

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験

Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test of 1,3-Bis(aminomethyl)benzene by Oral Administration in Rats

要約

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンの50, 150および450 mg/kgをSD系(Crj:CD(SD))のラットの交配前2週間および交配期間の2週間を通じて経口投与し、さらに雄では交配期間終了後20日間、雌では妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで連続投与し、親動物の反復投与毒性および生殖能ならびに児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

1. 反復投与毒性

150 mg/kg群の雄1例および450 mg/kg群の雄3例、雌1例が死亡した。被験物質投与による症状として、150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌雄で流涎、鼻音、不整呼吸、腹部膨満および鼻分泌物が認められた。体重および摂餌量では、450 mg/kg群の雌雄で体重増加抑制および摂餌量の減少が認められた。

病理学検査では、被験物質投与の直接作用によると考えられる胃の前胃潰瘍、角化亢進を伴った扁平上皮増生等、胃に対する諸変化が450 mg/kg群の雌雄に認められた。なお、雌雄とも生殖器系に被験物質投与に起因すると考えられる所見は観察されなかった。

2. 生殖発生毒性

交尾能、受胎能および性周期に被験物質投与の影響は認められなかった。また、分娩状態にも異常は観察されなかった。新生児の外表面検査には、異常は認められず、体重にも群間差は認められなかった。死亡児および哺育4日の剖検では、被験物質投与によると考えられる異常所見は観察されなかった。

以上の結果から、本試験条件下における1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンの親動物に対する無影響量(NOEL)は雄では50 mg/kg/day、雌では150 mg/kg/dayと判断された。生殖能および次世代児に対する影響はともに450 mg/kg/day投与によっても認められず、無影響量は450 mg/kg/dayと判断された。

方法

1. 被験物質

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼン[三菱瓦斯化学(株)製造(東京)、純度99.8 wt%, Lot No. 81001]は無色の液体であり、使用時まで直射日光を避け、冷暗所に保管した。本ロットは、投与期間中安定であったことを確認した。

被験物質は、局方精製水(共栄製薬(株)製造)に溶解し、5, 15および45 mg/mLの濃度になるよう各群の投与液を調製した。調製後は、使用時まで遮光・室温条件下で保管した。投与液中の被験物質は、1および60 mg/mLの濃度の場合、調製後室温保存で8日間安定であることを確認した。

投与液の濃度および均一性の分析は、調製開始時に調製した各群のバッチから無作為にサンプルを抽出し実施した。その結果、表示濃度に対する誤差が-0.8から+6.9%の範囲であり、基準範囲内(±10%以内)であった。したがって、使用した投与液にはほぼ所定量の1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンが含有されていたことが確認された。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー(株)(神奈川)から購入した生後8週齢のSprague-Dawley(Crj:CD(SD), SPF)系雌雄ラットを使用した。購入した動物は7日間検疫・馴化飼育した後、一般状態に異常が認められなかったものを10週齢で群分けして試験に用いた。群分け時の体重は、雄で354~399 g、雌で216~247 gの範囲であった。

動物は、温度 24 ± 2 °C、湿度 55 ± 10 %、換気回数15回/時間、照度150~300 lux、照明時間12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)に設定されたバリアシステムの飼育室でアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに1匹ずつ収容し飼育した。妊娠18日以降の母動物は哺育4日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに哺育トレーおよび巣作り材料(CareFRESH™, Absorption corporation 製造)を入れて飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)製造のNMF固型飼料(放射線滅菌飼料)を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。飲水は、水道水を自由に摂取させた。

3. 群分け

動物は投与開始日の体重をもとに層別化し、無作為抽出法により1群当たり12匹を振り分けた。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

先に実施した「1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンのラットを用いる28日間の反復投与毒性試験¹⁾」では600 mg/kg群で流涎、自発運動量の低下、立毛、腹部膨満などの投与後症状が雌雄に、摂餌量の減少および体重の増加抑制が雄に認められ、12例中雄で1例、雌で4例が

死亡している。また、同群で胃の前胃部粘膜に潰瘍および角化亢進を伴う上皮の過形成、骨髄に顆粒球形造血細胞の増加、副腎に皮質細胞の肥大・空胞化および盲腸の拡張が雌雄に認められた。これらの結果をもとに、28日間の反復投与毒性試験と同用量、すなわち0, 10, 40, 150および600 mg/kgで実施した予備試験「1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験-2週間投与予備試験」では、600 mg/kg群の雄で6例中2例、雌で1例が死亡し、投与後症状として雌雄に流涎等が認められた。他に同群の雄で体重増加抑制、雌雄で副腎重量の高値が認められた。

従って、本試験においては600 mg/kg/dayでは雌雄に死亡動物が認められたこと、加えて投与期間が予備試験の3倍以上に延長されることを考慮して高用量を450 mg/kg/dayに設定し、以下公比3で除し、150および50 mg/kg/dayとした。

投与液量は、体重100 g当り1 mLとし、交配前および交配期間中の雌雄では、個体別に測定した最新体重に基づいて算出を行った。また、妊娠期間および哺育期間中の雌は、妊娠0, 7, 14, 21および哺育0日に測定した個体別体重に基づいて算出を行った。胃ゾンデを用いて毎日1回(7日/週)強制経口投与した。対照群には局方精製水のみを同様に投与した。

雄の投与期間は、交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後20日間の連続48日間とした。雌の投与期間は、交配前14日間と交配期間中(最長5日間)ならびに交尾成立雌の妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで(41~45日間)とした。なお、交尾成立後分娩しなかった雌は妊娠25日の解剖前日までの40日間とした。

5. 観察および検査

1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

2) 体重

雄では、投与1(投与開始日)、8, 15, 22, 29, 36, 43および49日(剖検日)に測定し、投与1から43日までの体重増加量を算出した。雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に測定し、投与1から15日までの体重増加量を算出した。交尾成立後の雌は、妊娠0, 7, 14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に測定し、それぞれ妊娠0から21日および哺育0から4日までの体重増加量を算出した。

3) 摂餌量

雄では、投与1(投与開始日)、8, 15, 22, 29, 36, 43および48日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日および投与22から48日までの累積摂餌量を算出した。雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に、交尾しなかった雌はそれ以降の投与29, 36, 43および48日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均

1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日までの累積摂餌量を算出した。また、交尾成立の雌は妊娠0, 7, 14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともにそれぞれ妊娠0から21日および哺育0から4日までの累積摂餌量を算出した。なお、交配期間中の摂餌量は測定しなかった。

4) 交配

交配前14日間の性周期観察を行った雌を同群内の雄のケージに入れ1対1で最長5日間毎晩同居させた。翌朝、陰垢中の精子確認をもって交尾が成立したとし、その日を妊娠0日とした。性周期観察は交尾成立日までを行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数として平均性周期を算出した。また、性周期観察期間中の異常性周期(4または5日以外の性周期)発現率[(異常性周期を示す雌動物数/観察雌動物数)×100]を算出した。交配結果から、各群について交尾率[(交尾動物数/同居動物数)×100]を算出した。

5) 自然分娩時および新生児の観察

妊娠動物は全例を自然分娩させた。分娩の確認は午前9時から10時に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した個体および分娩を開始した個体については分娩完了まで待つ、その日を哺育0日とした。午前10時を過ぎて分娩が完了した個体については、翌日を哺育0日とした。分娩を確認した全例について妊娠期間(哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数)、受胎率[(受胎動物数/交尾動物数)×100]、出産率[(生児出産雌数/妊娠雌数)×100]、着床率[(着床痕数/妊娠黄体数)×100]、分娩率[(総出産児数/着床痕数)×100]、出生率[(出生生児数/総出産児数)×100]を算出した。妊娠25日の午前9時までに分娩のみられない動物は病理解剖した。母動物は哺育4日に病理解剖した。

