

を超える量と判断した。一方、100 mg/kgを投与したラットでは、体重、一般状態、剖検所見等に何ら毒性変化は認められなかった。この結果から、本試験における最高用量は100から250 mg/kgの範囲内で設定することが適切であると判断し、同一週齢の雄ラット各5例に被験物質の150ならびに200 mg/kgを7日間投与して確認した。その結果、200 mg/kgが最高用量として適当であると判断し、以下公比約3で除し、中ならびに低用量には70および20 mg/kgを設定した。なお、雌雄とも溶媒対照群にはコーン油を経口投与した。

群分けは、検疫期間中に異常のない動物の中から、投与開始前日の体重に基づいて、体重別層化無作為抽出法により行った。動物数は、溶媒対照群および200 mg/kg投与群では雌雄各13匹とし、20および70 mg/kg投与群では各5匹の動物を用いた。また、溶媒対照群の雌雄各5匹および200 mg/kg投与群の雌雄各2匹を、投与期間終了後、14日間の回復試験に用いた。一方、溶媒対照群および200 mg/kg投与群の各13匹中3匹を投与期間終了時に神経系の病理組織学検査を行う動物として、一般状態の観察ならびに病理組織学検査を実施した。これらの病理組織学検査対象動物のうち、投与期間中に溶媒対照群の雄の1例、200 mg/kg投与群の雌雄各2例が死亡したため、残りの動物を投与期間終了時に、0.1 Mリン酸緩衝1.25%グルタルアルデヒド2%パラホルムアルデヒド固定液で灌流固定し、脳、脊髄および坐骨神経の一部を電子顕微鏡用樹脂包埋し、病理組織学的に検査した。これらの神経系の病理組織学検査の結果、被験物質投与によると考えられる異常は認められなかった。

4. 投与方法

投与経路は、化審法ガイドライン「ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験」に従い経口投与とした。

投与は、1日1回、28日間、毎日9時～12時の間に、ラット用胃管を用いて強制的に行い、投与液量は、雌雄とも5 mL/kgとして、各投与時に最も近い時点で測定された体重に基づいて個別に算出した。

5. 検査項目

1) 一般状態の観察

投与期間および回復試験期間を通じて、毎日、死亡例の有無を調べた。また、生存動物全例について、一般状態を投与期間中は毎日、投与前および投与後の1日2回(回復試験期間中は1回)観察した。

2) 体重および摂餌量の測定

投与開始週では投与開始直前と投与第4日、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は1週に2回の頻度で、生存動物全例について体重を測定し、投与期間あるいは回復試験期間終了日および剖検日にも体重の測定を行った。また、投与開始週では投与開始日に、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は1週に1回の頻度で、生存動物全例について1日当たりの摂餌量の測定を行った。

3) 尿検査

投与期間終了週(投与第26日)に、溶媒対照群ならびに70 mg/kg以下の被験物質投与群では雌雄とも各5匹を、200 mg/kg投与群では検査日まで生存していた雌雄各4匹を選択し、また回復試験期間終了週(回復第12日)には回復試験を行った動物全例を、いずれも約24時間代謝ケージに収容して採尿し、尿量〔天秤で計量(尿重量を比重で除す)〕、色調および混濁(視診)、比重〔重量法、使用天秤(AE200, メトラー)〕、ナトリウム濃度、カリウム濃度および塩素濃度(イオン電極法、全自動電解質分析装置EA05, A&T)について検査した。なお、pH、潜血、蛋白質、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンおよび沈渣の検査は、代謝ケージに収容して4時間以内に採取した尿について、試験紙法(マルティスティックス/クリニテック 200, バイエル三共)および鏡検(光学顕微鏡)によって実施した。

4) 血液学検査

投与期間終了時および回復試験期間終了時の剖検に先立ち、全例について、18ないし24時間絶食させたのち、ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりEDTA 2Kを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter(Model S-PLUS IV, コールターエレクトロニクス)により赤血球数(電気抵抗法)、白血球数(電気抵抗法)、血色素量(吸光度法)、平均赤血球容積(電気抵抗法)、および血小板数(電気抵抗法)を測定し、これらを基に平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度およびヘマトクリット値を算出した。また、血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)および網状赤血球比率(Brecher法)を求めた。さらに、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の測定には、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液を用いて、光散乱検出法(CA-3000, 東亜医用電子株)により測定した。

5) 血液生化学検査

前述の血液学検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血しそれぞれ血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロシュ)により、総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD-DOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ・G6PDH法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼGt-DH法)、クレアチニン濃度(Jaffé法)、アルカリフォスファターゼ活性(パラニトロフェニルリン酸基質法)、GOT活性(SSCC法)、GPT活性(SSCC法)、LDH活性(Wröblewski-La Due法)、カルシウム濃度(OCPC法)、無機リン濃度(モリブデン酸直接法)、トリグリセライド濃度(GPO-DAOS法)、 γ -GTP活性(γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)、A/G比(総蛋白濃度およびアルブミン濃度より算出)を測定した。また、全自動電解質分析装置(EA05, A&T)により、ナトリウム濃度(イオン電極法)、カリウム濃度(イオン電極法)、塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

6) 病理学検査

上記の採血に引き続き、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、肝臓、腎臓、副腎、精巣または卵巣の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、脳、脊髄、下垂体、眼球、ハーダー腺、甲状腺(上皮小体を含む)、顎下腺(舌下腺を含む)、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、精巣または卵巣、精嚢腺、膀胱、前立腺、骨髄(大腿骨)、坐骨神経、骨格筋(下腿部)および病変部については、0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン液(pH 7.2)で固定した。病理組織学検査は、投与期間終了時ならびに回復試験期間終了時に剖検した雄の全動物の心臓、200 mg/kg投与群ならびに溶媒対照群の脳、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、坐骨神経、下垂体および卵巣について、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製して実施した。また、投与期間終了時および回復試験期間終了時の剖検時に、肉眼的に異常が認められた動物の病変部についても実施した。

6. 統計処理法

体重、摂餌量、尿検査(半定量検査を除く)、血液学検査、血液生化学検査ならびに器官重量で得られた値をもとにして、各群ごとに平均および標準偏差を求めた。また、1群の例数が3例以上の群が溶媒対照群を含め3群ある場合は、Bartlettの方法による分散の一般性の検定(有意水準:5%)を行い、ついで、分散が一般な場合は、一元配置型の分散分析を行い、有意(有意水準:5%)の時はDunnnettあるいはSchefféの方法で多重比較を行った。一方、分散が一般でない場合はKruskal-Wallisの順位検定を行い、有意(有意水準:5%)ならばDunnnett型あるいはScheffé型の方法で多重比較を行った。さらに、病理組織所見については、グレード分けしたデータは、Mann-WhitneyのU検定により、また、陽性グレードの合計値は、Fisherの直接確率の片側検定により、溶媒対照群と各被験物質投与群との間の有意差検定を行った(有意水準:5%)。200 mg/kg投与群の雌雄の、半定量検査を除く尿検査、血液学検査および血液生化学検査結果、器官重量測定値ならびに回復期間中の体重および摂餌量は、平均値のみを求め、検定は行わなかった。

結果

1. 一般状態

神経の病理組織学的検討を行った動物を除く、溶媒対照群および200 mg/kg投与群の雌雄各10例、20および70 mg/kg投与群の雌雄各5例のうち、200 mg/kg投与群の雄では投与第11日から、雌では投与第4日から死亡が発現し、投与期間終了まで各10例中6例が死亡した。流涎が70 mg/kg以上の投与群の雌雄で、痙攣が70 mg/kg以上の投与群の雄ならびに200 mg/kg投与群の雌でみられた。さらに、200 mg/kg投与群では姿勢の異常、自発

運動の低下、異常発声、呼吸異常、被毛の汚染および散瞳が雌雄で、挙尾が雄で、振戦、立毛および紅涙が雌で認められた。200 mg/kg投与群の雌で認められた被毛汚染は回復第6日まで継続したが、他の症状は回復試験期間中には認められなかった。溶媒対照群の雄の1例では潰瘍ならびに痂皮形成が投与期間中に認められ、回復試験期間終了まで継続したが、用量依存性の認められない変化であった。

中枢神経の病理組織学的検討を実施した動物のうち、200 mg/kg投与群の雄では流涎、痙攣、姿勢の異常、自発運動の低下、被毛の汚染および散瞳がみられ、3例のうち2例が死亡した。同群の雌では雄でみられた症状の他、振戦、紅涙および立毛がみられ、3例中2例が死亡した。溶媒対照群の雄の1例は、投与期間中に死亡したが、剖検の結果、肺全葉の暗赤色、無気域が認められ、病理組織学検査の結果、肺の出血と浮腫が認められたことから、投与過誤による死亡と判断した。

2. 体重(Fig. 1)

投与開始後、200 mg/kg投与群の雌雄では、体重が溶媒対照群の値を下回り、雄では投与第8日以降投与期間終了時剖検まで継続的に、雌では投与第4、25および28日に、それぞれ溶媒対照群に比較して有意差が認められた。体重は、雌雄とも投与期間終了後も継続して低値を示した。70 mg/kg以下の投与群の体重には変化は認められなかった。

3. 摂餌量(Fig. 2)

摂餌量の減少が200 mg/kg投与群の雌雄で認められた。摂餌量の減少は雄では投与第8日以降、投与期間を通してみられ、投与第22日には有意差が認められた。雌では投与第22日の測定においてのみ減少がみられた。回復試験期間中の摂餌量は雌雄とも回復第8日には回復傾向を示した。70 mg/kg以下の投与群の摂餌量には変化は認められなかった。

4. 尿検査(Table 1)

溶媒対照群を含む各投与群において、雌雄とも投与期間終了週ならびに回復試験期間終了週のいずれの時期にも、蛋白、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンが陽性または疑陽性となる動物があり、尿沈渣中に上皮細胞または結晶が観察される動物も存在した。投与期間終了週の検査において、尿中カリウム濃度の低下が20および200 mg/kg投与群の雌で、ナトリウムならびに塩素濃度の低下が200 mg/kg投与群の雌で認められたが、これらの電解質の24時間排泄量には溶媒対照群と比較して差は認められなかった。

5. 血液学検査(Table 2)

投与期間終了時の検査において、雄では平均赤血球色素濃度ならびに平均赤血球色素量の増加が70 mg/kg投与群で認められたが、赤血球数ならびにヘマトクリット値には変化がみられないことから、偶発的な

