

よび妊娠黄体数の減少に起因するものであり、体重推移にも異常はみられないことから、新生児の生存性に対する3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与の影響はないと考えられた。

以上のことから、雄動物の生殖能に対する影響は600 mg/kg群でも認められず、一方、雌動物では600 mg/kg群で妊娠黄体数の減少ならびにそれに起因すると考えられる着床数の減少および妊娠期間の延長が、次世代に対しては出産児数および出産生児数の減少が認められたことから、本試験における3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの親世代の生殖に対する無影響量は、雄動物では600 mg/kg/day、雌動物では200 mg/kg/dayであり、また、次世代に対する無影響量は200 mg/kg/dayと判断した。

#### 文献

- 1) P.Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation," Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1990, pp. 532-538.
- 2) 海平充代ら, ラット慢性腎症の病理組織学的解析-硝子滴変性について-, 第8回日本毒性病理学会講演要旨集, 76(1992).
- 3) 佐久間勇次 監, "ウサギ-生殖生理と実験手技-, " 近代出版, 東京, 1988, p.24.

#### 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  
(株)化合物安全性研究所  
〒229 北海道札幌市清田区真栄363番24号  
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

#### Correspondence

Authors: Hiroyuki Yoshimura (Study director)  
Hitoshi Shigeno, Jyunichi Nagaya,  
Masatoshi Furukawa  
Safety Research Institute for Chemical  
Compounds Co., Ltd.  
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,  
004, Japan  
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Body weight changes in male rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Day 1	418.2 ± 13.4	414.7 ± 12.3	415.8 ± 15.6	416.8 ± 12.8
2	422.5 ± 15.4	419.5 ± 12.0	416.5 ± 15.8	411.6 ± 16.6
5	444.3 ± 18.3	439.3 ± 13.7	434.3 ± 18.2	424.8 ± 12.8*
7	455.0 ± 18.6	451.9 ± 16.3	441.8 ± 17.4	432.2 ± 15.5**
10	471.8 ± 19.6	465.3 ± 16.6	457.4 ± 20.1	448.0 ± 18.0**
14	496.4 ± 24.1	487.7 ± 19.9	474.2 ± 25.7	465.9 ± 21.1**
21	519.4 ± 29.5	514.0 ± 20.8	493.3 ± 27.4*	485.2 ± 25.0**
28	553.4 ± 31.7	547.3 ± 24.8	522.7 ± 34.0*	510.8 ± 27.2**
35	583.6 ± 33.8	575.8 ± 27.9	547.3 ± 37.7*	533.0 ± 27.5**
42	597.1 ± 39.3	588.8 ± 42.0	551.8 ± 45.3*	546.5 ± 31.6**
46	608.3 ± 45.9	600.1 ± 47.3	560.6 ± 49.1*	555.6 ± 33.8*
Day 1-46, gain	190.1 ± 34.3	185.4 ± 41.0	144.8 ± 42.8*	138.8 ± 24.9**
Body weight gain <sup>a)</sup> (%)	45.3 ± 7.2	44.6 ± 9.3	34.8 ± 10.0**	33.2 ± 5.4**

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

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

Significantly different from 0 mg/kg group; \*: p ≤ 0.05, \*\*: p ≤ 0.01

Table 2 Body weight changes in female rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
Before the gestation period				
No. of animals	12	12	12	12
Day 1	238.3 ± 7.8	239.5 ± 6.2	241.2 ± 11.0	240.9 ± 9.2
2	241.6 ± 11.7	241.5 ± 9.2	241.2 ± 11.1	240.6 ± 10.6
5	247.6 ± 8.9	249.1 ± 7.2	246.9 ± 11.7	240.6 ± 10.7
7	255.4 ± 12.0	252.9 ± 8.9	248.4 ± 10.1	243.3 ± 9.8*
10	260.6 ± 14.6	259.2 ± 9.4	255.5 ± 14.2	247.1 ± 10.8*
14	268.2 ± 16.6	265.2 ± 8.9	258.9 ± 15.9	250.6 ± 11.8**
Day 1-14, gain	29.8 ± 12.3	25.7 ± 8.7	17.8 ± 8.9*	9.7 ± 9.3**
Body weight gain <sup>a</sup> (%)	12.5 ± 4.9	10.8 ± 3.8	7.3 ± 3.7**	4.0 ± 3.9**
During the gestation period				
No. of animals	10	11	12	11
Day 0	278.9 ± 8.7	277.9 ± 13.4	267.9 ± 11.5	253.3 ± 9.1**
1	285.8 ± 7.7	285.5 ± 11.2	274.9 ± 11.8*	265.2 ± 8.4**
3	298.6 ± 8.4	294.3 ± 11.8	284.8 ± 12.5*	278.0 ± 8.2**
5	308.1 ± 7.9	303.5 ± 13.0	293.1 ± 12.1**	283.0 ± 7.8**
7	318.8 ± 10.7	310.6 ± 11.4	301.1 ± 14.5**	291.3 ± 9.2**
10	335.2 ± 10.6	325.8 ± 14.8	315.4 ± 15.2**	305.5 ± 10.8**
14	360.0 ± 14.5	348.1 ± 18.9	338.5 ± 17.9**	323.9 ± 11.3**
17	393.4 ± 16.2	381.4 ± 22.6	371.9 ± 17.7*	350.8 ± 13.5**
20	445.9 ± 20.3	425.1 ± 30.4	417.8 ± 20.2*	388.7 ± 21.9**
Day 0-20, gain	167.0 ± 14.9	147.2 ± 25.4	149.9 ± 16.1	135.5 ± 21.3**
Body weight gain <sup>b</sup> (%)	59.9 ± 4.8	53.0 ± 9.0	56.0 ± 6.4	53.6 ± 8.9
During the lactation period				
No. of animals	10	11	12	10
Day 0	339.6 ± 15.3	331.2 ± 24.3	321.0 ± 22.1	306.5 ± 13.7**
1	336.2 ± 12.8	329.2 ± 21.9	318.9 ± 22.7*	311.0 ± 7.9**
4	342.9 ± 12.8	335.5 ± 21.0	330.3 ± 20.5	323.3 ± 13.7(9)
Day 0-4, gain	3.3 ± 10.7	4.4 ± 5.4	9.3 ± 16.2	19.1 ± 9.6(9)**
Body weight gain <sup>b</sup> (%)	1.0 ± 3.2	1.4 ± 1.7	3.1 ± 5.3	6.3 ± 3.2(9)**

