

1,4-ジシアノベンゼンのラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 1,4-dicyanobenzene in Rats

要約

1,4-ジシアノベンゼンの354, 500, 707, 1000, 1414および2000 mg/kgを5週齢のCrj:CD(SD)系雌雄ラットに経口単回投与し、その毒性を試験した。

死亡は、雄の500, 1000, 1414および2000 mg/kg群ならびに雌の1414および2000 mg/kg群で5例中1~2例に投与後2~4日に認められた。LD₅₀値は雌雄ともに約2000 mg/kgと推定された。1,4-ジシアノベンゼン投与による症状として、死亡例で間代性痙攣、強直性痙攣、自発運動の減少、横臥および呼吸緩徐が、生存例で間代性痙攣、流涎、自発運動の減少および被毛汚染が認められた。また、1,4-ジシアノベンゼン投与群で低体重あるいは体重減少が認められた。病理学的検査では、1,4-ジシアノベンゼンの刺激による反応性変化と考えられる所見として、前胃粘膜層の肥厚、潰瘍あるいは過角化などが認められ、死亡例ではさらに、肝臓に中心性の肝細胞の空胞化、脾臓および肺にうっ血などが認められた。

材料および方法

1. 被験物質

1,4-ジシアノベンゼンは燻蒸剤として使用される殺菌・殺虫用化学物質であり、油溶性(水溶解度: 0.03 g/100 g)の白色結晶である。本試験では昭和電工(株)より提供されたロット番号930825(純度99%以上)のものを使用した。被験物質は試験期間中安定であることを確認した。投与には、被験物質を1%メチルセルロース溶液(MC: 品名メトロー、SM-15, 信越化学工業(株); 日本薬局方精製水: ヤクハン製薬(株))で用時に懸濁調製したものを使用した。

2. 試験動物および飼育条件

生後4週齢のCrj:CD(SD)系のSPFラット雌雄を日本チャールス・リバー(株)より受け入れ、9日間の馴化飼育を行い、順調な発育を示した動物を試験に用いた。動物は、温度23±3°C、湿度55±10%、換気回数10~15回/時および照明12時間/日に設定されたバリアシステムの飼育室において、ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は5匹以内、群分け後は3匹以内収容した。飼料は固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))、飲料水は水道水(札幌市水道水)を自由に摂取させた。飼料の混入物

質および飲料水の水質を検査し、異常がないことを確認した。

3. 試験群の設定

本試験の投与量設定のために実施した試験において、2000および1000 mg/kg群で死亡が認められ、500 mg/kg群では死亡はみられなかったが、投与後の体重に減少あるいは増加抑制が認められ、死亡する可能性も考えられた。以上のことから、本試験では雌雄ともに投与(調製)可能な最大量である2000 mg/kgを最高用量とし、以下、公比√2で1414, 1000, 707, 500および354 mg/kg、さらに1%メチルセルロース溶液を投与する対照を設け、計7群とした。動物数は1群当たり雌雄各5匹とし、群分けは投与前日に体重別層化無作為抽出法により行った。

4. 投与方法

投与は、動物を約17~18時間絶食させた後、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与容量は、体重1 kg当り10 mlとして投与日に測定した体重に基づいて算出した。投与時の週齢は雌雄ともに5週齢で、その平均体重(体重範囲)は雄で129.4 g(118~141 g)、雌で109.9 g(105~114 g)であった。

5. 観察、測定および検査項目

全例について、一般状態を投与日は投与後6時間までは頻りに、投与後1日以降は1日1回以上の頻度で投与後14日まで観察した。また、体重を投与日、投与後1, 3, 5, 7, 10および14日に測定した。死亡例は発見後直ちに、生存例は投与後14日に体外表を観察した後、エーテル麻酔下で放血致死させ、剖検した。このうち、死亡例は全例、生存例は対照群および1,4-ジシアノベンゼン投与各群の雌雄各2例の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳(大脳・小脳)、胃(前胃・腺胃)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸および異常所見部位を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいは特殊染色[PAS染色、 α -アミラーゼ消化試験、PTAH染色、GFAP免疫染色、エラスチカ・ワンギーソン染色および鍍銀(渡辺変法)染色]標本を作製し、病理組織学的検査を行った。また、500および1000 mg/kg群の雌の生存例各1例の前胃、1414 mg/kg群の雄の死亡例1例の皮膚および骨格筋につい

て同様に検査した。

死亡例数より死亡率を算出し、体重についてBartlettの等分散検定の後、一元配置分散分析法あるいはKruskal-Wallis法により解析し、有意な場合、Dunnnettの検定法あるいはMann-WhitneyのU-検定法により対照群と1,4-ジシアノベンゼン投与各群との比較を行った。なお、対照群との検定については、危険率5%以下を統計学的に有意とした。また、プロビット法によりLD₅₀値が算出できなかったため、死亡状況からおおよそのLD₅₀値を推定した。

成績

1. 死亡状況およびLD₅₀値 (Table 1)

雄では死亡が500, 1000, 1414および2000 mg/kg群で投与後2~4日に認められ、LD₅₀値は約2000 mg/kgと推定された。雌では死亡が1414および2000 mg/kg群で投与後2あるいは3日に認められ、LD₅₀値は約2000 mg/kgと推定された。

2. 一般状態観察

死亡例では、1414 mg/kg群の雄1例で投与後2日に間代性痙攣、呼吸緩徐、自発運動の減少がみられ、その日に死亡が認められた。2000 mg/kg群の雌1例では、投与後1日に強直性痙攣、横臥および呼吸緩徐が認められ、投与後2日に死亡が認められた。その他の例では症状はみられず、投与後3あるいは4日に死亡が認められたのみであった。

生存例では、1000 mg/kg群の雄1例で投与後4~6日に間代性痙攣、流涎、自発運動の減少、口周囲の被毛汚染が、同群の雌1例で投与後2~5日に外尿道口周囲および腹部の被毛汚染、腹部に外傷および痂皮が認められた。

1414 mg/kg群の雌1例で投与後4日に外尿道口周囲の被毛汚染が認められた。その他の例では症状は認められなかった。

3. 体重推移

雌雄ともに、1,4-ジシアノベンゼン投与群の投与後約1週間の体重は対照群よりも低く推移し、雄の500 mg/kg以上の群で投与後1~7日、雌の354 mg/kg以上の群で投与後1~5日に有意な低値が認められた。また、雌雄ともに500 mg/kg以上の群で投与後1ないし3日に投与日体重を下回る例も認められ、その程度は生存例よりも死亡例で重度であった。一方、1,4-ジシアノベンゼン投与群の生存した例では、ほぼ全例で投与後14日には対照群と同程度にまで回復した。

4. 病理学的検査

死亡例の剖検では、前胃に粘膜の白色顆粒状がほぼ全例に、腺胃粘膜に暗赤色斑あるいは赤色化ならびに消化管内容物の暗赤色化が数例に認められた。病理組織学的には前胃粘膜層の肥厚や潰瘍などが認められたのみで、腺胃や腸管に異常は認められなかった。また、肝臓に小葉中心性の肝細胞の空胞化、脾臓及び肺にうっ血、頸部あるいは背部の皮膚に筋層における筋線維の巣状壊死、皮下織における出血、肩甲部骨格筋に筋線維の壊死などが認められたが、脳には異常は認められなかった。このうち、皮膚や骨格筋における所見は死亡当日に間代性痙攣のみられた例に認められ、痙攣の際の衝撃によることが予想された。

生存例では、剖検で前胃粘膜の一部肥厚が500 mg/kg以上の群の雌の一部の例に認められ、病理組織学的には粘膜層の肥厚、過角化などが認められた。

Table 1 Mortality and LD₅₀ values of rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the single dose toxicity test

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	Distribution of dead animals						Mortality ^{b)}	Approximate LD ₅₀ value (mg/kg)
		0	1	2	3	4	5-14 ^{a)}		
Male	0	0	0	0	0	0	0	0/5	2000
	354	0	0	0	0	0	0	0/5	
	500	0	0	0	1	0	0	1/5	
	707	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1000	0	0	0	1	0	0	1/5	
	1414	0	0	1	0	0	0	1/5	
	2000	0	0	0	0	2	0	2/5	
Female	0	0	0	0	0	0	0	0/5	2000
	354	0	0	0	0	0	0	0/5	
	500	0	0	0	0	0	0	0/5	
	707	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1000	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1414	0	0	0	1	0	0	1/5	
	2000	0	0	1	1	0	0	2/5	

a: Day after administration.

b: No. of dead animals / No. of animals dosed.