新生児は哺育0日に出生児数(生存児+死亡児)を調べ、性別を判定するとともに外表異常の有無を調べた。また、哺育0および4日に雌雄個体別の体重を測定し、1腹の雌雄別平均体重を算出した。

哺育4日の児重量を測定後に新生児全例をエーテル麻酔により安楽死させ、主要器官の肉眼観察を行った。なお、哺育期間中の死亡児についてはブアン氏液に固定し、主要器官の肉眼観察を行った。また、新生児の4日の生存率[(哺育4日生児数/出生生児数)×100]を求めた。

6) 病理学検査

a) 剖検および器官重量

① 死亡動物

死亡動物は発見後直ちに解剖した。主要器官の肉眼的観察を行った後、胸腺、胃、副腎、卵巣、子宮および膈を10 vol%中性緩衝ホルマリン液に、精巣および精巣上体はブアン氏液に1日固定した後、10 vol%中性緩衝ホルマリン液に固定した。また、一部の動物で変化が認められた器官・組織として鼻腔、肺、肝臓、脾臓、小腸、

大腸および精囊を10 vol%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

② 雄動物

48日間投与した翌日、エーテル麻酔下で放血安楽死させた。主要器官の肉眼的観察を行った後、胸腺、副腎、精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比(相対重量)を算出した。また、全動物の胸腺、胃、副腎、精囊、前立腺および一部の動物で肉眼所見の変化が認められた器官・組織として肺、腎臓および皮膚を10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、精巣および精巣上体はブアン氏液で1日固定した後、10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

③ 自然分娩した雌

哺育4日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた。主要器官の肉眼的観察を行った後、胸腺および副腎重量を測定し、相対重量を算出した。卵巣、子宮、膈および肉眼所見で変化が認められた器官・組織として肺、脾臓、肝臓、腎臓および皮膚を10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定した。また、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

④ 自然分娩の認められない雌

妊娠25日に、エーテル麻酔下で放血安楽死させた。器官・組織の肉眼的観察を行った後、胸腺、胃、副腎、卵巣、子宮および膈を10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

b) 病理組織学検査

① 死亡動物

150 mg/kg群の雄1例、450 mg/kg群の雄3例および雌1例の胸腺、胃、副腎、卵巣、子宮、膈、精巣および精巣上体について実施した。加えて、異常病変部組織が認められた動物の脾臓、鼻腔、小腸、大腸、精囊、肝臓および肺についても実施した。

② 妊娠を成立させた雄

対照群および450 mg/kg群のそれぞれ12および9例で胸腺、胃、副腎、精巣および精巣上体について実施した。胸腺、胃および副腎については、被験物質投与の影響が疑われたため50および150 mg/kg群の全例(12および11例)でも実施した。

加えて、異常病変部組織が認められた動物の腎臓、肺および皮膚についても実施した。

③ 自然分娩した雌

対照群および450 mg/kg群の各11例で胸腺、胃、副腎および卵巣について実施した。胸腺、胃および副腎については、被験物質投与の影響が疑われたため50および150 mg/kg群の全例(各12例)についても実施した。加えて、異常病変部組織が認められた動物の肝臓、肺、腎臓、皮膚および脾臓についても実施した。

④ 妊娠を成立させなかった雌

450 mg/kg群の1例で胸腺、胃、副腎、精巣、精巣上体、精囊および前立腺について実施した。

6. 統計解析

体重、摂餌量、黄体数、着床痕数、出産児数、死産児

数、性比、平均性周期、妊娠期間、着床率、分娩率、出生率、外表異常発現率、新生児の4日の生存率、器官重量および相対重量については多重比較検定^{2,4)}を行った。

出産率、交尾率および受胎率については χ^2 検定^{5,6)}を用いた。異常性周期発現率および病理学検査の所見の発生率については、Fisherの直接確率検定法⁶⁾を用いて検定した。なお、哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は5および1%の両側検定で実施した。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡および一般状態

死亡例が、雄では150 mg/kg群で投与38日に1例、450 mg/kg群で投与31、38および39日に各1例、雌では450 mg/kg群で妊娠2日に1例認められた。

被験物質投与後の主な一般状態の変化として、流涎が雌雄の150および450 mg/kg群で用量に依存して認められた。すなわち、雄の150 mg/kg群で観察された流涎は、投与5~6週には少数例、投与7週には約半数例で、投与直後から発現し投与後30分には消失する一過性の変化であった。雄の450 mg/kg群では投与1週に約半数例、投与2週以降にはほぼ全例で認められ、投与1週では投与直後から発現し投与後30分には消失したものの、投与回数が増すとともに流涎の消失までの時間は延長し、投与期間後半には投与後90~180分でも継続して認められていた。雌の150 mg/kg群では妊娠2日に1例のみに認められ、同群の雄と同様に一過性の変化であった。雌の450 mg/kg群では交配前、交配期間および妊娠前期には複数例、妊娠中期から後期へと移行するにつれて発現匹数は少数例に減少し、分娩後の哺育期間では1例のみに認められた。なお、雌の450 mg/kg群で観察された流涎は、妊娠期間では投与直後から発現し投与後60分でも継続している動物が少数例で認められた。一方、他の期間では、いずれの動物も投与直後から発現し投与後30分には消失する一過性の変化であった。

さらに、被験物質投与に関連した変化と考えられる所見として、鼻音、不整呼吸、腹部膨満および鼻分泌物が150および450 mg/kg群の雌雄で観察された。また、主に死亡動物で眼瞼下垂、削瘦、腹臥位、被毛の汚れ、蒼白、立毛および体温低下が観察された。これらは全身状態の悪化に起因した変化と考えられ、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

その他、自然発生性と考えられる所見として眼分泌物が対照群の雄で1例、脱毛が150 mg/kg群の雌および450 mg/kg群の雌雄でそれぞれ1例に認められた。

2) 体重(Fig. 1, 2)

