

ンはイソプロピル基, トルイジンはメチル基を有しており, 基の種類および結合位置の違いが染色体異常の発現に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

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. 218-223.
- 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. 345.
- 5) 石館基監修, "改訂増補 染色体異常試験データ集," リアライズ社, 東京, 1983, p. 31.
- 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. 99.
- 7) 石館基監修, "改訂増補 染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー社, 東京, 1987, pp. 418-419.

連絡先

試験責任者: 佐々木澄志

試験担当者: 日下部博一, 若栗 忍, 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, Shinobu Wakuri,

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 4-(1-methylethyl) aniline (MEA)** 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	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			—	—
Solvent ¹⁾ 0		24	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25			100.0	—
MEA 0.050		24	200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13			84.0	—
MEA 0.10		24	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			69.0	—
MEA 0.20		24	200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00	—	—	50.5	5.2
MEA 0.40***		24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			35.5	Tox
MC 0.00005		24	200	3	36	110	3	0	0	152	0	100* (50.0)	100* (50.0)	0.00			—	—
Solvent ¹⁾ 0		48	200	0	0	2	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			100.0	—
MEA 0.050		48	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13			99.5	—
MEA 0.10		48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	—	—	81.5	—
MEA 0.20		48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			49.0	6.4
MEA 0.40***		48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			5.5	0.1
MC 0.00005		48	200	0	65	238	8	2	20	333	4	139* (69.5)	139* (69.5)	0.38			—	—

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, Tox: cytotoxic.

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 99.27 %. MIPA (0.32 %) and OIPA (0.10 %) were contained as impurities. ***: Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4-(1-methylethyl) aniline (MEA)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	S9 mix	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	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			—	—
Solvent ¹⁾ 0		6-(18)	—	200	0	2	0	0	0	0	2	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
MEA 0.063		6-(18)	—	200	1	2	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.13			88.0	—
MEA 0.13		6-(18)	—	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			82.0	—
MEA 0.25		6-(18)	—	200	0	0	2	0	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	—	—	80.5	15.1
MEA 0.50***		6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			9.0	Tox
MEA 1.0***		6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			22.5	Tox
CPA 0.005		6-(18)	—	200	0	1	0	2	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25			—	—
Solvent ¹⁾ 0		6-(18)	+	200	2	1	1	0	0	0	4	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
MEA 0.075		6-(18)	+	200	0	4	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.00			83.5	—
MEA 0.15		6-(18)	+	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	—	+	78.0	—
MEA 0.30		6-(18)	+	200	0	1	6	0	0	0	7	0	6 (3.0)	6 (3.0)	0.63			59.5	9.9
MEA 0.60***		6-(18)	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—			28.5	Tox
CPA 0.005		6-(18)	+	200	3	43	144	0	0	0	190	1	104* (52.0)	102* (51.0)	0.13			—	—

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: cytotoxic.

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 99.27 %. MIPA (0.32 %) and OIPA (0.10 %) were contained as impurities. ***: Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity.

4-エチルビフェニルのラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 4-Ethylbiphenyl in Rats

要約

4-エチルビフェニルの0(コーンオイル), 250, 500, 1000および2000 mg/kgを1群5匹からなる5週齢の雌雄Sprague-Dawley系(Crj:CD)ラットに単回経口投与し、以下の結果を得た。

雄では死亡例はなかったが、雌では、1000 mg/kg投与群で1例、2000 mg/kg投与群で4例が死亡した。

雄の500 mg/kg, 雌の1000 mg/kg以上の投与群で鎮静あるいは活動性の低下が、雄の1000 mg/kg以上および雌の2000 mg/kgの投与群で腹臥位姿勢が観察され、一部の例では半眼もみられた。観察第2日には、1000および2000 mg/kg投与群の雌雄で排便量の減少または無排便が観察され、2000 mg/kg投与群の雌では活動性低下等の症状が観察された。2000 mg/kg投与群の雌では、これらの症状が観察第3日以降も持続し、貧血様蒼白も観察されたが、第7日以降回復した。体重推移では、500 mg/kg以上の投与群の雄および1000 mg/kg投与群の雌で観察第4日まで用量に依存した体重増加抑制がみられたが、その後回復傾向が認められた。

