

られ衰弱したため投与9日に屠殺した。また、同群の1例が投与25日の投与前に死亡した。

生存例では、投与期間中に雌雄の100 mg/kg群の各1例に流涎が認められたが、回復期間には5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連する変化は認められなかった。

2. 体重 (Table 1, 2)

雄では100 mg/kg群で投与21日の体重に低値が認められ、投与期間中の体重増加量および体重増加率の低値も認められた。雌では100 mg/kg群で投与期間中の体重増加量および体重増加率の低値が認められた。

回復期間中の体重推移には、雌雄ともに対照群との間に差は認められなかった。

3. 摂餌量

雌雄ともに対照群との間に差は認められなかった。

4. 尿検査

投与期間最終週には、雄では100 mg/kg群で蛋白の陽性例の増加および採尿中の飲水量の低値が認められた。雌では100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加傾向がみられた。

その他に、雄の4 mg/kg群で蛋白陽性例およびケトン体陽性例の増加、カリウムおよびクロール排泄量の低値が認められたが、20 mg/kg群ではこれらの変化は認められないことから、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連はないものと考えられた。

回復期間最終週には、雄の100 mg/kg群で無機リン排泄量の高値が認められた。雌では対照群との間に差は認められなかった。

5. 血液学検査

投与期間終了時に雄の100 mg/kg群で白血球数の高値が認められた。雌では対照群との間に差は認められなかった。

回復期間終了時には、雄の100 mg/kg群で網赤血球率の高値が、雌の100 mg/kg群でヘモグロビン量の高値が認められた。

6. 血液生化学検査 (Table 3, 4)

投与期間終了時には、雄の20および100 mg/kg群でアルブミン分画比の高値および α_1 -グロブリン分画比の低値、100 mg/kg群でA/G比の高値が認められた。雌では、100 mg/kg群でA/G比の高値、アルブミン分画比の高値、 α_1 -グロブリン分画比の低値傾向およびグルコースの低値が認められた。

回復期間終了時には、雄の100 mg/kg群でクロールの低値が認められ、雌の100 mg/kg群では総蛋白の低値、アルブミンの低値、 β -グロブリン分画比の高値およびカルシウムの低値が認められた。

7. 器官重量 (Table 5, 6)

投与期間終了時には、雄では20 mg/kg以上の群で脳の相対重量の高値、100 mg/kg群で剖検時体重の低値、心臓および肺の絶対重量の低値ならびに腎臓の相対重量の高値が認められた。雌では、100 mg/kg群で剖検時体重の低値傾向、胸腺および腎臓の相対重量の高値が認められた。その他に、4 mg/kg群で肝臓の絶対重量および相対重量の低値が認められたが、低用量群のみでの変化であった。

回復期間終了時には雄の100 mg/kg群で肝臓の相対重量ならびに心臓の絶対重量および相対重量の高値が認められた。雌では、100 mg/kg群で肝臓の相対重量の高値が認められた。

8. 剖検

雄の100 mg/kg群の衰弱屠殺例では盲腸と腹腔内脂肪織との癒着、盲腸の内腔拡張および粘膜灰白色化が認められたが、死亡例では異常所見は認められなかった。

投与期間終了時には、雄の100 mg/kg群で腎臓の褪色が3例に認められた。雌では5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連する異常所見は認められなかった。

回復期間終了時には、雌雄ともに5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連する異常所見は認められなかった。

9. 病理組織学検査 (Table 7, 8)

雄の100 mg/kg群の衰弱屠殺例では盲腸の壊死、炎症などが認められ、死亡例では腎臓に軽度の近位尿細管上皮の硝子滴が認められた。

投与期間終了時剖検例では、雄の腎臓で4および20 mg/kg群のそれぞれ5および7例に軽度の近位尿細管上皮の硝子滴が、100 mg/kg群の6例に中等度の近位尿細管上皮の硝子滴が、20および100 mg/kg群のそれぞれ2および3例に軽度の近位尿細管上皮の好酸性小体が、20および100 mg/kg群の各1例に中等度の近位尿細管上皮の好酸性小体が認められた。雄の甲状腺では、4、20および100 mg/kg群のそれぞれ1、1および6例にろ胞細胞の軽度の肥大およびコロイドの軽度の減少が、4および100 mg/kg群の各1例にろ胞の軽度の不整形化が認められた。雌の甲状腺では、100 mg/kg群の1例にろ胞細胞の軽度の肥大およびコロイドの軽度の減少が認められた。その他の所見は、発生例数が少なく、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連のない変化と考えられた。

回復期間終了時剖検例では、雄の腎臓で100 mg/kg群の4例に近位尿細管上皮の軽度の硝子滴が、100 mg/kg群の2例に近位尿細管上皮の軽度の好酸性小体が認められた。その他の所見は、発生例数が少なく、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連のない変化と考えられた。

考察

5-エチリデン-2-ノルボルネンの0(トウモロコシ油)、4、20および100 mg/kgを1群あたり雌雄各7あるいは14

匹のCrj:CD(SD)IGSラットに28日間反復経口投与して毒性を検討し、さらに0および100 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて14日間の回復性も併せて検討した。

