

## 既存化学物質の人健康影響に関する情報

(平成21年12月18日開催)

官報公示 整理番号	CAS No.	物質名称	試験名				頁
			Ames	染色体	28日間	Reprotox	
4-96	42240-73-3	2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン	○	○	○		1
2-140	75-50-3	トリメチルアミン	○	○		○	77
2-186	75-59-2	テトラメチルアンモニウムヒドロキシド	○	○	○		103
2-1065	79-39-0	メタクリルアミド	○	○	○		122
2-608	88-09-5	2-エチル酪酸	○	○		○	144
3-1183	90-02-8	2-ヒドロキシベンズアルデヒド	○	○		○	167
5-56	97-99-4	テトラヒドロフルフリルアルコール	○	○	○		188
3-2259	101-83-7	ジシクロヘキシルアミン	○	○	○		209
2-235	110-63-4	1,4-ブタンジオール	○	○		○	231
3-959	118-79-6	2,4,6-トリブロモフェノール	○	○		○	255
3-500	123-07-9	4-エチルフェノール	○	○	○		282
2-1541	126-98-7	メタクリロニトリル	○	○		○	303
2-1291 2-2709	683-10-3	N,N-ジメチル-N-ドデシルグリシン (N-カルボキシメチル-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウム)	○	○		○	325
2-1044	868-77-9	メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステル	○	○		○	351
2-2583	2439-35-2	アクリル酸2-(ジメチルアミノ)エチルエステル	○	○		○	374
2-1047	2867-47-2	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート	○	○		○	396

要 約

当該試験条件下において、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンには遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判定した。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100 株, TA98 株, TA1535 株および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

その結果、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、0.610 ~5000  $\mu\text{g}$ /プレート of いずれの用量においても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照の 2 倍を超える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

陽性対照物質は、各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

また、用量設定試験、本試験および本試験 (追加試験) により、試験結果の再現性が確認された。

#### 13.11. 結果の解析

平均復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に、陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は、実施しなかった。

### 14. 試験結果

#### 14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示す。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、-S9 処理ならびに +S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、-S9 処理の全菌株の低用量あるいは中用量以上の用量において、+S9 処理の TA100 株および TA1537 株の高用量において、試験菌株に対する生育阻害作用が認められた。

陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

#### 14.2. 被験物質の析出等（用量設定試験）

処理開始時に、-S9 処理および+S9 処理ともに 128 µg/プレート以上の用量で反応液に白濁および白色粉末状の析出物が観察された。プレインキュベーション後、-S9 処理では 128~320 µg/プレートの用量、+S9 処理では 128 µg/プレート以上の用量において、処理開始時に認められた白濁が消失していた。さらに、+S9 処理の 20.5 µg/プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、2000 µg/プレート以上の用量で白色塊状の析出物が認められた。

コロニー数計測時では、-S9 および+S9 処理ともに 128 µg/プレート以上の用量で白色粉末状の析出物がみられ、さらに、+S9 処理の 5000 µg/プレートの用量で白色塊状の析出物が観察された。

析出物の影響により、-S9 処理の 2000 µg/プレート以上および+S9 処理の 320 µg/プレート以上の用量では、コロニーアナライザーの使用が不適當と判断し、目視によりコロニー数を計数した。

#### 14.3. 本試験

結果を Figure 6~10 および Table 3, 4 に示す。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理の TA100 株および TA1537 株では 19.5 µg/プレート以上の用量で、TA1535 株および TA98 株では 39.1 µg/プレート以上の用量で、WP2uvrA 株では 625 µg/プレートの用量で、

また、+S9 処理の TA100 株および TA1537 株では 1250  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で認められた。

陽性対照物質は、試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

#### 14.4. 被験物質の析出等 (本試験)

処理開始時に、-S9 処理の 78.1  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で、また、+S9 処理の 156  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で反応液に白濁および白色粉末状の析出物が観察された。プレインキュベーション後、-S9 および+S9 処理の処理開始時に認められた白濁は消失していた。さらに、+S9 処理の 39.1  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、1250  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色塊状の析出物が認められた。

コロニー数計測時では、-S9 および+S9 処理ともに 78.1  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物がみられ、さらに、+S9 処理の 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色塊状の析出物が観察された。

析出物の影響により、+S9 処理の 156  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量では、コロニーアナライザーの使用が不適当と判断し、目視によりコロニー数を計数した。

#### 14.5. 本試験 (追加試験)

結果を Figure 11~14 および Table 5 に示す。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、いずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、TA100 株および TA1537 株では 25.0  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で、TA1535 株および TA98 株では 50.0  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で認められた。

陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

#### 14.6. 被験物質の析出等 (本試験-追加試験)

処理開始時およびコロニー数計測時において、被験物質の析出等の特筆すべき変化は、認められなかった。



## 15. 考察および結論

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの遺伝子突然変異誘発性を検討するため、細菌（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートあるいは試験菌株の生育を阻害を示す用量を設定し、試験を行った。その結果、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、-S9 処理および+S9 処理の全ての試験菌株において、陰性対照と比較し、2倍を超える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

これら両処理法での試験結果は、用量設定試験、本試験および本試験（追加試験）により、再現性が確認された。

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ（Appendix 1）から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の結果から、当該試験条件下において、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンには遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判定した。

なお、これまでに被験物質 2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンについての遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告は得られていない。

類縁体である 4,4'-メチレンビス（2-クロロアニリン）は、人において発がん性を示し<sup>1)~3)</sup>、遺伝子損傷を引き起こす<sup>4)~6)</sup>ことが報告されている。さらに、細菌を用いる復帰変異試験で陽性<sup>7)</sup>との報告があり、ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験で数的異常を誘発する<sup>8)</sup>ことも報告されている。

## 16. 参考文献

- 1) IARC: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 57: p.271-303. International Agency for Research on Cancer, Lyon. Also, 1993, Suppl.7: 246-247.
- 2) Ward E, Smith AB, Haiperin W.: 4,4'-Methylenebis (2-chloroaniline): an unregulated carcinogen. Am J Ind Med. 1987, 12(5): 537-549.
- 3) Ward E, Haiperin W, Thun M, Grossman HB, Fink B, Koss L, Osorio AM, Schulte P.: Bladder tumors in two young males occupationally exposed to MBOCA. Am J Ind Med. 1988, 14(3): 267-272.
- 4) McQueen CA, Williams GM.: Review of the genotoxicity and carcinogenicity of 4,4'-methylene-dianiline and 4,4'-methylene-bis -2-chloroaniline. Mutat. Res. 1990, 239(2): 133-142.

Table 1. Summary data on dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	90	104	117	12	10	8	18	19	16	12	18	15	11	7	13
		[ 104	±	14 ]	[ 10	±	2 ]	[ 18	±	2 ]	[ 15	±	3 ]	[ 10	±	3 ]
2,2',3,3'- tetrachloro-	8.19	89	98	97	8	12	14	14	10	13	16	20	18	10	7	8
		[ 95	±	5 ]	[ 11	±	3 ]	[ 12	±	2 ]	[ 18	±	2 ]	[ 8	±	2 ]
4,4'-diamino diphenylmethane	20.5	81*	70*	73*	9	12	12	13	9	12	23	22	21	6*	6*	6*
		[ 75	±	6 ]	[ 11	±	2 ]	[ 11	±	2 ]	[ 22	±	1 ]	[ 6	±	0 ]
	51.2	75*	73*	70*	12*	8*	9*	14	16	13	23*	17*	21*	7*	4*	5*
		[ 73	±	3 ]	[ 10	±	2 ]	[ 14	±	2 ]	[ 20	±	3 ]	[ 5	±	2 ]
	128 +	87*	82*	87*	8*	12*	7*	15	15	12	16*	20*	18*	11*	6*	6*
		[ 85	±	3 ]	[ 9	±	3 ]	[ 14	±	2 ]	[ 18	±	2 ]	[ 8	±	3 ]
	320 +	84*	73*	78*	10*	14*	11*	11*	13*	16*	24*	20*	23*	8*	5*	9*
		[ 78	±	6 ]	[ 12	±	2 ]	[ 13	±	3 ]	[ 22	±	2 ]	[ 7	±	2 ]
	800 +	86*	98*	90*	11*	11*	11*	12*	11*	19*	20*	19*	14*	6*	12*	6*
		[ 91	±	6 ]	[ 11	±	0 ]	[ 14	±	4 ]	[ 18	±	3 ]	[ 8	±	3 ]
	2000 +	91*	99*	80*	10*	8*	8*	16*	12*	17*	16*	11*	14*	6*	6*	4*
		[ 90	±	10 ]	[ 9	±	1 ]	[ 15	±	3 ]	[ 14	±	3 ]	[ 5	±	1 ]
	5000 +	86#	93#	86#	6#	6#	10#	12#	12#	19#	10#	11#	9#	5#	5#	4#
		[ 88	±	4 ]	[ 7	±	2 ]	[ 14	±	4 ]	[ 10	±	1 ]	[ 5	±	1 ]
Positive control compound		AF-2			NaN <sub>3</sub>			AF-2			AF-2			9-AA		
Dose (µg/plate)		0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Revertant colonies		743	710	697	654	559	583	99	110	121	671	638	641	282	361	391
per plate		[ 717	±	24 ]	[ 599	±	49 ]	[ 110	±	11 ]	[ 650	±	18 ]	[ 345	±	56 ]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide      NaN<sub>3</sub>: Sodium azide      9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

# : The growth of background lawn of bacteria can't be observed by visible precipitation.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	113	103	100	7	8	10	17	23	23	22	20	24	11	10	8
		[ 105	$\pm$ 7 ]	[ 8	$\pm$ 2 ]	[ 21	$\pm$ 3 ]	[ 22	$\pm$ 2 ]	[ 10	$\pm$ 2 ]					
2,2',3,3'- tetrachloro-	8.19	149	137	133	8	11	11	23	20	16	27	27	31	15	12	16
		[ 140	$\pm$ 8 ]	[ 10	$\pm$ 2 ]	[ 20	$\pm$ 4 ]	[ 28	$\pm$ 2 ]	[ 14	$\pm$ 2 ]					
4,4'-diamino diphenylmethane	20.5	156	143	140	9	12	9	12	14	21	26	32	33	8	17	12
		[ 146	$\pm$ 9 ]	[ 10	$\pm$ 2 ]	[ 16	$\pm$ 5 ]	[ 30	$\pm$ 4 ]	[ 12	$\pm$ 5 ]					
	51.2	155	149	141	12	8	14	24	18	17	34	32	33	11	6	14
		[ 148	$\pm$ 7 ]	[ 11	$\pm$ 3 ]	[ 20	$\pm$ 4 ]	[ 33	$\pm$ 1 ]	[ 10	$\pm$ 4 ]					
	128 +	145	137	137	13	9	15	31	25	29	32	30	29	6	10	13
		[ 140	$\pm$ 5 ]	[ 12	$\pm$ 3 ]	[ 28	$\pm$ 3 ]	[ 30	$\pm$ 2 ]	[ 10	$\pm$ 4 ]					
	320 +	130	121	131	11	13	12	22	21	16	30	25	23	8	10	12
		[ 127	$\pm$ 6 ]	[ 12	$\pm$ 1 ]	[ 20	$\pm$ 3 ]	[ 26	$\pm$ 4 ]	[ 10	$\pm$ 2 ]					
	800 +	127*	134*	127*	9	10	13	18	21	20	24	31	26	7	11	9
		[ 129	$\pm$ 4 ]	[ 11	$\pm$ 2 ]	[ 20	$\pm$ 2 ]	[ 27	$\pm$ 4 ]	[ 9	$\pm$ 2 ]					
	2000 +	131*	121*	124*	10	7	11	19	19	21	26	28	30	5*	5*	3*
		[ 125	$\pm$ 5 ]	[ 9	$\pm$ 2 ]	[ 20	$\pm$ 1 ]	[ 28	$\pm$ 2 ]	[ 4	$\pm$ 1 ]					
	5000 +	127*	135*	134*	13	15	16	14	19	14	27	26	24	6*	7*	6*
		[ 132	$\pm$ 4 ]	[ 15	$\pm$ 2 ]	[ 16	$\pm$ 3 ]	[ 26	$\pm$ 2 ]	[ 6	$\pm$ 1 ]					
Positive control compound		2-AA			2-AA			2-AA			2-AA			2-AA		
Dose( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		1			2			10			0.5			2		
Revertant colonies		1253	1177	1246	394	406	367	730	795	760	332	371	324	210	192	213
per plate		[ 1225	$\pm$ 42 ]	[ 389	$\pm$ 20 ]	[ 762	$\pm$ 33 ]	[ 342	$\pm$ 25 ]	[ 205	$\pm$ 11 ]					

2-AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	113	119	109	14	18	17	31	31	22	19	26	19	7	7	9
		[ 114	$\pm$	5 ]	[ 16	$\pm$	2 ]	[ 28	$\pm$	5 ]	[ 21	$\pm$	4 ]	[ 8	$\pm$	1 ]
2,2',3,3'- tetrachloro-	0.610	121	121	123										6	5	6
		[ 122	$\pm$	1 ]										[ 6	$\pm$	1 ]
4,4'-diamino diphenylmethane	1.22	107	99	109										13	8	7
		[ 105	$\pm$	5 ]										[ 9	$\pm$	3 ]
	2.44	112	113	108	13	13	11				24	18	19	9	9	14
		[ 111	$\pm$	3 ]	[ 12	$\pm$	1 ]				[ 20	$\pm$	3 ]	[ 11	$\pm$	3 ]
	4.88	109	97	104	12	16	13				30	16	20	6	6	11
		[ 103	$\pm$	6 ]	[ 14	$\pm$	2 ]				[ 22	$\pm$	7 ]	[ 8	$\pm$	3 ]
	9.77	84	93	99	8	7	8				18	25	18	8	12	9
		[ 92	$\pm$	8 ]	[ 8	$\pm$	1 ]				[ 20	$\pm$	4 ]	[ 10	$\pm$	2 ]
	19.5	106*	80*	87*	10	14	11	22	27	27	22	22	19	5*	6*	5*
		[ 91	$\pm$	13 ]	[ 12	$\pm$	2 ]	[ 25	$\pm$	3 ]	[ 21	$\pm$	2 ]	[ 5	$\pm$	1 ]
	39.1	70*	68*	75*	9*	9*	5*	34	23	21	18*	19*	17*	7*	4*	3*
		[ 71	$\pm$	4 ]	[ 8	$\pm$	2 ]	[ 26	$\pm$	7 ]	[ 18	$\pm$	1 ]	[ 5	$\pm$	2 ]
	78.1 +				14*	17*	10*	26	23	23	20*	20*	24*			
					[ 14	$\pm$	4 ]	[ 24	$\pm$	2 ]	[ 21	$\pm$	2 ]			
	156 +							20	23	18						
								[ 20	$\pm$	3 ]						
	313 +							20	25	18						
								[ 21	$\pm$	4 ]						
	625 +							36*	30*	26*						
								[ 31	$\pm$	5 ]						

a) : Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Continued

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]													
		TA100		TA1535			WP2uvrA			TA98		TA1537			
Positive control compound	AF-2	AF-2		NaN <sub>3</sub>			AF-2			AF-2		9-AA			
Dose( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.01		0.5			0.01			0.1		80			
Revertant colonies per plate [	639	731	644	663	605	564	127	148	126	697	596	695	295	305	295
	671	$\pm$	52 ]	611	$\pm$	50 ]	134	$\pm$	12 ]	663	$\pm$	58 ]	298	$\pm$	6 ]
AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide		NaN <sub>3</sub> : Sodium azide			9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride										

Table 4. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Non-activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	114 [ 118	122 $\pm$	119 4 ]]	15 13	11 $\pm$	12 2 ]]	26 35	43 $\pm$	36 9 ]]	18 25	32 $\pm$	25 7 ]]	19 17	17 $\pm$	16 2 ]
2,2',3,3'- tetrachloro-	39.1	152 [ 161	177 $\pm$	154 14 ]												
4,4'-diamino diphenylmethane	78.1 +	139 [ 158	168 $\pm$	168 17 ]										20 [ 17	17 $\pm$	14 3 ]
	156 +	120 [ 131	136 $\pm$	138 10 ]]	15 14	16 $\pm$	11 3 ]]	33 33	31 $\pm$	36 3 ]]	36 34	30 $\pm$	36 3 ]]	10 13	12 $\pm$	18 4 ]
	313 +	149 [ 146	140 $\pm$	148 5 ]]	9 8	9 $\pm$	7 1 ]]	21 27	29 $\pm$	30 5 ]]	36 36	33 $\pm$	38 3 ]]	10 12	12 $\pm$	13 2 ]
	625 +	145 [ 140	147 $\pm$	129 10 ]]	11 13	13 $\pm$	14 2 ]]	26 27	27 $\pm$	29 2 ]]	25 28	27 $\pm$	31 3 ]]	10 13	13 $\pm$	15 3 ]
	1250 +	132* [ 136	136* $\pm$	139* 4 ]]	11 14	14 $\pm$	16 3 ]]	20 24	22 $\pm$	30 5 ]]	17 21	23 $\pm$	23 3 ]]	8* 8	8* $\pm$	9* 1 ]
	2500 +				18 [ 18	18 $\pm$	17 1 ]]	20 25	23 $\pm$	32 6 ]]	21 24	22 $\pm$	30 5 ]]	5* 6	5* $\pm$	7* 1 ]
	5000 +				20 [ 18	16 $\pm$	18 2 ]]	27 28	26 $\pm$	32 3 ]]	24 26	30 $\pm$	23 4 ]			
Positive control compound		2-AA			2-AA			2-AA			2-AA			2-AA		
Dose( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		1			2			10			0.5			2		
Revertant colonies per plate		1490 [ 1367	1290 $\pm$	1320 108 ]]	468 480	504 $\pm$	469 21 ]]	833 873	876 $\pm$	909 38 ]]	499 484	438 $\pm$	514 40 ]]	236 206	194 $\pm$	187 27 ]

2-AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 5. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]											
		TA100			TA1535			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	99 [ 102	111 $\pm$	96 8 ]	17 17	15 $\pm$	20 3 ]	19 19	20 $\pm$	19 1 ]	13 13	10 $\pm$	16 3 ]
2,2',3,3'- tetrachloro-	0.781	82 [ 89	90 $\pm$	96 7 ]							7 [ 9	10 $\pm$	10 2 ]
4,4'-diamino diphenylmethane	1.56	113 [ 105	92 $\pm$	111 12 ]	13 13	14 $\pm$	11 2 ]	28 25	26 $\pm$	20 4 ]	16 14	15 $\pm$	12 2 ]
	3.13	101 [ 104	98 $\pm$	112 7 ]	11 10	8 $\pm$	10 2 ]	22 20	23 $\pm$	16 4 ]	11 12	10 $\pm$	15 3 ]
	6.25	88 [ 99	93 $\pm$	117 16 ]	12 14	16 $\pm$	15 2 ]	22 20	20 $\pm$	18 2 ]	11 10	12 $\pm$	8 2 ]
	12.5	83 [ 85	76 $\pm$	96 10 ]	9 7	6 $\pm$	7 2 ]	20 19	20 $\pm$	16 2 ]	10 7	6 $\pm$	5 3 ]
	25.0	82* [ 82	84* $\pm$	79* 3 ]	9 9	12 $\pm$	5 4 ]	14 15	18 $\pm$	14 2 ]	9* 7	5* $\pm$	7* 2 ]
	50.0				8* [ 8	9* $\pm$	6* 2 ]	15* 18	22* $\pm$	16* 4 ]			
Positive control compound		AF-2			NaN <sub>3</sub>			AF-2			9-AA		
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		0.01			0.5			0.1			80		
Revertant colonies		549	553	511	610	636	674	647	614	606	428	452	423
per plate		[ 538	$\pm$	23 ]	[ 640	$\pm$	32 ]	[ 622	$\pm$	22 ]	[ 434	$\pm$	16 ]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide      NaN<sub>3</sub>: Sodium azide      9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

\* : Growth inhibition was observed.

要 約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンは、染色体異常を誘起しないものと判定された。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果に基づいて染色体異常試験 (本試験) の濃度を設定したが、いずれの処理法においても、相対細胞増殖率が 50%未満の処理濃度では、重度の細胞増殖抑制あるいは分裂細胞の減少により、顕微鏡観察が不可能であった。したがって、本結果に基づいて、染色体異常試験 (追加試験) を実施した。短時間処理法-S9 処理では 68.6, 98.0 および 140  $\mu\text{g/mL}$ 、同+S9 処理では 63.7, 91.0 および 130  $\mu\text{g/mL}$  のそれぞれ3濃度について顕微鏡観察を実施した。その結果、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても、明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

以上の結果より、連続処理法 24 時間処理群では 31.2, 44.6, 63.7 および 91.0  $\mu\text{g/mL}$  の4濃度について顕微鏡観察を実施したが、当条件下においても2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理による染色体異常の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の陽性対照物質マイトマイシン C (MMC) ならびに短時間処理法+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) では、いずれも染色体構造異常を陰性対照と比較して高頻度に誘発した。



14. 試験結果

14.1. 細胞増殖抑制試験

14.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示す.

短時間処理法-S9 処理および+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理の全てにおいて、濃度依存的に細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、それぞれ 123, 459 および 61.2  $\mu\text{g/mL}$  と算出された.

14.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時、短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の 420~1680  $\mu\text{g/mL}$  の濃度において白濁、420  $\mu\text{g/mL}$  以上の濃度において白色粉末状、さらに、1680  $\mu\text{g/mL}$  以上の濃度において白色塊状の析出物が認められた。また、短時間処理法+S9 処理では、840~1680  $\mu\text{g/mL}$  の濃度において白濁、840  $\mu\text{g/mL}$  以上の濃度において白色粉末状、さらに、1680  $\mu\text{g/mL}$  以上の濃度において白色塊状の析出物が認められた。

被験物質処理終了時、短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の 105  $\mu\text{g/mL}$  以上の濃度においては白色粉末状、さらに、210  $\mu\text{g/mL}$  以上の濃度において白色塊状の析出物が認められた。また、短時間処理法+S9 処理では、210~1680  $\mu\text{g/mL}$  の濃度において白色膜状、210  $\mu\text{g/mL}$  以上の濃度において白色粉末状、さらに、420  $\mu\text{g/mL}$  以上の濃度において白色塊状の析出物が認められた。

14.2. 染色体異常試験 (本試験)

各処理法の相対細胞増殖率を下記に示す。相対細胞増殖率が 50%未満を示した処理濃度において、短時間処理法では重度の細胞増殖抑制のために、連続処理法 24 時間処理では重度の分裂細胞の減少のために染色体観察ができなかった。したがって、染色体異常試験 (追加試験) を実施することとし、本試験の標本は観察しなかった。

-S9 処理		+S9 処理		24 時間処理	
処理濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	相対細胞増殖率 (%)	処理濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	相対細胞増殖率 (%)	処理濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	相対細胞増殖率 (%)
15.6	94.5	31.3	90.8	7.81	98.1
31.3	78.3	62.5	89.4	15.6	105.6
62.5	81.7	125	54.0	31.3	102.5
125	53.0	250	1.2	62.5	66.5
250	2.6	500	0.1	125	19.1

14.2.1. 析出等の観察

被験物質処理開始時、短時間処理法+S9 処理の 500  $\mu\text{g/mL}$  の濃度において白濁が認められた。

被験物質処理終了時、短時間処理法の 125 µg/mL 以上および連続処理法 24 時間処理の 62.5 µg/mL 以上の濃度において白色粉末状、さらに、短時間処理法-S9 処理の 250 µg/mL 以上および短時間処理法+S9 処理の 500 µg/mL 濃度において白色塊状の析出物が認められた。また、短時間処理法+S9 処理の 250 µg/mL 以上の濃度において白色膜状の析出物が認められた。

### 14.3. 染色体異常試験 (追加試験)

#### 14.3.1. 短時間処理法-S9 処理

結果を Table 3 および Appendix 1 に示す。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群での染色体構造異常出現頻度は、68.6, 98.0 および 140 µg/mL でそれぞれ 1.0, 1.0 および 2.0% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、68.6, 98.0 および 140 µg/mL でそれぞれ 0.5, 2.0 および 1.0% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。また、濃度に依存した細胞増殖率の低下が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 140 µg/mL での細胞増殖率は 46.4% であった。

陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 56.0% であった。

#### 14.3.2. 短時間処理法+S9 処理

結果を Table 4 および Appendix 2 に示す。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群での染色体構造異常出現頻度は、63.7, 91.0 および 130 µg/mL でそれぞれ 0.0, 0.0 および 1.5% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、63.7, 91.0 および 130 µg/mL でそれぞれ 1.5, 0.5 および 0.5% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。また、濃度に依存した細胞増殖率の低下が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 130 µg/mL での細胞増殖率は 40.7% であった。

陽性対照物質 CP で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 29.5% であった。

#### 14.3.3. 連続処理法 24 時間処理

結果を Table 5 および Appendix 3 に示す。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群での染色体構造異常出現頻度は、31.2, 44.6, 63.7 および 91.0 µg/mL でそれぞれ 1.5, 1.0, 1.0 および 0.0% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現

頻度は、31.2, 44.6, 63.7 および 91.0  $\mu\text{g/mL}$  でそれぞれ 0.5, 0.5, 1.5 および 2.0%であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。また、濃度に依存した細胞増殖率の低下が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 91.0  $\mu\text{g/mL}$  での細胞増殖率は 48.5%であった。

陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 47.5%であった。

#### 14.3.4. 析出等の観察

被験物質処理開始時、いずれの処理法においても、析出等の特筆すべき変化は認められなかった。

被験物質処理終了時、短時間処理法-S9 処理の 98.0  $\mu\text{g/mL}$  以上、短時間処理法+S9 処理の 91.0  $\mu\text{g/mL}$  以上および連続処理法 24 時間処理の 63.7  $\mu\text{g/mL}$  以上の濃度において白色粉末状の析出物が認められた。

## 15. 考察および結論

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理では, 細胞の増殖を 50%以上抑制する濃度まで検討した。

その結果, 2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では, 短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理のいずれにおいても, 染色体異常の誘発頻度は, 陰性対照群と同等の値を示し, 明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

短時間処理法において陰性と判定されたことから, 連続処理法 24 時間処理の染色体の観察を実施した。その結果, いずれの濃度においても明確な染色体異常の誘発は認められなかった。

陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度は, いずれも背景データ (Appendix 4) から求めた基準値内であり, 試験成立条件を満たしたことから, 当該試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から, 当該試験条件下において, 2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定された。

なお, これまでに被験物質 2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンについての遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告は得られていない。

類縁体である 4,4'-メチレンビス (2-クロロアニリン) は, 人において発がん性を示し<sup>1)~3)</sup>, 遺伝子損傷を引き起こす<sup>4)~6)</sup>ことが報告されている。さらに, 細菌を用いる復帰変異試験で陽性<sup>7)</sup>との報告があり, ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験で数的異常を誘発する<sup>8)</sup>ことも報告されている。

## 16. 参考文献

- 1) IARC: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 57: p.271-303. International Agency for Research on Cancer, Lyon. Also, 1993, Suppl.7: 246-247.
- 2) Ward E, Smith AB, Haiperin W.: 4,4'-Methylenebis (2-chloroaniline): an unregulated carcinogen. Am J Ind Med. 1987, 12(5): 537-549.
- 3) Ward E, Haiperin W, Thun M, Grossman HB, Fink B, Koss L, Osorio AM, Schulte P.: Bladder tumors in two young males occupationally exposed to MBOCA. Am J Ind Med. 1988, 14(3): 267-272.

Table 1. Results of growth inhibition test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Short-term treatment]

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Relative cell growth (%)	[ Mean ]	Compound	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Relative cell growth (%)	[ Mean ]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	26.3	78.0 87.3	[ 82.7 ]	2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	26.3	79.0 86.7	[ 82.9 ]
	52.5	104.5 91.6	[ 98.1 ]		52.5	91.4 85.5	[ 88.5 ]
	105 d)	70.3 72.7	[ 71.5 ]		105	78.7 91.0	[ 84.9 ]
	210 d)	2.0 7.2	[ 4.6 ]		210 d)	48.2 42.8	[ 45.5 ]
	420 d)	20.1 5.1	[ 12.6 ]		420 d)	46.9 53.8	[ 50.4 ]
	840 d)	15.7 0.7	[ 8.2 ]		840 d)	41.0 45.3	[ 43.2 ]
	1680 d)	12.5 7.4	[ 10.0 ]		1680 d)	25.8 33.4	[ 29.6 ]
	3360 d)	9.2 13.6	[ 11.4 ]		3360 d)	44.5 39.2	[ 41.9 ]

Fifty % growth inhibition concentration was as follows:

[Short-term treatment : -S9] --- 123  $\mu\text{g/mL}$

[Short-term treatment : +S9] --- 459  $\mu\text{g/mL}$

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10  $\mu\text{L/mL}$ )

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 2. Results of growth inhibition test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
[Continuous treatment]

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Conc. (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[ Mean ]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	26.3	86.2 59.1	[ 72.7 ]
	52.5	58.5 55.5	[ 57.0 ]
	105 d)	43.0 36.3	[ 39.7 ]
	210 d)	3.8 16.7	[ 10.3 ]
	420 d)	0.0 0.0	[ 0.0 ]
	840 d)	1.1 0.0	[ 0.6 ]
	1680 d)	11.2 15.4	[ 13.3 ]
	3360 d)	18.6 3.5	[ 11.1 ]

Fifty % growth inhibition concentration was as follows:  
[Continuous treatment : 24 h] --- 61.2 µg/mL

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)  
d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Short-term treatment : -S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	6	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 ( 0.5)	200	1 ( 0.5)
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	68.6	6	78.8	200	1	0	2	0	0	0	2 ( 1.0)	200	1 ( 0.5)
	98.0 d)	6	61.1	200	1	0	2	0	0	0	2 ( 1.0)	200	4 ( 2.0)
	140 d)	6	46.4	200	1	1	3	0	0	0	4 ( 2.0)	200	2 ( 1.0)
MMC b)	0.1	6	85.9	200	12	48	100	1	0	0	112 ( 56.0)	200	2 ( 1.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Mitomycin C

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations					Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse				oth
DMSO a)	0	6	100.0	200	0	0	1	0	0	0	1 ( 0.5)	200	1 ( 0.5)
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	63.7	6	84.2	200	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	200	3 ( 1.5)
	91.0 d)	6	76.4	200	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	200	1 ( 0.5)
	130 d)	6	40.7	200	0	0	3	0	0	0	3 ( 1.5)	200	1 ( 0.5)
CP b)	12.5	6	122.7	200	3	15	48	0	1	0	59 ( 29.5)	200	0 ( 0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Cyclophosphamide

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.



Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Continuous treatment : 24 h]

Compound	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	24	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 ( 0.5)	200	1 ( 0.5)
2,2',3,3' - Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	31.2	24	85.1	200	1	2	1	0	0	0	3 ( 1.5)	200	1 ( 0.5)
	44.6	24	83.2	200	0	1	1	0	0	0	2 ( 1.0)	200	1 ( 0.5)
	63.7 d)	24	55.4	200	2	1	1	0	0	0	2 ( 1.0)	200	3 ( 1.5)
	91.0 d)	24	48.5	200	1	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	200	4 ( 2.0)
MMC b)	0.05	24	71.6	200	6	31	81	0	0	0	95 ( 47.5)	200	0 ( 0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10  $\mu\text{L/mL}$ )

b): Positive control: Mitomycin C

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Appendix 1. Chromosome aberration test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
(Additional study) [Short-term treatment : -S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	6	100.0	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
		6	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	1.0
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	68.6	6	68.4	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0
		6	89.2	100	1	0	2	0	0	0	1.0	2.0	100	1.0
	98.0 d)	6	62.7	100	1	0	1	0	0	0	1.0	1.0	100	4.0
		6	59.5	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
140 d)	140 d)	6	47.6	100	1	1	2	0	0	0	1.0	3.0	100	1.0
		6	45.2	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	1.0
MMC b)	0.1	6	78.8	100	7	25	53	0	0	0	0.0	58.0	100	1.0
		6	92.9	100	5	23	47	1	0	0	1.0	54.0	100	1.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Mitomycin C

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Appendix 2. Chromosome aberration test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
(Additional study) [Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	6	100.0	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
		6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	63.7	6	82.6	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	3.0
		6	85.7	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0
	91.0 d)	6	74.8	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0
		6	78.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
130 d)	6	42.7	100	0	0	2	0	0	0	0.0	2.0	100	0.0	
	6	38.7	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	1.0	
CP b)	12.5	6	125.0	100	2	7	18	0	0	0	1.0	24.0	100	0.0
		6	120.3	100	1	8	30	0	1	0	1.0	35.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Cyclophosphamide

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Appendix 3. Chromosome aberration test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
(Additional study) [Continuous treatment : 24 h]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
DMSO a)	0	24	100.0	100	1	1	0	0	0	0	1.0	1.0	100	0.0	
		24	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0	
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	31.2	24	81.3	100	1	0	1	0	0	0	1.0	1.0	100	0.0	
		24	88.9	100	0	2	0	0	0	0	0.0	2.0	100	1.0	
	44.6	24	80.4	100	0	1	1	0	0	0	0.0	2.0	100	0.0	
		24	86.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0	
	63.7 d)	24	54.5	100	1	1	1	0	0	0	1.0	2.0	100	3.0	
		24	56.2	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0	
	91.0 d)	24	50.4	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	2.0	
		24	46.5	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	2.0	
	MMC b)	0.05	24	77.0	100	3	17	44	0	0	0	0.0	53.0	100	0.0
			24	66.1	100	3	14	37	0	0	0	1.0	42.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
 -gap: total number of cells with aberrations except gap  
 a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)  
 b): Positive control: Mitomycin C  
 d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

要 約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン0 (媒体の0.5 w/v%メチルセルローズ溶液のみ投与, 対照群), 100, 300 および1,000 mg/kg/day をCri: CD(SD) 系ラットの雌雄各5匹に28日間反復経口投与した。また, 対照群および1,000 mg/kg には, 雌雄各5匹の回復群を設け, 28日間の反復投与終了後, 14日間の休薬による毒性の回復性についても検討した。

試験期間を通じて一般状態の観察, 機能観察総合検査 (FOB), 体重および摂餌量の測定を行い, 投与期間および回復期間終了時に臨床検査 (血液学検査, 血液凝固能検査, 血液生化学検査, 血清蛋白電気泳動検査および尿検査) および病理学検査 (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。

その結果は, 次の通りである。

雄の対照群でDay 41 (回復期間13日目) に1例の死亡が認められ, 病理所見から死因は持続性の腸閉塞およびこれに随伴した全身状態の悪化によるものと考えられた。

一般状態, 体重および摂餌量に被験物質投与の影響は認められず, 詳細な症状観察, 反応性検査, 握力および自発運動量にも変化は認められなかった。

血液学検査では, 被験物質投与の影響は認められなかった。

血液凝固能検査では, 毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

血液生化学検査では, 雄の300 および1,000 mg/kg 群で総蛋白が低下し, 雌の1,000 mg/kg 群で中性脂肪が上昇した。

血清蛋白電気泳動検査では, 雄の300 および1,000 mg/kg 群で $\alpha_1$ グロブリン分画が低下した。

尿検査では, 被験物質投与の影響は認められなかった。

病理学検査では, 雌の1,000 mg/kg 群で肝臓相対重量の増加が認められ, 対応する所見として, 病理組織学的に肝臓の小葉中心帯肝細胞肥大が雌雄の300 および1,000 mg/kg 群で認められた。

以上, 当該試験条件下において, 2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの反復経口投与に起因する毒性変化が, 雌雄ともに300 mg/kg/day 以上の投与で認められたことから, 無毒性量は, 雌雄とも100 mg/kg/day と判断された。また, 被験物質投与群で認められた変化は, いずれも14日間の休薬により回復性が認められた。

および腹部膨満を示して回復期間 13 日に死亡したが、この動物は対照群の動物であり、被験物質投与とは関係がない偶発的な異常と判断された。したがって、この動物の投与 25 日以降のデータを対照群のデータとして適切ではないと判断し、統計解析あるいは評価の対象から除外した。

## 15. 試験結果

### 15.1. 死亡および一般状態 (Table 1, Appendix 1)

雄の対照群で Day 41 (回復期間 13 日目) に 1 例 (動物番号 1010) の死亡が認められた。死亡した動物には、Day 28 から消瘦、Day 36 から腹部膨満が観察されていた。その他の動物では、投与および回復期間を通じて死亡および一般状態の変化は認められなかった。

### 15.2. 体重 (Figure 1~2, Table 2, Appendix 2)

雄では投与および回復期間を通じて、対照群と被験物質投与各群との間の体重に有意差は認められなかった。

雌の 1,000 mg/kg 群で投与 42 日に体重の有意な低下が認められたが、投与期間中に変動は認められず、むしろ回復試験用の対照群の体重が一時的に高かったことによるものと考えられた。

### 15.3. 摂餌量 (Figure 3~4, Table 3, Appendix 3)

雌雄ともに投与および回復期間を通じて、対照群と被験物質投与各群との間の摂餌量に有意差は認められなかった。

### 15.4. 機能観察総合検査 (FOB)

#### 15.4.1. 詳細な症状観察 (Table 4, 5, 6, Appendix 4, 5, 6)

投与期間中および回復期間中の観察において、雌雄ともに被験物質投与に起因する変化は認められなかった。また、排糞数および排尿数にも、対照群と被験物質投与各群との間に有意差は認められなかった。なお、回復期間中に死亡した対照群の 1 例に筋緊張の低下が投与 4 週目および回復 1 週目に、被毛粗剛が回復 1 週目に観察された。

#### 15.4.2. 反応性検査 (Table 4, Appendix 4)

投与 4 週目および回復 2 週目に実施した反応性検査において、雌雄ともに被験物質投与に起因する異常反応は認められなかった。

投与 4 週目の反応性検査では、触覚反応検査で「鳴いたり、活発に反応」が 100 mg/kg 群の雄で 1 例に、痛覚反応検査で「刺激から逃げようと前方に歩く」が 300 mg/kg 群の雄で 1 例に認められたが、これらは、対照群でもみられている反応であり、同用量の雌には認められていない反応であることから、被験物質とは関連性のない偶発的な変化と

考えられた。

回復 2 週目の反応性検査では、痛覚反応検査で「身を固くする」が 1,000 mg/kg 群の雄で 1 例に認められたが、投与 4 週目に同じ反応は認められておらず、同用量の雌には認められない反応であることから、被験物質とは関連性のない偶発的な変化と考えられた。

15.4.3. 握力 (前後肢) (Table 7, Appendix 7)

雌雄とも、投与 4 週目および回復 2 週目のいずれの検査においても、対照群と被験物質投与各群との間で前肢および後肢の握力に差は認められなかった。

15.4.4. 自発運動量 (Table 8, Appendix 8)

雄では、投与 4 週目および回復 2 週目のいずれの検査においても、対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかった。

雌では、投与 4 週目の検査において、100, 300 および 1,000 mg/kg 群で測定開始後 10~20 分の自発運動量が、100 mg/kg 群ではさらに測定開始後 40~50 分の自発運動量がそれぞれ有意な高値を示したが、いずれも一過性の変化であり、1 時間の総運動量には、群による差は認められなかった。回復 2 週目の検査では、対照群と 1,000 mg/kg 群との間で差は認められなかった。

15.5. 臨床検査 .

15.5.1. 血液学検査

15.5.1.1. 投与期間終了時 (Table 9-1, Appendix 9-1)

雄では、いずれの検査項目においても対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で白血球数が有意に増加したが、1 例 (動物番号 2304) が異常高値を示したことによる変化であった。また、100 mg/kg 群で MCV が有意に低下したが、雄では認められず、用量依存性のない変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

15.5.1.2. 回復期間終了時 (Table 9-2, Appendix 9-2)

雄では、1,000 mg/kg 群で好中球数の有意な低下が認められた。

雌では、1,000 mg/kg 群で網赤血球率の有意な増加が認められた。

15.5.2. 血液凝固能検査

15.5.2.1. 投与期間終了時 (Table 10-1, Appendix 10-1)

雌雄ともにいずれの検査項目においても対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

15.5.2.2. 回復期間終了時 (Table 10-2, Appendix 10-2)

雄では、いずれの検査項目においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に有意な差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群でPTが有意に短縮した。

15.5.2.3. 血液生化学検査

15.5.2.4. 投与期間終了時 (Table 11-1, Appendix 11-1)

雄では、300 および 1,000 mg/kg 群で総蛋白の有意な減少、1,000 mg/kg 群でカリウムの有意な増加が認められた。また、100 mg/kg 群でナトリウム、カリウムおよび塩素が有意に増加したが、用量依存性のない変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で中性脂肪が有意に上昇した。

15.5.2.5. 回復期間終了時 (Table 11-2, Appendix 11-2)

雌雄ともにいずれの検査項目においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に有意な差は認められなかった。

15.5.3. 血清蛋白電気泳動検査

15.5.3.1. 投与期間終了時 (Table 12-1, Appendix 12-1)

雄では、300 および 1,000 mg/kg 群で $\alpha_1$ グロブリン分画比率および濃度が有意に低下した。

雌では、300 mg/kg 群で $\alpha_2$ グロブリン分画比率および濃度が有意に増加したが、用量依存性のない変化であり被験物質投与の影響とは判断しなかった。

15.5.3.2. 回復期間終了時 (Table 12-2, Appendix 12-2)

雄では、いずれの検査項目においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に有意な差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で $\alpha_2$ グロブリン分画濃度が有意に増加したが、軽微な変化であり、毒性学的意義は低いと判断した。

15.5.4. 尿検査

15.5.4.1. 投与期間終了時 (Table 13-1, Appendix 13-1)

雄では、いずれの検査項目においても対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかった。

雌では、100 mg/kg 群でナトリウム、カリウムおよび塩素総排泄量の有意な減少、300 mg/kg 群でナトリウム総排泄量の有意な減少、1,000 mg/kg 群でカリウムおよび塩素総排泄量の有意な減少が認められた。



15.5.4.2. 回復期間終了時 (Table 13-2, Appendix 13-2)

雄では、1,000 mg/kg 群で浸透圧が有意に低下したが、同群の有意ではない尿量の増加に伴った変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。また、ナトリウム、カリウムおよび塩素濃度が有意に減少したが、総排泄量に変化は認められないことから、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

雌では、いずれの検査項目においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に差は認められなかった。

15.6. 病理学検査

15.6.1. 器官重量

15.6.1.1. 投与期間終了時 (Table 14-1, 15-1, Appendix 14-1, 15-1)

雄では、いずれの測定器官においても対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で肝臓の相対重量の有意な増加および絶対重量の増加傾向が認められた。また、100 および 300 mg/kg 群で脾臓の絶対および相対重量の有意な低下が、100 mg/kg 群で卵巣の絶対重量の有意な低下が認められたが、用量依存性のない変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

15.6.1.2. 回復期間終了時 (Table 14-2, 15-2, Appendix 14-2, 15-2)

雄では、いずれの測定器官においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で心臓および卵巣の相対重量の有意な増加が認められたが、同群での偶発的な低体重に起因した変化と考えられ、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

15.6.2. 剖検所見

15.6.2.1. 投与期間終了時 (Table 16-1, Appendix 16)

被験物質投与群において、対照群に比し発生数が明らかに増減した所見は認められなかった。被験物質投与群で認められた所見は、いずれも単発性あるいは散発性の発生であり、また、ラットにしばしば自然発生する所見であることから、被験物質投与による変化とは考えられなかった。

15.6.2.2. 回復期間終了時 (Table 16-2, Appendix 16)

対照群および 1,000 mg/kg 群で観察された所見は、いずれも単発性の発生であり、自然発生性の変化と考えられた。

15.6.2.3. 死亡動物 (Appendix 16)

回復期間中に死亡した対照群の 1 例 (動物番号 1010) では、回腸の閉塞、空腸および回腸の内腔拡張、膀胱の赤色斑、脾臓の小型化、胸腺の萎縮、精囊の萎縮および全身の削瘦が認められた。

15.6.3. 組織所見

15.6.3.1. 投与期間終了時 (Table 17-1, Appendix 17)

被験物質投与の関与が疑われた変化が肝臓に認められた。

肝臓では、小葉中心帯肝細胞肥大 (Photo. 1, 2) が雌雄の 300 および 1,000 mg/kg 群に認められ、雌雄ともに 1,000 mg/kg 群で発生数が有意に増加した。肝細胞肥大は、細胞質の好酸性化を伴っていた。なお、肝細胞巣状壊死が、雄の 1,000 mg/kg 群に 1 例発生した。

その他、散発的に軽度の変化が対照群を含めた各群に観察されたが、用量に関連した発生数の増減も認められず、いずれも自然発生病変と考えられた。

15.6.3.2. 回復期間終了時 (Table 17-2, Appendix 17)

投与期間終了時に、雌雄の 300 および 1,000 mg/kg 群に認められた肝細胞の肥大および巣状壊死は観察されなかった。

その他、散発的に軽度の変化が対照群および 1,000 mg/kg 群に観察されたが、その種類および発生数からいずれも自然発生病変と考えられた。

15.6.3.3. 死亡動物 (Appendix 17)

回復期間中に死亡した対照群の 1 例 (動物番号 1010) では、空腸および回腸の内腔拡張、漿膜のうっ血、水腫および単核細胞浸潤、筋層の肥大、回腸の閉塞、潰瘍、漿膜の線維化および出血がみられ、死亡の主因と考えられた。その他、骨髄のうっ血および重度の造血低下、脾臓および胸腺における重度の萎縮、リンパ節の赤血球貪食像および洞組織球症、肺の泡沫細胞集簇、肝臓の肝細胞巣状壊死、腎臓の尿細管好塩基化、膀胱の出血、前立腺および精囊の萎縮、皮膚の浮腫が観察され、二次的な一般状態の悪化と栄養障害が推察された。死因は持続性の腸閉塞であると判断した。

## 16. 考察および結論

被験物質投与に関連した変化が、毒性試験群の肝臓に認められた。1,000 mg/kg 群の雌で肝臓重量の増加が認められ、対応する所見として、病理組織学的に小葉中心帯の好酸性化を伴った肝細胞の肥大が 300 mg/kg 以上の群の雌雄で認められた。薬物や化学物質の投与により、滑面小胞体の増加やチトクローム P-450 の活性上昇をきたし、組織学的に小葉中心帯の好酸性化を伴った肝細胞の肥大を起こすことが知られていることから<sup>1), 2), 3)</sup>、小葉中心帯肝細胞肥大は、同様の機序で発生した可能性が考えられた。肝細胞肥大は、被験物質投与群のみに発生がみられることから、被験物質投与に関連した変化であると考えられた。肝細胞の巣状壊死が、1,000 mg/kg 群の雄 1 例に認められた。巣状壊死は、肝臓の一箇所のみに限局した所見であり、同様の形態学的特徴を持つ肝細胞の巣状壊死は、自然発生病変としてまれに観察されることから、本所見は偶発的な所見で、被験物質投与とは関係のない変化であると考えられた。

血液生化学検査において、毒性試験群の 300 および 1,000 mg/kg 群の雄で総蛋白が低下した。血清蛋白電気泳動検査結果では、同群の雄に  $\alpha_1$  グロブリン分画の低下が認められており、総蛋白の低下は  $\alpha_1$  グロブリン分画の低下に起因した変化であると考えられた。しかし、 $\alpha_1$  グロブリン分画の低下の機序は不明であった。また、毒性試験群の 1,000 mg/kg 群の雌で中性脂肪が上昇した。中性脂肪の上昇は、総コレステロールの変化を伴わない単独の変化であり、雌の高用量群のみに認められた変化である。したがって、これらの変化の毒性学的意義は不明であるが、被験物質の蛋白・脂質代謝系に対する影響が示唆された。

対照群の雄 1 例が回復期間中に死亡した。この動物は、投与 25 日以降体重および摂餌量が減少し、一般状態および FOB において、全身状態の悪化に関連した症状が観察された。病理組織学検査では、持続性の腸閉塞が認められ、これが死因と考えられた。腸閉塞は、ラットにおいてその発生は珍しいが、対照群に発生したことから、自然発生病変であると考えられた。

一般状態、体重および摂餌量に被験物質投与の影響は認められず、詳細な症状観察、反応性検査、握力および自発運動量にも神経毒性を示唆する変化は認められなかった。

その他、毒性試験群において、血液学検査では、1,000 mg/kg 群の雌 1 例（動物番号 2304）の白血球数が高値を示した。しかし、この動物を含めた同群の病理組織学検査で炎症性の変化は認められず、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。また、血液生化学検査では、1,000 mg/kg 群の雄でカリウムが上昇し、尿検査では 100, 300 または 1,000 mg/kg 群の雌で尿中電解質が低下したが、変化の程度が用量に伴っておらず、腎機能に関連する生化学検査項目およびその他の尿検査項目にも異常はなく、病理学検査においても腎の異常は認められないことから、被験物質投与とは関連のない変化と考え

られた。回復試験群において、1,000 mg/kg 群の雄で好中球数が減少し、1,000 mg/kg 群の雌で網赤血球率が増加し、PT が短縮した。これらの変化は、投与期間終了時には認められておらず、いずれも軽微な変化であるため、毒性学的意義は低いと考えられた。

以上、当該試験条件下において、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの反復投与に起因する毒性変化が、雌雄ともに 300 mg/kg/day 以上の投与で認められたことから、無毒性量は、雌雄ともに 100 mg/kg/day と判断された。また、毒性試験群で認められた変化は、いずれも 14 日間の休薬により回復性が認められた。

## 17. 参考文献

- 1) 伊東信之編著, 最新毒性病理学, 中山書店 : 158 (1994).
- 2) 日本毒性病理学会編, 毒性病理組織学, アイペック : 182 (2000).
- 3) Haschek MW, Rousseaux GC, Fundamentals of toxicologic pathology, Academic press: 139 (1998).

## 18. 試験関係資料の保存

当該試験の下記資料は、安評センター資料保存施設にて最終報告書作成後 10 年間保存される。その後の保存については、試験委託者と安評センターで協議の上、別途定める。また、病理組織標本作製関係資料については、株式会社 組織科学研究所にて 10 年間保存される。その後の保存については、試験委託者と安評センターならびに株式会社 組織科学研究所で協議の上、別途定める。

- 試験計画書 (正本)
- 被験物質 (各ロット, 2g)
- 被験物質に関する資料 (使用および調製記録, その他)
- 動物および施設に関する記録
- 生データ (一般状態観察記録, 体重測定記録, 摂餌量測定記録, 臨床検査記録, 器官重量測定記録, 病理学検査所見記録, その他)
- 各種標本類 (ブロック標本, 病理組織標本, 湿臓器, 血液塗抹標本, その他)
- 病理組織標本作製関係資料 (病理組織標本作製計画書の写し, 病理組織標本作製報告書の写し, 標本作製過程管理書の写し, その他)
- 最終報告書 (正本), 化学物質審査規制法届出様式 (写し)

Table 1. Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		1----->			2----->			3----->			4----->			5----->			6----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Emaciation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		7----->			8----->			9----->			10----->			11----->			12----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Emaciation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		13----->			14----->			15----->			16----->			17----->			18----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Emaciation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Total		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Total		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																	
		19----->			20----->			21----->			22----->			23----->			24----->		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Emaciation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment														
		25----->			26----->			27----->			28----->			29		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	5
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9
	Emaciation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	5
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																	
		1----->			2----->			3----->			4----->			5----->			6----->		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		7----->			8----->			9----->			10----->			11----->			12----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing    2: 30 to 60 minutes after dosing    3: 3 to 4 hours after dosing  
 TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		13----->			14----->			15----->			16----->			17----->			18----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing    2: 30 to 60 minutes after dosing    3: 3 to 4 hours after dosing  
 TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane



Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		19----->			20----->			21----->			22----->			23----->			24----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

- 37 -

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment												
		25----->			26----->			27----->			28----->			29
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

- 38 -

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment														
		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
01 control 0	normal	-	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Total	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Emaciation	-	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		+	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4
	Abdominal distention	-	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4
		+	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4
04 TCDAM 1000	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment														
		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
01 control 0	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 2. Body weight

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment									Gain 1-28	Unit:g
		1	4	8	11	15	18	22	25	28		
01 control 0	N	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	
	Mean	151	173	200	220	243	263	285	304	319	168	
	S.D.	6	10	14	18	23	26	30	31	33	29	
02 TCDAM 100	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Mean	150	172	199	219	246	264	283	300	318	168	
	S.D.	6	10	13	15	21	24	29	33	42	40	
03 TCDAM 300	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Mean	149	171	198	223	248	272	296	313	333	183	
	S.D.	6	8	14	16	17	18	20	22	22	18	
04 TCDAM 1000	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	151	172	197	219	240	257	277	292	308	158	
	S.D.	6	9	13	17	20	22	24	24	27	23	

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 2. -continued Body weight

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment									Gain 1-28	Unit:g
		1	4	8	11	15	18	22	25	28		
01 control 0	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	117	131	146	160	169	179	191	197	207	90	
	S.D.	5	6	6	9	10	9	11	10	10	10	
02 TCDAM 100	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Mean	117	132	144	157	164	172	181	187	198	82	
	S.D.	5	7	9	11	12	12	12	15	15	11	
03 TCDAM 300	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Mean	117	129	141	154	162	169	178	187	194	77	
	S.D.	5	7	10	13	16	21	23	25	26	24	
04 TCDAM 1000	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	117	131	143	155	163	173	185	190	196	80	
	S.D.	5	6	7	7	7	9	9	8	11	10	

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 2. -continued Body weight

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment					Gain 29-42	Unit:g
		29	32	36	39	42		
01 control 0	N	4	4	4	4	4	4	
	Mean	339	355	375	390	404	65	
	S.D.	25	24	27	27	29	5	
04 TCDAM 1000	N	5	5	5	5	5	5	
	Mean	318	332	346	363	372	54	
	S.D.	25	26	23	20	19	10	

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

-43-

Table 2. -continued Body weight

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment					Gain 29-42	Unit:g
		29	32	36	39	42		
01 control 0	N	5	5	5	5	5	5	
	Mean	210	219	227	234	240	30	
	S.D.	9	12	12	11	9	4	
04 TCDAM 1000	N	5	5	5	5	5	5	
	Mean	196	202	209	218	222*	26	
	S.D.	13	16	19	16	15	5	

Significantly different from 01 group \* P  $\leq$  0.05 (Dunnett)

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

-44-

Table 3.

## Food consumption

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment						Unit:g/animal/day
		1 => 8	8 => 15	15 => 22	22 => 28	29 => 36	36 => 42	
01 control 0	N	10	10	10	9	4	4	
	Mean	23	24	25	25	28	29	
	S.D.	2	3	3	2	1	2	
02 TCDAM 100	N	5	5	5	5			
	Mean	23	25	25	25			
	S.D.	2	3	4	5			
03 TCDAM 300	N	5	5	5	5			
	Mean	23	25	27	27			
	S.D.	1	2	2	2			
04 TCDAM 1000	N	10	10	10	10	5	5	
	Mean	22	24	24	24	26	26	
	S.D.	2	3	3	3	2	2	

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 3.

## -continued Food consumption

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment						Unit:g/animal/day
		1 => 8	8 => 15	15 => 22	22 => 28	29 => 36	36 => 42	
01 control 0	N	10	10	10	10	5	5	
	Mean	17	18	18	18	20	19	
	S.D.	1	1	1	1	2	1	
02 TCDAM 100	N	5	5	5	5			
	Mean	18	18	18	17			
	S.D.	1	2	2	2			
03 TCDAM 300	N	5	5	5	5			
	Mean	17	18	18	18			
	S.D.	1	2	3	3			
04 TCDAM 1000	N	10	10	10	10	5	5	
	Mean	17	18	19	18	20	19	
	S.D.	2	2	2	2	2	2	

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 4. Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)	
		B. G. 1	2	3	4	1	2
No. of animals	0	10	10	10	10	5	4
	100	5	5	5	5	-	-
	300	5	5	5	5	-	-
	1000	10	10	10	10	5	5
REMOVAL FROM CAGE Ease of removal	Very easy						
	0	10	10	10	10	5	4
	100	5	4	5	5	2	-
	300	5	5	5	5	4	-
	1000	10	7	10	9	9	5
	Easy						
	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	1	0	0	3	-
	300	0	0	0	0	1	-
	1000	0	3	0	1	1	0
-47- Vocalization	None						
	0	10	10	10	10	10	5
	100	5	5	5	5	5	-
	300	5	5	5	5	5	-
	1000	10	10	10	10	10	5

B. G.: Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)	
		B. G. 1	2	3	4	1	2
HANDLING OBSERVATIONS Muscle tone	Normal						
	Decrease or limp						
Subnormal temperature	Absent						
-48- Piloerection	Absent						
Staining hair	Absent						
Unkempt hair	Absent						
	Rough fur						

B. G.: Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)					Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2	
Skin color	Normal	0	10	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Lacrimation	Absent	0	10	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Exophthalmos	Absent	0	10	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Pupillary size	Normal	0	10	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Salivation	Absent	0	10	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)					Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2	
OBSERVATIONS IN ARENA Posture	Normal	0	10	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Motor activity	Normal	0	10	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Respiration	Normal	0	10	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Lid closure	Wide open	0	10	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Gait	Normal	0	10	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Tremor	None	0	10	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. --continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G. Administration period (Week)				Recovery period (Week)	
		1	2	3	4	1	2
Twitch	0	10	10	10	10	5	4
	100	5	5	5	5	-	-
	300	5	5	5	5	-	-
Convulsion	1000	10	10	10	10	5	5
	0	10	10	10	10	5	4
	100	5	5	5	5	-	-
Stereotypic behavior	300	5	5	5	5	-	-
	1000	10	10	10	10	5	5
	0	10	10	10	10	5	5
Abnormal behavior	100	10	10	10	10	5	4
	300	5	5	5	5	-	-
	1000	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. --continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G. Administration period (Week)				Recovery period (Week)	
		1	2	3	4	1	2
SENSORIMOTOR FUNCTION Approach contact	0	9	5	5	4	4	-
	100	5	5	5	5	-	-
	300	10	10	10	10	5	5
Touch response	0	1	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	-	-
	300	0	0	0	0	-	-
Pinna response	1000	0	0	0	0	0	0
	0	9	4	4	4	4	-
	100	4	5	5	5	-	-
Abnormal behavior	300	10	10	10	10	5	5
	1000	10	10	10	10	5	5
	0	0	0	0	0	0	0
Stereotypic behavior	100	1	1	1	1	0	0
	300	0	0	0	0	-	-
	1000	0	0	0	0	0	0
Abnormal behavior	0	1	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	-	-
	300	0	0	0	0	-	-
Pinna response	1000	0	0	0	0	0	0
	0	10	5	5	5	4	-
	100	5	5	5	5	-	-

B. G. : Before grouping  
a) Rat slowly approaches and sniffs at object or turns away



Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2
Pain response(Tail pinch)	Slowly turns	0				1		0
		100				0		-
		300				0		-
		1000				0		0
	Walk away from stimulus	0				2		0
		100				0		-
		300				1		-
		1000				0		0
	Freezing	0				0		0
		100				0		-
		300				0		-
		1000				0		1
	Normal	0				7		4
		100				5		-
		300				4		-
		1000				10		4
Pupillary reflex	Normal	0				10		4
		100				5		-
		300				5		-
		1000				10		5
Air righting reflex	Normal	0				10		4
		100				5		-
		300				5		-
		1000				10		5

B. G. : Before grouping

-53-

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)				
		B. G.	1	2	3	4	1	2		
No. of animals	0	10	10	10	10	10	5	5		
	100	5	5	5	5	5	-	-		
	300	5	5	5	5	5	-	-		
	1000	10	10	10	10	10	5	5		
REMOVAL FROM CAGE Ease of removal	Very easy	0	6	7	9	9	7	5	5	
		100	3	5	5	5	3	-	-	
		300	3	5	5	5	5	-	-	
		1000	6	10	10	10	9	5	4	
	Easy	0	4	3	1	1	3	0	0	
		100	2	0	0	0	2	-	-	
		300	2	0	0	0	0	-	-	
		1000	4	0	0	0	1	0	1	
	Vocalization	None	0	10	10	10	10	10	5	5
			100	5	5	5	5	5	-	-
			300	5	5	5	5	5	-	-
			1000	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

-54-

Table 4. --continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)	
		B. G. 1	2	3	4	1	2
<b>HANDLING OBSERVATIONS</b>							
Muscle tone	Normal	10	10	10	10	5	5
	0	5	5	5	5	-	-
	100	5	5	5	5	-	-
	300	10	10	10	10	5	5
	1000	10	10	10	10	5	5
Subnormal temperature	Absent	10	10	10	10	5	5
	0	5	5	5	5	-	-
	100	5	5	5	5	-	-
	300	10	10	10	10	5	5
	1000	10	10	10	10	5	5
Piloerection	Absent	10	10	10	10	5	5
	0	5	5	5	5	-	-
	100	5	5	5	5	-	-
	300	10	10	10	10	5	5
	1000	10	10	10	10	5	5
Staining hair	Absent	10	10	10	10	5	5
	0	5	5	5	5	-	-
	100	5	5	5	5	-	-
	300	10	10	10	10	5	5
	1000	10	10	10	10	5	5
Unkempt hair	Absent	10	10	10	10	5	5
	0	5	5	5	5	-	-
	100	5	5	5	5	-	-
	300	10	10	10	10	5	5
	1000	10	10	10	10	5	5
Skin color	Normal	10	10	10	10	5	5
	0	5	5	5	5	-	-
	100	5	5	5	5	-	-
	300	10	10	10	10	5	5
	1000	10	10	10	10	5	5

B. G.: Before grouping

Table 4. --continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)	
		B. G. 1	2	3	4	1	2
Lacrimation	Absent	10	10	10	10	5	5
	0	5	5	5	5	-	-
	100	5	5	5	5	-	-
	300	10	10	10	10	5	5
	1000	10	10	10	10	5	5
Exophthalmos	Absent	10	10	10	10	5	5
	0	5	5	5	5	-	-
	100	5	5	5	5	-	-
	300	10	10	10	10	5	5
	1000	10	10	10	10	5	5
Pupillary size	Normal	10	10	10	10	5	5
	0	5	5	5	5	-	-
	100	5	5	5	5	-	-
	300	10	10	10	10	5	5
	1000	10	10	10	10	5	5
Salivation	Absent	10	10	10	10	5	5
	0	5	5	5	5	-	-
	100	5	5	5	5	-	-
	300	10	10	10	10	5	5
	1000	10	10	10	10	5	5

B. G.: Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2
OBSERVATIONS IN ARENA								
Posture	Normal	0	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-
		1000	10	10	10	10	10	5
Motor activity	Normal	0	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-
		1000	10	10	10	10	10	5
Respiration	Normal	0	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-
		1000	10	10	10	10	10	5
Lid closure	Wide open	0	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-
		1000	10	10	10	10	10	5
Gait	Normal	0	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-
		1000	10	10	10	10	10	5
Tremor	None	0	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-
		1000	10	10	10	10	10	5

B. G. : Before grouping

-57-

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2
Twitch	None	0	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-
		1000	10	10	10	10	10	5
Convulsion	None	0	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-
		1000	10	10	10	10	10	5
Stereotypic behavior	None	0	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-
		1000	10	10	10	10	10	5
Abnormal behavior	None	0	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-
		1000	10	10	10	10	10	5

B. G. : Before grouping

-58-

Table 4. --continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)				
		1	2	3	4	1	2			
<b>SEX: Female</b>										
<b>SENSORIMOTOR FUNCTION</b>										
Approach contact	Normal a)	0	100	300	1000	10	5	5	-	-
Touch response	Moderate reaction	0	100	300	1000	10	5	5	-	-
Pinna response	Normal	0	100	300	1000	10	5	5	-	-
Pain response (Tail pinch)	Normal	0	100	300	1000	10	5	5	-	-
Pupillary reflex	Normal	0	100	300	1000	10	5	5	-	-
Air righting reflex	Normal	0	100	300	1000	10	5	5	-	-

B. G.: Before grouping

a) Rat slowly approaches and sniffs at object or turns away

Table 5. Summary of number of defecation

Exp. No. 9934(115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	B. G.	Administration period (week)				Recovery period (week)	
				1	2	3	4	1	2
Male	0	10	0.0±0.0	a) 0.3±0.9	0.0±0.0	0.2±0.6	0.3±1.0 (9)	0.0±0.0 (4)	0.0±0.0 (4)
	100	5	0.4±0.9	1.0±1.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0		
	300	5	0.4±0.9	0.4±0.9	0.0±0.0	0.2±0.4	0.6±1.3		
	1,000	10	0.6±1.1	0.8±1.1	0.2±0.6	0.3±0.9	0.1±0.3	0.4±0.9 (5)	0.0±0.0 (5)
Female	0	10	0.2±0.6	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0 (5)	0.0±0.0 (5)
	100	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0		
	300	5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0		
	1,000	10	0.1±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0 (5)	0.0±0.0 (5)

B. G.: Before grouping

a) Mean ± S.D.

Values in parentheses are expressed no. of animals examined

Table 6. Summary of number of pools of urine

Exp. No. 9934(115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	B. G.	Administration period (week)				Recovery period (week)	
				1	2	3	4	1	2
Male	0	10	0.6 ± 0.8 a)	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.6	0.4 ± 0.8	0.2 ± 0.4 (9)	0.0 ± 0.0 (4)	0.5 ± 0.6 (4)
	100	5	0.6 ± 0.9	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0		
	300	5	0.2 ± 0.4	0.8 ± 1.3	0.4 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0		
Female	1,000	10	1.0 ± 1.1	0.7 ± 0.8	0.2 ± 0.4	0.8 ± 0.9	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4 (5)	0.2 ± 0.4 (5)
	0	10	0.3 ± 0.7	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0 (5)	0.0 ± 0.0 (5)
	100	5	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.5		
	300	5	0.4 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
	1,000	10	0.2 ± 0.6	0.5 ± 1.0	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0 (5)	0.0 ± 0.0 (5)

B. G. : Before grouping

a) Mean ± S.D.

Values in parentheses are expressed no. of animals examined

Table 7. Summary of grip strength

Exp. No. 9934(115-213)

4 week of administration					Unit : g
Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Forelimb	Hindlimb	
Male	0	9	1338 ± 147 a)	703 ± 139	
	100	5	1457 ± 206	822 ± 228	
	300	5	1370 ± 211	721 ± 129	
	1,000	10	1281 ± 170	739 ± 205	
Female	0	10	620 ± 171	321 ± 77	
	100	5	741 ± 99	289 ± 42	
	300	5	551 ± 99	307 ± 34	
	1,000	10	605 ± 126	301 ± 74	

a) Mean ± S.D.

Table 7. --continued Summary of grip strength

Exp. No. 9934(115-213)

2 week of recovery		Unit : g			
Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Forelimb	Hindlimb	
Male	0	4	1381 ± 408 a)	707 ± 284	
	1,000	5	1604 ± 241	1027 ± 155	
Female	0	5	1080 ± 291	574 ± 190	
	1,000	5	889 ± 249	510 ± 269	
a) Mean ± S.D.					

- 63 -

Table 8. Summary of motor activity

Exp. No. 9934 (115-213)

4 week of administration		Motor activity (counts)							Total (0-60)
Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	0-10 a)	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
Male	0	9	194 ± 27 b)	169 ± 25	151 ± 40	129 ± 33	102 ± 40	102 ± 59	847 ± 139
	100	5	195 ± 35	178 ± 15	147 ± 30	127 ± 29	111 ± 57	132 ± 21	890 ± 132
	300	5	216 ± 22	159 ± 27	145 ± 25	111 ± 30	96 ± 58	102 ± 52	829 ± 153
Female	1,000	10	204 ± 17	169 ± 26	157 ± 25	130 ± 35	105 ± 64	74 ± 57	838 ± 146
	0	10	127 ± 28	68 ± 28	72 ± 20	77 ± 33	44 ± 25	58 ± 20	445 ± 114
	100	5	133 ± 22	113 ± 31**	91 ± 35	69 ± 37	87 ± 27*	62 ± 32	554 ± 117
Female	300	5	105 ± 23	102 ± 21*	69 ± 41	74 ± 25	51 ± 15	53 ± 30	455 ± 125
	1,000	10	126 ± 30	101 ± 17*	72 ± 23	74 ± 33	59 ± 32	46 ± 22	478 ± 103
	a) interval time (minutes)								
b) Mean ± S.D.									
Significantly different from control group * p ≤ 0.05 ** p ≤ 0.01 (Dunnett)									

- 64 -

Table 8. -continued Summary of motor activity

Exp. No. 9934 (115-213)

2 week of recovery			Motor activity (counts)						
Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	0-10 a)	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	Total (0-60)
Male	0	4	181 ± 38 b)	150 ± 34	128 ± 7	52 ± 45	24 ± 29	11 ± 18	546 ± 89
	1,000	5	183 ± 32	132 ± 68	110 ± 57	115 ± 52	68 ± 49	46 ± 52	653 ± 262
Female	0	5	137 ± 11	126 ± 35	94 ± 27	105 ± 58	108 ± 113	65 ± 68	636 ± 247
	1,000	5	161 ± 58	128 ± 55	106 ± 65	99 ± 70	104 ± 72	55 ± 57	652 ± 355

a) interval time (minutes)

b) Mean ± S.D.

Table 9-1. Hematology  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	HCT (%)	HGB (g/dL)	RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	5	41.8 ± 1.3	15.5 ± 0.4	7.72 ± 0.13	54.2 ± 1.0	20.1 ± 0.2	37.1 ± 0.6
	100	5	42.0 ± 1.5	15.5 ± 0.6	7.71 ± 0.27	54.5 ± 1.2	20.1 ± 0.5	36.9 ± 0.2
	300	5	40.5 ± 1.6	14.9 ± 0.5	7.31 ± 0.32	55.4 ± 2.4	20.4 ± 0.7	36.7 ± 0.4
	1,000	5	41.3 ± 2.0	15.2 ± 0.8	7.52 ± 0.29	54.9 ± 0.9	20.3 ± 0.4	36.9 ± 0.2
Female	0	5	39.5 ± 1.2	14.8 ± 0.4	7.22 ± 0.24	54.8 ± 0.4	20.5 ± 0.4	37.4 ± 0.5
	100	5	40.7 ± 1.8	15.3 ± 0.7	7.66 ± 0.38	53.2 ± 0.6#	20.0 ± 0.2	37.6 ± 0.4
	300	5	39.5 ± 1.4	14.9 ± 0.3	7.38 ± 0.38	53.6 ± 1.6	20.3 ± 0.8	37.7 ± 0.6
	1,000	5	39.4 ± 1.3	14.5 ± 0.5	7.24 ± 0.28	54.4 ± 1.9	20.0 ± 0.6	36.8 ± 0.3

Mean ± S.D.

Significantly different from control group; #:  $P \leq 0.05$  (Steel)

Table 9-1. -continued Hematology  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	WBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	Differential leukocyte counts (%)					
				NEUT	LYMPH	MONO	EOSN	BASO	LUC
Male	0	5	9.26 ± 2.60	15.3 ± 1.8	81.5 ± 1.6	1.8 ± 0.5	0.7 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1
	100	5	8.46 ± 2.65	14.4 ± 3.4	82.4 ± 3.8	1.5 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.3
	300	5	8.11 ± 1.02	18.3 ± 2.5	79.0 ± 2.9	1.5 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.3
	1,000	5	9.62 ± 2.25	18.2 ± 3.5	78.5 ± 3.5	1.7 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.4
Female	0	5	5.21 ± 2.63	14.0 ± 4.2	83.1 ± 4.5	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.7 ± 0.2
	100	5	5.12 ± 0.82	14.3 ± 2.9	82.6 ± 3.4	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.6	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.1
	300	5	4.94 ± 1.19	16.9 ± 8.1	80.3 ± 7.9	1.3 ± 0.4	0.8 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.3
	1,000	5	8.71 ± 2.92*	14.4 ± 4.3	82.1 ± 4.9	1.3 ± 0.7	1.1 ± 0.4	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.4

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells  
 Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnnett)

Table 9-1. -continued Hematology  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	NEUT ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		LYMPH ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		MONO ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		EOSN ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		BASO ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		LUC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	
Male	0	5	1.41 ± 0.40	7.56 ± 2.14	0.17 ± 0.09	0.06 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.02						
	100	5	1.21 ± 0.41	6.98 ± 2.25	0.13 ± 0.03	0.07 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.03						
	300	5	1.48 ± 0.28	6.40 ± 0.82	0.12 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.02						
	1,000	5	1.75 ± 0.57	7.55 ± 1.79	0.16 ± 0.04	0.07 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0.08 ± 0.05						
Female	0	5	0.68 ± 0.20	4.38 ± 2.41	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.03						
	100	5	0.72 ± 0.12	4.24 ± 0.80	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.00						
	300	5	0.82 ± 0.38	3.98 ± 1.18	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.03 ± 0.01						
	1,000	5	1.29 ± 0.70	7.10 ± 2.11	0.13 ± 0.12	0.09 ± 0.04	0.01 ± 0.01	0.09 ± 0.07						

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells  
 Mean ± S.D.



Table 9-1. -continued Hematology  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PLT ( $\times 10^9/\text{mm}^3$ )	Reticulocyte (%)
Male	0	5	1153 $\pm$ 164	2.7 $\pm$ 0.5
	100	5	1135 $\pm$ 178	2.7 $\pm$ 0.5
	300	5	1218 $\pm$ 58	3.0 $\pm$ 0.1
	1,000	5	1169 $\pm$ 178	3.0 $\pm$ 0.4
Female	0	5	1382 $\pm$ 185	2.6 $\pm$ 0.8
	100	5	1284 $\pm$ 136	2.2 $\pm$ 0.3
	300	5	1226 $\pm$ 152	2.4 $\pm$ 0.3
	1,000	5	1264 $\pm$ 190	3.2 $\pm$ 0.7

Mean  $\pm$  S.D.

- 69 -

Table 9-2. Hematology  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	HCT (%)	HGB (g/dL)	RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	4	42.7 $\pm$ 2.0	15.6 $\pm$ 0.6	8.06 $\pm$ 0.19	52.9 $\pm$ 1.5	19.4 $\pm$ 0.4	36.5 $\pm$ 0.3
	1,000	5	42.2 $\pm$ 1.6	15.3 $\pm$ 0.7	8.03 $\pm$ 0.54	52.6 $\pm$ 2.2	19.1 $\pm$ 0.7	36.3 $\pm$ 0.5
Female	0	5	41.9 $\pm$ 2.6	15.7 $\pm$ 1.0	7.91 $\pm$ 0.42	53.0 $\pm$ 1.4	19.9 $\pm$ 0.3	37.5 $\pm$ 0.8
	1,000	5	40.3 $\pm$ 2.4	15.0 $\pm$ 0.8	7.62 $\pm$ 0.58	52.9 $\pm$ 1.7	19.7 $\pm$ 0.7	37.3 $\pm$ 0.4

Mean  $\pm$  S.D.

- 70 -

Table 9-2. --continued Hematology  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	WBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	Differential leukocyte counts (%)						
				NEUT	LYMPH	MONO	EOSN	BASO	LUC	
Male	0	4	10.00 $\pm$ 2.46	16.7 $\pm$ 3.6	79.8 $\pm$ 3.7	1.8 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.1	
	1,000	5	10.20 $\pm$ 2.74	11.9 $\pm$ 4.7	84.4 $\pm$ 5.2	1.9 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	
Female	0	5	6.69 $\pm$ 2.02	19.4 $\pm$ 7.4	77.4 $\pm$ 6.9	1.7 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.2	
	1,000	5	5.81 $\pm$ 2.87	16.3 $\pm$ 5.8	79.7 $\pm$ 6.2	1.8 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.7	0.0 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2	

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells  
Mean  $\pm$  S.D.

-71-

Table 9-2. --continued Hematology  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	NEUT ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		LYMPH ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		MONO ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		EOSN ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		BASO ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )		LUC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	
			Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Male	0	4	1.62 $\pm$ 0.28	8.03 $\pm$ 2.17	0.18 $\pm$ 0.06	0.10 $\pm$ 0.06	0.01 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.02						
	1,000	5	1.15 $\pm$ 0.25*	8.69 $\pm$ 2.66	0.18 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.06	0.02 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.02						
Female	0	5	1.33 $\pm$ 0.83	5.14 $\pm$ 1.38	0.11 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.03	0.00 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.02						
	1,000	5	0.92 $\pm$ 0.45	4.66 $\pm$ 2.53	0.10 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.03	0.00 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.04						

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells  
Mean  $\pm$  S.D.  
Significantly different from control group; \*:  $P \leq 0.05$  (Dunnett)

-72-

Table 9-2. ---continued Hematology  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PLT (x10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )	Reticulocyte (%)
Male	0	4	1169 ± 192	2.4 ± 0.2
	1,000	5	1047 ± 74	2.6 ± 0.5
Female	0	5	1276 ± 142	2.0 ± 0.5
	1,000	5	1173 ± 112	2.9 ± 0.5*

Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group; \*; P ≤ 0.05 (Dunnett)

Table 10-1. Coagulation  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)
Male	0	5	19.1 ± 0.6	23.9 ± 1.7
	100	5	20.7 ± 3.5	24.9 ± 2.0
	300	5	19.9 ± 1.5	24.0 ± 2.1
	1,000	5	20.4 ± 1.0	25.2 ± 3.7
Female	0	5	17.3 ± 0.9	17.8 ± 2.6
	100	5	17.3 ± 0.8	18.4 ± 0.6
	300	5	17.6 ± 0.9	19.1 ± 1.8
	1,000	5	16.6 ± 0.4	18.7 ± 1.3

Mean ± S.D.

Table 10-2. Coagulation  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)
Male	0	4	19.4 ± 1.5	24.1 ± 1.7
	1,000	5	21.5 ± 1.4	25.1 ± 2.4
Female	0	5	17.9 ± 0.5	17.9 ± 1.0
	1,000	5	16.9 ± 0.4**	18.6 ± 0.7

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)

-75-

Table 11-1. Blood chemistry  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	T.protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	T.cholesterol (mg/dL)
Male	0	5	5.77 ± 0.16	145 ± 16	28.5 ± 16.7	61 ± 10
	100	5	5.62 ± 0.13	163 ± 19	51.0 ± 29.9	61 ± 12
	300	5	5.46 ± 0.15*	148 ± 24	43.5 ± 13.6	57 ± 6
	1,000	5	5.50 ± 0.21*	161 ± 26	51.4 ± 20.7	59 ± 8
Female	0	5	5.93 ± 0.31	115 ± 21	8.5 ± 5.1	63 ± 14
	100	5	5.84 ± 0.20	125 ± 19	17.2 ± 5.5	75 ± 7
	300	5	5.96 ± 0.13	118 ± 13	13.0 ± 6.5	66 ± 6
	1,000	5	5.89 ± 0.26	141 ± 25	20.1 ± 7.3*	71 ± 11

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

-76-

Table 11-1. -continued Blood chemistry  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	T.bilirubin (mg/dL)	Total bile acid ( $\mu$ mol/L)
Male	0	5	12.5 $\pm$ 0.7	0.21 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01	42.3 $\pm$ 23.9
	100	5	12.1 $\pm$ 1.2	0.22 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01	13.4 $\pm$ 5.0
	300	5	11.6 $\pm$ 1.2	0.22 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01	10.8 $\pm$ 4.6
	1,000	5	13.2 $\pm$ 2.4	0.21 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.01	19.4 $\pm$ 15.8
Female	0	5	15.5 $\pm$ 1.7	0.27 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01	16.8 $\pm$ 4.1
	100	5	13.3 $\pm$ 1.1	0.23 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01	11.8 $\pm$ 7.8
	300	5	15.7 $\pm$ 2.0	0.25 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	13.2 $\pm$ 5.8
	1,000	5	14.5 $\pm$ 1.6	0.24 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01	8.8 $\pm$ 1.6

Mean  $\pm$  S.D.

- 77 -

Table 11-1. -continued Blood chemistry  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	AST (U/L)	ALT (U/L)	AIP (U/L)	Gamma-GTP (U/L)
Male	0	5	82 $\pm$ 3	29 $\pm$ 6	860 $\pm$ 126	0.4 $\pm$ 0.1
	100	5	83 $\pm$ 7	31 $\pm$ 5	818 $\pm$ 84	0.3 $\pm$ 0.1
	300	5	78 $\pm$ 9	29 $\pm$ 3	762 $\pm$ 131	0.3 $\pm$ 0.1
	1,000	5	85 $\pm$ 10	31 $\pm$ 5	804 $\pm$ 172	0.4 $\pm$ 0.1
Female	0	5	84 $\pm$ 13	24 $\pm$ 7	409 $\pm$ 75	0.7 $\pm$ 0.1
	100	5	95 $\pm$ 15	22 $\pm$ 3	384 $\pm$ 40	0.8 $\pm$ 0.4
	300	5	88 $\pm$ 12	23 $\pm$ 6	397 $\pm$ 50	0.8 $\pm$ 0.1
	1,000	5	71 $\pm$ 10	21 $\pm$ 3	427 $\pm$ 108	0.8 $\pm$ 0.2

Mean  $\pm$  S.D.

- 78 -

Table 11-1. -continued Blood chemistry  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Calcium (mg/dL)	I.phosphorus (mg/dL)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	5	9.84 ± 0.14	8.27 ± 0.60	143.4 ± 0.5	4.48 ± 0.17	106.6 ± 0.7
	100	5	9.92 ± 0.21	8.75 ± 0.38	144.2 ± 0.3#	4.89 ± 0.17*	108.5 ± 0.2#
	300	5	9.78 ± 0.40	8.69 ± 0.43	143.9 ± 1.5	4.46 ± 0.17	107.2 ± 1.3
	1,000	5	9.65 ± 0.33	9.03 ± 0.68	142.5 ± 0.8	5.04 ± 0.28**	107.2 ± 1.4
Female	0	5	9.78 ± 0.36	7.84 ± 0.64	144.0 ± 1.3	4.46 ± 0.12	109.3 ± 1.3
	100	5	9.66 ± 0.20	7.86 ± 0.48	142.7 ± 1.0	4.36 ± 0.27	108.4 ± 1.8
	300	5	9.75 ± 0.34	7.95 ± 0.61	143.6 ± 0.3	4.26 ± 0.22	108.9 ± 1.8
	1,000	5	9.95 ± 0.12	8.34 ± 0.87	143.7 ± 1.1	4.28 ± 0.29	107.9 ± 1.5

Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 \*\*; P ≤ 0.01 (Dunnett)  
 Significantly different from control group; #: P ≤ 0.05 (Steel)

-79-

Table 11-2. Blood chemistry  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	T.protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	T.cholesterol (mg/dL)
Male	0	4	5.55 ± 0.28	149 ± 19	39.3 ± 7.6	55 ± 16
	1,000	5	5.53 ± 0.11	156 ± 18	50.3 ± 21.8	58 ± 11
Female	0	5	5.85 ± 0.15	115 ± 10	11.4 ± 3.0	61 ± 14
	1,000	5	5.95 ± 0.26	129 ± 22	12.4 ± 4.7	65 ± 9

Mean ± S.D.

-80-

Table 11-2. --continued Blood chemistry  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	T.bilirubin (mg/dL)	Total bile acid ( $\mu$ mol/L)
Male	0	4	11.5 $\pm$ 1.1	0.27 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.02	23.2 $\pm$ 21.4
	1,000	5	11.6 $\pm$ 1.4	0.26 $\pm$ 0.04	0.03 $\pm$ 0.01	20.9 $\pm$ 14.3
Female	0	5	15.6 $\pm$ 1.2	0.30 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.01	18.7 $\pm$ 20.2
	1,000	5	15.6 $\pm$ 2.6	0.27 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.01	16.4 $\pm$ 6.3

Mean  $\pm$  S.D.

- 81 -

Table 11-2. --continued Blood chemistry  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Gamma-GTP (U/L)
Male	0	4	96 $\pm$ 15	31 $\pm$ 3	486 $\pm$ 70	0.4 $\pm$ 0.1
	1,000	5	84 $\pm$ 6	30 $\pm$ 4	565 $\pm$ 76	0.4 $\pm$ 0.1
Female	0	5	86 $\pm$ 20	25 $\pm$ 3	358 $\pm$ 79	0.9 $\pm$ 0.4
	1,000	5	78 $\pm$ 10	25 $\pm$ 2	375 $\pm$ 31	0.9 $\pm$ 0.2

Mean  $\pm$  S.D.

- 82 -

Table 11-2. -continued Blood chemistry  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Calcium (mg/dL)	I. phosphorus (mg/dL)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	4	9.67 ± 0.32	7.58 ± 0.26	142.6 ± 1.3	4.73 ± 0.22	106.2 ± 1.0
	1,000	5	9.86 ± 0.25	7.71 ± 0.45	143.3 ± 0.6	4.60 ± 0.52	106.1 ± 0.9
Female	0	5	9.74 ± 0.24	7.52 ± 1.02	142.1 ± 1.2	4.55 ± 0.30	107.4 ± 1.6
	1,000	5	9.80 ± 0.30	6.84 ± 0.78	142.8 ± 1.9	4.33 ± 0.25	107.8 ± 1.5

Mean ± S.D.

- 83 -

Table 12-1. Electrophoresis  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (%)	Alpha-1 (%)	Alpha-2 (%)	Beta (%)	Gamma (%)	A/G
Male	0	5	50.6 ± 1.7	22.7 ± 1.4	7.9 ± 0.6	14.8 ± 0.7	4.1 ± 0.5	1.02 ± 0.07
	100	5	51.4 ± 3.2	21.0 ± 0.8	8.4 ± 0.9	15.5 ± 1.4	3.7 ± 0.7	1.07 ± 0.15
	300	5	52.6 ± 2.3	19.4 ± 2.5*	7.9 ± 0.6	15.5 ± 0.5	4.6 ± 0.2	1.12 ± 0.10
	1,000	5	52.9 ± 1.4	18.4 ± 2.0**	8.4 ± 0.6	15.5 ± 1.6	4.8 ± 0.7	1.12 ± 0.07
Female	0	5	52.7 ± 1.6	19.6 ± 2.2	7.5 ± 0.7	15.1 ± 0.5	5.2 ± 1.0	1.12 ± 0.07
	100	5	54.7 ± 3.4	18.4 ± 1.5	7.9 ± 0.3	14.9 ± 1.3	4.0 ± 1.1	1.22 ± 0.18
	300	5	54.1 ± 0.8	17.0 ± 0.8	8.8 ± 0.7**	15.3 ± 1.1	4.8 ± 0.9	1.18 ± 0.04
	1,000	5	55.0 ± 2.3	17.3 ± 1.6	8.1 ± 0.6	15.1 ± 1.3	4.5 ± 1.4	1.23 ± 0.12

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)

- 84 -



Table 12-1. --continued Electrophoresis  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (g/dL)	Alpha-1 (g/dL)	Alpha-2 (g/dL)	Beta (g/dL)	Gamma (g/dL)
Male	0	5	2.92 ± 0.17	1.31 ± 0.06	0.46 ± 0.04	0.85 ± 0.04	0.23 ± 0.03
	100	5	2.89 ± 0.18	1.18 ± 0.06	0.47 ± 0.05	0.87 ± 0.09	0.21 ± 0.03
	300	5	2.87 ± 0.08	1.06 ± 0.16*	0.43 ± 0.03	0.84 ± 0.03	0.25 ± 0.02
	1,000	5	2.91 ± 0.08	1.02 ± 0.15**	0.46 ± 0.04	0.85 ± 0.06	0.26 ± 0.04
Female	0	5	3.12 ± 0.12	1.17 ± 0.20	0.44 ± 0.04	0.89 ± 0.02	0.30 ± 0.06
	100	5	3.20 ± 0.26	1.07 ± 0.09	0.46 ± 0.01	0.87 ± 0.07	0.23 ± 0.07
	300	5	3.22 ± 0.10	1.01 ± 0.03	0.52 ± 0.03**	0.91 ± 0.08	0.29 ± 0.06
	1,000	5	3.24 ± 0.23	1.02 ± 0.13	0.48 ± 0.04	0.89 ± 0.05	0.26 ± 0.07

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \* : P ≤ 0.05 \*\* : P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 12-2. Electrophoresis  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (%)	Alpha-1 (%)	Alpha-2 (%)	Beta (%)	Gamma (%)	A/G
Male	0	4	48.7 ± 2.9	22.7 ± 3.6	8.0 ± 0.9	16.3 ± 0.9	4.3 ± 0.7	0.95 ± 0.11
	1,000	5	49.7 ± 2.7	21.9 ± 2.1	8.4 ± 1.0	15.9 ± 0.9	4.2 ± 1.3	0.98 ± 0.11
Female	0	5	51.3 ± 1.7	19.8 ± 1.0	7.6 ± 0.3	15.0 ± 0.6	6.3 ± 1.1	1.06 ± 0.07
	1,000	5	51.3 ± 2.4	19.0 ± 1.4	8.3 ± 0.7	15.9 ± 1.0	5.6 ± 1.3	1.05 ± 0.10

Mean ± S.D.

Table 12-2. --continued Electrophoresis  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (g/dL)	Alpha-1 (g/dL)	Alpha-2 (g/dL)	Beta (g/dL)	Gamma (g/dL)
Male	0	4	2.70 ± 0.14	1.27 ± 0.24	0.45 ± 0.03	0.91 ± 0.04	0.24 ± 0.05
	1,000	5	2.75 ± 0.12	1.21 ± 0.12	0.46 ± 0.06	0.88 ± 0.07	0.23 ± 0.08
Female	0	5	3.00 ± 0.06	1.16 ± 0.09	0.45 ± 0.02	0.88 ± 0.04	0.37 ± 0.07
	1,000	5	3.05 ± 0.18	1.13 ± 0.13	0.49 ± 0.02**	0.95 ± 0.06	0.33 ± 0.08

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)

- 87 -

Table 13-1. Urinalysis  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (mL)	Osmotic pressure (mOsm/kg)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	10	12.1 ± 4.1	1550 ± 532	122 ± 49	254.8 ± 94.5	170.0 ± 68.7
	100	5	16.8 ± 13.1	1469 ± 477	120 ± 40	233.2 ± 75.5	161.5 ± 57.2
	300	5	17.1 ± 7.5	1321 ± 425	116 ± 40	216.1 ± 70.1	142.1 ± 50.8
	1,000	10	11.1 ± 2.1	1571 ± 355	128 ± 26	252.2 ± 58.0	170.6 ± 41.4
Female	0	10	15.8 ± 7.1	1205 ± 385	99 ± 33	187.5 ± 61.5	127.7 ± 43.3
	100	5	10.9 ± 4.2	1378 ± 515	109 ± 47	214.2 ± 78.4	145.0 ± 59.3
	300	5	10.3 ± 3.9	1692 ± 516	119 ± 41	251.8 ± 67.6	168.6 ± 57.7
	1,000	10	11.2 ± 3.3	1388 ± 347	115 ± 26	212.3 ± 59.0	145.6 ± 35.8

Mean ± S.D.

- 88 -

Table 13-1. --continued Urinalysis  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Sodium (mmol/day)	Potassium (mmol/day)	Chloride (mmol/day)
Male	0	10	1.34 ± 0.37	2.76 ± 0.40	1.84 ± 0.35
	100	5	1.61 ± 0.42	3.16 ± 0.89	2.15 ± 0.55
	300	5	1.78 ± 0.33	3.31 ± 0.39	2.18 ± 0.41
	1,000	10	1.39 ± 0.12	2.72 ± 0.29	1.83 ± 0.15
Female	0	10	1.39 ± 0.16	2.63 ± 0.34	1.79 ± 0.23
	100	5	1.04 ± 0.14**	2.09 ± 0.26*	1.39 ± 0.12**
	300	5	1.10 ± 0.16**	2.38 ± 0.39	1.56 ± 0.21
	1,000	10	1.23 ± 0.16	2.24 ± 0.35*	1.54 ± 0.20*

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 \*\*; P ≤ 0.01 (Dunnett)

-89-

Table 13-1. --continued Urinalysis  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Color									pH	Occult blood																						
			1	2	3	4	5	6	7	8	9			10	11	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	≥9	-	+/-	1+	2+	3+						
Male	0	10	9	1																															
	100	5	5																																
	300	5	5																																
	1,000	10	10																																
Female	0	10	10																																
	100	5	5																																
	300	5	4	1																															
	1,000	10	10																																

Color : 1= Colorless, 2= Slight yellow, 3= Yellow-brown, 4= Red, 5= Red-brown, 6= Dark red, 7= Dark brown,  
8= Brown-black, 9= Milky white, 10= Fluorescent green, 11= Blue  
Occult blood : - (negative), +/- (trace), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked)

-06-

Table 13-1. --continued Urinalysis  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Ketone bodies					Glucose (g/dL)					Protein (mg/dL)						
			-	+/-	1+	2+	3+	-	0.1	0.25	0.5	≥1.0	-	+/-	30	100	≥300		
Male	0	10	7	2	1						9	1				2	4	3	1
	100	5	4		1						5						4		1
	300	5	4		1						5					1	2	2	
	1,000	10	8	1	1						10					1	8		1
Female	0	10	10								10					8		2	
	100	5	5								5					3		2	
	300	5	3	2							4	1				1	2	1	1
	1,000	10	10								10					6	3	1	

Ketone bodies : - (negative), +/- (5 mg/dL), 1+ (15 mg/dL), 2+ (40 mg/dL), 3+ (≥ 80 mg/dL)

- 91 -

Table 13-1. --continued Urinalysis  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Bilirubin			Urobilinogen (E.U./dL)										
			-	1+	2+	3+	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	≥12				
Male	0	10	9	1							9	1				
	100	5	5								5					
	300	5	5								5					
	1,000	10	10								10					
Female	0	10	10								10					
	100	5	5								5					
	300	5	4	1							4	1				
	1,000	10	10								10					

Bilirubin : - (negative), 1+ (slight), 2+ (moderate), 3+ (marked)

- 92 -

Table 13-1. --continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes			Leukocytes			Epithelial cells			Casts		Fat globules		Mucous threads		Crystals		
			-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+	-	+	-	+	-	+
Male	0	10	10			10			10			10			10					10
	100	5	5			5			5			5			5					5
	300	5	5			5			5			5			4	1				5
	1,000	10	10			10			10			10			10					4 6
Female	0	10	10			10			10			10			10					2 8
	100	5	5			5			4 1			5			5					5
	300	5	5			5			5			5			5					5
	1,000	10	10			10			10			10			10					10

Erythrocytes, Leukocytes and Epithelial cells (cells/ $\mu$ L) : - (0-4), 1+(5-14), 2+(15-29), 3+(30 or more)  
 Casts, Fat globules, Mucous threads and Crystals : - (not observed), +(observed)

- 93 -

Table 13-2. Urinalysis  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (mL)	Osmotic pressure (mOsm/kg)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	4	10.1 $\pm$ 1.7	2102 $\pm$ 146	179 $\pm$ 5	316.1 $\pm$ 25.0	232.4 $\pm$ 17.4
	1,000	5	13.3 $\pm$ 3.6	1611 $\pm$ 374*	128 $\pm$ 24#	243.1 $\pm$ 48.9*	164.1 $\pm$ 31.0**
Female	0	5	13.8 $\pm$ 5.0	1552 $\pm$ 480	122 $\pm$ 46	221.6 $\pm$ 66.1	151.4 $\pm$ 52.2
	1,000	5	14.2 $\pm$ 6.9	1536 $\pm$ 611	119 $\pm$ 51	223.6 $\pm$ 88.5	155.6 $\pm$ 66.3

Mean  $\pm$  S.D.  
 \* :  $P \leq 0.05$       \*\* :  $P \leq 0.01$  (Dunnett)  
 # :  $P \leq 0.05$  (Steel)

- 94 -

Table 13-2. --continued Urinalysis  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Sodium (mmol/day)	Potassium (mmol/day)	Chloride (mmol/day)
Male	0	4	1.81 ± 0.29	3.18 ± 0.43	2.34 ± 0.29
	1,000	5	1.63 ± 0.20	3.11 ± 0.43	2.10 ± 0.29
Female	0	5	1.51 ± 0.05	2.81 ± 0.25	1.89 ± 0.13
	1,000	5	1.43 ± 0.19	2.73 ± 0.43	1.87 ± 0.22

Mean ± S.D.

- 95 -

Table 13-2. --continued Urinalysis  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Color											pH								Occult blood						
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	≥9	-	+/-	1+	2+	3+	
Male	0	4	4																1	3						4		
	1,000	5	5																		5						5	
Female	0	5	5																	2	3						5	
	1,000	5	5																	1	4					4	1	

Color : 1= Colorless, 2= Slight yellow, 3= Yellow-brown, 4= Red, 5= Red-brown, 6= Dark red, 7= Dark brown, 8= Brown-black, 9= Milky white, 10= Fluorescent green, 11= Blue  
Occult blood : - (negative), +/- (trace), 1+ (slight), 2+ (moderate), 3+ (marked)

- 96 -

Table 13-2. -continued Urinalysis  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Ketone bodies					Glucose(g/dL)					Protein(mg/dL)				
			-	+/-	1+	2+	3+	-	0.1	0.25	0.5	≥1.0	-	+/-	30	100	≥300
Male	0	4	1		3				3	1					1	1	2
	1,000	5	1	2	2				5						1	2	2
Female	0	5	1	4					4	1					1	2	2
	1,000	5	1	4					5						1	2	2

Ketone bodies : -(negative), +/- (5 mg/dL), 1+(15 mg/dL), 2+(40 mg/dL), 3+(≥ 80 mg/dL)

-97-

Table 13-2. -continued Urinalysis  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Bilirubin				Urobilinogen(E.U./dL)						
			-	1+	2+	3+	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	≥12	
Male	0	4	4				3	1					
	1,000	5	4	1			3	2					
Female	0	5	5				2	3					
	1,000	5	5				1	4					

Bilirubin : -(negative), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked)

-98-

Table 13-2. --continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes			Leukocytes			Epithelial cells			Casts		Fat globules		Mucous threads		Crystals	
			-	1+	2+ 3+	-	1+ 2+ 3+	-	1+ 2+ 3+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Male	0	4		4			4		4		4		4		4		4		4
	1,000	5		5			5		5		5		5		5		5		5
Female	0	5		5			5		5		5		5		5		5		5
	1,000	5		5			5		5		5		5		5		5		5

Erythrocytes, Leukocytes and Epithelial cells (cells/ $\mu$ L) : - (0-4), 1+(5-14), 2+(15-29), 3+(30 or more)  
 Casts, Fat globules, Mucous threads and Crystals : - (not observed), +(observed)

- 66 -

Table 14-1. Organ weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidneys (g)
Male	0	5	283 $\pm$ 30	2.12 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.10	8.56 $\pm$ 1.05	2.34 $\pm$ 0.15
	100	5	293 $\pm$ 35	2.08 $\pm$ 0.08	1.07 $\pm$ 0.11	9.48 $\pm$ 1.97	2.40 $\pm$ 0.23
	300	5	306 $\pm$ 23	2.12 $\pm$ 0.08	1.10 $\pm$ 0.07	9.76 $\pm$ 0.80	2.59 $\pm$ 0.11
	1,000	5	272 $\pm$ 22	2.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.11	8.64 $\pm$ 1.30	2.35 $\pm$ 0.32
Female	0	5	189 $\pm$ 8	1.96 $\pm$ 0.06	0.72 $\pm$ 0.04	5.85 $\pm$ 0.29	1.62 $\pm$ 0.15
	100	5	182 $\pm$ 14	1.88 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.06	5.63 $\pm$ 0.64	1.46 $\pm$ 0.17
	300	5	181 $\pm$ 24	1.90 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.07	5.75 $\pm$ 0.52	1.58 $\pm$ 0.16
	1,000	5	186 $\pm$ 6	1.88 $\pm$ 0.10	0.73 $\pm$ 0.07	6.42 $\pm$ 0.63	1.57 $\pm$ 0.06

Mean  $\pm$  S.D.

- 100 -



Table 14-1. -continued Organ weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (g)	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)	Thyroid (mg)
Male	0	5	0.53 ± 0.09	47 ± 6	2.79 ± 0.26		20 ± 3
	100	5	0.55 ± 0.10	45 ± 6	3.03 ± 0.19		17 ± 2
	300	5	0.60 ± 0.12	54 ± 7	2.98 ± 0.15		22 ± 5
	1,000	5	0.53 ± 0.09	48 ± 5	2.82 ± 0.20		20 ± 6
Female	0	5	0.46 ± 0.07	60 ± 8		80 ± 4	15 ± 4
	100	5	0.35 ± 0.04*	62 ± 8		64 ± 10**	15 ± 2
	300	5	0.36 ± 0.05*	64 ± 7		79 ± 5	14 ± 2
	1,000	5	0.43 ± 0.06	64 ± 10		73 ± 7	15 ± 4

Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)

-101-

Table 14-1. -continued Organ weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Pituitary (mg)	Thymus (mg)	Epididymides (mg)	Mandibular gland (mg)
Male	0	5	8 ± 2	513 ± 101	625 ± 80	516 ± 68
	100	5	8 ± 1	484 ± 69	658 ± 39	532 ± 107
	300	5	10 ± 1	540 ± 81	654 ± 35	525 ± 34
	1,000	5	8 ± 3	483 ± 122	603 ± 62	500 ± 29
Female	0	5	12 ± 2	452 ± 85		369 ± 27
	100	5	10 ± 1	463 ± 35		353 ± 39
	300	5	9 ± 2	432 ± 101		370 ± 18
	1,000	5	10 ± 4	406 ± 63		377 ± 43

Mean ± S.D.

-102-

Table 14-2. Organ weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidneys (g)
Male	0	4	379 ± 30	2.16 ± 0.09	1.28 ± 0.07	11.09 ± 0.86	2.79 ± 0.15
	1,000	5	346 ± 20	2.11 ± 0.08	1.21 ± 0.11	10.02 ± 0.97	2.64 ± 0.18
Female	0	5	225 ± 9	1.99 ± 0.08	0.81 ± 0.04	6.31 ± 0.47	1.71 ± 0.04
	1,000	5	206 ± 14*	1.97 ± 0.10	0.81 ± 0.07	6.26 ± 0.96	1.70 ± 0.27

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*; P < 0.05 (Dunnett)

- 103 -

Table 14-2. --continued Organ weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (g)	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)	Thyroid (mg)
Male	0	4	0.66 ± 0.11	56 ± 2	3.37 ± 0.42		19 ± 4
	1,000	5	0.65 ± 0.15	51 ± 8	3.17 ± 0.11		20 ± 4
Female	0	5	0.50 ± 0.07	65 ± 4		75 ± 12	14 ± 1
	1,000	5	0.47 ± 0.14	66 ± 9		86 ± 13	14 ± 1

Mean ± S.D.

- 104 -

Table 14-2. -continued Organ weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Pituitary (mg)	Thymus (mg)	Epididymides (mg)	Mandibular gland (mg)
Male	0	4	11 ± 2	397 ± 11	964 ± 54	619 ± 38
	1,000	5	9 ± 2	484 ± 134	944 ± 35	589 ± 37
Female	0	5	13 ± 2	436 ± 66		448 ± 50
	1,000	5	13 ± 4	447 ± 90		409 ± 46

Mean ± S.D.

- 105 -

Table 15-1. Organ weight per body weight  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Heart (%)	Liver (%)	Kidneys (%)
Male	0	5	283 ± 30	0.754 ± 0.073	0.366 ± 0.010	3.025 ± 0.108	0.831 ± 0.048
	100	5	293 ± 35	0.721 ± 0.112	0.366 ± 0.025	3.215 ± 0.323	0.824 ± 0.071
	300	5	306 ± 23	0.695 ± 0.053	0.360 ± 0.011	3.186 ± 0.079	0.849 ± 0.039
	1,000	5	272 ± 22	0.737 ± 0.040	0.365 ± 0.017	3.161 ± 0.244	0.861 ± 0.073
Female	0	5	189 ± 8	1.037 ± 0.059	0.381 ± 0.018	3.097 ± 0.093	0.855 ± 0.058
	100	5	182 ± 14	1.037 ± 0.087	0.378 ± 0.011	3.081 ± 0.139	0.798 ± 0.054
	300	5	181 ± 24	1.061 ± 0.149	0.389 ± 0.023	3.194 ± 0.265	0.878 ± 0.102
	1,000	5	186 ± 6	1.010 ± 0.064	0.395 ± 0.032	3.446 ± 0.252*	0.843 ± 0.022

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 106 -

Table 15-1. --continued Organ weight per body weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (%)	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)	Thyroid (%)
Male	0	5	0.188 ± 0.024	0.017 ± 0.001	0.998 ± 0.155		0.007 ± 0.001
	100	5	0.187 ± 0.015	0.016 ± 0.002	1.046 ± 0.118		0.006 ± 0.000
	300	5	0.195 ± 0.029	0.018 ± 0.001	0.977 ± 0.065		0.007 ± 0.002
	1,000	5	0.194 ± 0.027	0.018 ± 0.002	1.038 ± 0.073		0.007 ± 0.002
Female	0	5	0.240 ± 0.029	0.032 ± 0.004		0.042 ± 0.002	0.008 ± 0.002
	100	5	0.192 ± 0.007**	0.034 ± 0.004		0.035 ± 0.007	0.008 ± 0.001
	300	5	0.202 ± 0.024*	0.036 ± 0.006		0.044 ± 0.009	0.008 ± 0.002
	1,000	5	0.229 ± 0.023	0.034 ± 0.005		0.039 ± 0.003	0.008 ± 0.002

Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)

- 107 -

Table 15-1. --continued Organ weight per body weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Pituitary (%)	Thymus (%)	Epididymides (%)	Mandibular gland (%)
Male	0	5	0.003 ± 0.001	0.180 ± 0.021	0.224 ± 0.040	0.182 ± 0.011
	100	5	0.003 ± 0.000	0.165 ± 0.014	0.227 ± 0.024	0.181 ± 0.020
	300	5	0.003 ± 0.000	0.177 ± 0.026	0.214 ± 0.014	0.172 ± 0.009
	1,000	5	0.003 ± 0.001	0.177 ± 0.038	0.222 ± 0.021	0.184 ± 0.014
Female	0	5	0.006 ± 0.001	0.239 ± 0.041		0.195 ± 0.011
	100	5	0.006 ± 0.001	0.255 ± 0.030		0.193 ± 0.009
	300	5	0.005 ± 0.001	0.237 ± 0.038		0.206 ± 0.023
	1,000	5	0.006 ± 0.002	0.219 ± 0.039		0.202 ± 0.019

Mean ± S.D.

- 108 -

Table 15-2. Organ weight per body weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Heart (%)	Liver (%)	Kidneys (%)
Male	0	4	379 ± 30	0.571 ± 0.035	0.338 ± 0.013	2.930 ± 0.111	0.739 ± 0.052
	1,000	5	346 ± 20	0.611 ± 0.029	0.352 ± 0.041	2.898 ± 0.193	0.766 ± 0.073
Female	0	5	225 ± 9	0.889 ± 0.074	0.359 ± 0.018	2.809 ± 0.167	0.761 ± 0.045
	1,000	5	206 ± 14*	0.958 ± 0.057	0.393 ± 0.024*	3.018 ± 0.280	0.823 ± 0.101

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 109 -

Table 15-2. --continued Organ weight per body weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (%)	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)	Thyroid (%)
Male	0	4	0.174 ± 0.026	0.015 ± 0.001	0.888 ± 0.063		0.005 ± 0.001
	1,000	5	0.189 ± 0.038	0.015 ± 0.002	0.921 ± 0.078		0.006 ± 0.001
Female	0	5	0.225 ± 0.036	0.029 ± 0.001		0.034 ± 0.004	0.006 ± 0.000
	1,000	5	0.225 ± 0.054	0.032 ± 0.004		0.042 ± 0.005*	0.007 ± 0.000

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 110 -

Table 15-2. -continued Organ weight per body weight  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Pituitary (%)	Thymus (%)	Epididymides (%)	Mandibular gland (%)
Male	0	4	0.003 ± 0.001	0.105 ± 0.008	0.255 ± 0.012	0.164 ± 0.009
	1,000	5	0.003 ± 0.000	0.140 ± 0.041	0.274 ± 0.024	0.171 ± 0.015
Female	0	5	0.006 ± 0.001	0.194 ± 0.030		0.200 ± 0.023
	1,000	5	0.006 ± 0.002	0.215 ± 0.031		0.198 ± 0.014

Mean ± S.D.

- 111 -

Table 16-1. Summary of gross findings with statistical analysis  
 ( sacrificed, administration period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals				Female animals				
		0	100	300	1,000	0	100	300	1,000	
Organ	Findings	5	5	5	5	5	5	5	5	
RESPIRATORY SYSTEM										
lung	brown patch/zone	1	0	0	0	0	0	0	0	
DIGESTIVE SYSTEM										
stomach	white patch/zone	0	1	0	0	0	0	0	0	
liver	hepatodiaphragmatic nodule	0	0	0	0	0	0	1	0	
	white patch/zone	0	0	0	1	0	0	0	0	
URINARY SYSTEM										
kidney	cyst	0	0	1	0	0	1	0	0	
	scarred	1	1	0	0	1	2	1	1	
REPRODUCTIVE SYSTEM										
uterus	cyst	-	-	-	-	0	1	0	0	
	dilated lumen	-	-	-	-	2	2	0	2	
ENDOCRINE SYSTEM										
thyroid gland	nodule	0	0	0	0	0	1	0	0	

- 112 -

Table 16-2.

Summary of gross findings with statistical analysis  
( sacrificed, recovery period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals		Female animals	
		0	1,000	0	1,000
Organ	Findings	4	5	5	5
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>					
liver	adhesion with kidney	0	0	1	0
<b>URINARY SYSTEM</b>					
kidney	cyst	0	1	0	1
	scarred	1	0	0	0
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>					
uterus	dilated lumen	-	-	0	1

- 113 -

Table 17-1.

Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed, administration period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals				Female animals				
		5	100	300	1,000	5	100	300	1,000	
Organ	Findings	5	5	5	5	5	5	5	5	
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>										
lung	accumulation of foamy cells	3	-	-	2	3	-	-	2	
	bronchopneumonia	1	-	-	0	0	-	-	0	
	osseous metaplasia	1	-	-	0	0	-	-	0	
trachea	dilatation, gland	1	-	-	0	0	-	-	1	
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>										
glandular stomach	dilatation, gland	0	0	-	0	1	-	-	0	
	epidermal cyst	0	1	-	0	0	-	-	0	
exocrine pancreas	degeneration, acinar cell	1	-	-	0	0	-	-	0	
liver	fatty change, hepatocyte	1	1	0	0	3	2	2	2	
	necrosis, hepatocyte, focal	0	0	0	1	0	0	0	0	
	microgranuloma	5	4	5	4	5	4	4	4	
	hepatodiaphragmatic nodule	0	0	0	0	0	0	1	0	
	hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	0	0	3	5**	0	0	1	5**	
<b>URINARY SYSTEM</b>										
kidney	basophilic tubule	3	1	0	1	1	0	0	1	
	cyst	0	0	0	1	1	1	0	1	
	hyaline droplet	1	0	0	1	0	0	0	0	
	mineralization	1	0	0	1	1	0	0	2	
	fibrosis, focal	1	1	1	0	0	0	0	0	
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>										
epididymis	cellular infiltration, lymphocyte	1	-	-	1	-	-	-	-	
prostate	cell debris, lumen	1	-	-	0	-	-	-	-	
	cellular infiltration, lymphocyte	5	-	-	2	-	-	-	-	
uterus	cyst	-	-	-	-	0	1	-	0	

Significantly different from control group; \*\* : P ≤ 0.01 (Fisher)

- 114 -

Table 17-1. -continued Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed, administration period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals				Female animals			
		0	100	300	1,000	0	100	300	1,000
Organ	Findings	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>									
uterus	dilatation, lumen	-	-	-	-	2	1	-	2
vagina	epidermal cyst	-	-	-	-	1	-	-	0
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>									
thyroid gland	ectopic thymus	1	-	-	0	0	0	-	0
	ultimobranchial remnant	2	-	-	0	1	0	-	3

-115-

Table 17-2. Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed, recovery period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals		Female animals	
		0	1,000	0	1,000
Organ	Findings	4	5	5	5
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>					
lung	accumulation of foamy cells	3	2	1	2
trachea	dilatation, gland	1	1	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>					
exocrine pancreas	degeneration, acinar cell	0	1	1	0
	cellular infiltration, mononuclear	0	0	1	0
	focus, hypertrophic, basophilic	0	0	1	0
cecum	cellular infiltration, mononuclear	1	0	0	0
liver	adhesion with kidney	0	0	1	0
	fatty change, hepatocyte	1	0	3	2
	microgranuloma	4	4	5	5
<b>URINARY SYSTEM</b>					
kidney	basophilic tubule	2	2	1	0
	cyst	0	1	1	1
	hyaline droplet	1	1	0	0
	mineralization	3	1	2	0
	fibrosis, focal	1	2	1	0
	hyperplasia, renal tubule	0	0	1	0
urinary bladder	cellular infiltration, lymphocyte	0	0	1	0
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>					
prostate	cellular infiltration, lymphocyte	3	2	-	-

-116-



Table 17-2. -continued Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed, recovery period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals		Female animals	
		0	1,000	0	1,000
Organ	Findings	4	5	5	5
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>					
uterus	dilatation, lumen	-	-	0	1
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>					
pituitary gland	cyst	0	1	0	0
thyroid gland	ultimobranchial remnant	1	4	3	2
adrenal gland	mineralization	0	0	1	0
<b>SPECIAL SENSE SYSTEM</b>					
eye	dysplasia, retina	0	0	1	0
<b>INTEGUMENTARY SYSTEM</b>					
skin	cellular infiltration, mononuclear	1	0	1	0

- 117 -

# トリメチルアミンの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Trimethylamine on Bacteria

### 要約

トリメチルアミンについて、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, TA98, TA1535, TA1537) および *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) の5菌株を用いた。試験は2回繰り返して実施し、S9 mix無添加群の各試験菌株およびS9 mix添加群のTA100, TA1535ならびにTA1537で39.1~1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の6用量、S9 mix添加群のWP2 *uvrA* で156~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の6用量、同群のTA98で78.1~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の7用量で試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加群および添加群のいずれにおいても、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではトリメチルアミンは、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

### 方法

#### 1. 試験菌株

細菌を用いる復帰変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535 および TA1537<sup>1)</sup> ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成11年3月31日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK KGaA)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80°Cで保存した。

#### 2. 培地の調製

##### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化

ナトリウム[いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID:No.1)を加え、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

##### 2) トップアガー(軟寒天)

塩化ナトリウム0.5%を含む0.6% Bacto-agar(Difco)水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mmol/L D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

#### 3. 前培養条件

内容量200 mLのパッフル付三角フラスコに2.5%ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No. 2: OXOID)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50  $\mu\text{L}$ 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10: タイテック(株))を用い、37°Cで8時間振盪(往復振盪: 100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

#### 4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADPH	4 $\mu\text{mol}$
NADH	4 $\mu\text{mol}$
Na-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$
精製水	残量

#### 5. 被験物質

トリメチルアミン(ロット番号:MT381012)は純度30.8%(不純物としてジメチルアミン10 ppm以下を含む)の水溶液である。本剤は水に易溶で、水溶液中で安定である。三菱ガス化学(株)(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷暗所で保管した。試

試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

## 6. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質を日本薬局方注射用水(㈱大塚製薬工場)を用いて希釈して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。なお、本被験物質情報から揮発性が疑われたため、調製に際しては蓋付きの試験管を用いた。また、原液中での被験物質濃度が30.8%であることを考慮して調製した。

## 7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量を用いて予備的な試験を実施した。S9 mix無添加群の各試験菌株ならびにS9 mix添加群のTA100, TA1535およびTA1537で1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ において試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。

従って、本試験においてはS9 mix無添加群の各試験菌株ならびにS9 mix添加群のTA100, TA1535およびTA1537で1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , S9 mix添加群のWP2 *uvrA*ならびにTA98で5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とし、それぞれ6~7用量(公比2)を設定した。

## 8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20°C)した。

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

アジ化ナトリウム( $\text{NaN}_3$ :和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA:Aldrich社)

2-アミノアントラセン(2-AA:和光純薬工業(株))

## 9. 試験方法

Amesらの原法<sup>1)</sup>の改良法であるプレインキュベーション法に準じて、S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。蓋付き試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100  $\mu\text{L}$ 、次いでS9 mix無添加群の場合、0.1 mol/Lナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500  $\mu\text{L}$ 、S9 mix添加群の場合、S9 mixを500  $\mu\text{L}$ 添加し、さらに試験菌液100  $\mu\text{L}$ を加え、37°Cで20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、あらかじめ45°Cに保温したトップアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。各プレートをビニールテープで密封して、37°Cの条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡( $\times 60$ )を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス(株))を用いた。なお、本試験1回目においては、S9 mix添加群のWP2 *uvrA*で5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ において強い

生育阻害作用の影響により、背景菌が目視できるほどのコロニーを形成していたため、コロニーアナライザーの使用は不適切と判断し、目視でコロニー数を計数した。各濃度につき3枚のプレートを使用した。また、独立して試験を2回実施した。

## 10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

## 結果および考察

1回目の試験結果をTable 1~2に、2回目の試験結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群ならびに添加群ともすべての試験菌株の高用量群において、トリメチルアミン処理による生育阻害作用が観察された。しかしながら、復帰突然変異コロニー数については、S9 mix無添加群、S9 mix添加群とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、コロニー計数時、析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

以上の試験結果から、本試験条件下において、トリメチルアミンの微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

なお、本被験物質の変異原性に関する報告はなかったが、類縁体であるdimethylamineについてはAmes試験で疑陽性<sup>3)</sup>、dimethylamine hydrochlorideでは染色体異常試験で陰性<sup>4)</sup>、methylamineではマウスリンフォーム試験で陽性<sup>5)</sup>との報告があった。

## 文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, **38**, 3 (1976).
- 3) N. R. Green and J. R. Savage, *Mutat. Res.*, **57**, 115 (1978).
- 4) M. Ishidate Jr. and S. Odashima, *Mutat. Res.*, **48**, 337(1977).
- 5) W. J. Caspary and B. Myhr, *Mutat. Res.*, **174** (4), 285 (1986).

連絡先

試験責任者：中嶋 圓  
試験担当者：益森勝志，北澤倫世，板倉真由実  
(財)食品農医薬品安全性評価センター  
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2  
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)  
Shoji Masumori, Michiyo Kitazawa,  
Mayumi Itakura  
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)  
582-2 Shioshinden, Fukude-cho, Iwata-gun,  
Shizuoka, 437-1213, Japan  
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Results of the bacterial reversion test of trimethylamine (1st trial)  
[direct method: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	122	134	119	9	10	11	21	20	22	20	22	22	7	8	5
		[125 $\pm$ 8]	[10 $\pm$ 1]	[21 $\pm$ 1]	[21 $\pm$ 1]	[7 $\pm$ 2]										
	39.1	121	111	120	10	11	15	24	24	26	20	20	21	4	4	4
		[117 $\pm$ 6]	[12 $\pm$ 3]	[25 $\pm$ 1]	[20 $\pm$ 1]	[4 $\pm$ 0]										
	78.1	113	117	112	14	10	13	24	23	24	29	31	29	9	7	7
		[114 $\pm$ 3]	[12 $\pm$ 2]	[24 $\pm$ 1]	[30 $\pm$ 1]	[8 $\pm$ 1]										
	156	121	120	124	12	11	10	20	24	20	25	21	26	6	4	4
	[122 $\pm$ 2]	[11 $\pm$ 1]	[21 $\pm$ 2]	[24 $\pm$ 3]	[5 $\pm$ 1]											
313	109	114	106	9	10	12	23	21	21	19	22	20	5	6	5	
	[110 $\pm$ 4]	[10 $\pm$ 2]	[22 $\pm$ 1]	[20 $\pm$ 2]	[5 $\pm$ 1]											
625	116	112	113	10	10	12	28	22	26	24	27	23	5	3	9	
	[114 $\pm$ 2]	[11 $\pm$ 1]	[25 $\pm$ 3]	[25 $\pm$ 2]	[6 $\pm$ 3]											
1250	68*	64*	67*	7*	10*	6*	18*	16*	16*	14*	15*	19*	7*	6*	5*	
	[66 $\pm$ 2]	[8 $\pm$ 2]	[17 $\pm$ 1]	[16 $\pm$ 3]	[6 $\pm$ 1]											
Positive control		530	506	522 <sup>a</sup>	404	413	416 <sup>b</sup>	120	128	123 <sup>c</sup>	696	661	657 <sup>c</sup>	426	413	434 <sup>d</sup>
		[519 $\pm$ 12]	[411 $\pm$ 6]	[124 $\pm$ 4]	[671 $\pm$ 21]	[424 $\pm$ 11]										

a) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b)  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 

\*: Growth inhibition was observed

Table 2 Results of the bacterial reversion test of trimethylamine (1st trial)  
[activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	128	127	124	12	11	15	27	25	30	30	32	30	11	13	10
		[126 $\pm$ 2]	[13 $\pm$ 2]	[27 $\pm$ 3]	[31 $\pm$ 1]	[11 $\pm$ 2]										
	39.1	121	116	123	11	12	13							9	13	11
		[120 $\pm$ 4]	[12 $\pm$ 1]										[11 $\pm$ 2]			
	78.1	114	120	119	10	11	11				26	32	27	10	12	11
		[118 $\pm$ 3]	[11 $\pm$ 1]							[28 $\pm$ 3]	[11 $\pm$ 1]					
	156	118	122	120	11	9	12	28	25	26	29	26	28	10	10	11
		[120 $\pm$ 2]	[11 $\pm$ 2]	[26 $\pm$ 2]	[28 $\pm$ 2]	[10 $\pm$ 1]										
	313	119	120	119	11	14	10	22	24	22	25	29	27	10	13	9
		[119 $\pm$ 1]	[12 $\pm$ 2]	[23 $\pm$ 1]	[27 $\pm$ 2]	[11 $\pm$ 2]										
625	107	105	106	12*	9*	12*	23	24	25	31	26	24	9*	7*	11*	
	[106 $\pm$ 1]	[11 $\pm$ 2]	[24 $\pm$ 1]	[27 $\pm$ 4]	[9 $\pm$ 2]											
1250	110	104*	97*	8*	9*	8*	33	33	37	31*	31*	29*	14*	18*	10*	
	[104 $\pm$ 7]	[8 $\pm$ 1]	[34 $\pm$ 2]	[30 $\pm$ 1]	[14 $\pm$ 4]											
2500							19*	18*	22*	6*	10*	9*				
							[20 $\pm$ 2]	[8 $\pm$ 2]								
5000							5*	9*	11*	0*	0*	0*				
							[8 $\pm$ 3]	[0 $\pm$ 0]								
Positive control		758	753	761 <sup>a</sup>	286	302	300 <sup>b</sup>	808	772	798 <sup>c</sup>	270	298	284 <sup>d</sup>	158	162	172 <sup>b</sup>
		[757 $\pm$ 4]	[296 $\pm$ 9]	[793 $\pm$ 19]	[284 $\pm$ 14]	[164 $\pm$ 7]										

a) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b) 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 

\*: Growth inhibition was observed

Table 3 Results of the bacterial reversion test of trimethylamine (2nd trial)  
[direct method:-S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535 <sup>c</sup>			WP2 <sup>uvrA</sup>			TA98			TA1537		
Test substance	0	125	117	109	12	13	15	25	25	20	20	20	19	5	7	5
		[117 $\pm$ 8]			[13 $\pm$ 2]			[23 $\pm$ 3]			[20 $\pm$ 1]			[6 $\pm$ 1]		
	39.1	123	120	117	13	14	15	22	26	29	19	18	21	11	8	8
		[120 $\pm$ 3]			[14 $\pm$ 1]			[26 $\pm$ 4]			[19 $\pm$ 2]			[9 $\pm$ 2]		
	78.1	122	126	125	13	12	14	26	21	22	18	20	19	8	6	6
		[124 $\pm$ 2]			[13 $\pm$ 1]			[23 $\pm$ 3]			[19 $\pm$ 1]			[7 $\pm$ 1]		
	156	127	112	118	17	14	14	25	25	24	24	17	17	6	5	4
	[119 $\pm$ 8]			[15 $\pm$ 2]			[25 $\pm$ 1]			[19 $\pm$ 4]			[5 $\pm$ 1]			
313	125	129	135	10	12	10	25	27	26	23	20	22	7	4	6	
	[130 $\pm$ 5]			[11 $\pm$ 1]			[26 $\pm$ 1]			[22 $\pm$ 2]			[6 $\pm$ 2]			
625	130	145	137	11	12	10	28	26	20	21	21	18	6	5	7	
	[137 $\pm$ 8]			[11 $\pm$ 1]			[25 $\pm$ 4]			[20 $\pm$ 2]			[6 $\pm$ 1]			
1250	75*	75*	71*	6*	8*	8*	18*	19*	20*	16*	16*	12*	7*	4*	5*	
	[74 $\pm$ 2]			[7 $\pm$ 1]			[19 $\pm$ 1]			[15 $\pm$ 2]			[5 $\pm$ 2]			
Positive control		525	508	480*	409	402	427 <sup>b</sup>	160	155	159 <sup>a</sup>	523	552	553 <sup>c</sup>	411	419	419 <sup>d</sup>
		[504 $\pm$ 23]			[413 $\pm$ 13]			[158 $\pm$ 3]			[543 $\pm$ 17]			[416 $\pm$ 5]		

a) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b)  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
c) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
\*: Growth inhibition was observed

Table 4 Results of the bacterial reversion test of trimethylamine (2nd trial)  
[activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <sup>uvrA</sup>			TA98			TA1537		
Test substance	0	118	125	122	16	15	16	27	29	30	25	30	24	10	15	10
		[122 $\pm$ 4]			[16 $\pm$ 1]			[29 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 3]		
	39.1	120	121	123	11	12	14							8	11	13
		[121 $\pm$ 2]			[12 $\pm$ 2]									[11 $\pm$ 3]		
	78.1	124	121	107	17	12	12				30	25	26	11	14	13
		[117 $\pm$ 9]			[14 $\pm$ 3]						[27 $\pm$ 3]			[13 $\pm$ 2]		
	156	117	129	129	13	10	13	23	26	28	31	28	28	14	10	13
		[125 $\pm$ 7]			[12 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 3]			[29 $\pm$ 2]			[12 $\pm$ 2]		
	313	125	120	126	13	10	13	29	30	31	26	28	27	13	14	12
	[124 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 2]			[30 $\pm$ 1]			[27 $\pm$ 1]			[13 $\pm$ 1]			
625	123	109	111	15*	12*	13*	22	24	25	32	28	28	11*	13*	10*	
	[114 $\pm$ 8]			[13 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 2]			[29 $\pm$ 2]			[11 $\pm$ 2]			
1250	112*	114*	114*	9*	7*	8*	30	25	30	17*	22*	18*	12*	9*	12*	
	[113 $\pm$ 1]			[8 $\pm$ 1]			[28 $\pm$ 3]			[19 $\pm$ 3]			[11 $\pm$ 2]			
2500							19*	20*	21*	0*	0*	0*				
							[20 $\pm$ 1]			[0 $\pm$ 0]						
5000							0*	0*	0*	0*	0*	0*				
							[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]						
Positive control		759	776	742 <sup>a</sup>	286	290	252 <sup>b</sup>	602	609	623 <sup>c</sup>	362	368	383 <sup>d</sup>	140	148	150 <sup>b</sup>
		[759 $\pm$ 17]			[276 $\pm$ 21]			[611 $\pm$ 11]			[371 $\pm$ 11]			[146 $\pm$ 5]		

a) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b) 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
\*: Growth inhibition was observed

# トリメチルアミンの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

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of Trimethylamine on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

トリメチルアミンが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。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、短時間処理法-S9ならびに+S9処理とも591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (10 mM相当)を最高処理濃度とし、73.9~591  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4用量を設定した。S9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)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。-S9ならびに+S9処理とも148~591  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、S9 mix非存在下で染色体構造異常の出現頻度が疑陽性(±)となり、S9 mix存在下では高用量においてのみ陽性反応(+)が認められた。従って、再現性あるいは用量依存性をみるため、-S9ならびに+S9処理とも303~591  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4用量を用いて確認試験を実施した。いずれの試験系とも378~591  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量について染色体異常の観察を行った結果、S9 mix非存在下ならびに存在下とも試験用量に依存した染色体構造異常の増加が観察された。

本被験物質処理により培養液のpHがアルカリ性を示していたが、森田らの報告ならびに染色体構造異常の誘発頻度の程度を考慮すると陽性であると考えられた。すなわち、-S9処理ではpHの影響が無い用量で試験用量に依存した構造異常の誘発が認められていること、+S9処理ではpHの影響により構造異常の出現頻度が数%上昇したとしても処理群での構造異常出現頻度が40%以上であることから本被験物質による構造異常誘発は陽性であると判断した。

以上の結果より、本試験条件下ではトリメチルアミンは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

### 方法

#### 1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK KGaA)を10 vol%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞を

融解し3~5日ごとに継代したものを使用した。なお、細胞増殖抑制試験では継代数12、染色体異常試験では同14、確認試験では同21の細胞を用いた。

#### 2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(旭テクノグラス株)に、メンブランフィルター(0.45  $\mu\text{m}$ :Featuring Corning and Costar Products)を用いて加圧濾過除菌した非働化(56  $^{\circ}\text{C}$ , 30分)済み仔牛血清(GIBCO Life Technologies, Inc)を最終濃度で10 vol%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液を冷暗所(4  $^{\circ}\text{C}$ )に保存した。

#### 3. 培養条件

CO<sub>2</sub>インキュベーター(Formaおよび三洋電機メデイカシステム株)を用い、CO<sub>2</sub>濃度5%、37  $^{\circ}\text{C}$ の条件で細胞を培養した。

#### 4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製された。また、S9 mixの組成は松岡らの方法<sup>1)</sup>に従った。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.3 mL
MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADP	4 $\mu\text{mol}$
HEPES緩衝液(pH 7.2)	4 $\mu\text{mol}$
精製水	残量

#### 5. 被験物質

トリメチルアミン(ロット番号:MT381012)は純度30.8%(不純物としてジメチルアミン10 ppm以下を含む)の水溶液である。本剤は水に易溶で、水溶液中で安定である。三菱ガス化学(株)(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷暗所で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 6. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質を日本薬局方生理食塩液(株)大

塚製薬工場)を用いて希釈して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。なお、本被験物質情報から揮発性が疑われたため、調製には蓋付きの試験管を用いた。ただし、原液中での被験物質濃度が30.8%であることを考慮して調製した。

7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

細胞培養用フラスコに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。S9 mix非存在下(-S9 mix)あるいは存在下(+S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

細胞を10 vol%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業株)で固定した後、0.1 w/v%クリスタル・バイオレット(関東化学株)水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30 vol%エタノール, 1 vol%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、すなわち細胞生存率を算出した。

その結果、最高用量の591 μg/mLにおいても短時間処理法S9 mix非存在下で60%以上、S9 mix存在下で80%以上の細胞が生存していた(Fig. 1~2)。

なお、被験物質暴露終了時、290 μg/mL以上において培養液のpHがアルカリ性を示していた。

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに、染色体異常試験では短時間処理法-S9処理ならびに+S9処理とも591 μg/mL(10 mM相当)を最高処理濃度とし、以下公比2で減じた計4用量ならびに溶媒対照群を設定した。

-S9処理において染色体構造異常の出現に関し疑陽性、+S9処理において1用量のみ陽性と判定されたことから、いずれの試験系とも591 μg/mLを最高処理濃度とした確認試験を実施し、公比1.25で減じた計4用量を設定した。

なお、陽性対照として、-S9処理でマイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業株)を0.1 μg/mL、+S9処理でシクロホスファミド(CP:塩野義製薬株)を12.5 μg/mLの用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

培養面積25 cm<sup>2</sup>の細胞培養用フラスコを用い、細胞増殖抑制試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃度で0.2 μg/mLとなるようコルセミド(GIBCO Life Technologies, Inc)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mmol/L塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.2 vol%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各フラスコあたり100個、すなわち用量当たり200個

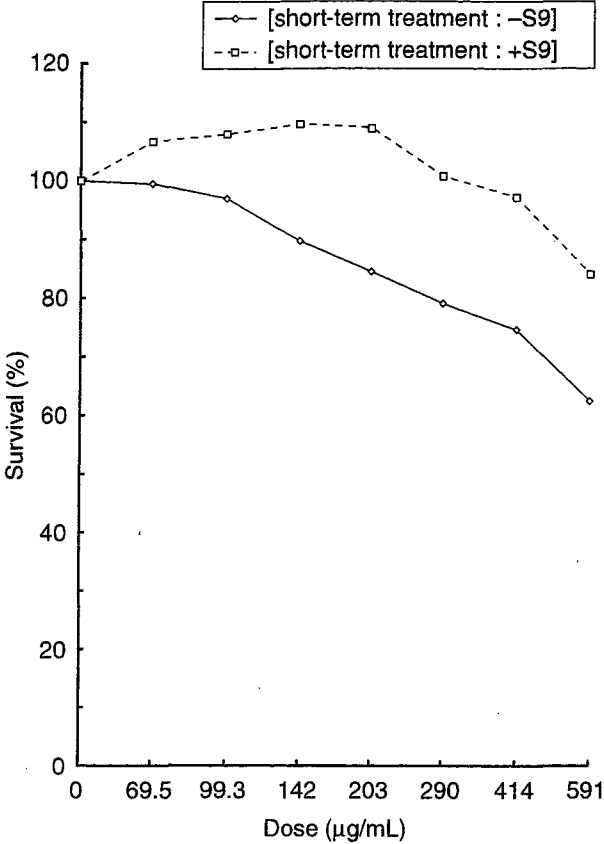


Fig. 1 Dose-survival curves of trimethylamine [short-term treatment : 6 hr]

の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)、染色体切断(csb)、染色分体交換(cte)、染色体交換(cse)およびその他(oth)の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会による分類法<sup>2)</sup>に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。

11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めない場合(-gap)について染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、石館ら<sup>3)</sup>の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とした。最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計的手法を用いた検定は実施しなかった。

また、分裂中期像の20%にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であるD<sub>20</sub>値を最小二乗法により算出し、一定濃度(mg/mL)あたりの交換型異常(cte)出現数を示す比較値であるTR値を、染色分体交換の出現頻度(%)を被験物質濃度(mg/mL換算)で割ることにより算出した。



## 結果および考察

短時間処理法での試験結果を Table 1~2 に示した。トリメチルアミン処理群の場合、S9 mix 非存在下においては染色体異常の僅かな誘発が認められ(出現頻度は 296  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 5.0%, 591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 7.0%), S9 mix 存在下においては高用量の 591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  においてのみ染色体構造異常の明確な誘発が観察された(出現頻度は 18.5%)。また、試験用量に依存した細胞増殖抑制作用がいずれの処理法においても観察された。なお、染色体異常の誘発は、疑陽性との判定あるいは 1 用量のみでの陽性反応であることから、再現性あるいは用量依存性をみるために確認試験を実施した。その結果、被験物質処理群の場合、S9 mix 非存在下ならびに存在下のいずれにおいても染色体構造異常の出現に明確な用量依存性が認められた (Table 3~4)。一方、S9 mix 非存在下における陽性対照物質 MMC で処理した細胞、および S9 mix 存在下における陽性対照物質 CP で処理した細胞では本試験、確認試験とも染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

本被験物質処理直後、培養液の pH は 591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  でおよそ 8.9~9.0 を示したが、暴露終了時では 8.2~8.6 であった。森田らの報告<sup>4,5)</sup>によると、今回の pH の変動では -S9 処理においては試験系に影響をおよぼさないこと、+S9 処理では極僅かに染色体構造異常を誘発することが示されている。-S9 処理では pH の影響が無い用量で試験用量に依存した構造異常の誘発が認められていること、+S9 処理では pH の影響により構造異常の出現頻度が数%上昇したとしても処理群での構造異常出現頻度が 40% 以上であることから本被験物質による構造異常誘発は陽性であると判断した。

変異原性の強さに関する相対的比較値である  $D_{20}$  値は 0.474 (mg/mL), TR 値は 67.7 と算出され、既知変異原性物質に比較してトリメチルアミンの変異原性は弱いことを示していた。

以上の試験結果から、本試験条件下においてトリメチルアミンのチャイニーズハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陽性と判定した。

なお、本被験物質の変異原性に関する報告はなかったが、類縁体である dimethylamine については Ames 試験で疑陽性<sup>6)</sup>、dimethylamine hydrochloride では染色体異常試験で陰性<sup>7)</sup>、methylamine ではマウスリンフォーマ試験で陽性<sup>8)</sup>との報告があった。

## 文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat. Res.*, **66**, 277 (1979).
- 2) 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.31-35.
- 3) 石館基監修, “<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, pp.19-24.

- 4) T. Morita, Y. Watanabe, K. Takeda and K. Okumura, *Mutat. Res.*, **225**, 55 (1989).
- 5) T. Morita, T. Nagaki, I. Fukuda and K. Okumura, *Mutat. Res.*, **262**, 159 (1991).
- 6) N. R. Green and J. R. Savage, *Mutat. Res.*, **57**, 115 (1978).
- 7) I. Motoi Jr. and O. Shigeyoshi, *Mutat. Res.*, **48**, 337 (1977).
- 8) J. C. William and M. Briann, *Mutat. Res.*, **174** (4), 285 (1986).

## 連絡先

試験責任者: 中嶋 圓  
 試験担当者: 益森勝志, 北澤倫世, 菊池正憲,  
 植田ゆみ子, 熊平智司, 鈴木ゆみ子,  
 加藤木かな江, 梶原玲子  
 (財)食品農医薬品安全性評価センター  
 〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田 582-2  
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

## Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)  
 Shoji Masumori, Michiyo Kitazawa,  
 Masanori Kikuchi, Yumiko Ueta,  
 Satoshi Kumadaira, Yumiko Suzuki,  
 Kanae Katogi, Reiko Kajihara  
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
 Pesticides (An-pyo Center)  
 582-2 Shiohinden, Fukude-cho, Iwata-gun,  
 Shizuoka, 437-1213, Japan  
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with trimethylamine [short-term treatment: -S9 mix]

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline <sup>a</sup>	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0) -	1(0.5) -	-
Test substance	148	6	103.1	200	0	0	1	0	0	0	1(0.5) -	6(3.0) -	-
	296	6	83.2	200	3	5	6	0	0	0	10(5.0)±	4(2.0) -	±
	591	6	61.1	200	3	4	11	0	0	0	14(7.0)±	3(1.5) -	±
MMC <sup>b</sup>	0.1	6	79.6	200	13	34	90	0	1	0	103(51.5)+	0(0.0) -	+

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth: others, -gap:total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (mitomycin C)

Table 2 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with trimethylamine [short-term treatment: +S9 mix]

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline <sup>a</sup>	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0) -	0(0.0) -	-
Test substance	148	6	72.6	200	1	0	1	0	0	0	1(0.5) -	3(1.5) -	-
	296	6	66.5	200	3	1	2	0	0	0	2(1.0) -	3(1.5) -	-
	591	6	37.8	200	7	10	30	0	0	0	37(18.5)+	3(1.5) -	+
CP <sup>b</sup>	12.5	6	61.8	200	3	44	142	0	1	0	146(73.0)+	2(1.0) -	+

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth: others, -gap:total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (cyclophosphamide)

Table 3 Results of the confirmative examination of trimethylamine  
[short-term treatment: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline <sup>a</sup>	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0) -	1(0.5) -	-
Test substance	378	6	42.2	200	3	7	17	0	0	0	18(9.0) ±	5(2.5) -	±
	473	6	23.0	200	5	15	41	0	0	0	45(22.5)+	7(3.5) -	+
	591	6	6.4	200	4	14	35	0	0	0	45(22.5)+	8(4.0) -	+
MMC <sup>b</sup>	0.1	6	58.9	200	6	35	69	0	0	0	80(40.0)+	3(1.5) -	+

Abbreviations; ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others,  
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (mitomycin C)

Table 4 Results of the confirmative examination of trimethylamine  
[short-term treatment: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline <sup>a</sup>	0	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0(0.0) -	3(1.5) -	-
Test substance	378	6	52.4	200	1	1	4	0	0	0	4(2.0) -	4(2.0) -	-
	473	6	42.1	200	0	2	9	0	0	0	11(5.5) ±	8(4.0) -	±
	591	6	16.7	200	7	29	80	0	1	0	90(45.0)+	3(1.5) -	+
CP <sup>b</sup>	12.5	6	53.9	200	11	34	121	0	0	0	126(63.0)+	2(1.0) -	+

Abbreviations; ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others,  
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (cyclophosphamide)

# トリメチルアミンのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

## Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of Trimethylamine by Oral Administration in Rats

### 要約

トリメチルアミンは、砂糖大根から砂糖、ベタインを抽出した残余中から主として抽出される化合物である<sup>1)</sup>。その複合体は植物、動物、特に魚の組織中に大量に存在し、ヒトおよび動物では腸内酵素によって生成され、通常、肝臓において代謝を受け、ジメチルアミンあるいはトリメチルアミノキシドになって尿中に排出される<sup>2)</sup>。ヒトでは、この代謝酵素(トリメチルアミノキシダーゼ)の先天性欠損症が知られており、その特徴的な臭気から魚臭病と呼ばれている<sup>3)</sup>。

1984年、インドのボパールで起きた殺虫剤製造工場での事故によって、大気中に大量のメチルイソシアニドが放出されたために、多数の死者が発生し、その後もこの地方で不妊、流産、死産、早産の発現率が増加した事例は、近年における最大の環境汚染事故として有名である<sup>4)</sup>。後年行われた動物実験の結果から、メチルイソシアニドには発癌性および生殖毒性があることが報告されている<sup>5)</sup>。本試験の被験物質であるトリメチルアミンはメチルイソシアニドの主要代謝物であるが<sup>6)</sup>、妊娠マウスにトリメチルアミンを投与すると胎児期および出生後の発育抑制が特に雄で強く認められたとする報告もある<sup>7)</sup>。しかし、トリメチルアミンの反復投与毒性および生殖発生毒性についての報告はない。今回、トリメチルアミンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。すなわち、Sprague-Dawley系(Crj:CD(SD)IGS)ラットの雌雄(各13匹/群)に、トリメチルアミンの0(媒体)、8, 40および200 mg/kgを交配前2週間ならびに交配期間2週間を通して経口投与し、さらに雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育4日まで投与を継続した。試験結果は以下のように要約される。

#### 1. 反復投与毒性

200 mg/kg投与群において雄に2例、雌に1例の死亡が認められた。雌雄ともに200 mg/kg投与群では異常呼吸音および投与直後の流涎、胃腸管に潰瘍および炎症性変化、粘膜上皮の過形成や粘膜下織の水腫がみられた。また、同群の雄では体重の増加抑制傾向、摂餌量の減少ならびに総蛋白濃度およびアルブミン濃度の減少が認められた。

雌の体重および摂餌量、雌雄の器官重量、尿検査結果および血液学検査結果にはトリメチルアミン投与の影響

はなかった。

#### 2. 生殖発生毒性

性周期、雌雄動物の交尾率、受胎率には、トリメチルアミン投与の影響は認められなかった。また、分娩および哺育状態の異常は観察されず、産児数、分娩率、妊娠期間、妊娠黄体数、着床数ならびに着床率にはトリメチルアミン投与の影響はなかった。

生児出生率、出産生児数、哺育4日の生児数、新生児の4日の生存率、性比、生児の体重および形態にもトリメチルアミン投与の影響は認められなかった。

#### 3. 無作用量

以上の試験成績から、本試験条件下ではトリメチルアミンの反復投与毒性に関する無作用量は雌雄とも40/kg/day、生殖発生毒性的な無作用量は雌雄共に200 mg/kg/day、また、産児に対する無作用量も200/kg/dayであると判断される。

### 方法

#### 1. 被験物質

本試験には、三菱ガス化学(株)(新潟)より提供されたトリメチルアミンの水溶液(ロット番号:M381012、含有量:30.8%)を用いた。トリメチルアミンの水溶液は無色透明で、不純物として10 ppm以下のジメチルアミンを含有していた。受領したトリメチルアミンは、入手後、使用時まで冷蔵保管した。被験物質の試験期間中の安定性は、残余被験物質を提供元で再分析することにより確認した。

投与にあたっては、供給された30.8%水溶液を日局注射用水(光製薬(株)、製造番号:9707SA)にて希釈し、いずれの用量においても1回の投与液量が10 mL/kg体重になるように濃度を調整した。試験中に調製した投与検体(0.08, 0.40, 2.00 w/v%)には所定濃度のトリメチルアミンが含有されていたことを確認した。なお、調製検体中の被験物質の安定性について確認した結果、0.08~10 w/v%の濃度では、冷蔵、遮光の条件下で少なくとも8日間安定であった。

#### 2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも7週齢にて購入した日本チャールス・リバー(株)筑波飼育センター生産のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS, SPF)を使用した。購入した

動物は、入荷後2週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、雄は検疫終了日の体重を基に、雌は規則的に4日あるいは5日で性周期を回帰している動物を選択し、さらに検疫終了日の体重を考慮して、体重別層化無作為抽出法により群分けして、各群とも雌雄各13匹を配した。

各動物は基準温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、基準湿度50~65%、換気回数約15回/時ならびに照明12時間(午前7時~午後7時)に制御された飼育室で、金属製金網床ケージに個別に収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア(株))および水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させた。妊娠14日(交尾確認日=妊娠0日)以後の雌動物については、プラスチック製ラット用繁殖ケージに収容し、床敷として紙パルプ製チップ(ALPHA-dri、加商(株))を適宜供給した。

### 3. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は、投与量設定のために実施した予備試験の結果を参考に設定し、予備試験の投与量は、急性経口投与毒性予備試験の結果をもとに設定した。急性経口投与毒性予備試験では、250、500ならびに1000 mg/kgのトリメチルアミンを各群雌雄各3匹のラットに投与した結果、500 mg/kg投与群では雄で1例、雌で2例、1000 mg/kg投与群では雄で2例、雌で3例の死亡が認められた。250 mg/kg以上の投与群の生存例においても体重の増加抑制がみられた。また、一般状態の変化として、500 mg/kg以上の投与群で異常姿勢、体温の低下、鎮静等の所見が認められた。死亡例の剖検所見においては腹水、胃粘膜の肥厚および赤色化、腸管の赤色化ならびに腎臓の皮質の淡色化等がみられた。トリメチルアミンの水溶液は強アルカリ性で皮膚への腐食性を有することから、急性経口投与毒性予備試験において認められた消化管の変化や腹水は、トリメチルアミン水溶液の物性による影響と考えられた。250 mg/kgの単回投与では体重の増加抑制のみが観察され、一般状態の変化、消化管への影響は明確ではなかったが、反復投与することにより、一般状態の著しい変化、消化管の毒性が重篤になる可能性が予想されたことから、反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合予備試験の高用量を急性経口投与毒性予備試験の低用量の約2分の1量である100 mg/kgと設定した。中用量以下は公比を2としてそれぞれ50ならびに25 mg/kgに設定して、14日間反復強制経口投与し、溶媒を同容量投与した対照群の動物と比較した。その結果、雌雄とも死亡例はなく、一般状態の変化、体重および摂餌量の推移、血液学検査および血液生化学検査結果のいずれにも明らかなトリメチルアミン投与の影響はなかった。これらのことから、トリメチルアミンの100 mg/kgの14日間の反復投与では、雌雄とも明確な毒性を見出すことができず、42日間の反復投与毒性試験の高用量としては低すぎる用量であると判断した。一方、トリメチルアミンの250 mg/kgの投与量は単回投与における死亡発現量の半分であり、42日間の反復投与によって投与期間中に動物が死亡する可能性が示唆された。以上の結果から、本試験の高用量を200 mg/kgと設定し、以下公比5で除して40および8 mg/kgを中および低用量

と設定した。

なお、対照群には注射用水をトリメチルアミン投与群と同一条件にて投与した。

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前2週間と2週間の交配期間および交配期間終了後、剖検日前日まで2週間の連続42日間、また、雌に対しては交配前2週間と交尾が認められるまで最長2週間の交配期間、ならびに交尾した雌では妊娠期間を通して分娩の後、哺育4日(分娩日=哺育0日)まで、交尾はしたが分娩しなかった雌は妊娠24日相当日まで、交尾しなかった雌は連続54日間、毎日1回、ラット用胃管を用いて経口投与した。毎日の投与は午前11時から午後3時の間に行い、各動物に投与する液量(体重1 kg当たり10 mL)は最新時の体重を基に算出した。

### 4. 観察および検査

#### 1) 親動物

##### A. 一般状態の観察

雌雄とも全例について、飼育期間中毎日1回以上、投与期間中は投与前後の毎日2回以上観察した。

##### B. 体重測定

雄は全例について、投与1(投与初日)、7、14、21、28、35、42日および解剖日に、雌は全例について、投与1、7および14日に測定し、交配までに期間を要した雌では投与21および28日に、交尾が確認されなかった雌ではさらに投与35ならびに42日にも体重を測定した。また、交尾した雌では妊娠0、7、14および20日に、分娩した雌では哺育0、4日および解剖日に体重を測定した。交尾は確認されたが分娩しなかった雌は、妊娠25日相当日(解剖日)に体重を測定した。

##### C. 摂餌量測定

雄では、投与1、7、13、29、35および41日に、雌では、投与1、7および13日にそれぞれ摂餌量を測定し、翌日までの摂餌量を測定した。2週間の交配期間中の摂餌量は測定しなかった。交尾が確認されなかった雌では投与29、35および41日にも摂餌量を測定した。さらに交尾した雌では、妊娠0、7、14および20日に、分娩した雌では、哺育0および3日にそれぞれ翌日までの摂餌量を測定した。

##### D. 性周期

全例の雌について、交尾が確認されるまで膣垢塗抹標本を作製した。膣垢像より性周期を観察し、発情期の間の平均日数を算出した。

##### E. 交配

交配は投与15日の夕方から最長2週間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。200 mg/kg投与群の1組では、交配期間中の交尾確認前に雄が死亡したため(交配10日目に死亡)、同群内の既に交尾した雄動物と引き続き交配させた。

交尾の確認は毎朝、膣栓および膣垢標本中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配の結果から、各群について交尾率((交尾動物数

/同居動物数)×100), 受胎率((受胎動物数/交尾動物数)×100), 同居開始から交尾までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

#### F. 分娩および哺育状態の観察

交尾を確認した雌は全例を自然分娩させた。分娩状態が直接観察できた動物についてはその状態を観察し、直接観察できなかった動物についても、分娩後の徴候から分娩困難や遅延などの分娩障害の有無を判断して記録した。分娩後は哺育状態を毎日観察した。

分娩の確認は午前9時~11時に実施し、この時間帯に分娩が終了していることを確認した動物については、その日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎてから分娩を終了した動物については、翌日を分娩日とした。

分娩を確認した全例について妊娠期間(妊娠0日から分娩日までの日数)を算定し、出産率((生児出産雌数/受胎動物数)×100)を各群について求めた。

#### G. 尿検査

各投与群の雌雄各5例について、投与6週に動物を代謝ケージに収容し約4時間尿あるいは新鮮尿を採取して、pH, 潜血, 蛋白, 糖, ウロビリノーゲン, ケトン体, ビリルビンを試験紙法(クリニテック200+, バイエル・三共(株))により、色調ならびに混濁度を視診により、それぞれ検査した。

#### H. 血液学検査

雄全例は投与42日の翌日に、分娩した雌は哺育4日の翌日に、交尾をしたが分娩しなかった雌は妊娠25日相当日に、交尾しなかった雌は投与54日の翌日に、それぞれ前日より18から24時間絶食させた後、剖検に先立ち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採血し、以下の測定を行った。先ずクエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血し血漿を分離して、プロトロンビン時間, 活性部分トロンボプラスチン時間(光散乱検出法, CA-1000, 東亜医用電子(株))を測定した。続いて、EDTA-2Kを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コールターエレクトロニクス(株))により、赤血球数, 白血球数, 平均赤血球容積, 血小板数(以上, 電気抵抗法)および血色素量(吸光度法)を測定し、これらを基に平均赤血球血色素量, ヘマトクリット値および平均赤血球血色素濃度を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)を視算した。なお、対照群ならびに高用量群については、網状赤血球比率を測定した。

#### I. 血液生化学検査

血液学検査用の採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロシユ・ダイアグノスティックス(株))を用いて総蛋白濃度(ビウレット法), アルブミン濃度(BCG法), 総コレステロール濃度(COD・DAOS法), トリグリセライド濃度(GPO・DAOS法), ブドウ糖濃度(グルコキナーゼG6PDH法), 尿素窒素濃度(ウレアーゼGLDH法), クレアチニン濃度(Jaffé法), アルカリフォスファターゼ活性(GSCC法), GOTおよびGPT活性(IFCC法), 総ビリルビン濃度(Jendrassik/Grof法), カ

ルシウム濃度(OCPC法), 無機リン濃度(モリブデン酸直接法),  $\gamma$ -GTP活性( $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)を測定し、A/G比を算出した。また、全自動電解質分析装置(EA05, (株)A&T)により、塩素, ナトリウムおよびカリウムの各濃度(イオン電極法)を測定した。

#### J. 病理学検査

採血後、全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行った。その際、脳, 心臓, 胸腺, 肝臓, 腎臓, 脾臓および副腎, 雄ではさらに精巣および精巣上体の重量を測定し、併せて比体重値(相対重量)を算出した。雌では卵巣および子宮を摘出し、卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を、子宮は着床数をそれぞれ数え、着床率((着床数/妊娠黄体数)×100)を算出した。全例の脳, 下垂体, 脊髄, 消化管, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓, 心臓, 胸腺, 甲状腺, 気管, 肺, 膀胱, 腸間膜リンパ節, 下顎リンパ節, 坐骨神経, 大腿骨髄および全ての雄動物の精囊ならびに前立腺腹葉, 全ての雌動物の腔, 卵巣ならびに子宮は0.1 Mリン酸緩衝10 vol%ホルマリン液(pH 7.2)に固定した。肺は注入固定を行った。全ての雄動物の精巣および精巣上体はブアン液に固定して保存し、その後、長期保存のために0.1 Mリン酸緩衝10 vol%ホルマリン液に置換した。対照群および高用量群の雌雄各5例の固定した器官は、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って、病理組織学検査を実施した。なお、精巣および精巣上体, 卵巣ならびに病理学検査の結果、異常が認められた胃については、全例の動物について病理組織学検査を実施した。

#### 2) 出生児

##### A. 産児数の算定

哺育0日に産児数(生児+死亡児)を調べ、分娩率((産児数/着床痕数)×100)および生児出産率((出产生児数/着床痕数)×100)を求めた。産児については、外表奇形の有無および性別を調べ、性比((雄の生児数/雌の生児数)×100)を算出した。

##### B. 死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ、出生率((出产生児数/産児数)×100)および新生児の4日の生存率((哺育4日の生児数/哺育0日の生児数)×100)を求めた。死亡児は剖検し、異常の有無および内部器官の肉眼的観察を行った。

##### C. 体重測定

哺育0日および4日に個別に体重を測定した。

##### D. 剖検

哺育4日に全例をエーテル吸入により致死させて剖検し、外表および内部器官の肉眼的観察を実施した。

#### 5. 統計解析

交尾率ならびに受胎率についてはFisherの直接確率検定を行った。病理組織学検査所見のうち、グレード分けしたデータはMann-WhitneyのU検定により、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対照群との間で有意差検定を行った。その他の体重, 摂

餌量ならびに定期解剖例の血液学、血液生化学検査の値および器官重量は、個体ごとに得られた値あるいはliterごとの平均値を1標本として、Dunnett法による多重比較検定を行った。有意水準はいずれも5%とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 一般状態

200 mg/kg投与群においては、雄で投与25日ならびに投与42日に各1例、雌で妊娠22日(投与38日)に1例の死亡が認められた。

投与25日に死亡した雄は、投与19日から流涎、削瘦、異常呼吸音、呼吸困難を示し、死亡前日から外陰部周囲の被毛の汚染、軟便が認められた。投与42日に死亡した雄は、投与10日から非連続的ではあったが、流涎、削瘦、異常呼吸音、呼吸困難、体温の低下、耳介蒼白、ふらつき歩行および鼻周囲褐色汚染が認められた。雌の死亡例では投与11日から、非連続的に流涎、異常呼吸音が観察された。

生存動物では、200 mg/kg投与群の雄において、投与9日以降流涎が10例に、異常呼吸音が3例に、接触反応の減弱が1例に、それぞれ観察され、同群の雌においても投与9日以降、流涎が10例に、異常呼吸音が3例に、削瘦が1例に、それぞれ観察された。40 mg/kg以下の投与群では、雌雄ともに一般状態の異常は観察されなかった。

#### 2) 体重(Table 1, 2)

雄では、200 mg/kg投与群において体重には有意差は認められなかったが、累積体重増加量は対照群と比較して小さく体重の増加抑制傾向が認められた。40 mg/kg以下の投与群の体重は、対照群と同様に推移した。

雌では、体重推移に対照群とトリメチルアミン各投与群との間で有意差は認められなかった。

#### 3) 摂餌量(Table 3, 4)

200 mg/kg投与群の雄の摂餌量は、投与13および41日に有意に減少した。一方、雌の摂餌量には、対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 4) 尿検査

尿検査の結果、雌雄ともいずれの検査項目についても、トリメチルアミンの投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

#### 5) 血液学検査(Table 5, 6)

雄では40 mg/kg以上の投与群において、平均赤血球血色素濃度の有意な増加がみられたが、他の赤血球関連の測定項目には差が認められず、病理組織学検査においても骨髓、脾臓等に血液学検査にみられた変化に関連すると考えられる変化は認められなかったことから、偶発

的な有意差であると判断した。さらに、40 mg/kg投与群では血小板数の有意な減少がみられたが、200 mg/kg投与群には認められないことから偶発的な有意差であると判断した。雌では、いずれの検査項目についてもトリメチルアミン投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

#### 6) 血液生化学検査(Table 7, 8)

雄の200 mg/kg投与群においては総蛋白濃度およびアルブミン濃度の有意な減少ならびに尿素窒素濃度およびクレアチニン濃度の有意な増加が認められた。

雌では、40 mg/kg以上の投与群において尿素窒素濃度の有意な増加が認められた。

#### 7) 病理学検査

##### A. 雄

##### イ. 肉眼所見

200 mg/kg投与群の7例の前胃粘膜に肥厚がみられ、そのうち3例には陥凹部、1例には硬化部も認められた。さらに、投与期間中に死亡した2例を含む3例の腺胃粘膜に赤色あるいは暗赤色の領域がみられ、死亡した動物の1例には前胃粘膜にも赤色域が認められた。また、死亡した2例の胃および腸管にはガスが貯留しており、十二指腸および空腸粘膜の赤色化あるいは空腸および回腸に赤色調の内容物が観察された。

精巣および精巣上体では200 mg/kg投与群で死亡したうちの1例、40 mg/kg投与群の1例に小型化が認められ、このうち200 mg/kg投与群の1例には前立腺および精囊の小型化もみられた。また、死亡した2例では胸腺および脾臓も小型化を呈していたほか、そのうちの1例は脾臓の淡色化、腸間膜リンパ節の小型化ならびに副腎の暗色化および腫大が認められ、他の1例では肺の暗色化がみられた。その他、対照群の精巣上体に結節、下顎リンパ節に暗赤色化がみられた。

##### ロ. 器官重量(Table 9)

雄の器官重量には、対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。

##### ハ. 病理組織学検査(Table 10)

精巣では200 mg/kg投与群の投与期間終了時に屠殺した1例の精細管で伸長した精子細胞の変性が、投与期間中に死亡した2例のうち1例の精細管で精母細胞および円形の精子細胞の変性が認められた。これらの例の精巣上体では管腔内に細胞残屑がみられたほか、精子細胞の変性がみられた例では変性した精子が、精母細胞に変化がみられた例では精子数の減少がそれぞれ観察された。また、トリメチルアミン各投与群では萎縮した精細管がみられ、他の例と比較して程度の強い例では精細管内に多核巨細胞ならびに精巣上体に細胞残屑が観察されたが、対照群とトリメチルアミン各投与群の間で発現頻度および程度には明らかな差は認められなかった。その他、精巣上体では対照群で精子肉芽腫、40 mg/kg投与群の間質でリンパ球の浸潤がそれぞれみられた。

前立腺および精囊では、200 mg/kg投与群で投与期間

中に死亡した例のうち精巢に変化がみられた1例で萎縮が認められた。また、200 mg/kg投与群および対照群の間質にリンパ球浸潤がみられ、他の例と比較して程度の強い例では上皮に好中球およびリンパ球の浸潤も観察されたが、両群間で発現頻度および程度に明らかな差は認められなかった。

胃では200 mg/kg投与群の全例の前胃に扁平上皮の過形成が認められ、粘膜では炎症細胞の浸潤、粘膜下織では水腫および肉芽を伴っていた。また、5例の粘膜に糜爛がみられそのうちの2例では潰瘍、1例では出血が認められたほか、漿膜に肉芽がみられる例もあった。さらに、前胃の糜爛および潰瘍の程度が他の例に比べ比較的強かった1例の腺胃では、粘膜に糜爛、出血および炎症細胞の浸潤が、粘膜下織に水腫が認められた。投与期間中に死亡した2例では前胃に扁平上皮の過形成が観察されたほか、1例の十二指腸および空腸の粘膜上皮にうっ血、盲腸の粘膜下織に好中球の浸潤を伴う水腫がみられたが、他の異常所見は認められなかった。

肝臓では、200 mg/kg投与群で投与期間中に死亡した例のうち、1例に限局性の壊死が観察された。また、200 mg/kg投与群および対照群に門脈周囲性の脂肪化がみられたが、両群間の発現頻度および程度に差は認められなかった。

脾臓では200 mg/kg投与群で投与期間中に死亡した例のうち、1例に萎縮が観察された。また、200 mg/kg投与群および対照群のほとんどの例に髓外造血および褐色色素の沈着がみられたが、両群間の発現頻度および程度に差は認められなかった。

また、200 mg/kg投与群および対照群では腎臓の皮質に好塩基性尿細管、髓質に鉍質沈着が、心臓の心筋に変性/線維化が、肺に泡沫細胞の集簇がみられたが、両群間の発現頻度および程度に差は認められなかった。

その他、対照群の甲状腺で異所性の胸腺組織、死亡した例の肺で限局性の出血がみられたが、他の観察器官に異常は認められなかった。

## B. 雌

### イ. 肉眼所見

200 mg/kg投与群の7例の前胃粘膜に肥厚がみられ、そのうち5例は陥凹部、4例は水腫を伴っていた。また、40および8 mg/kg投与群の各1例の腺胃粘膜に暗色あるいは黒色の点がみられた。投与期間中死亡した1例の胃および腸管ではガスが貯留していたほか、胸腺の小型化および肺の暗色化が認められた。その他、200、40 mg/kg投与群および対照群の胸腺にも小型化が認められたほか、200 mg/kg投与群には腎臓の淡色域が、対照群では肝臓に白色点あるいは子宮内腔の拡張がみられた。

### ロ. 器官重量 (Table 9)

雌の器官重量には、対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。

### ハ. 病理組織学検査 (Table 10)

子宮では200 mg/kg投与群および対照群の不妊動物各1例に内腔の拡張がみられ、そのうち対照群の例は200

mg/kg投与群の例と比較して程度が強く、腔上皮に好中球の浸潤を伴っており、腔には角化上皮が観察された。一方、200 mg/kg投与群の不妊例の腔には粘液分泌上皮および角化上皮がみられた。その他、妊娠中に死亡した例の腔には粘液分泌上皮が観察された。卵巣には異常は認められなかった。

胃では200 mg/kg投与群の11例の前胃に扁平上皮の過形成がみられ、そのうち妊娠中に死亡した例を含む8例の粘膜に糜爛あるいは潰瘍、炎症細胞の浸潤が認められたほか、7例の粘膜下織に水腫や肉芽がみられた。また、潰瘍の程度が他の例と比較して強い3例の粘膜では出血がみられ、そのうち2例では漿膜にも肉芽が認められた。対照群の2例の前胃粘膜でも、潰瘍あるいは糜爛、炎症細胞の浸潤を伴う扁平上皮の過形成が観察され、そのうち1例の粘膜下織には水腫および肉芽もみられた。一方、妊娠中に死亡した例では、腺胃粘膜に糜爛、潰瘍ならびに出血が認められた。その他、対照群の1例の腺胃粘膜にも糜爛がみられたほか、200 mg/kg投与群の盲腸の漿膜に肉芽が、対照群の直腸の粘膜下織に水腫がみられた。

肝臓では200 mg/kg投与群で妊娠中に死亡した1例に限局性の壊死が認められた。また、200 mg/kg投与群および対照群に門脈周囲性の脂肪化がみられたが、両群間の発現頻度および程度に明らかな差は認められなかった。

脾臓では、200 mg/kg投与群で妊娠中に死亡した1例に萎縮が認められたほか、200 mg/kg投与群および対照群のほとんどの例で髓外造血や褐色色素の沈着がみられたが、両群間の発現頻度および程度に差は認められなかった。

その他、腎臓では皮質に好塩基性尿細管、近位尿細管の空胞変性、間質にリンパ球浸潤がみられ、心臓では心筋の変性/線維化が、肺では血管に鉍質沈着が、甲状腺では異所性の胸腺組織が認められた。他の観察器官に異常は認められなかった。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 親動物

#### A. 性周期 (Table 11)

性周期の観察結果にトリメチルアミン投与の影響は認められなかった。

#### B. 交配成績 (Table 11)

対照群ならびに40 mg/kg投与群の各1組では、2週間の交配期間中に交尾しなかった。また、交尾はしたが不妊であった動物が、対照群に1組、200 mg/kg投与群に1組認められた。しかし、交尾率、受胎率、同居から交尾までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数には、対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。

#### C. 分娩および哺育状態

40 mg/kg投与群の1例では分娩日に産児の回集が認められず、産児の体表温も低下していたが、翌日には回復していた。その他の動物には、分娩および哺育状態の異



常は観察されなかった。200 mg/kg投与群の哺育状態は全て良好であったことから、40 mg/kg投与群の1例にみられた哺育状態の不良はトリメチルアミン投与の影響ではないと考えられた。

#### D. 出産率および妊娠期間 (Table 12)

40 mg/kg投与群の1例が妊娠25日に出産したが、他の動物は妊娠22～23日に出産した。妊娠期間が24日を超える例は、まれではあるものの今回の試験に使用した系統においても自然発生的に認められる所見であること、ならびに高用量群では全例が妊娠22～23日に出産したことから、この1例の変化はトリメチルアミン投与の影響ではない可能性が高いと判断した。出産率および妊娠期間には対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。

#### E. 妊娠黄体数、着床数および着床率 (Table 12)

200 mg/kg投与群で妊娠22日に死亡した1例を含め、妊娠黄体数、着床数および着床率には、対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。

### 2) 出生児

#### A. 生存性 (Table 12)

分娩率、生児出産率、出生率、新生児の4日の生存率、出産生児数、哺育4日の生児数および性比には、対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。死亡児は、対照群で5例、40 mg/kg投与群で7例、200 mg/kg投与群で3例みられたが、死亡時期および死亡児数に特定の傾向は認められなかった。

#### B. 体重 (Table 12)

いずれの投与群も雌雄ともに、対照群と同様な体重推移を示した。

#### C. 形態

いずれの出生児にも外表奇形は認められず、哺育4日の剖検においても内部器官に異常は認められなかった。また、死亡児の剖検でも異常は観察されなかった。

### 考察

200 mg/kg投与群の雄で2例、雌で1例の死亡がみられた。これらの動物の生前の一般状態の変化として投与後の流涎、異常呼吸音がみられ、さらに雄では、削瘦、呼吸困難、肛門周囲の汚れ、軟便等といった一般状態の悪化を伴った。また剖検の結果、雌雄いずれも胃および腸管にはガスが貯留し、胃粘膜上皮の過形成および炎症像がみられた。トリメチルアミンの単回経口投与毒性試験でも200 mg/kg以上の投与群で、同様な一般状態の変化および剖検所見を伴った死亡が認められている。これらの動物の死因は明らかではないが、次の様な要因が働いた可能性が考えられる。まず、トリメチルアミンが腐食性をもつ強塩基性刺激物質であることから、経口投与により胃粘膜および腸管粘膜を強度に障害し全身状態が悪化していた可能性は高い。本試験の剖検の結果、200 mg/kg投与群の雌雄に前胃粘膜の暗色化および肥厚等の病変が観察され、病理組織学検査の結果、前胃および

腺胃の潰瘍、糜爛、炎症、肉芽が観察された。また、同様の変化は、胃と比較して頻度、程度ともに軽度であったが盲腸にもみられている。一方、トリメチルアミンはニコチン性アセチルコリン受容体のアゴニストであることが明らかになっていることから<sup>9)</sup>、呼吸循環器に対しニコチン類似の交感神経興奮作用を呈し、さらに興奮が進行して神経筋接合部の脱分極性遮断作用が死因となった可能性も考えられる。

生存動物においては200 mg/kg投与群で、投与後の一過性の流涎ならびに異常呼吸音が観察され、同群の雄では体重増加の抑制傾向がみられた。トリメチルアミンの単回経口投与毒性試験では200 mg/kgの投与により体重の増加抑制が認められ、125 mg/kg投与群では異常呼吸音が、350 mg/kg投与群では流涎がみられていることから、本試験で認められた雄の体重増加抑制傾向および異常呼吸音等の一般状態の変化はトリメチルアミン投与の影響によるものと考えられた。

本試験では病理組織学検査の結果、胃の潰瘍、炎症、肉芽組織の増殖を伴った前胃粘膜上皮の過形成が観察された。トリメチルアミンの水溶液には局所刺激性があることが知られており、前胃粘膜が刺激性物質により増殖性変化を起こすことから<sup>9)</sup>、消化管にみられた増殖性病変はトリメチルアミン水溶液の刺激に基づく変化と考えられる。

トリメチルアミンは主に肝臓で代謝を受け、ジメチルアミンやトリメチルアミンオキシドとして腎臓から排出される<sup>2)</sup>。腎臓障害時には、トリメチルアミンを含む脂肪族化合物の血中濃度が増加するとの報告がみられ<sup>2)</sup>、トリメチルアミンの代謝、排泄経路である肝臓や腎臓においては影響が発現する可能性が考えられる。本試験においては、尿素窒素濃度の増加が雌では40 mg/kg以上の投与群、雄では200 mg/kg投与群で認められ、200 mg/kg投与群の雄ではクレアチニン濃度の増加がみられた。しかし、これらの測定値は当研究所の背景データから逸脱する値ではない事から、今回の試験で認められた有意差は偶発的なものである可能性が高いと判断した。また、尿検査、器官重量ならびに病理組織学検査結果のいずれにも、腎臓の異常ならびに腎臓以外に血中尿素窒素濃度を変化させる可能性が考えられる広範囲の組織崩壊あるいは肝臓における合成過剰等を示唆する所見は認められなかったことから、トリメチルアミンの投与に基づく腎障害は確認されないものと判断した。

以上の結果から、200 mg/kgのトリメチルアミンの反復投与により動物が死亡したこと、雄では体重の増加抑制傾向および摂餌量の減少がみられ、雌雄ともに胃腸管粘膜の著しい病理学変化が認められたことから、雌雄動物の一般毒性学的な無作用量は40 mg/kg/dayと推定された。

病理学検査の結果、生殖関連器官にトリメチルアミン投与によると考えられる異常は認められず、性周期観察の結果にも影響はみられなかった。また、雌雄動物の交尾率、受胎率、母動物の出産率、妊娠期間、哺育状態、妊娠黄体数、着床数および着床率ならびに産児の生存性、

性比, 体重および形態にトリメチルアミン投与の影響は認められなかった。以上のことから, 生殖発生毒性的な無作用量は雌雄ともに200 mg/kg/day, 産児に対する無作用量も200 mg/kg/dayと考えられた。前述の通り, トリメチルアミンはメチルイソシアニドの主要代謝物であり, メチルイソシアニドは生殖毒性を有することが明らかとなっているが, トリメチルアミンにはその作用は認められなかった。

以上の結果から, 本試験条件下ではトリメチルアミンの一般毒性的変化に関する無作用量は40 mg/kg/day, また, 生殖発生毒性的な変化は認められなかった事から無作用量は雌雄ともに200 mg/kg/day, 産児に対する無作用量も200 mg/kg/dayであると推察される。

#### 文献

- 1) "The Merck Index," 12th. edition., eds. by S. Budavari, et al., Merck & Co. Inc., Rahway, 1996, p.1527.
- 2) S. Lowis, M. A. Eastwood and W. G. Brydon, *British Journal of Nutrition*, **54**, 43(1985).
- 3) J. R. Humbert, K. B. Hammond and W. E. Hathaway, *Lancet*, **2**, 770(1970).
- 4) D. R. Varma, *J. Environ. Sci. Health*, **A26**, 1437(1991).
- 5) D. R. Varma, *J. Environ. Sci. Health*, **27**, 265(1987).
- 6) D. R. Varma, I. Guest and S. Smith, *J. Environ. Sci. Health*, **30**, 1(1990).
- 7) I. Guest and D. R. Varma, *Can. J. Physiol. Pharmacol*, **71**, 185(1992).
- 8) M. Alkodon, E. F. R. Pereira, W. S. Cortes, A. Maelicke and E. X. Albuquerque, *European Journal of Neuroscience*, **9**, 2734(1997).
- 9) J. R. Glaister, "毒性病理学の基礎," ソフトサイエンス社, 東京, 1992, p.87.

