

weight gain in dosed rats was observed; in dosed mice, minor reductions occurred between weeks 3 and 64, with recovery thereafter. Postgavage lethargy and prostration occurred frequently in dosed rats and mice.

Nonneoplastic and Neoplastic Effects in the Two-Year Studies:

The severity of nephropathy was increased in dosed male rats. Ulcers and inflammation of the forestomach were prevalent in dosed rats, as were increased incidences of epithelial hyperplasia and hyperkeratosis in male rats, but no neoplasms of the forestomach were observed. There were no increases of nonneoplastic lesions in mice which were considered to be compound related.

The incidences of a variety of tumors were increased in rats dosed with 2-mercaptobenzothiazole; some of the increased incidences were not dose related. In low dose male rats, increased incidences ($P < 0.01$) were observed for mononuclear cell leukemia (7/50; 16/50; 3/50) and pancreatic acinar cell adenomas (2/50; 13/50; 6/49). Increased tumor incidences with dose-related trends ($P < 0.05$) included pituitary gland adenomas in females (15/49; 24/50; 25/50), preputial gland adenomas or carcinomas (combined) in males (1/50; 6/50; 5/50), adrenal gland pheochromocytomas or malignant pheochromocytomas (combined) in males (18/50; 27/50; 24/49), and pheochromocytomas in females (1/50; 5/50; 6/50). These tumors were observed at significantly greater incidences ($P \leq 0.05$) in the high dose groups than in the vehicle controls.

An increased incidence ($P = 0.028$) of hepatocellular adenomas or carcinomas (combined) was observed only in low dose female mice (4/50; 12/49; 4/50). No significant increases in tumor incidences were seen in male mice.

Genetic Toxicology:

2-Mercaptobenzothiazole was not mutagenic in *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, or TA1537 with or without metabolic activation. In the presence of rat liver S9, 2-mercaptobenzothiazole increased the frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges (SCEs) in Chinese hamster ovary (CHO) cells, as well as mutations at the TK locus of mouse L5178Y lymphoma cells.

Audit:

The data, documents, and pathology materials from the 2-year studies of 2-mercaptobenzothiazole were audited at the NTP Archives. The audit findings show that the conduct of the studies is documented adequately and support the data and results given in this Technical Report.

Conclusions:

Under the conditions of these 2-year gavage studies, there was some evidence of carcinogenic activity of 2-mercaptobenzothiazole for male F344/N rats, indicated by increased incidences of mononuclear cell leukemia, pancreatic acinar cell adenomas, adrenal gland pheochromocytomas, and preputial gland adenomas or carcinomas (combined). There was some evidence of carcinogenic activity for female F344/N rats, indicated by increased incidences of adrenal gland pheochromocytomas and pituitary gland adenomas. There was no evidence of carcinogenic activity of 2-mercaptobenzothiazole for male B6C3F₁ mice dosed with 375 or 750 mg/kg. There was equivocal evidence of carcinogenic activity for female B6C3F₁ mice, indicated by increased incidences of hepatocellular adenomas or carcinomas (combined).

The National Toxicology Program

Levels from TR-332 2-Mercaptobenzo-Thiazole

**Target Organs and Levels of Evidence
NTP Technical Report Number 332**

Produced from Chemtrack Database 09/19/01

CHEMICAL/ CAS NUMBER	PEER REVIEW DATE	PRIMARY USES	ROUTE/EXPOSURE LEVELS	STUDY LABOI
2-MERCAPTOBENZOTHIAZOLE <u>149-30-4</u>	03/04/87	RUBBER VULCANIZATION ACCELERATOR. SALTS USED AS FUNGICIDE. CORROSION INHIBITOR FOR COPPER IN AQUEOUS SYSTEMS, CUTTING OILS AND PETROLEUM PRODUCTS. ADDITIVE IN EXTREME-PRESSURE GREASES. (TDB)	Gavage FR: 0,188,375, MR&M: 0,375,750 MG/KG/50 PER GROUP	Physiol. Researc Laborat

LEVELS OF EVIDENCE OF CARCINOGENICITY--ORGAN/TISSUE (NEOPLASM):

MR: SOME EVIDENCE HEMATOPOIETIC SYSTEM: LEUKEMIA 7/50 16/50 3/50
 PANCREAS ACINAR CELL: ADENOMA 2/50 13/50 6/50
 ADRENAL GLAND MEDULLA:
 PHEOCHROMOCYTOMA 18/50 25/50 22/49 OR
 MALIGNANT PHEOCHROMOCYTOMA 0/50 2/50
 2/49 COMBINED 18/50 27/50 24/49
 PREPUTIAL GLAND: ADENOMA 0/50 4/50 4/50 OR
 CARCINOMA 1/50 2/50 1/50 COMBINED 1/50 6/50 5/50

FR: SOME EVIDENCE ADRENAL GLAND MEDULLA:
 PHEOCHROMOCYTOMA 1/50 5/50 6/50
 PITUITARY GLAND: ADENOMA 15/49 24/50 25/50

MM: NO EVIDENCE

FM: EQUIVOCAL EVIDENCE LIVER: ADENOMA 3/50 7/49 4/50 OR CARCINOMA 1/50 5/49 0/50 COMBINED 4/50 12/49 4/50

p-ニトロフェノールナトリウムのラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of p-Nitrophenol sodium salt in Rats