雄では、450 mg/kg群で投与8日以降すべての測定日が対照群に比べ有意な低値を示し、投与期間中の体重増加量も有意な低値を示した。

雌では、450 mg/kg群で妊娠14および21日の体重が

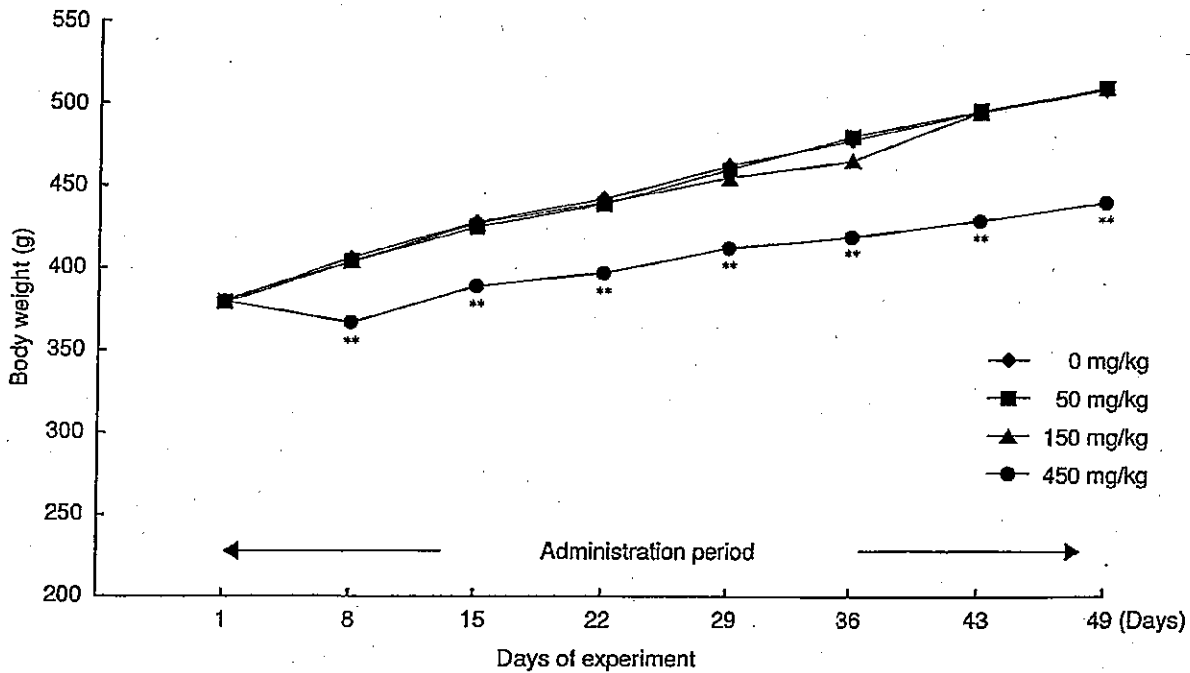


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with 1,3-bis(aminomethyl)benzene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Significant difference from control group; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

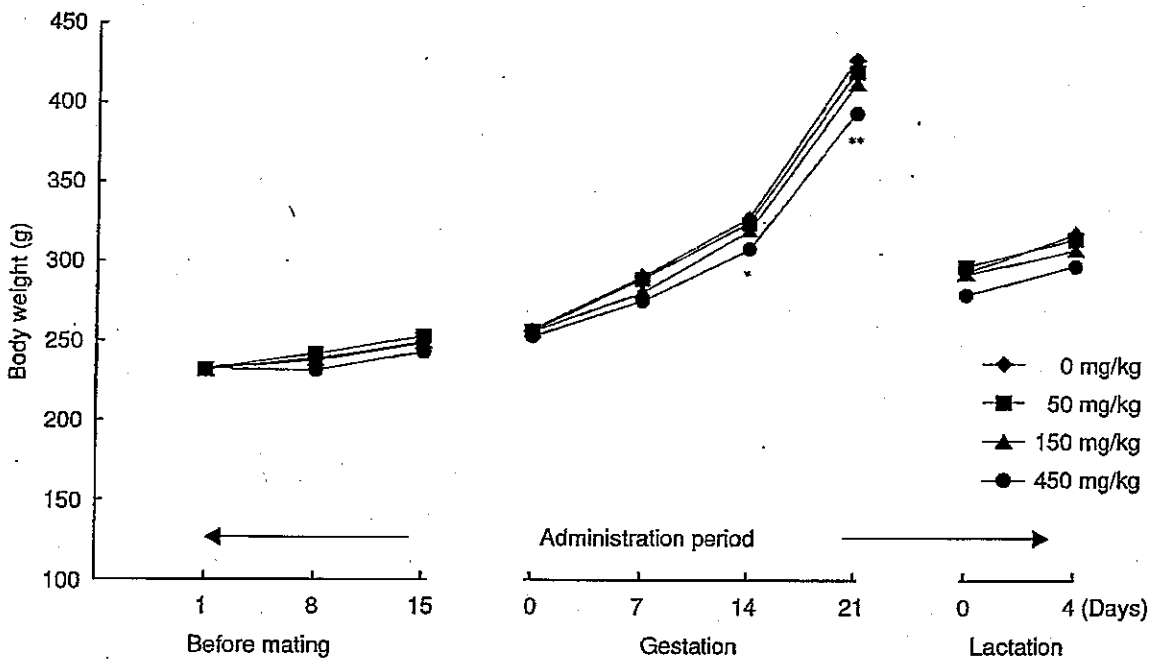


Fig. 2 Body weight change of female rats treated orally with 1,3-bis(aminomethyl)benzene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Significant difference from control group; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

対照群に比べ有意な低値を示し、妊娠期間中の体重増加量も有意な低値を示した。

有意な低値を示し、投与1から15日の累積摂取量も有意な低値を示した。

3) 摂取量 (Fig. 3, 4)

雄では、450 mg/kg群で投与1から8日、29から36日および43から48日の平均1日摂取量が対照群に比べ有

雌では、450 mg/kg群で交配前の投与1から8日の平均1日摂取量が対照群に比べ有意な低値を示し、投与1から15日の累積摂取量も有意な低値を示した。

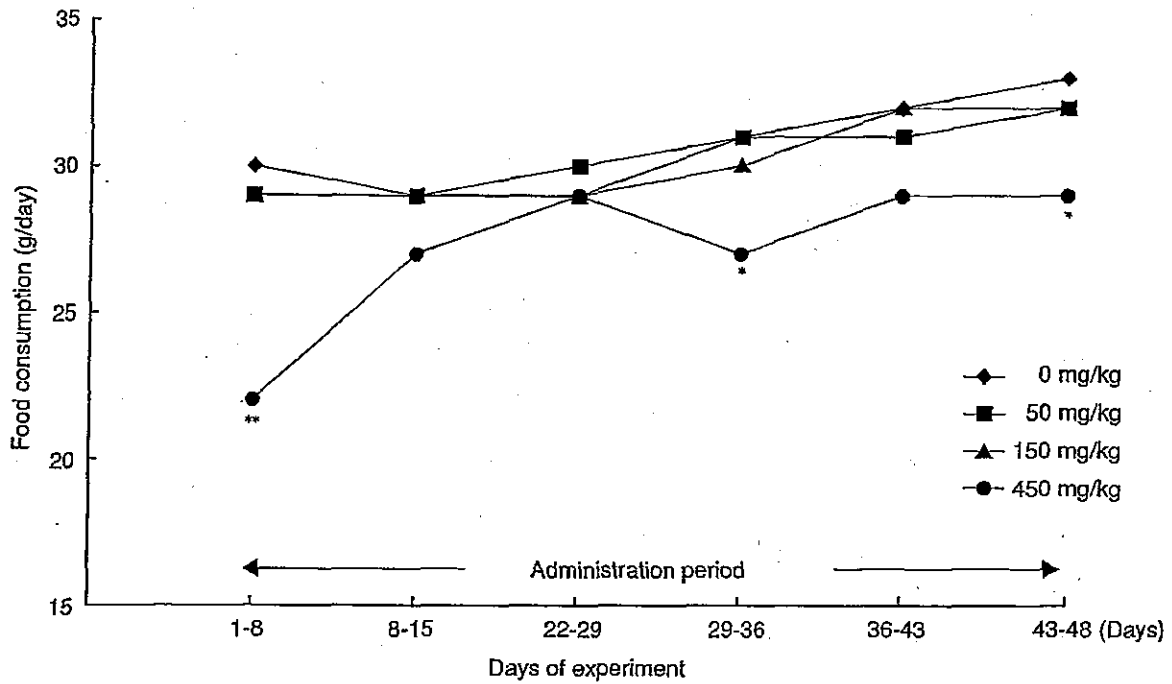


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 1,3-bis(aminomethyl)benzene in the preliminary reproduction toxicity screening test
Significant difference from control group; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

