

## b) 病理組織学検査

## ① 死亡動物および全児死亡動物

死亡動物(雄の600 mg/kg群の3例, 雌の60および600 mg/kg群の各1例)および全児死亡動物(雌の600 mg/kg群の1例)の皮膚, 乳腺, リンパ節, 唾液腺, 胸骨, 大腿骨(骨髓を含む), 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, 精囊, 前立腺, 精巣, 精巣上体, 卵巣, 子宮, 陰, 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, 副腎および精巣について実施し, 低および中用量群では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, 加えて高用量群の1例の皮膚について実施した。また, 低および中用量群では腎臓について実施した。

## ④ 交尾の成立しなかった雄雌

600 mg/kg群の雌雄各1例の脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 陰, 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。脳, 胸腺, 心臓, 肺, 胃, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 陰, 子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上体, 精囊, 前立腺, 下垂体および腹腔の塊について実施した。

## 5. 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, 器官重量・体重比(相対重量), 血液学的および血液生化学検査値については多重比較検定<sup>1,2)</sup>を行った。

出産率, 交尾率および受胎率については $\chi^2$ 検定<sup>4,5)</sup>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<sup>6)</sup>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, 順位と検定であるMann-WhitneyのU検定<sup>6)</sup>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

死亡例が雄では, 600 mg/kg群で投与6および9日に1および2例観察された。雌では, 60 mg/kg群で投与16日に1例, 600 mg/kg群で投与3日に1例観察された。

雄の一般状態の変化では, 投与後の症状として, すべての被験物質投与群で散瞳および眼瞼下垂が認められた。散瞳は60 mg/kg群の1例でごくまれに, 200 mg/kg

群のはほぼ全例で散発的に, 600 mg/kg群の全例で毎日観察され, 発現の強さは60 mg/kg群で軽度, 200および600 mg/kg群で軽度から重度であった。眼瞼下垂は60 mg/kg群のはほぼ全例で散発的に, 200および600 mg/kg群の全例で毎日観察され, 発現の強さは60 mg/kg群で軽度, 200 mg/kg群で軽度から中等度, 600 mg/kg群で軽度から重度であった。また, これらの症状の発現はいずれの群も投与後30分から認められ, 60 mg/kg群では投与後2時間, 200 mg/kg群では投与後4時間以内にはほぼ消失したが, 600 mg/kg群では投与後2時間でもっとも強く発現し, 投与後6時間でもほぼ全例が軽度または中等度の症状を呈していた。また, 自発運動低下が600 mg/kg群で交配前・交配期間中はほぼ全例で低頻度に認められた。その他, 脱毛が60 mg/kg群で交配前・交配期間中に1例(両前肢), 600 mg/kg群の死亡例に被毛の汚れ, 体温低下, 眼分泌物, 鼻分泌物, 流涎, 腹臥位, よろめき歩行および振戦が1から3例に認められた。

雌の一般状態の変化では, 投与後の症状として, すべての被験物質投与群で散瞳および眼瞼下垂が認められた。散瞳は, 60 mg/kg群の1例で投与期間中ごくまれに, 200 mg/kg群の少数例で妊娠期間までは散発的, 哺育期間では毎日, 600 mg/kg群のはほぼ全例で投与期間中毎日観察された。眼瞼下垂は60 mg/kg群では交配前・交配期間中はほぼ全例に毎日, 妊娠期間中はほぼ全例で散発的に, 哺育期間は少数例で散発的に, 200および600 mg/kg群では全例に投与期間中はほぼ毎日観察された。その他交配前・交配期間では, 体温低下および自発運動低下が600 mg/kg群で少数例に, 同群の交尾不成立の雌で消瘦, 軟便および流涎が認められた。妊娠期間では, 脱毛(胸部, 両前肢)が600 mg/kg群で1例, 自発運動低下が200 mg/kg群で1例, 600 mg/kg群で4例, 血尿が60 mg/kg群で1例, 流涎が600 mg/kg群で1例認められた。哺育期間では, 全児死亡が600 mg/kg群で哺育2日に1例, 自発運動低下が600 mg/kg群で哺育0日に1例認められた。

## 2) 体重(Fig. 1, 2)

雄では, 対照群に比べて200 mg/kg群で投与29日以降, 600 mg/kg群では投与22日以降に低値を示し, 両群ともに投与1~43日の体重増加量も低値を示した。雌の交配前投与期間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。妊娠期間では, 対照群に比べて200および600 mg/kg群で妊娠21日に低値を示し, 両群ともに妊娠0~21日の体重増加量も低値を示した。哺育期間では, 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。