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

Values in parentheses are no. of animals examined.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:p≤0.05, \*\*:p≤0.01

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

b: (Body weight gain/body weight on day 0)×100

Table 3 Food consumption in male rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Day 1	28.8 ± 4.1	27.3 ± 2.4	26.9 ± 3.1	28.0 ± 2.4
2	27.8 ± 3.3	27.3 ± 2.3	23.8 ± 3.5*	21.2 ± 5.9**
5	28.3 ± 4.5	26.5 ± 1.9	24.5 ± 3.6	27.3 ± 2.7
7	26.3 ± 3.5	24.5 ± 3.4	22.6 ± 3.4*	25.1 ± 3.3
10	26.9 ± 3.4	25.3 ± 2.2	24.3 ± 3.4	27.3 ± 2.3
14	27.5 ± 4.2	26.1 ± 2.3	24.0 ± 3.5*	27.3 ± 3.3
21	24.2 ± 3.2	22.9 ± 2.3(11)	21.1 ± 2.8*	25.3 ± 3.3
28	24.3 ± 3.4	23.2 ± 2.0	24.8 ± 3.9	26.3 ± 2.3
35	24.6 ± 3.9	24.0 ± 3.5	25.3 ± 3.3	27.3 ± 2.1
42	22.0 ± 3.6	22.4 ± 4.8	20.4 ± 3.2	25.6 ± 3.0
46	24.4 ± 4.0	23.9 ± 4.5	23.0 ± 3.4	26.2 ± 2.2

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

Values in parentheses are no. of animals examined.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$

Table 4 Food consumption in female rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
Before the gestation period				
No. of animals	12	12	12	12
Day 1	16.4 ± 2.5	16.3 ± 2.4	17.4 ± 3.0	15.8 ± 3.9
2	15.6 ± 3.3	15.4 ± 3.3	14.2 ± 2.7	13.8 ± 3.7
5	14.4 ± 3.2	14.2 ± 2.8	13.3 ± 2.3	12.3 ± 3.0
7	16.3 ± 2.4	14.3 ± 2.0	13.6 ± 1.9*	14.7 ± 2.3
10	17.3 ± 3.2	15.8 ± 2.2	15.4 ± 3.3	14.8 ± 2.1
14	15.9 ± 3.6	15.4 ± 2.6	15.2 ± 3.4	15.1 ± 3.2
During the gestation period				
No. of animals	10	11	12	11
Day 1	19.1 ± 3.2	18.9 ± 1.6	17.3 ± 2.6	16.8 ± 3.3
3	20.4 ± 3.2	18.2 ± 2.6	18.4 ± 3.3	19.6 ± 2.3
5	19.4 ± 3.2	19.5 ± 3.3	18.0 ± 1.7	19.8 ± 3.1
7	21.6 ± 2.6	18.7 ± 2.0*	18.8 ± 2.3*	19.5 ± 2.0
10	21.6 ± 2.1	20.2 ± 2.4	20.2 ± 3.1	21.1 ± 2.8
14	20.4 ± 2.3	18.5 ± 4.3	20.2 ± 1.7	21.1 ± 3.1
17	21.4 ± 2.8	20.7 ± 3.1	22.0 ± 2.4	23.0 ± 3.1
20	19.0 ± 3.2	17.8 ± 4.5	19.8 ± 3.9	19.8 ± 3.0
During the lactation period				
No. of animals	10	11	12	10
Day 1	13.4 ± 4.2	12.1 ± 2.7	15.0 ± 4.7	16.6 ± 4.0
4	31.5 ± 7.4	28.5 ± 5.2	32.0 ± 6.1	30.7 ± 5.5(9)

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

Values in parentheses are no. of animals examined.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$

