

既存化学物質の人健康影響に関する情報

(平成18年1月13日審議会用)

CAS No.	既存物質 番号	物質名称	急性	28日	Repro Tox	簡易 生殖	Ames	染色体	評価 文書	頁	備考
3048-65-5	4-581	3 a, 4, 7, 7 a-テトラヒドロ-1 H-インデン			○		○	○		1	再審議
56-93-9	3-2694	ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド		○			○	○		25	再審議
110-02-1	9-810	チオフェン			○		○	○		126	
126-33-0	5-77	テトラヒドロチオフェン-1, 1-ジ オキソド	○	○		○	○	○	○	153	
1570-64-5	3-900	4-クロロ- <i>o</i> -クレゾール		○			○	○	○	193	
3319-31-1	3-2684	1, 2, 4-ベンゼントリカルボン酸 トリス(2-エチルヘキシル)エステ ル	○	○		○	○	○	○	230	
87-61-6	3-74	1, 2, 3-トリクロロベ ンゼン							○	261	環境省 登録物質
95-63-6	3-7	1, 2, 4-トリメチルベンゼン		○			○	○		312	
96-69-5	3-1118	4, 4'-チオビス(6- <i>tert</i> -ブチ ル- <i>m</i> -クレゾール)		○			○	○	○	331	
98-08-8	3-86	(トリフルオロメチル)ベンゼン			○		○	○		418	
526-73-8	3-7	1, 2, 3-トリメチルベンゼン		○			○	○		438	
1843-05-6	4-141	2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキ シ)ベンゾフェノン		○			○	○		462	
25154-52-3	3-503	ノニルフェノール		○			○	○	○	475	

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 3a,4,7,7a-Tetrahydro-1H-indene by Oral Administration in Rats

要約

OECD既存化学物質の安全性点検事業の一環として、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン(CAS No. 3048-65-5)の67, 200および600 mg/kgを雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後の計46日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育3日までの期間経口投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および次世代の発生に及ぼす影響について反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。

雌雄動物への反復投与により、体重増加抑制が雌雄の200および600 mg/kg群で認められた。血液学検査では、赤血球数、ヘマトクリット値および血色素量の軽度の減少が雄の600 mg/kg群で認められた。器官重量では、肝臓重量の増加ないし増加傾向ならびに体重重量比の増加が雄の600 mg/kg群および雌の200 mg/kg以上の群で認められ、さらに左右の腎臓重量の増加ないし増加傾向ならびに体重重量比の増加が雄の67 mg/kg以上の群および雌の600 mg/kg群で認められた。また、病理組織学検査では、肝臓に軽度の小葉中心性肝細胞肥大が雌雄の600 mg/kg群で、腎臓において近位尿細管上皮の硝子滴沈着および好酸性小体の発現数の増加が雄の67 mg/kg以上の群に、さらに軽度の尿細管上皮の再生が雄の200および600 mg/kg群で認められた。

以上より、雄の67 mg/kg以上の群の腎臓の重量および体重重量比の増加(増加傾向を含む)、雌の200 mg/kg以上の群の体重増加抑制ならびに肝臓の重量および体重重量比の増加(増加傾向を含む)から、本試験における3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの反復投与による無影響量は雄で67 mg/kg/day未満、雌で67 mg/kg/dayと判断した。

雌雄動物の生殖能に対しては、雄動物での影響はみられなかったが、雌の母動物の剖検および分娩観察で、妊娠期間の延長、ならびに妊娠黄体数および着床数の減少が600 mg/kg群で認められた。また、雌雄動物の次世代に対する影響として出産児数および出生児数の減少が600 mg/kg群で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-インデンの雄動物の生殖に対する無影響量は600 mg/kg/day、雌動物および次世代に対する無影響量は200 mg/kg/dayと判断した。

方法

1. 被験物質

被験物質は3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン(CAS No.3048-65-5)で、不快臭のある無色透明液体であり、遮光気密容器に入れ、冷蔵庫内に保存した。本試験では、日本石油化学(株)製造のロット番号D1G02(純度:99.0%)を使用した。なお、被験物質は投与期間中安定であったことが製造業者の分析により確認された。

投与には、被験物質を1.34, 4および12 w/v%の濃度となるようにオリーブ油(日本薬局方、ヤクハン製薬(株))に溶解して調製した。調製頻度は7日間に1回以上とし、投与に用いるまで遮光気密容器に入れ、冷蔵庫内に保存した。各濃度の調製液は規定の濃度であり、かつ均一であることが(株)日本食品分析センターにより確認された。

2. 試験動物および飼育条件

生後8週齢のCrj:CD(SD)系のSPFラットを日本チャールス・リバー(株)から受け入れ、15日間の検疫・馴化飼育を行い、順調な発育を示した動物を試験に用いた。雌については10日間の性周期検査を併せて行い、性周期に異常の認められない動物を用いた。

動物は、温度23±3℃、湿度55±10%、換気回数10~15回/時間および照明時間12時間に設定されたバリアシステムの飼育室において、ブラケット式金属製金網床ケージを用いて飼育した。雌は、妊娠17日から金網床のかわりに実験動物用床敷(ホワイトフレック、日本チャールス・リバー(株))を敷いたステンレス製受皿を使用した。ケージ当たりの収容匹数は、群分け前は2匹以内、群分け後は1匹、交配中は雌雄各1匹、妊娠期間中は1母動物、哺育期間中は1腹とした。飼料は固型飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて、飲料水は水道水(札幌市水道水)を自動給水装置あるいは給水器を用いて、それぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量の設定、試験群の構成および群分け

試験群は、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの100, 300および1000 mg/kgを雌雄各5例に14日間反復経口投与した用量設定試験の結果を参考に設定した。すなわち、1000 mg/kg群では衰弱による屠殺例が雄5例中1例にみられたほか、同群の雌雄でよろめき歩行、呼吸緩徐、自発運動の減少、体重増加抑制、摂餌量の低値、肝臓の重量および体重重量比の増加、肝臓の暗褐色化、前胃粘膜

の肥厚が認められ、300 mg/kg群の雄では肝臓の重量および体重重量比の増加が認められた。本試験では投与期間が用量設定試験の約3倍になることから、高用量は明らかな毒性徴候がみられる用量として、1000 mg/kg群と300 mg/kg群のほぼ等比中項である600 mg/kgとし、以下公比3で200および67 mg/kgを設定した。さらに、媒体であるオリーブ油を投与する対照群を加えて計4群とし、動物数は1群当たり雌雄各12匹を用いた。群分けは、投与開始前日に投与開始前々日の体重値をもとに各群の体重が均一になるように体重別層化無作為抽出法を用いて行った。

4. 投与方法

投与経路は経口投与とし、胃ゾンデを用いて強制的に胃内に行った。

投与期間は、雄については交配前14日間、交配期間および交配後の計46日間、雌については交配前14日間および交尾までの交配期間、さらに交尾例は妊娠期間および哺育3日までの期間とした。

投与容量は、体重1 kg当たり5 mlとして投与日に最も近い日に測定した体重に基づいて算出し、体重測定当日の投与容量はその日の体重に基づいて算出した。投与は10週齢から開始し、投与開始時の平均体重(体重範囲)は雄で416.4 g(392~447g)、雌で240.0 g(222~270 g)であった。

5. 観察、測定および検査項目

(1) 一般状態観察

雌雄全例について、試験期間中1日1回以上の頻度で、視診および触診により行動、外観などを観察した。

(2) 体重測定

体重は投与1日(投与前)、投与2, 5, 7, 10および14日、その後は雄については7日毎(投与終了日)および剖検日に、雌については妊娠0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 17および20日、哺育0, 1および4日に、また交配期間中(雄と同居中)は相手雄の測定日と同じ日に電子天秤を用いて体重を測定した。また、雄については投与1から46日の、雌については投与1日から14日、妊娠0から20日および哺育0日から4日の体重増加量および体重増加率を算出した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、雄については交配期間および剖検日を除き、雌については妊娠0日および哺育0日を除き体重測定日と同じ日(投与終了日を含む)に、電子天秤を用いて測定した。測定前日に適量の飼料をケージ毎にセットし、翌日(測定日)に残量を測定して1匹当たりの1日分の摂餌量を算出した。

(4) 尿検査

投与期間の最終週(投与43~44日)に雄の各群6例について、ラット用代謝ケージ(KN-646 B-1型、夏目製作所)に収容して非絶食下で採尿を行った。約3時間の蓄尿の一部を用いて、pH、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血反応(以上、試験紙マル

チスティックス; バイエル・三共)および沈渣(鏡検)を検査し、21時間蓄尿を用いて比重(アタゴ製屈折計ユリコン)および尿量(容量)を測定した。また、採尿中の飲水量測定も併せて実施した。

(5) 血液学検査

投与46日の翌日の剖検時に約16時間絶食した雄の全例について、エーテル麻酔下で大腿静脈から採血した。EDTA・2Kで処理した血液を用いて、赤血球数、平均赤血球容積、血小板数、白血球数(以上、電気抵抗法; コールターカウンター T660型)、血色素量(シアンメトヘモグロビン法; コールターカウンター T660型)、ヘマトクリット値(赤血球数、平均赤血球容積より算出)、平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数、血色素量より算出)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(ヘマトクリット値、血色素量より算出)、網赤血球率(Brecher法)および白血球百分比(メイ・ギムザ染色法)を鏡検により測定した。また、大腿静脈から採取した無処理血液を用いて凝固時間(流体粘度変化による空気圧測定法; グライナー社製マイクロコアグロメーター)を測定した。さらに、腹部大動脈から採取した血液をクエン酸ナトリウムで処理した後、3000 r.p.m.で10分間遠心し、得られた血漿を用いてプロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上、AMELUNG KC-10A, バクスターKK)を測定した。

(6) 血液生化学検査

投与46日の翌日の剖検時に約16時間絶食した雄の全例について、血液学検査のための採血後、腹部大動脈から採取した血液を3000 r.p.m.で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて、GOT, GPT(以上、IFCC法)、 γ -GTP(包接L- γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法)、コリンエステラーゼ(ヨウ化ブチリルチオコリン基質法)、血糖(ヘキソキナーゼ法)、総コレステロール(酵素法)、トリグリセリド(遊離グリセロール消去法)、リン脂質(酵素法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、尿酸窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法)、クレアチニン(ヤッフエ法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(フィスケ・サバロー法)、総蛋白(ビウレット法)およびアルブミン(BCG法)(以上、日立7150形自動分析装置)、ナトリウムおよびカリウム(以上、炎光法; コーニング480型炎光光度計)、クロール(電量滴定法; 平沼CL-6M型クロライドカウンター)、A/G比(総蛋白、アルブミンより算出)および蛋白分画(セルロースアセテート膜電気泳動法)を測定した。

(7) 剖検および器官重量測定

雌については投与46日の翌日にエーテル麻酔下で採血後放血致死させ、全身の器官および組織を肉眼的に観察した。雌は全哺育児死亡例は発見後直ちに、哺育3日まで生存児のみられた例は哺育4日に、妊娠25日まで分娩の認められない例は妊娠26日に、エーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官および組織を肉眼的に観察し、子宮の着床痕および卵巣の妊娠黄体を計数した。さらに、雌雄の全例について肝臓、腎臓(左右)、胸腺、副腎(左

右), 精巣, 精巣上体(左右)および卵巣の重量を電子天秤を用いて測定するとともに, 器官体重重量比を算出した。

(8) 病理組織学検査

雌雄の全例について, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 心臓, 肺, 脳, 下垂体, 胸腺, 副腎, 甲状腺, 胃(前胃・腺胃), 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 前立腺および卵巣を10%中性緩衝ホルマリン液, 精巣および精巣上体をブアン液で固定後, パラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色標本ならびに必要なに応じて特殊染色(PAS染色, PTAH染色)標本を作製して病理組織検査を行った。

(9) 生殖能検査

雌全例について, 投与開始日の10日前から交尾までの連日, ギムザ染色による陰垢塗抹標本を作製し, 光学顕微鏡下で性周期段階(発情前期, 発情期前期, 発情期後期, 発情後期および発情休止期)の判定を行い, 性周期の異常の有無を検索した。投与14日の雌雄について, 同試験群内で夕方から1対1(無作為組み合わせ)で14日間を限度として同居させ, 雌の陰垢中に精子が確認された日を妊娠0日とした。妊娠の成立は雌の子宮に着床痕が確認された場合とし, 交尾率〔(交尾動物数/同居動物数)×100〕および受胎率〔(受胎動物数/交尾動物数)×100〕を算出した。

(10) 分娩および母性行動観察

交尾した雌全例について, 妊娠21日から分娩終了日まで分娩状態を観察し, 午前9時に分娩が終了していた動物を当該日分娩とし, その日を哺育0日とした。分娩終了が確認された母動物について母性行動, 総出産児数, 生存児数および死亡児数, 出産児の性別および外表を観察した。また, 妊娠期間(妊娠0日から哺育0日までの日数), 出産率〔(生存出産雌数/妊娠雌数)×100〕, 分娩率〔(総出産児数/着床痕数)×100〕, 出生率〔(出生児数/総出産児数)×100〕, 哺育4日時哺育率〔(哺育4日時に哺育児の認められる雌動物数/正常に分娩した雌動物数)×100〕および性比〔(雄生存児数/雌生存児数)×100〕を算出した。また, 剖検時の計測結果から着床率〔(着床痕数/妊娠黄体数)×100〕を算出した。

(11) 新生児の一般状態観察および生存性

全例について, 哺育0日から哺育4日まで1日1回生存および死亡を確認し, 一般状態および外表について観察した。観察結果から新生児の哺育4日の生存率〔(哺育4日生存児数/出生児数)×100〕を1腹を単位として算出した。なお, 喰殺を受け死亡あるいは不明例となった新生児は死亡例として扱った。

(12) 新生児の体重測定

測定対象となる全例について, 哺育0, 1および4日に電子天秤を用いて測定し, 体重値は1腹毎に雌雄別に1匹あたりの平均値で示した。得られた測定値から体重増加量(哺育4日体重-哺育0日体重)および体重増加率〔(体重増加量/哺育0日体重)×100〕を算出した。

(13) 新生児の剖検

死亡例は直ちに剖検し, その他の例については哺育4

日に二酸化炭素吸入法を用いて安楽致死させた後, 体外表(口腔内を含む)および全身の器官および組織を肉眼的に観察した。死亡例および異常所見部位の認められた例については, whole bodyを10%中性緩衝ホルマリン液で固定し, 保存した。

6. 統計解析

性周期, 交尾率, 受胎率, 出産率および哺育率, ならびに病理組織学検査結果のうち1段階の陽性グレードがみられた所見については, 多試料 χ^2 検定を行い, 有意な場合, 2試料 χ^2 検定をおこなった。また, これらの検定に不適な場合はFisherの直接確率検定法を用いた。その他の項目ならびに病理組織学検査結果のうち2段階以上の陽性グレードがみられた所見については, Bartlettの等分散検定後, 一元配置分散分析法あるいはKruskal-Wallis法により解析し, 有意な場合, Dunnettの検定法あるいはMann-WhitneyのU-検定法により, 対照群と3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン各投与群との比較を行った。対照群との検定に際しては, 有意水準を5および1%とした。

結果

1. 反復投与毒性

(1) 一般状態観察

雄では, 流涎が600 mg/kg群の10例で投与15日以降, 投与46日までのほぼ毎日, 投与直後あるいは投与前から投与後3時間までの間に観察された。600 mg/kg群の他の1例では投与24日にのみ流涎が認められたが, 残り1例では流涎は認められなかった。

雌においては, 妊娠前投与期間で流涎が600 mg/kg群の7例で投与15日以降, 投与前ないし投与直後より1時間程度の間認められた。妊娠期間では600 mg/kg群の11例で妊娠1日以降, 妊娠期間のほぼ毎日, 投与前ないし投与直後より2時間程度の間断続的に認められた。哺育期間では哺育0日より3日の間に, 600 mg/kg群の8例で投与直後より1時間程度の間断発的に認められた。

(2) 体重推移(Table 1,2)

雄では, 体重の低値が200 mg/kg群の投与21~46日, 600 mg/kg群の投与5~46日に認められ, これらの群では体重増加量および体重増加率の低値も認められた。

雌の妊娠前投与期間では, 体重の低値が600 mg/kg群で投与7日以降にみられ, 体重増加量および体重増加率の低値も200および600 mg/kg群で認められた。妊娠期間でも, 体重の低値が200 mg/kg群で妊娠1~20日に, 600 mg/kg群で妊娠0~20日にみられ, 600 mg/kg群では体重増加量の低値も認められた。哺育期間では, 体重の低値が200 mg/kg群で哺育1日に, 600 mg/kg群で哺育0および1日にみられたが, 哺育期間の体重増加量および体重増加率は対照群を上回り, 600 mg/kg群ではいずれも統計的に有意な高値を示した。

(3) 摂餌量 (Table 3,4)

摂餌量の低値が雄の200 mg/kg群の投与2, 7, 14および21日, ならびに600 mg/kg群の投与2日に認められた。

雌においては, 妊娠前投与期間で200 mg/kg群の投与7日, 妊娠期間では67および200mg/kg群の妊娠7日に低値が認められた。哺育期間に異常は認められなかった。

(4) 尿検査

いずれの検査項目にも対照群と比較して雄に異常は認められなかった。

(5) 血液学検査 (Table 5)

赤血球数, ヘマトクリット値および血色素量の軽度の減少が雄の600 mg/kg群で認められた。

(6) 血液生化学検査 (Table 6)

いずれの検査項目にも対照群と比較して雄に異常は認められなかった。

(7) 器官重量 (Table 7,8)

雄では, 剖検時体重の減少が200および600 mg/kg群で, 肝臓の体重重量比の増加が600 mg/kg群で, 左右の腎臓の重量の増加が200および600 mg/kg群で, 左右の腎臓の体重重量比の増加が67, 200および600 mg/kg群で, 左右の精巣の体重重量比の増加が600 mg/kg群で認められた。なお, 600 mg/kg群の肝臓重量および67 mg/kg群の左右の腎臓重量に統計学的有意差はないが, 対照群と比較して高値が認められた。

一方, 600 mg/kg群の左右の精巣重量には対照群との差は認められなかった。

雌では, 肝臓の重量の増加が600 mg/kg群で, 肝臓の体重重量比の増加が200および600 mg/kg群で, 左右の腎臓の重量および体重重量比の増加が600 mg/kg群で認められた。なお, 200 mg/kg群の肝臓重量にも統計学的な有意差はないが, 対照群と比較して高値が認められた。

(8) 剖検

雄で, 回腸憩室が600 mg/kg群で1例に認められた。雌では, いずれの例にも異常は認められなかった。なお, 流涎を示した例では唾液腺に異常は認められなかった。

(9) 病理組織学検査 (Table 9, 10)

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与による影響と考えられる所見として, 雄では, 肝臓で軽度の小葉中心性肝細胞肥大が600 mg/kg群で9例に, 腎臓で軽度の近位尿細管上皮の硝子滴沈着が67および200 mg/kg群で各1例, 中等度の硝子滴沈着が67および200 mg/kg群で各11例, 600 mg/kg群で12例全例に, 軽度の近位尿細管上皮の好酸性小体が67および200 mg/kg群で各8例, 600 mg/kg群で9例に認められ, 統計学的にも有意な変化であった。また, 統計学的有意差は認められないものの, 高用量群でより多くの例に認められ, 3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与との関連が考えられる所見として, 腎臓の尿細管上皮の再生が200 mg/kg群で4例, 600 mg/kg群で3例に認められた。

雌では, 600 mg/kg群の1例に, 肝臓で軽度の小葉中

心性肝細胞肥大が認められた。その他に被験物質投与と関連する変化は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

(1) 生殖能検査 (Table 11)

雌の性周期検査では全例に異常は認められなかった。また, 雌雄の交尾までに要した日数, 交尾率および受胎率にも3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与の影響は認められなかった。

(2) 分娩および母性行動観察 (Table 12)

妊娠期間の延長ならびに妊娠黄体数, 着床数, 出産児数および出産生児数の減少が600 mg/kg群で認められた。

分娩異常として, 分娩中から分娩終了時まで生児のみられない例が600 mg/kg群で1例, また哺育異常として, 全哺育児死亡例が600 mg/kg群で1例みられた。分娩異常例は着床数15, 出産児数が5例であったが, 分娩終了時に5例全例が死亡し, 喰殺を受けた例もみられた。母動物の病理組織学検査では胸腺の萎縮が認められた。全哺育児死亡例では, 着床数2, 出産児数が1例であり, その1例が哺育2日に死亡した。母動物の病理組織学検査では下垂体に嚢胞が認められたのみであった。

分娩終了時の死亡児が67および200 mg/kg群で各雌3例, 600 mg/kg群で雄3例, 雌5例および性別不明例2例が認められ, 67 mg/kg群の雌1例に腰椎の欠損, 痕跡尾および鎖肛が認められた。

(3) 新生児の生存性 (Table 12)

600 mg/kg群で, 哺育4日の生存児数の低値が認められた。

(4) 新生児の一般状態観察

死亡あるいは不明例が対照群で雄2例, 67 mg/kg群で雌雄各1例, 200 mg/kg群で雄3例, 600 mg/kg群で雄9例および雌5例に認められた。これらのうち, 痕跡尾および鎖肛が600 mg/kg群で雄1例に認められた。

生存例では痕跡尾およびその痕跡尾の脱落が200 mg/kg群で雄1例に認められ, 外傷が200 mg/kg群の他の1例に認められた。

(5) 新生児の体重推移 (Table 12)

いずれの3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与群にも, 対照群と比較して体重推移に異常は認められなかった。

(6) 新生児の剖検

一般状態観察でみられた600 mg/kg群の痕跡尾および鎖肛の1例, 哺育4日に屠殺した200 mg/kg群の痕跡尾の欠損の1例および外傷の1例の他に, 異常は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性

一般状態観察では, 流涎が雄においては600 mg/kg群の12例中10例で投与15日以降のはほぼ毎日, また他1例では一過性に認められた。雌でも, 雄と同様に, 流涎が

600 mg/kg群で妊娠前、投与期間および哺育期間を通して投与15日以降に計11例にみられた。剖検ではいずれの例にも唾液腺に異常は認められず、投与前から流涎がみられた例もいたことから、投与された3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンによる影響ではなく、投与薬物の臭いや口腔内への刺激による条件づけが成立したことによると考えられた。

体重推移では、体重増加抑制が雄の投与期間、雌の妊娠前交配期間および妊娠期間を通して200および600 mg/kg群で認められ、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与の影響と考えられた。雌の600 mg/kg群では他に、哺育期間の体重増加量および増加率の高値が認められたが、それまでの体重増加抑制に対する哺育期間中の代償的反応と考えられた。

摂餌量では、雄の200 mg/kg群で投与2, 7, 14および21日に低値が認められた。しかし、高用量である雄の600 mg/kg群では投与2日に一過性の低値を示したのみであり、雌で67あるいは200 mg/kg群の哺育期間を除いた期間にみられた低値も一過性であったことから、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与による摂餌量への影響はないと考えられた。

血液に及ぼす影響として、赤血球数、ヘマトクリット値および血色素量の減少が雄の600 mg/kg群で認められたが、いずれも軽度であり、尿検査、血液生化学検査ならびに脾臓を含む病理組織学検査においても異常は認められなかった。

肝臓に対する3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与の影響として、雄の600 mg/kg群で重量の増加傾向および体重重量比の増加がみられ、同群の病理組織学検査では軽度の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。雌でも肝臓の重量の増加ないし増加傾向および体重重量比の増加が200 mg/kg以上の群で認められ、病理組織学検査でも、1例のみの発現であったが600 mg/kg群で肝臓に軽度の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。

腎臓では、雄の67 mg/kg群で重量の増加傾向および体重重量比の増加、200および600 mg/kg群で重量および体重重量比の増加が認められ、雌でも腎臓の重量および体重重量比の増加が600 mg/kg群で認められた。病理組織学検査では、雄の3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与群全群で、近位尿細管上皮の硝子滴沈着および好酸性小体の発現に有意差が認められた。尿細管上皮の再生についても雄の200および600 mg/kg群で出現頻度の増加傾向が認められ、いずれも3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与による影響と考えられた。炭水化合物をラットに投与した場合、特に雄では腎臓の近位尿細管に硝子滴が沈着することが知られており、それ自体に毒性学的意義はないと考えられるが、硝子滴の沈着の程度が強い場合には尿細管上皮の障害および再生を引き起こすと考えられている¹⁾。また、好酸性小体についても硝子滴と同一物質であるという報告がある²⁾。したがって、本試験では近位尿細管上皮への硝子滴あるいは好酸性小体の出現数の増加を認めたものの、毒性病理学的影響は200および600 mg/kg群でみられた尿細管上

皮の再生の出現頻度の増加と考えるのが妥当と判断した。

また、雄の腎臓重量および体重重量比の増加は、硝子滴および好酸性小体の増加と関連していると思われるが、雌の600 mg/kg群ではこのような病理組織学的変化を伴わずに重量および体重重量比の増加が生じており、一元的には説明できなかった。

以上のことから、雄の67 mg/kg以上の群の腎臓の重量および体重重量比の増加(増加傾向を含む)、雌の200 mg/kg以上の群の体重増加抑制ならびに肝臓の重量および体重重量比の増加(増加傾向を含む)から、本試験における3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの反復投与による無影響量は雄で67 mg/kg/day未満、雌で67 mg/kg/dayと判断した。

2. 生殖発生毒性

生殖能検査では雌の性周期、雌雄の交尾および受胎、雌雄の生殖器および内分泌器官の重量、あるいは剖検および病理組織学検査において3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与による影響は認められなかった。なお、600 mg/kg群で認められた精巣の体重重量比の増加は重量に影響が認められないことから、同群の体重低値に基づくものと判断された。3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与群の不妊例の生殖器では、その原因を示唆する病理組織学所見は認められなかった。

分娩異常として分娩終了時に生児のみられない例、ならびに哺育異常として全哺育児死亡例が600 mg/kg群でそれぞれ1例認められた。しかし、後述のように、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与による妊娠黄体数の減少はみられるものの、着床率および胎児の生存性に及ぼす影響はみられず、またこれら2例の母動物では共通した所見がみられないことから、偶発的なものと考えられた。

母動物の剖検および分娩観察では、妊娠期間の延長ならびに妊娠黄体数、着床数、出産児数および出産生児数の減少が600 mg/kg群で認められた。着床数、出産児数、生存児数の減少については、それぞれ着床率、出産率および新生児の哺育4日の生存率に3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与の影響は認められないことから、これらは妊娠黄体数(排卵数)の減少に起因した変化であると考えられ、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンが着床および胎児の生存性に直接影響を及ぼしたとは考えられなかった。妊娠期間の延長については、ウサギで産児数の少ない場合に妊娠期間が長くなることが知られており³⁾、本試験の場合も出産児数の減少との関連が考えられた。

新生児では、一般状態観察および剖検で痕跡尾、鎖肛および腰椎の欠損が67 mg/kg群で1例、痕跡尾が200 mg/kg群で1例、痕跡尾および鎖肛が600 mg/kg群で1例にみられたが、各群1例のみの出現であり、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与との関連はないものと考えられた。また、哺育4日の生存児数の低値が600 mg/kg群で認められたが、前述した全哺育児死亡例お

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*	545.5 ± 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 ^{a)} (%)	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 ^a (%)	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 ^b (%)	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 ^b (%)	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 ($\times 10^9/\mu\text{l}$)	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	37 \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 ₁ -glob (%)	25.33 ± 2.82	25.44 ± 2.33	23.03 ± 3.22	23.95 ± 1.24
α ₂ -glob (%)	10.96 ± 2.15	11.43 ± 2.13	12.33 ± 1.67	11.86 ± 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-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 ^{a)}	12 ^{b)}	12	12 ^{b)}
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 ^a (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
No. of pregnant animals	10	11	12	11
Fertility index ^b (%)	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 ^a (%)	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 ^b (%)	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 ^c (%)	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 ^d (%)	100.0	100.0	100.0	90.9(10)
Nursing index ^e (%)	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 ^f (%)	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 ^g (%)	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, TA1537¹¹ および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²³ 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 μg /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 μg /プレート、添加試験は 7.81~250 μg /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突然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 D1G02、純度 99.0 wt%(不純物:0.8 wt% ブタジエン-イソプレン-ビペリレン、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・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⁴⁾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. Norpoth, 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)	660 665 634 (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	11	10	14	28	19	24	19	21	14	11	16	13
		(109 \pm 8.0)			(12 \pm 2.1)			(24 \pm 4.5)			(18 \pm 3.6)		(13 \pm 2.5)			
	3.91	ND			12	11	11	ND			ND		13	13	11	
					(11 \pm 0.6)								(12 \pm 1.2)			
	7.81	97	106	106	10	5	11	25	21	33	16	14	22	6	18	21
		(103 \pm 5.2)			(9 \pm 3.2)			(26 \pm 6.1)			(17 \pm 4.2)		(15 \pm 7.9)			
	15.6	99	108	106	18	11	14	17	17	16	19	16	17	13	5	10
		(104 \pm 4.7)			(14 \pm 3.5)			(17 \pm 0.6)			(17 \pm 1.5)		(9 \pm 4.0)			
31.3	107	97	96	6	11	10	21	26	22	11	20	14	12	14	6	
	(100 \pm 6.1)			(9 \pm 2.6)			(23 \pm 2.6)			(15 \pm 4.6)		(11 \pm 4.2)				
62.5	105	108	93	8	10	6	10	20	28	13	18	25	8	10	12	
	(102 \pm 7.9)			(8 \pm 2.0)			(19 \pm 9.0)			(19 \pm 6.0)		(10 \pm 2.0)				
125	89*	66*	89*	4*	3*	4*	24*	16*	20	9*	9*	8*	11*	7*	2*	
	(81 \pm 13.3)			(4 \pm 0.6)			(20 \pm 4.0)			(9 \pm 0.6)		(7 \pm 4.5)				
250	1*	22*	60*				17*	13*	28*	6*	10*	1*				
	(28 \pm 29.9)						(19 \pm 7.8)			(6 \pm 4.5)						
S9 mix (+)	0	112	106	107	12	6	8	25	23	40	30	31	22	22	8	6
		(108 \pm 3.2)			(9 \pm 3.1)			(29 \pm 9.3)			(28 \pm 4.9)		(12 \pm 8.7)			
	7.81	ND			8	11	9	ND			ND		9	14	4	
					(9 \pm 1.5)								(9 \pm 5.0)			
	15.6	93	114	103	7	17	10	25	23	17	16	21	19	6	13	9
		(103 \pm 10.5)			(11 \pm 5.1)			(22 \pm 4.2)			(19 \pm 2.5)		(9 \pm 3.5)			
	31.3	107	122	112	11	16	15	22	25	26	22	25	32	16	6	8
		(114 \pm 7.6)			(14 \pm 2.6)			(24 \pm 2.1)			(26 \pm 5.1)		(10 \pm 5.3)			
62.5	114	122	128	7	10	10	32	23	19	26	27	27	11	12	10	
	(121 \pm 7.0)			(9 \pm 1.7)			(25 \pm 6.7)			(27 \pm 0.6)		(11 \pm 1.0)				
125	99	105	111	7	10	13	32	32	20	31	12	22	13	6	5	
	(105 \pm 6.0)			(10 \pm 3.0)			(28 \pm 6.9)			(22 \pm 9.5)		(8 \pm 4.4)				
250	81*	58*	86*	1*	2*	4*	17*	25*	20*	9*	11*	12*	2*	2*	7*	
	(75 \pm 14.9)			(2 \pm 1.5)			(21 \pm 4.0)			(11 \pm 1.5)		(4 \pm 2.9)				
500	38*	8*	10*				16*	19*	12*	2*	2*	2*				
	(19 \pm 16.8)						(16 \pm 3.5)			(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	380	384	351	303	312	331	531	522	545	1349	1188	1356
		(568 \pm 6.1)			(372 \pm 18.0)			(315 \pm 14.3)			(533 \pm 11.6)		(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	274	271	345	485	499	470	308	348	287	227	292	311
		(590 \pm 70.6)			(297 \pm 41.9)			(485 \pm 14.5)			(314 \pm 31.0)		(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 cm², 池本理化)を用いた。2×10⁴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CO₂インキュベーター(5% CO₂)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C₉H₁₂、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-ビベリレン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

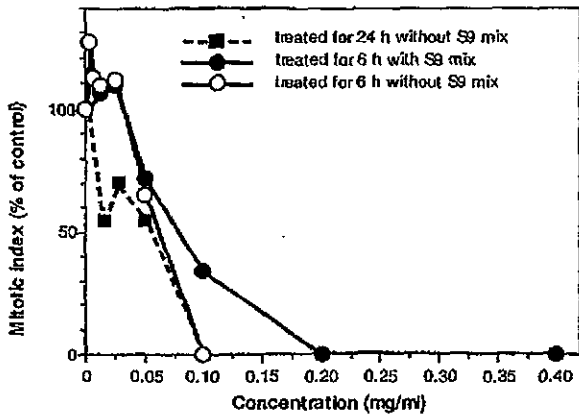


Fig. 1 Mitotic inhibition of CHL/IU cells treated with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene

るため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質の CHL/IU 細胞に対する増殖抑制作用は、フラスコあたりの観察細胞(1000細胞)における分裂中期細胞の頻度(分裂指数:Mitotic index)を調べ、2つのフラスコともに 0.5% 以上の分裂指数を示した最も高い濃度(MI max)を指標とした。

その結果、連続処理における MI max 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 であった(Fig. 1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、MI max の2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(24時間および48時間連続処理および短時間処理の S9 mix 非存在下:0.0063, 0.013, 0.025, 0.050, 0.10 mg/ml, 短時間処理の S9 mix 存在下:0.013, 0.025, 0.05, 0.10, 0.20 mg/ml)。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり2枚フラスコを用い、染色体標本作製と同時に分裂指数を測定した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約 0.1 μg/ml になるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各フラスコにつき6枚作製した。作製した標本を 3% ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

分裂指数の測定結果から、MI max を観察対象の最高

濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2)、連続処理では 0.050 mg/ml が、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 が MI max を示したことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1つのフラスコから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)研究会²⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法³⁾(多重性を考慮して familywise の有意水準を 5% とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定⁴⁾($p < 0.05$)を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果を Table 1 に示した。3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンを加えて S9 mix 非存在下における短時間処理では、いずれの処理群においても、染色体の構造異常は認められなかった。高濃度群(0.050 mg/ml)では細胞毒性のため、規定の細胞数が観察できなかったが、いずれの処理群においても、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix 存在下では、高濃度群(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、その頻度は 14.5% であった。また、高濃度群(0.10 mg/ml)では細胞毒性のため、規定の細胞数が観察できなかったが、いずれの処理群においても、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 吉村 功編, "毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ," サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編, "毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析," 地人書館, 東京, 1992, pp.218-223.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
試験担当者: 山影康次, 日下部博一,
中川ゆづき, 水谷正寛, 渡辺美香,
出石由紀, 橋本恵子
(財)食品薬品安全センター秦野研究所
〒257 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,
Yuzuki Nakagawa, Masahiro Mizutani,
Mika Watanabe, Yuki Izushi,
Keiko Hashimoto
Hatano Research Institute, Food and Drug
Safety Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL/IU) continuously treated with 3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-1H-indene (THI)* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)		
												with aberrations TAG (%)	Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾			
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total				TA (%)		SA	NA
Control			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			-
Solvent ¹⁾	0	24	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.25			100.0
THI	0.013	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			155.7
THI	0.025	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38	NT	NT	116.4
THI	0.050	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25			96.7
THI	0.10**	24	-											-			-
MC	0.00005	24	200	10	42	109	3	0	0	164	0	96 (48.0)	93 (46.5)	0.25			-
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38			100.0
THI	0.013	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			146.9
THI	0.025	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	NT	NT	124.5
THI	0.050	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			167.3
THI	0.10**	48	-											-			-
MC	0.00005	48	200	2	25	87	1	1	0	116	3	69 (34.5)	67 (33.5)	0.38			-

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no. of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C, NT:not tested.

1)Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done(p<0.05)when the incidence of TAG or polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control data(p<0.05)by Fisher's exact test. 6)Relative metaphase frequency to the solvent control, representing cytotoxicity, was calculated. *:Purity of test substance was 99.0 wt%. Butadiene-isoprene-piperylene (0.8 wt%) and dicyclopentadiene(0.1 wt%) were contained as impurities. **:Chromosome analysis was not performed because there were small number of metaphases due to cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL/IU) treated with 3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-1H-indene(THI)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)		
													with aberrations TAG (%)	Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾			
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total				TA (%)		SA	NA
Control				200	0	0	1	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25			-
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	2	1	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.25			100.0
THI	0.013	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			74.7
THI	0.025	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25	NT	NT	101.9
THI	0.050	-	6-(18)	156	0	0	2	2	0	0	4	0	3 (1.9)	3 (1.9)	0.43 ⁷⁾			42.6
THI	0.10***	-	6-(18)	-										-			-	
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	2	0	1	2	0	0	5	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.13			100.0
THI	0.025	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			91.3
THI	0.050	+	6-(18)	200	0	1	1	0	1	0	3	1	3 (1.5)	3 (1.5)	0.38	+	NT	57.7
THI	0.10	+	6-(18)	200	4	17	24	0	1	0	46	0	29*(14.5)	27 (13.5)	0.22 ⁸⁾			38.5
THI	0.20***	+	5-(18)	-										-			-	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	3	28	43	2	0	10	86	1	46 (23.0)	46 (23.0)	0.25			-

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no. of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide, NT:not tested.

1)Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done(p<0.05). 6)Relative metaphase frequency to the solvent control, representing cytotoxicity, was calculated. 7)Four hundred and sixty eight cells were analysed, 8)Four hundred and fifty nine cells were analysed. *:Significantly different from historical solvent control(p<0.05)by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **:Purity of test substance was 99.0 wt%. Butadiene-isoprene-piperylene (0.8 wt%) and dicyclopentadiene(0.1 wt%) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because there were small number of metaphases due to cytotoxicity.

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドのラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Benzyltrimethylanmonium chloride in Rats

要約

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドは、有機合成反応の触媒として使用されている化合物である。本化合物の毒性については、ほとんど報告がないため、今回、既存化学物質の安全点検に関わる毒性調査事業の一環として、SD系ラットを用いる強制経口投与による28日間反復投与毒性試験を実施した。

ラットは1群雌雄各5匹で4試験群、対照群および高用量群には雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドは、超純水に溶解し、0, 30, 60および120 mg/kgを毎日1回、4週間連続経口投与し、一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、血液学検査、血液凝固能検査、血液生化学検査、尿検査、器官重量測定および病理学的検査を行った。なお、回復期間は2週間とし、投与終了時と同様な検査を実施した。

その結果は、次のとおりである。

雌の120 mg/kg群で1例が投与4週に死亡した。病理学検査の結果には死因に結びつく変化は認められなかった。

一般状態の観察では、雄の60 mg/kg群で流涎、雌雄の120 mg/kg群で流涎、流涎および被毛の汚れが、さらに雌の120 mg/kg群で立毛が認められた。雌雄の120 mg/kg群で観察された症状は回復試験では観察されず回復を示した。

体重は雄の120 mg/kg群で増加が抑制され、投与3週以降有意であった。摂餌量は、雄の120 mg/kg群で投与期間を通して減少が認められた。飼料効率率は雄の120 mg/kg群で投与4週のみ低値であった。回復期間中は、体重変化を除き回復が認められた。

血液学検査の結果、雄の120 mg/kg群で、ヘモグロビン量、MCVおよびMCHの高値が認められた。回復期間終了時には、被験物質の投与と関連づけられる変化は認められなかった。

血液生化学検査の結果、雌雄とも被験物質投与と関連づけられる変化は認められなかった。

尿検査の結果、雌雄とも被験物質投与と関連づけられる変化は認められなかった。

器官重量測定の結果、雌雄とも被験物質投与と関連づけられる変化は認められなかった。

病理学的検査の結果、計画屠殺動物において剖検所見および組織所見では被験物質の影響が示唆される所見は

認められなかった。投与期間中に、120 mg/kg群の雌で1例死亡動物が観察され、組織学的検査の結果、肝細胞腫脹と好酸性小体の出現が認められた。

以上の結果、無影響量は雄で30 mg/kg/day、雌で60 mg/kg/dayと判断された。

材料および方法

1. 被験物質

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド(CAS No.56-93-9, 和光純薬工業(株)提供)は白色の固体(常温)で、水溶性、分子式 $C_{10}H_{16}ClN$ 、分子量185.70の化合物である。本試験に用いたロットRSL9083の純度は98%であった。

2. 供試動物

供試したラット [Crj:CD(SD)系, SPF] は日本チャールス・リバー(株)(神奈川県)から4週齢で購入した。動物を検収後、試験環境に9日間馴化させた後、6週齢で投与を開始した。動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした。動物の識別は、個別飼育ケージに動物標識番号(Animal ID-No.)を付すことにより行った。投与開始時の体重は雄で137~156 g、雌で117~131 gであった。

3. 飼育条件

動物はバリアシステムの飼育室で飼育し、環境調節の目標値は温度 $23 \pm 2^\circ C$ 、相対湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数20回/時、照明150~300 lux、12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)とした。(株)東京技研サービスの水洗式飼育機を使用し、金属製前面・床網目飼育ケージに動物を1匹ずつ収容し、オリエンタル酵母工業(株)製造の放射線滅菌改良NIH公開ラット・マウス飼料および水道水を自由に摂取させた。飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回取り換えた。

なお、動物の馴化期間を含め、投与および回復期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

4. 試験群の構成

試験群は0, 30, 60および120 mg/kgの4群とし、1群雌雄各5匹を用い、0および120 mg/kg群に雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

28日間反復投与毒性試験

(用量設定理由)

本試験に先立ち、投与量設定のための2週間投与試験を0, 10, 30, 90および180 mg/kgの5用量で実施した。その結果、雌雄とも180 mg/kg群で死亡が認められ、死亡率は雄で60%、雌で80%であった。90 mg/kg群では、雌雄とも器官重量に軽微な変化が認められたのみであった。従って、28日間反復投与毒性試験の最高用量は120 mg/kgとし、以下公比2で除した中用量を60 mg/kg、低用量を30 mg/kgに設定した。

5. 投与方法

被験物質の投与経路は経口とした。被験物質は超純水に溶解し、胃ゾンデを用いて経口投与した。投与容量は体重100 g当り0.5 mlとした。対照群には溶媒のみ投与した。

6. 投与液の調製、分析

被験物質は、各用量(30, 60および120 mg/kg)ごとに所定量を精秤し、超純水(NANO pureシステム、米国SYBRON社)に溶解した。投与液は調製後、冷蔵庫保存で1週間安定であることが確認されているので、本試験においては毎週1回調製を行い、1日分毎に小分けをし使用時まで冷蔵庫に保管した。投与液の濃度分析をすべての群に関し投与1および4週の調製液について実施した結果、設定濃度の104~107%の範囲であり、適切に調製されていた。

7. 投与期間

投与期間は28日間とし、投与終了後0および120 mg/kg群について2週間の回復試験を実施した。

8. 観察、測定および検査

1) 一般状態の観察

全動物を毎日午前、午後の2回観察し、中毒症状の有無、行動異常、死期の迫った動物および死亡動物の有無等を記録した。

2) 体重

投与開始から回復試験終了時まで、毎週1回測定した。

3) 摂餌量

毎週1回給餌した残量を測定し、飼料摂取量(g/week)を算出した。

4) 臨床検査

投与終了時および回復期間終了時の計2回実施した。採血するに当り、動物は約16時間絶食させた。動物をエーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。

a. 血液学検査

EDTA-3Kを添加した初血を用い、白血球数(WBC: 暗視野板法)、赤血球数(RBC: 暗視野板法)、ヘモグロビン量(HGB: シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトク

リット値(HCT: RBC, MCVより算出)、平均赤血球容積(MCV: 暗視野板法)、平均赤血球色素量(MCH: HGB, RBCより算出)、平均赤血球色素濃度(MCHC: HGB, HCTより算出)、血小板数(PLT: 暗視野板法)および白血球百分率(フローサイトケミストリー法)を血液自動分析装置THMS H・1E(米国マイルス社)を用いて測定した。

網赤血球(RC)率算定用に、全血をキャピロット(テルモ株式会社)で染色後、血液塗抹標本を作製し鏡検した。

また、クエン酸ソーダ添加血液の血漿について、プロトロンビン時間(Quick 1段法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(クロット法)およびフィブリノーゲン量(トロンビン時間法)を血液凝固自動測定装置KC-40(独国Amelung社)を用いて測定した。

b. 血液生化学検査

血清を用いて、総蛋白(ビュレット法)、アルブミン(B.C.G.法)、A/G比(計算値)、血糖(グルコースオキシダーゼ法)、中性脂肪(酵素法)、総コレステロール(酵素法)、尿素窒素(BUN: ウレアーゼ改良法)、総ビリルビン(ジアゾ色素法)、カルシウム(アルセナゾIII色素法)、無機リン(モリブデン酸ブルー法)、ナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)および塩素(電極法)をEKTACHEM 700N(米国コダック社)で、クレアチニン(アルカリ性ピクリン酸比色法)、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT: Karmen改良法)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT: Karmen改良法)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP: Szasz改良法)およびアルカリホスファターゼ(ALP: Bessey-Lowry-Brock改良法)をCentrifichem ENCORE II(米国ベーカー社)で測定した。

c. 尿検査

血液学検査に先立ち、採尿器を用いて24時間(午前10時から翌日午前10時まで)尿を採取し、尿量、色調および濁度を検査後、尿比重計UR-S(関アタゴ)を用いて尿比重を測定した。また、尿を遠心分離後Sternheimer変法により沈渣を染色し、鏡検した。pH、潜血、ケトン体、糖、蛋白、ビリルビンおよびウロビリノーゲンについて、N-マルティスティックスSG試験紙(マイルス・三共)およびCLINITEK 200(米国マイルス社)を用いて測定した。

5) 病理学検査

病理解剖は投与終了時および回復期間終了時に動物をエーテル麻酔し、放血致死させ実施した。肉眼的異常を病理解剖所見記録シートに記録した。また、脳、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺、精巣および卵巣について重量を測定し、器官重量・体重比を算出した。上記重量測定器官と下垂体、眼球、唾液腺、甲状腺(上皮小体を含む)、心臓、肺、胃、膀胱、骨髄(大腿骨)および肉眼所見で変化が認められた器官・組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

病理組織学検査は固定した器官・組織のうち、対照群

と高用量群の唾液腺、肝臓、心臓、脾臓、腎臓、副腎および骨髄(大腿骨)について実施した。常法に従って薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色し鏡検した。

6) データの記録および統計分析

各試験群の体重、摂餌量、血液学検査値、血液生化学検査値、尿検査値(尿量および尿比重のみ)、器官重量および器官重量・体重比は、下記に示した自動判別方式に従い、最初にBartlettの等分散検定を実施した。等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、分散が有意で各群の標本数が同数の場合はDunnettの多重比較検定、各群の標本数が異なる場合はDuncanの多重範囲検定で対照群と各投薬群間の有意差を検定した。Bartlettの等分散検定で不等分散の場合はKruskal-Wallisの順位検定を実施し、有意の場合はノンパラメトリックのDunnettの多重比較検定で対照群と各投薬群間の有意差を検定した。また、病理学的検査結果については、Fisherの直接確率検定を実施した。

有意水準は5および1%の片側検定で実施した。

試験結果

1. 死亡率

投与4週に、雌の120 mg/kg群で1例(動物番号2309)が死亡した。これを除き投与期間中、雌雄とも死亡例は認められなかった。

回復期間中には、雌雄とも対照群および120 mg/kg群で死亡例は認められなかった。

2. 一般状態の観察

雄では、120 mg/kg群で投与2週から流涎が観察され始め、投与2週は6例に、投与3週以降は9例に観察された。流涎は投与後1時間から発現し、3時間程度継続した後消失する繰り返しであり、程度は下顎がかなり濡れる程度であった。また、流涎は60 mg/kg群でも投与4週の5~7日に2例に発現したが、120 mg/kg群と比較し症状の程度は軽度で下顎が濡れる程度であった。その他の変化として、120 mg/kg群では、投与4週に5例に流涙が、また2例に被毛の汚れが認められた。これらはいずれも回復期間に入ると認められなかった。また、被毛の汚れについては、観察された2例がいずれも投与4週の計画屠殺動物であったため、回復性は明らかでなかった。

雌では、120 mg/kg群で投与2週から流涎が全例に、また、流涙および被毛の汚れが8例に、立毛が3例に観察され、投与4週には流涎および被毛の汚れが10例に、立毛が4例に増加し、このうち1例が投与4週に死亡したが、死亡例では流涎、流涙および被毛の汚れが投与2週から観察された以外、特記すべき変化は認められなかった。いずれの症状も回復期間に入ると認められなかった。なお、流涎の程度や発現時間は雄とほぼ同じであった。流涙についても発現時間は流涎と同様であったが、

程度は軽度で眼瞼が濡れる程度であった。

3. 体重(Figure 1)

雄では、120 mg/kg群で投与1週から増加抑制傾向が認められ、投与3および4週で対照群と比較して低値を示した。投与終了時の対照群と120 mg/kg群の体重差は、回復期間終了時でも大差がなかった。

雌では、投与期間中は120 mg/kg群で僅かに体重増加抑制傾向にあったもののいずれの被験物質投与群も対照群と有意な差は認められなかった。回復1週では、対照群と比較して120 mg/kg群で僅かに低値であったが、2週には有意な差は認められなかった。

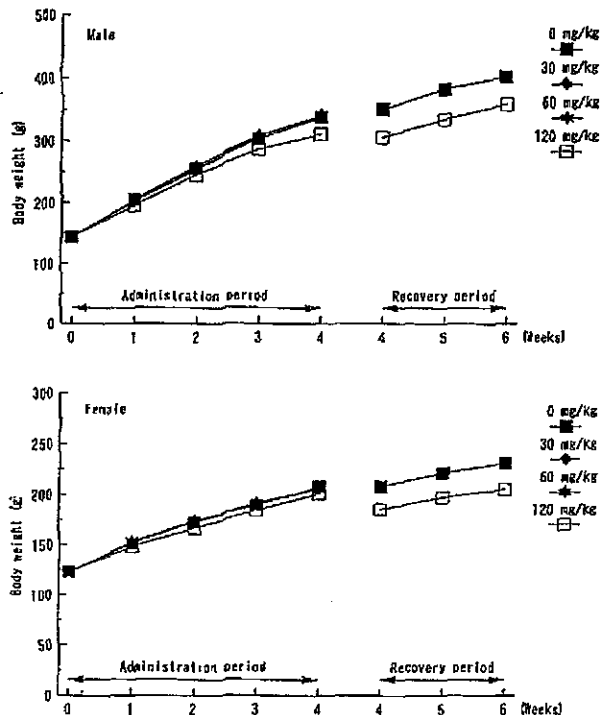


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

4. 摂餌量

雄では、対照群と比較して120 mg/kg群で投与期間を通じて減少が認められた。回復期間に入ると対照群と120 mg/kg群で明確な差は認められなかった。

雌では、投与期間および回復期間を通じて、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

5. 血液学検査(Table 1)

(投与終了時の検査結果)

雄では、対照群と比較して120 mg/kg群でヘモグロビン量、MCVおよびMCHの高値が認められた。また、MCVおよびMCHは、30および60 mg/kg群でも高値が認められたが、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数は対照群と差がなく、意義のある変化ではなかった。

Table 1 Hematology of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
HCT (%)	43.4 ± 1.7	43.2 ± 2.0	43.5 ± 1.4	45.8 ± 1.4	44.2 ± 0.4	43.1 ± 1.0
HGB (g/dl)	14.9 ± 0.3	15.1 ± 0.5	15.0 ± 0.5	16.1 ± 0.3**	15.2 ± 0.3	15.1 ± 0.4
RBC (×10 ⁶ /mm ³)	7.52 ± 0.22	7.28 ± 0.38	7.27 ± 0.30	7.66 ± 0.23	7.85 ± 0.10	7.47 ± 0.07**
MCV (μm ³)	57.7 ± 1.1	59.4 ± 1.1*	59.8 ± 0.8**	59.8 ± 0.9**	56.2 ± 0.7	57.7 ± 1.6
MCH (pg)	19.8 ± 0.3	20.7 ± 0.8*	20.7 ± 0.3*	21.0 ± 0.6**	19.4 ± 0.4	20.2 ± 0.5*
MCHC (%)	34.2 ± 0.7	34.8 ± 1.5	34.5 ± 0.5	35.1 ± 0.8	34.4 ± 0.4	35.0 ± 1.0
PLT (×10 ⁹ /mm ³)	1074 ± 66	1161 ± 132	1082 ± 98	1101 ± 156	1014 ± 96	1000 ± 121
WBC (×10 ⁹ /mm ³)	9.9 ± 1.8	13.9 ± 2.2	12.6 ± 1.7	10.5 ± 3.6	11.5 ± 1.5	15.0 ± 4.4
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	12 ± 3	9 ± 3	9 ± 3	11 ± 3	10 ± 1N	9 ± 4
LYMPH	85 ± 3	87 ± 4	89 ± 3	86 ± 2	85 ± 1N	88 ± 4
MONO	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 0	2 ± 1	1 ± 1
EOSN	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1
LUC	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0
Reticulocyte (%)	30 ± 2	29 ± 8	31 ± 5	30 ± 6	21 ± 7	29 ± 4
PT (sec.)	13.8 ± 0.4	13.5 ± 0.3	13.6 ± 0.2	13.7 ± 0.3	13.6 ± 0.4	13.4 ± 0.3
APTT (sec.)	25.1 ± 1.5	25.4 ± 1.1	25.1 ± 1.5	25.9 ± 1.9	25.9 ± 1.3	23.8 ± 2.1
Fibrinogen (mg/dl)	255 ± 20	258 ± 5	266 ± 21	244 ± 10	277 ± 21	254 ± 15
Female						
No. of animals	4	5	5	5	5	4
HCT (%)	43.0 ± 1.3	42.2 ± 1.5	42.6 ± 1.3	42.9 ± 1.3	40.7 ± 1.1	41.3 ± 1.9
HGB (g/dl)	15.3 ± 0.5	15.2 ± 0.4	15.1 ± 0.3	15.3 ± 0.3	14.6 ± 0.1N	14.9 ± 0.8
RBC (×10 ⁶ /mm ³)	7.49 ± 0.33	7.46 ± 0.36	7.36 ± 0.17	7.44 ± 0.19	7.32 ± 0.18	7.49 ± 0.22
MCV (μm ³)	57.4 ± 1.1	56.7 ± 1.0	57.9 ± 1.0	57.7 ± 0.9	55.6 ± 0.9	55.2 ± 1.6
MCH (pg)	20.4 ± 0.2	20.4 ± 0.7	20.5 ± 0.5	20.6 ± 0.4	19.9 ± 0.5	19.9 ± 0.8
MCHC (%)	35.6 ± 0.5	36.0 ± 0.7	35.4 ± 0.7	35.7 ± 0.9	35.8 ± 0.9	36.0 ± 0.8
PLT (×10 ⁹ /mm ³)	1114 ± 43	1139 ± 57	1069 ± 90	1065 ± 112	994 ± 79	1187 ± 107*
WBC (×10 ⁹ /mm ³)	6.5 ± 2.8	5.9 ± 2.2	6.3 ± 2.8	7.3 ± 2.5	5.5 ± 1.9	6.4 ± 1.1
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	12 ± 2	13 ± 4	11 ± 2	13 ± 5	18 ± 5	13 ± 2
LYMPH	84 ± 2	83 ± 4	84 ± 4	82 ± 6	79 ± 5	83 ± 3
MONO	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 0	2 ± 1
EOSN	2 ± 1	2 ± 0	2 ± 2	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 1
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Reticulocyte (%)	21 ± 7	18 ± 6	20 ± 3	19 ± 6	20 ± 5	23 ± 8
PT (sec.)	13.9 ± 0.5	13.9 ± 0.6	13.8 ± 0.2	14.0 ± 0.4	13.8 ± 0.5	14.1 ± 0.5
APTT (sec.)	21.0 ± 0.4	21.2 ± 1.2	21.8 ± 1.4	21.1 ± 1.6	19.8 ± 0.6	19.7 ± 0.8
Fibrinogen (mg/dl)	233 ± 26	214 ± 27	207 ± 23	213 ± 18	195 ± 9	204 ± 19