死亡例の剖検所見では、脾臓の小型化および淡色化、腎乳頭部の暗赤色化、腎盂の拡張、心臓の淡色化、消化管粘膜の黒色点、褐色斑等がみられ、循環障害あるいは消化管障害が疑われた。

以上のことより、4-エチルビフェニルの本試験条件下におけるLD₅₀値は、雌では1000~2000 mg/kgの間にあり、雄では2000 mg/kgを上回ると推定された。

方法

1. 被験物質および投与検体の調製法

被験物質として、新日鐵化学(株)(東京)より提供された4-エチルビフェニル(ロット番号:1-GOH; 純度:97.998%, 不純物:9-メチルフルオレン, 白色固体)を使用した。被験物質は常温で固体のため、検体調製にあたっては秤量後40℃の水浴中で加温融解させ、コーンオイル(ロット番号:V7R2020, ナカライテスク(株))を加えて各必要濃度に調製した。なお、2.00および200 mg/mLのコーンオイル溶液中における被験物質は、室温・遮光の条件下で5日間安定であり、また、各投与検体中の平均含量は、所定濃度内であることを確認した。

2. 投与量の設定および投与方法

本試験における投与量は、予備試験の結果を基に決定

した。すなわち、被験物質の8, 30, 125, 500および2000 mg/kgを5週齢の雌雄ラット各群3匹に単回経口投与した結果、2000 mg/kgは致死量であり、500 mg/kgは一過性に自発運動の低下を招く軽度毒性量であることが推定された。そこで本試験では250, 500, 1000および2000 mg/kg(公比2)投与群を設けた。また、溶媒がコーンオイルであることから、溶媒を被験物質投与群と同じ容量を投与する溶媒対照群を設定した。

投与容量は、体重1 kg当たり10 mLとし、投与液量は投与前約18時間絶食させた後、投与直前に測定した体重を基に算出し、ラット用胃管を用いて強制的に単回経口投与した。給餌は投与後約3時間に再開した。

3. 動物および飼育方法

4週齢のSprague-Dawley系(Crj:CD,SPF)雌雄ラットを、日本チャールス・リバー厚木飼育センターから購入し、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて7日間飼育した。全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し、温度23.5~25.0℃、湿度54~66%, 換気回数約15回/時、照明12時間(7時~19時点灯)に制御された飼育室で、固型飼料(CE-2, 日本クレア)および水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。

4. 群構成

試験には予備飼育中の一般状態に異常が認められなかった雌雄各25匹の動物を用いた。投与前日の体重を基に雌雄ともに体重別層化無作為抽出法により1群5匹からなる5群に分け、5週齢で使用した。

5. 観察および検査

一般状態の観察は、投与日においては投与直後から1時間まで連続して行い、以降は約1時間間隔で投与後6時間まで実施した。観察第2日から15日までは毎日1回行った。体重は、投与直前、観察2, 4, 8, 11および15日に測定した。投与後の死亡例は、発見次第体重を測定した後、速やかに剖検した。また、観察第15日に生存例全例をペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血屠殺して剖検した。

結果

1. 死亡動物(Table 1)

雄では、全被験物質投与群で死亡は認められなかった。雌では、1000 mg/kg投与群で観察第4日に1例が死亡し、

2000 mg/kg 投与群で観察第2, 3, 4および5日に各々1例が死亡した。

2. 一般状態の観察

雌雄の対照群では溶媒の影響と考えられる下痢便が散見された。被験物質投与群の雄においては、500 mg/kg 投与後、活動性の低下、腹臥位姿勢がみられた。1000 mg/kg 投与群では、活動性の低下、半眼および腹臥位姿勢みられたが、投与後6時間には異常所見は認められなかった。観察第2日には排便量の減少または無排便がみられたが、観察第3日以降は回復した。2000 mg/kg 投与群では、活動性の低下や腹臥位姿勢がみられ、時間が経過すると鎮静状態となったが、投与後6時間の観察では異常所見はみられなかった。観察第2日には、排便量の減少または無排便が全例でみられた。

雌においては、250 mg/kg 投与後下痢便が観察された。1000 mg/kg 投与群では、投与後鎮静がみられた。観察第2日には、排便量の減少または無排便がみられた。2000 mg/kg 投与群では、投与後鎮静が観察され、半眼および腹臥姿勢もみられた。観察第2日には、活動性の低下、排便量の減少あるいは無排便が全例で観察された。観察第3日以降も活動性の低下および排便量の減少あるいは無排便が持続し、貧血様蒼白も観察され、観察第3, 4および5日に各1例が死亡した。

