

表 3-2 S9 mix 存在下におけるビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の  
 復帰変異試験結果[本試験2回目-代謝活性化法]

用 量 [ $\mu$ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照 [局方精製水]	101	12	21	24	11
	92	9	24	23	9
	107	7	25	37	10
	(100 $\pm$ 8)	(9 $\pm$ 3)	(23 $\pm$ 2)	(28 $\pm$ 8)	(10 $\pm$ 1)
156	107	8	22	13	17
	94	6	15	23	11
	101	9	26	26	17
	(101 $\pm$ 7)	(8 $\pm$ 2)	(21 $\pm$ 6)	(21 $\pm$ 7)	(15 $\pm$ 3)
313	110	7	18	31	13
	107	9	25	35	12
	110	14	17	22	11
	(109 $\pm$ 2)	(10 $\pm$ 4)	(20 $\pm$ 4)	(29 $\pm$ 7)	(12 $\pm$ 1)
625	114	7	31	31	11
	116	11	21	21	20
	106	11	23	32	11
	(112 $\pm$ 5)	(10 $\pm$ 2)	(25 $\pm$ 5)	(28 $\pm$ 6)	(14 $\pm$ 5)
1250	113	6	21	32	5
	99	10	29	25	11
	110	8	22	28	9
	(107 $\pm$ 7)	(8 $\pm$ 2)	(24 $\pm$ 4)	(28 $\pm$ 4)	(8 $\pm$ 3)
2500 #	104	11	21	29	7
	101	12	18	26	11
	112	6	24	30	13
	(106 $\pm$ 6)	(10 $\pm$ 3)	(21 $\pm$ 3)	(28 $\pm$ 2)	(10 $\pm$ 3)
5000 #	98	8	21	21	9
	99	11	15	26	6
	105	8	28	21	5
	(101 $\pm$ 4)	(9 $\pm$ 2)	(21 $\pm$ 7)	(23 $\pm$ 3)	(7 $\pm$ 2)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu$ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異 コロニー数 /プレート	557	251	530	249	45
	436	234	559	270	98
	536	225	594	229	116
	(510 $\pm$ 65)	(237 $\pm$ 13)	(561 $\pm$ 32)	(249 $\pm$ 21)	(86 $\pm$ 37)

# : 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

## 要 約

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU）を用いて *In vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、46.88～3000  $\mu$ g/mL の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、短時間処理法の S9 mix 非存在下では、93.75～750  $\mu$ g/mL 用量で、S9 mix 存在下では 187.5～750  $\mu$ g/mL 用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。連続処理法 24 時間処理では、93.75  $\mu$ g/mL 以上の用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。

したがって、染色体異常試験における用量は、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では 12.5、25、50、75 および 100  $\mu$ g/mL、S9 mix 存在下では 25、50、100、150 および 200  $\mu$ g/mL、連続処理法の場合は、6.25、25、50 および 100  $\mu$ g/mL とした。

試験の結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下ともに染色体異常細胞の増加は認められなかった。また、連続処理法 24 時間においても染色体異常細胞の増加は認められなかった。なお、短時間処理法 S9 mix 非存在下の 75  $\mu$ g/mL 以上、S9 mix 存在下の 150  $\mu$ g/mL 以上、連続処理法 24 時間の 100  $\mu$ g/mL では、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

報告書ピアレビューにおいて、短時間処理法 S9 mix 存在下の 100～150  $\mu$ g/mL 間、連続処理法 24 時間の 50～100  $\mu$ g/mL 間で毒性が出ないで細胞が数えられる可能性が考えられるため、確認試験の実施を求められた。そこで、短時間処理法 S9 mix 存在下では 100、125 および 150  $\mu$ g/mL、連続処理法 24 時間では 50、60、75 および 100  $\mu$ g/mL を設定し、確認試験を行った。

その結果、短時間処理法 S9 mix 存在下および連続処理法 24 時間ともに染色体異常細胞の増加は認められなかった。なお、短時間処理法 S9 mix 存在下の 150  $\mu$ g/mL、連続処理法 24 時間の 60  $\mu$ g/mL 以上では、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

## 試験目的

この試験は、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするために実施した。

## 材料および方法<sup>1, 2)</sup>

### 1. 被験物質

名 称 : ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

(英名 : 4,4'-isopropylidenediphenol propoxylated)

CAS 番号 : 37353-75-6

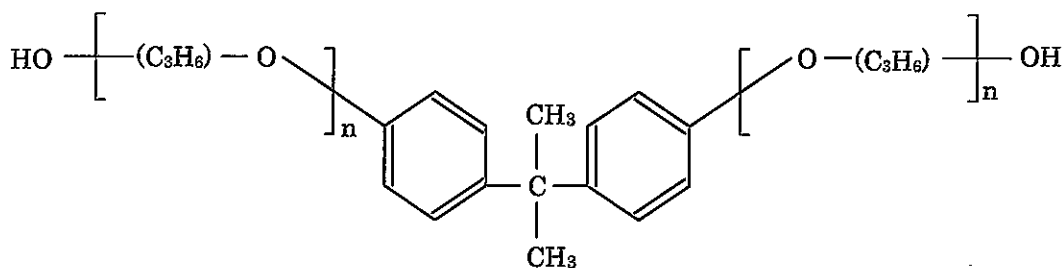
ロット番号 : L3-6S005-A

純 度 : 99%以上 (水分 : 0.03%)