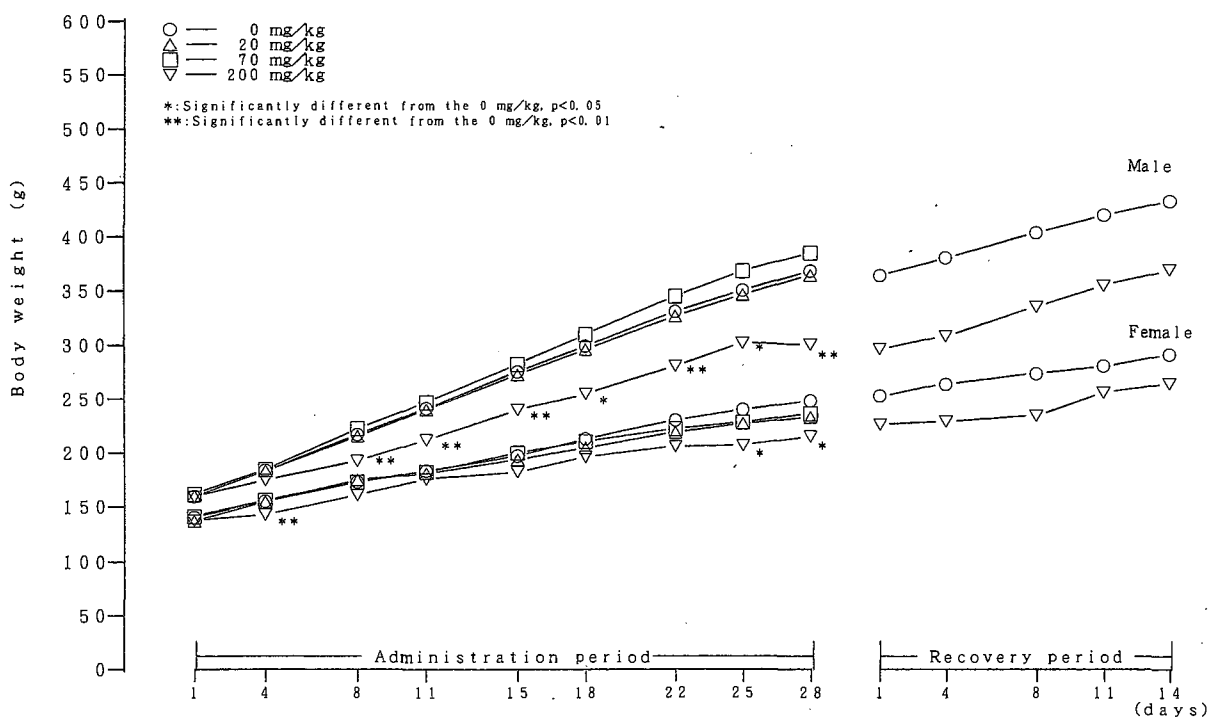


Fig. 1 Body weight changes of rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

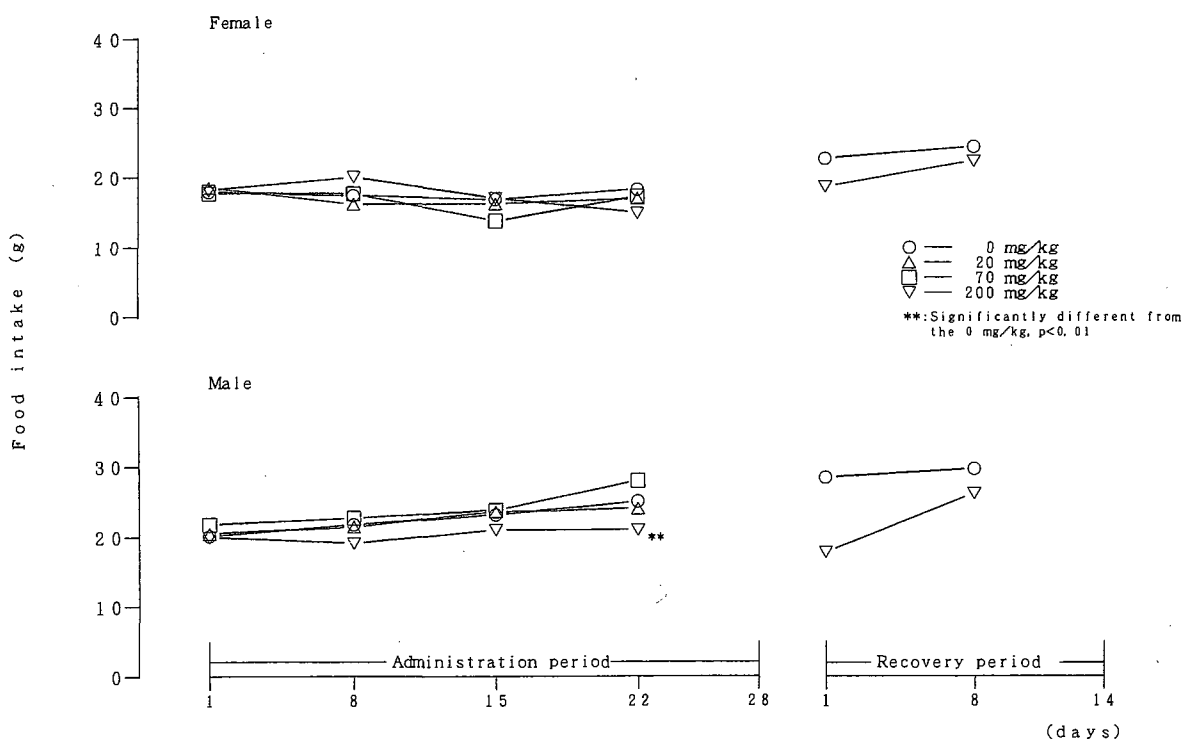


Fig. 2 Food intake of rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

差と判断した。一方、雌では分葉核好中球百分比の有意な低下ならびにリンパ球百分比の有意な上昇が70 mg/kg投与群で認められたが、用量依存性のみられない変化であることから、被験物質投与による変化ではないと判断した。雌では投与期間終了時ならびに回復試験期間終了時の白血球数の増加が200 mg/kg投与群で認められた。

6. 血液生化学検査 (Table 3)

投与期間終了時の検査において、血中トリグリセライド濃度の有意な上昇が70 mg/kg投与群の雄で、無機リン濃度の上昇が200 mg/kg投与群の雄および70 mg/kg以上の投与群の雌で、カルシウム濃度の上昇が70 mg/kg以上の投与群の雌で、ナトリウム濃度の上昇が70 mg/kg以上の投与群の雄で、カリウム濃度の上昇が200 mg/kg投与群の雌で、塩素濃度の上昇が20 mg/kg投与群の雄で、アルカリフォスファターゼ活性の上昇が200 mg/kg投与群の雌で認められた。

回復試験期間終了時の検査においては、トリグリセライド濃度の低下ならびに無機リン濃度の上昇が200 mg/kg投与群の雌で認められた。

7. 病理学検査

1) 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時剖検例においては、副腎の絶対重量および相対重量の増加が200 mg/kg投与群の雌雄で、肝臓の絶対重量の減少が200 mg/kg投与群の雌雄で、また、相対重量の減少が200 mg/kg投与群の雄で、相対重量の増加が200 mg/kg投与群の雌で、卵巣の絶対重量ならびに相対重量の減少が70 mg/kg以上の投与群で認められた。200 mg/kg投与群においては、雌雄とも剖検時まで体重増加抑制が認められていたため、精巣および雌雄の脳ならびに腎臓の相対重量が増加したが、絶対重量には変化はみられなかった。

回復試験期間終了時剖検において、200 mg/kg投与群では、副腎の絶対重量および相対重量の増加が雌で、肝臓の絶対重量の減少が雌雄で、卵巣の絶対重量の減少がそれぞれ認められた。また、回復試験期間中も体重増加抑制が継続したため、脳および腎臓の相対重量の増加が雌雄で、精巣および副腎の相対重量の増加が雄で認められたが、絶対重量には変化はみられなかった。

2) 剖検所見

200 mg/kg投与群の雌雄の死亡例において、胸腺の赤色点、肺の暗赤色または暗色領域、脾臓の淡色化ならびに被毛あるいは口・鼻孔周囲の被毛の汚染あるいは湿潤が認められたが、いずれも死因と考えられる著しい変化ではなかった。

投与期間終了時剖検において、肺の暗色点または暗色領域、肺の淡色領域、腎盂の拡張、肝臓の淡色領域、肝臓の横隔膜結節、卵巣の暗色点が散見され、被毛の汚染が200 mg/kg投与群の雌雄各1例で、痂皮の形成が溶媒対照群の雄の1例でそれぞれ認められたが、被毛の汚染

を除くいずれの所見にも、用量依存性は認められないことから、被験物質投与による変化ではないと判断した。

回復試験期間終了時の剖検において、下顎リンパ節の腫大、肺の暗色点または暗色領域、肝臓の淡色領域、腹腔内器官の軽度の癒着ならびに皮膚の痂皮形成が認められたが、いずれの所見も同週齢のラットにときおり認められる所見であることから、被験物質投与によると考えられる明らかな変化ではないと判断した。

3) 病理組織学所見 (Table 5)

200 mg/kg投与群の途中死亡例の病理組織学検査の結果、広範囲の心筋変性が雄の1例で認められた。雄の他の1例にもごく軽度な心筋変性が認められたが、程度も軽く、自然発生的な変化と考えられた。その他の所見として、肝臓では門脈周囲性の脂肪化、脾臓では髓外造血や褐色色素沈着、腎臓では皮質の好塩基性尿管ならびに円柱が認められたが、いずれも対照群の動物でときおり認められる所見であり、被験物質投与の影響を示唆する変化ではなかった。

投与期間終了時剖検例における溶媒対照群と200 mg/kg投与群の比較において、肝臓では門脈周囲性の脂肪化が両群の雌雄全例で、脾臓では髓外造血が両群の雌雄全例でみられ、雌の両群全例に褐色色素沈着が認められた。また、腎臓では、雄の溶媒対照群の5例全例、雄の200 mg/kg投与群の2例中1例、雌の溶媒対照群の5例中3例、雌の200 mg/kg投与群の2例中1例で皮質の好塩基性尿管が認められ、eosinophilic bodyが雄の溶媒対照群の5例中3例で、円柱が雌の溶媒対照群の5例中1例でそれぞれみられたが、いずれの病理組織学所見にもその発現頻度には溶媒対照群と200 mg/kg投与群の間で有意差は認められなかった。雄全例の心臓の病理組織学検査では、ごく軽度な心筋変性が溶媒対照群に1例、70 mg/kg投与群に3例みられた。