要約

p-ニトロフェノールナトリウムをCrj:CD(SD)IGS系雌雄ラットに単回経口投与し、その毒性を検討した。なお、被験物質としては、安定でありかつ市販されているナトリウム=p-ニトロフェノキシド二水和物(p-ニトロフェノールナトリウムの二水和物)を用いた。投与量(二水和物としての量)は、雌雄とも125, 250, 500および1000 mg/kgの4用量とし、対照群には媒体(0.5 w/v%カルメロースナトリウム水溶液)を投与した。

500 mg/kg群の雌雄各3例と1000 mg/kg群の雄4例および雌全例が死亡した。一般状態では、250 mg/kg以上の投与群で自発運動の減少および腹臥/横臥、500 mg/kg以上の投与群で強直性痙攣がみられ、死亡動物は投与直後から投与30分後の間に認められた。一方、生存動物にみられた症状は、投与2時間後までに全て消失した。体重推移および剖検では、雌雄ともに被験物質投与による変化は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下におけるp-ニトロフェノールナトリウムのLD₅₀値(95%信頼限界値)は、雄で550 mg/kg(303~1160 mg/kg)、雌で467 mg/kg(334~651 mg/kg)であった。

方法

1. 被験物質および被験液の調製

被験物質ナトリウム=p-ニトロフェノキシド二水和物(三井化学㈱, 東京, 純度98.5%, ロット番号8J-001)は、融点>300℃の黄色晶の化合物である。なお、投与終了後の残余被験物質について分析を行った結果、使用期間中は安定であったことが確認された。

投与容量が10 mL/kg体重となるよう、0.5 w/v%カルメロースナトリウム水溶液に懸濁して12.5, 25, 50および100 mg/mL懸濁液(濃度は二水和物としての濃度)を調製した。1~100 mg/mL懸濁液は、冷蔵(約4℃)8日後室温24時間、暗所(褐色ガラス瓶)保存で安定であったことから、被験液は投与日の4日前に調製し、褐色ガラス瓶に入れて使用時まで冷蔵庫(約4℃)に保存した。また、本投与に用いた被験液について当施設で測定した結果、濃度は適正でかつ均一であった。

2. 試験動物および飼育条件

4週齢のCrj:CD(SD)IGS系SPFラットを日本チャールス・リバー㈱から購入し、当所で15日間検疫・馴化

飼育した後、健康な動物を選び6週齢で試験に供した。投与日の体重範囲は雄で174~200 g(平均値: 183.8 g)、雌で126~146 g(平均値: 134.4 g)であった。

動物は、投与前日の体重により層別化し、無作為抽出法により各群の平均体重ができるだけ均等となるように割りつけた。

動物は、温度23±3℃、相対湿度50±20%、換気回数1時間当たり10~15回、照明1日12時間の飼育室で、金属製網ケージに2~3匹ずつ収容し、固型飼料(放射線滅菌CRF-1, オリエンタル酵母工業㈱)および飲料水(水道水)を自由に摂取させて飼育した。

3. 投与量および投与方法

125, 250, 500, 1000および2000 mg/kgを1群雌雄各3匹のラットに投与した予備試験では、1000および2000 mg/kg群の雌雄全例、500 mg/kg群の雌雄各2例および250 mg/kg群の雄2例と雌1例が死亡した。これらの結果から、1000 mg/kg群を最高用量とし、以下公比2で500, 250および125 mg/kgを設定し、これに対照群を加えて5群構成とした。

動物は、投与前に約16時間絶食させたのち、所定濃度の被験液を10 mL/kg体重の容量で、金属製胃ゾンデを用いて1回強制経口投与した。対照群には溶媒(0.5 w/v%カルメロースナトリウム水溶液)を同様に投与した。1群の動物数は雌雄とも5匹とした。なお、投与後の給餌は投与6時間後に実施し、給水は投与に関係なく継続して行った。

4. 検査項目

1) 一般状態および生死の観察

投与後6時間までは頻繁に、その後は1日1回、14日間にわたって実施した。

2) 体重測定

投与直前に体重を測定し、これを投与液量の算出基準にした。さらに、投与後1, 2, 3, 7, 10および14日に体重を測定した。

3) 病理学検査

14日間の観察期間終了後にエーテル深麻酔下で放血致死させ、体外表の観察を行った後、頭部、胸部、腹部を含む全身の器官・組織の異常の有無を肉眼的に観察した。

Table 1 Mortality and LD₅₀ values of rats treated orally with *p*-nitrophenol sodium salt in single dose toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Distribution of death (days after administration)														Mortality ^a	LD ₅₀ values (mg/kg) [95 % confidence limits]		
			0							1	2	3	4	5	6	7			8~14	
			minutes			hours														
			~5	~15	~30	~1	~2	~4	~6											
Male	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	550 [303 - 1160]
	125	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	500	5	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/5	
	1000	5	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/5	
Female	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	467 [334 - 651]
	125	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	500	5	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/5	
	1000	5	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5/5	

a) number of dead animals/number of animals examined

5. 統計解析

投与後14日間の累積死亡率をもとに、雄はProbit法、雌はVan der Waerden法を用いてLD₅₀値とその95%信頼限界値を求めた。体重については、まずBartlett法により各群の分散の均一性の検定を行った。その結果、分散が均一の場合にはDunnett法を用いて対照群と各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が均一でない場合にはDunnett型のmean rank testを用いて対照群と各投与群との平均順位の差の検定を行った

