

some of the results assigned in Table I differ from the initial evaluations published in the NTP Technical Bulletins [1980a,b, 1981a,b, 1982a,b, 1983]. The chemicals whose interpretations differ from those in the Bulletin are *o*-anisidine, boric acid (EGG Aliquot), 3-chloronitrobenzene, cyclohexanol, 2,4-dichlorophenol, 3,5-dichlorophenol, gallic acid (SRI Aliquot), glycerol (CWR Aliquot), and thiocarbanilide (SRI Aliquot).

RESULTS AND DISCUSSION

Summary results are presented in Table I and data in Appendix 2, Tables 1-250. The 250 chemicals tested encompass 370 separate samples (aliquots) tested under code using a standardized protocol. Fourteen of the chemicals were tested as coded, positive controls (AF-2, 2-aminoanthracene, 4-aminobiphenyl, benzo(a)pyrene, calcium chromate, cyclophosphamide, dimethylcarbamyl chloride, 3-methylcholanthrene, 4,4'-methylene-bis-2-chloroaniline, nitrofurantoin, N-nitrosodimethylamine, N-nitrosopiperidine, picric acid, and β -propiolactone) and five as coded, negative controls (choline chloride, glycerol, glycine, mannitol, and sodium phosphate). Streptomycin sulphate was originally chosen as a negative control, but was mutagenic in TA98 in two of the three laboratories testing it (see Appendix 2, Table 219.1,2,3). Among the 230 chemicals that were not originally selected as controls, 143 were clearly negative, 70 were clearly positive, and 17 were either questionable or did not show agreement between laboratories. These last 17 chemicals included five that were equivocal in one or both laboratories (*o*-anisidine, 3-chloronitrobenzene, cyclohexanol, 2,4-dichlorophenol, and 3,5-dichlorophenol). Of the remaining 12 chemicals, five were equivocal in one laboratory and positive or negative in the other(s). The final seven chemicals showed a definite disagreement between laboratories (*p*-anisidine, bromoform, 2,6-dimethylmorpholine, ethyl acrylate, ferrocene, isoproterenol hydrochloride, and 2-aminobiphenyl, which was negative in one laboratory the first time it was tested but positive the next).

It can be seen that, for the most part, there was good reproducibility between laboratories, even for relatively weak mutagens (Figs. 1-14). Occasionally, relatively large variations in the degrees of the response were seen, but it was difficult to determine to what extent these were a function of the laboratory or of the chemical/activation/Salmonella strain combination.

The negative control chemicals were all nonmutagenic in all tests with the exception of two positive responses from streptomycin sulphate and an equivocal response in one laboratory with glycerol. The positive controls were detected by all laboratories and were reproducible (Figs. 1-7).

The results presented in Appendix 2 are from the most definitive experiment conducted on each chemical. For the most part, the results from the confirmation (second) experiment are considered the most definitive. In a number of instances where the first or second experiment yielded weakly positive or questionably positive data, or the succeeding experiments were in disagreement with the first experiment, data from all of the experiments are presented. In all cases, however, if the reader wants data on a specific chemical in addition to that presented in Appendix 2, the specific testing laboratory should be contacted directly.

The majority of chemicals judged positive or questionable induced a response in TA100 with or without additional positive responses in one or more of the other

strains. A number of chemicals produced higher responses with hamster S-9 (for example, see Figs. 6, 7, 15-19), and vice versa (Figs. 12, 20-22), but a few were positive only with rat or hamster S-9, and some only in the absence of S-9. Substituted nitrobenzenes generally exhibited their strongest mutagenic responses in the presence of hamster S-9. The chlorinated nitrobenzenes were generally quite toxic to the tester strains, which limited the concentrations of chemical that could be tested. Two of these chemicals (2- and 4-chloronitrobenzene) were also tested (EGG) using the plate incorporation method (data not shown). Under these test conditions, higher concentrations of the chemicals could be tested. As might be expected, greater mutagenic activity was observed using the plate incorporation method. These data would indicate that when testing very toxic chemicals, negative or equivocal results with the preincubation method may require confirmation with the plate incorporation method. The similarities in the dose responses of azobenzene and hydrazobenzene (Fig. 21) suggest that both may be mutagenic via the same metabolic product. No information is available on the comparative metabolism of these substances.

The results from this testing can also be used to determine the extent of interlaboratory variability and, with some chemicals, intralaboratory variability as well. Representative examples of the degree of agreement between and within laboratories can be seen in the results on AF-2 (Fig. 1), 2-aminoanthracene (Fig. 2), 2- and 4-aminobiphenyl (Fig. 3), calcium chromate (Fig. 4), 2- and 4-chloronitrobenzene (Fig. 8), chloropicrin (Fig. 9), 2,3-dichloronitrobenzene (Fig. 10), dimethoate (Fig. 11), 3,3'-dimethoxybenzidine (Fig. 12), ethylenediamine (Fig. 13), formaldehyde (Fig. 14), nitrofurantoin (Fig. 5), N-nitrosodimethylamine (Fig. 6), and N-nitrosopiperidine (Fig. 7).

