

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

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	155 155 138 (149 \pm 9.8)	12 13 16 (14 \pm 2.1)	18 18 19 (18 \pm 0.6)	16 7 10 (11 \pm 4.6)		
	15.6	181 104 155 (147 \pm 39.2)	15 12 4 (10 \pm 5.7)	32 16 24 (24 \pm 8.0)	NT		
	31.3	150 124 128 (134 \pm 14.0)	14 11 11 (12 \pm 1.7)	22 23 20 (22 \pm 1.5)	7 5 4 (5 \pm 1.5)		
	62.5	150 133 124 (135 \pm 13.2)	14 12 12 (13 \pm 1.2)	16 20 17 (18 \pm 2.1)	4 9 5 (6 \pm 2.6)		
	125	138 112 115 (122 \pm 14.2)	11 12 11 (11 \pm 0.6)	16 22 11 (16 \pm 5.5)	6 8 7 (7 \pm 1.0)		
	250	115 97 102 (105 \pm 9.3)	7 9 8 (8 \pm 1.0)	17 10 5 (11 \pm 6.0)	3 3 4 (3 \pm 0.6)		
	500	28* 26* 7* (20 \pm 11.6)	1* 1* 3* (2 \pm 1.2)	5* 8* 3* (5 \pm 2.5)	1* 1* 0* (1 \pm 0.6)		
	1000	NT	NT	NT	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)		
S9 mix (+)	0	130 158 170 (153 \pm 20.5)	11 8 14 (11 \pm 3.0)	40 30 26 (32 \pm 7.2)	15 20 13 (16 \pm 3.6)		
	15.6	152 154 190 (165 \pm 21.4)	14 13 18 (15 \pm 2.6)	NT	18 20 9 (16 \pm 5.9)		
	31.3	174 165 181 (173 \pm 8.0)	9 11 15 (12 \pm 3.1)	32 34 40 (35 \pm 4.2)	16 9 11 (12 \pm 3.6)		
	62.5	199 190 204 (198 \pm 7.1)	11 14 9 (11 \pm 2.5)	27 38 24 (30 \pm 7.4)	12 10 15 (12 \pm 2.5)		
	125	192 179 184 (185 \pm 6.6)	7 12 11 (10 \pm 2.6)	31 22 33 (29 \pm 5.9)	11 10 11 (11 \pm 0.6)		
	250	108 173 156 (146 \pm 33.7)	9 8 6 (8 \pm 1.5)	35 29 31 (32 \pm 3.1)	3 7 6 (5 \pm 2/1)		
	500	124* 70* 63* (86 \pm 33.4)	2* 1* 1* (1 \pm 0.6)	9 13 6 (9 \pm 3.5)	3* 4* 6* (4 \pm 1.5)		
	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	555 518 493 (522 \pm 31.2)	551 557 568 (559 \pm 8.6)	597 601 621 (606 \pm 12.9)	483 382 572 (479 \pm 95.1)		
	Number of colonies/plate	939 909 948 (932 \pm 20.4)	357 372 388 (372 \pm 15.5)	388 473 472 (444 \pm 48.8)	443 483 361 (429 \pm 62.2)		

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 2-2 Mutagenicity of 2,4,6-tribromophenol on bacteria (II)

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			25 25 29 (26 \pm 2.3)			
	156			21 29 27 (26 \pm 4.2)			
	313			17 24 23 (21 \pm 3.8)			
	625			24 19 18 (20 \pm 3.2)			
	1250			17 9 17 (14 \pm 4.6)			
	2500			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
	5000			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
S9 mix (+)	0			30 32 30 (31 \pm 1.2)			
	156			34 44 30 (36 \pm 7.2)			
	313			37 30 34 (34 \pm 3.5)			
	625			23 26 27 (25 \pm 2.1)			
	1250			12 26 26 (21 \pm 8.1)			
	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			166 203 159 (176 \pm 23.6)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			10			
	Number of colonies/plate			675 652 609 (645 \pm 33.5)			

Purity was 99.8 %.

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

*:Growth inhibition was observed.

2,4,6-トリブロモフェノ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 2,4,6-Tribromophenol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2,4,6-トリブロモフェノ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)および短時間処理(6時間)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理では0.25 mg/mL, S9 mix非存在下およびS9 mix存在下における短時間処理ではそれぞれ0.31 mg/mLおよび0.33 mg/mLであった。各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度設定した。連続処理では、24時間および48時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。染色体分析が可能な濃度は、48時間連続処理および短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下において2濃度ずつしか得られなかったため、濃度を設定し直し再度試験を行った。その結果、染色体分析が可能な最高濃度は24時間連続処理では0.10 mg/mL, 48時間連続処理では0.050 mg/mLの濃度であったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。S9 mix非存在下およびS9 mix存在下における短時間処理ではそれぞれ0.050 mg/mLおよび0.10 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、この濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した群では、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非存在下の高濃度群(0.050 mg/mL)およびS9 mix存在下で処理した高濃度群(0.10 mg/mL)でそれぞれ10.5%および23.5%(gapを含む)の染色体異常が誘発された。一方、S9 mix非存在下および存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下で2,4,6-トリブロモフェノールは、染色体異常を誘発する(陽性)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21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、仔牛血清(CS: Cansera International)を10 vol%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. S9

S9(キッコーマン(株))は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

2,4,6-トリブロモフェノール(ロット番号:70909, マナック(株), 広島)は、白色フレーク状の粉末で、水に対しては100 mM未満, DMSOでは2 M以上, アセトンでは50 mg/mL以上で溶解し、融点87-89°C, 沸点119°C/2.0 kPaで、純度99.8%の物質であった。本物質は空気中で変色し、昇華性を示す物質である。

6. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(ロット番号:DLF7049, 和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5 vol%になるように加えた。

7. 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

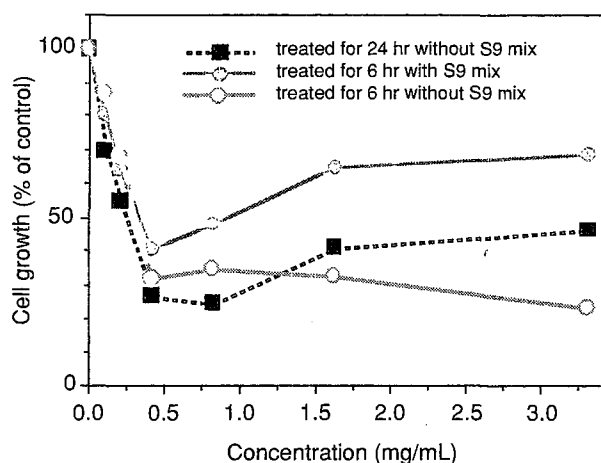


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2,4,6-tribromophenol

対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%細胞増殖抑制濃度は0.25 mg/mL、S9 mix非存在下および存在下における短時間処理では、それぞれ0.31 mg/mLおよび0.33 mg/mLであった(Fig. 1)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度である0.60 mg/mLを最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(0.038, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/mL)。しかし、染色体分析が可能な濃度は、48時間連続処理および短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下において2濃度ずつしか得られなかったため、濃度を設定し直し(0.013, 0.025, 0.050, 0.10, 0.20 mg/mL)、再度試験を行った。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、注射用蒸留水(株大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、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。

9. 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 $\mu\text{g/mL}$ になるように培養液に加えた。染色体標本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 vol%ギムザ溶液で染色した。

10. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の

分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2), 24時間および48時間連続処理では、それぞれ0.10 mg/mLおよび0.050 mg/mLが、S9 mix非存在下およびS9 mix存在下における短時間処理では、それぞれ0.050 mg/mLおよび0.10 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

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・哺乳動物試験研究会(MMS)¹¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、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。

11. 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、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法²⁾により、有意差検定を実施した($p < 0.01$)。また、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⁾($p < 0.01$)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

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。2,4,6-トリブロモフェノールを加えて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、染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。倍数性細胞については、24時間処理した濃度群(0.10 mg/mL)では、細胞毒性のために740細胞しか観察できなかったが、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、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。2,4,6-トリブロモフェノールを加えた短時間処理では、S9 mix非存在下で処理した高濃度群(0.050 mg/mL)およびS9 mix存在下で処理した高濃度群(0.10 mg/mL)でそれぞれ10.5%および23.5%(gapを含む)の染色体異常が誘発された。一方、倍数性細胞の誘発作用については、S9 mix非存在下および存在下で6時間処理したいずれの処理群でも、倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。

従って、2,4,6-トリブロモフェノールは、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すると結論した。

本物質は、細菌を用いる復帰突然変異試験においては、変異原活性が認められなかった⁴⁾。これまでに、多くの臭素化合物 (bromoacetic acid, 2-bromopropionic acid, 1-bromo-2-chloroethane, bromochloromethane, 2-bromo-2-methylpropionic acid, 1-bromo-3-chloropropane, 1,4-dibromobenzene 等) が^{5,6)}、染色体異常を誘発することが報告されており^{5,6)}、ハロゲン類としての反応性の強さから、DNA に対する傷害性も強いことが示唆された。

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, pp. 16-37.
- 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,” サイエンティスト社, 東京, 1987, pp. 76-78.
- 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. 213-223.
- 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. 411.
- 5) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課監修, “既存化学物質 変異原性試験データ集,” 日本化学物質安全・情報センター, 東京, 1996, pp. 167-538.
- 6) 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. 367.

