

Table 4 Absolute and relative organ weights 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
Body weight (g)	332 ± 34	319 ± 20	335 ± 30	311 ± 16	410 ± 30	377 ± 18
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.05 ± 0.03	2.01 ± 0.10	2.03 ± 0.11	1.99 ± 0.07	2.15 ± 0.04	2.03 ± 0.10*
Liver (g)	9.97 ± 1.50	9.78 ± 1.01	10.78 ± 1.56	12.35 ± 1.64*	11.99 ± 2.02	11.57 ± 1.27
Kidneys (g)	2.50 ± 0.23	2.58 ± 0.17	2.95 ± 0.33*	3.19 ± 0.38**	2.87 ± 0.21	3.08 ± 0.34
Spleen (g)	0.64 ± 0.07	0.55 ± 0.07	0.58 ± 0.07	0.55 ± 0.03	0.70 ± 0.02	0.63 ± 0.05**
Adrenals (mg)	47 ± 4	46 ± 5	51 ± 3	49 ± 6	52 ± 4	54 ± 8
Testes (g)	2.86 ± 0.15	2.85 ± 0.10	2.93 ± 0.12	2.62 ± 0.27	3.23 ± 0.20	3.06 ± 0.16
Thymus (mg)	717 ± 133	639 ± 118	593 ± 56	592 ± 104	471 ± 79	508 ± 40
Relative organ weight						
Brain (%)	0.622 ± 0.055	0.629 ± 0.028	0.608 ± 0.025	0.644 ± 0.058	0.527 ± 0.036	0.539 ± 0.027
Liver (%)	2.992 ± 0.162N	3.057 ± 0.157	3.199 ± 0.190	4.010 ± 0.788**	2.911 ± 0.310	3.065 ± 0.232
Kidneys (%)	0.754 ± 0.053	0.810 ± 0.063	0.879 ± 0.045**	1.025 ± 0.080**	0.701 ± 0.061	0.814 ± 0.059**
Spleen (%)	0.195 ± 0.036	0.173 ± 0.029	0.174 ± 0.027	0.177 ± 0.020	0.171 ± 0.012	0.166 ± 0.016
Adrenals (%)	0.014 ± 0.001	0.015 ± 0.002	0.015 ± 0.001	0.016 ± 0.002	0.013 ± 0.001	0.014 ± 0.002
Testes (%)	0.864 ± 0.043	0.897 ± 0.058	0.877 ± 0.065	0.843 ± 0.057	0.789 ± 0.035	0.813 ± 0.068
Thymus (%)	0.221 ± 0.060	0.199 ± 0.028	0.179 ± 0.033	0.192 ± 0.039	0.115 ± 0.021	0.135 ± 0.014
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	209 ± 7	199 ± 16	193 ± 20	178 ± 6**	231 ± 25	211 ± 14
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.97 ± 0.05	1.83 ± 0.06**	1.89 ± 0.05	1.85 ± 0.09**	1.88 ± 0.05	1.89 ± 0.09
Liver (g)	6.03 ± 0.42	5.91 ± 0.59	5.86 ± 0.73	7.03 ± 0.52*	6.28 ± 0.82	6.11 ± 0.72
Kidneys (g)	1.66 ± 0.26	1.62 ± 0.23	1.65 ± 0.15	1.68 ± 0.22	1.74 ± 0.16	1.66 ± 0.14
Spleen (g)	0.41 ± 0.086	0.35 ± 0.05	0.33 ± 0.06	0.37 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.42 ± 0.04
Adrenals (mg)	64 ± 5	59 ± 8	59 ± 7	55 ± 10	60 ± 8	64 ± 14
Ovaries (mg)	86 ± 11	87 ± 17	82 ± 18	78 ± 10	84 ± 7	86 ± 9
Thymus (mg)	485 ± 46	411 ± 24	365 ± 57**	401 ± 87*	468 ± 99	336 ± 78*
Relative organ weight						
Brain (%)	0.945 ± 0.035N	0.925 ± 0.066	0.987 ± 0.108	1.034 ± 0.015*	0.819 ± 0.082	0.894 ± 0.042
Liver (%)	2.885 ± 0.146	2.961 ± 0.029	3.032 ± 0.093	3.941 ± 0.233**	2.716 ± 0.190	2.885 ± 0.227
Kidneys (%)	0.796 ± 0.112	0.810 ± 0.080	0.860 ± 0.063	0.942 ± 0.093	0.760 ± 0.090	0.787 ± 0.046
Spleen (%)	0.197 ± 0.024	0.177 ± 0.017	0.174 ± 0.034	0.207 ± 0.015	0.173 ± 0.021	0.201 ± 0.018
Adrenals (%)	0.030 ± 0.001	0.030 ± 0.004	0.031 ± 0.003	0.031 ± 0.005	0.026 ± 0.005	0.030 ± 0.007
Ovaries (%)	0.041 ± 0.005	0.043 ± 0.007	0.042 ± 0.005	0.044 ± 0.004	0.036 ± 0.002	0.041 ± 0.005
Thymus (%)	0.232 ± 0.019	0.207 ± 0.020	0.190 ± 0.031	0.244 ± 0.045	0.201 ± 0.024	0.159 ± 0.035

