

トリイソブチレ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 Triisobutylene in Rats

要約

既存化学物質の安全性を評価するため、トリイソブチレンを雌雄のC₅₇:CD(SD)系ラットに単回経口投与し、急性毒性を検討した。なお、投与量は雌雄ともに2,000 mg/kgとした。

上記の試験は、OECD毒性試験ガイドライン401 (1987年2月24日)に従い、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号(昭和63年11月18日)の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」に基づいて実施したものである。

試験の結果、死亡例は雌雄ともに認められず、LD₅₀値は2,000 mg/kg以上と推定された。一般状態の観察では、雌雄ともに自発運動低下および下痢がみられ、さらに雄で軟便が認められた。投与後の体重は、雌雄とも観察終了時まで順調に増加した。観察終了時の剖検では、雌雄ともに肉眼的異常は認められなかった。

方法

1. 被験物質

トリイソブチレン (CAS No.7756-94-7, 別名: イソブチレントリマー、丸善石油化学(株)製造、(社)日本化学工業協会提供)は無色透明の液体で非水溶性、分子式C₁₂H₂₄、分子量168.3の物質である。本試験に用いたロット227606の純度は99.13%以上であった。

2. 供試動物

5週齢のC₅₇:CD(SD)系ラット(SPF)雌雄各30匹を日本チャールス・リバー(株)(神奈川県厚木市)から購入した。動物は、8日間検疫・馴化飼育した後、6週齢で投与に用いた。投与時の体重は、雄で164~171g、雌で128~132gであった。

3. 飼育

動物は、温度21~25℃、湿度45~65%、換気回数20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)に設定された飼育室(W3.6×D10×H2.5 m, 90 m³)で、(株)東京技研サービス(東京都府中市)の自動水洗式飼育機(W745.0×D50.0×H182.0 cm)を使用し、金属製網目飼育ケージ(W21.5×D27.5×H19.5 cm, 飼育ケージ・スペース11,529 cm³)に5匹ずつ収容して飼育した。飼育ケージおよび給餌器は週1回取り換えた。動物には、オリエンタル酵母工業(株)(東京都中央区)製造の固型飼料MFを自由に摂取させ、飲料水としては、水道水を自由に摂取させた。

4. 用量設定理由

本試験に先立ち、雌雄各3匹のラットを用いて予備試験を実施した結果、2,000 mg/kgの投与では死亡例は認められなかった。この結果を参考にして、本試験ではOECDガイドラインに従って雌雄ともに2,000 mg/kgの1用量を設定した。

5. 投与液の調製および投与方法

所定量の被験物質をコーンオイル(ナカライテスク(株)、京都府京都市)に溶解し、20w/v%液を調製した。

投与経路は、経口とし、投与前16時間絶食させた動物に上述の被験物質溶液を注射ポンプおよび胃ゾンデを用い、投与した。

投与容量は体重100gあたり1mlとし、個体別に測定した体重に基づいて算出した。

給餌は被験物質投与後3時間に行った。

6. 一般状態の観察

中毒症状および生死の観察は、投与後6時間までは1時間間隔、以後1日2回午前と午後(休日は午前のみ)14日間にわたって実施した。

7. 体重

体重は投与直前、投与後7および14日に測定した。

8. 病理解剖

観察終了時に全個体をエーテル麻酔後放血安楽死させ解剖し、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。

結果および考察

1. 死亡率およびLD₅₀値

死亡動物は、雌雄いずれの群にも認められず、従ってLD₅₀値は雌雄ともに2,000 mg/kg以上と推定された。

2. 一般状態

一般状態の観察では、投与後2から3時間に自発運動低下が雄1例および雌3例にみられ、さらに投与後3から5時間に下痢あるいは軟便が雄4例および雌全例に認められた。これらの症状は比較的軽度で、投与後2日までに全て消失した。

単回投与毒性試験

3. 体重

投与後7および14日の体重測定では、いずれも1週間前の測定値に比較して雌雄の全例に増加が認められた。

4. 剖検所見

観察終了時における剖検では、雌雄ともに肉眼的異常は認められなかった。

Table 1 Mortality and LD₅₀ values in rats after single administration of Triisobutylene

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Mortality (mg/kg)	LD ₅₀ values
Male	2,000	5	0/5	>2,000
Femal	2,000	5	0/5	>2,000

連絡先

試験責任者：大庭耕輔
試験担当者：藤島 敦
(財) 食品農医薬品安全性評価センター
〒437-12 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: Kousuke Oba (Study director),
Atsushi Fujishima
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-Pyo Center)
582-2 Shioshinden Arahama, Fukude-cho, Iwata-gun,
Shizuoka, 437-12, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

トリイソブチレ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 Triisobutylene in Rats

要約

OECDを中心にして、既存化学物質点検作業が実施されているが、日本独自の点検作業としてトリイソブチレンの毒性を明らかにするため、SD系ラットを用いた強制経口投与による28日間反復投与毒性試験を実施した。本試験は、環保業第700号、薬発第1039号、61基局第1014号（昭和61年12月5日）の「新規化学物質に係る試験の方法について」に準拠し、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」に基づいて実施したものである。

ラットは1群雌雄各5匹で対照群を含む4群、さらに対照群および高用量群には雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

トリイソブチレンは、コーン油に溶解し、0, 30, 150 および750 mg/kgを毎日1回、4週間連続経口投与し、一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、血液生化学的検査、血液凝固能検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量測定および病理学的検査を行った。なお、回復期間は2週間とし、投与終了時と同様な検査を実施した。

その結果は、次のとおりである。

一般状態の観察では、雌雄の750 mg/kg群で少数例に流涎が認められたが、投与前の一過性の発現であることから、被験物質の直接的影響とは判断されなかった。

体重および摂餌量には、雌雄とも被験物質投与による影響が認められなかった。

血液学的検査の結果、雌の150および750 mg/kg群で赤血球数が僅かに低値を示し、さらに雌の750 mg/kg群でプロトロンビン時間が僅かに短縮した。

血液生化学検査の結果、750 mg/kg群の雌雄でアルブミンが高値を示し、さらに雄でクレアチニンの高値が、雌でGOTの低値が認められた。

尿検査の結果、雌雄の750 mg/kg群で尿量の増加、尿比重の低値が認められた。

器官重量測定の結果、雄の150 mg/kg群および雌雄の750 mg/kg群で肝臓の実重量または相対重量の高値が認められ、さらに雄の150および750 mg/kg群で腎臓の実重量または相対重量の高値が、雌の750 mg/kg群で脾臓の実重量および相対重量の低値が認められた。

病理学的検査の結果、発生率の上から被験物質投与によると示唆される病変は、剖検所見では雌雄の750 mg/kg群の全例に見られた肝臓の肥大と雄の150 mg/kg群の5例中1例と750 mg/kg群の全例に見られた腎臓の肥大と淡色化であった。また、組織学的所見では雌雄150および750 mg/kg群で肝細胞腫脹が、雄のすべての投与群で腎臓の

好酸性小体の出現が観察された。これらの変化はいずれも可逆的な変化と考えられた。

以上の結果、中毒量は雌雄とも150 mg/kg、無影響量は雌雄とも30 mg/kgと判断された。

材料および方法

1. 被験物質

トリイソブチレン (CAS No. 7756-94-7, 別名: イソブチレントリマー, 丸善石油化学(株)製造, (社)日本化学工業協会提供) は無色透明の液体で、非水溶性、分子式 $C_{12}H_{24}$, 分子量168.3の物質である。本試験に用いたロット227606の純度は99wt%以上であった。

2. 供試動物

供試したラット [Cj: CD(SD)系, SPF] は日本チャールス・リバー(株) (神奈川県厚木市) から4週齢で購入した。

動物を検収後、試験環境に9日間馴化させた後、6週齢で投与を開始した。動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした。動物の識別は、個別飼育ケージに動物標識番号 (Animal ID-No.) を付すことにより行った。投与開始時の体重は雄で130~141 g, 雌で113~127 gであった。