連絡先

試験責任者: 佐々木澄志
試験担当者: 日下部博一, 高橋俊孝, 橋本恵子
(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: Kiyoshi Sasaki (Study director)
Hirokazu Kusakabe,
Toshitaka Takahashi, Keiko Hashimoto
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2,4,6-tribromophenol (TBP)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		Concurrent cytotoxicity ⁶⁾ (%)	Mitotic index ⁷⁾ (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Non-treatment			200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38			-	-
Solvent ¹⁾ 0		24	200	0	0	0	2	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			100.0	-
TBP 0.025		24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			93.5	-
TBP 0.050		24	200	0	0	1	2	1	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.00	-	-	69.5	-
TBP 0.10		24	200	0	2	0	3	0	0	5	1	4 (2.0)	4 (2.0)	0.00 ⁸⁾			43.0	7.0
TBP 0.20***		24	-											-			29.5	0.0 ⁹⁾
MC 0.00005		24	200	3	27	115	1	0	0	146	0	94*(47.0)	92*(46.0)	0.00			-	-
Solvent ¹⁾ 0		48	200	0	0	0	4	0	0	4	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			100.0	-
TBP 0.013		48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			98.5	-
TBP 0.025		48	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	-	-	92.5	-
TBP 0.050		48	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13			49.5	4.0
TBP 0.10***		48	-											-			14.0	-
TBP 0.20***		48	-											-			6.0	-
MC 0.00005		48	200	5	51	180	11	1	50	298	7	134*(67.0)	133*(66.5)	0.88*			-	-

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.

1)Dimethyl sulfoxide 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 $p<0.01$. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. 7)Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. 8)Seven hundred and forty cells were analysed. 9)Eight hundred and ten cells were analysed from two dishes.

*:Significantly different from solvent control at $p<0.01$ by Fisher's exact probability test. **:Purity was more than 99.8% ***:Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphases due to cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,4,6-tribromophenol (TBP)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		Concurrent cytotoxicity ⁶⁾ (%)	Mitotic index ⁷⁾ (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Non-treatment				200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			-	-
Solvent ¹⁾ 0		-	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			100.0	-
TBP 0.013		-	6-(18)	200	0	1	4	1	0	0	6	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			94.0	-
TBP 0.025		-	6-(18)	200	0	0	1	1	0	0	2	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	+	-	88.0	-
TBP 0.050		-	6-(18)	200	1	16	30	4	0	0	51	0	21*(10.5)	20*(10.0)	0.63			47.0	5.1
TBP 0.10***		-	6-(18)	-										-			19.0	-	
TBP 0.20***		-	6-(18)	-										-			1.5	-	
CPA 0.005		-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			-	-
Solvent ¹⁾ 0		+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			100.0	-
TBP 0.025		+	6-(18)	200	1	0	0	1	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			91.5	-
TBP 0.050		+	6-(18)	200	0	0	2	1	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38	+	-	78.5	-
TBP 0.10		+	6-(18)	200	1	19	84	11	0	20	135	2	47*(23.0)	46*(23.0)	0.13			40.5	11.7
TBP 0.20***		+	6-(18)	-										-			24.5	Tox	
CPA 0.005		+	6-(18)	200	0	6	19	4	0	0	29	1	25*(12.5)	25*(12.5)	0.00			-	-

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, Tox:cytotoxicity.

1)Dimethyl sulfoxide 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 $p<0.01$. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. 7)Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. *:Significantly different from solvent control at $p<0.01$ by Fisher's exact probability test. **:Purity was more than 99.8% ***:Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphases due to cytotoxicity.

2,4,6-トリブロモフェノールのラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2,4,6-Tribromophenol by Oral Administration in Rats

要約

2,4,6-トリプロモフェノールの100, 300および1000 mg/kgをSD系(Crj:CD)のラットの交配前2週間および交配期間の2週間を通じて経口投与し、さらには雄では交配期間終了後20日間、雌では妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで連続投与し、親動物の反復投与毒性および生殖能ならびに児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

1. 反復投与毒性

雌雄いずれの群にも死亡動物は観察されなかった。一般状態の観察で雌雄の300 mg/kg以上の投与群では被験物質投与後に流涎が認められた。また、雌雄の1000 mg/kg群で体重増加抑制および摂餌量の低値が認められた。雄の血液学検査および血液凝固能検査には被験物質投与の影響は認められなかった。雄の血液生化学検査では300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し、1000 mg/kg群で総タンパク、アルブミン、A/G、ALPおよび塩素が有意な高値を、BUNが高値傾向を、カリウムが有意な低値を示した。

器官重量では雌雄の1000 mg/kg群で肝臓および腎臓重量が高値を示し、雄の同群で胸腺重量が低値を示した。

剖検では雄の1000 mg/kg群で肝臓の肥大が観察され、病理組織学検査では肝細胞肥大の発生率が増加し、肝臓の脂肪化の発生率が減少した。また、雄の同群に腎乳頭壊死、尿細管拡張、リンパ球浸潤、尿細管の好塩基化および硝子円柱が認められた。

2. 生殖発生毒性

平均性周期、交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。分娩時観察では妊娠動物の全例が正常に分娩し、妊娠期間にも被験物質投与の影響は認められなかった。妊娠黄体数、着床痕数、出産児数、出産生児数、着床率および分娩率に明らかな被験物質投与の影響は認められなかった。1000 mg/kg群で雌雄の新生児の哺育0および4日体重、哺育4日の生児数および生存率が低値を示し、被験物質投与による出生前後の新生児の発育抑制および生存性に対する影響が示唆された。新生児の外表、死亡児および哺育4日の剖検でも被験物質投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では2,4,6-トリプロモフェノールの反復投与により投与後の一般状態の変化で

雌雄の300 mg/kg以上の投与群で流涎が観察され、雌雄ともに1000 mg/kg群で体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められた。さらに、雄の血液生化学検査で300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し、1000 mg/kg群の病理学検査および血液生化学検査において、被験物質投与による主として肝臓および腎臓に及ぼす影響が示唆される変化が認められた。したがって、雌雄とも無影響量(NOEL)は100 mg/kg/dayと判断された。雌雄の生殖能に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与でも認められず、無影響量は1000 mg/kg/dayと判断された。児動物の発生・発育に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与で発育抑制が認められ、哺育4日生児数および生存率が低値を示したことから無影響量は300 mg/kg/dayと判断された。

方法

1. 被験物質

2,4,6-トリプロモフェノール [マナック(株)製造(広島), Lot No. 70909, 純度99.8 wt%] は、白色のフレーク状の粉末であり、使用時まで直射日光を避け、適当な換気のある冷暗所に保管した。本ロットは投与期間中安定であったことを確認した。

被験物質は、トウモロコシ油 (Lot No. V7P1509, V7R2400, ナカライテスク(株)製造) に溶解し、20, 60 および200 mg/mLの濃度になるよう投与液を調製した。調製後は、使用時まで冷暗条件下で密閉保管した。投与液中の被験物質は、20および200 mg/mLについて、調製後遮光下冷蔵庫保存で8日目まで安定であることが予備試験において確認されているため、調製後8日以内に使用した。

