

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: Findings, grade and number of animals	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				
Spermatoc granulo ma, 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 <sup>a</sup>	589	560	598 <sup>c</sup>	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 <sup>a</sup>	383	318	386 <sup>b</sup>	690	732	733 <sup>c</sup>	367	362	377 <sup>d</sup>	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]

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。

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



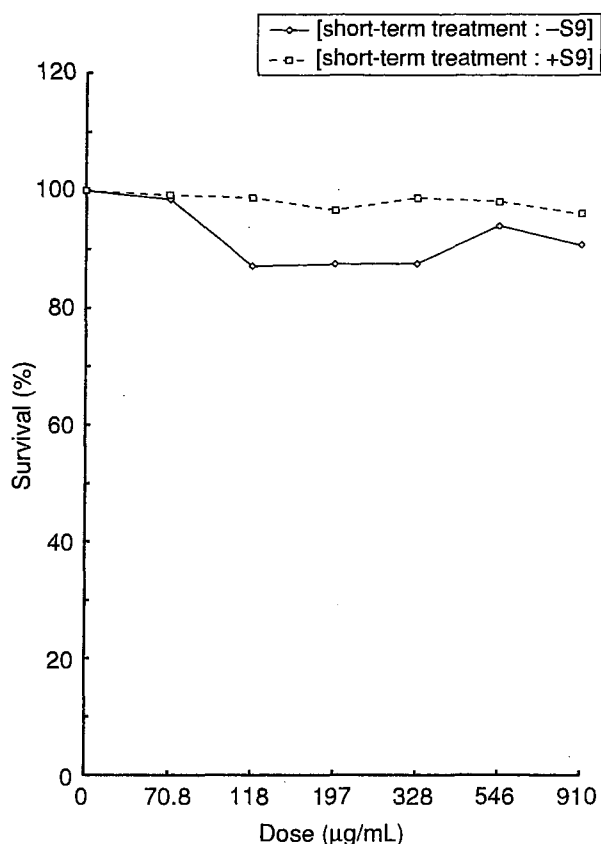


Fig. 1 Dose-survival curves of tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment: 6 hr]

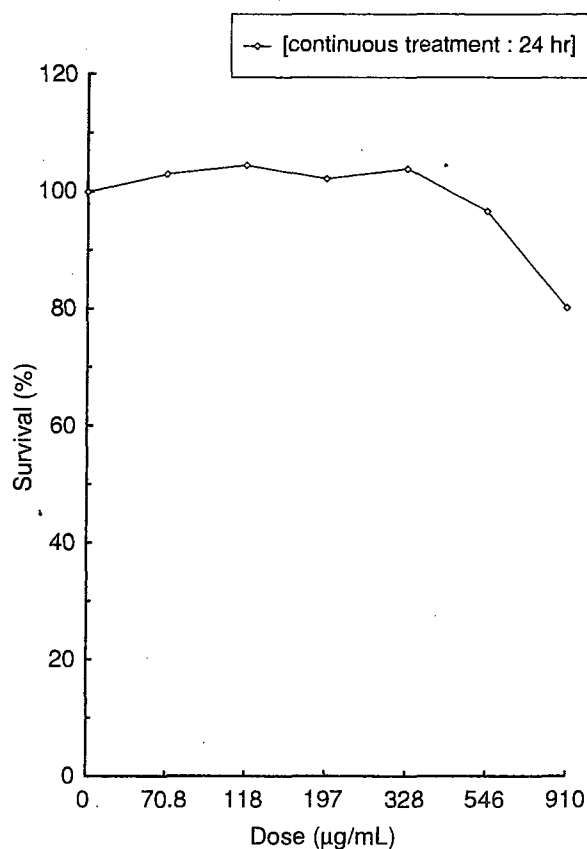


Fig. 2 Dose-survival curve of tetramethylammonium hydroxide [continuous treatment: 24 hr]

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(コールターエレクトロニクス(株))により赤血球数、白血球数、平均赤血球容積、血小板数(以上、電気抵抗法)および血色素量(吸光度法)を測定し、これらを基にヘマトクリット値、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)および網状赤血球比率(Brecher法)を求めた。また、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液を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投与群の雌雄では、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雄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