回復期間終了時剖検例には、被験物質投与の影響と考えられる病理組織学所見はみられなかった。雄全例の心臓の病理組織学検査においても、異常はみられなかった。

考察

染料、ゴム製品等の合成過程での触媒ならびにボイラーの錆防止剤や軟鋼の腐食防止などに広く使われているジシクロヘキシルアミンの20, 70および200 mg/kgを、雌雄のSprague-Dawley系(Crj:CD)ラットに1日1回、28日間にわたって反復経口投与した。その結果、200 mg/kg投与群の雌雄で死亡が認められ、一般状態の変化として、雌雄とも被験物質投与群で流涎や痙攣、姿勢の異常、散瞳、呼吸異常、異常発声等の神経症状がみられた。特に流涎は70 mg/kg以上の投与群の雌雄の多くの動物で認められ、200 mg/kg投与群では発現例数も多かった。また、散瞳および痙攣も200 mg/kg投与群においては多数例で認められた。ジシクロヘキシルアミンは、ラット精管のノルアドレナリン誘発収縮の際、フェント

ラミンによる阻害に拮抗することが報告されている¹⁾。また、同じく、ラット精管を用いた実験で、ノルアドレナリンによる収縮を増強することが知られている^{2,3)}。ノルアドレナリンによるラット精管の収縮に対する、ジシクロヘキシルアミンによる増強作用は、レセルピンにより神経終末のノルアドレナリンを枯渇させると抑制されることから、コカインと同様の作用機序であることが明らかになっている²⁾。また、高濃度のジシクロヘキシルアミンでは、交感神経興奮による間接的な精管収縮を示すことも知られている²⁾。すなわち、本試験において認められた一般状態の変化ならびに死亡の原因は主に、ジシクロヘキシルアミンによるノルアドレナリンの交感神経終末への再取り込み阻害による、交感神経興奮作用によるものと推察される。病理学所見においては、脳、脊髄および坐骨神経には病理学的変化は認められず、雄の死亡例のうち広範囲の心筋変性が認められた1匹を除き、剖検ならびに病理組織検査の結果、被験物質投与による影響を疑わせる変化は認められなかった。

尿検査においては、溶媒対照群を含む各投与群において、雌雄とも投与期間終了週ならびに回復試験期間終了週のいずれの時期にも、蛋白、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンが陽性または疑陽性となる動物が認められた。しかし、これらの成績を当研究所において過去2年間に「既存化学物質の安全性点検事業」として行われた3試験の28日間反復経口投与毒性試験の対照群の結果との比較した結果、陽性および疑陽性の発現頻度ならびに程度には差が認められないことから、被験物質投与の影響はないものと判断された。また、尿沈渣中にみられた上皮細胞ならびに結晶は、いずれもラットにおいて通常観察されるものであった。

血液学検査においては、雌で白血球数の増加が200 mg/kg投与群の、投与期間終了時ならびに回復試験期間終了時の検査で認められた。このうち、回復試験期間終了時の白血球数は、先に述べた3試験の回復試験期間終了時の白血球数と比較した結果、正常値の範囲内であると判断した。一方、投与期間終了時の白血球数の増加は雄では認められないこと、雌においても白血球百分比には変化がみられないことから、被験物質投与による影響であるか否かは明らかにならなかった。

血液生化学検査では、投与期間終了時の血中塩素濃度の上昇ならびにナトリウム濃度の上昇が雄で、カリウム濃度の上昇が雌で認められた。また、尿検査においては投与期間末期の検査において、尿中カリウム濃度が雌で、ナトリウムならびに塩素濃度が雌雄でそれぞれ溶媒対照群と比較して低下した。これらのことから、ジシクロヘキシルアミン投与による水、電解質代謝に対する影響が疑われたが、これらの変化も、先に述べた3試験のデータと比較すると正常値の範囲内であると判断された。一方、無機リン濃度の上昇が200 mg/kg投与群の雄および70 mg/kg以上の投与群の雌で、カルシウム濃度の上昇が70 mg/kg以上の投与群の雌で、アルカリフォスファターゼ活性の上昇が200 mg/kg投与群の雌で認められた。また、回復試験期間終了時の検査においても、雌で

は無機リン濃度の上昇が認められることから、ジシクロヘキシルアミン投与によるリン・カルシウム代謝に対する影響が疑われた。これらのうち、70 mg/kg投与群の雌における変化は、先に述べた3試験における投与期間終了時の溶媒対照群の検査結果と比較して、差がないと判断されるものの、200 mg/kg投与群における変化は、アルカリフォスファターゼ活性を除いて、いずれも正常範囲を逸脱した値と考えられることから、ジシクロヘキシルアミンの200 mg/kgの反復投与は、リン・カルシウム代謝に対して影響を及ぼす可能性が示唆された。

器官重量では、投与期間終了時剖検例において、副腎重量の増加ならびに肝臓重量の減少が200 mg/kg投与群の雌雄で、卵巣重量の減少が70 mg/kg以上の投与群で認められた。ストレスに伴い視床下部からコルチコトロンピン放出因子(CRF)が分泌され、視床下部-脳下垂体-性腺系におけるエストロゲン濃度の低下が引き起こされることにより、卵巣重量に変化が起きることが知られている^{4,5)}。本試験においては、副腎および卵巣重量に主に変化がみられた200 mg/kg投与群では、半数以上の動物に死亡が発現し、また痙攣を連日起こすなどの、かなりのストレスが負荷されたものと考えられることから、本試験における副腎ならびに卵巣重量の変化には、著しい症状の継続的発現により引き起こされたCRF分泌増加の影響が及んでいる可能性が考えられる。しかし、回復試験期間終了時剖検動物において、雄の200 mg/kg投与群の副腎重量の増加や雌の70 mg/kg投与群の卵巣重量の減少は回復傾向が認められたことから、ジシクロヘキシルアミンによる卵巣ならびに副腎に対する影響は、機能的な変化であり、可逆性を有することが明らかになった。一方、肝臓重量の減少については、病理組織学検査所見にも被験物質投与によると考えられる明らかな異常は認められず、血液生化学検査結果にも異常は認められないことから、被験物質投与による肝臓に対する影響が、いかなる機序によるものかについては明らかでなかった。しかし、回復試験期間終了時剖検動物においても、雌雄とも200 mg/kg投与群で肝臓重量の減少がみられたことから、14日間の休薬後の剖検でも回復傾向は認められないものと考えられた。ジシクロヘキシルアミンは培養細胞において、細胞の成長や分化に重要な因子である⁶⁾ポリアミン、特にスペルミジンの合成を抑制することが報告されている⁷⁾。In vivoでもジシクロヘキシルアミンには、Ehrlich ascites carcinomaやSacroma 180等の動物移植癌に対する抗腫瘍活性があることが明らかになっている。また、スペルミジンはラット肝臓ミトコンドリア中に、1.8 nmol/mg蛋白程度の濃度で存在することが報告されている⁸⁾。スペルミジンの合成抑制が、肝臓においていかなる変化を惹起するかはなお明らかでないが、ジシクロヘキシルアミンの反復投与により、肝臓を標的とした変化が生じた可能性も考えられる。200 mg/kg投与群における体重増加の抑制が回復試験期間中も継続して認められたことから、ジシクロヘキシルアミンの反復投与による毒性的影響は、投与終了後もかなり継続しているものと考えられた。

以上の結果、ジシクロヘキシルアミンの70 mg/kgの投与では、一般状態の観察において流涎や痙攣が認められ、被験物質による自律神経に対する毒性学的影響が疑われることから、本試験条件下におけるジシクロヘキシルアミンの無影響量は、雌雄とも20 mg/kgであると判断した。

文献

- 1) J.A. Hickman, D.R. Mottram, C. Kidman, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **228**, 191(1977).
- 2) D.R. Mottram, J.A. Hickman, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **242**, 50(1979).
- 3) C.D. Kidman, D.R. Mottram, J.A. Hickman, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **238**, 180(1979).
- 4) C. Rivier, S. Rivest, *Biol. Reprod.*, **45**, 525(1991).
- 5) A.E. Calogero, N. Burrello, P. Negri-Cesi, et al, *Endocrinology*, **137**, 4161(1996).
- 6) J. Ibrahim, A.D. Hughes, M. Schachter, P.S. Sever, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **23**, 410(1996).
- 7) H. Hibasami, M. Tanaka, J. Nagai, T. Ikeda, *FEBS Letters*, **116**, 99(1980).
- 8) V. Tasani, M. Campagnolo, A. Toninello, D. Siliprandi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 850(1996).

連絡先

試験責任者：大原直樹
 試験担当者：高島宏昌，田中あづさ，
 加藤博康，関 剛幸，小島幸一，
 稲田浩子，安生孝子，畔上二郎，
 吉村慎介，三枝克彦
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257-8523 秦野市落合 729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Naoki Ohara (Study Director)
 Hiromasa Takashima, Azusa Tanaka,
 Hiroyasu Katoh, Takayuki Seki,
 Kohichi Kojima, Hiroko Inada,
 Takako Anjo, Jiro Azegami,
 Shinsuke Yoshimura, Katsuhiko Saegusa
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa,
 257-8523, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Urinalysis in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

