

4-エチルビフェニ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 4-Ethylbiphenyl by Oral Administration in Rats

要約

4-エチルビフェニルのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験を行い、雌雄親動物の生殖能力および児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。投与量は、300 mg/kgを最高用量とし、以下100, 30および10 mg/kgとした。対照として媒体(コーンオイル)投与群を設けた。なお、各群の使用動物数は雌雄各12例とした。

1. 反復投与毒性

雄においては、いずれの群とも死亡および瀕死例は認められなかった。一般状態では、投与による変化はみられなかった。体重は、100および300 mg/kg群で低値がみられた。摂餌量は、300 mg/kg群で低値がみられた。剖検では、投与による変化はみられなかった。器官重量では、300 mg/kg群で精巣の相対重量の高値がみられた。精子検査では、投与による変化はみられなかった。病理組織学検査では、精巣および精巣上体に投与による変化はみられなかった。

雌においては、死亡例が300 mg/kg群で4例認められた。一般状態では、300 mg/kg群で体温低下、自発運動の低下、立毛、被毛の汚れおよび軟便がみられた。体重は、300 mg/kg群では、交配前、妊娠期および哺育期に低値がみられた。摂餌量は、100 mg/kg群で交配前に一過性の低値が、300 mg/kg群で交配前および妊娠期に低値がみられた。剖検では、300 mg/kg群の死亡例では、腺胃粘膜暗赤色斑がみられた。生存例では、投与による変化はみられなかった。器官重量では、投与による変化はみられなかった。病理組織学検査では、卵巣に投与による変化はみられなかった。

2. 生殖発生毒性

精子検査および病理組織学検査では、投与による変化はみられなかった。発情回数、交尾率、交尾所要日数、受胎率、分娩状態、哺育状態および妊娠黄体数では、投与による変化はみられなかった。妊娠期間は、100および300 mg/kg群で延長がみられた。300 mg/kg群では、着床数の低値、着床率および出生率の低値傾向がみられた。

100 mg/kg群では、死産児数の高値、児の産出率および出生率の低値、哺育0日の新生児数の低値傾向がみられた。300 mg/kg群では、死産児数の高値、総出生率、哺育0日の新生児数、分娩率、児の産出率および出生率

の低値がみられた。100 mg/kg群では、哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率の低値あるいは低値傾向がみられた。300 mg/kg群では、哺育4日の生存率は1例も得られなかった。300 mg/kg群では、哺育0日に雌雄別体重の低値あるいは低値傾向がみられた。新生児の外表面、一般状態および剖検では、投与による変化はみられなかった。

以上のように、4-エチルビフェニルの一般毒性学的無影響量は、雄では100 mg/kg投与により体重に影響が認められたことから30 mg/kg/day、雌では100 mg/kg投与により摂餌量に影響が認められたことから30 mg/kg/dayと考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雄では300 mg/kg投与しても精子検査成績、精巣および精巣上体の病理組織学検査成績、交尾率に影響が認められなかったことから300 mg/kg/dayと考えられる。雌では、100 mg/kg投与で妊娠期間の延長が認められたことから30 mg/kg/dayと考えられる。児動物では、100 mg/kg投与で死産児数の高値、児の産出率および出生率の低値、哺育0日の新生児数、哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率の低値傾向がみられたことから30 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質および媒体

被験物質の4-エチルビフェニルは、常温において白色塊で、融点以上では無色~わずかにうすい黄色の澄明の液体である[Lot No.8-LOT, 純度:99.71%, 新日鐵化学(株)(東京)]。入手後は、室温・遮光条件下で保管した。なお、投与期間終了後、残余被験物質を再分析し、使用期間中の安定性を確認した。

被験物質は、コーンオイルで溶解して調製した。調製に際して、被験物質の純度による換算は実施しなかった。なお、調製液は、室温・遮光条件下で7日間保存しても安定性に問題のないことが確認されていたため、各濃度の調製液は調製後、室温・遮光条件下で保管し、調製後7日以内に使用した。投与開始日および雄投与終了日に使用した各投与液中の被験物質濃度を確認した結果、被験物質濃度に問題はなかった。

2. 使用動物および飼育条件

8週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット[SPF, Crj:CD(SD)IGS]を日本チャールス・リバー(株)から購入した。入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後7

日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物を群分けした。群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与開始日を行った。

動物は、室温20～26℃、湿度40～70%、明暗各12時間(照明:午前6時～午後6時)、換気回数12回/時に維持されている飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製ケージを用いて1ケージ当たり5匹までの雌雄別群飼育とし、群分け後はステンレス製ケージを用いて個別飼育した。母動物は、妊娠18日以降オートクレーブ処理した床敷(サンフレック、日本チャールス・リバー(株))を入れたプラスチック製ケージで個別飼育し、自然分娩および哺育させた。飼料は固型飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業(株))を、飲料水は水道水をいずれも自由に摂取させた。

3. 投与経路、投与方法、投与量および投与期間

投与経路は、経口投与を選択した。投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスプレイ注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、雄では投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を基準とし、5 mL/kgで算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を、妊娠期間中は妊娠0、7、14および21日の体重を、授乳期間中は哺育0日の体重を基準とし、5 mL/kgで算出した。

投与開始日の週齢は雌雄とも10週齢であり、体重範囲は雄が321～354 g、雌が245～269 gであった。

投与量は、4-エチルピフェニルのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験¹⁾の結果により決定した。すなわち、死亡例が1000 mg/kg群で雄4/10例と雌1/10例、500 mg/kg群で雄1/5例認められた。また、500 mg/kg以上の群で体重および摂餌量の低値がみられた。しかし、100 mg/kg群では、肝臓、腎臓および胃に病理組織学変化がみられるものの、重篤な変化は認められなかった。そこで、当試験では、ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験において死亡例の認められた500 mg/kgと重篤な変化は認められなかった100 mg/kgの中間量に相当する300 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3により100、30および10 mg/kgとした。また、対照として媒体(コーンオイル)のみを同容量投与する群を設けた。1群の動物数は雌雄それぞれ12例とした。

投与期間は、雄では交配前14日間とその後36～38日間(精子検査に3日間必要なため、雄の剖検を3日間に分けて実施)の合計50～52日間とし、雌では交配前14日間、交配期間中(最長14日間)、妊娠期間中および哺育3日までの合計41～45日間とした。なお、投与開始日を投与1日とした。

4. 観察および検査項目

1) 雄

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回観察した。

(2) 体重測定

体重は、1週間に2回測定した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間および交配期間終了後に1週間に2回測定した。

(4) 剖検

最終投与の翌日(投与51～53日)に各群の各4例をエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、精巣、精巣上体および精巣上体の尾部重量を測定した。精巣および精巣上体の頭部は、プアン液で2～3時間固定後、90%アルコールに再固定した。前立腺および精囊は、20%中性緩衝ホルマリンで固定した。

(5) 精子検査

右精巣上体の尾部は、37℃に加温した精子培養液(0.5%牛血清アルブミン加Medium 199)中で分割し、精子原液を作製した。この精子原液を用いて精子の活動性、精子の生存性および精子の形態の各検査を実施した。

精子の活動性は、精子原液を精子培養液で希釈し、約30分間培養(培養条件:37℃、5%炭酸ガス、95%空気)後にHTM-IVOS(Hamilton Thorne Research)を用いて、活動精子率を算出するとともに、活動精子について基準点移動速度、最短距離移動速度、総移動速度および頭部の横切り回数を算出した。

精子の生存性として、加藤らの方法²⁾に従い、マイクロウェルプレート内で精子原液を精子培養液にて約2～3倍希釈した後、Calcein acetoxy methyl esterとEthidium homodimer-1とで約2時間培養・染色(培養条件:37℃、5%炭酸ガス、95%空気)した後、蛍光顕微鏡下で精子を生存精子、途中死亡精子と死滅精子に分類し、生存精子率と生き残り精子率を求めた。なお、生存、途中死亡および死滅精子の判定は、頭部～尾部にかけて緑色の蛍光発色が認められるものを生存精子、頭部には赤色の蛍光発色が、尾部には緑色の蛍光発色が認められるものを途中死亡精子、頭部には赤色の蛍光発色が認められるが、尾部には蛍光発色が認められないものを死滅精子とした。