付加モル分布 : 1 モル : 0.0%、2 モル : 5.7%、3 モル : 11.4%、4 モル : 22.1%、  
5 モル : 24.9%、6 モル : 18.1%、7 モル : 10.2%、8 モル以上 :  
7.6% (分析日 : 平成 18 年 10 月 19 日)

示 性 式 :  $(C_3H_6O)_n(C_3H_6O)_nC_{15}H_{16}O_2$

構 造 式 :



入 手 先 : 三洋化成工業株式会社 (京都府京都市東山区一橋野本町 11-1)

入手日・量 : 平成 19 年 3 月 14 日・25g

物 性 等 :

化学名 : ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

分子量 : 502 (付加モル数 5 モルと仮定した場合)

性状(常温) : 無色透明液体

酸価 : 0.001 mgKOH/g

たりの組成は、次のとおりである。

[S9 製造法]

A. 使用動物

- a) 種・系統： Sprague-Dawley 系ラット（日本エスエルシー株式会社）
- b) 性・週齢： 雄・7週齢
- c) 体 重： 213~247 g

B. 誘導法

- a) 誘導物質： phenobarbital (PB)、5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路： 腹腔内投与
- c) 投与法（投与開始日起算）

1日目：PB 30 mg/kg、 2日目：PB 60 mg/kg

3日目：PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg、 4日目：PB 60 mg/kg

C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離(9000×g)し、その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

S9	0.3 mL
MgCl <sub>2</sub>	5 μmol/0.1 mL
KCl	33 μmol/0.1 mL
G-6-P	5 μmol/0.1 mL
NADP	4 μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4 μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1 mL

8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な用量を検討するため、46.88、93.75、187.5、375、750、1500 および 3000 μg/mL（溶媒に溶解可能な上限量）の用量を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行った。なお、試験には各用量について2枚のシャーレを使用した。

1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製し、次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。被験物質の添加量は、各シャーレの培養液量の 0.5 vol% とした。

2) 細胞の処理

短時間処理法の場合、直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に  $4 \times 10^5$  個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え、培養開始 3

日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO (陰性対照) または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。また、S9 mix 存在下の場合は各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除き、S9 mix 0.5 mL を加えた後、DMSO または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加えて 18 時間培養した。一方、連続処理法の場合は短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し、培養開始 3 日後に DMSO または被験物質の供試液各 0.025 mL をシャーレに加えて 24 時間および 48 時間培養した。なお、短時間処理法および連続処理法ともに 375  $\mu$ g/mL 以上の用量ではその供試液を培養液に添加すると直ちに油滴様の被験物質の析出が認められ、特に 1500  $\mu$ g/mL 以上では油滴様の大きな固まりとなって培養終了時まで残存した。

培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10 vol% ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後、水洗し、0.1 w/v% クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後、室温で一晩自然乾燥した。

### 3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は、染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計 (モノセレーター II、MI-60、オリンパス光学工業株式会社) を用いて測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100% とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果は下表に示したとおり、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では、93.75~750  $\mu$ g/mL 用量で、S9 mix 存在下では 187.5~750  $\mu$ g/mL 用量で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められた。連続処理法の場合は、24 時間処理では 93.75  $\mu$ g/mL 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50% 細胞増殖抑制用量は 46.88~93.75  $\mu$ g/mL 用量域にあるものと判断され、48 時間処理では 46.88  $\mu$ g/mL 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50% 細胞増殖抑制用量は 46.88  $\mu$ g/mL 以下の用量域にあるものと判断された。

なお、短時間処理法における 1500  $\mu$ g/mL 以上の用量では、細胞増殖率の上昇が認められた。これは、1500  $\mu$ g/mL 以上の用量では析出した油滴様の被験物質が大きな固まりとなって培養終了時まで培養液表面に浮遊して認められたこ

とから、培養液中に溶解あるいは分散している被験物質濃度は、それ以下の用量と比べてむしろ低下しているものと推察され、これが細胞増殖率の上昇をもたらしたものと考えられる。このような現象は、水に難溶なため培養液中で析出がみられる化学物質においてしばしば認められている<sup>3,4,5,6)</sup>。

[短時間処理法]

用 量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[ 100.0 ]	100	100	[ 100.0 ]
46.88	89	95	[ 92.0 ]	95	102	[ 98.5 ]
93.75	47	40	[ 43.5 ]	88	92	[ 90.0 ]
187.5	17	19	[ 18.0 ]	16	16	[ 16.0 ]
375	17	18	[ 17.5 ]	20	21	[ 20.5 ]
750	14	16	[ 15.0 ]	15	14	[ 14.5 ]
1500	51	52	[ 51.5 ]	80	81	[ 80.5 ]
3000	49	54	[ 51.5 ]	67	65	[ 66.0 ]

[ ]: 平均値

[連続処理法]

