

を明らかに越える増殖抑制は認められなかった (Fig. 1).

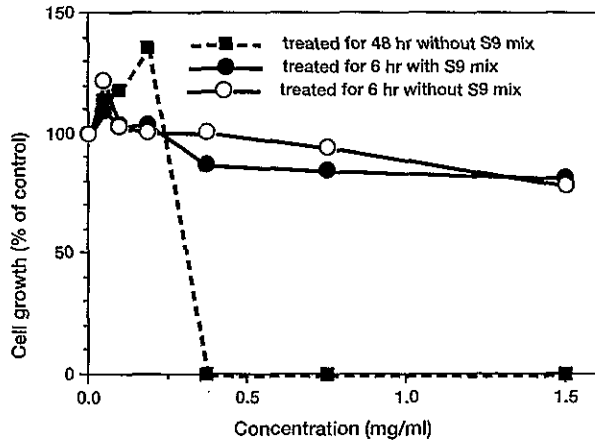


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with trifluoromethylbenzene

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、連続処理では0.3 mg/ml、短時間処理では、それぞれ1.5 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(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。

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、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。(トリフルオロメチル)ベンゼンを加えて24時間および48時間連続処理した高濃度群 (0.3 mg/ml) では、細胞毒性により分析できなかったが、その他の処理群では、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。(トリフルオロメチル)ベンゼンを加えて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、(トリフルオロメチル)ベンゼンは、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。

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

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Trend test ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		with aberrations				
												TAG (%)	TA (%)	Polyploid ⁴⁾ (%)	SA	NA
Control			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
TFMB	0.075	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
TFMB	0.15	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	NT	NT
TFMB	0.30	24	0 ^T											T		
MC	0.00005	24	200	2	22	56	1	0	0	81	0	62 (31.0)	62 (31.0)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
TFMB	0.075	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
TFMB	0.15	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	NT	NT
TFMB	0.30	48	0 ^T											T		
MC	0.00005	48	200	3	28	60	2	6	20	119	13	68 (34.0)	67 (33.5)	0.50		

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, T: Toxic; This group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed and less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 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 more than 98%, and water was contained (less than 2%).

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with trifluoromethylbenzene (TFMB)* 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			Trend test ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		with aberrations				
													TAG (%)	TA (%)	Polyploid ⁴⁾ (%)	SA	NA
Control				200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
TFMB	0.38	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38		
TFMB	0.75	-	6-(18)	200	1	1	0	1	0	0	3	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13	NT	NT
TFMB	1.5	-	6-(18)	200	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	0	0	2	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
TFMB	0.38	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00		
TFMB	0.75	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	NT	NT
TFMB	1.5	+	6-(18)	200	0	0	2	0	0	0	2	4	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	1	14	5	0	2	0	22	1	20 (10.0)	20 (10.0)	0.00		

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 more than 98%, and water was contained (less than 2%).

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: 田中憲穂
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 Furuhata
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

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 1,2,3-Trimethylbenzene in Rats

要約

トリメチルベンゼン(TMB)は、工業用に使用される多くの有機溶媒の主要な不純物であり、TMBはdimethyl benzoic acidおよびdimethyl hippuric acidに代謝される。トリメチルベンゼンには、今回試験を実施した1,2,3-トリメチルベンゼンの他、異性体として1,2,4-および1,3,5-トリメチルベンゼンがあり、これら3種類の異性体のうち、1,2,4-トリメチルベンゼンが最も代謝および排泄が遅く、そのため毒性が強いといわれている²⁾。また、毒性に関しては吸入時の毒性について、中枢神経抑制、粘膜刺激および呼吸器に対する障害等が明らかになっている³⁾。今回、既存化学物質の安全点検に係わる毒性調査事業の一環として、1,2,3-トリメチルベンゼンの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。

1,2,3-トリメチルベンゼンは、コーン油に溶解し、0、100、300および1000 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、血液凝固検査、血液生化学検査、尿検査、器官重量測定および病理学検査を行った。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。