#### 連絡先

試験責任者: 高島宏昌

試験担当者: 桑形麻樹子, 宮原 敬, 加藤博康,  
関 剛幸, 新藤智子, 丸茂秀樹,  
堀内伸二, 稲田浩子, 三枝克彦,  
安生孝子, 一原佐知子

(財)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: Hiromasa Takashima (Study director)

Makiko Kuwagata, Takashi Miyahara,

Hiroyasu Katou, Takayuki Seki,

Tomoko Shindou, Hideki Marumo,

Shinji Horiuchi, Hiroko Inada,

Katsuhiko Saegusa, Takako Anjou,

Sachiko Ichihara

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 Body weight changes of male rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Days of administration				
1 (Init.wt.)	379.0±11.7 (13)	378.0±14.0 (13)	379.5±12.2 (13)	379.2±11.1 (13)
7	398.1±14.6 (13)	400.3±20.0 (13)	405.2±16.1 (13)	393.3±22.9 (13)
14	425.4±16.9 (13)	428.7±25.0 (13)	433.3±21.1 (13)	413.1±30.1 (13)
21	447.7±19.9 (13)	453.1±28.7 (13)	457.1±21.1 (13)	420.2±65.7 (13)
28	473.0±24.0 (13)	478.1±33.6 (13)	481.5±25.4 (13)	448.3±43.2 (12)
35	495.3±26.6 (13)	502.7±35.5 (13)	504.3±29.4 (13)	472.9±35.8 (12)
42	517.3±32.9 (13)	521.6±35.5 (13)	523.1±32.9 (13)	495.5±17.5 (11)
Body weight gain				
1-42	107.2±28.1 (13)	112.5±22.2 (13)	110.5±24.2 (13)	88.8±16.5 (11)

Values represent mean±S.D. in grams, and parentheses indicate number of animals evaluated

Table 2 Body weight changes of female rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Days of administration				
1 (Init.wt.)	237.5±9.4 (13)	239.1±12.5 (13)	240.5±11.3 (13)	239.9±12.5 (13)
7	245.4±14.9 (13)	248.4±13.6 (13)	247.6±15.0 (13)	249.2±13.6 (13)
14	258.0±16.8 (13)	263.8±19.4 (13)	264.3±17.2 (13)	262.9±19.2 (13)
21	271.0±11.8 (3)		316.5 (1)	265.1 (2)
28	289.4 (1)		345.8 (1)	
35	289.7 (1)		346.6 (1)	
42	310.6 (1)		343.8 (1)	
Days of pregnancy				
0	273.4±16.3 (11)	269.5±19.5 (13)	272.3±20.8 (12)	271.0±16.4 (12)
7	311.4±18.1 (11)	308.7±21.9 (13)	312.7±23.0 (12)	307.3±17.2 (12)
14	349.0±20.0 (11)	348.0±26.8 (13)	348.9±25.2 (12)	338.1±20.7 (12)
20	415.4±26.0 (11)	419.4±30.5 (13)	417.7±32.0 (12)	403.5±28.8 (12)
Days of lactation				
0	304.6±28.2 (11)	307.7±25.6 (13)	310.9±28.1 (12)	317.4±17.5 (11)
4	329.0±23.6 (11)	336.4±16.5 (13)	338.2±19.1 (12)	333.2±15.4 (11)

Values represent mean±S.D. in grams, and parentheses indicate number of animals evaluated

Table 3 Food consumption of male rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Days of administration				
1	27.3±2.1 (13)	27.7±3.3 (13)	27.4±2.7 (13)	26.5±4.6 (13)
7	26.9±1.7 (13)	26.9±3.0 (13)	27.1±2.7 (13)	24.9±3.1 (13)
13	26.4±2.0 (13)	25.9±3.1 (13)	26.9±3.8 (13)	23.3±3.4* (13)
29	29.0±3.3 (13)	29.1±3.0 (13)	30.2±2.3 (13)	28.3±3.3 (12)
35	29.7±4.1 (13)	28.4±3.1 (13)	29.0±3.2 (13)	26.7±1.4 (12)
41	29.7±3.4 (13)	28.7±3.4 (13)	29.6±1.8 (13)	24.0±8.0* (12)

Values represent mean±S.D. in grams, and parentheses indicate number of animals evaluated

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

Table 4 Food consumption of female rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Days of administration				
1	16.1±2.6 (13)	16.9±4.2 (13)	17.4±4.3 (13)	17.2±3.5 (13)
7	19.4±2.5 (13)	20.6±2.1 (13)	19.7±3.6 (13)	19.7±2.2 (13)
13	17.7±3.8 (13)	19.2±3.2 (13)	18.7±3.9 (13)	17.8±3.7 (13)
29	21.3 (1)		23.8 (1)	
35	20.3 (1)		79.9 (1)	
41	21.2 (1)		76.8 (1)	
Days of pregnancy				
0	20.0±4.1 (11)	19.7±2.2 (13)	20.5±3.8 (12)	20.9±1.7 (12)
7	25.5±2.9 (11)	27.6±3.9 (13)	26.6±4.4 (12)	25.5±3.0 (12)
14	24.0±12.7 (11)	20.8±2.6 (13)	21.1±2.5 (12)	20.0±2.0 (12)
20	19.6±4.9 (11)	21.4±4.7 (13)	26.4±19.7 (12)	20.8±6.4 (12)
Days of lactation				
0	15.5±6.4 (11)	21.1±4.5 (13)	20.2±9.1 (12)	19.7±3.7 (11)
3	38.9±9.2 (11)	42.6±8.0 (13)	42.7±9.5 (12)	41.9±2.9 (11)

Values represent mean±S.D. in grams, and parentheses indicate number of animals evaluated

Table 5 Hematological examinations of male rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Red blood cells				
Count ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	807 $\pm$ 45 (13)	810 $\pm$ 40 (13)	803 $\pm$ 34 (13)	790 $\pm$ 26 (11)
Hemoglobin (g/dL)	15.2 $\pm$ 0.6 (13)	15.3 $\pm$ 0.4 (13)	15.3 $\pm$ 0.8 (13)	15.1 $\pm$ 0.7 (11)
Hematocrit (%)	44.7 $\pm$ 1.6 (13)	44.4 $\pm$ 1.6 (13)	44.2 $\pm$ 2.3 (13)	42.9 $\pm$ 2.3 (11)
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	55.6 $\pm$ 2.7 (13)	54.9 $\pm$ 1.9 (13)	55.0 $\pm$ 2.0 (13)	54.4 $\pm$ 2.1 (11)
MCH (pg)	18.8 $\pm$ 1.1 (13)	18.9 $\pm$ 0.7 (13)	19.1 $\pm$ 0.7 (13)	19.1 $\pm$ 0.6 (11)
MCHC (%)	33.9 $\pm$ 0.5 (13)	34.5 $\pm$ 0.6 (13)	34.6 $\pm$ 0.7* (13)	35.1 $\pm$ 0.7** (11)
White blood cells				
Count ( $\times 100/\text{mm}^3$ )	63 $\pm$ 19 (13)	65 $\pm$ 16 (13)	66 $\pm$ 21 (13)	63 $\pm$ 20 (11)
Band neutrophil (%)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (11)
Segmented neutrophil (%)	13 $\pm$ 7 (13)	12 $\pm$ 5 (13)	13 $\pm$ 6 (13)	19 $\pm$ 10 (11)
Eosinophil (%)	1 $\pm$ 1 (13)	1 $\pm$ 1 (13)	1 $\pm$ 1 (13)	1 $\pm$ 1 (11)
Basophil (%)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (11)
Monocyte (%)	3 $\pm$ 2 (13)	4 $\pm$ 3 (13)	4 $\pm$ 2 (13)	5 $\pm$ 3 (11)
Lymphocyte (%)	83 $\pm$ 7 (13)	83 $\pm$ 6 (13)	83 $\pm$ 7 (13)	76 $\pm$ 12 (11)
Platelet				
Count ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	94.8 $\pm$ 8.7 (13)	91.4 $\pm$ 4.7 (13)	87.7 $\pm$ 5.3* (13)	95.5 $\pm$ 8.5 (11)
PT (sec)	16.4 $\pm$ 2.0 (13)	16.3 $\pm$ 2.7 (13)	16.9 $\pm$ 2.9 (13)	15.0 $\pm$ 1.4 (11)
APTT (sec)	21.7 $\pm$ 1.3 (13)	21.2 $\pm$ 1.0 (13)	20.9 $\pm$ 1.7 (13)	20.2 $\pm$ 1.9 (11)
Reticulocyte (%)	2.6 $\pm$ 1.1 (13)	N.E.	N.E.	2.4 $\pm$ 0.7 (11)

N.E.: Not examined

Values represent mean  $\pm$  S.D., and parentheses indicate number of animals evaluated\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$ \*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$ 

Table 6 Hematological examinations of female rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Red blood cells				
RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	697 $\pm$ 40 (13)	675 $\pm$ 54 (13)	698 $\pm$ 46 (13)	701 $\pm$ 44 (12)
Hemoglobin (g/dL)	13.7 $\pm$ 0.7 (13)	13.6 $\pm$ 0.6 (13)	13.8 $\pm$ 0.7 (13)	13.9 $\pm$ 0.5 (12)
Hematocrit (%)	40.8 $\pm$ 2.3 (13)	40.1 $\pm$ 2.3 (13)	41.0 $\pm$ 2.8 (13)	41.4 $\pm$ 2.1 (12)
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	58.6 $\pm$ 2.2 (13)	59.6 $\pm$ 3.0 (13)	58.7 $\pm$ 1.8 (13)	59.2 $\pm$ 1.6 (12)
MCH (pg)	19.6 $\pm$ 0.9 (13)	20.2 $\pm$ 1.1 (13)	19.8 $\pm$ 0.7 (13)	19.8 $\pm$ 0.6 (12)
MCHC (%)	33.5 $\pm$ 0.8 (13)	33.8 $\pm$ 0.7 (13)	33.7 $\pm$ 0.7 (13)	33.5 $\pm$ 0.5 (12)
White blood cells				
Count ( $\times 100/\text{mm}^3$ )	70 $\pm$ 23 (13)	71 $\pm$ 20 (13)	66 $\pm$ 20 (13)	65 $\pm$ 15 (12)
Band neutrophil (%)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (12)
Segmented neutrophil (%)	14 $\pm$ 7 (13)	20 $\pm$ 8 (13)	19 $\pm$ 7 (13)	22 $\pm$ 7 (12)
Eosinophil (%)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 1 (13)	0 $\pm$ 1 (13)	0 $\pm$ 0 (12)
Basophil (%)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (12)
Monocyte (%)	4 $\pm$ 2 (13)	5 $\pm$ 2 (13)	6 $\pm$ 5 (13)	5 $\pm$ 3 (12)
Lymphocyte (%)	82 $\pm$ 8 (13)	74 $\pm$ 8 (13)	74 $\pm$ 10 (13)	74 $\pm$ 9 (12)
Platelet				
Count ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	101.6 $\pm$ 6.9 (13)	111.8 $\pm$ 12.7 (13)	99.4 $\pm$ 9.7 (13)	106.5 $\pm$ 13.0 (12)
PT (sec)	12.2 $\pm$ 0.7 (13)	12.2 $\pm$ 0.7 (13)	12.3 $\pm$ 0.7 (13)	12.6 $\pm$ 0.5 (12)
APTT (sec)	17.6 $\pm$ 1.2 (13)	17.2 $\pm$ 1.8 (13)	16.7 $\pm$ 1.6 (13)	17.7 $\pm$ 1.0 (12)
Reticulocyte (%)	6.8 $\pm$ 3.1 (13)	N.E.	N.E.	6.3 $\pm$ 2.7 (12)

N.E.: Not examined

Values represent mean  $\pm$  S.D., and parentheses indicate number of animals evaluated

Table 7 Blood chemical examinations of male rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0	8	40	200
Total protein(g/dL)	5.4 ± 0.2 (13)	5.3 ± 0.3 (13)	5.3 ± 0.2 (13)	5.1 ± 0.3** (11)
Albumin(g/dL)	3.0 ± 0.2 (13)	2.9 ± 0.2 (13)	2.9 ± 0.1 (13)	2.8 ± 0.2** (11)
A/G	1.26 ± 0.12 (13)	1.21 ± 0.13 (13)	1.21 ± 0.12 (13)	1.24 ± 0.14 (11)
BUN(mg/dL)	16 ± 3 (13)	17 ± 2 (13)	17 ± 1 (13)	19 ± 3** (11)
Creatinine(mg/dL)	0.5 ± 0.1 (13)	0.6 ± 0.1 (13)	0.5 ± 0.1 (13)	0.6 ± 0.1* (11)
Glucose(mg/dL)	129 ± 10 (13)	129 ± 10 (13)	127 ± 11 (13)	122 ± 8 (11)
Total cholesterol(mg/dL)	37 ± 8 (13)	44 ± 8 (13)	39 ± 7 (13)	42 ± 9 (11)
Triglyceride(mg/dL)	47 ± 20 (13)	42 ± 11 (13)	46 ± 17 (13)	37 ± 8 (11)
ALP(U/L)	231 ± 49 (13)	224 ± 47 (13)	217 ± 35 (13)	218 ± 65 (11)
GPT(U/L)	32 ± 5 (13)	29 ± 5 (13)	31 ± 4 (13)	31 ± 4 (11)
GOT(U/L)	65 ± 8 (13)	64 ± 14 (13)	67 ± 10 (13)	71 ± 11 (11)
γ-GTP(U/L)	0 ± 0 (13)	0 ± 0 (13)	0 ± 0 (13)	0 ± 0 (11)
Total bilirubin(mg/dL)	0.08 ± 0.02 (13)	0.08 ± 0.02 (13)	0.08 ± 0.02 (13)	0.08 ± 0.01 (11)
Inorg. phos.(mg/dL)	5.9 ± 0.6 (13)	5.8 ± 0.5 (13)	5.9 ± 0.4 (13)	6.0 ± 0.6 (11)
Ca(mg/dL)	8.3 ± 0.2 (13)	8.3 ± 0.3 (13)	8.4 ± 0.2 (13)	8.3 ± 0.1 (11)
Na(mEq/L)	145.2 ± 1.2 (13)	144.9 ± 1.2 (13)	145.4 ± 1.0 (13)	145.4 ± 0.8 (11)
K(mEq/L)	3.79 ± 0.25 (13)	3.83 ± 0.20 (13)	3.82 ± 0.19 (13)	3.84 ± 0.15 (11)
Cl(mEq/L)	107.6 ± 1.7 (13)	107.6 ± 1.8 (13)	108.5 ± 1.3 (13)	108.1 ± 1.3 (11)

Values represent mean±S.D., and parentheses indicate number of animals evaluated

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

\*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Table 8 Blood chemical examinations of female rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Total protein(g/dL)	5.9 ± 0.4 (13)	5.8 ± 0.3 (13)	5.8 ± 0.3 (13)	5.6 ± 0.2 (12)
Albumin(g/dL)	3.4 ± 0.3 (13)	3.3 ± 0.2 (13)	3.2 ± 0.2 (13)	3.2 ± 0.2 (12)
A/G	1.36 ± 0.12 (13)	1.32 ± 0.14 (13)	1.24 ± 0.10 (13)	1.36 ± 0.16 (12)
BUN(mg/dL)	15 ± 3 (13)	18 ± 1 (13)	18 ± 3* (13)	19 ± 3* (12)
Creatinine(mg/dL)	0.6 ± 0.1 (13)	0.6 ± 0.1 (13)	0.6 ± 0.1 (13)	0.6 ± 0.1 (12)
Glucose(mg/dL)	122 ± 14 (13)	119 ± 11 (13)	112 ± 9 (13)	116 ± 12 (12)
Total cholesterol(mg/dL)	52 ± 7 (13)	47 ± 7 (13)	49 ± 7 (13)	48 ± 8 (12)
Triglyceride(mg/dL)	34 ± 7 (13)	41 ± 10 (13)	36 ± 5 (13)	37 ± 11 (12)
ALP(U/L)	99 ± 27 (13)	111 ± 29 (13)	105 ± 34 (13)	101 ± 18 (12)
GPT(U/L)	35 ± 7 (13)	36 ± 7 (13)	38 ± 8 (13)	35 ± 7 (12)
GOT(U/L)	74 ± 10 (13)	73 ± 9 (13)	73 ± 7 (13)	68 ± 8 (12)
γ-GTP(U/L)	0 ± 0 (13)	1 ± 1 (13)	1 ± 1 (13)	0 ± 0 (12)
Total bilirubin(mg/dL)	0.12 ± 0.02 (13)	0.11 ± 0.03 (13)	0.10 ± 0.02 (13)	0.12 ± 0.02 (12)
Inorg. phos.(mg/dL)	6.1 ± 0.7 (13)	6.4 ± 0.5 (13)	6.2 ± 0.4 (13)	6.3 ± 0.7 (12)
Ca(mg/dL)	9.0 ± 0.2 (13)	9.1 ± 0.2 (13)	9.1 ± 0.3 (13)	9.1 ± 0.3 (12)
Na(mEq/L)	143.8 ± 1.4 (13)	143.5 ± 0.8 (13)	143.2 ± 1.3 (13)	144.4 ± 1.6 (12)
K(mEq/L)	3.71 ± 0.23 (13)	3.66 ± 0.18 (13)	3.73 ± 0.22 (13)	3.65 ± 0.20 (12)
Cl(mEq/L)	108.1 ± 1.2 (13)	108.6 ± 1.5 (13)	108.1 ± 1.6 (13)	108.4 ± 1.7 (12)

Values represent mean±S.D., and parentheses indicate number of animals evaluated

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

\*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Table 9 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose(mg/kg)	0	8	40	200
Male	Final body weight (g)	486.3 ± 30.7 (13)	490.5 ± 32.7 (13)	490.1 ± 31.4 (13)	466.7 ± 15.4 (11)
	Brain(g)	2.06 ± 0.13 <sup>a</sup> (13)	2.04 ± 0.07 (13)	2.07 ± 0.07 (13)	2.06 ± 0.08 (11)
		0.42 ± 0.04 <sup>b</sup> (13)	0.42 ± 0.03 (13)	0.42 ± 0.03 (13)	0.44 ± 0.02 (11)
	Heart(g)	1.42 ± 0.16 (13)	1.42 ± 0.09 (13)	1.44 ± 0.13 (13)	1.34 ± 0.07 (11)
		0.29 ± 0.04 (13)	0.29 ± 0.01 (13)	0.29 ± 0.02 (13)	0.29 ± 0.02 (11)
	Thymus(mg)	348.5 ± 93.4 (13)	355.9 ± 121.1 (13)	366.2 ± 106.4 (13)	317.8 ± 56.7 (11)
		72.0 ± 20.1 (13)	72.0 ± 21.1 (13)	74.1 ± 19.0 (13)	68.1 ± 12.3 (11)
	Liver(g)	12.29 ± 1.42 (13)	12.45 ± 1.25 (13)	12.07 ± 1.24 (13)	11.59 ± 0.68 (11)
		2.53 ± 0.22 (13)	2.54 ± 0.21 (13)	2.46 ± 0.15 (13)	2.48 ± 0.11 (11)
	Kidneys(g)	3.12 ± 0.23 (13)	3.05 ± 0.20 (13)	3.09 ± 0.23 (13)	2.95 ± 0.23 (11)
		0.64 ± 0.05 (13)	0.63 ± 0.05 (13)	0.63 ± 0.04 (13)	0.63 ± 0.04 (11)
	Spleen(g)	0.90 ± 0.08 (13)	0.83 ± 0.10 (13)	0.92 ± 0.17 (13)	0.83 ± 0.10 (11)
		0.19 ± 0.02 (13)	0.17 ± 0.03 (13)	0.19 ± 0.03 (13)	0.18 ± 0.02 (11)
	Adrenal glands(mg)	57.0 ± 8.7 (13)	58.8 ± 10.8 (13)	59.5 ± 8.0 (13)	59.0 ± 10.6 (11)
11.7 ± 1.5 (13)		12.0 ± 2.0 (13)	12.1 ± 1.3 (13)	12.6 ± 2.2 (11)	
Testes(g)	3.39 ± 0.22 (13)	3.36 ± 0.16 (13)	3.37 ± 0.32 (13)	3.34 ± 0.23 (11)	
	0.70 ± 0.05 (13)	0.69 ± 0.05 (13)	0.69 ± 0.08 (13)	0.72 ± 0.04 (11)	
Epididymides(g)	1.25 ± 0.05 (13)	1.28 ± 0.12 (13)	1.21 ± 0.25 (13)	1.24 ± 0.08 (11)	
	0.26 ± 0.02 (13)	0.26 ± 0.03 (13)	0.25 ± 0.05 (13)	0.27 ± 0.02 (11)	
Female	Final body weight (g)	292.5 ± 19.4 (11)	296.7 ± 20.3 (13)	302.3 ± 20.6 (12)	295.2 ± 11.7 (11)
	Brain(g)	1.92 ± 0.06 (11)	1.91 ± 0.06 (13)	1.93 ± 0.08 (12)	1.89 ± 0.10 (11)
		0.66 ± 0.05 (11)	0.65 ± 0.04 (13)	0.64 ± 0.05 (12)	0.64 ± 0.03 (11)
	Heart(g)	0.95 ± 0.09 (11)	0.97 ± 0.10 (13)	0.99 ± 0.10 (12)	0.95 ± 0.08 (11)
		0.32 ± 0.02 (11)	0.33 ± 0.01 (13)	0.33 ± 0.02 (12)	0.32 ± 0.02 (11)
	Thymus(mg)	210.2 ± 108.9 (11)	245.1 ± 66.9 (13)	232.0 ± 103.4 (12)	198.6 ± 56.4 (11)
		70.5 ± 33.1 (11)	82.5 ± 21.3 (13)	75.8 ± 31.0 (12)	67.1 ± 18.1 (11)
	Liver(g)	9.40 ± 0.87 (11)	9.62 ± 1.01 (13)	9.43 ± 0.70 (12)	9.74 ± 0.68 (11)
		3.22 ± 0.24 (11)	3.24 ± 0.24 (13)	3.13 ± 0.23 (12)	3.30 ± 0.26 (11)
	Kidneys(g)	1.91 ± 0.16 (11)	1.94 ± 0.16 (13)	1.90 ± 0.18 (12)	1.92 ± 0.10 (11)
		0.66 ± 0.05 (11)	0.65 ± 0.04 (13)	0.63 ± 0.06 (12)	0.65 ± 0.03 (11)
	Spleen(g)	0.67 ± 0.11 (11)	0.68 ± 0.09 (13)	0.72 ± 0.11 (12)	0.67 ± 0.10 (11)
		0.23 ± 0.04 (11)	0.23 ± 0.03 (13)	0.24 ± 0.04 (12)	0.23 ± 0.03 (11)
	Adrenal glands(mg)	80.4 ± 12.0 (11)	77.8 ± 15.7 (13)	74.6 ± 5.3 (12)	73.9 ± 7.7 (11)
27.6 ± 4.4 (11)		26.2 ± 4.6 (13)	24.8 ± 2.6 (12)	25.1 ± 2.9 (11)	

Values represent mean ± S.D., and parentheses indicate number of animals evaluated

a) Absolute weight

b) Relative weight (g or mg per 100 g body weight)

Table 10 Histopathological findings of rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Sex:	Male				Female			
		Dose(mg/kg):	0	8	40	200	0	8	40
Stomach		[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Squamous hyperplasia, forestomach	±	0	0	0	0	2	0	0	4
	+	0	0	0	9	0	0	0	2
	++	0	0	0	4	0	0	0	5
	total	0	0	0	13***##	2	0	0	11***##
Erosion, mucosa, forestomach	±	0	0	0	3	1	0	0	2
	+	0	0	0	1	0	0	0	2
	++	0	0	0	1	0	0	0	0
	total	0	0	0	5#	1	0	0	4
Ulcer, mucosa, forestomach	±	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	2	1	0	0	2
	++	0	0	0	0	0	0	0	3
	total	0	0	0	2	1	0	0	7*#
Hemorrhage, mucosa, forestomach	±	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	1	0	0	0	0
	total	0	0	0	1	0	0	0	3
Edema, submucosa, forestomach	±	0	0	0	1	0	0	0	0
	+	0	0	0	5	1	0	0	1
	++	0	0	0	4	0	0	0	5
	+++	0	0	0	1	0	0	0	1
	total	0	0	0	11***##	1	0	0	7*#
Cellular infiltration, inflammatory cell, mucosa, forestomach	±	0	0	0	3	2	0	0	3
	+	0	0	0	5	0	0	0	2
	++	0	0	0	3	0	0	0	3
	total	0	0	0	11***##	2	0	0	8*#
Granulation, submucosa, forestomach	±	0	0	0	3	1	0	0	1
	+	0	0	0	2	0	0	0	2
	++	0	0	0	6	0	0	0	3
	total	0	0	0	11***##	1	0	0	6#
Granulation, serosa, forestomach	±	0	0	0	0	0	0	0	1
	+	0	0	0	1	0	0	0	1
	total	0	0	0	1	0	0	0	2
Erosion, mucosa, glandular stomach	±	0	0	0	0	1	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	1	0	0	0	0
	total	0	0	0	1	1	0	0	1
Edema, submucosa, glandular stomach	++	0	0	0	1	0	0	0	0
Cellular infiltration, inflammatory cell, mucosa, glandular stomach	++	0	0	0	1	0	0	0	0
Ulcer, mucosa, glandular stomach	+	0	0	0	0	0	0	0	1
	total	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage, mucosa, glandular stomach	+	0	0	0	1	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	1
	total	0	0	0	1	0	0	0	1
Intestine		[5]	[0]	[0]	[5]	[5]	[0]	[0]	[4]
Congestion, epithelium, mucosa, duodenum & jejunum	+++	0			1	0			0
	total	0			1	0			0
Granulation, serosa, cecum	±	0			0	0			1
	total	0			0	0			1
Edema, submucosa, cecum	+	0			1	0			0
	total	0			1	0			0
Edema, submucosa, rectum	+	0			1	1			0
	total	0			1	1			0
Cellular infiltration, neutrophil, submucosa, cecum	+	0			1	0			0
	total	0			1	0			0

[ ]: Number of animals examined  
 Grade of histopathological findings; ±: very slight, +: slight, ++: moderate, +++: severe  
 \*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (by Two-tailed Mann-Whitney U test)  
 \*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (by Two-tailed Mann-Whitney U test)  
 #: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (by One-tailed Fisher exact test)  
 ##: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (by One-tailed Fisher exact test)



Table 10 (continued)

Organ	Sex: Findings, grade and number of animals	Dose(mg/kg):	Male				Female			
			0	8	40	200	0	8	40	200
Liver			[5]	[0]	[0]	[5]	[5]	[0]	[0]	[5]
Necrosis, focal	+	0				1	0			0
	++	0				0	0			1
	total	0				1	0			1
Fatty change, periportal	±	1				2	4			3
	+	4				1	1			0
	total	5				3	5			3
Kidneys			[5]	[0]	[0]	[5]	[5]	[0]	[0]	[5]
Basophilic tubule, cortex	±	3				2	1			0
	total	3				2	1			0
Mineralization, medulla	±	1				2	0			0
	total	1				2	0			0
Cellular infiltration, lymphocyte interstitium	±	0				0	0			1
	+	0				0	0			1
	total	0				0	0			2
Degeneration, vacuolar, proximal tubule	±	0				0	1			0
	total	0				0	1			0
Spleen			[5]	[0]	[0]	[4]	[5]	[0]	[0]	[5]
Atrophy	++	0				1	0			1
	total	0				1	0			1
Hematopoiesis, extramedullary	±	2				4	2			0
	+	3				0	2			4
	++	0				0	1			0
	total	5				4	5			4
Deposit, pigment, brown	±	1				0	0			0
	+	4				3	5			4
	++	0				0	0			1
	total	5				3	5			5
Heart			[5]	[0]	[0]	[5]	[5]	[0]	[0]	[5]
Myocardial degeneration/fibrosis	±	0				2	0			1
	+	2				0	0			0
	total	2				2	0			1
Lung			[5]	[0]	[0]	[5]	[5]	[0]	[0]	[5]
Accumulation, foam cell, focal	±	1				2	0			0
	total	1				2	0			0
Hemorrhage, focal	±	0				1	0			0
	total	0				1	0			0
Mineralization, artery	±	0				0	0			1
	total	0				0	0			1
Thyroid gland			[5]	[0]	[0]	[4]	[5]	[0]	[0]	[5]
Ectopic thymus	±	1				0	0			0
	+	0				0	1			1
	total	1				0	1			1
Testes			[13]	[13]	[13]	[13]				
Atrophy, seminiferous tubule	±	0	1	0	1					
	+	0	1	1	0					
	++	0	0	1	0					
	total	0	2	2	1					
Multinucleated giant cell, seminiferous tubule	+	0	0	1	0					
	total	0	0	1	0					
Degeneration, spermatocyte and round spermatid, seminiferous tubule	+	0	0	0	1					
	total	0	0	0	1					
Degeneration, elongated spermatid, seminiferous tubule	+	0	0	0	1					
	total	0	0	0	1					

[ ]: Number of animals examined

Grade of histopathological findings; ±: very slight, +: slight, ++: moderate, +++: severe

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (by Two-tailed Mann-Whitney U test)\*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (by Two-tailed Mann-Whitney U test)#: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (by One-tailed Fisher exact test)##: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (by One-tailed Fisher exact test)

Table 10 (continued)

Organ	Sex: Dose(mg/kg):	Male				Female			
		0	8	40	200	0	8	40	200
Epididymides		[13]	[13]	[13]	[13]				
Cell debris, in lumen	±	0	0	1	0				
	+	0	0	0	2				
	total	0	0	1	2				
Degenerated sperm, in lumen	+	0	0	0	1				
	total	0	0	0	1				
Decrease, sperm, in lumen	+	0	0	0	1				
	total	0	0	0	1				
Spermatid granuloma, unilateral	+	1	0	0	0				
	total	1	0	0	0				
Cellular infiltration, lymphocyte interstitium	±	0	0	1	0				
	total	0	0	1	0				
Prostate		[5]	[0]	[0]	[5]				
Atrophy	+	0			1				
	total	0			1				
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	±	2			1				
	+	2			0				
	++	1			2				
	total	5			3				
Cellular infiltration, lymphocyte and neutrophil, epithelium	±	1			1				
	+	1			1				
	total	2			2				
Seminal vesicle		[5]	[0]	[0]	[5]				
Atrophy	+	0			1				
	total	0			1				
Uterus						[5]	[0]	[0]	[5]
Dilatation, lumen	+					0			1
	++					1			0
	total					1			1
Cellular infiltration, neutrophil, luminal epithelium	++					1			0
	total					1			0
Vagina						[5]	[0]	[0]	[5]
Mucification, epithelium	±					0			1
	++					0			1
	total					0			2
Cornification, epithelium	++					1			1
	total					1			1

[ ]: Number of animals examined

Grade of histopathological findings; ±: very slight, +: slight, ++: moderate, +++: severe

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (by Two-tailed Mann-Whitney U test)

\*\* : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (by Two-tailed Mann-Whitney U test)

# : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (by One-tailed Fisher exact test)

## : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (by One-tailed Fisher exact test)

Table 11 Reproductive performance of rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Mean length of estrous cycle	4.1 ± 0.3	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1
Number of mated pairs	13	3	13	13
Number of copulated pairs	12	13	12	13
Copulation index <sup>a</sup>	92.3	100	92.3	100
Number of pregnant animals	11	13	12	12
Fertility index <sup>b</sup>	91.7	100	100	92.3
Pairing days until copulation (Mean ± S.D.)	4.3 ± 3.9	2.9 ± 1.0	2.8 ± 1.3	3.7 ± 3.0
Frequency of vaginal estrus (Mean ± S.D.)	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.6

a) Copulation index = (Number of copulated pairs/Number of mated pairs) × 100, %

b) Fertility index = (Number of pregnant animals/Number of copulated pairs) × 100, %

Table 12 Summary of development of pups from dams treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Number of pregnant females	11	13	12	12
Number of pregnant females with pups alive	11	13	12	11
Gestation index <sup>a</sup>	100	100	100	91.7
Gestation length in days	22.4 ± 0.5 (11)	22.3 ± 0.5 (13)	22.8 ± 0.9 (12)	22.5 ± 0.5 (11)
Number of corpora lutea	19.0 ± 4.1 (11)	18.1 ± 2.1 (13)	18.3 ± 2.3 (12)	17.9 ± 2.7 (12)
Number of implantation sites	14.8 ± 3.2 (11)	15.8 ± 2.7 (13)	14.6 ± 4.1 (12)	15.0 ± 2.3 (12)
Implantation index <sup>b</sup>	82.2 ± 23.4 (11)	86.8 ± 9.1 (13)	81.4 ± 23.7 (12)	84.2 ± 7.8 (12)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	14.0 ± 3.0 (11)	14.7 ± 2.5 (13)	13.3 ± 3.9 (12)	12.3 ± 4.6 (12)
Delivery index <sup>c</sup>	94.8 ± 4.8 (11)	93.5 ± 6.7 (13)	92.3 ± 9.5 (12)	82.2 ± 26.5 (12)
Number of pups alive	14.0 ± 3.0 (11)	14.7 ± 2.5 (13)	12.8 ± 4.4 (12)	13.2 ± 2.5 (11)
Birth index <sup>d</sup>	94.8 ± 4.8 (11)	93.5 ± 6.7 (13)	89.1 ± 18.1 (12)	88.0 ± 7.0 (11)
Live birth index <sup>e</sup>	100.0 ± 0.0 (11)	100.0 ± 0.0 (13)	95.8 ± 14.4 (12)	98.2 ± 4.3 (11)
Pups weight in grams				
Male	6.8 ± 0.5 (11)	6.8 ± 0.6 (13)	7.1 ± 1.1 (12)	7.2 ± 0.8 (11)
Female	6.3 ± 0.5 (11)	6.5 ± 0.6 (13)	6.5 ± 1.0 (12)	6.9 ± 0.8 (11)
Sex ratio on day 0 <sup>f</sup>	108 ± 74 (11)	108 ± 71 (13)	107 ± 30 (12)	194 ± 277 (11)
Day 4 of lactation				
Number of pups alive	13.5 ± 3.0 (11)	14.7 ± 2.5 (13)	12.8 ± 4.6 (12)	13.2 ± 2.5 (11)
Viability index <sup>g</sup>	97.0 ± 8.1 (11)	100.0 ± 0.0 (13)	95.8 ± 14.4 (12)	100.0 ± 0.0 (11)
Pups weight in grams				
Male	10.4 ± 1.6 (11)	11.0 ± 1.4 (13)	11.3 ± 1.5 (12)	11.5 ± 1.6 (11)
Female	9.8 ± 1.7 (11)	10.7 ± 1.4 (13)	10.8 ± 1.5 (12)	11.2 ± 1.6 (11)
Sex ratio on day 4 <sup>h</sup>	97 ± 52 (11)	108 ± 71 (13)	108 ± 31 (11) <sup>i</sup>	194 ± 277 (11)

Values represent mean ± S.D., and parentheses indicate number of litters evaluated

a) Gestation index = (number of females with alive pups/number of pregnant females) × 100, %

b) Implantation index = (number of implantation sites/number of corpora lutea) × 100, %

c) Delivery index = (number of pups born/number of implantation sites) × 100, %

d) Birth index = (number of live pups on day 0/number of implantation sites) × 100, %

e) Live birth index = (number of live pups on day 0/number of pups born) × 100, %

f) Sex ratio on day 0 = (number of male live pups on day 0/number of female live pups on day 0) × 100, %

g) Viability index = (number of live pups on day 4/number of live pups on day 0) × 100, %

h) Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4/number of female live pups on day 4) × 100, %

i) The data of a litter which has not any female live pups was excluded.

# テトラメチルアンモニウムヒドロキシドの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Tetramethylammonium hydroxide on Bacteria

### 要約

テトラメチルアンモニウムヒドロキシドについて、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, TA98, TA1535, TA1537)および*Escherichia coli*(WP2 *uvrA*)の5菌株を用いた。試験は2回繰り返して実施し、S9 mix無添加群の各試験菌株およびS9 mix添加群のWP2 *uvrA*を除いた試験菌株について39.1~1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、S9 mix添加群のWP2 *uvrA*について156~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ のそれぞれ6用量で実施した。

その結果、S9 mix無添加群および添加群のいずれにおいても、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではテトラメチルアンモニウムヒドロキシドは、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

### 方法

#### 1. 試験菌株

細菌を用いる復帰変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の*Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537<sup>1)</sup>ならびにトリプトファン要求性の*Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup>の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成11年3月31日ならびに平成11年6月29日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK KGaA)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80°Cで保存した。

#### 2. 培地の調製

##### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・

無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム[いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID:No. 1)を加え、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

##### 2) トップアガー(軟寒天)

塩化ナトリウム0.5%を含む0.6% Bacto-agar(Difco)水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mmol/L D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

#### 3. 前培養条件

内容量200 mLのバツフル付三角フラスコに2.5%ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No. 2: OXOID)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50  $\mu\text{L}$ 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10: タイテック(株))を用い、37°Cで8時間振盪(往復振盪: 100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

#### 4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADPH	4 $\mu\text{mol}$
NADH	4 $\mu\text{mol}$
Na-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$
精製水	残量

#### 5. 被験物質

テトラメチルアンモニウムヒドロキシド(ロット番号: 81021A)は純度20.0%の水溶液であり、水溶液中で安定である。昭和電工(株)(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験

終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 6. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質を日本薬局方注射用水(㈱大塚製薬工場)を用いて希釈して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。ただし、原液中での被験物質濃度が20.0%であることを考慮して調製した。

#### 7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量を用いて予備的な試験を実施した。S9 mix無添加群の各試験菌株ならびにS9 mix添加群のWP2 *uvrA*を除いた試験菌株では、1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ において試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。

従って、本試験においてはS9 mix無添加群の各試験菌株ならびにS9 mix添加群のTA100, TA1535, TA98ならびにTA1537で1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , S9 mix添加群のWP *uvrA*で5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

#### 8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20°C)した。

- 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
(AF-2:和光純薬工業(株))
- アジ化ナトリウム( $\text{NaN}_3$ :和光純薬工業(株))
- 9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA:Aldrich社)
- 2-アミノアントラセン(2-AA:和光純薬工業(株))

#### 9. 試験方法

Amesらの原法<sup>1)</sup>の改良法であるプレインキュベーション法に準じて、S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100  $\mu\text{L}$ , 次いでS9 mix無添加群の場合、0.1 mol/Lナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500  $\mu\text{L}$ , S9 mix添加群の場合、S9 mixを500  $\mu\text{L}$ 添加した。さらに、試験菌液100  $\mu\text{L}$ を加え、37°Cで20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、あらかじめ45°Cに保温したトップアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。37°Cの条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡( $\times 60$ )を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス(株))を用いた。各濃度につき3枚のプレートを使用した。また、独立して試験を2回実施した。

#### 10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

#### 結果および考察

1回目の試験結果をTable 1~2に、2回目の試験結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群ならびに添加群のすべての試験菌株の高用量群において、テトラメチルアンモニウムヒドロキシド処理による生育阻害作用が観察された。しかしながら、復帰突然変異コロニー数については、S9 mix無添加群、S9 mix添加群とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、コロニー計数時、析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から、本試験条件下において、テトラメチルアンモニウムヒドロキシドの微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

なお、本被験物質の類縁体であるtetramethylammonium bromide, tetramethylammonium chloride, tetramethylammonium iodide, tetramethylammonium fluoride tetrahydrate, tetramethylammonium hexafluorophosphate, tetramethylammonium hydroxide pentahydrateおよびtetramethylammonium tetrafluoroborateの変異原性に関する報告はなかった。

#### 文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, **38**, 3 (1976).

#### 連絡先

試験責任者：中嶋 圓  
 試験担当者：菊池正憲，益森勝志  
 (財)食品農医薬品安全性評価センター  
 〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2  
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

#### Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)  
 Masanori Kikuchi, Shoji Masumori  
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
 Pesticides (An-pyo Center)  
 582-2 Shioshinden, Fukude-cho, Iwata-gun,  
 Shizuoka, 437-1213, Japan  
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Results of the bacterial reversion test of tetramethylammonium hydroxide (1st trial)  
[direct method: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	101	107	104	9	14	12	29	27	29	23	23	23	8	10	9
		[104 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 3]			[28 $\pm$ 1]			[23 $\pm$ 0]			[9 $\pm$ 1]		
	39.1	118	104	105	11	11	15	18	25	25	17	20	22	11	10	13
		[109 $\pm$ 8]			[12 $\pm$ 2]			[23 $\pm$ 4]			[20 $\pm$ 3]			[11 $\pm$ 2]		
	78.1	107	106	111	11	8	13	28	21	26	22	25	19	9	10	8
		[108 $\pm$ 3]			[11 $\pm$ 3]			[25 $\pm$ 4]			[22 $\pm$ 3]			[9 $\pm$ 1]		
	156	102	104	100	12	9	12	20	20	22	28	26	20	6	7	6
		[102 $\pm$ 2]			[11 $\pm$ 2]			[21 $\pm$ 1]			[25 $\pm$ 4]			[6 $\pm$ 1]		
313	97	102	108	11	11	13	22	26	29	23	23	21	8	9	10	
	[102 $\pm$ 6]			[12 $\pm$ 1]			[26 $\pm$ 4]			[22 $\pm$ 1]			[9 $\pm$ 1]			
625	103	109	107	15	10	16	21	23	25	21	22	27	11	11	6	
	[106 $\pm$ 3]			[14 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 2]			[23 $\pm$ 3]			[9 $\pm$ 3]			
1250	87*	72*	90*	10*	8*	11*	25*	27*	22*	17*	19*	17*	12*	8*	9*	
	[83 $\pm$ 10]			[10 $\pm$ 2]			[25 $\pm$ 3]			[18 $\pm$ 1]			[10 $\pm$ 2]			
Positive control		384	403	427*	356	379	382 <sup>b</sup>	133	125	129*	589	560	598*	481	514	492 <sup>d</sup>
		[405 $\pm$ 22]			[372 $\pm$ 14]			[129 $\pm$ 4]			[582 $\pm$ 20]			[496 $\pm$ 17]		

a) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b)  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
 c) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
 \*: Growth inhibition was observed

Table 2 Results of the bacterial reversion test of tetramethylammonium hydroxide (1st trial)  
[activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	113	118	113	11	16	8	27	21	29	21	25	21	15	17	12
		[115 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 4]			[26 $\pm$ 4]			[22 $\pm$ 2]			[15 $\pm$ 3]		
	39.1	111	119	107	9	9	9				19	25	23	17	17	15
		[112 $\pm$ 6]			[9 $\pm$ 0]						[22 $\pm$ 3]			[16 $\pm$ 1]		
	78.1	115	110	108	11	8	9				23	26	25	19	21	18
		[111 $\pm$ 4]			[9 $\pm$ 2]						[25 $\pm$ 2]			[19 $\pm$ 2]		
	156	107	112	102	8	9	6	22	25	24	22	20	20	17	16	14
		[107 $\pm$ 5]			[8 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 2]			[21 $\pm$ 1]			[16 $\pm$ 2]		
	313	103	115	116	13	10	9	28	24	24	21	28	21	13	15	15
		[111 $\pm$ 7]			[11 $\pm$ 2]			[25 $\pm$ 2]			[23 $\pm$ 4]			[14 $\pm$ 1]		
625	94	96	93	16	9	10	29	27	26	17	21	22	13	16	21	
	[94 $\pm$ 2]			[12 $\pm$ 4]			[27 $\pm$ 2]			[20 $\pm$ 3]			[17 $\pm$ 4]			
1250	110*	98*	102*	12*	9*	9*	22	27	23	14*	14*	14*	19*	16*	17*	
	[103 $\pm$ 6]			[10 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 3]			[14 $\pm$ 0]			[17 $\pm$ 2]			
2500							21*	21*	20*							
							[21 $\pm$ 1]									
5000							0*	0*	0*							
							[0 $\pm$ 0]									
Positive control		831	828	869*	383	318	386 <sup>b</sup>	690	732	733 <sup>c</sup>	367	362	377*	141	154	154 <sup>b</sup>
		[843 $\pm$ 23]			[362 $\pm$ 38]			[718 $\pm$ 25]			[369 $\pm$ 8]			[150 $\pm$ 8]		

a) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b) 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
 \*: Growth inhibition was observed

Table 3 Results of the bacterial reversion test of tetramethylammonium hydroxide (2nd trial)  
[direct method: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]																			
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
Test substance	0	118	118	108	11	11	15	31	29	30	24	21	24	8	7	7	[115 $\pm$ 6]	[12 $\pm$ 2]	[30 $\pm$ 1]	[23 $\pm$ 2]	[7 $\pm$ 1]
	39.1	106	108	102	13	17	14	27	26	26	21	21	27	6	8	10	[105 $\pm$ 3]	[15 $\pm$ 2]	[26 $\pm$ 1]	[23 $\pm$ 3]	[8 $\pm$ 2]
	78.1	110	110	102	9	12	14	27	24	21	21	24	22	8	9	8	[107 $\pm$ 5]	[12 $\pm$ 3]	[24 $\pm$ 3]	[22 $\pm$ 2]	[8 $\pm$ 1]
	156	115	97	110	13	11	16	30	31	29	17	16	17	8	10	7	[107 $\pm$ 9]	[13 $\pm$ 3]	[30 $\pm$ 1]	[17 $\pm$ 1]	[8 $\pm$ 2]
	313	103	104	111	14	11	13	25	26	29	18	18	17	10	12	10	[106 $\pm$ 4]	[13 $\pm$ 2]	[27 $\pm$ 2]	[18 $\pm$ 1]	[11 $\pm$ 1]
	625	104	125	125	15	14	16	25	28	30	24	20	25	11	7	9	[118 $\pm$ 12]	[15 $\pm$ 1]	[28 $\pm$ 3]	[23 $\pm$ 3]	[9 $\pm$ 2]
	1250	92*	76*	86*	12*	9*	9*	29*	21*	29*	23*	22*	16*	7*	5*	6*	[85 $\pm$ 8]	[10 $\pm$ 2]	[26 $\pm$ 5]	[20 $\pm$ 4]	[6 $\pm$ 1]
	Positive control		382	401	379 <sup>a</sup>	337	373	394 <sup>b</sup>	157	159	138 <sup>a</sup>	519	554	559 <sup>c</sup>	398	373	437 <sup>d</sup>	[387 $\pm$ 12]	[368 $\pm$ 29]	[151 $\pm$ 12]	[544 $\pm$ 22]

a) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b)  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 

\*: Growth inhibition was observed

Table 4 Results of the bacterial reversion test of tetramethylammonium hydroxide (2nd trial)  
[activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]																			
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
Test substance	0	129	112	122	15	12	13	27	25	26	33	29	26	13	11	9	[121 $\pm$ 9]	[13 $\pm$ 2]	[26 $\pm$ 1]	[29 $\pm$ 4]	[11 $\pm$ 2]
	39.1	111	112	119	10	13	16				26	23	27	15	13	11	[114 $\pm$ 4]	[13 $\pm$ 3]		[25 $\pm$ 2]	[13 $\pm$ 2]
	78.1	130	126	125	16	12	13				31	24	25	9	13	7	[127 $\pm$ 3]	[14 $\pm$ 2]		[27 $\pm$ 4]	[10 $\pm$ 3]
	156	131	116	124	9	13	13	25	26	32	27	28	22	12	10	13	[124 $\pm$ 8]	[12 $\pm$ 2]	[28 $\pm$ 4]	[26 $\pm$ 3]	[12 $\pm$ 2]
	313	135	114	113	17	14	13	23	22	23	30	28	27	10	11	10	[121 $\pm$ 12]	[15 $\pm$ 2]	[23 $\pm$ 1]	[28 $\pm$ 2]	[10 $\pm$ 1]
	625	116	124	122	14	10	12	25	25	28	31	25	27	12	12	14	[121 $\pm$ 4]	[12 $\pm$ 2]	[26 $\pm$ 2]	[28 $\pm$ 3]	[13 $\pm$ 1]
	1250	100*	97*	106*	10*	10*	11*	24	23	25	24*	19*	21*	12*	10*	7*	[101 $\pm$ 5]	[10 $\pm$ 1]	[24 $\pm$ 1]	[21 $\pm$ 3]	[10 $\pm$ 3]
	2500							15*	17*	21*											
		5000							0*	0*	0*										
Positive control		681	724	718 <sup>a</sup>	316	359	355 <sup>b</sup>	636	619	647 <sup>c</sup>	391	343	341 <sup>d</sup>	172	164	157 <sup>b</sup>	[708 $\pm$ 23]	[343 $\pm$ 24]	[634 $\pm$ 14]	[358 $\pm$ 28]	[164 $\pm$ 8]

a) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b) 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 

\*: Growth inhibition was observed

# テトラメチルアンモニウムヒドロキシドの 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

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of Tetramethylammonium hydroxide on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

テトラメチルアンモニウムヒドロキシドが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。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、短時間処理法ならびに連続処理法とも10 mM相当の濃度を含む228~910  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量を設定した。短時間処理法ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、連続処理法では、S9 mix非存在下における24時間連続処理後、標本作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

その結果、短時間処理ならびに連続処理のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではテトラメチルアンモニウムヒドロキシドは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

### 方法

#### 1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK KGaA)を10 vol%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞を融解し3~5日ごとに継代したものを使用した。なお、細胞増殖抑制試験では継代数8および15の細胞を、染色体異常試験では同13および23の細胞を用いた。

#### 2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(旭テクノグラス(株))に、メンブランフィルター(0.45  $\mu\text{m}$ :Featuring Corning and Costar Products)を用いて加圧濾過除菌した非働化(56  $^{\circ}\text{C}$ , 30分)済み仔牛血清(GIBCO Life Technologies, Inc)を最終濃度で10 vol%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液を冷暗所(4  $^{\circ}\text{C}$ )に保存した。

#### 3. 培養条件

CO<sub>2</sub>インキュベーター(Formaおよび三洋電機メデイ

カシステム(株))を用い、CO<sub>2</sub>濃度5%, 37  $^{\circ}\text{C}$ の条件で細胞を培養した。

#### 4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製された。また、S9 mixの組成は松岡らの方法<sup>1)</sup>に従った。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.3 mL
MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADP	4 $\mu\text{mol}$
HEPES緩衝液(pH 7.2)	4 $\mu\text{mol}$
精製水	残量

#### 5. 被験物質

テトラメチルアンモニウムヒドロキシド(ロット番号:81021A)は純度20.0%の水溶液であり、水溶液中で安定である。昭和電工(株)(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 6. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質を日本薬局方注射用水(株)大塚製薬工場)を用いて希釈して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。ただし、原液中での被験物質濃度が20.0%であることを考慮して調製した。

#### 7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

12ウエルの細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。短時間処理法ではS9 mix非存在下(-S9 mix)あるいは存在下(+S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。連続処理法の場合、24時間連続して処理を実施した。

細胞を10 vol%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業(株))で固定した後、0.1 w/v%クリスタルバイオレット(関東化学(株))水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30



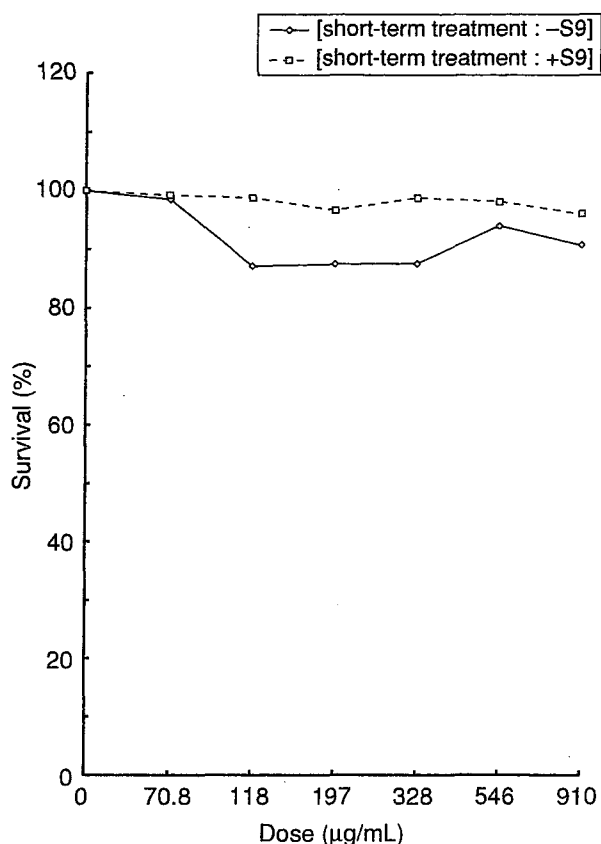


Fig. 1 Dose-survival curves of tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment: 6 hr]

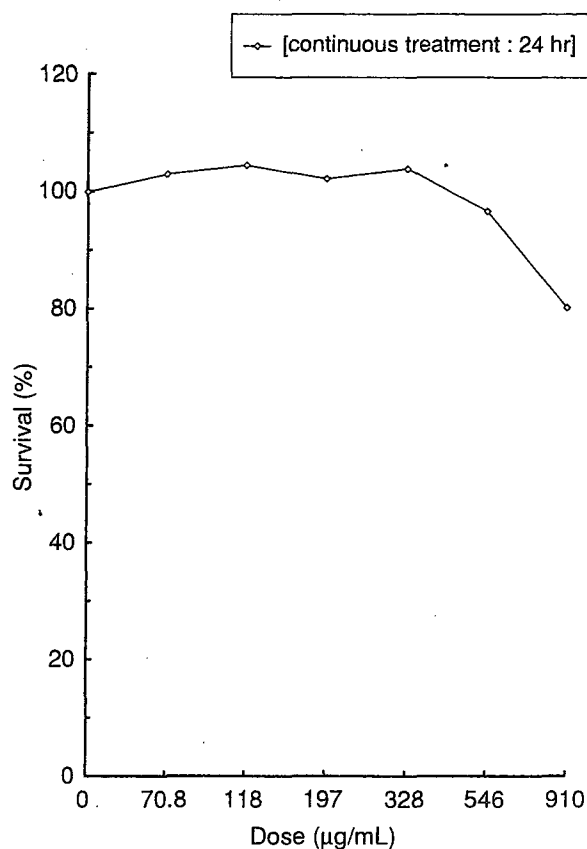


Fig. 2 Dose-survival curve of tetramethylammonium hydroxide [continuous treatment: 24 hr]

vol%エタノール, 1 vol%酢酸水溶液)を適量加え, 5分間程度放置して色素を溶出した後, 580 nmでの吸光度を測定した. 各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比, すなわち細胞生存率を算出した.

その結果, いずれの処理法においても明確な細胞増殖抑制は観察されなかった (Fig. 1~2).

なお, 被験物質暴露終了時, 短時間処理法では546 µg/mL以上において, 連続処理法では910 µg/mLにおいて培養液のpHが僅かにアルカリ性を示していた.

#### 8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに, 染色体異常試験では短時間処理法ならびに連続処理法のいずれにおいても910 µg/mL (10 mM相当)を最高処理濃度とし, 以下公比2で減じた計3用量ならびに溶媒対照群を設定した.

なお, 陽性対照として, 短時間処理法の場合, -S9処理でマイトマイシンC (MMC: 協和醗酵工業株) を0.1 µg/mL, +S9処理でシクロホスファミド (CP: 塩野義製薬株) を12.5 µg/mLの用量で, 連続処理の場合マイトマイシンCを0.05 µg/mLの用量で試験した.

#### 9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い, 細胞増殖抑制試験と同様に被験物質等の処理を行った. 培養終了2時間前に, 最終濃度で0.2 µg/mLとなるようコルセミド (GIBCO Life Technologies, Inc) を添加した. トリプシン処理で

細胞を剥離させ, 遠心分離により細胞を回収した. 75 mmol/L塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後, 固定液 (メタノール3容: 酢酸1容) で細胞を固定した. 空気乾燥法で染色体標本を作製した後, 1.2 vol% ギムザ染色液で12分間染色した.

#### 10. 染色体の観察

各プレートあたり100個, すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し, 染色体の形態的变化としてギャップ (gap), 染色分体切断 (ctb), 染色体切断 (csb), 染色分体交換 (cte), 染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した. 同時に, 倍数性細胞の出現率を記録した. 染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会による分類法<sup>2)</sup>に従って実施した.

すべての標本をコード化した後, マスキング法で観察した.

#### 11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含まない場合 (-gap) について染色体構造異常の出現頻度を表示した.

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を, 石館ら<sup>3)</sup>の基準に従って判定した. 染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性 (-), 5%以上10%未満を疑陽性 (±), 10%以上を陽性 (+) とした. 最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められ

た場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

### 結果および考察

短時間処理法での試験結果を Table 1~2 に示した。テトラメチルアンモニウムヒドロキシド処理群の場合、S9 mix 非存在下ならびに S9 mix 存在下とも、いずれの用量においても染色体構造異常ならびに倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。S9 mix 非存在下においては、試験用量に依存した細胞生存率のわずかな減少傾向が観察された。また、S9 mix 存在下においては、被験物質処理による強い細胞増殖抑制作用は観察されなかった。一方、S9 mix 非存在下における陽性対照物質 MMC で処理した細胞、および S9 mix 存在下における陽性対照物質 CP で処理した細胞ではいずれにおいても染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

連続処理法での試験結果を Table 3 に示した。被験物質処理群の場合、染色体構造異常ならびに倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。また、被験物質処理による強い細胞増殖抑制作用はいずれの用量においても認められなかった。一方、陽性対照物質の MMC で処理した細胞では染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

なお、本被験物質暴露終了時に短時間処理法ならびに連続処理法で高用量の 910  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において培養液の pH が僅かにアルカリ性を示していたが、染色体異常試験結果ならびに森田らの報告<sup>4,5)</sup>から試験系に影響をおよぼしたとは考えられなかった。

以上の試験結果から、本試験条件下においてテトラメチルアンモニウムヒドロキシドのチャイニーズハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陰性と判定した。

なお、本被験物質の類縁体である tetramethylammonium bromide, tetramethylammonium chloride, tetramethylammonium iodide, tetramethylammonium fluoride tetrahydrate, tetramethylammonium hexafluorophosphate, tetramethylammonium hydroxide pentahydrate および tetramethylammonium tetrafluoroborate の変異原性に関する報告はなかった。

### 文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat. Res.*, **66**, 277 (1979).
- 2) 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.31-35.
- 3) 石館基監修, “<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, pp.19-24.
- 4) T. Morita, Y. Watanabe, K. Takeda and K. Okumura, *Mutat. Res.*, **225**, 55 (1989).
- 5) T. Morita, T. Nagaki, I. Fukuda and K. Okumura, *Mutat. Res.*, **262**, 159 (1991).

### 連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 菊池正憲, 益森勝志, 梶原玲子,  
永井美穂

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

### Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)

Masanori Kikuchi, Shoji Masumori,

Reiko Kajihara, Miho Nagai

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden, Fukude-cho, Iwata-gun,

Shizuoka, 437-1213, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
D. W. <sup>a</sup>	0	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0(0.0)-	0(0.0)-	-
Test substance	228	6	110.1	200	3	1	1	0	0	0	2(1.0)-	1(0.5)-	-
	455	6	83.6	200	0	1	1	0	0	0	2(1.0)-	0(0.0)-	-
	910	6	78.5	200	1	1	0	0	0	0	1(0.5)-	2(1.0)-	-
MMC <sup>b</sup>	0.1	6	63.8	200	11	52	122	0	0	0	132(66.0)+	1(0.5)-	+

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth:others, -gap:total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (mitomycin C)

Table 2 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
D. W. <sup>a</sup>	0	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0(0.0)-	2(1.0)-	-
Test substance	228	6	97.2	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)-	1(0.5)-	-
	455	6	106.1	200	1	0	0	0	0	0	0(0.0)-	2(1.0)-	-
	910	6	95.6	200	0	1	1	0	0	0	1(0.5)-	1(0.5)-	-
CP <sup>b</sup>	12.5	6	74.5	200	12	52	140	0	0	1	148(74.0)+	0(0.0)-	+

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth:others, -gap:total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (cyclophosphamide)

Table 3 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with tetramethylammonium hydroxide [continuous treatment: 24 hr]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
D. W. <sup>a</sup>	0	24	100.0	200	2	0	0	0	0	0	0(0.0)-	1(0.5)-	-
Test substance	228	24	97.7	200	0	1	1	0	0	0	2(1.0)-	1(0.5)-	-
	455	24	93.8	200	1	1	0	0	0	0	1(0.5)-	2(1.0)-	-
	910	24	89.0	200	0	0	3	0	0	0	3(1.5)-	1(0.5)-	-
MMC <sup>b</sup>	0.05	24	60.1	200	14	21	54	0	0	0	63(31.5)+	1(0.5)-	+

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth:others, -gap:total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (mitomycin C)

## Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Tetramethylammonium hydroxide in Rats

### 要約

テトラメチルアンモニウムヒドロキシドの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系ラットを用いて実施した。投与量は雌雄とも0(対照群), 5, 10および20 mg/kgとし, 0および20 mg/kg投与群は回復試験の動物を含む1群10匹, 5および10 mg/kg投与群は1群5匹を使用して試験を行った。

その結果, いずれの投与群においても死亡例は認められなかった。一般状態の変化として, 投与第6日以降, 10 mg/kg以上の投与群で投与直後の流涎が繰り返して観察された。この流涎は, 投与後1時間以内に消失する一過性の症状であったが, 投与第13日以降には, 雄の10 mg/kg以上の投与群および雌の20 mg/kg投与群で投与後1時間以上継続して観察される例があった。10 mg/kg投与群の雄および20 mg/kg投与群の雌雄では, 投与第1週の摂餌量が低値を示した。また, 回復期間中に被験物質投与群の雄の摂餌量は高値を示し, 回復第1週には有意な差が認められた。回復第2週の尿検査では, 被験物質投与群の雄における電解質排泄量に増加がみられたが, 投与第4週の尿検査所見には被験物質投与に起因したと考えられる変化はなかった。血液学検査および血液生化学検査所見には, 被験物質投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。器官重量では, 投与期間終了時の雄の心臓重量が用量に依存して減少した。すなわち, 絶対重量は5 mg/kg以上の投与群で, 相対重量は10 mg/kg以上の投与群で, いずれも有意な減少が認められた。一方, 投与期間終了時の雌および回復期間終了時の雌雄の器官重量には, いずれも有意な差は認められなかった。また, 病理組織学所見には, 被験物質投与に起因したと考えられる変化は観察されなかった。

以上のことから, 本試験条件下におけるテトラメチルアンモニウムヒドロキシドの無影響量は, 雄では5 mg/kg/day未満, 雌では5 mg/kg/dayであると判断された。

### 方法

#### 1. 被験物質

被験物質として, 昭和電工(株)(福島)より提供されたテトラメチルアンモニウムヒドロキシドの20.19%水溶液(ロット番号:81029)を用いた。提供された水溶液は無色透明の液体で, 不純物として炭酸根3 ppm, 塩化物0.17 ppmを含有していた。被験物質は, 使用時まで室温で保

管した。なお, 被験物質の試験期間中の安定性は, 残余被験物質を提供元で再分析することにより確認した。

投与検体は, 被験物質を局方注射用水(製造番号:9707SA, 光製薬(株))で希釈してテトラメチルアンモニウムヒドロキシド濃度として0.2 w/v%溶液を調製し, これを注射用水により各濃度に段階希釈した。なお, 初回に調製した各濃度の投与検体の含量測定を実施した結果, 溶液中の被験物質の平均含量は, 所定濃度の100~101%であった。また, 本被験物質の溶媒中の安定性を確認するための分析法の確立が困難であったため, 安定性試験は実施せず, 投与検体は用時調製とした。

#### 2. 動物および飼育方法

試験には, 生後4週で購入し, 検疫を兼ねて8日間予備飼育した雌雄のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS, 日本チャールス・リバー(株))各30匹を使用した。

群分けは, 検疫期間中に異常がなかった動物を用い, 投与開始前日の体重に基づいて体重別層化無作為抽出法により行った。動物数は, 雌雄とも対照群および高用量群を各10匹とし, 低および中用量群を各5匹とした。

動物は, 温度 $24 \pm 1$  °C, 湿度50~65%, 換気回数約15回/時, 照明12時間(7~19時点灯)に設定した飼育室内で, 金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し, 固型飼料(CE-2, 日本クレア(株))および水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。

#### 3. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は, 投与量設定のための予備試験と急性経口投与毒性予備試験の結果に基づき決定した。すなわち, 20 mg/kgを5日間反復投与することにより雄3例中1例で, 腺胃粘膜の肥厚が観察されたが, 5および10 mg/kgを7日間反復投与しても何ら変化がみられなかった。一方, 急性経口投与毒性予備試験として, 25 mg/kgを単回投与したところ, 半眼および自発運動の減少等が散見され, 雄3例中1例では投与翌日の体重が減少した。これらのことから20 mg/kg投与群は, 被験物質による毒性影響が認められ, かつ28日間の反復投与に耐えうる用量であると判断し, 本試験の用量は, 高用量を20 mg/kgとし, 以下公比2で除して10および5 mg/kgを中用量および低用量とした。また, 雌雄とも媒体である注射用水を投与する対照群を設けた。

投与経路は強制経口投与とし, 1日1回, 28日間, ラット用胃管を用いて投与した。投与容量は10 mL/kgと

し、投与量は雌雄とも最近時の体重をもとに個別に算出した。なお、回復期間は14日間とした。

#### 4. 観察および検査

##### 1) 一般検査

毎日(投与期間中は投与前および投与後)全例の一般状態を観察した。また、体重は、投与第1週の第1日の投与直前と5日、投与第2週以降回復期間終了週までは1週に2回の頻度で測定し、その他、投与期間終了日、回復期間終了日および剖検日にも測定した。摂餌量は、投与第1週では、投与第1日から2日にかけて1日あたりの摂餌量を測定し、以後回復期間終了週まで毎週1回の頻度で測定した。

##### 2) 尿検査

各群とも全例について、投与第4週および回復第2週に代謝ケージに収容して蓄尿し、約4および24時間の時点で採尿した。この4時間尿を用いて、pH、潜血、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンを試験紙法(クリニテック200+, バイエル・三共(株))により、また色調および濁度を視診により検査し、24時間尿を用いて、尿量(天秤で重量を計測し、比重で除す)、比重(単位体積あたりの重量を測定)を測定したほか、全自動電解質分析装置(EA05, (株)A&T)により、ナトリウム、カリウムおよび塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

##### 3) 血液学検査

投与期間ないし回復期間終了日から翌日の剖検日にかけて定期解剖例全例を18から24時間絶食させ、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈よりEDTA 2Kを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コルターエレクトロニクス(株))により赤血球数、白血球数、平均赤血球容積、血小板数(以上、電気抵抗法)および血色素量(吸光度法)を測定し、これらを基にヘマトクリット値、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)および網状赤血球比率(Brecher法)を求めた。また、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液をCA-1000(東亜医用電子(株))によりプロトンピン時間および活性部分トロンボプラスチン時間(光散乱検出法)を測定した。

##### 4) 血液生化学検査

血液学検査用の採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロシユ・ダイアグノスティックス(株))により、総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD・DAOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ・G6PDH法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼ・Gl.DH法)、クレアチニン濃度(Jaffé法)、アルカリフォスファターゼ活性(GSCC法)、GOT活性(IFCC法)、GPT活性(IFCC法)、 $\gamma$ -GTP活性( $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)、

トリグリセライド濃度(GPO・DAOS法)、無機リン濃度(モリブデン酸直接法)、カルシウム濃度(OCPC法)を測定し、A/G比を算出した。また、全自動電解質分析装置(EA05, (株)A&T)により、ナトリウム濃度、カリウム濃度および塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

##### 5) 病理学検査

上記の採血に引き続き、動物を放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣または精巣、精巣上体の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、脳、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺、上皮小体、心臓、気管、気管支、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、前立腺、精囊、卵巣、子宮、腔、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、骨格筋(下腿部)、坐骨神経、大腿骨骨髓、脾臓、顎下腺、舌下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺、皮膚、病変部を0.1 mol/Lリン酸緩衝10 vol%ホルマリン溶液(pH 7.2)に固定し、精巣、精巣上体はブアン液に固定した。心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胃、精巣、精巣上体、卵巣および病変部はパラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、まず、対照群および高用量群について病理組織学検査を実施した。次いで、被験物質投与による影響が疑われた雄の腎臓について、全例の病理組織学検査を実施した。この他、肉眼的異常が認められた器官・組織についても病理組織学検査を実施した。

##### 5. 統計解析

体重、摂餌量、尿検査(半定量検査を除く)および定期解剖例の血液学検査、血液生化学検査ならびに器官重量について、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群が3群以上の場合は、Dunnett法で多重比較を行い、2群の場合には、Studentのt検定ないしAspin-Welchのt検定を行った。さらに、病理組織学検査所見は、グレード分けしたデータについてMann-WhitneyのU検定を、陽性グレードの合計値についてFisher直接確率の片側検定を行った。なお、これら対照群および被験物質投与群との間の有意差検定はいずれの場合も有意水準を5%とした。

## 結果

### 1. 一般状態

投与第6日以降、投与後1時間以内に消失する投与直後の一過性の流涎が、5 mg/kg投与群の雄1例、10 mg/kg投与群の雄4例、雌5例、20 mg/kg投与群の雄8例、雌9例に認められた。また、投与第13日以降には、流涎が投与後1時間以上継続して観察される例もあり、その例数は、10 mg/kg投与群の雄1例、20 mg/kg投与群の雄5例、雌6例であった。これらの流涎は、5 mg/kg投与群を除き、投与により繰り返して観察され

ることが多かった。また、個体によっては投与時の保定の段階で見られることがあった。さらに、20 mg/kg投与群の雌1例では、投与1時間後から流涎が認められることもあった。その他、10 mg/kg投与群の雄1例では、投与第12日以降、片側眼球の暗色化が認められた。なお、投与期間および回復期間中に死亡例はなかった。

## 2. 体重 (Fig. 1, 2)

観察期間中、被験物質投与群では、雌雄いずれにおいても対照群との間に体重の有意な差は認められなかった。

## 3. 摂餌量 (Fig. 3)

10 mg/kg投与群の雄および20 mg/kg投与群の雌では、投与第1週の摂餌量が対照群と比較して有意な低値を示したが、その後の投与期間中には、いずれの被験物質投与群においても有意な差は認められなかった。一方、回復期間中、被験物質投与群の雄の摂餌量は高値を示し、回復第1週には有意な差が認められた。

## 4. 尿検査 (Table 1)

投与第4週の検査では、いずれの検査項目においても、対照群と被験物質投与群の間に著しい差は認められなかった。回復第2週の検査では、被験物質投与群の雄における電解質排泄量に有意な増加が認められた。

## 5. 血液学検査 (Table 2)

投与期間終了時の検査では、20 mg/kg投与群の雄にプロトロンビン時間の短縮がみられた以外、対照群と被

験物質投与群の間に有意な差は認められなかった。また、回復期間終了時の検査では、被験物質投与群の雌に赤血球数の有意な減少がみられたほか、雄では網状赤血球比率、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の増加と血小板数の減少が、また、雌では血色素量の減少および活性部分トロンボプラスチン時間の短縮が認められた。

## 6. 血液生化学検査 (Table 3)

投与期間終了時の検査では、いずれの検査項目においても、対照群と被験物質投与群の間に有意な差は認められなかった。回復期間終了時の雄では、総蛋白濃度の有意な低下が認められたが、他の検査項目には対照群と被験物質投与群の間に有意な差は認められなかった。

## 7. 病理学検査

### 1) 肉眼所見

#### (1) 投与期間終了時解剖例

片側眼球の暗色部が10 mg/kg投与群の雄1例に、腎臓の嚢胞が対照群の雌1例に、脾臓の小型化が20 mg/kg投与群の雌1例に観察された。

#### (2) 回復期間終了時解剖例

腎臓の大型化と皮質の淡色部が20 mg/kg投与群の雄1例に、片側の精巣および精巣上体の小型化が対照群の1例に観察された。

### 2) 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時解剖例の5 mg/kg以上の投与群の雄では、心臓の絶対重量に有意な減少がみられ、10 mg/kg

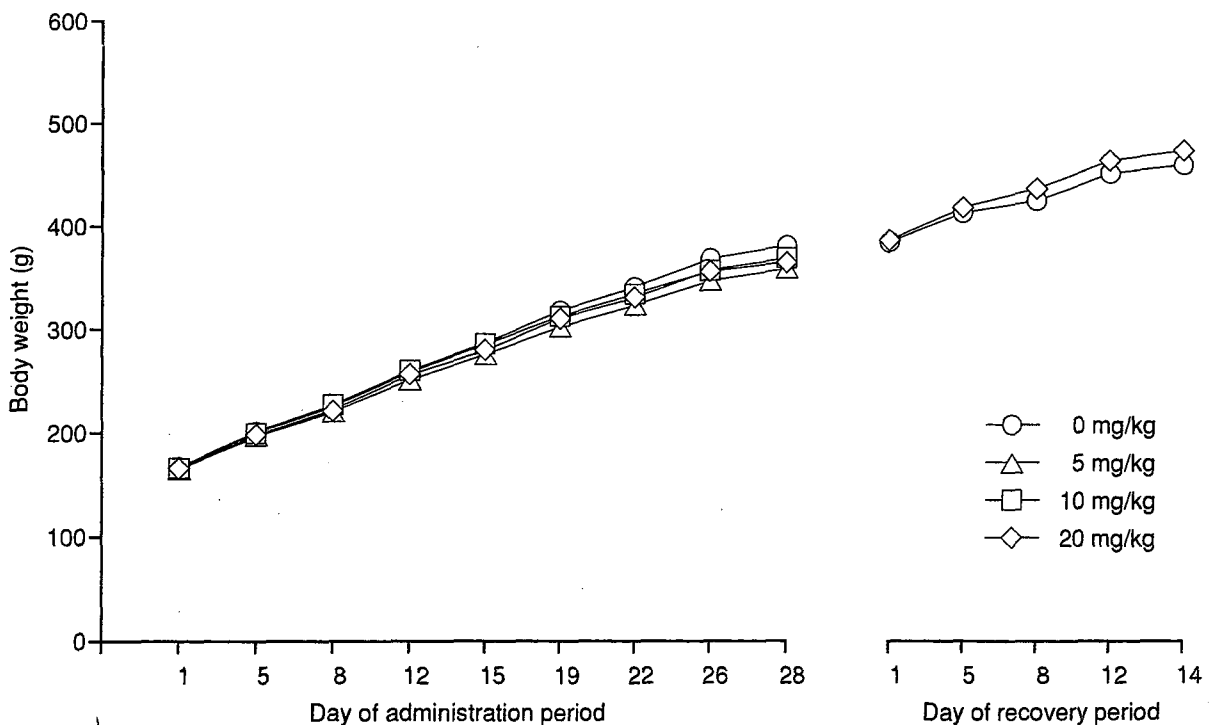


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

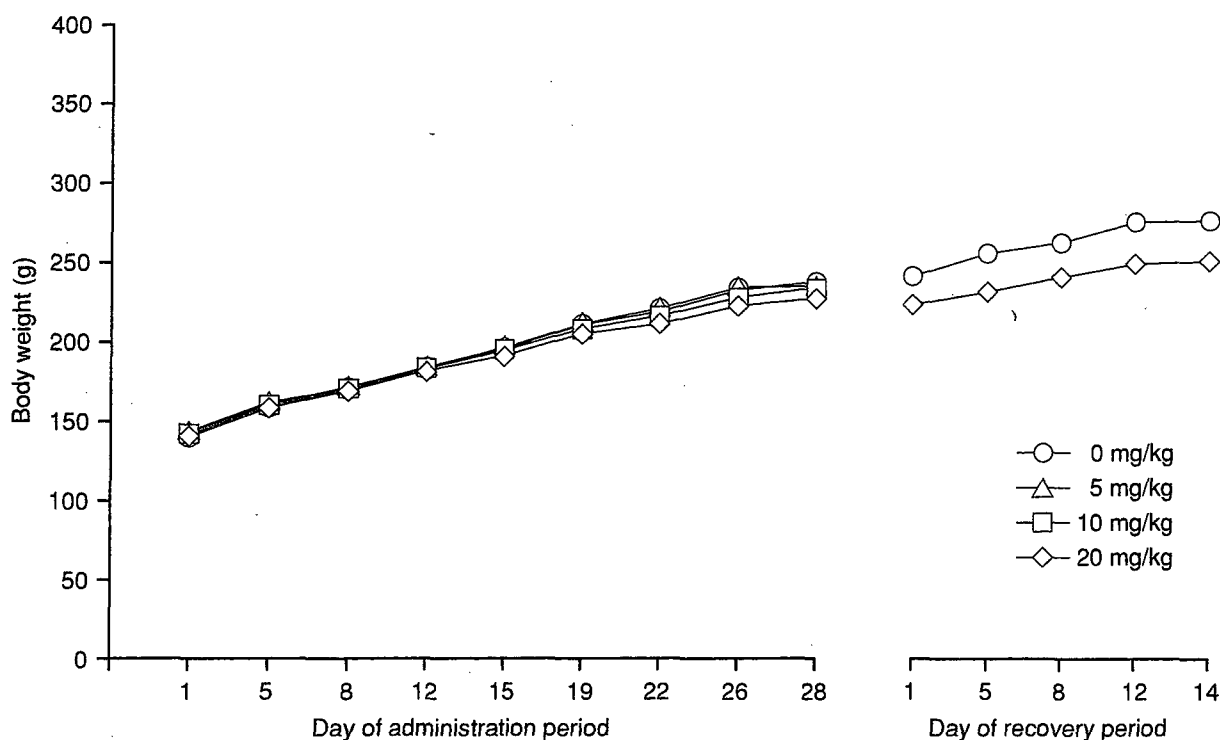


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

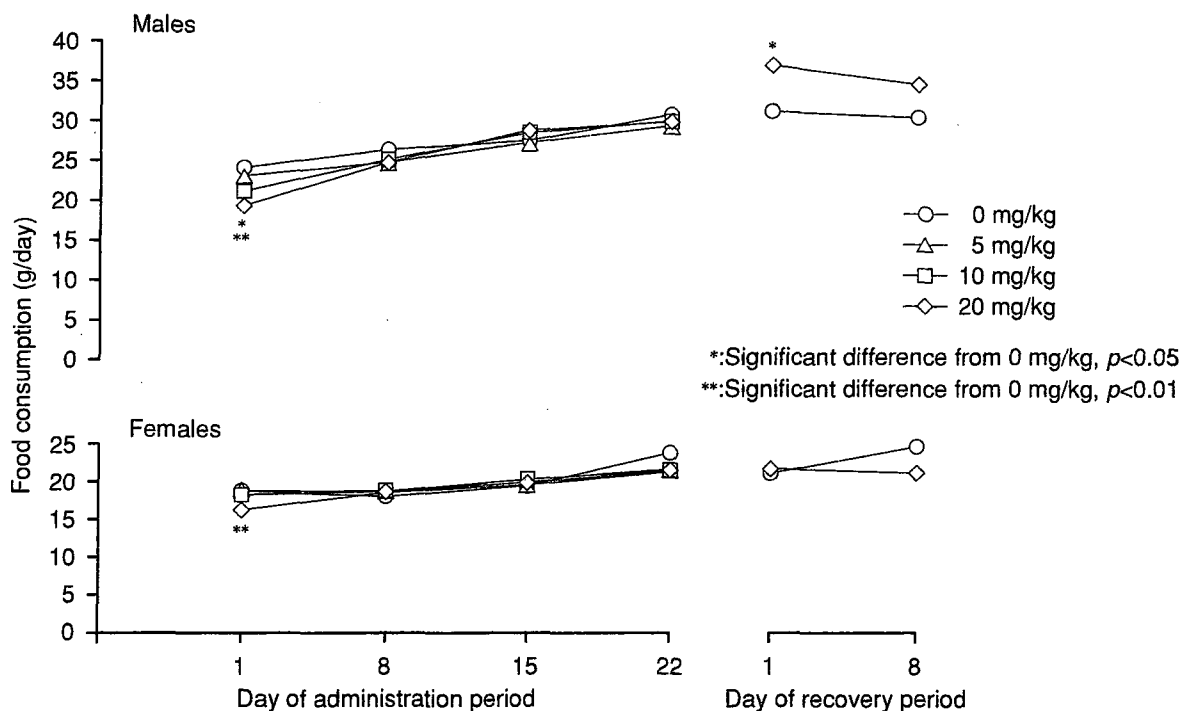


Fig. 3 Food consumption of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

以上の投与群では、相対重量にも有意な減少が認められた。一方、回復期間終了時解剖例の器官重量には、いずれも有意な差は認められなかった。

3) 病理組織学検査 (Table 5)

(1) 投与期間終了時解剖例

腎臓の近位尿細管に軽度な好酸性小体が20 mg/kg投与群の雄2例に観察されたほか、腎臓、脾臓あるいは心臓に所見が観察されたが、いずれの所見も群間でその発

生頻度および程度に差は認められなかった。なお、肉眼的に病変がみられた部位の所見として、片側眼球に暗色部がみられた10 mg/kg投与群の雄1例では硝子体の出血が、腎臓に嚢胞がみられた対照群の雌1例では皮質の嚢胞が、脾臓の小型化がみられた20 mg/kg投与群の雌1例では、髄外造血の消失がそれぞれ認められた。

## (2) 回復期間終了時解剖例

雄の腎臓の近位尿管に軽微から軽度な好酸性小体が、対照群2例、被験物質投与群3例に観察されたほか、自然発生性の所見が観察されたが、いずれの所見も群間でその発生頻度および程度に差は認められなかった。なお、肉眼的に病変がみられた部位の所見として、片側の精巣および精巣上体の小型化がみられた対照群の1例では、精巣の精細管萎縮および精巣上体の精子減少が観察されたが、腎臓の大型化と皮質の淡色部がみられた20 mg/kg投与群の雄1例では、これに対応すると考えられる変化は認められなかった。

## 考察

テトラメチルアンモニウムヒドロキシドを、5, 10および20 mg/kgの用量で雌雄のSprague-Dawley系ラットに28日間にわたって強制経口投与し、その後14日間の回復期間を設けた。

その結果、投与第6日以降、被験物質投与群に投与直後の流涎が認められた。この流涎は、投与後1時間以内に消失する一過性の症状であったが、投与第13日以降には、雄の10 mg/kg以上の投与群および雌の20 mg/kg投与群では、投与後1時間以上継続して観察される例があった。流涎は、テトラメチルアンモニウムヒドロキシドの急性経口投与毒性試験の高用量群(50 mg/kg)でも観察されており、被験物質投与による影響と考えられる。流涎の成因としては、テトラメチルアンモニウムヒドロキシドの0.2 w/v%水溶液のpHは12.5という強アルカリ性であることから、投与検体の刺激性による変化とも考えられるが、低用量の投与検体濃度でもpHはほとんど変わらないことから、その可能性は少ないと考えられる。一方、テトラメチルアンモニウム塩は神経節興奮薬(脱分極性薬物)であり、一部ムスカリン様作用を有する<sup>1)</sup>ことから、被験物質の自律神経系に対する作用によって、唾液の分泌が亢進した可能性がある。なお、流涎以外に、便の性状あるいは瞳孔等には変化は認められなかった。また、5 mg/kg投与群の雄1例に認められた流涎は、1回のみで、投与の保定の段階でみられていることから、被験物質の作用による症状ではなく、投与操作に反応した変化と考えられる。

10 mg/kg投与群の雄および20 mg/kg投与群の雌雄では、投与第1週の摂餌量が低値を示した。この変化は、用量依存性であることから被験物質投与によるものと考えられるが、観察期間中の体重には変化はなく、その影響は軽微なものであった。一方、回復期間中の被験物質投与群の雄の摂餌量が高値を示した。その成因については不明であるが、被験物質投与中止による変化と考えら

れる。また、回復第2週の尿検査で、被験物質投与群の雄の電解質排泄量に増加がみられたが、この所見は、前述の回復期間になってからの摂餌量の増加に伴う変化の可能性もある。

回復期間終了時の血液学検査所見として、被験物質投与群の雌雄に赤血球数の減少がみられたほか、雄では網状赤血球比率、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の増加と血小板数の減少が、雌では血色素量の減少がそれぞれ認められた。これらの変化は、いずれも投与期間終了時には対照群との差はなく、また、生理的変動範囲内の軽微な変化であることから、毒性学的意義は少ないものと考えられる。この他、血液および血液生化学の検査項目のうち、対照群と被験物質投与群との間に有意差の認められた血液凝固時間は、短縮方向の変化であったこと、総蛋白濃度の低下は、回復期間終了時のみの変化であり、他の関連所見もなかったことから、いずれも被験物質投与およびその後続く回復期間に関連がない変化と考えられる。

器官重量では、投与期間終了時に雄の心臓重量が用量に依存して減少したが、高用量群における組織学所見には対照群との差はなかった。前述のように、テトラメチルアンモニウム塩は神経節興奮薬であり、神経節のシナプス後膜を脱分極させることにより、節後ニューロンの興奮を起こし、次いで脱分極性の遮断を起こすことが知られており<sup>2)</sup>、また、ラットの心臓に対してムスカリン様作用を有することが報告されている<sup>3)</sup>。これらのことから、今回の試験でみられた雄の心臓重量の減少は、被験物質投与による降圧、心筋の収縮力低下、心拍数の減少等心臓に対する負荷の軽減によって生じた可能性があるが、その詳細については不明である。

その他、病理学検査所見として、投与期間終了時に、20 mg/kg投与群の雄2例で腎臓の近位尿管に好酸性小体が観察されたが、この所見は、雄ラットに特徴的な自然発生性病変であり<sup>4)</sup>、回復期間終了時の検査では、対照群でも認められていることから、投与期間終了時に観察された変化は、自然発生性のもので、被験物質投与に起因した変化ではないと考えられる。

以上のように、テトラメチルアンモニウムヒドロキシドを反復投与することにより、10 mg/kg以上の用量では、投与後の流涎がみられ、20 mg/kgの用量では、流涎が1時間以上継続して認められる例が多かった。また、雄では心臓の重量が用量依存的に減少し、5 mg/kg以上の用量で絶対重量に有意な差が認められた。したがって、本試験条件下におけるテトラメチルアンモニウムヒドロキシドの無影響量は、雄では5 mg/kg/day未満、雌では5 mg/kg/dayであると判断された。

## 文献

- 1) 伊藤宏, "薬理学," 三須良実編, 第6版, 栄光堂, 東京, 1986, p.200.



- 2) R. H. Kennedy, R. P. Wyeth, P. Gerner, S. Liu, H. J. Fontenot, E. Seifen, *Am. J. Physiol.*, **268** (*Cell Physiol.* **37**), C1414(1995).  
3) 伊東信行, “最新毒性病理学,” 中山書店, 東京, 1994, p.206.

連絡先

試験責任者: 畔上二郎  
試験担当者: 森村智美, 加藤博康, 関 剛幸,  
新藤智子, 永田伴子, 吉村慎介,  
堀内伸二, 稲田浩子, 三枝克彦,  
安生孝子

(財)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: Jiro Azegami (Study Director)

Tomomi Morimura, Hiroyasu Katoh,

Takayuki Seki, Tomoko Shindo,

Tomoko Nagata, Shinsuke Yoshimura,

Shinji Horiuchi, Hiroko Inada,

Katsuhiko Saegusa, Takako Anjo

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 Urinalysis of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	On day 26 of administration period				On day 12 of recovery period	
	0	5	10	20	0	20
<b>Male</b>						
Number of animals	10	5	5	10	5	5
Volume (mL/24 hr) <sup>a</sup>	26.9±10.9	24.9±4.6	27.1±2.8	24.0±5.3	32.9±11.0	26.6±3.7
Specific gravity <sup>a</sup>	1.038±0.011	1.033±0.007	1.030±0.005	1.033±0.007	1.033±0.010	1.040±0.008
Color	light yellow					
Protein <sup>c</sup>	±	±	±	±	±	±
	+	+	+	+	+	+
Ketone <sup>b</sup>	±	±	±	±	±	±
	+	+	+	+	+	+
Occult blood <sup>b</sup>	±	±	±	±	±	±
	+	+	+	+	+	+
Urobilinogen <sup>d</sup>	±	±	±	±	±	±
	+	+	+	+	+	+
Concentration of electrolyte (mEq/L) <sup>a</sup>						
Na	82.2±23.7	71.3±23.9	60.8±13.5	76.2±18.2	75.9±27.9	103.4±21.8
K	176.1±54.2	174.3±38.4	154.2±23.9	173.7±30.5	141.9±47.8	188.7±27.1
Cl	101.5±34.9	91.4±26.9	81.9±15.5	104.4±20.8	82.8±34.2	116.2±19.1
Excretion of electrolyte (mEq/24 hr) <sup>a</sup>						
Na	2.00±0.22	1.75±0.60	1.62±0.27	1.77±0.39	2.27±0.22	2.69±0.24*
K	4.23±0.71	4.26±0.89	4.13±0.33	4.06±0.71	4.28±0.53	4.94±0.23*
Cl	2.41±0.36	2.21±0.68	2.20±0.35	2.44±0.46	2.46±0.42	3.04±0.19*
Na/K	0.48±0.10	0.40±0.07	0.39±0.05	0.44±0.06	0.53±0.03	0.51±0.05
<b>Female</b>						
Number of animals	10	5	5	10	5	5
Volume (mL/24 hr) <sup>a</sup>	14.9±4.8	17.5±4.3	17.7±4.1	19.6±5.7	17.7±1.8	18.3±6.1
Specific gravity <sup>a</sup>	1.036±0.008	1.032±0.012	1.034±0.004	1.031±0.011	1.037±0.004	1.034±0.005
Color	light yellow					
Protein <sup>c</sup>	±	±	±	±	±	±
	+	+	+	+	+	+
Ketone <sup>b</sup>	±	±	±	±	±	±
	+	+	+	+	+	+
Urobilinogen <sup>d</sup>	±	±	±	±	±	±
	+	+	+	+	+	+
Concentration of electrolyte (mEq/L) <sup>a</sup>						
Na	83.2±23.9	76.3±28.9	76.2±15.2	63.6±21.4	107.6±9.3	101.4±16.7
K	200.2±41.2	172.9±61.7	181.0±17.3	162.9±49.5	187.8±15.3	177.0±23.8
Cl	100.0±28.0	88.8±39.1	98.2±4.9	88.3±30.8	112.0±12.7	104.0±13.9
Excretion of electrolyte (mEq/24 hr) <sup>a</sup>						
Na	1.22±0.43	1.26±0.43	1.38±0.47	1.19±0.41	1.90±0.27	1.79±0.41
K	2.93±0.84	2.83±0.75	3.16±0.60	3.03±0.73	3.31±0.27	3.16±0.85
Cl	1.48±0.55	1.43±0.55	1.74±0.40	1.66±0.57	1.98±0.31	1.88±0.61
Na/K	0.41±0.07	0.44±0.05	0.43±0.09	0.39±0.05	0.57±0.04	0.57±0.03

a) Values represent mean ± S.D. b) ±: trace, +: slight c) ±: trace, +: 30 mg/dL d) ±: 0.1 E.U./dL, +: 1.0 E.U./dL

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

Table 2 Hematological examination of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	5	10	20	0	20
<b>Male</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	717 $\pm$ 32	700 $\pm$ 28	700 $\pm$ 35	701 $\pm$ 40	777 $\pm$ 26	735 $\pm$ 21*
Hemoglobin (g/dL)	14.7 $\pm$ 0.4	14.8 $\pm$ 0.5	14.7 $\pm$ 0.6	15.0 $\pm$ 0.6	15.2 $\pm$ 0.4	15.1 $\pm$ 0.3
Hematocrit (%)	43.0 $\pm$ 1.5	42.9 $\pm$ 1.6	42.3 $\pm$ 1.9	42.6 $\pm$ 1.8	44.6 $\pm$ 1.8	43.5 $\pm$ 1.1
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	60.0 $\pm$ 1.4	61.4 $\pm$ 1.3	60.5 $\pm$ 0.5	60.8 $\pm$ 1.2	57.4 $\pm$ 0.7	59.2 $\pm$ 0.9**
MCH (pg)	20.6 $\pm$ 0.7	21.2 $\pm$ 0.5	21.0 $\pm$ 0.4	21.4 $\pm$ 0.4	19.6 $\pm$ 0.3	20.6 $\pm$ 0.5**
MCHC (%)	34.3 $\pm$ 0.5	34.6 $\pm$ 0.7	34.7 $\pm$ 0.5	35.2 $\pm$ 0.7	34.1 $\pm$ 0.8	34.7 $\pm$ 0.3
Reticulocyte (%)	3.7 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 1.6	3.3 $\pm$ 0.8	1.7 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.9*
Platelet ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	103.7 $\pm$ 7.0	95.1 $\pm$ 5.3	102.1 $\pm$ 7.5	102.1 $\pm$ 5.3	104.6 $\pm$ 10.2	89.5 $\pm$ 8.3*
PT (sec)	18.7 $\pm$ 2.0	20.2 $\pm$ 3.0	17.3 $\pm$ 2.0	14.2 $\pm$ 1.2*	15.9 $\pm$ 2.6	15.5 $\pm$ 2.5
APTT (sec)	21.1 $\pm$ 1.4	21.0 $\pm$ 2.0	20.4 $\pm$ 0.9	18.4 $\pm$ 2.0	20.6 $\pm$ 2.0	19.3 $\pm$ 1.5
WBC ( $\times 100/\text{mm}^3$ )	75 $\pm$ 23	81 $\pm$ 15	76 $\pm$ 31	77 $\pm$ 20	88 $\pm$ 23	67 $\pm$ 8
Differential leukocyte counts (%)						
Band neutrophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Segmented neutrophil	15 $\pm$ 8	6 $\pm$ 5	7 $\pm$ 4	7 $\pm$ 5	4 $\pm$ 2	9 $\pm$ 6
Eosinophil	1 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Basophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte	3 $\pm$ 4	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2
Lymphocyte	81 $\pm$ 11	90 $\pm$ 5	89 $\pm$ 7	90 $\pm$ 5	94 $\pm$ 1	86 $\pm$ 6
<b>Female</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	714 $\pm$ 23	709 $\pm$ 23	711 $\pm$ 27	714 $\pm$ 43	775 $\pm$ 18	740 $\pm$ 16*
Hemoglobin (g/dL)	14.9 $\pm$ 0.5	14.6 $\pm$ 0.2	14.8 $\pm$ 0.5	14.8 $\pm$ 0.6	15.3 $\pm$ 0.3	14.9 $\pm$ 0.3*
Hematocrit (%)	42.8 $\pm$ 1.4	41.5 $\pm$ 0.9	42.9 $\pm$ 1.7	42.5 $\pm$ 1.8	44.4 $\pm$ 1.1	43.0 $\pm$ 1.1
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	60.0 $\pm$ 0.9	58.6 $\pm$ 1.7	60.4 $\pm$ 1.8	59.6 $\pm$ 2.5	57.3 $\pm$ 0.9	58.1 $\pm$ 1.5
MCH (pg)	20.9 $\pm$ 0.3	20.7 $\pm$ 0.8	20.8 $\pm$ 0.4	20.8 $\pm$ 0.8	19.8 $\pm$ 0.2	20.1 $\pm$ 0.6
MCHC (%)	34.8 $\pm$ 0.4	35.3 $\pm$ 1.0	34.5 $\pm$ 0.5	35.0 $\pm$ 0.7	34.6 $\pm$ 0.5	34.6 $\pm$ 0.5
Reticulocyte (%)	2.4 $\pm$ 1.0	2.1 $\pm$ 0.7	2.2 $\pm$ 0.9	1.9 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.4
Platelet ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	88.3 $\pm$ 6.4	96.8 $\pm$ 9.2	105.7 $\pm$ 7.8	96.8 $\pm$ 14.4	95.3 $\pm$ 10.6	91.0 $\pm$ 6.8
PT (sec)	12.0 $\pm$ 0.6	12.5 $\pm$ 0.8	12.9 $\pm$ 0.2	12.7 $\pm$ 0.5	12.0 $\pm$ 0.5	11.7 $\pm$ 0.5
APTT (sec)	16.9 $\pm$ 1.4	16.3 $\pm$ 0.7	15.0 $\pm$ 1.6	15.7 $\pm$ 1.1	17.5 $\pm$ 1.0	15.9 $\pm$ 0.7*
WBC ( $\times 100/\text{mm}^3$ )	47 $\pm$ 12	49 $\pm$ 18	44 $\pm$ 4	42 $\pm$ 5	45 $\pm$ 7	39 $\pm$ 10
Differential leukocyte counts (%)						
Band neutrophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Segmented neutrophil	8 $\pm$ 3	8 $\pm$ 6	14 $\pm$ 8	8 $\pm$ 5	7 $\pm$ 3	9 $\pm$ 6
Eosinophil	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1
Basophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte	3 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 3
Lymphocyte	89 $\pm$ 4	90 $\pm$ 5	84 $\pm$ 9	91 $\pm$ 6	89 $\pm$ 4	87 $\pm$ 8

Values represent mean  $\pm$  S.D.\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$ \*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Table 3 Blood chemical examination of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	5	10	20	0	20
<b>Male</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.2±0.2	5.1±0.2	5.3±0.2	5.3±0.3	5.5±0.1	5.2±0.1**
Albumin (g/dL)	3.0±0.1	3.0±0.2	3.0±0.2	3.2±0.1	3.2±0.1	3.1±0.1
A/G	1.36±0.13	1.37±0.21	1.30±0.12	1.47±0.10	1.39±0.12	1.50±0.12
Glucose (mg/dL)	133±7	125±3	126±6	130±10	167±40	147±15
Total cholesterol (mg/dL)	40±4	36±6	43±6	44±5	46±11	40±6
Triglyceride (mg/dL)	41±4	42±10	43±18	37±5	48±9	50±11
BUN (mg/dL)	17±3	16±2	16±4	17±2	15±3	14±2
Creatinine (mg/dL)	0.5±0.0	0.5±0.1	0.6±0.1	0.6±0.0	0.7±0.1	0.6±0.1
Inorg. phos. (mg/dL)	7.5±0.4	7.4±0.2	7.5±0.3	7.3±0.6	7.4±0.5	7.1±0.5
Ca (mg/dL)	8.8±0.2	8.9±0.2	8.9±0.2	9.0±0.1	8.9±0.2	9.0±0.2
Na (mEq/L)	145.6±0.7	145.0±0.7	144.8±0.3	145.2±0.6	145.3±1.4	145.1±0.7
K (mEq/L)	3.52±0.15	3.61±0.12	3.73±0.23	3.63±0.2	4.03±0.44	3.61±0.25
Cl (mEq/L)	107.4±1.1	107.2±1.1	107.4±1.3	108.3±1.2	106.5±1.1	106.3±0.5
ALP (U/L)	453±62	425±99	396±66	399±80	319±53	309±49
GPT (U/L)	29±5	29±1	29±3	34±7	30±6	30±2
GOT (U/L)	69±5	66±6	61±6	67±13	70±7	70±6
γ-GTP (U/L)	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Female</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.2±0.2	5.4±0.2	5.1±0.2	4.9±0.3	5.8±0.3	5.6±0.2
Albumin (g/dL)	3.2±0.1	3.3±0.1	3.2±0.2	3.1±0.2	3.6±0.3	3.4±0.2
A/G	1.58±0.11	1.66±0.14	1.66±0.14	1.66±0.12	1.61±0.25	1.61±0.13
Glucose (mg/dL)	125±10	122±10	120±10	118±6	130±14	119±14
Total cholesterol (mg/dL)	50±4	51±6	52±13	56±10	53±10	62±4
Triglyceride (mg/dL)	30±7	30±6	31±7	30±13	41±22	27±10
BUN (mg/dL)	16±2	19±3	16±3	19±4	21±3	20±2
Creatinine (mg/dL)	0.6±0	0.6±0	0.6±0	0.6±0.1	0.7±0.1	0.7±0
Inorg. phos. (mg/dL)	5.8±0.8	6.6±0.6	5.8±1.0	6.3±0.2	6.0±0.7	6.2±0.8
Ca (mg/dL)	8.7±0.2	8.9±0.2	8.6±0.4	8.6±0.2	9.1±0.3	8.9±0.3
Na (mEq/L)	143.6±0.9	143.8±1.3	144.5±0.9	144.7±1.5	144.2±1.2	145.2±1.3
K (mEq/L)	3.26±0.19	3.47±0.29	3.38±0.19	3.31±0.37	4.04±0.31	3.89±0.35
Cl (mEq/L)	108.6±0.8	108.8±1.3	109.5±1.7	109.5±1.2	107.5±2.5	108.9±0.9
ALP (U/L)	259±91	244±83	276±65	293±52	186±16	191±42
GPT (U/L)	20±2	24±3	24±3	25±5	24±3	26±7
GOT (U/L)	62±5	57±4	57±5	58±3	64±8	65±14
γ-GTP (U/L)	0±1	0±0	0±0	0±1	1±0	0±0

Values represent mean ± S.D.

\*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Table 4 Organ weights of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	5	10	20	0	20
<b>Male</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	348.7±16.9	326.1±23.9	334.0±15.4	325.7±16.8	410.5±19.3	424.3±30.6
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1896.4±64.6	1916.0±82.1	1923.2±55.9	1919.2±123.1	1976.7±62.4	1986.9±11.8
Thymus	621.5±90.5	580.8±111.9	641.3±162.3	540.3±92.1	545.7±131.1	529.6±76.4
Heart	1259.9±78.8	1086.4±77.3*	1077.0±104.8**	1043.6±65.4**	1230.1±52.8	1254.6±117.5
Liver	10540.8±708.4	9927.4±910.4	10202.5±338.4	9943.1±1170.0	11831.7±963.2	12920.9±1257.9
Kidneys	2623.6±147.5	2444.1±187.2	2449.7±168.9	2473.4±191.5	2749.4±274.7	2839.4±196.4
Spleen	723.7±71.2	669.1±111.1	670.0±127.6	653.0±127.0	755.6±68.0	881.0±111.5
Adrenal glands	58.9±12.9	45.6±5.2	49.6±3.4	55.2±7.0	55.7±3.9	54.9±5.8
Testes	3159.3±294.7	2942.5±122.6	3030.4±128.5	2949.1±158.0	3223.9±395.3	3300.5±266.6
Epididymides	722.8±29.5	695.3±11.4	707.6±51.1	696.0±50.0	953.6±168.5	1067.5±58.9
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	5.450±0.360	5.895±0.414	5.765±0.266	5.892±0.200	4.818±0.117	4.705±0.380
Thymus	1.778±0.205	1.786±0.345	1.912±0.439	1.658±0.262	1.331±0.326	1.247±0.144
Heart	3.618±0.257	3.336±0.188	3.223±0.255*	3.207±0.195*	2.998±0.106	2.959±0.219
Liver	30.227±1.290	30.411±0.703	30.572±1.119	30.461±2.355	28.824±1.977	30.421±1.413
Kidneys	7.538±0.568	7.514±0.635	7.337±0.456	7.594±0.430	6.705±0.707	6.693±0.096
Spleen	2.082±0.248	2.047±0.284	2.008±0.393	2.000±0.331	1.846±0.213	2.076±0.209
Adrenal glands	0.170±0.041	0.140±0.014	0.149±0.011	0.169±0.015	0.136±0.009	0.129±0.013
Testes	9.083±0.999	9.074±0.917	9.086±0.527	9.058±0.319	7.844±0.797	7.814±0.878
Epididymides	2.079±0.163	2.140±0.145	2.120±0.140	2.140±0.161	2.317±0.361	2.519±0.091
<b>Female</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	214.7±10.8	213.6±25.4	213.2±21.0	211.0±18.8	251.7±14.5	226.2±26.3
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1805.3±70.2	1727.2±69.2	1755.5±65.6	1742.6±92.8	1855.1±98.4	1839.6±108.9
Thymus	499.0±71.5	503.9±108.3	442.2±92.1	446.8±62.9	392.9±55.3	388.9±88.2
Heart	771.3±59.3	748.4±106.6	724.3±54.3	763.0±100.9	815.5±48.7	799.1±97.5
Liver	6499.5±275.6	6351.2±1132.3	6120.9±881.6	6595.1±803.4	7001.4±563.2	6677.6±1024.8
Kidneys	1713.7±80.4	1649.4±222.2	1550.7±72.2	1602.6±135.1	1752.9±88.7	1657.1±292.5
Spleen	521.8±13.2	610.0±212.5	502.5±95.5	452.4±88.2	506.9±66.7	503.3±139.3
Adrenal glands	61.5±8.7	57.3±12.2	55.0±6.1	60.1±4.3	58.8±8.7	62.7±7.8
Ovaries	87.9±12.3	84.4±17.1	77.1±10.3	85.9±11.4	83.4±17.7	79.8±18.6
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	8.416±0.286	8.168±0.915	8.302±0.906	8.299±0.699	7.388±0.554	8.201±0.896
Thymus	2.322±0.290	2.340±0.282	2.097±0.518	2.116±0.222	1.571±0.296	1.704±0.266
Heart	3.594±0.235	3.498±0.154	3.409±0.221	3.616±0.324	3.249±0.285	3.535±0.215
Liver	30.291±0.701	29.593±2.103	28.670±2.220	31.204±1.553	27.812±1.488	29.448±1.890
Kidneys	7.988±0.283	7.714±0.323	7.318±0.643	7.601±0.220	6.994±0.726	7.304±0.695
Spleen	2.438±0.175	2.799±0.710	2.344±0.240	2.133±0.264	2.030±0.386	2.195±0.375
Adrenal glands	0.285±0.028	0.267±0.036	0.258±0.019	0.285±0.014	0.234±0.039	0.277±0.016
Ovaries	0.408±0.043	0.392±0.037	0.364±0.055	0.407±0.042	0.330±0.058	0.352±0.062

Values represent mean ± S.D.

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$ \*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Table 5 Histopathological findings of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Male						Female					
	End of administration period				End of recovery period		End of administration period				End of recovery period	
	0	5	10	20	0	20	0	5	10	20	0	20
Dose (mg/kg)	0	5	10	20	0	20	0	5	10	20	0	20
Number of animals examined (Kidney)	5	5	5	5	5	5	5	0	0	5	0	0
Eosinophilic body, proximal tubule	±	0	0	0	0	2	0			0		
	+	0	0	0	2	1	0			0		
	Total	0	0	0	2	3	0			0		
Basophilic tubule	±	4	3	4	3	4	5	3		2		
	+	0	0	1	0	0	0	0		0		
	Total	4	3	5	3	4	5	3		2		
Cellular infiltration, lymphocyte	±	5	3	5	4	5	5	2		2		
	Total	5	3	5	4	5	5	2		2		
Cyst, cortex	±	0	0	0	0	0	0	0		0		
	+	0	0	0	0	0	0	1		0		
	Total	0	0	0	0	0	0	1		0		
Cast, proteinous	±	2	0	1	0	0	0	0		0		
	+	0	0	0	1	0	0	0		0		
	Total	2	0	1	1	0	0	0		0		
Number of animals examined (Spleen)	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
Deposit, pigment, brown	±	0		0			0			0		
	+	5		5			5			5		
	Total	5		5			5			5		
Hematopoiesis, extramedullary	±	3		4			5			3		
	+	2		0			0			1		
	++	0		1			0			0		
	Total	5		5			5			4		
(Heart)												
Myocardial degeneration/fibrosis	±	1		0			0			0		
	+	0		1			0			0		
	Total	1		1			0			0		
Number of animals examined (Testis)	5	0	0	5	1	0						
Atrophy, seminiferous tubule, unilateral	±	0		0		0						
	+	0		0		0						
	++	0		0		0						
	+++	0		0		1						
	Total	0		0		1						
(Epididymis)												
Decrease, sperm, unilateral	±	0		0		0						
	+	0		0		0						
	++	0		0		0						
	+++	0		0		1						
	Total	0		0		1						
Number of animals examined (Eye)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorrhage, vitreous cavity	±			0								
	+			1								
	Total			1								

Grade of histopathological finding; ±: very slight, +: slight, ++: moderate, +++: severe, total: total of positive grade

# メタクリルアミドの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Methacrylamide on Bacteria

### 要約

メタクリルアミドについて、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、用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験はS9 mix無添加および添加試験のいずれも313~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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、溶媒対照値の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。

以上の結果から、メタクリルアミドは、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. 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1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与された。

*E. coli* WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与された。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したのを用い、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No. 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。

#### 2. 被験物質

メタクリルアミドは、白色結晶である。用いた被験物質は、ロット番号710130、純度99.5%以上(不純物:メタアクリル酸)であり、三井化学(株)(千葉)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保管した。

本被験物質は試験期間中安定であったことが確認された。

メタクリルアミドは、局方注射用水(ロット番号:K6I94, (株)大塚製薬工場)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。

#### 3. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

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

SA: アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA: 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)

2AA: 2-アミノアントラセン(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。

#### 4. 培地およびS9 mixの組成

##### 1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)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)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ビオチン	0.5 mM

\*: WP2 *uvrA*用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

##### 2) 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1 L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。

## 3) S9 mix

1 mL 中下記の成分を含む。

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された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に保温したトッパアガー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, 溶媒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目視またはコロニーアナライザーを用いて算定した。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, 溶媒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, 溶媒対照値の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抗菌性は認められなかった。

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5000  $\mu$ g/plateとした。

313~5000  $\mu$ g/plateの範囲で公比を2として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回の試験とも溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず, 陰性であった。

以上の結果に基づき, メタクリルアミドは, 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, 本被験物質はチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験でも陰性であった<sup>4)</sup>。本被験物質の類縁化合物については, 簡単な情報検索を行ったが, 変異原性に関する情報は得られなかった。

## 文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F. J. de Serres, J. Ashby, Elsevier, North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 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, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 62.

## 連絡先

試験責任者: 澁谷 徹  
 試験担当者: 原 巧, 川上久美子  
 (財)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: Tohru Shibuya (Study Director)  
 Takumi Hara, Kumiko Kawakami,  
 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 methacrylamide on bacteria (I)

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	153 149 152 ( 151 $\pm$ 2.1)	21 10 12 ( 14 $\pm$ 5.9)	32 30 23 ( 28 $\pm$ 4.7)	18 20 20 ( 19 $\pm$ 1.2)	10 5 8 ( 8 $\pm$ 2.5)					
	313	159 162 151 ( 157 $\pm$ 5.7)	15 13 10 ( 13 $\pm$ 2.5)	18 29 32 ( 26 $\pm$ 7.4)	23 21 24 ( 23 $\pm$ 1.5)	14 6 5 ( 8 $\pm$ 4.9)					
	625	149 128 146 ( 141 $\pm$ 11.4)	14 18 8 ( 13 $\pm$ 5.0)	23 26 26 ( 25 $\pm$ 1.7)	17 25 23 ( 22 $\pm$ 4.2)	3 9 5 ( 6 $\pm$ 3.1)					
	1250	138 133 141 ( 137 $\pm$ 4.0)	12 10 14 ( 12 $\pm$ 2.0)	27 27 32 ( 29 $\pm$ 2.9)	23 26 17 ( 22 $\pm$ 4.6)	9 5 10 ( 8 $\pm$ 2.6)					
	2500	141 134 165 ( 147 $\pm$ 16.3)	12 12 16 ( 13 $\pm$ 2.3)	24 27 17 ( 23 $\pm$ 5.1)	20 22 20 ( 21 $\pm$ 1.2)	11 8 3 ( 7 $\pm$ 4.0)					
	5000	138 152 162 ( 151 $\pm$ 12.1)	13 17 12 ( 14 $\pm$ 2.6)	26 30 25 ( 27 $\pm$ 2.6)	21 14 32 ( 22 $\pm$ 9.1)	9 7 5 ( 7 $\pm$ 2.0)					
S9 mix (+)	0	146 139 125 ( 137 $\pm$ 10.7)	13 8 7 ( 9 $\pm$ 3.2)	26 23 30 ( 26 $\pm$ 3.5)	37 26 24 ( 29 $\pm$ 7.0)	9 11 10 ( 10 $\pm$ 1.0)					
	313	182 177 166 ( 175 $\pm$ 8.2)	5 12 7 ( 8 $\pm$ 3.6)	24 26 36 ( 29 $\pm$ 6.4)	27 33 35 ( 32 $\pm$ 4.2)	10 7 8 ( 8 $\pm$ 1.5)					
	625	152 194 179 ( 175 $\pm$ 21.3)	14 9 6 ( 10 $\pm$ 4.0)	46 29 22 ( 32 $\pm$ 12.3)	25 34 23 ( 27 $\pm$ 5.9)	16 15 11 ( 14 $\pm$ 2.6)					
	1250	174 169 167 ( 170 $\pm$ 3.6)	12 14 13 ( 13 $\pm$ 1.0)	27 45 43 ( 38 $\pm$ 9.9)	27 22 28 ( 26 $\pm$ 3.2)	11 12 9 ( 11 $\pm$ 1.5)					
	2500	164 184 164 ( 171 $\pm$ 11.5)	13 8 16 ( 12 $\pm$ 4.0)	25 28 33 ( 29 $\pm$ 4.0)	30 27 21 ( 26 $\pm$ 4.6)	6 7 8 ( 7 $\pm$ 1.0)					
	5000	168 147 165 ( 160 $\pm$ 11.4)	15 17 14 ( 15 $\pm$ 1.5)	39 43 42 ( 41 $\pm$ 2.1)	40 42 41 ( 41 $\pm$ 1.0)	5 7 5 ( 6 $\pm$ 1.2)					
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	507 506 477 ( 497 $\pm$ 17.0)	573 557 587 ( 572 $\pm$ 15.0)	196 190 201 ( 196 $\pm$ 5.5)	506 545 521 ( 524 $\pm$ 19.7)	423 361 312 ( 365 $\pm$ 55.6)					
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	1025 1018 998 ( 1014 $\pm$ 14.0)	377 384 371 ( 377 $\pm$ 6.5)	824 846 836 ( 835 $\pm$ 11.0)	449 479 437 ( 455 $\pm$ 21.6)	379 356 358 ( 364 $\pm$ 12.7)					

Purity was above 99.5 %, and methacrylic acid was contained as impurity.  
 AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

Table 2 Mutagenicity of methacrylamide 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	166 169 146 (160 $\pm$ 12.5)	9 11 8 (9 $\pm$ 1.5)	21 19 28 (23 $\pm$ 4.7)	21 24 25 (23 $\pm$ 2.1)	8 17 12 (12 $\pm$ 4.5)	
	313	148 143 147 (146 $\pm$ 2.6)	16 13 6 (12 $\pm$ 5.1)	22 21 14 (19 $\pm$ 4.4)	14 21 32 (22 $\pm$ 9.1)	3 5 6 (5 $\pm$ 1.5)	
	625	150 138 142 (143 $\pm$ 6.1)	16 11 10 (12 $\pm$ 3.2)	28 24 25 (26 $\pm$ 2.1)	24 15 17 (19 $\pm$ 4.7)	8 10 5 (8 $\pm$ 2.5)	
	1250	122 147 143 (137 $\pm$ 13.4)	14 8 12 (11 $\pm$ 3.1)	26 20 21 (22 $\pm$ 3.2)	21 24 23 (23 $\pm$ 1.5)	10 8 7 (8 $\pm$ 1.5)	
	2500	154 128 136 (139 $\pm$ 13.3)	13 14 14 (14 $\pm$ 0.6)	26 13 16 (18 $\pm$ 6.8)	16 23 16 (18 $\pm$ 4.0)	9 7 9 (8 $\pm$ 1.2)	
	5000	144 161 149 (151 $\pm$ 8.7)	14 17 12 (14 $\pm$ 2.5)	20 14 20 (18 $\pm$ 3.5)	22 27 8 (19 $\pm$ 9.8)	8 12 10 (10 $\pm$ 2.0)	
S9 mix (+)	0	155 198 195 (183 $\pm$ 24.0)	12 18 15 (15 $\pm$ 3.0)	25 30 23 (26 $\pm$ 3.6)	25 29 42 (32 $\pm$ 8.9)	15 21 14 (17 $\pm$ 3.8)	
	313	180 191 171 (181 $\pm$ 10.0)	13 8 13 (11 $\pm$ 2.9)	30 22 21 (24 $\pm$ 4.9)	33 39 30 (34 $\pm$ 4.6)	12 10 12 (11 $\pm$ 1.2)	
	625	192 159 172 (174 $\pm$ 16.6)	15 25 8 (16 $\pm$ 8.5)	31 25 14 (23 $\pm$ 8.6)	21 24 47 (31 $\pm$ 14.2)	20 14 10 (15 $\pm$ 5.0)	
	1250	171 168 190 (176 $\pm$ 11.9)	15 14 13 (14 $\pm$ 1.0)	29 30 31 (30 $\pm$ 1.0)	27 27 29 (28 $\pm$ 1.2)	15 21 14 (17 $\pm$ 3.8)	
	2500	182 193 170 (182 $\pm$ 11.5)	14 17 23 (18 $\pm$ 4.6)	24 37 38 (33 $\pm$ 7.8)	39 20 39 (33 $\pm$ 11.0)	17 15 15 (16 $\pm$ 1.2)	
	5000	201 189 185 (192 $\pm$ 8.3)	12 20 18 (17 $\pm$ 4.2)	29 32 36 (32 $\pm$ 3.5)	40 34 35 (36 $\pm$ 3.2)	11 11 11 (11 $\pm$ 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	538 507 545 (530 $\pm$ 20.2)	569 587 546 (567 $\pm$ 20.6)	200 188 195 (194 $\pm$ 6.0)	604 556 570 (577 $\pm$ 24.7)	316 303 325 (315 $\pm$ 11.1)	
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	1072 1021 1073 (1055 $\pm$ 29.7)	450 430 475 (452 $\pm$ 22.5)	715 781 737 (744 $\pm$ 33.6)	540 504 488 (511 $\pm$ 26.6)	350 367 406 (374 $\pm$ 28.7)	

Purity was above 99.5 %, and methacrylic acid was contained as impurity.

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

*In Vitro* Chromosomal Aberration Test of Methacrylamide  
on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

メタクリルアミド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)、短時間処理(6時間)ともに0.90 mg/mL(10 mM)の濃度においても50%を越える細胞増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において0.90 mg/mLを最高処理濃度とし、公比2で3濃度を設定した。連続処理では、24時間および48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。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix非存在下および存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。S9 mix非存在下では、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下では、中濃度群(0.45 mg/mL)において、倍数性細胞の出現頻度は1.00%で有意差が認められたが、その頻度が低いことと傾向性検定( $p < 0.01$ )において有意差が認められなかったことから、陰性と判定した。

以上の結果より、メタクリルアミドは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

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時間および48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

メタクリルアミド(ロット番号:710130, 三井化学(株), 千葉)は、白色結晶で、水、DMSOおよびアセトンに対して50 mg/mL以上で溶解し、水溶性であり、融点112-114°C、沸点215°Cで、純度99.5%以上(不純物としてメタアクリル酸および水分を含む)の物質であった。被験物質原体は、過酸化物、酸化剤、酸、還元剤との接触により重合する。

6. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用蒸留水(ロット番号:K7G78, (株)大塚製薬工場)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10 vol%になるように加えた。

7. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

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™, オリンパス光学工業(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、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を越える細胞増殖抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理ともに0.90 mg/mL(10 mM)とし、連続処理、S9 mixの非存在

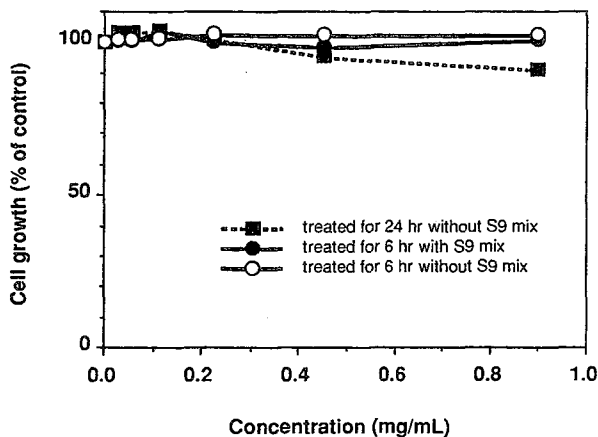


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with methacrylamide

下および存在下での短時間処理では公比2で3濃度を設定した。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、注射用蒸留水(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

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>1)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、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。

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>2)</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>3)</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。メタクリルアミドを加えて24時間および48時間連続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。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。メタクリルアミドを加えてS9 mix非存在下および存在下で短時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常誘発作用は認められなかった。また、S9 mix非存在下では、いずれの処理群においても、倍数性細胞の有意な増加は認められなかったが、S9 mix存在下では中濃度(0.45 mg/mL)においてのみ、有意な増加( $p < 0.01$ )が認められたものの、出現頻度は1.00%と低く、濃度依存性もないことから生物学的には陰性と判定した。

従って、メタクリルアミドは、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しないと結論した。

また、本物質は細菌を用いる復帰突然変異試験において、変異原活性は認められなかった<sup>4)</sup>。

#### 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) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修，“化学物質毒性試験報告”，Vol. 7，化学物質点検推進連絡協議会，東京，1999，p. 58.

連絡先

試験責任者：田中憲穂

試験担当者：日下部博一，佐々木澄志，  
高橋俊孝，橋本恵子

(財)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: Noriho Tanaka (Study director)

Hirokazu Kusakabe, Kiyoshi Sasaki,

Toshitaka Takahashi, Keiko Hashimoto

Hadano 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 methacrylamide (MA)\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		Concurrent cytotoxicity <sup>6)</sup> (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Non-treatment			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			100.0
MA	0.23	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			94.5
MA	0.45	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38	-	-	87.5
MA	0.90	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.0)	0.00			87.0
MC	0.00005	24	200	5	41	89	0	1	10	146	0	97*(48.5)	94*(47.0)	0.00			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			100.0
MA	0.23	48	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			93.5
MA	0.45	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-	87.5
MA	0.90	48	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00			74.0
MC	0.00005	48	200	3	52	222	8	4	30	319	5	142*(71.0)	140*(70.0)	0.38			-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, ctb: 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, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C.

1) Distilled water was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran-Armitage's trend test was done at  $p < 0.01$ . 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. \*: Significantly different from solvent control at  $p < 0.01$  by Fisher's exact probability test. \*\*: Purity was more than 99.5 %

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with methacrylamide (MA)\*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		Concurrent cytotoxicity <sup>6)</sup> (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Non-treatment				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			100.0
MA	0.23	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			96.5
MA	0.45	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-	96.5
MA	0.90	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			90.5
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			100.0
MA	0.23	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			96.5
MA	0.45	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.00	-	-	89.5
MA	0.90	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			90.0
CPA	0.005	+	6-(18)	200	3	8	40	1	0	0	52	0	44*(22.0)	41*(20.5)	0.00			-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, ctb: 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, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C.

1) Distilled water was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran-Armitage's trend test was done at  $p < 0.01$ . 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. \*: Significantly different from solvent control at  $p < 0.01$  by Fisher's exact probability test. \*\*: Purity was more than 99.5 %

# メタクリルアミドのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

## Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Methacrylamide in Rats

### 要約

繊維加工剤、接着剤、紙加工剤、凝集剤等の幅広い用途で使用されているメタクリルアミドの0(精製水)、30、100および300 mg/kg/dayを1群雌雄各7あるいは14匹のCrlj:CD(SD)IGSラットに28日間反復経口投与して毒性を検討し、さらに0および300 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて14日間の回復性も併せて検討した。その結果、以下の成績を得た。

一般状態では、雌雄の300 mg/kg群でよろめき歩行ならびに後肢の反転を伴う例が認められ、この症状は回復期間の14日間を通して認められた。行動機能観察では300 mg/kg群に投与21あるいは28日に雌雄で筋緊張の低下、歩行失調、雄で前肢の握力の低下がみられ、100および300 mg/kg群の雌雄ならびに30 mg/kg群の雌で自発運動量の低下が認められた。回復期間にも、300 mg/kg群の雌雄で筋緊張の低下、歩行失調、後肢の握力および自発運動量の低下がみられ、雄では後肢の着地開脚幅の低下も認められた。この変化は、投与期間および回復終了時の病理組織学検査において、300 mg/kg群の雌雄の全例で坐骨神経に神経線維の変性、また小脳に小脳脚における軸索膨化(1~2例)がみられたことから、メタクリルアミドによる神経毒性に起因するものであった。この神経毒性に関連して、投与終了時の剖検時に300 mg/kg群の雌雄の1~3例に膀胱の内腔拡張も認められた。

一方、回復終了時の病理組織学検査で1例のみの変化ではあるが、雄の300 mg/kg群にステージIX、Xにおけるステップ19精子細胞のretentionがみられ、軽度な精巢毒性も認められた。この変化との関連は明らかでなかったが、回復終了時に300 mg/kg群の雄の精巢の器官重量および器官体重重量比の増加も認められた。

その他にも、体重では、300 mg/kg群の雌雄で投与2日から体重増加抑制が認められ、投与7日以降にも低く推移し、この体重増加抑制は回復期間中にも認められた。また、投与28日には100 mg/kg群の雌でも認められた。摂餌量では、300 mg/kg群の雌雄で摂餌量の低下が投与2日以降に散見されたが、この摂餌量の低下は回復期間の後半には回復した。また投与4週に300 mg/kg群の雌雄で飲水量の低下がみられ、雌では回復2週にも認められた。血液学検査では、300 mg/kg群の雌雄および100 mg/kg群の雄で貧血傾向が認められたが、回復終了時には雄で血小板数の増加が、雌で血小板数の増加およびプロトロンビン時間の延長が認められたのみであった。

血液生化学検査では、300 mg/kg群の雌雄でアルブミンの増加、 $\alpha_1$ -グロブリンおよびアルカリホスファターゼの低下がみられ、雄で $\alpha_2$ -グロブリンの低下、雌でトリグリセリドの増加、尿素窒素およびクレアチニンの低下が認められた。回復終了時では、300 mg/kg群の雄でA/G比、アルブミン、カリウムおよび無機リンの増加、総蛋白、グルコースおよびトリグリセリドの低下、雌でアルカリホスファターゼ、カリウム、クロールおよび無機リンの増加、総蛋白およびグルコースの低下が認められた。これらの変化はメタクリルアミドの直接の毒性あるいはメタクリルアミドによる神経毒性に関連した変化と考えられた。

以上のことから、本試験条件下での無影響量(NOEL)は雄で30 mg/kg/day、雌で30 mg/kg/day未満と考えられた。

### 方法

#### 1. 被験物質および投与液の調製

メタクリルアミド(純度:99.5%, Lot No. 710130, 三井化学(株), 東京)は、白色の結晶で、融点が112~114℃で、30℃で水100 gに40.9 g溶解する。入手後の被験物質は遮光気密容器に入れ、室温で保存し、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。溶媒は日本薬局方精製水(ヤクハン製薬(株))を用い、これに被験物質を所定の濃度となるように溶解させた。調製液は、冷蔵庫内遮光下で7日間安定であることから、調製後直ちに遮光できる褐色瓶に入れて冷蔵庫内(3~7℃)に保存し、調製後7日以内に使用した。また、これらの調製液について濃度を確認し、設定値の±5%以内であることを確認した。

#### 2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた4週齢のSprague-Dawley系ラット(Crlj:CD(SD)IGS)の雌雄を8日間の検疫・馴化を行った後、雌雄各42匹を選択して5週齢で試験に供した。投与日の体重範囲は雄が152~183 g、雌が128~154 gであった。動物は、温度22~24℃、湿度50~63%、換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(午前8時から午後8時まで点灯)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、 $\gamma$ 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雌雄のラットに150, 300および600 mg/kgの3用量を1群5匹に14日間投与し, 600 mg/kgで雄に3例, 雌に1例の死亡あるいは切迫屠殺例が認められ, 300 mg/kg以上の投与群で一般状態, 体重, 摂餌量, 血液および血液生化学検査, 剖検, 器官重量等に雌雄いずれもメタクリルアミドの毒性が認められた。150 mg/kg群でも雌雄に体重増加抑制傾向, 雄に尿素窒素の低下および脳重量の低下, 雌に無機リンの増加が認められた。これらのことから, 300 mg/kgを本試験の高用量に設定し, 150 mg/kgでも弱い毒性がみられていることから, 公比約3で除し, 100および30 mg/kgとし, これに日本薬局方精製水を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。

動物は, 投与日に一番近い測定日の体重に基づいて5 mL/kgの容量で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。

### 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) 行動機能観察(FOB)

投与開始前, 投与7, 14, 21および28日ならびに回復7および14日に雌雄の各群7例のうち4例を用いて, ケージ外から動物のケージ内状態を姿勢, 眼瞼閉鎖, 呼吸, 振戦・痙攣, 常同行動(回転, 旋回)および異常行動(自傷)について, ケージから取り出す時に取り出し易さ, 扱い易さ, 筋緊張, 立毛, 被毛の状態, 皮膚, 眼球, 瞳孔径, 可視粘膜, 流涙, 流涎および体温について, またオープンフィールド装置内で痙攣, 歩行, 覚醒状態, 排尿, 排便, 呼吸, 常同行動(毛繕いおよび匂嗅ぎ)および異常行動(後方突進および発声)について, 検査台上で視覚(棒を接近させた時の反応), 触覚(筆を接触させた時の反応), 聴覚(ガルトン笛に対する反応), 痛覚(尾根部を挟んだ時の反応), 固有受容反応(強制姿勢からの復帰反応)および空中正向反射(30 cm上方から落下させた時の反応)について, それぞれのスコアリング表に従って観察し, スコア付けした。また, 投与4週および回復2週に前肢および後肢の握力(CPUゲージ, アイコーエンジニアリング株), 後肢の着地開脚幅, 10分毎60分間の自発運動量(Actomonitor II, メディカル・エイジェント社)を測定した。

#### 3) 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。

#### 4) 尿検査

投与期間および回復期間の最終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, アタゴ)を測定した。

#### 5) 血液学検査

全例について16~21時間絶食させた後, 剖検時に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, 平均赤血球容積, 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, コールターカウンターT660型, コールター), ヘマトクリット値(赤血球数, 平均赤血球容積より算出), 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)および白血球型別百分率(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 rpm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。

#### 6) 血液生化学検査

血液学検査と同時に, 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 rpmで10分間の遠心分離で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, また, 無処理血液を3000 rpmで10分間の遠心分離で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(アズビリルビン法), 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, コーニング480型炎光光度計), 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。



## 7) 剖検および器官重量測定

投与期間および回復期間終了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、器官重量を剖検当日の体重で除し100を乗じて器官体重重量比を算出した。

## 8) 病理組織学検査

全例について肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、膵臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、胸骨および大腿骨(骨髓を含む)、脊髄(頸部)、骨格筋(腓腹筋)、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃(前胃、腺胃、幽門部)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、精囊(凝固腺を含む)、前立腺、卵巣、子宮、陰、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・エオジン染色あるいは特殊染色(ボディアン染色、K・B染色、ニューロフィラメント免疫染色)標本を複製し、鏡検した。

## 5. 統計解析

前肢および後肢の握力、後肢の着地開脚幅、自発運動量、体重、摂餌量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および器官体重重量比の成績について、Bartlettの検定法によって等分散性を解析し、等分散を示した場合は、一元配置分散分析法によって解析し、有意な場合には、Dunnettの検定法により対照群と他群との比較を行った。不等分散を示した場合は、Kruskal-Wallis法で解析し、有意な場合には、Mann-WhitneyのU検定法を用いて対照群との比較を行った。行動機能観察のスコアおよび尿検査の定性的項目の成績については、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検定法を用いて対照群との比較を行った。なお、対照群との検定については、危険率5%以下を統計学的に有意とした。

## 結果

## 1. 一般状態

雌雄の300 mg/kg群で投与20あるいは21日からよろめき歩行がみられ、後肢の反転を伴う例も認められた。この症状は回復期間の14日間を通して認められた。

## 2. 行動機能観察(Table 1)

投与期間中は、300 mg/kg群で、投与21日に雌で歩行失調がみられ、そのスコアに対照群と比較して有意差が認められた。また投与28日には雌雄に筋緊張の低下お

よび歩行失調がみられ、そのスコアに有意差が認められた。投与4週に雄で前肢に有意な握力の低下がみられ、また自発運動量では、雄で測定開始後の10~20および20~30分ならびに60分間のカウント数、雌で0~10および10~20分のカウント数に有意な低下が認められた。また100 mg/kg群でも、雄で10~20分、雌で0~10分のカウント数に有意な低下が認められ、30 mg/kg群では、雌のみで0~10分のカウント数に有意な低下が認められた。

回復期間中は、300 mg/kg群で、雌雄とも回復7および14日に筋緊張の低下および歩行失調がみられ、そのスコアに有意差が認められた。また、回復2週に雌雄とも後肢に有意な握力の低下がみられ、また自発運動量では、雄で0~10、10~20、20~30および30~40分ならびに60分間のカウント数、雌で0~10および50~60分のカウント数ならびに60分間のカウント数に有意な低下が認められた。雄ではさらに後肢に有意な着地開脚幅の低下も認められた。

## 3. 体重(Fig. 1)

投与期間中は、雌雄の300 mg/kg群で有意な体重増加抑制が認められ、投与28日には雄の300 mg/kg群で体重減少が、雌の100 mg/kg群でも有意な体重増加抑制が認められた。

回復期間中も、雌雄の300 mg/kg群で体重が低く推移したが、体重増加量および体重増加率は対照群を上回り回復傾向が認められた。

## 4. 摂餌量(Fig. 2)

投与期間中は、雌雄の300 mg/kg群で投与2日以降に摂餌量の低下あるいは低下傾向が認められた。

回復期間中は、雌雄の300 mg/kg群で回復1あるいは7日まで有意な低下がみられたが、回復14日には有意差はみられなかった。

## 5. 尿検査および飲水量

尿検査では、投与4週に雌雄の各投与群に変化は認められなかった。回復2週には雌の300 mg/kg群で尿比重に対照群と比較して有意な低下が認められたが、正常範囲内の変動であった。

飲水量では、投与4週に雌雄の300 mg/kg群で対照群と比較して有意な低下あるいは低下傾向が認められ、回復2週にも雌で有意な低下が認められた。

## 6. 血液学検査(Table 2, 3)

投与終了時に、雌雄の300 mg/kg群でヘマトクリット値およびヘモグロビン量に対照群と比較して有意な低下あるいは低下傾向が認められ、雄の100 mg/kg群でも低下傾向が認められた。また、雄の100および300 mg/kg群では平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン量にも低下が認められた。一方、雄の30 mg/kg群には平均赤血球容積のみに低下が認められ、その他の項目には変化がみられなかった。

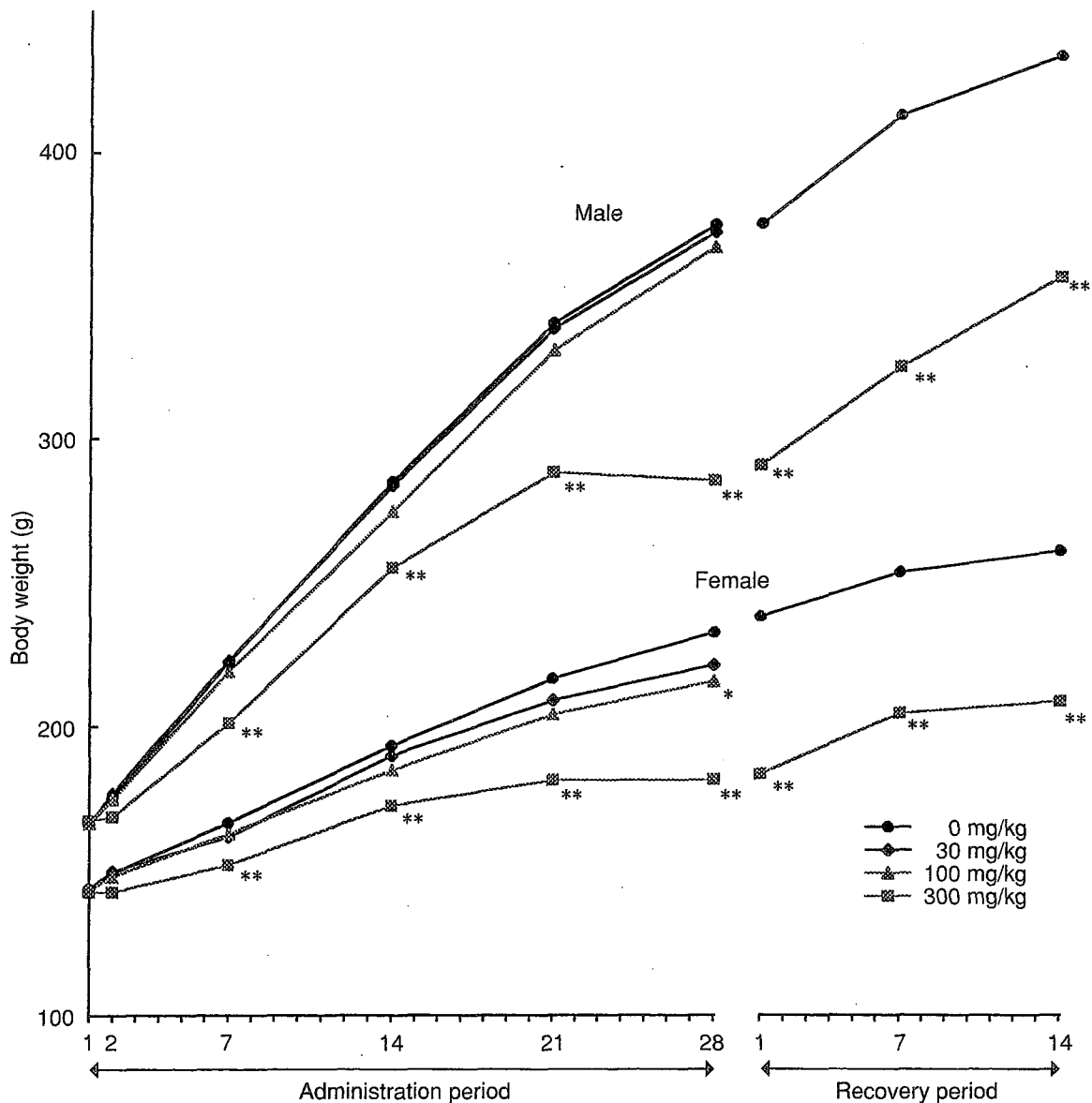


Fig. 1 Body weight change of rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test. Significantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$

回復終了時に、雌雄の300 mg/kg群で血小板数に有意な増加がみられ、雌でプロトロンビン時間に有意な延長が認められた。また、雄で単球に有意な増加がみられたが、正常範囲内の数値であった。

#### 7. 血液生化学検査 (Table 4, 5)

投与終了時に、300 mg/kg群の雄でアルブミンに有意な増加、 $\alpha_2$ -グロブリンおよびアルカリホスファターゼに有意な低下がみられ、 $\alpha_1$ -グロブリンには低下傾向が認められた。また、雌ではトリグリセリドに有意な増加、尿素窒素およびクレアチニンに有意な低下がみられ、アルブミンの増加傾向、アルカリホスファターゼおよび $\alpha_1$ -グロブリンの低下傾向が認められた。100 mg/kg群では、雄に総蛋白の有意な低下が認められたが、用量依存性は認められなかった。

回復終了時に、300 mg/kg群の雄でA/G比、アルブミ

ン、カリウムおよび無機リンの有意な増加、総蛋白、グルコースおよびトリグリセリドの有意な低下が認められた。また、雌ではアルカリホスファターゼ、カリウム、クロールおよび無機リンの有意な増加、総蛋白およびグルコースの有意な低下が認められた。一方、雄でクレアチニンに有意な低下が認められたが、対照群の変動範囲内の値であった。

#### 8. 剖検

投与終了時に、300 mg/kg群の雄で3例に膀胱の内腔拡張が認められ、1例に肺の右前葉に暗赤色化、左肺に暗赤色斑が認められ、また雌では1例に膀胱の内腔拡張が認められた。なお、対照群の1例に左肺の暗赤色斑が認められた。

回復終了時に、300 mg/kg群の雄の1例で肺の右中間葉および左肺に白色斑が認められ、また雌の1例で右腎

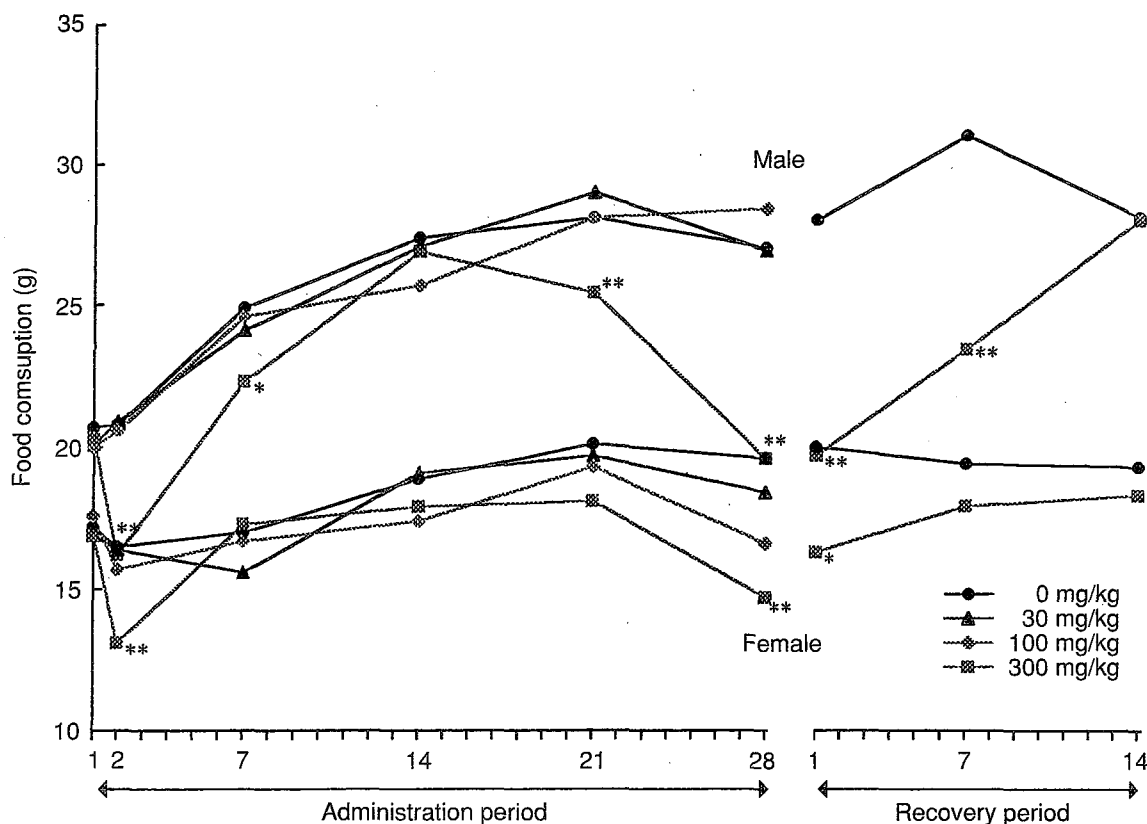


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test. Singificantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$

臓に腎盂拡張および子宮に嚢胞が認められた。

9. 器官重量および器官体重重量比 (Table 6, 7)

投与終了時および回復終了時のいずれにも、300 mg/kg群の雌雄ともに脳、肺、心臓および肝臓等多くの器官の器官重量が低下し、また器官体重重量比が増加した。しかし、回復終了時に雄の精巣は、器官重量および器官体重重量比のいずれもが増加を示した。

10. 病理組織学検査 (Table 8, 9)

投与終了時に、300 mg/kg群の雌雄ともに1~2例で小脳脚における軸索膨化が軽度に認められ、また全例で坐骨神経に軽度な神経線維の変性が認められた。

回復終了時には、300 mg/kg群の雌雄ともに3~5例で小脳脚における軸索膨化が軽度に認められ、また全例で坐骨神経に軽度~中等度な神経線維の変性が認められた。さらに、雄の1例で精巣にステージIX, Xにおけるステップ19精子細胞の軽度なretentionが認められた。

対照群および300 mg/kg群で投与終了時および回復終了時にみられたその他の変化にはメタクリルアミド投与との関連性は認められなかった。

考察

メタクリルアミドは、長期投与により神経毒性の発現が知られているアクリルアミドの類縁物質<sup>1)</sup>であり、メ

タクリルアミドの急性経口投与毒性試験<sup>2)</sup>において中枢神経の変性・壊死等が認められたことから、アクリルアミドと同様に神経毒性の発現が予測された。

一般状態では、300 mg/kg群で投与3~4週から雌雄いずれにもよろめき歩行がみられ、後肢の反転を伴う例も認められ、これらの神経症状は回復期間中にも継続して観察された。よろめき歩行および後肢の反転はアクリルアミドにおいて報告されている後肢の麻痺<sup>3)</sup>と類似した症状と考えられ、メタクリルアミドではマウスに神経毒性が報告<sup>1)</sup>されていることから、これらの歩行異常はメタクリルアミドの末梢神経に対する毒性により、後肢が麻痺した結果と推察された。

行動機能観察では、投与期間中に300 mg/kg群の雌雄で筋緊張の低下、歩行失調、握力の低下、雄で自発運動量の低下が認められた。この変化はいずれも末梢神経に対する神経毒性を示唆する前述の一般状態の変化とともに認められた。後肢の着地開脚幅の低下については回復期間に認められており、自発運動量の低下についても雌雄とも回復期間中の方がより高頻度に認められた。このことは末梢神経に対する神経毒性が、投与期間終了後も進行したものと推察された。握力の低下については、アクリルアミドの30 mg/kgを5週間投与した試験<sup>4)</sup>でも報告されていることから、この変化はメタクリルアミドの影響と考えられた。後肢の握力の低下に関連する病変として病理組織学所見で坐骨神経に神経線維の変性が確認された。前肢の握力の低下については、病理組織学検

査で認められた小脳の小脳脚における軸索膨化との関連が考えられた。雌の30および300 mg/kg群、雌雄の100 mg/kg群では、自発運動量の測定開始後0~10あるいは10~20分に有意な低下が認められた。対照群の動物では測定開始後の自発運動量が時間の経過とともに減少していく傾向がみられており、これは周囲の状況に馴れるに従って運動量が低下していくものと推察された。したがって、60分間の自発運動量に変化がみられないこと、各投与群の自発運動量の低下がいずれも測定開始後の初期にみられたことから、対照群と比較して周囲の状況の変化に対して鈍感であった可能性、あるいは運動活性が低下していた可能性が考えられた。このことは、60分間の自発運動量に有意差がみられている300 mg/kg群でも、測定開始後の初期に対照群と比較して有意差がみられることが多いことから、測定開始後の初期に認められた自発運動量の低下は、メタクリルアミドの影響によるものと推察された。なお、雌雄の30および100 mg/kg群では、一般状態、病理組織学検査において変化はみられなかった。

剖検では、300 mg/kg群で雌雄とも1~3例と少数例ではあるが膀胱に内腔拡張が認められた。この変化は、600 mg/kgを10~13日間投与した予備試験における死亡例にも認められ、メタクリルアミドとの関連が示唆された。また、この変化は、前述の後肢の麻痺に関連して、末梢神経の障害に起因した排尿困難による可能性も考えられた。

病理組織学検査では、300 mg/kg群の雌雄の全例で、坐骨神経に軽度な神経線維の変性が認められ、メタクリルアミドの神経毒性と考えられた。この変化は回復終了時ではその程度を増強し、前述と同様に末梢神経に対する神経毒性が、回復期間にも進行した可能性が推察された。アクリルアミドの50 mg/kgの週3回投与を4週間行った試験では、投与終了後40日には後肢の麻痺が回復し、末梢神経線維の再生像も認められている<sup>3)</sup>ことから、本試験において認められた神経線維の変性は、14日間の回復期間では回復するまでには至らなかったものと考えられた。また、300 mg/kg群の雌雄の小脳に散見された小脳脚における軸索膨化については、アクリルアミドの50 mg/kgの10日間投与においても認められている<sup>5)</sup>。なお、30および100 mg/kg群では、これらの神経毒性を示唆する変化は認められなかった。

一方、300 mg/kg群の1例の精巣で回復終了時に認められたステージIX, Xにおけるステップ19精子細胞のretentionについては、セルトリ細胞の障害に起因するものと考えられている<sup>6)</sup>。メタクリルアミドの急性経口投与毒性試験<sup>2)</sup>においても精巣毒性が示唆され、精母細胞および精子細胞に変化が認められたが、本試験で認められた所見とは異なり、またセルトリ細胞に障害がみられないことから、神経毒性の発現により体重および摂餌量の低下が継続したことに起因して、前述の精子細胞のretentionが起きた可能性も考えられた。しかし、精子細胞のretentionについては、特定のステージにのみ認められていることから精巣毒性の可能性を否定すること

はできなかった。

体重では、300 mg/kg群で雌雄とも投与初期から体重増加抑制が認められ、投与7日以降、回復終了時まで体重が低く推移した。また100 mg/kg群の雌でも投与28日に有意な体重増加抑制が認められた。回復期間には体重増加が認められたが、対照群と同等までの回復には至らなかった。

摂餌量では、300 mg/kgで雌雄とも摂餌量の低下が、投与初期から回復期間の前半まで継続したが、回復期間終了の時点では対照群とほぼ同等まで回復した。

血液学検査では、雌雄の300 mg/kg群でヘマトクリット値およびヘモグロビン量の低下あるいは低下傾向が認められ、雄の100 mg/kg群でもヘマトクリット値およびヘモグロビン量に低下傾向が認められた。また、雄の100および300 mg/kg群では平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン量にも低下が認められた。この貧血傾向は、雌雄の300 mg/kg群において神経症状が継続して認められたこと、体重の低下が投与7日以降継続して認められ、投与28日には減少あるいは停滞したこと、ならびに摂餌量の低下が継続的に認められたことに関連した二次的な変化と考えられた。しかし、骨髄あるいは脾臓に毒性を示唆する変化は認められず、回復期間には、これら貧血傾向を示唆する変化は認められなかった。また、雌雄の300 mg/kg群に血小板数の増加、雌のプロトロンビン時間の延長が認められ、この変化も、神経症状ならびに体重と摂餌量の低下が継続した影響によるものと考えられた。

血液生化学検査では、投与終了時に雌雄の300 mg/kg群で $\alpha_1$ -グロブリンに低下傾向およびアルカリホスファターゼに低下あるいは低下傾向がみられ、雄では $\alpha_2$ -グロブリンに低下、雌ではトリグリセリドに増加もみられた。この変化も血液学検査の場合と同様に、神経症状ならびに体重および摂餌量の低下が継続したことに起因するものと推察された。雌雄の300 mg/kg群でアルブミンに増加あるいは増加傾向が認められ、回復終了時に雄ではA/G比に増加も認められた。雌の300 mg/kg群では、尿素窒素およびクレアチニンに低下が認められたが、腎臓に病理組織学的な異常は認められなかった。

回復期間に雌雄いずれも総蛋白、グルコースに低下およびカリウム、無機リン等の電解質に増加が認められたが、この変化は、神経症状ならびに体重と摂餌量の低下が継続した影響が回復していないことに起因するか、あるいは神経毒性が進行したことから神経組織からの逸脱に起因する等の可能性が考えられた。

器官重量および器官体重重量比では、回復終了時の300 mg/kg群で精巣の器官重量および器官体重重量比に増加が認められたが、精子細胞のretentionが認められたのは1例のみであり、その原因について病理組織学所見から明らかにすることは出来なかった。

以上、メタクリルアミドをラットに28日間反復経口投与した場合、雌雄いずれも300 mg/kg投与で神経症状および体重増加抑制が認められ、病理組織学的には神経毒性が認められた。14日間の回復終了後に、この神経

赤性には回復性が認められなかった。また、100 mg/kg 投与でも、雌雄いずれにも自発運動量の低下、さらに雄で貧血傾向および腎臓の器官体重重量比の増加が、雌で体重増加抑制が認められた。30 mg/kg 投与では、雌で自発運動量の低下が認められた。

これらのことから、本試験条件下での無毒性量 (NOEL) は雄で 30 mg/kg/day、雌で 30 mg/kg/day 未満と考えられた。

#### 文献

- 1) K. Hashimoto, J. Sakamoto, and H. Tanii, *Arch. Toxicol.*, **47**, 179(1981).
- 2) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, “化学物質毒性試験報告,” Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 41.
- 3) B. Veronesi, K. Jones, S. Gupta, J. Pringle and C. Mezei, *Neurotoxicology*, **12**, 715(1991).
- 4) G. E. Schulze and B. G. Boysen, *Fund. Appl. Toxicol.*, **16**, 602(1991).
- 5) D. J. O'Shaughnessy and G. J. Losos, *Toxicol. Pathol.*, **14**, 389(1986).
- 6) D. M. Creasy, *Toxicol. Pathol.*, **25**, 119(1997).

