

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  $\mu\text{g}$ /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  $\mu\text{g}$ /プレート(TA100は15.6～500  $\mu\text{g}$ /プレート, WP2 *uvrA*は125～4000  $\mu\text{g}$ /プレート), S9 mix添加試験を62.5～2000  $\mu\text{g}$ /プレート(TA100は15.6～500  $\mu\text{g}$ /プレート, WP2 *uvrA*は125～4000  $\mu\text{g}$ /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  $\mu\text{g}$ /プレート(TA100およびTA1537), 1000  $\mu\text{g}$ /プレート(TA98およびTA1535)および4000  $\mu\text{g}$ /プレート(WP2)で、S9 mix添加試験では、500  $\mu\text{g}$ /プレート(TA100), 2000  $\mu\text{g}$ /プレート(TA1535, TA98およびTA1537)および4000  $\mu\text{g}$ /プレート(WP2)で認められた。復帰突然変異コロニー数は、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  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )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)。

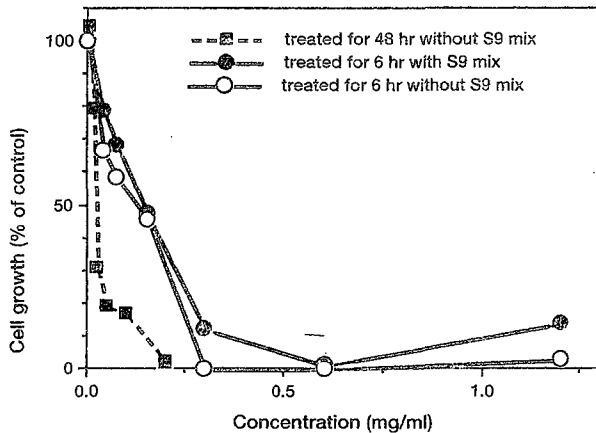


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-hydroxybenzaldehyde

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	
											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	
											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ーゲン顆粒の枯渇、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生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, セイメケミカル(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0.5 ml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<sup>3</sup>)、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微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。