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group;

*: P ≤ 0.05

** : P ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

28日間反復投与毒性試験

Table 5 Summary of gross findings in rats treated orally with 1,2,3-trimethylbenzene 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	100	300	1000	0	1000
Male								
		No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
	thymus	red patch/zone	1	0	1	0	0	0
RESPIRATORY SYSTEM								
	lung	colored patch/zone	0	0	0	0	0	1
		red patch/zone	0	0	0	0	0	1
URINARY SYSTEM								
	kidney	enlarged	0	0	1	4*	0	0
		pale	0	0	2	4*	0	4*
Female								
		No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
	lymph node	enlarged	0	0	0	1	0	0
RESPIRATORY SYSTEM								
	lung	colored patch/zone	0	1	0	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM								
	small intestine							
		deformed	0	0	1	0	0	0
	liver	enlarged	0	0	0	1	0	0
URINARY SYSTEM								
	kidney	enlarged	0	0	0	1	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM								
	ovary	cyst	0	0	0	0	1	0
	uterus	dilated lumen	1	0	1	0	0	0
	broad ligament of uterus							
		cyst	0	0	0	1	0	0

Significant difference from control group; *: $P \leq 0.05$

腎臓の硝子滴変性が雄の300, 1000 mg/kg群でそれぞれ4および5例に観察された。雄において対照群から観察されたものの、腎臓の好酸性小体が対照群, 100, 300 および1000 mg/kgの各群でそれぞれ1, 1, 2 (軽度:1, 中度:1) および3 (軽度:1, 重度:2) 例と, 300 および1000 mg/kg群で程度の増強を示した。また腎臓の好酸性小体の程度の増強に伴って, 腎臓の石灰沈着, 蛋白円柱および管腔拡張が雄の1000 mg/kg群でそれぞれ4, 3 および2例に観察された。また脾臓の鬱血が雌の1000 mg/kg群で全5例に観察された。発生数は1例のみであったが, 雄の1000 mg/kg群に脾臓の赤血球系造血亢進および肝臓の糖質蓄積が観察された。その他, 被験物質投与群で減少した所見として雄の1000 mg/kg群および

雌の全被験物質投与群で肝臓の脂肪化の発生がなかった。なお, 被験物質投与群において一般状態で流涎が観察されたため唾液腺の組織学的検査を行ったが, 異常は認められなかった。また, 対照群を含め試験群で肝臓の肉芽巢, 腎臓の細胞浸潤および好塩基化, 副腎の空胞化が観察されたが, 群間で発生数に差は認められなかった。

その他, 観察された所見は単発性の発生にとどまった。

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, 脾臓の色素沈着が雌雄の1000 mg/kg群で全5例に, 赤血球系造血亢進が雌雄の1000 mg/kg群にそれぞれ雄全5例, 雌2例に観察

Table 6 Summary of histopathological findings in rats treated orally with 2,4-dinitrophenol in the primary 14-day repeated dose toxicity test