Although we have not attempted to measure the extent of agreement between tests mathematically, it can be seen to vary with the chemical and is not necessarily related to the magnitude of the mutagenic response. Also, as seen with 2-aminoanthracene (cf TA100 and TA1535, Fig. 2C, D vs E, F), the variability can also be derived from the particular *Salmonella* strain examined.

In many instances, disagreements between laboratories occurred because the chemicals were coded. These disagreements may be relatively subtle and the result of low levels of activity in one laboratory versus questionable or no activity in the other. Many of these differences might have disappeared if the laboratory with the lower or negative response knew of the other data and adjusted the protocol accordingly. Other chemicals exist that are clearly positive in one laboratory and negative in another; the reasons for these differences are not obvious and would have to be investigated on an individual chemical basis.

A large number of chemicals were positive in TA100 but not in TA1535; a few were positive in TA1535 but not TA100. The chemicals that were positive in both strains usually showed two types of responses. The first type is best exemplified by 1-aziridine ethanol (Appendix 2, Table 22; Fig. 23). In this response, the mutagen induces approximately the same absolute numbers of revertants in both TA1535 and TA100; the only difference is that in TA100, the revertants appear against the higher background reversion frequency. Chemicals of this type which induce only low levels of revertants may be detected more readily using TA1535, and may be considered negative in TA100 if the number of induced revertants falls within or close to the range of spontaneous revertants; for example, ethylenediamine (Appendix 2, Table 123; Fig. 13) and N-nitrosopiperidine (Appendix 2, Table 185; Fig. 7). The other

type of response is the one in which mutagenicity is observed only in TA100, such as with chloropicrin (Appendix 2, Table 63; Fig. 9), dimethoate (Appendix 2, Table 107; Fig. 11), chloronitrobenzenes (Appendix 2, Tables 53-55; Figs. 8, 10) and others, or a higher number of revertants is induced in TA100 than in TA1535 (1,2,3-trichloropropane [Appendix 2, Table 242; Fig. 17] and 2-aminoanthracene [Appendix 2, Table 10; Fig. 2]). These responses are not unexpected and reflect the mechanisms of action of the mutagens and the degree to which the error-prone repair system coded for by the pKM101 plasmid recognizes the DNA adduct produced.

Limitations

In any study using coded chemicals with fixed protocols, one would expect to obtain negative results for chemicals that have been reported elsewhere as mutagenic. This is because, with a coded chemical, the testing laboratory does not have any preconceptions about the "expected" responses based upon knowledge of the chemical's structure or responses in other biological systems. Having this knowledge affords the researcher the ability to test at varying dose ranges with different levels and types of S-9 and in varied protocols if the anticipated result is not obtained in the standardized protocol. In a study of the type reported here, the testing laboratory does not have the luxury of knowing the "expected" response; therefore, some of the chemicals that are reported here as nonmutagenic may have been reported as positive in the literature.

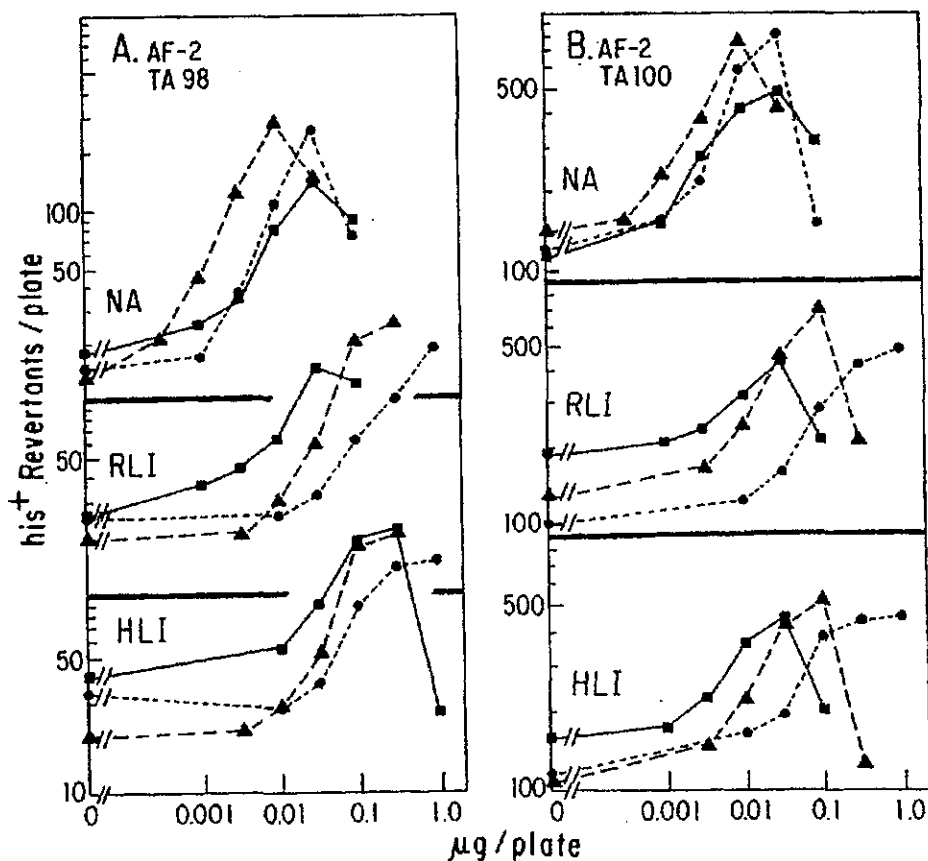


Fig. 1. Mutagenicity of AF-2 in *S typhimurium* TA98 (A) and TA100 (B) using no metabolic activation (NA), RLI, and HLI at CWR (■), EGG (▲), and SRI (●).