100 mg/kg群の雄1例に腹腔内腫瘍、自発運動の減少、呼吸不整、下痢および肛門周囲の被毛汚染が認められ、衰弱したため投与9日に屠殺した。この例では剖検で盲腸と腹腔内脂肪織との癒着、盲腸の内腔拡張および粘膜灰白色化が認められ、病理組織学検査では盲腸の壊死、炎症などが認められた。しかし、同群の他の例には盲腸への影響は認められておらず、本屠殺例の衰弱の原因と考えられる盲腸の変化と5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連は明らかにはならなかった。また、100 mg/kg群の雄1例が投与25日の投与前に死亡し、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による死亡が疑われたが、死因と考えられる変化は認められなかった。

生存例では、投与期間中に雌雄の100 mg/kg群の各1例に流涎が認められたが、5-エチリデン-2-ノルボルネンの粘膜に対する刺激性²⁾あるいは不快臭によるものと考えられ、毒性を示唆する変化ではないと考えられた。

体重推移では、雌雄の100 mg/kg群で投与期間中の体重増加量および増加率の低値が認められたが、回復期間には対照群との差は認められず、可逆的な変化と考えられた。

尿検査では、投与期間最終週に雄の100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加および採尿中の飲水量の低値が、雌の100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加傾向が認められた。しかし、回復期間にはこれらの変化は認められず、可逆的な変化と考えられた。

血液生化学検査では投与期間終了時に、雄の20および雌の100 mg/kg群でアルブミン分画比およびA/G比の高値ならびに α_1 -グロブリン分画比の低値あるいは低値傾向が認められた。これらの群では総蛋白およびアルブミン量に変化は認められないことから、アルブミン分画比の高値は α_1 -グロブリン分画比の低値による相対的増加と考えられ、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与により、 α_1 -グロブリン量の低値をもたらしたと考えられた。しかし、これらの変化は回復期間終了時には認められず、可逆的な変化と考えられた。

器官重量では、投与期間終了時に雌雄の100 mg/kg群で腎臓の相対重量の高値が認められ、雄の100 mg/kg群では剖検で腎臓の褐色が認められた。

病理組織学検査では、雄の4、20および100 mg/kg群で近位尿細管上皮の硝子滴が認められ、20および100 mg/kg群では近位尿細管上皮の好酸性小体も認められた。炭化水素化合物をラットに経口投与した場合、特に雄では腎臓の近位尿細管に硝子滴として沈着し、硝子滴の沈着の程度が強い場合には尿細管上皮の障害を引き起こすことが知られ²⁾、好酸性小体については硝子滴と同一物質との報告もある³⁾。したがって、本試験の雄の4 mg/kg以上の群で認められた近位尿細管上皮の硝子滴ならびに20 mg/kg以上の群で認められた好酸性小体は5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による影響と推察された。回復期間終了時には雄の100 mg/kg群で近位尿細管

上皮の硝子滴が認められたが、発生頻度は減少しており、器官重量および剖検で腎臓に異常は認められなかったことから、回復性のある変化と考えられた。

また、投与期間終了時には雄の4 mg/kg以上の群で甲状腺にろ胞細胞の肥大、コロイドの減少あるいはろ胞の不整形化が認められ、雌の100 mg/kg群でもろ胞細胞の肥大およびコロイドの減少が認められた。この甲状腺の重量増加を伴わない変化は、下垂体などの上位の内分泌系への影響を介した甲状腺機能の低下によると報告されている⁴⁾。しかし、本試験では下垂体の重量測定および病理組織学検査において異常は認められず、血中のTSHあるいは T_3 、 T_4 濃度等の測定を行っていないため、甲状腺でみられた変化の機序は明らかとはならなかった。また、回復期間終了時には甲状腺に異常は認められず、可逆的な変化と考えられた。

以上のほかに、尿検査では、回復期間最終週に、雄の100 mg/kg群で無機リン排泄量の高値が認められた。また、血液生化学検査では、投与期間終了時に雌の100 mg/kg群でグルコースの低値が認められ、回復期間終了時には、雄の100 mg/kg群でクロールの低値、雌の100 mg/kg群で総蛋白の低値、アルブミン量の低値、 β -グロブリン分画比の高値およびカルシウムの低値が認められた。しかし、いずれも軽微な変化であり5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連はないと考えられた。

血液学検査では、投与期間終了時に雄の100 mg/kg群で白血球数の高値が認められたが、生存例では炎症性的変化は認められず、造血系の器官にも異常は認められなかった。また、白血球百分比でも異常は認められていないことから5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連は明らかにはならなかった。回復期間終了時には、雄の100 mg/kg群で網赤血球率の高値が、雌の100 mg/kg群でヘモグロビン量の高値が認められた。しかし、他の赤血球パラメーターに異常は認められなかったことから、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与とは関連のない変化と考えられた。

器官重量では、投与期間終了時に雄の20 mg/kg以上の群で脳の相対重量の高値、100 mg/kg群で心臓および肺の絶対重量の低値が認められ、雌の100 mg/kg群で胸腺の相対重量の高値が認められたが、いずれも体重の低値に伴う変化であった。また、回復期間終了時には雌雄の100 mg/kg群で肝臓の相対重量の高値が認められ、雄の100 mg/kg群では心臓の絶対重量および相対重量の高値が認められたが、病理組織学検査では特記すべき所見は認められず、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与とは関連のない変化と考えられた。

以上のように、雄の4 mg/kg以上の群で腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴、甲状腺のろ胞細胞の肥大、ろ胞の不整形化およびコロイドの減少が認められ、雌の100 mg/kg群で尿蛋白陽性例の増加傾向、 α_1 -グロブリンの低値傾向ならびに腎臓の相対重量の高値、甲状腺のろ胞細胞の肥大およびコロイドの減少が認められたことから、本試験における5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による無影響量(NOEL)は、雄で4 mg/kg/day未満、雌

で20 mg/kg/dayであると考えられた。

文献

- 1) B. Ballantyne, et al., *J. Appl. Toxicol.*, **17**, 211 (1997).
- 2) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation," Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands, 1990, pp.532-538.
- 3) S. Uwagasa, *J. Toxicol. Pathol.*, **5**, 195 (1992).
- 4) 長瀬すみら, "実験動物の臨床生化学データ-病理組織像との関連-", ソフトサイエンス社, 東京, 1976, p.339.