考察

死亡は、雄で500, 1000, 1414および2000 mg/kg群に、雌で1414および2000 mg/kg群に認められ、LD₅₀値は雌雄ともに約2000 mg/kgと推定された。なお、死亡時期は投与後2~4日であり、遅延死する傾向が認められた。一般状態観察で認められた間代性痙攣、自発運動の減少などの所見は1,4-ジシアノベンゼン投与による影響と考えられた。また、1,4-ジシアノベンゼン投与群で認められた体重の低値あるいは体重減少は約1週間継続し、その程度は生存例よりも死亡例で重度であった。

前胃において認められた粘膜層の肥厚などの病理学的所見は、1,4-ジシアノベンゼンの刺激による反応性変化と考えられた。死亡例における小葉中心性の肝細胞の空胞化は、通常酸素欠乏時に認められる変性変化であることから、本試験では死亡までの経過が長いことに伴った変化と考えられた。

上記を考慮すると、1,4-ジシアノベンゼンの前胃に対する障害が継続したことにより一般状態が悪化し、死亡に至ったものと推察された。

連絡先

試験責任者：八幡 昭子
 試験担当者：山田 高士, 小林 裕幸
 運営管理者：井本 精一
 (株)化合物安全性研究所
 〒004 北海道札幌市豊平区真栄363番24号
 Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors :Akiko Yahata (Study director)
 Takashi Yamada, Hiroyuki Kobayashi,
 Seiichi Imoto (Management)
 Safety Research Institute for Chemical
 Compounds Co., Ltd.
 363-24 Shin-ei, Toyohira-ku, Sapporo, Hokkaido, 004,
 Japan
 Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

1,4-ジシアノベンゼンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 1,4-dicyanobenzene in Rats

要約

1,4-ジシアノベンゼンの1.25, 5, 20および80 mg/kg/dayをSD系雌雄ラットに28日間経口反復投与し, その毒性および投与後14日間休薬した際の回復性を検討した。

体重の増加抑制および摂餌量の減少が80 mg/kg群の雌雄で認められた。肝臓に対する影響として, 体重重量比の増加が80 mg/kg群の雌雄で, 小葉中心性の肝細胞肥大および小葉中心帯に滑面小胞体の増加が80 mg/kg群の雄で認められた。また, 血中のトリグリセリド, リン脂質あるいは総コレステロールの増加が20 mg/kg以上の群の雌雄で, γ -GTPの増加傾向が80 mg/kg群の雄で認められた。甲状腺に対する影響として, 体重重量比の増加が80 mg/kg群の雌雄で, 細胞の不整形化が80 mg/kg群の雄で, コロイドの減少が20 mg/kg以上の群の雄で認められた。腎臓に対する影響として, 褪色が5 mg/kg以上の群の雄で認められ, 組織学的に近位尿細管を主とする尿細管上皮の硝子滴沈着が対照群よりも多数例に認められ, その程度は用量相関的に重くなる傾向が認められた。また, 尿比重の低下および尿中電解質の減少が80 mg/kg群の雌雄で, 血中のクロールの減少が20 mg/kg以上の群の雄および80 mg/kg群の雌で, 血中のカルシウムの増加および無機リンの減少が80 mg/kg群の雌雄で認められた。

これらの変化はその多くが14日間の休薬により消失し, 回復傾向はあるものと考えられた。

以上のことから, 本試験条件下における1,4-ジシアノベンゼン投与による無影響量(NOEL)は雄で1.25 mg/kg/day, 雌で5 mg/kg/dayであると考えられた。

材料および方法

1. 被験物質

1,4-ジシアノベンゼンは燻蒸剤として使用される殺菌・殺虫用化学物質であり, 油性(水溶解度: 0.03 g/100 g)の白色結晶である。本試験では昭和電工(株)より提供されたロット番号930825(純度99%以上)のものを使用した。被験物質は試験期間中安定であることを確認した。投与液の調製は用時とし, 0.05, 0.2および0.8 w/v%の濃度は被験物質を1%メチルセルロース溶液(MC: 品名メトロース, SM-15, 信越化学工業(株); 日本薬局方精製水: ヤクハン製薬(株)で懸濁して調製した。0.0125%は0.05%調製液を1%メチルセルロース溶液で希釈して調製した。

2. 試験動物および飼育条件

生後4週齢の雌雄のCj:CD(SD)系SPFラットを日本チャールス・リバー(株)より受け入れ, 1週間の馴化飼育を行い, 異常がなく順調な発育を示した動物を試験に用いた。

動物は, 温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55\pm 10\%$, 換気回数10~15回/時および照明12時間/日に設定したバリアシステムの飼育室において, ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は5匹以内, 群分け後は1匹を収容した。飼料は固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株)), 飲料水は水道水(札幌市水道水)をそれぞれ自由に摂取させた。飼料の混入物質および飲料水の水質を検査し, 異常がないことを確認した。

3. 試験群の設定

試験群は, 本試験に先立って実施した1,4-ジシアノベンゼンの14日間反復投与経口毒性試験の成績を参考に設定した。すなわち, 500 mg/kg群では雌3例の死亡が認められ, 100 mg/kg群では体重増加抑制, 摂餌量の減少, 血中トリグリセリドの増加, 肝細胞の腫大, 肝細胞内好酸性封入体, 脳のグリア細胞の増殖などが認められ, 死亡する可能性も考えられた。また, 20 mg/kg群では血中トリグリセリドの増加, 肝細胞内好酸性封入体などが認められた。これらのことから, 20 mg/kg/dayを中間用量とし, 高用量を100 mg/kg/dayよりも小さくかつ確実に影響の現れる量と考えられる80 mg/kg/day, 低用量を公比4で5 mg/kg/day, また, 20 mg/kg群でみられた変化が5 mg/kg/day投与で出現する可能性も勘案し, 最低用量を無影響量と推測される1.25 mg/kg/dayとし, さらに1%メチルセルロース溶液を投与する対照を加えて計5群とした。動物数は対照群で雌雄各14匹, 1.25, 5および20 mg/kg群で雌雄各7匹, 80 mg/kg群で雌雄各14匹とし, このうち回復性試験のために対照群および80 mg/kg群の雌雄各7匹をあてた。群分けは馴化期間の最終日に体重別層化無作為抽出法により行った。

4. 投与方法

投与は胃ゾンデを用いた強制経口投与とし, 1日1回連続28回行った。回復性試験の日数は14日間とした。投与容量は, 体重1 kg当たり10 mlとして投与日に最も近い日に測定した体重に基づいて算出した。投与は5週齢から開始し, 投与開始時の平均体重(体重範囲)は雄で139.8 g(130~151 g), 雌で129.0 g(117~142 g)であった。

5. 観察, 測定および検査項目

1) 一般状態観察

投与期間および回復期間中, 全例について1日1回以上の頻度で観察した。

2) 体重, 摂餌量および飲水量測定

全例について, 体重を投与1日(投与前), 投与2, 7, 14, 21および28日(投与終了日), 回復1, 2, 7および14日, 剖検日に測定した。摂餌量および飲水量測定は剖検日を除いて体重測定と同じ日に測定した。また, 投与1から28日および回復1から14日の体重増加量および体重増加率を算出した。

3) 尿検査

投与期間の最終週(投与23~24日)および回復期間の最終週(回復12~13日)に全例を代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行った。約3時間の蓄尿についてpH, 蛋白, 糖, ケトン体, 潜血反応(以上, 試験紙マルティスティックス; マイルス・三共)および沈渣(鏡検)を検査し, 21時間蓄尿について尿量, 比重(アタゴ製屈折計ユリコン), ナトリウム, カリウム(以上, 炎光法: コーニング480型炎光光度計)およびクロール(電量滴定法: 平沼CL-6M型クロライドカウンター)を測定した。

4) 血液学的検査

剖検時に全例について約16時間絶食させた後, エーテル麻酔下で大腿静脈より採血し, EDTA・2Kで処理した血液を用いて赤血球数, 平均赤血球容積, 血小板数, 白血球数(以上, 電気抵抗法), 血色素量(シアンメトヘモグロビン法)(以上, コールターカウンターT660型), ヘマトクリット値(RBC, MCV値より算出), 平均赤血球ヘモグロビン量(RBC, Hb値より算出), 平均赤血球ヘモグロビン濃度(Ht, Hb値より算出), 網状赤血球数(Brecher法)および白血球型別百分率(鏡検)を測定した。また, 無処理血液を用いて, 凝固時間(流体粘度変化による空気圧測定法: グライナー社製マイクロアグロメータ)を測定した。さらに, 腹部大動脈より採血しクエン酸ナトリウムで処理した後, 3000 rpmで10分間遠心分離して得られた血漿を用いて, プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上, AMELUNG KC-10A バクスターKK)を測定した。

5) 血液生化学検査

剖検時に全例について腹部大動脈より採血し, 3000 rpmで10分間遠心分離して得られた血清を用いてGOT, GPT(以上, IFCC法), γ -GTP(包接L- γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法), アルカリフォスファターゼ(ベッセイ・ローリー法), 乳酸脱水素酵素(ロプレスキー・ラ・デュー法), 血糖(ヘキソキナーゼ法), 総コレステロール, リン脂質(以上, 酵素法), トリグリセリド(遊離グリセロール消去法), 総ビリルビン(アゾビリルビン法), 尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法), クレアチニン(ヤッフ法), カルシウム(OCPC法), 無機リン

