

復帰変異試験

Table 3. Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-trimethylbenzene (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		
DMSO#	0	94	103	106	16	15	14	20	21	27	21	20	24	7	8	7
		[101 \pm 6]			[15 \pm 1]			[23 \pm 4]			[22 \pm 2]			[7 \pm 1]		
Test sub.	1.42	101	98	100	14	16	15	27	21	22	21	20	22	5	5	8
		[100 \pm 2]			[15 \pm 1]			[23 \pm 3]			[21 \pm 1]			[6 \pm 2]		
	2.84	94	105	99	16	14	13	23	24	25	24	20	22	8	8	7
		[99 \pm 6]			[14 \pm 2]			[24 \pm 1]			[22 \pm 2]			[8 \pm 1]		
	5.68	97	98	92	15	17	17	22	25	25	22	23	24	8	6	7
		[96 \pm 3]			[16 \pm 1]			[24 \pm 2]			[23 \pm 1]			[7 \pm 1]		
	11.4	102	103	104	16	11	12	26	21	20	26	26	25	6	8	4
		[103 \pm 1]			[13 \pm 3]			[22 \pm 3]			[26 \pm 1]			[6 \pm 2]		
	22.7	103	93	100	15	15	15	24	26	23	27	23	24	7	6	10
		[99 \pm 5]			[15 \pm 0]			[24 \pm 2]			[25 \pm 2]			[8 \pm 2]		
	45.4	107*	94*	97*	10*	10*	9*	22*	22*	20*	23*	20*	21*	9*	6*	9*
		[99 \pm 7]			[10 \pm 1]			[21 \pm 1]			[21 \pm 2]			[8 \pm 2]		
Positive control		428	394	437 ^{a)}	375	442	502 ^{b)}	109	107	110 ^{a)}	631	645	659 ^{c)}	586	597	450 ^{d)}
		[420 \pm 23]			[440 \pm 64]			[109 \pm 2]			[645 \pm 14]			[544 \pm 82]		

#: 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 1,2,3-trimethylbenzene (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		
DMSO#	0	101	99	102	10	16	15	27	23	28	28	32	34	14	14	13
		[101 \pm 2]			[14 \pm 3]			[26 \pm 3]			[31 \pm 3]			[14 \pm 1]		
Test sub.	1.42	96	109	91	13	16	10	-	-	-	-	-	-	14	13	12
		[99 \pm 9]			[13 \pm 3]			-			-			[13 \pm 1]		
	2.84	98	94	102	12	18	14	-	-	-	-	-	-	9	9	14
		[98 \pm 4]			[15 \pm 3]			-			-			[11 \pm 3]		
	5.68	99	96	105	13	17	16	26	21	27	35	36	34	14	10	15
		[100 \pm 5]			[15 \pm 2]			[25 \pm 3]			[35 \pm 1]			[13 \pm 3]		
	11.4	102	107	106	15	15	13	27	27	21	34	39	32	14	14	14
		[105 \pm 3]			[14 \pm 1]			[25 \pm 3]			[35 \pm 4]			[14 \pm 0]		
22.7	90	105	103	15	18	13	27	26	27	33	37	38	10	13	14	
	[99 \pm 8]			[15 \pm 3]			[27 \pm 1]			[36 \pm 3]			[12 \pm 2]			
45.4	106*	98*	90*	9*	12*	12*	24	25	21	34	31	39	15*	15*	13*	
	[98 \pm 8]			[11 \pm 2]			[23 \pm 2]			[35 \pm 4]			[14 \pm 1]			
90.8	-	-	-	-	-	-	21*	23*	23*	35*	30*	32*	-	-	-	
	-			-			[22 \pm 1]			[32 \pm 3]			-			
182	-	-	-	-	-	-	24*	20*	27*	33*	30*	25*	-	-	-	
	-			-			[24 \pm 4]			[29 \pm 4]			-			
Positive control		658	716	764 ^{a)}	299	321	294 ^{b)}	528	504	607 ^{c)}	406	324	322 ^{d)}	104	105	111 ^{b)}
		[713 \pm 53]			[305 \pm 14]			[546 \pm 54]			[351 \pm 48]			[107 \pm 4]		

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

In Vitro Chromosomal Aberration Test of
1,2,3-Trimethylbenzene 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、1,2,3-トリメチルベンゼン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。細胞増殖抑制試験結果を基に、細胞毒性が観察される濃度を最高用量として設定した。すなわち、連続24時間処理法で90.0, 180および360 $\mu\text{g/ml}$ 、同48時間処理法で60.0, 120および240 $\mu\text{g/ml}$ 、短時間+S9 mix処理法で120, 240, 480および960 $\mu\text{g/ml}$ 、同-S9 mix処理法で120, 240および480 $\mu\text{g/ml}$ の3~4用量(公比2)について染色体標本作製した後、顕微鏡観察を実施した。短時間+S9 mix処理法の240および480 $\mu\text{g/ml}$ 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350, 500, 650および800 $\mu\text{g/ml}$ の4用量を用いた確認試験を実施した結果、800 $\mu\text{g/ml}$ において5.5%の構造異常細胞が出現した。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、1,2,3-トリメチルベンゼン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7の細胞を、確認試験においては同14の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM培地(LIFE TECHNOLOGIES社)を1000mlの精製水で溶解した後、2.2g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℃、