| Test period | | Sex | Group | N | Volume (mL/24hr) | Specific gravity | Color ^{b)} | | Turbidity ^{c)} | | pH | | | | | Protein ^{d)} | Glucose ^{e)} | Ketone ^{e)} | Bilirubin ^{e)} | Occult blood ^{e)} | Urobili- nogen ^{e)} | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-------|-----|------------------------------|---------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------------------|----|-------------------------|-----|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ly | y | | | | | | - | + | 5.5 | 6.0 | 6.5 | 7.0 | 7.5 | 8.0 | 8.5 | ≥9.0 | - | ± | + | - | ± | + | - | ± | ± | + | | | | | | | |
| Administration | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Male | 0 | 5 | 9.5±3.8 ^{a)} | 1.046±0.022 ^{a)} | 3 | 2 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 4 | 1 | 5 | 2 | 3 | 0 | 4 | 1 | 5 | 0 | 4 | 1 | | | |
| | 20 | 5 | 14.3±4.4 | 1.030±0.014 | 4 | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 4 | 1 | 5 | 2 | 2 | 1 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | | | |
| | 70 | 5 | 24.1±17.9 | 1.024±0.023 | 4 | 1 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 1 | 3 | 1 | 5 | 3 | 1 | 1 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | | | |
| | 200 | 4 | 10.0±4.2 | 1.039±0.020 | 1 | 3 | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 4 | 2 | 1 | 1 | 4 | 0 | 4 | 0 | 3 | 1 | | | |
| Female | 0 | 5 | 10.5±1.0 | 1.026±0.006 | 4 | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 2 | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | | |
| | 20 | 5 | 10.8±4.7 | 1.020±0.009 | 5 | 0 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 5 | 4 | 1 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 4 | 1 | | |
| | 70 | 5 | 13.0±4.5 | 1.028±0.010 | 4 | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 4 | 0 | 1 | 5 | 4 | 1 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | | |
| | 200 | 4 | 18.1±8.6 | 1.013±0.002 | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 3 | 1 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | | |
| Recovery | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Male | 0 | 5 | 15.2±4.8 | 1.068±0.011 | 4 | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 | 1 | 3 | 1 | 5 | 0 | 4 | 1 | 4 | 1 | 4 | 1 | | |
| | 200 | 2 | 16.0 | 1.059 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | |
| Female | 0 | 5 | 15.2±4.0 | 1.058±0.009 | 5 | 0 | 3 | 2 | 1 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 1 | 5 | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 0 | 4 | 1 | 4 | 1 |
| | 200 | 2 | 12.4 | 1.065 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| Test period | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sex | Group | N | Red blood cell ^{f)} | Crystal ^{h)} | Cast ^{g)} | White blood cell ^{h)} | Epithelial cell ^{h)} | Na | K | Cl | Na | K | Cl | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | - | - | ± | + | - | - | - | ± | + | (mEq/L) | (mEq/L) | (mEq/L) | (mEq/day) | (mEq/day) | (mEq/day) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Administration | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Male | 0 | 5 | 5 | 0 | 4 | 1 | 5 | 5 | 2 | 3 | 0 | 132.6±77.6 ^{a)} | 358.3±81.9 ^{a)} | 148.8±45.7 ^{a)} | 1.08±0.34 ^{a)} | 3.16±0.89 ^{a)} | 1.31±0.43 ^{a)} | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 20 | 5 | 5 | 0 | 3 | 2 | 5 | 5 | 1 | 4 | 0 | 96.2±20.9 | 287.7±85.8 | 133.1±30.9 | 1.32±0.25 | 3.84±0.30 | 1.80±0.17 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 70 | 5 | 5 | 0 | 2 | 3 | 5 | 5 | 0 | 5 | 0 | 93.7±84.3 | 216.9±159.4 | 109.2±87.2 | 1.39±0.61 | 3.43±1.22 | 1.71±0.60 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 200 | 4 | 4 | 0 | 1 | 3 | 4 | 4 | 1 | 2 | 1 | 89.6±55.1 | 253.9±106.0 | 119.2±39.3 | 0.76±0.31 | 2.23±0.49 | 1.08±0.12 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Female | 0 | 5 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 5 | 1 | 4 | 0 | 85.5±24.0 | 247.1±15.3 | 111.0±19.3 | 0.88±0.17 | 2.60±0.16 | 1.16±0.09 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 20 | 5 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 5 | 2 | 3 | 0 | 54.6±16.2 | 152.1±61.3 [*] | 75.3±27.9 | 0.60±0.35 | 1.72±1.15 | 0.86±0.59 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 70 | 5 | 5 | 0 | 5 | 0 | 5 | 5 | 1 | 4 | 0 | 76.2±27.0 | 187.3±69.7 | 96.5±28.6 | 0.91±0.25 | 2.33±0.84 | 1.19±0.35 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 200 | 4 | 4 | 0 | 2 | 2 | 4 | 4 | 1 | 3 | 0 | 46.2±7.9 [*] | 100.3±29.5 ^{**} | 60.9±13.0 [*] | 0.81±0.31 | 1.72±0.63 | 1.05±0.34 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Recovery | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Male | 0 | 5 | 5 | 0 | 2 | 3 | 5 | 5 | 2 | 3 | 0 | 83.0±22.8 | 244.6±42.6 | 85.4±25.7 | 1.19±0.34 | 3.59±0.89 | 1.31±0.52 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 200 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 74.6 | 222.6 | 83.5 | 1.20 | 3.56 | 1.34 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Female | 0 | 5 | 5 | 1 | 3 | 1 | 5 | 5 | 1 | 3 | 1 | 62.1±8.1 | 207.8±43.6 | 78.5±8.7 | 0.97±0.34 | 3.03±0.49 | 1.17±0.27 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 200 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 66.0 | 235.2 | 99.2 | 0.87 | 2.77 | 1.24 | | | | | | | | | | | | | | | | |

a) Mean±S.D. b) ly, Light yellow; y, Yellow c) -, Negative; ±, Trace; +, Slight
d) -, Negative; ±, Trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL e) -, Negative
f) ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL g) -, Not observed h) -, Not observed; ±, A few; +, Abundant

*, Significantly different from 0 mg/kg, p<0.05
**, Significantly different from 0 mg/kg, p<0.01

Table 2 Hematological findings in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

| Test period | | | Differential count of WBC (%) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-------|---|--------------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|---|---------------------|-------------------|-------------------|
| Sex | Group | N | RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$) | Hb (g/dL) | Ht (%) | MCV (μm^3) | MCH (pg) | MCHC (%) | Reticulo- cyte (%) | WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$) | Neutro. | | | | | Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$) | PT (sec) | APTT (sec) | |
| | | | | | | | | | | | Band | Seg. | Eos. | Baso. | Mono. | | | | Lymph. |
| Administration | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Male | 0 | 5 | 656 ± 26 | 13.6 ± 0.3 | 40.9 ± 1.3 | 62.4 ± 1.2 | 20.7 ± 0.3 | 33.2 ± 0.5 | 2.3 ± 0.4 | 81 ± 34 | 0 ± 0 | 8 ± 4 | 1 ± 1 | 0 ± 0 | 1 ± 1 | 90 ± 4 | 103.4 ± 5.2 | 20.3 ± 1.9 | 26.9 ± 1.1 |
| | 20 | 5 | 659 ± 21 | 13.9 ± 0.4 | 41.1 ± 0.7 | 62.4 ± 1.0 | 21.1 ± 0.1 | 33.8 ± 0.6 | 2.2 ± 0.6 | 77 ± 13 | 0 ± 0 | 9 ± 2 | 1 ± 1 | 0 ± 0 | 2 ± 1 | 88 ± 4 | 104.0 ± 10.4 | 20.8 ± 1.4 | 28.1 ± 1.6 |
| | 70 | 5 | 638 ± 41 | 13.9 ± 0.6 | 40.5 ± 1.6 | 63.6 ± 2.1 | 21.9* ± 0.6 | 34.4* ± 0.4 | 2.4 ± 0.5 | 66 ± 14 | 0 ± 0 | 10 ± 4 | 0 ± 1 | 0 ± 0 | 2 ± 1 | 88 ± 4 | 102.2 ± 7.5 | 17.2 ± 1.4 | 25.4 ± 0.5 |
| | 200 | 2 | 692 | 14.6 | 42.8 | 61.9 | 21.1 | 34.2 | 2.4 | 92 | 0 | 11 | 1 | 0 | 4 | 85 | 96.6 | 19.0 | 25.4 |
| Female | 0 | 5 | 671 ± 19 | 14.1 ± 0.3 | 41.4 ± 1.5 | 61.7 ± 1.6 | 21.0 ± 0.4 | 34.1 ± 0.6 | 1.5 ± 0.4 | 40 ± 7 | 0 ± 0 | 13 ± 5 | 1 ± 1 | 0 ± 0 | 2 ± 1 | 84 ± 6 | 106.4 ± 7.4 | 14.8 ± 0.8 | 23.6 ± 2.2 |
| | 20 | 5 | 667 ± 5 | 13.9 ± 0.2 | 40.6 ± 0.8 | 60.8 ± 1.2 | 20.9 ± 0.3 | 34.3 ± 0.4 | 1.5 ± 0.1 | 50 ± 22 | 0 ± 0 | 7 ± 4 | 0 ± 1 | 0 ± 1 | 1 ± 1 | 92 ± 4 | 101.8 ± 8.3 | 13.8 ± 0.7 | 22.2 ± 1.2 |
| | 70 | 5 | 654 ± 37 | 13.8 ± 0.7 | 40.3 ± 2.4 | 61.6 ± 1.5 | 21.1 ± 0.6 | 34.2 ± 0.5 | 1.4 ± 0.5 | 59 ± 23 | 0 ± 0 | 4* ± 2 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 1 ± 1 | 94* ± 2 | 95.8 ± 9.8 | 14.4 ± 1.2 | 23.3 ± 0.9 |
| | 200 | 2 | 741 | 15.0 | 43.2 | 58.4 | 20.3 | 34.7 | 0.9 | 113 | 0 | 7 | 0 | 0 | 3 | 91 | 92.9 | 16.0 | 24.5 |
| Recovery | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Male | 0 | 5 | 698 ± 54 | 14.5 ± 1.0 | 41.5 ± 2.7 | 59.4 ± 0.9 | 20.8 ± 0.3 | 35.0 ± 0.4 | 2.6 ± 1.9 | 85 ± 29 | 0 ± 0 | 16 ± 12 | 1 ± 1 | 0 ± 0 | 2 ± 2 | 82 ± 13 | 115.3 ± 13.6 | 18.8 ± 2.3 | 25.6 ± 1.7 |
| | 200 | 2 | 673 | 14.0 | 40.1 | 59.6 | 20.8 | 35.0 | 2.8 | 78 | 0 | 13 | 0 | 0 | 3 | 84 | 98.6 | 18.0 | 25.3 |
| Female | 0 | 5 | 677 ± 40 | 14.1 ± 0.6 | 39.6 ± 1.4 | 58.6 ± 1.8 | 20.8 ± 0.6 | 35.5 ± 0.5 | 2.0 ± 0.9 | 38 ± 11 | 0 ± 0 | 22 ± 8 | 1 ± 1 | 0 ± 0 | 3 ± 3 | 74 ± 10 | 96.1 ± 14.3 | 14.9 ± 0.6 | 23.6 ± 0.9 |
| | 200 | 2 | 673 | 13.7 | 39.1 | 58.1 | 20.4 | 35.1 | 1.8 | 49 | 0 | 9 | 2 | 0 | 3 | 87 | 104.5 | 15.7 | 24.4 |