NEUT:Neutrophil LYMPH:Lymphocyte MONO:Monocyte EOSN:Eosinophil ASO:Basophil LUC:Large unstained cells

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group: * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

雌では、いずれの検査項目も対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

〔回復期間終了時の検査結果〕

雄では、対照群に比較して120 mg/kg群で赤血球数の低値、MCHの高値が認められた。

雌では、対照群に比較して120 mg/kg群で血小板数が高値を示したが、背景値の範囲内の変化であった(背景値 $1103 \pm 124 \times 10^3 / \text{mm}^3$, $n=50$)。

6. 血液凝固検査 (Table 1)

投与終了時および回復試験終了時のいずれにおいても、雌雄ともに対照群と被験物質投与群とで検査を行った3項目に差は認められなかった。

7. 血液生化学検査 (Table 2)

〔投与終了時の検査結果〕

雄では、対照群に比較して30および120 mg/kg群でGOTが高値を示したが、背景値の正常範囲内の値であった。

雌では、すべての検査項目について、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

〔回復期間終了時の検査結果〕

雄では、すべての検査項目について、対照群と120 mg/kg群とで差が認められなかった。

雌では、対照群に比較して120 mg/kg群で総蛋白の低値が認められたが、対照群が僅かに高値傾向にあり、120 mg/kg群の値は正常範囲(背景値: $5.66 \pm 0.20 \text{ g/dl}$, $n=50$)内の値であった。

8. 尿検査 (Table 3)

投与終了時および回復試験終了時のいずれにおいても、雌雄ともに対照群と被験物質投与群とですべての検査項目について明らかな差は認められなかった。

9. 器官重量 (Table 4)

〔投与終了時の結果〕

雄では、対照群に比較して30および60 mg/kg群で脳、腎臓および脾臓重量が高値、さらに60 mg/kg群で胸腺重量が高値を示した。

雌では、重量測定を行ったすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差は認められなかった。

〔回復期間終了時の結果〕

雌雄とも重量測定を行ったすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差は認められなかった。

10. 器官重量・体重比(相対重量) (Table 4)

〔投与終了時の結果〕

雄では、対照群に比較して60 mg/kg群で胸腺相対重量の高値が認められた。

雌では、重量測定を実施したすべての器官について、

対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

〔回復期間終了時の結果〕

雄では、対照群に比較して120 mg/kg群で脳相対重量の高値が認められた。

雌では、重量測定を実施したすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

11. 病理学検査

a) 剖検所見 (Table 5)

雌の120 mg/kg群の死亡例については、肉眼的には特筆すべき所見は観察されなかった。

投与終了時の計画屠殺された動物の剖検所見で被験物質による影響と考えられる所見は雌雄いずれの投与群にも認められなかった。

対照群を含め観察された所見としては、肺の赤色斑/区域と有色斑/区域が、それぞれ雌雄で少数例、胸腺の赤色斑/区域は雌で少数例認められた。その他観察された所見はごく僅かか、単発性の発生に止まった。

回復期間終了時の所見は、いずれも単発性の発生に止まり、被験物質による影響と考えられる所見は認められなかった。

b) 組織所見 (Table 6)

雌の120 mg/kg群の死亡例については、肝臓において、好酸性小体の出現と肝細胞腫脹が認められ、また、副腎皮質の増生が認められた。その他、肝臓の肉芽巣、骨髄の血管拡張や自己融解が観察された。

投与終了時の組織学的検査の結果、被験物質による影響と考えられる所見は認められなかった。対照群を含め観察された所見として、肝臓の周辺性脂肪化あるいは脂肪化、肉芽巣、腎臓の尿細管の好塩基化、繊維化や管腔拡張などの変化が認められた。

考察および結論

雌の120 mg/kg群で死亡が1例認められ、この動物では、同群の他の動物でも観察された流涎、流涙および被毛の汚れが死亡の3週間前から観察された。病理学的検査の結果、肝臓に肝細胞腫脹と好酸性小体の出現等が認められたが、死因に結びつけられる変化ではなかった。しかしながら、予備試験での死亡例の状況等から、被験物質投与により死亡したものと考えられた。

一般状態の観察では、雌雄の120 mg/kg群で流涎、流涙および被毛の汚れが、さらに雌の120 mg/kg群で立毛が認められ、これらの症状のうち、流涎については雄の60 mg/kg群の1部の例でも観察された。投与中止により消失が認められいずれも被験物質投与による変化と考えられた。

体重、摂餌量および飼料効率は、雄の120 mg/kg群のみ低値または減少が認められ、摂餌量および飼料効率は投与の中止により回復した。体重については投与終了時の差が縮まらず、回復は認められなかった。

血液学検査の結果、雄の120 mg/kg群で認められたへ

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with benzytrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
BUN (mg/dl)	11.8 ± 3.2	11.1 ± 0.7	11.7 ± 1.9	14.4 ± 2.4	10.8 ± 1.6	12.7 ± 2.5
Creatinine (mg/dl)	0.57 ± 0.09	0.56 ± 0.07	0.57 ± 0.09	0.63 ± 0.02	0.65 ± 0.10	0.63 ± 0.08
T.cholesterol (mg/dl)	47 ± 10	38 ± 11	46 ± 13	33 ± 12	33 ± 11	35 ± 13
T.protein (g/dl)	5.29 ± 0.26N	5.32 ± 0.16	5.20 ± 0.04	5.36 ± 0.18	5.43 ± 0.21	5.44 ± 0.27
Albumin (g/dl)	3.04 ± 0.15	3.04 ± 0.13	2.96 ± 0.07	3.15 ± 0.11	3.05 ± 0.12	3.12 ± 0.13
A/G	1.35 ± 0.03N	1.33 ± 0.08	1.32 ± 0.09	1.43 ± 0.02	1.29 ± 0.04	1.35 ± 0.07
Glucose (mg/dl)	128 ± 9	132 ± 15	125 ± 10	115 ± 10	146 ± 22	139 ± 25
Triglyceride (mg/dl)	42.1 ± 9.6	55.9 ± 21.4	44.4 ± 11.2	40.7 ± 8.8	62.5 ± 19.2N	52.1 ± 4.3
GOT (U/l)	48 ± 1N	55 ± 4*	52 ± 8	56 ± 3*	40 ± 4	45 ± 7
GPT (U/l)	13 ± 2	14 ± 2	12 ± 2	14 ± 2	14 ± 3	14 ± 2
ALP (U/l)	163 ± 29	166 ± 48	138 ± 21	166 ± 19	136 ± 30	138 ± 17
γ-GTP (U/l)	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.4	0.6 ± 0.5	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.2
T.bilirubin (mg/dl)	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.02
Sodium (mmol/l)	144.1 ± 1.0	143.5 ± 0.7	144.7 ± 1.4	143.1 ± 1.4	142.5 ± 0.7	141.5 ± 1.1
Potassium (mmol/l)	4.50 ± 0.31	4.61 ± 0.25	4.48 ± 0.24	4.74 ± 0.21	4.01 ± 0.13	4.22 ± 0.27
Chloride (mmol/l)	107.2 ± 0.7	107.0 ± 1.6	107.9 ± 1.5	106.3 ± 0.7	108.2 ± 1.3	107.1 ± 0.6
Calcium (mg/dl)	9.79 ± 0.35	9.82 ± 0.27	9.64 ± 0.28	9.63 ± 0.15	9.70 ± 0.26	9.77 ± 0.31
Lphosphate (mg/dl)	7.81 ± 0.28	7.80 ± 0.65	7.61 ± 0.25	8.12 ± 0.52	7.36 ± 0.51	7.80 ± 0.50
Female						
No. of animals	4	5	5	5	5	4
BUN (mg/dl)	13.7 ± 3.2	14.3 ± 2.5	14.9 ± 2.3	13.8 ± 1.3	13.6 ± 2.9	15.1 ± 2.4
Creatinine (mg/dl)	0.67 ± 0.06	0.58 ± 0.06	0.59 ± 0.06	0.55 ± 0.07	0.65 ± 0.03	0.63 ± 0.10
T.cholesterol (mg/dl)	45 ± 6	41 ± 6	46 ± 8	46 ± 12	42 ± 18	45 ± 17
T.protein (g/dl)	5.46 ± 0.06	5.34 ± 0.18	5.40 ± 0.33	5.29 ± 0.22	5.83 ± 0.28	5.44 ± 0.15*
Albumin (g/dl)	3.26 ± 0.10	3.23 ± 0.16	3.27 ± 0.27	3.19 ± 0.18	3.40 ± 0.24	3.16 ± 0.18
A/G	1.48 ± 0.08	1.54 ± 0.10	1.53 ± 0.08	1.52 ± 0.08	1.39 ± 0.08	1.39 ± 0.12
Glucose (mg/dl)	105 ± 6	106 ± 12	105 ± 13	103 ± 15	114 ± 15	103 ± 16
Triglyceride (mg/dl)	33.3 ± 5.8	30.5 ± 4.9	33.7 ± 8.2	28.2 ± 2.7	49.8 ± 20.2	33.3 ± 8.8
GOT (U/l)	57 ± 8	59 ± 11	53 ± 8	56 ± 10	46 ± 10	47 ± 5
GPT (U/l)	15 ± 2	16 ± 2	15 ± 2	16 ± 4	13 ± 1	13 ± 3
ALP (U/l)	132 ± 38	105 ± 34	109 ± 23	83 ± 22	73 ± 27	89 ± 24
γ-GTP (U/l)	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.6	1.0 ± 0.4
T.bilirubin (mg/dl)	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.05	0.14 ± 0.03	0.16 ± 0.05	0.15 ± 0.05
Sodium (mmol/l)	143.6 ± 0.7	142.2 ± 1.6	142.5 ± 1.4	141.4 ± 1.1	141.3 ± 1.3	140.9 ± 1.1
Potassium (mmol/l)	4.32 ± 0.25N	4.50 ± 0.28	4.91 ± 1.22	4.57 ± 0.37	4.00 ± 0.53	4.29 ± 0.25
Chloride (mmol/l)	111.2 ± 1.4	109.0 ± 0.7	109.2 ± 1.9	108.9 ± 1.8	107.9 ± 2.7	110.4 ± 1.7
Calcium (mg/dl)	9.74 ± 0.12N	9.64 ± 0.34	10.02 ± 0.49	9.77 ± 0.13	9.94 ± 0.40	9.60 ± 0.31
Lphosphate (mg/dl)	6.75 ± 0.55	6.28 ± 0.48	7.34 ± 0.83	6.96 ± 0.59	6.15 ± 0.80	5.94 ± 0.91

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; * : P ≤ 0.05

N: Non parametric analysis

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Volume (ml)	21 ± 10N	16 ± 3	19 ± 8	18 ± 3	16 ± 4	18 ± 6
Specific gravity	1.042 ± 0.016	1.055 ± 0.011	1.040 ± 0.017	1.043 ± 0.006	1.037 ± 0.011	1.037 ± 0.021
Color	Slight yellow	5	5	5	5	5
Turbidity	Clear muddy	5	5	5	5	5
pH	7	0	2	1	0	0
	7.5	2	1	0	0	1
	8	0	0	0	0	0
	8.5	2	1	1	2	0
	≥9	1	1	3	3	3
Occult blood	-	5	5	5	3	5
	+/-	0	0	0	1	0
	2+	0	0	0	0	0
Ketones	-	2	1	2	5	1
	+/-	1	1	1	0	0
	1+	2	3	2	0	4
Glucose (g/dl)	-	5	5	5	5	5
	+/-	0	0	0	1	0
	30	2	1	4	4	3
	100	1	3	0	0	2
Protein (mg/dl)	≥300	2	1	1	0	0
	-	5	5	5	5	5
Bilirubin	-	5	5	5	5	5
Urobilinogen (E.U./dl)	0.1	2	1	2	5	4
	1.0	3	4	3	0	1
Erythrocytes	-	5	5	5	5	5
Leukocytes	-	5	5	5	5	5
Epith. cells	-	5	5	5	5	5
Casts	-	5	4	5	5	5
	+	0	1	0	0	0
Fat glob.	-	5	5	5	5	5
M. threads	-	5	5	5	5	4
	+	0	0	0	0	1
others	-	1	0	1	0	2
	+	4	5	4	5	3

Fat glob.: Fat globule, M. threads: Mucous threads, others: Crystals

Values of volume and specific gravity are expressed as Mean ± S.D., other values are expressed as No. of animals

N: Non parametric analysis

Table 3 (continued)

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
Female						
No. of animals	4	5	5	5	5	4
Volume (ml)	15 ± 9N	9 ± 2	11 ± 6	20 ± 12	16 ± 3	17 ± 10
Specific gravity	1.056 ± 0.022	1.063 ± 0.007	1.070 ± 0.019	1.044 ± 0.027	1.049 ± 0.014	1.041 ± 0.016
Color	Slight yellow	4	5	5	5	4
Turbidity	Clear muddy	4	5	5	5	4
pH	7	1	0	2	1	0
	7.5	1	0	2	1	2
	8	0	0	1	1	0
	8.5	2	1	0	0	2
	≥9	0	2	0	0	0
Occult blood	-	4	5	4	5	4
	1+	0	0	0	1	0
Ketones	-	1	2	1	5	0
	+/-	2	3	4	0	4
	1+	1	0	0	0	1
Glucose (g/dl)	-	4	5	5	5	4
Protein (mg/dl)	-	1	0	0	1	0
	30	0	4	1	3	3
	100	3	1	3	1	2
	≥300	0	0	1	0	0
Bilirubin	-	4	5	4	5	4
	1+	0	0	1	0	0
Urobilinogen (E.U./dl)	0.1	1	0	0	3	0
	1.0	3	5	5	2	5
Erythrocytes	-	4	3	5	5	5
	+	0	2	0	0	0
Leukocytes	-	4	5	5	5	5
Epith. cells	-	4	4	5	4	5
	+	0	1	0	1	0
Casts	-	4	4	5	5	5
	+	0	1	0	0	0
Fat glob.	-	4	5	5	5	5
M. threads	-	4	5	5	5	5
others	-	1	0	0	0	0
	+	3	5	5	5	5

Fat glob.: Fat globule, M. threads: Mucous threads, others: Crystals

Values of volume and specific gravity are expressed as Mean ± S.D., other values are expressed as No. of animals

N: Non parametric analysis

Table 4 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	324 ± 11	342 ± 19	340 ± 16	316 ± 16	403 ± 17	360 ± 33*
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.03 ± 0.06	2.12 ± 0.05*	2.13 ± 0.07*	2.02 ± 0.05	2.10 ± 0.07	2.05 ± 0.15
Liver (g)	9.26 ± 0.73	10.37 ± 1.24	10.04 ± 0.97	8.55 ± 0.53	11.42 ± 1.12	9.94 ± 1.42
Kidneys (g)	2.48 ± 0.17	2.84 ± 0.27*	2.81 ± 0.19*	2.47 ± 0.08	2.89 ± 0.37	2.62 ± 0.27
Spleen (g)	0.51 ± 0.06	0.67 ± 0.07*	0.66 ± 0.13*	0.44 ± 0.10	0.64 ± 0.08	0.61 ± 0.09
Adrenals (mg)	46 ± 7	53 ± 9	48 ± 4	53 ± 5	60 ± 14	54 ± 5
Testes (g)	2.91 ± 0.12	2.83 ± 0.17	2.88 ± 0.15	2.82 ± 0.19	3.08 ± 0.25	2.79 ± 0.19
Thymus (mg)	567 ± 133N	675 ± 19	740 ± 80*	564 ± 47	444 ± 104	511 ± 76
Relative organ weight						
Brain (%)	0.629 ± 0.035	0.621 ± 0.029	0.627 ± 0.030	0.639 ± 0.029	0.522 ± 0.015	0.570 ± 0.028**
Liver (%)	2.857 ± 0.157N	3.032 ± 0.290	2.955 ± 0.239	2.706 ± 0.046	2.828 ± 0.182	2.754 ± 0.218
Kidneys (%)	0.767 ± 0.049	0.833 ± 0.078	0.826 ± 0.050	0.783 ± 0.036	0.719 ± 0.105	0.730 ± 0.062
Spleen (%)	0.157 ± 0.014	0.197 ± 0.028	0.194 ± 0.038	0.139 ± 0.027	0.157 ± 0.015	0.170 ± 0.017
Adrenals (%)	0.014 ± 0.002N	0.016 ± 0.003	0.014 ± 0.001	0.017 ± 0.001	0.015 ± 0.003	0.015 ± 0.001
Testes (%)	0.899 ± 0.039	0.831 ± 0.082	0.849 ± 0.066	0.896 ± 0.090	0.764 ± 0.049	0.779 ± 0.060
Thymus (%)	0.175 ± 0.042N	0.198 ± 0.008	0.218 ± 0.020*	0.179 ± 0.015	0.111 ± 0.029	0.142 ± 0.016
Female						
No. of animals	4	5	5	5	5	4
Body weight (g)	207 ± 13	206 ± 12	206 ± 9	213 ± 19	231 ± 21	205 ± 19
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.90 ± 0.07	1.89 ± 0.02	1.88 ± 0.05	1.89 ± 0.07	1.97 ± 0.06	1.94 ± 0.05
Liver (g)	5.93 ± 0.30	5.84 ± 0.35	5.91 ± 0.66	6.22 ± 0.39	6.14 ± 0.67	5.35 ± 0.46
Kidneys (g)	1.62 ± 0.11	1.71 ± 0.05	1.59 ± 0.08	1.74 ± 0.15	1.70 ± 0.06	1.56 ± 0.14
Spleen (g)	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.09	0.37 ± 0.05	0.44 ± 0.07	0.38 ± 0.05
Adrenals (mg)	58 ± 5	61 ± 6	58 ± 10	60 ± 6	64 ± 5	67 ± 6
Ovaries (mg)	74 ± 9	81 ± 8	80 ± 13	81 ± 8	78 ± 4	71 ± 9
Thymus (mg)	403 ± 93	430 ± 56	458 ± 53	381 ± 93	408 ± 90	326 ± 51
Relative organ weight						
Brain (%)	0.920 ± 0.045	0.922 ± 0.061	0.915 ± 0.058	0.887 ± 0.056	0.859 ± 0.102	0.952 ± 0.079
Liver (%)	2.896 ± 0.103	2.842 ± 0.197	2.870 ± 0.206	2.927 ± 0.270	2.661 ± 0.201	2.615 ± 0.150
Kidneys (%)	0.791 ± 0.083	0.834 ± 0.075	0.771 ± 0.018	0.822 ± 0.100	0.742 ± 0.066	0.764 ± 0.035
Spleen (%)	0.191 ± 0.019	0.186 ± 0.014	0.189 ± 0.035	0.171 ± 0.017	0.191 ± 0.023	0.186 ± 0.018
Adrenals (%)	0.028 ± 0.002	0.030 ± 0.005	0.028 ± 0.004	0.028 ± 0.003	0.028 ± 0.003	0.033 ± 0.006
Ovaries (%)	0.036 ± 0.004	0.040 ± 0.003	0.039 ± 0.005	0.038 ± 0.006	0.034 ± 0.002	0.035 ± 0.004
Thymus (%)	0.195 ± 0.043	0.210 ± 0.031	0.223 ± 0.022	0.179 ± 0.045	0.176 ± 0.030	0.160 ± 0.026

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **; P ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

Table 5 Summary of gross findings in rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
			0	30	60	120	0	120
Male								
		No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
CARDIOVASCULAR SYSTEM								
	heart	white patch/zone	0	0	1	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
	spleen	deformed	0	0	0	0	0	1
RESPIRATORY SYSTEM								
	lung	black patch/zone	0	0	1	0	0	0
		colored patch/zone	1	0	0	1	0	0
		red patch/zone	1	1	1	2	0	0
DIGESTIVE SYSTEM								
	liver	colored patch/zone	0	0	1	0	0	0
		diaphragmatic hernia	0	0	0	1	0	0
		white patch/zone	0	0	0	1	0	0
URINARY SYSTEM								
	kidney	white patch/zone	0	0	0	0	1	0
ENDOCRINE SYSTEM								
	pituitary gland							
		cyst	0	1	0	0	0	0
	adrenal gland	enlarged	0	0	0	0	1	0
Female								
		No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
CARDIOVASCULAR SYSTEM								
	heart	black patch/zone	0	1	0	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
	spleen	enlarged	1	0	0	0	0	0
	lymph node	enlarged	1	0	0	0	0	0
	thymus	red patch/zone	2	1	0	0	0	0
RESPIRATORY SYSTEM								
	lung	black patch/zone	1	0	0	0	0	0
		colored patch/zone	1	0	0	0	0	1
		red patch/zone	0	0	0	2	0	0
DIGESTIVE SYSTEM								
	liver	enlarged	1	0	0	0	0	0
		granular	1	0	0	0	0	0
		pale	1	0	0	0	0	0
	choledochus	dilated lumen	1	0	0	0	0	0
URINARY SYSTEM								
	kidney	cyst	1	0	0	0	0	0
		dilated pelvis	0	0	0	1	0	0
		enlarged	1	0	0	0	0	0
		pale	1	0	0	0	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM								
	ovary	cyst	0	0	2	0	0	0
	uterus	dilated lumen	1	0	0	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM								
	pituitary gland							
		cyst	1	0	0	0	0	0

Table 6 Summary of histopathological findings in rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)											
			0			30			60			120		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Male														
No. of animals necropsied			5			5			5			5		
DIGESTIVE SYSTEM														
liver			(5)			(0)			(0)			(5)		
		fatty change, peripheral granulation	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		infiltration/cellular	4	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
		hepatodiaphragmatic nodule	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
			0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
URINARY SYSTEM														
kidney			(5)			(0)			(0)			(5)		
		basophilic change	3	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
		deposit of calcium	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		eosinophilic body	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		infiltration/cellular	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
MUSCULOSKELETAL SYSTEM														
bone			(5)			(0)			(0)			(5)		
		osteosclerosis	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
Female														
No. of animals necropsied			5			5			5			5		
HEMATOPOIETIC SYSTEM														
bone marrow			(5)			(0)			(0)			(5)		
		granulopoiesis, increased	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
spleen			(5)			(0)			(0)			(5)		
		capsulitis	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		hematopoiesis, increased	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM														
liver			(5)			(0)			(0)			(5)		
		bile duct dilatation	0	0	1	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		cytological alteration	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		fatty change	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		fatty change, peripheral	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		necrosis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		swelling of liver cells	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		cholangitis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		granulation	2	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
		bile duct hyperplasia	0	0	1	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		extramedullary hematopoiesis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
URINARY SYSTEM														
kidney			(5)			(0)			(0)			(5)		
		edema	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		basophilic change	2	0	0	-	-	-	-	-	-	3	0	0
		cyst	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		hydronephrosis	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		tubular dilatation	0	1	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		lymphocytic infiltration	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		fibrosis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
ENDOCRINE SYSTEM														
adrenal gland			(5)			(0)			(0)			(5)		
		vacuolic change	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0

1:slight 2:moderate 3:marked

Numbers in parenthesis indicate No. of animals examined microscopically at this site.

ヘモグロビン量、MCVおよびMCHの高値のみが被験物質投与に関連づけられる変化であったが、変化の程度は僅かであり、被験物質の血液に対する影響は弱いものと考えられた。回復試験終了時に雌雄の120 mg/kg群で認められた変化も、軽微または投与終了時に認められなかった変化であり、被験物質投与との関連は示唆されない。血液凝固能検査に関しては、雌雄とも変化が認められなかった。

血液生化学検査および尿検査の結果、被験物質投与によると考えられる変化は、雌雄いずれの群にも認められなかった。

器官重量測定の結果、明確に被験物質投与の影響を示唆する変化では認められなかった。雄の30および60 mg/kg群で認められた脳、腎臓および脾臓の実重量の変化は、相対重量に有意な差が認められず、この両群の体重が高値傾向にあることから、体重による影響と考えられた。また、雄の60 mg/kg群で認められた胸腺の実重量および相対重量の高値についても、投与用量との関連性がなく、被験物質投与による変化とは考えられなかった。回復試験終了時に認められた雄の120 mg/kgの脳相対重量の高値も、この群の体重が低いことによるものと推察された。

病理学的検査の結果、剖検所見では計画屠殺動物、死亡動物ともに特筆すべき所見は観察されなかった。

組織所見では、計画屠殺動物においては、被験物質の影響を示唆する所見は観察されなかったが、死亡した1例の動物では肝細胞腫脹と好酸性小体の出現が観察された。しかし、いずれも軽度の変化であり、死に至らしめるほどの肝細胞腫脹、好酸性小体の出現とは考えがたく死因は不明であった。なお、予備試験において、計画屠殺動物の180 mg/kg群では肝臓の肥大は観察されなかつ

たが、投与期間中に死亡した180 mg/kg群の雌雄の大部分の例で肝臓の肥大が肉眼的に観察されている。本試験の死亡動物の肝臓では肥大が認められなかったが、組織学的に観察された肝細胞腫脹と好酸性小体の出現は被験物質投与による影響が考えられた。

以上のことから、本試験では雌雄で認められた一般状態の変化および雄の120 mg/kg群で認められた血液学検査値の変化が被験物質投与に関連づけられるものであり、無影響量は一般状態に変化が認められなかった、雄で30 mg/kg/day、雌で60 mg/kg/dayと判断された。

連絡先

試験責任者：井上博之

試験担当者：各務 進、庄子明徳、渡 修明、

小林和雄、高木留美子

(財)食品農薬薬品安全性評価センター

〒437-12 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: Hiroyuki Inoue (Study director),

Susumu Kakamu, Akinori Shoji,

Nobuaki Watari, Kazuo Kobayashi,

Rumiko Takagi

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho, Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan

Tel 81-538-58-1266 Fax 81-538-58-1393

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Benzyltrimethylammonium chloride on Bacteria

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの変異原性について遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535およびTA1537株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA株を用いる復帰突然変異試験を行った。予備的な試験の結果を基に、試験用量を設定した。すなわち、直接法 (-S9 mix) ならびに代謝活性化法 (+S9 mix) の各菌株についてそれぞれ、156~5000 µg/プレート の6用量を設定し試験した。その結果、直接法および代謝活性化法のいずれにおいても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められず、再現性も確認された。一方、各系での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。従って、本試験条件下において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドは微生物に対し遺伝子突然変異を誘起しないものと判断した。

材料および方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537¹⁾ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2uvrA²⁾の5種類の菌株を選抜した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所から分与を受けた。平成6年11月25日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド (DMSO: MERCK社) を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mlずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

日清製粉(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエ

ン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム [いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID社:No.1)を加え、30 mlをシャーレに分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

Bacto-agar (DIFCO社)0.6%を含む0.5%塩化ナトリウム水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mM D-ピオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mlの円筒容器(ストレージボトル: Corning Costar社)に2.5%ニュートリエントブロス(OXOID社)溶液を25ml分注し、これに融解した菌懸濁液を50 µl接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック(株))を用い、37℃で8時間振盪(往復振盪:120回/分)培養し、試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンと投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1ml中の量
S9	0.1 ml
MgCl ₂	8 µmol
KCl	33 µmol
G-6-P	5 µmol
NADPH	4 µmol
NADH	4 µmol
リン酸緩衝Na-液(pH 7.4)	100 µmol

5. 被験物質

被験物質のベンジルトリメチルアンモニウムクロリド(ロット番号:RSL9083, CAS No.:56-93-9)は分子式C₁₀H₁₆ClN, 分子量185.70, 純度99.0%以上の白色粉末である。和光純薬工業(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質溶液の調製

注射用蒸留水(大塚蒸留水: 株式会社大塚製薬工場)に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 試験用量の設定

8.00, 40.0, 200, 1000および5000 μg/プレートの用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、直接法のTA100およびTA1535で5000 μg/プレートにおいて試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。従って、本試験においては直接法ならびに代謝活性化法の各菌株について5000 μg/プレートを最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20℃)した。

- 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2: 和光純薬工業株)
- アジ化ナトリウム(Na₃N₂: 和光純薬工業株)
- 9-アミノアクリジン(ACR: ALDRICH社)
- 2-アミノアントラセン(2-AA: 和光純薬工業株)

9. 試験方法

Amesらの原法の改良法であるプレインキュベーション法¹⁾に準じて、直接法および代謝活性化法それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を100 μl、次いで直接法の場合、0.1 Mナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μl、代謝活性化法の場合、S9 mixを500 μlおよび試験菌液100 μlを加え、37℃で20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、トップアガーを2 ml添加し、混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡(×60)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11: システムサイエンス株)を用いた。独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

試験結果をTable 1~4に示した。直接法(-S9 mix)のTA100およびTA1535の5000 μg/プレートにおいて、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理による生育阻害作用が観察された。直接法のTA98, TA1537およびWP2uvrAならびに代謝活性化法(+S9 mix)では、5000 μg/プレートにおいても同作用は観察されなかった。また、復帰突然変異コロニー数については、直接法、代謝活性化法とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、試験中析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から、本試験条件下においてベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron, and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, 38, 3 (1976)

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓
 試験担当者: 北沢倫世, 熊平智司, 勝俣 勇
 (財)食品農医薬品安全性評価センター
 〒437-12 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: Madoka Nakajima (Study director)
 Michiyo Kitazawa, Satoshi Kumadaira
 Isami Katsumata
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
 Pesticides (An-pyo Center)
 582-2 Shiohinden Aza Arahama, Fukude-cho,
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride(1st trial)
[direct method:-S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]															
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
D.W.#	0	97	91	85	13	8	12	23	24	21	22	27	25	9	6	7	
		[91 \pm 6]	[11 \pm 3]	[23 \pm 2]	[25 \pm 3]	[7 \pm 2]											
Test sub.	156	103	93	88	17	7	8	19	22	24	27	30	21	10	5	9	
		[95 \pm 8]	[11 \pm 6]	[22 \pm 3]	[26 \pm 5]	[8 \pm 3]											
	313	91	95	94	16	10	10	18	22	18	23	21	23	11	5	10	
		[93 \pm 2]	[12 \pm 3]	[19 \pm 2]	[22 \pm 1]	[9 \pm 3]											
	625	95	83	101	9	9	15	19	21	24	29	28	27	11	5	9	
		[93 \pm 9]	[11 \pm 3]	[21 \pm 3]	[28 \pm 1]	[8 \pm 3]											
5000	1250	90	96	102	11	10	14	23	24	20	20	35	27	10	11	9	
		[96 \pm 6]	[12 \pm 2]	[22 \pm 2]	[27 \pm 8]	[10 \pm 1]											
	2500	87	100	89	17	7	6	25	26	21	25	24	23	7	6	8	
		[92 \pm 7]	[10 \pm 6]	[24 \pm 3]	[24 \pm 1]	[7 \pm 1]											
5000	97*	84*	96*	7*	13*	8*	23	21	22	22	30	23	10	9	8		
	[92 \pm 7]	[9 \pm 3]	[22 \pm 1]	[25 \pm 4]	[9 \pm 1]												
Positive control		555	518	487 ^{a)}	464	409	411 ^{b)}	119	126	124 ^{c)}	631	595	660 ^{d)}	546	496	519 ^{d)}	
		[520 \pm 34]	[428 \pm 31]	[123 \pm 4]	[629 \pm 33]	[520 \pm 25]											

#: Solvent control *: The background lawn was thin
a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$
d): ACR; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride(1st trial)
[activation method: +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]															
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
D.W.#	0	106	109	100	15	10	13	31	20	25	27	32	28	12	11	10	
		[105 \pm 5]	[13 \pm 3]	[25 \pm 6]	[29 \pm 3]	[11 \pm 1]											
Test sub.	156	109	93	102	14	9	12	24	21	19	31	25	32	9	7	7	
		[101 \pm 8]	[12 \pm 3]	[21 \pm 3]	[29 \pm 4]	[8 \pm 1]											
	313	99	96	94	14	10	13	26	20	26	31	43	35	15	11	11	
		[96 \pm 3]	[12 \pm 2]	[24 \pm 3]	[36 \pm 6]	[12 \pm 2]											
	625	90	93	89	17	13	16	22	19	17	33	33	43	11	10	9	
		[91 \pm 2]	[15 \pm 2]	[19 \pm 3]	[36 \pm 6]	[10 \pm 1]											
5000	1250	96	94	98	15	15	13	23	23	26	34	47	34	14	6	9	
		[96 \pm 2]	[14 \pm 1]	[24 \pm 2]	[38 \pm 8]	[10 \pm 4]											
	2500	103	116	112	8	13	8	31	26	21	31	29	32	6	10	8	
		[110 \pm 7]	[10 \pm 3]	[26 \pm 5]	[31 \pm 2]	[8 \pm 2]											
5000	95	86	93	18	14	7	23	21	23	47	35	30	12	5	11		
	[91 \pm 5]	[13 \pm 6]	[22 \pm 1]	[37 \pm 9]	[9 \pm 4]												
Positive control		668	655	682 ^{a)}	319	333	376 ^{b)}	792	700	762 ^{c)}	391	335	316 ^{d)}	152	133	171 ^{b)}	
		[668 \pm 14]	[343 \pm 30]	[751 \pm 47]	[347 \pm 39]	[152 \pm 19]											

#: Solvent control
a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

復帰変異試験

Table 3. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride (2nd trial) [direct method: -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
D.W.#	0	116	97	93	17	16	15	29	33	29	32	29	26	7	11	8
		[102 \pm 12]			[16 \pm 1]			[30 \pm 2]			[29 \pm 3]			[9 \pm 2]		
Test sub.	156	105	105	111	14	15	10	37	35	25	27	32	21	10	12	9
		[107 \pm 3]			[13 \pm 3]			[32 \pm 6]			[27 \pm 6]			[10 \pm 2]		
	313	115	103	99	17	9	8	24	21	24	30	20	30	9	8	8
		[106 \pm 8]			[11 \pm 5]			[23 \pm 2]			[27 \pm 6]			[8 \pm 1]		
	625	110	99	124	14	14	9	25	22	27	30	23	31	12	11	9
		[111 \pm 13]			[12 \pm 3]			[25 \pm 3]			[28 \pm 4]			[11 \pm 2]		
	1250	110	99	102	18	12	14	23	24	21	35	27	25	4	9	7
		[104 \pm 6]			[15 \pm 3]			[23 \pm 2]			[29 \pm 5]			[7 \pm 3]		
	2500	94	109	98	13	13	11	26	25	30	25	26	28	12	10	9
		[100 \pm 8]			[12 \pm 1]			[27 \pm 3]			[26 \pm 2]			[10 \pm 2]		
	5000	91*	110*	104*	12*	13*	13*	29	26	28	25	27	32	11	11	10
		[102 \pm 10]			[13 \pm 1]			[28 \pm 2]			[28 \pm 4]			[11 \pm 1]		
Positive control		441	437	458 ^d	507	436	439 ^b	122	111	121 ^a	501	570	543 ^c	450	482	448 ^d
		[445 \pm 11]			[461 \pm 40]			[118 \pm 6]			[538 \pm 35]			[460 \pm 19]		

#: Solvent control * : The background lawn was thin

a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) : AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d) : ACR; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride (2nd trial) [activation method: +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
D.W.#	0	111	114	92	12	15	15	28	21	26	30	34	25	15	9	11
		[106 \pm 12]			[14 \pm 2]			[25 \pm 4]			[30 \pm 5]			[12 \pm 3]		
Test sub.	156	84	101	98	9	9	16	24	19	22	34	26	28	10	10	9
		[94 \pm 9]			[11 \pm 4]			[22 \pm 3]			[29 \pm 4]			[10 \pm 1]		
	313	82	101	120	13	16	16	23	22	19	27	18	24	5	6	8
		[101 \pm 19]			[15 \pm 2]			[21 \pm 2]			[23 \pm 5]			[6 \pm 2]		
	625	116	84	85	15	10	16	20	14	24	21	30	28	7	7	10
		[95 \pm 18]			[14 \pm 3]			[19 \pm 5]			[26 \pm 5]			[8 \pm 2]		
	1250	114	109	96	14	11	10	20	20	24	28	26	19	8	11	13
		[106 \pm 9]			[12 \pm 2]			[21 \pm 2]			[24 \pm 5]			[11 \pm 3]		
	2500	115	103	102	10	16	15	25	19	26	39	25	29	9	9	6
		[107 \pm 7]			[14 \pm 3]			[23 \pm 4]			[31 \pm 7]			[8 \pm 2]		
	5000	104	118	110	16	13	10	27	22	20	25	26	26	10	13	7
		[111 \pm 7]			[13 \pm 3]			[23 \pm 4]			[26 \pm 1]			[10 \pm 3]		
Positive control		614	625	618 ^a	415	382	384 ^b	795	730	745 ^c	308	311	346 ^d	103	113	135 ^b
		[619 \pm 6]			[394 \pm 19]			[757 \pm 34]			[322 \pm 21]			[117 \pm 16]		

#: Solvent control

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) : 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) : 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの
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 Benzyltrimethylammonium chloride
on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株(CHL)を用いる *in vitro* 染色体異常試験を行った。細胞増殖抑制試験において細胞が死滅するほどの毒性が観察されなかったため、OECDのガイドラインに従って10 mM相当の濃度を最高用量とした。すなわち、連続処理法(24時間処理および48時間処理)ならびに短時間処理法(6時間処理の+S9 mixおよび-S9 mix)のいずれにおいても使用溶媒での10 mM相当を最高用量とした475, 950および1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の3用量(公比2)について染色体標本を作製した後、顕微鏡観察を実施した。短時間+S9 mix処理法の1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において、僅かではあるが染色体構造異常の誘発傾向が観察された。同処理法において1000, 1300, 1600および1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の4用量を用いた確認試験を2回繰り返して実施した結果、構造異常誘発頻度は1回目では各用量群2.5~3.5%であったが、2回目は4.0~6.5%の細胞に構造異常の誘発が認められた。一方、連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンC(MMC)および短時間+S9 mix処理の陽性対照物質シクロホスファミド(CP)は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。従って、本試験条件下の *in vitro* 試験系において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの染色体異常誘起性について疑陽性と判断した。

材料および方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK社)を10%添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3~5日ごとに継代した。なお、本染色体異常試験では解凍後継代数9の細胞を、確認試験においては同8および45の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM培地(LIFE TECHNOLOGIES社)を1000 mlの精製水で溶解した後、2.2 gの炭酸水素ナトリウム

(関東化学株)を加えた。1N塩酸を用いてpHを7.2に調整した後、メンブランフィルター(0.2 μm :Gelman Sciences社)を用いて加圧濾過除菌した。非働化(56°C, 30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終濃度で10%になるよう加えた後、試験に使用した。

3. 培養条件

CO₂インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機特機株)を用い、CO₂濃度5%、37°Cの条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成は松岡らの方法に従った。

5. 被験物質

被験物質のベンジルトリメチルアンモニウムクロリド(ロット番号:RSL9083, CAS No.:56-93-9)は分子式C₁₀H₁₆ClN, 分子量185.70, 純度99.0%以上の白色粉末である。和光純薬工業(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質溶液の調製

生理食塩液(株)大塚製薬工場)に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質溶液を処理した。連続処理法の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理法ではS9 mix存在下(+S9 mix)あるいは非存在下(-S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

細胞を10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業(株))で固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット(関東化学株)水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30%エタノール, 1%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、す

染色体異常試験

なわち細胞生存率を算出した。

その結果、連続処理法においては細胞増殖抑制作用が観察されたが、短時間処理法では明確な同作用は認められなかった (Fig. 1)。プロビット法を用いて算出した50%細胞増殖抑制濃度は連続24時間処理で1311 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、同48時間処理で585 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と算出された。また、短時間処理では1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上と考えられた。

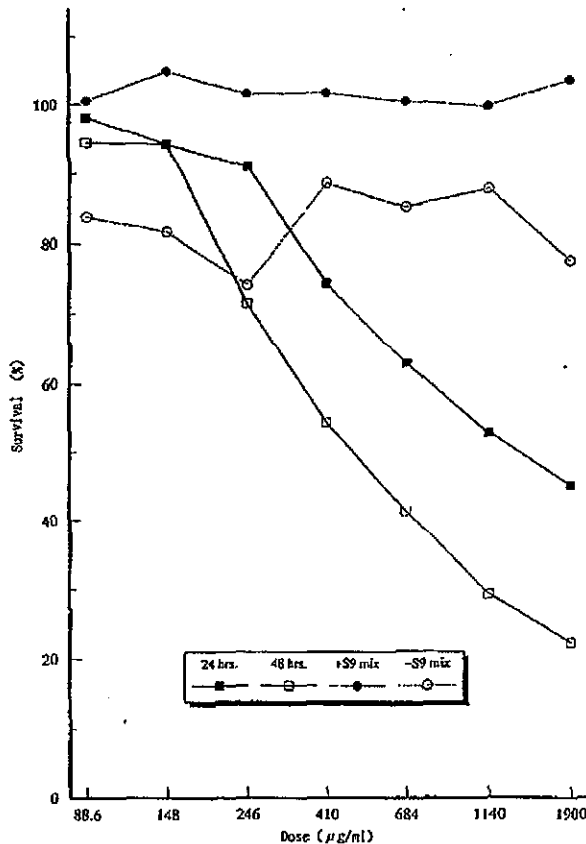


Fig. 1 Dose-survival curves of benzyltrimethylammonium chloride

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果を基に、染色体異常試験では連続処理法、短時間処理法とも10 mM相当の1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を高用量とし、以下公比2で減じた950および475 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の計3用量ならびに溶媒対照群を設定した。

陽性対照として、連続処理法の場合、マイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業株)を、24時間処理で0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、48時間処理で0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で、短時間処理法の場合、シクロホスファミド(CP:塩野義製薬株)を、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で試験した。

また、確認試験においては1000, 1300, 1600および1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の4用量(等差数列)を設定した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、予備試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃

度で0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようコロセミド(LIFE TECHNOLOGIES社)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.2%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)、染色体切断(csb)、染色分体交換(cte)、染色体交換(cse)およびその他(oth)の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会²⁾による分類法に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、観察した。

11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めた場合(+gap)と、含まない場合(-gap)とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、石館ら³⁾の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とした。最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

連続処理群での試験結果をTable 1に示した。ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理群の場合、24時間ならびに48時間処理のいずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。短時間処理群での試験結果をTable 2に示した。被験物質処理群の場合、+S9 mix処理において高用量の1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においてのみ染色体の構造異常の出現頻度が5%を示し、疑陽性と判定された。再現性を調査するため確認試験を実施した結果、1回目の試験では染色体構造異常の誘発頻度が2.5~3.5%であり疑陽性の判定基準である5%を超えることはなかった(Table 3)。2回目の確認試験では被験物質処理群において僅かではあるが染色体の構造異常の増加傾向が観察された(Table 4)。また、陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。以上の試験結果から、本試験条件下においてベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、疑陽性と判定した。

Table 1. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with benzyltrimethylammonium chloride [long-term treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline*	0	24	200	2	1	1	1	0	0	2.5	1.5	2.5	-
Test Sub.	475	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-
	950	24	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-
	1900	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-
MMC**	0.05	24	200	25	76	1	97	1	0	71.0	69.0	1.0	+
Saline*	0	48	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.5	-
Test Sub.	475	48	200	1	1	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-
	950	48	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	1.5	-
	1900	48	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	3.0	-
MMC**	0.025	48	200	15	45	1	66	3	0	50.5	47.5	0.5	+

*:Solvent control **:Positive control (mitomycin C)

ctb:chromatid break csb:chromosome break cte:chromatid exchange cse:chromosome exchange oth:others

Table 2. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with benzyltrimethylammonium chloride [short-term treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline*	0	+	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.5	-
Test Sub.	475	+	6	200	0	0	0	3	0	0	1.5	1.5	0.0	-
	950	+	6	200	1	4	0	5	1	1	4.0	4.0	3.5	-
	1900	+	6	200	3	3	0	9	0	0	5.0	5.0	2.5	±
CP**	12.5	+	6	200	7	36	0	61	2	1	43.5	42.0	0.5	+
Saline*	0	-	6	200	2	0	0	0	1	0	1.5	0.5	0.5	-
Test Sub.	475	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-
	950	-	6	200	3	1	0	0	0	0	2.0	0.5	1.0	-
	1900	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	2.0	-
CP**	12.5	-	6	200	0	1	0	1	0	0	1.0	1.0	0.0	-

*: Solvent control **:Positive control (cyclophosphamide)

ctb:chromatid break csb:chromosome break cte:chromatid exchange cse:chromosome exchange oth:others

染色体異常試験

Table 3. Results of the confirmative examination using CHL cells of benzyltrimethylammonium chloride [short-term treatment: first trial]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline*	0	+	6	200	1	0	0	1	0	0	1.0	0.5	0.0	-
Test Sub.	1000	+	6	200	0	3	0	4	1	0	3.0	3.0	1.0	-
	1300	+	6	200	1	0	0	4	0	0	2.5	2.0	1.0	-
	1600	+	6	200	2	2	0	5	0	0	3.5	3.0	0.0	-
	1900	+	6	200	1	0	1	2	1	0	2.5	2.0	1.0	-
CP**	12.5	+	6	200	26	43	0	137	3	0	74.0	72.5	1.5	+

*: Solvent control **: Positive control (cyclophosphamide)
 ctb: chromatid break csb: chromosome break cte: chromatid exchange cse: chromosome exchange oth: others

Table 4. Results of the confirmative examination using CHL cells of benzyltrimethylammonium chloride [short-term treatment: second trial]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline*	0	+	6	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.0	-
Test Sub.	1000	+	6	200	1	2	0	8	0	0	4.0	4.0	0.0	-
	1300	+	6	200	2	2	0	9	0	0	5.0	4.5	0.5	±
	1600	+	6	200	1	2	0	10	0	0	5.5	5.5	0.0	±
	1900	+	6	200	0	2	0	12	0	1	6.5	6.5	1.0	±
CP**	12.5	+	6	200	11	37	0	116	0	0	63.0	62.0	1.0	+

*: Solvent control **: Positive control (cyclophosphamide)
 ctb: chromatid break csb: chromosome break cte: chromatid exchange cse: chromosome exchange oth: others

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat Res.*, 66, 277 (1979).
- 2) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 31-35.
- 3) 石館基 監修, "<改訂>染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー社, 東京, 1987, pp. 19-24.

連絡先

試験責任者: 中嶋 園
 試験担当者: 北沢倫世, 菊池正憲, 板倉真由実
 (財)食品農医薬品安全性評価センター
 〒437-12 静岡県磐田郡榑田町塩新田字荒浜582-2
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)
 Michiyo Kitazawa, Masanori Kikuchi
 Mayumi Itakura
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
 Pesticides (An-pyo Center)
 582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

National Toxicology Program
Toxicity Report Series
Number 57

NTP Technical Report
on the Toxicity Studies of
Benzyltrimethylammonium Chloride

(CAS No. 56-93-9)

Administered by Gavage
to F344/N Rats and B6C3F₁ Mice

February 2000
NIH Publication No. 00-4405

U.S. Department of Health and Human Services
Public Health Service
National Institutes of Health

FOREWORD

The National Toxicology Program (NTP) is made up of four charter agencies of the U.S. Department of Health and Human Services (DHHS): the National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health; the National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), National Institutes of Health; the National Center for Toxicological Research (NCTR), Food and Drug Administration; and the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Centers for Disease Control and Prevention. In July 1981, the Carcinogenesis Bioassay Testing Program, NCI, was transferred to the NIEHS. The NTP coordinates the relevant programs, staff, and resources from these Public Health Service agencies relating to basic and applied research and to biological assay development and validation.

The NTP develops, evaluates, and disseminates scientific information about potentially toxic and hazardous chemicals. This knowledge is used for protecting the health of the American people and for the primary prevention of disease.

The studies described in this Toxicity Study Report were performed under the direction of the NIEHS and were conducted in compliance with NTP laboratory health and safety requirements and must meet or exceed all applicable federal, state, and local health and safety regulations. Animal care and use were in accordance with the Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Animals.

These studies are designed and conducted to characterize and evaluate the toxicologic potential of selected chemicals in laboratory animals (usually two species, rats and mice). Chemicals selected for NTP toxicology studies are chosen primarily on the bases of human exposure, level of production, and chemical structure. The interpretive conclusions presented in this Toxicity Study Report are based only on the results of these NTP studies. Extrapolation of these results to other species and quantitative risk analyses for humans require wider analyses beyond the purview of these studies. Selection *per se* is not an indicator of a chemical's toxic potential.

Listings of all published NTP reports and ongoing studies are available from NTP Central Data Management, NIEHS, P.O. Box 12233, MD E1-02, Research Triangle Park, NC 27709 (919-541-3419). Other information about NTP studies is available at the NTP's World Wide Web site: <http://ntp-server.niehs.nih.gov>.

National Toxicology Program
Toxicity Report Series
Number 57

**NTP Technical Report
on the Toxicity Studies of**

Benzyltrimethylammonium Chloride

(CAS No. 56-93-9)

**Administered by Gavage
to F344/N Rats and B6C3F₁ Mice**

**Kamal M. Abdo, Ph.D., Study Scientist
National Toxicology Program
P.O. Box 12233
Research Triangle Park, NC 27709**

**U.S. Department of Health and Human Services
Public Health Service
National Institutes of Health**

CONTRIBUTORS

National Toxicology Program

Evaluated and interpreted results and report findings

K.M. Abdo, Ph.D., Study Scientist
 J.R. Bucher, Ph.D.
 R.E. Chapin, Ph.D.
 G.J. Harry, Ph.D.
 J. Mahler, D.V.M.
 C.S. Smith, Ph.D.
 G.S. Travlos, D.V.M.
 K.L. Witt, M.S., Integrated Laboratory Systems, Inc.

Microbiological Associates, Inc.

Conducted studies

M.L. Wenk, Ph.D., Principal Investigator
 J.M. Pletcher, D.V.M.

Experimental Pathology Laboratories, Inc.

Provided pathology quality assurance

J.F. Hardisty, D.V.M., Principal Investigator
 S. Botts, D.V.M, M.S., Ph.D.

Pathology Associates International

Evaluated pathology findings

L.H. Brennecke, D.V.M.
 R.M. Kovatch, D.V.M.

NTP Pathology Review

Evaluated slides and prepared pathology report (22 November 1996)

J.C. Seely, D.V.M., Chairperson
 PATHCO, Inc.
 J. Mahler, D.V.M.
 National Toxicology Program

Analytical Sciences, Inc.

Provided statistical analyses

R.W. Morris, M.S., Principal Investigator
 K.P. McGowan, M.B.A.
 M.A. Mauney, M.S.
 N.G. Mintz, B.S.
 J.T. Scott, M.S.

Biotechnical Services, Inc.

Prepared Toxicity Study Report

S.R. Gunnels, M.A., Principal Investigator
 A.M. Macri-Hanson, M.A., M.F.A.
 M.L. Rainer, B.S.
 W.D. Sharp, B.A., B.S.
 D.P. Shaw, B.A.

PEER REVIEW

The draft report on the toxicity studies of benzyltrimethylammonium chloride was evaluated by the reviewers listed below. These reviewers serve as independent scientists, not as representatives of any institution, company, or governmental agency. In this capacity, reviewers determine if the design and conditions of these NTP studies are appropriate and ensure that the Toxicity Study Report presents the experimental results and conclusions fully and clearly.

Mohamed S. Abdel-Rahman, Ph.D.
Department of Pharmacology and Physiology
New Jersey Medical School
Newark, NJ

Linda A. Chatman, D.V.M.
Pfizer, Inc.
Groton, CT

James S. Bus, Ph.D.
Health and Environmental Sciences
Dow Chemical Company
Midland, MI

CONTENTS

ABSTRACT	5
INTRODUCTION	7
Chemical and Physical Properties	7
Production, Use, and Human Exposure	7
Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion	8
Toxicity	9
Neurotoxicity	9
Carcinogenicity	10
Genetic Toxicity	10
Study Rationale and Design	10
MATERIALS AND METHODS	11
Procurement and Characterization of Benzyltrimethylammonium Chloride	11
Preparation and Analysis of Dose Formulations	11
16-Day Studies	12
13-Week Studies	13
Statistical Methods	18
Quality Assurance Methods	18
Genetic Toxicology	19
RESULTS	21
Rats	21
Mice	28
Genetic Toxicology	32
DISCUSSION	33
REFERENCES	37
APPENDIXES	
Appendix A Summary of Nonneoplastic Lesions in Rats and Mice	A-1
Appendix B Functional Observation Battery Results	B-1
Appendix C Hematology and Clinical Chemistry Results	C-1
Appendix D Organ Weights and Organ-Weight-to-Body-Weight Ratios	D-1
Appendix E Reproductive Tissue Evaluations and Estrous Cycle Characterization	E-1
Appendix F Genetic Toxicology	F-1

ABSTRACT



BENZYLTRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

CAS No. 56-93-9

Molecular Weight: 185.70

Synonyms: Ammonium, benzyltrimethyl-chloride (8Cl); BTM; BTMAC; N,N,N,-trimethyl-benzenemethanaminium chloride; trimethylbenzylammonium chloride (9Cl); TMBAC

Benzyltrimethylammonium chloride is widely used as a solvent for cellulose, a gelling inhibitor in polyester resins, a chemical intermediate, a paint dispersant, and an acrylic dyeing agent. It is also used in plant growth regulator compositions and synthetic processes. The National Institute of Environmental Health Sciences nominated benzyltrimethylammonium chloride for study due to its high production volume and the potential for occupational exposure, as well as the limited information on toxicity of this chemical. Male and female F344/N rats and B6C3F₁ mice received benzyltrimethylammonium chloride by gavage for 16 days or 13 weeks. Animals were evaluated for hematology, clinical chemistry, histopathology, neurotoxicity, and reproductive toxicity. Genetic toxicology studies were conducted in *Salmonella typhimurium* and in mouse peripheral blood erythrocytes.