APPENDIX 2

Mutagenic responses of Salmonella tester strains TA100, TA1535, TA1537, and TA98 (mean \pm SEM) to test chemicals. Chemicals are numbered as in Table I (pp. 6-17). Doses are in $\mu\text{g}/\text{plate}$; 0.0 dose is the solvent control.

Where only one test is reported for one chemical/laboratory combination (Aliquot), only the final test data are presented. If more than one Aliquot of the chemical was tested, the different aliquots are designated .1., .2, etc. Where more than one test from the same aliquot is reported, they are labeled with lower case letters, eg 1a . . . where a is the earliest data set.

Abbreviations are as follows: DMSO, Dimethyl sulfoxide (solvent); H₂O, Distilled water (solvent); 95% ETOH, 95% Ethanol (solvent); POS, Positive control (see Table II); CWR, Case Western Reserve University; EGG, EG&G Mason Research Corporation; SRI, SRI International; NA, not activated; RLI, rat liver S-9, Aroclor 1254 induced; HLI, hamster liver S-9, Aroclor 1254 induced; s, slight clearing of background lawn; t, complete clearing of background lawn; p, precipitate present in plates.

TABLE I

Dose	ACETAMIDE [H ₂ O] [EGG]											
	TA100			TA1535			TA1537			TA98		
	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI
0.0	105 \pm 1.8	123 \pm 10.3	96 \pm 5.7	17 \pm 1.3	9 \pm 2.1	11 \pm 1.0	6 \pm .9	8 \pm 1.8	8 \pm 2.5	20 \pm 1.9	19 \pm 3.5	18 \pm 2.2
100.0	89 \pm 5.0	115 \pm 6.3	100 \pm 4.3	17 \pm 1.8	7 \pm 1.5	12 \pm 2.7	12 \pm 3.8	4 \pm .7	7 \pm 2.0	19 \pm 3.5	28 \pm 1.3	25 \pm 2.1
333.0	110 \pm 16.1	100 \pm 9.8	102 \pm 2.7	17 \pm 2.0	7 \pm .6	8 \pm 2.1	7 \pm .9	8 \pm 1.5	4 \pm 2.2	22 \pm .7	24 \pm 2.2	20 \pm 4.3
1000.0	94 \pm 5.8	107 \pm 8.3	105 \pm 10.0	18 \pm 1.7	10 \pm 2.5	10 \pm 1.5	6 \pm 3.1	8 \pm 2.8	8 \pm 1.0	16 \pm 2.3	21 \pm 3.6	21 \pm 2.0
3333.0	99 \pm 4.9	94 \pm 7.9	108 \pm 8.5	21 \pm 3.0	10 \pm 1.3	10 \pm 3.5	6 \pm .3	9 \pm 2.3	5 \pm 1.9	23 \pm 4.1	25 \pm 4.3	19 \pm 1.5
10000.0	102 \pm 11.0	88 \pm 5.4	93 \pm 3.2	17 \pm 2.6	9 \pm 1.5	10 \pm 1.5	9 \pm 1.0	11 \pm 2.7	5 \pm 1.3	17 \pm 1.7	27 \pm 2.3	21 \pm 3.1
POS	1432 \pm 45.3	690 \pm 82.6	1406 \pm 64.9	1423 \pm 75.6	50 \pm 1.2	101 \pm 2.3	174 \pm 15.6	44 \pm 4.1	154 \pm 8.7	1405 \pm 193.3	402 \pm 45.9	1043 \pm 52.4

TABLE 2

Dose	ACETIN [H ₂ O] [SRI]											
	TA100			TA1535			TA1537			TA98		
	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI
0.0	97 \pm 3.0	97 \pm 3.5	108 \pm 2.3	20 \pm 3.1	10 \pm 1.2	11 \pm 3.1	5 \pm .9	7 \pm .7	6 \pm .6	22 \pm 3.2	35 \pm 2.3	31 \pm 3.4
100.0	82 \pm 13.4	111 \pm 1.8	116 \pm 3.5	17 \pm 1.2	15 \pm 3.2	22 \pm 4.8	4 \pm .2	6 \pm .7	4 \pm 1.0	31 \pm 5.0	22 \pm 5.3	48 \pm 2.6
333.3	86 \pm 7.2	98 \pm 3.7	99 \pm 1.8	25 \pm 2.0	20 \pm 2.6	30 \pm 1.5	3 \pm .3	6 \pm 1.5	6 \pm 1.3	24 \pm 3.3	31 \pm 1.2	35 \pm 1.9
1000.0	89 \pm 8.2	111 \pm 10.3	119 \pm 4.5	42 \pm .3	58 \pm 3.5	64 \pm 5.0	4 \pm .6	4 \pm .6	7 \pm 1.7	24 \pm 2.7	31 \pm 1.5	35 \pm 3.3
3333.3	94 \pm 5.3	97 \pm 4.4	138 \pm 10.5	79 \pm 2.9	84 \pm 6.0	117 \pm 3.2	3 \pm .6	4 \pm .9	4 \pm .9	25 \pm 2.3	32 \pm 5.7	25 \pm 3.0
6666.7	104 \pm 6.4	133 \pm 4.4	139 \pm 9.8	106 \pm 2.4	123 \pm .3	149 \pm 4.7	3 \pm 1.2	4 \pm 0.0	3 \pm 0.0	20 \pm 4.0	35 \pm 2.1	31 \pm 6.2
10000.0	264 \pm 16.6	1492 \pm 61.4	2368 \pm 57.7	352 \pm 17.7	211 \pm 12.4	112 \pm 14.0	274 \pm 85.5	494 \pm 30.2	522 \pm 52.2	550 \pm 97.1	1033 \pm 57.8	1889 \pm 123.0
POS	264 \pm 16.6	1492 \pm 61.4	2368 \pm 57.7	352 \pm 17.7	211 \pm 12.4	112 \pm 14.0	274 \pm 85.5	494 \pm 30.2	522 \pm 52.2	550 \pm 97.1	1033 \pm 57.8	1889 \pm 123.0

