

## 既存化学物質の人健康影響に関する情報

(平成18年12月22日 3省合同審議会)

Cas No.	官報公示番号	物質名称	急性	28日	Repro Tox	簡易	Ames	染色体	小核	評価文書	頁
88-53-9	3-2024	2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸	○	○			○	○			1
4390-04-9	2-10	2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナン	○	○			○	○			23
5460-09-3	3-523	4-アミノ-5-ヒドキシ-2,7-ナフタレンジスフホン酸モノナトリウム	○	○			○	○			44
126-30-7	2-240	2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオール			○		○	○			63
2581-34-2	3-790	3-メチル-4-ニトロフェノール				○	○	○		○	80
58-90-2	3-791	2,3,4,6-トリクロロフェノール					○	○		○	109

# 2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の ラットを用いた急性経口投与毒性試験

## Acute Oral Toxicity Study of 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid in Rats

### 要約

既存化学物質の安全性を評価するため、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の2,000 mg/kgをラットに強制経口投与し、急性毒性を検討した。

死亡例は雌雄ともに観察期間を通じ、いずれの投与群にも観察されなかった。従ってLD<sub>50</sub>値は雌雄ともに2,000 mg/kg以上と推定された。

一般状態では、雌雄ともに一過性の下痢および軟便が観察された。

体重では、雌雄ともに投与後1および2週時の測定でいずれも前回の値に比較して全例に増加が認められた。

観察終了時の病理解剖結果では、雌雄ともに肉眼的異常は認められなかった。

### 緒言

OECDを中心として行われている国際協力による安全性点検評価事業の一環として、既存化学物質で現在十分な安全性資料のない、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の急性毒性を検討するため、CD (SD) 系ラットを用いて急性経口毒性試験を実施した。

上記の試験は、OECD毒性試験ガイドライン401 (1987年2月24日) に従い、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号 (昭和63年11月18日) の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」に基づいて実施したものである。

### 方法

#### 1) 供試動物

供試したCrj:CD(SD)系ラット(SPF)は日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川県厚木市) から生後5週齢の雌雄各40匹を平成3年9月2日に購入した。

動物は8日間検疫・馴化飼育した後、6週齢で投与に用いた。投与時の体重は、雄で162~167g、雌で120~134gであった。

#### 2) 飼育

動物は、温度21~25℃、湿度45~65%、換気回数20回/時間、照明度150~300 lux、照明時間12時間 (午前7時点灯、午後7時消灯) に設定された飼育室 (W3.6×D10×H2.5m、90m<sup>3</sup>) で飼育した。株式会社東京技研サービス (東京都府中市) の自動水洗式飼育機 (W745.0×D50.0×H182.0cm) を使用し、金属製網目飼育ケージ (W21.5×D27.5×H19.5cm、飼育ケージ・スペース11,529cm<sup>3</sup>) に動物を5匹ずつ収容し飼育した。飼育ケージおよび給餌器は週1回取り換えた。

飼料は、オリエンタル酵母工業株式会社 (東京都中央区) 製造の固形飼料MFを使用した。

飲水は、水道水を自由に摂取させた。

#### 3) 試験群の構成

試験群の構成は、雌雄各1群ずつの計2群とした。

性	試験群	用量(mg/kg)	動物数	動物番号
雄	1	2,000	5	1101~1105
雌	2	2,000	5	2101~2105

#### 4) 用量設定理由

投与量を設定するため、SD系ラットを用い、300、1,000および2,000 mg/kgの3用量を雌雄各3匹に投与した。その結果、死亡例は認められず、毒性が弱いと推定されたため、急性経口毒性試験の投与量の上限である2,000 mg/kgの1用量を設定した。

#### 5) 投与液の調製

被験物質の必要量を瑪瑙乳鉢にとり、粉碎した後0.5%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液 (和光純薬工業株式会社、大阪府大阪市) に懸濁し、20 (w/v) %懸濁液を調製した。

## 単回投与毒性試験

Table 1. Mortality and LD<sub>50</sub> values in rats after single administration of 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Mortality	LD <sub>50</sub> values (mg/kg)
Male	2,000	5	0/5	>2,000
Female	2,000	5	0/5	>2,000

### 6) 投与方法

投与経路は、経口投与とした。

投与前16時間絶食させた動物に上述の被験物質懸濁液を胃内に1回強制経口投与した。

投与容量は体重100g当り1mlとし、個体別に測定した体重に基づいて算出した。

給餌は被験物質投与後3時間に行った。

### 7) 一般状態の観察

中毒症状および生死の観察は、投与後8時間までは1時間間隔、以後1日2回午前と午後（休日は午前のみ）に行い、その結果を観察所見記録用紙に記録した。

なお、観察期間は投与後14日間とした。

### 8) 体重

体重は投与直前、投与後7および14日に測定した。

### 9) 病理解剖

観察終了時に全個体をエーテル麻酔後放血安楽死させ解剖し、肉眼的病理所見を病理解剖所見用紙に記録した。

## 結果および考察

### 1) 死亡率およびLD<sub>50</sub>値 (Table 1)

死亡動物は、雌雄いずれの群にも認められず、従ってLD<sub>50</sub>値は雌雄ともに2,000 mg/kg以上と推定された。

### 2) 一般状態

一般状態の観察で、雌雄ともに下痢および軟便が認められた。

これらの症状は、投与後6から8時間の間に観察され、投与後8-24時間までに回復した。

### 3) 体重

雌雄ともに投与後1および2週時の体重測定でいずれも前回の値に比較して全例に増加が認められた。

### 4) 剖検所見

観察終了時における剖検で、雌雄ともに被験物質投与による影響が示唆される所見は観察されなかった。

連絡先：試験責任者 山本利男

(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 : Yamamoto, Toshio

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and

Pesticides (An-pyo Center), Japan

582-2 Shioshinden Arahama, Fukude-cho, Iwata-gun,

Shizuoka, 437-12, Japan

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

# 2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の ラットを用いる28日間の反復投与毒性試験

## Twenty-eight-day Repeated Dose Toxicity Test of 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid in Rats

### 要約

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の毒性を明らかにするため、SD系ラットを用いた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。

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸は、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し、0、100、300および1,000 mg/kgを毎日1回、4週間連続経口投与した。その結果は、次のとおり要約される。

投与期間および回復期間を通じて、雌雄いずれの群にも一般状態の観察で異常の認められた動物はなく、死亡例も認められなかった。

体重は、雄の300および1,000 mg/kg群で増加抑制傾向にあったが、被験物質投与の影響と言える程明確なものではなかった。

摂餌量には、投与期間および回復期間を通じて雌雄とも群間で差が認められなかった。

血液形態学的検査、血液凝固検査および血液生化学的検査結果には、雌雄とも被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

尿検査の結果、雌雄ともウロビリノーゲン陽性、尿pHの低下が認められたが、主に被験物質の代謝物による変化と考えられ、特定臓器の障害に起因した変化とは考えられなかった。

臓器重量測定の結果、雌雄とも重量測定を実施したすべての臓器について、被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

病理学検査の結果、投与終了時および回復試験終了時の計画屠殺動物において、被験物質投与によると考えられる肉眼所見は、雌雄とも観察されなかった。

投与終了時の対照群および1,000 mg/kg群について組織学検査を行ったが、被験物質投与によると考えられる所見は、雌雄とも観察されなかった。

以上の結果、雌雄とも無影響量は1,000 mg/kg/dayと判断された。

### 緒言

OECDを中心にして、既存化学物質点検作業が実施されているが、日本独自の点検作業として、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸のラットを用いた28日間反復投与毒性試験を実施した。

### 方法

#### 1. 被験物質

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸 (CAS No. 88-53-9、別名：C酸、大日本インキ化学工業株式会社製造、社団法人日本化学工業協会提供) は白色粉末で、水に難溶、分子式 $C_7H_6ClNO_3S$ 、分子量221.5の物質である。本試験に用いたロットの純度は99.5%以上である。

#### 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・リバー株式会社 (神奈川県厚木市) 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、個体別飼育ケージに動物標識番号 (Animal ID-No.) を付すことにより行った。

投与開始時の体重は雄で137~151 g、雌で111~127 gであった。

#### 3. 飼育条件

動物はバリアシステムの飼育室 (W 9.8×D 8.2×H 2.5 m、200.9 m<sup>3</sup>) で飼育し、環境調節の目標値は温度23±1℃、相対湿度55±5%、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。

株式会社東京技研サービス (東京都府中市) の水洗式飼育機 (W 674.2×D 80.0×H 175.5 cm) を使用し、金属製前面・床網目飼育ケージ (W 20.0×D 28.2×H 18.0 cm、飼育ケージ・スペース10,152 cm<sup>3</sup>) に動物を1匹ずつ収容し、オリエンタル酵母工業株式会社 (東京都中央区) 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

試験群の構成は下記に示した。

1群雌雄各5匹とし、0および1,000 mg/kg群に雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

試験群	1		2		3		4	
用量 (mg/kg)	0		100		300		1,000	
性	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
動物数	10	10	5	5	5	5	10	10
動物番号	1001 1005	2001 2005	1101 1105	2101 2105	1201 1205	2201 2205	1301 1305	2301 2305
回復試験動物番号	1006 1010	2006 2010	--	--	--	--	1306 1310	2306 2310

## 【用量設定理由】

用量設定のための2週間投与による予備試験を0、100、300および1,000 mg/kg/dayの4用量で実施した。

その結果、死亡例はいずれの投与群でもみられず、また、体重、飼料摂取量、病理解剖所見および臓器重量にも被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。従って、28日間反復投与試験における最高用量は、限界用量の1,000 mg/kgとし、以下公比3で除し中用量を300 mg/kg、低用量を100 mg/kgに設定した。別に、担体（0.5%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液）のみを投与する対照群を設けた。

## 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0.5mlとした。対照群には担体（0.5%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液）のみ投与した。

## 6. 投与液の調製、分析

被験物質は、指定用量（100、300および1,000 mg/kg）ごとに所定量を精秤し、メノー乳鉢を用いて懸濁液を調製した。投与液は調製後、冷蔵庫保存で2週間安定であることが確認されているが、本試験においては毎週1回調製を行った。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97.3～104%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1,000 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（休日は1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. 血液形態学的検査

検査にはEDTA-3Kを添加した初血を用いた。

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: 全赤血球の容積より補正)、平均赤血球容積 (MCV: RBC, HCTより算出)、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) は血液自動分析装置THMS (米国テクニコン社) を用いて測定した。

網赤血球 (RC) 率算定用に、全血をキャピロット (テルモ株式会社、東京都渋谷区) で染色後、血液塗抹標本を作製し保管した。

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) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (クロット法) 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. 生化学的検査

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 (ヘキソキナーゼ法)、中性脂肪 (酵素法)、総コレステロール (酵素法)、尿素窒素 (BUN: ウレアーゼ改良法)、カルシウム (アリザリン法)、無機リン (モリブデンブルー法)、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 (Jaffe法)、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT: Karmen改良法)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT: Wroblewski and LaDue改良法)、 $\gamma$ -グルタミルトランスアミナーゼ ( $\gamma$ -GTP: 酵素法) およびアルカリホスファターゼ (ALP: Bessey-Lowry-Brock改良法) をCentrifiChem EN-CORE 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（株式会社アタゴ、東京都板橋区）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・三共株式会社、東京都中央区）およびCLINITEK200（米国マイルス社）を用いて測定した。ウロビリノーゲンについては、ウロペーパー“栄研”UAG-3（栄研化学株式会社、東京都文京区）を追加使用した。

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、腎、脾、副腎、精巣および卵巣について重量を測定し、臓器重量・体重比を算出した。上記重量測定臓器と下垂体、眼球、甲状腺（上皮小体を含む）、心、肺、胃、膀胱、髄（大腿骨）および肉眼所見で変化が認められた器

官・組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

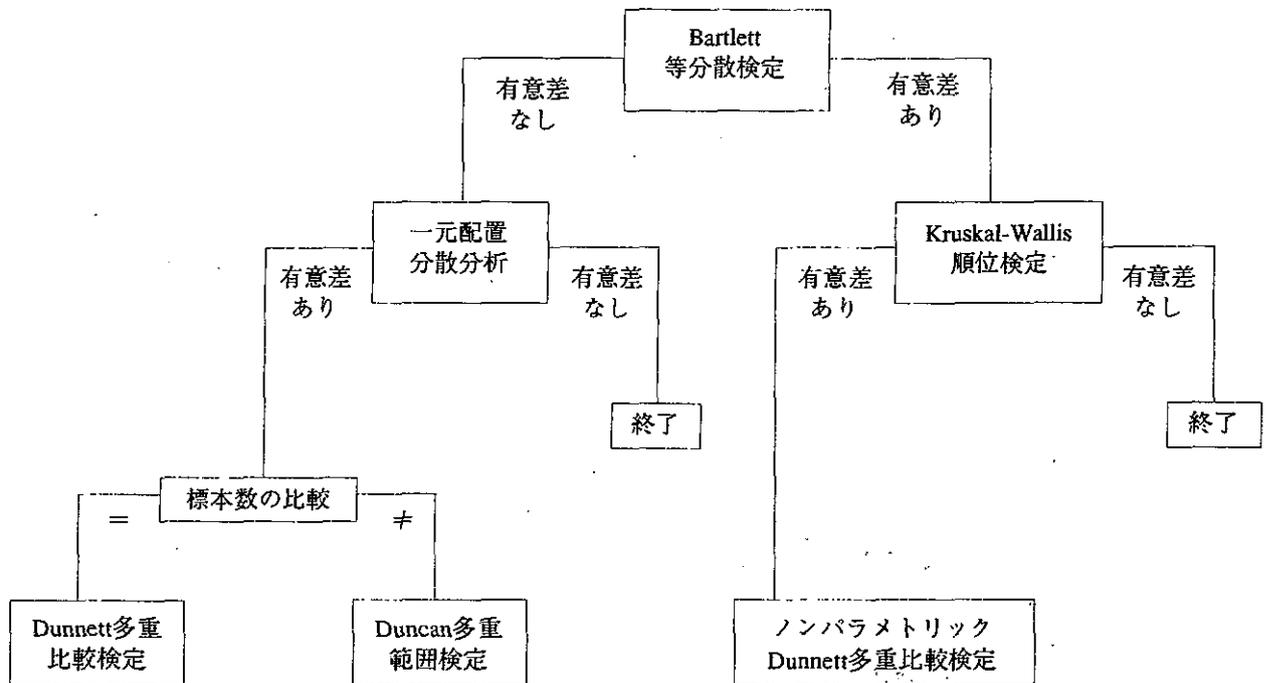
病理組織学検査は固定した器官・組織のうち、対照群と高用量群の心、肝、脾、腎および副腎について行った。常法に従って薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色し鏡検した。

6). データの記録および統計分析

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

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。



結果

1. 死亡率

投与期間中、雌雄とも対照群を含むすべての試験群で死亡例は認められなかった。また、回復期間中、雌雄とも対照群および1,000 mg/kg群で死亡例は認められなかった。

2. 一般状態の観察

投与期間および回復期間を通じて雌雄いずれの群にも異常動物は観察されなかった。

3. 体重 (Fig. 1)

雄では1,000 mg/kg群で投与後3週に対照群に比べ低値が認められ、4週間の体重増加量は300および1,000 mg/kg群で低値を示した。回復期間中は、対照群と1,000 mg/kg群で有意差は認められなかった。

雌では投与期間および回復期間を通じて群間で差が認められず、0~4および4~6週間の体重増加量にも差はなかった。

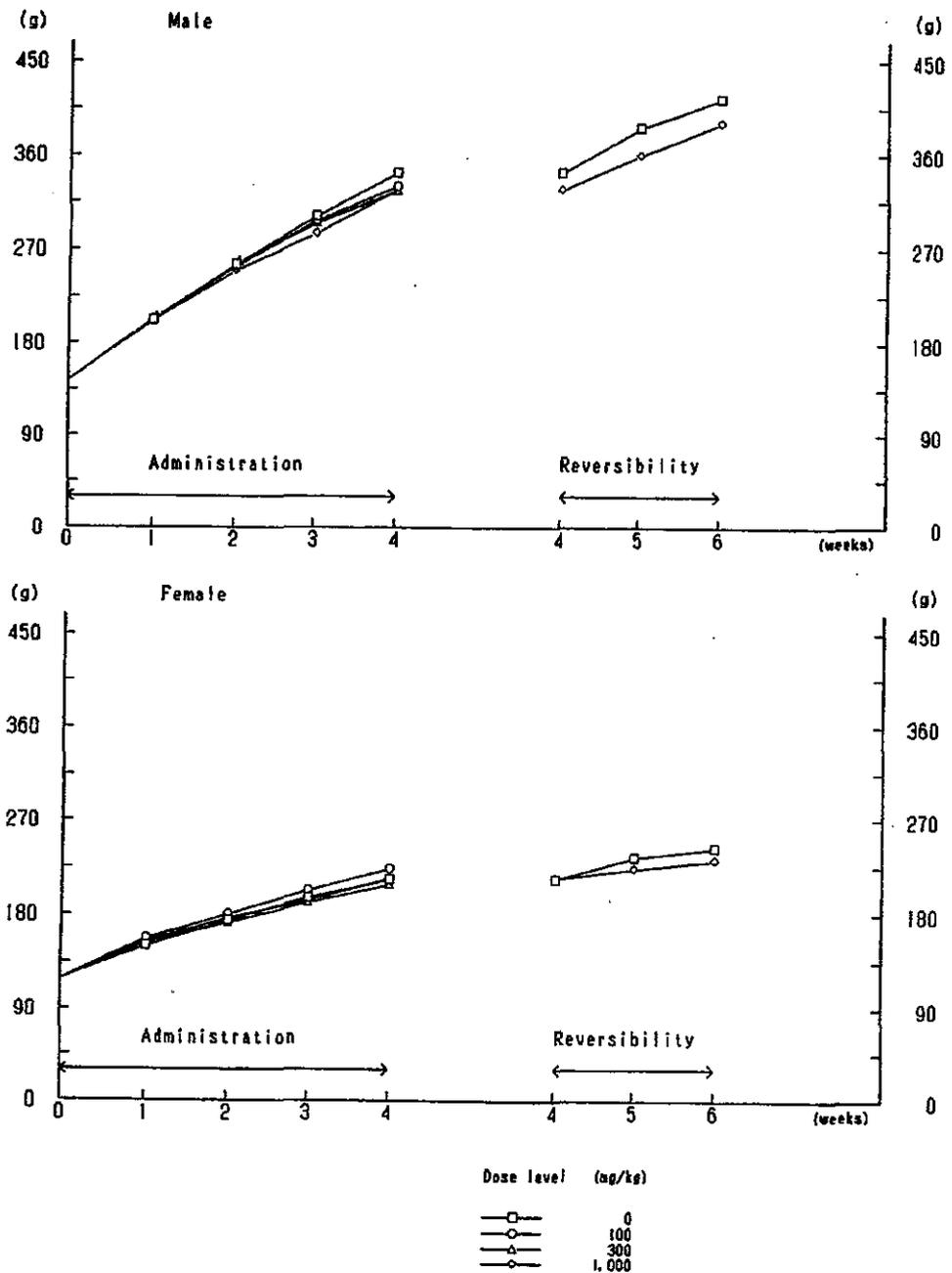


Fig. 1 Body weights of rats administered orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid for 28 days

## 4. 飼料摂取量 (Fig. 2)

雌雄とも投与期間および回復期間中を通じて差が認められず、0~4および4~6週間の総摂取量にも差は認められなかった。

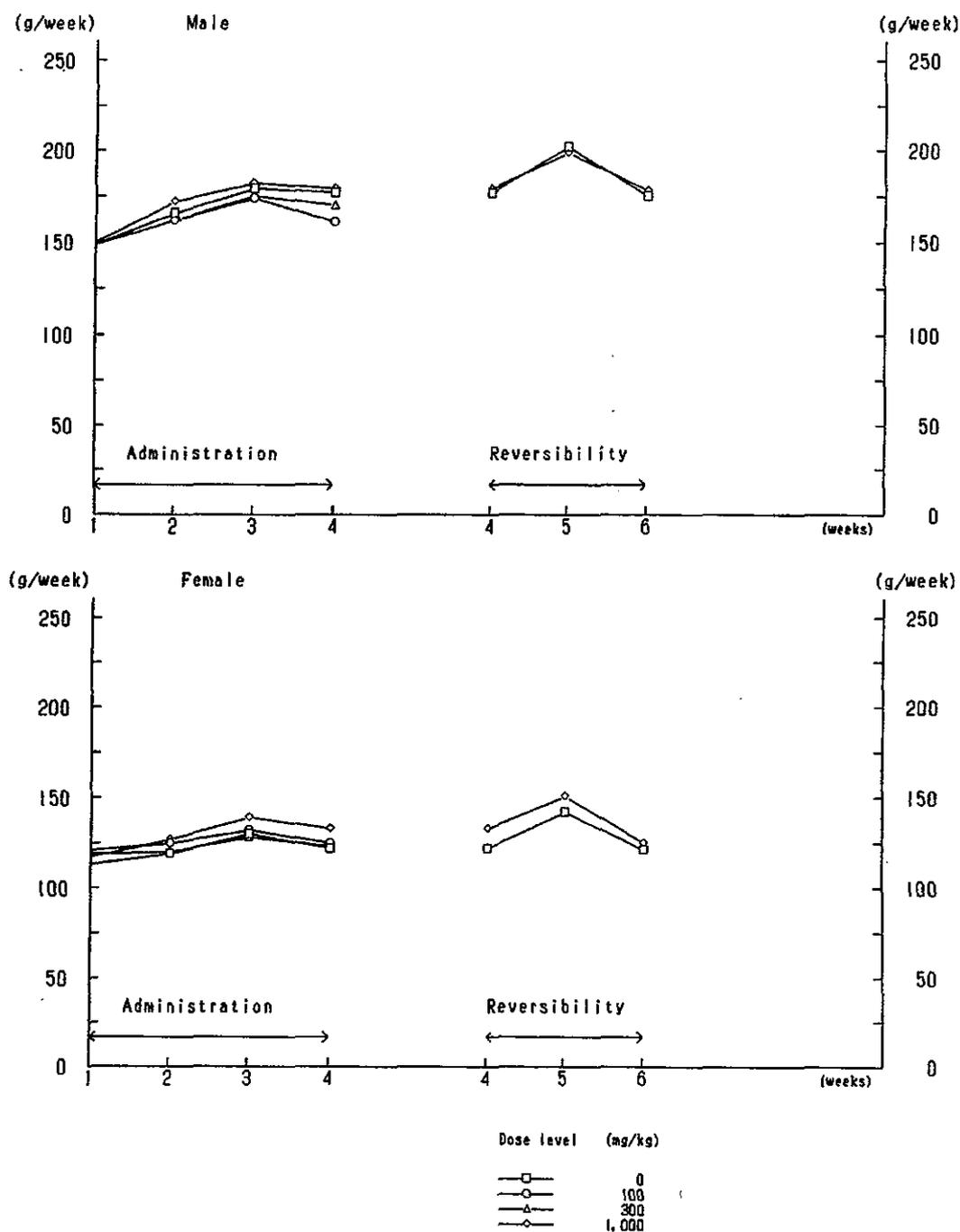


Fig. 2 Food consumption of rats administered orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid for 28 days

28日間反復投与毒性試験

5. 血液形態学的検査 (Table 1)

a) 投与終了時の結果

雄では 300 および 1,000 mg/kg群で対照群に比較して MCHCが低値を示した。

雌ではいずれの検査項目においても対照群との間に差は認められなかった。

b) 回復期間終了時の結果

雄では1,000 mg/kg群で対照群に比較してヘモグロビン量および血小板数の減少が認められた。

雌では1,000 mg/kg群で対照群に比較して白血球数の減少が認められた。

6. 血液凝固検査 (Table 1)

投与期間終了時の検査において、雌雄ともに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は群間で差がなかった。

回復期間終了時の検査で、雌の1,000 mg/kg群でプロトロンビン時間が対照群に比較して延長した。

Table 1 Hematological findings of rats administered orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid for 28 days and a recovery period for 14 days

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1,000	0	1,000
<b>Male</b>						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
HCT (%)	46.6±0.7	47.4±1.1	47.6±1.7	48.1±1.2	46.7±0.6	45.4±1.2
HGB (g/dl)	14.3±0.2	14.3±0.3	14.2±0.5	14.4±0.3	14.9±0.1	14.4±0.3**
RBC (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	7.57±0.29	7.69±0.19	7.68±0.43	7.89±0.15	8.08±0.21	7.87±0.44
MCV (μm <sup>3</sup> )	61.6±2.2	61.6±1.3	62.1±2.0	60.9±1.6	57.9±0.9	57.8±2.3
MCH (pg)	19.0±0.7	18.6±0.4	18.5±0.7	18.2±0.5	18.5±0.4	18.3±0.7
MCHC (%)	30.8±0.1N	30.2±0.2	29.8±0.6**	29.9±0.2**	31.9±0.3	31.7±0.2
PLT (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1199±63	1221±62	1180±118	1107±48	1238±60	1093±94**
WBC (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	12.3±2.7	13.6±1.8	12.7±3.4	12.2±2.3	12.4±3.3	14.5±2.4
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	12±3	12±2	9±1	13±3	11±4	12±4
LYMPH	84±3	84±2	89±2	84±3	85±5	85±5
MONO	2±1	2±1	1±1	1±1	2±2	2±1
EOSN	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0
BASO	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
LUC	1±0	1±0	1±1	1±0	1±0	1±0
PT (sec.)	14.8±0.6	14.5±0.4	14.5±0.7	14.5±0.4	15.4±0.5	15.2±0.6
APTT (sec.)	23.0±1.4	21.8±0.6	24.0±1.8	22.6±2.0	27.1±2.3	26.9±1.8
<b>Female</b>						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
HCT (%)	46.2±1.1	47.3±2.7	46.6±0.7	46.3±1.2	44.9±1.3	43.8±1.0
HGB (g/dl)	13.8±0.5	13.9±0.7	13.8±0.3	13.7±0.5	14.3±0.4	14.0±0.2
RBC (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	7.42±0.28	7.51±0.29	7.44±0.34	7.46±0.21	7.75±0.32	7.42±0.14
MCV (μm <sup>3</sup> )	62.3±1.3	63.0±1.9	62.7±2.5	62.1±1.9	57.9±1.3	59.1±1.4
MCH (pg)	18.6±0.3	18.5±0.5	18.5±0.9	18.4±0.6	18.4±0.6	18.9±0.3
MCHC (%)	29.9±0.4	29.4±0.3	29.6±0.5	29.6±0.4	31.7±0.3	32.0±0.9
PLT (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1190±164	1205±110	1117±88	1110±112	1196±156	1107±75
WBC (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	6.5±2.1	6.3±1.9	6.1±1.3	8.3±2.4	10.7±2.4	6.9±2.1*
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	11±2N	12±3	13±8	10±1	8±2	12±4
LYMPH	86±2N	86±3	85±10	87±1	89±2	84±5
MONO	1±0	1±1	1±1	1±0	1±1	2±1
EOSN	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0	1±1
BASO	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
LUC	0±1	0±0	0±0	0±1	1±0	0±1
PT (sec.)	16.0±0.4	15.7±0.5	15.5±0.3	15.4±0.4	15.5±0.5	16.3±0.5*
APTT (sec.)	21.2±2.1	21.1±1.4	19.2±1.2	18.9±1.4	22.1±1.4	25.2±4.2

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≤0.01

## 7. 生化学的検査 (Table 2)

## a) 投与終了時の結果

雄では対照群に比較して100および300 mg/kg群でカルシウムが、また、300 mg/kg群でアルブミンが減少した。

雌ではすべての被験物質投与群で対照群に比較してγ-GTPの減少、カルシウムの増加が認められ、また、100 mg/kg群で血糖の増加が認められた。

## b) 回復期間終了時の結果

雄では対照群に比較して1,000 mg/kg群でクレアチニンの増加、総蛋白、アルブミンおよびカリウムの減少が認められた。

雌ではすべての検査項目において対照群と1,000 mg/kg群で差は認められなかった。

Table 2 Blood chemical findings of rats administered orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid for 28 days and a recovery period for 14 days

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1,000	0	1,000
<b>Male</b>						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
BUN (mg/dl)	12.4±1.9	11.5±1.9	13.1±2.3	11.3±1.5	11.2±2.2	13.0±1.9
Creatinine (mg/dl)	0.59±0.03	0.56±0.07	0.55±0.10	0.59±0.06	0.58±0.03	0.63±0.02**
T.cholesterol (mg/dl)	49±16	48±5	44±15	47±9	51±21	43±8
T.protein (g/dl)	5.34±0.13	5.24±0.08	5.10±0.21	5.25±0.06	5.65±0.21	5.33±0.09**
Albumin (g/dl)	2.98±0.07	2.93±0.07	2.83±0.09*	2.94±0.09	3.02±0.08	2.86±0.09**
A/G	1.27±0.08	1.27±0.03	1.25±0.04	1.28±0.08	1.15±0.04	1.16±0.07
Glucose (mg/dl)	134±19	138±14	146±11	137±11	146±19	151±21
Triglyceride (mg/dl)	56.4±13.2	51.3±14.5	52.2±24.7	36.3±6.1	48.2±17.2	45.0±14.7
GOT (U/l)	61±6	65±2	57±6	56±7	45±7	42±7
GPT (U/l)	13±1	12±3	13±3	15±4	17±4	18±5
ALP (U/l)	151±23	176±48	154±21	153±22	126±24	141±30
Gamma-GTP (U/l)	0.0±0.0N	0.1±0.2	0.2±0.3	0.2±0.2	0.0±0.0	0.1±0.1
Sodium (mmol/l)	141.3±0.8	141.1±0.7	140.6±1.3	139.7±1.4	142.2±1.5	142.4±0.7
Potassium (mmol/l)	4.97±0.23	4.95±0.29	4.89±0.38	4.94±0.34	4.94±0.35	4.49±0.24*
Chloride (mmol/l)	106.6±1.6	106.4±0.7	107.4±1.0	105.4±1.0	106.8±1.7	107.7±1.5
Calcium (mg/dl)	9.52±0.14	9.11±0.12**	9.17±0.16**	9.40±0.14	9.52±0.29	9.47±0.14
I.phosphate (mg/dl)	8.09±0.53	7.60±0.34	7.72±0.62	7.58±0.35	7.35±0.58	6.73±0.32
<b>Female</b>						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
BUN (mg/dl)	14.5±2.9	16.0±1.2	16.1±3.7	14.3±4.8	13.7±0.9	15.2±1.5
Creatinine (mg/dl)	0.60±0.03	0.54±0.11	0.63±0.06	0.58±0.06	0.65±0.05	0.63±0.03
T.cholesterol (mg/dl)	44±10	52±20	56±14	61±11	64±13	56±7
T.protein (g/dl)	5.55±0.27	5.73±0.24	5.43±0.13	5.52±0.26	5.84±0.17	5.69±0.09
Albumin (g/dl)	3.24±0.20	3.32±0.20	3.14±0.05	3.22±0.21	3.38±0.22N	3.27±0.04
A/G	1.40±0.06	1.38±0.10	1.37±0.03	1.40±0.09	1.37±0.12	1.36±0.06
Glucose (mg/dl)	112±14	150±30**	133±8	120±14	131±21	125±9
Triglyceride (mg/dl)	27.8±5.3	34.6±15.9	26.2±5.1	42.1±13.1	42.5±12.0N	34.8±3.7
GOT (U/l)	56±8	54±6	55±4	51±10	48±8	46±4
GPT (U/l)	13±1	15±4	13±3	14±6	15±5	13±3
ALP (U/l)	102±16	105±20	91±17	112±23	72±17	85±30
Gamma-GTP (U/l)	0.9±0.5	0.2±0.2**	0.3±0.3*	0.4±0.3*	0.3±0.4	0.3±0.4
Sodium (mmol/l)	142.2±0.8	141.7±0.5	141.4±1.4	140.8±1.2	141.6±0.8	142.3±1.5
Potassium (mmol/l)	4.86±0.13	4.54±0.21	4.64±0.28	4.53±0.30	4.46±0.18	4.47±0.30
Chloride (mmol/l)	108.8±1.8	109.1±2.0	109.8±1.5	106.8±1.2	108.2±2.1	109.6±1.8
Calcium (mg/dl)	9.23±0.08	9.56±0.21**	9.51±0.14*	9.66±0.19**	9.45±0.17	9.37±0.17
I.phosphate (mg/dl)	6.29±0.15	6.37±0.26	6.05±0.49	6.27±0.28	6.02±0.38	5.36±0.63

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

8. 尿検査 (Table 3)

a) 投与終了時の結果

雌雄ともすべての被験物質投与群でウロビリノーゲン1.0 E.U./dl以上の動物が増加し、さらに、300 mg/kg以上の群で尿pH 5.5以下の動物が増加した。

b) 回復期間終了時の結果

雄では対照群と1,000 mg/kg群で、すべての検査項目について明確な差は認められなかった。

雌では1,000 mg/kg群で対照群に比較して尿比重が高値を示した。

Table 3 Urinary findings of rats administered orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid for 28 days and a recovery period for 14 days

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1,000	0	1,000
<b>Male</b>						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Volume (ml)	8±2	8±2	7±2	6±1	8±1N	7±2
Specific Gravity	1.053±0.013	1.061±0.016	1.070±0.017	1.067±0.006	1.062±0.004N	1.072±0.018
Color	Slight yellow	5	4	4	4	5
	Yellow-brown	0	1	1	1	0
Turbidity	Clear	5	5	5	5	5
pH	5	0	0	1	2	0
	5.5	0	1	1	3	0
	6	4	4	2	0	5
	6.5	1	0	1	0	0
Occult Blood	-	5	5	5	5	5
Ketones	-	0	0	1	2	0
	+/-	1	3	3	3	0
	1+	4	2	1	0	5
Glucose	-	5	5	5	5	5
(g/dl)						
Protein	30	4	4	2	1	2
(mg/dl)	100	1	1	2	4	3
	≥300	0	0	1	0	0
Bilirubin	-	1	3	0	0	1
	1+	4	2	5	5	4
Urobilinogen	0.1	5	2	0	0	5
(E.U./dl)	1.0	0	3	5	2	0
	2.0	0	0	0	3	0
Erythrocytes	-	5	5	5	5	5
Leukocytes	-	5	3	3	4	3
	1+	0	2	2	0	2
	2+	0	0	0	1	0
Epith. Cells	-	5	5	5	5	5
Casts	-	5	5	5	5	5
Fat glob.	-	5	5	5	5	5
M. threads	-	5	5	5	5	5
others	+	5	5	5	5	5

others : Crystals

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

N : Non parametric analysis

Table 3 (-continued)

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1,000	0	1,000
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Volume (ml)	5±2	5±2	5±1	6±2	6±2	3±1
Specific Gravity	1.065±0.015	1.070±0.025	1.077±0.011	1.069±0.017	1.068±0.021	1.101±0.014**
Color	Slight yellow	5	4	4	4	5
	Yellow-brown	0	1	1	1	0
Turbidity	Clear	5	5	5	5	5
		0	1	3	4	0
pH	5	1	2	2	0	1
	5.5	4	1	0	1	5
	6	0	1	0	0	1
	6.5	4	5	5	5	5
Occult Blood	-	1	0	0	0	1
	+/-	3	4	3	4	3
Ketones	-	2	1	2	1	2
	+/-	5	5	5	5	5
Glucose (g/dl)	-	0	0	0	1	1
	+/-	3	4	5	4	1
Protein (mg/dl)	30	2	1	0	0	3
	100	0	0	0	0	3
	≥300	0	0	0	0	0
		2	2	0	1	2
Bilirubin	-	3	3	5	4	3
	1+	5	2	0	0	5
Urobilinogen (E.U./dl)	0.1	0	3	5	1	0
	1.0	0	0	0	1	0
	2.0	0	0	0	3	0
	4.0	5	5	5	5	5
Erythrocytes	-	5	3	1	3	4
Leukocytes	-	0	1	3	0	1
	1+	0	1	1	2	0
	2+	5	5	5	4	5
Epith. Cells	-	0	0	0	1	0
	1+	5	5	5	5	5
Casts	-	5	5	5	5	5
Fat glob.	-	5	5	5	5	5
M. threads	-	5	5	5	5	5
others	-	0	0	1	0	1
	+	5	5	4	5	4

others : Crystals

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

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

## 9. 臓器重量 (Table 4)

## a) 投与終了時の結果

雌雄ともすべての重量測定臓器について、対照群と被験物質投与群で差は認められなかった。

## b) 回復期間終了時の結果

雌雄とも1,000 mg/kg群と対照群とで重量に差のある臓器は認められなかった。

## 10. 臓器重量・体重比 (相対重量) (Table 4)

## a) 投与終了時の結果

雌雄ともすべての重量測定臓器について、対照群と被験物質投与群で差は認められなかった。

## b) 回復期間終了時の結果

雄では1,000 mg/kg群で対照群に比較して副腎相対重量が増加した。

雌では対照群と重量に差のある臓器は認められなかった。

Table 4 Organ weight and Organ weight per body weight of rats administered orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid for 28 days and a recovery period for 14 days.

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1,000	0	1,000
<b>Male</b>						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body Weight (g)	336±17	330±20	326±8	329±7	414±25	391±18
<b>Absolute organ weight</b>						
Brain (g)	2.01±0.07	2.03±0.06	2.06±0.10	2.03±0.08	2.14±0.06	2.11±0.06
Liver (g)	9.58±0.77	9.61±0.60	9.61±0.54	9.12±0.64	11.78±1.36	10.29±1.34
Kidneys (g)	2.56±0.11	2.50±0.17	2.65±0.15	2.62±0.24	3.00±0.35	2.74±0.19
Spleen (g)	0.54±0.10	0.58±0.08	0.57±0.08	0.56±0.10	0.75±0.12	0.66±0.10
Adrenals (mg)	51±3	54±6	51±4	47±8	52±6N	57±1
Testes (g)	2.82±0.20	2.92±0.05	2.91±0.15	2.85±0.20	2.92±0.22	3.01±0.25
<b>Relative organ weight</b>						
Brain (%)	0.600±0.029	0.618±0.047	0.631±0.036	0.617±0.021	0.519±0.031	0.541±0.028
Liver (%)	2.851±0.174	2.909±0.051	2.947±0.166	2.771±0.211	2.841±0.180	2.625±0.237
Kidneys (%)	0.762±0.045	0.757±0.032	0.812±0.052	0.796±0.071	0.723±0.052	0.700±0.025
Spleen (%)	0.160±0.024	0.176±0.016	0.174±0.021	0.169±0.030	0.180±0.019	0.168±0.017
Adrenals (%)	0.015±0.001	0.016±0.002	0.016±0.001	0.014±0.002	0.012±0.001	0.015±0.001**
Testes (%)	0.841±0.080	0.887±0.072	0.891±0.052	0.864±0.052	0.707±0.056	0.772±0.079
<b>Female</b>						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body Weight (g)	207±14	223±5	208±21	220±15	243±13	231±25
<b>Absolute organ weight</b>						
Brain (g)	1.88±0.08	1.90±0.06	1.88±0.06	1.92±0.03	1.96±0.05	1.90±0.07
Liver (g)	5.89±0.57	6.76±0.62	6.22±0.48	6.56±0.64	6.72±0.57	6.07±0.43
Kidneys (g)	1.69±0.13	1.80±0.11	1.70±0.09	1.91±0.17	1.80±0.10	1.82±0.16
Spleen (g)	0.41±0.09	0.39±0.06	0.39±0.03	0.44±0.04	0.50±0.07	0.43±0.08
Adrenals (mg)	66±4	70±7	68±3	63±9	64±3	63±7
Ovaries (mg)	78±5	88±11	85±11	86±10	85±5	84±12
<b>Relative organ weight</b>						
Brain (%)	0.908±0.068	0.851±0.041	0.913±0.081	0.873±0.049	0.808±0.029N	
Liver (%)	2.841±0.188	3.025±0.253	3.001±0.197	2.971±0.103	2.762±0.185	2.636±0.168
Kidneys (%)	0.817±0.068	0.805±0.059	0.823±0.052	0.866±0.030	0.741±0.025	0.789±0.050
Spleen (%)	0.197±0.039	0.176±0.024	0.191±0.030	0.202±0.031	0.204±0.025	0.187±0.030
Adrenals (%)	0.032±0.001	0.031±0.004	0.033±0.003	0.029±0.002	0.027±0.002	0.028±0.003
Ovaries (%)	0.038±0.005	0.039±0.005	0.041±0.005	0.039±0.002	0.035±0.002	0.036±0.002

Values are expressed as Mean±S.D.

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

N: Non parametric analysis

## 11. 病理学検査 (Table 5)

## a) 剖検所見

投与終了時および回復試験終了時の剖検において、雌雄とも対照群と比較して、被験物質投与群で発生が増加した肉眼的異常は観察されなかった。

## b) 組織所見

組織学的検索は、投与終了時に解剖した対照群および1,000mg/kg群の雌雄について行った。その結果、雌雄とも両群の間に差のある変化は認められなかった。なお、対照群を含め観察された主な所見は、肝臓の細胞中の小空胞および肉芽巣、腎臓の尿細管上皮細胞の好塩基性化および石灰化、副腎の束状帯の空胞化などであった。

Table 5 Histopathological findings of rats orally with 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid for 28 days.

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1,000
No. of animals sacrificed at 4 week		5	5	5	5
No. of animals necropsied		5	5	5	5
No. of animals examined histologically		5	0	0	5
Organ	Findings	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
<b>Male</b>					
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>					
heart		(5)	(0)	(0)	(5)
	degeneration	0 0 0	---	---	1 0 0
	infiltration/cellular	0 0 0	---	---	1 0 0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>					
liver		(5)	(0)	(0)	(5)
	cytological alteration	1 0 0	---	---	0 0 0
	fatty change	5 0 0	---	---	3 0 0
	single cell necrosis	1 0 0	---	---	0 0 0
	granulation	4 0 0	---	---	4 0 0
	infiltration/cellular	1 0 0	---	---	0 0 0
	extramedullary hematopoiesis	2 0 0	---	---	0 0 0
<b>URINARY SYSTEM</b>					
kidney		(5)	(0)	(0)	(5)
	basophilic change	3 0 0	---	---	4 0 0
	deposit of calcium	1 0 0	---	---	1 0 0
	eosinophilic body	0 0 0	---	---	2 0 0
	vacuolic change	1 0 0	---	---	0 0 0
	fibrosis	0 0 0	---	---	1 0 0
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>					
adrenal gland		(5)	(0)	(0)	(5)
	vacuolic change	5 0 0	---	---	5 0 0
<b>Female</b>					
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>					
heart		(5)	(0)	(0)	(5)
	infiltration/cellular	0 0 0	---	---	1 0 0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>					
liver		(5)	(0)	(0)	(5)
	eosinophilic body	1 0 0	---	---	0 0 0
	fatty change	3 0 0	---	---	4 0 0
	granulation	5 0 0	---	---	4 0 0
<b>URINARY SYSTEM</b>					
kidney		(5)	(0)	(0)	(5)
	basophilic change	3 0 0	---	---	3 0 0
	deposit of calcium	2 0 0	---	---	1 0 0

1: slight 2: moderate 3: marked

(): No. of animals examined microscopically at this site.

## 考察

一般状態観察の結果、投与期間および回復期間を通じて雌雄いずれの群にも異常動物は観察されず、死亡例も認められなかった。

体重は、雄の1,000 mg/kg群で投与3週に対照群に比較し低値を示し、300および1,000mg/kg群で4週間の体重増加量が減少したが、極めて軽微な変化であった。雌では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。

摂餌量は、雌雄とも投与期間および回復期間を通じて対照群と差がなく、4週間の総摂餌量にも群間差は認められなかった。

血液形態学的検査の結果、投与終了時に雄の300および1,000 mg/kg群でMCHCが低値を示したが、軽微な変化であること、ヘモグロビン量および赤血球数に変化が認められていないことから、意義のある変化とは考えられなかった。回復期間終了時の検査では、雄の1,000 mg/kg群でヘモグロビン量および血小板数の減少が認められ、雌の同用量群で白血球数の減少が認められたが、軽微な変化であり、投与終了時には認められていない変化であることから、毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。

血液凝固検査の結果、投与終了時の検査では、雌雄の対照群と被験物質投与群で差は認められず、被験物質投与の影響はないものと考えられた。回復期間終了時の検査では、雌の1,000 mg/kg群でプロトロンビン時間に延長が認められたが、軽微な変化であった。

生化学的検査の結果、投与終了時に雄の100および300 mg/kg群でカルシウムが、さらに300 mg/kg群でアルブミンが減少したが、いずれも用量相関性のない変化であった。また、雌のすべての被験物質投与群で $\gamma$ -GPTの減少、カルシウムの増加、100 mg/kg群で血糖の増加が認められたが、カルシウムに関しては、対照群の値が背景値(9.60±0.28 mg/dl, n=35)に比較して僅かに低く、変動が小さいため、投与群で統計学的有意差が認められたもので、その他の項目に関しては、軽微かつ用量相関性のない変化であった。回復期間終了時の検査では、雄の1,000 mg/kg群でクレアチニンの増加、総蛋白、アルブミンおよびカリウムの減少が認められたが、いずれも軽微な変化で投与終了時には認められていないことから、毒性学的に意義のある変化とは考えられなかった。

尿検査の結果、雌雄ともすべての被験物質投与群でウロビリノーゲン1.0 E.U./dl以上の動物が増加し、300 mg/kg以上の群で尿pH 5.5以下の動物が増加した。ウロビリノーゲンに関しては、血清生化学的検査および病理組織学的検査で肝臓が標的臓器でないと考えられることから、薬剤干渉が示唆され、以下の追加試験を行った。

- (1) 試験に用いたと同系統、同週齢の雄ラットから尿を採取し、被験物質を加え、飽和させ(被験物質の水溶解度は90 mg/100 g)本試験で用いた尿検査試験紙N-マルティスティックスSGで検査したところ陰性であった。
- (2) 上述(1)で用いた同一ラットに、被験物質1,000 mg/kgを単回投与した後、尿を採取し、本試験で用いたN-

マルティスティックス試験紙で検査したところ陽性であった。N-マルティスティックス試験紙のウロビリノーゲンの測定はEhrlichアルデヒド反応を用いているため、これとは異なる測定反応系(ジアゾ・カップリング反応)を用いているウロペーパー“栄研”UAG-3を用いて同一尿を測定した結果、陰性であった。また、被験物質投与後2日の尿を両試験紙で検査した結果、陰性であった。

- (1)および(2)の結果に加え、回復期間終了時の検査では、対照群と差がないことから、被験物質の代謝物による薬剤干渉の結果、陽性を示したものと考えられた。尿pHに関しては、上述の(1)および(2)で用いたと同一の尿について、N-マルティスティックス試験紙で検査した結果、(1)の尿ではpHは僅かに下がる程度でほとんど変わらず、(2)の尿ではpHが低下したことから、主に被験物質の代謝物の関与が考えられた。

その他、尿検査では、回復期間終了時の検査において、雄の1,000 mg/kg群で尿比重が高値を示したが、尿量が僅かながら少ないため、投与終了時には認められなかった変化であり、被験物質の投与とそれに引続く休止との関連はないと考えられた。

臓器重量測定の結果、雌雄とも被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

病理学検査の結果、肉眼的にも、組織学的にも、被験物質投与によると示唆される病変は、雌雄ともに観察されなかった。

以上の結果、雌では測定および検査したすべての項目で、1,000 mg/kg投与群でも被験物質投与の影響が認められなかった。雄においても、300および1,000 mg/kg投与で極めて僅かな体重増加抑制傾向が認められたが、明確なものではなく、被験物質投与の影響と判断する程のものではなかった。従って、雌雄とも無影響量は1,000 mg/kg/dayと推察された。

## 文献

- 1). 大森義仁編, "化審法毒性試験法の解説改訂版," 化学工業日報社, 1992.
- 2). 吉村功編, "毒性・薬効データの統計解析," サイエンティスト社, 1987.
- 3). A. Jonckheere, *Biometrika*, 41, 133-145 (1954).

連絡先: 試験責任者 井上博之

(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: Inoue, Hiroyuki

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and

Pesticides (An-pyo Center), Japan

582-2 Shioshinden Arahama, Fukude-cho, Iwata-gun,

Shizuoka, 437-12, Japan

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

# 2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid on Bacteria

### 要約

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の変異原性の有無について、細菌を用いる復帰変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用い、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は50~5000 µg/プレートの用量で、本試験はTA100の直接試験のみは156.3~5000 µg/プレート、その他については、312.5~5000 µg/プレートの用量で実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸は、用いた試験系において変異原性を有しない（陰性）と判定された。

### 緒言

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸について、細菌を用いる復帰変異試験をプレート法より実施した。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異<sup>1)</sup>、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異<sup>2)</sup>を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9混液）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）およびOECD化学品試験法ガイドライン：471、472に準拠し、化学物質GLP（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

### 方法

#### 〔検定菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*

*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*Salmonella typhimurium* TA100、*Salmonella typhimurium* TA1535、*Salmonella typhimurium* TA98、*Salmonella typhimurium* TA1537の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与を受けた。

*Escherichia coli* WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス（Difco）を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

#### 〔被験物質〕

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸（CAS No.88-53-9、2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid）は、分子量221.5の白色粉末である。純度99.5%以上のもの（ロット番号：78454、大日本インキ化学工業株式会社製造）を（社）日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸は、ジメチルスルホキシド（ロット番号：DSL5887、和光純薬工業（株）、以下DMSOと略）を用いて50 mg/mlになるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、秦野研究所において2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸のDMSO溶液中での安定性試験を行った。本試験における最高濃度（50 mg/ml）および最低濃度（1.565 mg/ml）の2濃度について、室温遮光条件下で、実施した。その結果、調製後3時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれの初期値の平均（0時間）に対して、101および99.0%であった。これらの値は当研究所の標準操作手順書の基準（初回の測定平均値の90%以上）を満たしていた。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml溶液については、100~102%、1.563 mg/ml溶液については、101~104%であった。これらの値も、当研究所の標準操作手順書の基準（平均含量は添加量の85%以上）を満たしていた。

## 復帰変異試験

以上の結果から、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸はDMSO溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

- AF-2 : フリルフラマイド (上野製薬 (株))
- SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業 (株))
- 9-AA : 9-アミノアクリジン (東京化成工業 (株))
- 2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業 (株))

AF-2、9-AA、2-AAはDMSO (和光純薬工業 (株)) に、SAは蒸留水に溶解して試験に用いた。

### 〔培地およびS9混液の組成〕

#### 1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比10:1の割合で混合した。

(A)	バクト・アガー (Difco)	0.6%
	塩化ナトリウム	0.5%
(B)*	L-ヒスチジン	0.5 mM
	ビオチン	0.5 mM

\* WP2用には、0.5 mL-トリプトファン水溶液を用いた。

#### 2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社の最少寒天培地を用いた。なお、培地 1 lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2g
クエン酸・1水和物	2g
リン酸水素二カリウム	10g
リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5g
グルコース	20g
バクト・アガー (Difco)	15g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30mlを流して固めてある。

#### 3) S9混液 (1 ml中下記の成分を含む)

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース・6リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml

\*\* : 7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール (PB) および5、6-ベンゾフラボン (BF) の併用投与で酵素誘導して作製したS9 (キッコーマン (株)) を用いた。

### 〔試験方法〕

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。小試験管中にトップアガー2 ml、被験物質調製液0.1 ml、リン酸緩衝液0.5 ml (代謝活性化試験においてはS9混液0.5 ml)、検定菌液0.1 mlを混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりにDMSO、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を算定し、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。

### 〔判定基準〕

被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する (陽性) と判定することとした。

## 結果および考察

### 〔用量設定試験〕

50~5000 μg/プレートの範囲で試験を実施したところ、すべての検定菌の直接試験および代謝活性化試験において抗菌性は認められなかった。

なお、TA100の直接試験においては、用量に依存した変異コロニー数の減少が明らかであった。したがって、本試験における最高用量を、すべての検定菌で、直接試験および代謝活性化試験ともに5000 μg/プレートとし、公比2で5用量 (TA100の直接試験のみは6用量) を設定することとした。

### 〔本試験〕

結果をTables 1、2に示した。2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸について312.5~5000 μg/プレート (TA100の直接試験においてのみ156.3~5000 μg/プレートの6用量) の範囲で試験を実施した。本試験においては、2回目の試験のTA1535の代謝活性化試験の最高用量において、陰性対照群の2倍の変異コロニー数が得られた。その他の試験においては、用いた検定菌の直接試験および代謝活性化試験のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニーの増加は認められなかった。また、いずれの検定菌においても抗菌性は認められなかった。

TA1535の代謝活性化試験については、S9のロットが変わったため、2回の再現性試験を実施した。その結果、すべての用量において2回の試験ともに変異コロニーの増加は認められず、上記の変異コロニー数の増加は偶発的なものと考えられた (Tables 3、4)。

以上の結果に基づき、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸は、用いた試験系において変異原性を有しないもの (陰性) と判定した。

## 文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*. 113, 173-215 (1983)
- 2) M. H. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds.), Elsevier Science Publisher, New York, 1984, p161.

連絡先: 試験責任者 澁谷徹

(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: Shibuya, Tohru

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan  
Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid\*

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)														
			Base-pair substitution type						Frameshift type								
			TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537						
Solvent control	-	-	145 (128 $\pm$ 18.8)	132 (118 $\pm$ 15.3)	108 (95 $\pm$ 13.0)	12 (11 $\pm$ 0.6)	11 (10 $\pm$ 0.7)	11 (10 $\pm$ 0.7)	16 (15 $\pm$ 0.8)	13 (12 $\pm$ 0.9)	8 (7 $\pm$ 0.8)	21 (17 $\pm$ 4.0)	18 (17 $\pm$ 1.0)	13 (12 $\pm$ 1.1)	8 (8 $\pm$ 0.2)	8 (7 $\pm$ 0.3)	7 (6 $\pm$ 0.4)
Test substance	156.3	-	118 (126 $\pm$ 15.3)	144 (135 $\pm$ 9.0)	117 (104 $\pm$ 13.0)												
	312.5	-	128 (135 $\pm$ 6.1)	136 (127 $\pm$ 9.0)	140 (135 $\pm$ 5.5)	17 (17 $\pm$ 0.0)	13 (13 $\pm$ 0.0)	20 (20 $\pm$ 0.0)	22 (16 $\pm$ 6.0)	15 (15 $\pm$ 0.0)	10 (10 $\pm$ 0.0)	35 (27 $\pm$ 8.0)	23 (23 $\pm$ 0.0)	23 (23 $\pm$ 0.0)	12 (9 $\pm$ 3.0)	9 (9 $\pm$ 0.0)	7 (7 $\pm$ 0.0)
	625	-	127 (127 $\pm$ 0.0)	109 (109 $\pm$ 0.0)	144 (144 $\pm$ 0.0)	16 (16 $\pm$ 0.0)	16 (16 $\pm$ 0.0)	15 (15 $\pm$ 0.0)	9 (9 $\pm$ 0.0)	13 (13 $\pm$ 0.0)	18 (18 $\pm$ 0.0)	21 (19 $\pm$ 2.0)	23 (23 $\pm$ 0.0)	14 (14 $\pm$ 0.0)	8 (7 $\pm$ 1.0)	9 (9 $\pm$ 0.0)	4 (4 $\pm$ 0.0)
	1250	-	121 (120 $\pm$ 1.0)	111 (111 $\pm$ 0.0)	129 (129 $\pm$ 0.0)	14 (12 $\pm$ 2.0)	11 (11 $\pm$ 0.0)	10 (10 $\pm$ 0.0)	18 (16 $\pm$ 2.0)	16 (16 $\pm$ 0.0)	14 (14 $\pm$ 0.0)	29 (26 $\pm$ 3.0)	26 (26 $\pm$ 0.0)	23 (23 $\pm$ 0.0)	7 (7 $\pm$ 0.0)	7 (7 $\pm$ 0.0)	8 (8 $\pm$ 0.0)
	2500	-	108 (132 $\pm$ 24.0)	145 (145 $\pm$ 0.0)	144 (21.1)	9 (14 $\pm$ 5.0)	21 (21 $\pm$ 0.0)	11 (11 $\pm$ 0.0)	14 (12 $\pm$ 2.0)	12 (12 $\pm$ 0.0)	11 (11 $\pm$ 0.0)	23 (25 $\pm$ 2.0)	31 (31 $\pm$ 0.0)	20 (5.7)	5 (7 $\pm$ 2.0)	8 (8 $\pm$ 0.0)	7 (1.5)
	5000	-	106 (118 $\pm$ 12.0)	123 (123 $\pm$ 0.0)	124 (10.1)	13 (16 $\pm$ 3.0)	16 (16 $\pm$ 0.0)	20 (20 $\pm$ 0.0)	11 (12 $\pm$ 1.0)	14 (14 $\pm$ 0.0)	12 (12 $\pm$ 0.0)	40 (27 $\pm$ 13.0)	23 (23 $\pm$ 0.0)	17 (11.9)	8 (7 $\pm$ 1.0)	9 (9 $\pm$ 0.0)	4 (2.6)
Solvent control		+	129 (126 $\pm$ 3.0)	125 (125 $\pm$ 0.0)	123 (3.1)	21 (20 $\pm$ 1.0)	21 (21 $\pm$ 0.0)	17 (2.3)	14 (15 $\pm$ 1.0)	16 (16 $\pm$ 0.0)	14 (1.2)	34 (32 $\pm$ 2.0)	32 (32 $\pm$ 0.0)	30 (2.0)	15 (13 $\pm$ 2.0)	14 (14 $\pm$ 0.0)	9 (3.2)
Test substance	312.5	+	156 (138 $\pm$ 18.0)	135 (135 $\pm$ 0.0)	124 (16.3)	16 (16 $\pm$ 0.0)	16 (16 $\pm$ 0.0)	15 (0.6)	14 (13 $\pm$ 1.0)	16 (16 $\pm$ 0.0)	10 (3.1)	34 (31 $\pm$ 3.0)	37 (37 $\pm$ 0.0)	23 (7.4)	11 (7 $\pm$ 4.0)	5 (5 $\pm$ 0.0)	6 (3.2)
	625	+	130 (135 $\pm$ 5.0)	128 (128 $\pm$ 0.0)	148 (11.0)	10 (12 $\pm$ 2.0)	9 (9 $\pm$ 0.0)	17 (4.4)	9 (10 $\pm$ 1.0)	13 (13 $\pm$ 0.0)	9 (2.3)	30 (30 $\pm$ 0.0)	34 (34 $\pm$ 0.0)	27 (3.5)	12 (11 $\pm$ 1.0)	6 (6 $\pm$ 0.0)	15 (4.6)
	1250	+	136 (140 $\pm$ 4.0)	139 (139 $\pm$ 0.0)	146 (5.1)	5 (9 $\pm$ 4.0)	10 (10 $\pm$ 0.0)	12 (3.6)	12 (13 $\pm$ 1.0)	13 (13 $\pm$ 0.0)	13 (0.6)	25 (25 $\pm$ 0.0)	25 (25 $\pm$ 0.0)	26 (0.6)	6 (8 $\pm$ 2.0)	11 (11 $\pm$ 0.0)	8 (2.5)
	2500	+	178 (152 $\pm$ 26.0)	135 (135 $\pm$ 0.0)	142 (23.1)	11 (12 $\pm$ 1.0)	16 (16 $\pm$ 0.0)	8 (4.0)	10 (10 $\pm$ 0.0)	10 (10 $\pm$ 0.0)	11 (0.6)	28 (30 $\pm$ 2.0)	32 (32 $\pm$ 0.0)	29 (2.1)	5 (9 $\pm$ 4.0)	9 (9 $\pm$ 0.0)	14 (4.5)
	5000	+	153 (147 $\pm$ 6.0)	153 (153 $\pm$ 0.0)	136 (9.8)	12 (11 $\pm$ 1.0)	11 (11 $\pm$ 0.0)	10 (1.0)	16 (15 $\pm$ 1.0)	15 (15 $\pm$ 0.0)	14 (1.0)	26 (27 $\pm$ 1.0)	28 (28 $\pm$ 0.0)	28 (1.2)	5 (6 $\pm$ 1.0)	6 (6 $\pm$ 0.0)	8 (1.5)
Positive control	Chemical		AP2 0.01			SA 0.5			AP2 0.01			AP2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		534 (537 $\pm$ 3.0)	575 (575 $\pm$ 0.0)	503 (36.1)	109 (102 $\pm$ 7.0)	102 (102 $\pm$ 0.0)	95 (7.0)	137 (136 $\pm$ 1.0)	131 (131 $\pm$ 0.0)	141 (5.0)	650 (638 $\pm$ 12.0)	644 (644 $\pm$ 0.0)	620 (15.9)	1563 (1762 $\pm$ 200.0)	1951 (1951 $\pm$ 0.0)	1771 (194.2)
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		1037 (938 $\pm$ 99.0)	868 (868 $\pm$ 0.0)	910 (88.0)	225 (249 $\pm$ 24.0)	293 (293 $\pm$ 0.0)	228 (38.4)	628 (624 $\pm$ 4.0)	622 (622 $\pm$ 0.0)	623 (3.2)	521 (554 $\pm$ 33.0)	552 (552 $\pm$ 0.0)	588 (33.5)	223 (217 $\pm$ 6.0)	216 (216 $\pm$ 0.0)	211 (6.0)

AP2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene  
\*: Purity was above 99.5%

Table 2 Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid\*

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)														
			Base-pair substitution type									Frameshift type					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Solvent control	-	-	129 (127 $\pm$ )	146 (134 $\pm$ )	105 (20.6)	13 (12 $\pm$ )	11 (1.2)	13 (1.2)	18 (19 $\pm$ )	17 (3.2)	23 (27 $\pm$ )	25 (27 $\pm$ )	30 (2.5)	27 (9 $\pm$ )	10 (9 $\pm$ )	8 (1.0)	9 (1.0)
Test substance	156.3	-	149 (134 $\pm$ )	122 (13.7)	132												
	312.5	-	130 (125 $\pm$ )	140 (18.6)	104	18 (20 $\pm$ )	27 (6.7)	14	22 (25 $\pm$ )	28 (3.0)	25	34 (24 $\pm$ )	27 (11.2)	12	9 (9 $\pm$ )	11 (2.5)	6
	625	-	133 (122 $\pm$ )	116 (9.3)	118	11 (15 $\pm$ )	18 (3.6)	16	26 (28 $\pm$ )	31 (2.6)	27	16 (23 $\pm$ )	30 (7.0)	23	10 (9 $\pm$ )	8 (1.2)	10
	1250	-	128 (138 $\pm$ )	156 (15.9)	129	20 (20 $\pm$ )	19 (0.6)	20	28 (25 $\pm$ )	21 (3.8)	27	18 (19 $\pm$ )	23 (3.2)	17	7 (9 $\pm$ )	9 (1.5)	10
	2500	-	132 (132 $\pm$ )	138 (6.5)	125	15 (18 $\pm$ )	26 (6.7)	14	39 (32 $\pm$ )	37 (9.9)	21	15 (27 $\pm$ )	48 (18.2)	18	6 (9 $\pm$ )	9 (2.5)	11
	5000	-	149 (145 $\pm$ )	123 (20.3)	163	20 (16 $\pm$ )	15 (3.2)	14	27 (25 $\pm$ )	23 (2.1)	24	24 (22 $\pm$ )	16 (5.3)	26	7 (9 $\pm$ )	10 (1.7)	10
Solvent control		+	150 (132 $\pm$ )	106 (22.9)	139	11 (9 $\pm$ )	10 (2.1)	7	26 (24 $\pm$ )	17 (6.2)	29	35 (39 $\pm$ )	46 (6.1)	36	17 (11 $\pm$ )	9 (4.9)	8
Test substance	312.5	+	163 (134 $\pm$ )	122 (24.9)	118	17 (17 $\pm$ )	18 (1.0)	16	29 (26 $\pm$ )	27 (3.1)	23	57 (45 $\pm$ )	40 (10.8)	37	8 (12 $\pm$ )	10 (4.7)	17
	625	+	134 (141 $\pm$ )	134 (11.5)	154	16 (12 $\pm$ )	11 (3.2)	10	27 (24 $\pm$ )	21 (3.0)	24	37 (37 $\pm$ )	31 (5.5)	42	12 (11 $\pm$ )	10 (1.2)	12
	1250	+	163 (156 $\pm$ )	150 (6.5)	156	16 (15 $\pm$ )	12 (2.3)	16	27 (24 $\pm$ )	26 (4.9)	18	37 (34 $\pm$ )	40 (7.4)	26	13 (11 $\pm$ )	8 (2.9)	13
	2500	+	119 (136 $\pm$ )	150 (15.7)	139	14 (14 $\pm$ )	12 (2.5)	17	16 (25 $\pm$ )	27 (7.8)	31	39 (35 $\pm$ )	36 (4.0)	31	16 (13 $\pm$ )	6 (5.8)	16
	5000	+	148 (154 $\pm$ )	138 (20.3)	177	24 (18 $\pm$ )	12 (6.0)	18	26 (21 $\pm$ )	20 (4.2)	18	38 (42 $\pm$ )	39 (5.5)	48	10 (15 $\pm$ )	16 (4.2)	18
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		719 (699 $\pm$ )	708 (25.1)	671	236 (268 $\pm$ )	271 (30.6)	297	121 (129 $\pm$ )	126 (9.8)	140	723 (716 $\pm$ )	717 (7.5)	708	2087 (2392 $\pm$ )	2139 (484.5)	2951
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		703 (721 $\pm$ )	767 (39.8)	694	221 (216 $\pm$ )	213 (4.4)	214	372 (367 $\pm$ )	337 (28.3)	393	311 (310 $\pm$ )	335 (25.5)	284	219 (198 $\pm$ )	208 (27.4)	167

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene  
\*:Purity was above 99.5%

Table 3 Confirmation test (I) with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid\*

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)					
			Base-pair substitution type			Frameshift type		
			TA100	TA1535	NP2avrA	TA98	TA1537	
Solvent control		+		13 (16 $\pm$ 2.9)	18 (18 $\pm$ 2.9)	18 (18 $\pm$ 2.9)		
Test substance	312.5	+		20 (13 $\pm$ 6.7)	11 (11 $\pm$ 6.7)	7 (7 $\pm$ 6.7)		
	625	+		18 (14 $\pm$ 3.2)	12 (12 $\pm$ 3.2)	13 (13 $\pm$ 3.2)		
	1250	+		12 (14 $\pm$ 4.4)	11 (11 $\pm$ 4.4)	19 (19 $\pm$ 4.4)		
	2500	+		13 (15 $\pm$ 3.8)	12 (12 $\pm$ 3.8)	19 (19 $\pm$ 3.8)		
	5000	+		21 (19 $\pm$ 3.5)	15 (15 $\pm$ 3.5)	21 (21 $\pm$ 3.5)		
Positive control	Chemical Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		AP2 0.01	SA 0.5	AP2 0.01	AP2 0.1	9AA 80	
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate							
Positive control	Chemical Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2	
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate			188 (194 $\pm$ 8.5)	204 (204 $\pm$ 8.5)	191 (191 $\pm$ 8.5)		

AP2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene  
 \*:Purity was above 99.5%

Table 4 Confirmation test (II) with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid\*

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)					
			Base-pair substitution type			Frameshift type		
			TA100	TA1535	NP2avrA	TA98	TA1537	
Solvent control		+		14 (13 $\pm$ 1.2)	12 (12 $\pm$ 1.2)	12 (12 $\pm$ 1.2)		
Test substance	312.5	+		10 (15 $\pm$ 5.5)	15 (15 $\pm$ 5.5)	21 (21 $\pm$ 5.5)		
	625	+		13 (14 $\pm$ 1.2)	15 (15 $\pm$ 1.2)	15 (15 $\pm$ 1.2)		
	1250	+		19 (14 $\pm$ 5.6)	8 (8 $\pm$ 5.6)	15 (15 $\pm$ 5.6)		
	2500	+		17 (18 $\pm$ 2.3)	13 (13 $\pm$ 2.3)	17 (17 $\pm$ 2.3)		
	5000	+		11 (16 $\pm$ 7.6)	25 (25 $\pm$ 7.6)	13 (13 $\pm$ 7.6)		
Positive control	Chemical Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		AP2 0.01	SA 0.5	AP2 0.01	AP2 0.1	9AA 80	
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate							
Positive control	Chemical Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		2AA 1	2AA 2	2AA 10	2AA 0.5	2AA 2	
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate			265 (273 $\pm$ 22.5)	274 (274 $\pm$ 22.5)	250 (250 $\pm$ 22.5)		

AP2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene  
 \*:Purity was above 99.5%

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の  
チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In vitro Chromosomal Aberration Test of  
2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて検討した。

1) 細胞増殖抑制試験

直接法における50%増殖抑制濃度は約2.0 mg/mlであった。代謝活性化法では、いずれの処理濃度群 (0.08~2.50 mg/ml) においても、50%をこえる増殖抑制作用は観察されなかった。

従って、染色体異常試験において、直接法では2.0 mg/ml、代謝活性化法では2.2 mg/ml (10 mM) の処理濃度を高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

2) 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、高濃度群において染色体の構造異常の誘発作用が認められた。また、代謝活性化法においては、S 9mix存在下の高濃度群において、染色体異常の誘発作用が認められた。

しかしながら、高濃度群ではいずれもpHが低下し、染色体異常誘発にはpHの低下による影響も考えられる。

3) 結論

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸は、今回実施した試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発したが、pHの低下による影響も考えられることから、更に詳細な実験を行う必要があると思われる。

緒言

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

この試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号) およびOECDガイドライン: 473に準拠し、化学物質GLP (昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号) に基づいて実施したものである。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク (JCRB) から入手 (1988年2月、入手時: 継代4代) したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清 (FCS; J.R. Scientific、ロット番号C019407) を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

3. 培養条件

$2 \times 10^4$ 個のCHL細胞を、培養液 5mlを入れたシャーレ (径6 cm, Corning) に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) 内で培養した。

4. 被験物質

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸 (CAS No. 88-53-9、ロット番号: 78454、大日本インキ化学工業 (株) 製造、(社) 日本化学工業協会提供) は白色の粉末で、DMSO (ジメチルスルホキシド) に約125 mg/mlまで可溶で、水には溶けない。分子式 C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>ClNO<sub>2</sub>S、分子量221.5の物質で、純度は99.5%である (大日本インキ化学工業 (株) 資料)。本実験では被験物質が水に不溶であることから、溶媒として0.5% CMC Na (カルボキシメチルセルロースナトリウム) 溶液を用いた。原体の安定性に関しては情報は得られなかったが、秦野研究所分析化学研究室で実施した溶媒中での安定性試験では、5.00~22.0 mg/mlの濃度範囲で3時間は安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。原体を0.5% CMC Na溶液 (ナカライテスク (株)、ロット番号: M9G8053) に懸濁して原液 (20、22または25 mg/ml) を調製し、ついで原液を0.5% CMC Na溶液で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、全ての試験において培養液の10% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85%以上) の値であった。

## 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。

被験物質のCHL細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（オリンパス）を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、直接法における50%増殖抑制濃度は約2.0 mg/ml程度であった。代謝活性化法においては、処理した濃度範囲（0.08～2.50 mg/ml）において50%をこえる増殖抑制は観察されなかった（Fig.1）。

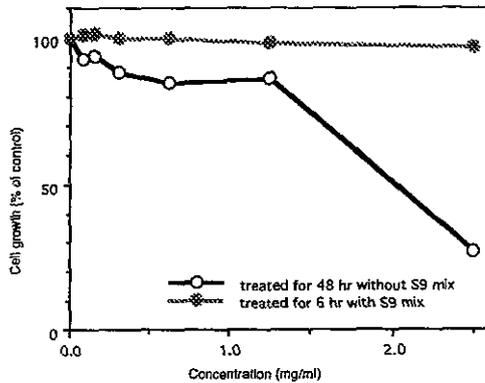


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid in CHL cells

## 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、直接法（24および48時間連続処理）では2.0 mg/ml、代謝活性化法（6時間処理後18時間培養）では10 mMにあたる2.2 mg/ml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。

## 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。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製し、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。ギムザ染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

## 9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのシャーレから得られた異なる標本を、複数の観察者がそれぞれブラインドの状態で行った。

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<sup>3)</sup>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、フィッシャーの“Exact probability test”法により溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定を行った。

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が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。

## 結果および考察

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸を加えて24時間および48時間処理した低・中濃度群においては、いずれも染色体の構造異常の出現頻度に有意な増加は認められなかったが、高濃度群の24時間処理では観察した細胞の9%（gapを含む、 $p=5.62 \times 10^{-4}$ ）、48時間処理では11.5%（gapを含む、 $p=1.86 \times 10^{-3}$ ）に染色体の構造異常が誘発され陽性と判定された。倍数性細胞については、いずれの群においても有意な増加はみられなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した。

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸を加えてS9 mix非存在下で6時間処理した高濃度群において、染色体の構造異常の有意な増加（ $p=0.0337$ ）が認められたが、その頻度は3.5%と低く陰性であった。一方、S9 mix存在下の高濃度群では、観察細胞の約50%に構造異常が誘発され陽性となった。倍数性細胞については、いずれの群においても有意な増加はみられなかった。

被験物質処理において、pHの低下が観察されたので、後日、培養液のpHを測定したところ、溶媒対照群ではpH7.11～8.07の範囲であったが、直接法の高濃度群では、処理直後はpH6.37～6.59であった。また、代謝活性化法のS9 mix存在下の高濃度群では、処理直後でpH5.46～5.81まで低下した。

Moritaらは<sup>3,4)</sup>、pHの著しい変化は染色体異常を誘発することを報告している。従って、この試験の最終判定は陽性となったが、pHが著しく低下したため、染色体異常が誘発された可能性も考えられる。本実験の結果からは、誘発された染色体異常が検体そのものの染色体切断作用に基づくものか、それとも検体によるpHの低下に起因する二次的な影響によるものかは明確でない。染色体異常誘発の要因を見極めるためには、更に詳細な実験を行う必要があると思われる。

陽性対照として用いた直接法でのMC処理群、およびS9 mix存在下でのCPA処理群では染色体体交換（cte）や染色体体切断（ctb）などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

なお、本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

## 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編：“化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 1988.
- 2) 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, 1987.
- 3) T. Morita, et al., *Mutation Res.*, 225, 55 (1989)
- 4) T. Morita, et al., *Mutation Res.*, 240, 195(1990)

連絡先：試験責任者 田中憲穂

(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 : Tanaka, Norihiro

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan

Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid\*\* by direct method

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>		
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Control			200	2	3	0	0	0	0	0	0	5	1	5 ( 2.5 )	3 ( 1.5 )	0.50		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	2	1	0	0	0	0	0	0	3	0	3 ( 1.5 )	1 ( 0.5 )	0.00		
ACMBS	0.5	24	200	1	2	0	1	0	0	0	0	4	0	4 ( 2.0 )	3 ( 1.5 )	0.38	-	-
ACMBS	1.0	24	200	0	2	0	1	1	0	0	0	4	0	4 ( 2.0 )	4 ( 2.0 )	0.00	-	-
ACMBS	2.0	24	200	5	8	8	1	0	1	0	0	23	0	18* ( 9.0 )	15* ( 7.5 )	0.25	±	-
MC	0.00005	24	200	6	18	44	0	0	6	0	0	74	0	54* ( 27.0 )	51* ( 25.5 )	0.25	+	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	3	1	1	2	0	0	0	0	7	0	7 ( 3.5 )	4 ( 2.0 )	0.38		
ACMBS	0.5	48	200	2	2	0	0	0	0	0	0	4	0	3 ( 1.5 )	2 ( 1.0 )	0.25	-	-
ACMBS	1.0	48	200	3	1	0	0	3	0	0	0	7	0	7 ( 3.5 )	4 ( 2.0 )	0.25	-	-
ACMBS	2.0	48	200	2	10	14	0	0	1	0	0	27	0	23* ( 11.5 )	21* ( 10.5 )	0.00	+	-
MC	0.00005	48	200	5	42	76	5	5	8	0	0	141	2	91* ( 45.5 )	87* ( 43.5 )	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.), f : fragment (deletion), 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 : mytomycin C. 1) 0.5 % carboxymethyl cellulose sodium 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

\* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 99.5%.