精子の形態は、精子原液をスライドガラスに塗抹し、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、1%エオジン染色液で染色し、顕微鏡下で観察した。

精子数は、左精巣上体尾部を0.1% Triton X-100中でホモジナイズ後、HTM-IVOS(Hamilton Thorne Research)を用いて算出した。なお、左精巣上体尾部1g当たりの精子数も算出した。

(6) 病理組織学検査

対照群および300 mg/kg群の精巣および精巣上体の頭部についてHE染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。

2) 雌

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回観察した。

死亡例は、発見後速やかに剖検した。

(2) 性周期

性周期は、投与開始日から交尾確認日あるいは交配期間終了日まで毎日1回観察した。なお、発情期が連続2日間にわたって観察された場合は1回として発情回数を計数した。

(3) 体重測定

体重は、交配開始前14日間および交配期間中は1週間に2回、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14および21日に、哺育期間中は哺育0および4日にそれぞれ測定した。

(4) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間までは1週間に2回、妊娠期間中は妊娠2, 9, 16および21日に、哺育期間中は哺育4日に測定した。

(5) 交尾不成立雌

交尾不成立雌は、交配期間終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床の有無を確認した。

(6) 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ、分娩状態の異常の有無、分娩終了の確認を妊娠21日から妊娠25日の午前10時まで毎日行った。午前10時に分娩が終了していた場合、その日を哺育0日とした。

(7) 妊娠25日までに分娩しなかった動物

妊娠25日までに分娩しなかった雌は、エーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

(8) 哺育状態の観察および剖検

母動物は、哺育状態を哺育4日まで毎日観察し、新生児が全例死亡した日あるいは哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床数および妊娠黄体数を数え、卵巣の重量を測定した。

(9) 病理組織学検査

対照群および300 mg/kg群の卵巣ならびに死亡例の剖検で異常の認められた器官・組織(300 mg/kgの2例の胃)についてHE染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。

3) 親動物の生殖発生に及ぼす影響

14日間投与した雌雄を同一群内で1対1に組み合わせ、同居交配した。交配期間は14日を限度として、交尾を確認するまでの連続同居交配とした。

交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い、膣垢内に精子または陰栓を確認した雌を交尾成立動物として、その日を妊娠0日として起算した。

4) 児動物

(1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。

(2) 児動物の観察

児動物は、一般状態および死亡の有無を毎日1回観察した。

(3) 体重測定

体重は、哺育0日(誕生日)および4日に測定した。

(4) 剖検

生存児は、哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

5. 統計解析

統計解析は以下に示したように、対照群と各投与群の間で行い、危険率を5%とした。

体重、摂餌量、器官の絶対重量および相対重量、精子検査、発情回数、交尾所要日数、妊娠期間、妊娠黄体数、着床数、着床率、総出産児数、死産児数、新生児数、分娩率、児の産出率、出生率、哺育4日の生存児数、新生児の4日の生存率、性比および外表異常の出現率は、各群で平均値および標準偏差を算出した。その後、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならばDunnett法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い、有意ならば順位を利用したDunnett型の検定法により行った。

交尾率、受胎率および出産率は、 χ^2 検定により行った。

結果

1. 反復投与毒性

1) 雄に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡および瀕死例は、いずれの群でも認められなかった。

一般状態観察において、対照群および10 mg/kg群では異常はみられなかった。30 mg/kg群では、投与30日以降の投与後に一過性の流涎がみられた。100および300 mg/kg群では、投与2日以降の投与後に一過性の流涎がみられた。

(2) 体重推移(Fig. 1)

10および30 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて投与18~49日に体重の有意な低値がみられた。

300 mg/kg群では、対照群と比べて投与4~49日に体重の有意な低値がみられた。

(3) 摂餌量(Fig. 2)

10, 30および100 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて投与3~10日に摂餌量の有意な低値がみられた。

(4) 剖検

いずれの群とも、異常はみられなかった。

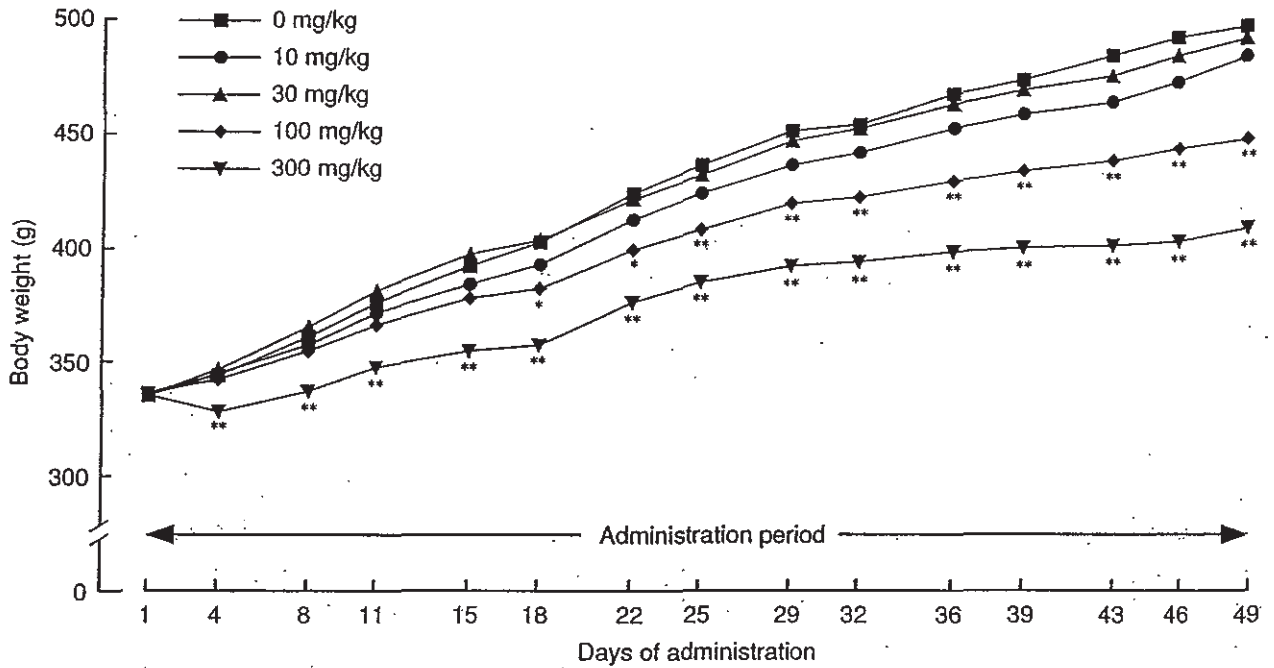


Fig. 1 Body weight of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Significantly different from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