投与液の濃度確認のため全試験群について、調製開始時に調製した投与液から無作為にサンプルを抽出し、投与液中の被験物質濃度の分析を実施した。その結果、投与液中の平均濃度は100.5~100.7%の濃度範囲で調製されていた。したがって、投与液はほぼ所定量の2,4,6-トリプロモフェノールが含有されていることを確認した。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー(株)(神奈川)から購入した生後8週齢のSprague-Dawley (Crj:CD (SD), SPF)系雌雄ラットを使用した。購入した動物は7日間検査・馴化飼育した後、一般状態に異常が認められなかったものを10週齢で群分けして試験に用いた。群分け

終了時の体重は、雄で361～397 g、雌で233～258 gの範囲であった。

動物は、温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数15回/時間、照度150～300 lux、照明時間12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)に設定されたバリアシステムの飼育室でアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに1匹ずつ収容し飼育した。妊娠18日以降の母動物は哺育4日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに哺育トレーおよび巣作り材料(Care FRESH™, Absorption corporation 製造)を入れて飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)製造のNMF固型飼料(放射線滅菌飼料)を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。飲水は、水道水を自由に摂取させた。

3. 群分け

動物は投与開始日の体重をもとに層別化し、無作為抽出法により1群当たり12匹を振り分けた。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本被験物質の製品安全データシート(MSDS)に経口投与によるラットの LD_{50} が2000 mg/kg以上であり、2000 mg/kgのラットを用いた14日間経口投与試験で特異的な病理学的所見は認められなかったことが報告されている。この情報に基づき、0、30、100、300および1000 mg/kgの用量で予備試験「2,4,6-トリプロモフェノールのラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験-2週間投与予備試験」を実施した。その結果、1000 mg/kg群で雄の1例が投与2日に死亡した。一般状態の変化として、流涎が雌雄ともに300および100 mg/kg群で観察された。また、1000 mg/kg群の雌雄に体重増加抑制傾向が認められ、同群の雌雄で投与1から3日の平均1日摂餌量が低値を示した。

雄の血液学検査では変化は認められなかったが、血液生化学検査では1000 mg/kg群でアルブミン、A/GおよびGPTが高値を示した。

剖検では、被験物質投与の影響と考えられる所見は認められなかった。

剖検時の器官重量では、1000 mg/kg群で雌雄ともに肝臓の絶対および相対重量が高値を示した。さらに、雄の1000 mg/kg群で肺および腎臓の相対重量が高値を示した。

以上の結果から、本試験の最高用量を明らかな毒性兆候が現れることが予想される1000 mg/kgに設定し、以下公比約3で除し、300および100 mg/kgを設定した。

投与容量は、体重100 g当り0.5 mLとし、交配前および交配期間中の雌雄では、個体別に測定した最新体重に基づいて算出を行った。また、妊娠期間および哺育期間中の雌は、妊娠0、7、14、21および哺育0日に測定した個体別体重に基づいて算出を行った。胃ゾンデを用いて毎日1回(7日/週)強制経口投与した。対照群にはトウモロコシ油のみを同様に投与した。雄の投与期間は、交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後20日間の連続48日間とした。雌の投与期間は、交配前14日

間と交配期間中(最長14日間)ならびに交尾成立雌の妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで(41～45日間)とした。なお、交尾不成立の雌は交配期間終了後20日間の連続48日間とした。

5. 観察および検査

1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

2) 体重

雄では、投与1(投与開始日)、8、15、22、29、36、43および49日(剖検日)に測定し、投与1から43日までの体重増加量を算出した。

雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に測定し、投与1から15日までの体重増加量を算出した。また、交尾成立後の雌は、妊娠0、7、14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に測定し、それぞれ妊娠0から21日および哺育0から4日までの体重増加量を算出した。

3) 摂餌量

雄では、投与1(投与開始日)、8、15、22、29、36、43および48日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日および投与22から48日までの累積摂餌量を算出した。

雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日までの累積摂餌量を算出した。また、交尾成立の雌は妊娠0、7、14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともに妊娠0から21日までの累積摂餌量を算出した。なお、交配期間中の摂餌量は測定しなかった。

4) 交配

交配前14日間の性周期観察を行った雌を同群内の雄のケージに入れ1対1で最長14日間毎晩同居させた。翌朝、膣垢中の精子確認をもって交尾が成立したとし、その日を妊娠0日とした。性周期観察は交尾成立日までを行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数として平均性周期を算出した。交配結果から、各群について交尾率 $[(\text{交尾動物数}/\text{同居動物数}) \times 100]$ を算出した。

5) 自然分娩時および新生児の観察

妊娠動物は全例を自然分娩させた。分娩の確認は午前9～10時に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した個体についてその日を哺育0日とした。午前10時を過ぎて分娩が完了した個体については、翌日を哺育0日とした。分娩を確認した全例について妊娠期間(哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数)、受胎率 $[(\text{受胎動物数}/\text{交尾動物数}) \times 100]$ 、出産率

[(生児出産雌数/妊娠雌数)×100], 着床率 [(着床痕数/妊娠黄体数)×100], 分娩率 [(総出産児数/着床痕数)×100], 出生率 [(出産生児数/総出産児数)×100] を算出した。

新生児は、哺育0日に出産児数(生存児+死亡児)を調べ、性別を判定するとともに外表異常の有無を調べた。また、哺育0および4日に雌雄個体の重量を測定し、1腹の雌雄別平均体重を算出した。

哺育4日の新生児の同腹児重量を測定後に新生児全例をエーテル麻酔により安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った。なお、哺育期間中の死亡児についても同様に器官・組織の肉眼観察を行った。また、新生児の4日の生存率 [(哺育4日生児数/出産生児数)×100] を求めた。

6) 臨床検査

各群の雄全例について剖検時に実施した。動物を最終投与日(投与期間:48日間)の夕方から翌朝まで約16時間絶食させた後、エーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血した。

a) 血液学検査

検査はEDTA-2Kを添加した初血について、THMS H・1E(米国マイルス社)を用いて白血球数(WBC:暗視野板法)、赤血球数(RBC:暗視野板法)、ヘマトクリット値(HCT:RBC, MCVより算出)、ヘモグロビン量(HGB:シアンメトヘモグロビン法)、平均赤血球容積(MCV:暗視野板法)、平均赤血球色素量(MCH:HGB, RBCより算出)、平均赤血球色素濃度(MCHC:HGB, HCTより算出)、血小板数(PLT:暗視野板法)および白血球百分率(フローサイトケミストリー法)を測定した。白血球百分率は前述の機器で測定したが、別途血液塗末標本を作製し、メイ・グリエンワルド・ギムザ染色して保管した。網赤血球(RC)比率の算定については、EDTA-2K添加血液をニューメチレンブルーで染色後、血液塗末標本を作製した。高用量群で貧血傾向が認められたため、全群全例の標本の観察を行った。

b) 血液凝固能検査

検査にはクエン酸ソーダ添加血液を3000 r.p.m., 13分間遠心分離して得た血漿について、血液凝固測定装置KC-40(独国アメルング社)を用いてプロトロンビン時間(PT:Quick 1段法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT:クロット法)およびフィブリノーゲン量(Fibrinogen:トロンビン時間法)を測定した。

c) 血液生化学検査

検査は採血管に血液を採取、30分間静置後3000 r.p.m. 7分間遠心分離して得た血清について、多項目生化学自動分析装置CentrifiChem ENCORE II(米国ベーカー社)およびEKTACHEM 700N(米国コダック社)を用いて総蛋白(ビューレット法)、アルブミン(B.C.G.法)、A/G(計算値)、血糖(グルコースオキシダーゼ法)、中性脂肪(酵素色素法)、総コレステロール(コレステロールオキシダーゼ法)、尿素窒素(ウレアーゼアンモニウム指示薬法)、クレアチニン(Jaffé法)、総ビリルビン(ジア

ゾ法)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(IFCC法)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(IFCC法)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(Orlowski法)、ナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)、塩素(電極法)、カルシウム(アルセナゾIII法)および無機リン(モリブデン酸青法)を測定した。

7) 病理学検査

a) 剖検および器官重量

① 雄動物

48日間投与した日の夕方から、約16時間絶食をさせた後エーテル麻酔下で採血し安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比(相対重量)を算出した。また、全動物の重量測定器官に加えて心臓、精囊、前立腺、下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として皮膚を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、精巣および精巣上体はブアン氏液で固定した。

② 雌動物

哺育4日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および卵巣重量を測定し相対重量を算出した。また、全動物の重量測定器官に加えて心臓、下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として肺および皮膚を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。また、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