Table 2 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid\*\* by metabolic activation method

Group	Concentration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0.25		
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0.00		
ACMBS	0.55	-	6-(18)	200	1	1	2	1	0	0	0	5	0	5 ( 2.5 )	4 ( 2.0 )	0.38	-	-
ACMBS	1.1	-	6-(18)	200	3	2	1	0	0	0	0	6	0	6 ( 3.0 )	3 ( 1.5 )	0.13	-	-
ACMBS	2.2	-	6-(18)	200	1	4	4	1	0	2	0	12	0	7* ( 3.5 )	6* ( 3.0 )	0.63	-	-
CPA	0.005	-	6-(18)	200	2	0	0	2	0	0	0	4	0	3 ( 1.5 )	1 ( 0.5 )	0.25	-	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	2	0	0	0	1	0	0	3	0	3 ( 1.5 )	1 ( 0.5 )	0.13		
ACMBS	0.55	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.00	-	-
ACMBS	1.1	+	6-(18)	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	4 ( 2.0 )	0 ( 0.0 )	0.00	-	-
ACMBS	2.2	+	6-(18)	200	12	94	148	0	0	4	230	488	0	104* ( 52.0 )	100* ( 50.0 )	0.50	+	-
CPA	0.005	+	6-(18)	200	18	108	265	9	3	10	160	573	0	168* ( 84.0 )	166* ( 83.0 )	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.), f : fragment (deletion), 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. 1) 0.5 % carboxymethyl cellulose sodium 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

\* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 99.5%.

## Single Dose Toxicity Test of 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonane in Rats

### 要約

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンの急性経口投与毒性試験を雌雄のSprague-Dawley系 (Crj:CD) ラット計20匹を用いて実施した。なお、投与量は、雌雄とも0 (溶媒対照群) および2000 mg/kgとした。

その結果、雌雄とも、溶媒対照群および2000 mg/kg投与群に死亡例はみられず、また、投与後の一般状態の変化も、溶媒として用いたコーンオイルの大量投与に起因すると思われる一過性の下痢便あるいは軟便の排泄がみられた以外には、異常は認められなかった。投与後の体重は、溶媒対照群、2000 mg/kg投与群ともに順調に増加し、15日目に行った剖検においても各器官・組織に異常所見は認められなかった。

以上の結果から、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける経口投与によるLD<sub>50</sub>値は、雌雄とも2000 mg/kgを上回る量と推定された。

### 緒言

既存化学物質の安全性評価の一環として、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける急性経口投与毒性試験を実施した。

### 方法

#### 1. 被験物質および投与検体

本試験の被験物質として、(社)日本化学工業協会から提供された2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナン [CAS No.: 4390-04-9, ロット番号: AU02 (東京化成工業(株)製)、無色透明の液体、比重: 0.78、純度: 99.9%] を用いた。

投与に際して、比重を考慮し、被験物質を25.6% (v/v) の濃度になるようコーンオイルに混和し、投与検体とした。

なお、この方法に従って調製された2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンの安定性試験では、コーンオイルに混和して調製した2.56および25.6% (v/v) 溶液中の被験物質は、室温遮光の条件下で7日間は安定であることが確認された。また、今回の試験で使用した溶液中の平均被験物質含量は、所定濃度の97.9%であった。

#### 2. 動物および飼育方法

生後4週で購入した雌雄のSprague-Dawley系ラット (Crj:CD; SPF、日本チャールス・リバー(株)、厚木飼育センター生産) を7日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各10匹を試験に供した。投与時体重は、雌が98.2~109.5 g、雄が107.7~120.1 gであった。全飼育期間を通じて、動物を金属製金網床ケージ (220 W×270 D×190 H mm、日本ケージ(株)製) に1匹ずつ収容し、温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数約15回/時間、照明12時間 (7~19時点灯) に設定された飼育室内 (バリアーシステム) で飼育した。動物には、投与前約18時間と投与後約3時間の絶食期間を除く全飼育期間を通じて固型飼料 (CE-2、日本クレア(株)) を自由に摂取させ、また、飲料水としては、全飼育期間を通じて水道水を自由に摂取させて維持管理した。

#### 3. 群分けおよび投与方法

群分けは、無作為選択により行い、投与は以下の要領で行った。即ち、雌雄ともあらかじめ約18時間の絶食を行った後、1群5匹からなる2群に分け、体重100 g当たり1 mlの割合でラット用胃管を用いて強制経口投与した。本試験に先立って実施した1群3匹の雄ラットを用いた予備試験の結果、500、1000および2000 mg/kg投与群では、いずれも死亡例は認められなかったため、本試験では、雌雄とも被験物質の投与用量を2000 mg/kgとし、他の1群 (対照群) には溶媒 (コーンオイル) のみを投与した。

#### 4. 観察および病理学的検査

投与日 (1日目) においては、投与直後から約2時間まで継続して、また、それ以降6時間までは、1ないし2時間に1回の頻度で各動物の一般状態と死亡例の有無を観察した。2日目から15日目には、毎日1回動物の状態を観察した。また、投与直前、2、4、8、11および15日目に体重の測定を行い、各群ごとに平均値と標準偏差を求めた。15日目には各動物をペントバルビタール・ナトリウム麻酔下で放血屠殺した後、病理解剖を行い、雌雄とも2000 mg/kg投与群の各1例の主要な器官・組織を10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定し保存した。

試験結果および考察

1. 死亡率およびLD<sub>50</sub>値

雌雄とも、いずれの投与群にも14日間の観察期間中に死亡例は認められなかった。従って、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナン<sup>50</sup>のラットにおける経口投与によるLD<sub>50</sub>値は、雌雄とも2000 mg/kgを上回る量と推定された。

2. 一般状態の変化

投与後約30分から4時間の間に一過性の下痢便あるいは軟便の排泄が、溶媒対照群の雌雄の全例、2000 mg/kg投与群の雌の5例中3例および雄の5例中4例に認められた。しかし、いずれも、それ以降は正常便となり、観察終了時まで一般状態に異常はみられなかった。

3. 体重の変化 (Table 1)

雌雄とも、いずれの投与群においても体重の増加抑制はみられず、観察期間中の体重増加は順調であった。

4. 病理学的検査所見

15日目に屠殺剖検を行った結果、雌雄とも溶媒対照群および2000 mg/kg投与群のいずれの動物にも、肉眼的変化は認められなかった。

なお、肉眼的観察において、病理組織学的検査を要すると思われる変化がみられなかったため、病理組織学的検査は行わなかった。

以上のように、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける急性経口投与毒性試験を行った結果、雌雄とも溶媒対照群および2000 mg/kg投与群のいずれにも死亡例はみられず、投与後の一般状態の変化として、いずれの投与群にも、一過性の下痢便あるいは軟便の排泄がみられた以外に異常は認められなかった。一般状態においてみられた一過性の下痢便あるいは軟便の排泄については、一般に大量の植物油を経口投与すると、一過性の下痢便の排泄がみられることが知られており、溶媒として用いたコーンオイル<sup>51</sup>に起因するものと考えられる。

以上の結果から、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける経口投与によるLD<sub>50</sub>値は、雌雄とも2000 mg/kgを上回る量と推定される。

文献

- 1) 白須泰彦、吐山豊秋編 "新毒性試験法—方法と評価—," リアライズ社, 東京, 1985, p.46.

連絡先: 試験責任者 今井清  
(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 : Imai, Kiyoshi  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan  
Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Body weight changes in rats after single oral administration of 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane

Sex	Group	Number of treated rats	Number of dead rats	Body weight (g)					
				Initial	2	4	8	11	Final
Female	Control	5	0	103.1 ±4.2	122.6 ±4.1	136.7 ±3.8	151.9 ±5.6	163.6 ±7.1	176.7 ±8.5
	2000 mg/kg	5	0	102.0 ±3.5	120.8 ±8.1	135.3 ±5.2	149.5 ±5.3	159.8 ±4.1	174.7 ±3.7
Male	Control	5	0	115.2 ±3.5	139.5 ±5.8	164.8 ±7.2	202.9 ±13.2	231.0 ±14.9	269.9 ±19.8
	2000 mg/kg	5	0	112.4 ±5.0	136.1 ±7.1	159.7 ±8.4	198.0 ±11.7	224.3 ±12.6	262.5 ±13.1

Body weight: Mean ± S.D.

## 2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける 28日間反復経口投与毒性試験（回復14日間）

### Twenty-eight Day Repeat Dose Toxicity Test of 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonane in Rats

#### 要約

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンの28日間反復経口投与毒性試験（回復14日間）を雌雄のSprague-Dawley系（Crj:CD）ラットを用いて実施した。投与量は、0（溶媒対照群）、100、300および1000 mg/kgとした。雌雄とも溶媒対照群および1000 mg/kg投与群では1群10匹、100および300 mg/kg投与群では1群5匹を使用し、このうち溶媒対照群および1000 mg/kg投与群の各群5匹については、14日間の回復試験を行った。

その結果、いずれの投与群においても死亡例は認められなかった。300 mg/kg以上の投与群では、肝臓の絶対重量あるいは相対重量が増加し、300 mg/kg投与群の雄および1000 mg/kg投与群の雌雄では、小葉中心部肝細胞の腫脹がみられる例があった。また、300 mg/kg以上の投与群の雄において、トリグリセライド濃度の減少がみられたほか、1000 mg/kg投与群の雄において、プロトンピン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。その他、300 mg/kg以上の投与群の多くの例では、投与第2週以降に投与直後の流涎が認められた。100 mg/kg投与群では、投与第2週以降に投与直後の流涎が少数例に認められたが、その他には被験物質投与に起因すると思われる変化は認められなかった。

1000 mg/kg投与群について行った14日間の回復試験では、投与期間終了時にみられた小葉中心部肝細胞の腫脹は認められなかった。また、雄においては、肝臓の相対重量の増加、プロトンピン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の延長が引き続き認められたが、いずれも投与期間終了時と比較して、その程度は軽減する傾向にあった。

これらの結果から、本試験条件下における2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンの無影響量は、雌雄とも100 mg/kg以下と推察された。

#### 緒言

「OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査」事業の一環として、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける28日間反復投与毒性試験（回復14日間）を実施した。

#### 方法

##### 1. 被験物質および投与検体の調製

本試験の被験物質として、(社)日本化学工業協会から提供された2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナン [CAS No.: 4390-04-09、ロット番号: AU02（東京化成工業(株)製）、無色透明の液体、比重: 0.78、純度: 99.9%] を用いた。

被験物質を25.6% (v/v) の濃度になるようコーンオイルに混和し、さらに、この25.6%溶液を7.68および2.56% (v/v) となるよう段階希釈して投与検体を調製し、投与時まで室温遮光の条件下で保管した。投与検体の調製は、1週間に1回の頻度で行った。

なお、被験物質の安定性試験の結果、2.56および25.6% (v/v) コーンオイル溶液中の被験物質は、室温遮光の条件下で7日間は安定であることが確認された。また、今回の試験で使用した投与検体について、含量試験を実施した結果、各投与検体中の被験物質の平均含量は、所定濃度の96.8～98.0%であった。

##### 2. 動物および飼育方法

生後4週で購入した雌雄のSprague-Dawley系ラット（Crj:CD;SPF、日本チャールス・リバー(株)、厚木飼育センター生産）を8日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各30匹を試験に供した。投与開始時体重は、雌が115.9～131.6 g、雄が143.1～160.0 gであった。全飼育期間を通じて、動物を金属製金網床ケージ（220 W×270 D×190 H mm、日本ケージ(株)製）に1匹ずつ収容し、温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数約15回/時間、照明12時間（7～19時点灯）に設定された飼育室内（バリアーシステム）で飼育した。動物には、剖検前約18～24時間の絶食期間を除き、固型飼料（CE-2、日本クレア(株)）を自由に摂取させ、また、飲料水として、全飼育期間を通じて水道水を自由に摂取させて維持管理した。

##### 3. 群および群分け

先に秦野研究所で実施した本被験物質2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける急性経口投与毒性試験<sup>1)</sup>で雌雄のSprague-Dawley系ラットに本被験物質を2000 mg/kg投与した結果、死亡例はみられず、また、被験物質投与に起因すると思われる一般状態および剖検特に異常所見は認められなかった。従って、本試験における投与量は、化審法ガイドライン「ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験」を参考にして、雌雄とも最高投与用量を1000 mg/kgとし、以下公比約3で除して300およ

## 28日間反復投与毒性試験

び100 mg/kgの各投与用量を設定した。なお、1群は、溶媒対照群としてコーンオイル投与群を設けた。

群分けは、投与開始前日の体重に基づいて、体重別層化無作為抽出法により行った。各群の匹数および動物番号を以下に示す。

群 (投与液の濃度)	匹数 (動物番号)	
	雌	雄
溶媒対照群 (コーンオイル)	10 (1~10)	10 (31~40)
被験物質 100 mg/kg投与群 (2.56% v/v)	5 (11~15)	5 (41~45)
被験物質 300 mg/kg投与群 (7.68% v/v)	5 (16~20)	5 (46~50)
被験物質 1000 mg/kg投与群 (25.6% v/v)	10 (21~30)	10 (51~60)

### 4. 投与方法

本試験の投与経路は、化審法ガイドライン「ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験」に従い経口投与とした。

投与は、1日1回、28日間、ラット用胃管を用いて強制的に行い、投与液量は、雌雄とも5 ml/kgとして、各投与時に最も近い体重値を基準にして算出した。なお、雌雄とも溶媒対照群および最高投与用量群の各5匹については、投与期間終了後、14日間の回復試験期間を設けた。

### 5. 検査項目

#### 1) 一般状態の観察

投与期間および回復試験期間を通じて、死亡例の有無を調べたほか、全例について、一般状態を毎日1回 (投与期間中は投与後) 観察した。

#### 2) 体重および摂餌量の測定

全例について、投与開始週では、投与開始直前と投与第4日、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は、1週に2回の頻度で体重を測定し、投与期間あるいは回復試験期間終了日および剖検口にも体重の測定を行った。また、全例について、投与開始週では投与開始日に、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は、1週に1回の頻度で1日当たりの摂餌量の測定を行った。

#### 3) 尿検査

各群とも動物番号の若い方から5匹を選択し、投与期間終了週 (投与第23日~24日) および回復試験期間終了週 (回復第9日~10日) に、動物を約24時間代謝ケージに収容して採尿し、以下の項目について検査した。なお、pH、潜血、総蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンおよび沈渣の検査には、代謝ケージに収容して約4時間以内に採取された新鮮尿を用いた。

項目	測定法および使用器具・製品	
尿量	計量	天秤 (尿重量を比重で除す)
色調、混濁	視診	
比重	糖度計	N-1 (アタゴ)
pH、潜血、総蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン	試験紙法	マルティステックSG/エームス・クリニテックシステム (マイルス三共)
沈渣	光学顕微鏡	

#### 4) 血液学的検査

投与期間終了時および回復試験期間終了時の剖検に先立ち、全例について、約18ないし24時間絶食させたのち、ベントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりEDTAを抗凝固剤として採血し、以下の項目について検査した。なお、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の測定には、上記の採血とは別に、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血した血液を用いた。

項目	測定法	使用機器
赤血球数 (RBC)	自動 (電気抵抗法)	Coulter Counter Model S-PLUS IV (コルターエレクトロニクス社)
白血球数 (WBC)	〃 (〃)	〃
血色素濃度 (Hb)	〃 (吸光度法)	〃
平均赤血球容積 (MCV)	〃 (電気抵抗法)	〃
ヘマトクリット値 (Ht)	〃 ( $0.001 \times \text{RBC} \times \text{MCV}$ )	〃
平均赤血球血色素量 (MCH)	〃 ( $1000 \times \text{Hb} / \text{RBC}$ )	〃
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	〃 ( $100 \times \text{Hb} / \text{Ht}$ )	〃
血小板数	〃 (電気抵抗法)	〃
白血球分類	視算 (静脈血塗抹標本、 Wright-Giemsa 染色)	光学顕微鏡
網状赤血球比率	Brecher法	〃
プロトロンビン時間 (PT)	自動 (シンプラスチンオート試薬)	CA-3000 (東亜医用電子)
活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	自動 (プラテリンAオート試薬)	〃

## 5) 血液生化学的検査

全例について、血液学的検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して以下の項目について検査を行った。

項目	測定法	使用機器
総蛋白濃度	ビウレット法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシュ)
アルブミン濃度	BCG法	〃
総コレステロール濃度	COD・DAOS法	〃
ブドウ糖濃度	グルコキナーゼ・G6PDH法	〃
尿素窒素濃度 (BUN)	ウレアーゼ・GLDH法	〃
クレアチニン濃度	Jaffe法	〃
アルカリフォスファターゼ活性 (ALP)	p-ニトロフェニルリン酸基質法	〃
GOT活性	SSCC法	〃
GPT活性	〃	〃
LDH活性	Wroblewski-La Due法	〃
カルシウム濃度	OCPC法	〃
ナトリウム濃度	イオン電極法	Na-K-Cl アナライザーIT-3型 (常光)
カリウム濃度	〃	〃
塩素濃度	電量滴定法	〃
無機リン濃度	モリブデン酸直接法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシュ)
トリグリセライド濃度	GPO・DAOS法	〃
$\gamma$ -GTP活性	$\gamma$ -グルタミル-p-ニトロ アニリド基質法	〃
A/G比	計算	

## 6) 病理学的検査

全例について、上記の採血に引き続き、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、肝臓、腎臓、副腎、卵巣または精巣の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、各動物より摘出した脳、下垂体、眼球、甲状腺、上皮小体、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、

胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、卵巣または精巣、膀胱、大腿骨骨髓および肉眼的変化のみられた器官については、0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン (pH 7.2) で固定し、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および剖検時に肉眼的変化の認められた器官について、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製した。組織学的検査は、雌雄とも投与期間終了時の溶媒対照群および1000 mg/kg投与群の心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副

腎について行い、さらに、被験物質投与に起因したと考えられる病理組織学的変化の認められた肝臓については、100、300 mg/kg投与群および回復試験期間終了時の溶媒対照群および1000 mg/kg投与群についても実施した。その他、投与期間終了時の剖検時に肉眼的変化の認められた一部の例の顎下リンパ節、皮膚、胸腺、肺、胃、子宮および精巣について、また、回復試験期間終了時の剖検時に肉眼的変化の認められた一部の例の胃、肺、腎臓および胸腺について組織学的検査を実施した。

## 6. 統計処理法

体重、摂餌量、半定量検査を除く尿検査および定期解剖例の血液学的検査、血液生化学的検査ならびに器官重量の値について、各群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群の構成が溶媒対照群を含め3群以上ある場合は、Bartlettの方法による分散の均一性の検定（有意水準：5%）を行い、ついで、分散が均一な場合は、一元配置型の分散分析を行い、有意（有意水準：5%）の時はDunnnettあるいはSchefféの方法で多重比較を行った。一方、分散が均一でない場合はKruskal-Wallisの順位検定を行い、有意（有意水準：5%）ならばDunnnett型あるいはScheffé型の方法で多重比較を行った。また、試験群が溶媒対照群を含め2群となる場合には、溶媒対照群と被験物質投与群の各平均値の差の検定は、等分散であればStudentのt検定、不等分散であればAspin-Welch検定を行った。

## 結果

### 1. 一般状態

投与期間および回復試験期間中に、溶媒対照群を含む各群に死亡例は認められなかった。一般状態の変化としては、溶媒対照群を含む一部の例で、投与直後に一過性の流涎がみられ、その多くは投与第2週以降に認められた。特に雌雄とも1000 mg/kg投与群では、投与を重ねるに従って発生例数が増加する傾向があり、まれに、投与時に保定するだけで観察されることもあった。なお、各群の投与期間中に流涎のみられた例数は、溶媒対照群の雌の2例と雄の1例、100 mg/kg投与群の雌の1例と雄の3例、300 mg/kg投与群の雌雄各3例および1000 mg/kg投与群の雌雄全例であった。その他、呼吸音の異常および頸部周囲皮膚の痂皮、潰瘍あるいは脱毛などが散発的にみられたが、いずれも用量依存性は認められなかった。

### 2. 体重 (Fig.1)

各群の平均体重は、投与期間および回復試験期間中を通して、溶媒対照群と被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。

### 3. 摂餌量 (Fig.2)

各群の平均摂餌量は、投与期間および回復試験期間中を通して、溶媒対照群と被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。

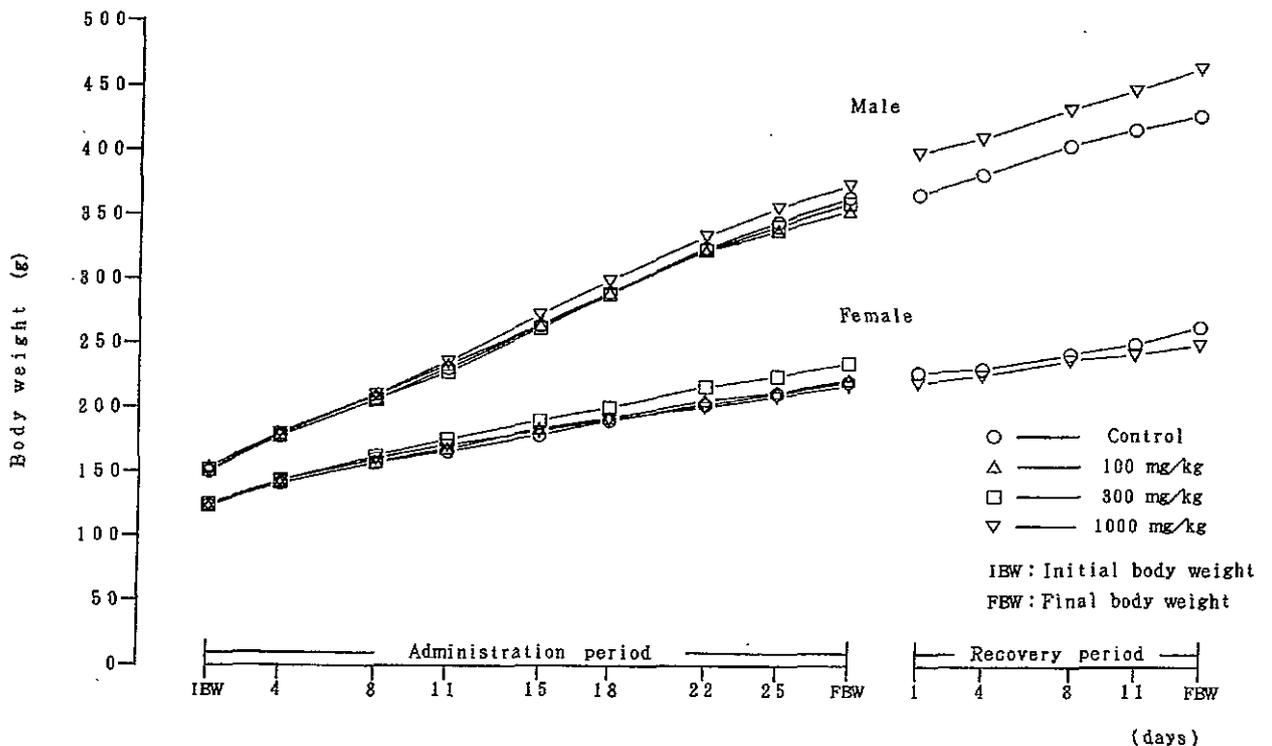


Fig 1 Body weight changes in rats administered with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

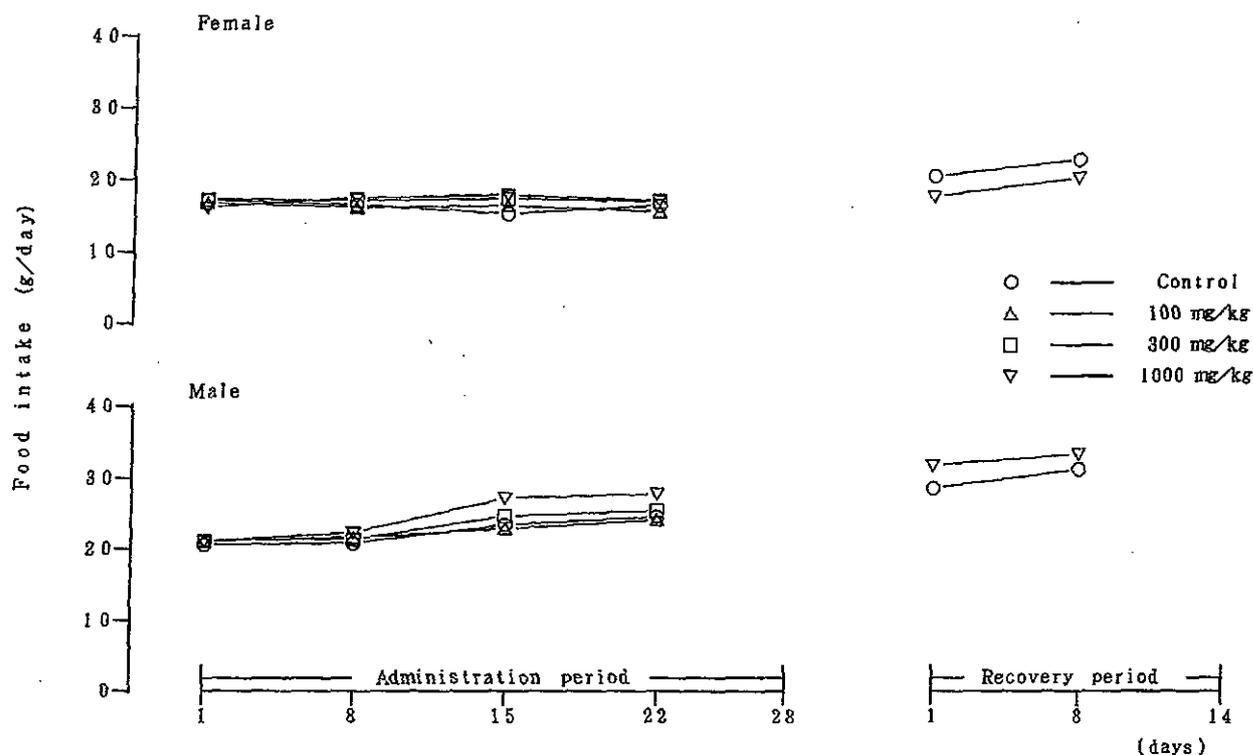


Fig 2 Food intake in rats administered with 2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-heptamethylnonane for 28 days

#### 4. 尿検査

投与期間終了週の検査では、100 mg/kg投与群の雌および300 mg/kg投与群の雄の各1例でビリルビンが陽性であり、また、300 mg/kg投与群の雌および1000 mg/kg投与群の雄の各1例では尿沈渣中に上皮細胞がみられた。その他、一部の例で蛋白、ケトン体、ウロビリノーゲンが陽性であり、尿沈渣中に結晶の認められる例もあったが、いずれも、その出現例数あるいは程度に溶媒対照群と被験物質投与群の間で用量に依存した差はみられなかった。なお、尿量、比重、混濁度、色調、pHには溶媒対照群と被験物質投与群の間に著しい差はなく、いずれの個体においても、糖、潜血、赤血球、円柱および白血球は検出されなかった。

回復試験期間終了週の検査では、1000 mg/kg投与群の雄の1例で糖および潜血反応が陽性であったほか、雄の他の1例で潜血反応が陽性となった。一方、溶媒対照群と1000 mg/kg投与群の間で、尿量、比重、混濁度、色調、pHに著しい差はなく、また、蛋白、ケトン体、ウロビリノーゲン、結晶および上皮細胞の出現頻度あるいは程度にも両群間で差は認められなかった。なお、いずれの個体においても、赤血球、円柱および白血球は観察されなかった。

#### 5. 血液学的検査 (Table 1-1~1-3)

投与期間終了時の検査では、300 mg/kg投与群の雄の網状赤血球比率が有意に減少し、1000 mg/kg投与群の雄では、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間に有意な延長が認められた。その他の検査項目では、溶媒対照群と被験物質投与群の間に有意な差は認められなかった。

回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群の雄のプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間に有意な延長がみられたが、投与期間終了時に比較すると、その程度は軽減される傾向にあった。さらに、血小板数が有意に増加したが、その他の検査項目では、溶媒対照群と1000 mg/kg投与群の間に有意な差は認められなかった。

#### 6. 血液生化学的検査 (Table 2-1~2-3)

投与期間終了時の検査では、溶媒対照群と比較すると、トリグリセライド濃度が100 mg/kg投与群の雌で有意に増加し、300および1000 mg/kg投与群の雄では有意に低下した。また、無機リン濃度は、300 mg/kg投与群の雌で有意に増加し、100および300 mg/kg投与群の雄では有意に低下した。さらに、GPT活性は、1000 mg/kg投与群の雌で有意に上昇し、カリウム濃度および塩素濃度は、1000 mg/kg投与群の雄でいずれも有意に低下した。その他の項目では、溶媒対照群と被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。

回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg投与群の雌でA/G比が有意に低下し、1000 mg/kg投与群の雄でLDH活性が有意に上昇したが、その他の項目では、溶媒対照群と1000 mg/kg投与群の間に有意差は認められなかった。

Table 1-1 Hematological findings in rats administered with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

Sex	Group	Red blood cells						
		Count ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	MCV ( $\mu^3$ )	MCH (pg)	MCHC (%)	Reticulocyte (%)
Female	Control	(5) 638 $\pm 34$	(5) 13.4 $\pm 0.7$	(5) 37.7 $\pm 1.9$	(5) 59.2 $\pm 1.3$	(5) 21.0 $\pm 0.5$	(5) 35.4 $\pm 0.6$	(5) 2.1 $\pm 0.7$
	100 mg/kg	(4) 657 $\pm 54$	(4) 13.8 $\pm 1.0$	(4) 38.4 $\pm 2.7$	(4) 58.5 $\pm 1.5$	(4) 21.0 $\pm 0.5$	(4) 35.9 $\pm 0.1$	(5) 1.9 $\pm 0.7$
	300 mg/kg	(5) 608 $\pm 29$	(5) 13.0 $\pm 0.7$	(5) 36.0 $\pm 1.7$	(5) 59.2 $\pm 1.0$	(5) 21.4 $\pm 0.5$	(5) 36.1 $\pm 0.6$	(5) 2.2 $\pm 0.9$
	1000 mg/kg	(5) 638 $\pm 59$	(5) 13.6 $\pm 1.1$	(5) 37.7 $\pm 3.4$	(5) 59.1 $\pm 1.2$	(5) 21.3 $\pm 0.6$	(5) 36.0 $\pm 0.4$	(5) 1.7 $\pm 0.6$
Male	Control	(5) 683 $\pm 41$	(5) 14.3 $\pm 1.2$	(5) 41.4 $\pm 2.8$	(5) 60.6 $\pm 0.6$	(5) 20.9 $\pm 0.5$	(5) 34.4 $\pm 0.7$	(5) 3.1 $\pm 0.3$
	100 mg/kg	(5) 662 $\pm 40$	(5) 14.1 $\pm 0.9$	(5) 40.1 $\pm 1.8$	(5) 60.6 $\pm 1.6$	(5) 21.3 $\pm 0.7$	(5) 35.2 $\pm 0.9$	(5) 2.4 $\pm 0.3$
	300 mg/kg	(5) 635 $\pm 24$	(5) 13.5 $\pm 0.6$	(5) 38.9 $\pm 1.2$	(5) 61.3 $\pm 0.5$	(5) 21.3 $\pm 0.3$	(5) 34.8 $\pm 0.7$	(5) 2.2* $\pm 0.2$
	1000 mg/kg	(5) 630 $\pm 12$	(5) 13.4 $\pm 0.6$	(5) 38.4 $\pm 0.7$	(5) 61.0 $\pm 1.4$	(5) 21.3 $\pm 0.8$	(5) 34.9 $\pm 0.8$	(5) 2.8 $\pm 0.9$

Parameter : Mean  $\pm$  S.D.  
( ) : N\* : Significantly different from control,  $p < 0.05$ 

Table 1-2 Hematological findings in rats administered with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

Sex	Group	White blood cells						Platelet		PT (sec)	APTT (sec)
		Count ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Band	Segs.	Eos.	Baso.	Mono.	Lymph.	Count ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )		
Female	Control	(5) 50 $\pm 20$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 12 $\pm 10$	(5) 0 $\pm 1$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 1 $\pm 1$	(5) 87 $\pm 11$	(5) 114.9 $\pm 14.7$	(5) 15.4 $\pm 1.1$	(5) 21.8 $\pm 1.9$
	100 mg/kg	(4) 45 $\pm 13$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 8 $\pm 6$	(5) 1 $\pm 1$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 1 $\pm 0$	(5) 90 $\pm 5$	(4) 106.9 $\pm 21.5$	(5) 15.2 $\pm 0.8$	(5) 21.3 $\pm 0.7$
	300 mg/kg	(5) 47 $\pm 12$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 6 $\pm 1$	(5) 1 $\pm 1$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 1 $\pm 1$	(5) 92 $\pm 3$	(5) 106.6 $\pm 4.7$	(5) 15.8 $\pm 1.7$	(5) 22.1 $\pm 2.0$
	1000 mg/kg	(5) 44 $\pm 17$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 11 $\pm 6$	(5) 0 $\pm 1$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 2 $\pm 2$	(5) 87 $\pm 7$	(5) 105.9 $\pm 10.1$	(5) 17.0 $\pm 2.5$	(5) 23.4 $\pm 1.3$
Male	Control	(5) 69 $\pm 10$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 8 $\pm 5$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 1 $\pm 2$	(5) 90 $\pm 5$	(5) 110.5 $\pm 15.3$	(5) 22.0 $\pm 1.7$	(5) 27.8 $\pm 1.5$
	100 mg/kg	(5) 64 $\pm 27$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 10 $\pm 6$	(5) 0 $\pm 1$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 2 $\pm 2$	(5) 88 $\pm 7$	(5) 106.7 $\pm 12.5$	(5) 26.3 $\pm 3.2$	(5) 29.7 $\pm 1.6$
	300 mg/kg	(5) 79 $\pm 27$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 6 $\pm 2$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 1 $\pm 1$	(5) 93 $\pm 2$	(5) 125.5 $\pm 16.7$	(5) 25.9 $\pm 3.8$	(5) 30.2 $\pm 2.2$
	1000 mg/kg	(5) 84 $\pm 23$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 20 $\pm 28$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 1 $\pm 1$	(5) 79 $\pm 27$	(5) 121.0 $\pm 6.6$	(5) 37.3** $\pm 6.6$	(5) 34.5** $\pm 4.1$

Parameter : Mean  $\pm$  S.D.

( ) : N

\*\* : Significantly different from control,  $p < 0.01$

Table 1-3 Hematological findings in rats after 14 days withdrawal following administration of 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

Sex	Group	Red blood cells							Reticulocyte (%)
		Count ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	MCV ( $\mu^3$ )	MCH (pg)	MCHC (%)		
Female	Control	(5) 746 $\pm 48$	(5) 15.0 $\pm 1.0$	(5) 43.5 $\pm 3.1$	(5) 58.3 $\pm 2.0$	(5) 20.2 $\pm 0.6$	(5) 34.6 $\pm 0.7$	(5) 1.9 $\pm 0.4$	
	1000 mg/kg	(5) 720 $\pm 15$	(5) 14.7 $\pm 0.4$	(5) 42.7 $\pm 1.4$	(5) 59.2 $\pm 1.2$	(5) 20.5 $\pm 0.5$	(5) 34.6 $\pm 0.7$	(5) 1.6 $\pm 0.4$	
Male	Control	(5) 739 $\pm 40$	(5) 15.1 $\pm 0.7$	(5) 43.6 $\pm 2.0$	(5) 59.0 $\pm 1.8$	(5) 20.4 $\pm 0.8$	(5) 34.6 $\pm 0.4$	(5) 1.7 $\pm 0.4$	
	1000 mg/kg	(5) 731 $\pm 44$	(5) 14.9 $\pm 0.5$	(5) 43.6 $\pm 1.4$	(5) 59.8 $\pm 2.0$	(5) 20.4 $\pm 0.5$	(5) 34.1 $\pm 0.4$	(5) 1.9 $\pm 0.7$	

Sex	Group	White blood cells						Platelet	PT (sec)	APTT (sec)	
		Count ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Differentiation (%)					Count ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )			
		Band	Segs.	Eos.	Baso.	Mono.	Lymph.				
Female	Control	(5) 81 $\pm 0$	(5) 0 $\pm 2$	(5) 7 $\pm 0$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 0 $\pm 1$	(5) 1 $\pm 2$	(5) 92 $\pm 11.0$	(5) 108.7 $\pm 0.9$	(5) 16.0 $\pm 1.5$	(5) 23.0
	1000 mg/kg	(5) 68 $\pm 24$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 7 $\pm 5$	(5) 0 $\pm 1$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 1 $\pm 1$	(5) 91 $\pm 6$	(5) 108.4 $\pm 8.0$	(5) 15.1 $\pm 0.5$	(5) 22.1 $\pm 1.2$
Male	Control	(5) 77 $\pm 29$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 7 $\pm 3$	(5) 1 $\pm 1$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 2 $\pm 1$	(5) 90 $\pm 4$	(5) 102.7 $\pm 9.3$	(5) 22.5 $\pm 1.7$	(5) 28.4 $\pm 1.2$
	1000 mg/kg	(5) 85 $\pm 19$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 9 $\pm 5$	(5) 1 $\pm 1$	(5) 0 $\pm 0$	(5) 2 $\pm 2$	(5) 89 $\pm 6$	(5) 118.3* $\pm 5.0$	(5) 26.4** $\pm 1.5$	(5) 31.7* $\pm 2.9$

Parameter : Mean  $\pm$  S.D.      \* : Significantly different from control,  $p < 0.05$   
 ( ) : N                                \*\* : Significantly different from control,  $p < 0.01$

Table 2-1 Biochemical findings in rats administered with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

Sex	Group	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G ratio	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Tri-glyceride (mg/dl)	Inorg. phos. (mg/dl)
Female	Control	(5) 5.3 $\pm 0.3$	(5) 3.1 $\pm 0.2$	(5) 1.38 $\pm 0.23$	(5) 20 $\pm 3$	(5) 0.7 $\pm 0.0$	(5) 112 $\pm 17$	(5) 48 $\pm 9$	(5) 29 $\pm 4$	(5) 6.3 $\pm 0.5$
	100 mg/kg	(5) 5.4 $\pm 0.2$	(5) 3.2 $\pm 0.1$	(5) 1.52 $\pm 0.16$	(5) 19 $\pm 2$	(5) 0.7 $\pm 0.1$	(5) 115 $\pm 21$	(5) 61 $\pm 5$	(5) 41* $\pm 9$	(5) 7.4 $\pm 0.6$
	300 mg/kg	(5) 5.3 $\pm 0.3$	(5) 3.0 $\pm 0.2$	(5) 1.34 $\pm 0.08$	(5) 17 $\pm 2$	(5) 0.6 $\pm 0.0$	(5) 110 $\pm 12$	(5) 58 $\pm 5$	(5) 34 $\pm 10$	(5) 7.8* $\pm 0.6$
	1000 mg/kg	(5) 5.1 $\pm 0.3$	(5) 3.1 $\pm 0.2$	(5) 1.49 $\pm 0.23$	(5) 18 $\pm 3$	(5) 0.7 $\pm 0.1$	(5) 100 $\pm 11$	(5) 54 $\pm 16$	(5) 26 $\pm 6$	(5) 6.9 $\pm 1.1$
Male	Control	(5) 5.2 $\pm 0.2$	(5) 2.9 $\pm 0.2$	(5) 1.21 $\pm 0.09$	(5) 14 $\pm 2$	(5) 0.6 $\pm 0.0$	(5) 128 $\pm 8$	(5) 49 $\pm 11$	(5) 64 $\pm 18$	(5) 8.2 $\pm 0.6$
	100 mg/kg	(5) 4.8 $\pm 0.8$	(5) 2.8 $\pm 0.7$	(5) 1.33 $\pm 0.31$	(5) 13 $\pm 4$	(5) 0.5 $\pm 0.1$	(5) 119 $\pm 26$	(5) 41 $\pm 6$	(5) 44 $\pm 5$	(5) 6.9* $\pm 0.9$
	300 mg/kg	(5) 5.1 $\pm 0.1$	(5) 2.9 $\pm 0.1$	(5) 1.33 $\pm 0.07$	(5) 15 $\pm 2$	(5) 0.6 $\pm 0.0$	(5) 128 $\pm 20$	(5) 45 $\pm 11$	(5) 39* $\pm 5$	(5) 6.8** $\pm 0.6$
	1000 mg/kg	(5) 5.2 $\pm 0.3$	(5) 2.9 $\pm 0.2$	(5) 1.25 $\pm 0.08$	(5) 11 $\pm 4$	(5) 0.6 $\pm 0.0$	(5) 113 $\pm 21$	(5) 38 $\pm 6$	(5) 37** $\pm 5$	(5) 7.1 $\pm 0.3$

Parameter : Mean  $\pm$  S.D.      \* : Significantly different from control,  $p < 0.05$   
 ( ) : N                                \*\* : Significantly different from control,  $p < 0.01$

Table 2-2 Biochemical findings in rats administered with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

Sex	Group	Ca (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)	Alkaline phosphatase (U/l)	LDH (U/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	$\gamma$ -GTP (U/l)
Female	Control	(5) 8.8 $\pm 0.4$	(5) 139.7 $\pm 1.5$	(5) 4.11 $\pm 0.27$	(5) 104.7 $\pm 2.3$	(5) 239 $\pm 42$	(5) 136 $\pm 14$	(5) 20 $\pm 4$	(5) 69 $\pm 22$	(5) 0 $\pm 1$
	100 mg/kg	(5) 8.9 $\pm 0.1$	(5) 138.2 $\pm 2.4$	(5) 4.99 $\pm 1.55$	(5) 102.6 $\pm 0.7$	(5) 210 $\pm 51$	(5) 178 $\pm 58$	(5) 21 $\pm 3$	(5) 61 $\pm 9$	(5) 0 $\pm 1$
	300 mg/kg	(5) 9.0 $\pm 0.2$	(5) 140.4 $\pm 1.1$	(5) 4.01 $\pm 0.28$	(5) 103.8 $\pm 0.9$	(5) 196 $\pm 22$	(5) 100 $\pm 16$	(5) 16 $\pm 3$	(5) 53 $\pm 7$	(5) 1 $\pm 1$
	1000 mg/kg	(5) 8.8 $\pm 0.5$	(5) 139.8 $\pm 1.8$	(5) 3.88 $\pm 0.60$	(5) 102.9 $\pm 1.7$	(5) 215 $\pm 43$	(5) 158 $\pm 32$	(5) 30** $\pm 4$	(5) 67 $\pm 5$	(5) 1 $\pm 1$
Male	Control	(5) 8.8 $\pm 0.1$	(5) 141.3 $\pm 0.9$	(5) 3.93 $\pm 0.49$	(5) 103.3 $\pm 1.0$	(5) 371 $\pm 82$	(5) 128 $\pm 23$	(5) 26 $\pm 7$	(5) 59 $\pm 6$	(5) 0 $\pm 0$
	100 mg/kg	(5) 8.4 $\pm 1.5$	(5) 138.4 $\pm 7.0$	(5) 3.83 $\pm 0.27$	(5) 100.5 $\pm 4.3$	(5) 357 $\pm 77$	(5) 136 $\pm 76$	(5) 22 $\pm 4$	(5) 55 $\pm 5$	(5) 0 $\pm 0$
	300 mg/kg	(5) 8.9 $\pm 0.2$	(5) 140.6 $\pm 0.9$	(5) 3.67 $\pm 0.07$	(5) 102.4 $\pm 0.5$	(5) 357 $\pm 67$	(5) 127 $\pm 16$	(5) 25 $\pm 4$	(5) 60 $\pm 4$	(5) 0 $\pm 0$
	1000 mg/kg	(5) 9.0 $\pm 0.3$	(5) 141.1 $\pm 0.6$	(5) 3.51** $\pm 0.09$	(5) 100.8* $\pm 0.6$	(5) 347 $\pm 53$	(5) 193 $\pm 83$	(5) 30 $\pm 1$	(5) 59 $\pm 2$	(5) 0 $\pm 0$

Parameter : Mean  $\pm$  S.D.      \* : Significantly different from control,  $p < 0.05$   
 ( ) : N                              \*\* : Significantly different from control,  $p < 0.01$

Table 2-3 Biochemical findings in rats after 14 days withdrawal following administration of 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

Sex	Group	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G ratio	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Tri- glyceride (mg/dl)	Inorg. phos. (mg/dl)
Female	Control	(5) 5.6 $\pm 0.2$	(5) 3.2 $\pm 0.1$	(5) 1.35 $\pm 0.05$	(5) 17 $\pm 2$	(5) 0.7 $\pm 0.1$	(5) 125 $\pm 18$	(5) 59 $\pm 7$	(5) 59 $\pm 33$	(5) 5.7 $\pm 0.6$
	1000 mg/kg	(5) 5.4 $\pm 0.4$	(5) 3.0 $\pm 0.2$	(5) 1.25* $\pm 0.05$	(5) 19 $\pm 2$	(5) 0.6 $\pm 0.1$	(5) 119 $\pm 23$	(5) 57 $\pm 11$	(5) 40 $\pm 21$	(5) 6.0 $\pm 0.7$
Male	Control	(5) 5.4 $\pm 0.2$	(5) 2.8 $\pm 0.2$	(5) 1.04 $\pm 0.14$	(5) 18 $\pm 2$	(5) 0.6 $\pm 0.1$	(5) 130 $\pm 14$	(5) 48 $\pm 10$	(5) 64 $\pm 21$	(5) 7.1 $\pm 0.8$
	1000 mg/kg	(5) 5.5 $\pm 0.3$	(5) 2.7 $\pm 0.1$	(5) 0.97 $\pm 0.04$	(5) 19 $\pm 2$	(5) 0.7 $\pm 0.0$	(5) 146 $\pm 12$	(5) 60 $\pm 20$	(5) 59 $\pm 17$	(5) 7.3 $\pm 0.8$

Sex	Group	Ca (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)	Alkaline phosphatase (U/l)	LDH (U/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	$\gamma$ -GTP (U/l)
Female	Control	(5) 8.7 $\pm 0.2$	(5) 139.2 $\pm 0.9$	(5) 3.99 $\pm 0.22$	(5) 103.7 $\pm 0.7$	(5) 132 $\pm 20$	(5) 114 $\pm 13$	(5) 18 $\pm 1$	(5) 51 $\pm 5$	(5) 0 $\pm 0$
	1000 mg/kg	(5) 8.8 $\pm 0.3$	(5) 139.7 $\pm 1.0$	(5) 3.86 $\pm 0.39$	(5) 104.1 $\pm 1.4$	(5) 165 $\pm 31$	(5) 112 $\pm 14$	(5) 21 $\pm 5$	(5) 55 $\pm 6$	(5) 0 $\pm 1$
Male	Control	(5) 8.9 $\pm 0.2$	(5) 141.8 $\pm 0.6$	(5) 3.88 $\pm 0.17$	(5) 104.7 $\pm 1.8$	(5) 260 $\pm 29$	(5) 132 $\pm 36$	(5) 32 $\pm 6$	(5) 64 $\pm 9$	(5) 1 $\pm 1$
	1000 mg/kg	(5) 9.0 $\pm 0.2$	(5) 141.7 $\pm 0.8$	(5) 3.83 $\pm 0.17$	(5) 104.2 $\pm 1.0$	(5) 258 $\pm 41$	(5) 313* $\pm 134$	(5) 49 $\pm 39$	(5) 83 $\pm 24$	(5) 0 $\pm 1$

Parameter : Mean  $\pm$  S.D.      \* : Significantly different from control,  $p < 0.05$   
 ( ) : N

## 7. 病理学的検査

## 1) 器官重量 (Table 3-1~3-3)

投与期間終了時の剖検例では、100および300 mg/kg投与群の雌で脳の絶対重量が有意に増加した。また、300 mg/kg投与群の雌では、肝臓の絶対重量が、300 mg/kg投与群の雄では、肝臓の相対重量がそれぞれ増加し、1000 mg/kg投与群の雌雄とも、肝臓の絶対重量および相対重量が有意に増加した。その他の器官については、溶媒対照群と被験物質投与群の間に絶対重量および相対重量とも有意差は認められなかった。

回復試験期間終了時の剖検例では、1000 mg/kg投与群の雄で脳の絶対重量と肝臓の相対重量が有意に増加した。その他の器官については、溶媒対照群と1000 mg/kg投与群の間に絶対重量および相対重量とも有意差は認められなかった。

## 2) 剖検所見

投与期間終了時および回復試験期間終了時剖検例ともに、被験物質投与に起因すると思われる肉眼的変化は認められなかった。

## 3) 組織学的所見 (Table 4-1~4-3)

投与期間終了時屠殺例では、1000 mg/kg投与群の雌雄各4例と300 mg/kg投与群の雄の1例の肝臓に、小葉中心部肝細胞の腫脹がみられ、1000 mg/kg投与群の雄の1例では、肝細胞の壊死巣が認められた。また、溶媒対照群を含む各群で主に小葉周辺部肝細胞の脂肪変性、小肉芽巣の形成がみられたが、その発生頻度あるいは変化の程度に用量依存性は認められなかった。その他、肝臓の変化として、300 mg/kg投与群の雄の1例に限局性の肝細胞の脂肪変性があり、100 mg/kg投与群の雄の1例に出血が認められた。心臓では、1000 mg/kg投与群の雄の1例に心筋細胞の変性が認められた。腎臓では、溶媒対照群の雌雄および1000 mg/kg投与群の雌の1ないし3例に再生尿細管が、溶媒対照群の雌の1例に腎盂の拡張が、1000 mg/kg投与群の雌の3例に結石の形成が、溶媒対照群および1000 mg/kg投与群の雄の1ないし2例にeosinophilic bodyがそれぞれ認められた。脾臓では、溶媒対照群および1000 mg/kg投与群の雌雄全例に髄外造血がみられ、両群とも雌の全例には褐色色素の沈着が認められたが、両群間に程度の差はみられなかった。副腎では、溶媒対照群および1000 mg/kg投与群とも異常はみられなかった。

Table 3-1 Organ weights in rats administered with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

Sex	Group	Body weight (g)	Absolute organ weight				
			Brain (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Adrenals (mg)	Ovaries/Testes (mg)
Female	Control	(5) 203.9 ±8.9	(5) 1722.4 ±74.5	(5) 6381.4 ±478.2	(5) 1654.0 ±78.9	(5) 60.8 ±2.5	(5) 83.7 ±16.2
	100 mg/kg	(5) 205.2 ±19.7	(5) 1816.4* ±68.8	(5) 6915.8 ±735.0	(5) 1696.1 ±174.5	(5) 67.7 ±0.9	(5) 89.6 ±9.6
	300 mg/kg	(5) 218.2 ±19.0	(5) 1825.7* ±24.8	(5) 7760.5* ±1191.4	(5) 1845.5 ±258.9	(5) 67.9 ±5.7	(5) 93.9 ±10.5
	1000 mg/kg	(5) 204.1 ±9.9	(5) 1783.2 ±28.4	(5) 7790.5* ±395.0	(5) 1793.8 ±91.4	(5) 65.4 ±6.6	(5) 81.5 ±13.1
Male	Control	(5) 344.0 ±27.7	(5) 1914.9 ±26.0	(5) 11535.0 ±830.6	(5) 2605.2 ±147.1	(5) 50.7 ±7.0	(5) 2868.7 ±260.4
	100 mg/kg	(5) 328.5 ±36.8	(5) 1934.6 ±61.9	(5) 11983.9 ±2312.7	(5) 2622.3 ±255.6	(5) 47.5 ±5.0	(5) 3002.8 ±25.2
	300 mg/kg	(5) 337.0 ±20.9	(5) 1950.8 ±108.9	(5) 13437.5 ±1144.4	(5) 2688.1 ±222.0	(5) 46.6 ±6.2	(5) 2789.0 ±148.5
	1000 mg/kg	(5) 337.8 ±28.6	(5) 1903.3 ±73.1	(5) 15083.3* ±2148.3	(5) 2790.6 ±155.6	(5) 49.0 ±4.3	(5) 2847.6 ±182.1

Parameter : Mean ± S.D.  
( ) : N

\* : Significantly different from control,  $p < 0.05$

Table 3-2 Organ weights in rats administered with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

Sex	Group	Body weight (g)	Relative organ weight				
			Brain (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Adrenals (mg/g)	Ovaries/Testes (mg/g)
Female	Control	(5) 203.9 ±8.9	(5) 8.450 ±0.264	(5) 31.312 ±2.250	(5) 8.115 ±0.299	(5) 0.299 ±0.017	(5) 0.413 ±0.088
	100 mg/kg	(5) 205.2 ±19.7	(5) 8.897 ±0.654	(5) 33.764 ±2.842	(5) 8.269 ±0.438	(5) 0.332 ±0.031	(5) 0.439 ±0.050
	300 mg/kg	(5) 218.2 ±19.0	(5) 8.413 ±0.642	(5) 35.469 ±3.547	(5) 8.427 ±0.484	(5) 0.312 ±0.018	(5) 0.432 ±0.049
	1000 mg/kg	(5) 204.1 ±9.9	(5) 8.753 ±0.484	(5) 38.192** ±1.784	(5) 8.804 ±0.620	(5) 0.321 ±0.026	(5) 0.399 ±0.054
Male	Control	(5) 344.0 ±27.7	(5) 5.598 ±0.485	(5) 33.573 ±1.201	(5) 7.612 ±0.721	(5) 0.148 ±0.017	(5) 8.335 ±0.170
	100 mg/kg	(5) 328.5 ±36.8	(5) 5.936 ±0.551	(5) 36.320 ±4.254	(5) 8.012 ±0.672	(5) 0.145 ±0.016	(5) 9.226 ±0.969
	300 mg/kg	(5) 337.0 ±20.9	(5) 5.802 ±0.435	(5) 39.842* ±1.753	(5) 7.972 ±0.351	(5) 0.139 ±0.016	(5) 8.302 ±0.714
	1000 mg/kg	(5) 337.8 ±28.6	(5) 5.653 ±0.277	(5) 44.540** ±3.701	(5) 8.293 ±0.622	(5) 0.146 ±0.024	(5) 8.458 ±0.616

Parameter : Mean ± S.D.  
( ) : N

\* : Significantly different from control, p < 0.05  
\*\* : Significantly different from control, p < 0.01

Table 3-3 Organ weights in rats after 14 days withdrawal following administration of 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

Sex	Group	Body weight (g)	Absolute organ weight				
			Brain (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Adrenals (mg)	Ovaries/Testes (mg)
Female	Control	(5) 237.2 ±9.5	(5) 1775.5 ±81.6	(5) 6953.8 ±628.5	(5) 1723.6 ±110.0	(5) 70.9 ±12.3	(5) 86.7 ±11.6
	1000 mg/kg	(5) 228.3 ±14.7	(5) 1843.4 ±22.3	(5) 6776.0 ±737.5	(5) 1809.5 ±52.3	(5) 66.1 ±5.9	(5) 88.1 ±4.7
Male	Control	(5) 398.0 ±41.3	(5) 2006.9 ±70.3	(5) 12042.3 ±2074.7	(5) 2892.2 ±283.4	(5) 48.8 ±6.6	(5) 3314.8 ±238.5
	1000 mg/kg	(5) 424.3 ±24.4	(5) 2138.1** ±43.8	(5) 14821.0 ±2153.3	(5) 3034.0 ±243.5	(5) 50.2 ±6.9	(5) 3114.0 ±177.3

Sex	Group	Body weight (g)	Relative organ weight				
			Brain (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Adrenals (mg/g)	Ovaries/Testes (mg/g)
Female	Control	(5) 237.2 ±9.5	(5) 7.493 ±0.406	(5) 29.290 ±1.890	(5) 7.278 ±0.576	(5) 0.299 ±0.047	(5) 0.366 ±0.049
	1000 mg/kg	(5) 228.3 ±14.7	(5) 8.099 ±0.470	(5) 29.635 ±1.665	(5) 7.951 ±0.521	(5) 0.290 ±0.029	(5) 0.386 ±0.009
Male	Control	(5) 398.0 ±41.3	(5) 5.075 ±0.398	(5) 30.093 ±2.214	(5) 7.290 ±0.595	(5) 0.125 ±0.025	(5) 8.434 ±1.334
	1000 mg/kg	(5) 424.3 ±24.4	(5) 5.052 ±0.297	(5) 34.852* ±3.918	(5) 7.148 ±0.360	(5) 0.118 ±0.010	(5) 7.356 ±0.542

Parameter : Mean ± S.D.  
( ) : N

\* : Significantly different from control, p < 0.05  
\*\* : Significantly different from control, p < 0.01

Table 4-1 Histopathological findings in female rats administered with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

Group Grade	Control (n=5)					100 mg/kg (n=5)					300 mg/kg (n=5)					1000 mg/kg (n=5)									
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++					
(Heart)																									
myocardial degeneration	5	0	0	0	0																5	0	0	0	0
(Liver)																									
swelling of hepatocyte	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	1	4	0	0	0					
focus of necrosis	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0					
fatty change in peripheral zone	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	3	2	0	0	0	5	0	0	0					
fatty change in central zone	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0					
nodular fatty change	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0					
microgranuloma	0	2	3	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0					
hemorrhage	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0					
(Kidneys)																									
regenerated tubule	3	2	0	0	0																4	1	0	0	0
dilated pelvis	4	0	1	0	0																5	0	0	0	0
calculi	5	0	0	0	0																2	1	2	0	0
eosinophilic body	5	0	0	0	0																5	0	0	0	0
(Spleen)																									
brown pigment	0	5	0	0	0																0	5	0	0	0
extramedullary hematopoiesis	0	3	2	0	0																0	4	1	0	0
(Adrenals)																									
abnormality	5	0	0	0	0																5	0	0	0	0

- Negative, ± Slight, + Moderate, ++ Marked, +++ Severe

Table 4-2 Histopathological findings in male rats administered with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

Group Grade	Control (n=5)					100 mg/kg (n=5)					300 mg/kg (n=5)					1000 mg/kg (n=5)									
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++					
(Heart)																									
myocardial degeneration	5	0	0	0	0																4	1	0	0	0
(Liver)																									
swelling of hepatocyte	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	1	3	0	0					
focus of necrosis	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	0	1	0	0					
fatty change in peripheral zone	0	0	5	0	0	1	4	0	0	0	1	4	0	0	0	1	4	0	0	0					
fatty change in central zone	4	1	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0					
nodular fatty change	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0					
microgranuloma	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	1	3	1	0	0	1	4	0	0	0					
hemorrhage	5	0	0	0	0	4	0	1	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0					
(Kidneys)																									
regenerated tubule	2	3	0	0	0																5	0	0	0	0
dilated pelvis	5	0	0	0	0																5	0	0	0	0
calculi	5	0	0	0	0																5	0	0	0	0
eosinophilic body	4	0	0	1	0																3	0	2	0	0
(Spleen)																									
brown pigment	5	0	0	0	0																5	0	0	0	0
extramedullary hematopoiesis	0	0	5	0	0																0	0	4	1	0
(Adrenals)																									
abnormality	5	0	0	0	0																5	0	0	0	0

- Negative, ± Slight, + Moderate, ++ Marked, +++ Severe

Table 4-3 Histopathological findings in rats after 14 days withdrawal following administration of 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days

Sex	Female										Male									
	Control (n=5)					1000 mg/kg (n=5)					Control (n=5)					1000 mg/kg (n=5)				
Group Grade	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
(Liver)																				
swelling of hepatocyte	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
focus of necrosis	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
fatty change in peripheral zone	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4	0	0
fatty change in central zone	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	4	1	0	0	0
nodular fatty change	5	0	0	0	0	4	0	1	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
microgranuloma	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	2	3	0	0	0	5	0	0	0
hemorrhage	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
scar and pigmentation	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0

- Negative, ± Slight, + Moderate, ++ Marked, +++ Severe

その他、投与期間終了時屠殺例のうち剖検時に肉眼的変化がみられた例について、各器官の主な組織所見を以下に示す。皮膚から皮下にかけては、潰瘍あるいは痂皮形成に伴う細胞浸潤のほか、毛根の変性がみられ、顎下リンパ節では胚中心のリンパ球の増加があり、胸腺では、出血あるいは嚢胞形成が認められた。また、胃では、腺胃における前胃粘膜の異所形成あるいは毛細血管の拡張がみられ、子宮では管腔の拡張があり、精巣では間質の出血が認められた。さらに、肺では、出血あるいは出血および水腫に伴う細胞浸潤、泡沫状細胞の集簇、異物周囲の線維化と色素沈着、炎症巣、肺胞領域の血管内の細胞数の増加が認められた。

回復試験期間終了時屠殺例では、1000 mg/kg投与群の雄の1例の肝臓に色素沈着を伴う癍痕の形成がみられたが、投与期間終了時屠殺例にみられた肝細胞の腫脹は認められなかった。

その他、回復試験期間終了時屠殺例のうち剖検時に肉眼的変化がみられた例について組織学的検査を行った結果、腺胃における前胃粘膜の異所形成、肺の出血あるいは出血を伴う炎症巣、腎臓の再生尿細管と管腔内の出血および胸腺における出血が認められた。

### 考察

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナン<sup>1</sup>の100, 300および1000 mg/kgを、雌雄のSprague-Dawley系 (Crj:CD) ラットに1日1回、28日間にわたって反復経口投与し、さらに14日間の回復試験を行った。

その結果、一般状態の変化として、雌雄とも1000 mg/kg投与群の全例と溶媒対照群を含む他の投与群の1ないし3例に、投与直後の一過性の流涎がみられ、被験物質投与群では、まれに投与時に保定するだけで認められる例もあった。溶媒対照群の流涎は、連続的にみられることはなく、28日間の投与期間中、1ないし4回であったのに対し、被験物質投与群の特に1000 mg/kg投与群では、その多くが投与第2週以降に連続的にみられる傾向にあり、投与時に保定するだけで認められる例もあったことから、溶媒対照群の流涎の成因とは異なり、被験物質の何らかの刺激によって成立した条件反射によるものと考えられる。

尿検査では、投与期間終了週において、被験物質投与群で散発的にビリルビンの陽性例が認められたが、その出現頻度および程度に用量依存性はなく、偶発的な所見と判断した。また、回復試験期間終了週の尿検査では、1000 mg/kg投与群の雄の1例が糖と潜血反応が陽性であり、他の1例でも潜血反応が陽性であったが、いずれも投与期間終了週の検査では認められなかったことから、これらの所見も偶発的なものと判断した。

投与期間終了時の血液学的あるいは血液生化学的検査では、1000 mg/kg投与群の雄において、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。また、300および1000 mg/kg投与群の雄では、トリグリセライド濃度が低下し、1000 mg/kg投与群の雌では、GPT活性が上昇したほか、雄では、カリウムおよび塩素濃度が、いずれも低下した。さらに、回復試験期間終了時の検査でも、1000 mg/kg投与群の雄において、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。しかし、これらの血液学的あ

るいは血液生化学的検査所見と関連があると考えられる病理学的変化は認められず、今回の試験においては、これらの変化の発生機序を明らかにすることは出来なかった。その他、投与期間終了時および回復試験期間終了時の検査で、溶媒対照群と被験物質投与群の間に有意差が認められる項目があったが、いずれも生理的変動範囲を著しく越えるものではなく、また、用量相関も認められなかったため、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

投与期間終了時の病理学的検査では、雌雄とも、300 mg/kg以上の投与群の肝臓の絶対重量あるいは相対重量が増加し、組織学的には、1000 mg/kg投与群の雌雄と300 mg/kg投与群の雄に、小葉中心部肝細胞の腫脹がみられる例があり、1000 mg/kg投与群の雄の1例では、肝細胞の壊死巣も認められた。また、回復試験期間終了時の病理学的検査では、1000 mg/kg投与群の雄において、肝臓の相対重量が増加し、組織所見では、1000 mg/kg投与群の雄の1例に色素沈着を伴う癍痕の形成がみられたが、投与期間終了時屠殺例にみられた肝細胞の腫脹は認められなかった。これらの肝臓の変化は、溶媒対照群および100 mg/kg投与群で認められなかったことから、被験物質投与に起因したものと考えられるが、今回の試験では、その成因を明らかにすることは出来なかった。なお、その他の器官の変化については、いずれも用量依存性はなく、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

以上のことから、本試験条件下における2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナン<sup>1</sup>の無影響量は、雌雄とも100 mg/kg以下と考えられる。

### 文献

- 1) 今井清 他, 本書, p.461.