連絡先

試験責任者: 吉村浩幸
試験担当者: 茂野 均, 長谷淳一, 古川正敏,
河村公太郎, 武田みよ子,
引地のゆみ

(株)化合物安全性研究所
〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors: Hiroyuki Yoshimura (Study director)
Hitoshi Shigeno, Junichi Nagaya,
Masatoshi Furukawa,
Kotaro Kawamura, Miyoko Takeda,
Noyumi Hikichi

Safety Research Institute for Chemical
Compounds Co., Ltd.
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,
004-0839, Japan
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Body weight changes of male rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
Administration period				
Number of animals	14	7	7	14
Day 1	151.7 ± 6.1	153.1 ± 3.8	150.4 ± 4.7	152.2 ± 4.1
2	160.6 ± 6.6	161.1 ± 4.6	159.3 ± 4.8	160.8 ± 4.8
5	188.4 ± 9.0	189.3 ± 5.6	185.7 ± 7.3	186.6 ± 5.3
7	205.4 ± 11.3	207.3 ± 6.4	202.9 ± 8.0	202.9 ± 6.0
10	232.9 ± 13.9	234.9 ± 8.3	229.3 ± 9.8	229.3 ± 7.3 (13)*
14	267.9 ± 15.4	269.0 ± 9.9	262.7 ± 13.5	258.8 ± 11.7 (13)
21	328.2 ± 19.6	324.7 ± 16.7	319.6 ± 18.0	309.6 ± 16.8* (13)
28	372.4 ± 23.4	362.0 ± 21.2	360.6 ± 25.0	350.5 ± 19.8 (12)
Day 1-28, gain	220.7 ± 20.6	208.9 ± 19.7	210.1 ± 23.6	197.9 ± 19.1* (12)
Body weight gain ^b (%)	145.5 ± 12.8	136.4 ± 12.2	139.7 ± 15.3	129.8 ± 12.8* (12)
Recovery period				
Number of animals	7			6
Day 1	369.7 ± 26.4	-	-	366.5 ± 19.7
2	373.0 ± 26.8	-	-	371.0 ± 20.9
5	392.4 ± 26.2	-	-	391.7 ± 24.8
7	401.4 ± 26.7	-	-	403.8 ± 28.1
14	434.4 ± 30.9	-	-	436.5 ± 34.4
Day 1-14, gain	64.7 ± 5.6	-	-	70.0 ± 16.4
Body weight gain ^b (%)	17.5 ± 1.0	-	-	19.0 ± 3.6

Values are expressed as Mean ± S.D. (gram)

- : blank value.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$)

a) Values in parentheses are number of animals examined.

b) (Body weight gain/body weight on day 1) × 100.

Table 2 Body weight changes of female rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
Administration period				
Number of animals	14	7	7	14
Day 1	136.1 ± 6.0	137.1 ± 6.7	135.4 ± 5.3	136.1 ± 6.2
2	141.0 ± 6.4	139.6 ± 5.3	142.3 ± 6.0	141.7 ± 6.4
5	155.7 ± 9.1	156.3 ± 8.3	155.0 ± 8.7	152.9 ± 10.6
7	164.6 ± 9.2	161.7 ± 8.4	163.4 ± 7.3	159.2 ± 9.3
10	176.8 ± 10.6	169.4 ± 9.5	173.3 ± 7.8	169.1 ± 10.6
14	191.5 ± 13.4	181.4 ± 11.7	188.9 ± 9.6	182.4 ± 12.8
21	216.1 ± 17.6	204.9 ± 17.2	211.9 ± 7.8	202.9 ± 17.4
28	236.5 ± 20.2	225.6 ± 21.6	235.4 ± 7.2	221.8 ± 18.6
Day 1-28, gain	100.4 ± 16.4	88.4 ± 15.5	100.0 ± 7.9	85.7 ± 13.4*
Body weight gain* (%)	73.6 ± 10.8	64.2 ± 8.5	74.0 ± 7.8	62.8 ± 8.0**
Recovery period				
Number of animals	7			7
Day 1	241.7 ± 31.0	-	-	226.3 ± 19.0
2	245.0 ± 33.3	-	-	232.9 ± 17.8
5	251.4 ± 33.9	-	-	239.9 ± 20.2
7	260.7 ± 37.9	-	-	252.7 ± 18.8
14	275.0 ± 43.1	-	-	264.1 ± 19.0
Day 1-14, gain	33.3 ± 13.7	-	-	37.9 ± 5.3
Body weight gain* (%)	13.4 ± 4.3	-	-	16.9 ± 2.9

Values are expressed as Mean ± S.D. (gram)

- : blank value.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

a) (Body weight gain / body weight on day 1) × 100.