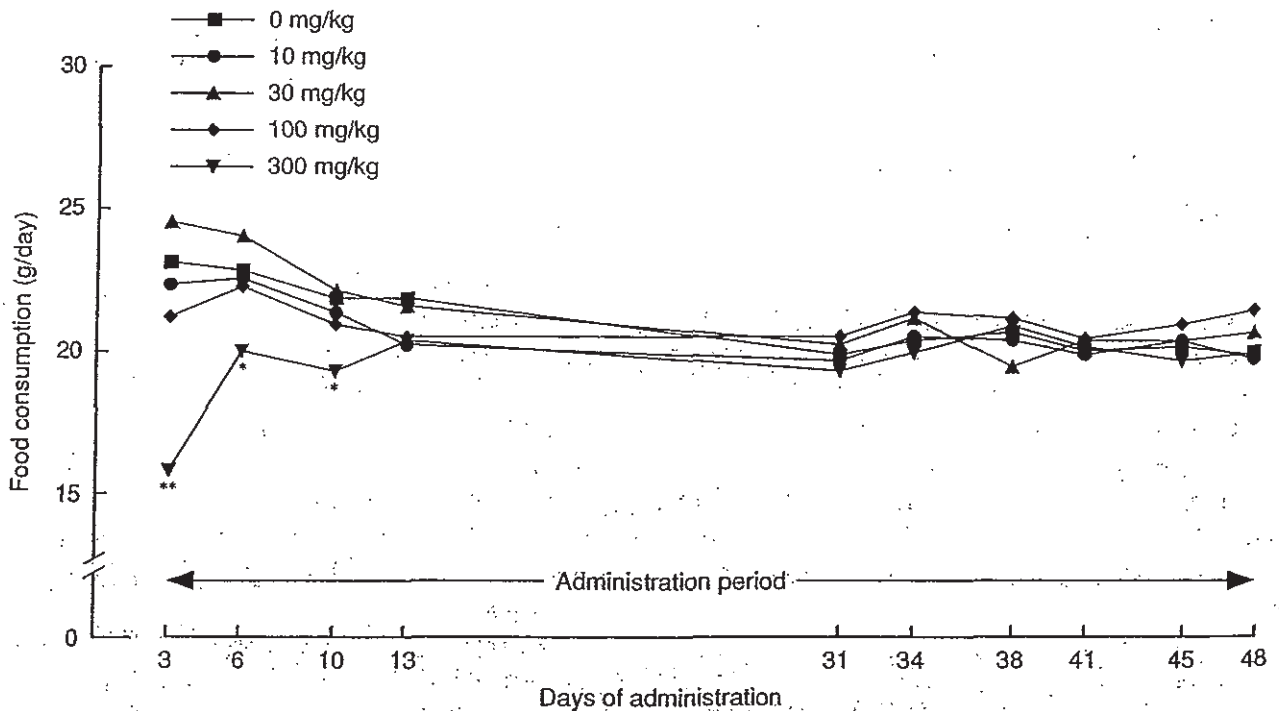


Fig. 2 Food consumption of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Significantly different from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

(5) 器官重量 (Table 1)

剖検日の体重において、10および30 mg/kg群では対照群と比べて有意差はみられなかった。100および300 mg/kg群では、対照群と比べて剖検日の体重の有意な低値がみられた。

器官重量において、10および30 mg/kg群では対照群

と比べて精巣および精巣上体の絶対ならびに相対重量に有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて精巣上体の相対重量の有意な高値がみられたが、対照群との体重差による変化と考えられる。300 mg/kg群では、対照群と比べて精巣の相対重量の有意な高値がみられた。また、300 mg/kg群では、対照群と比べて精

巢上体の相対重量の有意な高値がみられたが、対照群との体重差による変化と考えられる。

(6) 精子検査 (Table 2)

各投与群とも、対照群と比べて活動精子率、基準点移動速度、最短距離移動速度、総移動速度、頭部の横切り回数、奇形精子率、生存精子率、生き残り精子率、精子数、左精巢上体尾部1g当たりの精子数に有意差はみられなかった。

(7) 病理組織学検査 (Table 3)

精巢:対照群では、グループ3の精細管にステップ19精子細胞の残留が1例みられた。300 mg/kg群では、異常はみられなかった。

精巢上体(頭部):対照群および300 mg/kg群とも、異常はみられなかった。

2) 雌に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡は、300 mg/kg群で4例認められた。死亡例では、自発運動の低下、体温低下、被毛の汚れおよび一過性の流涎がみられた。

生存例の一般状態観察において、対照群、10および30 mg/kg群では異常はみられなかった。100 mg/kg群では、投与4日以降の投与後に一過性の流涎がみられた。300 mg/kg群では、投与2日以降の投与後に一過性の流涎がみられた。その他に、300 mg/kg群で体温低下、自発運動の低下、立毛、被毛の汚れおよび軟便がみられた。

(2) 体重推移 (Fig. 3)

交配開始前において、10、30および100 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて投与4~15日に体重の有意な低値がみられた。

妊娠期間中において、10、30および100 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠0~21日に体重の有意な低値がみられた。

哺育期間中において、10、30および100 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて哺育0日に体重の有意な低値がみられた。

(3) 摂餌量 (Fig. 4)

交配開始前において、10および30 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて投与6日に摂餌量の有意な低値がみられた。300 mg/kg群では、対照群と比べて投与3および6日に摂餌量の有意な低値がみられた。

妊娠期間中において、30および100 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠21日に摂餌量の有意な低値がみられた。なお、10 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠21日に摂餌量の有意な低値がみられたが、投与量に依存した変化ではなかった。

哺育期間中において、10、30および100 mg/kg群では対照群と比べて摂餌量に有意差はみられなかった。

(4) 剖検

生存例においては、いずれの群とも異常はみられなかった。

死亡例においては、300 mg/kg群で鼻口周囲の被毛の汚れが1例、腺胃粘膜暗赤色斑が2例みられた。

(5) 器官重量 (Table 4)

剖検日の体重において、10および30 mg/kg群では対照群と比べて有意差はみられなかった。100および300 mg/kg群では、対照群と比べて剖検日の体重の有意な低値がみられた。

器官重量において、10、30および100 mg/kg群では対照群と比べて卵巣の絶対ならびに相対重量に有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて卵巣の相対重量の有意な高値がみられたが、対照群との体重差による変化と考えられる。

(6) 病理組織学検査

卵巣:対照群および300 mg/kg群とも、異常はみられなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物の生殖発生に及ぼす影響

(1) 発情回数、交尾率および受胎率 (Table 5)

交配前の投与期間(14日間)の発情回数は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

対照群の1組を除いた全例で交尾が確認された。交尾所要日数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。また、交尾率にも、各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。

不受胎雌は、300 mg/kg群で2例みられた。しかし、受胎率には各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。

(2) 妊娠期間、分娩状態、妊娠黄体数、着床率および出産率 (Table 6)

妊娠期間は、10および30 mg/kg群では対照群と比べて有意差はみられなかった。100および300 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠期間の有意な延長がみられた。

分娩状態において、対照群、10、30および100 mg/kg群ではいずれの母動物とも異常はみられなかった。300 mg/kg群の3例では、哺育0日に出生児が全例死亡したため、新生児は得られなかった。

10、30および100 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠黄体数、着床数および着床率に有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて着床数の有意な低値および着床率の低値傾向がみられた。

出産率は、対照群、10、30および100 mg/kg群では100%であった。300 mg/kg群では、3母動物で新生児が得られなかったため出産率は50.0%であり、対照群と比べて有意差はないものの低値であった。対照群および各投与群とも、哺育状態に異常はみられなかった。