3. 体重測定

雄では、500 mg/kg 以上の投与群の体重は、溶媒対照群と比較して観察第4日まで用量依存的に低値を示したが、観察第8日以降増加量は溶媒対照群と同等あるいはそれ以上となる傾向がみられた。

雌においては、1000 mg/kg 投与群の体重増加はわずかであったが、第4日以降回復傾向が認められた。

4. 病理学検査

死亡例では、1000 mg/kg 投与群で腺胃粘膜に黒色点がみられ、2000 mg/kg 投与群では腺胃粘膜への暗色物の付着、前胃粘膜に褐色斑散在、空～回腸内腔に暗色液状物が観察された。脾臓の小型化や淡色化が2000 mg/kg 投与群に認められた。腎臓では、乳頭部の暗赤色化が1000および2000 mg/kg 投与群に認められ、1000 mg/kg 投与群では腎盂の拡張もみられた。さらに、心臓の淡色化および胸腺の暗赤色あるいは赤色化が1000および2000 mg/kg 投与群に、肺の気腫様変化(退縮不全)が2000 mg/kg 投与群に観察された。

観察期間終了時解剖例では、腺胃粘膜の白濁肥厚部が2000 mg/kg 投与群の雌に、前胃粘膜の白色あるいは白濁肥厚部が1000 mg/kg 投与群の雌雄と500 mg/kg 投与群の雌に観察され、500および1000 mg/kg 投与群の雌では、前胃漿膜面と肝臓の癒着も認められた。また、胸腺の多数の白色領域が2000 mg/kg 投与群の雄に、肺の暗色部が1000 mg/kg 投与群の雄にみられた。

考察

4-エチルピフェニルの250, 500, 1000および2000 mg/kgを1群5匹からなる5週齢のSprague-Dawley系(Crj:CD)雌雄ラットに単回強制経口投与した。

その結果、雄では死亡例はみられなかったが、雌では2000 mg/kg 投与群で観察第2～5日に計4例が死亡し、1000 mg/kg 投与群でも観察第4日に1例が死亡した。

雌雄の体重増加は、投与後4日頃まで抑制される傾向がみられた。雄における中毒症状は、500 mg/kg 以上の投与群で活動性の低下や腹臥位姿勢がみられ、雌においては、1000 mg/kg 以上の投与群で鎮静がみられた。雌雄とも観察第2日に排便量の減少または無排便がみられた。2000 mg/kg 投与群では、観察第2日以降も活動性の低下および排便量の減少あるいは無排便が持続し、貧血様蒼白も観察されて4例が死亡した。

死亡例では、腺胃粘膜に黒色点あるいは暗色物の付着、前胃粘膜に褐色斑散在、腎臓では、乳頭部の暗赤色化、腎盂の拡張、心臓の淡色化および胸腺の暗赤色等が観察され、これらの所見から、消化管障害あるいは循環障害が疑われたが、直接の死因を特定することは出来なかった。

これらのことより、4-エチルピフェニルの本試験条件下におけるLD₅₀値は、雌では1000～2000 mg/kgの間にあり、雄では2000 mg/kgを上回ると推定された。

連絡先

試験責任者：大原直樹

試験担当者：勝村英夫、高島宏昌、松本浩孝、
一原佐知子、稲田浩子、永田伴子、
畔上二郎、安生孝子、三枝克彦

(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: Naoki Ohara (Study director)
Hideo Katsumura, Hiromasa Takashima,
Hirotaka Matsumoto, Sachiko Ichihara,
Hiroko Inada, Tomoko Nagata,
Jiro Azegami, Takako Anjo,
Katsuhiko Saegusa

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,
Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Mortality and LD₅₀ values in rats after a single oral administration of 4-ethylbiphenyl

Sex	Dose (mg/kg)	Number of animals	Number of dead animals days after administration										Mortality ^a	LD ₅₀ values (mg/kg)
			1	2	3	4	5	6	7	8~15				
			~1 hr.	~3 hr.	~6 hr.									
Male	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	>2000
	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
Female	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	1000-2000
	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1000	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1/5	
	2000	5	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	4/5	

a) : number of dead animals/number of animals examined

4-エチルビフェニルのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 4-Ethylbiphenyl in Rats