(フィスケ・サバロー法), 総蛋白(ビウレット法), アルブミン(BCG法), クレアチンフォスフォキナーゼ(GSCC法)(以上, 日立7150形自動分析装置), ナトリウム, カリウム(以上, 炎光法: コーニング480型炎光光度計), クロール(電量滴定法: 平沼CL-6M型クロライドカウンター), A/G比(TP, Alb値より算出)および蛋白分画(セルロースアセテート膜電気泳動法)を測定した。

6) 剖検および器官重量測定

投与期間および回復期間終了の翌日に全例について, 体外表を観察し, エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。また, 脳, 下垂体, 甲状腺, 肺, 心臓, 脾臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 胸腺, 精巣および卵巣の重量を測定し, 器官体重重量比を算出した。

7) 病理組織学的検査

全例について肝臓, 腎臓, 脾臓, 心臓, 肺, 脳(大脳・小脳), 下垂体, 副腎, 甲状腺, 上皮小体, 胸腺, 腸間膜リンパ節, 脾臓, 舌, 下顎リンパ節, 顎下腺, 舌下腺, 耳下腺, 乳腺, 皮膚, 胸骨および大腿骨(骨髄を含む), 脊髄(頸部), 骨格筋(外側広筋), 胸部大動脈, 喉頭, 気管支, 食道, 胃(前胃・腺胃), 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 膀胱, 精巣, 精巣上体, 精囊(凝固腺を含む), 前立腺, 卵巣, 子宮, 膣および坐骨神経を10%中性緩衝ホルマリン液, 眼球およびハーダー膜をデビッドソン液で固定し, 常法に従いパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色あるいは特殊染色(GFAP免疫染色, ルクソール・ファースト青・オディアン重染色および鉄(ベルリン青)染色)標本作製し, 病理組織学的検査を行った。

8) 電子顕微鏡検査

投与期間終了時解剖例および回復期間終了時解剖例のうち対照群および80 mg/kg群の雌雄各2例について肝臓の一部を採取し, グルタルアルデヒドとオスミウム酸で二重固定し, 常法に従い超薄切片を作製し, 酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色を行い, 電子顕微鏡(JEM T8, 日本電子(株))を用いて観察した。

6. 統計処理

Bartlettの等分散検定の後, 一元配置分散分析法あるいはKruskal-Wallis法により解析し, 有意な場合, Dunnettの検定法あるいはMann-WhitneyのU-検定法により対照群と1,4-ジシアノベンゼン投与各群との比較を行った。なお, 対照群との検定については, 危険率5%以下を統計学的に有意とした。

成績

1. 一般状態観察

頸部に外傷, 痂皮あるいは脱毛が5および80 mg/kg群(雌雄各1例)で投与9~28日あるいは15~28日に認められた。回復期間では, 雌雄ともに異常は認められなかった。

2. 体重推移 (Table 1, 2)

投与期間では、雌雄ともに80 mg/kg群で投与7あるいは2日以降に体重の減少が、投与期間中の体重増加量および増加率の減少が認められた。

回復期間では、雌雄ともに80 mg/kg群で回復1あるいは2日に体重の減少が、回復期間中の体重増加量および増加率の増加が認められた。

3. 摂餌量

投与期間では、80 mg/kg群の雄で投与2~28日に、同群の雌で投与2および7日に摂餌量の減少が認められた。

回復期間では、80 mg/kg群の雄で回復1日に摂餌量の減少が、同群の雌で回復2日に摂餌量の増加が認められた。

4. 飲水量

投与期間では、雌雄ともに対照群と比較して有意な差は認められなかった。

回復期間では、雌の80 mg/kg群で回復2日に飲水量の増加が認められた。

5. 尿検査 (Table 3, 4)

投与期間最終週には、80 mg/kg群の雄で尿比重の低下、カリウムおよびクロールの減少が認められ、また、統計学的に有意な差ではないもののナトリウムの減少傾向が認められた。同群の雌では尿比重の低下、ナトリウム、カリウムおよびクロールの減少が認められた。

回復期間最終週には、雌雄ともに対照群と比較して有意な差は認められなかった。

6. 血液学的検査

投与期間終了時には、80 mg/kg群の雄で分節好中球率の上昇が、同群の雌で網状赤血球数の上昇が認められた。

回復期間終了時には、80 mg/kg群の雄で分節好中球率の上昇およびリンパ球率の低下が、同群の雌で網状赤血球数および分節好中球率の上昇、リンパ球率の低下が認められた。

7. 血液生化学検査 (Table 5, 6)

投与期間終了時には、雄では20および80 mg/kg群でトリグリセリドおよびリン脂質の増加ならびにクロールの減少が、さらに80 mg/kg群でアルカリフォスファターゼおよび無機リンの減少が認められた。また、統計学的に有意な差ではないものの、80 mg/kg群で γ -GTPおよびカルシウムの増加傾向が認められた。雌では、5 mg/kg以上の群で尿素窒素の減少が、20および80 mg/kg群にトリグリセリドの増加が、さらに80 mg/kg群で β -グロブリン分画の上昇、総コレステロールおよびリン脂質の増加、クレアチニンの減少、カルシウムの増加および無機リンの減少が認められた。また、統計学的に有意な差ではないものの、80 mg/kg群でクロールの減少傾向が認められた。

回復期間終了時には、80 mg/kg群の雄で γ -GTPの増加およびクレアチニンの減少が、同群の雌でクロールの減少が認められた。

その他、1,4-ジシアノベンゼン投与による異常は認められなかった。

8. 器官重量 (Table 7, 8)

投与期間終了時には、雄では20および80 mg/kg群で腎臓の重量および体重重量比の増加が、80 mg/kg群で甲状腺の体重重量比の増加、胸腺重量の減少、肝臓の体重重量比の増加、脾臓重量の減少および副腎の体重重量比の増加が認められた。雌では、80 mg/kg群で腎臓の体重重量比の増加、甲状腺の重量および体重重量比の増加、肝臓の体重重量比の増加および脾臓重量の減少が認められた。

回復期間終了時には、雄では80 mg/kg群で腎臓の体重重量比の増加、脾臓の重量および体重重量比の減少が認められた。雌では、80 mg/kg群で甲状腺の重量および体重重量比の増加ならびに肝臓の体重重量比の増加が認められた。

9. 剖検

投与期間終了時には、腎臓の褪色が5 mg/kg以上の群の雄に認められた。また、5および80 mg/kg群の雄各1例に下顎リンパ節の腫大が認められた。両例は、一般状態で頸部に外傷や脱毛などがみられた例であった。

回復期間終了時には、雌雄ともに異常は認められなかった。

10. 病理組織学的検査 (Table 9, 10)

投与期間終了時には、肝臓では小葉中心性の肝細胞肥大が80 mg/kg群の雄に認められた。腎臓では近位尿管を主とする尿管上皮の硝子滴沈着が対照群および5 mg/kg以上の群の雄で認められ、その出現例数は1,4-ジシアノベンゼン投与群で多く、程度は用量相関的に重くなる傾向が認められた。この硝子滴は自然発生でみられるものと同様であるものの、20 mg/kg以上の群ではほぼ全ての近位尿管上皮にみられ、80 mg/kg群では滴が大型化し、滴の癒合も認められた。さらに、硝子滴沈着が認められた例のうち80 mg/kg群の雄2例では遠位を主とする尿管の拡張および尿管上皮の萎縮が伴って認められた。脾臓では軽度のリンパ球の萎縮が80 mg/kg群の雄に認められた。甲状腺では軽度のろ胞の不整形化が80 mg/kg群の雄、軽度のコロイドの減少が20および80 mg/kg群の雄に認められた。なお、頸部に外傷などが認められた5および80 mg/kg群の雄各1例では、下顎リンパ節における髄索内形質細胞の増加、頸部皮膚における膿瘍、細胞浸潤、潰瘍、痂皮および水腫などが軽度あるいは中等度に認められ、さらに80 mg/kg群の雄1例では、胸骨および大腿骨における軽度の顆粒球系細胞の増加が認められた。

28日間反復投与毒性試験

Table 1 Body weight changes in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test
- Administration period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Day of administration						Body weight gain	
			1	2	7	14	21	28	Day 1-28	% ^{a)}
Male	0	14	140.4 ^{b)} ±4.9	147.2 ±5.9	188.4 ±10.1	247.7 ±17.9	304.2 ±24.7	347.8 ±29.8	207.357 ±26.398	147.431 ±15.901
	1.25	7	139.0 ±7.2	147.4 ±7.2	187.9 ±11.9	242.3 ±18.7	297.4 ±26.3	341.7 ±26.8	202.714 ±23.606	145.914 ±16.479
	5	7	140.3 ±4.6	147.9 ±5.1	188.7 ±5.7	248.1 ±11.7	304.7 ±18.1	348.9 ±20.0	208.571 ±18.876	148.767 ±13.746
	20	7	140.6 ±5.7	146.0 ±7.0	184.9 ±12.1	244.1 ±18.4	300.3 ±16.2	346.6 ±20.2	206.000 ±15.362	146.444 ±7.168
	80	14	139.1 ±5.5	141.5 ±6.4	162.9** ±8.0	215.4** ±11.4	258.4** ±16.6	287.3** ±22.1	148.214** ±19.116	106.512** ±12.541
Female	0	14	128.7 ±5.3	132.7 ±5.7	155.9 ±8.2	178.8 ±7.8	200.3 ±8.3	219.2 ±10.7	90.500 ±8.609	70.387 ±6.917
	1.25	7	128.9 ±3.9	132.7 ±5.3	154.3 ±7.6	176.7 ±11.3	199.6 ±15.5	220.9 ±19.5	92.000 ±16.482	71.216 ±11.250
	5	7	128.7 ±6.2	131.4 ±6.2	156.9 ±5.8	178.6 ±8.1	201.4 ±11.6	225.3 ±16.2	96.571 ±12.869	75.026 ±9.456
	20	7	129.6 ±6.5	128.9 ±4.7	149.9 ±9.1	172.0 ±13.2	194.0 ±12.8	215.0 ±18.1	85.429 ±15.988	65.994 ±12.344
	80	14	129.1 ±6.4	126.5* ±6.9	134.8** ±8.2	160.0** ±9.9	180.6** ±12.5	196.6** ±15.5	67.571** ±10.624	52.232** ±7.069

a : (Body weight gain / body weight on day 1) × 100.