TABLE 3

Dose	P-ACETOPHENETHESIDE [DMSO] [CWR]											
	TA100			TA1535			TA1537			TA98		
	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI
0.0	97 \pm 6.8	121 \pm 6.6	122 \pm 11.6	6 \pm .9	6 \pm 2.1	6 \pm 3.0	2 \pm 1.2	6 \pm 0.0	6 \pm 1.2	15 \pm 1.9	22 \pm 1.2	19 \pm .6
33.0	96 \pm 3.8	121 \pm 4.2	107 \pm 6.9	3 \pm .3	7 \pm 1.2	8 \pm 1.3	3 \pm .7	5 \pm .3	5 \pm 1.2	9 \pm 1.9	21 \pm 3.3	20 \pm 2.1
100.0	94 \pm 6.8	103 \pm 5.6	118 \pm 9.3	3 \pm 1.2	6 \pm 1.2	7 \pm .9	2 \pm .9	5 \pm 1.0	4 \pm 1.5	14 \pm 1.3	18 \pm 2.4	21 \pm 2.3
333.0	90 \pm 2.6	110 \pm 7.4	109 \pm 4.8	4 \pm .3	4 \pm .9	7 \pm .7	3 \pm 1.2	5 \pm 1.7	7 \pm 1.5	14 \pm 1.5	15 \pm 4.3	17 \pm 4.6
1000.0	87 \pm 7.4	114 \pm 2.7	124 \pm 3.7	3 \pm 1.3	4 \pm .9	5 \pm .9	3 \pm .6	4 \pm .3	7 \pm 1.2	13 \pm 4.3	18 \pm 1.5	19 \pm 4.7
2730.0	90 \pm 5.9	105 \pm 4.3	123 \pm 11.6	3 \pm .6	3 \pm .9	7 \pm .6	2 \pm .6	8 \pm 1.2	5 \pm .6	15 \pm 1.0	23 \pm 2.4	25 \pm 2.9
POS	499 \pm 23.9	1057 \pm 174.4	1818 \pm 296.3	212 \pm 33.8	36 \pm 2.1	30 \pm 3.7	396 \pm 32.0	109 \pm 2.3	107 \pm 1.8	276 \pm 25.4	626 \pm 139.2	984 \pm 100.2

138 Appendix 2

TABLE 235.2

TRIBUTYL BORATE (ACETONE) [EGG]

Dose	TA100			TA1535			TA1537			TA98		
	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI
0.0	111± 10.2	101± 3.7	99± 4.4	15± 2.3	9± 1.5	9± .9	7± 2.1	4± .7	6± 2.0	20± 5.2	17± .3	21± 1.5
77.0	118± 5.0	99± 4.2	102± .3	13± 1.7	9± 2.9	8± .6	8± 1.5	5± 1.3	6± 2.6	19± 2.4	15± 1.0	20± 2.9
256.7	106± 6.4	109± 7.5	97± 12.4	14± 2.1	7± .6	7± 1.2	5± .9	6± .3	4± 1.5	24± 3.3	18± 2.1	19± 2.4
770.0	112± 8.1	123± 4.4	114± 5.3	12± .9	7± .9	10± 1.5	4± .7	5± 1.8	5± .6	19± .6	19± 3.0	21± 1.2
2566.7	94± 9.8	106± 5.4	119± 1.8	10± 1.0	12± 2.6	7± .9	5± 2.0	7± 1.0	8± 1.5	15± 1.8	18± 3.3	23± 3.7
7700.0	81± 6.7	80± 5.9	103± 2.7	4± .5	4± .3	4± .3	3± .5	6± 1.3	t	7± 2.0	11± 2.0	11± 3.6
POS	1133± 50.7	1862± 63.3	2936± 66.2	817± 19.0	149± 7.5	199± 6.9	393± 85.4	133± 10.2	81± 4.4	2515± 139.9	1618± 62.3	242± 74.8

TABLE 236

1,2,3-TRICHLOROBENZENE (DMSO) [SRI]