Table 5 Hematological findings in male rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	9.35 $\pm$ 0.266	9.09 $\pm$ 0.246	9.10 $\pm$ 0.444	8.76 $\pm$ 0.337**
Hemoglobin (g/dl)	16.4 $\pm$ 0.48	16.0 $\pm$ 0.71	15.9 $\pm$ 0.63	15.4 $\pm$ 0.58**
Hematocrit (%)	52.4 $\pm$ 0.85	51.1 $\pm$ 1.88	51.4 $\pm$ 2.25	49.9 $\pm$ 1.41**
MCV (fl)	56.1 $\pm$ 1.59	56.2 $\pm$ 1.07	56.5 $\pm$ 1.35	57.1 $\pm$ 1.68
MCH (pg)	17.5 $\pm$ 0.74	17.6 $\pm$ 0.47	17.5 $\pm$ 0.63	17.6 $\pm$ 0.69
MCHC (%)	31.3 $\pm$ 0.73	31.3 $\pm$ 0.52	31.0 $\pm$ 0.63	30.8 $\pm$ 0.70
Platelet ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1124 $\pm$ 117.0	1075 $\pm$ 91.4	1071 $\pm$ 95.2	1116 $\pm$ 91.1
PT (sec)	12.1 $\pm$ 0.51	12.2 $\pm$ 0.24	12.6 $\pm$ 0.63	12.3 $\pm$ 0.55(11)
APTT (sec)	28.1 $\pm$ 2.24	27.1 $\pm$ 2.44	29.2 $\pm$ 3.51	29.8 $\pm$ 4.13(11)
CT (sec)	307 $\pm$ 110.9	382 $\pm$ 121.7	289 $\pm$ 122.9	351 $\pm$ 100.0
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	14.4 $\pm$ 2.85	11.8 $\pm$ 2.11	15.4 $\pm$ 3.30	15.5 $\pm$ 2.97
Differential leukocyte counts (%)				
Lymphocytes	87 $\pm$ 4.2	83 $\pm$ 6.3	89 $\pm$ 5.2	88 $\pm$ 5.2
Neutrophils				
Band	1 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 0.8	0 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0.5
Segmented	12 $\pm$ 3.9	15 $\pm$ 6.2	9 $\pm$ 4.5	11 $\pm$ 4.4
Eosinophils	1 $\pm$ 0.8	1 $\pm$ 0.8	1 $\pm$ 1.0	1 $\pm$ 1.2
Basophils	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
Monocytes	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
Reticulocyte (%)	12 $\pm$ 2.6	15 $\pm$ 3.9	14 $\pm$ 3.7	14 $\pm$ 3.6

Values are expressed as Mean $\pm$ S.D.

Values in parentheses are no. of animals examined.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*\*:p $\leq$ 0.01

fl:femtoliter, pg:picogram.

Table 6 Blood chemical findings in male rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
TP (g/dl)	6.53 ± 0.31	6.48 ± 0.25	6.30 ± 0.36	6.59 ± 0.27
Alb (g/dl)	2.49 ± 0.08	2.44 ± 0.13	2.45 ± 0.14	2.60 ± 0.14
Alb (%)	40.96 ± 4.25	39.22 ± 3.97	40.98 ± 4.33	40.79 ± 3.79
α <sub>1</sub> -glob (%)	25.33 ± 2.82	25.44 ± 2.33	23.03 ± 3.22	23.95 ± 1.24
α <sub>2</sub> -glob (%)	10.96 ± 2.15	11.43 ± 2.13	12.33 ± 1.67	11.85 ± 2.28
β-glob (%)	16.73 ± 1.96	18.17 ± 1.92	16.75 ± 1.77	17.41 ± 2.35
γ-glob (%)	6.03 ± 1.91	5.75 ± 1.33	6.91 ± 2.34	6.00 ± 1.90
A/G	0.612 ± 0.035	0.603 ± 0.042	0.633 ± 0.039	0.648 ± 0.039
BUN (mg/dl)	15.77 ± 1.50	16.58 ± 1.89	16.61 ± 1.94	16.94 ± 1.94
Creatinine (mg/dl)	0.54 ± 0.07	0.54 ± 0.07	0.53 ± 0.07	0.51 ± 0.05
Glucose (mg/dl)	166.8 ± 15.7	163.8 ± 15.7	158.3 ± 18.5	154.5 ± 21.1
PL (mg/dl)	138.6 ± 28.5	135.3 ± 27.2	124.5 ± 22.6	146.2 ± 17.1
TG (mg/dl)	124.3 ± 72.9	94.3 ± 47.7	74.1 ± 37.9	72.0 ± 26.5
T-Cho (mg/dl)	69.2 ± 11.3	71.7 ± 15.4	66.7 ± 11.6	77.8 ± 10.1
T-Bil (mg/dl)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
GOT (IU/l)	110.4 ± 18.7	110.6 ± 25.9	117.9 ± 22.4	94.8 ± 13.7
GPT (IU/l)	26.9 ± 5.6	25.3 ± 4.7	24.3 ± 3.6	24.0 ± 3.8
ChE (IU/l)	77.2 ± 25.1	77.3 ± 13.4	65.9 ± 17.0	72.5 ± 17.0
γ-GTP (IU/l)	1.05 ± 0.48	1.09 ± 0.43	1.20 ± 0.48	1.30 ± 0.30
Ca (mg/dl)	9.66 ± 0.62	9.55 ± 0.62	9.53 ± 0.63	9.42 ± 0.48
P (mg/dl)	7.44 ± 0.58	7.80 ± 0.80	7.71 ± 0.48	7.82 ± 0.68
Na (mEq/l)	142.21 ± 1.68	142.83 ± 1.07	142.54 ± 1.39	141.83 ± 1.13
K (mEq/l)	4.614 ± 0.375	4.808 ± 0.391	4.632 ± 0.323	4.805 ± 0.301
Cl (mEq/l)	104.7 ± 2.0	105.6 ± 2.0	104.9 ± 1.4	104.3 ± 1.2

Values are expressed as Mean±S.D.