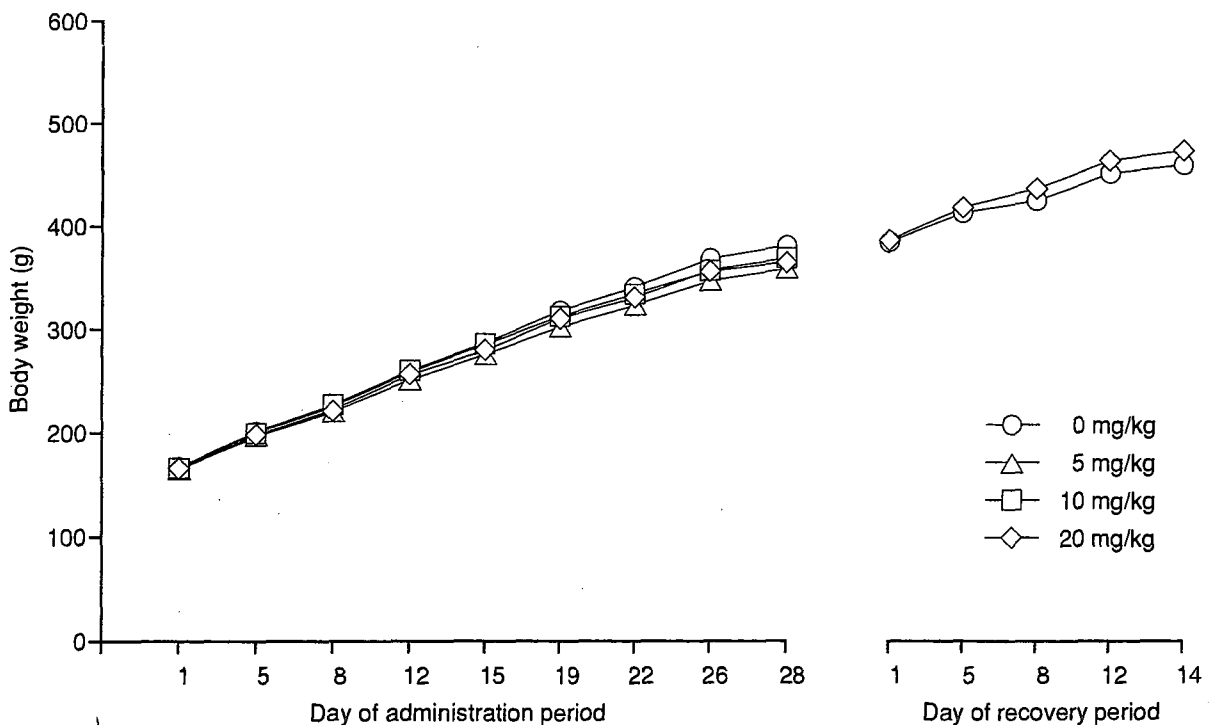


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

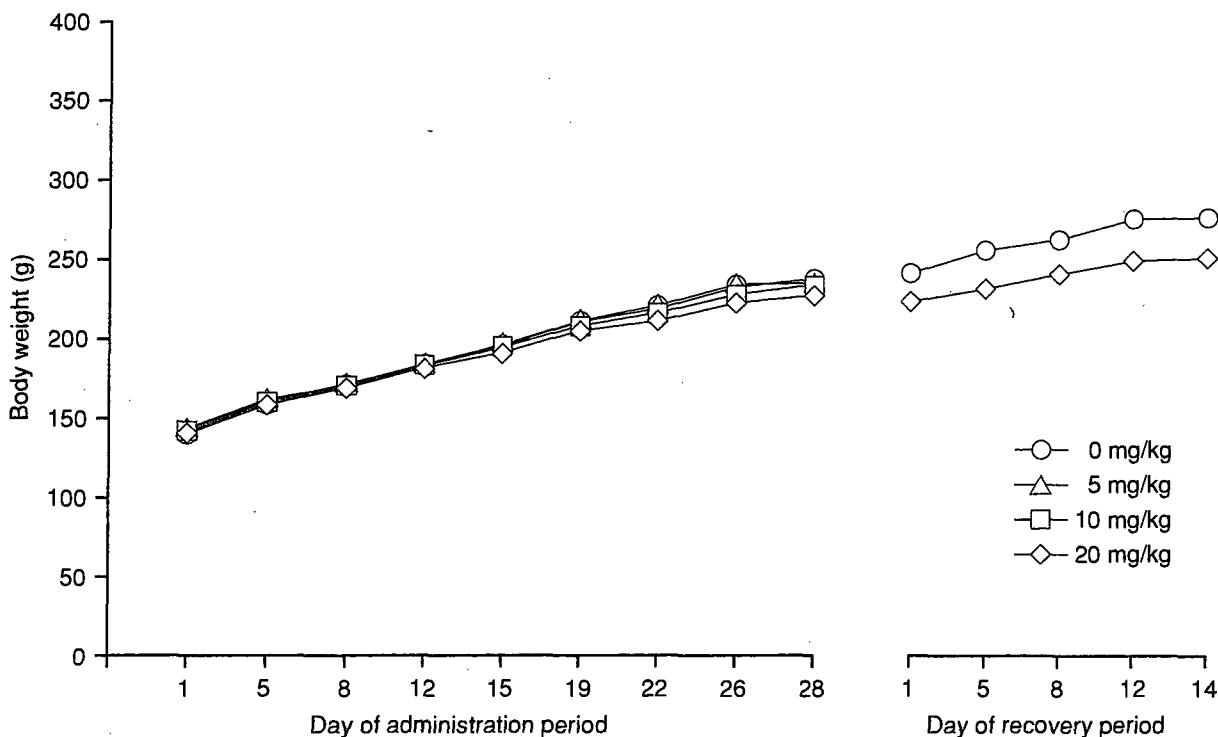


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

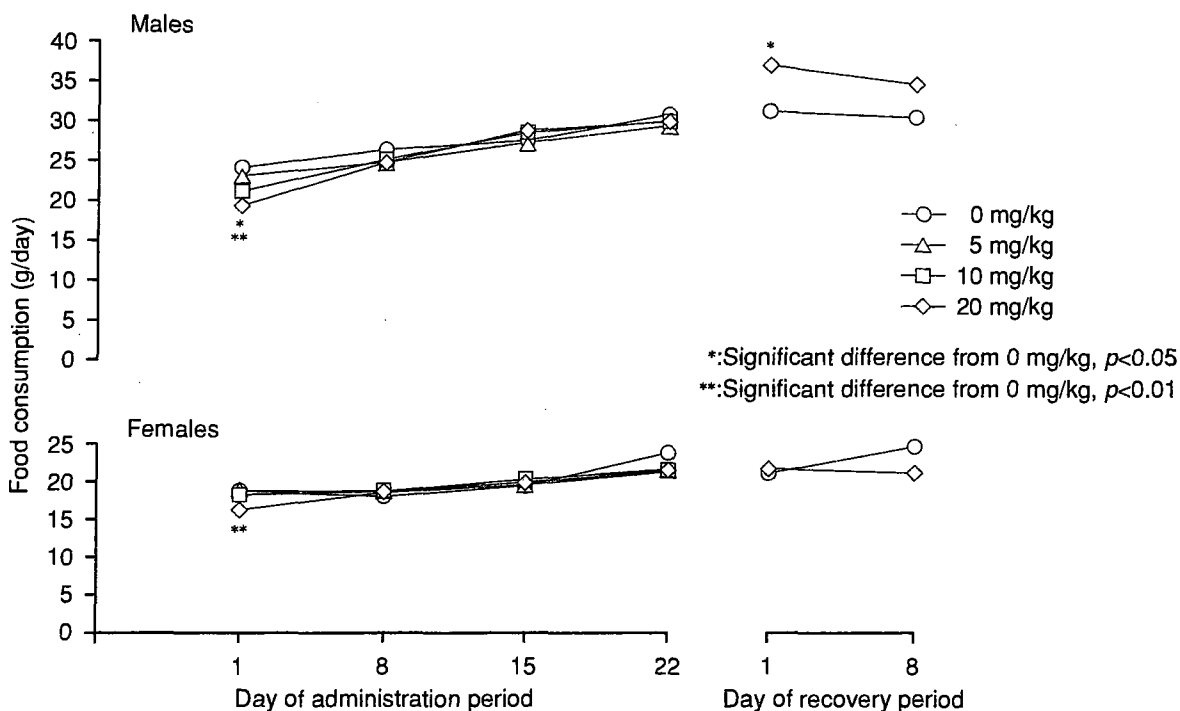


Fig. 3 Food consumption of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

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	2.24±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	0.54±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,  $p < 0.01$