

資料 2-1)

MEHP および DEHP のラットを用いた 28 日間反復投与毒性試験

分担研究者 今井 清 (財)食品農医薬品安全性評価センター

研究要旨 Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) とその代謝産物である Mono (2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) の反復摂取による毒性影響を比較・検討するため、DEHP の 200, 700 および 2,000 mg/kg/day ならびに MEHP の 70, 200 および 700 mg/kg/day を、生後 5 週齢の雄性 CrI: CD (SD) ラットに、1 日 1 回、28 日間連日経口投与した。投与期間中、動物の一般状態を毎日観察するとともに、体重および摂餌量を毎週 1 回測定した。投与期間終了後、血液検査(血液学検査, 血液凝固能検査, 血液生化学検査)および病理学検査(器官・組織の重量測定, 肉眼観察および病理組織学検査)を実施した。

投与期間中、MEHP 700 mg/kg 群の 2 例では、投与開始初期に流涎が観察され、軟便、腹部膨満、呼吸不整、間代性痙攣などを伴って瀕死状態となり切迫解剖された。

その他の動物では、MEHP の 700 mg/kg 群および DEHP の 2,000 mg/kg 群で僅かに体重増加が抑制された。投与期間終了後の血液検査では、MEHP 投与群では特筆すべき変化はなかったが、DEHP 投与群では 700 mg/kg 以上の投与群で貧血傾向があり、血液凝固能検査では、フィブリノーゲン濃度が MEHP, DEHP 両物質の投与群で用量依存的に減少した。血液生化学検査では、MEHP, DEHP 両物質の投与群で、アルブミン濃度、A/G 比、AST 活性、ALT 活性、ALP 活性の増加/上昇ならびに中性脂肪濃度および総ビリルビン濃度の減少が認められた。病理学的検査では、MEHP および DEHP 投与群に肝細胞の腫大、好酸性顆粒状変化および巣状壊死を伴った肝肥大が認められた。また、Sertoli only syndrome, セルトリ細胞の空胞化、精細管の萎縮、間細胞の過形成、生殖細胞の変性および多核巨細胞形成を特徴とする精巣障害があり、これに伴って精巣、精巣上体、前立腺および精囊に小型化が認められた。さらに副腎球状帯細胞のび慢性空胞化が散見された。

以上のように、MEHP, DEHP 両物質に共通する影響として、肝毒性および精巣毒性が認められ、いずれか一方の物質のみに特異的な影響としては、MEHP で神経毒性および呼吸器への影響が、DEHP で赤血球系への影響が示唆された。

A. 研究目的

「医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業研究事業におけるプラスチック製医療機器の安全性に関する研究—フタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の比較毒性学的研究」において MEHP の安全性を評価するため、ラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施した。

B. 研究方法

B-1. 被験物質

東京化成工業株式会社製 DEHP(純度 99.6%、

ロット番号: KIKQC) および株式会社ワークケミカル製 MEHP(純度 96< %(GC), ロット番号: TSM0536) を使用し、いずれも冷蔵、密閉下で保管した。

B-2. 供試動物

生後 4 週齢の雄性 CrI: CD (SD) [SPF] ラット(日本チャールス・リバー) 60 匹を購入した。動物搬入日を Day -8 と定め、Day -1(投与開始前日)までを検疫・馴化期間とした。同期間中、一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を Day -8(実測範囲: 78~90 g) および Day -1(実測範囲: 141~169 g) に測

定した。その結果、検疫・馴化期間を通じて一般状態あるいは体重推移に異常が確認された個体はなかった。

B-3. 飼育管理

動物は、バリアシステムの 7-110 号飼育室(W 6.4 × D 10.3 × H 2.6 m)で飼育した。環境調節の基準値は、温度 23±3°C(実測値:22.8~23.1°C)、湿度 55±20%RH(実測値:37.8~59.3%RH)、換気回数 12 回以上/時、空気差圧 30 Pa 以上、照明 12 時間(午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)とした。自動水洗式飼育機(東洋理工)に前面・床ステンレス網目飼育ケージ(W 19.7× D 26.3 × H 18.0 cm)を設置し、1 ケージにつき動物を 1 匹ずつ収容した。飼育ケージは約 2 週に 1 回、給餌器は週 1 回の頻度で交換した。飼料には、汚染物質の混入が日本実験動物飼料協会案の許容基準値内であることが確認された放射線滅菌固型飼料(CRF-1, Lot No. 070612, オリエンタル酵母工業)を用い、動物に自由に摂取させた。飲水には、水質が上水道水質基準(平成 15 年 5 月 30 日厚生労働省令第 101 号)の基準値内であることが確認された上水道水を用い、自動給水ノズルから自由に摂取させた。