要約

4-エチルビフェニルの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系ラットを用いて実施した。投与量は雌雄とも0(溶媒対照群), 20, 100, 500および1000 mg/kgとし, 20および100 mg/kg投与群は1群5匹, 0, 500および1000 mg/kg投与群は回復試験の動物を含む1群10匹を使用した。

投与期間中に1000 mg/kg投与群の雄5例および雌4例が死亡ないし瀕死状態のため切迫屠殺となった。また, 500 mg/kg投与群の雄1例が死亡した。

腎臓に関する所見として, 摂水量および尿量が500 mg/kg以上の投与群で増加した。同群では, 剖検時の検査で血漿中クレアチニン濃度が増加し, 腎臓の変色および腫大, 組織学的に乳頭壊死, 好塩基性尿細管の増加, 尿細管拡張, 蛋白性尿円柱等が観察された。好塩基性尿細管の増加は, 100 mg/kg以上の投与群の皮質でもみられた。その他, 切迫屠殺例では, 血漿中の尿素窒素濃度が増加した。

肝臓に関する所見として, 1000 mg/kg投与群では, γ -GTP, GPTおよびLDH活性の増加がみられ, 肉眼的に肝臓は腫大して暗色調を呈し, 組織学的に肝細胞は肥大してその細胞質は好酸性で顆粒状を呈し, 一部の例で肝臓の限局性壊死がみられた。この肝臓の肉眼的変化は500 mg/kg投与群から, 組織学的変化は, 100 mg/kg投与群から認められた。

消化管に関する所見として, 1000 mg/kg投与群では, 投与初期に黒色便が観察され, 組織学的には, 前胃粘膜上皮の過形成およびびらん, 腺胃のびらんおよび潰瘍等が散見された。その他, 粘膜下組織の水腫が一部の例でみられた。黒色便および前胃粘膜の変化は500 mg/kg投与群から, 粘膜下組織の水腫および腺胃の所見は100 mg/kg投与群から散見された。100 mg/kg以上の投与群で投与第2日から, 被験物質の刺激性によると推測される一過性の流涎が投与直後に認められた。

血液に関する所見として, 1000 mg/kg投与群で投与初期に皮膚色蒼白が散見され, 500 mg/kg以上の投与群で肝臓のクッパー細胞のヘモジデリン沈着および脾臓のヘモジデリン沈着の増加がみられた。切迫屠殺例では, 赤血球数, 血色素量およびヘマトクリット値が低く, 網状赤血球比率が高い傾向にあり, 剖検時に脾臓の小型化および淡色化が散見された。

この他, 500 mg/kg以上の投与群では体重が低い傾向にあり, 摂餌量も減少した。また, 同群では, 胸腺の萎

縮が認められた。

回復期間終了後, 多くの所見が軽減ないし消失したが, 腎乳頭壊死等は回復傾向が認められなかった。死亡および切迫屠殺例の主な変化は投与期間終了時屠殺例と同様であったが, 腎臓, 胃, 脾臓および胸腺ではより所見が強く, 投与初期の剖検例の肝臓の所見はより軽度であった。

以上のことから, 4-エチルビフェニルの反復投与により, 100 mg/kg以上の用量で, 主として腎臓の尿細管および乳頭が障害され, 1000 mg/kgでは, 重篤な個体は死亡することが明らかとなった。また, 100 mg/kg以上の用量で, 肝臓の代謝酵素を誘導する一方, 1000 mg/kgでは, 肝障害が示唆された。これらの腎臓および肝臓の変化は, 腎乳頭を除き, 投与中止により回復する傾向にあった。また, 被験物質は刺激性を有することが示唆され, これに起因すると考えられる胃を中心とした消化管粘膜の損傷も100 mg/kg以上の用量で生じた。これらのことから, 本試験条件下における4-エチルビフェニルの無影響量は雌雄とも20 mg/kg/dayであると考えられた。

方法

1. 被験物質および投与検体の調製法

被験物質には, 新日鐵化学(株)(東京)より提供された4-エチルビフェニル(ロット番号1-GOH, 純度97.998%)を使用し, 入手後, 試験開始まで室温で保管した。被験物質を用量毎に秤量し, 約40℃(融点34~35.5℃)に加熱融解後, コーンオイル(ロット番号:V7R2020, ナカライテスク(株))に溶解して投与検体とし, 投与時まで遮光室温下で保管した。なお, 調製検体中の被験物質の安定性試験および含量試験結果から, 0.2および20 w/v%溶液は, 遮光, 室温保管の場合, 8日間は安定であり, 初回に調製した投与検体中の平均含量は, 所定濃度の99.6~100%であることを確認した。