Table 7 Absolute and relative organ weights in male rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Body weight (g)	584.3 ± 41.3	575.1 ± 41.1	535.3 ± 47.2*	520.5 ± 32.4**
Absolute organ weight				
Thymus (g)	0.353 ± 0.091	0.351 ± 0.119	0.303 ± 0.071	0.314 ± 0.062
Liver (g)	16.557 ± 2.672	16.931 ± 2.591	15.240 ± 1.892	17.684 ± 1.591
Kidney (right, g)	1.688 ± 0.155	1.853 ± 0.213	2.013 ± 0.168**	2.106 ± 0.171**
Kidney (left, g)	1.659 ± 0.161	1.829 ± 0.211	1.961 ± 0.141**	2.063 ± 0.194**
Testis (right, g)	1.846 ± 0.101	1.794 ± 0.133	1.782 ± 0.137	1.811 ± 0.156
Testis (left, g)	1.798 ± 0.099	1.780 ± 0.125	1.668 ± 0.331	1.778 ± 0.158
Epididymis (right, g)	0.693 ± 0.046	0.679 ± 0.036	0.672 ± 0.068	0.666 ± 0.046
Epididymis (left, g)	0.670 ± 0.050	0.664 ± 0.038	0.635 ± 0.119	0.659 ± 0.061
Adrenal gland (right, mg)	30.6 ± 4.7	31.1 ± 3.4	30.4 ± 3.8	29.1 ± 3.2
Adrenal gland (left, mg)	32.8 ± 4.8	32.8 ± 4.0	32.7 ± 4.3	30.4 ± 3.5
Relative organ weight				
Thymus (g%)	0.060 ± 0.014	0.061 ± 0.019	0.057 ± 0.014	0.060 ± 0.012
Liver (g%)	2.822 ± 0.322	2.933 ± 0.292	2.840 ± 0.165	3.397 ± 0.202**
Kidney (right, g%)	0.290 ± 0.019	0.322 ± 0.027*	0.378 ± 0.027**	0.405 ± 0.033**
Kidney (left, g%)	0.284 ± 0.019	0.317 ± 0.027*	0.368 ± 0.028**	0.398 ± 0.034**
Testis (right, g%)	0.317 ± 0.029	0.312 ± 0.026	0.334 ± 0.028	0.348 ± 0.038*
Testis (left, g%)	0.308 ± 0.032	0.311 ± 0.026	0.314 ± 0.066	0.343 ± 0.034*
Epididymis (right, g%)	0.119 ± 0.010	0.119 ± 0.008	0.126 ± 0.013	0.128 ± 0.011
Epididymis (left, g%)	0.115 ± 0.013	0.117 ± 0.009	0.120 ± 0.025	0.127 ± 0.014
Adrenal gland (right, mg%)	5.24 ± 0.78	5.43 ± 0.66	5.73 ± 0.94	5.60 ± 0.62
Adrenal gland (left, mg%)	5.61 ± 0.76	5.74 ± 0.85	6.15 ± 1.00	5.85 ± 0.62

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:p≤0.05, \*\*:p≤0.01

Table 8 Absolute and relative organ weights in female rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	10	11	12	9
Body weight (g)	342.9 ± 12.8	335.5 ± 21.0	330.3 ± 20.5	323.3 ± 13.7
Absolute organ weight				
Thymus (g)	0.209 ± 0.065	0.178 ± 0.041	0.179 ± 0.059	0.164 ± 0.034
Liver (g)	14.091 ± 1.295	14.014 ± 1.177	15.007 ± 1.161	15.920 ± 1.532**
Kidney (right, g)	0.996 ± 0.079	1.002 ± 0.077	1.038 ± 0.058	1.102 ± 0.087*
Kidney (left, g)	0.954 ± 0.080	0.980 ± 0.075	0.998 ± 0.054	1.058 ± 0.066**
Ovary (right, mg)	56.0 ± 9.0	54.3 ± 9.4	55.9 ± 11.0	51.7 ± 8.5
Ovary (left, mg)	47.7 ± 6.1	55.4 ± 9.4	49.1 ± 10.7	42.0 ± 8.5
Adrenal gland (right, mg)	33.8 ± 4.7	34.2 ± 5.4	33.6 ± 3.9	30.0 ± 2.4
Adrenal gland (left, mg)	35.0 ± 4.8	36.6 ± 6.7	36.0 ± 4.0	33.4 ± 2.2
Relative organ weight				
Thymus (g%)	0.061 ± 0.018	0.053 ± 0.011	0.054 ± 0.016	0.051 ± 0.010
Liver (g%)	4.110 ± 0.346	4.177 ± 0.270	4.557 ± 0.411*	4.921 ± 0.406**
Kidney (right, g%)	0.292 ± 0.024	0.299 ± 0.037	0.313 ± 0.016	0.342 ± 0.027**
Kidney (left, g%)	0.278 ± 0.029	0.294 ± 0.032	0.303 ± 0.014	0.329 ± 0.021**
Ovary (right, mg%)	16.303 ± 2.371	16.181 ± 2.780	17.024 ± 3.643	16.041 ± 2.985
Ovary (left, mg%)	13.893 ± 1.560	16.549 ± 2.929	14.939 ± 3.439	13.040 ± 2.784
Adrenal gland (right, mg%)	9.87 ± 1.39	10.22 ± 1.68	10.16 ± 0.82	9.29 ± 0.86
Adrenal gland (left, mg%)	10.20 ± 1.32	10.94 ± 2.01	10.90 ± 1.01	10.36 ± 0.79

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:p≤0.05, \*\*:p≤0.01

Table 9 Histopathological findings in male rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item		0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings	Grade				
Liver:					
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	+	0	0	0	9**
Fibrosis, focal	+	0	0	1	0
Kidney:					
Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	Total	3	12**	12**	12**
	+	3	1	1	0
	++	0	11	11	12
Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	+	3	8	8	9*
Cast, cellular	+	0	0	1	0
Regeneration, tubular epithelium	+	1	1	4	3
Heart:					
Cellular infiltration, histiocyte	+	0	2	1	0
Lung:					
Accumulation, foam cell	+	0	1	0	1
Pituitary gland:					
Cyst	<+>	0	0	0	1
Ileum:					
Diverticulum	<+>	0	0	0	1
Testis:					
Atrophy, tubule	Total	0	1	1	0
	+	0	1	0	0
	+++	0	0	1	0
Epididymis:					
Decrease, sperm, intraductal	+++	0	0	1	0
Appearance, desquamative spermatogenic cell	++	0	0	1	0
Prostate:					
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitial	Total	1	3	5	2
	+	1	2	5	1
	++	0	1	0	1

Values are no. of animals with findings.