In the 16-day studies, groups of five male and five female rats received 0, 16, 32, 63, 125, or 250 mg benzyltrimethylammonium chloride/kg body weight in deionized water by gavage, 5 days per week for 16 days. Groups of five male and five female mice received 0, 63, 125, 250, 500, or 1,000 mg/kg benzyltrimethylammonium chloride in deionized water by gavage, 5 days per week for 16 days. All rats in the 125 and 250 mg/kg groups, all mice in the 250, 500, and 1,000 mg/kg groups, and one 125 mg/kg female mouse died on day 1 of the studies. Clinical findings observed in 125 mg/kg male and female rats included abnormal breathing, ataxia, lethargy (males only), nasal and eye discharge, and tremors. Salivation was slightly increased in male and female rats in the 63 mg/kg groups. Female mice in the 125 mg/kg group had

a significantly greater absolute liver weight than that of the vehicle controls. No gross or microscopic changes observed in rats or mice were considered related to chemical administration.

In the 13-week studies, groups of 10 male and 10 female rats and mice received benzyltrimethylammonium chloride in deionized water by gavage at doses of 0, 12.5, 25, 50, or 100 mg/kg, 5 days per week for 13 weeks. Benzyltrimethylammonium chloride generally had little effect on the body weights of rats or mice. Final mean body weights of dosed animals were within 8% (rats) or 3% (mice) of the control group body weights. The deaths of two female rats and one male and one female mouse administered 100 mg/kg were the result of pharmacologic effects on the cardiovascular system. Some cholinergic effects including chromodacryorrhea, lacrimation, salivation, pupillary constriction, altered gait, and mild tremors were observed at nonlethal doses in rats; these effects were accompanied by alterations in body position. No significant target organ toxicity was observed in dosed rats or mice.

Benzyltrimethylammonium chloride was not mutagenic in *S. typhimurium* strain TA97, TA98, TA100, or TA1535, with or without S9 metabolic activation enzymes. However, significant increases in the frequency of micronucleated normochromatic erythrocytes were found in the peripheral blood of male and female mice administered benzyltrimethylammonium chloride by gavage for 13 weeks.

Based on the mortality observed in the 16-day and 13-week studies, rats and mice appeared to be equally sensitive to benzyltrimethylammonium chloride. The minimally toxic dose for rats and mice was estimated to be 50 mg/kg.

INTRODUCTION

CHEMICAL AND PHYSICAL PROPERTIES

Benzyltrimethylammonium chloride is a quaternary ammonium compound with a structural resemblance to acetylcholine and other chemicals having cholinergic activity. It is an off-white to yellow powder (*Sigma-Aldrich*, 1988) with a melting point of 236° to 239° C (Karsai *et al.*, 1986). It decomposes at 239° C, and the decomposition products include carbon monoxide, carbon dioxide, nitrogen oxides, hydrochloride gas, and ammonia (*Sigma-Aldrich*, 1988; Sax and Lewis, 1989). Benzyltrimethylammonium chloride is hygroscopic (*Sigma-Aldrich*, 1988) and soluble in water, ethanol, and butanol and slightly soluble in butyl phthalate and tributyl phosphate (Sax and Lewis, 1987; Weast, 1989).

PRODUCTION, USE, AND HUMAN EXPOSURE

Benzyltrimethylammonium chloride is prepared by boiling benzyl chloride and trimethylamine in absolute ethanol. In addition, a reaction involving benzyl dimethylamine and methyl chloride, with or without solvent, may be used to manufacture this compound (Karsai *et al.*, 1986). Benzyltrimethylammonium chloride is also prepared by dissolving phenylmethyl chloride in ether and adding 25% trimethylamine in methanol. The product is collected and recrystallized from alcohol and ether (Hume and Holland, 1965).

In 1983, 16 companies were listed as manufacturers of benzyltrimethylammonium chloride. Ten of the manufacturers reported a total production volume ranging from 1.5 to 15.5 million pounds (USEPA, 1990). In 1986 and 1988, respectively, 4,132,000 and 3,985,000 pounds of benzyltrimethylammonium chloride were produced (USITC, 1986, 1987, 1989).

Benzyltrimethylammonium chloride is used as a solvent for cellulose, a gelling inhibitor in polyester resins, a chemical intermediate (Sax and Lewis, 1987), and a paint dispersant for the rubber industry (*Chemical Marketing Reporter*, 1983). It is also used extensively as an acrylic dyeing agent in the textile industry (Moore *et al.*, 1987). Benzyltrimethylammonium chloride is patented for use in plant growth regulator compositions and synthetic processes (Karsai *et al.*, 1986).

Occupational exposure may result from the use of this compound in the chemical (Sax and Lewis, 1987), rubber (*Chemical Marketing Reporter*, 1983), and textile industries (Moore *et al.*, 1987). Data from the National Occupational Exposure Survey, conducted by the National Institute for Occupational Safety and Health during the years 1981 to 1983, estimated that 5,000 workers were potentially exposed to benzyltrimethylammonium chloride (NIOSH, 1990). No exposure or threshold limit values for benzyltrimethylammonium chloride have been established.

ABSORPTION, DISTRIBUTION, METABOLISM, AND EXCRETION

Experimental Animals

Male Wistar rats intravenously administered benzyltrimethylammonium iodide eliminated the compound from plasma in two phases. One phase had a half-life of 3 minutes, and the other had a half-life of 70 minutes. Benzyltrimethylammonium chloride had an overall half-life of 30 minutes following intravenous administration. Greater than 90% of the dose was eliminated in the urine; 0.9% was eliminated in the bile. The highest tissue concentration following intravenous dosing was found in the liver and kidney 10 minutes after injection. No metabolites were found in the urine, bile, or plasma (Neef *et al.*, 1984).

Absorption from the gastrointestinal tract did not exceed 40% for F344/N rats or 15% for B6C3F₁ mice administered 0.63 mg benzyltrimethylammonium chloride (ring-U-¹⁴C)/kg body weight by gavage in water and did not exceed 10% for rats or mice administered 63 mg/kg dermally for 24 hours. Greater than 90% of the gavage dose was excreted in the urine and feces within 24 hours of administration. There was no evidence of metabolism of the parent compound in rats or mice because greater than 90% of the excreted radiolabel was composed of the parent compound (Sanders *et al.*, 1995).

Humans

No absorption, distribution, metabolism, or excretion studies of benzyltrimethylammonium chloride in humans were found in a review of the literature.

TOXICITY

Experimental Animals

An acute median lethal oral dose of 250 mg/kg has been reported for rats of an unspecified strain (Dewitt *et al.*, 1953). The acute oral lethality of 1,600 mg benzyltrimethylammonium chloride/kg body weight in an unspecified number of male TAC:SWfBr mice was reported to be 100% (Ellis *et al.*, 1980). In that study, benzyltrimethylammonium chloride was administered orally as a 2% suspension in 0.5% methylcellulose. The results of those studies indicate that rats are more sensitive than mice to the lethality of benzyltrimethylammonium chloride; these results were used to select the doses for the 16-day NTP studies. A 48-hour median lethal concentration for benzyltrimethylammonium chloride in water fleas (*Daphnia pulex*) was determined to be 11.94 ppm in an aquatic static bioassay (Moore *et al.*, 1987). Sanders *et al.* (1995) studied the acute oral toxicity of 125, 175, 210, and 250 mg benzyltrimethylammonium chloride/kg body weight in groups of five male F344/N rats (300 to 350 g). Mortality was observed in the 175, 210, and 250 mg/kg groups. In addition, benzyltrimethylammonium chloride induced muscarinic cholinergic symptoms of salivation and chromodacryorrhea. These symptoms were relieved by atropine injection, but atropine administration did not reduce mortality.

Humans

No data were found on the acute toxicity of benzyltrimethylammonium chloride in humans. However, 10 human fatalities resulting from overexposure to aryl/alkyl quaternary ammonium compounds have been reported. Three of these fatalities involved benzalkonium chloride, and the subjects suffered complete cardiovascular collapse. A common symptom observed in these fatalities was curariform paralysis. Intramuscular injection reportedly resulted in liver and kidney necrosis (Gosselin *et al.*, 1984).

NEUROTOXICITY

The cholinergic activities of benzyltrimethylammonium chloride were studied in isolated muscle preparations *in vitro* and through quantitation of saliva collected from the submaxillary duct of cats following intravenous administration (Hamilton and Rubinstein, 1968). Researchers concluded that benzyltrimethylammonium chloride is capable of stimulating both nicotinic and muscarinic receptors and speculated that it acts at the same ganglionic site as acetylcholine. This was confirmed by studies in which 25 mg benzyltrimethylammonium chloride/kg body weight, dissolved in tetrahydrofurfuryl alcohol and administered intravenously, induced a gastrocnemius muscle twitch in an unspecified strain of rats (Ellis *et al.*, 1980). Benzyltrimethylammonium chloride (40 µg/kg), administered without atropine to mongrel dogs via a femoral vein canula, mimicked

muscarinic acetylcholinergic activity and caused a decrease in blood pressure. A 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dose administered to atropinized dogs induced a nicotinic increase in blood pressure (Hume and Holland, 1965).

Anticholinergic actions of benzyltrimethylammonium bromide have been demonstrated *in vitro* using superfused frog rectus abdominis muscle and rabbit sciatic nerve gastrocnemius muscle preparations (Dretchen *et al.*, 1971). At low concentrations, the salt inhibited cholinergic receptors. At high concentrations, the salt appeared to have acted by a nonspecific mechanism that may have involved increased potassium efflux.

CARCINOGENICITY

No carcinogenicity studies of benzyltrimethylammonium chloride in experimental animals or humans were found in a review of the literature.

GENETIC TOXICITY

Only one set of published mutagenicity data for benzyltrimethylammonium chloride was identified; therefore, there is insufficient information to fully characterize the genetic activity of this compound. Results of mutagenicity testing in *Salmonella typhimurium* strains TA97, TA98, TA100, and TA1535, with and without induced rat or hamster liver S9 activation enzymes, were uniformly negative (Zeiger *et al.*, 1988). Concentrations of benzyltrimethylammonium chloride ranged from 100 to 10,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$. Slight toxicity was noted at the higher doses in some trials, but no increases in the number of mutant colonies were seen.

STUDY RATIONALE AND DESIGN

Benzyltrimethylammonium chloride was nominated for toxicity testing by the National Institute of Environmental Health Sciences because of its high production volume, the potential for occupational exposure, and the limited information on toxicity. Sixteen-day and 13-week toxicity studies were conducted in F344/N rats and B6C3F₁ mice administered benzyltrimethylammonium chloride by gavage. This route was selected because benzyltrimethylammonium chloride was found to be poorly absorbed via the dermal route (Sanders *et al.*, 1995). Micronucleus tests were conducted on mouse peripheral blood erythrocytes following treatment with benzyltrimethylammonium chloride by gavage for 13 weeks.

MATERIALS AND METHODS

PROCUREMENT AND CHARACTERIZATION OF BENZYLTRIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE

Benzyltrimethylammonium chloride was obtained from Fluka Chemical Corporation (Ronkonkoma, NY) in one lot (306793/1). Information on the identity, purity, and stability of the bulk chemical was provided by the manufacturer; identity was confirmed by the study laboratory. Reports on analyses performed in support of the benzyltrimethylammonium chloride studies are on file at the National Institute of Environmental Health Sciences.

The manufacturer identified the chemical, an off-white to yellow crystalline powder, as benzyltrimethylammonium chloride by nuclear magnetic resonance spectroscopy. The purity of lot 306793/1, determined by argentometric titration, was 100.4% or greater. The study laboratory confirmed the identity of the chemical with infrared spectroscopy. The spectrum was consistent with a literature reference for benzyltrimethylammonium bromide (*Aldrich*, 1990).

Based on the manufacturer's stability information, the bulk chemical was stored at room temperature in sealed containers flushed with nitrogen to expel moisture.

PREPARATION AND ANALYSIS OF DOSE FORMULATIONS

The dose formulations for the 16-day studies were prepared once within 7 days of the beginning of dosing. Dose formulations for the 13-week studies were prepared within 8 days of the first day of dosing, then every 2 to 3 weeks until the end of the study. To prepare the dose formulations, a weighed amount of benzyltrimethylammonium chloride was dissolved in deionized water and diluted to achieve the highest concentration required. Serial dilutions of the highest concentration were made to obtain each of the lower concentrations. Dose formulations were stored in sealed serum vials (16-day studies) or amber glass bottles (13-week studies) at room temperature.

Stability studies of 3.2 and 1.25 mg/mL dose formulations were performed by the study laboratory using ultraviolet spectroscopy. Stability was confirmed for at least 21 days (3.2 mg/mL) or 28 days (1.25 mg/mL) for formulations stored in sealed containers at room temperature.

The study laboratory analyzed the dose formulations used in the 16-day studies and the initial, mid-point, and final dose formulations used in the 13-week studies. The study laboratory also analyzed animal room samples of the same dose formulations after they had been in use for 2 to 3 weeks. All dose formulations administered to rats and mice and all animal room samples were within 10% of the target concentrations.

16-DAY STUDIES

Male and female F344/N rats and B6C3F₁ mice were obtained from Taconic Farms (Germantown, NY). On receipt, the rats and mice were 4 weeks old. Animals were quarantined for 13 (rats) or 14 (mice) days and were 6 weeks old on the first day of the studies. Groups of five male and five female rats received 0, 16, 32, 63, 125, or 250 mg benzyltrimethylammonium chloride per kg body weight in deionized water by gavage, 5 days per week for 16 days. Groups of five male and five female mice received 0, 63, 125, 250, 500, or 1,000 mg/kg in deionized water by gavage, 5 days per week for 16 days. Feed and water were available *ad libitum*. Rats and female mice were housed five per cage; male mice were housed individually. Animals were observed daily, and clinical findings and body weights were recorded initially, on day 8, and at the end of the studies. Prior to terminal sacrifice, a functional observation battery was performed on all surviving rats. Details of the study design and animal maintenance are summarized in Table 1.

At the end of the 16-day studies, the animals were anesthetized with a mixture of carbon dioxide and oxygen, and blood was collected from the retroorbital sinus of all rats and mice for hematology and clinical chemistry analyses. Blood samples for hematology analysis were collected in tubes containing EDTA as an anticoagulant. Blood samples for clinical chemistry analysis were collected in untreated clot tubes, and the sera were separated by centrifugation. Hematology parameters were analyzed on a Serono-Baker 9000 Automated Cell Counter (Serono-Baker Diagnostics, Allentown, PA). Manual hematocrit values were determined using an Adams Microhematocrit Centrifuge, CT2900 (Clay Adams, Sparks, MD). Leukocyte differentials and erythrocyte, leukocyte, lymphocyte, and platelet morphology were determined by light microscopy from blood smears stained with modified Wright's stain using an Ames Hematek Slide Stainer (Miles Laboratory, Ames Division, Elkhart, IN). Reticulocyte counts were determined by light microscopy using blood samples stained with new methylene blue (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Clinical chemistry parameters were measured

using a Hitachi 717[®] chemistry analyzer (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). All reagents were obtained from the manufacturer with the exception of the reagents for sorbitol dehydrogenase and total bile acid determinations, which were obtained from Sigma Chemical Company. The parameters measured are listed in Table 1.

A necropsy was performed on all rats and mice. The heart, right kidney, liver, lung, spleen, right testis, and thymus were weighed. Tissues for microscopic examination were fixed and preserved in 10% neutral buffered formalin, processed and trimmed, embedded in paraffin, sectioned to a thickness of 5 μ m, and stained with hematoxylin and eosin. Histopathologic examinations were performed on vehicle control rats and mice, rats receiving 63, 125, or 250 mg/kg, and mice receiving 125, 250, 500, or 1,000 mg/kg. Table 1 lists the tissues and organs examined.

13-WEEK STUDIES

Male and female F344/N rats and B6C3F₁ mice were obtained from Taconic Farms (Germantown, NY). Upon receipt, the rats and mice were 4 weeks old. Animals were quarantined for 12 to 15 days and were 6 weeks old on the first day of the studies. Before the studies began, five male and five female rats and mice were randomly selected for parasite evaluation and gross observation for evidence of disease. Blood was collected from five male and five female control rats and untreated mice at the end of the 13-week studies. The sera were analyzed for antibody titers to rodent viruses (Boorman *et al.*, 1986; Rao *et al.*, 1989a,b). All results were negative.

Core study groups of 10 male and 10 female rats and mice received benzyltrimethylammonium chloride in deionized water by gavage at doses of 0, 12.5, 25, 50, or 100 mg/kg, 5 days per week for 13 weeks. Feed and water were available *ad libitum*. Rats and female mice were housed five per cage; male mice were housed individually. Clinical findings were recorded and animals were weighed initially, on day 8, and weekly until the end of the studies. A functional observation battery was performed on core study rats on days 10 and 85. Details of the study design and animal maintenance are summarized in Table 1.

On days 3 and 21, blood was collected from the retroorbital sinus of groups of 10 special study rats administered the same doses as core study rats for hematology and clinical chemistry analyses. At the end of the 13-week studies, blood was collected from the retroorbital sinus of all core study rats for hematology and clinical chemistry analyses and from all core study mice for clinical chemistry analyses. Methods used for

hematology and clinical chemistry analyses were the same as those used in the 16-day studies. The parameters measured are listed in Table 1.

At the end of the 13-week studies, samples were collected for sperm motility and vaginal cytology evaluations on core study rats and mice receiving 0, 25, 50, or 100 mg/kg. The parameters evaluated are listed in Table 1. Methods used were those described in the NTP's sperm morphology and vaginal cytology evaluations protocol (NTP, 1991). For 12 consecutive days prior to the scheduled terminal sacrifice, the vaginal vaults of the females were moistened with saline, if necessary, and samples of vaginal fluid and cells were stained. Relative numbers of leukocytes, nucleated epithelial cells, and large squamous epithelial cells were determined and used to ascertain estrous cycle stage (i.e., diestrus, proestrus, estrus, and metestrus). Male animals were evaluated for sperm count and motility. The left testis and left epididymis were isolated and weighed. The tail of the epididymis (cauda epididymis) was then removed from the epididymal body (corpus epididymis) and weighed. Test yolk (rats) or modified Tyrode's buffer (mice) was applied to slides and a small incision was made at the distal border of the cauda epididymis. The sperm effluxing from the incision were dispersed in the buffer on the slides, and the numbers of motile and nonmotile spermatozoa were counted for five fields per slide by two observers. Following completion of sperm motility estimates, each left cauda epididymis was placed in buffered saline solution. Caudae were minced, and the tissue was incubated in the saline solution and then heat fixed at 65° C. Sperm density was then determined microscopically with the aid of a hemacytometer. To quantify spermatogenesis, the testicular spermatid head count was determined by removing the tunica albuginea and homogenizing the left testis in phosphate-buffered saline containing 10% dimethyl sulfoxide. Homogenization-resistant spermatid nuclei were counted with a hemacytometer.

A necropsy was performed on all core study rats and mice. The heart, right kidney, liver, lung, right testis, and thymus were weighed. Tissues for microscopic examination were fixed and preserved in 10% neutral buffered formalin, processed and trimmed, embedded in paraffin, sectioned to a thickness of 5 μ m, and stained with hematoxylin and eosin. A complete histopathologic examination was performed on vehicle control groups and all 100 mg/kg rats and mice. Table 1 lists the tissues and organs routinely examined.

Upon completion of the laboratory pathologist's histopathologic evaluation, the slides, paraffin blocks, and residual wet tissues were sent to the NTP Archives for inventory, slide/block match, and wet tissue audit. The slides, individual animal data records, and pathology tables were sent to an independent pathology laboratory where quality assessment was performed. Results were reviewed and evaluated by the NTP. Details of these review procedures have been described by Maronpot and Boorman (1982) and Boorman *et al.* (1985).

TABLE I
Experimental Design and Materials and Methods in the Gavage Studies
of Benzyltrimethylammonium Chloride

16-Day Studies	13-Week Studies
Study Laboratory Microbiological Associates, Inc. (Bethesda, MD)	Microbiological Associates, Inc. (Bethesda, MD)
Strain and Species Rats: F344/N Mice: B6C3F ₁	Rats: F344/N Mice: B6C3F ₁
Animal Source Taconic Farms (Germantown, NY)	Taconic Farms (Germantown, NY)
Time Held Before Studies Rats: 13 days Mice: 14 days	Rats: 12 days (males) or 13 days (females) Mice: 14 days (males) or 15 days (females)
Average Age When Studies Began 6 weeks	6 weeks
Date of First Dose Rats: 10 August 1992 Mice: 11 August 1992	Rats: 12 (males) or 13 (females) October 1993 Mice: 14 (males) or 15 (females) October 1993
Duration of Dosing 16 days (5 days/week)	13 weeks (5 days/week)
Date of Last Dose Rats: 25 August 1992 Mice: 26 August 1992	Rats: 10 (males) or 11 (females) January 1994 Mice: 12 (males) or 13 (females) January 1994
Necropsy Dates Rats: 26 August 1992 Mice: 27 August 1992	Rats: 11 (males) or 12 (females) January 1994 Mice: 13 (males) or 14 (females) January 1994
Average Age at Necropsy 8 weeks	19 weeks
Size of Study Groups 5 males and 5 females	10 males and 10 females
Method of Distribution Animals were distributed randomly into groups of approximately equal initial mean body weights.	Same as 16-day studies
Animals per cage Rats: 5 Mice: 1 (males) or 5 (females)	Rats: 5 Mice: 1 (males) or 5 (females)
Method of Animal Identification Tail tattoo	Tail tattoo
Diet NIH-07 open formula pelleted diet (Zeigler Brothers, Inc., Gardners, PA), available <i>ad libitum</i> , changed weekly	NIH-07 open formula meal diet (Zeigler Brothers, Inc., Gardners, PA), available <i>ad libitum</i> , changed weekly

TABLE 1
Experimental Design and Materials and Methods in the Gavage Studies
of Benzyltrimethylammonium Chloride

16-Day Studies	13-Week Studies
Water Tap water (Washington Suburban Sanitary Commission Potomac Plant) via automatic watering system (Edstrom Industries, Inc., Waterford, WI), available <i>ad libitum</i>	Same as 16-day studies
Cages Polycarbonate (Lab Products, Inc., Rochelle Park, NJ), changed twice weekly for group-housed animals and once weekly for individually housed animals	Same as 16-day studies
Bedding Sani-Chips® (P.J. Murphy Forest Products, Montville, NJ) changed twice weekly for group-housed animals and once weekly for individually housed animals	Same as 16-day studies
Racks Stainless steel (Lab Products, Inc., Rochelle Park, NJ), changed and rotated every 2 weeks	Same as 16-day studies
Animal Room Environment Temperature: 20.6°-23.9° C Relative humidity: 35%-65 % Room fluorescent light: 12 hours/day Room air changes: 10/hour	Temperature: 20.6°-23.9° C Relative humidity: 35%-65% Room fluorescent light: 12 hours/day Room air changes: 10/hour
Doses Rats: 0, 16, 32, 63, 125, or 250 mg/kg in deionized water by gavage (dosing volume=5 mL/kg body weight) Mice: 0, 63, 125, 250, 500, or 1,000 mg/kg in deionized water by gavage (dosing volume=10 mL/kg body weight)	0, 12.5, 25, 50, or 100 mg/kg in deionized water by gavage (dosing volume=5 mL/kg body weight for rats and 10 mL/kg body weight for mice)
Type and Frequency of Observation Observed twice daily; clinical findings and body weights were recorded initially, on day 8, and at the end of the studies.	Observed twice daily; animals were weighed and clinical findings were recorded initially, on day 8, and weekly thereafter until the end of the studies.
Method of Sacrifice CO ₂ asphyxiation	Same as 16-day studies
Necropsy Necropsy performed on all animals. Organs weighed were the heart, right kidney, liver, lung, spleen, right testis, and thymus.	Necropsy performed on all core study animals. Organs weighed were the heart, right kidney, liver, lung, right testis, and thymus.

TABLE 1
Experimental Design and Materials and Methods in the Gavage Studies
of Benzyltrimethylammonium Chloride

16-Day Studies	13-Week Studies
<p>Clinical Pathology Blood was collected from the retroorbital sinus of all rats and mice surviving to the end of the studies for hematology and clinical chemistry. <i>Hematology:</i> automated and manual hematocrit; hemoglobin concentration; erythrocyte, reticulocyte, and nucleated erythrocyte counts; mean cell volume; mean cell hemoglobin; mean cell hemoglobin concentration; platelet count; and total leukocyte count and differentials <i>Clinical chemistry:</i> urea nitrogen, creatinine, total protein, albumin, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, creatine kinase, sorbitol dehydrogenase, serum cholinesterase, erythrocyte cholinesterase, and bile acids</p>	<p>Blood was collected from the retroorbital sinus of all special study rats on days 3 and 21 and from all core study rats surviving until the end of the study for hematology and clinical chemistry. Blood was collected from the retroorbital sinus of all mice surviving to the end of the study for clinical chemistry. <i>Hematology:</i> automated and manual hematocrit; hemoglobin concentration; erythrocyte, reticulocyte, and nucleated erythrocyte counts; mean cell volume; mean cell hemoglobin; mean cell hemoglobin concentration; platelet count; and total leukocyte count and differentials <i>Clinical chemistry:</i> urea nitrogen, creatinine, total protein, albumin, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, creatine kinase, sorbitol dehydrogenase, serum cholinesterase, and bile acids</p>
<p>Histopathology Complete histopathology was performed on all vehicle control animals, 63, 125, and 250 mg/kg rats, and 125, 250, 500, and 1,000 mg/kg mice. In addition to gross lesions and tissue masses, the following tissues were examined: adrenal gland, bone and marrow, brain, clitoral gland, esophagus, gallbladder (mice), heart, large intestine (cecum, colon, rectum), small intestine (duodenum, jejunum, ileum), kidney, liver, lung, lymph nodes (mandibular and mesenteric), mammary gland (except male mice), nose, ovary, pancreas, parathyroid gland, pituitary gland, preputial gland, prostate gland, salivary gland, skin, spleen, stomach (forestomach and glandular), testis (with epididymis and seminal vesicle), thymus, thyroid gland, trachea, urinary bladder, uterus, and Zymbal's gland (rats).</p>	<p>Complete histopathology was performed on all core study vehicle control and 100 mg/kg rats and mice. In addition to gross lesions and tissue masses, the following tissues were examined: adrenal gland, bone with marrow, brain, clitoral gland, esophagus, gallbladder (mice), heart, large intestine (cecum, colon, rectum), small intestine (duodenum, jejunum, ileum), kidney, liver, lung, lymph nodes (mandibular and mesenteric), mammary gland, muscle, nose, ovary, pancreas, parathyroid gland, pituitary gland, preputial gland, prostate gland, salivary gland, spinal cord, spleen, stomach (forestomach and glandular), testis (with epididymis and seminal vesicle), thymus, thyroid gland, trachea, urinary bladder, uterus, and Zymbal's gland (rats). The lung of all 50 mg/kg rats was also examined.</p>
<p>Sperm Motility and Vaginal Cytology None</p>	<p>At the end of the studies, sperm samples were collected from all core study male rats and mice in the 0, 25, 50, and 100 mg/kg groups for sperm motility evaluations. The following parameters were evaluated: spermatid heads per testis and per gram testis, spermatid counts, and epididymal spermatozoal motility and concentration. The left cauda epididymis, left epididymis, and left testis were weighed. Vaginal samples were collected for up to 12 consecutive days prior to the end of the studies from all core study females administered 0, 25, 50, or 100 mg/kg for vaginal cytology evaluations. The parameters evaluated were estrous cycle length and the percentage of cycle spent in the estrous cycle stages.</p>
<p>Functional Observation Battery At the end of the study, all surviving rats were subjected to a functional observation battery. The parameters evaluated were body position, activity level, coordination, gait, general behavior, head-flick, head-searching, compulsive licking or biting, backward walking, self-mutilation, circling, convulsions, tremors, lacrimation or chromodacryorrhea, salivation, piloerection, pupillary dilation or constriction, unusual respiration, diarrhea, excessive or diminished urination, and vocalization.</p>	<p>Core study rats were subjected to a functional observation battery on days 10 and 85. The parameters evaluated were the same as those evaluated in the 16-day studies.</p>

STATISTICAL METHODS

Calculation and Analysis of Lesion Incidences

The incidences of lesions presented in Appendix A are given as the number of animals bearing such lesions at a specific anatomic site and the number of animals with that site examined microscopically. The Fisher exact test, a procedure based on the overall proportion of affected animals, was used to determine significance (Gart *et al.*, 1979).

Analysis of Continuous Variables

Two approaches were employed to assess the significance of pairwise comparisons between dosed and vehicle control groups in the analysis of continuous variables. Organ and body weight data, which have approximately normal distributions, were analyzed with the parametric multiple comparison procedures of Dunnett (1955) and Williams (1971, 1972). Hematology, clinical chemistry, spermatid, and epididymal spermatozoal data, which have typically skewed distributions, were analyzed using the nonparametric multiple comparison methods of Shirley (1977) and Dunn (1964). Jonckheere's test (Jonckheere, 1954) was used to assess the significance of the dose-related trends and to determine whether a trend-sensitive test (Williams' or Shirley's test) was more appropriate for pairwise comparisons than a test that does not assume a monotonic dose-related trend (Dunnett's or Dunn's test). Prior to statistical analysis, extreme values identified by the outlier test of Dixon and Massey (1951) were examined by NTP personnel, and implausible values were eliminated from the analysis. Because vaginal cytology data are proportions (the proportion of the observation period that an animal was in a given estrous stage), an arcsine transformation was used to bring the data into closer conformance with a normality assumption. Treatment effects were investigated by applying a multivariate analysis of variance (Morrison, 1976) to the transformed data to test for simultaneous equality of measurements across doses. The Fisher exact test was used to determine the significance of the functional observation battery data (Gart *et al.*, 1979).

QUALITY ASSURANCE METHODS

The 13-week studies of benzyltrimethylammonium chloride were conducted in compliance with Food and Drug Administration Good Laboratory Practice Regulations (21 CFR, Part 58). The quality assurance unit of Microbiological Associates, Inc., performed audits and inspections of protocols, procedures, data, and reports throughout the course of the studies.

GENETIC TOXICOLOGY

Salmonella typhimurium Mutagenicity Test Protocol

Testing was performed as reported by Zeiger *et al.* (1988). Benzyltrimethylammonium chloride was sent to the laboratory as a coded aliquot from Radian Corporation (Austin, TX). It was incubated with the *Salmonella typhimurium* tester strains TA97, TA98, TA100, and TA1535, either in buffer or S9 mix (metabolic activation enzymes and cofactors from Aroclor 1254-induced male Sprague-Dawley rat or Syrian hamster liver) for 20 minutes at 37° C. Top agar supplemented with L-histidine and d-biotin was added, and the contents of the tubes were mixed and poured onto the surfaces of minimal glucose agar plates. Histidine-independent mutant colonies arising on these plates were counted following incubation for 2 days at 37° C.

Each trial consisted of triplicate plates of concurrent positive and negative controls and five doses of benzyltrimethylammonium chloride. In the absence of toxicity, 10,000 µg/plate was selected as the high dose.

In this assay, a positive response is defined as a reproducible, dose-related increase in histidine-independent (revertant) colonies in any one strain/activation combination. An equivocal response is defined as an increase in revertants that is not dose related, is not reproducible, or is not of sufficient magnitude to support a determination of mutagenicity. A negative response is obtained when no increase in revertant colonies is observed following chemical treatment. There is no minimum percentage or fold increase required for a chemical to be judged positive or weakly positive.

Mouse Peripheral Blood Micronucleus Test Protocol

A detailed discussion of this assay is presented by MacGregor *et al.* (1990). At the end of the 13-week toxicity study, peripheral blood samples were obtained from male and female mice. Smears were immediately prepared and fixed in absolute methanol. The methanol-fixed slides were stained with acridine orange and coded. Slides were scanned to determine the frequency of micronuclei in 1,000 normochromatic erythrocytes (NCEs) in up to 10 animals per dose group.

The results were tabulated as the mean of the pooled results from all animals within a treatment group plus or minus the standard error of the mean. The frequency of micronucleated cells among NCEs was analyzed by a statistical software package that tested for increasing trend over dose groups with a one-tailed Cochran-Armitage trend test, followed by pairwise comparisons between each dose group and the control group (ILS, 1990). In the presence of excess binomial variation, as detected by a binomial dispersion test, the binomial variance of the Cochran-Armitage test was adjusted upward in proportion to the excess variation. In the

micronucleus test, an individual trial is considered positive if the trend test P value is less than or equal to 0.025 or if the P value for any single dose group is less than or equal to 0.025 divided by the number of dose groups. A final call of positive for micronucleus induction is preferably based on reproducibly positive trials (as noted above). Results of the 13-week studies were accepted without repeat tests, because additional test data could not be obtained. Ultimately, the final call is determined by the scientific staff after considering the results of statistical analyses, the reproducibility of any effects observed, and the magnitudes of those effects.

Evaluation Protocol

These are the basic guidelines for arriving at an overall assay result for assays performed by the National Toxicology Program. Statistical as well as biological factors are considered. For an individual assay, the statistical procedures for data analysis have been described in the preceding protocols. There have been instances, however, in which multiple aliquots of a chemical were tested in the same assay, and differing results were obtained among aliquots and/or among laboratories. Results from more than one aliquot or from more than one laboratory are not simply combined into an overall result. Rather, all the data are critically evaluated, particularly with regard to pertinent protocol variations, in determining the weight of evidence for an overall conclusion of chemical activity in an assay. In addition to multiple aliquots, the *in vitro* assays have another variable that must be considered in arriving at an overall test result. *In vitro* assays are conducted with and without exogenous metabolic activation. Results obtained in the absence of activation are not combined with results obtained in the presence of activation; each testing condition is evaluated separately. The results presented in the Abstract of this Toxicity Study Report represent a scientific judgement of the overall evidence for activity of the chemical in an assay.

RESULTS

RATS

16-DAY STUDY

All male and female rats in the 125 and 250 mg/kg groups died on day 1 of the study (Table 2). All other rats survived to the end of the study. The final mean body weights and body weight gains of dosed males and females were similar to those of the vehicle controls (Table 2).

TABLE 2
Survival and Body Weights of Rats in the 16-Day Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride

Dose (mg/kg)	Survival ^a	Mean Body Weight ^b (g)			Final Weight Relative to Controls (%)
		Initial	Final	Change	
Male					
0	5/5	151 ± 3	240 ± 4	89 ± 2	
16	5/5	150 ± 3	231 ± 5	81 ± 4	96
32	5/5	147 ± 7	233 ± 12	86 ± 6	97
63	5/5	146 ± 4	226 ± 8	80 ± 5	94
125	0/5 ^c	150 ± 4	—	—	—
250	0/5 ^c	149 ± 5	—	—	—
Female					
0	5/5	103 ± 4	137 ± 5	34 ± 1	
16	5/5	103 ± 3	144 ± 5	41 ± 2	105
32	5/5	106 ± 2	142 ± 4	36 ± 2	104
63	5/5	103 ± 2	137 ± 4	34 ± 2	100
125	0/5 ^c	103 ± 2	—	—	—
250	0/5 ^c	105 ± 4	—	—	—

^a Number of animals surviving at 16 days/number initially in group

^b Weights and weight changes are given as mean ± standard error. Differences from the vehicle control groups were not significant by Dunnett's test. No data were calculated for groups with 100% mortality.

^c Day of death: 1

Chemical-related clinical findings observed in three males and one female administered 125 mg/kg included abnormal breathing, ataxia, lethargy (males only), nasal and eye discharge, and tremors on day 1; one 63 mg/kg male was also lethargic and had nasal and eye discharge. A functional observation battery was performed on males and females surviving to the end of the study. All males in the 63 mg/kg group exhibited salivation (Table B1). Compared to the vehicle controls, incidences of pupillary dilation and mild tremors were slightly, but not significantly, increased in 63 mg/kg males. The only chemical-related effect observed in females was salivation in two of five rats in the 63 mg/kg group.

Because of 100% mortality in the 125 and 250 mg/kg groups, no hematology or clinical chemistry evaluations were performed and no organ weight data were collected for these groups. For the groups with survivors, there were no treatment-related changes in the hematology, clinical chemistry, or organ weight variables (Tables C1 and D1). No chemical-related gross or microscopic changes were observed. In some animals that died early, necrosis of thymic lymphocytes and pulmonary edema were observed; these were thought to be stress-related or agonal changes. Based on the 100% mortality observed at 125 and 250 mg/kg, doses of 0, 12.5, 25, 50, and 100 mg/kg were selected for the 13-week gavage study in rats.

13-WEEK STUDY

One 25 mg/kg and two 100 mg/kg female rats died before the end of the study (Table 3); the deaths of the 100 mg/kg females were considered to be due to pharmacologic effects of benzyltrimethylammonium chloride on the cardiovascular system. All other rats survived to the end of the study. The mean body weight gain of 100 mg/kg males was significantly less than that of the vehicle controls (Table 3 and Figure 1). Chemical-related clinical findings included nasal and eye discharge in 12.5 (1/10), 25 (6/10), 50 (6/10), and 100 (10/10) mg/kg males and in 50 (6/10) and 100 (6/10) mg/kg females, oral discharge in 50 (2/10) and 100 (3/10) mg/kg males and in 100 mg/kg females (9/10), and tremors in 100 mg/kg males (4/10) and females (2/10).

TABLE 3
Survival and Body Weights of Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride

Dose (mg/kg)	Survival ^a	Mean Body Weight ^b (g)			Final Weight Relative to Controls (%)
		Initial	Final	Change	
Male					
0	10/10	125 ± 4	338 ± 8	213 ± 7	
12.5	10/10	124 ± 4	337 ± 8	213 ± 6	100
25	10/10	125 ± 3	336 ± 8	211 ± 5	99
50	10/10	125 ± 4	340 ± 5	215 ± 4	101
100	10/10	125 ± 3	311 ± 9	186 ± 7**	92
Female					
0	10/10	106 ± 3	190 ± 3	85 ± 2	
12.5	10/10	106 ± 3	198 ± 4	93 ± 2	104
25	9/10 ^c	104 ± 2	193 ± 3	88 ± 2	101
50	10/10	107 ± 3	192 ± 4	85 ± 3	101
100	8/10 ^d	107 ± 3	187 ± 4	81 ± 2	98

** Significantly different ($P \leq 0.01$) from the vehicle control group by Dunnett's test

^a Number of animals surviving at 13 weeks/number initially in group

^b Weights and weight changes are given as mean ± standard error. Subsequent calculations are based on animals surviving to the end of the study.

^c Week of death: 12 (gavage accident)

^d Week of death: 10, 12

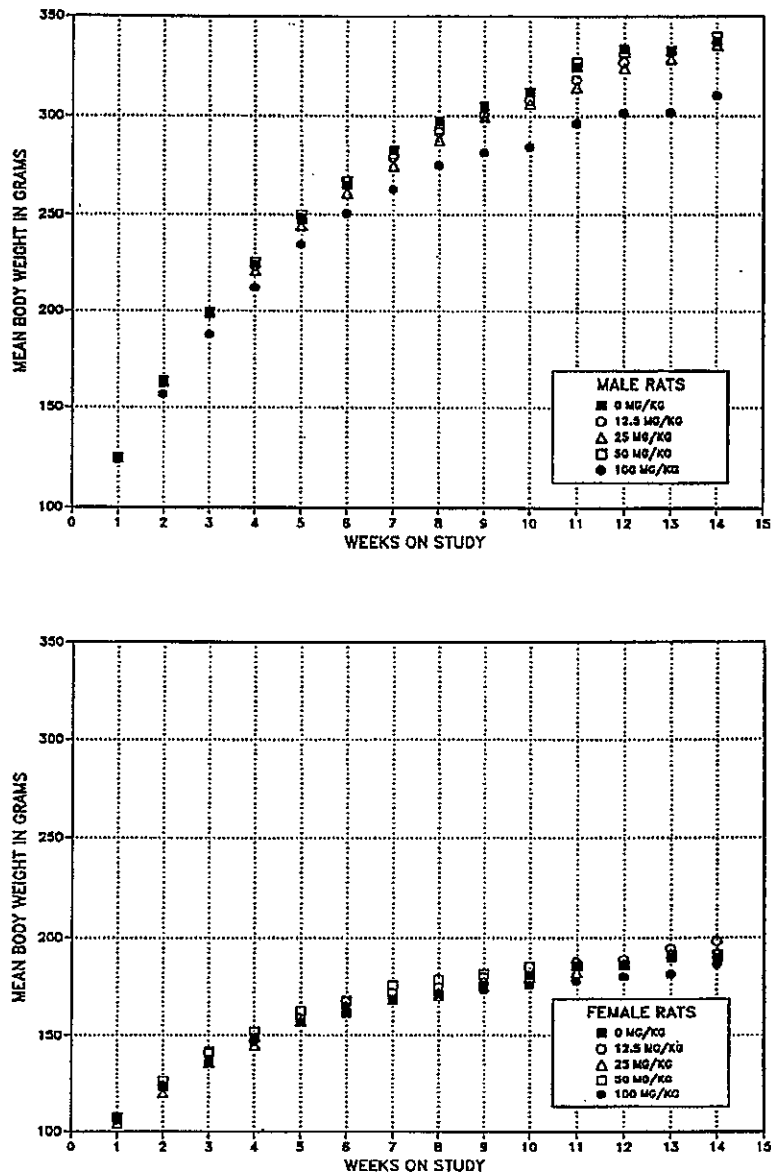


FIGURE 1
Body Weights of Rats Administered Benzyltrimethylammonium Chloride
by Gavage for 13 Weeks

A functional observation battery was conducted on days 10 and 85. Clinical evaluation demonstrated chromodacryorrhea and increased salivation in male and female rats in the 100 mg/kg group on day 85 (Tables 4 and B2). In female rats, slight lacrimation was observed in all dosed groups (30% to 75%) on day 85. Chemical-related effects on the motor system were evident on day 85 in male and female rats in the 100 mg/kg groups. These effects were characterized by an altered gait (males: 40%; females: 25%) and mild to severe tremors (males: 50%; females: 63%) and were accompanied by alterations in motor coordination and, in some cases, altered body position (males: 40%; females: 38%). Pupillary constriction was observed in 3 of 10 females in the 50 mg/kg group and 5 of 10 females in the 100 mg/kg group.

TABLE 4
Summary of Functional Observation Battery for Rats on Day 85 in the 13-Week Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Male					
n	10	10	10	10	10
Body position					
Crouched over	0	0	0	0	2
Head bobbing	0	0	0	0	2
Coordination of movement					
Moderately impaired	0	0	0	0	1
Severely impaired	0	0	0	0	1
Gait					
Hunched or crouched	0	0	0	0	2
Body drags/is flattened	0	0	0	0	2
Lacrimation or chromodacryorrhea					
Slight	0	0	0	0	5*
Severe	0	0	0	0	1
Pupillary constriction or dilation					
Constricted	0	0	0	0	1
Salivation					
Slight	0	1	2	4*	2
Severe	0	0	0	2	8**
Tremors					
Mild	0	0	0	0	2
Severe whole body	0	0	0	0	3

TABLE 4
Summary of Functional Observation Battery for Rats on Day 85 in the 13-Week Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Female					
n	10	10	9	10	8
Body position					
Flattened	0	0	0	0	1
Crouched over	0	0	0	0	2
Coordination of movement					
Slightly impaired	0	0	0	0	3
Gait					
Ataxia	0	0	0	0	2
Lacrimation or chromodacryorrhea					
Slight	0	3	3	4*	6**
Pupillary constriction or dilation					
Constricted	0	0	0	3	4*
Salivation					
Slight	1	1	1	0	3
Severe	0	0	0	1	1
Tremors					
Mild	0	0	0	0	4*
Mild whole body	0	0	0	0	1

* Significantly different ($P \leq 0.05$) from the vehicle control group by the Fisher exact test

** $P \leq 0.01$

Significant differences were observed in the hematology and clinical chemistry variables (Table C2). The majority of these differences were sporadic or minimal, did not demonstrate a treatment relationship, or were inconsistent between genders and consequently were not considered to be toxicologically relevant. However, at week 13, there were very minimal, treatment-related increases in the mean cell volumes of rats. These increases in mean cell volume, which is an estimate of the average size (expressed as a volume) of a population of erythrocytes, suggest that the erythrocytes were minimally larger in the dosed animals than in the vehicle controls. Additionally, females administered 25 mg/kg or greater appeared to have minimally decreased total protein and albumin concentrations. The biologic significance of the differences in mean cell volumes and protein concentrations is unknown; because these changes were minimal and no other hematologic, clinical chemistry, and pathologic alterations occurred, the differences were not considered to be clinically significant.

Benzyltrimethylammonium chloride administration had no effect on the absolute or relative organ weights of males or females (Table D2). No chemical-related gross or microscopic lesions were observed (Tables A1 and A2). There were no differences in reproductive tissue parameters in males (Table E1). A minimal shortening of diestrus and prolongation of proestrus occurred in 25 mg/kg females; there was no alteration in the length of the estrous cycle (Table E2).

MICE

16-DAY STUDY

All male and female mice in the 250, 500, and 1,000 mg/kg groups and one 125 mg/kg female died on day 1 of the study; all other mice survived to the end of the study (Table 5). The mean body weight gains of females in the 63 and 125 mg/kg groups were significantly greater than that of the vehicle controls (Table 5). The final mean body weights of dosed males and females and mean body weight gains of dosed males were similar to those of the vehicle controls. Clinical findings occurred sporadically and were not considered to be related to chemical administration.

TABLE 5
Survival and Body Weights of Mice in the 16-Day Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride

Dose (mg/kg)	Survival ^a	Mean Body Weight ^b (g)			Final Weight Relative to Controls (%)
		Initial	Final	Change	
Male					
0	5/5	23.8 ± 0.5	26.4 ± 0.7	2.6 ± 0.3	—
63	5/5	23.8 ± 0.6	26.0 ± 0.5	2.2 ± 0.2	98
125	5/5	23.6 ± 0.4	26.1 ± 0.6	2.6 ± 0.4	99
250	0/5 ^c	23.7 ± 0.4	—	—	—
500	0/5 ^c	23.5 ± 0.5	—	—	—
1,000	0/5 ^c	23.7 ± 0.6	—	—	—
Female					
0	5/5	20.0 ± 0.4	21.2 ± 0.4	1.2 ± 0.1	—
63	5/5	19.2 ± 0.5	21.9 ± 0.5	2.7 ± 0.2**	103
125	4/5 ^c	19.3 ± 0.5	22.4 ± 0.1	2.6 ± 0.3**	105
250	0/5 ^c	19.6 ± 0.3	—	—	—
500	0/5 ^c	19.7 ± 0.3	—	—	—
1,000	0/5 ^c	19.4 ± 0.5	—	—	—

** Significantly different ($P \leq 0.01$) from the vehicle control group by Dunnett's test

^a Number of animals surviving at 16 days/number initially in group

^b Weights and weight changes are given as mean ± standard error. Subsequent calculations are based on animals surviving to the end of the study. No data were calculated for groups with 100% mortality.

^c Day of death: 1

Because of 100% mortality in the groups receiving 250 mg/kg or greater, no hematology or clinical chemistry evaluations were performed and no organ weight data were collected for these groups. For the groups with survivors, there were no treatment-related changes in hematology or clinical chemistry variables (Table C3). For 125 mg/kg females, the absolute liver weight was significantly greater and the relative lung weight was significantly less than those of the vehicle controls (Table D3). No chemical-related gross or microscopic changes were observed. Pulmonary congestion and edema were observed in some animals that died early and were interpreted to be an agonal change. Based on the 100% mortality observed at 250 mg/kg and greater, doses of 0, 12.5, 25, 50, and 100 mg/kg were selected for the 13-week gavage study in mice.

13-WEEK STUDY

One male and one female in the 100 mg/kg groups died before the end of the study; the deaths were the result of pharmacologic effects of benzyltrimethylammonium chloride on the cardiovascular system (Table 6). All other mice survived until the end of the study. Final mean body weights and body weight gains of dosed males and females were similar to those of the vehicle controls (Table 6 and Figure 2). Beginning at week 10, hyperactivity was observed in 100 mg/kg females immediately following administration of benzyltrimethylammonium chloride. However, the hyperactivity diminished within an hour after dosing. No other clinical findings were observed.

TABLE 6
Survival and Body Weights of Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride

Dose (mg/kg)	Survival ^a	Mean Body Weight ^b (g)			Final Weight Relative to Controls (%)
		Initial	Final	Change	
Male					
0	10/10	24.4 ± 0.5	34.9 ± 0.7	10.6 ± 0.5	
12.5	10/10	24.3 ± 0.5	34.9 ± 1.0	10.6 ± 0.5	100
25	10/10	24.3 ± 0.5	34.5 ± 0.6	10.1 ± 0.5	99
50	10/10	24.6 ± 0.5	34.8 ± 0.9	10.2 ± 0.5	100
100	9/10 ^c	24.4 ± 0.5	33.9 ± 0.9	9.4 ± 0.4	97
Female					
0	10/10	19.3 ± 0.4	29.1 ± 1.0	9.8 ± 0.8	
12.5	10/10	19.2 ± 0.4	29.9 ± 0.9	10.6 ± 0.7	103
25	10/10	18.4 ± 0.4	28.7 ± 0.9	10.2 ± 0.7	98
50	10/10	19.2 ± 0.6	29.2 ± 1.3	10.0 ± 0.8	100
100	9/10 ^d	18.7 ± 0.4	28.2 ± 0.9	9.3 ± 0.7	97

^a Number of animals surviving at 13 weeks/number initially in group

^b Weights and weight changes are given as mean ± standard error. Subsequent calculations are based on animals surviving to the end of the study. Differences from the vehicle control groups were not significant by Dunnett's test.

^c Week of death: 9

^d Week of death: 6

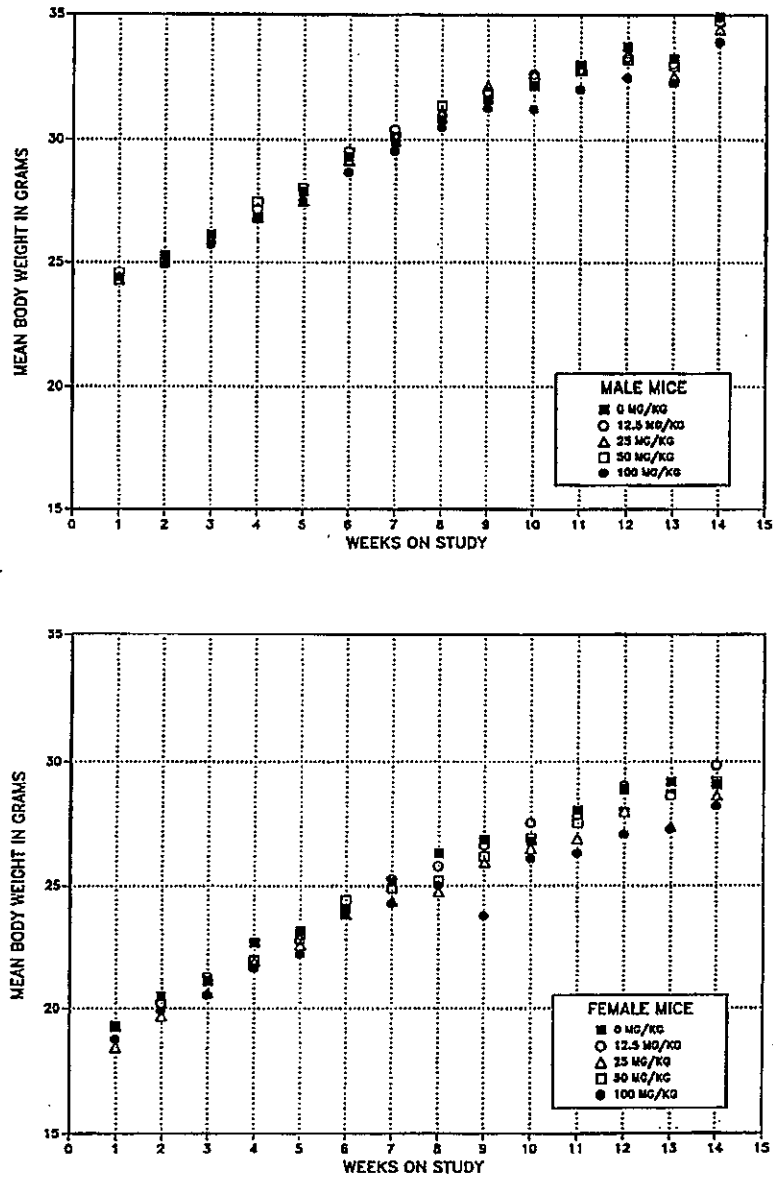


FIGURE 2
 Body Weights of Mice Administered Benzyltrimethylammonium Chloride
 by Gavage for 13 Weeks

In male mice, kidney weights were increased in the 50 mg/kg group, and the relative kidney weight was also increased in the 100 mg/kg group (Table D4). Relative heart weights were increased in the 25 mg/kg or greater males. However, no chemical-related gross or microscopic lesions were observed (Tables A3 and A4). Males administered 25 mg/kg or greater had minimally decreased total protein concentrations (Table C4). The biologic significance of the protein concentration difference was unknown; because the change was minimal and no other clinical chemistry and pathologic alterations occurred, this difference was not considered to be clinically significant. No treatment-related differences were detected in reproductive tissue evaluations or estrous cycle characterizations (Tables E3 and E4).

GENETIC TOXICOLOGY

Benzyltrimethylammonium chloride (100 to 10,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$) was not mutagenic in *Salmonella typhimurium* strain TA97, TA98, TA100, or TA1535 with or without induced rat or hamster liver S9 metabolic activation enzymes (Zeiger *et al.*, 1988; Table F1). Slight toxicity was noted at the two highest concentrations tested in all four strains. *In vivo*, benzyltrimethylammonium chloride induced a significant dose-related increase in the frequency of micronucleated normochromatic erythrocytes in the peripheral blood of male and female mice administered 12.5 to 100 mg/kg by gavage for 13 weeks (Table F2). Micronucleus analyses yielded positive trends ($P \leq 0.025$) for both the male and female data, but only the highest dose tested in males and females produced an increase in micronuclei that was significantly different from the control frequency ($P \leq 0.006$).

DISCUSSION

Benzyltrimethylammonium chloride is widely used in the chemical, textile, and rubber industries (USEPA, 1990). It was nominated for toxicity testing by the National Institute of Environmental Health Sciences because of its high production volume, potential for occupational exposure, and the paucity of toxicity information concerning the chemical.