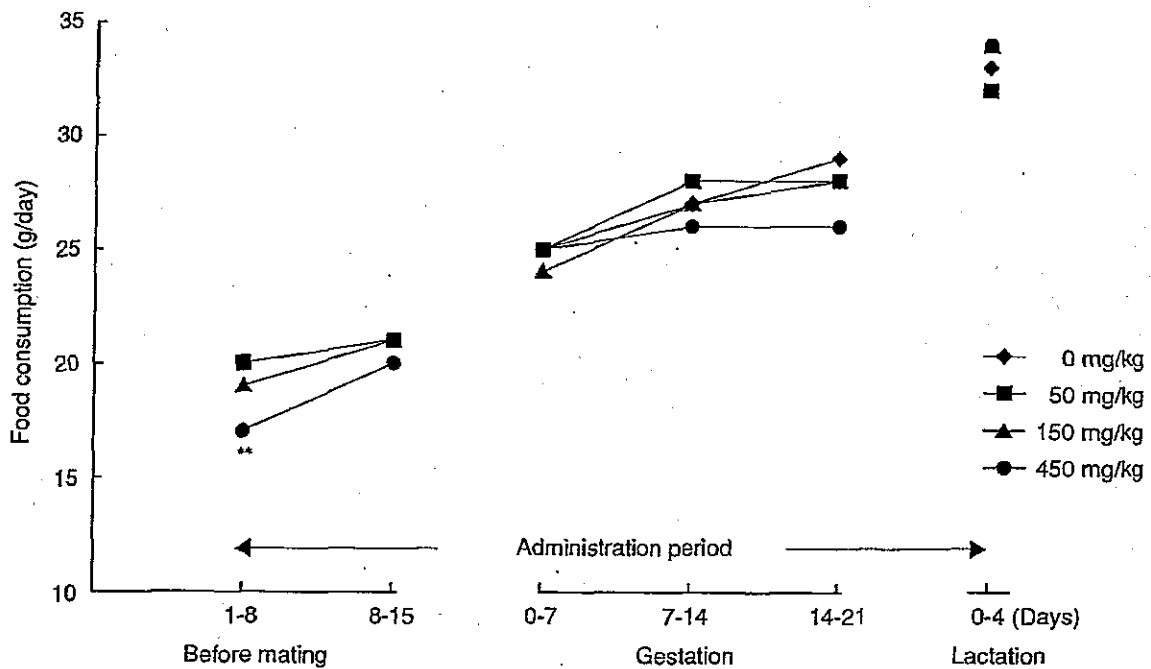


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 1,3-bis(aminomethyl)benzene in the preliminary reproduction toxicity screening test
Significant difference from control group; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

4) 器官重量 (Table 1)

雄では、対照群に比べ450 mg/kg群で胸腺の実重量が有意な低値、副腎の実重量および相対重量、精巣の相対重量が有意な高値を示した。また、同群で統計学的な有意差は認められていないが、胸腺の相対重量が低値を示

した。

雌では、対照群に比べ450 mg/kg群で胸腺の実重量が有意な低値、副腎の相対重量が有意な高値を示した。また、同群で統計学的な有意差は認められていないが、胸腺の相対重量が低値、副腎の実重量が高値を示した。

5) 剖検所見

死亡した150 mg/kg群の雄1例, 450 mg/kg群の雄3例および雌1例では, 所見として胃の前胃潰瘍が450 mg/kg群の雄で3例, 胃の前胃粘膜肥厚が450 mg/kg群の雌雄で各1例, 胃の腺胃赤色化が450 mg/kg群の雄で1例, 胃の腺胃赤色斑点が450 mg/kg群の雌で1例, 胃の内腔拡張が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌雄で各1例, 小腸の内腔拡張が150 mg/kg群の雄および50 mg/kg群の雌雄で各1例, 大腸の内腔拡張が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌雄でそれぞれ1, および3例, 胸腺の萎縮が150および450 mg/kg群の雄で各1例, 胸腺の赤色化が450 mg/kg群の雄で2例, 鼻腔の粘液性内容物が150 mg/kg群の雄で1例, 全身の削鼠が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌で各1例, 脾臓の萎縮が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌で各1例, 肺の赤色化が450 mg/kg群の雄で1例, 肝臓の白色斑点が450 mg/kg群の雌で1例, 精囊の萎縮が50 mg/kg群の雄で1例および子宮の小型化が450 mg/kg群の雌で1例に観察された。

雄では, 死亡動物を除く対照群, 50, 150および450 mg/kg群の12, 12, 11および9例について剖検を行った。その結果, 450 mg/kg群で胃の前胃潰瘍が9例に認められ, 対照群に比べ有意に発生数が増加した。なお, 前胃潰瘍の9例中6例では, 周囲組織との癒着も認められた。その他, 自然発生と考えられる肺の褐色斑点, 副腎の褐色斑点, 被毛の菲薄化および腎臓の嚢胞が対照群および50 mg/kg群で少数例に認められた。

自然分娩した雌では, 対照群, 50, 150および450 mg/kg群の11, 12, 12および11例について剖検を行った。その結果, 450 mg/kg群で胃の前胃潰瘍が9例, 胸腺の萎縮が6例に認められ, いずれの所見も対照群に比べて有意に発生数が増加した。なお, 前胃潰瘍は9例中3例で周囲組織との癒着も認められた。また, 同群で胃の前胃粘膜肥厚が3例, 脾臓の肥大が1例に認められた。その他, 自然発生と考えられる肺の褐色斑点, 腎臓の褐色斑点, 被毛の菲薄化, 肝臓の白色斑点および卵巣の嚢胞が対照群, 150および450 mg/kg群で少数例に散見された。妊娠25日までに分娩が認められなかった対照群の1例は, 所見として子宮の黒色斑点および内腔拡張が観察された。なお, この動物の子宮内に死亡胎児が1例認められた。

病理組織学検査 (Table 2, 3)

途中死亡した150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌では, 異常病変部組織, 胸腺, 胃, 副腎, 精巣, 精上体, 卵巣, 子宮および陰について病理組織学検査を行った。その結果, 前胃潰瘍および角化亢進を伴った胃前胃扁平上皮増生がそれぞれ450 mg/kg群の雄で3例, 胃の腺胃潰瘍および腺胃粘膜下織線維化が450 mg/kg群の雌で1例, 胃の腺胃粘膜下織出血および浮腫が450 mg/kg群の雄で1例, 胃の粘膜鬱血が450 mg/kg群の雌で1例に認められた。また, 副腎皮質の瀰漫性増が150および450 mg/kg群の雄で1および3例, 副腎皮

質の空胞変性が450 mg/kg群の雄で1例, 脾臓の萎縮が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌で各1例, 胸腺皮質の萎縮が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌雄で各1例, 胸腺の鬱血が450 mg/kg群の雄で2例, 胸腺の出血が450 mg/kg群の雄で1例, 肺の鬱血が450 mg/kg群の雄で1例および肝臓の巣状壊死が450 mg/kg群の雌で1例に認められた。

雄では, 対照群および450 mg/kg群の精巣および精巣上体, 被験物質投与の影響が疑われた器官組織である胸腺, 胃および副腎, さらに, 肉眼所見で認められた異常病変部組織全てについて病理組織学検査を行った。その結果, 450 mg/kg群で胃の前胃潰瘍および角化亢進を伴った前胃扁平上皮増生が全例(9例), 副腎皮質の瀰漫性増生が7例に認められ, いずれの所見も対照群に比べて有意に発生率が増加した。観察された胃の前胃潰瘍を程度分けして評価したところ, 軽度1例, 中等度2例および高度6例で対照群に比べ高度の所見が有意に増加した。また, 副腎皮質の空胞変性が対照群, 50, 150および450 mg/kg群でそれぞれ6, 6, 2および1例, 過剰分泌化を伴った肺の細気管支上皮杯細胞化生が450 mg/kg群で1例, 肺の局所的気管支肺炎が対照群および450 mg/kg群で各1例および腎臓の嚢胞が対照群で2例に認められた。