B-4. 群分けおよび個体識別

動物を、投与開始日(Day 1)の投与前に測定した体重を基に、安全性試験システムパッケージ(LATOX-F/V5, FFC)を用いて 1 群 7 匹からなる 7 群に割り付けた。試験に用いた動物の体重範囲は、Day 1 において 148~185 g であった。

個体を識別するため、動物入荷時に通し番号を割り付け、同番号を検疫・馴化期間中に動物の耳介に入れ墨した。検疫・馴化期間中、同番号が記載された仮動物番号カードを個体別飼育ケージに付して個々の動物を識別した。群分け後につ

いては、個体別飼育ケージに動物識別カード(ID カード)を付して識別した。

B-5.1. 試験系の構成

群	用量	動物番号 (ID No.)
1	0*	1001~1007
2	MEHP 70 mg/kg/day	1101~1107
3	MEHP 200 mg/kg/day	1201~1207
4	MEHP 700 mg/kg/day	1301~1307
5	DEHP 200 mg/kg/day	1401~1407
6	DEHP 700 mg/kg/day	1501~1507
7	DEHP 2,000 mg/kg/day	1601~1607

*: 媒体のみを投与した(5 mL/kg)。

B-5.2. 用量設定理由

MEHP の用量については、本試験に先立ち実施された用量設定試験(試験番号 A089)で得られた結果に基づき、700 mg/kg/day を最高用量とし、以下 200 および 70 mg/kg/day を中および低用量に設定した。DEHP の用量については、これまでに報告されている単回投与試験および反復経口投与試験の成績を参考に、2,000 mg/kg/day を最高用量とし、以下 700 および 200 mg/kg/day を中および低用量に設定した。

B-6. 投与経路選択理由および投与方法

投与経路は経口とした。投与容量は、体重 100 g 当たり 0.5 mL として最新の体重に基づき算出した。毎日 1 回、テフロン製胃ゾンデを用いて強制投与した。

B-7. 投与および観察期間

投与開始日を Day 1 とし、Day 28 までの 28 日間を投与期間とした。また、計画解剖日を Day 29 とした。

B-8. 投与液の調製

DEHP 投与液

本試験に先立ち実施された、DEHP および MEHP のコーンオイル中における安定性分析(試験番号 A074, A075)において、1~400 mg/mL の範囲で、冷蔵庫内で 9 日間保存し、さらに室温で 24 時間放置した場合、何れも安定であることが確認されたことから、DEHP 投与液の調製は、10 日間に 1 回以上の頻度で実施した。DEHP は、コーンオイル(ナカライテスク, ロット番号: V6R2129)に溶解させ、40, 140 および 400 mg/mL の投与液を調製した。

一方、MEHP は同様にコーンオイルに溶解させ、14, 40 および 140 mg/mL の投与液を調製した。

調製された DEHP および MEHP 投与液は、1 日使用分ごとにガラス瓶に小分けし、投与まで低温庫にて保存した。

B-9. 一般状態の観察

毎日 2 回(投与前および投与後)以上、動物の一般状態を観察し、観察所見を記録した。

B-10. 体重

Day 1, 8, 15, 22 および 28 の投与前に、電子天秤(XS4001-S, メトラー・トレド)を用いて全動物の体重を測定した。また、瀕死動物についてはその搬出時に、計画解剖動物については解剖当日にも測定した。

B-11. 摂餌量

Day 1, 8, 15, 22 および 28 に、餌重量を電子天秤(XS4001-S)を用いて測定し、測定日間の摂餌量(g/day)を算出した。

B-12. 臨床検査

ID 1301 を除く全例について、血液学検査、血

液凝固能検査および血液生化学検査を実施した。なお、瀕死状態に陥った ID 1304 では、採血量が少なかったため、血液学検査および血液生化学検査を実施できなかった。

B-12.1. 採血

採血にあたり、動物を 16 時間以上絶食させた後、エーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から採血した。血液学検査では、抗凝固剤(EDTA-2K)入り採血管(インセパック II-D, 積水化学工業)に採取した新鮮血を用いた。血液凝固能検査では、抗凝固剤(3.13%クエン酸ナトリウム水溶液)入り採血管(ベノジェクト II, テルモ)に採取した血液を、常温にて、1,700 × g で 13 分間遠心分離し、得られた血漿を使用した。血液生化学検査では、高速凝固促進剤・分離剤入り採血管(インセパック II-D)に採取した血液を、常温にて、1,700 × g で 7 分間遠心分離し、得られた血清を使用した。