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

* : Differs from control, p<0.05.

** : Differs from control, p<0.01.

Table 2 Body weight changes in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test
- Recovery period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Day of recovery				Body weight gain	
			1	2	7	14	Day 1-14	% ^{a)}
Male	0	7	356.3 ^{b)} ±36.1	360.7 ±37.2	387.7 ±43.7	418.7 ±45.7	62.429 ±9.981	17.447 ±1.288
	80	7	297.1** ±10.6	307.4** ±10.3	347.4 ±13.5	383.7 ±21.6	86.571** ±13.402	29.086** ±3.978
Female	0	7	217.3 ±12.3	220.1 ±13.3	233.0 ±13.1	240.9 ±14.0	23.571 ±4.721	10.860 ±2.202
	80	7	197.0* ±14.6	206.1 ±15.0	228.3 ±16.1	236.6 ±16.6	39.571** ±10.814	20.233** ±5.675

a : (Body weight gain / body weight on day 1) × 100.

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

* : Differs from control, p<0.05.

** : Differs from control, p<0.01.

Table 3 Urinary findings in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test
- Final week of the administration period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	pH					Pro	Glu	Ket	Occult blood	
			6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	±	-	-	-	
Male	0	14	1 ^{a)}	0	0	4	9	0	14	14	14	14
	1.25	7	0	0	1	0	6	0	7	7	7	7
	5	7	0	0	1	4	2	0	7	7	7	7
	20	7	0	1	1	3	2	0	7	7	7	7
	80	14	0	0	0	7	7	0	14	14	14	14
Female	0	14	0	5	0	4	5	8	6	14	14	14
	1.25	7	0	0	0	3	4	4	3	7	7	7
	5	7	0	1	1	2	3	5	2	7	7	7
	20	7	0	0	1	3	3	5	2	7	7	7
	80	14	1	0	2	6	5	11	3	14	14	14

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Urinary sediments							Specific gravity				
			Epithelial cell											
			RBC	WBC	Squamous	Round	Small round	Others	1.011- 1.020	1.021- 1.030	1.031- 1.040	1.041- 1.050	1.050<	
Male	0	14	14	14	14	0	14	14	14	0	2	5	7	0
	1.25	7	7	7	7	0	7	7	7	0	2	3	0	2
	5	7	7	7	7	0	7	7	7	0	0	2	4	1
	20	7	7	7	7	0	7	7	7	1	1	2	3	0
	80	14	14	14	13	1	14	14	14	[2	5	4	3	0]*
Female	0	14	14	14	14	0	14	14	14	0	0	7	6	1
	1.25	7	7	7	6	1	7	7	7	0	1	3	3	0
	5	7	7	7	7	0	7	7	7	1	1	2	2	1
	20	7	7	7	7	0	7	7	7	0	1	4	1	1
	80	14	14	14	14	0	14	14	14	[3	5	3	3	0]**

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	U-Vol ml/21hr	U-Na mEq/21hr	U-K mEq/21hr	U-Cl mEq/21hr
Male	0	14	14.00 ^{b)} ±2.06	0.7954 ±0.3104	3.1624 ±0.7701	1.3554 ±0.4395
	1.25	7	14.64 ±4.18	0.8726 ±0.3501	3.0851 ±0.9639	1.3770 ±0.5276
	5	7	13.50 ±3.59	1.0271 ±0.3915	3.3967 ±0.8889	1.4986 ±0.5134
	20	7	16.64 ±3.38	0.7624 ±0.2789	3.0264 ±0.6835	1.2681 ±0.3587
	80	14	15.32 ±6.08	0.5191 ±0.2406	2.1291** ±0.6942	0.8690* ±0.3848
Female	0	14	11.36 ±3.31	0.6843 ±0.1427	2.5085 ±0.4289	1.2399 ±0.2164
	1.25	7	11.71 ±3.01	0.7236 ±0.3339	2.4126 ±0.7615	1.1926 ±0.4719
	5	7	15.64 ±5.26	0.7809 ±0.3538	2.6590 ±0.7050	1.2451 ±0.4595
	20	7	13.07 ±4.06	0.5224 ±0.2490	2.3371 ±0.3835	1.0509 ±0.1981
	80	14	13.39 ±5.72	0.3611** ±0.2005	1.4764** ±0.5620	0.6138** ±0.2872

a: Values are no. of animals with findings.

b: Values are means ± S.D.

*: Differs from control, p<0.05.

** : Differs from control, p<0.01.

28日間反復投与毒性試験

Table 4 Urinary findings in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test
- Final week of the recovery period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	pH					Pro		Glu	Ket	Occult blood	
			6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	-	-	-	±
Male	0	7	0 ^{a)}	0	0	1	6	0	7	7	7	7	0
	80	7	0	0	1	0	6	0	7	7	7	7	0
Female	0	7	2	0	0	1	4	2	5	7	7	6	1
	80	7	1	2	0	1	3	3	4	7	7	7	0

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Urinary sediments							Specific gravity				
			Epithelial cell						Small round	Others	1.021- 1.030	1.031- 1.040	1.041- 1.050	1.050<
			RBC	WBC	Squamous	Round	±	-						
Male	0	7	7	7	6	1	7	7	7	0	0	4	3	
	80	7	7	7	7	0	7	7	7	2	2	2	1	
Female	0	7	7	7	5	2	7	7	7	1	2	3	1	
	80	7	7	7	6	1	7	7	7	2	2	3	0	

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	U-Vol ml/21hr	U-Na mEq/21hr	U-K mEq/21hr	U-Cl mEq/21hr
Male	0	7	12.21 ^{b)} ±3.17	0.9409 ±0.3147	3.7447 ±0.4127	1.6420 ±0.2945
	80	7	15.36 ±6.23	0.6751 ±0.3275	2.9729 ±1.0286	1.1026 ±0.5919
Female	0	7	13.57 ±6.62	0.8234 ±0.1266	2.6381 ±0.2945	1.2816 ±0.1300
	80	7	12.21 ±5.67	0.6741 ±0.3690	1.9617 ±0.8687	0.9317 ±0.4617

a: Values are no. of animals with findings.

b: Values are means ± S.D.

Table 5 Biochemical findings in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test
-End of the administration period -

