

# 1,4-ブタンジオールのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

## Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 1,4-Butanediol in Rats

### 要約

1,4-ブタンジオールの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験(以下、併合試験)を行い、同化合物の雌雄動物に及ぼす反復投与毒性ならびに生殖発生毒性について検討した。すなわち、0(媒体対照)、200、400および800 mg/kgの1,4-ブタンジオールを、Sprague-Dawley系(Crj:CD)ラットの雌雄(各13匹/群)に、交配前2週間および交配期間2週間経口投与した。さらに、雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで投与を継続して、剖検した。

#### 1. 反復投与毒性

いずれの被験物質投与群においても、投与後一過性に症状が発現し、投与量に依存してその重篤度は増加した。200 mg/kg投与群においては活動性が亢進した。400 mg/kg投与群においては活動性の亢進もみられたが、主として活動性は抑制され、800 mg/kg投与群においては昏睡状態に陥る動物もみられたが、5時間後には回復していた。

体重は400および800 mg/kg投与群において投与初期にその増加が抑制され、その後の増加率に変化はみられなかったが、初期の体重増加量の差が試験終了時まで継続した。また、これに付随して摂餌量も減少していた。

雄動物の血液学検査においては、何ら有意な変化は認められなかったが、血液生化学検査において、軽度で正常範囲内の変化であり、被験物質投与との関係は疑問視されるが、血糖値の統計的に有意な減少が観察された。

肉眼的解剖所見としては特筆すべき変化はみられなかったが、400 mg/kg以上の投与量群の膀胱の病理組織学観察により、移行上皮のびまん性過形成および粘膜固有層に線維化が認められた。

#### 2. 生殖発生毒性

産児の形態および生存率については異常はみられなかったが、800 mg/kg投与群において軽度ではあったが有意な体重減少がみられた。

#### 3. 無影響量

以上の試験成績から、本試験条件下では、1,4-ブタンジオールの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに200 mg/kg/dayを下回る量、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄ともに800 mg/kg/day、産児に対しては400 mg/kg/dayであると判断される。

### 方法

#### 1. 被験物質

本試験に使用した1,4-ブタンジオール(ロット番号:KCM2119、純度:98.0%)は、和光純薬工業(株)(東京)より提供を受けたもので、入手後は室温、遮光条件下で保管した。

被験物質は、局方注射用水(三亜製薬(株)、製造番号:DH004)に溶解し、いずれの用量においても1回の投与液量が5 mL/kg体重になるように含量を調整し、調製検体は、室温で密封保管して使用した。投与検体中に含まれる被験物質の含量については、当研究所において確認した。

#### 2. 使用動物および飼育方法

試験には、雌雄ともに7週齢で購入した日本チャールス・リバー(株)厚木飼育センター生産のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD, SPF)を使用した。購入した動物は、入荷後1週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、雌雄とも投与開始日(投与1日)の体重をもとに体重別層化無作為抽出法に準じて群分けした。

各動物は、基準温湿度各 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、および50-60%、換気回数約15回/時間、照明12時間(午前7時-午後7時)に制御された飼育室で、金属製ケージに個別に収容して飼育し、固型飼料(CA-1、日本クレア(株))および飲料水(水道水、秦野市水道局給水)を自由に摂取させた。妊娠18日(精子確認日=妊娠0日)以後の母動物は、飼育ケージの床にステンレス製床板を敷き、床敷として木製チップ(ホワイトフレック、日本チャールス・リバー(株))を適宜供給した。

#### 3. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験の投与量は、本試験と同系統のラット各群雌雄5匹に、1,4-ブタンジオールの200、400、600、800、1000 mg/kgを1週間強制的に連続経口投与した予備試験(以下予備試験と略記)の結果に基づき、体重増加の抑制傾向、活動性低下(投与4日まで)、活動性亢進(投与5日から)、血尿などの変化が認められた800 mg/kgを本試験の高用量に設定し、以下、公比2で減じて中用量には400 mg/kgを、低用量には200 mg/kgを設定した。

各用量の投与検体は、雌雄13匹から成る各群の動物に対して剖検日前日まで、毎日1回、ラット用胃管を用いて経口投与した。すなわち、雄に対しては交配期間14日間および交配期間終了後14日間までの連続42日間、

また、雌に対しては、交配前14日間と最長14日間の交配期間中(交尾まで)、ならびに交尾雌では妊娠期間を通して剖検前日までの哺育3日(分娩日=哺育0日)まで、交尾後、分娩の認められなかった動物に対しては妊娠24日相当日まで、それぞれ投与した。毎日の投与は、午前9時から12時の間に行い、各動物の投与液量(5 mL/kg)は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回の測定体重を基に、また、交尾後の雌については妊娠0日(交尾確認日)の体重を基にそれぞれ算出した。

#### 4. 観察方法

##### 1) 親動物

##### A. 一般状態の観察

雌雄とも、全例について飼育期間中毎日1回以上観察した。

##### B. 体重測定

雌雄とも、全例について体重を試験期間中週1回(雄:投与1, 8, 15, 22, 29, 36, 42日, 雌:投与1, 8, 15日)および剖検日に測定した。雄動物と同居中の雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾した雌では、妊娠0, 7, 14, 20日に、さらに、分娩した雌では、哺育0および4日の体重を測定した。

##### C. 摂餌量測定

雌雄とも、全例について体重測定日と同日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を算出した。2週間の交配期間中は摂餌量を測定しなかった。交尾した雌では、妊娠0-7, 7-14, 14-20日の、さらに、分娩した雌では、哺育0-4日の摂餌量を測定した。

##### D. 尿検査

検査日は投与1, 8, および15日とし、全例について投与後約4時間目の尿を強制排泄させて、尿中の血色素について試験紙法(マルティスティックス/クリニテック200, マイルス三共)により尿検査を実施した。採尿が困難な場合には、極度の刺激を避けるため採尿を中止した。

##### E. 交配

交配は、投与15日の夕方から最長14日間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾成立の確認は、毎朝、膣栓および膣垢標本中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率 $[(交尾動物数/交配動物数) \times 100]$ 、受胎率 $[(受胎動物数/交尾動物数) \times 100]$ 、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

##### F. 分娩・哺育状態の観察

各群とも交尾した雌は、全例を自然分娩させた。分娩

状態の観察は分娩を直接観察できたものについてのみ行った。また、直接観察できなかった例においても分娩後の徴候から分娩状態の良否が判定できるものについては、それを記録した。分娩後は哺育状態を観察し、異常の有無を記録した。

##### G. 分娩日の規定

分娩の確認は、午前9~11時に限定し、この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物について、その日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎて分娩を終了した動物については、翌日を分娩日とした。

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

##### H. 最終検査

##### (1) 雄動物

全例について、最終投与日に絶食を開始し、その翌日(絶食開始18~24時間後)に以下の検査を行った。

##### イ. 血液学検査

ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりEDTAを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コールターエレクトロニクス)を用いた電気抵抗法により、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、平均赤血球容積(MCV)、血小板数を自動測定し、また、吸光度法により血色素量(Hb)を自動測定してそれらの値から平均赤血球血色素量(MCH=Hb $\times$ 1000/RBC)、ヘマトクリット値(Ht=RBC $\times$ MCV $\times$ 0.001)、平均赤血球血色素濃度(MCHC=Hb $\times$ 100/Ht)を算出した。白血球分類は、Wright-Giemsa染色した静脈血塗抹標本を光学顕微鏡下で観察することにより視算した。