③ 交尾しなかった雌

48日間投与した翌日、エーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

④ 哺育期間中に全児が死亡した母動物(全児死亡動物)

生存児すべての死亡または喰殺が確認された日にエーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

b) 病理組織学検査

① 全児死亡動物

全児死亡動物(雌の1000 mg/kg群の1例)の皮膚、乳

腺, リンパ節, 唾液腺, 胸骨, 大腿骨(骨髄を含む), 胸腺, 気管, 肺および気管支, 心臓, 甲状腺および上皮小体, 舌, 食道, 胃, 十二指腸, 小腸, 大腸, 肝臓, 脾臓, 膵臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 卵巣, 子宮, 膣, 眼球, ハーダー腺, 脳, 下垂体および脊髄について実施した。

② 妊娠を成立させた雄

対照群と高用量群では脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 精巣および精巣上体について実施し, 加えて, 1000 mg/kg群の1例の腹膜および1例の皮下についても実施した。また, 低および中用量群では胸腺, 肝臓および腎臓について実施した。

③ 自然分娩した雌

対照群と高用量群では脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎および卵巣について実施し, 加えて, 対照群の1例の皮膚, 1000 mg/kg群の1例の皮膚および1例の肺についても実施した。また, 低および中用量群では肝臓について実施した。

④ 交尾しなかった雄雌

対照群の雌雄各1例の脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 膣, 子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上体, 精囊, 前立腺, 下垂体について実施した。

6. 統計解析

体重, 摂餌量, 黄体数, 着床痕数, 出産児数, 死産児数, 性比, 平均性周期, 妊娠期間, 着床率, 分娩率, 出生率, 外表異常発現率, 新生児の4日の生存率, 器官重量, 相対重量, 血液学および血液生化学検査値については多重比較検定¹⁻³⁾を行った。

出産率, 交尾率および受胎率については χ^2 検定^{4,5)}を用いた。病理学検査の所見の発生率については, Fisherの直接確率検定法⁵⁾を用いて検定し, グレードのある所見は, -を「1」, +1を「2」, +2を「3」および+3を「4」に割り当てた後, 順位和検定であるMann-WhitneyのU検定⁵⁾を用いて検定した。なお, 哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は*: $P<0.05$ および**: $P<0.01$ の2段階とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡および一般状態

1000 mg/kg群で哺育4日に全児死亡動物が1例(動物番号2306)認められた。

一般状態の観察では, 主な投与後の症状として流涎が雌雄の300および1000 mg/kg群で観察された。この症状は投与期間を通じて雄の300 mg/kg群で複数例に, 1000 mg/kg群で全例にほぼ毎日継続して観察され, 雌の300 mg/kg群で複数例に散発的に, 1000 mg/kg群で全例にほぼ毎日継続して観察された。症状の発現は, 投与後約5分から認められ, 30分後には消失した。また,

1000 mg/kg群で体表面の腫瘤(鼻部)および皮下部の腫瘤(口唇部)が各1例認められたが, それぞれ単発性の発現であり, 体表面の腫瘤は剖検日までに消失した。皮下部の腫瘤は組織学的には膿瘍であった。これらのことから被験物質投与との関連はないものと考えられた。

その他, 雄では脱毛が100 mg/kg群で1例, 被毛の汚れが1000 mg/kg群で2例, 痂皮が対照群で1例, 投与前の流涎が対照群で1例, 歯異常(上顎切歯折れ)が300 mg/kg群で1例にそれぞれ観察された。雌では交配前・交配期間中に脱毛が対照群および1000 mg/kg群で1および2例, 痂皮が300 mg/kg群で1例, 妊娠期間中に脱毛が対照群, 100および1000 mg/kg群で1, 1および3例, 哺育期間中に脱毛が対照群, 100および1000 mg/kg群で1, 1および2例にそれぞれ観察された。これらの所見はしばしば対照群でも認められるものであり, 被験物質投与の影響とは考えなかった。

2) 体重(Fig. 1, 2)

雄では, 対照群に比べて1000 mg/kg群で投与8日以降, 統計学的に有意な低値を示し, 同群の投与1から43日の体重増加量も有意な低値を示した。

雌では交配前の投与期間には対照群と被験物質投与群の間に有意な差は認められなかったが, 妊娠期間において対照群に比べ1000 mg/kg群で妊娠7日以降有意な低値を示し, 同群の妊娠0から21日の体重増加量も有意な低値を示した。また, 哺育期間においても対照群に比べて1000 mg/kg群で哺育4日に有意な低値を示し, 哺育0から4日の体重増加量も低値傾向を示した。

3) 摂餌量(Fig. 3, 4)

雄では, 対照群に比べて1000 mg/kg群で投与1から8日の平均1日摂餌量が統計学的に有意な低値を示した。

雌では交配前の投与期間に対照群に比べ1000 mg/kg群で投与1から8日の平均1日摂餌量が有意な低値を, また, 哺育0から4日の平均1日摂餌量が低値傾向を示した。妊娠期間中は, 対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

4) 雄の血液学検査(Table 1)

血液学検査ではいずれの検査項目についても対照群と被験物質投与群の間に統計学的に有意な差は認められなかった。血液凝固能検査では1000 mg/kg群でプロトロンビン時間が対照群に比べ有意な延長を示したが, 軽微な変化であり毒性学的意義の乏しいものと考えられた。

5) 雄の血液生化学検査(Table 2)

対照群に比べ300および1000 mg/kg群でクレアチニンが統計学的に有意な高値を示した。また, 1000 mg/kg群で総タンパク, アルブミン, A/G, ALPおよび塩素が有意な高値を, BUNが高値傾向を, 総ビリルビンおよびカリウムが有意な低値を示した。その他の検査項目では対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