Table 3 Blood chemical findings of male rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals	7	7	7	6	7	6
Total protein(g/dL)	5.63 ± 0.20	5.51 ± 0.23	5.57 ± 0.22	5.42 ± 0.17	5.87 ± 0.29	6.00 ± 0.25
Albumin(g/dL)	2.31 ± 0.07	2.33 ± 0.08	2.40 ± 0.12	2.38 ± 0.04	2.41 ± 0.11	2.42 ± 0.08
A/G	0.701 ± 0.053	0.736 ± 0.054	0.759 ± 0.043	0.790 ± 0.057*	0.704 ± 0.076	0.680 ± 0.042
Protein fraction(%)						
Albumin	53.34 ± 2.19	54.31 ± 1.99	55.70 ± 1.44*	57.48 ± 0.98**	52.80 ± 3.37	51.38 ± 1.36
α_1 -globulin	23.56 ± 1.66	22.50 ± 1.92	21.06 ± 1.55*	19.02 ± 0.81**	24.49 ± 2.30	25.65 ± 1.84
α_2 -globulin	7.09 ± 0.85	6.74 ± 1.57	6.54 ± 0.87	7.40 ± 0.46	5.77 ± 0.62	5.97 ± 0.57
β -globulin	15.04 ± 0.84	15.41 ± 1.11	15.49 ± 1.21	15.28 ± 0.71	15.21 ± 0.97	15.43 ± 1.52
γ -globulin	0.97 ± 0.52	1.03 ± 0.44	1.21 ± 0.92	0.82 ± 0.38	1.73 ± 0.69	1.57 ± 0.50
GOT(IU/L)	93.0 ± 12.8	80.4 ± 5.9	93.1 ± 19.6	89.7 ± 23.2	104.0 ± 16.6	98.3 ± 14.2
GPT(IU/L)	22.9 ± 3.8	23.6 ± 4.3	23.0 ± 4.6	22.3 ± 4.5	25.7 ± 3.0	22.8 ± 4.0
ALP(IU/dL)	425.6 ± 110.7	478.1 ± 77.5	482.4 ± 43.4	360.5 ± 80.2	416.9 ± 101.4	355.3 ± 56.9
LDH(IU/dL)	1991.6 ± 634.9	1197.3 ± 257.8	1804.6 ± 723.5	1644.7 ± 968.3	1959.4 ± 633.6	1779.8 ± 462.1
γ -GTP(IU/dL)	1.00 ± 0.30	1.16 ± 0.43	1.23 ± 0.65	1.12 ± 0.33	1.04 ± 0.13	0.90 ± 0.38
Total bilirubin(mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose(mg/dL)	139.4 ± 19.3	141.7 ± 16.9	132.9 ± 11.7	126.3 ± 16.8	145.9 ± 16.6	151.0 ± 20.4
Total cholesterol(mg/dL)	53.6 ± 5.1	47.0 ± 7.3	56.4 ± 9.1	60.8 ± 5.5	48.4 ± 11.6	50.0 ± 4.8
Triglyceride(mg/dL)	42.9 ± 11.7	42.1 ± 12.2	40.3 ± 14.5	57.2 ± 24.2	37.0 ± 15.0	42.7 ± 11.4
Urea nitrogen(mg/dL)	13.43 ± 2.16	13.41 ± 1.27	13.39 ± 1.09	14.05 ± 1.10	17.43 ± 1.60	16.68 ± 1.98
Creatinine(mg/dL)	0.47 ± 0.05	0.47 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.48 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.50 ± 0.00
Sodium(mEq/L)	145.79 ± 1.58	143.57 ± 2.17	145.00 ± 1.50	145.33 ± 1.57	145.86 ± 1.28	145.17 ± 0.93
Potassium(mEq/L)	5.021 ± 0.309	4.986 ± 0.458	5.324 ± 0.233	5.453 ± 0.222	4.734 ± 0.309	4.887 ± 0.316
Chlorine(mEq/L)	106.4 ± 1.4	105.9 ± 2.0	106.6 ± 1.1	105.3 ± 0.8	108.3 ± 1.4	106.0 ± 1.4*
Calcium(mg/dL)	10.20 ± 0.26	9.80 ± 0.42	10.00 ± 0.34	10.07 ± 0.26	9.57 ± 0.39	9.72 ± 0.40
Inorganic phosphorous(mg/dL)	9.01 ± 0.67	8.99 ± 0.27	9.06 ± 0.69	9.47 ± 0.43	7.70 ± 0.23	8.05 ± 0.44

