

o-アセトアセトトルイジドのラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of o-Acetoacetotoluidide in Rats

要約

o-アセトアセトトルイジドの単回投与毒性試験を、5週齢のSD系 [Crj:CD(SD)] ラットを1群雌雄各5匹用い、0(溶媒)、819、1024、1280、1600、2000および2500 mg/kg用量を単回経口投与して実施した。その結果、死亡は、雄で1280 mg/kg以上、雌で1600 mg/kg以上の群において投与後3時間から2日の間に認められた。主な中毒症状として自発運動の低下、腹臥位、筋弛緩、眼瞼下垂、呼吸深大化、立毛、体温降下、流涙および全身蒼白が認められた。死亡動物は、これらの症状が重度化し、呼吸が微弱となって死亡した。生存動物の症状は、投与後1日から5日までに概ね回復し、13日には全て回復した。体重は、投与後1日に用量依存的に減少が認められたが、3日には回復傾向が認められた。剖検では、投与翌日以降の死亡動物で、腺胃の点状出血、胃および腸の血様内容物ならびに膀胱の膨満が認められた。腺胃の病理組織学検査では、粘膜のびらんが観察された。LD₅₀値(95%信頼限界)は、雄で1854(1549-2298)mg/kg、雌で1945(1654-2318)mg/kgであった。

方法

1. 被験物質

o-アセトアセトトルイジドは、融点103.5℃、植物油および水に難溶性白色針状結晶である。試験には、三星化学工業(株)(東京)製造のもの(ロット番号7434、純度99.93%)を用い、これを1%メチルセルロース水溶液に懸濁して、投与液とした。被験物質の安定性ならびに投与液中での被験物質の安定性および均一性については、分析して確認した。

2. 使用動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より搬入した5週齢のSD系 [Crj:CD(SD)] ラット(雄120~137g、雌106~118g)を1群雌雄各5匹用いた。ラットは、室温21~23℃、湿度56~60%、換気回数10回以上/時(オールフレッシュエアー方式)、照明12時間/日(午前6時点灯、午後6時消灯)に制御した飼育室で、ステンレス製金網ケージに2~3匹ずつ雌雄別に収容し、固型飼料〔ラボMRストック、日本農産工業(株)〕と水は自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

1群雌雄各3匹のラットを用い、雌雄とも593、889、

1333、2000および3000 mg/kgを単回経口投与した投与量設定試験の結果、雌雄とも死亡は2000 mg/kg以上の群で認められた。したがって、本試験の用量は、雌雄とも819、1024、1280、1600、2000および2500 mg/kg(公比1.25)の6群を設定した。他に、溶媒のみ投与の対照群を設けた。投与方法は、投与液量を体重100g当り1.0mLとし、テフロン製胃ゾンデおよび注射筒を用いてラットの胃内に単回経口投与した。投与は午前中に行った。ラットは前日の午後5時より投与後3時間まで除餌し、水のみを自由に摂取させた。

4. 観察事項

観察期間は投与後14日間とし、その間の一般状態の観察と生死を確認した。体重は、投与直前、投与後1、3、7および14日に測定した。剖検は、死亡例は発見後直ちに、生存例は観察期間終了後にエーテル麻酔死させて行った。病理組織学検査は、剖検で投与翌日以降の死亡動物に胃の変化が認められたので、それらの内投与後24時間以降の死亡例で死後変化の認められなかった2匹(雌の1600 mg/kg群および2500 mg/kg群)について胃を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。LD₅₀値は、投与後14日間の観察期間終了時における死亡率を基に、プロビット法を用いて算出した。

結果および考察

1. LD₅₀値(Table 1)

死亡は、雄で1280 mg/kg以上、雌で1600 mg/kg以上の群に認められ、死亡率より算出されたLD₅₀値(95%信頼限界)は、雄1854(1549-2298)mg/kg、雌1945(1654-2318)mg/kgであった。o-アセトアセトトルイジドのラットにおける経口LD₅₀値については、1600 mg/kgとの報告があり、概ね一致した結果であった。

2. 一般状態

被験物質投与の全群の雌雄に共通して、投与後約10分から自発運動の低下および腹臥位が認められた。また、多くの例で筋弛緩、眼瞼下垂および呼吸深大化が認められた。さらに、投与後1~3時間から立毛、体温降下および流涙、投与翌日(投与後1日)から全身蒼白が、用量に依存して認められた。その他に、よろめき歩行、削瘦および下腹部の汚れが散見された。死亡動物は、これら

Table 1 Mortality and LD₅₀ value of rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the single dose oral toxicity test

| Sex | Dose (mg/kg) | No. of animals examined | Number of animals that died | | | | | | | | | | | | Mortality | LD ₅₀ value [95% Confidence limits] (mg/kg) | | |
|--------|--------------|-------------------------|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----------|--|------------------|-----------------------|
| | | | Day | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | | 9~14 | |
| | | | Hr. | 1 | 3 | | | | | | | | | | | | | 6 |
| Male | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 ^b | 1854 [1549 - 2298] |
| | 819 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 | |
| | 1024 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 | |
| | 1280 | 5 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/5 | |
| | 1600 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 | |
| | 2000 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3/5 | |
| | 2500 | 5 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5/5 | |
| Female | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 | 1945 [1654 - 2318] |
| | 819 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 | |
| | 1024 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 | |
| | 1280 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/5 | |
| | 1600 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/5 | |
| | 2000 | 5 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2/5 | |
| | 2500 | 5 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5/5 | |

a: Number of animals that died; b: Number of animals examined

の症状が重度化し、次第に呼吸微弱化し、投与後3時間~2日の間に死亡した。生存動物の症状は、投与後3~6時間から回復傾向が認められ、多くの症状は投与翌日から5日までに回復したが、全身蒼白のみ12日まで持続的に認められた。この変化は、ラットへの反復投与により溶血性貧血が認められている²⁾ことと関連性があるものと考えられた。

3. 体重推移

雌雄とも投与後1日に、対照群に比べて体重減少が用量に依存して認められた。しかし、3日には回復傾向を示し、多くの症状が回復した7日以降は順調な増加が認められた。

4. 病理学検査

死亡動物の剖検において、投与翌日以降に死亡した雌雄の多くの例で、腺胃の点状出血およびそれとの関連性が考えられる胃および腸の血様内容物、ならびに膀胱の膨満がみられた。また、雌1例には腹水の貯溜が認められた。腺胃の病理組織学検査では、点状出血は粘膜のびらんであることが確認された。投与日の死亡動物および14日間生存動物の剖検では、肉眼的変化は認められなかった。

文献

- 1) REGISTRY OF EFFECTS CHEMICAL SUBSTANCES, AK6550000
- 2) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 275.

連絡先

試験責任者: 山本 譲
 試験担当者: 伊藤義彦, 伊藤雅也
 (勸畜産生物科学安全研究所)
 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11
 Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Yuzuru Yamamoto (Study director)
 Yoshihiko Ito, Masaya Ito
 3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi, Kanagawa,
 229-1132, Japan
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

o-アセトアセトトルイジドのラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of o-Acetoacetotoluidide by Oral Administration in Rats

要約

o-アセトアセトトルイジドは、o-トルイジンのアミノ基がアシル化された化学構造を有し、o-トルイジンとジケテンから合成され、ハンザエローやベンジジンエローなどのアゾ顔料の合成原料として用いられる物質¹⁾である。o-トルイジンの毒性について、ラットへの反復投与によりメトヘモグロビン血症およびそれに伴う溶血性貧血を起こすことが知られている²⁾。しかしながら、o-アセトアセトトルイジドの毒性については、単回経口投与毒性についての報告³⁾は認められるが、反復投与毒性および生殖発生毒性に関する報告はみあたらない。

今回、o-アセトアセトトルイジドについて、反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を、SD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを用い、0, 8, 25, 80および250 mg/kg用量で実施した。動物は1群雌雄各10匹とし、被験物質は交配開始14日前から雄は44日間、雌は分娩後哺育3日(41~45日間)まで投与した。

1. 反復投与毒性

雄親について、血液学検査では、80 mg/kg以上の群で赤血球数の減少、平均赤血球容積の増加、さらに250 mg/kg群でヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少、平均赤血球色素量および網状赤血球数の増加、メトヘモグロビン含有率の増加傾向、ハインツ小体保有赤血球の出現が認められた。血液生化学検査では、80 mg/kg以上の群でビリルビンの増加、250 mg/kg群でカリウムの増加が認められた。剖検では、80 mg/kg以上の群で脾臓の黒色化が認められた。器官重量では、250 mg/kg群で脾臓および下垂体の絶対および相対重量の増加が認められた。病理組織学検査では、80 mg/kg以上の群で肝臓にベルリンブルー陽性ヘモジデリンの沈着、脾臓にベルリンブルー陽性ヘモジデリンの沈着の程度の増加、250 mg/kg群で脾臓に髓外造血の程度の増加および鬱血、腎臓に近位尿細管上皮における好酸体(PAS染色陰性)の出現率の増加が認められた。下垂体には、病理組織学的変化は認められなかった。

一方、雌親についても、病理学検査で雄親と類似した変化が認められた。すなわち、80mg/kg以上の群で、脾臓の黒色化、ベルリンブルー陽性ヘモジデリンの沈着の程度の増加および鬱血、肝臓にベルリンブルー陽性ヘモジデリンの沈着、さらに250 mg/kg群で脾臓の腫大、絶対および相対重量の増加、髓外造血の程度の増加が認められ、また肝臓の絶対重量の増加傾向および相対重量

の増加が認められた。

以上の結果から、o-アセトアセトトルイジドのラットにおける主な反復投与毒性は、溶血性貧血およびそれと関連する変化であった。また、雌の肝臓および雄の腎臓に対しても軽度な影響が認められた。無影響量は雌雄とも25 mg/kg/dayと推定された。

2. 生殖発生毒性

雌雄親の生殖能および児動物の発生について、変化は認められなかった。したがって、雌雄親の生殖能および児動物の発生に対する無影響量は250 mg/kg/day以上と推定された。

方法

1. 被験物質

o-アセトアセトトルイジドは、融点103.5℃、植物油および水に難溶性白色針状結晶である。試験には、三星化学工業(株)(東京)製造のもの(ロット番号7434、純度99.93%)を入手し、冷暗所(4℃)で密栓保管し使用した。投与終了後に供給元にて分析を行い試験期間中安定であったことを確認した。投与液は、被験物質を1%メチルセルロース水溶液〔メチルセルロース100cP:和光純薬工業(株);局方精製水:共栄製薬(株)〕に懸濁して調製し、使用時まで冷暗所(4℃)で密栓保管し、調製後7日以内に使用した。なお、投与開始前に投与液中の被験物質について分析し、均一性および7日間の安定性を確認した。試験に供した投与液については、ほぼ所定濃度で調製されていたことを確認した。

2. 供試動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より搬入したSD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを12日間試験環境に馴化させ、その間に検疫を行い、発育が順調で一般健康状態の良好なものを、雄は9週齢(343~391 g)、雌は8週齢(211~241 g)で、1群雌雄各10匹として試験に供した。ラットは、温度21~23℃、湿度53~64%、換気回数10回以上/時、照明12時間(6~18時)に制御した飼育室で、金網ケージに個別に収容し、固型飼料〔ラボMRストック、日本農産工業(株)〕および水を自由に摂取させた。ただし、交尾後の雌は、巣作り材料〔ホワイトフレック、日本チャールス・リバー(株)〕を入れたポリカーボネート製ケージに収容した。

3. 投与量および投与方法

投与量設定試験として、ラットを1群雌雄各4匹とし、 α -アセトアセトトリイズドを0, 50, 100, 250, 500および1000 mg/kgで14日間反復経口投与した。ラットは投与7日の夕方から交配が成立するまで、雌雄各1匹ずつを同居させた。その結果、毒性影響と考えられる主な変化は、眼球の退色、赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少、総ビリルビンおよびカリウムの増加、脾臓の黒色化および重量の増加などの溶血性貧血の可能性を示唆する変化、ならびに肝臓重量の増加、総ビリルビンおよびGPTの増加、活性化部分トロンボプラスチン時間の延長傾向などの肝臓に対する影響を示唆する変化であった。さらに、副腎重量の減少および尿素窒素の増加など、副腎や腎臓に対する影響も窺われた。これらの変化は、雄では250 mg/kg以上、雌では100 mg/kg以上の群で認められた。交配成績については、交尾能に対する影響を示唆する変化は認められなかった。以上の結果から、本試験における投与量については、250 mg/kgを最高用量とし、以下80, 25および8 mg/kgの計4用量を設定した。投与方法は、投与液量を体重100g当たり0.5mLとし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて1日1回、交配開始14日前から雄は44日間、雌は分娩後の哺育3日(41~45日間)まで、経口投与した。対照群には、1%メチルセルロース水溶液を同様に投与した。

4. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日、動物の生死、外観、行動等について観察した。

(2) 体重および摂餌量測定

体重の測定は、投与開始日(投与開始直前)およびその後は7日間隔で行い、さらに最終投与日と屠殺日に測定した。ただし、雌の妊娠後は、妊娠0, 7, 14および20日と哺育0および4日に測定した。摂餌量は、体重測定日に合わせて翌日までの24時間の飼料消費量を測定した。雌の哺育4日の摂餌量は、前日からの24時間消費量を測定した。

(3) 交配および分娩状態観察

投与15日の午後、雄のケージに同一群内の雌を入れ(1対1)、交尾が確認されるまで(4日間で全例の交尾を確認)連続同居させた。交尾の確認は毎朝一定時刻(9:30分頃)に行い、膣栓形成あるいは膣垢中に精子が確認された日を妊娠0日とした。分娩状態の観察も同じ時刻に行い、1腹ごとに全児の出産が確認された日を哺育0日とした。交配および分娩の観察結果から、各群について同居開始から交尾までの日数、交尾率〔(交尾動物数/同居動物数)×100〕、受胎率〔(受胎雌数/交尾雌数)×100〕および出産率〔(生児出産雌数/生存受胎雌数)×100〕ならびに分娩の確認された例について妊娠

期間(妊娠0日から分娩が確認された日までの日数)を算定した。

(4) 雄の臨床病理学検査

尿検査：投与39, 42あるいは43日に新鮮尿を採取して、pH, 潜血, タンパク, 糖, ケトン体, ビリルビンおよびウロビリノーゲン〔以上、バイエル・三共(株), マルティスティックス[®]〕を、またラットを代謝ケージに収容(約3時間)して得た蓄尿について、外観の観察、比重の測定〔エルマ光学(株), 屈折計〕および沈渣を検査〔URI-CELL[®]液(ケンブリッジケミカルプロダクト社)で染色して鏡検〕した。

血液学検査：採血は、投与期間終了翌日にエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より行なった。動物は採血前日の午後5時より除餌し、水のみを給与した。採取した血液は3分割し、その一部は、EDTA-2Kで凝固防止処理し、多項目自動血球計数装置〔東亜医用電子(株), E-4000〕により、赤血球数(電気抵抗検出方式)、血色素量(ラウリル硫酸ナトリウム-ヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(パルス検出方式)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC, 以上計算値)、白血球数および血小板数(以上、電気抵抗検出方式)を、また塗抹標本を作製して網状赤血球数(Brilliant cresyl blueで染色して鏡検)およびハインツ小体保有赤血球数(Neutral red-brilliant greenで染色して鏡検)、さらにメトヘモグロビン濃度(Evelyn-Malloy変法⁴⁾)を測定した。また一部は、3.8%クエン酸ナトリウム液で凝固阻止処理して血漿を得、血液凝固自動測定装置(アメルング社:KC-10A)により、プロトロンビン時間(PT, Quick一段法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT, エラジン酸活性化法)を測定した。

血液生化学検査：採取した血液の一部から血清を分離し、生化学自動分析装置〔日本電子(株), JCA-VX-1000型クリナライザー〕により、総タンパク(Biuret法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(計算値)、グルコース、トリグリセライド、総コレステロール(以上、酵素法)、総ビリルビン(Jendrassik法)、尿素窒素(Urease-UV法)、クレアチニン(Jaffé法)、GOT, GPT, γ -GTP, LDH(以上、SSCC法)、アルカリホスファターゼ(ALP, GSCC法)、コリンエステラーゼ(ChE, BTC-DTNB法)、カルシウム(OCPC法)および無機リン(酵素法)を、また電解質自動分析装置〔東亜電波工業(株), NAKL-132〕により、ナトリウム、カリウムおよび塩素を測定した。

(5) 病理学検査

雄は採血に続いて、また雌の計画屠殺動物は哺育4日の観察終了後に、対照群、8, 80および250 mg/kg群で各1匹認められた妊娠しなかった雌については分娩予定日の4日後に、エーテル麻酔下で放血屠殺して剖検し、脳, 下垂体, 甲状腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 胸腺ならびに雄については精巣, 精巣上体を秤量した。雌については、卵巣の黄体数および子宮の着床痕数を調

べ、着床率〔(着床痕数/黄体数)×100〕を算定した。病理組織学検査は、採取した器官を10%中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巣および精巣上体のみブアン液)で固定後、対照群および250 mg/kg群の全例、ならびに他の群の妊娠の成立しなかった雌雄の脳、下垂体、甲状腺、胸腺、心臓、肺、肝臓、胃、腎臓、脾臓、副腎、膀胱、骨髄、脊髄、坐骨神経、その他肉眼的異常部位、さらに雄では精巣、精巣上体について、また、妊娠しなかった雌雄について、雄は前立腺および精嚢、雌は卵巣および子宮について、8、25および80 mg/kg群で妊娠した雌雄については、250 mg/kg群で毒性影響と考えられる変化の認められた雌雄の肝臓および脾臓、雄の腎臓ならびに肉眼的異常部位について、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施して鏡検した。また、沈着物を同定するため、雌雄全例の脾臓および肝臓については鉄染色(ペルリンブルー法)、一部の雄の腎臓についてはPAS染色も行った。

2) 新生児に関する項目

(1) 産児数および性比の観察

分娩の終了後各腹の産児数(生児と死亡児の合計)を調べ、分娩率〔(総出産産児数/着床痕数)×100〕を算定した。性別を肛門と生殖突起の距離の長短により判定し、群ごとの性比を算出した。

(2) 外表異常および一般状態観察

分娩完了後、口腔内を含む外表の異常を観察した。また、毎日一般状態および生死を確認し、出生率〔(出産確認時生児数/総出産産児数)×100〕および新生児の4日の生存率〔(哺育4日生児数/出産確認時生児数)×100〕を求めた。

(3) 体重測定

新生児について哺育0日および4日に雌雄別に各腹ごとの総体重を測定し、1匹当たりの平均体重を算出した。

(4) 病理学検査

死亡例は発見時に、生存例は雌親の解剖時(哺育4日)に麻酔死させ、胸部および腹部における主要器官を肉眼的に観察した。

5. 統計解析

パラメトリックデータは、Bartlettの分散検定を行い、分散が一樣な場合は一元配置の分散分析を行った。分散が一樣でない場合およびノンパラメトリックデータは、Kruskal-Wallisの順位検定を行った。それらの結果有意差を認めた場合、Dunnett法またはScheffe法(群の大きさが異なる場合)により対照群に対する各群の比較検定を行った。カテゴリカルデータは、生殖発生毒性に関するパラメータは χ^2 検定を、病理学的検査における異常例の出現率にはFisherの直接確率法を用いた。なお、新生児に関するデータは、1腹当たりの平均を1標本とし

た。

結果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態および死亡

死亡は、各群の雌雄とも認められず、また一般状態にも異常は認められなかった。

2) 体重(Fig. 1, 2)

雌雄とも、被験物質の投与による有意な変化は認められなかった。また、投与期間中の体重増加量にも有意な差は認められなかった。

3) 摂餌量(Fig. 3, 4)

雌雄とも、被験物質の投与による有意な変化は認められなかった。

4) 雄の尿検査

250 mg/kg群で、尿比重の有意な増加が認められたが、増加の程度は背景データにおける正常範囲内の変化であった。その他の検査項目には、有意な変化は認められなかった。

5) 雄の血液学検査(Table 1)

80 mg/kg以上の群で赤血球数の有意な減少が認められ、平均赤血球容積は有意な高値を示した。さらに、250 mg/kg群でヘモグロビン量およびヘマトクリット値の有意な減少、網状赤血球数の有意な増加ならびにハイנטツ小体保有赤血球の出現が認められ、平均赤血球色素量は有意な高値を示した。また、統計学的有意差は認められなかったものの、メトヘモグロビン含有率は増加傾向を示した。

6) 雄の血液生化学検査(Table 2)

80 mg/kg以上の群で総ビリルビン、250 mg/kg群でカリウムのいずれも有意な増加が認められた。

7) 剖検(Tables 3, 4)

被験物質の投与と関連性がみられる変化として、脾臓の黒色化が雌雄とも80 mg/kg以上の群で認められ、250 mg/kg群の雌では腫大を伴う例も認められた。

その他に、雄では、肝臓に尾状葉の表面黄色顆粒状、副腎の腫大、雌では肺の赤色点、副腎の赤色化、脾臓の腹膜との癒着などが認められたが、いずれも散発的な変化で、用量依存性は認められなかった。また、被験物質の投与とは無関係に散発的に認められた妊娠不成立の雌雄について、雄では8 mg/kg群の1匹に精巣の萎縮が、雌では対照群の1匹に著明な子宮腔水腫が認められた。他の例には妊娠不成立と関連する変化は認められなかった。

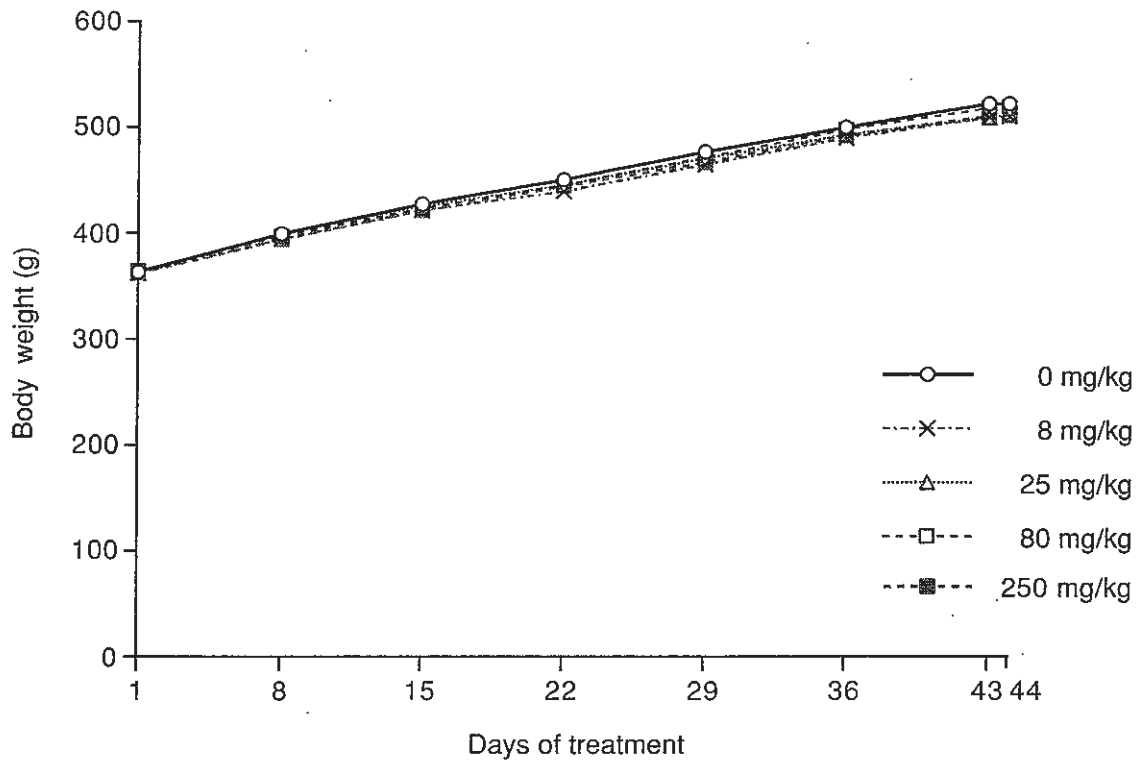


Fig. 1 Body weight change in male rats treated orally with *o*-acetoacetoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