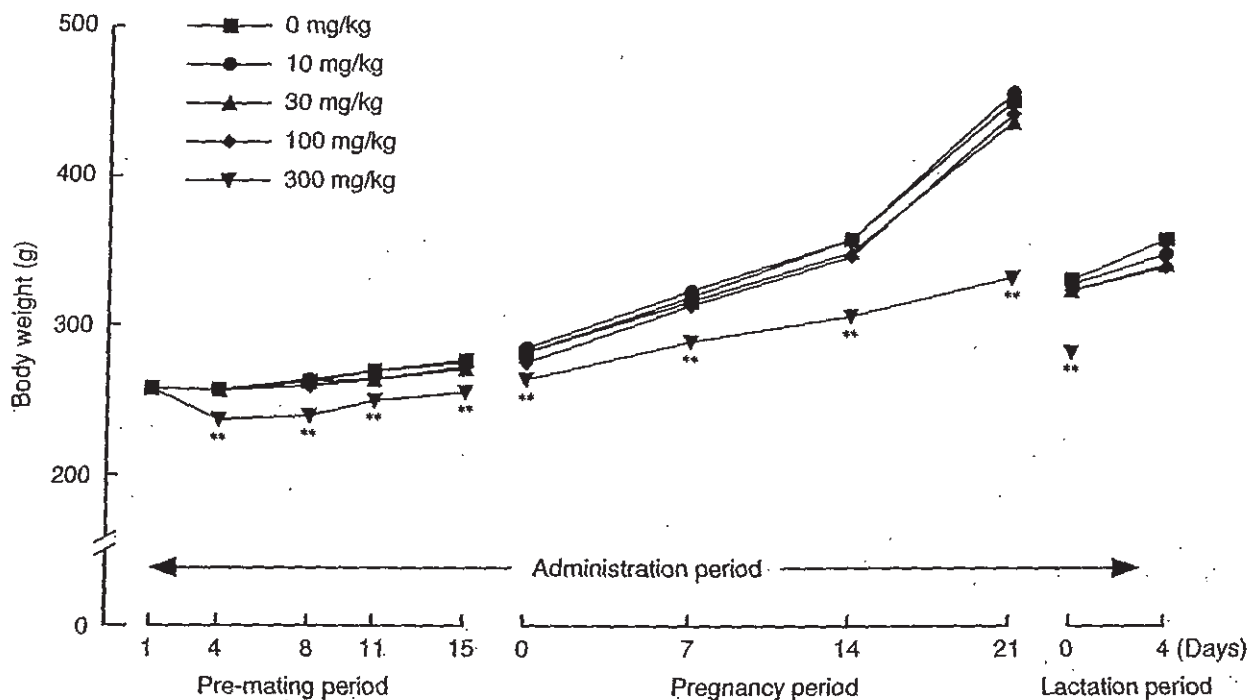


Fig. 3 Body weight of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Significantly different from control (** $p < 0.01$)

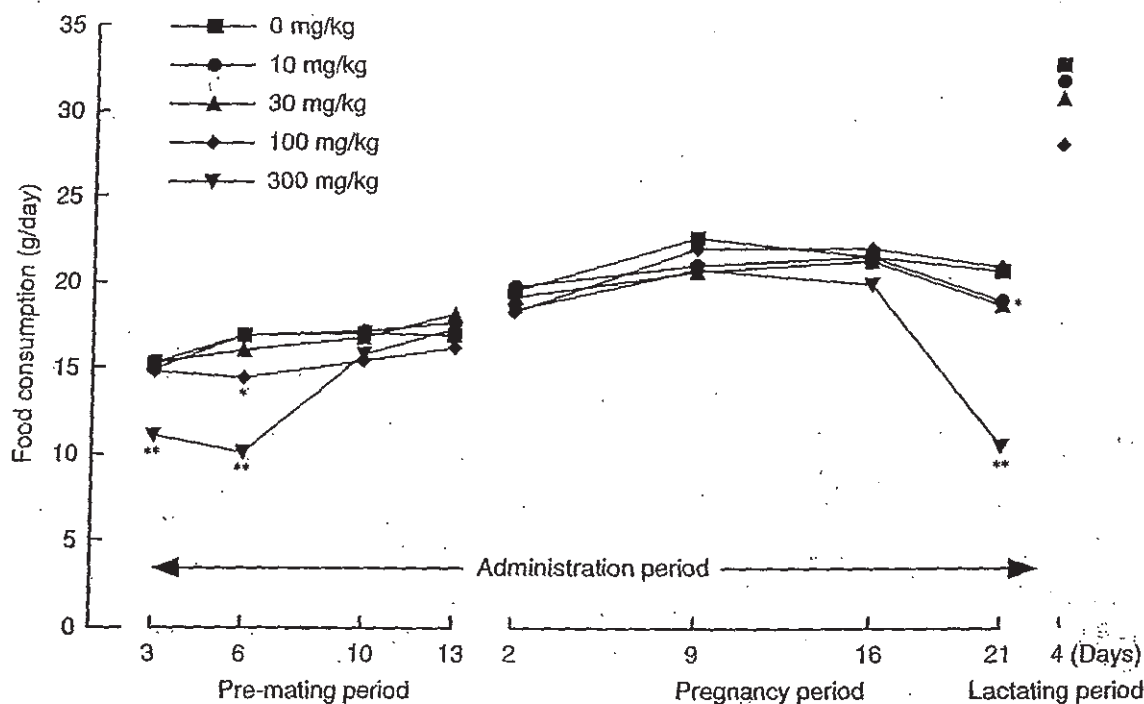


Fig. 4 Food consumption of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Significantly different from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

2) 児動物に及ぼす影響

(1) 分娩率および出生率 (Table 6)

10および30 mg/kg群では、対照群と比べて総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、性比、分娩率、児の産出率および出生率に有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて死産児数の有意な高値、

児の産出率および出生率の有意な低値、哺育0日の新生児数の低値傾向がみられた。300 mg/kg群では、対照群と比べて死産児数の有意な高値、総出産児数、哺育0日の新生児数、分娩率、児の産出率および出生率の有意な低値がみられた。

(2) 児動物の一般状態および生存率 (Table 6)

10および30 mg/kg群では、対照群と比べて哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率に有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、哺育1日までに全新生児が死亡した母動物が1例みられ、哺育4日の生存児数の有意な低値および新生児の4日の生存率の低値傾向が認められた。300 mg/kg群では、3母動物とも哺育2日までに全新生児が死亡したため、哺育4日の生存児が得られず、新生児の4日の生存率は0%であり、対照群と比べて有意差がみられた。

新生児の外表観察では、いずれの群とも異常はみられなかった。

児動物の一般状態では、いずれの群とも異常はみられなかった。

(3) 児動物の体重推移 (Table 6)

10, 30および100 mg/kg群では、対照群と比べて哺育0および4日の雌雄別体重に有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて哺育0日の雌雄別体重の低値傾向がみられた。

(4) 児動物の剖検

対照群, 10, 30および300 mg/kg群では、異常はみられなかった。100 mg/kg群では、腎盂拡張が1例みられたが、他の投与群で認められないことから偶発例と考えられる。

考察

4-エチルピフェニルのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験を行い、雌雄親動物の生殖能力および児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

雄に関しては、死亡および瀕死例はいずれの群にも認められなかった。一般状態では、30, 100および300 mg/kg群で投与後に一過性の流涎がみられたが、被験物質の刺激性に基づく変化と判断され、毒性症状とはみなさなかった。体重において、100および300 mg/kg群で低値がみられた。また、摂餌量においては、300 mg/kg群で低値がみられた。剖検、器官重量、精子検査、精巣および精巣上体の病理組織学検査において投与による影響は認められなかった。なお、ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験¹⁾でも、500 mg/kg以上の群で体重および摂餌量の低値がみられている。

雌に関しては、300 mg/kg群で妊娠末期に4例が死亡した。300 mg/kg群では、一部の例で妊娠末期に体温低下、自発運動の低下、立毛、被毛の汚れおよび軟便がみられた。なお、一般状態観察において、雄の場合と同様に100および300 mg/kg群で認められた流涎は毒性症状とはみなさなかった。体重において、300 mg/kg群で交配前、妊娠期および哺育期に低値がみられた。摂餌量において、100 mg/kg群で交配前に一過性の低値、300 mg/kg群で交配前および妊娠期に低値がみられた。しかし、生存例の剖検所見、器官重量および卵巣の病理組織学検査において投与による影響はみられなかった。なお、300 mg/kg群の死亡例の剖検において、腺胃粘膜暗

赤色斑がみられたが、該当部位の病理組織学検査では異常が認められなかったことから、軽微な変化と考えられる。ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験¹⁾では、死亡例が1000 mg/kg群で雄4/10例と雌1/10例、500 mg/kg群で雄1/5例認められており、妊娠動物の方が4-エチルピフェニルの毒性は強く発現する可能性がある。