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℃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)。

なお、本被験物質の純度は95%未満であるため、秤量に際して換算した。

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、すなわち細胞生存率を算出した。

その結果、いずれの処理法においても顕著な細胞増殖抑制が観察された (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180 $\mu\text{g/ml}$ 、同48時間処理で130 $\mu\text{g/ml}$ 、短時間+S9 mix処理で218 $\mu\text{g/ml}$ 、同-S9 mix処理で213 $\mu\text{g/ml}$ であった。

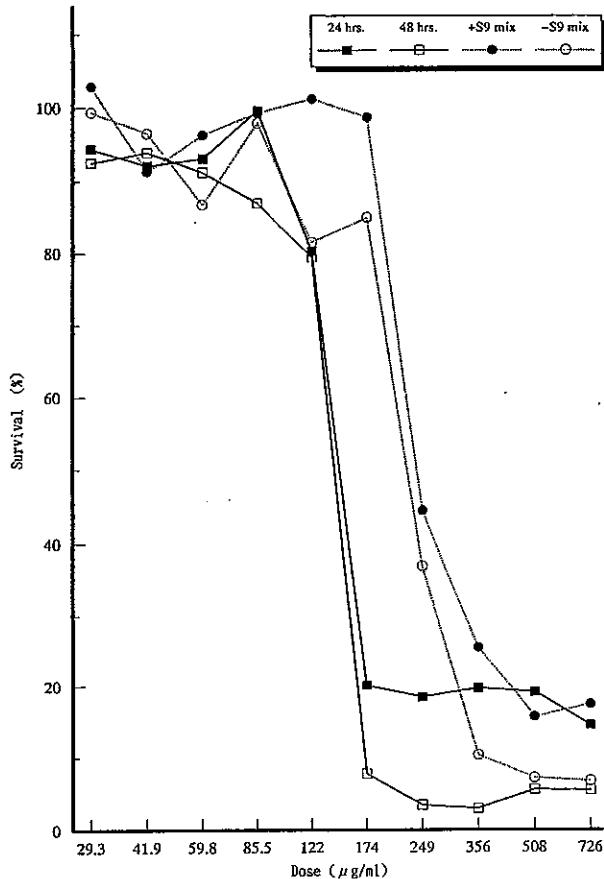


Fig. 1 Dose-survival curves of 1,2,3-trimethylbenzene

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24時間処理で360 $\mu\text{g/ml}$ 、同48時間処理で240 $\mu\text{g/ml}$ 、短時間+S9 mix処理で960 $\mu\text{g/ml}$ 、同-S9 mix処理で480 $\mu\text{g/ml}$ を最高用量とし、以下公比2で減じた計3~4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 $\mu\text{g/ml}$ 、48時間処理で0.025 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ の用量で試験した。

また、確認試験においては350, 500, 650および800 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ となるようコルセミド(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、含めない場合(-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。1,2,3-トリメチルベンゼン処理群の場合、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240および480 $\mu\text{g/ml}$ において染色体の構造異常の出現頻度が5%を超え、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、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 3)。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1,2,3-トリメチルベンゼン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 1,2,3-trimethylbenzene [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				
DMSO*	0	24	200	2	1	0	1	0	0	1.5	1.0	0.5	-
Test Sub.	90.0	24	200	3	4	0	2	0	0	4.5	3.0	0.5	-
	180	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.0	-
	360	24	200	0	1	0	1	0	0	1.0	1.0	0.0	-
MMC**	0.05	24	200	19	63	0	100	0	1	64.5	63.5	0.0	+
DMSO*	0	48	200	1	2	0	1	0	0	2.0	1.5	0.0	-
Test Sub.	60.0	48	200	1	2	0	4	0	0	3.5	3.0	0.5	-
	120	48	200	1	2	0	1	0	0	2.0	1.5	0.0	-
	240	48	200	0	2	0	3	0	0	2.5	2.5	2.0	-
MMC**	0.025	48	200	14	38	0	76	2	0	46.5	45.0	0.0	+

*: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 1,2,3-trimethylbenzene [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				
DMSO*	0	+	6	200	0	1	0	2	0	0	1.5	1.5	0.0	-
Test Sub.	120	+	6	200	0	5	0	4	0	0	3.5	3.5	2.0	-
	240	+	6	200	3	7	0	12	0	0	6.5	6.0	1.0	\pm
	480	+	6	200	2	4	0	6	1	0	5.5	4.5	3.0	\pm
	960	+	6	Toxic										
CP**	12.5	+	6	200	5	40	0	89	1	0	51.5	51.5	0.0	+
DMSO*	0	-	6	200	1	2	0	1	1	0	2.5	2.0	1.0	-
Test Sub.	120	-	6	200	1	4	0	1	0	0	3.0	2.5	1.0	-
	240	-	6	200	1	2	0	0	0	0	1.5	1.0	0.0	-
	480	-	6	200	2	2	0	0	0	0	1.5	1.0	1.0	-
CP**	12.5	-	6	200	1	0	0	2	0	0	1.5	1.0	1.0	-