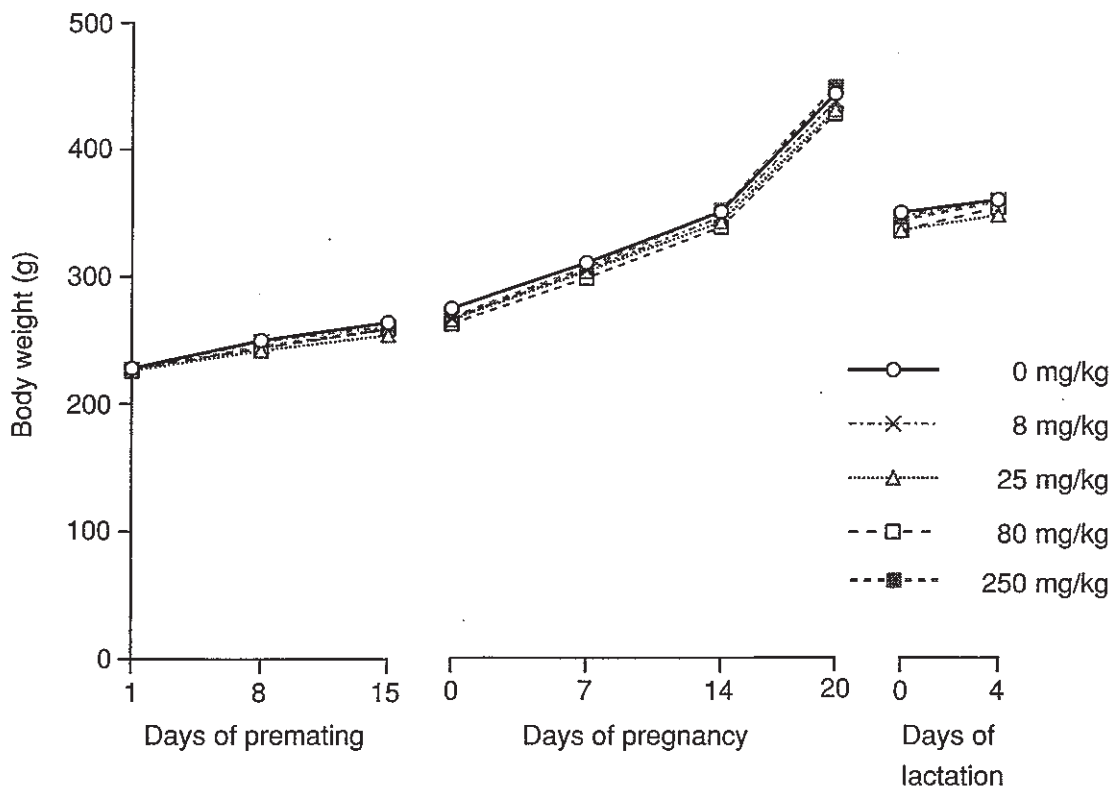


Fig. 2 Body weight change in female rats treated orally with *o*-acetoacetoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

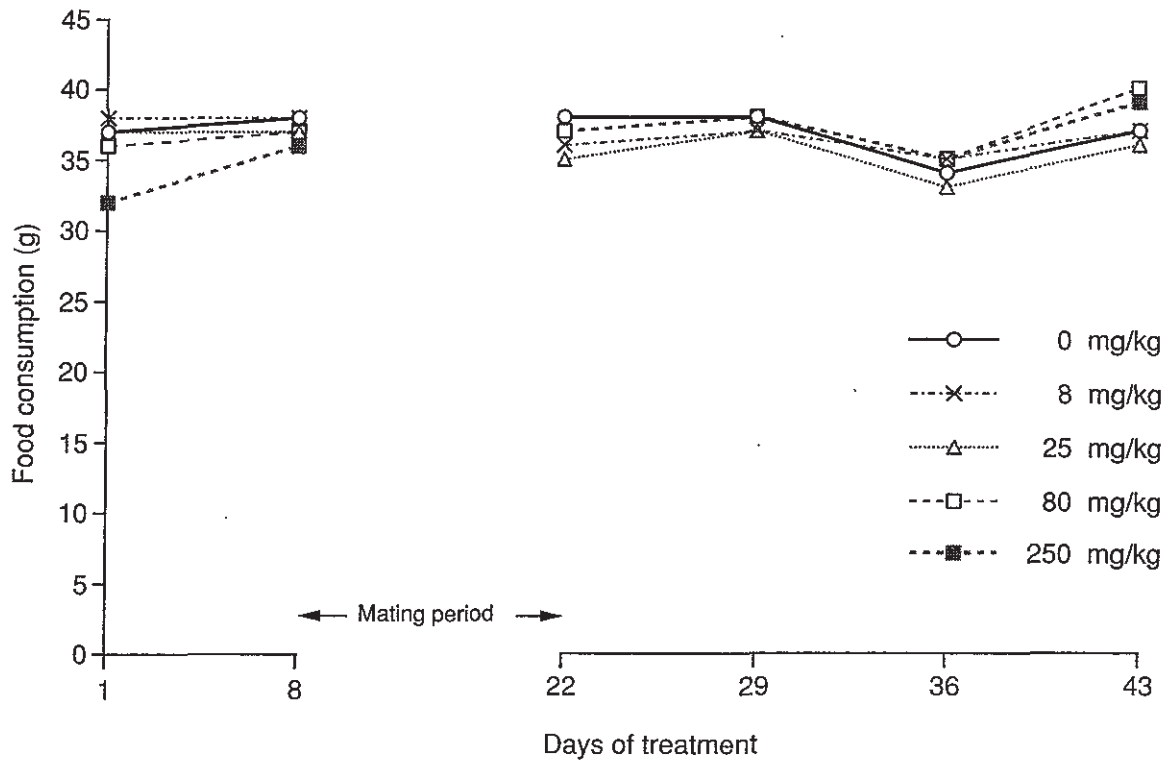


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

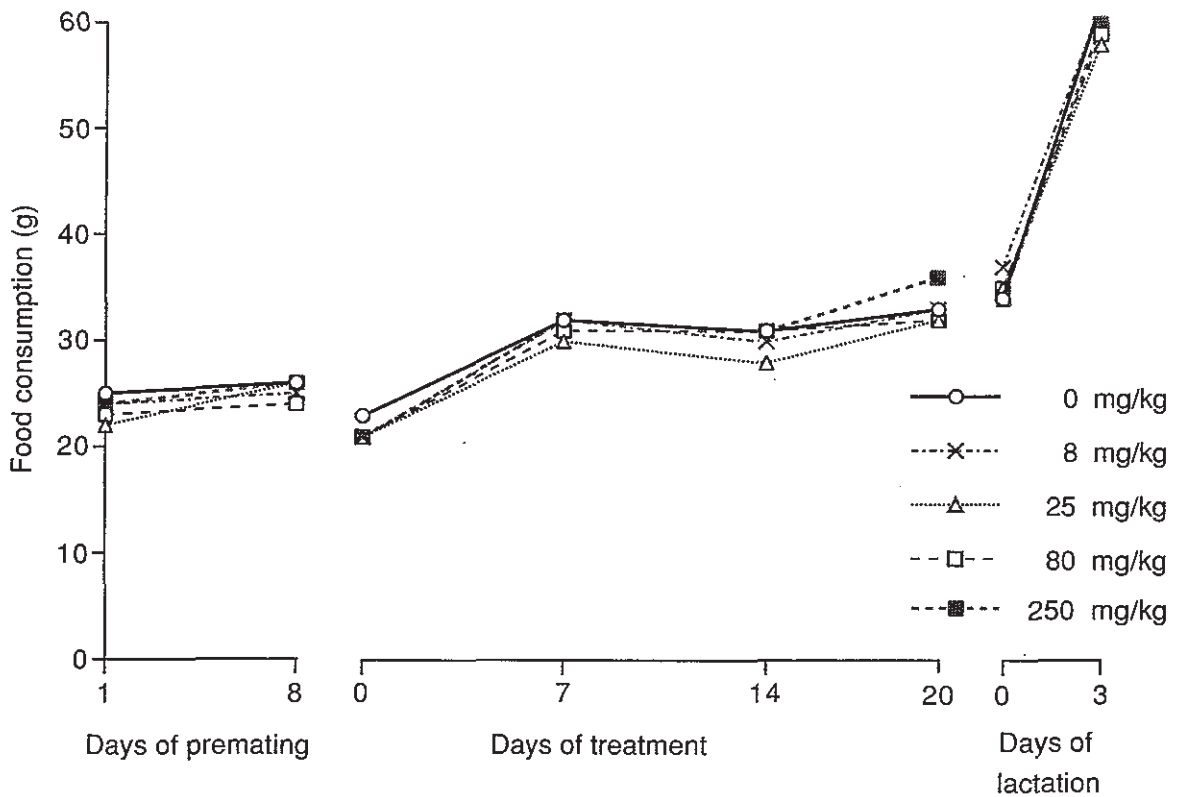


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

8) 器官重量 (Table 5)

250 mg/kg 群で、雌雄に脾臓の絶対および相対重量の有意な増加が認められた。さらに、250 mg/kg 群で、雄に下垂体の絶対および相対重量の有意な増加が、雌に肝臓の絶対重量の増加傾向および相対重量の有意な増加が認められた。その他に、25 mg/kg 群で雌の下垂体の絶対および相対重量が対照群と比べ有意に低値を示したが、用量依存性のない変化であった。

9) 病理組織学検査 (Tables 6, 7)

被験物質の投与に起因すると考えられる変化が、肝臓、腎臓および脾臓に認められた。すなわち、肝臓において、80 mg/kg 以上の群で、雌雄に肝臓のクッパー細胞のベルリンブルー陽性ヘモジデリン沈着が認められた。腎臓において、250 mg/kg 群で、雄に近位尿細管上皮の好酸体 (PAS 染色陰性) の出現率の有意な増加が認められた。脾臓において、80 mg/kg 以上の群で、雌雄にベルリンブルー陽性ヘモジデリン沈着の程度の有意な増加、雌に鬱血、さらに 250 mg/kg 群で、雌雄に髄外造血の程度の有意な増加、雄に鬱血が認められた。

その他に、被験物質の投与とは無関係に剖検において認められた肝臓の尾状葉の表面黄色顆粒状部には巣状壊死、脾臓の腹膜との癒着部には炎症性癒着が認められた。副腎の赤色化および腫大と記録された当該器官には変化は認められなかった。また、散発的に発現した妊娠不成立の雌雄について、雄では剖検で精巣の萎縮が認められた 8 mg/kg 群の雄 1 匹では精巣の精細管萎縮および間細胞の過形成、精巣上体の精巣上体管内精子減少および細胞残屑が認められた。また、雌では子宮腔水腫が認められた対照群の雌 1 匹では、子宮の内腔拡張が認められた。しかし、被験物質の投与に起因する生殖器系器官および生殖能と関連する内分泌系器官の変化は認められなかった。

以上の変化以外にも、検査した各器官に変化が認められたが、散発的なあるいは用量依存性の認められない所見であった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響 (Table 8)

(1) 交尾率および受胎率

各群とも全例に交尾が成立し、交尾率は 100 % であった。また、妊娠不成立動物が対照群、8, 80 および 250 mg/kg 群で認められたが、各 1 対のみで、受胎率にも有意な変化は認められなかった。

(2) 黄体数、着床痕数および着床率

各被験物質投与群の黄体数、着床痕数および着床率には、いずれも対照群と比べ有意差は認められなかった。

(3) 出産率および妊娠期間

出産率は、全ての群で 100 % であった。また、妊娠期間についても、各被験物質投与群と対照群間に有意差は認められなかった。

(4) 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態について、被験物質の投与による影響は認められなかった。哺育状態の観察において、哺育 0 日に 80 mg/kg 群で、哺育 1 日に 80 および 250 mg/kg 群でいずれも食殺が認められたが、各々 1 匹の雌親によるそれぞれ 1 匹の児動物の食殺であり、哺育 2 日以降の生児はいずれも生育した。

2) 新生児に及ぼす影響 (Table 9)

(1) 生存性および体重

各被験物質投与群の 1 腹当たりの総出産児数および新生児数、分娩率、出生率、性比、哺育 0 日および 4 日の体重、ならびに新生児の 4 日の生存率のいずれも、対照群と比べて有意差は認められなかった。また、新生児の一般状態にも変化は認められなかった。

(2) 形態

対照群および各被験物質投与群とも、外表および内臓異常は認められなかった。内臓変異について、胸腺の頸部遺残および左臍動脈遺残が認められたが、各被験物質投与群の発現率には、対照群と比べて有意差は認められなかった。

考察および結論

1. 反復投与毒性

認められた主な変化は、溶血性貧血およびそれとの関連性が考えられる変化であった。

すなわち、雄親において、80 mg/kg 以上の群で赤血球数の減少および平均赤血球容積の増加、さらに、250 mg/kg 群ではヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少、平均赤血球色素量の増加が認められ、大球性貧血の血液像が認められた。また、250 mg/kg 群で末梢血中網状赤血球数および脾臓の髄外造血の程度の増加が認められたが、これらの変化は貧血に対する造血機能の代償性反応によるものと考えられた。

なお、骨髄の造血細胞には病理組織学的変化は認められなかったが、これは貧血の程度が比較的軽度であったため、組織学的には明らかな変化として観察されなかったものと推察される。

さらに、貧血と関連して、80 mg/kg 以上の群で総ビリルビンの増加、肝臓のクッパー細胞および脾臓にヘモジデリンの沈着あるいは沈着の増加、250 mg/kg 群で血清カリウムの増加、メトヘモグロビン含有率の増加傾向、ハイツ小体保有赤血球の出現、脾臓の鬱血および重量増加が認められた。

ハイツ小体保有赤血球の出現およびメトヘモグロビン含有率の増加傾向は、ヘモグロビンの異化過程に対する影響およびそれによる異常ヘモグロビンの形成を、また総ビリルビンおよびカリウムの増加、脾臓や肝臓へのヘモジデリンの沈着は、溶血を示唆する変化と考えられる。