連絡先: 試験責任者 今井清

(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: Imai, Kiyoshi

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan

Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

## 2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナン<sup>1</sup>の細菌を用いる復帰変異試験

### Reverse Mutation Test of 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonane on Bacteria

#### 要約

2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は 50~5000 µg/プレート の用量で、本試験は 312.5~5000 µg/プレート の用量で試験を行った。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンは、用いた試験系において変異原性を有しない（陰性）と判定された。

#### 緒言

OECD 既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである、2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナン<sup>1</sup>について、細菌を用いる復帰変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異<sup>2</sup>、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異<sup>3</sup>を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9混液）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）およびOECD化学品試験法ガイドライン：471、472に準拠し、化学物質GLP（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

#### 方法

##### 〔検定菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*Salmonella typhimurium* TA100、*Salmonella typhimurium* TA1535、*Salmonella typhimurium* TA98、*Salmonella typhimurium* TA1537の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与を受けた。

*Escherichia coli* WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントプロス（Difco）を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

##### 〔被験物質〕

2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナン（CAS No. 4390-04-9、2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonane）は、分子量226.45、比重0.78、沸点240℃、無色透明の液体である。純度99.9%のもの（ロット番号：AU02、東京化成工業株式会社製造）を（社）日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。

2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンは、アセトン（ロット番号：DSR 3251、和光純薬工業（株））を用いて50 mg/mlになるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、秦野研究所において2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンのアセトン溶液中での安定性試験を行った。安定性試験における溶媒は当研究所で実施される、培養細胞を用いる染色体異常試験と共通なことから、両試験における最高濃度（460 mg/ml）および最低濃度（3 mg/ml）の2濃度について室温、遮光条件下で実施した。その結果、調製後3時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値の平均（0時間）に対して、104%および100%であった。これらの値は、当研究所の標準操作手順書の基準（初回の測定平均値の90%以上）を満たしていた。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml溶液の含量は既定濃度に対し、101~102%、3.125 mg/ml溶液については、97.8~99.9%であった。サンプル間のばらつきは平均値の2%以下であった。これらの値も、当研究所の標準操作手順書の基準（平均含量は添加量の85%以上）を満たしていた。

以上の結果から、2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンはアセトン溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

## 復帰変異試験

### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

- AF-2 : フリルフラマイド (上野製薬 (株))  
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業 (株))  
9-AA : 9-アミノアクリジン (東京化成工業 (株))  
2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業 (株))

AF-2、9-AA、2-AAはDMSO (和光純薬工業 (株)) に、SAは蒸留水に溶解して試験に用いた。

### 〔培地およびS9混液の組成〕

#### 1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクト・アガー (Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
ビオチン	0.5 mM

\* WP2用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

#### 2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社の最少寒天培地を用いた。なお、培地 1 lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2g
クエン酸・1水和物	2g
リン酸水素二カリウム	10g
リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5g
グルコース	20g
バクト・アガー (Difco)	15g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mlを流して固めてある。

#### 3) S9混液 (1 ml中下記の成分を含む)

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース・6リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml

\*\* : 7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール (PB) および5,6-ベンゾフラボン (BF) の併用投与で酵素誘導して作製したS9 (キッコーマン (株)) を用いた。

### 〔試験方法〕

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトップアガー2 ml、被験物質調製液0.1 ml、リン酸緩衝液0.5 ml (代謝活性化試験においてはS9混液0.5 ml)、検定菌液0.1 mlを混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりにアセトン、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変

異コロニー数を算定し、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。

### 〔判定基準〕

被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する (陽性) と判定することとした。

## 結果および考察

### 〔用量設定試験〕

50~5000 μg/プレートの範囲で試験を実施したところ、WP2の代謝活性化試験において1500 μg/プレート以上の用量で、弱い抗菌性が認められた。しかし、WP2の直接試験および他の菌種では抗菌性が認められなかったことから、本試験における最高用量を、すべての菌種において5000 μg/プレートとし、公比2で5用量を設定した。なお、直接試験では1500 μg/プレート、代謝活性化試験では500 μg/プレート以上の用量で寒天表面に被験物質由来の沈澱物が認められた。

### 〔本試験〕

結果をTables 1, 2に示した。2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンについて312.5~5000 μg/プレートの範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接試験代謝活性化試験のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。また、すべての試験において抗菌性は認められなかった。なお、代謝活性化試験において、5000 μg/プレートの用量で寒天表面に被験物質由来の沈澱物が認められた。

以上の結果に基づき、2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンは、用いた試験系において変異原性を有しないもの (陰性) と判定した。

## 文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983)
- 2) M. H. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, and C. Ramel eds.), Elsevier Science Publisher, New York, 1984, p161.

連絡先: 試験責任者 澁谷徹

(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 : Shibuya, Tohru

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan  
Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-heptamethylnonane\*

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)														
			Base-pair substitution type									Frameshift type					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98		TA1537			
Solvent control	-	-	169 (150 $\pm$ 22.7)	125 (134 $\pm$ 5.1)	157 (132 $\pm$ 5.0)	12 (12 $\pm$ 1.0)	11 (17 $\pm$ 1.5)	13 (13 $\pm$ 1.0)	17 (13 $\pm$ 3.5)	10 (13 $\pm$ 3.5)	13 (13 $\pm$ 3.5)	31 (26 $\pm$ 5.0)	26 (23 $\pm$ 1.0)	21 (10 $\pm$ 9.2)	13 (10 $\pm$ 2.3)	9 (9 $\pm$ 2.3)	
Test substance	312.5	-	133 (134 $\pm$ 5.1)	140 (133 $\pm$ 5.0)	130 (132 $\pm$ 3.5)	16 (13 $\pm$ 2.5)	19 (15 $\pm$ 2.5)	17 (11 $\pm$ 2.0)	16 (11 $\pm$ 2.0)	15 (13 $\pm$ 2.0)	16 (11 $\pm$ 2.0)	24 (23 $\pm$ 1.0)	23 (22 $\pm$ 0.6)	22 (8 $\pm$ 6.5)	15 (6 $\pm$ 1.5)	7 (5 $\pm$ 1.5)	11 (3 $\pm$ 3.1)
	625	-	138 (132 $\pm$ 3.5)	128 (132 $\pm$ 3.5)	132 (132 $\pm$ 3.5)	8 (13 $\pm$ 2.5)	13 (10 $\pm$ 2.5)	15 (11 $\pm$ 2.0)	11 (11 $\pm$ 2.0)	13 (11 $\pm$ 2.0)	9 (11 $\pm$ 2.0)	23 (23 $\pm$ 1.0)	22 (22 $\pm$ 0.6)	22 (8 $\pm$ 6.5)	10 (6 $\pm$ 1.5)	8 (5 $\pm$ 1.5)	6 (3 $\pm$ 3.1)
	1250	-	136 (132 $\pm$ 3.5)	132 (132 $\pm$ 3.5)	129 (132 $\pm$ 3.5)	13 (13 $\pm$ 2.5)	15 (10 $\pm$ 2.5)	10 (11 $\pm$ 2.0)	9 (11 $\pm$ 2.0)	13 (11 $\pm$ 2.0)	11 (11 $\pm$ 2.0)	30 (23 $\pm$ 1.0)	24 (22 $\pm$ 0.6)	15 (8 $\pm$ 6.5)	6 (6 $\pm$ 1.5)	5 (5 $\pm$ 1.5)	8 (3 $\pm$ 3.1)
	2500	-	104 (123 $\pm$ 17.1)	137 (123 $\pm$ 17.1)	128 (17.1)	7 (12 $\pm$ 4.2)	15 (12 $\pm$ 4.2)	13 (12 $\pm$ 4.2)	10 (12 $\pm$ 4.2)	18 (12 $\pm$ 4.2)	9 (12 $\pm$ 4.2)	27 (26 $\pm$ 12.1)	13 (26 $\pm$ 12.1)	37 (12.1)	9 (6 $\pm$ 3.1)	5 (6 $\pm$ 3.1)	3 (3 $\pm$ 3.1)
	5000	-	118 (126 $\pm$ 8.5)	125 (126 $\pm$ 8.5)	135 (8.5)	11 (11 $\pm$ 0.6)	10 (11 $\pm$ 0.6)	11 (11 $\pm$ 0.6)	15 (11 $\pm$ 0.6)	9 (11 $\pm$ 0.6)	9 (11 $\pm$ 0.6)	16 (19 $\pm$ 2.5)	19 (19 $\pm$ 2.5)	21 (19 $\pm$ 2.5)	7 (8 $\pm$ 1.7)	10 (8 $\pm$ 1.7)	7 (1.7)
Solvent control	+	+	163 (153 $\pm$ 11.8)	140 (147 $\pm$ 15.7)	156 (15.7)	16 (15 $\pm$ 3.0)	10 (15 $\pm$ 3.0)	9 (15 $\pm$ 3.0)	13 (15 $\pm$ 3.0)	12 (15 $\pm$ 3.0)	20 (15 $\pm$ 3.0)	33 (24 $\pm$ 3.2)	31 (24 $\pm$ 3.2)	24 (11 $\pm$ 1.0)	7 (11 $\pm$ 1.0)	14 (11 $\pm$ 1.0)	15 (1.0)
Test substance	312.5	+	135 (147 $\pm$ 8.4)	142 (136 $\pm$ 8.4)	165 (15.7)	18 (10 $\pm$ 2.5)	12 (12 $\pm$ 2.5)	15 (7 $\pm$ 2.5)	14 (9 $\pm$ 4.0)	15 (10 $\pm$ 4.0)	15 (10 $\pm$ 4.0)	28 (24 $\pm$ 2.1)	22 (24 $\pm$ 2.1)	23 (7 $\pm$ 5.6)	12 (7 $\pm$ 5.6)	11 (5 $\pm$ 6.6)	10 (6 $\pm$ 2.6)
	625	+	141 (132 $\pm$ 9.3)	140 (132 $\pm$ 9.3)	126 (9.3)	10 (11 $\pm$ 5.5)	12 (11 $\pm$ 5.5)	7 (11 $\pm$ 5.5)	13 (13 $\pm$ 1.7)	10 (13 $\pm$ 1.7)	5 (13 $\pm$ 1.7)	25 (27 $\pm$ 5.0)	26 (27 $\pm$ 5.0)	22 (5 $\pm$ 3.1)	10 (4 $\pm$ 2.1)	5 (4 $\pm$ 2.1)	6 (1.2)
	1250	+	140 (137 $\pm$ 4.7)	135 (137 $\pm$ 4.7)	122 (4.7)	16 (10 $\pm$ 1.7)	11 (10 $\pm$ 1.7)	5 (10 $\pm$ 1.7)	15 (10 $\pm$ 3.2)	12 (10 $\pm$ 3.2)	12 (10 $\pm$ 3.2)	32 (23 $\pm$ 3.1)	27 (23 $\pm$ 3.1)	22 (3.1)	5 (7 $\pm$ 2.1)	5 (7 $\pm$ 2.1)	3 (2.1)
	2500	+	139 (125 $\pm$ 7.5)	132 (125 $\pm$ 7.5)	141 (7.5)	11 (14 $\pm$ 7.0)	8 (14 $\pm$ 7.0)	11 (14 $\pm$ 7.0)	8 (11 $\pm$ 1.5)	14 (11 $\pm$ 1.5)	9 (11 $\pm$ 1.5)	20 (28 $\pm$ 4.5)	24 (28 $\pm$ 4.5)	26 (4.5)	5 (7 $\pm$ 0.6)	6 (7 $\pm$ 0.6)	9 (0.6)
	5000	+	133 (125 $\pm$ 7.5)	124 (125 $\pm$ 7.5)	118 (7.5)	21 (14 $\pm$ 7.0)	7 (14 $\pm$ 7.0)	13 (14 $\pm$ 7.0)	13 (11 $\pm$ 1.5)	11 (11 $\pm$ 1.5)	10 (11 $\pm$ 1.5)	28 (28 $\pm$ 4.5)	32 (28 $\pm$ 4.5)	23 (4.5)	7 (7 $\pm$ 0.6)	8 (7 $\pm$ 0.6)	7 (0.6)
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		534 (537 $\pm$ 36.1)	575 (36.1)	503 (36.1)	109 (102 $\pm$ 7.0)	102 (102 $\pm$ 7.0)	95 (7.0)	137 (136 $\pm$ 5.0)	131 (136 $\pm$ 5.0)	141 (5.0)	650 (638 $\pm$ 15.9)	644 (638 $\pm$ 15.9)	620 (15.9)	1563 (1762 $\pm$ 194.2)	1951 (1762 $\pm$ 194.2)	1771 (194.2)
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		1139 (1126 $\pm$ 82.3)	1201 (82.3)	1038 (82.3)	214 (214 $\pm$ 3.5)	211 (214 $\pm$ 3.5)	218 (3.5)	628 (624 $\pm$ 3.2)	622 (624 $\pm$ 3.2)	623 (3.2)	521 (554 $\pm$ 33.5)	552 (554 $\pm$ 33.5)	588 (33.5)	223 (217 $\pm$ 6.0)	216 (217 $\pm$ 6.0)	211 (6.0)

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene  
\*:Purity was 99.9%

Table 2 Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane\*

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)														
			Base-pair substitution type									Frameshift type					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Solvent control	-	-	166 (159 $\pm$ 10.4)	147 (140 $\pm$ 10.4)	164 (157 $\pm$ 10.4)	12 (15 $\pm$ 5.5)	21 (15 $\pm$ 5.5)	11 (11 $\pm$ 5.5)	20 (25 $\pm$ 4.4)	27 (25 $\pm$ 4.4)	28 (28 $\pm$ 4.4)	32 (30 $\pm$ 6.2)	35 (30 $\pm$ 6.2)	23 (23 $\pm$ 6.2)	6 (8 $\pm$ 2.5)	8 (8 $\pm$ 2.5)	11 (11 $\pm$ 2.5)
Test substance	312.5	-	142 (153 $\pm$ 12.8)	167 (153 $\pm$ 12.8)	150 (153 $\pm$ 12.8)	17 (15 $\pm$ 6.7)	21 (15 $\pm$ 6.7)	8 (8 $\pm$ 6.7)	23 (25 $\pm$ 3.2)	29 (25 $\pm$ 3.2)	24 (24 $\pm$ 3.2)	23 (22 $\pm$ 4.2)	17 (22 $\pm$ 4.2)	25 (22 $\pm$ 4.2)	12 (9 $\pm$ 3.1)	8 (9 $\pm$ 3.1)	6 (9 $\pm$ 3.1)
	625	-	127 (135 $\pm$ 7.1)	141 (135 $\pm$ 7.1)	136 (135 $\pm$ 7.1)	16 (13 $\pm$ 2.5)	13 (13 $\pm$ 2.5)	11 (11 $\pm$ 2.5)	27 (22 $\pm$ 7.6)	13 (22 $\pm$ 7.6)	25 (22 $\pm$ 7.6)	26 (22 $\pm$ 3.8)	19 (22 $\pm$ 3.8)	20 (22 $\pm$ 3.8)	7 (6 $\pm$ 2.3)	3 (6 $\pm$ 2.3)	7 (6 $\pm$ 2.3)
	1250	-	127 (137 $\pm$ 9.1)	138 (137 $\pm$ 9.1)	145 (137 $\pm$ 9.1)	11 (16 $\pm$ 4.2)	17 (16 $\pm$ 4.2)	19 (16 $\pm$ 4.2)	14 (18 $\pm$ 4.5)	23 (18 $\pm$ 4.5)	18 (18 $\pm$ 4.5)	32 (24 $\pm$ 6.7)	20 (24 $\pm$ 6.7)	21 (24 $\pm$ 6.7)	9 (7 $\pm$ 2.1)	5 (7 $\pm$ 2.1)	8 (7 $\pm$ 2.1)
	2500	-	119 (133 $\pm$ 13.1)	145 (133 $\pm$ 13.1)	134 (133 $\pm$ 13.1)	14 (12 $\pm$ 1.5)	11 (12 $\pm$ 1.5)	12 (12 $\pm$ 1.5)	10 (7 $\pm$ 2.9)	5 (7 $\pm$ 2.9)	5 (7 $\pm$ 2.9)	34 (28 $\pm$ 5.5)	28 (28 $\pm$ 5.5)	23 (28 $\pm$ 5.5)	8 (9 $\pm$ 1.5)	11 (9 $\pm$ 1.5)	9 (9 $\pm$ 1.5)
	5000	-	135 (135 $\pm$ 10.5)	125 (135 $\pm$ 10.5)	146 (135 $\pm$ 10.5)	12 (11 $\pm$ 1.0)	11 (11 $\pm$ 1.0)	10 (10 $\pm$ 1.0)	8 (10 $\pm$ 2.6)	13 (10 $\pm$ 2.6)	9 (10 $\pm$ 2.6)	33 (24 $\pm$ 7.9)	18 (24 $\pm$ 7.9)	21 (24 $\pm$ 7.9)	9 (9 $\pm$ 0.6)	9 (9 $\pm$ 0.6)	10 (9 $\pm$ 0.6)
Solvent control		+	146 (139 $\pm$ 8.7)	141 (139 $\pm$ 8.7)	129 (139 $\pm$ 8.7)	11 (12 $\pm$ 4.2)	17 (12 $\pm$ 4.2)	9 (9 $\pm$ 4.2)	25 (27 $\pm$ 4.0)	32 (27 $\pm$ 4.0)	25 (27 $\pm$ 4.0)	30 (32 $\pm$ 3.5)	36 (32 $\pm$ 3.5)	30 (32 $\pm$ 3.5)	10 (11 $\pm$ 1.2)	12 (11 $\pm$ 1.2)	12 (11 $\pm$ 1.2)
Test substance	312.5	+	146 (157 $\pm$ 12.7)	155 (157 $\pm$ 12.7)	171 (157 $\pm$ 12.7)	22 (18 $\pm$ 3.6)	17 (18 $\pm$ 3.6)	15 (15 $\pm$ 3.6)	16 (20 $\pm$ 4.6)	19 (20 $\pm$ 4.6)	25 (20 $\pm$ 4.6)	34 (33 $\pm$ 2.6)	30 (33 $\pm$ 2.6)	35 (33 $\pm$ 2.6)	15 (12 $\pm$ 2.5)	12 (12 $\pm$ 2.5)	10 (12 $\pm$ 2.5)
	625	+	154 (158 $\pm$ 6.9)	154 (158 $\pm$ 6.9)	166 (158 $\pm$ 6.9)	14 (13 $\pm$ 1.2)	14 (13 $\pm$ 1.2)	12 (12 $\pm$ 1.2)	33 (31 $\pm$ 7.0)	24 (31 $\pm$ 7.0)	31 (31 $\pm$ 7.0)	36 (36 $\pm$ 3.5)	33 (36 $\pm$ 3.5)	40 (36 $\pm$ 3.5)	11 (10 $\pm$ 1.5)	10 (10 $\pm$ 1.5)	8 (10 $\pm$ 1.5)
	1250	+	162 (158 $\pm$ 6.4)	151 (158 $\pm$ 6.4)	162 (158 $\pm$ 6.4)	9 (11 $\pm$ 2.1)	13 (11 $\pm$ 2.1)	10 (11 $\pm$ 2.1)	24 (18 $\pm$ 5.3)	16 (18 $\pm$ 5.3)	14 (18 $\pm$ 5.3)	40 (33 $\pm$ 6.1)	28 (33 $\pm$ 6.1)	32 (33 $\pm$ 6.1)	12 (11 $\pm$ 1.5)	11 (11 $\pm$ 1.5)	9 (11 $\pm$ 1.5)
	2500	+	178 (157 $\pm$ 18.6)	152 (157 $\pm$ 18.6)	142 (157 $\pm$ 18.6)	10 (14 $\pm$ 4.6)	19 (14 $\pm$ 4.6)	13 (14 $\pm$ 4.6)	24 (21 $\pm$ 3.6)	22 (21 $\pm$ 3.6)	17 (21 $\pm$ 3.6)	32 (36 $\pm$ 3.5)	38 (36 $\pm$ 3.5)	38 (36 $\pm$ 3.5)	10 (11 $\pm$ 3.6)	8 (11 $\pm$ 3.6)	15 (11 $\pm$ 3.6)
	5000	+	154 (146 $\pm$ 7.5)	146 (146 $\pm$ 7.5)	139 (146 $\pm$ 7.5)	12 (13 $\pm$ 2.1)	11 (13 $\pm$ 2.1)	15 (13 $\pm$ 2.1)	31 (26 $\pm$ 4.5)	26 (26 $\pm$ 4.5)	22 (26 $\pm$ 4.5)	26 (30 $\pm$ 4.0)	34 (30 $\pm$ 4.0)	31 (30 $\pm$ 4.0)	14 (9 $\pm$ 4.2)	8 (9 $\pm$ 4.2)	6 (9 $\pm$ 4.2)
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		719 (699 $\pm$ 25.1)	708 (699 $\pm$ 25.1)	671 (699 $\pm$ 25.1)	236 (268 $\pm$ 30.6)	271 (268 $\pm$ 30.6)	297 (268 $\pm$ 30.6)	121 (129 $\pm$ 9.8)	126 (129 $\pm$ 9.8)	140 (129 $\pm$ 9.8)	723 (716 $\pm$ 7.5)	717 (716 $\pm$ 7.5)	708 (716 $\pm$ 7.5)	2087 (2392 $\pm$ 484.5)	2139 (2392 $\pm$ 484.5)	2951 (484.5)
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		703 (721 $\pm$ 39.8)	767 (721 $\pm$ 39.8)	694 (721 $\pm$ 39.8)	221 (216 $\pm$ 4.4)	213 (216 $\pm$ 4.4)	214 (216 $\pm$ 4.4)	372 (367 $\pm$ 28.3)	337 (367 $\pm$ 28.3)	393 (367 $\pm$ 28.3)	311 (310 $\pm$ 25.5)	335 (310 $\pm$ 25.5)	284 (25.5)	219 (198 $\pm$ 27.4)	208 (198 $\pm$ 27.4)	157 (27.4)

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene  
\*:Purity was 99.9%

# 2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

## In vitro Chromosomal Aberration Test of 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonane on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンの染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて検討した。

#### 1) 細胞増殖抑制試験

直接法および代謝活性化法のいずれの処理濃度群 (0.02 ~ 2.00 mg/ml) においても、50%をこえる増殖抑制作用は観察されなかった。

従って、染色体異常試験において、直接法、代謝活性化法ともに10 mMに相当する2.26 mg/mlの処理濃度を高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

#### 2) 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、いずれの濃度においても染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。但し、48時間処理の高濃度群では分裂抑制のため染色体分析が不可能であった。また、代謝活性化法においても、S9 mix存在下および非存在下のいずれの処理条件においても、染色体異常の誘発作用は認められなかった。

#### 3) 結論

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンは、今回実施した試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

### 緒言

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンの、培養細胞に及ぼす細胞遺伝学影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

この試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号) およびOECDガイドライン: 473に準拠し、化学物質GLP (昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号) に基づいて実施したものである。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク (JCRB) から入手 (1988年2月、入手時: 継代4代) したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清 (FCS; J.R.Scientific、ロット番号C019407) を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

2×10<sup>4</sup>個のCHL細胞を、培養液 5mlを入れたシャーレ (径6 cm、Corning) に播き、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) 内で培養した。

#### 4. 被験物質

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナン (CAS No.: 4390-04-9、ロット番号: AUO2、東京化成工業 (株) 製造、(社) 日本化学工業協会提供) は無色透明の液体で、アセトンに約500 mg/mlまで可溶で、水には溶けない。分子式C<sub>10</sub>H<sub>24</sub>、分子量226.45、沸点240℃、比重0.78の物質で、純度は99.9%である (東京化成工業 (株) 資料)。本実験では被験物質がアセトンに可溶であることから、溶媒としてアセトンを用いた。原体の安定性に関しては情報は得られなかったが、秦野研究所分析化学研究室で実施したエームス試験 (試験計画番号: M-91-182) における溶媒中での安定性試験では、3~460 mg/mlの濃度範囲で3時間は安定であった。

#### 5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。原体をアセトン (和光純薬工業 (株)、ロット番号: DCK1899) に溶解して原液 (400または452 mg/ml) を調製し、ついで原液をアセトンで順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、全ての試験において培養液の0.5% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85%以上) の値であった。

#### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。

## 染色体異常試験

被験物質のCHL細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（オリンパス）を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、直接法、代謝活性化法ともに、処理した濃度範囲（0.02～2.00 mg/ml）において50%をこえる増殖抑制は観察されなかったが、直接法の2.00 mg/ml処理群では約44%の増殖抑制がみられた（Fig.1）。

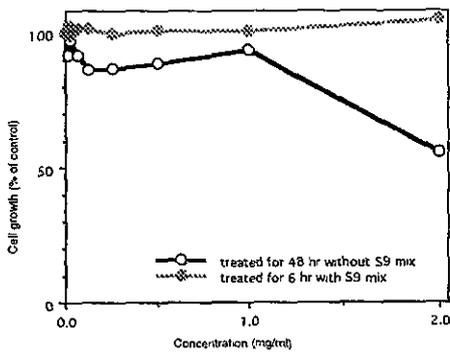


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane in CHL cells

### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果と化審法ガイドラインに定める最高濃度である10 mM (2.26 mg/ml) の値を考慮し、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、直接法（24および48時間連続処理）、代謝活性化法（6時間処理後18時間培養）ともに2.26 mg/ml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。

### 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0.1μg/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。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製し、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。ギムザ染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

### 9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのシャーレから得られた異なる標本を、複数の観察者がそれぞれブラインドの状態で行った。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<sup>4)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞（polyploid）の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

### 10. 記録と判定

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

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの“Exact probability test”法により溶媒対照群被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の意差検定を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が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。

### 結果および考察

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンを加えて24時間および48時間処理した各群において、48時間処理の高濃度群を除き、いずれも染色体の構造異常の出現頻度に有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。た、倍数性細胞についても同様に有意な増加はみられなかった。48時間処理の高濃度群では、分裂抑制のため観察可能な分裂中期細胞が得られなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した各濃度群においていずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。

陽性対照として用いた直接法でのMC処理群、およびmix存在下でのCPA処理群では染色体分体交換（cte）や染色体切断（ctb）などの構造異常をもつ細胞が高頻度誘発された。

なお、本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画からの逸脱はなかった。

### 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編：“化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 1988
- 2) 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, 1987.

連絡先：試験責任者 田中憲徳  
(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 : Tanaka, Noriho  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan  
Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane \*\* by direct method

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
HMN	0.57	24	200	0	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25	-	-
HMN	1.13	24	200	2	1	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.13	-	-
HMN	2.26	24	200	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	0 (0.0)	0.25	-	-
MC	0.00005	24	200	15	114	158	5	1	9	20	322	1	139* (69.5)	137* (68.5)	0.25	+	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		
HMN	0.57	48	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-
HMN	1.13	48	200	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-
HMN	2.26	48	0													+	+
MC	0.00005	48	200	15	102	237	6	8	12	120	500	4	152* (76.0)	151* (75.5)	0.38	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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. Tox : toxicity was observed. 1) Acetone was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations were scored as 10. 4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

\* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 99.9%.

Table 2 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane \*\* by metabolic activation method

Group	Concentration (ng/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.75		
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.50		
HMN	0.57	-	6-(18)	200	1	2	0	0	0	0	0	3	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25	-	-
HMN	1.13	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38	-	-
HMN	2.26	-	6-(18)	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.00	-	-
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	2	0	0	2	0	0	5	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	-	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38		
HMN	0.57	+	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	-	-
HMN	1.13	+	6-(18)	200	1	2	0	0	0	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	-	-
HMN	2.26	+	6-(18)	200	0	2	0	0	0	1	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	-	-
CPA	0.005	+	6-(18)	200	16	51	116	2	2	9	0	196	3	116* (58.0)	113* (56.5)	0.38	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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. 1) Acetone 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

\* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 99.9%.

# 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの ラットを用いた経口投与による急性毒性試験

## Acute Oral Toxicity Study of Monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate in Rats

### 要約

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの急性毒性を明らかにするため、雌雄各5匹のSD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを用い、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの2,000 mg/kg用量を単回経口投与した。投与後14日間の観察期間を通じて、ラットに一般状態の変化や死亡は認められず、体重も順調な増加を示した。また、観察終了時に実施した剖検においても、異常は認められなかった。以上の結果から、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムはラットに対する最小致死量が、2,000 mg/kg以上で、急性毒性の弱い物質と考えられた。

### 緒言

この試験は、厚生省の既存化学物質安全性点検事業の一環として実施したものであり、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムをラットに経口投与し、本物質の急性毒性を検討したので、その結果を報告する。

### 方法

#### 1. 被験物質

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムは、分子量341.30 (無水) の水にやや溶けにくい淡褐色の粉末で、試験には東京化成工業株式会社 (東京) から提供されたもの (ロット番号AZ01) を用いた。供試された4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの純度は87.4% (無水成分として) で、残部は結晶水や付着水などの水分であったことから、使用に当たっては純度換算した。

#### 2. 供試動物および飼育条件

動物は、日本チャールス・リバー (株) より導入したSD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを、雌雄各5匹用いた。投与時の平均体重 (体重の範囲) は、雄144 (137~150) g、雌121 (114~127) gであった。ラットの飼育は、馴化期間および投与後の観察期間を通じて、温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数10回以上/時 (オールフレッシュエアー方式)、照明12時間 (午前6時点灯、午後6時消灯) に設定されたバリアーシステム動物室で、ステンレス製金網ケージに2または3匹ずつ雌雄別に収容して行った。飼料〔日本農産工業 (株)、固型飼料ラボMRストック〕と水 (1 $\mu\text{m}$ カートリッジフィルター濾過後紫外線照射した殺菌水道水) は自由に摂取させた。ただし、投与前1日午後5時から投与後3時間までは除餌し、水のみを与えた。

#### 3. 投与量および投与方法

投与量設定のため予備試験を実施した結果、2,000 mg/kg投与によっても死亡はみられず、被験物質は急性毒性の弱い物質であると推測された。従って、用量は2,000 mg/kgの1用量とした。被験物質はメチルセルロース〔和光純薬工業 (株)、100cP〕の1.0 w/v%水溶液〔水は局方精製水、共栄製薬 (株)〕を媒体にした20 w/v%の懸濁液に調製し、体重1kgあたり10mlを胃ゾンデを用いて強制的にラットの胃内に単回経口投与 (投与時刻: 午前10時15分~10時20分) した。調整した投与液は分析し、所定濃度に調製されていることを確認した。

#### 4. 観察

観察期間は投与後14日間とし、その間の一般症状の観察と生死の確認は、投与日においては投与後1時間までと投与後約3時間および6時間までにそれぞれ1回ずつ、翌日 (投与後1日) 以降は午前9時から午後5時までの間に少なくとも1回行った。体重は投与直前 (投与0日)、投与後1、3、7および14日に測定し、測定日間の体重増加量を算出した。剖検は、観察期間終了後に動物をエーテル麻酔死させて行った。

### 結果

#### 1. 死亡率および致死量

2,000 mg/kg投与において、雌雄とも死亡動物は認められず、最小致死量は2,000 mg/kg以上であった。

#### 2. 一般症状および体重

観察期間を通じて、雌雄とも一般症状の変化は認められなかった。また、体重も順調に増加し、被験物質投与の明かな影響は認められなかった。

#### 3. 剖検所見

観察期間終了後の剖検において、雌雄とも臓器の肉眼的な異常は認められなかった。

考察

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフトレンジスルホン酸モノナトリウムのラットにおける急性経口毒性試験を実施した。その結果、OECDの毒性試験法ガイドラインで規定された限界用量である2,000mg/kgの投与においても死亡は認められず、最小致死量は2,000mg/kg以上であると推定された。また、一般症状、体重増加並びに剖検所見においても、毒性影響を示唆する変化は認められず、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフトレンジスルホン酸モノナトリウムは急性毒性の弱い物質であると考えられた。

連絡先：試験責任者 山本 譲  
(財) 畜産生物科学安全研究所  
〒 229 神奈川県相模原市橋本台 3-7-11  
Tel 0427-62-2775 Fax 0427-62-7979

Correspondence : Yamamoto, Yuzuru  
Research Institute for Animal Science in Biochemistry  
and Toxicology, Japan  
3-7-11 Hashimotodai, Sagamihara-shi, Kanagawa,  
229, Japan  
Tel 81-427-62-2775 Fax 81-427-62-7979

# 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムのラットを用いた経口投与による28日間の反復投与毒性試験

## 28-Day Repeated Dose Oral Toxicity Study of Monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate in Rats

### 要約

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの毒性を明らかにするため、SD系〔Crj:CD(SD)〕ラットに、本物質の0 (溶媒投与の対照、雌雄各12匹)、30 (各6匹)、100 (各6匹)、300 (各6匹) および1,000 mg/kg/日 (各12匹) 用量を28日間にわたって強制経口投与した。また、対照および1,000 mg/kg群の雌雄各6匹については、投与終了後14日間の回復期間を設け、変化の可逆性についても検討した。30、100および300 mg/kg群では、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定、尿検査並びに血液学的、血液生化学的および病理学的諸検査において、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム投与の影響と考えられる変化は認められなかった。1,000 mg/kg群においても、単なる内容物の増加による盲腸の軽度な拡張例が雌雄に認められたが、投与期間終了後屠殺動物および回復期間終了後屠殺動物とも、明かな毒性影響と考えられる変化は認められなかった。したがって、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムのラット28日間反復経口投与における無影響量は、1,000 mg/kg/日と推定された。

### 緒言

この試験は、厚生省の既存化学物質安全性点検事業の一環として実施したものであり、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムをラットに28日間反復経口投与し、現れる生体の機能および形態の変化を観察し、本物質の反復投与毒性を検討したので、その結果を報告する。

### 方法

#### 1. 被験物質

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムは、分子量341.30 (無水) の水にやや溶けにくい淡褐色の粉末で、試験には東京化成工業株式会社 (東京) から提供されたもの (ロット番号AZ01) を用いた。供試された4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの純度は87.4 % (無水物として) で、残部は結晶水や付着水などの水分であったことから、使用に当たっては純度換算した。投与終了後、被験物質を分析し、投与期間中安定であったことを確認した。

#### 2. 供試動物および飼育条件

動物は、日本チャールス・リバー (株) より導入したSD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを、雌雄各42匹用いた。各群の動物数は、雌雄それぞれ対照および1,000 mg/kg群は12匹、30、100および300 mg/kg群は6匹とし、このうち対照および1,000 mg/kg群の雌雄各6匹は投与期間終了後14日間の回復試験を行うための回復群に当てた。各群への動物の割り付けは、投与開始日の体重に基づく層化無作為抽出法を用いて行った。投与開始時の平均体重 (体重範囲) は、雄179 (170~188) g、雌143 (131~156) gであった。動物の飼育は、馴化、投与および回復期間とも、温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数10回以上/時 (オールフレッシュエアー方式)、照明12時間 (午前6時点灯、午後6時消灯) に設定したバリアシステム動物室で、ステンレス製金網ケージに各3匹ずつ雌雄別に収容して行った。飼料〔日本農産工業 (株)、固型飼料ラボMRストック〕と水 (1 $\mu\text{m}$ カートリッジフィルター濾過後紫外線照射した殺菌水道水) は、それぞれ給餌器および自動給水装置により自由摂取させた。

#### 3. 投与量および投与方法

投与量は、14日間反復投与による投与量設定試験の結果に基づいて、高用量を毒性試験法ガイドラインにおける上限量の1,000 mg/kg/日とし、以下300、100および30 mg/kg/日用量と、溶媒のみ投与の対照を設定した。被験物質は、メチルセルロース〔和光純薬工業 (株)、100cP〕の1 w/v %水溶液〔水は共栄製薬 (株)、局方精製水〕を溶媒とし、体重1kg当たりの投与液量が5mlで、純度換算量が所定の投与用量になるような濃度〔30 mg/kg群: 0.686 (純度換算濃度0.6) w/v %; 100 mg/kg群: 2.29 (同2) w/v %; 300 mg/kg群: 6.86 (同6) w/v %; 1,000 mg/kg群: 22.9 (同20) w/v %〕の溶液又は、中および高濃度では懸濁液として調製した。投与は、胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、1日1回、28日間にわたって強制的に経口投与した。各個体の投与液量は週1回の測定体重に基づいて算出した。投与液中の被験物質は均一に分散し、また冷所遮光下で少なくとも7日間は安定であることが確認されているので、調製した投与液の使用期間は7日以内とし、使用直前まで各濃度ごとに小分けして冷所遮光 (4 $^\circ\text{C}$ ) 下に保管した。さらに、実際に用いた投与液について濃度分析し、所定の濃度に調製されていることを確認した。

## 4. 観察および検査項目

## 1) 一般状態観察

投与および回復期間中毎日、生死および外観、行動等を観察した。

## 2) 体重および摂餌量測定

体重は、個体ごとに投与開始日（投与開始直前）およびその後は毎週1回測定した。摂餌量は、ケージごとに毎週1回、24時間の消費量を測定し、1匹あたりの平均摂餌量を算出した。

## 3) 尿検査

投与開始25日（雄）又は27日（雌）、並びに投与終了後14日（雄）又は13日（雌）に腰背部を圧迫刺激して強制排尿させ、pH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲン〔以上、マイルス・三共（株）、マルティスティックス\*〕、並びに外観を検査した。

## 4) 血液学的検査

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

## 5) 血液生化学的検査

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

## 6) 病理学的検査

## (1) 剖検

採血後に放血屠殺し、剖検を行った。

## (2) 臓器重量測定

脳、肝臓、腎臓、副腎、精巣又は卵巣を秤量（絶対重量）し、屠殺日の体重をもとに対体重比（相対重量）を算出した。腎臓、副腎、精巣および卵巣は、左右を一括して秤量した。

## (3) 病理組織学的検査

対照群および1,000 mg/kg群の心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎および盲腸について、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、常法によりパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色を施して鏡検した。

## 5. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との間の有意差（危険率5%以下）を次の方法で検定した。すなわち、3群以上の場合、定量的所見についてはBartlettの分散検定を行い、分散が一樣な場合は一元配置の分散分析を行った。分散が一樣でない場合、白血球百分率および尿所見はKruskal-Wallisの順位検定を行った。それらの結果有意差を認めなかった場合、Dunnett法により対照群に対する各群の比較検定を行った。また、剖検および病理組織学的所見については $\chi^2$ 検定を用いた。一方、2群の場合、定量的所見についてはF検定を行い、その結果分散が一樣な場合はStudentのt検定を、一樣でない場合はAspin-Welchのt検定を行った。また、白血球百分率および尿所見についてはMann-WhitneyのU検定を、剖検および病理組織学的所見については、Fisherの直接確率法を用いた。摂餌量については、ケージごとの量を測定するので各群における測定値の数が少なく、有意差検定は実施しなかった。

## 結果

## 1. 一般状態および死亡

対照群並びに30、100、300および1,000 mg/kg群の雌雄とも、観察期間を通じて一般状態の変化や死亡は認められなかった。

## 2. 体重（Figure 1）

投与および回復期間を通じて、被験物質投与各群の体重は、対照群と比べて統計学的に有意な差は認められなかった。雌の回復期間終了後屠殺動物において、1,000 mg/kg群の体重は投与終了時から対照群をやや下回っていたが、回復期間中両群の体重はほぼ平行して推移し、変動は認められなかった。

## 3. 摂餌量

投与および回復期間を通じて、被験物質投与各群の摂餌量は対照群と比べて差は認められなかった。

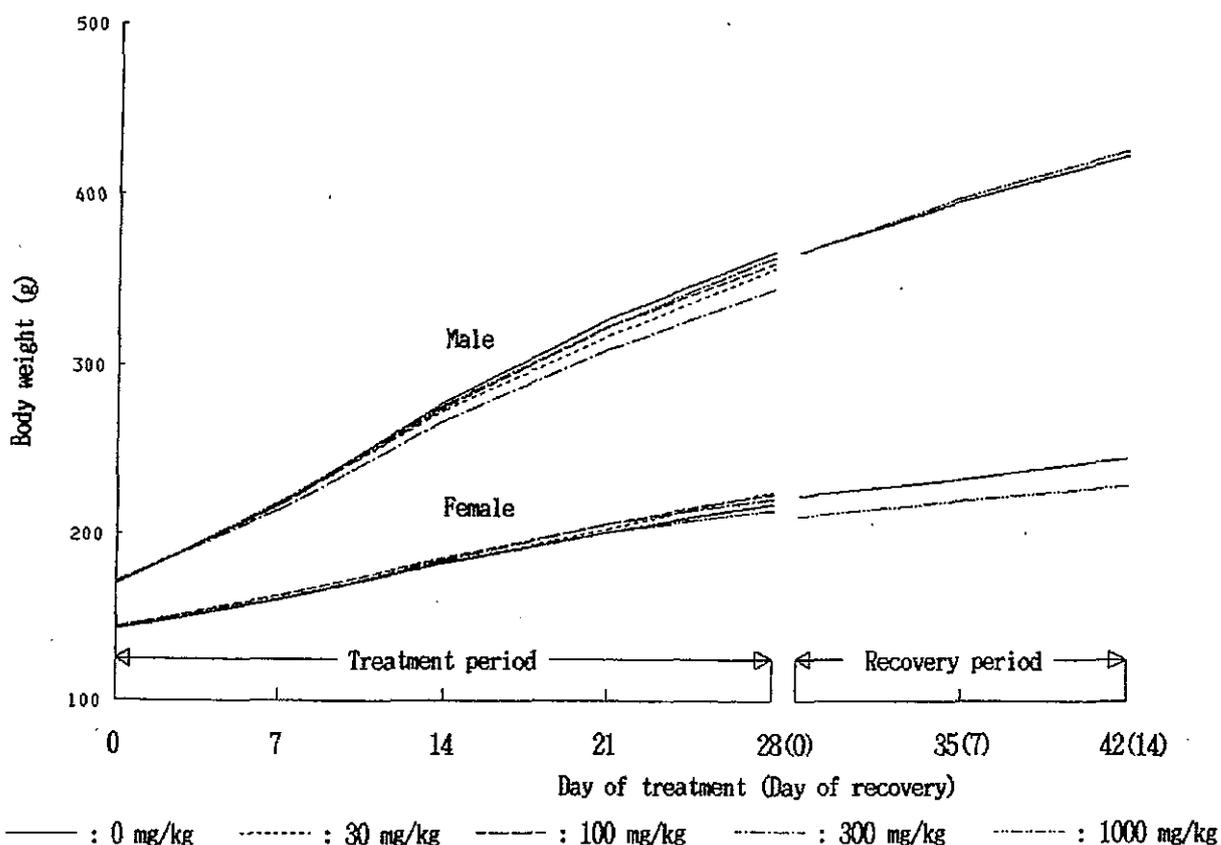


Fig.1 Body weight changes in rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days.

4. 尿所見

投与期間および回復期間終了前のいずれの検査においても、各検査項目に4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム投与の影響が考えられる変化は認められなかった。投与期間終了前の1,000 mg/kg群の雄のpHは、やや酸性に傾く傾向が認められたが、統計学的に有意な変化ではなかった。投与期間終了前の検査において、ビリルビンおよびウロビリノーゲン検査用試薬は100 mg/kg以上の用量群の被験尿に対し、本来の呈色反応（ビリルビン：淡褐色；ウロビリノーゲン：桃色）とは異なる色調（ビリルビン：赤紫色；ウロビリノーゲン：橙黄色）に発色し、判定が困難であった。この発色は、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム水溶液（100 ppm）に対しても発現することが確認された。

28日間反復投与毒性試験

5. 血液学的所見 (Table 1, 2)

投与期間および回復期間終了後屠殺動物を通じて、被験物質投与各群の雌雄とも、各検査項目に対照群と比べて統計学的に有意な変化は認められなかった。

Table 1 Hematological findings in male rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days

Stage	Dose (mg/kg)	No. of animals	RBC ( $10^4/\mu\text{l}$ )	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. ( $\%_{100}$ )	PT (sec)	APTT (sec)	
After treatment	0	6	782 $\pm 27$	15.2 $\pm 0.3$	44.2 $\pm 0.8$	57 $\pm 2$	19.4 $\pm 0.7$	34.4 $\pm 0.6$	60 $\pm 5$	14.2 $\pm 0.4$	20.3 $\pm 1.8$	
	30	6	762 $\pm 35$	14.9 $\pm 0.6$	43.1 $\pm 1.5$	57 $\pm 1$	19.6 $\pm 0.5$	34.6 $\pm 0.4$	64 $\pm 8$	14.8 $\pm 1.8$	21.0 $\pm 3.5$	
	100	6	784 $\pm 27$	15.1 $\pm 0.5$	43.9 $\pm 1.4$	56 $\pm 1$	19.2 $\pm 0.5$	34.3 $\pm 0.4$	67 $\pm 8$	14.3 $\pm 1.4$	20.1 $\pm 4.6$	
	300	6	749 $\pm 23$	14.5 $\pm 0.6$	42.5 $\pm 1.4$	57 $\pm 1$	19.4 $\pm 0.5$	34.0 $\pm 0.5$	72 $\pm 12$	14.5 $\pm 0.9$	19.8 $\pm 1.8$	
	1000	6	755 $\pm 36$	14.8 $\pm 0.4$	43.2 $\pm 1.3$	57 $\pm 2$	19.7 $\pm 0.6$	34.3 $\pm 0.5$	64 $\pm 11$	14.1 $\pm 0.4$	19.2 $\pm 1.0$	
After recovery	0	6	818 $\pm 56$	14.9 $\pm 0.5$	44.0 $\pm 2.1$	54 $\pm 1$	18.3 $\pm 0.7$	33.8 $\pm 0.6$	57 $\pm 4$	14.5 $\pm 0.9$	21.6 $\pm 2.5$	
	1000	6	797 $\pm 37$	14.6 $\pm 0.6$	43.1 $\pm 1.6$	54 $\pm 2$	18.3 $\pm 0.5$	33.8 $\pm 0.3$	57 $\pm 6$	14.7 $\pm 1.5$	21.3 $\pm 2.5$	
			WBC								Plat.	
			$(10^3/\mu\text{l})$	Differential leukocyte counts (%)							$(10^4/\mu\text{l})$	
				Baso.	Eosin.	Neutro.		Lymph.	Mono.	Other		
			0 $\pm 0$			1 $\pm 1$	Stab.				Seg.	
							0 $\pm 0$	7 $\pm 3$	91 $\pm 4$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	157 $\pm 16$
After treatment	30	6	66 $\pm 12$	0 $\pm 0$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	12 $\pm 4$	88 $\pm 5$	0 $\pm 1$	0 $\pm 0$	157 $\pm 11$	
	100	6	65 $\pm 8$	0 $\pm 0$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	10 $\pm 3$	88 $\pm 4$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	167 $\pm 18$	
	300	6	63 $\pm 19$	0 $\pm 0$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	21 $\pm 12$	78 $\pm 12$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	172 $\pm 9$	
	1000	6	85 $\pm 16$	0 $\pm 0$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	13 $\pm 10$	86 $\pm 11$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	155 $\pm 11$	
After recovery	0	6	82 $\pm 18$	0 $\pm 0$	0 $\pm 1$	0 $\pm 0$	13 $\pm 5$	86 $\pm 4$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	157 $\pm 24$	
	1000	6	83 $\pm 30$	0 $\pm 0$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	13 $\pm 4$	86 $\pm 3$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	156 $\pm 7$	

Each value is expressed as mean  $\pm$  S.D..

Abbreviations : RBC, Red blood cell ; Hb, Hemoglobin ; Ht, Hematocrit ; MCV, Mean corpuscular volume ; MCH, Mean corpuscular hemoglobin ; MCHC, Mean corpuscular hemoglobin concentration ; Ret., Reticulocyte ; PT, Prothrombin time ; APTT, Activated partial thromboplastin time ; WBC, White blood cell ; Baso., Basophil ; Eosin., Eosinophil ; Neutro., Neutrophil ; Stab., Stab form ; Seg., Segmented ; Lymph., Lymphocyte ; Mono., Monocyte ; Plat., Platelet

Table 2. Hematological findings in female rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days.

Stage	Dose (mg/kg)	No. of animals	RBC (10 <sup>4</sup> /μl)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	Ret. (% <sub>100</sub> )	PT (sec)	APTT (sec)
After treatment	0	6	777 ±29	15.1 ±0.6	42.7 ±1.5	55 ±1	19.4 ±0.4	35.3 ±0.5	33 ±7	12.9 ±0.4	17.9 ±0.6
	30	6	770 ±45	14.7 ±0.4	42.2 ±1.2	55 ±2	19.1 ±0.9	34.8 ±0.6	44 ±6	13.6 ±0.3	18.2 ±1.1
	100	6	779 ±35	14.9 ±0.6	42.6 ±1.3	55 ±1	19.1 ±0.3	34.9 ±0.7	41 ±10	13.3 ±0.5	17.5 ±1.3
	300	6	752 ±43	14.5 ±0.5	41.8 ±1.5	55 ±1	19.4 ±0.5	34.8 ±0.4	38 ±6	13.2 ±0.4	18.5 ±0.9
	1000	6	785 ±48	14.8 ±0.6	42.7 ±1.8	54 ±2	18.9 ±0.7	34.8 ±0.3	33 ±11	12.9 ±0.5	18.9 ±1.8
After recovery	0	6	813 ±21	15.2 ±0.4	44.4 ±0.7	55 ±1	18.8 ±0.5	34.3 ±0.5	43 ±7	13.9 ±0.8	19.0 ±1.0
	1000	6	814 ±35	15.2 ±0.5	44.0 ±1.6	54 ±1	18.7 ±0.4	34.6 ±0.3	49 ±9	14.0 ±0.5	18.1 ±0.5
			WBC (10 <sup>3</sup> /μl)	Differential leukocyte counts (%)							Plat. (10 <sup>4</sup> /μl)
				Baso.	Neutro.			Lymph.	Mono.	Other	
					Eosin.	Stab.	Seg.				
After treatment	0	6	48 ±19	0 ±0	2 ±1	0 ±0	8 ±4	89 ±5	1 ±1	0 ±0	156 ±14
	30	6	53 ±8	0 ±0	1 ±1	0 ±0	9 ±5	90 ±5	0 ±1	0 ±0	141 ±32
	100	6	47 ±12	0 ±0	1 ±1	0 ±0	11 ±4	87 ±5	1 ±1	0 ±0	151 ±11
	300	6	46 ±11	0 ±0	0 ±0	0 ±0	13 ±5	87 ±5	1 ±1	0 ±0	144 ±12
	1000	6	42 ±15	0 ±0	1 ±1	0 ±0	8 ±3	91 ±3	0 ±1	0 ±0	163 ±23
After recovery	0	6	51 ±25	0 ±0	1 ±1	0 ±0	9 ±4	90 ±3	1 ±0	0 ±0	145 ±12
	1000	6	47 ±11	0 ±0	2 ±2	0 ±0	9 ±6	89 ±7	0 ±1	0 ±0	147 ±14

Each value is expressed as mean ± S.D.

Abbreviations : RBC, Red blood cell ; Hb, Hemoglobin ; Ht, Hematocrit ; MCV, Mean corpuscular volume ; MCH, Mean corpuscular hemoglobin ; MCHC, Mean corpuscular hemoglobin concentration ; Ret., Reticulocyte ; PT, Prothrombin time ; APTT, Activated partial thromboplastin time ; WBC, White blood cell ; Baso., Basophil ; Eosin., Eosinophil ; Neutro., Neutrophil ; Stab., Stab form ; Seg., Segmented ; Lymph., Lymphocyte ; Mono., Monocyte ; Plat., Platelet

28日間反復投与毒性試験

6. 血液生化学的所見 (Table 3,4)

投与期間終了後屠殺動物において、雌雄とも1,000 mg/kg群の総ビリルビン量のみが対照群と比べ高値を示し、統計学的有意差が認められた。ビリルビン検査用試薬で被験物質水溶液 (0.1~1000ppm) を検査した結果、被験物質の濃度に依存して試薬が反応することが確認された。

回復期間終了後屠殺動物では、投与期間終了後屠殺動物で認められたビリルビンの変化は認められなかった。しかし、これとは別に、1,000 mg/kg群において、いずれも軽度なアルブミン量の減少およびそれに伴うA/G比の低下が雄に、無機リン量の減少が雌に認められた。

Table 3. Biochemical findings in male rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days.

Stage	Dose (mg/kg)	No. of animals	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	$\gamma$ -GTP (IU/l)	T.P. (g/dl)	Alb. (g/dl)	A/G	T-Chol. (mg/dl)	T.G. (mg/dl)
	0	6	62 ±5	34 ±6	379 ±50	0.25 ±0.19	6.09 ±0.23	2.84 ±0.16	0.88 ±0.07	85 ±10	107 ±33
	30	6	66 ±6	34 ±6	441 ±80	0.33 ±0.18	5.97 ±0.24	2.81 ±0.18	0.89 ±0.05	88 ±10	112 ±31
	100	6	64 ±6	36 ±5	471 ±135	0.42 ±0.36	5.96 ±0.20	2.83 ±0.11	0.90 ±0.05	92 ±16	91 ±27
	300	6	68 ±5	36 ±6	372 ±117	0.32 ±0.27	6.00 ±0.29	2.84 ±0.12	0.91 ±0.10	94 ±12	87 ±20
	1000	6	65 ±5	35 ±5	399 ±98	0.36 ±0.45	6.14 ±0.17	2.89 ±0.09	0.89 ±0.05	84 ±19	108 ±26
After recovery	0	6	66 ±6	40 ±4	316 ±64	0.26 ±0.16	6.31 ±0.32	2.94 ±0.10	0.88 ±0.08	84 ±8	129 ±44
	1000	6	61 ±4	32 ±8	348 ±64	0.15 ±0.11	6.26 ±0.24	2.74* ±0.13	0.78* ±0.05	88 ±16	113 ±55
			Glu. (mg/dl)	T-Bil. (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Crea. (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
	0	6	141 ±14	0.41 ±0.05	15.9 ±1.6	0.45 ±0.05	10.2 ±0.2	7.3 ±0.3	141 ±1	4.29 ±0.22	100 ±1
	30	6	136 ±6	0.42 ±0.05	15.7 ±1.8	0.48 ±0.05	10.2 ±0.3	7.5 ±0.6	141 ±1	4.50 ±0.22	101 ±1
	100	6	129 ±8	0.40 ±0.02	14.6 ±1.5	0.44 ±0.04	10.3 ±0.3	7.4 ±0.3	141 ±1	4.35 ±0.12	100 ±2
	300	6	132 ±15	0.41 ±0.05	16.0 ±1.1	0.46 ±0.04	10.2 ±0.4	7.1 ±0.5	141 ±1	4.41 ±0.22	101 ±1
	1000	6	133 ±15	0.56*** ±0.07	16.8 ±1.9	0.48 ±0.05	10.4 ±0.3	7.2 ±0.5	141 ±1	4.34 ±0.31	100 ±1
After recovery	0	6	164 ±24	0.43 ±0.06	16.4 ±1.1	0.54 ±0.05	10.3 ±0.4	7.3 ±0.5	140 ±1	4.28 ±0.24	100 ±2
	1000	6	146 ±16	0.48 ±0.04	17.2 ±0.9	0.52 ±0.04	10.2 ±0.3	7.3 ±0.3	140 ±1	4.52 ±0.18	100 ±0

Each value is expressed as mean ± S.D..

\*:Significantly different from control at 5% level of probability

\*\* :Significantly different from control at 1% level of probability

Abbreviations : GOT, Glutamic oxaloacetic transaminase ; GPT, Glutamic pyruvic transaminase ; ALP, Alkaline phosphatase ;

$\gamma$ -GTP, Gamma glutamyl transpeptidase ; T.P., Total protein ; Alb., Albumin ; A/G, Albumin-globulin ratio ; T-Chol., Total cholesterol ; T.G., Triglyceride ; Glu., Glucose ; T-Bil., Total bilirubin ;

BUN, Blood urea nitrogen ; Crea., Creatinine ; Ca, Calcium ; P, Inorganic phosphorus ; Na, Sodium ;

K, Potassium ; Cl, Chloride

Table 4. Biochemical findings in female rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days

Stage	Dose (mg/kg)	No. of animals	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	$\gamma$ -GTP (IU/l)	T.P. (g/dl)	Alb. (g/dl)	A/G	T-Cho. (mg/dl)	T.G. (mg/dl)
After treatment	0	6	73 $\pm 6$	29 $\pm 6$	226 $\pm 51$	0.66 $\pm 0.45$	6.29 $\pm 0.35$	3.28 $\pm 0.21$	1.10 $\pm 0.10$	91 $\pm 12$	51 $\pm 36$
	30	6	70 $\pm 10$	27 $\pm 4$	241 $\pm 41$	0.69 $\pm 0.43$	6.40 $\pm 0.30$	3.27 $\pm 0.26$	1.04 $\pm 0.09$	85 $\pm 7$	66 $\pm 42$
	100	6	66 $\pm 11$	27 $\pm 3$	290 $\pm 63$	0.36 $\pm 0.17$	6.56 $\pm 0.15$	3.36 $\pm 0.18$	1.05 $\pm 0.11$	95 $\pm 17$	74 $\pm 49$
	300	6	62 $\pm 6$	27 $\pm 7$	236 $\pm 49$	0.54 $\pm 0.28$	6.35 $\pm 0.33$	3.21 $\pm 0.22$	1.03 $\pm 0.05$	93 $\pm 23$	83 $\pm 15$
	1000	6	66 $\pm 5$	26 $\pm 5$	237 $\pm 72$	0.42 $\pm 0.21$	6.43 $\pm 0.14$	3.22 $\pm 0.17$	1.01 $\pm 0.08$	89 $\pm 17$	93 $\pm 53$
After recovery	0	6	70 $\pm 11$	28 $\pm 3$	220 $\pm 55$	0.37 $\pm 0.36$	6.48 $\pm 0.43$	3.31 $\pm 0.21$	1.05 $\pm 0.11$	95 $\pm 19$	77 $\pm 25$
	1000	6	62 $\pm 8$	28 $\pm 5$	196 $\pm 47$	0.51 $\pm 0.23$	6.61 $\pm 0.40$	3.46 $\pm 0.23$	1.10 $\pm 0.05$	106 $\pm 24$	121 $\pm 59$
			Glu. (mg/dl)	T-Bil. (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Crea. (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
After treatment	0	6	114 $\pm 8$	0.35 $\pm 0.08$	19.9 $\pm 3.0$	0.51 $\pm 0.04$	10.1 $\pm 0.4$	6.4 $\pm 0.7$	140 $\pm 1$	4.31 $\pm 0.33$	102 $\pm 1$
	30	6	125 $\pm 10$	0.38 $\pm 0.07$	17.7 $\pm 1.5$	0.54 $\pm 0.04$	10.4 $\pm 0.2$	6.4 $\pm 0.8$	140 $\pm 1$	4.15 $\pm 0.11$	102 $\pm 1$
	100	6	118 $\pm 13$	0.41 $\pm 0.08$	20.1 $\pm 2.5$	0.56 $\pm 0.04$	10.4 $\pm 0.3$	6.4 $\pm 0.6$	141 $\pm 1$	4.21 $\pm 0.15$	101 $\pm 2$
	300	6	120 $\pm 11$	0.41 $\pm 0.06$	19.4 $\pm 2.6$	0.52 $\pm 0.04$	10.5 $\pm 0.2$	6.5 $\pm 0.5$	140 $\pm 0$	4.03 $\pm 0.27$	102 $\pm 1$
	1000	6	123 $\pm 16$	0.56** $\pm 0.06$	18.7 $\pm 2.1$	0.52 $\pm 0.04$	10.3 $\pm 0.4$	6.2 $\pm 0.8$	140 $\pm 1$	4.12 $\pm 0.22$	102 $\pm 1$
After recovery	0	6	136 $\pm 21$	0.46 $\pm 0.06$	18.9 $\pm 2.7$	0.64 $\pm 0.05$	10.4 $\pm 0.3$	6.5 $\pm 0.8$	140 $\pm 2$	4.15 $\pm 0.12$	101 $\pm 1$
	1000	6	130 $\pm 12$	0.48 $\pm 0.05$	19.1 $\pm 2.2$	0.61 $\pm 0.05$	10.3 $\pm 0.2$	5.7* $\pm 0.3$	140 $\pm 1$	4.36 $\pm 0.22$	101 $\pm 1$

Each value is expressed as mean  $\pm$  S.D.

\*:Significantly different from control at 5% level of probability

\*\* :Significantly different from control at 1% level of probability

Abbreviations : GOT, Glutamic oxaloacetic transaminase ; GPT, Glutamic pyruvic transaminase ; ALP, Alkaline phosphatase ;

$\gamma$ -GTP, Gamma glutamyl transpeptidase ; T.P., Total protein ; Alb., Albumin ; A/G, Albumin-globulin ratio ; T-Cho., Total cholesterol ; T.G., Triglyceride ; Glu., Glucose ; T-Bil., Total bilirubin ;

BUN, Blood urea nitrogen ; Crea., Creatinine ; Ca, Calcium ; P, Inorganic phosphorus ; Na, Sodium ;

K, Potassium ; Cl, Chloride

28日間反復投与毒性試験

7. 病理学的所見

1) 剖検所見

投与期間終了後屠殺動物において、30、100および300 mg/kg群では、被験物質投与の影響がうかがわれる異常は認められなかった。1,000 mg/kg群では、盲腸の軽度な拡張が各6匹中雄の2匹と雌の4匹に認められた。回復期間終了後屠殺動物においては、異常は認められなかった。

2) 臓器重量 (Table 5,6)

投与期間終了後屠殺動物において、被験物質投与各群の測定した各臓器の重量は、絶対および相対重量のいずれにおいても、対照群に比べて統計学的に有意な変化は認められなかった。回復期間終了後屠殺動物においては、雌において1,000 mg/kg群の体重が対照群をやや下回ったため、副腎は絶対重量のみの減少、脳は相対重量のみの増加を示したが、絶対および相対重量に共通して一定の変化傾向を示す臓器は認められなかった。

Table 5. Absolute and relative organ weights in male rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days.

	Stage	Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Adrenals (mg)	Testes (g)		
Absolute	After treatment	0	6	345 ±24	1.99 ±0.05	10.26 ±0.30	2.59 ±0.33	57.5 ±8.4	2.92 ±0.18		
		30	6	335 ±18	1.99 ±0.08	9.68 ±0.74	2.46 ±0.07	57.2 ±9.9	3.19 ±0.10		
		100	6	342 ±24	1.99 ±0.05	9.70 ±1.35	2.54 ±0.24	51.5 ±4.2	3.08 ±0.15		
		300	6	322 ±20	1.99 ±0.12	9.42 ±0.74	2.41 ±0.28	55.2 ±6.8	2.90 ±0.21		
		1000	6	340 ±24	2.01 ±0.09	10.07 ±1.19	2.59 ±0.30	61.3 ±10.6	3.11 ±0.30		
	After recovery	0	6	400 ±27	2.05 ±0.05	11.70 ±1.17	2.68 ±0.26	57.1 ±7.8	3.21 ±0.35		
		1000	6	403 ±19	2.06 ±0.07	11.41 ±0.96	2.85 ±0.16	52.7 ±5.9	3.16 ±0.14		
		Relative <sup>a</sup>	After treatment	0	6	345 ±24	0.58 ±0.04	2.97 ±0.17	0.75 ±0.08	16.67 ±2.05	0.85 ±0.06
				30	6	335 ±18	0.60 ±0.03	2.89 ±0.08	0.74 ±0.05	17.19 ±3.32	0.96 ±0.07
				100	6	342 ±24	0.58 ±0.03	2.83 ±0.21	0.74 ±0.03	15.13 ±1.80	0.91 ±0.06
300	6			322 ±20	0.62 ±0.02	2.93 ±0.16	0.75 ±0.06	17.15 ±1.78	0.91 ±0.09		
1000	6			340 ±24	0.59 ±0.03	2.96 ±0.17	0.76 ±0.05	17.96 ±2.58	0.92 ±0.07		
After recovery	0	6	400 ±27	0.52 ±0.04	2.92 ±0.13	0.67 ±0.04	14.26 ±1.55	0.80 ±0.06			
	1000	6	403 ±19	0.51 ±0.02	2.83 ±0.17	0.71 ±0.06	13.12 ±1.74	0.79 ±0.03			

Each value is expressed as mean ± S.D..

a : Relative organ weight per 100g body weight

Table 6. Absolute and relative organ weights in female rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days

	Stage	Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Brain (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Adrenals (mg)	Ovaries (mg)		
Absolute	After treatment	0	6	194 ±14	1.86 ±0.05	5.30 ±0.59	1.55 ±0.09	59.3 ±6.9	76.8 ±13.3		
		30	6	202 ±19	1.83 ±0.06	5.93 ±0.62	1.59 ±0.13	60.2 ±7.6	84.4 ±5.2		
		100	6	204 ±13	1.84 ±0.03	5.79 ±0.64	1.54 ±0.09	57.8 ±4.0	76.8 ±16.4		
		300	6	202 ±15	1.78 ±0.06	6.01 ±0.66	1.55 ±0.23	55.6 ±6.3	76.2 ±9.2		
		1000	6	200 ±7	1.81 ±0.06	5.70 ±0.69	1.61 ±0.12	57.0 ±9.8	81.8 ±7.2		
	After recovery	0	6	222 ±17	1.83 ±0.03	6.11 ±0.75	1.53 ±0.14	67.6 ±8.8	88.9 ±11.3		
		1000	6	209 ±10	1.85 ±0.04	5.71 ±0.47	1.49 ±0.09	57.6* ±6.0	76.7 ±9.4		
		Relative*	After treatment	0	6	194 ±14	0.96 ±0.04	2.73 ±0.17	0.80 ±0.04	30.71 ±4.33	39.4 ±5.3
				30	6	202 ±19	0.91 ±0.08	2.94 ±0.12	0.79 ±0.05	29.83 ±2.46	42.0 ±3.2
				100	6	204 ±13	0.91 ±0.06	2.85 ±0.21	0.76 ±0.05	28.48 ±2.12	37.9 ±8.3
300	6			202 ±15	0.88 ±0.07	2.97 ±0.17	0.76 ±0.08	27.59 ±3.71	37.7 ±4.3		
1000	6			200 ±7	0.91 ±0.05	2.85 ±0.28	0.80 ±0.05	28.46 ±4.53	41.0 ±4.4		
After recovery	0		6	222 ±17	0.83 ±0.04	2.75 ±0.22	0.69 ±0.04	30.56 ±4.28	40.1 ±3.8		
	1000		6	209 ±10	0.89* ±0.04	2.73 ±0.11	0.71 ±0.04	27.67 ±3.76	36.7 ±3.4		

Each value is expressed as mean ± S.D.

\* : Significantly different from control at 5% level of probability

a : Relative organ weight per 100g body weight

### 3) 病理組織学的所見 (Table 7)

対照群および1,000 mg/kg群の雌雄について、心臓、肝臓、脾臓、腎臓および副腎を検査した。また、剖検で盲腸の拡張が認められたので盲腸についても検査した。その結果、観察した各臓器に、被験物質投与の影響が考えられる変化は認められなかった。肉眼的に拡張していた盲腸は、粘膜や筋層の進展はみられたが病的異常は認められなかった。

### 考察

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフトレンジスルホン酸モノナトリウムのラットを用いた経口投与による28日間の反復投与毒性試験を、0 (対照)、30、100、300および1,000 mg/kg群の5群で行った。また、対照群および1,000 mg/kg群については、投与期間終了後14日間の回復期間を設け、変化の可逆性についても検討した。

投与期間終了後屠殺動物において、30、100および300 mg/kg群では、雌雄とも被験物質投与の毒性影響と考えられる変化は認められなかった。1,000 mg/kg群においても、病理組織学的変化を伴わない単純な盲腸の拡張例が雌雄に認められたのみで、その他特に変化は認められなかった。

Table 7. Incidence of histopathological findings in rats treated orally with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate for 28 days (after treatment).

Sex	Organ : Findings	Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
		No. of animals	6	6	6	6	6
Male	Liver : Microgranuloma	+	0	-	-	-	1
	Kidney : Focal tubular dilatation with fibrosis	+	0	-	-	-	1
	Eosinophilic bodies in proximal tubule	+	0	-	-	-	2
	Hyaline droplets in proximal tubular epithelium	+	1	-	-	-	0
	Liver : Microgranuloma	+	2	-	-	-	2
Female	Kidney : Focal tubular dilatation with hyaline casts	+	2	-	-	-	0
	Interstitial cell infiltration	+	0	-	-	-	1

- : Not examined; + : Slight

No abnormalities detected in heart, spleen, adrenal and cecum from rats of control and 1000 mg/kg groups.

明らかな病理組織学的変化を伴わない盲腸の拡張は、抗菌性物質や高分子化合物のラットやウサギなどの盲腸の大きな動物種への投与時にしばしば認められ、腸内細菌叢の乱れによる変化と考えられている。

被験物質投与による盲腸拡張の発現機序については不明であるが、いずれにしても単なる盲腸内容物の増加による軽度な変化であり、下痢等の一般状態の変化や成長に対する影響は認められていないことから、生物学的にも毒性学的にも特に問題となるような変化ではないと判断される。

なお、尿中ビリルビンおよびウロビリノーゲンの定性的検査において、100 mg/kg以上の用量群の雌雄の尿に対し判定基準にない色調の呈色反応が現れ、判定が困難であった。また、血液生化学的検査において、関連する変化を伴わないビリルビン量のみの高値が1,000 mg/kg群の雌雄に認められた。

ビリルビンについては、尿および血清用検査試薬ともジアゾ試薬を用いており、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフトレンジルスルホン酸モノナトリウムはナフトール誘導体であることから、このジアゾ試薬と容易に反応することは当然考えられる。また、Ehrlich反応を応用した尿中のウロビリノーゲンの定性的検査についても、Ehrlich試薬は古くからアミノ基や活性メチレンの発色試薬として用いられており、ナフトール誘導体である被験物質に対しても反応することは十分予想される。これらのことは、被験物質水溶液に対して、これらの試薬が反応したことにより確認された。

したがって、尿試験におけるビリルビンやウロビリノーゲン検査試薬による発色や血清ビリルビンの高値は、尿中あるいは血中の被験物質およびその代謝物と試薬との反応生成体によるものと考えられ、被験物質の毒性影響を示唆する変化ではないと判断された。

一方、回復期間終了後屠殺動物では、投与期間終了後屠殺動物で認められた盲腸の拡張は認められず、回復していた。

これとは別に、回復期間終了後屠殺動物の1,000 mg/kg群において、いずれも血清アルブミン量の減少およびそれに伴うA/G比の低下が雄に、無機リン量の減少が雌に認められたが、いずれも軽度、かつ、当研究所におけるバックグランドデータからみて生理的範囲内の変動であり、他に関連する変化も認められないことから、被験物質投与と関連付けるのは困難であった。さらに、1,000 mg/kg群の雌における脳の相対重量増加と副腎の絶対重量減少についても、絶対および相対重量に共通して一定の変化傾向を示すものではなく、体重が対照群をやや下回ったことに伴う二次的な変化と判断される。

このように、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフトレンジルスルホン酸モノナトリウムはラットへの28日間反復投与において、1,000 mg/kg群においても特に問題となるような毒性影響は認められなかった。したがって、無影響量 (NOEL) は1,000 mg/kg/dayと推定された。

連絡先：試験責任者 伊藤義彦

(財) 畜産生物科学安全研究所

〒229 神奈川県相模原市橋本台 3-7-11

Tel 0427-62-2775 Fax 0427-62-7979

Correspondence : Ito, Yoshihiko

Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology, Japan

3-7-11 Hashimoto-dai, Sagami-hara-shi, Kanagawa, 229, Japan

Tel 81-427-62-2775 Fax 81-427-62-7979

# 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate on Bacteria

### 要約

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は 50~5000 µg/プレート の用量で、本試験は 312.5~5000 µg/プレート の用量で試験を行った。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムは、用いた試験系において変異原性を有しない（陰性）と判定された。

### 緒言

OECD 既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムについて、細菌を用いる復帰変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異<sup>1)</sup>、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異<sup>2)</sup> を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9混液）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）およびOECD化学品試験法ガイドライン：471、472に準拠し、化学物質GLP（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

### 方法

#### 〔検定菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*

*Salmonella typhimurium* TA98

*Salmonella typhimurium* TA1537

*Salmonella typhimurium* TA100、*Salmonella typhimurium* TA1535、*Salmonella typhimurium* TA98、*Salmonella typhimurium* TA1537の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与を受けた。

*Escherichia coli* WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス（Difco）を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

#### 〔被験物質〕

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム（CAS No. 5460-09-3、Monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate）は、分子量341.3の淡褐色粉末である。純度87.4%のもの（ロット番号：AZ01、東京化成工業（株））を（社）日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムは、ジメチルスルホキシド（ロット番号：DSL5887、和光純薬工業（株））を用いて50 mg/mlになるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。なお、調製にあたって、純度換算は行わなかった。

試験の開始に先立って、秦野研究所において4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム塩のDMSO溶液中での安定性試験を行った。本試験における最高濃度（50 mg/ml）および最低濃度（3 mg/ml）の2濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後3時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値の平均（0時間）に対して、96.1および101%であった。これらの値は、当研究所の標準操作手順書の基準（初回の測定平均値の90%以上）を満たしていた。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml溶液の含量は既定濃度に対し、98.4~101%、3.125 mg/ml溶液は、103~108%であった。これらの値も当研究所の標準操作手順書の基準（平均含量は添加量の85%以上）を満たしていた。

## 復帰変異試験

以上の結果から、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフトレンジスルホン酸モノナトリウムはDMSO溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

- AF-2 : フリルフラマイド (上野製薬(株))
- SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))
- 9-AA : 9-アミノアクリジン (東京化成工業(株))
- 2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF-2、9-AA、2-AAはDMSO (和光純薬工業(株)) に、SAは蒸留水に溶解して試験に用いた。

### 〔培地およびS9混液の組成〕

#### 1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクト・アガー (Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
ビオチン	0.5 mM

\* WP2用には、0.5mML-トリプトファン水溶液を用いた。

#### 2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社の最少寒天培地を用いた。なお、培地1lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2g
クエン酸・1水和物	2g
リン酸水素二カルシウム	10g
リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5g
グルコース	20g
バクト・アガー (Difco)	15g

径90mmのシャーレ1枚あたり30mlを流して固めてある。

#### 3) S9混液 (1 ml中下記の成分を含む)

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カルシウム	33 μmol
グルコース・6リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml

\*\* : 7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール (PB) および5、6-ベンゾフラボン (BF) の併用投与で酵素誘導して作製したS9 (キッコーマン(株)) を用いた。

### 〔試験方法〕

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトップアガー2ml、被験物質調製液0.1ml、リン酸緩衝液0.5 ml (代謝活性化試験においてはS9混液

0.5 ml)、検定菌液0.1 mlを混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりにDMSO、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を算定し、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。

### 〔判定基準〕

被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。

## 結果および考察

### 〔用量設定試験〕

50~5000 μg/プレートの範囲で試験を実施したところ、すべての検定菌の直接試験および代謝活性化試験において抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験における最高用量を、すべての検定菌で、直接試験および代謝活性化試験ともに5000 μg/プレートとし、公比2で5用量を設定することとした。

### 〔本試験〕

結果をTables 1, 2に示した。4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフトレンジスルホン酸モノナトリウムについて312.5~5000 μg/プレートの範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接試験、代謝活性化試験のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。また、すべての検定菌において抗菌性は認められなかった。

用量設定試験において、WP2の最低用量、50 μg/プレートで陰性対照の2倍以上の変異コロニーが認められたが、本試験では2回とも、WP2において変異コロニー数の増加は認められなかった。以上から、WP2の用量設定試験における変異コロニー数の増加は偶発的なものと考えられた。

以上の結果に基づき、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフトレンジスルホン酸モノナトリウムは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

## 文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983)
- 2) M. H. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, and C. Ramel eds.), Elsevier Science Publisher, New York, 1984, p161.