Based on the doses at which mortality occurred in the 16-day studies, rats and mice appear to be equally sensitive to benzyltrimethylammonium chloride. On day 1 of the studies, 100% mortality occurred in 125 and 250 mg/kg male and female rats and in 250, 500, and 1,000 mg/kg male and female mice; one of five 125 mg/kg female mice died. The high rate of mortality in rats and mice in the 16-day studies combined with the absence of an identifiable target organ for benzyltrimethylammonium chloride toxicity suggests that the cause of death was the result of a pharmacologic effect. The differences in lung and liver weights in 125 mg/kg female mice in the 16-day study were not associated with gross or histologic changes and, accordingly, were not considered to be related to chemical administration. Benzyltrimethylammonium chloride mimics the action of acetylcholine by activating the muscarinic and nicotinic receptors and was shown to be a vasodepressor that could lead to total cardiovascular collapse (Hume and Holland, 1965; Hamilton and Rubinstein, 1968; Gosselin *et al.*, 1984). The cholinergic activity of benzyltrimethylammonium chloride in rats in the 16-day study was evidenced by salivation. Benzyltrimethylammonium chloride was four times more active than acetylcholine in its ability to induce salivation in dogs (Long *et al.*, 1965). However, pupillary dilation was observed in 63 mg/kg male rats but not in females and therefore was not considered to be related to chemical administration. Neither salivation nor pupillary constriction occurred in dosed mice.

The NTP also conducted 14-day dermal studies (unpublished) of benzyltrimethylammonium chloride. Male and female F344/N rats were administered 0, 11.9, 39.6, or 118.8 mg per day (equivalent to 0, 170, 340, or 680 mg/kg per day for males and 0, 260, 520, or 860 mg/kg per day for females), and B6C3F₁ mice were administered 0, 3.96, 11.9, or 39.6 mg per day (equivalent to 0, 385, 790, or 1,580 mg/kg per day for males and 0, 450, 900, or 1,800 mg/kg per day for females). Results of these dermal studies were similar to those of the 16-day gavage studies except that the animals were more sensitive to toxic effects following gavage administration. Deaths, ataxia, and tremors occurred in rats administered 118.8 mg and mice administered 39.6 mg; these doses were 1.5 to 3.5 orders of magnitude greater than the doses used in the gavage studies.

This difference in sensitivity is supported by the findings of Sanders *et al.* (1995), which showed that benzyltrimethylammonium chloride was poorly absorbed from the skin of rats and mice.

Based on the mortality in the 16-day studies, doses of 0, 12.5, 25, 50, and 100 mg/kg were administered in deionized water by gavage to rats and mice in the 13-week studies. Three female rats and one male and one female mouse died before the end of the studies. There were no significant differences in final mean body weights of dosed male or female rats or mice compared to the vehicle controls. Because the changes in kidney and heart weights observed in 50 and 100 mg/kg male mice were not associated with gross or histopathologic changes, these effects were not considered to be related to chemical administration. Clinical findings and functional observations in 100 mg/kg rats included eye, nasal, and oral discharges, lacrimation or chromodacryorrhea, salivation, tremors, pupillary constriction, and impaired coordination. Between 10 and 13 weeks of dosing, female mice displayed increased activity levels immediately following dosing at 100 mg/kg; the activity level returned to normal levels within 1 hour. The cholinergic nature of these effects suggest an acetylcholine-mimicking activity of benzyltrimethylammonium chloride (Long *et al.*, 1965; Strycker and Long, 1969).

Significant decreases in total serum protein concentrations were observed in 25 and 50 mg/kg female rats on day 3, in 25, 50, and 100 mg/kg female rats at week 13, and in 25, 50, and 100 mg/kg male mice at week 13. The biological significance of this decrease is unknown because the effect was minimal in magnitude and was not accompanied by other clinical or pathologic alterations. In addition, total serum protein concentrations of all dosed groups fell within control values reported for rats (7.52 ± 0.20 g/dL) and mice (2.73 ± 0.30 g/dL); it is therefore unlikely that the decrease was due to chemical administration (Kaneko, 1989). Similarly, the increase in the mean cell volumes was considered biologically insignificant because the effect was minimal in magnitude and was not accompanied by hematologic or pathologic alterations. In the 16-day study, edema was observed in the lung of 250 mg/kg female rats and was considered secondary to lethality induced through cholinergic stimulation. Lung edema is likely to be the result of a decreased heart rate leading to reduced blood pressure and the force of contraction prior to death. No histopathologic changes that could be attributed to benzyltrimethylammonium chloride administration were observed in rats or mice.

Benzyltrimethylammonium chloride was not mutagenic in *Salmonella typhimurium* strains TA97, TA98, TA100, and TA1535, with or without S9 metabolic activation enzymes (Zeiger *et al.*, 1988). However, it did induce significant increases in the frequency of micronucleated normochromatic erythrocytes in peripheral blood of male and female mice in the 13-week study. Elevated micronucleus frequencies were observed in male and female mice administered 50 mg/kg or greater, although statistically significant increases were seen

only at 100 mg/kg. The observation of micronucleus induction suggests that benzyltrimethylammonium chloride induced chromosomal damage in maturing erythrocytes in the form of breakage and/or mitotic disruption leading to numerical aberrations (chromosome loss). No alteration in the percentage of normochromatic erythrocytes in the blood was observed in male or female mice, indicating no overt toxicity to the bone marrow and no stimulation of erythropoiesis.

Based on the mortality observed in the 16-day and 13-week studies, rats and mice appeared to be equally sensitive to benzyltrimethylammonium chloride. The minimally toxic dose for rats and mice was estimated to be 50 mg/kg.

REFERENCES

Aldrich Catalog/Handbook of Fine Chemicals 1990-1991 (1990), p. 146. Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI.

Boorman, G.A., Montgomery, C.A., Jr., Eustis, S.L., Wolfe, M.J., McConnell, E.E., and Hardisty, J.F. (1985). Quality assurance in pathology for rodent carcinogenicity studies. In *Handbook of Carcinogen Testing* (H.A. Milman and E.K. Weisburger, Eds.), pp. 345-357. Noyes Publications, Park Ridge, NJ.

Boorman, G.A., Hickman, R.L., Davis, G.W., Rhodes, L.S., White, N.W., Griffen, T.A., Mayo, J., and Hamm, T.E., Jr. (1986). Serological titers to murine viruses in 90-day and 2-year studies. In *Complications of Viral and Mycoplasmal Infections in Rodents to Toxicology Research and Testing* (T.E. Hamm, Jr., Ed.), pp. 11-23. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, DC.

Chemical Marketing Reporter (April 11, 1983), p. 13.

Code of Federal Regulations (CFR) 21, Part 58.

Dewitt, J.B., Bellack, E., Klingensmith, C.W., Ward, J.C., and Treichler, R. (1953). Relationship Between Chemical Structure and Toxic Action on Rats. Chemical and Biological Research Center, Review No. 5, p. 39. National Research Council, Washington, DC.

Dixon, W.J., and Massey, F.J., Jr. (1951). *Introduction to Statistical Analysis*, 1st ed., pp. 145-147. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.

Dretchen, K., Diecke, F.P.J., and Long, J.P. (1971). Studies on the nonspecific blocking action of benzyltrimethylammonium bromide (BTM). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **177**, 369-376.

Dunn, O.J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* **6**, 241-252.

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.* **50**, 1096-1121.

Ellis, K.O., White, R.L., Jr., Wright, G.C., and Wessels, F.L. (1980). Synthesis and skeletal muscle relaxant activity of quaternary ammonium salts of dantrolene and clodanole. *J. Pharm. Sci.* **69**, 327-331.

Gart, J.J., Chu, K.C., and Tarone, R.E. (1979). Statistical issues in interpretation of chronic bioassay tests for carcinogenicity. *JNCI* **62**, 957-974.

Gosselin, R.E., Smith, R.P., Hodge, H.C., and Braddock, J.E. (1984). *Clinical Toxicity of Commercial Products: Acute Poisoning*, 5th ed., pp. II-278, III-63 to III-66. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.

Hamilton, J.T., and Rubinstein, H.M. (1968). Nicotinic and muscarinic activity of benzyltrimethyl-ammonium and its alpha-, beta-, and gamma-substituted pyridylmethylammonium analogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **160**, 112-123.

Hume, A.S., and Holland, W.C. (1965). Vasopressor and depressor activity of phenylalkyltrimethylammonium compounds. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **154**, 155-160.

Integrated Laboratory Systems (ILS) (1990). Micronucleus Data Management and Statistical Analysis Software, Version 1.4. ILS, P.O. Box 13501, Research Triangle Park, NC 72207.

Jonckheere, A.R. (1954). A distribution-free k -sample test against ordered alternatives. *Biometrika* **41**, 133-145.

Kaneko, J.J. (1989). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 4th ed., p. 892. Academic Press, Inc., New York.

Karsai, J., Sebestyén, E., Gaál, S., Gárdi, I., Siki, K., and Kiss, G. (1986). Plant growth regulating compositions and process for regulating plant growth. International Patent Application, Patent No. WO 86/07237.

Long, J.P., Wong, K.C., and Witt, D.L. (1965). Cholinergic and anticholinergic activity of benzyltrimethylamine and fluorobenzyl isomers. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **155**, 282-288.

MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.D. (1990). The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fundam. Appl. Toxicol.* **14**, 513-522.

Maronpot, R.R., and Boorman, G.A. (1982). Interpretation of rodent hepatocellular proliferative alterations and hepatocellular tumors in chemical safety assessment. *Toxicol. Pathol.* **10**, 71-80.

Moore, S.B., Diehl, R.A., Barnhardt, J.M., and Avery, G.B. (1987). Aquatic toxicities of textile surfactants. *Text. Chemist Colorist* **19**, 29-32.

Morrison, D.F. (1976). *Multivariate Statistical Methods*, 2nd ed., pp. 170-179. McGraw-Hill Book Company, New York.

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) (1990). National Occupational Exposure Survey (1981-1983), unpublished provisional data as of July 1, 1990. NIOSH, Cincinnati, OH.

National Toxicology Program (NTP) (1991). Technical Protocol for Sperm Morphology and Vaginal Cytology Evaluations in Toxicity Testing for Rats and Mice, 10/31/82 version (updated May 1991). Research Triangle Park, NC.

Neef, C., Oosting, R., and Meijer, D.K.F. (1984). Structure-pharmacokinetics relationship of quaternary ammonium compounds. Elimination and distribution characteristics. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **328**, 103-110.

Rao, G.N., Haseman, J.K., and Edmondson, J. (1989a). Influence of viral infections on body weight, survival, and tumor prevalence in Fischer 344/NCr rats on two-year studies. *Lab. Anim. Sci.* **39**, 389-393.

Rao, G.N., Piegorsch, W.W., Crawford, D.D., Edmondson, J., and Haseman, J.K. (1989b). Influence of viral infections on body weight, survival, and tumor prevalence of B6C3F₁ (C57BL/6N × C3H/HeN) mice in carcinogenicity studies. *Fundam. Appl. Toxicol.* **13**, 156-164.

Sanders, M., Griffin, R.J., Burka, L.T., and Matthews, H.B. (1995). Toxicokinetics of the cholinomimetic compound benzyltrimethylammonium chloride in the male rat and mouse. *Xenobiotica* **25**, 303-313.

Sax, N.I., and Lewis, R.J., Sr. (1987). *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, 11th ed., p. 138. Van Nostrand Reinhold, New York.

Sax, N.I., and Lewis, R.J., Sr. (1989). *Dangerous Properties of Industrial Materials*, 7th ed., p. 426. Van Nostrand Reinhold, New York.

Shirley, E. (1977). A non-parametric equivalent of Williams' test for contrasting increasing dose levels of a treatment. *Biometrics* **33**, 386-389.

The Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data (1988). 2nd ed. (R.E. Lenga, Ed.). Sigma-Aldrich Corp., Milwaukee, WI.

Strycker, S.J., and Long, J.P. (1969). Studies on the muscarinic and antimuscarinic activity of benzyltrimethylammonium bromide (BTM). *J. Pharm. Sci.* **58**, 671-675.

United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1990). U.S. Environmental Protection Agency, Computer Printout (TSCAPP): 1983 Production Statistics for Chemicals in the Non-confidential TSCA Chemical Substances Inventory. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.

United States International Trade Commission (USITC) (1986). Synthetic Organic Chemicals, United States Production and Sales, 1986, pp. 145, 167, 177-178. U.S. Publication No. 2009. Government Printing Office, Washington, DC.

United States International Trade Commission (USITC) (1987). Synthetic Organic Chemicals, United States Production and Sales, 1987, pp. 3-4, 12-6. Publication No. 2118. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.

United States International Trade Commission (USITC) (1989). Synthetic Organic Chemicals, United States Production and Sales, 1988, pp. 12-6, 12-27, A-5, A-14 to A-18. Publication No. 2219. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.

Weast, R.C., Ed. (1989). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (1988-1989), 69th ed., p. C-150. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.

Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., and Mortelmans, K. (1988). *Salmonella* mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 11 (Suppl. 12), 1-158.

A-10

Benzyltrimethylammonium Chloride, NTP TOX 57

APPENDIX A
SUMMARY OF NONNEOPLASTIC LESIONS
IN RATS AND MICE

TABLE A1	Summary of the Incidence of Nonneoplastic Lesions in Male Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	A-2
TABLE A2	Summary of the Incidence of Nonneoplastic Lesions in Female Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	A-4
TABLE A3	Summary of the Incidence of Nonneoplastic Lesions in Male Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	A-6
TABLE A4	Summary of the Incidence of Nonneoplastic Lesions in Female Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	A-8

TABLE A1
Summary of the Incidence of Nonneoplastic Lesions in Male Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Disposition Summary					
Animals initially in study	10	10	10	10	10
Survivors					
Terminal sacrifice	10	10	10	10	10
Animals examined microscopically	10	2	1	10	10
Alimentary System					
Liver	(10)	(2)			(10)
Inflammation, focal Hepatocyte, centrilobular, vacuolization cytoplasmic	4 (40%)				5 (50%) 1 (10%)
Cardiovascular System					
Heart	(10)				(10)
Inflammation, focal	8 (80%)				5 (50%)
Endocrine System					
Pituitary gland	(10)				(10)
Cyst	1 (10%)				1 (10%)
Thyroid gland	(10)				(10)
Follicle, cyst	2 (20%)				1 (10%)
General Body System					
None					
Genital System					
Epididymis	(10)		(1)		(10)
Inflammation, focal, granulomatous			1 (100%)		
Prostate	(10)				(10)
Infiltration cellular, focal, lymphocyte Inflammation	1 (10%)				1 (10%)
Testes	(10)		(1)		(10)
Atrophy			1 (100%)		
Hematopoietic System					
Spleen	(10)				(10)
Hematopoietic cell proliferation	3 (30%)				4 (40%)
Integumentary System					
None					

TABLE A1
Summary of the Incidence of Nonneoplastic Lesions in Male Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Musculoskeletal System					
None					
Nervous System					
None					
Respiratory System					
Lung	(10)			(10)	(10)
Inflammation, focal	6 (60%)			1 (10%)	5 (50%)
Nose	(10)				(10)
Inflammation	2 (20%)				
Special Senses System					
None					
Urinary System					
Kidney	(10)		(1)		(10)
Renal tubule, hemorrhage, focal	1 (10%)				

^a Number of animals examined microscopically at the site and the number of animals with lesion

TABLE A2
Summary of the Incidence of Nonneoplastic Lesions in Female Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Disposition Summary					
Animals initially in study	10	10	10	10	10
Early death					
Accidental death			1		
Natural deaths					2
Survivors					
Died last week of study				1	
Terminal sacrifice	10	10	9	9	8
Animals examined microscopically	10	3	2	10	10
Alimentary System					
Liver	(10)	(1)	(1)		(10)
Inflammation, focal	5 (50%)				4 (40%)
Hepatocyte, centrilobular, vacuolization cytoplasmic			1 (100%)		
Mesentery	(1)		(1)		
Fat, necrosis	1 (100%)		1 (100%)		
Pancreas	(10)		(1)		(10)
Acinus, atrophy					1 (10%)
Acinus, degeneration, focal	1 (10%)				
Cardiovascular System					
Heart	(10)		(1)		(10)
Inflammation, focal	5 (50%)		1 (100%)		4 (40%)
Endocrine System					
Pituitary gland	(10)				(10)
Pars distalis, cyst					1 (10%)
Thyroid gland	(10)		(1)		(10)
Follicle, cyst	1 (10%)				
General Body System					
None					
Genital System					
Uterus	(10)	(2)	(1)	(1)	(10)
Bilateral, cyst		2 (100%)		1 (100%)	
Bilateral, dilatation	2 (20%)				2 (20%)
Hematopoietic System					
Spleen	(10)		(1)		(10)
Hematopoietic cell proliferation	1 (10%)		1 (100%)		

TABLE A2
Summary of the Incidence of Nonneoplastic Lesions in Female Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Integumentary System					
None					
Musculoskeletal System					
None					
Nervous System					
None					
Respiratory System					
Lung	(10)		(1)	(10)	(10)
Congestion					1 (10%)
Inflammation, focal	3 (30%)		1 (100%)	3 (30%)	6 (60%)
Nose	(10)				(10)
Inflammation, chronic active	1 (10%)				
Special Senses System					
None					
Urinary System					
None					

^a Number of animals examined microscopically at the site and the number of animals with lesion

TABLE A3
Summary of the Incidence of Nonneoplastic Lesions in Male Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Disposition Summary					
Animals initially in study	10	10	10	10	10
Early death					
Natural death					1
Survivors					
Died last week of study				1	
Terminal sacrifice	10	10	10	9	9
Animals examined microscopically	10				10
Alimentary System					
Liver	(10)				(10)
Inflammation, chronic, focal Hepatocyte, centrilobular, hypertrophy					1 (10%)
Salivary glands	3 (30%)				3 (30%)
Infiltration cellular, focal, lymphocyte	(10)				(10)
	1 (10%)				
Cardiovascular System					
None					
Endocrine System					
Adrenal cortex	(10)				(10)
Capsule, hyperplasia, focal					1 (10%)
General Body System					
None					
Genital System					
Prostate	(10)				(10)
Infiltration cellular, lymphocyte	1 (10%)				
Hematopoietic System					
Spleen	(10)				(10)
Hematopoietic cell proliferation	1 (10%)				1 (10%)
Lymphoid follicle, hyperplasia					2 (20%)
Integumentary System					
None					
Musculoskeletal System					
None					

TABLE A3
Summary of the Incidence of Nonneoplastic Lesions in Male Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Nervous System None					
Respiratory System None					
Special Senses System None					
Urinary System None					

^a Number of animals examined microscopically at the site and the number of animals with lesion

TABLE A4
Summary of the Incidence of Nonneoplastic Lesions in Female Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Disposition Summary					
Animals initially in study	10	10	10	10	10
Early death					
Natural death					1
Survivors					
Terminal sacrifice	10	10	10	10	9
Animals examined microscopically	10				10
Alimentary System					
Liver	(10)				(10)
Inflammation, chronic, focal	1 (10%)				
Necrosis, focal	2 (20%)				1 (10%)
Hepatocyte, centrilobular, hypertrophy	3 (30%)				3 (30%)
Cardiovascular System					
None					
Endocrine System					
Adrenal cortex	(10)				(10)
Bilateral, capsule, hyperplasia, focal	5 (50%)				5 (50%)
Capsule, hyperplasia, focal	1 (10%)				
Thyroid gland	(10)				(10)
Ultimobranchial cyst					1 (10%)
General Body System					
None					
Genital System					
Ovary	(10)				(10)
Hemorrhage					1 (10%)
Uterus	(10)				(10)
Endometrium, hyperplasia, cystic	3 (30%)				
Hematopoietic System					
Lymph node, mandibular	(10)				(10)
Hemorrhage					1 (10%)
Hyperplasia, lymphoid	1 (10%)				
Lymph node, mesenteric	(10)				(10)
Hyperplasia, lymphoid	1 (10%)				
Spleen	(10)				(10)
Hematopoietic cell proliferation	1 (10%)				3 (30%)

TABLE A4
Summary of the Incidence of Nonneoplastic Lesions in Female Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Integumentary System					
None					
Musculoskeletal System					
None					
Nervous System					
None					
Respiratory System					
Lung		(10)			(10)
Interstitial, inflammation, chronic		1 (10%)			2 (20%)
Nose		(10)			(10)
Olfactory epithelium, cytoplasmic alteration					1 (10%)
Special Senses System					
None					
Urinary System					
Urinary bladder		(10)			(10)
Infiltration cellular, lymphocyte					1 (10%)

^a Number of animals examined microscopically at the site and the number of animals with lesion

APPENDIX C

HEMATOLOGY AND CLINICAL CHEMISTRY RESULTS

TABLE C1	Hematology and Clinical Chemistry Data for Rats in the 16-Day Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	C-2
TABLE C2	Hematology and Clinical Chemistry Data for Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	C-4
TABLE C3	Hematology and Clinical Chemistry Data for Mice in the 16-Day Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	C-10
TABLE C4	Clinical Chemistry Data for Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	C-12

TABLE C1
Hematology and Clinical Chemistry Data for Rats in the 16-Day Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	16 mg/kg	32 mg/kg	63 mg/kg
Male				
n	5	5	5	5
Hematology				
Automated hematocrit (%)	40.4 ± 0.6	40.3 ± 0.6	40.7 ± 1.0	40.3 ± 0.4
Manual hematocrit (%)	45.4 ± 0.7	45.8 ± 0.7	45.8 ± 1.2	45.4 ± 0.5
Hemoglobin (g/dL)	15.0 ± 0.3	15.1 ± 0.1	15.1 ± 0.3	14.8 ± 0.1
Erythrocytes (10 ⁶ /μL)	7.06 ± 0.10	7.08 ± 0.12	7.13 ± 0.20	6.99 ± 0.11
Reticulocytes (10 ⁶ /μL)	0.29 ± 0.02	0.24 ± 0.06	0.25 ± 0.04	0.46 ± 0.13
Nucleated erythrocytes/100 leukocytes	0.40 ± 0.25	0.40 ± 0.25	0.20 ± 0.20	0.40 ± 0.25
Mean cell volume (fL)	57.1 ± 0.2	56.9 ± 0.3	57.1 ± 0.3	57.6 ± 0.5
Mean cell hemoglobin (pg)	21.2 ± 0.1	21.3 ± 0.3	21.3 ± 0.2	21.3 ± 0.2
Mean cell hemoglobin concentration (g/dL)	37.1 ± 0.2	37.4 ± 0.5	37.3 ± 0.3	36.8 ± 0.2
Platelets (10 ³ /μL)	838.4 ± 15.1	820.0 ± 34.2	857.4 ± 21.1	774.0 ± 9.4
Leukocytes (10 ³ /μL)	9.10 ± 0.32	8.42 ± 0.18	8.88 ± 0.55	9.06 ± 0.40
Segmented neutrophils (10 ³ /μL)	0.86 ± 0.16	0.82 ± 0.14	0.82 ± 0.14	1.00 ± 0.14
Lymphocytes (10 ³ /μL)	8.06 ± 0.31	7.38 ± 0.26	7.91 ± 0.35	7.63 ± 0.26
Monocytes (10 ³ /μL)	0.07 ± 0.05	0.20 ± 0.09	0.10 ± 0.06	0.37 ± 0.12
Eosinophils (10 ³ /μL)	0.12 ± 0.06	0.02 ± 0.02	0.06 ± 0.04	0.06 ± 0.04
Clinical Chemistry				
Urea nitrogen (mg/dL)	24.0 ± 0.5	25.8 ± 0.4	23.0 ± 0.7	25.0 ± 0.5
Creatinine (mg/dL)	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00	0.70 ± 0.00
Total protein (g/dL)	6.6 ± 0.2	6.3 ± 0.1	6.6 ± 0.1	6.2 ± 0.1
Albumin (g/dL)	4.8 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.6 ± 0.1
Alanine aminotransferase (IU/L)	48 ± 1	56 ± 4	43 ± 1	43 ± 4
Alkaline phosphatase (IU/L)	545 ± 15	553 ± 13	566 ± 16	559 ± 13
Creatine kinase (IU/L)	440 ± 81	542 ± 147	505 ± 81	444 ± 79
Sorbitol dehydrogenase (IU/L)	33 ± 2	32 ± 3	31 ± 2	32 ± 2
Serum cholinesterase (IU/L)	676.8 ± 28.8	753.2 ± 13.5	738.4 ± 23.4	789.0 ± 39.7*
Erythrocyte cholinesterase (IU/L)	530.2 ± 143.6	726.4 ± 113.2	694.4 ± 121.9	726.6 ± 71.4
Bile acids (μmol/L)	28.3 ± 4.5	28.6 ± 4.0	39.9 ± 7.2	34.5 ± 5.1

TABLE CI
Hematology and Clinical Chemistry Data for Rats in the 16-Day Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	16 mg/kg	32 mg/kg	63 mg/kg
Female				
n	5	5	5	5
Hematology				
Automated hematocrit (%)	44.5 ± 0.4	42.6 ± 0.8	42.5 ± 0.4	44.2 ± 1.1
Manual hematocrit (%)	46.4 ± 0.4	45.0 ± 0.5	44.8 ± 0.4	46.2 ± 0.9
Hemoglobin (g/dL)	15.6 ± 0.1	15.2 ± 0.2	15.0 ± 0.1	15.7 ± 0.3
Erythrocytes (10 ⁶ /μL)	7.59 ± 0.08	7.24 ± 0.13	7.20 ± 0.06	7.58 ± 0.20
Reticulocytes (10 ⁶ /μL)	0.20 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.23 ± 0.03
Nucleated erythrocytes/100 leukocytes	0.00 ± 0.00	0.80 ± 0.37	0.20 ± 0.20	0.00 ± 0.00
Mean cell volume (fL)	58.6 ± 0.2	58.9 ± 0.1	59.1 ± 0.2	58.3 ± 0.3
Mean cell hemoglobin (pg)	20.6 ± 0.2	21.0 ± 0.2	20.8 ± 0.1	20.7 ± 0.2
Mean cell hemoglobin concentration (g/dL)	35.2 ± 0.3	35.7 ± 0.4	35.2 ± 0.3	35.5 ± 0.2
Platelets (10 ³ /μL)	714.8 ± 13.5	755.2 ± 23.9	763.2 ± 14.2	710.0 ± 23.9
Leukocytes (10 ³ /μL)	9.28 ± 0.50	9.46 ± 0.19	9.38 ± 0.93	8.24 ± 0.30
Segmented neutrophils (10 ³ /μL)	1.30 ± 0.26	1.21 ± 0.22	1.17 ± 0.23	0.77 ± 0.18
Lymphocytes (10 ³ /μL)	7.72 ± 0.37	7.89 ± 0.27	8.05 ± 0.84	7.32 ± 0.44
Monocytes (10 ³ /μL)	0.19 ± 0.05	0.27 ± 0.05	0.13 ± 0.04	0.09 ± 0.05
Eosinophils (10 ³ /μL)	0.07 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.02
Clinical Chemistry				
Urea nitrogen (mg/dL)	23.8 ± 0.4	23.6 ± 0.2	22.6 ± 1.3	22.4 ± 0.8
Creatinine (mg/dL)	0.70 ± 0.00	0.68 ± 0.02	0.66 ± 0.02	0.66 ± 0.04
Total protein (g/dL)	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	5.8 ± 0.1	6.0 ± 0.1
Albumin (g/dL)	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1
Alanine aminotransferase (IU/L)	40 ± 2	37 ± 1	37 ± 2	37 ± 1
Alkaline phosphatase (IU/L)	505 ± 8	490 ± 18	501 ± 31	518 ± 9
Creatine kinase (IU/L)	432 ± 61	272 ± 32	421 ± 70	378 ± 86
Sorbitol dehydrogenase (IU/L)	30 ± 1	28 ± 0	27 ± 2	26 ± 1
Serum cholinesterase (IU/L)	2,364.0 ± 120.6	2,577.8 ± 189.9	2,061.0 ± 123.8	2,138.4 ± 223.7
Erythrocyte cholinesterase (IU/L)	673.8 ± 175.9	400.6 ± 164.4	1,185.8 ± 193.3	819.2 ± 204.7
Bile acids (μmol/L)	29.2 ± 2.9	31.4 ± 5.2	28.5 ± 5.0	28.9 ± 6.2

* Significantly different (P<0.05) from the vehicle control group by Dunnett's test

^a Mean ± standard error. Statistical tests were performed on unrounded data. No data are available for the 125 and 250 mg/kg groups due to 100% mortality.

TABLE C2
Hematology and Clinical Chemistry Data for Rats in the 13-Week Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Male					
n					
Day 3	10	10	10	10	10
Day 21	10	10	10	10	10
Week 13	10	9	10	10	10
Hematology					
Automated hematocrit (%)					
Day 3	38.4 ± 0.5	39.0 ± 0.6	37.9 ± 0.4	38.7 ± 0.4	39.1 ± 0.7
Day 21	44.3 ± 0.4	44.3 ± 0.4	44.1 ± 0.3	44.8 ± 0.5	43.5 ± 0.7
Week 13	46.8 ± 0.4	48.5 ± 0.3*	47.9 ± 0.5	46.5 ± 0.5	46.5 ± 0.4
Manual hematocrit (%)					
Day 3	42.2 ± 0.7	41.5 ± 0.7	41.2 ± 0.4	43.1 ± 0.4	42.5 ± 0.8
Day 21	47.7 ± 0.5	47.5 ± 0.7	47.0 ± 0.5	48.0 ± 0.6	47.6 ± 0.6
Week 13	48.9 ± 0.4	50.0 ± 0.4	49.5 ± 0.4	48.7 ± 0.5	48.9 ± 0.4
Hemoglobin (g/dL)					
Day 3	13.7 ± 0.2	13.8 ± 0.2	13.5 ± 0.1	13.8 ± 0.1	13.8 ± 0.2
Day 21	15.4 ± 0.1	15.6 ± 0.1	15.5 ± 0.1	15.6 ± 0.1	15.4 ± 0.2
Week 13	15.8 ± 0.1	15.9 ± 0.1	16.0 ± 0.1	15.8 ± 0.2	15.8 ± 0.1
Erythrocytes (10⁶/μL)					
Day 3	6.27 ± 0.07	6.33 ± 0.09	6.18 ± 0.06	6.28 ± 0.05	6.36 ± 0.12
Day 21	7.25 ± 0.08	7.31 ± 0.06	7.34 ± 0.05	7.28 ± 0.08	7.09 ± 0.10
Week 13	8.96 ± 0.07	9.08 ± 0.06	9.03 ± 0.09	8.71 ± 0.09	8.67 ± 0.06*
Reticulocytes (10⁶/μL)					
Day 3	0.53 ± 0.03	0.58 ± 0.02	0.54 ± 0.04	0.50 ± 0.02	0.55 ± 0.03
Day 21	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.20 ± 0.02*	0.20 ± 0.01**	0.21 ± 0.01**
Week 13	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01
Nucleated erythrocytes (10³/μL)					
Day 3	0.17 ± 0.05	0.13 ± 0.06	0.12 ± 0.05	0.16 ± 0.02	0.13 ± 0.03
Day 21	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.07 ± 0.03
Week 13	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.00 ± 0.00 ^b	0.02 ± 0.02 ^b	0.00 ± 0.00
Mean cell volume (fL)					
Day 3	61.2 ± 0.3	61.5 ± 0.3	61.3 ± 0.3	61.6 ± 0.2	61.4 ± 0.2
Day 21	61.0 ± 0.4	60.7 ± 0.4	60.0 ± 0.3	61.6 ± 0.4	61.3 ± 0.3
Week 13	52.2 ± 0.2	53.4 ± 0.1**	53.0 ± 0.2**	53.4 ± 0.2**	53.6 ± 0.1**
Mean cell hemoglobin (pg)					
Day 3	21.8 ± 0.1	21.8 ± 0.2	21.9 ± 0.1	22.0 ± 0.1	21.7 ± 0.1
Day 21	21.2 ± 0.2	21.3 ± 0.1	21.1 ± 0.1	21.4 ± 0.1	21.7 ± 0.1
Week 13	17.6 ± 0.1	17.5 ± 0.1	17.7 ± 0.1	18.1 ± 0.1**	18.2 ± 0.1**
Mean cell hemoglobin concentration (g/dL)					
Day 3	35.6 ± 0.1	35.5 ± 0.2	35.7 ± 0.2	35.7 ± 0.2	35.4 ± 0.2
Day 21	34.8 ± 0.3	35.1 ± 0.2	35.2 ± 0.2	34.8 ± 0.3	35.4 ± 0.2
Week 13	33.7 ± 0.2	32.8 ± 0.2*	33.4 ± 0.3	33.9 ± 0.2	34.0 ± 0.2
Platelets (10³/μL)					
Day 3	1,091.1 ± 30.5	1,086.9 ± 25.3	1,080.6 ± 14.8	1,025.7 ± 11.2	1,069.5 ± 26.3
Day 21	793.1 ± 19.9	807.4 ± 8.6	820.8 ± 10.4	824.7 ± 20.0	838.7 ± 28.7
Week 13	649.8 ± 10.3	640.6 ± 9.7	646.3 ± 10.8	641.4 ± 6.6	653.7 ± 13.7
Leukocytes (10³/μL)					
Day 3	8.09 ± 0.28	8.49 ± 0.24	7.70 ± 0.24	7.89 ± 0.22	8.91 ± 0.54
Day 21	11.03 ± 0.41	12.07 ± 0.30	10.78 ± 0.45	10.78 ± 0.25	10.90 ± 0.59
Week 13	11.96 ± 0.53	12.60 ± 0.61	11.90 ± 0.38	12.86 ± 0.60	11.67 ± 0.36

TABLE C2
Hematology and Clinical Chemistry Data for Rats in the 13-Week Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Male (continued)					
^a					
Day 3	10	10	10	10	10
Day 21	10	10	10	10	10
Week 13	10	9	10	10	10
Hematology (continued)					
Segmented neutrophils (10³/μL)					
Day 3	1.28 ± 0.21	1.14 ± 0.07	0.96 ± 0.11	0.10 ± 0.11	1.14 ± 0.08
Day 21	1.17 ± 0.07	1.37 ± 0.19	1.18 ± 0.14	1.35 ± 0.12	1.15 ± 0.14
Week 13	2.13 ± 0.17	1.59 ± 0.11*	1.56 ± 0.16 ^{a,b}	1.54 ± 0.20 ^{a,b}	1.25 ± 0.18**
Lymphocytes (10³/μL)					
Day 3	6.69 ± 0.32	7.18 ± 0.19	6.64 ± 0.27	6.72 ± 0.18	7.57 ± 0.49
Day 21	9.55 ± 0.43	10.16 ± 0.25	9.17 ± 0.41	9.01 ± 0.27	9.49 ± 0.47
Week 13	9.06 ± 0.43	10.35 ± 0.65	9.82 ± 0.42 ^b	10.29 ± 0.61 ^b	9.97 ± 0.50
Atypical lymphocytes (10³/μL)					
Day 21	0.04 ± 0.03	0.06 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.00 ± 0.00
Week 13	0.22 ± 0.09	0.12 ± 0.05	0.18 ± 0.06 ^b	0.19 ± 0.09 ^b	0.16 ± 0.07
Monocytes (10³/μL)					
Day 3	0.09 ± 0.04	0.14 ± 0.06	0.08 ± 0.02	0.14 ± 0.05	0.19 ± 0.04
Day 21	0.22 ± 0.07	0.44 ± 0.09	0.37 ± 0.09	0.36 ± 0.07	0.24 ± 0.10
Week 13	0.46 ± 0.12	0.35 ± 0.07	0.18 ± 0.05 ^b	0.53 ± 0.10 ^b	0.21 ± 0.04
Eosinophils (10³/μL)					
Day 3	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01
Day 21	0.05 ± 0.04	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.01 ± 0.01
Week 13	0.08 ± 0.03	0.16 ± 0.04	0.12 ± 0.04 ^b	0.11 ± 0.04 ^b	0.07 ± 0.03
Clinical Chemistry					
Urea nitrogen (mg/dL)					
Day 3	20.1 ± 0.6	19.3 ± 0.4	19.4 ± 0.3	19.8 ± 0.3	19.2 ± 0.3
Day 21	22.4 ± 1.5	21.4 ± 0.5	20.9 ± 0.3	23.4 ± 1.8	21.8 ± 0.5
Week 13	23.5 ± 0.5	24.2 ± 1.3	23.6 ± 0.6	22.6 ± 0.3	22.3 ± 0.6
Creatinine (mg/dL)					
Day 3	0.58 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.56 ± 0.02	0.57 ± 0.02
Day 21	0.68 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.68 ± 0.01	0.67 ± 0.02	0.67 ± 0.02
Week 13	0.66 ± 0.02	0.69 ± 0.01	0.70 ± 0.02	0.68 ± 0.01	0.67 ± 0.02
Total protein (g/dL)					
Day 3	5.7 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.7 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.7 ± 0.1
Day 21	6.2 ± 0.1	6.2 ± 0.1	6.2 ± 0.1	6.2 ± 0.1	6.2 ± 0.0
Week 13	6.8 ± 0.1	6.8 ± 0.1	7.0 ± 0.1	6.7 ± 0.1	6.7 ± 0.1
Albumin (g/dL)					
Day 3	4.3 ± 0.0	4.4 ± 0.0	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.1
Day 21	4.6 ± 0.1	4.5 ± 0.0	4.5 ± 0.0	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1
Week 13	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.0	4.9 ± 0.0	4.9 ± 0.0
Alanine aminotransferase (IU/L)					
Day 3	42 ± 1	41 ± 2	41 ± 2	43 ± 2	42 ± 1
Day 21	47 ± 1	50 ± 1	46 ± 1	47 ± 1	46 ± 1
Week 13	67 ± 4	60 ± 4	69 ± 5	67 ± 5	56 ± 2

TABLE C2
Hematology and Clinical Chemistry Data for Rats in the 13-Week Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Male (continued)					
n					
Day 3	10	10	10	10	10
Day 21	10	10	10	10	10
Week 13	10	9	10	10	10
Clinical Chemistry (continued)					
Alkaline phosphatase (IU/L)					
Day 3	708 ± 12	737 ± 17	730 ± 12	722 ± 15	700 ± 17
Day 21	533 ± 9	562 ± 17	543 ± 8	532 ± 10	544 ± 10
Week 13	270 ± 6	271 ± 8	276 ± 5	245 ± 5*	227 ± 7**
Creatine kinase (IU/L)					
Day 3	443 ± 47	577 ± 64	529 ± 38	429 ± 35	463 ± 31
Day 21	432 ± 31	457 ± 34	399 ± 20	467 ± 47	443 ± 47
Week 13	226 ± 23	255 ± 20	244 ± 14	256 ± 21	256 ± 30
Sorbitol dehydrogenase (IU/L)					
Day 3	16 ± 1	14 ± 2	15 ± 1	16 ± 1	16 ± 1
Day 21	19 ± 1	19 ± 1	20 ± 1	17 ± 1	20 ± 1
Week 13	25 ± 2	22 ± 2	24 ± 1	22 ± 1	19 ± 1**
Serum cholinesterase (IU/L)					
Day 3	859.6 ± 15.2	851.2 ± 17.9	853.5 ± 15.0	846.4 ± 14.4	904.1 ± 19.4
Day 21	692.9 ± 13.4	719.5 ± 11.1	712.4 ± 11.8	745.0 ± 32.0	777.3 ± 18.7**
Week 13	741.9 ± 20.7	760.0 ± 13.4	792.0 ± 25.2	792.5 ± 23.7	753.6 ± 16.3
Bile acids (μmol/L)					
Day 3	28.1 ± 4.2	18.0 ± 1.3	17.6 ± 1.3	23.3 ± 2.3	20.9 ± 1.6
Day 21	28.4 ± 2.9	15.6 ± 1.1*	18.6 ± 2.3	22.0 ± 2.5	26.8 ± 3.6
Week 13	19.4 ± 5.6	16.3 ± 2.7	17.3 ± 3.7	13.7 ± 0.8	17.6 ± 1.7
Female					
n					
Day 3	10	10	10	10	10
Day 21	10	10	10	10	10
Week 13	10	10	9	10	8
Hematology					
Automated hematocrit (%)					
Day 3	42.9 ± 0.4	41.7 ± 0.5	41.9 ± 0.5	40.9 ± 0.5*	42.7 ± 0.4
Day 21	45.0 ± 0.4	45.2 ± 0.6	46.1 ± 0.3	45.0 ± 0.3	45.7 ± 0.4
Week 13	45.2 ± 0.4	46.8 ± 0.3*	46.2 ± 0.4	46.4 ± 0.3	44.8 ± 0.3
Manual hematocrit (%)					
Day 3	43.9 ± 0.4	42.5 ± 0.4	43.0 ± 0.4	42.9 ± 0.4	43.9 ± 0.5
Day 21	48.6 ± 0.4	48.1 ± 0.9	49.4 ± 0.5	48.1 ± 0.6	49.7 ± 0.4
Week 13	46.1 ± 0.3	47.2 ± 0.4	46.7 ± 0.3	47.0 ± 0.4	45.8 ± 0.4
Hemoglobin (g/dL)					
Day 3	14.7 ± 0.1	14.2 ± 0.1	14.3 ± 0.2	14.1 ± 0.2*	14.7 ± 0.1
Day 21	15.7 ± 0.1	15.7 ± 0.2	16.0 ± 0.1	15.7 ± 0.1	16.0 ± 0.1
Week 13	15.3 ± 0.1	15.7 ± 0.1*	15.5 ± 0.1	15.5 ± 0.1	15.1 ± 0.1

TABLE C2
Hematology and Clinical Chemistry Data for Rats in the 13-Week Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Female (continued)					
^a					
Day 3	10	10	10	10	10
Day 21	10	10	10	10	10
Week 13	10	10	9	10	8
Hematology (continued)					
Erythrocytes ($10^6/\mu\text{L}$)					
Day 3	6.97 ± 0.08	6.74 ± 0.06	6.78 ± 0.10	6.61 ± 0.10*	6.91 ± 0.07
Day 21	7.15 ± 0.07	7.19 ± 0.12	7.31 ± 0.05	7.10 ± 0.07	7.31 ± 0.06
Week 13	7.88 ± 0.07	8.11 ± 0.05	7.97 ± 0.07	8.00 ± 0.06	7.70 ± 0.05
Reticulocytes ($10^6/\mu\text{L}$)					
Day 3	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.30 ± 0.02
Day 21	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Week 13	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Nucleated erythrocytes ($10^3/\mu\text{L}$)					
Day 3	0.13 ± 0.04	0.05 ± 0.03	0.08 ± 0.04	0.12 ± 0.04	0.06 ± 0.02
Day 21	0.06 ± 0.02	0.00 ± 0.00*	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.01 ± 0.01
Week 13	0.04 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Mean cell volume (fL)					
Day 3	61.6 ± 0.1	61.8 ± 0.2	61.8 ± 0.3	61.9 ± 0.3	61.8 ± 0.3
Day 21	63.0 ± 0.2	62.9 ± 0.3	63.0 ± 0.3	63.4 ± 0.3	62.6 ± 0.3
Week 13	57.4 ± 0.1	57.7 ± 0.1	57.9 ± 0.1**	57.9 ± 0.1**	58.2 ± 0.2**
Mean cell hemoglobin (pg)					
Day 3	21.1 ± 0.1	21.1 ± 0.1	21.1 ± 0.1	21.4 ± 0.2	21.3 ± 0.1
Day 21	21.9 ± 0.1	21.9 ± 0.2	21.9 ± 0.1	22.1 ± 0.2	21.9 ± 0.1
Week 13	19.4 ± 0.1	19.4 ± 0.1	19.4 ± 0.1	19.4 ± 0.1	19.6 ± 0.1
Mean cell hemoglobin concentration (g/dL)					
Day 3	34.2 ± 0.1	34.2 ± 0.3	34.1 ± 0.2	34.5 ± 0.2	34.4 ± 0.2
Day 21	34.9 ± 0.1	34.8 ± 0.2	34.8 ± 0.1	34.9 ± 0.3	35.1 ± 0.2
Week 13	33.9 ± 0.1	33.7 ± 0.2	33.5 ± 0.2	33.4 ± 0.2	33.6 ± 0.2
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)					
Day 3	1,010.4 ± 33.0	1,056.0 ± 14.6	1,045.4 ± 20.1	1,016.0 ± 20.9	980.5 ± 24.8
Day 21	693.6 ± 15.7	696.2 ± 17.9	709.2 ± 16.2	723.9 ± 20.5	665.5 ± 12.8
Week 13	649.3 ± 13.8	653.2 ± 11.5	648.7 ± 20.6	708.8 ± 35.8	641.0 ± 16.4
Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$)					
Day 3	9.52 ± 0.28	9.39 ± 0.28	9.18 ± 0.26	9.24 ± 0.41	9.77 ± 0.33
Day 21	10.73 ± 0.48	10.20 ± 0.71	10.72 ± 0.58	9.71 ± 0.48	10.51 ± 0.36
Week 13	10.38 ± 0.32	9.85 ± 0.60	9.84 ± 0.42	10.71 ± 0.52	10.51 ± 0.63
Segmented neutrophils ($10^3/\mu\text{L}$)					
Day 3	1.08 ± 0.04	1.21 ± 0.11	1.23 ± 0.12	1.21 ± 0.08	1.10 ± 0.15
Day 21	1.06 ± 0.09	1.19 ± 0.15	1.02 ± 0.07	0.98 ± 0.11	1.06 ± 0.09
Week 13	1.30 ± 0.17	0.85 ± 0.11	1.72 ± 0.23	1.13 ± 0.18	1.05 ± 0.20
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)					
Day 3	8.11 ± 0.29	7.71 ± 0.24	7.51 ± 0.29	7.53 ± 0.41	8.26 ± 0.23
Day 21	9.42 ± 0.45	8.79 ± 0.58	9.46 ± 0.61	8.57 ± 0.48	9.33 ± 0.41
Week 13	8.53 ± 0.34	8.45 ± 0.50	7.48 ± 0.41	8.84 ± 0.38	8.93 ± 0.61
Atypical lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)					
Day 3	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00
Week 13	0.02 ± 0.02	0.24 ± 0.20	0.08 ± 0.04	0.13 ± 0.05	0.11 ± 0.04

TABLE C2
Hematology and Clinical Chemistry Data for Rats in the 13-Week Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Female (continued)					
n					
Day 3	10	10	10	10	10
Day 21	10	10	10	10	10
Week 13	10	10	9	10	8
Hematology (continued)					
Monocytes ($10^3/\mu\text{L}$)					
Day 3	0.29 ± 0.09	0.42 ± 0.09	0.36 ± 0.09	0.38 ± 0.10	0.35 ± 0.09
Day 21	0.09 ± 0.05	0.09 ± 0.05	0.11 ± 0.05	0.12 ± 0.06	0.05 ± 0.03
Week 13	0.35 ± 0.07	0.37 ± 0.08	0.40 ± 0.07	0.49 ± 0.05	0.39 ± 0.11
Eosinophils ($10^3/\mu\text{L}$)					
Day 3	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02
Day 21	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.01 ± 0.01*	0.00 ± 0.00**
Week 13	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.05	0.14 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.01 ± 0.01**
Clinical Chemistry					
Urea nitrogen (mg/dL)					
Day 3	21.7 ± 0.6	20.8 ± 0.7	19.6 ± 0.5	21.5 ± 0.5	22.6 ± 0.9
Day 21	22.8 ± 0.7	22.7 ± 0.6	21.7 ± 0.7	24.8 ± 1.4	23.4 ± 0.7
Week 13	21.2 ± 0.6	24.2 ± 0.8*	21.4 ± 0.8	21.8 ± 1.3	22.8 ± 0.7
Creatinine (mg/dL)					
Day 3	0.57 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.58 ± 0.01	0.58 ± 0.01
Day 21	0.60 ± 0.00	0.65 ± 0.02	0.65 ± 0.02	0.64 ± 0.02	0.62 ± 0.01
Week 13	0.69 ± 0.02	0.69 ± 0.01	0.68 ± 0.02	0.69 ± 0.02	0.65 ± 0.03
Total protein (g/dL)					
Day 3	5.9 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.6 ± 0.1*	5.6 ± 0.0*	5.7 ± 0.1
Day 21	5.8 ± 0.0	5.8 ± 0.0	5.8 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.7 ± 0.1
Week 13	6.8 ± 0.1	6.7 ± 0.1	6.5 ± 0.1*	6.4 ± 0.1**	6.4 ± 0.1**
Albumin (g/dL)					
Day 3	4.5 ± 0.0	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1*	4.3 ± 0.0**
Day 21	4.5 ± 0.0	4.4 ± 0.0	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.0	4.4 ± 0.1
Week 13	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.0	4.9 ± 0.1	4.7 ± 0.1**	4.6 ± 0.1**
Alanine aminotransferase (IU/L)					
Day 3	37 ± 1	36 ± 1	36 ± 1	36 ± 2	36 ± 1
Day 21	36 ± 1	34 ± 1	34 ± 1	39 ± 1	39 ± 1
Week 13	42 ± 3	51 ± 4	41 ± 2	43 ± 2	48 ± 3
Alkaline phosphatase (IU/L)					
Day 3	541 ± 13	540 ± 13	537 ± 9	544 ± 13	544 ± 15
Day 21	398 ± 9	382 ± 8	400 ± 8	405 ± 13	383 ± 12
Week 13	212 ± 7	237 ± 5	235 ± 9	208 ± 6	233 ± 8
Creatine kinase (IU/L)					
Day 3	517 ± 44	574 ± 60	488 ± 44	484 ± 41	474 ± 33
Day 21	493 ± 60	505 ± 48	502 ± 29	387 ± 42	405 ± 46
Week 13	366 ± 29	311 ± 33	395 ± 25	309 ± 47	392 ± 44
Sorbitol dehydrogenase (IU/L)					
Day 3	13 ± 1	14 ± 2	13 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
Day 21	18 ± 1	18 ± 2	19 ± 1	21 ± 1	18 ± 1
Week 13	17 ± 1	20 ± 1	15 ± 1	16 ± 2	13 ± 1

TABLE C2
Hematology and Clinical Chemistry Data for Rats in the 13-Week Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Female (continued)					
n					
Day 3	10	10	10	10	10
Day 21	10	10	10	10	10
Week 13	10	10	9	10	8
Clinical Chemistry (continued)					
Serum cholinesterase (IU/L)					
Day 3	1,748.3 ± 49.9	1,774.0 ± 72.4	1,701.2 ± 94.9	1,764.3 ± 95.6	1,895.4 ± 76.1
Day 21	2,525.4 ± 68.3	2,872.1 ± 127.7	2,865.9 ± 143.1	2,819.0 ± 167.2	2,781.5 ± 181.6
Week 13	4,297.5 ± 144.8	4,412.9 ± 154.0	4,034.1 ± 206.4	3,284.1 ± 134.2**	2,797.9 ± 246.9**
Bile acids (μmol/L)					
Day 3	24.1 ± 2.3	20.8 ± 2.8	17.1 ± 1.5	21.8 ± 3.2	18.1 ± 2.6
Day 21	25.9 ± 1.5	20.9 ± 1.6	18.1 ± 2.6*	28.9 ± 4.7	20.4 ± 3.4
Week 13	14.9 ± 0.9	21.8 ± 4.0	20.1 ± 2.8	35.0 ± 8.6**	27.8 ± 3.9*

* Significantly different ($P < 0.05$) from the vehicle control group by Dunn's or Shirley's test

** $P < 0.01$

^a Mean ± standard error. Statistical tests were performed on unrounded data.

^b n=9

TABLE C3
Hematology and Clinical Chemistry Data for Mice in the 16-Day Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	63 mg/kg	125 mg/kg
Male			
n	5	5	5
Hematology			
Automated hematocrit (%)	45.0 ± 0.3	45.5 ± 0.5	45.5 ± 0.7
Manual hematocrit (%)	50.2 ± 0.4	51.4 ± 0.4	50.4 ± 0.5
Hemoglobin (g/dL)	15.8 ± 0.2	15.7 ± 0.2	15.9 ± 0.2
Erythrocytes (10 ⁶ /μL)	9.00 ± 0.08	9.09 ± 0.11	9.10 ± 0.12
Reticulocytes (10 ⁶ /μL)	0.19 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.02
Nucleated erythrocytes/100 leukocytes	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Mean cell volume (fL)	50.0 ± 0.2	50.0 ± 0.2	50.0 ± 0.1
Mean cell hemoglobin (pg)	17.5 ± 0.0	17.3 ± 0.1	17.5 ± 0.1
Mean cell hemoglobin concentration (g/dL)	35.0 ± 0.1	34.6 ± 0.4	34.9 ± 0.3
Platelets (10 ³ /μL)	760.0 ± 24.3	718.6 ± 36.0	763.2 ± 38.4
Leukocytes (10 ³ /μL)	4.84 ± 0.39	4.98 ± 0.56	4.98 ± 0.54
Segmented neutrophils (10 ³ /μL)	0.53 ± 0.13	0.42 ± 0.06	0.59 ± 0.09
Lymphocytes (10 ³ /μL)	4.20 ± 0.27	4.44 ± 0.53	4.26 ± 0.44
Monocytes (10 ³ /μL)	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.05 ± 0.02
Eosinophils (10 ³ /μL)	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.08 ± 0.03
Clinical Chemistry			
Serum cholinesterase (IU/L)	5,620.2 ± 192.7	5,900.0 ± 160.0	5,941.8 ± 199.0
Erythrocyte cholinesterase (IU/L)	2,016.0 ± 185.2	1,891.4 ± 247.4	1,812.5 ± 82.1 ^b

TABLE C3
Hematology and Clinical Chemistry Data for Mice in the 16-Day Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride

	Vehicle Control	63 mg/kg	125 mg/kg
Female			
n	5	5	4
Hematology			
Automated hematocrit (%)	44.1 ± 0.5	43.4 ± 0.5	43.9 ± 0.5
Manual hematocrit (%)	50.0 ± 0.4	49.4 ± 0.6	50.0 ± 0.9
Hemoglobin (g/dL)	15.6 ± 0.3	15.5 ± 0.2	15.4 ± 0.2
Erythrocytes (10 ⁶ /μL)	8.92 ± 0.09	8.75 ± 0.09	8.81 ± 0.14
Reticulocytes (10 ⁶ /μL)	0.22 ± 0.04	0.20 ± 0.06	0.16 ± 0.03
Nucleated erythrocytes/100 leukocytes	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^c
Mean cell volume (fL)	49.4 ± 0.1	49.6 ± 0.2	49.9 ± 0.3
Mean cell hemoglobin (pg)	17.5 ± 0.1	17.7 ± 0.1	17.5 ± 0.1
Mean cell hemoglobin concentration (g/dL)	35.3 ± 0.3	35.6 ± 0.2	35.0 ± 0.1
Platelets (10 ³ /μL)	708.2 ± 21.8	738.6 ± 12.6	722.3 ± 22.9
Leukocytes (10 ³ /μL)	4.58 ± 0.48	5.26 ± 0.38	5.93 ± 0.49
Segmented neutrophils (10 ³ /μL)	0.64 ± 0.16	0.58 ± 0.09	0.51 ± 0.12
Lymphocytes (10 ³ /μL)	3.86 ± 0.46	4.50 ± 0.34	5.36 ± 0.37
Monocytes (10 ³ /μL)	0.05 ± 0.02	0.10 ± 0.06	0.07 ± 0.03
Eosinophils (10 ³ /μL)	0.03 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.00 ± 0.00
Clinical Chemistry			
Serum cholinesterase (IU/L)	8,155.8 ± 24.2	8,328.6 ± 186.0	8,038.5 ± 247.4
Erythrocyte cholinesterase (IU/L)	2,044.8 ± 443.0	2,888.2 ± 300.2	2,384.8 ± 560.3

^a Mean ± standard error. Statistical tests were performed on unrounded data. No data are available for the 250, 500, and 1,000 mg/kg groups due to 100% mortality.