## 3) 摂餌量(Fig. 3, 4)

雄では, 対照群に比べて600 mg/kg群で投与8日以降高値を示し, 投与22~48日の累積摂餌量も高値を示した。

雌の交配前期間では, 対照群に比べ600 mg/kg群で投与8から15日の平均1日摂餌量が高値を示し, 投与1~

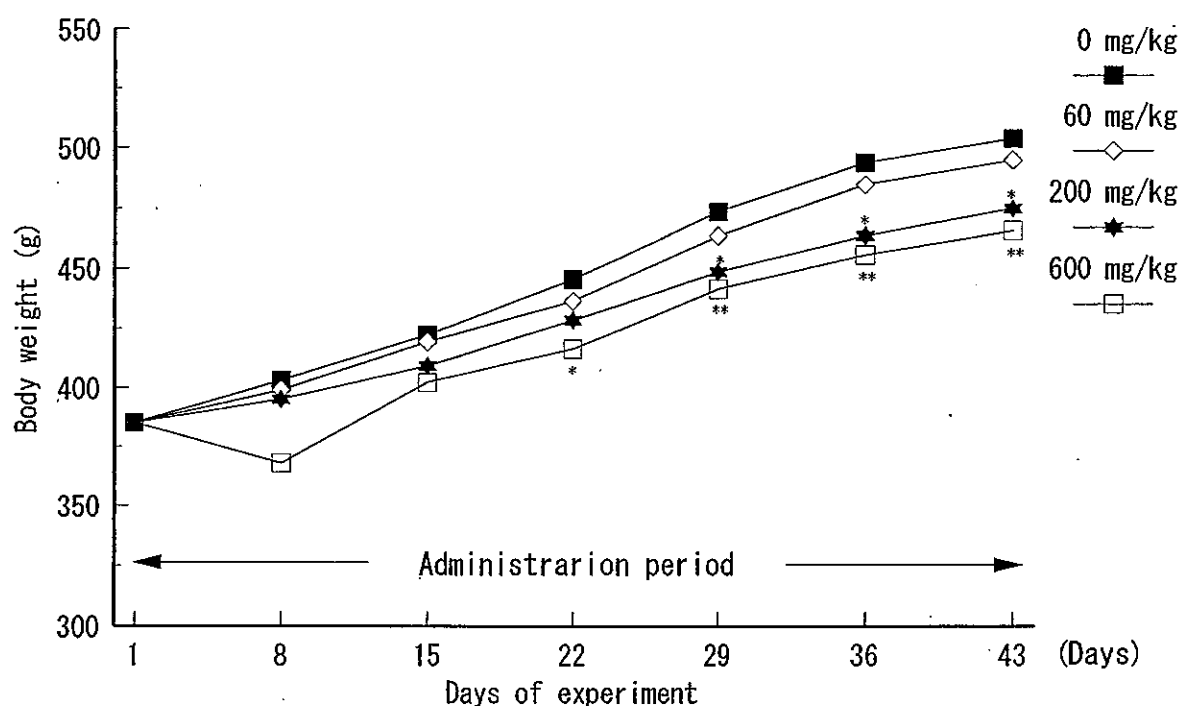


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

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

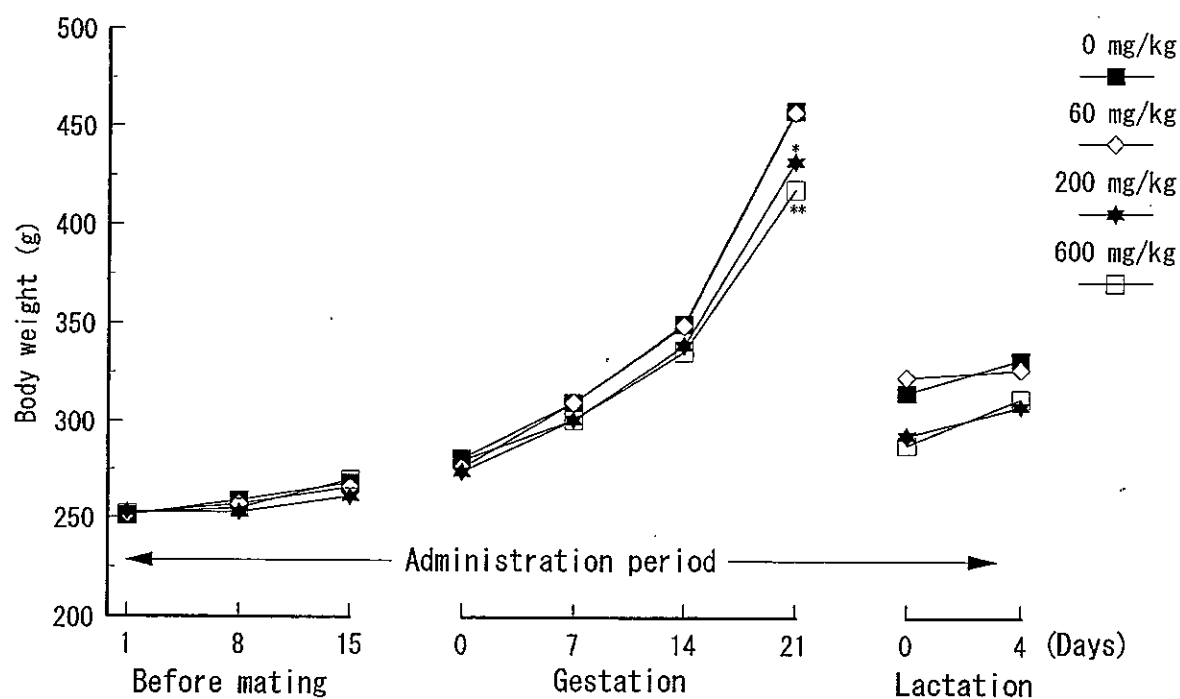


Fig. 2 Body weight change of female rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

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

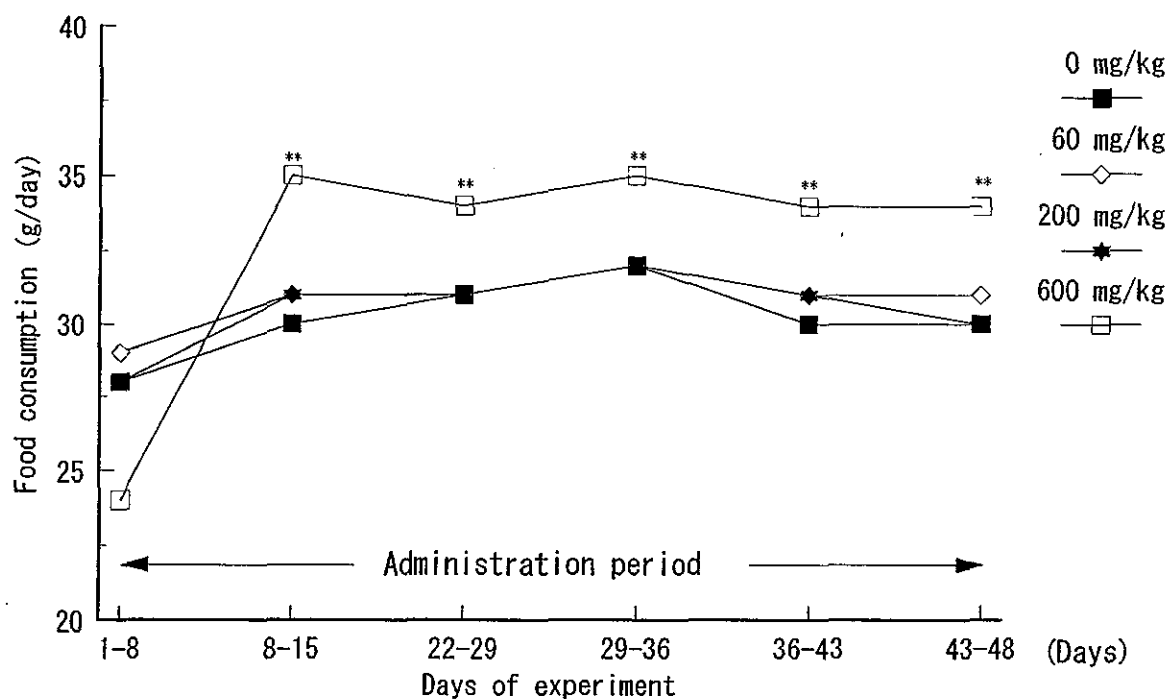


Fig. 1 Food consumption of male rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