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム

連絡先：試験責任者 澁谷徹  
 (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 : Shibuya, Tohru  
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
 Center  
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan  
 Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt\*

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)														
			Base-pair substitution type						Frameshift type								
			TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537						
Solvent control	-	-	145 (131 $\pm$ )	127 (13.5)	120 (13.5)	22 (18 $\pm$ )	17 (3.6)	15 (3.6)	9 (13 $\pm$ )	13 (3.5)	16 (3.5)	27 (22 $\pm$ )	18 (4.6)	21 (4.6)	10 (9 $\pm$ )	10 (2.3)	6 (2.3)
Test substance	312.5	-	168 (160 $\pm$ )	176 (21.7)	135 (21.7)	25 (17 $\pm$ )	8 (9.0)	16 (9.0)	12 (15 $\pm$ )	18 (3.1)	16 (3.1)	26 (22 $\pm$ )	21 (3.2)	20 (3.2)	4 (5 $\pm$ )	6 (1.2)	6 (1.2)
	625	-	144 (139 $\pm$ )	140 (5.0)	134 (5.0)	13 (15 $\pm$ )	14 (2.6)	18 (2.6)	12 (11 $\pm$ )	10 (1.2)	12 (1.2)	20 (20 $\pm$ )	22 (2.5)	17 (2.5)	8 (9 $\pm$ )	9 (0.6)	9 (0.6)
	1250	-	129 (117 $\pm$ )	115 (10.7)	108 (10.7)	16 (12 $\pm$ )	8 (4.0)	11 (4.0)	13 (13 $\pm$ )	15 (2.0)	11 (2.0)	11 (14 $\pm$ )	13 (3.1)	17 (3.1)	7 (7 $\pm$ )	8 (1.5)	5 (1.5)
	2500	-	136 (138 $\pm$ )	138 (2.0)	140 (2.0)	18 (16 $\pm$ )	18 (2.9)	13 (2.9)	8 (12 $\pm$ )	17 (4.7)	10 (4.7)	17 (19 $\pm$ )	17 (2.9)	22 (2.9)	6 (8 $\pm$ )	8 (1.5)	9 (1.5)
	5000	-	133 (140 $\pm$ )	148 (7.5)	140 (7.5)	16 (15 $\pm$ )	12 (2.3)	16 (2.3)	15 (14 $\pm$ )	10 (3.2)	16 (3.2)	21 (18 $\pm$ )	12 (4.9)	20 (4.9)	2 (4 $\pm$ )	5 (2.1)	6 (2.1)
Solvent control		+	163 (137 $\pm$ )	125 (22.2)	124 (22.2)	15 (12 $\pm$ )	13 (3.1)	9 (3.1)	19 (17 $\pm$ )	19 (2.9)	14 (2.9)	45 (42 $\pm$ )	45 (4.6)	37 (4.6)	10 (10 $\pm$ )	9 (1.0)	11 (1.0)
Test substance	312.5	+	156 (155 $\pm$ )	158 (3.6)	151 (3.6)	12 (14 $\pm$ )	15 (2.1)	16 (2.1)	19 (15 $\pm$ )	15 (4.0)	11 (4.0)	46 (39 $\pm$ )	27 (10.4)	44 (10.4)	4 (7 $\pm$ )	6 (3.1)	10 (3.1)
	625	+	149 (133 $\pm$ )	132 (15.0)	119 (15.0)	8 (10 $\pm$ )	10 (1.5)	11 (1.5)	20 (15 $\pm$ )	13 (4.7)	11 (4.7)	37 (30 $\pm$ )	25 (6.4)	27 (6.4)	8 (6 $\pm$ )	4 (2.1)	7 (2.1)
	1250	+	109 (129 $\pm$ )	156 (24.3)	122 (24.3)	7 (11 $\pm$ )	12 (3.2)	13 (3.2)	13 (11 $\pm$ )	9 (2.1)	12 (2.1)	27 (26 $\pm$ )	27 (1.2)	25 (1.2)	6 (7 $\pm$ )	10 (2.3)	6 (2.3)
	2500	+	163 (129 $\pm$ )	109 (29.4)	116 (29.4)	15 (12 $\pm$ )	9 (3.0)	12 (3.0)	12 (14 $\pm$ )	13 (2.1)	16 (2.1)	21 (26 $\pm$ )	31 (5.0)	25 (5.0)	7 (5 $\pm$ )	5 (2.5)	2 (2.5)
	5000	+	141 (140 $\pm$ )	145 (5.6)	134 (5.6)	18 (12 $\pm$ )	16 (4.0)	8 (4.0)	12 (12 $\pm$ )	12 (0.6)	13 (0.6)	28 (29 $\pm$ )	30 (1.0)	29 (1.0)	3 (6 $\pm$ )	10 (3.5)	6 (3.5)
Positive control	Chemical Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		694 (654 $\pm$ )	612 (41.1)	657 (41.1)	166 (184 $\pm$ )	194 (15.4)	191 (15.4)	122 (119 $\pm$ )	127 (10.4)	107 (10.4)	796 (780 $\pm$ )	748 (28.0)	797 (28.0)	2750 (3113 $\pm$ )	3527 (391.1)	3061 (391.1)
Positive control	Chemical Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		991 (1046 $\pm$ )	1051 (52.7)	1096 (52.7)	231 (203 $\pm$ )	196 (24.8)	183 (24.8)	899 (866 $\pm$ )	897 (54.9)	803 (54.9)	463 (372 $\pm$ )	345 (81.3)	307 (81.3)	198 (205 $\pm$ )	225 (18.0)	191 (18.0)

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene  
 \*:Purity was 87.4%

Table 2 Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt\*

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)														
			Base-pair substitution type									Frameshift type					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Solvent control	-	-	159 (154 $\pm$ )	156 (154 $\pm$ )	147 (6.2)	21 (16 $\pm$ )	15 (16 $\pm$ )	13 (4.2)	18 (21 $\pm$ )	17 (21 $\pm$ )	28 (6.1)	22 (29 $\pm$ )	28 (29 $\pm$ )	36 (7.0)	16 (13 $\pm$ )	14 (13 $\pm$ )	9 (3.6)
Test substance	312.5	-	127 (135 $\pm$ )	145 (135 $\pm$ )	132 (9.3)	14 (13 $\pm$ )	14 (13 $\pm$ )	10 (2.3)	16 (15 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	14 (1.0)	20 (25 $\pm$ )	31 (25 $\pm$ )	23 (5.7)	13 (9 $\pm$ )	7 (9 $\pm$ )	8 (3.2)
	625	-	150 (137 $\pm$ )	127 (137 $\pm$ )	133 (11.9)	25 (19 $\pm$ )	19 (19 $\pm$ )	13 (6.0)	16 (12 $\pm$ )	13 (12 $\pm$ )	8 (4.0)	23 (24 $\pm$ )	29 (24 $\pm$ )	21 (4.2)	5 (6 $\pm$ )	7 (6 $\pm$ )	5 (1.2)
	1250	-	127 (131 $\pm$ )	133 (131 $\pm$ )	133 (3.5)	15 (17 $\pm$ )	18 (17 $\pm$ )	19 (2.1)	10 (12 $\pm$ )	10 (12 $\pm$ )	15 (2.9)	14 (17 $\pm$ )	20 (17 $\pm$ )	16 (3.1)	7 (6 $\pm$ )	4 (6 $\pm$ )	7 (1.7)
	2500	-	139 (140 $\pm$ )	134 (140 $\pm$ )	147 (6.6)	10 (13 $\pm$ )	11 (13 $\pm$ )	18 (4.4)	20 (16 $\pm$ )	14 (16 $\pm$ )	13 (3.8)	17 (21 $\pm$ )	23 (21 $\pm$ )	24 (3.8)	8 (9 $\pm$ )	7 (9 $\pm$ )	12 (2.6)
	5000	-	138 (138 $\pm$ )	125 (138 $\pm$ )	150 (12.5)	19 (16 $\pm$ )	13 (16 $\pm$ )	16 (3.0)	11 (15 $\pm$ )	19 (15 $\pm$ )	16 (4.0)	22 (21 $\pm$ )	20 (21 $\pm$ )	22 (1.2)	6 (7 $\pm$ )	9 (7 $\pm$ )	6 (1.7)
Solvent control	+	+	155 (154 $\pm$ )	138 (154 $\pm$ )	170 (16.0)	15 (16 $\pm$ )	8 (16 $\pm$ )	25 (8.5)	16 (14 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	12 (2.0)	33 (32 $\pm$ )	26 (32 $\pm$ )	38 (6.0)	14 (13 $\pm$ )	13 (13 $\pm$ )	13 (0.6)
Test substance	312.5	+	136 (131 $\pm$ )	142 (131 $\pm$ )	114 (14.7)	16 (14 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	11 (2.5)	18 (17 $\pm$ )	17 (17 $\pm$ )	15 (1.5)	41 (38 $\pm$ )	44 (38 $\pm$ )	28 (8.5)	8 (14 $\pm$ )	18 (14 $\pm$ )	17 (5.5)
	625	+	137 (130 $\pm$ )	124 (130 $\pm$ )	128 (6.7)	22 (18 $\pm$ )	18 (18 $\pm$ )	15 (3.5)	21 (17 $\pm$ )	15 (17 $\pm$ )	16 (3.2)	26 (23 $\pm$ )	26 (23 $\pm$ )	17 (5.2)	10 (11 $\pm$ )	10 (11 $\pm$ )	13 (1.7)
	1250	+	137 (133 $\pm$ )	138 (133 $\pm$ )	123 (8.4)	17 (15 $\pm$ )	12 (15 $\pm$ )	15 (2.5)	24 (16 $\pm$ )	15 (16 $\pm$ )	10 (7.1)	25 (27 $\pm$ )	33 (27 $\pm$ )	23 (5.3)	7 (8 $\pm$ )	7 (8 $\pm$ )	11 (2.3)
	2500	+	126 (126 $\pm$ )	135 (126 $\pm$ )	117 (9.0)	11 (12 $\pm$ )	13 (12 $\pm$ )	12 (1.0)	15 (16 $\pm$ )	20 (16 $\pm$ )	13 (3.6)	27 (28 $\pm$ )	28 (28 $\pm$ )	30 (1.5)	9 (11 $\pm$ )	14 (11 $\pm$ )	10 (2.6)
	5000	+	115 (120 $\pm$ )	128 (120 $\pm$ )	116 (7.2)	20 (14 $\pm$ )	10 (14 $\pm$ )	13 (5.1)	19 (17 $\pm$ )	12 (17 $\pm$ )	19 (4.0)	26 (24 $\pm$ )	27 (24 $\pm$ )	19 (4.4)	14 (14 $\pm$ )	12 (14 $\pm$ )	15 (1.5)
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		653 (670 $\pm$ )	675 (670 $\pm$ )	683 (15.5)	184 (159 $\pm$ )	154 (159 $\pm$ )	140 (22.5)	106 (106 $\pm$ )	105 (106 $\pm$ )	106 (0.6)	779 (804 $\pm$ )	781 (804 $\pm$ )	851 (41.0)	2693 (2696 $\pm$ )	2638 (2696 $\pm$ )	2758 (60.1)
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		1001 (972 $\pm$ )	927 (972 $\pm$ )	987 (39.3)	187 (172 $\pm$ )	160 (172 $\pm$ )	169 (13.7)	748 (766 $\pm$ )	747 (766 $\pm$ )	802 (31.5)	201 (205 $\pm$ )	202 (205 $\pm$ )	213 (6.7)	157 (182 $\pm$ )	180 (182 $\pm$ )	208 (25.5)

AF2:2-(2-Puryl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene  
\*:Purity was 87.4%

# 4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

## In vitro Chromosomal Aberration Test of Monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて検討した。

#### 1) 細胞増殖抑制試験

直接法における約50%の増殖抑制濃度は2.20 mg/mlであった。代謝活性化法では、いずれの処理濃度群 (0.11~3.40 mg/ml) においても、50%をこえる増殖抑制作用は観察されなかった。

従って、染色体異常試験において、直接法では2.20 mg/ml、代謝活性化法では3.40 mg/ml (10 mM相当) の処理濃度をそれぞれ高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

#### 2) 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、いずれの濃度においても染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。また、代謝活性化法のS9 mix存在下および非存在下のいずれの処理条件においても、染色体異常の誘発作用は認められなかった。

#### 3) 結論

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムは、今回実施した試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

### 緒言

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの、培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

この試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号) およびOECDガイドライン:473に準拠し、化学物質GLP (昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号) に基づいて実施したものである。

### 材料および方法

#### 1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク (JCRB) から入手 (1988年2月、入手時:継代4代) したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清 (FCS: Bocknek、ロット番号SF70521) を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

$2 \times 10^4$ 個のCHL細胞を、培養液 5mlを入れたシャーレ (径6cm、Corning) に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) 内で培養した。

#### 4. 被験物質

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム (CAS No. 5460-09-3、ロット番号: AZ01、東京化成工業 (株) 製造、(社) 日本化学工業協会提供) は淡褐色の粉末で、アセトンおよび水には溶けず、DMSO (ジメチルスルホキシド) に5%まで溶解する。分子式C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>、分子量341.3の物質で、純度は87.4%である (東京化成工業 (株) 資料)。本実験では被験物質が水に溶けないことから、溶媒として0.5% CMC Na (カルボキシメチルセルロースナトリウム) 液を用いた。原体の安定性に関しては情報は得られなかったが、秦野研究所分析化学研究室で実施した溶媒中での安定性試験では、5.50~34.0 mg/mlの濃度範囲で3時間は安定であった。

#### 5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。原体を0.5% CMC Na溶液 (ナカライテスク (株)、ロット番号: M9G8053) に懸濁して原液 (34.0または22.0 mg/ml) を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、全ての試験において培養液の10% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85%以上) の値であった。

## 染色体異常試験

### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。

被験物質のCHL細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（オリンパス）を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、直接法における約50%の増殖抑制濃度は2.20 mg/mlであった。一方、代謝活性化法では、処理した濃度範囲（0.11～3.40 mg/ml）において50%をこえる増殖抑制は観察されなかった（Fig.1）。

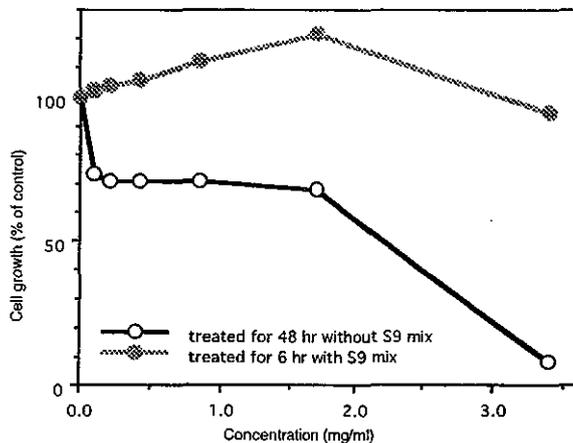


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate in CHL cells

### 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、直接法（24および48時間連続処理）では2.20 mg/ml、代謝活性化法（6時間処理後18時間培養）では3.40 mg/ml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。

### 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。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製し、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。ギムザ染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

### 9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのシャーレから得られた異なる標本を、複数の観察者がそれぞれブラインドの状態で行った。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<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞（polyploid）の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

### 10. 記録と判定

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

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの“Exact probability test”法により溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が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。

### 結果および考察

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムを加えて24時間および48時間処理した各群において、いずれも染色体の構造異常の出現頻度に有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。また、倍数性細胞についても同様に有意な増加はみられなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した。

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した各濃度群において、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。

陽性対照として用いた直接法でのMC処理群、およびS9 mix存在下でのCPA処理群では染色分体交換（cte）や染色分体切断（ctb）などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

なお、本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

### 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編：“化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 1988.
- 2) 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, 1987.

連絡先：試験責任者 田中憲穂  
(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: Tanaka, Norihiro  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan  
Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate\*\* by direct method

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG	TA (%)		SA	NA
Control			200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	0 ( 0.0)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	2	1	0	0	0	0	0	3	0	3 ( 1.5)	1 ( 0.5)	0.50		
AHNS	0.55	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.25	-	-
AHNS	1.10	24	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	0 ( 0.0)	0.50	-	-
AHNS	2.20	24	200	6	0	0	0	0	0	0	6	0	6 ( 3.0)	0 ( 0.0)	0.38	-	-
MC	0.00005	24	200	18	44	57	1	0	3	0	123	0	77* ( 38.5)	68* ( 34.0)	0.25	+	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.13		
AHNS	0.55	48	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	0 ( 0.0)	0.25	-	-
AHNS	1.10	48	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.00	-	-
AHNS	2.20	48	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	4 ( 2.0)	0 ( 0.0)	0.25	-	-
MC	0.00005	48	200	17	24	60	1	1	0	20	123	0	73* ( 36.5)	62* ( 31.0)	0.25	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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. 1) 0.5% Carboxymethylcellulose sodium 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

\* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 87.4%.

Table 2 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate\*\* by metabolic activation method

Group	Concentration (mg/ml)	S-9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG	TA (%)		SA	NA
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.25		
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.75		
AHNS	0.85	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.50	-	-
AHNS	1.70	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.38	-	-
AHNS	3.40	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.25	-	-
CPA	0.005	-	6-(18)	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	0 ( 0.0)	0.88	-	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.38		
AHNS	0.85	+	6-(18)	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	0 ( 0.0)	0.25	-	-
AHNS	1.70	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.50	-	-
AHNS	3.40	+	6-(18)	200	2	1	0	0	0	0	0	3	0	3 ( 1.5)	1 ( 0.5)	0.50	-	-
CPA	0.005	+	6-(18)	200	24	80	130	1	1	2	30	268	0	113* ( 56.5)	109* ( 54.5)	0.13	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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. 1) 0.5% Carboxymethylcellulose sodium 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

\* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 87.4%.

## 2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールのラットを用いた 反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

### Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2,2-Dimethyl-1,3-propanediol in Rats

#### 要約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオール（ネオペンチルグリコール）の0（溶媒対照群）、100、300および1,000 mg/kg/dayをSprague-Dawley系（Slc:SD）ラットに交配前2週間および交配期間2週間を通じて経口投与し、さらに雄では交配期間終了後17日間、雌では妊娠期間を通じて分娩後哺育3日まで連続投与し、親動物に対する反復投与毒性および生殖能ならびに児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

#### 1. 反復投与毒性

一般状態には被験物質投与の影響は認められず、死亡例も観察されなかった。

体重および摂餌量は雌雄ともに群間で差はなく被験物質投与の影響は認められなかった。

雄の血液学的検査では、被験物質投与の影響と考えられる変化はなかった。また、血液化学的検査では、300および1,000 mg/kg群でアルブミンの増加に伴う総蛋白の増加と総ビリルビンの増加が認められ、さらに1,000 mg/kg群では血糖値の減少が認められた。

器官重量は雄の300および1,000 mg/kg群で肝臓重量が増加した。さらに1,000 mg/kg群では腎臓重量が増加し、300 mg/kg群でも統計学的有意差はないものの増加傾向が認められた。

雄の剖検所見では、1,000 mg/kg群の12例中2例に肝臓の肥大が観察された。病理組織学検査では、肝臓の肥大を裏付ける明確な形態的变化は認められなかった。腎臓の所見として、雄の1,000 mg/kg群で蛋白円柱や硝子滴変性が増加し、尿管上皮の中程度好塩基性化が11例中4例に観察された。

#### 2. 生殖発生毒性

交尾能、受胎能および性周期観察では、被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時観察では、対照群の1例を除き妊娠動物の全例が正常に分娩し哺育期間を通じ被験物質投与の影響は認められなかった。また、新生児の外表検査でも被験物質投与によると考えられる異常はなく、体重も哺育4日まで順調に増加した。死産児および哺育4日までの死亡児ならびに哺育4日の剖検では、被験物質投与によると考えられる異常所見は観察されなかった。

以上の結果から、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールの反復投与毒性は、雄の300 mg/kg/day以上の投与で認められ、雌では1,000 mg/kg/day投与によっても認められなかった。したがって、最大無影響量は、雄では100 mg/kg/day、雌では1,000 mg/kg/dayと判断した。また、雌雄の生殖に及ぼす影響および児動物の発生・発育に及ぼす影響は1,000 mg/kg/day投与によっても認められず、最大無影響量はともに1,000 mg/kg/dayと判断した。

#### 緒言

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオール（2,2-Dimethyl-1,3-propanediol、別名：Neopentyl glycol）は、化学産業の分野においてポリエステル樹脂の主原料として使用されている化合物である。本化合物の毒性については、経口投与によるLD<sub>50</sub>値がラット6,400~12,800 mg/kg、マウス3,200~6,400 mg/kgであることや1%混餌による36日間投与で体重の増加抑制および摂餌量の減少することが報告されているが、ヒトや実験動物の生殖・発生に及ぼす影響についてはほとんど知られていない。今回、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールの反復投与毒性・生殖発生毒性について検討した。

#### 方法

##### 1. 被験物質

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオール〔ロット番号1N01（三菱瓦斯化学）、Cas No. 126-30-7、別名Neopentyl glycol（NPG）〕は、分子量104.15、融点127℃、沸点208℃（760mmHg）で水に可溶性の白色結晶状フレークであり、使用時まで室温条件下で密閉保管した。

本被験物質は局方注射用蒸留水〔ロット番号9106AS、9108CS、9108VS（光製薬）〕に溶解し、20（w/v）%溶液を調製した。これを原液とし、注射用蒸留水で順次希釈し各群の投与溶液を調製した。調製後は、使用時まで冷蔵庫に保存した。調製液中の被験物質は0.2, 20（w/v）%溶液の場合、冷蔵条件下ですくなくとも7日間安定であることが確認されているため、調製は1週間に1回実施し、調製後7日以内に使用した。

投与液の濃度分析は、各群の調製液について調製開始時に調製したバッチから無作為にサンプルを抽出し実施した。その結果、97.0~103%の範囲で適切に調製されており問題はなかった。

## 2. 使用動物および飼育条件

日本エスエルシー株式会社（静岡県浜松市）から購入した9週齢のSprague-Dawley (Slc:SD,SPF) 系雌雄ラットを使用した。購入した動物は8日間検疫・馴化飼育した後、全例を10週齢で群分けして試験に用いた。群分け時の体重は、雄で294~337 g、雌で199~223 gであった。

動物は、温度22~24℃、湿度50~60%、換気回数20回/時間、照度150~300lux、照明時間12時間（午前7時点灯、午後7時消灯）に設定された飼育室（W8×D8×H2.5 m、160m<sup>3</sup>）で飼育した。株式会社東京技研サービス（東京都府中市）の自動水洗式飼育機（W486×D79×H160 cm）を使用し、アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ（W15.8×D23.8×H16.0 cm、飼育ケージ・スペース6,017 cm<sup>3</sup>）に動物を1匹ずつ収容し飼育した。但し、交配期間中の雄は、アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ（W36.8×D25.0×H16.0 cm、飼育ケージ・スペース14,720 cm<sup>3</sup>）に収容し飼育した。母動物は、妊娠18日以降哺育4日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ（W36.8×D25.0×H16.0 cm）に哺育トレーおよび巣作り材料（アルファードライ）を入れて飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母工業株式会社（東京都中央区）製造のNMF固型飼料（放射線滅菌飼料）を使用した。飲水は、水道水を自由に摂取させた。

供給した飼料、水および巣作り材料には試験に支障を来す可能性の考えられる夾雑物の混在はなかった。

## 3. 群分け

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、1群当たり各12匹を用意した。

群分け後の動物の識別は個体別に耳に入れ墨をするとともにケージごとに動物標識番号（Animal ID-No.）をつけた。

## 4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験の用量は先に実施したラットを用いた反復投与毒性/生殖発生毒性併合予備試験（試験番号1796）の結果を参考にして決定した。すなわち、0、10、100および1,000 mg/kgを雄および雌に2週間連続経口投与した結果、1,000 mg/kg群の雄で肝臓重量が増加した。

以上の結果から、本試験の最高用量は予備試験と同じ1,000 mg/kgを設定し、以下公比約3にて除し、300および100 mg/kgを設定した。

投与経路は、OECDガイドライン「反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験」で指示されている投与経路に準じて強制経口投与を選択した。投与容量は、体重100 g当り0.5 mlとし、個体別に測定した最新体重に基づいて算出を行った。胃ゾンデを用いて毎日1回（7日/週）強制経口投与した。対照群には局方注射用蒸留水のみを投与した。

雄の投与期間は、交配前14日間と交配期間14日間および交配終了後の17日間の連続45日間とした。雌の投与期間は、交配前14日間と交配期間中（交尾成立まで最長14日間）ならびに交尾成立雌の妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで（40~46日間）とした。なお、交尾不成立の雌は交配期間終了後の解剖前日まで45日間投与した。

## 5. 観察および検査

### 1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

### 2) 体重

雄では、投与0（投与開始日）、7、14、21、28、35、42および46日（剖検日）に測定した。雌では、投与0（投与開始日）、7、14および21日に測定し、交尾不成立の雌はそれ以後は投与28、35、42および46日（剖検日）に測定した。交尾成立後の雌は、妊娠0、7、14、21日に、分娩した雌は哺育1および4日に測定した。

### 3) 摂餌量

雄では、投与0（投与開始日）、7および14日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出した。雌では、投与0、7および14日に餌重量を測定した。また、交尾成立の雌は妊娠0、7、14および21日に、分娩した雌は哺育1および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出した。なお、交配期間中および交配期間終了後の摂餌量は測定しなかった。

### 4) 交配

交配前14日間（交配開始日を含めて15日間）の性周期観察を行った雌と同群内の雄を1対1で最長2週間毎晩同居させた。翌朝、陰垢中の精子確認をもって交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。

性周期観察は交尾成立日まで行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数とし平均性周期を算出した。

交配結果から、各群について交尾率〔（交尾動物数/同居動物数）×100〕を算出した。

### 5) 自然分娩時および新生児の観察

交尾成立動物は、全例を自然分娩させた。分娩の確認は午前中（午前9時~12時）に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した個体について、その日を哺育1日、その前日を分娩日（哺育0日）と規定した。午前12時を過ぎて分娩した個体については、翌日を哺育1日とした。分娩を確認した全例について妊娠期間（哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数）、受胎率〔（受胎動物数/交尾成立動物数）×100〕、出産率〔（生児出産雌数/妊娠雌数）×100〕、着床率〔（着床痕数/妊娠黄体数）×100〕、分娩率〔（総出産児数/着床痕数）×100〕、出生率〔（出產生児数/総出産児数）×100〕を算出した。

新生児は哺育1日に出産児数（生存児+死亡児）を調べ、性別を判定するとともに、外形異常の有無を調べた。また、哺育1および4日に雌雄別の同腹児重量を測定し、雌雄別1匹当りの平均重量を算出した。

哺育4日に新生児全例を屠殺し、主要器官の肉眼観察を行った。哺育期間中の死亡児も同様に主要器官の肉眼観察を行った。また、新生児の4日生存率〔（哺育4日生存児数/出產生児数）×100〕を算出した。

### 6) 臨床検査

各群の雄全例について剖検時に実施した。動物を約16時間絶食させた後、エーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。

## a) 血液学的検査

血液学検査には初血を用いた。THMS H6000 (米国テクニコン社) を用いて下記の項目を測定した (EDTA-3K添加血液)。

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)	全赤血球の容積より補正
平均赤血球容積	(MCV)	RBC, HCTより算出
平均赤血球血色素量	(MCH)	HGB, RBCより算出
平均赤血球血色素濃度	(MCHC)	HGB, HCTより算出
血小板数	(PLT)	暗視野板法
白血球百分率		フローサイトケミストリー法

網状赤血球数 (RC) についてはキャピロット (テルモ株式会社、東京都渋谷区) で染色後、血液塗抹標本を作製し鏡検した。

## b) 血液化学的検査

クリーンシール (株式会社ヤトロン、東京都千代田区) に血液を採取し、30分間放置後3,000 r.p.m. 7分間遠心分離して得た血清を検査に用いた。生化学自動分析装置 CentrifChem ENCORE II (ペーカー社、米国) および EKTACHEM 700N (コダック社、米国) を用いて下記の項目を測定した。

総蛋白 (TP)	ビューレット法
アルブミン (Alb)	B.C.G.法
A/G	計算値
血糖 (Glu)	ヘキソキナーゼ法
尿素窒素 (BUN)	ウレアーゼ改良法
クレアチニン (Crea)	Jaffe 法
総ビリルビン (T-Bili)	ジアゾ色素法
グルタミン酸オキザロ	
酢酸トランスアミナーゼ (GOT)	Karmen改良法
グルタミン酸ピルビン	
酸トランスアミナーゼ (GPT)	Wroblewski and LaDue改良法
$\gamma$ -グルタミルトランス	
ペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP)	酵素法
カルシウム (Ca)	アリザリン法
無機リン (IP)	モリブデンブルー法
カリウム (K)	電極法
塩素 (Cl)	電極法

## 7. 病理学検査

## 剖検および器官重量測定

## a) 雄動物

45日間投与後、約16時間の絶食させ、エーテル麻酔下で放血安楽死させた。主要器官の肉眼的観察を行い、肝臓、腎臓、胸腺、精巣上体および精巣重量を測定し、器官重量・体重比を算出した。また、全動物の重量測定器官に加えて脳、心臓、脾臓、副腎、精囊、前立腺、下垂体および肉眼所見で変化が認められた器官・組織として腹腔内の塊を10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。なお、精巣および精巣上体はブアン氏液に固定した。

## b) 自然分娩した雌

哺育4日にエーテル麻酔後放血安楽死させ、主要器官の肉眼的観察を行った後、肝臓、腎臓、胸腺および卵巣重量を測定し、器官重量・体重比を算出した。また、全動物の重量測定器官に加えて脳、心臓、脾臓、副腎、下垂体および肉眼所見で変化が認められた器官・組織として肺を10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。また、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

## c) 交尾不成立の雌

45日間投与後、エーテル麻酔後放血安楽死させ、主要器官の肉眼的観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨 (骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃および十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

## d) 自然分娩の認められない雌

妊娠25日にエーテル麻酔後放血安楽死させ、主要器官の肉眼的観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨 (骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃および十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。着床痕が認められない動物は不妊と判定した。

## 8. 病理組織学検査

## 1) 交尾の成立した雄

対照群と高用量群全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および病変部組織として腹腔内の塊について実施した。なお、1,000 mg/kg群で腎臓の蛋白円柱や硝子滴変性、尿細管上皮の好塩基性化の発生数の増加が認められたため、100および300 mg/kg群の腎臓についても行った。

## 2) 自然分娩した雌

対照群と高用量群全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣および病変部組織として肺について実施した。

## 3) 交尾の成立しなかった雌雄

全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、膣、子宮、卵巣、精巣、精巣上体、精囊、前立腺および下垂体について実施した。

## 4) 妊娠を成立させなかった雄および妊娠不成立の雌

全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、膣、子宮、卵巣、精巣、精巣上体、精囊、前立腺および下垂体について実施した。

## 5) 自然分娩の認められない雌

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨 (骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃および十二指腸、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄について実施した。

9. 統計処理

体重、摂餌量、黄体数、着床痕数、出産児数、死産児数、性比、平均性周期、妊娠期間、着床率、算出率、出生率、外形異常発現率、新生児の4日生存率、器官重量、器官重量・体重比、血液学および血液化学的検査値については、まず、Bartlettの等分散検定を実施した。等分散の場合は一元配置分散分析を行った。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Scheffé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。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た。有意で各群の標本数が同数の場合はDunnnettの順位検定、各群の標本数が異なる場合はSchefféの順位検定で対照群と各投薬群間の有意差を検定した。出産率、交尾率、受胎率については $\chi^2$ 検定を行った。病理組織学検査で群間に程度差が認められた場合は累積カイ二乗検定を行った。なお、哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は\* :  $P < 0.05$ および\*\* :  $P < 0.01$ とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡および一般状態

死亡例は、雌雄ともに投与期間を通じいずれの群にも観察されなかった。

一般状態の観察では、雌雄とも被験物質投与による変化は認められなかった。自然発生性の所見として雄の100 mg/kg群で腹腔内の腫瘍および泌尿生殖器の出血が投与7週に1例、眼分泌物が投与4週に、また切歯異常(上顎切歯折れ)が投与3週に同一個体の1例に観察された。雌では、眼分泌物が対照群で妊娠8日に1例および100 mg/kg群で妊娠13日から哺育1日にかけて1例に観察された。

2) 体重 (Table 1~2)

雌雄ともに各群の体重はほぼ同様な推移を示し、対照群と被験物質投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。

Table 1. Body weight change of male rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals		12	12	12	12
Days of experiment	0	323 ± 9.6	322 ± 11.7	323 ± 12.7	323 ± 9.4
	7	343 ± 16.5	348 ± 8.8	346 ± 17.2	346 ± 15.6
	14	362 ± 19.0	362 ± 18.1	367 ± 20.1	370 ± 20.6
	21	383 ± 19.3	381 ± 18.3	388 ± 21.1	387 ± 21.1
	28	398 ± 21.6	399 ± 20.1	403 ± 23.5	401 ± 23.7
	35	404 ± 22.2	402 ± 20.9	410 ± 25.6	407 ± 28.9
	42	415 ± 23.8	417 ± 25.4	425 ± 28.5	419 ± 30.8
Gain 0-42		92 ± 20.6	95 ± 25.5	101 ± 20.4	96 ± 24.9

Values are expressed as g, Mean ± S.D.

Table 2. Body weight change of female rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Before mating period					
No. of animals		12	12	12	12
Days of experiment	0	210 ± 6.6	209 ± 6.0	210 ± 5.6	210 ± 6.0
	7	223 ± 8.5	225 ± 8.7	224 ± 7.4	224 ± 9.1
	14	238 ± 13.2	239 ± 10.1	238 ± 6.3	239 ± 12.7
	Gain 0-14	28 ± 10.4	29 ± 7.5	28 ± 4.8	29 ± 9.4
Gestation period					
No. of dams		12	10	12	11
Days of gestation	0	242 ± 15.6	242 ± 13.1	242 ± 6.6	243 ± 13.3
	7	270 ± 19.4	270 ± 15.4	270 ± 9.5	266 ± 18.1
	14	296 ± 19.6	295 ± 14.9	300 ± 11.7	294 ± 24.1
	21	365 ± 28.0	368 ± 19.9	378 ± 16.9	367 ± 34.6
	Gain 0-21	123 ± 23.8	125 ± 12.8	136 ± 15.4	123 ± 25.2
Lactation period					
No. of dams		11	10	12	11
Days of lactation	1	267 ± 19.4	260 ± 17.1	274 ± 15.0	272 ± 21.7
	4	273 ± 14.8	273 ± 16.0	281 ± 13.9	279 ± 25.5
	Gain 1-4	6 ± 5.7	13 ± 8.4	7 ± 6.4	8 ± 10.4

Values are expressed as g, Mean ± S.D.

## 3) 摂餌量

雌雄ともに各群の摂餌量はほぼ同程度で、対照群と被験物質投与群との間に統計学的有意差は認められなかった。

## 4) 雄の血液学的検査 (Table 3)

対照群と被験物質投与群との間で差の認められた検査項目はなかった。

## 5) 雄の血液化学検査 (Table 4)

300および1,000 mg/kgでは、対照群と比べ総ビリルビン、総蛋白およびアルブミン量が増加し、さらに1,000 mg/kg群で血糖値が減少した。その他、100および300 mg/kg

kg群でGOTの減少、100 mg/kg群で $\gamma$ -GPTの増加、100、300および1,000 mg/kg群でカルシウムの増加、300 mg/kg群で無機リンの増加、100 mg/kg群でカリウムの減少が認められたが、いずれも軽微な変化か、用量依存性のない変化であった。

## 6) 器官重量 (Table 5~6)

雄では、300および1,000 mg/kg群で対照群に比べ肝臓の実重量および相対重量がともに増加した。さらに、1,000 mg/kg群では、腎臓の実重量および相対重量がともに増加し、300 mg/kg群でも統計学的有意差はないものの増加傾向が認められた。雌では、実重量および相対重量とも対照群と被験物質投与群との間で統計学的有意差が認められた器官はなかった。

Table 3. Hematology of male rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol .

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
HCT(%)	46.6 $\pm$ 1.7	46.7 $\pm$ 3.0	47.2 $\pm$ 1.9	44.7 $\pm$ 2.4
HGB(g/dl)	14.8 $\pm$ 0.5	14.7 $\pm$ 0.9	14.8 $\pm$ 0.6	14.2 $\pm$ 0.5
RBC( $\times 10^6$ /mm <sup>3</sup> )	9.61 $\pm$ 0.30	9.47 $\pm$ 0.72	9.57 $\pm$ 0.46	9.14 $\pm$ 0.48
MCV( $\mu$ m <sup>3</sup> )	48.5 $\pm$ 1.4	49.4 $\pm$ 1.8	49.4 $\pm$ 1.5	48.9 $\pm$ 1.2
MCH(pg)	15.4 $\pm$ 0.4	15.6 $\pm$ 0.7	15.5 $\pm$ 0.6	15.6 $\pm$ 0.5
MCHC(%)	31.7 $\pm$ 0.4N	31.5 $\pm$ 0.5	31.4 $\pm$ 0.5	31.9 $\pm$ 1.0
PLT( $\times 10^3$ /mm <sup>3</sup> )	1172 $\pm$ 88	1232 $\pm$ 188	1304 $\pm$ 126	1274 $\pm$ 110
WBC( $\times 10^3$ /mm <sup>3</sup> )	6.7 $\pm$ 1.3	7.0 $\pm$ 1.5	6.8 $\pm$ 0.9	7.0 $\pm$ 1.3
Differential leukocyte counts(%)				
NEUT	29 $\pm$ 7N	29 $\pm$ 9	27 $\pm$ 5	29 $\pm$ 4
LYMPH	66 $\pm$ 8	67 $\pm$ 9	68 $\pm$ 5	66 $\pm$ 4
MONO	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1
EOSN	2 $\pm$ 1N	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0
BASO	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
LUC	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
Reticulocyte(% <sub>un</sub> )	11 $\pm$ 3N	14 $\pm$ 11	11 $\pm$ 6	10 $\pm$ 3

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

LUC : Large unstained cells

N : Non parametric analysis

Table 4. Blood chemistry of male rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Glucose(mg/dl)	152 $\pm$ 7N	154 $\pm$ 17	164 $\pm$ 26	140 $\pm$ 10 **
T.bilirubin(mg/dl)	0.25 $\pm$ 0.02N	0.26 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.02 *	0.32 $\pm$ 0.04 **
BUN(mg/dl)	15.5 $\pm$ 2.4	17.7 $\pm$ 4.4	18.2 $\pm$ 3.0	18.8 $\pm$ 2.6
Creatinine(mg/dl)	0.64 $\pm$ 0.04	0.66 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.09	0.68 $\pm$ 0.06
T.protein(g/dl)	6.02 $\pm$ 0.18	6.07 $\pm$ 0.11	6.29 $\pm$ 0.16 **	6.42 $\pm$ 0.19 **
Albumin(g/dl)	3.25 $\pm$ 0.12	3.31 $\pm$ 0.09	3.46 $\pm$ 0.16 **	3.52 $\pm$ 0.14 **
A/G	1.18 $\pm$ 0.05	1.21 $\pm$ 0.06	1.23 $\pm$ 0.08	1.22 $\pm$ 0.05
Potassium(mmol/l)	4.87 $\pm$ 0.23	4.52 $\pm$ 0.41 *	4.91 $\pm$ 0.38	4.72 $\pm$ 0.24
Chloride(mmol/l)	105.5 $\pm$ 1.3	106.8 $\pm$ 1.8	106.5 $\pm$ 1.7	105.2 $\pm$ 1.2
Calcium(mg/dl)	9.34 $\pm$ 0.31	9.64 $\pm$ 0.24 *	9.81 $\pm$ 0.42 **	9.67 $\pm$ 0.27 *
I.phosphate(mg/dl)	5.37 $\pm$ 0.67	5.75 $\pm$ 0.52	6.43 $\pm$ 0.96 **	5.68 $\pm$ 0.48
GOT(U/l)	49 $\pm$ 10N	38 $\pm$ 4 **	42 $\pm$ 10 *	43 $\pm$ 8
GPT(U/l)	24 $\pm$ 5	21 $\pm$ 5	23 $\pm$ 3	20 $\pm$ 2
Gamma-GTP(U/l)	0.5 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.5 **	0.3 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.4

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

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

N : Non parametric analysis

Table 5. Absolute and relative organ weight of male rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals		12	12	12	12
Body weight	(g)	391 ± 23	395 ± 23	399 ± 27	392 ± 30
Absolute organ weight					
Thymus	(mg)	303 ± 70	333 ± 36	286 ± 57	313 ± 82
Liver	(g)	11.23 ± 1.15	11.49 ± 0.96	12.52 ± 1.18 *	13.07 ± 1.43 **
Kidneys	(g)	2.61 ± 0.18	2.70 ± 0.16 (11)	2.83 ± 0.24	2.94 ± 0.33 *
Testes	(g)	3.41 ± 0.16	3.45 ± 0.18	3.42 ± 0.15	3.47 ± 0.22
Epididymides	(g)	1.18 ± 0.08	1.25 ± 0.10	1.19 ± 0.10	1.23 ± 0.14
Relative organ weight					
Thymus	(mg%)	77.170 ± 16.376	84.433 ± 8.928	71.518 ± 12.979	79.578 ± 18.122
Liver	(g%)	2.865 ± 0.164	2.911 ± 0.217	3.137 ± 0.154 **	3.331 ± 0.170 **
Kidneys	(g%)	0.666 ± 0.037	0.678 ± 0.046 (11)	0.711 ± 0.049	0.749 ± 0.052 **
Testes	(g%)	0.873 ± 0.058	0.874 ± 0.053	0.861 ± 0.045	0.889 ± 0.092
Epididymides	(g%)	0.301 ± 0.021	0.316 ± 0.021	0.299 ± 0.025	0.315 ± 0.038

Values are expressed as Mean ± S.D.

Values in parentheses are expressed number of animals measured

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

Table 6. Absolute and relative organ weight of female rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals		11	10	12	11
Body weight	(g)	273 ± 15	273 ± 16	281 ± 14	279 ± 25
Absolute organ weight					
Thymus	(mg)	197 ± 52	178 ± 44	208 ± 53	201 ± 46
Liver	(g)	10.85 ± 0.91	11.36 ± 1.21	10.92 ± 1.25	11.33 ± 1.41
Kidneys	(g)	1.86 ± 0.19	1.98 ± 0.20	2.00 ± 0.21	1.95 ± 0.22
Ovaries	(mg)	100 ± 6N	98 ± 7	100 ± 13	102 ± 18
Relative organ weight					
Thymus	(mg%)	71.979 ± 19.057	65.132 ± 14.151	73.626 ± 16.446	71.251 ± 12.240
Liver	(g%)	3.965 ± 0.170	4.160 ± 0.258	3.884 ± 0.369	4.050 ± 0.306
Kidneys	(g%)	0.682 ± 0.063	0.726 ± 0.049	0.710 ± 0.063	0.697 ± 0.042
Ovaries	(mg%)	36.769 ± 2.106N	36.063 ± 2.926	35.722 ± 4.349	36.572 ± 6.152

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 7. Summary of gross findings in male rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of animals necropsied		12	12	12	12
Organ	Findings				
DIGESTIVE SYSTEM					
liver	enlarged	0	0	0	2
	abdominal cavity mass	1	0	0	0
URINARY SYSTEM					
kidney	mass	0	1	0	0
	white patch/zone	0	1	0	0

Table 8. Summary of gross findings in female rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level (mg/kg)		0	100	300	1000
No. of animals necropsied		11	10	12	11
Organ	Findings				
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>					
lung	colored patch/zone	1	1	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>					
liver	nodule	0	1	0	0
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>					
ovary	cyst	0	0	1	0

## 7) 剖検所見 (Table 7~8)

雄では、肝臓の肥大が1,000 mg/kg群で12例中2例に観察された。その他、自然発生性の病変と考えられる所見として、腹腔内の塊（脂肪壊死）が対照群に1例、腎臓の腫瘤および白色斑/区域が100 mg/kg群の同一個体1例に観察された。なお、これらの雄動物うち、交尾の成立はしなかった雄は100 mg/kg群に1例、妊娠を成立させなかった雌は100および1,000 mg/kg群に各1例認められたが、特に生殖器系器官の異常は認められなかった。

交尾の成立しなかった雌は100 mg/kg群に1例認められたが、異常所見は観察されなかった。妊娠の成立しなかった雌は100および1,000 mg/kg群の各1例に認められたが、被験物質投与の影響と考えられる異常所見は観察されなかった。

哺育4日の母動物の剖検では、被験物質投与による影響が示唆される所見は観察されなかった。自然発生性の病変と考えられる所見として、肺の有色斑/区域が対照群および100 mg/kg群にそれぞれ1例、肝臓の結節が100 mg/kg群に1例および卵巣の嚢胞が300 mg/kg群に1例観察された。

Table 9. Summary of histological findings in male rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level (mg/kg)		0			100			300			1000						
No. of animals sacrificed		12			10			12			11						
No. of animals necropsied		12			10			12			11						
No. of animals examined histologically		12			10			12			11						
Organ	Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3				
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>																	
heart		(12)				(0)				(0)				(11)			
	infiltration/cellular	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>																	
spleen		(12)				(0)				(0)				(11)			
	deposit of pigment	-	12	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>																	
liver		(12)				(0)				(0)				(11)			
	cytological alteration	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	fatty change	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	granulation	-	4	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
	lymphocytic infiltration	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	bile duct hyperplasia	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
peritoneum		(1)				(0)				(0)				(0)			
	granulation	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>URINARY SYSTEM</b>																	
kidney		(12)				(10)				(12)				(11)			
	basophilic change	-	10	0	0	-	9	1	0	-	11	0	0	-	7	4	0
	deposit of calcium	-	3	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	2	0	0
	eosinophilic body	-	12	0	0	-	10	0	0	-	12	0	0	-	11	0	0
	hyaline droplet	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	4	0	0
	protein cast	-	1	0	0	-	1	0	0	-	2	0	0	-	5	0	0
	lymphocytic infiltration	-	0	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
	fibrosis	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
	#nephroblastoma	0	-	-	-	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>																	
adrenal gland		(12)				(0)				(0)				(11)			
	vacuolic change	-	11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	0	0

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

(): No. of animals examined microscopically at this site.

Table 10. Summary of histological findings in female rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level (mg/kg)	0				100				300				1000							
No. of animals sacrificed	11				10				12				11							
No. of animals necropsied	11				10				12				11							
No. of animals examined histologically	11				0				0				11							
Organ	Findings				T				1				2				3			
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>																				
heart	(11)				(0)				(0)				(11)							
deposit of calcium	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
infiltration/cellular	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>																				
spleen	(11)				(0)				(0)				(11)							
deposit of pigment	-	8	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	0	0				
hematopoiesis, increased	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0				
thymus	(11)				(0)				(0)				(11)							
atrophy	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
squamous metaplasia	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0				
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>																				
lung	(1)				(0)				(0)				(0)							
hemorrhage	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
granulation	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>																				
liver	(11)				(0)				(0)				(11)							
cytological alteration	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
granulation	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
extramedullary hematopoiesis	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0				
<b>URINARY SYSTEM</b>																				
kidney	(11)				(0)				(0)				(11)							
basophilic change	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
deposit of calcium	-	8	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	0	0				
protein cast	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
lymphocytic infiltration	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>																				
adrenal gland	(11)				(0)				(0)				(11)							
vacuolic change	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked  
 =: benign #: malignant  
 ( ): No. of animals examined microscopically at this site.

8) 病理組織学検査 (Table 9~10)

交尾成立した雄および自然分娩した雌は、対照群、100、300および1,000 mg/kg群でそれぞれ12、10、12、11例および11、10、12、11例であった。被験物質投与によると考えられる所見として、対照群に比べ1,000 mg/kg群の雄で腎臓の蛋白円柱が多い傾向を示したほか、同群の硝子滴変性は11例中4例と発生数の増加を示した。また、同群の腎尿管上皮の中等度好塩基性化が11例中4例に認められた。腎臓については高用量で変化が認められたため、100および300 mg/kg群について鏡検した結果、対照群との間に差異は認められなかった。その他の所見は対照群との間に差異は認められなかったが、2例以上の発生を示したものは次の通りであった。腎臓の好酸性小体が雄の全例に、脾臓の色素沈着が雌雄の多数例に、副腎の空胞化が雄の多数例に、腎臓の石灰沈着が雌の多数例にそれぞれ観察された。また、心臓の細胞浸潤、肝臓の細胞変性・小肉芽巣、腎臓のリンパ球浸潤が雌雄で、肝臓のリンパ球浸潤、腎臓の石灰沈着が雄で、脾臓の造血亢進、胸腺の扁平上皮化生、肝臓の髓外造血が雌でいずれも軽度ながら少数例に認められた。なお、

腫瘍性病変として、100 mg/kg群の雄の1例に腎芽腫が観察された。

交尾の成立しなかった動物は100 mg/kg群で雌雄各1例認められた。これらの動物では、脾臓の色素沈着、腎臓の尿管上皮好塩基性化・石灰沈着が雌雄に、心臓の石灰沈着、肝臓の小肉芽巣、腎臓の好酸性小体・蛋白円柱、副腎の空胞化が雄に観察された。

妊娠を成立させなかった雌および妊娠の成立しなかった雌は、100および1,000 mg/kg群で雌雄各1例認められた。これらの動物では、脾臓の色素沈着、肝臓の小肉芽巣が雌雄に、心臓の細胞浸潤、胸腺の扁平上皮化生、腎臓の尿管上皮好塩基性化・好酸性小体・リンパ球浸潤、副腎の空胞化が雄に、腎臓の石灰沈着が雌にそれぞれ認められた。

分娩が認められなかった雌は対照群の1例に認められた。この動物では、脾臓の色素沈着、腎臓の石灰沈着・リンパ球浸潤が観察された。

## 2. 生殖発生毒性

## 1) 交尾および受胎能 (Table 11)

交尾は、100 mg/kg群を除き対照群を含むすべての群で全例成立した。100 mg/kg群では1組が交尾不成立で、交尾率は91.7%であった。受胎は、対照群および300 mg/kg群の交尾成立の雌全例で成立し、100 mg/kg群では11例中10例、1,000 mg/kg群では12例中11例で成立した。

性周期観察では、100 mg/kg群の1例に偽妊娠と考えられる性周期の停止（連続した発情休止期像）が11日間連続して認められたが交尾はその後成立した。その他、1,000 mg/kg群の平均性周期は対照群の4.0日に比べて4.3日と長

く、統計学的有意差が認められた。

## 2) 分娩および哺育 (Table 12)

分娩時観察では、いずれの指標においても対照群と被験物質投与群との間に統計学的に有意差は認められなかった。すなわち、各群の妊娠期間、黄体数、着床痕数、出産児数、出産生児数、性比、4日生存児数および死産児数はほぼ同様な値を示し、出産率、着床率、分娩率、出生率および4日生存率に群間差は認められなかった。その他、対照群の1例に分娩徴候が認められなかったため、妊娠25日に剖検した。その結果、死亡胎児1例の子宮内残留が認められた。

Table 11. Summary of reproductive performance in rats treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	12	11	12	12
No. of pregnant females	12	10	12	11
Copulation index (%) <sup>a)</sup>	100	91.7	100	100
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	100	90.9	100	91.7
Estrus cycle (days, mean ± S.D.)	4.0 ± 0.1N	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.3	4.3 ± 0.4 *

a): (Number of animals with successful copulation / number of animals mated) x 100

b): (Number of pregnant animals / number of animals with successful copulation) x 100

Significantly different from control group; \*: P < 0.05

N: Non parametric analysis

Table 12. Findings of delivery in dams treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol and observations on their pups(F1)

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of dams observed	12	10	12	11
No. of dams delivered live pups	11	10	12	11
Duration of gestation (Mean ± S.D.)	21.1 ± 0.3	21.3 ± 0.5	21.3 ± 0.5	21.4 ± 0.5
No. of total corpora lutea (Mean ± S.D.)	170(15.5 ± 1.0)	157(15.7 ± 1.2)	193(16.1 ± 1.7)	164(14.9 ± 1.8)
No. of total implants (Mean ± S.D.)	163(14.8 ± 1.2)N	152(15.2 ± 1.3)	184(15.3 ± 1.2)	153(13.9 ± 2.7)
No. of total pups born (Mean ± S.D.)	152(13.8 ± 1.2)N	141(14.1 ± 1.6)	168(14.0 ± 2.8)	141(12.8 ± 2.2)
No. of total live pups born (Mean ± S.D.)	151(13.7 ± 1.2)	141(14.1 ± 1.6)	168(14.0 ± 2.8)	141(12.8 ± 2.2)
Male	67(6.1 ± 1.9)	76(7.6 ± 1.8)	83(6.9 ± 2.5)	66(6.0 ± 2.2)
Female	84(7.6 ± 2.5)	65(6.5 ± 1.6)	85(7.1 ± 2.5)	75(6.8 ± 2.4)
Sex ratio (Male/Female)	0.80(67/84)	1.17(76/65)	0.98(83/85)	0.88(66/75)
No. of live pups on day 4 (Mean ± S.D.)				
Male	65(5.9 ± 2.0)	76(7.6 ± 1.8)	81(6.8 ± 2.4)	65(5.9 ± 2.2)
Female	81(7.4 ± 2.7)	61(6.1 ± 1.1)	84(7.0 ± 2.4)	73(6.6 ± 2.2)
No. of dead pups born (Mean ± S.D.)	1(0.1 ± 0.3)	0	0	0
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	91.7	100	100	100
Implantation index (Mean ± S.D.) <sup>b)</sup>	95.9 ± 4.6	96.8 ± 3.4	95.7 ± 6.2	93.4 ± 14.0
Delivery index (Mean ± S.D.) <sup>c)</sup>	93.3 ± 5.1	92.8 ± 7.1	90.9 ± 15.6	92.7 ± 5.3
Birth index (Mean ± S.D.) <sup>d)</sup>	92.8 ± 6.1	92.8 ± 7.1	90.9 ± 15.6	92.7 ± 5.3
Viability index on day 4 (Mean ± S.D.) <sup>e)</sup>				
Male	97.0 ± 6.8	100.0 ± 0.0	97.9 ± 5.3	98.9 ± 3.8
Female	95.5 ± 7.8	95.2 ± 8.1	99.3 ± 2.4	97.4 ± 6.3

a): (Number of females with live pups / number of pregnant females) x 100

b): (Number of total implants / number of total corpora lutea) x 100

c): (Number of pups born / number of implants) x 100

d): (Number of live pups born / number of implants) x 100

e): (Number of live pups on day 4 after birth / number of live pups born) x 100

N: Non parametric analysis

3) 新生児の形態、体重および剖検所見

新生児の外表検査では、外傷（耳介、後肢）が100 mg/kg 群の2例に観察されたのみで、その他異常は観察されなかった。

哺育1および4日の体重は雌雄ともに群間差がなく統計学的有意差は認められなかった。

死産児および哺育4日までの死亡児の剖検では、主要器官の異常は認められなかった。哺育4日の剖検では、肝臓の奇形結節（過形成）が300 mg/kg群の1例に観察されたのみでその他異常は観察されなかった。

考察

1. 反復投与毒性

一般状態には被験物質投与の影響は認められず、死亡例も観察されなかった。

体重および摂餌量は雌雄ともに群間で差はなく被験物質投与の影響は認められなかった。

雄の血液学的検査では、いずれの検査項目においても被験物質投与の影響と考えられる変化はなかった。血液化学的検査では、300および1,000 mg/kg群でアルブミンの増加に伴う総蛋白の増加および総ビリルビンの増加が認められ、さらに1,000 mg/kg群で血糖値の減少が認められた。これら、1,000 mg/kg群で認められたアルブミン、総蛋白および総ビリルビンの増加は、肝臓に対する影響を示唆するものであり、被験物質投与の影響と考えられた。

器官重量は雌においては被験物質投与の影響が認められなかったが、雄では300および1,000 mg/kg群で肝臓の実重量および相対重量が増加し、さらに1,000 mg/kg群で腎臓の実重量および相対重量が増加した。また、300 mg/kg群では統計学的有意差は認められないものの腎臓の実重量および相対重量が増加傾向を示した。肝臓重量の増加に関連する剖検所見として、雄の1,000 mg/kg群で12例中2例に肝臓の肥大が観察され、被験物質投与の影響と考えられた。組織学検査では、肝臓の肥大を裏付ける明確な形態的变化は認められず、光顕所見には現われない程度の機能的増大による肥大と考えられる。その他、腎臓の蛋白円柱と硝子滴変性が病変の程度としては軽度ではあるが雄の1,000 mg/kg群で発生数の増加または増加傾向を示した。また、同群の腎尿細管上皮の中等度好塩基性化は11例中4例に観察された。これら腎臓の変化は、被験物質投与による特異的な変化ではなく、対照群にも観察されるような自然発生的な病変が雄では被験物質投与により増強されたものと考えられた。分娩不能動物、交尾不成立動物および妊娠不成立動物の組織学検査では、それぞれの原因に関連すると考えられる異常所見は認められなかった。

以上のことから、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールは、300 mg/kg/day以上の投与で雄の場合、肝臓および腎臓重量の増加または増加傾向、また、1,000 mg/kg/day投与でアルブミンの増加に伴う総蛋白の増加および総ビリルビンの増加、血糖値の減少、腎臓の蛋白円柱、硝子滴変性数の増加または増加傾向、尿細管上皮の好塩基性化の程度の増強および肝臓の肥大を誘起した。雌では1,000 mg/kg/day投与によっても認められなかった。

がって、反復投与毒性の最大無影響量は、雄では100 mg/kg/day、雌では1,000 mg/kg/dayと判断された。

2. 生殖発生毒性

交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。性周期観察で、1,000 mg/kg群の平均性周期に統計学的有意差が認められたが、1例が平均5.3日と長く、その他の動物では対照群と同様な性周期を示していることから被験物質投与の影響はないと判断された。

分娩時観察では、対照群の1例を除き、妊娠動物の全例が正常に分娩し、哺育期間を通じ被験物質投与の影響は認められなかった。また、新生児の外表検査でも被験物質投与によると考えられる異常はなく、体重も哺育4日まで群間に差はなく順調に増加した。

死産児および哺育4日までの死亡児ならびに哺育4日の剖検では、被験物質投与によると考えられる異常所見は認められなかった。

以上のことから、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールの雌雄の生殖に及ぼす影響および児動物の発生に及ぼす影響は、1,000 mg/kg/day投与によっても認められず、最大無影響量はともに1,000 mg/kg/dayと判断された。

文献

- 1) Govt. Reports Announcements & Index, NTIS/PB 89-215776 (1982).
- 2) C. G. Shayne and S.W. Carrol, "Statics and Experimental Design For Toxicologists," Telford Press, 1986.
- 3) 佐久間昭 "薬効評価 I-計画と解析一," 東京大学出版会, 1977.
- 4) 石居進, "生物統計学入門," 培風館, 1975.

連絡先：試験責任者 萩田孝一

(財) 食品農薬薬品安全性評価センター

〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜 582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence : Hagita, Koichi

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

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

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

## 2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールの細菌を用いる復帰変異試験

### Reverse Mutation Test of 2,2-Dimethyl-1,3-propanediol on Bacteria

#### 要約

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は50~5000 $\mu$ g/プレートの用量で、本試験は312.5~5000 $\mu$ g/プレートの用量で試験を行った。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌において、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

#### 緒言

高生産量既存化学物質で、現在十分な安全性資料のない、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールについて、OECDを中心として行われている国際協力による、安全性点検評価事業の一環として、細菌を用いる復帰変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ(ネズミチフス菌)におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異<sup>1)</sup>、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異<sup>2)</sup>を指標とした変異原の検出系である。試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素(S9混液)によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号)およびOECD化学品試験法ガイドライン:471、472に準拠し、化学物質GLP(昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号)に基づいて実施した。

#### 方法

##### 〔検定菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*Salmonella typhimurium* TA100、*Salmonella typhimurium* TA1535、*Salmonella typhimurium* TA98、*Salmonella typhimurium* TA1537の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与を受けた。

*Escherichia coli* WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス(Difco)を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

##### 〔被験物質〕

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオール(CAS No.126-30-7、2,2-Dimethyl-1,3-propanediol)は分子量104.17、融点123~127℃、水溶性の白色結晶である。純度99.15%のもの(ロット番号:1N01、三菱瓦斯化学株式会社製造)を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールは、蒸留水を用いて50 mg/mlになるように調製した後、同溶媒でさらに公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、秦野研究所において2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオール水溶液中での安定性試験を行った。安定性試験における溶媒は当研究所で実施される、培養細胞を用いる染色体異常試験と共通なことから、両試験における最高濃度(50 mg/ml)および最低濃度(2.5 mg/ml)の2濃度について室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後3時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値の平均(0時間)に対して102%および100%であった。これらの値は、当研究所の標準操作手順書の基準(初回の測定平均値の90%以上)を満たしていた。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml、3.125 mg/mlの両溶液とも、含量は既定濃度に対し、101~104%であった。これらの値も当研究所の標準操作手順書の基準(平均含量は添加量の85%以上)を満たしていた。

以上の結果から、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールは水溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

## 復帰変異試験

### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

- AF-2 : フリルフラマイド (上野製薬 (株))
- SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業 (株))
- 9-AA : 9-アミノアクリジン (東京化成工業 (株))
- 2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業 (株))

AF-2、9-AA、2-AAはDMSO (和光純薬工業 (株)) に、SAは蒸留水に溶解して試験に用いた。

### 〔培地およびS9混液の組成〕

#### 1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクト・アガー (Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
ピオチン	0.5 mM

\* WP2用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

#### 2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社の最少寒天培地を用いた。なお、培地 1 lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2g
クエン酸・1水和物	2g
リン酸水素二カリウム	10g
リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5g
グルコース	20g
バクト・アガー (Difco)	15g

径90mmのシャーレ1枚あたり30mlを流して固めてある。

#### 3) S9混液 (1 ml中下記の成分を含む)

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース・6リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml

\*\* : 7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール (PB)、および5,6-ベンゾフラボン (BF) の併用投与で酵素誘導して作製したS9 (キッコマン (株)) を用いた。

### 〔試験方法〕

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトップアガー2 ml、被験物質調製液0.1 ml、リン酸緩衝液0.5 ml (代謝活性化試験においてはS9混液0.5 ml)、検定菌液0.1 mlを混合したのち合成培地平板上に流固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに蒸留水、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌

ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を算定し、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。

### 〔判定基準〕

被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する (陽性) と判定することとした。

## 結果および考察

### 〔用量設定試験〕

50~5000μg/プレートの範囲で試験を実施したところ、直接試験および代謝活性化試験において抗菌性が認められなかったことから、本試験における最高用量を、すべての菌種において5000μg/プレートとし、公比2で5用量を設定した。

### 〔本試験〕

結果をTables 1、2に示した。2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールについて312.5~5000μg/プレートの範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接試験、代謝活性化試験のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。また、すべての菌種において抗菌性は認められなかった。

以上の結果に基づき、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの (陰性) と判定した。

## 文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983)
- 2) M. H. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds.), Elsevier Science Publisher, New York, 1984, p161.