親動物の生殖発生に対しては、前述したように10, 30, 100および300 mg/kg群とも精子検査成績、精巣、精巣上体および卵巣に病理組織学変化は認められなかった。発情回数、交尾率、交尾所要日数、受胎率、妊娠黄体数、分娩状態および哺育状態では、投与に起因する変化はみられなかった。しかし、100および300 mg/kg群では、妊娠期間の延長がみられた。また、300 mg/kg群では、着床数の低値、出産率および着床率の低値傾向がみられた。10および30 mg/kg群では、妊娠期間、着床数、着床率および出産率に投与に起因する変化はみられなかった。

児動物に対しては、10および30 mg/kg群では総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、性比、分娩率、児の産出率、出生率、一般状態、哺育4日の新生児数、哺育4日の生存率に投与による影響はみられなかった。100 mg/kg群では、死産児数の高値、児の産出率および出生率の低値、哺育0日の新生児数、哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率の低値あるいは低値傾向がみられた。300 mg/kg群では、死産児数の高値、総出産児数、哺育0日の新生児数、分娩率、児の産出率および出生率の低値がみられ、哺育4日の生存児は1例も得られなかった。新生児の外表観察において、投与に関連した変化はみられなかった。児動物の体重では、10, 30および100 mg/kg群では対照群との間に差はみられなかった。300 mg/kg群では、哺育0日の雌雄別体重の低値あるいは低値傾向がみられた。児動物の剖検では、投与に起因する変化はみられなかった。

以上のように、4-エチルピフェニルの一般毒性学的無影響量は、雄では100 mg/kg投与により体重に影響が認められたことから30 mg/kg/day、雌では100 mg/kg投与により摂餌量に影響が認められたことから30 mg/kg/dayと考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雄では300 mg/kg投与しても精子検査成績、精巣および精巣上体の病理組織学検査成績、交尾率に影響が認められなかったことから300 mg/kg/dayと考えられる。雌では100 mg/kg投与で妊娠期間の延長が認められたことから30 mg/kg/dayと考えられる。児動物では、100 mg/kg投与で死産児数の高値、児の産出率および出生率の低値、哺育0日の新生児数、哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率の低値傾向がみられたことから30 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 大原直樹ほか, 化学物質毒性試験報告, 7, 608 (1999).
- 2) M. Kato et al., *Congenital Anomalies*, 35, 394 (1995).

連絡先

試験責任者：古橋忠和

試験担当者：牧野浩平，内藤一嘉，藤村高志，
木村 均

(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島6-104

Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors: Tadakazu Furuhashi (Study director)

Kohei Makino, Kazuyoshi Naito,

Takasi Fuzimura and Hitoshi Kimura

Nihon Bioresearch Inc.

6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu, 501-

6251, Japan

Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284

Table 1 Organ weight of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Dose (mg/kg)		0	10	30	100	300
Number of males		12	12	12	12	12
Body weight	(g)	502.3±39.9	491.8±20.5	498.8±23.9	453.2±36.5**	411.7±25.1**
Testes	(g)	3.568±0.340	3.503±0.269	3.563±0.413	3.558±0.270	3.607±0.288
	(g%)	0.714±0.097	0.715±0.061	0.714±0.086	0.788±0.059	0.878±0.049**
Epididymides	(g)	1.250±0.073	1.290±0.098	1.261±0.116	1.262±0.070	1.151±0.118
	(g%)	0.250±0.023	0.264±0.023	0.253±0.022	0.279±0.026*	0.279±0.024*

Each value shows mean±S.D.

Significantly different from control (* p <0.05, ** p <0.01).

Table 2 Observation of sperm in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Dose (mg/kg)		0	10	30	100	300
Number of males		12	12	12	12	12
Sperm motion parameters						
After 30 min. incubation						
Motility ratio (%)		88.50±7.46	86.79±3.68	86.88±4.19	88.38±3.18	88.33±2.42
Path velocity (μ m/s)		160.99±16.47	163.03±6.87	160.95±4.48	165.85±7.88	164.34±9.23
Straight line velocity (μ m/s)		115.93±15.93	119.69±5.96	117.60±6.25	119.92±6.44	118.03±8.14
Curvilinear velocity (μ m/s)		367.77±31.58	376.40±12.37	363.23±12.29	381.67±15.55	381.93±20.57
Beat cross frequency (Hz)		31.11±1.35	30.84±0.89	30.25±2.22	31.14±1.28	32.63±1.64
Morphology of sperm						
Abnormal ratio (%) ^a		3.72±2.80	4.31±3.37	4.66±4.12	2.78±0.98	2.73±1.02
Viability (%) ^b		99.20±1.21	98.35±2.12	98.34±2.27	99.09±0.61	99.25±0.57
Survivability (%) ^c		87.08±3.86	85.03±4.69	84.98±7.55	86.60±3.48	84.18±3.47
Number of sperms in left cauda epididymis ($\times 10^6$)		265.51±52.70	274.13±38.27	272.24±56.87	271.93±41.72	227.70±43.55
Number of sperms/g (left cauda epididymis) ($\times 10^6$)		883.81±131.49	879.64±67.73	885.38±161.62	894.24±122.03	858.48±94.28

Each value shows mean±S.D.

a) (Number of abnormal sperms/300 sperms) $\times 100$.b) (Number of live sperms+number of dead sperms during the 2 hrs. incubation)/300 sperms $\times 100$.c) (Number of live sperms after the 2 hrs. incubation/300 sperms) $\times 100$.

Table 3 Histopathological findings of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Dose (mg/kg)	0								300							
	N ^a	A ^b	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+				
Incidence and grade																
Findings																
Testis	[12] ^c						[12]									
Retention, spermatid, group 3, seminiferous tubule	11	1	1	0	0	0	12	0								

Grade of histopathological findings; ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

a) No abnormality detected.

b) Abnormality detected.

c) Examined number of males.

No remarkable changes were seen in the epididymis.

Table 4 Organ weight of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	30	100	300
Number of females	12	12	12	12	8
Body weight (g)	356.7±22.1	346.8±18.8	340.0±18.0	335.6±18.1*	284.3±21.3**
Ovaries (mg)	101.38±10.29	107.16±12.70	106.98±14.05	105.35±15.01	119.55±22.29
(mg%)	28.48±3.17	31.03±4.36	31.52±4.39	31.38±4.05	42.30±8.79**

Each value shows mean±S.D.
Significantly different from control (* p <0.05, ** p <0.01).

Table 5 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	30	100	300
Number of females	12	12	12	12	12
Number of estrous cases before mating (14 days)					
Mean±S.D.	3.4±0.7	3.3±0.5	3.3±0.5	3.4±0.5	2.9±0.5
Number of pairs	12	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation	11	12	12	12	12
Copulation index (%) ^a	91.7	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of conceiving days					
Mean±S.D.	1.8±0.9	2.4±1.2	2.9±1.4	2.2±1.1	2.5±1.6
Conceiving days 1-5	11	12	12	12	11
Conceiving days ≥6	0	0	0	0	1
Number of pregnant females	11	12	12	12	10
Fertility index (%) ^b	100.0	100.0	100.0	100.0	83.3
Number of dead pregnant females	0	0	0	0	4
Number of live pregnant females at delivery	11	12	12	12	6
Number of pregnant females with live pups	11	12	12	12	3

a) (Number of pairs with successful copulation/number of pairs)×100.
b) (Number of pregnant females/number of pairs with successful copulation)×100.