Dose	TA100			TA1535			TA1537			TA98		
	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI
0.0	124± 9.9	138± 7.0	137± 7.3	25± 6.0	12± 2.9	13± .9	11± 2.7	20± .3	26± 3.5	25± 2.4	22± 5.0	35± 3.4
3.3	125± 13.2	127± 9.7	114± 4.1	17± 1.7	10± 2.2	16± 2.0	8± 2.1	15± 3.2	16± 3.0	20± 3.0	26± 2.2	32± 1.0
10.0	134± 14.0	131± 7.5	122± 7.2	20± 4.6	14± .3	13± .3	12± 1.3	14± 3.5	22± 3.0	16± 4.8	24± 1.7	31± 3.2
33.3	91± 3.4	131± 11.6	135± 10.6	17± 2.3	14± 2.9	16± 1.5	6± 1.3	13± 3.8	16± 1.5	20± .7	23± 3.7	32± 3.1
100.0	11± 6.4	91± 6.4	124± 10.2	0± 0.0	8± 1.5	14± 3.6	0± 0.0	11± 1.8	21± 3.3	10± 2.9	27± .6	31± 2.0
333.3	t	t	80± 2.8	t	4± 2.2	6± .7	t	0± 0.0	6± 1.0	t	6± 3.2	16± 6.2
POS	550± 8.1	596± 29.5	556± 9.5	436± 5.3	334± 51.3	367± 6.2	163± 24.0	287± 3.6	467± 13.0	474± 16.3	388± 25.1	93± 19.9

TABLE 237

1,2,4-TRICHLOROBENZENE (DMSO) [SRI]

Dose	TA100			TA1535			TA1537			TA98		
	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI
0.0	99± 5.2	113± 2.0	115± 8.7	20± 1.0	13± 3.0	13± .6	11± 1.5	14± 1.9	12± 2.7	37± 3.5	35± 2.3	37± 4.7
3.3	104± 4.0	107± 5.5	124± 2.0	16± 1.5	15± 2.5	13± 2.9	18± 3.8	10± 1.5	16± 5.2	38± 6.4	34± 2.3	33± .9
10.0	86± 6.7	115± 9.5	132± 5.8	18± 4.2	9± 0.0	10± 2.7	23± 2.7	11± 1.2	23± 3.7	26± 1.2	36± 4.8	35± 2.7
33.3	61± 10.1	123± 2.2	124± 7.3	19± 1.2	13± 3.2	11± 1.7	11± 1.7	9± .3	17± .7	24± 1.7	29± .9	43± 2.3
100.0	t	112± 6.7	100± 6.9	6± 6.0	9± 1.8	12± 2.7	3± 1.8	6± 1.7	17± 4.0	24± 1.3	34± 4.1	16± 6.4
333.3	t	114± 9.4	21± 21.5	t	13± .7	6± 1.9	5± 2.3	7± 1.2	0± 0.0	17± 2.5	34± 3.7	9± 8.5
POS	625± 26.8	460± 15.3	963± 104.3	444± 23.0	305± 3.2	268± 34.8	306± 8.0	158± 10.6	244± 5.6	850± 18.0	268± 3.0	1258± 30.5

TABLE 238

1,3,5-TRICHLOROBENZENE (DMSO) [SRI]

Dose	TA100			TA1535			TA1537			TA98		
	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI
0.0	124± 15.0	176± 1.2	108± 11.7	15± 2.4	18± 1.3	15± 1.7	24± 2.3	35± 5.2	26± 4.8	25± 4.8	43± 1.2	37± 5.8
33.3	99± 12.5	157± 1.8	126± 4.5	18± 3.2	13± 2.0	8± .6	10± 1.2	30± 1.2	25± 3.5	18± .9	41± 1.2	36± 6.9
100.0	59± 1.8	152± 2.8	117± 12.8	3± 1.3	11± 2.0	9± 2.9	3± .5	21± 3.3	26± 4.7	13± .6	33± 4.8	39± 1.8
333.3	5± 5.3	131± 2.3	101± 11.9	t	11± 2.4	16± 1.5	0± 0.0	10± 2.3	13± 1.0	3± .3	29± 2.0	31± 3.3
1000.0	28± 6.3	115± 7.3	81± 11.6	0± 0.0	7± 1.5	13± 3.0	0± 0.0	9± 1.7	12± 1.2	6± 1.3	27± 4.5	19± 1.5
3333.3	62± 22.4	121± 7.0	70± 5.0	6± 1.8	6± 1.0	11± 1.7	0± 0.0	10± 1.3	5± .6	13± .3	25± 4.3	18± 1.0
POS	617± 21.7	621± 5.1	442± 16.7	515± 4.9	197± 2.8	303± 4.4	136± 26.0	284± 7.2	322± 36.7	706± 14.6	534± 68.7	874± 31.9

TABLE 239.1

1,1,1-TRICHLOROETHANE (CHLOROETHENE) (DMSO) [CVR]