Parameter, Mean \pm S.D.*, Significantly different from 0 mg/kg, $p < 0.05$

28日間反復投与毒性試験

Table 3 Biochemical findings in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

| Test period | | Sex | Group | N | Total protein (g/dL) | Albu- min (g/dL) | A/G | BUN (mg/dL) | Creati- nine (mg/dL) | Glucose (mg/dL) | Total cholest- erol (mg/dL) | Triglyce- ride (mg/dL) | Inorg. phos. (mg/dL) | Ca (mg/dL) | Na (mEq/L) | K (mEq/L) | Cl (mEq/L) | ALP (U/L) | LDH (U/L) | GPT (U/L) | GOT (U/L) | γ-GTP (U/L) | |
|----------------|--------------|-----|-------|------|----------------------|---------------------|------|-------------|-------------------------|-----------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|------------|------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|--|
| Administration | Dose (mg/kg) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Administration | 0 | 5 | 5.3 | 3.1 | 1.38 | 15 | 0.7 | 130 | 39 | 45 | 6.5 | 9.0 | 141.9 | 3.95 | 104.9 | 339 | 213 | 27 | 68 | 0 | | | |
| | | | ±0.0 | ±0.1 | ±0.13 | ± 3 | ±0.1 | ± 7 | ± 3 | ±13 | ±0.3 | ±0.2 | ± 0.5 | ±0.22 | ± 0.7 | ± 73 | ±113 | ± 3 | ±13 | ± 0 | | | |
| | Male | 20 | 5 | 5.2 | 3.0 | 1.35 | 11 | 0.6 | 117 | 44 | 61 | 6.8 | 9.1 | 143.0 | 3.82 | 107.2* | 345 | 129 | 26 | 58 | 0 | | |
| | | | | ±0.1 | ±0.1 | ±0.12 | ± 2 | ±0.1 | ± 6 | ± 7 | ±16 | ±0.2 | ±0.2 | ± 0.2 | ±0.15 | ± 0.8 | ± 31 | ± 75 | ± 8 | ±11 | ± 0 | | |
| | 70 | 5 | 5.3 | 3.1 | 1.45 | 11 | 0.7 | 126 | 40 | 85* | 6.9 | 9.2 | 143.4* | 3.73 | 105.7 | 360 | 100 | 27 | 57 | 0 | | | |
| | | | ±0.1 | ±0.2 | ±0.23 | ± 2 | ±0.1 | ± 14 | ± 6 | ±19 | ±0.3 | ±0.2 | ± 1.0 | ±0.13 | ± 1.1 | ± 20 | ± 17 | ± 7 | ± 7 | ± 0 | | | |
| | 200 | 2 | 5.2 | 3.0 | 1.40 | 15 | 0.8 | 137 | 45 | 51 | 9.2 | 9.4 | 144.9 | 3.89 | 105.6 | 289 | 159 | 26 | 64 | 0 | | | |
| Recovery | 0 | 5 | 5.3 | 3.2 | 1.51 | 16 | 0.6 | 122 | 54 | 48 | 6.2 | 8.8 | 142.4 | 3.85 | 107.0 | 186 | 155 | 23 | 70 | 0 | | | |
| | | | ±0.2 | ±0.2 | 0.12 | ± 1 | ±0.1 | ± 15 | ±13 | ±10 | ±0.5 | ±0.1 | ± 0.9 | ±0.14 | ± 0.7 | ± 43 | ± 63 | ± 9 | ±19 | ± 0 | | | |
| | Female | 20 | 5 | 5.2 | 3.2 | 1.61 | 13 | 0.5 | 112 | 48 | 30 | 6.8 | 9.0 | 143.7 | 3.56 | 108.9 | 174 | 99 | 18 | 53 | 1 | | |
| | | | | ±0.1 | ±0.1 | ±0.07 | ± 2 | ±0.0 | ± 7 | ± 6 | ± 8 | ±0.5 | ±0.1 | ± 0.4 | ±0.17 | ± 0.9 | ± 23 | ± 9 | ± 2 | ± 3 | ± 1 | | |
| | 70 | 5 | 5.2 | 3.1 | 1.52 | 15 | 0.6 | 117 | 63 | 40 | 7.2* | 9.3* | 142.4 | 3.88 | 107.3 | 177 | 109 | 19 | 55 | 0 | | | |
| | | | ±0.4 | ±0.3 | ±0.10 | ± 3 | ±0.0 | ± 7 | ±17 | ±14 | ±0.3 | ±0.3 | ± 1.8 | ±0.20 | ± 1.5 | ± 52 | ± 32 | ± 3 | ± 4 | ± 0 | | | |
| | 200 | 2 | 5.0 | 2.9 | 1.33 | 17 | 0.6 | 126 | 52 | 46 | 10.5 | 10.7 | 142.8 | 4.34 | 106.0 | 270 | 191 | 30 | 57 | 1 | | | |
| Recovery | 0 | 5 | 5.3 | 2.9 | 1.22 | 17 | 0.6 | 123 | 46 | 38 | 5.7 | 8.5 | 143.9 | 3.98 | 108.5 | 218 | 100 | 22 | 56 | 0 | | | |
| | | | ±0.3 | ±0.3 | ±0.16 | ± 3 | ±0.0 | ± 11 | ± 8 | ±12 | ±0.6 | ±0.2 | ± 1.0 | ±0.16 | ± 1.7 | ± 61 | ± 19 | ± 3 | ± 6 | ± 0 | | | |
| | Male | 200 | 2 | 5.1 | 2.9 | 1.32 | 17 | 0.7 | 100 | 45 | 43 | 6.3 | 8.9 | 144.1 | 4.03 | 108.8 | 263 | 104 | 25 | 63 | 0 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Female | 0 | 5 | 5.2 | 3.0 | 1.40 | 18 | 0.7 | 106 | 51 | 48 | 5.1 | 8.6 | 143.7 | 3.61 | 110.6 | 175 | 94 | 19 | 52 | 0 | | | |
| | | | ±0.1 | ±0.1 | ±0.14 | ± 1 | ±0.1 | ± 5 | ± 6 | ±11 | ±0.7 | ±0.2 | ± 0.4 | ±0.12 | ± 1.0 | ± 31 | ± 14 | ± 1 | ± 6 | ± 0 | | | |
| | 200 | 2 | 5.1 | 3.0 | 1.37 | 15 | 0.6 | 95 | 50 | 28 | 7.7 | 8.9 | 144.9 | 3.31 | 111.8 | 172 | 124 | 26 | 60 | 1 | | | |

Parameter, Mean±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, p<0.05

Table 4 Absolute and relative organ weights in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

| Test period | | | Absolute | | | | | Relative | | | | | |
|----------------|---------|---|-----------------|-------------------|---------------------|-------------------|----------------|--------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|
| Sex | Group | N | Body weight | Brain | Liver | Kidneys | Adrenal glands | Ovaries/ Testes | Brain | Liver | Kidneys | Adrenal glands | Ovaries/ Testes |
| | (mg/kg) | | (g) | (mg) | (mg) | (mg) | (mg) | (mg) | (mg/g) | (mg/g) | (mg/g) | (mg/g) | (mg/g) |
| Administration | | | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 5 | 355.1 ± 16.4 | 1951.8 ± 64.1 | 11761.2 ± 521.6 | 2606.3 ± 194.9 | 47.3 ± 2.9 | 2845.8 ± 115.3 | 5.500 ± 0.118 | 33.144 ± 1.310 | 7.343 ± 0.491 | 0.134 ± 0.014 | 8.032 ± 0.578 |
| Male | 20 | 5 | 339.1 ± 12.7 | 1959.0 ± 115.2 | 11199.8 ± 354.7 | 2501.9 ± 242.1 | 44.0 ± 4.2 | 2804.2 ± 208.6 | 5.780 ± 0.318 | 33.080 ± 1.942 | 7.375 ± 0.618 | 0.130 ± 0.011 | 8.282 ± 0.740 |
| | 70 | 5 | 357.5 ± 29.1 | 1905.6 ± 63.2 | 12084.4 ± 927.8 | 2573.3 ± 221.7 | 49.6 ± 5.5 | 2803.1 ± 184.3 | 5.359 ± 0.465 | 33.840 ± 1.671 | 7.209 ± 0.515 | 0.139 ± 0.020 | 7.886 ± 0.896 |
| | 200 | 2 | 285.0 | 1935.1 | 8733.8 | 2329.7 | 62.5 | 2858.2 | 6.819 | 30.599 | 8.231 | 0.220 | 10.108 |
| | 0 | 5 | 232.0 ± 13.3 | 1813.4 ± 90.0 | 7127.4 ± 524.1 | 1763.3 ± 112.7 | 61.0 ± 5.4 | 98.2 ± 6.0 | 7.830 ± 0.464 | 30.713 ± 1.232 | 7.599 ± 0.151 | 0.263 ± 0.022 | 0.425 ± 0.044 |
| Female | 20 | 5 | 215.9 ± 9.6 | 1741.1 ± 46.9 | 6781.1 ± 220.9 | 1734.7 ± 30.5 | 66.9 ± 6.2 | 89.2 ± 13.2 | 8.073 ± 0.249 | 31.473 ± 1.941 | 8.048 ± 0.368 | 0.311 ± 0.035 | 0.414 ± 0.065 |
| | 70 | 5 | 224.3 ± 19.5 | 1798.4 ± 69.0 | 7083.0 ± 853.0 | 1663.6 ± 85.6 | 68.6 ± 10.6 | 79.6* ± 7.2 | 8.046 ± 0.404 | 31.530 ± 1.803 | 7.443 ± 0.456 | 0.309 ± 0.059 | 0.357 ± 0.045 |
| | 200 | 2 | 184.3 | 1649.9 | 5960.2 | 1597.9 | 88.2 | 59.9 | 8.949 | 32.352 | 8.668 | 0.478 | 0.325 |
| Recovery | | | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 5 | 399.9 ± 40.9 | 1970.1 ± 65.6 | 11753.2 ± 1667.9 | 2543.1 ± 173.0 | 53.5 ± 2.8 | 3154.4 ± 172.6 | 4.974 ± 0.610 | 29.301 ± 1.574 | 6.382 ± 0.338 | 0.135 ± 0.014 | 7.939 ± 0.714 |
| Male | 200 | 2 | 333.3 | 1942.3 | 8968.3 | 2211.7 | 53.8 | 3082.9 | 5.830 | 26.888 | 6.639 | 0.161 | 9.262 |
| | 0 | 5 | 266.2 ± 17.3 | 1834.6 ± 38.3 | 7852.3 ± 612.6 | 1854.0 ± 112.8 | 71.2 ± 10.6 | 94.5 ± 6.7 | 6.909 ± 0.358 | 29.556 ± 2.495 | 6.975 ± 0.410 | 0.270 ± 0.054 | 0.356 ± 0.030 |
| Female | 200 | 2 | 236.9 | 1805.8 | 6429.9 | 1731.7 | 94.9 | 78.2 | 7.649 | 27.221 | 7.325 | 0.401 | 0.330 |