結果

1. 死亡状況およびLD₅₀値 (Table 1)

125および250 mg/kg群では死亡は認められなかったが、500 mg/kg群の雌雄各3/5例および1000 mg/kg群の雄4/5例と雌5/5例が死亡した。LD₅₀値(95%信頼限界値)は、雄で550 mg/kg(303~1160 mg/kg)、雌で467 mg/kg(334~651 mg/kg)であった。

2. 一般状態

125 mg/kg群では、いずれの動物にも異常はみられなかった。

250 mg/kg群では、投与15分後に雄の2例で自発運動の減少、更に腹臥/横臥がみられたが、投与1時間後には消失した。

500 mg/kg群では、投与直後~5分後あるいは投与15分後から自発運動の減少がみられ、その後腹臥/横臥、更にほとんどの例では強直性痙攣を呈して投与直後~5分後から投与30分後の間に雌雄各3例が死亡した。生存例では、投与直後~5分後から雄1例、投与15分後から雌2例に自発運動の減少、その後腹臥/横臥がみられたが、すべて投与1時間後には消失した。

1000 mg/kg群では、投与直後~5分後から自発運動の減少がみられ、その後腹臥/横臥、更にほとんどの例で

は強直性痙攣を呈して投与直後~5分後から投与15分後の間に雄4例と雌全例が死亡した。雄の生存例1例は、投与直後~5分後に自発運動の減少、投与15分後に腹臥/横臥がみられたが、投与2時間後には消失した。

3. 体重

各投与群の体重は、対照群とほぼ同様に推移した。

4. 剖検

いずれの動物にも異常は認められなかった。

考察

死亡動物は、雌雄ともに500 mg/kg群から認められ、LD₅₀値(95%信頼限界値)は、雄で550 mg/kg(303~1160 mg/kg)、雌で467 mg/kg(334~651 mg/kg)であった。

一般状態では、250 mg/kg以上の投与群で自発運動の減少および腹臥/横臥、500 mg/kg以上の投与群で強直性痙攣がみられ、死亡動物は投与直後~5分後から投与30分後にかけて認められた。一方、生存動物にみられた症状は、投与2時間後までにはすべて消失した。

体重および剖検では、被験物質投与による変化は認められなかった。

連絡先

試験責任者：榎並倫宣
試験担当者：鷹野正生, 津田敏治
(株)ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284
Tel 0550-82-2000 Fax 0550-82-2379

Correspondence

Authors: Tomonori Enami (Study director)
Masao Takano, Toshiharu Tsuda
Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.
1284 Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka, 412-0039,
Japan
Tel +81-550-82-2000 Fax +81-550-82-2379

p-ニトロフェノールナトリウムのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of p-Nitrophenol sodium salt in Rats

要約

p-ニトロフェノールナトリウムをCrj:CD(SD)IGS系雌雄ラットに28日間強制経口投与し、その毒性を検討した。なお、被験物質としては、安定でありかつ市販されているナトリウム=p-ニトロフェノキシド二水和物(p-ニトロフェノールナトリウムの二水和物)を用いた。投与量(二水和物としての量)は0(対照群), 60, 160, 400および1000 mg/kgの用量で対照群, 160および400 mg/kg群については、別に14日間の回復群を設けた。

投与期間中1000 mg/kgの雌雄各10例が死亡したが、器質的变化を伴わない中枢神経系への作用が死因と考えられた。生存動物の一般状態では、1000 mg/kg群の雌雄で自発運動の減少、呼吸数の減少及び腹臥/横臥が投与期間のごく初期のみにみられた。

体重および摂餌量では、被験物質投与の影響は認められなかった。

尿検査では、pHの低下が400 mg/kg群の雄でみられた。

血液学・血液生化学検査、剖検および器官重量では、被験物質投与の影響は認められなかった。

病理学検査では、雄の腎臓で尿管上皮の好酸性小体の出現が400および1000 mg/kg群で増強された。

回復群では、上記の変化はすべて消失し、回復性が認められた。

以上の結果から、本試験条件下におけるp-ニトロフェノールナトリウムの無影響量は、雄で160 mg/kg/day、雌で400 mg/kg/dayと考えられた。

方法

1. 被験物質および被験液の調製

ナトリウム=p-ニトロフェノキシド二水和物(三井化学(株), 東京, 純度98.5%, ロット番号8J-001)は、融点 $>300^{\circ}\text{C}$ の黄色晶の化合物である。なお、投与終了後の残余被験物質について分析を行った結果、使用期間中は安定であったことが確認された。

投与容量が10 mL/kg体重となるよう、0.5 w/v%カルメロースナトリウム水溶液に懸濁して6, 16, 40および100 mg/mL懸濁液を調製した。また、投与開始前および投与終了週の2回、投与に使用する各濃度液について当施設で測定した結果、いずれも濃度は適正でかつ均一であった。