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

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

Table 3. Results of the confirmative examination using CHL cells of 1,2,3-trimethylbenzene [short-term treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	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				
DMSO*	0	+	6	200	1	0	1	3	0	1	3.0	2.5	0.0	-
Test Sub.	350	+	6	200	1	1	0	3	0	0	1.5	1.5	1.0	-
	500	+	6	200	0	1	0	6	1	0	3.5	3.5	0.5	-
	650	+	6	200	2	2	0	5	1	0	4.5	3.5	0.5	-
	800	+	6	200	2	7	0	7	0	0	5.5	5.0	1.5	±
CP**	12.5	+	6	200	10	34	0	105	0	0	59.0	58.5	0.0	+

*: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 圓
 試験担当者: 北沢倫世, 菊池正憲, 熊平智司
 (助)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, Masanori Kikuchi
 Satoshi Kumadaira
 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

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of
2-Hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone in Rats

要約

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンは、プラスチックや合成繊維の耐候性改良、食品や医療品などの容器・包装材に使用して内容物の紫外線からの保護、日焼け防止、シャンプーの分離防止、UVカットフィルムに用いる紫外線吸収材の目的で利用されているベンゾフェノン系紫外線吸収材である。毒性情報として、経口投与のLD₅₀値はマウスで10985 mg/kg以上と報告されている¹⁾。

今回、2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの20、140および1000 mg/kg/dayをSD系ラットの雌雄に28日間反復投与し、その毒性について検討した。対照および1000 mg/kg/day群については14日間回復群を設けた。

全試験期間を通して死亡はみられず、一般状態、体重、摂餌量に変化はなく、血液学検査、血液生化学検査、尿検査および病理検査結果に、被験物質投与に起因した毒性変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下における2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの無影響量は、雌雄ともに1000 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノン(住友化学工業(株)、ロット番号:40650、純度:99%以上)は、融点45~50℃、水、熱、光等に安定、*n*-ヘキサンおよびベンゼンに可溶で、水には不溶の淡黄(白)色粉末である。本ロットについては試験期間中安定であることが確認された。投与液は被験物質を0.1% Tween80添加0.5%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液に懸濁させ調製し、冷蔵保存した。投与液中の被験物質は冷蔵保存条件下で少なくとも8日間安定であり、また使用した投与液にはほぼ所定量の被験物質が均一に含有されていることを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より入手したSD系ラット(Crj:CD, SPF)の雌雄を8日間検疫・馴化し、試験に使用した。投与開始前に動物を体重別層化無作為抽出法により群分けした。1群の動物数は雌雄各6匹とし、対照および高用量群についてはこの他に雌雄各6匹の14日間

回復群を設けた。投与開始時の週齢は雌雄とも5週齢、体重範囲は雄が165~190 g、雌が129~153 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中、温度20~25℃、湿度40~70%、換気約12回/時、照明12時間(7:00~19:00)に自動調節された飼育室を使用した。動物は、実験動物用床敷(ペータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに1ケージ当り2匹で収容し飼育した。

動物には、実験動物用固型飼料(MF:オリエンタル酵母工業(株))および5 μmのフィルター濾過後、紫外線照射した水道水を、それぞれ自由摂取させた。

3. 投与量および投与方法

被験物質を500および1000 mg/kgの各用量でSD系ラットに7日間反復経口投与した結果、1000 mg/kg群でも毒性変化は認められなかった。従って、本試験では高用量をガイドラインの上限である1000 mg/kgとし、以下公比約7で中用量を140 mg/kg、低用量を20 mg/kgとした。

被験物質は28日間毎日1回、午前中に胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与量は10 ml/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。対照群には同様に溶媒を投与した。

4. 観察および検査方法

1) 一般状態、体重および摂餌量

全例について一般状態を毎日観察した。体重は投与開始日およびその後週1回測定した。また、摂餌量については、投与開始日およびその後週1回測定し、各期間毎の1匹当りの1日の平均摂餌量を算出した。

2) 血液学検査

各計画剖検時の全動物について、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採血し、赤血球数(シーフローDCインピーダンス検出法)、白血球数(RF/DCインピーダンス検出法)、血小板数(シーフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度(SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500:東亜医用電子(株))、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A:(株)立石電機)、網状赤血球数(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網赤血球測定装置(R-2000:東亜医用電子(株))、プロトロンビン時間(PT:

Quick一段法), 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT: 活性化セファロプラスチン法) を血液凝固自動測定装置 (KC 10A: アメルング社) により測定した。また, 検査の結果から平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球色素量 (MCH), 平均赤血球色素濃度 (MCHC) を算出した。凝固阻止剤として, プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間測定には3.13% クエン酸ナトリウム水溶液を, それ以外の項目の測定には EDTA-2K を用いた。