B-12.2. 血液学検査

総合血液学検査装置(ADVIA 120, バイエル)を用いて、次の項目を測定した:ヘマトクリット値(HCT), ヘモグロビン量(HGB), 赤血球数(RBC), 平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球血色素量(MCH), 平均赤血球血色素濃度(MCHC), 網赤血球率(Reticulocyte), 血小板数(PLT), 白血球数(WBC), 白血球百分率(Differential leukocyte counts), 好中球数(NEUT), リンパ球数(LYMPH), 単球数(MONO), 好酸球数(EOSN), 好塩基球数(BASO), 大型非染色球数(LUC)。

白血球百分率については、上述の機器を用いて測定した。試験群 1~4 については、別途血液塗抹標本を作製し、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色を施し、保存した。

B-12.3. 血液凝固能検査

全自動血液凝固線溶測定装置(STA Compact, ロシュ)を用いて、次の項目を測定した:プロトロン

ビン時間(PT), 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT), フィブリノーゲン.

B-12.4. 血液生化学検査

多項目生化学自動分析装置(日立 7170, 日立製作所)および全自動電解質分析装置(EA06R, アットウィル)を用いて, 次の項目を測定した: 総蛋白(T. protein), アルブミン, A/G 比, 血糖(Glucose), 中性脂肪(Triglyceride), 総コレステロール(T. cholesterol), 尿素窒素(BUN), クレアチニン, 総ビリルビン(T. bilirubin), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT), アルカリホスファターゼ(ALP), γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(Gamma-GTP), カルシウム(Calcium), 無機リン(I. phosphorus), ナトリウム*(Sodium), カリウム*(Potassium), 塩素*(Chloride).

*印の項目は EA06R を, 他の項目は日立 7170 を用いて測定した.

B-13. 病理学検査

病理学検査では, 器官重量測定, 肉眼観察および病理組織学検査を実施した. 計画解剖動物については, エーテル麻酔下にて採血後, 剖検した. 瀕死動物については, 発見後直ちに解剖した.

B-13.1. 器官重量測定

計画解剖時の全生存動物について, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 肺, 副腎, 精巣, 精嚢, 前立腺および精巣上体の重量を, 電子天秤(XS603-S メトラートレド)を用いて測定した. 器官重量 / 体重比(相対重量)を, Day 29 における体重および器官重量から算出した[(器官重量 / 最終体重) × 100]. なお, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 肺および精巣の測定単位はg(小数第2位まで)とし, 他の器官はmg(整数)とした.

B-13.2. 肉眼観察

全例について, 動物の体表, 自然開孔部等を観察し, 腹腔, 胸腔, 骨盤腔および頭蓋腔等の器官・組織を検査した. 全ての肉眼異常について, 部位, 大きさ, 硬さ等を記録した.

B-13.3. 固定

肝臓, 腎臓, 脾臓, 肺, 精巣, 精嚢, 前立腺, 精巣上体, 脳(下垂体), 副腎, 大腿部筋肉, 横隔膜ならびに肉眼観察において異常が認められた器官・組織について, 十分な量の 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液で固定した. 精巣は, ブアン液で前固定した後, 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液で固定した. 解剖後, 保存を要さない屍体残存部は速やかに焼却した.

B-13.4. 病理組織標本の作製および病理組織学検査

全例について, 肝臓, 腎臓, 肺, 精巣, 精巣上体, 副腎, 大腿二頭筋, 横隔膜ならびに肉眼観察において異常が認められた器官・組織の病理組織標本を作製した. 固定した器官・組織を常法に従ってパラフィン包埋し, 薄切後, ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色標本を作製した. 病理組織学検査では, 作製した肝臓, 腎臓, 肺, 精巣, 精巣上体, 副腎, 大腿二頭筋, 横隔膜の組織標本を鏡検し, 病変の種類および程度を含む各所見について記録した.

B-14. データ処理

当該試験の磁気データは, コンピュータ・システム[安全性試験システムパッケージ(LATOX-F/V5)および安評センターのコンピュータ・システム]を用いて記録され, 処理された.