本被験物質は、*o*-トルイジンのアミノ基がアシル化さ

れたものであり、o-トルイジンはラットへの反復投与によりメトヘモグロビン血症およびそれに伴う溶血性貧血を惹起させることが報告²⁾されている。本試験では、o-アセトアセトトルイジドのラットへの反復投与においても、メトヘモグロビンの増加傾向が認められ、溶血性貧血の惹起されることが確認された。

さらに、溶血性貧血およびそれとの関連性が考えられる変化に加えて、250 mg/kg群で腎臓の近位尿細管上皮における好酸体(PAS染色陰性)の出現率、尿比重ならびに下垂体の絶対および相対重量のいずれも増加が認められた。

腎臓の近位尿細管上皮における好酸体は雄ラットに生理的に認められ、これの増加はタンパクの再吸収過程における何らかの異常を示唆する変化と考えられるが、腎機能の異常を伴う変化ではなかった。

下垂体の絶対および相対重量の増加については、下垂体および関連する器官に病理組織学的変化は認められず、下垂体機能の異常を示唆する変化も認められなかったことから、毒性学的意義は小さいものと判断された。

一方、雌親についても、病理学検査において、80 mg/kg以上の群で脾臓のヘモジデリン沈着の程度の増加、鬱血、絶対および相対重量の増加、肉眼的黒色化、肝臓のヘモジデリン沈着が認められ、雄親と同様の溶血性貧血と関連する変化と考えられた。さらに、肝臓の絶対重量の増加傾向および相対重量の増加が認められた。

肝臓の重量増加については、肝臓にはヘモジデリンの軽度な沈着が認められたが重量に影響するような変化とは考えられず、同様にヘモジデリンの沈着が認められた雄では肝臓重量に変化は認められなかった。しかしながら、より高用量を14日間反復投与した投与量設定試験では、雌雄とも肝臓重量の増加に加え、血清GPTも増加が認められている⁵⁾。したがって、o-アセトアセトトルイジドは肝臓に対しても軽度な毒性影響を有するものと推察される。

また、被験物質の投与とは無関係に認められた妊娠不成立の雌雄において、その一部の動物には妊娠が成立しなかったことと関連する変化が生殖器系器官に認められたが、被験物質の投与と関連する生殖器系器官や内分泌系器官の変化は、認められなかった。

なお、上述のo-トルイジンは、膀胱粘膜に対しても毒性を有することが知られている²⁾が、o-アセトアセトトルイジドを投与した本試験において、膀胱粘膜に変化は認められなかった。

以上の結果から、o-アセトアセトトルイジドのラットにおける主な反復経口投与毒性は、溶血性貧血およびそれと関連する変化であった。また、雌の肝臓および雄の腎臓に対しても軽度な影響が認められた。無影響量は、雌雄とも25 mg/kg/dayと推定された。

2. 生殖発生毒性

雌雄親の生殖能に対する被験物質の投与による影響について、観察した各指標とも対照群と比べ有意な変化は認められなかった。

児動物の発生について、総出産児数、新生児数、出生率、性比、新生児の体重、生存率および形態のいずれの指標にも変化は認められなかった。

以上のように、雌雄親の生殖能並びに児動物の発生に対する影響は認められなかった。したがって、無影響量は、雌雄親の生殖能および児動物の発生に対して250 mg/kg/day以上と推定された。

文献

- 1) 化学工業日報社編, "12394の化学商品," 化学工業日報社, 東京, 1994, p. 547.
- 2) IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, 27, 155(1982)
- 3) REGISTRY OF TOXIC EFFECTS OF CHEMICAL SUBSTANCES, AK 6550000
- 4) E. J. van Kampen and W. G. Zijlstra, *Adv. Clin. Chem.*, 8, 181(1965)
- 5) 山本 譲, 「o-アセトアセトトルイジドのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験のための投与量設定試験」, 所内資料, 1998.

連絡先

試験責任者: 山本 譲

試験担当者: 伊藤義彦, 野田篤, 下平裕二,
赤木 博, 河村未佳

(財)畜産生物科学安全研究所

〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11

Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Yuzuru Yamamoto (Study director)

Yoshihiko Ito, Atushi Noda,

Yuji Shimodaira, Hiroshi Akagi,

Mika Kawamura

Research Institute for Animal Science in

Biochemistry and Toxicology

3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi, Kanagawa,

229-1132, Japan

Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Hematological findings of male rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity test

| Item | Dose level (mg/kg/day) | 0 | 8 | 25 | 80 | 250 |
|-----------------------------|------------------------|------------|------------|------------|------------|--------------|
| No. of animals | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| RBC (10 ⁴ /μL) | | 810 ± 36 | 804 ± 32 | 779 ± 22 | 756 ± 42** | 681 ± 28** |
| Hb (g/dL) | | 14.8 ± 0.5 | 14.8 ± 0.6 | 14.5 ± 0.5 | 14.3 ± 0.7 | 13.3 ± 0.4** |
| Ht (%) | | 44.5 ± 1.2 | 44.3 ± 1.8 | 43.3 ± 1.3 | 43.0 ± 2.0 | 40.1 ± 1.0** |
| MCV (fL) | | 55 ± 2 | 55 ± 1 | 56 ± 1 | 57 ± 1* | 59 ± 2** |
| MCH (pg) | | 18.3 ± 0.7 | 18.4 ± 0.4 | 18.6 ± 0.5 | 18.9 ± 0.3 | 19.5 ± 0.7** |
| MCHC (%) | | 33.3 ± 0.5 | 33.4 ± 0.5 | 33.5 ± 0.5 | 33.2 ± 0.3 | 33.1 ± 0.5 |
| Ret. (%) | | 35 ± 8 | 41 ± 7 | 46 ± 12 | 50 ± 13 | 94 ± 20** |
| Met-Hb (%) | | 0.8 ± 0.5 | 0.6 ± 0.5 | 0.5 ± 0.7 | 0.8 ± 0.6 | 1.3 ± 0.7 |
| Hein-B (%) | | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 27 ± 25** |
| Plat. (10 ⁴ /μL) | | 136 ± 16 | 140 ± 15 | 137 ± 14 | 132 ± 15 | 148 ± 13 |
| PT (sec) | | 12.9 ± 0.5 | 13.5 ± 1.1 | 13.0 ± 0.4 | 13.2 ± 0.3 | 13.2 ± 0.7 |
| APTT (sec) | | 17.6 ± 1.1 | 18.4 ± 1.6 | 18.1 ± 1.3 | 17.7 ± 1.3 | 18.5 ± 1.5 |
| WBC (10 ³ /μL) | | 79 ± 14 | 72 ± 14 | 81 ± 26 | 74 ± 21 | 77 ± 20 |

Each value is expressed as Mean±S.D.
Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01)

Table 2 Blood biochemical findings of male rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Item | Dose level (mg/kg/day) | 0 | 8 | 25 | 80 | 250 |
|-----------------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|---------------|
| No. of animals | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| LDH (IU/L) | | 280 ± 114 | 262 ± 85 | 304 ± 97 | 302 ± 141 | 302 ± 78 |
| GOT (IU/L) | | 61 ± 6 | 66 ± 7 | 66 ± 9 | 65 ± 7 | 62 ± 5 |
| GPT (IU/L) | | 34 ± 6 | 36 ± 6 | 38 ± 6 | 37 ± 8 | 38 ± 7 |
| ALP (IU/L) | | 245 ± 61 | 226 ± 42 | 228 ± 44 | 243 ± 68 | 225 ± 55 |
| γ-GTP (IU/L) | | 0.71 ± 0.54 | 1.14 ± 0.50 | 0.67 ± 0.56 | 0.48 ± 0.33 | 0.91 ± 0.65 |
| ChE (IU/L) | | 53 ± 15 | 41 ± 12 | 49 ± 12 | 44 ± 19 | 54 ± 27 |
| T.protein (g/dL) | | 6.21 ± 0.25 | 6.26 ± 0.18 | 6.42 ± 0.12 | 6.26 ± 0.15 | 6.12 ± 0.27 |
| Albumin (g/dL) | | 2.81 ± 0.21 | 2.88 ± 0.31 | 2.98 ± 0.18 | 2.74 ± 0.28 | 2.60 ± 0.37 |
| A/G ratio | | 0.83 ± 0.11 | 0.87 ± 0.14 | 0.87 ± 0.09 | 0.78 ± 0.13 | 0.74 ± 0.15 |
| T.cholesterol (mg/dL) | | 68 ± 14 | 67 ± 15 | 84 ± 13 | 76 ± 17 | 74 ± 17 |
| Triglyceride (mg/dL) | | 83 ± 27 | 81 ± 15 | 83 ± 30 | 91 ± 34 | 94 ± 36 |
| Glucose (mg/dL) | | 137 ± 19 | 136 ± 27 | 135 ± 23 | 133 ± 27 | 124 ± 17 |
| T.bilirubin (mg/dL) | | 0.27 ± 0.03 | 0.28 ± 0.02 | 0.29 ± 0.02 | 0.31 ± 0.02* | 0.33 ± 0.03** |
| BUN (mg/dL) | | 15.4 ± 1.4 | 15.7 ± 1.6 | 15.6 ± 1.9 | 16.2 ± 2.2 | 17.3 ± 1.1 |
| Creatinine (mg/dL) | | 0.51 ± 0.05 | 0.54 ± 0.07 | 0.51 ± 0.03 | 0.51 ± 0.07 | 0.54 ± 0.04 |
| Ca (mg/dL) | | 10.3 ± 0.3 | 10.5 ± 0.3 | 10.5 ± 0.3 | 10.5 ± 0.2 | 10.5 ± 0.3 |
| P (mg/dL) | | 7.1 ± 0.8 | 7.2 ± 0.4 | 7.0 ± 0.6 | 7.2 ± 0.5 | 7.1 ± 0.6 |
| Na (mEq/L) | | 142 ± 1 | 142 ± 1 | 143 ± 1 | 143 ± 1 | 142 ± 1 |
| K (mEq/L) | | 4.69 ± 0.28 | 4.76 ± 0.18 | 4.92 ± 0.31 | 4.97 ± 0.29 | 5.47 ± 0.40** |
| Cl (mEq/L) | | 103 ± 1 | 103 ± 1 | 104 ± 1 | 103 ± 2 | 104 ± 1 |

Each value is expressed as Mean±S.D.
Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01)

Table 3 Incidence of gross findings of male rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| | | Dose level (mg/kg/day) | | | 0 | | | 8 | | | 25 | | | 80 | | | 250 | | |
|---------|-------------------------------|------------------------|----|----|------|----|----|------|----|------|----|----|------|----|----|-------|-----|----|-------|
| Organ | Findings | No. of animals | TK | FP | (T) | TK | FP | (T) | TK | (T) | TK | FP | (T) | TK | FP | (T) | TK | FP | (T) |
| Liver | Granular, yellow caudate lobe | - | 9 | 1 | (10) | 8 | 1 | (9) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) |
| | | + | 0 | 0 | (0) | 1 | 0 | (1) | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) |
| Testis | Atrophy | - | 9 | 1 | (10) | 9 | 0 | (9) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) |
| | | + | 0 | 0 | (0) | 0 | 1 | (1) | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) |
| Adrenal | Enlargement | - | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 8 | 1 | (9) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) |
| | | + | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 1 | 0 | (1) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) |
| Spleen | Black | - | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 7 | 1 | (8) | 1 | 0 | (1) | 8 | 1 | (9)** |
| | | + | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 2 | 0 | (2) | 8 | 1 | (9)** | 8 | 1 | (9) |
| | Enlargement | - | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 8 | 1 | (9) | 8 | 1 | (9) |
| | | + | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 1 | 0 | (1) | 1 | 0 | (1) |

-:Negative, +:Slight
 TK: Terminal kill, FP: Failed to cause pregnancy, T: Total
 Significantly different from control (**:p<0.01)

Table 4 Incidence of gross findings of female rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| | | Dose level (mg/kg/day) | | | 0 | | | 8 | | | 25 | | | 80 | | | 250 | | |
|---------|----------------------|------------------------|----|----|------|----|----|------|----|------|----|----|-------|----|----|--------|-----|----|--------|
| Organ | Findings | No. of animals | TK | NP | (T) | TK | NP | (T) | TK | (T) | TK | NP | (T) | TK | NP | (T) | TK | NP | (T) |
| Lung | Red spot | - | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 8 | 1 | (9) | 8 | 1 | (9) |
| | | + | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 1 | 0 | (1) | 1 | 0 | (1) |
| Uterus | Hydrometra | - | 9 | 0 | (9) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) |
| | | + | 0 | 1 | (1) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) |
| Adrenal | Red | - | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 8 | 1 | (9) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) |
| | | + | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 1 | 0 | (1) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) |
| Spleen | Black | - | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 2 | 0 | (2) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) |
| | | +, ++ | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 7 | 1 | (8)** | 9 | 1 | (10)** | 9 | 1 | (10)** |
| | Enlargement | - | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 3 | 1 | (4) | 3 | 1 | (4) |
| | | + | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 6 | 0 | (6)** | 6 | 0 | (6)** |
| | Adhesion, peritoneum | - | 8 | 1 | (9) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) |
| | | + | 1 | 0 | (1) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) |