2. 使用動物および飼育条件

5週齢のCrj:CD(SD)IGS系SPF雌雄ラットを日本チャールス・リバー(株)から購入し、当所で8日間検疫・馴化飼育した後、体重増加が順調で一般状態に異常を認めなかった雌雄各54匹を選び、6週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で190~217 g(平均値: 199.6 g)、雌で144~169 g(平均値: 156.9 g)であった。

動物は、投与開始4日前にその日の体重に基づいて層別化し、各群平均体重がほぼ均等となるよう、コンピュータを用いて各群に割り付けた。

動物は、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数1時間当たり10~15回、照明1日12時間の飼育室で、金属製網ケージに1匹ずつ収容し、固型飼料(放射線滅菌CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))および飲料水(水道水)を自由に摂取させ飼育した。

3. 投与量、群構成および動物数

単回投与による予備試験(投与量: 125, 250, 500, 1000および2000 mg/kg, 1群雌雄各3例)では、1000および2000 mg/kg群の雌雄全例, 500 mg/kg群の雌雄各2例および250 mg/kg群の雄2例と雌1例が死亡した。一方、2週間投与による予備試験(投与量: 3, 12.5, 50および200 mg/kg)では、一般状態で被験物質の色に起因すると思われる黄色尿の排泄が50および200 mg/kg群の雌雄にみられたのみで、体重、摂餌量、血液・血液生化学検査、剖検および器官重量のいずれの検査においても被験物質投与の影響は認められなかった。これらの成績から、本試験では60, 160, 400および1000 mg/kgの4用量を設定し、これに対照群を加えて計5群を使用した。更に、対照群, 160, 400および1000 mg/kg群では回復群を設けた。動物数はいずれの群も雌雄各6匹とした。ただし、1000 mg/kg群では投与期間中にほとんどの動物が死亡したため、回復群の動物を含む全生存例を投与終了時に剖検して全例を主群扱いとしたため、この群のみ雌雄各12例となった。

被験液の投与容量は10 mL/kg体重とし、金属製胃ゾンデを用いて1日1回28日間強制経口投与した。対照群には溶媒(0.5 w/v%カルメロースナトリウム水溶液)を同様に投与した。投与液量は最新の体重を基準に算出した。回復期間は14日間とした。

4. 検査項目

1) 一般状態の観察

投与期間中は毎日2回以上、回復期間中は毎日1回観

察した。

2) 体重

投与期間および回復期間を通じ、週2回(投与第1週と回復第1週は3回)の頻度で体重を測定した。

3) 摂餌量測定

投与期間および回復期間を通じ、週2回(投与第1週は3回)の頻度で摂餌量を測定した。

4) 血液学検査

投与期間および回復期間終了の翌日の剖検時に検査を行った。前日から一夜(約16時間)絶食させた動物をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から抗凝固剤(EDTA-2K)を加えた採血ビンに血液を採取し、赤血球数(電気抵抗変化検出法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(平均赤血球容積および赤血球数から算出)、平均赤血球容積(電気抵抗変化検出法)、平均赤血球色素量(ヘモグロビン量および赤血球数から算出)、平均赤血球色素濃度(ヘモグロビン量およびヘマトクリット値から算出)、血小板数(電気抵抗変化検出法)、白血球数(電気抵抗変化検出法)(以上コールター全自動8項目血球アナライザーT890, コールター(株)、網赤血球率(Brecher法)および白血球百分率(May-Giemsa鏡検法)を測定した。また、3.8%クエン酸ナトリウムを加えた容器に採取した血液を遠心分離(3000 rpm, 10分間)し、得られた血漿を用いてプロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間(以上クロット法, 血液凝固自動測定装置, ACL 100, Instrumentation Laboratory)を測定した。

5) 血液生化学検査

血液学検査のための採血と同時に腹大動脈から採血し、遠心分離(3000 rpm, 10分間)により得られた血清を用いてAIP(Bessey-Lowry法)、総コレステロール(CEH-COD-POD法)、トリグリセライド(GK-GPO-POD法)、リン脂質(PLD-ChOD-POD法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、グルコース(Hexokinase-G6PD法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、ナトリウム、カリウムおよび塩素(イオン選択電極法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(モリブデン酸法)、総たん白質(Biuret法)、アルブミン(BCG法)およびA/G比(総たん白質およびアルブミンから算出)を測定した。また、ヘパリンを加えた容器に採血し、遠心分離(3000 rpm, 10分間)により得られた血漿を用いてGOT, GPT, LDH(UV-rate法)および γ -GTP(γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド法)(以上いずれも全自動分析装置 Monarch, Instrumentation Laboratory)を測定した。

6) 尿検査

投与第4週(検査当日の投与後)と回復第2週に検査を行った。検査動物(検査時点における全生存例)を代謝ケージに個別に収容し、絶食・自由摂水下で4時間尿を、

次いで自由摂食・自由摂水下でその後の20時間尿を採取した。採取した最初の4時間尿を用いてpH, たん白質, ケトン体, グルコース, 潜血, ビリルビン, ウロビリノーゲン(以上URIFLET7A試験紙, (株)京都第一科学), 色調(肉眼観察)および沈渣(鏡検)を検査した。また、その後に得られた20時間尿を用いて浸透圧(氷点降下法, 全自動浸透圧測定装置 オートアンドスタットOM-6030, (株)京都第一科学)を測定し、4時間尿量および20時間尿量から1日の尿量を算出した。更に、代謝ケージに収容した状態で、前日からの1日の摂水量を給水瓶を用いて測定した。