Parameter, Mean±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, p<0.05

Table 5 Histopathological findings in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

| Sex, Male Fate | Died during administration period | | Sacrificed at the end of administration period | | | | Sacrificed at the end of recovery period | |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------------|--|--------------|--------------|--------------|--|--------------|
| | 0 mg/kg | 200 mg/kg | 0 mg/kg | 20 mg/kg | 70 mg/kg | 200 mg/kg | 0 mg/kg | 200 mg/kg |
| | - ± +++ Pos. | - ± +++ Pos. | - ± +++ Pos. | - ± +++ Pos. | - ± +++ Pos. | - ± +++ Pos. | - ± +++ Pos. | - ± +++ Pos. |
| (Brain) | [1] | [8] | [7] | [0] | [0] | [3] | [0] | [0] |
| No remarkable change | | | | | | | | |
| (Spinal cord) | [1] | [8] | [7] | [0] | [0] | [3] | [0] | [0] |
| No remarkable change | | | | | | | | |
| (Liver) | [1] | [8] | [5] | [1] | [0] | [2] | [0] | [1] |
| Fatty change, periportal | 1 0 0 0 0 0 | 6 2 0 0 0 2 | 0 1 4 0 0 5 | 0 0 1 0 0 1 | | 0 2 0 0 0 2 | | 0 1 0 0 0 1 |
| Fatty change, focal | 1 0 0 0 0 0 | 8 0 0 0 0 0 | 5 0 0 0 0 0 | 0 0 1 0 0 1 | | 2 0 0 0 0 0 | | 0 0 1 0 0 1 |
| (Heart) | [1] | [8] | [5] | [5] | [5] | [2] | [5] | [2] |
| Myocardial degeneration | 1 0 0 0 0 0 | 6 1 0 1 0 2 | 4 1 0 0 0 1 | 5 0 0 0 0 0 | 2 3 0 0 0 3 | 2 0 0 0 0 0 | 5 0 0 0 0 0 | 2 0 0 0 0 0 |
| (Spleen) | [1] | [8] | [5] | [0] | [0] | [2] | [0] | [0] |
| Hematopoiesis, extramedullary | 0 0 1 0 0 1 | 0 6 2 0 0 8 | 0 1 4 0 0 5 | | | 0 1 1 0 0 2 | | |
| (Kidney) | [1] | [8] | [5] | [1] | [0] | [2] | [0] | [0] |
| Basophilic tubule, cortex | 0 1 0 0 0 1 | 3 5 0 0 0 5 | 0 5 0 0 0 5 | 0 1 0 0 0 1 | | 1 1 0 0 0 1 | | |
| Eosinophilic body | 1 0 0 0 0 0 | 8 0 0 0 0 0 | 2 0 1 0 2 3 | 1 0 0 0 0 0 | | 2 0 0 0 0 0 | | |
| Dilatation, renal pelvis | 1 0 0 0 0 0 | 8 0 0 0 0 0 | 5 0 0 0 0 0 | 0 0 0 1 0 1 | | 2 0 0 0 0 0 | | |
| Cast | 1 0 0 0 0 0 | 7 1 0 0 0 1 | 5 0 0 0 0 0 | 1 0 0 0 0 0 | | 2 0 0 0 0 0 | | |
| (Adrenal gland) | [1] | [8] | [5] | [0] | [0] | [2] | [0] | [0] |
| No remarkable change | | | | | | | | |
| (Sciatic nerve) | [1] | [8] | [7] | [0] | [0] | [3] | [0] | [0] |
| No remarkable change | | | | | | | | |
| (Lung) | [1] | [3] | [2] | [1] | [3] | [0] | [2] | [0] |
| Hemorrhage | 0 0 1 0 0 1 | 0 0 3 0 0 3 | 0 0 2 0 0 2 | 0 1 0 0 0 1 | 1 0 2 0 0 2 | | 0 0 2 0 0 2 | |
| Accumulation, foam cell | 1 0 0 0 0 0 | 1 0 2 0 0 2 | 2 0 0 0 0 0 | 1 0 0 0 0 0 | 3 0 0 0 0 0 | | 2 0 0 0 0 0 | |
| Edema | 0 0 1 0 0 1 | 2 1 0 0 0 1 | 2 0 0 0 0 0 | 1 0 0 0 0 0 | 3 0 0 0 0 0 | | 2 0 0 0 0 0 | |
| (Thymus) | [0] | [1] | [0] | [0] | [0] | [0] | [0] | [0] |
| Hemorrhage | | 0 1 0 0 0 1 | | | | | | |
| (Skin) | [0] | [1] | [1] | [0] | [0] | [0] | [1] | [0] |
| Ulcer | | 0 0 1 0 0 1 | 0 0 0 1 0 1 | | | | 0 0 0 1 0 1 | |

| Sex, Female Fate | Died during administration period | | Sacrificed at the end of administration period | | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|--------------|--|--------------|--------------|--------------|
| | 0 mg/kg | 200 mg/kg | 0 mg/kg | 20 mg/kg | 70 mg/kg | 200 mg/kg |
| | - ± +++ Pos. | - ± +++ Pos. | - ± +++ Pos. | - ± +++ Pos. | - ± +++ Pos. | - ± +++ Pos. |
| (Brain) | [0] | [8] | [8] | [0] | [0] | [3] |
| No remarkable change | | | | | | |
| (Spinal cord) | [0] | [8] | [8] | [0] | [0] | [3] |
| No remarkable change | | | | | | |
| (Liver) | [0] | [8] | [5] | [1] | [0] | [2] |
| Fatty change, periportal | | 5 3 0 0 0 3 | 0 1 4 0 0 5 | 0 1 0 0 0 1 | | 0 1 1 0 0 2 |
| Hemorrhage, diaphragmatic nodule | | 8 0 0 0 0 0 | 5 0 0 0 0 0 | 0 0 1 0 0 1 | | 2 0 0 0 0 0 |
| (Heart) | [0] | [8] | [5] | [0] | [0] | [2] |
| No remarkable change | | | | | | |
| (Spleen) | [0] | [8] | [5] | [0] | [0] | [2] |
| Deposit, pigment, brown | | 5 3 0 0 0 3 | 0 5 0 0 0 5 | | | 0 2 0 0 0 2 |
| Hematopoiesis, extramedullary | | 0 6 2 0 0 8 | 0 5 0 0 0 5 | | | 0 2 0 0 0 2 |
| (Kidney) | [0] | [8] | [5] | [0] | [0] | [2] |
| Basophilic tubule, cortex | | 6 2 0 0 0 2 | 2 2 1 0 0 3 | | | 1 1 0 0 0 1 |
| Cyst | | 8 0 0 0 0 0 | 4 0 1 0 0 1 | | | 2 0 0 0 0 0 |
| (Adrenal gland) | [0] | [8] | [5] | [0] | [0] | [2] |
| Hyperplasia, cortex, focal | | 8 0 0 0 0 0 | 4 0 1 0 0 1 | | | 2 0 0 0 0 0 |
| (Sciatic nerve) | [0] | [8] | [8] | [0] | [0] | [3] |
| No remarkable change | | | | | | |
| (Pituitary gland) | [0] | [8] | [5] | [0] | [0] | [2] |
| No remarkable change | | | | | | |
| (Ovary) | [0] | [8] | [5] | [0] | [1] | [2] |
| Hemorrhage, corpus luteum | | 8 0 0 0 0 0 | 5 0 0 0 0 0 | | 0 0 1 0 0 1 | 2 0 0 0 0 0 |
| (Lung) | [0] | [5] | [1] | [1] | [0] | [0] |
| Hemorrhage | | 3 0 2 0 0 2 | 0 0 1 0 0 1 | 1 0 0 0 0 0 | | |

- , Negative; ± , Very slight; + , Slight; ++ , Moderate; +++ , Severe; Pos., Total of positive grade
[], Number of animals examined

1,4-ブタンジオールの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 1,4-Butanediol on Bacteria

要約

1,4-ブタンジオールについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*^{2,3)}の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験ではS9 mix 無添加および添加試験を313～5000 μg/プレートの範囲で実施した。また、TA1537のS9 mix 無添加試験では、本試験と同一の用量で再現性試験を実施した。

その結果、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、1,4-ブタンジオールは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

[検定菌]

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。

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

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。試験に際して、ニュートリエントプロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

[被験物質]

1,4-ブタンジオール(CAS No. 110-63-4)は、分子量90.14の無色透明液体である。用いた被験物質は、三菱化学(株)製造、ロット番号 B5I04、純度99.8 wt%(不純

物:0.06 wt% 1,4-アセトキシヒドロキシブテン-2, 0.07 wt% 2-(4-ヒドロキシブチルオキシ)テトラヒドロフラン)であり、三菱化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで乾燥窒素でシールし、室温で遮光保管した。

1,4-ブタンジオールは、局方注射用水(ロット番号:K5A80, (株)大塚製薬工場)に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

[陽性対照物質]

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(上野製薬(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2 および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

[培地および S9 mix の組成]

1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比 10:1 の割合で混合した。

| | |
|-------------------|--------|
| (A) バクトアガー(Difco) | 0.6% |
| 塩化ナトリウム | 0.5% |
| (B)* L-ヒスチジン | 0.5 mM |
| D-ビオチン | 0.5 mM |

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

2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1lあたりの組成は下記のとおりである。

| | |
|---------------|--------|
| 硫酸マグネシウム・7水和物 | 0.2 g |
| クエン酸・1水和物 | 2 g |
| リン酸水素二カリウム | 10 g |
| リン酸一アンモニウム | 1.92 g |
| 水酸化ナトリウム | 0.66 g |
| グルコース | 20 g |
| バクトアガー(Difco) | 15 g |

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mlを流して固めて

ある。

3) S9 mix

1 ml 中下記の成分を含む

| | |
|----------------------|----------|
| S9** | 0.1 ml |
| 塩化マグネシウム | 8 μmol |
| 塩化カリウム | 33 μmol |
| グルコース-6-リン酸 | 5 μmol |
| NADH | 4 μmol |
| NADPH | 4 μmol |
| ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4) | 100 μmol |