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

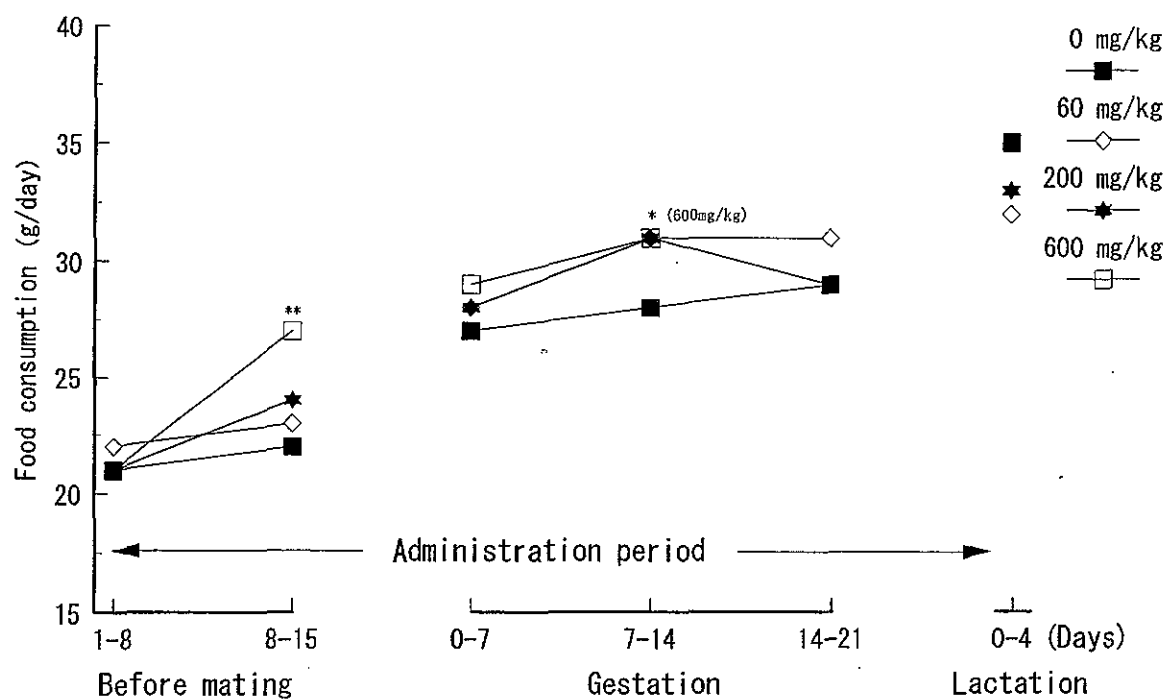


Fig. 2 Food consumption of female rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

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

15日の累積摂餌量も高値を示した。妊娠期間では、同群で妊娠7から14日の平均1日摂餌量が高値を示した。哺育期間では、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。

#### 4) 雄の血液学検査 (Table 1)

血液学検査および血液凝固能検査では、いずれの検査項目についても対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

#### 5) 雄の血液生化学検査 (Table 2)

200 mg/kg群で対照群に比べカルシウムが高値を示したが、用量に関連した変化ではなかった。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。

#### 6) 器官重量 (Table 3)

雌雄ともに対照群に比べ600 mg/kg群で副腎の相対重量が高値を示し、絶対重量も高値傾向を示した。さらに雌では600 mg/kg群で肝臓の相対重量が高値を示し、絶対重量も高値傾向を示した。その他、体重の低値に起因すると考えられる変化として雄では200および600 mg/kg群で脳の相対重量が高値を、精巣上体の絶対重量が低値を示し、さらに600 mg/kg群で肝臓の絶対重量が低値を示した。雌では、対照群に比べ200 mg/kg群で胸腺の絶対重量が低値を示し、腎臓の相対重量が高値を示した。

#### 7) 剖検所見

死亡例は、雄の600 mg/kg群で3例、雌の60および600 mg/kg群で各1例であった。雄の死亡例の剖検では1例に胃の穿孔性潰瘍、内腔拡大および肝臓との癒着、小腸の内腔拡大および赤色斑点、大腸の内腔拡大および内容物の赤色化、腹水貯留、胸腺の萎縮および全身性の消瘦が観察された。その他2例の雄では、胸腺の赤色斑点、肺の赤色化、胃の内容物の赤色化、小腸ならびに大腸の内腔拡大および内容物の赤色化、大腸の赤色斑点、胸水貯留、全身性の消瘦がいずれかの1例、膀胱の内腔拡大が2例に観察された。雌の死亡例の剖検では、60 mg/kg群の1例に胸腺および肺の赤色斑点、胃の内腔拡大および内容物の赤色化および小腸の内容物の赤色化が、600 mg/kg群の1例に胸腺および肺の赤色斑点、胃および小腸の赤色化、肝臓の黒色斑点が観察された。

雄では、200 mg/kg群で肺の褐色斑点および横隔膜との癒着が各1例、腎臓の癒痕および嚢胞が1例、600 mg/kg群で精巣上体の黄色結節が1例に観察された。

雌では、対照群で腎臓の癒痕および肺の赤色斑点が同一個体の1例に、胸腺の赤色斑点および肺の褐色斑点が各1例、60 mg/kg群で卵巣の嚢胞が2例、600 mg/kg群で胸腺の赤色斑点および卵巣の嚢胞が同一個体の1例に、脱毛が1例に観察された。