Dose	TA100			TA1535			TA1537			TA98		
	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI	NA	RLI	HLI
0.0	199± 4.4	240± 16.3	271± 5.9	5± .3	6± 1.3	7± 2.0	5± 1.2	13± 1.5	8± .9	22± 1.5	29± 1.2	23± 3.2
33.0	176± 13.4	294± 6.6	323± 9.1	4± .7	7± 1.3	7± 1.9	4± .7	11± 2.7	7± 1.9	21± 1.8	28± .7	26± 4.7
100.0	193± 6.1	292± 15.6	335± 23.0	5± .3	7± 0.0	7± 1.2	6± .7	12± 2.7	9± 1.5	24± 3.6	31± 1.9	29± .9
333.0	204± 15.2	290± 11.1	300± 12.9	4± .7	8± 1.3	7± 1.5	4± .9	11± 4.2	9± .6	20± 1.0	35± 2.4	28± 3.3
3333.0	203± 33.3	287± 15.9	292± 5.9	1± 0.0	5± 1.2	5± 1.5	5± .6	3± .3	4± .9	24± 1.3	26± 4.9	30± 1.8
10000.0	180± 13.4	293± 18.9	165± 30.4	1± 0.0	3± .6	4± 2.5	4± 0.0	4± 2.0	4± .9	22± 2.4	6± 3.3	
POS	867± 63.7	1126± 47.1	1905± 56.4	936± 79.2	99± 12.2	116± 16.2	63± 9.3	120± 1.2	163± 9.5	464± 49.0	645± 12.6	1946± 183.3

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 1,2,4-Trimethylbenzene in Rats

要約

1,2,4-トリメチルベンゼンは、トリメリット酸、ピタミンEなどの合成用、染料、顔料、医薬品の中間体、メチル化してデュレンを経てピロメリット酸の合成原料として広く使用されている。当物質をラットに5 ml/kg経口投与した場合には3/10例死亡するとの報告¹⁾があるが、反復投与毒性に関する報告は皆無に等しい。今回、既存化学物質の毒性を評価するために、当物質を雌雄ラットに1日1回、28日間反復経口投与し、その毒性について検討した。一部の動物については、14日間の回復期間を設けた。投与量は、1000 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3により300、100 および30 mg/kgとした。なお、対照として媒体(コーンオイル)投与群を設けた。

死亡は、いずれの群にも発現しなかった。一般状態観察において、300 mg/kg以上の群の雌雄で投与直後に流涎がみられた。

体重は、1000 mg/kg群の雌雄で増加抑制がみられた。回復期間中には、1000 mg/kg群の雌雄とも体重は低値で推移した。

摂餌量は、各投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様に推移した。

摂水量は、300 mg/kg群の雄と1000 mg/kg群の雌雄で増加がみられた。回復期間中には、1000 mg/kg群の雌雄とも摂水量は高値で推移した。

尿検査において、1000 mg/kg群の雌雄で尿量の高値がみられた。この変動は、回復期間終了前には消失した。

血液学検査において、各投与群の雌雄とも各検査項目に投与による変動はみられなかった。

血液生化学検査において、各投与群の雌雄とも各検査項目に投与による変動はみられなかった。

剖検では、いずれの群の雌雄とも異常はみられなかった。

器官重量において、雄では300 mg/kg以上の群で腎臓の相対重量の高値、1000 mg/kg群で肝臓の相対重量の高値および腎臓の絶対重量の高値がみられた。雌では、300 mg/kg以上の群で肝臓の絶対・相対重量の高値、1000 mg/kg群で腎臓の相対重量の高値がみられた。これらの変動は、回復期間終了時には消失した。

病理組織学的検査において、雄では300 mg/kg以上の群で腎臓に尿細管の硝子滴変性がみられた。この変化は、回復期間終了時には消失した。雌では、投与による変化はみられなかった。

以上のことから、当試験条件下における1,2,4-トリメチルベンゼンの28日間反復経口投与による毒性学的無影響量は、雌雄とも100 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質、媒体および投与検体

被験物質の1,2,4-トリメチルベンゼン(CAS No.95-63-6)は、分子量:120.20, 融点:-43.9℃, 沸点:169.4℃, 比重:0.88で水に難溶、有機溶媒に易溶の無色透明の液体である(Lot No.H5-CH-11, 製造元:東洋合成工業(株), 純度:98.75%)。入手後は、室温・遮光下で気密容器に入れて保管した。投与期間終了後に被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、純度は98.64%であり、使用期間中の安定性が確認された。

被験物質は秤取し、コーンオイルに溶解して必要濃度の投与検体を調製した。なお、0.6, 2および20%濃度の調製液は、室温・遮光・気密条件下で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、各濃度の調製液は調製後、室温・遮光・気密条件下で保管し、調製後7日以内に使用した。また、被験物質は純度換算しないで、投与量は原体重量で表示した。

2. 使用動物および飼育条件

Sprague-Dawley系ラット [Crj:CD(SD), (SPF)] を雄は4週齢、雌は3週齢で日本チャールス・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、雄は7日間、雌は14日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常の認められない6週齢の動物を群分けして試験に用いた。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の前日に行った。1群の動物数は、雌雄各10あるいは15匹とした。

動物は、室温20~24℃, 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/時に設定した飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージを用いて1ケージあたり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージを用いて個別飼育した。

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。なお、剖検前日の午後4時から絶食とした。

3. 投与経路, 投与方法, 群構成および投与量

1,2,4-トリメチルベンゼンは, 継続して経口的に人に摂取される可能性が考えられるため, 投与経路として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プラスチック製ディスプレイ注射筒を用いて, 強制経口投与した。投与量は, 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。