用 量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[ 100.0 ]	100	100	[ 100.0 ]
46.88	55	53	[ 54.0 ]	36	37	[ 36.5 ]
93.75	14	15	[ 14.5 ]	13	12	[ 12.5 ]
187.5	13	8	[ 20.5 ]	13	11	[ 12.0 ]
375	12	10	[ 11.0 ]	15	12	[ 13.5 ]
750	9	15	[ 12.0 ]	14	10	[ 12.0 ]
1500	21	16	[ 18.5 ]	15	14	[ 14.5 ]
3000	28	37	[ 32.5 ]	21	23	[ 22.0 ]

[ ]: 平均値

## 9. 染色体異常試験

### 1) 被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の用量は50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ、3用量以上のデータが得られることを考慮し、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では100 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公比2で50、25および12.5 $\mu\text{g/mL}$ の4用量および細胞増殖抑制試験で46.88~93.75 $\mu\text{g/mL}$ 間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことから、50 $\mu\text{g/mL}$ と100 $\mu\text{g/mL}$ の間量の75 $\mu\text{g/mL}$ を加えた計5用量を、S9 mix 非存在下では200 $\mu\text{g/mL}$ を最高

用量とし、以下公比 2 で 100、50 および 25  $\mu\text{g/mL}$  の 4 用量および細胞増殖抑制試験で 93.75~187.5  $\mu\text{g/mL}$  間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことから、100  $\mu\text{g/mL}$  と 200  $\mu\text{g/mL}$  の中間量の 150  $\mu\text{g/mL}$  を加えた計 5 用量を、また、連続処理法 24 時間処理では、最高用量を 100  $\mu\text{g/mL}$  とし、以下公比 2 で 50、25、12.5 および 6.25  $\mu\text{g/mL}$  の計 5 用量を設定した。陽性対照物質の MNNG は 2.5  $\mu\text{g/mL}$ 、B[a]P は 10  $\mu\text{g/mL}$  の用量を用いた。

## 2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈し、所定用量の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は 0.5 mg/mL、B[a]P は 2.0 mg/mL の供試液を調製した。

## 3) 細胞の処理

4×10<sup>8</sup> 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に加え、3 日間培養後、下記の方法で処理した。培養には 1 用量当たり 4 枚のシャーレを用い、そのうち 2 枚は染色体標本作製用に、残りの 2 枚は細胞増殖率測定用に使用した。但し、陽性対照群については細胞増殖率の測定は行わず、用いるシャーレは染色体標本作製用の 2 枚とした。

短時間処理法の S9 mix 非存在下の場合は、各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。また、S9 mix 存在下の場合は、各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除いた後、S9 mix 0.5 mL を加え、続いて DMSO、被験物質供試液および B[a]P の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。S9 mix 非存在および存在下のいずれの場合も、培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。

連続処理法の場合は、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.025 mL ずつ加え、24 時間培養した。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

[短時間処理法：S9 mix 非存在下]

用量( $\mu$ g/mL)	使用シャーレ数	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0 (陰性対照) <sup>a</sup>	4	4
12.5	4	--
25	4	4
50	4	4
75	4	--
100	4	4
150	--	4
200	--	4
2.5 (陽性対照) <sup>b</sup>	2	--
10 (陽性対照) <sup>c</sup>	--	2

a : DMSO、b : MNNG、c : B[a]P、使用シャーレ数 : 52

[連続処理法]

用量( $\mu$ g/mL)	使用シャーレ数
	24 時間処理
0 (陰性対照) <sup>a</sup>	4
6.25	4
12.5	4
25	4
50	4
100	4
2.5 (陽性対照) <sup>b</sup>	2

a : DMSO、b : MNNG、使用シャーレ数 : 26

5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

標本作製の2時間前に、培養中の各シャーレにコルセミド(Gibco Laboratories、ロット番号 1335046)を最終濃度として0.2 $\mu$ g/mLとなるように添加した。培養終了後、培養液を取り除き、0.2 w/v%トリプシン水溶液2 mLで処理して細胞をシャーレから剥離し、新鮮培養液5 mLを入れた遠沈管に移し、1000 rpm、5分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の75 mM塩化カリウム水溶液4 mLを加えて懸濁し、37°Cで15分間低張処理した。低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液(v/v)1 mLを添加して固定した。1000 rpmで5分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液4 mLで懸濁・固定した。この操作を3回繰り返した後、少量の固定液で適切な密度に細胞を懸濁し、スライドガラスの2ヶ所に1滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、S $\phi$ rensen 緩衝液(pH6.8、株式会社ヤトロン、ロット番号 1478)を用



いて希釈した 1.4 vol%ギムザ液で約 15 分間染色した。水洗後、室温で乾燥して染色体標本とした。標本は、1 シャーレ当たり 3 枚作製した。

細胞増殖率の測定は、培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10 vol%ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後水洗し、0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色し、水洗後乾燥した。単層培養細胞密度計（モノセレーターⅡ、MI-60、オリンパス光学工業株式会社）を用いて陰性（溶媒）対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