3. 飼育条件

動物はバリアシステムの飼育室 (W 4.2×D 8.2×H 2.5 m, 86.1 m³) で飼育し、環境調節の目標値は温度23±2℃, 相対湿度55±10%, 換気回数20回/時, 照明150~300 lux, 12時間 (午前7時点灯, 午後7時消灯) とした。

(株)東京技研サービス (東京都府中市) の水洗式飼育機 (W 674.2×D 48.0×H 175.5 cm) を使用し、金属製前面・床網目飼育ケージ (W 20.0×D 28.2×H 18.0 cm, 飼育ケージ・スペース 10,152cm²) に動物を1匹ずつ収容し、オリエンタル酵母工業(株) (東京都中央区) 製造の放射線滅菌改良NIH公開ラット・マウス飼料および水道水を自由に摂取させた。飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回取り換えた。

なお、動物の馴化期間を含め、投与および回復期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

4. 試験群の構成

試験群の構成は1群雌雄各5匹とし、0および750 mg/kg群に雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

[用量設定理由]

用量設定のための2週間投与による予備試験を0, 100, 300および1,000 mg/kg/dayの4用量で実施した。その結果、雄の300および1,000 mg/kg群、雌の1,000 mg/kg群で肝臓の実重量および相対重量に高値が認められた。本試験では雌雄とも700~800 mg/kgで確実な影響がでることが推察され、無影響量は予備試験の低用量の1/2~1/3程度と推察された。以上のことから、本試験の最高用量を750 mg/kgと設定し、以下公比5で除し中用量を150 mg/kg、低用量を30 mg/kgに設定した。別に担体（コーン油）のみを投与する対照群を設けた。

5. 投与方法

被験物質の投与経路は経口とした。被験物質はコーン油に溶解し、胃ゾンデを用いて経口投与した。投与容量は体重100 g当り0.5 mlとした。対照群には担体のみ投与した。

6. 投与液の調製、分析

被験物質は、各用量（30, 150および750 mg/kg）ごとに所定量を精秤し、コーン油（ナカライテスク（株））に溶解した。投与液は調製後、冷蔵庫保存で1週間安定であることが確認されているので、本試験においては毎週1回調製を行った。投与液の濃度分析をすべての群に関し投与1および4週の調製液について実施した結果、設定濃度の92.7~105%の範囲であり、適切に調製されていた。

7. 投与期間

投与期間は28日間とし、投与終了後0および750 mg/kg群について2週間の回復試験を実施した。

8. 観察、測定および検査

1) 一般状態の観察

全動物を毎日午前、午後の2回（休日は1回）観察し、中毒症状の有無、行動異常、死期の迫った動物および死亡動物の有無等を記録した。

2) 体重

投与開始から回復試験終了時まで、毎週1回測定した。

3) 摂餌量

毎週1回給餌した残量を測定し、飼料摂取量(g/week)を算出した。

4) 臨床検査

投与終了時および回復期間終了時の計2回実施した。採血するに当り、動物は約16時間絶食させた。動物をエーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。

a. 血液学的検査

検査にはEDTA-3Kを添加した初血を用いた。白血球数（WBC：暗視野板法）、赤血球数（RBC：暗視野板法）、ヘモグロビン量（HGB：シアンメトヘモグロビン法）、ヘマトクリット値（HCT：全赤血球の容積より補正）、平均赤血球容積（MCV：RBC, HCTより算出）、平均赤血球色素量（MCH：HGB, RBCより算出）、平均赤血球色素濃度（MCHC：HGB, HCTより

算出）、血小板数（PLT：暗視野板法）および白血球百分率（フローサイトケミストリー法）を血液自動分析装置THMS H6000（米国テクニコン社）を用いて測定した。

網赤血球（RC）率算定用に、全血をキャピロット（テルモ（株）、東京都渋谷区）で染色後、血液塗抹標本作製し保管した。

また、クエン酸ソーダ添加血液の血漿について、プロトロンビン時間（Quick I 段法）、活性化部分トロンボプラスチン時間（クロット法）およびフィブリノーゲン量（トロンビン時間法）を血液凝固自動測定装置 KC-40（独国 Amelung 社）を用いて測定した。

b. 血液生化学検査

血清を用いて、総蛋白（ビュレット法）、アルブミン（B.C.G.法）、A/G比（計算値）、血糖（グルコースオキシダーゼ法）、中性脂肪（酵素法）、総コレステロール（酵素法）、尿素窒素（BUN：ウレアーゼ改良法）、総ビリルビン（ジアゾ色素法）、カルシウム（アルセナソⅢ色素法）、無機リン（モリブデン酸アンモニウム法）、ナトリウム（電極法）、カリウム（電極法）および塩素（電極法）をEKTACHEM 700N（米国コダック社）で、クレアチニン（アルカリ性ピクリン酸比色法）、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT：Karmen改良法）、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（GPT：Karmen改良法）、 γ -グルタミルトランスアミナーゼ（ γ -GTP：Szasz改良法）およびアルカリホスファターゼ（ALP：Bessey-Lowry-Brock改良法）をCentrifiChem ENCORE II（米国ベーカー社）で測定した。

c. 尿検査

血液学検査に先立ち、採尿器を用いて24時間（午前10時から翌日午前10時まで）尿を採取し、尿量、色調および濁度を検査後、尿比重計UR-S（（株）アタゴ、東京都板橋区）を用いて尿比重を測定した。また、尿を遠心分離後Sternheimer変法により沈渣を染色し、鏡検した。pH、潜血、ケトン体、糖、蛋白、ビリルビンおよびウロビリノーゲンについて、N-マルティスティックスSG試験紙（マイルス・三共（株）、東京都中央区）およびCLINITEK 200（米国マイルス社）を用いて測定した。

5) 病理学検査

病理解剖は投与終了時および回復期間終了時に動物をエーテル麻酔し、放血致死させ実施した。肉眼的異常を病理解剖所見記録シートに記録した。また、脳、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および卵巣について重量を測定し、器官重量・体重比を算出した。上記重量測定器官と下垂体、眼球、甲状腺（上皮小体を含む）、心臓、肺、胃、膀胱、骨髄（大腿骨）および肉眼所見で変化が認められた器官・組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

病理組織学検査は固定した器官・組織のうち、対照群と高用量群の心臓、肝臓、脾臓、腎臓および副腎について行った。常法に従って薄切標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色し鏡検した。

6) データの記録および統計分析

各試験群の体重、飼料効率、血液学的検査値、生化学検査値、尿検査値（尿量および尿比重のみ）、器官重量および器官重量・体重比は、下記に示した自動判別方式

に従い、最初にBartlettの等分散検定を実施した。等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、分散が有意で各群の標本数が同数の場合はDunnnettの多重比較検定、各群の標本数が異なる場合はDuncanの多重範囲検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。Bartlettの等分散検定で不等分散の場合はkruskal-Wallisの順位検定を実施し、有意の場合はノンパラメトリックのDunnnettの多重比較検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。

なお、用量相関性については、Jonckheereの傾向検定を用いて有意差を検定した。

有意水準は5および1%の片側検定で実施した

試験結果

1. 死亡率

投与期間中、雌雄とも対照群を含むすべての群で死亡例は認められなかった。また、回復期間中、雌雄とも対照群および750 mg/kg群で死亡例は認められなかった。

2. 一般状態

投与4週に、750 mg/kg群の雄2例、雌1例に流涎が認められた。

回復期間中では回復1週に雌の750 mg/kg群の1例に流涎が認められたが、2週には消失した。その他、雌雄いずれの群にも異常動物は観察されなかった。なお、流涎はいずれも投与直前に認められ、投与後は消失した。

3. 体重

雌雄とも投与および回復期間を通じて群間で差が認められず、投与期間中(0~4週)の体重増加量に差はなかった。回復期間中(4~6週)の体重増加量は雌雄とも750 mg/kg群で対照群に比較して僅かに低値であった。