交尾の成立しなかった動物は600 mg/kg群で雌雄各1例であった。剖検で異常は認められなかった。

全児死亡動物は600 mg/kg群で1例認められ、胸腺の萎縮が観察された。

#### 8) 病理組織学検査 (Table 4,5)

600 mg/kg群の死亡動物で雌雄に共通して腎臓の皮質ないし皮髄境界部における尿細管上皮の空胞変性が認められ、被験物質投与の影響が示唆された。その他これら死亡動物の腎臓には、皮髄境界部の尿細管上皮の壊死および尿細管上皮の好塩基化が雌雄に、硝子円柱が雄に観察された。また、600 mg/kg群の死亡動物では空胞変性が腎臓以外の臓器にも認められ、全例の脾臓および唾液腺、雌雄各1例の脾臓の外分泌腺および肺、雌1例および雄2例の毛嚢、雄1例の舌、前胃、肝臓、胸腺および上皮小体にそれぞれ空胞変性が観察された。これら600 mg/kg群の死亡例に観察された空胞は中性脂肪とは異なり、大小の球状空胞形成が数個から多数認められ、内部に弱好酸性の無構造もしくは網状構造物が認められるものも存在しており、リン脂質様であった。さらに、これらの動物には腺胃の潰瘍および胸腺の萎縮が雄の全例に、骨髓の造血低下ならびに脾臓の萎縮が雌雄とも全例に、胸腺の核崩壊ならびに肝臓の壊死が雌雄各1例に観察された。

60 mg/kg群の死亡動物の雌1例では600 mg/kg群の死亡動物と同様な腎臓の皮髄境界部と脾臓の外分泌腺の空胞変性が観察された他、胸腺の出血も観察された。その他観察された所見は単発性の発生であった。600 mg/kg群の全児死亡動物では、腺胃の浮腫、細胞浸潤、糜爛ならびに上皮の再生、肺では巣状の浮腫、気管支上皮の糜爛や扁平上皮化生ならびに線維化、胸腺の萎縮が観察された。

雄では、腎臓の尿細管の好塩基化が対照群、60、200および600 mg/kg群でそれぞれ6、7、6および3例、好酸性小体がそれぞれ5、3、2および1例、リンパ球浸潤がそれぞれ4、0、2および0例、巣状の尿細管上皮の壊死が200 mg/kg群で1例に観察され、リンパ球浸潤の60 mg/kg群の発現率が対照群に比べ低値を示した。さらに肝臓の小肉芽腫が対照群および600 mg/kg群でそれぞれ5および2例、脾臓の色素沈着が4および3例、精巣上体の精子肉芽腫が600 mg/kg群で1例に観察された。その他観察された所見は単発性の所見であった。なお、死亡動物の腎臓で認められた空胞変性は生存例の雄では観察されなかった。

雌では、腎臓の尿細管の好塩基化が対照群、60、200および600 mg/kg群でそれぞれ1、2、4および2例、脾臓の色素沈着が対照群および600 mg/kg群でそれぞれ5および7例、脾臓の髄外造血が7および5例、肝臓の糖質沈着が1および3例、肝臓の髄外造血が5および3例、心臓の小肉芽腫が1および2例に観察された。生存例の雌にも死亡動物の腎臓で認められた空胞変性は観察されなかった。

交尾の成立しなかった雌雄動物では、脾臓の色素沈着が雌雄に、腎臓の尿細管の好塩基化および好酸性小体の出現が雄、肝臓の小肉芽腫が雌で観察された。死亡した

10 mg/kg 群の雄の1例には肺の鬱血、細胞浸潤および肝臓の鬱血が、100 mg/kg 群の雄の1例には肺の鬱血および前胃の角化亢進がそれぞれ認められたが、死因については不明であった。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 交尾および受胎能 (Table 6)

交尾は 600 mg/kg 群を除き対照群を含むすべての群で全例成立した。600 mg/kg 群では1組が交尾不成立であり、交尾率は90.9%であった。受胎は全ての群の交尾成立雌で成立した。

性周期観察では、600 mg/kg 群で連続した発情休止期像が観察される性周期の停止が3例に認められ、対照群に比べ平均性周期の延長が認められた。

### 2) 分娩および哺育 (Table 7)

600 mg/kg 群で対照群に比べ雌雄の哺育4日生児数が低値傾向を示し、4日生存率も低値傾向を示した。その他、妊娠期間、妊娠黄体数、着床痕数、出産児数、出産生児数、性比、死産児数、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、600 mg/kg 群で皮下出血が1例認められたのみであった。哺育期間中の体重では、生後0日に対照群に比べ600 mg/kg 群で雌雄とも低値を、生後4日に雌雄とも低値傾向を示した。死亡児の剖検では、200 mg/kg 群の雄の1例に腎盂拡大が観察された。哺育4日の剖検で、雄では対照群で胸腺頸部残留が5例および肝臓の結節が1例、60 mg/kg 群で腎臓の腎盂拡大が2例に観察された。雌では対照群で腎臓の腎盂拡大が2例、600 mg/kg 群で胸腺の頸部残留が1例に観察された。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

死亡例が、雄では600 mg/kg 群の3例、雌では60および600 mg/kg 群で各1例に認められた。これら死亡例の病理学検査の結果、600 mg/kg 群の剖検所見では胃の穿孔性潰瘍、内容物の赤色化、小腸および大腸の内腔拡大、赤色斑点および内容物の赤色化等が認められ、組織所見では腺胃の潰瘍に伴う所見が認められた。600 mg/kg 群の全例死亡動物の腺胃に糜爛が認められた。同一被験物質のラットを用いる急性経口毒性試験では、1690 mg/kg 以上の用量群の死亡動物における剖検で、腺胃のび慢性出血や十二指腸の赤色斑点、組織学的検査で腺胃の出血、壊死および空胞変性、十二指腸の浮腫、出血および壊死が観察され、強アルカリ性物質である本被験物質の直接的な影響による消化管出血を死因としている。本試験で600 mg/kg 群の死亡例の消化管に認められた上記の所見も被験物質投与による直接的な刺激に起因

した変化と考えられた。また、死亡例には共通して腎臓で皮質や皮髄境界部に尿細管上皮の空胞変性が観察され、被験物質投与の影響が示唆された。600 mg/kg 群の中には肝臓、脾臓、胸腺、肺、舌、前胃、脾臓、唾液腺および毛嚢にまで空胞変性が観察される例もあった。