-:Negative, +:Slight, ++:Moderate
 TK: Terminal kill, NP: Non-pregnant, T: Total
 Significantly different from control (**:p<0.01)

Table 5 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Sex | Item | Dose level (mg/kg/day) | 0 | 8 | 25 | 80 | 250 | |
|-------------------|------------------|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--|
| Male | No. of animals | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| | Body weight | | 486 ± 30 | 472 ± 29 | 475 ± 32 | 482 ± 30 | 475 ± 37 | |
| | Absolute weight | | | | | | | |
| | Brain (g) | | 2.07 ± 0.10 | 2.10 ± 0.05 | 2.10 ± 0.09 | 2.13 ± 0.11 | 2.11 ± 0.05 | |
| | Liver (g) | | 13.29 ± 1.58 | 12.63 ± 1.46 | 13.28 ± 1.14 | 13.93 ± 1.59 | 13.8 ± 1.58 | |
| | Kidneys (g) | | 3.14 ± 0.21 | 3.03 ± 0.11 | 3.11 ± 0.22 | 3.21 ± 0.35 | 2.99 ± 0.17 | |
| | Spleen (g) | | 0.83 ± 0.11 | 0.84 ± 0.09 | 0.87 ± 0.09 | 0.94 ± 0.18 | 1.11 ± 0.14** | |
| | Heart (g) | | 1.38 ± 0.13 | 1.34 ± 0.07 | 1.37 ± 0.07 | 1.42 ± 0.11 | 1.33 ± 0.10 | |
| | Thymus (g) | | 0.33 ± 0.06 | 0.32 ± 0.08 | 0.32 ± 0.08 | 0.36 ± 0.07 | 0.29 ± 0.05 | |
| | Thyroid (mg) | | 33.7 ± 2.9 | 32.7 ± 3.8 | 34.9 ± 2.8 | 36.0 ± 5.2 | 35.2 ± 3.9 | |
| | Pituitary (mg) | | 13.6 ± 1.4 | 13.4 ± 0.8 | 14.6 ± 1.6 | 14.2 ± 1.0 | 15.4 ± 1.6* | |
| | Adrenals (mg) | | 66.8 ± 12.2 | 63.5 ± 10.2 | 61.6 ± 4.0 | 61.8 ± 16.1 | 55.7 ± 7.9 | |
| | Testes (g) | | 3.49 ± 0.23 | 3.10 ± 0.64 | 3.55 ± 0.25 | 3.44 ± 0.27 | 3.42 ± 0.18 | |
| | Epididymides (g) | | 1.53 ± 0.14 | 1.41 ± 0.21 | 1.46 ± 0.09 | 1.49 ± 0.18 | 1.43 ± 0.14 | |
| | Relative weight | | | | | | | |
| | Brain (g%) | | 0.43 ± 0.03 | 0.45 ± 0.02 | 0.44 ± 0.04 | 0.44 ± 0.03 | 0.45 ± 0.03 | |
| | Liver (g%) | | 2.73 ± 0.22 | 2.67 ± 0.17 | 2.79 ± 0.13 | 2.89 ± 0.23 | 2.90 ± 0.18 | |
| | Kidneys (g%) | | 0.65 ± 0.03 | 0.64 ± 0.04 | 0.66 ± 0.03 | 0.67 ± 0.05 | 0.63 ± 0.04 | |
| | Spleen (g%) | | 0.17 ± 0.02 | 0.18 ± 0.02 | 0.18 ± 0.02 | 0.19 ± 0.03 | 0.23 ± 0.02** | |
| | Heart (g%) | | 0.28 ± 0.02 | 0.29 ± 0.02 | 0.29 ± 0.02 | 0.29 ± 0.01 | 0.28 ± 0.02 | |
| Thymus (g%) | | 0.07 ± 0.01 | 0.07 ± 0.01 | 0.07 ± 0.01 | 0.07 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 | | |
| Thyroid (mg%) | | 7.0 ± 0.6 | 6.9 ± 0.6 | 7.4 ± 0.9 | 7.5 ± 1.1 | 7.5 ± 1.1 | | |
| Pituitary (mg%) | | 2.8 ± 0.3 | 2.8 ± 0.3 | 3.1 ± 0.4 | 3.0 ± 0.3 | 3.3 ± 0.4* | | |
| Adrenals (mg%) | | 13.7 ± 2.1 | 13.5 ± 2.6 | 13.0 ± 0.8 | 12.8 ± 3.2 | 11.8 ± 2.0 | | |
| Testes (g%) | | 0.72 ± 0.05 | 0.66 ± 0.14 | 0.75 ± 0.07 | 0.71 ± 0.04 | 0.72 ± 0.06 | | |
| Epididymides (g%) | | 0.32 ± 0.03 | 0.30 ± 0.04 | 0.31 ± 0.02 | 0.31 ± 0.04 | 0.30 ± 0.03 | | |
| Female | No. of animals | | 9 | 9 | 10 | 9 | 9 | |
| | Body weight | | 359 ± 17 | 359 ± 13 | 347 ± 20 | 353 ± 14 | 358 ± 13 | |
| | Absolute weight | | | | | | | |
| | Brain (g) | | 1.98 ± 0.06 | 1.99 ± 0.11 | 1.95 ± 0.09 | 1.99 ± 0.07 | 1.98 ± 0.08 | |
| | Liver (g) | | 14.8 ± 0.74 | 14.35 ± 0.89 | 14.61 ± 0.91 | 14.81 ± 1.14 | 16.10 ± 1.16 | |
| | Kidneys (g) | | 2.10 ± 0.15 | 2.18 ± 0.19 | 2.04 ± 0.14 | 2.11 ± 0.17 | 2.16 ± 0.14 | |
| | Spleen (g) | | 0.71 ± 0.16 | 0.67 ± 0.10 | 0.74 ± 0.11 | 0.77 ± 0.10 | 1.12 ± 0.19** | |
| | Heart (g) | | 1.07 ± 0.09 | 1.02 ± 0.07 | 1.04 ± 0.08 | 1.05 ± 0.04 | 1.10 ± 0.08 | |
| | Thymus (g) | | 0.27 ± 0.03 | 0.27 ± 0.10 | 0.25 ± 0.09 | 0.23 ± 0.03 | 0.25 ± 0.05 | |
| | Thyroid (mg) | | 23.4 ± 3.9 | 22.0 ± 3.2 | 22.4 ± 3.1 | 24.2 ± 3.0 | 26.8 ± 2.8 | |
| | Pituitary (mg) | | 18.1 ± 2.5 | 16.0 ± 1.6 | 14.4 ± 1.1** | 17.1 ± 1.5 | 17.5 ± 2.1 | |
| | Adrenals (mg) | | 81.7 ± 14.0 | 72.2 ± 8.5 | 75.0 ± 12.0 | 76.1 ± 8.9 | 72.6 ± 4.1 | |
| | Relative weight | | | | | | | |
| | Brain (g%) | | 0.55 ± 0.03 | 0.55 ± 0.02 | 0.56 ± 0.04 | 0.56 ± 0.02 | 0.55 ± 0.03 | |
| | Liver (g%) | | 4.12 ± 0.26 | 4.00 ± 0.18 | 4.21 ± 0.21 | 4.19 ± 0.31 | 4.50 ± 0.23* | |
| | Kidneys (g%) | | 0.58 ± 0.03 | 0.61 ± 0.06 | 0.59 ± 0.04 | 0.60 ± 0.05 | 0.61 ± 0.04 | |
| | Spleen (g%) | | 0.20 ± 0.05 | 0.18 ± 0.03 | 0.21 ± 0.03 | 0.22 ± 0.03 | 0.31 ± 0.05** | |
| | Heart (g%) | | 0.30 ± 0.02 | 0.29 ± 0.02 | 0.30 ± 0.02 | 0.30 ± 0.01 | 0.31 ± 0.02 | |
| | Thymus (g%) | | 0.07 ± 0.01 | 0.07 ± 0.03 | 0.07 ± 0.02 | 0.07 ± 0.01 | 0.07 ± 0.01 | |
| | Thyroid (mg%) | | 6.5 ± 1.1 | 6.1 ± 0.9 | 6.5 ± 0.8 | 6.9 ± 0.9 | 7.5 ± 0.6 | |
| Pituitary (mg%) | | 5.0 ± 0.7 | 4.5 ± 0.4 | 4.1 ± 0.3* | 4.8 ± 0.4 | 4.9 ± 0.6 | | |
| Adrenals (mg%) | | 22.7 ± 3.9 | 20.1 ± 2.4 | 21.7 ± 3.8 | 21.5 ± 2.7 | 20.3 ± 1.3 | | |

Each value is expressed as Mean ± S.D.
Significantly different from control (*: p < 0.05, **: p < 0.01)

Table 6 Incidence of histopathological findings of male rats treated with o-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose level (mg/kg/day) | | | 0 | | | 8 | | | 25 | | 80 | | | 250 | | |
|------------------------|--|----------------|----|----|------|----|----|------|----|------|----|-----|------|-----|------|--------|
| Organ: | Findings | No. of animals | TK | FP | (T) | TK | FP | (T) | TK | (T) | TK | FP | (T) | TK | FP | (T) |
| | | | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) |
| Heart : | Myocardial degeneration/fibrosis | - | 7 | 1 | (8) | - | 1 | (1) | - | - | 1 | (1) | 6 | 1 | (7) | |
| | | + | 2 | 0 | (2) | - | 0 | (0) | - | - | 0 | (0) | 3 | 0 | (3) | |
| | Cellular infiltration, lymphocyte, focal | - | 8 | 1 | (9) | - | 1 | (1) | - | - | 1 | (1) | 9 | 1 | (10) | |
| | | + | 1 | 0 | (1) | - | 0 | (0) | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | |
| Lung : | Mineralization,artery | - | 5 | 1 | (6) | - | 1 | (1) | - | - | 1 | (1) | 7 | 0 | (7) | |
| | | + | 4 | 0 | (4) | - | 0 | (0) | - | - | 0 | (0) | 2 | 1 | (3) | |
| | Accumulation, foam cell | - | 7 | 1 | (8) | - | 1 | (1) | - | - | 1 | (1) | 8 | 1 | (9) | |
| | | + | 2 | 0 | (2) | - | 0 | (0) | - | - | 0 | (0) | 1 | 0 | (1) | |
| | Hemorrhage/cellular infiltration, neutrophil, focal | - | 8 | 1 | (9) | - | 1 | (1) | - | - | 1 | (1) | 8 | 1 | (9) | |
| | | + | 1 | 0 | (1) | - | 0 | (0) | - | - | 0 | (0) | 1 | 0 | (1) | |
| Liver : | Degeneration, fatty, hepatocyte, periportal | - | 8 | 1 | (9) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) |
| | | + | 1 | 0 | (1) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) |
| | Necrosis,focal | - | 9 | 1 | (10) | 8 | 1 | (9) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) |
| | | ++ | 0 | 0 | (0) | 1 | 0 | (1) | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) |
| | Microgranuloma | - | 7 | 0 | (7) | 8 | 0 | (8) | 9 | (9) | 7 | 1 | (8) | 7 | 1 | (8) |
| | | + | 2 | 1 | (3) | 1 | 1 | (2) | 1 | (1) | 2 | 0 | (2) | 2 | 0 | (2) |
| | Deposit, hemosiderin, Kupffer cell | - | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 5 | 1 | (6) | 0 | 0 | (0) |
| | | + | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 4 | 0 | (4)* | 9 | 1 | (10)** |
| Kidney: | Eosinophilic body, proximal tubular epithelium | - | 8 | 1 | (9) | 6 | 1 | (7) | 10 | (10) | 6 | 1 | (7) | 2 | 0 | (2) |
| | | +,++ | 1 | 0 | (1) | 3 | 0 | (3) | 0 | (0) | 3 | 0 | (3) | 7 | 1 | (8)** |
| | Hyaline droplet, proximal tubular epithelium | -,+ | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | (9) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) |
| | | ++ | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 1 | (1) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) |
| | Cyst, solitary/multiple | - | 9 | 1 | (10) | 7 | 1 | (8) | 10 | (10) | 8 | 0 | (8) | 9 | 1 | (10) |
| | | + | 0 | 0 | (0) | 2 | 0 | (2) | 0 | (0) | 1 | 1 | (2) | 0 | 0 | (0) |
| | Cast, hyaline/protenous | - | 7 | 1 | (8) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) |
| | | + | 2 | 0 | (2) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) |
| | Cellular infiltration, lymphocyte, cortex | - | 8 | 1 | (9) | 9 | 1 | (10) | 8 | (8) | 9 | 0 | (9) | 8 | 1 | (9) |
| | | + | 1 | 0 | (1) | 0 | 0 | (0) | 2 | (2) | 0 | 1 | (1) | 1 | 0 | (1) |
| | Basophilic tubules | - | 6 | 1 | (7) | 5 | 1 | (6) | 7 | (7) | 8 | 0 | (8) | 8 | 1 | (9) |
| | | + | 3 | 0 | (3) | 4 | 0 | (4) | 3 | (3) | 1 | 1 | (2) | 1 | 0 | (1) |
| Urinary : | Cellular infiltration, lymphocyte, bladder submucosa | - | 8 | 1 | (9) | - | - | - | - | - | - | - | - | 8 | 1 | (9) |
| | | + | 1 | 0 | (1) | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 0 | (1) |
| Testis : | Atrophy, seminiferus tubule | - | 9 | 1 | (10) | - | 0 | (0) | - | - | 1 | (1) | 9 | 1 | (10) | |
| | | ++ | 0 | 0 | (0) | - | 1 | (1) | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | |
| | Hyperplasia, interstitial cell | - | 9 | 1 | (10) | - | 0 | (0) | - | - | 1 | (1) | 9 | 1 | (10) | |
| | | + | 0 | 0 | (0) | - | 1 | (1) | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | |
| Epididymis: | Decrease, sperm | - | 9 | 1 | (10) | - | 0 | (0) | - | - | 1 | (1) | 9 | 1 | (10) | |
| | | +++ | 0 | 0 | (0) | - | 1 | (1) | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | |
| | Cell debris, lumen | - | 9 | 1 | (10) | - | 0 | (0) | - | - | 1 | (1) | 9 | 1 | (10) | |
| | | ++ | 0 | 0 | (0) | - | 1 | (1) | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | |
| | Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium | - | 7 | 1 | (8) | - | 1 | (1) | - | - | 1 | (1) | 9 | 1 | (10) | |
| | | + | 2 | 0 | (2) | - | 0 | (0) | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | |
| Prostate: | Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium | - | - | 0 | (0) | - | 1 | (1) | - | - | 1 | (1) | - | 1 | (1) | |
| | | + | - | 1 | (1) | - | 0 | (0) | - | - | 0 | (0) | - | 0 | (0) | |
| Thymus: | Hemorrhage | - | 8 | 1 | (9) | - | 1 | (1) | - | - | 1 | (1) | 9 | 1 | (10) | |
| | | + | 1 | 0 | (1) | - | 0 | (0) | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | |
| Pituitary: | Cyst, anterior lobe | - | 9 | 1 | (10) | - | 1 | (1) | - | - | 1 | (1) | 8 | 1 | (9) | |
| | | + | 0 | 0 | (0) | - | 0 | (0) | - | - | 0 | (0) | 1 | 0 | (1) | |
| Spleen: | Hematopoiesis, extramedullary | -,+ | 8 | 1 | (9) | 8 | 1 | (9) | 8 | (8) | 7 | 1 | (8) | 0 | 0 | (0) |
| | | ++ | 1 | 0 | (1) | 1 | 0 | (1) | 2 | (2) | 2 | 0 | (2) | 9 | 1 | (10)** |
| | Deposit, hemosiderin | -,+ | 8 | 1 | (9) | 7 | 1 | (8) | 10 | (10) | 3 | 1 | (4) | 0 | 0 | (0) |
| | | ++ | 1 | 0 | (1) | 2 | 0 | (2) | 0 | (0) | 6 | 0 | (6)* | 9 | 1 | (10)** |
| | Congestion | - | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 6 | 1 | (7) | 0 | 0 | (0) |
| | | +,++ | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 3 | 0 | (3) | 9 | 1 | (10)** |