Table 6 Observation of pups in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	30	100	300
Number of dams	11	12	12	12	6
Length of gestation (days)	22.18±0.40	22.50±0.52	22.50±0.67	22.83±0.39**	23.00±0.00**
Corpora lutea	17.0±1.9	17.5±2.5	17.8±2.0	16.6±1.8	14.3±3.1
Implantation scars	16.0±1.5	15.9±1.5	16.3±1.8	15.9±2.0	12.2±2.8**
Implantation index (%) ^a	94.6±7.5	91.8±8.9	91.8±10.7	96.0±5.2	85.3±13.6
Gestation index (%) ^b	100.0	100.0	100.0	100.0	50.0
Pups born	15.3±1.8	15.4±1.4	15.3±1.1	14.8±2.7	7.0±3.7**
Stillbirths	0.1±0.3	0.4±0.7	0.3±0.5	2.1±3.8**	6.3±3.3**
Live pups born	15.2±2.0	15.0±1.5	15.0±1.4	12.8±3.9	0.7±0.8**
Sex ratio ^c	1.11±0.42	1.21±0.64	1.06±0.49	1.44±1.49	0.00 (2)
Delivery index (%) ^d	95.4±6.0	96.8±3.3	94.3±5.2	92.7±9.2	58.3±25.1*
Birth index (%) ^e	94.7±7.9	94.3±4.9	92.6±4.7	80.3±22.3*	5.0±5.9**
Live birth index (%) ^f	99.3±2.4	97.3±4.2	98.2±3.3	87.0±22.7*	8.2±10.6**
Live pups on day 4 of lactation	14.8±2.1	15.0±1.5	14.7±1.8	11.7±4.6*	0.0±0.0**(3)
Viability index (%) ^g	97.5±4.3	100.0±0.0	97.6±3.6	86.3±27.9	0.0±0.0**(3)
External anomalies (%) ^h	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0 (3)
Body weight of pups (g)					
Male					
Day 0	6.69±0.59	7.01±0.39	6.96±0.48	6.75±0.51	5.40 (1)
4	11.30±1.45	11.63±1.12	11.14±1.22	10.45±1.22(11)	—
Female					
Day 0	6.40±0.69	6.68±0.31	6.62±0.57	6.44±0.51	5.05 (2)
4	10.83±1.51	11.01±0.89	10.56±1.39	10.10±1.17(11)	—

Each value shows mean±S.D. per dam.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

a) (Number of implantation scars/number of corpora lutea)×100.

b) (Number of dams with live pups/number of pregnant dams)×100.

c) Number of male pups born/number of female pups born.

d) (Number of pups born/number of implantation scars)×100.

e) (Number of live pups born/number of implantation scars)×100.

f) (Number of live pups born/number of pups born)×100.

g) (Number of live pups on day 4/number of live pups born)×100.

h) (Number of pups with external anomalies/number of live pups)×100.

4-エチルビフェニルの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 4-Ethylbiphenyl on Bacteria

要約

4-エチルビフェニルについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰変異試験をプレインキュベーション法により実施した。

予備試験における抗菌性の結果をもとに、本試験では S9 mix 非共存下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 は 19.5 ~ 0.610 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の6濃度, WP2 *uvrA* は 39.1 ~ 0.610 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の7濃度を, 共存下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 は 78.1 ~ 2.44 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の6濃度, WP2 *uvrA* は 313 ~ 9.77 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の6濃度をそれぞれ設定した。

本試験を2回実施した結果, 被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また, S9 mix 非共存下ではすべての菌株の 9.77 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で, 共存下では TA100, TA1535, TA98, TA1537 の 78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$, WP2 *uvrA* の 156 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で抗菌性が認められた。従って4-エチルビフェニルは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と結論した。

方法

[使用菌株]

カリフォルニア大学 B. N. Ames 教授より 1983年5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および東京大学医科学研究所 松島教授より 1985年10月14日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5菌株を用いた。各菌株は超低温槽で -80℃以下に凍結保存したものを使用した。

試験に際して, 各凍結菌株を融解後, その 20 μL をニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath 社) 25 g を 1 L の精製水に溶解して作製した液体完全培地 10 mL に接種し, 37℃ で 8時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は, 濁度計を用いて菌濃度を測定し, 各菌株共に生菌数が $1 \times 10^8/\text{mL}$ 以上であることを確認した。

[被験物質]

4-エチルビフェニル(ロット番号:1-GOH, 新日鐵化学(株), 東京)は, 純度 97.998% (不純物として, 9-メチルフルオレン 0.64% を含有) の白色固体である。被験物質は

使用時まで冷暗所に保存した。なお, 本ロットの安定性は, 実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し, 確認した。

4-エチルビフェニルはジメチルスルホキシド (DMSO, 関東化学(株)) を用いて最高濃度 (50 mg/mL) の溶液を調製した後, 同溶媒で所定濃度に段階希釈したものをを用いた。

[陽性対照物質]

陽性対照物質として下記のものを用いた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業(株))

NaN₃ : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N''-ニトロソグアニジン (Sigma Chemical Co.)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chemical Co.)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

NaN₃ は注射用水 (株) 大塚製薬工場) に, その他は DMSO に溶解したものを使用した。

[培地および S9 mix の組成]

1) トップアガー

アミノ酸水溶液として, 精製水を用いて 0.5 mM D-ピオチン, L-ヒスチジン混合水溶液 (サルモネラ用) または 0.5 mM L-トリプトファン水溶液 (大腸菌用) を調製し, これをろ過滅菌後, 冷蔵庫に保管した。精製水 100 mL に対して, 粉末寒天 (Bacto-Agar, Difco 社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え, オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後, 上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し, 約 45℃ に保温した。

2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 (オリエンタル酵母工業(株)) を購入し, 使用した。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・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
寒天 (OXOID Agar No.1)	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 mix

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム六水塩	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
D-グルコース6-リン酸	5 μ mol
β -NADPH	4 μ mol
β -NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol
滅菌精製水	残量

*:購入したS9(キッコーマン(株))を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボン併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 \times g遠心上清分画である。

[試験方法]

試験はブレインキューベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を0.1 mL、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mLおよび菌懸濁液を0.1 mL加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間振盪培養した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 mL添加した。ブレインキューベーション後、トップアガー2 mLを上記の混合液に加え混和し、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各用量につき1枚のプレートを使用した。本試験は各用量につき3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

[試験結果の判定基準]

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照値の2倍以上を示し、明確な用量相関性および再現性が認められる場合に陽性と判定した。

結果および考察

[予備試験]

5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 μ g/plateの濃度で実施した結果、S9 mix非共存下ではすべての菌株の19.5 μ g/plate以上で、共存下ではTA100, TA1535, TA98, TA1537の78.1 μ g/plate以上、WP2 *uvrA*の313 μ g/plate以上で抗菌性が認められた。従って、本試験ではS9 mix非共存下のTA100, TA1535, TA98, TA1537は19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610 μ g/plateの6濃度、WP2 *uvrA*は39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610 μ g/plateの7濃度を、共存下のTA100, TA1535, TA98,

TA1537は78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44 μ g/plateの6濃度、WP2 *uvrA*は313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77 μ g/plateの6濃度をそれぞれ設定した。

[本試験]

結果をTable 1, 2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施した結果、2回の本試験ともに、被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mix非共存下ではすべての菌株の9.77 μ g/plate以上で、共存下ではTA100, TA1535, TA98, TA1537の78.1 μ g/plate, WP2 *uvrA*の156 μ g/plate以上で抗菌性が認められた。

以上の結果から、4-エチルピフェニルは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と結論した。

なお、類似化合物である1,1'-ピフェニルおよび α -ピフェニルフェノールは、いずれも細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が報告されている³⁾。

参考文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173(1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3(1976).
- 3) 石館 基 監修, 微生物を用いる変異原性試験データ集, エル・アイ・シー社, 東京, 1991.

