2	0	0	0
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa		9	0	0	0	0	4	5	0	0	0	9	0	0	0	0	5	4	0	0	0
Colon, Rectum																					
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa		9	0	0	0	0	6	3	0	0	0	9	0	0	0	0	7	2	0	0	0
Kidney																					
Basophilic tubule, cortex		6	3	0	0	0	7	2	0	0	0	6	2	1	0	0	9	0	0	0	0
Dilatation, lumen, cystic		9	0	0	0	0	7	2	0	0	0	8	0	0	1	0	8	1	0	0	0
Testis																					
Atrophy, seminiferous tubule		7	2	0	0	0	9	0	0	0	0										
Ovary												9	0	0	0	0	9	0	0	0	0

Notes) -: No abnormal changes ±: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked

Numerals represent the number of animals.

#p<0.05 and ##p<0.01, compared with the control group by Fisher's test.

\*p<0.05, compared with the control group by Mann-Whitney U test.

表7 TBCを6ヵ月間経口投与したラットの病理組織学的所見

Findings	Sex Dose (mg/kg) Grade	Male			Female																										
		0			500																										
		-	±	2+3+	-	±	2+3+	-	±	2+3+																					
Liver																															
Single cell necrosis, midlobular		9	0	0	0	0	4	5	0	0	0	9	0	0	0	0	6	2	1	0	0	5	2	2	0	0					
Swelling, kupffer cell, containing a brown pigment		9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	4	5	0	0	0					
Duodenum, Jejunum, Ileum																															
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa		9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	5	4	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0	0					
Cecum																															
Cellular infiltration, mononuclear cell, lmina propria		9	0	0	0	0	6	3	0	0	0	5	4	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	6	3	0	0	0
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa		9	0	0	0	0	6	3	0	0	0	5	4	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	4	5	0	0	0
Colon, Rectum																															
Hyperplasia, epithelial cell, mucosa		9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	5	4	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	5	4	0	0	0
Kidney																															
Atrophy, glomerulus		9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	7	1	1	0	0	9	0	0	0	0	8	1	0	0	0	8	1	0	0	0
Basophilic tubule, cortex		6	3	0	0	0	5	4	0	0	0	7	0	2	0	0	8	1	0	0	0	8	0	0	1	0	8	0	0	1	0
Degeneration, tubule		9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	7	1	1	0	0	9	0	0	0	0	8	0	1	0	0	8	0	1	0	0
Dilatation, lumen, with hyalin cast		7	2	0	0	0	8	1	0	0	0	6	1	1	1	0	9	0	0	0	0	8	0	0	1	0	8	0	0	1	0
Testis																															
Atrophy, seminiferous tubule		8	0	0	1	0	9	0	0	0	0	7	2	0	0	0															
Ovary												9	0	0	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	0	0					

Notes) -: No abnormal changes ±: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked

Numerals represent the number of animals.

#p<0.05, compared with the control group by Fisher's test.

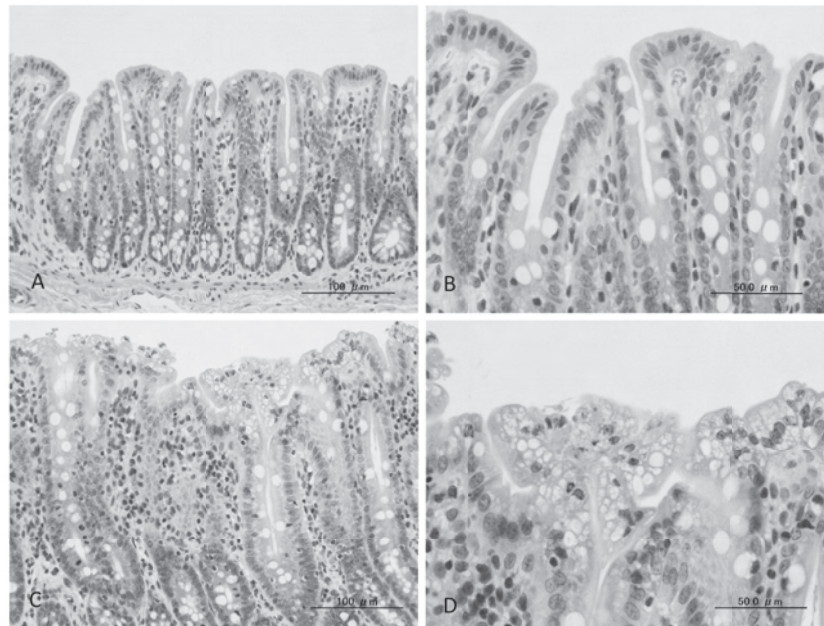


写真1 投与後6カ月の盲腸(雄)