Grade: +=slight, ++=moderate, +++=severe change and <+>=detected.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ .



Table 10 Histopathological findings in female rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1*H*-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item		0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals examined		12 <sup>a</sup>	12 <sup>b</sup>	12	12 <sup>b</sup>
Organ: Findings	Grade				
Liver:					
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	+	0	0	0	1
Kidney:					
Regeneration, tubular epithelium	+	0	0	1	0
Cast, hyaline	++	1	0	0	0
Mineralization, cortico-medullary junction	+	0	0	0	1
Spleen:					
Hematopoiesis, extramedullary, increased	+	1	0	0	0
Lung:					
Accumulation, foam cell	+	0	0	1	0
Thymus:					
Atrophy	Total	1	0	1	2
	+	1	0	1	1
	++	0	0	0	1
Pituitary gland:					
Cyst	<+>	0	0	0	1
Thyroid:					
Cyst	<+>	0	0	0	1
Ovary:					
Loss, corpus luteum	<+>	1	0	0	0
Cyst, corpus luteum	<+>	0	0	0	1

Values are no. of animals with findings.

Grade: +=slight, ++=moderate, +++=severe change and <+>=detected.

a: Includes two animals that had no evidence of pregnancy.

b: Includes one animal that had no evidence of pregnancy.

Table 11 Influence of 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene on reproductive performances of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals examined	12	12	12	12
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs with successful copulation	12	12	12	12
Duration of mating (days, Mean±S.D.)	3.1 ± 0.9	2.7 ± 1.7	2.9 ± 1.2	2.3 ± 1.3
Copulation index <sup>a)</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
No. of pregnant animals	10	11	12	11
Fertility index <sup>b)</sup> (%)	83.3	91.7	100.0	91.7

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

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

Table 12 Influence of 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene on developmental performances of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of pregnant females	10	11	12	11
No. of corpora lutea	18.8 ± 1.8	17.8 ± 2.8	18.3 ± 2.2	15.9 ± 1.8*
No. of implantation sites	18.0 ± 1.1	16.0 ± 3.9	16.8 ± 1.6	13.7 ± 4.3**
Implantation index <sup>a)</sup> (%)	96.2 ± 5.8	88.9 ± 15.9	91.8 ± 5.6	85.5 ± 24.4
No. of pups born	16.4 ± 1.1	14.4 ± 3.5	15.3 ± 1.6	11.8 ± 4.8**
Delivery index <sup>b)</sup> (%)	91.2 ± 5.2	90.6 ± 9.7	91.8 ± 6.9	83.2 ± 21.5
Live pups born				
No.	16.4 ± 1.1	14.1 ± 3.8	15.1 ± 1.7	10.9 ± 5.4**
Live birth index <sup>c)</sup> (%)	100.0 ± 0.0	97.2 ± 5.4	98.4 ± 5.4	88.0 ± 29.7
Sex ratio (M/F)	1.23 ± 0.92	1.03 ± 0.60	1.53 ± 1.72	1.22 ± 0.50(10)
Dead pups born				
No.	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.9	0.9 ± 1.6(10)
Gestation length (day)	22.3 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.2 ± 0.6	23.0 ± 0.6(10)*
Gestation index <sup>d)</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	90.9(10)
Nursing index <sup>e)</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	90.0(10)
Live pups on day 4				
No.	16.2 ± 1.0	13.9 ± 3.6	14.8 ± 1.7	10.6 ± 4.4(10)**
Viability index <sup>f)</sup> (%)	98.8 ± 2.5	98.9 ± 2.4	98.4 ± 3.9	80.8 ± 33.4(10)
Body weight of pups (g)				
Male				
Day 0	6.47 ± 0.54	6.75 ± 0.85	6.33 ± 0.71	6.26 ± 0.66(10)
Day 4	9.93 ± 1.03	10.66 ± 1.97	10.06 ± 1.40	9.53 ± 1.23(9)
Day 0-4, gain (g)	3.46 ± 0.64	3.92 ± 1.14	3.73 ± 0.81	3.46 ± 0.94(9)
Body weight gain <sup>g)</sup> (%)	53.45 ± 8.68	57.14 ± 9.58	58.82 ± 9.09	56.41 ± 12.65(9)
Female				
Day 0	6.18 ± 0.47	6.33 ± 0.78	58.82 ± 9.09	5.78 ± 0.59(9)
Day 4	9.45 ± 0.81	10.00 ± 2.08	9.28 ± 1.22	8.93 ± 1.34(9)
Day 0-4, gain (g)	3.27 ± 0.42	3.67 ± 1.31	3.40 ± 0.77	3.16 ± 1.07(9)
Body weight gain (%)	52.90 ± 5.50	56.67 ± 12.93	57.63 ± 9.79	54.71 ± 16.64(9)

Values are expressed as Mean±S.D.