##### ロ. 血液生化学検査

全例について、血液学検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して、遠心方式生化学自動分析装置COBAS-FARA(ロシュ)を用いて総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD・DAOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼG6PDH法)、尿素窒素濃度(BUN;ウレアーゼGl.DH法)、クレアチニン濃度(Jaffé法)、アルカリフォスファターゼ活性(パラニトロフェニルリン酸基質法)、GOTおよびGPT活性(SSCC法)、総ビリルビン濃度(ビリルビン「ロシュ」キットSシリーズ)、カルシウム濃度(OCPC法)、無機リン濃度(Inorg.phos.;モリブデン酸直接法)、 $\gamma$ -GTP活性( $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)を測定し、全自動電解質分析装置EA05(A&T)を用いてイオン電極法により、塩素、ナトリウムおよびカリウムの各濃度を測定した。また、A/G比は上記の測定結果に基づいて算出した。

##### ハ. 病理学検査

全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を実施した。その際、胸腺、肝臓、腎臓、精巣および精巣上体の重量を測定し、併せて比体重値(相対重量)を算出した。

精巣および精巣上体を除くこれらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱ならびに右側ハーダー腺は10 w/v%ホルマリン液に、精巣および精巣上体はブアン液に固定して保存した。固定器官のうち、膀胱はすべての投与群について、また、その他の器官は対照群および高用量群について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学検査を行った。

## (2) 雌動物

分娩した動物は哺育4日に、交尾は確認されたが分娩しなかった動物は妊娠25日相当日に、それぞれペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させて剖検した。妊・不妊のいずれの例においても卵巣および子宮を摘出し、子宮については着床数を数え、着床の認められた動物を妊娠例とした。卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数え、ブアン液に固定して保存した。不妊動物の子宮についてはSalewski法<sup>1)</sup>により不妊を確認し、卵巣については病理組織学検査を行った。また、肝臓、腎臓および胸腺重量を測定した。これらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱および右側ハーダー腺は、10 w/v%ホルマリン液に固定して保存した。これらの固定器官は対照群および高用量群について雄と同様に病理組織学検査を行った。なお、膀胱、胸腺および脾臓に関しては、対照群と高用量群の所見の間に差異が認められたため、これらの器官に関しては、低および中用量群の雌動物についても病理組織学観察を行った。

## 2) 出生児

### A. 産児数の算定

哺育0日に産児数(生存児+死亡児)を調べ、分娩率[(産児数/着床痕数)×100]および生児出産率[(出生児数/着床痕数)×100]を求めた。また、産児の外表面奇形の有無および性別を調べ、生存児の性比[(雄の生児数/雌の生児数)×100]を算出した。

### B. 死亡児数の算定

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

### C. 体重測定

哺育0日および4日に一腹単位で雌雄別に体重(litter重量)を測定し、(litter重量/測定児数)を各腹について求めた。

### D. 剖検

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

## 5. 統計解析

交尾率および受胎率については $\chi^2$ 検定を行った。その

他のすべてのデータは、個体毎に得られた値あるいは各腹児の平均値を1標本として、先ず、Bartlett法により各群の分散の均一性について検定した。その結果、分散が均一であると判定された場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合にはDunnett法<sup>2)</sup>あるいはScheffé法<sup>3)</sup>により対照群と各被験物質投与群との間で平均値の差の検定を行った。分散が均一でなかった場合は、Kruskal-Wallisの順位検定<sup>4)</sup>を行い、群間に有意性が認められた場合に対照群と各被験物質投与群との差についてDunnett型あるいはScheffé型の検定を行った。病理組織学検査所見中、対照群および被験物質投与群の両方に共通してみられ、被験物質投与群で頻度および程度が増加している所見についてはWilcoxonの順位和検定法により対照群と被験物質投与群の差について有意差検定を行った。有意水準は、5%および1%とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性(親動物所見)

#### 1) 一般状態

いずれの投与群の雌雄動物にも死亡は認められなかった。

200 mg/kg 投与群の雌雄動物において、3回目投与後より、活動性の増加を示す動物がみられた。こうした動物の数は投与1週頃まで次第に増加し、雌雄動物それぞれ10および11匹に認められたが、その後は次第に減少し、投与23日以後はみられなくなった。この症状は投与後約20分頃より始まり、その後約30分程で消失した。400 mg/kg 投与群においては、全ての動物において、初回投与後より活動性の変化が観察され、投与回数増加と共に症状の現われ方に変化が認められた。すなわち投与初期には、投与約20分後より活動性の減少が現われ、約30分後には回復したが、投与3日頃より先ず活動性の増加が現し、その後に減少する動物も観察されるようになった。また、活動性の増加あるいは減少の後、腹臥位を呈する動物も少数みられた。雄動物においては、この症状は投与期間を通して観察されたが、雌動物においては、妊娠期間中は軽度となる傾向が認められた。800 mg/kg 投与群においても、投与20分後頃より全ての動物に毒性症状が認められたが、症状はさらに重篤で、活動性の減少から腹臥位を呈した。また、投与初期には昏睡に陥る動物も雌雄にそれぞれ数匹認められた。しかし、こうした症状も投与5時間後には消失していた。この投与群においても、投与開始後1週間を経過すると投与回数増加と共に、特に雌動物においては妊娠期間中の症状の程度および発現動物数は減少した。しかし、この投与群においては、投与期間の後半期に、雌動物においては妊娠後半期に、軽度の眼球突出を示す動物が雌雄にそれぞれ7および6匹認められた。哺育期間中は、妊娠期間中に比較して、活動性の減少および昏睡状態を呈する動物数は増加し、またこうした症状を示す時間も延長する傾向にあった。

## 2) 体重

## A. 雄動物 (Table 1)

200 mg/kg 投与群においては、投与期間中の平均体重は対照群と比較して有意差は認められなかったが、400 mg/kg および 800 mg/kg 投与群においては、投与初期の体重増加抑制による平均体重の差が、実験終了時まで用量依存的に継続して認められた。すなわち、400 mg/kg 投与群では、投与期間中の平均体重は、対照群に比較して統計的に有意ではないが低値であった。また、800 mg/kg 投与群においては、投与期間を通じて、平均体重は有意 ( $p < 0.01$ ) に減少した。

## B. 雌動物 (Table 2)

## (1) 交配前

200 mg/kg 投与群の平均体重は、対照群と殆ど同等であった。400 mg/kg 投与群では投与開始後の平均体重は、対照群と比較した場合、低値であったが、有意な変化ではなかった。800 mg/kg 投与群においては、投与開始後 1 週間および 2 週間後の平均体重は有意 ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) に減少した。

## (2) 妊娠期間

被験物質投与群の妊娠期間中の平均体重は、特に妊娠後半期において、投与量依存的な減少が認められた。200 mg/kg 投与群においては、対照群に比較して統計的に有意な減少ではなかったが、400 mg/kg 投与群においては、妊娠 14 日の平均体重は有意 ( $p < 0.05$ ) に減少し、妊娠 20 日の平均体重も有意差は認められなかったが、低値のまま推移した。800 mg/kg 投与群の平均体重は、妊娠期間を通じて有意 ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) に減少した。

## (3) 哺育期間

哺育期間の体重は、妊娠末期の平均体重の差が継続的に示されていると考えられ、分娩日および哺育 4 日の平均体重は、400 mg/kg 投与群および 800 mg/kg 投与群で、対照群に比較して有意 ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) に減少した。

## 3) 摂餌量

## A. 雄動物 (Table 3)

200 mg/kg 投与群の摂餌量については、対照群に比較して殆ど差がみられなかった。400 mg/kg 投与群においては、投与開始後 2 週間の摂餌量が軽度 (7.6 % ~ 9.8 %) ではあったが有意 ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) に減少していた。800 mg/kg 投与群においては、測定した全ての期間にわたって有意 ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) に減少しており、減少の程度は約 7 % ~ 20 % であった。