#### 連絡先

試験責任者：須永昌男  
試験担当者：吉田文子, 皆川英俊, 平田真理子,  
古川正敏, 山本美代子  
株式会社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: Masao Sunaga (Study director)  
Ayako Yoshida, Hidetoshi Minagawa,  
Mariko Hirata, Masatoshi Hুরুkawa,  
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 Results of grip strength, foot splay, and locomotor activity counts in rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
<b>Male</b>						
Grip strength (g)						
Forelimb	867.5 ± 129.4	761.8 ± 150.7	912.5 ± 196.8	359.0 ± 86.8**	933.0 ± 88.5	777.5 ± 198.2
Hindlimb	369.5 ± 85.9	343.5 ± 111.3	394.3 ± 115.8	192.3 ± 61.4	271.8 ± 69.7	83.3 ± 54.8**
Splay (cm)						
Hindlimb	8.48 ± 1.33	8.15 ± 1.14	9.58 ± 1.52	8.73 ± 2.85	9.70 ± 1.65	5.73 ± 2.54*
Locomotor activity counts						
0'-10'	743.5 ± 143.9	611.3 ± 69.4	612.0 ± 129.1	421.0 ± 265.3	704.3 ± 28.9	240.3 ± 114.2**
10'-20'	519.8 ± 95.0	468.5 ± 26.8	345.3 ± 13.8*	188.8 ± 104.8*	432.5 ± 61.2	186.8 ± 66.5**
20'-30'	407.0 ± 74.1	364.0 ± 141.6	298.8 ± 114.1	123.0 ± 84.3**	290.8 ± 28.7	141.5 ± 27.1**
30'-40'	249.3 ± 43.3	196.3 ± 130.9	261.8 ± 106.2	70.0 ± 93.6	248.0 ± 113.0	57.3 ± 57.4*
40'-50'	254.0 ± 110.9	206.0 ± 151.2	203.3 ± 146.9	65.0 ± 90.0	37.0 ± 20.7	55.8 ± 54.7
50'-60'	224.0 ± 99.3	148.5 ± 121.7	168.3 ± 104.4	88.0 ± 68.1	14.5 ± 12.5	52.8 ± 45.2
Total (0'-60')	2397.5 ± 92.1	1994.5 ± 435.5	1889.3 ± 498.6	955.8 ± 613.9**	1727.0 ± 86.4	734.3 ± 220.6**
<b>Female</b>						
Grip strength (g)						
Forelimb	725.8 ± 152.3	712.5 ± 152.2	772.0 ± 281.3	419.8 ± 207.1	670.8 ± 68.7	549.0 ± 142.9
Hindlimb	316.3 ± 105.8	227.8 ± 52.5	227.0 ± 65.7	185.0 ± 63.9	130.5 ± 27.5	49.3 ± 22.0**
Splay (cm)						
Hindlimb	7.03 ± 2.52	7.15 ± 1.74	9.35 ± 1.29	8.58 ± 2.57	6.08 ± 2.35	6.83 ± 1.80
Locomotor activity counts						
0'-10'	646.0 ± 39.6	465.0 ± 87.7*	453.0 ± 118.8*	286.8 ± 76.2**	573.3 ± 99.4	322.8 ± 119.6*
10'-20'	442.5 ± 78.8	297.5 ± 153.2	269.0 ± 112.6	154.0 ± 105.6*	325.0 ± 61.7	151.0 ± 131.7
20'-30'	354.0 ± 144.6	203.3 ± 139.6	179.3 ± 151.6	116.0 ± 95.5	195.8 ± 76.9	114.8 ± 141.5
30'-40'	228.8 ± 173.1	230.3 ± 162.6	138.0 ± 126.0	136.5 ± 128.9	198.0 ± 45.7	118.0 ± 90.4
40'-50'	103.5 ± 116.1	217.8 ± 170.6	79.3 ± 88.5	149.0 ± 126.8	61.5 ± 36.5	39.3 ± 28.2
50'-60'	163.5 ± 215.8	170.0 ± 128.7	71.5 ± 83.1	54.0 ± 49.2	152.3 ± 77.5	43.5 ± 24.7*
Total (0'-60')	1938.3 ± 569.7	1583.8 ± 792.3	1190.0 ± 638.2	896.3 ± 514.3	1505.8 ± 290.3	789.3 ± 489.8*

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:p≤0.05, \*\*:p≤0.01

Table 2 Hematological findings in male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
RBC( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.061 $\pm$ 0.433	8.386 $\pm$ 0.341	8.174 $\pm$ 0.316	8.293 $\pm$ 0.355	8.491 $\pm$ 0.400	8.271 $\pm$ 0.349
Hematocrit (%)	51.10 $\pm$ 1.59	51.10 $\pm$ 1.02	49.44 $\pm$ 1.34	49.10 $\pm$ 1.09*	50.74 $\pm$ 2.71	48.93 $\pm$ 1.21
Hemoglobin (g/dL)	16.44 $\pm$ 0.59	16.59 $\pm$ 0.42	15.99 $\pm$ 0.57	15.86 $\pm$ 0.53	16.61 $\pm$ 0.90	15.87 $\pm$ 0.40
MCV (fL)	63.43 $\pm$ 1.75	60.97 $\pm$ 2.13*	60.49 $\pm$ 1.46*	59.23 $\pm$ 1.53**	59.76 $\pm$ 1.72	59.19 $\pm$ 1.64
MCH (pg)	20.41 $\pm$ 0.64	19.77 $\pm$ 0.63	19.56 $\pm$ 0.56*	19.16 $\pm$ 0.58**	19.56 $\pm$ 0.51	19.21 $\pm$ 0.73
MCHC (%)	32.19 $\pm$ 0.55	32.47 $\pm$ 0.34	32.33 $\pm$ 0.60	32.29 $\pm$ 0.61	32.74 $\pm$ 0.22	32.44 $\pm$ 0.71
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	13.59 $\pm$ 3.22	15.27 $\pm$ 3.76	13.06 $\pm$ 3.25	15.69 $\pm$ 4.99	14.81 $\pm$ 2.16	12.07 $\pm$ 3.33
Platelet ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1105.1 $\pm$ 68.0	1126.6 $\pm$ 138.3	1100.0 $\pm$ 115.3	1162.0 $\pm$ 107.4	954.0 $\pm$ 147.1	1183.0 $\pm$ 71.7**
PT (sec)	15.43 $\pm$ 1.99	15.74 $\pm$ 1.58	15.79 $\pm$ 1.96	16.47 $\pm$ 2.57	16.30 $\pm$ 2.15	15.16 $\pm$ 0.97
APTT (sec)	23.40 $\pm$ 2.66	23.20 $\pm$ 2.29	21.77 $\pm$ 2.79	23.93 $\pm$ 2.67	29.50 $\pm$ 2.83	29.74 $\pm$ 2.35
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophils						
Stab form	0.7 $\pm$ 0.8	0.7 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.8	0.7 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.7
Segmented	7.7 $\pm$ 3.9	10.1 $\pm$ 6.2	8.1 $\pm$ 2.2	9.9 $\pm$ 10.2	6.9 $\pm$ 3.3	7.6 $\pm$ 4.0
Eosinophils	0.7 $\pm$ 1.0	0.7 $\pm$ 1.0	0.9 $\pm$ 1.1	1.4 $\pm$ 1.4	0.3 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 1.1
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 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 1.0	0.6 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.5**
Lymphocytes	90.1 $\pm$ 3.3	87.4 $\pm$ 5.7	89.9 $\pm$ 2.8	87.4 $\pm$ 10.8	91.7 $\pm$ 2.9	88.9 $\pm$ 4.1

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

Table 3 Hematological findings in female male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
RBC( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.010 $\pm$ 0.457	8.186 $\pm$ 0.296	7.927 $\pm$ 0.292	7.759 $\pm$ 0.296	8.141 $\pm$ 0.263	8.007 $\pm$ 0.230
Hematocrit (%)	48.53 $\pm$ 2.94	49.20 $\pm$ 1.23	47.93 $\pm$ 2.09	45.64 $\pm$ 2.01*	48.19 $\pm$ 1.56	47.97 $\pm$ 2.25
Hemoglobin (g/dL)	16.10 $\pm$ 0.93	16.44 $\pm$ 0.39	16.03 $\pm$ 0.67	15.29 $\pm$ 0.69	15.83 $\pm$ 0.43	15.74 $\pm$ 0.76
MCV (fL)	60.59 $\pm$ 2.00	60.13 $\pm$ 1.76	60.44 $\pm$ 0.97	58.80 $\pm$ 1.18	59.20 $\pm$ 1.64	59.91 $\pm$ 1.59
MCH (pg)	20.11 $\pm$ 0.70	20.11 $\pm$ 0.61	20.21 $\pm$ 0.41	19.70 $\pm$ 0.51	19.46 $\pm$ 0.65	19.64 $\pm$ 0.65
MCHC (%)	33.19 $\pm$ 0.64	33.43 $\pm$ 0.52	33.44 $\pm$ 0.52	33.51 $\pm$ 0.58	32.84 $\pm$ 0.50	32.81 $\pm$ 0.85
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	8.16 $\pm$ 1.27	8.70 $\pm$ 3.16	10.36 $\pm$ 2.47	9.56 $\pm$ 3.20	10.41 $\pm$ 2.24	8.81 $\pm$ 3.00
Platelet ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1104.7 $\pm$ 297.0	1124.9 $\pm$ 112.0	1183.6 $\pm$ 93.8	1206.7 $\pm$ 115.9	1116.6 $\pm$ 104.2	1275.9 $\pm$ 99.2*
PT (sec)	13.41 $\pm$ 0.93	13.47 $\pm$ 0.79	13.13 $\pm$ 0.98	13.06 $\pm$ 1.16	14.36 $\pm$ 0.37	14.87 $\pm$ 0.35*
APTT (sec)	20.30 $\pm$ 5.00	17.60 $\pm$ 1.21	17.57 $\pm$ 1.23	17.50 $\pm$ 1.02	19.33 $\pm$ 1.51	19.80 $\pm$ 2.02
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophils						
Stab form	0.9 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.6	0.3 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.5
Segmented	8.1 $\pm$ 3.1	7.7 $\pm$ 3.6	9.4 $\pm$ 2.7	8.6 $\pm$ 2.8	6.9 $\pm$ 3.7	5.0 $\pm$ 2.4
Eosinophils	0.7 $\pm$ 1.1	1.4 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 1.6	1.4 $\pm$ 1.1	0.6 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.5
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	0.6 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.8
Lymphocytes	89.7 $\pm$ 2.1	89.7 $\pm$ 4.2	87.6 $\pm$ 3.3	88.9 $\pm$ 3.3	91.1 $\pm$ 4.9	93.4 $\pm$ 2.2

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

Table 4 Blood chemical findings in male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	5.77 ± 0.21	5.80 ± 0.13	5.49 ± 0.18*	5.79 ± 0.25	5.77 ± 0.15	5.49 ± 0.23*
A/G	1.190 ± 0.090	1.219 ± 0.069	1.273 ± 0.103	1.317 ± 0.115	1.109 ± 0.108	1.269 ± 0.105*
Protein fraction (%)						
Albumin	54.37 ± 1.76	55.00 ± 1.41	56.04 ± 1.90	56.83 ± 2.12*	52.59 ± 2.37	55.93 ± 1.93*
α-globulin	23.04 ± 1.83	22.60 ± 2.97	21.47 ± 1.62	20.94 ± 1.30	23.79 ± 2.32	21.39 ± 2.21
α <sub>2</sub> -globulin	10.50 ± 0.81	10.10 ± 0.99	10.21 ± 0.87	9.17 ± 0.88*	8.61 ± 0.23	8.41 ± 0.92
β-globulin	11.06 ± 0.65	11.47 ± 0.97	11.54 ± 0.52	12.24 ± 1.46	13.63 ± 0.71	13.01 ± 0.73
γ-globulin	1.03 ± 0.46	0.83 ± 0.40	0.73 ± 0.19	0.81 ± 0.23	1.39 ± 0.35	1.26 ± 0.80
GOT (IU/L)	65.0 ± 9.6	65.7 ± 10.8	60.3 ± 4.3	58.0 ± 8.2	68.7 ± 10.3	74.0 ± 12.3
GPT (IU/L)	25.1 ± 2.3	27.0 ± 6.2	25.1 ± 3.0	20.9 ± 3.0	33.0 ± 8.7	31.6 ± 3.9
ALP (IU/L)	495.6 ± 97.4	482.4 ± 110.5	447.1 ± 101.3	337.6 ± 57.5*	355.4 ± 123.6	358.6 ± 76.9
LDH (IU/L)	324.1 ± 86.5	304.6 ± 126.7	267.3 ± 56.4	295.6 ± 76.6	227.4 ± 39.2	260.7 ± 45.6
γ-GTP (IU/L)	0.56 ± 0.28	0.51 ± 0.30	0.61 ± 0.29	0.66 ± 0.28	0.54 ± 0.21	0.60 ± 0.24
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose (mg/dL)	156.0 ± 17.9	155.0 ± 21.9	148.7 ± 14.0	160.0 ± 15.9	171.3 ± 12.1	126.9 ± 18.8**
Total cholesterol (mg/dL)	64.4 ± 10.1	57.6 ± 16.3	52.4 ± 11.2	58.6 ± 15.9	65.3 ± 9.8	67.9 ± 9.1
Triglyceride (mg/dL)	34.4 ± 12.1	44.1 ± 16.8	39.9 ± 18.3	32.3 ± 13.6	53.4 ± 25.0	30.0 ± 11.2*
Urea nitrogen (mg/dL)	15.39 ± 1.58	15.90 ± 0.77	15.10 ± 1.50	15.74 ± 1.31	17.23 ± 1.64	16.69 ± 2.13
Creatinine (mg/dL)	0.44 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.43 ± 0.05	0.41 ± 0.04	0.49 ± 0.04	0.40 ± 0.00**
Sodium (mEq/L)	142.29 ± 0.95	142.86 ± 0.69	142.50 ± 1.50	141.29 ± 0.57	143.43 ± 1.10	143.21 ± 1.04
Potassium (mEq/L)	4.781 ± 0.220	4.383 ± 0.416	4.557 ± 0.280	4.777 ± 0.454	4.436 ± 0.356	4.887 ± 0.299*
Chlorine (mEq/L)	105.4 ± 1.9	105.6 ± 1.0	104.7 ± 0.8	106.6 ± 1.0	105.7 ± 1.6	106.9 ± 1.6
Calcium (mg/dL)	9.70 ± 0.22	9.63 ± 0.26	9.47 ± 0.20	9.47 ± 0.24	9.40 ± 0.12	9.20 ± 0.26
Inorganic phosphorous (mg/dL)	8.47 ± 0.33	8.64 ± 0.79	8.61 ± 0.76	7.83 ± 0.33	7.26 ± 0.51	7.94 ± 0.65*

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*: p≤0.05, \*\*: p≤0.01



Table 5 Blood chemical findings in male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	5.73 ± 0.26	5.83 ± 0.36	5.80 ± 0.18	5.61 ± 0.16	6.20 ± 0.19	5.60 ± 0.08**
A/G	1.426 ± 0.105	1.423 ± 0.148	1.459 ± 0.162	1.576 ± 0.044	1.486 ± 0.109	1.560 ± 0.127
Protein fraction (%)						
Albumin	58.76 ± 1.75	58.69 ± 2.43	59.31 ± 2.55	61.24 ± 0.64	59.77 ± 1.87	60.94 ± 1.99
α-globulin	19.63 ± 1.50	19.99 ± 2.44	19.40 ± 2.13	17.63 ± 0.87	18.94 ± 1.39	17.94 ± 1.05
α <sub>2</sub> -globulin	7.61 ± 1.01	7.64 ± 1.10	7.87 ± 0.99	7.43 ± 0.86	6.60 ± 0.55	6.60 ± 0.66
β-globulin	12.27 ± 0.95	12.10 ± 0.68	12.09 ± 0.77	12.39 ± 0.65	12.71 ± 1.34	12.33 ± 0.71
γ-globulin	1.73 ± 0.70	1.59 ± 0.73	1.33 ± 0.23	1.31 ± 0.16	1.97 ± 0.65	2.19 ± 1.04
GOT (IU/L)	65.3 ± 9.1	62.1 ± 4.3	62.1 ± 8.9	64.7 ± 4.3	61.9 ± 6.7	68.0 ± 7.5
GPT (IU/L)	23.7 ± 5.2	24.3 ± 4.9	20.9 ± 5.6	18.4 ± 2.2	22.0 ± 4.5	25.7 ± 4.3
ALP (IU/L)	271.3 ± 62.1	282.0 ± 67.3	282.6 ± 79.2	225.6 ± 50.7	182.1 ± 15.1	244.4 ± 87.6*
LDH (IU/L)	318.9 ± 90.9	277.0 ± 50.5	278.1 ± 88.6	328.4 ± 75.8	261.1 ± 49.0	250.7 ± 30.3
γ-GTP (IU/L)	1.64 ± 2.10	1.01 ± 0.55	0.91 ± 0.44	0.90 ± 0.23	1.40 ± 0.45	1.10 ± 0.54
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose (mg/dL)	118.7 ± 17.2	120.1 ± 5.7	120.7 ± 7.4	131.1 ± 14.3	150.4 ± 13.1	126.1 ± 9.9**
Total cholesterol (mg/dL)	64.4 ± 13.9	67.0 ± 13.5	59.9 ± 12.0	60.1 ± 10.0	71.1 ± 12.7	66.4 ± 16.2
Triglyceride (mg/dL)	9.3 ± 3.1	10.9 ± 3.1	13.4 ± 6.3	17.1 ± 6.4*	14.0 ± 6.5	11.6 ± 4.8
Urea nitrogen (mg/dL)	17.99 ± 1.53	19.04 ± 1.68	16.96 ± 1.81	15.43 ± 1.37*	18.10 ± 2.88	17.67 ± 1.78
Creatinine (mg/dL)	0.53 ± 0.08	0.50 ± 0.06	0.46 ± 0.05	0.43 ± 0.05*	0.54 ± 0.08	0.47 ± 0.05
Sodium (mEq/L)	141.07 ± 1.72	139.93 ± 0.98	140.86 ± 1.28	140.21 ± 1.44	142.79 ± 0.81	142.79 ± 1.07
Potassium (mEq/L)	4.553 ± 0.151	4.484 ± 0.343	4.551 ± 0.350	4.851 ± 0.422	4.090 ± 0.216	4.736 ± 0.350**
Chlorine (mEq/L)	108.1 ± 2.1	107.4 ± 1.5	107.1 ± 1.7	108.1 ± 0.9	107.1 ± 1.1	108.6 ± 1.0*
Calcium (mg/dL)	9.20 ± 0.14	9.09 ± 0.22	9.31 ± 0.23	9.06 ± 0.19	9.27 ± 0.34	8.99 ± 0.31
Inorganic phosphorous (mg/dL)	7.37 ± 0.85	7.14 ± 0.64	7.24 ± 0.91	7.26 ± 0.59	5.60 ± 0.60	6.93 ± 0.52**

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 in male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
Body weight (g)	347.7 ± 13.9	338.7 ± 26.2	332.7 ± 20.0	255.3 ± 34.3**	402.3 ± 47.9	318.9 ± 36.2**
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.050 ± 0.041	2.026 ± 0.082	2.080 ± 0.077	1.916 ± 0.114*	2.156 ± 0.165	2.030 ± 0.051
Lungs (g)	1.314 ± 0.084	1.266 ± 0.112	1.277 ± 0.064	1.160 ± 0.118*	1.350 ± 0.163	1.306 ± 0.096
Heart (g)	1.186 ± 0.053	1.246 ± 0.075	1.199 ± 0.085	1.059 ± 0.097*	1.371 ± 0.147	1.160 ± 0.147*
Liver (g)	10.257 ± 0.994	10.380 ± 1.422	10.241 ± 1.121	8.519 ± 1.434*	11.811 ± 1.929	9.384 ± 1.192*
Kidneys (g)	2.493 ± 0.181	2.566 ± 0.171	2.746 ± 0.332	2.460 ± 0.318	2.867 ± 0.434	2.646 ± 0.288
Spleen (g)	0.647 ± 0.094	0.651 ± 0.098	0.660 ± 0.087	0.473 ± 0.042**	0.721 ± 0.103	0.667 ± 0.095
Adrenals (mg)	62.286 ± 6.157	62.143 ± 9.582	62.571 ± 9.572	50.571 ± 7.850*	55.571 ± 8.264	52.286 ± 3.302
Pituitary gland (mg)	12.34 ± 1.03	11.54 ± 1.30	12.44 ± 1.71	9.61 ± 1.31**	12.31 ± 1.44	10.84 ± 0.49
Thymus (mg)	606.7 ± 114.6	573.0 ± 118.5	598.6 ± 80.5	482.9 ± 77.1	547.0 ± 135.7	534.4 ± 171.4
Thyroids (mg)	20.471 ± 2.369	21.900 ± 2.681	19.157 ± 3.153	19.143 ± 1.491	22.386 ± 5.167	20.314 ± 4.321
Testes (g)	3.006 ± 0.278	3.044 ± 0.517	3.134 ± 0.241	2.913 ± 0.265	3.193 ± 0.181	3.471 ± 0.240*
Epididymides (g)	0.756 ± 0.062	0.761 ± 0.069	0.770 ± 0.050	0.689 ± 0.061	1.031 ± 0.053	0.976 ± 0.028*
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.591 ± 0.029	0.601 ± 0.038	0.626 ± 0.046	0.759 ± 0.083**	0.539 ± 0.045	0.641 ± 0.062**
Lungs (g%)	0.379 ± 0.011	0.373 ± 0.016	0.387 ± 0.027	0.463 ± 0.092**	0.339 ± 0.027	0.413 ± 0.050**
Heart (g%)	0.341 ± 0.013	0.370 ± 0.028	0.359 ± 0.020	0.417 ± 0.042**	0.341 ± 0.020	0.361 ± 0.017
Liver (g%)	2.946 ± 0.197	3.056 ± 0.231	3.071 ± 0.182	3.327 ± 0.170**	2.924 ± 0.190	2.946 ± 0.198
Kidneys (g%)	0.717 ± 0.039	0.757 ± 0.011	0.823 ± 0.054**	0.966 ± 0.059**	0.713 ± 0.059	0.830 ± 0.039**
Spleen (g%)	0.187 ± 0.023	0.193 ± 0.035	0.196 ± 0.017	0.187 ± 0.014	0.179 ± 0.016	0.209 ± 0.029*
Adrenals (mg%)	17.940 ± 1.872	18.323 ± 2.137	18.774 ± 2.314	19.887 ± 2.162	13.841 ± 1.443	16.594 ± 2.375*
Pituitary gland (mg%)	3.559 ± 0.365	3.414 ± 0.380	3.736 ± 0.388	3.781 ± 0.364	3.076 ± 0.310	3.436 ± 0.392
Thymus (mg%)	174.296 ± 30.878	168.806 ± 30.054	179.911 ± 22.000	190.203 ± 27.392	134.384 ± 21.873	166.871 ± 43.446
Thyroids (mg%)	5.884 ± 0.634	6.474 ± 0.716	5.754 ± 0.880	7.621 ± 1.193**	5.617 ± 1.438	6.337 ± 0.862
Testes (g%)	0.863 ± 0.052	0.900 ± 0.122	0.944 ± 0.087	1.151 ± 0.125**	0.801 ± 0.076	1.097 ± 0.103**
Epididymides (g%)	0.219 ± 0.013	0.226 ± 0.020	0.230 ± 0.012	0.271 ± 0.035**	0.259 ± 0.033	0.310 ± 0.033*

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*: p ≤ 0.05, \*\*: p ≤ 0.01

Table 7 Absolute and relative organ weights in female rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
Body weight (g)	214.7 ± 15.1	206.3 ± 12.3	199.3 ± 12.4	163.6 ± 8.7**	244.7 ± 25.7	192.1 ± 6.6**
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.977 ± 0.096	1.980 ± 0.076	1.909 ± 0.050	1.803 ± 0.048**	2.023 ± 0.089	1.890 ± 0.043**
Lungs (g)	0.986 ± 0.069	1.003 ± 0.045	0.957 ± 0.064	0.859 ± 0.052**	1.013 ± 0.080	0.947 ± 0.024
Heart (g)	0.791 ± 0.080	0.809 ± 0.091	0.770 ± 0.033	0.691 ± 0.037*	0.830 ± 0.093	0.743 ± 0.062
Liver (g)	6.044 ± 0.679	6.137 ± 0.498	5.936 ± 0.482	5.121 ± 0.380**	6.644 ± 0.769	5.344 ± 0.236**
Kidneys (g)	1.696 ± 0.176	1.743 ± 0.145	1.650 ± 0.089	1.604 ± 0.082	1.744 ± 0.169	1.624 ± 0.079
Spleen (g)	0.467 ± 0.048	0.430 ± 0.067	0.439 ± 0.042	0.369 ± 0.027**	0.481 ± 0.068	0.461 ± 0.056
Adrenals (mg)	66.571 ± 17.008	68.286 ± 9.050	69.571 ± 7.743	56.714 ± 6.824	63.429 ± 5.682	61.571 ± 5.912
Pituitary gland (mg)	14.56 ± 1.46	14.41 ± 0.85	12.71 ± 1.33	10.83 ± 2.15**	15.69 ± 1.70	12.47 ± 0.70**
Thymus (mg)	526.9 ± 117.8	493.7 ± 68.5	472.1 ± 67.3	371.0 ± 54.0**	400.3 ± 64.6	392.1 ± 56.6
Thyroids (mg)	15.671 ± 2.299	15.171 ± 2.835	15.843 ± 2.615	14.729 ± 3.000	15.729 ± 3.461	13.586 ± 1.504
Ovaries (mg)	85.571 ± 12.985	91.714 ± 19.559	88.286 ± 10.889	69.714 ± 8.077	94.571 ± 9.144	77.286 ± 7.931**
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.924 ± 0.083	0.963 ± 0.060	0.961 ± 0.071	1.106 ± 0.072**	0.834 ± 0.086	0.984 ± 0.029**
Lungs (g%)	0.459 ± 0.009	0.487 ± 0.029	0.481 ± 0.022	0.526 ± 0.026**	0.416 ± 0.022	0.494 ± 0.015**
Heart (g%)	0.369 ± 0.025	0.391 ± 0.034	0.387 ± 0.024	0.424 ± 0.024**	0.339 ± 0.018	0.386 ± 0.032**
Liver (g%)	2.810 ± 0.185	2.971 ± 0.116	2.979 ± 0.138	3.136 ± 0.236**	2.717 ± 0.173	2.781 ± 0.102
Kidneys (g%)	0.790 ± 0.059	0.846 ± 0.056	0.829 ± 0.023	0.979 ± 0.032**	0.713 ± 0.021	0.847 ± 0.041**
Spleen (g%)	0.217 ± 0.018	0.207 ± 0.034	0.223 ± 0.030	0.227 ± 0.024	0.197 ± 0.024	0.240 ± 0.024**
Adrenals (mg%)	30.830 ± 6.257	33.103 ± 3.935	34.921 ± 3.557	34.716 ± 4.207	26.080 ± 2.875	32.037 ± 2.730**
Pituitary gland (mg%)	6.790 ± 0.675	7.011 ± 0.627	6.401 ± 0.770	6.604 ± 1.150	6.481 ± 1.113	6.500 ± 0.500
Thymus (mg%)	244.801 ± 49.342	239.991 ± 35.204	236.181 ± 23.055	228.024 ± 40.930	164.626 ± 29.299	203.676 ± 24.812*
Thyroids (mg%)	7.289 ± 0.792	7.376 ± 1.458	7.949 ± 1.210	8.991 ± 1.726	6.406 ± 1.035	7.069 ± 0.718
Ovaries (mg%)	39.687 ± 3.517	44.269 ± 7.908	44.456 ± 6.264	42.651 ± 4.748	38.801 ± 3.181	40.317 ± 4.887

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*: p≤0.05, \*\*: p≤0.01

Table 8 Histopathological findings in male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Grade	End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals examined		7	7	7	7	7	7
Organ: Findings	Grade						
Lung: Cellular infiltration, neutrophil	++	0	-	-	2	0	0
Granuloma	Total	0	-	-	1	0	2
	+	0	-	-	0	0	1
	++	0	-	-	1	0	1
Accumulation, foam cell	+	0	-	-	0	2	2
Trachea: Cellular infiltration, neutrophil, lamina propria							
	+	0	-	-	1	0	0
Liver: Granuloma	+	1	-	-	0	0	0
Kidney: Cellular infiltration, lymphocyte	+	0	-	-	0	1	0
Cast, hyaline	+	0	-	-	0	1	1
Cyst	<+>	0	-	-	0	0	1
Hyperplasia, tubular epithelium	+	0	-	-	0	1	1
Testis: Retention, step 19 spermatid, stage IX, X	+	0	-	-	0	0	1
Prostate: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium							
	+	1	-	-	2	1	1
Cerebellum: Swelling, axonal, cerebellar peduncle	+	0	0	0	1	0	3
Sciatic nerve: Degeneration, nerve fiber	Total	0	0	0	7	0	7
	+	0	0	0	7	0	4
	++	0	0	0	0	0	3
Pituitary gland: Hyperplasia, tubular, pars nervosa	+	0	-	-	1	0	0

Values are no. of animals with findings.

Grade: +=slight, ++=moderate change and <+>=detected.

--=blank value.

Table 9 Histopathological findings in female rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Grade	End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals examined		7	7	7	7	7	7
Organ: Findings	Grade						
Lung: Cellular infiltration, neutrophil	+	1	-	-	0	0	0
Granuloma	+	1	-	-	0	0	0
Accumulation, foam cell	+	0	-	-	0	1	1
Esophagus: Granulation, muscular layer	+	0	-	-	1	0	0
Kidney: Cellular infiltration, lymphocyte	+	2	-	-	1	0	0
Dilatation, renal pelvis	+	0	-	-	0	0	1
Uterus: Cyst	<+>	0	-	-	0	0	1
Cerebellum: Swelling, axonal, cerebellar peduncle	+	0	0	0	2	0	5
Sciatic nerve: Degeneration, nerve fiber	Total	0	0	0	7	0	7
	+	0	0	0	7	0	5
	++	0	0	0	0	0	2
Pituitary gland: Cyst	<+>	1	-	-	0	0	1
Hyperplasia, tubular, pars nervosa	+	1	-	-	0	0	0

Values are no. of animals with findings.

Grade: +=slight, ++=moderate change and <+>=detected.

--=blank value.

## 2-エチル酪酸の細菌を用いる復帰変異試験

### Reverse Mutation Test of 2-Ethylbutyric acid in Bacteria

#### 要約

2-エチル酪酸について *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰変異試験を実施した。

予備試験の結果をもとに本試験では, S9 mix 非共存下のすべての菌株は 5000 ~ 313  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の5用量を, 共存下の TA100, TA1535, TA98 および TA1537 は 5000 ~ 156  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の6用量, WP2 *uvrA* は 5000 ~ 313  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の5用量をそれぞれ設定した。

2回の本試験の結果, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から, 2-エチル酪酸は本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

#### 材料および方法

##### 1. テスト菌株

カリフォルニア大学 B. N. Ames 教授より 1983年5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1)</sup> および東京大学医科学研究所 松島教授より 1985年10月14日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> の5菌株を用いた。テスト菌株は菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO: 関東化学株)を加え, 0.2 mL ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結した後, 超低温槽で -80 °C 以下に凍結保存したものを使用した。これら菌株はアミノ酸要求性, 紫外線感受性, 膜変異, 薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ, 特性を備えていることを確認した。

##### 2. テスト菌株の前培養

L字型試験管に 2.5% ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath社)溶液を 10 mL 分注し, これに凍結保存した菌懸濁液を解凍して 20  $\mu\text{L}$  を接種した。37 °C で8時間振盪培養した後, 濁度計を用いて菌濃度を測定し, 生菌数が  $1 \times 10^9/\text{mL}$  以上であることを確認した。

##### 3. 被験物質

2-エチル酪酸(ロット番号: 01-91101, チッソ株(東京)提供)は, 純度 99.2% (不純物として, 水分 0.03% を含む) の無色液体である。被験物質は使用時まで冷蔵, 暗

所に保存した。

被験物質原体は, 通常取り扱い条件で安定である。酸化剤と激しく反応する。

##### 4. 被験物質溶液の調製

DMSO を用いて最高用量の溶液を調製した後, 同溶媒で所定用量に段階希釈し, 速やかに試験に使用した。

##### 5. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを用いた。陽性対照物質溶液は, あらかじめ所定の濃度に調製し, -80 °C 以下に凍結保存したものを使用した。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業株)

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム(和光純薬工業株)

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(Sigma Chemical Co.)

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩(Sigma Chemical Co.)

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業株)

NaN<sub>3</sub> は注射用水(株)大塚製薬工場)に, その他は DMSO に溶解したものを使用した。

##### 6. 培地および S9 mix の組成

###### 1) トップアガー

アミノ酸水溶液として, 精製水を用いて 0.5 mM D-ピオチン, L-ヒスチジン混合水溶液(サルモネラ用)または 0.5 mM L-トリプトファン水溶液(大腸菌用)を調製し, これをろ過滅菌後, 冷蔵庫に保管した。精製水 100 mL に対して, 粉末寒天(Bacto-Agar, Difco社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え, オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後, 上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し, 約 45 °C に保温した。

###### 2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地(オリエンタル酵母工業株)を購入し, 使用した。なお, 培地 1 L あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g

寒天(OXOID Agar No.1) 15 g  
 径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めてある。

### 3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム六水塩	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
D-グルコース6-リン酸	5 $\mu$ mol
$\beta$ -NADPH	4 $\mu$ mol
$\beta$ -NADH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu$ mol
滅菌精製水	残量

\*:購入したS9(キッコーマン株)を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボン併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 $\times$ g遠心上清分画である。

## 7. 試験方法

試験はプレインキュベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を0.1 mL、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)を0.5 mLおよび菌懸濁液を0.1 mL加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間振盪培養した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 mL添加した。プレインキュベーション後、トップアガー2 mLを上記の混合液に加え混和し、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各用量につき1枚のプレートを使用した。本試験は各用量につき3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

## 8. 試験結果の判定基準

いずれかの試験菌株で、S9 mixの有無によらず、被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数(平均値)が陰性(溶媒)対照値の2倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は変異原性を有する(陽性)と判定した。なお、試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

## 結果および考察

### 1. 予備試験

予備試験を *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535,

TA98, TA1537および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いて、5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88および1.22  $\mu$ g/plateの7用量で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix共存下ではTA100, TA1535, TA98およびTA1537の5000  $\mu$ g/plateで抗菌性が認められた。従って本試験では、S9 mix非共存下のすべての菌株は5000, 2500, 1250, 625, 313  $\mu$ g/plateの5用量を、共存下のTA100, TA1535, TA98, TA1537は5000, 2500, 1250, 625, 313, 156  $\mu$ g/plateの6用量、WP2 *uvrA*は5000, 2500, 1250, 625, 313  $\mu$ g/plateの5用量をそれぞれ設定した。

## 2. 本試験

試験の結果をTable 1, 2に示した。本試験を2回実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix共存下ではTA100, TA1535, TA98およびTA1537の5000  $\mu$ g/plateで抗菌性が認められた。

なお、S9 mix非共存下および共存下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数は、各菌株の陰性対照の復帰変異コロニー数と比較して、明らかに2倍を超えて増加し、陽性の結果を示した。

以上の結果から、2-エチル酪酸は本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

なお、類似化合物である酢酸ブチル<sup>3)</sup>、酪酸<sup>3)</sup>、イソ吉草酸エチル<sup>3)</sup>およびぎ酸イソアミル<sup>3)</sup>は、いずれも細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が報告されている。

## 参考文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173(1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3(1976).
- 3) 石館基監修, "微生物を用いる変異原性試験データ集," エル・アイ・シー, 東京, 1991, pp.70-71, pp.84-85, pp.234-235, pp.324-325.

連絡先

試験責任者：榎本佳明

試験担当者：榎本佳明，清水優子

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

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

Correspondence

Authors: Yoshiaki Enomoto (Study director)

Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,

Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,

Ibaraki, 314-0255 Japan

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

Table 1 Mutagenicity of 2-ethylbutyric acid in reverse mutation test (I) in bacteria

With(+) or Without(-) S9 mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	116 124 ( 126) 138 ( $\pm$ 11)	13 18 ( 14) 10 ( $\pm$ 4)	24 35 ( 29) 27 ( $\pm$ 6)	15 18 ( 16) 15 ( $\pm$ 2)	10 9 ( 10) 10 ( $\pm$ 1)
	313	106 118 ( 116) 125 ( $\pm$ 10)	8 12 ( 9) 8 ( $\pm$ 2)	37 39 ( 39) 41 ( $\pm$ 2)	15 18 ( 16) 15 ( $\pm$ 2)	15 13 ( 14) 13 ( $\pm$ 1)
	625	129 129 ( 129) 128 ( $\pm$ 1)	12 7 ( 9) 9 ( $\pm$ 3)	34 25 ( 34) 42 ( $\pm$ 9)	15 18 ( 16) 16 ( $\pm$ 2)	14 15 ( 13) 11 ( $\pm$ 2)
	1250	107 141 ( 120) 112 ( $\pm$ 18)	11 11 ( 10) 8 ( $\pm$ 2)	29 47 ( 37) 34 ( $\pm$ 9)	14 13 ( 14) 16 ( $\pm$ 2)	17 13 ( 16) 17 ( $\pm$ 2)
	2500	116 100 ( 114) 125 ( $\pm$ 13)	9 11 ( 10) 9 ( $\pm$ 1)	36 33 ( 35) 36 ( $\pm$ 2)	18 18 ( 17) 16 ( $\pm$ 1)	13 19 ( 16) 15 ( $\pm$ 3)
	5000	101 94 ( 94) 87 ( $\pm$ 7)	7 5 ( 7) 8 ( $\pm$ 2)	28 38 ( 35) 38 ( $\pm$ 6)	13 12 ( 14) 18 ( $\pm$ 3)	11 13 ( 12) 12 ( $\pm$ 1)
S9 mix (+)	0	111 118 ( 112) 108 ( $\pm$ 5)	10 10 ( 11) 12 ( $\pm$ 1)	36 29 ( 33) 35 ( $\pm$ 4)	29 22 ( 23) 18 ( $\pm$ 6)	19 19 ( 19) 19 ( $\pm$ 0)
	156	123 124 ( 122) 120 ( $\pm$ 2)	8 13 ( 10) 9 ( $\pm$ 3)	/	27 29 ( 25) 20 ( $\pm$ 5)	18 21 ( 20) 22 ( $\pm$ 2)
	313	118 124 ( 116) 106 ( $\pm$ 9)	15 10 ( 13) 14 ( $\pm$ 3)	41 29 ( 37) 42 ( $\pm$ 7)	31 26 ( 26) 21 ( $\pm$ 5)	22 27 ( 24) 24 ( $\pm$ 3)
	625	103 118 ( 114) 122 ( $\pm$ 10)	13 12 ( 12) 10 ( $\pm$ 2)	39 35 ( 35) 31 ( $\pm$ 4)	23 23 ( 25) 28 ( $\pm$ 3)	23 26 ( 25) 26 ( $\pm$ 2)
	1250	113 103 ( 111) 116 ( $\pm$ 7)	8 11 ( 10) 10 ( $\pm$ 2)	46 41 ( 38) 28 ( $\pm$ 9)	33 26 ( 29) 27 ( $\pm$ 4)	17 17 ( 17) 18 ( $\pm$ 1)
	2500	102 126 ( 116) 120 ( $\pm$ 12)	11 9 ( 10) 9 ( $\pm$ 1)	32 26 ( 30) 32 ( $\pm$ 3)	30 23 ( 24) 20 ( $\pm$ 5)	18 26 ( 21) 18 ( $\pm$ 5)
	5000	100* 108* ( 105) 108* ( $\pm$ 5)	8* 6* ( 7) 6* ( $\pm$ 1)	28 38 ( 30) 23 ( $\pm$ 8)	21* 26* ( 23) 21* ( $\pm$ 3)	18* 22* ( 17) 12* ( $\pm$ 5)
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
S9 mix (-)	Number of revertants	618 603 ( 608) 603 ( $\pm$ 9)	446 518 ( 486) 495 ( $\pm$ 37)	973 954 ( 964) 966 ( $\pm$ 10)	697 666 ( 682) 682 ( $\pm$ 16)	443 278 ( 329) 267 ( $\pm$ 99)
	Number of revertants	1600 1562 ( 1512) 1374 ( $\pm$ 121)	313 241 ( 264) 239 ( $\pm$ 42)	1080 1140 ( 1173) 1299 ( $\pm$ 113)	459 582 ( 488) 422 ( $\pm$ 84)	205 187 ( 203) 217 ( $\pm$ 15)

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN<sub>3</sub>:sodium azide  
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine hydrochloride  
 2-AA:2-aminoanthracene

(Mean)  
( $\pm$ S.D.)

\*:Microbial toxicity was observed.



Table 2 Mutagenicity of 2-ethylbutyric acid in reverse mutation test (II) in bacteria

With(+) or Without(-) S9 mix	Test Substance Concentration (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies / plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	97 106 ( 101) 100 (± 5)	11 13 ( 13) 15 (± 2)	40 37 ( 37) 34 (± 3)	18 19 ( 18) 17 (± 1)	9 12 ( 10) 9 (± 2)
	313	97 94 ( 102) 114 (± 11)	16 15 ( 14) 11 (± 3)	34 40 ( 39) 43 (± 5)	20 19 ( 20) 21 (± 1)	12 7 ( 10) 11 (± 3)
	625	103 112 ( 107) 107 (± 5)	15 11 ( 11) 8 (± 4)	38 39 ( 41) 45 (± 4)	19 20 ( 19) 17 (± 2)	10 10 ( 10) 10 (± 0)
	1250	114 104 ( 104) 95 (± 10)	10 14 ( 14) 17 (± 4)	44 39 ( 43) 45 (± 3)	19 19 ( 20) 22 (± 2)	9 10 ( 10) 12 (± 2)
	2500	103 102 ( 114) 137 (± 20)	12 16 ( 13) 12 (± 2)	41 33 ( 35) 30 (± 6)	18 21 ( 19) 17 (± 2)	9 10 ( 10) 11 (± 1)
	5000	100 95 ( 101) 108 (± 7)	14 11 ( 13) 15 (± 2)	41 28 ( 33) 30 (± 7)	18 18 ( 20) 23 (± 3)	8 11 ( 10) 11 (± 2)
S9 mix (+)	0	111 97 ( 104) 104 (± 7)	12 8 ( 11) 14 (± 3)	42 45 ( 44) 45 (± 2)	27 22 ( 24) 23 (± 3)	15 19 ( 17) 17 (± 2)
	156	98 112 ( 107) 110 (± 8)	16 12 ( 14) 15 (± 2)	/	26 31 ( 28) 28 (± 3)	20 20 ( 19) 17 (± 2)
	313	97 115 ( 106) 106 (± 9)	16 13 ( 13) 11 (± 3)	36 36 ( 39) 46 (± 6)	29 30 ( 30) 32 (± 2)	16 16 ( 16) 17 (± 1)
	625	100 105 ( 102) 102 (± 3)	12 16 ( 14) 15 (± 2)	45 44 ( 43) 39 (± 3)	32 26 ( 29) 29 (± 3)	14 14 ( 16) 20 (± 3)
	1250	106 112 ( 107) 104 (± 4)	14 15 ( 15) 17 (± 2)	38 42 ( 41) 42 (± 2)	32 22 ( 28) 30 (± 5)	13 12 ( 14) 16 (± 2)
	2500	107 97 ( 104) 109 (± 6)	11 14 ( 12) 11 (± 2)	37 37 ( 39) 43 (± 3)	26 31 ( 27) 25 (± 3)	12 12 ( 14) 18 (± 3)
	5000	113* 93* ( 104) 106* (± 10)	9* 6* ( 7) 6* (± 2)	41 40 ( 42) 46 (± 3)	22* 28* ( 26) 27* (± 3)	13* 13* ( 14) 15* (± 1)
Positive control	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration (μg/plate)	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 mix (-)	Number of revertants	585 545 ( 554) 533 (± 27)	488 493 ( 503) 527 (± 21)	892 880 ( 916) 975 (± 52)	537 480 ( 494) 465 (± 38)	309 312 ( 319) 336 (± 15)
Positive control	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (μg/plate)	1	2	10	0.5	2
S9 mix (+)	Number of revertants	1362 1242 ( 1276) 1223 (± 75)	267 274 ( 256) 228 (± 25)	1230 1217 ( 1224) 1225 (± 7)	432 440 ( 425) 403 (± 19)	197 186 ( 182) 163 (± 17)

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN<sub>3</sub>: sodium azide (Mean)  
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride (±S.D.)  
 2-AA: 2-aminoanthracene

\*: Microbial toxicity was observed.

## 2-エチル酪酸のチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

### *In Vitro* Chromosomal Aberration Test of 2-Ethylbutyric acid in Cultured Chinese Hamster Cells

#### 要約

2-エチル酪酸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。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下、非存在下で1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公比2で4濃度を設定した。連続処理法の24時間処理では、1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公差400で4濃度を設定した。

短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。また連続処理法の24時間処理の1200, 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、染色体の構造異常細胞の出現頻度はそれぞれ17.0, 74.0%であった。連続処理法24時間処理において、倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下では2-エチル酪酸は、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

#### 材料および方法

##### 1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1999年8月, 入手時:継代14代, 凍結時:17代)したチャイニーズ・ハムスター肺由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代5代以内で試験に用いた。

##### 2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(GIBCO BRL, ロット番号:1019033)を10 vol%添加したイーグルMEM(日本製薬(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, Becton Dickinson and Company)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。

短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で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。また連続処理法では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間処理した。

##### 4. 被験物質

2-エチル酪酸(ロット番号:01-91101, チッソ(株)(東京)

提供)は、純度99.2%(不純物として、水分0.03%を含む)の無色液体である。被験物質は使用時まで冷蔵、暗所に保存した。

被験物質原体は、通常の取り扱い条件で安定である。酸化剤と激しく反応する。

##### 5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒はジメチルスルホキシド(関東化学(株), ロット番号:010G1456, 104G1307, 108G2036)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。

##### 6. 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、血球計算盤を用いて各群の細胞を計数し、陰性対照群に対する割合をもって指標とした。

その結果、2-エチル酪酸の約50%の増殖抑制を示す濃度を、生存曲線において細胞増殖率が50%前後を示す2点を結ぶ直線式より算出したところ、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下でいずれも1002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また連続処理法の24時間処理における約50%の増殖抑制を示す濃度は1272  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった(Fig. 1)。

##### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、短時間処理法のS9 mix存在下、非存在下で1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公比2で4濃度を設定した。連続処理法の24時間処理では、1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公差400で4濃度を設定した。

陽性対照として、短時間処理法のS9 mix存在下では、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業(株), ロット番号:GG01)の濃度を20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , S9 mix非存在下では、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:283AIG)の濃度を0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 連続処理法では、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:286AIH)の濃度を0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。

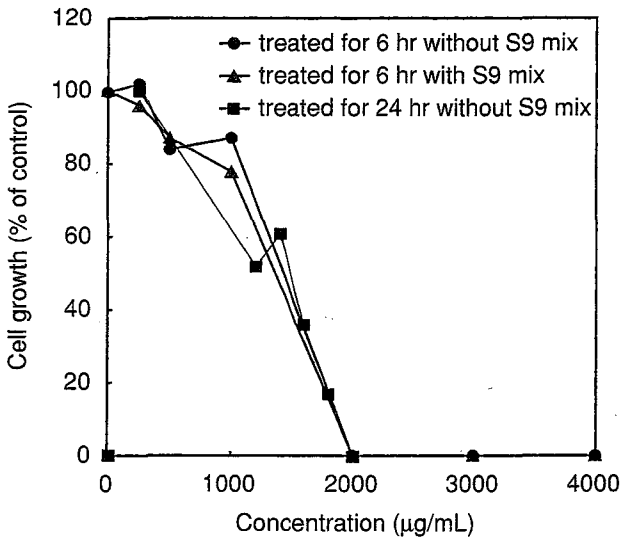


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-ethylbutyric acid

8. 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 µg/mLになるように培養液に加えた。染色体標本の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2枚作製した。作製した標本を、3 vol% ギムザ溶液で20分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のディッシュから得られたスライドを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・哺乳動物試験分科会(MMS)<sup>1)</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切断、交換などの構造異常およびギャップの有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。ギャップは構造異常には含めなかった。また、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。ただし、連続処理法24時間処理の1600 µg/mLでは、細胞毒性のため、一方のプレートの標本については50個以上の分裂中期細胞が得られず、集計から除外した。

10. 記録と測定

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。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

11. 細胞増殖率の測定

染色体標本作製と同一のサンプルにおける細胞増殖率を測定した。標本作製時に剥離した細胞の一部を採取し、血球計算盤で細胞を計数した。

結果および考察

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。2-エチル酪酸を加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した結果、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。

連続処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。2-エチル酪酸を加えて24時間連続処理した結果、1200, 1600 µg/mLで染色体の構造異常細胞の出現頻度はそれぞれ17.0, 74.0%であった。倍数性細胞の出現頻度は全ての処理条件で5%未満であった。

なお、処理開始時および処理終了時の細胞処理液のpHを測定したところ、連続処理法24時間処理の1200, 1600 µg/mLにおける細胞処理液のpHは6.6~7.1であった。よって、染色体構造異常誘発は、細胞処理液のpH低下に起因するものではなく、被験物質の染色体異常誘発性に起因するものであると考えられた。

以上の結果から、2-エチル酪酸は本試験条件下において、染色体異常を誘発すると結論した。

なお、類似化合物である氷酢酸、酪酸ならびに乳酸は、いずれも連続処理法で陰性の結果が報告されている<sup>2)</sup>。

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) 祖父尼俊雄監修, “染色体異常試験データ集(改訂1998年版),” エル・アイ・シー, 東京, 1999.

連絡先

試験責任者: 中川宗洋  
 試験担当者: 太田絵律奈, 石毛裕子, 成見香瑞範  
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
 〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Munehiro Nakagawa (Study director)  
 Erina Ohta, Yuko Ishige,  
 Kazunori Narumi  
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
 Kashima Laboratory  
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
 Ibaraki, 314-0255 Japan  
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-ethylbutyric acid with and without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	S9 mix	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid <sup>b)</sup> (%)	Judgement <sup>c)</sup>	
						ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Solvent <sup>a)</sup>	0	-	6-18	100	200	3	0	0	0	0	3	3(1.5)	0	0.0	-	-
Test Substance	200	-	6-18	125	200	0	1	1	0	0	2	2(1.0)	0	0.0	-	-
	400	-	6-18	117	200	1	0	1	0	0	2	2(1.0)	0	0.0	-	-
	800	-	6-18	91	200	1	0	1	0	0	2	2(1.0)	0	0.0	-	-
	1600 A	-	6-18	54	200	2	1	0	0	0	3	2(1.0)	0	0.5	-	-
MMC	0.1	-	6-18	62	200	51	33	0	0	0	84	66(33.0)	0	0.5	+	-
Solvent	0	+	6-18	100	200	0	0	2	0	0	2	2(1.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	200	+	6-18	84	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0	0.0	-	-
	400	+	6-18	93	200	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	0	0.0	-	-
	800	+	6-18	86	200	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	0	1.0	-	-
	1600 A	+	6-18	0	TOXIC											
BP	20	+	6-18	68	200	25	105	1	0	0	131	116(58.0)	0	0.0	+	-

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C (positive control), BP:benzo [a] pyrene (positive control)

a) Dimethyl sulfoxide was used as solvent.

b) Two hundred cells were analyzed in each group except 1600  $\mu\text{g/mL}$  with S9 mix.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

A: The color of the medium was changed yellow and it indicated that pH of the medium became low.

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-ethylbutyric acid without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid <sup>b)</sup> (%)	Judgement <sup>c)</sup>	
					ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Solvent <sup>a)</sup>	0	24	100	200	1	0	1	0	0	2	2(1.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	400	24	94	200	11	0	0	0	0	11	11(5.5)	2	0.0	±	-
	800	24	83	200	10	0	1	0	0	11	10(5.0)	2	1.0	±	-
	1200	24	62	200	33	0	2	0	0	35	34(17.0)	1	0.5	+	-
	1600 A	24	2	100	72	2	0	0	0	74	74(74.0)	4	0.0	+	-
MMC	0.03	24	79	200	37	19	5	0	0	61	59(29.5)	2	0.0	+	-

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C (positive control)

a) Dimethyl sulfoxide was used as solvent.

b) Two hundred cells were analyzed in each group except 1600  $\mu\text{g/mL}$ .

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

A: The color of the medium was changed yellow and it indicated that pH of the medium became low.

## 2-エチル酪酸のラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

### Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2-Ethylbutyric acid by Oral Administration in Rats

#### 要約

2-エチル酪酸は、抗癌薬のバルプロ酸の類縁化学物質として知られている有機酸である。本物質の安全性評価の資料を得るために、2-エチル酪酸0(媒体対照, コーン油), 10, 50および250 mg/kgを10週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット(各13匹/群)に、交配前2週間から2週間の交配期間を経て、雄は42日間、交尾した雌は妊娠期間を経て分娩後4日まで、交尾したが分娩しなかった雌は妊娠25日相当日まで、それぞれ連日投与して翌日剖検し、雌雄動物に対する反復投与毒性および生殖発生毒性を検討した。また、出生児は哺育4日まで観察して剖検し、出生児に対する影響も検討した。結果は以下のように要約される。

#### 1. 反復投与毒性

雌雄ともに被験物質投与に起因する、死亡および瀕死動物は認められなかった。

雌雄ともに250 mg/kg投与群において、投与後一過性の流涎が1例ずつに認められた他に、被験物質投与に起因した一般状態の異常は認められなかった。また、体重増加および摂餌量にも投与の影響は認められなかった。

雌雄ともに250 mg/kg投与群において腎臓重量がやや増加したが、病理組織学検査では被験物質投与に起因すると考えられる異常は認められなかった。その他の器官の重量および病理組織学検査所見にも被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学検査では、50 mg/kg以上の投与群の雄において白血球数が軽度に減少し、250 mg/kg投与群において血小板数が減少したが、雌では被験物質投与の影響は認められなかった。血液生化学検査成績については、雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

#### 2. 生殖発生毒性

性周期に被験物質投与の影響は認められず、全例が交尾した。また、受胎率にも投与の影響は認められなかった。

被験物質各投与群の妊娠期間は対照群と同様であり、出産率にも被験物質投与の影響は認められなかった。また、妊娠黄体数、着床数、着床率、産児数および分娩率といった出生までの胚および胎児の生存性にも投与の影響は認められなかった。しかし、50 mg/kg以上の投与群において、少数例に産児を集める行動や胎盤を処理する行動の欠如、あるいは分娩の遷延といった分娩異常が

認められた。さらに、250 mg/kg投与群では出生児数が減少し、生児出産率および出生率が減少し、このために、哺育4日における生存児数も減少した。哺育0日および4日における性比ならびに新生児の4日の生存率には投与の影響は認められず、出生児の体重にも投与の影響は認められなかった。形態異常を示す出生児も認められなかった。

以上の試験成績から、本試験条件下における2-エチル酪酸の無作用量は、反復投与毒性に関しては、雄では10 mg/kg/dayであり、雌では50 mg/kg/dayと推定された。生殖発生毒性に関しては、雄では250 mg/kg/dayであり、雌では10 mg/kg/dayと推定され、出生児では50 mg/kg/dayであると推定された。

#### 方法

##### 1. 被験物質

本試験に使用した2-エチル酪酸(ロット番号:01-91101, 純度:99.2%, 不純物として水分0.03%を含有する無色透明の液体)は、チッソ株式会社(熊本)から提供を受けたもので、入手後は室温保管した。被験物質の試験期間中の安定性は、残余被験物質を提供元で再分析することにより確認された。

投与検体は、被験物質を秤量してコーン油(英名:corn oil, ナカライテスク(株)Lot, No. V9F1299)に溶解し、いずれの用量においても1回の投与液量が2 mL/kg体重になるように含量を調製した。投与検体の安定性については、冷蔵、遮光条件下における8日間の安定性を確認しているため、1週間に1回以上の頻度で調製し、調製後7日以内に使用した。投与検体中に含まれる被験物質の含量は秦野研究所において確認した。

##### 2. 使用動物および飼育方法

試験には、日本チャールス・リバー(株)厚木飼育センター生産のSprague-Dawley系(Crj:CD(SD)IGS, SPF)ラットを使用した。雌雄動物は7週齢で購入し、入荷後6日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間毎日一般状態を観察して異常が認められなかった動物を、さらに2週間予備飼育した。この間、雄は一般状態を観察し、雌は一般状態を観察するとともに性周期を観察した。雌雄とも投与開始前日に体重を測定し、体重別層化無作為抽出法により群分けした。雌動物については、入荷後7日から群分け日まで性周期を毎日観察し、規則的に発情を回帰している動物を選択して群分けに用いた。

各動物は、基準温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、基準湿度50~65%、換気回数約15回/時間、照明12時間(7~19時点灯)にそれぞれ制御された飼育室で、金属製金網床ケージに個別に収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア(株))および飲料水(水道水、秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。妊娠18日(腔栓あるいは精子発見日=妊娠0日)以後の母動物は、ラット用プラスチック製繁殖ケージに収容し、哺育5日(哺育0日=分娩日)まで紙パルプ製チップ(ALPHA-dri、加商(株))を床敷として供給して飼育した。

### 3. 投与量の設定および投与方法

本試験における投与量は、本試験に先立ち実施した予備試験の結果に基づいて決定した。すなわち、本試験と同系統のラット各群雌雄各5匹に、2-エチル酪酸をコーン油に溶解して、0、250、500あるいは1000 mg/kgを2週間反復経口投与し、その間、一般状態を観察して体重推移、摂餌量、尿の性状を調べた後、最終投与後に絶食してその翌日に剖検し、器官重量を測定した。その結果、1000 mg/kg投与により投与初期に自発運動が減少し、体重増加および摂餌量が抑制された。その後は流涎が認められるようになり、呼吸異常を示した雄の1例は瀕死状態に至った。さらに、2週間の反復投与後には前胃粘膜の肥厚が認められ、雌雄の肝臓重量が増加し、雄の脾臓が腫大して雌の腎臓重量が増加した。これらの結果ならびに、本試験では投与期間がさらに延長し、雌には妊娠、分娩および哺育といった生理的負荷が加えられることを考慮すると、1000 mg/kgは、耐量を超える量であると推測された。一方、250 mg/kgおよび500 mg/kg投与群は、瀕死状態に至らなかったものの呼吸異常も認められ、肝臓および腎臓重量の増加傾向が認められた。また、呼吸異常を認めなかった雄には脾臓重量の増加傾向が認められた。さらに、器官形成期の妊娠ラットに2-エチル酪酸を150 mg/kg反復投与すると、母動物の一部が呼吸異常を示して瀕死あるいは死に至ることが報告されていることから<sup>1)</sup>、本試験における高用量には、予備試験において2週間の生存が確認された250 mg/kgを設定し、以下公比5で除して、中用量には50 mg/kgを、低用量には10 mg/kgを設定することとした。

### 4. 観察および検査

#### 1) 一般状態観察

雌雄とも、全例について毎日、投与前後に一般状態を観察し、症状が発現した場合は、速やかな回復が期待されない所見を除き、症状の発現している間、断続的に可能な限り観察を継続した。死亡例については発見後体重を測定して剖検した。

#### 2) 体重

雌雄の全例について体重を測定した。測定は、雄では投与1(投与開始日)、7、14、21、28、35、42日および解剖日に行い、雌では、交尾を確認するまでは投与1、7、14、21日に、交尾確認後は、妊娠0、7、14、20日に、

分娩後は哺育0、4日および解剖日に行った。分娩しなかった例は、妊娠26日相当日の剖検日に測定した。これらのうち、投与21日の雌については、交尾が確認されていない動物についてのみ測定したので評価の対象から除外した。

#### 3) 摂餌量

雌雄の全例について投与1~2、7~8および14~15日に摂餌量を測定した。これらの他に、雄では投与14~15、29~30、35~36および41~42日に、雌では妊娠0~1、7~8、14~15および20~21日ならびに分娩後の哺育3~4日にも測定した。

#### 4) 性周期

雌の全例について群分け日までの観察に引き続き、交尾確認日まで性周期を観察した。腔スミア標本の細胞像から性周期を判定し、発情期の回帰間隔を基に性周期のタイプを、4日周期、4および5日周期ならびに不正性周期に分類し、投与開始後性周期が変化した動物の頻度を群毎に算出した。また、群ごとに平均発情回帰日数(個体毎の発情期から次回発情期までの日数の平均)を求めた。

#### 5) 交配

雌雄ともに2週間投与後(投与15日)の12週齢から交尾を確認するまで、2週間を限度として同群内の雌雄1:1で連日同居させた。交配期間中は、毎朝、腔スミア中の精子、あるいは腔栓の有無を確認した。これらのうちのいずれかが確認された雌動物は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率〔(交尾動物数/交配動物数)×100、%〕を求め、剖検時に子宮に着床痕の確認された雌動物を受胎動物として受胎率〔(受胎動物数/交尾動物数)×100、%〕を算出した。また、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数も求めた。

#### 6) 分娩・哺育観察

各群とも、交尾した雌は、全例を自然分娩させて哺育させた。分娩の確認は、妊娠21日から分娩が確認されるまで、妊娠25日を限度として毎日行い、11時までには分娩が完了した例についてその日を哺育0日とした。分娩状態を直接観察できた例については、異常の有無を断続的に観察し、直接観察ができなかった例については、分娩前後の一般状態および産児の状態から異常の有無を判断した。妊娠25日相当日までに分娩が確認されない動物は翌日剖検し、子宮に着床痕の認められなかった例を不妊と判定した。

分娩を確認した全例について妊娠期間(妊娠0日~分娩日の日数)を算定し、出産率〔(生児出産雌数/受胎動物数)×100、%〕を各群について求めた。また、哺育1日から毎日、哺育状態を観察し、哺育5日の剖検において数えられた着床数および妊娠黄体数から着床率〔(着

床数/妊娠黄体数)×100, %) を算出した。

出生児は、哺育0日に、雌雄別に産児数(生存児+死亡児)を調べ、分娩率 [(産児数/着床痕数)×100, %], 生児出産率 [(出生産児数/着床痕数)×100, %] および出生率 [(出生産児数/産児数)×100, %] を算出した。生存児については外表奇形の有無を観察した。翌日(哺育1日)から哺育4日まで毎日一般状態を観察し、生児数と死亡児数を雌雄別に数えて新生児の4日の生存率 [(哺育4日の生児数/哺育0日の生児数)×100, %] を算出した。生存児については、哺育0および4日に個別の体重を測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出するとともに哺育0および4日における性比 [(哺育0あるいは4日雄生児数/哺育0あるいは4日雌生児数)×100] を算出した。

## 7) 剖検

### (1) 雄

投与42日に絶食を開始し、その18~24時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈から抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いて血液を採取し、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間測定に用いた。次いで、腹部後大静脈から抗凝固剤としてEDTA-3Kを用いて採血し、その他の血液学検査に用いた。さらに、腹部後大静脈から抗凝固剤としてヘパリンを用いて採血し、血液生化学検査に用いた。動物は、採血終了後に放血致死させ解剖し、器官・組織の肉眼観察を行った。また、全例について、脳、下垂体、脊髄、上部気道を含む上顎、甲状腺、心臓、肺、気管、気管支、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿骨髄、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、凝固腺を含む精囊、病変部を採取し、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体の重量を測定して相対重量を算出した。採取した器官および組織のうち、精巣ならびに精巣上体はブアン液(長期保存は0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液を使用)に固定し、その他は0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定して保存した。肺は、摘出前に0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液を注入してから固定・保存した。

### (2) 雌

死亡例は発見後直ちに剖検した。交尾したが分娩しなかった例については妊娠25日相当日に、また、分娩した例は哺育4日に絶食を開始し、いずれも絶食開始18~24時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で雄と同様に採血後、放血致死させ解剖し、器官・組織の肉眼観察を行った。また、全例について脳、下垂体、脊髄、上部気道を含む上顎、甲状腺、心臓、肺、気管、気管支、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿骨髄、卵巣、子宮、膣および病変部を採取し、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓および副腎の重量を測定して相対重量を算出した。子宮に

ついては着床数を数え、分娩した雌の卵巣については実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えた後、いずれも0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定して保存した。肺は雄と同様に0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液をよる注入固定を行った。

### (3) 出生児

死亡児は発見後速やかに剖検し、0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定して保存した。生存児は全例を哺育4日にエーテル吸入により致死させ剖検し、異常の認められた器官を0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定し保存した。

## 8) 血液学検査

プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間は全自動血液凝固測定装置CA-1000(東亜医用電子)を用いて光散乱法によって測定した。また、血液自動分析装置CELL-DYN3500SL(ダイナボット)を用いて赤血球数(RBC)、平均赤血球容積(MCV)ならびに血小板数を電気抵抗法で、白血球数および白血球分類をフローサイトメトリー・レーザー光散乱法で測定し、血色素量を吸光度法により測定した。さらに、RBC、MCVあるいは血色素量からヘマトクリット値、平均赤血球血色素濃度(MCHC)あるいは平均赤血球血色素量(MCH)を算出した。

## 9) 血液生化学検査

遠心方式生化学自動分析装置COBAS-FARA(ロシユ)を用い、総蛋白濃度はビウレット法で、アルブミン濃度はBCG法で、尿素窒素濃度(BUN)は、ウレアーゼG.L.DH法で、クレアチニン濃度はJaffé法で、ブドウ糖濃度はグルコキナーゼG6PDH法で、総コレステロール濃度はCOD・DAOS法で、トリグリセライド濃度はGPO・DAOS法で、アルカリフォスファターゼ活性(ALP)はGSCC法で、GPTおよびGOT活性はIFCC法で、 $\gamma$ -GTP活性は $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法で、総ビリルビン濃度はJendrassik/Grof法で、無機リン濃度はモリブデン酸直接法で、カルシウム濃度はOCPC法で測定し、A/G比は算出した。また、全自動電解質分析装置EA05(A&T)を用い、イオン電極法によって、ナトリウム、カリウムおよび塩素の各濃度を測定した。

## 10) 病理組織学検査

雄から得られた固定保存器官のうち、精巣および精巣上体は全例について、その他は対照群5例および250 mg/kg投与群6例について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。

雌では採取した器官および組織のうち、卵巣は全例について、その他は不妊例を除く対照群7例および250 mg/kg投与群5例について雄と同様に病理組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。

病変部については雌雄ともに脱毛を除き病理組織学検

査を行った。

## 5. 統計解析

性周期の変化した動物の頻度、交尾率、受胎率ならびに出生児の形態異常の出現頻度についてはFisherの直接確率検定を行った。病理組織学検査所見では、グレード分けをしたデータはMann-WhitneyのU検定により、陽性グレードの合計値はFisherの直接確率片側検定により対照群と2-エチル酪酸各投与群との間の有意差検定を行った。その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいはlitterごとの平均値を1標本として先ずBartlett法により各群の分散の一様性について検定を行った。分散が一様である場合には一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められる場合はDunnett法により多重比較を行った。一方、いずれかの群で分散が0となる場合および分散が一様でない場合には、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、群間に有意性が認められる場合には、Dunnett型の検定法により多重比較を行った。有意水準はいずれも5%とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 死亡および一般状態

雄動物に死亡はなかった。雄では250 mg/kg投与群の1例に投与後一過性の流涎が認められた他に、被験物質投与に起因すると考えられる異常は観察されなかった。

雌では対照群の1例が投与38日の分娩中に死亡した。死亡するまで異常は全く観察されなかったが、病理組織学検査において肺および腎臓糸球体の毛細血管内にフィブリン血栓が認められたことから、フィブリン血栓に関連した原因により死亡したものと推測される。この他に死亡および瀕死例はなかった。雌の一般状態については、250 mg/kg投与群の1例に投与後一過性の流涎が認められた他に被験物質投与に起因すると考えられる異常は観察されなかった。

#### 2) 体重(Figs. 1, 2)

雌雄ともにいずれの時期の体重も対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められず、体重増加に被験物質投与の影響は認められなかった。

#### 3) 摂餌量(Figs. 3, 4)

雌雄ともにいずれの時期の摂餌量も対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められず、被験物質投与の影響は認められなかった。

#### 4) 器官重量(Table 1)

雌雄ともに250 mg/kg投与群において腎臓重量が増加し、雄では相対重量のみが、また、雌では重量および相対重量のいずれもが対照群と比較して有意に増加した。その他の器官については雌雄ともに対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

#### 5) 血液学検査所見(Table 2)

雄では赤血球系の各測定値には対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。白血球系については、50 mg/kg以上の投与群において白血球数が対照群と比較して有意( $p<0.05$ )に減少した。また、白血球百分比については対照群との間に有意差は認められなかったが、リンパ球以外の白血球比率はむしろ対照群より高い値を示していた。凝固系については、250 mg/kg投与群において血小板数が有意( $p<0.01$ )に減少していたが、血液凝固時間には対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

雌ではいずれの検査項目についても対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

#### 6) 血液生化学検査所見(Table 3)

雄ではいずれの検査項目についても対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

雌では、50 mg/kg以上の投与群において $\gamma$ -GTP活性が対照群と比較して軽度ながら有意( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ )に上昇した。また、対照群と比較すると、50 mg/kg投与群において総ビリルビン濃度の有意( $p<0.01$ )な減少およびカルシウム濃度の有意( $p<0.01$ )な増加が認められたが、その他の投与群については対照群との間に有意差は認められなかった。上記以外の項目については、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

#### 7) 剖検所見

雄では、50 mg/kgおよび250 mg/kg投与群の各2例に肝臓および腎臓の腫大が認められ、そのうちの250 mg/kg投与群の1例には右側腎臓の皮質に淡色域が認められた。これらの他に250 mg/kg投与群では胸腺の腫大が1例に、小型化が2例に観察された。生殖器の変化としては、対照群および250 mg/kg投与群の2および1例の精巢上体に黄色あるいは乳白色の結節が片側性に観察された。

雌では、妊娠26日相当日に剖検した不妊例2例については、対照群の1例に所見は認められなかったが、50 mg/kg投与群の1例の胸腺に小型化が認められた。哺育5日の定期解剖では胸腺の小型化が対照群を含む各投与群に1例ずつ認められた。また、対照群の2例および10 mg/kg投与群の1例の腺胃粘膜に赤色点が認められ、10 mg/kg投与群の別の1例において前胃粘膜の肥厚が観察された。50 mg/kg投与群では1例の左側子宮角に赤色域が観察された。この他、対照群では1例に左側子宮角の限局性拡張が認められ、一般状態の観察において右腋窩皮下に結節の認められた例にはその部位に腫瘤が認められた。

#### 8) 病理組織学検査所見(Table 4)

雄では精巢、精巢上体、肝臓、腎臓、脾臓、肺および気管、心臓、および甲状腺に所見が認められたが、いずれも被験物質投与に起因した変化ではなかった。



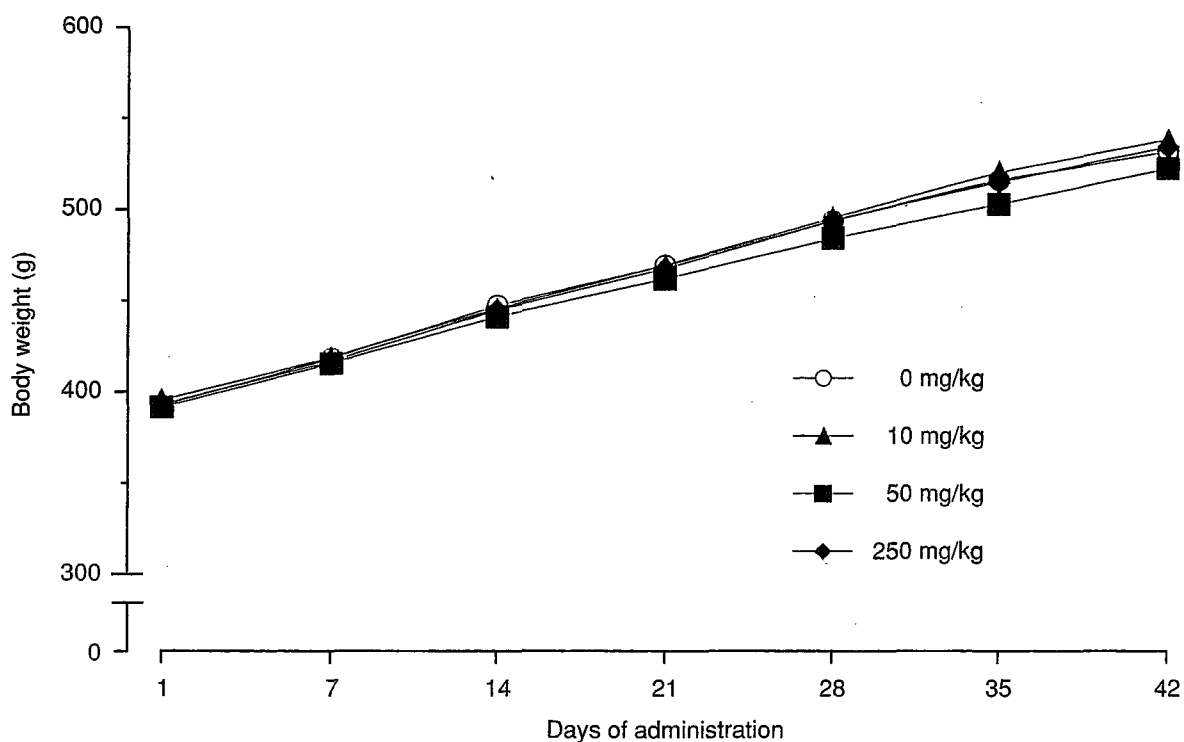


Fig. 1 Body weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

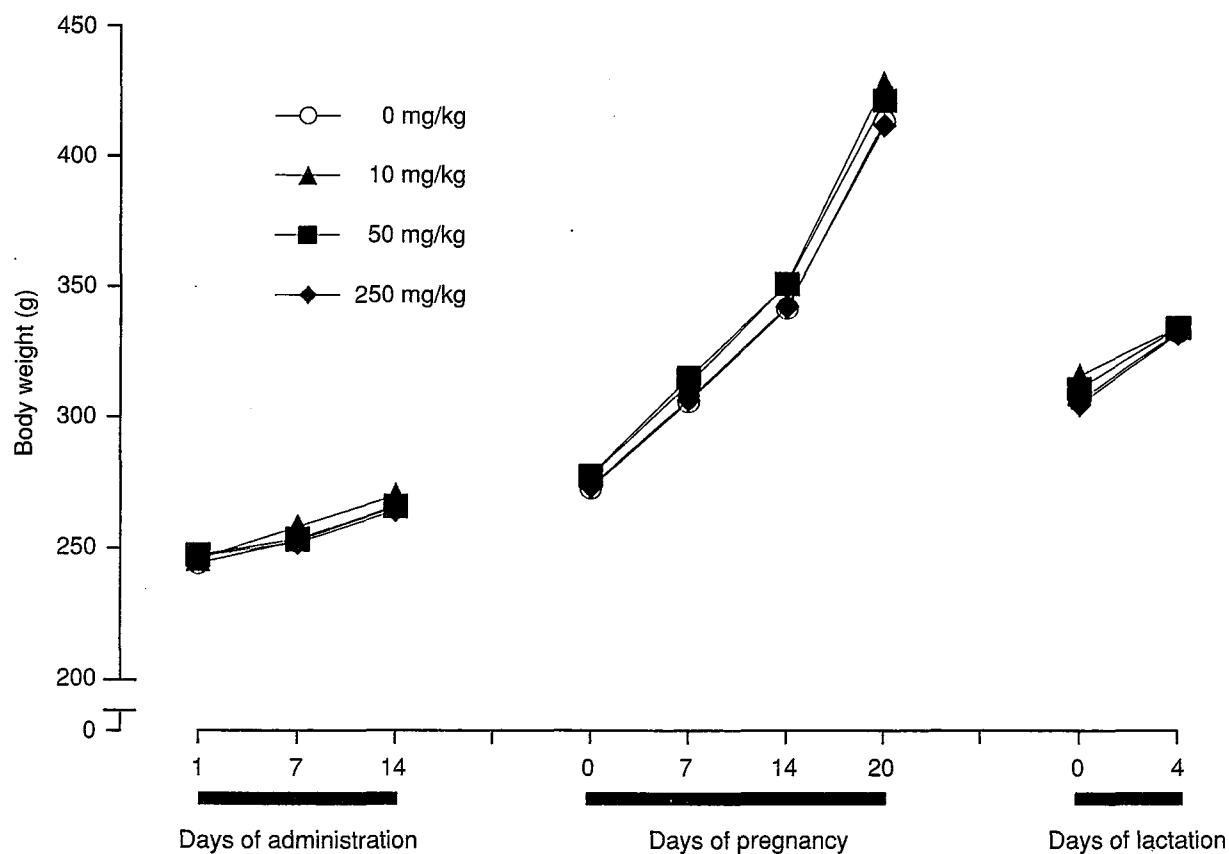


Fig. 2 Body weight of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

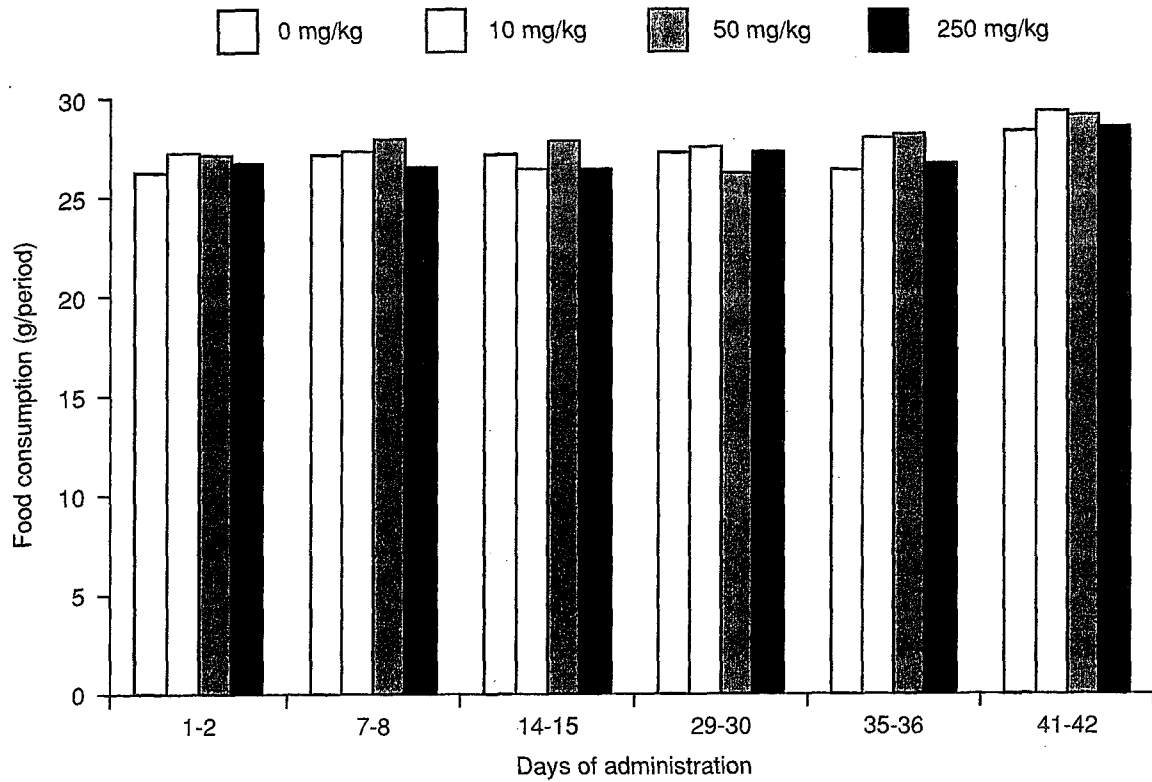


Fig. 3 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

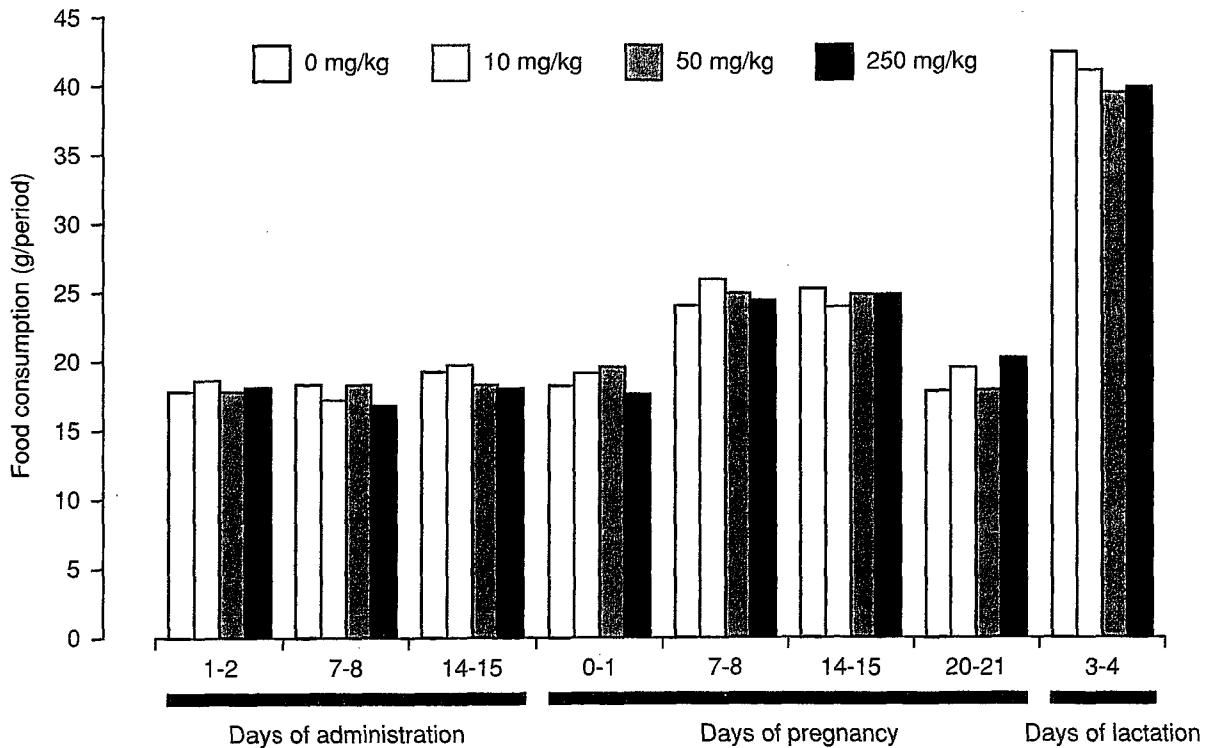


Fig. 4 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

雌でも子宮、肝臓、腎臓、脾臓、肺および気管、胸腺、膀胱、甲状腺に所見が認められたが、いずれも被験物質投与に起因した変化ではなかった。また、対照群の1例において右腋窩皮下に腫瘤が認められた例には、腋窩部の乳腺にリンパ球およびマクロファージの浸潤が認められ、乳管内には細胞残屑が認められた。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 性周期所見 (Table 5)

投与開始後に性周期の変化した動物の頻度および平均発情回帰日数には、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

### 2) 交配成績 (Table 5)

全例が交尾し、対照群および50 mg/kg投与群の各1例を除き受胎した。また、同居開始から交尾までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数にも対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

### 3) 分娩および哺育所見

対照群において分娩を直接観察した6例中1例は、妊娠22日の分娩中に死亡したが、分娩状態に異常は認められなかった。しかし、娩出された産児の中に皮下出血が認められたことから、これら2例の娩出時には分娩困難があったものと推測された。被験物質投与群では、10 mg/kg投与群の9例、50 mg/kg投与群の5例、および250 mg/kg投与群の9例の分娩を直接観察した。これらのうち、50 mg/kg投与群の2例には産児を集める行動が認められず、出生児が多数死亡した例が認められた。また、妊娠22日に分娩を開始したが、分娩が遷延して4時間が経過しても3匹しか分娩せず、翌日に死亡児1匹を含む18匹の分娩が確認された例も認められた。250 mg/kg投与群の1例には妊娠23日の分娩時に胎盤処理および産児を集める行動が認められず出生児の多数が死亡した例が認められ、この例の分娩状態は不良であったと判断された。しかし、10 mg/kg投与群の動物に分娩状態の異常は観察されず、妊娠期間および出産率については対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった (Table 6)。

哺育状態の異常はいずれの投与群の動物にも認められなかった。

### 4) 黄体数および着床数 (Table 6)

対照群と被験物質投与群の間に有意差は認められず、排卵および着床には被験物質投与の影響は認められなかった。

### 5) 出生児所見 (Table 6)

いずれの投与群の動物も行動を含む一般状態に異常は認められなかった。

出生児の生存性を対照群と比較すると、250 mg/kg投与群において出産生児数、生児出産率および出生率が有意 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) に低下した。産児数および分娩率

もやや低下したが、有意差は認められなかった。哺育0日における性比については対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。哺育期間中はいずれの投与群においても死亡児が増加することはなく、新生児の4日の生存率は対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。しかし、250 mg/kg投与群では哺育0日において低下していた生児数がそのまま維持されたため、対照群と比較すると、哺育4日における生児数に有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。哺育4日における性比については対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

体重については雌雄ともにいずれの時期も対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

生存産児の形態観察 (表には示さず) では、分娩途中で母動物が死亡した対照群の1腹の雌産児2例に、胸部および両前肢皮下に血液の貯留、皮膚の乾燥、ならびに左側後肢末端の皮下血腫および尾の小血腫あるいは吻部および両後肢の皮下血腫が認められたが、内臓に異常は観察されなかった。死亡児の形態に異常は観察されなかった。哺育4日における剖検では50 mg/kg投与群の1腹の雌2例に曲尾が観察された他に、いずれの投与群にも異常は観察されなかった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

雌雄ともに250 mg/kg投与群において流涎が観察されたが、各1例に投与後一過性に認められた軽微な変化であった。

予備試験では1000 mg/kgの反復投与を受けた雄が呼吸異常を示して瀕死状態に至ったが、本試験では瀕死あるいは死亡動物は認められなかった。Narotsky<sup>1)</sup>は、器官形成期にあたる妊娠時期に2-エチル酪酸を150あるいは250 mg/kg経口投与すると母動物が誤嚥により呼吸異常を示して死亡することを報告し、これは被験物質の消化管に対する刺激作用によるものであると推定している。予備試験において瀕死状態に至った動物に誤嚥は認められなかったが、呼吸異常の成因を知るために本試験では病理組織学検査に上部気道を加えた。また、予備試験のそれより最高用量を減らし、胃管の外壁に被験物質が全く付着しないように投与したところ、死亡および瀕死のみならず呼吸異常も観察されなかった。病理学検査においても上部気道から肺に至るまで呼吸器に異常は観察されなかったため、予備試験でみられた呼吸異常の成因を知ることはできなかった。

体重増加および摂餌量には被験物質投与の影響は認められなかった。

雌雄ともに、250 mg/kg投与群において腎臓重量あるいはその相対重量が増加した。高用量群に認められた変化であり、予備試験においても腎臓重量の増加が雌雄に認められていたことから被験物質投与による影響であると考えられる。しかし、血液生化学検査では腎機能を示す各指標に被験物質投与の影響は認められず、病理組織

学検査においても異常は観察されなかったことからその成因は不明である。その他の器官の重量には雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学検査では、50 mg/kg以上の投与群の雄において白血球数が軽度に減少し、250 mg/kg投与群では血小板数も減少した。いずれも軽微な変化であるが、用量に依存して変動していることから被験物質投与に起因した変化であると考えられる。白血球数の減少については、リンパ球以外の白血球比率はむしろ対照群より高い値を示していたことから、リンパ球数の減少に由来するものと推測される。雌動物の血液学検査には投与の影響は認められなかった。

雌の血液生化学検査において50 mg/kg以上の投与群の $\gamma$ -GTP活性がやや上昇した。しかしその程度はごく軽微であり、50 mg/kgおよび250 mg/kg両群間で被験物質の用量に関連した変化が認められなかった。また、その他の肝機能を表す指標に投与の影響は認められず、肝臓重量および肝臓の病理組織学検査においても投与に起因する異常は観察されなかったことから、50 mg/kg以上の投与群において認められた $\gamma$ -GTP活性の僅かな上昇は偶発的な変化であると判断された。その他の変化はいずれも被験物質の投与量とは無関係に認められた変化であることから被験物質投与による影響ではないものと考えられる。雄の血液生化学検査成績には投与の影響は認められなかった。

病理学検査ではいずれの器官にも被験物質投与の影響は認められなかった。

## 2. 生殖発生毒性

雌動物について観察した性周期には被験物質投与の影響は認められなかった。また、交配成績にも被験物質投与の影響は認められなかったことから、250 mg/kgまでの2-エチル酪酸は親動物の生殖能力に影響を及ぼさないものと考えられる。

対照群の1例が分娩中にフィブリン血栓に関連した原因により死亡した。分娩状態の異常は50 mg/kg以上の投与群にも少数例ずつ認められたが、いずれも分娩翌日以降の哺育状態には異常が認められなかったことから、対照群の死亡例とは異なる原因により分娩状態に異常をきたしたものと推測される。

250 mg/kg投与群において出産生児数が減少した。着床数には投与の影響は認められず、産児数は軽度な減少に留まっていたことから、出生時の死亡が増加したことによるものと考えられる。250 mg/kg投与では、1例ではあるが、分娩状態の異常が認められ、その例では生児出産率および出生率も著しい低値(いずれも38.5%)を示した。その他の動物の分娩状態に異常は認められなかったが、250 mg/kg投与では生児出産率および出生率が有意に低下していたことから、250 mg/kgの2-エチル酪酸投与は分娩に影響を及ぼし、産児の生存性を低下させるものと考えられる。50 mg/kg投与群においても2例に分娩の異常が観察された。2例のうち1例は生児出産率および出生率がやや低かった(いずれも68.8%)。また、50

mg/kg投与群の生児出産率および出生率は対照群との間に有意差は認められなかったが、やや低い値を示していたことから50 mg/kg投与も分娩に影響を及ぼす可能性があるものと推測される。10 mg/kg投与群では分娩および出生児の生存性のいずれにも投与の影響は認められなかった。出生児の性比および発育ならびに分娩翌日以降の生存性についてはいずれの投与群においても被験物質投与の影響は認められなかった。

2-エチル酪酸は、催奇形物質であるバルプロ酸と類似した化学構造を有する化学物質である。本試験では50 mg/kg投与群の同腹の2例に曲尾が認められた。曲尾は本系統のラットでしばしば観察される奇形であり、用量とは無関係に1腹のみに観察されたことから、本例は自然発生によるものと判断された。従って、250 mg/kgまでの投与量の2-エチル酪酸に催奇形性はないものと判断された。

## 3. 無作用量

以上の試験成績から、本試験条件下における2-エチル酪酸の無作用量は、雄に対する反復投与毒性に関しては、白血球数が軽度に減少したことから10 mg/kg/dayと推定された。雌に対する反復投与毒性に関しては、投与後一過性の流涎が認められ、腎臓重量およびその相対重量が増加したことから50 mg/kg/dayと推定された。生殖発生毒性に関しては雄では250 mg/kg/dayと推定された。雌では50 mg/kg/day以上の投与群の少数例に分娩異常が認められたことから10 mg/kg/dayであると推定された。出生児では、250 mg/kg/day投与群において出生日における生存性が低下したことから50 mg/kg/dayであると推定された。

## 文献

- 1) M. G. Narotsky, E. Z. Francis, R. J. Kavlock, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **22**, 251(1994).

## 連絡先

試験責任者：代田眞理子  
 試験担当者：佐藤昌子，一原佐知子  
 (財)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: Mariko Shirota (Study director)  
 Masako Sato, Sachiko Ichihara  
 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 Organ weights of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
<b>Male</b>				
Number of animals	13	13	13	13
Final body weight (g)	502.1 ± 47.6	509.8 ± 52.2	492.1 ± 52.0	501.7 ± 45.2
Brain (g)	2.02 ± 0.07	2.02 ± 0.08	2.01 ± 0.08	1.99 ± 0.10
(g%)	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.05	0.40 ± 0.04
Heart (g)	1.36 ± 0.13	1.38 ± 0.21	1.35 ± 0.13	1.36 ± 0.10
(g%)	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02
Thymus (mg)	270.5 ± 75.2	270.4 ± 78.9	290.1 ± 129.6	259.6 ± 98.2
(mg%)	53.3 ± 11.4	52.7 ± 12.8	58.1 ± 21.9	51.5 ± 18.5
Liver (g)	13.75 ± 2.19	13.80 ± 2.41	13.64 ± 2.58	13.89 ± 2.05
(g%)	2.73 ± 0.21	2.69 ± 0.23	2.76 ± 0.30	2.76 ± 0.20
Kidneys (g)	3.05 ± 0.42	3.13 ± 0.37	3.09 ± 0.26	3.36 ± 0.29
(g%)	0.61 ± 0.06	0.61 ± 0.03	0.63 ± 0.06	0.67 ± 0.05*
Spleen (g)	0.82 ± 0.15	0.83 ± 0.13	0.83 ± 0.14	0.77 ± 0.09
(g%)	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.02
Adrenal glands (mg)	57.1 ± 6.1	53.5 ± 10.9	58.6 ± 9.2	54.0 ± 6.3
(mg%)	11.5 ± 1.5	10.5 ± 1.6	12.0 ± 2.1	10.8 ± 1.3
Testes (g)	3.25 ± 0.33	3.26 ± 0.27	3.36 ± 0.32	3.08 ± 0.24
(g%)	0.65 ± 0.07	0.64 ± 0.07	0.69 ± 0.11	0.62 ± 0.07
Epididymides (g)	1.21 ± 0.10	1.24 ± 0.13	1.25 ± 0.10	1.18 ± 0.11
(g%)	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.24 ± 0.03
<b>Female</b>				
Number of animals	11	13	12	13
Final body weight (g)	307.8 ± 27.0	309.5 ± 29.4	306.6 ± 17.3	306.1 ± 20.4
Brain (g)	1.89 ± 0.10	1.91 ± 0.05	1.91 ± 0.08	1.92 ± 0.06
(g%)	0.62 ± 0.05	0.62 ± 0.06	0.62 ± 0.03	0.63 ± 0.04
Heart (g)	0.93 ± 0.09	0.90 ± 0.06	0.92 ± 0.09	0.93 ± 0.08
(g%)	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Thymus (mg)	169.7 ± 59.3	172.7 ± 70.8	197.4 ± 78.6	185.4 ± 81.2
(mg%)	54.8 ± 17.7	55.2 ± 19.9	64.3 ± 24.5	60.2 ± 26.0
Liver (g)	10.24 ± 1.29	9.85 ± 0.66	10.19 ± 0.78	10.25 ± 0.94
(g%)	3.32 ± 0.22	3.19 ± 0.22	3.32 ± 0.12	3.35 ± 0.24
Kidneys (g)	1.89 ± 0.16	1.94 ± 0.16	2.01 ± 0.21	2.12 ± 0.24*
(g%)	0.62 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.65 ± 0.05	0.70 ± 0.08*
Spleen (g)	0.71 ± 0.09	0.67 ± 0.08	0.69 ± 0.07	0.68 ± 0.13
(g%)	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.04
Adrenal glands (mg)	69.3 ± 8.4	72.5 ± 10.4	67.9 ± 10.3	67.7 ± 7.9
(mg%)	22.5 ± 1.8	23.6 ± 3.8	22.2 ± 3.4	22.2 ± 2.6

Values represent mean ± S.D.

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

Table 2 Hematological examination of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose(mg/kg)	0	10	50	250
<b>Male</b>				
Number of animals	13	13	13	13
RBC( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	850 $\pm$ 48	825 $\pm$ 42	850 $\pm$ 60	828 $\pm$ 31
Hemoglobin(g/dL)	15.2 $\pm$ 0.7	15.0 $\pm$ 0.5	15.1 $\pm$ 0.9	15.0 $\pm$ 0.6
Hematocrit(%)	44.6 $\pm$ 1.9	44.2 $\pm$ 1.6	44.5 $\pm$ 2.9	44.5 $\pm$ 1.6
MCV(fL)	52.5 $\pm$ 1.4	53.6 $\pm$ 1.2	52.4 $\pm$ 1.8	53.7 $\pm$ 1.4
MCH(pg)	17.9 $\pm$ 0.5	18.3 $\pm$ 0.5	17.8 $\pm$ 0.6	18.1 $\pm$ 0.5
MCHC(g/dL)	34.1 $\pm$ 0.3	34.0 $\pm$ 0.4	34.0 $\pm$ 0.4	33.8 $\pm$ 0.4
Platelet( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	111.4 $\pm$ 20.3	103.8 $\pm$ 13.2	103.6 $\pm$ 10.2	93.8 $\pm$ 7.4**
PT(sec)	16.2 $\pm$ 3.4	14.7 $\pm$ 1.3	15.9 $\pm$ 3.0	15.9 $\pm$ 2.6
APTT(sec)	22.1 $\pm$ 2.6	21.1 $\pm$ 2.4	21.9 $\pm$ 2.3	21.5 $\pm$ 1.9
WBC( $\times 100/\text{mm}^3$ )	87.8 $\pm$ 20.2	75.1 $\pm$ 23.5	65.0 $\pm$ 20.1*	64.7 $\pm$ 16.0*
Differential leukocyte counts(%)				
Neutrophil(%)	13 $\pm$ 4	14 $\pm$ 3	15 $\pm$ 5	16 $\pm$ 5
Eosinophil(%)	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
Basophil(%)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte(%)	3 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2
Lymphocyte(%)	82 $\pm$ 4	79 $\pm$ 5	79 $\pm$ 6	78 $\pm$ 7
<b>Female</b>				
Number of animals	11	13	12	13
RBC( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	646 $\pm$ 32	633 $\pm$ 48	650 $\pm$ 46	657 $\pm$ 40
Hemoglobin(g/dL)	12.7 $\pm$ 0.7	12.5 $\pm$ 0.7	12.7 $\pm$ 0.7	12.9 $\pm$ 0.6
Hematocrit(%)	37.5 $\pm$ 2.2	36.9 $\pm$ 2.1	37.4 $\pm$ 2.2	38.1 $\pm$ 1.9
MCV(fL)	58.1 $\pm$ 1.5	58.4 $\pm$ 2.0	57.6 $\pm$ 1.8	58.1 $\pm$ 3.1
MCH(pg)	19.7 $\pm$ 0.6	19.8 $\pm$ 0.7	19.5 $\pm$ 0.7	19.7 $\pm$ 1.0
MCHC(g/dL)	33.9 $\pm$ 0.5	33.9 $\pm$ 0.3	33.9 $\pm$ 0.4	34.0 $\pm$ 0.3
Platelet( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	111.7 $\pm$ 15.9	119.1 $\pm$ 11.5	110.2 $\pm$ 15.0	102.8 $\pm$ 10.8
PT(sec)	13.2 $\pm$ 0.7	13.2 $\pm$ 0.7	12.9 $\pm$ 0.5	13.2 $\pm$ 0.6
APTT(sec)	17.7 $\pm$ 2.4	16.6 $\pm$ 1.0	16.9 $\pm$ 0.8	16.7 $\pm$ 0.8
WBC( $\times 100/\text{mm}^3$ )	97.4 $\pm$ 24.5	91.2 $\pm$ 22.8	96.4 $\pm$ 25.8	90.0 $\pm$ 18.8
Differential leukocyte counts(%)				
Neutrophil(%)	19 $\pm$ 5	24 $\pm$ 9	21 $\pm$ 5	20 $\pm$ 6
Eosinophil(%)	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0
Basophil(%)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte(%)	8 $\pm$ 5	5 $\pm$ 3	5 $\pm$ 2	6 $\pm$ 3
Lymphocyte(%)	72 $\pm$ 9	70 $\pm$ 10	72 $\pm$ 6	73 $\pm$ 5

Values represent mean  $\pm$  S.D.

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

\*\* : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Table 3 Blood chemical examination of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
Male				
Number of animals	13	13	13	13
Total protein (g/dL)	5.5 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.3
Albumin (g/dL)	3.2 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.2
A/G	1.36 ± 0.13	1.26 ± 0.11	1.28 ± 0.15	1.34 ± 0.09
BUN (mg/dL)	16 ± 3	17 ± 3	17 ± 3	16 ± 2
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	152 ± 21	144 ± 24	140 ± 15	148 ± 17
Total cholesterol (mg/dL)	44 ± 7	44 ± 7	40 ± 10	41 ± 9
Triglyceride (mg/dL)	47 ± 18	41 ± 13	35 ± 14	39 ± 18
ALP (U/L)	193 ± 42	214 ± 39	233 ± 53	225 ± 44
GPT (U/L)	30 ± 3	32 ± 4	31 ± 5	39 ± 29
GOT (U/L)	67 ± 10	66 ± 6	69 ± 10	79 ± 35
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1
Total bilirubin (mg/dL)	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02
Inorganic phosphate (mg/dL)	5.7 ± 0.7	5.8 ± 0.8	5.8 ± 0.8	6.1 ± 0.7
Ca (mg/dL)	8.9 ± 0.2	8.8 ± 0.3	8.8 ± 0.3	8.9 ± 0.2
Na (mEq/L)	145.5 ± 1.3	145.5 ± 1.1	146.3 ± 1.2	145.4 ± 1.5
K (mEq/L)	4.00 ± 0.35	3.91 ± 0.31	3.96 ± 0.25	4.10 ± 0.22
Cl (mEq/L)	109.0 ± 1.8	109.4 ± 1.5	110.0 ± 0.8	108.3 ± 1.7
Female				
Number of animals	11	13	12	13
Total protein (g/dL)	5.4 ± 0.4	5.4 ± 0.2	5.7 ± 0.4	5.4 ± 0.4
Albumin (g/dL)	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.1	3.3 ± 0.3	3.2 ± 0.2
A/G	1.34 ± 0.12	1.33 ± 0.12	1.38 ± 0.13	1.46 ± 0.18
BUN (mg/dL)	17 ± 3	15 ± 3	17 ± 3	18 ± 3
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	124 ± 12	128 ± 9	135 ± 13	136 ± 15
Total cholesterol (mg/dL)	49 ± 11	48 ± 14	49 ± 11	47 ± 10
Triglyceride (mg/dL)	63 ± 20	64 ± 22	76 ± 28	53 ± 18
ALP (U/L)	103 ± 25	129 ± 51	128 ± 53	138 ± 57
GPT (U/L)	40 ± 6	40 ± 5	38 ± 7	41 ± 9
GOT (U/L)	62 ± 7	65 ± 10	59 ± 8	64 ± 13
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0*	1 ± 1**
Total bilirubin (mg/dL)	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.03**	0.10 ± 0.03
Inorganic phosphate (mg/dL)	6.8 ± 0.7	6.3 ± 0.5	6.6 ± 0.9	6.6 ± 1.0
Ca (mg/dL)	9.0 ± 0.5	9.2 ± 0.3	9.7 ± 0.2**	9.4 ± 0.5
Na (mEq/L)	143.2 ± 1.0	143.7 ± 1.0	142.9 ± 1.0	143.4 ± 1.0
K (mEq/L)	4.31 ± 0.55	3.98 ± 0.27	4.04 ± 0.29	3.95 ± 0.25
Cl (mEq/L)	107.6 ± 1.7	108.4 ± 1.2	107.5 ± 1.4	107.9 ± 1.6

Values represent mean ± S.D.

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

\*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Table 4 Histopathological findings of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Organ [Number of animals examined]	Sex: Dose (mg/kg)	Male				Female			
		0	10	50	250	0	10	50	250
Testis		[13]	[13]	[13]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Atrophy, seminiferous tubule	-	10	13	13	12				
	±	3	0	0	0				
	+	0	0	0	1				
	total	3	0	0	1				
Epididymis		[13]	[13]	[13]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Cell debris, lumen	-	11	13	13	12				
	±	2	0	0	0				
	+	0	0	0	1				
	total	2	0	0	1				
Spermatic granuloma	-	11	13	11	11				
	±	0	0	2	2				
	+	1	0	0	0				
	++	1	0	0	0				
	total	2	0	2	2				
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	-	10	13	11	11				
	±	3	0	2	2				
	total	3	0	2	2				
Prostate: ventral lobe		[5]	[0]	[0]	[6]	[0]	[0]	[0]	[0]
Cellular infiltration, lymphocyte & plasma cell, interstitium/epithelium	-	2			2				
	±	2			1				
	+	0			1				
	++	1			2				
	total	3			4				
Uterus		[0]	[0]	[0]	[0]	[7]	[0]	[1]	[5]
Dilatation, cystic, lumen, focal	-					6		1	5
	++					1		0	0
	total					1		0	0
Cellular infiltration, macrophage, with brown pigment, muscular layer	-					7		0	5
	+					0		1	0
	total					0		1	0
Liver		[5]	[0]	[2]	[7]	[7]	[0]	[0]	[5]
Fatty change, periportal	-	0		0	0	1			0
	±	4		0	5	6			5
	+	1		1	2	0			0
	++	0		1	0	0			0
	total	5		2	7	6			5
Microgranuloma	-	1		1	5	7			4
	±	4		1	0	0			1
	+	0		0	2	0			0
	total	4		1	2	0			1
Hematopoiesis, extramedullary	-	5		2	7	7			4
	±	0		0	0	0			1
	total	0		0	0	0			1
Kidney		[5]	[0]	[2]	[7]	[7]	[0]	[0]	[5]
Ectopic tissue, epididymis-like duct, cortex, right side	-	5		2	6	7			5
	+	0		0	1	0			0
	total	0		0	1	0			0
Eosinophilic body	-	3		1	5	7			5
	±	0		0	2	0			0
	+	1		1	0	0			0
	++	1		0	0	0			0
	total	2		1	2	0			0

-: Negative, ±: Very slight, +: Slight, ++: Moderate, +++: Severe, total: Total of positive grade  
[ ]: Number of animals examined



Table 4 (continued)

Organ [Number of animals examined]	Sex: Findings, grade and number of animals	Dose (mg/kg)	Male				Female			
			0	10	50	250	0	10	50	250
Kidney			[5]	[0]	[2]	[7]	[7]	[0]	[0]	[5]
Basophilic tubule, cortex	-		2		0	4	3			3
	±		3		2	2	4			2
	+		0		0	1	0			0
	total		3		2	3	4			2
Cast, hyalin, medulla	-		5		2	6	7			5
	+		0		0	1	0			0
	total		0		0	1	0			0
Cast, hyalin, cortex	-		5		2	6	7			5
	±		0		0	1	0			0
	total		0		0	1	0			0
Cyst, cortico-medullary junction	-		4		2	7	7			5
	±		1		0	0	0			0
	total		1		0	0	0			0
Mineralization	-		4		1	7	4			3
	±		1		1	0	3			1
	+		0		0	0	0			1
	total		1		1	0	3			2
Spleen			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Hematopoiesis, extramedullary	±		1			1	0			0
	+		4			5	1			0
	++		0			0	6			5
	total		5			6	7			5
Deposit, pigment, brown	±		5			6	7			5
	total		5			6	7			5
Lung & Bronchus			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Accumulation, foam cell	-		4			4	2			3
	±		1			2	5			1
	+		0			0	0			1
	total		1			2	5			2
Heart			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Degeneration/fibrosis, myocardium	-		4			5	7			5
	±		1			1	0			0
	total		1			1	0			0
Thymus			[5]	[0]	[0]	[8]	[8]	[1]	[1]	[5]
Atrophy	-		5			8	8	1	0	4
	±		0			0	0	0	0	1
	++		0			0	0	0	1	0
	total		0			0	0	0	1	1
Urinary bladder			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria	-		5			6	7			4
	±		0			0	0			1
	total		0			0	0			1
Thyroid gland			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Cellular infiltration, plasma cell & lymphocyte, interstitium	-		5			6	6			5
	±		0			0	1			0
	total		0			0	1			0
Ectopic thymus	-		5			5	7			5
	±		0			1	0			0
	total		0			1	0			0
Subcutaneous tissue of axilla			[0]	[0]	[0]	[0]	[1]	[0]	[0]	[0]
Cellular infiltration, lymphocyte & macrophage, mammary gland	±						1			
	total						1			
Cell debris, lactiferous duct, mammary gland	+						1			
	total						1			

-: Negative, ±: Very slight, +: Slight, ++: Moderate, +++: Severe, total: Total of positive grade  
 [ ]: Number of animals examined

Table 5 Estrous cycle and reproductive performance of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
Estrous cycle				
Number of females examined	13	13	13	13
Pre-treatment period				
Number of females showing 4-day cycle	13	13	13	13
Treatment period				
Number of animals showing:				
4-day cycle	12	13	13	12
4- and 5- day cycle	0	0	0	1
Irregular cycle	1	0	0	0
Mean length of estrous cycle in days				
Mean $\pm$ S.D.	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.1
Number of vaginal estrus during mating period				
Mean $\pm$ S.D.	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0
Reproductive performance				
Number of pairs examined (A)	13	13	13	13
Number of pairs copulated (B)	13	13	13	13
Copulation index [(B/A) $\times$ 100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of fertile pairs (C)	12	13	12	13
Fertility index [(C/B) $\times$ 100,%]	92.3	100.0	92.3	100.0
Pairing days until copulation				
Mean $\pm$ S.D.	2.6 $\pm$ 1.7	2.0 $\pm$ 1.1	2.8 $\pm$ 1.2	2.3 $\pm$ 1.3

Table 6 Development of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0		10		50		250	
Number of pregnant females	12		13		12		13	
Number of pregnant females with live newborns	11		13		12		13	
Gestation index	91.7		100.0		100.0		100.0	
Gestation length in days	22.5 ± 0.5	(11)	22.3 ± 0.5	(13)	22.4 ± 0.5	(12)	22.6 ± 0.5	(13)
Number of corpora lutea	16.1 ± 1.4	(12)	16.0 ± 1.9	(13)	16.2 ± 2.4	(12)	15.8 ± 1.8	(13)
Number of implantations	15.2 ± 1.9	(12)	15.4 ± 1.5	(13)	15.2 ± 2.5	(12)	15.1 ± 1.6	(13)
Implantation index	94.4 ± 9.2	(12)	96.4 ± 4.6	(13)	93.7 ± 6.7	(12)	95.8 ± 4.4	(13)
Day 0 of lactation								
Number of newborns	14.4 ± 2.2	(11)	14.5 ± 1.8	(13)	14.3 ± 3.2	(12)	13.5 ± 2.0	(13)
Delivery index	95.0 ± 6.2	(11)	94.4 ± 5.3	(13)	93.1 ± 9.8	(12)	89.3 ± 9.7	(13)
Number of live newborns	14.4 ± 2.2	(11)	14.4 ± 1.6	(13)	13.4 ± 3.1	(12)	11.5 ± 3.1*	(13)
Birth index	95.0 ± 6.2	(11)	93.5 ± 4.7	(13)	87.9 ± 11.2	(12)	76.0 ± 16.8**	(13)
Live birth index	100.0 ± 0.0	(11)	99.1 ± 2.3	(13)	94.8 ± 10.1	(12)	86.4 ± 21.1**	(13)
Sex ratio on day 0	1.49 ± 1.08	(11)	0.95 ± 0.56	(13)	1.27 ± 0.55	(12)	1.18 ± 1.05	(13)
Day 4 of lactation								
Number of live pups	14.1 ± 2.0	(11)	14.3 ± 1.7	(13)	13.4 ± 3.1	(12)	11.5 ± 3.0*	(13)
Viability index	98.3 ± 4.0	(11)	99.5 ± 2.0	(13)	100.0 ± 0.0	(12)	99.4 ± 2.1	(13)
Sex ratio on day 4	1.45 ± 1.07	(11)	0.96 ± 0.56	(13)	1.27 ± 0.55	(12)	1.18 ± 1.05	(13)
Body weights of pups (g)								
Day 0								
Male	6.8 ± 0.7	(11)	6.8 ± 0.4	(13)	6.8 ± 1.0	(12)	7.0 ± 0.9	(13)
Female	6.4 ± 0.6	(11)	6.5 ± 0.4	(13)	6.4 ± 0.8	(12)	6.6 ± 0.8	(13)
Day 4								
Male	10.6 ± 1.2	(11)	10.6 ± 0.9	(13)	11.4 ± 2.5	(12)	11.8 ± 2.0	(13)
Female	10.1 ± 1.2	(11)	10.2 ± 0.9	(13)	10.9 ± 1.9	(12)	11.2 ± 2.1	(13)

Values represent mean ± S.D.

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

\*\* : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Gestation index = (number of pregnant females with live newborns/number of pregnant females) × 100, %

Implantation index = (number of implantations/number of corpora lutea) × 100, %

Delivery index = (number of newborns/number of implantations) × 100, %

Birth index = (number of live newborns/number of implantations) × 100, %

Live birth index = (number of live newborns/number of newborns) × 100, %

Sex ratio on day 0 = number of male live newborns/number of female live newborns

Viability index = (number of live pups on day 4 of lactation/number of live newborns) × 100, %

Sex ratio on day 4 = number of male live pups on day 4 of lactation/number of female live pups on day 4 of lactation

## 2-ヒドロキシベンズアルデヒドの細菌を用いる復帰突然変異試験

### Reverse Mutation Test of 2-Hydroxybenzaldehyde on Bacteria

#### 要約

OECD既存化学物質安全性調査事業の一環として、2-ヒドロキシベンズアルデヒドについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加の条件でプレート法により、用量設定試験を50～5000 μg/プレートの用量で行ったところ、すべての検定菌において、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験で抗菌性が認められた。したがって、本試験はS9 mix無添加試験を31.3～1000 μg/プレート(TA100は15.6～500 μg/プレート, WP2 *uvrA*は125～4000 μg/プレート), S9 mix添加試験を62.5～2000 μg/プレート(TA100は15.6～500 μg/プレート, WP2 *uvrA*は125～4000 μg/プレート)の範囲で用量を設定し、試験を実施した。

その結果、抗菌性は、S9 mix無添加試験では、500 μg/プレート(TA100 およびTA1537), 1000 μg/プレート(TA98 およびTA1535) および4000 μg/プレート(WP2)で、S9 mix添加試験では、500 μg/プレート(TA100), 2000 μg/プレート(TA1535, TA98およびTA1537) および4000 μg/プレート(WP2)で認められた。復帰変異コロニー数は、2回の本試験とも、用いたすべての検定菌で、いずれの用量においても増加は認められなかったことから、2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

#### 方法

##### [検定菌]

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium*の4菌株<sup>1)</sup>は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames博士から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA*株<sup>2)</sup>は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを、ニ

ュートリエントブロスNo.2(Oxoid)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。

##### [被験物質]

2-ヒドロキシベンズアルデヒド(CAS No. 90-02-8)は、分子量 122.12 の淡黄色液体である。試験には、セイミケミカル(株)製 [ロット番号: 082316, 純度 95%以上(不純物: 不明)] のものを、(社)日本化学工業協会から供与されたもの、使用時までガラス製容器に入れ、窒素ガスで空気と置換密栓して室温で遮光保管し用いた。

2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解性がよいことから、DMSOに20～50 mg/mlの範囲で溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、2-ヒドロキシベンズアルデヒドのDMSO溶液中での安定性試験および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、低濃度(156 μg/ml)溶液は本試験IIで調製したのものについて、また高濃度(40.0 mg/ml)溶液は染色体異常試験で調製したのものについて、室温遮光条件下で、安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均値に対して、99.6および98.4%であった。また、本試験IIで調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、調製後の濃度はそれぞれ低濃度は102%、高濃度は101%であった。

##### [陽性対照物質]

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (上野製薬(株))

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF2, 2AAはDMSO(和光純薬工業(株))に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

##### [培地およびS9 mixの組成]

###### 1) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー (Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ビオチン	0.5 mM

\*: WP2 *uvrA* 用には, 0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた.

2) 合成培地

培地は, 日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた. なお, 培地1 l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
バクトアガー (Difco)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mlを流して固めてある.

3) S9 mix

1 ml中下記の成分を含む

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

\*\* : 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を用いた.

[試験方法]

プレート法により, S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った.

小試験管中にトッパアガー2ml, 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を混合したのち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DMSO, または数種の陽性対照物質溶液を用いた. 各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した. 培養は37℃で48時間行い, 生じた変異コロニー数を算定した. 抗菌性の有無については, 肉眼的あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌膜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, 溶媒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, 本試験は同一用量について2回実施し, 結果の再現性の確認を行った.

[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無添加あるいはS9 mix添加条件において, 被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が, 溶媒対照のそれに比べて2倍以上に増加し, かつ, その増加に再現性あるいは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(陽性)と判定することとした.

結果および考察

[用量設定試験]

50~5000 μg/プレートの範囲で公比を約3として, 試験を実施したところ, S9 mix無添加試験ではWP2 *uvrA* 5000 μg/プレートで, TA100が500 μg/プレート以上で, その他は1500 μg/プレート以上で抗菌性が認められた. また, S9 mix添加試験ではTA100が500 μg/プレート以上で, その他は1500 μg/プレート以上の用量で抗菌性が認められた.

[本試験]

結果をそれぞれTable 1, 2に示した. 2-ヒドロキシベンズアルデヒドの用量を, S9 mix無添加試験は31.3~1000 μg/プレート (TA100は15.6~500 μg/プレート, WP2 *uvrA*は125~4000 μg/プレート), S9 mix添加試験は62.5~2000 μg/プレート (TA100およびWP2 *uvrA*はS9 mix添加試験と同一用量)の範囲で公比を2として設定し試験を実施した. その結果, 2回の試験のいずれも, 用いた5種類の検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験において, 溶媒対照値の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.

以上の結果に基づき, 2-ヒドロキシベンズアルデヒドは, 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.

Table 1. Mutagenicity of 2-hydroxybenzaldehyde\*\* in reverse mutation test (I) on bacteria

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	
S9mix (-)	0	115 127 83 (108 $\pm$ 22.7)	11 9 13 (11 $\pm$ 2.0)	21 23 26 (23 $\pm$ 2.5)	21 18 22 (20 $\pm$ 2.1)	8 7 7 (7 $\pm$ 0.6)	
	15.6	97 81 93 (90 $\pm$ 8.3)	ND	ND	ND	ND	
	31.3	84 83 79 (82 $\pm$ 2.6)	17 8 21 (15 $\pm$ 6.7)	ND	20 22 28 (23 $\pm$ 4.2)	7 6 8 (7 $\pm$ 1.0)	
	62.5	82 79 80 (80 $\pm$ 1.5)	8 7 27 (14 $\pm$ 11.3)	ND	16 28 22 (22 $\pm$ 6.0)	2 11 7 (7 $\pm$ 4.5)	
	125	87 83 85 (85 $\pm$ 2.0)	11 12 15 (13 $\pm$ 2.1)	20 12 19 (17 $\pm$ 4.4)	13 18 19 (17 $\pm$ 3.2)	10 6 1 (6 $\pm$ 4.5)	
	250	58 38 55 (50 $\pm$ 10.8)	18 8 12 (13 $\pm$ 5.0)	22 19 26 (22 $\pm$ 3.5)	22 23 18 (21 $\pm$ 2.6)	8 7 7 (7 $\pm$ 0.6)	
	500	40* 41* 51* (44 $\pm$ 6.1)	19 3 7 (10 $\pm$ 8.3)	14 18 24 (19 $\pm$ 5.0)	19 18 20 (19 $\pm$ 1.0)	5* 8* 3* (5 $\pm$ 2.5)	
	1000		1* 0* 0* (0 $\pm$ 0.6)	23 21 15 (20 $\pm$ 4.2)	14* 11* 17* (14 $\pm$ 3.0)	1* 1* 7* (3 $\pm$ 3.5)	
	2000			2 4 6 (4 $\pm$ 2.0)			
4000			0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)				
S9mix (+)	0	123 144 155 (141 $\pm$ 16.3)	7 12 10 (10 $\pm$ 2.5)	30 18 23 (24 $\pm$ 6.0)	37 41 32 (37 $\pm$ 4.5)	12 14 15 (14 $\pm$ 1.5)	
	15.6	103 114 121 (113 $\pm$ 9.1)	ND	ND	ND	ND	
	31.3	81 117 111 (103 $\pm$ 19.3)	ND	ND	ND	ND	
	62.5	93 95 105 (98 $\pm$ 6.4)	9 14 13 (12 $\pm$ 2.6)	ND	26 35 22 (28 $\pm$ 6.7)	7 16 12 (12 $\pm$ 4.5)	
	125	96 98 93 (96 $\pm$ 2.5)	17 10 8 (12 $\pm$ 4.7)	29 21 18 (23 $\pm$ 5.7)	26 22 25 (24 $\pm$ 2.1)	7 6 14 (9 $\pm$ 4.4)	
	250	56 71 83 (70 $\pm$ 13.5)	10 10 7 (9 $\pm$ 1.7)	32 26 22 (27 $\pm$ 5.0)	21 27 28 (25 $\pm$ 3.8)	9 10 15 (11 $\pm$ 3.2)	
	500	45* 57* 68* (57 $\pm$ 11.5)	7 4 7 (6 $\pm$ 1.7)	26 12 19 (19 $\pm$ 7.0)	25 18 22 (22 $\pm$ 3.5)	10 8 4 (7 $\pm$ 3.1)	
	1000		4 1 3 (3 $\pm$ 1.5)	20 23 29 (24 $\pm$ 4.6)	20 14 23 (19 $\pm$ 4.6)	5 8 7 (7 $\pm$ 1.5)	
	2000		0* 0* 1* (0 $\pm$ 0.6)	15 12 6 (11 $\pm$ 4.6)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	
4000			0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)				
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	591 481 463 (512 $\pm$ 69.3)	263 262 225 (250 $\pm$ 21.7)	108 121 101 (110 $\pm$ 10.1)	785 800 745 (777 $\pm$ 28.4)	1064 1104 971 (1046 $\pm$ 68.2)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	2008 1637 1544 (1730 $\pm$ 245.5)	212 229 230 (224 $\pm$ 10.1)	1166 1335 1277 (1259 $\pm$ 85.9)	573 498 438 (503 $\pm$ 67.6)	262 217 221 (233 $\pm$ 24.9)	

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

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

\*\*: Purity was above 95% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 2. Mutagenicity of 2-hydroxybenzaldehyde\*\* in reverse mutation test (II) on bacteria

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	
S9mix (-)	0	102 98 89 (96 $\pm$ 6.7)	16 13 12 (14 $\pm$ 2.1)	23 22 21 (22 $\pm$ 1.0)	27 19 27 (24 $\pm$ 4.6)	5 11 10 (9 $\pm$ 3.2)	
	15.6	82 74 82 (79 $\pm$ 4.6)	ND	ND	ND	ND	
	31.3	88 92 99 (93 $\pm$ 5.6)	10 8 10 (9 $\pm$ 1.2)	ND	21 28 28 (26 $\pm$ 4.0)	12 7 10 (10 $\pm$ 2.5)	
	62.5	75 74 82 (77 $\pm$ 4.4)	15 10 11 (12 $\pm$ 2.6)	ND	31 30 35 (32 $\pm$ 2.6)	4 11 8 (8 $\pm$ 3.5)	
	125	96 64 78 (79 $\pm$ 16.0)	11 10 13 (11 $\pm$ 1.5)	31 31 23 (28 $\pm$ 4.6)	27 23 31 (27 $\pm$ 4.0)	10 4 7 (7 $\pm$ 3.0)	
	250	66 50 59 (58 $\pm$ 8.0)	6 6 5 (6 $\pm$ 0.6)	31 24 38 (31 $\pm$ 7.0)	22 23 11 (19 $\pm$ 6.7)	7 3 2 (4 $\pm$ 2.6)	
	500	34* 50* 44* (43 $\pm$ 8.1)	5 7 3 (5 $\pm$ 2.0)	20 12 28 (20 $\pm$ 8.0)	21 23 23 (22 $\pm$ 1.2)	4 12 8 (8 $\pm$ 4.0)	
	1000		3* 0* 2* (2 $\pm$ 1.5)	23 21 25 (23 $\pm$ 2.0)	11* 19* 17* (16 $\pm$ 4.2)	6* 5* 7* (6 $\pm$ 1.0)	
	2000			8 9 8 (8 $\pm$ 0.6)			
	4000			0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)			
S9mix (+)	0	100 112 109 (107 $\pm$ 6.2)	14 10 8 (11 $\pm$ 3.1)	30 25 29 (28 $\pm$ 2.6)	40 31 37 (36 $\pm$ 4.6)	5 18 12 (12 $\pm$ 6.5)	
	15.6	89 120 104 (104 $\pm$ 15.5)	ND	ND	ND	ND	
	31.3	115 116 105 (112 $\pm$ 6.1)	ND	ND	ND	ND	
	62.5	103 76 96 (92 $\pm$ 14.0)	10 10 11 (10 $\pm$ 0.6)	ND	29 40 29 (33 $\pm$ 6.4)	9 5 11 (8 $\pm$ 3.1)	
	125	94 98 88 (93 $\pm$ 5.0)	7 19 13 (13 $\pm$ 6.0)	37 29 37 (34 $\pm$ 4.6)	28 38 24 (30 $\pm$ 7.2)	7 13 11 (10 $\pm$ 3.1)	
	250	63 49 72 (61 $\pm$ 11.6)	20 7 3 (10 $\pm$ 8.9)	47 42 34 (41 $\pm$ 6.6)	28 23 27 (26 $\pm$ 2.6)	11 13 8 (11 $\pm$ 2.5)	
	500	41* 49* 52* (47 $\pm$ 5.7)	8 5 5 (6 $\pm$ 1.7)	33 24 31 (29 $\pm$ 4.7)	27 29 20 (25 $\pm$ 4.7)	7 7 3 (6 $\pm$ 2.3)	
	1000		1* 0* 1* (1 $\pm$ 0.6)	27 29 21 (26 $\pm$ 4.2)	30 19 20 (23 $\pm$ 6.1)	8 8 4 (7 $\pm$ 2.3)	
	2000		0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	17 8 14 (13 $\pm$ 4.6)	17* 13* 9* (13 $\pm$ 4.0)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	
	4000			0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)			
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	535 591 587 (571 $\pm$ 31.2)	267 284 275 (275 $\pm$ 8.5)	152 146 140 (146 $\pm$ 6.0)	761 734 764 (753 $\pm$ 16.5)	1132 929 1397 (1153 $\pm$ 234.7)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1464 1444 1498 (1469 $\pm$ 27.3)	291 304 309 (301 $\pm$ 9.3)	1422 1450 1427 (1433 $\pm$ 14.9)	342 363 371 (359 $\pm$ 15.0)	263 294 277 (278 $\pm$ 15.5)	

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

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

\*\* : Purity was above 95% and impurity was unknown.

ND : Not done

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.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：坂本京子, 川上久美子, 原 巧,  
堀谷尚古, 松木容彦, 中込まどか,  
中尾美津男, 北嶋美以子  
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257 秦野市落合 729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)  
Kyoko Sakamoto, Kumiko Kawakami,  
Takumi Hara, Naoko Horiya,  
Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi,  
Mitsuo Nakao, and Miiko Kitashima  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627



# 2-ヒドロキシベンズアルデヒドの 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

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of 2-Hydroxybenzaldehyde on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、2-ヒドロキシベンズアルデヒドの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.02 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。また、短時間処理(6時間)のS9 mix存在下および非存在下においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.2 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)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。

CHL/IU細胞を24時間処理した高濃度群(0.02 mg/ml)では、観察した細胞の5.5%に染色体の構造異常が認められた。また、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、48時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常は認められなかったが、高濃度群(0.02 mg/ml)においては倍数性細胞が誘発され、その頻度は18.12%であった。

短時間処理では、S9 mix非存在下で6時間処理した中濃度群(0.1 mg/ml)および高濃度群(0.2 mg/ml)では、観察した細胞のそれぞれ4.0%と25.1%に染色体の構造異常が認められた。また、低濃度群(0.05 mg/ml)では、有意な倍数性細胞の増加が認められたが疑陽性であった。

いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下では、中濃度群(0.1 mg/ml)および高濃度群(0.2 mg/ml)において、観察した細胞のそれぞれ5.0%と16.5%に染色体の構造異常が認められた。また、すべての処理群において倍数性細胞が誘発され、その頻度は1.63~6.25%であった。

以上の結果より、2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、染色体異常を誘発すると結論した。

### 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12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、牛胎児血清(FCS:Biocell)を10%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時間および48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存在下および非存在下で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. 被験物質

2-ヒドロキシベンズアルデヒド(略号:HBA, CAS No.:90-02-8, ロット番号:082316, セイメイケミカル株製造, 株)日本化学工業協会提供)は、無色~淡黄色透明液体で、水に対して1.4 g/100 ml(20°C)で溶解し、アルコール、エーテル等に可溶であり、融点-7°C, 沸点196~197°C, 蒸気圧1 hPa(30°C), 分子式C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, 分子量122.12, 純度95.0%以上(不純物は不明)の物質である。

被験物質原体の安定性に関する情報は得られなかったが、溶媒中(DMSO)では、156 μg/ml~40.0 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

#### 5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(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%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

#### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

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™, オリンパス光学工業(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%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%増殖抑制濃度をはさむ2濃度より算出したところ、0.02 mg/mlであった。短時間処理のS9 mix存在下および非存在下における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度は、ともに0.2 mg/mlであった(Fig. 1)。

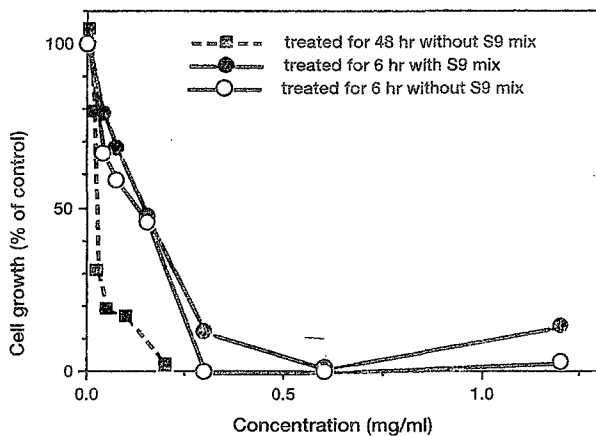


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-hydroxybenzaldehyde

### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理では、0.02 mg/ml、短時間処理のS9 mix存在下および非存在下では、0.2 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。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、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。

### 8. 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 µg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の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%ギムザ溶液で染色した。

### 9. 染色体分析

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(MMS)分科会<sup>1)</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。

### 10. 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。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、林<sup>2)</sup>の方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法<sup>3)</sup>(多重性を考慮してfamilywiseの有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、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>4)</sup>( $p < 0.05$ )を行った。原則として以上2回の検定でもともに有意差が認められた場合を陽性とした。傾向性検定で有意差が認められない場合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

### 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。2-ヒドロキシベンズアルデヒドを加えて24時間処理した高濃度群(0.02 mg/ml)では、観察した細胞の5.5%(gapを含む)に染色体の構造異常が認められた。また、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、48時間処理したいずれの処理群でも染色体の構造異常は認められなかったが、高濃度群(0.02 mg/ml)において、倍数性細胞の誘発作用が認められ、その頻度は18.12%であった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。2-ヒドロキシベンズアルデヒドを加えてS9 mix非存在下で6時間処理した中濃度群(0.1 mg/ml)および高濃度群(0.2 mg/ml)では、観察した細胞のそれぞれ4.0%と25.1%に染色体の構造異常が認められ、傾向性検定の結果、濃度依存性が認められた。また、低濃度群(0.05 mg/ml)において、有意な倍数性細胞の増加が認められ、その頻度は対照群が0.13%であるのに対して0.88%であったが、その他の処理群においては増加が認められず、傾向性検定の結果、濃度依存性は認められなかったため、疑陽性と判定した。一方、S9 mix存在下では、中濃度群(0.1 mg/ml)および高濃度群(0.2 mg/ml)では、観察した細胞のそれぞれ5.0%と16.5%に染色体の構造異常が誘発され、傾向性検定の結果、濃度依存性が認められた。また、すべての処理群において倍数性細胞が誘発され、その頻度は1.63~6.25%で、傾向性検定の結果、濃度依存性が認められた。

従って、2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、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。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-hydroxybenzaldehyde (HBA)\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells			Trend test <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		with aberrations	Polyloid <sup>4)</sup>	SA	NA	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)	(%)		
Control			200	0	3	1	1	0	0	5	2	5 (2.5)	5 (2.5)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38		
HBA	0.0050	24	200	1	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
HBA	0.010	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	+	NT
HBA	0.020	24	200	3	8	2	0	0	0	13	0	11* (5.5)	8 (4.0)	0.50		
MC	0.00005	24	200	4	35	93	2	1	0	135	2	85 (42.5)	82 (41.0)	0.00		
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
HBA	0.0050	48	200	0	1	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
HBA	0.010	48	200	0	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25	NT	+
HBA	0.020	48	200	1	3	1	0	0	0	5	1	4 (2.0)	4 (2.0)	18.12*		
MC	0.00005	48	200	6	38	81	7	2	10	144	7	81 (40.5)	77 (38.5)	0.50		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C, NT: not tested. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$ . \*: Significantly different from historical solvent control data with respect to TAG and polyloid at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\*: Purity was more than 95%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-hydroxybenzaldehyde (HBA)\*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells			Trend test <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		with aberrations	Polyloid <sup>4)</sup>	SA	NA	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)	(%)		
Control				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50		
HBA	0.050	-	6-(18)	200	1	0	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.88*		
HBA	0.10	-	6-(18)	200	0	8	6	5	0	0	19	2	8* (4.0)	8 (4.0)	0.38	+	-
HBA	0.20	-	6-(18)	179	11	36	40	5	0	0	92	0	45* (25.1)	42 (23.5)	0.66 <sup>6)</sup>		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	0	2	0	1	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	1.00		
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
HBA	0.050	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.63*		
HBA	0.10	+	6-(18)	200	4	7	14	0	0	10	35	0	10* (5.0)	10 (5.0)	4.13*	+	+
HBA	0.20	+	6-(18)	200	6	12	51	1	2	10	82	0	33* (16.5)	31 (15.5)	6.25*		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	6	25	25	1	0	0	57	2	43 (21.5)	40 (20.0)	0.50		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, CPA: cyclophosphamide. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$ . 6) Four hundred and fifty-eight cells were analysed. \*: Significantly different from historical solvent control data with respect to TAG and polyloid at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\*: Purity was more than 95%.