一般状態の観察では、雌雄の1000 mg/kg群で全例に流涎が認められたが、回復期間では発現がなかった。

体重は雌の1000 mg/kg群で増加が抑制され、雄の同群で増加抑制傾向がみられた。摂餌量は、雌雄とも群間で差が認められず、飼料効率は雄の300 mg/kg、雌雄の1000 mg/kg群で低値であった。

血液学検査では、被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかったが、血液凝固検査では、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)が雌雄の被験物質投与群で延長または延長傾向を示し、さらに、プロトロンビン時間(PT)が雄のすべての被験物質投与群、雌の300 mg/kg群で延長または延長傾向を示し、フィブリノーゲン量が雄の1000 mg/kg群で高値を示した。回復試験では雄の1000 mg/kg群でAPTTのみ影響が継続して認められたが、その他の変化には回復が認められた。

血液生化学検査の結果、雌雄のすべての被験物質投与群でGOTの低値、雌のこれらの群および雄の1000 mg/kg群で塩素の低値、さらに雌雄の1000 mg/kg群で

総コレステロールの高値、雌の1000 mg/kg群で総蛋白の高値が認められた。これらの変化のうち、雌の1000 mg/kg群で認められた総蛋白の高値は、回復終了時の検査でも僅かに高値であった。

尿検査の結果、雌雄の300および1000 mg/kg群で黄褐色尿が認められ、回復終了時の検査でも、雌雄の1000 mg/kg群で各1例ずつ認められた。

器官重量測定の結果、雄では300および1000 mg/kg群で腎臓、さらに1000 mg/kg群で肝臓の実重量および相対重量の高値が認められた。一方、雌では、300および1000 mg/kg群で胸腺の実重量の低値、さらに1000 mg/kg群で肝臓の実重量および相対重量の高値、脳の実重量の低値、相対重量の高値が認められた。回復終了時の測定では、これらの変化のうち、雄の1000 mg/kg群の腎臓相対重量の高値、雌の同群の胸腺実重量の低値が回復にまで至らなかった。

病理学検査の結果、被験物質の影響が示唆される病変として肉眼所見では投与終了時に腎臓の肥大および淡色化が雄の300および1000 mg/kg群に、肝臓の肥大が雌の1000 mg/kg群に観察された。このうち腎臓の淡色化は雄の回復試験終了時にも観察された。

組織所見では投与終了時に肝細胞腫脹が雌雄の1000 mg/kg群と雄の300 mg/kg群に、腎臓の硝子滴変性が雄の300および1000 mg/kg群に、石灰沈着などの変化が雄の1000 mg/kg群に観察された。腎臓の好酸性小体は雄で対照群から観察されたが、1000 mg/kg群で所見の程度の増強が観察されたほか、脾臓の鬱血が雌の1000 mg/kg群で観察された。

回復試験終了時には脾臓の色素沈着および赤血球系造血亢進が雌雄の1000 mg/kg群に観察された。

以上のことから、無影響量は雌雄とも100 mg/kg/day未満と判断され、低用量による追加試験を実施することとした。

材料および方法

1. 被験物質

1,2,3-トリメチルベンゼン(CAS No.526-73-8, 東京化成工業(株)提供)は無色透明の液体で、非水溶性、分子式C₉H₁₂、分子量120.20の化合物である。本試験に用いたロットFJA01の純度は99.8%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131~146 g、雌で106~123 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 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、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, 100, 300および1000 mg/kgの4群とし、1群雌雄各5匹を用い、0および250 mg/kg群に雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

[用量設定理由]

投与量設定のための2週間投与試験を0, 100, 300および1000 mg/kgの4用量で実施した。その結果、雌雄の1000 mg/kg群では、体重および摂餌量の低値傾向、肝臓の実重量および相対重量の高値が認められ、さらに雌の同群で流涎が認められた。また血液生化学検査では、雄の1000 mg/kg群、雌の300および1000 mg/kg群で被験物質投与によると考えられる軽微な変化が認められた。