## B. 雌動物 (Table 4)

## (1) 交配前

200 mg/kg 投与群の摂餌量は対照群と同等であった。400 mg/kg 投与群の摂餌量はいずれの週においても、対

照群に比較して減少 (6.3 % ~ 7.5 %) しており、投与開始後の 1 週間においてはこの減少は統計的に有意 ( $p < 0.05$ ) であった。800 mg/kg 投与群においても統計的に有意 ( $p < 0.01$ ) な減少が認められ、対照群に比較した減少の程度は約 10 % ~ 15 % であった。

## (2) 妊娠期間

200 mg/kg 投与群の摂餌量は、いずれの測定時においても対照群より減少 (2.3 % ~ 4.7 %) していたが、統計的に有意なものではなかった。400 mg/kg 投与群においても摂餌量はすべての測定時に減少 (5.6 % ~ 10.2 %) しており、妊娠前半期の減少は統計的に有意 ( $p < 0.05$  あるいは  $p < 0.01$ ) であった。800 mg/kg 投与群の摂餌量は、いずれの測定時においても有意 ( $p < 0.05$  あるいは  $p < 0.01$ ) に減少しており、その減少は対照群に比較して約 9 % ~ 11 % であった。

## (3) 哺育期間

被験物質各投与群の摂餌量はいずれの投与量群においても対照群に比較して減少 (8.8 % ~ 15.0 %) しており、減少の程度は投与量に依存していた。しかし、摂餌量の個体差が比較的大きかったため、統計的有意差はみられなかった。

## 4) 尿検査

いずれの被験物質各投与群およびいずれの検査日においても、尿中に血色素が認められた動物の頻度に有意差はみられなかった。しかし、800 mg/kg 投与群の投与初日の検査において、著しい量の血色素を排泄した動物が雌雄にそれぞれ 3 および 2 匹認められた。

## 5) 解剖時検査

## A. 雄

## (1) 血液学検査 (Table 5)

赤血球系の変化として 400 mg/kg 投与群の Hb (15.0 g/dL) および 800 mg/kg 投与群の Hb (14.9 g/dL) ならびに Ht (42.7 %) が統計的に有意 ( $p < 0.05$  あるいは  $p < 0.01$ ) に減少していたが、その程度は極めて軽度のものであった。当研究所の 14 週齢雄ラットにおける過去 5 試験の Hb および Ht は、それぞれ 14.5 ~ 15.6 g/dL および 40.1 ~ 44.3 % であり、上記変化はすべてこれらの範囲内に含まれることから、毒性学的に無意味なものと考えられる。

## (2) 血液生化学検査 (Table 6)

被験物質各投与群において、血糖値の軽度ではあるが有意 ( $p < 0.01$ ) な減少が認められた。対照群における血糖値の変動幅は、129 ~ 150 mg/dL であったが、200、400 および 800 mg/kg 投与群ではそれぞれ 105 ~ 138、115 ~ 141 および 98 ~ 131 mg/dL であった。また、200 および 800 mg/kg 投与群においてカリウムの軽度ではあるが統計的に有意 ( $p < 0.01$ ) な減少、および、これら投与群におけるリンの軽度ではあるが統計的に有意 ( $p < 0.05$  あるいは  $p < 0.01$ ) な増加が認められた。これら

カリウムおよびリンの変化はいずれも正常範囲内の変化であり、毒性学的には無意味なものと考えられる。

### (3) 器官重量 (Table 7)

400および800 mg/kg投与群の肝臓実重量が有意 ( $p<0.05$ あるいは $p<0.01$ )に減少していたが、体重比重量には有意差は認められなかった。この変化は体重減少を反映したものと考えられる。また、800 mg/kg投与群においては、腎臓実重量の有意 ( $p<0.05$ )な減少および精巣の比重量の有意 ( $p<0.05$ )な増加が認められたが、いずれも体重減少に関連して生じた変化であり、毒性学的に意味のある変化ではなかった。

### (4) 剖検

被験物質投与に起因したと考えられる異常所見は認められなかった。

### (5) 病理組織学検査 (Table 8)

膀胱、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、精巣、精巣上体およびハーダー腺に以下の所見が認められた。その他の組織に異常は観察されなかった。

#### (膀胱)

400 mg/kg投与群の5匹および800 mg/kg投与群の7匹に粘膜上皮のびまん性過形成がみられ、400 mg/kg投与群の4匹および800 mg/kg投与群の12匹の粘膜固有層に線維化が認められた。その他、対照群の3匹、400 mg/kg投与群の2匹および800 mg/kg投与群の1匹の粘膜固有層にリンパ球の浸潤が認められた。

#### (肝臓)

対照群および800 mg/kg投与群に小葉周辺性の肝細胞の脂肪化、小肉芽腫、髄外造血、巣状壊死および壊死巣への好中球の浸潤がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

#### (腎臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、萎縮あるいは再生尿細管、eosinophilic body、尿細管の限局性拡張、腎盂の拡張がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、対照群の1匹にリンパ球の浸潤が認められた。

#### (心臓)

対照群の1匹に心筋の線維化がみられ、対照群および800 mg/kg投与群の各1匹に巣状壊死が認められた。

#### (脾臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、髄外造血巣および色素沈着がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、対照群の1匹および800 mg/kg投与群の3匹に、極めて軽度の鬱血が認められた。

#### (精巣)

800 mg/kg投与群の1匹の精細管内に、多核巨細胞が認められた。

#### (精巣上体)

対照群および800 mg/kg投与群に、リンパ球の浸潤、

精子肉芽腫がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。

#### (ハーダー腺)

対照群の4匹および800 mg/kg投与群の1匹にリンパ球の浸潤がみられた以外に変化は認められなかった。

## B. 雌動物

### (1) 器官重量 (Table 7)

400 mg/kg投与群においては、肝臓の実重量が有意 ( $p<0.05$ )に減少し、腎臓の比重量が有意 ( $p<0.05$ )に増加していた。800 mg/kg投与群においては、肝臓の実重量および比重量が有意 ( $p<0.01$ )に減少し、また、腎臓の実重量も有意 ( $p<0.05$ )に減少していた。これらの変化はいずれも体重減少に伴って生じた変化であり、毒性学的に意味のある変化ではなかった。

### (2) 剖検

被験物質投与に起因すると思われる異常所見はなかった。

### (3) 病理組織学検査 (Table 8)

膀胱、胸腺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓およびハーダー腺に以下の所見が認められた。その他の組織に異常は観察されなかった。

各器官における観察所見の概要は以下の通りである。

#### (膀胱)

400 mg/kg投与群の1匹および800 mg/kg投与群の3匹に上皮のびまん性過形成がみられ、400 mg/kg投与群の2匹および800 mg/kg投与群の12匹の粘膜固有層に線維化が認められた。その他、200 mg/kg投与群の1匹の粘膜固有層にリンパ球の浸潤が認められた。

#### (胸腺)

対照群を含む各投与群に萎縮がみられたが、400および800 mg/kg投与群では、その頻度は対照群よりも高かった。その他、400および800 mg/kg投与群の各1匹に、出血が認められた。

#### (肝臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、小葉周辺性の脂肪化、小肉芽腫および髄外造血がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

#### (腎臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、萎縮あるいは再生尿細管がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。その他、800 mg/kg投与群の1匹に、皮髄境界部の石灰沈着が認められた。