自然分娩した雌では, 対照群および450 mg/kg群の卵巣, 被験物質投与の影響が疑われた器官組織である胸腺, 胃および副腎, さらに, 肉眼所見で認められた異常病変部組織全てについて病理組織学検査を行った。その結果, 450 mg/kg群で胃の前胃潰瘍が9例, 角化亢進を伴った前胃扁平上皮増生が10例および副腎皮質の瀰漫性増生が8例に認められ, いずれの所見も対照群に比べて統計学的に有意に発生率が増加した。雄同様, 胃の前胃潰瘍を程度分けして評価したところ, 中等度4例および高度5例で対照群に比べ高度の所見が有意に増加した。また, 胃の前胃粘膜下織線維化が450 mg/kg群で2例, 胃の前胃粘膜下織浮腫が450 mg/kg群で1例, 脾臓の白脾髄増生が450 mg/kg群で1例, 胸腺皮質の萎縮が対照群, 50および450 mg/kg群でそれぞれ2, 1および6例, 肺の局所的気管支肺炎および局所的泡沫細胞集簇が450 mg/kg群で各1例, マクロファージ集簇を伴った肝臓の局所的皮膜肥厚が対照群で1例, 卵巣の嚢胞が対照群で2例に認められた。

妊娠25日剖検の雌(自然分娩の認められなかった雌)では, 子宮について病理学的検査を行った。その結果, 子宮内腔内に局所的出血が認められた。

2. 生殖発生毒性

1) 交尾および受胎能 (Table 4)

交尾および受胎は, すべての群で全例成立した。なお, 450 mg/kg群で妊娠2日に死亡した動物は受胎の集計に含めなかった。

性周期観察では, 平均性周期に対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。異常性周期を示す動物が対照群, 150および450 mg/kg群でそれぞれ2例,

50 mg/kg群で1例認められたが、異常性周期発現率に対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

2) 分娩および哺育 (Table 5)

分娩状態に異常は観察されなかった。各群の妊娠期間、黄体数、着床痕数、出産児数および出産生児数はほぼ同様な値を示し、出産率、着床率、出生率、性比および新生児の4日の生存率に対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

3) 新生児の形態、体重および剖検所見

新生児の外表検査では、450 mg/kg群で矮小児が1例認められたのみであり、被験物質投与の影響は認められなかった。

哺育0および4日の体重では、雌雄ともに対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

哺育期間中の死亡児の剖検では、被験物質投与の影響と考えられる所見は認められず、胸腺頸部残留が対照群の雄1例および450 mg/kg群の雌1例に観察されたのみであった。

哺育4日の剖検では、被験物質投与の影響と考えられる所見は認められず、胸腺頸部残留が雄の対照群、50、450 mg/kg群および雌の50 mg/kg群でそれぞれ5、3、2および1例に観察された。その他、肝臓の白色斑点、黒色斑点、横隔膜との癒着、黄色化および奇形結節、腎臓の腎盂拡大、腎臓位置異常、眼球の赤色化および皮膚の外傷が各群で散発的に認められた。

考察

1. 反復投与毒性

被験物質投与による影響と考えられる死亡が、150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌雄で認められた。また、死亡動物を含め一般状態の変化として流涎、鼻音、不整呼吸、腹部膨満および鼻分泌物が認められ、被験物質投与の影響が疑われた。鼻音、不整呼吸および鼻分泌物については、対応する明確な剖検あるいは組織所見は観察されていないが、150 mg/kg群の雄の死亡例に剖検所見で鼻腔の粘液性内容物貯留が、また、450 mg/kg群の雄の計画解剖例に組織学検査で過剰分泌化を伴った気管支上皮の杯細胞化生が、それぞれ単発性ながら観察されており、被験物質投与による呼吸器系への粘液分泌亢進の誘発が疑われた。腹部膨満については、剖検の結果から消化管の内腔拡張によるものと確認された。この消化管の内腔拡張は、死亡動物の剖検で全例に認められており、被験物質投与に起因する呼吸器系変化(鼻音等)と関連した何らかの呼吸障害のために、開口呼吸による空気の誤嚥を招いたもので、死因にも関与した変化と考えられた。流涎は発現時期、匹数および継続時間から被験物質の用量に関連して増強すると判断した。なお、150 mg/kg群の雌で認められた流涎は1例であり、しかも妊娠2日の投与直後にのみ一過性に発現していることから偶発的な変化と判断し、被験物質投与の影響とは考えな

かった。

体重では、450 mg/kg群の雌雄で投与開始以降低値を示し、被験物質投与による体重増加抑制が認められた。また、摂餌量でも、450 mg/kg群の雄で投与開始以降、雌で投与期間の前半に低値を示し、被験物質投与の影響が認められた。

一般状態、体重および摂餌量の変化から、被験物質の作用には雌雄差があり、雌に比べ雄に強く影響が発現していると考えられた。

病理学検査では、生殖器系に対して被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。なお、450 mg/kg群の雄で認められた精巢の相対重量の高値は、実重量、剖検および組織所見で異常は認められないことから、低体重に起因した変化と判断した。450 mg/kg群の雌雄に認められた前胃の潰瘍、角化亢進を伴った扁平上皮増生、粘膜下織の線維化等の諸所見は、被験物質が強い刺激性の性状を有することから、前胃粘膜への直接的刺激作用による腐食性ならびに反応性変化と考えられ、中でも粘膜の刺激が強く認められた例では、前胃の潰瘍による炎症反応が漿膜にまで拡大した結果、周囲組織との癒着が生じたものと思われた。450 mg/kg群の雌の1例に観察された脾臓白脾腫の増生は、前胃の炎症に対する反応と考えられ、被験物質投与による二次的な影響と判断された。また、同群の雌雄で胸腺重量が低値、副腎重量が高値を示し、これらの重量変化に対応すると考えられる組織所見として、胸腺については皮質の萎縮が主に雌に、副腎については皮質の瀰漫性増生が雌雄に認められたが、被験物質投与の直接作用による影響であるかは明確でなかった。しかしながら、胸腺あるいは副腎に所見の認められた動物には共通して胃にも病変が認められることから、胃の病変に起因した生体負荷による変化とも考えられた。

以上のことから、本試験条件下における1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンの親動物に対する無影響量は、雄では50 mg/kg/day、雌では150 mg/kg/dayと判断された。

2. 生殖発生毒性

平均性周期、異常性周期発現率、交尾率、受胎率、妊娠期間、妊娠黄体数、着床痕数、出産児数、出産生児数、性比、哺育4日生児数、出産率、着床率、出生率および新生児の4日の生存率に被験物質投与の影響は認められなかった。また、新生児の外表検査でも被験物質投与の影響は認められず、体重にも群間差は認められなかった。死亡児および哺育4日の剖検では、被験物質投与によると考えられる異常所見は観察されなかった。

以上のことから、1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンの生殖能および次世代児に対する影響はともに450 mg/kg/day投与によっても認められず、無影響量は450 mg/kg/dayと判断された。

文献

- 1) 伊藤義彦, 化学物質毒性試験報告, 3, 387(1996).
- 2) S. Gad and C. S. Weil, "Statistics and Experimental Design For Toxicologists," Telford Press, New Jersey, 1986, pp.43-45.
- 3) 佐野正樹, 医薬安全性研究会会報, 32, 21(1990).
- 4) M. Yoshida, *J. Japanese Soc. Comp. Statist.*, 1, 111 (1988).
- 5) 佐久間昭, "薬効評価 I -計画と解析-", 東京大学出版会, 東京, 1977, pp.109-117.
- 6) 石居進, "生物統計学入門," 培風館, 東京, 1975, pp.78-107.