連絡先

試験責任者: 宮川 誠

試験担当者: 榎本佳明, 清水優子, 大久保智子

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Makoto Miyagawa (Study director)

Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu,

Tomoko Okubo

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,

Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,

Ibaraki, 314-0255, Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Results of reverse mutation test of 4-ethylbiphenyl on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	129 146 (146) 164 (\pm 18)	11 12 (12) 14 (\pm 2)	30 31 (31) 32 (\pm 1)	26 18 (22) 23 (\pm 4)	7 4 (6) 6 (\pm 2)
	0.610	125 149 (143) 155 (\pm 16)	11 12 (12) 12 (\pm 1)	26 27 (26) 26 (\pm 1)	20 27 (22) 20 (\pm 4)	4 6 (5) 4 (\pm 1)
	1.22	149 120 (139) 147 (\pm 16)	8 12 (10) 11 (\pm 2)	24 35 (27) 23 (\pm 7)	16 16 (16) 16 (\pm 0)	5 6 (5) 5 (\pm 1)
	2.44	148 136 (140) 136 (\pm 7)	12 13 (12) 11 (\pm 1)	27 28 (27) 26 (\pm 1)	18 30 (22) 18 (\pm 7)	9 4 (5) 3 (\pm 3)
	4.88	131 111 (124) 131 (\pm 12)	16 6 (12) 14 (\pm 5)	23 21 (25) 30 (\pm 5)	22 26 (24) 23 (\pm 2)	4 7 (6) 7 (\pm 2)
	9.77	116* 110* (111) 108* (\pm 4)	10* 3* (8) 10* (\pm 4)	18* 16* (20) 27* (\pm 6)	6* 11* (11) 15* (\pm 5)	6* 5* (4) 2* (\pm 2)
	19.5	0* 0* (0) 0* (\pm 0)	0* 0* (0) 0* (\pm 0)	15* 18* (17) 18* (\pm 2)	0* 0* (0) 0* (\pm 0)	0* 0* (0) 0* (\pm 0)
	39.1			17* 21* (18) 17* (\pm 2)		
S9 mix (+)	0	145 164 (156) 160 (\pm 10)	13 11 (12) 12 (\pm 1)	30 37 (34) 36 (\pm 4)	36 34 (34) 31 (\pm 3)	11 9 (10) 9 (\pm 1)
	2.44	148 147 (152) 162 (\pm 8)	9 11 (12) 17 (\pm 4)		39 28 (32) 28 (\pm 6)	5 11 (8) 9 (\pm 3)
	4.88	165 160 (164) 167 (\pm 4)	16 17 (17) 17 (\pm 1)		35 40 (35) 30 (\pm 5)	6 11 (10) 12 (\pm 3)
	9.77	151 160 (160) 170 (\pm 10)	16 12 (14) 13 (\pm 2)	27 38 (33) 34 (\pm 6)	40 28 (35) 38 (\pm 6)	6 11 (11) 16 (\pm 5)
	19.5	160 133 (162) 194 (\pm 31)	9 12 (14) 21 (\pm 6)	38 44 (37) 29 (\pm 8)	49 34 (36) 26 (\pm 12)	10 8 (11) 16 (\pm 4)
	39.1	131 152 (147) 157 (\pm 14)	12 10 (11) 10 (\pm 1)	46 47 (42) 34 (\pm 7)	34 36 (37) 40 (\pm 3)	9 10 (12) 16 (\pm 4)
	78.1	139* 123* (130) 128* (\pm 8)	4* 5* (7) 11* (\pm 4)	37 43 (37) 30 (\pm 7)	21* 27* (26) 30* (\pm 5)	7* 5* (6) 5* (\pm 1)
	156			22* 17* (19) 19* (\pm 3)		
313			29* 15* (22) 23* (\pm 7)			
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
Positive control S9 mix (-)	Number of revertants	487 481 (471) 445 (\pm 23)	501 456 (474) 465 (\pm 24)	452 400 (413) 387 (\pm 34)	358 364 (369) 384 (\pm 14)	346 228 (265) 222 (\pm 70)
	Number of revertants	1047 1108 (1074) 1066 (\pm 31)	366 346 (360) 369 (\pm 13)	1393 1414 (1384) 1345 (\pm 35)	360 416 (381) 368 (\pm 30)	123 166 (143) 139 (\pm 22)

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)
(\pm S.D.)

*Microbial toxicity was observed.

Table 2 Results of reverse mutation test of 4-ethylbiphenyl on bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test Substance Concentration (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	149 161 (± 157) 162 (± 7)	10 15 (± 11) 7 (± 4)	29 32 (± 27) 19 (± 7)	12 14 (± 14) 17 (± 3)	8 6 (± 6) 5 (± 2)
	0.610	139 145 (± 153) 176 (± 20)	6 11 (± 7) 5 (± 3)	25 19 (± 21) 18 (± 4)	22 16 (± 21) 26 (± 5)	7 6 (± 6) 4 (± 2)
	1.22	176 158 (± 171) 180 (± 12)	9 12 (± 10) 8 (± 2)	31 25 (± 26) 21 (± 5)	28 26 (± 24) 19 (± 5)	5 8 (± 6) 6 (± 2)
	2.44	169 149 (± 154) 145 (± 13)	9 5 (± 9) 14 (± 5)	20 26 (± 22) 20 (± 3)	23 15 (± 16) 10 (± 7)	8 5 (± 6) 5 (± 2)
	4.88	166 168 (± 158) 141 (± 15)	11 10 (± 10) 9 (± 1)	30 28 (± 26) 20 (± 5)	26 16 (± 21) 20 (± 5)	10 6 (± 8) 9 (± 2)
	9.77	85* 130* (± 115) 130* (± 26)	11* 4* (± 8) 8* (± 4)	19* 27* (± 20) 15* (± 6)	19* 11* (± 15) 14* (± 4)	5* 5* (± 4) 3* (± 1)
	19.5	0* 0* (± 0) 0* (± 0)	0* 0* (± 0) 0* (± 0)	8* 19* (± 15) 17* (± 6)	0* 0* (± 0) 0* (± 0)	0* 0* (± 0) 0* (± 0)
	39.1			10* 12* (± 12) 15* (± 3)		
S9 mix (+)	0	173 164 (± 170) 172 (± 5)	9 11 (± 10) 9 (± 1)	35 22 (± 29) 31 (± 7)	29 24 (± 29) 33 (± 5)	8 13 (± 9) 6 (± 4)
	2.44	166 193 (± 180) 180 (± 14)	17 18 (± 17) 15 (± 2)		28 28 (± 28) 28 (± 0)	10 12 (± 9) 6 (± 3)
	4.88	158 181 (± 168) 165 (± 12)	10 17 (± 13) 11 (± 4)		28 21 (± 27) 31 (± 5)	8 6 (± 7) 8 (± 1)
	9.77	192 157 (± 161) 133 (± 30)	8 10 (± 9) 9 (± 1)	26 34 (± 32) 37 (± 6)	36 36 (± 33) 28 (± 5)	9 10 (± 9) 8 (± 1)
	19.5	173 179 (± 178) 183 (± 5)	18 15 (± 15) 12 (± 3)	27 38 (± 33) 34 (± 6)	23 20 (± 22) 24 (± 2)	13 17 (± 12) 7 (± 5)
	39.1	141 143 (± 146) 155 (± 8)	9 9 (± 8) 7 (± 1)	32 26 (± 27) 23 (± 5)	22 30 (± 24) 21 (± 5)	12 9 (± 11) 11 (± 2)
	78.1	143* 136* (± 137) 133* (± 5)	7* 6* (± 8) 12* (± 3)	26 23 (± 23) 21 (± 3)	19* 25* (± 21) 19* (± 3)	7* 4* (± 6) 8* (± 2)
	156			17* 30* (± 22) 19* (± 7)		
313			18* 18* (± 19) 21* (± 2)			
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration (μg/plate)	0.01	0.5	2	0.1	80
	Number of revertants	558 538 (± 537) 515 (± 22)	447 418 (± 446) 474 (± 28)	719 678 (± 717) 755 (± 39)	421 394 (± 425) 460 (± 33)	237 195 (± 253) 328 (± 68)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (μg/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	1250 1131 (± 1136) 1027 (± 112)	244 283 (± 256) 242 (± 23)	1155 1170 (± 1227) 1357 (± 113)	390 459 (± 414) 392 (± 39)	136 173 (± 149) 137 (± 21)

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)
(±S.D.)