従って、28日間反復投与毒性試験の用量は予備試験と同様の0, 100, 300および1000 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。被験物質はコーン油に溶解し、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(100, 300および1000 mg/kg)ごとに所定量を精秤し、コーン油(ナカライテスク(株))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98.5~106%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1000 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、血液塗抹標本を作製しメイ・グリーンワルド・ギムザで染色後、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: ウレアーゼアンモニア法)、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(Jaffé法)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT: IFCC法)、グルタミン酸ピルビン酸トラ

ンスアミナーゼ(GPT:IFCC法), γ-グルタミルトランスアミナーゼ(γ-GTP: Szasz改法)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(株アタゴ)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(株))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, 精巣, 卵巣および胸腺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, 甲状腺(上皮小体を含む), 心臓, 肺, 胃, 膀胱, 骨髄(大腿骨)および一般状態の観察で流涎が観察されたため唾液腺について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, 肝臓, 脾臓および腎臓はすべての群について, 心臓, 副腎, 骨髄(大腿骨)および唾液腺については対照群と高用量群について行った。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Dunnnett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Dunnnettの多重比較検定で対照群と各投群間の有意差を検定した。また, 病理学検査結果についてはFisherの直接確率検定を実施した。なお, 用量相関性については, Jonckheereの傾向検定を用いて有意差を検定した。

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

投与期間中および回復期間中, 雌雄ともいずれの群に

2. 一般状態の観察

雌雄とも1000 mg/kg群で, 投与2週から流涎を示す動物が認められ, 雄では投与2週に1例, 投与3週に2例, 投与4週には全例に, 雌では, 投与2週に1例, 投与3週に全例に観察された。流涎は下顎が濡れる程度であったが, いずれも投与2週間後には消失し, 翌日また発現した。その他, 雌雄とも異常は認められなかった。回復期間では, 雌雄の1000 mg/kg群で, 流涎は観察されなかった。

3. 体重(Figure 1)

雄では, 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有意差が認められなかったが, 1000 mg/kg群は僅かながら低値傾向にあった。雌では, 対照群に比較して1000 mg/kg群で投与4週に低値が認められ, 0~4週の体重増加量も低値であった。回復期間では, 対照群と1000 mg/kg群とで差が認められなかった。

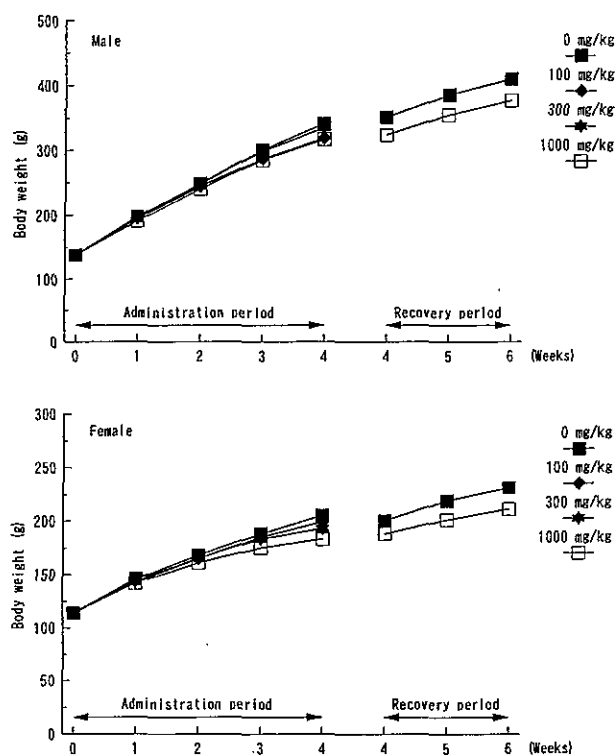


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with 1,2,3-trimethylbenzene in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

4. 摂餌量

雌雄とも, 投与期間および回復期間を通じて群間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, 対照群に比較して100および300 mg/kg群で