B-15. 統計解析

各試験群の体重値, 摂餌量値, 臨床検査値, 器官重量値および器官重量 / 体重比の統計学的解析については, Bartlett の等分散検定¹⁾を実施し, その結果, 等分散が認められた場合は,

Dunnett の多重比較検定²⁾を、不等分散が認められた場合は、Steel の検定³⁾を実施し、対照群と各投与群間の有意差を検定した。諸器官の肉眼観察および病理組織学検査の各発生例数については、Fisher の正確検定法を用いた。上記定量値の有意水準は、Bartlett の検定では両側 5%、その他の検定では両側 5%あるいは 1%とした。

(倫理面の配慮)

動物の飼育および取り扱いに際しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「財団法人 食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針」に従い、適正に使用した。

C. 研究結果

C-1. 死亡状況

投与期間中、MEHP の 700 mg/kg 群の 2 例 (ID 1301 および 1304) が、それぞれ Day 22 および 28 に瀕死状態となった。

C-2. 一般状態

一般状態の観察所見を別添 Table 1 に示す。

MEHP 投与群

ID 1301 で一過性の流涎が Day 10 の投与後に認められた。その後呼吸不整が Day 21 の投与前から、軟便が Day 22 の投与前からそれぞれ現れ、Day 22 の投与約 1.5 時間後に、自発運動の低下および側臥位を伴い瀕死状態となった。また、ID 1304 では、流涎が Day 10 の投与後に、呼吸不整が Day 10 の投与後から Day 14 の投与後にかけて認められた。これらの症状はその後消失したが、呼吸不整、被毛粗剛および腹部膨満がいずれも Day 28 の投与前から、跳躍が同投与後から現れ、同日の投与約 1.5 時間後に、自発運動の低下お

よび腹臥位を伴い瀕死状態となった。700 mg/kg 群の他の 5 例ならびにそれ以下の用量群では、投与期間を通じて一般状態の異常は認められなかった。

DEHP 投与群

2,000 mg/kg 群の 1 例で、流涎が、Day 11~14、Day 16、Day 21~Day 22 のいずれも投与後に、断続的に認められ、同群の他の 2 例で単発的な流涎がそれぞれ Day 11 あるいは Day 17 の投与後に認められた。2,000 mg/kg 群の他の動物ならびにそれ以下の用量群では、投与期間を通じて一般状態の異常は認められなかった。

C-3. 体重

体重の測定結果を別添 Table 2 に示す。

途中剖検された MEHP 700 mg/kg 群の 2 例では、体重の増加量が対照群に比し少なかった。一方、同群の他 5 例においても、対照群に比し体重増加が僅かに抑制された動物が散見された。DEHP 投与群では、2,000 mg/kg 群で対照群に比し僅かな体重増加抑制が認められた。

その他の被験物質投与各群の体重は、対照群とほぼ同等の推移を示した。

C-4. 摂餌量

摂餌量の測定結果を別添 Table 3 に示す。

途中剖検された MEHP 700 mg/kg 群の 2 例の平均 1 日摂餌量は、対照群に比し低下傾向を示した。一方、同群の他 5 例では、投与期間を通じて対照群とほぼ同等の摂餌量推移を示した。

その他の被験物質投与各群の平均 1 日摂餌量は、いずれも順調に推移し、対照群とほぼ同等の推移を示した。

C-5. 臨床検査

C-5.1. 血液学検査

血液学検査の結果を別添 Table 4 に示す。

MEHP 投与群

全項目で、特筆すべき異常は認められなかった。

DEHP 投与群

ヘマトクリット値ならびにヘモグロビン量が 2,000 mg/kg 群で対照群に比し有意に減少した(いずれも $p \leq 0.01$)。また、統計学的有意差はなかったが、赤血球数が 700 および 2,000 mg/kg 群で減少傾向を示した。なお、単球率(%)が 700 mg/kg 群で有意に増加したが、この変化は用量依存的な変化でないことから毒性学的意義は乏しいと考えられた。