7) 剖検および器官重量

上記血液学検査および血液生化学検査のための採血後に放血致死させ、外表異常の有無を観察した後、頭部、胸部および腹部を含む全身の器官・組織について肉眼的に異常の有無を観察した。続いて、以下に示す器官を摘出後、器官重量(絶対重量)を測定した。また、絶食後の体重および絶対重量から体重100 g当たりの相対重量を算出した。死亡動物は、発見後すみやかに剖検した。

脳, 甲状腺(上皮小体を含む)胸腺, 心臓, 肺(気管支を含む), 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 卵巣

8) 病理組織学検査

全動物について器官・組織(脳, 脊髄, 坐骨神経, 心臓, 気管, 肺(気管支を含む), 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 肝臓, 甲状腺(上皮小体を含む), 副腎, 胸腺, 脾臓, 腸間膜リンパ節, 顎下リンパ節, 腎臓, 膀胱, 精巣, 前立腺, 卵巣, 子宮, 骨および骨髄(胸骨・大腿骨), 大腿部骨格筋)を採取し、リン酸緩衝10%ホルマリン液(ただし、精巣はブアン液で固定した後リン酸緩衝10%ホルマリン液で保存した)で固定した後パラフィンに包埋した。投与期間終了時剖検動物では、このうち対照群と高および最高用量群は包埋した全ての器官・組織について、また、中および低用量群は被験物質投与による変化が疑われた雌雄の胃および雄の腎臓についてそれぞれ切片とし、ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を施して鏡検した。回復群では、被験物質投与による変化が疑われた上記の胃および腎臓について、全例を検査した。また、死亡動物については用量に関係なく鏡検した。

5. 統計解析

各検査項目のうち、数値化した成績についてまずBartlett法により各群の分散の均一性の検定を行った。その結果、分散が均一の場合には一元配置法による分散分析を行い、群間に有意差が認められたならば、Dunnnett法を用いて対照群と各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が均一でない場合には、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、有意であればDunnnett型の方法(Steel法)を用いて対照群と各投与群との平均順位の差の検定を行った。また、尿の定性的項目については累積 χ^2 検定法を行った。検定はいずれも両側で、有意水準

は5および1%とした。病理組織学検査の成績についてはMann-WhitneyのU検定を行った。検定は片側で、有意水準は5および1%とした。

結果

1. 一般状態

1) 投与期間

投与期間中、1000 mg/kg群の雌雄各10例が死亡した。このうち、雄7例と雌6例は投与開始日の投与直後から自発運動の減少、呼吸数の減少および腹臥/横臥がみられ、一部はこれに加えて強直性痙攣を呈して死亡した。その他の雄3例と雌4例では、投与開始日の投与直後に自発運動の減少および呼吸数の減少がみられ、ほとんどの例では腹臥/横臥も認められた。投与2日では約半数で投与直後に自発運動の減少がみられた。これ以降、これらの症状はみられなくなったが、投与6から14日にかけて雄2例と雌3例が症状を示すことなく投与30分～3時間後に死亡、投与17日に雌雄各1例が投与直後に呼吸数の減少、腹臥/横臥および強直性痙攣を示して死亡した。なお、投与開始日に死亡した例以外では、被験物質の色に起因すると考えられる黄色尿の排泄が投与開始日から連日観察された。

生存動物では、黄色尿の排泄が各投与群の雌雄全例で投与開始日から連日みられた。更に、1000 mg/kg群では黄色尿の排泄に加えて投与開始日の投与直後に自発運動の減少および呼吸数の減少が雌雄各2例(生存例全例)にみられ、雌雄各1例では腹臥/横臥も認められた。投与2日には投与直後に自発運動の減少が雄1例にみられた。

2) 回復期間

いずれの動物にも異常は認められなかった。

2. 体重(Fig. 1)

1) 投与期間

雌雄ともに、各投与群の体重は対照群と同様に推移した。

2) 回復期間

雌雄ともに、各投与群の体重は対照群と同様に推移した。

3. 摂餌量

1) 投与期間

投与期間を通じて、雌雄の各投与群の摂餌量は対照群と同様であった。

2) 回復期間

雄では、160および400 mg/kg群で対照群に比べて有意な低値が回復10日にみられた。なお、投与14日に摂餌量の有意な低値が160 mg/kg群にみられたが、400 mg/kg群では対照群との差がなく、用量に関連した変

化ではなかった。

雌では、回復期間を通じて各投与群の摂餌量は対照群と同様であった。

4. 血液学検査(Table 1)

1) 投与期間終了時検査

雌雄ともに、被験物質投与による変化はみられなかった。

2) 回復期間終了時検査

雌雄ともに、被験物質投与による変化はみられなかった。

5. 血液生化学検査(Table 2)