連絡先: 試験責任者 高鳥浩介

(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: Takatori, Kousuke

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan

Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol\*

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)														
			Base-pair substitution type									Frameshift type					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98		TA1537			
Solvent control	-	-	131 (130 $\pm$ )	131 (130 $\pm$ )	128 (128 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	19 (19 $\pm$ )	11 (11 $\pm$ )	18 (18 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	29 (29 $\pm$ )	22 (22 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	6 (6 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	12 (12 $\pm$ )
Test substance	312.5	-	138 (139 $\pm$ )	144 (144 $\pm$ )	134 (134 $\pm$ )	19 (19 $\pm$ )	7 (7 $\pm$ )	17 (17 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	9 (9 $\pm$ )	19 (19 $\pm$ )	22 (22 $\pm$ )	19 (19 $\pm$ )	6 (6 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	10 (10 $\pm$ )
	625	-	139 (141 $\pm$ )	151 (151 $\pm$ )	134 (134 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	9 (9 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	11 (11 $\pm$ )	21 (21 $\pm$ )	23 (23 $\pm$ )	25 (25 $\pm$ )	5 (5 $\pm$ )	9 (9 $\pm$ )	4 (4 $\pm$ )
	1250	-	125 (123 $\pm$ )	120 (120 $\pm$ )	124 (124 $\pm$ )	9 (9 $\pm$ )	11 (11 $\pm$ )	5 (5 $\pm$ )	11 (11 $\pm$ )	9 (9 $\pm$ )	12 (12 $\pm$ )	16 (16 $\pm$ )	17 (17 $\pm$ )	18 (18 $\pm$ )	6 (6 $\pm$ )	7 (7 $\pm$ )	6 (6 $\pm$ )
	2500	-	123 (124 $\pm$ )	126 (126 $\pm$ )	124 (124 $\pm$ )	10 (10 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	9 (9 $\pm$ )	7 (7 $\pm$ )	11 (11 $\pm$ )	11 (11 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	25 (25 $\pm$ )	26 (26 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	4 (4 $\pm$ )
	5000	-	126 (117 $\pm$ )	121 (121 $\pm$ )	105 (105 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	9 (9 $\pm$ )	10 (10 $\pm$ )	9 (9 $\pm$ )	6 (6 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	23 (23 $\pm$ )	21 (21 $\pm$ )	26 (26 $\pm$ )	7 (7 $\pm$ )	5 (5 $\pm$ )	7 (7 $\pm$ )
Solvent control	+	+	117 (127 $\pm$ )	131 (131 $\pm$ )	132 (132 $\pm$ )	13 (13 $\pm$ )	10 (10 $\pm$ )	24 (24 $\pm$ )	16 (16 $\pm$ )	13 (13 $\pm$ )	21 (21 $\pm$ )	29 (29 $\pm$ )	42 (42 $\pm$ )	39 (39 $\pm$ )	11 (11 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	19 (19 $\pm$ )
Test substance	312.5	+	119 (130 $\pm$ )	141 (141 $\pm$ )	129 (129 $\pm$ )	19 (19 $\pm$ )	9 (9 $\pm$ )	7 (7 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	10 (10 $\pm$ )	40 (40 $\pm$ )	35 (35 $\pm$ )	39 (39 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	13 (13 $\pm$ )	5 (5 $\pm$ )
	625	+	133 (144 $\pm$ )	158 (158 $\pm$ )	141 (141 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	11 (11 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	11 (11 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	41 (41 $\pm$ )	38 (38 $\pm$ )	36 (36 $\pm$ )	12 (12 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	12 (12 $\pm$ )
	1250	+	135 (130 $\pm$ )	150 (150 $\pm$ )	105 (105 $\pm$ )	6 (6 $\pm$ )	15 (15 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	12 (12 $\pm$ )	13 (13 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	38 (38 $\pm$ )	38 (38 $\pm$ )	35 (35 $\pm$ )	11 (11 $\pm$ )	7 (7 $\pm$ )	7 (7 $\pm$ )
	2500	+	147 (130 $\pm$ )	116 (116 $\pm$ )	128 (128 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	6 (6 $\pm$ )	7 (7 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	34 (34 $\pm$ )	29 (29 $\pm$ )	39 (39 $\pm$ )	12 (12 $\pm$ )	4 (4 $\pm$ )	5 (5 $\pm$ )
	5000	+	147 (151 $\pm$ )	147 (147 $\pm$ )	159 (159 $\pm$ )	11 (11 $\pm$ )	10 (10 $\pm$ )	10 (10 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	13 (13 $\pm$ )	14 (14 $\pm$ )	29 (29 $\pm$ )	28 (28 $\pm$ )	28 (28 $\pm$ )	5 (5 $\pm$ )	8 (8 $\pm$ )	10 (10 $\pm$ )
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		698 (685 $\pm$ )	665 (665 $\pm$ )	691 (691 $\pm$ )	204 (204 $\pm$ )	250 (250 $\pm$ )	196 (196 $\pm$ )	286 (286 $\pm$ )	252 (252 $\pm$ )	239 (239 $\pm$ )	605 (605 $\pm$ )	582 (582 $\pm$ )	576 (576 $\pm$ )	2597 (2597 $\pm$ )	2208 (2208 $\pm$ )	2554 (2554 $\pm$ )
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		844 (844 $\pm$ )	834 (834 $\pm$ )	855 (855 $\pm$ )	231 (231 $\pm$ )	194 (194 $\pm$ )	242 (242 $\pm$ )	520 (520 $\pm$ )	573 (573 $\pm$ )	553 (553 $\pm$ )	329 (329 $\pm$ )	353 (353 $\pm$ )	323 (323 $\pm$ )	189 (189 $\pm$ )	242 (242 $\pm$ )	167 (167 $\pm$ )

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene  
 \*:Purity was 99.15%

Table 2 Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol\*

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)														
			Base-pair substitution type									Frameshift type					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Solvent control	-	-	111 (117 $\pm$ 6.5)	117 (117 $\pm$ 6.5)	124 (124 $\pm$ 6.5)	18 (15 $\pm$ 3.1)	12 (12 $\pm$ 3.1)	14 (14 $\pm$ 3.1)	23 (22 $\pm$ 2.6)	19 (19 $\pm$ 2.6)	24 (24 $\pm$ 2.6)	29 (24 $\pm$ 4.4)	22 (24 $\pm$ 4.4)	21 (21 $\pm$ 4.4)	15 (11 $\pm$ 3.5)	8 (8 $\pm$ 3.5)	11 (11 $\pm$ 3.5)
Test substance	312.5	-	138 (140 $\pm$ 3.2)	132 (132 $\pm$ 3.2)	150 (150 $\pm$ 3.2)	15 (16 $\pm$ 4.6)	21 (21 $\pm$ 4.6)	12 (12 $\pm$ 4.6)	13 (16 $\pm$ 3.1)	19 (19 $\pm$ 3.1)	17 (17 $\pm$ 3.1)	22 (20 $\pm$ 2.6)	17 (20 $\pm$ 2.6)	21 (21 $\pm$ 2.6)	7 (8 $\pm$ 0.6)	8 (8 $\pm$ 0.6)	8 (8 $\pm$ 0.6)
	625	-	147 (150 $\pm$ 4.9)	148 (148 $\pm$ 4.9)	156 (156 $\pm$ 4.9)	13 (14 $\pm$ 0.6)	14 (14 $\pm$ 0.6)	14 (14 $\pm$ 0.6)	12 (15 $\pm$ 3.1)	18 (18 $\pm$ 3.1)	16 (16 $\pm$ 3.1)	15 (21 $\pm$ 5.1)	25 (21 $\pm$ 5.1)	22 (21 $\pm$ 5.1)	9 (8 $\pm$ 1.0)	7 (8 $\pm$ 1.0)	8 (8 $\pm$ 1.0)
	1250	-	158 (159 $\pm$ 4.2)	156 (156 $\pm$ 4.2)	164 (164 $\pm$ 4.2)	10 (13 $\pm$ 2.5)	13 (13 $\pm$ 2.5)	15 (15 $\pm$ 2.5)	16 (15 $\pm$ 2.5)	11 (15 $\pm$ 3.6)	18 (18 $\pm$ 3.6)	23 (25 $\pm$ 2.1)	24 (25 $\pm$ 2.1)	27 (25 $\pm$ 2.1)	8 (8 $\pm$ 2.0)	10 (8 $\pm$ 2.0)	6 (8 $\pm$ 2.0)
	2500	-	160 (157 $\pm$ 3.1)	156 (156 $\pm$ 3.1)	154 (154 $\pm$ 3.1)	15 (14 $\pm$ 2.1)	16 (14 $\pm$ 2.1)	12 (14 $\pm$ 2.1)	20 (15 $\pm$ 4.6)	12 (15 $\pm$ 4.6)	12 (15 $\pm$ 4.6)	16 (16 $\pm$ 2.5)	19 (16 $\pm$ 2.5)	14 (16 $\pm$ 2.5)	10 (9 $\pm$ 4.0)	13 (9 $\pm$ 4.0)	5 (9 $\pm$ 4.0)
	5000	-	148 (144 $\pm$ 8.4)	137 (137 $\pm$ 8.4)	148 (148 $\pm$ 8.4)	20 (14 $\pm$ 5.6)	9 (14 $\pm$ 5.6)	13 (13 $\pm$ 5.6)	13 (15 $\pm$ 1.5)	16 (15 $\pm$ 1.5)	15 (15 $\pm$ 1.5)	18 (19 $\pm$ 1.7)	21 (19 $\pm$ 1.7)	18 (19 $\pm$ 1.7)	5 (7 $\pm$ 1.5)	7 (7 $\pm$ 1.5)	8 (7 $\pm$ 1.5)
Solvent control	-	+	128 (130 $\pm$ 4.0)	135 (135 $\pm$ 4.0)	128 (128 $\pm$ 4.0)	24 (22 $\pm$ 1.5)	22 (22 $\pm$ 1.5)	21 (21 $\pm$ 1.5)	22 (22 $\pm$ 2.5)	24 (24 $\pm$ 2.5)	19 (19 $\pm$ 2.5)	38 (47 $\pm$ 8.2)	54 (47 $\pm$ 8.2)	49 (49 $\pm$ 8.2)	14 (12 $\pm$ 4.4)	15 (15 $\pm$ 4.4)	7 (12 $\pm$ 4.4)
Test substance	312.5	+	135 (142 $\pm$ 5.9)	144 (144 $\pm$ 5.9)	146 (146 $\pm$ 5.9)	10 (12 $\pm$ 2.0)	14 (14 $\pm$ 2.0)	12 (12 $\pm$ 2.0)	17 (17 $\pm$ 0.0)	17 (17 $\pm$ 0.0)	17 (17 $\pm$ 0.0)	58 (62 $\pm$ 6.1)	59 (62 $\pm$ 6.1)	69 (69 $\pm$ 6.1)	11 (11 $\pm$ 1.5)	9 (11 $\pm$ 1.5)	12 (11 $\pm$ 1.5)
	625	+	141 (133 $\pm$ 27.5)	155 (155 $\pm$ 27.5)	102 (102 $\pm$ 27.5)	11 (14 $\pm$ 4.2)	19 (19 $\pm$ 4.2)	13 (13 $\pm$ 4.2)	16 (14 $\pm$ 4.0)	16 (14 $\pm$ 4.0)	9 (9 $\pm$ 4.0)	59 (58 $\pm$ 6.6)	64 (58 $\pm$ 6.6)	51 (51 $\pm$ 6.6)	7 (14 $\pm$ 7.0)	21 (14 $\pm$ 7.0)	13 (14 $\pm$ 7.0)
	1250	+	138 (133 $\pm$ 8.4)	137 (137 $\pm$ 8.4)	123 (123 $\pm$ 8.4)	19 (16 $\pm$ 3.1)	15 (16 $\pm$ 3.1)	13 (13 $\pm$ 3.1)	18 (16 $\pm$ 5.3)	10 (16 $\pm$ 5.3)	20 (16 $\pm$ 5.3)	44 (42 $\pm$ 5.9)	35 (42 $\pm$ 5.9)	46 (46 $\pm$ 5.9)	12 (12 $\pm$ 1.0)	13 (12 $\pm$ 1.0)	11 (12 $\pm$ 1.0)
	2500	+	129 (130 $\pm$ 2.6)	133 (133 $\pm$ 2.6)	128 (128 $\pm$ 2.6)	15 (12 $\pm$ 3.8)	14 (12 $\pm$ 3.8)	8 (12 $\pm$ 3.8)	12 (10 $\pm$ 1.5)	9 (10 $\pm$ 1.5)	10 (10 $\pm$ 1.5)	51 (52 $\pm$ 5.1)	48 (52 $\pm$ 5.1)	58 (58 $\pm$ 5.1)	10 (11 $\pm$ 0.6)	11 (11 $\pm$ 0.6)	11 (11 $\pm$ 0.6)
	5000	+	115 (128 $\pm$ 11.4)	133 (133 $\pm$ 11.4)	136 (136 $\pm$ 11.4)	14 (16 $\pm$ 3.2)	15 (16 $\pm$ 3.2)	20 (16 $\pm$ 3.2)	12 (13 $\pm$ 1.5)	13 (13 $\pm$ 1.5)	15 (15 $\pm$ 1.5)	53 (54 $\pm$ 7.1)	48 (54 $\pm$ 7.1)	62 (62 $\pm$ 7.1)	15 (12 $\pm$ 3.0)	9 (12 $\pm$ 3.0)	12 (12 $\pm$ 3.0)
Positive control	Chemical Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		607 (624 $\pm$ 28.9)	607 (607 $\pm$ 28.9)	657 (657 $\pm$ 28.9)	166 (177 $\pm$ 11.5)	177 (177 $\pm$ 11.5)	189 (189 $\pm$ 11.5)	168 (163 $\pm$ 5.0)	158 (163 $\pm$ 5.0)	163 (163 $\pm$ 5.0)	447 (462 $\pm$ 36.3)	503 (462 $\pm$ 36.3)	435 (435 $\pm$ 36.3)	2644 (2367 $\pm$ 325.0)	2447 (2367 $\pm$ 325.0)	2009 (2367 $\pm$ 325.0)
Positive control	Chemical Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		931 (905 $\pm$ 36.9)	863 (905 $\pm$ 36.9)	922 (922 $\pm$ 36.9)	215 (196 $\pm$ 17.2)	193 (196 $\pm$ 17.2)	181 (181 $\pm$ 17.2)	547 (557 $\pm$ 12.3)	571 (557 $\pm$ 12.3)	554 (554 $\pm$ 12.3)	286 (277 $\pm$ 9.0)	278 (277 $\pm$ 9.0)	268 (268 $\pm$ 9.0)	191 (195 $\pm$ 13.1)	210 (195 $\pm$ 13.1)	185 (185 $\pm$ 13.1)

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene  
 \*:Purity was 99.15%

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールの  
チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In vitro Chromosomal Aberration Test of  
2,2-Dimethyl-1,3-propanediol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールの染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて検討した。

1) 細胞増殖抑制試験

直接法および代謝活性化法のいずれの処理濃度群 (0.01 ~ 1.00 mg/ml) においても、増殖抑制作用は観察されなかった。

従って、染色体異常試験において、直接法、代謝活性化法ともに1.00 mg/ml (10 mM相当) の処理濃度を高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

2) 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、いずれの濃度においても染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、代謝活性化法においても、S9 mix存在下および非存在下のいずれの処理条件においても、染色体異常の誘発作用は認められなかった。

3) 結論

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールは、今回実施した試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

緒言

OECDを中心として行われている国際協力による安全性点検評価事業の一環として、高生産量既存化学物質で現在十分な安全性資料のない2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールの、培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

上記の試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号) およびOECDガイドライン: 473に準拠し、化学物質GLP (昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号) に基づいて実施したものである。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク (JCRB) から入手 (1988年2月、入手時: 継代4代) したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清 (FCS; J.R. Scientific、ロット番号C019407) を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10<sup>4</sup>個のCHL細胞を、培養液 5mlを入れたシャーレ (径6 cm, Corning) に播き、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) 内で培養した。

4. 被験物質

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオール (CAS No.126-30-7、ロット番号: IN01、三菱瓦斯化学 (株) 製造、(社) 日本化学工業協会提供) は白色の結晶で、アルコールに可溶、水に65% (w/w) 溶ける。分子式C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>、分子量104.17、融点123~127℃の物質で、純度は99.15%である (三菱瓦斯化学 (株) 資料)。本実験では被験物質が蒸留水に可溶であることから、溶媒として蒸留水を用いた。原体の安定性に関しては情報は得られなかったが、秦野研究所分析化学研究室で実施したエームス試験 (試験計画番号: M-91-165) における溶媒中 (蒸留水) での安定性試験では2.50~50.0 mg/mlの濃度範囲で3時間は安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。原体を蒸留水 (大塚製薬工場、ロット番号: KOJ84およびK1D79) に溶解して原液を調製し、ついで原液を蒸留水で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、全ての試験において培養液の10% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた最高濃度群と最低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85%以上) の値であった。

## 染色体異常試験

### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。

被験物質のCHL細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（オリンパス）を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、直接法、代謝活性化法ともに、処理した濃度範囲（0.01～1.00 mg/ml）において被験物質による増殖抑制は観察されなかった（Fig.1）。

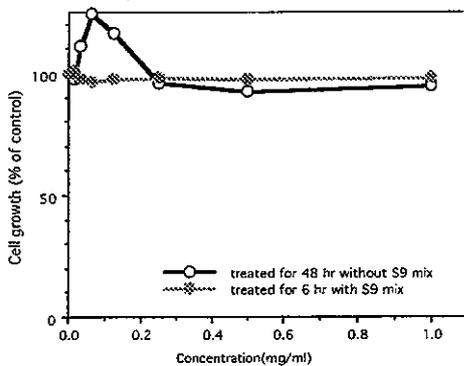


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol in CHL cells

### 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最高処理濃度を、直接法（24および48時間連続処理）、代謝活性化法（6時間処理後18時間培養）ともに1.00 mg/ml（10 mM）とし、それぞれ最高処理濃度の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。

### 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。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製し、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。ギムザ染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

### 9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのシャーレから得られた異なる標本を、複数の観察者がそれぞれブラインドの状態で行った。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<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞（polyploid）の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

### 10. 記録と判定

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

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの“Exact probability test”法により溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が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。

### 結果および考察

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールを加えて24時間および48時間処理した各群において、いずれも染色体の構造異常の出現頻度に有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。一方、倍数性細胞についても同様に有意な増加はみられなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した。

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した各濃度群において、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。

陽性対照として用いた直接法でのMC処理群、およびS9 mix存在下でのCPA処理群では染色分体交換（cte）や染色分体切断（ctb）などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

なお、本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

### 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編：“化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 1988.
- 2) 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, 1987.

連絡先：試験責任者 田中憲徳

(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: Tanaka, Noriho

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan

Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2,2,-dimethyl-1,3-propanediol\*\* by direct method

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	1	1	1	0	0	0	0	3	0	3 ( 1.5 )	2 ( 1.0 )	0.38		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.38		
DPD	0.25	24	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.00	-	-
DPD	0.50	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.00	-	-
DPD	1.00	24	200	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.50	-	-
MC	0.00005	24	200	3	42	70	5	2	0	0	122	0	83* ( 41.5 )	81* ( 40.5 )	0.00	+	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	1	0	0	2	0	0	0	3	0	2 ( 1.0 )	1 ( 0.5 )	0.13		
DPD	0.25	48	200	0	1	0	0	1	0	0	2	0	2 ( 1.0 )	2 ( 1.0 )	0.13	-	-
DPD	0.50	48	200	2	1	0	1	0	0	0	4	0	4 ( 2.0 )	2 ( 1.0 )	0.38	-	-
DPD	1.00	48	200	1	2	1	1	0	0	0	5	0	5 ( 2.5 )	4 ( 2.0 )	0.25	-	-
MC	0.00005	48	200	9	50	92	9	4	7	0	171	1	90* ( 45.0 )	86* ( 43.0 )	0.25	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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. 1) Distilled water 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

\* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 99.15%.

Table 2 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2,2,-dimethyl-1,3-propanediol \*\* by metabolic activation method

Group	Concentration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	0	2	1	2	1	0	0	6	0	4 ( 2.0 )	4 ( 2.0 )	0.38		
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6 - (18)	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0 )	1 ( 0.5 )	0.13		
DPD	0.25	-	6 - (18)	200	2	0	0	0	1	0	0	3	0	3 ( 1.5 )	1 ( 0.5 )	0.25	-	-
DPD	0.50	-	6 - (18)	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.38	-	-
DPD	1.00	-	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.25	-	-
CPA	0.005	-	6 - (18)	200	0	1	1	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0 )	2 ( 1.0 )	0.13	-	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6 - (18)	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0 )	1 ( 0.5 )	0.13		
DPD	0.25	+	6 - (18)	200	3	5	0	1	0	0	10	19	0	7 ( 3.5 )	5 ( 2.5 )	0.13	-	-
DPD	0.50	+	6 - (18)	200	4	2	0	0	0	0	0	6	0	4 ( 2.0 )	1 ( 0.5 )	0.13	-	-
DPD	1.00	+	6 - (18)	200	1	2	0	1	0	0	0	4	0	4 ( 2.0 )	3 ( 1.5 )	0.25	-	-
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	4	11	12	1	1	0	0	29	0	24* ( 12.0 )	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.), f : fragment (deletion), 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. 1) Distilled water 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

\* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 99.15%.

# 3-メチル-4-ニトロフェノールのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験

## Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test of 3-Methyl-4-nitrophenol by Oral Administration in Rats

### 要約

3-メチル-4-ニトロフェノール (CAS No.2581-34-2) の30, 100および300mg/kg/dayを雄ラットの交配前および交配期間を含む46日間、雌ラットの交配前、交配および妊娠期間、哺育3日までの期間に経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験を実施して、以下の知見を得た。

反復投与毒性では、死亡が300mg/kg群の雄1例で投与1日に認められた。本例では、死亡前に自発運動の減少、腹臥および呼吸緩徐が認められ、病理組織学的検査では腎臓、心臓および肺に血栓形成が認められた。同様の症状は300mg/kg群の雌2例で妊娠20あるいは21日に認められた。また、死亡例を除いた被験物質投与群の雌雄全例で、投与期間中に被験物質の色調に起因した黄色尿が認められた。体重推移、摂餌量および剖検では、被験物質投与による影響は認められなかった。以上のことから、3-メチル-4-ニトロフェノールの反復投与による無影響量 (NOEL) は雌雄ともに100mg/kg/dayであることが示唆された。

生殖発生毒性では、生殖能検査、生殖器の重量および病理組織学的検査、分娩および母性行動観察、新生児の生存性、一般状態観察、体重推移および剖検では、被験物質投与による影響は認められなかった。以上のことから、3-メチル-4-ニトロフェノールの雌雄動物の生殖および次世代の発生に対する無影響量は300mg/kg/dayであることが示唆された。

### 方法

#### 1. 動物および飼育条件

生後8週齢のCrj: CD (SD) 系SPFラットを日本チャールス・リバーより受け入れ、18日間馴化飼育した後、順調な発育を示し、かつ雌では性周期に異常のみられない動物を試験に用いた。

動物は温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数10~15回/時間、照明時間午前8時~午後8時に設定された飼育室で、ブラケット式金属製金網床ケージに収容して飼育した。雌については妊娠17日より、実験動物用床敷 (ホワイトフレック、日本チャールス・リバー) を敷いたステンレス製受皿を使用した。飼料は固型飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業)、飲料水は水道水をそれぞれ自由摂取させた。飼料および床敷の混入物質、飲料水の物質について検査を実施し、異常のみられないことを確認した。

#### 2. 被験物質

3-メチル-4-ニトロフェノール (Lot No.: 09307PW, 純度: 98.5%, 製造者: 住友化学工業) は、有機リン殺虫剤スミチオンの生体内代謝物であり、特有の臭気を有する水に溶けにくい淡黄褐色の結晶である。被験物質は密閉容器に入れ、直射日光を避け、冷所 ( $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ ) で乾燥した通気性の良い場所で保管した。投与液は、被験物質濃度が0.3, 1および3w/v%となるように10%アラビアゴム溶液 (日本薬局方アラビアゴム末, 山田製薬; 局方精製水, ヤクハン製薬) で懸濁して用時調製した。

#### 3. 試験群の設定

本被験物質のラットにおける急性経口毒性試験において、LD<sub>50</sub>値が雄で2300mg/kg、雌で1200mg/kgであり、1000mg/kg群では雄の1/5例、雌の2/5例に死亡が認められていること、および500mg/kg群で雌に自発運動の減少が認められていることを参考にし、また、本試験が約1カ月間の反復投与であることを考慮して、本試験では高用量を雌のLD<sub>50</sub>値の1/4である300mg/kg/dayとし、以下、公比約3で100および30mg/kg/day、さらに10%アラビアゴム溶液投与の対照群を設け、計4群とした。1群の動物数は雌雄各12匹とし、投与開始前日に各群の体重が均一になるように体重別層化無作為抽出法により群分けした。

#### 4. 投与方法

投与経路は経口とし、投与は胃ゾンデを用いて強制的に胃内に行った。投与容量は体重1kg当り10mlとして、投与日に最も近い日に測定した体重に基づいて算出した。投与期間は、雄については交配前14日間および交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は投与開始後46日までの期間、雌については交配前14日間および交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は妊娠期間および哺育3日までの期間とした。投与は10週齢から開始し、平均体重 (体重範囲) は雄で374.4g (331~407g)、雌で226.3g (209~251g) であった。

5. 観察、測定および検査項目

(1) 一般状態観察、体重および摂餌量測定

一般状態は、1日1回以上の頻度で観察した。体重は、投与1日（投与前）、投与2、5、7、10および14日、その後は雄は7日毎（投与終了日を含む）および剖検日、雌は妊娠0、1、3、5、7、10、14、17および20日、哺育0、1および4日に測定し、体重増加量および増加率を算出した。摂餌量は、雄は交配期間および剖検日を除いて、雌は妊娠0日および哺育0日を除いて体重測定と同じ日に測定した。

(2) 剖検および器官重量測定

死亡例は発見後直ちに剖検した。交尾成立例については雄は投与46日の翌日、雌は哺育4日に、交尾不成立例は交配期間終了の翌日に、妊娠26日まで分娩の認められない例（不妊例）は妊娠27日に、エーテル麻酔下で放血致死させた後、剖検した。器官重量は精巢、精巢上体および卵巣について測定し、器官体重重量比を算出した。

(3) 病理組織学的検査

全例の精巢および精巢上体、卵巣、300mg/kg群の死亡例の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、胸腺、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸および直腸、並びに30および100mg/kg群の異常所見部位（腎臓および乳腺）について、10%中性緩衝ホルマリン液あるいはブアン液（精巢、精巢上体）で固定し、パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいは死亡例の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺について、PTAH染色標本を作製し、検査した。

(4) 生殖能検査

雌について、投与前10日から交尾成立までの連日、ギムザ染色による腔垢塗抹標本を作製し、性周期の異常の有無を検査した。

投与14日の雌雄について、同試験群で夕方より1対1で最長14日間同居させた。交尾成立は雌の腔垢中に精子が確認された場合とし、妊娠の成立は雌の子宮に着床痕が確認された場合とした。また、交尾率および受胎率を算出した。

(5) 分娩および母性行動観察

交尾した雌全例について、分娩状態、母性行動、総出産児数、生存児数および死亡児数、出産児の性別および外表を観察した。また、着床率、出産率、分娩率、出生率、哺育4日時哺育率、性比および妊娠期間を算出した。なお、哺育日数は分娩終了を確認した日を哺育0日として起算した。

(6) 新生児の生存性、一般状態観察および体重測定

新生児は1日1回、生死を確認し、一般状態および外表を観察した。また、新生児生存率を算出した。体重は哺育0、1および4日に測定し、体重増加量および増加率を算出した。死亡例は発見後直ちに、その他の例は哺育4日に二酸化炭素吸入法により安楽致死させた後、剖検した。

6. 統計処理

交尾率、受胎率、出産率および哺育率はFisherの正確確率検定法により対照群と被験物質投与群との比較を行った。その他の項目はBartlettの検定法によって分散を検定した。その結果、等分散 ( $P>0.05$ ) を示した項目は一元配置分散分析法によって解析し、有意な場合 ( $P<0.10$ ) には、Dunnnettの検定法（各試料の大きさが違う場合は有効反復数を用いた）により対照群と被験物質投与群との比較を行った。不等分散 ( $P<0.05$ ) を示した項目はKruskal-Wallis法により解析し、有意な場合 ( $P<0.10$ ) には、Mann-WhitneyのU-検定法により対照群と被験物質投与群との比較を行った。なお、分娩および母性行動観察結果、新生児の生存性および体重については1腹を単位として検定を行い、対照群との検定は危険率5%以下を統計学的に有意とした。

結果

1. 反復投与毒性

(1) 死亡例

300mg/kg群の雄1例で死亡が投与1日の投与後約30分に認められた。本例では、死亡前に自発運動の減少、腹臥および呼吸緩徐が認められ、病理組織学的検査では腎臓、心臓および肺に血栓形成が認められた。

(2) 一般状態

生存例では、300mg/kg群の雌2例で、自発運動の減少あるいは腹臥、呼吸緩徐が妊娠20あるいは21日の投与後約30分より認められ、そのうち1例では呼吸緩徐および自発運動の減少が投与後約1時間45分まで継続して認められた。また、被験物質投与群の雌雄全例で黄色尿が投与のほぼ全期間に認められ、300mg/kg群の一部の例では陰のう部あるいは外尿道口周囲の被毛汚染が認められた。その他、雌では30mg/kg群の1例で右頸部の皮下腫瘍、100mg/kg群の1例（分娩異常例）で手足および耳介の蒼白などが妊娠末期および哺育期間中に認められた。

(3) 体重 (Table 1, 2)、摂餌量および器官重量

雌雄ともに、被験物質投与と関連した変化は認められなかった。

(4) 剖検および病理組織学的検査

雌雄ともに被験物質投与と関連した所見は認められず、交尾不成立例および不妊例においてその原因を示唆する所見は認められなかった。なお、前述した右頸部皮下腫瘍の病理組織学的検査では乳腺に乳頭腺管癌が認められた。手足および耳介が蒼白していた例では腎臓の褪色が認められ、病理組織学的には糸球体および尿細管の非同調性分化を特徴とする腎臓の形成異常が認められた。

## 2. 生殖発生毒性

## (1) 生殖能検査, 分娩および母性行動観察 (Table 3)

性周期について被験物質投与に関連した異常は認められなかった。交尾不成立は100mg/kg群の1例に, 受胎不成立は対照群の2例, 30および100mg/kg群の各1例に認められたが, 発現例数に用量依存性はみられなかった。

分娩および母性行動の観察項目について被験物質投与に関連した変化は認められなかった。なお, 分娩異常と

して, 100mg/kg群の1例で遷延分娩および妊娠期間の延長が認められた。本例は, 分娩を妊娠21日に開始し, 妊娠25日に終了し, 14匹の出産児のうち4匹は死亡児であった。その後, 哺育3日に1匹の死亡児が確認されたが, 残りの9匹は哺育4日まで全例哺育した。

## (2) 新生児の生存性, 一般状態, 体重および剖検

雌雄ともに被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

Table 1 Body weight changes of male rats treated orally with 3-methyl-4-nitrophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group (mg/kg)	No. of animals	Day of administration							
		1	2	5	7	10	14	21	28
0	12	375.4 <sup>a</sup>	376.2	388.0	392.6	402.6	419.2	438.8	460.9
		±17.9	±17.5	±20.3	±18.6	±21.2	±26.0	±25.9	±27.5
30	12	374.4	376.2	384.9	390.3	401.0	417.6	436.3	458.4
		±14.3	±14.1	±16.6	±19.1	±20.5	±23.2	±22.4	±23.6
100	12	374.0	376.9	387.0	394.1	403.1	419.2	438.1	459.7
		±19.1	±17.8	±20.2	±22.4	±24.4	±26.9	±26.4	±29.1
300	12	373.8	376.5	387.0	391.3	402.0	417.5	436.0	462.1
		±17.4	±18.8	±19.6	±19.7	±20.8	±23.1	±24.1	±27.2

Group (mg/kg)	No. of animals	Day of administration		
		35	42	46
0	12	477.2	494.8	506.6
		±30.8	±32.3	±34.5
30	12	477.0	491.1	504.2
		±27.7	±28.8	±29.9
100	12	(11)	(11)	(11)
		477.9	492.5	505.9
300	12	±32.7	±34.4	±34.7
		(11)	(11)	(11)
300	12	479.5	496.6	506.7
		±28.6	±30.4	±31.4

a: Values are means ± S.D., and expressed in gram.

b: Values in parentheses are no. of animals examined.

Table 2 Body weight changes of female rats treated orally with 3-methyl-4-nitrophenol in the preliminary reproduction toxicity screening test

Group (mg/kg)	No. of animals	Day of administration					
		1	2	5	7	10	14
0	12	228.9 <sup>a</sup>	226.8	233.9	235.3	240.5	247.0
		±11.0	±14.2	±12.5	±11.4	±13.5	±14.4
30	12	223.5	223.1	229.5	230.3	236.3	243.2
		±6.1	±7.7	±7.5	±7.5	±7.8	±8.7
100	12	225.7	224.2	230.3	233.8	237.7	243.5
		±8.6	±10.4	±10.3	±9.6	±9.8	±10.7
300	12	226.9	225.4	230.1	230.6	236.1	242.1
		±8.6	±7.6	±8.5	±10.6	±9.2	±10.7

Group (mg/kg)	No. of animals	Day of gestation								
		0	1	3	5	7	10	14	17	20
0	10	249.1	257.7	269.1	278.1	284.2	297.3	317.3	343.2	383.7
		±11.2	±10.2	±11.2	±8.6	±11.5	±13.9	±15.0	±14.0	±19.1
30	11	244.5	252.7	265.3	271.7	279.5	291.9	312.1	337.2	384.0
		±9.7	±11.0	±10.5	±9.7	±9.7	±9.6	±11.2	±12.2	±18.3
100	9	246.8	255.4	266.9	273.3	282.3	295.7	314.1	341.2	386.0
		±10.5	±12.8	±10.6	±12.5	±13.1	±15.6	±17.2	±18.3	±17.7
300	12	243.8	250.7	261.2	268.3	274.4	287.2	306.2	329.7	372.1
		±13.6	±12.4	±12.0	±12.7	±13.4	±12.5	±13.2	±15.7	±21.8

Group (mg/kg)	No. of animals	Day of lactation		
		0	1	4
0	10	301.4	292.5	309.1
		±21.0	±14.0	±15.8
30	11	291.4	283.0	308.5
		±14.4	±12.0	±16.3
100	10	290.7	279.2	302.6
		±15.9	±12.3	±15.9
300	12	290.0	279.0	302.8
		±15.2	±15.4	±14.1

a: Values are means ± S.D., and expressed in gram.

Table 3 Influence of 3-methyl-4-nitrophenol on reproductive ability, delivery and maternal behavior of rats in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	3-Methyl-4-nitrophenol (mg/kg)			
	0	30	100	300
No of animals examined	12	12	12	12
Days between the starting of mating and copulation	2.3±1.4 <sup>a</sup>	2.3±1.2	2.5±1.4	2.2±1.4
Copulation index <sup>b</sup> (%)	100.0	100.0	91.7	100.0
No. of pregnant animals	10	11	10	12
Fertility index <sup>c</sup> (%)	83.3	91.7	90.9	100.0
No. of corpora lutea	15.7±1.8	17.1±3.3	17.6±2.4	16.6±2.6
No. of implantation sites	14.7±1.6	15.2±1.1	14.8±1.0	14.3±2.3
Implantation index <sup>d</sup> (%)	93.923±7.133	90.753±12.263	85.333±11.452	86.681±13.699
No. of pups born (%)	13.1±2.4	14.3±1.6	13.8±1.3	13.3±2.8
Delivery index <sup>e</sup> (%)	89.509±14.728	94.156±9.056	93.159±4.829	95.510±10.254
Live pups born				
No.	13.1±2.4	14.2±1.5	13.3±1.7	13.3±2.8
Live birth index <sup>f</sup> (%)	100.000±0.000	99.394±2.011	96.476±9.046	99.479±1.804
Sex ratio <sup>g</sup>	1.041±0.694	1.600±1.478	1.429±1.559	0.881±0.538
Dead pups born				
No.	0.0±0.0	0.1±0.3	0.5±1.3	0.1±0.3
Gestation length (day)	21.4±0.5	21.5±0.5	21.9±1.2	21.5±0.5
Gestation index <sup>h</sup> (%)	100.0	100.0	90.0 <sup>i</sup>	100.0
Nursing index <sup>j</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	100.0

a: Values are means ± S.D.

b: (No. of pairs with successful copulation / no. of pairs mated) × 100.

c: (No. of pregnant animals / no. of pairs with successful copulation) × 100.

d: (No. of implantation sites / no. of corpora lutea) × 100, using the litter as a unit of treatment.

e: (No. of pups born / no. of implantation sites) × 100, using the litter as a unit of treatment.

f: (No. of live pups born / no. of pups born) × 100, using the litter as a unit of treatment.

g: (No. of male pups / no. of female pups), using the litter as a unit of treatment.

h: (No. of females with live pups / no. of pregnant females) × 100.

i: (No. of females with normal nursing / no. of females with complete delivery) × 100.

j: One of 10 pregnant females had prolonged delivery and gestation length.

## 考察

被験物質投与による死亡が300mg/kg群の雄1例で投与1日の投与後約30分に認められた。本例では死亡前に自発運動の減少、腹臥および呼吸緩徐が認められ、本被験物質の500~2500mg/kgを単回投与した場合と類似の症状であった。病理組織学的検査では腎臓、心臓および肺に血栓形成が認められ、循環障害による急性死亡と考えられた。死亡例でみられた症状は300mg/kg群の雌2例で妊娠20あるいは21日に認められたが、雌では死亡には至らず、また、妊娠維持や分娩に影響を及ぼすものでもなかった。一般状態観察では、他に、黄色尿が死亡例を除き被験物質投与群の雌雄全例で投与期間中に認められたが、これは被験物質の色調（淡黄褐色）を反映したものであると考えられた。その他、体重推移および摂餌量では被験物質投与による影響は認められなかった。

以上より、300mg/kg群で死亡が雄1例に認められ、また、自発運動の減少、腹臥および呼吸緩徐が死亡例および雌2例に認められたことから、本スクリーニング試験における3-メチル-4-ニトロフェノール反復投与による無影響量（NOEL）は雌雄ともに100mg/kg/dayであることが示唆された。

生殖能検査では、雌の性周期、雌雄の交尾および受胎、生殖器（精巣、精巣上体および卵巣）の重量および病理組織学的検査において被験物質投与による影響は認められなかった。分娩および母性行動観察では、100mg/kg群の1例で遷延分娩および妊娠期間の延長が認められた。なお、本例では手足および耳介の蒼白、腎臓に褪色および形成異常も認められたが、分娩異常との関連は明らかではなかった。本試験では同様の分娩異常は高用量群には認められないことから、本例の出現は偶発的であり、被験物質投与との関連はないものと考えられた。なお、同例は全出産児14匹のうちの死亡児を除く9匹を哺育4日まで正常に哺育したことから、哺育行動に異常はないと判断された。その他に30mg/kg群の母動物1例で乳頭腺管癌が認められたが、同所見は試験施設の背景データ（生殖試験の雌の親動物での出現頻度：0.11%）でもみられており、また高用量群には認められないことから、被験物質投与との関連はないものと考えられた。

新生児の観察では、生存性、一般状態、体重推移および剖検において被験物質投与による影響は認められなかった。

以上より、生殖発生について被験物質投与による影響は認められないことから、本スクリーニング試験における3-メチル-4-ニトロフェノールの雌雄動物の生殖および次世代の発生に対する無影響量は300mg/kg/dayであることが示唆された。

## 文献

- 1) 門田 忠臣ら “p-ニトロメタクレゾールのマウスならびにラットに対する急性毒性試験” 厚生省生活化学安全対策室提供資料, 1974.

## 連絡先

試験責任者：釜田 悟  
試験担当者：八幡昭子, 常見邦順,  
小林裕幸, 長谷淳一  
岡澤平一

(株)化合物安全性研究所  
〒004 北海道札幌市豊平区真栄363番24号  
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

## Correspondence

Authors : Satoru Kamada (Study director),  
Akiko Yahata, Kuninori Tsunemi,  
Hiroyuki Kobayashi,  
Jyun-ichi Nagaya, Heiichi Okazawa  
Safety Research Institute for Chemical  
Compounds Co., Ltd.  
363-24 Shin-ei, Toyohira-ku, Sapporo,  
Hokkaido, 004, Japan  
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

# 3-メチル-4-ニトロフェノールの細菌を用いる 復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 3-Methyl-4-nitrophenol on Bacteria

### 要約

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、3-メチル-4-ニトロフェノールについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *E. coli* WP2 *uvrA* を用い、用量設定試験は直接法および代謝活性化法のいずれも、1.5~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で、本試験は用量設定試験で抗菌性が認められたことから、直接法および代謝活性化法のいずれも 78.12~2500  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で試験を実施した。

その結果、それぞれ2回実施した本試験において、用いた5種類の検定菌とも、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、3-メチル-4-ニトロフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しない（陰性）と判定された。

### 方法

#### 〔検定菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*EScherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium* の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学の B.N. Ames 博士から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は、 $-80^{\circ}\text{C}$ 以下で凍結保存した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、10~12時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

#### 〔被験物質〕

3-メチル-4-ニトロフェノール (CAS No 2581-34-2) は、分子量153.15、比重 ( $128^{\circ}\text{C}$ ) 1.208 の淡黄褐色の結晶である。純度 99.9%のもの (ロット番号: 90320S, 住友化学工業(株)製造) を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで密栓して冷所に保管した。

3-メチル-4-ニトロフェノールは、ジメチルスルホキシド (DMSO, ロット番号: TWP5445, 和光純薬工業(株)) を用いて 50 mg/ml なるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。なお、調製にあたって、純度および比重換算は行わなかった。試験の開始に先立って、秦野研究所において3-メチル-4-ニトロフェノールの DMSO 溶液中での安定

性試験を行った。すなわち、本試験および染色体異常試験における最高濃度 (30 mg/ml) および最低濃度 (781.2  $\mu\text{g}$ /ml) の2濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後4時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値 (0時間) の平均に対して、いずれも 99.8%であった。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、25.00 mg/ml溶液の含量は既定濃度に対し、102~103%、また、781.2  $\mu\text{g}$ /ml 溶液は、106~108%であった。

以上の結果から、3-メチル-4-ニトロフェノールは DMSO 溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

#### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF-2 : フリルフラマイド (上野製薬(株))  
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))  
9-AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem.Co.)  
2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF-2, 2-AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、用時解凍した。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

#### 〔培地および S9 混液の組成〕

##### 1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー (Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
ピチオン	0.5 mM

\* : WP2 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

##### 2) 合成培地

培地は、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地 1 l あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸水素アンモニウムナトリウム ・4水和物	3.5 g

グルコース	20 g
バクトアガー (Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 混液 (1 ml中下記の成分を含む)

S9**	0.1 ml
NADH	4 $\mu$ mol
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol
NADPH	4 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
0.2M リン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 $\mu$ mol

\*\* : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5, 6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9 (キッコーマン(株)) を用いた。

〔試験方法〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトッパアガー2ml, 被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml, (代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 ml), 検定菌液 0.1 mlを混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに DMSO, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量はTableに示した。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定し、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面上の菌膜の状態から判断した。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

3-メチル-4-ニトロフェノールについて、1.5~5000  $\mu$ g/プレートの範囲で公比約3とし試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法および代謝活性化法において、1500  $\mu$ g/プレート以上で抗菌性が認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量の決定は、直接法、代謝活性化法とも抗菌性の認められる用量範囲の 2500  $\mu$ g/プレートとし、以下6用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Table 1, 2 に示した。3-メチル-4-ニトロフェノールについて上記の用量範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、用量依存性のある陰性対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、3-メチル-4-ニトロフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

文献

- (1) D.M. Maron, and B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983).
- (2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichol and C. Ramel eds.) Elsevier, Amsterdam, New York Oxford, 1984, 161-187.

連絡先

試験責任者: 高鳥浩介  
 試験担当者: 鈴木文子, 亀地礼子, 川上久美子,  
 松木容彦, 北嶋美似子,  
 (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: Kosuke Takatori (Study director)  
 Fumiko Suzuki, Reiko Kameji,  
 Kumiko Kawakami,  
 Yasuhiko Matsuki, Miiko Kitashima  
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
 Center  
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan  
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of 3-methyl-4-nitrophenol \*\* on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu$ g / plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9Mix (-)	0	102	99	102	13	13	12	18	22	20	19	32	22	5	10	13
		( 101 $\pm$ 1.7 )			( 13 $\pm$ 0.6 )			( 20 $\pm$ 2.0 )			( 24 $\pm$ 6.8 )			( 9 $\pm$ 4.0 )		
	78.12	130	92	105	13	17	16	10	14	20	30	29	22	9	7	12
		( 109 $\pm$ 19.3 )			( 15 $\pm$ 2.1 )			( 15 $\pm$ 5.0 )			( 27 $\pm$ 4.4 )			( 9 $\pm$ 2.5 )		
	156.2	116	110	87	19	18	19	11	12	17	21	30	20	5	11	10
		( 104 $\pm$ 15.3 )			( 19 $\pm$ 0.6 )			( 13 $\pm$ 3.2 )			( 24 $\pm$ 5.5 )			( 9 $\pm$ 3.2 )		
	312.5	103	122	99	10	14	13	7	14	16	26	17	26	9	12	2
		( 108 $\pm$ 12.3 )			( 12 $\pm$ 2.1 )			( 12 $\pm$ 4.7 )			( 23 $\pm$ 5.2 )			( 8 $\pm$ 5.1 )		
625	95	82	85	13	13	12	7	6	7	21	25	27	12	6	7	
	( 87 $\pm$ 6.8 )			( 13 $\pm$ 0.6 )			( 7 $\pm$ 0.6 )			( 24 $\pm$ 3.1 )			( 8 $\pm$ 3.2 )			
1250	64 *	75 *	70 *	7 *	10 *	17 *	0 *	2 *	2 *	28 *	17 *	18 *	0 *	4 *	7 *	
	( 70 $\pm$ 5.5 )			( 11 $\pm$ 5.1 )			( 1 $\pm$ 1.2 )			( 21 $\pm$ 6.1 )			( 4 $\pm$ 3.5 )			
2500	18 *	20 *	21 *	11 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	4 *	14 *	9 *	0 *	0 *	0 *	
	( 20 $\pm$ 1.5 )			( 4 $\pm$ 6.4 )			( 0 $\pm$ 0.0 )			( 9 $\pm$ 5.0 )			( 0 $\pm$ 0.0 )			
S9Mix (+)	0	113	111	107	11	9	14	20	28	27	36	41	39	12	16	12
		( 110 $\pm$ 3.1 )			( 11 $\pm$ 2.5 )			( 25 $\pm$ 4.4 )			( 39 $\pm$ 2.5 )			( 13 $\pm$ 2.3 )		
	78.12	121	126	108	14	17	16	27	22	32	30	31	20	15	9	16
		( 118 $\pm$ 9.3 )			( 16 $\pm$ 1.5 )			( 27 $\pm$ 5.0 )			( 27 $\pm$ 6.1 )			( 13 $\pm$ 3.8 )		
	156.2	117	107	103	12	12	16	18	28	22	29	22	29	13	11	9
		( 109 $\pm$ 7.2 )			( 13 $\pm$ 2.3 )			( 23 $\pm$ 5.0 )			( 27 $\pm$ 4.0 )			( 11 $\pm$ 2.0 )		
	312.5	95	100	103	8	15	22	10	7	16	31	28	23	11	14	11
		( 99 $\pm$ 4.0 )			( 15 $\pm$ 7.0 )			( 11 $\pm$ 4.6 )			( 27 $\pm$ 4.0 )			( 12 $\pm$ 1.7 )		
625	101	115	97	14	19	10	10	4	9	24	24	30	9	4	10	
	( 104 $\pm$ 9.5 )			( 14 $\pm$ 4.5 )			( 8 $\pm$ 3.2 )			( 26 $\pm$ 3.5 )			( 8 $\pm$ 3.2 )			
1250	86 *	58 *	75 *	13 *	9 *	10 *	4 *	3 *	4 *	16 *	24 *	22 *	7 *	2 *	3 *	
	( 73 $\pm$ 14.1 )			( 11 $\pm$ 2.1 )			( 4 $\pm$ 0.6 )			( 21 $\pm$ 4.2 )			( 4 $\pm$ 2.6 )			
2500	15 *	23 *	22 *	0 *	2 *	2 *	0 *	0 *	0 *	5 *	8 *	6 *	0 *	1 *	1 *	
	( 20 $\pm$ 4.4 )			( 1 $\pm$ 1.2 )			( 0 $\pm$ 0.0 )			( 6 $\pm$ 1.5 )			( 1 $\pm$ 0.6 )			
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu$ g / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu$ g / plate)	1			2			10			0.5			2		
Positive control S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	556	533	565	281	266	290	244	235	237	664	665	687	2796	3125	2913
		( 551 $\pm$ 16.5 )			( 279 $\pm$ 12.1 )			( 239 $\pm$ 4.7 )			( 672 $\pm$ 13.0 )			( 2945 $\pm$ 166.8 )		
Positive control S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	687	771	609	252	228	271	545	505	523	348	331	339	241	202	253
		( 689 $\pm$ 81.0 )			( 250 $\pm$ 21.5 )			( 524 $\pm$ 20.0 )			( 339 $\pm$ 8.5 )			( 232 $\pm$ 26.7 )		

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

\*\*: Purity was 99.9%.

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 3-methyl-4-nitrophenol \*\* on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu$ g /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean $\pm$ S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9Mix (-)	0	181	185	145	13	17	13	20	19	16	21	19	27	8	14	11
		( 170 $\pm$ 22.0 )			( 14 $\pm$ 2.3 )			( 18 $\pm$ 2.1 )			( 22 $\pm$ 4.2 )			( 11 $\pm$ 3.0 )		
	78.12	90	92	93	22	17	18	17	15	11	26	29	20	13	9	9
		( 92 $\pm$ 1.5 )			( 19 $\pm$ 2.6 )			( 14 $\pm$ 3.1 )			( 25 $\pm$ 4.6 )			( 10 $\pm$ 2.3 )		
	156.2	123	108	94	8	17	8	14	11	16	21	27	19	8	8	9
		( 108 $\pm$ 14.5 )			( 11 $\pm$ 5.2 )			( 14 $\pm$ 2.5 )			( 22 $\pm$ 4.2 )			( 8 $\pm$ 0.6 )		
	312.5	124	125	85	10	11	19	19	9	12	30	17	24	7	15	7
	( 111 $\pm$ 22.8 )			( 13 $\pm$ 4.9 )			( 13 $\pm$ 5.1 )			( 24 $\pm$ 6.5 )			( 10 $\pm$ 4.6 )			
625	101	99	103	13	15	11	4	8	7	22	11	17	6	4	5	
	( 101 $\pm$ 2.0 )			( 13 $\pm$ 2.0 )			( 6 $\pm$ 2.1 )			( 17 $\pm$ 5.5 )			( 5 $\pm$ 1.0 )			
1250	86 *	72 *	74 *	7 *	8 *	5 *	2 *	0 *	1 *	16 *	15 *	14 *	4 *	4 *	13 *	
	( 77 $\pm$ 7.6 )			( 7 $\pm$ 1.5 )			( 1 $\pm$ 1.0 )			( 15 $\pm$ 1.0 )			( 7 $\pm$ 5.2 )			
2500	5 *	6 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	2 *	0 *	0 *	0 *	
	( 4 $\pm$ 3.2 )			( 0 $\pm$ 0.0 )			( 0 $\pm$ 0.0 )			( 1 $\pm$ 1.2 )			( 0 $\pm$ 0.0 )			
S9Mix (+)	0	161	149	125	20	16	17	23	21	21	35	34	30	11	12	10
		( 145 $\pm$ 18.3 )			( 18 $\pm$ 2.1 )			( 22 $\pm$ 1.2 )			( 33 $\pm$ 2.6 )			( 11 $\pm$ 1.0 )		
	78.12	120	100	113	15	13	13	24	24	13	26	23	37	9	7	11
		( 111 $\pm$ 10.1 )			( 14 $\pm$ 1.2 )			( 20 $\pm$ 6.4 )			( 29 $\pm$ 7.4 )			( 9 $\pm$ 2.0 )		
	156.2	110	97	117	10	17	12	20	22	17	35	36	36	13	14	22
		( 108 $\pm$ 10.1 )			( 13 $\pm$ 3.6 )			( 20 $\pm$ 2.5 )			( 36 $\pm$ 0.6 )			( 16 $\pm$ 4.9 )		
	312.5	114	112	107	15	23	10	23	19	24	38	24	28	13	13	11
	( 111 $\pm$ 3.6 )			( 16 $\pm$ 6.6 )			( 22 $\pm$ 2.6 )			( 30 $\pm$ 7.2 )			( 12 $\pm$ 1.2 )			
625	107	103	117	12	8	17	4	10	9	32	31	23	12	12	15	
	( 109 $\pm$ 7.2 )			( 12 $\pm$ 4.5 )			( 8 $\pm$ 3.2 )			( 29 $\pm$ 4.9 )			( 13 $\pm$ 1.7 )			
1250	76 *	74 *	86 *	2 *	3 *	5 *	0 *	1 *	0 *	31 *	13 *	21 *	5 *	6 *	5 *	
	( 79 $\pm$ 6.4 )			( 3 $\pm$ 1.5 )			( 0 $\pm$ 0.6 )			( 22 $\pm$ 9.0 )			( 5 $\pm$ 0.6 )			
2500	0 *	1 *	2 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *	2 *	1 *	0 *	0 *	0 *	0 *	
	( 1 $\pm$ 1.0 )			( 0 $\pm$ 0.0 )			( 0 $\pm$ 0.0 )			( 1 $\pm$ 1.0 )			( 0 $\pm$ 0.0 )			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ( $\mu$ g /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	545	529	539	239	271	259	141	132	127	633	610	577	2723	2907	2685
		( 538 $\pm$ 8.1 )			( 256 $\pm$ 16.2 )			( 133 $\pm$ 7.1 )			( 607 $\pm$ 28.1 )			( 2772 $\pm$ 118.7 )		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu$ g /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	743	666	722	257	266	222	679	753	743	321	343	346	246	227	231
		( 710 $\pm$ 39.8 )			( 248 $\pm$ 23.2 )			( 725 $\pm$ 40.1 )			( 337 $\pm$ 13.7 )			( 235 $\pm$ 10.0 )		

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

\*\*: Purity was 99.9%.

# 3-メチル-4-ニトロフェノールの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of 3-Methyl-4-nitrophenol on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

OECD 既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、3-メチル-4-ニトロフェノールの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU, 以下CHLと略す)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、細胞増殖抑制試験を行ったところ、直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は0.023 mg/mlであった。一方、代謝活性化法のS9mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ0.12 mg/ml および0.15 mg/mlであった。従って、染色体異常試験において、直接法では0.023 mg/ml、代謝活性化法では0.15 mg/mlの処理濃度をそれぞれ高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、すべての処理群において、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、代謝活性化法におけるS9mix非存在下の高濃度群では、観察した細胞の9%に染色体の構造異常が認められた。また、S9mix存在下におけるすべての処理群で、観察した細胞の10%以上(gapを含む)に染色体の構造異常が認められ、陽性の結果が得られた。

以上の結果より、3-メチル-4-ニトロフェノールは、今回実施した試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月, 入手時: 継代4代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: JRH BIOSCIENCES, ロット番号: 1C2073)を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

2×10<sup>4</sup>個のCHL細胞を、培養液5mlを入れたディッシュ(径6cm, Corning)に播き、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。

直接法では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時

間および48時間処理した。また、代謝活性化法では、細胞播種3日目にS9mixの存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

#### 4. 被験物質

3-メチル-4-ニトロフェノール(別名: 4-ニトロ-m-クレゾール, CAS No.: 2581-34-2, ロット番号: 90320S, 住友化学工業(株)製造, (社)日本化学工業協会提供)は淡黄褐色結晶で、水に0.15 g/100 g (25℃)まで溶解、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびアセトンに溶けやすく、分子式C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>, 分子量153.15, 純度99.9%, 融点127~129℃, 沸点207℃で、170℃以上の高温にさらすと爆発の可能性がある物質である。原体の安定性に関する情報は得られなかったが、溶媒中(DMSO)での安定性試験では、0.7812~30 mg/mlの濃度範囲で4時間は安定であった。

#### 5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(Sigma Chemical Co., ロット番号: 129F0413 および30H0608)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5% (v/v)になるように加えた。染色体異常試験の直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群の調製液の濃度は、すべて許容範囲内(平均含量が添加量の85%以上)の値であった。

#### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、3-メチル-4-ニトロフェノールの約50%の増殖抑制を示す濃度を、50%をはさむ2濃度の値より算出したところ、直接法では0.023 mg/mlであった。一方、代謝活性化法のS9mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ0.12 mg/ml および0.15 mg/mlであった(Fig. 1)。

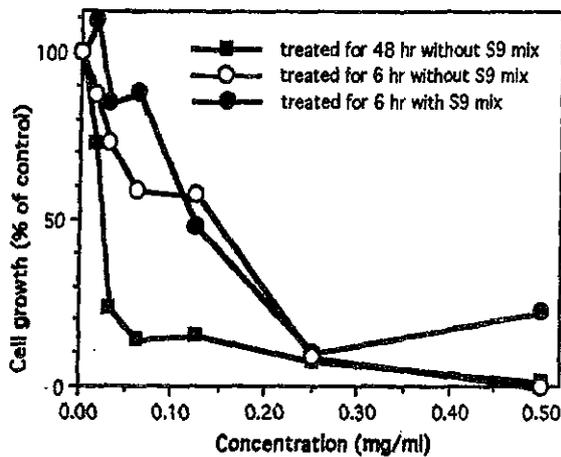


Fig. 1 Growth inhibition of CHL cells treated with with 3-methyl-4-nitrophenol

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、直接法では0.023 mg/ml、代謝活性化法のS9mix存在下および非存在下では0.15 mg/ml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。

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。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で約10分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、複数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<sup>9)</sup>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、フィッシャーのexact probability test法により、溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群の有意差検定を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が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。

結果および考察

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。3-メチル-4-ニトロフェノールを加えて24時間および48時間処理した各濃度群で、染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した。3-メチル-4-ニトロフェノールを加えてS9mix非存在下で6時間処理した高濃度群(0.15 mg/ml)で、観察した細胞の9%(gapを含む)に染色体の構造異常がみられた。また、S9mix存在下で6時間処理したすべての濃度群で、観察した細胞の10%以上(gapを含む)に染色体の構造異常がみられ、陽性の結果が得られた。

3-メチル-4-ニトロフェノールを培養液に加えると、培養液の色が黄色に変化することから、本試験の代謝活性化法と同一条件で、処理直後と処理終了時のpHを測定した。その結果、pHは6.87~7.96の範囲内の値を示し、明らかなpHの低下は認められなかった。従って、本実験で誘発された染色体異常に関しては、3-メチル-4-ニトロフェノール添加による培地の酸性化によるよりはむしろ、3-メチル-4-ニトロフェノールそれ自身によるDNA傷害作用に起因するものと考えられる。

一方、本試験と並行して実施された5種類の検定菌を用いる復帰突然変異試験では、直接法、代謝活性化法のいずれの試験においても変異原活性は認められなかった。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with 3-methyl-4-nitrophenol\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations			Polyloid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)	SA		NA	
Control			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			
MNP	0.006	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-	
MNP	0.012	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-	
MNP	0.023	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38	-	-	
MC	0.00005	24	200	7	25	69	1	0	1	0	103	0	56 * (28.0)	53 * (26.5)	0.25	+	-	
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25			
MNP	0.006	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	-	-	
MNP	0.01	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38	-	-	
MNP	0.023	48	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	3 (1.5)	0 (0.0)	0.13	-	-	
MC	0.00005	48	200	7	12	56	0	4	0	0	79	0	53 * (26.5)	51 * (25.5)	0.25	+	-	

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), 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.

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) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). \* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 99.9%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 3-methyl-4-nitrophenol \*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations			Polyloid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)	SA		NA	
Control				200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25			
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6 - (18)	200	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	0 (0.0)	0.38			
MNP	0.04	-	6 - (18)	200	2	0	9	0	0	0	0	11	0	8 (4.0)	7 * (3.5)	0.88	-	-	
MNP	0.08	-	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-	
MNP	0.15	-	6 - (18)	200	5	14	15	0	0	0	0	34	0	18 * (9.0)	15 * (7.5)	0.25	±	-	
CPA	0.0005	-	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-	
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00			
MNP	0.04	+	6 - (18)	200	10	11	29	0	0	0	20	70	0	31 * (15.5)	26 * (13.0)	0.88 *	+	-	
MNP	0.08	+	6 - (18)	200	6	7	33	0	0	0	0	46	0	21 * (10.5)	18 * (9.0)	0.50	+	-	
MNP	0.15	+	6 - (18)	200	6	9	15	0	0	0	0	30	0	23 * (11.5)	19 * (9.5)	0.00	+	-	
CPA	0.0005	+	6 - (18)	200	25	65	152	1	1	0	80	324	0	125 * (62.5)	121 * (60.5)	0.38	+	-	

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), 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.

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) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). \* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 99.9%.

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, 1988.
- 2) 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, 1987.

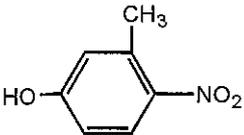
連絡先

試験責任者 : 田中憲穂  
試験担当者 : 山影康次, 日下部博一,  
橋本恵子, 渋谷 徹, 原 巧,  
加藤基恵, 石原尚子  
(財)食品薬品安全センター秦野研究所  
〒257 神奈川県秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors : Noriho Tanaka ( Study director )  
Kohji Yamakage,  
Hirokazu Kusakabe,  
Keiko Hashimoto, Toru Shibuya,  
Takumi Hara, Motoe Kato,  
Naoko Ishihara  
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

**SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE**

<b>CAS No.</b>	2581-34-2
<b>Chemical Name</b>	Phenol, 3-methyl-4-nitro-
<b>Structural Formula</b>	
<b>CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS</b>	
<p>Potential risk to man is identified due to genotoxicity and thus presumed carcinogenicity, but measures currently in place reduce risks such that the chemical is of low priority for further work.</p>	
<b>SHORT SUMMARY WHICH SUPPORTS THE REASONS FOR THE CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS</b>	
<p>3-Methyl-4-nitrophenol is a stable solid, and the production volume was 3,300 tonnes/year for 1990 - 1993 in Japan. The substance is used as an intermediate for the synthesis of pesticides. Based on an international information gathering activity on exposure, 3-methyl-4-nitrophenol has been produced in two OECD Member countries, i.e. Japan and Denmark. In Japan, the chemical is manufactured and processed in a closed system, i.e. the product itself and all reagents and solvents for its synthesis are handled in perfectly closed tubes and vessels. The synthesis is operated within the same plant. At the work place, protective clothing, gloves and goggles are used. No consumer uses are known. Monitoring data in the general environment in Japan (surface water and sediments) are available, but the substance was not detected in 1984. Regarding the Japanese global situation, the predicted worst case concentration in surface water is <math>1.7 \times 10^{-4}</math> mg/l and the predicted indirect exposure to humans through the environment was calculated to be <math>1.4 \times 10^{-3}</math> mg/man/day (i.e. <math>2.3 \times 10^{-5}</math> mg/kg/day). In Denmark, the chemical is produced, but detailed exposure information is not available, except that there is no consumer use.</p> <p>For the environment, various NOEC and LC<sub>50</sub> values were gained from test results; LC<sub>50</sub> = 9.8 mg/l (acute fish); EC<sub>50</sub> = 9.1 mg/l (acute daphnia); EC<sub>50</sub> = 8.6 mg/l (acute algae); NOEC = 0.78 mg/l (long-term daphnia reproduction). Therefore, the chemical is considered to be moderately toxic to fish, daphnids and algae. The lowest chronic toxicity result, 21 d-NOEC (reproduction) of <i>Daphnia magna</i> (0.78 mg/l), was adopted for the calculation of the PNEC, applying an assessment factor of 100. Thus the PNEC of the chemical is 0.0078 mg/l. Since the PEC is lower than the PNEC, the environmental risk is presumably low.</p> <p>The chemical showed genotoxic effects in a chromosomal aberration test <i>in vitro</i> and in an <i>in vivo</i> micronucleus test. In a 6 months repeated dose toxicity test, the chemical showed a transient excretion of glucose to urine in the 1500 ppm group, but no other abnormalities were noted. In an OECD preliminary reproductive/developmental toxicity test, the chemical showed no effect on reproductive ability, organ weight, histopathological appearance of reproductive organs, delivery and maternal behaviour of dams, viability, clinical signs, body weight change and autopsy findings for offspring. Also, as repeated dose effect to male rats, decreased locomotor activity, prone position, bradypnea and thrombus in the kidney, heart and lung were observed in the high-dose group (300 mg/kg/day). The NOEL for 6 months repeated dose toxicity was 500 ppm (30.7 mg/kg/day) in both sexes. The NOEL for reproductive toxicity was 300 mg/kg/day and the NOEL for repeat dose toxicity to male rats in the preliminary reproductive test was 100 mg/kg/day.</p> <p>3-Methyl-4-nitrophenol showed genotoxicity in an <i>in vitro</i> chromosomal aberration test. However, this chemical is used as raw material for the synthesis of pesticides in closed systems, and the results from gathering international exposure information showed that the production volume is low, and exposure to the general population from the general environment is currently low. In Japan, the chemical is manufactured and processed in a closed system, i.e. the product itself and all reagents and solvents for its synthesis are handled in perfectly closed tubes and vessels. The synthesis is operated within the same plant. At the work place, protective clothing, gloves and goggles are used. The</p>	

daily intake of the chemical via the environment was estimated to be  $1.4 \times 10^{-3}$  mg/man/day (i.e.  $2.3 \times 10^{-5}$  mg/kg/day) from the result of worst-case calculation using the MNSEM 145I exposure model. The concentrations in surface water and sediments were not detectable in a Japanese environmental monitoring program. No consumer uses have been identified. Although no data on work place monitoring have been reported, voluntary exposure reducing procedures are in place in Japan. Occupational exposure seems to be low.

Therefore, 3-methyl-4-nitrophenol is considered as low priority for further work.

**NATURE OF FURTHER WORK RECOMMENDED**

In an OECD preliminary reproductive/developmental toxicity test in rats at doses of 0, 30, and 300 mg/kg/day, the chemical showed decreased locomotor activity, prone position, bradypnea and thrombus in the kidney, heart and lung were observed in the high-dose group (300 mg/kg/day) as repeated dose effect to male rats. NOEL for repeated dose toxicity to male rats in the preliminary reproductive toxicity test was 100 mg/kg/day.

### 3.1.3 Mutagenicity

#### *In vitro Studies*

##### Bacterial test

A reverse gene mutation assay was conducted in line with Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Japan) and OECD Test Guidelines 471 and 472, using the pre-incubation method. This study was well controlled and regarded as a key study.

3-Methyl-4-nitrophenol showed negative results in *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 and *Escherichia coli* WP2 *uvrA* at concentrations up to 1.5 mg/plate with or without a metabolic activation system (MHW, 1993).

##### Non-bacterial test

A chromosomal aberration test in line with Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Japan) and OECD Test Guideline 473 was conducted using cultured Chinese Hamster lung (CHL/IU) cells. This study was well controlled and regarded as a key study. Although 3-methyl-4-nitrophenol showed negative results without metabolic activation, positive results were obtained with metabolic activation (MHW, 1993).

#### *In vivo Studies*

In a micronucleus test in mice, a positive result was reported. However, detailed data are not available.

### 3.1.4 Toxicity for Reproduction

3-Methyl-4-nitrophenol was studied for oral toxicity in rats according to the OECD Preliminary reproductive toxicity test at doses of 0, 30, 100 and 300 mg/kg/day. Although this study was designed to investigate reproductive capability in parental generation as well as development in F<sub>1</sub> offspring, parameters to evaluate developmental toxicity were limited to body weights at day 0 and day 4 after birth, and autopsy findings at day 4.

Effects of the repeated administration on both sexes:

No effects of 3-methyl-4-nitrophenol treatment were revealed in body weight changes, food consumption or autopsy. One male of the 300 mg/kg group died, and decrease in spontaneous activity, prone position and bradypnea were noted in the dead animal and two surviving females of the 300 mg/kg group. On the basis of these findings, NOEL of this chemical was considered to be 100 mg/kg/day for repeated administration toxicity of both sexes in this study.

In effects on reproduction of both sexes and development of the next generation, no effects of this chemical were detected in reproductive ability, organ weights or histopathological examination of the reproductive organs of both sexes, delivery or maternal behavior of dams, viability, general appearance, body weight changes or autopsy of pups. On the basis of these findings, the NOEL of this chemical was considered to be 300 mg/kg/day for reproductive/developmental toxicity of both parent animals and offspring in this study.

**5.2.2 EYE IRRITATION/CORROSION**

Species/strain: New Zealand white rabbit  
 Results: Highly corrosive [X]; Corrosive [ ]; Highly irritating [ ];  
 Irritating [ ]; Moderate irritating [ ]; Slightly irritating  
 [ ]; Not irritating [ ]  
 Classification: Irritating [ ]; Not irritating [ ]; Risk of serious damage to eyes [ ]  
 Method: 3 rabbits/unwashed group (2 males and 1 female, the same rabbits were used  
 for the skin irritation test), 3 rabbits/washed of (1 male and 2 females). 96  
 hour-observation period, application: 0.1 g/rabbit; In the case of washed  
 group, the treated eyes were flushed for 1 minute with ca. 300 ml water 30  
 seconds after application.  
 GLP: Yes [X] No [ ] ? [ ]  
 Test substance: purity 82.6 %  
 Remarks: 54.3 scores after 48 hrs, unwashed group (Extremely irritating)  
 Reference: Unpublished company report (1988)

**5.3 SKIN SENSITISATION**

No studies located

**5.4 REPEATED DOSE TOXICITY**

(a)  
 Species/strain: Rat (Wistar)  
 Sex: Female [ ]; Male [ ]; Male/Female [X]; No data [ ]  
 Route of Administration: oral (Diet)  
 Exposure period: 6 months  
 Frequency of treatment:  
 Post exposure observation period:  
 Dose: 0, 150, 500 or 1500 ppm  
 Control group: Yes [X]; No [ ]; No data [ ];  
 Concurrent no treatment [ ]; Concurrent vehicle [X];  
 Historical [ ]  
 NOEL: 500 ppm (30.7 mg/kg/day)  
 LOEL:  
 Results: A transient excretion of glucose into urine was observed in the rats fed 1500  
 ppm. No other abnormalities were noted.  
 Method:  
 GLP: Yes [ ] No [X] ? [ ]  
 Test substance: Commercial, purity: 99.5 %  
 Reference: Botyu-Kagaku 40, 38-48 (1975)

**5.5 GENETIC TOXICITY IN VITRO**

**A. BACTERIAL TEST**

(a)  
 Type : Bacterial reverse mutation assay  
 System of testing:  
 Species/strain: *S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538  
*E. coli* WP2 uvrA  
 Concentration: 78.12 - 2500 µg/plate  
 Metabolic activation: With [ ]; Without [ ]; With and Without [X]; No data [ ]

- 24) Miyamoto, J.: *Residue Reviews*, 25, 251 (1969).  
 25) Miyamoto, J., Y. Sato, K. Yamamoto and S. Suzuki: *Botyu-Kagaku*, 33, 1 (1968).  
 26) Hosokawa, S. and J. Miyamoto: unpublished.  
 27) Hollingworth R. M., R. L. Metcalf and T. R. Fukuto: *J. Agr. Food. Chem.*, 15, 242 (1967).  
 28) Douche, P. G. C., C. E. R. Hoock and J. N. Smith, *Austral. J. Pharma.*, 49, 570 (1968).  
 29) Fukami, J. and T. Shishido: *Botyu-Kagaku*, 28, 60 (1963).  
 30) Fukami, J. and T. Shishido: *Botyu-Kagaku*, 28, 78 (1963).

**Subchronic Toxicity Studies of Sumithion, Sumioxon and *p*-Nitroresol in Rats and 92 Week Feeding Study of Sumithion with Special Reference to Change of Cholinesterase Activity.**  
 Tadaomi KADOTA, Hiroyuki KOHDA and Junshi MIYAMOTO (Research Department, Pesticides Division Sumitomo Chemical Co., Ltd., Takarazuka, Hyogo, Japan) Received Jan. 16, 1975.  
*Botyu-Kagaku* 40, 38, 1975.

7. スミチオン, スミオキソン, *p*-ニトロクレゾールのラットにおける亜慢性毒性およびスミチオン92週摂食によるコリンエステラーゼの変動 門田忠臣, 鴻田弘行, 宮本純之 (住友化学工業株式会社農薬事業部研究部) 50. 1. 16. 受理

有機リン殺虫剤スミチオンおよびその代謝産物の亜慢性毒性を明らかにするため最高スミチオン150ppm, スミオキソン50ppm, *p*-ニトロクレゾール1,500ppmを含む飼料をそれぞれ6カ月間ラットに摂食させ、体重測定、摂食・摂水量測定、血液検査、臨床生化学検査、尿検査、臓器重量測定、病理組織学的検査を実施した。

コリンエステラーゼ活性を除き、各検査項目についてこれらの化合物の投与に起因すると思われる異常は見出されなかった。血漿、血球、脳コリンエステラーゼはスミチオン、スミオキソンの投与量に相関して阻害されており、スミチオンは最低の10ppmでも雌血漿コリンエステラーゼを有意に阻害したところから、さらに92週に及ぶ追加摂食実験を行ない経時的に血液コリンエステラーゼ活性を測定した。この条件下でスミチオンの無影響量は飼料中5ppm、体重換算0.27mg/kg/dayであった。

一方スミオキソンの無影響量は、6カ月摂食後で飼料中5ppmであった。

### Introduction

Sumithion® or *O,O*-dimethyl *O*-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate is an organophosphorus insecticide now widely used to control various plant pests and insects of medical importance. The metabolic studies in mammals<sup>1-6)</sup> revealed that orally administered radioactive Sumithion was easily absorbed from the gastrointestinal tract and distributed into various tissues. Sumithion was confirmed to be oxidized into the active metabolite Sumioxon, *O,O*-dimethyl *O*-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphate in the animal both in vivo and in vitro. Both compounds were decomposed in animal body and the radioactivity was eliminated rapidly and completely, majorly into urine. The major degradation products in urine were desmethylsumithion, desmethylsumioxon,

dimethylphosphorothioic acid, dimethylphosphoric acid, *p*-nitroresol (3-methyl-4-nitrophenol) and its conjugates. Plant metabolism proceeds in essentially the similar manner<sup>7-9)</sup>; a trace amount of Sumioxon and *p*-nitroresol, free and bound with glucose, were found.

Although it has already been demonstrated that residue of Sumithion and its metabolites in various harvested crops is generally low<sup>7-12)</sup>, it is necessary to assess the chronic toxicity of Sumithion and other possibly toxicologically significant metabolites in humans. In this study, therefore, Sumioxon and *p*-nitroresol as well as Sumithion were fed to rats for consecutive 6 months to examine the subchronic effects on various physiological parameters. A supplementary study was also carried out with special reference to the change of cholinesterase activity

during 92 week feeding of Sumithion.

### Materials and Methods

Sumithion was a technical product of Sumitomo Chemical Co., Ltd (lot No. 417, purity 97.2%). Sumioxon (99% pure) and *p*-nitrocresol (99.5% pure) were prepared in this laboratory.

Six week old male and female Wistar strain rats were purchased from Nihon Dobutsu Co., Ltd. and were housed in individual cages and kept at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  and relative humidity of  $60 \pm 10\%$  for 6 months. All animals had free access to food and water. The control group received basal diet (Nihon Crea CE-2) and the test groups received powdered diet containing the test material. The organization of the experiment is reproduced in Table 1. Behavioral changes and mortality were observed every day and body-weight, food and water consumption were recorded weekly. Urinary sugar (Benedict method), protein (sulfosalicylic acid method), bilirubin (ferric sulfate method), urobilinogen (Ehrich method) and occult blood (Benzidine method) were examined at 4th, 8th, 12th and 24th week (Shinotest Lab. Co.). At the termination of 6 month feeding, all the animals were anesthetized with ether and blood was withdrawn from abdominal aorta for hematological, clinical biochemical examinations including cholinesterase activity measurement. Red blood cells, white blood cells and thrombocytes were counted by a microcell counter (Toa Electric Co., Ltd. type II) and differential leucocyte counts were carried out as usual.

Total blood hemoglobin content was measured by the standard technique involving cyanomethemoglobin formation<sup>14)</sup>. Hematocrit and sedimentation rate were determined by the standard technique. Clinical biochemistry examinations were carried out with sodium, potassium, chloride, total protein, albumin, alkaline phosphatase (ALP), GOT, GPT, blood urea nitrogen, glucose and bilirubin by an autoanalyzer (Technicon Co., SMA 60/12). Cholinesterase activity (ChE) was determined of plasma, red blood cells and brain by an electrometric method<sup>15)</sup>. The enzyme preparations were reported elsewhere<sup>16)</sup>.