#### (心臓)

対照群の1匹に巣状壊死がみられた。

#### (脾臓)

対照群を含む各群に髄外造血巣がみられたが、800 mg/kg投与群では造血細胞の減少が認められる例が多かった。その他、対照群を含む各群に色素沈着がみられたが、各群間に頻度および程度の差はなかった。その他、400 mg/kg投与群の2匹および800 mg/kg投与群の3匹

に鬱血が見られ、対照群の1匹に線維化が認められた。

(ハーダー腺)

対照群および800 mg/kg投与群の各1匹に色素沈着の亢進がみられた。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 生殖関連所見

#### A. 交配成績 (Table 9)

交尾率はいずれの投与群においても100%であった。不妊動物が、対照群、200および800 mg/kg投与群にそれぞれ1, 1および2匹認められたが、被験物質投与と関連する有意な変化ではなかった。

#### B. 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態に関しても異常所見はなかった。

#### C. 妊娠黄体数、着床数および着床率 (Table 10)

これら観察項目に関しても異常所見はなかった。

#### D. 出産率および妊娠期間 (Table 10)

対照群を含むいずれの投与群においても、全ての妊娠動物が分娩し、妊娠期間に関しても異常はみられなかった。

### 2) 出生児所見

#### A. 一般状態および生存性 (Table 10)

生存性に関しては、対照群を含むいずれの投与群においても異常所見はなかった。

#### B. 体重 (Table 10)

対照群に比較した雌雄産児の生後4日の体重が、800 mg/kg投与群において僅か(10.2%および8.8%)ではあるが有意( $p < 0.05$ )に減少した。

#### C. 形態

産児の形態に関しては、対照群を含むいずれの投与群においても異常所見はなかった。

## 考察

主要な変化として、行動あるいは一般状態に対する影響、血糖値の軽度の低下および膀胱における病理組織学変化が認められた。

1,4-ブタンジオール投与による毒性試験はいくつか報告されており<sup>5-8)</sup>、その中で共通して観察されている一般状態の変化としては、表現上の差異はあるものの、活動性の減少および睡眠であった。本試験においても、こうした変化は400 mg/kg以上の投与量において観察された。200 mg/kg投与群においては活動性はむしろ亢進したが、これは1,4-ブタンジオールの生物学的活性<sup>9), 10)</sup>に起因する変化と考え、毒性変化とはみなさなかった。400 mg/kg投与群においては、投与の進行に伴って活動性の現われ方はやや変化し、亢進を示す動物も発現した。

また、こうした投与の進行に伴う変化は、1,4-ブタンジオールの代謝速度の変化を示唆していると思われる。妊娠期間中に症状が軽減する傾向がみられた理由としては、この期間中動物の体重が急速に増加し、妊娠末期までに約50%~60%増加していたのに対し、1,4-ブタンジオールの妊娠期間中の投与量が妊娠0日の体重に基づいていたことによるものと思われる。

雄動物の血液生化学検査において、軽度ではあるが、統計的に有意な減少が観察された。Jedrychowskiら<sup>7)</sup>は1,4-ブタンジオールの最高500 mg/kgまでの投与量を、Wistar系ラットに28日間経口投与したが、血糖値に関しては、統計的に有意差は認めていないがその平均値は投与量の増加とともにむしろ上昇していた。したがって本試験でみられた血糖値の軽度の減少は、被験物質投与によるものか否か、疑問視される。

膀胱の病理組織学観察において、移行上皮のびまん性過形成および粘膜固有層の線維化が400 mg/kg以上の投与量群において観察されたが、これらの所見は過去の報告には見当たらなかった。しかし1,4-ブタンジオールは各種器官に充血をもたらすことが報告されており<sup>11)</sup>、充血による透過性の亢進が被験物質あるいはその代謝物の組織中への移行を助長し、その結果これら物質が膀胱粘膜を刺激したと考えることができよう。

生殖発生毒性に関しては、親世代の生殖能に関連した観察項目において、被験物質投与との関連を示す変化は認められなかった。産児に関しては、雌雄産児の生後4日の体重が、800 mg/kg投与群において減少した。この減少は母動物の哺育4日の平均体重が低値であったことに起因しているのかもしれないが、毒性学的意義は不明である。

以上の試験成績から、本試験条件下では、1,4-ブタンジオールの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに200 mg/kg/dayを下回る量、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄ともに800 mg/kg/day、産児に対しては400 mg/kg/dayであると判断される。

## 文献

- 1) E. Salewski, *Naunyn-schmiedebergs arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **247**, 367 (1964).
- 2) C. W. Dunnett, *Biometrics.*, **20**, 482 (1964).
- 3) H. Scheffé, *Biometrika.*, **40**, 87 (1953).
- 4) W. H. Kruskal and W. A. Wallis, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **47**, 583 (1952).
- 5) P. V. Taberner, J. T. Rick and G. A. Kerkut, *Life Sciences*, **11**, 335 (1972).
- 6) P. V. Taberner and M. J. Pearce, *J. Pharm. Pharmacol.*, **26**, 597 (1974).
- 7) R. A. Jedrychowski, R. Görny, J. Stetkiewicz and I. Stetkiewicz, *Polish J. Occu. Med.*, **3**, 421 (1990).
- 8) National Toxicology Program, *Final Study Report*. (1994).

- 9) F. Poidrugo and O. C. Snead III, *Neuropharmacol.*, **23**, 109(1984).
- 10) H. Sprince, J. A. Josephs Jr. and C. R. Wilpizeski, *Life Sciences*, **5**, 2041(1966).
- 11) S. P. Knysnova, *Hyg. Sanit.*, **33**, 41(1968).

## 連絡先

試験責任者：藤井孝朗  
試験担当者：橋本 豊，佐藤昌子，宮原 敬，  
田子和美，関 剛幸，小島幸一，  
吉村慎介，畔上二郎，三枝克彦，  
稲田浩子，松木容彦，中込まどか  
(財)食品薬品安全センター  
〒257-8523 神奈川県秦野市落合725-3  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

## Correspondence

Authors:Takaaki Fujii (Study director)  
Yutaka Hashimoto, Masako Sato,  
Takashi Miyahara, Kazumi Tago,  
Takayuki Seki, Kohichi Kojima,  
Shinsuke Yoshimura, Jiro Azegami,  
Katsuhiko Saegusa, Hiroko Inada,  
Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center in Reproductive Toxicology  
729-5 Ochiai, Hadano city, Kanagawa, 257-8523,  
Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Body weights of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration								
1 (Init. wt.)	296.6 ± 7.3	(13)	296.7 ± 8.2	(13)	297.0 ± 7.3	(13)	296.6 ± 8.2	(13)
8	335.0 ± 17.1	(13)	335.3 ± 16.3	(13)	323.1 ± 12.8	(13)	304.8 ± 14.6**	(13)
15	371.5 ± 20.6	(13)	372.3 ± 23.0	(13)	357.6 ± 16.6	(13)	335.0 ± 15.5**	(13)
22	395.9 ± 23.8	(13)	398.7 ± 25.4	(13)	381.4 ± 19.1	(13)	358.5 ± 18.7**	(13)
29	424.3 ± 27.7	(13)	428.2 ± 28.3	(13)	405.2 ± 21.1	(13)	381.5 ± 17.3**	(13)
36	446.2 ± 30.1	(13)	454.1 ± 31.7	(13)	425.3 ± 20.9	(13)	402.7 ± 18.9**	(13)
42	463.4 ± 31.1	(13)	470.0 ± 32.7	(13)	441.4 ± 23.2	(13)	416.4 ± 18.9**	(13)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.  
 Parenthesis indicates number of animals.  
 \*\*: significant difference from control, p<0.01