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB) および 5, 6-ベンゾフラボン(BF) の併用投与で酵素誘導して作製した S9 を用いた。

〔試験方法〕

ブレインキュベーション法⁴⁾により, S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に, 被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml), 検定菌液 0.1 ml を混合し, 37℃で20分間往復振とう培養したのち, トップアガー 2 ml を加えて混和し, 合成培地平板上に流して固めた。また, 対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は, 同時に実施した他の試験と共通とした。培養は 37℃で48時間行い, 生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については, 肉眼的あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては, 溶媒および陽性対照群では3枚ずつ, 各用量については1枚ずつとした。また, 本試験および再現性試験においては, 両対照群および各用量につき, 3枚ずつを用い, それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回, 本試験は同一用量について2回実施し, 結果の再現性の確認を行った。また, TA1537 の S9 mix 無添加試験については, 本試験Iと本試験IIの結果が異なるため, 再現性試験を行った。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち, 1種以上の検定菌の S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において, 被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が, 溶媒対照のそれに比べて2倍以上に増加し, かつ, その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に, 当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。ただし, 2回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において, その溶媒対照値が10以下であり, 変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

1,4-ブタンジオールについて 50~5000 μg/プレート の範囲で公比を約3として, 試験を実施した。その結果, すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

したがって, 本試験における最高用量は, S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 μg/プレートとした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で, とともに 313~5000 μg/プレートの範囲で公比を2として2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果, TA1537 の S9 mix 無添加試験においては, 本試験Iの 625 μg/プレートで, 溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数を示したが, 本試験IIでは溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。また, TA1537 の S9 mix 添加試験と, その他の検定菌においては, 溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

〔再現性試験〕

TA1537 の S9 mix 無添加試験では, 本試験Iと本試験IIの結果が異なるため, 本試験と同一の用量で再現性試験を行った(Table 3)。その結果, 溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき, 1,4-ブタンジオールは, 用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 4) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K.H. Norpoth, R.C. Garner, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹

試験担当者：原 巧, 坂本京子, 堀谷尚古,
川上久美子

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257 秦野市落合 729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)

Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,

Naoko Horiya, Kumiko Kawakami

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety

Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan

Tel +81-463-82-4751 FAX +81-463-82-9627

Table 1. Mutagenicity of 1,4-butanediol in reverse mutation test (I) on bacteria

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.) | | | | | |
|--------------------------------------|--|--|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--|
| | | Base-pair substitution type | | | Frameshift type | | |
| | | TA100 | TA1535 | WP2 <i>uvrA</i> | TA98 | TA1537 | |
| S9 mix (-) | 0 | 177 161 156 (165 \pm 11.0) | 9 9 12 (10 \pm 1.7) | 25 27 23 (25 \pm 2.0) | 25 20 24 (23 \pm 2.6) | 14 16 15 (15 \pm 1.0) | |
| | 313 | 159 167 160 (162 \pm 4.4) | 14 13 21 (16 \pm 4.4) | 20 29 24 (24 \pm 4.5) | 31 40 27 (33 \pm 6.7) | 15 14 28 (19 \pm 7.8) | |
| | 625 | 156 151 144 (150 \pm 6.0) | 22 14 22 (19 \pm 4.6) | 29 29 30 (29 \pm 0.6) | 25 23 36 (28 \pm 7.0) | 27 40 27 (31 \pm 7.5) | |
| | 1250 | 178 186 162 (175 \pm 12.2) | 21 11 11 (14 \pm 5.8) | 29 30 26 (28 \pm 2.1) | 29 39 29 (32 \pm 5.8) | 24 20 29 (24 \pm 4.5) | |
| | 2500 | 148 139 145 (144 \pm 4.6) | 8 13 9 (10 \pm 2.6) | 29 20 21 (23 \pm 4.9) | 37 27 22 (29 \pm 7.6) | 20 28 15 (21 \pm 6.6) | |
| | 5000 | 114 159 156 (143 \pm 25.2) | 5 11 10 (9 \pm 3.2) | 30 29 18 (26 \pm 6.7) | 29 38 37 (35 \pm 4.9) | 24 27 27 (26 \pm 1.7) | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| S9 mix (+) | 0 | 176 165 163 (168 \pm 7.0) | 13 14 20 (16 \pm 3.8) | 38 22 21 (27 \pm 9.5) | 34 34 32 (33 \pm 1.2) | 29 18 20 (22 \pm 5.9) | |
| | 313 | 157 166 173 (165 \pm 8.0) | 14 17 12 (14 \pm 2.5) | 35 29 33 (32 \pm 3.1) | 25 39 46 (37 \pm 10.7) | 17 21 14 (17 \pm 3.5) | |
| | 625 | 177 158 173 (169 \pm 10.0) | 11 5 8 (8 \pm 3.0) | 29 33 21 (28 \pm 6.1) | 26 21 31 (26 \pm 5.0) | 31 31 27 (30 \pm 2.3) | |
| | 1250 | 169 149 178 (165 \pm 14.8) | 20 12 10 (14 \pm 5.3) | 35 23 33 (30 \pm 6.4) | 26 29 40 (32 \pm 7.4) | 21 29 12 (21 \pm 8.5) | |
| | 2500 | 158 155 166 (160 \pm 5.7) | 14 10 8 (11 \pm 3.1) | 31 20 19 (23 \pm 6.7) | 30 34 37 (34 \pm 3.5) | 11 11 14 (12 \pm 1.7) | |
| | 5000 | 150 186 173 (170 \pm 18.2) | 10 12 20 (14 \pm 5.3) | 18 23 33 (25 \pm 7.6) | 32 29 19 (27 \pm 6.8) | 18 23 20 (20 \pm 2.5) | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Positive control | Chemical | AF2 | SA | AF2 | AF2 | 9AA | |
| | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0.01 | 0.5 | 0.01 | 0.1 | 80 | |
| S9 mix (-) | Number of colonies/plate | 624 657 656 (646 \pm 18.8) | 294 292 291 (292 \pm 1.5) | 258 279 307 (281 \pm 24.6) | 565 503 552 (540 \pm 32.7) | 1259 1270 880 (1136 \pm 222.1) | |
| Positive control | Chemical | 2AA | 2AA | 2AA | 2AA | 2AA | |
| | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 1 | 2 | 10 | 0.5 | 2 | |
| S9 mix (+) | Number of colonies/plate | 719 785 817 (774 \pm 50.0) | 305 293 259 (286 \pm 23.9) | 459 662 617 (579 \pm 106.6) | 396 367 373 (379 \pm 15.3) | 304 332 364 (333 \pm 30.0) | |

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy)tetrahydrofuran were contained as impurities.

Table 2. Mutagenicity of 1,4-butanediol in reverse mutation test (II) on bacteria

| With (+) or without (-) S9 mix | Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.) | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|--|--|-----|-----------------|------------------|-----|------------------|------------------|-----|-----------------|------------------|-----|-----------------|-------------------|-----|-----|--|
| | | Base-pair substitution type | | | | | | Frameshift type | | | | | | | | | |
| | | TA100 | | | TA1535 | | | WP2 <i>uvrA</i> | | | TA98 | | | TA1537 | | | |
| S9 mix (-) | 0 | 156 | 161 | 158 | 5 | 14 | 14 | 28 | 27 | 30 | 32 | 39 | 39 | 27 | 21 | 14 | |
| | | (158 \pm 2.5) | | | (11 \pm 5.2) | | | (28 \pm 1.5) | | | (37 \pm 4.0) | | | (21 \pm 6.5) | | | |
| | 313 | 158 | 172 | 136 | 12 | 24 | 15 | 31 | 24 | 27 | 41 | 33 | 31 | 21 | 26 | 29 | |
| | | (155 \pm 18.1) | | | (17 \pm 6.2) | | | (27 \pm 3.5) | | | (35 \pm 5.3) | | | (25 \pm 4.0) | | | |
| | 625 | 169 | 162 | 185 | 11 | 8 | 20 | 27 | 21 | 33 | 30 | 39 | 52 | 33 | 35 | 33 | |
| | | (172 \pm 11.8) | | | (13 \pm 6.2) | | | (27 \pm 6.0) | | | (40 \pm 11.1) | | | (34 \pm 1.2) | | | |
| | 1250 | 136 | 163 | 163 | 15 | 7 | 14 | 20 | 16 | 19 | 55 | 51 | 51 | 19 | 24 | 30 | |
| | (154 \pm 15.6) | | | (12 \pm 4.4) | | | (18 \pm 2.1) | | | (52 \pm 2.3) | | | (24 \pm 5.5) | | | | |
| S9 mix (+) | 2500 | 172 | 173 | 161 | 19 | 17 | 14 | 22 | 28 | 20 | 57 | 64 | 36 | 19 | 31 | 18 | |
| | | (169 \pm 6.7) | | | (17 \pm 2.5) | | | (23 \pm 4.2) | | | (52 \pm 14.6) | | | (23 \pm 7.2) | | | |
| | 5000 | 156 | 171 | 155 | 9 | 9 | 13 | 23 | 28 | 20 | 43 | 59 | 43 | 24 | 29 | 26 | |
| | | (161 \pm 9.0) | | | (10 \pm 2.3) | | | (24 \pm 4.0) | | | (48 \pm 9.2) | | | (26 \pm 2.5) | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S9 mix (+) | 0 | 183 | 176 | 178 | 20 | 10 | 19 | 27 | 37 | 33 | 43 | 42 | 38 | 7 | 19 | 23 | |
| | | (179 \pm 3.6) | | | (16 \pm 5.5) | | | (32 \pm 5.0) | | | (41 \pm 2.6) | | | (16 \pm 8.3) | | | |
| | 313 | 168 | 163 | 181 | 15 | 13 | 17 | 27 | 37 | 44 | 31 | 31 | 26 | 22 | 25 | 13 | |
| | | (171 \pm 9.3) | | | (15 \pm 2.0) | | | (36 \pm 8.5) | | | (29 \pm 2.9) | | | (20 \pm 6.2) | | | |
| | 625 | 177 | 147 | 166 | 11 | 15 | 23 | 29 | 17 | 37 | 29 | 44 | 39 | 18 | 23 | 21 | |
| | | (163 \pm 15.2) | | | (16 \pm 6.1) | | | (28 \pm 10.1) | | | (37 \pm 7.6) | | | (21 \pm 2.5) | | | |
| | 1250 | 140 | 204 | 180 | 19 | 21 | 20 | 41 | 27 | 21 | 24 | 33 | 30 | 35 | 25 | 16 | |
| | (175 \pm 32.3) | | | (20 \pm 1.0) | | | (30 \pm 10.3) | | | (29 \pm 4.6) | | | (25 \pm 9.5) | | | | |
| S9 mix (+) | 2500 | 163 | 150 | 166 | 19 | 20 | 23 | 22 | 26 | 29 | 28 | 40 | 34 | 15 | 18 | 17 | |
| | | (160 \pm 8.5) | | | (21 \pm 2.1) | | | (26 \pm 3.5) | | | (34 \pm 6.0) | | | (17 \pm 1.5) | | | |
| | 5000 | 166 | 181 | 181 | 20 | 12 | 11 | 32 | 20 | 34 | 30 | 39 | 34 | 26 | 22 | 9 | |
| | | (176 \pm 8.7) | | | (14 \pm 4.9) | | | (29 \pm 7.6) | | | (34 \pm 4.5) | | | (19 \pm 8.9) | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Positive control | Chemical | AF2 | | | SA | | | AF2 | | | AF2 | | | 9AA | | | |
| | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 0.01 | | | 0.5 | | | 0.01 | | | 0.1 | | | 80 | | | |
| S9 mix (-) | Number of colonies/plate | 492 | 666 | 699 | 140 | 125 | 102 | 402 | 392 | 361 | 691 | 637 | 688 | 623 | 753 | 427 | |
| | | (619 \pm 111.2) | | | (122 \pm 19.1) | | | (385 \pm 21.4) | | | (672 \pm 30.3) | | | (601 \pm 164.1) | | | |
| Positive control | Chemical | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | 2AA | | | |
| | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | 1 | | | 2 | | | 10 | | | 0.5 | | | 2 | | | |
| S9 mix (+) | Number of colonies/plate | 826 | 842 | 883 | 254 | 240 | 271 | 694 | 707 | 753 | 436 | 429 | 442 | 277 | 296 | 341 | |
| | | (850 \pm 29.4) | | | (255 \pm 15.5) | | | (718 \pm 31.0) | | | (436 \pm 6.5) | | | (305 \pm 32.9) | | | |

