

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of
Ditridecyl phthalate by Oral Administration in Rats

要約

ジトリデシルフタラートは、軟質塩化ビニル(プラスチック)の可塑剤として使用されているフタル酸エステル的一种であり、血液バックや血液回路等の医療機器、食物の保存容器に広く使用されている化学物質である。フタル酸エステルの毒性試験は数多く実施されており、フタル酸エステルの中には、ペルオキシゾームを増殖させる作用をもち、肝および腎毒性、さらに精巢毒性を示すものもある²⁻⁶⁾。また、妊娠マウスあるいはラットにフタル酸エステルを投与すると、催奇形性を含む発生毒性を示すことが報告されている^{2,7,8)}。ジトリデシルフタラートについては、ラットでのLD₅₀値が経口投与では64 mL/kg以上であることが知られている¹⁰⁾が、反復投与毒性および生殖発生毒性については、明らかにされていない。そこで今回、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、ジトリデシルフタラートの0(溶媒対照)、10、50および250 mg/kgをSprague-Dawley系(Crj:CD)ラットの雌雄(各13匹/群)に交配前2週間および交配期間2週間経口投与し、さらに雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで投与を継続して、親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

その結果、死亡動物は、対照群を含まいずれの投与群においても認められなかった。雄では、投与後一過性の流産が、50 mg/kg以上のジトリデシルフタラート投与により投与16日以降、断続的ではあるが投与期間を通して観察された。摂餌量には、雌雄ともにジトリデシルフタラート投与による影響は認められなかったが、雌では体重の増加抑制が、50 mg/kg以上のジトリデシルフタラート投与により認められた。雌の一般状態および雄の体重推移には、ジトリデシルフタラート投与の影響は認められなかった。

肝臓重量の増加が、雄では250 mg/kgのジトリデシルフタラート投与により、雌では50 mg/kg以上のジトリデシルフタラート投与により認められた。病理組織学検査の結果、雌雄ともに、50 mg/kg以上のジトリデシルフタラート投与により小葉中心部の肝細胞が肥大し、雄では、250 mg/kgのジトリデシルフタラート投与により、カタラーゼ染色陽性顆粒が増加した。また、雄の腎臓重量の増加が、250 mg/kgのジトリデシルフタラート投与により認められた。病理組織学検査の結果、雄では、250 mg/kgのジトリデシルフタラート投与により、

eosinophilicbodyの発現頻度が増加し、尿細管上皮が壊死した後の再生像と思われる好塩基性尿細管が観察された。雌の腎臓重量にはジトリデシルフタラート投与の影響は認められなかったが、250 mg/kgのジトリデシルフタラート投与により、腎盂上皮および膀胱移行上皮の過形成が認められた。しかし、尿検査の結果には、雌雄ともにジトリデシルフタラート投与の影響は認められなかった。雄について実施した血液生化学検査では、250 mg/kgのジトリデシルフタラート投与により、アルカリフォスファターゼの上昇が認められたが、血液学的検査にはジトリデシルフタラート投与の影響はなかった。

また、ジトリデシルフタラート投与による精巢毒性も認められなかった。

一方、生殖発生毒性に関しては、雌雄動物の交尾率、受胎率、雌の妊娠維持および分娩に関して、ジトリデシルフタラート投与の影響は認められなかった。250 mg/kgのジトリデシルフタラート投与により、哺育不良が示唆された。250 mg/kgのジトリデシルフタラート投与により認められた母動物の哺育不良に起因して、産児の生存性が低下した。しかし、産児の性比、体重および形態に、ジトリデシルフタラート投与の影響は認められなかった。

これらのことから、本試験条件下では、ジトリデシルフタラートの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに、10 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、雄に対しては、250 mg/kg/day、雌に対しては、50 mg/kg/day、産児に対しては、250 mg/kg/dayであると判断される。

方法

1. 被験物質

ジトリデシルフタラート [ロット番号:2700(協和油化(株)),純度:93.7-100.0%(エステル価198-212より換算),分子式:C₃₄H₅₈O₄,分子量:530.83,比重:0.950(20℃/20℃),融点(凝固点):-21℃,沸点:250℃(2 mmHg)]は、無色透明の液体でフタル酸エステル的一种であり、使用時まで室温保管した。

被験物質は、コーン油 [ナカライテスク(株), Lot No.:V6N3521]にて溶解し、いずれの用量においても1回の投与量が5 mL/kg体重になるように濃度を調整した。調製検体は、冷蔵、遮光、気密の条件下で保管し、調製後7日以内に投与した。なお、0.2および20%(w/v)の濃度の調製液については、冷蔵、遮光条件下で少なく

とも11日間安定であることが確認されており、試験期間中に調製した投与液には、所定のジトリデシルフタラートが均一に含有されていたことを確認した。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも7週齢にて購入した日本チャールス・リバー(株)日野飼育センター生産のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD,SPF)を使用した。動物は、入荷後1週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、一般状態に異常が認められなかったものを試験に供した(群分け時体重範囲:雄312.0~348.2g,雌198.3~221.7g)。

各動物は、温度23.8~24.2℃および湿度53~68%、換気回数約15回/時、照明12時間(午前7時~午後7時)の飼育室で、金属製ケージ(日本ケージ(株))に個別に収容して飼育し、固型飼料(CE-2,日本クレア(株))および飲料水を自由に摂取させた。妊娠14日(交尾確認日=妊娠0日)以後の雌動物については、ラット用繁殖ケージ(日本クレア(株))に収容し、床敷として紙パルプ製チップ(ALPHA-dri,加藤(株))を適宜供給した。

3. 群分け法

雌雄とも初回投与日の体重をもとに、体重別層化無作為抽出法により群分けし、各群とも雌雄各13匹を配した。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

先に実施した14日間反復経口投与による予備試験において、1000 mg/kgのジトリデシルフタラート投与により、雌雄各1例で投与初日に軟便が観察された。摂餌量にジトリデシルフタラート投与の影響は認められなかったが、1000 mg/kgの投与により、雌雄とも、体重の増加抑制傾向が認められた。また、250 mg/kg以上の投与により、雌雄の肝臓重量が増加し、500 mg/kg以上の投与により、雄では腎臓重量が、雌では副腎重量が、それぞれ増加する傾向が認められた。さらに、雄では、尿検査の結果、500 mg/kg以上の投与により蛋白が、1000 mg/kgの投与によりビリルビンが、それぞれ軽度ではあったが増加した。雄の血液生化学検査の結果、250 mg/kg以上の投与により、アルブミンが上昇し、尿素窒素が減少する傾向が認められた。しかし、雌では、尿検査、血液生化学検査にジトリデシルフタラート投与の影響は認められなかった。血液学検査および剖検には雌雄とも、ジトリデシルフタラート投与による著しい変化は認められなかった。なお、500および1000 mg/kg投与群において実施した精巣の病理組織学検査の結果、1000 mg/kg投与群の1例に、萎縮した精細管の点在が認められたのみであり、ジトリデシルフタラート投与の影響と考えられる変化は認められなかったことから、14回の反復投与により雌雄の肝臓重量に影響を及ぼしたが、その他の検査項目にはジトリデシルフタラート投与による著しい変化の認められなかった250 mg/kgを高用量に設定し、以下、公比5で減じて中用量には50 mg/kgを、低用量には10 mg/kgを設定した。対照群のラットには

コーン油をジトリデシルフタラート投与群と同一条件にて投与した。

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前2週間と交配期間(2週間)および交配期間終了後2週間(剖検日前日までの連続42日間)、また、雌に対しては交配前2週間と最長2週間の交配期間中(交尾成立まで)、ならびに交尾成立雌では妊娠期間を通して分娩後の哺育3日(分娩日=哺育0日)まで毎日1回、ラット用胃管を用いて経口投与した。毎日の投与は、午前9時から12時の間に行い、各動物の投与液量(5 mL/kg体重)は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回測定した体重をもとに、また、交尾成立後の雌については妊娠0日の体重をもとにそれぞれ算出した。

5. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態

雌雄とも全例について、飼育期間中毎日1回以上観察した。

B. 体重

雄は全例について、投与1, 8, 15, 22, 29, 36, 42日および解剖日に、雌は全例について、投与1, 8, 15日に測定し、投与22日までに交尾しなかった雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾雌では、妊娠0, 7, 14, 20日に、分娩した雌では哺育0および4日(解剖日)に体重を測定した。

C. 摂餌量

雌雄とも全例について、体重測定日と同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算出した。2週間の交配期間中の餌重量は測定しなかった。交尾成立雌では、妊娠0~7, 7~14, 14~20日に、分娩した雌では、哺育0~4日の摂餌量を測定した。

D. 尿検査

雌雄とも全例について、雄は解剖日前日に、雌では妊娠14日にpH、潜血、蛋白質、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビンについて試験紙法(マルティステックス/クリニテック 200, マイルス三共)により尿検査を実施した。

E. 交配

交配は、投与15日の夕方から最長2週間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾の確認は、毎朝、膣栓および膣垢中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配の結果から、交尾率 $\{(\text{交尾動物数}/\text{交配動物数}) \times 100\}$ 、受胎率 $\{(\text{妊娠動物数}/\text{交尾動物数}) \times 100\}$ 、同居開始から交尾成立までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

F. 分娩・哺育状態

各群とも交尾した雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態は、直接観察が可能なものについてのみ行い、それ以外の動物については分娩後の徴候から分娩困難や遅延などの分娩障害の有無を判断した。分娩後は哺育状態を

観察した。

G. 分娩日の規定

分娩の確認は、午前9時～11時に限定し、この時間帯に分娩が終了していることを確認した動物について、その日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎてから分娩を終了した動物については、翌日を分娩日とした。分娩を確認した全例について、妊娠期間(妊娠0日から分娩日までの日数)を算定し、出産率〔(生児出産雌数/妊娠動物数)×100〕を各群について求めた。

H. 剖検

a) 雄動物

イ. 剖検、器官重量および病理組織学検査

最終投与日の投与終了後から絶食を開始し、翌日にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させて剖検した。その際、全例について胸腺、肝臓、腎臓、副腎、精巣および精巣上体の重量を測定した。精巣および精巣上体はプアン液に固定して保存し、残りの重量測定済み器官および脳、心臓、脾臓、膀胱ならびに剖検時に異常が認められた器官(肺)は、10%ホルマリン液に固定して保存した。これらの器官は、高用量群および対照群について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学検査を実施した。病理組織学検査の結果、高用量群で異常が認められた肝臓および腎臓については、他の投与群についても病理組織学検査を行った。