C-5.2. 血液凝固能検査

血液凝固能検査の結果を別添 Table 5 に示す。

MEHP 投与群

フィブリノーゲン濃度が 700 mg/kg 群で有意に減少($p \leq 0.01$)した。

DEHP 投与群

フィブリノーゲン濃度が 700 ($p \leq 0.05$) および 2,000 mg/kg 群 ($p \leq 0.01$) で有意に減少した。

C-5.3. 血液生化学検査

血液生化学検査の結果を別添 Table 6 に示す。

MEHP 投与群

アルブミン濃度が用量依存的な増加傾向を示し、これに伴い A/G 比が 200 ($p \leq 0.05$) および 700 mg/kg 群 ($p \leq 0.01$) で有意に上昇した。総ビリルビン濃度が 200 ($p < 0.05$) および 700 mg/kg 群 ($p < 0.01$) で有意に減少した。また、統計学的有意差はなかったが、中性脂肪濃度が MEHP 投与全群で減少した。さらに、700 mg/kg 群では、AST 活性、ALT 活性および ALP 活性が上昇傾向を示した。

DEHP 投与群

アルブミン濃度が用量依存的な増加傾向を示し、特に 700 および 2,000 mg/kg 群では統計学的にも有意に増加(いずれも $p \leq 0.01$)した。これに伴って、A/G 比は DEHP 投与全群で有意に上昇(いずれも $p \leq 0.01$)した。また、総ビリルビン濃度が 700 および 2,000 mg/kg 群で、ALT 活性が 2,000 mg/kg 群で、ALP 活性が 700 および 2,000 mg/kg 群でそれぞれ有意に増加/上昇(総ビリルビン濃度:いずれも $p \leq 0.01$, ALT 活性: $p \leq 0.05$, ALP 活性:いずれも $p \leq 0.05$)したほか、統計学的有意差はなかったが、中性脂肪濃度の減少が DEHP 投与全群で認められた。さらに、2,000 mg/kg 群では、AST 活性が上昇傾向を示した。なお、700 mg/kg 群では、ナトリウム濃度が対照群に比し有意に減少($p \leq 0.01$)したが、この変化に用量依存性はなく、毒性学的意義はないと考えられた。

他の検査項目については、被験物質投与各群に異常はみられなかった。

C-6. 病理学検査

C-6.1. 器官重量

器官重量の測定結果を別添 Table 7 に、器官相対重量(器官重量 / 体重)の測定結果を別添 Table 8 に示す。

MEHP 投与群

肝臓では、絶対重量が 700 mg/kg 群で、相対重量が 200 および 700 mg/kg 群でそれぞれ対照群に比し有意に増加 [絶対重量: $p \leq 0.01$ (700 mg/kg 群), 相対重量: $p \leq 0.01$ (200 mg/kg 群) および $p \leq 0.05$ (700 mg/kg 群)]した。腎臓では、相対重量が 700 mg/kg 群で有意に増加($p \leq 0.01$)した。その他、統計学的有意差はなかったが、精巣、前立腺および精囊の絶対ならびに相対重量が 700 mg/kg 群で減少した。

DEHP 投与群

肝臓では、絶対および相対重量が DEHP 投与

全群で有意に増加(いずれも $p \leq 0.01$)した。腎臓では、相対重量が 2,000 mg/kg 群で有意に増加($p \leq 0.01$)した。また、精巣および精巣上体の絶対および相対重量が 2,000 mg/kg 群で有意に減少(いずれも $p \leq 0.01$)した。前立腺および精嚢では、統計学的有意差はなかったが、絶対および相対重量が 2,000 mg/kg 群で減少した。

C-6.2. 肉眼所見

剖検所見を別添 Table 9 に示す。

MEHP 投与群

途中剖検された 700 mg/kg 群の 2 例では、胃—大腸の消化管にガス状内容物を伴う内腔拡張、脾臓および胸腺の萎縮、脾臓の淡色化、肝臓および腎臓の暗色化、肝臓の白色斑、精嚢の小型化、全身性の消瘦が共通して認められた。その他、心臓の白色斑、肺の赤色化、腺胃の赤色斑、精巣、精巣上体および前立腺の小型化が認められた。定期解剖例では、肝臓の肥大および白色斑が 200 mg/kg 以上の群に、肝臓の暗色化、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢の小型化、腎臓の暗色化が 700 mg/kg 群に認められた。

DEHP 投与群

肝臓では、暗色化および白色斑が 700 mg/kg 以上の群に、肥大が 200 mg/kg 以上の群に認められた。また、小型の精巣、精巣上体、前立腺および精嚢が 2,000 mg/kg 群に認められた。

C-6.3. 病理組織学検査

病理組織学検査の所見を別添 Table 10 に示す。

MEHP および DEHP 投与に起因すると考えられる変化が肝臓、精巣、精巣上体、腎臓および副腎に認められた。

肝臓では、MEHP および DEHP 投与群に共通して、肝細胞の肥大、好酸性顆粒状変化および巣状壊死が認められた。肝細胞の好酸性顆粒状変化と肝細胞の肥大(写真1)は、MEHP および