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.
- 2) 林 真, 変異原性試験, 1, 255 (1992).
- 3) 吉村 功 編著, “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.
- 4) 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.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂  
試験担当者: 山影康次, 中川ゆづき, 日下部博一,  
橋本恵子, 水谷正寛, 古畑紀久子  
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257 神奈川県秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)  
Kohji Yamakage, Yuzuki Nakagawa,  
Hirokazu Kusakabe, Keiko Hashimoto,  
Masahiro Mizutani, Kikuko Furuhata  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

## 2-ヒドロキシベンズアルデヒドのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

### Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2-Hydroxybenzaldehyde by Oral Administration in Rats

#### 要約

2-ヒドロキシベンズアルデヒドはバラ科シモツケソウ類の花、タバコの葉等に含まれ、トマト、グレープ、シナモン、コーヒー、お茶等の匂いの成分としても存在する化学物質<sup>1)</sup>であり、構造的にはサリチル酸に非常に類似している<sup>2)</sup>。また、本化学物質は石鹸、洗剤、香水等に0.005~0.2%の濃度で含有されている<sup>3)</sup>。本化学物質の毒性データでは、ラットのLD<sub>50</sub>値は経口投与で520 mg/kg、皮下投与で900 mg/kg、経皮投与で600 mg/kg、腹腔内投与で231 mg/kgであること、ラットに13日間反復混餌投与した場合、2%投与群では肝細胞の好塩基小体の著しい減少、脾臓房細胞からのチモゲン顆粒の枯渇、1%投与群では肝および腎のマイクロボディの数のおよび大きさの増加、肝細胞の脂肪滴等の変化が起こること、さらに、乳頭腫または癌を誘発しないことが報告されている<sup>4)</sup>。本化学物質はラット、マウスに100 mg/kgを単回皮下投与することによって低カルシウム血症が起こること、妊娠11日のラットに400 mg/kgを単回皮下投与することによりサリチル酸あるいはアスピリンの場合と同様に胎生期死亡の増加、口唇裂および多指等の外表奇形の出現が増加することが報告されている<sup>5)</sup>。このサリチル酸類における胎児毒性の主たる要因の一つは低カルシウム血症であることも報告されている<sup>6)</sup>。サリチル酸類の生殖発生毒性については多くの動物種で報告され、ヒトにおいてもプロスタグランジン合成の抑制により遷延分娩、子宮からの出血等について報告されている<sup>7-9)</sup>。本試験はOECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として2-ヒドロキシベンズアルデヒドを雌雄ラットに1日1回、雄には交配2週間前から交配期間を通して剖検前日までの49日間、雌には交配2週間前から交配期間、妊娠期間を通して哺育3日までの41~46日間経口投与し、反復投与による一般毒性学的な影響を検索するとともに、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検索した。

#### 1. 反復投与毒性

雄では、死亡例はなく、一般状態、体重、摂餌量、血液学検査値、血液生化学検査値、剖検所見および器官重量に被験物質投与の影響は認められなかった。病理組織学検査の結果、40 mg/kg以上の被験物質投与群において肝臓の少葉周辺性脂肪化の程度およびその出現頻度が対照群に比べて減少した。

雌では、40 mg/kg群の1母体が妊娠22日の分娩途中で、また、160 mg/kg群の1母体が妊娠22日に死亡した以外に死亡例はなく、一般状態の変化は観察されなかった。器官重量では160 mg/kg群において肝臓重量が高値を、卵巣重量が低値を示した。しかし、体重、摂餌量および剖検所見には被験物質投与の影響は認められなかった。病理組織学検査の結果、40 mg/kg以上の被験物質投与群において肝細胞内のグリコーゲン量の軽微な増加が観察された。

#### 2. 生殖発生毒性

親動物に関して、雌の性周期および発情回数、雌雄の交尾および受胎、雌動物の妊娠期間および分娩に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。哺育の異常は、40 mg/kg以下の被験物質投与群には認められなかった。160 mg/kg群では哺育4日までに全児死亡の母動物が2例認められた。生児出産雌数、出産率、黄体数、着床痕数および着床率には被験物質投与の影響は認められなかった。

新生児では、哺育0日の生存児数、死産児数、性比、分娩率および出生率には被験物質投与の影響は認められず、新生児および死産児に被験物質投与に起因すると考えられる外表異常は認められなかった。哺育期間中の児の死亡は、160 mg/kg群において多い傾向が見られ、同群の哺育4日の新生児生存率は低い傾向にあった。また、哺育0日および4日の体重は160 mg/kg群においてわずかに低値を示す傾向にあった。

以上の成績から、本試験条件下における一般毒性学的な無影響量は雌雄ともに10 mg/kg/dayであると考えられた。また、生殖発生毒性的な無影響量は、雄に関しては160 mg/kg/day、雌に関しては40 mg/kg/day、新生児に関しては40 mg/kg/dayであると考えられた。

#### 方法

##### 1. 被験物質

2-ヒドロキシベンズアルデヒド [CAS No. 90-02-8, セイミケミカル(株), Lot No. 082316, 純度99.3%, 分子量122.12, 比重1.167, 融点-7℃, 沸点196~197℃] は、無色~淡黄色透明油状液体であり、窒素置換し、密閉・室温・暗所条件下で保存した。なお、動物試験終了後に残余の被験物質を分析した結果、純度は99.3%であり、被験物質は安定であったことが確認された。

被験物質は、オリーブ油(丸石製薬(株))に溶解し0.05, 0.2, 0.8および3.2%(w/v)濃度に調製した。なお、調製は1週間に2回の頻度で行った。調製後の被験液は、1日分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、窒素置換した上で室温・暗所保存した。本被験物質の0.05~3.2%(w/v)液は、窒素置換・室温・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。

被験液の濃度確認は雌雄の投与開始前および雄の投与最終週の2回、各濃度液について実施した。その結果、いずれの被験液も設定濃度の96.9~104.0%の範囲であり、ほぼ設定濃度の2-ヒドロキシベンズアルデヒドが含有されていたことを確認した。

## 2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも日本チャールス・リバー(株)より7週齢で購入したSprague-Dawley(Crj:CD)系SPFラットを使用した。動物は、購入後7日間検疫・馴化飼育した後、一般状態に異常がなく、体重増加が良好な動物を8週齢で群分けして試験に使用した。群分け時の体重範囲は雄で294~319g, 雌で195~223gであった。

動物は、温度 $22.5 \pm 3.5^{\circ}\text{C}$ , 相対湿度 $50 \pm 20\%$ , 換気回数1時間10~15回, 照明1日12時間(午前7時~午後7時)の飼育室で飼育した。動物は、交配期間および妊娠17日から哺育4日までの期間を除き、金属製網ケージ[リードエンジニアリング(株)または理工電機(株)]に個別に収容し、飼育した。妊娠17日以降の母動物は、哺育4日まで床敷として木製チップ[ホワイフレーク, 日本チャールス・リバー(株)]を入れたプラスチック製エコンケージ[日本クレア(株)]に飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)のNMF固型飼料を使用し、飼料および飲料水は、飼育期間中自由に摂取させた。

## 3. 群分け

群分けは、投与開始日に行った。動物は、雌雄とも群分け当日の体重、検疫・馴化期間中の増体重あるいは性周期の観察結果などにより選択した後、当日の体重で層別化し、コンピュータを用いたブロック配置法により各群に振り分けた。1群の動物数は、雌雄各12匹とした。

## 4. 投与量, 群構成, 投与期間および投与方法

2-ヒドロキシベンズアルデヒドの投与量は、先に実施した予備試験の結果を参考にして2.5, 10, 40および160 mg/kgとした。

投与経路は、OECDガイドラインに準じて強制経口投与とした。投与容量は、体重100g当たり0.5mlとし、個体毎の投与液量は、雄は各測定日の体重を、雌は交配前および交配期間中については各測定日の体重、妊娠期間中については妊娠0日, 7日, 14日および21日の体重、授乳期間中については哺育0日の体重を基準に算出した。

投与は、金属製胃ゾンデを用いて1日1回強制経口投与した。対照群にはオリーブ油のみを同様に投与した。

雄の投与期間は、交配前14日間およびその後35日間の計49日間、雌の投与期間は、交配前14日間、交配期間、妊娠期間および哺育3日までの41~46日間とした。

## 5. 投与量の設定

2-ヒドロキシベンズアルデヒドの0, 50, 100, 200および400 mg/kgを8週齢のSprague-Dawley(Crj:CD)系ラット雌雄各5匹に1日1回, 14日間にわたって反復経口投与し、雌雄ラットに及ぼす影響について検討した。

その結果、400 mg/kg群では雄の全例、雌の5例中4例が、200 mg/kg群では雄の5例中1例、雌の5例中2例が投与7日までに死亡した。しかし、100 mg/kg以下の投与群では一般状態、体重、摂餌量、血液学検査値、血液生化学検査値等に明らかな被験物質投与の影響は認められなかった。したがって、最高用量は、死亡例の認められた200 mg/kgと被験物質投与の影響が認められなかった100 mg/kgのほぼ中間量に相当する160 mg/kg/dayとし、以下、公比4で減じて高用量を40 mg/kg/day, 中用量を10 mg/kg/day, 低用量を2.5 mg/kg/dayに設定した。

## 6. 反復投与毒性に関する観察, 測定および検査

### 1) 一般状態

一般状態の観察は、雌雄とも試験期間を通じて毎日行った。

### 2) 体重

雄の体重は、投与1日, 4日, 8日, 11日, 15日, 22日, 29日, 36日, 43日および50日に測定した。雌の体重は、投与1日, 4日, 8日, 11日および15日、交配期間中は週1回、妊娠期間中は妊娠0日, 7日, 14日および21日、哺育期間中は哺育0日および4日に測定した。

### 3) 摂餌量

摂餌量は、雄では投与開始日および剖検日を除く体重測定と同じ日に、雌では交配前は投与開始日を除く体重測定と同じ日、妊娠期間中は妊娠1日, 7日, 14日および21日、哺育期間中は哺育1日および4日に前日からの残量を測定し、給餌量との差から1日摂取量を算出した。なお、交配期間中の摂餌量は測定しなかった。

### 4) 雄の血液学検査

雄の全動物について、剖検日の前日より約16時間絶食させ、エーテル麻酔下で腹大動脈より採取した血液の一部に抗凝固剤、EDTA-2K処理した血液を用いて赤血球数(電気抵抗変化検出法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(平均赤血球容積 $\times$ 赤血球数/ $10^3$ )、血小板数(電気抵抗変化検出法)、白血球数(電気抵抗変化検出法)をコールター全自動8項目血球アナライザーT890 [株日科機]を用いて測定した。また、採取した血液の一部を3.8%クエン酸ナトリウム処理した血漿を用いてプロトロンビン時間(クロット法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(クロッ

ト法), フィブリノーゲン量(トロンボプラスチン法)を血液凝固測定装置ACL100(Instrumentation Laboratory)を用いて測定した。検査結果から、平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球色素量(MCH), 平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

白血球百分率はMay-Giemsa染色塗抹標本, 網赤血球率はBrecher法による超生体染色標本の鏡検により算出した。

#### 5) 雄の血液生化学検査

雄の全動物について、血液学検査のための採血と同時に腹大動脈から採取して得られた血液を遠心分離(3000 rpm, 10分間)し、得られたヘパリン加血漿を用いてGOT, GPT, LDH(UV-rate法)を、また、血清を用いてAIP(Bessey-Lowry法), 総コレステロール(CEH-COD-POD法), トリグリセライド(GK-GPO-POD法), リン脂質(PLD-ChoD-POD法), 総ビリルビン(アゾビリルビン法), 血糖(Hexokinase-G6PD法), 尿素窒素(Urease-GLDH法), クレアチニン(Jaffé法), ナトリウム(イオン選択電極法), カリウム(イオン選択電極法), 塩素(イオン選択電極法), カルシウム(OCPC法), 無機リン(モリブデン酸法), 総蛋白質(Biuret法)を全自動分析装置(Monarch:Instrumentation Laboratory)を用いて測定した。また、全自動電気泳動装置 CLINISCAN2(株式会社ヘレナ研究所)を用いて蛋白質分画(セルロースアセテート膜による電気泳動法)を測定し、蛋白質分画比率からA/G比を算出した。

#### 6) 病理検査

雄は、全動物を最終投与の翌日に、雌は全生存動物について哺育4日にエーテル麻酔下で放血致死させて剖検し、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣および精巣上体あるいは卵巣の重量を測定した。これらの器官に加えて、脳、下垂体、甲状腺(上皮小体を含む)、肺(気管支を含む)、副腎、子宮、膣および剖検で異常が認められた器官を採取し、リン酸緩衝10%ホルマリン液(精巣および精巣上体はブアン液)に固定した。なお、妊娠期間中に死亡した40および160 mg/kg群の母動物各1例、新生児が全て死亡した160 mg/kg群の母動物2例についても同様に処置した。

雌雄とも対照群および160 mg/kg群の脳、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣および精巣上体あるいは卵巣について常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検した。その結果、雌雄の肝臓に被験物質投与の影響が疑われたため、2.5, 10および40 mg/kg群についても検査を行った。さらに、雄では肝臓の小葉周辺帯肝細胞の細胞質内に微細～小型の空胞が観察されたため、その性状を詳細に検討するため対照群、40および160 mg/kg群の各3例についてオイルレッドO染色を実施した。また、雌の160 mg/kg群の肝臓においてヘマトキシリン・エオジン染色標本で肝臓の細胞質が腫大淡明化し明るくぬけて観察されたことから、その性状を詳細に検討するため160 mg/kg群の2例についてPAS反応および

唾液消化後PAS反応を実施した。なお、40および160 mg/kg群の雌では剖検時に異常が観察された胸腺、肺、皮下結節についても鏡検した。

#### 7. 生殖発生毒性に関する観察、測定および検査

##### 1) 性周期観察および交配

交配前14日間の性周期の観察を行った雌を同一群内の雄のケージに入れ1対1の組み合わせで終夜同居させた。同居期間は最長14日間として、交尾が確認されるまでとした。なお、交尾の確認は毎朝、膣栓形成あるいは膣垢中の精子の有無により行い、これらが確認された日を妊娠0日とした。交配結果から、各群について交尾率 $[(交尾確認動物数/交配動物数) \times 100]$ 、受胎率 $[(受胎動物数/交尾確認動物数) \times 100]$ および交尾までの同居日数を求めた。性周期観察は、投与開始日から交尾が確認されるまで毎日行い、発情期像発現回数および発情期から次の発情期までの日数を性周期とし、平均性周期を算出した。

##### 2) 分娩および哺育状態

交尾が確認された雌については全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。午前10時の時点で分娩が終了していた動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。午前10時を過ぎて分娩した場合は翌日を哺育0日とした。交尾確認後25日を経ても分娩が確認されなかった例については剖検し、妊娠の成否を確認した。

分娩終了が確認された母動物については出生児を哺育させ、哺育4日まで毎日、哺育状態の観察を行った。これらの結果から、妊娠期間[哺育0日(分娩確認日)-妊娠0日]、出産率 $[(生児出産雌数/受胎動物数) \times 100]$ 、着床率 $[(着床痕数/黄体数) \times 100]$ 、分娩率 $[(総出産児数/着床痕数) \times 100]$ を算出した。

#### 8. 新生児の観察、測定および検査

##### 1) 新生児の観察

哺育0日に生存児数、死産児数を数え、性別および外表異常の有無を検査した。生存児は全例を母動物に哺育させ、死亡の有無の観察を毎日1回行った。また、死亡児は死後変化の著しいものを除いてリン酸緩衝10%ホルマリン液に固定し、保存した。これらの結果から、性比[雄/雌]、出生率 $[(哺育0日の生存児数/総出産児数) \times 100]$ 、新生児生存率 $[(哺育4日の生存児数/哺育0日の生児数) \times 100]$ を算出した。

##### 2) 体重

体重は、哺育0日および4日に測定し、1腹毎に雌雄の平均値を算出した。

##### 3) 剖検

全例の新生児を哺育4日にエーテル麻酔下で放血致死させ、剖検した。

9. 統計解析

体重、摂餌量、発情期像発現回数、性周期、同居日数、妊娠期間、血液学および血液生化学検査値、器官重量、黄体数、着床痕数、出生児数、着床率、性比、分娩率、出生率および新生児生存率については、まずBartlett法により各群の分散の均一性の検定を行い、分散が均一の場合は一元配置分散分析を行い、分散が有意で各群の例数が等しいときにはDunnett法、各群の例数が異なるときにはScheffé法の多重比較検定で対照群と各被験物質投与群の有意差を検定した。分散が均一でない場合は、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、有意であれば対照群と各被験物質投与群との平均順位の違いについて、各群の例数が等しいときはDunnett型、各群の例数が異なるときはScheffé型の検定を行った。交尾率、受胎率、出産率については $\chi^2$ 検定を行った。なお、新生児に関するデータは1腹の平均を1標本とした。また、有意水準は5および1%とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡動物および一般状態

40 mg/kg群の1例が妊娠22日の分娩途中で、また、160 mg/kg群の1例が妊娠22日に死亡した。その他、雌雄とも死亡例は認められず、一般状態の変化は、いずれの例においても観察されなかった。

2) 体重および摂餌量(Fig. 1~4)

各被験物質投与群の体重および摂餌量は、雌雄とも対照群とほぼ同様の推移を示し、被験物質投与による影響は認められなかった。

3) 雄の血液および血液生化学検査(Table 1, 2)

40 mg/kg以下の被験物質投与群では血液および血液生化学検査のいずれの検査項目においても対照群との間に有意な差は認められなかった。160 mg/kg群では血液検査値において平均赤血球容積の高値、平均赤血球血色素濃度の低値、プロトロンビン時間の延長が、また、血液生化学検査では塩素の低値、A/G比およびアルブミン比率の高値、 $\gamma$ -グロブリン比率の低値に対照群との間に有意な差が認められた。しかし、これらのいくつかの項目はいずれも生理的変動の範囲内の値であり、血液凝固系の異常、総蛋白質の上昇、血液濃縮を疑わせる他の関連項目に変化が認められない単一項目における変化であったことから、被験物質投与の影響とは考えられなかった。

4) 器官重量(Table 3, 4)

雄では絶対重量および相対重量ともに対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。雌では160 mg/kg群において絶対重量および相対重量ともに肝臓が有意な高値を、右側卵巣が有意な低値を示した。

5) 剖検所見

計画解剖動物では、対照群および被験物質投与群の雌雄いずれの例においても異常所見は認められなかった。雌の死亡例の剖検では40 mg/kg群の例において胸腺の萎縮、肝臓の一部退色および副腎の肥大が、160 mg/kg群の例では左側頸部に皮下結節、胸腺に暗赤色点散在および肺の暗赤色変化が観察された。また、全児死亡のため剖検した160 mg/kg群の例では外部所見として乳頭の未発達を観察された。

6) 病理組織学検査(Table 5, 6)

雌雄とも被験物質投与に起因すると考えられる変化は肝臓で観察された。すなわち、雄では小葉周辺性脂肪化の程度および出現頻度は、2.5および10 mg/kg群では対照群と同様であったのに反して、40 mg/kg群では減少傾向、160 mg/kg群では減少を示した。なお、小葉周辺帯肝細胞の細胞質内に空胞が認められたため対照群、40および160 mg/kg群の代表例についてオイルレッドO染色を実施し検索した結果、肝細胞細胞質内の空胞化はその程度に応じてオイルレッドO染色陽性を示したため、これらは脂肪であると判断した。雌では40および160 mg/kg群において肝細胞内に蓄積しているグリコーゲン量の軽微な増加が認められ、その頻度は40 mg/kg群では2例、160 mg/kg群では7例であった。また、40および160 mg/kg群の肝臓においてヘマトキシリン・エオジン染色標本で肝臓の細胞質が腫大淡明化し明るくぬけて観察されたことから、その性状を詳細に検討するため160 mg/kg群の代表例についてPAS反応および唾液消化後PAS反応を実施した結果、PAS反応陽性、唾液消化後PAS反応陰性であった。

その他、被験物質投与に関連した変化は雌雄ともに認められなかった。

死亡例および全児死亡のため安楽死させた雌の所見として、40 mg/kg群の死亡例では肝臓に中等度の小葉中心性壊死、副腎に軽度な束状帯肥大および胸腺に軽度な萎縮が、160 mg/kg群の死亡例では心臓に中等度の心筋変性、腎臓に軽度な尿管上皮細胞壊死、胸腺に軽微な出血および肺に軽微なうっ血、乳癌が認められた。また、160 mg/kg群の安楽死させた2例においては肝臓に軽度なグリコーゲン量の増加が認められた。

2. 生殖発生毒性

1) 生殖機能(Table 7)

被験物質投与群における発情期から次の発情期までの日数(性周期)は対照群とほぼ同様で有意な差は認められなかった。交尾は対照群および被験物質投与群のいずれにおいても同居開始後5日以内に成立し、各群の交尾率は100%であった。また、交尾までに要した平均日数には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。非妊娠動物は対照群および被験物質投与群のいずれにも認められず、各群の受胎率は100%であった。



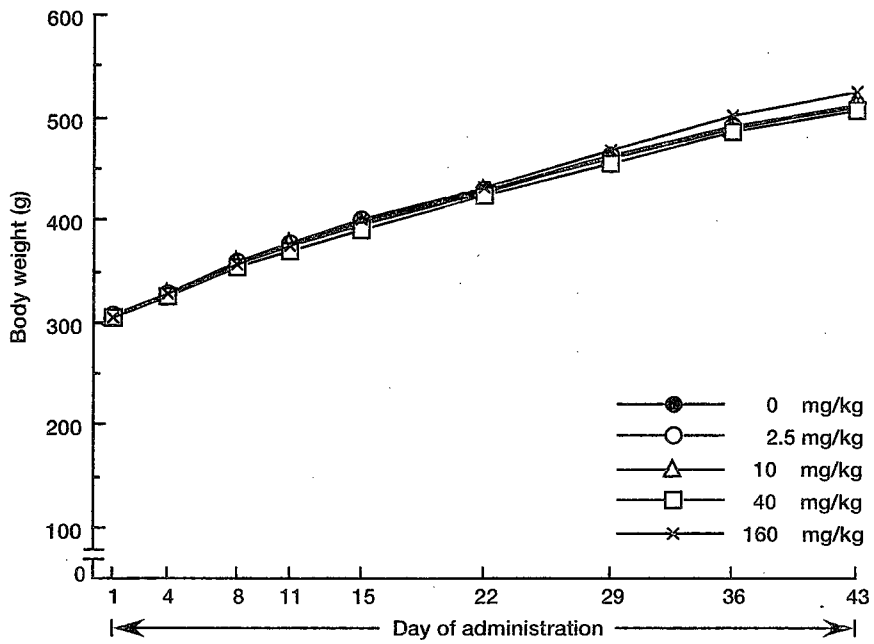


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

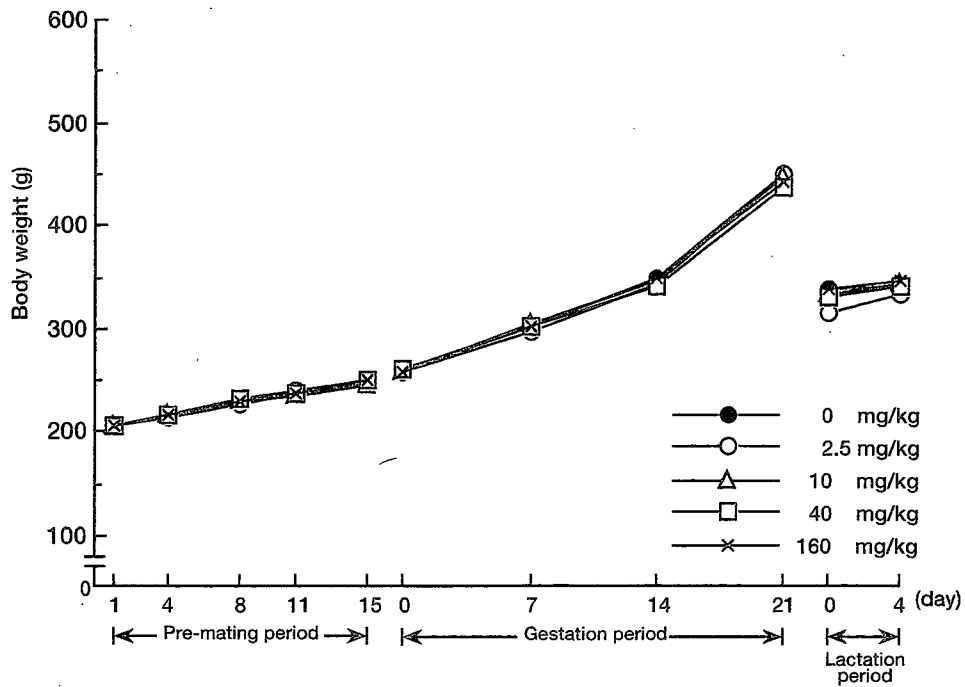


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

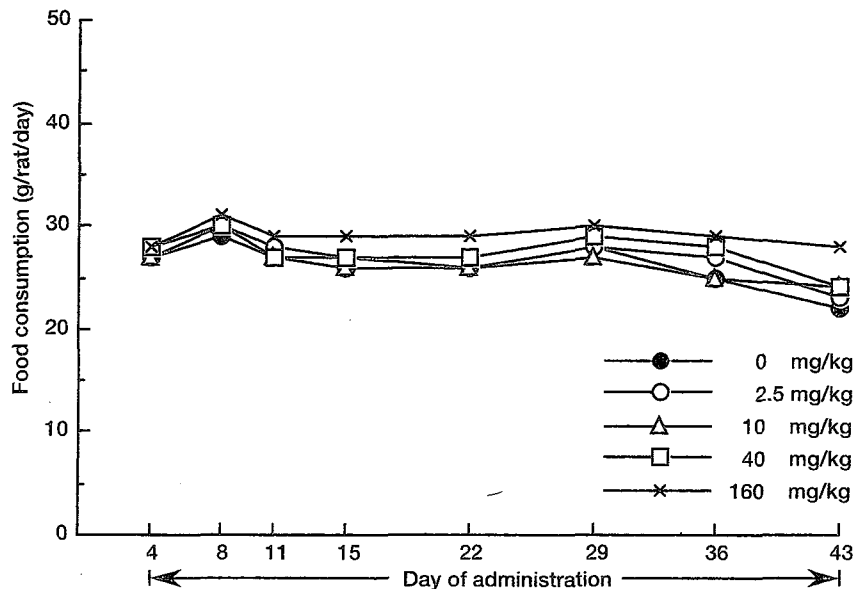


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

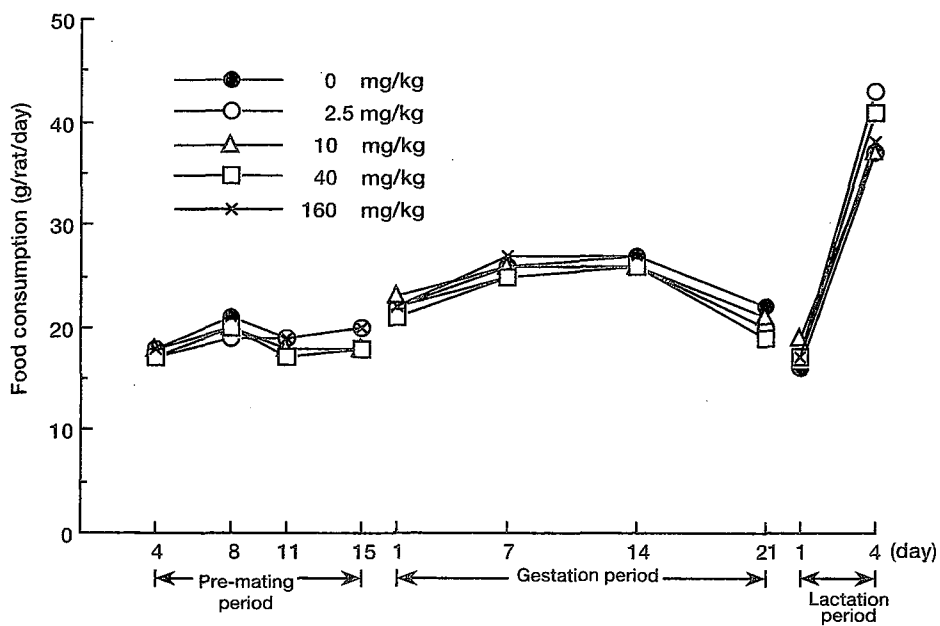


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Table 1 Hematological examination in male rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
No. of animals	12	12	12	12	12
RBC ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	838 $\pm$ 31	849 $\pm$ 31	832 $\pm$ 29	851 $\pm$ 45	844 $\pm$ 32
Hb (g/dl)	16.3 $\pm$ 0.5	16.1 $\pm$ 0.3	16.2 $\pm$ 0.4	16.1 $\pm$ 0.4	16.5 $\pm$ 0.3
Ht (%)	47 $\pm$ 2	47 $\pm$ 1	46 $\pm$ 2	47 $\pm$ 2	48 $\pm$ 1
MCV ( $\mu^3$ )	55.6 $\pm$ 1.5	54.9 $\pm$ 1.2	55.8 $\pm$ 0.9	55.0 $\pm$ 1.6	57.1 $\pm$ 1.3*
MCH (pg)	19.4 $\pm$ 0.6	19.0 $\pm$ 0.6	19.5 $\pm$ 0.4	19.0 $\pm$ 0.7	19.5 $\pm$ 0.5
MCHC (%)	34.9 $\pm$ 0.4	34.7 $\pm$ 0.7	34.9 $\pm$ 0.6	34.5 $\pm$ 0.5	34.2 $\pm$ 0.4**
Reticulocyte (%)	21 $\pm$ 5	22 $\pm$ 4	22 $\pm$ 4	20 $\pm$ 4	25 $\pm$ 4
Platelet ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	118.2 $\pm$ 11.8	113.5 $\pm$ 10.7	117.8 $\pm$ 10.7	117.0 $\pm$ 11.1	108.2 $\pm$ 8.4
PT (sec.)	12.4 $\pm$ 0.9	12.5 $\pm$ 1.2	12.4 $\pm$ 0.6	12.5 $\pm$ 0.7	14.3 $\pm$ 1.7**
APTT (sec.)	19.2 $\pm$ 1.2	18.7 $\pm$ 1.0	18.8 $\pm$ 0.9	19.5 $\pm$ 2.0	20.4 $\pm$ 1.6
Fibrinogen (mg/dl)	241 $\pm$ 27	262 $\pm$ 27	247 $\pm$ 19	250 $\pm$ 16	245 $\pm$ 21
WBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	100 $\pm$ 17	109 $\pm$ 29	111 $\pm$ 31	106 $\pm$ 35	112 $\pm$ 24
Differential leucocyte counts (%)					
Lymphocytes	88.0 $\pm$ 4.3	85.2 $\pm$ 5.8	87.5 $\pm$ 4.5	88.5 $\pm$ 4.4	86.8 $\pm$ 8.3
Stab	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Segmented	10.8 $\pm$ 4.1	14.0 $\pm$ 5.4	11.6 $\pm$ 4.4	10.8 $\pm$ 3.8	12.4 $\pm$ 7.8
Eosinophils	0.6 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.7
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
Monocytes	0.7 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.4
Others	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

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

Significantly different from the control group; \*:P<0.05. \*\*:P<0.01

Table 2 Blood chemical examination in male rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
No. of animals	12	12	12	12	12
GOT (IU/l)	60 $\pm$ 7	56 $\pm$ 7	53 $\pm$ 9	59 $\pm$ 9	59 $\pm$ 10
GPT (IU/l)	42 $\pm$ 8	38 $\pm$ 3	39 $\pm$ 5	42 $\pm$ 4	44 $\pm$ 4
LDH (IU/l)	41 $\pm$ 23	42 $\pm$ 25	38 $\pm$ 12	34 $\pm$ 13	38 $\pm$ 13
ALP (IU/l)	209 $\pm$ 48	219 $\pm$ 36	202 $\pm$ 57	214 $\pm$ 51	230 $\pm$ 40
Total chol. (mg/dl)	56 $\pm$ 8	54 $\pm$ 7	58 $\pm$ 11	51 $\pm$ 9	49 $\pm$ 9
TG (mg/dl)	97 $\pm$ 37	91 $\pm$ 40	87 $\pm$ 31	89 $\pm$ 34	96 $\pm$ 43
PL (mg/dl)	105 $\pm$ 13	104 $\pm$ 12	105 $\pm$ 13	99 $\pm$ 14	100 $\pm$ 14
Total bilirubin (mg/dl)	0.13 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.03
Glucose (mg/dl)	114 $\pm$ 8	119 $\pm$ 9	114 $\pm$ 9	115 $\pm$ 12	105 $\pm$ 11
BUN (mg/dl)	15 $\pm$ 2	15 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2	14 $\pm$ 3
Creatinine (mg/dl)	0.65 $\pm$ 0.06	0.66 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.07
Na (mEq/l)	141 $\pm$ 1	142 $\pm$ 1	141 $\pm$ 1	141 $\pm$ 1	141 $\pm$ 1
K (mEq/l)	4.5 $\pm$ 0.1	4.5 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.2
Cl (mEq/l)	113 $\pm$ 1	114 $\pm$ 1	113 $\pm$ 1	113 $\pm$ 1	112 $\pm$ 1*
Ca (mg/dl)	9.3 $\pm$ 0.2	9.2 $\pm$ 0.2	9.1 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.3	9.3 $\pm$ 0.2
P (mg/dl)	7.1 $\pm$ 0.6	7.2 $\pm$ 0.7	7.0 $\pm$ 0.6	7.4 $\pm$ 0.8	7.3 $\pm$ 0.6
TP (g/dl)	6.4 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.3	6.4 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.3	6.1 $\pm$ 0.3
A/G ratio	0.93 $\pm$ 0.06	0.94 $\pm$ 0.05	0.96 $\pm$ 0.10	0.99 $\pm$ 0.07	1.08 $\pm$ 0.11**
Albumin (%)	48.0 $\pm$ 1.6	48.3 $\pm$ 1.4	48.9 $\pm$ 2.6	49.7 $\pm$ 1.8	51.9 $\pm$ 2.5**
Globulin (%)					
$\alpha_1$	22.9 $\pm$ 1.5	22.6 $\pm$ 2.3	22.4 $\pm$ 1.9	21.9 $\pm$ 3.1	22.1 $\pm$ 2.7
$\alpha_2$	4.8 $\pm$ 1.0	5.1 $\pm$ 1.8	4.7 $\pm$ 1.8	4.6 $\pm$ 1.6	4.4 $\pm$ 1.4
$\beta$	18.0 $\pm$ 1.5	17.9 $\pm$ 1.2	17.8 $\pm$ 1.4	18.0 $\pm$ 1.7	16.8 $\pm$ 0.9
$\gamma$	6.0 $\pm$ 1.2	6.1 $\pm$ 0.9	6.3 $\pm$ 1.0	5.7 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 1.4*

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

Significantly different from the control group; \*:P<0.05. \*\*:P<0.01.

Table 3 Absolute and relative organ weights in male rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
No. of animals	12	12	12	12	12
Body weight (g)	502 ± 33	505 ± 35	503 ± 26	498 ± 23	511 ± 11
Absolute organ weight					
Thymus (mg)	333 ± 115	353 ± 103	334 ± 77	369 ± 99	352 ± 52
Heart (g)	1.49 ± 0.16	1.44 ± 0.11	1.43 ± 0.09	1.43 ± 0.12	1.46 ± 0.09
Liver (g)	14.12 ± 1.49	14.13 ± 1.48	14.12 ± 1.64	13.38 ± 1.03	13.77 ± 0.72
Spleen (mg)	769 ± 58	792 ± 94	799 ± 72	793 ± 124	762 ± 82
Kidney					
Right (g)	1.56 ± 0.14	1.57 ± 0.14	1.56 ± 0.09	1.61 ± 0.16	1.58 ± 0.13
Left (g)	1.55 ± 0.13	1.54 ± 0.15	1.54 ± 0.10	1.63 ± 0.17	1.61 ± 0.11
Testis					
Right (g)	1.73 ± 0.14	1.71 ± 0.12	1.73 ± 0.12	1.72 ± 0.12	1.67 ± 0.13
Left (g)	1.70 ± 0.14	1.70 ± 0.11	1.73 ± 0.13	1.80 ± 0.37	1.67 ± 0.11
Epididymis					
Right (mg)	658 ± 60	654 ± 57	659 ± 49	682 ± 59	645 ± 50
Left (mg)	661 ± 63	649 ± 55	672 ± 52	659 ± 62	627 ± 56
Relative organ weight					
Thymus (mg%)	67 ± 23	70 ± 21	66 ± 15	74 ± 21	69 ± 12
Heart (g%)	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Liver (g%)	2.81 ± 0.18	2.79 ± 0.14	2.80 ± 0.22	2.69 ± 0.16	2.70 ± 0.15
Spleen (mg%)	154 ± 12	157 ± 18	159 ± 19	159 ± 24	149 ± 19
Kidney					
Right (g%)	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.03
Left (g%)	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.01	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.03
Testis					
Right (g%)	0.35 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.33 ± 0.03
Left (g%)	0.34 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.07	0.33 ± 0.02
Epididymis					
Right (mg%)	132 ± 14	130 ± 18	131 ± 11	137 ± 12	126 ± 12
Left (mg%)	132 ± 14	129 ± 15	134 ± 10	133 ± 13	123 ± 12

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 4 Absolute and relative organ weights in female rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
No. of animals	12	12	12	10	9
Body weight (g)	340 ± 15	334 ± 13	343 ± 20	340 ± 17	346 ± 9
Absolute organ weight					
Thymus (mg)	241 ± 67	192 ± 60	282 ± 79	240 ± 49	188 ± 49
Heart (g)	1.07 ± 0.15	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.08	0.98 ± 0.05	1.00 ± 0.10
Liver (g)	13.28 ± 0.99	13.21 ± 0.75	12.97 ± 1.26	13.58 ± 1.15	15.36 ± 1.02**
Spleen (mg)	710 ± 75	677 ± 107	659 ± 83	648 ± 70	752 ± 77
Kidney					
Right (g)	1.03 ± 0.07	1.09 ± 0.12	1.03 ± 0.08	1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.05
Left (g)	1.04 ± 0.07	1.07 ± 0.10	1.03 ± 0.08	1.00 ± 0.06	1.09 ± 0.27
Ovary					
Right (mg)	63 ± 9	62 ± 9	57 ± 11	54 ± 7	47 ± 7**
Left (mg)	55 ± 6	55 ± 5	54 ± 6	50 ± 5	47 ± 7
Relative organ weight					
Thymus (mg%)	71 ± 20	58 ± 17	82 ± 23	71 ± 13	54 ± 15
Heart (g%)	0.31 ± 0.05	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.03
Liver (g%)	3.91 ± 0.31	3.96 ± 0.22	3.79 ± 0.33	4.00 ± 0.31	4.43 ± 0.30**
Spleen (mg%)	209 ± 18	203 ± 31	193 ± 26	191 ± 19	217 ± 20
Kidney					
Right (g%)	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Left (g%)	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.08
Ovary					
Right (mg%)	19 ± 3	19 ± 3	17 ± 3	16 ± 2	14 ± 2**
Left (mg%)	16 ± 2	16 ± 2	16 ± 2	15 ± 1	14 ± 2

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from the control group; \*\*:P<0.01

Table 5 Histopathological findings of male rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs	Dose (mg/kg/day)	0				2.5				10				40				160			
		No. of animals				No. of animals				No. of animals				No. of animals				No. of animals			
-findings	Grade	0	1	2	TE	0	1	2	TE	0	1	2	TE	0	1	2	TE	0	1	2	TE
Cerebrum		12			12				0				0				0	12			12
Cerebellum		12			12				0				0				0	12			12
Heart																					
-myocarditis/focal		10	2		12				0				0				0	8	4		12
Liver																					
-lipid droplet/cytoplasmic			8	4	12		7	5	12		8	4	12		1	11	12		6		6
Adrenal		12			12				0				0				0	12			12
Spleen		12			12				0				0				0	12			12
Kidney																					
-basophilic change/tubular epithelium/focal		11		1	12				0				0				0	12			12
Testis																					
-atrophy/tubular/focal/bilateral		11	1		12				0				0				0	12			12
Epididymis		12			12				0				0				0	12			12

0:No remarkable changes 1:Slight 2:Mild TE:Total Examine

Table 6 Histopathological findings of dams treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs	Dose (mg/kg/day)	0			2.5		10		40			40			160			160						
		Alive			Alive		Alive		Alive			Dead or Sacrificed			Alive			Dead or Sacrificed						
-findings	Grade	No. of animals			No. of animals		No. of animals		No. of animals			No. of animals			No. of animals			No. of animals						
		0	1	TE	0	TE	0	TE	0	1	TE	0	2	3	TE	0	1	TE	0	1	2	3	P	TE
Cerebrum		12		12		0		0			0			0	9		9	3						3
Cerebellum		12		12		0		0			0			0	9		9	3						3
Heart																								
-degeneration/myocardial		12		12		0		0			0			0	9		9	2				1		3
Liver																								
-necrosis/centrilobular		12		12	12	12	12	12	10	10	1	1	2	9		9	3						3	
-deposit/glycogen		12		12	12	12	12	12	8	2	10	2		2	2	7	9	1				2		3
Adrenal																								
-hypertrophy/zona foveolata		12		12		0		0			0		1	1	9		9	3						3
Spleen																								
-hematopoiesis/extramedullary/increased		8	4	12		0		0			0			0	6	3	9	3						3
Kidney																								
-necrosis/tubular epithelium		12		12		0		0			0			0	9		9	2				1		3
Ovary		12		12		0		0			0			0	9		9	3						3
Other gross lesion																								
-Thymus:atrophy			0		0		0		0		1	1			0	1							1	
hemorrhage			0		0		0		0		1	1			0			1					1	
-Lung:congestion			0		0		0		0			0			0			1					1	
-Subcutaneous nodule:adenocarcinoma/ mammary gland			0		0		0		0			0			0							1	1	

0:No remarkable changes 1:Slight 2:Mild 3:Moderate P:Present<sup>a)</sup> TE:Total Examine

a): "Present" is used when grading of severity was not done, such as case in the neoplastic lesion

Table 7 Summary of reproductive performance in rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
Estrus cycle (days, Mean $\pm$ S.D.)	4.4 $\pm$ 0.6	4.4 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.6	4.2 $\pm$ 0.3
No. of pairs mated	12	12	12	12	12
No. of pairs copulated	12	12	12	12	12
No. of pregnant females	12	12	12	12	12
Copulation index (%) <sup>a)</sup>	100	100	100	100	100
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	100	100	100	100	100

a): (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated) $\times$ 100b): (No. of pregnant animals/No. of pairs with successful copulation) $\times$ 100

## 2) 分娩および哺育状態 (Table 8)

40 mg/kg 群の 1 例が妊娠 22 日の分娩途中で死亡した以外に分娩の異常は対照群および被験物質投与群のいずれにも観察されなかった。しかし、160 mg/kg 群では分娩途中の死亡例は認められないことから、40 mg/kg 群における死亡が分娩異常に起因したものであるとは考えられない。また、40 mg/kg 群の 1 例では妊娠 25 日においても分娩が観察されなかったため、剖検したところ着床痕が観察された。妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、出産率および分娩率には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

哺育状況では、160 mg/kg 群において乳頭の未発達例が 2 例に観察され、全ての新生児が哺育 2 日あるいは 3 日に死亡した。その他には哺育状況の異常は認められなかった。性比、出生率および新生児生存率には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。なお、哺育期間中の児の死亡は、160 mg/kg 群において多い傾向がみられたため、同群の哺育 4 日の平均生存児数が少なく、新生児生存率も低い傾向にあった。

## 3) 新生児の形態、体重および剖検所見 (Table 9)

生存児および死産児数の外表検査では、短軀および痕跡尾が対照群の死産児に 1 例、痕跡尾が 160 mg/kg 群の生存児に 1 例観察されたのみであった。哺育 0 日および 4 日の体重は、160 mg/kg 群において対照群に比べてわずかに低値を示す傾向にあったが、有意な差は認められなかった。40 mg/kg 以下の投与群における体重は対照群とほぼ同等の値であった。哺育 4 日の剖検では、いずれの例においても異常は認められなかった。

## 考察

## 1. 反復投与毒性

雄では、死亡例はなく、一般状態、体重、摂餌量、血液学検査値、血液生化学検査値、剖検所見および器官重量には被験物質投与の影響は認められなかった。なお、血液学検査において 160 mg/kg 群にプロトンピン時間の延長が認められたが、血液凝固系に関連する他の項目に変化が認められない単一項目における変化であった。また、本被験物質はラットおよびマウスにおいて低カルシウム血症を起こすことが報告<sup>2)</sup>されているが、本試験

では血液凝固因子の 1 つであるカルシウムの低下は認められなかった。これらのことから、この変化が被験物質投与による影響とは考えられない。病理組織学検査において被験物質投与に起因すると考えられる変化は肝臓で認められた。すなわち、対照群において観察される小葉周辺性脂肪化の程度およびその出現頻度が 40 mg/kg 以上の被験物質投与群で減少した。しかし、その機序は明らかではなかった。

雌では、40 mg/kg 群の 1 母体が妊娠 22 日の分娩途中で、160 mg/kg 群の 1 母体が妊娠 22 日に死亡した。死亡例の病理組織学検査において、死亡に直接関連すると考えられる共通した所見は両者には認められなかった。その他、一般状態、体重、摂餌量および剖検所見に被験物質投与の影響は認められなかった。器官重量では 160 mg/kg 群において肝臓の高値、卵巣の低値が認められたが、40 mg/kg 以下の被験物質投与群には対照群との間に有意な差は認められなかった。病理組織学検査において被験物質投与に起因すると考えられる変化は雄と同様に肝臓で認められたが、その変化は雄と異なっていた。すなわち、肝細胞内にグリコーゲン量の軽微な増加が 40 mg/kg 群の少数例、160 mg/kg 群の多数例に観察された。なお、40 および 160 mg/kg 群の肝臓においてヘマトキシリン・エオジン染色標本で肝細胞の細胞質が腫大淡明化し明るくぬけていたため、その性状を PAS 反応および唾液消化後 PAS 反応で検索したところ、細胞内に分布するグリコーゲンを反映するものと考えられた。

以上のことから、2-ヒドロキシベンズアルデヒドの反復投与により、160 mg/kg 群において雌の肝臓重量が高値を、卵巣重量が低値を示し、病理組織学検査では雌雄に相違はあるものの 40 mg/kg 以上の投与群において肝臓に変化が認められた。したがって、本試験条件下における 2-ヒドロキシベンズアルデヒドの一般毒性学的な無影響量は、雌雄ともに 10 mg/kg/day であると判断される。

## 2. 生殖発生毒性

雌の性周期、雌雄の交尾および受胎および雌の妊娠期間ならびに分娩に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。哺育状況では、160 mg/kg 群において乳頭の未発達に起因すると考えられる全新生児の死亡例が 2 例認められた。しかし、乳頭の未発達と被験物質投与の影

Table 8 Delivery and litter data in female rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
No. of pregnant females	12	12	12	12	12
No. of females with live pups	12	12	12	10	11
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100	100	100	83.8	91.7
Gestation length (days, Mean±S.D.)	22.3 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.5 ± 0.7	22.5 ± 0.5	22.8 ± 0.4
No. of corpora lutea (Mean±S.D.)	248(20.7 ± 4.7)	257(21.4 ± 3.5)	226(18.8 ± 3.6)	198(19.8 ± 2.4)	214(19.5 ± 2.3)
No. of implantations (Mean±S.D.)	207(17.3 ± 3.1)	223(18.6 ± 2.6)	184(15.3 ± 4.8)	172(17.2 ± 1.7)	185(16.8 ± 2.0)
Implantation index (%) <sup>b)</sup>	83.5	86.8	81.4	86.9	86.4
No. of stillborn (Mean±S.D.)	2( 0.2 ± 0.4)	4( 0.3 ± 0.7)	0( 0.0 ± 0.0)	2( 0.2 ± 0.6)	7( 0.6 ± 0.9)
No. of live born (Mean±S.D.)	183(15.3 ± 4.0)	208(17.3 ± 2.2)	165(13.8 ± 4.3)	152(15.2 ± 2.5)	152(13.8 ± 3.1)
Live birth index (%) <sup>c)</sup>	98.9	98.1	100	98.7	95.6
Delivery index (%) <sup>d)</sup>	89.4	95.1	89.7	89.5	85.9
No. of male pups (Mean±S.D.)	97( 8.1 ± 3.2)	105( 8.8 ± 2.4)	83( 6.9 ± 3.1)	78( 7.8 ± 2.7)	82( 7.5 ± 2.2)
No. of female pups (Mean±S.D.)	86( 7.2 ± 3.1)	103( 8.6 ± 2.0)	82( 6.8 ± 2.2)	74( 7.4 ± 2.5)	70( 6.4 ± 2.0)
Sex ratio <sup>e)</sup>	1.13	1.02	1.01	1.05	1.17
No. of pups					
Day 0 of lactation (Mean±S.D.)	183(15.3 ± 4.0)	208(17.3 ± 2.2)	165(13.8 ± 4.3)	152(15.2 ± 2.5)	151(13.7 ± 3.3)
Day 4 of lactation (Mean±S.D.)	179(14.9 ± 3.8)	203(16.9 ± 1.7)	163(13.6 ± 4.3)	151(15.1 ± 2.5)	125(11.4 ± 6.1)
Viability index (%) <sup>f)</sup>	97.8	97.6	98.8	99.3	82.8

a) : (No. of females with live pup/No. of pregnant females)×100

b) : (No. of implantations/No. of corpora lutea)×100

c) : (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100

d) : (No. of pups born/No. of implantations)×100

e) : (No. of males/No. of females)

f) : (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100

Table 9 Body weight of pups from dams treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
Day 0 of lactation					
Male	6.7 ± 0.6	6.4 ± 0.4	7.0 ± 0.6	6.9 ± 0.5	6.0 ± 0.5
Female	6.2 ± 0.5	6.0 ± 0.4	6.8 ± 0.6	6.5 ± 0.7	5.7 ± 0.5
Day 4 of lactation					
Male	10.5 ± 1.8	10.0 ± 1.1	11.2 ± 1.3	10.9 ± 1.2	9.7 ± 1.4
Female	10.0 ± 1.5	9.3 ± 1.0	11.2 ± 1.8	10.5 ± 1.5	9.0 ± 1.7

Values are expressed as Mean ± S.D.

響との関係については明らかではなかった。40 mg/kg以下の被験物質投与群には哺育の異常は認められなかった。新生児出産雌数、出産率、黄体数、着床痕数および着床率には被験物質投与の影響は認められなかった。

新生児に関して、生存児数、死産児数、性比、分娩率および出生率には被験物質投与の影響は認められなかった。また、新生児および死産児に被験物質投与に起因する外表異常は認められなかった。哺育期間中の児の死亡は、対照群との間に有意な差は認められないものの160 mg/kg群において多い傾向がみられ、新生児生存率が低い傾向にあった。また、哺育0日および4日の体重は160 mg/kg群においてわずかに低値を示す傾向にあった。サリチル酸あるいはアスピリンの150 mg/kgを妊娠8日～14日までの7日間にわたって経口投与した試験

では新生児の発育遅延、離乳率の低下が報告<sup>6)</sup>されている。したがって、本被験物質160 mg/kgの投与により新生児の生存および発育に及ぼす影響が示唆された。しかし、40 mg/kg以下の投与群においては新生児の生存および発育に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。新生児の哺育4日の剖検では、いずれの例においても異常は認められなかった。

以上のことから、生殖発生毒性的には性周期、交尾および受胎、妊娠期間および分娩に及ぼす被験物質投与の影響はいずれの投与群においても認められなかった。しかし、160 mg/kg群では全新生児が死亡した母動物が2例認められ、また、新生児の生存・発育に及ぼす影響が示唆された。したがって、本試験条件下における生殖発生毒性的な無影響量は、雄に関しては160 mg/kg/day、

雌に関しては40 mg/kg/day, 新生児に関しては40 mg/kg/dayであると判断される.

文献

- 1) D. L. J. Opdyke, *Fd Cosmet. Toxicol.*, **17**, 903 (1979)
- 2) H. Saito, A. Yokoyama, S. Takeno, T. Sakai, K. Ueno, H. Masumura and H. Kitagawa, *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.*, **38**, 209 (1982)
- 3) C. A. Kimmel, J. G. Wilson and H. J. Shumacher, *Teratology*, **4**, 15 (1971)
- 4) R. P. Koshakji and A. R. Schulert, *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 407 (1973)
- 5) K. S. Khera, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **37**, 149 (1975)
- 6) S. Tanaka, K. Kawashima, S. Nakaura, S. Nagao, T. Kuwamura, A. Takanaka and Y. Omori, *Cong. Anom.*, **13**, 73 (1973)

連絡先

試験責任者：梅村建夫  
試験担当者：杉沢健一, 石倉寿一, 石井孝広,  
田村一利, 茂呂光夫, 勝亦俱慶  
(株)ボゾリサーチセンター 函南研究所  
〒419-01 静岡県田方郡函南町桑原三本松1308  
Tel 0559-78-7851 Fax 0559-78-7898

Correspondence

Authors: Tatsuo Umemura (Study Director)  
Kenichi Sugisawa, Toshikazu Ishikura,  
Takahiro Ishii, Kazutoshi Tamura,  
Mitsuo Moro, Tomoyoshi Katsumata  
Bozo Research Center Inc. Kannami Laboratory  
1308 Kuwahara-Sanbonmatsu, Kannami-cho,  
Tagata-gun, Shizuoka-ken, 419-01, Japan  
Tel +81-559-78-7851 Fax +81-559-78-7898



# テトラヒドロフルフリルアルコールの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Tetrahydrofurfuryl alcohol in Bacteria

### 要約

テトラヒドロフルフリルアルコールについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101 を用いる復帰変異試験を実施した。

予備試験の結果をもとに本試験では、S9 mix 非共存下および共存下の各菌株について 5000 ~ 313  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の5用量を設定した。

2回の本試験の結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、テトラヒドロフルフリルアルコールは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

### 方法

#### 1. テスト菌株

カリフォルニア大学B.N.Ames教授より1983年5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1)</sup> および日本バイオアッセイ研究センターより1997年9月18日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101<sup>2)</sup> の5菌株を用いた。テスト菌株は菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO:関東化学株)を加え、0.2 mLずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結した後、超低温槽で-80°C以下に凍結保存したものを使用した。これら菌株はアミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異、薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ、特性を備えていることを確認した。

#### 2. テスト菌株の前培養

L字型試験管に2.5%ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath)溶液を10 mL分注し、これに凍結保存した菌懸濁液を解凍して20  $\mu\text{L}$ を接種した。37°Cで8時間振盪培養した後、濁度計を用いて菌濃度を測定し、生菌数が $1 \times 10^9/\text{mL}$ 以上であることを確認した。

#### 3. 被験物質

テトラヒドロフルフリルアルコール(ロット番号:2002-4; 高压化学工業(大阪)提供)は、純度99.5%(不純物として5-メチルテトラヒドロフルフリルアルコール:0.34%含有)の無色液体である。被験物質は使用

時まで室温で保存した。

被験物質原体は安定であり、反応しない。

#### 4. 被験物質溶液の調製

注射用水(DW:大塚製薬工場)を用いて最高用量の溶液を調製した後、同溶媒で所定用量に段階希釈し、速やかに試験に使用した。

#### 5. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを用いた。陽性対照物質溶液は、あらかじめ所定の濃度に調製し、-80°C以下に凍結保存したものを使用した。

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

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム(和光純薬工業)

ENNG: N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(Sigma Chemical)

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩(Sigma Chemical)

2-AA: 2-アミノアントラセン(和光純薬工業)

NaN<sub>3</sub>はDWに、その他はDMSOに溶解したものを使用した。

#### 6. 培地およびS9 mixの組成

##### 1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いて0.5 mmol/L D-ピオチン、0.5 mmol/L L-ヒスチジン混合水溶液(サルモネラ用)または0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液(大腸菌用)を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水100 mLに対して、粉末寒天(Bacto-Agar, Difco)0.6 g、塩化ナトリウム0.5 gの割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を1/10量加えて混和し、約45°Cに保温した。

##### 2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディアAM-N培地(オリエンタル酵母工業)を購入し、使用した。なお、培地1 Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸二カリウム・無水塩	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g

寒天(OXOID Agar No.1) 15 g  
 径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めてある。

3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
D-グルコース6-リン酸	5 μmol
β-NADPH	4 μmol
β-NADH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μmol
滅菌精製水	残量

\*:購入したS9(キッコーマン)を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボン併用投与して作製した肝ホモジネートの9000×g遠心上清分画である。

7. 試験方法

試験はブレインキューベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を0.1 mL、0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)を0.5 mLおよび菌懸濁液を0.1 mL加え、37°Cで20分間振盪培養した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 mL添加した。ブレインキューベーション後、トップアガー2 mLを上記の混合液に加え混和し、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37°Cで48時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各用量につき1枚のプレートを使用した。本試験は各用量につき3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

8. 試験結果の判定基準

いずれかの試験菌株で、S9 mixの有無によらず、被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数(平均値)が陰性(溶媒)対照値の2倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は変異原性を有する(陽性)と判定した。なお、試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

結果及び考察

1. 予備試験

予備試験を *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 uvrA/pKM101を用いて、5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 μg/plateの7用量で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても抗菌性および沈殿物は認められなかった。従って本試験では、S9 mix非共存下および共存下の各菌株について5000, 2500, 1250, 625, 313 μg/plateの5用量を設定した。

2. 本試験

試験の結果をTable 1, 2に示した。本試験を2回実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても抗菌性および沈殿物は認められなかった。

なお、S9 mix非共存下および共存下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数は、各菌株の陰性対照の復帰変異コロニー数と比較して、明らかに2倍を超えて増加し、陽性の結果を示した。

以上の結果から、テトラヒドロフルフリルアルコールは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

なお、類似化合物であるテトラヒドロフラン<sup>3)</sup>、フルフラール<sup>3)</sup>は、いずれも細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が報告されている。

文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res*, 113: 173-215(1983).
- 2) Green MHL, Muriel WJ: Mutagen testing using *Trp*<sup>r</sup> reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Res*, 38: 3-32(1976).
- 3) 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 日本化学物質安全・情報センター, 東京(1996)p.178, pp.233-234.

連絡先

試験責任者：榎本佳明  
試験担当者：榎本佳明，清水優子，大西千絵美  
(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所  
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Yoshiaki Enomoto (Study director)  
Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu,  
Chiemi Oonishi  
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
Kashima Laboratory  
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
Ibaraki, 314-0255 Japan  
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Mutagenicity of tetrahydrofurfuryl alcohol in bacteria (I)

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 change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	103 123 ( 113) 113 ( $\pm$ 10)	14 11 ( 12) 11 ( $\pm$ 2)	82 75 ( 81) 87 ( $\pm$ 6)	22 20 ( 21) 22 ( $\pm$ 1)	17 16 ( 17) 17 ( $\pm$ 1)
	313	97 103 ( 107) 122 ( $\pm$ 13)	11 8 ( 10) 10 ( $\pm$ 2)	93 73 ( 86) 92 ( $\pm$ 11)	17 23 ( 20) 21 ( $\pm$ 3)	16 21 ( 17) 15 ( $\pm$ 3)
	625	112 122 ( 114) 108 ( $\pm$ 7)	10 8 ( 10) 12 ( $\pm$ 2)	76 76 ( 83) 98 ( $\pm$ 13)	21 20 ( 20) 19 ( $\pm$ 1)	15 18 ( 16) 14 ( $\pm$ 2)
	1250	110 134 ( 113) 96 ( $\pm$ 19)	14 11 ( 12) 10 ( $\pm$ 2)	63 77 ( 78) 95 ( $\pm$ 16)	31 18 ( 25) 25 ( $\pm$ 7)	18 20 ( 18) 15 ( $\pm$ 3)
	2500	116 109 ( 112) 111 ( $\pm$ 4)	11 9 ( 10) 9 ( $\pm$ 1)	93 81 ( 89) 92 ( $\pm$ 7)	20 17 ( 20) 24 ( $\pm$ 4)	17 11 ( 15) 17 ( $\pm$ 3)
	5000	118 119 ( 113) 102 ( $\pm$ 10)	10 16 ( 12) 11 ( $\pm$ 3)	87 70 ( 83) 91 ( $\pm$ 11)	17 21 ( 18) 17 ( $\pm$ 2)	17 23 ( 18) 15 ( $\pm$ 4)
S9 mix (+)	0	128 127 ( 119) 102 ( $\pm$ 15)	13 8 ( 12) 15 ( $\pm$ 4)	99 106 ( 101) 99 ( $\pm$ 4)	33 24 ( 27) 23 ( $\pm$ 6)	25 24 ( 24) 22 ( $\pm$ 2)
	313	114 120 ( 118) 119 ( $\pm$ 3)	9 11 ( 10) 11 ( $\pm$ 1)	87 111 ( 97) 92 ( $\pm$ 13)	40 23 ( 31) 29 ( $\pm$ 9)	26 27 ( 25) 21 ( $\pm$ 3)
	625	137 98 ( 120) 125 ( $\pm$ 20)	13 10 ( 12) 12 ( $\pm$ 2)	92 102 ( 90) 77 ( $\pm$ 13)	33 30 ( 29) 23 ( $\pm$ 5)	27 23 ( 24) 22 ( $\pm$ 3)
	1250	108 126 ( 113) 106 ( $\pm$ 11)	12 11 ( 13) 17 ( $\pm$ 3)	104 111 ( 109) 112 ( $\pm$ 4)	30 31 ( 33) 37 ( $\pm$ 4)	22 27 ( 24) 24 ( $\pm$ 3)
	2500	113 120 ( 119) 123 ( $\pm$ 5)	10 16 ( 14) 15 ( $\pm$ 3)	109 95 ( 105) 112 ( $\pm$ 9)	29 29 ( 30) 33 ( $\pm$ 2)	26 24 ( 23) 18 ( $\pm$ 4)
	5000	101 120 ( 111) 113 ( $\pm$ 10)	10 18 ( 14) 13 ( $\pm$ 4)	86 113 ( 105) 116 ( $\pm$ 17)	23 33 ( 26) 23 ( $\pm$ 6)	25 30 ( 28) 29 ( $\pm$ 3)
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2 <sup>a)</sup>	NaN <sub>3</sub> <sup>b)</sup>	ENNG <sup>c)</sup>	AF-2	9-AA <sup>d)</sup>
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
	Number of colonies/plate	564 555 ( 551) 533 ( $\pm$ 16)	520 476 ( 488) 468 ( $\pm$ 28)	4412 4259 ( 4221) 3992 ( $\pm$ 213)	632 644 ( 634) 625 ( $\pm$ 10)	292 237 ( 292) 346 ( $\pm$ 55)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA <sup>e)</sup>	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	2	0.5	2
	Number of colonies/plate	1381 1446 ( 1423) 1443 ( $\pm$ 37)	169 149 ( 163) 171 ( $\pm$ 12)	935 955 ( 938) 925 ( $\pm$ 15)	436 437 ( 441) 451 ( $\pm$ 8)	171 167 ( 171) 175 ( $\pm$ 4)

a) AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide  
 b) NaN<sub>3</sub>: sodium azide  
 c) ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  
 d) 9-AA: aminoacridine hydrochloride  
 e) 2-AA: 2-aminoanthracene

Table 2 Mutagenicity of tetrahydrofurfuryl alcohol in 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 change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	121 118 ( 114) 102 ( $\pm$ 10)	16 15 ( 15) 14 ( $\pm$ 1)	82 85 ( 85) 88 ( $\pm$ 3)	19 22 ( 21) 22 ( $\pm$ 2)	18 14 ( 14) 11 ( $\pm$ 4)
	313	127 111 ( 115) 108 ( $\pm$ 10)	14 11 ( 12) 12 ( $\pm$ 2)	96 94 ( 92) 86 ( $\pm$ 5)	24 24 ( 25) 26 ( $\pm$ 1)	17 16 ( 16) 15 ( $\pm$ 1)
	625	95 106 ( 103) 107 ( $\pm$ 7)	9 10 ( 10) 10 ( $\pm$ 1)	95 86 ( 90) 89 ( $\pm$ 5)	16 24 ( 22) 25 ( $\pm$ 5)	16 16 ( 16) 15 ( $\pm$ 1)
	1250	110 112 ( 113) 117 ( $\pm$ 4)	10 11 ( 11) 12 ( $\pm$ 1)	76 90 ( 85) 88 ( $\pm$ 8)	17 25 ( 21) 21 ( $\pm$ 4)	14 18 ( 16) 17 ( $\pm$ 2)
	2500	101 105 ( 104) 105 ( $\pm$ 2)	13 9 ( 12) 15 ( $\pm$ 3)	86 90 ( 89) 91 ( $\pm$ 3)	16 17 ( 18) 20 ( $\pm$ 2)	15 13 ( 15) 17 ( $\pm$ 2)
	5000	121 98 ( 116) 130 ( $\pm$ 17)	8 11 ( 11) 14 ( $\pm$ 3)	93 87 ( 87) 81 ( $\pm$ 6)	26 18 ( 22) 23 ( $\pm$ 4)	12 10 ( 11) 12 ( $\pm$ 1)
S9 mix (+)	0	110 127 ( 115) 108 ( $\pm$ 10)	11 11 ( 13) 16 ( $\pm$ 3)	93 95 ( 92) 87 ( $\pm$ 4)	32 29 ( 32) 35 ( $\pm$ 3)	23 23 ( 20) 15 ( $\pm$ 5)
	313	123 114 ( 121) 116 ( $\pm$ 6)	12 13 ( 13) 13 ( $\pm$ 1)	88 111 ( 97) 91 ( $\pm$ 13)	24 31 ( 27) 27 ( $\pm$ 4)	20 17 ( 20) 22 ( $\pm$ 3)
	625	124 119 ( 118) 110 ( $\pm$ 7)	14 16 ( 15) 14 ( $\pm$ 1)	90 87 ( 93) 103 ( $\pm$ 9)	39 21 ( 28) 24 ( $\pm$ 10)	18 22 ( 23) 29 ( $\pm$ 6)
	1250	121 115 ( 116) 112 ( $\pm$ 5)	10 13 ( 11) 10 ( $\pm$ 2)	87 95 ( 95) 102 ( $\pm$ 8)	25 28 ( 29) 33 ( $\pm$ 4)	22 25 ( 23) 22 ( $\pm$ 2)
	2500	108 99 ( 108) 116 ( $\pm$ 9)	14 10 ( 12) 13 ( $\pm$ 2)	90 96 ( 98) 108 ( $\pm$ 9)	24 27 ( 27) 30 ( $\pm$ 3)	22 16 ( 19) 20 ( $\pm$ 3)
	5000	108 114 ( 108) 102 ( $\pm$ 6)	9 13 ( 11) 10 ( $\pm$ 2)	101 87 ( 99) 108 ( $\pm$ 11)	25 25 ( 26) 28 ( $\pm$ 2)	22 19 ( 20) 19 ( $\pm$ 2)
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2 <sup>a)</sup>	NaN <sub>3</sub> <sup>b)</sup>	ENNG <sup>c)</sup>	AF-2	9-AA <sup>d)</sup>
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
	Number of colonies/plate	563 520 ( 522) 482 ( $\pm$ 41)	369 387 ( 399) 440 ( $\pm$ 37)	4358 4439 ( 4357) 4275 ( $\pm$ 82)	632 618 ( 613) 590 ( $\pm$ 21)	242 209 ( 220) 209 ( $\pm$ 19)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA <sup>e)</sup>	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	2	0.5	2
	Number of colonies/plate	1398 1398 ( 1366) 1301 ( $\pm$ 56)	150 147 ( 145) 138 ( $\pm$ 6)	1347 1373 ( 1264) 1072 ( $\pm$ 167)	432 428 ( 428) 423 ( $\pm$ 5)	200 182 ( 192) 194 ( $\pm$ 9)

a) AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

b) NaN<sub>3</sub>: sodium azide

c) ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

d) 9-AA: aminoacridine hydrochloride

e) 2-AA: 2-aminoanthracene

テトラヒドロフルフリルアルコールの  
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

*In Vitro* Chromosomal Aberration Test  
of Tetrahydrofurfuryl alcohol in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

テトラヒドロフルフリルアルコールの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を、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。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下ならびに連続処理法の24時間処理で、1030  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (約10 mmol/L)を最高濃度として公比2で3濃度を設定した。

短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下ならびに24時間連続処理のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下ではテトラヒドロフルフリルアルコールは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

大日本製薬から入手(2001年7月, 入手時:継代14代, 凍結時:17代)したチャイニーズ・ハムスター肺由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代4週間以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(Invitrogen, ロット番号:296130)を10 vol%添加したイーグルMEM(日本水薬)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, Becton Dickinson)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。

短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で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。また連続処理法では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間処理した。

4. 被験物質

テトラヒドロフルフリルアルコール(ロット番号:2002-4, 高圧化学工業(大阪)提供)は、純度99.5%(不純物として5-メチルテトラヒドロフルフリルアルコール:0.34%含有)の無色液体である。被験物質は使用時まで室温で保存した。

被験物質原体は安定であり、反応しない。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒は生理食塩水(大塚製薬工場, ロット番号:K2A79)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10 vol%になるように加えた。

6. 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(オリンパス光学工業)を用いて測定し、陰性対照群に対する割合をもって指標とした。

その結果、テトラヒドロフルフリルアルコールによる50%以上の細胞増殖抑制は、短時間処理法および連続処理法のいずれにおいても認められなかった(Fig.1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下ならびに連続処理法の24時間処理で、1030  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として公比2で3濃度を設定した。

陽性対照として、短時間処理法のS9 mix存在下では、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業, ロット番号:GG01)の濃度を20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , S9 mix非存在下では、マイトマイシンC(協和発酵工業, ロット番号:342AJH)の濃度を0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 連続処理法では、マイトマイシンCの濃度を0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。

各濃度4枚のディッシュに処理し、2枚を染色体標本作製、2枚を細胞増殖率測定に使用した。

8. 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように染色体標本作成用ディッシュの培養液に加えた。染色体標本の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2枚作製した。作製した標本を、3 vol%ギムザ溶液で20分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のディッシュから得られたスライドを処理条件が分からないようにコード

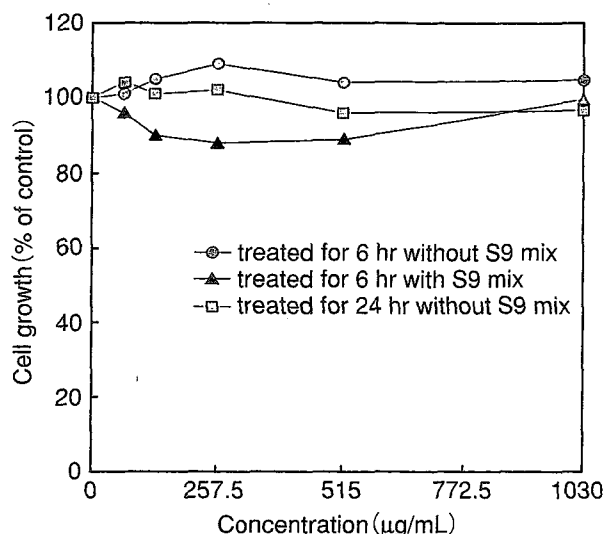


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with tetrahydrofurfuryl alcohol

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・哺乳動物試験分科会(MMS)<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型の切断、交換などの構造異常およびギャップの有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。ギャップは構造異常には含めなかった。また、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

#### 10. 記録と測定

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。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

#### 11. 細胞増殖の測定

染色体標本作製と同一のサンプルにおける細胞増殖を測定した。細胞増殖測定用のディッシュを用いて、細胞増殖抑制試験と同様に測定した。

### 結果および考察

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。テトラヒドロフルフリルアルコールを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した結果、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。

連続処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。テトラヒドロフルフリルアルコールを加えて24時間連続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。

以上の結果から、テトラヒドロフルフリルアルコール

は本試験条件下において、染色体異常を誘発しないと結論した。

なお、類似化合物であるDibenzofuranは、染色体異常試験で陰性の結果が報告されている。また、Maleic anhydrideは、染色体異常試験の連続処理法48時間処理で陽性の結果が報告されている<sup>2)</sup>。

#### 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) 祖父尼俊雄(監修):「染色体異常試験データ集」1998年版、エル・アイ・シー、東京(1999).

#### 連絡先

試験責任者: 中川宗洋

試験担当者: 成見香瑞範, 石毛裕子, 齋藤 準,  
齋藤宏美, 長友弘子, 須之内みどり

(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所

〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

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

#### Correspondence

Authors: Munehiro Nakagawa (Study director)

Kazunori Narumi, Yuko Ishige,

Hitoshi Saitou, Hiromi Saitou,

Hiroko Nagatomo, Midori Sunouchi

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,

Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,

Ibaraki, 314-0255 Japan

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

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with tetrahydrofurfuryl alcohol with and without S9 mix

Group	Concentration (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid <sup>b)</sup> (%)	Judgement <sup>c)</sup>	
						ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Vehicle <sup>a)</sup>	0	-	6-18	100	200	1	0	0	0	0	1	1( 0.5)	0	0.0	-	-
Test Substance	257.5	-	6-18	105	200	2	0	0	1	1	4	4( 2.0)	0	0.0	-	-
	515	-	6-18	104	200	1	0	0	0	0	1	1( 0.5)	0	0.0	-	-
	1030	-	6-18	106	200	1	1	1	0	0	3	2( 1.0)	0	0.0	-	-
	MMC	0.1	-	6-18	N.D.	200	34	51	0	0	0	85	82(41.0)	0	0.0	+
Vehicle	0	+	6-18	100	200	0	0	1	0	0	1	1( 0.5)	1	0.0	-	-
Test Substance	257.5	+	6-18	108	200	0	1	1	0	0	2	2( 1.0)	0	0.0	-	-
	515	+	6-18	107	200	0	1	0	0	0	1	1( 0.5)	0	0.0	-	-
	1030	+	6-18	112	200	0	0	0	0	0	0	0( 0.0)	0	0.0	-	-
	BP	20	+	6-18	N.D.	200	24	157	2	0	0	183	163(81.5)	1	0.0	+

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment

SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C (positive control), BP:benzo [a] pyrene (positive control)  
N.D.:Not determined

a) Isotonic sodium chloride solution was used as vehicle.

b) Two hundred cells were analyzed in each group.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987)

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with tetrahydrofurfuryl alcohol without S9 mix

Group	Concentration (µg/mL)	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid <sup>b)</sup> (%)	Judgement <sup>c)</sup>	
					ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Vehicle <sup>a)</sup>	0	24	100	200	1	0	1	0	0	2	2( 1.0)	1	0.0	-	-
Test Substance	257.5	24	103	200	0	1	1	1	0	3	3( 1.5)	0	0.0	-	-
	515	24	102	200	0	0	0	0	0	0	0( 0.0)	0	0.0	-	-
	1030	24	101	200	0	2	0	0	0	2	2( 1.0)	0	0.0	-	-
	MMC	0.05	24	N.D.	200	21	33	1	9	0	64	53(26.5)	0	0.0	+

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment

SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C (positive control)

N.D.:Not determined

a) Isotonic sodium chloride solution was used as vehicle.

b) Two hundred cells were analyzed in each group.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).



Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test  
of Tetrahydrofurfuryl alcohol in Rats

要約

テトラヒドロフルフリルアルコールは、溶剤、可塑剤、防かび剤、リジンの中間体、樹脂改質剤、塗料、ジヒドロピラン原料、合成医薬品中間体原料等に用いられている化学物質である<sup>1)</sup>。本物質の毒性については、ラット経口投与におけるLD<sub>50</sub>値は1.6-3.2 g/kgで、皮膚や粘膜に対して刺激性を有すること<sup>2)</sup>が知られている。また、ラットへの90日間混餌投与による亜慢性毒性試験では、精巣に対する毒性影響が認められているほか、血色素量、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、血小板数、血糖値、総タンパク、グロブリンおよびカルシウムの低値が認められている<sup>3)</sup>。また、本物質の基本骨格であるテトラヒドロフランの毒性として、マウスへの単回経口投与により麻酔作用が認められ<sup>4)</sup>、マウス或いはラットへの反復吸入暴露試験においては、副腎の肥大、肝臓の肝細胞肥大および肝細胞逸脱酵素活性の上昇、白血球数減少、運動失調等<sup>5-9)</sup>が認められている。さらに、発癌性試験においては、マウスで肝細胞腺腫/癌の発生率の有意な増加、ラットで腎細胞腺腫/癌の発生率の増加傾向<sup>10)</sup>が認められている。

今回、テトラヒドロフルフリルアルコールについて、SD系[Crj:CD(SD)IGS]ラットを用い、0(溶媒)、10、40、150および600 mg/kg用量で、28日間反復経口投与毒性試験を実施した。動物数は1群雌雄各5匹とし、投与期間終了後屠殺の5群、ならびに対照および600 mg/kgの14日間回復群を設定した。

その結果、600 mg/kg群で、雌雄に自発運動亢進、続いて自発運動低下および腹臥姿勢、さらに雄には後肢握力の低下、摂餌量の減少および体重増加の抑制、雌には投与1週のみ摂餌量の減少が認められた。150 mg/kg群では、雌に自発運動亢進が認められた。尿検査では、600 mg/kg群で雄にpHの低下が認められた。血液学検査では、600 mg/kg群で雌雄に平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、白血球数および血小板数の減少並びにプロトロンビン時間の延長、さらに雄には網状赤血球数、雌には血色素量の減少が認められた。血液生化学検査では、600 mg/kg群で雌雄にALP、総タンパク、アルブミン、総ビリルビンおよびカルシウム、さらに雄にはLDH、トリグリセライドおよびナトリウムのいずれも減少並びに尿素窒素の増加が認められた。150 mg/kg群では、雄に総タンパクの減少が認められた。器官重量では、600 mg/kg群で雌雄に胸腺、雌に下垂体の絶対および相対重量に共通した減少、雄で脳絶対重量の減少、

雌で腎臓相対重量の増加が認められた。150 mg/kg群では、雌に下垂体相対重量の減少が認められた。病理組織学検査では、600 mg/kg群で雌雄に胸腺の萎縮、雄に脾臓の髓外造血低下による赤脾髄萎縮および被膜炎並びに精巣の精上皮細胞壊死、150 mg/kg群で雄に脾臓の被膜炎並びに精巣の精上皮細胞壊死が認められ、精巣の精子形成サイクル検査では、600 mg/kg群でセルトリ細胞に対する精子細胞の比率の減少が認められた。

回復群においては、これらの投与期間中或いは投与期間終了時の観察および検査で認められた変化のうち、精巣の変化は増強する傾向にあり、精子細胞に加えてパキテン期精母細胞の比率も減少したが、その他の変化は回復或いは回復傾向を示した。

以上の結果から、テトラヒドロフルフリルアルコールのラットへの28日間反復投与による主な毒性は、胸腺、脾臓、腎臓および精巣に対する影響並びに血液学および血液生化学的影響であった。無影響量は、雌雄とも40 mg/kg/dayであると考えられた。

方法

1. 被験物質

テトラヒドロフルフリルアルコールは水、アセトンに易溶な無色の液体である。試験には、高圧化学工業(大阪)から提供されたロット番号2002-4(純度99.5%)を入手し、冷暗(4℃)条件下で保管し、使用した。被験物質の投与液は、局方精製水(共栄製薬)を溶媒として、所定の投与用量になるような濃度の溶液として調製し、使用時まで冷所(4℃)遮光下で密栓保管し、調製後7日以内に使用した。なお、保管条件下および投与形態での被験物質は安定であることを確認した。

2. 供試動物および飼育条件

動物は、SD系[Crj:CD(SD)IGS]ラットを、日本チャールス・リバー(神奈川)より搬入し、雄は7日、雌は8日間検疫を兼ねて試験環境に馴化させた後、5週齢で試験に供した。1群の動物数は雌雄各5匹とし、投与期間終了後屠殺の5群のほか、対照群および最高用量群については別に雌雄各5匹の14日間回復群を設けた。群分けは、投与開始前日の体重に基づく層化無作為抽出法により行なった。投与開始時の体重は雄で157~181 g、雌で141~161 gであった。ラットは、温度22.4~22.8℃、湿度47~62%に制御した飼育室で、金網ケージに個別に収容し、固型飼料[ラボMRストック、日本農産工

業]および水を自由に摂取させて飼育した。

### 3. 投与量および投与方法

投与量設定試験として、1群雌雄各4匹のラットに、被験物質を0, 50, 100, 200, 500および1000 mg/kg用量で14日間反復経口投与した結果、100 mg/kg群では、自発運動の亢進が認められたが、雌1匹のみの変化であった。200 mg/kg群では、自発運動の亢進が雌に認められたほか、雌雄に血小板数、雄に尿pH、平均赤血球血色素濃度、アルブミンおよび総タンパク、雌に平均赤血球血色素量、胸腺および下垂体の絶対および相対重量のいずれも低値が認められた。500 mg/kg群では、雌雄に自発運動亢進および低下、摂餌量、尿pH、血小板数、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、白血球数、血清アルブミン、総タンパク、LDH、総ビリルビンおよびカルシウムの低値並びに $\gamma$ -GTPの高値、盲腸の拡張、雄に立毛例、体重増加の抑制傾向、血清ALPの低値並びに尿素窒素およびクレアチニンの高値、雌にプロトンピン時間の高値、ナトリウム、胸腺および下垂体の絶対および相対重量のいずれも低値が認められた。1000 mg/kg群では、500 mg/kg群で認められた変化に加えて、雄にプロトンピン時間および血清ChEの高値並びにナトリウム、胸腺の絶対および相対重量のいずれも低値、雌に立毛例、血色素量の低値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間およびトリグリセライドの高値が認められた。以上の結果から、本試験における投与量は、600 mg/kg/dayを最高用量とし、以下150, 40および10 mg/kg/dayの4用量を設定した。投与方法は、投与液量を体重1 kg当たり5 mLとし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、1日1回(午前中)、28日間にわたって経口投与した。対照群には、局方精製水を同様に投与した。

### 4. 観察および検査

#### 1) 一般状態観察

28日間の投与期間およびそれに続く14日間の回復期間を通じて、動物の生死、外観、行動等を毎日観察した。

#### 2) 詳細な臨床観察

週1回(投与7, 14, 21および28日並びに回復群ではさらに回復7および14日)、午後の概ね一定時刻に、動物をケージから取り出す時およびケージ外のアルミ製オープンフィールド(370 W×560 D×40 Hmm)で観察(ケージからの出し易さ、ケージから出す時の扱い易さ、体躯緊張、皮膚、毛並み、立毛、眼分泌液、眼瞼閉鎖状態、眼球突出、流涙、口鼻分泌液、流涎、下腹部被毛の尿による汚れ、肛門周囲の便による汚れ、異常発声、呼吸、姿勢、痙攣、振戦、探索行動、警戒性、自発運動、歩行、異常行動、常同、意識不全、四肢筋緊張、排尿、排便)し、認められた変化を評点で記録した。各個体の行動の特性を把握するため、投与開始前日にも観察した。観察は、ブラインドで行った。

### 3) 感覚反射機能検査

投与28日および回復14日においては、詳細な臨床観察に加えて、聴覚反応(ピンセットで軽くケージを叩く音に対する耳介のPreyer反射)、視覚反応(顔面に棒を近づけた場合の接近反射)、触覚反応(腰部に触れた場合の反応)、耳介反射(耳介に触れた場合の耳介の反射)、痛覚反応(尾根部をピンセットで摘んだ場合の逃避、発声などの反応)、瞳孔反射(暗所から急に明るい場所に移した時の瞳孔の反射)、同側屈筋反射(後肢の足趾をピンセットで摘んだ場合の屈筋の反応)、眼瞼反射(眼瞼に接触した場合の眼瞼の反応)および正向反射(面上で動物を背臥位にした場合の正常姿勢にもどる反射)を調べ、認められた変化を評点で記録した。

### 4) 着地開脚幅、握力および自発運動量測定

投与4週(投与23日)および回復2週(回復13日)において、午後の概ね一定時刻に、着地開脚幅(足趾に墨を塗り、30 cmの高さから落とした時の足跡の幅を測定)、前肢および後肢の握力(ラット・マウス用握力測定装置、MK-380R/FR、室町機械)並びに自発運動量(自発運動量測定装置、SUPERMEX、室町機械、測定装置内の区画間の60分間における移動回数を測定)を測定した。

### 5) 体重および摂餌量測定

体重は、週2回、3あるいは4日ごと、および屠殺日に測定した。摂餌量は、毎週1回、1日(24時間)の飼料消費量を測定した。

### 6) 尿検査

投与26日および回復12日に、動物の腰部を刺激して新鮮尿を採取し、外観の観察並びにpH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンの検査(以上、試験紙法:マイルス・三共、マルティステイクス<sup>®</sup>)を行った。

### 7) 血液学検査

採血は、投与期間および回復期間終了翌日にエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より行なった。動物は採血前日の午後5時から除餌し、水のみを給与した。採取した血液は3分割し、その一部は、EDTA-2 Kで凝固防止処理し、多項目自動血球計数装置〔東亜医用電子、E-4000〕により、赤血球数(電気抵抗検出方式)、血色素量(ラウリル硫酸ナトリウム-ヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(パルス検出方式)、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、以上計算値)、白血球数および血小板数(以上、電気抵抗検出方式)を、また塗抹標本を作製して網状赤血球数(Brilliant cresyl blueで染色して鏡検)および白血球百分率(May-Giemsaで染色して鏡検)を測定した。また一部は、3.8%クエン酸ナトリウム液で凝固阻止処理して血漿を分離し、血液凝固自動測定装置(アメルング社、KC-10 A)により、プロトンピン時間(PT, Quick一段法)および活性化部分トロンボプラスチン時間

(APTT, エラジン酸活性化法)を測定した。

## 8) 血液生化学検査

採取した血液の一部から血清を分離し、生化学自動分析装置〔日本電子, JCA-BM8〕により、総タンパク(Biuret法), アルブミン(BCG法), A/G比(計算値), グルコース, トリグリセライド, 総コレステロール(以上, 酵素法), 総ビリルビン(ジアゾ法), 尿素窒素(Urease-UV法), クレアチニン(Jaffé法), GOT, GPT,  $\gamma$ -GTP, ALP(以上, JSCC法), LDH(SFBC法), コリンエステラーゼ(BTC-DTNB法), カルシウム(OCPC法)および無機リン(酵素法)を, また電解質自動分析装置〔東亜電波工業, NAKL-132〕により, ナトリウム, カリウムおよび塩素を測定した。

## 9) 病理学検査

投与期間あるいは回復期間終了翌日の採血に続いて放血屠殺し, 剖検を行った。また, 脳, 心臓, 胸腺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 精巣, 精巣上体, 卵巣および子宮を秤量(絶対重量)し, また対体重比(相対重量)を算出した。病理組織学検査は, 採取した器官を10%中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巣および精巣上体のみブアン液で固定)で固定後, 対照群および600 mg/kg群については, 脳, 下垂体, 甲状腺(上皮小体を含む), 胸腺, 心臓, 肺, 気管, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 胃, 腸, 膀胱, 脊髄, リンパ節, 坐骨神経, 骨髄, さらに雄では精巣, 精巣上体, 前立腺, 雌では卵巣, 子宮を検査した。また, 600 mg/kg群で, 雌雄の胸腺並びに雄の精巣および脾臓に病理組織学的変化が認められたので, 雌雄の胸腺, 雄の精巣および脾臓については, 10, 40および150 mg/kg群並びに回復群も検査した。検査は, 常法によりパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。精巣についてはPAS染色標本も作製し, 精子形成サイクル(ステージII-III, V, VIIおよびXII)の検査<sup>11,12)</sup>も行なった。さらに, 沈着物を同定するため, 対照群の雄の2匹の腎臓にもPAS染色を行なった。

## 5. 統計解析

パラメトリックデータについては, Bartlettの分散検定を行い, 分散が一樣な場合は一元配置の分散分析を行った。分散が一樣でない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの順位検定を行った。それらの結果, 有意差を認めた場合, DunnettまたはSheffé(群間で標本数が異なる場合)の方法により対照群に対する各群の比較検定を行った。カテゴリカルデータにはFisherの直接確率法を用いた。ただし, 回復群のパラメトリックデータはF検定を行い, その結果分散が一樣な場合はStudentのt検定を, 一樣でない場合はAspinn-Welchのt検定を行った。ノンパラメトリックデータには, Mann-WhitneyのU検定を用いた。有意水準は, いずれの場合も5%とした。

## 結果

### 1. 死亡および一般状態

投与期間において, 概ね投与後5~40分の間に軽度な自発運動亢進が150 mg/kg群の雌の5匹中5匹並びに600 mg/kg群の各10匹中雄の4匹および雌の9匹に認められ, これらの発現率はいずれも対照群と比べて有意差が認められた。また, 自発運動亢進が消失した後, 続いて軽度ないし中等度な自発運動低下および自発運動低下中の一時的な腹伏姿勢が600 mg/kg群の雌雄全例に認められた。自発運動低下は, 投与開始後数日間は投与後概ね6時間まで認められたが, 4~6日以降においては, 投与後2~3時間以内に回復した。

回復期間においては, 一般状態の変化は認められなかった。

死亡は, 投与および回復期間を通じて認められなかった。

### 2. 詳細な臨床観察

投与期間中および回復期間中の観察において, 各観察項目に有意な変化は認められなかった。

### 3. 感覚反射機能検査

投与期間中および回復期間中の検査において, 各検査項目に有意な変化は認められなかった。

### 4. 着地開脚幅, 握力および自発運動量(Table 1)

投与期間中の測定において, 600 mg/kg群で雄の後肢握力に有意な減少が認められた。着地開脚幅および自発運動量には, 有意な変化は認められなかった。

回復期間中の測定においては, 着地開脚幅, 握力および自発運動量ともに, 有意な変化は認められなかった。

### 5. 体重(Fig. 1)

投与期間において, 600 mg/kg群の雄の体重は対照群を下回り, 投与3日以降の体重および投与期間中の体重増加量に有意差が認められ, 対照群の体重との差は投与の経過とともに拡大する傾向にあった。150 mg/kg群の雄の体重も対照群を下回って推移する傾向にあったが, 各測定時点の体重および投与期間中の体重増加量に有意差は認められなかった。また, 雌においては, 体重に対する影響は認められなかった。

回復期間において, 600 mg/kg群の雄の体重に有意差は残るものの, 対照群と概ね平行して推移した。

### 6. 摂餌量(Fig. 2)

投与期間において, 600 mg/kg群の雄の摂餌量は, 投与期間を通じて有意な低値を示した。同群の雌では, 投与1週にのみ, 有意な低値が認められた。150 mg/kg群では, 雄の摂餌量が投与期間を通じて低値傾向にあったが, 有意差は認められなかった。

回復期間において, 600 mg/kg群の雌雄の摂餌量は, 対照群と比べて有意差は認められなかった。

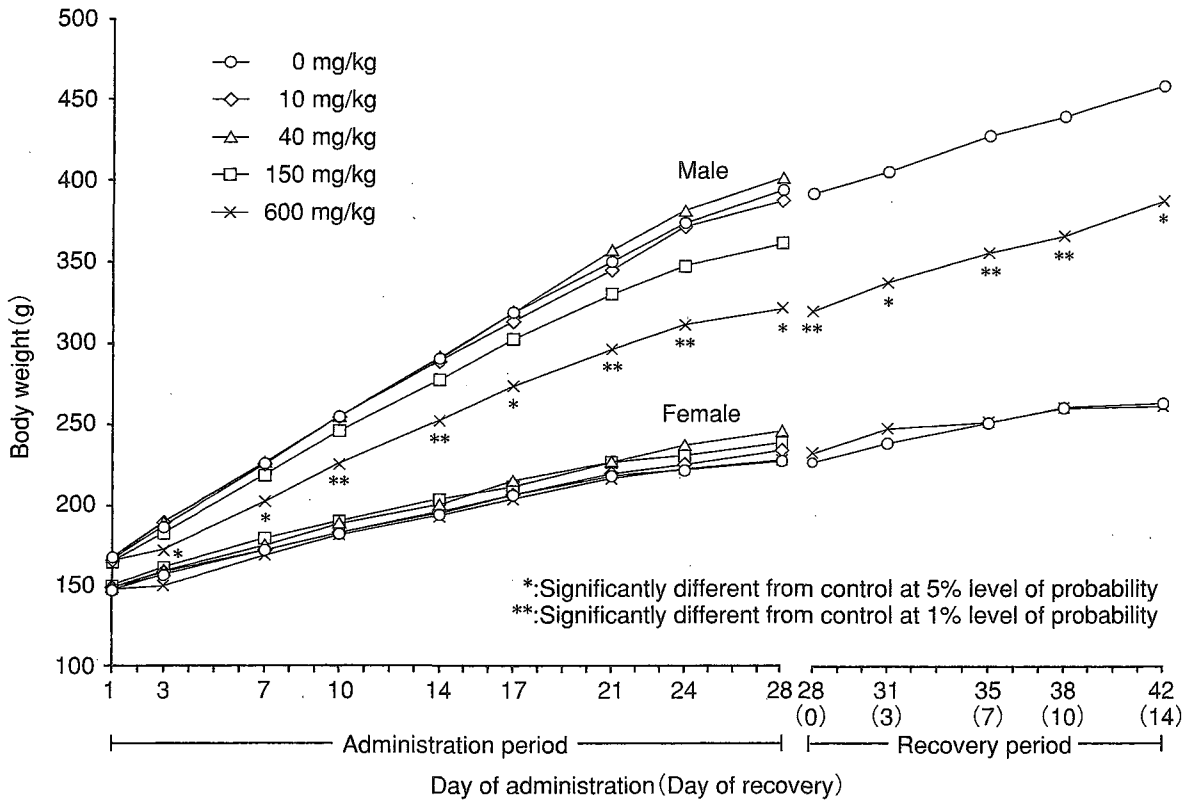


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

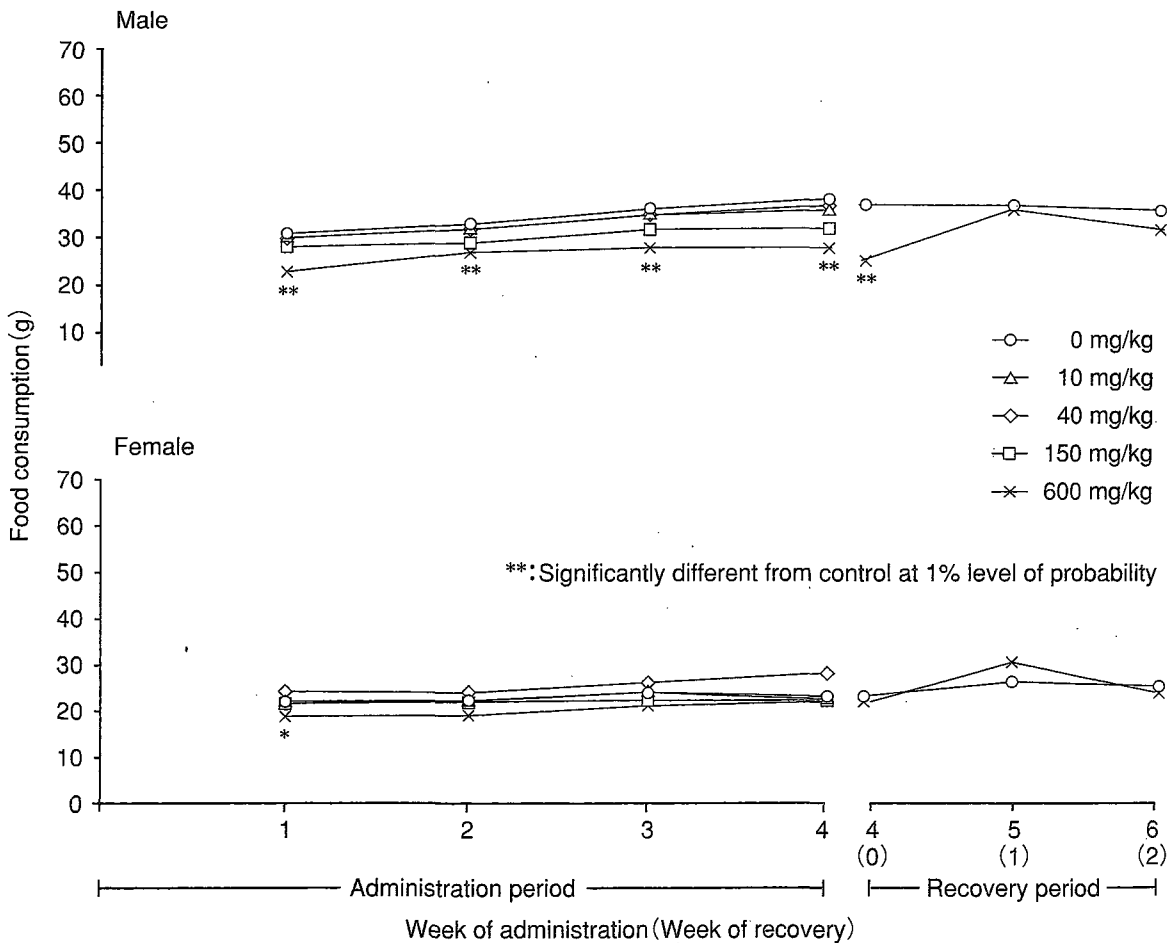


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

## 7. 尿検査 (Table 2)

投与期間中の検査において、600 mg/kg群の雄に尿pHの有意な低下が認められ、また有意差は認められなかったものの、同群の雌においても同様の傾向が認められた。

回復期間中の検査において、各検査項目に有意な変化は認められなかった。

## 8. 血液学検査 (Table 3)

投与期間終了時屠殺動物において、600 mg/kg群で雌雄に平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、白血球数および血小板数の有意な減少並びにプロトロンビン時間の有意な延長、さらに雄に血色素量の減少傾向および網状赤血球数の有意な減少、雌に血色素量の有意な減少が認められた。

回復期間終了時屠殺動物において、投与期間終了時屠殺動物で認められた変化は認められなかった。なお、回復期間終了時屠殺動物では、投与期間終了時屠殺動物で認められなかった赤血球数の有意な増加が雌雄に認められ、雌雄の平均赤血球容積および平均赤血球血色素量並びに雌の平均赤血球血色素濃度はいずれも有意な低値を示した。また、雄に活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な短縮が認められた。

## 9. 血液生化学検査 (Table 4)

投与期間終了時屠殺動物において、600 mg/kg群で雌雄にALP、総タンパク、アルブミン、総ビリルビンおよびカルシウム、さらに雄にはLDH、トリグリセライドおよびナトリウムのいずれも有意な減少並びに尿素窒素の有意な増加、雌にはLDHの減少傾向が認められた。150 mg/kg群では、雄に総タンパクの有意な減少が認められた。なお、アルブミンおよびカルシウムの有意な減少は40 mg/kg群の雌にも認められたが、150 mg/kg群の雌のアルブミンおよびカルシウムには有意差は認められなかった。また、これらの変化以外にも有意差のある項目が認められたが、変化に用量相関性は認められなかった。

回復期間終了時屠殺動物においては、投与期間終了時屠殺動物において認められた変化のうち、雌雄のカルシウム並びに雄の総タンパクおよび尿素窒素に有意差が残るものの、その他の変化は回復し、また総タンパクおよび尿素窒素の変化にも回復傾向が認められた。なお、回復期間終了時屠殺動物では、雌のカリウムが有意な高値を示したほか、投与期間終了時屠殺動物において有意差は認められなかったものの低値傾向にあった雌のコリンエステラーゼにも有意差が認められた。

## 10. 剖検

投与期間終了時屠殺動物において、胸腺の小型化が600 mg/kg群で雄の5匹および雌の4匹に認められた。回復期間終了時屠殺動物においては、胸腺の小型化は雄の2匹に認められたほか、雄に精巣の小型化が3匹に認められた。なお、雌においては、被験物質の投与とは無

関係に、子宮腔水腫が散発的に認められた。

## 11. 器官重量 (Table 5)

投与期間終了時屠殺動物において、600 mg/kg群で雌雄に胸腺および雌に下垂体の絶対および相対重量に共通した有意な減少が認められた。また、600 mg/kg群の雌では腎臓相対重量の有意な増加、150 mg/kg群の雌では下垂体相対重量の有意な減少が認められた。なお、600 mg/kg群の雄の最終体重は対照群の雄と比べて約19%少なく、脳、肝臓、心臓、下垂体、副腎、精巣および精巣上体の絶対重量は有意な低値を示したが、相対重量には有意差は認められなかった。

回復期間終了時屠殺動物において、雄の胸腺の絶対および相対重量の減少に有意差が残るものの、投与期間終了時屠殺動物と比べて変化の程度は軽減する傾向にあった。また、雄の最終体重は対照群と比べて約15%少なく、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体は絶対重量のみの有意な低値、脳、心臓および下垂体は相対重量のみの有意な高値を示した。さらに、雌では甲状腺の絶対および相対重量の有意な高値が認められた。

## 12. 病理組織学検査 (Table 6)

投与期間終了時屠殺動物において、被験物質の投与に起因する変化が、雌雄の胸腺並びに雄の脾臓および精巣に認められた。

胸腺では、600 mg/kg群の雌雄の全例で、皮質および髄質領域のリンパ球が低形成となり、軽度な萎縮が認められた。

脾臓では、対照群の雄の全例の赤脾髄に中等度な髄外造血が認められた。一方、600 mg/kg群の雄の髄外造血は全例が軽度であり、赤脾髄の萎縮が認められた。また、被膜の一部に細胞浸潤や線維化等を伴う軽度な炎症が、150 mg/kg群で雄の1匹および600 mg/kg群で雄の3匹に認められた。

精巣では、精上皮細胞の壊死が150 mg/kg群の2匹および600 mg/kg群の5匹に認められた。精子形成サイクル検査によりセルトリ細胞に対する生殖細胞の比率を算定した結果、ステージII-III、VおよびVIIにおいて、精子細胞(round)の比率が減少傾向にあり、ステージII-IIIおよびVIIで有意差が認められた。

回復期間終了時屠殺動物では、雌雄の胸腺、雄の脾臓の変化には回復傾向が認められた。しかしながら、精巣の精上皮細胞の壊死の程度は増強する傾向にあり、精子形成サイクル検査ではステージII-IIIおよびVでパキテン期精母細胞および精子細胞(round)の比率の有意な減少が認められた。

なお、被験物質の投与とは無関係と考えられる変化として、肺の動脈壁鉍質沈着、肝臓の微小肉芽腫および巣状壊死、腎臓の嚢胞、好塩基性尿管管および皮質リンパ球浸潤、脾臓の褐色色素沈着、胸腺の出血が認められたが、対照群にも認められ、被験物質投与群の発現率や変化の程度に差は認められなかった。肺の泡抹細胞は、対照群には認められず、600 mg/kg群の雌の1匹に認め

られたが、この変化はラットに自然発生的にしばしば認められる病変であることから、被験物質の投与とは無関係な所見と判断された。また、剖検で被験物質の投与とは無関係に認められた子宮の子宮腔水腫の例では、子宮腔の拡張が認められた。

### 考察

テトラヒドロフルフリルアルコールのラットへの28日間反復経口投与において、胸腺、脾臓、腎臓および精巣に対する影響並びに血液学および血液生化学的影響が認められた。

胸腺に対する影響について、600 mg/kg群で雌雄に胸腺重量の減少が認められ、病理組織学的には、胸腺の萎縮が認められた。この胸腺の変化は、副腎の肥大を伴っていないことから、毒性によるストレスに伴う二次的影響ではなく、被験物質の胸腺に対する直接的な毒性影響によるものと推察される。

血液学検査では、600 mg/kg群で雌に血色素濃度、雌雄に平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度並びに白血球数および血小板数の減少が認められた。これに関連して、骨髓造血細胞には変化は認められなかったものの、雄で脾臓の髓外造血低減による赤脾髄の萎縮および末梢血中網状赤血球数の減少が認められ、被験物質の造血機能に対する抑制的影響が示唆された。また、雌雄で血小板数の減少に加えてプロトロンビン時間の延長も認められ、血液凝固系に対する影響も認められた。なお、脾臓の病理組織学的変化として、赤脾髄の萎縮に加えて、脾臓の被膜の炎症が150および600 mg/kg群の雄に認められた。この変化は、本物質のラットにおける簡易生殖・発生毒性試験<sup>13)</sup>では雌雄に認められており、雄に特有の変化ではないと思われるが、その病理発生については不明である。

腎臓に対する影響について、600 mg/kg群で、雄では尿素窒素の増加、雌では腎臓相対重量の増加が認められた。病理組織学検査では、腎臓に被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。しかしながら、血液生化学検査におけるナトリウムの減少や600 mg/kg群の雄に認められた尿pHの低下も腎臓に対する影響を示唆する変化である可能性も考えられ、テトラヒドロフルフリルアルコールは腎臓に対しても軽度な影響を有するものと思われる。

精巣に対する影響について、150および600 mg/kg群で精上皮細胞の壊死が認められ、14日間の回復群では精上皮細胞の壊死は増強する傾向にあった。精子形成サイクル検査では、600 mg/kg群でセルトリ細胞に対するパキテン期精母細胞および精子細胞(round)の比率が減少していることが確認され、精祖細胞の比率には明らかな変化が認められなかった。しかしながら、簡易生殖毒性試験<sup>13)</sup>でテトラヒドロフルフリルアルコールを47日間経口投与したラットや亜慢性毒性試験<sup>3)</sup>で3か月間混餌投与したラットの精巣では、セルトリ細胞のみを残して萎縮した精細管が認められており、精祖細胞を含む生

殖細胞全般に影響を及ぼすものと考えられる。

血液生化学検査では、600 mg/kg群で雌雄に総タンパク、アルブミン、カルシウム、ALP、総ビリルビン、さらに雄にLDH、トリグリセライドおよびナトリウムの減少が認められ、総タンパクの減少は150 mg/kg群の雄にも認められた。総タンパクおよびカルシウムの減少は、テトラヒドロフルフリルアルコールのラットへの90日間混餌投与による亜慢性毒性試験<sup>3)</sup>においても認められており、総タンパクの減少と関連するアルブミンの減少も含めて、テトラヒドロフルフリルアルコールによる特徴的な変化と考えられる。ALP、LDHおよび総ビリルビンの変化は減少性のものであり、毒性学的意義は小さいものと判断され、トリグリセライドおよびナトリウムの減少も背景データにおける正常範囲の変化であった。

雌の下垂体重量は、600 mg/kg群では絶対および相対重量に共通して、また150 mg/kg群では相対重量の減少が認められた。下垂体に病理組織学的変化は認められなかったものの、雌の600 mg/kg群および150 mg/kg群では体重の変化は認められていないことから、下垂体重量の変化は被験物質の投与による影響と判断される。また、下垂体重量の変化と関連する可能性のある変化として、本物質のラットにおける簡易生殖・発生毒性試験<sup>13)</sup>では、雌の性周期に対する影響が認められている。

回復期間中或いは回復期間終了時の検査では、上述の投与期間中あるいは投与期間終了時の検査で認められた変化のうち、精巣の変化は増強する傾向にあった以外、回復あるいは回復傾向を示した。なお、回復群では、投与期間終了時屠殺動物で認められなかった赤血球数の増加が雌雄に認められ、雌雄の平均赤血球容積および平均赤血球血色素量並びに雌の平均赤血球血色素濃度はいずれも低値を示したが、これは投与による貧血傾向に対するリバウンド現象と解せられる。また、その他にも回復群で認められられた変化はあったが、投与期間終了時屠殺動物では認められておらず、偶発的所見と判断された。

以上の結果から、テトラヒドロフルフリルアルコールのラットへの28日間反復投与による主な毒性として、胸腺、脾臓、腎臓および精巣に対する影響並びに血液学および血液生化学的影響が認められた。無影響量は、雌雄とも40 mg/kg/dayと考えられた。

### 文献

- 1) 「12394の化学商品」化学工業日報社、東京(1994) p.701.
- 2) Richardson ML and Gangolli S: "The Dictionary of Substances and their Effects", Vol. 7, The royal society of chemistry, England(1994) pp.353-354.
- 3) TSCA Section 8, (e) Data, 8EHQ-1091-1381 A, -0692-1381B, and -0992-1381C.
- 4) IUCLID (International Uniform Chemical Information Data Base) Data Sheet, EU (1995).
- 5) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), US NIOSH(1996).

- 6) David EM: Drug and chemical Toxicology, 14: 319-342(1991).
- 7) Hazardous Substances Data Bank(HSDB), U.S. National Library of Medicine(1998).
- 8) ACGIH, Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices(1991).
- 9) 片平卓男:産業医学, 24: 379-387(1982).
- 10) Chabra RS: Toxicological Sciences, 41: 183-188 (1992).
- 11) 高橋道人: 精巢毒性評価のための精細管アトラス, ソフトサイエンス, 東京(1994)pp.15-20.
- 12) Matui H, Toyoda K, Kawanishi T, Mitumori K, Takahashi M: J Toxicologic Pathology, 9:285-292(1996).
- 13) 野田篤ら: テトラヒドロフルフリルアルコールのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験. 化学物質毒性試験報告, 11:175-186(2004).

連絡先

試験責任者: 伊藤義彦  
試験担当者: 野田 篤, 山口真樹子,  
伊藤雅也, 赤木 博  
(財)畜産生物科学安全研究所  
〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11  
Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Yoshihiko Ito (Study director)  
Atushi Noda, Makiko Yamaguchi,  
Masaya Ito, Hiroshi Akagi  
Research Institute for Animal Science  
in Biochemistry and Toxicology  
3-7-11 Hashimotodai, Sagamihara-shi,  
Kanagawa, 229-1132, Japan  
Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Mean value of landing foot splay, grip strength and motor activity of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	End of administration period					End of recovery period	
		0	10	40	150	600	0	600
Male								
	Number of animals	10	5	5	5	10	5	5
	Landing foot splay (cm)	8.3 ± 2.3	8.8 ± 1.4	7.7 ± 1.9	9.7 ± 3.5	8.7 ± 1.5	9.2 ± 2.9	7.5 ± 2.0
	Grip strength (g)							
	Forelimb	670 ± 141	744 ± 142	621 ± 132	532 ± 117	554 ± 114	686 ± 271	548 ± 149
	Hindlimb	235 ± 61	270 ± 60	296 ± 102	138 ± 50	126 ± 54*	405 ± 54	339 ± 85
	Motor activity (Counts/0~60min)	11491 ± 3793	11600 ± 1989	9427 ± 2332	13066 ± 2925	12451 ± 2976	11064 ± 2351	12098 ± 3876
Female								
	Number of animals	10	5	5	5	10	5	5
	Landing foot splay (cm)	5.1 ± 1.1	5.5 ± 1.7	4.4 ± 0.7	4.9 ± 1.1	5.2 ± 0.9	6.4 ± 2.8	6.4 ± 2.4
	Grip strength (g)							
	Forelimb	451 ± 107	447 ± 91	438 ± 158	454 ± 122	342 ± 133	541 ± 265	428 ± 117
	Hindlimb	241 ± 93	239 ± 109	124 ± 17	170 ± 71	150 ± 88	301 ± 73	228 ± 43
	Motor activity (Counts/0~60min)	12863 ± 2122	12810 ± 1167	12782 ± 2910	13399 ± 5001	13142 ± 2540	13376 ± 3307	11772 ± 2986

Each value is expressed as Mean ± S.D.  
Significantly different from control (\* $p < 0.05$ )



Table 2 Urinary examination of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Dose(mg/kg)	Administration period					Recovery period	
		0	10	40	150	600	0	600
Male								
Number of animals:		10	5	5	5	10	5	5
Color:	Pale yellow	10	5	5	5	10	5	5
Cloudy:	-	10	5	5	5	10	5	5
pH:	6.0					4		
	6.5					1		
	7.0					3	1	
	7.5	4	4	3	1	2**	1	2
	8.0	1	1				3	1
	8.5	5		2	4			2
Protein:	-							
	±	1	1				4	2
	+	5	2	2	2	1	1	3
	++	4	2	3	3	9		
Glucose:	-	10	5	5	5	10	5	5
Ketone body:	-	1				2	2	4
	±	9	5	4	5	8	3	1
	+			1				
Occult blood:	-	10	5	5	5	10	5	5
Urobilinogen:	0.1	10	5	5	5	10	5	5
Bilirubin:	-	10	5	5	5	10	5	5
Female								
Number of animals:		10	5	5	5	10	5	5
Color:	Pale yellow	10	5	5	5	10	5	5
Cloudy:	-	10	5	5	5	10	5	5
pH:	6.0					5		
	6.5	2	1					
	7.0		1			1		1
	7.5	2	1	1	1	3	4	1
	8.0	4	2	3	3	1	1	2
	8.5	2		1	1			1
Protein:	-	4	1	1				2
	±	4	2			1	4	3
	+	2	2	2	5	9	1	
	++			2				
Glucose:	-	10	5	5	5	10	5	5
Ketone body:	-	10	5	5	5	7	5	5
	±					3		
Occult blood:	-	9	5	5	5	10	4	5
	±	1					1	
Urobilinogen:	0.1	10	5	5	5	10	5	5
Bilirubin:	-	10	5	5	5	10	5	5

Cloudy:-(negligible)

Protein:-(negligible), ±(15~30 mg/dL), +(30 mg/dL), +(100 mg/dL)

Glucose:-(negligible)

Ketone body:-(negligible), ±(5 mg/dL), +(15 mg/dL)

Occult blood:-(negligible)

Urobilinogen:Ehrich unit/dL

Bilirubin:-(negligible)

Significantly different from control(\*\* $p < 0.01$ )

Table 3 Hematological findings of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	End of administration period					End of recovery period	
		0	10	40	150	600	0	600
Male								
	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
	Erythrocyte ( $10^6/\mu\text{L}$ )	840 $\pm$ 31	806 $\pm$ 42	814 $\pm$ 34	824 $\pm$ 18	829 $\pm$ 35	813 $\pm$ 23	876 $\pm$ 53*
	Hemoglobin (g/dL)	16.3 $\pm$ 0.6	16.0 $\pm$ 0.9	15.7 $\pm$ 0.5	15.9 $\pm$ 0.5	15.2 $\pm$ 0.3	15.6 $\pm$ 0.7	15.5 $\pm$ 0.7
	Hematocrit (%)	48.2 $\pm$ 2.1	47.1 $\pm$ 2.5	47.4 $\pm$ 0.7	48.0 $\pm$ 1.6	46.9 $\pm$ 0.7	45.4 $\pm$ 1.0	46.5 $\pm$ 2.1
	MCV (fL)	58 $\pm$ 2	58 $\pm$ 1	58 $\pm$ 2	58 $\pm$ 1	57 $\pm$ 2	56 $\pm$ 1	53 $\pm$ 1**
	MCH (pg)	19.4 $\pm$ 0.5	19.8 $\pm$ 0.6	19.4 $\pm$ 0.4	19.3 $\pm$ 0.4	18.3 $\pm$ 0.8*	19.3 $\pm$ 0.8	17.8 $\pm$ 0.7*
	MCHC (%)	33.8 $\pm$ 0.3	33.9 $\pm$ 0.4	33.2 $\pm$ 0.7	33.1 $\pm$ 0.5	32.3 $\pm$ 0.5**	34.5 $\pm$ 1.0	33.4 $\pm$ 0.5
	Leukocyte ( $10^3/\mu\text{L}$ )	63 $\pm$ 15	63 $\pm$ 11	61 $\pm$ 16	54 $\pm$ 12	37 $\pm$ 9*	77 $\pm$ 18	56 $\pm$ 17
	Differential leukocyte counts (%)							
	Baso.	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Eosin.	2 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1
	Neutro.	12 $\pm$ 5	13 $\pm$ 5	11 $\pm$ 3	9 $\pm$ 4	7 $\pm$ 3	14 $\pm$ 4	13 $\pm$ 7
	Lymph.	85 $\pm$ 6	85 $\pm$ 5	88 $\pm$ 2	89 $\pm$ 4	93 $\pm$ 4	82 $\pm$ 5	83 $\pm$ 7
	Mono.	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 2	0 $\pm$ 1	3 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1
	Other	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Platelet ( $10^4/\mu\text{L}$ )	152 $\pm$ 6	151 $\pm$ 12	159 $\pm$ 18	134 $\pm$ 15	87 $\pm$ 12**	147 $\pm$ 12	143 $\pm$ 30
	Reticulocyte (%)	37 $\pm$ 6	42 $\pm$ 5	41 $\pm$ 3	30 $\pm$ 5	21 $\pm$ 6**	25 $\pm$ 3	24 $\pm$ 3
	PT (sec)	12.9 $\pm$ 0.5	12.8 $\pm$ 0.2	12.7 $\pm$ 0.3	13.2 $\pm$ 0.6	13.9 $\pm$ 0.1*	12.9 $\pm$ 0.3	12.6 $\pm$ 0.2
	APTT (sec)	19.0 $\pm$ 1.9	18.5 $\pm$ 2.7	18.3 $\pm$ 1.1	19.6 $\pm$ 1.8	19.0 $\pm$ 2.9	22.8 $\pm$ 1.6	19.8 $\pm$ 0.9**
Female								
	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
	Erythrocyte ( $10^6/\mu\text{L}$ )	823 $\pm$ 20	803 $\pm$ 52	816 $\pm$ 49	833 $\pm$ 29	815 $\pm$ 37	794 $\pm$ 49	876 $\pm$ 13*
	Hemoglobin (g/dL)	15.7 $\pm$ 0.4	15.8 $\pm$ 0.6	15.4 $\pm$ 0.7	15.8 $\pm$ 0.3	14.6 $\pm$ 0.4**	15.2 $\pm$ 1.1	15.3 $\pm$ 0.6
	Hematocrit (%)	46.5 $\pm$ 0.3	45.7 $\pm$ 1.5	46.6 $\pm$ 2.2	46.7 $\pm$ 1.5	45.7 $\pm$ 2.5	44.4 $\pm$ 2.6	46.7 $\pm$ 1.0
	MCV (fL)	57 $\pm$ 1	57 $\pm$ 2	57 $\pm$ 1	56 $\pm$ 0	56 $\pm$ 1	56 $\pm$ 2	53 $\pm$ 1*
	MCH (pg)	19.1 $\pm$ 0.3	19.7 $\pm$ 1.2	18.8 $\pm$ 0.5	18.9 $\pm$ 0.4	18.0 $\pm$ 0.5*	19.2 $\pm$ 0.6	17.5 $\pm$ 0.7**
	MCHC (%)	33.8 $\pm$ 0.7	34.5 $\pm$ 0.8	32.9 $\pm$ 0.7	33.7 $\pm$ 0.6	32.1 $\pm$ 0.8**	34.2 $\pm$ 0.8	32.9 $\pm$ 0.7*
	Leukocyte ( $10^3/\mu\text{L}$ )	50 $\pm$ 19	52 $\pm$ 15	50 $\pm$ 11	40 $\pm$ 13	23 $\pm$ 7*	48 $\pm$ 20	42 $\pm$ 14
	Differential leukocyte counts (%)							
	Baso.	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Eosin.	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2
	Neutro.	14 $\pm$ 4	11 $\pm$ 7	9 $\pm$ 4	8 $\pm$ 2	13 $\pm$ 7	18 $\pm$ 10	16 $\pm$ 8
	Lymph.	85 $\pm$ 5	87 $\pm$ 7	90 $\pm$ 4	91 $\pm$ 2	86 $\pm$ 6	78 $\pm$ 9	81 $\pm$ 8
	Mono.	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
	Other	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	Platelet ( $10^4/\mu\text{L}$ )	141 $\pm$ 22	153 $\pm$ 14	145 $\pm$ 9	134 $\pm$ 22	85 $\pm$ 15**	135 $\pm$ 8	135 $\pm$ 14
	Reticulocyte (%)	26 $\pm$ 3	26 $\pm$ 4	21 $\pm$ 5	23 $\pm$ 2	22 $\pm$ 8	23 $\pm$ 6	21 $\pm$ 4
	PT (sec)	13.3 $\pm$ 0.6	13.2 $\pm$ 0.3	13.8 $\pm$ 0.6	13.6 $\pm$ 0.2	14.6 $\pm$ 0.6**	12.7 $\pm$ 0.5	13.1 $\pm$ 0.4
	APTT (sec)	17.6 $\pm$ 0.9	16.6 $\pm$ 1.1	16.4 $\pm$ 1.0	18.1 $\pm$ 2.5	18.1 $\pm$ 0.3	17.7 $\pm$ 0.6	17.3 $\pm$ 1.1

Each value is expressed as Mean  $\pm$  S.D.

Baso.: Basophil, Eosin.: Eosinophil, Neutro.: Neutrophil, Lymph.: Lymphocyte, Mono.: Monocyte

Significantly different from control (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table 4 Blood biochemical findings of male rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	End of administration period					End of recovery period	
		0	10	40	150	600	0	600
Male								
	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
	LDH (IU/L)	251 ± 65	421 ± 212	242 ± 41	186 ± 38	134 ± 32*	221 ± 66	296 ± 134
	GOT (IU/L)	71 ± 5	74 ± 9	73 ± 6	70 ± 7	68 ± 6	73 ± 3	78 ± 11
	GPT (IU/L)	30 ± 4	30 ± 3	33 ± 3	28 ± 2	27 ± 6	36 ± 5	38 ± 7
	ALP (IU/L)	761 ± 170	765 ± 148	736 ± 115	650 ± 103	499 ± 79*	591 ± 176	702 ± 120
	γ-GTP (IU/L)	0.73 ± 0.11	0.65 ± 0.27	1.01 ± 0.69	0.76 ± 0.09	0.75 ± 0.17	0.61 ± 0.23	0.64 ± 0.22
	ChE (IU/L)	36 ± 8	49 ± 8	54 ± 24	50 ± 12	67 ± 19	48 ± 15	49 ± 6
	T.protein (g/dL)	5.89 ± 0.12	5.74 ± 0.10	5.77 ± 0.12	5.51 ± 0.20**	5.20 ± 0.17**	5.77 ± 0.23	5.44 ± 0.18*
	Albumin (g/dL)	2.89 ± 0.12	2.84 ± 0.09	2.85 ± 0.15	2.69 ± 0.16	2.59 ± 0.16*	2.85 ± 0.24	2.68 ± 0.18
	A/G ratio	0.96 ± 0.06	0.98 ± 0.06	0.98 ± 0.08	0.95 ± 0.05	0.99 ± 0.06	0.98 ± 0.11	0.97 ± 0.08
	T.cholesterol (mg/dL)	62 ± 19	71 ± 15	74 ± 15	54 ± 12	63 ± 8	61 ± 9	56 ± 12
	Triglyceride (mg/dL)	50 ± 11	61 ± 11	49 ± 26	28 ± 6	26 ± 8*	89 ± 18	66 ± 30
	Glucose (mg/dL)	142 ± 13	155 ± 20	141 ± 15	141 ± 15	140 ± 10	165 ± 14	153 ± 6
	BUN (mg/dL)	13.0 ± 1.0	15.6 ± 2.4	13.5 ± 1.1	14.8 ± 1.8	17.0 ± 3.1*	13.6 ± 1.0	15.8 ± 1.1*
	Creatinine (mg/dL)	0.36 ± 0.01	0.40 ± 0.07	0.42 ± 0.02*	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.51 ± 0.07	0.48 ± 0.13
	T.bilirubin (mg/dL)	0.34 ± 0.04	0.32 ± 0.04	0.34 ± 0.04	0.30 ± 0.01	0.25 ± 0.01*	0.31 ± 0.05	0.31 ± 0.03
	Ca (mg/dL)	10.2 ± 0.3	10.0 ± 0.2	10.1 ± 0.1	9.9 ± 0.1	9.7 ± 0.2**	9.7 ± 0.1	9.3 ± 0.2*
	I.phosphorus (mg/dL)	7.6 ± 0.4	7.8 ± 0.6	8.0 ± 0.4	8.0 ± 0.4	7.8 ± 0.3	7.1 ± 0.4	6.9 ± 0.4
	Na (mEq/L)	148 ± 1	147 ± 1	148 ± 1	146 ± 1	145 ± 1**	145 ± 1	145 ± 0
	K (mEq/L)	5.05 ± 0.15	5.29 ± 0.33	5.17 ± 0.23	5.23 ± 0.22	5.20 ± 0.12	5.05 ± 0.2	5.16 ± 0.17
	Cl (mEq/L)	106 ± 1	107 ± 1	107 ± 1	107 ± 1	107 ± 1	106 ± 2	108 ± 2
Female								
	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
	LDH (IU/L)	202 ± 74	235 ± 57	230 ± 57	178 ± 27	115 ± 10	336 ± 120	393 ± 151
	GOT (IU/L)	70 ± 7	71 ± 9	72 ± 4	62 ± 7	63 ± 4	69 ± 8	81 ± 11
	GPT (IU/L)	28 ± 4	27 ± 6	27 ± 4	20 ± 2*	21 ± 5	29 ± 5	32 ± 7
	ALP (IU/L)	485 ± 97	414 ± 144	459 ± 70	375 ± 56	277 ± 43**	350 ± 49	515 ± 171
	γ-GTP (IU/L)	1.46 ± 0.94	1.26 ± 0.38	1.66 ± 0.39	1.01 ± 0.22	2.01 ± 0.73	1.23 ± 0.39	1.74 ± 0.78
	ChE (IU/L)	367 ± 135	354 ± 91	264 ± 66	297 ± 61	256 ± 102	459 ± 84	266 ± 43**
	T.protein (g/dL)	6.16 ± 0.41	6.14 ± 0.14	5.83 ± 0.23	5.76 ± 0.16	5.30 ± 0.23**	6.42 ± 0.37	5.83 ± 0.50
	Albumin (g/dL)	3.20 ± 0.31	3.08 ± 0.11	2.82 ± 0.26*	3.02 ± 0.14	2.58 ± 0.22**	3.43 ± 0.36	2.91 ± 0.41
	A/G ratio	1.08 ± 0.08	1.01 ± 0.06	0.94 ± 0.13	1.10 ± 0.05	0.95 ± 0.11	1.15 ± 0.13	0.99 ± 0.11
	T.cholesterol (mg/dL)	73 ± 11	85 ± 8	68 ± 14	86 ± 13	71 ± 10	79 ± 14	64 ± 12
	Triglyceride (mg/dL)	22 ± 7	21 ± 6	16 ± 5	21 ± 10	26 ± 10	26 ± 6	32 ± 20
	Glucose (mg/dL)	139 ± 11	127 ± 13	119 ± 8	121 ± 12	127 ± 10	156 ± 10	150 ± 22
	BUN (mg/dL)	17.4 ± 3.4	16.0 ± 3.1	13.9 ± 0.9	16.4 ± 2.0	13.4 ± 2.7	14.5 ± 1.2	17.3 ± 3.6
	Creatinine (mg/dL)	0.45 ± 0.05	0.43 ± 0.05	0.41 ± 0.04	0.46 ± 0.06	0.39 ± 0.03	0.73 ± 0.08	0.74 ± 0.05
	T.bilirubin (mg/dL)	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.04	0.17 ± 0.01**	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.02
	Ca (mg/dL)	10.1 ± 0.3	9.9 ± 0.1	9.7 ± 0.0*	9.9 ± 0.2	9.7 ± 0.0*	9.9 ± 0.4	9.4 ± 0.3*
	I.phosphorus (mg/dL)	7.1 ± 0.7	6.5 ± 0.3	6.8 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.1 ± 0.5	5.7 ± 0.9	5.4 ± 0.4
	Na (mEq/L)	147 ± 2	148 ± 1	149 ± 0	147 ± 2	146 ± 1	147 ± 1	146 ± 1
	K (mEq/L)	5.18 ± 0.21	4.92 ± 0.16	4.98 ± 0.32	5.06 ± 0.07	5.07 ± 0.33	4.59 ± 0.31	5.01 ± 0.24*
	Cl (mEq/L)	108 ± 2	108 ± 2	110 ± 1	110 ± 2	110 ± 1	109 ± 1	108 ± 2

Each value is expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table 5 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	End of administration period					End of recovery period	
		0	10	40	150	600	0	600
Male								
	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
	Body weight (g)	357 ± 30	348 ± 28	362 ± 43	326 ± 16	290 ± 28**	420 ± 10	355 ± 39**
	Absolute weight							
	Brain (g)	1.94 ± 0.07	1.87 ± 0.04	1.99 ± 0.07	1.82 ± 0.08	1.77 ± 0.08**	1.98 ± 0.12	1.88 ± 0.09
	Liver (g)	10.11 ± 1.34	10.24 ± 0.54	10.32 ± 1.32	8.76 ± 0.70	7.32 ± 0.60**	11.97 ± 0.58	9.81 ± 1.12**
	Kidneys (g)	2.75 ± 0.25	2.74 ± 0.27	2.89 ± 0.31	2.54 ± 0.08	2.46 ± 0.28	2.87 ± 0.05	2.57 ± 0.15**
	Spleen (g)	0.70 ± 0.10	0.66 ± 0.06	0.74 ± 0.09	0.61 ± 0.05	0.63 ± 0.10	0.73 ± 0.05	0.63 ± 0.07*
	Heart (g)	1.24 ± 0.08	1.24 ± 0.23	1.21 ± 0.08	1.15 ± 0.04	1.04 ± 0.09*	1.38 ± 0.08	1.30 ± 0.17
	Thymus (g)	0.64 ± 0.14	0.56 ± 0.05	0.61 ± 0.16	0.42 ± 0.04	0.25 ± 0.04**	0.50 ± 0.06	0.34 ± 0.06**
	Thyroids (mg)	25.1 ± 3.0	26.3 ± 3.3	26.1 ± 3.9	25.0 ± 2.4	22.4 ± 1.0	25.2 ± 4.8	25.7 ± 5.2
	Pituitary (mg)	12.6 ± 1.6	11.8 ± 1.6	11.8 ± 0.9	10.8 ± 0.8	9.1 ± 0.6**	11.8 ± 1.3	11.2 ± 0.9
	Adrenals (mg)	58.0 ± 9.6	59.1 ± 10.1	56.0 ± 6.6	52.2 ± 4.9	41.9 ± 4.0**	66.5 ± 8.5	49.8 ± 2.7**
	Testes (g)	3.50 ± 0.33	3.17 ± 0.28	3.49 ± 0.33	3.21 ± 0.20	2.78 ± 0.24**	3.33 ± 0.12	2.47 ± 0.52**
	Epididymides (g)	0.85 ± 0.05	0.89 ± 0.11	0.83 ± 0.08	0.78 ± 0.03	0.68 ± 0.06**	1.05 ± 0.07	0.79 ± 0.09**
	Relative weight							
	Brain (g%)	0.55 ± 0.06	0.54 ± 0.03	0.56 ± 0.07	0.56 ± 0.05	0.62 ± 0.07	0.47 ± 0.02	0.53 ± 0.05*
	Liver (g%)	2.83 ± 0.18	2.95 ± 0.08	2.85 ± 0.05	2.68 ± 0.18	2.53 ± 0.06	2.85 ± 0.10	2.77 ± 0.08
	Kidneys (g%)	0.77 ± 0.04	0.79 ± 0.04	0.80 ± 0.05	0.78 ± 0.06	0.85 ± 0.04	0.68 ± 0.02	0.73 ± 0.07
	Spleen (g%)	0.20 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.03
	Heart (g%)	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.05	0.34 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.33 ± 0.01	0.37 ± 0.01**
	Thymus (g%)	0.18 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.04	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.01**	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.02*
	Thyroids (mg%)	7.1 ± 1.0	7.6 ± 0.8	7.2 ± 0.4	7.7 ± 1.0	7.8 ± 0.7	6.0 ± 1.3	7.2 ± 1.2
	Pituitary (mg%)	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.3	3.3 ± 0.3	3.3 ± 0.3	3.1 ± 0.2	2.8 ± 0.3	3.2 ± 0.2*
	Adrenals (mg%)	16.2 ± 1.5	17.1 ± 3.8	15.5 ± 0.6	16.0 ± 1.0	14.5 ± 1.5	15.8 ± 1.8	14.2 ± 1.2
	Testes (g%)	0.98 ± 0.04	0.91 ± 0.06	0.97 ± 0.13	0.99 ± 0.10	0.97 ± 0.13	0.79 ± 0.04	0.71 ± 0.19
	Epididymides (g%)	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.04
Female								
	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
	Body weight (g)	208 ± 16	213 ± 15	222 ± 15	219 ± 14	201 ± 13	237 ± 15	240 ± 29
	Absolute weight							
	Brain (g)	1.84 ± 0.06	1.78 ± 0.04	1.87 ± 0.10	1.78 ± 0.05	1.77 ± 0.07	1.83 ± 0.06	1.79 ± 0.07
	Liver (g)	5.99 ± 0.62	6.08 ± 0.68	6.22 ± 0.53	6.21 ± 0.43	5.89 ± 0.57	6.58 ± 0.73	6.56 ± 0.90
	Kidneys (g)	1.62 ± 0.21	1.61 ± 0.12	1.77 ± 0.23	1.74 ± 0.12	1.75 ± 0.21	1.65 ± 0.06	1.72 ± 0.13
	Spleen (g)	0.43 ± 0.07	0.49 ± 0.09	0.49 ± 0.07	0.46 ± 0.05	0.38 ± 0.03	0.45 ± 0.05	0.50 ± 0.08
	Heart (g)	0.77 ± 0.11	0.74 ± 0.04	0.83 ± 0.08	0.79 ± 0.05	0.79 ± 0.09	0.84 ± 0.04	0.89 ± 0.11
	Thymus (g)	0.42 ± 0.04	0.43 ± 0.07	0.52 ± 0.11	0.42 ± 0.10	0.25 ± 0.04**	0.40 ± 0.08	0.42 ± 0.10
	Thyroids (mg)	20.8 ± 1.6	19.9 ± 2.4	23.2 ± 2.2	19.4 ± 2.8	19.9 ± 2.0	19.4 ± 2.7	24.7 ± 3.0*
	Pituitary (mg)	13.2 ± 1.0	13.6 ± 1.1	14.0 ± 2.5	12.1 ± 1.1	10.3 ± 1.1*	14.1 ± 1.4	12.0 ± 1.7
	Adrenals (mg)	63.0 ± 12.7	59.0 ± 7.6	65.5 ± 9.8	61.5 ± 6.4	51.1 ± 8.5	62.5 ± 3.9	57.8 ± 2.6
	Ovaries (mg)	84.0 ± 17.9	80.1 ± 10.9	81.6 ± 4.2	83.8 ± 5.3	74.9 ± 17.4	78.7 ± 5.6	86.4 ± 8.9
	Uterus (g)	0.46 ± 0.19	0.44 ± 0.10	0.58 ± 0.18	0.51 ± 0.20	0.39 ± 0.10	0.62 ± 0.14	0.51 ± 0.08
	Relative weight							
	Brain (g%)	0.88 ± 0.09	0.84 ± 0.06	0.84 ± 0.03	0.81 ± 0.04	0.88 ± 0.06	0.77 ± 0.03	0.75 ± 0.11
	Liver (g%)	2.87 ± 0.16	2.84 ± 0.14	2.80 ± 0.10	2.83 ± 0.11	2.93 ± 0.16	2.78 ± 0.24	2.73 ± 0.15
	Kidneys (g%)	0.78 ± 0.08	0.76 ± 0.04	0.79 ± 0.05	0.80 ± 0.03	0.87 ± 0.05*	0.70 ± 0.04	0.72 ± 0.07
	Spleen (g%)	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.03
	Heart (g%)	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.01
	Thymus (g%)	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.04	0.23 ± 0.05	0.19 ± 0.06	0.12 ± 0.02*	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.04
	Thyroids (mg%)	10.0 ± 1.3	9.4 ± 1.5	10.4 ± 0.5	8.9 ± 1.4	9.9 ± 1.2	8.2 ± 1.3	10.3 ± 1.1*
	Pituitary (mg%)	6.4 ± 0.7	6.4 ± 0.3	6.3 ± 0.8	5.5 ± 0.4*	5.1 ± 0.4*	6.0 ± 0.4	5.1 ± 0.9
	Adrenals (mg%)	30.1 ± 5.2	27.7 ± 3.0	29.5 ± 4.4	28.1 ± 2.2	25.6 ± 5.2	26.4 ± 1.8	24.4 ± 3.8
	Ovaries (mg%)	40.1 ± 6.5	37.4 ± 2.8	36.8 ± 2.5	38.3 ± 2.4	37.3 ± 8.3	33.3 ± 2.7	36.2 ± 3.4
	Uterus (g%)	0.22 ± 0.08	0.21 ± 0.05	0.26 ± 0.08	0.23 ± 0.09	0.20 ± 0.04	0.26 ± 0.06	0.22 ± 0.05

Each value is expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table 6 Incidence of histopathological findings of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Organ:	Findings	Dose (mg/kg)	Number of animals	End of administration period					End of recovery period	
					0	10	40	150	600	0	600
					5	5	5	5	5	5	5
Male											
	Liver:	Microgranuloma	-	4	#	#	#	5	#	#	
			+	1	#	#	#	0	#	#	
	Kidney:	Cyst, solitary	-	3	#	#	#	3	#	#	
			+	2	#	#	#	2	#	#	
		Basophilic tubules	-	4	#	#	#	4	#	#	
			+	1	#	#	#	1	#	#	
		Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	-	1	#	#	#	2	#	#	
			+	4	#	#	#	3	#	#	
		Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	-	4	#	#	#	5	#	#	
			+	1	#	#	#	0	#	#	
	Spleen:	Hematopoiesis, extramedullary	-, +	0	2	1	3	5**	0	2	
			++	5	3	4	2	0	5	3	
		Deposit, pigment, brown	-	0	0	0	0	0	0	0	
			+	5	5	5	5	5	5	5	
		Inflammation, capsule	-	5	5	5	4	2	5	4	
			+	0	0	0	1	3	0	1	
	Testis:	Necrosis, seminiferous epithelium	-	5	5	5	3	0	5	0	
			+, ++	0	0	0	2	5**	0	5**	
	Thymus:	Atrophy	-	5	5	5	5	0	5	5	
			+	0	0	0	0	5**	0	0	
		Hemorrhage	-	5	5	4	5	5	4	5	
			+	0	0	1	0	0	1	0	
Female											
	Lung:	Mineralization, artery	-	4	#	#	#	5	#	#	
			+	1	#	#	#	0	#	#	
		Accumulation, foam cell	-	5	#	#	#	4	#	#	
			+	0	#	#	#	1	#	#	
	Liver:	Small granuloma	-	4	#	#	#	4	#	#	
			+	1	#	#	#	1	#	#	
		Necrosis, focal	-	4	#	#	#	4	#	#	
			+	1	#	#	#	1	#	#	
	Kidney:	Cyst, solitary	-	4	#	#	#	3	#	#	
			+	1	#	#	#	2	#	#	
	Spleen:	Hematopoiesis, extramedullary	-	0	#	#	#	0	#	#	
			+	5	#	#	#	5	#	#	
		Deposit, pigment, brown	-	0	#	#	#	0	#	#	
			+	5	#	#	#	5	#	#	
	Uterus:	dilatation, lumen	-	4	#	0/2 <sup>a)</sup>	0/1 <sup>a)</sup>	5	#	#	
			+	1	#	2/2	1/1	0	#	#	
	Thymus:	Atrophy	-	5	5	5	5	0	5	5	
			+	0	0	0	0	5**	0	0	
		Hemorrhage	-	4	4	5	4	5	5	5	
			+	1	1	0	1	0	0	0	

-:Negative, +:Slight, ++:Moderate

#:Not examined, a):Examined the animal with macroscopic abnormalities

Significantly different from control (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

# ジシクロヘキシルアミンの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of Dicyclohexylamine on Bacteria

### 要約

ジシクロヘキシルアミンの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

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

156~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲で濃度を設定(公比2)して行った濃度設定試験では、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の濃度で生育阻害が認められたが、いずれの濃度においても溶媒対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。したがって、本試験は、全菌株とも2500  $\mu\text{g}$ /プレートを最高濃度とし、以下公比2で計6濃度を設定して行った。

試験の結果、濃度設定試験と同様、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において2500  $\mu\text{g}$ /プレート濃度で生育阻害が認められ、また、いずれの濃度においても復帰変異コロニー数は、陰性対照値の2倍を越えなかった。

但し、濃度設定試験および本試験ともに代謝活性化法のTA100で若干の濃度依存的な復帰変異コロニー数の増加傾向が認められたため、確認試験を行った。その結果、復帰変異コロニー数の明らかな増加は認められず、濃度依存性傾向も認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、ジシクロヘキシルアミンは、細菌に対し遺伝子突然変異を誘発しない(陰性)と結論した。

### 方法

#### 1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1)</sup> および *E. coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> の5菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を解冻後、その30  $\mu\text{L}$ をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の菌懸濁液は、濁度を測定し、

濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり $1 \times 10^9$ 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

#### 2. 被験物質

ジシクロヘキシルアミン(ロット番号26281, 関東電化工業(株)提供)は、無色透明の液体で、水に微溶(0.16 g/100 mL)、アルコール、エーテル、ベンゼンおよびアセトンに可溶であり、分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}$ 、分子量181.32、純度99.63% (不純物として、ジシクロヘキシルイミン0.119%を含む)の物質である。

実験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 3. 被験物質供試液の調製

溶媒にアセトン(和光純薬工業(株))を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製した。

#### 4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

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

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

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

AF-2および2-AAはジメチルスルホキシド(株)同仁化学研究所)に、SAおよび9-AAは蒸留水(株)大塚製薬工場)に溶解した。

#### 5. 培地

##### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

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

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g

グルコース	20 g
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

2) アミノ酸添加軟寒天培地(トッパアガー)

0.6%寒天粉末(Difco Laboratories)および0.5%塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、*S. typhimurium*用には0.5 mM D-ビオチンおよび0.5 mM L-ヒスチジン水溶液、*E. coli*用には0.5 mM L-トリプトファン水溶液を1/10容加え、トッパアガーとした。

6. S9 mix

製造後6ヶ月以内のエームテスト用凍結S9 mix(キッコーマン株)を購入し、使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

7. 試験方法

試験は、プレインキュベーション法で行った。

試験管に使用溶媒0.05 mL, 被験物質供試液0.05 mLあるいは陽性対照物質溶液0.1 mLを入れ、次いで直接法では0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を0.5 mL, 代謝活性化法ではS9 mixを0.5 mL加え、続いて試験菌液0.1 mLを分注し、37°Cで20分間振盪培養した。培養終了後、45°Cに保温したトッパアガー2 mLを加えた混合液をプレート上に重層した。37°Cで48時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。プレートは、各濃度とも3枚を使用した。

8. 結果の判定

結果の判定は、各濃度におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、以下の3基準を全て満たす場合を陽性とした。

- 1) 被験物質処理群において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
- 2) 被験物質濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する(濃度依存性)。
- 3) 濃度設定試験および本試験の結果から、復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

結果および考察

156~5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で濃度を設定(公比2)して行った濃度設定試験(Table 1, 2)では、直接法および代謝活性化法ともに、全ての指標菌株において2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の濃度で生育阻害が認められたが、いずれの濃度においても溶媒対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。したがって、本試験における被験物質の処理濃度は、最高濃度を2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、以下公比2で1250, 625, 313, 156および78  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。

本試験の結果(Table 3, 4)は、濃度設定試験と同様、

直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、供試した全ての菌株における復帰変異コロニー数は、溶媒対照値の2倍を越えるものではなかった。また、いずれの菌株においても2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で生育阻害が認められた。

但し、濃度設定試験および本試験ともに代謝活性化法のTA100において、若干の濃度依存的な復帰変異コロニー数の増加傾向が認められたため、1250~2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 間でさらに濃度依存性の復帰変異コロニー数の増加が認められるか否かを調べる目的で750~2500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で濃度を設定(公差250)し、TA100の代謝活性化法による確認試験を行った。その結果(Table 5)、いずれの濃度においても復帰変異コロニー数の明らかな増加は認められず、濃度依存性傾向も認められなかった。また、1500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の濃度では菌の生育阻害が認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、ジシクロヘキシルアミンの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

ジシクロヘキシルアミンの変異原性については、すでに*S. typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537を用いた復帰突然変異試験<sup>9)</sup>およびシリアンハムスター由来のBHK21cl13細胞を用いたトランスフォーメーション試験<sup>1)</sup>で陰性と報告されており、一方、ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験では陽性<sup>9)</sup>と報告されている。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," 1, Vol.3, eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.
- 3) K. Mortelmans, S. Haworth, T. Lawlor, W. Speck, B. Tainer, E. Zeiger, *Environ. Mutagen.*, **8(suppl.7)**, 1(1986).
- 4) 賀田恒夫, 石館基監修, "環境変異原データ集1," サイエンティスト社, 東京, 1980, p. 141.
- 5) International Agency for Research on Cancer (IARC), "IARC Monographs on Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans," suppl.6, World Health Organization, Lyon, 1987, pp. 240-241.

Table 1 Results of reverse mutation test of dicyclohexylamine on bacteria (Dose range finding test)  
[direct method:-S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	121	139	133	12	11	13	19	12	16	19	18	14	6	6	5
	[131 $\pm$ 9]			[ 12 $\pm$ 1]			[ 16 $\pm$ 4]			[ 17 $\pm$ 3]			[ 6 $\pm$ 1]		
156	121	107	133	12	9	12	26	16	10	26	20	18	8	7	7
	[120 $\pm$ 13]			[ 11 $\pm$ 2]			[ 17 $\pm$ 8]			[ 21 $\pm$ 4]			[ 7 $\pm$ 1]		
313	120	134	141	7	10	14	15	17	16	15	19	22	7	6	4
	[132 $\pm$ 11]			[ 10 $\pm$ 4]			[ 16 $\pm$ 1]			[ 19 $\pm$ 4]			[ 6 $\pm$ 2]		
625	110	119	112	10	11	12	18	10	16	19	15	21	8	10	7
	[114 $\pm$ 5]			[ 11 $\pm$ 1]			[ 15 $\pm$ 4]			[ 18 $\pm$ 3]			[ 8 $\pm$ 2]		
1250	125	121	118	10	11	11	12	16	15	12	11	13	5	3	4
	[121 $\pm$ 4]			[ 11 $\pm$ 1]			[ 14 $\pm$ 2]			[ 12 $\pm$ 1]			[ 4 $\pm$ 1]		
2500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]		
5000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]		
Positive control	829	964	904 <sup>a)</sup>	287	332	360 <sup>b)</sup>	888	934	948 <sup>c)</sup>	385	355	381 <sup>d)</sup>	731	819	739 <sup>e)</sup>
	[899 $\pm$ 68]			[326 $\pm$ 37]			[923 $\pm$ 31]			[374 $\pm$ 16]			[763 $\pm$ 49]		

\*: Toxic effect was observed.

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$ b):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): AF-2, 0.04  $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 2 Results of reverse mutation test of dicyclohexylamine on bacteria (Dose range finding test)  
[activation method:+S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	108	116	128	10	9	13	19	21	14	31	27	33	12	11	10
	[117 $\pm$ 10]			[ 11 $\pm$ 2]			[ 18 $\pm$ 4]			[ 30 $\pm$ 3]			[ 11 $\pm$ 1]		
156	120	121	125	10	13	15	23	23	24	33	28	30	14	11	12
	[122 $\pm$ 3]			[ 13 $\pm$ 3]			[ 23 $\pm$ 1]			[ 30 $\pm$ 3]			[ 12 $\pm$ 2]		
313	126	122	115	8	11	10	15	14	14	33	30	41	11	9	14
	[121 $\pm$ 6]			[ 10 $\pm$ 2]			[ 14 $\pm$ 1]			[ 35 $\pm$ 6]			[ 11 $\pm$ 3]		
625	134	147	135	17	10	8	17	17	14	37	42	45	15	9	14
	[139 $\pm$ 7]			[ 12 $\pm$ 5]			[ 16 $\pm$ 2]			[ 41 $\pm$ 4]			[ 13 $\pm$ 3]		
1250	165	143	168	10	10	11	15	21	20	37	33	40	15	17	15
	[159 $\pm$ 14]			[ 10 $\pm$ 1]			[ 19 $\pm$ 3]			[ 37 $\pm$ 4]			[ 16 $\pm$ 1]		
2500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	21*	13*	16*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 17 $\pm$ 4]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]		
5000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]		
Positive control	536	638	543 <sup>a)</sup>	196	193	211 <sup>b)</sup>	896	934	1001 <sup>c)</sup>	210	222	235 <sup>a)</sup>	86	80	76 <sup>b)</sup>
	[572 $\pm$ 57]			[200 $\pm$ 10]			[944 $\pm$ 53]			[222 $\pm$ 13]			[ 81 $\pm$ 5]		

\*: Toxic effect was observed.

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$



Table 3 Results of reverse mutation test of dicyclohexylamine on bacteria [direct method:-S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	127	119	110	11	13	15	20	14	22	27	27	26	7	8	6
	[119 $\pm$ 9]			[ 13 $\pm$ 2]			[ 19 $\pm$ 4]			[ 27 $\pm$ 1]			[ 7 $\pm$ 1]		
78	122	117	131	8	12	8	20	13	21	31	32	25	5	4	6
	[123 $\pm$ 7]			[ 9 $\pm$ 2]			[ 18 $\pm$ 4]			[ 29 $\pm$ 4]			[ 5 $\pm$ 1]		
156	107	108	107	8	11	15	16	19	15	21	20	15	7	7	7
	[107 $\pm$ 1]			[ 11 $\pm$ 4]			[ 17 $\pm$ 2]			[ 19 $\pm$ 3]			[ 7 $\pm$ 0]		
313	112	124	126	12	10	15	15	13	13	25	21	30	8	7	5
	[121 $\pm$ 8]			[ 12 $\pm$ 3]			[ 14 $\pm$ 1]			[ 25 $\pm$ 5]			[ 7 $\pm$ 2]		
625	103	125	115	8	10	10	11	10	14	25	21	22	10	7	7
	[114 $\pm$ 11]			[ 9 $\pm$ 1]			[ 12 $\pm$ 2]			[ 23 $\pm$ 2]			[ 8 $\pm$ 2]		
1250	106	116	107	10	9	11	15	15	11	21	18	19	5	6	4
	[110 $\pm$ 6]			[ 10 $\pm$ 1]			[ 14 $\pm$ 2]			[ 19 $\pm$ 2]			[ 5 $\pm$ 1]		
2500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	1*	9*	12*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 7 $\pm$ 6]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]		
Positive control	1014	964	917 <sup>a)</sup>	426	421	394 <sup>b)</sup>	943	925	1011 <sup>c)</sup>	420	391	392 <sup>d)</sup>	856	868	994 <sup>e)</sup>
	[965 $\pm$ 49]			[414 $\pm$ 17]			[960 $\pm$ 45]			[401 $\pm$ 16]			[906 $\pm$ 76]		

\*: Toxic effect was observed.

a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b) : NaN<sub>3</sub>; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

c) : AF-2, 0.04  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) : AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e) : 9-AA; 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4 Results of reverse mutation test of dicyclohexylamine on bacteria [activation method:+S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	113	106	117	13	12	12	20	21	17	34	38	33	10	17	14
	[112 $\pm$ 6]			[ 12 $\pm$ 1]			[ 19 $\pm$ 2]			[ 35 $\pm$ 3]			[ 14 $\pm$ 4]		
78	117	112	119	13	10	13	18	22	17	30	43	38	10	19	12
	[116 $\pm$ 4]			[ 12 $\pm$ 2]			[ 19 $\pm$ 3]			[ 37 $\pm$ 7]			[ 14 $\pm$ 5]		
156	113	114	123	16	14	8	14	12	19	30	34	37	14	15	16
	[117 $\pm$ 6]			[ 13 $\pm$ 4]			[ 15 $\pm$ 4]			[ 34 $\pm$ 4]			[ 15 $\pm$ 1]		
313	124	125	141	11	12	12	23	14	16	39	41	46	10	13	17
	[130 $\pm$ 10]			[ 12 $\pm$ 1]			[ 18 $\pm$ 5]			[ 42 $\pm$ 4]			[ 13 $\pm$ 4]		
625	136	128	136	8	15	14	17	19	12	36	36	42	15	17	13
	[133 $\pm$ 5]			[ 12 $\pm$ 4]			[ 16 $\pm$ 4]			[ 38 $\pm$ 3]			[ 15 $\pm$ 2]		
1250	125	144	149	12	11	4	21	19	12	30	33	28	12	9	13
	[139 $\pm$ 13]			[ 9 $\pm$ 4]			[ 17 $\pm$ 5]			[ 30 $\pm$ 3]			[ 11 $\pm$ 2]		
2500	0*	0*	0*	5*	3*	5*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	3*	0*
	[ 0 $\pm$ 0]			[ 4 $\pm$ 1]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 0 $\pm$ 0]			[ 1 $\pm$ 2]		
Positive control	590	514	502 <sup>a)</sup>	237	276	242 <sup>b)</sup>	907	965	901 <sup>c)</sup>	272	278	294 <sup>a)</sup>	85	83	79 <sup>b)</sup>
	[535 $\pm$ 48]			[252 $\pm$ 21]			[924 $\pm$ 35]			[281 $\pm$ 11]			[ 82 $\pm$ 3]		

\*: Toxic effect was observed.

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b) : 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) : 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 5 Results of reverse mutation test of dicyclohexylamine on bacteria (Confirmative test)  
[activation method: +S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate					[Mean $\pm$ S.D.]
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
0	134 135 128 [132 $\pm$ 4]	-	-	-	-	
750	155 166 170 [164 $\pm$ 8]	-	-	-	-	
1000	176 170 139 [162 $\pm$ 20]	-	-	-	-	
1250	129 146 147 [141 $\pm$ 10]	-	-	-	-	
1500	127* 130* 127* [128 $\pm$ 2]	-	-	-	-	
1750	137* 149* 138* [141 $\pm$ 7]	-	-	-	-	
2000	144* 189* 137* [157 $\pm$ 28]	-	-	-	-	
2250	115* 135* 136* [129 $\pm$ 12]	-	-	-	-	
2500	12* 8* 17* [ 12 $\pm$ 5]	-	-	-	-	
Positive control	609 693 593 <sup>a)</sup> [632 $\pm$ 54]	-	-	-	-	

\*: Toxic effect was observed. -: Not tested.

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$

連絡先

試験責任者：野田 篤  
試験担当者：野田 篤, 昆 尚美  
(財)畜産生物科学安全研究所  
〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11  
Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)  
Naomi Kon  
Research Institute for Animal Science in  
Biochemistry and Toxicology  
3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi,  
kanagawa, 229-1132, Japan  
Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

ジシクロヘキシルアミンの  
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

*In Vitro* Chromosomal Aberration Test of  
Dicyclohexylamine on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

ジシクロヘキシルアミンの染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL)を用いて *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、細胞増殖抑制試験を行った結果、連続処理法の場合は、24時間および48時間処理でそれぞれ400および250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上、短時間処理法の場合は、S9 mix非存在および存在下でそれぞれ600および1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で、50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。したがって、染色体異常試験における濃度は、連続処理法の場合100, 200, 250, 300, 400および500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法の場合100, 200, 400, 600, 800および1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とした。

試験の結果、連続処理法においては、染色体異常を有する細胞の増加は認められなかった。48時間処理の400および500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度では、細胞に対する毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。一方、短時間処理法においては、S9 mix非存在下で細胞に対する毒性のため観察可能な分裂中期像が認められなかった高濃度を除く100~600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のうち600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度でのみ染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度10.0%)が認められた。S9 mix存在下では、800および1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度で染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度13.5および31.0%)が認められ、600~1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  間では濃度依存性傾向も認められた。

以上の成績から、本実験条件下において、ジシクロヘキシルアミンは、CHL細胞に対し染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL) [国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部(元: 国立衛生試験所 変異原性部)から昭和60年1月13日入手] を使用した。供試細胞は、浮遊細胞液に10%の割合でジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業(株))を添加し、液体窒素条件下で保存しておいたものを培養液に戻し、解凍後の継代数が4回までのものを使用した。

2. 培養液

Eagle-MEM粉末培地(Gibco Laboratories)を常法に従

い調製し、これに非働化仔牛血清(Gibco Laboratories)を10%の割合で添加したものをを用いた。

3. 培養条件

$4 \times 10^3$ 個/mLの細胞を含む培養液5 mLをシャーレ(径6 cm, Becton Dickinson Co.)に加え、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。

連続処理法では、培養開始3日後に被験物質供試液を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理法では、培養開始3日後にS9 mix非存在および存在下で6時間処理し、処理終了後、新鮮培養液でさらに18時間培養した。

4. S9 mix

製造後6ヶ月以内の染色体異常試験用凍結S9 mix(キッコマン(株))を購入し、使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

5. 被験物質

ジシクロヘキシルアミン(ロット番号26281, 関東電化工業(株)提供)は、無色透明の液体で、水に微溶(0.16 g/100 mL)、アルコール、エーテル、ベンゼンおよびアセトンに可溶であり、分子式C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>N, 分子量181.32, 純度99.63% (不純物として、ジシクロヘキシルイミン0.119%を含む)の物質である。

実験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質供試液の調製

溶媒にアセトン(和光純薬工業(株))を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製し、そのシャーレ内への添加量は培養液量の1.0% (v/v)とした。

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。0.1%クリスタルバイオレット水溶液で染色した細胞の密度を単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業(株))を用いて測定し、溶媒対照群の細胞増殖率を100%とした時の各濃度群の細胞増殖率を求めた。

その結果(Appendix 1, 2), 連続処理法の場合は, 24時間処理で400 µg/mL以上, 48時間処理では250 µg/mL以上の濃度で, 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ, 50%細胞増殖抑制濃度は, それぞれ300~400 µg/mL間および200~250 µg/mL間にあるものと判断された。

短時間処理法の場合は, S9 mix非存在および存在下でそれぞれ600および1000 µg/mL以上の濃度で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ, 50%細胞増殖抑制濃度は, それぞれ400~600 µg/mL間および800~1000 µg/mL間にあるものと判断された。

Appendix 1 Cell growth inhibition test of CHL cells continuously treated with dicyclohexylamine without S9 mix

Concentration (µg/mL)	Average cell growth rate (%)	
	24-hour treatment	48-hour treatment
0(Solvent)	100	100
100	99.5	86.5
150	-	73.5
200	77.0	60.5
250	-	43.5
300	65.0	36.0
350	-	18.5
400	44.0	-
500	42.0	-
600	34.0	-

-: not tested

Appendix 2 Cell growth inhibition test of CHL cells treated with dicyclohexylamine with and without S9 mix

Concentration (µg/mL)	Average cell growth rate (%)	
	without S9 mix	with S9 mix
0(Solvent)	100	100
400	79.5	90.0
600	34.0	79.0
800	11.0	60.0
1000	3.5	35.0
1200	3.0	8.5
1400	4.0	7.0

### 8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果から, 染色体異常試験における被験物質の濃度は, 50%細胞増殖抑制濃度の前後が含まれ, かつ3濃度以上のデータが得られることを考慮して, 連続処理法では100, 200, 250, 300, 400および500 µg/mL, 短時間処理法では100, 200, 400, 600, 800および1000 µg/mLの各6濃度を設定した。対照として, 溶媒

対照群と陽性対照群を設けた。

陽性対照として, 連続処理法では*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG, Sigma Chemical Co.)を2.5 µg/mL, 短時間処理法では3,4-benzo [a] pyrene(B [a] P, Sigma Chemical Co.)を10 µg/mLの濃度で用いた。陽性対照物質の溶媒には, いずれもDMSO(和光純薬工業株)を使用した。

### 9. 染色体標本の作製

培養終了2時間前にコルセミド(Gibco Laboratories)を最終濃度として0.2 µg/mLとなるように添加した。トリプシン処理で細胞を剥離し, 遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理後, 用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後, 1.4%ゴムザ液で約15分間染色した。スライド標本は, 各シャーレにつき3枚作製した。

### 10. 染色体の観察

各シャーレ当たり100個, すなわち, 1濃度当たり2シャーレ, 200個の分裂中期像を, 総合倍率600倍の顕微鏡下で観察した。標本は全てコード化し, 盲検法で観察を行った。染色体の分析は, 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(MMS)による分類法<sup>1)</sup>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と倍数性細胞(Polyploid)の有無について観察した。

### 11. 記録と判定

観察した細胞数, 構造異常の種類と数および倍数性細胞の数について集計し, 構造異常を有する細胞については, ギャップのみを有する細胞を含めた場合(+g)と含めない場合(-g)とに区別して記録した。

ギャップを含めた染色体構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度について, 多試料 $\chi^2$ 検定を行い有意差(有意水準5%以下)が認められた場合は, フィッシャーの直接確率法を用いて溶媒対照群と各濃度群との間の有意差検定(有意水準は多重性を考慮して, 5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた)を行った。

その結果, 溶媒対照群と比較して, 被験物質による染色体異常細胞の出現頻度が2濃度以上で有意に増加し, かつ濃度依存性あるいは再現性が認められた場合, 陽性と判定した。

### 結果および考察

連続処理法による結果をTable 1に示した。ジシクロヘキシルアミンを加えて24時間および48時間処理したいずれの濃度群においても, 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。

短時間処理法による結果をTable 2に示した。S9 mix非存在下では, 600 µg/mL濃度で染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度10.0%)が認められた。S9 mix存

在下においては、800および1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度13.5および31.0%)が認められ、600~1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間では濃度依存性傾向も認められた。S9 mix非存在および存在下ともに、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

なお、連続処理法48時間処理の400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上および短時間処理法S9 mix非存在下の800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では、被験物質の細胞に対する毒性のため、観察可能な分裂中期像が認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、ジシクロヘキシルアミンのCHL細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。本試験結果は、CHL細胞において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が10%以上を陽性とする生物学的判定基準<sup>2)</sup>からみても明らかに陽性を示すものであった。陽性結果が得られたため、 $D_{20}$ 値<sup>3)</sup>(分裂中期像の20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の濃度)を算出したところ、本被験物質の $D_{20}$ 値は、短時間処理法において0.96 mg/mLであった。

ジシクロヘキシルアミンの変異原性については、すでにヒトリンパ球を用いた染色体異常試験においても陽性<sup>4)</sup>と報告されており、一方、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537を用いた復帰突然変異試験<sup>5)</sup>およびシリアンハムスター由来のBHK21cl13細胞を用いたトランスフォーメーション試験<sup>6)</sup>では陰性と報告されている。

## 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) 石館基監修, “改定増補 染色体異常試験 データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 19.
- 3) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, “化審法毒性試験法の解説 改訂版,” 化学工業日報社, 東京, 1992, pp. 51-52.
- 4) International Agency for Research on Cancer (IARC), “IARC Monographs on Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans,” suppl. 6, World Health Organization, Lyon, 1987, pp. 240-241.
- 5) K. Mortelmans, S. Haworth, T. Lawlor, W. Speck, B. Tainer, E. Zeiger, *Environ. Mutagen.*, **8**(suppl.7), 1(1986).
- 6) 賀田恒夫, 石館基監修, “環境変異原データ集1,” サイエンティスト社, 東京, 1980, p. 141.