また、各群2例について、肝臓のペルオキシゾーム酵素活性を調べるために、肝臓の一部を0.1 M カコジル酸緩衝2.5%グルタルアルデヒド液に固定し、カタラーゼ染色を行って酵素組織化学検査を実施した。

ロ. 血液学検査

全例について、剖検に先立ち、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で後大静脈腹部より、抗凝固剤としてEDTA-2K処理した注射筒を用いて採血し、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、血色素量(Hb)、平均赤血球容積(MCV)、血小板数、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を多項目自動血液測定器(Coulter Counter Model S-PLUS IV)により測定し、白血球分類は、Wright-Giemsa染色を行い、光学顕微鏡下で観察し算出した。

ハ. 血液生化学検査

全例について、血液学検査のための採血に引き続き、抗凝固剤としてヘパリン処理した注射筒を用いて採血し、血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置COBAS-FARA(ロシュ)および全自動電解質分析装置EA05(A&T)を用い、総蛋白(ビウレット法)、アルブミン(BCG法)、総コレステロール(COD・DAOS法)、ブドウ糖(グルコキナーゼG6PDH法)、尿素窒素(ウレアーゼGLDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、アルカリフォスファターゼ(パラニトロフェニルリン酸基質法)、GOT(SSCC法)、GPT(SSCC法)、 γ -GTP(γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)、トリグリセライド(GPO・DAOS法)、無機リン(モリブデン酸直接

法)、総ビリルビン(ビリルビン「ロシュ」キットSシリーズ)、カルシウム(OCPC法)、A/G比(計算)、ナトリウム(イオン電極法)、カリウム(イオン電極法)、塩素(イオン電極法)について分析した。

b) 雌動物

分娩した動物は哺育4日に、交尾は確認されたが分娩しなかった動物は妊娠25日相当日にそれぞれ、ペントバルビタール麻酔下で放血・致死させて剖検した。その際、卵巣および子宮を摘出し、卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えた後、プアン液に保存した。子宮については着床数を数え、着床率〔(着床数/妊娠黄体数)×100〕を算出した。また、肝臓、腎臓、副腎および胸腺の重量を測定した。重量測定済み器官および脳、心臓、脾臓、膀胱、子宮ならびに剖検時に異常が認められた器官は、10%ホルマリン液に固定して保存した。これらの器官(卵巣および子宮を除く)は、高用量群および対照群について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学検査を行った。不妊例の卵巣についても病理組織学検査を実施した。病理組織学検査の結果、高用量群で異常が認められた肝臓、胸腺、腎臓、膀胱および副腎については、他の投与群についても病理組織学検査を行った。

2) 出生児

A. 産児数の算定

哺育0日に産児数(生存児+死亡児)を調べ、分娩率〔(産児数/着床痕数)×100〕および生児出産率〔(出生児数/着床痕数)×100〕を求めた。産児については、外表奇形の有無および性別を調べ、生存児の性比〔(雄の生児数/出生児数)×100〕を算出した。

B. 死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ、出生率〔(出生児数/産児数)×100〕および新生児の4日の生存率〔(哺育4日の生児数/哺育0日の生児数)×100〕を求めた。死亡児は剖検した。

C. 体重測定

哺育0日および4日に一腹単位で雌雄別に体重(litter重量)を測定し、(litter重量/測定児数)を各腹について求めた。

D. 剖検

哺育4日に全例を剖検した。

6. 統計解析

交尾率および受胎率についてはYatesの補正を含む χ^2 検定を行った。病理組織所見については、グレード分けしたデータはMann-WhitneyのU検定を、陽性グレードの合計値はFisher直接確率の片側検定を行った。その他のデータ(尿検査を除く)は、個体ごとに得られた値あるいは一腹ごとの平均値を1標本として、先ずBartlett法により各群の分散の一樣性について検定した。その結果、分散が一樣とされた場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合には、各群の匹数が同一であればDunnnett法を用い、同一でない場合

は Scheffé 法を用いて対照群とジトリデシルフタラート各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が一様でなかった場合、または分散が0となる群が存在した場合は、Kruskal-Wallis 順位検定を行い、群間に有意性が認められた場合に、対照群とジトリデシルフタラート各投与群との差について Dunnett 法あるいは Scheffé 法の検定を行った。なお、有意水準は、5%および1%とした。

結果

I. 反復投与毒性(親動物所見)

1) 一般状態

雌雄ともに、いずれの投与群においても死亡あるいは瀕死動物は認められなかった。雄では、投与後に一過性の流涎が、50 mg/kg 以上の投与群に観察された。この流涎は、50 mg/kg 投与群の2例に、投与38日以降1~3回、250 mg/kg 投与群の7例に、投与16日以降1~7回観察された。雌では、両前肢、頸部あるいは腹部の脱毛が、投与34日以降、対照群を含む各投与群に1~2例認められたが、各群の頻度および程度に差はなかった。

2) 体重(Tables 1,2)

雄では、250 mg/kg 投与群において、投与期間後期の体重が対照群と比較してやや低値を示したが、有意差は認められなかった。

雌では、交配前の50 mg/kg 以上の投与群において、体重の増加抑制が認められ、50 mg/kg 投与群では、投与1~8日および1~15日の増加量が、250 mg/kg 投与群では、投与15日の体重および投与1~15日の増加量が有意($p<0.05, 0.01$)に減少した。

妊娠期間中の体重推移には、対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。哺育期では、50 mg/kg 投与群の哺育4日の体重が対照群と比較して有意($p<0.05$)に減少したが、哺育0~4日の増加量には、対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

3) 摂餌量(Tables 3,4)

雄では、投与期間中の摂餌量には、対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。雌では、交配前、妊娠期および哺育期のいずれの時期の摂餌量にも、対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

4) 尿検査

雌雄動物ともに、いずれの検査項目についても、ジトリデシルフタラート投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

5) 解剖時検査所見

A. 雄

(1) 血液学検査所見(Table 5)

平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度が、250 mg/kg 投与群において対照群と比較して有意($p<0.05, 0.01$)な低値を示した。

(2) 血液生化学検査所見(Table 6)

アルカリフォスファターゼが、250 mg/kg 投与群において、対照群と比較して統計学的に有意($p<0.05$)に増加した。また、カリウムが10および250 mg/kg 投与群で、有意($p<0.05, 0.01$)な低値を示したが、僅かな変化であり、用量依存的な変化ではなかった。

(3) 剖検所見

胸腺の小型化が、50 mg/kg 投与群の2例にみられた。

肺では、暗色点が、対照群の2例および50 mg/kg 投与群の1例に、暗色領域が、10 mg/kg 投与群の1例にみられた。また、淡白色斑が、50 mg/kg 投与群の1例にみられた。

腎臓では、腫大が、250 mg/kg 投与群の3例に、腎盂の拡張が、対照群の1例に、腎臓表面に陥凹部が、50 mg/kg 投与群の2例にみられた。

精巣上体では、結節が、250 mg/kg 投与群の2例にみられた。

肝臓では、黄色化が、対照群の2例、10 mg/kg 投与群の4例、50 mg/kg 投与群の4例、250 mg/kg 投与群の2例にみられた。また、退色が、対照群を含む各投与群に各1例みられた。

(4) 器官重量(Table 7)

肝臓の比体重値および腎臓の重量が、250 mg/kg 投与群において、対照群と比較して統計学的に有意($p<0.05, 0.01$)に増加した。胸腺、副腎、精巣および精巣上体の重量および比体重値には、対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

(5) 病理組織学検査所見(Table 8)

各器官の観察所見を以下に示す。

(心臓)

心筋変性が、対照群の3例および250 mg/kg 投与群の2例にみられた。

(肝臓)

小葉中心部の肝細胞の肥大が、50 mg/kg 投与群の3例および250 mg/kg 投与群の11例にみられ、250 mg/kg 投与群における肝細胞肥大の発現頻度および程度は有意($p<0.01$)に増強された。

カタラーゼを組織化学的に染色した各群2例のうち、250 mg/kg 投与群の2例では、小葉中心部の肝細胞で陽性顆粒がごく軽度増加しており、これらの2例では、棒状に伸長した少数の陽性顆粒も含まれていた。なお、同群における陽性顆粒の発現頻度に有意差($p<0.01$)が認められた。

門脈周囲性の脂肪化が、対照群を含む各投与群にみられたが、発現頻度には、対照群と各投与群との間に有意差はなく、程度は、250 mg/kg 投与群で有意($p<0.01$)に軽度であった。

(脾臓)

褐色色素沈着および髓外造血が、対照群および250 mg/kg 投与群の全例にみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。

(腎臓)

Eosinophilic body が対照群を含む各投与群でみられ、

250 mg/kg投与群での eosinophilic body の発現頻度は有意 ($p < 0.05$) に増加した。

皮質に好塩基性の尿細管が、対照群を含む各投与群にみられたが、250 mg/kg投与群のうち eosinophilic body の発現の著しい例では、好塩基性尿細管の程度が他の例より強く、これらの好塩基性尿細管の多くは尿細管上皮が壊死した後の再生像と思われた。さらにこの例では、皮髄境界部の尿管腔内に顆粒状の円柱が認められ、これらは脱落した尿管上皮の変性物であると推測された。その他、髄質の鉍質沈着が、対照群および 250 mg/kg 投与群の各 1 例、腎盂の拡張が対照群の 1 例、嚢胞が 10 および 50 mg/kg 投与群の各 1 例にみられた。

(精巣上体)

精子肉芽腫が、対照群および 250 mg/kg 投与群の各 1 例にみられたが、両群間に程度の差はなかった。

(その他)

脳、胸腺、膀胱、副腎および精巣に異常はみられなかった。

B. 雌

(1) 剖検所見

胸腺の小型化が、対照群の 2 例、10 mg/kg 投与群の 5 例、50 mg/kg 投与群の 5 例、250 mg/kg 投与群の 8 例にみられた。また、暗色領域が、10 mg/kg 投与群の 1 例にみられた。

肝臓の腫大が、250 mg/kg 投与群の 2 例にみられ、このうち 1 例は、暗色調を呈していた。また、横隔膜ヘルニアが、50 mg/kg 投与群の 1 例にみられた。