投与期間は, 1日1回で28日間反復投与とした。また, 28日間の投与後に一部の動物について14日間の回復期間を設けた。なお, 投与開始日を投与1日とし, 最終投与日の翌日を回復1日とした。投与開始日の週齢は6週齢であり, 体重範囲は雄が154~180 g, 雌が133~165 gであった。

投与量は, 先に実施した雄ラットを用いた2週間投与による予備試験(投与段階: 0, 62.5, 125, 250, 500および1000 mg/kg, 各群5例)の結果により決定した。すなわち, 125 mg/kg以上の群で投与直後に流涎がみられたのみで, 各群とも死亡発現はなく, 体重推移および剖検でも異常はみられなかった。そこで, 当試験の投与量は, 1000 mg/kgを最高用量とし, 以下公比約3で300, 100および30 mg/kgとした。また, 対照として被験物質と同一液量の媒体(コーンオイル)を投与する群を設けた。

1群の動物数は, 対照群および1000 mg/kg群では投与期間終了時剖検例雌雄各10匹と回復期間終了時剖検例雌雄各5匹の雌雄各15匹とした。また, 30, 100および300 mg/kg群では, 投与期間終了時剖検例雌雄各10匹とした。

4. 観察および検査項目

1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は, 投与期間中には投与前・後の1日2回ならびに回復期間中には毎日1回観察した。

2) 体重測定

体重は, 投与期間中および回復期間中とも1週間に2回測定した。

3) 摂餌量測定

摂餌量は, 投与期間中および回復期間中ともに1週間に1回測定した。

4) 摂水量測定

摂餌量測定と同様にして摂水量を測定した。

5) 尿検査

投与期間終了前に投与期間終了時の剖検用動物を, 回復期間終了前に回復期間終了時の剖検用動物について実施した。すなわち, 採尿ケージを用いて絶食・給水下で3時間で採取した尿(3時間尿)と引き続いて給餌・給水下で21時間で採取した尿(21時間尿)ならびにそれらを合計した尿(24時間尿)について, 以下の検査を実施した。

3時間尿: 色調は, 外観判定とした。pH, 蛋白, 糖, ケトン体, ビリルビン, 潜血, ウロビリノーゲンは, エームスクリニテック用検査紙(マイルス・三共(株))に尿を滴下後にエームス尿分析器(クリニテック200, マイルス・三共(株))を用いて検査した。尿沈渣は, 沈渣を尿沈渣染色液で染色後に顕微鏡下で観察した。なお, 投与期間中の採尿は, 当日の検体投与後に行った。

21時間尿: 比重を屈折率により屈折型尿比重計(ユリペット・II D, (株)ニコン)を用いて測定した。

24時間尿: 尿量を比重と重量から算出した。

6) 血液学検査

最終投与の翌日および回復期間終了後に, ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から血液を採取し, 以下の検査を実施した。

赤血球数(RBC), ヘモグロビン量, ヘマトクリット値, 血小板数および白血球数(WBC)は, EDTA-2KコーティングしたSysmexサンプルカップに採取した血液について, 多項目自動血球計数装置(Sysmex E-2000, 東亜医用電子(株))を用いて測定した。さらに, 平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球色素量(MCH)および平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

網状赤血球数は, EDTA-2K処理した血液をBrecher法により超生体染色してスライドグラスに塗抹後, Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で赤血球1000個中の数を計数した。

白血球百分率は, EDTA-2K処理した血液をスライドグラスに塗抹し, May-Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で白血球100個を分類計数した。

プロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)は, 3.13%クエン酸ナトリウムで処理した血漿について, 散乱光検出方式により血液凝固分析装置(コアグマスターII, 三共(株))を用いて測定した。

7) 血液生化学検査

血液学的検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液を遠心分離し, 得られた血清について, 以下の検査を実施した。

GOTおよびGPTはHenry変法, ALPはp-NPP基質法, γ -GTPは γ -G-P-NA基質法, 総蛋白はBiuret法, 総ビリルビンはAzobilirubin法, 尿素窒素(BUN)はUrease-GIDH法, クレアチニンはJaffé法, ブドウ糖はGlucose dehydrogenase法, 総コレステロールはCOD・DAOS法, トリグリセライドはGPO・DAOS法, Caはo-CPC法, 無機リンはMolybdenum blue法により, 自動分析装置(AU 500, オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

NaおよびKはイオン選択電極法により, Clは電量滴定法により, いずれも全自動電解質分析装置(EA04, (株)A&T)を用いて測定した。

蛋白分画は, 電気泳動法により自動電気泳動装置(AES 600, オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

アルブミン量は総蛋白量および蛋白分画値から, A/G

比は蛋白分画値から算出した。

8) 剖検

上記の6)および7)の項で採血した動物をさらに放血致死させた後に器官・組織の肉眼的観察を行った。

9) 器官重量の測定

剖検時に以下の器官重量を測定した。さらに、剖検前に測定した体重を基準として器官重量の体重比(相対重量)を算出した。

脳(大腦, 小脳, 延髄), 胸腺, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣および精巣上体または卵巣。