-:Negative, +:Slight, ++:Moderate, +++:Severe
 TK:Terminal kill, FP:Failed to cause pregnancy, T:Total, -:Not examined
 Significantly different from control(*:p<0.05, **:p<0.01)

Table 7 Incidence of histopathological findings of female rats treated with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| | | Dose level (mg/kg/day) | | | 0 | | | 8 | | | 25 | | 80 | | | 250 | | |
|---|--|------------------------|----|------|------|----|------|------|------|------|----|------|-------|----|--------|--------|--|--|
| Organ | Findings | No. of animals | TK | NP | (T) | TK | NP | (T) | TK | (T) | TK | NP | (T) | TK | NP | (T) | | |
| | | | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | | |
| Heart | Myocardial degeneration/fibrosis | - | 9 | 1 | (10) | - | 0 | (0) | - | - | - | 1 | (1) | 9 | 1 | (10) | | |
| | | + | 0 | 0 | (0) | - | 1 | (1) | - | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | | |
| | Cellular infiltration, lymphocyte, focal | - | 9 | 0 | (9) | - | 1 | (1) | - | - | - | 1 | (1) | 9 | 1 | (10) | | |
| | | + | 0 | 1 | (1) | - | 0 | (0) | - | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | | |
| Lung | Mineralization, artery | - | 7 | 0 | (7) | - | 0 | (0) | - | - | - | 1 | (1) | 9 | 1 | (10) | | |
| | | + | 2 | 1 | (3) | - | 1 | (1) | - | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | | |
| | Accumulation, foam cell | - | 9 | 1 | (10) | - | 1 | (1) | - | - | - | 1 | (1) | 7 | 1 | (8) | | |
| | | + | 0 | 0 | (0) | - | 0 | (0) | - | - | - | 0 | (0) | 2 | 0 | (2) | | |
| Hemorrhage/proliferation, macrophage, focal | - | 9 | 1 | (10) | - | 1 | (1) | - | - | - | 1 | (1) | 8 | 1 | (9) | | | |
| | + | 0 | 0 | (0) | - | 0 | (0) | - | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (1) | | | |
| Liver | Necrosis, focal | - | 9 | 1 | (10) | 8 | 1 | (9) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | | |
| | | + | 0 | 0 | (0) | 1 | 0 | (1) | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | | |
| | Deposit, hemosiderin, Kupffer cell | - | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 5 | 1 | (6) | 0 | 0 | (0) | | |
| | | + | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 4 | 0 | (4)* | 9 | 1 | (10)** | | |
| Kidney | Cyst, solitary | - | 8 | 1 | (9) | - | 1 | (1) | - | - | - | 1 | (1) | 8 | 1 | (9) | | |
| | | + | 1 | 0 | (1) | - | 0 | (0) | - | - | - | 0 | (0) | 1 | 0 | (1) | | |
| | Mineralization, corticomedullary junction | - | 9 | 0 | (9) | - | 0 | (0) | - | - | - | 0 | (0) | 9 | 1 | (10) | | |
| + | | 0 | 1 | (1) | - | 1 | (1) | - | - | - | 1 | (1) | 0 | 0 | (0) | | | |
| Urinary: bladder | Cellular infiltration, lymphocyte, submucosa | - | 8 | 1 | (9) | - | 1 | (1) | - | - | - | 1 | (1) | 9 | 1 | (10) | | |
| | | + | 1 | 0 | (1) | - | 0 | (0) | - | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | | |
| Uterus | Dilatation, lumen | - | - | 0 | (0) | - | 1 | (1) | - | - | - | 1 | (1) | - | 1 | (1) | | |
| | | + | - | 1 | (1) | - | 0 | (0) | - | - | - | 0 | (0) | - | 0 | (0) | | |
| Thymus | Hemorrhage | - | 8 | 1 | (9) | - | 1 | (1) | - | - | - | 1 | (1) | 9 | 1 | (10) | | |
| | | + | 1 | 0 | (1) | - | 0 | (0) | - | - | - | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | | |
| Spleen | Hematopoiesis, extramedullary | -,+ | 8 | 1 | (9) | 7 | 1 | (8) | 9 | (9) | 5 | 1 | (6) | 0 | 0 | (0) | | |
| | | ++,+++ | 1 | 0 | (1) | 2 | 0 | (2) | 1 | (1) | 4 | 0 | (4) | 9 | 1 | (10)** | | |
| | Deposit, hemosiderin | -,+ | 8 | 1 | (9) | 8 | 1 | (9) | 8 | (8) | 2 | 0 | (2) | 0 | 0 | (0) | | |
| | | ++,+++ | 1 | 0 | (1) | 1 | 0 | (1) | 2 | (2) | 7 | 1 | (8)** | 9 | 1 | (10)** | | |
| | Congestion | -,+ | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 6 | 0 | (6) | 0 | 0 | (0) | | |
| ++,+++ | | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 3 | 1 | (4)* | 9 | 1 | (10)** | | | |
| Adhesive inflammation | - | 8 | 1 | (9) | 9 | 1 | (10) | 10 | (10) | 9 | 1 | (10) | 9 | 1 | (10) | | | |
| | ++ | 1 | 0 | (1) | 0 | 0 | (0) | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | 0 | 0 | (0) | | | |

-:Negative, +:Slight, ++:Moderate, +++:Severe
 TK:Terminal kill, NP:Non-pregnant, T:Total, -:Not examined
 Significantly different from control(*:p<0.05, **:p<0.01)

Table 8 Reproduction results of treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose(mg/kg) | 0 | 8 | 25 | 80 | 250 |
|---|------------|------------|-------------|------------|------------|
| No. of pairs with mated | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| No. of pairs with successful copulation | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Copulation index (%) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Pairing days until copulation (day, Mean±S.D.) | 2.3 ± 1.16 | 2.4 ± 1.26 | 2.9 ± 0.88 | 2.3 ± 0.82 | 2.3 ± 1.06 |
| No. of pregnant females | 9 | 9 | 10 | 9 | 9 |
| Fertility index (%) | 90 | 90 | 100 | 90 | 90 |
| No. of corpora lutea (Mean±S.D.) | 21.8 ± 2.0 | 21.7 ± 2.1 | 20.9 ± 2.2 | 20.7 ± 1.2 | 21.2 ± 2.5 |
| No. of implantation sites (Mean±S.D.) | 17.2 ± 1.9 | 15.9 ± 2.1 | 16.0 ± 3.2 | 16.1 ± 0.9 | 18.0 ± 0.9 |
| Implantation index (% , Mean±S.D.) | 79.5 ± 9.5 | 73.7 ± 9.2 | 77.1 ± 16.2 | 78.4 ± 8.3 | 85.7 ± 8.8 |
| No. of pregnant females with parturition | 9 | 9 | 10 | 9 | 9 |
| Gestation length (day, Mean±S.D.) | 22.7 ± 0.5 | 23.0 ± 0 | 22.7 ± 0.5 | 22.7 ± 0.5 | 22.4 ± 0.5 |
| No. of pregnant females with live pups | 9 | 9 | 10 | 9 | 9 |
| Gestation index (%) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| No. of pregnant females with live pups on day 4 | 9 | 9 | 10 | 9 | 9 |

Copulation index=(No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)×100

Fertility index=(No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)×100

Gestation index=(No. of females with live pups/No. of pregnant females)×100

Table 9 Litter results of female rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

| Dose(mg/kg) | 0 | 8 | 25 | 80 | 250 |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|
| No. of pups born | 16.2 ± 1.7 | 15.2 ± 1.3 | 15.3 ± 3.4 | 15.2 ± 1.9 | 16.7 ± 1.7 |
| Delivery index (%) | 94.5 ± 7.4 | 96.2 ± 5.0 | 95.6 ± 6.6 | 94.2 ± 8.5 | 92.5 ± 7.2 |
| No. of pups alive on day 0 of lactation | | | | | |
| Total | 15.8 ± 1.5 | 14.9 ± 1.2 | 15.0 ± 3.3 | 14.7 ± 2.1 | 16.2 ± 1.7 |
| Male | 7.7 ± 2.1 | 8.6 ± 1.7 | 7.6 ± 3.3 | 6.8 ± 1.6 | 9.0 ± 1.7 |
| Female | 8.1 ± 2.1 | 6.3 ± 1.5 | 7.4 ± 2.2 | 7.9 ± 2.7 | 9.0 ± 1.4 |
| Live birth index (%) | 97.5 ± 5.5 | 97.6 ± 3.2 | 98.2 ± 4.2 | 96.2 ± 4.8 | 97.4 ± 4.4 |
| Sex ratio (Male/Female) | 0.92 | 1.36 | 0.99 | 0.88 | 1.24 |
| No. of pups alive on day 4 of lactation | | | | | |
| Total | 15.6 ± 1.6 | 14.9 ± 1.2 | 14.9 ± 3.2 | 14.6 ± 2.1 | 15.8 ± 1.6 |
| Male | 7.4 ± 1.8 | 8.6 ± 1.7 | 7.6 ± 3.3 | 6.8 ± 1.6 | 8.9 ± 1.5 |
| Female | 8.1 ± 2.1 | 6.3 ± 1.5 | 7.3 ± 2.3 | 7.9 ± 2.7 | 6.9 ± 1.9 |
| Viability index (%) | 98.6 ± 2.8 | 100 ± 0 | 99.5 ± 1.6 | 99.3 ± 2.1 | 97.4 ± 3.1 |
| Body weight of live pups (g) | | | | | |
| on day 0 | | | | | |
| Male | 7.4 ± 0.7 | 7.8 ± 0.4 | 7.7 ± 0.9 | 7.5 ± 0.5 | 7.0 ± 0.4 |
| Female | 6.9 ± 0.7 | 7.4 ± 0.3 | 7.1 ± 0.9 | 7.2 ± 0.6 | 6.6 ± 0.4 |
| on day 4 | | | | | |
| Male | 12.0 ± 1.1 | 13.0 ± 0.9 | 12.6 ± 2.3 | 12.4 ± 1.3 | 11.1 ± 0.5 |
| Female | 11.3 ± 1.2 | 12.5 ± 0.7 | 11.7 ± 2.0 | 12.1 ± 1.5 | 10.6 ± 0.5 |

