

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

Group	Dose	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)														
			Base-pair substitution type									Frameshift type					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
(μ g/plate)																	
Solvent control	-	-	111 (117 $\pm$	117 6.5)	124 6.5)	18 (15 $\pm$	12 3.1)	14 3.1)	23 (22 $\pm$	19 2.6)	24 2.6)	29 (24 $\pm$	22 4.4)	21 4.4)	15 (11 $\pm$	8 3.5)	11 3.5)
Test substance	312.5	-	138 (140 $\pm$	132 9.2)	150 9.2)	15 (16 $\pm$	21 4.6)	12 4.6)	13 (16 $\pm$	19 3.1)	17 3.1)	22 (20 $\pm$	17 2.6)	21 2.6)	7 (8 $\pm$	8 0.6)	8 0.6)
	625	-	147 (150 $\pm$	148 4.9)	156 4.9)	13 (14 $\pm$	14 0.6)	14 0.6)	12 (15 $\pm$	18 3.1)	16 3.1)	15 (21 $\pm$	25 5.1)	22 5.1)	9 (8 $\pm$	7 1.0)	8 1.0)
	1250	-	158 (159 $\pm$	156 4.2)	164 4.2)	10 (13 $\pm$	13 2.5)	15 2.5)	16 (15 $\pm$	11 3.6)	18 3.6)	23 (25 $\pm$	24 2.1)	27 2.1)	8 (8 $\pm$	10 2.0)	6 2.0)
	2500	-	160 (157 $\pm$	156 3.1)	154 3.1)	15 (14 $\pm$	16 2.1)	12 2.1)	20 (15 $\pm$	12 4.6)	12 4.6)	16 (16 $\pm$	19 2.5)	14 2.5)	10 (9 $\pm$	13 4.0)	5 4.0)
	5000	-	148 (144 $\pm$	137 8.4)	148 8.4)	20 (14 $\pm$	9 5.6)	13 5.6)	13 (15 $\pm$	16 1.5)	15 1.5)	18 (19 $\pm$	21 1.7)	18 1.7)	5 (7 $\pm$	7 1.5)	8 1.5)
Solvent control	+	+	128 (130 $\pm$	135 4.0)	128 4.0)	24 (22 $\pm$	22 1.5)	21 1.5)	22 (22 $\pm$	24 2.5)	19 2.5)	38 (47 $\pm$	54 8.2)	49 8.2)	14 (12 $\pm$	15 4.4)	7 4.4)
Test substance	312.5	+	135 (142 $\pm$	144 5.9)	146 5.9)	10 (12 $\pm$	14 2.0)	12 2.0)	17 (17 $\pm$	17 0.0)	17 0.0)	58 (62 $\pm$	59 6.1)	69 6.1)	11 (11 $\pm$	9 1.5)	12 1.5)
	625	+	141 (133 $\pm$	155 27.5)	102 27.5)	11 (14 $\pm$	19 4.2)	13 4.2)	16 (14 $\pm$	16 4.0)	9 4.0)	59 (58 $\pm$	64 6.6)	51 6.6)	7 (14 $\pm$	21 7.0)	13 7.0)
	1250	+	138 (133 $\pm$	137 8.4)	123 8.4)	19 (16 $\pm$	15 3.1)	13 3.1)	18 (16 $\pm$	10 5.3)	20 5.3)	44 (42 $\pm$	35 5.9)	46 5.9)	12 (12 $\pm$	13 1.0)	11 1.0)
	2500	+	129 (130 $\pm$	133 2.6)	128 2.6)	15 (12 $\pm$	14 3.8)	8 3.8)	12 (10 $\pm$	9 1.5)	10 1.5)	51 (52 $\pm$	48 5.1)	58 5.1)	10 (11 $\pm$	11 0.6)	11 0.6)
	5000	+	115 (128 $\pm$	133 11.4)	136 11.4)	14 (16 $\pm$	15 3.2)	20 3.2)	12 (13 $\pm$	13 1.5)	15 1.5)	53 (54 $\pm$	48 7.1)	62 7.1)	15 (12 $\pm$	9 3.0)	12 3.0)
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		607 (624 $\pm$	607 28.9)	657 28.9)	166 (177 $\pm$	177 11.5)	189 11.5)	168 (163 $\pm$	158 5.0)	163 5.0)	447 (462 $\pm$	503 36.3)	435 36.3)	2644 (2367 $\pm$	2447 325.0)	2009 325.0)
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		931 (905 $\pm$	863 36.9)	922 36.9)	215 (196 $\pm$	193 17.2)	181 17.2)	547 (557 $\pm$	571 12.3)	554 12.3)	286 (277 $\pm$	278 9.0)	268 9.0)	191 (195 $\pm$	210 13.1)	185 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

2×10⁴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CO₂インキュベーター (5% CO₂) 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、(株) 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6.5% (w/w) 溶ける。分子式C₃H₈O₂、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。

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）。

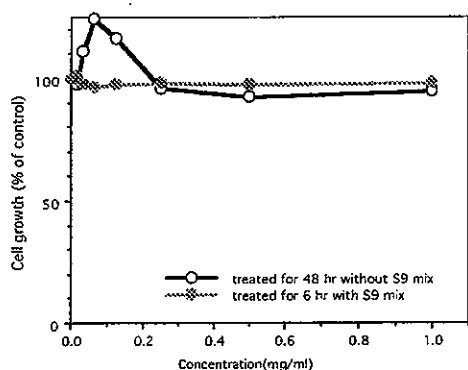


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with 2,2-dimethyl-1,3-propanediol in CHL cells

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¹⁾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²⁾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, 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 2,2,-dimethyl-1,3-propanediol** by direct method

Group	Concent-ration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	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 ¹⁾	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 ¹⁾	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	Concent-ration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	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 ¹⁾	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 ¹⁾	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 (ホワイトフレーク、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、飲料水の水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¹⁾において、LD₅₀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LD₅₀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。器官重量は精巣、精巣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

全例の精巣および精巣上体、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（精巣、精巣上体）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、Dunnett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、被験物質投与に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に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 ^a	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		(11) ^b	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)	(11)
		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)
		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 ^a	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 ^a	2.3±1.2	2.5±1.4	2.2±1.4
Copulation index ^b (%)	100.0	100.0	91.7	100.0
No. of pregnant animals	10	11	10	12
Fertility index ^c (%)	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 ^d (%)	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 ^e (%)	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 ^f (%)	100.000±0.000	99.394±2.011	96.476±9.046	99.479±1.804
Sex ratio ^g	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 ^h (%)	100.0	100.0	90.0 ⁱ	100.0
Nursing index ⁱ (%)	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¹⁾。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例で乳腺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