Immediately after blood sampling every tissue and organ were grossly observed and major organs were dissected out to weigh. Also the following tissues were subjected to histopathological examinations by fixation with 10% formalin, followed by double staining with Hematoxylin and Eosin; brain, eye, spinal cord, peripheral nerve, heart, lung, spleen, bone marrow, lymph node, thymus, esophagus, stomach, small intestine, large intestine, liver, pancreas, kidney, urinary bladder, testis or ovary, prostate or uterus, pituitary, thyroid, adrenal and bronchus.

A supplementary study was carried out with special reference to the change of cholinesterase activity of plasma and red blood cells during 92 week feeding of 2.5, 5 and 10 ppm of Sumithion. Each group was composed of 15 males and 15 females. At 2nd, 4th, 6th, 8th, 12th, 16th, 20th, 24th, 42nd, 68th and 92nd week of feeding, a small amount of blood was obtained from orbital

Table 1. Experimental designs of feeding test of Sumithion, Sumioxon and *p*-nitrocresol to rats.

Group	Compound	Dietary level ppm	Number of animals	
			male	female
C	—	0	15	15
T-I	Sumithion	10	15	15
T-II	"	30	15	15
T-III	"	150	15	15
T-IV	Sumioxon	5	15	15
T-V	"	15	15	15
T-VI	"	50	15	15
T-VII	<i>p</i> -nitrocresol	150	15	15
T-VIII	"	500	15	15
T-IX	"	1500	15	15

plexus by using glass capillary under ether anesthetization. Brain cholinesterase activity was measured after 92 week feeding.

### Results and Discussions

**Behavior and mortality;** There was no signs of toxicity during 6 month feeding of Sumithion, Sumioxon or *p*-nitroresol. One death was observed in male fed 15 ppm Sumioxon during starvation period just prior to necropsy.

**Body weight change;** Table 2 shows mean body weight change during the feeding period. These compounds were found not to affect the body weight gain adversely except that a slight depression of body weight gain was observed during the initial feeding period of 150 ppm Sumithion in both males and females (1st to 2nd week). However, the body weight gain recovered to the normal level in 2 to 3 weeks.

**Food and water consumption;** The results of food and water consumption measurement revealed

that only at high dosage of Sumithion the animals ingested a little more amount of food at the initial 2 weeks. There were no appreciable differences in water consumption among control and any test groups. Intake of the test compounds during the feeding period was calculated and the results are shown in Table 3.

Table 3. Intake of Sumithion, Sumioxon and *p*-nitroresol during 6 month feeding period.

Compound	Dietary level ppm	Compound ingested mg/kg body weight/day	
		male	female
Sumithion	10	0.59	0.64
	30	1.83	2.00
	150	9.16	11.2
Sumioxon	5	0.31	0.34
	15	0.91	0.99
	50	2.99	3.66
<i>p</i> -nitroresol	150	9.23	10.1
	500	30.7	32.8
	1500	94.7	101.00

Table 2. Body weight gain during 6 month feeding of Sumithion, Sumioxon and *p*-nitroresol to rats.

Sex	Experimental groups		Body weight <sup>a)</sup> , g			
			Initial	Final	Gain	
Male	control	0 ppm	188 ± 6.13	419 ± 11.6	231 ± 9.0	
		Sumithion	10 ppm	194 ± 4.50	438 ± 8.6	244 ± 10.3
			30 ppm	178 ± 3.48	434 ± 13.9	256 ± 15.5
	Sumioxon	150 ppm	197 ± 3.87	427 ± 11.5	230 ± 10.8	
		5 ppm	156 ± 2.48**	408 ± 13.9	252 ± 14.2	
		15 ppm	165 ± 6.03*	410 ± 12.2	245 ± 13.2	
	<i>p</i> -nitroresol	50 ppm	197 ± 6.67	423 ± 12.5	226 ± 10.8	
		150 ppm	177 ± 7.85	428 ± 12.0	251 ± 11.6	
		500 ppm	185 ± 7.75	430 ± 16.5	245 ± 14.2	
Female	control	0 ppm	145 ± 4.35	273 ± 8.4	128 ± 5.4	
		Sumithion	10 ppm	155 ± 3.86	279 ± 7.4	124 ± 6.7
			30 ppm	143 ± 3.68	262 ± 5.3	119 ± 4.1
	Sumioxon	150 ppm	141 ± 5.31	252 ± 5.2*	111 ± 6.3	
		5 ppm	140 ± 2.74	263 ± 6.7	123 ± 5.6	
		15 ppm	153 ± 2.83	270 ± 2.8	117 ± 3.5	
	<i>p</i> -nitroresol	50 ppm	148 ± 3.22	279 ± 7.7	131 ± 6.6	
		150 ppm	143 ± 3.68	269 ± 5.2	126 ± 5.5	
		500 ppm	142 ± 2.79	273 ± 5.8	131 ± 4.9	
		1500 ppm	145 ± 4.08	268 ± 6.1	123 ± 5.5	

<sup>a)</sup> mean ± standard error

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 4. Hematological studies in rats treated with Sumithion, Sumioxon and *p*-nitroresol for 6 months. <sup>a)</sup>

Sex	Groups	Dietary level ppm	Red blood cell $\times 10^4$	Thrombocyte $\times 10^4$	Sedimentation rate mm/hr	Hematocrit %	Hemoglobin g/dl	White blood cell $\times 10^2$
Male	control	0	919 $\pm$ 19.9	74.1 $\pm$ 6.10	1.54 $\pm$ 0.38	48.6 $\pm$ 1.08	14.7 $\pm$ 0.26	88.2 $\pm$ 4.60
	Sumithion	10	918 $\pm$ 12.2	76.5 $\pm$ 3.59	2.42 $\pm$ 0.50	46.0 $\pm$ 0.61	15.2 $\pm$ 0.22	92.7 $\pm$ 4.91
		30	874 $\pm$ 11.2	78.7 $\pm$ 4.34	2.99 $\pm$ 0.81	46.0 $\pm$ 0.93	14.5 $\pm$ 0.19	84.4 $\pm$ 6.39
		150	904 $\pm$ 14.7	68.0 $\pm$ 4.05	1.25 $\pm$ 0.27	46.3 $\pm$ 0.69	14.6 $\pm$ 0.19	91.5 $\pm$ 4.39
	Sumioxon	5	940 $\pm$ 10.8	79.9 $\pm$ 6.70	2.55 $\pm$ 0.35	46.1 $\pm$ 0.48	14.1 $\pm$ 0.17	97.6 $\pm$ 3.80
		15	945 $\pm$ 12.0	74.5 $\pm$ 4.40	2.64 $\pm$ 0.46	46.9 $\pm$ 0.70	13.9 $\pm$ 0.19*	90.6 $\pm$ 5.20
		50	939 $\pm$ 16.5	81.0 $\pm$ 5.80	1.88 $\pm$ 0.30	47.8 $\pm$ 1.08	14.0 $\pm$ 0.28	92.4 $\pm$ 4.90
	<i>p</i> -nitroresol	150	991 $\pm$ 16.1**	71.8 $\pm$ 5.00	1.49 $\pm$ 0.42	47.3 $\pm$ 0.97	14.0 $\pm$ 0.24	80.9 $\pm$ 6.00
		500	979 $\pm$ 20.0	82.5 $\pm$ 6.40	1.49 $\pm$ 0.32	47.8 $\pm$ 0.95	14.1 $\pm$ 0.22	92.1 $\pm$ 4.00
		1500	996 $\pm$ 16.2**	78.1 $\pm$ 4.10	1.37 $\pm$ 0.40	47.1 $\pm$ 0.72	14.0 $\pm$ 0.21	90.3 $\pm$ 3.70
Female	control	0	843 $\pm$ 14.7	90.5 $\pm$ 6.95	0.94 $\pm$ 0.29	43.8 $\pm$ 0.72	13.8 $\pm$ 0.11	78.8 $\pm$ 4.95
	Sumithion	10	885 $\pm$ 15.8*	88.2 $\pm$ 6.43	0.84 $\pm$ 0.17	45.6 $\pm$ 0.89	13.8 $\pm$ 0.20	79.9 $\pm$ 6.01
		30	836 $\pm$ 13.8	82.3 $\pm$ 4.85	0.99 $\pm$ 0.33	42.8 $\pm$ 0.72	13.7 $\pm$ 0.14	70.5 $\pm$ 5.17
		150	840 $\pm$ 13.0	84.0 $\pm$ 5.42	1.78 $\pm$ 0.45	42.1 $\pm$ 0.27*	13.9 $\pm$ 0.11	70.5 $\pm$ 5.17
	Sumioxon	5	826 $\pm$ 8.2	79.1 $\pm$ 4.00	2.38 $\pm$ 0.49*	43.5 $\pm$ 0.73	13.5 $\pm$ 0.13	66.1 $\pm$ 4.40
		15	845 $\pm$ 9.8	82.7 $\pm$ 5.01	1.98 $\pm$ 0.31*	43.7 $\pm$ 0.60	13.8 $\pm$ 0.15	60.9 $\pm$ 3.70**
		50	877 $\pm$ 6.6*	85.1 $\pm$ 3.40	1.61 $\pm$ 0.29	43.5 $\pm$ 0.58	13.9 $\pm$ 0.19	62.1 $\pm$ 4.50*
	<i>p</i> -nitroresol	150	827 $\pm$ 13.3	79.8 $\pm$ 4.00	1.41 $\pm$ 0.30	43.1 $\pm$ 0.46	13.9 $\pm$ 0.19	53.1 $\pm$ 3.90**
		500	821 $\pm$ 14.1	79.9 $\pm$ 3.31	2.33 $\pm$ 0.50	42.8 $\pm$ 0.50	13.7 $\pm$ 0.09	49.3 $\pm$ 3.31**
		1500	845 $\pm$ 16.7	79.3 $\pm$ 4.72	1.89 $\pm$ 0.41	43.5 $\pm$ 0.78	13.5 $\pm$ 0.15	49.5 $\pm$ 2.31**

<sup>a)</sup> mean  $\pm$  standard error

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

*Hematology*; Table 4 summarizes the results of the hematological examinations (Differential leucocyte counts were also carried out although the data are not submitted here). Although there were several significant differences in some cases indicated by asterisk, they were not attributable to the compounds, since some of them were not dose-related and others were seemingly within the range of physiological fluctuations.

*Urinalysis*; At the latter half of the feeding period urinary protein was found in all rats examined of both control and each of the test groups. However, the degree was not dependent on the administration of the compounds. A transient excretion of sugar into urine was observed in the rats fed 1500 ppm *p*-nitroresol at 4th and 8th week, but it disappeared thereafter. No other abnormalities were noted.

*Clinical biochemistry and cholinesterase activity*; The results of blood biochemistry and cholinesterase activity after 6 month feeding are shown in Table 5. Although there were some significant differences in several of the parameters tested, these differences (excluding cholinesterases) were neither so large nor dose-dependent and, therefore, are presumably not attributable to the feeding of these chemicals. On the other hand, plasma, red blood cell and brain cholinesterase activity of the animals given Sumithion or Sumioxon showed a dose-related decrease. Female plasma cholinesterase was more susceptible to Sumithion than the male enzyme and even at the lowest dosage (10 ppm) the activity of the former was significantly lower than the control, whereas the latter showed no inhibition. Sumioxon at 5 and 15 ppm caused no significant inhibition of plasma enzyme. No reduction in red blood cell cholinesterase activity was observed by Sumithion at 10 ppm (male and female) and 30 ppm (male) or by Sumioxon at 5 and 15 ppm (male and female). The inhibition of brain cholinesterase activity was more remarkably observed in females than males; in females Sumithion at 150 and 30 ppm and Sumioxon at 50 and 15 ppm were inhibitory, while in males only Sumithion at 150 ppm was inhibitory.

*Organ weight*; The weight of 9 major organs was determined and their ratios to body weight

were calculated. Table 6 shows the ratios. Although the weight and the ratio of several organs in a certain treated groups were significantly deviated from those of the control, they were regarded as not dependent on the compounds administered.

*Histopathology*; Histopathological examinations were made of 24 tissues of all rats given the highest dosage of Sumithion, Sumioxon and *p*-nitroresol in comparison with the control. The results are summarized in Table 7. Pneumonia or abscess in lung (excluding *p*-nitroresol group), vacuolar degeneration in the parenchymal cells as well as a slight bile duct proliferation and infiltration of oval cells in liver and a slight magnification of the renal tubule and cell infiltration in interstitial connective tissues in kidney were findings common to both control and treated groups and these changes were not due to the administration of the compounds. No other signs of abnormalities were observed in any tissues examined which might lead to the formation of hyperplasia.

Thus, no adverse effects were observed in all the parameters examined except cholinesterase inhibition by 6 month feeding of up to 150 ppm Sumithion, 50 ppm Sumioxon and 1500 ppm *p*-nitroresol to rats. The findings were in well accord with 2 year chronic feeding study of Sumithion in beagle dogs<sup>17)</sup>, where 200 ppm of Sumithion gave no other untoward reactions than inhibition of cholinesterases. Sumioxon at 5 ppm was not inhibitory on plasma, red blood cell and brain cholinesterase, while Sumithion at the lowest level (10 ppm) inhibited the female plasma cholinesterase. Therefore, a supplementary feeding experiment of Sumithion to rats was undertaken to establish no effect level in terms of the effect on cholinesterases. In this study each 15 male and 15 female rats were kept on diet containing 0, 2.5, 5 and 10 ppm of Sumithion and blood was taken periodically and plasma and red blood cell cholinesterases were determined by delta pH method. At the termination of the feeding the animals were sacrificed and brain cholinesterase activity was determined. Some of the test animals were dead in the latter half of

Table 5. Blood biochemical studies in rats treated with Sumithion, Sumioxon and *p*-nitroresol for 6 months.<sup>a)</sup>

Sex	Groups	Dietary level ppm	Sodium Meq/l	Potassium Meq/l	Chlorine Meq/l	Glucose mg/dl	Blood urea-N mg/dl	Total protein g/dl	Albumin g/dl
Male	control	0	140±0.81	8.84±0.32	101±1.36	93.8±3.09	16.7±0.96	7.21±0.13	2.48±0.09
	Sumithion	10	139±0.30*	9.50±0.27	101±0.73	107 ±5.43	15.0±0.56	6.89±0.10	2.48±0.08
		30	139±0.71	9.47±0.20	103±0.40	112 ±6.53*	16.1±0.57	6.77±0.10*	2.45±0.11
		150	140±0.52	9.58±0.31	103±0.64	98.2±4.97	20.1±2.58	6.78±0.09*	2.46±0.07
	Sumioxon	5	142±0.45*	7.56±0.20**	101±0.50	113 ±3.79**	16.8±0.65	6.73±0.10*	2.44±0.08
		15	142±0.40	9.00±0.40	101±0.72	101 ±7.16	15.9±0.73	6.88±0.16	2.56±0.07
		50	140±0.70	9.08±0.24	102±0.69	112 ±7.26*	17.0±1.04	6.63±0.06**	2.51±0.12
	<i>p</i> -nitroresol	150	143±1.07	8.95±0.35	103±0.71	92.2±8.28	16.4±0.61	7.02±0.12	2.39±0.15
		500	142±0.79	8.89±0.26	109±6.13	107 ±9.14	14.8±0.96	7.07±0.06	2.58±0.09
		1500	142±0.79*	8.76±0.32	102±0.58	98.3±5.82	15.9±0.87	6.90±0.13	2.47±0.11
Female	control	0	146±0.62	11.6±0.59	108±0.54	90.8±5.98	15.3±0.47	7.96±0.12	3.69±0.09
	Sumithion	10	151±0.88	8.88±0.30	107±0.56	73.8±3.96*	17.9±0.64	7.98±0.13	3.47±0.13
		30	146±0.65	11.2±0.61	106±0.69*	71.2±3.33*	17.1±0.65	7.83±0.12	3.65±0.16
		150	149±0.65*	10.8±0.34	108±0.70	74.6±3.00**	20.7±0.79**	7.71±0.14	3.50±0.14
	Sumioxon	5	142±0.47**	7.66±0.25**	102±0.56**	81.7±8.15	15.9±1.03	7.89±0.11	3.41±0.15
		15	144±1.01	9.26±0.39	104±1.39	83.9±4.56	16.6±0.77	7.56±0.13*	3.21±0.10*
		50	143±0.56**	7.47±0.25**	103±0.37	81.6±3.15	16.7±0.79	7.57±0.13*	3.31±0.02*
	<i>p</i> -nitroresol	150	135±1.28**	7.90±0.28**	101±0.70**	79.0±6.36	14.4±1.12	7.01±0.08**	2.96±0.14*
		500	140±1.11**	8.22±0.37**	103±0.53**	81.0±4.17	13.5±0.82	7.32±0.07**	3.45±0.15
		1500	142±0.57**	8.72±0.30**	104±0.71**	75.4±4.67	15.0±1.18	7.93±0.10	3.53±0.14

<sup>a)</sup> mean ± standard error

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 5. (Continued)

Sex	Groups	Dietary level ppm	Bilirubin mg/dl	ALP K-A u	GOT Karmen u	GPT Karmen u	Cholinesterase <sup>b)</sup>		
							plasma $\Delta$ PH	red blood cell $\Delta$ pH	brain $\Delta$ PH
Male	control	0	0.26 ± 0.02	31.2 ± 3.92	228 ± 7.49	77.0 ± 2.09	0.89 ± 0.14	0.36 ± 0.04	0.98 ± 0.05
	Sumithion	10	0.28 ± 0.01	22.1 ± 1.36	199 ± 10.7*	74.5 ± 3.04	0.84 ± 0.07	0.35 ± 0.02	1.09 ± 0.07
		30	0.22 ± 0.01	18.1 ± 1.04**	206 ± 5.43	72.3 ± 0.88	0.60 ± 0.05	0.30 ± 0.05	0.88 ± 0.03
		150	0.25 ± 0.02	28.3 ± 1.86	187 ± 10.8**	71.1 ± 1.89	0.51 ± 0.03*	0.11 ± 0.04**	0.46 ± 0.10**
	Sumioxon	5	0.30 ± 0.01**	21.8 ± 1.63*	203 ± 12.4	63.0 ± 3.06**	0.66 ± 0.06	0.42 ± 0.02	1.16 ± 0.06*
		15	0.29 ± 0.01	25.1 ± 3.13	190 ± 9.32**	68.3 ± 3.06**	0.59 ± 0.08	0.36 ± 0.03	0.93 ± 0.04
		50	0.27 ± 0.02	24.4 ± 2.27	196 ± 14.3	70.2 ± 1.28*	0.60 ± 0.06	0.24 ± 0.02*	0.96 ± 0.04
	<i>p</i> -nitroresol	150	0.35 ± 0.02**	21.0 ± 2.05*	187 ± 8.45**	75.3 ± 3.36	—	—	—
		500	0.33 ± 0.02**	19.7 ± 2.02*	193 ± 4.29**	67.0 ± 1.63**	—	—	—
		1500	0.32 ± 0.01**	20.5 ± 1.52*	192 ± 9.80**	66.4 ± 1.33**	—	—	—
Female	control	0	0.33 ± 0.02	17.1 ± 1.93	226 ± 9.85	31.1 ± 1.32	1.84 ± 0.31	0.38 ± 0.04	0.95 ± 0.04
	Sumithion	10	0.39 ± 0.02	15.8 ± 1.22	251 ± 10.4	23.9 ± 1.79	0.83 ± 0.09**	0.32 ± 0.02	0.95 ± 0.04
		30	0.33 ± 0.02	12.4 ± 0.73	240 ± 16.3	23.7 ± 1.75	0.92 ± 0.17**	0.27 ± 0.02*	0.66 ± 0.02**
		150	0.30 ± 0.00**	15.3 ± 1.24	226 ± 9.85	19.7 ± 0.82**	0.45 ± 0.04**	0.13 ± 0.02**	0.29 ± 0.01**
	Sumioxon	5	0.33 ± 0.02	16.1 ± 1.58	231 ± 11.4	24.1 ± 2.11*	1.60 ± 0.09	0.40 ± 0.02	0.92 ± 0.06
		15	0.33 ± 0.02	13.3 ± 1.43	239 ± 9.71	20.3 ± 2.24	1.24 ± 0.19	0.35 ± 0.05	0.83 ± 0.03*
		50	0.40 ± 0.01**	17.0 ± 1.86	254 ± 14.9	26.8 ± 2.44	0.78 ± 0.12*	0.15 ± 0.01**	0.72 ± 0.02**
	<i>p</i> -nitroresol	150	0.31 ± 0.01	9.69 ± 1.49**	182 ± 13.8*	19.8 ± 3.83*	—	—	—
		500	0.33 ± 0.02	13.9 ± 1.74	192 ± 10.0*	19.4 ± 1.73**	—	—	—
		1500	0.34 ± 0.02	13.0 ± 1.02	228 ± 8.80	20.8 ± 1.76**	—	—	—

<sup>b)</sup>  $\Delta$ PH for 60 min., at 37.5°C

Table 6. Ratio of organ weight to body weight of rats treated with Sumithion, Sumioxon and *p*-nitroresol for 6 months.<sup>a)</sup>

Sex	Groups	Dietary level ppm	Lung %	Liver %	Kidney %	Spleen %	Heart %
Male	control	0	0.69±0.06	2.31±0.08	0.59±0.01	0.24±0.02	0.30±0.01
	Sumithion	10	0.54±0.03*	2.39±0.04	0.64±0.02	0.21±0.02	0.31±0.01
		30	0.56±0.05	2.38±0.08	0.64±0.01*	0.19±0.01*	0.32±0.01
		150	0.59±0.04	2.36±0.05	0.62±0.01	0.19±0.01*	0.30±0.01
	Sumioxon	5	0.61±0.05	2.34±0.06	0.60±0.02	0.20±0.02	0.30±0.01
		15	0.65±0.04	2.37±0.05	0.63±0.01	0.24±0.02	0.32±0.01
		50	0.62±0.06	2.49±0.06	0.64±0.03	0.20±0.01*	0.32±0.01
	<i>p</i> -nitroresol	150	0.67±0.09	2.12±0.04	0.60±0.02	0.22±0.02	0.28±0.01**
		500	0.68±0.06	2.28±0.05	0.62±0.02	0.21±0.01	0.31±0.01
1500		0.55±0.02*	2.25±0.05	0.60±0.02	0.20±0.01	0.31±0.01	
Female	control	0	0.65±0.05	2.63±0.08	0.66±0.02	0.23±0.01	0.32±0.01
	Sumithion	10	0.67±0.04	2.34±0.06**	0.63±0.01	0.24±0.02	0.34±0.01
		30	0.66±0.03	2.43±0.05*	0.60±0.01**	0.22±0.01	0.34±0.01
		150	0.68±0.03	2.62±0.05	0.70±0.02	0.26±0.02	0.36±0.01**
	Sumioxon	5	0.68±0.03	2.37±0.03**	0.61±0.01*	0.26±0.03	0.35±0.01*
		15	0.58±0.02	2.43±0.04*	0.62±0.01	0.23±0.01	0.34±0.01
		50	0.67±0.03	2.34±0.06**	0.62±0.01	0.23±0.01	0.34±0.01
	<i>p</i> -nitroresol	150	0.64±0.04	2.49±0.03	0.60±0.03	0.24±0.02	0.35±0.01**
		500	0.60±0.03	2.36±0.03**	0.61±0.02	0.24±0.02	0.35±0.01*
1500		0.68±0.04	2.40±0.04*	0.61±0.02	0.23±0.01	0.34±0.01	

<sup>a)</sup> mean ± standard error\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ 

Table 6. (Continued)

Sex	Groups	Dietary level ppm	Adrenal mg %	Testis %	Ovary mg %	Brain %
Male	control	0	11.8±0.83	0.73±0.02	/	0.45±0.01
	Sumithion	10	11.8±0.55	0.72±0.02	/	0.46±0.01
		30	10.8±0.77	0.74±0.03	/	0.45±0.01
		150	10.4±0.72	0.70±0.02	/	0.45±0.01
	Sumioxon	5	13.2±1.21	0.74±0.02	/	0.46±0.02
		15	13.1±1.14	0.75±0.02	/	0.48±0.01
		50	12.0±0.25	0.72±0.02	/	0.45±0.02
	<i>p</i> -nitroresol	150	12.4±0.70	0.74±0.02	/	0.43±0.01
		500	12.2±0.81	0.73±0.02	/	0.45±0.02
1500		10.4±0.66	0.72±0.03	/	0.43±0.02	
Female	control	0	20.6±1.11	/	28.0±3.12	0.66±0.02
	Sumithion	10	21.3±1.23	/	31.0±3.60	0.62±0.02
		30	19.8±0.96	/	26.5±1.89	0.64±0.04
		150	22.5±1.19	/	35.4±3.62	0.72±0.02*
	Sumioxon	5	22.9±1.19	/	29.7±3.30	0.66±0.02
		15	22.3±1.23	/	27.0±2.78	0.65±0.01
		50	20.2±1.04	/	31.7±3.36	0.66±0.02
	<i>p</i> -nitroresol	150	21.4±1.00	/	27.8±2.93	0.65±0.02
		500	22.7±1.11	/	28.0±2.27	0.65±0.01
1500		20.9±0.92	/	26.9±2.37	0.64±0.01	

Table 7. Histopathological findings of rats treated with Sumithion, Sumioxon and *p*-nitroresol for 6 months.

Tissues	control		Sumithion 150ppm		Sumioxon 50ppm		<i>p</i> -nitroresol 1500ppm	
	male	female	male	female	male	female	male	female
Brain	—	—	—	—	—	—	—	—
Eye	—	—	—	—	—	—	—	—
Spinal cord	—	—	—	—	—	—	—	—
Peripheral nerve	—	—	—	—	—	—	—	—
Bronchus	—	—	—	—	—	—	—	—
Lung*	±	±	±	±	±	—	—	—
Heart	—	—	—	—	—	—	—	—
Spleen	—	—	—	—	—	—	—	—
Bone marrow	—	—	—	—	—	—	—	—
Lymph node	—	—	—	—	—	—	—	—
Thymus	—	—	—	—	—	—	—	—
Esophagus	—	—	—	—	—	—	—	—
Stomach	—	—	—	—	—	—	—	—
Small intestine	—	—	—	—	—	—	—	—
Large intestine	—	—	—	—	—	—	—	—
Liver	—	—	—	—	—	—	—	—
Pancreas	—	—	—	—	—	—	—	—
Kidney	—	—	—	—	—	—	—	—
Urinary bladder	—	—	—	—	—	—	—	—
Testis	—	/	—	/	—	/	—	/
Prostate	—	/	—	/	—	/	—	/
Ovary	/	—	/	—	/	—	/	—
Uterus	/	—	/	—	/	—	/	—
Pituitary	—	—	—	—	—	—	—	—
Thyroid	—	—	—	—	—	—	—	—
Adrenal	—	—	—	—	—	—	—	—

\* Pneumonia or abscess

Table 8. Mortality of rats treated with Sumithion for 92 weeks.

Sex	Dose ppm	No. of rat	Number of dead animals							Mortality	%
			0~12 week	12~24	24~48	48~60	60~72	72~84	84~92		
Male	0	15	0	1	2	0	1	3	0	7/15	46.7
	2.5	15	3	0	0	0	1	2	2	8/15	53.3
	5	15	0	0	2	2	1	0	3	8/15	53.3
	10	15	0	0	3	0	1	3	0	7/15	46.7
Female	0	15	1	1	3	0	1	1	0	7/15	46.7
	2.5	15	2	0	0	1	2	1	2	8/15	53.3
	5	15	0	0	1	0	4	1	1	7/15	46.7
	10	15	1	0	0	1	1	2	2	7/15	46.7

the feeding period, as shown in Table 8, mainly due to pneumonia, which indicates that Sumithion had no adverse effects on survival of the animals. Fig. 1 shows change of plasma cholinesterase activity. The enzyme was not inhibited by 2.5 ppm Sumithion throughout the 92 week experi-

mental period. At 5 ppm the cholinesterase activity was slightly depressed at the early period of feeding, but it tended to recover on longer feeding. The tendency was similar to that reported by other workers<sup>18)</sup>. Sumithion at 10 ppm was significantly inhibitory, just like the

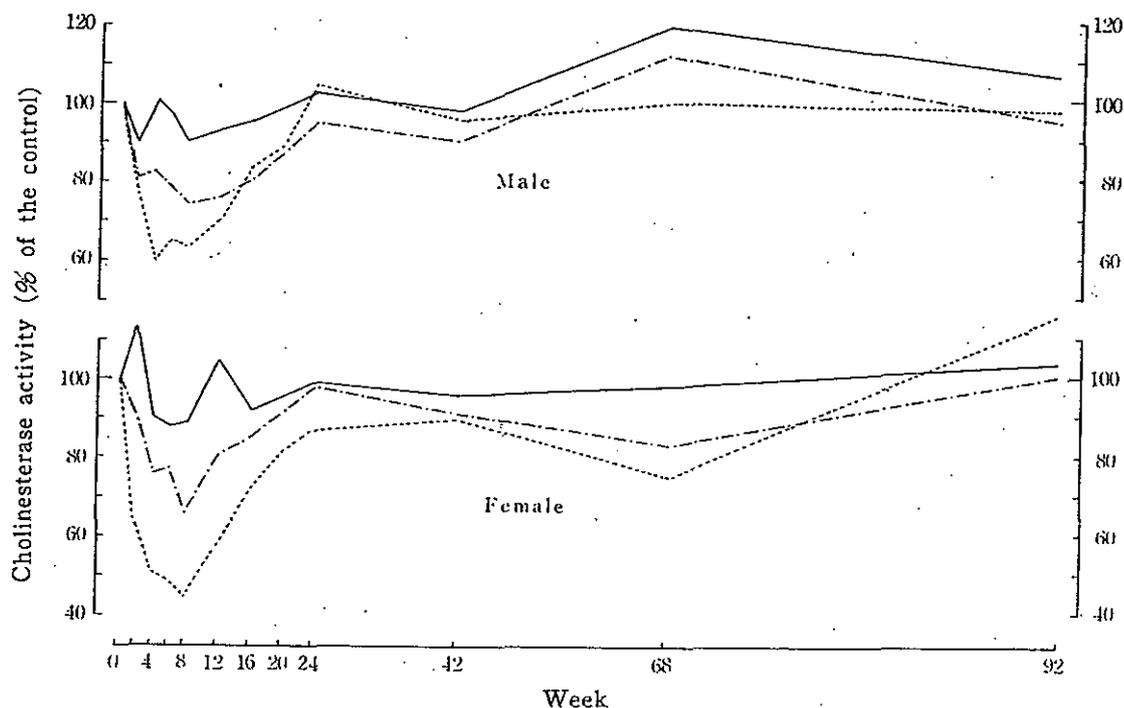


Fig. 1. Changes of plasma cholinesterase activity in rats treated with Sumithion for 92 weeks.  
 — 2.5 ppm    ····· 5.0 ppm    - - - 10 ppm

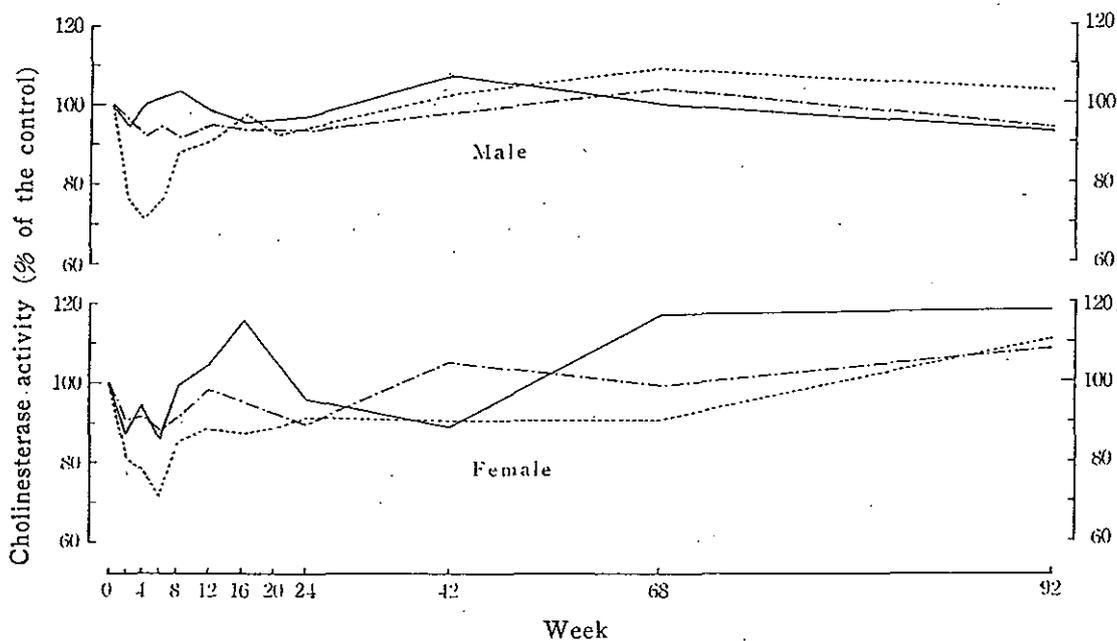


Fig. 2. Changes of red cell cholinesterase activity in rats treated with Sumithion for 92 weeks.  
 — 2.5 ppm    ····· 5.0 ppm    - - - 10 ppm

Table 9. Brain cholinesterase activity of rats treated with Sumithion for 92 weeks.

Dietary level ppm	Male		Female	
	$\Delta$ PH <sup>a)</sup>	%	$\Delta$ PH <sup>a)</sup>	%
0	0.918±0.041	100	0.905±0.016	100
2.5	0.911±0.024	99.3	0.906±0.078	100
5	0.880±0.020	95.9	0.896±0.026	99.0
10	0.860±0.034	93.7	0.865±0.016	95.6

<sup>a)</sup>  $\Delta$ PH for 60min. at 37.5°C

Mean ± standard error is given. (n=15)

previous trial.

Red blood cell cholinesterase was again less susceptible, as shown in Fig. 2, to Sumithion than the plasma enzyme and even at 10 ppm the inhibition was not so significant. The activity of brain cholinesterase of the treated rats was comparable to the control, as shown in Table 9. Histopathological examination of the animals sacrificed at the termination of the feeding revealed no adverse effects which were due to administration of Sumithion.

Based on the supplementary experiment, no effect level of Sumithion with respects to cholinesterase inhibition can be determined to be 5 ppm in food or 0.27 mg/kg body weight/day in male or 0.28 mg/kg/day in female, which is rather close to the no effect level in dog (5 ppm in food or 0.15 mg/kg/day)<sup>17)</sup> or in human (0.2 mg/kg/day by subacute oral administration to volunteers)<sup>19)</sup>.

**Acknowledgement:** The authors are very much grateful to Prof. N. Ito, Nagoya City University Medical School for carrying out the histopathological examinations. They wish to express their thanks to Mr. M. Miyata, Miss K. Mizushima and Miss R. Takeyasu for their skilled technical assistances. They also thank Sumitomo Chemical Co., Ltd. for permission to publish this work.

#### References

- Miyamoto, J., Y. Sato, T. Kadota, A. Fujinami and M. Endo; *Agr. Biol. Chem.*, 27, 381 (1963).
- Miyamoto, J.; *Agr. Biol. Chem.*, 28, 411 (1964).
- Miyamoto, J., Y. Sato, K. Yamamoto and S. Suzuki; *Botyu-Kagaku*, 33, 1 (1968).
- Miyamoto, J.; *Residue Reviews*, 25, 251 (1969).
- Miyamoto, J., S. Hosokawa and K. Mihara; Unpublished.
- Hollingworth, R. M., R. L. Metcalf and T. R. Fukuto; *J. Agr. Food Chem.*, 15, 242 (1967).
- Miyamoto, J. and Y. Sato; *Botyu-Kagaku*, 30, 45 (1965).
- Hosokawa, S. and J. Miyamoto; *Botyu-Kagaku*, 39, 49 (1974).
- Leuck, D. B. and M. C. Bowman; *J. Econ. Entomol.*, 62, 1238 (1969).
- Anonymous; 1969 Evaluations of some pesticide residues in food. p.117 (WHO/FAO) (1970).
- Anonymous; Technical Report Series No.65. (Norin Suisan Gijitsu-Kaigi) (1973).
- Takimoto, Y. and J. Miyamoto; Submitted to Residue Reviews, (1974).
- Anonymous; Technical Report of Sumitomo Chemical Co., Ltd., Submitted to FAO. (1974).
- Davidsohn, I. and J. B. Henry; Clinical diagnosis by laboratory methods. 14th ed., p.48, 61, 130. (Saunders, Philadelphia) (1969).
- Michel, H. O.; *J. Lab. Clin. Med.*, 34, 1564 (1949).
- Miyamoto, J., Y. Sato, T. Kadota and A. Fujinami; *Agr. Biol. Chem.*, 27, 669 (1963).
- Burtner, B. R., G. L. Kennedy, Jr. and M. L. Keplinger; Unpublished report of Industrial BIO-TEST Laboratories to Sumitomo Chemical Co., Ltd. (1974).
- Misu, Y., T. Segawa, I. Kuruma, M. Kojima and H. Takagi; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 9, 17 (1966).
- Carofaro, M., R. J. Palazzolo and R. G. Sanders; Unpublished report of Industrial BIO-TEST Laboratories to Sumitomo Chemical Co., Ltd. (1972).



## U.S. Environmental Protection Agency Integrated Risk Information System

[Recent Additions](#) | [Contact Us](#) | [Print Version](#) Search:  **GO**

[EPA Home](#) > [Browse EPA Topics](#) > [Human Health](#) > [Health Effects](#) > [IRIS Home](#) > [IRIS Summaries](#)

### 2,3,4,6-Tetrachlorophenol (CASRN 58-90-2)

[view QuickView](#)



[List of IRIS Substances](#)

Search IRIS by Keyword

**GO**

Full IRIS Summaries/Toxicological Reviews

Entire IRIS Website

#### MAIN CONTENTS

Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD)  **GO**

0108

#### 2,3,4,6-Tetrachlorophenol; CASRN 58-90-2

Health assessment information on a chemical substance is included in IRIS only after a comprehensive review of chronic toxicity data by U.S. EPA health scientists from several Program Offices and the Office of Research and Development. The summaries presented in Sections I and II represent a consensus reached in the review process. Background information and explanations of the methods used to derive the values given in IRIS are provided in the Background Documents.

STATUS OF DATA FOR 2,3,4,6-Tetrachlorophenol

File First On-Line 01/31/1987

Category (section)	Status	Last Revised
Oral RfD Assessment (I.A.)	on-line	01/01/1992
Inhalation RfC Assessment (I.B.)	no data	
Carcinogenicity Assessment (II.)	no data	

#### I. Chronic Health Hazard Assessments for Noncarcinogenic Effects

##### I.A. Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD)

Substance Name – Substance Name – 2,3,4,6-Tetrachlorophenol  
CASRN – 58-90-2  
Last Revised – 01/01/1992

The oral Reference Dose (RfD) is based on the assumption that thresholds exist for certain toxic effects such as cellular necrosis. It is expressed in units of mg/kg-day. In general, the RfD is an estimate (with uncertainty spanning perhaps an order of magnitude) of a daily exposure to the human population (including sensitive subgroups) that is likely to be without an appreciable risk of deleterious effects during a lifetime. Please refer to the Background Document for an elaboration of these concepts. RfDs can also be derived for the noncarcinogenic health effects of substances that are also carcinogens. Therefore, it is essential to refer to other sources of information concerning the carcinogenicity of this substance. If the U.S. EPA has evaluated this substance for potential human

#### SUBSTANCE SUMMARY INDEX

[Chronic Health Hazards for Non-Carcinogenic Effects](#)

[Reference Dose for Chronic Oral Exposure \(RfD\)](#)

- [Oral RfD Summary](#)
- [Principal and Supporting Studies](#)
- [Uncertainty and Modifying Factors](#)
- [Additional Studies/Comments](#)
- [Confidence in the Oral RfD](#)
- [EPA Documentation and Review](#)

[Reference Concentration for Chronic Inhalation Exposure \(RfC\)](#)

- [Inhalation RfC Summary](#)
- [Principal and Supporting Studies](#)
- [Uncertainty and Modifying Factors](#)
- [Additional Studies/Comments](#)
- [Confidence in the Inhalation RfC](#)
- [EPA Documentation and Review](#)

[Carcinogenicity Assessment for Lifetime Exposure](#)

[Evidence for Human Carcinogenicity](#)

- [Weight-of-Evidence Characterization](#)
- [Human Carcinogenicity Data](#)
- [Animal Carcinogenicity Data](#)
- [Supporting Data for Carcinogenicity](#)

[Quantitative Estimate of Carcinogenic Risk](#)

carcinogenicity, a summary of that evaluation will be contained in Section II of this file.

### I.A.1. Oral RfD Summary

Critical Effect	Experimental Doses*	UF	MF	RfD
Increased liver weights and centrilobular hypertrophy	NOAEL: 25 mg/kg/day	1000	1	3E-2 mg/kg/day
	LOAEL: 100 mg/kg/day			

Rat oral subchronic study

U.S. EPA, 1986

\*Conversion Factors: none

### I.A.2. Principal and Supporting Studies (Oral RfD)

U.S. EPA. 1986. 2,3,4,6-Tetrachlorophenol. 90-Day subchronic oral toxicity study in rats. Office of Solid Waste, Washington, DC.

Sprague-Dawley rats (30/sex/dose) were gavaged daily with 0, 25, 100 or 200 mg/kg/day 2,3,4,6-tetrachlorophenol in olive oil. Body weight gain, food consumption, clinical signs of toxicity and mortality were recorded throughout the study. Clinical pathology was performed on 10 rats/dose/sex both at 44-45 day interim sacrifice interval and after 90 days; gross pathology was performed on all animals sacrificed at interim or final sacrifice and on all animals found dead or sacrificed moribund. Histopathological evaluations were also conducted in animals sacrificed at 90 days as well as in the cases of unscheduled death. Results of this study indicated that at 200 mg/kg/day dose male rats showed progressive depression of body weights 3 weeks after the onset of dosing; these body weight depressions were significantly different from controls during week 4, and weeks 8 through 12. No such difference was observed in females. Liver and kidney weights and relative liver and kidney weights (ratio to body and brain weight) were significantly higher than controls both in males and females at the time of sacrifice. Centrilobular hypertrophy was observed histopathologically in 15 males and 6 females at this dose (200 mg/kg), compared with none seen in control. Females in the 200 mg/kg group had significantly reduced platelet count (increased alkaline phosphatase levels), and increased BUN levels at 100 and 200 mg/kg; whereas males in the high-dose group had increased SGPT levels and an A/G ratio. Both males and females had significantly reduced Cl levels at 200 mg/kg, and females (200 mg/kg) and males (100 and 200 mg/kg) had increased total protein and albumin levels.

Rats administered 100 mg/kg/day tetrachlorophenol were found to have statistically significant elevations in liver weights (net and relative) in both males and females. In females, both absolute and relative kidney weights were also elevated. Centrilobular hypertrophy in livers was seen (with lower incidence than in the 200 mg/kg dosage group) in 12 males and 1 female. Based on the results discussed above, the 25 mg/kg/day dosage represents the NOAEL and the 100 mg/kg/day is the LOAEL for 2,3,4,6-tetrachlorophenol in this oral subchronic study.

A reproductive study (Schwetz et al., 1974) and a 55-day oral gavage study (Hattula et al., 1981) provided a NOEL of 10 mg/kg/day in rats; however, inadequate study designs (few animals per group) and impurities associated with the commercial grade tetrachlorophenol used in these studies raised some concerns for the validity of the database to derive an RfD. These concerns prompted the Office of Solid Waste to sponsor a 90-day oral study (U.S. EPA,

from Oral Exposure

- [Summary of Risk Estimates](#)  
 - [Dose-Response Data](#)  
 - [Additional Comments](#)  
 - [Discussion of Confidence](#)

[Quantitative Estimate of Carcinogenic Risk from Inhalation Exposure](#)

- [Summary of Risk Estimates](#)  
 - [Dose-Response Data](#)  
 - [Additional Comments](#)  
 - [Discussion of Confidence](#)

[EPA Documentation, Review and, Contacts](#)

- [Bibliography](#)
- [Revision History](#)
- [Synonyms](#)

1986) and a teratology study (Research Triangle Institute, 1986) in rats. Both the studies used purified 2,3,4,6-tetrachlorophenol (99% pure) suspended in olive oil.

In the teratology study, pregnant rats were administered by gavage with 0, 25, 100 or 200 mg/kg/day 2,3,4,6-tetrachlorophenol in olive oil daily on days 6-15 of gestation. Body weight gain, food consumption and clinical signs of toxicity were recorded during the gestation period. Rats were sacrificed on gestation day 20; gross pathology, liver and gravid uterine weight and status of uterine contents were recorded. Fetuses were removed, weighed and examined for malformations.

Results of this study indicated the only statistically significant adverse effect in the high-dose group (200 mg/kg/day): reduced maternal weight gain (corrected to exclude weight of uterine contents) as contrasted with controls. No significant maternal effects were noted at 25 or 100 mg/kg/day dosage group. Embryo-fetal growth and prenatal viability were not adversely affected by tetrachlorophenol exposure, nor was there any definitive evidence of an effect of the compound on fetal morphological development.

Based on data presented above, the 25 mg/kg/day dosage represents the subchronic NOAEL for 2,3,4,6-tetrachlorophenol; by applying an uncertainty factor of 1000 to this NOAEL, an RfD of 0.025 mg/kg/day or 0.03 mg/kg/day can be derived.

#### I.A.3. Uncertainty and Modifying Factors (Oral RfD)

UF – 1000: 10 interspecies and 10 for intraspecies variability to the toxicity of this chemical in lieu of specific data and 10 for extrapolation of a subchronic effect level to its chronic equivalent.

MF – None

#### I.A.4. Additional Studies/Comments (Oral RfD)

Previously an RfD of 0.01 mg/kg/day was verified on 7/8/85 based on a 55-day oral study (Hattula et al., 1981) in which Wistar rats were administered daily with 0, 10, 50 and 100 mg/kg/day 2,3,4,6-tetrachlorophenol by gavage (10 rats/group). This study reported body weight changes and organ histopathology at doses higher than 10 mg/kg; the NOAEL identified in this study was 10 mg/kg/day. This study, however, used commercial grade compound which contains substantial proportion of contaminants such as pentachlorophenol and dioxins. Additionally, this study used few number of animals and the duration of the study was only 55 days.

Schwetz et al. (1974) evaluated potential effects of both commercial grade and purified 2,3,4,6-tetrachlorophenol on embryo-fetal development following gavage dosing of pregnant Sprague-Dawley rats on gestational days 6 through 15. Based upon an earlier range finding study, doses of 10 and 30 mg/kg/day of both grades of tetrachlorophenol were examined in this teratology study. Administration of either grade of the compound resulted in no evidence of maternal toxicity, resorptions, fetal body weight or fetal crown-rump length. The only fetal anomaly that was increased at 30 mg/kg/day was delayed ossification of the skull bones, an effect that was interpreted as a developmental delay, not teratogenicity. The lower dose (10 mg/kg/day) in this study produced subcutaneous edema in exposed fetuses that was considered a chance alone incidence. The subcutaneous edema was not observed in the high-dose group. The issues related to both these studies, discussed above, call into question the validity of the data to derive an RfD.

#### I.A.5. Confidence in the Oral RfD

Study – High  
Database – Medium

RfD – Medium

The critical study is a very well-designed oral study with adequate toxicological endpoints and a higher than average number of animals/sex/dose; therefore, a high confidence was recommended. The database provided adequate supporting subchronic oral studies and reproductive studies; therefore, a medium confidence was recommended. The RfD was supported by subchronic toxicity and teratology studies; however, until additional chronic toxicity data are available a medium confidence is recommended.

#### I.A.6. EPA Documentation and Review of the Oral RfD

Source Document – This assessment is not presented in any existing U.S. EPA document.

Other EPA Documentation – U.S. EPA, 1986

Agency Work Group Review – 07/08/1985, 08/13/1987

Verification Date – 08/13/1987

Screening-Level Literature Review Findings – A screening-level review conducted by an EPA contractor of the more recent toxicology literature pertinent to the RfD for 2,3,4,6-Tetrachlorophenol conducted in September 2002 did not identify any critical new studies. IRIS users who know of important new studies may provide that information to the IRIS Hotline at [hotline.iris@epa.gov](mailto:hotline.iris@epa.gov) or (202) 566-1676.

#### I.A.7. EPA Contacts (Oral RfD)

Please contact the IRIS Hotline for all questions concerning this assessment or IRIS, in general, at (202)566-1676 (phone), (202)566-1749 (FAX) or [hotline.iris@epa.gov](mailto:hotline.iris@epa.gov) (internet address).

[Back to top](#)

---

#### I.B. Reference Concentration for Chronic Inhalation Exposure (RfC)

Substance Name – 2,3,4,6-Tetrachlorophenol  
CASRN – 58-90-2

Not available at this time.

[Back to top](#)

---

#### II. Carcinogenicity Assessment for Lifetime Exposure

Substance Name – 2,3,4,6-Tetrachlorophenol  
CASRN – 58-90-2

This substance/agent has not undergone a complete evaluation and determination under US EPA's IRIS program for evidence of human carcinogenic potential.

[Back to top](#)

---

## **\_VI. Bibliography**

Substance Name -- 2,3,4,6-Tetrachlorophenol  
CASRN -- 58-90-2  
Last Revised -- 06/01/1991

### **\_VI.A. Oral RfD References**

Hattula, M.L., V.M. Wasenius, R. Krees, A.U. Arstila and M. Kihlstrom. 1981. Acute and short-term toxicity of 2,3,4,6-tetrachlorophenol in rats. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 26: 795-800.

RTI (Research Triangle Institute). 1986. Teratologic evaluation of 2,3,4,6-tetrachlorophenol (CAS No. 58-90-2) administered to CD rats on gestational days 6 through 15. Chemistry and Life Sciences, RTI, Research Triangle Park, NC.

Schwetz, B.A., P.A. Keeler and P.J. Gehring. 1974. Effect of purified and commercial grade Tetrachlorophenol on rat embryonal and fetal development. Toxicol. and Appl. Pharmacol. 28: 146-150.

U.S. EPA. 1986. 2,3,4,6-Tetrachlorophenol. 90-Day subchronic oral toxicity study in rats. Office of Solid Waste, Washington, DC.

[Back to top](#)

---

### **\_VI.B. Inhalation RfC References**

None

[Back to top](#)

---

### **\_VI.C. Carcinogenicity Assessment References**

None

[Back to top](#)

---

## **\_VII. Revision History**

Substance Name -- 2,3,4,6-Tetrachlorophenol  
CASRN -- 58-90-2

Date	Section	Description
12/23/1987	I.A.	RfD withdrawn pending further review
03/01/1988	I.A.	Revised Oral RfD summary added - RfD changed
06/01/1991	VI.	Bibliography on-line
01/01/1992	I.A.7.	Secondary contact changed
01/01/1992	IV.	Regulatory actions updated
04/01/1997	III., IV., V.	Drinking Water Health Advisories, EPA

Regulatory Actions, and Supplementary Data were removed from IRIS on or before April 1997. IRIS users were directed to the appropriate EPA Program Offices for this information.

12/03/2002 I.A.6.

Screening-Level Literature Review Findings message has been added.

[Back to top](#)

---

### **\_VIII. Synonyms**

Substance Name – 2,3,4,6-Tetrachlorophenol  
CASRN – 58-90-2  
Last Revised – 01/31/1987

58-90-2  
DOWICIDE 6  
PHENOL, 2,3,4,6-TETRACHLORO-  
RCRA WASTE NUMBER U212  
TCP  
2,3,4,6-Tetrachlorophenol  
2,4,5,6-TETRACHLOROPHENOL  
Tetrachlorophenol, 2,3,4,6-

[Back to top](#)

---

[Recent Additions](#) | [Newsroom](#) | [Search IRIS](#) | [IRIS Home](#) | [NCEA Home](#) | [ORD Home](#)

---

[EPA Home](#) | [Privacy and Security Notice](#) | [Contact Us](#)

Last updated on Monday, November 13th, 2006

URL: [http://C%3A/Documents%2520and%2520Settings/OTWIN/0612//IRIS/2%2C3%2C4%2C6-Tetrachloropheno\\_IRIS.htm](http://C%3A/Documents%2520and%2520Settings/OTWIN/0612//IRIS/2%2C3%2C4%2C6-Tetrachloropheno_IRIS.htm)

# **The Mutagenicity of MCPA and Its Soil Metabolites, Chlorinated Phenols, Catechols and Some Widely Used Slimicides in Finland**

Liisa Räsänen  
*Department of Cell Biology  
University of Jyväskylä  
SF-40100 Jyväskylä 10, Finland*

Marja Liisa Hattula  
*Department of Chemistry  
University of Jyväskylä  
SF-40100 Jyväskylä 10, Finland*

Antti U. Arstila  
*Department of Cell Biology  
University of Jyväskylä  
SF-40100 Jyväskylä 10, Finland*

## **INTRODUCTION**

Because a generally regarded assumption is that the mutagenicity and the carcinogenicity of a chemical compound correlate, the mutagenic properties measured by the first tier (FLAMM 1974) of several widely used compounds were tested in this work.

The use of MCPA (4-chloro-2-phenoxyacetic acid) has increased as a herbicide in the Nordic countries during the last few years. This probably dues to the fact that the herbicides used earlier (2,4-D and 2,4,5-T) contain dioxines the toxic effects of which are extensive. MCPA has been regarded as a relative safe compound (GURD et al. 1965, VERSCHUUREN et al. 1975, HATTULA et al. 1976). Although the sale of pure MCPA decreased more than 200 tons in Finland from 1973 to 1974 the sale of mixed products increased almost 300 tons (MARKKULA and TIITTANEN 1975). The last official figures in Finland (TIITTANEN and BLONQVIST 1976) show that the sale of MCPA increased from 1974 to 1975 400 tons.

4-chloro-o-cresol was first identified as the metabolite of MCPA (GAUNT and EVANS 1961) and it has later been shown to be the metabolite of other phenoxyacetic acid herbicides, too (BJERKE et al. 1972). Our own analyses show that the technical product of MCPA in Finland also contains approx. 4% 4-chloro-o-cresol as an impurity.

5-chloro-3-methylcatechol was first identified as the metabolite of MCPA by GAUNT and EVANS (1971). Generally, catechols are known as metabolites of chlorinated phenols (BOLLAG et al. 1968a, HORVATH and ALEXANDER 1970, HORVATH 1971) and the toxicity of catechols to cell is evident (HORVATH).

Chlorinated phenols are widely used as fungicides and slimicides around the world. Some of them are also known as metabolites of chlorophenoxyacetic acid herbicides (HELLING et al., LOOS et al. 1967, BOLLAG et al. 1968b, HORVATH 1971, IDE et al. 1972, FREAL and CHADWICK, CROSBY and WONG 1973, CLARK et al. 1975) and they are distributed on the areas where these herbicides have been used. Their use in sawmills has been realized to be an environmental hazard (LEVIN et al. 1976). Recently they have been discovered in the bleaching solution of lignin and according to primary results (KNUUTILINEN, personal communication) the solution contained 2 ppm

2,3,4,6-tetrachlorophenol and 0.2 ppm 2,4,6-trichlorophenol and several other chlorinated phenols (0.2 - 0.5 ppm).

The Fennosan compounds (trade name by Kemira Co., Finland) studied are widely used slimicides and fungicides in the wood-pulp industry. The toxicity of 3,5-D and the quinoline compounds is known but no data are available of the toxicity of Fennosan F-50. The toxicity of some phthalates which are present in the commercial product of Fennosan F-50 have been studied (BELISLE et al. 1975, LAKE et al. 1975). In this work, therefore both the mutagenicity of the active ingredient and the commercial product (mixture of different compounds) were tested separately.

The test method was the original Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test by AMES et al. (1975) which is based on the use of Salmonella typhi-murium bacteria as test organisms for carcinogens and mutagens. Certain mutants of the bacterium cannot grow on a histidine deficient medium. If the mutants to be tested cause point mutations they revert the strains back to prototrophy and the mutagenic effect is detected as a bacterial growth.

#### MATERIALS AND METHODS

##### The chemicals tested

MCPA (99.9% purity, Kemisk Værk, Denmark)	
5-chloro-salicylic alcohol (hydroxymethyl compound of MCPA)	(+)
3-chloro-o-cresol	(+)
4- "	Fluka purum
5- "	"
5-chloro-3-methylcatechol	(+)
3,4-dichlorocatechol	(+)
3,5- "	(+)
3,6- "	(+)
3,4,5-trichlorocatechol	(+)
2,3-dichlorophenol	Fluka purum
2,4- "	"
2,5- "	"
2,6- "	"
3,4- "	"
3,5- "	"
2,3,5-trichlorophenol	"
2,3,6- "	"
2,4,5- "	"
2,4,6- "	"
2,3,4,6-tetrachlorophenol	"
Fennosan F-50	[active ingredient 1,4-bisbromoacetoxy-2-butene (U.S. Patent n = 2.840,598, June 24, 1958)], Kemira Co., Finland.
Fennosan H-30	(8-hydroxyquinoline), Kemira Co.
Fennosan B-100	(3,5-D = 3,5-dimethyltetrahydro-1,3,5-thiadiazine-2-thione), Kemira Co.
Fennotox 45	(Copper-8-hydroxyquinolate), Kemira Co.

benzo(a)pyrene	Fluka
2-aminofluorene	Sigma
9-aminoacridine	Fluka
MNNG	(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) Sigma

The compounds denoted by a (+) were synthesized in the Department of Chemistry, University of Jyväskylä and the purity was tested by UV-, IR-, NMR and mass spectrometry.

The media used were as follows: Vogel-Bonner -stock solution, minimum-glucose agar, nutrient agar, broth solution, top agar, 0.5 mM histidine-biotin solution, 0.2-M phosphate buffer and the cofactor solution as described by AMES et al. (1975).

The enzyme inducer used was Aroclor 1254 (Monsanto) dissolved in sterile corn-oil, concentration 200 mg/ml.

The bacteria used were *Salmonella typhi-murium* tester strains originating in strain LT2: TA98, TA100, TA1535, TA1537.

The rats were male Wistar-rats, 2-3 months old, served as a source of the liver homogenate. The rats were induced by Aroclor 1254 5 days before the sacrifice and the food was removed one day before the sacrifice.

The homogenate was made as described by AMES et al. (1975) and it was denoted by S-9. The final S-9Mix (liver homogenate + cofactor solution) contained per ml 0.1 ml S-9, 8  $\mu$ moles  $MgCl_2$ , 33  $\mu$ moles KCl, 5  $\mu$ moles glucose-6-phosphate, 4  $\mu$ moles NADP and 100  $\mu$ moles phosphate buffer. (pH was 7.4.)

### Experimental

The test was carried out as described by AMES et al. (1975). Firstly the bacteria strains were tested by testing the histidine requirement, spontaneous mutations, crystal-violet sensitivity, sensitivity to UV-light and to ampicillin, respectively. The mutagenesis tests were carried out as plate incorporation assays. All compounds studied were dissolved in dimethylsulphoxide (MERCK, p.a.).

The compounds were tested over a wide range of concentrations (0.5, 5, 50 and 500  $\mu$ g/plate) both in the presence and absence of S-9Mix. Also the water-soluble compounds (MCPA, Fennosan F-50, Fennosan H-30, Fennosan B-100 and Fennotox 45) were dissolved in dimethylsulphoxide. The revertant colonies were calculated after incubation of 48 hours at 37°C.

Benzo(a)pyrene (10  $\mu$ g/plate), 2-aminofluorene (10  $\mu$ g), 9-aminoacridine (100  $\mu$ g) and MNNG (5  $\mu$ g) served as positive controls. Also different amounts of S-9/S-Mix were tested with some of the compound by the tester strains TA98 and TA100 because, as described by AMES et al. (1975), the amount of the liver homogenate fraction which gives the optimum mutagenic effect may vary with test compounds. In this test MCPA, 4-chloro-4-o-cresol and 5-chloro-3-methylcatechols were used.

## RESULTS

The results of 5 µg of test compounds/plate and positive control mutagens are shown in Table 1. None of the test compounds caused significant increase in revertant colonies under conditions where increased back mutations occurred in the plates containing control mutagens. The number of colonies by using 0.5 and 50 µg of test compounds per plate were comparable to those observed in Table 1 but in the presence of 500 µg/plate the number of colonies decreased due to the toxic effect of the compounds. The toxicity of Fenosan F-50, its active ingredient and Fenosan H-30 was obvious and the results are based on 0.005 µg/compound/plate.

In Figure 1 are shown the results of the testing of the amount of S-9 on the mutagenesis of TA100. The results show that there were no difference in the number of colonies when concentrations 0.05, 0.1, 0.2 or 0.4 ml S-9/S-Mix were used with the tester strain TA100.

## DISCUSSION

Because of the extensive use of 2,4-D and 2,4,5-T also their toxicity, mutagenicity and carcinogenicity have been widely studied. MCPA was taken in use at the time when little attention was paid to the possible toxicity of the compound. The studies carried out on MCPA (GURD et al. 1961, VERSCHUUREN et al. 1975, HATTULA et al. 1976) show the relatively low toxicity of the compound. The degradation products of MCPA in soil, however, have not been studied practically at all. The results of the present study show that MCPA and its metabolites, chlorinated phenols and catechols studied do not show a positive result. This result must be regarded very important because of the increasing use of MCPA and the wide distribution of chlorinated phenols as environmental contaminants. However, we want to point out that according to the tier system of mutagen testing (FLAMM 1974) the test system used belongs to the first tier and a negative result in the test used does not completely exclude the possible risk of the mutagenicity and carcinogenicity of the compound studied. As long as the use of the MCPA is increasing and new possible sources of chlorinated phenols and catechols are found it is important to ascertain the results observed by using the mutagenicity tests of second tier.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Acknowledgements are due to the Academy of Finland for the financial support. We are greatly indebted to Dr. B.N. AMES for the tester strains which we got from Dr. V. RAUNIO, University of Oulu. Thanks are also due to Miss R. PÄÄKKÖNE and Mr. K. RÖNNHOLM from the University of Oulu for the valuable advice for the practical work.

TABLE 1

Reversion of the bacterial tester strains with the test compounds and positive control mutagens (number of colonies calculated) at the level of 5 µg of the compound.  
 [(+) = S-9Mix added, (-) = without S-9Mix.]

Compounds tested	µg/plate	TA98		TA100		TA1535		TA1537	
		+	-	+	-	+	-	+	-
MCPA	5	53/55 <sup>x</sup>	48/36	94/66	182/176	18/18	23/41	14/10	11/9
5-chlorosalicylic alcohol	"	15/38	38/42	200/148	120/116	12/20	42/25	8/8	5/6
3-chloro-o-cresol	"	58/49	61/65	164/178	186/228	15/18	18/18	9/13	8/9
4- "	"	47/55	31/36	86/66	175/66	15/18	31/41	12/10	13/9
5- "	"	44/49	34/65	126/178	190/228	10/18	23/18	18/13	9/9
5-chloro-3-methylcatechol	"	46/55	39/36	86/66	124/176	15/18	23/41	13/10	16/19
3,4-dichlorocatechol	"	144/63	110/60	314/332	272/196	23/18	28/61	20/33	19/21
3,5- "	"	55/49	64/65	238/206	200/239	17/27	10/34	2/9	4/6
3,6- "	"	56/49	45/65	136/178	154/228	18/18	18/18	12/13	19/19
3,4,5-trichlorocatechol	"	59/49	34/65	321/206	262/239	21/27	52/34	12/9	8/6
2,3-dichlorophenol	"	42/49	47/65	92/67	182/115	7/16	18/46	19/8	7/14
2,4- "	"	48/52	48/36	140/168	160/142	21/26	59/30	5/8	11/6
2,5- "	"	32/49	54/65	72/67	117/115	14/16	31/46	9/8	7/14
2,6- "	"	31/43	34/65	88/67	82/115	13/16	58/46	3/8	7/14
3,4- "	"	56/49	58/65	118/67	84/115	25/16	44/46	8/8	6/14
3,5- "	"	84/63	55/60	296/332	352/196	15/18	58/61	12/33	16/21
2,3,5-trichlorophenol	"	64/52	62/36	144/168	188/142	24/26	20/30	12/18	15/16
2,3,6- "	"	67/63	53/63	368/332	308/196	16/18	59/61	9/6	19/21
2,4,5- "	"	12/52	30/36	96/168	192/142	22/26	37/30	16/8	10/6
2,4,6- "	"	72/52	32/36	112/168	140/142	36/26	44/30	13/8	12/6
2,3,4,6-tetrachlorophenol	"	41/49	39/65	402/239	222/239	18/27	33/34	7/9	10/6
Fennotox 45	"	42/49	43/60	188/148	184/116	13/34	22/40	13/8	6/6
Fennosan B-100	"	57/49	45/60	156/48	116/116	0/34	40/40	2/8	8/6
Fennosan B-50 active ingredient	0.005	36/38	26/42	112/148	114/116	21/20	7/25	8/6	3/6
Fennosan F-50	"	33/38	52/42	144/148	200/116	14/20	9/25	5/6	0/6
Fennosan H-30	"	36/38	25/42	280/148	202/116	12/20	15/25	3/6	2/6
2-aminofluorine	10	3 480/63							
benzo(a)pyrene	10			1 244/332					
MNNG	5					13 600/46			
9-aminoacridine	100							8 200/9	

<sup>x</sup>Revertant colonies in test plates/revertant colonies in control plates

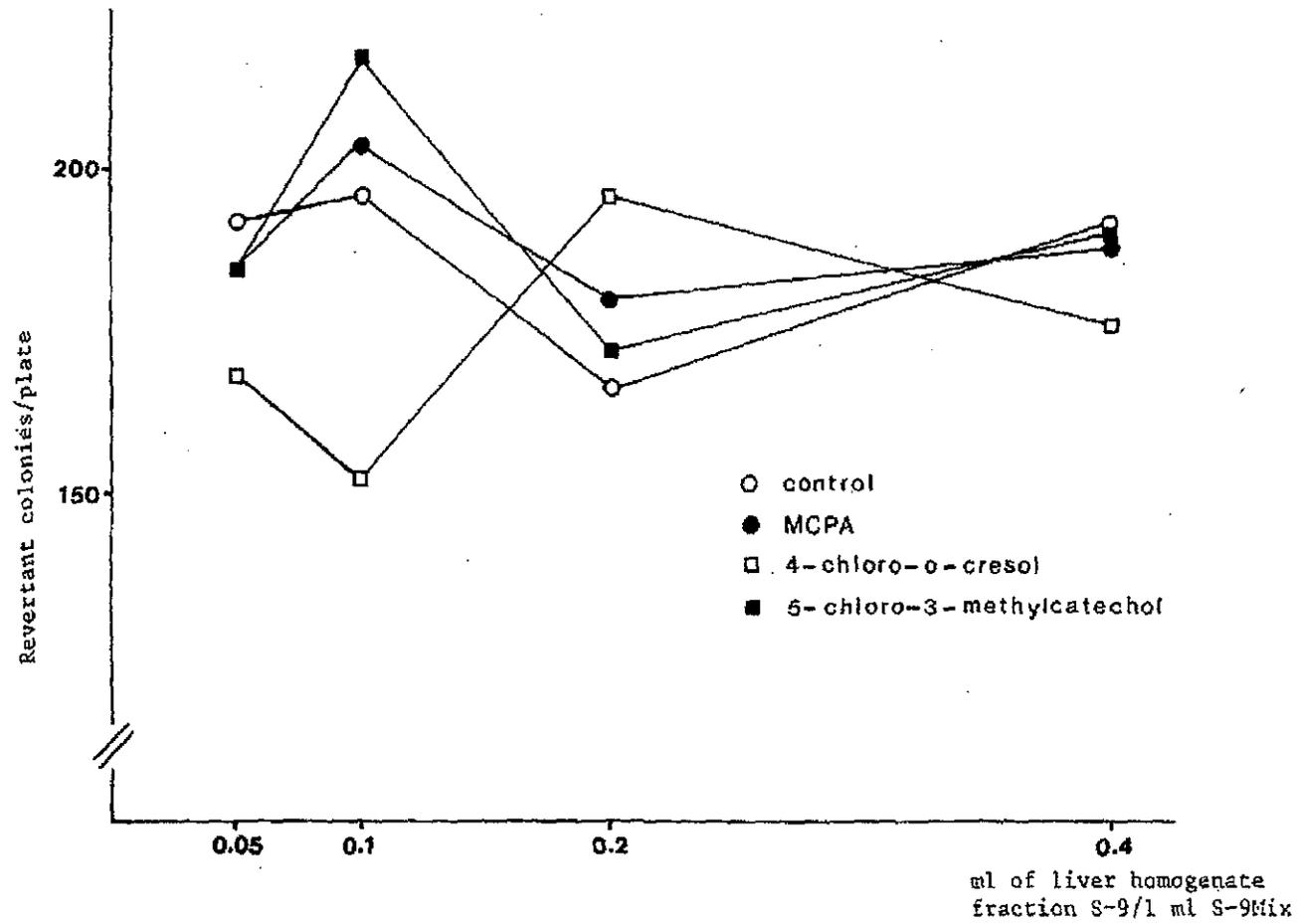


FIGURE 1. Effect of the amount of S-9 on the mutagenesis of the tester strain TA100. MCPA, 4-chloro-o-cresol and 5-chloro-3-methylcatechol were applied 5  $\mu$ g/plate.

#### REFERENCES

- AMES, B.N., McCANN, J. and E. YAMASAKI: Rev. manuscript, June 2, 1975.
- BELISLE, A.A., REICHEL, W.M. and J.W. SPANN: Bull. Environ. Cont. Toxicol. 13, 129-132 (1975).
- BJERKE, E., HERMAN, J.L., MILLER, P.W. and J.H. WETTERS: J. Agr. Food Chem. 20, 963-967 (1972).
- BOLLAG, J.M., BRIGGS, G.G. and J.E. DAWSON: J. Agr. Food Chem. 16, 829-833 (1968a).
- BOLLAG, J.M., HELLING, C.S. and M. ALEXANDER: J. Agr. Food Chem. 16, 826-828 (1968b).
- CROSBY, D.G. and A.S. WONG: J. Agr. Food Chem. 21, 1052-1054 (1973).
- CLARK, D.E., PALMER, J.S., RADELEFF, R.D., CROOKSHANK, R.D. and F.M. FAER: J. Agr. Food Chem. 23, 573-578 (1975).
- FLAMM, W.G.: Mutation research 26, 329-333 (1974).
- FREAL, J.J. and R.W. CHADWICK: J. Agr. Food Chem. 21, 424-427 (1973).
- GAUNT, J.K. and W.C. EVANS: Biochem. J. 122, 519-526 (1971).
- GURD, M.R., HARMER, G.L.M. and B. LESSEL: Fd. Cosmet. Toxicol. 3, 883-885 (1965).
- HATTULA, M.L., ELO, H., SORVARI, T.E., REUNANEN, H. and A.U. ARSTILA: Accepted to Bull. Environ. Contam. Toxicol.
- HELLING, C.S., BOLLAG, J.M. and M. ALEXANDER: Appl. Microbiol. 15, 1393-1398 (1967).
- HORVATH, R.S.: Biochem. J. 119, 871-876 (1970).
- HORVATH, R.S.: J. Agr. Food Chem. 19, 291-293 (1971).
- HORVATH, R.S. and M. ALEXANDER: Can. J. Microbiol. 16, 1131-1132 (1970).
- IDE, A., NIKI, Y., SAKAMOTO, F. and I. WATANABE: Agr. Biol. Chem. 36, 1937-1944 (1972).
- KNUUTINEN, J.: Academic dissertation, in preparation. University of Jyväskylä, Finland.
- LAKE, B.G., GANGOLLI, S.D., GRASSO, P. and A.G. LLOYD: Toxicol. Appl. Pharmacol. 32, 355-367 (1975).
- LEVIN, J.O., RAPPE, R. and C.A. NILSSON: Report obtained by personal communication (1976).
- LOOS, M.A., BOLLAG, J.M. and M. ALEXANDER: J. Agr. Food Chem. 15, 858-860 (1967).
- MARKKULA, M. and K. TIITTANEN: Kemia-Kemi 2, 377-379 (1975).
- TIITTANEN, K. and H. BLONQVIST: Kemia-Kemi 3, 424-425 (1975).
- VERSCHUUREN, H.G., KROES, R. and E.M. DEN TONKELAAR: Toxicology 3, 349-359 (1975).