Item	Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)												14 days recovery groups (mg/kg)								
			0			100			300			1000			0			1000					
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Male																							
		No. of animals necropsied	5			5			5			5			5			5					
HEMATOPOIETIC SYSTEM																							
		spleen	(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)					
		deposit of pigment	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0**
		erythropoiesis, increased	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0**
DIGESTIVE SYSTEM																							
		liver	(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)					
		fatty change	3	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
		glycogen storage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		swelling of liver cells	0	0	0	0	0	0	2	0	0	5	0	0**	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		granulation	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
URINARY SYSTEM																							
		kidney	(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)					
		basophilic change	3	0	0	3	0	0	2	0	0	4	1	0	5	0	0	3	1	0	0	0	0
		deposit of calcium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0*	1	0	0	1	0	0	0	0	0
		eosinophilic body	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	2	0	0	0	2	0	1	0	0	0
		hyaline droplet	0	0	0	0	0	0	4	0	0*	5	0	0**	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		protein cast	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		tubular dilatation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
		infiltration/cellular	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
		lymphocytic infiltration	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																							
		adrenal gland	(5)			(0)			(0)			(5)			(0)			(0)					
		vacuolic change	5	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Female																							
		No. of animals necropsied	5			5			5			5			5			5					
HEMATOPOIETIC SYSTEM																							
		spleen	(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)					
		congestion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0**	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		deposit of pigment	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0**	0	0	0
		erythropoiesis, increased	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM																							
		liver	(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)					
		fatty change	4	0	0	0	0	0*	0	0	0*	0	0	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		swelling of liver cells	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0**	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		granulation	3	0	0	4	0	0	3	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
URINARY SYSTEM																							
		kidney	(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)					
		basophilic change	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0
		deposit of calcium	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		lymphocytic infiltration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

1:slight 2:moderate 3:marked

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

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

された。また、腎臓の好酸性小体が雄の1000 mg/kg群で3例に観察されたが、そのうちの1例には投与終了時と同様の重度の好酸性小体と蛋白円柱および管腔拡張も観察された。その他、肝臓の肉芽巢および脂肪化、腎臓の好塩基化および細胞浸潤が観察された。

その他、観察された所見は単発性の発生にとどまった。

考察および結論

一般状態の観察では、雌雄とも1000 mg/kg群で流涎が認められたが、投与2時間後には消失した。回復期間に入ると、雌雄の1000 mg/kg群で認められた流涎は1例も観察されず、この症状が被験物質投与に起因することを裏付けた。

雌雄とも摂餌量の増減は認められなかったが、体重が雌の1000 mg/kg群で低値、雄の同用量群で低値傾向を示したため、これらの群では飼料効率が低値を示した。

血液学検査に関しては、病理組織学的検査で脾臓に赤血球系造血亢進が認められたが、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。

血液凝固検査において、雌雄ともAPTTに低用量の100 mg/kgから延長傾向または延長が認められ、雄ではPTも同様な傾向を示した。雄の1000 mg/kg群では、フィブリノーゲン量も高値を示しており、抗凝固薬や抗血小板薬で認められるものと同様な変化であったが、これらの薬剤で認められる血小板数の増加は本被験物質では認められていない。

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の低値が認められた。

GOTはGPT同様逸脱酵素であり高値の場合のみ意義のある変化といわれている。GPTに関しては、セファロスポリン系抗生物質の投与で直接活性阻害を引き起こすことが知られているが⁴⁾、GOTに関しての報告は見あたらず、本試験における他の諸検査の結果からもGOT低値の原因は明らかではない。その他雌雄で認められた総コレステロールおよび塩素、雌で認められた総蛋白についても変化の程度は僅かであり、特定器官の障害を明確に示唆するものではないと考えられた。

尿検査の結果、尿色の黄褐色化が認められたが、潜血やビリルビンなどの増加は認められなかった。被験物質の代謝物による色調変化が示唆されるが、回復期間終了時の検査でも雌雄各1例に認められていることから、原因は明らかではない。

器官重量測定の結果、雌雄で肝臓重量の高値、さらに雄で腎臓重量の高値、雌で胸腺重量の低値が認められ、胸腺の変化を除き、病理学検査で重量増加の要因となる対応所見が認められた。