Values in parentheses are no. of animals examined.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*: p≤0.05, \*\*: p≤0.01

a: (No. of implantation sites/no. of corpora lutea)×100

b: (No. of pups born/no. of implantation sites)×100

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

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

e: (No. of females nursing live pups/no. of females with normal delivery)×100

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

g: (Body weight gain/body weight on day 0)×100

# 3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 3a,4,7,7a-Tetrahydro-1H-indene on Bacteria

### 要約

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537<sup>1)</sup>および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2,3)</sup>の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められたことから、本試験はS9 mix 無添加試験および添加試験ともに、78.1~250  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲(TA1535 および TA1537 ではS9 mix 無添加試験は3.91~125  $\mu\text{g}$ /プレート、添加試験は7.81~250  $\mu\text{g}$ /プレート)で実施した。その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。以上の結果から、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

### 方法

#### [検定菌]

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium* の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に凍結した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

#### [被験物質]

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン(CAS No. 3048-65-5)は、分子量 120.21 の無色透明液体である。用いた

被験物質は、日本石油化学(株)製造、ロット番号 DIG02、純度 99.0 wt%(不純物:0.8 wt% ブタジエン-イソプレン-ピペリレン, 0.1 wt% ジシクロペンタジエン, 0.1 wt% 未知成分)であり、日本石油化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:ESK4546, 和光純薬工業(株))に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

#### [陽性対照物質]

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(上野製薬(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem.Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2 および 2AA は DMSO に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

#### [培地および S9 mix の組成]

##### 1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ピオチン	0.5 mM

\*:WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

##### 2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	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
グルコース	20 g
バクトアガー(Difco)	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。

3) S9 mix

1 ml 中下記の成分を含む

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

\*\* : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール (PB) および 5, 6-ベンゾフラボン (BF) の併用投与で酵素誘導して作製した S9 を用いた。

〔試験方法〕

プレインキュベーション法<sup>1)</sup>により, S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に, 被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml), 検定菌液 0.1 ml を混合し, 37℃で20分間往復振とう培養したのち, トップアガー 2 ml を加えて混和し, 合成培地平板上に流して固めた。また, 対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は, 同時に実施した他の試験と共通とした。培養は 37℃で 48 時間行い, 生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については, 肉眼的あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては, 溶媒および陽性対照群では 3 枚ずつ, 各用量については 1 枚ずつとした。また, 本試験においては, 両対照群および各用量につき, 3 枚ずつを用い, それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は 1 回, 本試験は同一用量について 2 回実施し, 結果の再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

用いた 5 種の検定菌のうち, 1 種以上の検定菌の S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において, 被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が, 溶媒対照のそれに比べて 2 倍以上に増加し, かつ, その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に, 当該被験物質は本試験系において変異原性を有する (陽性) と判定することとした。ただし, 2 回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の 2 倍以上となる用量が認められた場合において, その溶媒対照値が 10 以下であり, 変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンについて 50 ~ 5000 μg/プレート の範囲で公比を約 3 として, 試験を実施した。その結果, S9 mix 無添加試験では 150 μg/プレート以上で, S9 mix 添加試験では TA1535 と TA1537 において 150 μg/プレート以上で, その他の検定菌においては 500 μg/プレート以上で抗菌性が認められた。

したがって, 本試験における最高用量は, S9 mix 無添加試験および添加試験とも 250 μg/プレート (TA100, TA98 および WP2 *uvrA* の S9 mix 添加試験は 500 μg/プレート) とした。しかし, TA1535 と TA1537 の S9 mix 無添加試験においては, 本試験 I で抗菌性のない用量が 4 用量に達しなかったため, 本試験の最高用量を 125 μg/プレートに下げるとともに, 試験をやり直し, その結果を本試験 I の結果とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で, とともに上記の最高用量に基づいて公比 2 で 6 用量を設定して 2 回の本試験を実施した (Table 1, 2)。その結果, いずれの検定菌においても, 溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。以上の結果に基づき, 3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは, 用いた試験系において変異原性を有しない (陰性) と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 4) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K.H. Norporth, R.C. Garner, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子  
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257 秦野市落合 729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)  
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,  
Kumiko Kawakami  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan  
Tel +81-463-82-4751 FAX +81-463-82-9627