連絡先

試験責任者: 伊藤圭一
試験担当者: 森山知通, 伊賀達也, 木原 亨
(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: Keiichi Ito (Study director)
Tomomichi Moriyama, Tatsuya Iga,
Tohru Kihara
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shiohinden Arahama, Fukude-cho, Iwata-
gun, Shizuoka, 437-1213, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 1,3-bis (aminomethyl)benzene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level		0 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg	450 mg/kg
Male					
No. of animals examined		12	12	11	9
Body weight	(g)	509 ± 31	510 ± 28	510 ± 45	440 ± 19**
Absolute organ weight					
Thymus	(mg)	277 ± 73	325 ± 71	300 ± 72	199 ± 60*
Adrenals	(mg)	63 ± 9	64 ± 9	63 ± 11	90 ± 14**
Testes	(g)	3.39 ± 0.22	3.53 ± 0.38	3.48 ± 0.20	3.26 ± 0.14
Epididymides	(mg)	1262 ± 84	1350 ± 104	1245 ± 110	1197 ± 112
Relative organ weight					
Thymus	(mg%)	54.23 ± 13.22	63.88 ± 14.15	58.74 ± 12.93	45.09 ± 13.43
Adrenals	(mg%)	12.38 ± 1.93	12.44 ± 1.64	12.32 ± 1.74	20.53 ± 3.26**
Testes	(g%)	0.67 ± 0.05	0.69 ± 0.09	0.69 ± 0.08	0.74 ± 0.03**
Epididymides	(mg%)	248.40 ± 20.66	265.02 ± 22.62	245.94 ± 30.64	271.65 ± 22.20
Female					
No. of animals examined		11	12	12	11
Body weight	(g)	316 ± 28	313 ± 18	306 ± 25	296 ± 17
Absolute organ weight					
Thymus	(mg)	130 ± 56	144 ± 55	116 ± 44	81 ± 23*
Adrenals	(mg)	83 ± 8	80 ± 12	79 ± 10	93 ± 10
Relative organ weight					
Thymus	(mg%)	40.25 ± 14.43	45.52 ± 16.26	37.52 ± 13.51	27.56 ± 8.16
Adrenals	(mg%)	26.37 ± 3.62	25.70 ± 3.85	25.99 ± 3.87	31.45 ± 3.52**

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

Table 2 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 1, 3-bis(aminomethyl)benzene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organ Findings	Dose level (mg/kg) No. of animals necropsied	Male animals				Female animals			
		0	50	150	450	0	50	150	450
HEMATOPOIETIC SYSTEM									
spleen									
hyperplasia		-	-	-	-	-	-	-	1
thymus									
atrophy		0	0	0	0	2	1	0	6
RESPIRATORY SYSTEM									
lung									
accumulation of foamy cells		0	-	-	0	-	-	-	1
bronchopneumonia		1	-	-	1	-	-	-	1
goblet cell metaplasia		0	-	-	1	-	-	-	0
DIGESTIVE SYSTEM									
stomach									
edema		0	0	0	0	0	0	0	1
ulcer, forestomach		0	0	0	9**	0	0	0	9**
fibrosis		0	0	0	0	0	0	0	2
squamous hyperplasia		0	0	0	9**	0	0	0	10**
liver									
capsular thickening		-	-	-	-	1	-	-	-
URINARY SYSTEM									
kidney									
cyst		2	-	-	-	-	-	0	-
REPRODUCTIVE SYSTEM									
ovary									
cyst, brusa		-	-	-	-	2	-	-	0
ENDOCRINE SYSTEM									
adrenal gland									
degeneration, vacuolar		6	6	2	1	0	0	0	0
hyperplasia, cortex		0	0	0	7**	0	0	0	8**

) : No. of animals examined microscopically at this site. - : Not applicable.
 significant difference from control group; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

Table 3 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 1,3-bis(aminomethyl)benzene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organ Findings	Dose level (mg/kg) No. of animals necropsied	Male animals												Female animals																																						
		0			50			150			450			0			50			150			450																													
		T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3																							
HEMATOPOIETIC SYSTEM																																																				
spleen																										(1)																										
hyperplasia		-																								1	0	0																								
thymus																																																				
atrophy		-																								2	0	0	1	0	0	0	0	0	6	0	0															
RESPIRATORY SYSTEM																																																				
lung		(1)															(1)															(2)																				
accumulation of foamy cells		0	0	0	-												0	0	0	-												1	0	0																		
bronchopneumonia		1	0	0	-												1	0	0	-												1	0	0																		
goblet cell metaplasia		0	0	0	-												1	0	0	-												0	0	0																		
DIGESTIVE SYSTEM																																																				
stomach																																																				
edema		-																								0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0												
ulcer, forestomach		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	**																							
fibrosis		-																								0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0									
squamous hyperplasia		0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0																								
liver																										(1)																										
capsular thickening		-																								1	0	0	-																							
URINARY SYSTEM																																																				
kidney																										(2)																										
cyst		2	0	0	-																							-																								
REPRODUCTIVE SYSTEM																																																				
ovary																																																				
cyst, brusa		-																								2	0	0	-																					0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																																																				
adrenal gland																																																				
degeneration, vacuola		6	0	0	6	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0																					
hyperplasia, cortex		0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0																								

T: tumor 1: slight 2: moderate 3: marked

=: benign #: malignant

(): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.

Significant difference from control group; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Table 4 Summary of reproductive performance in rats treated orally with 1,3-bis(aminomethyl)benzene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg	450 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	12	12	12	12
No. of pregnant females	12	12	12	11 ^c
Copulation index (%) ^a	100.0	100.0	100.0	100.0
Fertility index (%) ^b	100.0	100.0	100.0	100.0(11/11) ^c
Estrus cycle				
No. of animals examined	12	12	12	12
Mean estrus cycle(days, Mean ± S.D.)	4.5 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.6(11)	4.2 ± 0.3(11)
Irregular cycle ^c (%) ^d	2(16.7)	1(8.3)	2(16.7)	2(16.7)

a) (No. of animals with successful copulation/no. of animals mated)×100

b) (No. of pregnant animals/no. of animals with successful copulation)×100

c) No. of animals having irregular estrus cycles

d) (No. of animals having irregular estrus cycles/no. of animals examined)×100

e) Excludes the dead female from the calculation, because the pregnancy or non-pregnancy status could not be determined at Day 2 of gestation

Values in parentheses are expressed no. of animals observed

Significant difference from control group; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