2. 動物および飼育方法

試験には, 生後4週で購入し, 検疫を兼ねて6日間予備飼育した雌雄のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD, SPF, 日本チャールス・リバー(株))各40匹を使用した。動物は, 温度24~24.5℃, 湿度52~58%, 換気回数約15回/時, 照明12時間(7~19時点灯)に制御した飼育室内で, 金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し, 固型飼料(CE-2, 日本クレア(株))および給水瓶に入れた水道水(秦

野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。

3. 群および群分け

本試験における投与量は、先に実施した予備試験の成績を参考にして決定した。即ち、雄では0, 100, 500および1000 mg/kgを、雌では0および1000 mg/kgをそれぞれ1群5匹に7日間連続投与した。その結果、反復投与開始初期の体重減少ないし増加抑制、血小板数の増加、アルカリフォスファターゼ活性の減少、GPT活性の増加、前胃粘膜の白濁および潰瘍、肝臓の暗色化および死亡例における脾臓の退色および小型化等が観察された。また、1000 mg/kgの用量を反復投与することにより死亡する場合があることも明らかとなった。しかし、500 mg/kg投与群では、前述の所見の多くが軽度かあるいは認められなかったため、本試験では、高用量を1000 mg/kgとし、死亡例の発生を想定して中用量に500 mg/kgを設け、以下の用量は公比5で100および20 mg/kgとした。なお、予備試験において、500 mg/kg以上の投与群全例の血漿が黄色調を呈したため、血漿中のビリルビン濃度を測定したが、増加は認められなかった。また、500 mg/kg以上の投与群では、他の群と比較して剖検時の麻酔導入に時間がかかった。

群分けは、検査期間中に異常がなかった動物を用い、投与開始前日の体重に基づいて体重別層化無作為抽出法により行った。動物数は、雌雄とも0, 500および1000 mg/kg投与群を回復試験を予定した5匹を含め各群10匹とし、20および100 mg/kg投与群を各群5匹としたが、結果にも示したように投与期間中に死亡および切迫屠殺例があったため、回復試験は雌雄の溶媒対照群および雌の中用量2群では各5匹、雄の中用量2群では4匹、雌の高用量群では3匹を、それぞれ動物番号が若い方から選択して行った。生存例が5例となった雄の高用量群は、回復試験を実施しなかった。

4. 投与方法

1日1回、28日間、毎日9時～12時の間にラット用胃管を用いて強制経口投与した。投与容量は5 mL/kgとし、投与液量は雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に算出した。なお、回復期間は14日間とした。

5. 検査項目

1) 一般検査

毎日(投与期間中は投与前および投与後)全例の一般状態を観察した。また、体重は、投与第1週に投与第1日の投与直前と投与第2および4日、投与第2週以降回復期間終了週までは1週に2回の頻度で測定し、その他、投与期間終了日、回復期間終了日および剖検日、ならびに死亡時および切迫屠殺時にも測定した。摂餌量は、検査終了日から投与第1日にかけて投与開始前の摂餌量を測定し、その後は回復期間終了週まで毎週1回の頻度で1日あたりの摂餌量を測定した。摂水量は、投与開始前の摂水量および毎週1回の1日あたりの摂水量を上記摂餌量と同日に測定し、その他、尿検査用に選抜した動物

について、投与第1, 4週および回復期間終了週の尿検査時に、代謝ケージ内に収容した状態での約24時間の摂水量を測定した。

2) 尿検査

各群とも動物番号の若い方から5匹を選択して(生存例数が5匹以下の群は全例)、投与第1, 4週および回復期間終了週に代謝ケージに収容して蓄尿し、約4および24時間の時点で採尿した。この4時間尿を用いて、pH、潜血、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンおよび沈渣を試験紙法(クリニテック200+, バイエル・三共(株))および光学顕微鏡により検査し、24時間尿を用いて、尿量(天秤で重量を計測し、比重で除す)、色調および濁度(視診)、比重(単位体積あたりの重量を測定)を検査した。