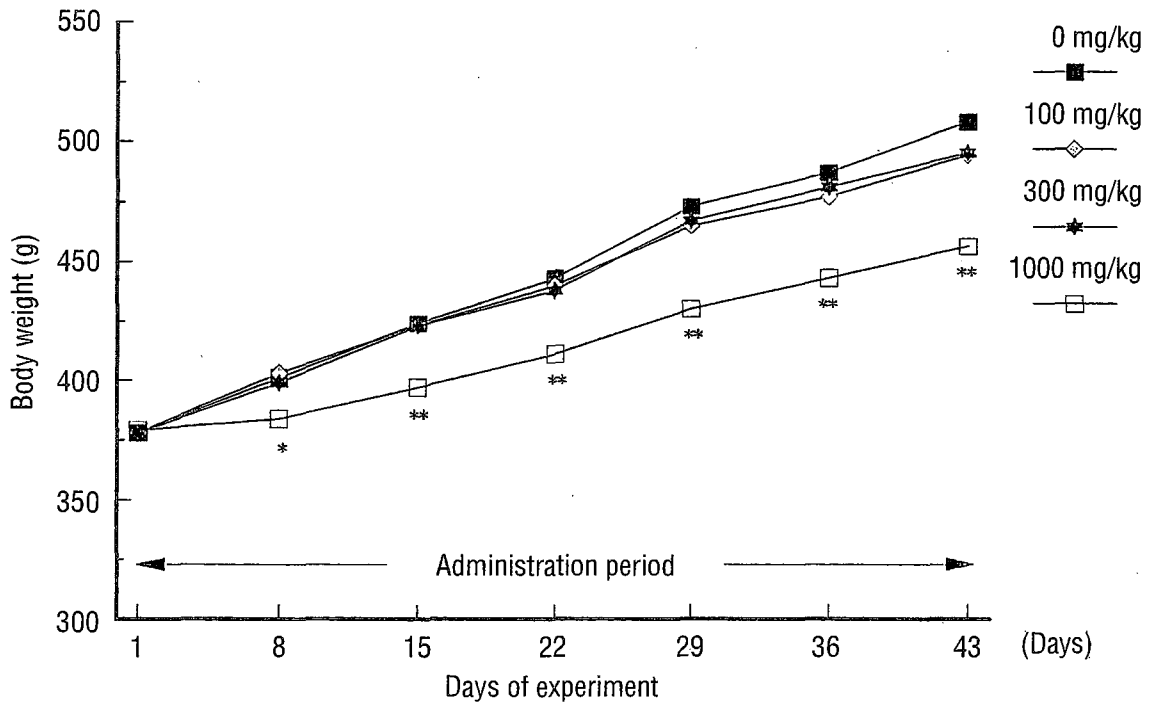


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

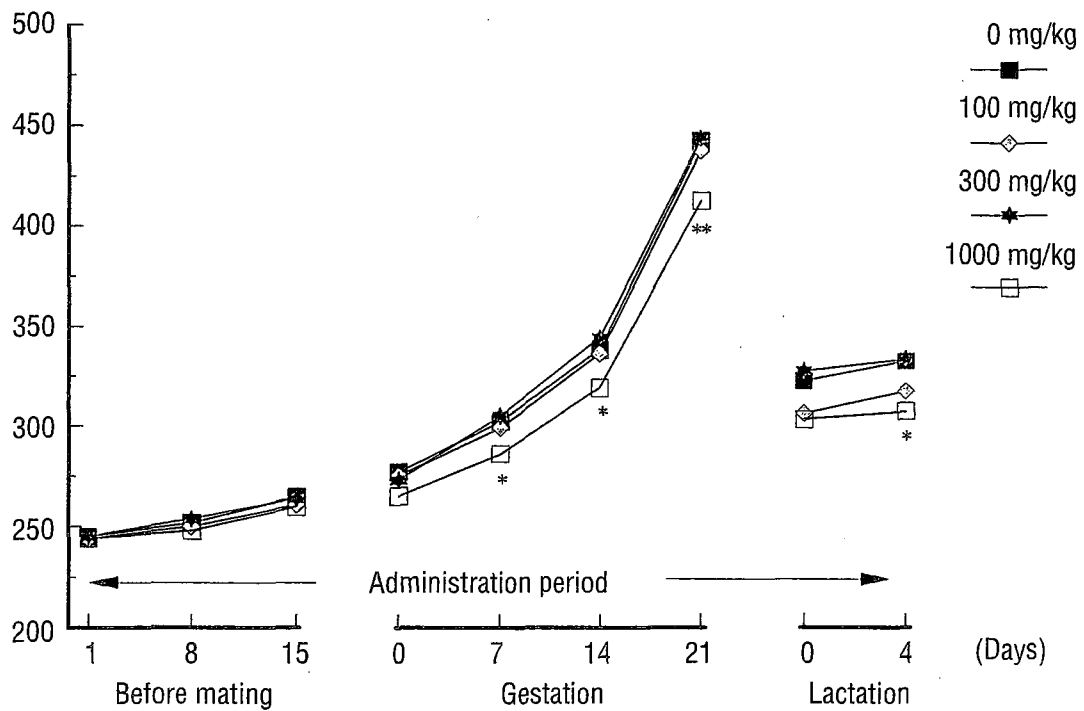


Fig. 2 Body weight change of female rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

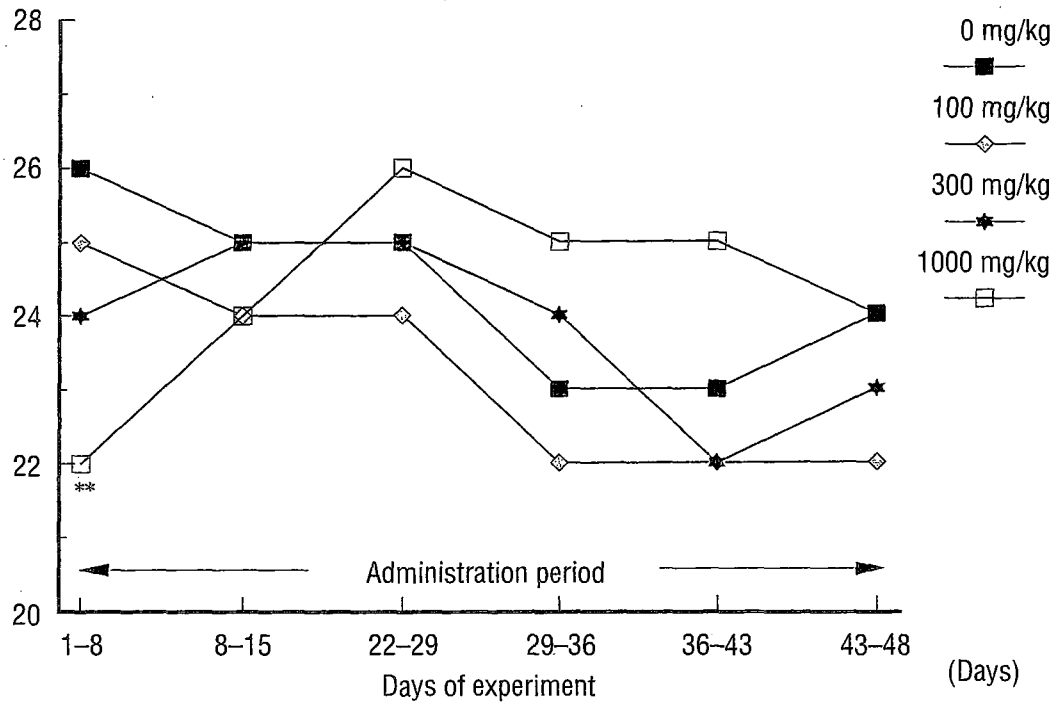


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significant difference from control group; **:P<0.01

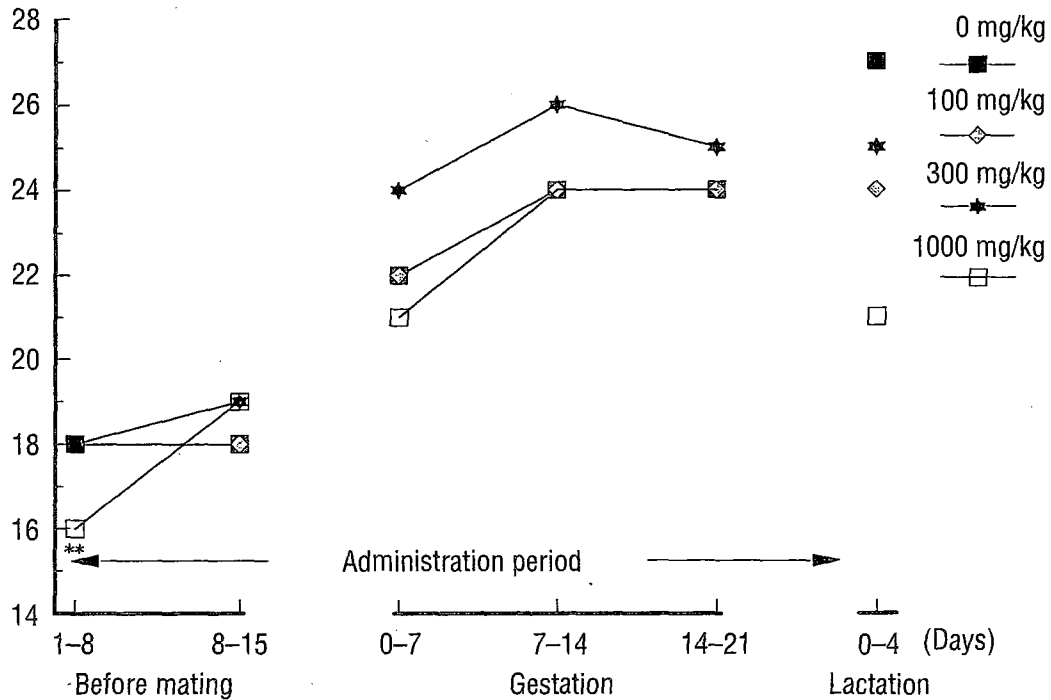


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significant difference from control group; **:P<0.01

6) 器官重量 (Table 3)

雌雄ともに対照群に比べ1000 mg/kg群で肝臓の絶対および相対重量, 脳, 腎臓および副腎の相対重量が統計学的に有意な高値を示した。さらに雄では1000 mg/kg群で胸腺の絶対重量が有意な低値を, 精巣の相対重量が有意な高値を示した。

7) 剖検所見

1000 mg/kg群の1例に認められた全児死亡動物(動物番号 2306)には異常所見は認められなかった。

雄では, 1000 mg/kg群で胸腺の萎縮が4例, 肝臓の肥大が3例観察された。その他, 1000 mg/kg群で腎臓の白色斑点および副腎の肥大が各2例に観察され, 胸腺の赤色斑点, 肝臓の白色斑点, 皮下の塊, 腹腔の塊, 精巣上体の結節および被毛の菲薄化が300 mg/kg群を除く各群に単発性に観察された。