^b n=4

^c n=5

TABLE C4
Clinical Chemistry Data for Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Male					
n	8	10	10	10	9
Urea nitrogen (mg/dL)	27.0 ± 0.6 ^b	31.6 ± 1.6	30.3 ± 1.8	30.8 ± 1.1	30.1 ± 1.7 ^c
Creatinine (mg/dL)	0.43 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.44 ± 0.02 ^c
Total protein (g/dL)	6.1 ± 0.1 ^d	6.0 ± 0.1 ^b	5.8 ± 0.1 ^{**}	5.7 ± 0.1 ^{**b}	5.7 ± 0.1 ^{**c}
Albumin (g/dL)	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.1 ± 0.1 ^c
Alanine aminotransferase (IU/L)	40 ± 8	53 ± 20	84 ± 31	71 ± 22	37 ± 8
Alkaline phosphatase ((IU/L)	91 ± 2 ^b	86 ± 4	86 ± 2	86 ± 3	84 ± 3
Creatine kinase (IU/L)	276 ± 87 ^b	255 ± 57	461 ± 113 ^b	485 ± 135	310 ± 77
Sorbitol dehydrogenase (IU/L)	47 ± 2	46 ± 1	45 ± 2	45 ± 4	45 ± 1 ^c
Serum cholinesterase (IU/L)	8,963 ± 210	8,923 ± 376	8,404 ± 107	8,380 ± 353 ^b	8,893 ± 369 ^c
Bile acids (μmol/L)	14.0 ± 1.1	13.8 ± 0.6 ^b	14.9 ± 0.8	15.2 ± 0.8 ^b	13.3 ± 0.6 ^c
Female					
n	10	10	10	10	9
Urea nitrogen (mg/dL)	26.0 ± 2.0	26.9 ± 1.2	28.9 ± 1.3	25.0 ± 1.8	26.3 ± 1.3
Creatinine (mg/dL)	0.59 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.58 ± 0.02
Total protein (g/dL)	6.0 ± 0.1	5.9 ± 0.1	5.9 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.8 ± 0.1
Albumin (g/dL)	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.0	4.4 ± 0.1
Alanine aminotransferase (IU/L)	34 ± 6	40 ± 9	29 ± 2	26 ± 1	36 ± 9
Alkaline phosphatase ((IU/L)	139 ± 3	126 ± 6	124 ± 4	128 ± 6	125 ± 6
Creatine kinase (IU/L)	297 ± 69	615 ± 212	428 ± 55	474 ± 91	318 ± 76
Sorbitol dehydrogenase (IU/L)	47 ± 1	48 ± 3	48 ± 1	48 ± 1	46 ± 1
Serum cholinesterase (IU/L)	10,020 ± 235	10,147 ± 114	9,964 ± 179	10,080 ± 230	9,726 ± 146
Bile acids (μmol/L)	15.1 ± 0.6	15.5 ± 0.8	15.5 ± 0.5	15.2 ± 0.5	15.6 ± 0.2

* Significantly different ($P \leq 0.05$) from the vehicle control group by Dunn's test

** Significantly different ($P \leq 0.01$) from the vehicle control group by Shirley's test

^a Mean ± standard error. Statistical tests were performed on unrounded data.

^b n=9

^c n=8

^d n=5

^e n=7

APPENDIX D ORGAN WEIGHTS AND ORGAN-WEIGHT-TO-BODY-WEIGHT RATIOS

TABLE D1	Organ Weights and Organ-Weight-to-Body-Weight Ratios for Rats in the 16-Day Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	D-2
TABLE D2	Organ Weights and Organ-Weight-to-Body-Weight Ratios for Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	D-3
TABLE D3	Organ Weights and Organ-Weight-to-Body-Weight Ratios for Mice in the 16-Day Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	D-4
TABLE D4	Organ Weights and Organ-Weight-to-Body-Weight Ratios for Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	D-5

TABLE D1
Organ Weights and Organ-Weight-to-Body-Weight Ratios for Rats in the 16-Day Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	16 mg/kg	32 mg/kg	63 mg/kg
n	5	5	5	5
Male				
Necropsy body wt	240 ± 4	231 ± 5	233 ± 12	226 ± 8
Heart				
Absolute	0.833 ± 0.013	0.810 ± 0.016	0.828 ± 0.046	0.829 ± 0.038
Relative	3.46 ± 0.05	3.51 ± 0.06	3.55 ± 0.04	3.67 ± 0.11
R. Kidney				
Absolute	1.078 ± 0.024	1.061 ± 0.029	1.058 ± 0.081	1.011 ± 0.020
Relative	4.49 ± 0.10	4.59 ± 0.09	4.51 ± 0.14	4.48 ± 0.08
Liver				
Absolute	12.166 ± 0.302	11.288 ± 0.400	11.509 ± 0.970	10.997 ± 0.626
Relative	50.58 ± 0.70	48.82 ± 0.78	48.98 ± 1.68	48.47 ± 1.20
Lung				
Absolute	1.383 ± 0.058	1.355 ± 0.087	1.491 ± 0.104	1.314 ± 0.053
Relative	5.75 ± 0.20	5.85 ± 0.27	6.39 ± 0.30	5.82 ± 0.21
Spleen				
Absolute	0.626 ± 0.017	0.585 ± 0.020	0.605 ± 0.029	0.579 ± 0.024
Relative	2.60 ± 0.05	2.53 ± 0.05	2.60 ± 0.04	2.56 ± 0.04
R. Testis				
Absolute	1.266 ± 0.013	1.247 ± 0.026	1.231 ± 0.055	1.231 ± 0.019
Relative	5.27 ± 0.09	5.41 ± 0.14	5.28 ± 0.06	5.46 ± 0.11
Thymus				
Absolute	0.521 ± 0.010	0.501 ± 0.010	0.523 ± 0.029	0.502 ± 0.035
Relative	2.17 ± 0.06	2.17 ± 0.05	2.26 ± 0.13	2.21 ± 0.09
Female				
Necropsy body wt	137 ± 5	144 ± 5	142 ± 4	137 ± 4
Heart				
Absolute	0.548 ± 0.020	0.577 ± 0.024	0.596 ± 0.009	0.560 ± 0.021
Relative	4.01 ± 0.05	4.02 ± 0.05	4.21 ± 0.08	4.10 ± 0.12
R. Kidney				
Absolute	0.636 ± 0.031	0.655 ± 0.023	0.663 ± 0.020	0.619 ± 0.025
Relative	4.65 ± 0.12	4.57 ± 0.05	4.67 ± 0.11	4.53 ± 0.11
Liver				
Absolute	5.966 ± 0.333	6.233 ± 0.278	6.147 ± 0.219	5.771 ± 0.324
Relative	43.58 ± 1.29	43.37 ± 0.80	43.30 ± 1.00	42.09 ± 1.13
Lung				
Absolute	0.897 ± 0.041	0.985 ± 0.043	0.944 ± 0.034	0.884 ± 0.063
Relative	6.56 ± 0.13	6.88 ± 0.29	6.65 ± 0.18	6.44 ± 0.27
Spleen				
Absolute	0.401 ± 0.013	0.416 ± 0.017	0.426 ± 0.016	0.366 ± 0.021
Relative	2.93 ± 0.02	2.90 ± 0.08	3.00 ± 0.11	2.67 ± 0.07
Thymus				
Absolute	0.357 ± 0.022	0.367 ± 0.012	0.366 ± 0.008	0.353 ± 0.023
Relative	2.61 ± 0.13	2.56 ± 0.08	2.58 ± 0.09	2.58 ± 0.11

^a Organ weights (absolute weights) and body weights are given in grams; organ-weight-to-body-weight ratios (relative weights) are given as mg organ weight/g body weight (mean ± standard error). Differences from the vehicle control group were not significant by Dunnett's test. No data are available for the 125 and 250 mg/kg groups due to 100% mortality.

TABLE D2
Organ Weights and Organ-Weight-to-Body-Weight Ratios for Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Male					
n	10	10	10	10	10
Necropsy body wt	338 ± 8	337 ± 8	336 ± 8	340 ± 5	311 ± 9
Heart					
Absolute	1.018 ± 0.030	1.010 ± 0.024	1.000 ± 0.024	1.016 ± 0.025	0.953 ± 0.028
Relative	3.02 ± 0.05	3.00 ± 0.04	2.98 ± 0.05	2.99 ± 0.06	3.07 ± 0.03
R. Kidney					
Absolute	1.266 ± 0.049	1.274 ± 0.044	1.307 ± 0.092	1.238 ± 0.036	1.208 ± 0.041
Relative	3.74 ± 0.07	3.78 ± 0.07	3.89 ± 0.24	3.64 ± 0.08	3.89 ± 0.05
Liver					
Absolute	12.136 ± 0.423	12.671 ± 0.412	11.893 ± 0.277	12.146 ± 0.262	11.409 ± 0.459
Relative	35.88 ± 0.50	37.58 ± 0.69	35.46 ± 0.34	35.78 ± 0.60	36.66 ± 0.73
Lung					
Absolute	1.540 ± 0.040	1.473 ± 0.045	1.503 ± 0.045	1.515 ± 0.042	1.388 ± 0.054
Relative	4.57 ± 0.08	4.37 ± 0.07	4.48 ± 0.09	4.46 ± 0.09	4.47 ± 0.10
R. Testis					
Absolute	1.459 ± 0.043	1.380 ± 0.036	1.385 ± 0.063	1.443 ± 0.029	1.423 ± 0.043
Relative	4.32 ± 0.07	4.11 ± 0.12	4.15 ± 0.21	4.25 ± 0.05	4.58 ± 0.02
Thymus					
Absolute	0.328 ± 0.016	0.343 ± 0.023	0.341 ± 0.022	0.360 ± 0.017	0.295 ± 0.012
Relative	0.97 ± 0.04	1.01 ± 0.05	1.02 ± 0.06	1.06 ± 0.05	0.96 ± 0.04
Female					
n	10	10	9	9	8
Necropsy body wt	190 ± 3	198 ± 4	193 ± 3	193 ± 4	187 ± 4
Heart					
Absolute	0.704 ± 0.011	0.679 ± 0.012	0.674 ± 0.016	0.693 ± 0.013	0.670 ± 0.014
Relative	3.71 ± 0.04	3.43 ± 0.05**	3.49 ± 0.05*	3.60 ± 0.07	3.59 ± 0.06
R. Kidney					
Absolute	0.716 ± 0.015	0.730 ± 0.020	0.710 ± 0.012	0.750 ± 0.014	0.730 ± 0.025
Relative	3.77 ± 0.07	3.68 ± 0.06	3.68 ± 0.05	3.90 ± 0.06	3.91 ± 0.10
Liver					
Absolute	6.435 ± 0.144	6.532 ± 0.221	6.449 ± 0.129	6.715 ± 0.204	6.731 ± 0.221
Relative	33.82 ± 0.32	32.92 ± 0.81	33.47 ± 0.54	34.79 ± 0.54	36.00 ± 0.68*
Lung					
Absolute	1.156 ± 0.048	1.184 ± 0.033	1.147 ± 0.037	1.195 ± 0.050	1.121 ± 0.045
Relative	6.06 ± 0.17	5.97 ± 0.13	5.97 ± 0.24	6.20 ± 0.24	6.00 ± 0.17
Thymus					
Absolute	0.263 ± 0.010	0.276 ± 0.014	0.263 ± 0.010	0.251 ± 0.013	0.257 ± 0.012
Relative	1.38 ± 0.04	1.39 ± 0.06	1.36 ± 0.04	1.30 ± 0.05	1.37 ± 0.06

* Significantly different ($P \leq 0.05$) from the vehicle control group by Williams' or Dunnett's test

** Significantly different ($P \leq 0.01$) from the vehicle control group by Dunnett's test

^a Organ weights (absolute weights) and body weights are given in grams; organ-weight-to-body-weight ratios (relative weights) are given as mg organ weight/g body weight (mean ± standard error).

TABLE D3
Organ Weights and Organ-Weight-to-Body-Weight Ratios for Mice in the 16-Day Gavage Study
of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	63 mg/kg	125 mg/kg
Male			
n	5	5	5
Necropsy body wt	26.4 ± 0.7	26.0 ± 0.5	26.1 ± 0.6
Heart			
Absolute	0.132 ± 0.005	0.130 ± 0.003	0.131 ± 0.003
Relative	5.00 ± 0.11	5.00 ± 0.06	5.01 ± 0.05
R. Kidney			
Absolute	0.249 ± 0.012	0.246 ± 0.007	0.255 ± 0.008
Relative	9.41 ± 0.22	9.43 ± 0.13	9.76 ± 0.11
Liver			
Absolute	1.456 ± 0.049	1.416 ± 0.044	1.437 ± 0.042
Relative	55.03 ± 0.66	54.35 ± 1.03	54.94 ± 0.64
Lung			
Absolute	0.180 ± 0.007	0.184 ± 0.007	0.194 ± 0.006
Relative	6.80 ± 0.20	7.08 ± 0.35	7.42 ± 0.18
Spleen			
Absolute	0.069 ± 0.003	0.067 ± 0.003	0.067 ± 0.003
Relative	2.61 ± 0.06	2.57 ± 0.08	2.57 ± 0.07
R. Testis			
Absolute	0.106 ± 0.002	0.103 ± 0.001	0.103 ± 0.004
Relative	4.03 ± 0.16	3.96 ± 0.07	3.94 ± 0.14
Thymus			
Absolute	0.054 ± 0.003	0.049 ± 0.004	0.051 ± 0.005
Relative	2.04 ± 0.13	1.87 ± 0.16	1.96 ± 0.20
Female			
n	5	5	4
Necropsy body wt	21.2 ± 0.4	21.9 ± 0.5	22.4 ± 0.1
Heart			
Absolute	0.120 ± 0.003	0.118 ± 0.005	0.118 ± 0.002
Relative	5.66 ± 0.11	5.40 ± 0.14	5.28 ± 0.09
R. Kidney			
Absolute	0.169 ± 0.007	0.173 ± 0.002	0.173 ± 0.007
Relative	7.96 ± 0.22	7.90 ± 0.12	7.75 ± 0.32
Liver			
Absolute	1.073 ± 0.043	1.136 ± 0.025	1.209 ± 0.017*
Relative	50.51 ± 1.35	51.88 ± 0.69	54.12 ± 1.04
Lung			
Absolute	0.171 ± 0.007	0.162 ± 0.008	0.150 ± 0.009
Relative	8.07 ± 0.23	7.38 ± 0.25	6.72 ± 0.36*
Spleen			
Absolute	0.078 ± 0.003	0.078 ± 0.004	0.076 ± 0.004
Relative	3.67 ± 0.12	3.56 ± 0.09	3.40 ± 0.20
Thymus			
Absolute	0.062 ± 0.003	0.064 ± 0.005	0.064 ± 0.007
Relative	2.94 ± 0.14	2.91 ± 0.21	2.84 ± 0.29

* Significantly different ($P \leq 0.05$) from the vehicle control group by Williams' or Dunnett's test

^a Organ weights (absolute weights) and body weights are given in grams; organ-weight-to-body-weight ratios (relative weights) are given as mg organ weight/g body weight (mean ± standard error). No data are available for the 250, 500, and 1,000 mg/kg groups due to 100% mortality.

TABLE D4
Organ Weights and Organ-Weight-to-Body-Weight Ratios for Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	12.5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
Male					
n	10	10	10	8	9
Necropsy body wt	34.9 ± 0.7	34.9 ± 1.0	34.5 ± 0.6	34.8 ± 0.9	33.9 ± 0.9
Heart					
Absolute	0.142 ± 0.003	0.146 ± 0.003	0.146 ± 0.002	0.151 ± 0.003	0.145 ± 0.003
Relative	4.06 ± 0.06	4.19 ± 0.06	4.25 ± 0.05*	4.30 ± 0.10*	4.29 ± 0.06*
R. Kidney					
Absolute	0.284 ± 0.006	0.290 ± 0.008	0.285 ± 0.006	0.311 ± 0.008*	0.297 ± 0.009
Relative	8.13 ± 0.13	8.32 ± 0.17	8.28 ± 0.16	8.82 ± 0.15**	8.77 ± 0.16**
Liver					
Absolute	1.519 ± 0.042	1.553 ± 0.049	1.534 ± 0.049	1.599 ± 0.041	1.537 ± 0.036
Relative	43.44 ± 0.61	44.48 ± 0.57	44.47 ± 0.90	45.33 ± 0.50	45.39 ± 1.00
Lung					
Absolute	0.196 ± 0.011	0.199 ± 0.008	0.198 ± 0.014	0.188 ± 0.015	0.184 ± 0.006
Relative	5.63 ± 0.32	5.71 ± 0.17	5.78 ± 0.46	5.31 ± 0.34	5.43 ± 0.18
R. Testis					
Absolute	0.119 ± 0.005	0.113 ± 0.007	0.119 ± 0.003	0.120 ± 0.005	0.120 ± 0.004
Relative	3.39 ± 0.11	3.24 ± 0.21	3.46 ± 0.07	3.39 ± 0.12	3.54 ± 0.05
Thymus					
Absolute	0.063 ± 0.009	0.045 ± 0.006	0.044 ± 0.004	0.042 ± 0.005	0.044 ± 0.005
Relative	1.80 ± 0.25	1.31 ± 0.19	1.26 ± 0.11	1.19 ± 0.14	1.31 ± 0.14
Female					
n	10	10	10	10	9
Necropsy body wt	29.1 ± 1.0	29.9 ± 0.9	28.7 ± 0.9	29.2 ± 1.3	28.2 ± 0.9
Heart					
Absolute	0.125 ± 0.002	0.128 ± 0.003	0.122 ± 0.003	0.126 ± 0.003	0.124 ± 0.003
Relative	4.31 ± 0.12	4.31 ± 0.09	4.28 ± 0.11	4.37 ± 0.12	4.40 ± 0.08
R. Kidney					
Absolute	0.193 ± 0.003	0.190 ± 0.004	0.184 ± 0.004	0.192 ± 0.006	0.184 ± 0.006
Relative	6.70 ± 0.22	6.40 ± 0.18	6.44 ± 0.14	6.64 ± 0.17	6.52 ± 0.06
Liver					
Absolute	1.168 ± 0.022	1.223 ± 0.046	1.246 ± 0.034	1.249 ± 0.055	1.208 ± 0.039
Relative	40.47 ± 1.35	40.95 ± 0.81	43.57 ± 0.50	42.95 ± 1.21	42.81 ± 0.64
Lung					
Absolute	0.187 ± 0.004	0.196 ± 0.009	0.172 ± 0.005	0.176 ± 0.006	0.176 ± 0.006
Relative	6.48 ± 0.24	6.58 ± 0.27	6.02 ± 0.12	6.08 ± 0.16	6.25 ± 0.14
Thymus					
Absolute	0.051 ± 0.003	0.054 ± 0.003	0.048 ± 0.002	0.056 ± 0.005	0.050 ± 0.004
Relative	1.77 ± 0.09	1.79 ± 0.09	1.69 ± 0.10	1.90 ± 0.12	1.78 ± 0.16

* Significantly different ($P \leq 0.05$) from the vehicle control group by Williams' or Dunnett's test

** Significantly different ($P \leq 0.01$) from the vehicle control group by Williams' test

^a Organ weights (absolute weights) and body weights are given in grams; organ-weight-to-body-weight ratios (relative weights) are given as mg organ weight/g body weight (mean ± standard error).

D-6

Benzyltrimethylammonium Chloride, NTP TOX 57

APPENDIX E
REPRODUCTIVE TISSUE EVALUATIONS
AND ESTROUS CYCLE CHARACTERIZATION

TABLE E1	Summary of Reproductive Tissue Evaluations for Male Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	E-2
TABLE E2	Estrous Cycle Characterization for Female Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	E-2
TABLE E3	Summary of Reproductive Tissue Evaluations for Male Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	E-3
TABLE E4	Estrous Cycle Characterization for Female Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride	E-3

TABLE E1
Summary of Reproductive Tissue Evaluations for Male Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
n	10	10	10	10
Weights (g)				
Necropsy body wt	338 ± 9	335 ± 8	340 ± 5	311 ± 9*
L. Cauda epididymis	0.1660 ± 0.0076	0.1633 ± 0.0063	0.1607 ± 0.0056	0.1582 ± 0.0078
L. Epididymis	0.4933 ± 0.0157	0.4944 ± 0.0084	0.4973 ± 0.0140	0.4828 ± 0.0149
L. Testis	1.5400 ± 0.0487	1.5126 ± 0.0259	1.5180 ± 0.0316	1.4909 ± 0.0441
Spermatid measurements				
Spermatid heads (10 ⁷ /g testis)	9.15 ± 0.42	9.51 ± 0.38	9.12 ± 0.54	9.36 ± 0.35
Spermatid heads (10 ⁷ /testis)	13.98 ± 0.56	14.35 ± 0.49	13.84 ± 0.83	13.90 ± 0.49
Spermatid count (mean/10 ³ mL suspension)	69.90 ± 2.78	71.75 ± 2.45	69.18 ± 4.16	69.48 ± 2.46
Epididymal spermatozoal measurements				
Motility (%)	84.66 ± 0.43 ^b	83.63 ± 0.47	83.32 ± 0.47	83.27 ± 0.40
Concentration (10 ⁶ /g cauda epididymal tissue)	427 ± 19	454 ± 21	460 ± 17	409 ± 36

* Significantly different (P<0.05) from the vehicle control group by Dunnett's test

^a Data are presented as mean ± standard error. Differences from the vehicle control group are not significant by Dunnett's test (tissue weights) or Dunn's test (spermatid and epididymal spermatozoal measurements).

^b n=8

TABLE E2
Estrous Cycle Characterization for Female Rats in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
n	10	9	10	8
Necropsy body wt (g)	190 ± 3	193 ± 3	192 ± 4	187 ± 4
Estrous cycle length (days)	4.75 ± 0.13	4.44 ± 0.15 ^b	4.80 ± 0.17	4.94 ± 0.26
Estrous stages^c (% of cycle)				
Diestrus	42.5	36.1	38.3	37.5
Proestrus	14.2	20.4	17.5	18.8
Estrus	25.0	23.1	25.8	22.9
Metestrus	18.3	20.4	18.3	20.8

^a Necropsy body weight and estrous cycle length data are presented as mean ± standard error. Differences from the vehicle control group are not significant by Dunnett's test (necropsy body weight) or Dunn's test (estrous cycle length).

^b Estrous cycle was longer than 12 days or unclear in one of nine animals.

^c Evidence shows that females administered 25 mg/kg differ significantly (Wilk's Criterion, P<0.05) from the vehicle control females in the relative length of time spent in the estrous stages. Dosed females spent more time in proestrus and less time in diestrus than the vehicle control females.

TABLE E3
Summary of Reproductive Tissue Evaluations for Male Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
n	10	10	9	9
Weights (g)				
Necropsy body wt	34.9 ± 0.7	34.5 ± 0.6	35.5 ± 0.7	33.9 ± 0.9
L. Cauda epididymis	0.0175 ± 0.0008	0.0167 ± 0.0010	0.0173 ± 0.0010	0.0174 ± 0.0009
L. Epididymis	0.0503 ± 0.0016	0.0470 ± 0.0016	0.0514 ± 0.0020	0.0486 ± 0.0015
L. Testis	0.1106 ± 0.0044	0.1150 ± 0.0033	0.1180 ± 0.0052	0.1184 ± 0.0034
Spermatid measurements				
Spermatid heads (10 ⁷ /g testis)	15.90 ± 0.34	14.83 ± 0.44	14.25 ± 0.35*	15.10 ± 0.49
Spermatid heads (10 ⁷ /testis)	1.76 ± 0.09	1.70 ± 0.05	1.69 ± 0.09	1.78 ± 0.07
Spermatid count (mean/10 ⁻⁴ mL suspension)	55.10 ± 2.76	53.05 ± 1.47	52.64 ± 2.75	55.78 ± 2.13
Epididymal spermatozoal measurements				
Motility (%)	88.75 ± 0.31	88.42 ± 0.52 ^b	88.92 ± 0.54	87.82 ± 0.40
Concentration (10 ⁶ /g cauda epididymal tissue)	914 ± 55	925 ± 71	796 ± 117	856 ± 57

* Significantly different (P<0.05) from the vehicle control group by Dunnett's test

^a Data are presented as mean ± standard error. Differences from the vehicle control group are not significant by Dunnett's test (tissue weights) or Dunn's test (spermatid heads per testis, spermatid count, and epididymal spermatozoal measurements).

^b n=9

TABLE E4
Estrous Cycle Characterization for Female Mice in the 13-Week Gavage Study of Benzyltrimethylammonium Chloride^a

	Vehicle Control	25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg
n	10	10	10	9
Necropsy body wt (g)	29.1 ± 1.0	28.7 ± 0.9	29.2 ± 1.3	28.2 ± 0.9
Estrous cycle length (days)	4.00 ± 0.00 ^b	4.30 ± 0.13	4.61 ± 0.44 ^c	4.17 ± 0.12
Estrous stages (% of cycle)				
Diestrus	40.0	32.5	36.7	27.8
Proestrus	16.7	17.5	15.8	17.6
Estrus	22.5	29.2	26.7	30.6
Metestrus	20.8	20.8	20.8	24.1

^a Necropsy body weight and estrous cycle length data are presented as mean ± standard error. Differences from the vehicle control group are not significant by Dunnett's test (necropsy body weight) or Dunn's test (estrous cycle length). By multivariate analysis of variance, dosed females do not differ significantly from the vehicle control females in relative length of time spent in the estrous stages.

^b Estrous cycle was longer than 12 days or unclear in 3 of 10 animals.

^c Estrous cycle was longer than 12 days or unclear in 1 of 10 animals.

E-4

Benzyltrimethylammonium Chloride, NTP TOX 57

APPENDIX F

GENETIC TOXICOLOGY

TABLE F1	Mutagenicity of Benzyltrimethylammonium Chloride in <i>Salmonella typhimurium</i>	F-2
TABLE F2	Frequency of Micronuclei in Peripheral Blood Erythrocytes of Mice Following Treatment with Benzyltrimethylammonium Chloride by Gavage for 13 Weeks	F-3

TABLE F1
Mutagenicity of Benzyltrimethylammonium Chloride in *Salmonella typhimurium*^a

Strain	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertants/plate ^b					
		-S9		+ hamster S9		+ rat S9	
		Trial 1	Trial 2	10%	30%	10%	30%
TA100	0	122 \pm 8.2	122 \pm 9.2	116 \pm 7.0	119 \pm 11.0	84 \pm 6.6	147 \pm 9.6
	100	119 \pm 12.7	128 \pm 3.7	102 \pm 1.2	130 \pm 4.9	105 \pm 7.1	128 \pm 7.1
	333	115 \pm 6.9	118 \pm 14.2	110 \pm 3.5	115 \pm 9.0	89 \pm 6.9	128 \pm 3.4
	1,000	116 \pm 11.7	116 \pm 8.2	107 \pm 8.1	113 \pm 5.7	104 \pm 8.7	136 \pm 2.5
	3,333	121 \pm 9.0 ^c	122 \pm 2.4	99 \pm 3.0	135 \pm 2.9 ^c	102 \pm 8.7	138 \pm 3.8
	10,000	65 \pm 3.7 ^c	104 \pm 4.4 ^c	103 \pm 13.5 ^c	109 \pm 6.4 ^c	91 \pm 7.8	113 \pm 7.2 ^c
Trial summary		Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Positive control ^d		1,389 \pm 22.6	1,485 \pm 4.8	1,125 \pm 21.5	2,231 \pm 35.7	1,883 \pm 33.0	702 \pm 16.7
TA1535	0	31 \pm 3.0	29 \pm 0.9	9 \pm 0.9	14 \pm 0.9	9 \pm 1.7	12 \pm 2.3
	100	29 \pm 0.7	30 \pm 1.0	11 \pm 3.8	8 \pm 1.0	10 \pm 1.9	13 \pm 0.0
	333	25 \pm 0.9	26 \pm 4.4	13 \pm 2.3	12 \pm 1.5	10 \pm 1.5	15 \pm 2.0
	1,000	28 \pm 1.5	37 \pm 2.2	9 \pm 1.2	10 \pm 1.7	11 \pm 0.7	11 \pm 0.7
	3,333	28 \pm 3.0 ^c	27 \pm 2.7	9 \pm 0.9	12 \pm 3.5	9 \pm 3.8	13 \pm 1.2
	10,000	22 \pm 4.8 ^c	21 \pm 1.5 ^c	9 \pm 1.5 ^c	12 \pm 0.6	11 \pm 1.5 ^c	11 \pm 2.3
Trial summary		Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Positive control		1,051 \pm 8.7	1,095 \pm 18.9	127 \pm 9.0	323 \pm 17.8	117 \pm 5.0	130 \pm 13.9
TA97	0	104 \pm 8.4	121 \pm 3.5	140 \pm 4.1	170 \pm 8.8	113 \pm 9.7	181 \pm 5.5
	100	113 \pm 7.0	110 \pm 7.4	143 \pm 0.3	158 \pm 8.8	126 \pm 12.1	181 \pm 4.2
	333	99 \pm 0.9	114 \pm 3.6	144 \pm 8.0	156 \pm 1.9	124 \pm 3.5	155 \pm 9.2
	1,000	112 \pm 8.3	128 \pm 5.5	139 \pm 6.9	165 \pm 6.1	133 \pm 5.3	168 \pm 11.1
	3,333	95 \pm 2.1 ^c	128 \pm 2.9	130 \pm 7.1	152 \pm 6.0 ^c	129 \pm 2.2	167 \pm 6.4
	10,000	92 \pm 5.2 ^c	100 \pm 5.6 ^c	131 \pm 2.2 ^c	172 \pm 7.8 ^c	110 \pm 4.6 ^c	174 \pm 12.8
Trial summary		Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Positive control		1,626 \pm 161.0	722 \pm 9.3	511 \pm 17.2	1,452 \pm 23.1	763 \pm 36.3	691 \pm 13.3
TA98	0	19 \pm 4.1	16 \pm 0.6	39 \pm 2.6	35 \pm 2.7	32 \pm 5.5	31 \pm 5.8
	100	14 \pm 1.5	14 \pm 1.7	37 \pm 3.4	27 \pm 4.4	31 \pm 1.2	29 \pm 0.9
	333	16 \pm 2.1	19 \pm 4.1	32 \pm 3.2	31 \pm 2.8	30 \pm 1.3	34 \pm 2.6
	1,000	17 \pm 2.0	17 \pm 2.4	36 \pm 2.1	34 \pm 1.2	35 \pm 1.7	30 \pm 5.8
	3,333	19 \pm 1.2 ^c	16 \pm 1.5	33 \pm 5.5	30 \pm 3.5	38 \pm 2.2	35 \pm 2.2
	10,000	14 \pm 1.0 ^c	19 \pm 3.5 ^c	34 \pm 1.2	28 \pm 1.8	31 \pm 3.8	36 \pm 1.7 ^c
Trial summary		Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Positive control		1,246 \pm 69.5	1,848 \pm 57.8	1,205 \pm 26.9	2,210 \pm 28.6	1,401 \pm 30.6	659 \pm 32.9

^a Study was performed at Microbiological Associates, Inc. The detailed protocol and these data are presented in Zeiger *et al.* (1988).
0 $\mu\text{g}/\text{plate}$ was the solvent control.

^b Revertants are presented as mean \pm standard error from three plates.

^c Slight toxicity

^d The positive controls in the absence of metabolic activation were sodium azide (TA100 and TA1535), 9-aminoacridine (TA97), and 4-nitro-*o*-phenylenediamine (TA98). The positive control for metabolic activation with all strains was 2-aminoanthracene.

TABLE F2
Frequency of Micronuclei in Peripheral Blood Erythrocytes of Mice Following Treatment with Benzyltrimethylammonium Chloride by Gavage for 13 Weeks^a

Compound	Dose (mg/kg)	Number of Mice with Erythrocytes Scored	Micronucleated NCEs/1,000 NCEs ^b	Pairwise P Value ^c
Male				
Water ^d		10	3.7 ± 0.6	
Benzyltrimethylammonium chloride	12.5	10	2.5 ± 0.5	0.937
	25	10	2.8 ± 0.6	0.868
	50	10	5.2 ± 0.9	0.056
	100	9	6.6 ± 1.1	0.003
			P ≤ 0.001 ^e	
Female				
Water		10	2.0 ± 0.3	
Benzyltrimethylammonium chloride	12.5	10	2.5 ± 0.6	0.228
	25	10	3.0 ± 0.3	0.078
	50	10	3.9 ± 0.3	0.007
	100	9	6.4 ± 0.6	0.000
			P ≤ 0.001	

^a Study was performed at Integrated Laboratory Systems. The detailed protocol is presented in MacGregor *et al.* (1990).

NCE=normochromatic erythrocyte

^b Mean ± standard error

^c Pairwise comparison to solvent control; significant at P ≤ 0.006 (ILS, 1990)

^d Solvent control

^e Significance of micronucleated NCEs/1,000 NCEs tested by the one-tailed trend test, significant at P ≤ 0.025 (ILS, 1990)

F-4

Benzyltrimethylammonium Chloride, NTP TOX 57

**NTP TECHNICAL REPORTS ON TOXICITY STUDIES
PRINTED AS OF FEBRUARY 2000**

TOX No.	Chemical	TOX No.	Chemical
1	Hexachloro-1,3-butadiene	28	Tetrachlorophthalic Anhydride
2	<i>n</i> -Hexane	29	Cupric Sulfate
3	Acetone	30	Dibutyl Phthalate
4	1,2-Dichloroethane	31	Isoprene
5	Cobalt Sulfate Heptahydrate	32	Methylene Bis(thiocyanate)
6	Pentachlorobenzene	33	2-Chloronitrobenzene and 4-Chloronitrobenzene
7	1,2,4,5-Tetrachlorobenzene	34	1-Nitropyrene
8	D & C Yellow No. 11	35	Chemical Mixture of 25 Groundwater Contaminants
9	<i>o</i> -Cresol, <i>m</i> -Cresol, and <i>p</i> -Cresol	36	Pesticide/Fertilizer Mixtures
10	Ethylbenzene	37	Sodium Cyanide
11	Antimony Potassium Tartrate	38	Sodium Selenate and Sodium Selenite
12	Castor Oil	39	Cadmium Oxide
13	Trinitrofluorenone	40	β -Bromo- β -nitrostyrene
14	<i>p</i> -Chloro- α,α,α -trifluorotoluene	42	1,3-Diphenylguanidine
15	<i>t</i> -Butyl Perbenzoate	43	<i>o</i> -, <i>m</i> -, and <i>p</i> -Chloroaniline
16	Glyphosate	44	<i>o</i> -Nitrotoluene and <i>o</i> -Toluidine Hydrochloride
17	Black Newsprint Ink	45	Halogenated Ethanes
18	Methyl Ethyl Ketone Peroxide	50	Cyclohexanone Oxime
19	Formic Acid	51	Methyl Ethyl Ketoxime
20	Diethanolamine	52	Urethane
21	2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone	53	<i>t</i> -Butyl Alcohol
22	<i>N,N</i> -Dimethylformamide	54	1,4-Butanediol
23	<i>o</i> -Nitrotoluene, <i>m</i> -Nitrotoluene, and <i>p</i> -Nitrotoluene	58	60-Hz Magnetic Fields
24	1,6-Hexanediamine	59	Chloral Hydrate
25	Glutaraldehyde	65	3,3',4,4'-Tetrachloroazobenzene
26	Ethylene Glycol Ethers	66	3,3',4,4'-Tetrachloroazoxybenzene
27	Riddelliine		

チオフェンのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of Thiophene by Oral Administration in Rats

要約

チオフェン(CAS No. 110-02-1; 化学式, C_4H_4S ; 分子量, 84.14)は, 5員環にイオウ1原子を有するヘテロ環系化合物で, ベンゼンと同様な溶剤として, また, 樹脂の架橋剤や染料および医薬品などの化学物質の中間体として広く使用されている¹⁾. チオフェンは, また, 工業用のみならず, コーヒーなどの食品中にも含有されている²⁾. 疫学的調査から, チオフェンは, 職業的にこれを使用する労働者に腎毒性を引き起こし, 循環系に悪影響を及ぼし, 光に対する目の反応性に悪影響を及ぼすことが報告されている³⁾. LD_{50} 値は, 経口投与において, ラットでは1400 mg/kg, マウスでは420 mg/kgであり⁴⁾, マウスの腹腔内投与では100 mg/kg⁵⁾, ウサギの皮下投与では830 mg/kgである⁶⁾. チオフェンの8000 ppmをラットに1時間吸入暴露すると, 暴露されたチオフェンの16.3%は, 呼吸器から吸収されることが明らかにされているが⁷⁾, チオフェンの吸入暴露における LD_{50} 値は, ラットでは, 9500 mg/m³/2hrとされている⁸⁾. 経口投与されたチオフェンの約30%はそのまま呼吸から排泄されるが, その他は肝臓で代謝され, ごく一部が糞便から排泄され, 約70%は尿中から排泄される⁹⁾. チオフェンは, 肝臓のチトクロームP450 mono-oxygenasesにより, 求電子性の活性中間体にバイオトランスフォームされ⁹⁾, これが肝臓の壊死を惹起すること¹⁰⁾, および, チオフェンを投与すると小脳の顆粒細胞が壊死すること¹¹⁾などが報告されている. 長期間の暴露については, ラットに対して毎日4時間ずつ1~9ヵ月吸入暴露した成績があり, 肺および気管に炎症が, 心筋には軽度なネクロパオシスが, また, 副腎には脂質の増加がそれぞれ惹起されることが報告されている¹²⁾. しかし, 経口投与による反復投与毒性については評価されていない. 生殖発生毒性に関しては, チオフェンが精子形成に影響を及ぼすことが報告されているが¹³⁾, 生殖機能に及ぼす影響は評価されていない. 本試験では, OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環としてチオフェンの0(溶媒対照), 25, 100および400 mg/kgをSprague-Dawley系ラット(Crj:CD)の雌雄(各13匹/群)に交配前2週間および交配期間2週間経口投与し, さらに雄では交配期間終了後2週間, 雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで投与を継続して親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した.

その結果, 雄では, 100 mg/kg以上の投与量は, 投与

後に, 寄り掛かり姿勢など一般状態を変化させ, 400 mg/kg投与により, 投与期間初期に一過性に摂餌量および体重増加を抑制した. 投与期間末期に摂餌量は高値を示したが, 体重増加は軽度に抑制され, 投与37日に実施した尿検査では, pHが異常な高値を示した.

42回反復投与後の剖検では, 100 mg/kg以上の投与量により小葉中心性に肝細胞は肥大し, マクロファージが浸潤し, 肝臓重量比体重値が増加した. さらに, 400 mg/kg投与により, 小葉中心性の肝細胞壊死, 小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化が認められ, 総ビリルビン濃度および総コレステロール濃度ならびに肝臓機能の指標となる各種酵素活性が高値を示し, 100 mg/kg以上の投与量のチオフェンは, 肝臓毒性を示した. また, 400 mg/kg投与により, 小脳顆粒細胞の核濃縮あるいは壊死が1例に観察され, 400 mg/kgの投与量のチオフェンは, 小脳に対する軽度な毒性を現した. これらの変化に伴い, 100 mg/kg以上の投与量ではブドウ糖濃度およびアルカリフォスファターゼ活性が低下し, 無機リン濃度が上昇した. このほか, 100 mg/kg以上の投与群において腎臓重量比体重値が増加し, 400 mg/kg投与によりeosinophilic bodyがやや増加したが, 腎機能の異常を示す変化は認められなかった. 400 mg/kg投与群において脾臓重量が低下したが, 病理組織学的異常は認められなかった. その他の器官にチオフェンの毒性を示唆する変化は認められず, 25 mg/kgの投与量のチオフェンには毒性は認められなかった.

雌動物では, 100 mg/kg以上の投与量は, 投与後に寄り掛かり姿勢など一般状態を変化させ, 400 mg/kg投与により摂餌量および体重増加を投与期間初期に一過性に抑制し, 運動失調を惹起し, 1例は投与8日に瀕死状態となったため剖検した.

生存例の剖検では, 100 mg/kg以上の投与により, 変化の有無に個体差はあるものの, 400 mg/kg投与により雄の肝臓に惹起されたのと同質の所見が観察され, 肝臓重量比体重値も増加した. また, 小脳の顆粒細胞壊死が100 mg/kg以上の投与群に観察され, 400 mg/kg投与群では, 大脳の脳室拡張およびその周囲の浮腫も認められた. これらのことから, 100 mg/kg以上の投与量は, 肝臓および小脳に障害を与える毒性量であると考えられる. これらの変化は, 瀕死屠殺例にも観察され, 投与期間初期から認められた. また, 生存例の各所見は雄と比較してより増強されていた. 100 mg/kg以上の投与により尿細管上皮の空胞変性が有意に増加し, 400 mg/kg投与群において腎臓重量比体重値が高値を示した. その他

の器官にチオフェンの毒性を示唆する変化は認められず、25 mg/kgの投与量のチオフェンには毒性は認められなかった。

一方、生殖発生毒性に関しては、400 mg/kgまでの投与量は、交尾、排卵および受胎に毒性を示さなかった。また、チオフェン投与に起因する分娩異常はいずれの投与群にも認められなかった。しかし、100 mg/kg以上の投与群の小脳に所見が認められた動物の多くに、哺育行動の廃絶や、泌乳の低下が認められ、100 mg/kg以上の投与量は、母動物の哺育状態に影響を及ぼす毒性量であると考えられる。

出生日の児の生存性および性比にはチオフェン投与の影響は認められなかったが、400 mg/kg投与群において、出生日および哺育4日の体重、ならびに新生児の4日の生存率が低値の傾向が認められた。100 mg/kg以下の投与群にチオフェン投与の影響は認められず、チオフェン投与に起因した形態異常はいずれの投与群にも観察されなかった。

これらのことから本試験条件下では、チオフェンの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに25 mg/kg/dayであり、生殖発生毒性に関する無影響量は、雄では、400 mg/kg/day、雌では、25 mg/kg/day、新生児では100 mg/kg/dayであると推定される。

方法

1. 被験物質

チオフェン〔ロット番号、FG301(東京化成工業㈱)；純度、98%(wt%)；不純物、不明〕は、水には不溶であるが、多くの有機物に溶解する、臭気を有する無色透明の液体である。本被験物質は、使用時まで冷蔵条件下で保管し、コーンオイル〔ロット番号、V4K5052(ナカライテスク)〕に溶解して、いずれの用量においても1回の投与液量が5 ml/kgになるように含量を調整し、投与液とした。投与液は、室温、遮光条件下で保管し、調整後8日以内に投与した。投与液中の被験物質は、室温、遮光条件下で少なくとも8日間安定であり、動物飼育室内で30分間開封してもチオフェン濃度は変化せず、また、使用した投与液にはほぼ所定量のチオフェンが含有されていたことを確認した。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも7週齢にて購入したSprague-Dawley系ラット(Crj:CD, SPF)を使用した。動物は、入荷後1週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、一般状態に異常が認められなかったものを試験に供した〔群分け時体重範囲：雄277.4～328.2 g、雌207.1～224.7 g〕。

各動物は、温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数約15回/時間、照明12時間(午前7時～午後7時)に条件設定された飼育室で、金属製金網床ケージ(日本ケージ)に個別に収容して飼育し、固型飼料(CA-1, 日本クレア)および水道水を自由に摂取させた。妊娠18日以後の母動物には、飼育ケージの床に金属製床板を敷き、床

敷として木製チップ(ホワイトフレーク[®], 日本チャールス・リバー)を適宜供給した。供給した飼料、水および床敷には試験に支障を来す可能性の考えられる混入物はなかった。

3. 群分け法

雌雄とも初回投与日の体重をもとに体重別層化無作為抽出法に準じて群分けし、1群につき各13匹を用意した。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

チオフェンの投与量は、次項に示す予備試験の結果を参考に25、100および400 mg/kgとした。投与液量は、各用量とも5 ml/kgとし、対照群のラットには、チオフェンの媒体としたコーンオイルをチオフェン投与群と同一条件にて投与した。各用量の投与検体は、雄に対しては交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後14日間の連続42日間、また、雌に対しては交配前14日間と最長14日間の交配期間中(交尾まで)ならびに交尾雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育3日まで毎日1回、ラット用胃管を用いて強制的に経口投与した。毎日の投与は、原則として一定時刻の間(通常13時～15時)に行い、各動物の投与液量は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回の測定体重をもとに、また、交尾成立後の雌については妊娠0日の体重をもとにそれぞれ算定した。

5. 投与量の設定

チオフェンの0(溶媒対照)、25、100および400 mg/kgを8週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD)の雌雄各5匹に1日1回、14日間、反復して経口投与した。また、経口投与されたチオフェンの一部は呼吸としてそのまま排泄されること⁸⁾、およびチオフェンは吸入により呼吸器から吸収されること⁹⁾が報告されていることから、呼吸として排泄されたチオフェンが同一飼育室内で飼育されている対照群に影響を及ぼす可能性の有無を検討するために、雌雄各5匹を別室で飼育し、これに対照群と同様に溶媒を投与した。

その結果、100 mg/kg以上のチオフェンは投与開始後一般状態を変化させ、14日間の反復経口投与によって肝臓重量を増加させた。さらに、400 mg/kgのチオフェンは、雌雄の体重増加および摂餌量を一過性に抑制し、雄の肝機能を変化させたことから、400 mg/kg/dayは6週間の反復投与により、何らかの毒性変化の期待される量であると考え、これを併合試験における高用量に設定した。また、低用量には毒性変化を生じないことの期待される25 mg/kg/dayを設定し、中用量には等比中項の100 mg/kg/dayを設定した。予備試験において、いずれの検査項目についても、対照群には、呼吸から排泄されたチオフェンによる暴露の影響を示唆する変化は認められなかったことから、併合試験の対照群は、チオフェン投与群と同室で飼育することとした。

6. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

B. 体重

雌雄とも、全例について体重を試験期間中週1回〔雄：投与1, 8, 15, 22, 29, 36, 42日, 雌：投与1, 8, 15日〕および解剖日に測定した。投与22日までに交尾しなかった雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾成立雌では、妊娠0, 7, 14, 20日, 分娩した雌では、分娩後0および4日(哺育0および4日)の体重を測定した。

C. 摂餌量

雌雄とも、全例について体重測定日と同日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を算定した。2週間の交配期間中の摂餌量は測定しなかった。交尾成立雌では、妊娠0~7, 7~14, 14~20日の、さらに、分娩した雌では、哺育0~4日の摂餌量を測定した。

D. 尿検査

予備試験では、投与2および9日に尿検査を実施したが、異常は認められなかった。併合試験では、尿の性状の異常の有無を確認するために、投与期間末期の投与37日に、雄の全例について尿検査を実施した。尿は、動物を4時間代謝ケージに収容して蓄尿することにより採取し、pH測定ならびに潜血、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲンおよびビリルビンの含有の程度は試験紙法(マルティスティックス/クリニテック200(マイルス三共))により判定し、沈渣は鏡検した。

E. 交配

交配は、投与15日(投与開始日=投与1日)の夕方から最長2週間、同一群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾の確認は、毎朝、膣栓および膣垢中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率〔(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〕, 同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情数を求めた。

F. 分娩状態

各群とも交尾雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態は、直接観察が可能なものについてのみ行った。

G. 分娩日の算定

分娩の確認は、午前9時~11時に限定し、この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物について、その日を哺育0日, その前日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎて分娩した動物については、翌日を分娩日とした。

分娩を確認した全例について妊娠期間(妊娠0日~分娩日の日数)を算定し、出産率〔(生児出産雌数/受胎雌数)×100〕を各群について求めた。

H. 病理組織検査

a) 雄動物

イ. 剖検, 器官重量および病理組織検査

最終投与日の投与終了後から絶食を開始し、翌日〔投与43日相当日〕にペントバルビタール深麻酔下で放血・致死させて剖検した。その際、全例について肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、甲状腺、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、これらの器官のうち、精巣および精巣上体はブアン液に固定し、その他の器官および大脳、小脳、脊髄、心臓、肺、副腎、膀胱ならびに剖検において異常を認めた器官は、10%ホルマリンに固定した。これらの器官のうち、大脳、小脳、肝臓および腎臓は各群の全例について、その他の器官は、対照群および400 mg/kg投与群の全例について組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織検査を行った。また、必要に応じてOil red O染色も施して観察した。なお、脾臓および甲状腺の重量測定と病理組織検査、ならびに小脳、脊髄および肺の病理組織検査は、チオフェンの毒性情報として脾臓重量の低下が報告されていること、ならびに予備試験において肝臓重量が増加して酵素誘導が疑われたことから、脾臓重量と酵素誘導の指標となる甲状腺重量を測定し、病理組織検査を実施することとした。また、チオフェンは呼吸器から吸収されることから、肺の病理組織検査を実施した。さらに、チオフェンは小脳の特定位に壊死性の病変を形成することが報告されているので、投与量と病変との関連性を明らかにするために小脳および脊髄の病理組織検査を実施した。

ロ. 血液学検査

全例について、剖検に先立ち、ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりEDTAを抗凝固剤として採血し、赤血球数(RBC), 白血球数(WBC), 血色素量(Hb), 平均赤血球容積(MCV), ヘマトクリット値(Ht), 平均赤血球血色素量(MCH), 平均赤血球血色素濃度(MCHC), 血小板数を多項目血液自動測定機(Coulter Counter Model S-PLUS IV)により測定し、白血球百分比はWright-Giemsa染色を行い、光学顕微鏡下で観察して算出した。また、各群の5例については、EDTAを抗凝固剤とする採血に先立ち、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血し、血液凝固時間自動測定装置(クロテック)により、プロトロンビン時間(PT)および活性部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定した。

ハ. 血液生化学検査

全例について、血液学検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、それぞれ血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA)および全自動電解質分析装置EA-05(A & T)を用い、総蛋白濃度(ビウレット法), アルブミン濃度(BCG法), 総コレステロール濃度(COD・DAOS法), ブドウ糖濃度(グルコキナーゼG6PDH法), 尿素窒素濃度(ウレアーゼGLDH法), クレアチニン濃度(Jaffé法), アルカリフォスファターゼ活性(p-ニトロフェニルリン酸基質法), GOT活性(SSCC法), GPT活性(SSCC法), 総ビリルビン濃度(ビリルビン「ロシュ」キットSシリーズ), カルシウム濃度(OCPC法), 無機リン濃度(モリブデン酸直接法), γ -GTP活性(γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニト

ロアニリド基質法), ナトリウム濃度(イオン電極法), カリウム濃度(イオン電極法), 塩素濃度(イオン電極法), A/G比(計算)について分析した。

b) 雌動物

イ. 剖検, 器官重量および病理組織検査

交尾不成立雌は交配期間終了日に, 交尾したが分娩しない雌は妊娠25日相当日に, 致死量のペントバルビタールを投与後に放血・致死させ, 剖検した。分娩した雌は哺育4日に, また, 瀕死状態と判断された動物は, そのつど剖検した。妊・不妊のいずれの例においても卵巣および子宮を摘出し, 子宮については Salewski法¹⁵⁾を応用して着床痕を染色して着床数を確認した。卵巣はブアン液に固定して保存し, 実体顕微鏡下で黄体数を数えた。不妊例および交尾不成立例の卵巣については, 病理組織検査を行った。また, 肝臓, 腎臓および胸腺の重量を全例について測定した。これらの器官および大脳, 小脳, 脊髄, 心臓, 脾臓, 肺, 副腎, 甲状腺, 子宮, 膀胱および剖検において異常を認めた器官は10%ホルマリンに固定して保存した。これらの器官のうち, 大脳, 小脳, 肝臓, 腎臓, 胸腺および脾臓は各群の全例について, その他の器官は, 400 mg/kg投与群および対照群の全例について組織切片を作製し, ヘマトキシリン-エオジン染色を施して病理組織検査を行った。また, 必要に応じてOil red O染色を行った。なお, 小脳, 脊髄, 脾臓, 肺および甲状腺および肺の病理組織検査は, 雄と同様の理由から実施した。

2) 出生児

A. 産児数の算定

哺育0日に産児数(生存児+死亡児)を調べ, 児の分娩率[(産児数/着床痕数)×100]および出生率[(出生産児数/着床痕数)×100]を求めた。また, 産児の外表異常の有無および性別を調べた。

B. 死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ, 哺育0日の生存率[(生児数/産児数)×100]および新生児の生後4日の生存率[(哺育4日の生児数/哺育0日の生児数)×100]を求めた。死亡児は剖検し, 胸腔および腹腔内の器官を除去した後, エタノールに固定して保存した。

C. 体重測定

哺育0日および4日に一腹単位で雌雄別に体重(litter重量)を測定し, [litter重量/測定児数]を各腹について求めた。

D. 剖検

哺育4日に全例をエーテル吸入により致死させ, 剖検した。胸腔および腹腔内の器官は一括して摘出し, 一腹ごとに10%ホルマリンに固定して保存した。カーカスは, 一腹ごとにエタノールに固定して保存した。

7. 統計解析

交尾率, 受胎率および産児の形態異常発現頻度については χ^2 検定¹⁶⁾を行った。その他のすべてのデータは, 個体ごとに得られた値あるいは一腹ごとの平均値を1標

本としてBartlett法¹⁷⁾を用いて分散性の一様性についての検定し, 次いで, 一元配置型の分散分析¹⁷⁾あるいはKruskal-Wallis順位検定²⁰⁾を行い, 対照群とチオフェン各投与群の差についてはDunnett型¹⁸⁾あるいはScheffé型¹⁹⁾の検定を行った。有意水準は, 5%および1%とした。病理組織検査結果については, Mann-WhitneyのU検定²¹⁾を用いて検定した。