4. 摂餌量

雌雄いずれの被験物質投与群も投与期間を通じて対照群と差がなかった。また、回復期間中、雌雄の750 mg/kg群は対照群と差がなかった。

5. 血液学的検査 (Table 1)

投与終了時の結果

雄では、検査したすべての項目について、いずれの被験物質投与群も対照群との間に差が認められなかった。

雌では、150および750 mg/kg群で対照群に比較して、赤血球数が僅かに低値を示した。回復試験終了時の結果雄では、対照群と750 mg/kg群で差の認められた項目はなかった。

雌では、750 mg/kg群で対照群に比較して、血小板数が高値を示したが、むしろ対照群の値が低値によるための有意差であった。

6. 血液凝固能検査 (Table 1)

投与終了時の結果

雄では、いずれの被験物質投与群ともプロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間およびフィブリノーゲン量で対照群と差がなかった。

雌では、750 mg/kg群で対照群に比較してプロトロンビ

ン時間が僅かに短縮を示した。

回復試験終了時の結果

雌雄の750 mg/kg群は、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間およびフィブリノーゲン量とも対照群と差がなかった。

7. 血液生化学検査 (Table 2)

投与終了時の結果

雄では、750 mg/kg群で対照群に比較して、クレアチニンおよびアルブミンが、高値を示した。その他、30および150 mg/kg群で対照群に比較して塩素が高値を示したが、用量相関性のない変化であった。

雌では、750 mg/kg群で対照群に比較して、アルブミンが高値を示し、GOTが低値を示した。

回復試験終了時の結果

雄では、750 mg/kg群で対照群に比較してGPTが高値を示し、雌では750 mg/kg群で対照群に比較してGOTが低値を、塩素が高値を示したが、いずれも生理的変動の範囲内の値であった。

8. 尿検査 (Table 3)

投与終了時の結果

雌雄の750 mg/kg群で対照群に比較して尿量が増加し、比重が低値を示した。その他は、雌雄とも投与群と対照群との間で差の認められた項目はなかった。

回復試験終了時の結果

雌雄とも750 mg/kg群はすべての検査項目で対照群との間に差は認められなかった。

9. 器官重量 (Table 4)

投与終了時の結果

雄では、750 mg/kg群で対照群に比較して肝臓および腎臓重量が高値を示した。その他、すべての投与群で対照群に比較して副腎重量が低値を示したが、生理的変動の範囲内の値であった(背景値 53 ± 7 mg; n=40)。

雌では、750 mg/kg群で対照群に比較して肝臓重量が高値を示し、脾臓重量が低値を示した。その他、30 mg/kg群で脾臓重量が低値であったが、用量相関性のない変化であった。

回復試験終了時の結果

雌雄とも750 mg/kg群と対照群との間で重量に差の認められた器官はなかった。

10. 器官重量・体重比(相対重量) (Table 4)

投与終了時の結果

雄では150および750 mg/kg群で対照群に比較して肝臓および腎臓相対重量が高値を示した。

雌では、750 mg/kg群で対照群に比較して肝臓相対重量が高値を示し、脾臓相対重量が低値を示した。その他、30 mg/kg群でも脾臓相対重量が低値を示したが、用量相関性のない変化であった。

Table 1 Hematology of rats treated orally with triisobutylene in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	150	750	0	750
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
HCT (%)	43.3±1.5	43.5±1.7	43.3±1.0	42.6±1.4	47.8±1.4	47.3±1.4
HGB (g/dl)	14.3±0.5	14.2±0.5	14.1±0.5	13.9±0.5	15.0±0.4	14.6±0.4
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	7.01±0.21	7.05±0.44	6.95±0.32	6.95±0.18	8.13±0.27	7.84±0.30
MCV (μm ³)	61.8±2.4	61.8±2.4	62.3±1.5	61.3±1.3	58.9±1.9	60.4±0.9
MCH (pg)	20.4±0.5	20.2±0.8	20.3±0.3	20.0±0.4	18.4±0.4	18.7±0.3
MCHC (%)	33.1±0.6	32.6±0.2	32.5±0.4	32.6±0.3	31.3±0.5	30.9±0.2
PLT (x10 ³ /mm ³)	1252±108	1298±216	1310±159	1415±157	1280±144	1304±171
WBC (x10 ³ /mm ³)	11.1±2.2	10.5±1.7	8.1±1.4	9.8±1.2	11.1±2.6	11.5±2.7
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	11±3	15±8	13±3	13±3	14±2	12±2
LYMPH	86±2	82±8	85±4	85±3	83±3	85±3
MONO	2±1	2±0	1±1	1±1	2±1	2±1
EOSN	1±0	1±0	1±1	1±0	1±0	1±0
BASO	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
LUC	1±0	1±0	0±1	1±0	1±0	1±0
PT (sec.)	14.9±0.5	15.2±1.0	14.4±0.4	14.4±0.3	14.6±0.5	14.0±0.8
APTT (sec.)	27.2±1.6	26.7±2.3	25.5±1.2	26.4±2.0	26.9±1.9	26.3±2.2
Fibrinogen (mg/dl)	204±18N	240±63	201±18	220±22	221±12	218±11
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
HCT (%)	44.4±0.8	43.6±1.1	43.6±1.1	42.2±1.9	47.1±2.2	45.7±1.3
HGB (g/dl)	14.2±0.3	14.0±0.4	14.0±0.3	13.6±0.6	14.2±0.6	13.8±0.4
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	7.38±0.18	7.19±0.20	7.02±0.22*	7.00±0.24*	7.80±0.26	7.54±0.14
MCV (μm ³)	60.2±0.9	60.7±2.2	62.1±1.8	60.3±1.2	60.4±1.4	60.7±1.5
MCH (pg)	19.3±0.3	19.6±0.6	19.9±0.5	19.4±0.4	18.1±0.4	18.3±0.7
MCHC (%)	32.1±0.4	32.3±0.6	32.1±0.2	32.2±0.5	30.0±0.2	30.2±0.7
PLT (x10 ³ /mm ³)	1329±75	1353±125	1302±145	1400±68	1160±55	1405±98**
WBC (x10 ³ /mm ³)	7.2±1.6	5.9±1.6	6.9±2.3	6.2±0.6	7.5±1.7	6.0±2.7
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	14±5	16±6	14±5	11±3	11±4	11±2
LYMPH	83±5	81±5	83±6	86±3	86±4	87±2
MONO	1±0	1±0	1±0	1±0	1±1	1±0
EOSN	2±1	2±1	2±1	1±0	1±0	1±0
BASO	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
LUC	1±1	0±1	0±0	0±0	0±1	0±0
PT (sec.)	15.0±0.3	14.8±0.4	15.4±0.4	13.8±0.7**	15.2±0.6	15.2±0.8
APTT (sec.)	25.2±0.9	23.2±1.2	24.8±1.6	23.6±1.2	23.1±1.6	23.3±1.9
Fibrinogen (mg/dl)	163±17	147±15	163±17	187±23	174±6	180±19

NEUT:Neutrophil LYMPH:Lymphocyte MONO:Monocyte EOSN:Eosinophil BASO:Basophil LUC:Large unstained cells