雌では, 胸腺の赤色斑点, 肺の褐色斑点, 肝臓の肥大, 癍痕および白色斑点, 卵巣の嚢胞, 子宮の内腔拡張, 副腎の肥大および被毛の菲薄化が対照群を含む各群に1ないし少数例に観察された。

交尾しなかった動物は対照群で雌雄各1例であった。雄では異常所見は認められず, 雌では脾臓の表面粗および結節, 肺の褐色斑点および子宮の内腔拡張が観察された。

8) 病理組織学検査 (Table 4, 5)

1000 mg/kg群の全児死亡動物では, 脾臓の色素沈着, 肺の細胞浸潤, 肝臓の脂肪化および子宮の小肉芽腫が観察された。

雄では, 1000 mg/kg群で胸腺の萎縮が3例, 肝細胞肥大が12例, 腎臓の硝子円柱が8例, 尿管管拡張が7例, 腎乳頭壊死が5例, リンパ球浸潤が6例に発生し, 対照群と比べて統計学的に有意な発生率の増加が認められた。また, 肝臓の脂肪化が対照群で6例の発生に対し, 1000 mg/kg群では認められず有意な減少を示した。さらに腎尿管の好塩基化が対照群, 100, 300および1000 mg/kg群でそれぞれ8(全例軽度), 9(全例軽度), 9(軽度8, 中等度1)および12例(軽度8, 中等度4)観察され, 発生率に有意差は認められなかったが1000 mg/kg群で程度の増強が認められた。一方, 100 mg/kg群で腎臓の好酸性小体の発生率に有意な高値が認められたが, 用量に関連した発現の増加および程度の増強は認められなかった。脾臓の色素沈着, 胸腺の出血, 肝臓の小肉芽腫および副腎束状帯の空胞変性が対照群を含め比較的多く観察されたが発生率に有意な変化は認められなかった。なお, 1000 mg/kgの雄の1例に認められた皮下の塊は, 組織学的には膿瘍であった。その他, 観察された所見は単発性あるいは少数例の発生であった。

雌で認められた所見はいずれも単発性の変化かあるいは群間の発生率に差がない変化であった。

交尾しなかった動物では, 雌雄に共通して脾臓の色素沈着および腎臓のリンパ球浸潤が認められ, その他雄では肝臓のリンパ球浸潤, 腎臓の尿管の好塩基化および

副腎の血管拡張ならびに束状帯の空胞変性, 雌では脾臓の包膜炎, 肺炎, 肝臓の小肉芽腫, 腎臓の腎盂炎, 子宮の内腔拡張および細胞浸潤が観察された。

2. 生殖発生毒性

1) 交尾および受胎能 (Table 6)

交尾は対照群を除くすべての被験物質投与群で全例成立した。対照群では1組が交尾不成立であり, 交尾率は91.7%であった。受胎はすべての群の交尾成立雌で成立した。

性周期観察では, いずれの群もほぼ4~5日の性周期を示し平均性周期に群間差は認められなかった。

2) 分娩および哺育 (Table 7)

1000 mg/kg群で対照群に比べ妊娠期間が統計学的に有意な低値を示したが, 個体別の妊娠期間はすべて22日であり, 正常の範囲内であった。また, 同群で対照群に比べ哺育4日の生児数が雌雄ともに有意な低値を示し, 哺育4日の生存率も雌雄ともに有意な低値を示した。その他, 分娩状態には異常が観察されず, 対照群を含む各群の黄体数, 着床痕数, 出産生児数および死産児数はほぼ同様な値を示し, 出産率, 着床率, 分娩率および出生率に群間差は認められなかった。

3) 新生児の形態, 体重および剖検所見

新生児の外表検査では, 100 mg/kg群で鎖肛および無尾が同一個体の1例に, 300 mg/kg群で鎖肛および痕跡尾が同一個体の1例にそれぞれ観察された。

哺育期間中の体重では, 哺育0および4日に対照群に比べ1000 mg/kg群で雌雄とも統計学的に有意な低値を示した。死亡児の剖検では, 右鎖骨下動脈起始異常が100および1000 mg/kg群で1および3例観察された。その他, 腎盂拡張が100 mg/kg群の1例, 大脳低形成および食道位置異常が300 mg/kg群の同一個体の1例, 小眼球が1000 mg/kg群の1例にそれぞれ観察された。哺育4日の剖検で, 雄では胸腺頸部残留が対照群, 100および300 mg/kg群でそれぞれ3, 2および1例観察された。また, 肝臓の白色斑点が対照群および1000 mg/kg群で各1例に観察された。その他, 肝臓の赤色斑点, 黒色斑点および淡色が300あるいは1000 mg/kg群で1から2例に観察された。雌では胸腺頸部残留が対照群, 100および1000 mg/kg群でそれぞれ2, 1および1例に観察された。また, 肝臓の白色斑点が100および1000 mg/kg群で1および4例に観察され, 対照群に比べて1000 mg/kg群で有意な発生率の高値を示した。その他, 肝臓の赤色斑点, 黒色斑点および緑色, 鎖肛, 眼球の赤色, 尾の欠損, 痕跡尾および痂皮が被験物質投与群で単発性に散見された。

考察

1. 反復投与毒性

死亡例は, 投与期間を通じ雌雄いずれの群にも認めら

れなかった。

一般状態の観察では、流涎が投与期間を通じ雌雄ともに300 mg/kg以上の被験物質投与群で認められた。この症状は用量に対応して発現頻度が増強し、被験物質投与に関連した変化と考えられた。

体重は、雌雄ともに1000 mg/kg群で増加抑制が認められ、摂餌量についても雌雄ともに同群で投与開始直後低値を示し、被験物質投与の影響が示唆された。

雄の血液学検査および血液凝固能検査には被験物質投与の影響は認められなかった。

雄において、1000 mg/kg群で肝臓重量が高値を示し、剖検でも肝臓の肥大が観察された。また、病理組織学検査においても肝細胞肥大の発生率は増加を示したのに対し、肝臓の脂肪化は発生率の減少が観察され、肝臓に対する被験物質投与の影響が認められた。また、同群で腎臓重量が高値を示し、病理組織学検査で腎乳頭壊死、尿細管拡張、リンパ球浸潤、尿細管の好塩基化および硝子円柱が認められた。腎乳頭壊死は鎮痛剤および非ステロイド系抗炎症剤の投与により実験的に誘発されることが知られており^{6,7)}、本試験においても尿細管の好塩基化や硝子円柱の程度の強いものに腎乳頭壊死および尿細管拡張が観察されていることから、被験物質による尿細管の障害とともに尿濃縮による腎乳頭への障害が考えられた。また、血液生化学検査においても300および1000 mg/kg群でクレアチニンが、また、1000 mg/kg群でBUNの高値が認められ、腎障害が示唆された。その他、血液生化学検査で1000 mg/kg群に認められた総タンパク、アルブミン、A/G、ALP、塩素およびカリウムの変化も肝臓あるいは腎臓に対する被験物質の影響を反映するものと考えられた。同群で認められた総ビリルビンの減少は毒性学的意義が乏しいものと考えられるため被験物質投与の影響とは判断しなかった。1000 mg/kg群で観察された胸腺の萎縮は、組織学的には皮質および髄質領域の萎縮であり、器官重量にも低値が認められていることから被験物質投与の影響と考えられた。

雌においても1000 mg/kg群で肝臓および腎臓重量が高値を示し、剖検で肝臓の肥大が観察され、肝臓および腎臓に及ぼす被験物質投与の影響が示唆された。しかし、病理組織学検査では影響を示唆する変化は認められず、雄に比べ雌に対する被験物質投与の影響は軽度なものと考えられた。

その他、雌雄の1000 mg/kg群で脳、副腎および精巣重量の高値が認められたが、病理組織学検査では相当する所見は認められず、相対重量のみの変化であることから同群の低体重に起因する二次的な変化と考えられた。

以上のことから、2,4,6-トリプロモフェノールの反復投与により投与後の一般状態の変化で雌雄の300 mg/kg以上の投与群で流涎が観察された。また、雌雄とも1000 mg/kg群で体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められた。さらに、雄の血液生化学検査で300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し、1000 mg/kg群の病理学検査および血液生化学検査において、被験物質投与による主として肝臓および腎臓に及ぼす影