Sex	I,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	TP g/dl	Alb g/dl	A/G	Protein fractions (%)									GOT IU/l	GPT IU/l	ALP IU/l	LDH-γ-GTP	
						Alb	Globulin				IU/l	IU/l	IU/l	IU/l				IU/l	IU/l
							α ₁	α ₂	β	γ									
Male	0	7	5.56 ^{a)} ±0.11	2.34 ±0.10	0.726 ±0.054	52.56 ±1.82	20.26 ±1.62	7.34 ±0.52	15.39 ±1.20	4.46 ±0.80	132.7 ±22.0	27.4 ±2.1	510.9 ±125.6	2850.9 ±750.8	1.39 ±0.40				
	1.25	7	5.60 ±0.22	2.31 ±0.07	0.700 ±0.041	52.01 ±2.15	20.37 ±1.49	6.91 ±0.73	15.70 ±0.94	5.00 ±1.04	136.6 ±21.5	29.7 ±3.4	515.7 ±55.3	2942.0 ±735.0	1.07 ±0.43				
	5	7	5.61 ±0.11	2.26 ±0.08	0.666 ±0.035	49.71 ±2.58	21.74 ±1.45	6.90 ±0.95	16.27 ±2.30	5.37 ±1.03	135.0 ±3.5	25.4 ±5.7	499.4 ±162.1	3080.3 ±433.6	1.23 ±0.35				
	20	7	5.61 ±0.09	2.33 ±0.08	0.704 ±0.047	51.77 ±1.51	19.93 ±1.51	7.43 ±0.63	16.11 ±0.96	4.76 ±1.26	145.1 ±20.0	27.0 ±2.2	437.3 ±58.0	3493.3 ±732.2	1.36 ±0.42				
	80	7	5.60 ±0.19	2.23 ±0.22	0.659 ±0.092	49.44 ±5.26	20.13 ±1.51	8.06 ±1.38	17.40 ±2.42	4.97 ±1.03	142.3 ±26.1	30.9 ±5.3	345.6** ±69.0	3385.6 ±1052.1	1.87 ±0.39				
Female	0	7	5.80 ±0.24	2.47 ±0.14	0.739 ±0.060	54.61 ±1.52	19.31 ±0.77	6.47 ±0.72	15.14 ±0.80	4.46 ±1.02	128.6 ±23.4	27.6 ±4.1	239.4 ±68.8	2863.1 ±887.2	2.71 ±0.43				
	1.25	7	5.89 ±0.24	2.54 ±0.10	0.760 ±0.064	55.49 ±1.31	17.64 ±2.02	6.50 ±0.80	15.47 ±1.27	4.90 ±1.26	133.0 ±29.5	23.4 ±4.4	229.6 ±50.6	2941.9 ±1029.4	2.60 ±0.42				
	5	6	5.68 ±0.10	2.43 ±0.08	0.743 ±0.037	54.10 ±2.22	18.98 ±1.28	6.08 ±0.69	16.10 ±0.42	4.73 ±0.87	134.0 ±8.2	20.5* ±2.4	252.3 ±17.7	2933.8 ±398.5	2.97 ±0.45				
	20	7	5.86 ±0.26	2.51 ±0.11	0.749 ±0.025	54.40 ±2.38	19.79 ±0.89	5.84 ±0.78	15.59 ±0.72	4.39 ±1.45	137.0 ±37.4	23.6 ±3.4	215.1 ±61.5	3013.1 ±1171.3	2.27 ±0.35				
	80	7	5.67 ±0.18	2.41 ±0.07	0.739 ±0.012	55.00 ±1.40	18.39 ±0.86	6.31 ±0.74	16.80** ±0.96	3.50 ±1.34	154.0 ±50.6	22.9 ±4.8	181.6 ±71.0	4293.0 ±1980.4	2.74 ±0.32				

Sex	I,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	CPK IU/l	T-Bil mg/dl	Glu mg/dl	T-Cho mg/dl	TG mg/dl	PL mg/dl	BUN mg/dl	Crea mg/dl	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mEq/l	Ca mg/dl	P mg/dl
	1.25	7	750.9 ±225.3	0.10 ±0.00	132.9 ±23.1	59.4 ±7.3	61.3 ±19.4	106.9 ±10.4	14.93 ±1.12	0.44 ±0.05	143.71 ±0.86	4.770 ±0.303	105.0 ±1.5	9.74 ±0.17	9.59 ±0.43
	5	7	886.0 ±158.3	0.10 ±0.00	127.3 ±23.6	67.1 ±12.7	78.7 ±36.0	118.3 ±20.1	13.93 ±1.63	0.43 ±0.05	143.36* ±0.48	4.701 ±0.445	104.4 ±1.0	9.54 ±0.30	9.31 ±0.38
	20	7	899.7 ±184.1	0.10 ±0.00	132.1 ±18.8	76.9 ±8.1	112.4** ±12.3	138.7* ±12.5	13.53 ±1.56	0.44 ±0.05	143.00** ±0.96	4.623 ±0.211	102.7** ±1.3	9.67 ±0.19	8.76 ±0.64
	80	7	982.7 ±278.0	0.10 ±0.00	136.0 ±18.1	73.9 ±11.7	104.1* ±57.9	149.1** ±23.3	15.11 ±1.32	0.43 ±0.05	143.79 ±0.91	4.526 ±0.310	102.9** ±1.6	9.81 ±0.27	8.07 ±0.54
Female	0	7	787.1 ±312.4	0.10 ±0.00	112.7 ±18.7	64.3 ±9.0	16.3 ±4.2	129.0 ±16.6	18.37 ±1.64	0.56 ±0.05	142.86 ±1.46	4.507 ±0.263	107.4 ±2.0	9.70 ±0.28	8.39** ±0.73
	1.25	7	831.3 ±363.6	0.10 ±0.00	110.3 ±19.7	68.1 ±12.0	25.6 ±20.5	139.3 ±22.1	16.94 ±0.87	0.53 ±0.08	143.07 ±1.27	4.397 ±0.210	107.4 ±2.0	9.54 ±0.25	8.30 ±0.74
	5	6	824.7 ±137.7	0.10 ±0.00	126.7 ±19.4	73.3 ±8.1	27.7 ±17.3	150.8 ±13.2	15.82* ±2.36	0.53 ±0.10	142.83 ±0.93	4.565 ±0.498	106.8 ±2.5	9.60 ±0.21	8.50 ±0.52
	20	7	960.0 ±408.7	0.10 ±0.00	103.1 ±11.9	67.3 ±11.0	31.7* ±16.2	140.1 ±22.4	15.31** ±2.05	0.53 ±0.10	142.79 ±1.22	4.303 ±0.309	106.6 ±2.6	9.64 ±0.25	8.03 ±0.42
	80	7	1322.4 ±641.4	0.10 ±0.00	125.6 ±15.6	87.1** ±9.0	65.1** ±37.2	179.4** ±17.1	15.47* ±1.21	0.41** ±0.07	142.86 ±1.28	4.593 ±0.239	105.1 ±1.3	10.13** ±0.23	7.06** ±0.82

a : Values are means ± S.D.

* : Differs from control, p<0.05.

** : Differs from control, p<0.01.

28日間反復投与毒性試験

Table 6 Biochemical findings in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test
- End of the recovery period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	TP g/dl	Alb g/dl	A/G	Protein fractions (%)				GOT IU/l	GPT IU/l	ALP IU/l	LDH γ -GTP			
						Alb	Globulin						IU/l	IU/l	IU/l	IU/l
							α_1	α_2	β							
Male	0	7	5.79 ^a ±0.16	2.31 ±0.07	0.660 ±0.034	49.94 ±1.39	21.37 ±1.68	7.37 ±0.20	16.63 ±1.00	4.69 ±0.72	126.7 ±19.2	24.3 ±3.5	318.0 ±53.4	3027.3 ±670.3	1.43 ±0.29	
	80	7	5.70 ±0.15	2.24 ±0.10	0.641 ±0.031	49.87 ±1.20	21.90 ±1.60	6.66** ±0.30	16.63 ±0.78	4.94 ±0.76	132.3 ±28.2	30.0 ±8.2	309.0 ±56.5	3080.6 ±1066.0	2.26** ±0.46	
Female	0	7	6.17 ±0.27	2.57 ±0.08	0.711 ±0.059	52.70 ±2.04	20.74 ±1.99	6.34 ±0.57	15.30 ±0.77	4.91 ±0.95	102.4 ±22.5	27.7 ±5.7	173.9 ±22.9	1789.6 ±810.2	2.36 ±0.49	
	80	7	6.11 ±0.28	2.60 ±0.14	0.737 ±0.055	52.99 ±2.96	19.73 ±1.49	6.01 ±0.52	16.03 ±1.64	5.24 ±1.16	140.0 ±53.4	29.0 ±11.0	173.1 ±24.5	3431.0 ±2292.6	2.40 ±0.43	

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	CPK IU/l	T-Bil mg/dl	Glu mg/dl	T-Cho mg/dl	TG mg/dl	PL mg/dl	BUN mg/dl	Crea mg/dl	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mEq/l	Ca mg/dl	P mg/dl
80	7	826.3 ±274.6	0.10 ±0.00	128.1 ±21.5	67.0 ±12.9	66.9 ±38.6	116.9 ±24.8	14.30 ±1.81	0.46* ±0.05	144.21 ±0.91	4.811 ±0.200	106.7 ±1.1	9.49 ±0.35	8.04 ±0.31	
Female	0	7	478.9 ±173.7	0.10 ±0.00	120.0 ±15.3	70.3 ±8.3	18.0 ±12.4	137.7 ±19.7	18.31 ±2.27	0.57 ±0.08	143.21 ±1.07	4.193 ±0.220	109.1 ±1.3	9.74 ±0.22	6.50 ±0.65
	80	7	977.6 ±672.4	0.10 ±0.00	119.4 ±18.3	71.4 ±15.0	35.1 ±22.1	144.6 ±26.2	16.31 ±1.87	0.54 ±0.05	143.14 ±1.44	4.334 ±0.300	107.3* ±1.3	9.76 ±0.24	6.81- ±0.52

a : Values are means ± S.D.

* : Differs from control, p<0.05.