## 連絡先

試験責任者:野田 篤  
 試験担当者:野田 篤, 昆 尚美  
 (財)畜産生物科学安全研究所  
 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11  
 Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

## Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)  
 Naomi Kon  
 Research Institute for Animal Science in  
 Biochemistry and Toxicology  
 3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi,  
 kanagawa, 229-1132, Japan  
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with dicyclohexylamine without S9 mix

Group	Concentration (μg/mL)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0	-	-
DCHA	100	24	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0	-	-
	200	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0	-	-
	250	24	200	0	0	2	1	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0	-	-
	300	24	200	1	1	0	0	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0	-	-
	400	24	200	1	0	2	0	0	0	3	2 (1.0)	3 (1.5)	0	-	-
	500	24	200	0	2	2	1	0	0	5	3 (1.5)	3 (1.5)	0	-	-
MNNG	2.5	24	200	3	15	182	2	0	0	202	183 (91.5)	183 (91.5)**	0	+	-
Solvent	0	48	200	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0	-	-
DCHA	100	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0 (0)	1 (0.5)	0	-	-
	200	48	200	0	0	2	0	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0	-	-
	250	48	200	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0	-	-
	300	48	200	0	0	0	1	1	0	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0	-	-
	400	48	Toxic												
	500	48	Toxic												
MNNG	2.5	48	200	3	33	152	19	7	0	214	164 (82.0)	164 (82.0)**	0.5	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, DCHA: Dicyclohexylamine, MNNG: N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine  
 1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample  $\chi^2$  test was done at  $p < 0.05$ , and then Fisher's exact test was done at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ .  
 \*\*: Significantly different from solvent group data at  $p < 0.01$  by Fisher's exact test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with dicyclohexylamine with and without S9 mix

Group	Concentration (μg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	2	0	1	0	0	0	3	1 (0.5)	3 (1.5)	0	-	-
DCHA	100	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0	-	-
	200	-	6-(18)	200	1	0	0	1	1	0	3	1 (0.5)	2 (1.0)	0	-	-
	400	-	6-(18)	200	0	0	3	0	2	0	5	5 (2.5)	5 (2.5)	1.5	-	-
	600	-	6-(18)	200	2	3	18	4	0	0	27	19 (9.5)	20 (10.0)**	0	+	-
	800	-	6-(18)	Toxic												
	1000	-	6-(18)	Toxic												
BP	10	-	6-(18)	200	0	1	0	1	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0 (0)	1 (0.5)	0	-	-
DCHA	100	+	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0	-	-
	200	+	6-(18)	200	2	0	1	0	0	0	3	1 (0.5)	3 (1.5)	0	-	-
	400	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	1.0	-	-
	600	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	1.0	-	-
	800	+	6-(18)	200	1	10	26	2	1	0	40	27 (13.5)	27 (13.5)**	0.5	+	-
	1000	+	6-(18)	200	7	35	57	16	0	0	115	60 (30.0)	62 (31.0)**	0	+	-
BP	10	+	6-(18)	200	8	13	103	1	3	0	128	108 (54.0)	113 (56.5)**	0	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, DCHA: Dicyclohexylamine, BP: benzo[a]pyrene  
 1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample  $\chi^2$  test was done at  $p < 0.05$ , and then Fisher's exact test was done at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ .  
 \*\*: Significantly different from solvent group data at  $p < 0.01$  by Fisher's exact test.

# ジシクロヘキシルアミンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

## Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Dicyclohexylamine in Rats

### 要約

ジシクロヘキシルアミンの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系(Crj:CD)ラットを用いて実施した。投与量は、雌雄いずれも0(溶媒対照群)、20、70および200 mg/kgとした。雌雄とも溶媒対照群および200 mg/kg投与群では1群13例、20および70 mg/kg投与群では1群5例を使用し、このうち溶媒対照群の雌雄各5例および200 mg/kg投与群の雌雄各2例については14日間の回復試験を行った。一方、投与期間終了時に生存していた溶媒対照群ならびに200 mg/kg投与群の一部の動物については、神経系の病理組織学検査に使用した。その結果、以下の成績を得た。

雌雄とも200 mg/kg投与群の13例中8例で死亡がみられ、雄では投与第11日から、雌では投与第4日から、それぞれ投与期間終了まで断続的に認められた。雄の死亡動物のうち1例の病理組織学検査では、広汎な心筋変性がみられたが、他の死亡動物においては同様の変化はみられず、他の器官においても異常は認められなかった。

一般状態の変化として、雌雄とも200 mg/kg投与群で流涎や痙攣、姿勢の異常、散瞳、呼吸異常、異常発声等の神経症状がみられ、70 mg/kg投与群では雌雄で流涎が、雄で痙攣が認められた。これらの神経症状は投与期間の終了とともに消失した。ジシクロヘキシルアミンには、交感神経終末におけるノルアドレナリンの再吸収阻害作用が認められており<sup>1-3)</sup>、本試験においてみられた一般状態の変化および死亡の原因は、交感神経の過剰な興奮によるものと推察される。

200 mg/kg投与群の雌および雄では、体重ならびに摂餌量が溶媒対照群と比較して低値を示した。体重の低値は投与期間終了後も継続したが、摂餌量は休薬とともに回復した。

投与期間終了時の血液学検査では、200 mg/kg投与群の雌の白血球数が増加した。

投与期間終了時の血液生化学検査では、200 mg/kg投与群の雌雄で無機リンおよびカルシウム濃度の上昇が認められ、リン・カルシウム代謝に対するジシクロヘキシルアミン投与の影響が疑われた。

投与期間終了時の剖検において、副腎重量の増加が200 mg/kg投与群の雌雄で、卵巣重量の減少が70 mg/kg以上の投与群で観察された。200 mg/kg投与群では多数の死亡がみられ、また重度の神経症状の発現あるいは全身状態の悪化などが認められたことから、著しい症状の継続的発現によるストレス負荷により、コルチコ

トロンピン放出因子の分泌が増加し、これらの器官重量に変化を及ぼしている可能性が示唆された。

以上の結果、本試験条件下におけるジシクロヘキシルアミンの無影響量(NOEL)は、雌雄とも20 mg/kgであると判断した。

### 方法

#### 1. 被験物質および投与検体の調製

被験物質として、関東電化工業(株)より提供されたジシクロヘキシルアミン〔ロット番号:26281,無色透明液体,融点:-0.1℃,沸点:255.8℃,純度:99.63 wt%〕を用い、入手後、遮光条件下に室温にて保管した。

被験物質を40.0 mg/mLの濃度になるよう、コーン油〔ロット番号:V6N3521,ナカライテスク(株)〕に溶解し、さらにこの40.0 mg/mL液を14.0および4.0 mg/mLの濃度に段階希釈した後、投与時まで冷暗所で保管した。調製された検体は、調製後6日以内に使用した。なお、調製検体の安定性試験および含量試験を実施した結果、1.00および100 mg/mLコーン油溶液の被験物質は、冷暗所で7日間は安定であり、また、投与検体中の被験物質の平均含量は、所定濃度の107~109%であることが確認された。

#### 2. 動物および飼育方法

生後4週で購入した雌雄のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD;SPF,日本チャールス・リバー(株))を9日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各36匹を試験に供した。動物は、全飼育期間を通じて、温度24.0~24.6℃,湿度46~63%,換気回数約15回/時間,照明時間12時間(7~19時点灯)に制御された飼育室内で、金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2,日本クレア(株)製)および水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。

#### 3. 群および群分け

投与量は、本試験開始前に予備試験として秦野研究所で実施した、ジシクロヘキシルアミンのラットにおける7日間反復経口投与毒性試験の成績を参考にして決定した。即ち、雄のSprague-Dawley系ラットに、ジシクロヘキシルアミンを0,50,100,250および500 mg/kgの用量で7日間反復投与した結果、500 mg/kgを投与したラット5例全例、250 mg/kgを投与したラット5例中4例が1週間の投与期間内に死亡し、これらの用量は最大耐量



を超える量と判断した。一方、100 mg/kgを投与したラットでは、体重、一般状態、剖検所見等に何ら毒性変化は認められなかった。この結果から、本試験における最高用量は100から250 mg/kgの範囲内で設定することが適切であると判断し、同一週齢の雄ラット各5例に被験物質の150ならびに200 mg/kgを7日間投与して確認した。その結果、200 mg/kgが最高用量として適当であると判断し、以下公比約3で除し、中ならびに低用量には70および20 mg/kgを設定した。なお、雌雄とも溶媒対照群にはコーン油を経口投与した。

群分けは、検疫期間中に異常のない動物の中から、投与開始前日の体重に基づいて、体重別層化無作為抽出法により行った。動物数は、溶媒対照群および200 mg/kg投与群では雌雄各13匹とし、20および70 mg/kg投与群では各5匹の動物を用いた。また、溶媒対照群の雌雄各5匹および200 mg/kg投与群の雌雄各2匹を、投与期間終了後、14日間の回復試験に用いた。一方、溶媒対照群および200 mg/kg投与群の各13匹中3匹を投与期間終了時に神経系の病理組織学検査を行う動物として、一般状態の観察ならびに病理組織学検査を実施した。これらの病理組織学検査対象動物のうち、投与期間中に溶媒対照群の雄の1例、200 mg/kg投与群の雌雄各2例が死亡したため、残りの動物を投与期間終了時に、0.1 Mリン酸緩衝1.25%グルタルアルデヒド2%パラホルムアルデヒド固定液で灌流固定し、脳、脊髄および坐骨神経の一部を電子顕微鏡用樹脂包埋し、病理組織学的に検査した。これらの神経系の病理組織学検査の結果、被験物質投与によると考えられる異常は認められなかった。

#### 4. 投与方法

投与経路は、化審法ガイドライン「ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験」に従い経口投与とした。

投与は、1日1回、28日間、毎日9時～12時の間に、ラット用胃管を用いて強制的に行い、投与量は、雌雄とも5 mL/kgとして、各投与時に最も近い時点で測定された体重に基づいて個別に算出した。

#### 5. 検査項目

##### 1) 一般状態の観察

投与期間および回復試験期間を通じて、毎日、死亡例の有無を調べた。また、生存動物全例について、一般状態を投与期間中は毎日、投与前および投与後の1日2回(回復試験期間中は1回)観察した。

##### 2) 体重および摂餌量の測定

投与開始週では投与開始直前と投与第4日、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は1週に2回の頻度で、生存動物全例について体重を測定し、投与期間あるいは回復試験期間終了日および剖検日にも体重の測定を行った。また、投与開始週では投与開始日に、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は1週に1回の頻度で、生存動物全例について1日当たりの摂餌量の測定を行った。

##### 3) 尿検査

投与期間終了週(投与第26日)に、溶媒対照群ならびに70 mg/kg以下の被験物質投与群では雌雄とも各5匹を、200 mg/kg投与群では検査日まで生存していた雌雄各4匹を選択し、また回復試験期間終了週(回復第12日)には回復試験を行った動物全例を、いずれも約24時間代謝ケージに収容して採尿し、尿量〔天秤で計量(尿重量を比重で除す)〕、色調および混濁(視診)、比重〔重量法、使用天秤(AE200, メトラー)〕、ナトリウム濃度、カリウム濃度および塩素濃度(イオン電極法、全自動電解質分析装置EA05, A&T)について検査した。なお、pH、潜血、蛋白質、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンおよび沈渣の検査は、代謝ケージに収容して4時間以内に採取した尿について、試験紙法(マルティスティックス/クリニテック 200, バイエル三共)および鏡検(光学顕微鏡)によって実施した。

##### 4) 血液学検査

投与期間終了時および回復試験期間終了時の剖検に先立ち、全例について、18ないし24時間絶食させたのち、ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりEDTA 2Kを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter(Model S-PLUS IV, コールターエレクトロニクス)により赤血球数(電気抵抗法)、白血球数(電気抵抗法)、血色素量(吸光度法)、平均赤血球容積(電気抵抗法)、および血小板数(電気抵抗法)を測定し、これらを基に平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度およびヘマトクリット値を算出した。また、血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)および網状赤血球比率(Brecher法)を求めた。さらに、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の測定には、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液を用いて、光散乱検出法(CA-3000, 東亜医用電子株)により測定した。

##### 5) 血液生化学検査

前述の血液学検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血しそれぞれ血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロシュ)により、総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD・DOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ・G6PDH法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼGl-DH法)、クレアチニン濃度(Jaffé法)、アルカリフォスファターゼ活性(パラニトロフェニルリン酸基質法)、GOT活性(SSCC法)、GPT活性(SSCC法)、LDH活性(Wröblewski-La Due法)、カルシウム濃度(OCPC法)、無機リン濃度(モリブデン酸直接法)、トリグリセライド濃度(GPO・DAOS法)、 $\gamma$ -GTP活性( $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)、A/G比(総蛋白濃度およびアルブミン濃度より算出)を測定した。また、全自動電解質分析装置(EA05, A&T)により、ナトリウム濃度(イオン電極法)、カリウム濃度(イオン電極法)、塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

## 6) 病理学検査

上記の採血に引き続き、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、肝臓、腎臓、副腎、精巣または卵巣の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、脳、脊髄、下垂体、眼球、ハーダー腺、甲状腺(上皮小体を含む)、顎下腺(舌下腺を含む)、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、精巣または卵巣、精嚢腺、膀胱、前立腺、骨髄(大腿骨)、坐骨神経、骨格筋(下腿部)および病変部については、0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン液(pH 7.2)で固定した。病理組織学検査は、投与期間終了時ならびに回復試験期間終了時に剖検した雄の全動物の心臓、200 mg/kg投与群ならびに溶媒対照群の脳、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、坐骨神経、下垂体および卵巣について、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して実施した。また、投与期間終了時および回復試験期間終了時の剖検時に、肉眼的に異常が認められた動物の病変部についても実施した。

## 6. 統計処理法

体重、摂餌量、尿検査(半定量検査を除く)、血液学検査、血液生化学検査ならびに器官重量で得られた値をもとにして、各群ごとに平均および標準偏差を求めた。また、1群の例数が3例以上の群が溶媒対照群を含め3群ある場合は、Bartlettの方法による分散の一樣性の検定(有意水準:5%)を行い、ついで、分散が一樣な場合は、一元配置型の分散分析を行い、有意(有意水準:5%)の時はDunnnettあるいはSchefféの方法で多重比較を行った。一方、分散が一樣でない場合はKruskal-Wallisの順位検定を行い、有意(有意水準:5%)ならばDunnnett型あるいはScheffé型の方法で多重比較を行った。さらに、病理組織所見については、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、溶媒対照群と各被験物質投与群との間の有意差検定を行った(有意水準:5%)。200 mg/kg投与群の雌雄の、半定量検査を除く尿検査、血液学検査および血液生化学検査結果、器官重量測定値ならびに回復期間中の体重および摂餌量は、平均値のみを求め、検定は行わなかった。

## 結果

## 1. 一般状態

神経の病理組織学的検討を行った動物を除く、溶媒対照群および200 mg/kg投与群の雌雄各10例、20および70 mg/kg投与群の雌雄各5例のうち、200 mg/kg投与群の雄では投与第11日から、雌では投与第4日から死亡が発現し、投与期間終了まで各10例中6例が死亡した。流涎が70 mg/kg以上の投与群の雌雄で、痙攣が70 mg/kg以上の投与群の雄ならびに200 mg/kg投与群の雌でみられた。さらに、200 mg/kg投与群では姿勢の異常、自発

運動の低下、異常発声、呼吸異常、被毛の汚染および散瞳が雌雄で、挙尾が雄で、振戦、立毛および紅涙が雌で認められた。200 mg/kg投与群の雌で認められた被毛汚染は回復第6日まで継続したが、他の症状は回復試験期間中には認められなかった。溶媒対照群の雄の1例では潰瘍ならびに痂皮形成が投与期間中に認められ、回復試験期間終了まで継続したが、用量依存性の認められない変化であった。

中枢神経の病理組織学的検討を実施した動物のうち、200 mg/kg投与群の雄では流涎、痙攣、姿勢の異常、自発運動の低下、被毛の汚染および散瞳がみられ、3例のうち2例が死亡した。同群の雌では雄でみられた症状の他、振戦、紅涙および立毛がみられ、3例中2例が死亡した。溶媒対照群の雄の1例は、投与期間中に死亡したが、剖検の結果、肺全葉の暗赤色、無気域が認められ、病理組織学検査の結果、肺の出血と浮腫が認められたことから、投与過誤による死亡と判断した。

## 2. 体重(Fig. 1)

投与開始後、200 mg/kg投与群の雌雄では、体重が溶媒対照群の値を下回り、雄では投与第8日以降投与期間終了時剖検まで継続的に、雌では投与第4、25および28日に、それぞれ溶媒対照群に比較して有意差が認められた。体重は、雌雄とも投与期間終了後も継続して低値を示した。70 mg/kg以下の投与群の体重には変化は認められなかった。

## 3. 摂餌量(Fig. 2)

摂餌量の減少が200 mg/kg投与群の雌雄で認められた。摂餌量の減少は雄では投与第8日以降、投与期間を通してみられ、投与第22日には有意差が認められた。雌では投与第22日の測定においてのみ減少がみられた。回復試験期間中の摂餌量は雌雄とも回復第8日には回復傾向を示した。70 mg/kg以下の投与群の摂餌量には変化は認められなかった。

## 4. 尿検査(Table 1)

溶媒対照群を含む各投与群において、雌雄とも投与期間終了週ならびに回復試験期間終了週のいずれの時期にも、蛋白、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンが陽性または疑陽性となる動物があり、尿沈渣中に上皮細胞または結晶が観察される動物も存在した。投与期間終了週の検査において、尿中カリウム濃度の低下が20および200 mg/kg投与群の雌で、ナトリウムならびに塩素濃度の低下が200 mg/kg投与群の雌で認められたが、これらの電解質の24時間排泄量には溶媒対照群と比較して差は認められなかった。

## 5. 血液学検査(Table 2)

投与期間終了時の検査において、雄では平均赤血球血色素濃度ならびに平均赤血球血色素量の増加が70 mg/kg投与群で認められたが、赤血球数ならびにヘマトクリット値には変化がみられないことから、偶発的な

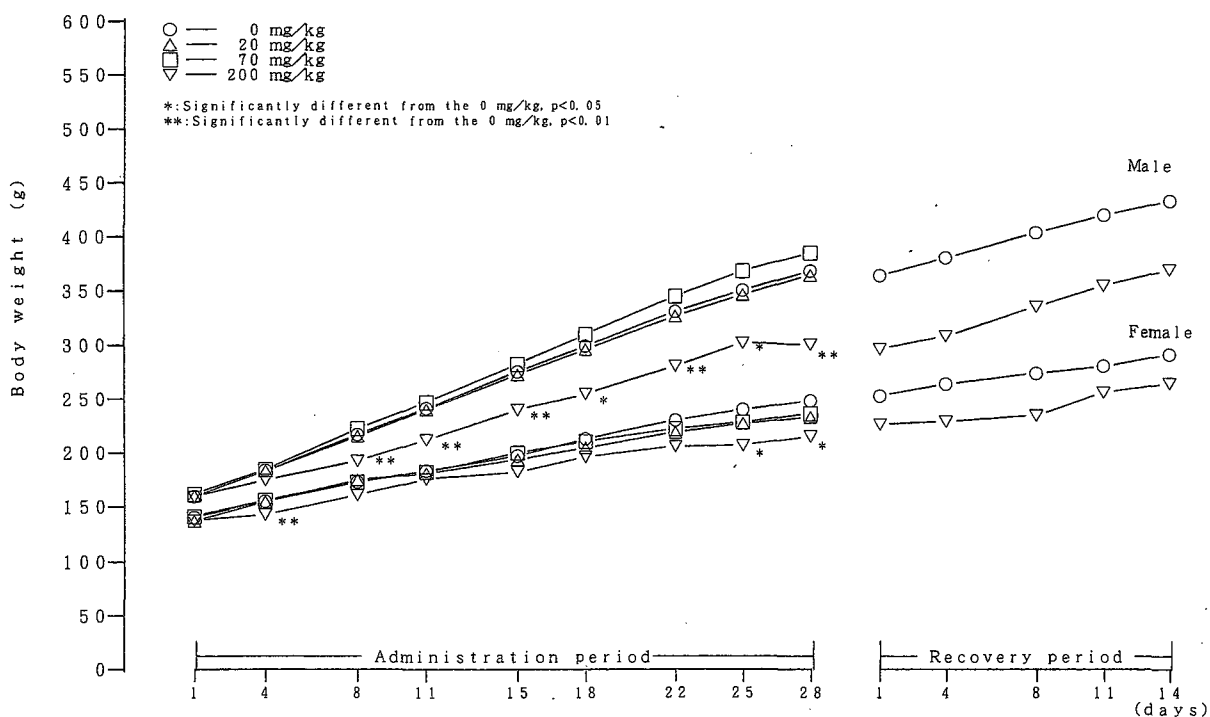


Fig. 1 Body weight changes of rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

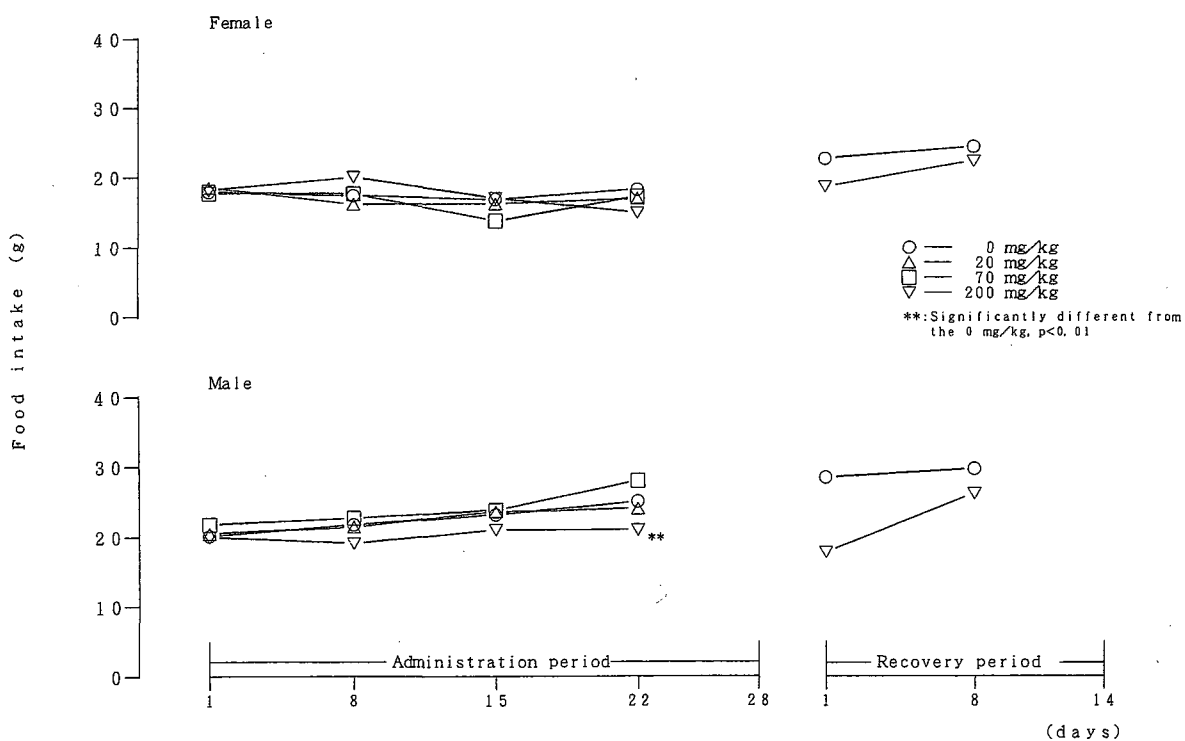


Fig. 2 Food intake of rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

差と判断した。一方、雌では分葉核好中球百分比の有意な低下ならびにリンパ球百分比の有意な上昇が70 mg/kg投与群で認められたが、用量依存性のみられない変化であることから、被験物質投与による変化ではないと判断した。雌では投与期間終了時ならびに回復試験期間終了時の白血球数の増加が200 mg/kg投与群で認められた。

#### 6. 血液生化学検査 (Table 3)

投与期間終了時の検査において、血中トリグリセライド濃度の有意な上昇が70 mg/kg投与群の雄で、無機リン濃度の上昇が200 mg/kg投与群の雄および70 mg/kg以上の投与群の雌で、カルシウム濃度の上昇が70 mg/kg以上の投与群の雌で、ナトリウム濃度の上昇が70 mg/kg以上の投与群の雄で、カリウム濃度の上昇が200 mg/kg投与群の雌で、塩素濃度の上昇が20 mg/kg投与群の雄で、アルカリフォスファターゼ活性の上昇が200 mg/kg投与群の雌で認められた。

回復試験期間終了時の検査においては、トリグリセライド濃度の低下ならびに無機リン濃度の上昇が200 mg/kg投与群の雌で認められた。

#### 7. 病理学検査

##### 1) 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時剖検例においては、副腎の絶対重量および相対重量の増加が200 mg/kg投与群の雌雄で、肝臓の絶対重量の減少が200 mg/kg投与群の雌雄で、また、相対重量の減少が200 mg/kg投与群の雄で、相対重量の増加が200 mg/kg投与群の雌で、卵巣の絶対重量ならびに相対重量の減少が70 mg/kg以上の投与群で認められた。200 mg/kg投与群においては、雌雄とも剖検時まで体重増加抑制が認められていたため、精巣および雌雄の脳ならびに腎臓の相対重量が増加したが、絶対重量には変化はみられなかった。

回復試験期間終了時剖検において、200 mg/kg投与群では、副腎の絶対重量および相対重量の増加が雌で、肝臓の絶対重量の減少が雌雄で、卵巣の絶対重量の減少がそれぞれ認められた。また、回復試験期間中も体重増加抑制が継続したため、脳および腎臓の相対重量の増加が雌雄で、精巣および副腎の相対重量の増加が雄で認められたが、絶対重量には変化はみられなかった。

##### 2) 剖検所見

200 mg/kg投与群の雌雄の死亡例において、胸腺の赤色点、肺の暗赤色または暗色領域、脾臓の淡色化ならびに被毛あるいは口・鼻孔周囲の被毛の汚染あるいは湿潤が認められたが、いずれも死因と考えられる著しい変化ではなかった。

投与期間終了時剖検において、肺の暗色点または暗色領域、肺の淡色領域、腎盂の拡張、肝臓の淡色領域、肝臓の横隔膜結節、卵巣の暗色点が散見され、被毛の汚染が200 mg/kg投与群の雌雄各1例で、痂皮の形成が溶媒対照群の雄の1例でそれぞれ認められたが、被毛の汚染

を除くいずれの所見にも、用量依存性は認められないことから、被験物質投与による変化ではないと判断した。

回復試験期間終了時の剖検において、下顎リンパ節の腫大、肺の暗色点または暗色領域、肝臓の淡色領域、腹腔内器官の軽度の癒着ならびに皮膚の痂皮形成が認められたが、いずれの所見も同週齢のラットにときおり認められる所見であることから、被験物質投与によると考えられる明らかな変化ではないと判断した。

##### 3) 病理組織学所見 (Table 5)

200 mg/kg投与群の途中死亡例の病理組織学検査の結果、広範囲の心筋変性が雄の1例で認められた。雄の他の1例にもごく軽度な心筋変性が認められたが、程度も軽く、自然発生的な変化と考えられた。その他の所見として、肝臓では門脈周囲性の脂肪化、脾臓では髓外造血や褐色色素沈着、腎臓では皮質の好塩基性尿管ならびに円柱が認められたが、いずれも対照群の動物でときおり認められる所見であり、被験物質投与の影響を示唆する変化ではなかった。

投与期間終了時剖検例における溶媒対照群と200 mg/kg投与群の比較において、肝臓では門脈周囲性の脂肪化が両群の雌雄全例で、脾臓では髓外造血が両群の雌雄全例でみられ、雌の両群全例に褐色色素沈着が認められた。また、腎臓では、雄の溶媒対照群の5例全例、雄の200 mg/kg投与群の2例中1例、雌の溶媒対照群の5例中3例、雌の200 mg/kg投与群の2例中1例で皮質の好塩基性尿管が認められ、eosinophilic bodyが雄の溶媒対照群の5例中3例で、円柱が雌の溶媒対照群の5例中1例でそれぞれみられたが、いずれの病理組織学所見にもその発現頻度には溶媒対照群と200 mg/kg投与群の間で有意差は認められなかった。雄全例の心臓の病理組織学検査では、ごく軽度な心筋変性が溶媒対照群に1例、70 mg/kg投与群に3例みられた。

回復期間終了時剖検例には、被験物質投与の影響と考えられる病理組織学所見はみられなかった。雄全例の心臓の病理組織学検査においても、異常はみられなかった。

#### 考察

染料、ゴム製品等の合成過程での触媒ならびにボイラーの錆防止剤や軟鋼の腐食防止などに広く使われているジシクロヘキシルアミンの20, 70および200 mg/kgを、雌雄のSprague-Dawley系(Crj:CD)ラットに1日1回、28日間にわたって反復経口投与した。その結果、200 mg/kg投与群の雌雄で死亡が認められ、一般状態の変化として、雌雄とも被験物質投与群で流涎や痙攣、姿勢の異常、散瞳、呼吸異常、異常発声等の神経症状がみられた。特に流涎は70 mg/kg以上の投与群の雌雄の多くの動物で認められ、200 mg/kg投与群では発現例数も多かった。また、散瞳および痙攣も200 mg/kg投与群においては多数例で認められた。ジシクロヘキシルアミンは、ラット精管のノルアドレナリン誘発収縮の際、フェント

ラミンによる阻害に拮抗することが報告されている<sup>1)</sup>。また、同じく、ラット精管を用いた実験で、ノルアドレナリンによる収縮を増強することが知られている<sup>2,3)</sup>。ノルアドレナリンによるラット精管の収縮に対する、ジシクロヘキシルアミンによる増強作用は、レセルピンにより神経終末のノルアドレナリンを枯渇させると抑制されることから、コカインと同様の作用機序であることが明らかになっている<sup>2)</sup>。また、高濃度のジシクロヘキシルアミンでは、交感神経興奮による間接的な精管収縮を示すことも知られている<sup>2)</sup>。すなわち、本試験において認められた一般状態の変化ならびに死亡の原因は主に、ジシクロヘキシルアミンによるノルアドレナリンの交感神経終末への再取り込み阻害による、交感神経興奮作用によるものと推察される。病理学所見においては、脳、脊髄および坐骨神経には病理学的変化は認められず、雄の死亡例のうち広範囲の心筋変性が認められた1匹を除き、剖検ならびに病理組織検査の結果、被験物質投与による影響を疑わせる変化は認められなかった。

尿検査においては、溶媒対照群を含む各投与群において、雌雄とも投与期間終了週ならびに回復試験期間終了週のいずれの時期にも、蛋白、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンが陽性または疑陽性となる動物が認められた。しかし、これらの成績を当研究所において過去2年間に「既存化学物質の安全性点検事業」として行われた3試験の28日間反復経口投与毒性試験の対照群の結果との比較した結果、陽性および疑陽性の発現頻度ならびに程度には差が認められないことから、被験物質投与の影響はないものと判断された。また、尿沈渣中にみられた上皮細胞ならびに結晶は、いずれもラットにおいて通常観察されるものであった。

血液学検査においては、雌で白血球数の増加が200 mg/kg投与群の、投与期間終了時ならびに回復試験期間終了時の検査で認められた。このうち、回復試験期間終了時の白血球数は、先に述べた3試験の回復試験期間終了時の白血球数と比較した結果、正常値の範囲内であると判断した。一方、投与期間終了時の白血球数の増加は雄では認められないこと、雌においても白血球百分比には変化がみられないことから、被験物質投与による影響であるか否かは明らかにならなかった。

血液生化学検査では、投与期間終了時の血中塩素濃度の上昇ならびにナトリウム濃度の上昇が雄で、カリウム濃度の上昇が雌で認められた。また、尿検査においては投与期間末期の検査において、尿中カリウム濃度が雌で、ナトリウムならびに塩素濃度が雌雄でそれぞれ溶媒対照群に比較して低下した。これらのことから、ジシクロヘキシルアミン投与による水、電解質代謝に対する影響が疑われたが、これらの変化も、先に述べた3試験のデータと比較すると正常値の範囲内であると判断された。一方、無機リン濃度の上昇が200 mg/kg投与群の雄および70 mg/kg以上の投与群の雌で、カルシウム濃度の上昇が70 mg/kg以上の投与群の雌で、アルカリフォスファターゼ活性の上昇が200 mg/kg投与群の雌で認められた。また、回復試験期間終了時の検査においても、雌で

は無機リン濃度の上昇が認められることから、ジシクロヘキシルアミン投与によるリン・カルシウム代謝に対する影響が疑われた。これらのうち、70 mg/kg投与群の雌における変化は、先に述べた3試験における投与期間終了時の溶媒対照群の検査結果と比較して、差がないと判断されるものの、200 mg/kg投与群における変化は、アルカリフォスファターゼ活性を除いて、いずれも正常範囲を逸脱した値と考えられることから、ジシクロヘキシルアミンの200 mg/kgの反復投与は、リン・カルシウム代謝に対して影響を及ぼす可能性が示唆された。

器官重量では、投与期間終了時剖検例において、副腎重量の増加ならびに肝臓重量の減少が200 mg/kg投与群の雌雄で、卵巣重量の減少が70 mg/kg以上の投与群で認められた。ストレスに伴い視床下部からコルチコトロンピン放出因子(CRF)が分泌され、視床下部-脳下垂体-性腺系におけるエストロゲン濃度の低下が引き起こされることにより、卵巣重量に変化が起きることが知られている<sup>4,5)</sup>。本試験においては、副腎および卵巣重量に主に変化がみられた200 mg/kg投与群では、半数以上の動物に死亡が発現し、また痙攣を連日起こすなどの、かなりのストレスが負荷されたものと考えられることから、本試験における副腎ならびに卵巣重量の変化には、著しい症状の継続的発現により引き起こされたCRF分泌増加の影響が及んでいる可能性が考えられる。しかし、回復試験期間終了時剖検動物において、雄の200 mg/kg投与群の副腎重量の増加や雌の70 mg/kg投与群の卵巣重量の減少は回復傾向が認められたことから、ジシクロヘキシルアミンによる卵巣ならびに副腎に対する影響は、機能的な変化であり、可逆性を有することが明らかになった。一方、肝臓重量の減少については、病理組織学検査所見にも被験物質投与によると考えられる明らかな異常は認められず、血液生化学検査結果にも異常は認められないことから、被験物質投与による肝臓に対する影響が、いかなる機序によるものかについては明らかでなかった。しかし、回復試験期間終了時剖検動物においても、雌雄とも200 mg/kg投与群で肝臓重量の減少がみられたことから、14日間の休薬後の剖検でも回復傾向は認められないものと考えられた。ジシクロヘキシルアミンは培養細胞において、細胞の成長や分化に重要な因子である<sup>6)</sup>ポリアミン、特にスペルミジンの合成を抑制することが報告されている<sup>7)</sup>。In vivoでもジシクロヘキシルアミンには、Ehrlich ascites carcinomaやSacroma 180等の動物移植癌に対する抗腫瘍活性があることが明らかになっている。また、スペルミジンはラット肝臓ミトコンドリア中に、1.8 nmol/mg蛋白程度の濃度で存在することが報告されている<sup>8)</sup>。スペルミジンの合成抑制が、肝臓においていかなる変化を惹起するかはなお明らかでないが、ジシクロヘキシルアミンの反復投与により、肝臓を標的とした変化が生じた可能性も考えられる。200 mg/kg投与群における体重増加の抑制が回復試験期間中も継続して認められたことから、ジシクロヘキシルアミンの反復投与による毒性的影響は、投与終了後もかなり継続しているものと考えられた。

以上の結果、ジシクロヘキシルアミンの70 mg/kgの投与では、一般状態の観察において流涎や痙攣が認められ、被験物質による自律神経に対する毒性学的影響が疑われることから、本試験条件下におけるジシクロヘキシルアミンの無影響量は、雌雄とも20 mg/kgであると判断した。

## 文献

- 1) J.A. Hickman, D.R. Mottram, C. Kidman, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **228**, 191(1977).
- 2) D.R. Mottram, J.A. Hickman, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **242**, 50(1979).
- 3) C.D. Kidman, D.R. Mottram, J.A. Hickman, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **238**, 180(1979).
- 4) C. Rivier, S. Rivest, *Biol. Reprod.*, **45**, 525(1991).
- 5) A.E. Calogero, N. Burrello, P. Negri-Cesi, et al, *Endocrinology*, **137**, 4161(1996).
- 6) J. Ibrahim, A.D. Hughes, M. Schachter, P.S. Sever, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **23**, 410(1996).
- 7) H. Hibasami, M. Tanaka, J. Nagai, T. Ikeda, *FEBS Letters*, **116**, 99(1980).
- 8) V. Tasani, M. Campagnolo, A. Toninello, D. Siliprandi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 850(1996).

## 連絡先

試験責任者：大原直樹  
 試験担当者：高島宏昌，田中あづさ，  
 加藤博康，関 剛幸，小島幸一，  
 稲田浩子，安生孝子，畔上二郎，  
 吉村慎介，三枝克彦  
 (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: Naoki Ohara (Study Director)  
 Hiromasa Takashima, Azusa Tanaka,  
 Hiroyasu Katoh, Takayuki Seki,  
 Kohichi Kojima, Hiroko Inada,  
 Takako Anjo, Jiro Azegami,  
 Shinsuke Yoshimura, Katsuhiko Saegusa  
 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 Urinalysis in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Test period		Sex	Group	N	Volume (mL/24hr)	Specific gravity	Color <sup>b)</sup>		Turbidity <sup>c)</sup>		pH					Protein <sup>d)</sup>	Glucose <sup>e)</sup>	Ketone <sup>e)</sup>	Bilirubin <sup>e)</sup>	Occult blood <sup>e)</sup>	Urobili- nogen <sup>e)</sup>									
ly	y						-	+	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	+	-	±	+	-	±	±	+				
Administration																														
Male	0	5	9.5±3.8 <sup>a)</sup>	1.046±0.022 <sup>a)</sup>	3	2	3	2	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	4	1	5	2	3	0	4	1	5	0	4	1
	20	5	14.3±4.4	1.030±0.014	4	1	4	1	0	0	0	1	0	0	1	3	0	0	4	1	5	2	2	1	5	0	5	0	5	0
	70	5	24.1±17.9	1.024±0.023	4	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1	3	1	5	3	1	1	5	0	5	0	5	0
	200	4	10.0±4.2	1.039±0.020	1	3	4	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	1	2	1	4	2	1	1	4	0	4	0	3	1
Female	0	5	10.5±1.0	1.026±0.006	4	1	4	1	0	0	0	2	0	0	1	2	3	2	0	0	5	5	0	0	5	0	5	0	5	0
	20	5	10.8±4.7	1.020±0.009	5	0	3	2	0	1	0	0	0	0	1	3	3	1	1	0	5	4	1	0	5	0	5	0	4	1
	70	5	13.0±4.5	1.028±0.010	4	1	4	1	0	0	0	1	1	1	0	2	4	0	1	0	5	4	1	0	5	0	5	0	5	0
	200	4	18.1±8.6	1.013±0.002	4	0	4	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3	1	0	0	4	4	0	0	4	0	4	0	4	0
Recovery																														
Male	0	5	15.2±4.8	1.068±0.011	4	1	4	1	0	0	1	3	1	0	0	0	0	0	5	0	5	1	3	1	5	0	4	1	4	1
	200	2	16.0	1.059	2	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	2	1	1	0	2	0	2	0	2	0
Female	0	5	15.2±4.0	1.058±0.009	5	0	3	2	1	0	1	3	0	0	0	0	3	1	1	0	5	5	0	0	5	0	5	0	4	1
	200	2	12.4	1.065	2	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	2	0	0	2	0	2	0	2	0
Test period																														
Sex	Group	N	Red blood cell <sup>f)</sup>	Crystal <sup>h)</sup>	Cast <sup>g)</sup>	White blood cell <sup>h)</sup>	Epithelial cell <sup>h)</sup>	Na	K	Cl	Na	K	Cl																	
			-	-	±	+	-	-	-	±	+	(mEq/L)	(mEq/L)	(mEq/L)	(mEq/day)	(mEq/day)	(mEq/day)													
Administration																														
Male	0	5	5	0	4	1	5	5	2	3	0	132.6±77.6 <sup>a)</sup>	358.3±81.9 <sup>a)</sup>	148.8±45.7 <sup>a)</sup>	1.08±0.34 <sup>a)</sup>	3.16±0.89 <sup>a)</sup>	1.31±0.43 <sup>a)</sup>													
	20	5	5	0	3	2	5	5	1	4	0	96.2±20.9	287.7±85.8	133.1±30.9	1.32±0.25	3.84±0.30	1.80±0.17													
	70	5	5	0	2	3	5	5	0	5	0	93.7±84.3	216.9±159.4	109.2±87.2	1.39±0.61	3.43±1.22	1.71±0.60													
	200	4	4	0	1	3	4	4	1	2	1	89.6±55.1	253.9±106.0	119.2±39.3	0.76±0.31	2.23±0.49	1.08±0.12													
Female	0	5	5	0	5	0	5	5	1	4	0	85.5±24.0	247.1±15.3	111.0±19.3	0.88±0.17	2.60±0.16	1.16±0.09													
	20	5	5	0	5	0	5	5	2	3	0	54.6±16.2	152.1±61.3 <sup>*</sup>	75.3±27.9	0.60±0.35	1.72±1.15	0.86±0.59													
	70	5	5	0	5	0	5	5	1	4	0	76.2±27.0	187.3±69.7	96.5±28.6	0.91±0.25	2.33±0.84	1.19±0.35													
	200	4	4	0	2	2	4	4	1	3	0	46.2±7.9 <sup>*</sup>	100.3±29.5 <sup>**</sup>	60.9±13.0 <sup>*</sup>	0.81±0.31	1.72±0.63	1.05±0.34													
Recovery																														
Male	0	5	5	0	2	3	5	5	2	3	0	83.0±22.8	244.6±42.6	85.4±25.7	1.19±0.34	3.59±0.89	1.31±0.52													
	200	2	2	0	2	0	2	2	1	1	0	74.6	222.6	83.5	1.20	3.56	1.34													
Female	0	5	5	1	3	1	5	5	1	3	1	62.1±8.1	207.8±43.6	78.5±8.7	0.97±0.34	3.03±0.49	1.17±0.27													
	200	2	2	1	0	1	2	2	0	2	0	66.0	235.2	99.2	0.87	2.77	1.24													

a) Mean±S.D.      b) ly, Light yellow; y, Yellow  
 d) -, Negative; ±, Trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL  
 f) ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL      g) -, Not observed  
 c) -, Negative; ±, Trace; +, Slight  
 e) -, Negative  
 h) -, Not observed; ±, A few; +, Abundant

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

Table 2 Hematological findings in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Test period			Differential count of WBC (%)																
Sex	Group	N	RBC ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	MCH (pg)	MCHC (%)	Reticulo- cyte (%)	WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	Neutro.					Platelet ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	PT (sec)	APTT (sec)	
											Band	Seg.	Eos.	Baso.	Mono.				Lymph.
Administration																			
Male	0	5	656 $\pm 26$	13.6 $\pm 0.3$	40.9 $\pm 1.3$	62.4 $\pm 1.2$	20.7 $\pm 0.3$	33.2 $\pm 0.5$	2.3 $\pm 0.4$	81 $\pm 34$	0 $\pm 0$	8 $\pm 4$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	1 $\pm 1$	90 $\pm 4$	103.4 $\pm 5.2$	20.3 $\pm 1.9$	26.9 $\pm 1.1$
	20	5	659 $\pm 21$	13.9 $\pm 0.4$	41.1 $\pm 0.7$	62.4 $\pm 1.0$	21.1 $\pm 0.1$	33.8 $\pm 0.6$	2.2 $\pm 0.6$	77 $\pm 13$	0 $\pm 0$	9 $\pm 2$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	2 $\pm 1$	88 $\pm 4$	104.0 $\pm 10.4$	20.8 $\pm 1.4$	28.1 $\pm 1.6$
	70	5	638 $\pm 41$	13.9 $\pm 0.6$	40.5 $\pm 1.6$	63.6 $\pm 2.1$	21.9* $\pm 0.6$	34.4* $\pm 0.4$	2.4 $\pm 0.5$	66 $\pm 14$	0 $\pm 0$	10 $\pm 4$	0 $\pm 1$	0 $\pm 0$	2 $\pm 1$	88 $\pm 4$	102.2 $\pm 7.5$	17.2 $\pm 1.4$	25.4 $\pm 0.5$
	200	2	692	14.6	42.8	61.9	21.1	34.2	2.4	92	0	11	1	0	4	85	96.6	19.0	25.4
Female	0	5	671 $\pm 19$	14.1 $\pm 0.3$	41.4 $\pm 1.5$	61.7 $\pm 1.6$	21.0 $\pm 0.4$	34.1 $\pm 0.6$	1.5 $\pm 0.4$	40 $\pm 7$	0 $\pm 0$	13 $\pm 5$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	2 $\pm 1$	84 $\pm 6$	106.4 $\pm 7.4$	14.8 $\pm 0.8$	23.6 $\pm 2.2$
	20	5	667 $\pm 5$	13.9 $\pm 0.2$	40.6 $\pm 0.8$	60.8 $\pm 1.2$	20.9 $\pm 0.3$	34.3 $\pm 0.4$	1.5 $\pm 0.1$	50 $\pm 22$	0 $\pm 0$	7 $\pm 4$	0 $\pm 1$	0 $\pm 0$	1 $\pm 1$	92 $\pm 4$	101.8 $\pm 8.3$	13.8 $\pm 0.7$	22.2 $\pm 1.2$
	70	5	654 $\pm 37$	13.8 $\pm 0.7$	40.3 $\pm 2.4$	61.6 $\pm 1.5$	21.1 $\pm 0.6$	34.2 $\pm 0.5$	1.4 $\pm 0.5$	59 $\pm 23$	0 $\pm 0$	4* $\pm 2$	0 $\pm 0$	0 $\pm 0$	1 $\pm 1$	94* $\pm 2$	95.8 $\pm 9.8$	14.4 $\pm 1.2$	23.3 $\pm 0.9$
	200	2	741	15.0	43.2	58.4	20.3	34.7	0.9	113	0	7	0	0	3	91	92.9	16.0	24.5
Recovery																			
Male	0	5	698 $\pm 54$	14.5 $\pm 1.0$	41.5 $\pm 2.7$	59.4 $\pm 0.9$	20.8 $\pm 0.3$	35.0 $\pm 0.4$	2.6 $\pm 1.9$	85 $\pm 29$	0 $\pm 0$	16 $\pm 12$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	2 $\pm 2$	82 $\pm 13$	115.3 $\pm 13.6$	18.8 $\pm 2.3$	25.6 $\pm 1.7$
	200	2	673	14.0	40.1	59.6	20.8	35.0	2.8	78	0	13	0	0	3	84	98.6	18.0	25.3
Female	0	5	677 $\pm 40$	14.1 $\pm 0.6$	39.6 $\pm 1.4$	58.6 $\pm 1.8$	20.8 $\pm 0.6$	35.5 $\pm 0.5$	2.0 $\pm 0.9$	38 $\pm 11$	0 $\pm 0$	22 $\pm 8$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	3 $\pm 3$	74 $\pm 10$	96.1 $\pm 14.3$	14.9 $\pm 0.6$	23.6 $\pm 0.9$
	200	2	673	13.7	39.1	58.1	20.4	35.1	1.8	49	0	9	2	0	3	87	104.5	15.7	24.4

Parameter, Mean $\pm$ S.D.\*, Significantly different from 0 mg/kg,  $p < 0.05$



Table 3 Biochemical findings in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Test period		Sex	Group	N	Total protein (g/dL)	Albu- min (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creati- nine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total choles- terol (mg/dL)	Triglyce- ride (mg/dL)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	LDH (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ-GTP (U/L)
Administration																						
Male	0	5	5.3 ±0.0	3.1 ±0.1	1.38 ±0.13	15 ±3	0.7 ±0.1	130 ±7	39 ±3	45 ±13	6.5 ±0.3	9.0 ±0.2	141.9 ±0.5	3.95 ±0.22	104.9 ±0.7	339 ±73	213 ±113	27 ±3	68 ±13	0 ±0		
	20	5	5.2 ±0.1	3.0 ±0.1	1.35 ±0.12	11 ±2	0.6 ±0.1	117 ±6	44 ±7	61 ±16	6.8 ±0.2	9.1 ±0.2	143.0 ±0.2	3.82 ±0.15	107.2* ±0.8	345 ±31	129 ±75	26 ±8	58 ±11	0 ±0		
	70	5	5.3 ±0.1	3.1 ±0.2	1.45 ±0.23	11 ±2	0.7 ±0.1	126 ±14	40 ±6	85* ±19	6.9 ±0.3	9.2 ±0.2	143.4* ±1.0	3.73 ±0.13	105.7 ±1.1	360 ±20	100 ±17	27 ±7	57 ±7	0 ±0		
	200	2	5.2 ±0.2	3.0 ±0.2	1.40 ±0.12	15 ±1	0.8 ±0.1	137 ±15	45 ±13	51 ±10	9.2 ±0.5	9.4 ±0.1	144.9 ±0.9	3.89 ±0.14	105.6 ±0.7	289 ±43	159 ±63	26 ±9	64 ±19	0 ±0		
Female	0	5	5.2 ±0.1	3.2 ±0.1	1.61 ±0.07	13 ±2	0.5 ±0.0	112 ±7	48 ±6	30 ±8	6.8 ±0.5	9.0 ±0.1	143.7 ±0.4	3.56 ±0.17	108.9 ±0.9	174 ±23	99 ±9	18 ±2	53 ±3	1 ±1		
	20	5	5.2 ±0.4	3.1 ±0.3	1.52 ±0.10	15 ±3	0.6 ±0.0	117 ±7	63 ±17	40 ±14	7.2* ±0.3	9.3* ±0.3	142.4 ±1.8	3.88 ±0.20	107.3 ±1.5	177 ±52	109 ±32	19 ±3	55 ±4	0 ±0		
	70	5	5.0 ±0.3	2.9 ±0.3	1.33 ±0.16	17 ±3	0.6 ±0.0	126 ±11	52 ±8	46 ±12	10.5 ±0.6	10.7 ±0.2	142.8 ±1.0	4.34 ±0.16	106.0 ±1.7	270 ±61	191 ±19	30 ±3	57 ±6	1 ±0		
	200	2	5.1 ±0.1	2.9 ±0.1	1.32 ±0.14	17 ±1	0.7 ±0.1	100 ±5	45 ±6	43 ±11	6.3 ±0.7	8.9 ±0.2	144.1 ±0.4	4.03 ±0.12	108.8 ±1.0	263 ±31	104 ±14	25 ±1	63 ±6	0 ±0		
Recovery	0	5	5.2 ±0.1	3.0 ±0.1	1.40 ±0.14	18 ±1	0.7 ±0.1	106 ±5	51 ±6	48 ±11	5.1 ±0.7	8.6 ±0.2	143.7 ±0.4	3.61 ±0.12	110.6 ±1.0	175 ±31	94 ±14	19 ±1	52 ±6	0 ±0		
	200	2	5.1 ±0.1	3.0 ±0.1	1.37 ±0.14	15 ±1	0.6 ±0.1	95 ±5	50 ±6	28 ±11	7.7 ±0.7	8.9 ±0.2	144.9 ±0.4	3.31 ±0.12	111.8 ±1.0	172 ±31	124 ±14	26 ±1	60 ±6	1 ±0		

Parameter, Mean±S.D.

\*, Significantly different from 0 mg/kg, p&lt;0.05

Table 4 Absolute and relative organ weights in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Test period			Absolute					Relative					
Sex	Group	N	Body weight	Brain	Liver	Kidneys	Adrenal glands	Ovaries/ Testes	Brain	Liver	Kidneys	Adrenal glands	Ovaries/ Testes
	(mg/kg)		(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
Administration													
	0	5	355.1 ± 16.4	1951.8 ± 64.1	11761.2 ± 521.6	2606.3 ± 194.9	47.3 ± 2.9	2845.8 ± 115.3	5.500 ± 0.118	33.144 ± 1.310	7.343 ± 0.491	0.134 ± 0.014	8.032 ± 0.578
Male	20	5	339.1 ± 12.7	1959.0 ± 115.2	11199.8 ± 354.7	2501.9 ± 242.1	44.0 ± 4.2	2804.2 ± 208.6	5.780 ± 0.318	33.080 ± 1.942	7.375 ± 0.618	0.130 ± 0.011	8.282 ± 0.740
	70	5	357.5 ± 29.1	1905.6 ± 63.2	12084.4 ± 927.8	2573.3 ± 221.7	49.6 ± 5.5	2803.1 ± 184.3	5.359 ± 0.465	33.840 ± 1.671	7.209 ± 0.515	0.139 ± 0.020	7.886 ± 0.896
	200	2	285.0	1935.1	8733.8	2329.7	62.5	2858.2	6.819	30.599	8.231	0.220	10.108
	0	5	232.0 ± 13.3	1813.4 ± 90.0	7127.4 ± 524.1	1763.3 ± 112.7	61.0 ± 5.4	98.2 ± 6.0	7.830 ± 0.464	30.713 ± 1.232	7.599 ± 0.151	0.263 ± 0.022	0.425 ± 0.044
Female	20	5	215.9 ± 9.6	1741.1 ± 46.9	6781.1 ± 220.9	1734.7 ± 30.5	66.9 ± 6.2	89.2 ± 13.2	8.073 ± 0.249	31.473 ± 1.941	8.048 ± 0.368	0.311 ± 0.035	0.414 ± 0.065
	70	5	224.3 ± 19.5	1798.4 ± 69.0	7083.0 ± 853.0	1663.6 ± 85.6	68.6 ± 10.6	79.6* ± 7.2	8.046 ± 0.404	31.530 ± 1.803	7.443 ± 0.456	0.309 ± 0.059	0.357 ± 0.045
	200	2	184.3	1649.9	5960.2	1597.9	88.2	59.9	8.949	32.352	8.668	0.478	0.325
Recovery													
	0	5	399.9 ± 40.9	1970.1 ± 65.6	11753.2 ± 1667.9	2543.1 ± 173.0	53.5 ± 2.8	3154.4 ± 172.6	4.974 ± 0.610	29.301 ± 1.574	6.382 ± 0.338	0.135 ± 0.014	7.939 ± 0.714
Male	200	2	333.3	1942.3	8968.3	2211.7	53.8	3082.9	5.830	26.888	6.639	0.161	9.262
	0	5	266.2 ± 17.3	1834.6 ± 38.3	7852.3 ± 612.6	1854.0 ± 112.8	71.2 ± 10.6	94.5 ± 6.7	6.909 ± 0.358	29.556 ± 2.495	6.975 ± 0.410	0.270 ± 0.054	0.356 ± 0.030
Female	200	2	236.9	1805.8	6429.9	1731.7	94.9	78.2	7.649	27.221	7.325	0.401	0.330

Parameter, Mean±S.D.

\*, Significantly different from 0 mg/kg, p&lt;0.05

Table 5 Histopathological findings in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex, Male Fate	Died during administration period		Sacrificed at the end of administration period				Sacrificed at the end of recovery period	
	0 mg/kg	200 mg/kg	0 mg/kg	20 mg/kg	70 mg/kg	200 mg/kg	0 mg/kg	200 mg/kg
	- ± +++ +++ Pos.	- ± +++ +++ Pos.	- ± +++ +++ Pos.	- ± +++ +++ Pos.	- ± +++ +++ Pos.	- ± +++ +++ Pos.	- ± +++ +++ Pos.	- ± +++ +++ Pos.
(Brain)	[1]	[8]	[7]	[0]	[0]	[3]	[0]	[0]
No remarkable change								
(Spinal cord)	[1]	[8]	[7]	[0]	[0]	[3]	[0]	[0]
No remarkable change								
(Liver)	[1]	[8]	[5]	[1]	[0]	[2]	[0]	[1]
Fatty change, periportal	1 0 0 0 0 0	6 2 0 0 0 2	0 1 4 0 0 5	0 0 1 0 0 1		0 2 0 0 0 2		0 1 0 0 0 1
Fatty change, focal	1 0 0 0 0 0	8 0 0 0 0 0	5 0 0 0 0 0	0 0 1 0 0 1		2 0 0 0 0 0		0 0 1 0 0 1
(Heart)	[1]	[8]	[5]	[5]	[5]	[2]	[5]	[2]
Myocardial degeneration	1 0 0 0 0 0	6 1 0 1 0 2	4 1 0 0 0 1	5 0 0 0 0 0	2 3 0 0 0 3	2 0 0 0 0 0	5 0 0 0 0 0	2 0 0 0 0 0
(Spleen)	[1]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]	[0]	[0]
Hematopoiesis, extramedullary	0 0 1 0 0 1	0 6 2 0 0 8	0 1 4 0 0 5			0 1 1 0 0 2		
(Kidney)	[1]	[8]	[5]	[1]	[0]	[2]	[0]	[0]
Basophilic tubule, cortex	0 1 0 0 0 1	3 5 0 0 0 5	0 5 0 0 0 5	0 1 0 0 0 1		1 1 0 0 0 1		
Eosinophilic body	1 0 0 0 0 0	8 0 0 0 0 0	2 0 1 0 2 3	1 0 0 0 0 0		2 0 0 0 0 0		
Dilatation, renal pelvis	1 0 0 0 0 0	8 0 0 0 0 0	5 0 0 0 0 0	0 0 0 1 0 1		2 0 0 0 0 0		
Cast	1 0 0 0 0 0	7 1 0 0 0 1	5 0 0 0 0 0	1 0 0 0 0 0		2 0 0 0 0 0		
(Adrenal gland)	[1]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]	[0]	[0]
No remarkable change								
(Sciatic nerve)	[1]	[8]	[7]	[0]	[0]	[3]	[0]	[0]
No remarkable change								
(Lung)	[1]	[3]	[2]	[1]	[3]	[0]	[2]	[0]
Hemorrhage	0 0 1 0 0 1	0 0 3 0 0 3	0 0 2 0 0 2	0 1 0 0 0 1	1 0 2 0 0 2		0 0 2 0 0 2	
Accumulation, foam cell	1 0 0 0 0 0	1 0 2 0 0 2	2 0 0 0 0 0	1 0 0 0 0 0	3 0 0 0 0 0		2 0 0 0 0 0	
Edema	0 0 1 0 0 1	2 1 0 0 0 1	2 0 0 0 0 0	1 0 0 0 0 0	3 0 0 0 0 0		2 0 0 0 0 0	
(Thymus)	[0]	[1]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]
Hemorrhage		0 1 0 0 0 1						
(Skin)	[0]	[1]	[1]	[0]	[0]	[0]	[1]	[0]
Ulcer		0 0 1 0 0 1	0 0 0 1 0 1				0 0 0 1 0 1	

Sex, Female Fate	Died during administration period		Sacrificed at the end of administration period			
	0 mg/kg	200 mg/kg	0 mg/kg	20 mg/kg	70 mg/kg	200 mg/kg
	- ± +++ +++ Pos.	- ± +++ +++ Pos.	- ± +++ +++ Pos.	- ± +++ +++ Pos.	- ± +++ +++ Pos.	- ± +++ +++ Pos.
(Brain)	[0]	[8]	[8]	[0]	[0]	[3]
No remarkable change						
(Spinal cord)	[0]	[8]	[8]	[0]	[0]	[3]
No remarkable change						
(Liver)	[0]	[8]	[5]	[1]	[0]	[2]
Fatty change, periportal		5 3 0 0 0 3	0 1 4 0 0 5	0 1 0 0 0 1		0 1 1 0 0 2
Hemorrhage, diaphragmatic nodule		8 0 0 0 0 0	5 0 0 0 0 0	0 0 1 0 0 1		2 0 0 0 0 0
(Heart)	[0]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]
No remarkable change						
(Spleen)	[0]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]
Deposit, pigment, brown		5 3 0 0 0 3	0 5 0 0 0 5			0 2 0 0 0 2
Hematopoiesis, extramedullary		0 6 2 0 0 8	0 5 0 0 0 5			0 2 0 0 0 2
(Kidney)	[0]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]
Basophilic tubule, cortex		6 2 0 0 0 2	2 2 1 0 0 3			1 1 0 0 0 1
Cyst		8 0 0 0 0 0	4 0 1 0 0 1			2 0 0 0 0 0
(Adrenal gland)	[0]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]
Hyperplasia, cortex, focal		8 0 0 0 0 0	4 0 1 0 0 1			2 0 0 0 0 0
(Sciatic nerve)	[0]	[8]	[8]	[0]	[0]	[3]
No remarkable change						
(Pituitary gland)	[0]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]
No remarkable change						
(Ovary)	[0]	[8]	[5]	[0]	[1]	[2]
Hemorrhage, corpus luteum		8 0 0 0 0 0	5 0 0 0 0 0		0 0 1 0 0 1	2 0 0 0 0 0
(Lung)	[0]	[5]	[1]	[1]	[0]	[0]
Hemorrhage		3 0 2 0 0 2	0 0 1 0 0 1	1 0 0 0 0 0		

- , Negative; ± , Very slight; + , Slight; ++ , Moderate; +++ , Severe; Pos., Total of positive grade  
[ ], Number of animals examined

# 1,4-ブタンジオールの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 1,4-Butanediol on Bacteria

### 要約

1,4-ブタンジオールについて、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>2,3)</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、用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験ではS9 mix 無添加および添加試験を313~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲で実施した。また、TA1537のS9 mix 無添加試験では、本試験と同一の用量で再現性試験を実施した。

その結果、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、1,4-ブタンジオールは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

### 方法

#### 〔検定菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium* の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを用い、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、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子 pKM101(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、ニュートリエントプロスNo. 2(Oxoid)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。

#### 〔被験物質〕

1,4-ブタンジオール(CAS No. 110-63-4)は、分子量90.14の無色透明液体である。用いた被験物質は、三菱化学(株)製造、ロット番号 B5I04、純度99.8 wt%(不純

物:0.06 wt% 1,4-アセトキシヒドロキシブテン-2, 0.07 wt% 2-(4-ヒドロキシブチルオキシ)テトラヒドロフラン)であり、三菱化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで乾燥窒素でシールし、室温で遮光保管した。

1,4-ブタンジオールは、局方注射用水(ロット番号:K5A80, (株)大塚製薬工場)に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

#### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(上野製薬(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2 および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

#### 〔培地および S9 mix の組成〕

##### 1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ビオチン	0.5 mM

\*:WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

##### 2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地を用いた。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
バクトアガー(Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めて

ある。

3) S9 mix

1 ml 中下記の成分を含む

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

\*\* : 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 を用いた。

〔試験方法〕

ブレインキューベーション法<sup>4)</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℃で20分間往復振とう培養したのち, 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。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は, 同時に実施した他の試験と共通とした。培養は 37℃で 48 時間行い, 生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については, 肉眼的あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌膜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, 溶媒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, 本試験および再現性試験においては, 両対照群および各用量につき, 3 枚ずつを用い, それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は 1 回, 本試験は同一用量について 2 回実施し, 結果の再現性の確認を行った。また, TA1537 の S9 mix 無添加試験については, 本試験 I と本試験 II の結果が異なるため, 再現性試験を行った。

〔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 無添加あるいは S9 mix 添加条件において, 被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が, 溶媒対照のそれに比べて 2 倍以上に増加し, かつ, その増加に再現性あるいは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(陽性)と判定することとした。ただし, 2 回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の 2 倍以上となる用量が認められた場合において, その溶媒対照値が 10 以下であり, 変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

1,4-ブタンジオールについて 50~5000 μg/プレート の範囲で公比を約 3 として, 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抗菌性は認められなかった。

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 5000 μg/プレートとした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で, とともに 313~5000 μg/プレートの範囲で公比を 2 として 2 回の本試験を実施した (Table 1, 2)。その結果, TA1537 の S9 mix 無添加試験においては, 本試験 I の 625 μg/プレートで, 溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数を示したが, 本試験 II では溶媒対照値の 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。また, TA1537 の S9 mix 添加試験と, その他の検定菌においては, 溶媒対照値の 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。

〔再現性試験〕

TA1537 の S9 mix 無添加試験では, 本試験 I と本試験 II の結果が異なるため, 本試験と同一の用量で再現性試験を行った (Table 3)。その結果, 溶媒対照値の 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。

以上の結果に基づき, 1,4-ブタンジオールは, 用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) 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.
- 4) 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, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹

試験担当者：原 巧, 坂本京子, 堀谷尚古,  
川上久美子

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257 秦野市落合 729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)

Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,

Naoko Horiya, Kumiko Kawakami

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety

Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan

Tel +81-463-82-4751 FAX +81-463-82-9627

Table 1. Mutagenicity of 1,4-butanediol in reverse mutation test (I) on bacteria

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	177 161 156 (165 $\pm$ 11.0)	9 9 12 (10 $\pm$ 1.7)	25 27 23 (25 $\pm$ 2.0)	25 20 24 (23 $\pm$ 2.6)	14 16 15 (15 $\pm$ 1.0)	
	313	159 167 160 (162 $\pm$ 4.4)	14 13 21 (16 $\pm$ 4.4)	20 29 24 (24 $\pm$ 4.5)	31 40 27 (33 $\pm$ 6.7)	15 14 28 (19 $\pm$ 7.8)	
	625	156 151 144 (150 $\pm$ 6.0)	22 14 22 (19 $\pm$ 4.6)	29 29 30 (29 $\pm$ 0.6)	25 23 36 (28 $\pm$ 7.0)	27 40 27 (31 $\pm$ 7.5)	
	1250	178 186 162 (175 $\pm$ 12.2)	21 11 11 (14 $\pm$ 5.8)	29 30 26 (28 $\pm$ 2.1)	29 39 29 (32 $\pm$ 5.8)	24 20 29 (24 $\pm$ 4.5)	
	2500	148 139 145 (144 $\pm$ 4.6)	8 13 9 (10 $\pm$ 2.6)	29 20 21 (23 $\pm$ 4.9)	37 27 22 (29 $\pm$ 7.6)	20 28 15 (21 $\pm$ 6.6)	
	5000	114 159 156 (143 $\pm$ 25.2)	5 11 10 (9 $\pm$ 3.2)	30 29 18 (26 $\pm$ 6.7)	29 38 37 (35 $\pm$ 4.9)	24 27 27 (26 $\pm$ 1.7)	
S9 mix (+)	0	176 165 163 (168 $\pm$ 7.0)	13 14 20 (16 $\pm$ 3.8)	38 22 21 (27 $\pm$ 9.5)	34 34 32 (33 $\pm$ 1.2)	29 18 20 (22 $\pm$ 5.9)	
	313	157 166 173 (165 $\pm$ 8.0)	14 17 12 (14 $\pm$ 2.5)	35 29 33 (32 $\pm$ 3.1)	25 39 46 (37 $\pm$ 10.7)	17 21 14 (17 $\pm$ 3.5)	
	625	177 158 173 (169 $\pm$ 10.0)	11 5 8 (8 $\pm$ 3.0)	29 33 21 (28 $\pm$ 6.1)	26 21 31 (26 $\pm$ 5.0)	31 31 27 (30 $\pm$ 2.3)	
	1250	169 149 178 (165 $\pm$ 14.8)	20 12 10 (14 $\pm$ 5.3)	35 23 33 (30 $\pm$ 6.4)	26 29 40 (32 $\pm$ 7.4)	21 29 12 (21 $\pm$ 8.5)	
	2500	158 155 166 (160 $\pm$ 5.7)	14 10 8 (11 $\pm$ 3.1)	31 20 19 (23 $\pm$ 6.7)	30 34 37 (34 $\pm$ 3.5)	11 11 14 (12 $\pm$ 1.7)	
	5000	150 186 173 (170 $\pm$ 18.2)	10 12 20 (14 $\pm$ 5.3)	18 23 33 (25 $\pm$ 7.6)	32 29 19 (27 $\pm$ 6.8)	18 23 20 (20 $\pm$ 2.5)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	624 657 656 (646 $\pm$ 18.8)	294 292 291 (292 $\pm$ 1.5)	258 279 307 (281 $\pm$ 24.6)	565 503 552 (540 $\pm$ 32.7)	1259 1270 880 (1136 $\pm$ 222.1)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	719 785 817 (774 $\pm$ 50.0)	305 293 259 (286 $\pm$ 23.9)	459 662 617 (579 $\pm$ 106.6)	396 367 373 (379 $\pm$ 15.3)	304 332 364 (333 $\pm$ 30.0)	

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene  
Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy)tetrahydrofuran were contained as impurities.

Table 2. Mutagenicity of 1,4-butanediol in reverse mutation test (II) on bacteria

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	156	161	158	5	14	14	28	27	30	32	39	39	27	21	14	
		(158 $\pm$ 2.5)			( 11 $\pm$ 5.2)			( 28 $\pm$ 1.5)			( 37 $\pm$ 4.0)			( 21 $\pm$ 6.5)			
	313	158	172	136	12	24	15	31	24	27	41	33	31	21	26	29	
		(155 $\pm$ 18.1)			( 17 $\pm$ 6.2)			( 27 $\pm$ 3.5)			( 35 $\pm$ 5.3)			( 25 $\pm$ 4.0)			
	625	169	162	185	11	8	20	27	21	33	30	39	52	33	35	33	
		(172 $\pm$ 11.8)			( 13 $\pm$ 6.2)			( 27 $\pm$ 6.0)			( 40 $\pm$ 11.1)			( 34 $\pm$ 1.2)			
	1250	136	163	163	15	7	14	20	16	19	55	51	51	19	24	30	
		(154 $\pm$ 15.6)			( 12 $\pm$ 4.4)			( 18 $\pm$ 2.1)			( 52 $\pm$ 2.3)			( 24 $\pm$ 5.5)			
S9 mix (+)	2500	172	173	161	19	17	14	22	28	20	57	64	36	19	31	18	
		(169 $\pm$ 6.7)			( 17 $\pm$ 2.5)			( 23 $\pm$ 4.2)			( 52 $\pm$ 14.6)			( 23 $\pm$ 7.2)			
	5000	156	171	155	9	9	13	23	28	20	43	59	43	24	29	26	
		(161 $\pm$ 9.0)			( 10 $\pm$ 2.3)			( 24 $\pm$ 4.0)			( 48 $\pm$ 9.2)			( 26 $\pm$ 2.5)			
S9 mix (+)	0	183	176	178	20	10	19	27	37	33	43	42	38	7	19	23	
		(179 $\pm$ 3.6)			( 16 $\pm$ 5.5)			( 32 $\pm$ 5.0)			( 41 $\pm$ 2.6)			( 16 $\pm$ 8.3)			
	313	168	163	181	15	13	17	27	37	44	31	31	26	22	25	13	
		(171 $\pm$ 9.3)			( 15 $\pm$ 2.0)			( 36 $\pm$ 8.5)			( 29 $\pm$ 2.9)			( 20 $\pm$ 6.2)			
	625	177	147	166	11	15	23	29	17	37	29	44	39	18	23	21	
		(163 $\pm$ 15.2)			( 16 $\pm$ 6.1)			( 28 $\pm$ 10.1)			( 37 $\pm$ 7.6)			( 21 $\pm$ 2.5)			
	1250	140	204	180	19	21	20	41	27	21	24	33	30	35	25	16	
		(175 $\pm$ 32.3)			( 20 $\pm$ 1.0)			( 30 $\pm$ 10.3)			( 29 $\pm$ 4.6)			( 25 $\pm$ 9.5)			
S9 mix (+)	2500	163	150	166	19	20	23	22	26	29	28	40	34	15	18	17	
		(160 $\pm$ 8.5)			( 21 $\pm$ 2.1)			( 26 $\pm$ 3.5)			( 34 $\pm$ 6.0)			( 17 $\pm$ 1.5)			
	5000	166	181	181	20	12	11	32	20	34	30	39	34	26	22	9	
		(176 $\pm$ 8.7)			( 14 $\pm$ 4.9)			( 29 $\pm$ 7.6)			( 34 $\pm$ 4.5)			( 19 $\pm$ 8.9)			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	492	666	699	140	125	102	402	392	361	691	637	688	623	753	427	
		(619 $\pm$ 111.2)			(122 $\pm$ 19.1)			(385 $\pm$ 21.4)			(672 $\pm$ 30.3)			(601 $\pm$ 164.1)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	826	842	883	254	240	271	694	707	753	436	429	442	277	296	341	
		(850 $\pm$ 29.4)			(255 $\pm$ 15.5)			(718 $\pm$ 31.0)			(436 $\pm$ 6.5)			(305 $\pm$ 32.9)			

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

Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy) tetrahydrofuran were contained as impurities.



Table 3. Mutagenicity of 1,4-butanediol in confirmation test of reverse mutation test on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)					
					Frameshift type		
					TA1537		
S9 mix (-)	0					12 12 10 ( 11 $\pm$ 1.2)	
	313					7 10 11 ( 9 $\pm$ 2.1)	
	625					11 11 18 ( 13 $\pm$ 4.0)	
	1250					9 10 11 ( 10 $\pm$ 1.0)	
	2500					5 13 11 ( 10 $\pm$ 4.2)	
	5000					7 13 14 ( 11 $\pm$ 3.8)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical					9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )					80	
	Number of colonies/plate					622 621 787 (677 $\pm$ 95.6)	

9AA:9-Aminoacridine  
Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy) tetrahydrofuran were contained as impurities.

# 1,4-ブタンジオールの 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

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of 1,4-Butanediol on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

1,4-ブタンジオ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)、短時間処理(6時間)ともに0.90 mg/ml(10 mM)の濃度においても50%を明らかに越える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において0.90 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix 非存在下で24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix 存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、1,4-ブタンジオールは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

### 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12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、牛胎児血清(FCS: Cansera International)を10%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時間および48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 存在下および非存在下で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. 被験物質

1,4-ブタンジオール(略号:BD, CAS No.:110-63-4, ロット番号:B5I04, 三菱化学(株))は、無色透明液体で、水に対しては50.8 mg/ml以上、DMSOでは2 M以上、アセトンでは50 mg/ml以上で溶解し、融点20.1°C、沸点228°C、蒸気圧0.1 mmHg(25°C)で、分子式C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>、分子量90.14、純度99.8%(不純物として1,4-アセトキシヒドロキシブテン-2 0.06 wt%、2-(4-ヒドロキシブチルオキシ)テトラヒドロフラン 0.07 wt%を含む、他は不明)の物質である。

被験物質原体は、吸湿性があり、酸の存在下でテトラヒドロフラン化する。

#### 5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用水(株)大塚製薬工場)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10%(v/v)になるように加えた。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

#### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

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™, オリンパス光学工業(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、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を明らかに越える増殖抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。

#### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理ともに0.90 mg/ml(10 mM)とし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。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、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

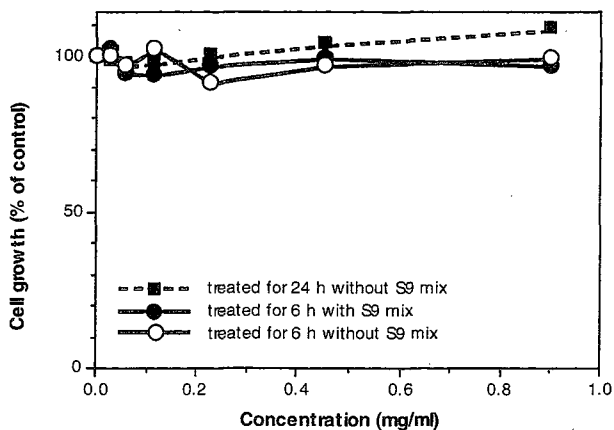


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,4-butanediol

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枚ディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本を作製し、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。

8. 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 μg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の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% ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

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(MMS)研究会<sup>2)</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。

10. 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。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法<sup>2)</sup>(多重性を考慮して familywise の有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、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>3)</sup>( $p < 0.05$ )を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

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。1,4-ブタンジオールを加えて24時間および48時間連続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。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。1,4-ブタンジオールを加えて S9 mix 存在下および非存在下で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。

従って、1,4-ブタンジオールは、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しないと結論した。

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.
- 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.
- 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.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂  
 試験担当者: 山影康次, 日下部博一,  
 渡辺千津子, 橋本恵子, 水谷正寛,  
 澁谷 徹  
 (財)食品薬品安全センター秦野研究所  
 〒257 神奈川県秦野市落合729-5  
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)  
 Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,  
 Chizuko Watanabe, Keiko Hashimoto,  
 Masahiro Mizutani, Tohru Shibuya  
 Hatano Research Institute, Food and Drug  
 Safety Center  
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan  
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 1, 4- butanediol (BD)\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								No. of cells			Concurrent <sup>6)</sup> cytotoxicity (%)			
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total	Others <sup>3)</sup>	with aberrations	Polyloid <sup>4)</sup>	Trend test <sup>5)</sup>				
											TAG (%)	TA (%)	(%)	SA	NA	(%)		
Control			200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	1 ( 0.5)	1.00			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	5	0	0	5	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.25			100.0	
BD	0.23	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.38			100.5	
BD	0.45	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.50	NT	NT	103.0	
BD	0.90	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.50			103.0	
MC	0.00005	24	200	4	41	109	0	1	0	155	0	88 (44.0)	88 (44.0)	0.63			-	
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.13			100.0	
BD	0.23	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.13			99.0	
BD	0.45	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.25	NT	NT	100.0	
BD	0.90	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.50			100.5	
MC	0.00005	48	200	5	38	103	7	4	10	167	1	90 (45.0)	86 (43.0)	0.50			-	

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, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$  when the incidence of TAG and polyloid was significantly different from historical solvent control at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. \*\*:Purity of test substance was 99.8 wt%. 1,4-Acetoxyhydroxybutene-2(0.06 wt%) and 2-(4-hydroxybutyloxy) tetrahydrofuran(0.07 wt%) were contained as impurities.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1, 4- butanediol (BD)\*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								No. of cells			Concurrent <sup>6)</sup> cytotoxicity (%)		
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total	Others <sup>3)</sup>	with aberrations	Polyloid <sup>4)</sup>	Trend test <sup>5)</sup>			
											TAG (%)	TA (%)	(%)	SA	NA	(%)		
Control				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.38			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1.00			100.0
BD	0.23	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.75			100.5
BD	0.45	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.75	NT	NT	97.5
BD	0.90	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	1 ( 0.5)	0.50			98.0
CPA	0.005	-	6-(18)	200	3	1	0	0	0	0	4	0	4 ( 2.0)	1 ( 0.5)	0.75			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	0.63			100.0
BD	0.23	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.75			100.0
BD	0.45	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.88	NT	NT	98.0
BD	0.90	+	6-(18)	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	0 ( 0.0)	0.50			95.0
CPA	0.005	+	6-(18)	200	14	139	298	3	1	100	555	0	160 (80.0)	159 (79.5)	0.63			-

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, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$  when the incidence of TAG and polyloid was significantly different from historical solvent control at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. \*\*:Purity of test substance was 99.8 wt%. 1,4-Acetoxyhydroxybutene-2(0.06 wt%) and 2-(4-hydroxybutyloxy) tetrahydrofuran(0.07 wt%) were contained as impurities.

# 1,4-ブタンジオールのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

## Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 1,4-Butanediol in Rats

### 要約

1,4-ブタンジオールの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験(以下、併合試験)を行い、同化合物の雌雄動物に及ぼす反復投与毒性ならびに生殖発生毒性について検討した。すなわち、0(媒体対照)、200、400および800 mg/kgの1,4-ブタンジオールを、Sprague-Dawley系(Crj:CD)ラットの雌雄(各13匹/群)に、交配前2週間および交配期間2週間経口投与した。さらに、雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで投与を継続して、剖検した。

#### 1. 反復投与毒性

いずれの被験物質投与群においても、投与後一過性に症状が発現し、投与量に依存してその重篤度は増加した。200 mg/kg投与群においては活動性が亢進した。400 mg/kg投与群においては活動性の亢進もみられたが、主として活動性は抑制され、800 mg/kg投与群においては昏睡状態に陥る動物もみられたが、5時間後には回復していた。

体重は400および800 mg/kg投与群において投与初期にその増加が抑制され、その後の増加率に変化はみられなかったが、初期の体重増加量の差が試験終了時まで継続した。また、これに付随して摂餌量も減少していた。

雄動物の血液学検査においては、何ら有意な変化は認められなかったが、血液生化学検査において、軽度で正常範囲内の変化であり、被験物質投与との関係は疑問視されるが、血糖値の統計的に有意な減少が観察された。

肉眼的解剖所見としては特筆すべき変化はみられなかったが、400 mg/kg以上の投与量群の膀胱の病理組織学観察により、移行上皮のびまん性過形成および粘膜固有層に線維化が認められた。

#### 2. 生殖発生毒性

産児の形態および生存率については異常はみられなかったが、800 mg/kg投与群において軽度ではあったが有意な体重減少がみられた。

#### 3. 無影響量

以上の試験成績から、本試験条件下では、1,4-ブタンジオールの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに200 mg/kg/dayを下回る量、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄ともに800 mg/kg/day、産児に対しては400 mg/kg/dayであると判断される。

### 方法

#### 1. 被験物質

本試験に使用した1,4-ブタンジオール(ロット番号:KCM2119、純度:98.0%)は、和光純薬工業(株)(東京)より提供を受けたもので、入手後は室温、遮光条件下で保管した。

被験物質は、局方注射用水(三亜製薬(株)、製造番号:DH004)に溶解し、いずれの用量においても1回の投与液量が5 mL/kg体重になるように含量を調整し、調製検体は、室温で密封保管して使用した。投与検体中に含まれる被験物質の含量については、当研究所において確認した。

#### 2. 使用動物および飼育方法

試験には、雌雄ともに7週齢で購入した日本チャールス・リバー(株)厚木飼育センター生産のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD, SPF)を使用した。購入した動物は、入荷後1週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、雌雄とも投与開始日(投与1日)の体重をもとに体重別層化無作為抽出法に準じて群分けした。

各動物は、基準温湿度各 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、および50-60%、換気回数約15回/時間、照明12時間(午前7時-午後7時)に制御された飼育室で、金属製ケージに個別に収容して飼育し、固型飼料(CA-1、日本クレア(株))および飲料水(水道水、秦野市水道局給水)を自由に摂取させた。妊娠18日(精子確認日=妊娠0日)以後の母動物は、飼育ケージの床にステンレス製床板を敷き、床敷として木製チップ(ホワイトフレック、日本チャールス・リバー(株))を適宜供給した。

#### 3. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験の投与量は、本試験と同系統のラット各群雌雄5匹に、1,4-ブタンジオールの200、400、600、800、1000 mg/kgを1週間強制的に連続経口投与した予備試験(以下予備試験と略記)の結果に基づき、体重増加の抑制傾向、活動性低下(投与4日まで)、活動性亢進(投与5日から)、血尿などの変化が認められた800 mg/kgを本試験の高用量に設定し、以下、公比2で減じて中用量には400 mg/kgを、低用量には200 mg/kgを設定した。

各用量の投与検体は、雌雄13匹から成る各群の動物に対して剖検日前日まで、毎日1回、ラット用胃管を用いて経口投与した。すなわち、雄に対しては交配期間14日間および交配期間終了後14日間までの連続42日間、

また、雌に対しては、交配前14日間と最長14日間の交配期間中(交尾まで)、ならびに交尾雌では妊娠期間を通して剖検前日までの哺育3日(分娩日=哺育0日)まで、交尾後、分娩の認められなかった動物に対しては妊娠24日相当日まで、それぞれ投与した。毎日の投与は、午前9時から12時の間に行い、各動物の投与液量(5 mL/kg)は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回の測定体重を基に、また、交尾後の雌については妊娠0日(交尾確認日)の体重を基にそれぞれ算出した。

#### 4. 観察方法

##### 1) 親動物

##### A. 一般状態の観察

雌雄とも、全例について飼育期間中毎日1回以上観察した。

##### B. 体重測定

雌雄とも、全例について体重を試験期間中週1回(雄:投与1, 8, 15, 22, 29, 36, 42日, 雌:投与1, 8, 15日)および剖検日に測定した。雄動物と同居中の雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾した雌では、妊娠0, 7, 14, 20日に、さらに、分娩した雌では、哺育0および4日の体重を測定した。

##### C. 摂餌量測定

雌雄とも、全例について体重測定日と同日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を算出した。2週間の交配期間中は摂餌量を測定しなかった。交尾した雌では、妊娠0-7, 7-14, 14-20日の、さらに、分娩した雌では、哺育0-4日の摂餌量を測定した。

##### D. 尿検査

検査日は投与1, 8, および15日とし、全例について投与後約4時間目の尿を強制排泄させて、尿中の血色素について試験紙法(マルティスティックス/クリニテック200, マイルス三共)により尿検査を実施した。採尿が困難な場合には、極度の刺激を避けるため採尿を中止した。

##### E. 交配

交配は、投与15日の夕方から最長14日間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾成立の確認は、毎朝、膣栓および膣垢標本中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率[(交尾動物数/交配動物数)×100]、受胎率[(受胎動物数/交尾動物数)×100]、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

##### F. 分娩・哺育状態の観察

各群とも交尾した雌は、全例を自然分娩させた。分娩

状態の観察は分娩を直接観察できたものについてのみ行った。また、直接観察できなかった例においても分娩後の徴候から分娩状態の良否が判定できるものについては、それを記録した。分娩後は哺育状態を観察し、異常の有無を記録した。

##### G. 分娩日の規定

分娩の確認は、午前9~11時に限定し、この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物について、その日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎて分娩を終了した動物については、翌日を分娩日とした。

分娩を確認した全例について妊娠期間(妊娠0日から分娩日までの日数)を算定し、出産率[(生児出産雌数/受胎動物数)×100]を各群について求めた。

##### H. 最終検査

##### (1) 雄動物

全例について、最終投与日に絶食を開始し、その翌日(絶食開始18~24時間後)に以下の検査を行った。

##### イ. 血液学検査

ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりEDTAを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コールターエレクトロニクス)を用いた電気抵抗法により、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、平均赤血球容積(MCV)、血小板数を自動測定し、また、吸光度法により血色素量(Hb)を自動測定してそれらの値から平均赤血球血色素量(MCH=Hb×1000/RBC)、ヘマトクリット値(Ht=RBC×MCV×0.001)、平均赤血球血色素濃度(MCHC=Hb×100/Ht)を算出した。白血球分類は、Wright-Giemsa染色した静脈血塗抹標本を光学顕微鏡下で観察することにより視算した。

##### ロ. 血液生化学検査

全例について、血液学検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して、遠心方式生化学自動分析装置COBAS-FARA(ロシュ)を用いて総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD・DAOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼG6PDH法)、尿素窒素濃度(BUN;ウレアーゼGl.DH法)、クレアチニン濃度(Jaffé法)、アルカリフォスファターゼ活性(パラニトロフェニルリン酸基質法)、GOTおよびGPT活性(SSCC法)、総ビリルビン濃度(ビリルビン「ロシュ」キットSシリーズ)、カルシウム濃度(OCPC法)、無機リン濃度(Inorg.phos.;モリブデン酸直接法)、γ-GTP活性(γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)を測定し、全自動電解質分析装置EA05(A&T)を用いてイオン電極法により、塩素、ナトリウムおよびカリウムの各濃度を測定した。また、A/G比は上記の測定結果に基づいて算出した。

##### ハ. 病理学検査

全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を実施した。その際、胸腺、肝臓、腎臓、精巣および精巣上体の重量を測定し、併せて比体重値(相対重量)を算出した。

精巢および精巢上体を除くこれらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱ならびに右側ハーダー腺は10 w/v%ホルマリン液に、精巢および精巢上体はブアン液に固定して保存した。固定器官のうち、膀胱はすべての投与群について、また、その他の器官は対照群および高用量群について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学検査を行った。

## (2) 雌動物

分娩した動物は哺育4日に、交尾は確認されたが分娩しなかった動物は妊娠25日相当日に、それぞれペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させて剖検した。妊・不妊のいずれの例においても卵巣および子宮を摘出し、子宮については着床数を数え、着床の認められた動物を妊娠例とした。卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数え、ブアン液に固定して保存した。不妊動物の子宮についてはSalewski法<sup>1)</sup>により不妊を確認し、卵巣については病理組織学検査を行った。また、肝臓、腎臓および胸腺重量を測定した。これらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱および右側ハーダー腺は、10 w/v%ホルマリン液に固定して保存した。これらの固定器官は対照群および高用量群について雄と同様に病理組織学検査を行った。なお、膀胱、胸腺および脾臓に関しては、対照群と高用量群の所見の間に差異が認められたため、これらの器官に関しては、低および中用量群の雌動物についても病理組織学観察を行った。

## 2) 出生児

### A. 産児数の算定

哺育0日に産児数(生存児+死亡児)を調べ、分娩率[(産児数/着床痕数)×100]および生児出産率[(出生児数/着床痕数)×100]を求めた。また、産児の外表面奇形の有無および性別を調べ、生存児の性比[(雄の生児数/雌の生児数)×100]を算出した。

### B. 死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ、出生率[(出生産児数/産児数)×100]および新生児の4日の生存率[(哺育4日の生児数/哺育0日の生児数)×100]を求めた。死亡児は剖検し、異常の有無、外表および内部器官の肉眼的観察を行った。

### C. 体重測定

哺育0日および4日に一腹単位で雌雄別に体重(litter重量)を測定し、(litter重量/測定児数)を各腹について求めた。

### D. 剖検

哺育4日に全例をエーテル吸入により致死させて剖検し、外表および内部器官の肉眼的観察を実施した。

## 5. 統計解析

交尾率および受胎率については $\chi^2$ 検定を行った。その

他のすべてのデータは、個体毎に得られた値あるいは各腹児の平均値を1標本として、先ず、Bartlett法により各群の分散の均一性について検定した。その結果、分散が均一であると判定された場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合にはDunnett法<sup>2)</sup>あるいはScheffé法<sup>3)</sup>により対照群と各被験物質投与群との間で平均値の差の検定を行った。分散が均一でなかった場合は、Kruskal-Wallisの順位検定<sup>4)</sup>を行い、群間に有意性が認められた場合に対照群と各被験物質投与群との差についてDunnett型あるいはScheffé型の検定を行った。病理組織学検査所見中、対照群および被験物質投与群の両方に共通してみられ、被験物質投与群で頻度および程度が増加している所見についてはWilcoxonの順位和検定法により対照群と被験物質投与群の差について有意差検定を行った。有意水準は、5%および1%とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性(親動物所見)

#### 1) 一般状態

いずれの投与群の雌雄動物にも死亡は認められなかった。

200 mg/kg 投与群の雌雄動物において、3回目投与後より、活動性の増加を示す動物がみられた。こうした動物の数は投与1週頃まで次第に増加し、雌雄動物それぞれ10および11匹に認められたが、その後は次第に減少し、投与23日以後はみられなくなった。この症状は投与後約20分頃より始まり、その後約30分程で消失した。400 mg/kg 投与群においては、全ての動物において、初回投与後より活動性の増加が観察され、投与回数が増加と共に症状の現われ方に変化が認められた。すなわち投与初期には、投与約20分後より活動性の減少が現われ、約30分後には回復したが、投与3日頃より先ず活動性の増加が現し、その後に減少する動物も観察されるようになった。また、活動性の増加あるいは減少の後、腹臥位を呈する動物も少数みられた。雄動物においては、この症状は投与期間を通して観察されたが、雌動物においては、妊娠期間中は軽度となる傾向が認められた。800 mg/kg 投与群においても、投与20分後頃より全ての動物に毒性症状が認められたが、症状はさらに重篤で、活動性の減少から腹臥位を呈した。また、投与初期には昏睡に陥る動物も雌雄にそれぞれ数匹認められた。しかし、こうした症状も投与5時間後には消失していた。この投与群においても、投与開始後1週間を経過すると投与回数が増加と共に、特に雌動物においては妊娠期間中の症状の程度および発現動物数は減少した。しかし、この投与群においては、投与期間の後半期に、雌動物においては妊娠後半期に、軽度の眼球突出を示す動物が雌雄にそれぞれ7および6匹認められた。哺育期間中は、妊娠期間中に比較して、活動性の減少および昏睡状態を呈する動物数は増加し、またこうした症状を示す時間も延長する傾向にあった。

## 2) 体重

## A. 雄動物 (Table 1)

200 mg/kg 投与群においては、投与期間中の平均体重は対照群と比較して有意差は認められなかったが、400 mg/kg および 800 mg/kg 投与群においては、投与初期の体重増加抑制による平均体重の差が、実験終了時まで用量依存的に継続して認められた。すなわち、400 mg/kg 投与群では、投与期間中の平均体重は、対照群に比較して統計的に有意ではないが低値であった。また、800 mg/kg 投与群においては、投与期間を通じて、平均体重は有意 ( $p < 0.01$ ) に減少した。

## B. 雌動物 (Table 2)

## (1) 交配前

200 mg/kg 投与群の平均体重は、対照群と殆ど同等であった。400 mg/kg 投与群では投与開始後の平均体重は、対照群と比較した場合、低値であったが、有意な変化ではなかった。800 mg/kg 投与群においては、投与開始後1週間および2週間後の平均体重は有意 ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) に減少した。

## (2) 妊娠期間

被験物質投与群の妊娠期間中の平均体重は、特に妊娠後半期において、投与量依存的な減少が認められた。200 mg/kg 投与群においては、対照群に比較して統計的に有意な減少ではなかったが、400 mg/kg 投与群においては、妊娠14日の平均体重は有意 ( $p < 0.05$ ) に減少し、妊娠20日の平均体重も有意差は認められなかったが、低値のまま推移した。800 mg/kg 投与群の平均体重は、妊娠期間を通じて有意 ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) に減少した。

## (3) 哺育期間

哺育期間の体重は、妊娠末期の平均体重の差が継続的に示されていると考えられ、分娩日および哺育4日の平均体重は、400 mg/kg 投与群および800 mg/kg 投与群で、対照群に比較して有意 ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) に減少した。

## 3) 摂餌量

## A. 雄動物 (Table 3)

200 mg/kg 投与群の摂餌量については、対照群に比較して殆ど差がみられなかった。400 mg/kg 投与群においては、投与開始後2週間の摂餌量が軽度 (7.6 % ~ 9.8 %) ではあったが有意 ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) に減少していた。800 mg/kg 投与群においては、測定した全ての期間にわたって有意 ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) に減少しており、減少の程度は約7 % ~ 20 % であった。

## B. 雌動物 (Table 4)

## (1) 交配前

200 mg/kg 投与群の摂餌量は対照群と同等であった。400 mg/kg 投与群の摂餌量はいずれの週においても、対

照群に比較して減少 (6.3 % ~ 7.5 %) しており、投与開始後の1週間においてはこの減少は統計的に有意 ( $p < 0.05$ ) であった。800 mg/kg 投与群においても統計的に有意 ( $p < 0.01$ ) な減少が認められ、対照群に比較した減少の程度は約10 % ~ 15 % であった。

## (2) 妊娠期間

200 mg/kg 投与群の摂餌量は、いずれの測定時においても対照群より減少 (2.3 % ~ 4.7 %) していたが、統計的に有意なものではなかった。400 mg/kg 投与群においても摂餌量はすべての測定時に減少 (5.6 % ~ 10.2 %) しており、妊娠前半期の減少は統計的に有意 ( $p < 0.05$  あるいは  $p < 0.01$ ) であった。800 mg/kg 投与群の摂餌量は、いずれの測定時においても有意 ( $p < 0.05$  あるいは  $p < 0.01$ ) に減少しており、その減少は対照群に比較して約9 % ~ 11 % であった。

## (3) 哺育期間

被験物質各投与群の摂餌量はいずれの投与量群においても対照群に比較して減少 (8.8 % ~ 15.0 %) しており、減少の程度は投与量に依存していた。しかし、摂餌量の個体差が比較的大きかったため、統計的有意差はみられなかった。

## 4) 尿検査

いずれの被験物質各投与群およびいずれの検査日においても、尿中に血色素が認められた動物の頻度に有意差はみられなかった。しかし、800 mg/kg 投与群の投与初日の検査において、著しい量の血色素を排泄した動物が雌雄にそれぞれ3および2匹認められた。

## 5) 解剖時検査

## A. 雄

## (1) 血液学検査 (Table 5)

赤血球系の変化として400 mg/kg 投与群のHb (15.0 g/dL) および800 mg/kg 投与群のHb (14.9 g/dL) ならびにHt (42.7 %) が統計的に有意 ( $p < 0.05$  あるいは  $p < 0.01$ ) に減少していたが、その程度は極めて軽度のものであった。当研究所の14週齢雄ラットにおける過去5試験のHb および Ht は、それぞれ14.5 ~ 15.6 g/dL および 40.1 ~ 44.3 % であり、上記変化はすべてこれらの範囲内に含まれることから、毒性学的に無意味なものと考えられる。

## (2) 血液生化学検査 (Table 6)

被験物質各投与群において、血糖値の軽度ではあるが有意 ( $p < 0.01$ ) な減少が認められた。対照群における血糖値の変動幅は、129 ~ 150 mg/dL であったが、200、400 および 800 mg/kg 投与群ではそれぞれ105 ~ 138、115 ~ 141 および 98 ~ 131 mg/dL であった。また、200 および 800 mg/kg 投与群においてカリウムの軽度ではあるが統計的に有意 ( $p < 0.01$ ) な減少、および、これら投与群におけるリンの軽度ではあるが統計的に有意 ( $p < 0.05$  あるいは  $p < 0.01$ ) な増加が認められた。これら



カリウムおよびリンの変化はいずれも正常範囲内の変化であり、毒性学的には無意味なものと考えられる。

### (3) 器官重量 (Table 7)

400および800 mg/kg投与群の肝臓実重量が有意 ( $p<0.05$ あるいは $p<0.01$ )に減少していたが、体重比重量には有意差は認められなかった。この変化は体重減少を反映したものと考えられる。また、800 mg/kg投与群においては、腎臓実重量の有意 ( $p<0.05$ )な減少および精巣の比重量の有意 ( $p<0.05$ )な増加が認められたが、いずれも体重減少に関連して生じた変化であり、毒性学的に意味のある変化ではなかった。

### (4) 剖検

被験物質投与に起因したと考えられる異常所見は認められなかった。

### (5) 病理組織学検査 (Table 8)

膀胱、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、精巣、精巣上体およびハーダー腺に以下の所見が認められた。その他の組織に異常は観察されなかった。

#### (膀胱)

400 mg/kg投与群の5匹および800 mg/kg投与群の7匹に粘膜上皮のびまん性過形成がみられ、400 mg/kg投与群の4匹および800 mg/kg投与群の12匹の粘膜固有層に線維化が認められた。その他、対照群の3匹、400 mg/kg投与群の2匹および800 mg/kg投与群の1匹の粘膜固有層にリンパ球の浸潤が認められた。

#### (肝臓)

対照群および800 mg/kg投与群に小葉周辺性の肝細胞の脂肪化、小肉芽腫、髓外造血、巣状壊死および壊死巣への好中球の浸潤がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

#### (腎臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、萎縮あるいは再生尿細管、eosinophilic body、尿細管の限局性拡張、腎盂の拡張がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、対照群の1匹にリンパ球の浸潤が認められた。

#### (心臓)

対照群の1匹に心筋の線維化がみられ、対照群および800 mg/kg投与群の各1匹に巣状壊死が認められた。

#### (脾臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、髓外造血巣および色素沈着がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、対照群の1匹および800 mg/kg投与群の3匹に、極めて軽度の鬱血が認められた。

#### (精巣)

800 mg/kg投与群の1匹の精細管内に、多核巨細胞が認められた。

#### (精巣上体)

対照群および800 mg/kg投与群に、リンパ球の浸潤、

精子肉芽腫がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。

#### (ハーダー腺)

対照群の4匹および800 mg/kg投与群の1匹にリンパ球の浸潤がみられた以外に変化は認められなかった。

## B. 雌動物

### (1) 器官重量 (Table 7)

400 mg/kg投与群においては、肝臓の実重量が有意 ( $p<0.05$ )に減少し、腎臓の比重量が有意 ( $p<0.05$ )に増加していた。800 mg/kg投与群においては、肝臓の実重量および比重量が有意 ( $p<0.01$ )に減少し、また、腎臓の実重量も有意 ( $p<0.05$ )に減少していた。これらの変化はいずれも体重減少に伴って生じた変化であり、毒性学的に意味のある変化ではなかった。

### (2) 剖検

被験物質投与に起因すると思われる異常所見はなかった。

### (3) 病理組織学検査 (Table 8)

膀胱、胸腺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓およびハーダー腺に以下の所見が認められた。その他の組織に異常は観察されなかった。

各器官における観察所見の概要は以下の通りである。

#### (膀胱)

400 mg/kg投与群の1匹および800 mg/kg投与群の3匹に上皮のびまん性過形成がみられ、400 mg/kg投与群の2匹および800 mg/kg投与群の12匹の粘膜固有層に線維化が認められた。その他、200 mg/kg投与群の1匹の粘膜固有層にリンパ球の浸潤が認められた。

#### (胸腺)

対照群を含む各投与群に萎縮がみられたが、400および800 mg/kg投与群では、その頻度は対照群よりも高かった。その他、400および800 mg/kg投与群の各1匹に、出血が認められた。

#### (肝臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、小葉周辺性の脂肪化、小肉芽腫および髓外造血がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

#### (腎臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、萎縮あるいは再生尿細管がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。その他、800 mg/kg投与群の1匹に、皮髄境界部の石灰沈着が認められた。

#### (心臓)

対照群の1匹に巣状壊死がみられた。

#### (脾臓)

対照群を含む各群に髓外造血巣がみられたが、800 mg/kg投与群では造血細胞の減少が認められる例が多かった。その他、対照群を含む各群に色素沈着がみられたが、各群間に頻度および程度の差はなかった。その他、400 mg/kg投与群の2匹および800 mg/kg投与群の3匹

に鬱血が見られ、対照群の1匹に線維化が認められた。  
(ハーダー腺)

対照群および800 mg/kg投与群の各1匹に色素沈着の亢進がみられた。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 生殖関連所見

#### A. 交配成績 (Table 9)

交尾率はいずれの投与群においても100%であった。不妊動物が、対照群、200および800 mg/kg投与群にそれぞれ1, 1および2匹認められたが、被験物質投与と関連する有意な変化ではなかった。

#### B. 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態に関しても異常所見はなかった。

#### C. 妊娠黄体数、着床数および着床率 (Table 10)

これら観察項目に関しても異常所見はなかった。

#### D. 出産率および妊娠期間 (Table 10)

対照群を含むいずれの投与群においても、全ての妊娠動物が分娩し、妊娠期間に関しても異常はみられなかった。

### 2) 出生児所見

#### A. 一般状態および生存性 (Table 10)

生存性に関しては、対照群を含むいずれの投与群においても異常所見はなかった。

#### B. 体重 (Table 10)

対照群に比較した雌雄産児の生後4日の体重が、800 mg/kg投与群において僅か(10.2%および8.8%)ではあるが有意( $p < 0.05$ )に減少した。

#### C. 形態

産児の形態に関しては、対照群を含むいずれの投与群においても異常所見はなかった。

また、こうした投与の進行に伴う変化は、1,4-ブタンジオールの代謝速度の変化を示唆していると思われる。妊娠期間中に症状が軽減する傾向がみられた理由としては、この期間中動物の体重が急速に増加し、妊娠末期までに約50%~60%増加していたのに対し、1,4-ブタンジオールの妊娠期間中の投与量が妊娠0日の体重に基づいていたことによるものと思われる。

雄動物の血液生化学検査において、軽度ではあるが、統計的に有意な減少が観察された。Jedrychowskiら<sup>7)</sup>は1,4-ブタンジオールの最高500 mg/kgまでの投与量を、Wistar系ラットに28日間経口投与したが、血糖値に関しては、統計的に有意差は認めていないがその平均値は投与量の増加とともにむしろ上昇していた。したがって本試験でみられた血糖値の軽度の減少は、被験物質投与によるものか否か、疑問視される。

膀胱の病理組織学観察において、移行上皮のびまん性過形成および粘膜固有層の線維化が400 mg/kg以上の投与量群において観察されたが、これらの所見は過去の報告には見当たらなかった。しかし1,4-ブタンジオールは各種器官に充血をもたらすことが報告されており<sup>11)</sup>、充血による透過性の亢進が被験物質あるいはその代謝物の組織中への移行を助長し、その結果これら物質が膀胱粘膜を刺激したと考えることができよう。

生殖発生毒性に関しては、親世代の生殖能に関連した観察項目において、被験物質投与との関連を示す変化は認められなかった。産児に関しては、雌雄産児の生後4日の体重が、800 mg/kg投与群において減少した。この減少は母動物の哺育4日の平均体重が低値であったことに起因しているのかもしれないが、毒性学的意義は不明である。

以上の試験成績から、本試験条件下では、1,4-ブタンジオールの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに200 mg/kg/dayを下回る量、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄ともに800 mg/kg/day、産児に対しては400 mg/kg/dayであると判断される。

## 文献

- 1) E. Salewski, *Naunyn-schmiedebergs arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **247**, 367 (1964).
- 2) C. W. Dunnett, *Biometrics.*, **20**, 482 (1964).
- 3) H. Scheffé, *Biometrika.*, **40**, 87 (1953).
- 4) W. H. Kruskal and W. A. Wallis, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **47**, 583 (1952).
- 5) P. V. Taberner, J. T. Rick and G. A. Kerkut, *Life Sciences*, **11**, 335 (1972).
- 6) P. V. Taberner and M. J. Pearce, *J. Pharm. Pharmacol.*, **26**, 597 (1974).
- 7) R. A. Jedrychowski, R. Görny, J. Stetkiewicz and I. Stetkiewicz, *Polish J. Occu. Med.*, **3**, 421 (1990).
- 8) National Toxicology Program, *Final Study Report*. (1994).

## 考察

主要な変化として、行動あるいは一般状態に対する影響、血糖値の軽度の低下および膀胱における病理組織学変化が認められた。

1,4-ブタンジオール投与による毒性試験はいくつか報告されており<sup>5-8)</sup>、その中で共通して観察されている一般状態の変化としては、表現上の差異はあるものの、活動性の減少および睡眠であった。本試験においても、こうした変化は400 mg/kg以上の投与量において観察された。200 mg/kg投与群においては活動性はむしろ亢進したが、これは1,4-ブタンジオールの生物学的活性<sup>9), 10)</sup>に起因する変化と考え、毒性変化とはみなさなかった。400 mg/kg投与群においては、投与の進行に伴って活動性の現われ方はやや変化し、亢進を示す動物も発現した。

- 9) F. Poidrugo and O. C. Snead III, *Neuropharmacol.*, **23**, 109(1984).
- 10) H. Sprince, J. A. Josephs Jr. and C. R. Wilpizeski, *Life Sciences*, **5**, 2041(1966).
- 11) S. P. Knysnova, *Hyg. Sanit.*, **33**, 41(1968).

## 連絡先

試験責任者：藤井孝朗  
試験担当者：橋本 豊，佐藤昌子，宮原 敬，  
田子和美，関 剛幸，小島幸一，  
吉村慎介，畔上二郎，三枝克彦，  
稲田浩子，松木容彦，中込まどか  
(財)食品薬品安全センター  
〒257-8523 神奈川県秦野市落合725-3  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

## Correspondence

Authors:Takaaki Fujii (Study director)  
Yutaka Hashimoto, Masako Sato,  
Takashi Miyahara, Kazumi Tago,  
Takayuki Seki, Kohichi Kojima,  
Shinsuke Yoshimura, Jiro Azegami,  
Katsuhiko Saegusa, Hiroko Inada,  
Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center in Reproductive Toxicology  
729-5 Ochiai, Hadano city, Kanagawa, 257-8523,  
Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Body weights of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration								
1 (Init. wt.)	296.6 ± 7.3	(13)	296.7 ± 8.2	(13)	297.0 ± 7.3	(13)	296.6 ± 8.2	(13)
8	335.0 ± 17.1	(13)	335.3 ± 16.3	(13)	323.1 ± 12.8	(13)	304.8 ± 14.6**	(13)
15	371.5 ± 20.6	(13)	372.3 ± 23.0	(13)	357.6 ± 16.6	(13)	335.0 ± 15.5**	(13)
22	395.9 ± 23.8	(13)	398.7 ± 25.4	(13)	381.4 ± 19.1	(13)	358.5 ± 18.7**	(13)
29	424.3 ± 27.7	(13)	428.2 ± 28.3	(13)	405.2 ± 21.1	(13)	381.5 ± 17.3**	(13)
36	446.2 ± 30.1	(13)	454.1 ± 31.7	(13)	425.3 ± 20.9	(13)	402.7 ± 18.9**	(13)
42	463.4 ± 31.1	(13)	470.0 ± 32.7	(13)	441.4 ± 23.2	(13)	416.4 ± 18.9**	(13)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.  
 Parenthesis indicates number of animals.  
 \*\*: significant difference from control, p<0.01

Table 2 Body weights of female rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration (Pre-mating period)								
1 (Init. wt.)	216.5 ± 6.5	(13)	216.6 ± 7.4	(13)	216.1 ± 6.3	(13)	216.0 ± 6.3	(13)
8	235.1 ± 12.6	(13)	232.2 ± 10.9	(13)	229.2 ± 7.3	(13)	219.7 ± 8.8**	(13)
15	251.8 ± 15.4	(13)	251.8 ± 16.2	(13)	245.4 ± 7.4	(13)	237.9 ± 11.2*	(13)
Days of pregnancy								
0	259.2 ± 14.9	(12)	260.7 ± 16.5	(12)	252.5 ± 7.8	(13)	242.1 ± 13.5*	(11)
7	300.4 ± 20.1	(12)	292.5 ± 19.3	(12)	285.3 ± 10.9	(13)	279.4 ± 18.0*	(11)
14	339.0 ± 22.6	(12)	329.4 ± 22.2	(12)	318.1 ± 11.4*	(13)	312.7 ± 21.0**	(11)
20	412.9 ± 23.3	(12)	401.1 ± 27.1	(12)	391.0 ± 18.5	(13)	382.4 ± 29.4*	(11)
Days of lactation								
0	308.2 ± 32.1	(12)	302.4 ± 20.1	(12)	279.1 ± 12.1*	(13)	276.8 ± 21.7*	(11)
4	355.1 ± 23.4	(12)	321.1 ± 26.0	(12)	305.6 ± 16.9**	(13)	296.5 ± 23.4**	(11)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.  
 Parenthesis indicates number of animals.  
 \*: significant difference from control, p<0.05  
 \*\*: significant difference from control, p<0.01

Table 3 Food consumption of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration								
1 ~ 8	198.2 ± 13.9	(13)	199.1 ± 13.8	(13)	183.1 ± 9.8*	(13)	159.5 ± 15.1**	(13)
8 ~ 15	197.6 ± 12.0	(13)	192.8 ± 14.1	(13)	178.3 ± 12.2**	(13)	162.7 ± 15.0**	(13)
29 ~ 36	187.9 ± 11.8	(13)	193.4 ± 15.2	(13)	178.3 ± 8.8	(13)	174.9 ± 11.2*	(13)
36 ~ 42	161.5 ± 9.8	(13)	164.4 ± 11.8	(13)	154.0 ± 7.9	(13)	145.9 ± 9.1**	(13)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.  
 Parenthesis indicates number of animals.  
 \*: significant difference from control, p<0.05  
 \*\*: significant difference from control, p<0.01

Table 4 Food consumption of female rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration (Pre-mating period)								
1~ 8	140.4 ± 13.1	(13)	139.9 ± 8.7	(13)	129.9 ± 9.0*	(13)	118.7 ± 8.9**	(13)
8~15	141.9 ± 11.7	(13)	145.5 ± 11.2	(13)	133.0 ± 7.4	(13)	128.1 ± 9.5**	(13)
Days of pregnancy								
0~ 7	173.2 ± 14.2	(12)	165.1 ± 13.2	(12)	157.8 ± 10.2*	(13)	158.3 ± 16.7*	(11)
7~14	183.6 ± 17.6	(12)	177.3 ± 15.3	(12)	164.8 ± 8.6**	(13)	167.6 ± 13.2*	(11)
14~20	154.1 ± 12.9	(12)	150.6 ± 14.3	(12)	145.5 ± 9.4	(13)	137.7 ± 10.5**	(11)
Days of lactation								
0~ 4	121.9 ± 12.5	(12)	111.2 ± 24.7	(12)	108.6 ± 21.6	(13)	103.6 ± 22.0	(11)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

\* :significant difference from control, p<0.05

\*\* :significant difference from control, p<0.01

Table 5 Hematology of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Male								
Red blood cells								
Count (× 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	821 ± 24	(13)	805 ± 34	(13)	803 ± 37	(13)	797 ± 22	(13)
Hemoglobin (g/dl)	15.6 ± 0.6	(13)	15.1 ± 0.4	(13)	15.0 ± 0.6*	(13)	14.9 ± 0.5**	(13)
Hematocrit (%)	44.4 ± 1.5	(13)	43.5 ± 1.3	(13)	42.9 ± 1.8	(13)	42.7 ± 1.5*	(13)
MCV (μm <sup>3</sup> )	54.1 ± 1.9	(13)	54.1 ± 2.0	(13)	53.5 ± 1.2	(13)	53.6 ± 2.0	(13)
MCH (pg)	19.0 ± 0.7	(13)	18.8 ± 0.7	(13)	18.6 ± 0.4	(13)	18.7 ± 0.7	(13)
MCHC (%)	35.1 ± 0.6	(13)	34.8 ± 0.3	(13)	34.8 ± 0.3	(13)	34.9 ± 0.3	(13)
White blood cells								
Count (× 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	71 ± 14	(13)	58 ± 14*	(13)	54 ± 10**	(13)	67 ± 14	(13)
Band neutrophil (%)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Segmented neutrophil (%)	14 ± 7	(13)	15 ± 6	(13)	17 ± 7	(13)	14 ± 7	(13)
Eosinophil (%)	1 ± 1	(13)	1 ± 1	(13)	1 ± 1	(13)	1 ± 2	(13)
Basophil (%)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Monocyte (%)	3 ± 2	(13)	4 ± 2	(13)	4 ± 2	(13)	4 ± 3	(13)
Lymphocyte (%)	82 ± 7	(13)	79 ± 8	(13)	78 ± 8	(13)	80 ± 9	(13)
Platelet								
Count (× 10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	102.9 ± 12.3	(13)	100.1 ± 11.0	(13)	104.7 ± 10.8	(13)	97.8 ± 8.0	(13)

Values are expressed as mean±S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

\* :significant difference from control, p<0.05

\*\* :significant difference from control, p<0.01

Table 6 Blood chemistry of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0		200		400		800	
Total protein(g/dL)	5.6 ± 0.2	(13)	5.5 ± 0.1	(13)	5.4 ± 0.2	(13)	5.4 ± 0.2	(13)
Albumin(g/dL)	3.0 ± 0.1	(13)	2.9 ± 0.1	(13)	2.9 ± 0.1	(13)	2.9 ± 0.1	(13)
A/G	1.12 ± 0.08	(13)	1.17 ± 0.12	(13)	1.16 ± 0.13	(13)	1.16 ± 0.14	(13)
BUN(mg/dL)	16 ± 1	(13)	15 ± 2	(13)	15 ± 2	(13)	17 ± 3	(13)
Creatinine(mg/dL)	0.7 ± 0.1	(13)	0.7 ± 0.0	(13)	0.7 ± 0.1	(13)	0.7 ± 0.1	(13)
Glucose(mg/dL)	139 ± 7	(13)	127 ± 10**	(13)	128 ± 9**	(13)	116 ± 9**	(13)
Total cholesterol(mg/dL)	29 ± 3	(13)	27 ± 6	(13)	27 ± 4	(13)	29 ± 4	(13)
Total bilirubin(mg/dL)	0.06 ± 0.02	(13)	0.06 ± 0.04	(13)	0.07 ± 0.02	(13)	0.06 ± 0.03	(13)
Na(mEq/L)	143.9 ± 0.9	(13)	144.5 ± 0.7	(13)	143.2 ± 0.8	(13)	143.6 ± 1.3	(13)
K(mEq/L)	4.17 ± 0.20	(13)	3.92 ± 0.17**	(13)	4.08 ± 0.20	(13)	3.89 ± 0.15**	(13)
Cl(mEq/L)	108.7 ± 1.3	(13)	108.8 ± 1.1	(13)	108.6 ± 1.3	(13)	108.2 ± 1.0	(13)
Ca(mg/dL)	8.5 ± 0.2	(13)	8.6 ± 0.2	(13)	8.6 ± 0.3	(13)	8.7 ± 0.2	(13)
Inorg. phos.(mg/dL)	5.6 ± 0.3	(13)	6.0 ± 0.5*	(13)	5.8 ± 0.3	(13)	6.5 ± 0.5**	(13)
ALP(U/L)	303 ± 44	(13)	280 ± 27	(13)	297 ± 34	(13)	307 ± 48	(13)
GPT(U/L)	31 ± 4	(13)	30 ± 5	(13)	34 ± 6	(13)	29 ± 3	(13)
GOT(U/L)	68 ± 6	(13)	65 ± 10	(13)	66 ± 7	(13)	66 ± 7	(13)
γ-GTP(U/L)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)

Values are expressed as mean±S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

\* :significant difference from control, p<0.05

\*\* :significant difference from control, p<0.01

Table 7 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Male	Final body weight (g)	434.3 ± 29.3	(13)	443.5 ± 30.7	(13)	415.3 ± 20.4	(13)	390.8 ± 18.0**	(13)
	Liver (g)	12.15 ± 1.36 <sup>a</sup>	(13)	11.70 ± 0.96	(13)	11.09 ± 1.02*	(13)	10.34 ± 0.83**	(13)
		2.79 ± 0.20 <sup>b</sup>		2.64 ± 0.13		2.67 ± 0.17		2.64 ± 0.15	
	Kidneys (g)	2.82 ± 0.20	(13)	2.86 ± 0.22	(13)	2.64 ± 0.18	(13)	2.62 ± 0.16*	(13)
		0.65 ± 0.04		0.65 ± 0.03		0.64 ± 0.03		0.67 ± 0.03	
	Thymus (mg)	348.8 ± 103.5	(13)	343.3 ± 94.8	(13)	317.8 ± 79.6	(13)	286.2 ± 69.8	(13)
		80.9 ± 25.5		77.6 ± 21.6		76.2 ± 17.2		73.3 ± 18.0	
	Testes (g)	3.06 ± 0.20	(13)	3.11 ± 0.37	(13)	3.14 ± 0.21	(13)	3.06 ± 0.17	(13)
		0.71 ± 0.05		0.70 ± 0.08		0.76 ± 0.06		0.78 ± 0.07*	
	Epididymides (g)	1.19 ± 0.06	(13)	1.16 ± 0.09	(13)	1.17 ± 0.08	(13)	1.13 ± 0.08	(13)
		0.28 ± 0.02		0.26 ± 0.02		0.28 ± 0.03		0.29 ± 0.02	
	Female	Final body weight (g)	335.1 ± 23.4	(12)	321.1 ± 26.0	(12)	305.6 ± 16.9**	(13)	296.5 ± 23.4**
Liver (g)		14.27 ± 0.92	(12)	13.36 ± 1.40	(12)	13.08 ± 1.07*	(13)	11.68 ± 1.15**	(11)
		4.26 ± 0.15		4.17 ± 0.33		4.28 ± 0.26		3.94 ± 0.21**	
Kidneys (g)		2.07 ± 0.15	(12)	2.07 ± 0.21	(12)	2.09 ± 0.18	(13)	1.88 ± 0.17*	(11)
		0.62 ± 0.06		0.65 ± 0.05		0.69 ± 0.06*		0.63 ± 0.04	
Thymus (mg)		231.7 ± 88.9	(12)	221.1 ± 66.1	(12)	188.9 ± 62.0	(13)	167.0 ± 57.5	(11)
		68.6 ± 23.5		68.1 ± 16.7		61.3 ± 18.1		55.5 ± 15.9	

Values are expressed as mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

a: absolute weight

b: relative weight (g or mg per 100 g body weight)

\*: significant difference from control, p < 0.05

\*\*: significant difference from control, p < 0.01

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 8 Histopathological findings of rats treated orally with 1, 4-butanediol in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ [Number of animals examined]	Sex:	male				female			
		Dose(mg/kg):				Dose(mg/kg):			
Findings, grade and number of animals		0	200	400	800	0	200	400	800
Urinary bladder		[13]	[13]	[12]	[13]	[13]	[12]	[13]	[13]
Diffuse hyperplasia of epithelium	total	0	0	5	7	0	0	1	3
	±	0	0	5	7	0	0	1	3
Fibrosis in lamina propria	total	0	0	4	12	0	0	2	12
	±	0	0	4	12	0	0	2	12
Infiltration of lymphocytes in lamina propria	total	3	0	2	1	0	1	0	0
	±	3	0	2	1	0	1	0	0
Thymus		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Atrophy	total	0			0	1	1	5	7
	±	0			0	0	1	2	2
	+	0			0	1	0	3	5
Hemorrhage	total	0			0	0	0	1	1
	±	0			0	0	0	1	0
	+	0			0	0	0	0	1
Spleen		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Extramedullary hematopoiesis	total	13			13	13	13	13	13
	±	6			4	1	1	0	4
	+	7			9	4	5	5	6
	++	0			0	8	7	8	3
Deposits of pigment	total	13			13	13	13	13	13
	±	2			0	0	1	1	3
	+	11			13	13	12	12	10
Congestion	total	1			3	0	0	2	3
	±	1			3	0	0	0	0
	+	0			0	0	0	2	3
Fibrosis	total	0			0	1	0	0	0
	+	0			0	1	0	0	0
Liver		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Fatty change of hepatocyte in peripheral zone	total	13			13	1			1
	±	0			0	0			1
	+	8			10	1			0
	++	5			3	0			0
Microgranuloma	total	10			11	6			7
	±	9			11	6			7
	+	1			0	0			0
Extramedullary hematopoiesis	total	1			2	4			3
	±	1			2	4			3
Focal necrosis	total	2			1	0			0
	±	1			0	0			0
	+	1			1	0			0
Infiltration neutrophils in necrotic focus	total	2			1	0			0
	±	1			1	0			0
	+	1			0	0			0

±:very slight, +:slight, ++:moderate, +++:severe



Table 8 (continued)

Organ [Number of animals examined] Findings, grade and number of animals	Sex: Dose (mg/kg):	male				female			
		0	200	400	800	0	200	400	800
Kidney		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Atrophic/regenerated tubule	total	12			11	5			7
	±	10			11	5			7
	+	2			0	0			0
Eosinophilic body	total	8			4	0			0
	±	5			2	0			0
	+	3			2	0			0
Focal dilatation of tubule in medulla	total	1			1	0			0
	+	1			1	0			0
Dilatation of pelvis	total	2			2	0			0
	+	2			2	0			0
Infiltration of lymphocytes	total	1			0	0			0
	+	1			0	0			0
Calcification in cortico-medullary junction	total	0			0	0			1
	+	0			0	0			1
Brain		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Partial defect	total	1			0	0			0
	+	1			0	0			0
Heart		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Myocardial fibrosis	total	1			0	0			0
	±	1			0	0			0
Focal necrosis	total	1			1	1			0
	±	1			1	1			0
Harderian gland		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Infiltration of lymphocytes	total	4			1	0			0
	±	3			1	0			0
	+	1			0	0			0
Increased pigmentation	total	0			0	1			1
	+	0			0	1			1
Testis		[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Multinucleated giant cells in seminiferous tubules	total	0			1				
	±	0			1				
Epididymis		[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Infiltration of lymphocytes	total	8			8				
	±	5			6				
	+	3			2				
Spermatic granuloma	total	3			2				
	+	3			2				

±:very slight, +:slight, ++:moderate, +++:severe

Table 9 Summary of reproductive performance in parental rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	200	400	800
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	13
Copulation index <sup>A)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant animals	12	12	13	11
Fertility index <sup>B)</sup>	92.3	92.3	100.0	84.6
Pairing days until copulation (mean±S.D.)	2.8 ± 1.2	2.8 ± 1.9	3.1 ± 1.2	3.0 ± 3.5
Frequency of vaginal estrus (mean±S.D.)	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3

A) : Copulation index = (Number of copulated pairs/Number of mated pairs) × 100; %

B) : Fertility index = (Number of pregnant animals/Number of copulated pairs) × 100; %

Table 10 Summary of development of pups from dams treated orally with 1, 4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Number of pregnant females	12		12		13		11	
Number of pregnant females with pups alive	12		12		13		11	
Gestation index <sup>A)</sup>	100.0		100.0		100.0		100.0	
Gestation length in days	22.0 ± 0.0	(12)	22.0 ± 0.0	(12)	22.2 ± 0.4	(13)	22.2 ± 0.4	(11)
Number of corpora lutea	17.6 ± 3.4	(12)	17.9 ± 4.4	(12)	17.0 ± 1.4	(13)	16.8 ± 1.9	(11)
Number of implantation sites	15.1 ± 2.0	(12)	15.8 ± 2.4	(12)	15.4 ± 1.3	(13)	15.9 ± 1.6	(11)
Implantation index <sup>B)</sup>	87.5 ± 13.9	(12)	89.6 ± 11.3	(12)	90.8 ± 8.0	(13)	94.9 ± 5.7	(11)
Day 0 of lactation								
Number of pups born	14.8 ± 1.9	(12)	14.6 ± 2.2	(12)	14.6 ± 1.9	(13)	15.0 ± 1.8	(11)
Delivery index <sup>C)</sup>	98.4 ± 2.9	(12)	92.9 ± 7.1	(12)	94.8 ± 6.3	(13)	94.2 ± 4.7	(11)
Number of pups alive	14.7 ± 1.9	(12)	14.4 ± 2.1	(12)	13.9 ± 2.1	(13)	14.7 ± 1.8	(11)
Birth index <sup>D)</sup>	97.3 ± 3.3	(12)	92.0 ± 8.3	(12)	90.4 ± 10.6	(13)	92.4 ± 4.4	(11)
Live birth index <sup>E)</sup>	98.9 ± 2.5	(12)	98.9 ± 2.5	(12)	95.5 ± 9.8	(13)	98.2 ± 3.1	(11)
Pup weight in grams								
Male	6.3 ± 0.3	(12)	6.0 ± 0.3	(12)	6.4 ± 0.3	(13)	6.1 ± 0.5	(11)
Female	6.0 ± 0.3	(12)	5.8 ± 0.3	(12)	6.0 ± 0.3	(13)	5.7 ± 0.6	(11)
Sex ratio <sup>F)</sup>	45.6 ± 13.4	(12)	47.8 ± 13.5	(12)	51.6 ± 15.1	(13)	46.2 ± 14.8	(11)
Day 4 of lactation								
Number of pups alive	14.4 ± 1.7	(12)	14.3 ± 2.0	(12)	13.8 ± 2.2	(13)	14.5 ± 1.5	(11)
Viability index <sup>G)</sup>	98.5 ± 2.8	(12)	99.5 ± 1.7	(12)	99.3 ± 2.5	(13)	98.4 ± 3.7	(11)
Pup weight in grams								
Male	10.2 ± 0.8	(12)	9.8 ± 0.7	(12)	10.0 ± 0.5	(13)	9.3 ± 0.8*	(11)
Female	9.8 ± 1.0	(12)	9.4 ± 0.8	(12)	9.6 ± 0.5	(13)	8.8 ± 0.8*	(11)
Sex ratio <sup>H)</sup>	46.3 ± 13.2	(12)	47.5 ± 13.4	(12)	51.9 ± 14.8	(13)	46.7 ± 15.1	(11)

Values are expressed as mean ± S.D.

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

\*: significant difference from control, p < 0.05

A) : Gestation index = (Number of pregnant females with pups alive/Number of pregnant females) × 100; %

B) : Implantation index = (Number of implantation sites/Number of corpora lutea) × 100; %

C) : Delivery index = (Number of pups born/Number of implantation sites) × 100; %

D) : Birth index = (Number of pups alive on day 0/Number of implantation sites) × 100; %

E) : Live birth index = (Number of pups alive on day 0/Number of pups born) × 100; %

F) : Sex ratio = (Number of male pups alive on day 0/Number of pups alive on day 0) × 100; %

G) : Viability index = (Number of pups alive on day 4/Number of pups alive on day 0) × 100; %

H) : Sex ratio = (Number of male pups alive on day 4/Number of pups alive on day 4) × 100; %

## 2,4,6-トリブロモフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

### Reverse Mutation Test of 2,4,6-Tribromophenol on Bacteria

#### 要約

2,4,6-トリブロモ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、用量設定試験で抗菌性が認められたことから、本試験はS9 mix無添加試験では、TA100, TA1535およびTA98は15.6~500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , TA1537は31.3~1000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , WP2 *uvrA*は156~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で、S9 mix添加試験ではTA100, TA1535およびTA1537は15.6~500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , TA98は31.3~1000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , WP2 *uvrA*は156~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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、溶媒対照値の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。

以上の結果から、2,4,6-トリブロモフェノールは、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. 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1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与された。

*E. coli* WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものをを用い、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No. 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。

##### 2. 被験物質

2,4,6-トリブロモフェノールは、白色フレーク状の粉末である。用いた被験物質は、ロット番号70909、純度99.8%(不純物:不明)であり、マナック(株)(広島)から供与された。被験物質は、使用時まで密栓、遮光して冷蔵した。本被験物質は試験期間中安定であったことが確認された。

2,4,6-トリブロモフェノールは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:TPJ5678, 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。

##### 3. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

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

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン(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。

##### 4. 培地およびS9 mixの組成

###### 1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco Ltd.) 0.6 w/v%

塩化ナトリウム 0.5 w/v%

(B)\* L-ヒスチジン 0.5 mM

D-ビオチン 0.5 mM

\*: WP2 *uvrA*用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

###### 2) 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1 L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

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：原 巧, 川上久美子  
(財)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: Tohru Shibuya (Study Director)  
Takumi Hara, Kumiko Kawakami  
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

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。

### 3) S9 mix

1 mL中下記の成分を含む。

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されたS9(キッコーマン株)を用いた。

## 5. 試験方法

ブレインキューベーション法<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分間ブレインキューベーションしたのち、約45°Cに保温したトプアガー2mL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、溶媒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目視またはコロニーアナライザーを用いて算定した。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、溶媒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、溶媒対照値の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、S9 mix無添加試験ではTA100, TA1535およびTA98で500  $\mu$ g/plate以上、TA1537で1500  $\mu$ g/plate以上、WP2 *uvrA*で5000  $\mu$ g/plateの用量で抗菌性が認められた。また、S9 mix添加試験ではTA100, TA1535およびTA1537で500  $\mu$ g/plate以上、TA98で1500  $\mu$ g/plate以上、WP2 *uvrA*で5000  $\mu$ g/plateの用量で抗菌性が認められた。

これらの結果から、本試験における最高用量は、S9 mix無添加試験ではTA100, TA1535およびTA98は500  $\mu$ g/plate, TA1537は1000  $\mu$ g/plate, WP2 *uvrA*は5000  $\mu$ g/plateとし、S9 mix添加試験ではTA100, TA1535およびTA1537は500  $\mu$ g/plate, TA98は1000  $\mu$ g/plate, WP2 *uvrA*は5000  $\mu$ g/plateとした。

上記の最高用量に基づいて公比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回の試験とも溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、陰性であった。

以上の結果に基づき、2,4,6-トリプロモフェノールは、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、本被験物質はチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では、S9 mix非存在下および存在下で染色体の構造異常が誘発され陽性であった<sup>4)</sup>。また、本被験物質の類縁化合物の1,4-ジプロモベンゼンでは、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陽性、細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が得られている<sup>5)</sup>。

## 文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F. J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York 1981, pp. 351-360.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norporth, R. C. Garner, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1980, pp. 273-285.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 418.
- 5) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 2, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1995, p. 353.

Table 1-1 Mutagenicity of 2,4,6-tribromophenol on bacteria (I)

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		TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	136 130 128 ( 131 $\pm$ 4.2)	16 9 18 ( 14 $\pm$ 4.7)		20 25 21 ( 22 $\pm$ 2.6)	17 7 7 ( 10 $\pm$ 5.8)	
	15.6	105 132 129 ( 122 $\pm$ 14.8)	7 9 8 ( 8 $\pm$ 1.0)		18 14 26 ( 19 $\pm$ 6.1)	NT	
	31.3	132 126 166 ( 141 $\pm$ 21.6)	13 11 10 ( 11 $\pm$ 1.5)		19 13 29 ( 20 $\pm$ 8.1)	8 3 6 ( 6 $\pm$ 2.5)	
	62.5	157 115 125 ( 132 $\pm$ 21.9)	12 11 9 ( 11 $\pm$ 1.5)		17 23 25 ( 22 $\pm$ 4.2)	4 5 6 ( 5 $\pm$ 1.0)	
	125	136 146 133 ( 138 $\pm$ 6.8)	11 18 12 ( 14 $\pm$ 3.8)		19 13 21 ( 18 $\pm$ 4.2)	3 12 6 ( 7 $\pm$ 4.6)	
	250	118 108 102 ( 109 $\pm$ 8.1)	13 14 10 ( 12 $\pm$ 2.1)		14 13 17 ( 15 $\pm$ 2.1)	3 3 2 ( 3 $\pm$ 0.6)	
	500	33* 36* 27* ( 32 $\pm$ 4.6)	2* 3* 3* ( 3 $\pm$ 0.6)		10* 10* 8* ( 9 $\pm$ 1.2)	0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	
	1000	NT	NT		NT	0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	
S9 mix (+)	0	154 161 177 ( 164 $\pm$ 11.8)	8 10 11 ( 10 $\pm$ 1.5)		28 40 42 ( 37 $\pm$ 7.6)	17 10 18 ( 15 $\pm$ 4.4)	
	15.6	177 160 156 ( 164 $\pm$ 11.2)	9 7 8 ( 8 $\pm$ 1.0)		NT	15 15 12 ( 14 $\pm$ 1.7)	
	31.3	149 171 158 ( 159 $\pm$ 11.1)	6 9 18 ( 11 $\pm$ 6.2)		25 37 36 ( 33 $\pm$ 6.7)	10 18 15 ( 14 $\pm$ 4.0)	
	62.5	176 170 181 ( 176 $\pm$ 5.5)	10 6 14 ( 10 $\pm$ 4.0)		21 29 35 ( 28 $\pm$ 7.0)	13 10 8 ( 10 $\pm$ 2.5)	
	125	160 167 170 ( 166 $\pm$ 5.1)	9 10 12 ( 10 $\pm$ 1.5)		47 45 29 ( 40 $\pm$ 9.9)	13 8 12 ( 11 $\pm$ 2.6)	
	250	135 140 153 ( 143 $\pm$ 9.3)	9 9 12 ( 10 $\pm$ 1.7)		22 23 20 ( 22 $\pm$ 1.5)	5 2 7 ( 5 $\pm$ 2.5)	
	500	69* 61* 49* ( 60 $\pm$ 10.1)	3* 3* 3* ( 3 $\pm$ 0.0)		12 8 9 ( 10 $\pm$ 2.1)	1* 2* 3* ( 2 $\pm$ 1.0)	
	1000	NT	NT		0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	NT	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA		AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5		0.1	80	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA		2AA	2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2		0.5	2	
	Number of colonies/plate	522 507 480 ( 503 $\pm$ 21.3)	554 512 577 ( 548 $\pm$ 33.0)		518 562 563 ( 548 $\pm$ 25.7)	401 350 380 ( 377 $\pm$ 25.6)	
	Number of colonies/plate	1241 1073 1020 (1111 $\pm$ 115.4)	526 387 397 ( 437 $\pm$ 77.5)		549 515 570 ( 545 $\pm$ 27.8)	357 394 365 ( 372 $\pm$ 19.5)	

Purity was 99.8 %.

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

\*: Growth inhibition was observed.

NT: Not tested

Table 1-2 Mutagenicity of 2,4,6-tribromophenol on bacteria (I)

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					
				WP2 <i>uvrA</i>			
S9 mix (-)	0			26 28 16 ( 23 $\pm$ 6.4)			
	156			21 27 22 ( 23 $\pm$ 3.2)			
	313			24 22 28 ( 25 $\pm$ 3.1)			
	625			24 19 24 ( 22 $\pm$ 2.9)			
	1250			8 15 18 ( 14 $\pm$ 5.1)			
	2500			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)			
	5000			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)			
S9 mix (+)	0			40 23 31 ( 31 $\pm$ 8.5)			
	156			27 46 40 ( 38 $\pm$ 9.7)			
	313			33 40 40 ( 38 $\pm$ 4.0)			
	625			31 26 26 ( 28 $\pm$ 2.9)			
	1250			17 27 26 ( 23 $\pm$ 5.5)			
	2500			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)			
	5000			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			0.01			
	Number of colonies/plate			170 171 175 ( 172 $\pm$ 2.6)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			10			
	Number of colonies/plate			876 693 718 ( 762 $\pm$ 99.2)			

Purity was 99.8 %.

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 2AA:2-Aminoanthracene

\*:Growth inhibition was observed.



Table 2-1 Mutagenicity of 2,4,6-tribromophenol 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		TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	155 155 138 (149 $\pm$ 9.8)	12 13 16 (14 $\pm$ 2.1)	18 18 19 (18 $\pm$ 0.6)	16 7 10 (11 $\pm$ 4.6)		
	15.6	181 104 155 (147 $\pm$ 39.2)	15 12 4 (10 $\pm$ 5.7)	32 16 24 (24 $\pm$ 8.0)	NT		
	31.3	150 124 128 (134 $\pm$ 14.0)	14 11 11 (12 $\pm$ 1.7)	22 23 20 (22 $\pm$ 1.5)	7 5 4 (5 $\pm$ 1.5)		
	62.5	150 133 124 (135 $\pm$ 13.2)	14 12 12 (13 $\pm$ 1.2)	16 20 17 (18 $\pm$ 2.1)	4 9 5 (6 $\pm$ 2.6)		
	125	138 112 115 (122 $\pm$ 14.2)	11 12 11 (11 $\pm$ 0.6)	16 22 11 (16 $\pm$ 5.5)	6 8 7 (7 $\pm$ 1.0)		
	250	115 97 102 (105 $\pm$ 9.3)	7 9 8 (8 $\pm$ 1.0)	17 10 5 (11 $\pm$ 6.0)	3 3 4 (3 $\pm$ 0.6)		
	500	28* 26* 7* (20 $\pm$ 11.6)	1* 1* 3* (2 $\pm$ 1.2)	5* 8* 3* (5 $\pm$ 2.5)	1* 1* 0* (1 $\pm$ 0.6)		
	1000	NT	NT	NT	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)		
S9 mix (+)	0	130 158 170 (153 $\pm$ 20.5)	11 8 14 (11 $\pm$ 3.0)	40 30 26 (32 $\pm$ 7.2)	15 20 13 (16 $\pm$ 3.6)		
	15.6	152 154 190 (165 $\pm$ 21.4)	14 13 18 (15 $\pm$ 2.6)	NT	18 20 9 (16 $\pm$ 5.9)		
	31.3	174 165 181 (173 $\pm$ 8.0)	9 11 15 (12 $\pm$ 3.1)	32 34 40 (35 $\pm$ 4.2)	16 9 11 (12 $\pm$ 3.6)		
	62.5	199 190 204 (198 $\pm$ 7.1)	11 14 9 (11 $\pm$ 2.5)	27 38 24 (30 $\pm$ 7.4)	12 10 15 (12 $\pm$ 2.5)		
	125	192 179 184 (185 $\pm$ 6.6)	7 12 11 (10 $\pm$ 2.6)	31 22 33 (29 $\pm$ 5.9)	11 10 11 (11 $\pm$ 0.6)		
	250	108 173 156 (146 $\pm$ 33.7)	9 8 6 (8 $\pm$ 1.5)	35 29 31 (32 $\pm$ 3.1)	3 7 6 (5 $\pm$ 2/1)		
	500	124* 70* 63* (86 $\pm$ 33.4)	2* 1* 1* (1 $\pm$ 0.6)	9 13 6 (9 $\pm$ 3.5)	3* 4* 6* (4 $\pm$ 1.5)		
	1000	NT	NT	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	NT		
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	9AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.1	80		
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	0.5	2		
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	555 518 493 (522 $\pm$ 31.2)	551 557 568 (559 $\pm$ 8.6)	597 601 621 (606 $\pm$ 12.9)	483 382 572 (479 $\pm$ 95.1)		
	Number of colonies/plate	939 909 948 (932 $\pm$ 20.4)	357 372 388 (372 $\pm$ 15.5)	388 473 472 (444 $\pm$ 48.8)	443 483 361 (429 $\pm$ 62.2)		

Purity was 99.8 %.

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

\*:Growth inhibition was observed.

NT:Not tested

Table 2-2 Mutagenicity of 2,4,6-tribromophenol 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					
				WP2 <i>uvrA</i>			
S9 mix (-)	0			25 25 29 ( 26 $\pm$ 2.3)			
	156			21 29 27 ( 26 $\pm$ 4.2)			
	313			17 24 23 ( 21 $\pm$ 3.8)			
	625			24 19 18 ( 20 $\pm$ 3.2)			
	1250			17 9 17 ( 14 $\pm$ 4.6)			
	2500			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)			
	5000			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)			
S9 mix (+)	0			30 32 30 ( 31 $\pm$ 1.2)			
	156			34 44 30 ( 36 $\pm$ 7.2)			
	313			37 30 34 ( 34 $\pm$ 3.5)			
	625			23 26 27 ( 25 $\pm$ 2.1)			
	1250			12 26 26 ( 21 $\pm$ 8.1)			
	2500			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)			
	5000			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			0.01			
	Number of colonies/plate			166 203 159 ( 176 $\pm$ 23.6)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			10			
	Number of colonies/plate			675 652 609 ( 645 $\pm$ 33.5)			

Purity was 99.8 %.

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 2AA:2-Aminoanthracene

\*:Growth inhibition was observed.

# 2,4,6-トリブロモフェノールのチャイニーズ・ハムスター 培養細胞を用いる染色体異常試験

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of 2,4,6-Tribromophenol on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

2,4,6-トリブロモ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0.25 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0.31 mg/mLおよび0.33 mg/mLであった。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時間および48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濃度は、48時間連続処理および短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下において2濃度ずつしか得られなかったため、濃度を設定し直し再度試験を行った。その結果、染色体分析が可能な最高濃度は24時間連続処理では0.10 mg/mL, 48時間連続処理では0.050 mg/mLの濃度であったことから、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。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0.050 mg/mLおよび0.10 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、この濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した群では、いずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix非存在下の高濃度群(0.050 mg/mL)およびS9 mix存在下で処理した高濃度群(0.10 mg/mL)でそれぞれ10.5%および23.5%(gapを含む)の染色体異常が誘発された。一方、S9 mix非存在下および存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下で2,4,6-トリブロモフェノールは、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時間および48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存在下および非存在下で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

2,4,6-トリブロモフェノール(ロット番号:70909, マナック(株), 広島)は、白色フレーク状の粉末で、水に対しては100 mM未満, DMSOでは2 M以上, アセトンでは50 mg/mL以上で溶解し、融点87-89°C, 沸点119°C/2.0 kPaで、純度99.8%の物質であった。本物質は空気中で変色し、昇華性を示す物質である。

#### 6. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(ロット番号:DLF7049, 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. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

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

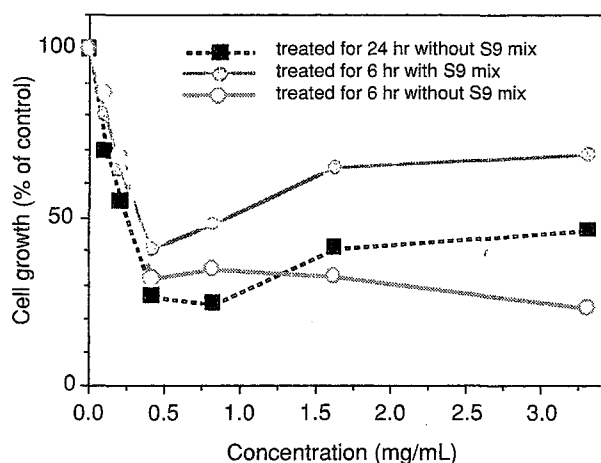


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2,4,6-tribromophenol

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0.25 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0.31 mg/mLおよび0.33 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倍濃度である0.60 mg/mLを最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(0.038, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/mL)。しかし、染色体分析が可能な濃度は、48時間連続処理および短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下において2濃度ずつしか得られなかったため、濃度を設定し直し(0.013, 0.025, 0.050, 0.10, 0.20 mg/mL)、再度試験を行った。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、注射用蒸留水(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  $\mu$ g/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), 24時間および48時間連続処理では、それぞれ0.10 mg/mLおよび0.050 mg/mLが、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0.050 mg/mLおよび0.10 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>11)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、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。

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>2)</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>3)</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。2,4,6-トリブロモフェノールを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。倍数性細胞については、24時間処理した濃度群(0.10 mg/mL)では、細胞毒性のために740細胞しか観察できなかったが、24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、倍数性細胞の誘発作用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。2,4,6-トリブロモフェノールを加えた短時間処理では、S9 mix非存在下で処理した高濃度群(0.050 mg/mL)およびS9 mix存在下で処理した高濃度群(0.10 mg/mL)でそれぞれ10.5%および23.5%(gapを含む)の染色体異常が誘発された。一方、倍数性細胞の誘発作用については、S9 mix非存在下および存在下で6時間処理したいずれの処理群でも、倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。

従って、2,4,6-トリブロモフェノールは、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。

本物質は、細菌を用いる復帰突然変異試験においては、変異原活性が認められなかった<sup>4)</sup>。これまでに、多くの臭素化合物 (bromoacetic acid, 2-bromopropionic acid, 1-bromo-2-chloroethane, bromochloromethane, 2-bromo-2-methylpropionic acid, 1-bromo-3-chloropropane, 1,4-dibromobenzene 等) が<sup>5,6)</sup>、ハロゲン類としての反応性の強さから、DNA に対する傷害性も強いことが示唆された。

### 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. 213-223.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, “化学物質毒性試験報告,” Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 411.
- 5) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課監修, “既存化学物質 変異原性試験データ集,” 日本化学物質安全・情報センター, 東京, 1996, pp. 167-538.
- 6) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, “化学物質毒性試験報告,” Vol. 2, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1995, p. 367.

### 連絡先

試験責任者: 佐々木澄志  
試験担当者: 日下部博一, 高橋俊孝, 橋本恵子  
(財)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: Kiyoshi Sasaki (Study director)  
Hirokazu Kusakabe,  
Toshitaka Takahashi, 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 2,4,6-tribromophenol (TBP)\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		Concurrent cytotoxicity <sup>6)</sup> (%)	Mitotic index <sup>7)</sup> (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Non-treatment			200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38			-	-
Solvent <sup>1)</sup> 0		24	200	0	0	0	2	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			100.0	-
TBP 0.025		24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			93.5	-
TBP 0.050		24	200	0	0	1	2	1	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.00	-	-	69.5	-
TBP 0.10		24	200	0	2	0	3	0	0	5	1	4 (2.0)	4 (2.0)	0.00 <sup>8)</sup>			43.0	7.0
TBP 0.20***		24	-											-			29.5	0.0 <sup>9)</sup>
MC 0.00005		24	200	3	27	115	1	0	0	146	0	94*(47.0)	92*(46.0)	0.00			-	-
Solvent <sup>1)</sup> 0		48	200	0	0	0	4	0	0	4	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			100.0	-
TBP 0.013		48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			98.5	-
TBP 0.025		48	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	-	-	92.5	-
TBP 0.050		48	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13			49.5	4.0
TBP 0.10***		48	-											-			14.0	-
TBP 0.20***		48	-											-			6.0	-
MC 0.00005		48	200	5	51	180	11	1	50	298	7	134*(67.0)	133*(66.5)	0.88*			-	-

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, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C.

1)Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater<sup>TM</sup>. 7)Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. 8)Seven hundred and forty cells were analysed. 9)Eight hundred and ten cells were analysed from two dishes.

\*:Significantly different from solvent control at p<0.01 by Fisher's exact probability test. \*\*:Purity was more than 99.8% \*\*\*:Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphases due to cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,4,6-tribromophenol (TBP)\*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		Concurrent cytotoxicity <sup>6)</sup> (%)	Mitotic index <sup>7)</sup> (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Non-treatment				200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			-	-
Solvent <sup>1)</sup> 0		-	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			100.0	-
TBP 0.013		-	6-(18)	200	0	1	4	1	0	0	6	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			94.0	-
TBP 0.025		-	6-(18)	200	0	0	1	1	0	0	2	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	+	-	88.0	-
TBP 0.050		-	6-(18)	200	1	16	30	4	0	0	51	0	21*(10.5)	20*(10.0)	0.63			47.0	5.1
TBP 0.10***		-	6-(18)	-										-			19.0	-	
TBP 0.20***		-	6-(18)	-										-			1.5	-	
CPA 0.005		-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			-	-
Solvent <sup>1)</sup> 0		+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			100.0	-
TBP 0.025		+	6-(18)	200	1	0	0	1	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			91.5	-
TBP 0.050		+	6-(18)	200	0	0	2	1	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38	+	-	78.5	-
TBP 0.10		+	6-(18)	200	1	19	84	11	0	20	135	2	47*(23.0)	46*(23.0)	0.13			40.5	11.7
TBP 0.20***		+	6-(18)	-										-			24.5	Tox	
CPA 0.005		+	6-(18)	200	0	6	19	4	0	0	29	1	25*(12.5)	25*(12.5)	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, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide, Tox:cytotoxicity.

1)Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater<sup>TM</sup>. 7)Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. \*:Significantly different from solvent control at p<0.01 by Fisher's exact probability test. \*\*:Purity was more than 99.8% \*\*\*:Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphases due to cytotoxicity.