28日間反復投与毒性試験

Table 1 Hematology of rats treated orally with 1,2,3-trimethylbenzene in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
HCT (%)	43.6 ± 0.9	43.4 ± 1.1	43.3 ± 1.8	42.2 ± 2.4	42.3 ± 0.9	43.4 ± 1.5
HGB (g/dl)	14.6 ± 0.3	14.4 ± 0.3	14.6 ± 0.5	14.1 ± 0.8	14.8 ± 0.5	14.9 ± 0.5
RBC (×10 ⁶ /mm ³)	7.39 ± 0.35	7.32 ± 0.17	7.30 ± 0.31	7.22 ± 0.48	7.79 ± 0.25	7.82 ± 0.44
MCV (μm ³)	59.0 ± 1.8N	59.4 ± 1.7	59.3 ± 0.2	58.5 ± 1.4	54.4 ± 0.8	55.6 ± 2.0
MCH (pg)	19.8 ± 0.6	19.6 ± 0.3	20.1 ± 0.6	19.5 ± 0.4	19.0 ± 0.4	19.1 ± 0.8
MCHC (%)	33.6 ± 0.5	33.1 ± 0.6	33.9 ± 0.8	33.3 ± 0.5	34.9 ± 0.5	34.3 ± 0.3
PLT (×10 ³ /mm ³)	1156 ± 87	1106 ± 124	1067 ± 99	1191 ± 155	1075 ± 74	1067 ± 102
WBC (×10 ³ /mm ³)	17.2 ± 3.5	10.9 ± 2.8*	11.0 ± 2.6*	14.0 ± 4.5	10.0 ± 1.9	9.5 ± 3.3
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	9 ± 4	11 ± 4	11 ± 3	14 ± 4	17 ± 4	18 ± 3
LYMPH	88 ± 5	86 ± 4	87 ± 3	83 ± 4	78 ± 5	77 ± 4
MONO	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 0
EOSN	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 1	1 ± 1
BASO	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 1	0 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Reticulocyte (%)	25 ± 5	19 ± 5	24 ± 8	24 ± 4	20 ± 3	25 ± 4
PT (sec.)	13.7 ± 1.0N	19.4 ± 3.9	25.7 ± 5.3**	38.8 ± 17.9**	13.9 ± 0.6N	17.2 ± 3.0
APTT (sec.)	29.2 ± 2.0N	36.9 ± 4.4	43.1 ± 4.3**	57.3 ± 15.5**	26.2 ± 1.5	29.9 ± 2.4**
Fibrinogen (mg/dl)	250 ± 23	243 ± 17	255 ± 16	282 ± 25*	263 ± 21	265 ± 17
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
HCT (%)	42.0 ± 1.4	43.4 ± 1.3	42.7 ± 1.6	42.2 ± 1.2	41.8 ± 1.0	41.3 ± 2.1
HGB (g/dl)	14.3 ± 0.4	14.7 ± 0.6	14.8 ± 0.7	14.4 ± 0.5	14.7 ± 0.3	14.7 ± 0.5
RBC (×10 ⁶ /mm ³)	7.23 ± 0.12	7.45 ± 0.22	7.53 ± 0.25	7.50 ± 0.24	7.51 ± 0.11N	7.24 ± 0.50
MCV (μm ³)	58.0 ± 1.0	58.2 ± 1.0	56.7 ± 1.2	56.3 ± 0.6*	55.6 ± 0.6	57.2 ± 1.8
MCH (pg)	19.8 ± 0.3	19.8 ± 0.4	19.6 ± 0.4	19.3 ± 0.4	19.5 ± 0.2N	20.3 ± 0.9
MCHC (%)	34.1 ± 0.3	34.0 ± 0.5	34.7 ± 0.6	34.3 ± 0.6	35.2 ± 0.4N	35.6 ± 1.3
PLT (×10 ³ /mm ³)	1102 ± 89	1065 ± 122	1145 ± 91	1247 ± 94	1068 ± 52	1215 ± 145
WBC (×10 ³ /mm ³)	8.4 ± 1.9	10.8 ± 1.2*	5.9 ± 1.7*	8.7 ± 1.3	6.3 ± 3.3	5.4 ± 1.1
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	8 ± 2N	8 ± 2	12 ± 6	9 ± 1	17 ± 6	17 ± 5
LYMPH	89 ± 3	88 ± 3	84 ± 7	88 ± 2	79 ± 6	80 ± 6
MONO	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 0	2 ± 1
EOSN	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 1
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0
Reticulocyte (%)	14 ± 7	18 ± 7	15 ± 2	19 ± 4	22 ± 8	24 ± 5
PT (sec.)	13.9 ± 0.3	13.4 ± 0.6	16.6 ± 1.4**	14.1 ± 1.1	13.7 ± 0.4	14.1 ± 0.4
APTT (sec.)	23.0 ± 1.1	27.5 ± 3.0	33.7 ± 2.6**	34.0 ± 5.1**	21.2 ± 2.3	20.8 ± 1.8
Fibrinogen (mg/dl)	198 ± 27N	190 ± 6	171 ± 2	187 ± 14	210 ± 17	213 ± 25