結果

I. 反復投与毒性(親動物所見)

1) 死亡例, 瀕死屠殺例, 一般状態

雌雄ともにいずれの投与群にも死亡は認められず, 雄動物に瀕死屠殺例はなかった。雌では, 400 mg/kg投与群の1例が, 投与6日から失調歩行(ふらつき歩行)を示し, さらに投与8日には後肢が麻痺し削瘦したため, 瀕死状態であると判断して剖検した。生存例の一般状態については, 雄では, 100 mg/kg以上の投与群において半眼, 不整呼吸, 自発運動量の低下あるいは腹臥姿勢, 寄り掛かり姿勢, 軟便ならびに流涎が観察された。さらに, 400 mg/kg投与群では流涎も観察された。これらの変化は, 投与開始後の早い時期に投与後一過性に観察されたが, 流涎は全投与期間にわたって観察された。その他の変化はチオフェンの投与量とは無関係に観察された。雌では, 400 mg/kg投与群において, 上述の瀕死屠殺例のほかに1例の動物に失調歩行が観察された。この動物は, 不妊であったため剖検したが, 剖検時まで回復は認められなかった。また, 分娩後の哺育期間中にも3例の動物が失調歩行を示し, このうち1例には強直性痙攣も観察された。その他, 400 mg/kg投与群では雄と同様に, 眼瞼下垂, 不整呼吸, 腹臥姿勢, 寄り掛かり姿勢および流涎が観察され, 削瘦および背弯姿勢も認められたが, 100 mg/kg投与群にはこれらの変化は認められなかった。また, すべてのチオフェン投与群に流涎が観察された。しかし, 流涎は, 100 mg/kg以上の投与群では比較的多くの動物に全投与期間にわたって観察されたのに対し, 25 mg/kg投与群では少数に一時的に観察されたのみであった。その他の変化は, チオフェンの投与量とは無関係に観察された。

2) 体重, 摂餌量(Tables 1~6)

雄では, 25 mg/kg投与群の体重推移および摂餌量には投与の影響は認められなかった。100 mg/kg以上の投与群において, 投与開始後一過性に体重増加および摂餌量の抑制が認められたが, 100 mg/kg投与群についてはいずれの時期の体重および摂餌量にも対照群との間に有意差は認められなかった。400 mg/kg投与群では, 投与1~8日の摂餌量および体重増加が抑制された($p<0.01$)。その後の摂餌量は対照群と同様な値で推移し, 投与36~42日では対照群と比較して有意($p<0.05$)な高値を示したが, 体重は, 投与全期間にわたり対照群と比較して有意($p<0.05$, $p<0.01$)な低値で推移した。また, 対照群との間に有意差は認められなかったが, 投与36~42

Table 1 Body weight of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Days of administration				
1 (Init. wt.)	299.3 ± 11.6 (13)	299.8 ± 12.9 (13)	298.9 ± 11.4 (13)	298.4 ± 10.1 (13)
8	341.7 ± 20.4 (13)	341.8 ± 23.0 (13)	328.2 ± 30.0 (13)	301.1 ± 16.2** (13)
15	380.3 ± 28.6 (13)	377.7 ± 30.3 (13)	362.2 ± 35.0 (13)	342.2 ± 21.8** (13)
22	400.3 ± 32.0 (13)	402.2 ± 32.8 (13)	383.7 ± 34.9 (13)	361.4 ± 28.1** (13)
29	423.6 ± 28.0 (13)	430.8 ± 35.9 (13)	413.1 ± 38.9 (13)	383.6 ± 33.2* (13)
36	447.6 ± 31.2 (13)	457.2 ± 41.1 (13)	436.4 ± 43.2 (13)	403.8 ± 36.9* (13)
42	462.2 ± 35.0 (13)	467.9 ± 45.3 (13)	444.8 ± 43.2 (13)	409.6 ± 44.6** (13)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

*: significant difference from control, $p < 0.05$

**: significant difference from control, $p < 0.01$

Table 2 Body weight gain of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Days of administration				
1~8	42.4 ± 10.8 (13)	42.1 ± 11.2 (13)	29.3 ± 21.3 (13)	2.7 ± 11.6** (13)
8~15	38.5 ± 9.9 (13)	35.9 ± 8.9 (13)	34.1 ± 8.5 (13)	41.1 ± 11.4 (13)
15~22	20.1 ± 6.2 (13)	24.4 ± 5.8 (13)	21.5 ± 6.4 (13)	19.3 ± 9.6 (13)
22~29	23.3 ± 9.4 (13)	28.7 ± 5.6 (13)	29.4 ± 6.1 (13)	22.2 ± 8.2 (13)
29~36	24.0 ± 6.8 (13)	26.3 ± 7.3 (13)	23.3 ± 7.3 (13)	20.1 ± 6.6 (13)
36~42	14.5 ± 5.7 (13)	10.7 ± 6.0 (13)	8.3 ± 8.1 (13)	5.8 ± 11.6 (13)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

**: significant difference from control, $p < 0.01$

Table 3 Body weights of female rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Days of administration (Pre-mating period)				
1 (Init. wt.)	216.2 ± 5.2 (13)	216.2 ± 5.3 (13)	216.1 ± 5.3 (13)	216.4 ± 5.0 (13)
8	232.0 ± 7.7 (13)	233.8 ± 4.4 (13)	229.3 ± 6.6 (13)	205.3 ± 23.9** (13)
15	250.2 ± 11.6 (13)	253.8 ± 8.5 (13)	250.6 ± 10.7 (13)	234.3 ± 11.7** (12)
Days of pregnancy				
0	254.9 ± 11.5 (11)	255.3 ± 4.5 (10)	257.2 ± 8.9 (11)	242.0 ± 10.4** (9)
7	292.1 ± 12.0 (11)	292.0 ± 8.1 (10)	295.4 ± 7.8 (11)	277.9 ± 11.6** (9)
14	330.4 ± 10.9 (11)	328.1 ± 14.6 (10)	330.7 ± 7.2 (11)	315.3 ± 14.0* (9)
20	396.2 ± 15.1 (11)	390.8 ± 26.5 (10)	393.3 ± 20.6 (11)	381.5 ± 21.7 (9)
Days of lactation				
0	304.1 ± 26.0 (11)	290.4 ± 30.0 (10)	287.7 ± 25.0 (11)	282.5 ± 19.6 (9)
4	321.4 ± 18.1 (11)	328.5 ± 17.4 (9)	307.2 ± 26.7 (10)	294.6 ± 38.5 (7)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

*: significant difference from control, $p < 0.05$

**: significant difference from control, $p < 0.01$

Table 4 Body weight gain of female rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		25		100		400	
Days of administration (Pre-mating period)								
1~8	15.8 ± 4.2	(13)	17.6 ± 3.7	(13)	13.1 ± 3.8	(13)	-11.1 ± 21.6**	(13)
8~15	18.2 ± 6.4	(13)	19.9 ± 7.4	(13)	21.3 ± 6.2	(13)	24.2 ± 11.6	(12)
Days of pregnancy								
0~7	37.2 ± 3.6	(11)	36.7 ± 6.4	(10)	38.2 ± 4.0	(11)	35.9 ± 6.1	(9)
7~14	38.3 ± 4.6	(11)	36.1 ± 7.3	(10)	35.3 ± 5.6	(11)	37.4 ± 5.2	(9)
14~20	65.8 ± 12.9	(11)	62.7 ± 15.2	(10)	62.6 ± 18.6	(11)	66.2 ± 12.6	(9)
Days of lactation								
0~4	17.3 ± 16.0	(11)	31.4 ± 15.8	(9)	16.1 ± 14.3	(10)	6.4 ± 28.6	(7)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

** : significant difference from control, p<0.01

Table 5 Food consumption of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		25		100		400	
Days of administration								
1~8	170.9 ± 16.9	(13)	172.5 ± 17.2	(13)	150.2 ± 30.4	(13)	122.5 ± 12.6**	(13)
8~15	166.0 ± 19.9	(13)	160.1 ± 23.0	(13)	153.8 ± 25.6	(13)	165.0 ± 19.2	(13)
29~36	147.0 ± 14.0	(13)	148.9 ± 14.7	(13)	153.4 ± 17.8	(13)	163.2 ± 22.5	(13)
36~42	124.4 ± 13.4	(13)	118.4 ± 14.0	(13)	125.1 ± 14.1	(13)	141.2 ± 20.8*	(13)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, p<0.05

** : significant difference from control, p<0.01

Table 6 Food consumption of female rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		25		100		400	
Days of administration (Pre-mating period)								
1~8	119.0 ± 7.6	(13)	116.7 ± 5.3	(13)	109.7 ± 12.3	(13)	74.5 ± 22.9**	(13)
8~15	118.9 ± 8.9	(13)	117.1 ± 8.5	(13)	121.1 ± 10.3	(13)	126.7 ± 8.6	(12)
Days of pregnancy								
0~7	139.0 ± 5.5	(11)	137.5 ± 11.3	(10)	142.9 ± 10.9	(11)	136.2 ± 14.0	(9)
7~14	154.5 ± 6.8	(11)	150.0 ± 13.3	(10)	154.2 ± 11.2	(11)	150.8 ± 13.0	(9)
14~20	130.3 ± 6.5	(11)	128.0 ± 15.2	(10)	129.8 ± 10.1	(11)	133.3 ± 14.8	(9)
Days of lactation								
0~4	91.8 ± 14.5	(11)	99.4 ± 16.9	(9)	80.3 ± 31.2	(10)	65.6 ± 35.7	(7)

Values are expressed as Mean ± S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

** : significant difference from control, p<0.01

日の増加量は再びやや低値の傾向を示した。

雌では、100 mg/kg以下の投与群では、いずれの時期の体重および摂餌量にも対照群と比較して有意差は認められなかった。400 mg/kg投与群では、交配前の投与1～8日の摂餌量が対照群と比較して有意($p<0.01$)な低値を示し、体重が減少した。投与8～15日の摂餌量には、対照群との間に有意差は認められず、体重増加抑制も認められなくなったが、投与開始後の各時期の体重は対照群と比較して有意($p<0.01$)な低値を示した。妊娠期の摂餌量には対照群との間で有意差は認められなかったが、交配前の体重が低値であったために、妊娠0～14日の体重が対照群と比較して有意($p<0.05$, $p<0.01$)な低値を示した。哺育期には、哺育0～4日の摂餌量がやや低値の傾向を示したが、体重および摂餌量ともに対照群との間に有意差は認められなかった。

100 mg/kg投与群の1例の体重は、後述のII-1-2)分娩および哺育状態の項に記載した理由により評価の対象から除外した。

3) 尿検査所見

25 mg/kg投与群の尿検査所見は対照群と同様であった。100 mg/kg以上の投与群では、pHがアルカリに傾く動物が増加し、400 mg/kg投与群では、13例中11例が9以上を示した。その他の検査項目は、対照群と同様であった。

4) 解剖時検査所見

A. 雄〔解剖日：投与期間(42回投与)終了翌日〕

(1) 血液学検査所見 (Table 7)

赤血球については、100 mg/kg以上の投与群において血色素量および平均赤血球血色素濃度が、軽度ではあるが用量依存的に有意($p<0.05$, $p<0.01$)に低下した。また、400 mg/kg投与群では、平均赤血球血色素量が有意($p<0.01$)に減少した。ヘマトクリット値は、すべてのチオフェン投与群が対照群と比較して有意($p<0.05$, $p<0.01$)な低値を示したが、その程度は生理的変動の範囲内であった。その他の項目については対照群とチオフェン各投与群との間に有意差は認められなかった。

白血球については、数および百分比のいずれにも対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。

血液凝固に関連した検査項目では、400 mg/kg投与群においてAPTTが有意($p<0.05$)に短縮したが、PTについてはいずれのチオフェン投与群においても対照群との間に有意差は認められなかった。

(2) 血液生化学検査所見 (Table 8)

対照群と比較して、100 mg/kg以上の投与群においてブドウ糖濃度が有意($p<0.01$)に減少した。また、無機リン濃度が有意($p<0.01$)に増加し、アルカリフォスファターゼ活性が有意($p<0.01$)に低下した。さらに、400 mg/kg投与群では、尿素窒素、総コレステロールおよび総ビリルビンの各濃度、ならびにGPT, GOTおよび γ -GTPの各活性がそれぞれ対照群と比較して有意

($p<0.05$, $p<0.01$)に上昇した。これらはいずれもチオフェンの用量に依存して変化した。このほか、ナトリウム濃度がチオフェン各投与群において、また、カリウムおよび塩素濃度が25 mg/kg投与群において有意($p<0.05$, $p<0.01$)な高値を示したが、いずれも用量に依存した変化ではなかった。総蛋白濃度、アルブミン濃度、A/G比、クレアチニン濃度およびカルシウム濃度については、対照群とチオフェン各投与群との間に有意差は認められなかった。

(3) 器官重量 (Table 9)

25 mg/kg投与群では、重量および比体重値ともに対照群との間に有意差の認められる器官はなかった。100 mg/kg以上の投与群において肝臓および腎臓の比体重値が有意($p<0.01$)な高値を示した。また、400 mg/kg投与群では、脾臓重量が有意($p<0.01$)な低値を示した。400 mg/kg投与群における精巣上体重量は対照群と同様であったが、解剖時体重が対照群と比較して有意($p<0.01$)な低値を示したことから、比体重値が対照群と比較して有意($p<0.05$)な高値を示した。胸腺、精巣および甲状腺については、重量および比体重値ともに対照群との間で有意差は認められなかった。

(4) 剖検所見

肝臓では400 mg/kg投与群において2例に暗赤色化が、また、1例に退色がみられた。腫大は、チオフェン各投与群の1例ずつに認められ、黄色化が、対照群の4例、25 mg/kg投与群の5例、100 mg/kg投与群の3例および400 mg/kg投与群の1例にみられた。このほか、対照群の2例、25および100 mg/kg投与群の各4例、400 mg/kg投与群の1例に肝小葉の明瞭化がみられた。

腎臓では、400 mg/kg投与群に皮質の陥凹および退色が1例みられ、100 mg/kg投与群に腎乳頭の赤色化が1例みられた。また、25および100 mg/kg投与群の各1例、対照群の3例に腎盂の拡張が認められた。

肺では、対照群、100、および400 mg/kg投与群の各1例に暗赤色点、対照群の2例に灰白色域、1例に白色点がみられた。

甲状腺では100および400 mg/kg投与群の各2例に腫大、25 mg/kg投与群の1例に萎縮が認められた。

以上のほかに、対照群では胸腺の赤色点、心臓の白色点および精囊の萎縮が各1例にみられ、25 mg/kg投与群では副腎の腫大が2例に、100 mg/kg投与群では精巣上体の結節が1例にみられ、400 mg/kg投与群では、脾臓の萎縮を伴う退色、精巣および精巣上体の萎縮が各1例にみられた。また、100 mg/kg投与群では、水頭症が観察された。

(5) 病理組織検査所見 (Table 10)

各器官における観察所見を以下に示す。

(小脳)

400 mg/kg投与群の1例に、IIIおよびVI～X葉の顆粒細胞層に限局して、顆粒細胞の核濃縮を伴うごく軽度な壊死が認められたが、白質板および分子層に変化は認められなかった。

Table 7 Hematology of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		25		100		400	
Male								
Red blood cells								
Count ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	804 ± 39	(13)	770 ± 42	(13)	769 ± 31	(13)	788 ± 37	(13)
Hemoglobin (g/dl)	15.4 ± 1.0	(13)	14.7 ± 0.5	(13)	14.3 ± 0.4**	(13)	14.0 ± 0.4**	(13)
Hematocrit (%)	43.5 ± 2.2	(13)	41.9 ± 1.6*	(13)	41.5 ± 1.3**	(13)	41.4 ± 1.1**	(13)
M C V (μm^3)	54.2 ± 1.6	(13)	54.5 ± 2.3	(13)	54.1 ± 1.8	(13)	52.5 ± 2.1	(13)
M C H (pg)	19.2 ± 0.5	(13)	19.1 ± 0.9	(13)	18.6 ± 0.6	(13)	17.8 ± 0.7**	(13)
M C H C (%)	35.4 ± 0.8	(13)	35.1 ± 0.6	(13)	34.5 ± 0.5*	(13)	34.0 ± 0.2**	(13)
White blood cells								
Count ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	68 ± 15	(13)	56 ± 10	(13)	59 ± 15	(13)	62 ± 17	(13)
Band neutrophil (%)	0 ± 0	(13)	0 ± 1	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Segmented neutrophil (%)	15 ± 7	(13)	16 ± 7	(13)	18 ± 6	(13)	11 ± 5	(13)
Eosinophil (%)	1 ± 1	(13)	1 ± 2	(13)	0 ± 1	(13)	1 ± 1	(13)
Basophil (%)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Monocyte (%)	3 ± 2	(13)	3 ± 2	(13)	3 ± 2	(13)	3 ± 2	(13)
Lymphocyte (%)	81 ± 7	(13)	79 ± 8	(13)	79 ± 7	(13)	86 ± 6	(13)
Platelet								
Count ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	99.7 ± 13.1	(13)	98.5 ± 27.2	(13)	99.0 ± 10.9	(13)	102.1 ± 11.7	(13)
Coagulation time								
P T (sec)	15.3 ± 1.1	(5)	16.4 ± 2.4	(5)	15.4 ± 1.5	(5)	14.6 ± 1.4	(5)
A P T T (sec)	24.9 ± 1.5	(5)	23.7 ± 1.6	(5)	23.9 ± 1.9	(5)	21.8 ± 0.6*	(5)

Values are expressed as Mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

* :significant difference from control, $p < 0.05$

** :significant difference from control, $p < 0.01$

Table 8 Blood chemistry of male rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		25		100		400	
Total protein (g/dl)	5.5 ± 0.3	(13)	5.5 ± 0.2	(13)	5.6 ± 0.2	(13)	5.5 ± 0.2	(13)
Albumin (g/dl)	3.1 ± 0.1	(13)	3.1 ± 0.1	(13)	3.1 ± 0.1	(13)	3.1 ± 0.1	(13)
A/G	1.33 ± 0.15	(13)	1.28 ± 0.20	(13)	1.21 ± 0.07	(13)	1.26 ± 0.14	(13)
B U N (mg/dl)	13 ± 2	(13)	14 ± 2	(13)	14 ± 2	(13)	16 ± 3**	(13)
Creatinine (mg/dl)	0.7 ± 0.1	(13)	0.7 ± 0.0	(13)	0.7 ± 0.1	(13)	0.7 ± 0.1	(13)
Glucose (mg/dl)	147 ± 12	(13)	132 ± 9	(13)	114 ± 8**	(13)	120 ± 18**	(13)
Total cholesterol (mg/dl)	39 ± 6	(13)	35 ± 6	(13)	45 ± 7	(13)	51 ± 9**	(13)
Total bilirubin (mg/dl)	0.08 ± 0.03	(13)	0.08 ± 0.02	(13)	0.09 ± 0.01	(13)	0.17 ± 0.05**	(13)
Na (mEq/l)	143.7 ± 1.2	(13)	145.5 ± 0.8**	(13)	145.7 ± 0.8**	(13)	145.2 ± 0.7**	(13)
K (mEq/l)	3.90 ± 0.17	(13)	4.09 ± 0.17*	(13)	3.88 ± 0.15	(13)	3.98 ± 0.20	(13)
Cl (mEq/l)	108.6 ± 1.2	(13)	110.4 ± 1.1**	(13)	108.9 ± 1.0	(13)	108.6 ± 0.8	(13)
Ca (mg/dl)	8.6 ± 0.4	(13)	8.7 ± 0.2	(13)	8.8 ± 0.2	(13)	8.6 ± 0.2	(13)
Inorg. phos. (mg/dl)	5.5 ± 0.5	(13)	5.9 ± 0.4	(13)	6.2 ± 0.4**	(13)	6.5 ± 0.4**	(13)
A L P (U/l)	273 ± 36	(13)	254 ± 43	(13)	222 ± 41**	(13)	200 ± 20**	(13)
G P T (U/l)	30 ± 6	(13)	27 ± 5	(13)	30 ± 4	(13)	81 ± 100**	(13)
G O T (U/l)	61 ± 11	(13)	56 ± 8	(13)	58 ± 6	(13)	96 ± 69*	(13)
γ -GTP (U/l)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 1	(13)	1 ± 1**	(13)

Values are expressed as Mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

* :significant difference from control, $p < 0.05$

** :significant difference from control, $p < 0.01$

(肝臓)

100 mg/kg投与群において、小葉中心部の肝細胞の肥大が7例、マクロファージの浸潤が4例にみられたが、小葉中心性の肝細胞壊死は認められなかった。400 mg/kg投与群では、全例に軽度またはごく軽度な小葉中心性の肝細胞壊死と肝細胞の軽度な肥大が認められ、そのうちの11例に肝細胞細胞質の均質化または小空胞化とマクロファージの浸潤が認められた。小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化が観察された例のうちの2例についてOil red O染色を行ったが、小空胞化した肝細胞には染色性を示す顆粒はほとんど認められなかった。その他、対照群およびチオフェン投与群に小肉芽腫や小葉中心性および周辺性の肝細胞の脂肪化がみられたが、対照群とチオフェン各投与群との間に頻度および程度の差は見られなかった。

(腎臓)

Eosinophilic bodyが対照群の1例、25 mg/kg投与群の8例、100 mg/kg投与群の6例および400 mg/kg投与群の5例に認められたが、400 mg/kg投与群では、他の投与群と比較してより多数のeosinophilic bodyが認められた。また、対照群では12例、25および100 mg/kg投与群では各10例および400 mg/kg投与群では7例に萎縮および再生性の尿細管がみられたが、対照群とチオフェン各投与群との間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、腎盂の拡張が、対照群の4例ならびに、25および100 mg/kg投与群の各1例にみられ、間質内のリンパ球の浸潤が、対照群の2例および25 mg/kg投与群の1例に認められた。また、対照群では、髄質のごく少数の尿細管内に硝子円柱が2例にみられ、皮髄境界部にごく軽度なカルシウム沈着が1例にみられた。25 mg/kg投与群では腎盂に移行上皮の限局性の軽度な過形成が1例にみられ、100 mg/kg投与群では皮質の尿細管のごく軽度な拡張が1例にみられた。

(肺)

対照群の4例および400 mg/kg投与群の2例の動脈壁にカルシウム沈着、対照群の9例および400 mg/kg投与群の2例に肺胞内の泡沫細胞の集簇がみられ、そのうち対照群の3例ではマクロファージ、好中球およびリンパ球の浸潤を伴う肺肺炎が認められた。

(脾臓)

対照群および400 mg/kg投与群の全例に髄外造血および色素沈着がみられた。

(心臓)

対照群の4例および400 mg/kg投与群の1例に限局性のごく軽度な心筋壊死がみられた。

(膀胱)

対照群の1例および400 mg/kg投与群の2例に粘膜上皮のごく軽度なびまん性の過形成がみられた。

(精巣上体)

対照群の1例および400 mg/kg投与群の3例にごく軽度なリンパ球の浸潤が、また、対照群の1例に軽度な精肉芽腫がみられたが、400 mg/kg投与群と対照群との間に程度および頻度の差は認められなかった。400

mg/kg投与群の1例に精細管内生殖細胞の壊死・変性が認められた。

(精巣)

400 mg/kg投与群の1例の精細管が萎縮し、生殖細胞が減少しており、間質細胞のごく軽度な過形成がみられ、その例の精巣上体では管腔内に壊死および変性した生殖細胞がみられた。

(大脳、胸腺、甲状腺、副腎および脊髄)

いずれの投与群にも変化はみられなかった。

B. 雌〔解剖日：瀕死屠殺日、哺育4日(出生児生存)、哺育4日(全出生児死亡)、妊娠25日相当日(不妊および全胚死亡例)、交配期間終了日(交尾不成立例)〕

(1) 剖検所見

肝臓では、色調の変化がチオフェン各投与群で観察された。25および100 mg/kg投与群では、暗赤色化が少数に観察されたが、400 mg/kg投与群では、暗赤色化が4例に観察された他に、灰白色および黄色域が3例に、また、赤色域が2例に観察された。400 mg/kg投与群の瀕死屠殺例では、前記の赤色域の他に黄色化も観察された。小葉の明瞭化も400 mg/kg投与群の瀕死屠殺例を含むチオフェン各投与群に少数例ずつ観察された。このほか、400 mg/kg投与群では腫大が1例に認められた。また、25 mg/kg投与群では横隔膜ヘルニアが1例に認められた。

胸腺では、チオフェン各投与群の分娩例および400 mg/kg投与群の瀕死屠殺例に萎縮が観察された。25 mg/kg投与群では、2例と少なかったが、100 mg/kg投与群では4例、400 mg/kg投与群では6例と用量の増加に伴って増加した。このほか、対照群の1例に赤色点がみられた。

脾臓では100 mg/kg投与群の1例、瀕死屠殺例を含む400 mg/kg投与群の4例に萎縮が認められ、対照群では陥凹部が、また、400 mg/kg投与群では濾胞の不明瞭化がそれぞれ1例ずつにみられた。

肺では、25 mg/kg投与群の2例に暗赤色点が認められた。

副腎では、対照群に暗調の混濁化が、また、100 mg/kg投与群に腫大がそれぞれ1例に認められた。

腹部および陰部の被毛の汚れは、100 mg/kg投与群の2例および、瀕死屠殺した400 mg/kg投与群の1例に認められた。

その他、対照群では、前胃に黄色物沈着が、25 mg/kg投与群では、脾臓の赤色化が、100 mg/kg投与群では、腎臓皮質の退色化が、それぞれ1例に認められた。また、100 mg/kg投与群の全胚死亡例では、子宮の暗赤色化および肥厚、ならびに臍に暗赤色液の貯留が認められた。400 mg/kg投与群では、甲状腺の腫大が1例に認められた。また、瀕死屠殺した400 mg/kg投与群の動物には、顎下腺の萎縮、腎臓髄質の赤色化、腺胃にヘマチンの付着、胃および腸管の内容物の著しい減少が認められた。

(2) 器官重量(Table 9)

哺育4日出生児生存例では、100 mg/kg以下の投与群

Table 9 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Male	Final body weight (g)	439.7 ± 33.9 (13)	445.1 ± 43.7 (13)	419.7 ± 40.6 (13)	381.4 ± 41.5** (13)
	Liver (g)	12.49 ± 1.27 ^a (13)	13.04 ± 1.84 (13)	13.00 ± 1.76 (13)	13.56 ± 1.61 (13)
		2.84 ± 0.17 ^b	2.92 ± 0.17	3.09 ± 0.17**	3.55 ± 0.16**
	Kidneys (g)	2.65 ± 0.25 (13)	2.78 ± 0.30 (13)	2.89 ± 0.39 (13)	2.65 ± 0.33 (13)
		0.60 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.69 ± 0.04**	0.69 ± 0.04**
	Thymus (mg)	346.7 ± 92.8 (13)	324.6 ± 57.0 (13)	305.5 ± 86.4 (13)	309.7 ± 53.2 (13)
		79.1 ± 21.1	72.9 ± 11.3	73.1 ± 21.8	82.2 ± 17.5
	Testes (g)	3.09 ± 0.20 (13)	2.96 ± 0.25 (13)	3.24 ± 0.18 (13)	2.91 ± 0.37 (13)
		0.71 ± 0.06	0.67 ± 0.08	0.78 ± 0.07	0.77 ± 0.13
	Epididymides (g)	1.09 ± 0.08 (13)	1.09 ± 0.12 (13)	1.16 ± 0.08 (13)	1.06 ± 0.11 (13)
	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.04*	
Spleen (g)	0.72 ± 0.12 (13)	0.73 ± 0.14 (13)	0.68 ± 0.14 (13)	0.54 ± 0.09** (13)	
	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.14 ± 0.02	
Thyroid glands (mg)	15.4 ± 3.3 (13)	15.5 ± 4.2 (13)	17.8 ± 4.9 (13)	14.6 ± 4.1 (13)	
	3.5 ± 0.8	3.5 ± 0.8	4.3 ± 1.2	3.8 ± 1.1	
Female	Final body weight (g)	321.4 ± 18.1 (11)	328.5 ± 17.4 (9)	307.2 ± 26.7 (10)	294.6 ± 38.5 (7)
	Liver (g)	12.53 ± 0.79 (11)	13.21 ± 0.77 (9)	13.01 ± 1.02 (10)	13.89 ± 1.60 (7)
		3.90 ± 0.25	4.03 ± 0.19	4.26 ± 0.44	4.77 ± 0.74**
	Kidneys (g)	1.94 ± 0.13 (11)	1.88 ± 0.12 (9)	1.95 ± 0.12 (10)	2.10 ± 0.21 (7)
		0.60 ± 0.04	0.57 ± 0.04	0.64 ± 0.05	0.71 ± 0.03**
Thymus (mg)	245.2 ± 114.3 (11)	204.0 ± 81.7 (9)	188.4 ± 102.8 (10)	170.8 ± 109.8 (7)	
	75.5 ± 32.6	61.4 ± 22.3	59.6 ± 28.2	55.1 ± 31.3	

Values are expressed as Mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

a: absolute weight

b: relative weight (g or mg per 100 g body weight)

*: significant difference from control, p<0.05

**: significant difference from control, p<0.01

には、重量および比体重値ともに対照群と比較して有意差の認められた器官はなかった。400 mg/kg投与群では、肝臓および腎臓の比体重値が対照群と比較して有意(p<0.01)な高値を示した。しかし、胸腺重量については対照群との間に有意差は認められなかった。

瀕死屠殺、交尾不成立および不妊であったため、途中剖検した動物においても400 mg/kg投与群では、肝臓および腎臓の比体重値が高値の傾向を示した。また、瀕死屠殺例および全出生児死亡例では、チオフェンの用量とは無関係に胸腺重量が低値の傾向を示した。

(3) 病理組織所見 (Table 10)

各器官における観察所見を以下に示す。

(大脳)

400 mg/kg投与群で小脳に明らかな変化を示した例のうち、瀕死屠殺例を含む4例に脳室の軽度な拡張が、また、3例に脳室周囲のごく軽度な浮腫が認められた。

(小脳)

100 mg/kg投与群では、1例にごく軽度な顆粒細胞の壊死が認められたが、400 mg/kg投与群では、核濃縮を

伴う顆粒細胞の壊死が8例に認められた。さらに、400 mg/kg投与群の顆粒細胞の壊死巣付近では、白質板の壊死が7例に、また、分子層の軽度な空胞化およびプルキンエ細胞の変性または脱落が各6例にみられ、壊死巣内および周囲では脂肪顆粒細胞の浸潤が4例に、出血が4例に、また、カルシウム沈着が3例にみられた。顆粒細胞、白質板および分子層に強い変化がみられた例の小脳核では、多数の神経細胞の空胞変性が4例に、また、軽度な浮腫が2例に認められた。顆粒細胞が著しい壊死を起こし、白質板にも明らかな壊死が認められた例の病変域はほぼ全葉に及んでおり、特に、II~IV、IXまたはX葉の顆粒細胞層では変化が強く、IIIおよびIV葉では分子層およびプルキンエ細胞にも明らかな変化がみられた。一方、小脳の変化が軽度な例では、病変部は顆粒細胞層にはほぼ限局しており、主にII、IIIまたはIX葉に変化がみられた。これらの変化は、投与8日に行った瀕死屠殺例や、不妊解剖を行った例など、試験途中で剖検した400 mg/kg投与群の非妊娠動物にも認められた。

Table 10 Histopathological findings of rats treated orally with thiophene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ [Number of animals examined]	Sex:	male				female			
		Dose (mg/kg): 0 25 100 400 0 25 100 400							
Cerebrum		[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Dilatation of ventricle	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	+	0	0	0	0	0	0	0	4
Edema around ventricle	total	0	0	0	0	0	0	0	3
	±	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	1
Cerebellum		[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Pyknosis/necrosis of granular cells	total	0	0	0	1	0	0	1	8**
	±	0	0	0	1	0	0	1	0
	+	0	0	0	0	0	0	0	3
	++	0	0	0	0	0	0	0	2
	+++	0	0	0	0	0	0	0	3
Vacuolation in molecular layer	total	0	0	0	0	0	0	0	6
	±	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	4
Necrosis in laminae albae	total	0	0	0	0	0	0	0	7*
	±	0	0	0	0	0	0	0	3
	++	0	0	0	0	0	0	0	4
Hemorrhage in necrotic foci	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	±	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	2
Degeneration/loss of Purkinje cells	total	0	0	0	0	0	0	0	6
	±	0	0	0	0	0	0	0	1
	+	0	0	0	0	0	0	0	3
	++	0	0	0	0	0	0	0	2
Infiltration of fat granule cells around the necrosis	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	±	0	0	0	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	0	0	0	0	2
	+++	0	0	0	0	0	0	0	1
Calcification in necrotic foci	total	0	0	0	0	0	0	0	3
	±	0	0	0	0	0	0	0	1
	+	0	0	0	0	0	0	0	2
Vacuolar degeneration of neurons in cerebellar nuclei	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	++	0	0	0	0	0	0	0	3
	+++	0	0	0	0	0	0	0	1
Edema in cerebellar nuclei	total	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	2
Liver		[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Necrosis of hepatocyte in central zone	total	0	0	0	13**	0	0	3	5
	±	0	0	0	4	0	0	2	0
	+	0	0	0	9	0	0	1	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	3
	+++	0	0	0	0	0	0	0	2
Homogenous or vesicula changes of hepatocyte in central zone	total	0	0	0	11**	0	0	1	4
	±	0	0	0	1	0	0	0	0
	+	0	0	0	5	0	0	1	2
	++	0	0	0	5	0	0	0	2
Hypertrophy of hepatocyte in central zone	total	0	0	7*	13**	0	0	11**	13**
	±	0	0	7	1	0	0	10	4
	+	0	0	0	9	0	0	1	6
	++	0	0	0	3	0	0	0	3

±: very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

*: Significant difference from control, p<0.05

**: Significant difference from control, p<0.01

Table 10 (Continued)

Organ [Number of animals examined]	Sex:	male				female			
		Dose (mg/kg): 0	25	100	400	0	25	100	400
Liver									
Infiltration of macrophages in central zone	total	0	0	4	11**	0	0	5	4
	±	0	0	4	3	0	0	3	2
	+	0	0	0	4	0	0	1	2
	++	0	0	0	4	0	0	1	0
Infiltration of macrophages around necrotic area	total	0	0	0	0	0	0	0	4
	+	0	0	0	0	0	0	0	2
	++	0	0	0	0	0	0	0	2
Infiltration of neutrophil in necrotic area	total	0	0	0	0	0	0	0	2
	+	0	0	0	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage	total	0	0	0	0	0	0	0	3
	+	0	0	0	0	0	0	0	3
Fatty change of hepatocyte in central zone	total	13	13	13	13	5	6	9	12*
	±	10	11	4	10	5	6	8	11
	+	3	2	9	3	0	0	1	1
Fatty change of hepatocyte in peripheral zone	total	13	13	13	13	13	13	13	13
	±	0	0	0	0	6	8	7	9
	+	5	5	7	6	6	4	5	3
	++	8	8	6	7	1	1	1	1
Microgranuloma	total	13	13	13	10*	13	9	12	10
	±	7	11	8	10	12	9	10	9
	+	6	2	5	0	1	0	2	1
Infiltration of lymphocytes	total	0	0	0	0	1	0	0	0
	±	0	0	0	0	1	0	0	0
Increased number of mitosis of hepatocyte	total	0	0	0	0	0	0	0	1
	+	0	0	0	0	0	0	0	1
Kidney									
Eosinophilic body	total	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
	±	1	8*	6	5	0	0	0	0
	+	1	7	6	0	0	0	0	0
	++	0	1	0	3	0	0	0	0
Atrophic/regenerated tubules in cortex	total	12	10	10	7	8	10	7	4
	±	11	10	10	6	8	10	7	3
	+	1	0	0	1	0	0	0	1
Vacuolar degeneration of tubular epithelium	total	0	0	0	0	0	3	11**	8**
	±	0	0	0	0	0	3	4	4
	+	0	0	0	0	0	0	3	3
	++	0	0	0	0	0	0	4	1
Focal dilatation of tubular lumen in medulla	total	0	0	0	0	1	0	0	3
	±	0	0	0	0	1	0	0	3
Focal dilatation of tubular lumen in cortex	total	0	0	1	0	0	0	0	0
	±	0	0	1	0	0	0	0	0
Calcification of cortico-medullary junction	total	1	0	0	0	1	0	0	2
	±	1	0	0	0	1	0	0	2
Infiltration of lymphocytes in interstitium	total	2	1	0	0	1	0	2	0
	±	2	1	0	0	1	0	2	0

±:very slight;+, slight;++, moderate;+++, severe

*:Significant difference from control, p<0.05

**:Significant difference from control, p<0.01

Table 10 (Continued)

Organ [Number of animals examined]	Sex: Findings, grade and number of animals	male				female			
		Dose (mg/kg): 0	25	100	400	0	25	100	400
Kidney									
Hyaline cast in medulla	total	2	0	0	0	0	0	0	0
	±	2	0	0	0	0	0	0	0
Focal hyperplasia of transitional epithelium in renal pelvis	total	0	1	0	0	0	0	0	0
	+	0	1	0	0	0	0	0	0
Dilatation of renal pelvis	total	4	1	1	0	0	0	0	0
	+	4	1	1	0	0	0	0	0
Focal fibrosis in cortex	total	0	0	0	0	1	1	2	0
	±	0	0	0	0	1	1	2	0
Thymus									
Atrophy	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
	±	0			0	3	3	6	6
	+	0			0	3	1	1	1
	++	0			0	0	1	3	3
	+++	0			0	0	1	1	2
Spleen									
Decrease of blood content in red pulp	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
	±	0			0	0	2	2	3
	+	0			0	0	0	0	1
Atrophy of follicle	total	0			0	0	0	0	1
	+	0			0	0	0	0	1
Extramedullary hematopoiesis	total	13			13	13	13	12	12
	±	13			12	1	2	5	5
	+	0			1	9	7	6	6
	++	0			0	3	4	1	1
Deposits of pigment	total	13			13	13	13	13	13
	±	12			13	0	1	3	0
	+	1			0	13	10	10	8
	++	0			0	0	2	0	5
Lung									
Aggregation of foamy cells in alveolus	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
	±	9			2*	10			7
	+	7			2	8			7
Alveolitis with infiltration of macrophages/neutrophils /lymphocytes	total	3			0	0			0
	+	3			0	0			0
Calcification in artery	total	4			2	1			1
	±	4			2	1			1
Heart									
Focal necrosis of myocardial fiber	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
	±	4			1	1			3
Adrenal gland	total	[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
	Necrosis of fascicular and reticular zone	0			0	0			1
	+++	0			0	0			1

±: very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

*: Significant difference from control, p<0.05

**: Significant difference from control, p<0.01

Table 10 (Continued)

Organ [Number of animals examined] Findings, grade and number of animals	Sex: Dose (mg/kg):	male				female			
		0	25	100	400	0	25	100	400
Thyroid gland		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Ectopic thymus	total	0			0	1			0
	+	0			0	1			0
Urinary bladder		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Diffuse hyperplasia of epithelium	total	1			2	0			0
	±	1			2	0			0
Testis		[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Focal atrophy of seminiferous tubules	total	0			1				
	++	0			1				
Decreased number of germ cells of seminiferous tubules	total	0			1				
	++	0			1				
Diffuse hyperplasia of Leydig cells	total	0			1				
	±	0			1				
Epididymis		[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Spermatic granuloma	total	1			0				
	+	1			0				
Necrotic/degenerated germ cells in lumen	total	0			1				
	+	0			1				
Infiltration of lymphocytes in interstitium	total	1			3				
	±	1			3				

±: very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

*: Significant difference from control, p<0.05

**: Significant difference from control, p<0.01

(肝臓)

400 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例を含む5例に小葉中心性の肝細胞壊死がみられ、そのうちの瀕死屠殺例を除く4例では、壊死組織周囲にマクロファージが浸潤しており、瀕死屠殺例を含む2例では好中球の浸潤がみられた。400 mg/kg 投与群の瀕死屠殺例を含む3例に出血がみられた。また、小葉中心部では全例に肝細胞の肥大が認められ、瀕死屠殺例を含む4例に肝細胞細胞質の均質化または小空胞化が認められた。また、小葉中心部にもマクロファージの浸潤がみられた。100 mg/kg 投与群の小葉中心部でも11例に肝細胞の肥大が認められ、そのうち3例に肝細胞の壊死が、1例に軽度な肝細胞の均質化または小空胞化、5例にマクロファージの浸潤がみられた。小葉中心性の肝細胞の脂肪化が、対照群に5例、25 mg/kg 投与群に6例、100 mg/kg 投与群に9例、400 mg/kg 投与群に12例みられた。肝臓に小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化が観察された例のうちの2例および対照群1例についてOil red O染色を行った。その結果、小空胞化した肝細胞は瀕死屠殺した1例では小空胞とともに染色性を示す顆粒が認められたが、他の3例では染色性を示す顆粒はほとんど認められなかった。その他、小肉芽腫および小葉周辺性の脂肪化が認められたが、対照群とチオフェン各投与群との間に頻度および程度の差は認められなかった。

(腎臓)

チオフェン各投与群に尿細管上皮細胞の空胞変性が認められ、100および400 mg/kg 投与群では頻度および程度が増強した。対照群の1例および尿細管上皮細胞の空胞変性が観察された雌の例のうち1例についてOil red O染色を行った。その結果、空胞変性した尿細管上皮細胞は、まったく染色性を示さなかった。このほか、すべての投与群に萎縮または再生性の尿細管がみられたが、その頻度および程度に対照群とチオフェン各投与群との間で差はなかった。また、対照群の1例および400 mg/kg 投与群の3例に髄質の尿細管の拡張、対照群および25 mg/kg 投与群の各1例、および100 mg/kg 投与群の2例に皮質の限局性の線維化、対照群の1例および100 mg/kg 投与群の2例にごく軽度な間質へのリンパ球の浸潤、対照群の1例および400 mg/kg 投与群の2例に皮髄境界部のごく軽度なカルシウム沈着が認められた。

(胸腺)

対照群の3例にごく軽度な萎縮がみられた。25 mg/kg 投与群ではその程度が、また、100および400 mg/kg 投与群では頻度および程度が増強したが、対照群との間には、頻度および程度ともに差は認められなかった。

(脾臓)

25および100 mg/kg 投与群の各2例、ならびに瀕死屠殺例を含む、400 mg/kg 投与群の3例にごく軽度な赤脾

髄での血液量の減少がみられ、そのうち、瀕死屠殺例では濾胞の萎縮を伴っていた。また、色素沈着は全例でみられたが、25 mg/kg投与群の2例および400 mg/kg投与群の5例では程度が強かった。その他、髄外造血は各群のほぼ全例でみられ、程度および頻度についても対照群とチオフェン各投与群との間に差は認められなかった。

(肺)

対照群の10例および400 mg/kg投与群の7例に肺胞内の泡沫細胞の集簇が、また、対照群および400 mg/kg投与群の各1例の動脈壁にごく軽度なカルシウム沈着がみられた。

(心臓)

対照群の1例および400 mg/kg投与群の3例に限局性のごく軽度な心筋壊死がみられた。

(副腎)

400 mg/kg投与群の1例に束状帯および網状帯の広範な壊死がみられた。

(甲状腺)

対照群の1例に異所性の胸腺組織がみられた。

(胸腺、副腎、脊髄、不妊および交尾不成立雌の卵巣)

変化はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖学的検査所見

1) 交配成績 (Table 11)

交尾率および同居開始から交尾までに要した日数ならびにその間に回帰した発情期の回数に対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。また、着床の有無を基準に妊娠の成否を判定する限りにおいては、受胎した雌の数に群間で著しい差はみられず、したがって受胎率にも対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 分娩および哺育状態

観察が可能であった動物については、分娩状態の異常は観察されなかった。また、妊娠期間にも対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。なお、100 mg/kg投与群の1例は、腔栓が確認され、交尾成立が確認されてから、20日後に分娩した。しかし、出生児の体重および外表から判断された成熟度は交尾成立後22日に分娩した動物の出生児と差はなく、また、腔内に腔栓が確認された2日前に、精子は確認されなかったが、腔栓の落下が認められていたことから、この動物は交尾成立日が特定されなかったと判断して、妊娠期間ならびに妊娠期の体重および摂餌量を評価の対象から除外した。哺育状態については、児集めや児の保温を行わず、このため乳頭の突出が不良であった動物が、100 mg/kg投与群に2例、400 mg/kg投与群に1例観察された。さらに、400 mg/kg投与群では、これらの哺育行動は認められるものの、乳頭の突出が不良であった動物が1例認められた。

3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 12)

妊娠動物の黄体数、着床数および着床率に対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。

4) 出産率および妊娠期間 (Table 12)

出産率および妊娠期間に対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。

2. 出生児所見

1) 一般状態および生存性 (Table 12)

対照群の出生児に一般状態の異常は観察されず、全出生児の死亡した腹もなかった。25 mg/kg投与群では、分娩時に母動物の下腹部に被毛汚染の観察された1腹において、哺育0日に出生児の腹部に乳汁の貯留(ミルクスポット)が観察されず、哺育1日に全例が死亡した。100 mg/kg投与群では、哺育0日から、母動物の哺育不良に起因する体表温の低下や、ミルクスポットの認められない出生児が2腹に観察され、このうち1腹の出生児は、哺育2日までに全例が死亡した。他の1腹の出生児は、哺育1日には異常は観察されなくなった。400 mg/kg投与群では、哺育1日から母動物の哺育不良に起因する、出生児の体表温の低下や、ミルクスポットの無形成が1腹の出生児に観察され、哺育4日までに全例が死亡した。また、2腹の出生児は、哺育0日に異常は観察されなかったが、1腹は哺育2日から、また、他の1腹は哺育4日に、それぞれ全例の出生児の腹部にミルクスポットが認められなくなり、1腹は哺育4日までに全出生児が死亡した。なお、これら400 mg/kg投与群の3腹の母動物には、ふらつき歩行や、振戦などが観察された。

児の生存率については、100 mg/kg以下の投与群ではいずれの時期も対照群と同様であった。400 mg/kg投与群では、分娩率、生児出産率および出生率などの出生日の生存性には投与の影響は認められなかったが、生後の死亡がやや増加し、新生児の4日の生存率が低値の傾向を示した。しかし、対照群との間に有意差は認められなかった。

性比については対照群とチオフェン各投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 体重 (Table 12)

100 mg/kg以下の投与群については、対照群との間に有意差は認められなかった。400 mg/kg投与群では、哺育0および4日の体重が、雌雄ともにやや低値の傾向を示したが、対照群との間に有意差は認められなかった。

3) 形態

哺育0日の生児についての外表観察では、いずれの動物にも異常は観察されなかった。哺育4日における出生児の剖検において、100 mg/kg投与群の1腹の雌の1例の児に、左側水腎が観察されたほかには、いずれの投与群の新生児にも異常は認められなかった。死亡児の剖検では、異常はいずれの投与群にも認められなかった。

Table 11 Summary of reproductive performance in parental rats treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Number of mated pairs	13	13	13	12
Number of copulated pairs	12	13	13	11
Copulation index ^{A)}	92.3	100.0	100.0	91.7
Number of pregnant animals	11	10	12	9
Fertility index ^{B)}	91.7	76.9	92.3	81.8
Pairing days until copulation (Mean ± S.D.)	2.7 ± 1.2	3.2 ± 1.6	3.0 ± 1.0	4.4 ± 3.2
Frequency of vaginal estrus (Mean ± S.D.)	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3

A) : Copulation index=(Number of copulated pairs/Number of mated pairs)×100;%

B) : Fertility index=(Number of pregnant animals/Number of copulated pairs)×100;%

Table 12 Summary of development up of pups from dams treated orally with thiophene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	25	100	400
Number of pregnant females	11	10	12	9
Number of pregnant females with pups alive	11	10	11	9
Gestation index ^{A)}	100.0	100.0	91.7	100.0
Gestation length in days	22.2 ± 0.4 (11)	22.3 ± 0.5 (10)	22.4 ± 0.5 (10)	22.0 ± 0.0 (9)
Number of corpora lutea	14.9 ± 3.4 (11)	15.2 ± 1.7 (10)	15.0 ± 3.4 (12)	14.7 ± 1.1 (9)
Number of implantation sites	13.3 ± 3.8 (11)	13.8 ± 4.0 (10)	13.4 ± 4.9 (12)	12.9 ± 3.3 (9)
Implantation index ^{B)}	87.2 ± 15.0 (11)	89.5 ± 23.4 (10)	85.2 ± 26.5 (12)	87.1 ± 19.5 (9)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	12.6 ± 3.7 (11)	12.9 ± 3.8 (10)	12.6 ± 4.9 (12)	12.7 ± 3.3 (9)
Delivery index ^{C)}	95.5 ± 4.6 (11)	94.1 ± 8.1 (10)	86.8 ± 27.9 (12)	98.4 ± 3.3 (9)
Number of pups alive	11.9 ± 3.3 (11)	11.9 ± 4.4 (10)	12.4 ± 4.8 (12)	12.2 ± 3.1 (9)
Birth index ^{D)}	91.1 ± 10.6 (11)	87.7 ± 20.3 (10)	85.7 ± 27.4 (12)	95.3 ± 5.0 (9)
Live birth index ^{E)}	95.5 ± 10.6 (11)	92.6 ± 17.8 (10)	98.8 ± 2.6 (11)	96.9 ± 3.7 (9)
Pup weight in grams				
Male	6.6 ± 0.8 (11)	6.5 ± 0.7 (10)	6.2 ± 0.7 (11)	5.8 ± 0.6 (9)
Female	6.1 ± 0.8 (11)	6.1 ± 0.7 (10)	5.8 ± 0.8 (11)	5.5 ± 0.5 (9)
Sex ratio ^{F)}	34.6 ± 16.5 (11)	40.5 ± 13.9 (10)	50.9 ± 17.6 (11)	47.0 ± 10.7 (9)
Day 4 of lactation				
Number of pups alive	11.7 ± 3.3 (11)	11.2 ± 5.5 (10)	10.6 ± 5.6 (11)	7.4 ± 5.7 (9)
Viability index ^{G)}	98.4 ± 3.5 (11)	89.3 ± 31.5 (10)	79.6 ± 36.5 (11)	63.5 ± 43.4 (9)
Pup weight in grams				
Male	11.0 ± 1.9 (11)	10.6 ± 1.3 (10)	9.5 ± 1.8 (11)	8.5 ± 2.0 (9)
Female	10.2 ± 2.1 (11)	10.1 ± 1.5 (10)	9.0 ± 2.0 (11)	7.6 ± 2.1 (9)
Sex ratio ^{H)}	34.2 ± 17.1 (11)	42.8 ± 11.3 (9)	51.1 ± 17.6 (10)	45.6 ± 23.4 (7)

Values are expressed as mean ± S.D.