Table 2 Body weights of female rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration (Pre-mating period)								
1 (Init. wt.)	216.5 ± 6.5	(13)	216.6 ± 7.4	(13)	216.1 ± 6.3	(13)	216.0 ± 6.3	(13)
8	235.1 ± 12.6	(13)	232.2 ± 10.9	(13)	229.2 ± 7.3	(13)	219.7 ± 8.8**	(13)
15	251.8 ± 15.4	(13)	251.8 ± 16.2	(13)	245.4 ± 7.4	(13)	237.9 ± 11.2*	(13)
Days of pregnancy								
0	259.2 ± 14.9	(12)	260.7 ± 16.5	(12)	252.5 ± 7.8	(13)	242.1 ± 13.5*	(11)
7	300.4 ± 20.1	(12)	292.5 ± 19.3	(12)	285.3 ± 10.9	(13)	279.4 ± 18.0*	(11)
14	339.0 ± 22.6	(12)	329.4 ± 22.2	(12)	318.1 ± 11.4*	(13)	312.7 ± 21.0**	(11)
20	412.9 ± 23.3	(12)	401.1 ± 27.1	(12)	391.0 ± 18.5	(13)	382.4 ± 29.4*	(11)
Days of lactation								
0	308.2 ± 32.1	(12)	302.4 ± 20.1	(12)	279.1 ± 12.1*	(13)	276.8 ± 21.7*	(11)
4	355.1 ± 23.4	(12)	321.1 ± 26.0	(12)	305.6 ± 16.9**	(13)	296.5 ± 23.4**	(11)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.  
 Parenthesis indicates number of animals.  
 \*: significant difference from control, p<0.05  
 \*\*: significant difference from control, p<0.01

Table 3 Food consumption of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration								
1 ~ 8	198.2 ± 13.9	(13)	199.1 ± 13.8	(13)	183.1 ± 9.8*	(13)	159.5 ± 15.1**	(13)
8 ~ 15	197.6 ± 12.0	(13)	192.8 ± 14.1	(13)	178.3 ± 12.2**	(13)	162.7 ± 15.0**	(13)
29 ~ 36	187.9 ± 11.8	(13)	193.4 ± 15.2	(13)	178.3 ± 8.8	(13)	174.9 ± 11.2*	(13)
36 ~ 42	161.5 ± 9.8	(13)	164.4 ± 11.8	(13)	154.0 ± 7.9	(13)	145.9 ± 9.1**	(13)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.  
 Parenthesis indicates number of animals.  
 \*: significant difference from control, p<0.05  
 \*\*: significant difference from control, p<0.01



Table 4 Food consumption of female rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration (Pre-mating period)								
1~ 8	140.4 ± 13.1	(13)	139.9 ± 8.7	(13)	129.9 ± 9.0*	(13)	118.7 ± 8.9**	(13)
8~15	141.9 ± 11.7	(13)	145.5 ± 11.2	(13)	133.0 ± 7.4	(13)	128.1 ± 9.5**	(13)
Days of pregnancy								
0~ 7	173.2 ± 14.2	(12)	165.1 ± 13.2	(12)	157.8 ± 10.2*	(13)	158.3 ± 16.7*	(11)
7~14	183.6 ± 17.6	(12)	177.3 ± 15.3	(12)	164.8 ± 8.6**	(13)	167.6 ± 13.2*	(11)
14~20	154.1 ± 12.9	(12)	150.6 ± 14.3	(12)	145.5 ± 9.4	(13)	137.7 ± 10.5**	(11)
Days of lactation								
0~ 4	121.9 ± 12.5	(12)	111.2 ± 24.7	(12)	108.6 ± 21.6	(13)	103.6 ± 22.0	(11)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

\* :significant difference from control, p<0.05

\*\* :significant difference from control, p<0.01

Table 5 Hematology of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Male								
Red blood cells								
Count (× 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	821 ± 24 *	(13)	805 ± 34	(13)	803 ± 37	(13)	797 ± 22	(13)
Hemoglobin (g/dl)	15.6 ± 0.6	(13)	15.1 ± 0.4	(13)	15.0 ± 0.6*	(13)	14.9 ± 0.5**	(13)
Hematocrit (%)	44.4 ± 1.5	(13)	43.5 ± 1.3	(13)	42.9 ± 1.8	(13)	42.7 ± 1.5*	(13)
MCV (μm <sup>3</sup> )	54.1 ± 1.9	(13)	54.1 ± 2.0	(13)	53.5 ± 1.2	(13)	53.6 ± 2.0	(13)
MCH (pg)	19.0 ± 0.7	(13)	18.8 ± 0.7	(13)	18.6 ± 0.4	(13)	18.7 ± 0.7	(13)
MCHC (%)	35.1 ± 0.6	(13)	34.8 ± 0.3	(13)	34.8 ± 0.3	(13)	34.9 ± 0.3	(13)
White blood cells								
Count (× 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	71 ± 14	(13)	58 ± 14*	(13)	54 ± 10**	(13)	67 ± 14	(13)
Band neutrophil (%)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Segmented neutrophil (%)	14 ± 7	(13)	15 ± 6	(13)	17 ± 7	(13)	14 ± 7	(13)
Eosinophil (%)	1 ± 1	(13)	1 ± 1	(13)	1 ± 1	(13)	1 ± 2	(13)
Basophil (%)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Monocyte (%)	3 ± 2	(13)	4 ± 2	(13)	4 ± 2	(13)	4 ± 3	(13)
Lymphocyte (%)	82 ± 7	(13)	79 ± 8	(13)	78 ± 8	(13)	80 ± 9	(13)
Platelet								
Count (× 10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	102.9 ± 12.3	(13)	100.1 ± 11.0	(13)	104.7 ± 10.8	(13)	97.8 ± 8.0	(13)

Values are expressed as mean±S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

\* :significant difference from control, p<0.05

\*\* :significant difference from control, p<0.01

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 6 Blood chemistry of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Total protein (g/dL)	5.6 ± 0.2	(13)	5.5 ± 0.1	(13)	5.4 ± 0.2	(13)	5.4 ± 0.2	(13)
Albumin (g/dL)	3.0 ± 0.1	(13)	2.9 ± 0.1	(13)	2.9 ± 0.1	(13)	2.9 ± 0.1	(13)
A/G	1.12 ± 0.08	(13)	1.17 ± 0.12	(13)	1.16 ± 0.13	(13)	1.16 ± 0.14	(13)
BUN (mg/dL)	16 ± 1	(13)	15 ± 2	(13)	15 ± 2	(13)	17 ± 3	(13)
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	(13)	0.7 ± 0.0	(13)	0.7 ± 0.1	(13)	0.7 ± 0.1	(13)
Glucose (mg/dL)	139 ± 7	(13)	127 ± 10**	(13)	128 ± 9**	(13)	116 ± 9**	(13)
Total cholesterol (mg/dL)	29 ± 3	(13)	27 ± 6	(13)	27 ± 4	(13)	29 ± 4	(13)
Total bilirubin (mg/dL)	0.06 ± 0.02	(13)	0.06 ± 0.04	(13)	0.07 ± 0.02	(13)	0.06 ± 0.03	(13)
Na (mEq/L)	143.9 ± 0.9	(13)	144.5 ± 0.7	(13)	143.2 ± 0.8	(13)	143.6 ± 1.3	(13)
K (mEq/L)	4.17 ± 0.20	(13)	3.92 ± 0.17**	(13)	4.08 ± 0.20	(13)	3.89 ± 0.15**	(13)
Cl (mEq/L)	108.7 ± 1.3	(13)	108.8 ± 1.1	(13)	108.6 ± 1.3	(13)	108.2 ± 1.0	(13)
Ca (mg/dL)	8.5 ± 0.2	(13)	8.6 ± 0.2	(13)	8.6 ± 0.3	(13)	8.7 ± 0.2	(13)
Inorg. phos. (mg/dL)	5.6 ± 0.3	(13)	6.0 ± 0.5*	(13)	5.8 ± 0.3	(13)	6.5 ± 0.5**	(13)
ALP (U/L)	303 ± 44	(13)	280 ± 27	(13)	297 ± 34	(13)	307 ± 48	(13)
GPT (U/L)	31 ± 4	(13)	30 ± 5	(13)	34 ± 6	(13)	29 ± 3	(13)
GOT (U/L)	68 ± 6	(13)	65 ± 10	(13)	66 ± 7	(13)	66 ± 7	(13)
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)