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 4 Blood chemical findings of female rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	6.14 ± 0.36	5.83 ± 0.28	5.99 ± 0.31	5.83 ± 0.21	6.51 ± 0.40	6.04 ± 0.22*
Albumin (g/dL)	2.64 ± 0.20	2.49 ± 0.16	2.59 ± 0.12	2.69 ± 0.18	2.76 ± 0.16	2.57 ± 0.13*
A/G	0.757 ± 0.030	0.744 ± 0.047	0.761 ± 0.035	0.857 ± 0.070**	0.736 ± 0.056	0.740 ± 0.040
Protein fraction (%)						
Albumin	59.26 ± 1.77	58.81 ± 2.80	60.14 ± 1.01	62.79 ± 1.52**	58.50 ± 2.38	57.13 ± 2.80
α_1 -globulin	18.04 ± 2.12	18.59 ± 2.09	18.07 ± 1.04	16.06 ± 0.93	19.37 ± 1.90	19.11 ± 1.35
α_2 -globulin	6.17 ± 0.74	6.46 ± 0.79	5.33 ± 0.48	5.69 ± 0.75	5.40 ± 0.68	5.07 ± 0.94
β -globulin	15.24 ± 1.35	14.54 ± 1.38	14.99 ± 0.95	14.10 ± 0.81	14.09 ± 1.18	15.81 ± 1.38*
γ -globulin	1.29 ± 0.30	1.60 ± 0.68	1.47 ± 0.24	1.37 ± 0.59	2.64 ± 1.03	2.87 ± 0.94
GOT (IU/L)	123.4 ± 31.1	106.0 ± 34.1	108.4 ± 14.9	117.7 ± 25.4	107.0 ± 17.7	113.1 ± 22.8
GPT (IU/L)	20.9 ± 4.2	20.6 ± 2.6	21.9 ± 4.6	22.3 ± 5.6	25.9 ± 4.0	22.7 ± 2.9
ALP (IU/dL)	279.6 ± 41.4	287.4 ± 55.9	289.1 ± 64.8	269.9 ± 79.2	163.0 ± 44.1	146.3 ± 27.8
LDH (IU/dL)	3080.9 ± 1547.7	2206.0 ± 1244.4	2317.7 ± 637.7	2802.4 ± 1042.1	2261.4 ± 799.1	2820.7 ± 1117.0
γ -GTP (IU/dL)	1.13 ± 0.38	1.17 ± 0.35	1.26 ± 0.43	1.04 ± 0.46	1.03 ± 0.45	0.97 ± 0.26
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose (mg/dL)	132.6 ± 15.3	122.0 ± 12.1	135.0 ± 18.0	113.3 ± 6.0*	132.3 ± 23.6	138.9 ± 21.7
Total cholesterol (mg/dL)	62.6 ± 21.6	53.4 ± 12.9	58.0 ± 4.0	54.3 ± 15.0	70.4 ± 7.9	73.1 ± 13.1
Triglyceride (mg/dL)	15.9 ± 6.8	11.0 ± 2.6	16.0 ± 4.7	19.3 ± 5.5	19.0 ± 21.0	19.4 ± 8.6
Urea nitrogen (mg/dL)	16.21 ± 2.28	16.04 ± 0.91	16.94 ± 1.43	15.96 ± 2.25	17.20 ± 1.71	17.27 ± 0.73
Creatinine (mg/dL)	0.51 ± 0.09	0.47 ± 0.08	0.51 ± 0.07	0.51 ± 0.04	0.57 ± 0.05	0.56 ± 0.05
Sodium (mEq/L)	143.86 ± 0.63	143.71 ± 0.76	143.64 ± 0.75	143.50 ± 1.63	144.29 ± 1.32	144.86 ± 1.03
Potassium (mEq/L)	4.613 ± 0.263	4.533 ± 0.275	4.404 ± 0.255	4.719 ± 0.255	4.344 ± 0.376	4.377 ± 0.462
Chlorine (mEq/L)	107.1 ± 1.8	108.1 ± 1.6	107.6 ± 1.4	106.9 ± 2.8	107.9 ± 1.7	107.0 ± 0.8
Calcium (mg/dL)	9.91 ± 0.23	9.81 ± 0.21	9.99 ± 0.50	9.89 ± 0.36	9.84 ± 0.25	9.54 ± 0.21*
Inorganic phosphorous (mg/dL)	7.86 ± 0.94	7.61 ± 1.07	7.99 ± 0.95	8.00 ± 1.10	6.23 ± 0.59	6.71 ± 0.27