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

A) : Gestation index=(Number of pregnant females with pups alive/Number of pregnant females)×100;%

B) : Implantation index=(Number of implantation sites/Number of corpora lutea)×100;%

C) : Delivery index=(Number of pups born/Number of implantation sites)×100;%

D) : Birth index=(Number of pups alive on day 0/Number of implantation sites)×100;%

E) : Live birth index=(Number of pups alive on day 0/Number of pups born)×100;%

F) : Sex ratio=(Number of male pups alive on day 0/Number of pups alive on day 0)×100;%

G) : Viability index=(Number of pups alive on day 4/Number of pups alive on day 0)×100;%

H) : Sex ratio=(Number of male pups alive on day 4/Number of pups alive on day 4)×100;%

考察

以上の試験成績から、雄では、100 mg/kg以上の投与群において、肝細胞は小葉中心性に肥大し、マクロファージの浸潤が惹起され、さらに、400 mg/kg投与により小葉中心部の肝細胞細胞質が均質化および小空胞化し、小葉中心性に肝細胞が壊死した。また、血液生化学検査においても、GOTおよびGPT活性が上昇した。雌においても、100 mg/kg以上の投与群において、肝細胞は小葉中心性に肥大し、小葉中心性の肝細胞壊死、小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化、ならびにマクロファージの浸潤が観察された。これらの肝臓の毒性変化を反映して、雄では100 mg/kg以上の投与群において、また、雌では400 mg/kg投与群において肝臓重量比体重値が増加した。これらの変化は、投与8日に瀕死屠殺した雌にもすでに観察されていたことから、少なくとも雌では、比較的早期から肝臓は障害を受けていたものと考えられる。

チオフェンによる肝臓障害は、チオフェンの代謝過程で生成された活性中間体による毒性であることが明らかにされている¹⁰⁾。チオフェンは、肝臓のP450 monooxygenasesにより、S-oxidationを受け、その結果、反応性の非常に高いthiophene-S-oxidesに転換されることが*in vitro*²⁰⁾でも、また、*in vivo*²¹⁾でも証明されている。チオフェンの主要な尿中代謝物は、メルカプト尿酸であることから、thiophene-S-oxidesの代謝には、グルタチオン付加が関与しているものと考えられている²²⁾。一方、thiophene-S-oxidesは好電子性であるため、グルタチオンのない条件では、ミクロゾーム蛋白と非可逆的に結合する²³⁾。従って、チオフェンによる肝臓障害には、thiophene-S-oxidesの生成量と、グルタチオン付加などの第2相の代謝活性が関与しているものと考えられる。本試験では雌雄ともに肝臓に同質の病理組織所見が観察されているが、雌では、所見の有無に個体差はあるものの、雄と比較すると、より低い投与量から所見が認められ、その程度も雄と比較して増強されており、チオフェンによる肝臓障害には性差があるものと考えられる。一般に、肝臓の薬物代謝酵素活性は雄の方が高いので、thiophene-S-oxidesは雄においてより多く生成されると考えられるが、雄における肝臓障害の程度がむしろ弱かったのは、第二相の代謝活性や、細胞内の求核性分子の種類あるいは濃度などに相違があったためと推測される。

雌における肝細胞壊死の個体差の成因については、本試験結果からは明らかではないが、肝細胞壊死が非妊娠動物にも分娩後の動物にも観察されていることから、動物の生理状態よりも活性中間体の第二相の代謝活性などの個体差によるものと推測される。

雌では、400 mg/kg投与により、投与初期から一部の動物が運動失調を呈した。また、病理組織検査では、小脳の顆粒細胞壊死があり、これに伴って小脳核神経細胞の変性が観察された。また、100 mg/kg投与によっても軽度な変化が1例に観察された。雄では、運動失調を呈する動物は無く、また、病理組織検査においても400

mg/kg投与群の1例に軽度な所見が観察されたのみで、小脳の変化にも性差が認められた。チオフェンの毒性変化として小脳の顆粒細胞壊死および小脳核神経細胞の変性も、すでに報告されているが¹¹⁻¹³⁾、小脳に著しい変化の観察された動物には、肝細胞壊死も顕著に観察され、小脳の顆粒細胞壊死および小脳核神経細胞の変性の成因と肝細胞壊死の成因は同一であると推測される。脳においても薬物代謝酵素が合成されていることが証明されており²⁴⁾、小脳には、P4501A1/2や、P4502E1などの活性のあることが明らかにされている²⁵⁾。小脳病変の原因が、肝臓で生成されたチオフェンの活性中間体が脳血管閥門を越えて小脳に流入したことにより惹起されたものか、あるいは、チオフェンが脳血管閥門を越えて小脳に入り、小脳の薬物代謝酵素で代謝された結果生成された活性中間体により惹起されたものかは、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。小脳における変性には部位特異性があり、II～IVおよびIX葉の顆粒細胞に顕著に観察された。これは、既報¹²⁾ともほぼ一致する所見であるが、これらの葉は下小脳動脈の支配領域にあること²⁶⁾、また、小脳核神経細胞の分泌機能あるいは細胞間の情報伝達物質系は、小脳核神経細胞の細胞種ごとに異なること²⁶⁾等から、小脳におけるチオフェンの毒性発現には、障害を受ける細胞の解剖学的および生化学的性質が関係しているものと推測される。

職業的にチオフェンを使用している労働者に腎障害が起こることが報告されているが、本試験では、腎臓重量比体重値は雌雄ともに増加した。病理組織検査では、100 mg/kg以上の投与群の雌において尿管上皮の空胞変性が有意に増加したが、その程度と、肝臓や小脳の病理組織変化の程度や、動物の一般状態、あるいは哺育状態との間に相関性は認められないことから、尿管上皮の空胞変性は、チオフェン投与による変化であると考えられるが、その成因は、肝臓あるいは小脳病変の成因とは異なるものと推測される。雄の病理組織検査では、400 mg/kg投与群においてeosinophilic bodyの数の軽度な増加が認められたのみであった。血液生化学検査においても、血液尿素窒素濃度が増加したが、クレアチニン濃度には異常は認められなかったことから、少なくとも雌に腎臓機能障害はなかったものと考えられる。

チオフェンを経口投与すると、尿中にはメルカプト尿酸として排泄されることが報告されている¹⁰⁾。投与末期に行った尿検査では、pHがアルカリを示すものが、用量依存的に増加した。予備試験では、投与2および9日に尿検査を実施したが、pHは弱酸性から弱アルカリ性を呈していたことから、投与を反復することにより、pHが上昇したものと推測される。メルカプト尿酸は、酸性であることから、尿のpHの上昇は、少なくとも尿中に排泄されたメルカプト尿酸に起因するものではないと考えられるが、その原因については、本試験成績からは明らかにならなかった。

脾臓重量が400 mg/kg投与群の雄で低下した。また、重量測定は行わなかったが、100 mg/kg投与群の雌で脾臓の萎縮が観察された。しかし、雌雄ともに病理組織の

変化は伴っていなかった。SHR系ラットを用いた実験¹⁰⁾でも、脾臓重量の低下が報告されているが、組織学的には濾胞の萎縮を伴っており、今回の結果とは異なる。このほか雌の脾臓の病理組織検査では、チオフェン各投与群において、赤脾髄の血液量の減少が観察されたが、用量に伴う変化ではなく、雄には認められなかった。

雄の血液学検査において、100 mg/kg以上の投与群で血色素量が軽度低下したが、肝臓機能の指標となる酵素活性や器官重量との間に相関性は認められず、また、生理的変動の範囲内であることから、毒性変化であるとは判断されない。

血液生化学検査を実施した雄の100 mg/kg以上の投与群において、ブドウ糖濃度の減少、無機リン濃度の増加ならびにアルカリフォスファターゼ活性の低下が認められたが、いずれも軽微な変化であった。

交配成績および生殖器の病理組織検査から、チオフェンの雌雄動物の生殖能力に対する影響は認められなかった。チオフェンは、精子形成に影響を及ぼす化学物質のひとつに挙げられている¹¹⁾が、今回の試験結果からは、形態学的にも、機能の面からもチオフェンの影響は認められなかった。

チオフェンの投与量に伴う着床前死亡、胚・胎児死亡および形態異常などの増加は認められないことから、400 mg/kgまでの投与量のチオフェンには発生毒性はないものと考えられる。

分娩に対するチオフェン投与の影響は認められなかったが、100 mg/kg以上の投与群の少数の母動物に、児を集めたり保温したりするといった哺育行動に低下が認められた。また、400 mg/kg投与群では、母動物の哺育行動にこのような異常は認められないにもかかわらず、新生児の腹部に乳汁の貯留が認められないことから、泌乳の低下が疑われる動物が認められた。これらの動物には100 mg/kg投与群の1例を除いていずれも、小脳核神経細胞の変性が観察されており、哺育行動の低下、あるいは泌乳状態の不良は、チオフェン投与による二次的変化であると推測される。

有意差は認められなかったものの、400 mg/kg投与群では新生児生存率が著しく低値を示した。新生児の4日の生存率の低下は、母動物の哺育行動あるいは泌乳の低下に起因すると考えられるが、本試験結果からは、活性中間体が乳汁を介して、母動物から新生児へと移行し、それが新生児に毒性を発現した可能性も否定できなかった。

これらのことから本試験条件下では、チオフェンの無影響量は、反復投与毒性に関しては、雌雄いずれに対しても25 mg/kg/dayであり、生殖発生毒性に関しては、雄に対しては400 mg/kg/day、雌に対しては、25 mg/kg/day、新生児に対しては、100 mg/kg/dayであると推察される。

文献

- 1) The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. S. Budavari, M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman, eds., Eleventh edn., Merck & CO., Inc., Rahway, N.J., U.S.A. (1989).
- 2) National Toxicology Program: Health and safety program for thiophene. Research Triangle Park, N.C., U.S.A.:NTP, (1986).
- 3) National Toxicology Program: Prechronic design for thiophene. Part of Toxicology Design Committee package. Research Triangle Park, N.C., U.S.A.: NTP (1985).
- 4) И. Б. Михайлец, Г. А. Михайлец, Д. Г. Лелъц, А. В. Валихметов, *Gigiena Trúda i Professional nye Zabolevaniia*, 10, 57 (1966).
- 5) National Technical Information Service:AD277-689, Springfield, V.A., U.S.A.
- 6) J. Marhold, "Preheld Prumyslove Toxikologie," *Organicke Latky, Avicenum, Praha, Czechoslovakia*, 1986, p.1089.
- 7) A.A. Nomeir, P.M. Markham, M. Chadwick, *J. Toxicol. Environ. Health*, 39, 223 (1993).
- 8) H.G. Bray, F.M.B. Carpanini, B.D. Waters, *Xenobiotica*, 1, 157 (1971).
- 9) P.M. Dansette, C. Amar, C. Smith, C. Pons, D. Mansuy, *Biochem. Pharmacol.*, 339, 911 (1990).
- 10) R.J. McMurtry, J.R. Mitchell, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 42, 285 (1977).
- 11) R.M. Herdon, *Exp. Brain Res.*, 6, 49 (1968).
- 12) F. Mori, G. Koya, Y. Yoshida, K. Tamayama, T. Nishioka, *J. Toxicol. Pathol.*, 5, 21 (1992).
- 13) F. Mori, G. Koya, Y. Yoshida, *J. Toxicol. Pathol.*, 6, 223 (1993).
- 14) E. Nieschlag, Th. Schurmeyer, *Arch. Toxicol.*, Suppl., 7, 146 (1984).
- 15) E. Salewski, *Pharmacol.*, 247, 367 (1964).
- 16) 西村秀雄, "胎児科学," 雄鶏社, 東京, 1976, pp.115~177.
- 17) 佐久間昭, "薬効評価一計画と解析," 東大出版会, 東京, 1977.
- 18) C. W. Dunnett, *Biometrics.*, 20, 482 (1964).
- 19) H. Scheffé, *Biometrika.*, 40, 87 (1953).
- 20) W. H. Kruskal and W. A. Wallis, *J. amer. Statist. Assoc.*, 47, 583 (1952).
- 21) 丹後俊郎, "医学への統計学(古川俊之 監修)," 朝倉書店, 東京, 1985.
- 22) A.V. Hodgson, T.B. White, J.W. White, H.W. Strobel, *Mol. Cell. Biochem.*, 120, 171 (1993).
- 23) H. K. Anandatheerthavarada, J.F. Williams, L. Wecker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194, 312 (1993).
- 24) 遠山正彌, "医学のあゆみ," 170, 576 (1994).

- 25) D. Mansuy, P. Valadon, I. Erdelmeier, P. Lopez-Garcia, C. Amar, J.-P. Girault, P. M. Dansette, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 7825 (1991).
- 26) P. M. Dansette, D. C. Thang, H. E. Amri, D. Mansuy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**, 1624 (1992).

連絡先

試験責任者：長尾哲二
試験担当者：代田真理子，森村智美，渡辺千朗
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tetsuji Nagao (Study director)
Mariko Shirota, Tomomi Morimura,
Chiaki Watanabe
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

チオフェンの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Thiophene on Bacteria

要約

OECD既存化学物質安全性調査事業の一環として、チオフェンについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加の条件でプレート法により、用量設定試験を50~5000 μg /プレートの用量で行ったところ、S9 mix無添加試験、添加試験のいずれもWP2 *uvrA*以外の検定菌において、高用量群で抗菌性が認められた。したがって、本試験ではS9 mix無添加試験および添加試験のいずれもTA1537では78.1~2500 μg /プレート、WP2 *uvrA*では313~5000 μg /プレート、その他は156~5000 μg /プレートの範囲で用量を設定して試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加試験および添加試験のいずれも2500~5000 μg /プレートの用量で抗菌性が認められた。復帰変異コロニー数は、2回の本試験とも、用いた検定菌について、いずれの用量においても増加は認められなかったことから、チオフェ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¹⁾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²⁾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、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍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]

チオフェン(CAS No. 110-02-1)は、分子量 84.14の無色透明の液体である。試験には、東京化成工業(株)製、

[ロット番号：FGB01, 純度98%(不純物：不明)]のものを購入し、使用時まで冷蔵保管した。

チオフェンは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解性がよいことから、DMSOに50 mg/mlまたは25 mg/mlの割合で溶解した後、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。

試験の開始に先立って、チオフェンのDMSO溶液中での安定性試験および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、低濃度(0.781 mg/ml)溶液は本試験IIで調製したものについて、また高濃度(168 mg/ml)溶液は染色体異常試験で調製したものについて、室温遮光条件下で、安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均値に対して、100および101%であった。また、含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、低濃度は89.7%とやや低い値であったが、高濃度は95.2%であった。

[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, 2AAはDMSO(和光純薬工業(株))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

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-ビオチン	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、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。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・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	20g
バクタアガー (Difco)	15g

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 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol

** : 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〕

プレート法により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中にトッパアガー2 ml, 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を混合したのち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DMSO, 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。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。

結果および考察

〔用量設定試験〕

50~5000 μ g/プレートの範囲で公比を約3として、試験を実施したところ、S9 mix 無添加試験、添加試験のいずれもTA1537では1500 μ g/プレート以上で、またTA100, TA1535, A98の3菌株では5000 μ g/プレートで抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA*のみ最高用量においても抗菌性は認められなかった。

〔本試験〕

結果をそれぞれTable 1, 2に示した。チオフェンの用量を、S9 mix無添加試験、添加試験のいずれもTA1537では78.1~2500 μ g/プレート、WP2 *uvrA*では313~5000 μ g/プレート、その他は156~5000 μ g/プレートの範囲で公比を2として設定し試験を実施した。その結果、2回の試験のいずれも、用いた5種類の検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験において、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、チオフェンは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

Table I. Mutagenicity of thiophene** 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	
S9mix (-)	0	97 114 127 (113 \pm 15.0)	11 18 9 (13 \pm 4.7)	29 21 23 (24 \pm 4.2)	28 14 21 (21 \pm 7.0)	9 4 5 (6 \pm 2.6)	
	78.1	ND	ND	ND	ND	4 8 6 (6 \pm 2.0)	
	156	97 113 101 (104 \pm 8.3)	7 7 13 (9 \pm 3.5)	ND	18 21 24 (21 \pm 3.0)	7 5 8 (7 \pm 1.5)	
	313	107 106 111 (108 \pm 2.6)	12 11 8 (10 \pm 2.1)	13 12 20 (15 \pm 4.4)	23 18 18 (20 \pm 2.9)	6 5 4 (5 \pm 1.0)	
	625	113 94 86 (98 \pm 13.9)	11 11 14 (12 \pm 1.7)	27 16 18 (20 \pm 5.9)	19 20 23 (21 \pm 2.1)	7 6 9 (7 \pm 1.5)	
	1250	78 96 86 (87 \pm 9.0)	15 14 14 (14 \pm 0.6)	20 20 16 (19 \pm 2.3)	18 29 21 (23 \pm 5.7)	7 6 5 (6 \pm 1.0)	
	2500	79 99 94 (91 \pm 10.4)	12 13 10 (12 \pm 1.5)	17 16 20 (18 \pm 2.1)	21 19 28 (23 \pm 4.7)	4* 2* 3* (3 \pm 1.0)	
	5000	83* 75* 72* (77 \pm 5.7)	6* 11* 9* (9 \pm 2.5)	16* 24 13 (18 \pm 5.7)	18* 15* 13* (15 \pm 2.5)		
S9mix (+)	0	124 127 132 (128 \pm 4.0)	15 12 12 (13 \pm 1.7)	28 27 23 (26 \pm 2.6)	27 32 44 (34 \pm 8.7)	18 7 9 (11 \pm 5.9)	
	78.1	ND	ND	ND	ND	11 14 11 (12 \pm 1.7)	
	156	121 127 124 (124 \pm 3.0)	11 11 19 (14 \pm 4.6)	ND	28 34 22 (28 \pm 6.0)	15 8 8 (10 \pm 4.0)	
	313	120 107 98 (108 \pm 11.1)	19 12 12 (14 \pm 4.0)	33 13 24 (23 \pm 10.0)	34 16 25 (25 \pm 9.0)	17 25 18 (20 \pm 4.4)	
	625	119 105 120 (115 \pm 8.4)	13 13 11 (12 \pm 1.2)	19 21 24 (21 \pm 2.5)	23 26 31 (27 \pm 4.0)	18 8 15 (14 \pm 5.1)	
	1250	131 98 119 (116 \pm 16.7)	12 12 10 (11 \pm 1.2)	30 34 25 (30 \pm 4.5)	29 36 33 (33 \pm 3.5)	10 16 8 (11 \pm 4.2)	
	2500	110 117 116 (114 \pm 3.8)	9 10 16 (12 \pm 3.8)	21 14 10 (15 \pm 5.6)	21 19 26 (22 \pm 3.6)	12* 7* 12* (10 \pm 2.9)	
	5000	82* 91* 104* (92 \pm 11.1)	8* 9* 15* (11 \pm 3.8)	17 18 25 (20 \pm 4.4)	25* 14* 22* (20 \pm 5.7)		
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	618 627 632 (626 \pm 7.1)	174 215 208 (199 \pm 21.9)	119 117 113 (116 \pm 3.1)	840 892 847 (860 \pm 28.2)	1965 1673 1991 (1876 \pm 176.6)	
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	1068 1025 1025 (1039 \pm 24.8)	270 272 221 (254 \pm 28.9)	1270 1435 1069 (1258 \pm 183.3)	450 432 416 (433 \pm 17.0)	328 294 362 (328 \pm 34.0)	

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 98 % and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 2. Mutagenicity of thiophene** 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			
S9mix (-)	0	120	114	135	20	17	14	23	32	30	30	32	20	17	16	23
		(123 \pm 10.8)			(17 \pm 3.0)			(28 \pm 4.7)			(27 \pm 6.4)		(19 \pm 3.8)			
	78.1	ND			ND			ND			ND		14	17	11	
		(14 \pm 3.0)														
	156	131	117	83	7	6	13	ND			18	14	20	24	18	23
		(110 \pm 24.7)			(9 \pm 3.8)						(17 \pm 3.1)		(22 \pm 3.2)			
	313	104	81	120	11	12	13	20	21	21	21	19	17	18	12	31
		(102 \pm 19.6)			(12 \pm 1.0)			(21 \pm 0.6)			(19 \pm 2.0)		(20 \pm 9.7)			
625	105	93	100	16	9	9	29	16	18	19	16	24	17	14	19	
	(99 \pm 6.0)			(11 \pm 4.0)			(21 \pm 7.0)			(20 \pm 4.0)		(17 \pm 2.5)				
1250	88	83	85	10	9	13	23	12	22	17	17	19	26	25	18	
	(85 \pm 2.5)			(11 \pm 2.1)			(19 \pm 6.1)			(18 \pm 1.2)		(23 \pm 4.4)				
2500	76*	84*	78*	9*	6*	8*	23	12	21	18*	18*	21*	6*	12*	11*	
	(79 \pm 4.2)			(8 \pm 1.5)			(19 \pm 5.9)			(19 \pm 1.7)		(10 \pm 3.2)				
5000	78*	70*	91*	6*	5*	9*	13	17	15	17*	10*	11*				
	(80 \pm 10.6)			(7 \pm 2.1)			(15 \pm 2.0)			(13 \pm 3.8)						
S9mix (+)	0	126	129	117	16	13	10	44	24	21	37	34	28	8	17	16
		(124 \pm 6.2)			(13 \pm 3.0)			(30 \pm 12.5)			(33 \pm 4.6)		(14 \pm 4.9)			
	78.1	ND			ND			ND			ND		11	11	9	
													(10 \pm 1.2)			
	156	122	116	134	13	10	11	ND			23	37	29	13	12	6
		(124 \pm 9.2)			(11 \pm 1.5)						(30 \pm 7.0)		(10 \pm 3.8)			
	313	114	96	108	11	11	8	9	21	21	25	29	39	6	11	5
		(106 \pm 9.2)			(10 \pm 1.7)			(17 \pm 6.9)			(31 \pm 7.2)		(7 \pm 3.2)			
625	114	91	97	23	9	11	16	27	24	22	29	27	12	9	9	
	(101 \pm 11.9)			(14 \pm 7.6)			(22 \pm 5.7)			(26 \pm 3.6)		(10 \pm 1.7)				
1250	119	101	96	13	14	14	22	24	20	35	28	25	9	17	3	
	(105 \pm 12.1)			(14 \pm 0.6)			(22 \pm 2.0)			(29 \pm 5.1)		(10 \pm 7.0)				
2500	74*	107*	99*	7*	10*	12*	14	25	24	25*	28*	29*	10*	11*	10*	
	(93 \pm 17.2)			(10 \pm 2.5)			(21 \pm 6.1)			(27 \pm 2.1)		(10 \pm 0.6)				
5000	63*	69*	71*	4*	2*	6*	11*	25*	12*	19*	22*	26*				
	(68 \pm 4.2)			(4 \pm 2.0)			(16 \pm 7.8)			(22 \pm 3.5)						
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	678	599	627	247	269	266	145	157	153	959	967	925	1963	2099	1748
		(635 \pm 40.1)			(261 \pm 11.9)			(152 \pm 6.1)			(950 \pm 22.3)		(1937 \pm 177.0)			
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	1056	1405	1231	291	292	293	1477	1388	1534	501	502	487	208	280	208
		(1231 \pm 174.5)			(292 \pm 1.0)			(1466 \pm 73.6)			(497 \pm 8.4)		(232 \pm 41.6)			

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 98 % and impurity was unknown.

ND : Not done

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) 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.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：坂本京子, 川上久美子, 原 巧,
清水ゆり, 堀谷尚古, 松本容彦,
中込まどか, 中尾美津男,
飯田さやか
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)
Kyoko Sakamoto, Kumiko Kawakami,
Takumi Hara, Yuri Shimizu,
Naoko Horiya, Yasuhiko Matsuki,
Madoka Nakagomi, Mitsuo Nakao and
Sayaka Iida
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

チオフェンの 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 Thiophene on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、チオフェンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)、短時間処理(6時間)ともに0.84 mg/ml(10 mM)の濃度においても50%を明らかに越える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において0.84 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix非存在下における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。

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群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、チオフェンは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

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: Biocell)を10%添加したイーグルMEM(日水製薬㈱)培養液を用いた。

3. 培養条件

チオフェンは揮発しやすいことから、培養にはフラスコ(25 cm², Corning)を用いた。2×10⁴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CO₂インキュベーター(5% CO₂)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

チオフェン(略号: TP, CAS No.: 110-02-1, ロット番号: FGB01, 東京化成工業㈱製造)は、無色透明液体で、水に対しては不溶、DMSOおよびアセトンには混和し、融点-38℃、沸点84℃、分子式C₄H₄S、分子量84.14、純度98%(不純物は不明)の物質である。

被験物質原体の安定性に関する情報は得られなかったが、溶媒中(DMSO)では、0.781 μg/ml~168 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

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㈱)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0.5% (v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。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るため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、フラスコあたりの観察細胞(400細胞)における分裂中期細胞の頻度(分裂指数: Mitotic index)を調べ、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を明らかに越える増殖抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理ともに0.84 mg/ml(10 mM)とし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業㈱)およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical

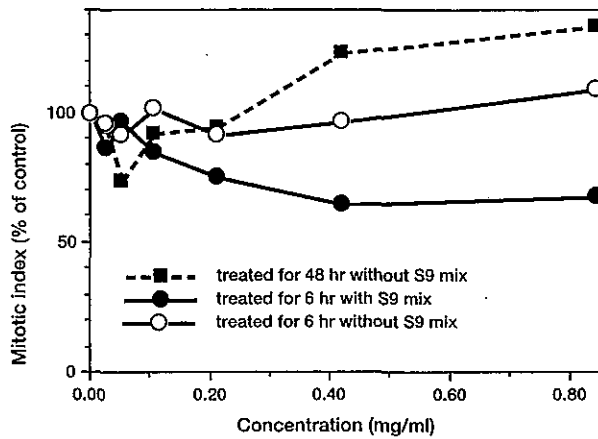


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with thiophene

Co.) は、注射用水(榊大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 µg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各フラスコにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのフラスコから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、林²⁾の方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法³⁾(多重性を考慮してfamilywiseの有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定⁴⁾($p < 0.05$)を行った。原則として以上2回の検定でともに有意差が認められた場

合を陽性とした。傾向性検定で有意差が認められない場合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。チオフェンを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。チオフェンを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、チオフェンは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 林 真, 変異原性試験, 1, 255(1992).
- 3) 吉村 功 編著, “毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ,” サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 4) 吉村 功, 大橋靖夫 編, “毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析,” 地人書館, 東京, 1992.

連絡先

試験責任者: 田中憲徳
 試験担当者: 山影康次, 中川ゆづき, 日下部博一,
 橋本恵子, 水谷正寛, 古畑紀久子
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 神奈川県秦野市落合729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
 Kohji Yamakage, Yuzuki Nakagawa,
 Hirokazu Kusakabe, Keiko Hashimoto,
 Masahiro Mizutani, Kikuko Furuhashi
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with thiophene (TP)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	0	0	0	3	1	0	4	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		
TP	0.21	24	200	1	0	1	0	0	0	2	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25		
TP	0.42	24	200	1	0	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25	NT	NT
TP	0.84	24	200	0	1	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
MC	0.00005	24	200	4	28	22	3	1	0	58	3	40 (20.0)	38 (19.0)	0.00		
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		
TP	0.21	48	200	0	0	0	0	1	10	11	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		
TP	0.42	48	200	1	0	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38	NT	NT
TP	0.84	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
MC	0.00005	48	200	3	23	45	15	4	0	90	6	60 (30.0)	58 (29.0)	0.25		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C, NT: not tested. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran · Armitage's trend test was done at $p < 0.05$ when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at $p < 0.05$ by Fisher's exact test. **: Purity was 98%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with thiophene (TP)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	1	2	1	0	1	0	5	2	5 (2.5)	4 (2.0)	0.25		
TP	0.21	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13		
TP	0.42	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13	NT	NT
TP	0.84	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	2	4	0	0	0	6	2	4 (2.0)	4 (2.0)	0.25		
TP	0.21	+	6-(18)	200	1	2	2	1	0	0	6	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.00		
TP	0.42	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	1	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	NT	NT
TP	0.84	+	6-(18)	200	5	6	5	0	0	0	16	0	7 (3.5)	5 (2.5)	0.25		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	0	10	10	1	2	0	23	2	20 (10.0)	20 (10.0)	0.13		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, CPA: cyclophosphamide, NT: not tested. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran · Armitage's trend test was done at $p < 0.05$ when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at $p < 0.05$ by Fisher's exact test. **: Purity was 98%.

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドのラットを用いる 単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of Tetrahydrothiophene 1,1-dioxide in Rats

要約

水および芳香族炭化水素との親和性が高いことから、工業的に溶媒として広く用いられている既存化学物質テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドの単回経口投与毒性試験を、SD系[Crj:CD(SD)]ラットを1群雌雄各5匹とし、0(対照)、892、1204、1626、2195、2963および4000mg/kg(公比1.35)用量で投与した。死亡は、投与後1～6時間に認められた。中毒症状として、自発運動の低下、痙攣、眼瞼下垂、流涎、立毛、紅涙、下腹部の尿による汚染が認められた。死亡動物の多くは、痙攣を呈した後、呼吸が微弱となって死亡した。生存動物の症状は、投与翌日～2日には回復した。体重は、投与翌日に増加抑制あるいは減少したが、症状が回復した3日には回復ないし回復傾向が認められた。剖検においては、死亡動物で、腺胃粘膜に黒色点散在が認められた。LD₅₀値(95%信頼限界)は、雄で2006(1783～2256)mg/kg、雌で2130(1844～2460)mg/kgであった。

方法

1. 被験物質

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドは、分子量120.16、融点27.4-27.8℃、沸点287℃、蒸気圧14.53 mmHg(150℃)、比重1.265(30/20℃)の無色透明の液体で、水や芳香族炭化水素に溶けやすい。試験には、新日本理化株式会社(大阪)製造のもの(Lot No.0007、純度95%、不純物として水5%を含む)を入手し、これを投与直前に純度換算で所定の投与用量になるような濃度に局方精製水(共栄製薬)に溶解して投与液とした。

2. 使用動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より購入したSD系[Crj:CD(SD)]雌雄ラットを5日間馴化・検疫飼育し、5週齢(雄122～138g、雌107～120g)で、1群雌雄各5匹として用いた。ラットは、温度22±3℃、湿度55±10%、換気回数10回以上/時、照明12時間(6～18時)に設定された飼育室で、金網ケージに2～3匹ずつ雌雄別に収容し、固型飼料〔日本農産工業(株)製、ラボMRストック〕と水は自由摂取させた。ただし、投与前日午後5時から投与後3時間まで除餌し、水のみを与えた。

3. 投与量および投与方法

投与量設定試験として、雌雄ラットに744、1041、

1458、2041、2857および4000 mg/kg用量を単回経口投与した結果、死亡率(死亡動物数/供試動物数)は、各々雄が0/3、0/3、1/3、1/3、2/3および3/3、雌が0/3、0/3、0/3、1/3、3/3および3/3であった。そこで、本試験の用量は、雌雄とも0、892、1204、1626、2195、2963および4000 mg/kg(公比1.35)に設定した。投与方法は、投与液量を体重1kg当たり10 mlとし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて強制的に動物の胃内に単回経口投与した。対照群には溶媒として用いた精製水を同様に投与した。

4. 観察事項

観察期間は投与後14日間とし、その間に一般状態の観察と生死の確認を投与日は頻回、その後は、少なくとも1日1回行った。体重は、投与直前(投与0日)、投与後1、3、7および14日に、また死亡動物については発見日にも測定した。剖検は、死亡動物は発見後速やかに、生存動物は観察期間終了後エーテル麻酔死させて行った。LD₅₀値は、投与後14日間の観察期間終了時における死亡率を基に、Van der Waerden法を用いて算出した。

結果

1. 死亡率およびLD₅₀値(Table 1)

死亡は、雌雄とも2195 mg/kg以上の用量群で、投与後1～6時間に認められた。LD₅₀値(95%信頼限界)は、雄で2006(1783～2256)mg/kg、雌で2130(1844～2460)mg/kgであった。

2. 中毒症状および体重

中毒症状としては、雌雄とも1204 mg/kg以上の用量群で、自発運動の低下が投与後15～30分から全例に認められ、1626 mg/kg以上の用量群で、痙攣が30分～6時間に用量依存的に認められた。さらに、眼瞼下垂、流涎、立毛、紅涙が雌雄に、下腹部の尿による汚染が雌に、いずれも散発的に認められた。死亡の多くは、痙攣を呈した後、呼吸が次第に微弱となって死亡した。生存動物の症状は、投与後1時間から回復傾向が認められ、2日には回復した。体重は、投与翌日(1日)に対照群に比べ増加抑制が雌雄とも892および1204 mg/kg群でみられ、1626 mg/kg以上の用量群で投与前に比べ減少した。しかし、3日には体重は増加に転じ、以後順調な増加が認められた。

Table 1 Mortality and LD₅₀ values of rats treated with tetrahydrothiophene 1,1-dioxide in the single dose oral toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after administration								Mortality ^{a)}	LD ₅₀ (mg/kg) [95% Confidence limit]	
			Day	0			1	2	3	4			5~14
				~1	~3	~6 hr.							
Male	0	5	0 ^{b)}	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	2006 [1783-2256]
	892	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1204	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1626	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	2195	5	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4/5	
	2963	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5/5	
	4000	5	0	3	2	0	0	0	0	0	0	5/5	
Female	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	2130 [1844-2460]
	892	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1204	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1626	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	2195	5	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3/5	
	2963	5	0	1	4	0	0	0	0	0	0	5/5	
	4000	5	0	4	1	0	0	0	0	0	0	5/5	

a: Number of animals died/Number of animals examined

b: Number of animals died

3. 剖検

死亡動物の腺胃粘膜に、黒色点の散在が雄では用量依存的に、雌では少数例に認められた。生存動物の器官には、異常は認められなかった。

考察

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドの急性毒性について、Brownら¹⁾は、ラットにおける経口LD₅₀値が2100 mg/kgで、中毒症状として痙攣が認められ、死亡は投与後24時間以内、多くは3時間までに認められたと報告している。本試験においても、LD₅₀値は雄で2006 mg/kg、雌で2130 mg/kg、特徴的な中毒症状は痙攣で、死亡は投与後6時間までに認められた。これらは、Brownらの報告と類似する結果であった。急性中毒症状としての痙攣は、本被験物質の類縁化合物²⁾あるいはチオフェン³⁾にも認められており、これらに共通した症状と考えられる。

文献

- 1) V. K. H. Brown, L. W. Ferrigan, D. E. Stevenson, *Brit. J. Industr. Med.*, **23**, 302(1966).
- 2) W. M. Alexander, B. E. Abreu, L. C. Weaver, H. E. Faith, J. W. Newberne, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **CXIX**, No.3-4, 423(1959).
- 3) M. M. Smith, S. T. Reid, *J. Med. Pharmaceut. Chem.*, **6**, 507(1959).

連絡先

試験責任者：山本 譲
 試験担当者：伊藤 雅也， 藩 栗 緒
 (財)畜産生物科学安全研究所
 〒229-11 神奈川県相模原市橋本台3-7-11
 Tel 0427-62-2775 Fax 0427-62-7979

Correspondence

Authors: Yuzuru Yamamoto (Study director)
 Masaya Ito, Cleo Pan
 Research Institute for Animal Science in
 Biochemistry and Toxicology
 3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi, Kanagawa,
 229-11, Japan
 Tel +81-427-62-2775 Fax +81-427-62-7979

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドの 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 Tetrahydrothiophene 1,1-dioxide in Rats

要約

工業的に溶媒として広く用いられている既存化学物質テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドの28日間反復経口投与毒性試験を、SD系[Crj:CD(SD)]ラットを用い、0(対照)、60、200および700 mg/kg/day用量の投与により実施した。動物数は1群雌雄各6匹とし、6群を設け、4群はそれぞれ0、60、200および700 mg/kg/dayを投与し、投与期間終了時に屠殺した。2群は0(対照)および700 mg/kgの14日間回復群とした。

一過性の自発運動低下が、投与初期に700 mg/kg群の雌に認められた。体重増加の抑制および摂餌量の減少が、700 mg/kg群の雌雄に認められた。尿および血液学検査では、被験物質の投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。血液生化学検査では、700 mg/kg群の雄に有意なコリンエステラーゼおよび総ビリルビンの増加、塩素の減少が、また雌にGPTの増加、グルコースの減少が認められた。病理学検査では、腎臓の近位尿管上皮における硝子滴および好酸体の増加が200および700 mg/kg群の雌に認められ、700 mg/kg群の雄の腎臓相対重量は有意に増加した。700 mg/kg群の雌で、脾臓の絶対重量の有意な減少が認められたが、組織学的には異常は認められなかった。回復群においては、腎臓の変化は回復傾向を示し、その他の変化はいずれも回復した。

以上の結果から、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドのラットへの28日間反復投与により、腎臓の病理学的変化および主に肝機能への影響が示唆される血液生化学的変化などが認められた。無影響量は雄で60 mg/kg/day、雌で200 mg/kg/dayと推定された。

方法

1. 被験物質

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドは、分子量120.16、融点27.4~27.8℃で、水および芳香族炭化水素に極めて溶け易く、水を3~5%添加された無色透明の液体である。試験には、新日本理化学工業のもの〔ロット番号0007、純度95%、不純物として水5%を含む〕を入手し、冷暗(4℃)条件下で密栓保管し、使用した。投与液は、被験物質を純度換算で所定の投与用量になるような濃度に局方精製水(共栄製薬)に溶解して調製し、使用時まで冷所(4℃)遮光下で密栓保管した。被験物質の原液および投与液中の被験物質は、安定であることを

確認した。

2. 供試動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より搬入したSD系[Crj:CD(SD)]ラットを、雄は5日、雌は6日間検疫・馴化飼育し、5週齢(雄146-157 g、雌126-140 g)で、1群雌雄各6匹として試験に用いた。ラットは、温度22±3℃、湿度55±10%、換気回数10回以上/時、照明12時間(6-18時)に設定した飼育室で、金網ケージに個別に収容し、固型飼料〔日本農産工業(株)、ラボMRストック〕および水を自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドのラットにおける急性経口LD₅₀値は、2100 mg/kgと報告¹⁾されている。投与量設定試験は、5週齢のSD系ラットを1群雌雄各4匹とし、0、50、100、250、500あるいは1000 mg/kg/day用量の14日間反復経口投与により実施した。体重増加の抑制、摂餌量の減少および尿pHの上昇傾向が、500 mg/kg以上の雌雄に認められた。1000 mg/kgでは、投与5日頃まで初期体重を下回って推移し、雄の1匹は死亡した。さらに、雌雄にヘマトクリット値の増加が、雌に血清GOT、GPTの増加が、雄に総ビリルビンの増加およびカリウムの減少がそれぞれ認められた。剖検および器官重量においては、変化は認められなかった。したがって、本試験における投与量は、明らかな毒性影響の発現が予想される700 mg/kg/dayを最高用量とし、以下200および60 mg/kg/dayの3用量および対照を設定した。試験群は、以上の4群の他に、700 mg/kg/dayおよび対照の14日間回復群を設けた。投与は、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を1日1回、28日間にわたって経口投与した。投与液量は、体重100 g当たり0.5 mlとした。対照群には溶媒として用いた局方精製水を同様に投与した。

4. 観察および検査項目

1) 一般状態観察

投与および回復期間中毎日、生死および外観、行動等を観察した。

2) 体重および摂餌量測定

体重は、投与1日(投与初日の投与直前)、3日およびその後は週2回、3あるいは4日ごと、ならびに屠殺日に測定した。摂餌量は、ケージごとに週1回(雄は投与3、

10, 17, 24日および投与終了後3, 10日, 雌は投与2, 9, 16, 23日および投与終了後2, 9日), 翌日までの24時間の飼料消費量を測定した。

3) 尿検査

雄は投与23日および投与終了後11日, 雌は投与24あるいは27日および投与終了後10日に, ラットを代謝ケージに約3時間収容して採尿し, 外観の観察, 比重の測定 [屈折計, エルマ光学(株)], pH, 潜血, タンパク, 糖, ケトン体, ビリルビン, ウロビリノーゲン [以上, マルティスティックス, マイルス・三共(株)] および沈渣 (URI-CEL液で染色, ケンブリッジケミカルプロダクト社) の検査を行った。

4) 血液学検査

供試血液の採取は, 投与期間および回復期間終了翌日における屠殺剖検時に行った。動物は採血前日の午後5時より除餌し, 水のみを給与した。腹大動脈から採取した血液は3分割し, その一部はEDTA-2Kで凝固防止処理し, 多項目自動血球計数装置 [東亜医用電子(株), E-4000] により, 赤血球数(電気抵抗検出方式), 血色素量(ラウリル硫酸ナトリウム-ヘモグロビン法), ヘマトクリット値(パルス検出方式), 平均赤血球容積, 平均赤血球血色素量, 平均赤血球血色素濃度(以上, 計算値), 白血球数および血小板数(以上, 電気抵抗検出方式)を, また塗抹標本を作製して網状赤血球数(Brilliant cresyl blue染色)および白血球百分率(May-Giemsa染色)を測定した。さらに一部は3.8%クエン酸ナトリウム液で処理して血漿を得, 血液凝固自動測定装置(アメルング社, KC-10A)により, プロトロンビン時間(Quick一段法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸活性化法)を測定した。

5) 血液生化学検査

採取した血液の一部から血清を分離し, 生化学自動分析装置 [日本電子(株), JCA-VX-1000型クリナライザー] により, 総タンパク(Biuret法), アルブミン(BCG), A/G比(計算値), 血糖, トリグリセライド, 総コレステロール(以上, 酵素法), 総ビリルビン(Jendrassik法), 尿素窒素(Urease-UV法), クレアチニン(Jaffé法), GOT, GPT, γ -GTP(以上, SSCC法), アルカリホスファターゼ(GSCC法), コリンエステラーゼ(BTC-DTNB法), カルシウム(OCPC法)および無機リン(酵素法)を, 電解質自動分析装置 [東亜電波工業(株), NAKL-1] により, ナトリウム, カリウムおよび塩素を測定した。

6) 病理学検査

所定の投与期間あるいは回復期間終了翌日の採血に続いて放血屠殺し, 剖検した。また, 脳, 心臓, 胸腺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 精巣, 精巣上体, 卵巣を秤量した。病理組織学検査は, 採取した器官を10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後, 対照群および700 mg/kg群では脳, 脊髄, 下垂体, 眼球, 甲状腺(上皮小体を含

む), 胸腺, 心臓, 気管, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 胃, 小腸(十二指腸・空腸・回腸), 大腸(盲腸・結腸・直腸), 膵臓, 精巣, 精巣上体, 精囊, 前立腺, 卵巣, 子宮, 膣, 膀胱, リンパ節(頸部リンパ節, 腸間膜リンパ節), 坐骨神経, 骨髄について, 60および200 mg/kg群ならびに回復群では, 毒性影響がうかがわれた雄の腎臓を, さらに回復群については器官重量に変化の認められた雌の肝臓, 脾臓, 胸腺および血液検査で変化が認められたため雌雄の骨髄を検査した。検査は, 常法によりパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。

5. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について, Dunnettの多重比較検定を行った。ただし, 回復群については, t 検定およびU検定を行った。

結果

1. 一般状態および死亡

一般状態の変化について, 自発運動の低下が700 mg/kg群で雌の12匹中3匹に認められた。これらの自発運動の低下は, いずれも投与3日のみに認められ一過性の変化であった。死亡は認められなかった。

2. 体重(Fig. 1)

700 mg/kgの体重は対照群を下回って推移し, 雄は投与期間を通じて, 雌は投与開始後14日までの体重に有意差が認められた。回復期間においては, 700 mg/kgの回復群の体重増加量は雌雄とも対照群を上回り, 有意に低値を示した雄の体重も, 回復期間終了時には対照群との間に有意差は認められなくなった。

3. 摂餌量(Fig. 2)

摂餌量の有意な減少が, 700 mg/kg群で雄は投与1~3週, 雌は投与1週に認められた。700 mg/kgの回復群の摂餌量は, 対照群に比べて, 雄では差がなく, 雌では投与終了後1週に有意に増加した。

4. 尿所見

投与および回復期間中の検査で, 被験物質投与各群の雌雄とも, 各検査項目に有意な変化は, 認められなかった。

5. 血液学所見 (Table 1, 2)

被験物質投与各群の雄の平均赤血球血色素濃度は, 対照群と比べて全般的にやや低値を示し, 統計学的に有意差が認められた。しかし, 変化傾向が用量依存的でなく, 赤血球数, 血色素量およびヘマトクリット値にも, 有意な変化は認められなかった。700 mg/kgの回復群においては, 雄に有意な白血球数の増加が, 雌に有意な赤血球数の減少および平均赤血球容積の増加が認められた。白血球の百分率には変化は認められなかった。

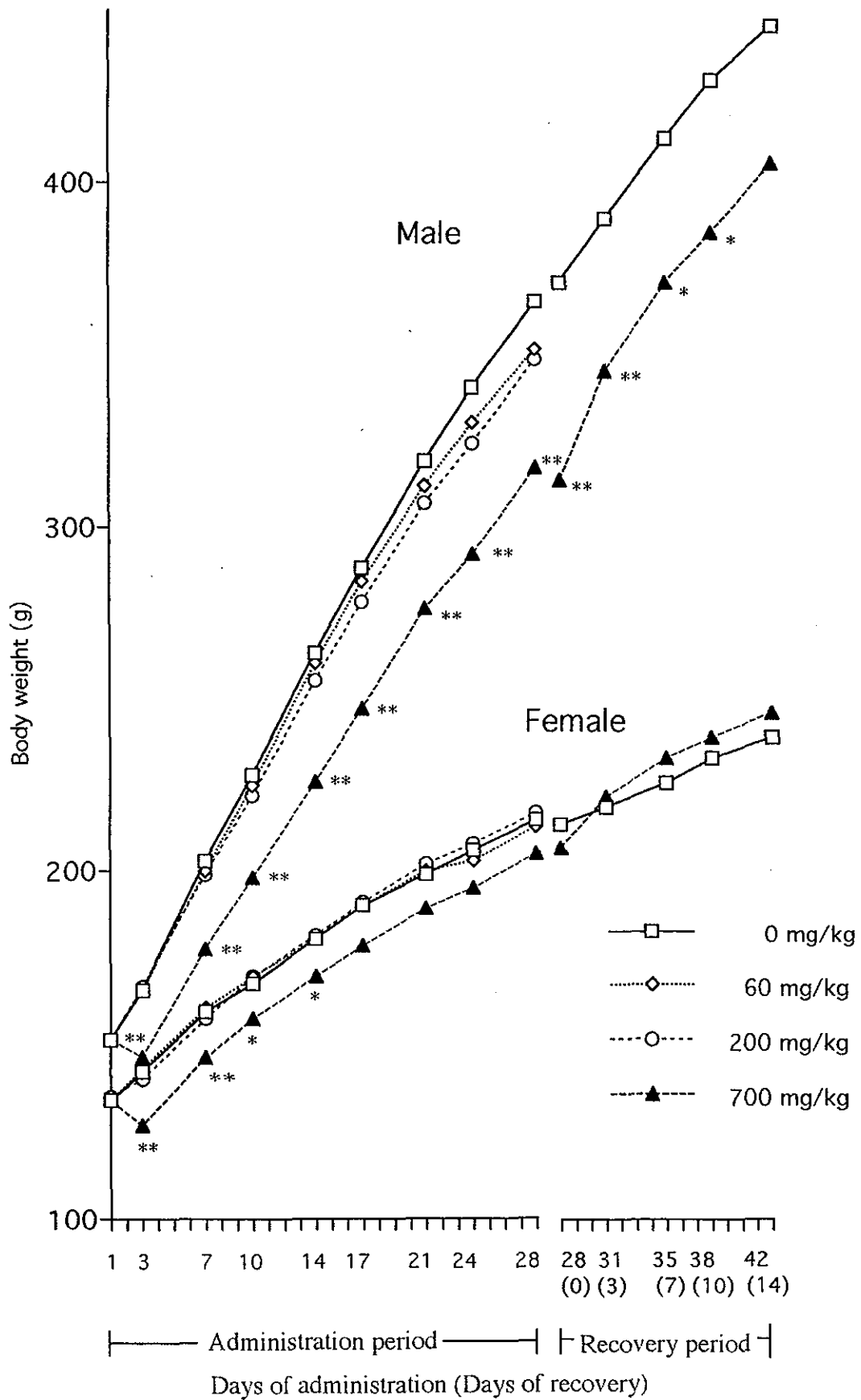


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with tetrahydrothiophene 1, 1-dioxide in the 28-day repeat dose toxicity test

Significantly different from control group (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)

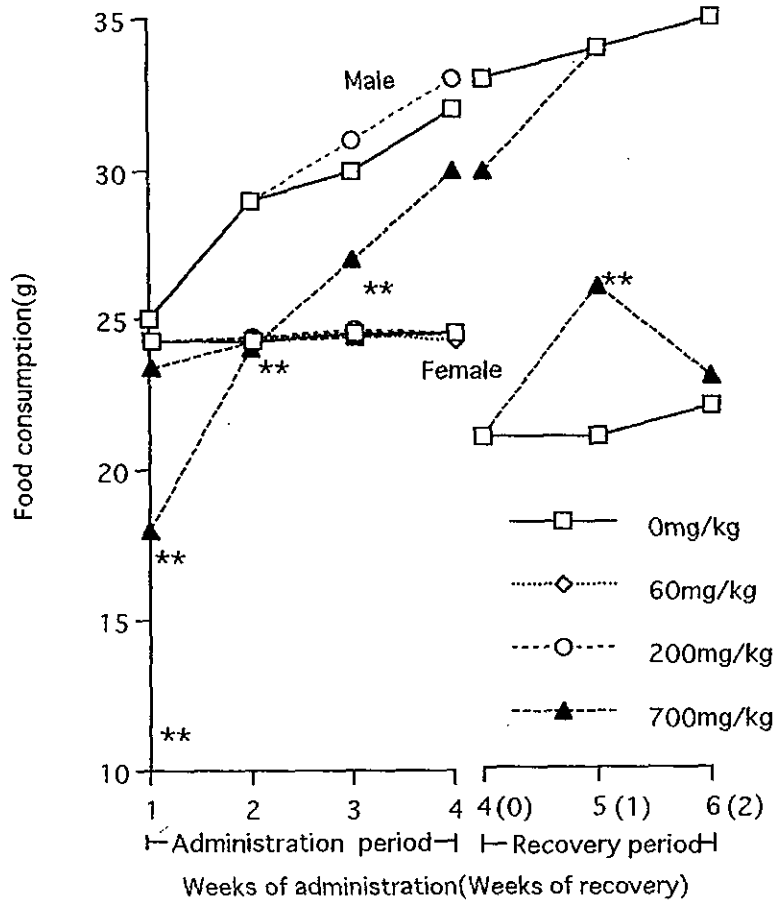


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with tetrahydrothiophene 1, 1-dioxide in the 28-day repeat dose toxicity test

Significantly different from control group (**:p<0.01)

Table 1 Hematological examination in male rats after the oral administration of tetrahydrothiophene 1,1-dioxide for 28 days and a recovery period for 14 days

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	60	200	700	0	700
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Erythrocyte (10 ¹² /mm ³)	765 ± 32	763 ± 43	763 ± 29	772 ± 22	784 ± 58	800 ± 49
Hemoglobin (g/dl)	15.6 ± 0.4	15.4 ± 0.5	15.0 ± 0.4	15.8 ± 0.6	15.5 ± 0.7	15.9 ± 0.6
Hematocrit (%)	45.0 ± 1.8	45.4 ± 1.8	44.8 ± 1.2	47.1 ± 1.5	45.0 ± 1.9	46.1 ± 2.1
MCV (fl)	59 ± 3	60 ± 3	59 ± 2	61 ± 2	58 ± 2	58 ± 2
MCH (pg)	20.4 ± 0.9	20.2 ± 1.1	19.7 ± 0.6	20.5 ± 0.8	19.8 ± 0.7	19.9 ± 0.9
MCHC (%)	34.6 ± 0.8	33.8 ± 0.4*	33.5 ± 0.2**	33.6 ± 0.4**	34.3 ± 0.5	34.5 ± 0.8
Reticulocyte (%)	39 ± 10	38 ± 11	43 ± 9	28 ± 6	35 ± 10	37 ± 11
PT (sec)	12.5 ± 0.3	12.7 ± 0.2	12.7 ± 0.1	12.8 ± 0.1	12.6 ± 0.2	12.9 ± 0.3
APTT (sec)	17.2 ± 1.0	17.7 ± 0.3	16.6 ± 1.1	16.7 ± 1.2	17.5 ± 1.3	17.0 ± 1.1
Leukocyte (10 ⁹ /mm ³)	60 ± 16	58 ± 19	58 ± 13	64 ± 7	76 ± 19	104 ± 22*
Platelet (10 ⁹ /mm ³)	149 ± 17	148 ± 8	154 ± 11	154 ± 19	158 ± 19	147 ± 18

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group (*:p<0.05, **:p<0.01)

Table 2 Hematological examination in female rats after the oral administration of tetrahydrothiophene 1,1-dioxide for 28 days and a recovery period for 14 days

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	60	200	700	0	700
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Erythrocyte ($10^4/\text{mm}^3$)	773 ± 21	778 ± 32	752 ± 23	778 ± 42	817 ± 16	781 ± 21**
Hemoglobin (g/dl)	15.1 ± 0.4	15.6 ± 0.5	14.8 ± 0.7	15.2 ± 0.9	15.5 ± 0.5	15.3 ± 0.5
Hematocrit (%)	43.9 ± 1.0	44.6 ± 1.3	43.0 ± 1.5	44.9 ± 2.5	44.9 ± 0.9	44.4 ± 1.2
MCV (fl)	57 ± 2	57 ± 2	57 ± 1	58 ± 1	55 ± 1	57 ± 1**
MCH (pg)	19.5 ± 0.6	20.0 ± 0.6	19.7 ± 0.8	19.6 ± 0.3	19.0 ± 0.6	19.6 ± 0.4
MCHC (%)	34.4 ± 0.4	34.9 ± 0.4	34.4 ± 0.7	33.9 ± 0.6	34.6 ± 0.7	34.5 ± 0.3
Reticulocyte (%)	33 ± 10	27 ± 5	28 ± 8	31 ± 10	27 ± 6	26 ± 6
PT (sec)	13.1 ± 0.3	13.0 ± 0.1	13.1 ± 0.3	13.1 ± 0.5	12.9 ± 0.2	12.7 ± 0.2
APTT (sec)	16.0 ± 0.6	16.0 ± 1.1	15.9 ± 0.9	15.1 ± 1.1	16.2 ± 0.8	15.8 ± 0.2
Leukocyte ($10^2/\text{mm}^3$)	49 ± 12	41 ± 12	38 ± 12	36 ± 15	49 ± 14	69 ± 22
Platelet ($10^4/\text{mm}^3$)	149 ± 23	150 ± 20	150 ± 22	142 ± 15	149 ± 13	147 ± 15

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group (**:p<0.01)

Table 3 Blood chemical examination in male rats after the oral administration of tetrahydrothiophene 1,1-dioxide for 28 days and a recovery period for 14 days

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	60	200	700	0	700
No. of animals	6	6	6	6	6	6
GOT (IU/l)	62 ± 5	60 ± 6	63 ± 7	70 ± 7	61 ± 8	63 ± 11
GPT (IU/l)	28 ± 5	28 ± 6	27 ± 3	33 ± 5	31 ± 6	36 ± 9
ALP (IU/l)	462 ± 44	500 ± 150	486 ± 102	524 ± 132	329 ± 82	370 ± 95
γ-GTP (IU/l)	0.50 ± 0.52	0.49 ± 0.59	0.50 ± 0.31	0.26 ± 0.24	0.23 ± 0.25	0.40 ± 0.20
ChE (IU/l)	25 ± 9	20 ± 6	26 ± 4	40 ± 12*	51 ± 22	45 ± 23
T.protein (g/dl)	6.33 ± 0.22	6.12 ± 0.12	6.07 ± 0.13*	6.35 ± 0.13	6.29 ± 0.34	6.09 ± 0.14
Albumin (g/dl)	3.11 ± 0.12	2.94 ± 0.14	3.03 ± 0.13	3.25 ± 0.19	3.04 ± 0.12	2.94 ± 0.14
A/G ratio	0.97 ± 0.05	0.93 ± 0.09	1.00 ± 0.12	1.05 ± 0.10	0.94 ± 0.08	0.93 ± 0.07
T.cholesterol (mg/dl)	95 ± 13	83 ± 16	100 ± 26	102 ± 11	98 ± 15	92 ± 19
Triglyceride (mg/dl)	80 ± 25	71 ± 13	86 ± 17	110 ± 32	90 ± 32	63 ± 16
Glucose (mg/dl)	134 ± 11	142 ± 24	138 ± 9	130 ± 18	157 ± 12	143 ± 8*
T.bilirubin (mg/dl)	0.35 ± 0.05	0.35 ± 0.05	0.40 ± 0.05	0.45 ± 0.03**	0.28 ± 0.02	0.30 ± 0.05
Urea nitrogen (mg/dl)	15.4 ± 1.9	16.3 ± 1.5	17.8 ± 2.5	16.6 ± 2.5	18.7 ± 1.6	18.8 ± 2.5
Creatinine (mg/dl)	0.51 ± 0.07	0.47 ± 0.06	0.50 ± 0.05	0.49 ± 0.04	0.63 ± 0.03	0.57 ± 0.04*
Ca (mg/dl)	10.2 ± 0.1	10.0 ± 0.4	9.9 ± 0.1	10.2 ± 0.3	10.0 ± 0.2	10.2 ± 0.2
I.phosphorus (mg/dl)	8.5 ± 0.4	8.7 ± 0.2	8.5 ± 0.6	8.3 ± 0.3	7.5 ± 0.5	8.1 ± 0.6
Na (mEq/l)	142 ± 1	142 ± 1	141 ± 0	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 1
K (mEq/l)	4.42 ± 0.17	4.30 ± 0.29	4.48 ± 0.36	4.18 ± 0.17	4.39 ± 0.19	4.62 ± 0.22
Cl (mEq/l)	104 ± 0	104 ± 1	104 ± 1	102 ± 1**	103 ± 2	103 ± 1

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group (*:p<0.05;**p<0.01)

6. 血液生化学所見 (Table 3, 4)

700 mg/kg群で、雄に有意なコリンエステラーゼおよび総ビリルビンの増加、塩素の減少が、雌に有意なGPTの増加、グルコースの減少が認められた。なお、

200 mg/kg群で、雄に有意な総タンパクの減少が、雌に有意なトリグリセライドの増加が認められたが、用量相関的な変化ではなかった。700 mg/kgの回復群においては、雄に有意なグルコースおよびクレアチニンの減少が

Table 4. Blood chemical examination in female rats after the oral administration of tetrahydrothiophene 1,1-dioxide for 28 days and a recovery period for 14 days