Values are expressed as mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

\* : significant difference from control, p < 0.05

\*\* : significant difference from control, p < 0.01

Table 7 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Male	Final body weight (g)	434.3 ± 29.3	(13)	443.5 ± 30.7	(13)	415.3 ± 20.4	(13)	390.8 ± 18.0**	(13)
	Liver (g)	12.15 ± 1.36 <sup>a</sup>	(13)	11.70 ± 0.96	(13)	11.09 ± 1.02*	(13)	10.34 ± 0.83**	(13)
		2.79 ± 0.20 <sup>b</sup>		2.64 ± 0.13		2.67 ± 0.17		2.64 ± 0.15	
	Kidneys (g)	2.82 ± 0.20	(13)	2.86 ± 0.22	(13)	2.64 ± 0.18	(13)	2.62 ± 0.16*	(13)
		0.65 ± 0.04		0.65 ± 0.03		0.64 ± 0.03		0.67 ± 0.03	
	Thymus (mg)	348.8 ± 103.5	(13)	343.3 ± 94.8	(13)	317.8 ± 79.6	(13)	286.2 ± 69.8	(13)
80.9 ± 25.5			77.6 ± 21.6		76.2 ± 17.2		73.3 ± 18.0		
Testes (g)	3.06 ± 0.20	(13)	3.11 ± 0.37	(13)	3.14 ± 0.21	(13)	3.06 ± 0.17	(13)	
	0.71 ± 0.05		0.70 ± 0.08		0.76 ± 0.06		0.78 ± 0.07*		
Epididymides (g)	1.19 ± 0.06	(13)	1.16 ± 0.09	(13)	1.17 ± 0.08	(13)	1.13 ± 0.08	(13)	
	0.28 ± 0.02		0.26 ± 0.02		0.28 ± 0.03		0.29 ± 0.02		
Female	Final body weight (g)	335.1 ± 23.4	(12)	321.1 ± 26.0	(12)	305.6 ± 16.9**	(13)	296.5 ± 23.4**	(11)
	Liver (g)	14.27 ± 0.92	(12)	13.36 ± 1.40	(12)	13.08 ± 1.07*	(13)	11.68 ± 1.15**	(11)
		4.26 ± 0.15		4.17 ± 0.33		4.28 ± 0.26		3.94 ± 0.21**	
	Kidneys (g)	2.07 ± 0.15	(12)	2.07 ± 0.21	(12)	2.09 ± 0.18	(13)	1.88 ± 0.17*	(11)
		0.62 ± 0.06		0.65 ± 0.05		0.69 ± 0.06*		0.63 ± 0.04	
	Thymus (mg)	231.7 ± 88.9	(12)	221.1 ± 66.1	(12)	188.9 ± 62.0	(13)	167.0 ± 57.5	(11)
68.6 ± 23.5			68.1 ± 16.7		61.3 ± 18.1		55.5 ± 15.9		

Values are expressed as mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

a: absolute weight

b: relative weight (g or mg per 100 g body weight)

\*: significant difference from control,  $p < 0.05$

\*\*: significant difference from control,  $p < 0.01$

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Table 8 Histopathological findings of rats treated orally with 1, 4-butanediol in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ [Number of animals examined]	Sex:	male				female			
		Dose(mg/kg):				Dose(mg/kg):			
Findings, grade and number of animals		0	200	400	800	0	200	400	800
Urinary bladder		[13]	[13]	[12]	[13]	[13]	[12]	[13]	[13]
Diffuse hyperplasia of epithelium	total	0	0	5	7	0	0	1	3
	±	0	0	5	7	0	0	1	3
Fibrosis in lamina propria	total	0	0	4	12	0	0	2	12
	±	0	0	4	12	0	0	2	12
Infiltration of lymphocytes in lamina propria	total	3	0	2	1	0	1	0	0
	±	3	0	2	1	0	1	0	0
Thymus		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Atrophy	total	0			0	1	1	5	7
	±	0			0	0	1	2	2
	+	0			0	1	0	3	5
Hemorrhage	total	0			0	0	0	1	1
	±	0			0	0	0	1	0
	+	0			0	0	0	0	1
Spleen		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Extramedullary hematopoiesis	total	13			13	13	13	13	13
	±	6			4	1	1	0	4
	+	7			9	4	5	5	6
	++	0			0	8	7	8	3
Deposits of pigment	total	13			13	13	13	13	13
	±	2			0	0	1	1	3
	+	11			13	13	12	12	10
Congestion	total	1			3	0	0	2	3
	±	1			3	0	0	0	0
	+	0			0	0	0	2	3
Fibrosis	total	0			0	1	0	0	0
	+	0			0	1	0	0	0
Liver		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Fatty change of hepatocyte in peripheral zone	total	13			13	1			1
	±	0			0	0			1
	+	8			10	1			0
	++	5			3	0			0
Microgranuloma	total	10			11	6			7
	±	9			11	6			7
	+	1			0	0			0
Extramedullary hematopoiesis	total	1			2	4			3
	±	1			2	4			3
Focal necrosis	total	2			1	0			0
	±	1			0	0			0
	+	1			1	0			0
Infiltration neutrophils in necrotic focus	total	2			1	0			0
	±	1			1	0			0
	+	1			0	0			0

±:very slight, +:slight, ++:moderate, +++:severe

Table 8 (continued)

Organ [Number of animals examined] Findings, grade and number of animals	Sex: Dose(mg/kg):	male				female			
		0	200	400	800	0	200	400	800
Kidney		[13]	[ 0]	[ 0]	[13]	[13]	[ 0]	[ 0]	[13]
Atrophic/regenerated tubule	total	12			11	5			7
	±	10			11	5			7
	+	2			0	0			0
Eosinophilic body	total	8			4	0			0
	±	5			2	0			0
	+	3			2	0			0
Focal dilatation of tubule in medulla	total	1			1	0			0
	+	1			1	0			0
Dilatation of pelvis	total	2			2	0			0
	+	2			2	0			0
Infiltration of lymphocytes	total	1			0	0			0
	+	1			0	0			0
Calcification in cortico-medullary junction	total	0			0	0			1
	+	0			0	0			1
Brain		[13]	[ 0]	[ 0]	[13]	[13]	[ 0]	[ 0]	[13]
Partial defect	total	1			0	0			0
	+	1			0	0			0
Heart		[13]	[ 0]	[ 0]	[13]	[13]	[ 0]	[ 0]	[13]
Myocardial fibrosis	total	1			0	0			0
	±	1			0	0			0
Focal necrosis	total	1			1	1			0
	±	1			1	1			0
Harderian gland		[13]	[ 0]	[ 0]	[13]	[13]	[ 0]	[ 0]	[13]
Infiltration of lymphocytes	total	4			1	0			0
	±	3			1	0			0
	+	1			0	0			0
Increased pigmentation	total	0			0	1			1
	+	0			0	1			1
Testis		[13]	[ 0]	[ 0]	[13]	[ 0]	[ 0]	[ 0]	[ 0]
Multinucleated giant cells in seminiferous tubules	total	0			1				
	±	0			1				
Epididymis		[13]	[ 0]	[ 0]	[13]	[ 0]	[ 0]	[ 0]	[ 0]
Infiltration of lymphocytes	total	8			8				
	±	5			6				
	+	3			2				
Spermatic granuloma	total	3			2				
	+	3			2				