1) 投与期間終了時検査

雌雄ともに、被験物質投与による変化はみられなかった。なお、アルブミンの有意な増加が400 mg/kg群の雄、A/G比の有意な高値が160 mg/kg群の雄、総コレステロールの有意な減少が160 mg/kg群の雌、更にカリウムの有意な増加が60 mg/kg群の雌にみられたが、いずれも用量に関連した変化ではなかった。

2) 回復期間終了時検査

雌雄ともに、被験物質投与による変化は認められなかった。

6. 尿検査(Table 3)

1) 投与第4週検査

雄では、pHの有意な低下が400 mg/kg群にみられた。雌では、pHの有意な低下がすべての投与群にみられた。

2) 回復第2週検査

雌雄ともに、被験物質投与による変化はみられなかった。

7. 器官重量(Table 4)

1) 投与期間終了時剖検例

雌雄ともに、被験物質投与による変化は認められなかった。なお、心臓の相対重量の有意な減少が400 mg/kg群の雄に、肝臓、副腎および卵巣の相対重量の有意な増加が400 mg/kg群の雌にみられたが、いずれも用量に関連した変化ではなかった。

2) 回復期間終了時剖検例

雄では、被験物質投与による変化はみられなかった。雌では、副腎の絶対重量の有意な増加が400 mg/kg群にみられた。

8. 剖検所見(Table 5)

1) 死亡例

雌雄ともに、異常は認められなかった。

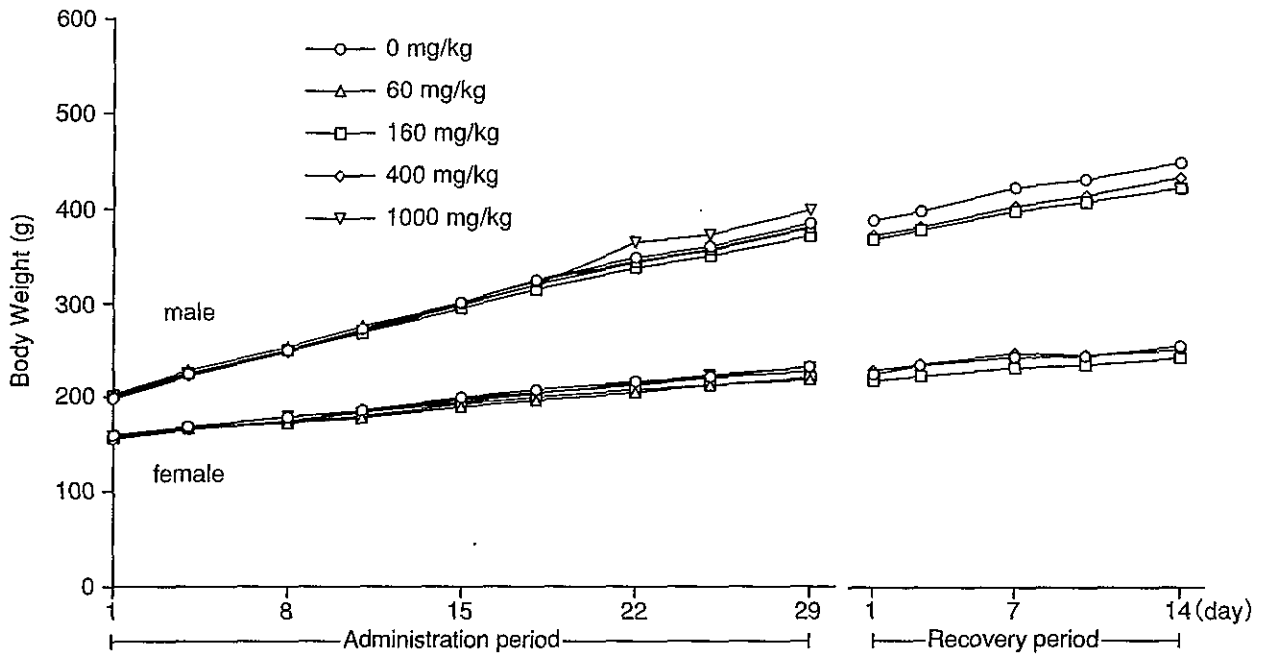


Fig. 1 Body weight of rats administered orally with p-nitrophenol sodium salt for 28 days

2) 投与期間終了時剖検例

雌雄ともに、被験物質投与による変化は認められなかった。なお、腺胃の暗赤色点が60 mg/kg群の雄1例と400 mg/kg群の雌1例に、精巣上体の白色斑(片側性)が400 mg/kg群の1例にみられたが、正常ラットでもしばしば認められる変化であることあるいはその出現状況からいずれも偶発所見と判断した。

3) 回復期間終了時剖検例

雌雄ともに、被験物質投与による変化は認められなかった。なお、腎臓の一部陥凹(片側性)が400 mg/kg群の雄1例に、腺胃の暗赤色点(片側性)が160および400 mg/kg群の雌各1例にみられたが、正常ラットでもしばしば認められる変化であることあるいはその出現状況からいずれも偶発所見と判断した。

9. 病理組織学検査(Table 6)

1) 死亡例

被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。なお、雄で肝臓における髓外造血の増加および脾臓における髓外造血の亢進が有意にみられ、雌でも同様の傾向が認められたが、大半の動物が投与開始日に死亡していることから、動物の週齢の違いによる差と判断した。また、雄の1例で大腿骨骨髓に限局性の線維化がみられたが、その出現状況から偶発所見と判断した。