# 2,4,6-トリブロモフェノールのラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

## Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2,4,6-Tribromophenol by Oral Administration in Rats

### 要約

2,4,6-トリブロモフェノールの100, 300および1000 mg/kgをSD系(Crj:CD)のラットの交配前2週間および交配期間の2週間を通じて経口投与し、さらには雄では交配期間終了後20日間、雌では妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで連続投与し、親動物の反復投与毒性および生殖能ならびに児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

#### 1. 反復投与毒性

雌雄いずれの群にも死亡動物は観察されなかった。一般状態の観察で雌雄の300 mg/kg以上の投与群では被験物質投与後に流涎が認められた。また、雌雄の1000 mg/kg群で体重増加抑制および摂餌量の低値が認められた。雄の血液学検査および血液凝固能検査には被験物質投与の影響は認められなかった。雄の血液生化学検査では300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し、1000 mg/kg群で総タンパク、アルブミン、A/G、ALPおよび塩素が有意な高値を、BUNが高値傾向を、カリウムが有意な低値を示した。

器官重量では雌雄の1000 mg/kg群で肝臓および腎臓重量が高値を示し、雄の同群で胸腺重量が低値を示した。

剖検では雄の1000 mg/kg群で肝臓の肥大が観察され、病理組織学検査では肝細胞肥大の発生率が増加し、肝臓の脂肪化の発生率が減少した。また、雄の同群に腎乳頭壊死、尿細管拡張、リンパ球浸潤、尿細管の好塩基化および硝子円柱が認められた。

#### 2. 生殖発生毒性

平均性周期、交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。分娩時観察では妊娠動物の全例が正常に分娩し、妊娠期間にも被験物質投与の影響は認められなかった。妊娠黄体数、着床痕数、出産児数、出産生児数、着床率および分娩率に明らかな被験物質投与の影響は認められなかった。1000 mg/kg群で雌雄の新生児の哺育0および4日体重、哺育4日の生児数および生存率が低値を示し、被験物質投与による出生前後の新生児の発育抑制および生存性に対する影響が示唆された。新生児の外表、死亡児および哺育4日の剖検でも被験物質投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では2,4,6-トリブロモフェノールの反復投与により投与後の一般状態の変化で

雌雄の300 mg/kg以上の投与群で流涎が観察され、雌雄ともに1000 mg/kg群で体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められた。さらに、雄の血液生化学検査で300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し、1000 mg/kg群の病理学検査および血液生化学検査において、被験物質投与による主として肝臓および腎臓に及ぼす影響が示唆される変化が認められた。したがって、雌雄とも無影響量(NOEL)は100 mg/kg/dayと判断された。雌雄の生殖能に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与でも認められず、無影響量は1000 mg/kg/dayと判断された。児動物の発生・発育に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与で発育抑制が認められ、哺育4日生児数および生存率が低値を示したことから無影響量は300 mg/kg/dayと判断された。

### 方法

#### 1. 被験物質

2,4,6-トリブロモフェノール [マナック(株)製造(広島), Lot No. 70909, 純度99.8 wt%] は、白色のフレーク状の粉末であり、使用時まで直射日光を避け、適当な換気のある冷暗所に保管した。本ロットは投与期間中安定であったことを確認した。

被験物質は、トウモロコシ油 (Lot No. V7P1509, V7R2400, ナカライテスク(株)製造) に溶解し、20, 60 および200 mg/mLの濃度になるよう投与液を調製した。調製後は、使用時まで冷暗条件下で密閉保管した。投与液中の被験物質は、20および200 mg/mLについて、調製後遮光下冷蔵庫保存で8日目まで安定であることが予備試験において確認されているため、調製後8日以内に使用した。

投与液の濃度確認のため全試験群について、調製開始時に調製した投与液から無作為にサンプルを抽出し、投与液中の被験物質濃度の分析を実施した。その結果、投与液中の平均濃度は100.5~100.7%の濃度範囲で調製されていた。したがって、投与液はほぼ所定量の2,4,6-トリブロモフェノールが含有されていることを確認した。

#### 2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー(株)(神奈川)から購入した生後8週齢のSprague-Dawley (Crj:CD (SD), SPF)系雌雄ラットを使用した。購入した動物は7日間検査・馴化飼育した後、一般状態に異常が認められなかったものを10週齢で群分けして試験に用いた。群分け

終了時の体重は、雄で361～397 g、雌で233～258 gの範囲であった。

動物は、温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数15回/時間、照度150～300 lux、照明時間12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)に設定されたバリアシステムの飼育室でアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに1匹ずつ収容し飼育した。妊娠18日以降の母動物は哺育4日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに哺育トレーおよび巣作り材料(Care FRESH™, Absorption corporation 製造)を入れて飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)製造のNMF固型飼料(放射線滅菌飼料)を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。飲水は、水道水を自由に摂取させた。

### 3. 群分け

動物は投与開始日の体重をもとに層別化し、無作為抽出法により1群当たり12匹を振り分けた。

### 4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本被験物質の製品安全データシート(MSDS)に経口投与によるラットの $LD_{50}$ が2000 mg/kg以上であり、2000 mg/kgのラットを用いた14日間経口投与試験で特異的な病理学的所見は認められなかったことが報告されている。この情報に基づき、0、30、100、300および1000 mg/kgの用量で予備試験「2,4,6-トリプロモフェノールのラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験-2週間投与予備試験」を実施した。その結果、1000 mg/kg群で雄の1例が投与2日に死亡した。一般状態の変化として、流涎が雌雄ともに300および100 mg/kg群で観察された。また、1000 mg/kg群の雌雄に体重増加抑制傾向が認められ、同群の雌雄で投与1から3日の平均1日摂餌量が低値を示した。

雄の血液学検査では変化は認められなかったが、血液生化学検査では1000 mg/kg群でアルブミン、A/GおよびGPTが高値を示した。

剖検では、被験物質投与の影響と考えられる所見は認められなかった。

剖検時の器官重量では、1000 mg/kg群で雌雄ともに肝臓の絶対および相対重量が高値を示した。さらに、雄の1000 mg/kg群で肺および腎臓の相対重量が高値を示した。

以上の結果から、本試験の最高用量を明らかな毒性兆候が現れることが予想される1000 mg/kgに設定し、以下公比約3で除し、300および100 mg/kgを設定した。

投与容量は、体重100 g当り0.5 mLとし、交配前および交配期間中の雌雄では、個体別に測定した最新体重に基づいて算出を行った。また、妊娠期間および哺育期間中の雌は、妊娠0、7、14、21および哺育0日に測定した個体別体重に基づいて算出を行った。胃ゾンデを用いて毎日1回(7日/週)強制経口投与した。対照群にはトウモロコシ油のみを同様に投与した。雄の投与期間は、交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後20日間の連続48日間とした。雌の投与期間は、交配前14日

間と交配期間中(最長14日間)ならびに交尾成立雌の妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで(41～45日間)とした。なお、交尾不成立の雌は交配期間終了後20日間の連続48日間とした。

### 5. 観察および検査

#### 1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

#### 2) 体重

雄では、投与1(投与開始日)、8、15、22、29、36、43および49日(剖検日)に測定し、投与1から43日までの体重増加量を算出した。

雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に測定し、投与1から15日までの体重増加量を算出した。また、交尾成立後の雌は、妊娠0、7、14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に測定し、それぞれ妊娠0から21日および哺育0から4日までの体重増加量を算出した。

#### 3) 摂餌量

雄では、投与1(投与開始日)、8、15、22、29、36、43および48日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日および投与22から48日までの累積摂餌量を算出した。

雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日までの累積摂餌量を算出した。また、交尾成立の雌は妊娠0、7、14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともに妊娠0から21日までの累積摂餌量を算出した。なお、交配期間中の摂餌量は測定しなかった。

#### 4) 交配

交配前14日間の性周期観察を行った雌を同群内の雄のケージに入れ1対1で最長14日間毎晩同居させた。翌朝、膣垢中の精子確認をもって交尾が成立したとし、その日を妊娠0日とした。性周期観察は交尾成立日までを行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数として平均性周期を算出した。交配結果から、各群について交尾率 $[(\text{交尾動物数}/\text{同居動物数}) \times 100]$ を算出した。

#### 5) 自然分娩時および新生児の観察

妊娠動物は全例を自然分娩させた。分娩の確認は午前9～10時に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した個体についてその日を哺育0日とした。午前10時を過ぎて分娩が完了した個体については、翌日を哺育0日とした。分娩を確認した全例について妊娠期間(哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数)、受胎率 $[(\text{受胎動物数}/\text{交尾動物数}) \times 100]$ 、出産率



[(生児出産雌数/妊娠雌数)×100], 着床率 [(着床痕数/妊娠黄体数)×100], 分娩率 [(総出産児数/着床痕数)×100], 出生率 [(出産生児数/総出産児数)×100] を算出した。

新生児は、哺育0日に出産児数(生存児+死亡児)を調べ、性別を判定するとともに外表異常の有無を調べた。また、哺育0および4日に雌雄個体の重量を測定し、1腹の雌雄別平均体重を算出した。

哺育4日の新生児の同腹児重量を測定後に新生児全例をエーテル麻酔により安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った。なお、哺育期間中の死亡児についても同様に器官・組織の肉眼観察を行った。また、新生児の4日の生存率 [(哺育4日生児数/出産生児数)×100] を求めた。

## 6) 臨床検査

各群の雄全例について剖検時に実施した。動物を最終投与日(投与期間:48日間)の夕方から翌朝まで約16時間絶食させた後、エーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血した。

### a) 血液学検査

検査はEDTA-2Kを添加した初血について、THMS H・1E(米国マイルス社)を用いて白血球数(WBC:暗視野板法), 赤血球数(RBC:暗視野板法), ヘマトクリット値(HCT:RBC, MCVより算出), ヘモグロビン量(HGB:シアンメトヘモグロビン法), 平均赤血球容積(MCV:暗視野板法), 平均赤血球色素量(MCH:HGB, RBCより算出), 平均赤血球色素濃度(MCHC:HGB, HCTより算出), 血小板数(PLT:暗視野板法)および白血球百分率(フローサイトケミストリー法)を測定した。白血球百分率は前述の機器で測定したが、別途血液塗末標本を作製し、メイ・グリウンワルド・ギムザ染色して保管した。網赤血球(RC)比率の算定については、EDTA-2K添加血液をニューメチレンブルーで染色後、血液塗末標本を作製した。高用量群で貧血傾向が認められたため、全群全例の標本の観察を行った。

### b) 血液凝固能検査

検査にはクエン酸ソーダ添加血液を3000 r.p.m., 13分間遠心分離して得た血漿について、血液凝固測定装置KC-40(独国アメルング社)を用いてプロトロンビン時間(PT:Quick 1段法), 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT:クロット法)およびフィブリノーゲン量(Fibrinogen:トロンビン時間法)を測定した。

### c) 血液生化学検査

検査は採血管に血液を採取, 30分間静置後3000 r.p.m. 7分間遠心分離して得た血清について、多項目生化学自動分析装置CentrifiChem ENCORE II(米国ベーカー社)およびEKTACHEM 700N(米国コダック社)を用いて総蛋白(ビュレット法), アルブミン(B.C.G.法), A/G(計算値), 血糖(グルコースオキシダーゼ法), 中性脂肪(酵素色素法), 総コレステロール(コレステロールオキシダーゼ法), 尿素窒素(ウレアーゼアンモニウム指示薬法), クレアチニン(Jaffé法), 総ビリルビン(ジア

ゾ法), グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(IFCC法), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(IFCC法),  $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(Orlowski法), ナトリウム(電極法), カリウム(電極法), 塩素(電極法), カルシウム(アルセナゾIII法)および無機リン(モリブデン酸青法)を測定した。

## 7) 病理学検査

### a) 剖検および器官重量

#### ① 雄動物

48日間投与した日の夕方から、約16時間絶食をさせた後エーテル麻酔下で採血し安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比(相対重量)を算出した。また、全動物の重量測定器官に加えて心臓、精囊、前立腺、下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として皮膚を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、精巣および精巣上体はブアン氏液で固定した。

#### ② 雌動物

哺育4日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および卵巣重量を測定し相対重量を算出した。また、全動物の重量測定器官に加えて心臓、下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として肺および皮膚を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。また、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

#### ③ 交尾しなかった雌

48日間投与した翌日、エーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む), 胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

#### ④ 哺育期間中に全児が死亡した母動物(全児死亡動物)

生存児すべての死亡または喰殺が確認された日にエーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む), 胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

### b) 病理組織学検査

#### ① 全児死亡動物

全児死亡動物(雌の1000 mg/kg群の1例)の皮膚、乳

腺, リンパ節, 唾液腺, 胸骨, 大腿骨(骨髄を含む), 胸腺, 気管, 肺および気管支, 心臓, 甲状腺および上皮小体, 舌, 食道, 胃, 十二指腸, 小腸, 大腸, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 卵巣, 子宮, 膣, 眼球, ハーダー腺, 脳, 下垂体および脊髄について実施した。

② 妊娠を成立させた雄

対照群と高用量群では脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 精巣および精巣上体について実施し, 加えて, 1000 mg/kg群の1例の腹膜および1例の皮下についても実施した。また, 低および中用量群では胸腺, 肝臓および腎臓について実施した。

③ 自然分娩した雌

対照群と高用量群では脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎および卵巣について実施し, 加えて, 対照群の1例の皮膚, 1000 mg/kg群の1例の皮膚および1例の肺についても実施した。また, 低および中用量群では肝臓について実施した。

④ 交尾しなかった雄雌

対照群の雌雄各1例の脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 膣, 子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上体, 精囊, 前立腺, 下垂体について実施した。

6. 統計解析

体重, 摂餌量, 黄体数, 着床痕数, 出産児数, 死産児数, 性比, 平均性周期, 妊娠期間, 着床率, 分娩率, 出生率, 外表異常発現率, 新生児の4日の生存率, 器官重量, 相対重量, 血液学および血液生化学検査値については多重比較検定<sup>1-3)</sup>を行った。

出産率, 交尾率および受胎率については $\chi^2$ 検定<sup>4, 5)</sup>を用いた。病理学検査の所見の発生率については, Fisherの直接確率検定法<sup>5)</sup>を用いて検定し, グレードのある所見は, -を「1」, +1を「2」, +2を「3」および+3を「4」に割り当てた後, 順位和検定であるMann-WhitneyのU検定<sup>5)</sup>を用いて検定した。なお, 哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は\*: $P<0.05$ および\*\*: $P<0.01$ の2段階とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡および一般状態

1000 mg/kg群で哺育4日に全児死亡動物が1例(動物番号2306)認められた。

一般状態の観察では, 主な投与後の症状として流涎が雌雄の300および1000 mg/kg群で観察された。この症状は投与期間を通じて雄の300 mg/kg群で複数例に, 1000 mg/kg群で全例にほぼ毎日継続して観察され, 雌の300 mg/kg群で複数例に散発的に, 1000 mg/kg群で全例にほぼ毎日継続して観察された。症状の発現は, 投与後約5分から認められ, 30分後には消失した。また,

1000 mg/kg群で体表面の腫瘤(鼻部)および皮下部の腫瘤(口唇部)が各1例認められたが, それぞれ単発性の発現であり, 体表面の腫瘤は剖検日までに消失した。皮下部の腫瘤は組織学的には膿瘍であった。これらのことから被験物質投与との関連はないものと考えられた。

その他, 雄では脱毛が100 mg/kg群で1例, 被毛の汚れが1000 mg/kg群で2例, 痂皮が対照群で1例, 投与前の流涎が対照群で1例, 歯異常(上顎切歯折れ)が300 mg/kg群で1例にそれぞれ観察された。雌では交配前・交配期間中に脱毛が対照群および1000 mg/kg群で1および2例, 痂皮が300 mg/kg群で1例, 妊娠期間中に脱毛が対照群, 100および1000 mg/kg群で1, 1および3例, 哺育期間中に脱毛が対照群, 100および1000 mg/kg群で1, 1および2例にそれぞれ観察された。これらの所見はしばしば対照群でも認められるものであり, 被験物質投与の影響とは考えなかった。

2) 体重(Fig. 1, 2)

雄では, 対照群に比べて1000 mg/kg群で投与8日以降, 統計学的に有意な低値を示し, 同群の投与1から43日の体重増加量も有意な低値を示した。

雌では交配前の投与期間には対照群と被験物質投与群の間に有意な差は認められなかったが, 妊娠期間において対照群に比べ1000 mg/kg群で妊娠7日以降有意な低値を示し, 同群の妊娠0から21日の体重増加量も有意な低値を示した。また, 哺育期間においても対照群に比べて1000 mg/kg群で哺育4日に有意な低値を示し, 哺育0から4日の体重増加量も低値傾向を示した。

3) 摂餌量(Fig. 3, 4)

雄では, 対照群に比べて1000 mg/kg群で投与1から8日の平均1日摂餌量が統計学的に有意な低値を示した。

雌では交配前の投与期間に対照群に比べ1000 mg/kg群で投与1から8日の平均1日摂餌量が有意な低値を, また, 哺育0から4日の平均1日摂餌量が低値傾向を示した。妊娠期間中は, 対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

4) 雄の血液学検査(Table 1)

血液学検査ではいずれの検査項目についても対照群と被験物質投与群の間に統計学的に有意な差は認められなかった。血液凝固能検査では1000 mg/kg群でプロトロンビン時間が対照群に比べ有意な延長を示したが, 軽微な変化であり毒性学的意義の乏しいものと考えられた。

5) 雄の血液生化学検査(Table 2)

対照群に比べ300および1000 mg/kg群でクレアチニンが統計学的に有意な高値を示した。また, 1000 mg/kg群で総タンパク, アルブミン, A/G, ALPおよび塩素が有意な高値を, BUNが高値傾向を, 総ビリルビンおよびカリウムが有意な低値を示した。その他の検査項目では対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

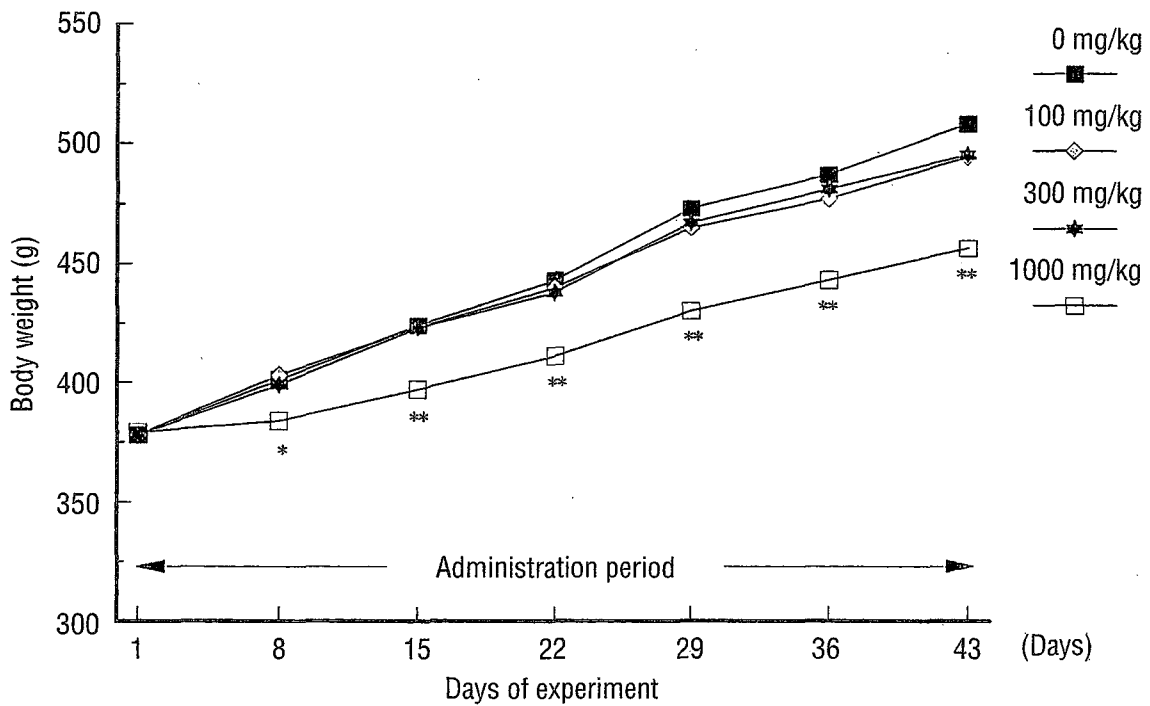


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significant difference from control group; \*:P<0.05 \*\*:P<0.01

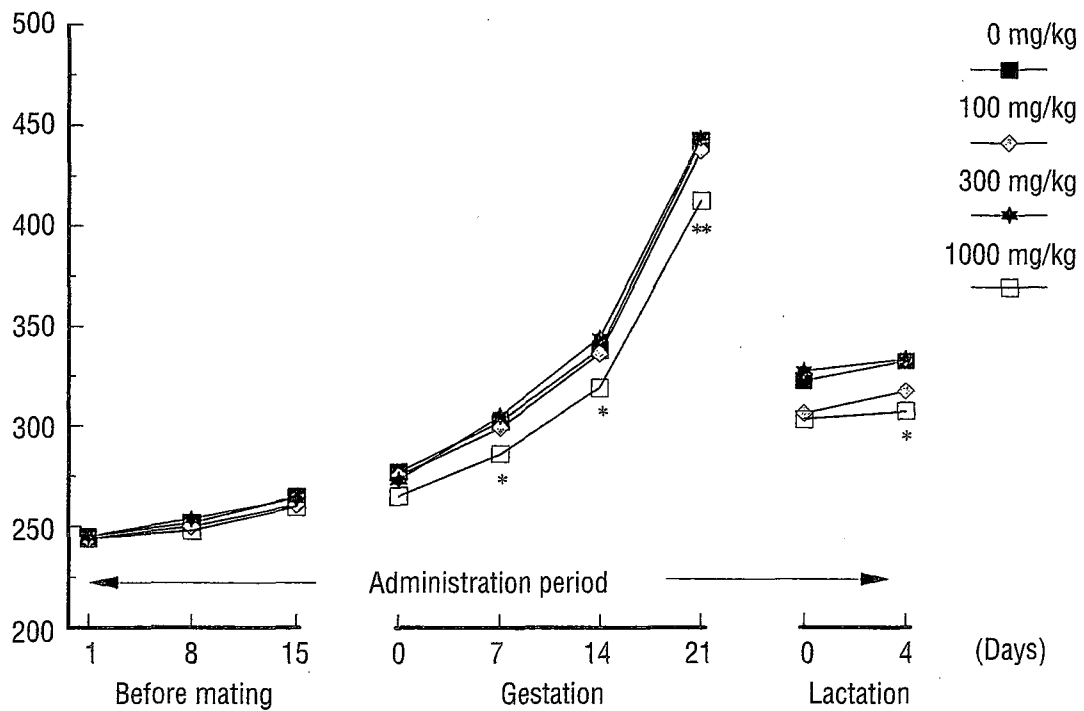


Fig. 2 Body weight change of female rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significant difference from control group; \*:P<0.05 \*\*:P<0.01

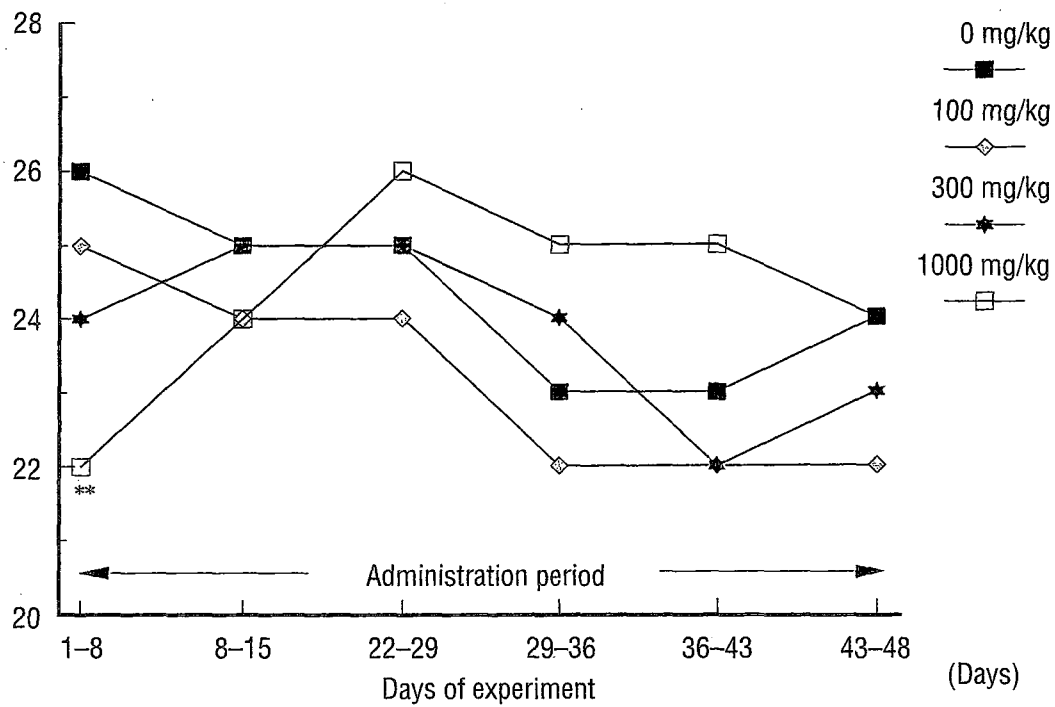


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significant difference from control group; \*\*: $P < 0.01$

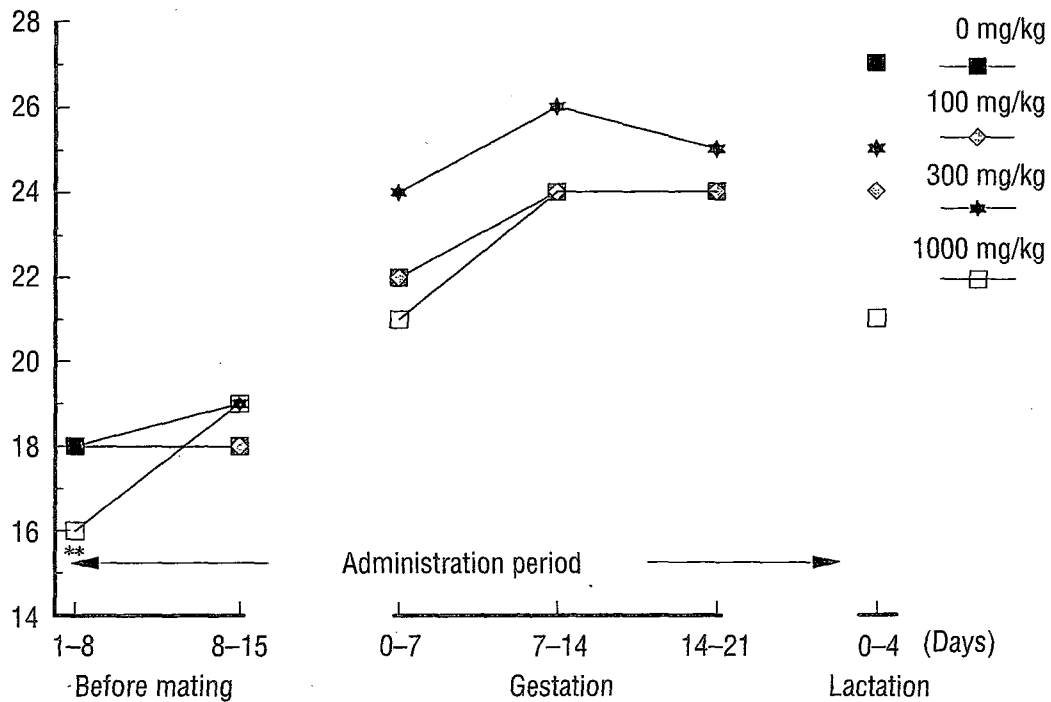


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significant difference from control group; \*\*: $P < 0.01$

## 6) 器官重量 (Table 3)

雌雄ともに対照群に比べ1000 mg/kg群で肝臓の絶対および相対重量, 脳, 腎臓および副腎の相対重量が統計学的に有意な高値を示した。さらに雄では1000 mg/kg群で胸腺の絶対重量が有意な低値を, 精巣の相対重量が有意な高値を示した。

## 7) 剖検所見

1000 mg/kg群の1例に認められた全児死亡動物(動物番号 2306)には異常所見は認められなかった。

雄では, 1000 mg/kg群で胸腺の萎縮が4例, 肝臓の肥大が3例観察された。その他, 1000 mg/kg群で腎臓の白色斑点および副腎の肥大が各2例に観察され, 胸腺の赤色斑点, 肝臓の白色斑点, 皮下の塊, 腹腔の塊, 精巣上体の結節および被毛の菲薄化が300 mg/kg群を除く各群に単発性に観察された。

雌では, 胸腺の赤色斑点, 肺の褐色斑点, 肝臓の肥大, 癒痕および白色斑点, 卵巣の嚢胞, 子宮の内腔拡張, 副腎の肥大および被毛の菲薄化が対照群を含む各群に1ないし少数例に観察された。

交尾しなかった動物は対照群で雌雄各1例であった。雄では異常所見は認められず, 雌では脾臓の表面粗および結節, 肺の褐色斑点および子宮の内腔拡張が観察された。

## 8) 病理組織学検査 (Table 4, 5)

1000 mg/kg群の全児死亡動物では, 脾臓の色素沈着, 肺の細胞浸潤, 肝臓の脂肪化および子宮の小肉芽腫が観察された。

雄では, 1000 mg/kg群で胸腺の萎縮が3例, 肝細胞肥大が12例, 腎臓の硝子円柱が8例, 尿管管拡張が7例, 腎乳頭壊死が5例, リンパ球浸潤が6例に発生し, 対照群と比べて統計学的に有意な発生率の増加が認められた。また, 肝臓の脂肪化が対照群で6例の発生に対し, 1000 mg/kg群では認められず有意な減少を示した。さらに腎尿管の好塩基化が対照群, 100, 300および1000 mg/kg群でそれぞれ8(全例軽度), 9(全例軽度), 9(軽度8, 中等度1)および12例(軽度8, 中等度4)観察され, 発生率に有意差は認められなかったが1000 mg/kg群で程度の増強が認められた。一方, 100 mg/kg群で腎臓の好酸性小体の発生率に有意な高値が認められたが, 用量に関連した発現の増加および程度の増強は認められなかった。脾臓の色素沈着, 胸腺の出血, 肝臓の小肉芽腫および副腎束状帯の空胞変性が対照群を含め比較的多く観察されたが発生率に有意な変化は認められなかった。なお, 1000 mg/kgの雄の1例に認められた皮下の塊は, 組織学的には膿瘍であった。その他, 観察された所見は単発性あるいは少数例の発生であった。

雌で認められた所見はいずれも単発性の変化かあるいは群間の発生率に差がない変化であった。

交尾しなかった動物では, 雌雄に共通して脾臓の色素沈着および腎臓のリンパ球浸潤が認められ, その他雄では肝臓のリンパ球浸潤, 腎臓の尿管の好塩基化および

副腎の血管拡張ならびに束状帯の空胞変性, 雌では脾臓の包膜炎, 肺炎, 肝臓の小肉芽腫, 腎臓の腎盂炎, 子宮の内腔拡張および細胞浸潤が観察された。

## 2. 生殖発生毒性

## 1) 交尾および受胎能 (Table 6)

交尾は対照群を除くすべての被験物質投与群で全例成立した。対照群では1組が交尾不成立であり, 交尾率は91.7%であった。受胎はすべての群の交尾成立雌で成立した。

性周期観察では, いずれの群もほぼ4~5日の性周期を示し平均性周期に群間差は認められなかった。

## 2) 分娩および哺育 (Table 7)

1000 mg/kg群で対照群に比べ妊娠期間が統計学的に有意な低値を示したが, 個体別の妊娠期間はすべて22日であり, 正常の範囲内であった。また, 同群で対照群に比べ哺育4日の生児数が雌雄ともに有意な低値を示し, 哺育4日の生存率も雌雄ともに有意な低値を示した。その他, 分娩状態には異常が観察されず, 対照群を含む各群の黄体数, 着床痕数, 出産生児数および死産児数はほぼ同様な値を示し, 出産率, 着床率, 分娩率および出生率に群間差は認められなかった。

## 3) 新生児の形態, 体重および剖検所見

新生児の外表検査では, 100 mg/kg群で鎖肛および無尾が同一個体の1例に, 300 mg/kg群で鎖肛および痕跡尾が同一個体の1例にそれぞれ観察された。

哺育期間中の体重では, 哺育0および4日に対照群に比べ1000 mg/kg群で雌雄とも統計学的に有意な低値を示した。死亡児の剖検では, 右鎖骨下動脈起始異常が100および1000 mg/kg群で1および3例観察された。その他, 腎盂拡張が100 mg/kg群の1例, 大脳低形成および食道位置異常が300 mg/kg群の同一個体の1例, 小眼球が1000 mg/kg群の1例にそれぞれ観察された。哺育4日の剖検で, 雄では胸腺頸部残留が対照群, 100および300 mg/kg群でそれぞれ3, 2および1例観察された。また, 肝臓の白色斑点が対照群および1000 mg/kg群で各1例に観察された。その他, 肝臓の赤色斑点, 黒色斑点および淡色が300あるいは1000 mg/kg群で1から2例に観察された。雌では胸腺頸部残留が対照群, 100および1000 mg/kg群でそれぞれ2, 1および1例に観察された。また, 肝臓の白色斑点が100および1000 mg/kg群で1および4例に観察され, 対照群に比べて1000 mg/kg群で有意な発生率の高値を示した。その他, 肝臓の赤色斑点, 黒色斑点および緑色, 鎖肛, 眼球の赤色, 尾の欠損, 痕跡尾および痂皮が被験物質投与群で単発性に散見された。

## 考察

## 1. 反復投与毒性

死亡例は, 投与期間を通じ雌雄いずれの群にも認めら

れなかった。

一般状態の観察では、流涎が投与期間を通じ雌雄ともに300 mg/kg以上の被験物質投与群で認められた。この症状は用量に対応して発現頻度が増強し、被験物質投与に関連した変化と考えられた。

体重は、雌雄ともに1000 mg/kg群で増加抑制が認められ、摂餌量についても雌雄ともに同群で投与開始直後低値を示し、被験物質投与の影響が示唆された。

雄の血液学検査および血液凝固能検査には被験物質投与の影響は認められなかった。

雄において、1000 mg/kg群で肝臓重量が高値を示し、剖検でも肝臓の肥大が観察された。また、病理組織学検査においても肝細胞肥大の発生率は増加を示したのに対し、肝臓の脂肪化は発生率の減少が観察され、肝臓に対する被験物質投与の影響が認められた。また、同群で腎臓重量が高値を示し、病理組織学検査で腎乳頭壊死、尿細管拡張、リンパ球浸潤、尿細管の好塩基化および硝子円柱が認められた。腎乳頭壊死は鎮痛剤および非ステロイド系抗炎症剤の投与により実験的に誘発されることが知られており<sup>6,7)</sup>、本試験においても尿細管の好塩基化や硝子円柱の程度の強いものに腎乳頭壊死および尿細管拡張が観察されていることから、被験物質による尿細管の障害とともに尿濃縮による腎乳頭への障害が考えられた。また、血液生化学検査においても300および1000 mg/kg群でクレアチニンが、また、1000 mg/kg群でBUNの高値が認められ、腎障害が示唆された。その他、血液生化学検査で1000 mg/kg群に認められた総タンパク、アルブミン、A/G、ALP、塩素およびカリウムの変化も肝臓あるいは腎臓に対する被験物質の影響を反映するものと考えられた。同群で認められた総ビリルビンの減少は毒性学的意義が乏しいものと考えられるため被験物質投与の影響とは判断しなかった。1000 mg/kg群で観察された胸腺の萎縮は、組織学的には皮質および髄質領域の萎縮であり、器官重量にも低値が認められていることから被験物質投与の影響と考えられた。

雌においても1000 mg/kg群で肝臓および腎臓重量が高値を示し、剖検で肝臓の肥大が観察され、肝臓および腎臓に及ぼす被験物質投与の影響が示唆された。しかし、病理組織学検査では影響を示唆する変化は認められず、雄に比べ雌に対する被験物質投与の影響は軽度なものと考えられた。

その他、雌雄の1000 mg/kg群で脳、副腎および精巣重量の高値が認められたが、病理組織学検査では相当する所見は認められず、相対重量のみの変化であることから同群の低体重に起因する二次的な変化と考えられた。

以上のことから、2,4,6-トリプロモフェノールの反復投与により投与後の一般状態の変化で雌雄の300 mg/kg以上の投与群で流涎が観察された。また、雌雄とも1000 mg/kg群で体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められた。さらに、雄の血液生化学検査で300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し、1000 mg/kg群の病理学検査および血液生化学検査において、被験物質投与による主として肝臓および腎臓に及ぼす影

響が示唆される変化が認められた。したがって、雌雄とも無影響量は100 mg/kg/dayと判断された。

## 2. 生殖発生毒性

性周期、交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。交尾しなかった動物の病理学検査では生殖器系に特異的な変化は認められなかった。分娩時観察では妊娠動物の全例が正常に分娩し、妊娠期間にも被験物質投与の明らかな影響は認められなかった。1000 mg/kg群で雌雄の新生児の哺育0および4日の体重が低値を示し、哺育4日の生児数および生存率が低値を示したことから、被験物質投与による出生前後の新生児の発育抑制および生存性に対する影響が示唆された。なお、1000 mg/kg群で全児死亡動物が1例観察されたが、病理学検査の結果からは母動物には被験物質投与の影響と考えられる所見は認められなかった。しかし、前述のごとく新生児の哺育4日の生存率が明らかな低値を示していることから、新生児に対する本被験物質の影響に起因したものと考えられた。その他、出産率、出生率に被験物質投与の影響は認められず、新生児の外表面にも被験物質投与の影響は認められなかった。また、死亡児の剖検で1000 mg/kg群に認められた右鎖骨下動脈起始異常{Crj:CD(SD)胎児の背景値<sup>8)</sup> [12施設分:施設間の変動(施設内変動)] :0.03~0.63%(0~4.55%)}は3例中2例が同腹児の発現であり、被験物質投与との関連は明らかではなかった。哺育4日の剖検では雌の1000 mg/kg群で肝臓の白色斑点の発生率が増加を示したが、母動物2例から各2例の発現であり、雄ではこの所見は対照群でも認められ、発生率の増加も認められないことから被験物質投与の影響とは考えなかった。

以上のことから、2,4,6-トリプロモフェノールの雌雄の生殖に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与でも認められず、無影響量は1000 mg/kg/dayと判断された。

児動物の発生・発育に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与で発育抑制が認められ、哺育4日生児数および生存率が低値を示したことから無影響量は300 mg/kg/dayと判断された。

## 文献

- 1) S. Gad and C. S. Weil, "Statistics and Experimental Design For Toxicologists," Telford Press, New Jersey, 1986, pp. 43-45.
- 2) 佐野正樹, 岡山佳弘, 医薬安全性研究会会報, 32, 21(1990).
- 3) M, Yoshida, J. Japanese Soc. Comp. Statist., 1, 111(1988).
- 4) 佐久間昭, "薬効評価-計画と解析-I," 東京大学出版会, 東京, 1977, pp. 109-117.
- 5) 石居進, "生物統計学入門," 培風館, 東京, 1975, pp. 78-107.
- 6) 高橋道人監訳, "毒性病理学の基礎," ソフトサイエンス社, 東京, 1992, pp. 59-152.

- 7) C. Gopinath, D. E. Prentice and D. J. Lewis, "Atlas of Experimental Toxicological Pathology," MTP Press Limited, Lancaster, 1987, pp. 77-90.
- 8) T. Nakatsuka et al., *Cong. Anom.*, **37**, 47-138 (1997).

連絡先

試験責任者：田中亮太  
試験担当者：山田るみ，大庭耕輔，伊賀達也，  
三上真一  
(財)食品農医薬品安全性評価センター  
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜  
582-2  
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Ryota Tanaka (Study director)  
Rumi Yamada, Kousuke Oba,  
Tatsuya Iga, Shinichi Mikami  
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)  
582-2 Shioshinden, Arahama, Fukude-cho, Iwata-  
gun, Shizuoka, 437-1213, Japan  
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Hematology and coagulation of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
HCT (%)	44.1 ± 1.6	44.6 ± 1.1	44.1 ± 1.9	43.6 ± 1.9
HGB (g/dL)	15.3 ± 0.4	15.5 ± 0.4	15.3 ± 0.6	15.1 ± 0.7
RBC (× 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	8.23 ± 0.34	8.35 ± 0.19	8.23 ± 0.30	8.16 ± 0.48
MVC (μm <sup>2</sup> )	53.7 ± 1.5	53.4 ± 1.2	53.7 ± 1.6	53.5 ± 1.6
MCH (pg)	18.6 ± 0.6	18.6 ± 0.5	18.6 ± 0.6	18.5 ± 0.7
MCHC (%)	34.6 ± 0.6	34.8 ± 0.6	34.7 ± 0.3	34.5 ± 0.5
PLT (× 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1090 ± 115	1100 ± 111	1024 ± 116	1093 ± 124
WBC (× 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	9.3 ± 3.0	9.7 ± 3.8	9.5 ± 3.2	8.6 ± 2.2
Differential leukocyte counts (%)				
NEUT	15 ± 4	16 ± 6	16 ± 5	18 ± 6
LYMPH	80 ± 4	80 ± 7	80 ± 5	78 ± 7
MONO	3 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 1
EOSN	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1
PT (sec.)	14.2 ± 0.7	14.6 ± 0.5	15.0 ± 1.1	15.6 ± 1.2**
APTT (sec.)	24.8 ± 1.9	24.5 ± 2.0	25.3 ± 2.0	26.7 ± 2.6
Fibrinogen (mg/dL)	222 ± 16	208 ± 13	214 ± 19	240 ± 35

NEUT:Neutrophil LYMPH:Lymphocyte MONO:Monocyte EOSN:Eosinophil BASO:Basophil  
 LUC:Large unstained cells  
 Values are expressed as Mean±S.D.  
 Significant difference from control group; \*\*:P<0.01

Table 2 Blood chemistry chemical examination of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
T. protein (g/dL)	5.87 ± 0.22	5.84 ± 0.14	5.95 ± 0.26	6.45 ± 0.51**
Albumin (g/dL)	3.36 ± 0.13	3.33 ± 0.09	3.39 ± 0.19	3.88 ± 0.29**
A/G	1.34 ± 0.06	1.33 ± 0.09	1.33 ± 0.10	1.51 ± 0.08**
Glucose (mg/dL)	152 ± 25	157 ± 21	157 ± 18	149 ± 14
Triglyceride (mg/dL)	49.4 ± 17.9	47.7 ± 14.6	55.6 ± 28.8	62.0 ± 33.7
T. cholesterol (mg/dL)	61 ± 14	60 ± 14	54 ± 15	57 ± 14
BUN (mg/dL)	13.3 ± 1.4	13.6 ± 2.1	13.2 ± 2.3	20.9 ± 11.4
Creatinine (mg/dL)	0.27 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.33 ± 0.07*	0.47 ± 0.26**
T. bilirubin (mg/dL)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01**
GOT (U/L)	77 ± 10	77 ± 13	72 ± 7	71 ± 8
GPT (U/L)	32 ± 5	34 ± 7	29 ± 4	38 ± 7
ALP (U/L)	354 ± 74	440 ± 162	342 ± 102	514 ± 155*
γ-GTP (U/L)	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2
Sodium (mmol/L)	141.3 ± 1.2	141.5 ± 0.8	141.5 ± 0.7	141.9 ± 1.3
Potassium (mmol/L)	4.46 ± 0.29	4.40 ± 0.25	4.38 ± 0.30	4.03 ± 0.25**
Chloride (mmol/L)	106.6 ± 1.2	107.6 ± 1.1	107.8 ± 1.5	119.0 ± 3.6**
Calcium (mg/dL)	9.58 ± 0.51	9.38 ± 0.23	9.47 ± 0.27	9.88 ± 0.34
I. phosphorus (mg/dL)	6.31 ± 0.64	5.91 ± 0.52	5.68 ± 0.58	7.28 ± 1.24

Values are expressed as Mean±S.D.  
 Significant difference from control group; \*:P<0.05 \*\*:P<0.01



Table 3 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
<b>Male</b>				
No. of animals examined	12	12	12	12
Body weight (g)	492 ± 34	478 ± 31	478 ± 36	422 ± 25
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.25 ± 0.08	2.22 ± 0.08	2.25 ± 0.08	2.20 ± 0.06
Thymus (mg)	299 ± 81	269 ± 52	269 ± 66	201 ± 57**
Liver (g)	13.99 ± 1.72	13.18 ± 1.31	14.20 ± 1.99	16.23 ± 2.32**
Spleen (g)	0.73 ± 0.14	0.69 ± 0.09	0.73 ± 0.09	0.63 ± 0.10
Kidneys (g)	3.34 ± 0.36	3.15 ± 0.17	3.23 ± 0.31	3.47 ± 0.37
Adrenals (mg)	60 ± 7	56 ± 6	64 ± 7	64 ± 6
Testes (g)	3.55 ± 0.32	3.50 ± 0.25	3.47 ± 0.32	3.35 ± 0.25
Epididymides (mg)	1319 ± 75	1220 ± 124	1341 ± 109	1235 ± 111
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.460 ± 0.042	0.465 ± 0.033	0.473 ± 0.041	0.522 ± 0.032**
Thymus (mg%)	60.382 ± 14.897	56.587 ± 12.134	56.483 ± 13.955	47.291 ± 12.204
Liver (g%)	2.834 ± 0.218	2.751 ± 0.152	2.964 ± 0.285	3.837 ± 0.447**
Spleen (g%)	0.149 ± 0.023	0.144 ± 0.016	0.152 ± 0.016	0.149 ± 0.020
Kidneys (g%)	0.678 ± 0.054	0.661 ± 0.053	0.679 ± 0.083	0.824 ± 0.101**
Adrenals (mg%)	12.257 ± 1.299	11.807 ± 1.277	13.494 ± 1.966	15.304 ± 1.697**
Testes (g%)	0.721 ± 0.062	0.733 ± 0.067	0.729 ± 0.080	0.794 ± 0.046*
Epididymides (mg%)	268.582 ± 16.867	256.085 ± 31.810	281.498 ± 26.289	292.996 ± 27.221
<b>Female</b>				
No. of animals examined	11	12	12	11
Body weight (g)	332 ± 16	317 ± 27	333 ± 22	307 ± 15
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.03 ± 0.06	2.07 ± 0.10	2.00 ± 0.10	2.04 ± 0.05
Thymus (mg)	157 ± 46	134 ± 48	168 ± 75	137 ± 32
Liver (g)	13.70 ± 0.80	13.48 ± 2.07	14.39 ± 1.76	15.74 ± 1.28**
Spleen (g)	0.60 ± 0.09	0.64 ± 0.10	0.61 ± 0.13	0.57 ± 0.09
Kidneys (g)	2.15 ± 0.20	2.18 ± 0.11	2.22 ± 0.19	2.36 ± 0.25
Adrenals (mg)	77 ± 7	82 ± 11	87 ± 15	84 ± 8
Ovaries (mg)	108 ± 30	111 ± 15	98 ± 11	94 ± 12
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.613 ± 0.034	0.657 ± 0.067	0.602 ± 0.038	0.665 ± 0.025*
Thymus (mg%)	47.175 ± 13.289	41.733 ± 13.767	49.633 ± 20.449	44.365 ± 9.118
Liver (g%)	4.138 ± 0.287	4.230 ± 0.396	4.312 ± 0.393	5.117 ± 0.265**
Spleen (g%)	0.181 ± 0.029	0.201 ± 0.026	0.183 ± 0.031	0.185 ± 0.029
Kidneys (g%)	0.649 ± 0.072	0.694 ± 0.078	0.666 ± 0.047	0.772 ± 0.094**
Adrenals (mg%)	23.171 ± 1.572	25.991 ± 3.418	25.988 ± 4.091	27.315 ± 3.415**
Ovaries (mg%)	32.738 ± 9.135	35.252 ± 6.883	29.454 ± 3.137	30.501 ± 4.301

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; \*: P &lt; 0.05 \*\* : P &lt; 0.01

Table 4 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 2, 4, 6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Male animals				Female animals			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals necrosied	11	12	20	12	11	12	12	11
Organ Findings								
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>								
heart								
cellular infiltration, lymphocyte	2	-	-	1	0	-	-	0
fibrosis	1	-	-	0	0	-	-	0
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>								
spleen								
deposit, pigment	11	-	-	12	11	-	-	11
hematopoiesis, extramedullary	0	-	-	0	3	-	-	3
thymus								
hemorrhage	2	4	4	4	0	-	-	1
atrophy	0	0	0	3	0	-	-	0
deposit, pigment	0	0	0	0	0	-	-	1
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>								
lung								
hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	1(1)
cellular infiltration	-	-	-	-	-	-	-	1(1)
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>								
liver								
cytological alteration	0	1	0	0	0	0	0	0
deposit, pigment	1	0	0	0	0	0	0	0
fatty change	6	5	3	0**	2	1	0	0
hypertrophy, hepatocyte	0	0	0	12**	0	0	0	0
necrosis, focal	0	0	0	1	0	3	0	2
accumulation of macrophage	0	0	0	1	0	0	0	2
cellular infiltration, lymphocyte	1	2	3	2	0	0	0	0
microgranuloma	5	4	4	3	0	0	1	0
hematopoiesis, extramedullary	0	0	0	0	3	2	2	3
peritoneum								
fat granuloma	-	-	-	1(1)	-	-	-	-
<b>URINARY SYSTEM</b>								
kidney								
basophilic tubules	8	9	9	12	2	-	-	3
case, hyaline	1	1	0	8**	1	-	-	0
dilatation, tubules	0	0	0	7**	0	-	-	0
eosinophilic body	5	11*	9	7	0	-	-	0
mineralization	1	0	0	1	3	-	-	1
papillary necrosis	0	0	0	5	0	-	-	0
cellular infiltration, lymphocyte	1	1	0	6*	0	-	-	0
inflammatory infiltration	0	1	0	0	0	-	-	0
=lipoma	0	1	0	0	0	-	-	0

=:benign #:malignant

( ):No. of animals examined microscopically at this site. -:Not applicable.

Significant difference from control group; \*:P<0.05 \*\*:P<0.01

Table 4 (continued)

Dose level (mg/kg)	Male animals				Female animals			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals necrosied	11	12	20	12	11	12	12	11
Organ Findings								
REPRODUCTIVE SYSTEM								
testis								
atrophy, seminiferous tubule	0	-	-	1	-	-	-	-
cellular infiltration	1	-	-	0	-	-	-	-
epididymis								
cellular infiltration, lymphocyte	1	-	-	1	-	-	-	-
ovary								
deosit, pigment	-	-	-	-	1	-	-	1
mineralization	-	-	-	-	0	-	-	1
ENDCRINE SYSTEM								
adrenal gland								
angiectasis	1	-	-	1	1	-	-	0
accumulation of foamy cells	0	-	-	0	0	-	-	1
degeneration, vacuolar	4	-	-	3	0	-	-	0
NERVOUS SYSTEM								
brain								
dilatation, ventricle	0	-	-	0	1	-	-	0
INTEGUMENTARY SYSTEM								
skin								
hair follicle atrophy	-	-	-	-	1 (1)	-	-	1 (1)
subcutaneous tissue								
abscessy	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-

=:benign #:malignant

():No. of animals examined microscopically at this site. -:Not applicable.

Table 5 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 2, 4, 6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Male animals												Female animals																							
	0			100			300			1000			0			100			300			1000														
No. of animals necropsied	11			12			12			12			11			12			12			11														
Organ Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3								
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>																																				
heart																																				
cellular infiltration, lymphocyte	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
fibrosis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>																																				
spleen																																				
deposit, pigment	-	11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	1	0	-	11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	0	0				
hematopoiesis, extramedullary	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0				
thymus																																				
hemorrhage	-	2	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0				
atrophy	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
deposit, pigment	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>																																				
lung																																				
hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
cellular infiltration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
<b>DEGESTIVE SYSTEM</b>																																				
liver																																				
cytological alteration	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
deposit, pigment	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
fatty change	-	5	1	0	-	5	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	0	1	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
hypertrophy, hepatocyte	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	12	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
necrosis, focal	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0
accumulation of macrophage	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0
cellular infiltration, lymphocyte	-	1	0	0	-	2	0	0	-	3	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
microgranuloma	-	5	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
hematopoiesis, extramedullary	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	3	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0
peritoneum																																				
fat granuloma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
<b>URINARY SYSTEM</b>																																				
kidney																																				
basophilic tubules	-	8	0	0	-	9	0	0	-	8	1	0	-	8	4	0**	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0				
cast, hyaline	-	0	1	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	7	1	0**	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
dilatation, tubules	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	6	1	0**	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
eosinophilic body	-	4	1	0	-	11	0	0*	-	6	3	0	-	6	1	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
mineralization	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
parillary necrosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	3	2	0**	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
cellular infiltration, lymphocyte	-	1	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	6	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
inflammatory infiltration	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
= lipoma	0	-	-	-	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-				

1:slight 2:moderate 3:marked  
 =:benign #:malignant  
 ( ):No. of animals examined microscopically at this site. -:Not applicable  
 Significant difference from control group; \*:P<0.05 \*\*:P<0.01

Table 5 (continued)

Dose level (mg/kg)	Male animals												Female animals															
	0			100			300			1000			0			100			300			1000						
No. of animals necropsied	11			12			12			12			11			12			12			11						
Organ Findingsd	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
REPRODUCTIVE SYSTEM																												
testis																												
atrophy, seminiferous tubule	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cellular infiltration	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
epididymis																												
cellular infiltration, lymphocyte	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ovary																												
deposit, pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0
mineralization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
ENDOCRINE SYSTEM																												
adrenal gland																												
angiectasis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	1	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0
accumulation of foamy cells	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0
degeneration, vacuolar	-	4	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0
NERVOUS SYSTEM																												
brain																												
dilatation, ventricle	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	1	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0
INTEGUMENTARY SYSTEM																												
skin																(1)												
hair follicle atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0
subcutaneous tissue																(1)												
abscess	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1:slight 2:moderate 3:marked

=:benign #:malignant

():No. of animals examined microscopically at this site. -:Not applicable

Table 6 Summary of reproductive performance in rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	11	12	12	12
No. of pregnant females	11	12	12	12
Copulation index (%) <sup>a)</sup>	91.7	100.0	100.0	100.0
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Estrus cycle (days, Mean ± S.D.)	4.2 ± 0.3	4.3 ± 0.3	4.3 ± 0.5	4.2 ± 0.3

a) : (No. of animals with successful copulation/no. of animals mated) × 100

b) : (No. of pregnant animals/no. of animals with successful copulation) × 100

Values in parentheses are expressed no. of animals observed

Table 7 Findings of delivery in dams treated orally with 2,4,6-tribromophenol and observations on their pups (F<sub>1</sub>) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of dams observed	11	12	12	12
No. of dams delivered live pups	11	12	12	12
Duration of gestation (Mean±S.D.)	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.7	22.0 ± 0.0*
No. of total corpora lutea (Mean±S.D.)	209 (19.0 ± 3.9)	231 (19.3 ± 3.7)	209 (17.4 ± 1.8)	200 (16.7 ± 2.0)
No. of total implants (Mean±S.D.)	175 (15.9 ± 2.0)	204 (17.0 ± 2.3)	195 (16.3 ± 1.9)	189 (15.8 ± 1.4)
No. of total pups born (Mean±S.D.)	161 (14.6 ± 2.0)	188 (15.7 ± 1.9)	175 (14.8 ± 3.2)	174 (14.5 ± 1.9)
No. of total live pups born (Mean±S.D.)	161 (14.6 ± 2.0)	187 (15.6 ± 1.9)	175 (14.5 ± 2.6)	174 (14.5 ± 1.9)
Male	87 ( 7.9 ± 1.4) <sup>g</sup>	97 ( 8.1 ± 2.3) <sup>g</sup>	89 ( 7.4 ± 2.5)	79 ( 6.6 ± 2.1) <sup>g</sup>
Female	74 ( 6.7 ± 1.9) <sup>g</sup>	90 ( 7.5 ± 1.8) <sup>g</sup>	85 ( 7.1 ± 1.0) <sup>f,g</sup>	95 ( 7.9 ± 1.2) <sup>g</sup>
Sex ratio (male/female, Mean±S.D.)	1.29 ± 0.54	1.17 ± 0.50	1.07 ± 0.42	0.88 ± 0.42
No. of total live pups on day 4 (Mean±S.D.)				
Male	83 ( 7.3 ± 1.2)	87 ( 7.3 ± 2.8)	86 ( 7.2 ± 2.3)	42 ( 3.5 ± 2.4)**
Female	72 ( 6.5 ± 1.9)	84 ( 7.0 ± 2.2)	80 ( 6.7 ± 1.2)	49 ( 4.1 ± 2.9)*
No. of total dead pups born (Mean±S.D.)	0 ( 0.0 ± 0.0)	1 ( 0.1 ± 0.3)	1 ( 0.1 ± 0.3)	0 ( 0.0 ± 0.0)
stillbirth	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)	1 ( 0.1 ± 0.3)	0 ( 0.0 ± 0.0)
cannibalism	0 ( 0.0 ± 0.0)	1 ( 0.1 ± 0.0)	1 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Implantation index (% Mean±S.D.) <sup>b)</sup>	83.5 ± 11.7	90.1 ± 13.2	93.3 ± 6.9	94.9 ± 5.9
Delivery index (% Mean±S.D.) <sup>c)</sup>	92.1 ± 5.8	92.5 ± 6.6	89.3 ± 9.4	91.9 ± 7.0
Live birth index (% Mean±S.D.) <sup>d)</sup>	100.0 ± 0.0	99.5 ± 1.8	99.5 ± 1.7	100.0 ± 0.0
Viability index on day 4 (% Mean±S.D.) <sup>e)</sup>				
Male	96.2 ± 8.6	88.6 ± 23.7	97.4 ± 6.3	53.3 ± 34.2**
Female	97.6 ± 5.4	92.7 ± 15.5	94.0 ± 9.6	50.4 ± 35.1**

a) : (No. of females with live pups/no. of pregnant females) × 100

b) : (No. of implants/no. of corpora lutea) × 100

c) : (No. of pups born/no. of implants) × 100

d) : (N. of live pups born/no. of pups born) × 100

e) : (No. of live pups on day 4 after birth/no. of live pups born) × 100

f) : Includes live pups died before observations

g) : Includes a pup retained on day 1 after birth

Values in parentheses are expressed number of animals examined

Significant difference from control group; \* : P < 0.05 \*\* : P < 0.01

## 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1 L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に保温したトッパアガー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 (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean±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 ± 0.6)			(10 ± 3.2)			(24 ± 6.8)			(24 ± 4.0)			(14 ± 1.7)		
	62.5	140	140	130	10	8	15	23	29	25	19	26	24	9	10	14
		(137 ± 5.8)			(11 ± 3.6)			(23 ± 3.1)			(23 ± 3.6)			(11 ± 2.6)		
	125	144	136	152	9	14	9	16	22	20	25	20	19	14	2	2
		(144 ± 8.0)			(11 ± 2.9)			(19 ± 3.1)			(21 ± 3.2)			(6 ± 6.9)		
	250	145	105	131	7	9	13	19	18	28	14	22	20	5	15	10
		(127 ± 20.3)			(10 ± 3.1)			(22 ± 5.5)			(19 ± 4.2)			(10 ± 5.0)		
500	141	129	140	9	10	8	15	20	20	18	25	18	14	14	11	
	(137 ± 6.7)			(9 ± 1.0)			(18 ± 2.9)			(20 ± 4.0)			(13 ± 1.7)			
1000	47*	49*	54*	5*	2*	2*	17	21	23	7*	16*	3*	4*	2*	0*	
	(50 ± 3.6)			(3 ± 1.7)			(20 ± 3.1)			(9 ± 6.7)			(2 ± 2.0)			
2000	0*	0*	0*	0*	0*	0	0*	0*	0	0*	0*	0	0*	0*	0	
	(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			
S9 mix (+)	0	176	146	154	8	10	10	25	28	27	38	29	26	9	14	19
		(159 ± 15.5)			(9 ± 1.2)			(27 ± 1.5)			(31 ± 6.2)			(14 ± 5.0)		
	62.5	174	182	172	10	12	12	34	31	24	36	23	23	15	17	14
		(176 ± 5.3)			(11 ± 1.2)			(30 ± 5.1)			(27 ± 7.5)			(15 ± 1.5)		
	125	157	175	179	8	11	13	29	27	19	34	32	33	15	16	12
		(170 ± 11.7)			(11 ± 2.5)			(25 ± 5.3)			(33 ± 1.0)			(14 ± 2.1)		
	250	181	163	188	12	16	15	23	28	21	27	29	34	10	14	11
		(177 ± 12.9)			(14 ± 2.1)			(24 ± 3.6)			(30 ± 3.6)			(12 ± 2.1)		
500	165	158	160	15	10	11	20	20	20	28	35	35	21	12	18	
	(161 ± 3.6)			(12 ± 2.6)			(20 ± 0.0)			(33 ± 4.0)			(17 ± 4.6)			
1000	136	132	119	3	9	7	18	20	16	22	20	23	5	12	9	
	(129 ± 8.9)			(6 ± 3.1)			(18 ± 2.0)			(22 ± 1.5)			(9 ± 3.5)			
2000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			(0 ± 0.0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg/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 ± 21.7)			(718 ± 18.9)			(232 ± 42.3)			(640 ± 13.1)			(473 ± 103.9)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg/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 ± 80.3)			(423 ± 31.3)			(879 ± 96.6)			(503 ± 27.5)			(369 ± 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.

## 4-エチルフェノールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

### 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未満, 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>11)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、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.

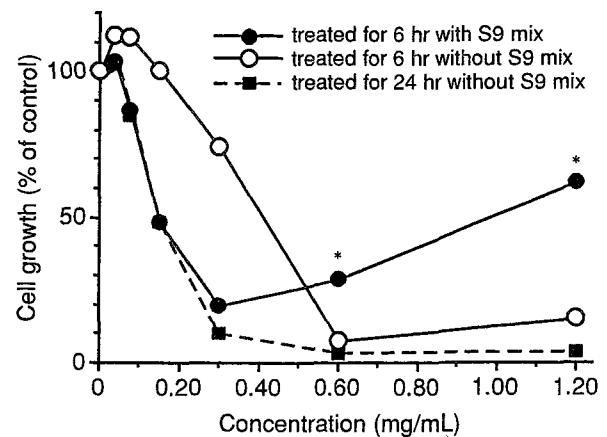


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4-ethylphenol

\*: 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クラン・アーミテッジの傾向性検定<sup>21)</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細胞の観察ができず、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)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>i)</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>i)</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>i)</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>i)</sup>	+	6-(18)	—											—			38.0	2.0, 0.4	
4EP	0.30 <sup>i)</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<sup>1)</sup>。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(バイエル板含む), 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(骨髄含む), 大腿骨(骨髄含む), 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,

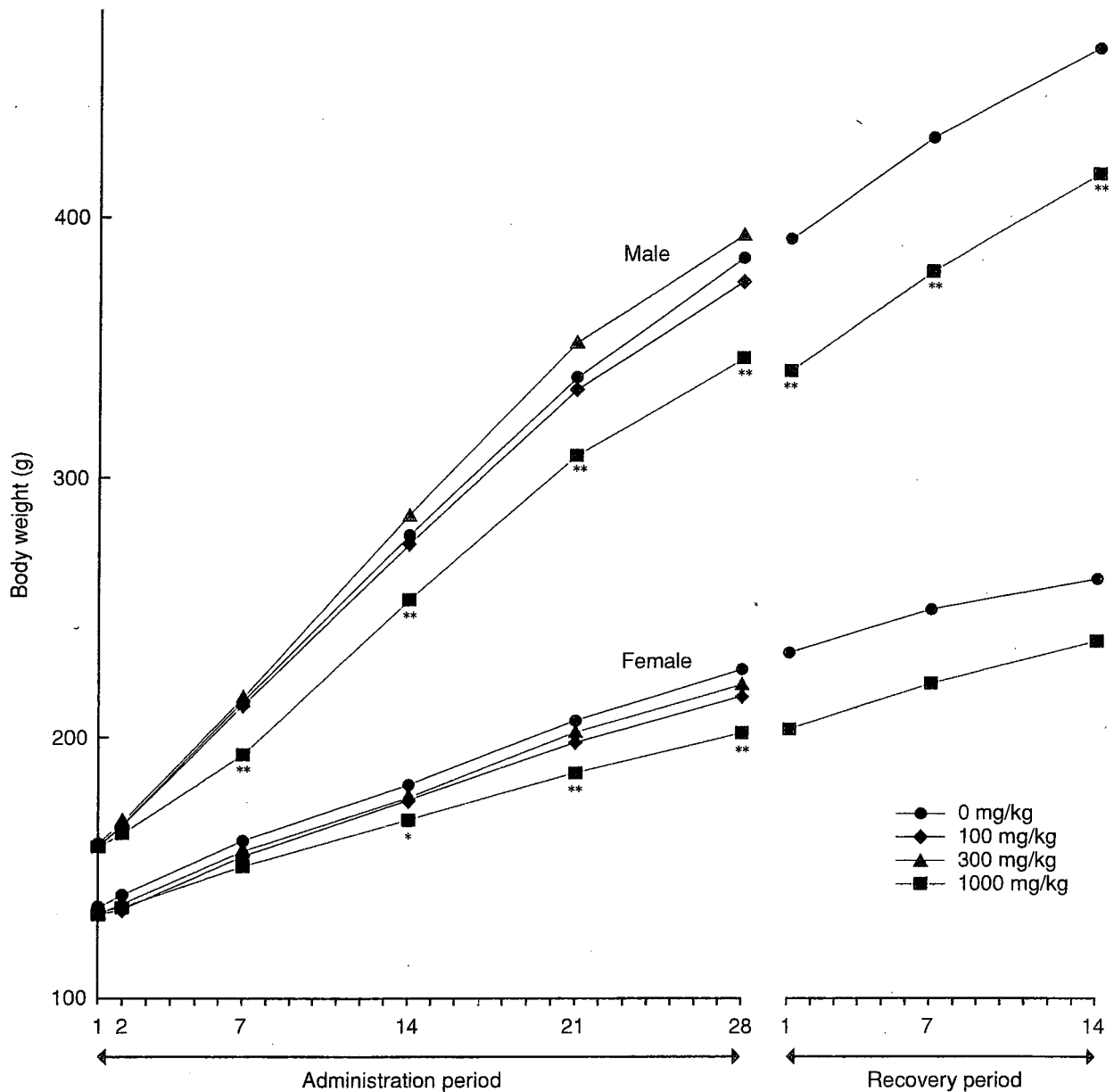


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test. Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

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。

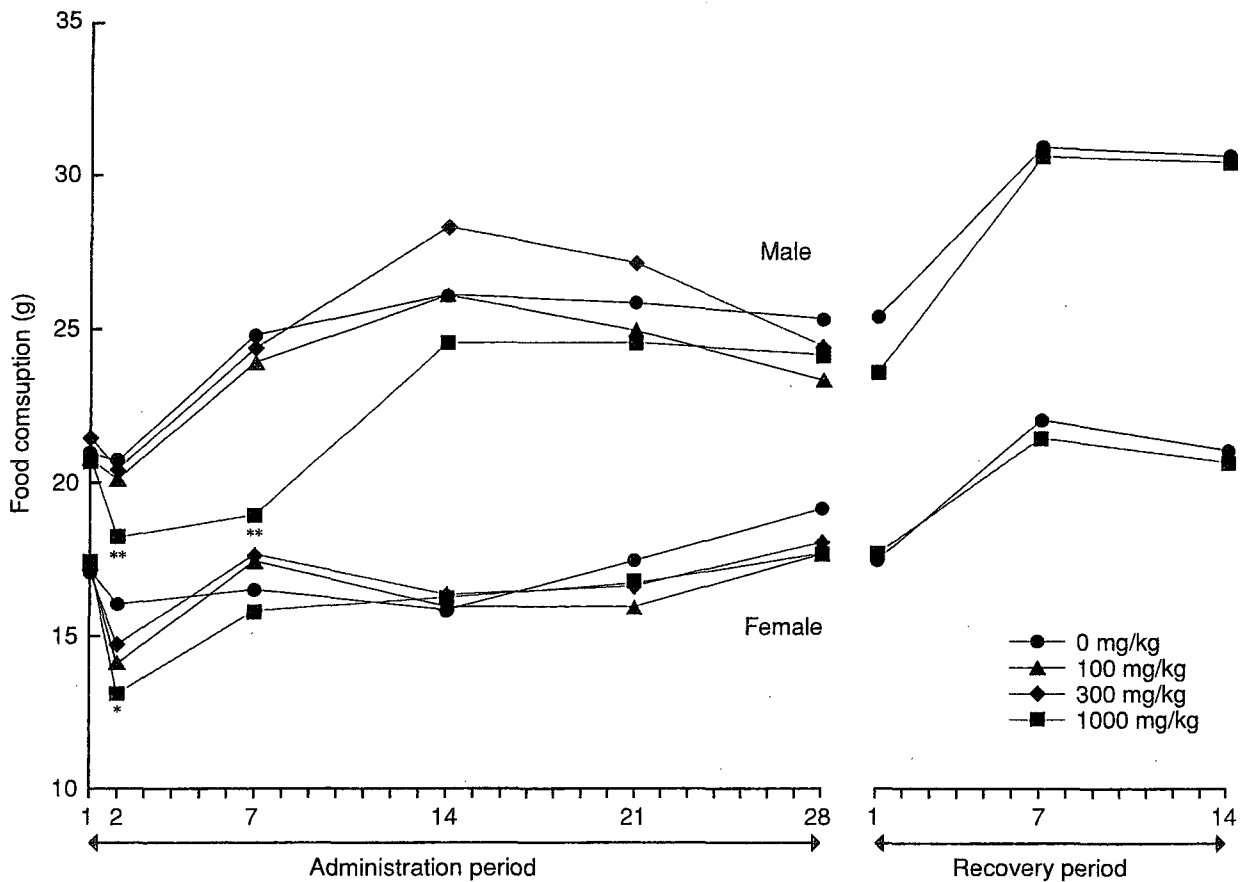


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test  
Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

### 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<sup>1)</sup>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
$\alpha_1$ -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
$\alpha_2$ -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
$\beta$ -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
$\gamma$ -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	292.4 ± 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
$\gamma$ -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	241.9±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

# メタクリロニトリルの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Methacrylonitrile on Bacteria

### 要約

メタクリロニトリルについて、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、用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験はS9 mix無添加試験および添加試験ともに313~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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。

以上の結果からメタクリロニトリルは、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

メタクリロニトリルは、無色透明の液体である。用いた被験物質は、ロット番号P-30A、純度99%、製造旭化成工業(株)(岡山)であり、旭化成工業(株)から供与された。被験物質は、使用時まで遮光して冷蔵した。本ロットについては、試験期間中安定であることが確認された。

メタクリロニトリルは、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No. 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 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

\*: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℃で20分間プレインキュベーションしたのち、約45℃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℃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 μg/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抗菌

性は認められなかった。また、被験物質に由来する沈殿も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5000 μg/plateとした。

最高用量を5000 μg/plateとして公比2で5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、メタクリロニトリルは、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。

なおメタクリロニトリルは、復帰変異試験およびショウジョウバエを用いた伴性劣性致死突然変異試験とともに陰性の結果が得られており<sup>4,5)</sup>、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および倍数性細胞が誘発され、陽性であった<sup>6)</sup>。また、関連物質であるアクリロニトリルについては、復帰変異試験および染色体異常試験とともに陽性の結果が<sup>7)</sup>、メチルメタクリレートについては、復帰変異試験で陰性、染色体異常試験および培養細胞を用いた突然変異試験で陽性の結果が得られている<sup>8-10)</sup>。

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) E. Zeiger, *et al.*, *Environ. Mutagenesis* **9 (Suppl. 9)**, 1(1987).
- 5) S. Zimmering, *et al.*, *Environ. Mol. Mutagenesis* **14**, 245(1989).
- 6) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **8**, 656(2001).
- 7) 石館基, "＜改定＞染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 9.
- 8) T. H. J. M. Waegemaekers, M. P. M. Bensink, *Mutat. Res.*, **37**, 95(1984).
- 9) C. L. Doerr, *et al.*, *Mutat. Res.*, **22**, 191(1989).
- 10) H. Schweikl, *et al.*, *Mutat. Res.*, **15**, 119(1998).

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：原 巧, 川上久美子, 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)  
Takumi Hara, Kumiko Kawakami,  
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 methacrylonitrile on bacteria (I)

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	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)		
	313	134	145	143	11	7	15	25	26	19	20	23	22	2	4	12
		(141 $\pm$ 5.9)			(11 $\pm$ 4.0)			(23 $\pm$ 3.8)			(22 $\pm$ 1.5)			(6 $\pm$ 5.3)		
	625	117	167	155	10	15	8	27	22	33	20	24	31	18	9	12
		(146 $\pm$ 26.1)			(11 $\pm$ 3.6)			(27 $\pm$ 5.5)			(25 $\pm$ 5.6)			(13 $\pm$ 4.6)		
	1250	122	145	143	12	13	11	19	17	30	19	26	27	10	14	7
		(137 $\pm$ 12.7)			(12 $\pm$ 1.0)			(22 $\pm$ 7.0)			(24 $\pm$ 4.4)			(10 $\pm$ 3.5)		
2500	145	117	147	7	8	15	15	23	31	20	21	18	17	11	7	
	(136 $\pm$ 16.8)			(10 $\pm$ 4.4)			(23 $\pm$ 8.0)			(20 $\pm$ 1.5)			(12 $\pm$ 5.0)			
5000	136	148	168	10	10	10	25	24	25	18	27	27	10	11	11	
	(151 $\pm$ 16.2)			(10 $\pm$ 0.0)			(25 $\pm$ 0.6)			(24 $\pm$ 5.2)			(11 $\pm$ 0.6)			
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)		
	313	159	168	142	7	13	4	21	27	28	20	28	31	12	17	15
		(156 $\pm$ 13.2)			(8 $\pm$ 4.6)			(25 $\pm$ 3.8)			(26 $\pm$ 5.7)			(15 $\pm$ 2.5)		
	625	147	170	166	13	7	8	34	29	20	29	26	21	8	14	15
		(161 $\pm$ 12.3)			(9 $\pm$ 3.2)			(28 $\pm$ 7.1)			(25 $\pm$ 4.0)			(12 $\pm$ 3.8)		
	1250	166	157	130	9	14	9	23	31	22	18	34	28	12	18	20
		(151 $\pm$ 18.7)			(11 $\pm$ 2.9)			(25 $\pm$ 4.9)			(27 $\pm$ 8.1)			(17 $\pm$ 4.2)		
2500	148	147	151	6	8	12	32	25	32	33	29	30	16	20	16	
	(150 $\pm$ 3.8)			(9 $\pm$ 3.1)			(30 $\pm$ 4.0)			(31 $\pm$ 2.1)			(17 $\pm$ 2.3)			
5000	148	160	151	7	11	16	35	36	33	28	19	30	13	16	20	
	(154 $\pm$ 6.0)			(11 $\pm$ 4.5)			(35 $\pm$ 1.5)			(26 $\pm$ 5.9)			(16 $\pm$ 3.5)			
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	598	557	565	714	702	739	183	260	252	639	628	651	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 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	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 99 %.

This substance contained 51 ppm *p*-methoxyphenol as polymerization inhibitor, and 19 ppm acetone, 59 ppm acrylonitrile, 55 ppm propionitrile, 72 ppm methacrolein, 48 ppm isobutyronitrile, 35 ppm hydrogen cyanide, and trace amount of acetonitrile and *cis*-crotonitrile as impurities.

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

Table 2 Mutagenicity of methacrylonitrile 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 )		
	313	151	147	128	16	17	12	14	24	19	31	21	21	5	8	9
		( 142 $\pm$ 12.3 )			( 15 $\pm$ 2.6 )			( 19 $\pm$ 5.0 )			( 24 $\pm$ 5.8 )			( 7 $\pm$ 2.1 )		
	625	111	148	138	7	8	20	12	20	10	24	28	29	12	15	4
		( 132 $\pm$ 19.1 )			( 12 $\pm$ 7.2 )			( 14 $\pm$ 5.3 )			( 27 $\pm$ 2.6 )			( 10 $\pm$ 5.7 )		
	1250	144	138	124	17	17	17	21	21	20	26	17	17	9	5	10
	( 135 $\pm$ 10.3 )			( 17 $\pm$ 0.0 )			( 21 $\pm$ 0.6 )			( 20 $\pm$ 5.2 )			( 8 $\pm$ 2.6 )			
2500	140	134	123	6	5	11	20	23	11	30	21	26	9	11	8	
	( 132 $\pm$ 8.6 )			( 7 $\pm$ 3.2 )			( 18 $\pm$ 6.2 )			( 26 $\pm$ 4.5 )			( 9 $\pm$ 1.5 )			
5000	134	132	129	15	8	18	15	18	12	20	36	34	9	10	10	
	( 132 $\pm$ 2.5 )			( 14 $\pm$ 5.1 )			( 15 $\pm$ 3.0 )			( 30 $\pm$ 8.7 )			( 10 $\pm$ 0.6 )			
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 )		
	313	129	150	168	13	16	12	25	18	24	35	38	33	15	12	19
		( 149 $\pm$ 19.5 )			( 14 $\pm$ 2.1 )			( 22 $\pm$ 3.8 )			( 35 $\pm$ 2.5 )			( 15 $\pm$ 3.5 )		
	625	138	166	145	12	16	12	22	32	25	32	34	30	17	18	18
		( 150 $\pm$ 14.6 )			( 13 $\pm$ 2.3 )			( 26 $\pm$ 5.1 )			( 32 $\pm$ 2.0 )			( 18 $\pm$ 0.6 )		
	1250	148	168	154	15	9	11	28	16	27	43	32	42	15	19	9
	( 157 $\pm$ 10.3 )			( 12 $\pm$ 3.1 )			( 24 $\pm$ 6.7 )			( 39 $\pm$ 6.1 )			( 14 $\pm$ 5.0 )			
2500	155	152	167	10	13	11	23	31	29	26	25	34	12	20	13	
	( 158 $\pm$ 7.9 )			( 11 $\pm$ 1.5 )			( 28 $\pm$ 4.2 )			( 28 $\pm$ 4.9 )			( 15 $\pm$ 4.4 )			
5000	160	163	154	15	16	13	34	34	31	33	29	35	11	18	16	
	( 159 $\pm$ 4.6 )			( 15 $\pm$ 1.5 )			( 33 $\pm$ 1.7 )			( 32 $\pm$ 3.1 )			( 15 $\pm$ 3.6 )			
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 99 %.

This substance contained 51 ppm *p*-methoxyphenol as polymerization inhibitor, and 19 ppm acetone, 59 ppm acrylonitrile, 55 ppm propionitrile, 72 ppm methacrolein, 48 ppm isobutyronitrile, 35 ppm hydrogen cyanide, and trace amount of acetonitrile and *cis*-crotonitrile as impurities.

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



*In Vitro* Chromosomal Aberration Test of Methacrylonitrile  
on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

メタクリロニトリ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S9 mix非存在下の短時間処理(6時間)では、0.67 mg/mL(10 mM)の濃度においても50%を越える細胞増殖抑制は認められなかった。S9 mix存在下の短時間処理における50%細胞増殖抑制濃度は、0.27 mg/mLであった。従って、連続処理およびS9 mix非存在下での短時間処理では、0.67 mg/mL(10 mM)を最高濃度とし、公比2で3濃度設定した。S9 mix存在下での短時間処理では、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時間連続処理およびS9 mix非存在下の短時間処理では0.67 mg/mL(10 mM)、S9 mix存在下での短時間処理では0.27 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時間連続処理およびS9 mix非存在下で短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存在下の短時間処理では、すべての処理群(0.068-0.27 mg/mL)で染色体異常の誘発作用が認められ、その誘発頻度は7.5-62.0%(gapを除く)であった。倍数性細胞の誘発作用は低濃度群(0.068 mg/mL)および中濃度(0.14 mg/mL)で観察され、出現頻度はそれぞれ3.13%および1.88%であった。傾向性検定では有意差( $p < 0.01$ )が認められなかったが、それは分裂遅延による可能性が考えられた。

以上の結果より、本試験条件下でメタクリロニトリルは、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

メタクリロニトリルはプラスチック底面を溶解し、揮発性があることから、培養にはガラスフラスコ(25 cm<sup>2</sup>, ハリオ)を用いた。2 × 10<sup>4</sup>個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたフラスコに播き、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

メタクリロニトリル(ロット番号:P-30A, 旭化成工業(株)(岡山))は、無色透明液体で、水に対しては100 mmol/L以上50 mg/mL未満、DMSOでは50 mg/mL以上、アセトンでは50 mg/mL以上で溶解し、凝固点-35.8 °C、沸点90.3 °C、蒸気圧8.7 kPaで、純度99%(不純物としてパラメトキシフェノール51 ppm, アセトン19 ppm, アクリロニトリル59 ppm, プロピオニトリル55 ppm, メタクロレイン72 ppm, イソブチロニトリル48 ppm, 靑酸35 ppm, アセトニトリルとシスクロトニトリルは痕跡程度を含む)の物質で、冷蔵、遮光で保存した。被験物質原体は、冷蔵、遮光下で安定であった。

6. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に使用した。溶媒は局方注射用水(ロット番号:K8H73, (株)大塚製薬工場)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10 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、コールターカウンター(Coulter Electronics Ltd.)を用いて各群の細胞数を計測し、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、連続処理およびS9 mix非存在下での短時間処理では、最高処理濃度の0.67 mg/mL (10 mM)においても50%を越える細胞増殖抑制作用は認められなかった。S9 mix存在下の短時間処理における50%細胞増殖抑制濃度は0.27 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、連続処理およびS9 mix非存在下の短時間処理では、0.67 mg/mL (10 mM)を最高濃度とし、公比2で3濃度を設定した(0.17, 0.34, 0.67 mg/mL)。S9 mix存在下の短時間処理では、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濃度を設定した(0.034, 0.068, 0.14, 0.27, 0.54 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、溶媒対照群と処理群では1濃度あたり2フラスコを用い、染色体標本の作製およびコールターカウンターによる細胞増殖率測定を行った。無処理対照群および陽性対照群についてはコールターカウンターによる細胞増殖率測定は行わなかった。

## 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。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各フラスコにつき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フラスコともに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)、連続処理およびS9 mix非存在下での短時間処理では0.67 mg/mL (10 mM)が、S9 mix存在下の短時間処理では0.27 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つのフラスコ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>11)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型

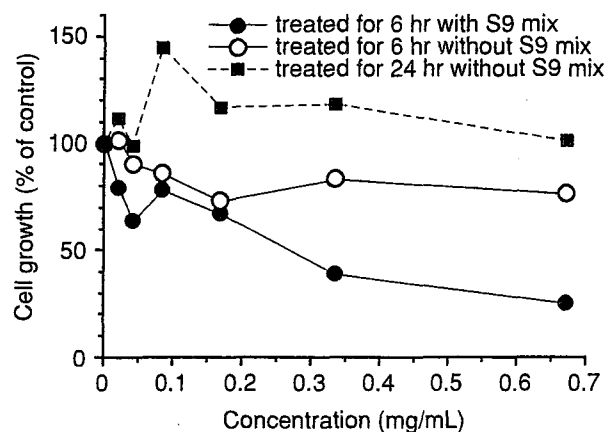


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with methacrylonitrile

あるいは染色分体型のギャップ、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。

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>2)</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クラン・アーミテッジの傾向性検定<sup>3)</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。メタクリロニトリルを加えて24時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体異常および倍数性細胞の誘発作用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。メタクリロニトリルを加え、S9 mix非存在下で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。一方、S9 mix存在下で短時間処理したすべての処理群 (0.068~0.27 mg/mL) において、染色体の構造異常の誘発が見られ、その出現頻度は7.5~62.0% (gapを除く)であった。また、低濃度群 (0.068 mg/mL) および中濃度群 (0.14 mg/mL) で倍数性細胞の有意な ( $p < 0.01$ ) 増加が認められ、その出現頻度は3.13%および1.88%であったが、傾向性検定の結果、濃度依存性は認められなかった ( $p < 0.01$ )。これは、高濃度群 (0.27 mg/mL) では細胞増殖率が57.5%と高い値であったにもかかわらず、分裂指数が低下していることや毒性のため800細胞観察できな

かった(観察細胞数:733細胞)ことから、分裂遅延により倍数性細胞の頻度が濃度依存的に減少した可能性が考えられた。

メタクリロニトリルのメチル基が水素に置換しているアクリロニトリルは、代謝活性化の有無に関係なく染色体の構造異常を誘発するが、倍数性細胞を誘発しないことが報告されている<sup>4)</sup>。また、メタクリロニトリルのニトリル基がメチルエステルに置換しているメチルメタクリラートは染色体の構造異常を誘発するが、その作用は弱い<sup>5)</sup>。これらのことから、化学構造が類似したこれらの3物質は、ともに染色体の構造異常を誘発するがその作用機序が異なる可能性が示唆された。

なお、メタクリロニトリルやメチルメタクリラートについては、復帰変異試験およびショウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験において陰性の結果が報告されている<sup>6-9)</sup>が、アクリロニトリルは、復帰変異試験で陽性の結果が得られている<sup>4)</sup>。

### 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<sup>1)</sup>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) 石舘基監修，“改訂増補 染色体異常試験データ集,” 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 9.
- 5) C. L. Doerr *et al.*, *Mutat. Res.*, **222**, 191(1989).
- 6) E. Zeiger *et al.*, *Environ. Mutagen.*, **9**, 1(1987).
- 7) S. Zimmering *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.*, **14**, 245(1989)
- 8) T. H. J. M. Waegemaekers and M. P. M. Bensink, *Mutat. Res.*, **137**, 95(1984)
- 9) H. Schweikl *et al.*, *Mutat. Res.*, **415**, 119(1998)

### 連絡先

試験責任者: 田中憲穂  
試験担当者: 山影康次, 日下部博一, 佐々木澄志,  
高橋俊孝, 若栗 忍, 橋本恵子  
(財)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: Noriho Tanaka (Study director)  
Kohji Yamakage, 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 methacrylonitrile (MPN)<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>c</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Solvent <sup>b</sup>	0	24	200	1	0	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00	-	-	100.0	-
MPN	0.17	24	200	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	-	-	119.6	-
MPN	0.34	24	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.00	-	-	120.7	-
MPN	0.67	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-	109.0	10.2, 9.0
MC	0.05 µg/mL	24	200	3	19	87	3	2	0	114	0	81*(40.5)	80*(40.0)	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 99%. This substance contained impurities as follows: *p*-methoxyphenol as polymerization inhibitor (51 ppm), acetone (19 ppm), acrylonitrile (59 ppm), propionitrile (55 ppm), methacrolein (72 ppm), isobutyronitrile (48 ppm), hydrogen cyanide (35 ppm), and trace amount of acetonitrile and *cis*-crotonitrile.

b) Distilled water 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 number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter<sup>®</sup>. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish.

\*: 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 methacrylonitrile (MPN)<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>c</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Non-treatment				200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-	-	-
Solvent <sup>b</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-	100.0	-
MPN	0.17	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-	102.9	-	
MPN	0.34	-	6-(18)	200	0	0	1	4	0	0	5	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	-	-	104.9	-
MPN	0.67	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25	-	-	87.5	12.0, 11.2
MC	0.1 µg/mL	-	6-(18)	200	10	59	184	1	3	0	257	4	122*(61.0)	119*(59.5)	0.00	-	-	-	-
Solvent <sup>b</sup>	0	+	6-(18)	200	2	3	0	1	0	0	6	0	5 (2.5)	4 (2.0)	0.50	-	-	100.0	-
MPN	0.068	+	6-(18)	200	4	10	7	1	0	0	22	0	19*(9.5)	15*(7.5)	3.13*	-	-	80.3	-
MPN	0.14	+	6-(18)	200	3	16	27	1	0	0	47	0	31*(15.5)	30*(15.0)	1.88*	+	-	80.7	-
MPN	0.27	+	6-(18)	200	20	146	126	4	0	320	616	0	129*(64.5)	124*(62.0)	0.14 <sup>i</sup>	-	-	57.5	0.8, 1.6
MPN	0.54 <sup>i</sup>	+	6-(18)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20.0	Tox, Tox	
CPA	5 µg/mL	+	6-(18)	200	9	47	169	4	0	0	229	1	127*(63.5)	124*(62.0)	0.13	-	-	-	-

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 99%. This substance contained impurities as follows: *p*-methoxyphenol as polymerization inhibitor (51 ppm), acetone (19 ppm), acrylonitrile (59 ppm), propionitrile (55 ppm), methacrolein (72 ppm), isobutyronitrile (48 ppm), hydrogen cyanide (35 ppm), and trace amount of acetonitrile and *cis*-crotonitrile. b) Distilled water 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 number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter<sup>®</sup>. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome analysis was not performed because there was no metaphase due to cytotoxicity. j) Seven hundred and thirty-three cells were analysed.

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

# メタクリロニトリルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

## Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of Methacrylonitrile by Oral Administration in Rats

### 要約

プラスチック、エラストマー、単重合体、共重合体、被覆剤等の合成に使用され、酸、アミド、アミン、エステル、ニトリル等の合成時には化学反応中間体として、また特殊な用途としては炭酸飲料容器の製造時にアクリロニトリルの置換剤としても使用されているメタクリロニトリルをオリブ油に溶解し、1群あたり雌雄各12匹のCrl:CD(SD)IGSラットに0, 7.5, 15および30 mg/kgの投与量で雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後を含む計46日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育4日までの期間、反復経口投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および新生児の発生に及ぼす影響について検討し、以下の成績を得た。

#### 1. 反復投与毒性

血液学検査では、30 mg/kg群の雄に赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量の低値が認められた。血液生化学検査では、15および30 mg/kg群の雄にカリウムの低値、30 mg/kg群の雄にクレアチニンの高値、雌に総ビリルビンおよびグルコースの高値が認められた。剖検では、7.5および15 mg/kg群の雌各1例、30 mg/kg群の雄1例および雌2例に腺胃粘膜の暗赤色斑がみられ、病理組織学検査でびらんが確認された。器官重量では、肝臓について30 mg/kg群の雄および各投与群の雌に相対重量、雌に絶対重量の高値が認められた。雌では、脾臓の絶対重量および相対重量の高値が30 mg/kg群で、心臓の絶対重量の高値が各投与群で、また、心臓の相対重量の高値が15および30 mg/kg群で認められた。病理組織学検査では、雌の脾臓に髄外造血が15 mg/kg群で3例、30 mg/kg群で7例に認められた。

以上のことから、雄の15 mg/kg以上の群においてカリウムの低値、雌の7.5 mg/kg以上の群において心臓の絶対重量の高値および腺胃粘膜のびらんがそれぞれ認められた。したがって、本試験条件下におけるメタクリロニトリルの無影響量(NOEL)は雄で7.5 mg/kg/dayであり、雌では7.5 mg/kg/day未満と考えられた。

#### 2. 生殖発生毒性

生殖能検査では、各投与群の雌雄ともに異常は認められず、新生児にも変化は認められなかった。

したがって、本試験条件下におけるメタクリロニトリルの反復投与による親動物の生殖ならびに新生児の発

生に対する無影響量(NOEL)はいずれも30 mg/kg/day以上と考えられた。

### 方法

#### 1. 被験物質および投与液の調製

メタクリロニトリル(純度:99%, Lot No. P-30A, 旭化成工業(株), 東京)は、常温において刺激臭のある無色透明の液体である。入手後の被験物質は遮光気密容器に入れ、4~10℃の冷暗所で保存し、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。溶媒は日本薬局方オリブ油(ヤクハン製薬(株))を用い、これに被験物質を所定の濃度となるように溶解させた。調製液は、冷暗所保存条件下で8日間安定であることから、調製後直ちに遮光気密容器に入れて冷所保存し、室温に戻して使用した。また、これらの調製液について濃度を確認し、設定値の±5%以内であることを確認した。

#### 2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた8週齢のSprague-Dawley系ラット(Crl:CD(SD)IGS)の雌雄を14日間の検疫および馴化を行い、雌については10日間の性周期検査も併せて行った後、雌雄各48匹を選択して10週齢で試験に供した。投与開始日の体重は雄が354~434 g、雌が210~259 gであった。動物は、温度21~24℃、湿度37~62%、換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(8時から20時まで点灯)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1ケージあたり雌雄別に3匹以内を収容し、群分け後は1匹、交配中は雌雄各1匹、妊娠期間中は1母動物を収容した。雌は、妊娠17日から金網床のかわりに実験動物用床敷(ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー(株))を敷いたステンレス製受皿を使用して1腹を収容した。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雌雄のラットに5, 15および30 mg/kgの3用量を1群5匹に1日1回14日間投与し、30 mg/kg群の雄で体重増加量の低値、雌で投与14日に摂餌量の低値が認められ、その他の検査項目には異常は認

められなかった。このことから、本試験の投与量は高用量を死亡あるいは衰弱例がみられず、体重推移に影響が予測される用量として30 mg/kg/dayを設定し、以下、公比2で15および7.5 mg/kg/dayを雌雄ともに設定し、これに日本薬局方オリブ油を投与する対照群を含めた雌雄各4群を設定した。1群の動物数は雌雄とも12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。

各個体の投与量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて算出し、5 mL/kgの容量でラット用胃ゾンデを用いて1日1回強制的に胃内に投与した。投与期間は、雄については交配前14日間および交配期間を含む46日間、雌については交配前14日間および交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は妊娠期間および哺育4日までの期間、交尾不成立例は交配期間終了後23日までの期間とした。

#### 4. 検査項目

##### 1) 一般状態観察

雌雄全例について、試験期間中1日1回の頻度で、視診および触診により行動、外観などを観察した。

##### 2) 体重測定

全例について、投与1, 2, 5, 7, 10および14日の投与前、その後は雄については7日毎(投与終了日を含む)および剖検日に、雌については妊娠0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 17および20日、哺育0, 1および4日の投与前ならびに哺育4日の翌日(剖検日)に、交尾不成立例については投与28, 35, 42および49日の投与前および51日の翌日(剖検日)に、また交配期間中(雄と同居中)は相手雄の測定日と同じ日に測定した。体重増加量および体重増加率を、雄については投与1から46日、雌については投与1から14日、妊娠0から20日および哺育0から4日について算出した。

##### 3) 摂餌量測定

雄については交配期間を除き、雌については妊娠0日および哺育0日を除き体重測定と同じ日に、測定前日の給与量から翌日の残量を減じて個々の動物の1日分の摂餌量を算出した。

##### 4) 尿検査

雄の各群6例について投与期間の最終週(投与43~44日)に、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。

##### 5) 血液学検査

雄の全例について投与46日の翌日の剖検時に、雌の

哺育母動物各群6例について分娩後5日(哺育4日の翌日)に、16~22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)、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)(以上、自動血球計数装置F-820, シスメックス)、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。

##### 6) 血液生化学検査

雄の全例について投与46日の翌日の剖検時に、雌の哺育母動物各群6例について分娩後5日(哺育4日の翌日)に、16~22時間絶食させた後、血液学検査と同時に、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)およびグルコース(ヘキシキナーゼ法)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)、コリンエステラーゼ(ヨウ化ブチリルチオコリン基質法)、総コレステロール、リン脂質(以上、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(アズビルビン法)、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。

##### 7) 剖検および器官重量測定

雄の全例について投与46日の翌日に、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。雌の分娩例は分娩後5日(哺育4日の翌日)に、交尾不成立例は交配期間終了後24日(投与51日の翌日)に、妊娠25日まで分娩が認められない交尾成立例は妊娠26日に剖検した。また、脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺、精巣、精巣上体および卵巣の重量を測定するとともに、絶対重量を剖検当日の体重で除し100を乗じて相対重量を算出した。

8) 病理組織学検査

雌雄の全例について脳(大脳・小脳), 下垂体, 胸腺, 甲状腺(左右), 上皮小体(左右), 副腎(左右), 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(パイエル板を含む), 盲腸, 結腸, 直腸, 喉頭, 気管, 肺(気管支含む), 腎臓(左右), 膀胱, 精巣(左右), 精巣上体(左右), 前立腺, 精囊(凝固腺含む, 左右), 卵巣(左右), 子宮(角部および頸部), 膈, 眼球(左右), ハーダー腺(左右), 乳腺(右腹部, 雌のみ), 皮膚(右腹部), 胸骨(骨髄含む), 大腿骨(骨髄含む, 右), 脊髄(頸部), 骨格筋(右大腿部), 腸間膜リンパ節, 下顎リンパ節(左右), 顎下腺(左右), 舌下腺(左右), 耳下腺(左右), 坐骨神経(右)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, 脾臓のベルリン青染色標本を作製して鏡検した。

9) 生殖能検査

雌全例について, 投与開始日の10日前から交尾までの連日, ギムザ染色による膈垢塗抹標本を作製し, 光学顕微鏡下で性周期段階(発情前期, 発情期前期, 発情期後期, 発情後期および発情休止期)の判定を行い, 性周期の各段階を4日から6日の間隔で2回以上繰り返すものを正常と判定した。発情休止期あるいは発情期が7日以上継続してみられる場合に性周期の異常と判定した。投与14日の雌雄について, 同試験群内で夕方から1対1(無作為組み合わせ)で14日間を限度として同居させた。交尾の成立は雌の膈内の膈栓あるいは膈垢スメア標本中に精子が確認された場合とし, 交尾日を妊娠0日とした。妊娠の成立は雌の子宮に着床痕が確認された場合とし, 交尾率 $[(交尾雌動物数/同居雌動物数) \times 100]$ および受胎率 $[(受胎動物数/交尾雌動物数) \times 100]$ を算出した。

10) 分娩および哺育状態観察

交尾した雌全例について, 妊娠21日から分娩終了日まで, 分娩段階, 哺育状態, 生存児数および死亡児数, 出産児の性別および外表を観察した。朝9時に分娩終了を確認した場合, その日を哺育0日とした。その結果から, 妊娠期間[妊娠0日から哺育0日(分娩終了日)までの日数], 出産率 $[(生児出産雌数/妊娠雌数) \times 100]$ , 分娩率 $[(総出産児数/着床痕数) \times 100]$ , 出生率 $[(出産確認時生存児数/総出産児数) \times 100]$ , 哺育4日時哺育率 $[(哺育4日時に哺育児の認められる雌動物数/正常に分娩した雌動物数) \times 100]$ および性比 $[(雄生児数/雌生児数)]$ を算出した。

11) 新生児の一般状態観察および生存率

全例について, 哺育0日から哺育4日まで1日1回, 生存および死亡を確認し, 一般状態および外表について観察した。なお, 哺育日数は分娩終了日を哺育0日とした。

観察結果から新生児の4日の生存率 $[(哺育4日生存児数/出産確認時生存児数) \times 100]$ を1腹を単位として算出し, 喰殺あるいは不明例となった新生児は死亡例として扱った。

12) 新生児の体重測定

全例について, 哺育0, 1および4日に個体毎に測定し, 体重値は1腹あたりの生児全例の体重の合計ならびに1腹毎の雌雄別平均体重として取扱った。

13) 新生児の剖検

死亡例は直ちに剖検した。その他の例については, 哺育4日に体外表(口腔内を含む)を観察し, 二酸化炭素吸入法により安楽死させ, 全身の器官・組織を肉眼的に観察した。

5. 統計解析

性周期の異常の有無, 交尾率, 受胎率, 出産率および哺育4日時哺育率ならびに病理組織学検査結果のうち1段階の陽性グレードがみられた所見については多試料 $\chi^2$ -検定を行い, その結果, 有意差がみられた場合は2試料 $\chi^2$ -検定で解析した。ただし, これらの検定に不適合の場合はFisherの直接確率検定法を用いた。

尿検査の定性的項目ならびに病理組織学検査結果のうち2段階以上の陽性グレードがみられた所見については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。

その他の項目について, Bartlettの検定法によって等分散性を解析し, 等分散の場合は, 一元配置分散分析法で解析し, 有意差がみられた場合は, Dunnettの検定法により解析した。不等分散の場合は, Kruskal-Wallis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。なお, 新生児の観察および測定において, 出生率, 性比, 新生児生存率および雌雄別体重ならびに雌雄合計体重について, 1腹を標本単位として統計処理を行った。

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. 反復投与毒性

(1) 一般状態

雄では, いずれの群にも異常は認められなかった。

雌では, 15 mg/kg群の1例で妊娠21日以降に, 30 mg/kg群の1例で妊娠17日以降に, 剖検日(分娩後5日)まで皮下腫瘍が認められた以外に異常は認められなかった。この皮下腫瘍は病理組織学検査で乳腺の腺癌と判定されたが, 妊娠を契機に自然発生的にしばしば発現することが知られていること<sup>1-3)</sup>から, 自然発生腫瘍と判断した。

(2) 体重(Fig. 1)

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。

(3) 摂餌量(Fig. 2)

雄では15 mg/kg群で投与14日に低値が認められた。

雌では, 15および30 mg/kg群で妊娠前投与期間の投与2日に, 15 mg/kg群で妊娠5日に, 対照群と比較して

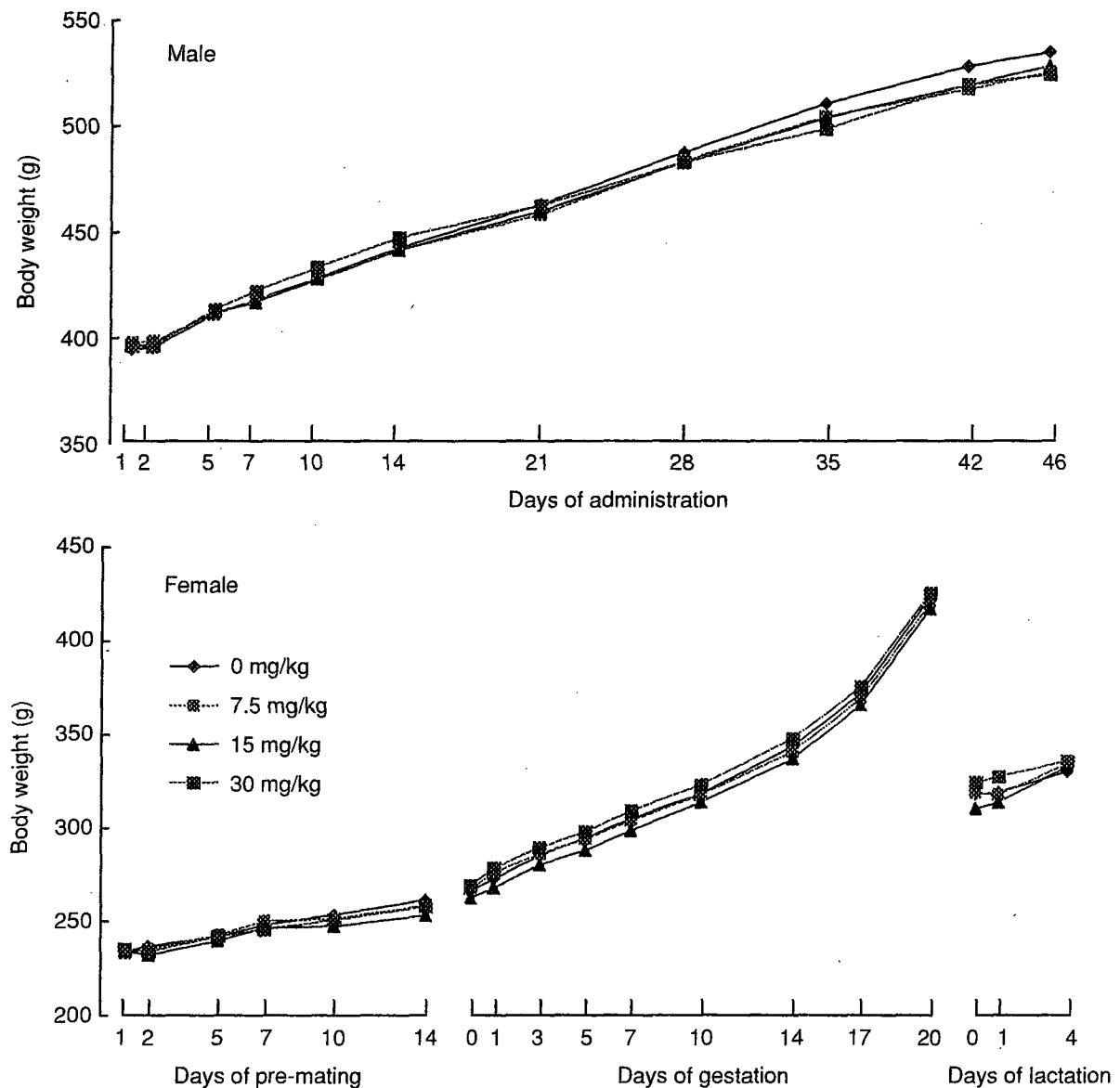


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

低値が認められたが、哺育期間には、各投与群とも有意な差は認められなかった。投与2日には対照群でも前日と比較して摂餌量の低下がみられていること、いずれも一過性的な変化であることから、被験物質による毒性的な変化ではないと考えられた。

#### (4) 尿検査

雄の各投与群とも対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

#### (5) 血液学検査 (Table 1, 2)

雄では30 mg/kg群で赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量に対照群と比較して低値、ならびにプロトロンビン時間に短縮が認められた。プロトロンビン時間の短縮については、軽度な短縮であり、血小板数に変化がみられていないことから、毒性学的意義はないものと考えられた。他に7.5 mg/kg群では分葉核好中球の高値、リンパ球の低値、15 mg/kg群で平均赤血球ヘモグロビン量の低値が認められたが、用量依存的でない

変化であり、被験物質との関連性はないものと考えられた。

雌では30 mg/kg群で平均赤血球ヘモグロビン濃度の低値、7.5および15 mg/kg群で桿状核好中球の低値が認められたが、関連する他の項目に変化がみられないことから、被験物質との関連性はないものと考えられた。

#### (6) 血液生化学検査 (Table 3, 4)

雄では15および30 mg/kg群でアルカリホスファターゼおよびカリウムの低値、30 mg/kg群でクレアチニンの高値が認められた。アルカリホスファターゼの低値については、毒性学的意義がないと考えられた。

雌では30 mg/kg群で総ビリルビンおよびグルコースの高値が認められた。他に7.5 mg/kg群で尿素窒素の高値が認められたが、低用量群のみの変化であり、被験物質との関連性はないものと考えられた。

#### (7) 剖検

雄では、30 mg/kg群の1例に腺胃粘膜の暗赤色斑が認



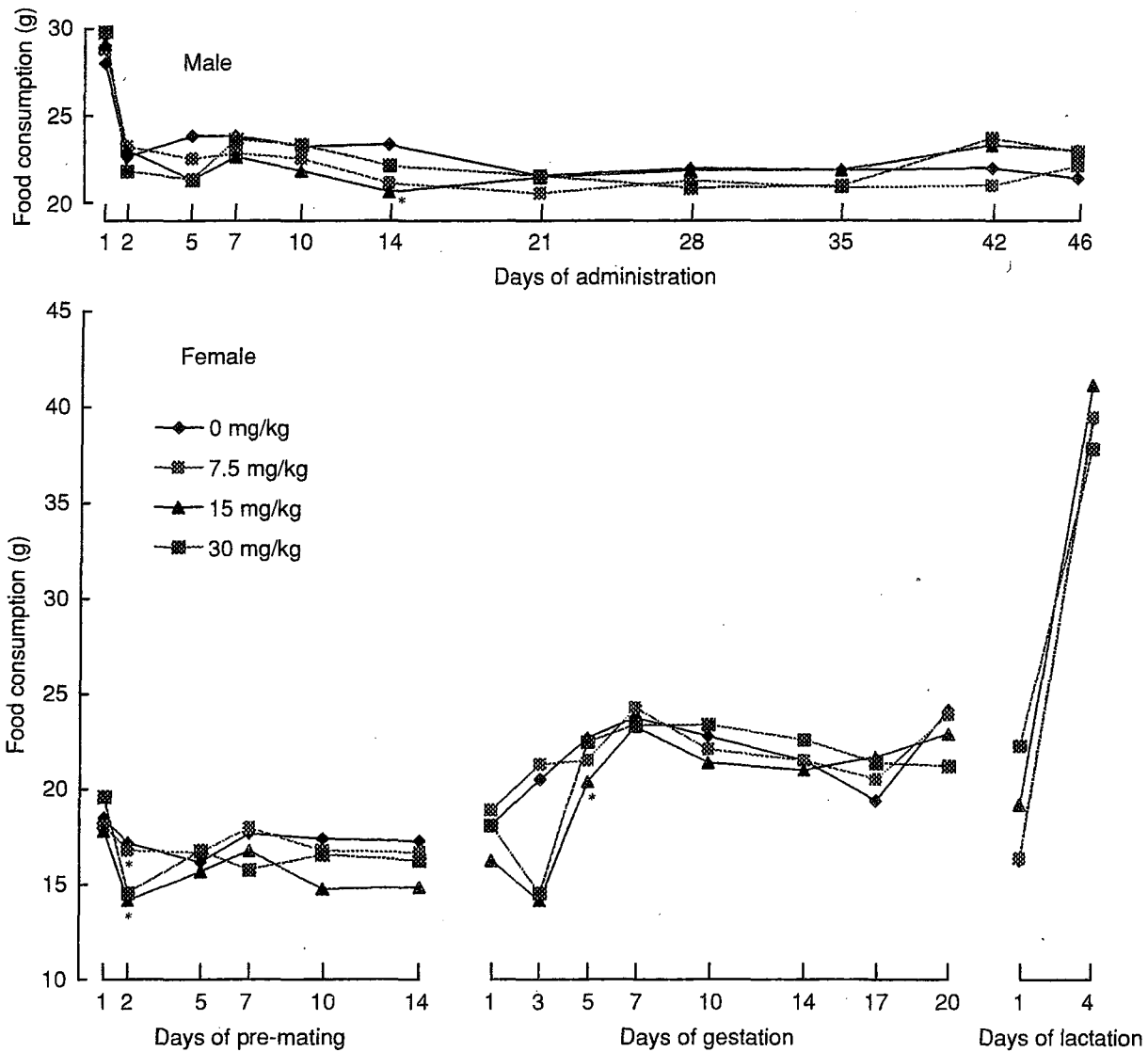


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test  
Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ )

められた。

雌では、7.5および15 mg/kg群の各1例、ならびに30 mg/kg群の2例に腺胃粘膜の暗赤色斑が認められた。

(8) 器官重量 (Table 5, 6)

雄では、30 mg/kg群で対照群と比較して肝臓の相対重量に高値が認められた。

雌では、7.5 mg/kg以上の投与群で心臓の絶対重量、肝臓の相対重量に高値がみられ、15 mg/kg以上の投与群で心臓の相対重量、30 mg/kg群で肝臓の絶対重量に高値が認められた。30 mg/kg群では、脾臓の絶対重量および相対重量にも高値が認められた。

(9) 病理組織学検査 (Table 7)

雌雄とも剖検時に腺胃の暗赤色斑がみられた例には、軽度のびらんが認められた。

雌で、重量増加のみられた脾臓では、軽度の髄外造血が対照群の1例、15 mg/kg群の3例、30 mg/kg群の7例にみられ、有意な発現率増加が認められた。

2. 生殖発生毒性

(1) 生殖能検査 (Table 8)

交尾までの日数、交尾率および受胎率に各投与群とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。交尾不成立が30 mg/kg群で1組にみられたが、雌の性周期検査、雌雄の剖検および病理組織学検査で生殖器に異常は認められなかった。不妊例は対照群および7.5 mg/kg群で各1例、15 mg/kg群で2例に認められた。

性周期検査では交配中に発情休止期の連続が30 mg/kg群で1例にみられたが、この例は交尾および妊娠が成立した。

(2) 分娩および哺育状態観察 (Table 9)

妊娠期間、哺育率、出産率、着床数、出産児数、分娩率、出産確認時生存児数および出生率に、各投与群とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

なお、分娩終了確認時の死亡児が7.5 mg/kg群で雌1例、30 mg/kg群で雄3例および雌7例に認められた。30

mg/kg群の死亡児のうち雄3例および雌6例は1腹の児であったが、この母動物は雌雄各1例の新生児を哺育し、哺育行動に異常はみられなかった。

### (3) 新生児の生存率 (Table 9)

各投与群とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

### (4) 新生児の一般状態

死亡あるいは不明例が対照群で雌1例、7.5 mg/kg群で雌2例、15 mg/kg群で雄3例にみられたが、30 mg/kg群では死亡あるいは不明例はみられず、被験物質による影響はないものと考えられた。

生存例では30 mg/kg群の雌1例に外傷が認められたのみであった。

### (5) 新生児の体重推移 (Table 9)

各投与群とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

### (6) 新生児の剖検

死亡例には異常は認められなかった。

哺育4日剖検例には、7.5 mg/kg群の雄1例に肝臓の黄白色斑が、30 mg/kg群の雌1例に外傷がみられたが、他に異常はみられなかった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

血液学検査では、30 mg/kg群の雄に赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量の低値が認められた。この変化は、メタクリロニトリル投与により赤血球およびヘモグロビンの減少などの溶血性貧血が報告されていること<sup>4)</sup>から、被験物質による影響と考えられた。

血液生化学検査では、雄について15および30 mg/kg群にカリウムの低値、30 mg/kg群にクレアチニンの高値が認められた。被験物質の影響と推察されたが、病理組織学検査で腎臓に異常が認められないことから、その機序については明らかでなかった。雌について30 mg/kg群に総ビリルビンおよびグルコースの高値が認められた。肝臓については、30 mg/kg群の雄に相対重量、雌に絶対重量、また各投与群の雌に相対重量の高値が認められていることから、病理組織学的に肝臓の異常は認められなかったが、この変化は肝臓の機能亢進によるものと推察された。

剖検では、7.5および15 mg/kg群の雌各1例、30 mg/kg群の雄1例および雌2例に腺胃粘膜の暗赤色斑がみられ、病理組織学的にはびらんが確認された。この変化は、メタクリロニトリルに皮膚腐食性があることが報告されていること<sup>5)</sup>、また、メタクリロニトリルの急性経口投与毒性試験<sup>6)</sup>でも腺胃粘膜の暗赤色斑がみられたことから、被験物質による影響と考えられた。

器官重量では雌の30 mg/kg群に前述の肝臓の他、脾臓の絶対重量および相対重量の高値がみられ、病理組織学検査では15 mg/kg群で雌3例、30 mg/kg群で雌7例に髓外造血が認められた。この変化は、メタクリロニ

トリルによる溶血性貧血が報告されていること<sup>4)</sup>から、メタクリロニトリル投与による貧血に対する代償性的変化と考えられた。雌では、各投与群に心臓の絶対重量の高値がみられ、15および30 mg/kg群には相対重量の高値も認められた。心臓に病理組織学検査で異常はみられなかったが、げっ歯類では心肥大が心臓重量増加として認められ、組織学的変化は顕著でないと報告されており<sup>7)</sup>、心肥大の原因の一つに貧血が挙げられている<sup>7)</sup>。一方、メタクリロニトリルの急性経口投与毒性試験<sup>6)</sup>の死亡例では右心房の拡張および肺の明橙色化がみられ、メタクリロニトリルによる溶血との関連が考えられる。したがって、本試験でみられた心臓の絶対重量および相対重量の変化も被験物質による溶血性貧血の影響と推察された。

以上のことから、雄の15 mg/kg以上の投与群においてカリウムの低値、雌の7.5 mg/kg以上の投与群において心臓の相対重量の高値および腺胃粘膜のびらんがそれぞれ認められた。したがって、本試験条件下におけるメタクリロニトリルの無影響量(NOEL)は雄で7.5 mg/kg/dayであり、雌では7.5 mg/kg/day未満と考えられた。

### 2. 生殖発生毒性

生殖能検査では、各投与群とも雌雄の交尾率、雌の性周期および受胎率、また、生殖器(精巣、精巣上体および卵巣)および内分泌器官(副腎)の重量ならびに剖検に変化はみられず、30 mg/kg群の生殖器の病理組織学検査においても異常は認められなかった。

母動物の剖検、妊娠期間、着床数、出産率、分娩率、出産児数、出産確認時生存児数および出生率に、メタクリロニトリル投与による影響は認められなかった。なお、30 mg/kg群の母動物1例で分娩終了確認時に雄3例および雌6例の死亡児みられたが、この母動物の一般状態および剖検で異常はみられず、同例は雌雄各1例の新生児を哺育し、新生児の発育にも異常はみられなかったことから、死亡児と被験物質との関連性については明らかではなかった。

新生児の一般状態、新生児生存率、体重および剖検では、各投与群とも影響は認められなかった。

以上のことから、雌雄の生殖および新生児の発生に各投与群とも被験物質の影響は認められなかった。したがって、本試験条件下におけるメタクリロニトリルの反復投与による親動物の生殖ならびに新生児の発生に対する無影響量(NOEL)はいずれも30 mg/kg/day以上と考えられた。

## 文献

- 1) 村岡義博他, *Exp. Anim.*, **26**, 13(1977).
- 2) 森井外吉他, *Exp. Anim.*, **33**, 47(1984).
- 3) 今井清, 吉村慎介, *J. Toxicol. Pathol.*, **1**, 7(1988).
- 4) T. Samikkannu, V. Vasanthakumari, and S. N. Devaraj, *Toxicol. Letters*, **92**, 15(1997).
- 5) 製品安全データシート(未公開).

- 6) 須永昌男他, 化学物質毒性試験報告, **8**, 635(2001).  
7) 伊東信行編著, “最新 毒性病理学,” 中山書店, 東京, 1994, pp. 179-187.

連絡先

試験責任者: 須永昌男  
試験担当者: 堀川裕尚, 咲間正志, 山本美代子,  
平田真理子, 古川正敏, 吉村浩幸  
(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: Masao Sunaga (Study director)  
Hironao Horikawa, Masashi Sakuma,  
Miyoko Yamamoto, Mariko Hirata,  
Masatoshi Furukawa,  
Hiroyuki Yoshimura  
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 methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	12	12	12	12
RBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	904.7 $\pm$ 39.7	915.3 $\pm$ 29.8	910.5 $\pm$ 26.9	856.7 $\pm$ 38.6**
Hematocrit (%)	48.68 $\pm$ 2.65	48.39 $\pm$ 2.42	48.01 $\pm$ 2.01	46.23 $\pm$ 1.61*
Hemoglobin (g/dL)	16.38 $\pm$ 0.63	16.22 $\pm$ 0.72	15.88 $\pm$ 0.52	15.52 $\pm$ 0.62**
MCV (fL)	53.81 $\pm$ 1.65	52.87 $\pm$ 1.81	52.73 $\pm$ 1.40	53.99 $\pm$ 1.48
MCH (pg)	18.11 $\pm$ 0.55	17.71 $\pm$ 0.48	17.43 $\pm$ 0.39**	18.12 $\pm$ 0.56
MCHC (g/dL)	33.68 $\pm$ 1.03	33.54 $\pm$ 0.86	33.07 $\pm$ 0.77	33.57 $\pm$ 0.52
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	107.1 $\pm$ 27.9	113.8 $\pm$ 24.1	117.3 $\pm$ 28.0	114.0 $\pm$ 23.4
Platelet ( $10^4/\mu\text{L}$ )	113.95 $\pm$ 11.09	116.83 $\pm$ 8.70	109.61 $\pm$ 13.75	107.32 $\pm$ 14.73
Reticulocyte (%)	21.3 $\pm$ 3.8	19.8 $\pm$ 3.5	18.8 $\pm$ 4.0	23.3 $\pm$ 4.6
PT (sec)	15.75 $\pm$ 1.62	15.28 $\pm$ 1.47	15.33 $\pm$ 1.70	14.13 $\pm$ 0.61**
APTT (sec)	26.21 $\pm$ 2.24	25.65 $\pm$ 2.60	26.01 $\pm$ 2.45	24.66 $\pm$ 2.55
Differential leukocyte counts (%)				
Neutrophils				
Stab form	1.5 $\pm$ 1.6	1.9 $\pm$ 1.3	1.6 $\pm$ 1.8	2.3 $\pm$ 1.2
Segmented	7.8 $\pm$ 2.9	11.9 $\pm$ 5.2*	9.1 $\pm$ 3.9	10.3 $\pm$ 3.2
Eosinophils	1.6 $\pm$ 1.2	1.1 $\pm$ 1.2	1.1 $\pm$ 1.7	0.8 $\pm$ 0.7
Basophils	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocytes	0.4 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 1.0	0.8 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.9
Lymphocytes	88.8 $\pm$ 3.9	84.1 $\pm$ 4.4*	87.4 $\pm$ 6.1	85.7 $\pm$ 3.0

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

Table 2 Hematological findings of female rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	6	6	6	6
RBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	682.8 $\pm$ 51.9	688.0 $\pm$ 28.7	651.8 $\pm$ 31.0	678.2 $\pm$ 32.1
Hematocrit (%)	41.05 $\pm$ 1.52	41.28 $\pm$ 2.34	40.62 $\pm$ 2.73	42.53 $\pm$ 1.53
Hemoglobin (g/dL)	13.57 $\pm$ 0.67	13.55 $\pm$ 0.43	13.27 $\pm$ 0.80	13.50 $\pm$ 0.56
MCV (fL)	60.28 $\pm$ 3.02	60.02 $\pm$ 2.73	62.27 $\pm$ 2.10	62.77 $\pm$ 1.65
MCH (pg)	19.92 $\pm$ 0.82	19.72 $\pm$ 0.80	20.37 $\pm$ 0.73	19.90 $\pm$ 0.46
MCHC (g/dL)	33.05 $\pm$ 0.73	32.87 $\pm$ 1.23	32.70 $\pm$ 0.64	31.77 $\pm$ 0.57*
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	122.7 $\pm$ 25.3	139.7 $\pm$ 26.8	128.2 $\pm$ 15.9	123.2 $\pm$ 31.4
Platelet ( $10^4/\mu\text{L}$ )	114.18 $\pm$ 9.81	113.38 $\pm$ 16.29	122.58 $\pm$ 16.71	123.28 $\pm$ 9.72
Reticulocyte (%)	57.5 $\pm$ 21.5	44.3 $\pm$ 17.5	71.3 $\pm$ 17.6	68.7 $\pm$ 20.6
PT (sec)	13.85 $\pm$ 0.27	13.90 $\pm$ 0.27	14.13 $\pm$ 0.43	14.07 $\pm$ 0.18
APTT (sec)	19.38 $\pm$ 1.10	18.38 $\pm$ 1.25	19.42 $\pm$ 1.15	19.13 $\pm$ 0.94
Differential leukocyte counts (%)				
Neutrophils				
Stab form	4.0 $\pm$ 2.4	1.3 $\pm$ 1.2*	0.7 $\pm$ 0.8**	2.3 $\pm$ 1.5
Segmented	26.5 $\pm$ 9.9	22.8 $\pm$ 7.3	25.0 $\pm$ 8.7	23.7 $\pm$ 7.9
Eosinophils	0.7 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 1.3	0.0 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 1.2
Basophils	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocytes	1.2 $\pm$ 1.5	0.7 $\pm$ 0.8	0.2 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.6
Lymphocytes	67.7 $\pm$ 11.4	74.2 $\pm$ 8.0	74.2 $\pm$ 8.3	72.5 $\pm$ 7.5

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 methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	12	12	12	12
Total protein (g/dL)	5.88 ± 0.24	6.00 ± 0.24	6.03 ± 0.18	5.93 ± 0.34
A/G	1.092 ± 0.089	1.063 ± 0.067	1.107 ± 0.100	1.076 ± 0.097
Protein fraction (%)				
Albumin	52.23 ± 2.03	51.63 ± 1.56	52.53 ± 2.23	51.87 ± 2.20
α <sub>1</sub> -globulin	21.89 ± 2.41	22.96 ± 1.36	22.23 ± 2.45	22.14 ± 2.28
α <sub>2</sub> -globulin	9.17 ± 0.62	8.99 ± 0.64	8.74 ± 0.52	9.35 ± 0.89
β-globulin	13.93 ± 0.82	13.85 ± 0.99	14.03 ± 0.68	13.98 ± 1.24
γ-globulin	2.78 ± 0.87	2.58 ± 0.87	2.47 ± 0.54	2.66 ± 0.56
GOT (IU/L)	59.3 ± 6.0	72.5 ± 19.6	62.0 ± 14.7	73.8 ± 35.5
GPT (IU/L)	24.3 ± 5.8	34.0 ± 17.3	25.6 ± 5.5	30.3 ± 15.7
ALP (IU/L)	273.9 ± 59.8	235.2 ± 41.0	217.6 ± 63.4*	198.8 ± 41.8**
ChE (IU/L)	61.8 ± 28.6	69.7 ± 28.3	60.3 ± 15.7	55.2 ± 14.0
γ-GTP (IU/L)	0.37 ± 0.13	0.48 ± 0.24	0.40 ± 0.14	0.43 ± 0.17
Total bilirubin (mg/dL)	0.059 ± 0.010	0.068 ± 0.022	0.062 ± 0.006	0.070 ± 0.015
Glucose (mg/dL)	172.6 ± 19.2	176.6 ± 48.2	182.3 ± 18.6	184.3 ± 32.5
Total cholesterol (mg/dL)	60.4 ± 13.8	62.5 ± 12.9	60.8 ± 8.5	59.6 ± 9.3
Triglyceride (mg/dL)	51.1 ± 20.1	43.8 ± 24.8	66.6 ± 37.1	61.8 ± 38.1
Phospholipids (mg/dL)	101.9 ± 19.3	104.9 ± 17.1	109.4 ± 14.2	106.3 ± 19.8
Urea nitrogen (mg/dL)	15.38 ± 1.40	14.90 ± 1.30	15.27 ± 1.56	14.67 ± 2.42
Creatinine (mg/dL)	0.458 ± 0.033	0.475 ± 0.068	0.492 ± 0.042	0.513 ± 0.084**
Sodium (mEq/L)	141.42 ± 0.87	141.67 ± 1.30	141.29 ± 1.37	141.04 ± 1.03
Potassium (mEq/L)	4.861 ± 0.253	4.709 ± 0.212	4.522 ± 0.178**	4.613 ± 0.208*
Chlorine (mEq/L)	105.6 ± 1.6	105.9 ± 1.2	105.8 ± 1.3	105.4 ± 1.2
Calcium (mg/dL)	9.65 ± 0.33	9.54 ± 0.33	9.58 ± 0.15	9.56 ± 0.26
Inorganic phosphorous (mg/dL)	7.13 ± 0.43	6.93 ± 0.46	6.73 ± 0.44	7.07 ± 0.55

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 methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	6	6	6	6
Total protein (g/dL)	5.60 ± 0.44	5.53 ± 0.21	5.55 ± 0.15	5.48 ± 0.26
A/G	1.180 ± 0.114	1.152 ± 0.059	1.120 ± 0.038	1.175 ± 0.046
Protein fraction (%)				
Albumin	54.17 ± 2.46	53.57 ± 1.29	52.92 ± 0.84	54.07 ± 0.97
α <sub>1</sub> -globulin	21.13 ± 1.85	20.08 ± 1.54	21.65 ± 1.78	21.37 ± 2.87
α <sub>2</sub> -globulin	8.45 ± 1.33	10.00 ± 1.55	9.62 ± 0.88	8.87 ± 1.80
β-globulin	13.83 ± 1.15	14.17 ± 0.73	14.02 ± 1.11	13.52 ± 1.36
γ-globulin	2.42 ± 0.89	2.18 ± 0.66	1.80 ± 0.46	2.18 ± 0.67
GOT (IU/L)	80.2 ± 19.0	87.5 ± 15.2	83.8 ± 15.0	73.2 ± 11.7
GPT (IU/L)	38.5 ± 9.8	33.3 ± 4.7	38.5 ± 7.6	28.0 ± 7.2
ALP (IU/L)	127.5 ± 64.4	147.2 ± 30.1	117.2 ± 21.3	151.8 ± 57.4
ChE (IU/L)	246.0 ± 36.7	211.8 ± 40.4	226.2 ± 45.6	213.2 ± 53.4
γ-GTP (IU/L)	0.77 ± 0.33	0.83 ± 0.36	0.55 ± 0.19	0.75 ± 0.18
Total bilirubin (mg/dL)	0.058 ± 0.012	0.055 ± 0.015	0.078 ± 0.019	0.080 ± 0.011*
Glucose (mg/dL)	126.7 ± 8.2	128.3 ± 14.4	134.0 ± 16.4	148.0 ± 13.9*
Total cholesterol (mg/dL)	58.2 ± 3.5	57.5 ± 12.6	66.7 ± 9.3	54.0 ± 9.0
Triglyceride (mg/dL)	33.8 ± 8.2	41.7 ± 40.1	46.5 ± 19.6	62.3 ± 43.1
Phospholipids (mg/dL)	113.8 ± 6.7	111.3 ± 21.5	128.3 ± 13.0	108.8 ± 15.1
Urea nitrogen (mg/dL)	16.03 ± 1.34	19.62 ± 0.96**	16.83 ± 2.77	17.47 ± 3.58
Creatinine (mg/dL)	0.532 ± 0.034	0.560 ± 0.040	0.568 ± 0.041	0.557 ± 0.061
Sodium (mEq/L)	140.92 ± 1.24	141.25 ± 1.64	140.67 ± 1.03	140.42 ± 1.39
Potassium (mEq/L)	4.670 ± 0.280	4.657 ± 0.309	4.710 ± 0.374	4.790 ± 0.152
Chlorine (mEq/L)	109.0 ± 1.1	108.7 ± 1.8	108.3 ± 1.0	108.5 ± 1.4
Calcium (mg/dL)	9.85 ± 0.50	9.78 ± 0.25	9.65 ± 0.39	9.70 ± 0.40
Inorganic phosphorous (mg/dL)	8.53 ± 1.25	8.90 ± 0.92	8.02 ± 0.41	8.30 ± 0.39

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 methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	12	12	12	12
Body weight (g)	511.8 ± 50.2	501.9 ± 51.9	502.4 ± 46.0	500.2 ± 58.0
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.200 ± 0.066	2.240 ± 0.070	2.193 ± 0.078	2.235 ± 0.081
Heart (g)	1.504 ± 0.173	1.464 ± 0.196	1.433 ± 0.115	1.403 ± 0.119
Liver (g)	13.891 ± 2.222	13.664 ± 1.896	14.575 ± 2.256	15.398 ± 2.655
Kidneys (g)	3.329 ± 0.358	3.216 ± 0.313	3.084 ± 0.446	3.168 ± 0.280
Spleen (g)	0.748 ± 0.104	0.715 ± 0.082	0.703 ± 0.123	0.790 ± 0.128
Adrenals (mg)	57.8 ± 6.2	60.3 ± 10.0	60.3 ± 8.6	62.4 ± 7.4
Thymus (mg)	299.8 ± 52.6	276.1 ± 65.4	271.7 ± 53.2	282.2 ± 100.2
Testes (g)	3.234 ± 0.550	3.280 ± 0.236	3.191 ± 0.308	3.442 ± 0.245
Epididymides (g)	1.233 ± 0.205	1.243 ± 0.061	1.271 ± 0.120	1.301 ± 0.098
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.432 ± 0.043	0.450 ± 0.046	0.437 ± 0.033	0.452 ± 0.042
Heart (g%)	0.293 ± 0.021	0.292 ± 0.019	0.286 ± 0.018	0.283 ± 0.018
Liver (g%)	2.698 ± 0.199	2.717 ± 0.181	2.889 ± 0.244	3.063 ± 0.230**
Kidneys (g%)	0.651 ± 0.049	0.643 ± 0.053	0.612 ± 0.041	0.635 ± 0.038
Spleen (g%)	0.147 ± 0.019	0.142 ± 0.016	0.139 ± 0.020	0.158 ± 0.019
Adrenals (mg%)	11.320 ± 0.859	12.008 ± 1.597	11.998 ± 1.305	12.512 ± 1.032
Thymus (mg%)	59.102 ± 12.036	54.784 ± 10.731	54.043 ± 9.930	56.000 ± 16.133
Testes (g%)	0.639 ± 0.131	0.658 ± 0.063	0.638 ± 0.083	0.696 ± 0.079
Epididymides (g%)	0.245 ± 0.054	0.250 ± 0.030	0.254 ± 0.027	0.262 ± 0.027

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

Table 6 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	11	11	10	11
Body weight (g)	309.1 ± 19.9	311.5 ± 21.5	306.9 ± 18.2	308.7 ± 21.6
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.051 ± 0.107	2.029 ± 0.053	2.051 ± 0.062	2.013 ± 0.066
Heart (g)	0.922 ± 0.042	1.005 ± 0.132*	0.980 ± 0.051*	1.024 ± 0.135*
Liver (g)	9.694 ± 0.746	10.659 ± 1.004	10.478 ± 0.929	10.724 ± 1.210*
Kidneys (g)	1.968 ± 0.134	2.022 ± 0.154	2.010 ± 0.145	2.015 ± 0.178
Spleen (g)	0.613 ± 0.098	0.625 ± 0.110	0.673 ± 0.103	0.838 ± 0.119**
Adrenals (mg)	71.8 ± 8.3	80.5 ± 11.7	71.3 ± 7.0	79.0 ± 10.8
Thymus (mg)	219.6 ± 71.3	223.1 ± 77.3	196.8 ± 60.7	200.3 ± 54.6
Ovaries (mg)	106.3 ± 7.3	106.0 ± 7.2	106.8 ± 12.7	109.5 ± 10.1
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.666 ± 0.053	0.653 ± 0.041	0.671 ± 0.034	0.655 ± 0.053
Heart (g%)	0.298 ± 0.017	0.324 ± 0.040	0.319 ± 0.018*	0.330 ± 0.036*
Liver (g%)	3.140 ± 0.213	3.420 ± 0.166**	3.413 ± 0.215**	3.465 ± 0.206**
Kidneys (g%)	0.637 ± 0.043	0.652 ± 0.053	0.655 ± 0.043	0.655 ± 0.042
Spleen (g%)	0.196 ± 0.024	0.200 ± 0.024	0.220 ± 0.038	0.274 ± 0.038**
Adrenals (mg%)	23.252 ± 2.416	25.780 ± 2.796	23.226 ± 1.744	25.562 ± 2.662
Thymus (mg%)	70.383 ± 19.754	71.106 ± 22.416	64.247 ± 20.346	65.323 ± 18.878
Ovaries (mg%)	34.480 ± 2.896	34.155 ± 2.995	34.797 ± 3.513	35.598 ± 3.475

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

Table 7 Histopathological findings of rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item		0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
<Male>					
Number of animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings	Grade				
Glandular stomach: Erosion	+	0	0	0	1
<Female>					
Number of animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings	Grade				
Glandular stomach: Erosion	+	0	1	1	2
Spleen: Hematopoiesis, extramedullary	+	1	0	3	7*

Values are number of animals with findings.  
Grade of histopathological finding; +: slight.  
Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ )

Table 8 Influence of methacrylonitrile on reproductive performance of rats treated orally in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals examined	12	12	12	12
Number of pairs mated	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation	12	12	12	11
Duration of mating (day, Mean $\pm$ S.D.)	2.3 $\pm$ 0.8	2.9 $\pm$ 0.9	2.9 $\pm$ 1.1	3.5 $\pm$ 3.6
Copulation Index <sup>a</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	91.7
Number of pregnant animals	11	11	10	11
Fertility index <sup>b</sup> (%)	91.7	91.7	83.3	100.0

a) (Number of pairs with successful copulation/number of pairs mated) $\times$ 100.

b) (Number of pregnant animals/number of pairs with successful copulation) $\times$ 100.



Table 9 Influence of methacrylonitrile on developmental performance of rats treated orally in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of pregnant animals	11	11	10	11
Number of implantation sites	15.2 ± 1.7	15.7 ± 1.3	15.8 ± 1.1	16.0 ± 2.0
Number of pups born	14.5 ± 1.7	14.4 ± 2.2	15.0 ± 1.6	14.5 ± 2.3
Delivery index <sup>a</sup> (%)	96.0 ± 7.2	91.5 ± 12.8	94.9 ± 6.5	91.2 ± 10.6
Number of live pups	14.5 ± 1.7	14.3 ± 2.1	15.0 ± 1.6	13.6 ± 4.3
Live birth index <sup>b</sup> (%)	100.0 ± 0.0	99.5 ± 1.8	100.0 ± 0.0	92.0 ± 24.6
Sex ratio (Male/Female)	1.21 ± 0.62	0.83 ± 0.30	1.09 ± 0.44	1.00 ± 0.61
Number of dead pups	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.9 ± 2.7
Gestation length (day)	22.5 ± 0.5	22.6 ± 0.5	22.8 ± 0.4	22.6 ± 0.5
Gestation index <sup>c</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Nursing index <sup>d</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of live pups on day 0	14.5 ± 1.7	14.3 ± 2.1	15.0 ± 1.6	13.6 ± 4.3
Number of live pups on day 4	14.5 ± 1.6	14.1 ± 2.0	14.7 ± 1.5	13.6 ± 4.3
Viability index <sup>e</sup> (%)	99.5 ± 1.8	98.9 ± 2.5	98.1 ± 3.1	100.0 ± 0.0
Body weight of pups (g)				
Litter Day 0	98.14 ± 9.61	96.65 ± 11.61	99.51 ± 8.17	91.38 ± 27.56
1	107.27 ± 11.26	104.83 ± 12.08	109.18 ± 8.54	100.35 ± 30.07
4	151.44 ± 13.34	150.61 ± 15.98	154.09 ± 13.99	143.23 ± 42.32
Male Day 0	6.99 ± 0.68	7.00 ± 0.53	6.90 ± 0.63	6.91 ± 0.55
1	7.64 ± 0.85	7.66 ± 0.82	7.55 ± 0.76	7.58 ± 0.79
4	10.80 ± 1.25	11.09 ± 1.46	10.99 ± 1.24	11.05 ± 1.31
Female Day 0	6.60 ± 0.63	6.68 ± 0.57	6.50 ± 0.53	6.60 ± 0.53
1	7.23 ± 0.74	7.32 ± 0.78	7.14 ± 0.73	7.27 ± 0.68
4	10.34 ± 1.12	10.61 ± 1.31	10.22 ± 1.25	10.40 ± 1.17

Values are expressed as Mean ± S.D.

a) (Number of pups born/number of implantation sites) × 100.

b) (Number of live pups born/number of pups born) × 100.

c) (Number of females with live pups delivery/number of pregnant females) × 100.

d) (Number of females nursing live pups/number of females with normal delivery) × 100.

e) (Number of live pups on day 4/number of live pups born) × 100.

# N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウムの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of N-(Carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in Bacteria

### 要約

N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウムについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101 を用いる復帰変異試験を実施した。

予備試験の結果をもとに本試験では、S9 mix 非共存下の TA100, TA1535 は 78.1 ~ 2.44  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の6用量, WP2 *uvrA*/pKM101 は 156 ~ 2.44  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の7用量, TA98, TA1537 は 39.1 ~ 0.610  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の7用量を、S9 mix 共存下の TA100, TA1535 は 313 ~ 9.77  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の6用量, WP2 *uvrA*/pKM101 は 2500 ~ 39.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の7用量, TA98, TA1537 は 625 ~ 9.77  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の7用量をそれぞれ設定した。

2回の本試験の結果、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウムは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

### 方法

#### 1. テスト菌株

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1)</sup> および日本バイオアッセイ研究センターより 1997 年 9 月 18 日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101<sup>2)</sup> の 5 菌株を用いた。テスト菌株は菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO: 関東化学)を加え、0.2 mL ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結した後、超低温槽で -80°C 以下に凍結保存したものを使用した。これら菌株はアミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異、薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ、特性を備えていることを確認した。

#### 2. テスト菌株の前培養

L 字型試験管に 2.5 % ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No.2, Oxoid 社)溶液を 10 mL 分注し、これに凍結保存した菌懸濁液を解冻して 20  $\mu\text{L}$  を接種した。37°C で 8 時間振盪培養した後、濁度計を用いて菌濃度を測定し、生菌数が  $1 \times 10^9/\text{mL}$  以上であることを確認した。

#### 3. 被験物質

N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウム(ロット番号: 3047, 花王(東京)提供)は、純度 27.1 % の微黄色透明液体である。被験物質は使用時まで室温、遮光に密閉容器で保存した。実験終了後、残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 4. 被験物質溶液の調製

注射用水(DW: 大塚製薬工場)を用いて最高用量の溶液を調製した後、同溶媒で所定用量に段階希釈し、速やかに試験に使用した。被験物質の秤量に際しては純度換算(27.1 %)を実施した。

#### 5. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを用いた。陽性対照物質溶液は、あらかじめ所定の濃度に調製し、-80°C 以下に凍結保存したものを使用した。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)

アクリルアミド (和光純薬工業)

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム (和光純薬工業)

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩

(Sigma-Aldrich Fine Chemicals)

2-AA: 2-アミノアントラセン (和光純薬工業)

NaN<sub>3</sub> は DW に、その他は DMSO に溶解したものを使用した。

#### 6. 培地および S9 mix の組成

##### 1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いて 0.5 mmol/L D-ビオチン、0.5 mmol/L L-ヒスチジン混合水溶液(サルモネラ用)または 0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液(大腸菌用)を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水 100 mL に対して、粉末寒天(Bacto-agar, Difco 社) 0.6 g、塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し、約 45°C に保温した。

##### 2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地(オリエンタル酵母工業)を購入し、使用した。なお、培地 1 L あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸二カリウム・無水塩	10 g

リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
寒天(伊那寒天BA-30 A)	15 g

結果及び考察

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めてある。

3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

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

\*: 購入したS9(キッコーマン)を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボン併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 $\times$ g遠心血清分画である。

7. 試験方法

試験はプレインキュベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を0.1 mL、0.1 mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)を0.5 mLおよび菌懸濁液を0.1 mL加え、37°Cで20分間振盪培養した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 mL添加した。プレインキュベーション後、トッパアガー2 mLを上記の混合液に加え混和し、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトッパアガーが凝固した後、37°Cで48時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各用量につき1枚のプレートを使用した。本試験は各用量につき3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

8. 試験結果の判定基準

いずれかの試験菌株で、S9 mixの有無にかかわらず、被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数(平均値)が陰性(溶媒)対照値の2倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は変異原性を有する(陽性)と判定した。なお、試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

1. 予備試験

予備試験を *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101 を用いて5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22  $\mu$ g/plateの7用量で実施した結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix非共存下ではTA100, TA1535, WP2 *uvrA*/pKM101の78.1  $\mu$ g/plate以上、TA98, TA1537の19.5  $\mu$ g/plate以上で、共存下ではTA100, TA1535, TA98, TA1537の313  $\mu$ g/plate以上、WP2 *uvrA*/pKM101の1250  $\mu$ g/plate以上で抗菌性が認められた。なお、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。従って本試験では、S9 mix非共存下のTA100, TA1535は78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44  $\mu$ g/plateの6用量、WP2 *uvrA*/pKM101は156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44  $\mu$ g/plateの7用量、TA98, TA1537は39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610  $\mu$ g/plateの7用量を、共存下のTA100, TA1535は313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77  $\mu$ g/plateの6用量、WP2 *uvrA*/pKM101は2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1  $\mu$ g/plateの7用量、TA98, TA1537は625, 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77  $\mu$ g/plateの7用量をそれぞれ設定した。

2. 本試験

試験の結果をTable 1, 2に示した。本試験を2回実施した結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix非共存下ではTA100, TA1535の39.1  $\mu$ g/plate以上、WP2 *uvrA*/pKM101の78.1  $\mu$ g/plate以上、TA98, TA1537の19.5  $\mu$ g/plate以上で、共存下ではTA100, TA1535の313  $\mu$ g/plate、WP2 *uvrA*/pKM101の1250  $\mu$ g/plate以上、TA98, TA1537の313  $\mu$ g/plate以上で抗菌性が認められた。なお、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの被験物質処理群においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。

なお、S9 mix非共存下および共存下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数は、各菌株の陰性対照の復帰変異コロニー数と比較して、明らかに2倍を超えて増加し、陽性の結果を示した。

以上の結果から、N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウムは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

なお、N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウムは当試験施設で並行して実施したほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験では陰性の結果が報告されている<sup>3)</sup>。また、類似化合物であるL-Arginine L-gultamate<sup>4)</sup>は、細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が報告されている。

文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*, **113**: 173-215 (1983).
- 2) Green MHL, Muriel WJ: Mutagen testing using Trp<sup>+</sup> reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Res*, **38**: 3-32 (1976).
- 3) 成見香瑞範ら: *N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウム のチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験. 化学物質毒性試験報告, **13**: 109-112 (2006).
- 4) 石館基(監修): 「微生物を用いる変異原性試験データ集」エル・アイ・シー, 東京(1991)p. 41.

連絡先

試験責任者: 榎本佳明  
試験担当者: 榎本佳明, 清水優子, 網代真希子  
(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
〒314-0255 茨城県神栖市砂山14  
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Yoshiaki Enomoto (Study director)  
Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu,  
Makiko Ajiro  
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
Kashima Laboratory  
14 Sunayama, Kamisu-shi, Ibaraki, 314-0255  
Japan  
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Mutagenicity of N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean ± S.D.)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pkM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0 <sup>a)</sup>	123 99 ( ± 112) 113 ( ± 12)	13 9 ( ± 11) 10 ( ± 2)	84 95 ( ± 89) 87 ( ± 6)	19 18 ( ± 20) 23 ( ± 3)	10 8 ( ± 9) 10 ( ± 1)
	0.610	NT <sup>b)</sup>	NT	NT	18 21 ( ± 19) 19 ( ± 2)	11 11 ( ± 11) 12 ( ± 1)
	1.22	NT	NT	NT	17 17 ( ± 18) 20 ( ± 2)	11 8 ( ± 10) 10 ( ± 2)
	2.44	135 114 ( ± 117) 101 ( ± 17)	11 14 ( ± 13) 14 ( ± 2)	91 94 ( ± 89) 82 ( ± 6)	17 18 ( ± 17) 17 ( ± 1)	9 11 ( ± 11) 13 ( ± 2)
	4.88	100 99 ( ± 101) 104 ( ± 3)	10 10 ( ± 10) 11 ( ± 1)	72 71 ( ± 79) 95 ( ± 14)	18 18 ( ± 18) 18 ( ± 0)	13 10 ( ± 12) 12 ( ± 2)
	9.77	98 117 ( ± 110) 114 ( ± 10)	10 11 ( ± 10) 9 ( ± 1)	97 86 ( ± 91) 90 ( ± 6)	17 22 ( ± 18) 16 ( ± 3)	9 10 ( ± 10) 10 ( ± 1)
	19.5	101 99 ( ± 103) 108 ( ± 5)	13 10 ( ± 10) 8 ( ± 3)	83 75 ( ± 78) 75 ( ± 5)	14* 14* ( ± 14) 13* ( ± 1)	9* 12* ( ± 10) 8* ( ± 2)
	39.1	85* 69* ( ± 75) 70* ( ± 9)	6* 7* ( ± 9) 14* ( ± 4)	71 92 ( ± 84) 88 ( ± 11)	9* 8* ( ± 9) 11* ( ± 2)	0* 0* ( ± 0) 0* ( ± 0)
	78.1	0* 0* ( ± 0) 0* ( ± 0)	0* 0* ( ± 0) 0* ( ± 0)	61* 68* ( ± 68) 76* ( ± 8)	NT	NT
	156	NT	NT	71* 58* ( ± 68) 75* ( ± 9)	NT	NT
S9 mix (+)	0	126 108 ( ± 115) 111 ( ± 10)	15 13 ( ± 14) 13 ( ± 1)	104 94 ( ± 97) 93 ( ± 6)	21 21 ( ± 23) 26 ( ± 3)	23 16 ( ± 18) 16 ( ± 4)
	9.77	118 119 ( ± 119) 120 ( ± 1)	9 11 ( ± 11) 14 ( ± 3)	NT	24 22 ( ± 24) 26 ( ± 2)	17 24 ( ± 19) 17 ( ± 4)
	19.5	100 104 ( ± 105) 111 ( ± 6)	11 14 ( ± 12) 11 ( ± 2)	NT	24 22 ( ± 23) 24 ( ± 1)	24 18 ( ± 20) 19 ( ± 3)
	39.1	121 129 ( ± 120) 111 ( ± 9)	10 14 ( ± 13) 14 ( ± 2)	101 101 ( ± 102) 104 ( ± 2)	23 24 ( ± 22) 20 ( ± 2)	17 19 ( ± 18) 19 ( ± 1)
	78.1	119 105 ( ± 115) 121 ( ± 9)	10 16 ( ± 12) 11 ( ± 3)	98 99 ( ± 100) 102 ( ± 2)	21 25 ( ± 23) 23 ( ± 2)	18 24 ( ± 20) 17 ( ± 4)
	156	116 121 ( ± 113) 101 ( ± 10)	10 14 ( ± 13) 14 ( ± 2)	104 92 ( ± 99) 102 ( ± 6)	25 26 ( ± 26) 26 ( ± 1)	22 16 ( ± 19) 19 ( ± 3)
	313	63* 68* ( ± 61) 51* ( ± 9)	7* 6* ( ± 7) 9* ( ± 2)	100 101 ( ± 98) 92 ( ± 5)	21* 23* ( ± 21) 20* ( ± 2)	11* 15* ( ± 13) 13* ( ± 2)
	625	NT	NT	96 105 ( ± 98) 94 ( ± 6)	0* 0* ( ± 0) 0* ( ± 0)	0* 0* ( ± 0) 0* ( ± 0)
	1250	NT	NT	81* 86* ( ± 79) 70* ( ± 8)	NT	NT
	2500	NT	NT	50* 40* ( ± 48) 55* ( ± 8)	NT	NT
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2 <sup>c)</sup>	NaN <sub>3</sub> <sup>d)</sup>	AF-2	AF-2	9-AA <sup>e)</sup>
	Dosage (μg/plate)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	Number of colonies / plate	601 587 ( ± 596) 599 ( ± 8)	481 460 ( ± 471) 472 ( ± 11)	1167 1039 ( ± 1021) 858 ( ± 155)	665 700 ( ± 685) 689 ( ± 18)	139 171 ( ± 143) 120 ( ± 26)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA <sup>f)</sup>	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Dosage (μg/plate)	1	2	2	0.5	2
	Number of colonies / plate	1286 1147 ( ± 1192) 1143 ( ± 81)	207 211 ( ± 220) 241 ( ± 19)	944 941 ( ± 949) 961 ( ± 11)	344 359 ( ± 366) 395 ( ± 26)	216 209 ( ± 209) 202 ( ± 7)

a) Water for injection, b) NT: Not tested, c) AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, d) NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

e) 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride, f) 2-AA: 2-Aminoanthracene

\*: Microbial toxicity was observed.

Table 2 Mutagenicity of *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean ± S.D.)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pkM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0 <sup>a)</sup>	109 111 ( ± 106) 98 ( ± 7)	10 7 ( ± 9) 10 ( ± 2)	66 70 ( ± 67) 64 ( ± 3)	18 18 ( ± 17) 16 ( ± 1)	8 12 ( ± 9) 7 ( ± 3)
	0.610	NT <sup>b)</sup>	NT	NT	16 18 ( ± 17) 17 ( ± 1)	11 10 ( ± 10) 9 ( ± 1)
	1.22	NT	NT	NT	18 17 ( ± 18) 18 ( ± 1)	11 10 ( ± 10) 9 ( ± 1)
	2.44	104 107 ( ± 104) 100 ( ± 4)	9 14 ( ± 11) 9 ( ± 3)	65 63 ( ± 64) 63 ( ± 1)	17 18 ( ± 17) 17 ( ± 1)	10 11 ( ± 11) 11 ( ± 1)
	4.88	117 101 ( ± 111) 114 ( ± 9)	9 9 ( ± 9) 8 ( ± 1)	73 65 ( ± 72) 77 ( ± 6)	21 19 ( ± 20) 20 ( ± 1)	8 11 ( ± 10) 11 ( ± 2)
	9.77	105 118 ( ± 109) 103 ( ± 8)	10 14 ( ± 13) 14 ( ± 2)	66 68 ( ± 66) 64 ( ± 2)	20 17 ( ± 18) 16 ( ± 2)	10 8 ( ± 9) 9 ( ± 1)
	19.5	105 110 ( ± 107) 105 ( ± 3)	10 8 ( ± 9) 8 ( ± 1)	63 76 ( ± 68) 65 ( ± 7)	14* 13* ( ± 13) 11* ( ± 2)	7* 9* ( ± 8) 8* ( ± 1)
	39.1	73* 78* ( ± 77) 79* ( ± 3)	7* 7* ( ± 7) 6* ( ± 1)	74 71 ( ± 70) 64 ( ± 5)	10* 7* ( ± 9) 11* ( ± 2)	0* 0* ( ± 0) 0* ( ± 0)
	78.1	0* 0* ( ± 0) 0* ( ± 0)	0* 0* ( ± 0) 0* ( ± 0)	48* 58* ( ± 52) 50* ( ± 5)	NT	NT
	156	NT	NT	49* 52* ( ± 49) 45* ( ± 4)	NT	NT
S9 mix (+)	0	121 122 ( ± 118) 110 ( ± 7)	13 10 ( ± 11) 9 ( ± 2)	77 99 ( ± 88) 88 ( ± 11)	24 20 ( ± 21) 20 ( ± 2)	18 16 ( ± 16) 14 ( ± 2)
	9.77	138 119 ( ± 131) 137 ( ± 11)	10 9 ( ± 9) 9 ( ± 1)	NT	26 20 ( ± 22) 21 ( ± 3)	16 15 ( ± 17) 19 ( ± 2)
	19.5	106 101 ( ± 104) 104 ( ± 3)	14 11 ( ± 14) 16 ( ± 3)	NT	24 23 ( ± 22) 20 ( ± 2)	15 14 ( ± 14) 14 ( ± 1)
	39.1	126 108 ( ± 123) 135 ( ± 14)	13 9 ( ± 11) 12 ( ± 2)	87 90 ( ± 83) 73 ( ± 9)	24 19 ( ± 22) 24 ( ± 3)	17 13 ( ± 15) 15 ( ± 2)
	78.1	130 124 ( ± 126) 123 ( ± 4)	11 10 ( ± 10) 10 ( ± 1)	94 92 ( ± 90) 85 ( ± 5)	23 27 ( ± 25) 25 ( ± 2)	15 14 ( ± 14) 13 ( ± 1)
	156	105 110 ( ± 108) 108 ( ± 3)	15 11 ( ± 12) 10 ( ± 3)	87 97 ( ± 89) 84 ( ± 7)	25 23 ( ± 23) 20 ( ± 3)	14 13 ( ± 14) 16 ( ± 2)
	313	75* 66* ( ± 72) 74* ( ± 5)	6* 8* ( ± 6) 5* ( ± 2)	81 91 ( ± 82) 74 ( ± 9)	17* 15* ( ± 17) 19* ( ± 2)	8* 11* ( ± 10) 10* ( ± 2)
	625	NT	NT	95 86 ( ± 86) 77 ( ± 9)	0* 0* ( ± 0) 0* ( ± 0)	0* 0* ( ± 0) 0* ( ± 0)
	1250	NT	NT	67* 66* ( ± 66) 66* ( ± 1)	NT	NT
	2500	NT	NT	41* 43* ( ± 40) 36* ( ± 4)	NT	NT
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2 <sup>c)</sup>	NaN <sub>3</sub> <sup>d)</sup>	AF-2	AF-2	9-AA <sup>e)</sup>
	Dosage (μg/plate)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	Number of colonies / plate	590 695 ( ± 666) 712 ( ± 66)	422 465 ( ± 430) 403 ( ± 32)	1059 1230 ( ± 1209) 1338 ( ± 141)	588 639 ( ± 626) 650 ( ± 33)	149 141 ( ± 150) 160 ( ± 10)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA <sup>f)</sup>	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Dosage (μg/plate)	1	2	2	0.5	2
	Number of colonies / plate	1042 1199 ( ± 1175) 1284 ( ± 123)	199 200 ( ± 207) 222 ( ± 13)	1065 1026 ( ± 1036) 1016 ( ± 26)	430 393 ( ± 407) 397 ( ± 20)	211 187 ( ± 201) 204 ( ± 12)

a) Water for injection, b) NT: Not tested, c) AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-Furyl) acrylamide, d) NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

e) 9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride, f) 2-AA: 2-Aminoanthracene

\*: Microbial toxicity was observed.