±:very slight, +:slight, ++:moderate, +++:severe

Table 9 Summary of reproductive performance in parental rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	200	400	800
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	13
Copulation index <sup>A)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant animals	12	12	13	11
Fertility index <sup>B)</sup>	92.3	92.3	100.0	84.6
Pairing days until copulation (mean±S.D.)	2.8 ± 1.2	2.8 ± 1.9	3.1 ± 1.2	3.0 ± 3.5
Frequency of vaginal estrus (mean±S.D.)	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3

A) : Copulation index = (Number of copulated pairs/Number of mated pairs) × 100; %

B) : Fertility index = (Number of pregnant animals/Number of copulated pairs) × 100; %

Table 10 Summary of development of pups from dams treated orally with 1, 4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Number of pregnant females	12		12		13		11	
Number of pregnant females with pups alive	12		12		13		11	
Gestation index <sup>A)</sup>	100.0		100.0		100.0		100.0	
Gestation length in days	22.0 ± 0.0	(12)	22.0 ± 0.0	(12)	22.2 ± 0.4	(13)	22.2 ± 0.4	(11)
Number of corpora lutea	17.6 ± 3.4	(12)	17.9 ± 4.4	(12)	17.0 ± 1.4	(13)	16.8 ± 1.9	(11)
Number of implantation sites	15.1 ± 2.0	(12)	15.8 ± 2.4	(12)	15.4 ± 1.3	(13)	15.9 ± 1.6	(11)
Implantation index <sup>B)</sup>	87.5 ± 13.9	(12)	89.6 ± 11.3	(12)	90.8 ± 8.0	(13)	94.9 ± 5.7	(11)
Day 0 of lactation								
Number of pups born	14.8 ± 1.9	(12)	14.6 ± 2.2	(12)	14.6 ± 1.9	(13)	15.0 ± 1.8	(11)
Delivery index <sup>C)</sup>	98.4 ± 2.9	(12)	92.9 ± 7.1	(12)	94.8 ± 6.3	(13)	94.2 ± 4.7	(11)
Number of pups alive	14.7 ± 1.9	(12)	14.4 ± 2.1	(12)	13.9 ± 2.1	(13)	14.7 ± 1.8	(11)
Birth index <sup>D)</sup>	97.3 ± 3.3	(12)	92.0 ± 8.3	(12)	90.4 ± 10.6	(13)	92.4 ± 4.4	(11)
Live birth index <sup>E)</sup>	98.9 ± 2.5	(12)	98.9 ± 2.5	(12)	95.5 ± 9.8	(13)	98.2 ± 3.1	(11)
Pup weight in grams								
Male	6.3 ± 0.3	(12)	6.0 ± 0.3	(12)	6.4 ± 0.3	(13)	6.1 ± 0.5	(11)
Female	6.0 ± 0.3	(12)	5.8 ± 0.3	(12)	6.0 ± 0.3	(13)	5.7 ± 0.6	(11)
Sex ratio <sup>F)</sup>	45.6 ± 13.4	(12)	47.8 ± 13.5	(12)	51.6 ± 15.1	(13)	46.2 ± 14.8	(11)
Day 4 of lactation								
Number of pups alive	14.4 ± 1.7	(12)	14.3 ± 2.0	(12)	13.8 ± 2.2	(13)	14.5 ± 1.5	(11)
Viability index <sup>G)</sup>	98.5 ± 2.8	(12)	99.5 ± 1.7	(12)	99.3 ± 2.5	(13)	98.4 ± 3.7	(11)
Pup weight in grams								
Male	10.2 ± 0.8	(12)	9.8 ± 0.7	(12)	10.0 ± 0.5	(13)	9.3 ± 0.8*	(11)
Female	9.8 ± 1.0	(12)	9.4 ± 0.8	(12)	9.6 ± 0.5	(13)	8.8 ± 0.8*	(11)
Sex ratio <sup>H)</sup>	46.3 ± 13.2	(12)	47.5 ± 13.4	(12)	51.9 ± 14.8	(13)	46.7 ± 15.1	(11)

Values are expressed as mean ± S.D.

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

\*: significant difference from control, p < 0.05

A) : Gestation index = (Number of pregnant females with pups alive/Number of pregnant females) × 100; %

B) : Implantation index = (Number of implantation sites/Number of corpora lutea) × 100; %

C) : Delivery index = (Number of pups born/Number of implantation sites) × 100; %

D) : Birth index = (Number of pups alive on day 0/Number of implantation sites) × 100; %

E) : Live birth index = (Number of pups alive on day 0/Number of pups born) × 100; %

F) : Sex ratio = (Number of male pups alive on day 0/Number of pups alive on day 0) × 100; %

G) : Viability index = (Number of pups alive on day 4/Number of pups alive on day 0) × 100; %

H) : Sex ratio = (Number of male pups alive on day 4/Number of pups alive on day 4) × 100; %

## 2,4,6-トリブロモフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

### Reverse Mutation Test of 2,4,6-Tribromophenol on Bacteria

#### 要約

2,4,6-トリブロモフェノールについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537<sup>1)</sup>および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup>の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められたことから、本試験はS9 mix無添加試験では、TA100, TA1535およびTA98は15.6~500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , TA1537は31.3~1000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , WP2 *uvrA*は156~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で、S9 mix添加試験ではTA100, TA1535およびTA1537は15.6~500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , TA98は31.3~1000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , WP2 *uvrA*は156~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。

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

以上の結果から、2,4,6-トリブロモフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

#### 方法

##### 1. 検定菌

*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

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

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

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものをを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)およびアンピシリン耐性因子pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid Ltd.)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

##### 2. 被験物質

2,4,6-トリブロモフェノールは、白色フレーク状の粉末である。用いた被験物質は、ロット番号70909、純度99.8%(不純物:不明)であり、マナック(株)(広島)から供与された。被験物質は、使用時まで密栓、遮光して冷蔵した。本被験物質は試験期間中安定であったことが確認された。

2,4,6-トリブロモフェノールは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:TPJ5678, 和光純薬工業(株))に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

##### 3. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

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

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを-20℃で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

##### 4. 培地およびS9 mixの組成

###### 1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco Ltd.) 0.6 w/v%

塩化ナトリウム 0.5 w/v%

(B)\* L-ヒスチジン 0.5 mM

D-ビオチン 0.5 mM

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

###### 2) 合成培地

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

硫酸マグネシウム・7水和物 0.2 g

クエン酸・1水和物 2 g

リン酸水素二カリウム 10 g

リン酸一アンモニウム 1.92 g

水酸化ナトリウム 0.66 g



連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：原 巧, 川上久美子  
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)  
Takumi Hara, Kumiko Kawakami  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,  
Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