2) 投与期間終了時剖検例

被験物質投与によると考えられる変化が、雄の腎臓にみられた。なお、胃は被験物質投与の影響が疑われたため雌雄全例について検索したが、最終的には被験物質投与の影響はないと判断した。

腎臓：雄における尿管上皮の好酸性小体が、対照群

では軽微3例、60 mg/kg群では軽微1例と軽度1例、160 mg/kg群では軽微1例なのに対し、400 mg/kg群では軽微3例と軽度3例、1000 mg/kg群では軽度2例(生存例全例)であり、400および1000 mg/kg群で変化の程度が増強され、400 mg/kg群では有意差も認められた。

上記以外の所見は正常ラットでもしばしば認められる変化であること、あるいはその出現状況から、いずれも偶発所見と判断した。

3) 回復期間終了時剖検例

被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

考察

投与期間中、1000 mg/kg群の雌雄各10例が死亡した。発現した症状は中枢神経系への影響を示唆するものであったこと、一方、剖検および病理組織検査では神経系に変化がみられず、脳重量の変化も認められなかったことから、器質的変化を伴わない中枢神経系への作用が死因と考えられた。

生存動物の一般状態では、死亡が認められた1000 mg/kg群の雌雄で死亡動物と同様に自発運動の減少、呼吸数の減少および腹臥/横臥がみられた。しかし、呼吸数の減少と腹臥/横臥は投与開始日のみ、自発運動の減少も投与3日以降は認められなかった。このように、投与開始時にみられた症状が投与を繰り返すことにより消失する場合には、肝臓の薬物代謝酵素の誘導が認められることが多いが、本試験では薬物代謝酵素の誘導を示唆する小葉中心性の肝細胞肥大はみられず、肝臓重量の増加も明らかではないことからその機序は不明であった。なお、投与開始日以降、雌雄の投与群全例で黄色尿

の排泄が連日みられたが、黄色を有する被験物質自身あるいはその代謝物が尿中に排泄された結果と考えられ、毒性とはみなさなかつた。

体重および摂餌量では、被験物質投与の影響は認められなかつた。

尿検査では、pHの低下が400 mg/kg群の雄でみられ、後述の腎臓の組織学的変化とともに被験物質の腎臓への影響が示唆された。なお、pHの低下は雌のすべての投与群にもみられたが、その変化の程度が用量に関連していないこと、他の尿検査の項目や腎臓の病理学検査において何ら変化がみられないことから毒性ではないと判断した。

血液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つた。

病理学検査では、雄の腎臓で尿管上皮の好酸性小体の出現が400および1000 mg/kg群で増強された。しかし、この変化は雄ラットで性成熟に伴って生理的に認められるものであり、本試験では尿管の障害性を示唆する変化がみられないことから、毒性学的意義は乏しいと推察された。

休薬により、上記の変化はすべて消失し、回復性が認められた。なお、摂餌量で有意な低値が160および400 mg/kg群の雄にみられたが、回復10日の1時点のみの変化であり、その前後では対照群との差は認められないことから偶発的な変化と判断した。また、副腎重量の増加が400 mg/kg群の雌にみられたが、絶対重量のみの変化で相対重量に差がないことや投与終了時に被験物質の副腎への影響が認められないことから偶発的な変化と判断した。

以上の如く、*p*-ニトロフェノールナトリウムをラットに28日間反復経口投与した結果、1000 mg/kg群の雌雄で死亡が認められ、400および1000 mg/kg群の雄で腎臓の組織学的変化、400 mg/kg群の雄で尿pHの低下がみられた。一方、400 mg/kg群の雌と160 mg/kg以下の投与群の雌雄では変化は認められなかつた。

これらの結果から、本試験における*p*-ニトロフェノールナトリウムの無影響量は雄で160 mg/kg/day、雌で400 mg/kg/dayと推定された。

文献

- 1) S. C. Gad and C. S. Weil, "Principles and Methods of Toxicology," 2, ed. by A. W. Hayes, Raven Press Ltd., New York, 1989, pp. 435-483.

連絡先

試験責任者：榎並倫宣

試験担当者：鷹野正生，畠山和久，田村一利，
津田敏治，勝亦俱慶

(株)ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284

Tel 0550-82-2000 Fax 0550-82-2379

Correspondence

Authors: Tomonori Enami (Study director)

Masao Takano, Kazuhisa Hatayama,

Kazutoshi Tamura, Toshiharu Tsuda,

Toyohisa Katsumata

Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.