#### 6) 染色体の観察

染色体の観察は 60 倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率 600 倍で鏡検した。観察は標本をすべてコード化し、盲検法で行った。各用量とも、染色体が明瞭に識別でき、染色体の数が  $25 \pm 2$  本の分裂中期像について、1 シャーレ当たり 100 個、すなわち、1 用量当たり 2 枚のシャーレの合計 200 個について観察した。

#### 7) 染色体異常の分類および集計<sup>7)</sup>

染色体異常の分類は、構造異常については、染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換（二動原体、環状染色体など）およびその他（断片化など）とした。数的異常については、倍数性細胞（倍数体）のみを記録した。

ギャップ（染色分体型および染色体型）については、異常として記録したが、構造異常には含めなかった。ギャップは、染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は、観察した細胞 200 個中に認められた異常細胞数を表示した。

#### 8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料  $\chi^2$  検定を行って、有意差（有意水準 5%以下）が認められた場合は、Fisher の直接確率法を用いて陰性対照群と各用量群との間の有意差検定（有意水準は多重性を考慮して、5%または 1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、陰性対照群と比較して、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻

度が2用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められた場合、染色体異常誘発性は陽性と判定した。

## 結 果

### 1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表 1-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 0~1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 98.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数体の出現頻度は、陰性対照群で 0.5%の低値で認められた。被験物質群および陽性対照群では倍数体は認められなかった。

なお、75 および 100  $\mu$ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

### 2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表 1-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞は、陰性対照群では認められなかった。被験物質群では 0.5 または 1.5%の出現頻度で認められたが、陰性対照群との間に有意差はなかった。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 73.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、25  $\mu$ g/mL でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、150 および 200  $\mu$ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

### 3. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）－確認試験

報告書ピアレビューにおいて、短時間処理法 S9 mix 存在下では、細胞増殖率が 100  $\mu$ g/mL で 87.5%、150  $\mu$ g/mL で 36.5%と、この間に 50%以上の開きがあるため、この用量間で毒性が出ないで染色体異常を示す用量がある可能性が考えられるため、確認試験を実施する必要があるとの指摘を受けた。この指摘に従い、100、125 および 150  $\mu$ g/mL 用量を設定し、確認試験を行った。

結果は表 1-3 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 0.5%と低値であった。被験物質群では 0.5%の出現頻度であり、陰性対照群との間に差は認められなかった。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 42.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、100  $\mu$ g/mL でのみ 1.0%の低い出現頻度で認められた。

なお、150  $\mu$ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

#### 4. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

結果は表 2-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 0~1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 96.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、12.5  $\mu$ g/mL でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、100  $\mu$ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

#### 5. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）－確認試験

報告書ピアレビューにおいて、連続処理法 24 時間処理では、細胞増殖率が 50  $\mu$ g/mL で 54.0%、100  $\mu$ g/mL で 11.5%であり、この用量間で毒性が出ないで細胞が数えられる可能性があるため、確認試験を実施する必要があるとの指摘を受けた。この指摘に従い、50、60、75 および 100  $\mu$ g/mL 用量を設定し、確認試験を行った。

結果は表 2-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 50  $\mu$ g/mL で 1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 94.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群で 0.5%の低値で認められた。被験物質群では、50  $\mu$ g/mL で 0.5%の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では認められなかった。

なお、60  $\mu$ g/mL 以上では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

## 結 論

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）について染色体異常誘発性の有無を調べるため、CHL/IU 細胞を用いた *In vitro* における染色体異常試験を実施した。その結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下並びに連続処理法 24 時間のいずれの方法においても染色体異常誘発作用は認められなかった。

したがって、本実験条件下では、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。本試験結果は、CHL/IU 細胞において染色体異常を有する細胞の出現頻度が 5%未満を陰性とする生物学的判断基準<sup>8)</sup>からみても陰性と判断されるものであった。

ビスフェノール A の変異原性については、*S. typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 または *E. coli* WP2uvrA を用いた復帰突然変異試験<sup>9,10,11)</sup>で陰性との報告がある。また、CHO 細胞を用いた染色体異常試験で陽性<sup>12)</sup>および陰性<sup>13)</sup>、V-79 細胞を用いた細胞遺伝子突然変異試験で陰性<sup>9)</sup>との報告がある。

## 参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.
- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). "Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, 66, 277-290.
- 3) 佐々木澄志, 日下部博一, 若栗 忍, 中川ゆづき, 大嶋節子, 橋本恵子 (1998), ジイソプロピルベンゼンのチャイニーズハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験, 化学物質毒性試験報告, 6, 614-617.