DEHP の 200 mg/kg 以上の群に認められ、用量の増加に伴い、発生数の増加および程度の増強が認められた。また、肝細胞の巣状壊死は MEHP の 700 mg/kg 群および DEHP の 2,000 mg/kg 以上の群に認められた。精巣では、MEHP および DEHP 投与群に共通して、Sertoli only syndrome, セルトリ細胞の空胞化、精細管の萎縮、間細胞の過形成、生殖細胞の変性および多核巨細胞形成などを特徴とする精巣障害(写真2, 3)が MEHP では 700 mg/kg 群に、DEHP 投与群では 700 mg/kg 以上の投与群に認められた。これらの病変には DEHP の用量の増加に伴い発生数の増加、程度の増強が認められ、DEHP の 2,000 mg/kg 群は、精細管内に生殖細胞がほとんど認められなかった。

精巣上体では、MEHP および DEHP 投与群に共通して精子減少、管内細胞残渣が認められた。DEHP の 2,000 mg/kg 群の多くは、精子減少の程度が増し、無精子であった。精子減少および管内細胞残渣は MEHP の 700 mg/kg 群および DEHP の 700 mg/kg 以上の群に認められた。

腎臓では、皮質尿細管の変性が MEHP の 700 mg/kg 群および DEHP の 2,000 mg/kg 群の各 1 例で小範囲に限局して認められた。

副腎では、球状帯細胞のび漫性空胞化(写真4)が MEHP および DEHP の 200 mg/kg 以上の群に認められ、用量の増加に伴い、発生数の増加および程度の増強が認められた。

D. 考察

Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) とその代謝産物である Mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP)⁴⁾ の反復摂取による毒性影響を比較・検討するため、DEHP の 200, 700 および 2,000 mg/kg/day ならびに MEHP の 70, 200 および 700 mg/kg/day を、生後 5 週齢の雄性 CrI: CD

(SD)ラットに、1日1回、28日間(Day 1~28)連日経口投与した。投与期間中、動物の一般状態を毎日観察するとともに、体重および摂餌量を毎週1回測定した。投与期間終了後、臨床検査(血液学検査、血液凝固能検査、血液生化学検査)および病理学検査(器官・組織の重量測定、肉眼観察および病理組織学検査)を実施した。

投与期間中、MEHP 700 mg/kg 群の ID 1301 と ID 1304 の 2 例が瀕死状態(ID 1301:Day 22, ID 1304:Day 28)となり、切迫解剖された。当該 2 例では、生存中から摂餌量低下が認められ、体重増加も少なく、剖検時には全身性の消瘦がみられた。

瀕死となった 2 例では投与開始初期に一過性の流涎が認められたが、同症状は、予備試験(試験番号 A089)においても MEHP の 700 mg/kg 以上の投与で散見されたことから、被験物質投与に起因するものと考えられた。さらに、これら 2 例では軟便あるいは腹部膨満が瀕死当日の投与前から認められ、呼吸不整も観察された。剖検の結果、これらの動物では消化管にガス状内容を伴う内腔拡張が観察されたが、呼吸器系には同症状を示唆する病変はなく、急速に進行した一般状態の悪化の原因を特定する事は出来なかった。

その他特筆すべき一般状態の変化として、ID 1304 では、瀕死当日の投与後に跳躍が認められた。予備試験において MEHP の 2,000 mg/kg 投与により 3/3 例に間代性痙攣が観察されたことを考慮すると、同症状は、間代性痙攣の部分現象として発現したのと考えられ、MEHP 投与による神経毒性が発現した可能性が示唆された。なお、DEHP 投与群では、呼吸不整および痙攣は投与期間を通じて認められなかった。