Table 5 Findings of delivery in dams treated orally with 1,3-bis(aminomethyl)benzene and observations on their pups (F₁) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg	450 mg/kg
No. of dams observed	12	12	12	11
No. of dams delivered live pups	11	12	12	11
Duration of gestation (Mean ± S.D.)	22.6 ± 0.5	22.7 ± 0.7	22.6 ± 0.5	22.5 ± 0.5
No. of total corpora lutea (Mean ± S.D.)	225(18.8 ± 1.9)	236(19.7 ± 2.9)	237(19.8 ± 4.1)	199(18.1 ± 4.4)
No. of total implants (Mean ± S.D.)	192(16.0 ± 5.2)	190(15.8 ± 2.5)	199(16.6 ± 1.4)	175(15.9 ± 1.8)
No. of total pups born (Mean ± S.D.)	176(16.0 ± 2.1)	170(14.2 ± 3.0)	179(14.9 ± 2.1)	163(14.8 ± 2.1)
No. of total live pups born (Mean ± S.D.)	173(15.7 ± 2.3)	170(14.2 ± 3.0)	179(14.9 ± 2.1)	161(14.6 ± 1.9)
Male	89(8.1 ± 2.3)	97(8.1 ± 2.9)	89(7.4 ± 2.2)	80(7.3 ± 1.6) ^f
Female	84(7.6 ± 2.5) ^e	73(6.1 ± 1.6)	90(7.5 ± 1.7)	81(7.3 ± 2.1) ^f
Sex ratio (Male/Female, Mean ± S.D.)	1.29 ± 0.97	1.45 ± 0.73	1.06 ± 0.46	1.08 ± 0.45
No. of total live pups on day 4 (Mean ± S.D.)				
Male	86(7.8 ± 2.6)	92(7.7 ± 2.5)	83(6.9 ± 2.4)	78(7.1 ± 1.4)
Female	83(7.5 ± 2.6)	69(5.8 ± 1.7)	84(7.0 ± 2.0)	72(6.5 ± 1.4)
No. of total dead pups (Mean ± S.D.)	3(0.3 ± 0.5)	0(0.0 ± 0.0)	0(0.0 ± 0.0)	2(0.2 ± 0.6)
No. of total cannibalism (Mean ± S.D.)	0(0.0 ± 0.0)	0(0.0 ± 0.0)	0(0.0 ± 0.0)	0(0.0 ± 0.0)
Gestation index (%) ^a	91.7	100.0	100.0	100.0
Implantation index (% Mean ± S.D.) ^b	84.3 ± 25.8	81.4 ± 14.1	86.4 ± 13.9	90.8 ± 14.3
Delivery index (% Mean ± S.D.) ^c	92.8 ± 10.9	89.3 ± 10.1	90.0 ± 10.4	92.9 ± 4.7
Live birth index (% Mean ± S.D.) ^d	98.1 ± 3.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	99.0 ± 3.4
Viability index on day 4 (% Mean ± S.D.) ^e				
Male	95.6 ± 10.0	96.5 ± 9.2	92.2 ± 11.7	97.9 ± 4.8
Female	98.2 ± 6.0	94.4 ± 12.0	92.9 ± 15.4	90.6 ± 11.7

a) (No. of females with live pups/no. of pregnant females)×100

b) (No. of implants/no. of corpora lutea)×100

c) (No. of pups born/no. of implants)×100

d) (No. of live pups born/no. of pups born)×100

e) (No. of live pups on day 4 after birth/no. of live pups born)×100

f) Includes pups found after the day of delivery

Significant difference from control group; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 1,3-Bis(aminomethyl)benzene on Bacteria

要約

1,3-ビス(アミノメチル)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, TA1537¹⁾ 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、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、1,3-ビス(アミノメチル)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°C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°C、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〕

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼン(CAS No 1477-55-0)は、分子量136.22の無色透明液体である。純度99.8%のもの(ロット番号: 30817, 不純物として水分 0.018%を含

む、三菱瓦斯化学(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、使用時まで冷蔵所に保管した。

被験物質は、純水に 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。

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンの純水中での安定性試験を、当研究所で同時に実施した染色体異常試験での低濃度(0.825 mg/ml)および本試験での高濃度(50.00 mg/ml)の2濃度について、冷蔵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、98.6および96.2%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結果、3.125 mg/ml溶液の含量は既定濃度に対し104~107%、50 mg/ml溶液は、100~104%であった。以上の結果から、1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンは純水中では安定であり、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°C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 およびトッパアガー 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純水、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〕

1,3-ビス(アミノメチル)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 S9 Mix 無添加、添加試験ともに抗菌性が認められなかった。

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、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。1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンについて、すべての検定菌について、S9 Mix 無添加、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、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。

以上の結果に基づき、1,3-ビス(アミノメチル)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, 加藤基恵,
 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,
 Motoe Katoh, 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 1,3-Bis(aminomethyl)benzene** on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvr</i> A			TA98		TA1537			
S9 Mix (-)	0	123	109	118	11	12	16	13	18	25	34	17	26	8	6	6
		(117 \pm 7.1)			(13 \pm 2.6)			(19 \pm 6.0)			(26 \pm 8.5)		(7 \pm 1.2)			
	312.5	144	106	122	11	15	14	20	28	19	19	24	20	6	10	5
		(124 \pm 19.1)			(13 \pm 2.1)			(22 \pm 4.9)			(21 \pm 2.6)		(7 \pm 2.6)			
	625	92	107	105	14	17	17	14	23	24	25	20	18	2	5	6
		(101 \pm 8.1)			(16 \pm 1.7)			(20 \pm 5.5)			(21 \pm 3.6)		(4 \pm 2.1)			
S9 Mix (+)	1250	111	102	87	10	13	9	19	23	25	21	28	25	5	9	6
		(100 \pm 12.1)			(11 \pm 2.1)			(22 \pm 3.1)			(25 \pm 3.5)		(7 \pm 2.1)			
	2500	104	133	139	12	9	13	20	24	21	24	28	21	14	8	3
		(125 \pm 18.7)			(11 \pm 2.1)			(22 \pm 2.1)			(24 \pm 3.5)		(8 \pm 5.5)			
S9 Mix (+)	5000	92	127	111	6	10	12	23	28	24	22	9	23	7	8	5
		(110 \pm 17.5)			(9 \pm 3.1)			(25 \pm 2.6)			(18 \pm 7.8)		(7 \pm 1.5)			
S9 Mix (+)	0	130	136	123	12	14	10	17	16	22	26	29	28	7	7	8
		(130 \pm 6.5)			(12 \pm 2.0)			(18 \pm 3.2)			(28 \pm 1.5)		(7 \pm 0.6)			
	312.5	133	135	134	17	12	13	20	19	22	29	51	24	8	17	14
		(141 \pm 11.6)			(14 \pm 2.6)			(20 \pm 1.5)			(35 \pm 14.4)		(13 \pm 4.6)			
	625	110	137	126	9	16	8	27	16	34	26	37	22	11	10	8
		(124 \pm 13.6)			(11 \pm 4.4)			(26 \pm 9.1)			(28 \pm 7.8)		(10 \pm 1.5)			
S9 Mix (+)	1250	129	130	118	12	6	13	20	25	27	30	18	30	16	13	10
		(126 \pm 6.7)			(10 \pm 3.8)			(24 \pm 3.6)			(26 \pm 6.9)		(13 \pm 3.0)			
	2500	136	147	125	16	13	12	21	36	31	29	33	44	11	9	14
		(136 \pm 11.0)			(14 \pm 2.1)			(29 \pm 7.6)			(35 \pm 7.8)		(11 \pm 2.5)			
S9 Mix (+)	5000	163	148	161	18	10	16	26	21	19	36	34	18	6	12	8
		(157 \pm 8.1)			(15 \pm 4.2)			(22 \pm 3.6)			(29 \pm 9.9)		(9 \pm 3.1)			
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2		9AA			
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1		80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA		2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5		2			
Positive control S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	500	466	567	160	163	129	129	106	146	874	867	804	916	913	845
		(511 \pm 51.4)			(151 \pm 18.8)			(127 \pm 20.1)			(848 \pm 38.6)		(891 \pm 40.2)			
Positive control S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	939	902	984	217	283	244	979	1116	952	279	358	370	349	367	317
		(942 \pm 41.1)			(248 \pm 33.2)			(1016 \pm 87.9)			(336 \pm 49.4)		(344 \pm 25.3)			