3) 血液生化学検査

採取した血液を室温で約30分間放置した後, 3000 r.p.m., 10分間遠心分離し, 得られた血清を用いて総蛋白 (Biuret法), アルブミン (BCG法), A/G比 (総蛋白およびアルブミンから算出), グルコース (GK-G6PDH法), トリグリセライド (LPL-GK-G3PO-POD法), 総コレステロール (CES-CO-POD法), 尿素窒素 (Urease-GLDH法), クレアチニン (Jaffé法), カルシウム (O-CPC法), 無機リン (UV法), GOT (SSCC改良法), GPT (SSCC改良法), γ -GTP (SSCC改良法), ALP (GSCC改良法), ナトリウム, カリウム, クロール (イオン選択電極法) を自動分析装置 (日立736-10形: (株)日立製作所) により測定した。

4) 尿検査

投与終了時の解剖の2日前に全生存動物の新鮮尿を採取し, pH, 潜血, 蛋白, 糖, ケトン体, ビリルビン, ウロビリノーゲン (試験紙法, マルティスティックス: マイルス・三共(株)) を尿分析器 (クリニテック100: マイルス・三共(株)) で検査した。その結果, 1000 mg/kg 群の雌で変化がみられたので, 雌のみ更に21時間蓄積尿を採取し, 尿量をメスシリンダーで, 比重 (屈折法) を尿比重計 (ユリコン-S: (株)アタゴ) で, ナトリウムおよびカリウム (炎光光度法) を全自動炎光光度計 (FLAME-30C/AD-3: 日本分光メディカル(株)) で, クロール (電量滴定法) をクロライドメーター (Model 925: コーニングメディカル(株)) により測定した。

投与期間に変化のみられた雌については, 回復期間終了時の解剖の2日前にも同様の検査を実施した。

5) 病理検査

各計画殺時, 全動物について採血後に腹大動脈を切断して放血致死させ剖検し, 脳, 肝臓, 腎臓, 副腎, 胸腺, 脾臓, 精巣および卵巣の重量を測定した。また, これらの器官に加え, 下垂体, 眼球 (付属腺を含む), 肺, 胃, 甲状腺 (上皮小体を含む), 心臓, 膀胱, 骨髄 (大腿骨) を採取し, 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン液 (眼球およびハーダー腺は Davidson 液) にて固定後保存した。

投与終了時解剖動物の対照および1000 mg/kg 群の雌雄の心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎を対象に, 常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し, 鏡検した。また, 肉眼的に変化のみられた投与期間終了時の20 mg/kg 群の雄1例および140 mg/kg 群の雄2例の腎

臓, 1000 mg/kg 群の雄1例の精巣と回復期間終了時の対照群の雄1例の肺, 1000 mg/kg 群の雄1例の胸腺についても同様に検査した。

6) 統計解析

計量データについては, Bartlett法による等分散の検定を行い, 分散が一樣の場合は一元配置分散分析を行った後, Dunnett法またはScheffé法により平均値の比較検定を行った。分散が一樣でない場合にはKruskal-Wallisの検定を行い, Dunnett型またはScheffé型の順位和検定を行った。尿検査で得られた計数データについては, Armitageの χ^2 検定を用いた。有意水準は5%以下とした。

結果

1. 一般状態, 体重および摂餌量

全試験期間を通して, 死亡および異常所見は認められなかった。体重および摂餌量は全ての被験物質投与群で対照群と同様な推移を示した。

2. 血液学検査 (Table 1)

投与期間終了時の検査において, 20 mg/kg 群の雄でMCHCの低値がみられたが, 140および1000 mg/kg 群では認められないことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。また, 回復期間終了時の検査において, 1000 mg/kg 群の雌で単球比の高値がみられたが, 投与期間終了時にはみられなかったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

3. 血液生化学検査 (Table 2)

投与期間終了時の検査において, 変化の認められた項目はなかった。なお, 回復期間終了時の検査において, 1000 mg/kg 群の雌で尿素窒素の低値がみられたが, 投与期間終了時にはみられなかったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

4. 尿検査 (Table 3)

投与期間の検査において, 1000 mg/kg 群の雌でpHのアルカリ側への変動がみられた。なお, 20 mg/kg 群の雄でビリルビンの上昇がみられたが, 140および1000 mg/kg 群では認められなかったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

雌のみについて実施した回復期間の検査においては, pHの変化は認められなかった。なお, 1000 mg/kg 群でカリウムの低値が認められたが, 投与期間にはみられなかったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

5. 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時の検査において, 140 mg/kg 群の雌で副腎の相対重量の低値がみられたが, 1000 mg/kg 群では認められなかったことから, 被験物質投与とは関連の