響が示唆される変化が認められた。したがって、雌雄とも無影響量は100 mg/kg/dayと判断された。

2. 生殖発生毒性

性周期、交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。交尾しなかった動物の病理学検査では生殖器系に特異的な変化は認められなかった。分娩時観察では妊娠動物の全例が正常に分娩し、妊娠期間にも被験物質投与の明らかな影響は認められなかった。1000 mg/kg群で雌雄の新生児の哺育0および4日の体重が低値を示し、哺育4日の生児数および生存率が低値を示したことから、被験物質投与による出生前後の新生児の発育抑制および生存性に対する影響が示唆された。なお、1000 mg/kg群で全児死亡動物が1例観察されたが、病理学検査の結果からは母動物には被験物質投与の影響と考えられる所見は認められなかった。しかし、前述のごとく新生児の哺育4日の生存率が明らかな低値を示していることから、新生児に対する本被験物質の影響に起因したものと考えられた。その他、出産率、出生率に被験物質投与の影響は認められず、新生児の外表面にも被験物質投与の影響は認められなかった。また、死亡児の剖検で1000 mg/kg群に認められた右鎖骨下動脈起始異常{Crj:CD(SD)胎児の背景値⁸⁾ [12施設分:施設間の変動(施設内変動)] :0.03~0.63%(0~4.55%)}は3例中2例が同腹児の発現であり、被験物質投与との関連は明らかではなかった。哺育4日の剖検では雌の1000 mg/kg群で肝臓の白色斑点の発生率が増加を示したが、母動物2例から各2例の発現であり、雄ではこの所見は対照群でも認められ、発生率の増加も認められないことから被験物質投与の影響とは考えなかった。

以上のことから、2,4,6-トリプロモフェノールの雌雄の生殖に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与でも認められず、無影響量は1000 mg/kg/dayと判断された。

児動物の発生・発育に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与で発育抑制が認められ、哺育4日生児数および生存率が低値を示したことから無影響量は300 mg/kg/dayと判断された。

文献

- 1) S. Gad and C. S. Weil, "Statistics and Experimental Design For Toxicologists," Telford Press, New Jersey, 1986, pp. 43-45.
- 2) 佐野正樹, 岡山佳弘, 医薬安全性研究会会報, 32, 21(1990).
- 3) M, Yoshida, J. Japanese Soc. Comp. Statist., 1, 111(1988).
- 4) 佐久間昭, "薬効評価-計画と解析-I," 東京大学出版会, 東京, 1977, pp. 109-117.
- 5) 石居進, "生物統計学入門," 培風館, 東京, 1975, pp. 78-107.
- 6) 高橋道人監訳, "毒性病理学の基礎," ソフトサイエンス社, 東京, 1992, pp. 59-152.

- 7) C. Gopinath, D. E. Prentice and D. J. Lewis, "Atlas of Experimental Toxicological Pathology," MTP Press Limited, Lancaster, 1987, pp. 77-90.
- 8) T. Nakatsuka et al., *Cong. Anom.*, **37**, 47-138 (1997).

連絡先

試験責任者：田中亮太
試験担当者：山田るみ，大庭耕輔，伊賀達也，
三上真一
(財)食品農医薬品安全性評価センター
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜
582-2
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Ryota Tanaka (Study director)
Rumi Yamada, Kousuke Oba,
Tatsuya Iga, Shinichi Mikami
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shioshinden, Arahama, Fukude-cho, Iwata-
gun, Shizuoka, 437-1213, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Hematology and coagulation of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
HCT(%)	44.1 ± 1.6	44.6 ± 1.1	44.1 ± 1.9	43.6 ± 1.9
HGB(g/dL)	15.3 ± 0.4	15.5 ± 0.4	15.3 ± 0.6	15.1 ± 0.7
RBC($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8.23 ± 0.34	8.35 ± 0.19	8.23 ± 0.30	8.16 ± 0.48
MVC(μm^2)	53.7 ± 1.5	53.4 ± 1.2	53.7 ± 1.6	53.5 ± 1.6
MCH(pg)	18.6 ± 0.6	18.6 ± 0.5	18.6 ± 0.6	18.5 ± 0.7
MCHC(%)	34.6 ± 0.6	34.8 ± 0.6	34.7 ± 0.3	34.5 ± 0.5
PLT($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1090 ± 115	1100 ± 111	1024 ± 116	1093 ± 124
WBC($\times 10^3/\text{mm}^3$)	9.3 ± 3.0	9.7 ± 3.8	9.5 ± 3.2	8.6 ± 2.2
Differential leukocyte counts(%)				
NEUT	15 ± 4	16 ± 6	16 ± 5	18 ± 6
LYMPH	80 ± 4	80 ± 7	80 ± 5	78 ± 7
MONO	3 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 1
EOSN	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1
PT(sec.)	14.2 ± 0.7	14.6 ± 0.5	15.0 ± 1.1	15.6 ± 1.2**
APTT(sec.)	24.8 ± 1.9	24.5 ± 2.0	25.3 ± 2.0	26.7 ± 2.6
Fibrinogen(mg/dL)	222 ± 16	208 ± 13	214 ± 19	240 ± 35

NEUT:Neutrophil LYMPH:Lymphocyte MONO:Monocyte EOSN:Eosinophil BASO:Basophil
 LUC:Large unstained cells
 Values are expressed as Mean±S.D.
 Significant difference from control group; **:P<0.01

Table 2 Blood chemistry chemical examination of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
T. protein(g/dL)	5.87 ± 0.22	5.84 ± 0.14	5.95 ± 0.26	6.45 ± 0.51**
Albumin(g/dL)	3.36 ± 0.13	3.33 ± 0.09	3.39 ± 0.19	3.88 ± 0.29**
A/G	1.34 ± 0.06	1.33 ± 0.09	1.33 ± 0.10	1.51 ± 0.08**
Glucose(mg/dL)	152 ± 25	157 ± 21	157 ± 18	149 ± 14
Triglyceride(mg/dL)	49.4 ± 17.9	47.7 ± 14.6	55.6 ± 28.8	62.0 ± 33.7
T. cholesterol(mg/dL)	61 ± 14	60 ± 14	54 ± 15	57 ± 14
BUN(mg/dL)	13.3 ± 1.4	13.6 ± 2.1	13.2 ± 2.3	20.9 ± 11.4
Creatinine(mg/dL)	0.27 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.33 ± 0.07*	0.47 ± 0.26**
T. bilirubin(mg/dL)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01**
GOT(U/L)	77 ± 10	77 ± 13	72 ± 7	71 ± 8
GPT(U/L)	32 ± 5	34 ± 7	29 ± 4	38 ± 7
ALP(U/L)	354 ± 74	440 ± 162	342 ± 102	514 ± 155*
γ -GTP(U/L)	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2
Sodium(mmol/L)	141.3 ± 1.2	141.5 ± 0.8	141.5 ± 0.7	141.9 ± 1.3
Potassium(mmol/L)	4.46 ± 0.29	4.40 ± 0.25	4.38 ± 0.30	4.03 ± 0.25**
Chloride(mmol/L)	106.6 ± 1.2	107.6 ± 1.1	107.8 ± 1.5	119.0 ± 3.6**
Calcium(mg/dL)	9.58 ± 0.51	9.38 ± 0.23	9.47 ± 0.27	9.88 ± 0.34
I. phosphorus(mg/dL)	6.31 ± 0.64	5.91 ± 0.52	5.68 ± 0.58	7.28 ± 1.24

Values are expressed as Mean±S.D.
 Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