表 1-1 ビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

検体の用量 ( $\mu$ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)						キヤップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	0	0	0	0	1	1		100	1	0	1
0	100	0	1	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	2	1		200	1	0	1
		( 0.5 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0.5 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
12.5	100	0	0	0	0	0	0	0	101.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
			( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )		( 0 )		( 0 )	( 0 )
25	100	1	0	0	1	0	2	0	98.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
	200	1	0	0	1	0	2	1		200	0	0	0
			( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 1.0 )		( 0.5 )		( 0 )	( 0 )
50	100	1	0	0	0	0	1	1	88.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	1	0	0	0	0	1	1		200	0	0	0
			( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )		( 0.5 )		( 0 )	( 0 )
75 #	--	--	--	--	--	--	--	--	49.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
			( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )		( -- )		( -- )	( -- )
100 #	--	--	--	--	--	--	--	--	18.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
			( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )		( -- )		( -- )	( -- )
陽性対照	100	36	96	3	0	0	98	1		100	0	0	0
2.5	100	38	97	1	0	0	98	0	--	100	0	0	0
	200	74	193	4	0	0	196	1		200	0	0	0
		( 37.0 )	( 96.5 )	( 2.0 )	( 0 )	( 0 )	( 98.0 )**	( 0.5 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )

陰性対照:ジメチルスルホキシド。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine。

\*\*: $p < 0.01$ 。

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 1-2 ビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

検体の用量 ( $\mu$ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							キヤップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0	
		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )
25	100	1	0	0	0	0	1	0	98.0	100	1	0	1	
	100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0	
	200	1	0	0	0	0	1	1		200	1	0	1	
		( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0.5 )		( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )		
50	100	0	1	0	0	0	1	0	93.0	100	0	0	0	
	100	0	2	0	0	0	2	0		100	0	0	0	
	200	0	3	0	0	0	3	0		200	0	0	0	
		( 0 )	( 1.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.5 )	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )		
100	100	0	1	0	0	0	1	0	87.5	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0	
		( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )		
150 #	--	--	--	--	--	--	--	--	36.5	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )		( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	
200 #	--	--	--	--	--	--	--	--	12.5	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )		( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	
陽性対照	100	14	71	0	1	0	75	0		100	0	0	0	
10	100	11	70	0	0	0	71	1	---	100	0	0	0	
	200	25	141	0	1	0	146	1		200	0	0	0	
		( 12.5 )	( 70.5 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 73.0 )**	( 0.5 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

\*\*: $p < 0.01$ .

#:細胞毒性のため,観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 1-3 ビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)-確認試験

検体の用量 ( $\mu$ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							キヤップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常細胞数	出現数(%)	増殖率(%)	観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0	
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0	
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	0	0	0	
		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )
100	100	0	0	0	0	0	0	0	88.0	100	1	0	1	
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	1	0	1	
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	2	0	2	
		( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )		( 0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )
125	100	0	1	0	0	0	1	0	76.5	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0	
		( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )
150 #	--	--	--	--	--	--	--	--	44.5	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )		( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )
陽性対照	100	9	46	0	1	0	47	0		100	0	0	0	
10	100	12	36	0	0	0	37	0	--	100	0	0	0	
	200	21	82	0	1	0	84	0		200	0	0	0	
		( 10.5 )	( 41.0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 42.0 )**	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

\*\*: $p < 0.01$ .

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 2-1 ビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)

検体の用量 ( $\mu$ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他			総異常 細胞数	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
0	100	0	1	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	2	0		200	0	0	0
		( 0.5 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
6.25	100	1	0	0	0	0	1	0	90.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0
	200	1	0	0	1	0	2	0		200	0	0	0
		( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	
12.5	100	0	0	0	0	0	0	1	83.5	100	1	0	1
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	1		200	1	0	1
		( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0.5 )		( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )	
25	100	0	0	0	0	0	0	0	72.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	
50	100	0	0	0	0	0	0	0	54.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	
100 #	--	--	--	--	--	--	--	--	11.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )		( -- )	( -- )	( -- )	
陽性対照	100	34	91	1	0	0	95	0		100	0	0	0
2.5	100	35	95	0	0	0	97	0	--	100	0	0	0
	200	69	186	1	0	0	192	0		200	0	0	0
		( 34.5 )	( 93.0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 96.0 )**	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

\*\*: $p < 0.01$ .

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。



表 2-2 ビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)-確認試験

検体 の用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	染色体構造異常の細胞数(%)						キヤップの細胞 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)					
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他			総異常 細胞数	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	0	2	0	1	0	3	0		100	1	0	1	
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0	
	200	0	2	0	1	0	3	0		200	1	0	1	
		( 0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )	
50	100	1	1	0	0	0	2	0	55.0	100	1	0	1	
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
	200	1	1	0	0	0	2	0		200	1	0	1	
		( 0.5 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )		( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )		
60 #	--	--	--	--	--	--	--	--	43.5	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )			( -- )	( -- )	( -- )	
75 #	--	--	--	--	--	--	--	--	17.5	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )			( -- )	( -- )	( -- )	
100 #	--	--	--	--	--	--	--	--	19.5	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )	( -- )			( -- )	( -- )	( -- )	
陽性対照	100	46	93	2	0	0	96	0		100	0	0	0	
2.5	100	40	89	0	0	0	93	0	--	100	0	0	0	
	200	86	182	2	0	0	189	0		200	0	0	0	
		( 44.0 )	( 91.0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 0 )	( 94.5 )**	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )		

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

\*\*: $p < 0.01$ .