*: Microbial toxicity was observed.

4-エチルビフェニルのチャイニーズ・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 4-Ethylbiphenyl on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

4-エチルビフェニルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、連続処理法の24時間処理および短時間処理法のS9 mix存在下、非存在下では18.8, 37.5, 75, 150, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を、連続処理法48時間処理では9.38, 18.8, 37.5, 75, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下では4-エチルビフェニルは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

材料および方法

1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1996年11月, 入手時:継代14代, 凍結時:17代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代5代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(GIBCO BRL, ロット番号:39K0464)を10 vol%添加したイーグルMEM(日本製薬(株)培養液)を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたデイスコ(径6cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。

連続処理法では、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、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mix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

4-エチルビフェニル(ロット番号:1-GOH, 新日鐵化学

(株), 東京)は、純度:97.998%(不純物として、9-メチルフルオレン0.64%含有)の白色固体である。被験物質は使用時まで冷暗所に保存した。なお、本ロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質提供者が分析し、確認した。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒はアセトン(国産化学(株), ロット番号:A605G1)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1.0 vol%になるように加えた。

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/IU細胞に対する増殖抑制作用は、血球計算盤を用いて各群の細胞を計数し、陰性対照群に対する割合をもって指標とした。

その結果、4-エチルビフェニルの約50%の増殖抑制を示す濃度を、プロビット法により算出したところ、連続処理法の24時間および48時間処理ではそれぞれ78, 66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、短時間処理法のS9 mix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97, 91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。しかし、すべての処理条件で高濃度側(5000, 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)においても、生存細胞が認められた(Fig.1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験は、全ての処理条件において5000, 2500, 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定した。さらに、50%の増殖抑制を示す濃度の値から、連続処理法24時間処理および短時間処理法S9 mix存在下、非存在下では150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法48時間処理では75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度とし、公比2で4用量を設定した。

陽性対照として、連続処理法は、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:139AFK)を0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法は、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業(株), ロット番号:AX01)を20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。

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

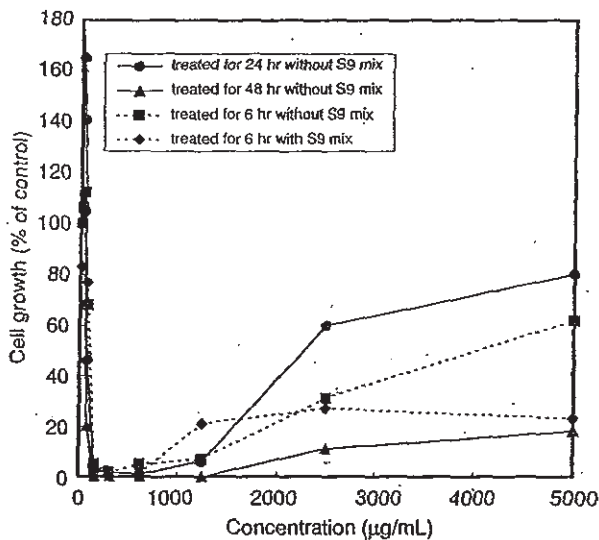


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4-ethylbiphenyl

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。スライド標本は各ディッシュにつき2枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で20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枚のディッシュから得られたスライドを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・哺乳動物試験分科会(MMS)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。

構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と測定

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。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、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

連続処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。4-エチルビフェニルを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および数的異常の誘発作用は認められなかった。

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。4-エチルビフェニルを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常および数的異常の誘発作用は

認められなかった。

以上の結果から、4-エチルビフェニルは本試験条件下において、染色体異常誘発性を有しないと結論した。

なお、類似化合物であるdiphenyl, o-phenylphenol, 2,5-dihydroxybiphenylは、染色体異常試験の連続処理法において陰性の結果が報告されている。なお、また、diphenylは短時間処理法S9 mix存在下で陽性の結果が報告されている²⁾。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 16-37.
- 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, 東京, 1987.

連絡先

試験責任者: 太田絵律奈

試験担当者: 中川宗洋, 石毛裕子, 穴澤由美子, 玉川 恵

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Erina Ohta (Study director)

Munehiro Nakagawa, Yuko Ishige,

Yumiko Anazawa, Megumi Tamagawa

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-0255, Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 4-ethylbiphenyl without S9 mix

Group	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Number of cells with aberrations		polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap(%)	+gap(%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	1	2	0	0	3	3(1.5)	3(1.5)	0.5	-	-
Test Substance	18.8	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.5	-	-
	37.5	24	200	0	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	1.0	-	-
	75	24	100	0	0	1	0	0	0	1	1(1.0)	1(1.0)	1.0	-	-
	150	24													
	1250 ※◇	24	100	0	1	0	0	0	0	1	1(1.0)	1(1.0)	0.0	-	-
	2500 ※◇	24													
	5000 ※#	24	100	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
MMC	0.03	24	200	2	20	23	0	0	0	45	43(21.5)	44(22.0)	0.0	+	-
Solvent	0	48	200	0	1	0	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
Test Substance	9.38	48	200	0	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.5	-	-
	18.8	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0(0.0)	1(0.5)	0.0	-	-
	37.5	48	200	1	1	0	1	0	0	3	2(1.0)	3(1.5)	0.5	-	-
	75	48													
	1250 ※◇	48													
	2500 ※◇	48													
	5000 ※#	48													
MMC	0.03	48	200	3	33	40	2	0	0	78	66(33.0)	68(34.0)	0.5	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), f: fragment
 -gap: total number cells with aberrations except gap, +gap: total number of cells with aberrations
 SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MMC: mitomycin C (positive control)

1) Acetone was used as solvent.

2) Two hundred cells were analyzed in each group, except 75, 150, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al* (1987).

※: Some of the test substance precipitated in the medium at the beginning of the treatment.

◇: Some of the test substance suspended in the medium at the beginning of the treatment.

#: Some of the test substance floated as a lump on the surface of the medium at the beginning of the treatment.

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4-ethylbiphenyl with and without S9 mix

Group	Concentration (μg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Number of cells with aberrations		polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap (%)	+gap (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	-	6-18	200	0	1	0	2	0	0	3	3(1.5)	3(1.5)	0.5	-	-
Test Substance	18.8	-	6-18	200	2	1	0	0	0	0	3	1(0.5)	3(1.5)	0.0	-	-
	37.5	-	6-18	200	0	3	0	2	0	0	5	5(2.5)	5(2.5)	0.5	-	-
	75	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
	150	-	6-18		Toxic											
	1250 ※◇	-	6-18		Toxic											
	2500 ※◇	-	6-18	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.5	-
	5000 ※#	-	6-18	200	0	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
BP	20	-	6-18	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.5	-	-
Solvent	0	+	6-18	200	0	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
Test Substance	18.8	+	6-18	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
	37.5	+	6-18	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	1.5	-	-
	75	+	6-18	200	0	1	1	0	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	1.5	-	-
	150	+	6-18		Toxic											
	1250 ※◇	+	6-18	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
	2500 ※◇	+	6-18	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
	5000 ※#	+	6-18	200	0	0	3	0	0	0	3	3(1.5)	3(1.5)	0.0	-	-
BP	20	+	6-18	200	0	24	157	0	0	0	181	159(79.5)	159(79.5)	0.5	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), f: fragment

-gap: total number cells with aberrations except gap, +gap: total number of cells with aberrations

SA: structural aberration, NA: numerical aberration, BP: benzo [a] pyrene (positive control)

1) Acetone was used as solvent.

2) Two hundred cells were analyzed in each group, 75, 150 and 1250 μg/mL without S9 mix and 150 μg/mL with S9 mix.

3) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

※: Some of the test substance precipitated in the medium at the beginning of the treatment.

◇: Some of the test substance suspended in the medium at the beginning of the treatment.

#: Some of the test substance floated as a lump on the surface of the medium at the beginning of the treatment.