Table 3 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Male				
No. of animals examined	12	12	12	12
Body weight (g)	492 ± 34	478 ± 31	478 ± 36	422 ± 25
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.25 ± 0.08	2.22 ± 0.08	2.25 ± 0.08	2.20 ± 0.06
Thymus (mg)	299 ± 81	269 ± 52	269 ± 66	201 ± 57**
Liver (g)	13.99 ± 1.72	13.18 ± 1.31	14.20 ± 1.99	16.23 ± 2.32*
Spleen (g)	0.73 ± 0.14	0.69 ± 0.09	0.73 ± 0.09	0.63 ± 0.10
Kidneys (g)	3.34 ± 0.36	3.15 ± 0.17	3.23 ± 0.31	3.47 ± 0.37
Adrenals (mg)	60 ± 7	56 ± 6	64 ± 7	64 ± 6
Testes (g)	3.55 ± 0.32	3.50 ± 0.25	3.47 ± 0.32	3.35 ± 0.25
Epididymides (mg)	1319 ± 75	1220 ± 124	1341 ± 109	1235 ± 111
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.460 ± 0.042	0.465 ± 0.033	0.473 ± 0.041	0.522 ± 0.032**
Thymus (mg%)	60.382 ± 14.897	56.587 ± 12.134	56.483 ± 13.955	47.291 ± 12.204
Liver (g%)	2.834 ± 0.218	2.751 ± 0.152	2.964 ± 0.285	3.837 ± 0.447**
Spleen (g%)	0.149 ± 0.023	0.144 ± 0.016	0.152 ± 0.016	0.149 ± 0.020
Kidneys (g%)	0.678 ± 0.054	0.661 ± 0.053	0.679 ± 0.083	0.824 ± 0.101**
Adrenals (mg%)	12.257 ± 1.299	11.807 ± 1.277	13.494 ± 1.966	15.304 ± 1.697**
Testes (g%)	0.721 ± 0.062	0.733 ± 0.067	0.729 ± 0.080	0.794 ± 0.046*
Epididymides (mg%)	268.582 ± 16.867	256.085 ± 31.810	281.498 ± 26.289	292.996 ± 27.221
Female				
No. of animals examined	11	12	12	11
Body weight (g)	332 ± 16	317 ± 27	333 ± 22	307 ± 15
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.03 ± 0.06	2.07 ± 0.10	2.00 ± 0.10	2.04 ± 0.05
Thymus (mg)	157 ± 46	134 ± 48	168 ± 75	137 ± 32
Liver (g)	13.70 ± 0.80	13.48 ± 2.07	14.39 ± 1.76	15.74 ± 1.28**
Spleen (g)	0.60 ± 0.09	0.64 ± 0.10	0.61 ± 0.13	0.57 ± 0.09
Kidneys (g)	2.15 ± 0.20	2.18 ± 0.11	2.22 ± 0.19	2.36 ± 0.25
Adrenals (mg)	77 ± 7	82 ± 11	87 ± 15	84 ± 8
Ovaries (mg)	108 ± 30	111 ± 15	98 ± 11	94 ± 12
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.613 ± 0.034	0.657 ± 0.067	0.602 ± 0.038	0.665 ± 0.025*
Thymus (mg%)	47.175 ± 13.289	41.733 ± 13.767	49.633 ± 20.449	44.365 ± 9.118
Liver (g%)	4.138 ± 0.287	4.230 ± 0.396	4.312 ± 0.393	5.117 ± 0.265**
Spleen (g%)	0.181 ± 0.029	0.201 ± 0.026	0.183 ± 0.031	0.185 ± 0.029
Kidneys (g%)	0.649 ± 0.072	0.694 ± 0.078	0.666 ± 0.047	0.772 ± 0.094**
Adrenals (mg%)	23.171 ± 1.572	25.991 ± 3.418	25.988 ± 4.091	27.315 ± 3.415**
Ovaries (mg%)	32.738 ± 9.135	35.252 ± 6.883	29.454 ± 3.137	30.501 ± 4.301

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: P < 0.05 ** : P < 0.01

Table 4 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 2, 4, 6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Male animals				Female animals			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals necrosied	11	12	20	12	11	12	12	11
Organ Findings								
CARDIOVASCULAR SYSTEM								
heart								
cellular infiltration, lymphocyte	2	-	-	1	0	-	-	0
fibrosis	1	-	-	0	0	-	-	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
spleen								
deposit, pigment	11	-	-	12	11	-	-	11
hematopoiesis, extramedullary	0	-	-	0	3	-	-	3
thymus								
hemorrhage	2	4	4	4	0	-	-	1
atrophy	0	0	0	3	0	-	-	0
deposit, pigment	0	0	0	0	0	-	-	1
RESPIRATORY SYSTEM								
lung								
hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	1(1)
cellular infiltration	-	-	-	-	-	-	-	1(1)
DIGESTIVE SYSTEM								
liver								
cytological alteration	0	1	0	0	0	0	0	0
deposit, pigment	1	0	0	0	0	0	0	0
fatty change	6	5	3	0**	2	1	0	0
hypertrophy, hepatocyte	0	0	0	12**	0	0	0	0
necrosis, focal	0	0	0	1	0	3	0	2
accumulation of macrophage	0	0	0	1	0	0	0	2
cellular infiltration, lymphocyte	1	2	3	2	0	0	0	0
microgranuloma	5	4	4	3	0	0	1	0
hematopoiesis, extramedullary	0	0	0	0	3	2	2	3
peritoneum								
fat granuloma	-	-	-	1(1)	-	-	-	-
URINARY SYSTEM								
kidney								
basophilic tubules	8	9	9	12	2	-	-	3
case, hyaline	1	1	0	8**	1	-	-	0
dilatation, tubules	0	0	0	7**	0	-	-	0
eosinophilic body	5	11*	9	7	0	-	-	0
mineralization	1	0	0	1	3	-	-	1
papillary necrosis	0	0	0	5	0	-	-	0
cellular infiltration, lymphocyte	1	1	0	6*	0	-	-	0
inflammatory infiltration	0	1	0	0	0	-	-	0
=lipoma	0	1	0	0	0	-	-	0

=:benign #:malignant

():No. of animals examined microscopically at this site. -:Not applicable.

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

Table 4 (continued)

Dose level (mg/kg)	Male animals				Female animals			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals necrosied	11	12	20	12	11	12	12	11
Organ Findings								
REPRODUCTIVE SYSTEM								
testis								
atrophy, seminiferous tubule	0	-	-	1	-	-	-	-
cellular infiltration	1	-	-	0	-	-	-	-
epididymis								
cellular infiltration, lymphocyte	1	-	-	1	-	-	-	-
ovary								
deosit, pigment	-	-	-	-	1	-	-	1
mineralization	-	-	-	-	0	-	-	1
ENDCRINE SYSTEM								
adrenal gland								
angiectasis	1	-	-	1	1	-	-	0
accumulation of foamy cells	0	-	-	0	0	-	-	1
degeneration, vacuolar	4	-	-	3	0	-	-	0
NERVOUS SYSTEM								
brain								
dilatation, ventricle	0	-	-	0	1	-	-	0
INTEGUMENTARY SYSTEM								
skin								
hair follicle atrophy	-	-	-	-	1 (1)	-	-	1 (1)
subcutaneous tissue								
abscessy	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-

=:benign #:malignant

():No. of animals examined microscopically at this site. -:Not applicable.

Table 5 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 2, 4, 6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Male animals												Female animals																							
	0			100			300			1000			0			100			300			1000														
No. of animals necropsied	11			12			12			12			11			12			12			11														
Organ Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3								
CARDIOVASCULAR SYSTEM																																				
heart																																				
cellular infiltration, lymphocyte	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
fibrosis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
HEMATOPOIETIC SYSTEM																																				
spleen																																				
deposit, pigment	-	11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	1	0	-	11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	0	0				
hematopoiesis, extramedullary	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0				
thymus																																				
hemorrhage	-	2	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0				
atrophy	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
deposit, pigment	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
RESPIRATORY SYSTEM																																				
lung																																				
hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
cellular infiltration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
DEGESTIVE SYSTEM																																				
liver																																				
cytological alteration	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
deposit, pigment	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
fatty change	-	5	1	0	-	5	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	0	1	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
hypertrophy, hepatocyte	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	12	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
necrosis, focal	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0
accumulation of macrophage	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0
cellular infiltration, lymphocyte	-	1	0	0	-	2	0	0	-	3	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
microgranuloma	-	5	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
hematopoiesis, extramedullary	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	3	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0
peritoneum																																				
fat granuloma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
URINARY SYSTEM																																				
kidney																																				
basophilic tubules	-	8	0	0	-	9	0	0	-	8	1	0	-	8	4	0**	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0				
cast, hyaline	-	0	1	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	7	1	0**	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
dilatation, tubules	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	6	1	0**	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
eosinophilic body	-	4	1	0	-	11	0	0*	-	6	3	0	-	6	1	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
mineralization	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
parillary necrosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	3	2	0**	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
cellular infiltration, lymphocyte	-	1	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	6	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
inflammatory infiltration	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
= lipoma	0	-	-	-	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-				

1:slight 2:moderate 3:marked
 =:benign #:malignant
 ():No. of animals examined microscopically at this site. -:Not applicable
 Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01