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group; *: P≤0.05 **: P≤0.01

N: Non parametric analysis

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with triisobutylene in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	150	750	0	750
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
BUN (mg/dl)	10.1±2.4	9.4±1.4	8.8±1.2	11.3±1.2	11.0±1.3	12.8±3.2
Creatinine (mg/dl)	0.60±0.04	0.63±0.04	0.66±0.0	0.77±0.07**	0.54±0.09	0.55±0.08
T.cholesterol (mg/dl)	44±14	42±11	41±10	44±10	48±9	54±13
T.protein (g/dl)	5.18±0.14	5.26±0.26	5.29±0.15	5.48±0.12	5.42±0.08	5.43±0.09
Albumin (g/dl)	3.11±0.11	3.07±0.09	3.19±0.08	3.38±0.10**	3.21±0.07	3.17±0.07
A/G	1.51±0.10N	1.41±0.10	1.51±0.02	1.61±0.07	1.45±0.10	1.41±0.06
Glucose (mg/dl)	105±16	124±19	127±11	121±29	148±13	141±18
Triglyceride (mg/dl)	38.6±4.9	49.1±16.6	40.2±10.1	28.8±5.8	48.3±6.2	50.6±8.3
T.bilirubin (mg/dl)	0.13±0.04	0.12±0.03	0.13±0.02	0.17±0.02	0.13±0.03	0.11±0.02
GOT (U/l)	58±8	59±7	51±6	49±8	47±5	44±7
GPT (U/l)	10±3	13±3	14±6	14±3	14±3	21±5*
ALP (U/l)	172±67	186±23	187±36	164±43	110±31	135±23
Gamma-GTP (U/l)	0.5±0.2N	1.5±1.2	1.0±1.3	0.6±0.3	1.0±1.1N	0.2±0.1
Sodium (mmol/l)	141.5±1.6	143.4±2.0	144.2±0.9	143.5±1.0	140.6±0.7	140.6±0.8
Potassium (mmol/l)	4.61±0.28	4.73±0.22	4.84±0.36	4.75±0.38	4.94±0.17	4.86±0.31
Chloride (mmol/l)	103.8±1.3	107.2±1.4**	106.7±0.9**	104.0±1.1	105.3±1.8	105.7±1.4
Calcium (mg/dl)	9.51±0.10	9.36±0.13	9.37±0.06	9.37±0.22	9.53±0.18	9.49±0.13
I.phosphate (mg/dl)	8.47±0.41	7.71±0.48	7.98±0.79	8.06±0.56	7.68±0.56	7.37±0.19
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
BUN (mg/dl)	14.0±1.6N	14.0±3.4	12.7±2.7	12.1±0.4	15.7±4.1N	15.1±1.1
Creatinine (mg/dl)	0.60±0.06	0.60±0.07	0.61±0.04	0.65±0.06	0.57±0.04	0.54±0.05
T.cholesterol (mg/dl)	49±4N	53±9	44±14	68±21	66±9	71±12
T.protein (g/dl)	5.77±0.31	5.61±0.23	5.58±0.19	6.18±0.42	5.86±0.18	5.94±0.29
Albumin (g/dl)	3.62±0.27	3.53±0.09	3.46±0.15	4.00±0.33*	3.54±0.20	3.61±0.23
A/G	1.70±0.18	1.71±0.11	1.64±0.08	1.84±0.14	1.53±0.13	1.54±0.08
Glucose (mg/dl)	105±9	114±23	105±11	125±23	131±20	126±26
Triglyceride (mg/dl)	35.1±6.2	28.9±5.1	27.2±4.5	43.3±14.2	42.3±8.2	41.4±14.0
T.bilirubin (mg/dl)	0.15±0.05	0.12±0.03	0.13±0.03	0.19±0.02	0.19±0.05	0.16±0.03
GOT (U/l)	57±10	51±8	52±3	35±6**	49±3	42±6*
GPT (U/l)	15±3	13±3	13±2	11±3	15±5	9±5
ALP (U/l)	88±10	119±32	114±27	113±39	86±15	75±22
Gamma-GTP (U/l)	1.6±1.4	1.9±1.3	0.9±0.8	1.2±0.4	0.7±0.2	0.6±0.2
Sodium (mmol/l)	143.0±1.1	143.0±0.9	143.8±0.6	143.6±1.0	141.4±1.2	142.4±1.3
Potassium (mmol/l)	4.54±0.28	4.24±0.23	4.26±0.39	4.59±0.37	4.52±0.24	4.50±0.33
Chloride (mmol/l)	108.9±1.7	109.5±1.7	110.2±1.3	107.5±0.7	107.3±2.0N	109.5±0.2*
Calcium (mg/dl)	9.90±0.20	9.60±0.24	9.71±0.28	10.12±0.29	9.52±0.13	9.60±0.15
I.phosphate (mg/dl)	6.42±0.42	6.52±0.44	6.63±0.73	7.41±0.63	6.24±0.40	6.22±0.55

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group; *: P≤0.05 **: P≤0.01

N: Non parametric analysis

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with triisobutylene in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	150	750	0	750
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Volume (ml)	7±2	9±2	6±3	14±4**	8±2	10±2
Specific Gravity	1.076±0.024	1.060±0.013	1.085±0.028	1.047±0.009*	1.076±0.023	1.058±0.014
Color						
	Slight yellow	3	5	5	5	5
	Yellow-brown	2	0	0	0	0
Turbidity	Clear	5	5	5	5	5
pH	6.5	2	1	0	1	0
	7	1	1	2	1	0
	7.5	1	2	3	2	1
	8	1	1	0	1	4
Occult Blood	-	5	5	5	4	4
	+/-	0	0	0	1	0
	1+	0	0	0	0	1
Ketones	-	2	1	0	1	1
	+/-	1	4	2	2	1
	1+	2	0	3	2	3
Glucose (g/dl)	-	5	5	5	5	5
Protein (mg/dl)	+/-	1	0	0	0	1
	30	2	3	0	1	1
	100	1	2	5	1	2
	≥300	1	0	0	3	1
Bilirubin	-	4	5	2	3	4
	1+	1	0	3	2	1
Urobilinogen (E.U./dl)	0.1	2	2	0	2	2
	1.0	3	3	5	3	3
Erythrocytes	-	5	5	5	5	5
Leukocytes	-	3	3	3	1	3
	1+	2	2	2	2	2
	2+	0	0	0	2	0
Epith. Cells	-	5	5	5	5	4
	1+	0	0	0	0	1
Casts	-	5	5	5	5	5
	+	0	0	0	0	0
Fat glob.	-	5	5	5	5	5
M. threads	-	5	5	5	5	5
others	-	0	0	0	5	0
	+	5	5	5	0	5

Fat glob. : Fat globule, M. threads : Mucous threads, others : Crystals

Values of volume and specific gravity are expressed as Mean±S.D., other values are expressed as No. of animals

Significant difference from control group; *: P≤0.05 **: P≤0.01

Table 3 (Continued)

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	150	750	0	750
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Volume (ml)	5±1	4±1	6±1	10±1**	6±2	6±2
Specific Gravity	1.082±0.015	1.089±0.022	1.076±0.015	1.043±0.004**	1.080±0.031	1.076±0.022
Color	Slight yellow	5	5	5	5	5
Turbidity	Clear	5	5	5	5	5
pH	5	0	0	1	0	0
	6	2	1	1	0	0
	6.5	0	2	0	0	0
	7	1	1	2	1	1
	7.5	0	0	1	1	2
Occult Blood	-	5	5	5	5	4
	+/-	0	0	0	0	1
Ketone	-	1	2	1	0	3
	+/-	3	1	2	5	2
	1+	1	2	2	0	0
Glucose (g/dl)	-	5	5	5	5	5
Protein (mg/dl)	-	0	0	1	0	1
	+/-	0	1	0	0	1
	30	3	1	2	3	1
	100	2	1	1	2	2
	≥300	0	2	1	0	0
Bilirubin	-	4	4	3	4	3
	1+	1	1	2	1	2
Urobilinogen (E.U./dl)	0.1	1	0	1	2	1
Erythrocytes	1.0	4	5	4	3	4
	-	5	5	4	5	4
Leukocytes	1+	0	0	1	0	1
	-	1	0	1	3	1
	1+	1	4	4	2	2
	2+	3	0	0	0	2
Epith. Cells	3+	0	1	0	0	0
	-	5	5	5	3	4
	1+	0	0	0	2	1
Casts	-	5	5	5	4	4
	+	0	0	0	1	1
Fat glob.	-	5	5	5	5	5
M. threads	-	5	5	5	5	5
others	-	0	0	1	5	0
	+	5	5	4	0	5

Fat glob. : Fat globule , M. threads : Mucous threads , others : Crystals

Values of volume and specific gravity are expressed as Mean±S.D. , other values are expressed as No. of animals