Table 1. Mutagenicity of 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in reverse mutation test (I) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	110 107 95 (104 $\pm$ 7.9)	17 5 9 ( 10 $\pm$ 6.1)	15 20 18 ( 18 $\pm$ 2.5)	18 13 19 ( 17 $\pm$ 3.2)	13 8 9 ( 10 $\pm$ 2.6)	
	3.91	ND	11 12 9 ( 11 $\pm$ 1.5)	ND	ND	6 7 6 ( 6 $\pm$ 0.6)	
	7.81	93 83 83 ( 86 $\pm$ 5.8)	7 16 12 ( 12 $\pm$ 4.5)	23 20 19 ( 21 $\pm$ 2.1)	9 14 20 ( 14 $\pm$ 5.5)	10 14 6 ( 10 $\pm$ 4.0)	
	15.6	129 110 125 (121 $\pm$ 10.0)	8 7 10 ( 8 $\pm$ 1.5)	24 22 27 ( 24 $\pm$ 2.5)	22 16 15 ( 18 $\pm$ 3.8)	7 6 7 ( 7 $\pm$ 0.6)	
	31.3	113 127 114 (118 $\pm$ 7.8)	10 12 4 ( 9 $\pm$ 4.2)	24 15 15 ( 18 $\pm$ 5.2)	14 19 15 ( 16 $\pm$ 2.6)	9 7 9 ( 8 $\pm$ 1.2)	
	62.5	114 117 103 (111 $\pm$ 7.4)	10* 7* 12* ( 10 $\pm$ 2.5)	28 15 17 ( 20 $\pm$ 7.0)	8 16 11 ( 12 $\pm$ 4.0)	10* 12* 10* ( 11 $\pm$ 1.2)	
	125	82* 84* 92* ( 86 $\pm$ 5.3)	3* 6* 0* ( 3 $\pm$ 3.0)	7* 22* 12* ( 14 $\pm$ 7.6)	6* 7* 13* ( 9 $\pm$ 3.8)	3* 5* 2* ( 3 $\pm$ 1.5)	
	250	2* 7* 4* ( 4 $\pm$ 2.5)		11* 7* 7* ( 8 $\pm$ 2.3)	4* 0* 3* ( 2 $\pm$ 2.1)		
S9 mix (+)	0	145 121 138 (135 $\pm$ 12.3)	9 7 18 ( 11 $\pm$ 5.9)	27 9 21 ( 19 $\pm$ 9.2)	26 26 19 ( 24 $\pm$ 4.0)	11 9 10 ( 10 $\pm$ 1.0)	
	7.81	ND	11 10 13 ( 11 $\pm$ 1.5)	ND	ND	6 11 4 ( 7 $\pm$ 3.6)	
	15.6	110 116 119 (115 $\pm$ 4.6)	9 12 12 ( 11 $\pm$ 1.7)	34 25 30 ( 30 $\pm$ 4.5)	21 24 21 ( 22 $\pm$ 1.7)	7 7 6 ( 7 $\pm$ 0.6)	
	31.3	123 126 97 (115 $\pm$ 15.9)	11 15 12 ( 13 $\pm$ 2.1)	23 32 15 ( 23 $\pm$ 8.5)	26 14 20 ( 20 $\pm$ 6.0)	5 6 10 ( 7 $\pm$ 2.6)	
	62.5	99 119 118 (112 $\pm$ 11.3)	12 15 5 ( 11 $\pm$ 5.1)	20 20 21 ( 20 $\pm$ 0.6)	27 29 14 ( 23 $\pm$ 8.1)	10 15 10 ( 12 $\pm$ 2.9)	
	125	120 124 99 (114 $\pm$ 13.4)	14* 7* 12* ( 11 $\pm$ 3.6)	19 27 24 ( 23 $\pm$ 4.0)	22 19 21 ( 21 $\pm$ 1.5)	10 5 7 ( 7 $\pm$ 2.5)	
	250	93* 96* 110* (100 $\pm$ 9.1)	10* 4* 6* ( 7 $\pm$ 3.1)	22* 13* 25* ( 20 $\pm$ 6.2)	15* 13* 10* ( 13 $\pm$ 2.5)	8* 9* 3* ( 7 $\pm$ 3.2)	
	500	22* 19* 14* ( 18 $\pm$ 4.0)		18* 13* 9* ( 13 $\pm$ 4.5)	0* 3* 5* ( 3 $\pm$ 2.5)		
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	775 794 860 (810 $\pm$ 44.6)	235 321 352 (303 $\pm$ 60.6)	314 275 290 (293 $\pm$ 19.7)	724 638 737 (700 $\pm$ 53.8)	884 976 1205 (1022 $\pm$ 165.3)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	632 740 739 (704 $\pm$ 62.1)	301 300 326 (309 $\pm$ 14.7)	680 665 634 (660 $\pm$ 23.5)	282 318 334 (311 $\pm$ 26.6)	315 338 356 (336 $\pm$ 20.6)	

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

\*:Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.0 wt% and 0.8 wt% butadiene-isoprene-piperylene and 0.1 wt% dicyclopentadiene were contained as impurities.

ND:Not done

Table 2. Mutagenicity of 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in reverse mutation test (II) on bacteria