Table I Hematology of rats treated orally with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level	28 Days				Recovery	
		0mg/kg	20mg/kg	140mg/kg	1000mg/kg	0mg/kg	1000mg/kg
Male							
	Number of animals	6	6	6	6	6	6
	RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	743 \pm 21.9	720 \pm 40.9	753 \pm 19.0	739 \pm 23.2	779 \pm 23.1	770 \pm 41.1
	Hematocrit (%)	43.6 \pm 0.64	43.1 \pm 1.74	44.6 \pm 0.83	44.3 \pm 1.67	43.4 \pm 1.33	43.9 \pm 1.25
	Hemoglobin (g/dl)	15.0 \pm 0.21	14.6 \pm 0.57	15.2 \pm 0.25	15.1 \pm 0.50	14.9 \pm 0.41	15.1 \pm 0.60
	Reticulocyte (%)	36 \pm 3.6	33 \pm 3.2	31 \pm 2.3	32 \pm 2.9	29 \pm 2.9	29 \pm 1.6
	MCV (μm^3)	58.8 \pm 1.61	60.0 \pm 1.87	59.2 \pm 1.08	60.0 \pm 2.09	55.7 \pm 2.22	57.1 \pm 2.22
	MCH (pg)	20.2 \pm 0.51	20.3 \pm 0.67	20.2 \pm 0.34	20.5 \pm 0.73	19.1 \pm 0.73	19.7 \pm 0.81
	MCHC (%)	34.3 \pm 0.18	33.9 \pm 0.14*	34.1 \pm 0.29	34.2 \pm 0.27	34.3 \pm 0.14	34.5 \pm 0.50
	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	114.2 \pm 13.61	106.9 \pm 8.42	103.8 \pm 6.81	117.6 \pm 15.41	103.9 \pm 14.43	108.2 \pm 13.03
	PT (sec)	13.6 \pm 0.21	13.5 \pm 0.37	13.5 \pm 0.36	13.5 \pm 0.35	13.2 \pm 0.28	13.2 \pm 0.27
	APTT (sec)	17.7 \pm 1.14	17.4 \pm 0.95	16.6 \pm 1.30	18.2 \pm 0.75	18.3 \pm 1.16	17.0 \pm 1.54
	WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	121 \pm 24.4	120 \pm 33.0	140 \pm 26.9	143 \pm 35.9	102 \pm 23.6	105 \pm 14.9
	Differential leukocyte counts (%)						
	Lymphocytes	88 \pm 5.7	84 \pm 3.0	91 \pm 6.2	88 \pm 4.9	86 \pm 4.9	85 \pm 4.1
	Neutrophils						
	segmented	8 \pm 3.4	11 \pm 3.5	5 \pm 4.0	7 \pm 4.0	9 \pm 3.7	8 \pm 2.2
	band	1 \pm 0.5	1 \pm 0.5	0 \pm 0.8	0 \pm 0.4	0 \pm 0.5	0 \pm 0.5
	Eosinophils	1 \pm 0.5	1 \pm 0.5	0 \pm 0.8	1 \pm 0.8	1 \pm 0.8	1 \pm 0.5
	Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
	Monocytes	4 \pm 2.7	5 \pm 3.7	4 \pm 2.6	5 \pm 1.0	4 \pm 1.4	6 \pm 3.5
Female							
	Number of animals	6	6	6	6	6	6
	RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	703 \pm 26.1	727 \pm 29.2	727 \pm 29.3	737 \pm 24.6	724 \pm 34.3	740 \pm 9.1
	Hematocrit (%)	41.7 \pm 1.20	42.1 \pm 1.05	43.0 \pm 1.45	42.5 \pm 0.92	40.8 \pm 1.19	41.1 \pm 1.08
	Hemoglobin (g/dl)	14.5 \pm 0.45	14.5 \pm 0.32	14.8 \pm 0.34	14.7 \pm 0.24	14.1 \pm 0.55	14.2 \pm 0.31
	Reticulocyte (%)	27 \pm 4.1	28 \pm 1.5	22 \pm 3.9	23 \pm 4.0	26 \pm 5.2	25 \pm 4.7
	MCV (μm^3)	59.3 \pm 1.10	57.9 \pm 1.41	59.2 \pm 1.35	57.7 \pm 1.87	56.4 \pm 1.81	55.5 \pm 1.28
	MCH (pg)	20.6 \pm 0.32	20.0 \pm 0.54	20.4 \pm 0.48	20.0 \pm 0.55	19.5 \pm 0.68	19.1 \pm 0.29
	MCHC (%)	34.7 \pm 0.18	34.5 \pm 0.28	34.4 \pm 0.58	34.6 \pm 0.27	34.6 \pm 0.34	34.5 \pm 0.42
	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	99.8 \pm 9.57	92.1 \pm 10.67	99.5 \pm 9.38	102.0 \pm 6.27	95.1 \pm 8.26	101.1 \pm 8.16
	PT (sec)	13.8 \pm 0.45	13.6 \pm 0.51	13.4 \pm 0.78	14.1 \pm 0.45	14.1 \pm 0.70	14.0 \pm 0.71
	APTT (sec)	14.6 \pm 1.20	15.3 \pm 0.74	15.2 \pm 1.36	15.5 \pm 1.70	15.2 \pm 0.98	14.5 \pm 0.68
	WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	102 \pm 24.0	89 \pm 36.1	99 \pm 19.2	97 \pm 22.9	72 \pm 23.3	80 \pm 23.1
	Differential leukocyte counts (%)						
	Lymphocytes	90 \pm 4.1	88 \pm 3.9	90 \pm 3.8	89 \pm 3.9	85 \pm 5.6	84 \pm 5.2
	Neutrophils						
	segmented	6 \pm 2.3	6 \pm 2.4	6 \pm 4.1	6 \pm 2.5	12 \pm 5.2	9 \pm 3.2
	band	0 \pm 0.5	0 \pm 0.5	1 \pm 0.5	0 \pm 0.4	1 \pm 0.5	0 \pm 0.4
	Eosinophils	1 \pm 0.8	2 \pm 1.5	1 \pm 1.0	0 \pm 0.5	1 \pm 0.8	1 \pm 1.1
	Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
	Monocytes	4 \pm 2.4	4 \pm 2.6	3 \pm 1.9	5 \pm 2.5	2 \pm 1.0	6 \pm 6.2*

Values are expressed as Mean \pm S.D.