3) 血液学検査

投与期間ないし回復期間終了日から翌日の剖検日にかけて定期解剖例全例を18から24時間絶食させ、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈よりEDTA 2Kを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コールターエレクトロニクス(株))により赤血球数、白血球数、平均赤血球容積、血小板数(以上、電気抵抗法)および血色素量(吸光度法)を測定し、これらを基にヘマトクリット値、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)および網状赤血球比率(Brecher法)を求めた。また、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液を用いてプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間(光散乱検出法, CA-1000, 東亜医用電子(株))を測定した。また、切迫屠殺例でも可能な限り定期解剖例と同様の検査をしたが、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間は測定しなかった。骨髓像検査は、大腿骨骨髓を用いて塗抹標本作製(Wright-Giemsa染色)し、投与期間終了時剖検例の溶媒対照群および高用量群、ならびに切迫屠殺例について実施した。

4) 血液生化学的検査

血液学検査用の採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として死亡例を除く全例から採血し、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・ダイアグノスティックス(株))により、総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD・DAOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ・G6PDH法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼ・GLDH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(GSCC法)、GOT活性(IFCC法)、GPT活性(IFCC法)、LDH活性(Wróblewski-La Due法)、カルシウム濃度(OCPC法)、無機リン濃度(モリブデン酸直接法)、トリグリセライド濃度(GPO・DAOS法)、 γ -GTP活性(γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)を測定し、A/G比を算出した。また、全自動電解質

分析装置(EA05, 株式会社A&T)により、ナトリウム濃度、カリウム濃度および塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

5) 病理学検査

上記の採血に引き続き、死亡例を除く全例を放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣または精巣、精巣上体の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、脳、脊髄、下垂体、眼球、ハート腺、甲状腺(上皮小体を含む)、顎下腺(舌下腺を含む)、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、卵巣または精巣、精囊、精巣上体、膀胱、前立腺、大腿骨骨髓、坐骨神経および下腿部骨格筋を0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン液(pH 7.2)に固定した。脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胃、精巣、精巣上体、卵巣、骨髓(大腿骨)肉眼的に異常が認められた器官・組織は、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、先ず、溶媒対照群および高用量群について組織学検査を実施した。次いで、被験物質投与による影響が疑われた胸腺、肝臓、腎臓、脾臓および胃について、全例の検査を行った。また、肝臓および腎臓では組織学的検査で褐色色素沈着がみられたため、全例のベルリンブルー染色標本を作製した。この他、前立腺および精囊についても全例の追加検査を実施した。なお、死亡例は器官重量を測定せず、それ以外は屠殺例と同様の病理学検査を行った。

6. 統計解析

体重、摂餌量、摂水量、尿検査(半定量検査を除く)ならびに定期解剖例の血液学検査、血液生化学検査および器官重量について、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群が3群以上の場合には、Bartlettの方法による分散の均等性の検定、一元配置型の分散分析ないしKruskal-Wallisの順位検定およびDunnettないしDunnett型の検定法で多重比較を行った。2群の場合には、Studentのt検定ないしAspin-Welchのt検定を行った。さらに、病理組織学検査所見は、グレード分けしたデータについてMann-Whitney U検定(両側検定)を、陽性グレードの合計値についてFisher直接確率の片側検定を行った。なお、これら溶媒対照群および被験物質投与群との間の有意差検定はいずれの場合も有意水準を5%とした。

結果

1. 切迫屠殺例および死亡例

1000 mg/kg投与群では、投与第4日に雄2例が死亡し、雄1例および雌2例を切迫屠殺した。また、投与第5日の投与前に雄1例が死亡し、雌1例を切迫屠殺した。その後、投与第13日に雌1例、投与第19日に雄1例が死亡した。500 mg/kg投与群では投与第24日に雄1例が死亡した。