腎臓の退色が、50 mg/kg 投与群の 1 例、肺の暗色点が、10 mg/kg 投与群の 2 例、腺胃部粘膜に暗色点が、10 mg/kg 投与群の 1 例にみられた。

その他、脱毛が、対照群の 2 例、10 mg/kg 投与群の 2 例、50 mg/kg 投与群の 1 例にみられた。

(2) 器官重量 (Table 7)

肝臓の比体重値が、50 mg/kg 以上の投与群において、対照群と比較して統計学的に有意 ($p < 0.01$) に増加した。

腎臓、胸腺および副腎重量には、対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

(3) 病理組織学所見 (Table 8)

各器官の観察所見を以下に示す。

(肝臓)

小葉中心部の肝細胞の肥大が、50 mg/kg 投与群の 4 例および 250 mg/kg 投与群の全例にみられ、発現頻度に有意差 ($p < 0.05, 0.01$) が認められた。また、250 mg/kg 投与群での肝細胞肥大の程度は、有意 ($p < 0.01$) に増強された。

その他、巣状壊死が、10 および 250 mg/kg 投与群の各 1 例にみられた。

(脾臓)

褐色色素沈着および髄外造血が、対照群および 250 mg/kg 投与群の全例にみられたが、両群間に発現頻度および程度の差はなかった。

(胸腺)

萎縮が、対照群を含む各投与群にみられた。50

mg/kg 投与群の 1 例および 250 mg/kg 投与群の腎臓の近位尿細管に空胞変性がみられた 1 例では、他の例より萎縮の程度が強かったが、発現頻度および程度に統計学的有意差はなかった。

その他、出血が、10 mg/kg 投与群の 1 例にみられた。

(腎臓)

近位尿細管の空胞変性が、10 mg/kg 投与群に 2 例、50 mg/kg 投与群の 1 例、250 mg/kg 投与群に 2 例みられた。これらのうち 250 mg/kg 投与群の 1 例では、他の例より程度が強かった。

皮質に好塩基性の尿細管が、対照群を含む各投与群にみられたが、各群間の程度に明らかな差はなく、50 mg/kg 投与群では発現頻度が低かった ($p < 0.05$)。

また、腎盂上皮の過形成が、250 mg/kg 投与群の 1 例でみられ、蛋白円柱の形成および腎盂粘膜にリンパ球浸潤を伴っていた。

(膀胱)

腎盂上皮に過形成がみられた 250 mg/kg 投与群の 1 例および同群の他の 1 例に、移行上皮の過形成がみられた。

(副腎)

腎臓の近位尿細管に空胞変性がみられた 250 mg/kg 投与群の 1 例では、束状帯に脂肪滴の増加がみられた。その他、皮質の壊死が、10 mg/kg 投与群の 1 例にみられた。

(その他)

脳、心臓および不妊例の卵巣には、異常はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 生殖関連所見

1) 交配成績 (Table 9)

全ての動物が交尾をした。交尾はしたが不妊であった動物が、50 mg/kg 投与群に 1 組、250 mg/kg 投与群に 1 組認められた。しかし、受胎率、同居から交尾までに要した日数およびその間の発情回数には、対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 分娩および哺育状態

250 mg/kg 投与群の 1 例が、分娩日に胎盤の処理をせず、産児を回集しなかった。この動物は、翌日以降、営巣し、産児を回集していたが、哺育 2 日までに約半数の産児が死亡した。同群の他の 1 例においても、母動物は営巣し、産児を回集していたが、哺育 2 日までに産児の約半数が死亡した。また、同群の他の 1 例は、妊娠 24 日に産児 2 例を出産したが、分娩確認時には、産児はすでに死亡していた。

その他の動物には、分娩状態および哺育状態の異常は観察されなかった。

3) 出産率および妊娠期間 (Table 10)

250 mg/kg 投与群の 1 例が妊娠 24 日に出産したが、同群の他の動物は、妊娠 22~23 日に出産した。出産率お

および妊娠期間には対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

4) 妊娠黄体数, 着床数および着床率 (Table 10)

妊娠動物の黄体数, 着床数および着床率に, 対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

2. 産児所見

1) 一般状態および生存性 (Table 10)

いずれの群の産児にも一般状態の異常は観察されなかった。

分娩率, 生児出生率および性比には, 対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。死亡児は, 対照群を含む各投与群に認められたが, 250 mg/kg 投与群の総死亡児数は, 対照群と比較してやや増加した。250 mg/kg 投与群の出生率は, 対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) な低値を示し, 同群の新生児の4日の生存率も減少傾向を示した。

2) 体重 (Table 10)

雌雄とも, 哺育0および4日の体重には, 対照群と各投与群との間に有意差は認められなかった。

3) 形態

哺育0日の生存産児に外表奇形は認められず, 哺育4日の剖検においても異常は認められなかった。また, 死亡児の剖検においても異常は観察されなかった。

考察

雄では 50 mg/kg 以上のジトリデシルフタラート投与により, 投与後, 一過性の流涎が観察され, 用量依存的に発現した動物数および回数が増加したことから, ジトリデシルフタラート投与の影響と考えられた。雌ではジトリデシルフタラート投与によると考えられる一般状態の変化は認められなかった。

雌雄ともに, 摂餌量にはジトリデシルフタラート投与の影響は認められなかったが, 雌では 50 mg/kg 以上のジトリデシルフタラート投与により, 投与期間初期に体重の増加抑制が認められた。

肝臓重量が, 雄では 250 mg/kg のジトリデシルフタラート投与により, 雌では 50 mg/kg 以上のジトリデシルフタラート投与により増加し, 病理組織学検査では, 雌雄とも, 50 mg/kg 以上のジトリデシルフタラート投与により, 小葉中心部の肝細胞に肥大が認められた。雄で実施したカタラーゼ染色では, 250 mg/kg のジトリデシルフタラート投与により, 小葉中心部の肝細胞にカタラーゼ陽性顆粒が増加していたことから, 小葉中心性の肝細胞の腫大は, ペルオキシゾームの増殖に起因した変化と考えられた。

腎臓重量が, 雄の 250 mg/kg のジトリデシルフタラート投与により増加した。病理組織学検査では, eosinophilic body の増加が認められ, 増加が著しかった。

動物では, 尿細管上皮の壊死および脱落を伴っていた。雌の腎臓重量には, ジトリデシルフタラート投与の影響はなく, 病理組織学検査では, いずれのジトリデシルフタラート投与群においても近位尿細管の空胞変性が観察されたが, 頻度および程度にジトリデシルフタラートの用量に依存した明らかな変化は認められなかった。しかし, 250 mg/kg 投与群の雌では, 膀胱移行上皮の過形成あるいはリンパ球浸潤および蛋白円柱の形成を伴った腎盂上皮の過形成が認められた。フタル酸エステル的一种である di-(2-ethylhexyl) phthalate のラットを用いた毒性試験において, 腎臓重量の増加, 尿細管上皮の変性および細胞質の崩壊・壊死が認められている¹⁾ことから, 250 mg/kg 投与群の雌雄に観察された腎臓の形態学的な変化は, ジトリデシルフタラート投与による影響と考えられた。しかし, 尿検査の結果には, 雌雄ともにジトリデシルフタラート投与による変化は認められず, 腎機能障害を示唆する所見は認められなかった。また, 尿細管上皮の空胞変性の程度が著しかった雌の 250 mg/kg 投与群の1例では, 分娩状態および分娩日の哺育状態が不良であった。病理組織学検査では, 副腎束状帯に脂肪滴の増加が認められ, 糖質コルチコイドの分泌増加が示唆された。さらに, 胸腺細胞の著しい萎縮も認められた。ストレス負荷時には, 胸腺が萎縮し, 糖質コルチコイドの分泌が増加することから²⁾, この1例に認められた副腎の変化は, 分娩時のストレスが過大であったことによるものと考えられた。

血液生化学検査の結果, 250 mg/kg のジトリデシルフタラート投与により, 僅かではあるがアルカリフォスファターゼ活性の上昇が認められた。アルカリフォスファターゼは, 腎臓, 肝臓の細胞膜に多く存在するが, 本試験では, これらの組織にジトリデシルフタラート投与による変化と考えられる所見が認められていることから, ジトリデシルフタラート投与の影響である可能性が高い。

血液学検査の結果, 250 mg/kg のジトリデシルフタラート投与により, 平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度が低値を示したが, 赤血球数, 血色素量, ヘマトクリット値にジトリデシルフタラート投与の影響が認められていないことから, これらの変化は偶発的な変化であり, 毒性学的に意義のないものと考えられた。

一方, フタル酸エステル投与により, 精巣の萎縮, 精子数減少などの精巣毒性が報告されているが^{3, 4)}, 本試験では, 精巣および精巣上体の重量および病理組織像には, ジトリデシルフタラート投与の影響は認められず, ジトリデシルフタラートの 250 mg/kg までの投与では, 精巣毒性はないと考えられた。

雌雄動物の交尾率, 受胎率には, ジトリデシルフタラート投与による影響は認められなかった。250 mg/kg 投与群の2例で, 哺育4日までに産児の約半数が死亡したが, 50 mg/kg 以下の投与群では, 同様の変化を示した動物は認められていないことから, 250 mg/kg のジトリデシルフタラート投与による哺育不良が示唆された。これに起因して, 同群の死亡児総数が対照群と比較して増

加し、産児の生存性が低下した。また、250 mg/kg 投与群の1例が、妊娠24日に産児2例を娩出し、その産児は分娩日に死亡した。しかし、同群の他の動物は妊娠22～23日に正常に分娩していることから、分娩遅延は、この動物の胎児2例(着床数:2)に起因したものと考えられ、ジトリデシルフタレート投与の影響ではないと考えられた。これらのことから、本試験条件下では、ジトリデシルフタレートの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに10 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、雄に対しては250 mg/kg/day、雌に対しては50 mg/kg/day、産児に対しては250 mg/kg/dayと結論される。

文献

- 1) 大場琢磨, 鈴木康雄, 大森義仁, 桑村 司, 山羽力, 田中 彰, 小田嶋成和, 石館 基, 前川照彦, 衛生試験所報告, 93, 1(1975).
- 2) National toxicology program, Technical report series No.492(NTP TR 429)Diethylphthalate (Dermal studies), 5(1995).
- 3) 松島裕子, 小野寺博志, 三森国敏, 前川昭彦, 黒川雄二, 高橋道人, 衛生試験所報告, 110, 26(1992).
- 4) E.D. Moody, K.J. Reddy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 45, 497(1978).
- 5) M.D. Creasy, L.M. Beech, T.J. Gray, W.H. Butler, *Exp. Mol. Pathol.*, 46, 357(1987).
- 6) S.P. Srivastava, S. Srivastava, D.K. Saxena, S.V. Chandra, P.K. Seth, *Arch. Toxicol.*, 64, 148(1990).
- 7) M. R. Plasterer, W.S. Bradshaw, G.M. Booth, M.W. Carter, *J. Toxicol. Environ. Health*, 15, 25(1985).
- 8) C.J. Lamb IV, R.E. Chapin, A.D. Lawton, J.R. Reel, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 88, 255(1987).
- 9) J.A. Thomas, T.D. Darby, R.F. Wallin, P.J. Garvin, L. Martis, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 45, 1(1978).
- 10) H.F. Smyth JR., C.P. Carpenter, G.S. Weil, U.S. Pozzani, J.A. Striegel, "Range-finding toxicity data: list IV," *Industrial Hygiene Journal*, March-April, 1962, pp. 95-107.
- 11) P. Greaves, "Histopathology of preclinical toxicity studies," Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1990.