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

**: Purity was 99.8 % and H₂O (0.02 %) was contained as impurity.

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 1,3-Bis(aminomethyl)benzene** 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	136	127	127	9	14	15	28	18	23	24	22	23	15	6	12
		(130± 5.2)			(13± 3.2)			(23± 5.0)			(23± 1.0)			(11± 4.6)		
	312.5	134	136	123	10	8	9	25	22	20	16	16	23	2	9	7
		(131± 7.0)			(9± 1.0)			(22± 2.5)			(18± 4.0)			(6± 3.6)		
	625	146	140	145	16	12	17	22	35	20	26	26	20	10	5	5
		(144± 3.2)			(15± 2.6)			(26± 8.1)			(24± 3.5)			(7± 2.9)		
	1250	126	139	119	14	15	10	27	21	26	17	30	33	5	9	11
	(128± 10.1)			(13± 2.6)			(25± 3.2)			(27± 8.5)			(8± 3.1)			
S9 Mix (+)	2500	151	157	161	9	11	7	27	20	34	20	20	16	4	8	11
		(156± 5.0)			(9± 2.0)			(27± 7.0)			(19± 2.3)			(8± 3.5)		
	5000	155	162	154	11	11	9	36	30	27	35	19	23	5	7	8
	(157± 4.4)			(10± 1.2)			(31± 4.6)			(26± 8.3)			(7± 1.5)			
S9 Mix (-)	0	136	149	134	14	11	15	31	26	37	32	35	28	10	11	13
		(140± 8.1)			(13± 2.1)			(31± 5.5)			(32± 3.5)			(11± 1.5)		
	312.5	130	130	139	10	7	14	32	36	22	33	29	28	8	16	16
		(133± 5.2)			(10± 3.5)			(30± 7.2)			(30± 2.6)			(13± 4.6)		
	625	164	148	149	8	14	19	32	24	30	45	39	27	14	9	11
		(154± 9.0)			(14± 5.5)			(29± 4.2)			(37± 9.2)			(11± 2.5)		
	1250	149	135	140	14	12	13	31	28	30	34	38	36	18	14	17
	(141± 7.1)			(13± 1.0)			(30± 1.5)			(36± 2.0)			(16± 2.1)			
S9 Mix (+)	2500	140	148	175	10	8	9	31	31	29	40	35	29	16	11	14
		(154± 18.3)			(9± 1.0)			(30± 1.2)			(35± 5.5)			(14± 2.5)		
	5000	173	190	185	11	12	15	32	31	35	31	35	35	18	16	10
	(183± 8.7)			(13± 2.1)			(33± 2.1)			(34± 2.3)			(15± 4.2)			
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	628	660	662	185	195	234	221	210	221	758	843	888	1723	1542	1867
		(650± 19.1)			(205± 25.9)			(217± 6.4)			(830± 66.0)			(1711± 162.9)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	648	620	760	345	296	325	951	1175	1053	406	395	400	279	308	356
		(676± 74.1)			(322± 24.6)			(1060± 112.1)			(400± 5.5)			(314± 38.9)		

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

** : Purity was 99.8 % and H O (0.02 %) was contained as impurity.

1,3-ビス(アミノメチル)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 1,3-Bis(aminomethyl)benzene on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検に係る毒性試験調査事業の一環として、1,3-ビス(アミノメチル)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/TU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(24および48時間)、短時間処理(6時間)のS9 mix 非存在下においては、50%を越える増殖抑制濃度、すなわち0.33 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。また、短時間処理のS9 mix 存在下では、50%を越える増殖抑制濃度、すなわち0.47 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。

CHL/TU細胞を24時間および48時間連続処理した高濃度群(0.33 mg/ml)において、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群においては、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、1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/TU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/TU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(日本製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/TU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インキュベーター(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

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼン(略号: BAB, CAS No.: 1477-55-0, ロット番号: 30817, 三菱瓦斯化学(株)製造, (社)日本化学工業協会提供)は、無色透明液体で、水、アセトンおよびジメチルスルホキシドに可溶、融点14.1°C、沸点247°C、蒸気圧 1.6×10^{-3} mmHg(25°C)、分子式C₈H₁₂N₂、分子量136.22、純度99.8%(不純物を0.2%含む、うち水分(0.018%))の物質である。被験物質原体は安定であり、溶媒中(注射用水および純水)では、0.825~50.00 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。溶媒は注射用水((株)大塚製薬工場)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の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(溶媒中の平均含量が添加量の90.0~110%)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/TU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、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度(約60%の増殖抑制濃度)は、60%の増殖抑制濃度をはさむ2濃度より算出したところ、0.28 mg/mlであった。短時間処理のS9 mix 存在下およびS9 mix 非

存在下における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度は、それぞれ、0.47 mg/ml および 0.33 mg/ml であった (Fig. 1).

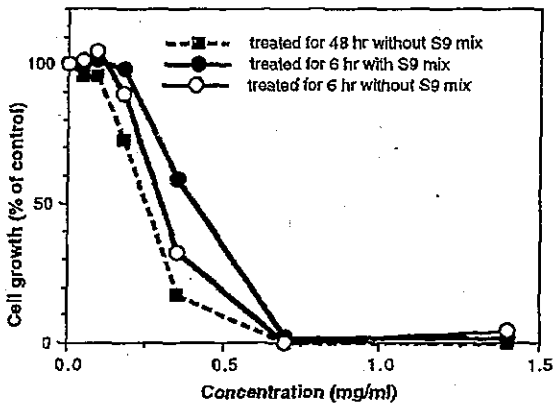


Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,3-bis(aminomethyl)benzene

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、連続処理および短時間処理のS9 mix 非存在下では 0.33 mg/ml、短時間処理のS9 mix 存在下では 0.47 mg/ml 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CMC、協和醸造工業(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⁹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、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、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、ソイツシャーの exact probability test 法により、溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定 ($p < 0.05$) 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。

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンを加えて24時間および48時間連続処理した高濃度群(0.33 mg/ml)では、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかった。特に24時間連続処理では、構造異常が誘発(gapを含み27.3%)されたが、観察可能な細胞は33細胞と極端に少なく評価することができなかった。その他の処理群においては、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。

1,3-ビス(アミノメチル)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、1,3-ビス(アミノメチル)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.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 1,3-bis(aminomethyl)benzene (BAB)**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 ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
Solvent	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
BAB	0.08	24	200	0	1	1	0	0	1	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13	-	-
BAB	0.17	24	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	-	-
BAB	0.33	24	33	2	10	11	0	0	1	0	24	0	9*(27.3)	8*(24.2)	0.00 ⁶⁾	Tox	Tox
MC	0.00005	24	200	10	46	124	6	2	2	0	190	3	97*(48.5)	96*(48.0)	0.00	+	-
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
BAB	0.08	48	200	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	-	-
BAB	0.17	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50	-	-
BAB	0.33	48	38	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	2.90 ⁷⁾	Tox	Tox
MC	0.00005	48	200	0	34	124	14	3	8	20	203	15	101*(50.5)	101*(50.5)	0.38	+	-

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, Tox : toxic. 1) Water for injection 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). 6) Seventy-six cells were analysed. 7) Sixty-nine cells were analysed. * : Significantly different from solvent control at p<0.05. ** : Purity was 99.8%, water(0.018%) was contained as impurity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1,3-bis(aminomethyl)benzene (BAB)** 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 ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			
Solvent	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			
BAB	0.08	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	-	-	
BAB	0.17	-	6-(18)	200	0	0	1	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	-	-	
BAB	0.33	-	6-(18)	200	1	3	0	0	0	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13 ⁶⁾	-	-	
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	-	-	
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25			
BAB	0.12	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	-	-	
BAB	0.24	+	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	-	-	
BAB	0.47	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	-	-	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	4	58	110	3	4	1	30	210	0	94*(47.0)	93*(46.5)	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) Water for injection 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). 6) Seven hundred and ninety-four cells were analysed. * : Significantly different from solvent control at p<0.05. ** : Purity was 99.8%, water(0.018%) was contained as impurity.

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 Nakagawa, 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