MEHP および DEHP に共通する所見として、臨床検査では、アルブミン濃度の増加、AST 活性、ALT 活性および ALP 活性の上昇、フィブリノーゲ

ン量の減少ならびに中性脂肪濃度の減少傾向が MEHP の 700 mg/kg 群および DEHP の 2,000 mg/kg 群で認められ、病理学検査では、肝細胞の肥大および好酸性顆粒状変化が MEHP の 200 mg/kg 以上の群および DEHP の 200 mg/kg 以上の群で認められたほか、巣状壊死が MEHP の 700 mg/kg 群および DEHP の 200 mg/kg 以上の群で散見された。AST 活性、ALT 活性および ALP 活性の上昇は、高用量群のみに認められた極めて軽度な変化であり、また、巣状壊死の認められた個体と AST 活性、ALT 活性および ALP 活性の上昇が認められた個体は必ずしも一致しないことから、これら血液生化学検査値の変動の要因として、細胞膜の透過性の変化など、肝細胞壊死以外の原因を考慮する必要がある。なお、本試験で肝細胞内に観察された好酸性顆粒は電子顕微鏡観察により PPAR の標的細胞内小器官であるペルオキシゾームである^{5),6)}ことが報告されている。さらに、精巣では Sertoli only syndrome, 精細管内の多核細胞形成、セルトリ細胞の空胞化、精細管の萎縮および間細胞の過形成などを特徴とする精巣障害が観察されたが、フタル酸エステルによる精巣障害の主な原因は、セルトリ細胞内の細胞骨格を形成する中間径フィラメントあるいはアクチンフィラメントの障害によるもの⁷⁾⁸⁾と考えられており、MEHP も同様の作用を有することが確認された。一方、副腎では、球状帯細胞のびまん性空胞化が MEHP の 200 mg/kg 以上の群および DEHP の 200 mg/kg 以上の群でそれぞれ認められた。今回観察された所見は同種ラットの無処置対照群では認められない所見であり、DEHP あるいは MEHP 投与により惹起された変化であると考えられるが、その毒性学的意義は明らかではない。さらに、病理学検査においてごく軽度の皮質尿管の変性が MEHP の 700 mg/kg 群および DEHP の 2,000 mg/kg 群の各 1 例に認められたが、変化

がごく軽度で極めて小範囲の限局性変化であることから、被験物質投与による変化であると特定する事は出来なかった。因みに、近年 B6C3F1 マウスに DEHP を飼料に添加し、104 週間投与すると、1,500ppm 投与群の雌に慢性進行性ネフロパチーがおきる⁹⁾ことが報告されている。

なお、今回いずれか一方の物質のみに認められる影響として、MEHP では先述の通り、瀕死となった動物において痙攣が認められ、一方、DEHP では、軽度の貧血が認められた。

E. 結論

MEHP, DEHP 両物質に共通する影響として、肝毒性および精巣毒性が認められ、腎臓および副腎に対する影響も示唆された。また、いずれか一方の物質のみに特異的な影響としては、MEHP で神経毒性および呼吸器への影響が、DEHP で赤血球の異常が、それぞれ認められた。

F. 参考文献

- 1) Snedecor GW, Cochran WG. Statistical Methods: 8th ed. Iowa State University Press; 1989.
- 2) Yoshida M. Exact probabilities associated with Tukey's and Dunnett's multiple comparisons procedures in imbalanced one-way ANOVA J Japanese Soc Comp Statist 1988; 1: 111-22.
- 3) Steel RGD. A multiple comparison rank sum test: Treatments versus control. Biometric 1959; 15: 560-72.
- 4) Thomas JA and Thomas MJ. Biological Effects of Di-(ethylhexyl)Phthalate and other Phthalic acid Esters/CRC Crit. Reviews in Toxicol. 13; 283-317, 1984.
- 5) Moody DE and Reddy JK, Hepatic peroxisome(microbody) proliferation in rats fed

plasticizers and related compounds. Toxicop. appl. Pharmacol. 45; 497-504 1978.

- 6) Thomas JA and Thomas MJ, Biological Effects of Di-(ethylhexyl)Phthalate and other Phthalic acid Esters/ CRC Crit. Reviews in Toxicol. 13; 283-317, 1984.
- 7) Dalgaard M, Nellemann C, Lam HR, Sorensen IK and Ladefoged O., The acute effects of mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes of prepubertal Wistar rats, Toxicol Lett. 122; 69-79, 2001.
- 8) Saitoh Y, Usumi K, Nagata T, Maromo H, Imai K and Katoh M, Early Changes in the Rat Testis Induced by Di-(2-Ethylhexyl)Phthalate and 2,5-Hexanedione-Ultrastructure and Lanthanum Trace Study., J Toxicol. Pathol. 10; 51-57, 1997.
- 9) David RM, Moore MR, Finney DC and Guest D., Chronic toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate in mice, Toxicol Sci. 58; 377-385, 2000.