連絡先

試験責任者: 長尾哲二
 試験担当者: 和田和義, 桑形麻樹子, 関 剛幸,
 宮原 敬
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tetsuji Nagao (Study director)
 Kazuyoshi Wada, Makiko Kuwagata,
 Takayuki Seki, Takashi Miyahara
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Body weights of male rats treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose (mg/kg) | 0 | 10 | 50 | 250 |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Days of administration | | | | |
| 1 (Init. wt.) | 331.0 ± 9.2 (13) | 331.4 ± 7.9 (13) | 331.3 ± 8.6 (13) | 331.2 ± 9.1 (13) |
| 8 | 380.1 ± 14.5 (13) | 384.7 ± 13.9 (13) | 381.7 ± 13.5 (13) | 381.6 ± 19.8 (13) |
| 15 | 420.6 ± 20.6 (13) | 428.2 ± 19.1 (13) | 426.0 ± 20.1 (13) | 420.1 ± 31.0 (13) |
| 22 | 450.4 ± 23.1 (13) | 458.3 ± 23.5 (13) | 452.4 ± 19.3 (13) | 448.4 ± 37.6 (13) |
| 29 | 482.3 ± 28.3 (13) | 491.1 ± 25.3 (13) | 484.6 ± 21.2 (13) | 479.5 ± 45.9 (13) |
| 36 | 511.0 ± 30.3 (13) | 521.6 ± 27.8 (13) | 512.2 ± 26.2 (13) | 505.1 ± 53.9 (13) |
| 42 | 530.9 ± 33.4 (13) | 538.4 ± 34.6 (13) | 526.4 ± 31.8 (13) | 523.0 ± 58.7 (13) |

Values are expressed as mean±S.D. in grams.
Parenthesis indicates number of animals.

Table 2 Body weights of female rats treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose (mg/kg) | 0 | 10 | 50 | 250 |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Days of administration (Pre-mating period) | | | | |
| 1 (Init. wt.) | 208.7 ± 6.4 (13) | 209.3 ± 6.5 (13) | 208.9 ± 6.1 (13) | 208.6 ± 6.3 (13) |
| 8 | 228.9 ± 7.5 (13) | 225.5 ± 10.2 (13) | 221.8 ± 9.1 (13) | 222.1 ± 8.8 (13) |
| 15 | 246.0 ± 8.6 (13) | 240.6 ± 12.3 (13) | 237.0 ± 10.1 (13) | 233.6 ± 11.9* (13) |
| Days of pregnancy | | | | |
| 0 | 252.6 ± 14.2 (13) | 246.4 ± 11.4 (13) | 243.5 ± 15.5 (12) | 244.1 ± 9.8 (12) |
| 7 | 290.0 ± 18.4 (13) | 284.1 ± 12.5 (13) | 276.1 ± 17.1 (12) | 278.6 ± 12.5 (12) |
| 14 | 330.0 ± 28.2 (13) | 320.6 ± 16.0 (13) | 307.5 ± 19.6 (12) | 316.1 ± 18.6 (12) |
| 20 | 402.2 ± 33.3 (13) | 395.8 ± 24.8 (13) | 380.1 ± 28.0 (12) | 393.5 ± 26.6 (12) |
| Days of lactation | | | | |
| 0 | 294.5 ± 27.3 (13) | 282.4 ± 28.3 (12) | 270.9 ± 17.0 (9) | 278.6 ± 18.3 (13) |
| 4 | 313.7 ± 24.9 (13) | 307.2 ± 22.2 (12) | 291.0 ± 16.8* (9) | 296.7 ± 17.4 (12) |

Values are expressed as mean±S.D. in grams.
Parenthesis indicates number of animals.

*: significant difference from control, $p < 0.05$.

Table 3 Food consumption of male rats treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose (mg/kg) | 0 | 10 | 50 | 250 |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Days of administration | | | | |
| 1~8 | 202.7 ± 16.6 (13) | 199.8 ± 10.8 (13) | 197.6 ± 14.5 (13) | 197.0 ± 21.5 (13) |
| 8~15 | 186.6 ± 17.4 (13) | 192.4 ± 16.9 (13) | 181.9 ± 17.8 (13) | 181.1 ± 27.5 (13) |
| 29~36 | 183.8 ± 17.8 (13) | 188.0 ± 17.1 (13) | 181.7 ± 17.2 (13) | 189.8 ± 30.9 (13) |
| 36~42 | 154.8 ± 12.4 (13) | 149.6 ± 21.3 (13) | 147.1 ± 14.7 (13) | 153.0 ± 21.7 (13) |

Values are expressed as mean±S.D. in grams.
Parenthesis indicates number of animals.

Table 4 Food consumption of female rats treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose (mg/kg) | 0 | 10 | 50 | 250 |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Days of administration (Pre-mating period) | | | | |
| 1~ 8 | 123.9 ± 12.4 (13) | 120.1 ± 10.9 (13) | 118.8 ± 9.6 (13) | 119.9 ± 7.5 (13) |
| 8~15 | 121.0 ± 11.8 (13) | 119.7 ± 12.1 (13) | 115.0 ± 10.5 (13) | 119.8 ± 10.7 (13) |
| Days of pregnancy | | | | |
| 0~ 7 | 154.1 ± 22.6 (13) | 149.9 ± 11.0 (13) | 142.8 ± 13.5 (12) | 153.1 ± 9.1 (12) |
| 7~14 | 174.9 ± 28.3 (13) | 162.2 ± 15.4 (13) | 149.8 ± 14.2 (12) | 164.1 ± 15.4 (12) |
| 14~20 | 128.2 ± 14.1 (13) | 130.8 ± 13.5 (13) | 119.7 ± 8.0 (12) | 134.2 ± 8.2 (12) |
| Days of lactation | | | | |
| 0~ 4 | 104.6 ± 23.0 (13) | 91.3 ± 33.9 (13) | 87.5 ± 28.4 (12) | 93.4 ± 25.5 (11) |

Values are expressed as Mean±S.D. in grams.
Parenthesis indicates number of animals.

Table 5 Hematological findings of male rats treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose (mg/kg) | 0 | 10 | 50 | 250 |
|-------------------------------------|------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| Male | | | | |
| Red blood cells | | | | |
| Count ($\times 10^4/\text{mm}^3$) | 798 ± 29 (13) | 816 ± 40 (13) | 795 ± 28 (13) | 802 ± 34 (13) |
| Hemoglobin (g/dL) | 15.7 ± 0.5 (13) | 15.7 ± 0.5 (13) | 15.4 ± 0.4 (13) | 15.2 ± 0.6 (13) |
| Hematocrit (%) | 46.0 ± 1.5 (13) | 46.1 ± 1.9 (13) | 45.7 ± 1.5 (13) | 45.4 ± 1.6 (13) |
| M C V (μm^3) | 57.6 ± 1.7 (13) | 56.6 ± 1.6 (13) | 57.4 ± 2.0 (13) | 56.6 ± 1.7 (13) |
| M C H (pg) | 19.7 ± 0.6 (13) | 19.2 ± 0.6 (13) | 19.4 ± 0.5 (13) | 19.0 ± 0.5** (13) |
| M C H C (%) | 34.1 ± 0.4 (13) | 34.0 ± 0.6 (13) | 33.8 ± 0.4 (13) | 33.6 ± 0.6* (13) |
| White blood cells | | | | |
| Count ($\times 10^2/\text{mm}^3$) | 112 ± 36 (13) | 123 ± 31 (13) | 111 ± 34 (13) | 138 ± 36 (13) |
| Band neutrophil (%) | 0 ± 0 (13) | 0 ± 0 (13) | 0 ± 0 (13) | 0 ± 0 (13) |
| Segmented neutrophil (%) | 17 ± 7 (13) | 18 ± 8 (13) | 17 ± 7 (13) | 14 ± 6 (13) |
| Eosinophil (%) | 1 ± 1 (13) | 0 ± 1 (13) | 1 ± 1 (13) | 1 ± 1 (13) |
| Basophil (%) | 0 ± 0 (13) | 0 ± 0 (13) | 0 ± 0 (13) | 0 ± 0 (13) |
| Monocyte (%) | 4 ± 3 (13) | 4 ± 2 (13) | 5 ± 3 (13) | 5 ± 3 (13) |
| Lymphocyte (%) | 78 ± 8 (13) | 77 ± 8 (13) | 77 ± 9 (13) | 80 ± 7 (13) |
| Platelet | | | | |
| Count ($\times 10^4/\text{mm}^3$) | 100.2 ± 8.9 (13) | 98.6 ± 6.7 (13) | 101.2 ± 10.7 (13) | 106.0 ± 10.4 (13) |

Values are expressed as mean±S.D.
Parenthesis indicates number of animals.
*:significant difference from control, $p < 0.05$
**:significant difference from control, $p < 0.01$