病理学検査の結果、被験物質投与の影響と考えられる変化として、肉眼所見では投与終了時の雄に腎臓の淡色化と肥大、雌に肝臓の肥大が観察され、回復試験終了時の雄にも腎臓の淡色化が観察された。その他の所見は自然発生性の所見と考えられた。組織所見では被験物質の

影響と考えられる変化として、投与終了時の雌雄に中心性肝細胞腫脹、雄に腎臓の硝子滴変性が観察された。また被験物質投与によって、対照群にも観察された腎臓の好酸性小体の程度が増強し、それに伴って対照群には見られなかった腎臓の石灰沈着、蛋白円柱および管腔拡張が観察された。その他、各1例のみであったが、1000 mg/kg群の雄に肝臓の糖質蓄積および脾臓の赤血球系造血亢進、雌に脾臓の鬱血が観察された。回復試験終了時の雌雄に脾臓の赤血球系造血亢進および色素沈着が観察された。逆に投与終了時の雌雄に肝臓の脂肪化の発生が減少した。また、投与終了時に雌の腎臓の肉眼的な肥大が観察されたが、組織学的には異常は認められなかった。その他の所見は、自然発生性の変化と考えられた。

投与終了時に観察された雌の肝臓の肉眼的な肥大、雌雄の中心性の肝細胞腫脹は肝機能に関する臨床検査値の明らかな上昇もなく、毒性変化というより生体の適応反応と考えられた。すなわち被験物質投与によって、薬物代謝誘導などにより、肝細胞が肥大したのと考えられた⁵⁾。この変化は回復試験終了時には観察されず、可逆性の変化と考えられた。

投与終了時に観察された雄の腎臓の硝子滴変性および投与終了時と回復試験終了時に観察された雄の腎臓の好酸性小体は、近位尿細管に観察された。揮発性炭化水素類の薬物投与により、肝臓で合成された $\alpha 2\mu$ -グロブリンが揮発性炭化水素と結合し、蛋白代謝の低下した近位尿細管に蓄積するとされ、蓄積が強くなると尿管上皮細胞の変性、壊死、再生変化、蛋白円柱が観察される⁶⁾。本試験の1,2,3-トリメチルベンゼンもベンゼン環をもつ揮発性炭化水素であり、同様の所見が観察されたと考えられた。

回復試験終了時の雄の1000 mg/kg群の1例にも同様の変化が認められたものの、発生数の減少より回復傾向はあるものと考えられた。

また投与終了時に観察された雌の脾臓の鬱血および雄の脾臓の赤血球系造血亢進、回復試験終了時に観察された雌雄の脾臓の赤血球系造血亢進と色素沈着は、投与期間および回復期間中の赤血球系の臨床検査値の異常はみられず、骨髄の異常も観察されなかったことから原因は不明であった。しかし血液凝固系の延長が起こっており、また造血障害を示唆する文献もあることから⁷⁾、投与期間中に何らかの赤血球への障害があったことが示唆され、回復期での造血亢進は障害に対する回復反応とも考えられた。

以上のことから、本被験物質は腎臓、血液凝固系を主な標的とし、無影響量は雌雄とも100 mg/kg/day未満と判断された。従って無影響量が求まらなかったことから、さらに低用量による追加試験を実施した。

参考文献

- 1) P. Kasirzewski A. Weaderna-Brychat and B. Czernski Determination of dimethylbenzoic acid isomers in wrie by gas chromatography. *Medycyna Pracy*,

- 2) P. I Mikulski and R. Wiglusz, The comparative metabolism of mesitylen;pseudocumene, and heminellitene in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **31** (1), 21(1995).
- 3) Information Profiles of Potential Occupational Hazard: Trimethyl-benzene, Govt Reports Announcements & Index (GRA & I), Issue 15, 1987.
- 4) G. Feuer et al. Alanine aminotransferase activity of rat tissues following the administration of cefazolin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **41**, 185(1977).
- 5) 松原尚志, 戸内明, ラット血中および肝内酵素活性に及ぼす Cefamandole の影響: GTP 活性低下機作の解析. *Chemotherapy*, **27**, 740 (1979).
- 6) P. Greaves, "Urinary Tract, Histopathology of Preclinical Toxicity Studies," ELSEVIER, The Netherlands, 1990, pp.497-583