** : Differs from control, p<0.01.

Table 7 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test - Administration period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Body weight g	Kidney				Thyroid			
				Right		Left		Right		Left	
				g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Male	0	7	313.9 ^{a)} ±24.1	1.190 ±0.125	0.377 ±0.019	1.163 ±0.088	0.371 ±0.017	9.46 ±1.33	3.041 ±0.617	(6) ^{b)} 8.37 ±1.32	(6) 2.610 ±0.326
	1.25	7	311.3 ±25.8	1.217 ±0.139	0.389 ±0.025	1.166 ±0.128	0.374 ±0.025	9.33 ±1.34	2.994 ±0.330	8.40 ±1.30	2.714 ±0.472
	5	7	317.3 ±18.9	1.279 ±0.111	0.403 ±0.026	1.267 ±0.110	0.399 ±0.025	9.34 ±1.30	2.960 ±0.487	9.16 ±1.15	2.881 ±0.266
	20	7	318.1 ±19.7	1.303 ±0.113	0.410* ±0.022	1.320* ±0.110	0.416* ±0.016	9.46 ±1.99	2.976 ±0.605	9.29 ±1.22	2.914 ±0.293
	80	7	262.0** ±28.0	1.337 ±0.170	0.511** ±0.061	1.321* ±0.119	0.507** ±0.048	10.19 ±0.77	3.924* ±0.477	9.44 ±1.26	3.634** ±0.602
Female	0	7	201.7 ±9.9	0.823 ±0.064	0.409 ±0.030	0.811 ±0.071	0.403 ±0.026	6.70 ±1.06	3.327 ±0.554	6.80 ±1.08	3.373 ±0.523
	1.25	7	205.0 ±14.9	0.836 ±0.061	0.409 ±0.013	0.810 ±0.072	0.396 ±0.016	7.26 ±1.32	3.561 ±0.764	6.64 ±1.57	3.249 ±0.803
	5	7	206.7 ±14.7	0.853 ±0.088	0.413 ±0.035	0.853 ±0.083	0.413 ±0.028	7.30 ±1.22	3.547 ±0.656	7.44 ±0.68	3.617 ±0.433
	20	7	198.6 ±16.8	0.877 ±0.080	0.443 ±0.036	0.851 ±0.069	0.431 ±0.038	7.99 ±1.39	4.044 ±0.801	7.64 ±2.22	3.816 ±0.893
	80	7	180.6* ±15.1	0.869 ±0.090	0.481** ±0.027	0.841 ±0.108	0.464** ±0.032	8.87* ±1.75	4.947** ±1.119	6.77 ±1.26	3.733 ±0.558

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Thymus		Liver		Spleen		Adrenal			
			mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%	Right		Left	
			mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Male	0	7	661.1 ±111.1	210.741 ±30.967	9.367 ±1.279	2.979 ±0.229	0.607 ±0.063	0.196 ±0.021	24.4 ±3.9	7.783 ±1.129	27.0 ±4.4	8.586 ±1.163
	1.25	7	641.7 ±122.4	208.451 ±49.502	9.546 ±1.367	3.057 ±0.204	0.580 ±0.097	0.184 ±0.026	21.9 ±4.0	7.019 ±1.115	24.9 ±4.5	7.953 ±1.048
	5	7	658.7 ±120.6	207.680 ±35.478	9.830 ±0.949	3.099 ±0.237	0.677 ±0.109	0.214 ±0.030	27.0 ±4.1	8.544 ±1.405	28.9 ±4.8	9.124 ±1.568
	20	7	643.1 ±60.5	202.129 ±14.746	10.004 ±0.664	3.144 ±0.125	0.543 ±0.060	0.173 ±0.015	26.9 ±2.7	8.469 ±0.967	28.6 ±4.0	9.007 ±1.344
	80	7	466.6** ±63.6	178.419 ±17.922	9.451 ±0.801	3.619** ±0.143	0.434** ±0.086	0.170 ±0.050	26.9 ±3.8	10.234** ±0.687	29.3 ±4.4	11.163** ±0.910
Female	0	7	514.0 ±103.6	256.111 ±56.773	6.084 ±0.414	3.016 ±0.155	0.424 ±0.067	0.210 ±0.037	30.1 ±2.3	14.980 ±1.457	31.3 ±2.4	15.549 ±1.471
	1.25	7	478.4 ±79.0	232.224 ±24.368	6.281 ±0.597	3.061 ±0.134	0.470 ±0.060	0.229 ±0.020	32.9 ±3.8	16.010 ±1.118	35.0 ±2.6	17.087 ±0.743
	5	7	536.0 ±148.2	257.661 ±57.462	6.561 ±0.309	3.184 ±0.185	0.431 ±0.070	0.209 ±0.030	33.4 ±3.5	16.209 ±1.736	35.3 ±3.2	17.090 ±1.298
	20	7	457.3 ±99.3	229.243 ±40.378	6.079 ±0.699	3.056 ±0.136	0.400 ±0.037	0.201 ±0.011	31.7 ±5.2	15.969 ±2.133	34.4 ±6.0	17.274 ±1.952
	80	7	392.1 ±48.2	219.993 ±43.747	6.491 ±0.632	3.596** ±0.138	0.321** ±0.033	0.177 ±0.014	29.7 ±4.5	16.430 ±1.787	30.9 ±4.7	17.096 ±2.177

a: Values are means ± S.D.

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

*: Differs from control, p<0.05.

**: Differs from control, p<0.01.

Table 8 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test - Recovery period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Body weight g	Kidney				Thyroid			
				Right		Left		Right		Left	
				g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Male	0	7	390.4 ^{a)} ±41.7	1.336 ±0.111	0.344 ±0.022	1.293 ±0.120	0.334 ±0.017	9.56 ±1.55	2.456 ±0.342	9.11 ±1.35	2.327 ±0.142
	80	7	357.7 ±19.5	1.380 ±0.129	0.386* ±0.031	1.324 ±0.118	0.369* ±0.025	9.36 ±1.25	2.613 ±0.298	8.47 ±1.32	2.359 ±0.251
Female	0	7	226.9 ±12.7	0.843 ±0.057	0.370 ±0.031	0.833 ±0.063	0.367 ±0.033	7.21 ±1.20	3.183 ±0.521	6.23 ±1.02	2.746 ±0.425
	80	7	221.4 ±14.4	0.856 ±0.047	0.389 ±0.020	0.841 ±0.052	0.380 ±0.026	7.57 ±0.82	3.417 ±0.268	7.74* ±0.89	3.493** ±0.282

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Thymus		Liver		Spleen		Adrenal			
			mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%	Right		Left	
									mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Male	0	7	548.7 ±65.6	141.214 ±16.388	11.434 ±1.327	2.930 ±0.112	0.716 ±0.049	0.183 ±0.014	27.1 ±4.7	6.923 ±0.606	29.1 ±5.9	7.419 ±0.874
	80	7	572.7 ±145.9	159.370 ±34.114	10.763 ±1.324	3.000 ±0.210	0.576** ±0.081	0.160* ±0.020	25.4 ±1.9	7.131 ±0.694	28.9 ±2.9	8.100 ±1.037
Female	0	7	385.1 ±60.5	169.129 ±18.244	6.280 ±0.519	2.766 ±0.123	0.449 ±0.043	0.199 ±0.018	30.4 ±3.6	13.437 ±1.715	32.1 ±5.1	14.207 ±2.443
	80	7	426.1 ±90.9	192.156 ±38.731	6.484 ±0.302	2.933* ±0.134	0.431 ±0.081	0.194 ±0.029	32.9 ±5.3	14.887 ±2.546	33.9 ±3.8	15.340 ±1.967

a: Values are means ± S.D.

*: Differs from control, p<0.05.

**: Differs from control, p<0.01.

回復期間終了時には、腎臓に近位尿管を主とする尿管上皮の硝子滴沈着および限局性の尿管上皮の再生が対照群および80 mg/kg群の雄に認められた。

11. 電子顕微鏡検査

投与期間終了時には、肝臓の小葉中心帯における滑面小胞体の増加が80 mg/kg群の雄に認められた。

回復期間終了時には、雌雄ともに異常は認められなかった。

考察

体重の増加抑制および摂餌量の減少が80 mg/kg群の雌雄で認められ、1,4-ジシアノベンゼン投与による影響と考えられた。

肝臓に対する影響として、体重重量比の増加が80 mg/

kg群の雌雄で、小葉中心性の肝細胞肥大および小葉中心帯に滑面小胞体の増加が80 mg/kg群の雄で認められ、1,4-ジシアノベンゼン投与による薬物代謝酵素誘導^{1,2)}が示唆された。また、血中のトリグリセリド、リン脂質あるいは総コレステロールの増加が20 mg/kg以上の群の雌雄で、γ-GTPの増加傾向およびアルカリフォスファターゼの減少が80 mg/kg群の雄で、β-グロブリン分画の上昇が80 mg/kg群の雌で認められ、1,4-ジシアノベンゼンの肝臓・胆道系への影響が示唆された。

甲状腺に対する影響として、体重重量比の増加が80 mg/kg群の雌雄で、ろ胞の不整形化が80 mg/kg群の雄で、コロイドの減少が20 mg/kg以上の群の雄で認められた。外来物質によって引き起こされた酵素誘導は体内の性ホルモンや甲状腺ホルモンなどの分解を促進する場合があると報告されており²⁾、本試験でも肝臓の酵素誘導によ

Table 9 Summary of histopathological findings in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test - Administration period -

Item	(Grade) ^{a)}	Male					Female				
		1,4-dicyanobenzene (mg/kg)					1,4-dicyanobenzene (mg/kg)				
		0	1.25	5	20	80	0	1.25	5	20	80
No. of animals examined		7	7	7	7	7	7	7	7	7	
Organ : Findings											
Liver : Centrilobular hypertrophy of hepatocytes	(+)	0 ^{b)}	0	0	0	5	0	0	0	0	
Kidney (right/left)											
: Hyaline droplets deposition in tubular epithelium, mainly proximal tubules	(+)	1	0	5	4	0	0	0	0	0	
	(++)	0	0	0	3	5	0	0	0	0	
	(+++)	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
Dilation of tubules, mainly distal tubules	(+)	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
Atrophy of tubular epithelium, mainly distal tubules	(+)	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
Spleen : Atrophy of lymph follicles	(+)	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
Thyroids : Irregularity in shape of follicles	(+)	0	0	0	0	3	0	0	0	0	
Decrease in colloid	(+)	0	0	0	0	1	3	0	0	0	

a: + = slight change, ++ = moderate change and +++ = severe change.

b: Values are no. of animals with findings.