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 5 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals	7	7	7	6	7	6
Body weight (g)	354.1 ± 14.7	335.6 ± 19.5	333.1 ± 22.5	310.7 ± 13.8**	397.3 ± 27.0	402.8 ± 31.4
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.036 ± 0.054	1.963 ± 0.135	2.057 ± 0.078	1.995 ± 0.104	2.091 ± 0.063	2.085 ± 0.078
Liver (g)	11.297 ± 0.854	10.237 ± 0.960	10.649 ± 1.357	10.915 ± 1.669	11.023 ± 1.162	12.588 ± 1.575
Heart (g)	1.270 ± 0.096	1.169 ± 0.070	1.194 ± 0.109	1.118 ± 0.065*	1.323 ± 0.106	1.480 ± 0.076*
Lung (g)	1.349 ± 0.061	1.253 ± 0.099	1.343 ± 0.081	1.220 ± 0.045*	1.360 ± 0.077	1.332 ± 0.127
Spleen (g)	0.653 ± 0.079	0.623 ± 0.106	0.646 ± 0.089	0.578 ± 0.055	0.690 ± 0.102	0.688 ± 0.085
Kidney (g)	2.683 ± 0.204	2.561 ± 0.245	2.719 ± 0.267	2.657 ± 0.231	2.876 ± 0.313	3.045 ± 0.353
Pituitary gland (mg)	11.51 ± 1.42	10.87 ± 1.50	10.79 ± 0.78	10.05 ± 0.87	13.14 ± 1.27	13.42 ± 1.75
Thymus (mg)	613.4 ± 131.1	574.0 ± 98.4	577.7 ± 57.5	626.0 ± 140.4	601.6 ± 132.4	620.8 ± 112.3
Thyroid (mg)	22.129 ± 3.036	21.086 ± 2.806	21.086 ± 2.490	19.350 ± 2.089	20.000 ± 3.643	21.450 ± 3.313
Adrenal (mg)	58.000 ± 8.981	55.143 ± 6.842	50.571 ± 5.159	54.667 ± 7.230	60.571 ± 7.413	65.833 ± 4.355
Testis (g)	3.150 ± 0.181	2.969 ± 0.360	3.120 ± 0.182	2.828 ± 0.199	3.174 ± 0.185	3.080 ± 0.166
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.574 ± 0.018	0.587 ± 0.052	0.621 ± 0.041*	0.643 ± 0.010**	0.527 ± 0.039	0.520 ± 0.046
Liver (g%)	3.191 ± 0.226	3.050 ± 0.202	3.190 ± 0.238	3.503 ± 0.412	2.773 ± 0.217	3.120 ± 0.260*
Heart (g%)	0.359 ± 0.021	0.350 ± 0.018	0.359 ± 0.024	0.360 ± 0.019	0.333 ± 0.010	0.372 ± 0.026**
Lung (g%)	0.381 ± 0.025	0.376 ± 0.030	0.406 ± 0.021	0.393 ± 0.023	0.344 ± 0.026	0.332 ± 0.042
Spleen (g%)	0.184 ± 0.023	0.186 ± 0.028	0.193 ± 0.023	0.187 ± 0.020	0.173 ± 0.024	0.170 ± 0.011
Kidney (g%)	0.756 ± 0.044	0.761 ± 0.052	0.814 ± 0.044	0.855 ± 0.062**	0.724 ± 0.053	0.757 ± 0.083
Pituitary gland (mg%)	3.254 ± 0.405	3.229 ± 0.288	3.240 ± 0.171	3.237 ± 0.280	3.309 ± 0.269	3.328 ± 0.290
Thymus (mg%)	173.669 ± 38.209	172.611 ± 37.170	173.874 ± 19.136	201.773 ± 44.644	151.024 ± 28.834	153.898 ± 23.674
Thyroid (mg%)	6.246 ± 0.794	6.294 ± 0.866	6.383 ± 1.083	6.248 ± 0.799	5.007 ± 0.594	5.343 ± 0.840
Adrenal (mg%)	16.373 ± 2.392	16.459 ± 1.979	15.161 ± 0.788	17.592 ± 2.072	15.277 ± 1.885	16.463 ± 2.079
Testis (g%)	0.890 ± 0.040	0.886 ± 0.100	0.940 ± 0.082	0.910 ± 0.065	0.801 ± 0.062	0.767 ± 0.069

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 6 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Body weight (g)	219.1 ± 10.0	209.1 ± 18.6	217.9 ± 5.7	203.1 ± 19.9	253.7 ± 39.0	245.0 ± 18.2
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.930 ± 0.103	1.947 ± 0.074	1.869 ± 0.135	1.849 ± 0.088	2.010 ± 0.108	1.949 ± 0.053
Liver (g)	6.829 ± 0.425	6.030 ± 0.623*	6.684 ± 0.485	6.651 ± 0.784	6.797 ± 1.149	6.931 ± 0.645
Heart (g)	0.834 ± 0.036	0.760 ± 0.052	0.823 ± 0.049	0.806 ± 0.079	0.917 ± 0.068	0.911 ± 0.082
Lung (g)	1.046 ± 0.094	1.011 ± 0.057	1.049 ± 0.045	1.027 ± 0.111	1.080 ± 0.067	1.086 ± 0.028
Spleen (g)	0.487 ± 0.101	0.463 ± 0.064	0.453 ± 0.057	0.466 ± 0.100	0.464 ± 0.043	0.501 ± 0.084
Kidney (g)	1.663 ± 0.128	1.699 ± 0.143	1.654 ± 0.091	1.681 ± 0.140	1.794 ± 0.210	1.826 ± 0.165
Pituitary gland (mg)	13.13 ± 2.98	13.04 ± 2.05	12.69 ± 1.62	12.80 ± 1.53	14.11 ± 1.80	13.87 ± 2.19
Thymus (mg)	481.3 ± 66.6	482.1 ± 66.8	485.9 ± 51.8	578.0 ± 107.5	455.7 ± 103.9	466.1 ± 50.7
Thyroid (mg)	14.429 ± 3.355	15.371 ± 3.042	14.933 ± 2.252	15.343 ± 3.260	15.857 ± 2.293	14.000 ± 1.697
Adrenal (mg)	68.143 ± 11.908	59.857 ± 6.094	64.571 ± 9.090	67.286 ± 7.675	63.286 ± 6.047	65.429 ± 4.860
Ovary (mg)	91.143 ± 9.245	91.714 ± 8.902	89.714 ± 9.827	92.714 ± 11.743	92.143 ± 12.240	91.714 ± 13.363
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.881 ± 0.048	0.934 ± 0.084	0.856 ± 0.066	0.914 ± 0.058	0.809 ± 0.141	0.799 ± 0.069
Liver (g%)	3.119 ± 0.150	2.886 ± 0.195*	3.069 ± 0.203	3.270 ± 0.123	2.679 ± 0.122	2.827 ± 0.098*
Heart (g%)	0.380 ± 0.018	0.366 ± 0.014	0.379 ± 0.016	0.399 ± 0.019	0.369 ± 0.032	0.371 ± 0.011
Lung (g%)	0.477 ± 0.031	0.486 ± 0.024	0.483 ± 0.022	0.504 ± 0.017	0.431 ± 0.047	0.444 ± 0.030
Spleen (g%)	0.223 ± 0.039	0.220 ± 0.014	0.209 ± 0.024	0.229 ± 0.038	0.184 ± 0.028	0.206 ± 0.033
Kidney (g%)	0.759 ± 0.045	0.814 ± 0.047	0.759 ± 0.045	0.830 ± 0.052*	0.711 ± 0.042	0.744 ± 0.033
Pituitary gland (mg%)	5.991 ± 1.325	6.251 ± 0.952	5.831 ± 0.820	6.317 ± 0.672	5.630 ± 0.832	5.686 ± 0.962
Thymus (mg%)	219.017 ± 22.731	230.400 ± 22.794	222.671 ± 19.395	283.333 ± 34.332**	180.579 ± 40.788	190.486 ± 17.852
Thyroid (mg%)	6.556 ± 1.353	7.367 ± 1.410	6.855 ± 0.973	7.576 ± 1.554	6.323 ± 0.992	5.714 ± 0.555
Adrenal (mg%)	31.234 ± 6.143	28.616 ± 1.385	29.701 ± 4.727	33.244 ± 3.710	25.323 ± 3.618	26.839 ± 2.857
Ovary (mg%)	41.711 ± 5.073	43.959 ± 3.815	41.134 ± 3.813	46.126 ± 7.555	36.831 ± 6.477	37.567 ± 5.791