1284 Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka, 412-0039,

Japan

Tel +81-550-82-2000 Fax +81-550-82-2379

Table 1 Hematology of rats treated orally with p-nitrophenol sodium salt in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	60	160	400	1000	0	160	400
Male								
No. of animals	6	6	6	6	2	6	6	6
RBC (10 ⁶ /μL)	781±27	801±31	818±15	804±52	762±18	829±54	823±37	823±32
Hb (g/dL)	15.3±0.4	15.7±0.7	15.7±0.3	15.6±0.6	15.5±0.0	15.8±0.6	15.8±0.5	15.5±0.7
Ht (%)	46±1	48±1	48±1	47±2	47±0	47±2	47±1	46±1
MCV (fL)	59.1±1.2	59.5±1.7	57.9±1.5	58.4±1.0	61.6±1.6	56.2±1.9	57.1±1.4	55.9±1.3
MCH (pg)	19.6±0.5	19.6±0.5	19.1±0.6	19.4±0.6	20.3±0.4	19.1±0.6	19.2±0.5	18.9±0.5
MCHC (%)	33.0±0.4	32.9±0.5	33.1±0.3	33.1±0.7	33.0±0.1	33.9±0.6	33.6±0.3	33.8±0.4
Reticulocyte (%)	2.0±0.4	2.2±0.3	2.0±0.3	2.3±0.4	2.6±0.3	1.8±0.2	1.8±0.2	2.0±0.4
Platelet (10 ⁴ /μL)	103.2±7.2	103.2±14.7	95.8±6.5	99.2±4.0	107.6±20.6	95.5±13.7	86.6±7.6	91.4±3.2
WBC (10 ³ /μL)	81±19	85±27	82±22	89±27	102±4	95±18	84±19	82±18
Differential leukocyte counts (%)								
Lymph	84.3±7.1	89.6±4.0	84.4±5.4	86.3±5.6	87.3±3.2	86.9±4.3	88.0±5.1	87.8±2.2
Stab	0.4±0.4	0.2±0.3	0.2±0.3	0.5±0.6	0.0±0.0	0.4±0.4	0.3±0.3	0.1±0.2
Seg	14.2±7.4	9.4±3.9	14.4±5.0	12.7±5.2	12.8±3.2	11.3±4.2	10.8±5.3	10.7±2.6
Eosino	0.6±0.7	0.6±0.6	0.7±0.5	0.3±0.6	0.0±0.0	1.3±0.7	0.8±0.7	1.1±0.6
Baso	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
Mono	0.5±0.3	0.3±0.3	0.3±0.4	0.3±0.3	0.0±0.0	0.2±0.3	0.2±0.3	0.3±0.3
Others	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
PT (S)	12.9±0.9	14.0±1.3	14.8±2.2	13.9±1.7	14.9±3.1	13.3±1.3	13.7±1.5	13.4±1.2
APTT (S)	16.0±2.7	18.7±1.1	17.3±2.4	16.3±1.4	16.0±1.3	16.5±1.1	18.1±1.9	15.4±1.9
Female								
No. of animals	6	6	6	6	2	6	6	6
RBC (10 ⁶ /μL)	786±34	801±36	789±40	788±39	728±40	822±25	807±44	831±39
Hb (g/dL)	15.4±0.6	15.9±0.6	15.3±0.7	15.9±0.8	14.9±0.6	15.8±0.4	15.3±0.5	15.8±0.9
Ht (%)	46±2	47±2	46±2	47±3	44±1	48±1	46±2	47±2
MCV (fL)	58.4±2.0	58.6±2.5	57.9±1.6	59.8±0.9	59.9±1.8	57.9±5.0	56.7±1.8	56.6±2.0
MCH (pg)	19.5±1.0	19.9±1.0	19.5±0.8	20.2±0.6	20.5±0.4	19.2±0.5	19.0±0.5	19.0±0.7
MCHC (%)	33.5±0.7	33.8±0.4	33.6±0.8	33.7±0.6	34.2±0.4	33.2±0.6	33.5±0.3	33.5±0.4
Reticulocyte (%)	1.9±0.1	1.9±0.3	2.1±0.2	2.1±0.3	2.9±0.6	1.9±0.3	2.0±0.2	1.9±0.4
Platelet (10 ⁴ /μL)	101.3±11.4	93.6±5.4	99.7±7.7	100.9±12.3	102.9±8.8	105.5±4.9	101.4±11.2	106.5±11.8
WBC (10 ³ /μL)	75±14	56±15	54±15	88±32	67±23	64±15	74±24	76±32
Differential leukocyte counts (%)								
Lymph	83.3±13.2	83.9±6.1	80.5±7.6	89.0±4.4	87.0±7.8	83.7±6.9	88.5±2.3	84.4±5.6
Stab	0.7±0.8	0.3±0.3	0.2±0.3	0.3±0.4	0.3±0.4	0.6±0.5	0.2±0.3	0.3±0.3
Seg	14.5±12.0	14.6±6.1	17.3±7.0	9.4±4.4	11.8±7.4	14.5±7.0	10.9±2.3	14.4±5.4
Eosino	1.1±0.6	0.8±0.4	1.5±1.1	0.8±0.7	0.3±0.4	0.9±0.7	0.3±0.4	0.7±0.6
Baso	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
Mono	0.5±0.4	0.5±0.3	0.5±0.4	0.4±0.2	0.8±0.4	0.3±0.3	0.2±0.3	0.3±0.3
Others	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
PT (S)	11.3±0.5	11.5±0.4	11.1±0.5	11.2±0.3	12.0±0.1	10.7±0.5	10.8±0.3	10.6±0.5
APTT (S)	14.4±0.7	14.3±1.1	13.9±0.9	14.5±1.4	15.2±0.4	12.4±1.5	14.4±1.2	13.1±1.8

Values are expressed as Mean±S.D.