NEUT:Neutrophil LYMPH:Lymphocyte MONO:Monocyte EOSN:Eosinophil BASO: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

白血球数の増加が認められたが、対照群と同程度内であり、これらの群の値に問題はなかった(背景値 $11.8 \pm 3.5 \times 10^3/\text{mm}^3$, $n=80$)。

雌では、対照群に比較して100 mg/kg群で白血球数の高値、300 mg/kg群で低値が認められたが用量相関性のない変化であった。

[回復期間終了時の検査結果]

雌雄とも検査したすべての項目について、対照群と1000 mg/kg群とで差が認められなかった。

6. 血液凝固検査(Table 1)

[投与終了時の検査結果]

雄では、対照群に比較して300および1000 mg/kg群で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)が延長を示し、さらに1000 mg/kg群でフィブリノーゲン量が高値を示した。PTおよびAPTTに関しては、統計学的有意差は認められなかったものの、低用量の100 mg/kg群でも延長傾向にあった。雌では、対照群に比較して300および1000 mg/kg群でAPTTが延長を示し、300 mg/kg群でPTが延長を示した。

[回復期間終了時の検査結果]

雄の1000 mg/kg群でAPTTの延長が認められた。雌については、3検査項目とも対照群と1000 mg/kg群で差が認められなかった。

7. 血液生化学検査(Table 2)

[投与終了時の検査結果]

雄では、対照群に比較してすべての被験物質投与群でGOTが低値を示し、さらに1000 mg/kg群で総コレステロールが高値、塩素が低値を示した。

雌では、対照群に比較してすべての被験物質投与群でGOTおよび塩素が低値を示し、さらに1000 mg/kg群で総コレステロールおよび総蛋白が高値を示した。

[回復期間終了時の検査結果]

雄では、対照群に比較して1000 mg/kg群で尿素窒素およびGOTが低値を示し、雌では、対照群に比較して1000 mg/kg群でアルカリ性ホスファターゼが低値、総蛋白、アルブミンおよびカリウムが高値を示した。

8. 尿検査(Table 3)

[投与終了時の検査結果]

対照群に比較して、雌雄の300および1000 mg/kg群で尿色の変化が認められ、黄褐色尿動物の増加が認められた。

その他の検査項目は、雌雄と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]

雌雄の1000 mg/kg群で黄褐色尿動物が各1例認めら

れた。対照群、300 mg/kg群、1000 mg/kg群で認められた。

9. 器官重量(Table 4)

[投与終了時の検査結果]

雄では、対照群に比較して300および1000 mg/kg群で腎臓重量が高値を示し、さらに1000 mg/kg群で肝臓重量が高値を示した。

雌では、対照群に比較して300および1000 mg/kg群で胸腺重量が低値を示し、さらに1000 mg/kg群で脳重量が低値、肝臓重量が高値を示した。その他、100 mg/kg群でも脳重量が低値を示したが、用量相関性のない変化であった。

[回復期間終了時の検査結果]