Table 6 Blood chemical examination of male rats treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose (mg/kg) | 0 | | 10 | | 50 | | 250 | |
|---------------------------|-------------|------|--------------|------|-------------|------|---------------|------|
| Total protein (g/dL) | 5.5 ± 0.3 | (13) | 5.5 ± 0.2 | (13) | 5.4 ± 0.3 | (13) | 5.5 ± 0.3 | (13) |
| Albumin (g/dL) | 2.9 ± 0.1 | (13) | 2.9 ± 0.1 | (13) | 2.9 ± 0.2 | (13) | 3.0 ± 0.2 | (13) |
| A/G | 1.16 ± 0.12 | (13) | 1.14 ± 0.09 | (13) | 1.17 ± 0.12 | (13) | 1.23 ± 0.13 | (13) |
| BUN (mg/dL) | 12 ± 2 | (13) | 12 ± 2 | (13) | 13 ± 2 | (13) | 13 ± 1 | (13) |
| Creatinine (mg/dL) | 0.7 ± 0.1 | (13) | 0.6 ± 0.1 | (13) | 0.6 ± 0.1 | (13) | 0.6 ± 0.1 | (13) |
| Glucose (mg/dL) | 158 ± 21 | (13) | 149 ± 14 | (13) | 151 ± 12 | (13) | 143 ± 14 | (13) |
| Total cholesterol (mg/dL) | 52 ± 13 | (13) | 53 ± 10 | (13) | 52 ± 12 | (13) | 49 ± 12 | (13) |
| Total bilirubin (mg/dL) | 0.08 ± 0.02 | (13) | 0.09 ± 0.01 | (13) | 0.08 ± 0.02 | (13) | 0.08 ± 0.03 | (13) |
| Triglyceride (mg/dL) | 77 ± 26 | (13) | 79 ± 41 | (13) | 64 ± 24 | (13) | 70 ± 37 | (13) |
| Na (mEq/L) | 143.9 ± 0.8 | (13) | 143.5 ± 0.7 | (13) | 143.3 ± 0.7 | (13) | 144.0 ± 0.7 | (13) |
| K (mEq/L) | 3.95 ± 0.24 | (13) | 3.76 ± 0.11* | (13) | 3.85 ± 0.19 | (13) | 3.69 ± 0.19** | (13) |
| Cl (mEq/L) | 107.2 ± 1.1 | (13) | 106.9 ± 1.3 | (13) | 106.6 ± 1.2 | (13) | 106.7 ± 1.5 | (13) |
| Ca (mg/dL) | 8.8 ± 0.2 | (13) | 9.0 ± 0.3 | (13) | 8.9 ± 0.2 | (13) | 8.9 ± 0.4 | (13) |
| Inorg. phos. (mg/dL) | 5.8 ± 0.5 | (13) | 6.0 ± 0.5 | (13) | 5.7 ± 0.6 | (13) | 5.9 ± 0.4 | (13) |
| ALP (U/L) | 201 ± 39 | (13) | 181 ± 47 | (13) | 206 ± 33 | (13) | 243 ± 51* | (13) |
| GPT (U/L) | 22 ± 3 | (13) | 21 ± 3 | (13) | 22 ± 6 | (13) | 24 ± 5 | (13) |
| GOT (U/L) | 51 ± 5 | (13) | 51 ± 4 | (13) | 50 ± 7 | (13) | 49 ± 7 | (13) |
| γ-GTP (U/L) | 0 ± 0 | (13) | 0 ± 0 | (13) | 0 ± 0 | (13) | 0 ± 0 | (13) |

Values are expressed as mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

*: significant difference from control, $p < 0.05$

** : significant difference from control, $p < 0.01$

Table 7 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Sex | Dose (mg/kg) | 0 | 10 | 50 | 250 |
|--------|-----------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Male | Final body weight (g) | 501.7 ± 30.7 (13) | 509.6 ± 32.1 (13) | 498.9 ± 28.3 (13) | 496.0 ± 56.1 (13) |
| | Liver (g) | 14.47 ± 1.32 ^a (13) 2.88 ± 0.17 ^b | 14.48 ± 1.57 (13) 2.84 ± 0.18 | 14.67 ± 1.36 (13) 2.94 ± 0.16 | 16.86 ± 2.85 (13) 3.38 ± 0.22** |
| | Kidneys (g) | 3.00 ± 0.19 (13) 0.60 ± 0.05 | 2.92 ± 0.19 (13) 0.57 ± 0.03 | 3.07 ± 0.24 (13) 0.62 ± 0.04 | 3.28 ± 0.35* (13) 0.67 ± 0.09 |
| | Thymus (mg) | 314.1 ± 68.8 (13) 62.9 ± 15.2 | 311.3 ± 101.4 (13) 60.8 ± 18.6 | 280.4 ± 64.0 (13) 56.6 ± 14.7 | 319.7 ± 93.4 (13) 65.6 ± 21.6 |
| | Adrenal glands (mg) | 52.0 ± 8.6 (13) 10.4 ± 1.8 | 45.3 ± 9.2 (13) 8.9 ± 1.8 | 45.5 ± 7.2 (13) 9.1 ± 1.5 | 47.4 ± 7.8 (13) 9.7 ± 1.9 |
| | Testes (g) | 3.21 ± 0.26 (13) 0.64 ± 0.08 | 3.27 ± 0.21 (13) 0.64 ± 0.05 | 3.23 ± 0.33 (13) 0.65 ± 0.06 | 3.34 ± 0.25 (13) 0.68 ± 0.09 |
| | Epididymides (g) | 1.17 ± 0.08 (13) 0.24 ± 0.03 | 1.16 ± 0.08 (13) 0.23 ± 0.02 | 1.16 ± 0.08 (13) 0.23 ± 0.01 | 1.20 ± 0.12 (13) 0.24 ± 0.03 |
| Female | Final body weight (g) | 313.7 ± 24.9 (13) | 307.2 ± 22.2 (13) | 291.0 ± 16.8* (12) | 296.7 ± 17.4 (11) |
| | Liver (g) | 13.16 ± 1.19 (13) 4.20 ± 0.28 | 13.48 ± 1.23 (13) 4.40 ± 0.37 | 13.50 ± 1.30 (12) 4.63 ± 0.29** | 14.34 ± 1.08 (11) 4.83 ± 0.19** |
| | Kidneys (g) | 1.80 ± 0.21 (13) 0.57 ± 0.04 | 1.87 ± 0.20 (13) 0.61 ± 0.04 | 1.75 ± 0.12 (12) 0.60 ± 0.05 | 1.85 ± 0.15 (11) 0.62 ± 0.05 |
| | Thymus (mg) | 162.5 ± 55.4 (13) 51.7 ± 15.8 | 140.3 ± 70.2 (13) 45.1 ± 21.8 | 128.2 ± 66.5 (12) 43.7 ± 22.1 | 137.0 ± 44.6 (11) 46.1 ± 15.1 |
| | Adrenal glands (mg) | 68.4 ± 9.2 (13) 21.9 ± 2.8 | 69.9 ± 8.0 (13) 22.8 ± 2.4 | 66.6 ± 10.5 (12) 22.9 ± 3.5 | 64.0 ± 7.6 (11) 21.6 ± 2.5 |

Values are expressed as Mean±S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

a): absolute weight

b): relative weight (g or mg per 100 g body weight)

Table 8 Histopathological findings of rats treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Organ [Number of animals examined] | Sex: | male | | | | female | | | |
|--|-------|-----------------|------|------|-------------------|--------|------|----------------|-------------------|
| | | Dose (mg/kg): 0 | 10 | 50 | 250 | 0 | 10 | 50 | 250 |
| Heart | | [13] | [0] | [0] | [13] | [13] | [0] | [0] | [13] |
| Myocardial degeneration | total | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ± | 3 | | | 2 | | | | |
| Liver | | [13] | [13] | [13] | [13] | [13] | [13] | [13] | [13] |
| Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular | total | 0 | 0 | 3 | 11 ^{***} | 0 | 0 | 4 [*] | 13 ^{***} |
| | ± | 0 | 0 | 3 | 6 | 0 | 0 | 4 | 9 |
| | + | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| Fatty change, periportal | total | 13 | 13 | 13 | 10 ^{**} | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ± | 2 | 0 | 1 | 7 | | | | |
| | + | 3 | 4 | 5 | 3 | | | | |
| | ++ | 8 | 9 | 7 | 0 | | | | |
| Increase, catalase positive granule, centrilobular | total | 0 | 0 | 0 | 2 ^{**} | 0 | | | 0 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 2 | | | | 0 |
| Elongation, catalase positive granule | total | 0 | 0 | 0 | 2 ^{**} | 0 | | | 0 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 2 | | | | 0 |
| Necrosis, focal | total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Spleen | | [13] | [0] | [0] | [13] | [13] | [0] | [0] | [13] |
| Deposit, pigment, brown | total | 13 | 0 | 0 | 13 | 13 | 0 | 0 | 13 |
| | ± | 0 | | | 0 | 0 | | | 0 |
| | + | 13 | | | 13 | 13 | | | 13 |
| Hematopoiesis, extramedullary | total | 13 | 0 | 0 | 13 | 13 | 0 | 0 | 13 |
| | ± | 7 | | | 7 | 0 | | | 2 |
| | + | 6 | | | 6 | 11 | | | 8 |
| | ++ | 0 | | | 0 | 2 | | | 3 |
| Thymus | | [13] | [0] | [0] | [13] | [13] | [13] | [13] | [13] |
| Atrophy | total | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 8 | 8 | 8 |
| | ± | | | | | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | + | | | | | 2 | 4 | 2 | 1 |
| | ++ | | | | | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Hemorrhage | total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | ± | | | | | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Kidney | | [13] | [13] | [13] | [13] | [13] | [13] | [13] | [13] |
| Eosinophilic body | total | 3 | 2 | 5 | 9 [*] | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ± | 0 | 1 | 3 | 2 | | | | |
| | + | 1 | 1 | 1 | 4 | | | | |
| | ++ | 2 | 0 | 1 | 2 | | | | |
| | +++ | 0 | 0 | 0 | 1 | | | | |
| Basophilic tubule, cortex | total | 12 | 9 | 10 | 8 | 6 | 5 | 1 [*] | 5 |
| | ± | 12 | 9 | 10 | 7 | 6 | 5 | 1 | 4 |
| | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | ++ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cast, granular cortico-medullary junction | total | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | 0 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | 0 |
| Mineralization, medulla | total | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | 0 |
| | ± | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | 0 |
| Dilatation, renal pelvis | total | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 0 |
| | ± | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 0 |
| Cyst | total | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | | | 0 |
| | ± | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | | | 0 |
| Hyperplasia, pelvic epithelium | total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Cellular infiltration, lymphocyte, pelvic mucosa | total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Cast, proteinous | total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Urinary bladder | | [13] | [0] | [0] | [13] | [13] | [13] | [13] | [13] |
| Hyperplasia, transitional cell | total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Adrenal gland | | [13] | [0] | [0] | [13] | [13] | [13] | [13] | [13] |
| Lipid droplet, increased, zona fasciculata | total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Necrosis, cortex | total | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Epididymis | | [13] | [0] | [0] | [13] | [0] | [0] | [0] | [0] |
| Granuloma spermatic | total | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ± | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ++ | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