MUTAGENESIS OF MAMMALIAN CELLS IN  
CULTURE BY CHLOROPHENOLS, CHLORO-  
CATECHOLS AND CHLOROGUAIACOLS

Marja-Liisa Hattula\*

Department of Biology, University of Jyväskylä  
SF-40100 JYVÄSKYLÄ, Finland

and

Juha Knuutinen

Department of Chemistry, University of Jyväskylä  
SF-40100 Jyväskylä, Finland

ABSTRACT

The mutagenicity of 4 chlorinated phenols, 4 chlorinated catechols, 3 chlorinated guaiacols, one chloromethoxyphenol and one wood preservative mixture was studied in a mammalian cell assay, in which Chinese hamster cells V79 are used. Of the compounds studied 2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol, 3,4,6-trichlorocatechol, 4,5,6-trichloroguaiacol and the wood preservative were mutagenic in the test system used.

INTRODUCTION

The chlorophenolic compounds are widely spread as environmental pollutants the main sources of which are the fungicides, chlorine bleaching in wood pulp industry and combustion processes of organic materials (1). About 200 000 tons of chlorophenols are manufactured annually for use as pesticides (2). The wood pulp industry produces chlorophenols and related compounds which appear in the bleaching liquor as a result of chemical reaction of chlorine with the natural phenolic compounds of the wood. The first study of chlorophenolics in European pulp bleachery effluents was conducted by Lindström and Nordin (3) and later by Landner et al. (4) and Gjøns and Carlberg (5).

In Finland 1000 tons of chlorophenolic wood preservatives are used annually and the estimated amount of chlorophenols from pulp industry is of the order of 75000 tons (6). The first observations of chlorinated phenols in wildlife samples in Finland were

made in 1973 and later also guaiacols and catechols were identified in pike (7). The main route of chlorocatechols and guaiacols in the waters is wood pulp industry. Knuutinen et al. (8) identified 4 chlorocatechols in chlorination stage spent liquor and 9 guaiacols of the 15 theoretically possible ones were identified in the extraction stage spent bleach liquor (9).

Combustion processes of organic materials also produce chlorophenols and their highly toxic dimeric products (10, 11). Polychlorophenols are among the main components of the smoke of communal waste burning plants (12). In Finland the analysis of the fly ash of such a plant showed 1 ppm chlorophenols which together with polychlorobenzenes, PCDD and PCDF caused a mass disappearance of several nesting birds on the nearby area (13).

The mutagenicity of pulp mill effluents and chlorophenols has been studied by Ander et al. and Räsänen et al. (14, 15). The latter study was conducted by the Ames test and 11 chlorophenols as well as 5 chlorocatechols all gave negative response. Nestmann and Lee (16) studied 42 compounds of a pulp mill effluent by *Saccharomyces cerevisiae*. The two chlorophenols of the study gave negative response in yeast whereas 4,5-dichlorocatechol and 4,5-dichloroguaiacol were positive. Ames test and yeast were used in the study of the genetic activity of bleached kraft chlorination stage effluents (17). The XAD-2 resin concentrate of the effluent induced mutations in three *Salmonella* strains and the extract had genetic activity in yeast.

In the study of Kinae et al. (18) 2,4,6-trichlorophenol and 3,4,5,6-tetrachloroguaiacol exhibited high DNA damaging potency in *Bacillus subtilis*.

In the present study we used a cell-mediated assay developed by Huberman and Sachs (19) in which Chinese hamster lung cell line, V79 is used. In this assay we studied 4 chlorophenols, 4-chlorocatechols, 3 chloroguaiacols, one chlorinated methoxyphenol and one commercial fungicide mixture containing chlorinated phenols and methoxyphenols.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

The chemical compounds chosen for this study are either used as wood preservatives or they appear in the effluents of wood pulp industry as a result of reactions of chlorine with natural phenolic compounds of the wood and the bleaching process.

The compounds studied are presented in Figure 1 and in addition, one commercial fungicide mixture KY-5 was included in the experiment. It contains mainly 246TCP and 2346eCP and some methoxyphenols.

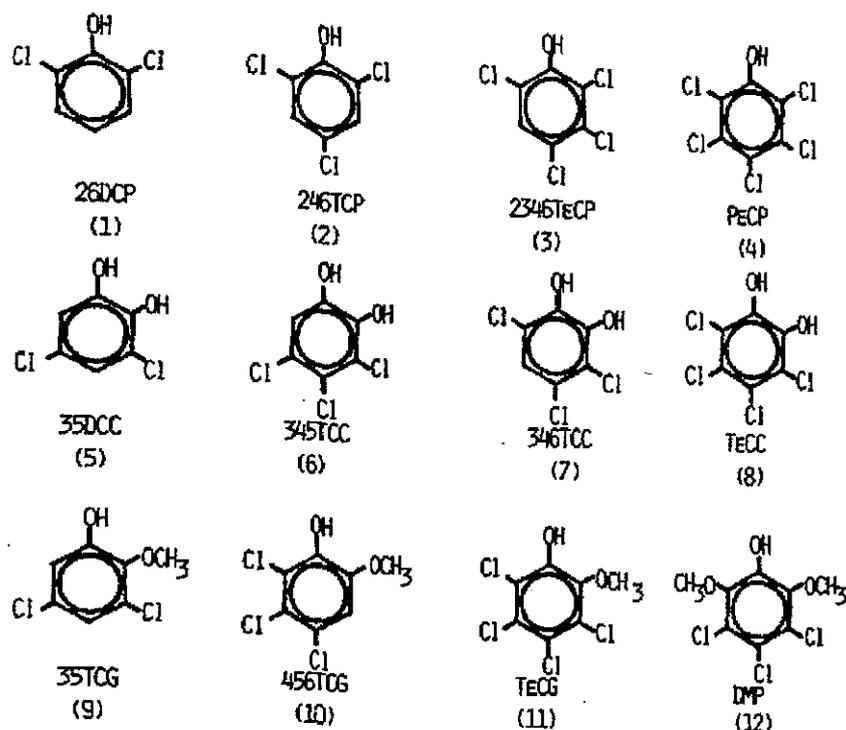


Figure I. Structures and notation of the compounds of the study.

(1) 26DCP, 2,6-dichlorophenol, (2) 246TCP, 2,4,6-trichlorophenol, (3) 2346TeCP, 2,3,4,6-tetrachlorophenol, (4) PeCP, pentachlorophenol, (5) 35DCC, 3,5-dichlorocatechol, (6) 345TCC, 3,4,5-trichlorocatechol, (7) 346TCC, 3,4,6-trichlorocatechol, (8) TeCC, tetrachlorocatechol, (9) 35DCG, 3,5-dichloroguaiacol, (10) 456TCG, 4,5,6-trichloroguaiacol, (11) TeCG, tetrachloroguaiacol, (12) DMP, 3,4,5-trichloro-2,6-dimethoxyphenol.

The chlorinated phenols were purchased from Fluka A.G. Switzerland and they were purified at the Department of Chemistry, University of Jyväskylä to the purity >99.95%. Final checking was made on Perkin Elmer Sigma 3 gas chromatograph equipped with FI and EC detectors and an SE-30 quartz capillary column. No dioxins were observed at ppb level.

The chlorinated catechols and guaiacols were synthesized at the Department of Chemistry, University of Jyväskylä (20, 21).

3,4,5-trichloro-2,6-dimethoxyphenol was prepared by chlorination of 2,6-dimethoxyphenol (Fluka) with chlorine gas in  $CS_2$  at 20°C. The structures of the synthesized compounds were verified by GLC, Jeol FX-60-NMR and Varian MAT-212 GC-MS.

KY-5 was obtained from KYMI C.O., Finland.

In the hepatocyte-mediated assay (24), primary hepatocytes of 2-3 months old male Sprague-Dawley rats were used and only one concentration of 8 compounds was examined by the method. As a positive control we used DMN, (N-nitrosodimethylamine, 98% pure Sigma).

V79 cells were seeded at  $5 \times 10^5$  cells/25 cm<sup>2</sup> T-flask. After 18 hr  $2 \times 10^6$  primary rat hepatocytes were seeded on the V79 cells in 4 ml Leibovitz L-15 medium (Gibco) containing 2 mM glutamine, 10% fetal calf serum, 100 IU penicillin/ml and streptomycin 100 µg/ml. After 3 h the medium was changed and the chlorophenols were added in 4 ml of fresh medium. The cells were dispersed 18 hr later with 0.05% trypsin and 0.02% EDTA. The experiment was conducted as in the direct method. The following compounds were studied in this method: 26DCP, 246TCP, 2346TeCP, PeCP, 346TCC, TeCC, 456TCG and the commercial fungicide, KY-5.

## RESULTS

The study was started simultaneously as a direct and fibroblast-mediated assay with part of the chemicals. The results of the cell-mediated assay with fibroblasts are presented in Table I.

Table I. Induction of 6-thioguanine resistant mutants in the fibroblast-mediated assay by polychlorophenolic compounds and DMBA as a positive control.

	Concentration µg/ml	Cloning efficiency %	6-thioguanine resistant mutants per 10 <sup>6</sup> survivors
Control		74.9	0
26DCP	30	45.5	0
"	90	55.1	2
"	150	58.5	0
2346TeCP	10	79.7	0
"	15	56.0	0
"	20	50.0	0
35DCC	1.5	44.8	0
"	3.0	60.6	2
"	10.0	52.8	2
KY-5	2.4	75.3	0
"	8	78.0	0
"	24	67.2	1
DMBA	0.01	56.6	264
"	0.03	41.8	490
"	0.10	21.4	645

Because no response was obtained in the cell-mediated assay it was discontinued and all compounds were studied in the direct method. Table II shows those compounds which caused the induction of 6-thioguanine resistant mutants the number of which was three-fold or more as compared to the control.

Table II. Induction of 6-thioguanine resistant mutants in the direct method by chlorophenolic compounds and MNNG as a positive control.

	Concentration µg/mg	Cloning efficiency %	6-thioguanine resistant mutants per 10 <sup>6</sup> survivors
Control	0	61.7	0
246TCP	10	58.0	1
"	20	55.0	13
"	30	55.1	53
"	45	47.5	25
"	60	40.5	11
Control	0	74.3	0
2346TeCP	3.5	75.3	12
"	7	73.0	17
"	10	70.8	35
"	15	68.5	18
"	20	60.0	10
Control	0	54.5	0
246TCC	3	51.2	0
"	4	45.0	11
"	5	38.3	16
"	6	27.6	20
Control	0	51.3	0
456TCG	10	51.5	5
"	30	48.8	16
"	50	40.0	27
Control	0	78.0	0
KY-5	2.4	68.0	5
"	8	67.7	4
"	24	50.6	2
Control	0	65.5	0
MNNG	0.5	54.5	471
"	1.0	45.5	799

In the direct method positive results were obtained with 246TCP, 2346TeCP, 346TCC, 456TCG and KY-5, the commercial fungicide mixture. Even the highest mutagenicity observed was roughly one tenth or less of the mutagenic power of MNNG, the positive control. The compounds which produced no mutants or less than three times as compared to the control were 26DCP, PeCP, 35DCC, 345TCC, TeCC, 35DCG, TeCG and DMP.

Finally, all the compounds which gave positive response in the direct method plus 26DCP, PeCP and TeCC, one concentration of each were conducted in the hepatocyte-mediated assay and DMN was used as a positive control. The results are shown in Table III and it shows either decrease or total disappearing of the mutagenicity.

Table III. Induction of 6-thioguanine resistant mutants in the hepatocyte-mediated assay by polychlorophenolic compounds and DMN as a positive control.

	Concentration	Cloning efficiency %	6-thioguanine resistant mutants per 10 <sup>6</sup> survivors
Control	ug/ml	54.7	34
26DCP	100	49.9	12
246TCP	30	43.3	0
2346TeCP	10	61.0	0
PeCP	15	55.3	0
346TCC	5	34.1	0
TeCC	5	54.1	0
456TCG	30	36.7	6
KY-5	10	51.2	3
	mM		
DMN	0.3	49.3	102
	1.0	53.1	300
	3.0	37.6	347

#### CONCLUSION

The present investigation was undertaken in an attempt to find mutagenic compounds among chlorinated phenols and related compounds in a mammalian cell mutagenesis assay. The compounds studied are widely spread as environmental pollutants. 2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol, 3,4,6-trichlorocatechol and 4,5,6-trichloroguaiacol and one commercial fungicide mixture were found mutagenic and there was a dose related increase in the number of mutant colonies. The mutagenicity, however, decreased or disappeared in the hepatocyte-mediated assay. 2,3,4,6-tetrachlorophenol and KY-5 which gave positive response in the direct method gave negative responses in the fibroblast-mediated assay. Similar decrease or disappearance of mutagenicity of XAD-resin concentrate of chlorination stage pulp mill effluents was observed in three strains of *Salmonella typhimurium* (17) in the presence of S9 mix, S9 mix without cofactors or heat activated S9 mix.

In our study the maximum response was roughly one tenth as compared to MNNG at 0.5 µg/ml level, which shows the compounds studied weak mutagenic. The maximum response was

a factor of 50 higher compared to the control at 30 µg/ml of 246TCP and only a factor of 5 of the commercial fungicide mixture.

In the study of pulp mill effluent by a bacterial assay (17) the mutagenic response was a factor 3.6 times higher at 1 mg pulp mill extract/ml level as compared to the background level. In the study of Kinae et al. (18) high DNA damaging potency was obtained by 246TCP and 3456TeCG at 0.5 and 0.1 mg/disk level).

It is important to know the mutagenic activity of pulp industry effluents which are complex mixtures but it is also important to know the mutagenicity of single chlorinated phenols and related compounds because they seem to appear from new sources to the environment like in the precipitation of snow and concentrate in animal tissues, too (1).

Chlorophenols did not give positive response in the *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae* assays (15, 16) although one chloroguaiacol and -catechol gave positive response in the yeast. However, both a chlorophenol and chloroguaiacol gave positive response in *Bacillus subtilis*.

It is obvious that several *in vitro* systems, including the mammalian cell assay should be used simultaneously in the study of the mutagenicity of chlorinated phenols and related compounds. The final evaluation of their mutagenic potency and risk to the environment can, however, be ascertained when more data of their dilution in waters and the concentration coefficients in the tissues of different organisms is available.

#### REFERENCES

1. J. Paasivirta, K. Heinola, T. Humpi, A. Karjalainen, J. Knuutinen, K. Mäntykoski, R. Pauku, T. Piilola, K. Surma-aho, J. Tarhanen, L. Welling, H. Vihonen and J. Särkkä, Chemosphere, in press.
2. J-O. Levin and C-A. Nilsson, Chemosphere, **6**, 443 (1977).
3. K. Lindström and J. Nordin, J. Chromatog., **128**, 13 (1976).
4. L. Lander, K. Lindström, M. Karlsson, J. Nordin and L. Sörensen, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **18**, 663 (1977).
5. N. Gjøvs and G.E. Carlberg, Adv. Mass Spectrom., **813**, 1468- (1980).
6. J. Paasivirta, Environmental Chemistry Comprehensive Course, Assoc. Finn. Chem. Soc., Helsinki 114 (1983).
7. J. Paasivirta, J. Särkkä, T. Leskijärvi and A. Roos, Chemosphere, **9**, 441 (1980).
8. J. Knuutinen, J. Tarhanen and M. Lahtiperä, Chromatographia, **15**, 9 (1982).
9. J. Knuutinen, J. Chromatog., **248**, 289 (1982).

10. K. Olie, P.L. Vermeulen and O. Hutzinger, Chemosphere, 7, 419 (1977).
11. H.R. Buser and H.P. Bosshardt, Chemosphere, 7, 419 (1978).
12. T.O. Tiernan, M.L. Taylor, J.H. Garret, G.F. Van Ness, J.G. Solch, D.A. Deis and D.J. Wagel, Chemosphere, 12, 595 (1983).
13. J. Paasivirta, Kemia-Kemi, 11, 452 (1984).
14. P. Ander, K.-E. Erikson, M.-C. Kolar, K. Kringstad, U. Rannug and C. Ramel, Svensk. Papperstid., 80, 454 (1977).
15. L. Räsänen, M.L. Hattula and A.U. Arstila, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 18, 565 (1977).
16. E.R. Nestmann and E.G.-L. Lee, Mutat. Res., 119, 273 (1983).
17. D.P. Kamra, E.R. Nestmann, G.R. Douglas, D.J. Kowbel and T.R. Harrington, Mutat. Res., 118, 269 (1983).
18. N. Kinae, T. Hashizume, T. Makita, I. Tomita, I. Kimura and H. Kanamori, Water Res., 15, 17 (1981).
19. E. Huberman and L. Sachs, Int. J. Cancer, 13, 326 (1974).
20. J. Knuutinen, J. Chromatog., 209, 446 (1981).
21. J. Knuutinen and E. Kolehmainen, Chromatographia, 15, 707 (1982).
22. R. Langenbach, H.J. Freed, D. Raven and E. Huberman, Nature, 276, 5685,
23. E. Huberman and T.J. Slaga, Cancer Res., 39, 411 (1979).
24. C.A. Jones and E. Huberman, Cancer Res., 40, 406 (1980).

(Received in Germany 14 March 1985)

MUTAGENESIS OF MAMMALIAN CELLS IN  
CULTURE BY CHLOROPHENOLS, CHLORO-  
CATECHOLS AND CHLOROGUAIACOLS

Marja-Liisa Hattula\*

Department of Biology, University of Jyväskylä  
SF-40100 JYVÄSKYLÄ, Finland

and

Juha Knuutinen

Department of Chemistry, University of Jyväskylä  
SF-40100 Jyväskylä, Finland

ABSTRACT

The mutagenicity of 4 chlorinated phenols, 4 chlorinated catechols, 3 chlorinated guaiacols, one chloromethoxyphenol and one wood preservative mixture was studied in a mammalian cell assay, in which Chinese hamster cells V79 are used. Of the compounds studied 2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol, 3,4,6-trichlorocatechol, 4,5,6-trichloroguaiacol and the wood preservative were mutagenic in the test system used.

INTRODUCTION

The chlorophenolic compounds are widely spread as environmental pollutants the main sources of which are the fungicides, chlorine bleaching in wood pulp industry and combustion processes of organic materials (1). About 200 000 tons of chlorophenols are manufactured annually for use as pesticides (2). The wood pulp industry produces chlorophenols and related compounds which appear in the bleaching liquor as a result of chemical reaction of chlorine with the natural phenolic compounds of the wood. The first study of chlorophenolics in European pulp bleachery effluents was conducted by Lindström and Nordin (3) and later by Landner et al. (4) and Gjøns and Carlberg (5).

In Finland 1000 tons of chlorophenolic wood preservatives are used annually and the estimated amount of chlorophenols from pulp industry is of the order of 75000 tons (6). The first observations of chlorinated phenols in wildlife samples in Finland were

made in 1973 and later also guaiacols and catechols were identified in pike (7). The main route of chlorocatechols and guaiacols in the waters is wood pulp industry. Knuutinen et al. (8) identified 4 chlorocatechols in chlorination stage spent liquor and 9 guaiacols of the 15 theoretically possible ones were identified in the extraction stage spent bleach liquor (9).

Combustion processes of organic materials also produce chlorophenols and their highly toxic dimeric products (10, 11). Polychlorophenols are among the main components of the smoke of communal waste burning plants (12). In Finland the analysis of the fly ash of such a plant showed 1 ppm chlorophenols which together with polychlorobenzenes, PCDD and PCDF caused a mass disappearance of several nesting birds on the nearby area (13).

The mutagenicity of pulp mill effluents and chlorophenols has been studied by Ander et al. and Räsänen et al. (14, 15). The latter study was conducted by the Ames test and 11 chlorophenols as well as 5 chlorocatechols all gave negative response. Nestmann and Lee (16) studied 42 compounds of a pulp mill effluent by *Saccharomyces cerevisiae*. The two chlorophenols of the study gave negative response in yeast whereas 4,5-dichlorocatechol and 4,5-dichloroguaiacol were positive. Ames test and yeast were used in the study of the genetic activity of bleached kraft chlorination stage effluents (17). The XAD-2 resin concentrate of the effluent induced mutations in three *Salmonella* strains and the extract had genetic activity in yeast.

In the study of Kinne et al. (18) 2,4,6-trichlorophenol and 3,4,5,6-tetrachloroguaiacol exhibited high DNA damaging potency in *Bacillus subtilis*.

In the present study we used a cell-mediated assay developed by Huberman and Sachs (19) in which Chinese hamster lung cell line, V79 is used. In this assay we studied 4 chlorophenols, 4-chlorocatechols, 3 chloroguaiacols, one chlorinated methoxyphenol and one commercial fungicide mixture containing chlorinated phenols and methoxyphenols.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

The chemical compounds chosen for this study are either used as wood preservatives or they appear in the effluents of wood pulp industry as a result of reactions of chlorine with natural phenolic compounds of the wood and the bleaching process.

The compounds studied are presented in Figure 1 and in addition, one commercial fungicide mixture KY-5 was included in the experiment. It contains mainly 246TCP and 2346eCP and some methoxyphenols.

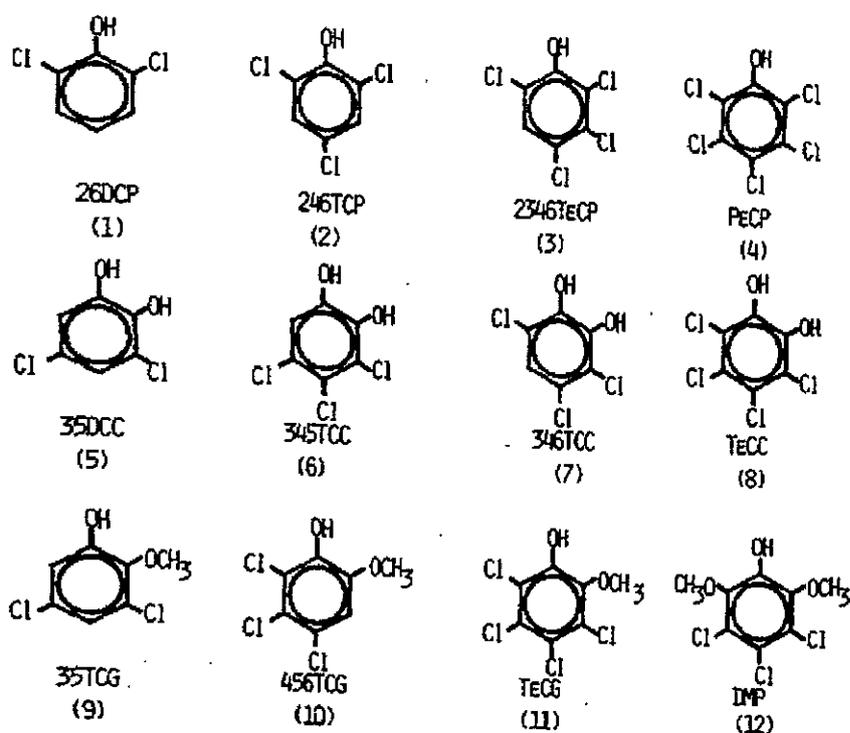


Figure I. Structures and notation of the compounds of the study.

(1) 26DCP, 2,6-dichlorophenol, (2) 246TCP, 2,4,6-trichlorophenol, (3) 2346TeCP, 2,3,4,6-tetrachlorophenol, (4) PeCP, pentachlorophenol, (5) 35DCC, 3,5-dichlorocatechol, (6) 345TCC, 3,4,5-trichlorocatechol, (7) 346TCC, 3,4,6-trichlorocatechol, (8) TeCC, tetrachlorocatechol, (9) 35DCG, 3,5-dichloroguaiacol, (10) 456TCG, 4,5,6-trichloroguaiacol, (11) TeCG, tetrachloroguaiacol, (12) DMP, 3,4,5-trichloro-2,6-dimethoxyphenol.

The chlorinated phenols were purchased from Fluka A.G. Switzerland and they were purified at the Department of Chemistry, University of Jyväskylä to the purity >99.95 %. Final checking was made on Perkin Elmer Sigma 3 gas chromatograph equipped with FI and EC detectors and an SE-30 quartz capillary column. No dioxins were observed at ppb level.

The chlorinated catechols and guaiacols were synthesized at the Department of Chemistry, University of Jyväskylä (20, 21).

3,4,5-trichloro-2,6-dimethoxyphenol was prepared by chlorination of 2,6-dimethoxyphenol (Fluka) with chlorine gas in CS<sub>2</sub> at 20°C. The structures of the synthesized compounds were verified by GLC, Jeol FX-60-NMR and Varian MAT-212 GC-MS.

KY-5 was obtained from KYMI C.O., Finland.

## MUTAGENESIS ASSAY

A cell mediated mutagenesis assay (19) was used as a direct method without metabolizing cells for all the compounds and part of the material was studied in a cell-mediated assay with irradiated fibroblasts and hepatocytes (22, 23, 24).

The Chinese hamster cells V79 derived from clone V79-4 were kindly supplied by Dr. E. Huberman, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.

The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco Grand Island, N.Y.) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco G.I., N.Y.) and 2 mM glutamine (K.C. Biological, Kansas, USA), penicillin 100 IU per ml, streptomycin 100 µg and fungizone 250 ng per ml (Gibco, Grand Island, N.Y.) and incubated at 37 °C. The cultures were incubated in a humidified incubator supplied with a constant amount of 10% CO<sub>2</sub> in air.

In the direct method 10<sup>6</sup> V79 cells in 10 ml medium were seeded in a tissue culture dish (Ø 10 cm) and the test compound was added 24 hr after the V79 cells in 1 ml of medium. The maximum amount of acetone which was used as a solvent of the test compounds was 50 µl and it was added to controls, too. The cultures were incubated for 2 days and the cells were dissociated with trypsin-EDTA (0.05 and 0.1% Gibco) and seeded at 200 cells per 60 mm tissue culture dish in 5 ml of medium to determine the cloning efficiency and 10<sup>5</sup> cells per 10 mm dishes. 6 days later the cells were dissociated and reseeded for cloning efficiency, 200 cells per 60 mm dish, and 2 x 10<sup>4</sup> cells per 60 mm dish in 4 ml of medium for determination of the number of 6-thioguanine resistant mutants. 6-thioguanine (Sigma, St. Louis, USA) final concentration 40 µM, was added in 1 ml of medium. The colonies were counted after Giemsa staining. Cloning efficiency was determined by counting the number of colonies in five dishes per point 7-8 days after cell seeding. The frequency of 6-thioguanine resistant mutants was determined by counting 16 dishes per point 12-14 days after cell seeding.

As a positive control we used MNNG, (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, Sigma).

In the cell-mediated method (22, 23) the chemicals were cocultivated with rat fibroblasts and V79 cells. 3 x 10<sup>5</sup> V79 cells were seeded on a monolayer of 2 x 10<sup>6</sup> 5000R irradiated fibroblasts and the test compound was added and the experiment conducted as above. As a positive control we used DMBA, (7,8-dimethylbenz(a)anthracene, Fluka 98% pure). 26DCP, 2346TeCP, 35DCC and KY-5 were studied in this assay.

In the hepatocyte-mediated assay (24) primary hepatocytes of 2-3 months old male Sprague-Dawley rats were used and only one concentration of 8 compounds was examined by the method. As a positive control we used DMN, (N-nitrosodimethylamine, 98% pure Sigma).

V79 cells were seeded at  $5 \times 10^5$  cells/25 cm<sup>2</sup> T-flask. After 18 hr  $2 \times 10^6$  primary rat hepatocytes were seeded on the V79 cells in 4 ml Leibovitz L-15 medium (Gibco) containing 2 mM glutamine, 10% fetal calf serum, 100 IU penicillin/ml and streptomycin 100 µg/ml. After 3 h the medium was changed and the chlorophenols were added in 4 ml of fresh medium. The cells were dispersed 18 hr later with 0.05% trypsin and 0.02% EDTA. The experiment was conducted as in the direct method. The following compounds were studied in this method: 26DCP, 246TCP, 2346TeCP, PeCP, 346TCC, TeCC, 456TCG and the commercial fungicide, KY-5.

## RESULTS

The study was started simultaneously as a direct and fibroblast-mediated assay with part of the chemicals. The results of the cell-mediated assay with fibroblasts are presented in Table I.

Table I. Induction of 6-thioguanine resistant mutants in the fibroblast-mediated assay by polychlorophenolic compounds and DMBA as a positive control.

	Concentration µg/ml	Cloning efficiency %	6-thioguanine resistant mutants per 10 <sup>6</sup> survivors
Control		74.9	0
26DCP	30	45.5	0
"	90	55.1	2
"	150	58.5	0
2346TeCP	10	79.7	0
"	15	56.0	0
"	20	50.0	0
35DCC	1.5	44.8	0
"	3.0	60.6	2
"	10.0	52.8	2
KY-5	2.4	75.3	0
"	8	78.0	0
"	24	67.2	1
DMBA	0.01	56.6	264
"	0.03	41.8	490
"	0.10	21.4	645

Because no response was obtained in the cell-mediated assay it was discontinued and all compounds were studied in the direct method. Table II shows those compounds which caused the induction of 6-thioguanine resistant mutants the number of which was three-fold or more as compared to the control.

Table II. Induction of 6-thioguanine resistant mutants in the direct method by chlorophenolic compounds and MNNG as a positive control.

	Concentration µg/mg	Cloning efficiency %	6-thioguanine resistant mutants per 10 <sup>6</sup> survivors
Control	0	61.7	0
246TCP	10	58.0	1
"	20	55.0	13
"	30	55.1	53
"	45	47.5	25
"	60	40.5	11
Control	0	74.3	0
2346TeCP	3.5	75.3	12
"	7	73.0	17
"	10	70.8	35
"	15	68.5	18
"	20	60.0	10
Control	0	54.5	0
246TCC	3	51.2	0
"	4	45.0	11
"	5	38.3	16
"	6	27.6	20
Control	0	51.3	0
456TCG	10	51.5	5
"	30	48.8	16
"	50	40.0	27
Control	0	78.0	0
KY-5	2.4	68.0	5
"	8	67.7	4
"	24	50.6	2
Control	0	65.5	0
MNNG	0.5	54.5	471
"	1.0	45.5	799

In the direct method positive results were obtained with 246TCP, 2346TeCP, 346TCC, 456TCG and KY-5, the commercial fungicide mixture. Even the highest mutagenicity observed was roughly one tenth or less of the mutagenic power of MNNG, the positive control. The compounds which produced no mutants or less than three times as compared to the control were 26DCP, PeCP, 35DCC, 345TCC, TeCC, 35DCG, TeCG and DMP.

Finally, all the compounds which gave positive response in the direct method plus 26DCP, PeCP and TeCC, one concentration of each were conducted in the hepatocyte-mediated assay and DMN was used as a positive control. The results are shown in Table III and it shows either decrease or total disappearing of the mutagenicity.

Table III. Induction of 6-thioguanine resistant mutants in the hepatocyte-mediated assay by polychlorophenolic compounds and DMN as a positive control.

	Concentration	Cloning efficiency %	6-thioguanine resistant mutants per $10^6$ survivors
Control	ug/ml	54.7	34
260CP	100	49.9	12
246TCP	30	43.3	0
2346TeCP	10	61.0	0
PeCP	15	55.3	0
346TCC	5	34.1	0
TeCC	5	54.1	0
456TCG	30	36.7	6
KY-5	10	51.2	3
	mM		
DMN	0.3	49.3	102
	1.0	53.1	300
	3.0	37.6	347

#### CONCLUSION

The present investigation was undertaken in an attempt to find mutagenic compounds among chlorinated phenols and related compounds in a mammalian cell mutagenesis assay. The compounds studied are widely spread as environmental pollutants. 2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol, 3,4,6-trichlorocatechol and 4,5,6-trichloroguaiacol and one commercial fungicide mixture were found mutagenic and there was a dose related increase in the number of mutant colonies. The mutagenicity, however, decreased or disappeared in the hepatocyte-mediated assay. 2,3,4,6-tetrachlorophenol and KY-5 which gave positive response in the direct method gave negative responses in the fibroblast-mediated assay. Similar decrease or disappearance of mutagenicity of XAD-resin concentrate of chlorination stage pulp mill effluents was observed in three strains of *Salmonella typhimurium* (17) in the presence of S9 mix, S9 mix without cofactors or heat activated S9 mix.

In our study the maximum response was roughly one tenth as compared to MNNG at 0.5 ug/ml level, which shows the compounds studied weak mutagenic. The maximum response was

a factor of 50 higher compared to the control at 30 µg/ml of 246TCP and only a factor of 5 of the commercial fungicide mixture.

In the study of pulp mill effluent by a bacterial assay (17) the mutagenic response was a factor 3.6 times higher at 1 mg pulp mill extract/ml level as compared to the background level. In the study of Kinae et al. (18) high DNA damaging potency was obtained by 246TCP and 3456TeCG at 0.5 and 0.1 mg/disk level.

It is important to know the mutagenic activity of pulp industry effluents which are complex mixtures but it is also important to know the mutagenicity of single chlorinated phenols and related compounds because they seem to appear from new sources to the environment like in the precipitation of snow and concentrate in animal tissues, too (1).

Chlorophenols did not give positive response in the *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae* assays (15, 16) although one chloroguaiacol and -catechol gave positive response in the yeast. However, both a chlorophenol and chloroguaiacol gave positive response in *Bacillus subtilis*.

It is obvious that several *in vitro* systems, including the mammalian cell assay should be used simultaneously in the study of the mutagenicity of chlorinated phenols and related compounds. The final evaluation of their mutagenic potency and risk to the environment can, however, be ascertained when more data of their dilution in waters and the concentration coefficients in the tissues of different organisms is available.

#### REFERENCES

1. J. Paasivirta, K. Heinola, T. Humppi, A. Karjalainen, J. Knuutinen, K. Mäntykoski, R. Paukku, T. Piilola, K. Surma-aho, J. Tarhanen, L. Welling, H. Vihonen and J. Särkkä, Chemosphere, in press.
2. J-O. Levin and C-A. Nilsson, Chemosphere, 6, 443 (1977).
3. K. Lindström and J. Nordin, J. Chromatog., 128, 13 (1976).
4. L. Lander, K. Lindström, M. Karlsson, J. Nordin and L. Sörensen, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 18, 663 (1977).
5. N. Gjøns and G.E. Carlberg, Adv. Mass Spectrom., 813, 1468- (1980).
6. J. Paasivirta, Environmental Chemistry Comprehensive Course, Assoc. Finn. Chem. Soc., Helsinki 114 (1983).
7. J. Paasivirta, J. Särkkä, T. Leskijärvi and A. Roos, Chemosphere, 9, 441 (1980).
8. J. Knuutinen, J. Tarhanen and M. Lahtiperä, Chromatographia, 15, 9 (1982).
9. J. Knuutinen, J. Chromatog., 248, 289 (1982).

10. K. Olie, P.L. Vermeulen and O. Hutzinger, Chemosphere, 7, 419 (1977).
11. H.R. Buser and H.P. Bosshardt, Chemosphere, 7, 419 (1978).
12. T.O. Tiernan, M.L. Taylor, J.H. Garret, G.F. Van Ness, J.G. Solch, D.A. Deis and D.J. Wagerl, Chemosphere, 12, 595 (1983).
13. J. Paasivirta, Kemia-Kemi, 11, 452 (1984).
14. P. Ander, K.-E. Erikson, M.-C. Kolar, K. Kringstad, U. Rannug and C. RameI, Svensk. Papperstid., 80, 454 (1977).
15. L. Räsänen, M.L. Hattula and A.U. Arstila, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 18, 565 (1977).
16. E.R. Nestmann and E.G.-L. Lee, Mutat. Res., 119, 273 (1983).
17. O.P. Kamra, E.R. Nestmann, G.R. Douglas, D.J. Kowbel and T.R. Harrington, Mutat. Res., 118, 269 (1983).
18. N. Kinae, T. Hashizume, T. Makita, I. Tomita, I. Kimura and H. Kanamori, Water Res., 15, 17 (1981).
19. E. Huberman and L. Sachs, Int. J. Cancer, 13, 326 (1974).
20. J. Knuutinen, J. Chromatog., 209, 446 (1981).
21. J. Knuutinen and E. Kolehmainen, Chromatographia, 15, 707 (1982).
22. R. Langenbach, H.J. Freed, D. Raven and E. Huberman. Nature, 276, 5685.
23. E. Huberman and T.J. Slaga, Cancer Res., 39, 411 (1979).
24. C.A. Jones and E. Huberman, Cancer Res., 40, 406 (1980).

(Received in Germany 14 March 1985)

MTR 01084

## Inability of chlorophenols to induce 6-thioguanine-resistant mutants in V79 Chinese hamster cells

Kristian Jansson \* and Vuokko Jansson

Department of Cell Biology, University of Jyväskylä, Vapaudenkatu 4, SF-40100 Jyväskylä (Finland)

(Received 23 October 1985)

(Revision received 17 March 1986)

(Accepted 1 April 1986)

### Summary

The induction of mutation at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus and cytotoxicities of 6 different chlorophenols (2,4- and 2,6-dichlorophenol, 2,4,5- and 2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol and pentachlorophenol) were examined in V79 Chinese hamster cells without exogenous metabolic activation. The chlorophenols were cytotoxic to V79 cells, but failed to produce significant increases in the frequency of 6-thioguanine-resistant mutants.

Chlorophenols are used extensively as wood preservatives (fungicides), bactericides, slimicides, herbicides and as intermediates in the manufacture of other pesticides. The annual world-wide production of chlorophenols has been estimated to be about 200 000 ton (Paasivirta, 1978). Chlorine bleaching of pulp produces chlorophenol-containing effluents (Lindström and Nordin, 1976). Furthermore, penta-chlorophenol and various di-, tri- and tetra-chlorophenols have been identified as mammalian metabolites of hexachlorocyclohexane (IARC, 1979; Munir et al., 1984).

In humans, soft tissue sarcoma, malignant lymphoma and leukemia have been associated with occupational exposure to 2,4,5-tri- and penta-chlorophenol, and to chlorophenol formulations containing mainly 2,4,6-tri-, 2,3,4,6-tetra- and penta-chlorophenol (IARC, 1982). In animal studies, 2,4,6-trichlorophenol (96-97% pure) has been shown to produce lymphomas and leukemias in male Fisher rats, and hepatocellular carcinomas or

adenomas in both male and female B6C3F1 mice (National Cancer Institute, 1979). Long-term bioassays of pentachlorophenol by the U.S. National Toxicology Program are in progress (Huff, 1982).

The genotoxicity of chlorophenols has not been well characterized. 2,4,6-Trichlorophenol was reported to exhibit high DNA-damaging potency without exogenous metabolic activation in *Bacillus subtilis* rec-assay (Kinae et al., 1981). 2,4-Di- and 2,4,5-tri-chlorophenol induced stickiness and lagging of chromosomes, and chromosome fragmentation in *Vicia faba* (Amer and Ali, 1974). In *Saccharomyces cerevisiae*, in the absence of exogenous activation, 2,6-di- and 2,4,5-tri-chlorophenol failed to induce reverse mutation or mitotic gene conversion (Nestmann and Lee, 1983), whereas 2,4,6-trichlorophenol induced forward mutation but did not induce mitotic gene conversion, and pentachlorophenol induced both forward mutation and mitotic gene conversion (Fahrig et al., 1978). Pentachlorophenol failed to induce sex-linked recessive lethals in *Drosophila melanogaster* (Vogel and Chandler, 1974), and there was con-

\* To whom all correspondence should be addressed.

flicting evidence with regard to the production of chromosomal aberrations in workers exposed to pentachlorophenol (Wyllie et al., 1975; Bauchinger et al., 1982).

The mutagenicity of chlorophenols in mammalian cells has not been determined. However, the chlorophenol derivative 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) was shown to be mutagenic without exogenous activation in V79 Chinese hamster cells (Ahmed et al., 1977). To extend the previous genotoxicity studies, we examined the induction of mutation to 6-thioguanine resistance in V79 Chinese hamster cells by 6 different chlorophenols.

## Materials and methods

### Chemicals

2,4- and 2,6-dichlorophenol, 2,4,5- and 2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol and pentachlorophenol were purchased from Fluka AG, Buchs, Switzerland, purified by recrystallization and determined to be > 99.5% pure by GC. Chlorinated dibenzo-*p*-dioxins were not detected (limit of detection, 0.05 ppm). Ethyl methanesulfonate (EMS) was obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Stock solutions of the chlorophenols (50 mg/ml in acetone) and EMS (50 mg/ml in water) were prepared immediately before use.

### Cell culture

V79 Chinese hamster cells, originally obtained from Dr. Eliezer Huberman (Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN), were cloned to reduce the spontaneous background frequency of 6-thioguanine-resistant mutants and stored in ampoules frozen in liquid nitrogen. No HATG (hypoxanthine, aminopterin, thymidine, glycine) treatments were performed. Prior to each experiment, an ampoule of cells was thawed and used. The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (K.C. Biological, Inc., Lenexa, KS) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco Ltd., Paisley, Scotland), 2 mM glutamine (K.C. Biological), 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 250 ng/ml fungizone (Gibco Ltd.) at 37°C with a humidified

atmosphere of 10% CO<sub>2</sub> in air. Cell culture dishes were purchased from Falcon Co., Oxnard, CA.

### Mutation assay

The forward mutation assay on 6-thioguanine resistance in V79 cells was based on the replating method described by McMillan and Fox (1979).  $1 \times 10^6$  cells were plated in 100-mm dishes in 9 ml of medium and cultured for 24 h. The test chemical was then added to the dishes in 1 ml of medium to give the desired final concentrations. For each concentration, two dishes were used. Each experiment included a solvent control and a positive control of EMS at 200 µg/ml. The maximum solvent concentration was 1%. This level had no effect on cell growth or spontaneous mutant frequency. After 24 h of treatment, cells were dissociated with a trypsin-EDTA solution, and cell survival was determined by plating 200 cells in 60-mm dishes (4 dishes/dose) in 4 ml of medium and staining the dishes with Giemsa 6 days later. Colonies of at least 50 cells were counted and survival was calculated relative to the solvent control.

At the time cells were plated for survival,  $1-2 \times 10^6$  cells of each treatment condition were plated in 100-mm dishes in 10 ml of medium to allow phenotypic expression. Cells were subcultured every 48 h, maintaining  $1 \times 10^6$  cells at each subculture. After a 6-day expression time, which is considered to be adequate in general (Bradley et al., 1981),  $1 \times 10^5$  cells were plated in 100-mm dishes (10 dishes/dose) in 9 ml of medium, and 6-thioguanine (Sigma Chemical Co.) was added in 1 ml of medium 4 h later to give a final concentration of 10 µg/ml. The number of mutant colonies was determined 10 days later, after Giemsa staining. To determine cell viability at the time of mutant selection, 200 cells were plated in 60-mm dishes (4 dishes/dose) in 4 ml of medium, and the colonies were stained with Giemsa and counted 6 days later. Mutant frequencies were expressed as the numbers of mutants per  $10^6$  viable cells.

A chemical was considered to be mutagenic if the mutant frequency exceeded the 99% upper confidence limit of the historical background mutant frequency and a dose-related increase in the mutagenicity was observed. The historical background mutant frequency (the solvent control

frequencies in 12 independent experiments including those reported here) was  $7.0 \times 10^{-6} \pm 4.5 \times 10^{-6}$  (mean  $\pm$  standard deviation). The 99% confidence interval calculated by multiplying the standard deviation by the appropriate *t* value of the Student's *t* distribution (one-sided) requiring 99% confidence was  $12.2 \times 10^{-6}$ , and the 99% upper confidence limit was  $19.2 \times 10^{-6}$ .

### Results and discussion

The results are presented in Table 1. Each of the 6 chlorophenols tested reduced the plating efficiency (% cell survival) in a dose-dependent manner. This cytotoxic effect can be attributed to the ability of pentachlorophenol and other chlorophenols to inhibit oxidative phosphorylation (Farquharson et al., 1958; Weinbach et al., 1965). At the concentrations tested, none of the chlorophenols produced significant increases in the frequency of 6-thioguanine-resistant mutants. Evidence that the cells in these experiments were responsive was shown by EMS at 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In a separate experiment, EMS induced marked dose-related increases in 6-thioguanine resistance.

There have been few studies regarding the induction of gene mutation by chlorophenols. Our negative results are in accordance with the findings of Nestmann and Lee (1983), who showed that 2,6-di- and 2,4,5-tri-chlorophenol were inactive in inducing reverse mutation in *S. cerevisiae*, and of Vogel and Chandler (1974), who reported that pentachlorophenol failed to induce sex-linked recessive lethals in *D. melanogaster*. Fahrig et al. (1978) found that 2,4,6-tri- and penta-chlorophenol induced forward mutation to cycloheximide resistance in *S. cerevisiae* without exogenous metabolic activation. However, the biochemical basis of cycloheximide resistance is poorly understood, and this mutation system is not considered to be completely reliable (Zimmermann et al., 1984).

Most human and animal carcinogens have been found to cause gene mutation, chromosome breakage or other types of DNA lesions. We point out that the apparent lack of induction of gene mutation by chlorophenols does not necessarily mean the lack of genotoxicity of these chemicals. In this respect, it is interesting to note the findings of

TABLE 1

INDUCTION OF MUTATION TO 6-THIOGUANINE (TG) RESISTANCE IN V79 CHINESE HAMSTER CELLS BY TREATMENT WITH CHLOROPHENOLS FOR 24 h

Chemical	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Survival (%) <sup>a</sup>	Number of TG-resistant mutants/ $10^6$ viable cells
2,4-Dichlorophenol	0	100	12
	12.5	108	6
	25	80	6
	50	18	0
EMS <sup>b</sup>	200	84	965
2,6-Dichlorophenol	0	100	4
	125	88	0
	250	82	0
	500	17	6
EMS	200	62	584
2,4,5-Trichlorophenol	0	100	9
	6.25	90	3
	12.5	63	6
	25	45	5
	50	17	7
EMS	200	64	1262
2,4,6-Trichlorophenol	0	100	2
	12.5	85	3
	25	79	4
	50	72	2
	100	53	0
EMS	200	79	631
2,3,4,6-Tetrachlorophenol	0	100	1
	12.5	101	7
	25	88	16
	50	34	7
	100	10	9
EMS	200	88	1181
Pentachlorophenol	0	100	16
	6.25	90	10
	12.5	73	0
	25	53	0
	50	27	7
EMS	200	55	966
EMS	0	100	8
	50	74	180
	100	73	259
	200	53	613
	400	13	1367

<sup>a</sup> The average absolute plating efficiency of control cells was 75%, range 62–89%.

<sup>b</sup> Positive control, ethyl methanesulfonate.

Bauchinger et al. (1982), who reported that peripheral lymphocytes of pentachlorophenol-exposed workers showed a significant increase in chromosome-type aberrations (dicentrics and acentrics) but not in chromatid-type aberrations, such as breaks or exchanges. Further studies will be required to clarify the genotoxic properties of chlorophenols, as well as their suspected human and animal carcinogenicity.

### Acknowledgements

We wish to thank Dr. Juha Knuutinen for purifying the chlorophenols and performing the GC analyses. We also wish to thank Mrs. Irene Helkala for technical assistance. This work was supported by grants from the Foundation of Maj and Tor Nessling, and the National Academy of Finland.

### References

- Ahmed, F.E., N.J. Lewis and R.W. Hart (1977) Pesticide induced ouabain resistant mutants in Chinese hamster V79 cells, *Chem.-Biol. Interact.*, 19, 369-374.
- Amer, S.M., and E.M. Ali (1974) Cytological effects of pesticides, V. Effects of some herbicides on *Vicia faba*, *Cytologia* (Tokyo), 39, 633-643.
- Bauchinger, M., J. Dresp, E. Schmid and R. Hauf (1982) Chromosome changes in lymphocytes after occupational exposure to pentachlorophenol (PCP), *Mutation Res.*, 102, 83-88.
- Bradley, M.O., B. Bhuyan, M.C. Francis, R. Langenbach, A. Peterson and E. Huberman (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature, A report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 87, 81-142.
- Fahrig, R., C.-A. Nilsson and C. Rappe (1978) Genetic activity of chlorophenols and chlorophenol impurities, in: K.R. Rao (Ed.), *Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology and Environmental Toxicology*, Plenum, New York, pp. 325-338.
- Farquharson, M.E., J.C. Gage and J. Northover (1958) The biological actions of chlorophenols, *Br. J. Pharmacol.*, 13, 20-24.
- Huff, J. (1982) Carcinogenesis bioassay results from the National Toxicology Program, *Environ. Health Persp.*, 45, 185-198.
- IARC (1979) Some halogenated hydrocarbons, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 20, pp. 195-239.
- IARC (1982) Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Suppl. 4, pp. 88-89.
- Kinae, N., T. Hashizume, T. Makita, I. Tomita, I. Kimura and H. Kanamori (1981) Studies on the toxicity of pulp and paper mill effluents, I. Mutagenicity of the sediment samples derived from kraft paper mills, *Water Res.*, 15, 17-24.
- Lindström, K., and J. Nordin (1976) Gas chromatography-mass spectrometry of chlorophenols in spent bleach liquors, *J. Chromatogr.*, 128, 13-26.
- McMillan, S., and M. Fox (1979) Failure of caffeine to influence induced mutation frequencies and the independence of cell killing and mutation induction in V79 Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, 60, 91-107.
- Munir, K.M., J. Nair and S.V. Bhide (1984) Comparative formation of chlorophenol metabolites from hexachlorocyclohexane in mouse and rat in vivo and in vitro, *Carcinogenesis*, 5, 1519-1521.
- National Cancer Institute (1979) Bioassay of 2,4,6-trichlorophenol for possible carcinogenicity (Technical Report Series No. 155), DHEW Publications No. (NIH) 79-1711, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Washington, DC.
- Nestmann, E.R., and E.G.-H. Lee (1983) Mutagenicity of constituents of pulp and paper mill effluent in growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Res.*, 119, 273-280.
- Paasivirta, J. (1978) Chlorophenols — poisons, possible environmental poisons, *Kemia-Kemi*, 5, 367-370.
- Vogel, E., and J.L.R. Chandler (1974) Mutagenicity testing of cyclamate and some pesticides in *Drosophila melanogaster*, *Experientia*, 30, 621-623.
- Weinbach, E.C., J. Garbus and E.C. Clagett (1965) The interaction of uncoupling phenols with mitochondria and with mitochondrial protein, *J. Biol. Chem.*, 240, 1811-1819.
- Wyllie, J.A., J. Gabica, W.W. Benson and J. Yoder (1975) Exposure and contamination of the air and employees of a pentachlorophenol plant, *Pesticides Monitoring J.*, 9, 150-153.
- Zimmermann, F.K., R.C. von Borstel, E.S. von Halle, J.M. Parry, D. Siebert, G. Zetterberg, R. Barale and N. Loprieno (1984) Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 133, 199-244.

MUTGEN 01553

## A comparison of chromosome aberration induction by 25 compounds tested by two Chinese hamster cell (CHL and CHO) systems in culture

Toshio Sofuni<sup>1</sup>, Atsuko Matsuoka<sup>1</sup>, Minoru Sawada<sup>1</sup>, Motoi Ishidate, Jr.<sup>1</sup>,  
Errol Zeiger<sup>2</sup> and Michael D. Shelby<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic Sciences, Tokyo 158 (Japan), and <sup>2</sup> Cellular and Genetic Toxicology Branch, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, N.C. 27709 (U.S.A.)

(Received 15 September 1989)

(Revision received 5 January 1990)

(Accepted 9 January 1990)

**Keywords:** Chromosome aberration; Cytogenetics; Chinese hamster cell line; CHL cells; CHO cells; Genetic toxicology

### Summary

Twenty-five chemicals were tested for the induction of chromosomal aberrations in 2 cultured mammalian cell systems, Chinese hamster lung cells (CHL) and Chinese hamster ovary cells (CHO). This study was carried out to provide a data set that would permit an assessment of the extent to which the 2 systems agree in the results produced. Results presented for the 2 systems in this paper are not based on the same criteria but rather on the criteria standardly used in each of the systems. In tests conducted in the absence of S9 mix, 7 chemicals gave positive results in both systems and 12 were negative in both. In tests with S9 mix, 5 were positive in both systems and 9 were negative in both. When the overall results including tests both with and without S9 mix were considered, the 2 systems agreed on 15 results, 11 positives and 4 negatives. A review of the test conditions and data suggests that disagreements in test results were more often due to differences in the protocols used in these 2 systems than to a difference in the sensitivities of the 2 cell lines.

Chromosomal aberration tests using cultured mammalian cells have been widely used in primary screening for environmental mutagens and/or carcinogens and in evaluating the genotoxicity of chemicals including drugs, food additives, cosmetics, pesticides, and industrial chemicals.

For the chromosomal aberration test *in vitro*, primary cells (e.g., human lymphocytes) as well as

established cell line cells (e.g., Chinese hamster fibroblasts) are commonly used (Evans et al., 1980). In the U.S.A., under the National Toxicology Program (NTP), a Chinese hamster ovary cell line, CHO cells, has been used for *in vitro* cytogenetic studies on a variety of chemicals since 1980. Chemicals have been tested under code for their ability to induce chromosomal aberrations with and without rat liver microsome fraction (S9) (Galloway et al., 1985, 1987). In Japan, a different protocol using Chinese hamster lung cells, CHL cells, has been used for screening chemicals and test data on more than 700 substances have been

*Correspondence:* Dr. T. Sofuni, Division of Genetics and Mutagenesis, Biological Safety Research Center, National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158 (Japan).

0165-1218/90/\$03.50 © 1990 Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division)

accumulated during the past 10 years (Ishidate and Odashima, 1977; Ishidate, 1988).

A recent review and comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures (Ishidate et al., 1988) shows that there are qualitative differences in test results when chemicals are tested in different cell lines. These differences in results are more often due to differences in the test protocols, e.g., treatment time, harvest time, or the conditions used for metabolic activation, etc., than to hypersensitivity of a particular cell type. Related questions are whether or not clastogenic effects seen only at very high dose levels are artifactual and if so, whether the CHL and CHO cells are particularly prone to such effects (Ishidate and Harnois, 1987). These problems are important not only when the data are evaluated qualitatively as well as quantitatively, but also when guidelines for genotoxicity tests are prepared by governmental authorities for regulatory purposes.

The present study was conducted to compare the results obtained in CHL and CHO cells on 25 test chemicals. Some of the CHO test results were previously published by the NTP and the U.S. National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). All experiments with CHL cells were performed at the Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic Sciences, Tokyo (Japan), while the experiments with CHO cells were conducted at laboratories under contract to the NTP.

#### Materials and methods

The test chemicals (see Table 1 for names and CAS numbers, and Fig. 1 for structures) were chosen from a list of chemicals selected by the NTP for *Salmonella* mutagenicity testing in 1985. The group of chemicals is not a random selection and contains a large number of chlorophenols and phenylenediamines. Samples were supplied under code by the NTP chemical repository (Radian Corp., Austin, TX, U.S.A.). They were dissolved immediately before use in culture medium (M), physiological saline (S), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol (E), acetone (A) or carboxymethylcellulose (CMC). The name of the labora-

tory where the test was conducted is also indicated in Table 1 (NIHS for National Institute of Hygienic Sciences, Tokyo 158, Japan; HB for Hazleton Biotechnologies, Kensington, MD 20895, U.S.A.; LB for Litton Bionetics Inc., Kensington, MD 20895, U.S.A.; EHRT for Environmental Health Research and Testing Inc., Lexington, KY 45244, U.S.A.; and BSC for Bioassay Systems Corp., Woburn, MA, U.S.A.).

Experimental protocols in CHL and CHO systems were as described below. Major differences in experimental protocols are summarized in Table 2.

#### CHL system

The CHL test protocol has been described in detail in the *Data Book of Chromosomal Aberration Tests In Vitro* (Ishidate, 1988). The CHL cells were originally established from the lung of a female newborn Chinese hamster (Koyama et al., 1970), and the clonal cell line (CHL-CL-11) has been stocked in liquid nitrogen at the NIHS Cell Bank (JCRB0030). The cells were grown in a monolayer in Eagle's minimum essential medium (MEM, Gibco) containing no antibiotics and supplemented with 10% calf serum. The modal chromosome number was 25 and more than 80% of cells had 25 chromosomes. The doubling time was estimated to be 15-17 h.

To select the maximum test chemical concentration, a preliminary test was conducted on each test chemical as follows:  $1.2 \times 10^4$  cells were seeded in a 35-mm plastic dish with 2 ml of culture medium. The test chemical, at different concentrations (usually diluted at 2-fold intervals), was added on the 3rd day of culture. After an additional 2 days, the medium was discarded and the cells were washed with physiological saline. The cells were then fixed with 10% formalin solution and stained with 0.1% crystal violet solution. The concentration needed for 50% cell growth inhibition was approximated using a cell densitometer (Monocellater, Olympus Co. Ltd., Japan). For the chromosomal aberration test, 3 serial concentrations, including one above and one below the 50% growth inhibition dose, were generally used. For the negative control, untreated and/or solvent-treated cells were used. For the positive control, mitomycin C (CAS No. 50-07-7)

TABLE 1

TEST CHEMICALS, CAS NUMBERS, SOLVENTS USED AND LABORATORIES WHERE THE TESTS WERE CONDUCTED

Chemical No.	Test chemical	CAS No.	Solvent used <sup>a</sup>		Laboratory <sup>b</sup>	
			CHL	CHO	CHL	CHO
1	2,3,4-Trichlorophenol	15950-66-0	DMSO	DMSO	NIHS	HB(4)
2	2,3,6-Trichlorophenol	933-75-5	DMSO	DMSO	NIHS	LB(4)
3	3,4,5-Trichlorophenol	609-19-8	DMSO	DMSO	NIHS	HB(4)
4	2,3,4,5-Tetrachlorophenol	4901-51-3	DMSO	DMSO	NIHS	LB(4)
5	2,3,4,6-Tetrachlorophenol	58-90-2	DMSO	DMSO	NIHS	LB(4)
6	2,3,5,6-Tetrachlorophenol	935-95-5	DMSO	DMSO	NIHS	LB(4)
7	<i>o</i> -Phenylenediamine	95-54-5	DMSO	DMSO	NIHS	HB(4)
8	<i>m</i> -Phenylenediamine	108-45-2	DMSO	DMSO	NIHS	HB(4)
9	2,6-Toluenediamine dihydrochloride	15481-70-6	Saline	DMSO	NIHS	EHRT(1)
10	<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -phenylenediamine	99-98-9	DMSO	DMSO	NIHS	EHRT(4)
11	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine	100-22-1	DMSO	DMSO	NIHS	EHRT(4)
12	<i>N,N</i> -Diethyl- <i>p</i> -phenylenediamine	93-05-0	DMSO	DMSO	NIHS	EHRT(4)
13	<i>N,N'</i> -Di- <i>sec</i> -butyl- <i>p</i> -phenylenediamine	101-96-2	DMSO	DMSO	NIHS	EHRT(4)
14	<i>N,N'</i> -Diphenyl- <i>p</i> -phenylenediamine	74-31-7	DMSO	DMSO	NIHS	EHRT(4)
15	<i>N,N'</i> -Di-2-naphthyl- <i>p</i> -phenylenediamine	93-46-9	DMSO	DMSO	NIHS	EHRT(4)
16	<i>N</i> -Phenyl-1-naphthylamine	90-30-2	DMSO	DMSO	NIHS	BSC(3)
17	<i>N</i> -Phenyl-2-naphthylamine	135-88-6	DMSO	DMSO	NIHS	BSC(4)
18	<i>p</i> -Isopropoxydiphenylamine	101-73-5	DMSO	DMSO	NIHS	BSC(3)
19	4,4'-Dimethoxydiphenylamine	101-70-2	DMSO	DMSO	NIHS	BSC(3)
20	4,4'-Dioctyldiphenylamine	101-67-7	EtOH	Acet	NIHS	BSC(3)
21	<i>N</i> -Nitrosodiphenylamine	86-30-6	DMSO	DMSO	NIHS	BSC(3)
22	Tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurate	2451-62-9	DMSO	DMSO	NIHS	BSC(3)
23	Triallyl isocyanurate	1025-15-6	DMSO	DMSO	NIHS	BSC(3)
24	Chromium carbonyl	13007-92-6	CMC	Acet	NIHS	LB(4)
25	1-(1,2-Dibromoethyl)-3,4-dibromocyclohexane	3322-93-8	DMSO	DMSO	NIHS	BSC(2)

<sup>a</sup> DMSO, dimethyl sulfoxide; Saline, physiological saline; EtOH, ethanol; CMC, sodium carboxymethyl cellulose; Acet, acetone.

<sup>b</sup> NIHS, National Institute of Hygienic Sciences (Tokyo, Japan); HB, Hazleton Biotechnologies (U.S.A.); LB, Litton Bionetics (U.S.A.); EHRT, Environmental Health Research and Testing (U.S.A.); BSC, Bioassay Systems Corp. (U.S.A.).

(1) Data originally published in Gulati et al. (1989).

(2) Data originally published in Loveday et al. (1989).

(3) Data originally published in Loveday et al. (1990).

(4) Complete data, including SCE data, will be published by the NTP in their series of manuscripts on in vitro test results.

or *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (CAS No. 70-25-7) was used in the test without S9 mix, while benzo[*a*]pyrene (CAS No. 50-32-8) or dimethylnitrosamine (CAS No. 62-75-9) was used in the test with S9 mix.

In the test without metabolic activation, the cells were grown in the presence of the test agent for 24 h or 48 h. Colcemid (0.2 µg/ml final concentration) was added to the culture medium 2 h before harvesting. Chromosome preparations were made by the air-drying technique. In the system with metabolic activation, cells were treated with the test agent and S9 mix for 6 h. S9 was prepared from the livers of male Fischer rats

pretreated with PCB (KC-400). 10 ml of S9 mix consisted of 3 ml of S9, 2 ml of 20 mM HEPES buffer solution (pH 7.2), 1 ml of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 ml of 330 mM KCl, 1 ml of 50 mM glucose 6-phosphate, 1 ml of 40 mM NADP and 1 ml of distilled water. The final concentration of S9 in the medium was adjusted to 5% (0.5 ml of S9 mix and 2.5 ml of culture medium including calf serum). Cells treated only with the test agent (without S9 mix) for 6 h also served as a control. After 6-h treatment, the reaction mixture was replaced with fresh culture medium, and the cells grown for an additional 18 h. 2 h before harvesting, Colcemid was added to the culture medium.

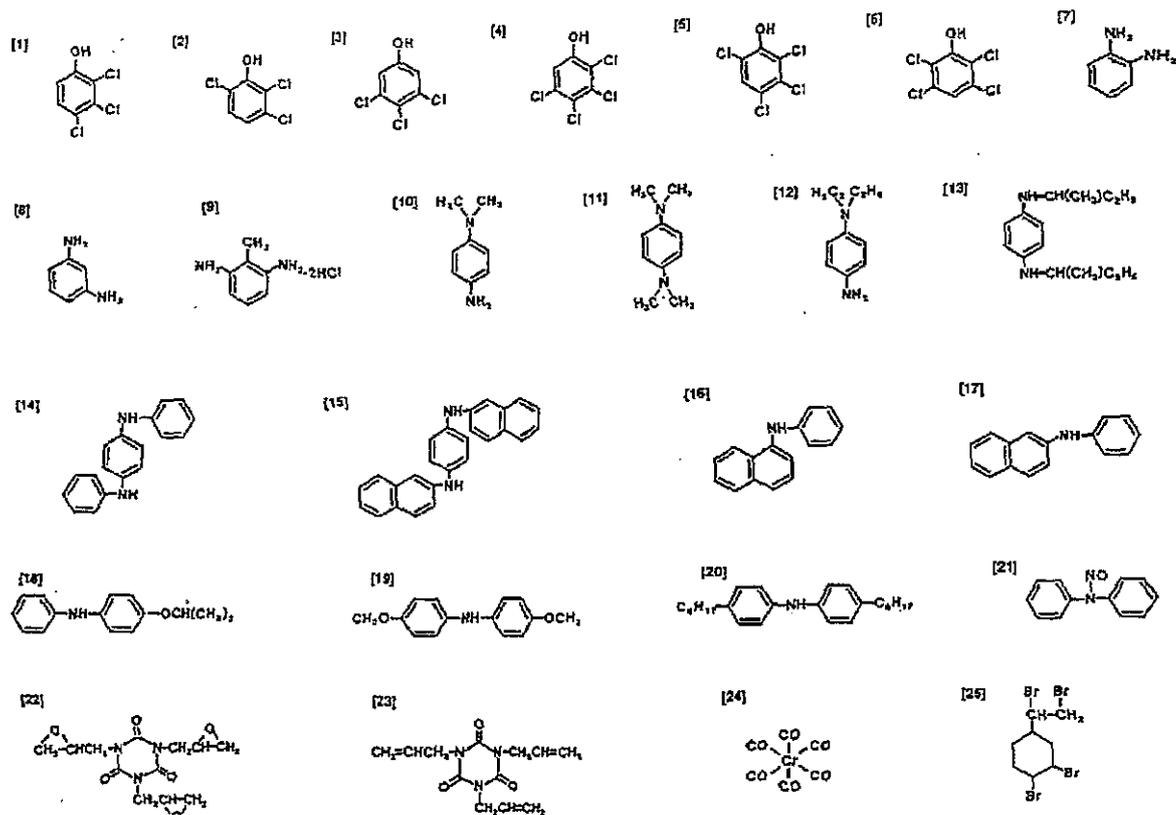


Fig. 1. Structures of test chemicals.

Chromosome preparations were made in the same way as in the test without metabolic activation.

One hundred well-spread metaphases per dose were observed under the microscope (at magnifications of 600–1000). The numbers of cells with chromosomal aberrations and polyploid cells were recorded. Different types of aberrations such as chromatid gaps (ctg) including chromosome gaps, chromatid breaks (ctb), chromatid exchanges (cte), chromosome breaks (csb), chromosome exchanges (cse) and 'others' including fragmentation (frg), were recorded. Any cell with 1 or more aberrations was counted as 1 aberrant cell.

The NIEHS historical data base showed that the frequency of CHL cells with aberrations or polyploidy in both untreated and solvent-treated negative controls had not exceeded 4%. From the present study, the mean and range of aberrant cells in solvent-treated negative controls was as follows:

ctg: 0.59% (0–3%); ctb: 0.25% (0–2%); cte: 0.14% (0–1%); frg: 0%; csb: 0.04% (0–1%); cse: 0.05% (0–1%); total (with ctg but without polyploid): 1.04% (0–4%); polyploid: 0.45% (0–4%). The final result of each test was decided for structural aberrations or polyploid cells, separately as follows: negative (–) if the frequency of aberrant cells (including gaps for structural aberrations) was less than 5%; inconclusive (±) if greater than 5% but less than 10%; and positive (+) if 10% or more. Overall evaluation for each chemical was made after the judgement of individual results at different dose groups. Weakly positive (+w) was used if the effect was found only at a relatively high concentration (about 2 mg/ml or more), or at a relatively low frequency (about less than 20%), or without a dose-related response (negative at 2 lower concentrations). If the outcome was evaluated as inconclusive or showed no dose-re-

TABLE 2  
MAJOR PROTOCOL DIFFERENCES BETWEEN CHO AND CHL ASSAYS FOR CHROMOSOMAL ABERRATIONS

	CHL system	CHO system
Culture medium	Eagle's MEM with 10% calf serum	McCoy's 5A with 10% fetal calf serum
Dose determination	3 doses including one above and one below the 50% growth inhibition dose measured by the Monocellater	3 highest scorable doses selected from 10 doses spanning 4-5 orders of magnitude up to a maximum dose of 5 mg/ml
Treatment time		
Without S9 mix	24 and 48 h	8-10 h
With S9 mix	Treated for 6 h, followed by culture in fresh medium for 18 h	Treated for 2 h, followed by culture in fresh medium for 10-18 h
S9	From the livers of male Fischer rats pretreated with KC-400	From the livers of male Sprague-Dawley rats pretreated with Aroclor 1254
S9 mix <sup>a</sup>	50 µl/ml of S9, 0.16 mg/ml of HEPES, 0.17 mg/ml of MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 0.41 mg/ml of KCl, 0.25 mg/ml of G 6-P, 0.53 mg/ml of NADP in culture medium with 10% calf serum	15 or 20 µl/ml of S9, 2.4 mg/ml of NADP, 4.5 mg/ml isocitric acid in serum-free medium
S9 concentration <sup>a</sup>	5.0%	1.5%
Colcemid treatment	Added 2 h before harvesting	Added 2.0-2.5 h before harvesting (without S9 mix), the cells are washed and then treated with Colcemid in fresh medium
Cell harvest	Trypsin treatment	Mitotic shake-off
Judgement	Percent of cells with aberrations: negative if less than 5%, inconclusive if greater than 5% but less than 10%, positive if 10% or more	Percent of cells with aberrations: statistical significance using the binomial sampling assumption and the trend analysis
Achromatic lesions (gaps)	Included in analysis	Not included in analysis

<sup>a</sup> Concentrations in the final incubation mixture with a test chemical and cells.

lated response, the experiment was repeated. No statistical procedures were applied to the CHL data.

#### CHO system

The test method has been described by Gallo-way et al. (1985, 1987). Cloned Chinese hamster ovary cells (CHO-WBL), with a modal chromosome number of 21 (only cells with 19-23 chromosomes were scored), were cultured in McCoy's 5A medium supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine and antibiotics. In the test without metabolic activation, the cells were treated with the test chemical for 8-10 h. They were then washed, reincubated with medium containing Colcemid and harvested 2.0-2.5 h later. In the test with metabolic activation, the cells were exposed to the test chemical and S9 mix in serum-free medium for 2 h. Following treatment, the cells were washed and reincubated in medium contain-

ing serum. The cells were allowed to grow for 10 h with Colcemid present for the final 2.0-2.5 h.

The S9 mix was prepared from the livers of male Sprague-Dawley rats pretreated with Aroclor 1254. The S9 mix consisted of 15 or 20 µl/ml of S9, 2.4 mg/ml of NADP, and 4.5 mg/ml isocitric acid in serum-free medium (the final concentration of S9 in the medium is estimated to be 1.5%). The cells were exposed to a range of 10 doses spanning 4-5 orders of magnitude up to a maximum dose of 5 mg/ml or to the limits of solubility in culture medium. Generally, the 3 highest doses with analyzable cells were scored.