2. 一般状態

500 mg/kg以上の投与群で、投与第2日から6日の間に排便量が減少し、黒色便の排泄がみられた。同群では、雌雄の一部で腹部ないしその周辺部の脱毛が認められた。また、投与第2ないし6日から投与直後に一過性の流涎が認められ、散発的ではあるものの、死亡および切迫屠殺例の一部を除く全例でみられた。この流涎は投与の際の保定だけでみられることもあり、100 mg/kg投与群においても散見された。この他、1000 mg/kg投与群の雌雄で腹臥位姿勢、皮膚色蒼白および呼吸深大等が散見され、死亡および切迫屠殺例でより頻繁に認められた。死亡および切迫屠殺例では、前述の所見の他に、流涎、体表温の減少および脱水状態が観察された。その他、頭部および下腹部被毛の汚れが500 mg/kg投与群の雌2例および1000 mg/kg投与群の雌雄各2例で認められた。また、500 mg/kg投与群の雄1例では、投与第21日に鼻孔周囲の褐色の汚れが観察され、翌日より排便量が減少し、投与第24日に死亡が確認された。回復期間中は、前述の腹部周辺部の脱毛が引き続きみられたが、これらは日数の経過とともに回復する傾向にあった。

3. 体重(Fig. 1)

1000 mg/kg投与群の雌雄の体重は、投与第2日から投与第28日までの間、溶媒対照群と比較して有意に低く、さらに回復試験を実施した雌では、回復第8日まで有意に低かった。また、500 mg/kg投与群でも雄で投与第11日から、雌で第8日から有意に低くなり、回復第1日の雌で有意差がみられなかったものの、この他の測定日では雌雄とも回復第14日まで有意に低い状態が続いた。20および100 mg/kg投与群では、観察期間を通じて有意な変化はなかった。

4. 摂餌量(Fig. 2)

1000 mg/kg投与群の雌雄の摂餌量は、投与第1週から溶媒対照群と比較して有意に減少し、雄で第4週、雌で第3週まで有意差を示した。また、500 mg/kg投与群でも雄で投与第1、2および4週、雌で第1週に有意に減少したが、500および1000 mg/kg投与群の回復期間ならびに20および100 mg/kg投与群では、有意な変化は認められなかった。

5. 摂水量(Fig. 3)

1000 mg/kg投与群の雌雄では、投与第1日の摂水量が有意に減少したが、その後増加に転じ、雄で投与第1週の尿検査時から、雌では投与第2週から有意に増加し、回復試験を行わなかった雄で投与第4週の尿検査時まで、雌では回復第2週まで続いた。また、500 mg/kg投与群でも摂水量が増加する傾向がみられ、雄で投与第2および3週、雌で投与第2週から回復第1週までが有意に増加した。20および100 mg/kg投与群では、観察期間を通じて有意な変化はなかった。