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 7 Histopathological findings of male rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item		End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals examined		7	7	7	6	7	6
Organ: Findings	Grade						
Kidney: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	Total	1	5	7	6	0	4
	+	1	5	7	0	0	4
	++	0	0	0	6	0	0
Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	Total	0	0	3	4	0	2
	+	0	0	2	3	0	2
	++	0	0	1	1	0	0
Thyroid: Hypertrophy, follicular cell	+	0	1	1	6	0	0
	Decrease, colloid	+	0	1	1	6	0
	Irregular, shape, follicle	+	0	1	0	1	0

Values are number of animals with findings.

Grade of histopathological finding; +: slight, ++: moderate.

Table 8 Histopathological findings of female rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item		End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals examined		7	7	7	7	7	7
Organ: Findings	Grade						
Thyroid: Hypertrophy, follicular cell	+	0	0	0	1	0	0
	Decrease, colloid	+	0	0	0	1	0

Values are number of animals with findings.

Grade of histopathological finding; +: slight.

5-エチリデン-2-ノルボルネンのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験

Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test of 5-Ethylidene-2-norbornene by Oral Administration in Rats

要約

5-エチリデン-2-ノルボルネンは、高分子ゴム改質剤、塗料、接着剤などの製造に使用されている¹⁾。毒性に関する情報としては、ラットの経口投与によるLD₅₀値は2527 mg/kg²⁾で、皮膚や粘膜に刺激性を有する報告³⁾などがあるが、生殖発生毒性については知られていない。今回、SDラット(1群雌雄各12匹)に4, 20および100 mg/kgの用量を交配前14日から交配を経て雄は計45日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育3日まで経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

1. 反復投与毒性

100 mg/kg群において、雄で死亡が投与25および36日にそれぞれ1例認められ、雌雄とも投与開始後7日から剖検時まで体重増加の抑制および摂餌量の減少が認められた。また、雄では肝臓の相対重量の増加および暗褐色化がみられ、病理組織学的には小葉中心性肝細胞肥大および肝細胞の空胞化などが認められた。

2. 生殖発生毒性

親動物では、100 mg/kg群において、交尾率、受胎率、出産率、黄体数、分娩状態および哺育行動には被験物質に起因する変化は認められなかったが、妊娠期間の延長、着床数の低値傾向、着床率および分娩率の減少が認められた。

児動物では、100 mg/kg群において、総出産児数、出生産児数および哺育4日の生児数に低値が認められた。

その他、性比、出生率、新生児の4日の生存率、剖検所見および外表に被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果より、5-エチリデン-2-ノルボルネンの反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも20 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量についても親動物および児動物ともに20 mg/kg/dayと考えられた。

方法

1. 被験物質

5-エチリデン-2-ノルボルネン [(株)サン・ペトロケミカル、茨城、Lot No. 7K03、純度99.5%] は、融点-80℃以下、沸点147℃、蒸気圧6 mmHg/25℃、水との反応性はなく、320℃以上で異常発熱し、光で着色、水に0.01 g以下/100 g(25℃)溶解し、有機溶剤に易溶の不快

臭がある無色透明な液体である。被験物質は酸化劣化を防止するため窒素シールを行い、密閉、冷蔵、遮光下で保管した。なお、被験物質は試験期間中安定であったことが確認された。被験物質はコーン油に溶解させ、投与に供するまで冷蔵・遮光保存し、調製後8日以内に使用した。投与開始前に投与液中の被験物質の調製後8日間の安定性および濃度を確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)から入手した雌雄のSDラット [Crj:CD(SD)IGS] を6日間検疫・馴化後、試験に供した。投与開始前日に体重別層化無作為抽出法により、1群につき雌雄各12匹を振り分けた。投与開始時の週齢は雌雄とも9週齢、体重範囲は雄が320~356 g、雌が203~237 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中、温度22±2℃、湿度55±15%、換気約12回/時、照明12時間/日(7:00~19:00)に設定した飼育室を使用した。動物は実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに、群分け後は1匹、交配期間は雌雄各1匹、哺育期間は1腹で収容し、飼育した。