一般状態の観察では、投与期間を通じ散瞳および眼瞼下垂が、雌雄ともにすべての被験物質投与群で認められた。これらの症状は用量に関連した発現頻度および持続時間の増強が認められ、被験物質投与による影響と考えられた。また、600 mg/kg 群で観察された自発運動低下は低頻度ながら雌雄ともに認められ被験物質投与によるものと考えられた。主に600 mg/kg 群の死亡例で認められた流涎、体温低下および消瘦は被験物質の影響が強く現れたことによる全身状態の悪化に伴った変化と考えられた。その他、認められた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。

体重について、雄では200および600 mg/kg 群で投与期間の半ばから明らかな低値を示し、被験物質投与による体重増加抑制と考えられた。雌では200および600 mg/kg 群で妊娠21日に低値を示し被験物質投与の影響が示唆された。摂餌量について、雄では600 mg/kg 群で投与開始以降高値を示した。雌では600 mg/kg 群で交配前から妊娠期間にかけて高値を示す期間が認められた。いずれも機序は不明であるが被験物質投与の影響が示唆された。

雄の血液学検査、血液凝固能検査および血液生化学検査では、被験物質投与の影響は認められなかった。

器官重量について、雌雄ともに対照群に比べ600 mg/kg 群で副腎重量が高値を示し、さらに雌では600 mg/kg 群で肝臓重量が高値を示し被験物質投与に起因した変化と考えられた。その他の器官で認められた変化は体重の低値に起因する二次的な変化と考えられた。

病理学検査の結果、妊娠を成立させた雄および自然分娩した雌の剖検所見は、いずれも単発性あるいは少数例の発生であり被験物質投与の影響が示唆される病変は観察されなかった。また、組織所見では腎臓のリンパ球浸潤の発現率が60 mg/kg 群で低値を示したが、用量に関連した変化ではないことから被験物質投与の影響とは考えなかった。その他認められた組織所見は群間の発現率に差はなかった。死亡動物の組織所見から被験物質の腎臓への影響が示唆されたが、生存例では腎臓に対する影響は認められなかった。

以上のことから、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの反復投与により雌の60 mg/kg 群および雌雄の600 mg/kg 群で死亡例が認められ、投与後の一般状態の変化では60 mg/kg 以上の投与群で眼瞼下垂および散瞳が、600 mg/kg 群で自発運動低下が観察された。死亡例には腺胃の潰瘍に伴う所見および腎臓で皮質や皮髄境界部に尿細管上皮の空胞変性が観察された。また、雌雄とも200 mg/kg 以上の投与群で体重の増加抑制が、600 mg/kg 群で摂餌量の高値が認められた。したがって、雌雄とも無影響量は60 mg/kg/day未満と判断された。

## 2. 生殖発生毒性

600 mg/kg群で連続した発情休止期像が観察される性周期の停止が3例認められ、平均性周期も延長を示し、被験物質投与の影響が疑われた。交尾率および受胎率に被験物質投与の影響は認められなかった。交尾の成立しなかった動物の病理学検査では特に生殖器系に変化は認められなかった。600 mg/kg群で雌雄の新生児の生後0日体重が低値を示し、4日の生存率が低値傾向を示したことから、被験物質投与による新生児の発育抑制または周産期の母動物の哺育行動に対する影響が疑われた。

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。

以上のことから、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの雄の生殖に及ぼす影響は600 mg/kg投与でも認められず、無影響量は600 mg/kg/dayと判断された。雌の生殖に及ぼす影響は600 mg/kg投与で平均性周期が延長したことから、無影響量は200 mg/kg/dayと判断された。新生児の発生・発育に及ぼす影響は600 mg/kg投与で発育抑制が認められ、新生児の4日の生存率が低値傾向を示したことから無影響量は200 mg/kg/dayと判断された。

## 文献

- 1) C.G. Shayne, S.W. Carrol, "Statics and Experimental Design For Toxicologists," Telford Press, 1986.
- 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. J. Soc. Comp. Stat.*, 1, 111 (1988).
- 4) 佐久間昭, "薬効評価 I - 計画と解析 -," 東京大学出版会, 東京, 1977.
- 5) 石居 進, "生物統計学入門," 培風館, 東京, 1975.

## 連絡先

試験責任者: 田中亮太

試験担当者: 伊藤圭一, 大庭耕輔, 宮島留美子

財団法人 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),

Keiichi Ito, Kousuke Oba,

Rumiko Miyajima

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 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	60 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
HCT (%)	44.5 ± 1.4	44.6 ± 1.4	45.6 ± 1.4	45.1 ± 1.9
HGB (g/dL)	15.4 ± 0.4	15.3 ± 0.4	15.7 ± 0.5	15.5 ± 0.6
RBC (×10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	8.24 ± 0.26	8.25 ± 0.39	8.48 ± 0.34	8.22 ± 0.33
MCV (μm <sup>3</sup> )	54.0 ± 1.1	54.2 ± 1.8	53.8 ± 2.0	54.8 ± 1.4
MCH (pg)	18.7 ± 0.4	18.6 ± 0.6	18.5 ± 0.7	18.8 ± 0.3
MCHC (%)	34.7 ± 0.5	34.4 ± 0.5	34.4 ± 0.7	34.3 ± 0.4
PLT (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1177 ± 124	1137 ± 81	1195 ± 64	1215 ± 133
WBC (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	10.8 ± 3.8	10.2 ± 3.0	10.1 ± 3.6	11.1 ± 3.3
Differential leukocyte counts (%)				
NEUT	13 ± 5	11 ± 4	14 ± 5	14 ± 5
LYMPH	83 ± 6	85 ± 5	82 ± 5	82 ± 6
MONO	2 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1
EOSN	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 0
PT (sec.)	14.6 ± 0.9	14.5 ± 1.1	14.4 ± 0.8	14.0 ± 0.8
APTT (sec.)	25.4 ± 1.7	25.3 ± 2.0	24.8 ± 2.7	24.1 ± 1.5
Fibrinogen (mg/dL)	245 ± 26	240 ± 17	254 ± 28	249 ± 52

NEUT:Neutrophil LYMPH:Lymphocyte MONO:Monocyte EOSN:Eosinophil BASO:Basophil

LUC:Large unstained cells

Values are expressed as Mean±S.D.