#:細胞毒性のため, 観察可能な分裂中期像は認められなかった。

## 要 約

ビスフェノール A-PO 付加物 (平均付加モル数 5 モル) の 0 (被験物質の媒体である局方オリブ油のみ投与)、30、120 および 500 mg/kg/day を、1 群雌雄各 12 匹の SD 系ラットに、交配開始 2 週間前から、雄は 42 日間、雌は分娩後哺育 4 日まで経口投与し、その反復投与毒性および生殖発生毒性を調べた。また、雄については対照群および 500 mg/kg 群の各 12 匹からそれぞれ 5 匹を選別し、雌についてはサテライト群として別に 1 群 5 匹の対照群および 500 mg/kg 群を設け、投与終了後 14 日間観察を継続し、毒性の回復性についても検討した。

### 1. 反復投与毒性

500 mg/kg 群で雌雄に消瘦例、さらに雄には眼瞼下垂や自発運動の低下例および投与期間中の体重増加量の低値、妊娠雌には 1 例の死亡が認められた。血液生化学検査では、120 および 500 mg/kg 群で雄に総タンパク濃度の低値、500 mg/kg 群で雄にアルブミン濃度の低値、雌雄に総コレステロール濃度の高値が認められた。器官重量では、500 mg/kg 群で雄に肝臓の絶対および相対重量、雌に相対重量の高値が認められ、剖検においても同群の雌雄に肝臓の大型化が確認された。病理組織学検査では、120 および 500 mg/kg 群で雌雄に小腸における腸絨毛の乳糜管拡張、500 mg/kg 群で雌雄に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。詳細な臨床観察、感覚反射機能検査、握力、自発運動量および摂餌量において、被験物質の投与による影響は認められなかった。

回復群においては、雌に肝臓相対重量の高値、雌雄の全例に乳糜管の拡張が認められるものの、変化の程度は軽減する傾向にあった。

### 2. 生殖発生毒性

500 mg/kg 群の雌で性周期の乱れを呈する個体の発現が増加した。親動物の交尾成立期間、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率、分娩および哺育状態に変化は認められなかった。

児動物に対しては、500 mg/kg 群で新生児体重の低値が認められた。総出産児数、新生児数、性比、出生率、形態および哺育 4 日生存率に、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の親動物への反復投与における無影響量（NOEL）および無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも 120 mg/kg 以上の群で総タンパク濃度の低下および小腸に対する影響が認められたことから、いずれも 30 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL および NOAEL は、500 mg/kg 群で性周期および新生児体重に影響が認められたことから、いずれも 120 mg/kg/day と推定した。

## 目 的

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）をラットに反復経口投与し、本物質の反復投与毒性および生殖発生毒性を検討した。

## 材料および方法

### 1. 被験物質

被験物質であるビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）（CAS No. 37353-75-6）は、水に不溶な無色透明液体で、試験には、三洋化成工業株式会社（京都府京都市東山区一橋野本町 11-1）から提供されたロット番号 L3-6S005-A（純度 99%以上）のものを冷暗所（2～6℃）、密栓下で保管し、使用した。用いた被験物質は投与終了後に分析し、使用期間中安定であったことを確認した（Appendix 1）。本物質の特性は、Appendix 1 に示す。

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）は水のほか油にも溶けにくいですが、食物油にはわずかに溶け、溶解しない高濃度においても均一な懸濁液として調製可能であったことから、投与液はオリーブ油（局方、ロット番号 BH17、宮澤薬品株式会社）を媒体とし、所定の投与用量となる濃度の懸濁液に調製した。調製した投与液は、1 日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷所（2～6℃）遮光下で密栓して保管した。投与液中の被験物質は、冷所遮光下で少なくとも 7 日間は安定であることが確認された（Appendix 2）ので、調製後 7 日以内に使用した。初回に調製された投与液について分析し、所定の濃度で調製されていることを確認した（Appendix 3）。

### 2. 動物および飼育条件

動物は、SD 系 [CrI : CD(SD)]ラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバー株式会社 筑波飼育センター（茨城県石岡市上林 955）から 8 週齢のものを搬入（雄 57 匹、雌 67 匹）し、12 日間試験環境に馴化させた。馴化期間中に検疫および雌については 10 日間の性周期観察も併せて行い、発育および一般健康状態が良好で、雌では性周期に異常の認められなかったものについて、投与開始前日に体重を測定し、体重分布の中央値に近い雄は 48 匹、雌は 58 匹を選び、10 週齢で試験に用いた。1 群の動物数は雌雄各 12 匹とし、雌についてはさらに対照群と最高用量群の回復群として各 5 匹からなる 2 群の

サテライト群を設け、無作為抽出法により群分けを行った。なお、雌の回復群については交配を行わなかった。雄の回復群については、投与 42 日に対照群と最高用量群の中から無作為抽出法によりそれぞれ 5 匹を選別し、回復群とした。投与開始時の平均体重(体重範囲)は、雄 361(329~385)g、雌 228(199~253)g であった。ラットは、温度  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 10\%$ 、換気回数 10 回以上/時(オールフレッシュエアー方式)、照明 12 時間/日(午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)に設定したバリアーシステム動物室(第 2 室)で、個体別にステンレス製金網ケージ [260W×380D×180 H(mm)] に収容し、これをステンレス製 5 段のラックに配置して飼育した。ただし、交尾の成立した雌は、巣作り材料(ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社)を入れたポリカーボネート製ケージ [265W×426D×200H(mm)] に収容し、分娩後は児動物と同居させた。飼料(固型飼料ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社、ロット番号 20070470、20070678)および飲料水(孔径  $1\mu\text{m}$  のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水)は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶(ポリカーボネートケージの場合)により、自由に摂取させた。