Significant difference from control group; **: P≤0.01

28日間反復投与毒性試験

回復試験終了時の結果

雄の750mg/kg群で、対照群に比較して脳および精巣相対重量が高値を示したが、むしろ対照群が低値傾向であり、両群両器官とも生理的変動の範囲内の値であった。

区域、胸水および肝臓の有色斑/区域が各群に単発性あるいは少数例に発生した。

回復試験終了時の剖検において、被験物質投与によると示唆される病変は認められず、腎臓の癍痕が雄の750 mg/kg群に1例観察されたのみであった。

11. 病理学的検査

a) 剖検所見 (Table 5)

投与終了時の剖検において、被験物質投与によると示唆される病変として、肝臓の肥大が雌雄の750mg/kg群で全例に、腎臓の肥大および淡色化が150 mg/kg群の雄で1例、750 mg/kg群では雄の全例および雌の1例に観察された。

その他の病変として、リンパ節の肥大、肺の有色斑/

b) 組織学的所見 (Table 6)

投与終了時計画屠殺動物において被験物質投与によると示唆される病変として、肝臓では、肝細胞腫脹が対照群、30、150および750 mg/kg群のそれぞれで雌雄ともに0、0、2および5例に観察された。一方、腎臓では好酸性小体の出現が対照群、30、150および750 mg/kg群の雄にそれぞれ1、1、5および5例観察された。その他対照群を含

Table 4 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with triisobutylene in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	150	750	0	750
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	341±14	355±37	329±30	343±9	414±10N	388±3
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.08±0.05	2.07±0.04	2.04±0.09	1.99±0.12	2.10±0.04	2.14±0.09
Liver (g)	10.26±0.50	10.63±1.25	11.22±1.60	15.54±0.67**	11.94±0.52	11.49±1.18
Kidneys (g)	2.66±0.14	2.69±0.25	2.89±0.23	3.62±0.26**	3.01±0.25	3.24±0.46
Spleen (g)	0.64±0.09	0.65±0.05	0.55±0.10	0.59±0.10	0.69±0.05	0.64±0.10
Adrenals (mg)	59±8	49±9*	48±2*	46±6*	58±6	52±7
Testes (g)	2.81±0.20	2.99±0.26	2.87±0.27	2.93±0.11	3.08±0.22	3.31±0.20
Relative organ weight						
Brain (%)	0.610±0.028	0.587±0.059	0.623±0.036	0.580±0.026	0.508±0.012	0.552±0.032*
Liver (%)	3.011±0.127	2.992±0.181	3.400±0.227**	4.527±0.122**	2.884±0.058	2.956±0.146
Kidneys (%)	0.781±0.051	0.761±0.071	0.880±0.056*	1.056±0.079**	0.727±0.064	0.832±0.091
Spleen (%)	0.188±0.022	0.185±0.015	0.166±0.015	0.170±0.026	0.167±0.012	0.165±0.011
Adrenals (%)	0.017±0.002	0.014±0.004	0.015±0.001	0.013±0.001	0.014±0.001	0.013±0.002
Testes (%)	0.823±0.047	0.844±0.079	0.879±0.127	0.855±0.054	0.743±0.052	0.855±0.071*
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	223±11	214±10	214±17	218±11	251±16	236±20
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.93±0.08	1.92±0.06	1.90±0.11	1.89±0.02	1.99±0.05	1.99±0.03
Liver (g)	6.74±0.28	6.76±0.32	6.85±0.81	9.66±0.51**	7.25±0.71	7.37±1.38
Kidneys (g)	1.80±0.10	1.69±0.08	1.81±0.22	1.78±0.21	1.85±0.20	1.81±0.22
Spleen (g)	0.48±0.04	0.36±0.02**	0.41±0.07	0.37±0.08*	0.48±0.02N	0.45±0.08
Adrenals (mg)	66±5	67±8	65±8	64±7	65±5	66±9
Ovaries (mg)	88±3N	88±5	91±18	81±17	91±4N	97±18
Relative organ weight						
Brain (%)	0.868±0.027	0.899±0.054	0.890±0.069	0.871±0.052	0.796±0.031	0.850±0.065
Liver (%)	3.031±0.098	3.171±0.190	3.192±0.255	4.438±0.223**	2.894±0.241	3.108±0.332
Kidneys (%)	0.808±0.050	0.794±0.063	0.842±0.054	0.817±0.074	0.738±0.068	0.769±0.048
Spleen (%)	0.214±0.011	0.169±0.010**	0.189±0.021	0.169±0.033**	0.194±0.018	0.190±0.026
Adrenals (%)	0.030±0.002	0.032±0.005	0.030±0.003	0.029±0.004	0.026±0.002	0.028±0.002
Ovaries (%)	0.040±0.002N	0.041±0.002	0.042±0.008	0.037±0.008	0.036±0.002N	0.041±0.007

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group; *: P≤0.05 **; P≤0.01

N: Non parametric analysis

め雌雄で観察された主な所見は、肝臓の脂肪化、肉芽巣および細胞浸潤、腎臓の好塩基化であった。上記以外に観察された所見はごく僅かか、単発性の発生に止まった。

なお、一般状態の観察で流涎が認められた雄の750 mg/kg群の2例の唾液腺では、組織学的に異常は認められなかった。

回復試験終了時の計画屠殺動物では投与終了時の動物で組織学的に認められた、肝細胞腫脹は対照群および750 mg/kg群でそれぞれ雄で0および3例、雌で0および1例、腎臓の好酸性小体出現は、雄のみに対照群および750 mg/kg群で各2例認められ、また、750 mg/kg群3例には腎臓の皮質境界部に尿細管上皮の好酸性小体ないし壊死が見られた。さらに、尿管細管の好塩基化が対照群および750 mg/kg群でそれぞれ雄で0および5例、雌で0および4例に認められた。

なお、その他対照群を含め雌雄で観察された主な所見は、肝臓の脂肪化および肉芽巣であった。上記以外に観察された所見はごく僅かか、単発性の発生に止まった。

考察および結論

雌雄いずれの群にも死亡例も認められなかった。

一般状態の観察で、投与4週に雌雄の750 mg/kg群の少数例に流涎が認められた。これらはいずれも投与前の一過性の発現であること、雄では投与中止とともに発生がなく、雌でも回復1週のみ発生であったことなどから、被験物質の直接的影響とは考えられなかった。

体重は、摂餌量には雌雄いずれの投与群も、被験物質投与の影響は認められなかった。

なお、雌雄の750 mg/kg群では回復期間中の体重増加量に低値が認められたが、軽微であり、週毎の比較では差がなく被験物質投与とそれに続く投与休止に関連した変化か否か明確ではなかった。

血液学的検査の結果、雌の150および750 mg/kg群で赤血球数の僅かな低値が認められ、さらに雌の750 mg/kg群ではプロトロンビン時間が僅かに短縮した。雌に認められたこれらの変化はいずれも軽微であり、雄には認めら

Table 5 Summary of gross findings in rats treated orally with triisobutylene in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	150	750	0	750
Organ	Findings					
Male						
No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
HEMATOPOIETIC SYSTEM						
lymph nod	enlarged	0	1	0	0	0
RESPIRATORY SYSTEM						
lung	colored patch/zone	0	1	2	0	0
thoracic cavity	hydrothorax	0	1	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM						
liver	colored patch/zone	0	1	0	0	0
	enlarged	0	0	0	5**	0
URINARY SYSTEM						
kidney	enlarged	0	0	1	5**	0
	pale	0	0	1	5**	0
	scarred	0	0	0	0	1
Female						
No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
RESPIRATORY SYSTEM						
lung	colored patch/zone	2	0	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM						
liver	enlarged	0	0	0	5**	0
URINARY SYSTEM						
kidney	enlarged	0	0	0	1	0
	pale	0	0	0	1	0