±: very slight; +, slight; ++, moderate;

#: significant difference from control, $p < 0.05$ (by Fisher exact test)##: significant difference from control, $p < 0.01$ (by Fisher exact test)**.: significant difference from control, $p < 0.01$ (by Mann-Whitney U test)

Table 9 Summary of reproductive performance in parental rats treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose (mg/kg) | 0 | 10 | 50 | 250 |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Number of mated pairs | 13 | 13 | 13 | 13 |
| Number of copulated pairs | 13 | 13 | 13 | 13 |
| Copulation index ^{A)} | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Number of pregnant animals | 13 | 13 | 12 | 12 |
| Fertility index ^{B)} | 100 | 100 | 92.3 | 92.3 |
| Pairing days until copulation (Mean ± S.D.) | 3.1 ± 2.2 | 2.7 ± 0.9 | 2.3 ± 1.9 | 2.8 ± 1.3 |
| Frequency of vaginal estrus (Mean ± S.D.) | 1.2 ± 0.6 | 1.0 ± 0.0 | 1.1 ± 0.3 | 1.0 ± 0.0 |

A): copulation index = (number of copulated pairs/number of mated pairs) × 100 ; %

B): fertility index = (number of pregnant animals/number of copulated pairs) × 100 ; %

Table 10 Summary of development up of pups from dams treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose (mg/kg) | 0 | 10 | 50 | 250 |
|---|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| Number of pregnant females | 13 | 13 | 12 | 12 |
| Number of pregnant females with pups alive | 13 | 13 | 12 | 11 |
| Gestation index ^{A)} | 100 | 100 | 100 | 91.7 |
| Gestation length in days | 22.5 ± 0.5 (13) | 22.6 ± 0.5 (13) | 22.3 ± 0.5 (12) | 22.5 ± 0.7 (12) |
| Number of corpora lutea | 16.5 ± 2.3 (13) | 17.8 ± 2.0 (13) | 17.4 ± 2.6 (12) | 17.5 ± 3.4 (12) |
| Number of implantation sites | 15.5 ± 1.7 (13) | 16.5 ± 2.2 (13) | 15.9 ± 3.0 (12) | 15.3 ± 4.3 (12) |
| Implantation index ^{B)} | 93.9 ± 5.2 (13) | 92.6 ± 6.8 (13) | 91.9 ± 13.3 (12) | 86.1 ± 22.6 (12) |
| Day 0 of lactation | | | | |
| Number of pups born | 14.4 ± 1.9 (13) | 14.7 ± 3.4 (13) | 15.0 ± 2.9 (12) | 13.9 ± 4.0 (12) |
| Delivery index ^{C)} | 93.0 ± 7.2 (13) | 88.2 ± 16.0 (13) | 94.4 ± 5.9 (12) | 91.5 ± 8.0 (12) |
| Number of pups alive | 14.3 ± 1.8 (13) | 14.7 ± 3.4 (13) | 14.9 ± 2.8 (12) | 13.2 ± 4.5 (12) |
| Birth index ^{D)} | 92.6 ± 7.2 (13) | 88.2 ± 16.0 (13) | 93.9 ± 6.0 (12) | 79.7 ± 27.2 (12) |
| Live birth index ^{E)} | 99.6 ± 1.6 (13) | 100.0 ± 0.0 (13) | 99.5 ± 1.6 (12) | 87.7 ± 23.4* (12) |
| Pup weight in grams | | | | |
| Male | 6.6 ± 0.7 (13) | 6.4 ± 0.5 (13) | 6.2 ± 0.6 (12) | 6.3 ± 0.4 (11) |
| Female | 6.3 ± 0.8 (13) | 6.1 ± 0.6 (13) | 5.9 ± 0.6 (12) | 6.0 ± 0.4 (11) |
| Sex ratio ^{F)} | 1.11 ± 0.6 (13) | 1.34 ± 1.0 (13) | 1.09 ± 0.6 (12) | 0.99 ± 0.5 (11) |
| Day 4 of lactation | | | | |
| Number of pups alive | 13.8 ± 2.0 (13) | 14.5 ± 3.3 (13) | 14.4 ± 2.7 (12) | 13.1 ± 3.8 (11) |
| Viability index ^{G)} | 96.8 ± 11.4 (13) | 98.6 ± 3.7 (13) | 96.8 ± 5.7 (12) | 89.9 ± 21.1 (11) |
| Pup weight in grams | | | | |
| Male | 10.3 ± 1.6 (13) | 9.5 ± 2.0 (13) | 9.1 ± 1.8 (12) | 9.5 ± 0.5 (10) |
| Female | 10.0 ± 1.7 (13) | 9.2 ± 2.1 (13) | 8.7 ± 1.9 (12) | 9.3 ± 0.4 (11) |

Values are expressed as mean ± S.D.

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

A): Gestation index = (number of pregnant females with pups alive/number of pregnant females) × 100 ; %

B): Implantation index = (number of implantation sites/number of corpora lutea) × 100 ; %

C): Delivery index = (number of pups born/number of implantation sites) × 100 ; %

D): Birth index = (number of pups alive on day 0/number of implantation sites) × 100 ; %

E): Live birth index = (number of pups alive on day 0/number of pups born) × 100 ; %

F): Sex ratio = (number of male pups alive on day 0/number of female pups alive on day 0) × 100 ; %

G): Viability index = (number of pups alive on day 4/number of pups alive on day 0) × 100 ; %

ジトリデシルフタラートの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Ditridecyl phthalate on Bacteria

要約

ジトリデシルフタラートについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537) および *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) の5菌株を用い、用量設定試験の結果をもとに、本試験ではS9 mix無添加群および添加群の各試験菌株についてそれぞれ156~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量で試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加群および添加群のいずれにおいても、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではジトリデシルフタラートは、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535 および TA1537¹⁾ ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB.N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受けた。平成9年2月12日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK社)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム [いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID社:No.1)を加

え、30 mLをシャーレに分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

Bacto-agar(DIFCO社)0.6%を含む0.5%塩化ナトリウム水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mM D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mLのバツフル付三角フラスコに2.5%ニュートリエントブロス(OXOID社)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μL 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック(株))を用い、37℃で6時間振盪(往復振盪:120回/分)培養し、試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

| 成分 | S9 mix 1 mL中の量 |
|-------------------|---------------------|
| S9 | 0.1 mL |
| MgCl ₂ | 8 μmol |
| KCl | 33 μmol |
| G-6-P | 5 μmol |
| NADPH | 4 μmol |
| NADH | 4 μmol |
| リン酸緩衝Na-液(pH 7.4) | 100 μmol |
| 精製水 | 残量 |

5. 被験物質

被験物質のジトリデシルフタラート(ロット番号: 2700)は分子式C₃₄H₅₆O₄、分子量530.83、純度99.82%の液体である。協和油化(株)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

DMSOに被験物質を溶解して調製原液とした。調製

原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250 µg/plateの用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果, S9 mix無添加群ならびに添加群のいずれの処理群においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。

従って, 本試験においてはS9 mix無添加群ならびに添加群の各試験菌株について5000 µg/plateを最高用量とし, それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は, DMSOを用いて溶解し, 少量ずつ分注した後凍結保存(-20℃)した。

- 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2:和光純薬工業(株))
- アジ化ナトリウム (NaN₃:和光純薬工業(株))
- 9-アミノアクリジン塩酸塩 (ACR:ALDRICH社)
- 2-アミノアントラセン(2-AA:和光純薬工業(株))

9. 試験方法

Amesらの原法の改良法であるプレインキュベーション法¹⁾に準じて, S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に, 使用溶媒, 被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 µL, 次いでS9 mix無添加群の場合, 0.1 Mナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 µL, S9 mix添加群の場合, S9 mixを500 µL添加し, さらに試験菌液100 µLを加え, 37℃で20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後, トップアガーを2 mL添加し, 混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後, 被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため, 実体顕微鏡(×60)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで, 復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス(株))を用いた。独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し, かつ, 再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に, 陽性と判定した。

なお, 統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

1回目の試験結果をTable 1~2に, 2回目の試験結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群のTA1537株の5000 µg/plateにおいてのみ, ジトリデシルフタラート処理による生育阻害作用が観察された。また, 復帰突然変異コロニー数については, S9 mix無添加群, S9 mix

添加群とも溶媒対照と同等の値であり, 明確な増加傾向は認められなかった。一方, 陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において, 溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお, コロニー数計測時, S9 mix無添加群, 添加群のいずれも1250 µg/plate以上の用量において, 油滴状の析出物が観察された。以上の試験結果から, 本試験条件下において, ジトリデシルフタラートの微生物に対する遺伝子突然変異に関し, 陰性と判定した。

なお, 類縁化合物であるフタル酸ジヘプチルエステルの変異原性については, *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた復帰突然変異試験で陰性²⁾と報告されている。

文献

- 1) D.M. Maron and B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) M.H.L. Green and W.J. Muriel, *Mutat. Res.*, 38, 3(1976).
- 3) 西富 保, 化学物質毒性試験報告, 4, 741(1996).