動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札の貼付、並びに耳パンチ法により行った。

飼育期間中、動物室の温度は  $22.2 \sim 25.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度は  $45 \sim 58\%$  の範囲で推移(Appendix 4)し、また飼料、巣作り材料および飲料水の汚染物質の分析結果(Appendices 5、6、7)は、いずれも当研究所で設定した許容範囲内にあることが確認された。したがって、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化は、なかったものと判断した。

本試験は、動物実験を科学的観点および倫理的な配慮の下に実施するために遵守すべき事項等を定めた、「財団法人 畜産生物科学安全研究所の動物実験実施規定」に従い、本施設の動物実験委員会の承認を得て行った。

### 3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

本物質の 500、1000 および 2000 mg/kg を雌雄各 1 匹のラットに 3 日間反復経口投与した結果、1000 mg/kg 以上投与の雌雄で体重増加抑制が認められ、さらに 2000 mg/kg 投与の雌雄で腹臥位、自発運動低下および便による下腹部の汚れが認められた。

また、500 mg/kg 以上投与の雌雄で、投与直後に一過性の流涎が認められた。そこで、1 群雌雄各 4 匹のラットに、本被験物質を 0 (局方オリブ油のみ投与)、50、100、200、500 および 1000 mg/kg/day で 14 日間反復経口投与し、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定、血液学および血液生化学検査、剖検並びに器官重量の測定を行った。その結果、100 mg/kg 以上の群で、雄に投与直後の流涎および体重増加の抑制傾向、雌に血清総コレステロールの高値傾向、200 mg/kg 以上の群では、雌においても流涎および血清総コレステロールの高値傾向が認められた。さらに、500 mg/kg 以上の群では、雌雄に肝臓重量の高値、雄に副腎重量の高値、雌に血清総タンパク、アルブミンおよびカルシウムの高値並びに血液プロトロンビン時間の低値が認められた。1000 mg/kg 群では、一般状態の変化、体重増加の明らかな抑制および雄 1 匹、雌 2 匹の死亡が認められた。50 mg/kg 群では、変化は認められなかった。

したがって、本試験における投与量については、500 mg/kg/day を最高用量とし、以下、120 および 30 mg/kg/day の計 3 用量を設定した。

試験群の構成は、①溶媒投与群(以下、対照群)、②被験物質の 30 mg/kg/day 投与群(30 mg/kg 群)、③同 120 mg/kg/day 投与群(120 mg/kg 群)、④同 500 mg/kg/day 投与群(500 mg/kg 群)の 4 群とした。

投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を胃内に投与した。対照群には、媒体として用いた局方オリブ油を同様に投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。投与期間は、雌雄とも交配開始 14 日前から、雄は 42 日間、雌は交配および妊娠期間を経て分娩後の哺育 4 日まで、最短 42 日～最長 53 日間、1 日 1 回、午前中(9:00～11:56)に投与した。ただし、雌の回復群は、雄と同様に 42 日間投与した。

#### 4. 観察および検査

##### 1) 親動物に関する項目

親動物について、次の項目を観察あるいは検査した。なお、感覚反射機能検査、握力、自発運動量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および病理組織学検査については、各群から無作為抽出法により雌雄各 5 匹を選び、検査の対象とした。

## 結 果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 一般状態および死亡 (Tables 1~4, Appendices 10~13)

一般状態の変化について、120 mg/kg 群で雌雄とも 12 匹中 11 匹に投与 4 日以降、500 mg/kg 群で雌のサテライト群を含む雌雄の全例に投与 2 日以降、流涎が認められた。この流涎は、投与直後に口周囲を軽度ないし中等度に濡らす程度の一過性のものであった。また、500 mg/kg 群では、雄の 2 匹に軽度な眼瞼下垂が投与 33 日以降認められ、このうちの 1 匹には投与 41 日以降、中等度の自発運動の低下および消瘦が認められた。さらに、500 mg/kg 群の雌の 1 匹にも軽度の消瘦が投与 40 日以降認められた。120 mg/kg 群の雌の 1 匹に軽度な紅涙が投与 30 日以降に認められたが、500 mg/kg 群では紅涙は認められなかった。回復期間においては、いずれの群にも一般状態の変化は認められなかった。

死亡について、500 mg/kg 群の雌の 1 匹 (動物番号 552) が分娩予定日の妊娠 22 日 (投与開始後 39 日) の朝、分娩出来ずに衰弱し、死亡した。この例の前日までの一般状態には、投与直後の一過性の流涎以外に異常は認められなかった。その他の投与群では、投与期間および回復期間を通じて死亡は認められなかった。