Significantly different from control group; *, $P < 0.05$.

Table 2 Blood chemical examination of rats treated orally with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level	28 Days				Recovery	
		0mg/kg	20mg/kg	140mg/kg	1000mg/kg	0mg/kg	1000mg/kg
Male							
	Number of animals	6	6	6	6	6	6
	GOT (IU/l)	87 ± 17.3	85 ± 14.6	95 ± 26.4	82 ± 14.6	95 ± 17.3	89 ± 22.3
	GPT (IU/l)	27 ± 4.2	31 ± 5.7	28 ± 4.2	29 ± 4.8	25 ± 4.2	23 ± 3.4
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	ALP (IU/l)	566 ± 189.7	577 ± 90.0	642 ± 97.8	533 ± 97.8	556 ± 94.8	520 ± 71.7
	Urea nitrogen (mg/dl)	15.2 ± 3.33	16.5 ± 1.49	16.4 ± 2.16	16.8 ± 2.16	20.8 ± 2.82	20.2 ± 1.46
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.00	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.05
	Glucose (mg/dl)	147 ± 9.4	149 ± 12.9	151 ± 4.6	143 ± 9.5	160 ± 10.0	153 ± 7.5
	Total chol. (mg/dl)	69 ± 8.5	68 ± 9.3	64 ± 5.6	74 ± 9.6	67 ± 12.5	73 ± 7.4
	Triglyceride (mg/dl)	210 ± 55.0	172 ± 64.0	187 ± 72.6	173 ± 45.0	195 ± 54.2	181 ± 71.1
	Total protein (g/dl)	6.83 ± 0.360	6.59 ± 0.231	6.70 ± 0.150	6.78 ± 0.271	6.79 ± 0.258	6.81 ± 0.364
	Albumin (g/dl)	3.75 ± 0.072	3.65 ± 0.063	3.80 ± 0.037	3.78 ± 0.091	3.63 ± 0.118	3.63 ± 0.093
	A/G ratio	1.23 ± 0.099	1.25 ± 0.083	1.31 ± 0.055	1.27 ± 0.076	1.15 ± 0.046	1.15 ± 0.077
	Calcium (mg/dl)	9.7 ± 0.26	9.6 ± 0.16	9.8 ± 0.12	9.8 ± 0.23	9.4 ± 0.13	9.4 ± 0.23
	Inorganic phos. (mg/dl)	9.5 ± 0.28	9.9 ± 0.15	9.3 ± 0.55	9.4 ± 0.54	7.4 ± 0.38	7.3 ± 0.59
	Na (mEq/l)	142 ± 0.8	143 ± 0.9	143 ± 1.5	143 ± 1.5	143 ± 0.9	143 ± 1.2
	K (mEq/l)	4.9 ± 0.18	4.7 ± 0.13	4.7 ± 0.20	4.6 ± 0.18	4.4 ± 0.15	4.6 ± 0.10
	Cl (mEq/l)	98 ± 1.4	99 ± 2.1	99 ± 1.2	99 ± 1.0	100 ± 1.2	101 ± 1.4
Female							
	Number of animals	6	6	6	6	6	6
	GOT (IU/l)	78 ± 7.1	90 ± 21.6	82 ± 16.7	83 ± 9.9	89 ± 9.3	86 ± 15.8
	GPT (IU/l)	24 ± 2.3	24 ± 3.6	20 ± 1.2	27 ± 8.0	26 ± 5.2	23 ± 3.1
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.0	0 ± 0.4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	ALP (IU/l)	322 ± 65.3	296 ± 41.2	280 ± 71.9	399 ± 88.9	362 ± 68.6	296 ± 58.4
	Urea nitrogen (mg/dl)	15.2 ± 3.29	14.1 ± 1.96	14.1 ± 1.85	16.8 ± 2.51	21.2 ± 2.38	15.8 ± 1.54**
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.05	0.6 ± 0.05	0.6 ± 0.05	0.6 ± 0.08	0.6 ± 0.04	0.6 ± 0.00
	Glucose (mg/dl)	144 ± 7.0	146 ± 5.3	143 ± 7.6	139 ± 11.1	161 ± 15.8	158 ± 7.3
	Total chol. (mg/dl)	69 ± 5.0	77 ± 13.7	78 ± 8.2	70 ± 10.7	71 ± 10.3	76 ± 15.4
	Triglyceride (mg/dl)	69 ± 30.9	61 ± 14.6	60 ± 15.3	87 ± 61.6	77 ± 34.1	75 ± 10.5
	Total protein (g/dl)	6.77 ± 0.250	6.80 ± 0.333	6.75 ± 0.221	6.84 ± 0.354	6.89 ± 0.181	7.11 ± 0.262
	Albumin (g/dl)	3.96 ± 0.113	3.94 ± 0.186	3.95 ± 0.081	3.99 ± 0.142	3.86 ± 0.056	3.85 ± 0.142
	A/G ratio	1.41 ± 0.066	1.38 ± 0.055	1.42 ± 0.109	1.41 ± 0.065	1.28 ± 0.086	1.19 ± 0.112
	Calcium (mg/dl)	9.4 ± 0.17	9.2 ± 0.20	9.4 ± 0.15	9.5 ± 0.20	9.1 ± 0.20	9.2 ± 0.20
	Inorganic phos. (mg/dl)	8.6 ± 0.37	7.9 ± 0.39	8.5 ± 0.48	8.7 ± 0.73	6.3 ± 0.98	6.6 ± 0.58
	Na (mEq/l)	143 ± 1.0	143 ± 0.5	142 ± 0.8	143 ± 0.4	142 ± 0.8	142 ± 0.9
	K (mEq/l)	4.2 ± 0.19	4.2 ± 0.08	4.4 ± 0.18	4.2 ± 0.12	3.9 ± 0.28	3.9 ± 0.12
	Cl (mEq/l)	101 ± 1.4	102 ± 1.0	101 ± 1.4	101 ± 1.2	102 ± 1.8	102 ± 0.9