A, 対照群; B, Aの拡大像; C, TBC 500 mg/kg投与群; D, Cの拡大像  
TBC投与群では粘膜上皮細胞の過形成が観察された。(HE染色)

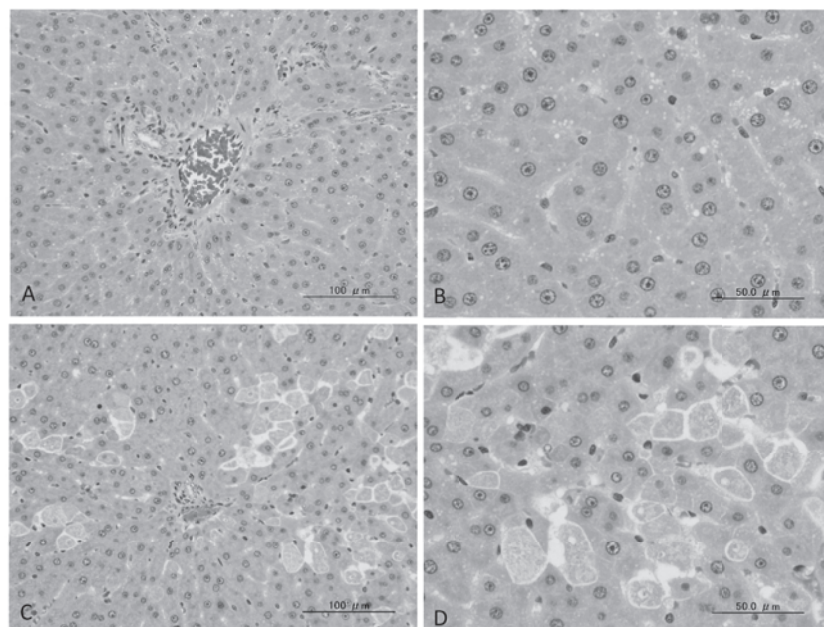


写真2 投与後6カ月の肝臓(雄)

A, 対照群; B, Aの拡大像; C, TBC 500 mg/kg投与群; D, Cの拡大像  
TBC投与群では、中間帯に肝細胞の壊死が観察された。  
しかし、細胞反応は認められなかった。(HE染色)

に盲腸では粘膜固有層への単核細胞浸潤が観察された(写真1)。100 mg/kg投与群の雄でも投与後6カ月に同様の所見がみられた。これらの腸管での変化の程度は投与後3および6カ月間で明らかな差は認められなかった。

肝臓の病理組織学的変化として、投与後3カ月で

は、500 mg/kg投与群の雌雄で中間帯の単細胞壊死がみられた。投与後6カ月でも、100および500 mg/kg投与群の雌雄で中間帯の単細胞壊死が観察され(写真2)、500 mg/kg投与群の雌では褐色色素を含む腫大したクッパー細胞が観察された。

腎臓の病理組織学的変化として、投与後6カ月

のみに糸球体の萎縮，好塩基性尿細管，尿細管の変性および硝子円柱を伴った尿細管の拡張が少数例であるものの100 mg/kg投与群の雌および500 mg/kg投与群の雌雄で観察された。

精巣，精巣上部，前立腺および精嚢にTBC投与によると考えられる肉眼的および組織学的な異常は認められなかった。卵巣および子宮を含めて，その他の器官・組織に異常は認められなかった。

## 考察

TBC投与による毒性変化として，軟便が500 mg/kg投与群で投与初期から投与期間を通じて散見された。軟便の発現例数は解剖前日の絶食に伴って増えており，100 mg/kg投与群でも絶食時に軟便が観察されたことから，消化管内容物の減少によりTBCの影響が強く発現したと考えられた。病理組織学的変化として腸管粘膜上皮の過形成および盲腸粘膜固有層への単核細胞浸潤が観察され，これはTBCの28日間反復経口投与毒性試験<sup>2)</sup>および経口投与簡易生殖毒性試験の結果と一致していた。TBCが腸管粘膜に作用して軟便が生じ，その反応性変化として過形成が発生したと考えられた。しかし，長期投与により腸管での毒性変化が増悪されることはなく，TBCの癌原性試験<sup>3)</sup>では腸管に腫瘍性変化は観察されていないことから，過形成が腫瘍に進展することはないと考えられた。また，血液学検査では白血球数に変動はみられなかったものの，白血球数とその百分比率から算出した実数では，好中球および単球数の増加が500 mg/kg投与群で投与後3および6ヵ月に認められており，上述した腸管粘膜固有層への炎症細胞である単核細胞浸潤との関連性も考えられた。