雄では、対照群に比較して1000 mg/kg群で脳および脾臓重量が低値を示した。

雌では、対照群に比較して1000 mg/kg群で胸腺重量が低値を示した。

10. 器官重量・体重比(相対重量)(Table 4)

[投与終了時の検査結果]

雄では、対照群に比較して300および1000 mg/kg群で腎臓相対重量が高値を示し、さらに1000 mg/kg群で肝臓相対重量が高値を示した。

雌では、対照群に比較して1000 mg/kg群で脳および肝臓相対重量が高値を示した。

[回復期間終了時の検査結果]

雄では、対照群に比較して1000 mg/kg群で腎臓相対重量が高値を示した。

雌では、対照群と1000 mg/kg群で差が認められなかった。

11. 病理学検査

a) 剖検所見(Table 5)

投与終了時において、対照群に比較して被験物質投与群で多く観察された所見として、腎臓の肥大が雄の300、1000 mg/kg群でそれぞれ1および4例、雌の1000 mg/kg群で1例に、腎臓の淡色化が雄の300、1000 mg/kg群でそれぞれ2および4例に観察された。また肝臓の肥大が雌の1000 mg/kg群で1例に観察された。その他観察された所見は、対照群、被験物質投与群で単発性の発生であった。

回復試験終了時において、対照群に比較して被験物質投与群で多く観察された所見として、腎臓の淡色化が雄の1000 mg/kg群で4例に観察された。その他観察された所見は、対照群、1000 mg/kg群でいずれも単発性の発生であった。

b) 組織所見(Table 6)

投与終了時において、対照群に比較して被験物質投与群に多く観察された所見として、肝細胞腫脹が雌雄の1000 mg/kg群の全5例と、雄の300 mg/kg群の2例に、