試験責任者: 井上博之

試験担当者: 各務 進, 庄子明德, 渡 修明,
小林和雄, 松木由加

(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: Hiroyuki Inoue (Study director),

Susumu Kakamu, Akinori Shoji,

Nobuaki Watari, Kazuo Kobayashi,

Yuka Matuki

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

1,2,3-トリメチルベンゼンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験(追加試験)

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

要約

先に実施した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において最低用量の100 mg/kg群でも雌雄で活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT), さらに雄の100 mg/kg群でプロトロンビン時間(PT)の延長傾向が認められたため、無影響量を見い出すための追加試験を実施した。

ラットは1群雌雄各5匹で4試験群、計40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, 3, 10および30 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、血液凝固能検査、血液生化学検査(GOTおよび塩素のみ)および病理学的検査(剖検)を行った。

その結果は、次のとおりであった。

一般状態の観察では、雌雄とも投与期間を通じて異常動物は認められなかった。

体重、摂餌量および飼料効率は、雌雄とも群間で差が認められなかった。

血液凝固能検査では、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、プロトロンビン時間(PT)およびフィブリノーゲン量のいずれも、雌雄ともに被験物質投与群と対照群とで差が認められなかった。

血液生化学検査の結果、雌雄のすべての被験物質投与群ともGOTおよび塩素の2項目について、対照群と差が認められなかった。

病理学的検査の結果、被験物質の影響が示唆される肉眼所見は雌雄いずれの群にも認められなかった。

以上のことから、無影響量は雌雄とも30 mg/kg/dayと判断された。

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 C_9H_{12} 、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 [CriJ: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8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130~144 g、雌で104~121 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, 3, 10および30 mg/kgの4群とし、1群雌雄各5匹、計40匹を使用した。

[用量設定理由]

28日間反復投与毒性試験を0, 100, 300および1000 mg/kgで実施した結果、雌雄とも100 mg/kgにおいてもPT, APTTの延長のみが影響として認められた。無影響量を把握するため、さらに公比約3で30, 10および3 mg/kgを設定した。

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(3, 10および30 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

官した。投与液の濃度分析を9へくの群に關し投与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89.5～99.3%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

投与開始から投与終了時まで、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

投与終了時に実施した。

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. 血液凝固能検査

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、塩素(電極法)をEKTACHEM 700N(米国コダック社)で、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)をCentrifichem ENCORE II(米国ベーカー社)で測定した。

5) 病理学検査

病理解剖は投与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、肝臓、腎臓、脾臓および骨髓(大腿骨)について10%中性緩衝ホルマリン液で固定し保存した。

6) データの記録および統計分析

各試験群の体重、摂餌量、血液凝固能検査値および血液生化学検査値は、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

投与期間中、雌雄ともいずれの群にも死亡例は認められなかった。

2. 一般状態の観察

雌雄いずれの群にも異常動物は認められなかった。

3. 体重

雌雄とも全投与期間を通じて、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。

4. 摂餌量

雌雄とも、投与期間を通じて群間で差が認められなかった。

5. 血液凝固能検査(Table 1)

雌雄ともPT、APTTおよびフィブリノーゲン量の3検査項目について群間で差は認められなかった。

6. 血液生化学検査(Table 2)

雌雄ともGOTおよび塩素は被験物質投与群と対照群とで差が認められなかった。

7. 病理学検査

a) 剖検所見

被験物質投与群で多く観察された所見はなく、観察された所見は、いずれも単発性の発生であった。

考察および結論

雌雄とも投与期間を通じて死亡例はなく、一般状態に異常のある動物は観察されなかった。

体重、摂餌量および飼料効率、雌雄とも被験物質投与群で差が認められなかった。

血液凝固能検査については、前試験(投与量0, 100, 300および1000 mg/kg)で認められたPTおよびAPTTの延長傾向が、雌雄の30 mg/kg群では認められなかった。