動物には、オートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1:オリエンタル酵母工業(株))および孔径5 μmのフィルターで濾過後、紫外線照射した水道水をそれぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

SDラットの雌雄を用いて、被験物質を30, 100および300 mg/kgの用量で14日間経口投与した結果、100 mg/kg以上の群の雌雄で体重の増加抑制あるいは減少、肝臓重量の増加がみられ、さらに300 mg/kg群では摂餌量の減少も認められた。以上の結果から、本試験では高用量を100 mg/kgとし、以下公比5で中用量を20 mg/kg、低用量を4 mg/kgとした。また、媒体(コーン油)のみを投与する対照群を設けた。

投与期間は、雌雄とも交配前14日間、交配期間および雄は剖検前日までの計45日間、雌は交尾成立後、妊娠、分娩を経て哺育3日(交尾確認日を妊娠0日、分娩確認日を哺育0日とする)までの計40~45日間とし、テフロン製胃ゾンデを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与液量は5 mL/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。

4. 反復投与毒性に関する観察・検査

1) 一般状態

全例について生死、外観、行動等を投与前および投与後に毎日観察した。

2) 体重および摂餌量

体重は、雌雄とも投与開始日、投与開始後3, 7, 14日およびその後は週1回、交尾した雌は妊娠0, 7, 14, 20日および哺育0, 4日に測定した。また、雄では投与開始日の体重を基準に、雌では交配前期間、妊娠期間、哺育期間について、それぞれ投与開始日、妊娠0日、哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定した。

3) 病理学検査

雌雄とも最終投与日の翌日に、全生存動物についてペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈の切断・放血により安楽死させて剖検し、肝臓、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、解剖日の体重を基に相対重量(対体重比)を算出した。さらに、これらの器官に加えて、精のう、前立腺、卵巣、子宮、膈、全新生児が死亡した母動物の乳腺および肉眼的異常部位を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後保存した。ただし、死亡動物以外の精巣および精巣上体はブアン液で固定した。

病理組織学検査は、雌雄の対照群および100 mg/kg群の肝臓、精巣および精巣上体、全動物の肉眼的異常部位、非妊娠雌の卵巣について、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検した。なお、雄の肝臓で被験物質に起因する変化が認められたため、4および20 mg/kg群の雄の肝臓についても検査した。また、100 mg/kg群の代表例の肝臓は脂肪(オイルレッドO)染色標本を作製し、鏡検した。

5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

1) 生殖機能

交配前の投与期間終了後、各群内で雄1雌1の交配対を設け、昼夜同居させ、毎日午前中に雌の膈垢を採取し、ギムザ染色して鏡検した。膈垢形成あるいは膈垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。交尾した対は雌雄を分離し、以後の検査に供した。これらの結果から、交尾所要日数(交配開始後、交尾成立までに要した日数)、交尾成立までに逸した発情期の回数、交尾率 [(交尾動物数/同居動物数) × 100]、受胎率 [(受胎動物数/交尾動物数) × 100] を算出した。

2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が完了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。その後、新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。

母動物は、哺育4日の剖検時に卵巣、子宮を摘出し、

黄体数および着床数を検査した。分娩しなかった雌は交尾確認後26日に剖検し、肉眼的に着床が認められない動物の子宮は10%硫化アンモニウム水溶液に浸漬して着床の有無を確認した。これらの結果から、妊娠期間(妊娠0日から出産が確認された日までの期間)、出産率 [(生児出産雌数/受胎雌数) × 100]、着床率 [(着床数/黄体数) × 100]、分娩率 [(総出産児数/着床数) × 100] を算出した。

3) 新生児の観察・検査

(1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数(出産児数、死産児数)、性別および外表異常の有無を検査した。その後、一般状態、死亡の有無を哺育4日まで毎日観察した。哺育0および4日の生存児数から出生率 [(出産児数/総出産児数) × 100]、新生児の4日の生存率 [(哺育4日生存児数/出産児数) × 100] を算出した。

(2) 体重

哺育0および4日に全生存児を個体ごとに測定した。また、哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。

(3) 剖検

哺育4日に全生存児の口腔を含む外表を検査した後、親動物と同様にして安楽死させ、剖検した。死亡動物は食殺等で検査に耐えないものを除き、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬・固定後、実体顕微鏡下で剖検した。

6. 統計解析

計量データについては、パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い、分散が一様の場合是一元配置分散分析を行った。分散が一様でない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合はDunnett法またはDunnett型の多重比較を行った。計数データのうち、病理組織所見はa × bのχ²検定を行い、有意差が認められた場合はArmitageのχ²検定により対照群と各被験物質投与群間の比較を行った。その他の計数データはFisherの直接確率法により検定した。有意水準は5%とし、新生児に関するデータは各母動物ごとに算出した平均値を標本単位とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡動物

死亡が、100 mg/kg群の雄で投与開始後25日および36日にそれぞれ1例認められた。

2) 一般状態

投与直後の流涎が100 mg/kg群の雌雄で投与開始後16日以降から投与終了時まで数例に散見されたが、いずれも投与後約30分には回復したことや被験物質が皮膚や粘膜に対し刺激性を有することが知られている³⁾ことな