Delivery index=(No. of pups born/No. of implantation sites)×100

Live birth index=(No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100

Sex ratio= Total No. of male pups/Total No. of female pups

Viability index=(No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100

Each value is expressed as Mean±S.D., except sex ratio

o-アセトアセトトルイジドの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of o-Acetoacetotoluidide on Bacteria

要約

o-アセトアセトトルイジドについて、細菌を用いる復帰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o-アセトアセトトルイジドは、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日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成10年1月21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、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

0.5%塩化ナトリウムを含む0.6% Bacto-agar(DIFCO社)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、0.5mM L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5mM D-ピオチン(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、0.5mM 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 Nutrient Broth No. 2: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8時間振盪(往復振盪:100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

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o-アセトアセトトルイジド(ロット番号:7434)は純度99.93%(不純物として、アセト酢酸アニライド0.06%, アセト酢酸m-トルイダイド0.003%を含む)の固体である。三星化学工業(株)(福井)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(MERCK社)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 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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 $^{\circ}\text{C}$)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(NaN_3 :和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA: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¹⁾の改良法であるプレインキュベーション法に準じて, 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, 0.1M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 $^{\circ}\text{C}$ 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, あらかじめ45 $^{\circ}\text{C}$ に保温したトップアガーを2 mL添加し, 混合液をプレート上に重層した。37 $^{\circ}\text{C}$ 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($\times 60$)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。各濃度につき3枚のプレートを使用した。また, 独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰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。

群のいずれにおいても, o-アセトアセトトルイジド処理による生育阻害作用は観察されなかった。また, 復帰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倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。なお, コロニー数計測時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から, 本試験条件下において, o-アセトアセトトルイジド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。

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).

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 嶋田佐和子, 植田ゆみ子

(財)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)

Sawako Shimada, Yumiko Ueta

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

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan.

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

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無添加群ならびに添加

Table 1 Results of the bacterial reversion test of *o*-acetoacetotoluidide (1st trial) [direct method:-S9 mix]

| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.] | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|-----|-------------------|----------------|-----|-------------------|---------------|-----|-------------------|---------------|-----|-------------------|----------------|-----|-------------------|
| | TA100 | | | TA1535 | | | WP2uvrA | | | TA98 | | | TA1537 | | |
| 0 | 100 | 103 | 95 | 9 | 8 | 10 | 19 | 21 | 17 | 27 | 27 | 28 | 7 | 8 | 9 |
| | [99 \pm 4] | | | [9 \pm 1] | | | [19 \pm 2] | | | [27 \pm 1] | | | [8 \pm 1] | | |
| 156 | 108 | 96 | 103 | 7 | 7 | 8 | 18 | 23 | 18 | 25 | 26 | 23 | 13 | 14 | 10 |
| | [102 \pm 6] | | | [7 \pm 1] | | | [20 \pm 3] | | | [25 \pm 2] | | | [12 \pm 2] | | |
| 313 | 89 | 94 | 92 | 6 | 7 | 5 | 16 | 18 | 18 | 35 | 29 | 35 | 8 | 9 | 8 |
| | [92 \pm 3] | | | [6 \pm 1] | | | [17 \pm 1] | | | [33 \pm 3] | | | [8 \pm 1] | | |
| 625 | 85 | 86 | 86 | 8 | 7 | 7 | 26 | 25 | 29 | 22 | 28 | 26 | 9 | 9 | 10 |
| | [86 \pm 1] | | | [7 \pm 1] | | | [27 \pm 2] | | | [25 \pm 3] | | | [9 \pm 1] | | |
| 1250 | 68 | 72 | 75 | 3 | 6 | 4 | 20 | 14 | 17 | 27 | 27 | 24 | 9 | 12 | 7 |
| | [72 \pm 4] | | | [4 \pm 2] | | | [17 \pm 3] | | | [26 \pm 2] | | | [9 \pm 3] | | |
| 2500 | 58 | 61 | 51 | 4 | 4 | 4 | 23 | 20 | 22 | 19 | 20 | 19 | 10 | 11 | 10 |
| | [57 \pm 5] | | | [4 \pm 0] | | | [22 \pm 2] | | | [19 \pm 1] | | | [10 \pm 1] | | |
| 5000 | 5 | 6 | 2 | 5 | 6 | 4 | 16 | 18 | 17 | 16 | 12 | 9 | 5 | 3 | 5 |
| | [4 \pm 2] | | | [5 \pm 1] | | | [17 \pm 1] | | | [12 \pm 4] | | | [4 \pm 1] | | |
| Positive control | 459 | 470 | 456 ^{a)} | 437 | 395 | 415 ^{b)} | 147 | 136 | 131 ^{a)} | 611 | 625 | 623 ^{d)} | 381 | 352 | 368 ^{d)} |
| | [462 \pm 7] | | | [416 \pm 21] | | | [138 \pm 8] | | | [620 \pm 8] | | | [367 \pm 15] | | |

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):9-AA;9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2 Results of the bacterial reversion test of *o*-acetoacetotoluidide (1st trial) [activation method:+S9 mix]

| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.] | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|-----|-------------------|----------------|-----|-------------------|---------------|-----|-------------------|----------------|-----|-------------------|---------------|-----|-------------------|
| | TA100 | | | TA1535 | | | WP2uvrA | | | TA98 | | | TA1537 | | |
| 0 | 128 | 126 | 133 | 13 | 16 | 13 | 17 | 16 | 21 | 37 | 33 | 35 | 18 | 16 | 14 |
| | [129 \pm 4] | | | [14 \pm 2] | | | [18 \pm 3] | | | [35 \pm 2] | | | [16 \pm 2] | | |
| 156 | 129 | 120 | 118 | 11 | 16 | 14 | 22 | 21 | 20 | 38 | 30 | 34 | 13 | 17 | 12 |
| | [122 \pm 6] | | | [14 \pm 3] | | | [21 \pm 1] | | | [34 \pm 4] | | | [14 \pm 3] | | |
| 313 | 128 | 133 | 124 | 12 | 9 | 8 | 28 | 30 | 24 | 30 | 34 | 29 | 12 | 12 | 15 |
| | [128 \pm 5] | | | [10 \pm 2] | | | [27 \pm 3] | | | [31 \pm 3] | | | [13 \pm 2] | | |
| 625 | 115 | 112 | 110 | 15 | 12 | 15 | 19 | 22 | 23 | 33 | 35 | 37 | 14 | 9 | 11 |
| | [112 \pm 3] | | | [14 \pm 2] | | | [21 \pm 2] | | | [35 \pm 2] | | | [11 \pm 3] | | |
| 1250 | 115 | 108 | 109 | 8 | 12 | 13 | 26 | 29 | 26 | 31 | 25 | 28 | 16 | 14 | 14 |
| | [111 \pm 4] | | | [11 \pm 3] | | | [27 \pm 2] | | | [28 \pm 3] | | | [15 \pm 1] | | |
| 2500 | 96 | 93 | 85 | 12 | 9 | 10 | 23 | 24 | 25 | 29 | 35 | 31 | 12 | 9 | 14 |
| | [91 \pm 6] | | | [10 \pm 2] | | | [24 \pm 1] | | | [32 \pm 3] | | | [12 \pm 3] | | |
| 5000 | 82 | 75 | 71 | 8 | 9 | 9 | 28 | 28 | 28 | 32 | 32 | 28 | 9 | 11 | 11 |
| | [76 \pm 6] | | | [8 \pm 2] | | | [28 \pm 0] | | | [31 \pm 2] | | | [10 \pm 1] | | |
| Positive control | 648 | 657 | 674 ^{a)} | 390 | 399 | 378 ^{b)} | 680 | 668 | 675 ^{d)} | 236 | 241 | 221 ^{d)} | 180 | 166 | 162 ^{b)} |
| | [660 \pm 13] | | | [389 \pm 11] | | | [674 \pm 6] | | | [233 \pm 10] | | | [169 \pm 9] | | |

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 o-acetoacetotoluidide (2nd trial) [direct method: -S9 mix]

| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.] | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|-----|-------------------|----------------|-----|-------------------|---------------|-----|-------------------|----------------|-----|-------------------|----------------|-----|-------------------|
| | TA100 | | | TA1535 | | | WP2uvrA | | | TA98 | | | TA1537 | | |
| 0 | 104 | 114 | 111 | 9 | 15 | 11 | 17 | 16 | 16 | 19 | 23 | 22 | 7 | 6 | 7 |
| | [110 \pm 5] | | | [12 \pm 3] | | | [16 \pm 1] | | | [21 \pm 2] | | | [7 \pm 1] | | |
| 156 | 96 | 100 | 107 | 12 | 8 | 8 | 22 | 19 | 18 | 21 | 17 | 16 | 6 | 7 | 5 |
| | [101 \pm 6] | | | [9 \pm 2] | | | [20 \pm 2] | | | [18 \pm 3] | | | [6 \pm 1] | | |
| 313 | 93 | 94 | 91 | 8 | 7 | 8 | 18 | 15 | 13 | 20 | 22 | 24 | 6 | 4 | 4 |
| | [93 \pm 2] | | | [8 \pm 1] | | | [15 \pm 3] | | | [22 \pm 2] | | | [5 \pm 1] | | |
| 625 | 92 | 87 | 92 | 6 | 10 | 8 | 17 | 12 | 14 | 18 | 19 | 23 | 5 | 4 | 4 |
| | [90 \pm 3] | | | [8 \pm 2] | | | [14 \pm 3] | | | [20 \pm 3] | | | [4 \pm 1] | | |
| 1250 | 70 | 66 | 64 | 9 | 7 | 10 | 17 | 21 | 15 | 17 | 16 | 12 | 5 | 5 | 6 |
| | [67 \pm 3] | | | [9 \pm 2] | | | [18 \pm 3] | | | [15 \pm 3] | | | [5 \pm 1] | | |
| 2500 | 60 | 61 | 63 | 6 | 4 | 6 | 12 | 17 | 17 | 14 | 17 | 15 | 5 | 3 | 3 |
| | [61 \pm 2] | | | [5 \pm 1] | | | [15 \pm 3] | | | [15 \pm 2] | | | [4 \pm 1] | | |
| 5000 | 33 | 21 | 24 | 3 | 0 | 1 | 16 | 10 | 13 | 9 | 12 | 11 | 0 | 4 | 3 |
| | [26 \pm 6] | | | [1 \pm 2] | | | [13 \pm 3] | | | [11 \pm 2] | | | [2 \pm 2] | | |
| Positive control | 435 | 423 | 438 ^{a)} | 399 | 466 | 438 ^{b)} | 119 | 123 | 123 ^{a)} | 633 | 621 | 587 ^{c)} | 587 | 648 | 647 ^{d)} |
| | [432 \pm 8] | | | [434 \pm 34] | | | [122 \pm 2] | | | [614 \pm 24] | | | [627 \pm 35] | | |