10) 病理組織学的検査

以下の器官または組織を摘出して10%中性緩衝ホルマリン液(ただし、眼球はグルタルアルデヒド・ホルマリン液)で固定し、全例について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。

心臓, 肺, 肝臓, 胃, 脾臓, 胸腺, 腎臓, 膀胱, 精巣, 精巣上体, 卵巣, 下垂体, 副腎, 甲状腺(上皮小体を含む), 脳(大腦, 小脳, 延髄), 眼球, 骨髄(大腿骨)。

投与期間終了時剖検例の対照群および1000 mg/kg群の心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓および副腎についてH-E染色組織標本を作製し、病理組織学的に検査した。さらに、投与期間終了時の1000 mg/kg群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた肝臓は30, 100および300 mg/kg群ならびに回復期間終了時の対照群および1000 mg/kg群の雌雄について、腎臓は30, 100および300 mg/kg群ならびに回復期間終了時の対照群および1000 mg/kg群の雄について同様に検査した。

5. 統計解析

体重, 摂餌量, 摂水量, 尿量, 尿比重, 血液学検査, 血液生化学検査, 器官重量(相対重量を含む)について

は、各群で平均値および標準偏差を算出した。有意差検定は対照群と各投与群との間で多重比較検定を用いて行い、危険率5%未満を有意とした。すなわち、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散ならば一元配置法による分散分析²⁾を行い、有意ならばDunnett法³⁾またはScheffé法⁴⁾を用いて行った。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⁵⁾)を行い、有意ならば順位を利用したDunnett法またはScheffé法を用いて行った。なお、病理組織学的検査において、1000 mg/kg群で毒性学的影響が示唆された器官・組織については、対照群との群間比較を上記の順位を利用したDunnett法またはScheffé法を用いて行った。さらに対照群との間に有意差が認められた所見については、Cochran・Armitageの傾向検定を用いて用量反応性を確認した。

結果

1. 一般状態

投与期間中には、対照群および100 mg/kg以下の群の雌雄とも異常症状はみられなかった。300 mg/kg以上の群の雌雄では、投与後に流涎がみられた。流涎は、300 mg/kg群の雄で投与7日、雌で投与20日、1000 mg/kg群の雄で投与2日、雌で投与3日からみられ、300 mg/kg群の雌雄では少数例～約半数例、1000 mg/kg群の雌雄では全例に認められた。

回復期間中には、対照群および1000 mg/kg群の雌雄とも異常症状はみられなかった。

2. 体重推移(Fig.1)

投与期間中には、300 mg/kg以下の群の雌雄は対照群とほぼ同様の体重推移であり、いずれの測定日も有意差はみられなかった。1000 mg/kg群の雄では、対照群と比べて投与4日頃から体重増加抑制傾向がみられ、投

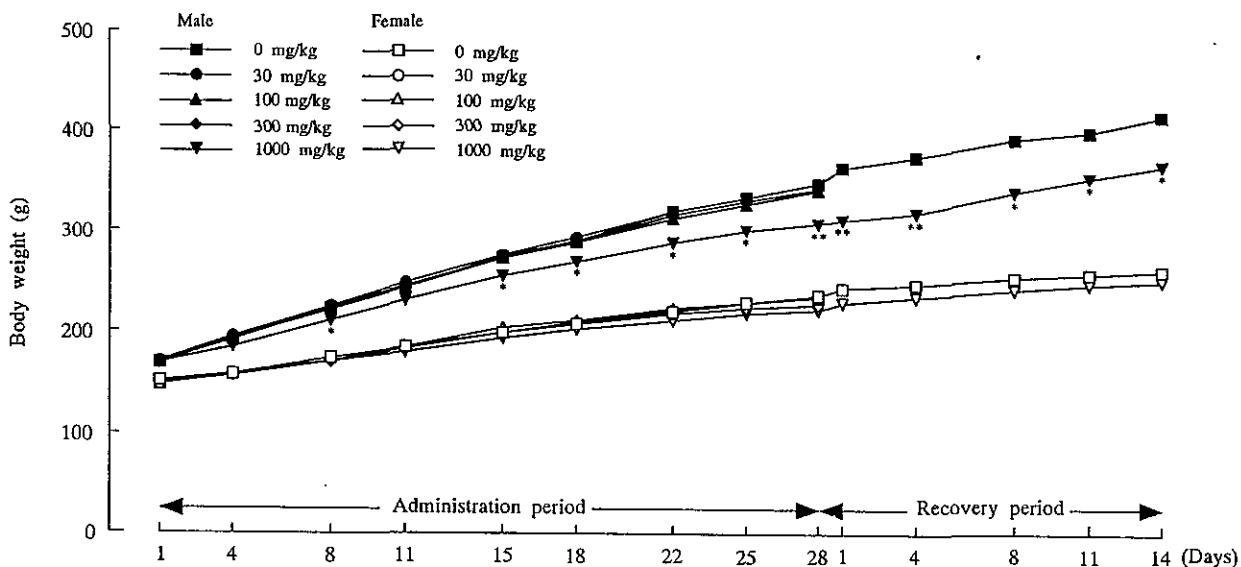


Fig. 1 Body weight of male and female rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 1,2,4-trimethylbenzene. Significantly different from control (*: p<0.05, **: p<0.01).