With(+) or without(-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	117 108 101 (109 $\pm$ 8.0)	11 10 14 ( 12 $\pm$ 2.1)	28 19 24 ( 24 $\pm$ 4.5)	19 21 14 ( 18 $\pm$ 3.6)	11 16 13 ( 13 $\pm$ 2.5)	
	3.91	ND	12 11 11 ( 11 $\pm$ 0.6)	ND	ND	13 13 11 ( 12 $\pm$ 1.2)	
	7.81	97 106 106 (103 $\pm$ 5.2)	10 5 11 ( 9 $\pm$ 3.2)	25 21 33 ( 26 $\pm$ 6.1)	16 14 22 ( 17 $\pm$ 4.2)	6 18 21 ( 15 $\pm$ 7.9)	
	15.6	99 108 106 (104 $\pm$ 4.7)	18 11 14 ( 14 $\pm$ 3.5)	17 17 16 ( 17 $\pm$ 0.6)	19 16 17 ( 17 $\pm$ 1.5)	13 5 10 ( 9 $\pm$ 4.0)	
	31.3	107 97 96 (100 $\pm$ 6.1)	6 11 10 ( 9 $\pm$ 2.6)	21 26 22 ( 23 $\pm$ 2.6)	11 20 14 ( 15 $\pm$ 4.6)	12 14 6 ( 11 $\pm$ 4.2)	
	62.5	105 108 93 (102 $\pm$ 7.9)	8 10 6 ( 8 $\pm$ 2.0)	10 20 28 ( 19 $\pm$ 9.0)	13 18 25 ( 19 $\pm$ 6.0)	8 10 12 ( 10 $\pm$ 2.0)	
	125	89* 66* 89* ( 81 $\pm$ 13.3)	4* 3* 4* ( 4 $\pm$ 0.6)	24* 16* 20 ( 20 $\pm$ 4.0)	9* 9* 8* ( 9 $\pm$ 0.6)	11* 7* 2* ( 7 $\pm$ 4.5)	
	250	1* 22* 60* ( 28 $\pm$ 29.9)		17* 13* 28* ( 19 $\pm$ 7.8)	6* 10* 1* ( 6 $\pm$ 4.5)		
S9 mix (+)	0	112 106 107 (108 $\pm$ 3.2)	12 6 8 ( 9 $\pm$ 3.1)	25 23 40 ( 29 $\pm$ 9.3)	30 31 22 ( 28 $\pm$ 4.9)	22 8 6 ( 12 $\pm$ 8.7)	
	7.81	ND	8 11 9 ( 9 $\pm$ 1.5)	ND	ND	9 14 4 ( 9 $\pm$ 5.0)	
	15.6	93 114 103 (103 $\pm$ 10.5)	7 17 10 ( 11 $\pm$ 5.1)	25 23 17 ( 22 $\pm$ 4.2)	16 21 19 ( 19 $\pm$ 2.5)	6 13 9 ( 9 $\pm$ 3.5)	
	31.3	107 122 112 (114 $\pm$ 7.6)	11 16 15 ( 14 $\pm$ 2.6)	22 25 26 ( 24 $\pm$ 2.1)	22 25 32 ( 26 $\pm$ 5.1)	16 6 8 ( 10 $\pm$ 5.3)	
	62.5	114 122 128 (121 $\pm$ 7.0)	7 10 10 ( 9 $\pm$ 1.7)	32 23 19 ( 25 $\pm$ 6.7)	26 27 27 ( 27 $\pm$ 0.6)	11 12 10 ( 11 $\pm$ 1.0)	
	125	99 105 111 (105 $\pm$ 6.0)	7 10 13 ( 10 $\pm$ 3.0)	32 32 20 ( 28 $\pm$ 6.9)	31 12 22 ( 22 $\pm$ 9.5)	13 6 5 ( 8 $\pm$ 4.4)	
	250	81* 58* 86* ( 75 $\pm$ 14.9)	1* 2* 4* ( 2 $\pm$ 1.5)	17* 25* 20* ( 21 $\pm$ 4.0)	9* 11* 12* ( 11 $\pm$ 1.5)	2* 2* 7* ( 4 $\pm$ 2.9)	
	500	38* 8* 10* ( 19 $\pm$ 16.8)		16* 19* 12* ( 16 $\pm$ 3.5)	2* 2* 2* ( 2 $\pm$ 0.0)		
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix(-)	Number of colonies/plate	563 575 567 (568 $\pm$ 6.1)	380 384 351 (372 $\pm$ 18.0)	303 312 331 (315 $\pm$ 14.3)	531 522 545 (533 $\pm$ 11.6)	1349 1188 1356 (1298 $\pm$ 95.0)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2	
S9 mix(+)	Number of colonies/plate	512 607 650 (590 $\pm$ 7.6)	274 271 345 (297 $\pm$ 41.9)	485 499 470 (485 $\pm$ 14.5)	308 348 287 (314 $\pm$ 31.0)	227 292 311 (277 $\pm$ 44.0)	

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

\*:Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.0 wt% and 0.8 wt% butadiene-isoprene-piperylene and 0.1 wt% dicyclopentadiene were contained as impurities.

ND:Not done

# 3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの 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

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of 3a,4,7,7a-Tetrahydro-1H-indene on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)において、0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度(MI max)は、連続処理(24時間)では0.050 mg/ml、短時間処理(6時間)のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下ではそれぞれ0.050 mg/mlおよび0.10 mg/mlであった。各系列での処理濃度は、MI maxの2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度設定した。なお、48時間連続処理の濃度は、24時間連続処理と同じ濃度に設定した。連続処理では、S9 mix非存在下で24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間および48時間連続処理では0.050 mg/ml、短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下ではそれぞれ0.050 mg/mlおよび0.10 mg/mlの濃度であったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理濃度群においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。短時間処理では、S9 mix非存在下において、いずれの処理群においても染色体異常は誘発されなかった。倍数性細胞については、高濃度群(0.050 mg/ml)で、細胞毒性のため規定の細胞数を観察できなかったが、いずれの処理群でも誘発されなかった。S9 mix存在下では、高濃度(0.10 mg/ml)において、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発された(14.5%)。また、高濃度(0.10 mg/ml)において、細胞毒性のため規定の細胞数を観察できなかったが、いずれの処理群でも倍数性細胞の誘発は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下で3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・

ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: Cansera International)を10%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、揮発しやすいこと、またプラスチック底面を溶解することから、培養にはガラス製培養フラスコ(25 cm<sup>2</sup>, 池本理化)を用いた。2×10<sup>4</sup>個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたフラスコに播き、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

#### 4. 被験物質

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン(略号:THI, CAS No.:3048-65-5, ロット番号:D1G02, 日本石油化学(株))は、無色透明液体で、水に対しては50.0 mg/ml未満、DMSOでは1 M以上1.5 M未満、アセトンでは50 mg/ml以下で溶解し、融点-80℃、沸点160.3℃、蒸気圧4 mmHgで、分子式C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>、分子量120.21、純度99.0 wt%(不純物としてブタジエン-イソプレン-ピペリレン0.8 wt%, ジシクロペンタジエン0.1 wt%, 未知成分0.1 wt%を含む)の物質である。

被験物質原体は、通常の取り扱い条件においては安定である。

#### 5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の1%(v/v)になるように加えた。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

#### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定す