Significant difference from control group; **: $P \leq 0.01$

Table 6 Summary of histopathological findings in rats treated orally with triisobutylene in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)									14 days recovery groups (mg/kg)									
	0			30			150			750			0			750			
Organ	Findings			1 2 3			1 2 3			1 2 3			1 2 3			1 2 3			
Male																			
No. of animals necropsied		5			5			5			5			5			5		
CARDIOVASCULAR SYSTEM																			
heart		(5)			(0)			(0)			(5)			(0)			(0)		
infiltration/cellular		1 0 0			-			-			0 0 0			-			-		
DIGESTIVE SYSTEM																			
liver		(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)		
fatty change		5 0 0			5 0 0			4 0 0			2 0 0			4 0 0			4 0 0		
swelling of liver cells		0 0 0			0 0 0			2 0 0			5**0 0			0 0 0			3 0 0		
granulation		5 0 0			4 0 0			5 0 0			2 0 0			5 0 0			5 0 0		
infiltration/cellular		1 0 0			1 0 0			0 0 0			1 0 0			1 0 0			0 0 0		
fibrosis		0 0 0			0 0 0			0 0 0			1 0 0			0 0 0			0 0 0		
URINARY SYSTEM																			
kidney		(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)		
basophilic change		2 0 0			2 0 0			5 0 0			4 0 0			0 0 0			5**0 0		
deposit of calcium		0 0 0			0 0 0			0 0 0			0 0 0			1 0 0			0 0 0		
eosinophilic body		1 0 0			1 0 0			5* 0 0			0 5* 0			2 0 0			2 0 0		
eosinophilic change		0 0 0			0 0 0			0 0 0			0 0 0			0 0 0			3 0 0		
infiltration/cellular		0 0 0			0 0 0			0 0 0			1 0 0			0 0 0			1 0 0		
lymphocytic infiltration		0 0 0			0 0 0			0 0 0			0 0 0			0 0 0			2 0 0		
carring		0 0 0			0 0 0			0 0 0			0 0 0			0 0 0			1 0 0		
ENDOCRINE SYSTEM																			
adrenal gland		(5)			(0)			(0)			(5)			(0)			(0)		
vacuolic change		1 0 0			-			-			1 0 0			-			-		
Female																			
No. of animals necropsied		5			5			5			5			5			5		
CARDIOVASCULAR SYSTEM																			
heart		(5)			(0)			(0)			(5)			(0)			(0)		
fibrosis		0 0 0			-			-			1 0 0			-			-		
HEMATOPOIETIC SYSTEM																			
spleen		(5)			(0)			(0)			(5)			(0)			(0)		
deposit of pigment		0 0 0			-			-			1 0 0			-			-		
DIGESTIVE SYSTEM																			
liver		(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)		
fatty change		2 0 0			4 0 0			2 0 0			0 0 0			2 0 0			1 0 0		
swelling of liver cells		0 0 0			0 0 0			2 0 0			5**0 0			0 0 0			1 0 0		
granulation		5 0 0			4 0 0			4 0 0			3 0 0			5 0 0			5 0 0		
infiltration/cellula		2 0 0			1 0 0			0 0 0			0 0 0			0 0 0			0 0 0		
URINARY SYSTEM																			
kidney		(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)		
basophilic change		3 0 0			1 0 0			2 0 0			1 0 0			0 0 0			4* 0 0		
deposit of calcium		0 0 0			0 0 0			0 0 0			0 0 0			0 0 0			2 0 0		

1: slight 2: moderate 3: marked

(): No. of animals examined microscopically at this site.

Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01

れていないことから、本被験物質は本質的な血液毒性を有しないと推察される。

血液生化学検査の結果、750 mg/kg 群の雌雄でアルブミンの高値が認められ、さらに雄でクレアチニンの高値が、雌でGOTの低値が認められた。いずれの変化も生理的変動の範囲を僅かに外れた程度であり、肝臓および腎臓との関連が示唆されるものの、他の関連検査項目に変化が認められないこともあり、これらの器官の機能を含めた障害の程度は強くないと推察される。

尿検査の結果、雌雄の750 mg/kg群で明確な尿量の増加、尿比重の低値が認められた。

器官重量測定の結果、雄の150 mg/kg群および雌雄の750 mg/kg群で肝臓の実重量または相対重量の高値が認められ、さらに雄では150および750 mg/kg群で腎臓の実重量または相対重量の高値が、雌では750 mg/kg群で脾臓の実重量および相対重量の低値が認められた。

病理学的検査の結果、被験物質投与の影響が示唆される剖検所見として、肝臓の肥大が雌雄の750 mg/kg群で全例に観察され、腎臓の肥大と淡色化が雄の750 mg/kg群全例と150 mg/kg群の1例にみられた。組織学的に、肝臓では雌雄ともに肝細胞腫脹が150 mg/kg以上の群で、雄の腎臓では好酸性小体の出現例数あるいは程度が150 mg/kg以上の群で増加した。一方、回復群では肝臓および腎臓に肉眼的な異常は認められず、組織学的にも肝細胞腫脹は、750 mg/kg 群の雄で3例、雌で1例、腎臓の好酸性小体出現は750 mg/kg群の雄で2例と、いずれの病変も減少（回復）がみられた。しかし、雄の腎臓では皮質境界部に尿管上皮の好酸性小体ないし壊死を示す例が750 mg/kg群の3例に認められ、好酸性小体の出現に引き続くものと考えられた。その他の組織学的所見では、腎臓の好塩基化が投与終了時の雄の150および750 mg/kg群でやや発生数が増加した。さらに回復群の投与群でも腎臓の好塩基化が雄で5例、雌で4例と高い発生を示した。しかし、投与終了時の雌の投与群ではむしろ少ない発生を示していること、自然発生病変同様1ネフロン単位でみられる軽いものであったことなどから、被験物質投与による直接的な障害ではなく再生的な変化と考えられた。また、一般状態の観察で流涎が認められた750 mg/kg群の雄2例の唾液腺には肉眼的かつ組織学的異常は認められなかった。

以上の結果より、本被験物質の標的器官は肝臓および腎臓と考えられ、回復群では発生数あるいは程度が減少しており可逆性の傾向を示す障害と考えられた。中毒量は雌雄とも150 mg/kg、無影響量は雌雄とも被験物質投与に起因した明確な変化が認められなかった30 mg/kgと判断された。

文献

- 1) 大森義仁編, "化審法毒性試験法の解説改訂版," 化学工業日報社, 1992.
- 2) 吉村 功編, "毒性・薬効データの統計解析," サイエンティスト社, 1987.
- 3) A. Jonckheere, *Bionetrika*, 41, 133-145, (1954).

連絡先

試験責任者: 井上博之
 試験担当者: 各務 進, 庄子明德, 渡 修明,
 小林和雄, 山本慎二
 (財)食品農医薬品安全性評価センター
 〒437-12 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: Hiroyuki Inoue (Study director),
 Susumu Kakamu, Akinori Syoji,
 Nobuaki Watari, Kazuo Kobayashi,
 Shinzi Yamamoto
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
 Pesticides (An-Pyo Center)
 582-2 Shioshinden Arahama, Fukude-cho,
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

トリイソブチレンの細菌を用いる 復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Triisobutylene on Bacteria

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、難分解性既存化学物質の一つであるトリイソブチレンについて、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 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験では、50~5000 µg/プレート (TA100 においては 10~5000 µg/プレート、本試験では 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、いずれの用量でも復帰突然変異コロニー数の増加が認められなかったことから、トリイソブチレンは、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。

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11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〕

トリイソブチレン (CAS No 7756-94-7) は、分子量 168.30 の無色透明の液体である。純度 99.13% のもの (ロット番号: 227606, 丸善石油化学(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、使用時まで冷暗所で保管した。トリイソブチレンは、アセトン (ロット番号: DSR3251 および DSM4173, 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3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

秦野研究所においてトリイソブチレンのアセトン溶液中での安定性試験を高濃度 (340 mg/ml) および低濃度 (200 µg/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、100および99.5%であった。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、97.3~98.0%、3.125 mg/ml 溶液は、100~102%であった。