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group; **, P < 0.01.

Table 3. Urinary pH of female rats treated orally with 2-(4-hydroxy-4'-octyloxy)benzophenone in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level	28 Days				Recovery	
		0mg/kg	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg	0mg/kg	500mg/kg
Female							
Number of animals		12	6	6	12	6	6
pH	6.5	2	0	1	0	0	0
	7.0	1	0	0	0	1	0
	7.5	0	1	1	0	2	2
	8.0	3	0	0	4	1	3
	8.5	6	4	3	5	2	1
	>9.0	0	1	1	3	0	0

Values are expressed as number of animals.

Significantly different from control group; *, P<0.05.

ない変化と判断した。なお、回復期間終了時の検査において、1000 mg/kg群の雌で卵巣の相対重量の低値がみられたが、投与期間終了時にはみられなかったことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

6. 剖検所見

被験物質投与に起因する変化は認められなかった。偶発性変化として腎臓の軽度の褪色、腎臓のう胞、副腎の腫大、精巣の小型化、肺の出血斑、胸腺の出血が認められた。

7. 組織所見

被験物質投与に起因する変化は認められなかった。偶発性変化として肝臓の微小肉芽腫、腎臓の尿細管上皮の好塩基性変化、腎臓の尿細管のう胞状拡張、腎臓の単核細胞浸潤、精細管の低形成、肺の出血、胸腺の出血が認められた。

考察

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの20, 140および1000 mg/kg/dayをSD系ラットの雌雄に28日間反復経口投与し、その毒性について検討した。

その結果、1000 mg/kg/dayを投与した群でも、死亡は認められず、一般状態、体重および摂餌量に変化はなく、血液学検査、血液生化学検査および病理検査においても被験物質投与に起因した毒性変化は認められなかった。

尿検査において、投与期間中に1000 mg/kg/day群の雌でpHのアルカリ側への変動がみられた。アルカリ尿は一般的には代謝性および呼吸性アルカローシス、腎不全や腎盂腎炎による腎臓のH⁺排泄障害でみられることが知られている²⁾。しかし、今回の変動は、当研究所の背景データの範囲内にあり、かつ、腎障害を示唆する病理変化は認められていないことから、偶発的な偏りによるものと判断した。

以上の結果から、本試験条件下における2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの無影響量は雌雄ともに1000 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 化学工業日報社編, "12093の化学商品," 化学工業日報社, 東京, 1993, pp. 938-941.
- 2) 谷本 義文, "実験動物の血液・尿生化学, 動物尿の性状とその検査意義," ソフトサイエンス社, 東京, 1988, pp. 119-134.