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

Dose level	0 mg/kg	60 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	9
T.protein (g/dL)	6.20 ± 0.23	6.32 ± 0.23	6.29 ± 0.31	5.96 ± 0.25
Albumin (g/dL)	3.19 ± 0.09	3.22 ± 0.16	3.27 ± 0.16	3.05 ± 0.13
A/G	1.06 ± 0.05	1.04 ± 0.05	1.08 ± 0.04	1.05 ± 0.03
Glucose (mg/dL)	148 ± 20	151 ± 17	135 ± 20	142 ± 10
Triglyceride (mg/dL)	59.3 ± 23.2	54.1 ± 14.5	50.8 ± 16.8	46.2 ± 10.0
T.cholesterol (mg/dL)	53 ± 7	50 ± 10	58 ± 9	62 ± 10
BUN (mg/dL)	14.2 ± 1.6	13.2 ± 2.5	13.6 ± 1.1	14.0 ± 2.1
Creatinine (mg/dL)	0.58 ± 0.08	0.57 ± 0.10	0.57 ± 0.10	0.57 ± 0.09
T.bilirubin (mg/dL)	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.03
GOT (U/L)	41 ± 11	41 ± 9	45 ± 11	44 ± 14
GPT (U/L)	17 ± 2	19 ± 4	20 ± 4	17 ± 4
ALP (U/L)	85 ± 18	101 ± 25	106 ± 25	91 ± 21
Gamma-GTP (U/L)	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.2
Sodium (mmol/L)	144.8 ± 1.4	145.1 ± 1.6	145.6 ± 1.2	144.4 ± 0.7
Potassium (mmol/L)	4.51 ± 0.31	4.65 ± 0.25	4.92 ± 0.81	4.52 ± 0.28
Chloride (mmol/L)	109.5 ± 2.1	109.5 ± 1.0	109.3 ± 2.1	108.8 ± 1.6
Calcium (mg/dL)	9.34 ± 0.25	9.59 ± 0.23	9.68 ± 0.34**	9.49 ± 0.14
I.phosphorus (mg/dL)	6.26 ± 0.69	6.64 ± 0.52	6.89 ± 0.83	6.79 ± 0.54

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group; \*\*:P&lt;0.01

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

Dose level		0 mg/kg	60 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
Male					
No. of animals examined		12	12	12	9
Body weight (g)		482 ± 19	475 ± 32	450 ± 26**	438 ± 19**
Absolute organ weight					
Brain (g)		2.19 ± 0.09	2.20 ± 0.06	2.18 ± 0.07	2.12 ± 0.08
Thymus (mg)		309 ± 70	293 ± 60	260 ± 71	247 ± 47
Liver (g)		13.56 ± 0.68	12.95 ± 1.37	12.94 ± 1.92	11.76 ± 1.07**
Spleen (g)		0.74 ± 0.09	0.71 ± 0.16	0.74 ± 0.11	0.71 ± 0.09
Kidneys (g)		3.39 ± 0.19	3.28 ± 0.22	3.24 ± 0.28	3.12 ± 0.22
Adrenals (mg)		66 ± 2	63 ± 7	67 ± 12	71 ± 8
Testes (g)		3.45 ± 0.22	3.27 ± 0.26	3.29 ± 0.19	3.32 ± 0.20
Epididymides (mg)		1262 ± 71	1219 ± 82	1161 ± 70**	1153 ± 69**
Relative organ weight					
Brain (g%)		0.455 ± 0.027	0.465 ± 0.034	0.486 ± 0.025*	0.485 ± 0.016*
Thymus (mg%)		64.107 ± 13.590	61.342 ± 10.685	57.534 ± 13.952	56.234 ± 10.322
Liver (g%)		2.815 ± 0.086	2.724 ± 0.150	2.867 ± 0.315	2.682 ± 0.206
Spleen (g%)		0.154 ± 0.017	0.149 ± 0.028	0.163 ± 0.019	0.161 ± 0.017
Kidneys (g%)		0.704 ± 0.051	0.695 ± 0.073	0.720 ± 0.052	0.713 ± 0.046
Adrenals (mg%)		13.688 ± 1.934	13.367 ± 1.403	14.865 ± 2.922	16.250 ± 1.836*
Testes (g%)		0.717 ± 0.060	0.692 ± 0.072	0.732 ± 0.034	0.757 ± 0.033
Epididymides (mg%)		262.543 ± 21.364	258.047 ± 26.833	258.166 ± 12.805	263.432 ± 16.636
Female					
No. of animals examined		12	11	12	9
Body weight (g)		332 ± 23	327 ± 21	308 ± 26	312 ± 26
Absolute organ weight					
Brain (g)		2.05 ± 0.07	2.07 ± 0.06	2.03 ± 0.07	2.05 ± 0.09
Thymus (mg)		180 ± 66	153 ± 65	118 ± 35*	130 ± 35
Liver (g)		14.45 ± 1.82	15.10 ± 1.52	14.56 ± 1.07	15.43 ± 2.43
Spleen (g)		0.61 ± 0.12	0.69 ± 0.11	0.60 ± 0.08	0.65 ± 0.13
Kidneys (g)		2.30 ± 0.20	2.38 ± 0.25	2.33 ± 0.16	2.35 ± 0.22
Adrenals (mg)		80 ± 10	86 ± 9	82 ± 8	87 ± 10
Ovaries (mg)		107 ± 11	110 ± 13	100 ± 7	102 ± 11
Relative organ weight					
Brain (g%)		0.619 ± 0.048	0.635 ± 0.040	0.663 ± 0.052	0.661 ± 0.056
Thymus (mg%)		53.869 ± 18.435	46.169 ± 18.173	38.455 ± 10.913	41.643 ± 10.913
Liver (g%)		4.341 ± 0.396	4.618 ± 0.403	4.741 ± 0.270	4.927 ± 0.535**
Spleen (g%)		0.184 ± 0.032	0.211 ± 0.026	0.195 ± 0.037	0.209 ± 0.034
Kidneys (g%)		0.694 ± 0.051	0.727 ± 0.065	0.760 ± 0.065*	0.754 ± 0.048
Adrenals (mg%)		24.142 ± 2.978	26.456 ± 2.873	26.647 ± 2.910	27.825 ± 2.976*
Ovaries (mg%)		32.306 ± 4.592	33.735 ± 4.443	32.679 ± 3.317	32.751 ± 2.276