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	60	200	700	0	700
No. of animals	6	6	6	6	6	6
GOT (IU/l)	67 ± 8	64 ± 6	61 ± 7	74 ± 12	65 ± 6	59 ± 7
GPT (IU/l)	24 ± 5	24 ± 4	23 ± 4	35 ± 6**	27 ± 6	29 ± 6
ALP (IU/l)	300 ± 75	268 ± 55	246 ± 48	306 ± 80	236 ± 50	204 ± 38
γ-GTP (IU/l)	0.32 ± 0.33	0.27 ± 0.28	0.44 ± 0.17	0.69 ± 0.39	0.37 ± 0.28	0.51 ± 0.48
ChE (IU/l)	304 ± 175	296 ± 106	281 ± 60	294 ± 41	292 ± 89	263 ± 47
T.protein (g/dl)	6.26 ± 0.36	6.49 ± 0.26	6.41 ± 0.16	6.36 ± 0.15	6.60 ± 0.29	6.62 ± 0.12
Albumin (g/dl)	3.23 ± 0.19	3.47 ± 0.15	3.31 ± 0.16	3.35 ± 0.15	3.42 ± 0.28	3.43 ± 0.13
A/G ratio	1.07 ± 0.06	1.15 ± 0.06	1.08 ± 0.13	1.11 ± 0.08	1.08 ± 0.10	1.08 ± 0.06
T.cholesterol (mg/dl)	97 ± 14	93 ± 9	97 ± 14	109 ± 35	92 ± 3	95 ± 19
Triglyceride (mg/dl)	26 ± 4	38 ± 12	44 ± 12*	32 ± 12	46 ± 15	61 ± 19
Glucose (mg/dl)	130 ± 15	117 ± 13	124 ± 10	110 ± 4*	139 ± 13	125 ± 10
T.bilirubin (mg/dl)	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.29 ± 0.05	0.28 ± 0.02
Urea nitrogen (mg/dl)	18.6 ± 2.6	18.5 ± 1.6	16.9 ± 2.8	19.0 ± 3.7	21.2 ± 3.3	19.6 ± 2.9
Creatinine (mg/dl)	0.54 ± 0.05	0.55 ± 0.04	0.53 ± 0.02	0.53 ± 0.04	0.65 ± 0.10	0.61 ± 0.05
Ca (mg/dl)	10.0 ± 0.2	10.2 ± 0.3	10.1 ± 0.1	9.9 ± 0.2	10.2 ± 0.3	10.2 ± 0.2
I. phosphorus (mg/dl)	7.7 ± 0.5	8.3 ± 0.9	7.2 ± 0.4	8.2 ± 0.8	7.3 ± 0.7	7.6 ± 0.5
Na (mEq/l)	141 ± 1	141 ± 1	141 ± 0	142 ± 1	141 ± 1	141 ± 1
K (mEq/l)	4.26 ± 0.21	4.29 ± 0.23	4.24 ± 0.17	4.18 ± 0.19	4.42 ± 0.29	4.47 ± 0.18
Cl (mEq/l)	106 ± 1	106 ± 1	106 ± 2	106 ± 1	105 ± 2	105 ± 1

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group (*:p<0.05; **:p<0.01)

認められた。しかし、投与期間終了時屠殺動物で認められた変化は認められなかった。

7. 剖検所見

腎臓の軽度な腫大が、700 mg/kg群の雄6匹中2匹に認められた。回復群の剖検においては、異常は認められなかった。

8. 器官重量 (Table 5, 6)

700 mg/kg群で、雄は腎臓の絶対重量が増加傾向を示し、相対重量は有意に増加した。また、雌では、脾臓の絶対重量が有意に減少し、相対重量も減少傾向を示した。なお、700 mg/kg群の雄で、脳および心臓は絶対重量に変化が認められなかったが、相対重量は有意に増加した。700 mg/kgの回復群においては、雌で脾臓の絶対および相対重量、胸腺の絶対重量ならびに脾臓の相対重量の有意な増加が認められた。しかし、投与期間終了時屠殺動物で認められた変化は認められなかった。

9. 病理組織学所見 (Table 7, 8)

投与期間終了時屠殺動物の検査において、被験物質の投与に起因すると考えられる変化が、雄の腎臓に認められた。すなわち、腎臓の近位尿細管上皮において、硝子滴の増加および好酸体の出現が200および700 mg/kg群で認められた。また、好塩基性尿細管の目立つ例が700 mg/kg群で増加する傾向にあった。さらに、遠位尿細管の軽度な拡張が、200および700 mg/kg群の各1匹に認められた。雌の腎臓、ならびに器官重量で変化の認め

られた雄の脳、心臓および雌の脾臓を含むその他の器官には、被験物質投与との関連性がみられる変化は認められなかった。700 mg/kgの回復群においては、投与期間終了時屠殺動物の雄で認められた腎臓の変化は明らかに軽減あるいは消失し、回復傾向が認められた。器官重量に変化のみられた雌の肝臓、脾臓および胸腺には、被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。また、700 mg/kgの回復群の雌雄の骨髄にも異常は認められなかった。以上の所見の他にも、投与期間終了時屠殺動物および回復期間終了時屠殺動物において、検査した各器官に変化が認められたが、いずれも散発的で用量依存性はみられず、自然発生病変と考えられる所見であった。

考察

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドの毒性について、ラットにおける急性経口LD₅₀値は2100 mg/kgと報告²⁾されており、当研究所で実施した急性経口毒性試験においても、雄で2006 mg/kg、雌で2130 mg/kgと類似した結果が得られている²⁾。皮膚刺激性および感作性は、認められないことが報告²⁾されている。反復投与毒性に関しては、ラット、モルモット、イヌおよびサルに29～95日間吸入させたAndersenら³⁾の報告があり、毒性変化として、被験物質の直接的な影響による肺の炎症性変化が各動物種で発現したほか、モルモットでは肝細胞の空胞化および肝機能障害を示唆する血液生化学的変化が認められている。

Table 5 Absolute and relative organ weights in male rats after the oral administration of tetrahydrothiophene 1,1-dioxide for 28 days and a recovery period for 14 days

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	60	200	700	0	700
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Body weight (g)	323 ± 24	318 ± 14	314 ± 8	287 ± 18**	404 ± 37	370 ± 19
Absolute weight						
Brain (g)	1.99 ± 0.10	2.03 ± 0.07	2.00 ± 0.08	1.95 ± 0.04	2.08 ± 0.09	2.00 ± 0.06
Liver (g)	9.77 ± 0.72	9.70 ± 0.88	9.76 ± 0.37	9.23 ± 0.65	11.98 ± 1.62	10.56 ± 0.49
Kidneys (g)	2.47 ± 0.22	2.53 ± 0.14	2.48 ± 0.11	2.70 ± 0.30	2.69 ± 0.21	2.60 ± 0.27
Spleen (g)	0.68 ± 0.05	0.62 ± 0.07	0.62 ± 0.02	0.58 ± 0.10	0.77 ± 0.15	0.68 ± 0.09
Heart (g)	1.10 ± 0.11	1.11 ± 0.13	1.09 ± 0.05	1.10 ± 0.09	1.28 ± 0.12	1.25 ± 0.11
Thymus (g)	0.59 ± 0.12	0.54 ± 0.08	0.57 ± 0.10	0.55 ± 0.14	0.62 ± 0.08	0.60 ± 0.10
Adrenals (mg)	59.4 ± 10.7	56.8 ± 15.2	55.0 ± 6.5	51.1 ± 5.6	63.3 ± 16.8	59.6 ± 5.9
Testes (g)	3.24 ± 0.22	3.06 ± 0.27	3.07 ± 0.02	3.14 ± 0.22	3.29 ± 0.24	3.25 ± 0.23
Epididymides (g)	0.85 ± 0.04	0.85 ± 0.11	0.87 ± 0.07	0.78 ± 0.07	1.20 ± 0.10	1.12 ± 0.09
Relative weight						
Brain (g%)	0.62 ± 0.03	0.64 ± 0.03	0.64 ± 0.03	0.68 ± 0.05*	0.52 ± 0.04	0.54 ± 0.04
Liver (g%)	3.04 ± 0.22	3.05 ± 0.15	3.11 ± 0.10	3.22 ± 0.15	2.96 ± 0.23	2.86 ± 0.11
Kidneys (g%)	0.77 ± 0.04	0.80 ± 0.05	0.79 ± 0.05	0.94 ± 0.06**	0.67 ± 0.05	0.71 ± 0.08
Spleen (g%)	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.02
Heart (g%)	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.39 ± 0.03*	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.03
Thymus (g%)	0.18 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02
Adrenals (mg%)	18.48 ± 3.52	17.76 ± 4.02	17.56 ± 2.20	17.81 ± 1.76	15.51 ± 2.93	16.16 ± 1.69
Testes (g%)	1.01 ± 0.11	0.97 ± 0.09	0.98 ± 0.08	1.10 ± 0.10	0.82 ± 0.05	0.88 ± 0.09
Epididymides (g%)	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group (*:p<0.05; **:p<0.01)

Table 6 Absolute and relative organ weights in female rats after the oral administration of tetrahydrothiophene 1,1-dioxide for 28 days and a recovery period for 14 days

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	60	200	700	0	700
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Body weight (g)	198 ± 7	196 ± 10	196 ± 15	187 ± 8	219 ± 29	224 ± 18
Absolute weight						
Brain (g)	1.82 ± 0.05	1.87 ± 0.04	1.83 ± 0.03	1.81 ± 0.05	1.84 ± 0.09	1.85 ± 0.05
Liver (g)	5.95 ± 0.32	5.81 ± 0.31	6.29 ± 0.96	5.64 ± 0.38	6.00 ± 0.84	6.69 ± 0.60
Kidneys (g)	1.61 ± 0.11	1.58 ± 0.12	1.63 ± 0.12	1.60 ± 0.13	1.58 ± 0.23	1.58 ± 0.08
Spleen (g)	0.48 ± 0.06	0.43 ± 0.05	0.44 ± 0.08	0.37 ± 0.03*	0.44 ± 0.06	0.53 ± 0.05*
Heart (g)	0.77 ± 0.03	0.74 ± 0.04	0.76 ± 0.07	0.73 ± 0.06	0.79 ± 0.09	0.84 ± 0.06
Thymus (g)	0.49 ± 0.11	0.46 ± 0.04	0.45 ± 0.04	0.51 ± 0.10	0.43 ± 0.04	0.49 ± 0.04*
Adrenals (mg)	62.9 ± 11.1	56.6 ± 5.6	68.3 ± 12.0	57.5 ± 4.3	63.8 ± 6.3	65.3 ± 9.6
Ovaries (mg)	88.9 ± 11.2	84.0 ± 7.9	84.4 ± 15.2	81.6 ± 9.5	81.1 ± 9.5	98.5 ± 18.5
Relative weight						
Brain (g%)	0.92 ± 0.05	0.96 ± 0.06	0.94 ± 0.07	0.97 ± 0.05	0.85 ± 0.08	0.83 ± 0.06
Liver (g%)	3.00 ± 0.18	2.97 ± 0.08	3.19 ± 0.27	3.01 ± 0.15	2.74 ± 0.15	2.98 ± 0.09**
Kidneys (g%)	0.82 ± 0.07	0.81 ± 0.07	0.83 ± 0.03	0.85 ± 0.07	0.72 ± 0.05	0.71 ± 0.04
Spleen (g%)	0.24 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.05	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.02*
Heart (g%)	0.39 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.38 ± 0.03
Thymus (g%)	0.25 ± 0.05	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.27 ± 0.05	0.20 ± 0.03	0.22 ± 0.01
Adrenals (mg%)	31.86 ± 6.31	29.06 ± 3.70	34.56 ± 3.72	30.74 ± 2.49	29.52 ± 4.43	29.07 ± 2.65
Ovaries (mg%)	45.0 ± 6.8	43.0 ± 3.3	42.9 ± 6.2	43.6 ± 4.4	37.5 ± 5.5	43.9 ± 7.5

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group (*:p<0.05; **:p<0.01)

Table 7 Incidence of histopathological findings in male rats after the oral administration of tetrahydrothiophene 1,1-dioxide for 28 days and a recovery period for 14 days

Organ: Finding	Dose level (mg/kg) No. of animals	After administration period				After recovery period	
		0	60	200	700	0	700
		6	6	6	6	6	6
Lung: Arterial wall mineralization	+	1	-	-	1	-	-
Ectopic ossification	+	1	-	-	0	-	-
Kidney: Hyaline droplets in proximal tubular epithelium	+	1	0	5	1	1	3
	++	0	0	1	4	0	0
	+++	0	0	0	1	0	0
Eosinophilic bodies in proximal tubule	+	0	0	5	4	1	0
Basophilic tubules	+	2	1	2	5	4	5
Focal tubular dilatation with or without hyaline casts	+	1	1	0	0	0	0
Distal tubular dilatation	+	0	0	1	1	0	0
Prostate: Cellular infiltration	+	1	-	-	0	-	-

+: Slight; ++: Moderate; +++: Marked; -: Not examined

No abnormalities detected in the heart, trachea, liver, pancreas, stomach, small intestine, large intestine, spleen, urinary bladder, testis, epididymis, seminal vesicle, pituitary, thyroid, parathyroid, adrenal, thymus, lymph node, bone marrow, brain, spinal cord, sciatic nerve and eye ball from animals of control and 700 mg/kg groups killed by design after administration period and the bone marrow from animals of those groups after a 14-day recovery period.

Table 8 Incidence of histopathological findings in female rats after the oral administration of tetrahydrothiophene 1,1-dioxide for 28 days and a recovery period for 14 days

Organ: Finding	Dose level (mg/kg) No. of animals	After administration period				After recovery period	
		0	60	200	700	0	700
		6	6	6	6	6	6
Liver: Microgranuloma	+	1	-	-	0	0	1
Pancreas: Acinar cell vacuolation	+	0	-	-	1	-	-
Kidney: Basophilic tubules	+	2	-	-	1	-	-
Fibrotic focus	+	0	-	-	1	-	-
Thymus: Hemorrhage	+	0	-	-	1	1	0
Spleen: Increased extramedullary hematopoiesis	+	0	-	-	0	1	0

+: Slight; -: Not examined

No abnormalities detected in the heart, trachea, lung, stomach, small intestine, large intestine, urinary bladder, ovary, uterus, vagina, pituitary, thyroid, lung, parathyroid, adrenal, lymph node, bone marrow, brain, spinal cord, sciatic nerve and eye ball from animals of control and 700 mg/kg groups killed by design after administration period and the bone marrow from animals of those groups after a 14-day recovery period.

今回、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドの0, 60, 200および700 mg/kg/day用量をラットに28日間経口投与して実施した反復投与毒性試験においては、肝臓に対する毒性影響を示唆する血液生化学的变化が認められたほか、腎臓の病理学的変化などが認められた。

一般状態の観察では、700 mg/kg群の雌の少数に自発運動の低下が投与初期に一過性に認められた。

本被験物質の急性中毒症状として、痙攣等の中枢神経興奮症状が知られている⁶⁾ほか、ゲッ菌類を用いた実験で、代謝率(酸素消費量)が減少し、体温や運動量が低下あるいは減少することが報告⁴⁾されている。本試験で認められた自発運動の低下は、急性毒性的な症状が軽度に見られたものと考えられる。

体重および摂餌量は、700 mg/kg群の雌雄でいずれも対照群を下回ったが、投与の反復につれて変化は増強せず、雌の体重は投与後半に回復する傾向にあった。

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドは、ラット

およびウサギへの腹腔内投与において、主に3-ヒドロキシテトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドとして尿中に排泄される⁶⁾。急性毒性症状の発現は、未変化体の血中濃度と相関することが知られている⁴⁾。尿中排泄速度は、ラットへの静脈内投与において、投与2日間の排泄量が約50%と遅いが、未変化体の血中半減期は3.5~5時間と短い⁷⁾。

Alexanderら⁸⁾は、本被験物質の臭素化合物である3-プロモテトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドのラットおよびイヌを用いた反復経口投与毒性試験においても、毒性は投与の延長により増強しないことを報告している。

尿検査および血液学検査では、被験物質の投与に起因すると思われる変化は認められなかった。

血液生化学検査では、700 mg/kg群において、いずれも有意な総ビリルビンおよびコリンエステラーゼの増加、塩素の減少が雄に、GPTの増加、グルコースの減

少が雌に認められた。

肝臓に病理学的変化は認められなかったものの、GPTおよび総ビリルビンの増加は投与量設定試験においても認められており、肝臓に対する毒性影響を示唆する所見と解せられる。

コリンエステラーゼ、グルコースおよび塩素の変動については、いずれも当研究所における背景データの範囲内での軽度な変化であった。

病理学検査では、腎臓の近位尿細管上皮における好酸体や硝子滴の出現あるいは増加が、200および700 mg/kg群の雄に認められた。700 mg/kg群の雄では、障害後の再生過程にあると思われる好塩基性尿細管が増加する傾向にあり、さらに、腎臓の有意な相対重量増加および肉眼的腫大例も認められた。

尿管上皮における好酸体や硝子滴はラットに生理的にも認められ、タンパクの再吸収と考えられている⁹⁾。これらの増加は、腎臓におけるタンパクの再吸収あるいはその代謝過程に対する何らかの影響を示唆しているが、尿検査および血液生化学検査において、腎機能の異常をうかがわせる変化は認められなかった。

なお、200および700 mg/kg群の雄に遠位尿細管の拡張が認められたが、軽度、かつ、各群1匹と発現率が低く、用量相関的な増加がみられていないことから、被験物質投与との関連性を判断するのは困難であった。

脾臓重量の減少傾向が、700 mg/kg群の雌に認められた。組織学的には明らかな異常は認められなかったが、回復群においては逆にリバウンド現象とも考えられる重量増加が認められていることから、脾臓に対し何らかの影響を有する可能性が考えられた。

チオフェンは小脳顆粒細胞の壊死を起こすことが知られている¹⁰⁾が、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドのラットへの投与においては、脳に組織学的変化は認められなかった。700 mg/kg群の雄で相対重量増加が認められたが、絶対重量は対照群と比べ差はなく、体重増加抑制に伴う所見と判断された。

これらの投与期間中あるいは投与期間終了時屠殺動物の検査で認められた変化は、回復群において、腎臓の変化は回復傾向を示し、その他の変化はいずれも回復した。したがって、本被験物質の投与により発現する毒性変化は、可逆的であると判断される。

なお、700 mg/kg群の投与期間終了時屠殺動物において、心臓重量の変化が雄に認められたが、絶対および相対重量に共通した変化ではなく、病理組織学的にも異常は認められなかったことから、主に体重増加の抑制に伴う所見と考えられた。また、同群の回復期間終了時屠殺動物においては、赤血球数の減少が雌に、白血球数の増加が雄に認められたが軽度な変化で、骨髓造血細胞には異常は認められなかった。さらに雌の肝臓、脾臓および胸腺重量の変化についても、病理組織学的には異常は認められなかった。したがって、回復群で認められた所見は、遅発的な毒性影響を示唆する変化ではないと判断された。

以上の結果から、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験において、肝臓に対する毒性影響を示唆する血液生化学的变化、腎臓の病理学的変化などが発現した。無影響量は雄で60 mg/kg/day、雌で200 mg/kg/dayと推定された。

文献

- 1) V. K. H. Brown, L. W. Ferrigan, D. E. Stevenson, *Brit. J. industr. Med.*, **23**, 302(1966).
- 2) 山本譲, 毒性試験報告, **4**, 435(1996).
- 3) M. E. Andersen, R. A. Jones, R. G. Mehl, T. A. Hill, L. Kurlansik, L. J. Jenkins Jr, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **40**, 463(1977).
- 4) C. J. Gordon, R. S. Dyer, M. D. Long, K. S. Fehlner, *J. Toxicol. Health*, **16**, 461(1985)
- 5) P.H.Ruppert, R.S.Dyer, *Toxicol. Letters*, **28**, 111(1985)
- 6) J. J. Roberts, G. P. Warwick, *Biochem. Pharmacol.*, **6**, 217(1961)
- 7) M. E. Andersen, R. A. Jones, L. Kurlansik, R. G. Mehl, L. J. Jenkins, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **15**, 571(1976)
- 8) W. M. Alexander, B. E. Abreu, L. C. Weaver, H. E. Faith, J. W. Newberne, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **CXIX(3-4)**, 423(1959)
- 9) S. J. Broghoff, B. B. Shrt, J. A. Swenberg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 349(1990).
- 10) R. M. Herndon, *Exp. Brain Res.*, **6**, 49(1968)

連絡先

試験責任者：伊藤義彦

試験担当者：迫川朋子, 赤木 博, 杉本忠美,
伊藤雅也, 鈴木昭雄

(財)畜産生物科学安全研究所

〒229-11 神奈川県相模原市橋本台3-7-11

Tel 0427-62-2775 Fax 0427-62-7979

Correspondence

Authors: Yoshihiko Ito (Study director)

Tomoko Sakogawa, Hiroshi Akagi,

Tadami Sugimoto, Masaya Ito,

Teruo Suzuki

Research Institute for Animal Science in

Biochemistry and Toxicology

3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi, Kanagawa,

229-11, Japan

Tel +81-427-62-2775 Fax +81-427-62-7979

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドのラットを用いる 経口投与簡易生殖毒性試験

Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test of Tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by Oral Administration in Rats

要約

テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験を行い、雌雄親動物の生殖能力および次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。投与量は、700 mg/kgを最高用量とし、以下200および60 mg/kgとした。対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。

1. 反復投与毒性

雄においては、死亡例が700 mg/kg群で1/12例認められた。一般状態では、700 mg/kg群で被毛の汚れ、下痢および軟便がみられた。体重は、700 mg/kg群で増加抑制がみられた。摂餌量は、700 mg/kg群で低値がみられた。剖検、器官重量および病理組織学検査では、投与による変化はみられなかった。

雌においては、死亡例が700 mg/kg群で1/12例認められた。一般状態では、700 mg/kg群で被毛の汚れがみられた。体重は、700 mg/kg群で交配前に増加抑制がみられた。摂餌量は、700 mg/kg群で交配前および哺育期に低値がみられた。器官重量では、700 mg/kg群で卵巣の相対重量の高値がみられた。剖検および病理組織学検査では、投与による変化はみられなかった。

2. 生殖発生毒性

700 mg/kg群では、発情回数の低値がみられた。交尾率、交尾所要日数、受胎率、妊娠期間、分娩状態、哺育状態では、投与による変化はみられなかった。黄体数、着床痕数および着床率では、投与による変化はみられなかった。哺育期に新生児が全例死亡した母動物が700 mg/kg群で4例認められた。700 mg/kg群では、児の産出率、出生率、哺育4日の新生児数、生存率、哺育0および4日に雌雄別体重の低値、哺育0日の新生児数の低値傾向、死産児数の高値がみられた。200 mg/kg群では、児の産出率の低値、哺育0および4日の新生児数の低値傾向がみられた。新生児の外表、一般状態および剖検では、投与による変化はみられなかった。

以上のように、テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドの一般毒性的無影響量は、雌雄とも700 mg/kg投与により死亡例の発現、体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められたことから200 mg/kg/dayと考えられる。また、生殖発生毒性的な無影響量は、雄では700 mg/kg投与しても交尾率および受胎率に影響は認められなかったことから700 mg/kg/day、雌では700 mg/kg

投与により新生児が全例死亡した母動物が認められたことから200 mg/kg/day、児動物では200 mg/kg投与により児の産出率の低値、哺育0および4日の新生児数の低値傾向が認められたことから60 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質および媒体

被験物質のテトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシドは、常温において無色透明の液体である [Lot No. 20802, 純度:97.3 %, 住友精化(株), 大阪]。入手後は、室温条件下で保管した。

被験物質は、注射用水で希釈して調製した。被験物質は純度換算を行い、投与量は原体重量で表示した。なお、調製液は、調製後室温・遮光条件下で7日間保存しても安定性に問題のないことが確認されていたため、室温・遮光条件下で保管し、調製後7日以内に使用した。また、投与開始日および雄の投与期間終了日に使用した各濃度の投与液中の被験物質濃度を確認した結果、被験物質濃度に問題はなかった。

2. 使用動物および飼育条件

8週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット [Crj:CD(SD)IGS, (SPF)] を日本チャールス・リバー(株)から購入した。入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後7日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物を群分けした。群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与開始日に行った。1群の動物数は、雌雄各12匹とした。

動物は、室温20～26℃、湿度40～70%、明暗各12時間(照明:午前6時～午後6時)、換気回数12回/時に維持されている飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製ケージを用いて1ケージ当たり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製ケージを用いて個別飼育した。母動物は、妊娠18日にオートクレーブ処理した床敷(サンフレック、日本チャールス・リバー(株))を入れたプラスチック製ケージに個別に移し、自然分娩および哺育をさせた。飼料は固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を、飲料水は水道水をいずれも自由に摂取させた。

3. 投与経路, 投与方法, 群構成および投与量

投与経路は, 経口投与を選択した。投与に際しては, 金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスプレイ注射筒を用いて, 強制経口投与した。投与液量は, 雄では投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を基準とし, 5 mL/kgで算出した。雌では, 交配前および交配期間中は投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を, 妊娠期間中は妊娠0, 7, 14および21日の体重を, 授乳期間中は哺育0日の体重を基準とし, 5 mL/kgで算出した。投与回数は1日1回とした。

投与開始日の週齢は雌雄とも10週齢であり, 体重範囲は雄が355~379 g, 雌が209~228 gであった。

投与量は, ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験¹⁾(投与段階:0, 60, 200および700 mg/kg)において, 700 mg/kg群で自発運動の低下, 体重および摂餌量の減少が認められた。そこで, 当試験の投与量は, 一般状態, 体重および摂餌量に影響の認められることが予想される700 mg/kgを高用量とし, 以下公比約3.5で除して200および60 mg/kgとした。また, 対照として被験物質投与群の投与液と同一容量の媒体(注射用水)のみを投与する群を設けた。

投与期間は, 雄では交配前14日間とその後35日間の合計49日間とし, 雌では交配前14日間, 交配期間中(最長14日間), 妊娠期間中および哺育3日までの合計41~50日間とした。なお, 投与開始日を投与1日とした。

4. 観察および検査項目

1) 雄

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は, 投与前・後の1日2回観察した。

死亡例は, 発見後速やかに剖検した。

(2) 体重測定

体重は, 1週間に2回測定した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は, 交配開始前14日間および交配期間終了後から1週間に2回測定した。

(4) 剖検

生存例は, 最終投与の翌日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し, 精巣および精巣上体の重量を測定した。なお, 各器官重量を最終体重で除して相対重量も算出した。精巣および精巣上体は, プアン液に固定した。

(5) 病理組織学検査

精巣および精巣上体は, 常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。

対照群および700 mg/kg群の精巣および精巣上体についてH-E染色組織標本を作製し, 病理組織学検査を実施した。

2) 雌

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は, 投与前・後の1日2回

観察した。

死亡例は, 発見後速やかに剖検した。

(2) 性周期

性周期は, 投与開始日から交尾確認日まで1日1回観察した。なお, 発情期が連続2日間にわたって観察された場合は1回と計数した。

(3) 体重測定

体重は, 交配開始前14日間および交配期間中には1週間に2回, 妊娠期間中には妊娠0, 7, 14および21日に, 哺育期間中には哺育0および4日にそれぞれ測定した。

(4) 摂餌量測定

摂餌量は, 交配開始前14日間までは1週間に2回測定した。また, 妊娠期間中は妊娠2, 9, 16および21日に, 哺育期間中は哺育4日に測定した。

(5) 交尾不成立雌の剖検

交尾不成立雌は, 交配期間終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

(6) 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ, 分娩状態の異常の有無, 分娩終了の確認を妊娠21日から妊娠25日まで1日1回行った。午前10時に分娩が終了していた場合, その日を哺育0日とした。

(7) 妊娠25日までに分娩しなかった動物

妊娠25日までに分娩しなかった雌は, エーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

(8) 哺育状態の観察および剖検

母動物は, 哺育状態を哺育4日まで1日1回観察し, 新生児が全例死亡した日あるいは哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し, 着床痕数および黄体数を数えた。卵巣は重量を測定し, 20%中性緩衝ホルマリンに固定した。なお, 卵巣重量を最終体重で除して相対重量も算出した。

(9) 病理組織学検査

卵巣は, 常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。

対照群および700 mg/kg群の卵巣についてH-E染色組織標本を作製し, 病理組織学検査を実施した。

3) 親動物の生殖発生に及ぼす影響

14日間投与した雌雄を同一群内で1対1に組み合わせ同居交配した。交配期間は14日を限度として, 交尾を確認するまでの連続同居交配とした。ただし, 交配相手が死亡したため交配組み合わせができなかった700 mg/kg群の雌は, 交配開始後5日に同一群内の交尾経験のある雄と組み合わせ同居交配した。交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い, 膣垢内に精子または膣栓を確認した雌を交尾成立動物として, その日を妊娠0日として起算した。

4) 新生児

(1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性, 死産児数, 新生児数および外表異常の有無を観察した。

(2) 新生児の観察

新生児は、一般状態および死亡の有無を1日1回観察した。

(3) 体重

体重は、哺育0日(出生日)および4日に測定した。

(4) 剖検

生存児は、哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

5. 統計学的方法

統計解析は、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならばDunnett法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い、有意ならば順位を利用したDunnett型の検定法により行った。

交尾率、受胎率および出産率は、 χ^2 検定により行った。

結果

1. 反復投与毒性

1) 雄に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡および瀕死例は、対照群、60および200 mg/kg群では認められなかった。700 mg/kg群では、投与5日に1例が死亡した。死亡例では、死亡前日まで一般状態に異常はみられなかった。

生存例の一般状態観察において、対照群、60および200 mg/kg群ではいずれの動物にも異常はみられなかつ

た。700 mg/kg群では、被毛の汚れ、流涎、下痢、軟便がみられた。

(2) 体重(Fig. 1)

60 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。200 mg/kg群では、対照群と比べて投与4日に体重の有意な低値がみられたが、その後は順調に推移し、対照群との間に有意差が認められないことから、毒性学的影響とはみなさなかつた。700 mg/kg群では、対照群と比べて投与4~49日に体重の有意な低値がみられた。

(3) 摂餌量(Fig. 2)

60 mg/kg群では、対照群と比べて投与48日に摂餌量の有意な高値がみられたが、投与量に依存した変化ではなかった。200 mg/kg群では、対照群と比べて投与3日に摂餌量の有意な低値がみられたが、その後は順調に推移し、対照群との間に有意差が認められないことから、毒性学的影響とはみなさなかつた。700 mg/kg群では、対照群と比べて投与3および6日に摂餌量の有意な低値がみられた。

(4) 剖検

700 mg/kg群の死亡例においては異常はみられなかつた。

生存例においては、対照群では、両側精巣、両側精巣上体、精囊および前立腺の萎縮が1例みられた。60 mg/kg群では、いずれの動物にも異常はみられなかつた。200および700 mg/kg群では、両側精巣の萎縮および両側精巣上体の萎縮がそれぞれ各1例みられた。しかし、これらの変化は、いずれも偶発的所見と考えられた。

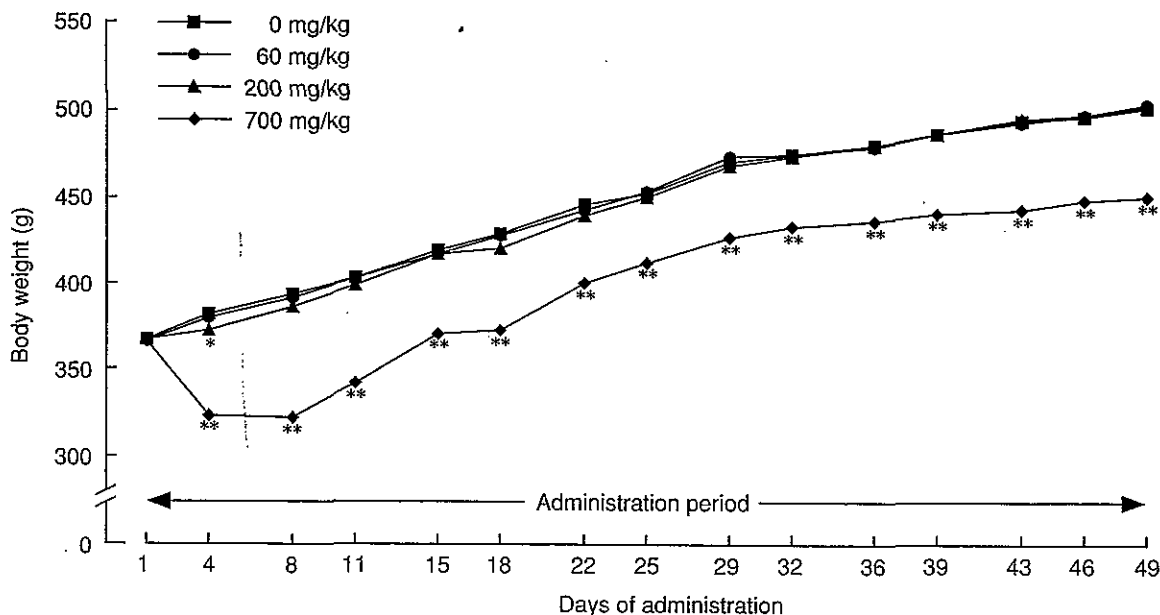


Fig. 1 Body weight of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01)

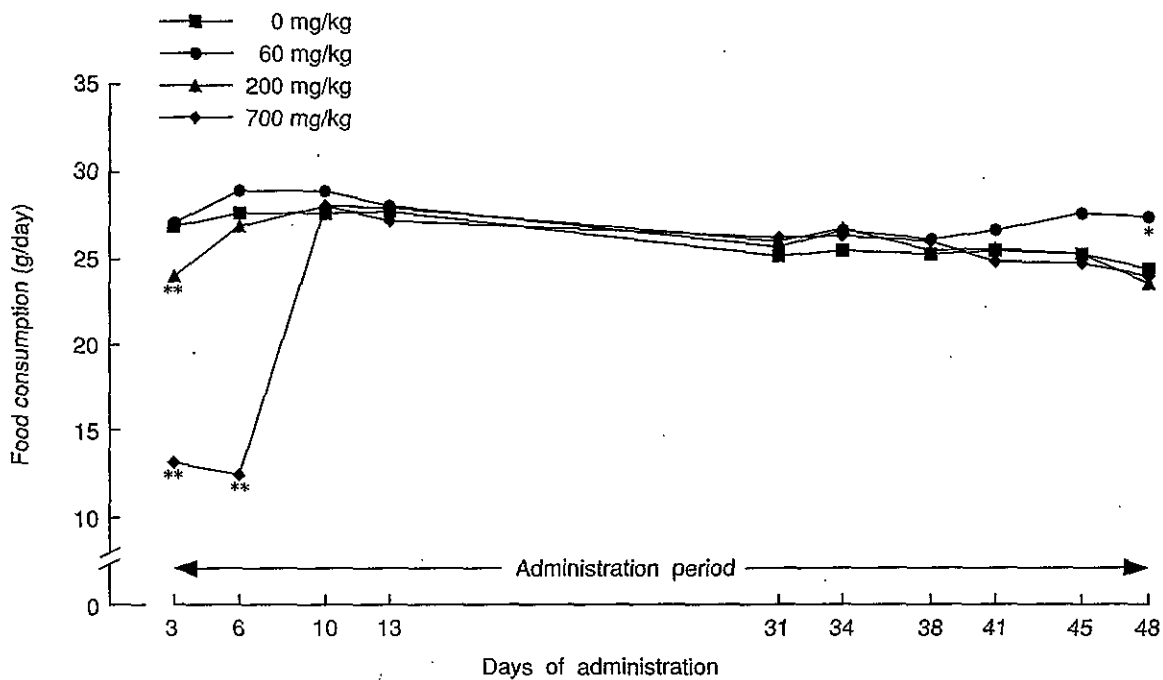


Fig. 2 Food consumption of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01)

(5) 器官重量 (Table 1)

60および200 mg/kg群では、対照群と比べて剖検日の体重に有意差はみられなかった。

700 mg/kg群では、対照群と比べて剖検日の体重の有意な低値がみられた。

各投与群とも、対照群と比べていずれの器官の絶対および相対重量にも有意差はみられなかった。

(6) 病理組織学検査 (Table 2)

精巣において精細管の萎縮および間細胞の増生が、精巣上体において精子の減少、精巣上体管の空胞化および精子肉芽腫がみられたが、いずれも少数例であることから、偶発的変化と判断された。

2) 雌に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡および瀕死例は、対照群、60および200 mg/kg群では認められなかった。700 mg/kg群では、哺育2日に1例が死亡した。死亡例では、流産の他には異常はみられなかった。

生存例の一般状態観察において、対照群、60および200 mg/kg群ではいずれの動物にも異常はみられなかった。700 mg/kg群では、被毛の汚れ、流産がみられた。

(2) 体重 (Fig. 3)

交配開始前において、60および200 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。700 mg/kg群では、対照群と比べて投与4~11日に体重の有意な低値がみられた。

妊娠期間中において、各投与群とも対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

哺育期間中において、各投与群とも対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

(3) 摂餌量 (Fig. 4)

交配開始前において、60および200 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。700 mg/kg群では、対照群と比べて投与3および6日に摂餌量の有意な低値がみられた。

妊娠期間中において、各投与群とも対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。

哺育期間中において、60および200 mg/kg群では対照群と比べて摂餌量に有意差はみられなかった。700 mg/kg群では、対照群と比べて哺育4日に摂餌量の有意な低値がみられた。

(4) 剖検

700 mg/kg群の死亡例においては異常はみられなかった。

生存例においては、いずれの群とも異常はみられなかった。

(5) 器官重量 (Table 3)

60および200 mg/kg群では、対照群と比べて剖検日の体重、卵巣の絶対および相対重量に有意差はみられなかった。700 mg/kg群では、対照群と比べて卵巣の相対重量の有意な高値および剖検日の体重の有意な低値がみられた。

(6) 病理組織学検査

対照群および700 mg/kg群とも、卵巣に異常はみられなかった。

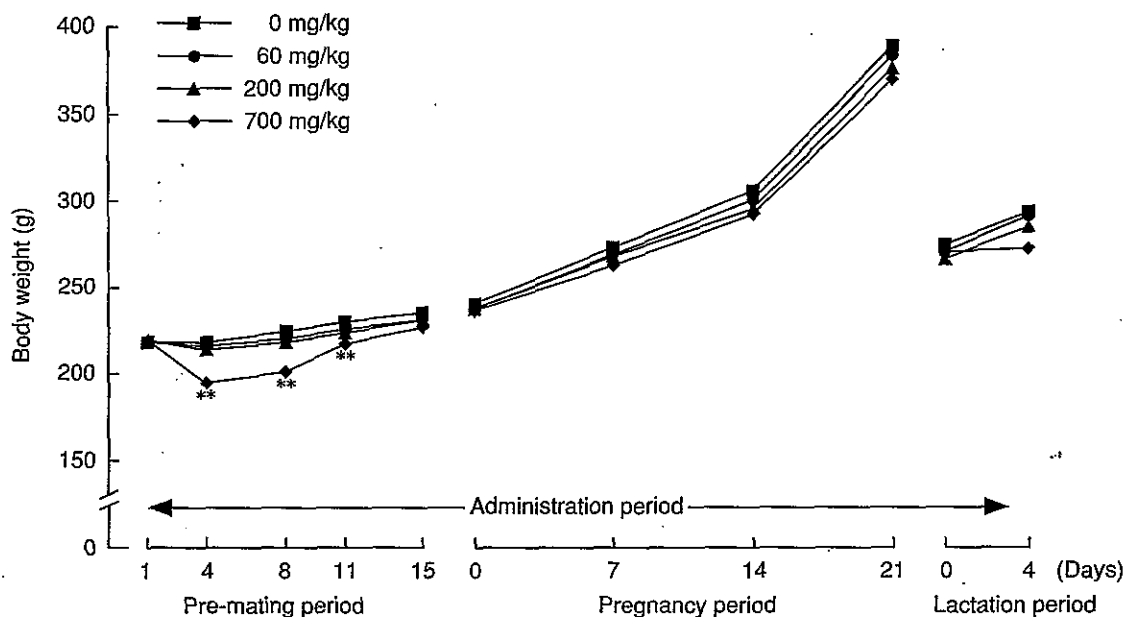


Fig. 3 Body weight of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Significantly different from control (**:p<0.01)

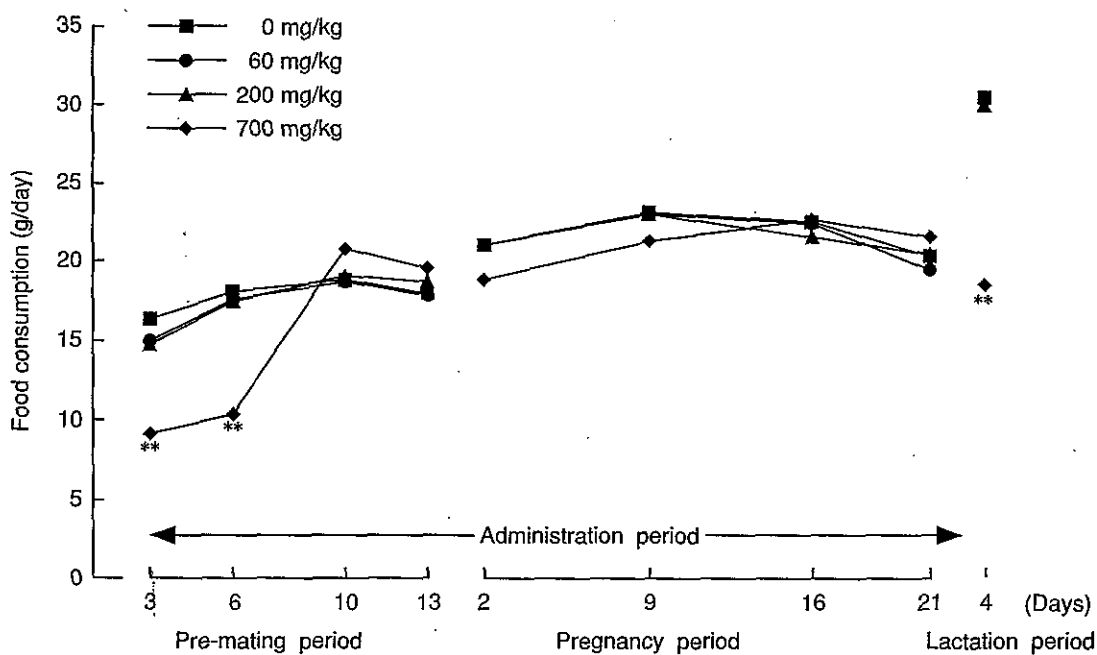


Fig. 4 Food consumption of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Significantly different from control (**:p<0.01)

2. 生殖発生毒性

1) 親動物の生殖発生に及ぼす影響

(1) 発情回数, 交尾率および受胎率 (Table 4)

交配前投与期間(14日間)の発情回数は, 60および200 mg/kg群では対照群との間に有意差はみられなかった. 700 mg/kg群では, 発情周期の乱れている雌が4例認められ, 対照群と比べて発情回数の有意な低値がみられ

た.

700 mg/kg群の1組を除いた全例で交尾が確認された. 交尾所要日数は, 各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった. また, 交尾率にも, 各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった.

不受胎雌は, 対照群および700 mg/kg群で各1例, 200 mg/kg群で2例みられたが, 受胎率には各投与群と

対照群との間に有意差はみられなかった。

(2) 妊娠期間, 分娩状態, 黄体数, 着床率および出産率 (Table 5)

妊娠期間は, 各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。分娩状態の異常は, いずれの群にもみられなかった。

各投与群とも, 対照群と比べて黄体数, 着床痕数および着床率に有意差はみられなかった。

対照群, 60, 200および700 mg/kg群とも出産率は100%であった。700 mg/kg群では, 全出生児が死亡した母動物が4例みられた。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 分娩率および出生率 (Table 5)

60 mg/kg群では, 対照群と比べて総出産児数, 分娩率, 児の産出率, 哺育0日の新生児数, 死産児数, 出生率および性比に有意差はみられなかった。200 mg/kg群では, 対照群と比べて児の産出率の有意な低値, 有意な差ではないが哺育0日の新生児数の低値傾向がみられた。また, 200 mg/kg群では, 対照群と比べて分娩率の有意な低値がみられたが, 700 mg/kg群で有意差は認められず, 投与によるものではないと判断される。700 mg/kg群では, 対照群と比べて死産児数の有意な高値, 児の産出率および出生率の有意な低値, 有意差は認められないものの, 哺育0日の新生児数の低値傾向がみられた。

(2) 新生児の生存率および一般状態 (Table 5)

60 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育4日の生存児数および生存率に有意差はみられなかった。200 mg/kg群では, 対照群と比べて有意な差ではないが哺育4日の生存児数の低値傾向がみられた。700 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育4日の生存児数および生存率の有意な低値がみられた。

新生児の外表面観察では, 対照群で無尾が1例にみられたのみであった。

新生児の一般状態では, 各群とも異常はみられなかった。

(3) 新生児の体重 (Table 5)

60 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育0日に雄体重の有意な低値がみられたが, 200 mg/kg群では哺育0日の雌雄別体重に有意差が認められないことから, 投与によるものではないと判断される。700 mg/kg群では, 対照群と比べて哺育0および4日に雌雄別体重の有意な低値がみられた。

(4) 新生児の剖検

各群とも, 異常はみられなかった。

考察

テトラヒドロチオフェン-1,1'-ジオキシドのラットを用いる経口投与による簡易生殖毒性試験を行い, 雌雄親動物の生殖能力および次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

雄に関しては, 死亡例が700 mg/kg群で1例認められた。死亡例では, 一般状態および剖検所見に特記すべき異常は認められなかったものの, 体重減少がみられていることから, 被験物質投与に基づくものと判断した。一般状態観察では, 700 mg/kg群で被毛の汚れ, 下痢および軟便がみられた。また, 700 mg/kg群で流涎が認められたが, 被験物質の刺激性に基づく変化と判断され, 毒性症状とはみなさなかった。体重および摂餌量において, 700 mg/kg群では投与期間を通して体重増加の抑制, 投与期間の初期に摂餌量の低値がみられた。しかし, 剖検および器官重量では, 投与による変化はみられなかった。精巣および精巣上体の病理組織学検査において, 投与による変化はみられなかった。なお, ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験¹⁾においても, 700 mg/kg投与で死亡例および流涎は認められないものの, 自発運動の低下, 体重および摂餌量の減少がみられている。

雌に関しては, 死亡例が700 mg/kg群で1例認められた。一般状態観察では, 700 mg/kg群で被毛の汚れがみられた。700 mg/kg群で流涎が認められたが, 雄と同様に毒性症状とはみなさなかった。体重において, 700 mg/kg群では交配前に増加抑制がみられた。摂餌量において, 700 mg/kg群で交配前および哺育期に低値がみられた。また, 700 mg/kg群で卵巣の相対重量の有意な高値がみられたが, 病理組織学検査では変化はみられなかった。

したがって, 当試験条件下におけるテトラヒドロチオフェン-1,1'-ジオキシドの一般毒性学的無影響量は, 雌雄とも200 mg/kg/dayと考えられる。

親動物の生殖発生に対しては, 前述したように精巣, 精巣上体および卵巣の病理組織学検査において投与に起因すると思われる変化はみられなかった。また, いずれの群とも交尾率および受胎率に影響は認められなかった。

交尾所要日数, 受胎雌数, 妊娠期間, 黄体数, 着床痕数, 分娩状態および哺育状態では, 投与による変化はみられなかった。しかし, 700 mg/kg群では, 発情周期の乱れている雌が認められ, 発情回数の低値がみられた。また, 同群では, 哺育期に新生児が全例死亡した母動物が4例認められた。

新生児に対しては, 200 mg/kg群では児の産出率の低値, 哺育0および4日の新生児数の低値傾向がみられた。700 mg/kg群では, 死産児数の高値および哺育0日の新生児数の低値傾向, 児の産出率, 出生率, 哺育4日の新生児数および生存率の低値がみられた。また, 700 mg/kg群では, 哺育0および4日に雌雄別体重の低値がみられた。外表面観察では, 各投与群とも投与による影響はみられなかった。一般状態では, 各投与群とも投与による異常症状はみられなかった。剖検においても, 変化はみられなかった。

以上のように, テトラヒドロチオフェン-1,1'-ジオキシドの一般毒性学的無影響量は, 雌雄とも700 mg/kg投与により死亡例の発現, 体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められたことから200 mg/kg/dayと考えられる。

また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雄では700 mg/kg投与しても交尾率および受胎率に影響は認められなかったことから700 mg/kg/day、雌では700 mg/kg投与により新生児が全例死亡した母動物が認められたことから200 mg/kg/day、児動物では200 mg/kg投与により児の産出率の低値、哺育0および4日の新生児数の低値傾向が認められたことから60 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, “化学物質毒性試験報告,” Vol. 4, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1996, p. 437.

連絡先

試験責任者: 古橋忠和
試験担当者: 長瀬孝彦, 藤村高志, 内藤一嘉,
今枝知子, 吉島賢一, 牧野浩平
(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島6-104
Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors: Tadakazu Furuhashi (Study director)
Takahiko Nagase, Takashi Fujimura,
Kazuyoshi Naitou, Tomoko Imaeda,
Ken-ichi Yoshijima and Kohei Makino
Nihon Bioresearch Inc. Hashima Laboratory
6-104 Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu, 501-
6251, Japan.
Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284

Table 1 Organ weight of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Dose (mg/kg)		0	60	200	700
Number of males		12	12	12	11
Body weight	(g)	504.2 ± 26.3	505.9 ± 25.7	505.8 ± 14.9	454.3 ± 22.2**
Testes	(g)	3.118 ± 0.720	3.287 ± 0.182	3.225 ± 0.750	2.961 ± 0.808
	(g%)	0.619 ± 0.143	0.652 ± 0.054	0.640 ± 0.153	0.655 ± 0.187
Epididymides	(g)	1.172 ± 0.226	1.230 ± 0.083	1.211 ± 0.222	1.087 ± 0.236
	(g%)	0.233 ± 0.048	0.243 ± 0.020	0.241 ± 0.045	0.241 ± 0.052

Each value shows mean±S.D.
Significantly different from control (**:p<0.01).

Table 2 Histopathological examination of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Dose (mg/kg)	0						200						700					
	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+
Testis	[12]						[1]						[11]					
Atrophy, seminiferous tubule	10	2	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	9	2	0	1	0	1
Proliferation, Leydig's cell	11	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	10	1	0	1	0	0
Epididymis	[12]						[1]						[11]					
Decrease, sperm	11	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	10	1	0	0	0	1
Vacuolization, duct	11	1	0	1	0	0	1	0					10	1	0	1	0	0
Spermatic granuloma	12	0					1	0					10	1	0	1	0	0

Grade of histopathological finding; ±:slight, +:mild, 2+:moderate, 3+:marked.
N:No abnormality detected.
A:Abnormality detected.
[]:Number of males examined.

Table 3 Organ weight of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Dose (mg/kg)		0	60	200	700
Number of dams		12	12	12	11
Body weight	(g)	289.0 ± 21.3	290.3 ± 19.2	284.0 ± 15.0	268.3 ± 14.2*
Ovaries	(mg)	94.79 ± 11.71	95.51 ± 11.57	98.39 ± 10.42	108.63 ± 17.99
	(mg%)	32.90 ± 4.36	33.04 ± 4.62	34.66 ± 3.33	40.45 ± 5.92**

Each value shows mean±S.D.
Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

Table 4 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Dose (mg/kg)	0	60	200	700
Number of females	12	12	12	12
Number of estrous cases before mating (14 days)				
Mean±S.D.	3.3 ± 0.5	3.3 ± 0.5	3.2 ± 0.4	2.2 ± 0.9**
Number of males	12	12	12	11
Number of males with successful copulation	12	12	12	10
Copulation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	90.9
Number of females	12	12	12	12
Number of females with successful copulation	12	12	12	11
Copulation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	91.7
Number of conceiving days (Mean ± S.D.)	2.3 ± 1.2	2.2 ± 1.2	2.3 ± 1.4	3.5 ± 3.6
Number of pregnant females	11	12	10	10
Fertility index (%) ^{c)}	91.7	100.0	83.3	90.9
Number of pregnant females with live pups	11	12	10	10

a) : (Number of males with successful copulation/number of males) × 100.

b) : (Number of females with successful copulation/number of females) × 100.

c) : (Number of pregnant females/number of females with successful copulation) × 100.

Significantly different from control (**:p<0.01).

Table 5 Observation of pups (F₁) in preliminary reproduction toxicity screening test of tetrahydrothiophene-1,1-dioxide by oral administration

Dose (mg/kg)	0	60	200	700
Number of dams	11	12	10	10
Length of gestation (days)	22.18 ± 0.40	22.08 ± 0.29	22.00 ± 0.00	22.00 ± 0.00
Corpora lutea	16.4 ± 1.3	16.8 ± 1.4	17.7 ± 2.2	17.0 ± 3.3
Implantation scars	15.5 ± 1.2	15.7 ± 1.9	15.6 ± 1.8	15.8 ± 3.2
Implantation index (%) ^{a)}	94.5 ± 4.1	93.4 ± 7.1	88.4 ± 4.7	92.8 ± 6.3
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Pups born	15.2 ± 1.7	15.2 ± 1.7	14.3 ± 1.8	14.9 ± 3.4
Delivery index (%) ^{c)}	98.1 ± 4.5	96.9 ± 4.0	91.8 ± 4.1*	94.0 ± 6.7
Live pups born	14.9 ± 1.9	15.0 ± 1.9	14.1 ± 1.6	11.3 ± 4.7
Sex ratio at birth ^{d)}	0.98 ± 0.67	1.12 ± 0.55	1.73 ± 1.09	0.78 ± 0.33
Birth index (%) ^{e)}	96.3 ± 6.5	95.8 ± 4.8	90.5 ± 5.1*	71.6 ± 26.2**
Dead pups on day 0 of lactation	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	3.6 ± 4.4**
Live birth index (%) ^{f)}	98.1 ± 3.3	98.8 ± 2.8	98.7 ± 2.8	75.9 ± 26.2**
Live pups on day 4 of lactation	14.8 ± 1.8	15.0 ± 1.9	13.7 ± 1.3	4.0 ± 5.6** (9)
Viability index (%) ^{g)}	99.5 ± 1.8	100.0 ± 0.0	97.3 ± 3.5	29.2 ± 40.4** (9)
External anomalies (%) ^{h)}	0.7 ± 2.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Anury (%)	0.7 ± 2.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Body weight of pups (g)				
Male Day 0	6.64 ± 0.31	6.15 ± 0.42*	6.22 ± 0.38	5.44 ± 0.52**
Male Day 4	9.92 ± 0.75	9.63 ± 1.16	9.57 ± 1.03	6.63 ± 1.41** (4)
Female Day 0	6.20 ± 0.30	5.88 ± 0.33	5.85 ± 0.44	4.93 ± 0.46**
Female Day 4	9.25 ± 0.84	9.19 ± 0.96	9.18 ± 1.31	5.68 ± 1.37** (5)

Each value shows mean±S.D. per dam.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

a) : (Number of implantation scars/number of corpora lutea) × 100.

b) : (Number of dams with live pups/number of pregnant dams) × 100.

c) : (Number of pups born/number of implantation scars) × 100.

d) : Number of male pups/number of female pups.

e) : (Number of live pups born/number of implantation scars) × 100.

f) : (Number of live pups born/number of pups born) × 100.

g) : (Number of live pups on day 4/number of live pups born) × 100.

h) : (Number of pups with external anomalies/number of live pups born) × 100.