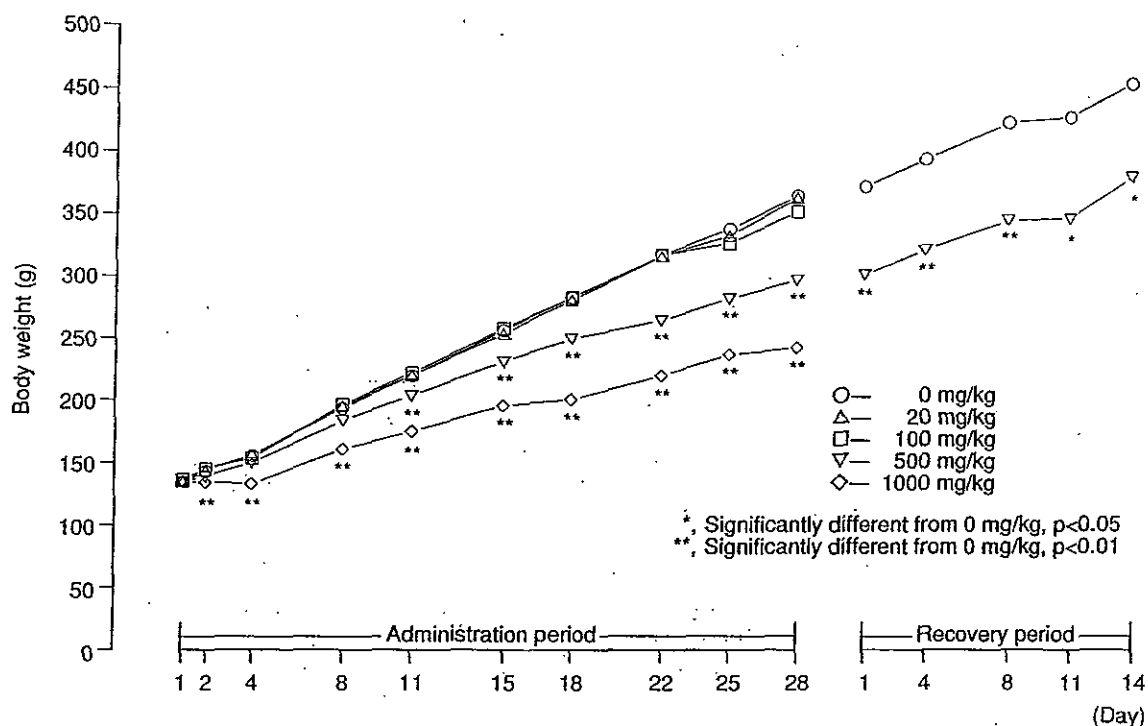


Fig. 1-1 Body weight changes of males in 28-day repeat dose oral toxicity test of 4-ethylbiphenyl in rats

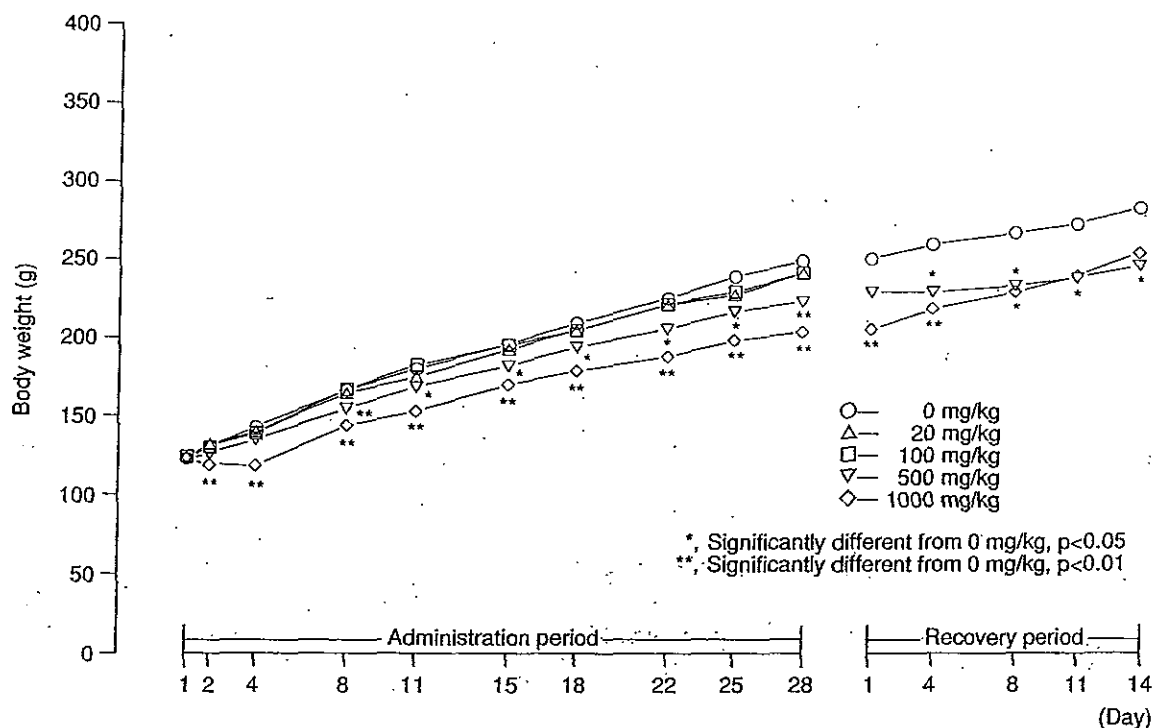


Fig. 1-2 Body weight changes of females in 28-day repeat dose oral toxicity test of 4-ethylbiphenyl in rats

6. 尿検査 (Table 1)

尿量は、1000 mg/kg 投与群で増加し、雄で投与第1および4週、雌で投与第4週に溶媒対照群と比較して有意差を示した。500 mg/kg 投与群でも尿量が増加する傾向がみられ、雌で投与第4週に有意に増加した。さらに、

投与第1週の検査では、1000 mg/kg 投与群で、濁度+が雌雄各1例、尿蛋白++が雌雄各2例、潜血±または+が雄2例、沈渣中の結晶+が雌1例で認められ、このうち、尿蛋白++および潜血+と、濁度+、尿蛋白++および潜血±は、それぞれ同一個体の所見で、これら2例は新鮮