連絡先

試験責任者: 高橋 要
 試験担当者: 山下弘太郎, 三上由紀子, 松本 忍,
 土谷 稔, 横山光恵, 豊田直人,
 高野克代, 鈴木美江
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
 〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Kaname Takahashi (Study director)
 Koutarou Yamashita, Yukiko Mikami,
 Shinobu Matsumoto, Minoru
 Tsuchitani,
 Mitsue Yokoyama, Naoto Toyota,
 Katsuyo Takano, Yoshie Suzuki
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
 Kashima Laboratory
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
 Ibaraki, 314-02 Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 4 Absolute and relative organ weight of rats treated orally with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level	28 Days				Recovery	
		0mg/kg	20mg/kg	140mg/kg	1000mg/kg	0mg/kg	1000mg/kg
Male							
	Number of animals	6	6	6	6	6	6
	Body weight (g)	418 ± 44.1	398 ± 21.4	412 ± 33.5	398 ± 20.8	479 ± 21.3	475 ± 25.0
	Absolute organ weight						
	Brain (g)	2.08 ± 0.072	2.09 ± 0.056	2.09 ± 0.096	2.01 ± 0.059	2.13 ± 0.123	2.17 ± 0.031
	Thymus (mg)	712 ± 108.0	618 ± 91.4	691 ± 73.4	698 ± 99.9	577 ± 152.6	642 ± 125.3
	Liver (g)	16.71 ± 2.869	15.10 ± 1.309	16.15 ± 1.756	15.92 ± 1.752	19.33 ± 0.823	18.03 ± 2.196
	Kidneys (g)	2.84 ± 0.267	2.71 ± 0.185	2.94 ± 0.196	2.81 ± 0.150	3.09 ± 0.243	3.05 ± 0.315
	Adrenals (mg)	62.1 ± 14.38	55.8 ± 12.32	54.4 ± 4.52	53.0 ± 7.27	56.7 ± 5.82	57.7 ± 6.70
	Spleen (g)	0.87 ± 0.079	0.80 ± 0.086	0.82 ± 0.086	0.80 ± 0.138	0.91 ± 0.122	0.90 ± 0.039
	Testes (g)	3.18 ± 0.185	3.02 ± 0.229	3.19 ± 0.357	2.73 ± 0.911	3.32 ± 0.336	3.26 ± 0.224
	Relative organ weight						
	Brain (g%)	0.50 ± 0.049	0.53 ± 0.037	0.51 ± 0.046	0.51 ± 0.024	0.45 ± 0.024	0.46 ± 0.026
	Thymus (mg%)	171 ± 27.5	155 ± 17.9	169 ± 25.0	176 ± 24.2	120 ± 26.4	136 ± 28.5
	Liver (g%)	3.98 ± 0.279	3.80 ± 0.231	3.92 ± 0.266	3.99 ± 0.260	4.04 ± 0.128	3.78 ± 0.276
	Kidneys (g%)	0.68 ± 0.011	0.68 ± 0.037	0.72 ± 0.024	0.71 ± 0.056	0.65 ± 0.039	0.64 ± 0.033
	Adrenals (mg%)	14.8 ± 2.47	14.0 ± 2.78	13.2 ± 1.23	13.4 ± 2.33	11.9 ± 1.30	12.2 ± 1.45
	Spleen (g%)	0.21 ± 0.019	0.20 ± 0.016	0.20 ± 0.032	0.20 ± 0.033	0.19 ± 0.021	0.19 ± 0.013
	Testes (g%)	0.77 ± 0.076	0.76 ± 0.072	0.78 ± 0.121	0.69 ± 0.233	0.69 ± 0.066	0.69 ± 0.066
Female							
	Number of animals	6	6	6	6	6	6
	Body weight (g)	241 ± 14.8	234 ± 13.9	243 ± 10.5	246 ± 18.8	258 ± 10.6	258 ± 14.6
	Absolute organ weight						
	Brain (g)	1.89 ± 0.049	1.92 ± 0.050	1.91 ± 0.086	1.84 ± 0.087	1.95 ± 0.045	1.94 ± 0.043
	Thymus (mg)	494 ± 97.5	546 ± 147.1	557 ± 91.6	589 ± 131.9	488 ± 89.8	437 ± 94.9
	Liver (g)	8.70 ± 0.626	8.39 ± 0.720	8.34 ± 0.353	8.59 ± 0.787	9.07 ± 0.620	9.12 ± 0.560
	Kidneys (g)	1.62 ± 0.063	1.65 ± 0.137	1.61 ± 0.149	1.70 ± 0.088	1.68 ± 0.089	1.62 ± 0.111
	Adrenals (mg)	76.3 ± 2.58	72.5 ± 14.17	63.3 ± 5.59	71.6 ± 9.33	64.4 ± 2.59	62.4 ± 5.18
	Spleen (g)	0.56 ± 0.070	0.57 ± 0.099	0.53 ± 0.071	0.52 ± 0.048	0.54 ± 0.034	0.59 ± 0.090
	Ovaries (mg)	97.9 ± 14.11	102.9 ± 11.55	100.2 ± 19.82	90.6 ± 11.17	100.9 ± 10.08	91.9 ± 6.06
	Relative organ weight						
	Brain (g%)	0.79 ± 0.059	0.82 ± 0.042	0.79 ± 0.035	0.75 ± 0.042	0.76 ± 0.046	0.76 ± 0.039
	Thymus (mg%)	205 ± 42.2	232 ± 53.7	231 ± 43.5	240 ± 52.9	189 ± 29.5	170 ± 34.9
	Liver (g%)	3.61 ± 0.125	3.58 ± 0.128	3.44 ± 0.086	3.48 ± 0.151	3.52 ± 0.193	3.54 ± 0.065
	Kidneys (g%)	0.67 ± 0.036	0.71 ± 0.030	0.67 ± 0.085	0.69 ± 0.030	0.65 ± 0.048	0.63 ± 0.023
	Adrenals (mg%)	31.8 ± 1.40	30.9 ± 4.75	26.2 ± 2.99*	29.0 ± 2.43	25.0 ± 1.37	24.4 ± 3.14
	Spleen (g%)	0.23 ± 0.025	0.24 ± 0.036	0.22 ± 0.028	0.21 ± 0.019	0.21 ± 0.008	0.23 ± 0.041
	Ovaries (mg%)	40.6 ± 5.05	43.9 ± 3.17	41.6 ± 9.71	37.0 ± 6.03	39.1 ± 3.21	35.7 ± 1.85*

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; *, P<0.05.