TBCの毒性は肝臓にも認められ，肝臓の中間帯での単細胞壊死が100および500 mg/kg投与群で観察された。これに関連した変化として，投与後3ヵ月から肝臓重量の増加，血漿中ALTおよびAST活性の上昇が500 mg/kg投与群の雌雄で，血漿中総ビリルビン濃度の増加が同群の雌で認められ，投与後6ヵ月でも同様の変化が観察された。TBCの28日間反復経口投与毒性試験<sup>2)</sup>ではALTおよびASTの上昇など肝機能障害を示す所見はみられなかったが，今回，長期投与によってTBCが肝機能障害を引き起こすことが示唆され

た。また，褐色色素を含む腫大したクッパー細胞が500 mg/kg投与群の雌で観察されたことから，赤血球の崩壊あるいは肝臓での出血が推察されたが，血液学検査や脾臓，骨髓の病理組織所見に貧血を示唆する変化や肝臓での出血はみられていない。さらに，500 mg/kg投与群の雄ではPTおよびAPTTの延長が認められたことから，肝障害により血液凝固因子の合成障害が生じている可能性も考えられた。

投与後6ヶ月の尿検査において，500 mg/kg投与群で尿タンパクの排泄が多い動物が散見された。これらの個体の腎臓の病理組織学検査では，糸球体の萎縮，好塩基性尿細管，尿細管の変性および硝子円柱を伴った尿細管の拡張が皮質に観察されており，TBCが主に糸球体，近位および遠位尿細管に影響を及ぼすと考えられた。これらの腎臓障害を示す変化はTBCの3ヵ月間投与では発現しなかった。

血液生化学検査では，前述した肝臓への影響を示唆するパラメータ以外に，総コレステロール濃度の増加が500 mg/kg投与群の雄で投与3ヵ月以降に，同群の雌で投与後6ヵ月にみられた。高コレステロール血症はネフローゼ症候群や胆道閉塞，胆汁うっ滞時にみられるが，本試験でみられた程度の肝臓および腎臓障害で発生するかどうかは疑問である。しかし，総コレステロール濃度の増加は28日間反復経口投与毒性試験<sup>2)</sup>でも確認されていることから，何らかの機序によりTBCが脂質代謝に影響を及ぼしているものと考えられた。

Wistarラットによる2ヵ月間混餌投与雄性生殖毒性試験<sup>1)</sup>から精巣毒性が懸念されたが，SDラットへの強制経口投与による簡易生殖試験では繁殖能への影響はみられず，本試験でも精子運動能および精巣上部尾部重量あたりの精子数に変化は観察されなかった。また，卵巣摘出マウスでの子宮増殖性試験ではTBCが生体内においてエストロゲン活性を示すことが報告されているが<sup>1)</sup>，雌雄ともに生殖器官の重量および病理学的検査結果に異常は観察されなかったことから，より長期のTBC暴露によっても生殖器への影響は認められないと考えられた。

今回の検討では28日間反復経口投与毒性試験

と同様の毒性変化が腸管に観察され、脂質代謝への影響も認められた。また、TBCの長期暴露によって肝臓および腎臓障害、血液凝固系への影響も明らかとなった。

#### 文献

- 1) Takahashi O, Oishi S: Male reproductive toxicity of four bisphenol antioxidants in mice and rats and their estrogenic effect. *Arch Toxicol.* 2006; **80**: 225-241
- 2) 4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール)のラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験. In: 「化学物質毒性試験報告 Vol.4」, 東京: 化学物質点検推進連絡協議会, 1996. 227-238
- 3) Toxicology and carcinogenesis studies of 4,4'-thiobis(6-*t*-butyl-*m*-cresol) (CAS NO. 96-69-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studied). NTP TR 435, Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program: US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health. 1994
- 4) Sakaue M, Ohsako S, Ishimura R, et al.: Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *J Occup Health.* 2001; **43**: 185-190