If little or no delay was found in the cell cycle as indicated by a preliminary sister-chromatid exchange test, the cells were harvested 10-12.5 h after the beginning of treatment as stated above; if a delay was found, they were harvested at 17-20 h. Thus, harvest times ranged from 10 to 20 h (-S9) and from 12 to 20 h (+S9). Cells were

collected by mitotic shake-off as described by Galloway et al. (1985). Slides were prepared by the air-drying technique and stained with Giemsa. One hundred or 200 well-spread metaphases per dose were scored. Solvent-treated and/or untreated cultures served as solvent and negative controls, respectively. Triethylenemelamine (CAS No. 51-18-3) or mitomycin C (CAS No. 50-07-7) was used as the positive control in tests without metabolic activation. Cyclophosphamide (CAS No. 50-18-0) was the positive control in tests with metabolic activation.

Cells were scored for the following types of aberrations: 'simple' (chromatid or chromosome breaks, fragments, deletions and double minutes), 'complex' rearrangements (interstitial deletions, triradials, quadriradials, rings, and dicentric) and 'other' (pulverized). Gaps and endoreduplications were scored, but not included in the analyses or in the data presented in the Appendix. All other categories were combined for the statistical analyses. The 'percent cells with aberrations' rather than the number of aberrations per cell was analyzed, so as not to distort the results in cases where there were a high number of aberrations in any one cell. For these 25 studies the mean and range of cells with aberrations in solvent control groups was 1.5% (0.0-3.0%) without S9 and 2.2% (0.0-6.0%) with S9.

The data were analyzed for trend and individual dose groups were compared with the concurrent solvent control. A linear regression of the log dose vs. the percent of cells with aberrations was used for the trend analysis. A binomial sampling assumption was used to examine increases over the solvent control for each dose point. The *P* value was adjusted by Dunnett's method to take into account the multiple-dose comparison.

A dose was considered positive if the adjusted *P* value was <0.05 and the trend was significant if the *P* value was <0.003. A positive test result was defined as a trial with 2 significant doses. If only 1 dose was significant and there was a significant trend, the result was weakly positive. In cases where there was only 1 significant dose and no trend, or only a significant trend, the chemical was concluded to be equivocal. Generally, trials concluded to be positive, weakly positive, or equivocal were repeated.

## Results and discussion

The summary results obtained with 25 chemicals in CHL and CHO cells are shown in Table 3. The data and results for the individual trials are given in the Appendix. The chemical numbers used in Table 1 are used consistently throughout the other Tables and the Appendix. Usually the experiment was repeated for confirmation; however, only data which were considered representative (in most cases the data from the last experiment performed on each sample) are presented in the Appendix. In all cases the positive controls responded as anticipated and these data are not presented.

For the CHL system, both exposure and harvest times are constant throughout experiments. Tests without metabolic activation are designated as 24-0 or 48-0 (exposed for 24 h or 48 h with Colcemid present for the last 2 h and harvested immediately after the treatment). The tests with metabolic activation are designated as 6-18 (exposed for 6 h and grown for 18 h with Colcemid present the last 2 h). Cells treated only with the test agent (without S9 mix) for 6 h and harvested 18 h after the treatment were also examined in this test. In the Appendix, the frequencies of polyploid cells and cells with chromosome aberrations are presented.

For the CHO system, the exposure and harvesting time varied slightly among the 4 laboratories conducting the tests. The number of aberrations per cell and the frequency of cells with the simple and complex types of aberrations are presented.

When the overall results obtained from tests both with and without S9 mix are considered, the 2 systems agree on 15 results: positive or weakly positive in 11 chemicals (Nos. 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 19 and 22), and negative or inconclusive in 4 chemicals (Nos. 3, 13, 16, 20). The individual results of these chemicals are as follows.

No. 2 (2,3,6-trichlorophenol) was positive in both CHL and CHO cells in the presence of S9 mix. Positive results were obtained in CHL cells at doses of 200.0 µg/ml and higher (11.0% at 200.0 µg/ml, 15.0% at 250.0 µg/ml, 24.0% at 300.0 µg/ml), and in CHO cells at 375.0 µg/ml and higher (10.0% and 68.0% at 375.0 and 750 µg/ml, respectively). In the absence of S9 mix, it was

TABLE 3

## SUMMARY RESULTS OF CHROMOSOMAL ABERRATION TESTS IN THE CHL AND CHO TEST SYSTEMS

Chemical No.	CHL system				CHO system					
	Without S9 mix		With S9 mix		Without S9 mix		With S9 mix			
	Dose <sup>a</sup>		Result <sup>b</sup>		Dose		Result			
	( $\mu\text{g/ml}$ )	(mM)	24 h	48 h	( $\mu\text{E/ml}$ )	24 h <sup>c</sup>	( $\mu\text{g/ml}$ )	(time)	( $\mu\text{g/ml}$ )	(time) <sup>c</sup>
1	30.0	(0.15)	-	-	120.0	-	37.7	-(20 h)	70.2	+(20 h)
2	180.0	(0.91)	-	$\pm$	200.0	+	175.0	+(20 h)	375.0	+(20 h)
3	15.0	(0.075)	-	-	30.0	$\pm$	30.0	-(20 h)	30.0	-(12 h)
4	30.0	(0.13)	-	-	60.0	+w	40.0	-(20.5 h)	29.8	+(12 h)
5	90.0	(0.39)	$\pm$	$\pm$	250.0	+w	50.0	+w (20 h)	100.0	+(20 h)
6	60.0	(0.26)	-	-	60.0	+	75.0	-(20 h)	175.0	+(20 h)
7	3.0	(0.028)	+w	+	25.0	-	7.5	+(20 h)	2513.0	+(20 h)
8	15.0	(0.14)	$\pm$	+	125.0	+w	246.5	+(20 h)	5000.0	-(12 h)
9	250.0	(1.28)	+	+	1500.0	+	1000.0	+(17 h)	1600.0	-(13 h)
10	10.0	(0.073)	+	-	20.0	$\pm$	30.0	-(12.5 h)	160.0	-(15.5 h)
11	10.0	(0.061)	+	+	20.0	+w	50.0	+w (12.5 h)	50.0	+(13.5 h)
12	2.5	(0.015)	+w	-	10.0	-	16.0	+(12.5 h)	100.0	-(13.5 h)
13	2.0	(0.009)	$\pm$	-	4.0	-	5.0	-(12.5 h)	30.0	-(13.5 h)
14	1.8	(0.007)	+	+	15.0	-	30.0	-(12.5 h)	160.0	-(13 h)
15	500.0	(1.39)	+	+	1000.0	$\pm$	1600.0	-(12.5 h)	500.0	-(13 h)
16	30.0	(0.14)	-	-	15.6	-	29.9	-(10.5 h)	19.9	-(20 h)
17	30.0	(0.14)	-	-	60.0	+w	29.7	-(10.5 h)	29.7	-(12 h)
18	30.0	(0.13)	$\pm$	+w	31.3	$\pm$	49.8	-(10.5 h)	30.0	-(12 h)
19	30.0	(0.13)	+w	+	30.0	+w	2498.0	+w (20.5 h)	1320.0	$\pm$ (12 h)
20	500.0	(1.27)	-	-	500.0	-	4450.0	-(10.5 h)	4450.0	-(12 h)
21	62.5	(0.32)	-	-	62.5	+	87.5	-(10.5 h)	1530.0	-(12 h)
22	1.2	(0.004)	+	+	5.0	-	3.0	+(10.5 h)	10.0	+(12 h)
23	1000.0	(4.01)	$\pm$	$\pm$	250.0	+	1460.0	-(10.5 h)	2910.0	-(12 h)
24	8000.0	(36.35)	-	-	2000.0	+w	128.0	-(10.5 h)	128.0	-(12.5 h)
25	120.0	(0.28)	-	-	125.0	+	100.0	-(10.5 h)	300.0	-(12 h)

<sup>a</sup> The minimum effective dose for 'positive' results or the maximum tested dose for 'negative' and 'inconclusive' results.

<sup>b</sup> Overall evaluation: +, clearly positive; +w, weakly positive;  $\pm$ , inconclusive; -, negative.

<sup>c</sup> Harvest time.

positive only in CHO cells at more than 175.0  $\mu\text{g/ml}$  (7.0% and 6.5% at 175.0 and 250.0  $\mu\text{g/ml}$ , respectively). In CHL cells, it was negative at 24 h and inconclusive at the highest doses, 120 and 180.0  $\mu\text{g/ml}$  at 48 h.

No. 4 (2,3,4,5-tetrachlorophenol) was positive with S9 mix in both cell lines; in CHL cells effects were observed at 60.0  $\mu\text{g/ml}$  (12.0%) and at 120.0  $\mu\text{g/ml}$  (15.9%). In CHO cells, doses of 29.8  $\mu\text{g/ml}$  (5.5%), 45.2  $\mu\text{g/ml}$  (12.0%) and 60.3  $\mu\text{g/ml}$  (17.0%) were judged to be positive. Without S9 mix, it was negative in CHL and CHO cells, at doses up to 30.0  $\mu\text{g/ml}$  and 40.0  $\mu\text{g/ml}$ , respectively.

No. 5 (2,3,4,6-tetrachlorophenol) was positive

or weakly positive with S9 mix in both cell lines. In CHO cells, it was clearly positive at doses of 100.0  $\mu\text{g/ml}$  (20.5%) and 150.0  $\mu\text{g/ml}$  (74.0%). In CHL cells, the overall conclusion was weakly positive, because it was evaluated as positive only at a single dose, 250.0  $\mu\text{g/ml}$  (14.0%) and a dose-related effect was not found in 3 separate experiments. Without S9 mix, it was considered weakly positive (not because of a small effect but because aberrations were elevated only at the highest dose tested) in CHO cells with a significant effect only at 50.0  $\mu\text{g/ml}$  (6.0%) and a repeat test gave a positive effect only at 125.0  $\mu\text{g/ml}$  (64%). In CHL cells without S9 mix, it was inconclusive at doses up to 90.0  $\mu\text{g/ml}$ .

No. 6 (2,3,5,6-tetrachlorophenol) was positive with S9 mix, but negative without S9 mix, in both cell lines. With S9 mix, it was positive in CHL cells at more than 60.0  $\mu\text{g/ml}$  (11.0% at 60.0  $\mu\text{g/ml}$  and 60.5% at 120.0  $\mu\text{g/ml}$ ), and in CHO cells at 175.0  $\mu\text{g/ml}$  (28.0%) and at 262.5  $\mu\text{g/ml}$  (80.0%) (cytotoxic at 350.0  $\mu\text{g/ml}$ ). Without S9 mix, it was negative in CHL cells at doses up to 60.0  $\mu\text{g/ml}$ , as well as in CHO cells at doses up to 75.0  $\mu\text{g/ml}$  (cytotoxic at 112.0  $\mu\text{g/ml}$ ).

No. 7 (*o*-phenylenediamine) was positive without S9 mix in both cell lines; a positive response was observed in CHL cells at 3.0  $\mu\text{g/ml}$  (15.0% at 48 h) and at 6.0  $\mu\text{g/ml}$  (14.0% at 24 h and 32.0% at 48 h). It was judged to be positive in CHO cells at 7.5  $\mu\text{g/ml}$  (9.0%), 11.3  $\mu\text{g/ml}$  (19.0%) and 15.0  $\mu\text{g/ml}$  (23.0%). With S9 mix, the effect was reduced in CHO cells and positive results were obtained at relatively high doses, 2513  $\mu\text{g/ml}$  and 5000  $\mu\text{g/ml}$ . In CHL cells, it was negative up to 25.0  $\mu\text{g/ml}$ , though the control for the S9 mix (treated for 6 h without S9 mix) showed a positive response at 25.0  $\mu\text{g/ml}$ .

No. 8 (*m*-phenylenediamine) was positive without S9 mix in both cell lines: in CHL cells at 15.0  $\mu\text{g/ml}$  (16.0%) and 30.0  $\mu\text{g/ml}$  (21.0%) at 48 h, and in CHO cells at doses of 246.5, 502.5, and 747.0  $\mu\text{g/ml}$  (31.0%, 32.0% and 64.0%, respectively). With S9 mix, it was positive in CHL cells only at 125.0  $\mu\text{g/ml}$  (17.0%) (cytotoxic at 250.0  $\mu\text{g/ml}$ ), but negative in CHO cells at doses up to 5000  $\mu\text{g/ml}$ .

No. 9 (2,6-toluenediamine dihydrochloride) was clearly positive without S9 mix in both cell lines: in CHL cells at 250.0 (23.0%) and 500.0  $\mu\text{g/ml}$  (57.0%) at 48 h, and in CHO cells at 250.0 (8%), 500.0 (5%), 1000.0 (12.0%) and 1500.0  $\mu\text{g/ml}$  (29.0%). With S9 mix, it was also positive in CHL cells at high dose levels (28.0% at 1500.0  $\mu\text{g/ml}$ ), but in CHO cells it was negative at doses up to 1600.0  $\mu\text{g/ml}$  (cytotoxic at 3000.0  $\mu\text{g/ml}$ ).

No. 11 (*N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine) was positive or weakly positive without S9 mix in both cell lines. In CHL cells, it was clearly positive at doses above 10.0  $\mu\text{g/ml}$  (32.0% at 15.0  $\mu\text{g/ml}$  at 24 h). In CHO cells, it was only positive at the highest dose, 50.0  $\mu\text{g/ml}$  (6.5%), and was therefore considered weakly positive. With S9 mix, it was positive in CHL cells only at 20.0

$\mu\text{g/ml}$  (18.0%), and in CHO cells at 50.0 (5.5%) and 100.0  $\mu\text{g/ml}$  (20.0%), though no clear-cut dose response was seen in either cell line.

No. 12 (*N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine) was positive or weakly positive without S9 mix in both cell lines. In CHL cells, it was judged to be weakly positive, because it was positive only at 2.5  $\mu\text{g/ml}$  (24.0%) at 24 h and showed no dose response. In CHO cells, it was positive at 16.0 and 20.0  $\mu\text{g/ml}$ . With S9 mix, it was negative in both cell lines; in CHL cells it was tested at doses up to 10.0  $\mu\text{g/ml}$ , and in CHO cells at doses up to 100.0  $\mu\text{g/ml}$  (cytotoxic at 160.0  $\mu\text{g/ml}$ ). In CHL cells, it was positive in the cells treated for 6 h without S9 mix (24.7% at 10.0  $\mu\text{g/ml}$ ).

No. 19 (4,4'-dimethoxydiphenylamine) was positive without S9 mix in both cell lines. In CHL cells, it was clearly positive at 30.0  $\mu\text{g/ml}$  (12.0% at 24 h and 31.0% at 48 h) (cytotoxic at 60.0  $\mu\text{g/ml}$ ). In CHO cells, it was positive only at the relatively high dose of 2498.0  $\mu\text{g/ml}$  (7.5%). With S9 mix, it was positive in CHL cells at 30.0  $\mu\text{g/ml}$  (21.0%). In CHO cells, the lowest dose tested (132.0  $\mu\text{g/ml}$ ) gave a positive effect, and in repeated tests single doses gave positive results; however, the results are considered inconclusive, because of lack of both reproducibility and a dose-related effect. In CHL cells, a slight increase in the frequency of polyploid cells was noted in cells treated for 6 h without S9 mix (12.0% at 30.0  $\mu\text{g/ml}$ ), and this was the only case of increased polyploid cells in the present study.

No. 22 (tris(2,3-epoxypropyl)isocyanurate) was clearly positive without S9 mix in both cell lines; in CHL cells at more than 1.2  $\mu\text{g/ml}$  (74.0% at 24 h and 92.0% at 48 h) (no mitosis was observed at 2.5  $\mu\text{g/ml}$  and 5.0  $\mu\text{g/ml}$  at 48 h), and in CHO cells it was positive at 3.0–30.0  $\mu\text{g/ml}$  (30.0–87.0%) (cytotoxic at 50.0  $\mu\text{g/ml}$ ). An additional experiment in CHO cells showed 100.0% of cells with aberrations at 19.0  $\mu\text{g/ml}$ . With S9 mix, it was negative in CHL cells at doses up to 5.0  $\mu\text{g/ml}$ , although it was positive in the cells treated for 6 h without S9 mix (48.0% at 1.2  $\mu\text{g/ml}$ ). In CHO cells, the effect was slightly reduced in the test using S9 mix, but still positive at the dose range of 10.0–100.0  $\mu\text{g/ml}$ .

No. 3 (3,4,5-trichlorophenol) was negative without S9 mix in both cell lines: in CHL cells at

doses up to 15.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and in CHO cells at doses up to 30.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . With S9 mix, it was inconclusive in CHL cells at 30.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; only gaps and breaks were increased. In CHO cells, it was negative at doses up to 30.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  with S9 mix.

No. 13 (*N,N'*-di-*sec.*-butyl-*p*-phenylenediamine) was negative with S9 mix in both cell lines: in CHL cells at doses up to 4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , and in CHO cells at doses up to 30.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Without S9 mix, it was inconclusive in CHL cells at 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  at 24 h, and negative in CHO cells at doses up to 5.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

No. 20 (4,4'-dioctyldiphenylamine) was negative with and without S9 mix in both cell lines. In CHL cells, it was negative at doses up to 500.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  both without and with S9 mix. In CHO cells, it was negative even at the relatively high dose of 4450.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  both without and with S9 mix (precipitation of the chemical was noted at 4450.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  without S9 mix and at 1340.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  with S9 mix).

The remaining 10 chemicals gave qualitatively different results in the 2 test systems: 1 chemical was positive only in the CHO system, while 9 were positive only in the CHL system. These differences are as follows.

No. 1 (2,3,4-trichlorophenol) was positive only in CHO cells in the presence of S9 mix. A dose-related increase in the frequency of aberrant cells was observed over a dose range of 49.8–70.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Negative results were obtained in the CHL system with doses up to 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$  with S9 mix. The difference in results is most easily attributable to the activity of the S9 fraction used in the CHO system; a higher concentration of the test chemical and a longer treatment time were employed in the CHL test.

No. 10 (*N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine) was positive only in CHL cells in the absence of S9 mix. Positive results were obtained at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  using 24-h exposure and at 10 and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  following 6-h exposure. In all cases the frequency of aberrant cells was about 20%. Exposure of CHO cells for 12.5 h to doses of 5, 10 and 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gave a weak effect at 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in one test, but the effect could not be reproduced. Because an effect was observed in CHL cells following both 6-h and 24-h exposures, it is possible that the difference in effects between the 2 systems is

attributable to a difference in the sensitivities of the 2 cell lines to this chemical. However, if harvest of CHO cells had been delayed to 18 or 24 h, an effect might have been observed.

No. 14 (*N,N'*-diphenyl-*p*-phenylenediamine) was positive only in CHL cells without S9 mix. Effects were observed at doses below 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  following 24- and 48-h treatments. As an aromatic amine, this chemical should require metabolic activation for activity. It is possible that the inherent metabolic capacity of CHL cells activates the compound when there is sufficient exposure time. It is unexpected, however, that aromatic amines, compounds generally requiring metabolic activation for mutagenic activity, are positive in CHL cells in the absence of S9 mix (see also chemicals No. 10 and No. 15). Tests in CHO cells using extended exposure times should be conducted to determine if an effect similar to that in CHL cells is observed.

No. 15 (*N,N'*-di-2-naphthyl-*p*-phenylenediamine) produced results similar to those of chemical No. 14, although the effective doses were higher for chemical No. 15 (500–1500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

No. 17 (*N*-phenyl-2-naphthylamine) gave a positive result in CHL cells only with S9 mix. There was no evidence of a dose-effect relationship in repeat experiments and the effect was judged to be weakly positive. In CHO cells, elevated aberration frequencies were observed in tests with S9 mix but the solvent control value was higher than normal and the treatment effects were not sufficiently high to give a positive result. This compound appears to be a weak clastogen requiring metabolic activation and a longer exposure time or later harvest time, or higher S9 concentration than that used in the CHO test protocol.

No. 18 (*p*-isopropoxydiphenylamine) gave a weakly positive effect in CHL cells without S9 mix and an inconclusive result with S9 mix. It was judged to be negative in CHO cells even though one test with S9 mix gave 17.5% aberrant cells at a dose of 20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; the result was not reproducible. An explanation for these conflicting results is not readily obvious. It could be concluded that chemical No. 18 possesses weak clastogenic activity, but that its effect is not easily detectable using the test systems employed in this study.

No. 21 (*N*-nitrosodiphenylamine) was positive

only in CHL cells with S9 mix and at lower doses than those used in the CHO tests. As with chemical No. 17, the clastogenic activity may only be evident following longer treatment times and/or later harvest times (with S9 mix) than used in the CHO system.

No. 23 (triallyl isocyanurate) was negative in CHO cells both with and without S9 mix while giving a clear positive result in CHL cells with S9 mix; dose ranges were similar in the 2 test systems. As discussed above, the difference in results may be due to the difference in treatment or harvest times.

No. 24 (chromium carbonyl) was negative in CHL and CHO cells without S9 mix. With S9 mix, it was weakly positive only in CHL cells at relatively high dose levels (2000.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). In the CHO test where much lower doses were used (75.0–128.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), results were negative.

No. 25 (1-(1,2-dibromoethyl)-3,4-dibromocyclohexane) was positive only in CHL cells in the presence of S9 mix; it induced a dose-related increase in the frequency of aberrant cells with doses of 62.5, 125.0 and 250.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . A similar dose range (30.0–300.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gave no evidence of an effect in CHO cells. The simplest explanation for this difference in results is the longer treatment time used in CHL cells where exposure to the test chemical and S9 mix is 6 h as opposed to 2 h in the CHO system. It is also possible that the higher concentration of S9 fraction in the final reaction mixture (5% in CHL, 1.5% in CHO) and/or later harvest time (18 h in CHL, 10 h in CHO) may have contributed to the different results.

Of the 10 differences in qualitative results discussed above, 5 are positive in CHL cells only in the presence of S9 mix (Nos. 17, 21, 23, 24, 25). Fig. 2 shows the results of testing triallyl isocyanurate (No. 23) with S9 mix using the CHO cells in the CHL protocol. It should be noted that the CHO cells used in these tests were obtained from the ATCC and were not the same cells used by the NTP. It can be seen that positive results are obtained in CHO cells when they are exposed to chemical No. 23 for 6 h in the presence of S9 mix and harvested at 18 h. The dose effect is very similar to that seen with CHL cells using the same protocol. Thus, it appears that some test chemicals

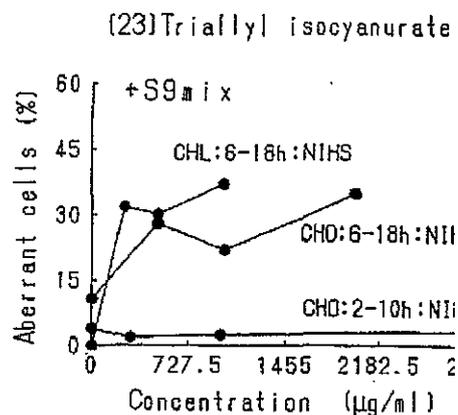


Fig. 2. Results of chromosomal aberration tests of isocyanurate (No. 23) in the presence of S9 mix. CHO cells were exposed for 6 h and grown in fresh medium before harvesting (performed at NIHS). CHO cells exposed for 2 h and grown in fresh medium for 10 h harvesting (performed at BSC). An additional test was run at NIHS using CHO cells (obtained from ATCC according to the CHL protocol (6-h exposure time recovery time).

only induce an increase in aberrations when treatment and harvest times are longer than those used in the standard CHO protocol. It is assumed that this results from the rate at which the test agent is metabolized to its genotoxic form and/or the time required for an adequate concentration of the active form to reach the chromosomes.

There are 4 cases where the only positive results come from an effect in CHL cells in the presence of S9 mix (Nos. 10, 14, 15, 18). In all 4 cases the test chemicals are aromatic amines which are known to require metabolic activation for their mutagenic activity. Fig. 3 gives results of *N*-phenyl-*p*-phenylenediamine (No. 14) using the CHL protocol with CHO cells. Where chemical No. 14 gave negative results in the standard CHO test (12.5-h exposure), results from tests conducted at NIHS were positive following 24-h exposure using the same doses. As this phenylenediamine was negative in both test systems in the presence of S9 mix, the exogenous metabolic activation systems used are apparently not adequate for the induction of chromosomal aberrations. A possible explanation for this is that the chemical is not activated by S9 mix or is activated but is rapidly detoxified such that the active form

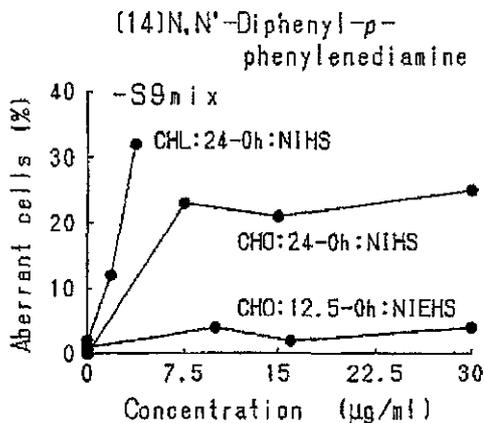


Fig. 3. Results of chromosomal aberration tests on *N,N'*-diphenyl-*p*-phenylenediamine (No. 14) in the absence of S9 mix. CHL cells were exposed for 24 h before harvesting (performed at NIHS). CHO cells were exposed for 12.5 h before harvesting (performed at EHRT). An additional test was carried out at NIHS using CHO cells (obtained from ATCC, U.S.A.) according to the CHL protocol (24-h exposure time).

not reach the cell nucleus. Given sufficient exposure time, the inherent metabolizing capacity of CHL and CHO cells may be sufficient to result in activation of the compound to a clastogen.

A similar phenomenon (a positive effect in CHO cells following long-term exposure in the absence of S9) was observed with *N,N'*-di-2-naphthyl-*p*-phenylenediamine (chemical No. 15) as seen in Fig. 4. In this case, the effect seen in CHO cells using the CHL protocol was apparent only at higher doses than used in CHL cells and did not reach the level of effect seen in CHL cells. This could indicate that CHL cells have a higher metabolic capacity than CHO cells for certain aromatic amines.

In 3 cases (Nos. 1, 7, 22), the test chemical was positive in CHO cells with S9 mix and negative in CHL cells with S9 mix. For chemicals No. 7 and No. 22, the doses used in CHL cells were lower than those used in CHO cells. This may be the reason for the difference in results. A 2-h treatment in the CHL system might allow the use of higher doses and may reveal activity in the presence of S9 mix. However, because these 2 chemicals were positive in both test systems in the absence of S9, the differences in results with S9 mix might be considered relatively unimportant.

Chemical No. 1 (2,3,4-trichlorophenol) was active only in CHO cells and only with S9 mix. The effect was dose-related and reproducible and represents the single case in which a clear positive result was observed only in CHO cells. The conditions used in the 2 systems were similar and, in fact, the highest doses used in CHL cells were somewhat higher than those used in CHO cells. In this case, the composition of the S9 mix, its concentration in the medium or the length of treatment of CHO cells may not have been appropriate to elicit a response.

In chemical No. 1, the positive result was obtained in the CHO system using a harvest time of 18 h. On the other hand, 7 test chemicals (Nos. 9, 17, 21, 23, 24, 25), in which the CHL system had positive or weakly positive results without S9 mix, showed negative results in the CHO system using a harvesting time of only about 10 h. These findings suggest that the differences in harvest times contribute to the different results between the 2 test systems.

Among the test chemicals showing qualitatively similar results in both test systems, some chemicals showed quantitative differences in the results. For example, in the absence of S9 mix, chemical No. 19 (4,4'-dimethoxydiphenylamine) was w

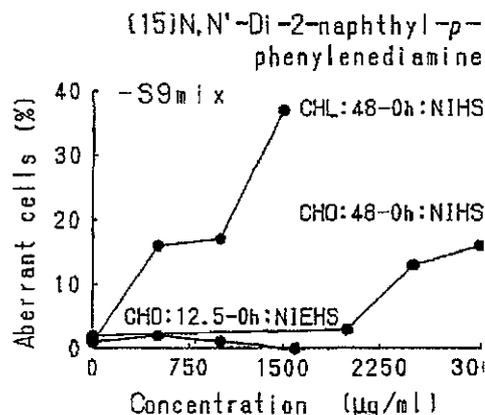


Fig. 4. Results of chromosomal aberration tests on *N,N'*-di-2-naphthyl-*p*-phenylenediamine (No. 15) in the absence of S9 mix. CHL cells were exposed for 48 h before harvesting (performed at NIHS). CHO cells were exposed for 12.5 h before harvesting (performed at EHRT). An additional test was carried out at NIHS using CHO cells (obtained from ATCC, U.S.A.) according to the CHL protocol (48-h exposure time).

TABLE 4  
COMPARISON <sup>a</sup> OF THE RESULTS BETWEEN THE CHL AND CHO TEST SYSTEMS

	CHL	+	+	+w	±	-	Sub-	+	+w	+w	±	±	-	Sub-	Total
	CHO	+	+w	+	-	-	total	-	-	±	+	+w	+	total	
-S9 mix	Chemical	22					24 25								
	No.	9					20 21	15							
		8	19		23	4 6		14							
		7	11	12	13	1 3		10	18	0	2	5			
	No. of chemicals	4	2	1	2	10	19 (76%)	3	1	0	1	1	0	6 (24%)	25
+S9 mix	Chemical						20								
	No.			11	18	16		25							
		6		5	10	14		23	24				22		
		2		4	3	12		21	17				7		
	No. of chemicals	2	0	3	4	5	14 (56%)	4	3	1	0	0	3	11 (44%)	25

<sup>a</sup> For overall comparison, +w is classified as a positive response, and ± as a negative response.

positive at 24 h and clearly positive at 48 h in CHL cells, and was weakly positive at 20.5 h in CHO cells. However, the concentration of the chemical required to induce chromosomal aberrations was about 80 times higher in CHO cells than in CHL cells. In this case, it appears that the quantitative differences in the results might be related to a difference in the characteristics of the 2 cell lines rather than to protocol differences.

A comparison of results for all chemicals, with and without metabolic activation, is given in Table 4. For tests conducted in the absence of S9 mix, results are in agreement on 19 (76%) of the test chemicals, perhaps a surprisingly high number considering the difference in cell lines and the rather extreme differences in test protocols.

In the presence of S9 mix, agreement was lower; similar results were obtained with only 14 (56%) of the test chemicals. Considering the variability of S9 preparations and the differences in treatment protocols with S9 mix, the level of disagreement between the 2 test systems was not unexpected. Additional tests are being conducted to determine the extent to which similar results are obtained when the same protocol is used in both CHL and CHO cells.

Table 5 presents a more condensed comparison of test results. It is clear that the CHL system gave a much higher frequency of positive results than did the CHO cells with these same 25 chemicals. In CHL cells 20 chemicals (80%) were positive or weakly positive and only 5 gave negative or inconclusive results. In contrast, the CHO system gave positive or weakly positive results with only 12 chemicals (48%) and negative results were produced by 13 chemicals.

Thus, the overall conclusion of this study is that the CHL system detects a higher proportion of chemicals tested as positive than does the CHO test system. Although there may be a difference in the sensitivities of the 2 cell lines to induction of chromosomal aberrations, the results presented in

TABLE 5

OVERALL RESULTS OF CHROMOSOMAL ABERRATION TESTS IN THE CHL AND CHO TEST SYSTEMS

Test result	+	+w	±	-
Cell system				
CHL	14 (56%) <sup>a</sup>	6 (24%)	2 (8%)	3 (12%)
CHO	11 (44%)	1 (4%)	0	13 (52%)

<sup>a</sup> Number of chemicals (% of chemicals).

this paper suggest that many of the differences could be due to protocol differences and that the most likely protocol differences to effect a difference in results are the length of time that cells are treated with the test chemical and the harvest time. Additional studies are being conducted to elucidate the bases for the different responses.

The most appropriate cell line and protocol for use in screening chemicals for effects will be determined by the purpose of conducting the test and the value of the test in predicting the health concern of interest.

#### Acknowledgements

The authors are indebted to Miss. M. Hatanaka and Mrs. Y. Matsuda for their excellent assistance in conducting the studies at the Division of Genetics and Mutagenesis, NIHS, Tokyo and to the following investigators and their staffs for conducting tests for the NTP: Dr. Sheila Galloway, Litton Bionetics, Kensington, MD; Dr. James Ivett, Hazleton Laboratories, Kensington, MD; Dr. Dushyant Gulati, Environmental Health Research and Testing, Inc., Lexington, KY; and Dr. Kenneth Loveday, Bioassay Systems Corp., Woburn, MA.

Special thanks are extended to Beth Anderson for her thorough reading and criticism of this manuscript and her many helpful suggestions.

## Appendix

## Chromosomal aberration data and results

[1] 2,3,4-TRICHLOROPHENOL (15950-66-0) M.W.: 197.45

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	2.0			
		7.5	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-		
		15.0	100	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	-
		30.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
-	48-0	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0			
		7.5	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	2.0	-		
		15.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		30.0	100	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	-		
-	6-18	DMSO	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0			
		60.0	100	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-		
		90.0	100	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	1.0	3.0	-	-	
		120.0	100	0.0	0.0	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-		
+	6-18	DMSO	100	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0			
		60.0	100	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-		
		90.0	100	1.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	-	
		120.0	100	0.0	0.0	2.0	3.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-		

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-12	Medium	200	0.01	1.0	0.01	0.5	0.02	1.5		
		DMSO	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	
		11.3	200	0.01	0.5	0.01	1.0	0.02	2.0	-	
		15.1	200	0.02	2.0	0.01	0.5	0.03	2.5	+	-
		37.7	200	0.00	0.0	0.01	0.5	0.01	0.5	-	
		75.4	0							TOX	
+	2-18	Medium	100	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0		
		DMSO	100	0.03	3.0	0.00	0.0	0.03	3.0		
		49.8	100	0.08	5.0	0.01	1.0	0.09	5.0	-	
		60.0	100	0.12	7.0	0.03	2.0	0.25	10.0	-	+
		70.2	25	0.32	28.0	0.36	28.0	0.68	44.0	+	
		80.0	0							TOX	

[2] 2,3,6-TRICHLOROPHENOL (933-75-5) M.W.: 197.45

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		60.0	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
		120.0	100	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	-
		180.0	100	0.0	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	
-	48-0	DMSO	100	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	1.0		
		60.0	100	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
		120.0	100	0.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	±	±
-	6-18	DMSO	100	2.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
		200.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	-	
		250.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		300.0	100	4.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
+	6-18	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		200.0	100	1.0	4.0	1.0	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.0	+	
		250.0	100	0.0	3.0	5.0	7.0	0.0	1.0	0.0	0.0	15.0	+	+
		300.0	100	1.0	7.0	17.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	24.0	+	

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-12	Medium	200	0.04	2.0	0.00	0.0	0.04	2.0		
		DMSO	200	0.01	1.0	0.01	0.5	0.02	1.5		
		124.0	200	0.04	3.5	0.01	0.5	0.05	4.0	-	
		175.0	200	0.08	7.0	0.00	0.0	0.08	7.0	+	+
+	2-18	250.0	200	0.07	6.0	0.01	0.5	0.08	6.5	+	
		Medium	200	0.03	2.0	0.00	0.0	0.03	2.0		
		DMSO	200	0.01	0.5	0.01	1.0	0.02	1.5		
		150.0	200	0.01	0.5	0.01	1.0	0.02	1.5	-	
		375.0	200	0.14	8.0	0.08	4.5	0.22	10.0	+	+
		750.0	25	0.52	48.0	0.04	4.0	2.56	68.0	+	
		1125.0	0							TOX	

## [3] 3,4,5-TRICHLOROPHENOL (609-19-8) M.W.: 197.45

## CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation	
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		3.7	100	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
		7.5	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		15.0	100	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
-	48-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		3.7	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
		7.5	100	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		15.0	100	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
-	6-18	DMSO	100	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
		15.0	100	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-		
		30.0	100	2.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	-	±	
		60.0	100	0.0	4.0	1.0	0.0	0.0	0.0	5.0	±		
+	6-18	DMSO	100	0.0	3.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0		
		15.0	100	0.0	1.0	2.0	1.0	0.0	0.0	3.0	-		
		30.0	100	1.0	4.0	3.0	0.0	0.0	0.0	6.0	±	±	
		60.0	0								TOX		

## CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-12	Medium	200	0.01	1.0	0.01	1.0	0.02	2.0		
		DMSO	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0		
		15.0	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	
		22.4	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5	-	-
		30.0	200	0.02	1.5	0.00	0.0	0.02	1.5	-	
		40.0	0							TOX	
+	2-10	Medium	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5		
		DMSO	200	0.01	1.0	0.01	0.5	0.02	1.5		
		15.0	200	0.01	0.5	0.01	0.5	0.01	1.0	-	
		22.4	200	0.02	1.5	0.01	1.0	> 0.08	3.0	-	-
		30.0	200	0.01	0.5	0.01	0.5	0.02	1.0	-	
		40.0	0							TOX	

[4] 2,3,4,5-TETRACHLOROPHENOL (4901-51-3) M.W.: 231.88

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation	
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	2.0		
		7.5	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
		15.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		30.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	-	
-	48-0	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		7.5	100	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
		15.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		30.0	100	0.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-	
-	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
		30.0	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	1.0	-	
		60.0	100	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	2.0	-	-
		120.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
+	6-18	DMSO	100	4.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
		30.0	100	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
		60.0	100	3.0	3.0	1.0	9.0	0.0	0.0	0.0	12.0	+	+w
		120.0	63	1.6	3.2	6.3	17.9	0.0	0.0	0.0	15.9	+	

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-12.5	Medium	200	0.06	4.0	0.03	2.0	0.08	6.0		
		DMSO	200	0.03	2.5	0.01	1.0	0.04	3.5		
		20.0	200	0.02	2.0	0.01	0.5	0.03	2.5	-	
		30.0	200	0.01	0.5	0.01	0.5	0.01	1.0	-	-
		40.0	200	0.05	4.5	0.00	0.0	0.05	4.5	-	
+	2-10	Medium	200	0.00	0.0	0.03	3.0	0.03	3.0		
		DMSO	200	0.01	0.5	0.01	0.5	0.01	1.0		
		29.8	200	0.02	2.0	0.04	3.5	0.06	5.5	+	
		45.2	200	0.07	5.5	0.08	7.5	0.15	12.0	+	+
		60.3	200	0.07	14.0	0.07	6.0	0.24	17.0	+	

## [5] 2,3,4,6-TETRACHLOROPHENOL (58-90-2) M.W.: 231.88

## CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	±
		30.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		60.0	100	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.0		
		90.0	68	0.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0		
-	48-0	DMSO	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	±
		30.0	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		60.0	100	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0		
		90.0	100	1.0	2.0	5.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	8.0		
-	6-18	DMSO	100	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	-
		62.5	100	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
		125.0	100	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0		
		250.0	100	1.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
+	6-18	DMSO	100	0.0	2.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-	+w
		62.5	100	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
		125.0	100	0.0	2.0	3.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0		
		250.0	100	0.0	4.0	2.0	9.0	0.0	0.0	0.0	0.0	14.0		

## CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-12	Medium	200	0.00	0.0	0.01	0.5	0.01	1.0	-	+w
		DMSO	200	0.01	0.5	0.01	0.5	0.02	1.0		
		25.0	200	0.03	2.5	0.00	0.0	0.03	2.5		
		37.5	200	0.02	1.5	0.00	0.0	0.02	1.5		
		50.0	200	0.05	4.5	0.02	1.5	0.07	6.0		
+	2-18	Medium	200	0.01	0.5	0.01	1.0	0.02	1.5	+	+
		DMSO	200	0.01	0.5	0.02	1.5	0.02	2.0		
		100.0	200	0.19	14.5	0.16	10.5	0.35	20.5		
		150.0	200	0.81	71.0	0.04	3.5	0.94	74.0		
		200.0	0								

[6] 2,3,5,6-TETRACHLOROPHENOL (935-95-5) M.W.: 231.88

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		15.0	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
		30.0	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	-
		60.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
-	48-0	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		15.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
		30.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		60.0	100	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
-	6-18	DMSO	100	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0		
		30.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
		60.0	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	-
		120.0	100	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
+	6-18	DMSO	100	0.0	2.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0		
		30.0	100	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	
		60.0	100	3.0	5.0	6.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.0	+	+
		120.0	76	1.3	14.5	43.4	21.1	0.0	0.0	0.0	0.0	60.5	+	

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-12	Medium	200	0.01	1.0	0.02	1.5	0.03	2.5		
		DMSO	200	0.02	2.0	0.01	1.0	0.03	3.0		
		14.8	200	0.01	0.5	0.01	1.0	0.02	1.5	-	
		37.3	200	0.04	3.0	0.01	0.5	0.05	3.5	-	
		75.0	71	0.07	5.6	0.00	0.0	0.07	5.6	-	-
		112.0	0							TOX	
+	2-18	Medium	200	0.01	1.0	0.01	1.0	0.02	2.0		
		DMSO	200	0.01	1.0	0.01	1.0	0.02	1.5		
		86.8	200	0.03	2.5	0.01	0.5	0.03	3.0	-	
		175.0	25	0.48	16.0	0.20	12.0	1.08	28.0	+	
		262.5	10	0.70	30.0	0.20	10.0	5.90	80.0	+	+
		350.0	0							TOX	

[7] *o*-PHENYLENEDIAMINE (95-54-5) M.W.: 108.15

## CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		1.5	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
		3.0	100	0.0	0.0	0.0	5.0	6.0	0.0	0.0	0.0	9.0	±	+w
		6.0	100	0.0	0.0	3.0	6.0	8.0	0.0	0.0	0.0	14.0	+	
-	48-0	DMSO	100	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		1.5	100	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
		3.0	100	0.0	5.0	6.0	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.0	+	+
		6.0	100	0.0	2.0	19.0	18.0	0.0	0.0	0.0	0.0	32.0	+	
-	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		6.2	100	1.0	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-	
		12.5	100	0.0	0.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-	+w
		25.0	100	0.0	2.0	5.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	+	
+	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		6.2	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
		12.5	100	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	-
		25.0	100	0.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-	

## CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-12	Medium	200	0.02	1.5	0.01	0.5	0.02	2.0		
		DMSO	200	0.02	1.0	0.00	0.0	0.02	1.0		
		7.5	200	0.10	6.0	0.03	3.0	0.23	9.0	+	
		11.3	200	0.21	16.0	0.07	4.5	0.38	19.0	+	+
		15.0	100	0.27	16.0	0.05	5.0	0.52	23.0	+	
+	2-18	Medium	200	0.02	1.5	0.01	0.5	0.02	2.0		
		DMSO	200	0.02	1.5	0.01	1.0	0.03	2.5		
		2513.0	200	0.11	9.5	0.03	2.5	0.39	13.0	+	
		3750.0	200	0.05	4.5	0.01	0.5	0.15	6.0	-	+
		5000.0	200	0.09	6.5	0.02	1.0	0.36	9.5	+	

[8] *m*-PHENYLENEDIAMINE (108-45-2) M.W.: 108.15

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	± ± TOX	±
		15.0	100	0.0	2.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0		
		30.0	100	1.0	0.0	1.0	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0		
		60.0	0											
-	48-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	+ + TOX	+
		15.0	100	0.0	0.0	6.0	11.0	0.0	0.0	0.0	1.0	16.0		
		30.0	100	0.0	4.0	8.0	15.0	0.0	0.0	0.0	0.0	21.0		
		60.0	0											
-	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	- - ±	±
		62.5	100	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
		125.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		250.0	92	1.1	2.2	1.1	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	5.4		
+	6-18	DMSO	100	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	± + TOX	+ <sup>w</sup>
		62.5	100	0.0	2.0	5.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0		
		125.0	100	0.0	0.0	12.0	9.0	0.0	0.0	0.0	0.0	17.0		
		250.0	0											

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-12	Medium	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5	+ + + TOX	+
		DMSO	200	0.02	1.5	0.01	0.5	0.02	1.5		
		246.5	100	0.46	28.0	0.09	5.0	> 0.75	31.0		
		502.5	100	0.43	24.0	0.12	11.0	> 0.85	32.0		
		747.0	25	0.96	52.0	0.24	12.0	> 2.00	64.0		
+	2-10	Medium	200	0.03	2.5	0.00	0.0	0.03	2.5	- - - -	-
		DMSO	200	0.02	1.5	0.01	1.0	0.03	2.5		
		2513.0	200	0.04	2.5	0.03	2.5	0.07	4.5		
		3750.0	200	0.03	2.0	0.01	1.0	0.04	2.5		
		5000.0	200	0.04	3.0	0.04	3.5	0.08	6.0		

## [9] 2,6-TOLUENEDIAMINE DIHYDROCHLORIDE (15481-70-6) M.W.: 195.11

## .CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation	
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall
-	24-0	Saline	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0		
		125.0	100	0.0	1.0	4.0	5.0	0.0	1.0	0.0	10.0	+	
		250.0	100	0.0	1.0	5.0	4.0	0.0	1.0	0.0	9.0	±	+
		500.0	100	0.0	4.0	3.0	14.0	0.0	0.0	0.0	19.0	+	
-	48-0	Saline	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		125.0	100	1.0	0.0	1.0	4.0	0.0	1.0	1.0	7.0	±	
		250.0	100	0.0	2.0	7.0	17.0	0.0	2.0	0.0	23.0	+	+
		500.0	100	0.0	2.0	14.0	47.0	0.0	0.0	0.0	57.0	+	
-	6-18	Saline	100	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		500.0	100	0.0	3.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	6.0	±	
		1000.0	100	1.0	1.0	1.0	8.0	0.0	0.0	0.0	9.0	±	+w
		1500.0	100	0.0	2.0	2.0	6.0	0.0	1.0	0.0	10.0	+	
+	6-18	Saline	100	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		500.0	100	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	
		1000.0	100	0.0	2.0	0.0	7.0	0.0	0.0	0.0	9.0	±	+
		1500.0	100	0.0	7.0	12.0	20.0	0.0	1.0	0.0	28.0	+	

## CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	14.5-2.5	Medium	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5		
		250.0	200	0.08	7.5	0.00	0.0	0.08	7.5	+	
		500.0	200	0.05	4.5	0.01	0.5	0.05	5.0	+	
		1000.0	200	0.13	9.5	0.05	4.0	0.18	12.0	+	+
		1500.0	104	0.44	26.0	0.04	3.8	0.48	28.8	+	
+	2-11	Medium	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5		
		500.0	200	0.01	1.0	0.01	0.5	0.02	1.5	-	
		1000.0	200	0.04	2.5	0.00	0.0	0.04	2.5	-	
		1600.0	200	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0	-	
		3000.0	0							TOX	

[10] *N,N*-DIMETHYL-*p*-PHENYLENEDIAMINE (99-98-9) M.W.: 136.20

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	ctc	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		2.5	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
		5.0	100	0.0	0.0	2.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	±	+
		10.0	98	1.0	3.1	13.3	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	21.4	+	
-	48-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		2.5	100	2.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	-	-
		5.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		10.0	100	1.0	1.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-	
-	6-18	DMSO	100	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		5.0	100	3.0	0.0	1.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-	
		10.0	100	1.0	2.0	11.0	9.0	0.0	0.0	0.0	0.0	17.0	+	+
		20.0	100	3.0	6.0	10.0	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	19.0	+	
+	6-18	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		5.0	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
		10.0	100	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	±
		20.0	100	1.0	0.0	1.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	±	

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	10-2.5	DMSO	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5		
		5.0	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	
		10.0	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5	-	-
		30.0	155	0.05	3.9	0.01	0.6	0.05	4.5	+	
+	2-11.5	DMSO	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5		
		50.0	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	
		100.0	200	0.01	1.0	0.01	0.5	0.02	1.5	-	-
		160.0	200	0.02	1.5	0.00	0.0	0.02	1.5	-	

[11] *N,N,N',N'*-TETRAMETHYL-*p*-PHENYLENEDIAMINE (100-22-1) M.W.: 164.24

## CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		5.0	100	1.0	1.0	2.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	±	
		10.0	100	0.0	5.0	13.0	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.0	+	+
		15.0	100	1.0	15.0	25.0	16.0	0.0	0.0	0.0	0.0	32.0	+	
-	48-0	DMSO	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		5.0	100	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	-	
		10.0	100	1.0	3.0	7.0	8.0	0.0	0.0	1.0	1.0	16.0	+	+
		15.0	100	0.0	3.0	10.0	13.0	0.0	0.0	0.0	0.0	22.0	+	
-	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0		
		10.0	100	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
		20.0	100	0.0	3.0	2.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0	±	+w
		30.0	100	0.0	3.0	1.0	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.0	+	
+	6-18	DMSO	100	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		10.0	100	1.0	2.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	
		20.0	100	1.0	5.0	10.0	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.0	+	+w
		30.0	100	2.0	1.0	3.0	7.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0	±	

## CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	10-2.5	DMSO	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5		
		16.0	200	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0	-	
		30.0	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	+w
		50.0	200	0.08	6.0	0.01	0.5	0.09	6.5	+	
+	2-11.5	DMSO	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5		
		30.0	200	0.02	1.5	0.02	1.0	0.03	2.5	-	
		50.0	200	0.04	2.5	0.06	3.5	0.10	5.5	+	+
		100.0	200	0.15	10.5	0.20	12.0	0.36	20.0	+	

[12] *N,N*-DIETHYL-*p*-PHENYLENEDIAMINE (93-05-0) M.W.: 164.28

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation				
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall			
-	24-0	DMSO	100	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-			
		0.6	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0				
		1.2	100	0.0	0.0	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0			-	+w
		2.5	100	0.0	9.0	19.0	12.0	1.0	0.0	0.0	0.0	24.0			+	
-	48-0	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-			
		0.6	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0				
		1.2	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0			-	-
		2.5	100	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	3.0			-	
-	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-			
		2.5	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0				
		5.0	100	0.0	2.0	8.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0			+	+
		10.0	93	2.2	1.1	15.1	16.1	0.0	0.0	0.0	0.0	24.7			+	
+	6-18	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-			
		2.5	100	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.0				
		5.0	100	0.0	2.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0			-	-
		10.0	100	0.0	3.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0			-	

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation		
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall	
-	10-2.5	DMSO	200	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0	-		
		10.0	200	0.03	2.5	0.02	2.0	0.05	4.5			
		16.0	200	0.01	1.0	0.18	15.5	0.19	16.5			+
		20.0	200	0.08	6.0	0.00	0.0	0.08	6.0			+
+	2-11.5	DMSO	200	0.02	1.5	0.00	0.0	0.02	1.5	-		
		30.0	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0			
		50.0	200	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0			
		100.0	200	0.01	0.5	0.01	0.5	0.01	1.0			
		160.0	0									TOX

[13] *N,N'*-DI-*sec.*-BUTYL-*p*-PHENYLENEDIAMINE (101-96-2) M.W.: 220.40

## CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	±
		0.5	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		1.0	100	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0		
		2.0	100	2.0	1.0	1.0	5.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0		
-	48-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		0.5	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0		
		1.0	100	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		2.0	100	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0		
-	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	±
		1.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		2.0	100	0.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	4.0	0.0		
		4.0	100	1.0	5.0	0.0	2.0	0.0	0.0	1.0	8.0	0.0		
+	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	-
		1.0	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		2.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		4.0	100	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0		

## CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	10-2.5	DMSO	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5	-	-
		1.0	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0		
		1.6	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0		
		3.0	200	0.01	0.5	0.01	0.5	0.01	1.0		
		5.0	50	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0		
+	2-11.5	DMSO	200	0.02	1.5	0.00	0.0	0.02	1.5	-	-
		5.0	200	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0		
		10.0	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5		
		16.0	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5		
		30.0	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0		
		50.0	0								

[14] *N,N'*-DIPHENYL-*p*-PHENYLENEDIAMINE (74-31-7) M.W.: 260.34

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
		1.8	100	0.0	0.0	9.0	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.0	+	
		3.7	100	0.0	5.0	17.0	22.0	0.0	0.0	0.0	0.0	32.0	+	+
		7.5	0										TOX	
-	48-0	DMSO	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		1.8	100	2.0	3.0	10.0	23.0	0.0	0.0	0.0	0.0	27.0	+	
		3.7	100	1.0	5.0	30.0	63.0	0.0	0.0	0.0	0.0	68.0	+	+
		7.5	0										TOX	
-	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		3.7	100	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	
		7.5	100	0.0	0.0	1.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0	±	±
		15.0	100	0.0	2.0	1.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	±	
+	6-18	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		3.7	100	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
		7.5	100	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.0	-	-
		15.0	100	2.0	2.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	10-2.5	DMSO	200	0.01	1.0	0.01	1.0	0.01	1.0		
		10.0	200	0.03	3.0	0.01	1.0	0.04	4.0	-	
		16.0	200	0.02	2.0	0.00	0.0	0.02	2.0	-	-
		30.0	200	0.04	4.0	0.01	1.0	0.04	4.0	-	
+	2-11.0	DMSO	200	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0		
		50.0	200	0.03	3.0	0.00	0.0	0.03	3.0	-	
		100.0	200	0.02	2.0	0.00	0.0	0.02	2.0	-	-
		160.0	200	0.03	3.0	0.00	0.0	0.03	3.0	-	

[15] *N,N'*-DI-2-NAPHTHYL-*p*-PHENYLENEDIAMINE (93-46-9) M.W.: 360.48

## CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	csc	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		500.0	100	1.0	0.0	5.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.0	±	
		1000.0	100	0.0	0.0	5.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	14.0	+	+
		1500.0	100	0.0	2.0	6.0	8.0	0.0	0.0	0.0	1.0	15.0	+	
-	48-0	DMSO	100	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		500.0	100	0.0	3.0	8.0	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.0	+	
		1000.0	100	1.0	3.0	6.0	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	17.0	+	+
		1500.0	100	1.0	4.0	14.0	26.0	0.0	0.0	0.0	0.0	37.0	+	
-	6-18	DMSO	100	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		250.0	100	0.0	1.0	2.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	±	
		500.0	100	1.0	0.0	4.0	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	±	±
		1000.0	100	1.0	0.0	2.0	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	±	
+	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		250.0	100	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
		500.0	100	0.0	1.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0	±	±
		1000.0	100	2.0	1.0	4.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0	±	

## CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	10-2.5	DMSO	200	0.01	1.0	0.01	1.0	0.01	1.0		
		500.0	200	0.01	1.0	0.01	1.0	0.02	2.0	-	
		1000.0	200	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0	-	-
		1600.0	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	
+	2-11.0	DMSO	200	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0		
		160.0	200	0.01	1.0	0.01	1.0	0.01	1.0	-	
		300.0	200	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0	-	
		500.0	200	0.01	1.0	0.01	1.0	0.02	2.0	-	-
		1000.0	0							TOX	

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		7.5	100	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	-		
		15.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	
		30.0	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-		
-	48-0	DMSO	100	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0		
		7.5	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-		
		15.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0	-	-	
		30.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-		
-	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	3.0	3.0		
		15.6	100	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-		
		31.3	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	
		62.5	100	3.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-		
+	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0		
		15.6	100	1.0	0.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-		
		31.3	0									TOX		
		62.5	0									TOX	-	

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-2.5	DMSO	200	0.03	3.0	0.01	1.0	0.04	3.0		
		3.0	200	0.06	5.0	0.01	1.0	0.07	6.0	-	
		10.0	200	0.05	3.0	0.00	0.0	0.05	3.0	-	
		29.9	200	0.04	4.0	0.01	1.0	0.10	5.0	-	-
		49.8	0								TOX
+	2-18	DMSO	200	0.02	2.0	0.00	0.0	0.02	1.5		
		10.0	200	0.05	4.0	0.02	2.0	0.07	5.0	-	
		14.9	200	0.04	4.0	0.01	1.0	0.05	3.5	-	
		19.9	200	0.04	2.0	0.02	2.0	0.07	4.0	-	-
		29.8	0								TOX

[17] *N*-PHENYL-2-NAPHTHYLAMINE (135-88-6) M.W.: 219.30

## CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
		7.5	100	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
		15.0	100	3.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	-	-
		30.0	100	2.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
-	48-0	DMSO	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		7.5	100	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
		15.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		30.0	0										TOX	
-	6-18	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		30.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
		60.0	100	3.0	2.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	3.0	-	-
		90.0	100	0.0	2.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-	
+	6-18	DMSO	100	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
		30.0	100	0.0	2.0	1.0	4.0	0.0	0.0	0.0	5.0	5.0	±	
		60.0	100	0.0	5.0	3.0	5.0	0.0	0.0	0.0	11.0	11.0	+	+w
		90.0	100	0.0	7.0	4.0	6.0	0.0	0.0	0.0	14.0	14.0	+	

## CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-2.5	DMSO	200	0.02	1.0	0.02	2.0	0.04	3.0		
		3.0	200	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0	-	
		9.9	200	0.02	1.5	0.01	0.5	0.02	2.0	-	
		29.7	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5	-	-
		49.5	0								TOX
+	2-10	DMSO	200	0.05	5.0	0.01	1.0	0.06	6.0		
		3.0	200	0.06	5.0	0.01	0.5	0.06	5.5	-	
		9.9	200	0.03	2.0	0.01	0.5	0.03	2.5	-	
		29.7	200	0.08	6.5	0.01	0.5	0.18	8.0	-	-
		49.5	0								TOX

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	±
		7.5	100	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		15.0	100	0.0	1.0	0.0	2.0	0.0	1.0	0.0	4.0	0.0		
		30.0	100	0.0	1.0	4.0	4.0	0.0	0.0	0.0	9.0	0.0		
-	48-0	DMSO	100	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	+w
		7.5	100	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0		
		15.0	100	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	4.0		
		30.0	100	0.0	3.0	5.0	8.0	0.0	0.0	0.0	15.0	0.0		
-	6-18	DMSO	100	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	±
		15.6	100	2.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0		
		31.3	100	0.0	1.0	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	4.0	0.0		
		62.5	100	3.0	0.0	0.0	6.0	0.0	0.0	0.0	6.0	0.0		
+	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	±	±
		15.6	100	0.0	1.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0		
		31.3	100	0.0	4.0	2.0	3.0	0.0	0.0	0.0	8.0	0.0		
		62.5	0											

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-2.5	DMSO	200	0.03	2.0	0.00	0.0	0.03	2.0	-	-
		1.5	200	0.03	2.5	0.00	0.0	0.03	2.5		
		5.0	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5		
		15.0	200	0.02	1.5	0.00	0.0	0.02	1.5		
		49.8	28	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0		
+	2-10	DMSO	200	0.05	3.5	0.03	1.5	0.07	4.0	-	-
		15.0	200	0.05	4.0	0.05	4.5	0.15	8.0		
		20.0	200	0.11	9.0	0.10	8.0	0.31	17.5		
		30.0	200	0.06	6.0	0.03	3.0	0.19	8.5		

[19] 4,4'-DIMETHOXYDIPHENYLAMINE (101-70-2) M.W.: 229.30

## CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation			
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall		
-	24-0	DMSO	100	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-		
		7.5	100	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	3.0	±			+ w
		15.0	100	0.0	2.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	7.0				
		30.0	100	1.0	4.0	4.0	7.0	0.0	0.0	0.0	12.0				
-	48-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	-	
		7.5	100	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	±	+		
		15.0	100	0.0	1.0	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	7.0				
		30.0	100	0.0	4.0	18.0	24.0	0.0	0.0	0.0	31.0				
-	6-18	DMSO	100	0.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0			-	
		7.5	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	+ w		
		15.0	100	3.0	0.0	1.0	1.0	0.0	1.0	0.0	3.0				
		30.0	100	12.0	0.0	4.0	7.0	0.0	0.0	0.0	10.0				
+	6-18	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	-
		7.5	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	+ w		
		15.0	100	3.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	2.0				
		30.0	100	0.0	2.0	3.0	17.0	0.0	0.0	1.0	21.0				

## CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation			
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall		
-	8-12	DMSO	200	0.01	0.5	0.01	1.0	0.02	1.5	-			
		504.0	200	0.06	3.0	0.02	1.5	0.08	4.5				
		1501.0	200	0.04	3.5	0.05	2.0	0.09	4.5			+	+ w
		2498.0	200	0.06	5.0	0.03	2.5	0.09	7.5				
+	2-10	DMSO	200	0.04	3.0	0.02	1.5	0.05	4.0	+			
		132.0	200	0.09	6.5	0.08	7.5	0.22	11.5				
		440.0	200	0.09	5.0	0.05	4.5	0.18	8.5			-	±
		1320.0	200	0.03	3.0	0.03	2.5	0.06	5.5				

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	Ethanol	100	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	3.0			
		125.0	100	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	-		
		250.0	100	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	-	-
		500.0	100	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-		
-	48-0	Ethanol	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0			
		125.0	100	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	-		
		250.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	
		500.0	100	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.0	-		
-	6-18	Ethanol	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
		125.0	100	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-		
		250.0	100	0.0	1.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	-	
		500.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-		
+	6-18	Ethanol	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
		125.0	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-		
		250.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	
		500.0	100	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-		

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-2.5	Acetone	200	0.03	2.5	0.01	0.5	0.03	3.0		
		445.0	200	0.05	3.5	0.01	1.0	0.06	4.0	-	
		1340.0	200	0.03	2.5	0.01	1.0	0.04	3.5	-	-
		4450.0	200	0.03	2.5	0.01	1.0	0.04	3.5	-	
+	2-10	Acetone	200	0.02	1.5	0.01	1.0	0.03	2.0		
		445.0	200	0.01	0.5	0.01	0.5	0.01	1.0	-	
		1340.0	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	-
		4450.0	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	

## [21] N-NITROSODIPHENYLAMINE (86-30-6) M.W.: 198.24

## CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation			
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall		
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-		
		15.6	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
		31.3	100	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0			-
		62.5	100	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0			-
-	48-0	DMSO	100	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-		
		15.6	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
		31.3	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
		62.5	100	1.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0			
-	6-18	DMSO	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-		
		31.3	100	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0			
		62.5	100	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0			
		125.0	0												TOX
+	6-18	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	±	+	
		31.3	100	0.0	2.0	3.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.0			
		62.5	100	1.0	2.0	3.0	15.0	0.0	0.0	0.0	0.0	19.0			
		125.0	100	0.0	6.0	1.0	16.0	0.0	0.0	0.0	0.0	21.0			

## CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-2.5	DMSO	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5	-	
		8.8	200	0.01	0.5	0.01	0.5	0.01	1.0		
		26.2	200	0.02	1.5	0.01	1.0	0.03	2.5		
		43.8	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5		
		87.5	100	0.02	2.0	0.00	0.0	0.02	2.0		
		131.0	0								
+	2-10	DMSO	200	0.04	3.5	0.01	0.5	0.04	4.0	-	
		153.0	200	0.03	2.5	0.03	2.5	0.06	4.0		
		382.0	81	0.04	3.7	0.00	0.0	0.04	3.7		
		1020.0	200	0.02	1.5	0.02	1.5	0.03	2.5		
		1530.0	200	0.02	2.0	0.00	0.0	0.02	2.0		

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	csc	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		1.2	100	0.0	8.0	26.0	63.0	0.0	0.0	0.0	74.0	+		
		2.5	100	2.0	17.0	43.0	89.0	0.0	0.0	0.0	94.0	+	+	
		5.0	100	0.0	11.0	66.0	84.0	7.0	0.0	0.0	100.0	+		
-	48-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		1.2	100	2.0	9.0	45.0	86.0	1.0	0.0	3.0	92.0	+		
		2.5	0									TOX	+	
	5.0	0									TOX			
-	6-18	DMSO	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0			
		1.2	100	0.0	8.0	8.0	41.0	0.0	0.0	0.0	48.0	+		
		2.5	100	0.0	8.0	11.0	54.0	0.0	0.0	0.0	61.0	+	+	
		5.0	100	1.0	14.0	18.0	78.0	0.0	0.0	0.0	82.0	+		
+	6-18	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
		1.2	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-		
		2.5	100	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	-	
		5.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-		

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-2.5	DMSO	200	0.02	2.0	0.00	0.0	0.02	2.0		
		3.0	50	0.14	14.0	0.18	18.0	0.34	30.0	+	
		10.0	50	0.92	54.0	0.48	34.0	1.40	72.0	+	
		30.0	15	1.93	67.0	0.47	33.0	3.73	87.0	+	+
		50.0	0							TOX	
+	2-10	DMSO	200	0.02	2.0	0.02	1.5	0.04	3.0		
		10.0	200	0.16	13.5	0.05	4.5	0.20	18.0	+	
		30.0	50	0.58	38.0	0.56	34.0	1.34	62.0	+	+
		100.0	20	1.05	40.0	0.85	40.0	5.90	85.0	+	

## [23] TRIALLYL ISOCYANURATE (1025-15-6) M.W.: 249.27

## CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		500.0	100	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
		750.0	100	1.0	1.0	3.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	±	±
		1000.0	100	0.0	0.0	4.0	2.0	0.0	0.0	0.0	1.0	7.0	±	
-	48-0	DMSO	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		500.0	100	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	-	
		750.0	100	2.0	2.0	4.0	2.0	2.0	0.0	0.0	2.0	9.0	±	±
		1000.0	0										TOX	
-	6-18	DMSO	100	2.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
		250.0	100	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
		500.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		1000.0	100	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	2.0	-	
+	6-18	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		250.0	100	4.0	13.0	17.0	25.0	2.0	0.0	0.0	0.0	32.0	+	
		500.0	100	2.0	6.0	16.0	22.0	3.0	0.0	0.0	0.0	30.0	+	+
		1000.0	100	4.0	7.0	16.0	25.0	4.0	1.0	0.0	0.0	37.0	+	

## CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-2.5	DMSO	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0		
		146.0	200	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	
		485.0	200	0.01	0.5	0.00	0.0	0.01	0.5	-	-
		1460.0	200	0.00	0.0	0.01	0.5	0.01	0.5	-	
+	2-10	DMSO	200	0.05	4.0	0.00	0.0	0.05	4.0		
		291.0	200	0.02	1.5	0.00	0.0	0.02	2.0	-	
		970.0	200	0.02	1.5	0.01	0.5	0.03	2.5	-	-
		2910.0	200	0.04	3.0	0.01	0.5	0.04	3.5	-	

[24] CHROMIUM CARBONYL (13007-92-6) M.W.: 220.07

CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation	
					ctg	ctb	cte	frg	csb	csc	total	Each	Overall
-	24-0	CMC	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
		2000.0	100	1.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	4.0	-	
		4000.0	100	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	-
		8000.0	100	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
-	48-0	CMC	100	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0		
		2000.0	100	0.0	1.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-	
		4000.0	100	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	-
		8000.0	100	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
-	6-18	CMC	100	0.0	2.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	3.0		
		500.0	100	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
		1000.0	100	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	-
		2000.0	100	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	
+	6-18	CMC	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
		500.0	100	0.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-	
		1000.0	100	0.0	5.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	9.0	±	+w
		2000.0	100	0.0	9.0	8.0	20.0	0.0	0.0	0.0	27.0	+	

CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-2.5	Medium	100	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0		
		Acetone	100	0.03	2.0	0.00	0.0	0.03	2.0		
		75.0	100	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	
		100.0	100	0.02	2.0	0.00	0.0	0.02	2.0	-	-
		128.0	100	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	
+	2-10.5	Medium	100	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0		
		Acetone	100	0.02	2.0	0.00	0.0	0.02	2.0		
		75.0	100	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0	-	
		100.0	100	0.02	2.0	0.01	1.0	0.03	2.0	-	-
		128.0	100	0.07	5.0	0.00	0.0	0.07	5.0	-	

## [25] 1-(1,2-DIBROMOETHYL)-3,4-DIBROMOCYCLOHEXANE (3322-93-8) M.W.: 427.83

## CHL cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>a</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Polyploid (%)	Frequency of aberrant cells (%) <sup>b</sup>							Evaluation		
					ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total	Each	Overall	
-	24-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
		30.0	100	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
		60.0	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		120.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
-	48-0	DMSO	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
		30.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
		60.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-
		120.0	100	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	
-	6-18	DMSO	100	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
		62.5	100	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-		
		125.0	100	0.0	2.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	-	
		250.0	100	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-		
+	6-18	DMSO	100	1.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0			
		62.5	100	0.0	1.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	5.0	±		
		125.0	100	0.0	6.0	10.0	10.0	0.0	0.0	0.0	18.0	+	+	
		250.0	87	0.0	5.7	19.5	19.5	0.0	0.0	0.0	29.9	+		

## CHO cells

S9 mix	Treatment time (h) <sup>c</sup>	Dose (µg/ml)	Total cells	Simple aber.		Complex aber.		Total aber.		Evaluation	
				No./cell	% cells	No./cell	% cells	No./cell	% cells	Each	Overall
-	8-2.5	DMSO	100	0.02	2.0	0.00	0.0	0.02	2.0		
		10.0	100	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	
		30.0	100	0.01	1.0	0.01	1.0	0.02	2.0	-	-
		100.0	100	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0	-	
+	2-10	DMSO	100	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0		
		30.0	100	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0	-	
		100.0	100	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	-
		150.0	100	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00	0.0	-	
		300.0	100	0.01	1.0	0.00	0.0	0.01	1.0	-	

<sup>a</sup> Treatment time-recovery time.<sup>b</sup> ctg, chromatid gaps (including chromosome gaps); ctb, chromatid breaks; cte, chromatid exchanges; frg, fragmentation; csb, chromosome breaks; cse, chromosome exchanges such as dicentric or ring chromosomes.<sup>c</sup> Treatment time-harvest time.

## References

- Evans, H.J., M., Ishidate, Jr., M. Leng, C.T. Miller, F. Mitelman and E. Vogel (1980) Cytogenetic damage as an endpoint in short-term assay systems for detecting environmental carcinogens, in: Long-Term and Short-Term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal, IARC Monographs Suppl. 2, IARC, Lyon, pp. 227-244.
- Galloway, S.M., A.D. Bloom, M. Resnick, B.H. Margolin, F. Nakamura, P. Archer and E. Zeiger (1985) Development of a standard protocol for in vitro cytogenetic testing with Chinese hamster ovary cells: comparison of results for 22 compounds in two laboratories, *Environ. Mutagen.*, 7, 1-51.
- Galloway, S.M., M.J. Armstrong, C. Reuben, S. Colinan, B. Brown, C. Cannon, A.D. Bloom, F. Nakamura, M. Ahmed, S. Duk, J. Rimpo, B.H. Margolin, M.A. Resnick, B. Anderson and E. Zeiger (1987) Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 10 (Suppl. 10), 1-175.
- Gulati, D.K., K. Witt, B. Anderson, E. Zeiger and M.D. Shelby (1989) Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. III: Results with 27 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 133-193.
- Ishidate, M. Jr. (Ed.) (1988) *Data Book of Chromosomal Aberration Tests In Vitro*, LIC/Elsevier, Tokyo/Amsterdam, New York, Oxford.
- Ishidate, M. Jr., and C.M. Harnois (1987) The clastogenicity of chemicals in cultured mammalian cells (Letters to the Editor), *Mutagenesis*, 2, 240-243.
- Ishidate, M. Jr., and S. Odashima (1977) Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro. A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354.
- Ishidate, M. Jr., M.C. Harnois and T. Sofuni (1988) A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures, *Mutation Res.*, 195, 151-213.
- Koyama, H., T. Utakoji and T. Ono (1970) A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue, *Gann*, 61, 161-167.
- Loveday, K.S., M.H. Lugo, M.A. Resnick, B. Anderson and E. Zeiger (1989) Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. II: Results with 20 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 60-94.
- Loveday, K.S., B. Anderson, M.A. Resnick and E. Zeiger (1990) Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. V: Results with 46 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, submitted.