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy) tetrahydrofuran were contained
as impurities.

Table 3. Mutagenicity of 1,4-butanediol in confirmation test of reverse mutation test on bacteria

| With(+) or without(-) S9 mix | Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.) | | | | | |
|------------------------------------|--|--|--|--|-----------------|---------------------------------|--|
| | | | | | Frameshift type | | |
| | | | | | TA1537 | | |
| S9 mix (-) | 0 | | | | | 12 12 10 (11 \pm 1.2) | |
| | 313 | | | | | 7 10 11 (9 \pm 2.1) | |
| | 625 | | | | | 11 11 18 (13 \pm 4.0) | |
| | 1250 | | | | | 9 10 11 (10 \pm 1.0) | |
| | 2500 | | | | | 5 13 11 (10 \pm 4.2) | |
| | 5000 | | | | | 7 13 14 (11 \pm 3.8) | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Positive control S9 mix (-) | Chemical | | | | | 9AA | |
| | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | | | | | 80 | |
| | Number of colonies/plate | | | | | 622 621 787 (677 \pm 95.6) | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

9AA:9-Aminoacridine

Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy) tetrahydrofuran were contained as impurities.

1,4-ブタンジオールの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 1,4-Butanediol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

1,4-ブタンジオールの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)、短時間処理(6時間)ともに0.90 mg/ml(10 mM)の濃度においても50%を明らかに越える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において0.90 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix非存在下で24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、1,4-ブタンジオールは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: Cansera International)を10%添加したイーグル MEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 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CO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了

後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

1,4-ブタンジオール(略号:BD, CAS No.:110-63-4, ロット番号:B5I04, 三菱化学(株))は、無色透明液体で、水に対しては50.8 mg/ml以上、DMSOでは2 M以上、アセトンでは50 mg/ml以上で溶解し、融点20.1°C、沸点228°C、蒸気圧0.1 mmHg(25°C)で、分子式C₄H₁₀O₂、分子量90.14、純度99.8%(不純物として1,4-アセトキシヒドロキシブテン-2 0.06 wt%、2-(4-ヒドロキシブチルオキシ)テトラヒドロフラン 0.07 wt%を含む、他は不明)の物質である。

被験物質原体は、吸湿性があり、酸の存在下でテトラヒドロフラン化する。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用水(株)大塚製薬工場)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10%(v/v)になるように加えた。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を明らかに越える増殖抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理ともに0.90 mg/ml(10 mM)とし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている

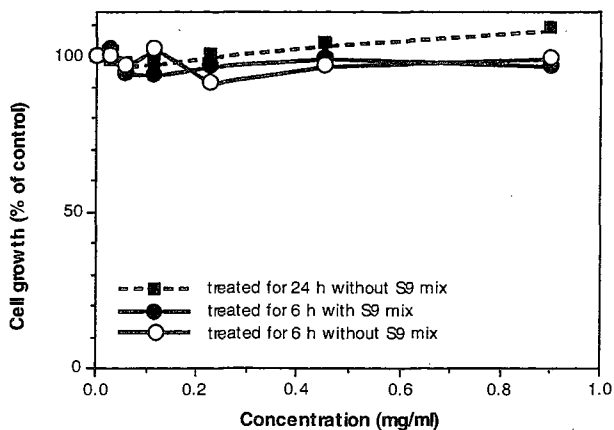


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,4-butanediol

濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚ディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本を作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 μg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3% ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)研究会²⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法²⁾(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³⁾(p<0.05)を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果を Table 1 に示した。1,4-ブタンジオールを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。1,4-ブタンジオールを加えて S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、1,4-ブタンジオールは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 吉村 功編, "毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ," サイエントリスト社, 東京, 1987.
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編, "毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析," 地人書館, 東京, 1992, pp.218-223.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
 試験担当者: 山影康次, 日下部博一,
 渡辺千津子, 橋本恵子, 水谷正寛,
 澁谷 徹
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 神奈川県秦野市落合729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
 Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,
 Chizuko Watanabe, Keiko Hashimoto,
 Masahiro Mizutani, Tohru Shibuya
 Hatano Research Institute, Food and Drug
 Safety Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 1, 4- butanediol (BD)** without S9 mix

| Group | Concentration (mg/ml) | Time of exposure (h) | No. of cells analysed | No. of structural aberrations | | | | | | | No. of cells | | | Concurrent ⁶⁾ | | | |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|-------|----------------------|------------------|------------------------|--------------------------|--------------|-----|-------|
| | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ²⁾ | total | Others ³⁾ | with aberrations | Polyloid ⁴⁾ | Trend test ⁵⁾ | cytotoxicity | | |
| | | | | | | | | | | | TAG (%) | TA (%) | (%) | SA | NA | (%) | |
| Control | | | 200 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 1 (0.5) | 1.00 | | | - |
| Solvent ¹⁾ | 0 | 24 | 200 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.25 | | | 100.0 |
| BD | 0.23 | 24 | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.38 | | | 100.5 |
| BD | 0.45 | 24 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.50 | NT | NT | 103.0 |
| BD | 0.90 | 24 | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.50 | | | 103.0 |
| MC | 0.00005 | 24 | 200 | 4 | 41 | 109 | 0 | 1 | 0 | 155 | 0 | 88 (44.0) | 88 (44.0) | 0.63 | | | - |
| Solvent ¹⁾ | 0 | 48 | 200 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.13 | | | 100.0 |
| BD | 0.23 | 48 | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.13 | | | 99.0 |
| BD | 0.45 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.25 | NT | NT | 100.0 |
| BD | 0.90 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.50 | | | 100.5 |
| MC | 0.00005 | 48 | 200 | 5 | 38 | 103 | 7 | 4 | 10 | 167 | 1 | 90 (45.0) | 86 (43.0) | 0.50 | | | - |

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no.of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at $p < 0.05$ when the incidence of TAG and polyloid was significantly different from historical solvent control at $p < 0.05$ by Fisher's exact test. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. **:Purity of test substance was 99.8 wt%. 1,4-Acetoxyhydroxybutene-2(0.06 wt%) and 2-(4-hydroxybutyloxy)tetrahydrofuran(0.07 wt%) were contained as impurities.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1, 4- butanediol (BD)** with and without S9 mix

| Group | Concentration (mg/ml) | S9 mix | Time of exposure (h) | No. of cells analysed | No. of structural aberrations | | | | | | | No. of cells | | | Concurrent ⁶⁾ | | | |
|-----------------------|-----------------------|--------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------------|---------|----------------------|------------------|------------------------|--------------------------|--------------|----|-------|
| | | | | | gap | ctb | cte | csb | cse | mul ²⁾ | total | Others ³⁾ | with aberrations | Polyloid ⁴⁾ | Trend test ⁵⁾ | cytotoxicity | | |
| | | | | | | | | | | | TAG (%) | TA (%) | (%) | SA | NA | (%) | | |
| Control | | | | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.38 | | | - |
| Solvent ¹⁾ | 0 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 1.00 | | | 100.0 |
| BD | 0.23 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.75 | | | 100.5 |
| BD | 0.45 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.75 | NT | NT | 97.5 |
| BD | 0.90 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 1 (0.5) | 0.50 | | | 98.0 |
| CPA | 0.005 | - | 6-(18) | 200 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 (2.0) | 1 (0.5) | 0.75 | | | - |
| Solvent ¹⁾ | 0 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 2 (1.0) | 0.63 | | | 100.0 |
| BD | 0.23 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.75 | | | 100.0 |
| BD | 0.45 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.88 | NT | NT | 98.0 |
| BD | 0.90 | + | 6-(18) | 200 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 0 (0.0) | 0.50 | | | 95.0 |
| CPA | 0.005 | + | 6-(18) | 200 | 14 | 139 | 298 | 3 | 1 | 100 | 555 | 0 | 160 (80.0) | 159 (79.5) | 0.63 | | | - |

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no.of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at $p < 0.05$ when the incidence of TAG and polyloid was significantly different from historical solvent control at $p < 0.05$ by Fisher's exact test. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. **:Purity of test substance was 99.8 wt%. 1,4-Acetoxyhydroxybutene-2(0.06 wt%) and 2-(4-hydroxybutyloxy)tetrahydrofuran(0.07 wt%) were contained as impurities.