28日間反復投与毒性試験

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with 1,2,3-trimethylbenzene in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
BUN (mg/dl)	12.1 ± 2.5	9.9 ± 1.5	9.9 ± 2.0	12.7 ± 4.1	13.2 ± 2.0	10.8 ± 0.7*
Creatinine (mg/dl)	0.62 ± 0.08	0.64 ± 0.05	0.60 ± 0.08	0.61 ± 0.12	0.56 ± 0.04	0.58 ± 0.05
T.cholesterol (mg/dl)	47 ± 15	33 ± 10	49 ± 12	69 ± 17*	52 ± 29	38 ± 10
T.protein (g/dl)	5.39 ± 0.21	5.43 ± 0.14	5.39 ± 0.10	5.48 ± 0.18	5.63 ± 0.42	5.77 ± 0.15
Albumin (g/dl)	3.11 ± 0.13	3.12 ± 0.08	3.13 ± 0.09	3.19 ± 0.12	3.17 ± 0.30	3.32 ± 0.10
A/G	1.37 ± 0.10	1.35 ± 0.11	1.39 ± 0.07	1.40 ± 0.08	1.30 ± 0.08	1.35 ± 0.06
Glucose (mg/dl)	134 ± 12	124 ± 17	124 ± 9	138 ± 19	132 ± 26	139 ± 15
Triglyceride (mg/dl)	50.5 ± 18.0	45.2 ± 16.1	60.9 ± 22.6	48.4 ± 15.7	55.2 ± 33.1	56.9 ± 10.7
GOT (U/l)	57 ± 19	40 ± 8*	34 ± 7**	36 ± 7*	53 ± 6	41 ± 5**
GPT (U/l)	11 ± 2	12 ± 2	12 ± 3	14 ± 3	12 ± 2	14 ± 3
ALP (U/l)	161 ± 25N	150 ± 7	167 ± 52	195 ± 34	143 ± 43	116 ± 19
γ-GTP (U/l)	0.7 ± 0.5	0.7 ± 0.4	0.6 ± 0.4	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.4	0.5 ± 0.3
T.bilirubin (mg/dl)	0.13 ± 0.05	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.05N	0.11 ± 0.02
Sodium (mmol/l)	142.8 ± 1.6	143.9 ± 1.5	143.2 ± 1.2	141.7 ± 1.5	142.9 ± 1.0	143.6 ± 0.8
Potassium (mmol/l)	4.87 ± 0.42	4.38 ± 0.13	4.38 ± 0.27	4.66 ± 0.42	4.49 ± 0.26	4.70 ± 0.31
Chloride (mmol/l)	109.3 ± 1.8	108.3 ± 1.0	107.7 ± 1.4	106.1 ± 1.5**	107.9 ± 1.4	109.3 ± 1.0
Calcium (mg/dl)	9.86 ± 0.14	9.81 ± 0.19	10.02 ± 0.44	10.08 ± 0.41	9.76 ± 0.39	9.88 ± 0.23
I.phosphate (mg/dl)	8.37 ± 0.58	7.67 ± 0.81	7.67 ± 0.76	7.78 ± 0.52	6.90 ± 0.60	6.99 ± 0.26
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
BUN (mg/dl)	14.5 ± 4.7N	13.1 ± 1.4	14.2 ± 0.8	11.7 ± 1.4	13.1 ± 1.1	14.9 ± 2.5
Creatinine (mg/dl)	0.65 ± 0.10	0.58 ± 0.05	0.63 ± 0.04	0.58 ± 0.09	0.56 ± 0.06	0.58 ± 0.10
T.cholesterol (mg/dl)	43 ± 14	52 ± 18	46 ± 11	74 ± 12**	50 ± 19	61 ± 12
T.protein (g/dl)	5.34 ± 0.11	5.59 ± 0.19	5.67 ± 0.28	5.99 ± 0.35**	5.79 ± 0.20	6.07 ± 0.10*
Albumin (g/dl)	3.21 ± 0.04N	3.41 ± 0.13	3.45 ± 0.22	3.62 ± 0.28	3.41 ± 0.17	3.60 ± 0.06*
A/G	1.51 ± 0.04N	1.56 ± 0.02	1.55 ± 0.10	1.53 ± 0.11	1.44 ± 0.07	1.46 ± 0.05
Glucose (mg/dl)	103 ± 9	107 ± 10	102 ± 12	115 ± 15	116 ± 14	112 ± 7
Triglyceride (mg/dl)	28.6 ± 6.8N	40.5 ± 12.2	28.9 ± 1.3	34.2 ± 2.2	49.1 ± 25.8	36.9 ± 10.3
GOT (U/l)	62 ± 15	44 ± 4**	44 ± 7**	42 ± 8**	54 ± 7	56 ± 3
GPT (U/l)	12 ± 1	11 ± 2	12 ± 3	14 ± 2	12 ± 1	13 ± 2
ALP (U/l)	95 ± 22	75 ± 28	85 ± 12	79 ± 30	90 ± 22	61 ± 12*
γ-GTP (U/l)	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.5	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1.3 ± 0.5
T.bilirubin (mg/dl)	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.05	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.05	0.16 ± 0.01N	0.18 ± 0.02
Sodium (mmol/l)	142.8 ± 0.5	142.5 ± 0.6	142.6 ± 0.8	141.9 ± 0.6	142.8 ± 1.5	143.0 ± 0.9
Potassium (mmol/l)	4.60 ± 0.30	4.59 ± 0.31	4.61 ± 0.33	4.25 ± 0.14	4.18 ± 0.12	4.50 ± 0.22*
Chloride (mmol/l)	113.3 ± 1.2	110.9 ± 1.3*	110.9 ± 1.8*	108.8 ± 1.1**	110.8 ± 1.7	109.6 ± 0.7
Calcium (mg/dl)	9.74 ± 0.13	9.99 ± 0.12	9.84 ± 0.29	9.96 ± 0.08	9.62 ± 0.12	9.78 ± 0.17
I.phosphate (mg/dl)	6.83 ± 0.51N	7.08 ± 0.17	6.99 ± 0.56	7.23 ± 0.14	6.34 ± 0.62	6.95 ± 1.37