グルコース	20 g
大洋寒天(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

3) S9 mix

1 mL中下記の成分を含む。

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

\*\*：7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製されたS9(キッコーマン株)を用いた。

5. 試験方法

ブレインキューベーション法<sup>3)</sup>により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 mL)、検定菌液0.1 mLを混合し、37°Cで20分間ブレインキューベーションしたのち、約45°Cに保温したトッパアガー2mLを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。同時に実施した試験については、溶媒および陽性対照群を共通とした。培養は37°Cで48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を目視またはコロニーアナライザーを用いて算定した。抗菌性の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、溶媒および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。

6. 判定基準

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定することとした。

結果および考察

50.0~5000  $\mu$ g/plateの範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した。その結果、S9 mix無添加試験ではTA100, TA1535およびTA98で500  $\mu$ g/plate以上、TA1537で1500  $\mu$ g/plate以上、WP2 *uvrA*で5000  $\mu$ g/plateの用量で抗菌性が認められた。また、S9 mix添加試験ではTA100, TA1535およびTA1537で500  $\mu$ g/plate以上、TA98で1500  $\mu$ g/plate以上、WP2 *uvrA*で5000  $\mu$ g/plateの用量で抗菌性が認められた。

これらの結果から、本試験における最高用量は、S9 mix無添加試験ではTA100, TA1535およびTA98は500  $\mu$ g/plate, TA1537は1000  $\mu$ g/plate, WP2 *uvrA*は5000  $\mu$ g/plateとし、S9 mix添加試験ではTA100, TA1535およびTA1537は500  $\mu$ g/plate, TA98は1000  $\mu$ g/plate, WP2 *uvrA*は5000  $\mu$ g/plateとした。

上記の最高用量に基づいて公比2で6用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、陰性であった。

以上の結果に基づき、2,4,6-トリプロモフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

なお、本被験物質はチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では、S9 mix非存在下および存在下で染色体の構造異常が誘発され陽性であった<sup>4)</sup>。また、本被験物質の類縁化合物の1,4-ジプロモベンゼンでは、チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性、細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が得られている<sup>5)</sup>。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F. J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York 1981, pp. 351-360.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norporth, R. C. Garner, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1980, pp. 273-285.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 418.
- 5) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 2, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1995, p. 353.

Table 1-1 Mutagenicity of 2,4,6-tribromophenol on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100		TA1535	TA98		TA1537
S9 mix (-)	0	136 130 128 ( 131 $\pm$ 4.2)	16 9 18 ( 14 $\pm$ 4.7)		20 25 21 ( 22 $\pm$ 2.6)	17 7 7 ( 10 $\pm$ 5.8)	
	15.6	105 132 129 ( 122 $\pm$ 14.8)	7 9 8 ( 8 $\pm$ 1.0)		18 14 26 ( 19 $\pm$ 6.1)	NT	
	31.3	132 126 166 ( 141 $\pm$ 21.6)	13 11 10 ( 11 $\pm$ 1.5)		19 13 29 ( 20 $\pm$ 8.1)	8 3 6 ( 6 $\pm$ 2.5)	
	62.5	157 115 125 ( 132 $\pm$ 21.9)	12 11 9 ( 11 $\pm$ 1.5)		17 23 25 ( 22 $\pm$ 4.2)	4 5 6 ( 5 $\pm$ 1.0)	
	125	136 146 133 ( 138 $\pm$ 6.8)	11 18 12 ( 14 $\pm$ 3.8)		19 13 21 ( 18 $\pm$ 4.2)	3 12 6 ( 7 $\pm$ 4.6)	
	250	118 108 102 ( 109 $\pm$ 8.1)	13 14 10 ( 12 $\pm$ 2.1)		14 13 17 ( 15 $\pm$ 2.1)	3 3 2 ( 3 $\pm$ 0.6)	
	500	33* 36* 27* ( 32 $\pm$ 4.6)	2* 3* 3* ( 3 $\pm$ 0.6)		10* 10* 8* ( 9 $\pm$ 1.2)	0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	
	1000	NT	NT		NT	0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	
S9 mix (+)	0	154 161 177 ( 164 $\pm$ 11.8)	8 10 11 ( 10 $\pm$ 1.5)		28 40 42 ( 37 $\pm$ 7.6)	17 10 18 ( 15 $\pm$ 4.4)	
	15.6	177 160 156 ( 164 $\pm$ 11.2)	9 7 8 ( 8 $\pm$ 1.0)		NT	15 15 12 ( 14 $\pm$ 1.7)	
	31.3	149 171 158 ( 159 $\pm$ 11.1)	6 9 18 ( 11 $\pm$ 6.2)		25 37 36 ( 33 $\pm$ 6.7)	10 18 15 ( 14 $\pm$ 4.0)	
	62.5	176 170 181 ( 176 $\pm$ 5.5)	10 6 14 ( 10 $\pm$ 4.0)		21 29 35 ( 28 $\pm$ 7.0)	13 10 8 ( 10 $\pm$ 2.5)	
	125	160 167 170 ( 166 $\pm$ 5.1)	9 10 12 ( 10 $\pm$ 1.5)		47 45 29 ( 40 $\pm$ 9.9)	13 8 12 ( 11 $\pm$ 2.6)	
	250	135 140 153 ( 143 $\pm$ 9.3)	9 9 12 ( 10 $\pm$ 1.7)		22 23 20 ( 22 $\pm$ 1.5)	5 2 7 ( 5 $\pm$ 2.5)	
	500	69* 61* 49* ( 60 $\pm$ 10.1)	3* 3* 3* ( 3 $\pm$ 0.0)		12 8 9 ( 10 $\pm$ 2.1)	1* 2* 3* ( 2 $\pm$ 1.0)	
	1000	NT	NT		0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	NT	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA		AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5		0.1	80	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA		2AA	2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2		0.5	2	
	Number of colonies/plate	522 507 480 ( 503 $\pm$ 21.3)	554 512 577 ( 548 $\pm$ 33.0)		518 562 563 ( 548 $\pm$ 25.7)	401 350 380 ( 377 $\pm$ 25.6)	
	Number of colonies/plate	1241 1073 1020 (1111 $\pm$ 115.4)	526 387 397 ( 437 $\pm$ 77.5)		549 515 570 ( 545 $\pm$ 27.8)	357 394 365 ( 372 $\pm$ 19.5)	

Purity was 99.8 %.

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

\*: Growth inhibition was observed.

NT: Not tested

Table 1-2 Mutagenicity of 2,4,6-tribromophenol on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)					
		Base-pair substitution type					
				WP2 <i>uvrA</i>			
S9 mix (-)	0			26 28 16 ( 23 $\pm$ 6.4)			
	156			21 27 22 ( 23 $\pm$ 3.2)			
	313			24 22 28 ( 25 $\pm$ 3.1)			
	625			24 19 24 ( 22 $\pm$ 2.9)			
	1250			8 15 18 ( 14 $\pm$ 5.1)			
	2500			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)			
	5000			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)			
S9 mix (+)	0			40 23 31 ( 31 $\pm$ 8.5)			
	156			27 46 40 ( 38 $\pm$ 9.7)			
	313			33 40 40 ( 38 $\pm$ 4.0)			
	625			31 26 26 ( 28 $\pm$ 2.9)			
	1250			17 27 26 ( 23 $\pm$ 5.5)			
	2500			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)			
	5000			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			0.01			
	Number of colonies/plate			170 171 175 ( 172 $\pm$ 2.6)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			10			
	Number of colonies/plate			876 693 718 ( 762 $\pm$ 99.2)			

Purity was 99.8 %.

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 2AA: 2-Aminoanthracene

\*: Growth inhibition was observed.