Clinical signs

Table : 1
Sex: Male

Group No. Dose mg/kg/day	Finding part	No. of animals	Day of Treatment											
			1--->	2--->	3--->	4--->	5--->	6--->	7--->	8--->	9--->			
		Observation time*	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
01	No. of animals		7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
control	Normal	0	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
02	No. of animals		7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MEHP	Normal	70	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
03	No. of animals		7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MEHP	Normal	200	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

*: 1 Before administration, 2 After administration, A Additional observation

Group No. Dose mg/kg/day	Finding Part	Day of Treatment																	
		1		2		3		4		5		6		7		8		9	
Sex: Male	Observation time*	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
04	No. of animals	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MEHP	Normal	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	700																		
	Prone position	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lateral position	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease in locomotor activity	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Jumping	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Irregular respiration	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Soiled fur Abdomen	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abdominal distention	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mucous feces	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
05	No. of animals	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
DEHP	Normal	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	200																		

*: 1 Before administration, 2 After administration, A Additional observation

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg/day	Finding Part	Day of Treatment												
		1--->	2--->	3--->	4--->	5--->	6--->	7--->	8--->	9--->				
06	No. of animals	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
DEHP	Normal	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
700														
07	No. of animals	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
DEHP	Normal	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
2000	Salivation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

+: 1 Before administration, 2 After administration, A Additional observation

Group No. Dose mg/kg/day	Finding Part	Day of Treatment																		
		10--->	11--->	12--->	13--->	14--->	15--->	16--->	17--->	18--->	19--->	20--->	21--->	22--->	23--->					
04	No. of animals	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
MEHP	700	7	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Prone position	+																		
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lateral position	+																		
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Decrease in locomotor activity	+																		
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Jumping	+																		
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Irregular respiration	+																		
	Total	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Soiled fur Abdomen	+																		
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Salivation	+																		
	Total	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Abdominal distention	+																		
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mucous feces	+																		
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
05	No. of animals	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
DEHP	200	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Normal	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

*: 1 Before administration, 2 After administration, A Additional observation

Group No. Dose mg/kg/day	Finding Part	Day of Treatment																	
		10--->	11--->	12--->	13--->	14--->	15--->	16--->	17--->	18--->	19--->	20--->	21--->	22--->	23--->				
06	No. of animals	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
DEHP 700	Normal	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
07	No. of animals	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
DEHP 2000	Normal	7	7	7	5	7	6	7	6	7	6	7	7	7	6	7	6	7	7
	Salivation	0	0	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0

*: 1 Before administration, 2 After administration, A Additional observation

Group No. Dose mg/kg/day	Finding Part	Day of Treatment													
		19-->	20-->	21-->	22-->	23-->	24-->	25-->	26-->	27-->					
01	No. of animals	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	Observation time*	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
control	Normal	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
02	No. of animals	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
MEHP	Normal	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
03	No. of animals	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
MEHP	Normal	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

*: 1 Before administration, 2 After administration, A Additional observation

Table : 1 -continued Clinical signs Exp.No. RD-07-007
 Sex: Male

Group No. Dose mg/kg/day	Finding Part	No. of animals	Observation time*	Day of Treatment		
				1	2	29
01 control	Normal	7	7	A	7	7
				1	7	7
02 MEHP 70	Normal	7	7	A	7	7
				1	7	7
03 MEHP 200	Normal	7	7	A	7	7
				1	7	7

*: 1 Before administration, 2 After administration, A Additional observation

Group No. Dose mg/kg/day	Finding Part	Observation time*	Day of Treatment			
			28-----> 29----->	1 A 2 1 2		
04	No. of animals		6	1	5	5
MEHP 700	Normal		5	0	5	5
	Prone position	+	0	1	0	0
	Total		0	1	0	0
	Lateral position	+	0	0	0	0
	Total		0	0	0	0
	Decrease in locomotor activity	+	0	1	0	0
	Total		0	1	0	0
	Jumping	+	0	1	0	0
	Total		0	1	0	0
	Irregular respiration	+	1	1	0	0
	Total		1	1	0	0
	Soiled fur Abdomen	+	1	1	0	0
	Total		1	1	0	0
	Salivation	+	0	0	0	0
	Total		0	0	0	0
	Abdominal distention	+	1	1	0	0
	Total		1	1	0	0
	Mucous feces	+	0	0	0	0
	Total		0	0	0	0
05	No. of animals		7	7	7	7
DEHP 200	Normal		7	7	7	7

*: 1 Before administration, 2 After administration, A Additional observation