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group;\*: P&lt;0.05\*\*: P&lt;0.01



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

Dose level (mg/kg)		Male animals				Female animals			
		0	60	200	600	0	60	200	600
No. of animals necropsied		12	12	12	8	12	11	12	9
Organ	Findings								
CARDIOVASCULAR SYSTEM									
heart									
	cellular infiltration	1	-	-	0	0	-	-	0
	microgranuloma	1	-	-	1	1	-	-	2
HEMATOPOIETIC SYSTEM									
spleen									
	deposit, pigment	4	-	-	3	5	-	-	7
	hematopoiesis, extramedullary	0	-	-	0	7	-	-	5
thymus									
	hemorrhage	0	-	-	0	1	-	-	1
	cortical atrophy	0	-	-	0	1	-	-	1
RESPIRATORY SYSTEM									
lung									
	hemorrhage	-	-	-	-	2(2)	-	-	-
DIGESTIVE SYSTEM									
liver									
	deposit, glycogen	0	-	-	0	1	-	-	3
	fatty change	1	-	-	0	0	-	-	0
	necrosis	0	-	-	0	0	-	-	1
	microgranuloma	5	-	-	2	0	-	-	1
	hematopoiesis, extramedullary	0	-	-	0	5	-	-	3
URINARY SYSTEM									
kidney									
	basophilic tubules	6	7	6	3	1	2	4	2
	cyst	0	0	1	0	0	0	0	0
	dilatation, tubules	0	0	0	1	0	0	0	0
	eosinophilic body	5	3	2	1	0	0	0	0
	necrosis, tubular epithelium	0	0	1	0	0	0	0	0
	cellular infiltration, lymphocyte	4	0*	2	0	0	0	0	0
	fibrosis, scar	0	0	0	0	1	0	0	1
REPRODUCTIVE SYSTEM									
epididymis									
	spermatic granuloma	-	-	-	1(1)	-	-	-	-
ovary									
	cyst, brusa	-	-	-	-	0	-	-	1

( ): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.  
Significant difference from control group; \*:  $P < 0.05$

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

Dose level (mg/kg)	Male animals								Female animals							
	0	60	200	600	0	60	200	600	0	60	200	600	0	60	200	600
No. of animals necropsied	12	12	12	8	12	12	12	9	12	12	12	9	12	12	12	9
Organ Findings	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
CARDIOVASCULAR SYSTEM																
heart																
cellular infiltration	1 0 0	- - -	- - -	0 0 0	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	0 0 0	- - -	- - -	- - -	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0
microgranuloma	1 0 0	- - -	- - -	1 0 0	1 0 0	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	- - -	2 0 0	- - -	- - -	0 0 0
HEMATOPOIETIC SYSTEM																
spleen																
deposit, pigment	4 0 0	- - -	- - -	3 0 0	5 0 0	- - -	- - -	- - -	7 0 0	- - -	- - -	- - -	7 0 0	- - -	- - -	0 0 0
hematopoiesis, extramedullary	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	6 1 0	- - -	- - -	- - -	4 1 0	- - -	- - -	- - -	4 1 0	- - -	- - -	0 0 0
thymus																
hemorrhage	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	1 0 0	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	0 0 0
cortical atrophy	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	1 0 0	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	0 0 0
RESPIRATORY SYSTEM																
lung					(2)											
hemorrhage	- - -	- - -	- - -	- - -	2 0 0	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
DIGESTIVE SYSTEM																
liver																
deposit, glycogen	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	1 0 0	- - -	- - -	- - -	3 0 0	- - -	- - -	- - -	3 0 0	- - -	- - -	0 0 0
fatty change	1 0 0	- - -	- - -	0 0 0	0 0 0	- - -	- - -	- - -	0 0 0	- - -	- - -	- - -	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0
necrosis	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	0 0 0	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	0 0 0
microgranuloma	5 0 0	- - -	- - -	2 0 0	0 0 0	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	0 0 0
hematopoiesis, extramedullary	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	5 0 0	- - -	- - -	- - -	3 0 0	- - -	- - -	- - -	3 0 0	- - -	- - -	0 0 0
URINARY SYSTEM																
kidney																
basophilic tubules	6 0 0	7 0 0	6 0 0	3 0 0	1 0 0	2 0 0	4 0 0	2 0 0	2 0 0	2 0 0	4 0 0	2 0 0	2 0 0	2 0 0	4 0 0	2 0 0
cyst	0 0 0	0 0 0	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	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
dilatation, tubules	0 0 0	0 0 0	0 0 0	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	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
eosinophilic body	4 1 0	2 1 0	1 1 0	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	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
necrosis, tubular epithelium	0 0 0	0 0 0	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	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
cellular infiltration, lymphocyte	4 0 0	0 0 0	2 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	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
fibrosis, scar	0 0 0	0 0 0	0 0 0	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	1 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
REPRODUCTIVE SYSTEM																
epididymis				(1)												
spermatic granuloma	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
ovary																
cyst, brusa	- - -	- - -	- - -	- - -	0 0 0	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	0 0 0

1:slight 2:moderate 3:marked

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

Table 6 Summary of reproductive performance in rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	60 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of pairs mated	12	11	12	10
No. of pairs copulated	12	11	12	10
No. of pregnant females	12	11	12	10
Copulation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	90.9
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Estrus cycle (days, Mean±S.D.)	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.3 ± 0.5	4.5 ± 0.4*