血液生化学的検査の結果、GOTおよび塩素は、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。

剖検所見にも被験物質投与と関連づけられる異常は認められなかった。

以上のことから、無影響量は雌雄とも30 mg/kg/dayと判断された。

Table 1 Coagulation 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)			
	0	3	10	30
Male				
No. of animals	5	5	5	5
PT (sec.)	13.6 ± 0.3	13.5 ± 0.3	13.5 ± 0.6	13.8 ± 0.4
APTT (sec.)	23.0 ± 0.6	23.5 ± 0.7	22.8 ± 1.2	23.2 ± 1.1
Fibrinogen (mg/dl)	284 ± 19	273 ± 17	283 ± 17	266 ± 9
Female				
No. of animals	5	5	5	5
PT (sec.)	13.8 ± 0.2	14.1 ± 0.5	14.0 ± 0.4	13.8 ± 0.4
APTT (sec.)	20.5 ± 1.7	20.7 ± 1.4	20.1 ± 0.9	20.8 ± 1.3
Fibrinogen (mg/dl)	231 ± 22	221 ± 31	229 ± 11	219 ± 16

Values are expressed as Mean ± S.D.

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)			
	0	3	10	30
Male				
No. of animals	5	5	5	5
GOT (U/l)	48 ± 10	46 ± 9	38 ± 3	49 ± 5
Chloride (mmol/l)	110.6 ± 0.9	110.3 ± 0.4	109.6 ± 1.0	110.9 ± 0.9
Female				
No. of animals	5	5	5	5
GOT (U/l)	52 ± 11	59 ± 7	51 ± 8	57 ± 10
Chloride (mmol/l)	112.3 ± 1.3	112.1 ± 1.2	111.7 ± 1.0	113.8 ± 0.8

Values are expressed as Mean ± S.D.

連絡先

試験責任者：井上博之
 試験担当者：各務 進，庄子明德，渡 修明，
 小林和雄，松木由加
 (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: Hiroyuki Inoue (Study director),
 Susumu Kakamu, Akinori Shoji,
 Nobuaki Watari, Kazuo Kobayashi,
 Yuka Matuki
 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

Reverse Mutation Test of 1,2,3-Trimethylbenzene on Bacteria

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、1,2,3-トリメチルベンゼン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) の各菌株ならびに代謝活性化法 (+S9 mix) の TA100, TA1535 および TA1537 でそれぞれ、1.42~45.4 μg /プレート、代謝活性化法の WP2uvrA および TA98 で 5.68~182 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、1,2,3-トリメチルベンゼン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種類の菌株を選択した。

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9月5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-ビオチン (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% ニュートリエントプロス (OXOID 社) 溶液を 25 ml 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 ヶ月以内のキッコマン(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 1,2,3-トリメチルベンゼン (ロット番号: FJA01, CAS No.: 526-73-8) は分子式 C₉H₁₂, 分子量 120.20, 純度 90.8% の液体である。東京化成工業(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、当センター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

DMSO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

7.26, 36.3, 182, 908および4540 μg /プレート(50 mg/ml溶液を本被験物質の純度90.8%で補正した)の用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、直接法の全菌株ならびに代謝活性化法のTA100, TA1535およびTA1537で36.3 μg /プレート以上、代謝活性化法のWP2uvrAおよびTA98で182 μg /プレート以上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の各菌株ならびに代謝活性化法のTA100, TA1535およびTA1537で45.4 μg /プレート、代謝活性化法のWP2uvrAおよびTA98で182 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°C)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(NaN_3 : 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°C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°C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($\times 60$)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)ならびに代謝活性化法(+S9 mix)のいずれとも高用量群において、1,2,3-トリメチルベンゼン処理による生育阻害作用が観察された。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、S9 mix添加時182 μg /プレートの用量において、試験管内の反応液が僅かに白濁したが、コロニー計数時には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1,2,3-トリメチルベンゼン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, 板倉真由実, 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, Mayumi Itakura
 Isami Katsumata
 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