以上の結果から、トリイソブチレンはアセトン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。

AF-2 : 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))
9-AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem.Co.)
2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF-2, 2-AA 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。9-AA 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 混液の組成〕

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
ピチオン	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1l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
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸水素アンモニウムナトリウム 4水和物	3.5 g

グルコース	20 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 μ mol
塩化マグネシウム	8 μ mol
NADPH	4 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
0.2M リン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 μ mol

** : 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、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトッパアガー2ml, 被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml (代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 ml), 検定菌液 0.1 ml を混合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アセトン, 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 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、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。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種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、陰性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〕

トリイソプチレンについて、50~5000 μ g/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、すべての検定菌の直接法および代謝活性化法において、いずれの用量でも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、直接法、代謝活性化法ともに 5000 μ g/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。トリイソプチレンについて、すべての検定菌について、直接法、代謝活性化法ともに、312.5~5000 μ g/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種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニーの増加は認められなかった。また、WP2 の直接法を除いて、最高用量の 5000 μ g/プレートにおいて、抗菌性が認められた場合があった。

以上の結果に基づき、トリイソプチレンは、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, and B.N. Ames, *Mutation Research*. 113,173-215 (1983).
- (2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. 1984, 161-187.

連絡先

試験責任者: 澁谷 徹
 試験担当者: 加藤基恵, 坂本京子, 原 巧,
 石原尚古, 川上久美子,
 松本容彦, 中込まどか
 (財)食品薬品安全センター薬野研究所
 〒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)
 Motoe Katoh, Kyoko Sakamoto,
 Takumi Hara, Naoko Ishihara,
 Kumiko Kawakami,
 Yasuhiko Matsuki, 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 triisobutylene ** on bacteria

With (+) or without (-)	Test substance dose (μ g/plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	0	130	141	136	10	20	18	40	30	32	30	36	23	14	11	11
		(136 \pm 5.5)			(16 \pm 5.3)			(34 \pm 5.3)			(30 \pm 6.5)			(12 \pm 1.7)		
	312.5	156	153	113	8	14	12	18	14	10	14	22	17	9	9	1
		(141 \pm 24.0)			(11 \pm 3.1)			(14 \pm 4.0)			(18 \pm 4.0)			(6 \pm 4.6)		
	625	126	142	161	12	10	12	15	18	15	20	16	20	10	8	5
		(143 \pm 17.5)			(11 \pm 1.2)			(16 \pm 1.7)			(19 \pm 2.3)			(8 \pm 2.5)		
	1250 #	135	148	135	9	10	14	20	8	14	19	21	16	6	7	10
	(139 \pm 7.5)			(11 \pm 2.6)			(14 \pm 6.0)			(19 \pm 2.5)			(8 \pm 2.1)			
2500 #	154	150	167	17	11	8	26	20	27	23	13	17	13	12	9	
	(157 \pm 8.9)			(12 \pm 4.6)			(24 \pm 3.8)			(18 \pm 5.0)			(11 \pm 2.1)			
5000 #	113	127	152	13	9	5	23	17	16	20	17	24	2	5	8	
	(131 \pm 19.8)			(9 \pm 4.0)			(19 \pm 3.8)			(20 \pm 3.5)			(5 \pm 3.0)			
S9 Mix (+)	0	154	140	141	13	12	12	26	31	27	33	28	31	21	20	20
		(145 \pm 7.8)			(12 \pm 0.6)			(28 \pm 2.6)			(31 \pm 2.5)			(20 \pm 0.6)		
	312.5	128	142	130	12	11	11	29	26	27	26	22	20	6	12	10
		(133 \pm 7.6)			(11 \pm 0.6)			(27 \pm 1.5)			(23 \pm 3.1)			(9 \pm 3.1)		
	625	116	115	127	10	14	12	21	17	21	28	28	48	11	8	6
		(119 \pm 6.7)			(12 \pm 2.0)			(20 \pm 2.3)			(35 \pm 11.5)			(8 \pm 2.5)		
	1250 #	142	145	133	11	10	15	19	13	8	31	17	29	8	15	12
	(140 \pm 6.2)			(12 \pm 2.6)			(13 \pm 5.5)			(26 \pm 7.6)			(12 \pm 3.5)			
2500 #	145	156	156	12	11	8	10	10	16	27	22	29	10	5	5	
	(152 \pm 6.4)			(10 \pm 2.1)			(12 \pm 3.5)			(26 \pm 3.6)			(7 \pm 2.9)			
5000 #	90 *	117 *	111 *	13	9	8	11	14	16	25	21	14	9	9	8	
	(106 \pm 14.2)			(10 \pm 2.6)			(14 \pm 2.5)			(20 \pm 5.6)			(9 \pm 0.6)			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μ g/plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	571	521	498	430	420	402	125	141	136	706	653	644	3272	3474	3159
		(530 \pm 37.3)			(417 \pm 14.2)			(134 \pm 8.2)			(668 \pm 33.5)			(3302 \pm 159.6)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μ g/plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	874	903	887	200	186	237	546	540	637	271	288	287	234	257	260
		(888 \pm 14.5)			(208 \pm 26.4)			(574 \pm 54.4)			(282 \pm 9.5)			(250 \pm 14.2)		

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was 99.13%.

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of triisobutylene ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μ g/plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvr A			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	0	138	144	147	15	12	14	12	13	17	18	25	23	5	8	8
		(143 \pm 4.6)			(14 \pm 1.5)			(14 \pm 2.6)			(22 \pm 3.6)			(7 \pm 1.7)		
	312.5	128	105	100	16	11	17	15	23	9	19	14	20	7	7	8
		(111 \pm 14.9)			(15 \pm 3.2)			(16 \pm 7.0)			(18 \pm 3.2)			(7 \pm 0.6)		
	625 #	107	108	118	20	13	17	9	5	12	26	20	10	7	8	3
		(111 \pm 6.1)			(17 \pm 3.5)			(9 \pm 3.5)			(19 \pm 8.1)			(6 \pm 2.6)		
	1250 #	129	127	107	18	15	18	12	12	15	17	20	21	4	6	2
	(121 \pm 12.2)			(17 \pm 1.7)			(13 \pm 1.7)			(19 \pm 2.1)			(4 \pm 2.0)			
2500 #	99	106	96	17	10	13	19	14	7	21	13	15	7	1	8	
	(100 \pm 5.1)			(13 \pm 3.5)			(13 \pm 6.0)			(16 \pm 4.2)			(5 \pm 3.8)			
5000 #	137 *	123 *	112 *	7 *	9 *	12 *	8	4	8	13 *	6 *	0 *	4 *	4 *	1 *	
	(124 \pm 12.5)			(9 \pm 2.5)			(7 \pm 2.3)			(6 \pm 6.5)			(3 \pm 1.7)			
S9 Mix (+)	0	159	154	149	12	9	15	17	17	13	29	23	33	10	10	9
		(154 \pm 5.0)			(12 \pm 3.0)			(16 \pm 2.3)			(28 \pm 5.0)			(10 \pm 0.6)		
	312.5	111	122	111	9	7	5	14	15	18	28	20	24	4	5	5
		(115 \pm 6.4)			(7 \pm 2.0)			(16 \pm 2.1)			(24 \pm 4.0)			(5 \pm 0.6)		
	625 #	139	124	105	14	14	10	18	13	13	25	14	17	6	6	3
		(123 \pm 17.0)			(13 \pm 2.3)			(15 \pm 2.9)			(19 \pm 5.7)			(5 \pm 1.7)		
	1250 #	115	101	116	10	17	16	14	12	11	32	22	24	4	6	5
	(111 \pm 8.4)			(14 \pm 3.8)			(12 \pm 1.5)			(26 \pm 5.3)			(5 \pm 1.0)			
2500 #	106	92	80	10	22	11	13	15	10	14	17	10	6	8	6	
	(93 \pm 13.0)			(14 \pm 6.7)			(13 \pm 2.5)			(14 \pm 3.5)			(7 \pm 1.2)			
5000 #	124 *	121 *	140 *	8 *	9 *	9 *	6 *	5 *	3 *	16 *	19 *	45 *	3 *	5 *	4 *	
	(128 \pm 10.2)			(9 \pm 0.6)			(5 \pm 1.5)			(27 \pm 15.9)			(4 \pm 1.0)			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μ g/plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	521	538	546	154	166	167	200	193	186	626	670	616	2077	2184	2021
		(535 \pm 12.8)			(162 \pm 7.2)			(193 \pm 7.0)			(637 \pm 28.7)			(2094 \pm 82.8)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μ g/plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	732	727	749	167	173	174	514	648	700	172	176	183	205	192	198
		(736 \pm 11.5)			(171 \pm 3.8)			(621 \pm 96.0)			(177 \pm 5.6)			(198 \pm 6.5)		