a) : (No. of animals with successful copulation/no. of animals mated)×100

b) : (No. of pregnant animals/no. of animals with successful copulation)×100

Values in parentheses are expressed no. of animals observed

Significant difference from control group; \*: P&lt;0.05

Table 7 Findings of delivery in dams treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine and observations on their pups (F<sub>1</sub>) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	60 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of dams observed	12	11	12	10
No. of dams delivered live pups	12	11	12	10
Duration of gestation (Mean±S.D.)	22.7 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.6 ± 0.5	22.4 ± 0.5
No. of total corpora lutea (Mean±S.D.)	226(18.8 ± 1.5)	227(20.6 ± 2.9)	235(19.6 ± 2.5)	186(18.6 ± 1.7)
No. of total implants (Mean±S.D.)	211(17.6 ± 1.6)	189(17.2 ± 3.3)	218(18.2 ± 1.9)	170(17.0 ± 2.3)
No. of total pups born (Mean±S.D.)	196(16.3 ± 2.0)	168(15.3 ± 3.3)	185(15.4 ± 1.5)	157(15.7 ± 2.7)
No. of total live pups born (Mean±S.D.)	196(16.3 ± 2.0)	167(15.2 ± 3.3)	184(15.3 ± 1.4)	157(15.7 ± 2.7)
Male	98( 8.2 ± 2.2) <sup>c)</sup>	85( 7.7 ± 2.3)	95( 7.9 ± 1.8) <sup>c)</sup>	70( 7.0 ± 3.0) <sup>c)</sup>
Female	98( 8.2 ± 1.5) <sup>c)</sup>	82( 7.5 ± 2.6) <sup>c)</sup>	89( 7.4 ± 2.2) <sup>c)</sup>	87( 8.7 ± 2.3) <sup>c)</sup>
Sex ratio (male/female, Mean±S.D.)	1.05 ± 0.37	1.15 ± 0.46	1.22 ± 0.60	0.90 ± 0.57
No. of total live pups on day 4 (Mean±S.D.)				
Male	94( 7.8 ± 2.0)	82( 7.5 ± 2.2)	78( 6.5 ± 2.7)	43( 4.3 ± 2.9)
Female	89( 7.4 ± 1.1)	71( 6.5 ± 2.5)	76( 6.3 ± 2.5)	64( 6.4 ± 3.7)
No. of total dead pups born (Mean±S.D.)	0( 0.0 ± 0.0)	1( 0.1 ± 0.3)	1( 0.1 ± 0.3)	0( 0.0 ± 0.0)
stillbirth	0( 0.0 ± 0.0)	0( 0.0 ± 0.0)	0( 0.0 ± 0.0)	0( 0.0 ± 0.0)
cannibalism	0( 0.0 ± 0.0)	1( 0.1 ± 0.3)	1( 0.1 ± 0.3)	0( 0.0 ± 0.0)
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Implantation index (% , Mean±S.D.) <sup>b)</sup>	93.4 ± 5.4	83.5 ± 14.3	93.2 ± 7.5	91.3 ± 8.0
Delivery index (% , Mean±S.D.) <sup>c)</sup>	92.9 ± 7.0	90.3 ± 16.2	85.2 ± 6.9	92.1 ± 6.0
Live birth index (% , Mean±S.D.) <sup>d)</sup>	100.0 ± 0.0	99.5 ± 1.8	99.5 ± 1.7	100.0 ± 0.0
Viability index on day 4 (% , Mean±S.D.) <sup>e)</sup>				
Male	96.1 ± 7.5	96.8 ± 5.4	82.7 ± 28.4	67.2 ± 39.2
Female	91.9 ± 9.9	86.2 ± 10.4	85.8 ± 20.3	70.7 ± 35.0

a) : (No. of females with live pups/no. of pregnant females)×100

b) : (No. of implants/no. of corpora lutea)×100

c) : (No. of pups born/no. of implants)×100

d) : (No. of live pups born/no. of pups born)×100

e) : (No. of live pups on day 4 after birth/no. of live pups born)×100

f) : Includes live pups died before observations

Values in parentheses are expressed number of animals examined

# 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの細菌を用いる復帰突然変異試験

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

### 要約

OECD既存化学物質安全点検に係わる毒性調査事業の一環として、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法により実施した。

予備試験における抗菌性の結果をもとに、本試験では S9 mix 非共存下および共存下の各菌株について 5000 ~ 156  $\mu\text{g}$ /プレート (公比2) の6濃度を設定した。

本試験を2回実施した結果、被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mix 非共存下の TA1535, WP2 *uvrA* では 5000  $\mu\text{g}$ /プレート、TA100, TA98, TA1537 では 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上で、共存下の TA100, TA1537 では 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上、TA100, TA98, TA1537 では 5000  $\mu\text{g}$ /プレートでそれぞれ抗菌性が認められた。従って2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの変異原性は陰性と結論した。

### 方法

#### 〔使用菌株〕

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>+</sup> および東京大学医科学研究所 松島教授より 1985 年 10 月 14 日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>-</sup> の 5 菌株を用いた。各菌株は超低温槽で -80℃ 以下に凍結保存したものを使用した。

試験に際して、各凍結菌株を融解後、その 20  $\mu\text{L}$  をニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath 社) 25 g を 1 L の精製水に溶解して作製した液体完全培地 10 mL に接種し、37℃ で 8 時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は菌濃度を測定した後、試験に使用した。

#### 〔被験物質〕

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジン (ロット番号: 6509051, 三井石油化学工業(株)提供) は、分子式  $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}$ , 分子量 157.26, 純度 99.8% (不純物として、トリアセトンアミン 0.1% 以下, 2,2,6,6-テトラメチル-4-アミノピペリジン 0.02%, 2,2,6,6-テトラメチルテトラヒ

ドロピラン-4-オール 0.04% を含む) の白色顆粒であり、通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し、確認した。

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンは注射用水 (DW, 大塚製薬工場) を用いて最高濃度 (50 mg/mL) の溶液を調製した後、同溶媒で所定濃度に段階希釈したものを用いた。

#### 〔陽性対照物質〕

陽性対照物質として下記のものを用いた。

AF-2 : 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))

$\text{NaN}_3$  : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))

ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (Sigma Chemical Co.)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chemical Co.)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

$\text{NaN}_3$  は DW に、その他はジメチルスルホキシド (関東化学(株)) に溶解したものを使用した。

#### 〔培地および S9 mix の組成〕

##### 1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いて D-ビオチン、L-ヒスチジンおよび L-トリプトファン の 0.5 mM 混合水溶液を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水 100 mL に対して、粉末寒天 (Bacto-Agar, Difco 社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し、約 45℃ に保温した。

##### 2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 (オリエンタル酵母工業(株)) を購入し、使用した。なお、培地 1 L あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム七水塩	0.2 g
クエン酸一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム無水塩	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
ブドウ糖	20 g
寒天 (OXOID Agar No.1)	15 g

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めてある。