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	97	104	103	10	12	14	15	21	18	18	24	25	4	6	10
		[101 \pm 4]			[12 \pm 2]			[18 \pm 3]			[22 \pm 4]			[7 \pm 3]		
Test sub.	1.42	87	101	85	7	14	16	22	23	13	18	19	29	8	9	8
		[91 \pm 9]			[12 \pm 5]			[19 \pm 6]			[22 \pm 6]			[8 \pm 1]		
	2.84	97	91	82	12	8	9	18	19	24	22	19	26	7	9	10
		[90 \pm 8]			[10 \pm 2]			[20 \pm 3]			[22 \pm 4]			[9 \pm 2]		
	5.68	74	94	94	4	11	5	13	19	22	20	22	27	5	9	4
		[87 \pm 12]			[7 \pm 4]			[18 \pm 5]			[23 \pm 4]			[6 \pm 3]		
	11.4	80	83	69	5	13	12	17	21	16	25	21	22	7	10	8
		[77 \pm 7]			[10 \pm 4]			[18 \pm 3]			[23 \pm 2]			[8 \pm 2]		
	22.7	83	88	95	7	8	7	31	18	21	26	20	15	6	7	7
		[89 \pm 6]			[7 \pm 1]			[23 \pm 7]			[20 \pm 6]			[7 \pm 1]		
	45.4	77*	66*	88*	8*	6*	11*	25*	14*	26*	19*	26*	22*	5*	9*	5*
		[77 \pm 11]			[8 \pm 3]			[22 \pm 7]			[22 \pm 4]			[6 \pm 2]		
Positive control		558	579	517 ^{a)}	402	345	345 ^{b)}	107	140	106 ^{c)}	528	588	565 ^{c)}	620	580	585 ^{d)}
		[551 \pm 32]			[364 \pm 33]			[118 \pm 19]			[560 \pm 30]			[595 \pm 22]		

: 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 1,2,3-trimethylbenzene (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		
DMSO#	0	109	100	97	8	11	14	26	23	27	28	25	33	14	11	15
		[102 \pm 6]			[11 \pm 3]			[25 \pm 2]			[29 \pm 4]			[13 \pm 2]		
Test sub.	1.42	97	94	96	9	7	15	-	-	-	-	-	-	23	23	16
		[96 \pm 2]			[10 \pm 4]			-			-			[21 \pm 4]		
	2.84	94	102	90	13	15	12	-	-	-	-	-	-	17	20	23
		[95 \pm 6]			[13 \pm 2]			-			-			[20 \pm 3]		
	5.68	89	110	107	13	20	11	21	26	21	32	30	40	20	17	22
		[102 \pm 11]			[15 \pm 5]			[23 \pm 3]			[34 \pm 5]			[20 \pm 3]		
	11.4	114	99	106	18	9	9	29	26	17	40	37	41	24	23	27
		[106 \pm 8]			[12 \pm 5]			[24 \pm 6]			[39 \pm 2]			[25 \pm 2]		
22.7	108	121	105	6	10	14	24	26	24	33	37	43	25	17	22	
	[111 \pm 9]			[10 \pm 4]			[25 \pm 1]			[38 \pm 5]			[21 \pm 4]			
45.4	110*	121*	118*	8*	10*	11*	25	24	30	33	37	24	14*	24*	15*	
	[116 \pm 6]			[10 \pm 2]			[26 \pm 3]			[31 \pm 7]			[18 \pm 6]			
90.8	-	-	-	-	-	-	14	25	22	38	33	30	-	-	-	
		-			-			[20 \pm 6]			[34 \pm 4]			-		
182	-	-	-	-	-	-	28*	28*	26*	26*	21*	24*	-	-	-	
		-			-			[27 \pm 1]			[24 \pm 3]			-		
Positive control		620	580	583 ^{a)}	272	367	321 ^{b)}	577	554	646 ^{c)}	314	287	288 ^{d)}	130	120	97 ^{b)}
		[594 \pm 22]			[320 \pm 48]			[592 \pm 48]			[296 \pm 15]			[116 \pm 17]		

: Solvent control * : The background lawn was thin - : Not tested

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 $\mu\text{g}/\text{plate}$