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

N: Non parametric analysis

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with 1,2,3-trimethylbenzene in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	100	300	1000	0	1000	
Male							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	
Volume (ml)	22 ± 15	11 ± 4	15 ± 6	23 ± 7	21 ± 5	20 ± 10	
Specific gravity	1.039 ± 0.021	1.052 ± 0.016	1.052 ± 0.015	1.044 ± 0.018	1.032 ± 0.015	1.033 ± 0.016	
Color	Slight yellow	5	5	2	1	5	4
	Yellow-brown	0	0	3	4	0	1
Turbidity	Clear muddy	5	5	5	5	5	5
pH	5	0	0	1	0	0	0
	6	0	1	1	2	0	0
	6.5	0	1	1	2	0	0
	7	0	1	1	0	0	0
	7.5	1	0	1	1	0	0
	8	0	1	0	0	3	0
	8.5	2	0	0	0	0	1
	≥9	2	1	0	0	2	4
Occult blood	-	4	5	5	5	5	5
	+/-	1	0	0	0	0	0
Ketones	-	0	1	0	2	1	1
	+/-	3	2	1	2	3	2
	1+	2	2	4	1	1	2
Glucose	-	5	5	5	5	5	5
(g/dl)							
Protein	-	1	1	0	0	0	0
(mg/dl)	30	3	0	1	2	2	2
	100	1	3	1	2	3	2
	≥300	0	1	3	1	0	1
Bilirubin	-	5	4	3	4	5	4
	1+	0	1	2	1	0	1
Urobilinogen	0.1	2	1	1	4	3	2
(E.U./dl)	1.0	3	4	4	1	2	3
Erythrocytes	-	5	5	5	5	5	5
Leukocytes	-	5	5	5	5	5	5
Epith. cells	-	5	5	5	5	5	5
Casts	-	5	5	5	5	5	5
Fat glob.	-	5	5	5	5	5	5
M. threads	-	5	5	5	5	4	5
	+	0	0	0	0	1	0
others	-	2	0	0	1	2	2
	+	3	5	5	4	3	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

Table 3 (continued)

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	100	300	1000	0	1000	
Female							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	
Volume (ml)	13 ± 2N	12 ± 4	11 ± 5	20 ± 10	10 ± 3	11 ± 4	
Specific gravity	1.046 ± 0.006	1.050 ± 0.025	1.057 ± 0.031	1.040 ± 0.019	1.054 ± 0.015	1.057 ± 0.027	
Color	Slight yellow	5	5	3	2	5	4
	Yellow-brown	0	0	2	3	0	1
Turbidity	Clear	5	5	5	5	5	5
	muddy	0	0	0	0	0	0
pH	5	0	0	2	1	0	0
	5.5	1	1	0	1	0	0
	6	1	0	1	1	1	0
	6.5	1	1	1	2	1	1
	7	1	2	0	0	1	1
	7.5	1	1	1	0	1	1
	8	0	0	0	0	1	1
	8.5	0	0	0	0	0	1
Occult blood	-	5	5	5	5	5	5
Ketones	-	1	1	1	2	0	0
	+/-	0	3	1	2	4	3
	1+	4	1	3	1	1	2
Glucose	-	5	5	5	5	5	5
(g/dl)							
Protein	-	0	1	1	2	0	0
(mg/dl)	+/-	1	2	0	1	0	0
	30	0	1	1	1	2	2
	100	2	0	1	1	2	1
	≥300	2	1	2	0	1	2
Bilirubin	-	3	5	4	5	3	2
	1+	2	0	1	0	2	3
Urobilinogen	0.1	1	1	2	3	0	0
(E.U./dl)	1.0	4	4	3	2	5	5
Erythrocytes	-	5	5	5	5	5	5
Leukocytes	-	5	5	5	5	5	5
Epith. cells	-	5	5	5	5	5	5
Casts	-	5	5	5	5	5	5
Fat glob.	-	5	5	5	5	5	5
M. threads	-	5	5	5	5	5	5
others	-	1	0	2	2	1	2
	+	4	5	3	3	4	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