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓
 試験担当者: 菊池正憲, 板倉真由実
 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
 〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜
 582-2
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)
 Masanori Kikuchi, Mayumi Itakura
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs
 and Pesticides (An-pyo Center)
 582-2 Shiohinden Aza Arahama, Fukude-cho,
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1. Results of the bacterial reversion test of ditridecyl phthalate (1st trial)
[direct method:-S9]

| Compound | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.] | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--|-----|-------|----------------|-----|-------|-----------------|-----|-------|----------------|-----|-------|----------------|-----|-------|
| | | TA100 | | | TA1535 | | | WP2 <i>uvrA</i> | | | TA98 | | | TA1537 | | |
| Test sub. | 0 | 120 | 101 | 116 | 12 | 17 | 13 | 22 | 21 | 20 | 21 | 27 | 23 | 8 | 9 | 9 |
| | | [112 \pm 10] | | | [14 \pm 3] | | | [21 \pm 1] | | | [24 \pm 3] | | | [9 \pm 1] | | |
| | 156 | 99 | 115 | 103 | 18 | 14 | 12 | 16 | 18 | 20 | 17 | 21 | 22 | 13 | 12 | 7 |
| | | [106 \pm 8] | | | [15 \pm 3] | | | [18 \pm 2] | | | [20 \pm 3] | | | [11 \pm 3] | | |
| | 313 | 121 | 101 | 101 | 13 | 17 | 12 | 20 | 22 | 26 | 24 | 25 | 19 | 11 | 14 | 10 |
| | | [108 \pm 12] | | | [14 \pm 3] | | | [23 \pm 3] | | | [23 \pm 3] | | | [12 \pm 2] | | |
| | 625 | 100 | 101 | 127 | 18 | 16 | 12 | 21 | 23 | 21 | 22 | 15 | 24 | 12 | 11 | 10 |
| | | [109 \pm 15] | | | [15 \pm 3] | | | [22 \pm 1] | | | [20 \pm 5] | | | [11 \pm 1] | | |
| | 1250+ | 101 | 85 | 112 | 14 | 11 | 14 | 26 | 27 | 18 | 28 | 20 | 21 | 9 | 11 | 9 |
| | | [99 \pm 14] | | | [13 \pm 2] | | | [24 \pm 5] | | | [23 \pm 4] | | | [10 \pm 1] | | |
| | 2500+ | 101 | 81 | 102 | 12 | 16 | 19 | 23 | 20 | 22 | 21 | 21 | 24 | 9 | 8 | 11 |
| | | [95 \pm 12] | | | [16 \pm 4] | | | [22 \pm 2] | | | [22 \pm 2] | | | [9 \pm 2] | | |
| | 5000+ | 97 | 94 | 100 | 15 | 17 | 16 | 25 | 27 | 27 | 21 | 23 | 25 | 11* | 10* | 10* |
| | | [97 \pm 3] | | | [16 \pm 1] | | | [26 \pm 1] | | | [23 \pm 2] | | | [10 \pm 1] | | |
| Positive control | | 699 | 681 | 694** | 417 | 429 | 398** | 183 | 190 | 161** | 561 | 602 | 618** | 460 | 505 | 483** |
| | | [691 \pm 9] | | | [415 \pm 16] | | | [178 \pm 15] | | | [594 \pm 29] | | | [483 \pm 23] | | |

* :Growth inhibition was observed

+ :Visible precipitation was occurred at the end of exposure period

a):AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b):NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c):AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d):ACR; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 2. Results of the bacterial reversion test of ditridecyl phthalate (1st trial)
[activation method:+S9]

| Compound | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.] | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--|-----|-------|----------------|-----|-------|-----------------|-----|-------|---------------|-----|-------|----------------|-----|-------|
| | | TA100 | | | TA1535 | | | WP2 <i>uvrA</i> | | | TA98 | | | TA1537 | | |
| Test sub. | 0 | 111 | 109 | 111 | 13 | 18 | 19 | 21 | 26 | 27 | 30 | 25 | 29 | 13 | 12 | 16 |
| | | [110 \pm 1] | | | [17 \pm 3] | | | [25 \pm 3] | | | [28 \pm 3] | | | [14 \pm 2] | | |
| | 156 | 127 | 123 | 102 | 20 | 13 | 13 | 20 | 20 | 25 | 25 | 27 | 28 | 11 | 14 | 10 |
| | | [117 \pm 13] | | | [15 \pm 4] | | | [22 \pm 3] | | | [27 \pm 2] | | | [12 \pm 2] | | |
| | 313 | 109 | 113 | 107 | 17 | 14 | 10 | 20 | 25 | 21 | 24 | 23 | 27 | 11 | 9 | 11 |
| | | [110 \pm 3] | | | [14 \pm 4] | | | [22 \pm 3] | | | [25 \pm 2] | | | [10 \pm 1] | | |
| | 625 | 117 | 114 | 113 | 12 | 15 | 15 | 21 | 24 | 26 | 37 | 32 | 35 | 16 | 16 | 17 |
| | | [115 \pm 2] | | | [14 \pm 2] | | | [24 \pm 3] | | | [35 \pm 3] | | | [16 \pm 1] | | |
| | 1250+ | 99 | 127 | 113 | 15 | 15 | 18 | 26 | 23 | 27 | 35 | 32 | 34 | 12 | 14 | 15 |
| | | [113 \pm 14] | | | [16 \pm 2] | | | [25 \pm 2] | | | [34 \pm 2] | | | [14 \pm 2] | | |
| | 2500+ | 108 | 105 | 125 | 14 | 16 | 17 | 27 | 20 | 26 | 38 | 30 | 37 | 12 | 10 | 17 |
| | | [113 \pm 11] | | | [16 \pm 2] | | | [24 \pm 4] | | | [35 \pm 4] | | | [13 \pm 4] | | |
| | 5000+ | 121 | 155 | 128 | 18 | 14 | 13 | 26 | 29 | 23 | 34 | 38 | 29 | 18 | 12 | 13 |
| | | [135 \pm 18] | | | [15 \pm 3] | | | [26 \pm 3] | | | [34 \pm 5] | | | [14 \pm 3] | | |
| Positive control | | 703 | 639 | 698** | 320 | 314 | 401** | 404 | 431 | 414** | 347 | 349 | 360** | 152 | 171 | 173** |
| | | [680 \pm 36] | | | [345 \pm 49] | | | [416 \pm 14] | | | [352 \pm 7] | | | [165 \pm 12] | | |

+ :Visible precipitation was occurred at the end of exposure period

a):2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b):2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c):2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d):2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3. Results of the bacterial reversion test of dodecyl phthalate (2nd trial) [direct method:-S9]

| Compound | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.] | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--|-----|-------|----------------|-----|-------|-----------------|-----|-------|----------------|-----|-------|----------------|-----|-------|
| | | TA100 | | | TA1535 | | | WP2 <i>uvrA</i> | | | TA98 | | | TA1537 | | |
| Test sub. | 0 | 120 | 111 | 120 | 16 | 15 | 18 | 24 | 25 | 23 | 24 | 24 | 23 | 8 | 5 | 5 |
| | | [117 \pm 5] | | | [16 \pm 2] | | | [24 \pm 1] | | | [24 \pm 1] | | | [6 \pm 2] | | |
| | 156 | 114 | 127 | 131 | 19 | 20 | 16 | 26 | 23 | 22 | 33 | 29 | 22 | 6 | 8 | 6 |
| | | [124 \pm 9] | | | [18 \pm 2] | | | [24 \pm 2] | | | [28 \pm 6] | | | [7 \pm 1] | | |
| | 313 | 124 | 133 | 111 | 15 | 12 | 16 | 21 | 25 | 22 | 28 | 27 | 30 | 5 | 5 | 7 |
| | | [123 \pm 11] | | | [14 \pm 2] | | | [23 \pm 2] | | | [28 \pm 2] | | | [6 \pm 1] | | |
| | 625 | 133 | 128 | 126 | 19 | 18 | 17 | 22 | 23 | 19 | 22 | 28 | 28 | 5 | 4 | 5 |
| | | [129 \pm 4] | | | [18 \pm 1] | | | [21 \pm 2] | | | [26 \pm 3] | | | [5 \pm 1] | | |
| | 1250 + | 116 | 115 | 132 | 14 | 14 | 18 | 25 | 19 | 22 | 25 | 22 | 18 | 5 | 3 | 3 |
| | | [121 \pm 10] | | | [15 \pm 2] | | | [22 \pm 3] | | | [22 \pm 4] | | | [4 \pm 1] | | |
| | 2500 + | 121 | 105 | 112 | 21 | 15 | 16 | 18 | 26 | 21 | 21 | 33 | 32 | 4 | 5 | 4 |
| | | [113 \pm 8] | | | [17 \pm 3] | | | [22 \pm 4] | | | [29 \pm 7] | | | [4 \pm 1] | | |
| | 5000 + | 124 | 126 | 137 | 18 | 20 | 18 | 19 | 27 | 27 | 27 | 33 | 36 | 7* | 9* | 5* |
| | | [129 \pm 7] | | | [19 \pm 1] | | | [24 \pm 5] | | | [32 \pm 5] | | | [7 \pm 2] | | |
| Positive control | | 648 | 677 | 638** | 477 | 514 | 502** | 172 | 183 | 170** | 548 | 505 | 551** | 493 | 553 | 535** |
| | | [654 \pm 20] | | | [498 \pm 19] | | | [175 \pm 7] | | | [535 \pm 26] | | | [527 \pm 31] | | |