Table 10 Summary of histopathological findings in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test - Recovery period -

Item	(Grade) ^{a)}	Male		Female	
		1,4-dicyanobenzene (mg/kg)		1,4-dicyanobenzene (mg/kg)	
		0	80	0	80
No. of animals examined		7	7	7	7
Organ : Findings					
Kidney (right/left)					
: Hyaline droplets deposition in tubular epithelium, mainly proximal tubules	(+)	1 ^{b)}	4	0	0
: Focal regeneration of tubular epithelium	(+)	1	5	0	0

a: + = slight change.

b: Values are no. of animals with findings.

り甲状腺ホルモンレベルが低下し、TSHの作用によって甲状腺の機能が亢進し、二次的に増生性の変化が生じたもの³⁾と考えられた。

腎臓に対する影響として、肉眼的に褪色が5 mg/kg以上の群の雄で認められた。組織学的には近位尿細管を主とする尿細管上皮の硝子滴沈着が認められ、その出現例数は5 mg/kg以上の群で対照群よりも多く、程度は用量相関的に重くなる傾向が認められた。また、14日間の休業により80 mg/kg群でみられた硝子滴は自然発生と同じ程度にまで回復したものの、尿細管上皮に限局性の再生像が対照群よりも多数例に認められた。薬物がライソソーム内に蓄積したりライソソーム酵素を阻害することにより

尿細管上皮への硝子滴の蓄積が生じるといわれている²⁾が、1,4-ジシアノベンゼンも同様の機序により腎臓に障害を与えたと考えられた。腎機能の低下を示唆する所見としては、尿比重の低下、尿中電解質の減少、血中のカルシウムの増加および無機リンの減少などが80 mg/kg群の雌雄で、血中のクロールの減少が20 mg/kg以上の群の雄および80 mg/kg群の雌で認められた。このうち、カルシウムの変動については、大量の甲状腺ホルモン投与によって骨組織中の蛋白質の異化が促進され、血中のカルシウムが増加すること⁴⁾から、1,4-ジシアノベンゼンの甲状腺への影響との関連も考えられた。なお、雌では血中尿素窒素の減少が5 mg/kg以上の群で、血中クレアチニン

の減少が80 mg/kg群で認められたが、いずれも背景データ範囲内のわずかな変動であることから、1,4-ジシアノベンゼン投与との関連はないと考えられた。

その他に、網状赤血球数の上昇が80 mg/kg群の雌で認められ、1,4-ジシアノベンゼン投与により赤血球の生成亢進状態であったことが示唆されたが、赤血球数には変化は認められなかった。また、分節好中球率の上昇が80 mg/kg群の雄で認められた。同変化は100 mg/kgの14日間投与でも認められており、1,4-ジシアノベンゼン投与による影響と考えられたが、その機序については不明であった。前述以外の器官では、脾臓に重量の減少およびリンパ球の萎縮、胸腺に重量の減少、副腎に体重重量比の上昇が80 mg/kg群で認められ、体重増加抑制が同群で認められていることを考慮すると、これらの変化は1,4-ジシアノベンゼン投与による全身的な影響を示唆するものと考えられた。また、5および80 mg/kg群の雄で頸部皮膚に潰瘍や水腫などが認められたが、投与操作時に被験物質が付着したため生じた1,4-ジシアノベンゼンの刺激に対する反応性の変化と考えられた。なお、単回投与試験では500 mg/kg以上の群で1,4-ジシアノベンゼンの刺激による変化が前胃に認められたが、本試験では80 mg/kgの28日間反復投与でも異常は認められなかった。

上述の変化はその多くが14日間の休薬により消失し、回復傾向はあるものと考えられた。以上、雄では5 mg/kg群で腎臓の褪色および尿細管上皮の硝子滴沈着が、雌では20 mg/kg群で血中トリグリセリドの増加が認められたことから、本試験条件下における1,4-ジシアノベンゼン投与による無影響量(NOEL)は雄で1.25 mg/kg/day、雌で5 mg/kg/dayであると考えられた。

参考文献

- 1) 長瀬すみら, "実験動物の臨床生化学データー - 病理組織像との関連," ソフトサイエンス社, 東京, 1976, pp. 345-352.
- 2) J.R. Glaister, "Principles of Toxicological Pathology," Taylor & Francis, London, 1986. [高橋道人監訳, "毒性病理学の基礎", ソフトサイエンス社, 東京, 1992, p. 260]
- 3) S. Hosokawa et al., *J. Toxicol. Sci.*, 17, 155-166 (1992).
- 4) 中野 昭一ら, "主要疾患の病態生理," 南山堂, 東京, 1981, pp. 337-338.

連絡先

試験責任者: 八幡 昭子
 試験担当者: 山田 高士, 長谷 淳一,
 小林 裕幸
 運営管理者: 井本 精一
 (株)化合物安全性研究所
 〒004 北海道札幌市豊平区真栄363番24号
 Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors: Akiko Yahata (Study director)
 Takashi Yamada, Jun-ichi Nagaya,
 Hiroyuki Kobayashi,
 Seiichi Imoto (Management)
 Safety Research Institute for Chemical
 Compounds Co., Ltd.
 363-24 Shin-ei, Toyohira-ku, Sapporo, Hokkaido, 004,
 Japan
 Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

1,4-ジシアノベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 1,4-Dicyanobenzene on Bacteria

要約

1,4-ジシアノベンゼンについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537^D および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*² を用い、S9 Mix 無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験では、50~5000 µg/プレートで実施したところ、抗菌性が認められなかったため、本試験では S9 Mix 無添加および添加試験ともに 312.5~5000 µg/プレートの用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも溶媒対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められなかったことから、1,4-ジシアノベンゼンは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

〔検定菌〕

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

S. typhimurium の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。各検定菌は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子(pKM101)の有無についての特性確認を行った。試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、約10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

1,4-ジシアノベンゼン(CAS No 623-26-7)は、分子量128.14の白色結晶である。純度99%以上のもの(ロット番号: 930825, 不純物不明(1%未満), 昭和電工(株)製造)を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温遮光で保管した。

1,4-ジシアノベンゼンは、ジメチルスルホキシド(以下DMSOと略, 和光純薬工業(株))に50 mg/mlになるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし約3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

1,4-ジシアノベンゼンのDMSO溶液中での安定性試験を、本試験での低濃度(3.125 mg/ml)および高濃度(50.00 mg/ml)の2濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後4時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均に対して、101および100%であった。また、本試験IIに用いた調製検体について、含量測定試験を行った。その結果、1,4-ジシアノベンゼンはDMSO溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : フリルフラマイド (上野製薬(株))
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))
9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)
2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF2, 2AA はDMSO(和光純薬工業(株))に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA はDMSOに、SA は蒸留水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地およびS9 Mixの組成〕

1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混合した。

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

* : WP2用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1リットルあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g
グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
バクトアガー (Difco)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mlを流して固めてある。

3) S9 混液 (1 ml中下記の成分を含む)

** S9	0.1 ml
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

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

〔試験方法〕

プレート法を用いて、S9 Mix 無添加および添加条件下で試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 Mix 添加試験においては S9 Mix 0.5 ml), 検定菌液 0.1 ml およびトップアガー 2 ml を混和したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに DMSO, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は Table 1~2 に示した。培養は 37 °C で 48 時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 Mix 無添加あるいは添加試験において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

1,4-ジシアノベンゼンについて、50~5000 μg/プレートの範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、すべての検定菌において抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験における最高用量を、すべての検定菌において、S9 Mix 無添加および添加試験ともに、5000 μg/プレートとすることとした。

〔本試験〕

結果を Table 1, 2 に示した。1,4-ジシアノベンゼンについて、すべての検定菌において、S9 Mix 無添加および添加試験ともに 312.5~5000 μg/プレートの範囲で、公比を2とし、試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の S9 Mix 無添加および添加試験のいずれにお

いても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。

なお、最高用量の 5000 μg/プレート群において S9 Mix 無添加および添加試験のいずれにおいても被験物質に由来する沈殿が認められた。

以上の結果に基づき、1,4-ジシアノベンゼンは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983).
- 2) M.H.L. Green, in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.