#### 2) 詳細な臨床観察 (Tables 5, 6, Appendices 14, 15)

投与期間中および回復期間中とも、各観察項目に有意な変化は認められなかった。

#### 3) 感覚反射機能検査 (Tables 7, 8, Appendices 16, 17)

投与期間中および回復期間中の検査において、各検査項目に変化は認められなかった。

#### 4) 握力および自発運動量 (Tables 9, 10, Appendices 18, 19)

投与期間中および回復期間中の検査において、握力および自発運動量とも有意な変化は認められなかった。

#### 5) 体重 (Tables 11, 12, Appendices 20, 21)

500 mg/kg 群で雄に投与期間中の体重増加量の有意な低値が認められた。雌では、

被験物質投与各群とも交配前、妊娠期間および哺育期間を通じて体重および体重増加量に有意な変化は認められなかった。

雌のサテライト群では、500 mg/kg 群で回復 14 日の体重および回復期間中の体重増加量に有意な低値が認められた。

#### 6) 摂餌量 (Tables 13, 14, Appendices 22, 23)

投与期間中において、120 mg/kg 群の雌および 500 mg/kg 群の雄で、いずれも投与 14 日の摂餌量のみ、対照群と比べてやや高値で有意差が認められた。回復期間中の摂餌量は、対照群と比べて有意差は認められなかった。

#### 7) 雄の尿検査 (Table 15, Appendix 24)

投与期間中の検査において、各検査項目に有意な変化は認められなかった。

回復期間中の検査では、カリウムの有意な低値が認められた。

#### 8) 血液学検査 (Tables 16, 17, Appendices 25, 26, 背景データ : Appendices 42, 43)

500 mg/kg 群で雄に MCH およびプロトロンビン時間の有意な低値が認められた。

回復期間終了時屠殺動物においては、雄に白血球百分率における好中球の比率の有意な低値および雌に活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な低値が認められた。

#### 9) 血液生化学検査 (Tables 18, 19, Appendices 27, 28, 背景データ : Appendices 42, 43)

120 mg/kg 群で雄に総タンパク濃度の有意な低値が認められた。500 mg/kg 群では、雄に総タンパク濃度およびアルブミン濃度の有意な低値並びに雌雄に総コレステロール濃度の有意な高値が認められた。なお、雄は 30 および 120 mg/kg 群の尿素窒素濃度、30 mg/kg 群のカルシウム濃度、30 および 500 mg/kg 群の無機リン濃度がいずれも有意な高値、雌では 30, 120 および 500 mg/kg 群の総ビリルビン濃度は有意な低値、120 mg/kg 群の塩素濃度は有意な高値を示したが、これらの変化には用量相関性は認められなかった。

回復期間終了時屠殺動物では、血糖値の有意な低値および無機リン濃度の有意な高



値が雄に、カリウム濃度の有意な低値が雌に認められた。総タンパク、アルブミおよび総コレステロールの濃度には変化は認められなかった。

#### 10) 剖検 (Tables 20, 21, Appendices 29~30)

投与期間終了時屠殺動物において、肝臓の大型化が、500 mg/kg 群で雄の 2 匹および雌の 1 匹に認められた。胸腺の赤色域が 120 mg/kg 群および脾臓の大型化が 500 mg/kg 群に認められたが、胸腺および脾臓の変化はいずれも雌の 1 匹のみの発現であった。500 mg/kg 群の雌の死亡例 (動物番号 552) では、肝臓の大型化が認められた。

回復期間終了時屠殺動物では、変化は認められなかった。

#### 11) 器官重量 (Tables 22, 23, Appendices 32~35)

投与期間終了時屠殺動物において、500 mg/kg 群で雄に肝臓の絶対および相対重量、腎臓の相対重量並びに脳相対重量のいずれも有意な高値、雌に肝臓の相対重量の有意な高値が認められた。なお、30 mg/kg 群で雌に脾臓の絶対および相対重量の有意な高値、120 mg/kg 群で雌に胸腺の相対重量の有意な高値が認められたが、これらの変化には用量相関性は認められなかった。

回復期間終了時屠殺動物においては、雌の肝臓の相対重量にのみ、有意な高値が認められた。

#### 12) 病理組織学検査 (Tables 24~26, Appendices 29~31, Photos 1, 2)

被験物質の投与に起因すると思われる変化が、肝臓および小腸に認められた。

投与期間終了時屠殺動物において、肝臓では、小葉中心性肝細胞肥大が 500 mg/kg 群で検査対象各 5 匹中雄の 4 匹および雌の 5 匹中 5 匹に認められた。この変化は、回復期間終了時屠殺動物では認められなかった。

なお、肝臓において門脈周囲性リンパ球浸潤、微小肉芽腫、巣状壊死、その修復像と思われる肉芽腫および胆管過形成が回復群を含む対照群あるいは被験物質投与群で認められたが、いずれも用量相関性のない変化で、発現率や変化の程度に対照群との差は認められないことから、被験物質とは無関係な変化と判断した。

小腸では、腸絨毛の乳糜管拡張が 120 mg/kg 群で雄の 2 匹および雌の 1 匹、500