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): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4 Results of the bacterial reversion test of o-acetoacetotoluidide (2nd trial) [activation method: +S9 mix]

| Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$) | Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.] | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|-----|-------------------|----------------|-----|-------------------|----------------|-----|-------------------|----------------|-----|-------------------|----------------|-----|-------------------|
| | TA100 | | | TA1535 | | | WP2uvrA | | | TA98 | | | TA1537 | | |
| 0 | 128 | 120 | 117 | 17 | 14 | 11 | 26 | 19 | 19 | 32 | 35 | 32 | 11 | 14 | 11 |
| | [122 \pm 6] | | | [14 \pm 3] | | | [21 \pm 4] | | | [33 \pm 2] | | | [12 \pm 2] | | |
| 156 | 119 | 111 | 122 | 17 | 16 | 12 | 25 | 22 | 30 | 34 | 26 | 29 | 10 | 7 | 9 |
| | [117 \pm 6] | | | [15 \pm 3] | | | [26 \pm 4] | | | [30 \pm 4] | | | [9 \pm 2] | | |
| 313 | 123 | 117 | 117 | 14 | 16 | 16 | 22 | 25 | 24 | 29 | 26 | 31 | 9 | 7 | 7 |
| | [119 \pm 3] | | | [15 \pm 1] | | | [24 \pm 2] | | | [29 \pm 3] | | | [8 \pm 1] | | |
| 625 | 99 | 107 | 112 | 9 | 8 | 6 | 30 | 31 | 31 | 25 | 20 | 23 | 6 | 5 | 7 |
| | [106 \pm 7] | | | [8 \pm 2] | | | [31 \pm 1] | | | [23 \pm 3] | | | [6 \pm 1] | | |
| 1250 | 85 | 93 | 104 | 6 | 9 | 6 | 26 | 31 | 30 | 30 | 28 | 26 | 7 | 3 | 5 |
| | [94 \pm 10] | | | [7 \pm 2] | | | [29 \pm 3] | | | [28 \pm 2] | | | [5 \pm 2] | | |
| 2500 | 79 | 7 | 86 | 6 | 9 | 11 | 23 | 21 | 27 | 29 | 19 | 22 | 3 | 6 | 5 |
| | [81 \pm 5] | | | [9 \pm 3] | | | [24 \pm 3] | | | [23 \pm 5] | | | [5 \pm 2] | | |
| 5000 | 74 | 62 | 70 | 6 | 7 | 9 | 11 | 22 | 14 | 17 | 19 | 23 | 5 | 6 | 9 |
| | [69 \pm 6] | | | [7 \pm 2] | | | [16 \pm 6] | | | [20 \pm 3] | | | [7 \pm 2] | | |
| Positive control | 614 | 612 | 596 ^{a)} | 316 | 344 | 338 ^{b)} | 522 | 617 | 598 ^{c)} | 222 | 254 | 226 ^{d)} | 140 | 119 | 147 ^{b)} |
| | [607 \pm 10] | | | [333 \pm 15] | | | [579 \pm 50] | | | [234 \pm 17] | | | [135 \pm 15] | | |

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

In Vitro Chromosomal Aberration Test of o-Acetoacetotoluidide on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

o-アセトアセトトルイジド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/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、連続処理法の24時間処理で5000 µg/mL、48時間処理で3600 µg/mL、短時間処理法では5000 µg/mLを最高処理濃度とした。連続処理法は、最高処理濃度の1/2、1/4および1/8をそれぞれ高濃度、中濃度および低濃度とした。また、短時間処理法では-S9処理で最高処理濃度の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。連続処理法では、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理法では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、いずれの処理法においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかったが、染色体構造異常の僅かな誘発傾向が観察され、連続処理法の24時間処理では陽性判定基準と同じ10%を示した。

しかしながら明確な用量依存性が認められなかったことから、連続処理法の24時間処理において確認試験を実施した。確認試験では、最高処理濃度を3500 µg/mLとし、公差500で減じた5用量を設定した。

その結果、僅かながらも染色体構造異常の用量依存的な誘発作用が認められた。

以上の結果より、本試験条件下ではo-アセトアセトトルイジドは、染色体異常を誘発する(陽性)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/IU)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所(現: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 vol%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞液を融解し数回継代した後使用した。なお、本染色体異常試験では継代数32、確認試験では同48、追加試験では同29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℃, 30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終濃度で10 vol%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蔵所(4℃)に保存した。

3. 培養条件

CO₂インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機特機(株))を用い、CO₂濃度5%, 37℃の条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンと投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製された。また、S9 mixの組成は松岡らの方法¹⁾に従って調製された。

5. 被験物質

被験物質のo-アセトアセトトルイジド(ロット番号:7434)は純度99.93%(不純物として、アセト酢酸アニライド0.06%, アセト酢酸m-トルイダイド0.003%を含む)の固体である。三星化学工業(株)(福井)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(MERCK社)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. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

12ウエルの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。連続処理法の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理法ではS9 mix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 vol%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 w/v%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

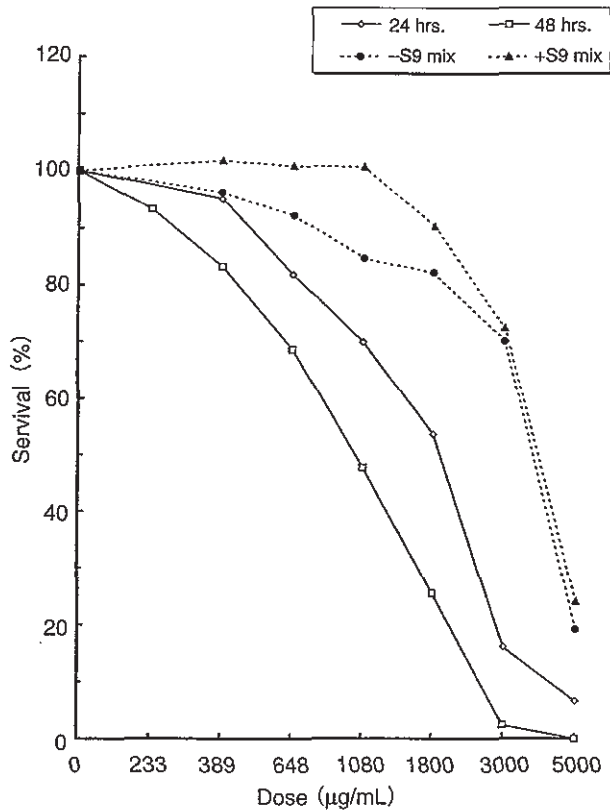


Fig. 1 Dose-survival curves of *o*-acetoacetotoluidide

vol%エタノール, 1 vol%酢酸水溶液)を適量加え, 5分間程度放置して色素を溶出した後, 580 nmでの吸光度を測定した. 各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比, すなわち細胞生存率を算出した.

その結果, いずれの処理法においても顕著な細胞増殖抑制が観察された (Fig. 1). プロビット法を用いて算出した 50% 細胞増殖抑制濃度は連続処理法 24 時間処理で 1565 µg/mL, 同 48 時間処理で 940 µg/mL, 短時間処理法-S9 mix 処理で 3392 µg/mL および同+S9 mix 処理では 3699 µg/mL であった.

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の 24 時間処理で 5000 µg/mL, 48 時間処理で 3600 µg/mL, 短時間処理法では 5000 µg/mL を最高処理濃度とし, 以下公比 2 で減じた計 3~4 用量ならびに溶媒対照群を設定した.

また, 連続処理法の 24 時間処理において明確な用量依存性は認められないものの染色体構造異常の出現頻度が 10% であったことから, 確認試験を実施した. 最高処理濃度を 3500 µg/mL とし, 公差 500 で減じた 5 用量を設定した.

なお, 陽性対照として, 連続処理法の場合, マイトマイシン C (MMC: 協和醗酵工業株) を, 24 時間処理で 0.05 µg/mL, 48 時間処理で 0.025 µg/mL の用量で, 短時間処理法の場合, シクロホスファミド (CP: 塩野義製薬株) を, 12.5 µg/mL の用量で試験した.

9. 染色体標本の作製

直径 60 mm のディッシュを用い, 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 vol% ギムザ染色液で 12 分間染色した.

10. 染色体の観察

各ディッシュあたり 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), 染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した. 同時に, 倍数性細胞の出現率を記録した. 染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会による分類法²⁾に従って実施した.

すべての標本をブラインド処理した後, 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, 含まない場合 (-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

連続処理法での試験結果を Table 1 に示した. *o*-アセトアセトトルイジド処理群の場合, 24 時間処理および 48 時間処理のいずれにおいても, 僅かに染色体構造異常の誘発傾向が観察された (出現頻度は 10.0% および 5.0%). 倍数性細胞の誘発はいずれの処理法においても認められなかった. なお, 24 時間処理および 48 時間処理の最高処理濃度では被験物質の影響により分裂中期像は観察されなかったため, 染色体観察を実施しなかった. 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.

短時間処理法での試験結果を 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においても, 染色体構造異常の僅かな誘発傾向が観察されたが (出現頻度は 9.0% および 5.0%), 倍数性細胞の誘発は認められなかった. 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.

連続処理法の24時間処理において、染色体構造異常の出現頻度が1用量のみ陽性反応を示したことから確認試験を実施し、結果をTable 3に示した。被験物質処理群の場合、僅かながら染色体構造異常の用量依存的な誘発が認められた。なお、被験物質の影響により、3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においては観察可能な分裂中期像は180細胞のみであり、最高用量である3500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では観察可能な分裂中期像はほとんど観察されなかった。

なお、暴露終了時、連続処理法ならびに短時間処理法+S9 mix処理では最高用量で、短時間処理法-S9 mix処理では2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で、粉末状被験物質が培養液中に散在しているのが観察された。

以上の試験結果から、本試験条件下において α -アセトアセトトルイジド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、陽性と判定した。

文献

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

連絡先

試験責任者：中嶋 圓

試験担当者：北澤倫世, 益森勝志, 熊平智司

(財)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)

Michiyo Kitazawa, Shoji Masumori,

Satoshi Kumadaira

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

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan

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

Table 1 Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-acetoacetotoluidide [continuous treatment]

| Compound | Dose (μg/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 | cte | csb | cse | oth | | | | SA | Pol |
| Test substance | 0 | 24 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.5 | - | - |
| | 625 | 24 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | - | - |
| | 1250 | 24 | 200 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2.0 | 2.0 | 0.0 | - | - |
| | 2500 | 24 | 200 | 2 | 6 | 13 | 0 | 0 | 0 | 10.0 | 9.0 | 0.0 | + | - |
| | 5000 # | 24 | Toxic | | | | | | | | | | | |
| MMC* | 0.05 | 24 | 200 | 4 | 44 | 81 | 0 | 0 | 0 | 51.5 | 51.5 | 0.5 | + | - |
| Test substance | 0 | 48 | 200 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1.0 | 1.0 | 0.5 | - | - |
| | 450 | 48 | 200 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1.5 | 1.5 | 0.0 | - | - |
| | 900 | 48 | 200 | 0 | 2 | 4 | 1 | 0 | 0 | 3.5 | 3.5 | 0.0 | - | - |
| | 1800 | 48 | 200 | 0 | 4 | 7 | 0 | 0 | 0 | 5.0 | 5.0 | 0.5 | ± | - |
| | 3600 # | 48 | Toxic | | | | | | | | | | | |
| MMC* | 0.25 | 48 | 200 | 5 | 44 | 78 | 1 | 1 | 0 | 50.0 | 50.0 | 1.0 | + | - |

*:Positive control (Mitomycin C)

ctb:Chromatid break cte:Chromatid exchange csb:Chromosome break cse:Chromosome exchange oth:others
SA:structural aberration Pol:polyploid cell

#:Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 2 Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-acetoacetotoluidide [short-term treatment]

| Compound | Dose (μg/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 | cte | csb | cse | oth | | | | SA | Pol |
| Test substance | 0 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | - | - |
| | 1250 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1.5 | 1.5 | 0.5 | - | - |
| | 2500 # | - | 6-(18) | 200 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 3.5 | 3.5 | 0.5 | - | - |
| | 5000 # | - | 6-(18) | 200 | 1 | 10 | 11 | 0 | 0 | 0 | 9.0 | 8.5 | 0.0 | ± | - |
| CP* | 12.5 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2.5 | 2.5 | 0.5 | - | - |
| Test substance | 0 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.0 | - | - |
| | 1250 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 | 0.0 | 0.5 | - | - |
| | 2500 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | - | - |
| | 5000 # | + | 6-(18) | 200 | 1 | 6 | 8 | 0 | 0 | 0 | 5.0 | 5.0 | 0.5 | ± | - |
| CP* | 12.5 | + | 6-(18) | 200 | 11 | 58 | 177 | 0 | 1 | 0 | 89.5 | 89.5 | 0.0 | + | - |

*:Positive control (Cyclophosphamide)

ctb:Chromatid break cte:Chromatid exchange csb:Chromosome break cse:Chromosome exchange oth:others
SA:structural aberration Pol:polyploid cell

#:Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 3 Results of the confirmative examination of *o*-acetoacetotoluidide [continuous treatment:24 hrs]

| 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 | cte | csb | cse | oth | | | | SA | Pol |
| Test substance | 0 | 24 | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0.0 | 0.5 | - | - |
| | 1500 | 24 | 200 | 1 | 5 | 3 | 0 | 0 | 0 | 4.0 | 3.5 | 0.0 | - | - |
| | 2000 | 24 | 200 | 1 | 11 | 6 | 0 | 0 | 0 | 8.5 | 8.0 | 0.0 | ± | - |
| | 2500 | 24 | 200 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 2.5 | 2.5 | 0.0 | - | - |
| | 3000 | 24 | 180 | 0 | 3 | 4 | 0 | 0 | 0 | 3.9 | 3.9 | 0.0 | - | - |
| | 3500 # | 24 | Toxic | | | | | | | | | | | |
| MMC* | 0.05 | 24 | 200 | 12 | 56 | 85 | 0 | 0 | 0 | 57.0 | 56.0 | 0.5 | + | - |

*:Positive control (Mitomycin C)

ctb:Chromatid break cte:Chromatid exchange csb:Chromosome break cse:Chromosome exchange oth:others

SA:structural aberration Pol:polyploid cell

#:Visible precipitation was shown at the end of exposure period