連絡先

試験責任者: 澁谷 徹
 試験担当者: 堀谷尚古, 坂本京子, 原 巧,
 川上久美子, 松木容彦,
 飯田さやか, 中込まどか
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 神奈川県秦野市落合 729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors : Tohru Shibuya (Study Director)
 Naoko Horiya, Kyoko Sakamoto,
 Takumi Hara, Kumiko Kawakami,
 Yasuhiko Matsuki,
 Sayaka Iida and Madoka Nakagomi
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of 1,4-Dicyanobenzene** on bacteria

With (+) or without (-)	Test substance dose (µg/plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvr</i> A			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	0	104	89	106	12	26	11	20	18	19	20	16	23	8	8	7
		(100± 9.3)			(16± 8.4)			(19± 1.0)			(20± 3.5)			(8± 0.6)		
	312.5	111	103	94	12	14	9	16	19	27	20	20	22	7	4	3
		(103± 8.5)			(12± 2.5)			(21± 5.7)			(21± 1.2)			(5± 2.1)		
	625	84	107	114	10	17	7	20	24	18	19	18	18	4	4	6
		(102± 15.7)			(11± 5.1)			(21± 3.1)			(18± 0.6)			(5± 1.2)		
	1250	102	89	86	12	10	4	15	14	18	17	21	19	4	5	4
	(92± 8.5)			(9± 4.2)			(16± 2.1)			(19± 2.0)			(4± 0.6)			
S9 Mix (+)	2500	83	80	72	14	12	12	27	13	14	16	13	10	2	8	7
		(78± 5.7)			(13± 1.2)			(18± 7.8)			(13± 3.0)			(6± 3.2)		
	5000 #	88	75	63	17	10	10	12	12	9	18	18	10	2	5	8
	(75± 12.5)			(12± 4.0)			(11± 1.7)			(15± 4.6)			(5± 3.0)			
S9 Mix (+)	0	124	122	155	8	14	17	27	31	20	35	39	22	6	20	11
		(134± 18.5)			(13± 4.6)			(26± 5.6)			(32± 8.9)			(12± 7.1)		
	312.5	127	118	127	5	18	10	16	30	19	24	28	26	11	12	18
		(124± 5.2)			(11± 6.6)			(22± 7.4)			(26± 2.0)			(14± 3.8)		
	625	115	121	126	11	13	13	27	28	23	24	27	25	9	12	9
		(121± 5.5)			(12± 1.2)			(26± 2.6)			(25± 1.5)			(10± 1.7)		
	1250	100	131	116	9	12	14	19	17	21	27	25	35	11	7	8
	(116± 15.5)			(12± 2.5)			(19± 2.0)			(29± 5.3)			(9± 2.1)			
S9 Mix (+)	2500	89	94	109	11	14	14	17	28	21	22	18	31	10	5	6
		(97± 10.4)			(13± 1.7)			(22± 5.6)			(24± 6.7)			(7± 2.6)		
	5000 #	126	104	126	7	10	9	23	23	20	29	32	20	11	10	4
	(119± 12.7)			(9± 1.5)			(22± 1.7)			(27± 6.2)			(8± 3.8)			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (µg/plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	635	556	616	242	233	248	212	203	207	898	968	992	2016	1736	2227
		(602± 41.2)			(241± 7.5)			(207± 4.5)			(953± 48.8)			(1993± 246.3)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (µg/plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	1293	1371	1277	396	338	343	1697	1689	1874	572	540	563	518	397	392
		(1314± 50.3)			(359± 32.1)			(1753± 104.6)			(558± 16.5)			(436± 71.3)		

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

**: Purity was above 99 %.

1,4-ジシアノベンゼンの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 1,4-Dicyanobenzene on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、1,4-ジシアノベンゼンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)、短時間処理(6時間)ともに、1.3 mg/ml(約10 mM)の濃度においても50%を越える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において1.3 mg/mlの濃度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、標本を複製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU 細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理した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、1,4-ジシアノベンゼンは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: JRH BIOSCIENCES)を10%添加したイーグル MEM(日本水産薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10⁴個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO₂インキュベ-

ター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix 存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

1,4-ジシアノベンゼン(略号: DCB, CAS No.: 623-26-7, ロット番号: 930825, 昭和電工(株)製造, (社)日本化学工業協会提供)は、白色結晶固体で、水に対する溶解度は0.03 wt%, アセトンおよびジメチルスルホキシド(DMSO)に可溶(それぞれ34 wt%未満, および5 wt%以上17 wt%未満), 融点224°C, 沸点284°C, 蒸気圧0.01 mmHg(60°C), 分子式C₆H₄N₂, 分子量128.14, 純度99%以上の物質である。被験物質原体は、室温・遮光保存条件下で1年間は安定であり、媒体中(0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液, 以下0.5% CMC Naと略す)では、3.25~13.0 mg/mlの濃度範囲で4時間は安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。媒体は0.5% CMC Na(ナカライテスク(株))を用いた。原体を媒体に懸濁して原液を調製し、ついで原液を媒体で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10% (v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(媒体中の平均含量が添加量の85.0~115%)の値であった。なお、濃度の記載について、純度換算は行なわなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の陰性対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべて濃度範囲で50%を明らかに越える増殖抑制は認められなかった(Fig. 1)。

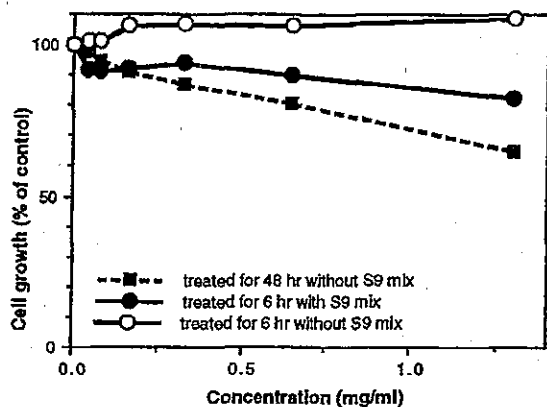


Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,4-dicyanobenzene

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理とも1.3 mg/ml (10 mM相当)とし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水((株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 μg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は、各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については、1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析することとした。

10. 記録と判定

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

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの exact probability test 法により、陰性対照群と被験物質処理群間および陰性対照群と陽性対照群間の有意差検定(p<0.05)を行った。

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果を Table 1 に示した。

1,4-ジシアノベンゼンを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。

1,4-ジシアノベンゼンを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、1,4-ジシアノベンゼンは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 石館 基 監修, "改訂)染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー社, 東京, 1987.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
 試験担当者: 山影康次, 若栗 忍, 中川ゆづき,
 日下部博一, 橋本恵子
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257神奈川県秦野市落合729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
 Kohji Yamakage, Shinobu Wakuri,
 Yuzuki Nakagaw, Hirokazu Kusakabe,
 Keiko Hashimoto
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 1,4-dicyanobenzene (DCB)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid (%)	Judgement ⁴⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul	total ²⁾		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25		
Solvent	0	24	200	0	1	0	1	1	1	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.38		
DCB	0.3	24	200	1	0	2	2	0	0	0	5	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.13	--	--
DCB	0.7	24	200	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	--	--
DCB	1.3	24	200	0	1	0	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	--	--
MC	0.00005	24	200	4	35	92	5	2	4	0	142	3	85 *(42.5)	85 *(42.5)	0.38	+	--
Solvent ¹⁾	0	48	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00		
DCB	0.3	48	200	0	0	0	0	0	0	10	10	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	--	--
DCB	0.7	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	--	--
DCB	1.3	48	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	--	--
MC	0.00005	48	200	5	14	48	4	5	3	0	79	6	57 *(28.5)	53 *(26.5)	0.13	+	--

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C. 1) 0.5% carboxymethyl cellulose sodium solution was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). * : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was more than 99%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1,4-dicyanobenzene (DCB)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid (%)	Judgement ⁴⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul	total ²⁾		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control ¹⁾	0	--	6-(18)	200	0	3	0	0	0	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00		
Solvent	0	--	6-(18)	200	0	0	2	6	0	0	0	8	1	3 (1.5)	3 (1.5)	0.38		
DCB	0.3	--	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	--	--
DCB	0.7	--	6-(18)	200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	--	--
DCB	1.3	--	6-(18)	200	0	1	4	0	0	0	0	5	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	--	--
CPA	0.005	--	6-(18)	200	0	3	1	1	0	0	0	5	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	--	--
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	0	0	2	1	1	0	4	1	3 (1.5)	3 (1.5)	0.50		
DCB	0.3	+	6-(18)	200	1	0	0	3	0	0	0	4	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38	--	--
DCB	0.7	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.75	--	--
DCB	1.3	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.88	--	--
CPA	0.005	+	6-(18)	200	11	80	242	4	1	2	20	360	1	127 *(63.5)	125 *(62.5)	0.13	+	--

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide. 1) 0.5% carboxymethyl cellulose solution was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). * : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was more than 99%.