

## 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、肺の動脈壁鈣質沈着、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 ± 31	806 ± 42	814 ± 34	824 ± 18	829 ± 35	813 ± 23	876 ± 53*
	Hemoglobin (g/dL)	16.3 ± 0.6	16.0 ± 0.9	15.7 ± 0.5	15.9 ± 0.5	15.2 ± 0.3	15.6 ± 0.7	15.5 ± 0.7
	Hematocrit (%)	48.2 ± 2.1	47.1 ± 2.5	47.4 ± 0.7	48.0 ± 1.6	46.9 ± 0.7	45.4 ± 1.0	46.5 ± 2.1
	MCV (fL)	58 ± 2	58 ± 1	58 ± 2	58 ± 1	57 ± 2	56 ± 1	53 ± 1**
	MCH (pg)	19.4 ± 0.5	19.8 ± 0.6	19.4 ± 0.4	19.3 ± 0.4	18.3 ± 0.8*	19.3 ± 0.8	17.8 ± 0.7*
	MCHC (%)	33.8 ± 0.3	33.9 ± 0.4	33.2 ± 0.7	33.1 ± 0.5	32.3 ± 0.5**	34.5 ± 1.0	33.4 ± 0.5
	Leukocyte ( $10^3/\mu\text{L}$ )	63 ± 15	63 ± 11	61 ± 16	54 ± 12	37 ± 9*	77 ± 18	56 ± 17
	Differential leukocyte counts (%)							
	Baso.	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Eosin.	2 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 1	2 ± 1	1 ± 1
	Neutro.	12 ± 5	13 ± 5	11 ± 3	9 ± 4	7 ± 3	14 ± 4	13 ± 7
	Lymph.	85 ± 6	85 ± 5	88 ± 2	89 ± 4	93 ± 4	82 ± 5	83 ± 7
	Mono.	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 1	3 ± 2	3 ± 1
	Other	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Platelet ( $10^4/\mu\text{L}$ )	152 ± 6	151 ± 12	159 ± 18	134 ± 15	87 ± 12**	147 ± 12	143 ± 30
	Reticulocyte (%)	37 ± 6	42 ± 5	41 ± 3	30 ± 5	21 ± 6**	25 ± 3	24 ± 3
	PT (sec)	12.9 ± 0.5	12.8 ± 0.2	12.7 ± 0.3	13.2 ± 0.6	13.9 ± 0.1*	12.9 ± 0.3	12.6 ± 0.2
	APTT (sec)	19.0 ± 1.9	18.5 ± 2.7	18.3 ± 1.1	19.6 ± 1.8	19.0 ± 2.9	22.8 ± 1.6	19.8 ± 0.9**
Female								
	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
	Erythrocyte ( $10^6/\mu\text{L}$ )	823 ± 20	803 ± 52	816 ± 49	833 ± 29	815 ± 37	794 ± 49	876 ± 13*
	Hemoglobin (g/dL)	15.7 ± 0.4	15.8 ± 0.6	15.4 ± 0.7	15.8 ± 0.3	14.6 ± 0.4**	15.2 ± 1.1	15.3 ± 0.6
	Hematocrit (%)	46.5 ± 0.3	45.7 ± 1.5	46.6 ± 2.2	46.7 ± 1.5	45.7 ± 2.5	44.4 ± 2.6	46.7 ± 1.0
	MCV (fL)	57 ± 1	57 ± 2	57 ± 1	56 ± 0	56 ± 1	56 ± 2	53 ± 1*
	MCH (pg)	19.1 ± 0.3	19.7 ± 1.2	18.8 ± 0.5	18.9 ± 0.4	18.0 ± 0.5*	19.2 ± 0.6	17.5 ± 0.7**
	MCHC (%)	33.8 ± 0.7	34.5 ± 0.8	32.9 ± 0.7	33.7 ± 0.6	32.1 ± 0.8**	34.2 ± 0.8	32.9 ± 0.7*
	Leukocyte ( $10^3/\mu\text{L}$ )	50 ± 19	52 ± 15	50 ± 11	40 ± 13	23 ± 7*	48 ± 20	42 ± 14
	Differential leukocyte counts (%)							
	Baso.	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Eosin.	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	3 ± 1	2 ± 2
	Neutro.	14 ± 4	11 ± 7	9 ± 4	8 ± 2	13 ± 7	18 ± 10	16 ± 8
	Lymph.	85 ± 5	87 ± 7	90 ± 4	91 ± 2	86 ± 6	78 ± 9	81 ± 8
	Mono.	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 1	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0
	Other	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Platelet ( $10^4/\mu\text{L}$ )	141 ± 22	153 ± 14	145 ± 9	134 ± 22	85 ± 15**	135 ± 8	135 ± 14
	Reticulocyte (%)	26 ± 3	26 ± 4	21 ± 5	23 ± 2	22 ± 8	23 ± 6	21 ± 4
	PT (sec)	13.3 ± 0.6	13.2 ± 0.3	13.8 ± 0.6	13.6 ± 0.2	14.6 ± 0.6**	12.7 ± 0.5	13.1 ± 0.4
	APTT (sec)	17.6 ± 0.9	16.6 ± 1.1	16.4 ± 1.0	18.1 ± 2.5	18.1 ± 0.3	17.7 ± 0.6	17.3 ± 1.1

Each value is expressed as Mean ± 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(トップアガー)

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、トップアガーとした。

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に保温したトップアガー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>3)</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>4)</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>5)</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) :  $\text{NaN}_3$ ; 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 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