# *N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムの 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

## *In Vitro* Chromosomal Aberration Test of *N*-(Carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を調べるため、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。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下では300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix非存在下では200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を、連続処理法の24時間処理では150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を各々最高濃度として、公差25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で5濃度ずつを設定した。また、連続処理法の24時間処理では、50%以上の細胞増殖抑制を示す用量の標本において分析ができなかったため、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公差10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で6濃度を設定し、追加試験を実施した。

短時間処理法のS9 mix存在下およびS9 mix非存在下ならびに連続処理法24時間処理のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下では*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

大日本製薬から入手(2003年9月, 入手時:継代14代, 凍結時:17代)したチャイニーズ・ハムスター肺由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代4週間以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(Invitrogen Corp., ロット番号: 353445)を10 vol%添加したイーグルMEM(日水製薬)培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

2 $\times$ 10<sup>4</sup>個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson and Company)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3日間前培養した。

前培養後、短時間処理法では、S9 mix存在下および非存在下で被験物質を6時間処理し、その後、新鮮な培養液でさらに18時間培養した。連続処理法では、被験物質を24時間連続処理した。

#### 4. 被験物質

*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウム(ロット番号: 3047, 花王(東京)提供)は、純度27.1%の微黄色透明液体である。被験物質は使用時まで室温、遮光下で密閉容器に保存した。

実験終了後、残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。被験物質の秤量に際しては、純度換算(27.1%)を実施した。溶媒は生理食塩液(大塚製薬工場, ロット番号: K3K96)を用いた。被験物質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10 vol%になるように加えた。

#### 6. 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。

短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下では、同じく50~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で7濃度を、連続処理法の24時間処理では12.5~200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で6濃度を各々設定した。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、血球計算盤を用いて各群の細胞を計数し、陰性(溶媒)対照群に対する相対増殖率をもって指標とした。この細胞増殖率が50%を挟む2用量を結ぶ直線式より50%の細胞増殖抑制を示す濃度を算出した。その結果、50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法のS9 mix存在下で242  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix非存在下で146  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の24時間処理で107  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった(Fig.1)。

#### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下では300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix非存在下では200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を、連続処理法の24時間処理では150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を各々最高濃度として、公差25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で5濃度ずつを設定した。また、連続処理法の24時間処理では、50%以上の細胞増殖抑制を示す用量の標本において分析ができなかったため、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公差10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で6濃度を設定し、追加試験を実施した。

陽性対照群として、短時間処理法のS9 mix存在下では、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業, ロット番号: GG01)を20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で、S9 mix非存在下では、マイ

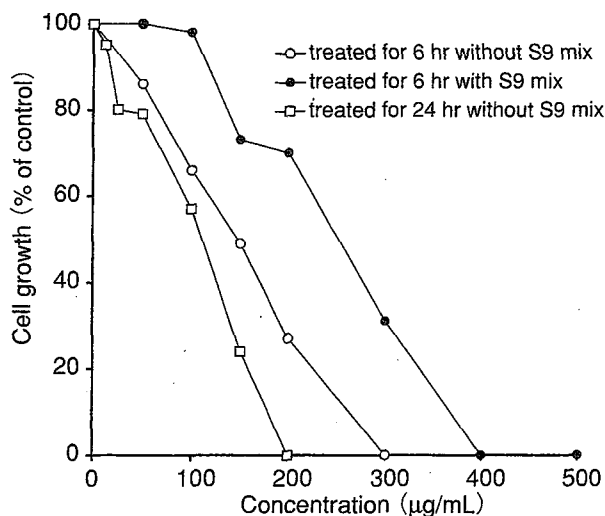


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt

トマイシンC(協和発酵工業, ロット番号: 413ACF)を0.1 µg/mL濃度で, 連続処理法では, マイトマイシンCを0.05 µg/mL濃度で各々設定した。

### 8. 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0.1 µg/mLになるように各ディッシュの培養液に加えた。染色体標本の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2枚作製した。作製した標本を, 3 vol%ギムザ溶液で20分間染色した。

### 9. 染色体分析

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スライドを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・哺乳動物試験分科会(MMS)<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行い, 染色体型あるいは染色分体型の切断, 交換などの構造異常およびギャップの有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。ギャップは構造異常には含めなかった。また, 構造異常および倍数性細胞について1群200個の分裂中期細胞を分析した。ただし, 連続処理法24時間処理の追加試験の120 µg/mLでは, 1群178個(各ディッシュ84個および94個)の分裂中期像しか得られなかった。また, 短時間処理法S9 mix存在下の300 µg/mLの一方のディッシュでは細胞毒性により観察に必要な規定数の分裂中期細胞が得られず, このスライド標本を分析の対象から除外したため, 1群100個の分裂中期細胞のみ分析した。連続処理法24時間処理の本試験の150 µg/mLおよび追加試験の130, 140, 150 µg/mLの両ディッシュから作製した標本についても同様に分析の対象から除外した。

### 10. 記録と判定

陰性対照群, 陽性対照群および被験物質処理群につい

での分析結果は, 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。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は, 石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い, 染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性, 5%以上10%未満を疑陽性, 10%以上を陽性とした。

### 11. 細胞増殖の測定

染色体標本作製と同一のサンプルにおける細胞増殖を測定した。標本作製時に剥離した細胞の一部を採取し, 血球計算盤で細胞を計数した。

### 結果および考察

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した, いずれの被験物質処理群においても, 染色体構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

連続処理法による染色体分析の結果をTable 2(本試験)およびTable 3(追加試験)に示した。*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムを加えて24時間連続処理した, いずれの被験物質処理群においても, 染色体構造異常および倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果から, *N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムは本試験条件下において, 染色体異常を誘発しないと結論した。

なお, 類似化合物であるL-Arginine L-gultamate, Glycine, Isoamyl formate, L-Isoleucine, Methyl AcetylricinolateおよびMonosodium L-aspartateは, 染色体異常試験で陰性の結果が報告されている<sup>2)</sup>。

### 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) 祖父尼俊雄(監修): 「染色体異常試験データ集」1998年版, エル・アイ・シー, 東京(2000)p.62. p.261. p.289. p.294. p.322. p.343



連絡先

試験責任者: 成見香瑞範  
 試験担当者: 堀 一成, 齋藤 準, 石毛裕子,  
 梶原昭彦, 高嶋恵美, 清成亜紀子,  
 高橋美記子, 長友弘子  
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
 〒314-0255 茨城県神栖市砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Kazunori Narumi (Study director)  
 Kazushige Hori, Hitoshi Saitou,  
 Yuko Ishige, Akihiko Kajiwara,  
 Emi Takashima, Akiko Kiyonari,  
 Mikiko Takahashi, Hiroko Nagatomo  
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
 Kashima Laboratory  
 14 Sunayama, Kamisu-shi, Ibaraki, 314-0255,  
 Japan  
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1. Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt for 6 hr with and without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9 mix	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations					Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid <sup>b)</sup> (%)	Judgement <sup>c)</sup>		
						ctb	cte	csb	cse	frg				total	SA	NA
Vehicle <sup>a)</sup>	0	-	6-18	100	200	0	0	0	2	0	2	2( 1.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	100	-	6-18	79	200	1	0	1	0	0	2	2( 1.0)	0	0.0	-	-
	125	-	6-18	77	200	1	0	0	0	0	1	1( 0.5)	0	0.0	-	-
	150	-	6-18	57	200	2	2	1	0	0	5	5( 2.5)	0	0.0	-	-
	175	-	6-18	46	200	0	0	1	0	0	1	1( 0.5)	1	0.0	-	-
	200	-	6-18	16	200	4	1	1	1	0	7	7( 3.5)	1	0.0	-	-
MMC	0.1	-	6-18	N.D.	200	13	44	2	0	0	59	55(27.5)	0	0.0	+	-
Vehicle <sup>a)</sup>	0	+	6-18	100	200	1	0	1	1	0	3	3( 1.5)	0	0.0	-	-
Test Substance	200	+	6-18	85	200	1	0	0	0	0	1	1( 0.5)	0	1.0	-	-
	225	+	6-18	67	200	0	1	2	0	0	3	3( 1.5)	0	0.0	-	-
	250	+	6-18	59	200	0	2	0	1	0	3	3( 1.5)	0	0.5	-	-
	275	+	6-18	41	200	0	3	1	0	0	4	4( 2.0)	1	1.0	-	-
	300	+	6-18	6	100	0	0	0	1	0	1	1( 1.0)	1	1.0	-	-
BP	20	+	6-18	N.D.	200	9	133	4	0	0	146	135(67.5)	0	0.0	+	-

Abbreviations; ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), frg: fragment

SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MMC: mitomycin C (positive control), BP: benzo [a] pyrene (positive control)

N.D.: Not determined

a) Isotonic sodium chloride solution was used as vehicle.

b) The same number of cells as those used in the structural aberration analysis were analyzed.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt for 24 hr without S9 mix (main test)

Group	Concentration (μg/mL)	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid <sup>b)</sup> (%)	judgement <sup>c)</sup>	
					ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Vehicle <sup>a)</sup>	0	24	100	200	1	0	1	0	0	2	2 ( 1.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	50	24	68	200	3	1	1	0	0	5	5 ( 2.5)	0	0.0	-	-
	75	24	65	200	0	0	0	1	0	1	1 ( 0.5)	0	0.0	-	-
	100	24	58	200	0	1	4	1	0	6	6 ( 3.0)	1	0.0	-	-
	125	24	53	200	0	1	1	0	0	2	2 ( 1.0)	0	0.0	-	-
	150	24	30	Tox											
MMC	0.05	24	N.D.	200	12	39	2	1	0	54	49 (24.5)	0	0.0	+	-

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment

SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C(positive control)

N.D.:Not determined

Tox:Because of cytotoxicity, 50 metaphase cells per dish could not be obtained.

a) Isotonic sodium chloride solution was used as vehicle.

b) The same number of cells as those used in the structural aberration analysis were analyzed.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

Table 3 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt for 24 hr without S9 mix (additional test)

Group	Concentration (μg/mL)	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid <sup>b)</sup> (%)	judgement <sup>c)</sup>	
					ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Vehicle <sup>a)</sup>	0	24	100	200	0	2	1	0	0	3	2 ( 1.0)	0	0.5	-	-
Test Substance	100	24	67	200	2	0	4	0	0	6	6 ( 3.0)	1	0.0	-	-
	110	24	49	200	2	0	1	1	0	4	4 ( 2.0)	0	0.0	-	-
	120	24	47	178	0	0	1	0	0	1	1 ( 0.6)	0	0.0	-	-
	130	24	40	Tox											
	140	24	31	Tox											
	150	24	31	Tox											
MMC	0.05	24	N.D.	200	12	56	2	0	0	70	66 (33.0)	2	0.0	+	-

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment

SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C(positive control)

N.D.:Not determined

Tox:Because of cytotoxicity, 50 metaphase cells per dish could not be obtained.

a) Isotonic sodium chloride solution was used as vehicle.

b) The same number of cells as those used in the structural aberration analysis were analyzed.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムのラットを用いる  
反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test  
of *N*-(Carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt  
by Oral Administration in Rats

要約

*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムはカルボキシベタイン型の両性界面活性剤で、繊維仕上げ剤、化粧品、シャンプー、医薬品、金属イオン封鎖剤等の幅広い分野で使用されている<sup>1)</sup>。毒性情報として、OECD TG423で実施した経口投与による急性毒性試験ではCategory 4(>300-2000)に分類された<sup>2)</sup>。しかし、反復投与および生殖発生毒性についての知見はない。

*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムを10, 60および300 mg/kg/dayの用量でSD系ラット(1群雌雄各12匹、雌はサテライト動物として対照群および300 mg/kg群に各5匹を追加)に交配前14日から交配を経て雄は42日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育4日、雌サテライト動物は雄と同様に42日間までそれぞれ経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

1. 反復投与毒性

死亡が妊娠20日および23日に各1例、流産が雌雄全例でいずれも300 mg/kg群で認められた。病理学検査の結果、被験物質に起因する変化として、剖検では前胃粘膜の肥厚、黄色化および隆起巣、組織学検査では扁平上皮過形成、角化亢進、錯角化、び慢性炎症性細胞浸潤、びらんおよび粘膜下織の水腫が300 mg/kg群の雌雄で認められた。また、腎臓の尿細管上皮の壊死および腎盂上皮の過形成、膀胱の粘膜上皮過形成が60および300 mg/kg群の雌雄で認められた。血液生化学検査では、尿素窒素の増加が300 mg/kg群の雌雄で認められた。

投与期間で認められた変化は2週間の回復期間により消失するか、変化がみられても病変程度が明らかに軽減していることから、回復傾向を示しているものと判断された。

2. 生殖発生毒性

全出産児死亡が哺育0日に1例、妊娠期間の延長、出産児数の減少、ならびに出生率の低下が300 mg/kg群で認められた。その他、親動物では性周期、交尾率、受胎率、分娩率、黄体数、着床数および着床率、新生児では性比、新生児の4日生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムの本試験条件下における反復投

与毒性に関する無毒性量は雌雄とも10 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無毒性量は雄親動物で300 mg/kg/day、雌親動物ならびに児動物では60 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質

*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウム(花王、東京)、ロット番号3047、純度27.1%は、石油エーテル可溶分0.1%、乾燥減量65.8%、強熱残分7.0%を有する透明液体である。被験物質は室温、暗所、密栓容器にて保存し、試験期間中安定であることを確認した。投与液の調製には、被験物質の有効成分の純度が27.1%であることから、所定量の3.7倍を秤量し、媒体(日本薬局方注射用水、大塚製薬工場)に溶解させた。投与液中の被験物質の安定性を投与開始前に調製後8日間安定であることを確認した。投与液は投与に供するまで冷蔵・遮光・密栓保存条件下で保存し、調製後7日以内に使用した。また、初回および最終調製時に投与液中の被験物質濃度が設定濃度±10%以内であることを確認した。

2. 試験動物

日本チャールス・リバー(厚木生産所)から入手した雌雄のSD系ラット(Crj:CD(SD)IGS,SPF)を5日間検疫・馴化した。その後も馴化を継続し雌雄の一般状態、さらに雌は性周期を7日間観察し、異常のない動物を試験に供した。投与開始前日に体重層別化無作為抽出法により、1群あたり雌雄各12匹に振り分けた。さらに、雌サテライト動物(回復動物)として対照群および300 mg/kg群に各5匹の雌を追加した。投与開始時の週齢は雌雄とも9週齢、体重範囲は雄318~381 g、雌が197~250 gであった。検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通じて、温度22±3°C、相対湿度55±20%、換気約6~20回/時、照明12時間/日(7:00-19:00)に自動調節した飼育室を使用した。動物飼育には、妊娠・哺育期間を除く期間はステンレス製つり下げ式金網製ケージを、妊娠・哺育期間には実験動物用床敷(ベータチップ、日本チャールス・リバー)を敷いたポリカーボネート製ケージを使用した。交配期間は雌雄各1匹、哺育期間は1腹、検疫・馴化期間を含むその他の期間は1匹ずつ収容した。動物にはオートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業)と、5 μmのフィルター濾過後、

紫外線照射した水道水を自由に摂取させた。

### 3. 投与量および投与方法

投与用量は用量設定試験の結果を参考に決定した。すなわち被験物質を0, 30, 100, 300および1000 mg/kgの用量で、1群雌雄各3匹のSD系ラットに14日間反復経口投与した。その結果1000 mg/kg群の雌雄全例で死亡するか、あるいは瀕死期解剖された。300 mg/kg群では流涎が雌雄の全例、赤血球数の低値が雌、前胃の水腫あるいは肥厚が雌雄に認められた。30および100 mg/kg群では被験物質に起因する変化は認められなかった。これらの結果および本試験の投与期間を考慮し、本試験の高用量は明らかな毒性発現が予想される300 mg/kgとし、以下公比約5で中用量は60 mg/kg、低用量は10 mg/kgの3用量を設定した。また、媒体(日本薬局方注射用水)のみを投与する対照群を設けた。

投与経路は経口とした。投与期間について、雄は交配前14日間および交配期間を経て剖検前日までの計42日間、雌は交配前14日間、交配期間、妊娠期間および分娩を経て哺育4日までとした。分娩しなかった雌は剖検前日までとした。なお、雌サテライト動物は交配は行わず雄と同様に42日間投与した。また、対照群と300 mg/kg群の雄各5匹および同群の雌サテライト動物各5匹は、投与期間終了後14日間の回復期間を設けた。

投与の際はテフロン製胃ゾンデを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与量は4 mL/kgとし、至近日に測定した体重に基づいて算出した。

### 4. 反復投与毒性に関する観察・検査項目

#### 1) 一般状態

全例について、生死、外観、行動等を投与前および投与後に毎日観察した。回復動物は1日1回午前中に観察した。

#### 2) 行動検査

雌雄全例について、詳細な症状観察(ホームケージ内、ハンドリング時、オープンフィールドでの観察)を、投与開始前日に1回、投与期間中は1回/週、いずれも午後に行った。雌雄とも各群5匹を選抜し、機能検査(刺激に対する反応性、握力)および自発運動の測定を、第6週の午後に1回行った。握力はデジタルフォースゲージ(DPS-5)、自発運動量にはSUPERMEX(室町機械)を用いて測定した。投与期間中の検査で被験物質の影響が疑われる変化が認められなかったため、回復期間の検査は行わなかった。

#### 3) 体重および摂餌量

雄では第1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 42および43日、さらに雄回復動物では第50および56日に測定した。雌サテライト動物は雄と同様の頻度で測定した。雌では第1, 4, 8および15日、交尾した雌は妊娠0, 7, 14および20日、分娩した雌は哺育0および4日に測定した。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定し、各測定日間

の1匹あたりの1日平均摂餌量を算出した。

#### 4) 血液学検査

雄では第42日、雄回復動物および雌サテライト動物では第56日、雌では哺育4日に、全生存動物を午後4時頃より絶食させた。測定対象動物(採血動物)は、雄は5例、雄回復動物および雌サテライト動物は全例、雌は分娩日の順に5例とした。これらの動物は、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で、後大静脈より採血した。採取した血液を用いて以下に示す項目を測定した。

EDTA-2Kにより抗凝固処理し、赤血球数(球状化処理二次元レーザーFCM法)、ヘモグロビン濃度(シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(球状化処理二次元レーザーFCM法)、網赤血球数(RNA染色によるレーザーFCM法)、血小板数(球状化処理二次元レーザーFCM法)、白血球数(酸性界面活性剤によるレーザーFCM法)を多項目自動血球分析装置(ADVIA120, バイエルメディカル)、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-50, HEG-50 VFオムロン)を用いて測定した。また、検査結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。血液の一部を3.2 w/v%クエン酸三ナトリウム水溶液で抗凝固処理し、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(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)(光散乱検出方式)を血液凝固自動分析装置(CA-510, シスメックス)を用いて測定した。

#### 5) 血液生化学検査

計画解剖日に採取した血液の一部を室温・遮光下で約30分間静置後遠心分離し、得られた血清を用いて以下の項目を測定した。

GOTおよびGPT(UV-rate法(JSCC改良法)),  $\gamma$ -GT( $\gamma$ -グルタミン-p-ニトロアニリド基質法(SSCC改良法)), ALP(p-ニトロフェニルリン酸基質法(JSCC改良法)), 総ビリルビン(酵素法(BOD法)), 尿素窒素(酵素-UV法(Urease-LEDH法)), クレアチニン(酵素法(Creatininase-POD法)), グルコース(酵素-UV法(HK-G6PDH法)), 総コレステロール(酵素法(CO-HDAOS法)), トリグリセライド(酵素法(GPO-HDAOS法, グリセリン消去法)), 総蛋白(Biuret法), アルブミン(BCG法), A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出), カルシウム(OCPC法), 無機リン(酵素法(PNP-XOD-POD法)), ナトリウム, カリウムおよびクロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(TBA-200FR, 東芝)を用いて測定した。

#### 6) 雄の尿検査

雄について、第38日の投与前に各用量群5匹の新鮮尿を採取し、pH, 蛋白, グルコース, ケトン体, ビリルビン, 潜血およびウロビリノーゲン(試験紙法, マルティスティックス:バイエルメディカル)を自動尿分析器(ク

リニテック100, バイエル メディカル)により測定した。被験物質の影響が疑われる変化が認められなかったため、尿沈渣、蓄積尿を用いた検査、回復動物の尿検査は行わなかった。

## 7) 病理学検査

雌雄全例について、解剖日にチオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で、腹大動脈の切断・放血により安楽死させて解剖した。計画解剖動物のうち、血液学検査の対象動物と同じ雌雄5匹(回復・サテライト動物は全例)の脳、心臓、肝臓、腎臓、副腎、胸腺、脾臓、精巣および精巣上体の重量を測定した。ただし、精巣および精巣上体は雄全例について測定した。また、解剖日の体重を基に相対重量(対体重比)を算出した。さらに雌雄全例については上記の器官に加えて、下垂体、リンパ節(下顎・腸間膜)、気管、肺、胃、腸管(十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸)、甲状腺・上皮小体、膀胱、精のう、前立腺腹葉、卵巣、子宮、膣、骨髄(大腿骨)、坐骨神経、脊髄および肉眼的異常部位を採取し、10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定して保存した。ただし、精巣および精巣上体はブアン液で固定後、保存した。病理組織学検査は、対照群と300 mg/kg群の投与後解剖動物のうち、雌雄各5例(血液学検査および器官重量測定対象動物と同様)の上記器官、死亡動物および全出産児が死亡した母動物の上記器官、対照群を含む全動物の肉眼的異常部位および非妊娠雌1例の卵巣について、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、鏡検した。この結果、被験物質に起因すると思われる変化が雌雄の胃、腎臓、膀胱および雌の胸腺と十二指腸に認められた。このため、10および60 mg/kg群の上述の基準で選択した各5例と回復後解剖動物の雌雄全例の当該器官・組織の検査を行った。

## 5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

### 1) 生殖機能検査

投与開始日から交配開始日まで雌の膣垢を毎日午前中に採取、性周期を検査し、平均性周期日数および異常性周期動物の発現率を算出した。交配前の投与期間終了後、各群内で雄1雌1の交配对を設け、第15日(交配開始日)の16:00頃から4日間昼夜同居させた。交尾確認は毎日午前中に行い、膣栓形成あるいは膣垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。交配した対は雌雄を分離し、以後の検査に供した。これらの結果から、交尾所要日数(交配開始後、交尾成立までに要した日数)、交尾成立までに逸した発情期の回数、交尾率[(交尾動物数/同居動物数)×100]、受胎率[(受胎動物数/交尾動物数)×100]を算出した。

### 2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が完了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。交尾確認後25日を経ても分娩しない場合は、非分娩雌とした。

分娩した動物は新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。母動物は剖検時に卵巣および子宮を摘出し、黄体数および着床数を検査した。これらの結果から、妊娠期間(妊娠0日から分娩完了日までの期間)、出産率[(生児出産雌数/受胎雌数)×100]、着床率[(着床数/黄体数)×100]、分娩率[(総出産児数/着床数)×100]を算出した。

## 3) 新生児の観察・検査

### (1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数(出生生児数、死産児数)、性別および外表異常の有無を検査した。その後は、一般状態、死亡の有無を哺育4日まで毎日観察した。哺育0および4日の生存児数から出生率[(出生生児数/総出産児数)×100]、新生児の4日の生存率[(哺育4日生児数/出生生児数)×100]を算出した。

### (2) 体重

生後0および4日に全生存児を個体ごとに測定した。

### (3) 剖検

生後4日に全生存児の口腔を含む外表を検査した後、親動物と同様に安楽死させ、剖検した。死亡動物については10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬、固定した後、実体顕微鏡下で剖検した。なお、分娩途中で死亡した母動物から出産された新生児のうち、生存していた新生児も同様に安楽死させた後、剖検した。

## 6. 統計解析

計量データについて、パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い、分散が等しい場合は一元配置分散分析を行った。分散が等しくない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意差が認められた場合はDunnett法またはDunnett型の多重比較を行った。計数データのうち尿検査はKruskal-Wallisの検定を行い、有意差が認められた場合はDunnett型の多重比較を、病理組織所見はWilcoxonの順位和検定で対照群との2群間比較を行った。その他の計数データはFisherの直接確率法により検定した。各検定の有意水準は5%とした。新生児に関するデータは各母動物ごとに算出した平均値を標本単位とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 一般状態

死亡が300 mg/kgの雌で2例、全出産児死亡が同群の1例で認められた。死亡動物の1例は妊娠20日に、他の1例は妊娠22日から分娩を開始し、妊娠23日の分娩途中で死亡した。全出産児死亡の1例は、分娩完了までに2日間(妊娠22日~24日、難産)を要し、分娩完了時には出産児が全例死亡していたため瀕死期解剖とした。

投与後の症状として、300 mg/kg群では流産が第7日

から視察され、剖検までの間に雌雄全例で認められた。鼻周囲あるいは下腹部の汚れが同群の雌雄各2例でみられ、雌2例の内1例は難産を示した動物、他1例は分娩途中で死亡した動物であった。軟便が300 mg/kg群の雄1例に認められた。

2) 行動検査

詳細な症状観察、機能検査および自発運動量測定の内いずれも被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

3) 体重 (Fig. 1, 2)

被験物質の影響と考えられる変化は雌雄とも認められなかった。

4) 摂餌量

被験物質の影響と考えられる変化は雌雄とも認められなかった。

なお、投与期間では摂餌量の有意な低値が10および300 mg/kg群の雄の第38日に認められたが、60 mg/kg群で変化がないこと、さらに実験期間を通してみると摂

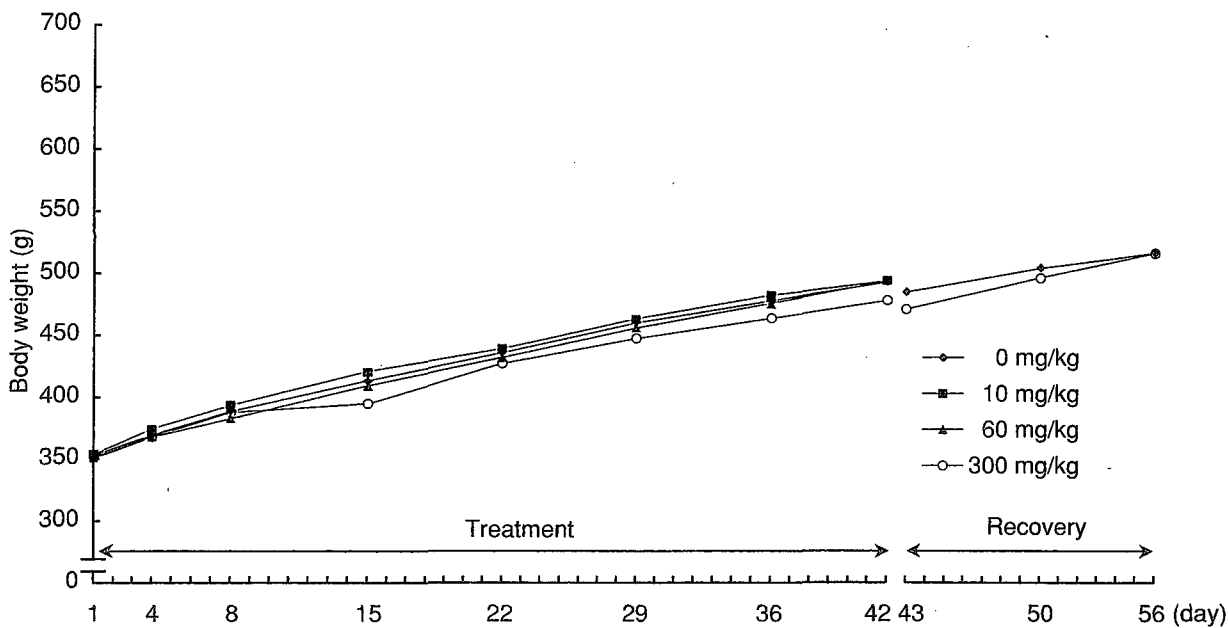


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

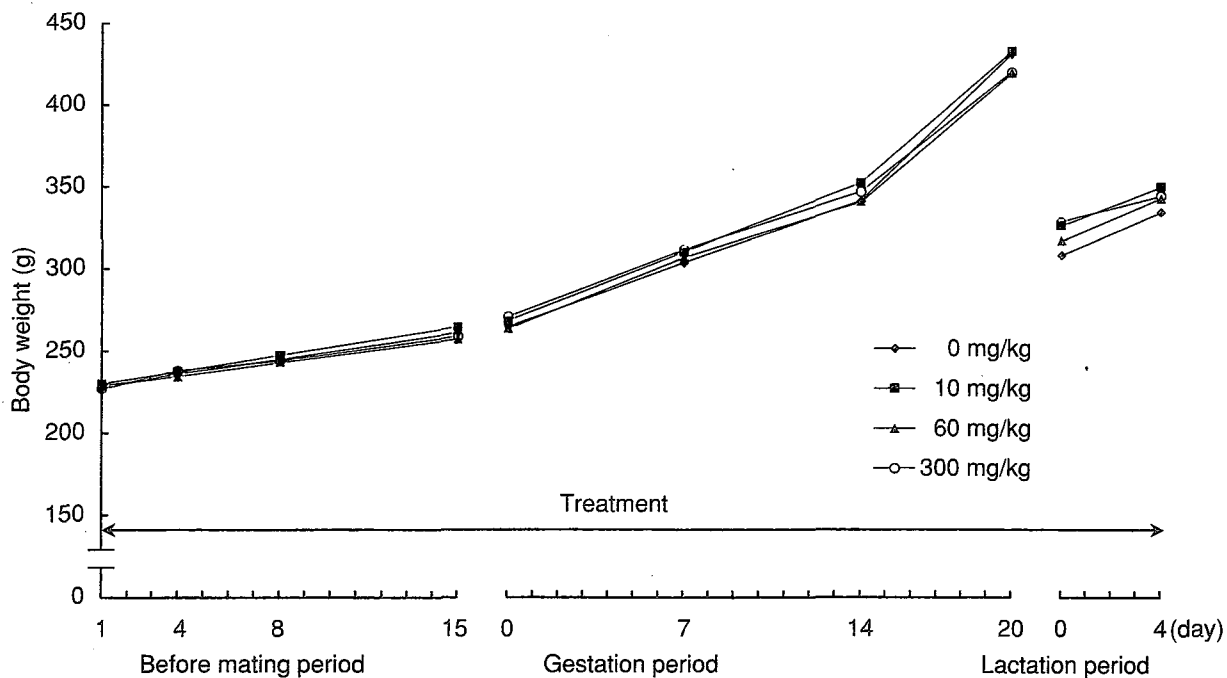


Fig. 2-1 Body weight changes of female rats treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

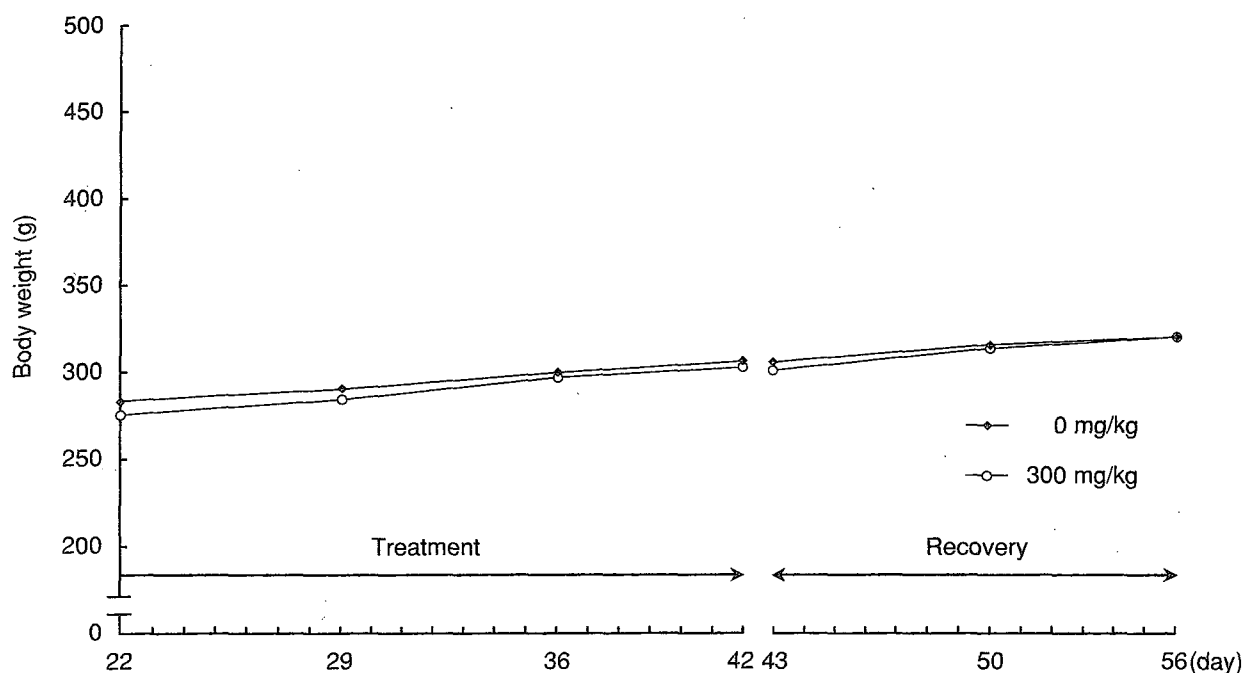


Fig. 2-2 Body weight changes of female rats (satellite animal) treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

餌量の低値は一過性の変化であることから、被験物質に関連するものではないと考えられる。回復期間では摂餌量の有意な高値が300 mg/kg群の雄の第50日にみられたが、投与期間中の摂餌量と同程度と判断され、偶発的な変化と考えられる。雌では投与および回復期間のいずれにも変化は認められず、対照群と同様に推移した。

#### 5) 血液学検査 (Table 1)

被験物質の影響と考えられる変化は雌雄とも認められなかった。

10 および 300 mg/kg 群の雄のプロトロンビン時間が対照群の 22.50 sec に対し、それぞれ 17.94 sec および 17.86 sec と有意な低値を示した。しかし、当研究所の背景データ (平均 18.51 sec <Min-Max, 17.07-20.50 sec>, 2000-2003 年) から、10 および 300 mg/kg 群の値は背景データ内の変動であり、対照群の値が高値を示したものと思われ、被験物質と関連のない偶発的な変化と考えられる。また、300 mg/kg 群の雌の回復終了後検査では好酸球比率の有意な低値が認められたが、投与終了後検査では変化がなかったことから、偶発的な変化と考えられる。

#### 6) 血液生化学検査 (Table 2)

被験物質の影響と考えられる変化が、300 mg/kg 群の雌雄で尿素窒素の高値、同群の雌でカルシウムの高値が認められた。

投与終了後検査では 10 mg/kg 群の雄で  $\gamma$ GT およびクレアチニンの有意な高値が認められたが、60 および 300 mg/kg 群では変化がなく用量との関連がないことから、被験物質に起因する変化ではないと考えられる。

#### 7) 雄の尿検査 (Table 3)

被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

#### 8) 器官重量 (Table 4)

被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

#### 9) 剖検所見

被験物質の影響と考えられる変化が 300 mg/kg 群の雌雄の胃に認められた。

前胃粘膜の肥厚が投与後解剖動物の 300 mg/kg 群で雄 7 例雌 6 例に認められた。このうち、雄 4 例では同部位粘膜の黄色化を伴っていた。前胃粘膜の隆起巣が投与後解剖動物の 300 mg/kg 群の雌 1 例で認められた。回復後解剖動物では、これらの変化は認められなかった。

死亡動物の剖検では、投与後解剖動物と同様に前胃粘膜の肥厚が 2 例に認められた。この他、1 例では下垂体の腫大が認められた。全出産児が死亡した動物の剖検では、前胃粘膜の肥厚および胸腺の萎縮が認められた。

生殖器系への変化として、片側性の精巣上体尾部の黄色斑が対照群および 60 mg/kg 群の雄各 1 例、片側性の精巣および精巣上体の小型が対照群の雄 1 例、両側性の精巣および精巣上体の小型が 300 mg/kg 群の雄 1 例に認められた。本所見は用量に関係なくみられ、雌との交尾も全例で成立した。ただし、両側性の精巣および精巣上体の小型を示した 300 mg/kg 群の雄 1 例の相手雌は受胎しなかった。

10) 病理組織所見 (Table 5)

被験物質の影響と考えられる変化が300 mg/kg群の雌雄の胃、60および300 mg/kg群の雌雄の腎臓ならびに膀胱に認められた。

前胃:扁平上皮過形成が投与後解剖動物の300 mg/kg群の雄3例雌1例で軽度、雄3例雌6例で中等度、雄1例で重度に認められた。300 mg/kg群ではこれに伴い、角化亢進が雄3例雌7例で軽度、雄3例で中等度、錯角化が雄4例雌2例で軽度、び慢性炎症性細胞浸潤が雄5例雌6例で軽度、雌雄各1例で中等度、粘膜下織の水腫が雌雄各5例で軽度、雄1例で中等度に認められた。また、びらんが300 mg/kg群の雌雄各3例で軽度に認められた。回復後解剖動物ではこれらの変化のうち、300 mg/kg群の雄1例に扁平上皮過形成が軽度に認められたのみであった。

腎臓:細胞質の強好酸性化、核濃縮および尿細管腔内への脱落を特徴とする尿細管上皮の変性/壊死が、投与後解剖動物の60および300 mg/kg群の雌各4例で軽度に認められた。この変化は、回復後解剖動物では認められなかった。腎盂上皮の過形成が60 mg/kg群の雄4例雌1例、300 mg/kg群の雌雄各3例で軽度に認められた。この変化は回復後解剖動物では300 mg/kg群の雌1例に軽度に認められたのみであった。

膀胱:粘膜上皮の過形成が60 mg/kg群の雌雄全例で軽度、300 mg/kg群の雌雄全例で中等度に認められた。この変化は、回復後解剖動物でも300 mg/kg群の雌雄全例で軽度に認められた。

剖検時に認められた片側性の精巣上体尾部の黄色斑は精子肉芽腫、片側性の精巣の小型は限局性精細管萎縮、それに伴う精巣上体の小型は腔内精子減少、両側性の精巣の小型はび慢性精細管萎縮、それに伴う精巣上体の小型は腔内精子減少であった。

死亡動物では、被験物質に起因する変化として、前胃の扁平上皮過形成、角化亢進およびびらん、錯角化が雌2例ともにみられ、加えて1例では膀胱の粘膜上皮の過形成、胸腺の萎縮も認められた。なお、死後の自己融解が強く2例の腎臓、1例の膀胱は評価できなかった。その他、個々に認められた所見として1例では、気管に重度の粘膜上皮の壊死と中等度の固有層の炎症性細胞浸潤、肺に中等度のうっ血と軽度の水腫が認められた。他の1例では、肺の静脈および肝臓の中心静脈に血栓が認められ、死因として播種性血管内凝固症候群(DIC)が疑われた。この他、胸腺および子宮における出血、脾臓の白脾髄の萎縮、副腎の限局性壊死が認められた。なお、剖検でみられた下垂体の腫大は、特記すべき組織学的変化は認められなかった。

全出産児が死亡した動物では、被験物質に起因する変化として、前胃の扁平上皮過形成、角化亢進、錯角化、びらんおよび炎症性細胞浸潤、腎臓の尿細管上皮の変性/壊死および腎盂上皮の過形成、膀胱の粘膜上皮の過形成および胸腺の萎縮が認められた。この他、腺胃粘膜の萎縮、肝臓の肝細胞および腎臓の近位尿細管に脂肪滴と思われる空胞化、副腎の束状帯の過形成が認められた。

なお、十二指腸粘膜上皮の過形成が認められ、被験物質の影響を疑ったが、投与後解剖動物および回復後解剖動物でこの変化は認められなかった。

雌の胸腺で被験物質の影響を疑い、10および60 mg/kg群ならびに回復後解剖動物の胸腺も合わせて精査したが、対照群との差は認められなかった。300 mg/kg群の雌で認められた胸腺の萎縮は、死亡および全出産児動物に限られた衰弱性の変化と考えられる。

この他にもいくつかの変化が認められたが、ラットでは非特異的に発現する変化であり、その発現状況に明らかでない群差がみられないことから、被験物質とは関連のない変化と判断した。

2. 生殖発生毒性

1) 生殖機能 (Table 6)

性周期検査では、4日周期を示した動物が対照群、10、60および300 mg/kg群でそれぞれ各群12例中、12、11、12および10例であり、被験物質投与による性周期の延長あるいは短縮は認められなかった。なお、300 mg/kg群の1例で発情休止期の継続がみられたが、雄との同居後に性周期が回帰し交尾した。その他に、異常性周期を示す動物は認められなかった。

各群の全例が交尾し、交尾率、交尾所要日数、交尾成立までに逸した発情期の回数とともに被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。非妊娠の動物は300 mg/kg群の1例にみられただけで、受胎率にも被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。なお、非妊娠雌の相手雄は両側性の精巣および精巣上体の小型がみられ、非妊娠は雄が原因と考えられたが、本所見は稀にみられる変化で、被験物質による影響ではないと考えられる。

2) 分娩・哺育状態 (Table 7)

妊娠期間の延長および出産児数の低値が300 mg/kg群で認められた。その他、黄体数、着床数、着床率、出生率および分娩率のいずれにも被験物質投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

分娩状態の観察で300 mg/kg群の2例に以下の変化が認められた。1例では、妊娠22日の分娩途中の観察で出産児5例が娩出されていたが、翌日には7例の死亡児が確認され、母動物も死亡していた。この母動物の子宮内には5例の胎児が遺残していた。また、娩出された出産児の内3例は母動物の死亡発見時には生存していた。他の1例は、分娩完了までに2日間(妊娠22日~24日)を要し難産を示した母動物であった。本母動物では妊娠23日に16例の出産児が観察されたが、触診の結果、子宮内に遺残している胎児が確認されたため観察を続けた。妊娠24日の観察時にはすべての胎児が娩出されたが、全出産児は死亡していた。この母動物は授乳、胎盤摂取、児動物を回集するなどの哺育行動が認められなかった。その他の母動物に分娩および哺育行動の異常は認められなかった。



## 3) 新生児に及ぼす影響

## (1) 新生児の観察 (Table 7)

300 mg/kg群で出産児数の低値を示し、それに伴い出生率も低値傾向を示した。なお、性比に変化は認められなかった。

一般状態および外表異常の観察では、被験物質に起因する変化は認められなかった。

## (2) 体重 (Table 7)

雌雄の体重および体重増加量とも被験物質投与群に変化は認められなかった。

## (3) 剖検

哺育4日の生存児の剖検および死亡児の剖検では、被験物質に起因する異常所見は認められなかった。

## 考察

## 1. 反復投与毒性

死亡が300 mg/kgの妊娠20日に雌1例、妊娠23日の分娩途中で雌1例で認められた。投与後の症状として、流涎が300 mg/kg群の雌雄全例に認められた。被験物質はウサギの眼粘膜に対し強い刺激性を有することか知られている<sup>3)</sup>こと、被験物質投与による神経症状が認められていないことから、流涎は被験物質の刺激性に起因する変化と考えられる。

病理学検査の結果、被験物質に起因する変化が胃、腎臓および膀胱に認められた。剖検において前胃粘膜の肥厚、黄色化および隆起巣が300 mg/kg群の雌雄でみられ、組織学的には扁平上皮過形成、角化亢進、錯角化、び慢性炎症性細胞浸潤、びらんおよび粘膜下織の水腫が同群の雌雄で認められた。その他、腎臓の尿細管上皮の壊死および腎盂上皮の過形成、膀胱の粘膜上皮過形成が60および300 mg/kg群の雌雄で認められた。

前胃の扁平上皮過形成は、種々の刺激性化学物質の経口投与によって誘発され、角化亢進や炎症性細胞浸潤、水腫を伴うこともあり、投与を中止することにより回復することが報告されている<sup>4)</sup>。胃の変化は、上述のように流涎が300 mg/kg群の全例で認められていることから、被験物質の刺激性に起因する変化と考えられる。腎臓の尿細管上皮の壊死は多くの薬物によって誘発され、その機序は様々である<sup>4)</sup>。壊死は近位尿細管に見られることが多く<sup>5)</sup>、本試験での発現部位はそれに一致していた。膀胱の粘膜上皮過形成は、種々の原因による移行上皮の損傷部における再生像として認められる<sup>6)</sup>。被験物質は消毒剤に用いられ殺菌力が強力であることが知られている<sup>7)</sup>こと、両性界面活性剤のうち市販殺菌消毒剤の代謝についての実験では、高用量投与における排泄は主として腎臓より行われる<sup>7)</sup>ことから、腎臓および膀胱の変化は被験物質により誘発されたものと考えられる。

血液生化学検査では、尿素窒素の増加が300 mg/kg群の雌雄で認められた。血清尿素は腎機能の指標として用いられており<sup>8)</sup>、前述のように腎臓への影響が組織学的にみられていることから、それに伴う増加と考えられる。

これら投与期間で認められた変化は、2週間の回復期間により消失するか、変化がみられても病変程度が明らかに軽減し、回復傾向を示しているものと考えられる。

分娩途中で死亡した300 mg/kg群の1例では、交配前に一過性の変化として鼻周囲および下腹部の汚れ、性周期検査で発情休止期の継続、剖検では前胃粘膜の肥厚、組織学的には、被験物質に起因する前述の変化の他、肺の静脈および肝臓の中心静脈に血栓が認められた。周産期に死亡した動物を組織検査すると、静脈に血栓がみられ、播種性血管内凝固症候群(DIC)を呈することがしばしば認められる。本動物も同様の変化を示していることから、死因として播種性血管内凝固症候群(DIC)の可能性が示唆された。他の死亡動物では、被験物質に起因する前述の変化の他、病理組織学検査では気管に重度の粘膜上皮の壊死と中等度の固有層の炎症性細胞浸潤、肺に中等度のうっ血と軽度の水腫が認められた。また、本死亡動物は死亡前日に流涎が観察されていたことから、流涎の発症と気管・肺の組織学的変化から誤嚥した可能性が考えられ、死亡したものと推察された。

雄の生殖器系への変化として、精巣および精巣上体の小型および精細管萎縮などが認められたが、本系統の動物でしばしば観察される自然発生性の変化と考えられ、さらに用量に関係なくみられていることから、被験物質に起因するものではないと判断した。その他、体重、摂餌量、血液学検査、尿検査(雄)および器官重量では、被験物質に起因する影響は認められなかった。また、詳細な症状観察、機能検査および自発運動量測定でも被験物質の影響はなく、神経症状を示唆する変化は認められなかった。

## 2. 生殖発生毒性

全出産児死亡が300 mg/kg群の雌1例の哺育0日に認められた。本動物は分娩完了までに2日間(妊娠22日~24日)を要し難産を示し、分娩完了の観察時には全出産児が死亡していた。分娩途中の観察においても、授乳、胎盤摂取あるいは児動物を回集するなどの哺育行動が認められなかった。また、妊娠期間の延長および出産児数の減少が300 mg/kg群で認められた。300 mg/kg群の雌では妊娠末期の死亡、分娩途中の死亡、全出産児死亡がみられ、いずれも周産期に集中して認められていることから、妊娠期間の延長や出産児数の減少を招いたものと考えられる。この他、性周期、交尾率、受胎率、分娩率、黄体数、着床数、着床率および出産率では被験物質に起因する変化は認められなかった。

新生児の検査において、出産児数が300 mg/kg群で減少し、それに伴い出生率も低値傾向を示した。生後4日の生存率、性比、外表、一般状態、体重および剖検では被験物質に起因する変化は認められなかった。したがって、出産児数の減少がみられたが、次世代の発育へ影響を及ぼすものではないと考えられる。

以上のように、N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウムを反復経口投与した結果、一般毒性

学的な主な変化として300 mg/kg群で周産期における雌の死亡、雌雄全例に流産がみられ、前胃粘膜の肥厚と組織学的には扁平上皮過形成が認められた。60および300 mg/kg群の雌雄では腎臓の尿細管上皮の壊死および膀胱の粘膜上皮過形成が認められ、加えて血清尿素窒素の高値が300 mg/kg群の雌雄で認められた。これら投与期間で認められた変化は2週間の回復期間により消失するか、変化がみられても病変程度が軽減し、回復傾向を示しているものと判断された。生殖発生毒性に及ぼす影響として、300 mg/kg群で全出産児死亡、妊娠期間の延長、出産児数の減少が認められた。したがって、本試験条件下における反復投与毒性に関する無毒性量は雌雄とも10 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無毒性量は雄親動物で300 mg/kg/day、雌親動物ならびに児動物では60 mg/kg/dayと考えられる。

#### 文献

- 1) 「13901の化学商品」化学工業日報社、東京(2001) pp.1262-1264.
- 2) 星野信人ら：*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムノラットを用いる単回経口投与毒性試験。化学物質毒性試験報告，13: 85-86 (2006)。
- 3) アンヒトール24B。製品安全性データシート，花王(2003)。
- 4) Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ: The alimentary system and pancreas. Stomach. In "Atlas of experimental toxicological pathology", Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ (ed), MTP Press, Lancaster (1987) pp.64-65.
- 5) 渡辺満利，西川秋佳：腎臓。非腫瘍性病変。尿細管上皮細胞の壊死。In「毒性病理組織学」前川昭彦(責任編集)，日本毒性病理学会，名古屋(2000) p.254.
- 6) 福島昭治：膀胱／尿管／尿道。増殖性および腫瘍性病変。膀胱。過形成。In「毒性病理組織学」前川昭彦(責任編集)，日本毒性病理学会，名古屋(2000) p.272.
- 7) 界面活性剤の安全性および生分解性に関するデータシート集(第4集)，日本界面活性剤工業界，東京(1988) pp.168-170.
- 8) 河合忠，屋形稔，伊藤喜久：「異常値の出るメカニズム」医学書院，東京(2001) p.119.

#### 連絡先

試験責任者：星野信人  
 試験担当者：佐藤ゆかり，藤代真弓，小山 隆  
 爰島洋子，豊田直人  
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
 〒314-0255 茨城県神栖市砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

#### Correspondence

Authors: Nobuhito Hoshino (Study director)  
 Yukari Sato, Mayumi Fujishiro,  
 Takashi Koyama, Hiroko Kokoshima,  
 Naoto Toyota  
 Kashima Laboratory Mitsubishi Chemical Safety  
 Institute Ltd.,  
 14 Sunayama, Kamisu-shi, Ibaraki, 314-0255,  
 Japan  
 Tel +81-479-46-2871 Fax+81-479-46-2874

Table 1 Hematological examination in rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	10	60	300	0	300
Male							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.650 $\pm$ 0.323	8.322 $\pm$ 0.243	8.426 $\pm$ 0.397	8.520 $\pm$ 0.267	8.420 $\pm$ 0.319	8.598 $\pm$ 0.299
	Hemoglobin (g/dL)	15.50 $\pm$ 0.51	15.14 $\pm$ 0.19	15.36 $\pm$ 0.71	15.30 $\pm$ 0.41	15.02 $\pm$ 0.47	15.08 $\pm$ 0.47
	Hematocrit (%)	46.98 $\pm$ 1.60	45.56 $\pm$ 0.95	46.10 $\pm$ 2.17	46.46 $\pm$ 1.55	45.72 $\pm$ 1.54	46.14 $\pm$ 1.24
	Reticulocyte (%)	2.06 $\pm$ 0.30	2.28 $\pm$ 0.30	2.80 $\pm$ 0.35	2.34 $\pm$ 0.86	2.44 $\pm$ 0.67	2.50 $\pm$ 0.44
	MCV (fL)	54.38 $\pm$ 2.08	54.68 $\pm$ 1.15	54.74 $\pm$ 2.29	54.56 $\pm$ 1.81	54.36 $\pm$ 1.96	53.72 $\pm$ 1.59
	MCH (pg)	17.94 $\pm$ 0.76	18.14 $\pm$ 0.35	18.24 $\pm$ 1.05	17.94 $\pm$ 0.38	17.84 $\pm$ 0.44	17.56 $\pm$ 0.52
	MCHC (%)	33.02 $\pm$ 0.43	33.16 $\pm$ 0.54	33.32 $\pm$ 0.85	32.92 $\pm$ 1.02	32.86 $\pm$ 0.43	32.70 $\pm$ 0.22
	Platelet ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	981.6 $\pm$ 34.6	1101.8 $\pm$ 153.2	995.6 $\pm$ 140.4	1137.4 $\pm$ 44.0	1064.2 $\pm$ 217.9	1055.6 $\pm$ 124.9
	PT (sec)	22.50 $\pm$ 3.29	17.94 $\pm$ 1.68*	19.50 $\pm$ 2.57	17.86 $\pm$ 2.40*	18.30 $\pm$ 2.00	20.68 $\pm$ 2.83
	APTT (sec)	21.26 $\pm$ 1.18	20.24 $\pm$ 1.00	21.84 $\pm$ 1.67	19.96 $\pm$ 1.75	20.26 $\pm$ 1.15	20.76 $\pm$ 1.17
	WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	10.352 $\pm$ 3.403	8.772 $\pm$ 1.252	9.260 $\pm$ 2.759	9.792 $\pm$ 1.142	10.000 $\pm$ 3.524	8.914 $\pm$ 3.208
	Differential leukocyte counts (%)						
	Lymphocyte	82.60 $\pm$ 8.26	83.72 $\pm$ 3.38	79.16 $\pm$ 15.79	78.84 $\pm$ 4.84	84.36 $\pm$ 5.27	86.74 $\pm$ 4.38
	Neutrophilie Segmented	15.20 $\pm$ 7.60	14.26 $\pm$ 3.88	18.84 $\pm$ 14.14	18.76 $\pm$ 5.50	11.84 $\pm$ 4.31	10.64 $\pm$ 4.12
	Neutrophilie Band	0.20 $\pm$ 0.45	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.55	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
	Eosinophil	0.80 $\pm$ 0.84	0.60 $\pm$ 0.89	0.80 $\pm$ 0.84	1.00 $\pm$ 0.71	1.40 $\pm$ 0.89	1.20 $\pm$ 0.84
	Basophil	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
	Monocyte	1.20 $\pm$ 1.10	1.42 $\pm$ 0.94	1.20 $\pm$ 1.10	1.00 $\pm$ 1.00	2.40 $\pm$ 1.14	1.42 $\pm$ 1.18
Female							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	6.872 $\pm$ 0.343	6.964 $\pm$ 0.577	6.890 $\pm$ 0.390	6.600 $\pm$ 0.314	7.936 $\pm$ 0.191	7.764 $\pm$ 0.355
	Hemoglobin (g/dL)	13.10 $\pm$ 0.62	13.36 $\pm$ 0.95	13.30 $\pm$ 0.70	12.88 $\pm$ 0.40	14.88 $\pm$ 0.55	14.62 $\pm$ 0.13
	Hematocrit (%)	39.42 $\pm$ 1.90	40.42 $\pm$ 2.91	39.78 $\pm$ 1.95	38.58 $\pm$ 1.13	43.68 $\pm$ 1.39	43.28 $\pm$ 1.57
	Reticulocyte (%)	5.78 $\pm$ 0.97	6.68 $\pm$ 1.71	6.14 $\pm$ 1.31	5.96 $\pm$ 1.44	2.50 $\pm$ 0.52	2.46 $\pm$ 0.27
	MCV (fL)	57.38 $\pm$ 0.44	58.12 $\pm$ 2.49	57.78 $\pm$ 1.11	58.50 $\pm$ 1.69	55.04 $\pm$ 2.06	55.76 $\pm$ 1.48
	MCH (pg)	19.04 $\pm$ 0.11	19.22 $\pm$ 0.72	19.28 $\pm$ 0.42	19.50 $\pm$ 0.44	18.76 $\pm$ 0.67	18.84 $\pm$ 0.72
	MCHC (%)	33.20 $\pm$ 0.12	33.04 $\pm$ 0.32	33.38 $\pm$ 0.23	33.38 $\pm$ 0.31	34.06 $\pm$ 0.47	33.78 $\pm$ 1.16
	Platelet ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1193.4 $\pm$ 75.7	1252.2 $\pm$ 343.9	1213.0 $\pm$ 67.5	1262.4 $\pm$ 238.0	1142.2 $\pm$ 125.4	1014.6 $\pm$ 77.8
	PT (sec)	17.46 $\pm$ 0.97	17.36 $\pm$ 0.76	17.24 $\pm$ 0.32	17.24 $\pm$ 0.67	15.76 $\pm$ 0.54	15.68 $\pm$ 0.30
	APTT (sec)	16.44 $\pm$ 1.48	14.48 $\pm$ 2.16	15.72 $\pm$ 2.37	14.96 $\pm$ 1.61	16.56 $\pm$ 0.91	16.86 $\pm$ 1.40
	WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	10.658 $\pm$ 2.458	10.866 $\pm$ 2.816	11.242 $\pm$ 2.694	10.522 $\pm$ 3.663	6.080 $\pm$ 1.416	6.224 $\pm$ 2.337
	Differential leukocyte counts (%)						
	Lymphocyte	75.10 $\pm$ 11.00	66.86 $\pm$ 7.61	75.00 $\pm$ 12.14	63.14 $\pm$ 11.29	84.50 $\pm$ 5.86	85.38 $\pm$ 2.69
	Neutrophilie Segmented	21.90 $\pm$ 10.91	28.74 $\pm$ 7.61	22.00 $\pm$ 11.38	31.40 $\pm$ 9.52	12.08 $\pm$ 4.80	13.22 $\pm$ 2.77
	Neutrophilie Band	0.60 $\pm$ 0.55	0.20 $\pm$ 0.45	0.40 $\pm$ 0.89	1.02 $\pm$ 2.28	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
	Eosinophil	0.80 $\pm$ 0.84	1.80 $\pm$ 0.84	1.40 $\pm$ 0.89	0.80 $\pm$ 0.45	1.60 $\pm$ 1.14	0.20 $\pm$ 0.45*
	Basophil	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
	Monocyte	1.60 $\pm$ 1.14	2.40 $\pm$ 2.07	1.20 $\pm$ 0.84	3.64 $\pm$ 1.99	1.82 $\pm$ 1.33	1.20 $\pm$ 0.84

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

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

Table 2 Blood chemical examination in rats treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	10	60	300	0	300
<b>Male</b>							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	GOT (U/L)	96.0 ± 19.9	105.4 ± 20.8	99.0 ± 11.3	92.4 ± 10.9	125.6 ± 29.5	148.0 ± 42.1
	GPT (U/L)	32.0 ± 7.9	30.0 ± 6.0	30.0 ± 4.0	28.2 ± 2.0	34.0 ± 9.2	50.2 ± 46.3
	γGT (U/L)	1.2 ± 0.4	2.0 ± 0.0*	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.0	2.2 ± 1.1	1.6 ± 0.5
	ALP (U/L)	377.6 ± 58.0	395.4 ± 91.1	383.6 ± 51.3	304.8 ± 39.7	379.0 ± 67.3	381.2 ± 75.2
	Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
	Urea nitrogen (mg/dL)	12.48 ± 0.93	13.08 ± 0.56	13.34 ± 1.37	16.76 ± 2.06**	14.68 ± 2.07	14.04 ± 1.42
	Creatinine (mg/dL)	0.22 ± 0.04	0.30 ± 0.00*	0.24 ± 0.05	0.28 ± 0.04	0.30 ± 0.00	0.26 ± 0.05
	Glucose (mg/dL)	125.8 ± 10.1	118.0 ± 13.7	121.6 ± 10.1	112.2 ± 13.7	125.2 ± 15.4	117.2 ± 4.2
	Total chol. (mg/dL)	62.0 ± 12.8	66.2 ± 13.8	63.8 ± 13.1	61.2 ± 7.9	67.2 ± 30.3	61.2 ± 12.0
	Triglyceride (mg/dL)	23.0 ± 8.1	20.2 ± 3.3	28.2 ± 12.2	24.4 ± 11.9	26.6 ± 9.9	44.0 ± 30.5
	Total protein (g/dL)	6.64 ± 0.19	6.94 ± 0.13	6.92 ± 0.42	6.70 ± 0.28	6.92 ± 0.37	7.00 ± 0.43
	Albumin (g/dL)	3.06 ± 0.15	3.08 ± 0.13	3.18 ± 0.20	3.08 ± 0.19	3.20 ± 0.10	3.28 ± 0.13
	A/G ratio	0.868 ± 0.098	0.790 ± 0.045	0.856 ± 0.095	0.854 ± 0.048	0.862 ± 0.095	0.878 ± 0.054
	Calcium (mg/dL)	9.98 ± 0.33	10.10 ± 0.21	10.22 ± 0.41	10.04 ± 0.37	10.02 ± 0.22	10.06 ± 0.31
	Inorganic phos. (mg/dL)	7.58 ± 0.32	7.54 ± 0.17	7.90 ± 0.17	7.82 ± 0.42	7.60 ± 0.42	7.78 ± 0.36
	Na (mmol/L)	146.8 ± 0.8	147.0 ± 1.0	147.4 ± 1.5	147.0 ± 1.0	147.0 ± 1.0	146.8 ± 1.3
	K (mmol/L)	4.52 ± 0.28	4.64 ± 0.15	4.58 ± 0.38	4.62 ± 0.20	4.40 ± 0.21	4.52 ± 0.27
	Cl (mmol/L)	105.0 ± 0.7	105.2 ± 0.8	105.6 ± 1.5	103.2 ± 2.4	103.4 ± 1.8	104.6 ± 1.1
<b>Female</b>							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	GOT (U/L)	137.4 ± 22.2	117.8 ± 19.8	123.2 ± 19.0	132.0 ± 23.2	163.4 ± 77.1	127.8 ± 32.1
	GPT (U/L)	54.4 ± 16.6	47.6 ± 12.9	49.8 ± 7.2	79.8 ± 25.3	44.4 ± 30.0	30.0 ± 12.3
	γGT (U/L)	1.6 ± 0.9	1.8 ± 0.8	1.4 ± 0.5	2.0 ± 0.0	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.4
	ALP (U/L)	298.0 ± 45.7	259.6 ± 59.0	313.8 ± 196.4	401.0 ± 86.7	164.2 ± 60.1	138.4 ± 35.4
	Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.08 ± 0.04	0.14 ± 0.05	0.10 ± 0.00
	Urea nitrogen (mg/dL)	19.16 ± 1.69	20.56 ± 3.70	18.34 ± 2.02	26.66 ± 2.55**	14.98 ± 2.70	18.68 ± 3.07
	Creatinine (mg/dL)	0.32 ± 0.04	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.36 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	Glucose (mg/dL)	121.8 ± 6.3	125.8 ± 6.2	122.0 ± 6.1	111.2 ± 10.1	135.4 ± 9.4	130.8 ± 14.7
	Total chol. (mg/dL)	77.8 ± 13.9	80.4 ± 14.3	64.8 ± 8.6	79.8 ± 14.4	79.4 ± 18.4	77.8 ± 23.8
	Triglyceride (mg/dL)	76.0 ± 68.8	70.6 ± 13.6	53.0 ± 24.8	62.0 ± 21.8	23.2 ± 6.8	20.6 ± 14.0
	Total protein (g/dL)	6.74 ± 0.33	6.94 ± 0.05	7.10 ± 0.19	6.92 ± 0.26	7.34 ± 0.39	7.48 ± 0.66
	Albumin (g/dL)	3.14 ± 0.18	3.30 ± 0.10	3.34 ± 0.21	3.16 ± 0.28	3.62 ± 0.27	3.64 ± 0.42
	A/G ratio	0.862 ± 0.038	0.906 ± 0.050	0.876 ± 0.076	0.850 ± 0.088	0.972 ± 0.067	0.950 ± 0.068
	Calcium (mg/dL)	10.70 ± 0.31	10.80 ± 0.33	11.02 ± 0.29	13.46 ± 4.45*	10.22 ± 0.29	10.20 ± 0.47
	Inorganic phos. (mg/dL)	9.26 ± 0.31	9.16 ± 0.51	9.64 ± 1.17	9.96 ± 0.38	6.46 ± 0.68	6.44 ± 0.34
	Na (mmol/L)	145.0 ± 1.9	146.2 ± 1.8	146.4 ± 0.9	146.2 ± 1.3	146.0 ± 0.7	145.6 ± 1.5
	K (mmol/L)	4.46 ± 0.21	4.36 ± 0.17	4.32 ± 0.33	4.50 ± 0.25	3.94 ± 0.22	4.02 ± 0.26
	Cl (mmol/L)	101.8 ± 3.4	103.6 ± 2.1	104.4 ± 1.3	104.2 ± 1.8	106.2 ± 2.4	107.8 ± 1.5

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

Table 3 Urinalysis of male rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period			
		0	10	60	300
Male					
Number of animals		5	5	5	5
pH	5.0	0	0	0	0
	5.5	0	0	0	0
	6.0	0	0	0	0
	6.5	0	0	0	0
	7.0	0	0	0	0
	7.5	0	0	0	0
	8.0	0	0	0	1
	8.5	5	4	2	3
	>=9	0	1	3	1
Protein	-	0	0	0	0
	+/-	0	0	0	0
	1+	3	2	2	4
	2+	2	3	3	1
	3+	0	0	0	0
Glucose	-	5	5	5	5
	+/-	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0
Ketones	-	0	1	0	0
	+/-	0	0	2	2
	1+	4	3	3	3
	2+	1	1	0	0
	3+	0	0	0	0
Bilirubin	-	4	3	3	4
	1+	1	2	2	1
	2+	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0
Occult blood	-	5	5	5	5
	+/-	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0
Urobilinogen (EU/dL)	0.1	0	2	0	2
	1.0	5	3	5	3
	2.0	0	0	0	0
	4.0	0	0	0	0
	>=8	0	0	0	0

Grade; -:negative, +/-:trace, 1+:slight, 2+:moderate, 3+:severe  
Significantly different from 0 mg/kg group; \*p<0.05, \*\*p<0.01

Table 4 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	10	60	300	0	300
<b>Male</b>							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	Final body weight (g)	466.0 ± 61.0(7) <sup>a)</sup>	465.8 ± 36.3(12)	463.7 ± 39.4(12)	440.3 ± 32.8(7)	490.0 ± 19.8	484.2 ± 28.5
	Absolute organ weight						
	Brain (g)	2.134 ± 0.098	2.150 ± 0.094	2.122 ± 0.025	2.066 ± 0.096	2.158 ± 0.100	2.090 ± 0.086
	Thymus (mg)	327.8 ± 25.9	339.2 ± 75.5	361.6 ± 163.6	232.8 ± 52.3	313.4 ± 53.3	301.2 ± 103.2
	Heart (g)	1.456 ± 0.094	1.512 ± 0.153	1.510 ± 0.170	1.474 ± 0.127	1.626 ± 0.163	1.584 ± 0.169
	Liver (g)	10.962 ± 1.354	11.216 ± 1.198	12.462 ± 2.432	11.244 ± 0.820	12.388 ± 1.914	12.982 ± 1.690
	Spleen (g)	0.700 ± 0.097	0.790 ± 0.039	0.882 ± 0.185	0.718 ± 0.088	0.808 ± 0.149	0.798 ± 0.094
	Kidneys (g)	2.976 ± 0.357	3.130 ± 0.199	2.996 ± 0.170	3.144 ± 0.276	3.246 ± 0.167	3.278 ± 0.179
	Adrenals (mg)	65.00 ± 16.68	68.68 ± 12.79	63.22 ± 5.53	68.56 ± 3.49	59.20 ± 11.37	57.62 ± 9.79
	Testes (g)	3.347 ± 0.316(7)	3.339 ± 0.358(12)	3.484 ± 0.262(12)	3.290 ± 0.740(7)	3.600 ± 0.349	3.628 ± 0.165
	Epididymides (g)	1.304 ± 0.108(7)	1.276 ± 0.116(12)	1.335 ± 0.056(12)	1.259 ± 0.254(7)	1.398 ± 0.112	1.442 ± 0.079
	Relative organ weight						
	Brain (g%)	0.488 ± 0.047	0.458 ± 0.026	0.450 ± 0.054	0.474 ± 0.035	0.442 ± 0.029	0.432 ± 0.019
	Thymus (mg%)	74.96 ± 6.12	72.34 ± 16.33	74.70 ± 26.78	53.00 ± 9.59	63.98 ± 10.91	61.56 ± 17.86
	Heart (g%)	0.334 ± 0.039	0.322 ± 0.018	0.316 ± 0.009	0.338 ± 0.040	0.332 ± 0.031	0.326 ± 0.026
	Liver (g%)	2.492 ± 0.089	2.384 ± 0.118	2.600 ± 0.241	2.578 ± 0.176	2.524 ± 0.342	2.676 ± 0.241
	Spleen (g%)	0.160 ± 0.012	0.168 ± 0.015	0.186 ± 0.042	0.166 ± 0.023	0.164 ± 0.026	0.162 ± 0.019
	Kidneys (g%)	0.678 ± 0.034	0.668 ± 0.045	0.632 ± 0.044	0.720 ± 0.055	0.664 ± 0.021	0.676 ± 0.021
	Adrenals (mg%)	14.66 ± 2.63	14.58 ± 1.99	13.38 ± 1.75	15.72 ± 0.93	12.10 ± 2.36	11.96 ± 2.24
	Testes (g%)	0.727 ± 0.109(7)	0.718 ± 0.071(12)	0.754 ± 0.069(12)	0.746 ± 0.169(7)	0.736 ± 0.077	0.750 ± 0.041
	Epididymides (g%)	0.286 ± 0.046(7)	0.274 ± 0.022(12)	0.290 ± 0.022(12)	0.287 ± 0.054(7)	0.284 ± 0.018	0.298 ± 0.013
<b>Female</b>							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	Final body weight (g)	306.8 ± 13.3(12) <sup>a)</sup>	323.1 ± 25.5(12)	312.5 ± 23.9(12)	319.8 ± 21.1(8)	299.4 ± 20.8	299.0 ± 39.4
	Absolute organ weight						
	Brain (g)	2.072 ± 0.109	1.990 ± 0.065	1.942 ± 0.099	1.952 ± 0.105	1.992 ± 0.041	1.970 ± 0.066
	Thymus (mg)	287.8 ± 108.9	205.2 ± 69.5	239.6 ± 63.5	246.2 ± 72.6	340.2 ± 71.5	272.2 ± 38.2
	Heart (g)	1.000 ± 0.083	1.022 ± 0.108	0.976 ± 0.076	0.996 ± 0.062	0.976 ± 0.050	0.990 ± 0.063
	Liver (g)	10.546 ± 1.329	10.790 ± 0.726	10.022 ± 0.877	11.366 ± 0.619	7.810 ± 0.843	7.986 ± 1.318
	Spleen (g)	0.714 ± 0.074	0.704 ± 0.018	0.714 ± 0.102	0.714 ± 0.119	0.566 ± 0.050	0.560 ± 0.099
	Kidneys (g)	2.054 ± 0.145	2.026 ± 0.101	2.000 ± 0.173	2.084 ± 0.176	1.944 ± 0.178	1.980 ± 0.210
	Adrenals (mg)	76.98 ± 8.12	71.20 ± 3.87	72.18 ± 10.22	74.38 ± 12.55	77.40 ± 6.75	74.02 ± 10.55
	Relative organ weight						
	Brain (g%)	0.686 ± 0.063	0.632 ± 0.067	0.664 ± 0.067	0.626 ± 0.036	0.666 ± 0.054	0.672 ± 0.114
	Thymus (mg%)	95.12 ± 35.19	64.56 ± 22.26	81.28 ± 20.30	78.82 ± 22.68	114.46 ± 27.53	91.24 ± 8.05
	Heart (g%)	0.332 ± 0.011	0.322 ± 0.013	0.336 ± 0.043	0.318 ± 0.023	0.326 ± 0.018	0.334 ± 0.038
	Liver (g%)	3.478 ± 0.288	3.408 ± 0.225	3.416 ± 0.283	3.642 ± 0.180	2.608 ± 0.186	2.660 ± 0.128
	Spleen (g%)	0.234 ± 0.015	0.222 ± 0.022	0.242 ± 0.024	0.230 ± 0.037	0.190 ± 0.028	0.188 ± 0.016
	Kidneys (g%)	0.678 ± 0.023	0.640 ± 0.041	0.682 ± 0.045	0.668 ± 0.058	0.652 ± 0.079	0.664 ± 0.052
	Adrenals (mg%)	25.48 ± 2.84	22.58 ± 2.53	24.72 ± 4.32	23.86 ± 3.98	25.94 ± 2.58	25.02 ± 4.18

a) Number of animals examined.

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

Table 5 Histopathological findings in rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
			0	10	60	300	0	300
	Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5
Male		(Grade)						
	Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Degeneration, myocardium, focal	1+	1			1		
	Lymph node, mandibular		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Lymph node, mesenteric		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Thymus		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Cyst	1+	1			0		
	Spleen		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Bone marrow, femur		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Trachea		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Lung (and bronchus)		<6>	<4>	<0>	<5>	<1>	<0>
	Hemorrhage, focal	1+	0	2		1	1	
	Metaplasia, osseous	1+	1	0		1	0	
	Stomach		<5>	<5>	<5>	<7>	<5>	<5>
	Cell infiltration, inflammatory, forestomach, diffuse	1+	0	0	0	5	0	0
		2+	0	0	0	1	0	0
	Edema, forestomach	1+	0	0	0	5	0	0
		2+	0	0	0	1	0	0
	Erosion, forestomach	1+	0	0	0	3	0	0
	Hyperkeratosis, forestomach	1+	0	0	0	3	0	0
		2+	0	0	0	3	0	0
	Hyperplasia, squamous, forestomach	1+	0	0	0	3	0	1
		2+	0	0	0	3	0	0
		3+	0	0	0	1	0	0
	Parakeratosis, forestomach	1+	0	0	0	4	0	0
	Small intestine, duodenum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Small intestine, jejunum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Small intestine, ileum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Large intestine, cecum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Large intestine, colon		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Large intestine, rectum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Liver		<5>	<0>	<1>	<5>	<0>	<0>
	Cell infiltration, inflammatory, focal	1+	3		1	2		
	Kidney		<5>	<5>	<6>	<5>	<5>	<5>
	Basophilic tubule, proximal tubule	1+	5	2	4	2	2	1
	Cast, hyaline	1+	1	0	0	0	0	0
	Cyst	1+	1	0	1	0	0	0
	Hyaline droplet, proximal tubule	1+	0	0	0	1	0	1
	Hyperplasia, pelvic epithelium	1+	0	0	4*	3	0	0
	Mineralization, cortex	1+	1	0	0	0	1	0
	Mineralization, papilla	1+	2	1	1	0	0	1

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe, total: total of positive grade

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

Table 5 (Continued)

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
			0	10	60	300	0	300
	Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5
Male		(Grade)						
	Urinary bladder		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
	Hyperplasia, mucosal epithelium	1+	0	0	5**	0**	0	5**
		2+	0	0	0	5	0	0
	Testis		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Atrophy, seminiferous tubule, diffuse	2+	0			1		
	Atrophy, seminiferous tubule, focal	2+	1			0		
	Epididymis		<5>	<0>	<1>	<5>	<0>	<0>
	Cell debris, duct	1+	1		0	1		
	Decrease, sperm, duct	1+	1		0	0		
		2+	0		0	1		
	Granuloma, spermatic	1+	1		1	0		
	Seminal vesicle		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Prostate		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Cell infiltration, lymphocyte, interstitium	1+	2			1		
		2+	1			0		
	Pituitary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Thyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Ultimobrancheal remnant	1+	3			1		
	Parathyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Adrenal		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Accessory adrenocortical tissue	1+	1			0		
	Hypertrophy, cortical cell, glomerular zone, focal	1+	1			0		
	Brain		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Spinal cord		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Sciatic nerve		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Skin		<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe, total: total of positive grade

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



Table 5 (Continued)

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period		Death	Total litter loss
			0	10	60	300	0	300	300	300
	Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5	2	1
Female		(Grade)								
	Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Lymph node, mandibular		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Lymph node, mesenteric		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Thymus		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<2>	<1>
	Atrophy	1+	0	0	0	0	0	0	1	1
	Hemorrhage	1+	0	0	0	0	0	0	1	0
	Spleen		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Extramedullary hematopoiesis	1+	4			5			0	0
	Atrophy, white pulp	1+	0			0			1	0
	Bone marrow, femur		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Trachea		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Cell infiltration, inflammatory, lamina propria	2+	0			0			1	0
	Necrosis, mucosal epithelium	3+	0			0			1	0
	Lung (and bronchus)		<6>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Cell infiltration, inflammatory, focal	1+	1			0			0	0
	Hemorrhage, focal	1+	1			0			0	0
	Congestion	2+	0			0			1	0
	Edema	1+	0			0			1	0
	Thrombus	1+	0			0			1	0
	Stomach		<5>	<5>	<5>	<8>	<5>	<5>	<2>	<1>
	Cell infiltration, inflammatory, forestomach, diffuse	1+ 2+	0 0	0 0	0 0	6 1	** 0	0 0	0 0	0 1
	Edema, forestomach	1+	0	0	0	5*	0	0	0	0
	Erosion, forestomach	1+	0	0	0	3	0	0	1	1
	Hyperkeratosis, forestomach	1+ 2+	0 0	0 0	0 0	7 0	** 0	0 0	0 2	0 1
	Hyperplasia, squamous, forestomach	1+ 2+	0 0	0 0	0 0	1 6	** 0	0 0	2 0	1 0
	Mineralization, glandular stomach	1+	0	0	0	1	0	0	0	0
	Parakeratosis, forestomach	1+ 2+	0 0	0 0	0 0	2 0	0 0	0 0	1 0	0 1
	Atrophy, mucosa, glandular stomach	1+	0	0	0	0	0	0	0	1
	Small intestine, duodenum		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<2>	<1>
	Hyperplasia, mucosal epithelium	1+	0	0	0	0	0	0	0	1
	Small intestine, jejunum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<0>	<1>
	Small intestine, ileum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<0>	<1>
	Large intestine, cecum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>	<1>
	Large intestine, colon		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Large intestine, rectum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe, total: total of positive grade  
Significantly different from 0 mg/kg group; \*p<0.05, \*\*p<0.01

Table 5 (Continued)

Sex			Administration period				Recovery period		Death	Total litter loss
	Organ	Dose level (mg/kg)	0	10	60	300	0	300	300	300
	Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5	2	1
Female		(Grade)								
Liver			<5>	<1>	<0>	<5>	<1>	<0>	<2>	<1>
Cell infiltration, inflammatory, focal	1+		0	0	0	1	0	0	0	0
Hemorrhage, focal	1+		0	0	0	0	1	0	0	0
Thrombus, central vein	2+		0	0	0	0	0	0	1	0
Vacuolation, hepatocyte, diffuse	2+		0	0	0	0	0	0	0	1
Kidney			<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<1>	<5>
Basophilic tubule, proximal tubule	1+		0	2	1	3	2	2	0	1
	2+		0	0	0	1	0	0	0	0
Degeneration/necrosis, tubular epithelium	1+		0	0	4*	4*	0	0	0	1
Hyperplasia, pelvic epithelium	1+		0	0	1	3	0	1	0	1
Mineralization, papilla	1+		0	0	1	1	2	0	0	0
Vacuolation, proximal tubule	1+		0	0	0	0	0	0	0	1
Urinary bladder			<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<1>	<1>
Hyperplasia, mucosal epithelium	1+		0	0	5**	0**	0	5**	1	1
	2+		0	0	0	5	0	0	0	0
Ovary			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Uterus			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Hemorrhage	1+		0			0			1	0
Vagina			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Pituitary			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Cystic dilatation, Rathke's pouch	1+		0			1			0	0
Thyroid			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<0>	<1>
Ectopic thymic tissue	1+		1			0				0
Ultimobrancheal remnant	1+		3			1				1
Parathyroid			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Adrenal			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Necrosis, focal	1+		0			0			1	0
Hypertrophy, fascicular zone	1+		0			0			0	1
Brain			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Spinal cord			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Sciatic nerve			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Skin			<0>	<1>	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>
Atrophy, hair follicle	1+			1						

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe, total: total of positive grade

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

Table 6 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Administration period			
	0	10	60	300
Number of pairs examined	12	12	12	12
Estrous cycle	4.00 ± 0.00	4.08 ± 0.29	4.00 ± 0.00	4.05 ± 0.15
Irregular estrous cycle	0/12	0/12	0/12	1/12
Number of pairs with successful mating	12	12	12	12
Mating index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	12	12	12	11
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	100.0	100.0	100.0	91.7
Pairing days until mating	2.4 ± 1.1	2.3 ± 1.1	2.9 ± 1.2	3.1 ± 1.0
Number of estrous stages without mating	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

a) Mating index (%) = (Number of pairs with successful mating/number of pairs examined) × 100  
 b) Fertility index (%) = (Number of pregnant animals/number of pairs with successful mating) × 100  
 Values are expressed as Mean ± S.D.  
 Significantly different from 0 mg/kg group; \*p<0.05, \*\*p<0.01

Table 7 Delivery and litter data in rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Administration period					
	0	10	60	300		
Number of females examined	12	12	12	11		
Number of females with live pups	12	12	12	9		
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	81.8		
Gestation length (days)	22.4 ± 0.5	22.8 ± 0.5	22.6 ± 0.5	23.1 ± 0.3**		
Number of corpora lutea	16.8 ± 1.9	15.8 ± 1.6	14.4 ± 2.9	15.7 ± 1.1		
Number of implantation sites	16.3 ± 2.0	15.6 ± 1.6	14.1 ± 3.0	15.3 ± 1.2		
Implantation index (%) <sup>b)</sup>	96.51 ± 4.21	98.46 ± 2.80	97.40 ± 4.95	97.15 ± 4.43		
Delivery index (%) <sup>c)</sup>	94.88 ± 4.83	84.43 ± 17.73	89.79 ± 12.20	86.40 ± 7.86		
Number of pups delivered	15.4 ± 2.0	13.3 ± 3.3	12.8 ± 3.6	13.1 ± 1.3*		
Number of live pups on day 0	15.0 ± 2.1	13.3 ± 3.3	12.8 ± 3.6	10.8 ± 4.6		
Live birth index (%) <sup>d)</sup>	97.22 ± 5.56	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	83.01 ± 34.61		
Sex ratio (male/female)	0.89 (87/98)	0.89 (75/84)	0.83 (70/84)	0.95 (55/58)		
Number of live pups on day 4	14.9 ± 2.1	13.3 ± 3.3	12.8 ± 3.6	12.0 ± 2.7		
Viability index on day 4 (%) <sup>e)</sup>	99.51 ± 1.70	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	98.21 ± 5.06		
Body weight of pups (g)	on day 0	male	6.5 ± 0.6	7.0 ± 1.1	6.9 ± 0.8	7.4 ± 0.4
		female	6.0 ± 0.5	6.6 ± 1.1	6.5 ± 0.7	6.8 ± 0.7
	on day 4	male	10.4 ± 0.9	11.6 ± 2.0	11.4 ± 1.8	11.9 ± 1.0
		female	9.8 ± 0.8	11.1 ± 2.0	10.8 ± 1.7	11.1 ± 1.1
Body weight gain of pups (g)	day 0 to 4	male	3.9 ± 0.5	4.5 ± 1.0	4.5 ± 1.1	4.5 ± 0.9
		female	3.7 ± 0.5	4.5 ± 1.0	4.3 ± 1.2	4.3 ± 0.8

a) Gestation index (%) = (Number of females with live pups/number of pregnant females) × 100  
 b) Implantation index (%) = (Number of implantation sites/number of corpora lutea) × 100  
 c) Delivery index (%) = (Number of pups delivered/number of implantation sites) × 100  
 d) Live birth index (%) = (Number of live pups on day 0/number of pups delivered) × 100  
 e) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4/number of live pups on day 0) × 100  
 Values are expressed as Mean ± S.D.  
 Significantly different from 0 mg/kg group; \*p<0.05, \*\*p<0.01

# メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 2-Hydroxyethyl methacrylate on Bacteria

### 要約

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルについて、細菌を用いる復帰突然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>2,3)</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、用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験ではS9 mix 無添加試験および添加試験を313~5000 µg/プレートの範囲で実施した。

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、溶媒対照値の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。

以上の結果から、メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

### 方法

#### 〔検定菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium* の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものをを用い、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、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子 pKM101(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No. 2(Oxoid)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。

#### 〔被験物質〕

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステル(CAS No. 868-77-9)は、分子量 130.16 の無色透明液体である。用いた被験物質は、(株)日本触媒製造、ロット番号 5P05LA、純度 97.6 wt% [不純物:0.2-0.3% エチレングリコールジ

メタクリレート, 2.0-2.5% ジエチレングリコールモノメタクリレート, 50 ppm メトキノン(重合防止剤)] であり、(株)日本触媒から供与された。被験物質は、使用時まで冷蔵した。なお、試験終了後に(株)日本触媒において、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 97.3 wt% であった。メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルは、局方注射用水(ロット番号:K5A80, (株)大塚製薬工場)に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

#### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(上野製薬(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2 および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

#### 〔培地および S9 mix の組成〕

##### 1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco) 0.6%

塩化ナトリウム 0.5%

(B)\* L-ヒスチジン 0.5 mM

D-ビオチン 0.5 mM

\*:WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

##### 2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地を用いた。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

バクトアガー(Difco) 15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 mix

1 ml 中下記の成分を含む

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を用いた。

〔試験方法〕

ブレインキューベーション法<sup>9)</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 分間往復振とう培養したのち, 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。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は, 同時に実施した他の試験と共通とした。培養は 37°C で 48 時間行い, 生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については, 肉眼的あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌膜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, 溶媒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, それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は 1 回, 本試験は同一用量について 2 回実施し, 結果の再現性の確認を行った。

〔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 無添加あるいは S9 mix 添加条件において, 被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が, 溶媒対照のそれに比べて 2 倍以上に増加し, かつ, その増加に再現性あるいは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(陽性)と判定することとした。ただし, 2 回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の 2 倍以上となる用量が認められた場合において, その溶媒対照値が 10 以下であり, 変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルについて 50~5000  $\mu$ g/プレート 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抗菌性は認められなかった。

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 5000  $\mu$ g/プレートとした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で, とともに 313~5000  $\mu$ g/プレート の範囲で公比を 2 として 2 回の本試験を実施した (Table 1, 2)。その結果, いずれの検定菌においても, 溶媒対照値の 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。

以上の結果に基づき, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは, 用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) 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.
- 4) 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, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子  
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257 秦野市落合 729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)  
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,  
Kumiko Kawakami  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan  
Tel +81-463-82-4751 FAX +81-463-82-9627

Table 1. Mutagenicity of 2-hydroxyethyl methacrylate in reverse mutation test (I) on bacteria

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	154 171 159 (161 $\pm$ 8.7)	13 7 12 ( 11 $\pm$ 3.2)	28 26 29 ( 28 $\pm$ 1.5)	25 33 27 ( 28 $\pm$ 4.2)	11 15 10 ( 12 $\pm$ 2.6)	
	313	141 158 160 (153 $\pm$ 10.4)	13 9 10 ( 11 $\pm$ 2.1)	31 33 30 ( 31 $\pm$ 1.5)	23 28 19 ( 23 $\pm$ 4.5)	11 8 10 ( 10 $\pm$ 1.5)	
	625	141 147 139 (142 $\pm$ 4.2)	12 14 12 ( 13 $\pm$ 1.2)	30 34 31 ( 32 $\pm$ 2.1)	27 20 20 ( 22 $\pm$ 4.0)	9 12 8 ( 10 $\pm$ 2.1)	
	1250	151 133 149 (144 $\pm$ 9.9)	9 17 9 ( 12 $\pm$ 4.6)	31 37 22 ( 30 $\pm$ 7.5)	12 19 18 ( 16 $\pm$ 3.8)	14 8 9 ( 10 $\pm$ 3.2)	
	2500	137 137 157 (144 $\pm$ 11.5)	12 15 13 ( 13 $\pm$ 1.5)	30 26 20 ( 25 $\pm$ 5.0)	28 20 18 ( 22 $\pm$ 5.3)	12 9 12 ( 11 $\pm$ 1.7)	
	5000	154 141 160 (152 $\pm$ 9.7)	12 10 19 ( 14 $\pm$ 4.7)	29 26 23 ( 26 $\pm$ 3.0)	25 33 23 ( 27 $\pm$ 5.3)	15 12 15 ( 14 $\pm$ 1.7)	
S9 mix (+)	0	156 193 150 (166 $\pm$ 23.3)	11 10 9 ( 10 $\pm$ 1.0)	40 39 40 ( 40 $\pm$ 0.6)	44 26 36 ( 35 $\pm$ 9.0)	11 20 9 ( 13 $\pm$ 5.9)	
	313	129 162 154 (148 $\pm$ 17.2)	11 15 13 ( 13 $\pm$ 2.0)	27 27 35 ( 30 $\pm$ 4.6)	20 29 33 ( 27 $\pm$ 6.7)	15 13 8 ( 12 $\pm$ 3.6)	
	625	157 183 181 (174 $\pm$ 14.5)	14 13 8 ( 12 $\pm$ 3.2)	48 36 31 ( 38 $\pm$ 8.7)	25 35 37 ( 32 $\pm$ 6.4)	12 15 7 ( 11 $\pm$ 4.0)	
	1250	177 180 182 (180 $\pm$ 2.5)	14 9 11 ( 11 $\pm$ 2.5)	36 28 41 ( 35 $\pm$ 6.6)	34 30 27 ( 30 $\pm$ 3.5)	8 11 10 ( 10 $\pm$ 1.5)	
	2500	172 177 172 (174 $\pm$ 2.9)	13 10 12 ( 12 $\pm$ 1.5)	33 40 29 ( 34 $\pm$ 5.6)	22 30 36 ( 29 $\pm$ 7.0)	6 10 8 ( 8 $\pm$ 2.0)	
	5000	162 175 160 (166 $\pm$ 8.1)	15 11 15 ( 14 $\pm$ 2.3)	37 30 33 ( 33 $\pm$ 3.5)	30 30 34 ( 31 $\pm$ 2.3)	9 11 12 ( 11 $\pm$ 1.5)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	689 685 779 (718 $\pm$ 53.2)	262 272 295 (276 $\pm$ 16.9)	337 289 301 (309 $\pm$ 25.0)	688 663 721 (691 $\pm$ 29.1)	1291 1123 1369 (1261 $\pm$ 125.7)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	755 927 1012 (898 $\pm$ 130.9)	300 298 262 (287 $\pm$ 21.4)	582 746 652 (660 $\pm$ 82.3)	298 332 304 (311 $\pm$ 18.1)	367 346 313 (342 $\pm$ 27.2)	

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene  
Purity was 97.6 wt% and 0.2-0.3 % ethylene glycol dimethacrylate, 2.0-2.5 % diethylene glycol monomethacrylate and  
50 ppm methoquinone were contained as impurities.

Table 2. Mutagenicity of 2-hydroxyethyl methacrylate in reverse mutation test (II) on bacteria

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	140	125	147	11	18	13	25	27	23	20	31	20	12	14	11	
		(137 $\pm$ 11.2)			(14 $\pm$ 3.6)			( 25 $\pm$ 2.0)			( 24 $\pm$ 6.4)		( 12 $\pm$ 1.5)				
	313	124	122	145	13	10	19	26	22	28	31	19	33	4	8	9	
		(130 $\pm$ 12.7)			( 14 $\pm$ 4.6)			( 25 $\pm$ 3.1)			( 28 $\pm$ 7.6)		( 7 $\pm$ 2.6)				
	625	116	104	169	8	8	10	26	26	25	26	26	19	14	6	6	
		(130 $\pm$ 34.6)			( 9 $\pm$ 1.2)			( 26 $\pm$ 0.6)			( 24 $\pm$ 4.0)		( 9 $\pm$ 4.6)				
	1250	108	118	116	14	10	13	23	20	26	30	22	14	7	5	11	
	(114 $\pm$ 5.3)			( 12 $\pm$ 2.1)			( 23 $\pm$ 3.0)			( 22 $\pm$ 8.0)		( 8 $\pm$ 3.1)					
2500	151	141	139	19	10	8	17	20	26	22	15	25	5	7	12		
	(144 $\pm$ 6.4)			( 12 $\pm$ 5.9)			( 21 $\pm$ 4.6)			( 21 $\pm$ 5.1)		( 8 $\pm$ 3.6)					
5000	149	134	151	10	9	10	20	27	31	20	27	30	8	12	9		
	(145 $\pm$ 9.3)			( 10 $\pm$ 0.6)			( 26 $\pm$ 5.6)			( 26 $\pm$ 5.1)		( 10 $\pm$ 2.1)					
S9 mix (+)	0	141	115	140	9	14	11	37	26	28	34	22	31	9	5	8	
		(132 $\pm$ 14.7)			( 11 $\pm$ 2.5)			( 30 $\pm$ 5.9)			( 29 $\pm$ 6.2)		( 7 $\pm$ 2.1)				
	313	141	138	137	6	11	7	37	23	29	38	30	21	6	8	6	
		(139 $\pm$ 2.1)			( 8 $\pm$ 2.6)			( 30 $\pm$ 7.0)			( 30 $\pm$ 8.5)		( 7 $\pm$ 1.2)				
	625	128	147	131	10	18	17	22	30	29	26	27	28	12	3	5	
		(135 $\pm$ 10.2)			( 15 $\pm$ 4.4)			( 27 $\pm$ 4.4)			( 27 $\pm$ 1.0)		( 7 $\pm$ 4.7)				
	1250	140	170	143	10	20	13	35	31	21	24	24	21	5	8	15	
	(151 $\pm$ 16.5)			( 14 $\pm$ 5.1)			( 29 $\pm$ 7.2)			( 23 $\pm$ 1.7)		( 9 $\pm$ 5.1)					
2500	159	151	146	10	12	17	30	35	29	24	28	29	12	10	8		
	(152 $\pm$ 6.6)			( 13 $\pm$ 3.6)			( 31 $\pm$ 3.2)			( 27 $\pm$ 2.6)		( 10 $\pm$ 2.0)					
5000	146	173	170	5	10	15	26	38	33	28	27	32	8	8	8		
	(163 $\pm$ 14.8)			( 10 $\pm$ 5.0)			( 32 $\pm$ 6.0)			( 29 $\pm$ 2.6)		( 8 $\pm$ 0.0)					
Positive control	Chemical	AF2		SA			AF2			AF2		9AA					
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01		0.5			0.01			0.1		80					
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	644	728	760	347	386	359	483	487	475	672	665	608	1320	1043	1130	
		(711 $\pm$ 59.9)			(364 $\pm$ 20.0)			(482 $\pm$ 6.1)			(648 $\pm$ 35.1)		(1164 $\pm$ 141.7)				
Positive control	Chemical	2AA		2AA			2AA			2AA		2AA					
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1		2			10			0.5		2					
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	658	680	770	310	335	315	473	407	420	281	255	313	269	274	260	
		(703 $\pm$ 59.3)			(320 $\pm$ 13.2)			(433 $\pm$ 35.0)			(283 $\pm$ 29.1)		(268 $\pm$ 7.1)				

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene  
Purity was 97.6 wt% and 0.2-0.3 % ethylene glycol dimethacrylate, 2.0-2.5 % diethylene glycol monomethacrylate and 50 ppm methoquinone were contained as impurities.



メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの  
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

*In Vitro* Chromosomal Aberration Test of  
2-Hydroxyethyl methacrylate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステ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)ともに 1.3 mg/ml(10 mM)においても 50% を超える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において 1.3 mg/ml の濃度を最高処理濃度として、連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では、公比2で4濃度、短時間処理の S9 mix 非存在下では、公比2で3濃度設定した。なお、48時間連続処理の濃度は、24時間連続処理と同じ濃度に設定した。連続処理では、S9 mix 非存在下で24時間および48時間連続処理後、短時間処理では S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)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時間連続処理と短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では 1.3 mg/ml(10 mM)、48時間連続処理では 0.65 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時間連続処理した高濃度群(1.3 mg/ml)では、細胞毒性のため染色体の構造異常および倍数性細胞について規定の細胞数が観察できなかったが、中濃度群(0.65 mg/ml)および高濃度群(1.3 mg/ml)において染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発され、その頻度は 10.0% および 70.6% であった。一方、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。48時間連続処理したすべての処理群において、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発され、その頻度は 6.0~84.0% であった。また、高濃度群(0.65 mg/ml)において、観察した細胞の 3.25% に倍数性細胞が認められた。短時間処理では、S9 mix 非存在下において、いずれの処理群でも染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。一方、低濃度群(0.33 mg/ml)および高濃度群(1.3 mg/ml)において観察した細胞の 0.88% および 6.13% に倍数性細胞が誘発された。S9 mix 存在下では、高濃度群(1.3 mg/ml)において観察した細胞の 13.0% に染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発された。また、中濃度群(0.65 mg/ml)において観察した細胞の 1.25% に倍数性細胞の誘発作用が認められたが、傾向性検定では有意差は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下でメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは、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12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、牛胎児血清(FCS:Cansera International)を 10% 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

2×10<sup>4</sup>個の CHL/IU 細胞を、培養液 5 ml を入れたデイツシュ(径 6 cm, Corning)に播き、37℃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時間および48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 存在下および非存在下で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. 被験物質

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステル(略号: HEMA, CAS No.:868-77-9, ロット番号:5P05LA, (株)日本触媒)は、無色透明液体で、水に対しては 54.5 mg/ml, DMSOでは 50 mg/ml, アセトンでは 50 mg/ml で溶解し、融点-10℃以下、沸点87℃(5 mmHg)で、分子式 C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>, 分子量130.16, 純度 97.6 wt%(不純物としてエチレングリコールジメタクリレート 0.2-0.3%, ジエチレングリコールモノメタクリレート 2.0-2.5%, メトキノン(重合防止剤)50 ppmを含む)の物質である。

被験物質原体は、熱、光、過酸化物などによって重合が起こることがある。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用蒸留水(株)大塚製薬工場)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

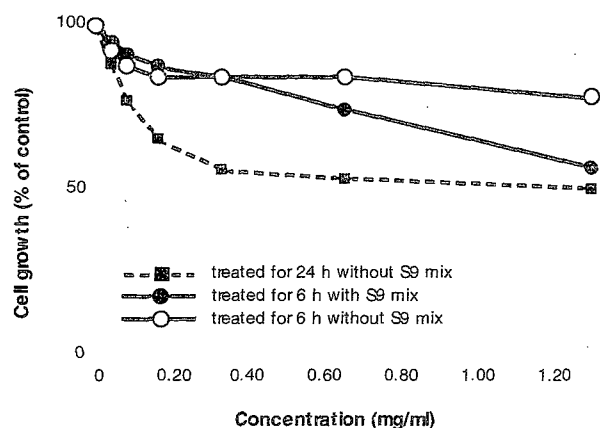


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-hydroxyethyl methacrylate

は、すべての試験において培養液の 10%(v/v) になるように加えた。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

#### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

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、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で 50% を明らかに越える増殖抑制作用は認められなかった (Fig. 1)。

#### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理ともに 1.3 mg/ml (10 mM) とし、連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では、公比 2 で 4 濃度を設定 (0.16, 0.33, 0.65, 1.3 mg/ml) し、短時間処理の S9 mix 非存在下では、公比 2 で 3 濃度設定した (0.33, 0.65, 1.3 mg/ml)。なお、連続処理の 48 時間処理群の濃度は、24 時間処理群と同じ濃度に設定した。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、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。

#### 8. 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 μg/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

シにつぎ 6 枚作製した。作製した標本を 3% ギムザ溶液で染色した。

#### 9. 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), 24 時間連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では 1.3 mg/ml (10 mM) が、48 時間連続処理においては 0.65 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 (MMS) 研究会<sup>1)</sup> による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、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。

#### 10. 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。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法<sup>2)</sup> (多重性を考慮して familywise の有意水準を 5% とした) により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、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>3)</sup> ( $p < 0.05$ ) を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

#### 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。メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルを加えて 24 時間連続処理した高濃度群 (1.3 mg/ml) では、細胞毒性のため染色体の構造異常および倍数性細胞について規定の細胞数が観察できなかったが、中濃度群 (0.65 mg/ml) および高濃度群 (1.3 mg/ml) において染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その頻度は 10.0% および 70.6% であった。一方、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。48 時間連続処理したすべての処理群において、染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その頻度は 6.0 ~ 84.0% であった。また、高濃度群 (0.65 mg/ml) において、観察した細胞の 3.25% に倍数性細胞が認められ、傾向性検定の結果、有意差が認められた。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルを加えて S9 mix 非存在下における短時間処理では、いずれの処理群でも染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。一方、低濃度群 (0.33 mg/ml) および高濃度群 (1.3 mg/ml) において観察した細胞の 0.88% および 6.13% に倍数性細胞が誘発され、傾向性検定の結果、有意差が認められた。

S9 mix 存在下では、高濃度群 (1.3 mg/ml) において観察した細胞の 13.0% に染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発された。また、中濃度群 (0.65 mg/ml) において観察した細胞の 1.25% に倍数性細胞の誘発作用が認められたが、傾向性検定では有意差は認められなかった。

従って、メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは、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。

#### 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.
- 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.
- 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.

#### 連絡先

試験責任者: 田中憲穂  
 試験担当者: 山影康次, 日下部博一, 水谷正寛,  
 澁谷 徹, 橋本恵子, 出石由紀  
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
 〒257 神奈川県秦野市落合 729-5  
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

#### Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)  
 Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,  
 Masahiro Mizutani, Tohru Shibuya,  
 Keiko Hashimoto, Yuki Izushi  
 Hatano Research Institute, Food and Drug  
 Safety Center  
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan  
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2- hydroxyethyl methacrylate (HEMA)\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells			Concurrent <sup>6)</sup> cytotoxicity (%)	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		with aberrations TAG (%)	Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup> SA NA		
Control			200	1	0	0	0	0	0	0	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.50		-
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.75		100.0
HEMA	0.33	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.25		70.0
HEMA	0.65	24	200	14	8	1	0	0	0	23	0	20*(10.0)	8 ( 4.0)	0.63	+	NT
HEMA	1.3	24	177	40	228	34	1	0	110	413	2	125*(70.6)	112 (63.3)	0.28 <sup>7)</sup>		46.5
MC	0.00005	24	200	8	70	145	2	1	0	226	0	113 (56.5)	112 (56.0)	0.38		-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.50		100.0
HEMA	0.16	48	200	6	4	0	2	0	0	12	0	12*( 6.0)	6 ( 3.0)	0.50		59.5
HEMA	0.33	48	200	15	5	1	2	0	0	23	0	20*(10.0)	7 ( 3.5)	0.63	+	+
HEMA	0.65	48	200	102	329	51	6	1	120	609	1	168*(84.0)	153 (76.5)	3.25*		79.0
HEMA	1.3***	48	-											-		0.0
MC	0.00005	48	200	5	51	118	10	4	30	218	0	93 (46.5)	92 (46.0)	1.38		-

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, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at p<0.05. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7)Seven hundred and two cells were analysed. \*:Significantly different from historical solvent control data (p<0.05) by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\*:Purity of test substance was 97.6 wt%. Ethylene glycol dimethacrylate (0.2 - 0.3%), diethylene glycol monomethacrylate (2.0 - 2.5%) and methoquinone (50 ppm) were contained as impurities. \*\*\*:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2- hydroxyethyl methacrylate (HEMA)\*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells			Concurrent <sup>6)</sup> cytotoxicity (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		with aberrations TAG (%)	Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup> SA NA		
Control				200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	1 ( 0.5)	0.38		-
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.50		100.0
HEMA	0.33	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.88*		84.0
HEMA	0.65	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.50	NT	+
HEMA	1.3	-	6-(18)	200	1	0	2	0	0	0	3	0	3 ( 1.5)	2 ( 1.0)	6.13*		86.5
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.50		-
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.50		100.0
HEMA	0.33	+	6-(18)	200	0	2	1	2	0	0	5	0	4 ( 2.0)	4 ( 2.0)	0.88		80.0
HEMA	0.65	+	6-(18)	200	1	2	5	0	0	0	8	0	6 ( 3.0)	5 ( 2.5)	1.25*	+	-
HEMA	1.3	+	6-(18)	200	4	11	16	0	0	0	31	0	26*(13.0)	22 (11.0)	0.88		58.0
CPA	0.005	+	6-(18)	200	13	43	90	1	1	0	148	0	83 (41.5)	77 (38.5)	0.50		-

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, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at p<0.05. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. \*:Significantly different from historical solvent control data at p<0.05 by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\*:Purity of test substance was 97.6 wt%. Ethylene glycol dimethacrylate (0.2 - 0.3%), diethylene glycol monomethacrylate (2.0 - 2.5%) and methoquinone (50 ppm) were contained as impurities.

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの  
ラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of  
2-Hydroxyethyl methacrylate by Oral Administration in Rats

要約

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する反復投与による一般毒性学的な影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検討した。投与量は、1000 mg/kg を最高用量とし、以下 300, 100 および 30 mg/kg とした。対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。

1. 反復投与毒性

雄においては、一般状態では 1000 mg/kg 群で流涎がみられ、1/12 例が死亡した。体重は、1000 mg/kg 群で増加抑制がみられた。摂餌量は、1000 mg/kg 群で減少がみられた。血液学検査では、各投与群とも各検査項目に投与による変動はみられなかった。血液生化学検査では、30 mg/kg 以上の群で尿素窒素の高値あるいはその傾向、1000 mg/kg 群で K, Cl および無機リンの高値およびトリグリセライドの低値がみられた。剖検では、各投与群とも、投与による影響はみられなかった。死亡例では、胸腺および肺の暗赤色化、副腎の肥大がみられた。器官重量では、100 mg/kg 以上の群で腎臓の相対重量の高値、1000 mg/kg 群で肝臓の相対重量の高値がみられた。病理組織学検査では、1000 mg/kg 群で腎臓に尿細管拡張および集合管拡張がみられた。しかし、死亡例においては投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

雌においては、一般状態では 1000 mg/kg 群で流涎、自発運動の低下、腹臥、流涙、被毛の汚れ、表皮温下降および呼吸緩徐がみられ、6/12 例が死亡した。体重は、1000 mg/kg 群で交配前投与期間に増加抑制がみられた。摂餌量は、1000 mg/kg 群で交配前投与期間に減少がみられた。剖検所見では、1000 mg/kg 群で胸腺の萎縮および副腎の肥大がみられた。死亡例では、胸腺の萎縮、肺の暗赤色化、脾臓の萎縮、副腎の肥大、腺胃粘膜の暗赤色化および小腸の暗赤色化がみられた。器官重量では、100 mg/kg 以上の群で腎臓の絶対重量の高値あるいはその傾向、1000 mg/kg 群で腎臓の絶対・相対重量の高値がみられた。病理組織学検査では、1000 mg/kg 群で腎臓に髄質および乳頭部への好中球浸潤、脳に延髄の広範な軟化がみられた。死亡例においては、脾臓の萎縮、副腎の束状帯の過形成など死戦期のストレスに起因すると思われる変化がみられた。

2. 生殖発生毒性

発情回数、交尾率、交尾日数、受胎雌数、妊娠期間および受胎率では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。また、分娩状態にも異常はみられなかった。黄体数、着床痕数、着床率および出産率では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。

総出産児数、分娩率、哺育0日の新生児数、児の産出率、死産児数、出生率、性比、哺育4日の新生児数、哺育4日の生存率では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。外表観察では、いずれの群においても異常はみられなかった。体重では、各投与群の雌雄とも哺育0日および哺育4日とも対照群との間に差はみられなかった。一般状態では、対照群および各投与群とも異常症状はみられなかった。また、剖検では、いずれの群においても異常はみられなかった。

以上のことから、当該試験条件下におけるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの一般毒性学的無影響量は、雄では 30 mg/kg 投与により尿素窒素の高値が認められたことから 30 mg/kg/day 未満、雌では 100 mg/kg 投与により腎臓の相対重量の高値が認められたことから 30 mg/kg/day と考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、いずれの項目にも影響が認められなかったことから雌雄の生殖および児動物の発生とも 1000 mg/kg/day と推察される。

方法

1. 被験物質、媒体および投与検体

被験物質のメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは、分子量:130.16、融点:-10℃以下、沸点:87℃の無色透明の液体であり、水およびアセトンにきわめて溶けやすい(Lot No. 5P05LA、製造元:(株)日本触媒、純度:97.6%、ただし、不純物としてエチレングリコールジメタクリレート を 0.2~0.3%、ジエチレングリコールモノメタクリレート を 2.0~2.5% 含有)。入手後は、冷蔵・遮光・気密条件下で保管した。なお、投与期間終了後に被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、使用期間中の安定性が確認された。

被験物質は、注射用水に溶解して調製した。なお、2, 20 および 200 mg/ml の調製液は、調製後冷蔵・遮光条件下で7日間、さらに室温・遮光条件下で4時間保存しても安定性に問題のないことが確認されていたため、各濃度の調製液は調製後、冷蔵・遮光条件下で保管し、調製後7日以内に使用した。被験物質は純度による換算を

行って調製した。

## 2. 使用動物および飼育条件

8週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット [Crj:CD(SD), (SPF)] を日本チャールス・リバー(株)から購入した。入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後7日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物を群分けして試験に用いた。群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与開始日に行った。1群の動物数は、雌雄各12匹とした。

動物は、室温20～24℃、湿度40～70%、明暗各12時間(照明:午前6時～午後6時)、換気回数12回/時に設定した飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージを用いて1ケージあたり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージを用いて個別飼育した。ただし、交配はステンレス製懸垂式ケージ内で行った。また、母動物は、妊娠18日にオートクレーブ処理した床敷(サンフレック、日本チャールス・リバー(株))を入れたプラスチック製ケージに個別に移し、自然分娩および哺育をさせた。飼料は固型飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業(株))を、飲料水は水道水をいずれも自由に摂取させた。なお、剖検前日の午後4時から絶食とした。

## 3. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

投与経路は経口投与を選択した。投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたプラスチック製ディスプレイ注射筒を用いて、強制経口投与した。投与量は、雄では投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を、妊娠期間中は妊娠0、7、14および21日の体重を、授乳期間中は哺育0日の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。投与回数は1日1回とした。投与開始日の週齢は雌雄とも10週齢であり、体重範囲は雄が341～380 g、雌が232～256 gであった。

投与量は、先に実施した雄ラットを用いた2週間経口投与による予備試験(投与段階:0, 30, 100, 300 および1000 mg/kg、各群5例)の結果により決定した。すなわち、1000 mg/kg群で投与直後に流涎がみられたのみで、各群とも死亡発現はなく、体重推移および剖検でも異常は認められなかった。そこで、当試験の投与量は、1000 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3で300, 100 および30 mg/kgとした。また、対照として被験物質と同一容量の媒体(注射用水)を投与する群を設けた。

## 4. 観察および検査項目

### 1) 雄

#### (1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回観察した。なお、死亡例は、発見後速やかに剖検し、異

常の認められた器官・組織を10%中性緩衝ホルマリン液に固定後、H-E染色組織標本を作製し、病理組織学的に検査した。

### (2) 体重測定

体重は、1週間に2回測定した。

### (3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間および交配期間終了後から毎週2回測定した。

### (4) 血液学検査

投与期間終了の翌日に、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から血液を採取し、以下の検査を実施した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数および白血球数(WBC)は、EDTA-2KコーティングしたSysmexサンプルカップに採取した血液について、多項目自動血球計数装置(Sysmex E-2000、東亜医用電子(株))を用いて測定した。さらに、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)および平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

網状赤血球数(RET)は、EDTA-2K処理した血液をBrecher法により超生体染色してスライドガラスに塗抹後、Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で赤血球1000個中の数を計数した。

白血球百分率は、EDTA-2K処理した血液をスライドガラスに塗抹し、May-Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で白血球100個を分類計数した。

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)およびフィブリノーゲン濃度は、3.13%クエン酸ナトリウムで処理した血漿について、散乱光検出方式により血液凝固分析装置(コアグマスターII、三共(株))を用いて測定した。

### (5) 血液生化学検査

血液学的検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液を遠心分離し、得られた血清について、以下の検査を実施した。

GOTおよびGPTはHenry変法、ALPはp-NPP基質法、γ-GTPはγ-G-P-NA基質法、総蛋白はBiuret法、総ビリルビンはAzobilirubin法、尿素窒素(BUN)はUrease-GIDH法、クレアチニンはJaffé法、ブドウ糖はGlucose dehydrogenase法、総コレステロールはCOD-DAOS法、トリグリセライドはGPO-DAOS法、Caはo-CPC法、無機リンはMolybdenum blue法により、自動分析装置(AU 500、オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

NaおよびKはイオン選択電極法により、Clは電量滴定法により、いずれも全自動電解質分析装置(EA04、株A&T)を用いて測定した。

蛋白分画は、電気泳動法により自動電気泳動装置(AES 600、オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

アルブミン量は総蛋白量および蛋白分画値から、A/G比は蛋白分画値から算出した。

### (6) 剖検

上記の(4)および(5)の項で採血した動物をさらに放血致死させた後に器官・組織の肉眼的観察を行った。胸

腺、肝臓、腎臓、精巣および精巣上体は摘出後に重量を測定し、副腎、脳、心臓および脾臓とともに10%中性緩衝ホルマリン液(ただし、精巣および精巣上体はブアン液)に固定した。

#### (7) 病理組織学検査

摘出した器官・組織について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。対照群および1000 mg/kg群の心臓、肝臓、脾臓、胸腺、腎臓、精巣、精巣上体、副腎および脳についてH-E染色組織標本を作製し、病理組織学的に検査した。1000 mg/kg群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた腎臓は30、100および300 mg/kg群についても同様に検査した。

## 2) 雌

### (1) 一般状態および死亡の有無

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回観察した。なお、死亡例は、発見後速やかに剖検し、卵巣、子宮および異常の認められた器官・組織を10%中性緩衝ホルマリン液に固定後、H-E染色組織標本を作製し、病理組織学的に検査した。

### (2) 性周期

性周期は、投与開始日から交尾確認日まで毎日1回観察した。なお、発情期が連続2日間にわたって観察された場合は1回と計数した。

### (3) 体重測定

体重は、交配開始前14日間および交配期間中には毎週2回、妊娠期間中には妊娠0、7、14および21日に、哺育期間には哺育0および4日にそれぞれ測定した。

### (4) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間までは毎週2回測定した。また、妊娠期間中は妊娠2、9、16および21日に、哺育期間中は哺育4日に測定した。

### (5) 交尾不成立雌の剖検

交尾不成立雌は、交配期間終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床の有無により妊娠の成否を確認した。

### (6) 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ、分娩状態の異常の有無、分娩終了の確認を妊娠21日から妊娠25日の午前10時まで毎日行った。午前10時に分娩が終了していた場合、その日を哺育0日とした。

### (7) 妊娠25日までに分娩しなかった雌の剖検

妊娠25日までに分娩しなかった雌は、エーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床の有無により妊娠の成否を確認した。

### (8) 哺育状態の観察および剖検

母動物は、哺育状態を哺育4日まで毎日観察し、哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床痕数および黄体数を数えた。肝臓、腎臓、胸腺および卵巣は摘出後に重量を測定し、副腎、脳、心臓および脾臓とともに10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

### (9) 病理組織学検査

摘出した器官・組織について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。対照群および1000 mg/kg群の心臓、肝臓、脾臓、胸腺、腎臓、卵巣、副腎および脳についてH-E染色組織標本を作製し、病理組織学的に検査した。1000 mg/kg群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた脳ならびに1000 mg/kg群の死亡例で変化のみられた副腎は30、100および300 mg/kg群についても同様に検査した。

## 3) 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

14日間にわたって投与された雌雄は、同一群内で1対1に組み合わせて同居交配した。交配期間は14日を限度として、交尾を確認するまでの連続同居交配とした。

交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い、膣垢内に精子または陰栓を確認した雌を交尾成立動物として、その日を妊娠0日として起算した。

## 4) 新生児

### (1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。

### (2) 新生児の観察

新生児は、一般状態および死亡の有無を生存期間中毎日1回観察した。

### (3) 体重測定

体重は、哺育0日(出生日)および4日に測定した。

### (4) 剖検

新生児は、哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

## 5. 統計解析

測定値の統計解析は下記の検定法を用い、有意差検定は対照群と各投与群との間で行った。いずれの検定においても、危険率5%未満を有意とした。新生児は一腹の平均を一単位として検定した。

体重(親動物、新生児)、摂餌量、発情回数、交尾日数、妊娠期間[分娩日(哺育0日)-交尾確認日]、着床痕数、総出産児数(新生児数+死産児数)、新生児数、死産児数、分娩率 $[(\text{総出産児数}/\text{着床痕数}) \times 100]$ 、児の産出率 $[(\text{哺育0日の新生児数}/\text{着床痕数}) \times 100]$ 、黄体数、着床率 $[(\text{着床痕数}/\text{黄体数}) \times 100]$ 、出生率 $[(\text{哺育0日の新生児数}/\text{総出産児数}) \times 100]$ 、哺育4日の新生児数、哺育4日の生存率 $[(\text{哺育4日の新生児数}/\text{哺育0日の新生児数}) \times 100]$ 、外表異常出現率 $[(\text{外表異常児数}/\text{新生児数}) \times 100]$ 、性比(雄/雌)、器官重量(相対重量を含む)、血液学検査成績、血液生化学検査成績については、各群で平均値および標準偏差を算出した。有意差検定は、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散ならば一元配置法による分散分析<sup>2)</sup>を行い、有意ならばDunnnett法<sup>2)</sup>を用いて行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定<sup>3)</sup>)を行い、有意ならば順

位を利用したDunnett型の検定法を用いて行った。

交尾率 [(交尾成立動物数/同居動物数)×100]、受胎率 [(受胎雌数/交尾成立動物数)×100]、出産率 [(新生児出産雌数/受胎雌数)×100] は、 $\chi^2$ 検定を用いた。

なお、病理組織学検査において、1000 mg/kg群で毒性学的影響が示唆され他の用量群についても検査を実施した器官・組織の所見については、上記の順位を利用したDunnett型の検定法を用いて行った。そこで有意差が認められた所見については、Cochran・Armitageの傾向検定を用いて用量反応性の検定を実施した。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 雄に及ぼす影響

##### (1) 一般状態

死亡は、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では認められなかった。1000 mg/kg群では、投与 20 日に1例が死亡したが、前日まで流涎の他には異常はみられなかった。

生存例の一般状態観察において、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では観察期間を通していずれの動物とも異常はみられなかった。1000 mg/kg群では、流涎が投与3日から投与後約1分～約30分の間にみられた。

##### (2) 体重推移 (Fig.1)

30、100 および 300 mg/kg群の体重は、対照群とほぼ同様の推移であり、いずれの測定日にも有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与 18～25 および 32～50 日に体重の有意な低値がみられた。

##### (3) 摂餌量 (Fig.2)

30 および 300 mg/kg群の摂餌量は、対照群とほぼ同程度であり、いずれの測定日にも有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて投与 31 日に摂餌量の有意な低値がみられたが、投与量に依存したものでなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与 13、31、38～45 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

##### (4) 血液学検査 (Table 1)

各投与群とも、対照群と比べていずれの測定項目にも有意差はみられなかった。

##### (5) 血液生化学検査 (Table 2)

30 および 300 mg/kg群では、対照群と比べて尿素窒素の有意な高値がみられた。100 mg/kg群では、対照群と比べて有意差はないが尿素窒素の高値傾向がみられた。1000 mg/kg群では、対照群と比べて尿素窒素、K、Cl および無機リンの有意な高値、トリグリセライドの有意な低値がみられた。

##### (6) 剖検

生存例の剖検において、対照群では片側性の精巣上体の尾部に黄白色結節が1例にみられた。30 および 100 mg/kg群では、いずれにも異常はみられなかった。300 mg/kg群では、片側性の腎臓に白色斑が1例、両側性の

精巣の萎縮と軟化が1例にみられた。1000 mg/kg群では、胸腺の暗赤色化が1例、両側性の腎臓の肥大が1例にみられた。しかし、これらの変化は、いずれも少数例であり、投与によるものではないと判断した。

1000 mg/kg投与群の死亡例の剖検において、肺・胸腺の暗赤色化および両側性の副腎の肥大がみられた。

##### (7) 器官重量 (Table 3)

30 mg/kg群では、対照群と比べていずれの器官重量にも有意差はみられなかった。100 および 300 mg/kg群では、対照群と比べて腎臓の相対重量の有意な高値がみられた。

1000 mg/kg投与群では、対照群と比べて肝臓および腎臓の相対重量の有意な高値がみられた。

##### (8) 病理組織学検査 (Table 4)

生存例では、腎臓において尿細管拡張が 1000 mg/kg群で3例、集合管拡張が 1000 mg/kg群で2例にみられたが、それらの程度はいずれもごく軽度であった。なお、尿細管拡張は 1000 mg/kg群で対照群と比べて用量相関性はないものの有意差が認められ、集合管拡張は有意差はないものの増加傾向にあった。

その他には、胸腺の出血、心臓の小肉芽腫、肝臓の小肉芽腫および小葉中心性の肝細胞空胞変性、腎臓の尿細管好塩基性化、近位尿細管内の好酸性小体、嚢胞、びまん性鉍質沈着および好中球浸潤がみられたが、対照群でも同程度にみられているか、あるいは少数例であることから、偶発的变化と判断した。なお、脾臓、副腎、精巣および脳では対照群および 1000 mg/kg群とも異常はみられなかった。

1000 mg/kg群の死亡例では、胸腺の出血、肺の浮腫、胸腺・肺・副腎の自己融解がみられたが、それらの程度はいずれもごく軽度～軽度であった。なお、剖検で異常の認められた副腎には肥大を示唆する変化はみられなかった。

### 2) 雌に及ぼす影響

#### (1) 一般状態

死亡は、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では認められなかった。1000 mg/kg群では、投与6日に3例、投与9日に1例、投与12日に1例と投与17日に1例の計6例が死亡した。死亡例では、流涎が投与3日から投与後約1分～約30分の間にみられ、自発運動の低下、呼吸緩徐、腹臥、被毛の汚れ、表皮温下降、流涎あるいは削瘦が死亡する1～9日前から多くの例で認められた。

生存例の一般状態観察において、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では観察期間を通していずれの動物とも異常はみられなかった。1000 mg/kg群では、流涎が投与3日から投与後約1分～約30分の間にみられ、また、1例では自発運動の低下、腹臥、被毛の汚れ、表皮温下降、削瘦も認められた。

#### (2) 体重推移 (Fig.3)

交配開始前では、30、100 および 300 mg/kg群の体重は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与4および



8日に体重の有意な低値がみられた。なお、1000 mg/kg群の死亡例では、死亡前に急激な体重減少がみられた。

妊娠期間中では、30, 300 および 1000 mg/kg群の体重は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠 21 日に体重の有意な高値がみられたが、投与量に依存したものでなかった。

哺育期間中では、30 および 100 mg/kg群の体重は対照群と比べて哺育4日に体重の有意な高値がみられたが、投与量に依存したものでなかった。300 および 1000 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

### (3) 摂餌量 (Fig.4)

交配開始前では、30, 100 および 300 mg/kg群の摂餌量は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与3, 6 および 13 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

妊娠期間中では、30 および 300 mg/kg群の摂餌量は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。なお、100 および 1000 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠 16 日に摂餌量の有意な高値がみられたが、一過性の変化であり、投与によるものではないと判断した。

哺育期間中では、各投与群とも対照群と比べて摂餌量に有意差はみられなかった。

### (4) 剖検

生存例の剖検において、対照群, 30, 100 および 300 mg/kg群では異常はみられなかった。1000 mg/kg群では、胸腺の萎縮と両側性の副腎の肥大が1例にみられた。

1000 mg/kg群の死亡例の剖検において、胸腺の萎縮が1例、肺の暗赤色化が1例、脾臓の萎縮が6例、両側性の副腎の肥大が6例、腺胃粘膜の暗赤色化が3例、小腸の暗赤色化が2例にみられた。

### (5) 器官重量 (Table 5)

30 mg/kg群では、対照群と比べていずれの器官重量にも有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて腎臓の絶対重量の有意な高値がみられた。300 mg/kg群では、対照群と比べて有意差はないが、腎臓の絶対重量の高値傾向がみられた。1000 mg/kg群では、対照群と比べて腎臓の絶対・相対重量の有意な高値がみられた。

### (6) 病理組織学検査 (Table 6)

生存例では、腎臓において髄質および乳頭部への好中球浸潤(片側性)が1000 mg/kg群で1例にみられたが、その程度は軽度であった。脳において、延髄の広範軟化が1000 mg/kg群で1例にみられたが、その程度は軽度であった。

その他、胸腺の萎縮および出血、脾臓の髄外造血亢進、副腎の束状帯広範壊死、束状帯巣状類洞拡張、束状帯巣状空胞変性および束状帯肥大がみられたが、いずれも少数例であることから、偶発的变化と判断した。

なお、心臓、肝臓および卵巣では対照群および 1000

mg/kg群とも異常はみられなかった。また、剖検で異常の認められた 1000 mg/kg群の1例の副腎の肥大と脾臓の萎縮を示唆する変化はみられなかった。

1000 mg/kg投与群の死亡例6例において、肺に浮腫が1例、胸腺に萎縮が1例、脾臓に萎縮が5例と白脾髄の萎縮が1例、副腎に束状帯の過形成が3例と自己融解が1例、腺胃粘膜のびらんが1例と自己融解が1例、小腸粘膜にびらんが1例にみられた。なお、それらの程度は、胸腺の萎縮および白脾髄の萎縮が中等度であったが、その他の所見はいずれもごく軽度～軽度であった。また、剖検で異常の認められた 1000 mg/kg群の2例の副腎の肥大、2例の腺胃粘膜の暗赤色化、1例の小腸の暗赤色化を示唆する変化はみられなかった。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 親動物の生殖発生に及ぼす影響

#### (1) 発情回数、交尾率および受胎率 (Table 7)

交配前の投与期間(14日間)の発情回数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

対照群と 1000 mg/kg投与群の各1組を除いた全例で交尾が確認された。また、1000 mg/kg群の1組で雌が交配期間中に死亡した。交尾日数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。また、交尾率にも、各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。不受胎雌は、30 および 300 mg/kg投与群で各1例みられたが、受胎率には各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。なお、受胎雌の全例が新生児を分娩した。

#### (2) 妊娠期間、分娩状態、黄体数、着床率および出産率 (Table 8)

妊娠期間は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。また、いずれの動物とも分娩状態に異常はみられなかった。

黄体数、着床痕数および着床率は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

出産率は、対照群、各投与群とも 100 %であった。

### 2) 新生児に及ぼす影響

#### (1) 分娩率、出生率および生存率 (Table 8)

総出産児数および分娩率は、各投与群とも対照群の間に有意差はみられなかった。

哺育0日の新生児数、死産児数、出生率、児の産出率および性比は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

新生児の一般状態では、いずれの群とも異常症状は観察されなかった。

哺育4日の新生児数および哺育4日の生存率は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

新生児の外表異常の観察では、いずれの群とも異常はみられなかった。

#### (2) 新生児の体重 (Table 8)

各投与群の体重は、哺育0日および4日とも雌雄とも対照群との間に有意差はみられなかった。

## (3) 新生児の剖検

対照群, 各投与群とも, いずれにも異常はみられなかった。

## 考察

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。投与量は, 1000 mg/kg を最高用量とし, 以下 300, 100 および 30 mg/kg とした。なお, 対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。

雄動物に対して, 1000 mg/kg 群で 1 例が死亡した。死亡例の剖検, 異常の観察された器官・組織の病理組織学検査において, 死後変化に基づくと考えられる所見の他には, 特筆すべき変化は認められず, 死因は明らかにできなかった。一般状態観察において, 1000 mg/kg 群では投与期間の初期から投与直後に流涎がみられたが, 持続時間は約 30 分間であり, 投与を継続しても持続時間の延長は認められなかった。この流涎は, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの刺激性に基づく変化と考えられる。また, 1000 mg/kg 群では, 摂餌量の減少と関連した体重の増加抑制がみられた。30 mg/kg 以上の群の尿素窒素の増加, 100 mg/kg 以上の群の腎臓の相対重量の増加, 1000 mg/kg 群の K, Cl, 無機リンの増加, 腎臓の病理組織学検査における尿細管拡張, 集合管拡張などは腎機能の低下を示唆する変化と考えられる。しかし, 尿素窒素, K, Cl, 無機リンの増加は軽度であり, 腎臓の組織学的所見も発生頻度が低く, 程度も軽微であった。1000 mg/kg 群では, 肝臓の相対重量の有意な高値, 血液生化学検査においてトリグリセライドの低値が認められたが, 肝臓の絶対重量には差がみられないこと, 肝臓の病理組織学検査でも異常がみられないことから, 肝臓の相対重量の高値とトリグリセライドの低値は摂餌量の減少に伴う変化と考えられ, 毒性学的に重篤なものではないと判断した。なお, 血液学検査においては, 1000 mg/kg 群でも各検査項目に異常は認められなかった。

雌動物に対して, 1000 mg/kg 群で 6 例が死亡した。死亡例では, 急激な体重減少, 摂餌量の減少がみられ, 剖検において肺の暗赤色化, 胸腺の萎縮, 脾臓の萎縮, 副腎の肥大, 腺胃粘膜および小腸の暗赤色化が認められた。死亡例で異常の観察された器官・組織の病理組織学検査において肺の浮腫, 胸腺の萎縮, 脾臓の萎縮, 副腎束状帯の過形成, 腺胃粘膜および小腸粘膜のびらんがみられたが, これらの変化は死戦期のストレスに起因するものと考えられる。一般状態観察においては, 雄の場合と同様に 1000 mg/kg 群で流涎がみられた。その他には自発運動の低下, 腹臥, 流涎, 被毛の汚れ, 表皮温下降, 呼吸緩徐が死亡例の多くにみられた。1000 mg/kg 群では, 雄と同様に摂餌量の減少と関連した体重の増加抑制が交配前投与期間にみられた。器官重量では, 100 mg/kg 以上の群で腎臓の絶対重量の高値あるいは高値傾向, 1000 mg/kg 群で腎臓の相対重量の高値がみられた。また,

1000 mg/kg 群において, 腎臓に髄質および乳頭部への好中球浸潤, 脳に延髄の広範軟化巣が認められ, 1 例のみの変化であるが, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの投与により生じた可能性を否定できない。

したがって, 当試験条件下におけるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの一般毒性学的無影響量は, 雄で 30 mg/kg/day 未満, 雌で 30 mg/kg/day と考えられる。

親動物の生殖発生に対しては, 発情回数, 交尾率, 交尾日数, 受胎率および受胎雌数には, 各投与群とも影響はみられなかった。また, 各投与群とも妊娠期間, 分娩状態, 黄体数, 着床痕数, 着床率および出産率にも影響はみられなかった。

新生児に対しては, 各投与群で総出産児数, 分娩率, 死産児数, 哺育 0 日の新生児数, 出生率, 児の産出率, 性比には影響はみられなかった。外表観察では, いずれの群とも異常はみられなかった。また, 一般状態, 哺育 4 日の新生児数, 生存率, 体重, 剖検にも影響はみられなかった。

したがって, 当試験条件下におけるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの生殖発生毒性学的な無影響量は, 雌雄の生殖および児動物の発生に関していずれも 1000 mg/kg/day と推察される。

以上のように, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの一般毒性学的無影響量は, 雄では 30 mg/kg 投与により尿素窒素の高値が認められたことから 30 mg/kg/day 未満, 雌では 100 mg/kg 投与により腎臓の相対重量の高値が認められたことから 30 mg/kg/day と考えられる。また, 生殖発生毒性学的な無影響量は, いずれの項目にも影響が認められなかったことから雌雄の生殖および児動物の発生とも 1000 mg/kg/day と推察される。なお, 筆者らは類似物質であるメタクリル酸(2-ヒドロキシプロピル)エステルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を先に実施したが, その一般毒性学的無影響量は雌雄とも 300 mg/kg/day であり<sup>4)</sup>, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの方が毒性は強いと考えられる。

## 文献

- 1) 佐久間昭, “薬効評価-計画と解析 I, II,” 東大出版会, 東京, 1977, 1981.
- 2) C.W. Dunnett, *Biometrics*, 20, 482(1964).
- 3) W.H. Kruskal, W.A. Wallis, *J. Amer. Statist. Assoc.*, 47, 583(1952).
- 4) 古橋忠和ほか, 化学物質毒性試験報告, 4, 569(1996).

連絡先

試験責任者：古橋忠和  
試験担当者：長瀬孝彦，藤村高志，内藤一嘉，  
牧野浩平，渡邊ゆかり，木村均  
(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所  
〒501-62 岐阜県羽島市福寿町間島6-104  
Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors: Tadakazu Furuhashi (Study director)  
Takahiko Nagase, Takashi Fujimura,  
Kazuyoshi Naitou, Kohei Makino,  
Yukari Watanabe and Hitoshi Kimura  
Nihon Bioresearch Inc. Hashima Laboratory  
6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu,  
501-62, Japan  
Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284

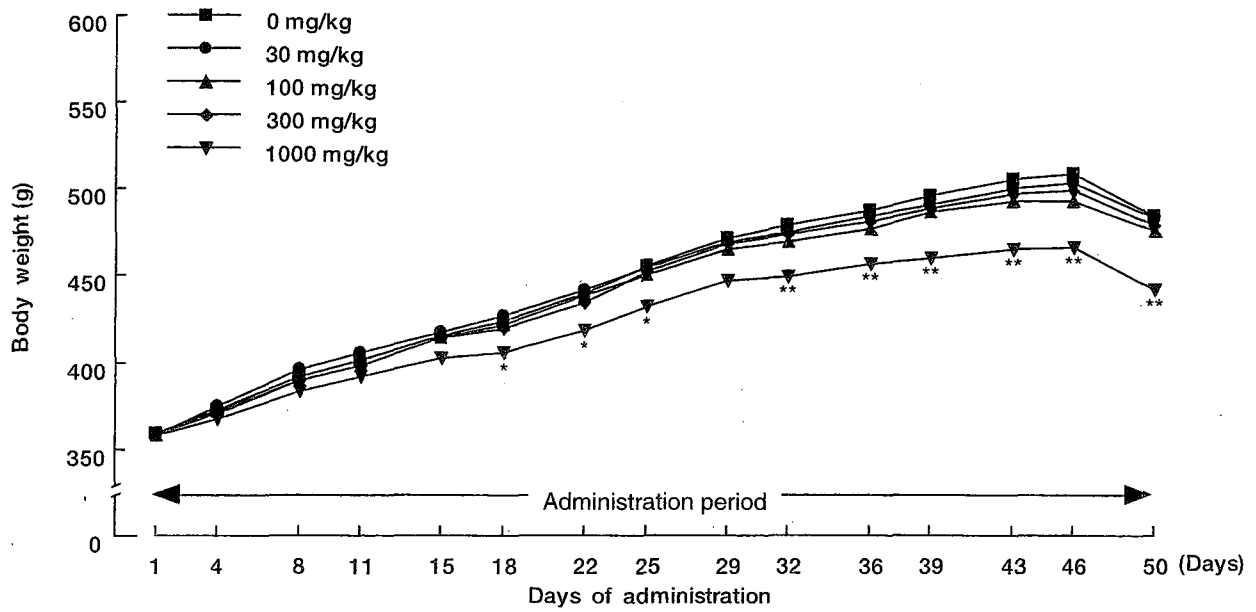


Fig. 1 Body weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration  
Significantly different from control (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

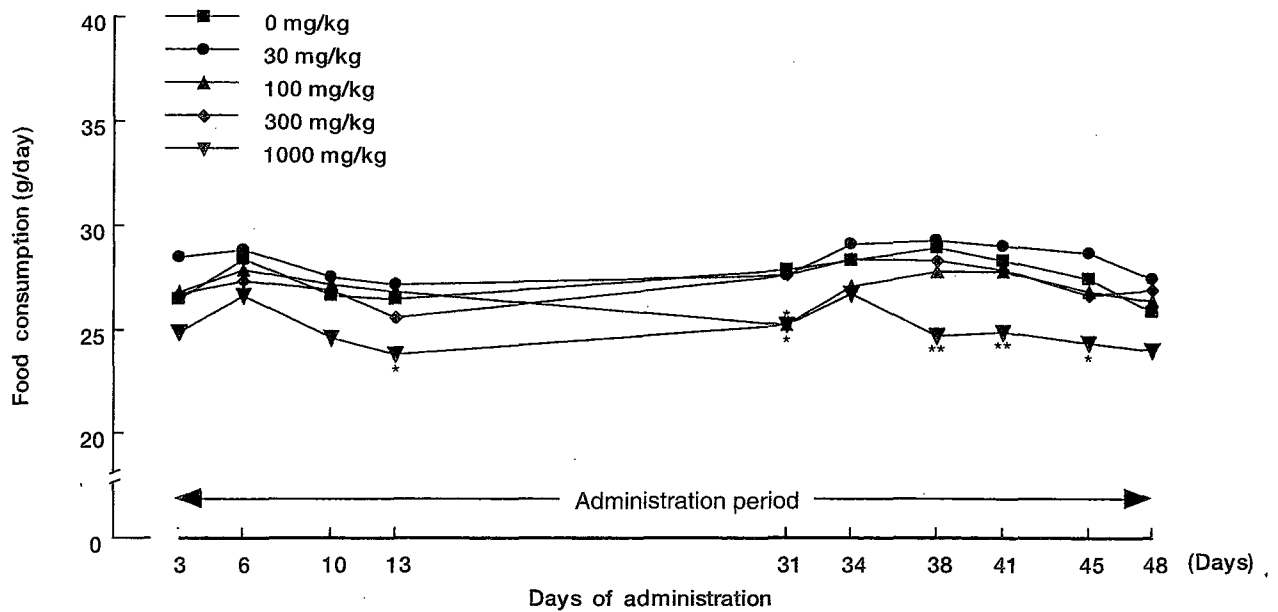


Fig. 2 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration  
Significantly different from control (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

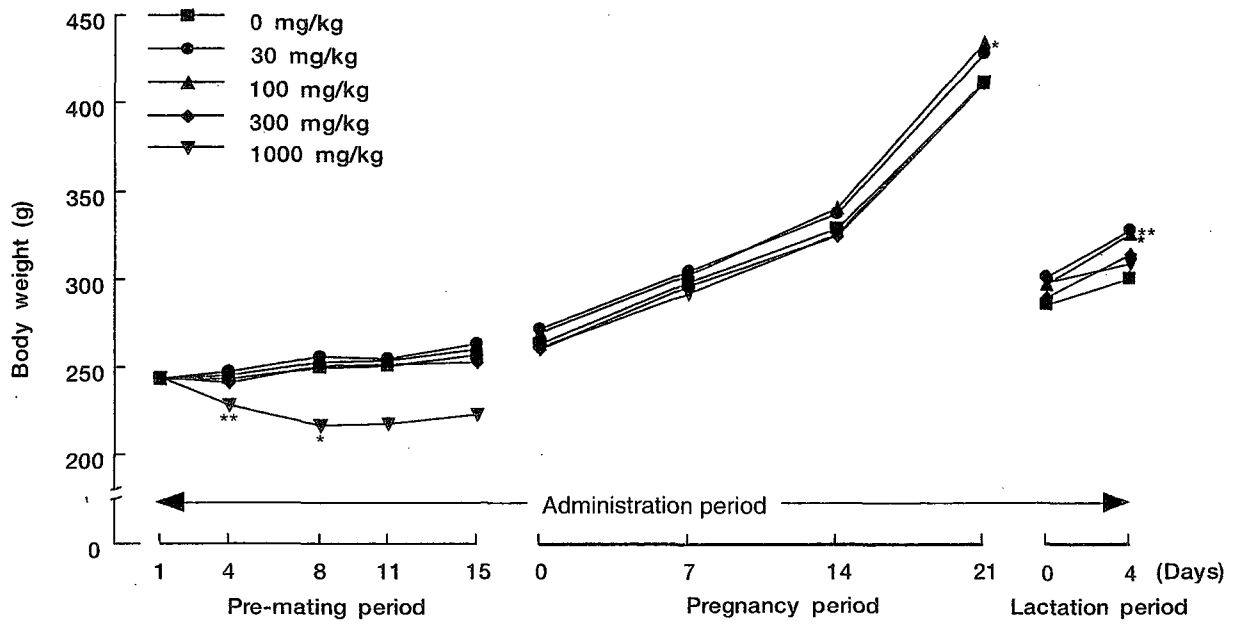


Fig. 3 Body weight of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration  
Significantly different from control (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

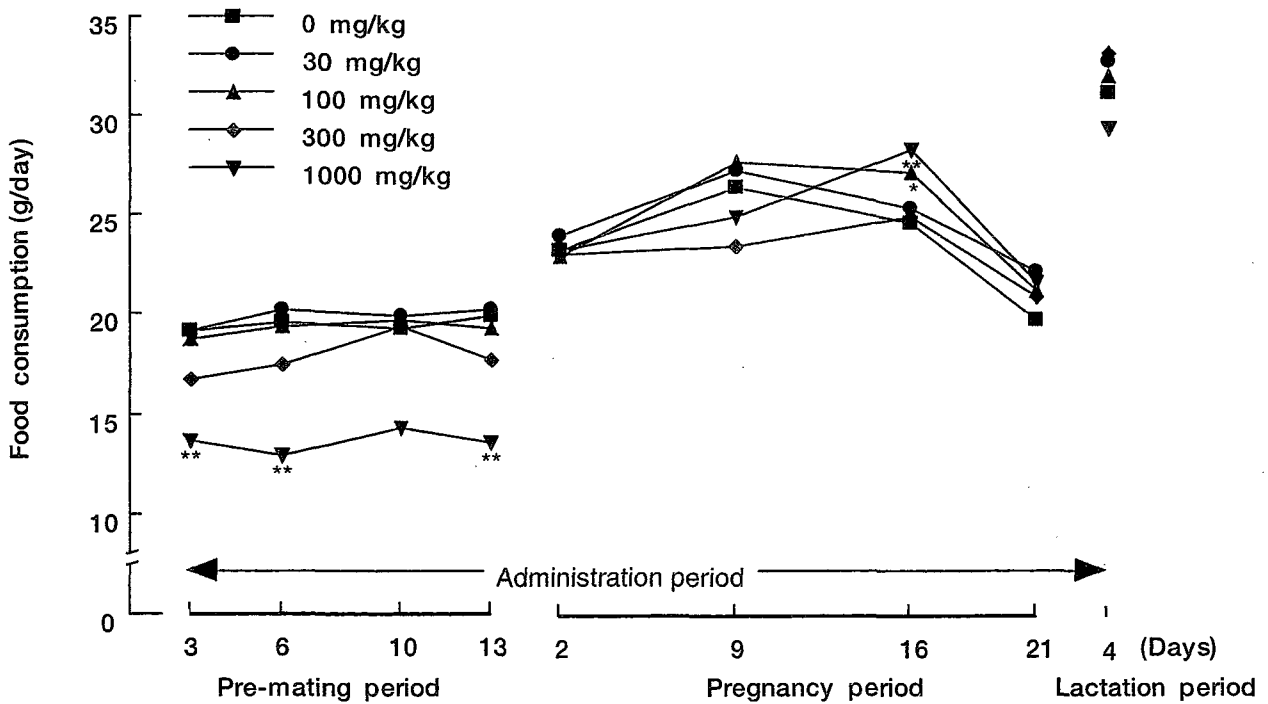


Fig. 4 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration  
Significantly different from control (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

Table 1 Hematological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	11
RBC ( $10^4/\text{mm}^3$ )	859.9 ± 32.2	874.3 ± 32.3	847.8 ± 46.8	851.7 ± 30.3	845.7 ± 62.4
Hemoglobin (g/dl)	15.43 ± 0.84	15.81 ± 0.68	15.63 ± 0.81	15.37 ± 0.67	15.42 ± 1.10
Hematocrit (%)	44.54 ± 1.66	45.52 ± 1.33	44.93 ± 1.44	44.64 ± 1.21	45.01 ± 2.72
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	51.80 ± 1.23	52.09 ± 1.89	53.09 ± 2.51	52.44 ± 1.35	53.28 ± 1.51
MCH (pg)	17.95 ± 0.63	18.08 ± 0.90	18.46 ± 1.10	18.06 ± 0.72	18.25 ± 0.56
MCHC (g/dl)	34.60 ± 0.90	34.73 ± 1.09	34.78 ± 1.08	34.42 ± 1.05	34.25 ± 0.90
Platelet ( $10^4/\text{mm}^3$ )	109.02 ± 12.78	115.20 ± 12.08	109.88 ± 12.66	107.55 ± 9.71	109.95 ± 14.15
Reticulocyte (%)	23.8 ± 5.2	24.8 ± 5.2	23.3 ± 6.3	24.2 ± 6.8	22.0 ± 3.5
PT (sec.)	16.91 ± 1.47	16.44 ± 1.24	15.96 ± 0.96	17.78 ± 2.16	16.80 ± 1.80
APTT (sec.)	31.99 ± 2.70	32.98 ± 5.59	30.23 ± 2.24	32.17 ± 2.31	31.03 ± 2.85
Fibrinogen (mg/dl)	253.8 ± 15.5	256.6 ± 20.6	254.9 ± 16.1	241.7 ± 12.3	258.3 ± 29.6
WBC ( $10^3/\text{mm}^3$ )	54.3 ± 10.0	53.1 ± 8.0	58.5 ± 14.6	53.6 ± 11.8	57.3 ± 10.7
Differential leukocyte (%)					
Lymphocyte	84.0 ± 6.9	84.9 ± 7.3	86.8 ± 6.9	84.3 ± 7.4	82.4 ± 11.9
Neutrophil	15.1 ± 6.7	13.8 ± 6.8	12.1 ± 6.3	14.6 ± 7.3	17.0 ± 12.1
Eosinophil	0.5 ± 0.8	0.8 ± 1.0	0.8 ± 0.9	0.8 ± 1.0	0.1 ± 0.3
Basophil	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Monocyte	0.4 ± 0.7	0.6 ± 0.5	0.3 ± 0.6	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.5

Each value shows mean ± S.D.

Table 2 Blood chemical examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	11
GOT (IU/l)	70.94 ± 12.29	68.81 ± 10.63	70.82 ± 10.88	66.21 ± 10.88	62.32 ± 12.26
GPT (IU/l)	21.38 ± 3.24	22.33 ± 3.15	21.38 ± 4.14	21.48 ± 2.20	21.06 ± 5.94
ALP (IU/l)	75.68 ± 11.70	79.52 ± 15.80	84.17 ± 18.07	71.48 ± 14.95	75.33 ± 28.16
$\gamma$ -GTP (IU/l)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
T-protein (g/dl)	5.62 ± 0.29	5.88 ± 0.27	5.74 ± 0.20	5.73 ± 0.24	5.54 ± 0.36
Albumin (g/dl)	2.892 ± 0.141	2.991 ± 0.164	2.912 ± 0.144	2.970 ± 0.135	2.873 ± 0.169
Protein fraction (%)					
Albumin	51.49 ± 1.34	50.90 ± 1.92	50.72 ± 1.46	51.81 ± 1.52	51.95 ± 2.40
$\alpha_1$ -globulin	22.78 ± 2.13	23.61 ± 1.68	23.21 ± 1.74	22.38 ± 2.50	22.44 ± 2.13
$\alpha_2$ -globulin	4.52 ± 0.97	4.98 ± 0.71	4.83 ± 0.67	4.64 ± 0.70	4.67 ± 0.96
$\alpha_3$ -globulin	5.60 ± 0.49	5.50 ± 0.22	5.54 ± 0.51	5.33 ± 0.26	5.20 ± 0.53
$\beta$ -globulin	12.25 ± 1.46	11.50 ± 0.77	11.77 ± 0.69	12.04 ± 0.85	12.11 ± 0.97
$\gamma$ -globulin	3.37 ± 0.79	3.51 ± 0.55	3.93 ± 1.03	3.81 ± 0.62	3.63 ± 0.76
A/G ratio	1.064 ± 0.057	1.039 ± 0.082	1.032 ± 0.062	1.076 ± 0.066	1.085 ± 0.101
T-bilirubin (mg/dl)	0.072 ± 0.006	0.075 ± 0.007	0.077 ± 0.011	0.076 ± 0.010	0.070 ± 0.012
BUN (mg/dl)	17.36 ± 2.04	19.97 ± 2.57*	19.42 ± 2.11	20.82 ± 2.07**	25.06 ± 4.57**
Creatinine (mg/dl)	0.535 ± 0.025	0.546 ± 0.051	0.538 ± 0.026	0.542 ± 0.056	0.544 ± 0.063
Glucose (mg/dl)	125.26 ± 10.06	125.89 ± 8.99	124.38 ± 8.77	126.18 ± 9.70	142.55 ± 43.06
T-cholesterol (mg/dl)	65.68 ± 13.77	61.31 ± 14.52	63.34 ± 16.35	67.97 ± 9.88	56.11 ± 13.66
Triglyceride (mg/dl)	83.18 ± 47.03	99.67 ± 45.12	54.01 ± 20.45	72.99 ± 29.19	47.85 ± 26.99*
Na (mEq/l)	144.41 ± 1.76	144.08 ± 1.57	144.38 ± 1.72	144.03 ± 1.72	143.38 ± 1.21
K (mEq/l)	4.130 ± 0.184	4.173 ± 0.231	4.293 ± 0.154	4.291 ± 0.220	4.535 ± 0.418**
Cl (mEq/l)	105.71 ± 1.91	105.97 ± 0.99	107.15 ± 2.25	107.09 ± 0.98	107.08 ± 3.36*
Ca (mg/dl)	9.76 ± 0.35	9.86 ± 0.30	9.68 ± 0.18	9.66 ± 0.26	9.61 ± 0.39
I-phosphorus (mg/dl)	6.55 ± 0.70	6.55 ± 0.66	6.96 ± 0.61	6.98 ± 0.74	7.95 ± 0.80**

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (\*:p&lt;0.05, \*\*:p&lt;0.01).

Table 3 Organ weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose(mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	11
Body weight (g)	484.5 ± 34.2	483.2 ± 27.9	475.4 ± 26.5	478.8 ± 18.5	442.5 ± 20.9**
Thymus (mg)	310.63 ± 80.69	273.98 ± 72.28	277.63 ± 67.98	289.81 ± 85.98	265.77 ± 64.35
(mg%)	64.41 ± 17.67	56.42 ± 13.56	58.31 ± 13.24	60.68 ± 18.21	60.33 ± 15.66
Liver (g)	12.099 ± 1.758	12.532 ± 1.413	12.263 ± 1.484	12.647 ± 0.840	12.115 ± 0.755
(g%)	2.489 ± 0.216	2.590 ± 0.184	2.572 ± 0.196	2.640 ± 0.124	2.741 ± 0.139**
Kidneys (g)	2.823 ± 0.246	2.921 ± 0.247	3.017 ± 0.250	3.028 ± 0.260	3.200 ± 0.466
(g%)	0.583 ± 0.044	0.605 ± 0.055	0.635 ± 0.046*	0.634 ± 0.060*	0.723 ± 0.110**
Testes (g)	3.283 ± 0.232	3.344 ± 0.178	3.418 ± 0.286	3.158 ± 0.475	3.281 ± 0.213
(g%)	0.682 ± 0.075	0.694 ± 0.063	0.721 ± 0.070	0.662 ± 0.100	0.744 ± 0.054
Epididymides (g)	1.303 ± 0.077	1.298 ± 0.143	1.295 ± 0.093	1.236 ± 0.161	1.305 ± 0.093
(g%)	0.271 ± 0.028	0.270 ± 0.042	0.271 ± 0.019	0.259 ± 0.036	0.296 ± 0.030

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control(\*:p<0.05, \*\*:p<0.01).

Table 4 Histopathological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose(mg/kg)	0				30				100				300				1000				
	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	
HThymus	[12]				[0]				[0]				[0]				[11]				
Hemorrhage	12	0															10	1	1	0	0
Heart	[12]				[0]				[0]				[0]				[11]				
Microgranuloma	11	1	1	0	0	0											10	1	1	0	0
Liver	[12]				[0]				[0]				[0]				[11]				
Microgranuloma	10	2	2	0	0	0											9	2	2	0	0
Degeneration, vacuolar, centrilobular	11	1	1	0	0	0											11	0			
Kidney	[12]				[12]				[12]				[12]				[11]				
Basophilic tubules	9	3	3	0	0	0	11	1	1	0	0	0	12	0			7	4	3	1	0
Eosinophilic body, proximal tubule	10	2	2	0	0	0	11	1	1	0	0	0	11	1	1	0	10	1	1	0	0
Hyaline droplet, proximal tubule	12	0			12	0			11	1	1	0	0	0			11	0			
Dilatation, renal tubule	12	0			12	0			12	0			12	0			8	3	3	0	0
Dilatation, collecting tubule	12	0			12	0			12	0			12	0			9	2	2	0	0
Cyst, unilateral	12	0			12	0			12	0			12	0			10	1	1	0	0
Mineralization, diffuse	12	0			12	0			12	0			12	0			10	1	1	0	0
Cellular infiltration, neutrophil	12	0			12	0			12	0			12	0			10	1	1	0	0
Degeneration, renal tubule, focal, unilateral	12	0			12	0			12	0			11	1	1	0	11	0			
Epididymis	[12]				[0]				[0]				[0]				[11]				
Granuloma, spermatic, left tail	11	1	0	1	0	0											11	0			

Grade of histopathological finding; ±:Slight, +:Mild, 2+:Moderate, 3+:Marked.

N:No abnormality detected.

A:Abnormality detected.

[ ]:Number of males examined.

No remarkable changes were recognized in spleen, adrenal, testis and brain of control and 1000 mg/kg groups.

Significantly different from control(\*\*:p<0.01).

Table 5 Organ weight of dams on day 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of dams	11	11	12	11	5
Body weight (g)	300.7 ± 40.0	328.8 ± 12.7**	326.1 ± 11.5*	315.1 ± 17.4	309.2 ± 19.1
Thymus (mg)	163.16 ± 74.90	176.37 ± 30.67	159.91 ± 54.09	160.71 ± 44.26	174.02 ± 76.33
(mg%)	54.11 ± 22.37	53.74 ± 9.84	48.94 ± 16.16	51.51 ± 15.76	56.30 ± 24.76
Liver (g)	12.775 ± 1.020	13.159 ± 0.833	13.661 ± 1.182	13.021 ± 1.717	13.050 ± 1.537
(g%)	4.342 ± 0.849	4.005 ± 0.264	4.187 ± 0.286	4.118 ± 0.349	4.216 ± 0.333
Kidneys (g)	1.785 ± 0.158	1.848 ± 0.084	1.953 ± 0.151*	1.947 ± 0.162	2.056 ± 0.261**
(g%)	0.605 ± 0.107	0.564 ± 0.037	0.598 ± 0.038	0.618 ± 0.048	0.662 ± 0.049*
Ovaries (mg)	98.96 ± 8.50	100.55 ± 15.13	102.85 ± 11.51	95.71 ± 11.23	97.44 ± 10.80
(mg%)	33.83 ± 8.14	30.57 ± 4.40	31.53 ± 3.28	30.35 ± 2.94	31.52 ± 2.69

Each value shows mean ± S.D.  
Significantly different from control (\*:p<0.05, \*\*:p<0.01).

Table 6 Histopathological examination of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0				30				100				300				1000				
	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	
Thymus	[12]				[0]				[0]				[0]				[6]				
Atrophy	11	1	0	1 0 0 0													5	1	0	0 1 0 0	
Hemorrhage	11	1	1	0 0 0 0													6	0			
Spleen	[12]				[0]				[0]				[0]				[6]				
Hematopoiesis, extramedullary, increased	11	1	0	1 0 0 0													6	0			
Kidney	[12]				[0]				[0]				[0]				[6]				
Cellular infiltration, papilla and medulla, neutrophil, unilatera	12	0															5	1	0	1 0 0 0	
Adrenal	[12]				[12]				[12]				[12]				[6]				
Necrosis, zona fasciculata, massive	10	2	0	2 0 0 0	12	0			12	0			12	0			6	0			
Dilatation, sinusoid, zona fasciculata, focal	11	1	1	0 0 0 0	12	0			12	0			12	0			6	0			
Degeneration, vacuolar, zona fasciculata, focal	11	1	1	0 0 0 0	12	0			12	0			12	0			6	0			
Hypertrophy, zona fasciculata	11	1	1	0 0 0 0	12	0			12	0			12	0			6	0			
Brain	[12]				[12]				[12]				[12]				[6]				
Malacia, medulla oblongata, massive	12	0			12	0			12	0			12	0			5	1	0	1 0 0 0	

Grade of histopathological finding; ±: Slight, +: Mild, 2+: Moderate, 3+: Marked.

N: No abnormality detected.

A: Abnormality detected.

[ ]: Number of females examined.

No remarkable changes were recognized in heart, liver and ovary of control and 1000 mg/kg groups.



Table 7 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of females	12	12	12	12	7
Number of estrous cases before mating (14 days)					
Mean±S.D.	3.4 ± 0.5	3.3 ± 1.2	3.5 ± 0.5	3.3 ± 0.6	2.9 ± 1.7
Number of pairs	12	12	12	12	7
Number of pairs with successful copulation	11	12	12	12	5
Copulation index (%) <sup>a)</sup>	91.7	100.0	100.0	100.0	71.4
Number of conceiving days					
Mean±S.D.	2.7 ± 1.8	3.4 ± 1.6	2.8 ± 1.1	2.8 ± 1.2	2.4 ± 0.9
Number of pregnant females	11	11	12	11	5
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	100.0	91.7	100.0	91.7	100.0
Number of pregnant females with live pups	11	11	12	11	5

a) : (Number of pairs with successful copulation/number of pairs)×100.

b) : (Number of pregnant females/number of pairs with successful copulation)×100.

Table 8 Observation of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose(mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of dams	11	11	12	11	5
Length of gestation (days)					
Mean±S.D. per dam	22.64 ± 0.50	22.27 ± 0.47	22.50 ± 0.52	22.18 ± 0.40	22.40 ± 0.55
Number of corpora lutea					
Mean±S.D. per dam	17.6 ± 1.4	18.3 ± 2.0	18.8 ± 2.1	17.1 ± 2.2	16.8 ± 2.8
Number of implantation scars					
Mean±S.D. per dam	16.5 ± 1.4	16.5 ± 0.9	17.2 ± 2.1	15.9 ± 1.8	15.8 ± 2.7
Implantation index <sup>a)</sup>					
Mean±S.D. per dam	93.5 ± 6.4	91.1 ± 7.6	91.9 ± 9.2	93.5 ± 7.2	93.8 ± 4.0
Gestation index (%) <sup>b)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of live pups born					
Mean±S.D. per dam	14.5 ± 1.0	15.1 ± 1.0	15.8 ± 1.8	15.1 ± 2.3	14.0 ± 2.9
Sex ratio at birth <sup>c)</sup>					
Mean±S.D. per dam	1.42 ± 1.45	1.31 ± 0.71	1.47 ± 1.37	0.83 ± 0.21	1.44 ± 0.63
Birth index <sup>d)</sup>					
Mean±S.D. per dam	88.5 ± 6.1	91.3 ± 6.7	91.9 ± 5.0	94.5 ± 6.6	88.0 ± 6.0
Number of dead pups on day 0 of lactation					
Mean±S.D. per dam	0.8 ± 1.0	0.3 ± 0.5	0.8 ± 1.0	0.1 ± 0.3	0.4 ± 0.5
Number of pups born					
Mean±S.D. per dam	15.4 ± 1.2	15.4 ± 1.1	16.5 ± 2.3	15.2 ± 2.4	14.4 ± 3.2
Delivery index <sup>e)</sup>					
Mean±S.D. per dam	93.5 ± 4.8	92.8 ± 6.5	95.9 ± 5.4	95.1 ± 6.8	90.4 ± 8.0
Live birth index <sup>f)</sup>					
Mean±S.D. per dam	94.9 ± 5.9	98.3 ± 3.0	95.9 ± 4.9	99.5 ± 1.8	97.6 ± 3.3
Number of live pups on day 4 of lactation					
Mean±S.D. per dam	14.3 ± 0.9	14.8 ± 1.1	15.3 ± 2.0	14.8 ± 2.3	14.0 ± 2.9
Viability index <sup>g)</sup>					
Mean±S.D. per dam	98.2 ± 3.1	98.3 ± 4.0	97.3 ± 4.5	98.2 ± 4.4	100.0 ± 0.0
Number of external anomalies					
Mean±S.D. per dam	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Body weight of pups (g)					
Mean±S.D. per dam					
Male Day 0	6.43 ± 0.50	6.39 ± 0.37	6.55 ± 0.56	6.37 ± 0.51	6.82 ± 0.74
Male Day 4	10.19 ± 0.80	10.02 ± 0.77	10.23 ± 1.15	10.13 ± 1.10	10.44 ± 1.62
Female Day 0	6.11 ± 0.45	6.07 ± 0.44	6.02 ± 0.48	6.04 ± 0.49	6.34 ± 0.67
Female Day 4	9.66 ± 0.62	9.73 ± 0.88	9.48 ± 0.93	9.75 ± 1.04	9.90 ± 1.56

a) : (Number of implantation scars/number of corpora lutea)×100.

c) : Number of male pups/number of female pups.

e) : (Number of pups born/number of implantation scars)×100.

g) : (Number of live pups on day 4/number of live pups born)×100.

b) : (Number of dams with live pups/number of pregnant dams)×100.

d) : (Number of live pups born/number of implantation scars)×100.

f) : (Number of live pups born/number of pups born)×100.

# アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 2-(Dimethylamino)ethyl acrylate on Bacteria

### 要約

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルについて、細菌を用いる復帰突然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>2,3)</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、156~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲(S9 無添加試験の TA98 と TA1537 は 78.1~2500  $\mu\text{g}$ /プレート、添加試験の WP2 *uvrA* は 313~5000  $\mu\text{g}$ /プレート)で実施した。また、TA98 の S9 mix 添加試験では、1000~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量範囲で再現性試験を実施した。

その結果、TA98 の S9 mix 添加試験において、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加が認められ、用量依存性もみられた。

以上の結果から、アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルは、用いた試験系において変異原性を有する(陽性)と判定された。

### 方法

#### 〔検定菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium* の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下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、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子 pKM101(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No. 2(Oxoid)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。

#### 〔被験物質〕

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステル(CAS No. 2439-35-2)は、分子量 143.21 の無色-黄色透明液体(受領時:無色透明液体)である。(株)日本触媒製造、用いた被験物質は、ロット番号 5P07, 純度 99.9 wt% [不純物:0.01% 2-ジメチルアミノエタノール, 0.01% アクリル酸, 2000 ppm メトキノン(重合防止剤)]であり、(株)日本触媒から供与された。被験物質は、使用時まで冷蔵した。なお、試験終了後に(株)日本触媒において、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 99.8 wt%であった。

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルは、局方注射用水(ロット番号:K5A80, (株)大塚製薬工場)に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

#### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(上野製薬(株))  
SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))  
9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)  
2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2 および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

#### 〔培地および S9 mix の組成〕

##### 1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ビオチン	0.5 mM

\*:WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

##### 2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地を用いた。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
バクトアガー (Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 mix (1 ml 中下記の成分を含む)

1 ml 中下記の成分を含む

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 を用いた。

〔試験方法〕

プレインキュベーション法<sup>4)</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 分間往復振とう培養したのち、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。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。培養は 37°C で 48 時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜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、溶媒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、本試験および再現性試験においては、両対照群および各用量につき、3 枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は 1 回、本試験は同一用量について 2 回実施し、結果の再現性の確認を行った。また、TA98 の S9 mix 添加試験については、本試験 I と本試験 II の結果が異なるため、再現性試験を行った。また、陽性結果が得られた TA98 の S9 mix 添加試験については、本試験および再現性試験で変異コロニー数が溶媒対照値の 2 倍以上となった用量について、変異コロニー数の平均値から溶媒対照値を差し引いた値を、用量で除して比変異活性値 (誘発復帰変異コロニー数/mg) を求めた。

〔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 無添加あるいは S9 mix 添加条件において、被験物

質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照のそれに比べて 2 倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは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 (陽性) と判定することとした。ただし、2 回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の 2 倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が 10 以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルについて 50~5000  $\mu$ g/プレート 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、S9 mix 無添加試験では、TA98 と TA1537 において 1500  $\mu$ g/プレート 以上で、その他の検定菌においては 5000  $\mu$ g/プレート で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験では、WP2 *uvrA* 以外の検定菌において 5000  $\mu$ g/プレート で抗菌性が認められた。

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 5000  $\mu$ g/プレート (TA98 と TA1537 の S9 mix 無添加試験は 2500  $\mu$ g/プレート) とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で、ともに上記の最高用量に基づいて公比 2 で 5~6 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、TA98 の S9 mix 添加試験においては、本試験 I ではいずれの用量においても溶媒対照値の 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が、本試験 II の最高用量の 5000  $\mu$ g/プレート で、溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数を示した。また、TA98 の S9 mix 無添加試験と、その他の検定菌においては、溶媒対照値の 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。

〔再現性試験〕

TA98 の S9 mix 添加試験では、本試験 II の最高用量の 5000  $\mu$ g/プレート でのみ溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加が認められたため、再現性と用量依存性を確認するために、最高用量を 5000  $\mu$ g/プレート とし、等差 800  $\mu$ g/プレート で 6 用量を設定して再現性試験を実施した (Table 3)。その結果、用量依存的な変異コロニー数の増加が認められ、3400  $\mu$ g/プレート 以上では溶媒対照値の 2 倍以上となった。TA98 の S9 mix 添加試験での、当被験物質の最大比変異活性値は、10.6 誘発復帰変異コロニー/mg (再現性試験, 3400  $\mu$ g/プレート) で、同一条件下における陽性対照物質 2-アミノアントラセンの値 (508000 誘発復帰変異コロニー/mg) の約 50000 分の 1 であった。

以上の結果に基づき、アクリル酸 2-(ジメチルアミ

ノ)エチルエステルは、用いた試験系において変異原性を有する(陽性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) 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.
- 4) 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, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子  
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257 秦野市落合 729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)  
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,  
Kumiko Kawakami  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan  
Tel +81-463-82-4751 FAX +81-463-82-9627

Table 1. Mutagenicity of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in reverse mutation test (I) on bacteria

With(+) or without(-) S9 mix	Test substance dose (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean ± S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	178 143 115 (145±31.6)	21 18 7 ( 15± 7.4)	22 30 22 ( 25± 4.6)	27 29 22 ( 26± 3.6)	8 10 8 ( 9± 1.2)	
	78.1	ND	ND	ND	34 18 29 ( 27± 8.2)	17 15 12 ( 15± 2.5)	
	156	166 127 136 (143±20.4)	14 9 10 ( 11± 2.6)	21 22 23 ( 22± 1.0)	31 30 31 ( 31± 0.6)	11 16 18 ( 15± 3.6)	
	313	139 114 118 (124±13.4)	11 6 11 ( 9± 2.9)	30 30 24 ( 28± 3.5)	22 33 34 ( 30± 6.7)	11 9 15 ( 12± 3.1)	
	625	147 116 153 (139±19.9)	12 7 6 ( 8± 3.2)	23 27 25 ( 25± 2.0)	31 37 31 ( 33± 3.5)	12 20 16 ( 16± 4.0)	
	1250	136 129 156 (140±14.0)	7 9 7 ( 8± 1.2)	28 19 20 ( 22± 4.9)	59 45 33* ( 46±13.0)	4 9 10* ( 8± 3.2)	
	2500	169 193 180 (181±12.0)	11 8 13 ( 11± 2.5)	36 34 27 ( 32± 4.7)	8* 16* 12* ( 12± 4.0)	7* 2* 4* ( 4± 2.5)	
	5000	61* 23* 54* ( 46±20.2)	0* 0* 5* ( 2± 2.9)	15* 9* 15* ( 13± 3.5)			
S9 mix (+)	0	164 149 138 (150±13.1)	17 17 16 ( 17± 0.6)	40 44 37 ( 40± 3.5)	35 31 31 ( 32± 2.3)	21 25 23 ( 23± 2.0)	
	156	126 124 126 (125± 1.2)	15 13 7 ( 12± 4.2)	ND	31 21 26 ( 26± 5.0)	9 8 13 ( 10± 2.6)	
	313	129 132 114 (125± 9.6)	8 7 9 ( 8± 1.0)	37 29 25 ( 30± 6.1)	13 22 22 ( 19± 5.2)	5 10 9 ( 8± 2.6)	
	625	158 127 153 (146±16.6)	15 8 10 ( 11± 3.6)	29 28 29 ( 29± 0.6)	21 16 20 ( 19± 2.6)	8 12 9 ( 10± 2.1)	
	1250	133 115 86 (111±23.7)	16 11 10 ( 12± 3.2)	31 17 27 ( 25± 7.2)	17 24 23 ( 21± 3.8)	5 11 7 ( 8± 3.1)	
	2500	138 123 102 (121±18.1)	8 20* 20* ( 16± 6.9)	28 27 26 ( 27± 1.0)	28 26 23 ( 26± 2.5)	5 5 8 ( 6± 1.7)	
	5000	149 139 152 (147± 6.8)	8* 7* 9* ( 8± 1.0)	21 28 42 ( 30±10.7)	43 34 45 ( 41± 5.9)	16 8 16* ( 13± 4.6)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	641 680 673 (665±20.8)	425 412 454 (430±21.5)	415 414 402 (410± 7.2)	683 668 718 (690±25.7)	1924 1724 1891 (1846±107.2)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg/plate)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	659 676 721 (685±32.0)	295 304 321 (307±13.2)	677 613 546 (612±65.5)	312 322 324 (319± 6.4)	327 333 257 (306±42.3)	

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

\*:Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinone were contained as impurities.

ND:Not done

Table 2. Mutagenicity of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in reverse mutation test (II) on bacteria

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	140	125	147	13	9	9	25	36	28	24	13	21	8	6	7
		(137 $\pm$ 11.2)			(10 $\pm$ 2.3)			(30 $\pm$ 5.7)			(19 $\pm$ 5.7)		(7 $\pm$ 1.0)			
	78.1	ND			ND			ND			28 22 24		8 8 11			
											(25 $\pm$ 3.1)		(9 $\pm$ 1.7)			
	156	115	114	123	8	10	12	28	27	23	26	19	23	13	11	8
		(117 $\pm$ 4.9)			(10 $\pm$ 2.0)			(26 $\pm$ 2.6)			(23 $\pm$ 3.5)		(11 $\pm$ 2.5)			
	313	111	117	135	12	10	17	27	30	32	22	25	28	16	11	11
		(121 $\pm$ 12.5)			(13 $\pm$ 3.6)			(30 $\pm$ 2.5)			(25 $\pm$ 3.0)		(13 $\pm$ 2.9)			
625	127	133	135	6	10	8	27	28	24	29	34	38	9	11	11	
	(132 $\pm$ 4.2)			(8 $\pm$ 2.0)			(26 $\pm$ 2.1)			(34 $\pm$ 4.5)		(10 $\pm$ 1.2)				
1250	121	104	118	12	8	7	32	28	26	43	27	39	2*	5*	6*	
	(114 $\pm$ 9.1)			(9 $\pm$ 2.6)			(29 $\pm$ 3.1)			(36 $\pm$ 8.3)		(4 $\pm$ 2.1)				
2500	160	161	169	10*	10*	12*	41	42	33	10*	9*	5*	2*	3*	2*	
	(163 $\pm$ 4.9)			(11 $\pm$ 1.2)			(39 $\pm$ 4.9)			(8 $\pm$ 2.6)		(2 $\pm$ 0.6)				
5000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	2*	8*	24							
	(0 $\pm$ 0.0)			(0 $\pm$ 0.0)			(11 $\pm$ 11.4)									
S9 mix (+)	0	104	113	111	13	15	10	34	31	30	27	23	23	9	8	7
		(109 $\pm$ 4.7)			(13 $\pm$ 2.5)			(32 $\pm$ 2.1)			(24 $\pm$ 2.3)		(8 $\pm$ 1.0)			
	156	104	115	133	15	17	12	ND			23	39	25	8	10	14
		(117 $\pm$ 14.6)			(15 $\pm$ 2.5)						(29 $\pm$ 8.7)		(11 $\pm$ 3.1)			
	313	137	108	110	11	12	12	28	30	38	30	30	35	3	8	6
		(118 $\pm$ 16.2)			(12 $\pm$ 0.6)			(32 $\pm$ 5.3)			(32 $\pm$ 2.9)		(6 $\pm$ 2.5)			
	625	107	104	103	7	13	12	39	30	42	24	19	12	3	6	4
		(105 $\pm$ 2.1)			(11 $\pm$ 3.2)			(37 $\pm$ 6.2)			(18 $\pm$ 6.0)		(4 $\pm$ 1.5)			
1250	106	94	100	9	8	8	36	28	29	23	20	27	5	12	5	
	(100 $\pm$ 6.0)			(8 $\pm$ 0.6)			(31 $\pm$ 4.4)			(23 $\pm$ 3.5)		(7 $\pm$ 4.0)				
2500	102	95	101	13	9	11	30	35	36	29	28	27	9	2	6	
	(99 $\pm$ 3.8)			(11 $\pm$ 2.0)			(34 $\pm$ 3.2)			(28 $\pm$ 1.0)		(6 $\pm$ 3.5)				
5000	107	114	96	13*	8*	14*	44	39	34	66	45	55	14	9*	11*	
	(106 $\pm$ 9.1)			(12 $\pm$ 3.2)			(39 $\pm$ 5.0)			(55 $\pm$ 10.5)		(11 $\pm$ 2.5)				
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2		9AA			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1		80			
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	644	728	760	370	359	383	244	282	281	495	608	544	557	484	444
		(711 $\pm$ 59.9)			(371 $\pm$ 12.0)			(269 $\pm$ 21.7)			(549 $\pm$ 56.7)		(495 $\pm$ 57.3)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA		2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5		2			
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	440	456	431	333	342	317	523	499	534	321	355	296	255	311	324
		(442 $\pm$ 12.7)			(331 $\pm$ 12.7)			(519 $\pm$ 17.9)			(324 $\pm$ 29.6)		(297 $\pm$ 36.7)			

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

\*:Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinone were contained as impurities.

ND:Not done

Table 3. Mutagenicity of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in confirmation test of reverse mutation test on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)					
					Frameshift type		
					TA98		
S9 mix (+)	0				34	22	31 ( 29 $\pm$ 6.2)
	1000				23	20	27 ( 23 $\pm$ 3.5)
	1800				48	32	27 ( 36 $\pm$ 11.0)
	2600				63	54	52 ( 56 $\pm$ 5.9)
	3400				72	52	70 ( 65 $\pm$ 11.0)
	4200				79	74	57 ( 70 $\pm$ 11.5)
	5000				63	76	70 ( 70 $\pm$ 6.5)
Positive control S9 mix(+)	Chemical				2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )				0.5		
	Number of colonies/plate				281	255	313 (283 $\pm$ 29.1)

2AA:2-Aminoanthracene

Purity was 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinon were contained as impurities.



アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルの  
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

*In Vitro* Chromosomal Aberration Test of  
2-(Dimethylamino)ethyl acrylate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステ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(24時間)では0.06 mg/ml、短時間処理(6時間)のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下ではそれぞれ0.04 mg/mlおよび0.2 mg/mlであった。各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度設定した。なお、48時間連続処理の濃度は、24時間連続処理と同じ濃度に設定した。連続処理では、S9 mix非存在下で24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)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時間および48時間連続処理では0.060 mg/mlの濃度であったことから、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。短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下ではそれぞれ0.010 mg/mlおよび0.050 mg/mlが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、この濃度を含む2濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理した高濃度群(0.060 mg/ml)で染色体の構造異常(gapを含む)および倍数性細胞が誘発され、その頻度は23.5%および10.75%であった。48時間連続処理した高濃度群(0.060 mg/ml)で染色体の構造異常(gapを含む)が誘発された(8.5%)。また、すべての処理群において細胞毒性のために倍数性細胞については規定の細胞数が観察できなかったが、高濃度群(0.060 mg/ml)で倍数性細胞が誘発された(6.21%)。短時間処理では、S9 mix非存在下において、0.020 mg/ml以上の処理群では細胞毒性のため分析できなかったが、0.010 mg/mlでは、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発された(16.0%)。また、0.0050 mg/mlおよび0.01 mg/mlにおいて倍数性細胞が認められ、その頻度は1.25%および10.88%であった。S9 mix存在下では、0.10 mg/ml以上の処理群では細胞毒性のため分析できなかったが、0.050 mg/mlでは、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発された(12.5%)。また、0.025 mg/mlおよび0.050 mg/mlにおいて倍数性細胞の誘発作用が認められ、その誘発頻度は1.25%お

び5.25%であった。

以上の結果より、本試験条件下でアクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルは、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12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、牛胎児血清(FCS:Cansera International)を10%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5mlを入れたディッシュ(径6cm, Corning)に播き、37℃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時間および48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存在下および非存在下で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. 被験物質

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステル(略号:DMAEA, CAS No.:2439-35-2, ロット番号:5P07, (株)日本触媒)は、無色-黄色透明液体で、水に対しては54.3 mg/ml、DMSOでは50 mg/ml、アセトンでは50 mg/mlで溶解し、融点-75℃、沸点170℃で、分子式C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>、分子量143.21、純度99.9 wt%(不純物としてジメチルアミノエタノール0.01%、アクリル酸0.01%、メトキノン(重合防止剤)2000 ppmを含む)の物質である。

被験物質原体は、熱、光、過酸化剤などによって重合が起こることがあり、経時により黄褐色に着色する。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用蒸留水(株)大塚製薬工場)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

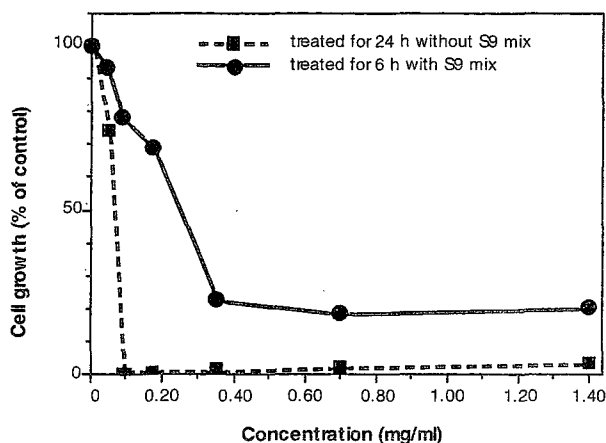


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate

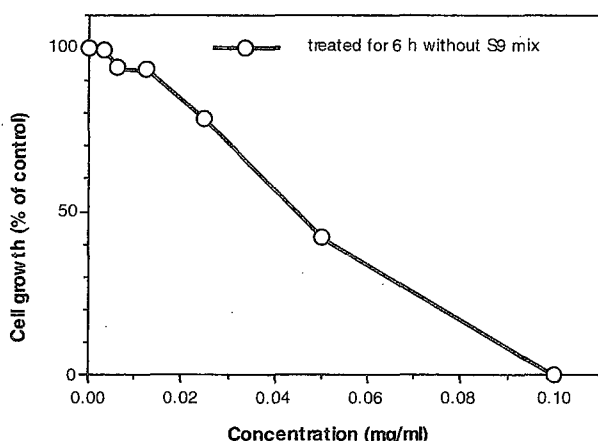


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate

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 10% (v/v) になるように加えた。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

#### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

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™, オリンパス光学工業 (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% の増殖抑制濃度は、0.06 mg/ml、短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では、それぞれ 0.04 mg/ml および 0.2 mg/ml であった (Fig. 1, 2)。

#### 7. 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% 増殖抑制濃度の 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 (24 時間および 48 時間連続処理: 0.0075, 0.015, 0.030, 0.060, 0.12 mg/ml, 短時間処理の S9 mix 非存在下: 0.0050, 0.010, 0.020, 0.040, 0.080 mg/ml, 短時間処理の S9 mix 存在下: 0.025, 0.050, 0.10, 0.20, 0.40 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、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。

#### 8. 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 μg/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% ギムザ溶液で染色した。

#### 9. 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 0.060 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。短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では、それぞれ 0.010 mg/ml および 0.050 mg/ml が染色体分析の可能な最高濃度であり、それ以上の濃度では分裂中期細胞が得られなかったことから、これらの濃度を含む 2 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 (MMS) 研究会<sup>1)</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。

#### 10. 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。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法<sup>2)</sup> (多重性を考慮して familywise の有意水準を 5%

とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、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>2)</sup> ( $p < 0.05$ )を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

### 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。アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルを加えて 24 時間連続処理した高濃度群 (0.060 mg/ml) で染色体の構造異常 (gap を含む) および倍数性細胞が誘発され、その頻度は 23.5% および 10.75% であった。

48 時間連続処理した高濃度群 (0.060 mg/ml) で染色体の構造異常 (gap を含む) が誘発され、その頻度は 8.5% であった。また、すべての処理群において細胞毒性のために倍数性細胞については規定の細胞数が観察できなかったが、高濃度群 (0.060 mg/ml) で倍数性細胞が誘発され、その頻度は 6.21% であった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルを加えて S9 mix 非存在下における短時間処理では、0.020 mg/ml 以上の処理群では細胞毒性のため分析できなかったが、0.010 mg/ml では、染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その頻度は 16.0% であった。また、0.0050 mg/ml および 0.01 mg/ml において倍数性細胞の誘発作用が認められ、その誘発頻度は 1.25% および 10.88% であった。S9 mix 存在下では、0.10 mg/ml 以上の処理群では細胞毒性のため分析できなかったが、0.050 mg/ml では、染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その発生頻度は 12.5% であった。また、0.025 mg/ml および 0.050 mg/ml において倍数性細胞の誘発作用が認められ、その頻度は 1.25% および 5.25% であった。

従って、アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルは、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。

### 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.
- 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.
- 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.

### 連絡先

試験責任者: 田中憲穂  
 試験担当者: 山影康次, 佐々木澄志, 若栗 忍,  
 日下部博一, 中川ゆづき,  
 水谷正寛, 古畑紀久子, 橋本恵子  
 (財) 食品薬品安全センター 秦野研究所  
 〒257 神奈川県秦野市落合 729-5  
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

### Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)  
 Kohji Yamakage, Kiyoshi Sasaki,  
 Shinobu Wakuri, Hirokazu Kusakabe,  
 Yuzuki Nakagawa, Masahiro Mizutani,  
 Kikuko Furuhashi, Keiko Hashimoto  
 Hatano Research Institute, Food and Drug  
 Safety Center  
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan  
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate (DMAEA)\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells			Trend test <sup>5)</sup>		Concurrent <sup>6)</sup> cytotoxicity (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)	Polyploid <sup>4)</sup> (%)	SA	NA	
Control			200	0	2	2	0	0	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.50			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38			100.0
DMAEA	0.015	24	200	0	0	0	2	1	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.50			82.5
DMAEA	0.030	24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	+	+	72.0
DMAEA	0.060	24	200	8	23	44	1	1	0	77	0	47*(23.5)	42 (21.0)	10.75*			65.0
DMAEA	0.12 ***	24	-											-			13.0
MC	0.00005	24	200	6	32	109	1	0	0	148	0	94 (47.0)	91 (45.5)	0.13			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.63			100.0
DMAEA	0.015	48	200	3	4	0	2	0	0	9	1	7 (3.5)	5 (2.5)	0.26 <sup>7)</sup>			58.5
DMAEA	0.030	48	180	3	3	0	9	1	0	16	1	8 (4.4)	6 (3.3)	0.36 <sup>8)</sup>	+	+	56.5
DMAEA	0.060	48	200	0	4	10	11	2	10	37	4	17*(8.5)	17 (8.5)	6.21 <sup>9)</sup> *			103.5
DMAEA	0.12 ***	48	-											-			8.0
MC	0.00005	48	200	6	35	127	12	7	20	207	1	98 (49.0)	96 (48.0)	0.25			-

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, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at p<0.05. 6)Concurrent cytotoxicity, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7)Seven hundred and sixty four cells were analysed. 8)Five hundred and fifty seven cells were analysed. 9)Seven hundred and eighty nine cells were analysed. \*:Significantly different from historical solvent control data at p<0.05 by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\*:Purity was 99.9 wt%. 2-Dimethylamino ethanol (0.01 %), acrylate (0.01 %) and methoquinone (2000 ppm) were contained as impurities. \*\*\*:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate (DMAEA)\*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells			Trend test <sup>5)</sup>		Concurrent <sup>6)</sup> cytotoxicity (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)	Polyploid <sup>4)</sup> (%)	SA	NA	
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.00			-	
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	1	0	1	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			100.0	
DMAEA	0.0050	-	6-(18)	200	2	0	1	1	0	0	4	4 (2.0)	2 (1.0)	1.25*			97.5	
DMAEA	0.010	-	6-(18)	200	4	12	39	1	0	0	56	32*(16.0)	30 (15.0)	10.88*	+	+	99.0	
DMAEA	0.020 ***	-	6-(18)	-										-			17.0	
DMAEA	0.040 ***	-	6-(18)	-										-			15.5	
DMAEA	0.080 ***	-	6-(18)	-										-			17.0	
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25			-	
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	2	0	5	0	0	7	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00			100.0	
DMAEA	0.025	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	1.25*			85.0	
DMAEA	0.050	+	6-(18)	200	6	7	15	0	0	0	28	25*(12.5)	19 (9.5)	5.25*	+	+	80.0	
DMAEA	0.10 ***	+	6-(18)	-										-			39.0	
DMAEA	0.20 ***	+	6-(18)	-										-			36.0	
DMAEA	0.40 ***	+	6-(18)	-										-			37.5	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	8	86	387	11	3	120	615	0	185 (92.5)	184 (92.0)	0.13			-

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, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at p<0.05. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. \*:Significantly different from historical solvent control data at p<0.05 by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\*:Purity was 99.9 wt%. 2-Dimethylamino ethanol (0.01 %), acrylate (0.01 %) and methoquinone (2000 ppm) were contained as impurities. \*\*\*:Chromosome analysis was not performed because there were small number of metaphases due to severe cytotoxicity.

# アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

## Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2-(Dimethylamino)ethyl acrylate by Oral Administration in Rats

### 要約

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルは、カチオン系凝集剤、エマルジョン改善剤、繊維処理剤、粘着剤、接着剤などの製造に使用されている。毒性に関する情報としては、眼、皮膚、粘膜に対して刺激性を有し、ラットの経口投与によるLD<sub>50</sub>値は455 mg/kgとの報告がある<sup>1)</sup>。今回、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、SDラット(1群雌雄各12匹)に4, 20および100 mg/kgの用量を交配前14日から交配を経て雄は計43日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育3日まで経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

### 1. 反復投与毒性

100 mg/kg群において、雄で一過性の体重増加抑制および摂餌量減少、雌で死亡が2例認められた。剖検では雌雄で前胃壁の肥厚および十二指腸リンパ節の腫大が観察され、病理組織学検査では前胃粘膜に潰瘍、炎症性細胞の浸潤および粘膜上皮の過形成、十二指腸リンパ節に形質細胞の増生が認められた。さらに雌では胸腺の重量減少と萎縮が認められた。また、雄の血液学検査で網状赤血球、血小板および分葉核球数の増加、血液生化学検査でアルブミンの減少が認められた。20 mg/kg群においても雄の前胃に同様な組織変化が認められた。

### 2. 生殖発生毒性

親動物の交尾率、受胎率、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率、妊娠期間、分娩および哺育行動には被験物質に起因する変化は認められなかった。また、出産児数、出産生児数、性比、出生率、新生児の4日生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにおいても被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果より、アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルの反復投与毒性に関する無影響量は雄が4 mg/kg/day、雌が20 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、親動物および児動物ともに100 mg/kg/dayと考えられる。

### 方法

#### 1. 被験物質

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステル(株)日本触媒工業、Lot No. 5P07、純度99.9%)は、融点-75℃、

沸点170℃、水およびアセトンに溶けやすい無色～黄色透明の液体である。被験物質は冷蔵・遮光下で保管した。また、試験期間中安定であったことが確認された。

#### 2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より入手した雌雄のSDラット(Crj:CD)を6日間検疫・馴化後、試験に供した。投与開始前日に体重別層化無作為抽出法により、1群につき雌雄各12匹を振り分けた。投与開始時の週齢は雌雄とも9週齢、体重範囲は雄が324～369 g、雌が212～244 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中、温度20～25℃、湿度40～70%、換気約12回/時、照明12時間/日(7:00～19:00)に自動調節された飼育室を使用した。動物は実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに、群分け後は1匹、交配期間は雌雄各1匹、哺育期間は1腹で収容し、飼育した。

動物には、オートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1:オリエンタル酵母工業(株))および5 μmのフィルターで濾過後、紫外線照射した水道水をそれぞれ自由摂取させた。

#### 3. 投与量および投与方法

SDラットの雌雄を用いて、被験物質を50, 100および200 mg/kgの用量で7日間経口投与した結果、雌雄とも200 mg/kg群で体重減少あるいは増加抑制、摂餌量減少、削瘦が認められた。また剖検では、200 mg/kg群で前胃粘膜の肥厚、白色化、出血、潰瘍、胃の穿孔と周囲組織との癒着、十二指腸粘膜の白色化などの消化管の変化が認められ、100 mg/kg群でも前胃に同様な変化が認められた。以上の結果から、本試験では高用量を100 mg/kgとし、以下公比5で中用量を20 mg/kg、低用量を4 mg/kgとした。また、媒体(コーン油)のみを投与する対照群を設けた。

投与期間は、雌雄とも交配前14日間、交配期間、および雄は剖検前日までの計43日間、雌は交尾成立後、妊娠、分娩を経て哺育3日までとし、コーン油に溶解させた被験物質を胃ゾンデを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与液量は5 ml/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。

投与液の調製はイエローランプ照明下で行い、投与液は褐色瓶に入れ、投与に供するまで冷蔵・遮光下で保存した。なお、投与開始前に投与液中の被験物質の安定性

および濃度を確認した。

#### 4. 反復投与毒性に関する観察・検査

##### 1) 一般状態

全例について生死、外観、行動等を投与前および投与後に毎日観察した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。

##### 2) 体重および摂餌量

体重は、雌雄とも投与開始日、投与開始後3, 7, 14日、およびその後週1回、交尾した雌は妊娠0, 7, 14, 20日および哺育0, 4日に測定した(交尾確認日を妊娠0日、分娩確認日を哺育0日とする)。また、体重増加量を交配前は投与開始日、妊娠期間は妊娠0日、哺育期間は哺育0日の体重を基準に算出した。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定した。

##### 3) 雄の血液学検査

雄の全生存動物について、解剖日の前日より約21時間絶食させ、チオペンタールナトリウム(ラボナル：田辺製薬(株))の腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採取した血液の一部をEDTA-2Kにより凝固阻止し、赤血球数(シースフローDCインピーダンス検出法)、白血球数(RF/DCインピーダンス検出法)、血小板数(シースフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度(SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500: 東亜医用電子(株))、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A: 立石電機(株))、網状赤血球数(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網赤血球測定装置(R-2000: 東亜医用電子(株))により測定した。また、検査結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。

##### 4) 雄の血液生化学検査

雄の全生存動物について、解剖日に採取した血液を室温で約30分間放置した後、3000 r.p.m.で10分間遠心分離し、得られた血清について、GOT(SSCC改良法)、GPT(SSCC改良法)、ALP(GSCC改良法)、 $\gamma$ -GTP(SSCC改良法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、グルコース(GK-G6PDH法)、総コレステロール(CES-CO-POD法)、トリグリセライド(LPL-GK-G3PO-POD法)、クレアチニン(Jaffé法)、総ビリルビン(Jendrassik改良法)、総蛋白(Biuret法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出)、カルシウム(O-CPC法)、無機リン(UV法)、ナトリウム、カリウム、クロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(日立736-10形: (株)日立製作所)により測定した。

##### 5) 病理検査

雌雄とも最終投与日の翌日に、全生存動物についてチオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹

大動脈の切断・放血により安楽死させて剖検し、胸腺、肝臓、腎臓、副腎、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、解剖日の体重を基に相対重量(対体重比)を算出した。さらに、これらの器官に加えて、脳、下垂体、眼球およびハーダー腺、甲状腺および上皮小体、心臓、肺、脾臓、胃、腸管(十二指腸～直腸)、膀胱、卵巣、骨髄(大腿骨)、坐骨神経および脊髄を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後保存した。ただし、死亡例以外の眼球およびハーダー腺はダビッドソン液、精巣および精巣上体はブアン液で固定した。

病理組織検査は雌雄の対照および100 mg/kg群の脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、胃、十二指腸、副腎、精巣、精巣上体、非妊娠雌の卵巣、全新生児死亡および哺育異常を示した母動物の乳腺、ならびにその他の肉眼的異常部位について、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検した。また、器官重量測定で減少がみられた雌の胸腺、さらに、雄の血液学検査で網状赤血球および血小板数の増加がみられたことから、雌雄の大腿骨骨髄についても対照および100 mg/kg群を検査した。その結果、雌雄の胃および雌の胸腺に被験物質に起因する変化が認められたので、4および20 mg/kg群のこれらの器官についても検査した。なお、肉眼的に変化がみられた脾十二指腸リンパ節を検査した結果、被験物質に起因する変化が認められたが、胃の変化に伴った二次的变化と判断し、4および20 mg/kg群については検査しなかった。

#### 5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

##### 1) 生殖機能

交配前の投与期間終了後、各群内で雄1雌1の交配対を設け、最長14日間昼夜同居させ、毎日午前中に雌の膣垢を採取し、ギムザ染色して鏡検した。膣栓形成あるいは膣垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。交尾した対は雌雄を分離し、以後の検査に供した。これらの結果から、交尾所要日数(交配後、交尾成立までに要した日数)、交尾成立までに逸した発情期の回数、交尾率(〔交尾動物数/同居動物数〕×100)、受胎率(〔受胎動物数/交尾動物数〕×100)を算出した。

##### 2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が終了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。その後、新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ、一般状態、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。

哺育4日の解剖時に卵巣、子宮を摘出して黄体数および着床数を検査した。交尾確認後25日を経ても分娩しない雌は剖検し、肉眼的に着床が認められない動物の子宮は2% KOH水溶液に浸漬し、着床の有無を確認した。また、全ての出産児が死亡した母動物はその時点で剖検し、乳腺を保存した。これらの結果から、妊娠期間(妊娠0日から出産が確認された日までの期間)、出産率

(〔生児出産雌数/受胎雌数〕×100), 着床率(〔着床数/黄体数〕×100), 分娩率(〔総出産児数/着床数〕×100)を算出した。

### 3) 新生児の観察・検査

#### (1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数, 出産生児数, 死産児数, 性別および外表異常の有無を検査した。その後, 一般状態, 死亡の有無を毎日観察した。死亡動物は食殺等で検査に耐えないものを除き, 10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬・固定後, 実体顕微鏡下で剖検した。哺育0および4日の生存児数から出生率(〔出産生児数/総出産児数〕×100), 新生児の4日生存率(〔哺育4日生児数/出産生児数〕×100)を算出した。

#### (2) 体重

哺育0および4日に1腹毎に雌雄単位で測定し, それぞれの平均値を算出した。また, 哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。

#### (3) 剖検

全ての生存児について哺育4日に口腔を含む外表を検査した後, チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈を切断・放血し, 安楽死させて剖検した。

## 6. 統計解析

計量データについて, パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い, 分散が一様の場合は一元配置分散分析を行った。分散が一様でない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合で各群の例数が一定ならばDunnnett法またはDunnnett型, 不定ならばScheffé法またはScheffé型により多重比較を行った。計数データについては, 組織所見をArmitageの $\chi^2$ 検定, その他の項目をFisherの直接確率法により検定した。新生児に関するデータは各母動物毎に算出した平均値を統計単位とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 死亡動物

100 mg/kg群の雌2例が投与開始後1日および16日に死亡した。後者は投与開始後13日に自発運動の低下, うずくまり, ラッセル音, 赤色鼻汁および軟便を示したが, 翌日にはこれらの症状が消失し, 以後死亡するまで投与後の流涎が観察された以外に変化は認められなかった。前者には死亡に関連する一般状態の変化は認められなかった。病理検査では, 共通する所見として肺のうっ血および出血が認められた他, 前者には赤色胸水, 食道の出血巣と潰瘍, 前胃粘膜の出血巣, 片側腎臓のう胞が認められ, 後者には肺の水腫, 前胃粘膜の潰瘍, 炎症性細胞の浸潤および粘膜の過形成, 腺胃粘膜の出血巣, 胸腺の萎縮および片側副腎皮質の壊死が認められた。

#### 2) 一般状態

投与直後の流涎が100 mg/kg群の雄では投与開始後4日から, 雌では8日から観察され, 投与終了時までには断続的に発現する例を含めてほぼ全例で認められた。これらの一部には投与直前から反射的に流涎する例も観察された。その他, 哺育異常を示した母動物で自発運動の低下, 肛門周囲の汚れ, 体温低下または紅涙が対照群の1例で哺育1日に, 20 mg/kg群の1例で哺育3日以降に認められた。

#### 3) 体重(Fig.1,2)

雄では, 100 mg/kg群で投与開始後3日の体重増加量が有意な低値を示したが, 以後は有意な変化は認められなかった。雌では, 全期間を通して対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 4) 摂餌量

雄では, 100 mg/kg群で投与開始後3日の摂餌量が有意な低値を示したが, 以後は有意な変化は認められなかった。その他, 4 mg/kg群で投与開始後42日の摂餌量が有意な高値を示したが, 20および100 mg/kg群では有意差が認められなかったことから, 偶発的な変化と判断した。雌では, 全期間を通して対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 5) 雄の血液学検査(Table 1)

網状赤血球および血小板数の有意な増加が100 mg/kg群で認められた。また, 同群では, リンパ球比が有意な低値を, 分葉核球比が有意な高値を示し, 実数換算値では分葉核球数の有意な増加が認められた。

#### 6) 雄の血液生化学検査(Table 2)

アルブミンの有意な減少が100 mg/kg群で認められた。その他, 4 mg/kg群の総ビリルビンが有意な高値を示したが, 20および100 mg/kg群では有意な変化が認められなかったことから, 偶発的なものと判断した。また, 100 mg/kg群のクロールが有意な高値を示したが, 生理的変動範囲内の値であった。

#### 7) 器官重量(Table 3)

胸腺の絶対重量および相対重量の有意な減少が100 mg/kg群の雌で認められた。その他, 4 mg/kg群の雌で副腎の絶対重量が有意な低値を示したが, 20および100 mg/kg群では有意な変化が認められなかったことから, 偶発的な変化と判断した。雄では, いずれの器官においても, 絶対重量および相対重量とも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### 8) 剖検所見(Table 4)

投与終了後解剖動物では, 前胃壁の肥厚が20 mg/kg群の雄2例, 100 mg/kg群の雌雄全例に認められた。肥厚した前胃粘膜の表面は白色化し, 粗造を呈していた。少数例では前胃漿膜面の一部と周囲の腹膜, 横隔膜や肝

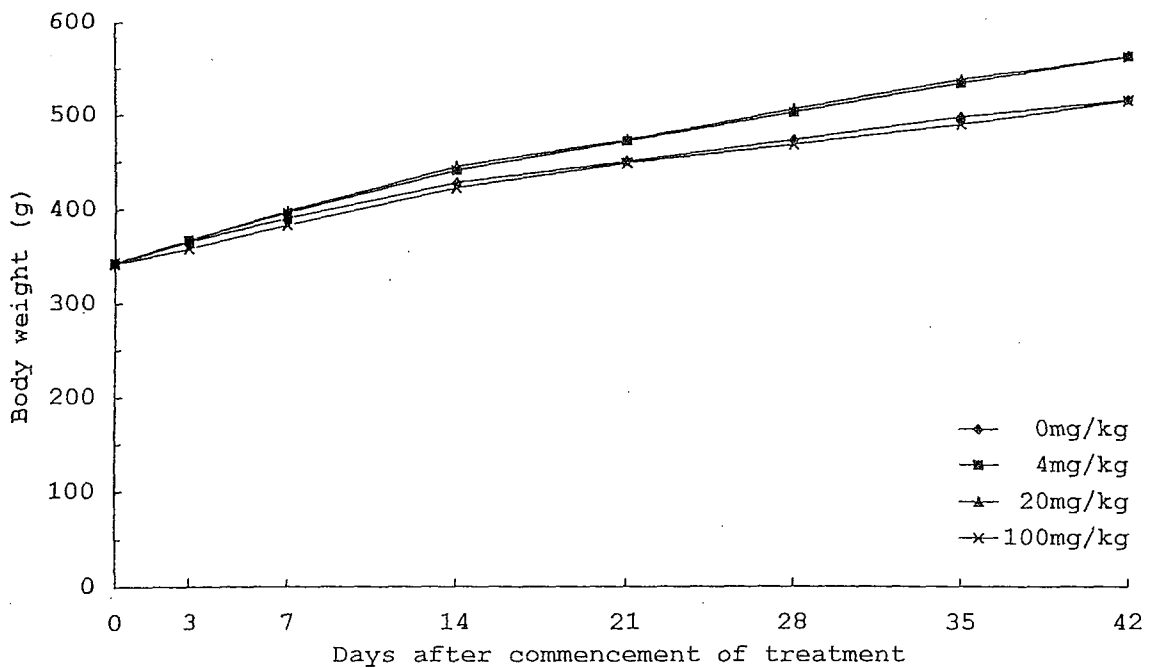


Fig.1 Body weight changes of male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

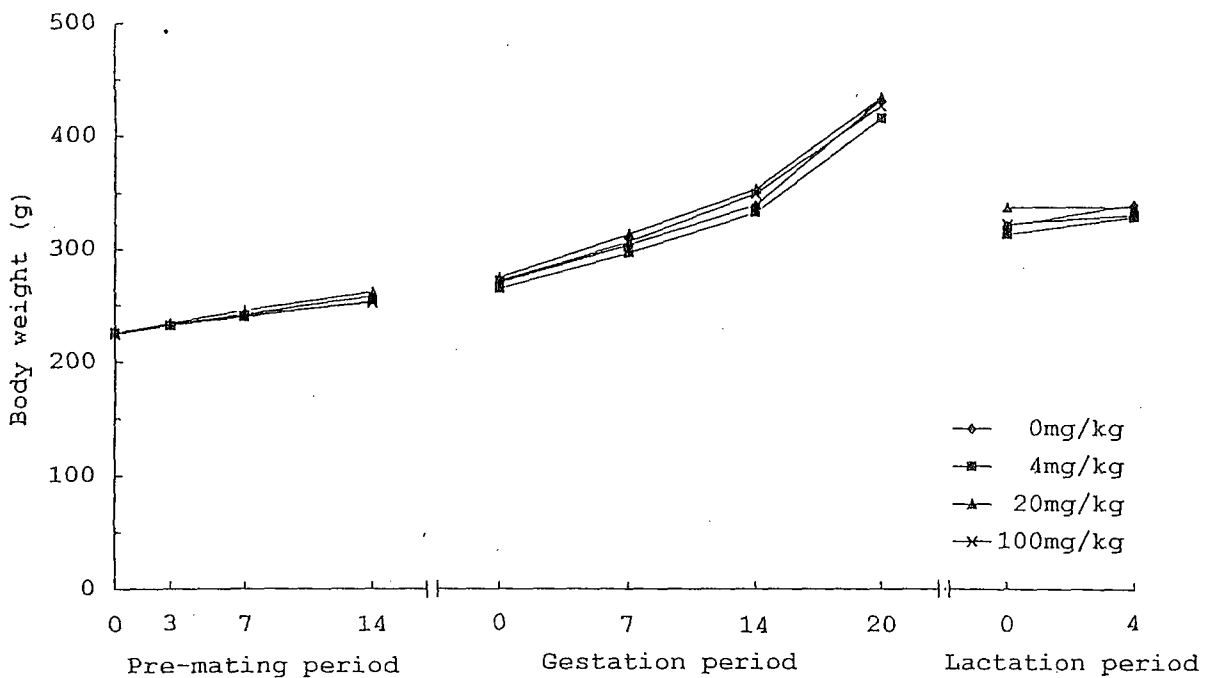


Fig.1 Body weight changes of female rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

臓、横隔膜と肺の癒着が観察された。また、脾十二指腸リンパ節の腫大が100 mg/kg群の雌雄各7例で認められた。

全新生児が死亡した対照群の雌の1例では、胸腺および脾臓の小型化、胃の膨満、両側副腎の腫大、膣の膿貯留、両側ハーダー腺の褐色化が認められた。また、哺育3日以降に授乳行動を示さなかった20 mg/kg群の雌の1例では、胸腺の小型化、腺胃粘膜の出血巣、両側副腎の腫大が認められた。その他に、被験物質投与群で種々の

変化が認められたが、発現状況から偶発病変と判断した。

9) 組織所見 (Table 5)

投与終了後解剖動物では、被験物質に起因する変化が雌雄の前胃、脾十二指腸リンパ節および雌の胸腺に認められた。すなわち、前胃粘膜の潰瘍とそれに伴い生じた炎症性細胞の浸潤および粘膜上皮の過形成が20 mg/kg群で雄2例、100 mg/kg群の雌雄全例に認められ、100



mg/kg群では発現頻度に有意差が認められた。潰瘍が漿膜面にまで及び、周囲の組織と癒着する例が認められる一方、粘膜の過形成あるいは炎症性細胞の浸潤のみがみられる例もあった。肉眼的に腫大していた脾十二指腸リンパ節では、髄索における形質細胞の増生が認められた。雌の胸腺では、軽度あるいは中等度の萎縮が対照、20および100 mg/kg群のそれぞれ1, 1, 3例で認められ、100 mg/kg群でわずかに増加する傾向がみられた。

非妊娠雌の卵巣、全新生児死亡および哺育異常を示した母動物の乳腺ならびに雌雄の大腿骨髄には、特記すべき異常所見は認められなかった。

その他に、被験物質投与群で種々の変化が認められたが、いずれも自然発生的に観察される変化であり、発現状況に一定の傾向がないことから偶発病変と判断した。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 生殖機能 (Table 6)

ほとんどの雌が交配開始後5日以内に発情期を示して交尾し、交尾率、交尾所要日数および交尾成立までに逸した発情期の回数ともに有意な差は認められなかった。100 mg/kg群の雌2例は交配開始日から発情休止期が継続したが、これらのうち1例は交配開始後14日に発情期を示して交尾し、他の1例も陰垢検査では交尾確認できなかったものの、後の観察で受胎していたことが判明した。また、非妊娠動物は各群とも1例のみであり、受胎率にも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

### 2) 分娩・哺育状態 (Table 7)

各群とも母動物全例が正常な分娩を示した。また、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率および分娩率には、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

哺育期間の観察において、哺育異常が対照および100 mg/kg群の母動物各1例で観察され、哺育2日までに全新生児が死亡した。いずれも分娩日から新生児の回集、授乳などの哺育行動を示さず、さらに100 mg/kg群の1例は全新生児を食殺した。また、20 mg/kg群の母動物1例は哺育3日以降、新生児の回集および授乳行動を示さなかった。しかし、これらの哺育異常については、各群1例のみの発現であったことから、偶発的な変化と判断した。

### 3) 新生児に及ぼす影響

#### (1) 生存率 (Table 7)

同腹内全新生児死亡が対照および100 mg/kg群の各1腹で認められた他は、死亡児は4, 20および100 mg/kg群でそれぞれ1, 3, 1腹で1~2例観察されただけであり、出産児数、出生児数、性比、出生率および新生児の4日生存率ともに対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

#### (2) 出生児の観察

各群いずれの新生児にも外表異常は認められなかつ

た。また、出生日に未受乳の新生児が各群で観察されたが、母動物が授乳行動を示さなかった腹以外のほとんどは翌日に受乳し、一般状態にも異常は認められなかった。

#### (3) 体重 (Table 7)

各被験物質投与群の雌雄ともに対照群とほぼ同様な体重および体重増加量を示し、有意差は認められなかった。

#### (4) 剖検

腎盂拡張が、生存動物では20 mg/kg群の1腹で1例および100 mg/kg群の1腹で6例、死亡動物では対照群の1腹で10例に観察された。その他には、生存動物および死亡動物ともに異常は認められなかった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

反復投与による影響として、100 mg/kg群の雄で投与初期の一過性の体重増加抑制と摂餌量減少、雌で死亡が2例認められた。死亡例には共通する所見として肺のうっ血、出血、水腫が認められた。被験物質が属するアクリル酸エステル類により急性中毒死した動物の特徴的所見は、肺の充血および出血であることが知られていることから<sup>2)</sup>、同様な原因により死亡した可能性が考えられる。

病理検査において、前胃の肥厚が雄では20 mg/kg以上の群、雌では100 mg/kg群で認められ、組織学的には前胃の潰瘍およびそれに伴う炎症性細胞の浸潤と粘膜上皮の過形成が観察された。被験物質と類似の化合物であるアクリル酸エチルエステルは、ラットの前胃に対し刺激性を有し、潰瘍や炎症性変化および上皮の過形成を起こすことが報告されている<sup>2-5)</sup>。したがって、被験物質もこのアクリル酸エステルと同様に前胃に対して刺激性を有するものと考えられる。

脾十二指腸リンパ節における形質細胞の増生が100 mg/kg群の雌雄で肉眼的な腫大を伴って認められた。本変化はリンパ節近辺にある炎症性変化に対する生理的反応として生じるものであり<sup>6)</sup>、前胃の潰瘍による炎症性変化に反応した二次的な変化と考えられる。また、胸腺の重量減少と萎縮の増加傾向が100 mg/kg群の雌で認められたが、本変化はストレス状態の動物で観察されるものであり<sup>7)</sup>、被験物質に特異的な変化というよりも、妊娠、分娩および哺育の負荷に被験物質の影響が加わったことにより生じた非特異的な変化と考えられる。

雄の血液学検査において、100 mg/kg群で認められた網状赤血球および血小板数の増加については、前胃の病変部からの出血に対する代償性の造血機能亢進像であり、分葉核球数の増加についても前胃の炎症に伴った変化と推察される。また、血液生化学検査におけるアルブミンの減少は、その他に肝臓あるいは腎臓への影響を示唆する変化が認められなかったことから、前胃の病変に伴った喪失性の二次的な変化である可能性が考えられる。

投与直後の流涎が100 mg/kg群の雌雄で観察された

が、一部には投与直前から反射的に発現する例もみられたことから、被験物質の局所刺激性に起因したもので、反復投与毒性を示す変化ではないと判断した。

## 2. 生殖発生毒性

親動物の検査において、交尾率、受胎率、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率、妊娠期間、分娩および哺育行動ともに被験物質の影響を示唆する変化は認められなかった。また、出産児数、出生生児数、性比、出生率、新生児の生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにおいても被験物質に起因する変化は認められなかった。したがって、被験物質による親動物の生殖機能、分娩・哺育機能および次世代の発育への影響はないと考えられる。

以上のように、本試験では反復投与による一般毒性学的影響として、親動物には前胃の潰瘍、粘膜上皮の増生など、主に被験物質の刺激性に起因する変化が雄では20 mg/kg以上の群、雌では100 mg/kg群で認められ、2例が死亡した。しかし、親動物の生殖機能および分娩・哺育機能ならびに次世代の発育への影響は認められなかった。したがって、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雄が4 mg/kg/day、雌が20 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は親動物および児動物ともに100 mg/kg/dayと考えられる。

## 文献

- 1) EPA/OTS, Doc #89-910000064, 1991.
- 2) 後藤 稔, 池田正之, 原 一郎編, "産業中毒便覧(増補版)," 医歯薬出版株式会社, 東京, 1984, pp.893-993.
- 3) B. I. Ghanayem et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 323(1985).
- 4) B. I. Ghanayem et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 336(1985).
- 5) B. I. Ghanayem et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **83**, 576(1986).
- 6) J. M. Ward, "Monographs on Pathology of Laboratory Animals:Hemopoietic System," eds. by T. C. Jones, J. M. Ward, U. Mohr and R. D. Hunt, Springer-Verlag, Berlin, 1990, pp.155-161.
- 7) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies," Elsevier, Amsterdam, 1990, pp.112-114.

## 連絡先

試験責任者：松浦郁夫

試験担当者：田谷ゆかり, 土谷 稔, 涌生ゆみ,  
豊田直人, 高野克代

(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所  
〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

## Correspondence

Authors: Ikuo Matsuura (Study director)

Yukari Taya, Minoru Tsuchitani,

Yumi Wako, Naoto Toyota,

Katsuyo Takano

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
Ibaraki, 314-02, Japan

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

Table 1 Hematological examination in male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Number of animals	12	12	12	12
RBC ( $10^4/\mu\text{l}$ )	851 $\pm$ 24.9	842 $\pm$ 40.9	840 $\pm$ 38.8	830 $\pm$ 34.9
Ht (PCV) (%)	45.5 $\pm$ 1.08	44.9 $\pm$ 1.32	45.8 $\pm$ 1.79	44.1 $\pm$ 1.52
Hb (g/dl)	15.8 $\pm$ 0.46	15.7 $\pm$ 0.54	15.9 $\pm$ 0.52	15.4 $\pm$ 0.35
Reticulo (%)	25 $\pm$ 2.2	27 $\pm$ 3.3	26 $\pm$ 3.4	30 $\pm$ 3.3**
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	53.5 $\pm$ 1.32	53.4 $\pm$ 2.32	54.6 $\pm$ 1.68	53.1 $\pm$ 1.87
MCH (pg)	18.6 $\pm$ 0.52	18.7 $\pm$ 0.95	19.0 $\pm$ 0.60	18.6 $\pm$ 0.69
MCHC (%)	34.7 $\pm$ 0.36	35.0 $\pm$ 0.83	34.8 $\pm$ 0.61	34.9 $\pm$ 0.60
Plt ( $10^4/\mu\text{l}$ )	103.0 $\pm$ 9.03	102.5 $\pm$ 12.28	104.6 $\pm$ 7.78	115.3 $\pm$ 13.27*
WBC ( $10^2/\mu\text{l}$ )	120 $\pm$ 15.7	120 $\pm$ 24.9	122 $\pm$ 32.5	159 $\pm$ 43.4
Differential leukocyte counts (%)				
Lymphocytes	81 $\pm$ 4.4	84 $\pm$ 5.0	82 $\pm$ 4.5	68 $\pm$ 7.9**
Neutrophils				
segmented	13 $\pm$ 4.7	10 $\pm$ 4.5	12 $\pm$ 4.2	25 $\pm$ 8.1**
band	0 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 0.9	0 $\pm$ 0.7	1 $\pm$ 0.5
Eosinophils	1 $\pm$ 0.8	1 $\pm$ 0.8	2 $\pm$ 1.4	1 $\pm$ 1.2
Basophils	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
Monocytes	4 $\pm$ 2.7	5 $\pm$ 2.4	5 $\pm$ 3.0	5 $\pm$ 2.7
Differential leukocyte counts ( $\times 10^2/\mu\text{l}$ )				
Lymphocytes	98 $\pm$ 13.9	100 $\pm$ 21.4	99 $\pm$ 26.0	109 $\pm$ 34.3
Neutrophils				
segmented	16 $\pm$ 6.0	12 $\pm$ 4.8	15 $\pm$ 7.3	39 $\pm$ 16.0**
band	0 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 1.2	0 $\pm$ 0.7	1 $\pm$ 0.8
Eosinophils	1 $\pm$ 1.0	1 $\pm$ 1.1	2 $\pm$ 2.1	2 $\pm$ 2.5
Basophils	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
Monocytes	5 $\pm$ 3.7	7 $\pm$ 3.8	6 $\pm$ 3.6	8 $\pm$ 5.3

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

Significantly different from control: \*, P<0.05; \*\*, P<0.01.

Table 2 Blood chemical examination in male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Number of animals	12	12	12	12
GOT (IU/l)	83 $\pm$ 17.5	87 $\pm$ 15.3	85 $\pm$ 21.3	82 $\pm$ 18.3
GPT (IU/l)	24 $\pm$ 4.0	25 $\pm$ 5.4	20 $\pm$ 4.8	24 $\pm$ 3.6
$\gamma$ -GTP (IU/l)	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
ALP (IU/l)	268 $\pm$ 60.3	256 $\pm$ 48.6	251 $\pm$ 71.9	243 $\pm$ 37.4
Total bilirbin (mg/dl)	0.1 $\pm$ 0.06	0.2 $\pm$ 0.03*	0.2 $\pm$ 0.07	0.2 $\pm$ 0.06
Urea nitrogen (mg/dl)	13.4 $\pm$ 1.93	13.3 $\pm$ 2.02	12.9 $\pm$ 1.41	13.2 $\pm$ 2.12
Creatinine (mg/dl)	0.5 $\pm$ 0.07	0.5 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0.04	0.5 $\pm$ 0.03
Glucose (mg/dl)	133 $\pm$ 15.5	129 $\pm$ 7.6	139 $\pm$ 7.6	130 $\pm$ 12.1
Total Chol. (mg/dl)	89 $\pm$ 15.8	83 $\pm$ 13.8	84 $\pm$ 15.2	93 $\pm$ 15.8
Triglyceride (mg/dl)	70 $\pm$ 25.7	87 $\pm$ 53.6	85 $\pm$ 27.7	92 $\pm$ 32.3
Total protein (g/dl)	6.99 $\pm$ 0.269	7.02 $\pm$ 0.193	7.02 $\pm$ 0.366	6.86 $\pm$ 0.248
Albumin (g/dl)	3.73 $\pm$ 0.132	3.80 $\pm$ 0.060	3.74 $\pm$ 0.129	3.61 $\pm$ 0.126*
A/G ratio	1.14 $\pm$ 0.050	1.19 $\pm$ 0.059	1.15 $\pm$ 0.069	1.12 $\pm$ 0.092
Inorganic phos. (mg/dl)	7.3 $\pm$ 0.33	7.5 $\pm$ 0.43	7.6 $\pm$ 0.44	7.4 $\pm$ 0.33
Ca (mg/dl)	9.6 $\pm$ 0.33	9.6 $\pm$ 0.33	9.7 $\pm$ 0.34	9.7 $\pm$ 0.33
Na (mEq/l)	143 $\pm$ 1.1	144 $\pm$ 0.8	144 $\pm$ 0.7	144 $\pm$ 0.8
K (mEq/l)	4.6 $\pm$ 0.23	4.4 $\pm$ 0.19	4.6 $\pm$ 0.15	4.5 $\pm$ 0.26
Cl (mEq/l)	100 $\pm$ 1.2	100 $\pm$ 1.2	101 $\pm$ 1.2	101 $\pm$ 0.7*

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

Significantly different from control: \*, P<0.05.

Table 3 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
<b>Male</b>				
Number of animals	12	12	12	12
Body weight (g)	494 ± 37.3	539 ± 45.6	540 ± 69.5	491 ± 50.0
Absolute organ weight				
Thymus (mg)	346 ± 45.3	438 ± 101.0	380 ± 101.3	314 ± 70.2
Liver (g)	13.61 ± 1.527	15.05 ± 2.531	14.70 ± 2.865	14.13 ± 1.948
Kidney (g)	3.02 ± 0.248	3.33 ± 0.302	3.23 ± 0.451	3.09 ± 0.416
Adrenal (mg)	57.2 ± 11.63	60.7 ± 13.43	66.1 ± 10.81	64.9 ± 8.61
Testis (g)	3.35 ± 0.212	3.48 ± 0.232	3.34 ± 0.292	3.38 ± 0.294
Epididymis (g)	1.27 ± 0.054	1.32 ± 0.107	1.27 ± 0.194	1.33 ± 0.125
Relative organ weight				
Thymus (mg%)	71 ± 11.8	82 ± 19.7	71 ± 19.5	64 ± 12.3
Liver (g%)	2.75 ± 0.203	2.78 ± 0.242	2.70 ± 0.188	2.87 ± 0.188
Kidney (g%)	0.61 ± 0.054	0.62 ± 0.046	0.60 ± 0.043	0.63 ± 0.049
Adrenal (mg%)	11.6 ± 2.47	11.3 ± 2.33	12.3 ± 1.71	13.3 ± 1.42
Testis (g%)	0.68 ± 0.034	0.65 ± 0.061	0.62 ± 0.078	0.69 ± 0.058
Epididymis (g%)	0.26 ± 0.026	0.24 ± 0.025	0.24 ± 0.050	0.27 ± 0.028
<b>Female</b>				
Number of animals	10	11	11	7
Body weight (g)	340 ± 22.9	329 ± 17.4	338 ± 51.7	331 ± 38.2
Absolute organ weight				
Thymus (mg)	256 ± 80.8	203 ± 43.3	220 ± 76.1	162 ± 27.3*
Liver (g)	14.29 ± 0.977	14.04 ± 1.219	13.66 ± 2.302	15.45 ± 2.915
Kidney (g)	2.02 ± 0.117	1.95 ± 0.100	2.03 ± 0.122	2.05 ± 0.216
Adrenal (mg)	75.0 ± 5.04	67.7 ± 4.55*	74.9 ± 12.56	78.0 ± 7.40
Relative organ weight				
Thymus (mg%)	75 ± 22.4	62 ± 12.0	64 ± 20.2	49 ± 4.0**
Liver (g%)	4.21 ± 0.168	4.27 ± 0.229	4.05 ± 0.296	4.62 ± 0.478
Kidney (g%)	0.59 ± 0.043	0.60 ± 0.028	0.62 ± 0.151	0.62 ± 0.023
Adrenal (mg%)	22.2 ± 1.94	20.6 ± 1.57	23.5 ± 10.08	23.8 ± 2.92

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control:\*, P<0.05;\*\* P<0.01.

Table 4 Summary of necropsy findings in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Sex Fate	Male				Female				
		Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice				Dead
Findings	Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100	0	4	20	100	100
Number of animals		12	12	12	12	12	12	12	10	2*
Lymph node										
Enlargement, pancreatico-duodenal		0	0	0	7	0	0	0	7	0
Thymus										
Small		0	0	0	0	1	0	1	0	1
Spleen										
Small		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Lung										
Congestion		0	0	0	0	0	0	0	0	2
Edema		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage, focal		1	0	0	0	0	0	0	0	0
Esophagus										
Hemorrhage, focal		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Stomach										
Distention		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Hemorrhage, focal, forestomach		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage, focal, glandular stomach		0	0	0	0	0	0	1	0	1
Thickening of wall, forestomach		0	0	2	12	0	0	0	10	0
Kidney										
Dilatation, pelvis		0	0	0	0	0	1	0	1	0
Nodule, one		1	0	0	0	0	0	0	0	0
Testis										
Small		0	0	1	0					
Epididymis										
Small		0	0	1	0					
Vagina										
Pus within lumen						1	0	0	0	0
Adrenal										
Enlargement		0	0	0	0	1	0	1	0	0
Harderian gland										
Brownish		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Thoracic cavity										
Pleural fluid, red		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Abdominal cavity										
Adhesion, stomach and diaphragm and liver		0	0	0	0	0	0	0	1	0
Adhesion, stomach and diaphragm and lung		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Adhesion, stomach and peritoneum		0	0	0	1	0	0	0	1	0

&, One animal died at 1 day, the other died at 16 days after commencement of administration.

Table 5 Summary of histopathological findings in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Sex	Fate	Dose (mg/kg/day)	Male				Female				Dead
				Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice				
				0	4	20	100	0	4	20	100	
Number of animals				12	12	12	12	12	12	12	10	2 <sup>&amp;</sup>
Heart												
	Inflammatory cell infiltration, focal	Total		1	#	#	0	0	#	#	0	0
		+		1	#	#	0	0	#	#	0	0
Lymph node (pancreatico-duodenal)												
	Hyperplasia, plasma cell	Total		#	#	#	7/7 <sup>§</sup>	#	#	#	7/7	#
		+		#	#	#	7/7	#	#	#	7/7	#
Thymus												
	Atrophy	Total		#	#	#	#	1	0	1	3	1
		+		#	#	#	#	0	0	1	2	0
		++		#	#	#	#	1	0	0	1	1
	Hyperplasia, thymic epithelium	Total		#	#	#	#	1	1	0	0	0
		+		#	#	#	#	1	1	0	0	0
Spleen												
	Increase in extramedullary hematopoiesis	Total		0	#	#	0	6	#	#	4	0
		+		0	#	#	0	6	#	#	4	0
	Atrophy	Total		0	#	#	0	1	#	#	0	0
		+		0	#	#	0	0	#	#	0	0
		++		0	#	#	0	1	#	#	0	0
Bone marrow (femur)				ND	#	#	ND	ND	#	#	ND	ND
Lung												
	Congestion	Total		0/1	#	#	#	#	#	#	#	2
		+		0/1	#	#	#	#	#	#	#	0
		++		0/1	#	#	#	#	#	#	#	2
	Edema	Total		0/1	#	#	#	#	#	#	#	1
		+		0/1	#	#	#	#	#	#	#	1
	Hemorrhage	Total		0/1	#	#	#	#	#	#	#	2
		+		0/1	#	#	#	#	#	#	#	0
		++		0/1	#	#	#	#	#	#	#	2
Inflammatory cell infiltration, focal		Total		1/1	#	#	#	#	#	#	#	0
		+		1/1	#	#	#	#	#	#	#	0
Esophagus												
	Ulcer	Total		#	#	#	#	#	#	#	#	1/1
		+		#	#	#	#	#	#	#	#	0/1
		++		#	#	#	#	#	#	#	#	1/1
Stomach												
	Atrophy, mucosa, glandular stomach	Total		0	0	0	0	1	0	0	0	0
		+		0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Hemorrhage, focal, forestomach	Total		0	0	0	0	0	0	0	0	1
		+		0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Hemorrhage, focal, glandular stomach	Total		0	0	0	0	0	0	1	0	1
		+		0	0	0	0	0	0	1	0	1
	Hyperplasia, mucosa, forestomach	Total		0	0	2	12**	0	0	0	10**	1
		+		0	0	1	0	0	0	0	0	0
		++		0	0	1	12	0	0	0	10	1
	Inflammatory cell infiltration, forestomach	Total		0	0	2	11**	0	0	0	10**	1
		+		0	0	1	0	0	0	0	0	0
		++		0	0	1	11	0	0	0	10	1
	Ulcer, forestomach	Total		0	0	1	11**	0	0	0	9**	1
		+		0	0	0	0	0	0	0	0	0
		++		0	0	1	11	0	0	0	9	1
Duodenum				ND	#	#	ND	ND	#	#	ND	ND

+, Slight; ++, Moderate; #, Not examined; ND, No abnormalities were detected.

§, Number of animals showing lesion/number of animals examined.

&, One animal died at 1 day, the other died at 16 days after commencement of administration.

Significantly different from control: \*\*, P<0.01.

Table 5 (Continued)

Organ	Sex	Fate	Male				Female				Dead
			Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice				
			0	4	20	100	0	4	20	100	
Findings	Dose (mg/kg/day)										100
Number of animals			12	12	12	12	12	12	10		2*
Liver											
Fatty change, hepatocyte	Total		5	#	#	4	1	#	#	0	0
	+		5	#	#	4	0	#	#	0	0
	++		0	#	#	0	1	#	#	0	0
Microgranuloma	Total		6	#	#	3	0	#	#	1	0
	+		6	#	#	3	0	#	#	1	0
Necrosis, focal	Total		1	#	#	0	0	#	#	0	0
	+		1	#	#	0	0	#	#	0	0
Kidney											
Basophilic tubule	Total		2	#	#	1	0	0/1 <sup>§</sup>	#	0	0
	+		2	#	#	1	0	0/1	#	0	0
Cyst	Total		1	#	#	0	1	0/1	#	0	1
	+		1	#	#	0	1	0/1	#	0	1
Dilatation, pelvis	Total		0	#	#	0	0	1/1	#	1	0
	+		0	#	#	0	0	1/1	#	1	0
Eosinophilic body, tubular epithelium, proximal	Total		0	#	#	1	0	0/1	#	0	0
	+		0	#	#	1	0	0/1	#	0	0
Fatty degeneration, tubular epithelium	Total		0	#	#	0	1	0/1	#	0	0
	+		0	#	#	0	0	0/1	#	0	0
	++		0	#	#	0	1	0/1	#	0	0
Hyaline droplet, tubular epithelium	Total		3	#	#	2	0	0/1	#	0	0
	+		3	#	#	2	0	0/1	#	0	0
Inflammatory cell infiltration, interstitium	Total		1	#	#	0	0	0/1	#	0	0
	+		1	#	#	0	0	0/1	#	0	0
Mineralization	Total		1	#	#	0	0	0/1	#	0	0
	+		1	#	#	0	0	0/1	#	0	0
Testis											
Atrophy	Total		0	#	1/1	0					
Epididymis											
Decrease in sperm	Total		0	#	1/1	0					
	+		0	#	1/1	0					
Inflammatory cell infiltration, focal	Total		0	#	0/1	1					
	+		0	#	0/1	1					
Ovary							ND/1	ND/1	ND/1	ND/1	#
Vagina											
Inflammatory cell infiltration	Total						1/1	#	#	#	#
	+						0/1	#	#	#	#
	++						1/1	#	#	#	#
Mammary gland							ND/1	#	ND/1	ND/1	#
Adrenal											
Hypertrophy, cortical cell, fascicular zone	Total		ND	#	#	ND	1	#	0/1 <sup>§</sup>	0	0
	+		ND	#	#	ND	1	#	0/1	0	0
Increase in lipid droplet, fascicular zone	Total		ND	#	#	ND	1	#	0/1	1	0
	+		ND	#	#	ND	0	#	0/1	1	0
	++		ND	#	#	ND	1	#	0/1	0	0
Mineralization	Total		ND	#	#	ND	1	#	0/1	0	0
	+		ND	#	#	ND	1	#	0/1	0	0
Necrosis, cortex	Total		ND	#	#	ND	0	#	1/1	0	1
	+		ND	#	#	ND	0	#	0/1	0	1
	++		ND	#	#	ND	0	#	1/1	0	0
Harderian gland	Total		#	#	#	#	1/1	#	#	#	#
Hypersecretion	+		#	#	#	#	1/1	#	#	#	#
Brain			ND	#	#	ND	ND	#	#	ND	ND

+, Slight ; ++, Moderate ; #, Not examined ; ND, No abnormalities were detected.

§, Number of animals showing lesion/number of animals examined.

&, One animal died at 1 day, the other died at 16 days after commencement of administration.

Table 6 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Number of pairs examined	12	12	12	11 <sup>#</sup>
Number of pairs with successful mating	12	12	12	10 <sup>§</sup>
Mating index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	11	11	11	9 <sup>§</sup>
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	91.7	91.7	91.7	90.0
Pairing days until mating	2.0 ± 1.41 <sup>c)</sup>	2.1 ± 1.16	2.0 ± 1.04	3.6 ± 4.03
Number of estrous stages without mating	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00

a) Mating index (%) = (Number of pairs with successful mating/number of pairs examined) × 100

b) Fertility index (%) = (Number of pregnant animals/number of pairs with successful mating) × 100

c) Values are expressed as Mean ± S.D.

#, One female died at 2 days after pairing.

§, These indices included one female that the pregnancy was noticed later by clinical signs.

Table 7 Delivery and litter data in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Number of females examined	11	11	11	8
Number of females with live pups	11	11	11	8
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Gestation length (days)	22.4 ± 0.50 <sup>b)</sup>	22.5 ± 0.52	22.7 ± 0.47	22.6 ± 0.52
Number of corpora lutea	19.0 ± 2.49	18.3 ± 2.28	17.7 ± 1.27	18.4 ± 2.83
Number of implantation sites	16.9 ± 1.76	16.2 ± 2.04	15.9 ± 3.45	16.3 ± 3.45
Implantation index (%) <sup>b)</sup>	89.8	90.4	89.7	89.0
Delivery index (%) <sup>c)</sup>	95.5	93.2	85.4	96.5
Number of pups delivered	16.2 ± 2.18	15.4 ± 2.46	13.8 ± 3.09	15.8 ± 3.73
Number of live pups on day 0	15.9 ± 1.81	15.3 ± 2.49	13.6 ± 3.07	14.9 ± 3.60
Live birth index (%) <sup>d)</sup>	98.6	99.4	98.7	95.1
Sex ratio (male/female)	0.97 (86/89)	0.91 (80/88)	1.14 (80/70)	0.89 (56/63)
Number of live pups on day 4	14.4 ± 5.08	15.2 ± 2.56	13.5 ± 3.01	13.4 ± 6.39
Viability index on day 4 (%) <sup>e)</sup>	90.9	99.4	98.8	87.5
Body weight of pups (g)				
on day 0 male	6.6 ± 0.54	6.9 ± 0.59	7.2 ± 0.91	6.7 ± 0.79
female	6.3 ± 0.56	6.5 ± 0.52	6.8 ± 0.87	6.4 ± 0.89
on day 4 male	10.9 ± 0.83	11.2 ± 1.56	11.4 ± 2.56	10.6 ± 1.38
female	10.6 ± 0.94	10.8 ± 1.51	10.9 ± 2.43	10.2 ± 1.28
Body weight gain of pups (g)				
day 0 to 4 male	4.3 ± 0.39	4.3 ± 1.14	4.2 ± 1.74	3.8 ± 1.04
female	4.2 ± 0.50	4.3 ± 1.06	4.2 ± 1.70	3.7 ± 0.79

a) Gestation index (%) = (Number of females with live pups/number of pregnant females) × 100

b) Implantation index (%) = (Number of implantation sites/number of corpora lutea) × 100

c) Delivery index (%) = (Number of pups delivered/number of implantation sites) × 100

d) Live birth index (%) = (Number of live pups on day 0/number of pups delivered) × 100

e) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4/number of live pups on day 0) × 100

f) Values are expressed as Mean ± S.D.



## 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの細菌を用いる復帰突然変異試験

### Reverse Mutation Test of 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate on Bacteria

#### 要約

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

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

156~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲で濃度を設定して行った濃度設定試験では、直接法における TA98 および TA1537 の 5000  $\mu\text{g}$ /プレートでのみ菌の生育阻害が認められ、2500  $\mu\text{g}$ /プレートでは、両菌株とも復帰変異コロニー数の増加が認められた。したがって、本試験は、いずれの菌株においても 5000  $\mu\text{g}$ /プレートを最高濃度とし、以下公比2で計6濃度を設定して行った。

試験を2回行った結果、直接法の TA1537 においてのみ 2500  $\mu\text{g}$ /プレートで復帰変異コロニー数の増加が認められた。しかし、濃度依存性については明らかではなかった。また、直接法の TA98 において、2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の濃度で復帰変異コロニー数の増加傾向が認められた。

そこで、この2菌株について、1000~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲で濃度を設定(公差500)し、直接法における確認試験を行った。その結果、両菌株とも 3500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の濃度で生育阻害が認められた。TA1537 では 2500 および 3000  $\mu\text{g}$ /プレートで復帰変異コロニー数の増加が認められ、濃度依存性傾向も認められた。TA98 では、復帰変異コロニー数の増加傾向は認められたものの、溶媒対照値の2倍を越えるものではなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートは、細菌に対し遺伝子突然変異を誘発する(陽性)と結論した。

#### 方法

##### 1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1</sup> および *E. coli* WP2 *uvrA*<sup>2</sup> の5菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で-80℃以下に凍結保存し

た。

試験に際して、各凍結菌株を解凍後、その30  $\mu\text{L}$ をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の菌懸濁液は、濁度を測定し、濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり $1 \times 10^9$ 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

##### 2. 被験物質

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート(ロット番号K609415, 三洋化成工業(株)提供)は、無色透明の液体で、水、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびアセトンに可溶であり、分子式 $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_2$ 、分子量157.24、純度99.9%〔不純物として、ハイドロキノンモノメチルエーテル2000ppm(重合防止剤として添加)、ジメチルアミノエタノール0.1%以下、メチルメタクリレート0.02%以下を含む〕の物質である。

実験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

##### 3. 被験物質供試液の調製

溶媒に蒸留水(株大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製した。

##### 4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

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

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

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

AF-2 および 2-AA は DMSO(株同仁化学研究所)に、SA および 9-AA は蒸留水(株大塚製薬工場)に溶解した。

##### 5. 培地

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

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

したものである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

## 2) アミノ酸添加軟寒天培地(トッパアガー)

0.6%寒天粉末(Difco Laboratories)および0.5%塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、*S. typhimurium*用には0.5 mM D-ビオチンおよび0.5 mM L-ヒスチジン水溶液、*E. coli*用には0.5 mM L-トリプトファン水溶液を1/10容加え、トッパアガーとした。

## 6. S9 mix

製造後6ヶ月以内のエームステスト用凍結S9 mix(キッコーマン株)を購入し、使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

## 7. 試験方法

試験は、プレインキュベーション法で行った。

試験管に使用溶媒、被験物質供試液あるいは陽性対照物質溶液を0.1 mL入れ、次いで直接法では0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を0.5 mL、代謝活性化法ではS9 mixを0.5 mL加え、続いて試験菌液0.1 mLを分注し、37°Cで20分間振盪培養した。培養終了後、45°Cに保温したトッパアガー2 mLを加えた混合液をプレート上に重層した。37°Cで48時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。プレートは、濃度設定試験では各濃度とも2枚、本試験では3枚を使用した。本試験は、同一濃度を用いて2回行った。

## 8. 結果の判定

結果の判定は、各濃度におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、以下の3基準を全て満たす場合を陽性とした。

- 1) 被験物質処理群において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
- 2) 被験物質濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する(濃度依存性)。
- 3) 2回にわたる本試験の結果から、復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

### 結果および考察

156~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲で濃度を設定して行った濃度設定試験では、直接法におけるTA98およびTA1537の5000  $\mu\text{g}$ /プレートでのみ菌の生育阻害が認め

られ、また、2500  $\mu\text{g}$ /プレートでは両菌株とも溶媒対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。したがって、本試験における被験物質の処理濃度は、最高濃度を5000  $\mu\text{g}$ /プレートとし、以下公比2で2500, 1250, 625, 313および156  $\mu\text{g}$ /プレートとした。

本試験の結果(Tables 1~4)、直接法のTA1537株においてのみ2500  $\mu\text{g}$ /プレートで溶媒対照値の2倍を越える復帰変異コロニー数の増加が認められたが、濃度依存性については明らかではなかった。また、直接法におけるTA98の2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の濃度で復帰変異コロニー数の増加傾向が認められた。菌の生育阻害は、濃度設定試験と同様、TA98およびTA1537の5000  $\mu\text{g}$ /プレートでのみ認められた。

そこで、この2菌株について2500  $\mu\text{g}$ /プレートから菌の生育阻害が認められた5000  $\mu\text{g}$ /プレート間に濃度依存性の復帰変異コロニー数の増加が認められるか否かを調べる目的で1000~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲で濃度を設定(公差500)し、直接法による確認試験を行った。その結果(Table 5)、両菌株とも3500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の濃度で生育阻害が認められた。TA1537では、2500および3000  $\mu\text{g}$ /プレートで溶媒対照値と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められ、濃度依存性傾向も認められた。TA98においては、2000~3500  $\mu\text{g}$ /プレートで復帰変異コロニー数の増加傾向が認められたものの、溶媒対照値の2倍を越えるものではなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定した。陽性結果が得られたので、変異原性の強さに関する相対的比較値である比変異活性値<sup>3)</sup>(誘発復帰変異コロニー数/mg)を算出したところ、本被験物質の比変異活性値は3.6/mgであった。

なお、類縁化合物である(ジメチルアミノ)エチルアクリラートの変異原性についても、*S. typhimurium*および*E. coli*を用いた復帰突然変異試験並びにCHL細胞を用いた染色体異常試験で陽性<sup>4)</sup>と報告されており、エチルメタクリラートについては、*S. typhimurium*を用いた復帰突然変異試験で陰性<sup>5)</sup>、L5178Yマウスリンホーマ細胞を用いた染色体異常試験で陽性<sup>6)</sup>、CHO細胞を用いた染色体異常試験では陰性<sup>7)</sup>および姉妹染色分体交換試験で陽性<sup>7)</sup>と報告されている。また、2-(ジメチルアミノ)エチル塩化物については、麦酒酵母菌を用いた復帰突然変異試験で陽性<sup>8)</sup>と報告されている。

## 文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983).
- 2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," 1, Vol.3, eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.
- 3) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化審法毒性試験法の解説 改訂版," 化学工業日報社, 東京, 1992, p. 42.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化学物質毒性試験報告 Vol. 5" 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1997, pp. 595-604.
- 5) E. Zeiger, B. Anderson, S. Haworth, T. Lowlor, K. Mortelmans, W. Speck, *Environ. Mutagen.*, **9(suppl. 9)**, 1(1987).
- 6) M.M. Moore, A. Amtower, C.L. Doerr, K.H. Brock, K.L. Dearfield, *Environ. Mol. Mutagen.*, **11**, 49(1988).
- 7) "The Dictionary of Substances and their Effects," Vol.4, eds. by M.L. Richardson, S. Gangolli, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994, pp. 430-432.
- 8) F.K. Zimmermann, R.C. Borstel, E.S. Halle, J.M. Parry, D. Siebert, G. Zetterberg, R. Barale, N. Loprieno, *Mutat. Res.*, **133**, 199(1984).

## 連絡先

試験責任者：野田 篤  
 試験担当者：野田 篤, 昆 尚美  
 (財)畜産生物科学安全研究所  
 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11  
 Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

## Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)  
 Naomi Kon  
 Research Institute for Animal Science in  
 Biochemistry and Toxicology  
 3-7-11 Hashimoto-dai, Sagami-hara-shi,  
 Kanagawa, 229-1132, Japan  
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Results of reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate on bacteria (1st trial)  
[direct method:-S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	143	147	163	11	12	7	13	14	20	17	18	24	7	7	6
	[151 $\pm$ 11]			[ 10 $\pm$ 3]			[ 16 $\pm$ 4]			[ 20 $\pm$ 4]			[ 7 $\pm$ 1]		
156	169	191	169	8	10	10	17	16	15	18	20	30	6	10	3
	[176 $\pm$ 13]			[ 9 $\pm$ 1]			[ 16 $\pm$ 1]			[ 23 $\pm$ 6]			[ 6 $\pm$ 4]		
313	142	148	171	9	8	9	10	16	14	16	24	17	6	6	4
	[154 $\pm$ 15]			[ 9 $\pm$ 1]			[ 13 $\pm$ 3]			[ 19 $\pm$ 4]			[ 5 $\pm$ 1]		
625	136	157	150	11	10	12	10	10	12	26	27	18	6	5	7
	[148 $\pm$ 11]			[ 11 $\pm$ 1]			[ 11 $\pm$ 1]			[ 24 $\pm$ 5]			[ 6 $\pm$ 1]		
1250	172	181	178	8	10	8	12	17	19	19	17	24	7	6	8
	[177 $\pm$ 5]			[ 9 $\pm$ 1]			[ 16 $\pm$ 4]			[ 20 $\pm$ 4]			[ 7 $\pm$ 1]		
2500	164	162	148	14	6	9	11	20	14	30	44	30	11	15	18
	[158 $\pm$ 9]			[ 10 $\pm$ 4]			[ 15 $\pm$ 5]			[ 35 $\pm$ 8]			[ 15 $\pm$ 4]		
5000	170	171	165	8	8	8	17	19	18	19*	46*	37*	4*	3*	6*
	[169 $\pm$ 3]			[ 8 $\pm$ 0]			[ 18 $\pm$ 1]			[ 34 $\pm$ 14]			[ 4 $\pm$ 2]		
Positive control	830	888	888 <sup>a)</sup>	361	315	320 <sup>b)</sup>	895	933	941 <sup>c)</sup>	382	384	402 <sup>d)</sup>	1014	794	1030 <sup>e)</sup>
	[869 $\pm$ 33]			[332 $\pm$ 25]			[923 $\pm$ 25]			[389 $\pm$ 11]			[946 $\pm$ 132]		

\*: Toxic effect was observed.

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
 c): AF-2, 0.04  $\mu\text{g}/\text{plate}$     d): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     e): 9-AA; 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2 Results of reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate on bacteria (1st trial)  
[activation method:+S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	149	150	163	20	15	10	19	14	15	25	41	40	9	16	10
	[154 $\pm$ 8]			[ 15 $\pm$ 5]			[ 16 $\pm$ 3]			[ 35 $\pm$ 9]			[ 12 $\pm$ 4]		
156	184	174	186	10	6	9	17	14	14	28	38	37	12	8	9
	[181 $\pm$ 6]			[ 8 $\pm$ 2]			[ 15 $\pm$ 2]			[ 34 $\pm$ 6]			[ 10 $\pm$ 2]		
313	207	187	192	16	7	10	22	17	15	32	29	41	8	7	18
	[195 $\pm$ 10]			[ 11 $\pm$ 5]			[ 18 $\pm$ 4]			[ 34 $\pm$ 6]			[ 11 $\pm$ 6]		
625	220	223	193	9	18	7	14	15	21	39	35	33	13	15	13
	[212 $\pm$ 17]			[ 11 $\pm$ 6]			[ 17 $\pm$ 4]			[ 36 $\pm$ 3]			[ 14 $\pm$ 1]		
1250	216	221	223	15	14	11	16	14	14	35	42	48	14	17	13
	[220 $\pm$ 4]			[ 13 $\pm$ 2]			[ 15 $\pm$ 1]			[ 42 $\pm$ 7]			[ 15 $\pm$ 2]		
2500	222	205	191	9	9	12	20	15	17	37	32	41	18	20	15
	[206 $\pm$ 16]			[ 10 $\pm$ 2]			[ 17 $\pm$ 3]			[ 37 $\pm$ 5]			[ 18 $\pm$ 3]		
5000	242	214	216	13	9	9	20	17	25	52	54	37	20	17	14
	[224 $\pm$ 16]			[ 10 $\pm$ 2]			[ 21 $\pm$ 4]			[ 48 $\pm$ 9]			[ 17 $\pm$ 3]		
Positive control	566	631	510 <sup>a)</sup>	205	201	180 <sup>b)</sup>	958	982	988 <sup>c)</sup>	301	258	265 <sup>a)</sup>	85	80	103 <sup>b)</sup>
	[569 $\pm$ 61]			[195 $\pm$ 13]			[976 $\pm$ 16]			[275 $\pm$ 23]			[ 89 $\pm$ 12]		

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b): 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$     c): 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3 Results of reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate on bacteria (2nd trial)  
[direct method:-S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate															[Mean $\pm$ S.D.]				
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
0	109	135	141	13	10	8	18	16	17	21	32	26	6	7	5	[128 $\pm$ 17]	[10 $\pm$ 3]	[17 $\pm$ 1]	[26 $\pm$ 6]	[6 $\pm$ 1]
156	107	119	103	13	7	8	25	16	15	26	19	11	6	9	6	[110 $\pm$ 8]	[9 $\pm$ 3]	[19 $\pm$ 6]	[19 $\pm$ 8]	[7 $\pm$ 2]
313	120	112	151	7	14	7	22	13	20	29	18	20	6	6	10	[128 $\pm$ 21]	[9 $\pm$ 4]	[18 $\pm$ 5]	[22 $\pm$ 6]	[7 $\pm$ 2]
625	132	133	130	16	10	7	19	14	18	27	16	31	6	9	6	[132 $\pm$ 2]	[11 $\pm$ 5]	[17 $\pm$ 3]	[25 $\pm$ 8]	[7 $\pm$ 2]
1250	128	110	130	6	11	6	21	11	14	26	15	27	7	5	11	[123 $\pm$ 11]	[8 $\pm$ 3]	[15 $\pm$ 5]	[23 $\pm$ 7]	[8 $\pm$ 3]
2500	121	110	110	10	6	11	17	12	12	38	38	42	18	14	13	[114 $\pm$ 6]	[9 $\pm$ 3]	[14 $\pm$ 3]	[39 $\pm$ 2]	[15 $\pm$ 3]
5000	139	128	147	7	13	4	17	22	19	33*	54*	27*	1*	4*	2*	[138 $\pm$ 10]	[8 $\pm$ 5]	[19 $\pm$ 3]	[38 $\pm$ 14]	[2 $\pm$ 2]
Positive control	872	857	845**	354	340	317**	976	913	993*	413	432	372*	946	982	964**	[858 $\pm$ 14]	[337 $\pm$ 19]	[961 $\pm$ 42]	[406 $\pm$ 31]	[964 $\pm$ 18]

\*:Toxic effect was observed.

a):AF-2;2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b):NaN<sub>3</sub>;Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ c):AF-2, 0.04  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d):AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e):9-AA;9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 4 Results of reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate on bacteria (2nd trial)  
[activation method:+S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate															[Mean $\pm$ S.D.]				
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
0	111	119	136	11	8	13	16	17	17	30	44	36	19	21	18	[122 $\pm$ 13]	[11 $\pm$ 3]	[17 $\pm$ 1]	[37 $\pm$ 7]	[19 $\pm$ 2]
156	143	140	139	14	7	14	23	19	13	29	34	41	20	18	16	[141 $\pm$ 2]	[12 $\pm$ 4]	[18 $\pm$ 5]	[35 $\pm$ 6]	[18 $\pm$ 2]
313	132	120	139	11	14	6	18	14	17	48	43	30	20	11	22	[130 $\pm$ 10]	[10 $\pm$ 4]	[16 $\pm$ 2]	[40 $\pm$ 9]	[18 $\pm$ 6]
625	147	123	142	16	11	13	13	25	14	39	29	37	14	24	20	[137 $\pm$ 13]	[13 $\pm$ 3]	[17 $\pm$ 7]	[35 $\pm$ 5]	[19 $\pm$ 5]
1250	139	160	147	12	8	9	22	20	19	25	44	34	18	16	14	[149 $\pm$ 11]	[10 $\pm$ 2]	[20 $\pm$ 2]	[34 $\pm$ 10]	[16 $\pm$ 2]
2500	133	117	151	9	9	11	17	20	17	34	46	40	16	16	19	[134 $\pm$ 17]	[10 $\pm$ 1]	[18 $\pm$ 2]	[40 $\pm$ 6]	[17 $\pm$ 2]
5000	153	175	149	9	9	14	23	20	21	38	58	32	24	27	29	[159 $\pm$ 14]	[11 $\pm$ 3]	[21 $\pm$ 2]	[43 $\pm$ 14]	[27 $\pm$ 3]
Positive control	513	555	637*	197	175	161*	920	981	971*	351	375	390*	100	88	82*	[568 $\pm$ 63]	[178 $\pm$ 18]	[957 $\pm$ 33]	[372 $\pm$ 20]	[90 $\pm$ 9]

a):2-AA;2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b):2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c):2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 5 Results of reverse mutation test of 2- (dimethylamino)ethyl methacrylate on bacteria (Confirmative test) [direct method: -S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]				
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
0	-	-	-	26 23 25 [ 25 $\pm$ 2]	5 4 5 [ 5 $\pm$ 1]
1000	-	-	-	25 23 22 [ 23 $\pm$ 2]	8 8 5 [ 7 $\pm$ 2]
1500	-	-	-	22 23 33 [ 26 $\pm$ 6]	9 11 7 [ 9 $\pm$ 2]
2000	-	-	-	33 36 30 [ 33 $\pm$ 3]	8 7 9 [ 8 $\pm$ 1]
2500	-	-	-	52 42 39 [ 44 $\pm$ 7]	12 11 16 [ 13 $\pm$ 3]
3000	-	-	-	36 47 42 [ 42 $\pm$ 6]	13 11 21 [ 15 $\pm$ 5]
3500	-	-	-	28* 29* 46* [ 34 $\pm$ 10]	7* 9* 6* [ 7 $\pm$ 2]
4000	-	-	-	17* 22* 16* [ 18 $\pm$ 3]	5* 4* 3* [ 4 $\pm$ 1]
4500	-	-	-	15* 7* 10* [ 11 $\pm$ 4]	3* 3* 4* [ 3 $\pm$ 1]
5000	-	-	-	10* 15* 17* [ 14 $\pm$ 4]	3* 8* 4* [ 5 $\pm$ 3]
Positive control	-	-	-	343 393 358 <sup>a)</sup> [365 $\pm$ 26]	933 962 905 <sup>b)</sup> [933 $\pm$ 29]

\*: Toxic effect was observed. -: Not tested.

a) : AF-2; 2- (2-Furyl)-3- (5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$

b) : 9-AA; 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

# 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの 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

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL)を用いて *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、細胞増殖抑制試験を行った結果、連続処理法の場合は、24時間および48時間処理でそれぞれ625および313  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、短時間処理法の場合は、S9 mix非存在および存在下でそれぞれ800および1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で、50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。したがって、染色体異常試験における濃度は、連続処理法の場合20, 39, 78, 156, 313および625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法の場合200, 400, 600, 800, 1400および1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

試験の結果、連続処理法では、24時間および48時間処理ともに最高濃度の625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (出現頻度88.5および76.5%)で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。短時間処理法においては、S9 mix非存在下で細胞に対する毒性のため観察可能な分裂中期像が認められなかった高濃度を除く200~600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (出現頻度6.5, 49.5, 87.5%)で、また、S9 mix存在下では、800~1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (出現頻度13.5, 99.5, 100%)で濃度依存的な染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。

以上の成績から、本実験条件下において、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートは、CHL細胞に対し染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

### 方法

#### 1. 試験細胞株

チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL)〔国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部(元: 国立衛生試験所 変異原性部)から昭和60年1月13日入手〕を使用した。供試細胞は、浮遊細胞液に10%の割合でジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業(株))を添加し、液体窒素条件下で保存しておいたものを培養液に戻し、解凍後の継代数が6回までのものを使用した。

#### 2. 培養液

Eagle-MEM粉末培地(Gibco Laboratories)を常法に従い調製し、これに非働化仔牛血清(Gibco Laboratories)を10%の割合で添加したものをを用いた。

#### 3. 培養条件

$4 \times 10^3$ 個/mLの細胞を含む培養液5 mLをシャーレ(径6 cm, Becton Dickinson Co.)に加え、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。

連続処理法では、培養開始3日後に被験物質供試液を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理法では、培養開始3日後にS9 mix非存在および存在下で6時間処理し、処理終了後、新鮮培養液でさらに18時間培養した。

#### 4. S9 mix

製造後6ヶ月以内の染色体異常試験用凍結S9 mix(キッコマン(株))を購入し、使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

#### 5. 被験物質

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート(ロット番号K609415, 三洋化成工業(株)提供)は、無色透明の液体で、水、DMSOおよびアセトンに可溶であり、分子式C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>、分子量157.24、純度99.9%〔不純物として、ハイドロキノンモノメチルエーテル2000 ppm(重合防止剤として添加)、ジメチルアミノエタノール0.1%以下、メチルメタクリレート0.02%以下を含む〕の物質である。

実験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 6. 被験物質供試液の調製

溶媒に蒸留水(株)大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製し、そのシャーレ内への添加量は培養液量の10%(v/v)とした。

#### 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。0.1%クリスタルバイオレット水溶液で染色した細胞の密度を単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリジナル光学工業(株))を用いて測定し、溶媒対照群の細胞増殖率を100%とした時の各濃度群の細胞増殖率を求めた。

その結果(Appendix 1, 2)、連続処理法の場合は、24

時間処理では625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は313~625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間にあるものと判断された。48時間処理では156  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で50%細胞増殖抑制が認められ、313  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。短時間処理法の場合は、S9 mix非存在および存在下でそれぞれ800および1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、それぞれ600~800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間および1400~1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間にあるものと判断された。

Appendix 1 Cell growth inhibition test of CHL cells continuously treated with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate without S9 mix

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Average cell growth rate (%)	
	24-hour treatment	48-hour treatment
0(Solvent)	100	100
78	66.0	62.5
156	61.5	50.0
313	58.0	39.0
625	26.5	20.5
1250	12.0	3.5
2500	10.0	3.0
5000	8.0	2.5

Appendix 2 Cell growth inhibition test of CHL cells treated with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate with and without S9 mix

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Average cell growth rate (%)	
	without S9 mix	with S9 mix
0(Solvent)	100	100
600	56.5	81.0
800	41.5	70.5
1000	28.0	70.5
1200	18.0	70.5
1400	16.5	57.5
1600	11.5	43.5
1800	17.5	33.0

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果から、染色体異常試験における被験物質の濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の前後が含まれ、かつ3濃度以上のデータが得られることを考慮して、連続処理法では625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度とし、以下公比2で計6濃度を設定した。短時間処理法においては1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (約10 mM)を最高濃度とし、以下公比2で4濃度、並びにS9 mix非存在および存在下で50%をやや

上回る細胞増殖率を示した600および1400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ も設定し、計6濃度とした。対照として、溶媒対照群と陽性対照群を設けた。

陽性対照として、連続処理法ではN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, Sigma Chemical Co.)を2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法では3,4-benzo [a] pyrene(B [a] P, Sigma Chemical Co.)を10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で用いた。陽性対照物質の溶媒には、いずれもDMSO(和光純薬工業(株))を使用した。

9. 染色体標本の作製

培養終了2時間前にコルセミド(Gibco Laboratories)を最終濃度として0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。トリプシン処理で細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.4%ギムザ液で約15分間染色した。スライド標本は、各シャーレにつき3枚作製した。

10. 染色体の観察

各シャーレ当たり100個、すなわち、1濃度当たり2シャーレ、200個の分裂中期像を、総合倍率600倍の顕微鏡下で観察した。標本は全てコード化し、盲検法で観察を行った。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(MMS)による分類法<sup>1)</sup>に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常と倍数性細胞(Polyploid)の有無について観察した。

11. 記録と判定

観察した細胞数、構造異常の種類と数および倍数性細胞の数について集計し、構造異常を有する細胞については、ギャップのみを有する細胞を含めた場合(+g)と含めない場合(-g)とに区別して記録した。

ギャップを含めた染色体構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度について、多試料 $\chi^2$ 検定を行い有意差(有意水準5%以下)が認められた場合は、フィッシャーの直接確率法を用いて溶媒対照群と各濃度群との間の有意差検定(有意水準は多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた)を行った。

その結果、溶媒対照群と比較して、被験物質による染色体異常細胞の出現頻度が2濃度以上で有意に増加し、かつ濃度依存性あるいは再現性が認められた場合、陽性と判定した。

結果および考察

連続処理法による結果をTable 1に示した。24時間および48時間処理ともに、最高濃度の625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ でのみ染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度88.5および76.5%)が認められた。倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。



短時間処理法による結果をTable 2に示した。S9 mix非存在下では、200~600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で濃度依存的かつ有意な染色体構造異常細胞の増加(出現頻度6.5, 49.5, 87.5%)が認められた。S9 mix存在下では、800~1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で濃度依存的な染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度13.5, 99.5, 100%)が認められた。S9 mix非存在および存在下ともに、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。なお、短時間処理法S9 mix非存在下の800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では、被験物質の細胞に対する毒性のため、観察可能な分裂中期像が認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートのCHL細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。本試験結果は、CHL細胞において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が10%以上を陽性とする生物学的判定基準<sup>2)</sup>からみても明らかに陽性を示すものであった。陽性結果が得られたため、 $D_{20}$ 値<sup>3)</sup>(分裂中期像の20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の濃度)を算出したところ、連続処理法では妥当と考えられる $D_{20}$ 値は得られず、短時間処理法において算出された0.19 mg/mLを本被験物質の $D_{20}$ 値とした。

なお、類縁化合物である(ジメチルアミノ)エチルアクリラートの変異原性についてもCHL細胞を用いた染色体異常試験並びに*Salmonella typhimurium*および*Escherichia coli*を用いた復帰突然変異試験で陽性<sup>4)</sup>と報告されており、エチルメタクリラートについては、*S.typhimurium*を用いた復帰突然変異試験で陰性<sup>5)</sup>、L5178Yマウスリンホーマ細胞を用いた染色体異常試験で陽性<sup>6)</sup>、CHO細胞を用いた染色体異常試験では陰性<sup>7)</sup>および姉妹染色分体交換試験で陽性<sup>7)</sup>と報告されている。また、2-(ジメチルアミノ)エチル塩化物については、麦酒酵母菌を用いた復帰突然変異試験で陽性<sup>8)</sup>と報告されている。

## 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) 石館 基 監修, “改定増補 染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 19.
- 3) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, “化審法毒性試験法の解説 改訂版,” 化学工業日報社, 東京, 1992, pp. 51-52.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, “化学物質毒性試験報告 Vol. 5,” 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1997, pp. 595-604.
- 5) E. Zeiger, B. Anderson, S. Haworth, T. Lowlor, K. Mortelmans, W. Speck, *Environ. Mutagen.*, **9**(suppl. 9), 1(1987).
- 6) M.M. Moore, A. Amtower, C.L. Doerr, K.H. Brock, K.L. Dearfield, *Environ. Mol. Mutagen.*, **11**, 49(1988).

- 7) “The Dictionary of Substances and their Effects,” Vol.4, eds. by M.L. Richardson, S. Gangolli, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994, pp. 430-432.
- 8) F.K. Zimmermann, R.C. Borstel, E.S. Halle, J.M. Parry, D. Siebert, G. Zetterberg, R. Barale, N. Loprieno, *Mutat. Res.*, **133**, 199(1984).

## 連絡先

試験責任者：野田 篤  
 試験担当者：野田 篤, 昆 尚美  
 (財)畜産生物科学安全研究所  
 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11  
 Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

## Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)  
 Naomi Kon  
 Research Institute for Animal Science in  
 Biochemistry and Toxicology  
 3-7-11 Hashimoto-dai, Sagami-hara-shi,  
 Kanagawa, 229-1132, Japan  
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate without S9 mix

Group	Concentration (μg/mL)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0	—	—
DAEM	20	24	200	3	0	0	0	0	0	3	0 (0)	3 (1.5)	0.5	-	-
	39	24	200	0	0	1	0	1	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0	-	-
	78	24	200	0	1	1	0	0	0	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0	-	-
	156	24	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.5	-	-
	313	24	200	0	1	0	1	2	0	4	4 (2.0)	4 (2.0)	0	-	-
	625	24	200	22	119	131	42	0	0	314	173 (86.5)	177 (88.5)**	0	+	-
MNNG	2.5	24	200	11	32	185	7	0	0	235	188 (94.0)	189 (94.5)**	0	+	-
Solvent	0	48	200	1	0	1	0	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0	—	—
DAEM	20	48	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0	-	-
	39	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0 (0)	1 (0.5)	0	-	-
	78	48	200	2	0	0	1	1	0	4	2 (1.0)	4 (2.0)	0	-	-
	156	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0	-	-
	313	48	200	1	0	0	0	2	0	3	2 (1.0)	3 (1.5)	0	-	-
	625	48	200	21	61	123	46	0	0	251	148 (74.0)	153 (76.5)**	0	+	-
	625	48	200	21	61	123	46	0	0	251	148 (74.0)	153 (76.5)**	0	+	-
MNNG	2.5	48	200	11	39	136	25	17	0	228	159 (79.5)	159 (79.5)**	1.0	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, DAEM: 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate, MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  
 1) Distilled water was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample  $\chi^2$  test was done at  $p < 0.05$ , and then Fisher's exact test was done at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ .  
 \*\*: Significantly different from solvent group data at  $p < 0.01$  by Fisher's exact test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate with and without S9 mix

Group	Concentration (μg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>		
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA	
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0	—	—	
DAEM	200	-	6-(18)	200	1	1	6	0	6	0	14	13 (6.5)	13 (6.5)**	1.0	+	-	
	400	-	6-(18)	200	18	23	86	6	0	0	133	92 (46.0)	99 (49.5)**	0.5	+	-	
	600	-	6-(18)	200	28	115	141	21	0	0	305	172 (86.0)	175 (87.5)**	0.5	+	-	
	800	-	6-(18)	Toxic													
	1400	-	6-(18)	Toxic													
	1600	-	6-(18)	Toxic													
BP	10	-	6-(18)	200	1	1	2	0	0	0	4	3 (1.5)	4 (2.0)	0	-	-	
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	1.0	—	—	
DAEM	200	+	6-(18)	200	0	0	0	0	2	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0	-	-	
	400	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0	-	-	
	600	+	6-(18)	200	1	1	3	0	2	0	7	6 (3.0)	7 (3.5)	0.5	-	-	
	800	+	6-(18)	200	2	2	24	0	2	0	30	26 (13.0)	27 (13.5)**	1.5	+	-	
	1400	+	6-(18)	200	13	146	194	45	0	0	398	199 (99.5)	199 (99.5)**	0	+	-	
	1600	+	6-(18)	84	6	60	81	21	0	0	168	84 (100)	84 (100)**	0	+	-	
BP	10	+	6-(18)	200	9	11	112	4	2	0	138	116 (58.0)	117 (58.5)**	0	+	-	

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, DAEM: 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate, BP: benzo[a]pyrene  
 1) Distilled water was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample  $\chi^2$  test was done at  $p < 0.05$ , and then Fisher's exact test was done at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ .  
 \*\*: Significantly different from solvent group data at  $p < 0.01$  by Fisher's exact test.

## 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

### Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate by Oral Administration in Rats

#### 要約

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートは、共重合による合成樹脂の接着性、染色性などの改善に用いられる他、凝集材、制電剤イオン交換樹脂、塗料用樹脂などのカチオン性モノマー、潤滑油および燃料油添加剤の原料として使用されている。毒性に関する情報としては、ラットの経口投与による最小致死量は2000 mg/kg以上で、前胃に刺激性を示唆する病理変化を起こすことが報告されている<sup>1)</sup>。今回、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、SDラット(1群雌雄各12匹)に40, 200および1000 mg/kgの用量を交配前14日から交配を経て雄は計43日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育3日まで経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

#### 1. 反復投与毒性

1000 mg/kg群において、雄で投与開始後36日以降、雌で31日以降に攣縮、挙尾、間代性痙攣が散見された。また、雌雄で体重増加抑制、雌で3例の死亡および授乳期間の摂餌量減少が認められた。病理学検査では、雌雄で脳および脊髄の神経線維の変性、前胃壁の肥厚、粘膜上皮の増生、水腫および炎症性細胞浸潤、雌で胸腺の萎縮が認められた。この他、雌雄の腎臓および雄の肝臓、雌の副腎の重量が増加を示したが、組織変化は認められなかった。また、雄の血液生化学検査では、尿素窒素の上昇、血液学検査では赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の減少、網状赤血球比の増加などの貧血性変化、白血球数および分葉核球数の増加が認められた。

200 mg/kg群においても雄でヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の減少が認められた。

#### 2. 生殖発生毒性

親動物の交尾率、受胎率、黄体数、着床数、着床率、分娩率、出産率、妊娠期間および分娩には被験物質に起因する変化は認められなかった。哺育期間の観察では、1000 mg/kg群の母動物3例で全新生児死亡が認められた。新生児の検査では、1000 mg/kg群で低体重および4日生存率の低下が認められた。出産児数、出生率、性比、出生率、外表、一般状態および剖検では被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリ

ラートの反復投与毒性に関する無影響量は雄が40 mg/kg/day、雌が200 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、親動物に対して雄が1000 mg/kg/day、雌が200 mg/kg/day、児動物に対しては200 mg/kg/dayと考えられる。

#### 方法

##### 1. 被験物質

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート(三洋化成工業(株)、Lot No. K609415、純度99.9%)は、融点-30℃、沸点182~192℃、比重0.936、水、アセトンおよびDMSOに溶けやすい、アミン臭のある無色透明の液体である。被験物質は室温・暗所・密閉で保管した。また、試験期間中安定であったことが確認された。

##### 2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)から入手した雌雄のSDラット[Crj:CD(SD)IGS]を6日間検疫・馴化後、試験に供した。投与開始前日に体重別層化無作為抽出法により、1群につき雌雄各12匹を振り分けた。投与開始時の週齢は雌雄とも9週齢、体重範囲は雄が325~360 g、雌が191~242 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中、温度22±2℃、湿度55±15%、換気約12回/時、照明12時間/日(7:00~19:00)に設定した飼育室を使用した。動物は実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに、群分け後は1匹、交配期間は雌雄各1匹、哺育期間は1腹で収容し、飼育した。

動物には、オートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1:オリエンタル酵母工業(株))および5 μmのフィルターで濾過後、紫外線照射した水道水をそれぞれ自由摂取させた。

##### 3. 投与量および投与方法

SDラットの雌雄を用いて、被験物質を30, 100, 300および1000 mg/kgの用量で14日間経口投与した結果、1000 mg/kg群の雄で体重減少、雌で体重増加抑制、雌雄で前胃粘膜の肥厚が認められた。以上の結果から、本試験では高用量を1000 mg/kgとし、以下公比5で中用量を200 mg/kg、低用量を40 mg/kgとした。また、媒体(コーン油)のみを投与する対照群を設けた。

投与期間は、雌雄とも交配前14日間、交配期間、お

よび雄は剖検前日までの計43日間、雌は交尾成立後、妊娠、分娩を経て哺育3日まで(41~52日間)とし、プラスチック製胃ゾンデを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与量は5 mL/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。

被験物質はコーン油に溶解させ、投与に供するまで冷蔵保存し、調製後8日以内に使用した。投与開始前に投与液中の被験物質の安定性および濃度を確認した。

#### 4. 反復投与毒性に関する観察・検査

##### 1) 一般状態

全例について生死、外観、行動等を投与前および投与後に毎日観察した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。

##### 2) 体重および摂餌量

体重は、雌雄とも投与開始日、投与開始後3, 7, 14日、およびその後週1回、交尾した雌は妊娠0, 7, 14, 20日および哺育0, 4日に測定した(交尾確認日を妊娠0日、分娩確認日を哺育0日とする)。また、雄では投与開始日の体重を基準に、雌では交配前期間、妊娠期間、哺育期間をそれぞれ投与開始日、妊娠0日、哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定した。

##### 3) 雄の尿検査

解剖日の2日前に各群6匹の新鮮尿を採取し、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン(試験紙法、マルティスティックス:マイルス・三共(株))を尿分析器(グリニテック100:マイルス・三共(株))により測定し、尿沈渣(Sternheimer-Malbin染色標本)を検査した。また、約21時間蓄尿について、尿量を計量し、比重(屈折法)を尿比重計(ユリコン-S:(株)アタゴ)により測定した。

##### 4) 雄の血液学検査

雄の全生存動物について、解剖日の前日から約21日間絶食させ、チオペンタールナトリウム(ラボナル:田辺製薬(株))の腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採取した血液の一部をEDTA-2Kにより凝固阻止し、赤血球数(シースフローDCインピーダンス検出法)、白血球数(RF/DCインピーダンス検出法)、血小板数(シースフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度(SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500:東亜医用電子(株))、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A:オムロン(株))、網状赤血球数(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網赤血球測定装置(R-2000:東亜医用電子(株))により測定した。また、検査結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

##### 5) 雄の血液生化学検査

雄の全生存動物について、解剖日に採取した血液を室温で約30分間静置後遠心分離し、得られた血清についてGOT(SSCC改良法)、GPT(SSCC改良法)、 $\gamma$ -GTP(SSCC改良法)、ALP(GSCC改良法)、総ビリルビン(Jendrassik改良法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、グルコース(GK-G6PDH法)、総コレステロール(CES-CO-POD法)、トリグリセライド(LPL-GK-G3PO-POD法)、総蛋白(Biuret法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(UV法)、ナトリウム、カリウム、クロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(日立736-10形:(株)日立製作所)により測定した。また、採取した血液の一部をヘパリン(リチウム塩)処理後遠心分離し、得られた血漿についてLDH(SSCC改良法)を自動分析装置(COBAS FARA II:F. Hoffmann La Roche & Co.)により測定した。

##### 6) 病理学検査

雌雄とも最終投与日の翌日に、全生存動物についてチオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈の切断・放血により安楽死させて剖検し、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、解剖日の体重を基に相対重量(対体重比)を算出した。さらに、これらの器官に加えて、眼球およびハーダー腺、唾液腺(下顎・舌下)、リンパ節(下顎・腸間膜)、上皮小体、気管、肺、食道、胃、腸管(十二指腸~直腸)、膵臓、膀胱、前立腺腹葉、精のう、卵巣、子宮、膣、骨髄(胸骨・大腿骨)、坐骨神経、脊髄、乳腺および肉眼的異常部位を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後保存した。ただし、死亡例以外の眼球およびハーダー腺はダビドソン液、精巣および精巣上体はブアン液で固定した。

病理組織学検査は雌雄の対照群および1000 mg/kg群の脳、下垂体、甲状腺、胸腺、気管、肺、胃、腸管、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、膵臓、膀胱、骨(胸骨・大腿骨)、骨髄(胸骨・大腿骨)、リンパ節(下顎・腸間膜)、坐骨神経、脊髄、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、精のう、卵巣、子宮、膣、雌の乳腺ならびに全動物の肉眼的異常部位について、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検した。その結果、雌雄とも脳、脊髄、胃および胸腺で被験物質に起因する変化が認められたので、40および200 mg/kg群のこれらの器官についても検査した。なお、この他に雄の40および200 mg/kg群の前立腺および精のうも検査した。

#### 5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

##### 1) 生殖機能

交配前の投与期間終了後、各群内で雄1雌1の交配対を設け、最長14日間昼夜同居させ、毎日午前中に雌の膣垢を採取し、ギムザ染色して鏡検した。膣栓形成あるいは膣垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立と

し、その日を妊娠0日とした。交尾した対は雌雄を分離し、以後の検査に供した。これらの結果から、交尾所要日数(交配開始後、交尾成立までに要した日数)、交尾成立までに逸した発情期の回数、交尾率〔(交尾動物数/同居動物数)×100〕、受胎率〔(受胎動物数/交尾動物数)×100〕を算出した。

## 2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が完了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。その後、新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。

母動物は、哺育4日の剖検時に卵巣、子宮を摘出し、黄体数および着床数を検査した。分娩しない雌は交尾確認後26日に剖検し、肉眼的に着床が認められない動物の子宮は10%硫化アンモニウム水溶液に浸漬して着床の有無を確認した。また、全新生児が死亡した母動物はその時点で剖検した。これらの結果から、妊娠期間(妊娠0日から出産が確認された日までの期間)、出産率〔(生児出産雌数/受胎雌数)×100〕、着床率〔(着床数/黄体数)×100〕、分娩率〔(総出産児数/着床数)×100〕を算出した。

## 3) 新生児の観察・検査

### (1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数(出產生児数、死産児数)、性別および外表異常の有無を検査した。その後、一般状態、死亡の有無を哺育4日まで毎日観察した。哺育0および4日の生存児数から出生率〔(出產生児数/総出産児数)×100〕、新生児の4日生存率〔(哺育4日生存児数/出產生児数)×100〕を算出した。

### (2) 体重

哺育0および4日に全生存児を個体ごとに測定した。また、哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。

### (3) 剖検

哺育4日に全生存児の口腔を含む外表を検査した後、親動物と同様にして安楽死させ、剖検した。死亡動物は食殺等で検査に耐えないものを除き、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬・固定後、実体顕微鏡下で剖検した。

## 6. 統計解析

計量データについては、パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い、分散が一樣の場合は一元配置分散分析を行った。分散が一樣でない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合はDunnnett法またはDunnnett型の多重比較を行った。計数データのうち、尿検査の定性所見および病理組織所見は $a \times b$ の $\chi^2$ 検定を行い、有意差が認められた場合はArmitageの $\chi^2$ 検定により対照群と各被験物質投与群間

の比較を行った。その他の計数データはFisherの直接確率法により検定した。有意水準は5%とし、新生児に関するデータは各母動物ごとに算出した平均値を標本単位とした。なお、1000 mg/kg群の雄1例は投与開始後25日に上切歯を破損し、体重増加不良を示したため、生殖機能検査以外の以後のデータを集計から除外した。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 死亡動物

1000 mg/kg群の雌で、投与開始後2, 6および38日(妊娠23日)にそれぞれ1例が死亡した。投与初期の死亡例には、死亡1~2日前にラッセル音、自発運動低下、呼吸困難あるいは不整呼吸などが認められた。また、妊娠後期の死亡例には投与開始後31日(妊娠16日)から攣縮および挙尾が死亡前日まで観察された。

この他、対照群の雌1例が妊娠23日に分娩を開始したが、体温低下および蒼白を示して翌日に死亡した。

#### 2) 一般状態

1000 mg/kg群で、攣縮および挙尾が、雄で投与開始後36日、雌で31日からそれぞれ4および3例で認められ、さらに一部の動物には間代性痙攣あるいは不整呼吸が観察された。これらの症状は、投与時の保定などの刺激により発症し、数分間持続した後消失した。また、投与直後の流涎が雌雄で投与開始後7日から認められた。一部には投与前から発症する動物もみられ、投与終了時までには雌雄ともほぼ全例で観察された。

200 mg/kg群では、雌で同様の流涎が投与開始後14日に4例で観察された。

その他、軟便、紅涙、脱毛が各群で散見されたが、1000 mg/kg群で多発する傾向がみられなかったことから、被験物質との関連はないと判断した。

#### 3) 体重(Fig.1,2)

1000 mg/kg群の雌で、体重増加量が妊娠7および14日に有意な低値を示し、その後も哺育4日まで体重および増加量とも低値で推移した。また、雄でも有意差は認められなかったものの、交配以後の体重は低値傾向を示した。

その他、200 mg/kg群の雄の体重増加量が投与開始後41日に有意な高値を示したが、1000 mg/kg群では増加傾向はなく、偶発変化と判断した。

#### 4) 摂餌量

1000 mg/kg群の雌で、投与開始後7および14日に有意な高値を、哺育4日に有意な低値を示した。

雄では対照群と被験物質投与群との間に有意な変化は認められなかった。

#### 5) 雄の尿検査

1000 mg/kg群で尿量が有意な高値を示したが、生理

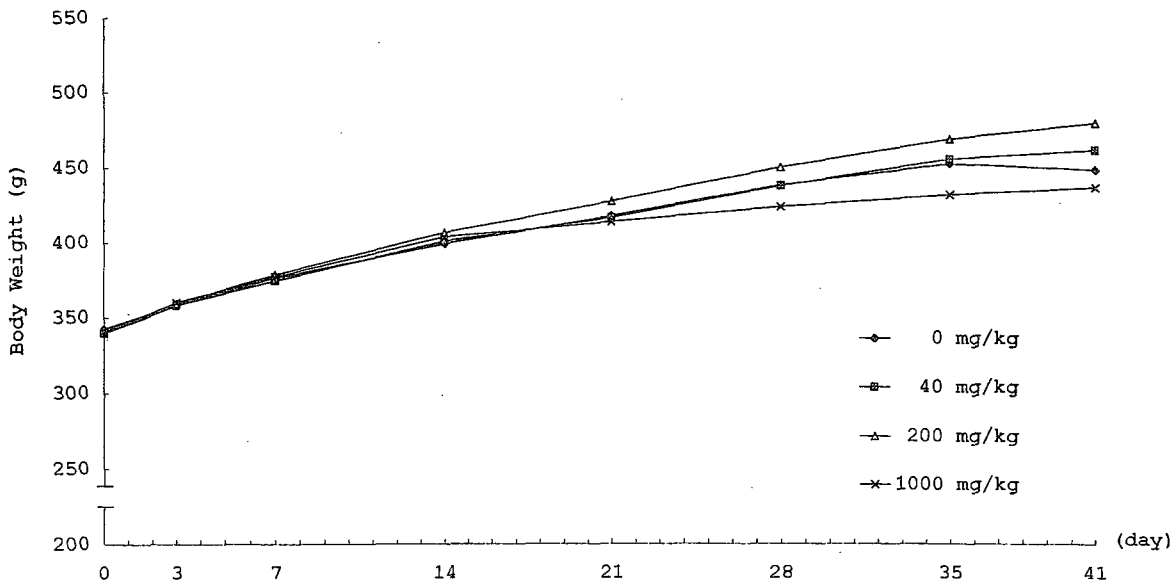


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

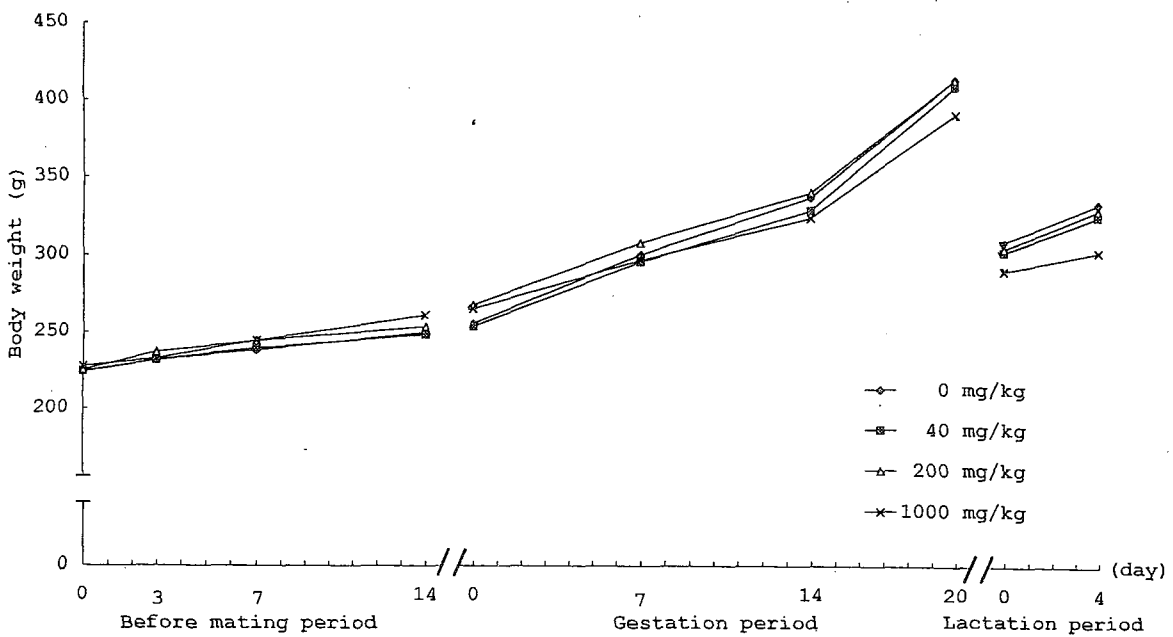


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

的変動範囲内の値であったことから、偶発的な変化と判断した。その他の検査項目には有意な変化は認められなかった。

#### 6) 雄の血液学検査 (Table 1)

200 mg/kg以上の群でヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値が有意な低値を、網状赤血球比が有意な高値を、1000 mg/kg群で赤血球数、平均赤血球容積および平均赤血球色素量が有意な低値を示した。また、1000 mg/kg群で白血球数が有意な高値を、白血球百分率ではリンパ球が有意な低値を示し、実数換算値で分葉核球数の有意な増加が認められた。なお、同群の単球数も有意な高値を示したが、百分率では有意差は認められず、生理的変動範囲内の値であった。

#### 7) 雄の血液生化学検査 (Table 2)

1000 mg/kg群で尿素窒素が有意な高値を示した。その他、ナトリウムが有意な低値を示したが、生理的変動範囲内の値であったことから、偶発的な変化と判断した。その他の検査項目には有意な変化は認められなかった。

#### 8) 器官重量 (Table 3)

雄では、1000 mg/kg群で肝臓および腎臓の相対重量が有意な高値を示し、絶対重量でも高値の傾向がみられた。また雌では、1000 mg/kg群で副腎の絶対重量および相対重量、腎臓の相対重量が有意な高値を示した。

この他、1000 mg/kg群で雄の脳および精巣上体の絶対重量が有意な低値を、雌の心臓の相対重量が有意な高値を示したが、相対重量あるいは絶対重量では明確な変化はみられなかったことから、体重増加抑制が反映したものと考えられた。また、200 mg/kg群で雄の胸腺の絶対重量が有意な高値を示したが、1000 mg/kg群では同様の変化は認められなかったことから、偶発変化と判断した。

#### 9) 剖検所見

前胃壁の肥厚が1000 mg/kg群の雄の全例、雌では死亡例を含めて10例に認められた。肥厚した前胃粘膜の表面は粗造であった。この他、1000 mg/kg群の雌の死亡例では全例に肺水腫が認められた他、脾臓の小型化、心房拡張、肝臓のうっ血、腺胃の潰瘍、腺胃粘膜の充血、副腎の腫大および胃腸管の鼓張などが観察された。

対照群の雌の死亡例では子宮および胸腺の出血が認められた。また、全新生児が死亡した母動物では、1000 mg/kg群の1例で胸腺の小型化、子宮および膈の出血、200 mg/kg群の1例で腎臓の褪色、脾臓の褐色化および腫大が認められた。

この他、対照群を含む各群で種々の変化が認められたが、いずれも1例のみであったことから偶発所見と判断した。

#### 10) 組織所見 (Table 4)

被験物質に起因する変化が雌雄の脳、脊髄、前胃およ

び雌の胸腺で認められた。脳では、橋の赤核脊髄路領域の神経線維の変性が1000 mg/kg群の雄3例、雌4例で左右対称性に観察された。脊髄でも、背側後脊髄小脳路の神経線維の変性が1000 mg/kg群の雄8例、雌6例で左右対称性に観察され、雌雄とも発現頻度に有意差が認められた。前胃では、粘膜上皮の増生が1000 mg/kg群で死亡例も含めて雌雄全例(死後変化の著しい投与開始後2日の死亡例を除く)で認められた。多くの例ではさらに増生した粘膜の下織に水腫と炎症性細胞浸潤を伴っており、発現頻度に有意差も認められた。雌の胸腺では、萎縮が対照群、40、200および1000 mg/kg群でそれぞれ2、0、2および6例に認められ、有意差は認められなかったものの、1000 mg/kg群で高頻度に発現した。これらのうち、1000 mg/kg群の6例中5例は死亡動物あるいは全新生児が死亡した母動物であった。

1000 mg/kg群の雌の死亡例では、肺の水腫が全例、脾臓の白脾髄の萎縮が2例、下顎および腸間膜リンパ節のリンパ小節の萎縮が1例に認められた。

対照群の死亡例では子宮と胸腺に出血が認められ、子宮の大量出血が原因で衰弱し、死亡したものと考えられた。

この他、対照群を含む各群で種々の変化が認められたが、自然発生性に認められる変化であり、1000 mg/kg群で多発する傾向はみられなかったことから、偶発所見と判断した。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 生殖機能 (Table 5)

未交尾動物は200 mg/kg群で1対観察されただけで、ほとんどの交配対は交配開始後5日以内に雌が発情期を示して交尾し、交尾率、交尾所要日数および交尾成立までに逸した発情期の回数ともに対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。また、非妊娠動物は1000 mg/kg群で1例観察されただけであり、受胎率にも有意な差は認められなかった。なお、200 mg/kg群の未交尾動物の雄には、剖検で精巣の小型化、病理組織学検査では精細管のび慢性萎縮などが認められ、交尾不成立の原因と思われる。

### 2) 分娩・哺育状態 (Table 6)

分娩の観察において、対照群の1例が妊娠23日に分娩を開始したが、新生児1例を娩出したのみで、分娩が完了しないまま翌日に死亡した。また、200 mg/kg群の1例が妊娠24日に分娩し、授乳、児なめ、胎盤摂食、回集行動などの母性行動を示さず、全ての新生児が哺育1日までに死亡した。その他の母動物は各群とも妊娠22または23日に正常な分娩を示し、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、分娩率および出産率ともに対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

哺育期間の観察において、全新生児死亡が、分娩遅延を示した200 mg/kg群の1腹の他に、1000 mg/kg群の3腹で観察された。これらの母動物には母性行動がみられたが、新生児のほとんどは受乳状態が不良で、哺育2日

までに全例が死亡した。また、同群の他の1腹でも分娩日に未受乳の新生児が多数観察され、それらのほとんどは死亡した。その他の母動物の哺育状態には異常は認められなかった。

### 3) 新生児に及ぼす影響

#### (1) 生存率 (Table 6)

1000 mg/kg群で、有意差は認められなかったものの、哺育4日の新生児数および新生児の4日生存率が低値を示した。本変化は母動物が哺育異常を示した4腹で新生児死亡が多発したことに起因しており、同群のその他の腹では新生児死亡はほとんど観察されなかった。出産児数、出産児数、性比および出生率には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。なお、1000 mg/kg群の出産児数が他の群に比べて低値を示したが、着床数が8および6と少なかった母動物2例の出産児数が反映していた。対照群でも着床数8を示す母動物が1例観察されており、これらを除外した場合の対照群および1000 mg/kg群の出産児数は14.5および14.7とほぼ同様の値であった。さらに、黄体数、着床率、分娩率にも被験物質の影響は認められなかったことから、偶発変化と考えられる。

#### (2) 外表および一般状態

皮下出血が対照群で出生日に1例観察された。その他には、1000 mg/kg群で未受乳の新生児が多発した以外は一般状態に変化はみられず、外表異常も認められなかった。

#### (3) 体重 (Table 6)

1000 mg/kg群で雌雄とも哺育0日の体重が有意な低値を示した。200 mg/kg以下の群では雌雄とも対照群と被験物質投与群との間に有意な変化は認められなかった。なお、1000 mg/kg群の体重について、全新生児死亡および死亡児が多発した腹を除いた場合、哺育0日の平均体重は雄7.1 g、雌6.5 g、また平均体重増加量は雄4.0 g、雌3.8 gと対照群とほぼ同様の値であった。

#### (4) 剖検

生存動物ではいずれの群にも異常は認められなかった。また、死亡動物では胸腺頸部残留が対照群の1腹で1例、1000 mg/kg群の2腹で2例観察されただけであったことから、被験物質に起因する変化ではないと判断した。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

反復投与による影響として、1000 mg/kg群の雌雄で攣縮、挙尾および間代性痙攣が、投与開始後30日以上経過した後、投与時の保定などの刺激により発現した。また、同群では雌雄で体重増加抑制、雌で授乳期間の摂餌量減少が認められた他、雌では3例が死亡し、病理学検査で肺水腫が認められた。化学構造が類似する物質では、中毒症状として呼吸器刺激による呼吸困難が起り、肺水腫により死亡することが知られており<sup>2)</sup>、同様な原

因により死亡した可能性が考えられる。

病理学検査において、1000 mg/kg群の雌雄で脳、脊髄および前胃、雌で胸腺に被験物質に起因する変化が認められた。すなわち、脳および脊髄では、橋の赤核脊髄路領域と背側後脊髄小脳路で神経線維の変性が左右対称性に認められた。これらは筋の運動あるいは筋緊張の調節に関与する神経連絡路であり、同群で投与後期に観察された攣縮、挙尾などの行動異常と関連する変化と推察される。化学構造が類似するメタクリル酸2-ヒドロエチルエステルおよび2-エチルヘキシルメタクリレートでも反復投与により行動異常の発現および脳の組織変化が起こることが報告されている<sup>3,4)</sup>。また、メチルメタクリレートは行動異常を誘発することが知られ<sup>5)</sup>、脳内アミンあるいは神経伝達に影響を及ぼすことが明らかにされている<sup>6-7)</sup>。発現機序は不明であるが、被験物質も中枢神経系への影響が示唆される。前胃では、剖検で肥厚が観察され、組織学的には粘膜上皮の増生と粘膜下織の水腫および炎症性細胞浸潤が認められた。化学構造が類似するアクリル酸のエステル化合物は、ラットのの前胃に対し刺激性を有することが知られており<sup>8-10)</sup>、被験物質も同様の刺激性を有するものと考えられる。また、胸腺の萎縮が1000 mg/kg群の雌で高頻度に認められたが、死亡あるいは全新生児死亡を示した母動物がほとんどであり、死亡例の一部では脾臓の白脾髄およびリンパ節のリンパ小節の萎縮も観察された。これらの変化はストレス状態の動物に非特異的にみられる変化でもあることから<sup>11)</sup>、被験物質に直接起因したものではなく、二次的に生じた変化である可能性が考えられる。

器官重量では雌雄の腎臓重量が増加の傾向を示し、雄では血尿素窒素の上昇が認められたことから、被験物質による腎機能への影響の可能性が示唆される。また、雄の肝臓および雌の副腎にも重量増加が認められ、これらの器官にも影響している可能性が考えられた。しかし、いずれも病理組織学検査では変化は認められなかったことから、影響としては軽度のものと考えられる。

雄の血液学検査では、1000 mg/kg群で赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の減少、網状赤血球比の増加などの貧血性変化と白血球数および分葉核球数の増加が認められた。これらの変化は前胃の病変部の炎症との関連が考えられるが、貧血性変化については、前胃に病変が認められなかった200 mg/kg群でも観察されており、被験物質による造血機能への影響が示唆される。しかし、脾臓および骨髄には組織変化は認められなかったことから、影響としては軽度なものと考えられる。

投与直後の流涎が1000 mg/kg群の雌雄および200 mg/kg群の雌で観察されたが、一部には投与直前から反射的に発現する例もみられたことから、被験物質の局所刺激性に起因したものであり、反復投与毒性を示すものではないと考えられる。

### 2. 生殖発生毒性

親動物の検査において、交尾率、受胎率、黄体数、着



床数, 着床率, 分娩率, 出産率, 妊娠期間には被験物質の影響を示唆する変化は認められなかった。また, 分娩にも異常は認められなかった。したがって, 被験物質による親動物の生殖機能および分娩への影響はないと考えられる。一方, 哺育期間の観察では, 全新生児死亡が1000 mg/kg群の母動物3例で観察された他にも, 1例で新生児死亡が多発したことから, 被験物質により哺育機能に何らかの障害を来した可能性が考えられる。なお, 200 mg/kg群でも全新生児死亡が1例観察されたが, 分娩が遅延した母動物であり, 対照群でも難産が1例で観察されていること, 200 mg/kg群では本動物以外に新生児死亡が多発した例がなかったことなどから, 被験物質との関連はない偶発的なものと考えられる。

新生児の検査において, 出産児数, 出生児数, 性比および出生率に被験物質の影響はみられなかったが, 1000 mg/kg群で低体重および新生児の4日生存率の低下が認められた。全新生児死亡あるいは死亡が多発した腹以外の新生児の体重および4日生存率は対照群とほぼ同様な値を示していたことから, 低体重および4日生存率の低下は母動物の哺育機能障害に起因したものである可能性が考えられる。外表検査, 一般状態および剖検では被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上のように, 本試験では反復投与による一般毒性学的影響として, 200 mg/kg以上の群の雄で貧血性変化が認められ, 1000 mg/kg群では雌雄で行動異常, 体重増加抑制, 脳, 脊髄および前胃の組織変化, 雌で死亡, 摂餌量減少, 胸腺の萎縮が認められた。生殖・発生に及ぼす影響として, 親動物の生殖機能および分娩には異常は認められなかったが, 1000 mg/kg群で母動物の哺育機能および新生児の発育への影響を示唆する変化が認められた。したがって, 本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雄が40 mg/kg/day, 雌が200 mg/kg/day, 生殖発生毒性に関する無影響量は親動物に対して雄が1000 mg/kg/day, 雌が200 mg/kg/day, 児動物に対しては200 mg/kg/dayと考えられる。

#### 文献

- 1) 山下弘太郎ら, 化学物質毒性試験報告, 6, 545 (1998).
- 2) 後藤 稔, 池田正之, 原 一郎編, "産業中毒便覧(増補版)," 医歯薬出版(株), 東京, 1984, pp. 889-993.
- 3) 古橋忠和ら, 化学物質毒性試験報告, 5, 583 (1997).
- 4) 古橋忠和ら, 化学物質毒性試験報告, 6, 405 (1998).
- 5) R. Husain, S.P. Srivastava, P.K. Seth, *Arch. Toxicol.*, **58**, 33(1985).
- 6) D.L. Innes, M.F. Tansy, *Neurotoxicology*, **2**, 515 (1981).
- 7) E. Verkkala, R. Rajaniemi, H. Savolainen, *Toxicol. Lett.*, **18**, 111(1983).

- 8) B.I. Ghanayem, R.R. Maronpot, H.B. Matthews, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 323(1985).
- 9) B.I. Ghanayem, R.R. Maronpot, H.B. Matthews, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 336(1985).
- 10) B.I. Ghanayem, R.R. Maronpot, H.B. Matthews, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **83**, 576(1986).
- 11) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies," Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 77-142.

#### 連絡先

試験責任者: 松浦郁夫

試験担当者: 星野信人, 土居卓也, 豊田直人,  
高野克代, 鈴木美江

(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所  
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

#### Correspondence

Authors: Ikuo Matsuura (Study director)  
Nobuhito Hoshino, Takuya Doi,  
Naoto Toyota, Katsuyo Takano,  
Yoshie Suzuki

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
Kashima Laboratory  
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
Ibaraki, 314-0255, Japan  
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Hematological examination in male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		0	40	200	1000
Number of animals		12	12	12	11
RBC	$\times 10^4/\mu\text{L}$	881.7 $\pm$ 43.6	861.7 $\pm$ 24.0	859.8 $\pm$ 36.7	821.6 $\pm$ 34.1**
Hematocrit	%	46.73 $\pm$ 2.45	46.22 $\pm$ 1.56	44.84 $\pm$ 1.26*	41.72 $\pm$ 1.97**
Hemoglobin	g/dL	15.91 $\pm$ 0.69	15.78 $\pm$ 0.44	15.28 $\pm$ 0.40*	14.24 $\pm$ 0.74**
Reticulocyte	%	17.81 $\pm$ 2.61	19.28 $\pm$ 4.58	21.56 $\pm$ 3.57*	24.84 $\pm$ 3.75**
MCV	fl	53.02 $\pm$ 1.73	53.65 $\pm$ 1.18	52.23 $\pm$ 2.08	50.81 $\pm$ 2.30*
MCH	pg	18.07 $\pm$ 0.60	18.33 $\pm$ 0.44	17.78 $\pm$ 0.74	17.33 $\pm$ 0.81*
MCHC	%	34.05 $\pm$ 0.64	34.16 $\pm$ 0.60	34.08 $\pm$ 0.77	34.14 $\pm$ 0.66
Platelet	$\times 10^4/\mu\text{L}$	97.50 $\pm$ 14.74	99.33 $\pm$ 10.04	106.43 $\pm$ 13.86	108.71 $\pm$ 18.39
WBC	$\times 10^2/\mu\text{L}$	73.37 $\pm$ 15.08	79.35 $\pm$ 21.47	91.29 $\pm$ 23.38	96.20 $\pm$ 23.80*
Differential leukocyte counts	%				
Lymphocytes		82.2 $\pm$ 5.3	82.2 $\pm$ 6.5	81.7 $\pm$ 6.3	74.5 $\pm$ 7.3*
Neutrophils					
segmented		11.8 $\pm$ 3.6	11.2 $\pm$ 5.0	10.0 $\pm$ 3.7	17.0 $\pm$ 8.4
band		0.6 $\pm$ 0.7	0.3 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.7
Eosinophils		0.5 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 1.1	0.5 $\pm$ 0.7
Basophils		0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocytes		4.9 $\pm$ 3.0	5.8 $\pm$ 2.8	7.3 $\pm$ 3.1	7.5 $\pm$ 3.3
Differential leukocyte counts	$\times 10^2/\mu\text{L}$				
Lymphocytes		60.0 $\pm$ 11.1	65.7 $\pm$ 19.6	74.9 $\pm$ 21.0	71.5 $\pm$ 20.2
Neutrophils					
segmented		8.8 $\pm$ 3.9	8.5 $\pm$ 2.9	9.1 $\pm$ 4.0	16.3 $\pm$ 7.8*
band		0.6 $\pm$ 0.7	0.3 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.7
Eosinophils		0.5 $\pm$ 0.7	0.6 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.9	0.5 $\pm$ 0.7
Basophils		0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocytes		3.8 $\pm$ 2.7	4.5 $\pm$ 2.4	6.3 $\pm$ 2.7	7.3 $\pm$ 4.0*

Values are expressed as Mean $\pm$ S.D.  
Significantly different from control: \*, P<0.05, \*\*, P<0.01.

Table 2 Blood chemical examination in male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		0	40	200	1000
Number of animals		12	12	12	11
GOT	U/L	95.0 $\pm$ 15.4	96.8 $\pm$ 14.7	94.3 $\pm$ 14.7	96.1 $\pm$ 13.5
GPT	U/L	27.6 $\pm$ 7.9	21.2 $\pm$ 3.4	22.1 $\pm$ 4.5	23.5 $\pm$ 4.8
LDH	U/L	178.0 $\pm$ 61.9	166.7 $\pm$ 79.6	142.6 $\pm$ 40.1	162.5 $\pm$ 33.8
$\gamma$ -GTP	U/L	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.3
ALP	U/L	269.8 $\pm$ 43.4	268.2 $\pm$ 42.3	271.8 $\pm$ 29.2	272.4 $\pm$ 52.5
Total bilirubin	mg/dL	0.13 $\pm$ 0.07	0.13 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.05
Urea nitrogen	mg/dL	14.44 $\pm$ 2.15	13.89 $\pm$ 1.53	14.79 $\pm$ 1.66	16.46 $\pm$ 1.79*
Creatinine	mg/dL	0.49 $\pm$ 0.09	0.50 $\pm$ 0.06	0.51 $\pm$ 0.05	0.54 $\pm$ 0.07
Glucose	mg/dL	128.0 $\pm$ 16.0	124.3 $\pm$ 13.8	130.5 $\pm$ 13.4	135.1 $\pm$ 15.6
Total Cholesterol	mg/dL	52.3 $\pm$ 12.2	56.0 $\pm$ 10.5	51.8 $\pm$ 9.6	63.7 $\pm$ 13.4
Triglyceride	mg/dL	26.8 $\pm$ 13.3	35.3 $\pm$ 14.5	33.2 $\pm$ 7.4	29.7 $\pm$ 9.4
Total protein	g/dL	6.84 $\pm$ 0.34	6.90 $\pm$ 0.31	6.84 $\pm$ 0.27	7.04 $\pm$ 0.28
Albumin	g/dL	3.38 $\pm$ 0.13	3.37 $\pm$ 0.13	3.33 $\pm$ 0.11	3.46 $\pm$ 0.15
A/G ratio		0.979 $\pm$ 0.055	0.955 $\pm$ 0.065	0.946 $\pm$ 0.030	0.970 $\pm$ 0.043
Inorganic phosphate	mg/dL	7.50 $\pm$ 0.63	7.60 $\pm$ 0.35	7.50 $\pm$ 0.50	7.81 $\pm$ 0.48
Ca	mg/dL	9.19 $\pm$ 0.23	9.23 $\pm$ 0.30	9.08 $\pm$ 0.26	9.15 $\pm$ 0.28
Na	mmol/L	144.8 $\pm$ 0.6	144.6 $\pm$ 1.1	144.4 $\pm$ 1.0	143.1 $\pm$ 1.0**
K	mmol/L	4.33 $\pm$ 0.20	4.51 $\pm$ 0.19	4.45 $\pm$ 0.26	4.55 $\pm$ 0.20
Cl	mmol/L	99.8 $\pm$ 2.3	98.6 $\pm$ 1.7	99.8 $\pm$ 2.1	98.3 $\pm$ 2.5

Values are expressed as Mean $\pm$ S.D.  
Significantly different from control: \*, P<0.05, \*\*, P<0.01.

Table 3 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	40	200	1000
<b>Male</b>				
Number of animals	12	12	12	11
Body weight g	432.1 ± 40.2	444.3 ± 41.1	459.8 ± 29.6	410.9 ± 33.4
Absolute organ weight				
Brain g	2.123 ± 0.066	2.123 ± 0.078	2.145 ± 0.049	2.043 ± 0.053**
Pituitary mg	13.17 ± 1.32	13.58 ± 1.61	14.14 ± 2.33	13.87 ± 2.63
Thyroid mg	20.52 ± 3.07	20.74 ± 2.44	21.43 ± 2.75	20.37 ± 1.41
Thymus mg	235.5 ± 36.4	230.4 ± 74.0	291.1 ± 45.8*	206.3 ± 50.3
Heart g	1.367 ± 0.185	1.315 ± 0.125	1.358 ± 0.081	1.325 ± 0.108
Liver g	10.936 ± 1.371	11.490 ± 1.942	11.718 ± 1.154	12.035 ± 1.370
Spleen g	0.651 ± 0.058	0.682 ± 0.109	0.721 ± 0.134	0.712 ± 0.118
Kidney g	2.858 ± 0.254	2.962 ± 0.272	2.969 ± 0.221	3.042 ± 0.316
Adrenal mg	57.34 ± 6.95	58.56 ± 9.53	55.27 ± 6.89	52.77 ± 6.12
Testis g	3.338 ± 0.257	3.188 ± 0.210	3.102 ± 0.732	3.292 ± 0.206
Epididymis g	1.209 ± 0.092	1.203 ± 0.096	1.170 ± 0.222	1.104 ± 0.072*
Relative organ weight				
Brain g%	0.493 ± 0.045	0.482 ± 0.049	0.468 ± 0.032	0.498 ± 0.037
Pituitary mg%	3.07 ± 0.35	3.06 ± 0.38	3.09 ± 0.53	3.39 ± 0.60
Thyroid mg%	4.74 ± 0.52	4.71 ± 0.69	4.66 ± 0.57	4.98 ± 0.39
Thymus mg%	54.74 ± 8.64	51.53 ± 13.69	63.38 ± 9.81	50.29 ± 12.08
Heart g%	0.316 ± 0.028	0.296 ± 0.017	0.297 ± 0.015	0.324 ± 0.022
Liver g%	2.526 ± 0.108	2.572 ± 0.241	2.547 ± 0.150	2.922 ± 0.126**
Spleen g%	0.150 ± 0.007	0.153 ± 0.019	0.158 ± 0.026	0.173 ± 0.021
Kidney g%	0.663 ± 0.046	0.668 ± 0.044	0.648 ± 0.057	0.740 ± 0.053**
Adrenal mg%	13.30 ± 1.35	13.21 ± 2.03	12.04 ± 1.45	12.90 ± 1.64
Testis g%	0.778 ± 0.092	0.724 ± 0.094	0.679 ± 0.166	0.805 ± 0.080
Epididymis g%	0.283 ± 0.036	0.273 ± 0.031	0.256 ± 0.055	0.270 ± 0.029
<b>Female</b>				
Number of animals	11	12	10	5
Body weight g	332.0 ± 10.6	324.6 ± 23.7	329.1 ± 26.0	303.0 ± 16.3
Absolute organ weight				
Brain g	2.016 ± 0.080	1.993 ± 0.065	2.026 ± 0.103	1.934 ± 0.063
Pituitary mg	19.25 ± 2.84	20.43 ± 2.65	20.26 ± 3.19	19.30 ± 3.23
Thyroid mg	17.54 ± 3.07	17.75 ± 3.61	17.61 ± 2.98	16.36 ± 3.19
Thymus mg	189.5 ± 67.4	192.7 ± 47.2	170.0 ± 70.8	201.4 ± 61.4
Heart g	1.011 ± 0.055	0.965 ± 0.072	1.011 ± 0.091	1.052 ± 0.063
Liver g	14.764 ± 1.604	14.538 ± 1.621	14.644 ± 1.759	14.094 ± 1.181
Spleen g	0.562 ± 0.059	0.595 ± 0.109	0.572 ± 0.088	0.692 ± 0.172
Kidney g	2.065 ± 0.147	1.957 ± 0.136	2.146 ± 0.171	2.210 ± 0.248
Adrenal mg	74.46 ± 8.98	70.17 ± 5.86	78.28 ± 6.82	89.80 ± 10.05**
Relative organ weight				
Brain g%	0.608 ± 0.031	0.617 ± 0.046	0.617 ± 0.039	0.640 ± 0.029
Pituitary mg%	5.80 ± 0.87	6.33 ± 0.97	6.17 ± 1.00	6.36 ± 1.03
Thyroid mg%	5.27 ± 0.82	5.49 ± 1.06	5.37 ± 0.93	5.38 ± 0.98
Thymus mg%	57.23 ± 20.74	60.01 ± 17.24	51.39 ± 21.06	66.48 ± 20.45
Heart g%	0.304 ± 0.017	0.298 ± 0.022	0.308 ± 0.015	0.350 ± 0.034**
Liver g%	4.445 ± 0.455	4.474 ± 0.289	4.449 ± 0.415	4.660 ± 0.444
Spleen g%	0.171 ± 0.019	0.183 ± 0.031	0.174 ± 0.020	0.228 ± 0.061
Kidney g%	0.623 ± 0.057	0.605 ± 0.049	0.656 ± 0.057	0.730 ± 0.084**
Adrenal mg%	22.46 ± 2.86	21.68 ± 1.79	23.83 ± 1.67	29.64 ± 2.68**

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control:\*, P&lt;0.05, \*\*, P&lt;0.01.

Table 4 Histopathological findings in rats treated orally with 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Sex	Fate	Dose (mg/kg)	Male				Female						
				Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice				Dead		
				0	40	200	1000	0	40	200	1000	0	1000	
Number of animals				12	12	12	11	11	12	12	9	1 <sup>a)</sup>	3 <sup>b)</sup>	
Heart														
			Inflammatory cell infiltration, focal	+	5	#	#	1	0	#	0/1 <sup>s</sup>	0	0	0
Mandibular lymph node														
			Blood absorption	+	2	#	#	1	1	#	0/1	0	0	0
			Atrophy, lymph follicle	+	0	#	#	0	0	#	0/1	0	0	1
Mesenteric lymph node														
			Blood absorption	+	0	#	#	1	0	#	0/1	0	0	0
			Atrophy, lymph follicle	+	0	#	#	0	0	#	0/1	0	0	1
Pancreaticoduodenal lymph node					#	#	#	ND/3	#	#	#	ND/1	#	#
Thymus														
			Hemorrhage	+	0	0	0	0	0	0	0	0/8	1	0
			Atrophy, acute	+	0	0	0	0	2	0	2	3/8	0	3
Spleen														
			Atrophy, white pulp	+	0	#	#	0	0	#	0/1	0	0	2
Bone marrow (femur)					ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Bone marrow (sternum)					ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Trachea														
			Dilatation, tracheal gland	+	4	#	#	4	1	#	0/1	4	0	0
Lung														
			Edema	+	0	#	#	0	0	#	0/2	0	0	3
			Hemorrhage, focal	+	0	#	#	0	0	#	0/2	1	0	0
			Inflammatory cell infiltration	+	4	#	#	5	2	#	1/2	4	0	0
Stomach														
			Dilatation, gastric gland	+	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0/2
			Edema	+	0	0	0	7**	0	0	0	2	0	1/2
			Hyperplasia, squamous, forestomach, diffuse	+	0	0	0	11**	0	0	0	9**	0	2/2
			Inflammatory cell infiltration, forestomach	+	0	0	0	10**	0	0	0	5**	0	1/2
			Ulcer, forestomach	+	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0/2
			Ulcer, glandular stomach	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/2
Duodenum					ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Jejunum					ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Ileum					ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Cecum					ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Colon					ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Rectum					ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Liver														
			Fatty change, hepatocyte, focal	+	0	#	1/1	0	0	#	0/1	0	0	0
			Microgranuloma	+	1	#	0/1	1	1	#	0/1	0	0	0
			Necrosis, focal	+	0	#	0/1	0	0	#	0/1	1	0	0
Pancreas														
			Atrophy, acinus, focal	+	0	#	#	1	1	#	0/1	0	1	0
			Inflammatory cell infiltration, focal	+	2	#	#	1	0	#	0/1	0	0	0

+, Slight ; #, Not examined ; ND, No abnormalities were detected.

\$. Number of animals showing lesion/number of animals examined

a), One animal died of dystocia at day 23 of gestation.

b), Dead animals were observed at 2,6 and 38 days after commencement of administration.

Significantly different from control: \*\*, P<0.01.

Table 4 (Continued)

Organ	Sex	Fate	Male				Female				Dead	
			Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice					
			0	40	200	1000	0	40	200	1000	0	1000
Number of animals			12	12	12	11	11	12	12	9	1 <sup>a)</sup>	3 <sup>b)</sup>
Kidney												
Basophilic tubule		+	0	#	#	2	0	#	0/1	0	0	0
Cyst		+	0	#	#	0	0	#	0/1	0	0	1
Dilatation, tubule		+	1	#	#	0	0	#	0/1	0	0	0
Hyaline droplet, tubular epithelium, proximal		+	7	#	#	5	0	#	0/1	0	0	0
Inflammatory cell infiltration, interstitium, focal		+	1	#	#	0	1	#	0/1	1	0	1
Urinary bladder			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Testis												
Atrophy, seminiferous tubule, diffuse		+	0	#	1/1	0						
Epididymis												
Decrease in sperm		+	0	#	1/1	0						
Seminal vesicle			ND	ND	ND	ND						
Prostate												
Inflammatory cell infiltration		+	2	3	0	1						
Ovary							ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Uterus												
Hemorrhage		+					0	#	0/1	1	1	0
Inflammatory cell infiltration		+					0	#	0/1	1	0	0
Vagina												
Hemorrhage		+					0	#	0/1	1	0	0
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte		+					0	#	0/1	1	0	0
Mammary gland							ND	ND/3	ND/3	ND	ND	ND
Pituitary												
Cystic dilatation, Rathke's Pouch		+	0	#	#	1	0	#	0/1	0	0	0
Thyroid												
Ultimobranchial remnant		+	3	#	#	2	3	#	0/1	4	1	0
Adrenal			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Brain												
Degeneration, nerve fiber		+	0	0	0	3	0	0	0	4	0	0
Spinal cord												
Degeneration, nerve fiber		+	0	0	0	8**	0	0	0	6**	0	0
Sciatic nerve			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Skin												
Atrophy, hair follicle		+	#	#	#	#	1/1	#	#	#	#	#
Bone (femur)			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Bone (sternum)			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND

+, Slight ; #, Not examined ; ND, No abnormalities were detected.

\$, Number of animals showing lesion/number of animals examined

a), One animal died of dystocia at 23 of gestation.

b), Dead animals were observed at 2,6 and 38 days after commencement of administration.

Significantly different from control:\*\*, P&lt;0.01.

Table 5 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	40	200	1000
Number of pairs examined	12	12	12	10
Number of pairs with successful mating	12	12	11	10
Mating index % <sup>a)</sup>	100.0	100.0	91.7	100.0
Number of pregnant females	12	12	11	9
Fertility index % <sup>b)</sup>	100.0	100.0	100.0	90.0
Pairing days until mating	2.5 ± 1.0 <sup>c)</sup>	3.1 ± 1.0	3.9 ± 3.0	2.8 ± 1.0
Number of estrous stages without mating	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0

a) Mating index (%) = (Number of pairs with successful mating/number of pairs examined) × 100

b) Fertility index (%) = (Number of pregnant animals/number of pairs with successful mating) × 100

c) Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 6 Delivery and litter data in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	40	200	1000
Number of females examined	12	12	11	8
Number of females with live pups	11	12	11	8
Gestation index % <sup>a)</sup>	91.7	100.0	100.0	100.0
Gestation length (days)	22.9 ± 0.3 <sup>c)</sup>	22.6 ± 0.5	22.6 ± 0.7	22.8 ± 0.5
Number of corpora lutea <sup>d)</sup>	17.3 ± 1.9	17.6 ± 1.6	16.8 ± 1.7	16.9 ± 4.9
Number of implantation sites	15.6 ± 2.9	16.4 ± 1.6	15.6 ± 2.5	14.8 ± 4.9
Implantation index % <sup>b)</sup>	89.5 ± 12.3	93.6 ± 8.1	92.6 ± 7.8	86.2 ± 11.6
Delivery index % <sup>e)</sup>	89.7 ± 5.9	94.7 ± 4.8	85.4 ± 15.1	88.9 ± 8.2
Number of pups delivered	14.5 ± 1.4	15.5 ± 1.2	13.6 ± 4.1	12.6 ± 4.5
Number of live pups on day 0	14.3 ± 1.6	15.5 ± 1.2	13.1 ± 5.1	11.0 ± 3.7
Live birth index % <sup>d)</sup>	98.03 ± 4.52	100.00 ± 0.00	93.18 ± 22.61	89.06 ± 12.64
Sex ratio (male/female)	1.18 (85/72)	0.86 (86/100)	0.87 (67/77)	0.83 (40/48)
Number of live pups on day 4	14.0 ± 1.5	15.5 ± 1.2	14.0 ± 3.7	7.8 ± 4.2
Viability index on day 4 % <sup>e)</sup>	98.16 ± 3.18	100.00 ± 0.00	89.78 ± 29.88	51.51 ± 50.48
Body weight of pups g				
on day 0 male	7.2 ± 0.4	6.6 ± 0.4	6.9 ± 0.7	6.4 ± 1.1*
female	6.8 ± 0.6	6.3 ± 0.5	6.5 ± 0.7	6.0 ± 0.9*
on day 4 male	11.1 ± 1.1	10.4 ± 0.9	10.8 ± 2.0	10.2 ± 2.5
female	10.7 ± 1.3	9.8 ± 1.0	10.4 ± 2.0	9.8 ± 1.8
Body weight gain of pups g				
day 0 to 4 male	3.9 ± 0.9	3.7 ± 0.7	4.0 ± 1.5	3.4 ± 1.4
female	3.9 ± 0.9	3.6 ± 0.6	3.9 ± 1.5	3.5 ± 0.8

a) Gestation index (%) = (Number of females with live pups/number of pregnant females) × 100

b) Implantation index (%) = (Number of implantation sites/number of corpora lutea) × 100

c) Delivery index (%) = (Number of pups delivered/number of implantation sites) × 100

d) Live birth index (%) = (Number of live pups on day 0/number of pups delivered) × 100

e) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4/number of live pups on day 0) × 100

f) Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control: \*, P < 0.05.