* :Growth inhibition was observed

+ :Visible precipitation was occurred at the end of exposure period

a) :AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) :NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

c) :AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) :ACR; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of dodecyl phthalate (2nd trial) [activation method:+S9]

| Compound | Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.] | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--|--|-----|-------|----------------|-----|-------|-----------------|-----|-------|----------------|-----|-------|---------------|-----|-------|
| | | TA100 | | | TA1535 | | | WP2 <i>uvrA</i> | | | TA98 | | | TA1537 | | |
| Test sub. | 0 | 119 | 114 | 133 | 13 | 14 | 17 | 30 | 30 | 24 | 30 | 32 | 32 | 10 | 13 | 9 |
| | | [122 \pm 10] | | | [15 \pm 2] | | | [28 \pm 3] | | | [31 \pm 1] | | | [11 \pm 2] | | |
| | 156 | 124 | 115 | 107 | 13 | 18 | 11 | 24 | 20 | 28 | 33 | 26 | 25 | 9 | 14 | 13 |
| | | [115 \pm 9] | | | [14 \pm 4] | | | [24 \pm 4] | | | [28 \pm 4] | | | [12 \pm 3] | | |
| | 313 | 115 | 118 | 131 | 20 | 18 | 17 | 24 | 34 | 24 | 33 | 26 | 34 | 10 | 12 | 12 |
| | | [121 \pm 9] | | | [18 \pm 2] | | | [27 \pm 6] | | | [31 \pm 4] | | | [11 \pm 1] | | |
| | 625 | 109 | 129 | 127 | 20 | 18 | 13 | 25 | 22 | 28 | 23 | 26 | 32 | 10 | 7 | 11 |
| | | [122 \pm 11] | | | [17 \pm 4] | | | [25 \pm 3] | | | [27 \pm 5] | | | [9 \pm 2] | | |
| | 1250 + | 133 | 121 | 131 | 16 | 17 | 17 | 26 | 28 | 26 | 23 | 30 | 35 | 12 | 9 | 16 |
| | | [128 \pm 6] | | | [17 \pm 1] | | | [27 \pm 1] | | | [29 \pm 6] | | | [12 \pm 4] | | |
| | 2500 + | 130 | 128 | 121 | 15 | 18 | 17 | 31 | 26 | 23 | 41 | 29 | 33 | 13 | 13 | 11 |
| | | [126 \pm 5] | | | [17 \pm 2] | | | [27 \pm 4] | | | [34 \pm 6] | | | [12 \pm 1] | | |
| | 5000 + | 125 | 122 | 120 | 21 | 17 | 19 | 33 | 38 | 32 | 38 | 39 | 42 | 17 | 13 | 12 |
| | | [122 \pm 3] | | | [19 \pm 2] | | | [34 \pm 3] | | | [40 \pm 2] | | | [14 \pm 3] | | |
| Positive control | | 551 | 492 | 565** | 336 | 364 | 418** | 401 | 417 | 411** | 348 | 333 | 368** | 151 | 153 | 141** |
| | | [536 \pm 39] | | | [373 \pm 42] | | | [410 \pm 8] | | | [350 \pm 18] | | | [148 \pm 6] | | |

:Visible precipitation was occurred at the end of exposure period

:2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) :2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$

:2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) :2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

ジトリデシルフタラートの 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 Ditridecyl phthalate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

ジトリデシルフタラートが培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、連続処理法ならびに短時間処理法で4750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度および低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

その結果、連続処理ならびに短時間処理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誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではジトリデシルフタラートは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL)を選択した。昭和59年11月15日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK社)を10%添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3~5日ごとに継代した。なお、本染色体異常試験では解凍後継代数50の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(LIFE TECHNOLOGIES社)に、メンブランフィルター(0.45 μm : CORNING社)を用いて加圧濾過除菌した非働化(56 $^{\circ}\text{C}$, 30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終濃度で10%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液を冷暗所(4 $^{\circ}\text{C}$)に保存した。

3. 培養条件

CO_2 インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機株式会社)を用い、 CO_2 濃度5%、37 $^{\circ}\text{C}$ の条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成は松岡らの方法に従った。

5. 被験物質

被験物質のジトリデシルフタラート(ロット番号: 2700)は分子式 $\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{O}_4$ 、分子量530.83、純度99.82%の液体である。協和油化(株)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

被験物質をDMSOを用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。ただし、最高処理濃度(4750 $\mu\text{g}/\text{mL}$)については原液を用いた。

7. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。連続処理の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理ではS9 mix非存在下(-S9 mix)あるいは存在下(+S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

細胞を10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業(株))で固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット(関東化学(株))水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30%エタノール, 1%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、すなわち細胞生存率を算出した。

その結果、いずれの処理法においても明確な細胞増殖抑制は観察されなかった(Fig. 1)。

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに、染色体異常試験では連続処理法ならびに短時間処理法のいずれにおいても4750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量とし、以下公比2で減じた計3用量ならびに溶媒対照群を設定した。

陽性対照として、連続処理の場合、マイトマイシンC(MMC: 協和醗酵工業(株))を、24時間処理で0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、

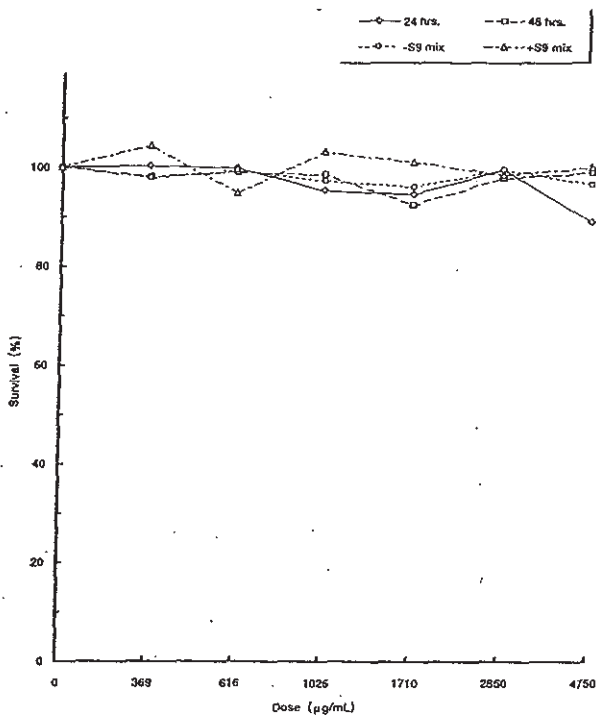


Fig. 1 Dose-survival curves of ditridecyl phthalate

48時間処理で0.025 µg/mLの用量で、短時間処理の場合、シクロホスファミド(CP:塩野義製薬株)を、12.5 µg/mLの用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、予備試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃度で0.2 µg/mLとなるようコルセミド(LIFE TECHNOLOGIES社)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.2%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)、染色分体切断(csb)、染色分体交換(cte)、染色分体交換(cse)およびその他(othi)の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会²⁾による分類法に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、観察した。

11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めた場合(+gap)と、含めない場合(-gap)とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、石館ら³⁾の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とした。最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

連続処理群での試験結果をTable 1に示した。ジトリデシルフタレート処理群の場合、いずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。短時間処理群での試験結果をTable 2に示した。被験物質処理群の場合、S9 mix非存在下および存在下のいずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。なお、連続処理および短時間処理の各試験系において、全ての試験用量で油滴状の被験物質の析出が認められた。以上の試験結果から、本試験条件下においてジトリデシルフタレートのチャイニーズハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陰性と判定した。

なお、類縁化合物であるフタル酸ジヘプチルエステルの変異原性については、CHL細胞を用いた染色体異常試験で陰性⁴⁾と報告されている。

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat. Res.*, 66, 277(1979).
- 2) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 31-35.
- 3) 石館基監修, “<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 東京, 1987, pp. 19-24.
- 4) 西富 保, 化学物質毒性試験報告, 4, 745(1996).

Table 1 Chromosomal aberration test on CHL cells treated with ditridecyl phthalate [continuous exposure]

| Compound | Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Time of exposure (hr) | Number of cells analyzed | Number of cells with structural aberrations | | | | | | Total [+gap] (%) | Total [-gap] (%) | Polyploid cells (%) | Final judgement | |
|-----------|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------|-----|
| | | | | gap | ctb | csb | cte | cse | oth | | | | SA | Pol |
| Test sub. | 0 | 24 | 200 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1.0 | 0.5 | 0.0 | - | - |
| | 1188 | 24 | 200 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 1.5 | - | - |
| | 2375 | 24 | 200 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2.0 | 2.0 | 1.0 | - | - |
| | 4750 | 24 | 200 | 1 | 1 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2.5 | 2.0 | 0.0 | - | - |
| MMC* | 0.05 | 24 | 200 | 22 | 51 | 0 | 94 | 1 | 0 | 61.5 | 57.0 | 0.5 | + | - |
| Test sub. | 0 | 48 | 200 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.0 | 0.0 | 0.5 | - | - |
| | 1188 | 48 | 200 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1.5 | 1.5 | 2.0 | - | - |
| | 2375 | 48 | 200 | 3 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2.5 | 1.5 | 0.5 | - | - |
| | 4750 | 48 | 200 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2.0 | 1.0 | 0.0 | - | - |
| MMC* | 0.025 | 48 | 200 | 31 | 63 | 2 | 97 | 2 | 1 | 64.0 | 61.5 | 1.0 | + | - |

*:Positive control (mitomycin C)

ctb:chromatid break csb:chromosome break cte:chromatid exchange cse:chromosome exchange oth:others
SA:structural aberration Pol:polyploid cell

Table 2 Chromosomal aberration test on CHL cells treated with ditridecyl phthalate [short-term exposure]

| Compound | Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | S9 mix | Time of exposure (hr) | Number of cells analyzed | Number of cells with structural aberrations | | | | | | Total [+gap] (%) | Total [-gap] (%) | Polyploid cells (%) | Final judgement | |
|-----------|-------------------------------------|-----------|-----------------------------|--------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------|-----|
| | | | | | gap | ctb | csb | cte | cse | oth | | | | SA | Pol |
| Test sub. | 0 | - | 6 | 200 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1.0 | 0.5 | 0.0 | - | - |
| | 1188 | - | 6 | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0.0 | 1.0 | - | - |
| | 2375 | - | 6 | 200 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | - | - |
| | 4750 | - | 6 | 200 | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.0 | 0.5 | 0.5 | - | - |
| CP* | 12.5 | - | 6 | 200 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.5 | 0.5 | 0.5 | - | - |
| Test sub. | 0 | + | 6 | 200 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1.0 | 0.5 | 0.5 | - | - |
| | 1188 | + | 6 | 200 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 1.0 | - | - |
| | 2375 | + | 6 | 200 | 0 | 2 | 0 | 4 | 0 | 0 | 2.0 | 2.0 | 1.5 | - | - |
| | 4750 | + | 6 | 200 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1.5 | 1.5 | 0.5 | - | - |
| CP* | 12.5 | + | 6 | 200 | 17 | 56 | 0 | 155 | 2 | 1 | 84.5 | 83.5 | 0.0 | + | - |

*:Positive control (cyclophosphamide)

ctb:chromatid break csb:chromosome break cte:chromatid exchange cse:chromosome exchange oth:others
SA:structural aberration Pol:polyploid cell

連絡先

試験責任者：中嶋 圓
試験担当者：菊池正憲，板倉真由実
財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜
582-2
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)
Masanori Kikuchi, Mayumi Itakura
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shiohinden Aza Arahama, Fukude-cho,
Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