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

** : Purity was 99.13%.

トリイソブチレンの 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 Triisobutylene on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

OECD 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、トリイソブチレ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, 以下CHLと略す) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、細胞増殖抑制試験を行ったところ、直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は0.021 mg/mlであった。一方、代謝活性化法のS9mix非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、0.0042 mg/mlであった。また、S9mix存在下では、試験した濃度範囲(0.05~1.70 mg/ml)で50%を超える増殖抑制作用は認められなかった。従って、染色体異常試験において、直接法では0.021 mg/ml、代謝活性化法のS9mix存在下では1.70 mg/ml (10 mM)、S9mix非存在下では0.0042 mg/mlの処理濃度をそれぞれ高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、すべての処理群において、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。また、代謝活性化法におけるS9mix存在下および非存在下のいずれの濃度群においても、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。

以上の結果からトリイソブチレンは、上記の試験条件下で試験管内のCHL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・リンズバンク (ICRB) から入手 (1988年2月, 入手時: 継代4代) したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL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, ロット番号: 1C2073) を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL細胞を、培養液5mlを入れたディッシュ (径6cm, Coming) に播き、37℃のCO₂ インキュベーター (5% CO₂) 内で培養した。

直接法では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、代謝活性化法では、細胞播種3日目にS9mixの存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

トリイソブチレン (CAS No.: 7756-94-7, ロット番号: 227606, 丸善石油化学(株)製造, (社)日本化学工業協会提供) は無色透明液体で、水およびジメチルスルホキシドに不溶、アセトンに可溶である。分子式C₁₂H₂₄, 分子量168.30, 引火点50℃, 沸点177.5~179.5℃, 蒸気圧0.53KPa (20℃) の物質で、純度は99.13%である。原体は冷暗所で窒素密封の保存条件下で長期間安定であり、溶媒中 (アセトン) での安定性試験では、0.20~340 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。溶媒はアセトン (和光純薬工業(株), ロット番号: DCK1899) 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0.5% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験の直接法の高濃度群、代謝活性化法におけるS9mix非存在下の低濃度群、およびS9mix存在下の高濃度群と低濃度群の調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85%以上) の値であった。

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, オリンパス光学工業(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、トリイソブチレンの約50%の増殖抑制を示す濃度を、50%をはさむ2濃度の値より算出したところ、直接法では0.021 mg/mlとなった。一方、代謝活性化法のS9mix非存在下では0.0042 mg/mlとなった。また、S9mix存在下では1.70 mg/ml (10 mM) の濃度においても50%を超える増殖抑制作用は認められなかった (Fig. 1, 2)。

なお、本物質はアセトンに溶解して培養液に添加した場合、表面に油滴を形成し、濃度がある程度以上になると増殖抑制作用は減少する傾向がみられた。水に不溶性の物質であることから、理論上の処理濃度と、実際に培養液に溶け込んでいる量はかなり差があると考えられる。

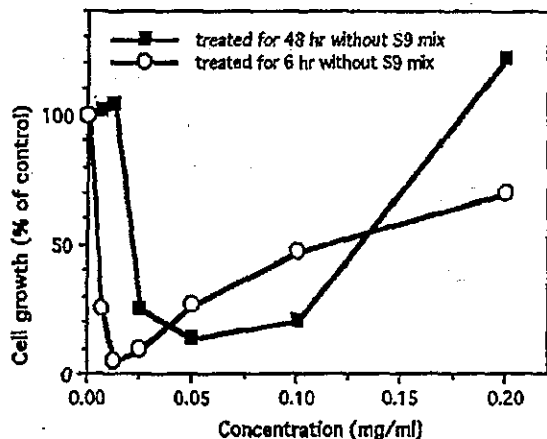


Fig.1 Growth inhibition of CHL cells treated with triisobutylene without S9 mix

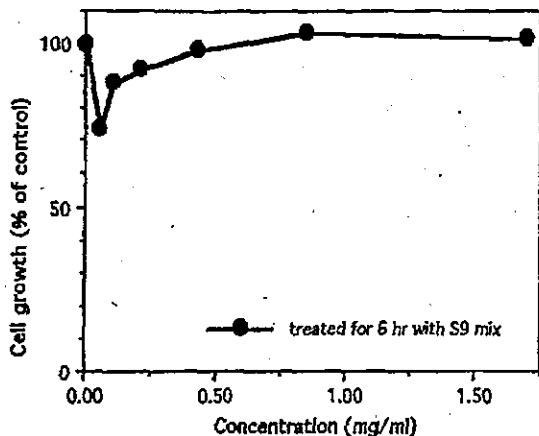


Fig.2 Growth inhibition of CHL cells treated with triisobutylene with S9 mix

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、直接法では0.021 mg/ml、代謝活性化法のS9mix存在下では1.70 mg/ml、S9mix非存在下では0.0042 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。

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。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で約10分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、複数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、フィッシャーの 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の有意差検定を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

結果および考察

直接法による染色体分析の結果を Table 1 に示した。トリイソブチレンを加えて24時間および48時間処理した各濃度群で、染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果を Table 2 に示した。トリイソブチレンを加えてS9mix存在下および非存在下で6時間処理した各濃度群では、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with triisobutylene ** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							total	Others ³⁾	No. of cells with aberrations			Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾			TAG (%)	TA (%)	SA		NA	
Control			200	0	0	0	0	0	4	0	4	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			
Solvent ¹⁾ 0		24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25			
TIB 0.005		24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	-	-	
TIB 0.011		24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50	-	-	
TIB 0.021		24	200	0	1	0	0	1	0	0	2	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	-	-	
MC 0.00005		24	200	5	54	106	2	1	5	10	183	0	99 *(49.5)	98 *(49.0)	0.00	+	-	
Solvent ¹⁾ 0		48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			
TIB 0.005		48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-	
TIB 0.011		48	200	1	0	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13	-	-	
TIB 0.021		48	200	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-	
MC 0.00005		48	200	5	59	143	7	4	9	10	237	10	116 *(58.0)	115 *(57.5)	0.50	+	-	

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) Acetone 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 99.13%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with triisobutylene ** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							total	Others ³⁾	No. of cells with aberrations			Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾			TAG (%)	TA (%)	SA		NA	
Control				200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			
Solvent ¹⁾ 0		-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			
TIB 0.0011		-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-	
TIB 0.0021		-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	2	0	3	1	3 (1.5)	2 (1.0)	0.13	-	-	
TIB 0.0042		-	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.88	-	-	
CPA 0.005		-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13	-	-	
Solvent ¹⁾ 0		+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25			
TIB 0.43		+	6-(18)	200	1	0	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38	-	-	
TIB 0.85		+	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	0	2	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	-	-	
TIB 1.70		+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	-	-	
CPA 0.005		+	6-(18)	200	10	103	254	2	2	8	30	409	0	157 *(78.5)	156 *(78.0)	0.00	+	-	

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) Acetone 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 99.13%.

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, 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, 1987.

連絡先

試験責任者: 田中憲徳
試験担当者: 山影康次, 佐々木澄志,
若栗 忍, 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, Kiyoshi Sasaki,
Shinobu Wakuri,
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