

## 2-ペンチルアントラキノ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 Repeated Dose Oral Toxicity Test of 2-Pentylanthraquinone in Rats

#### 要約

2-ペンチルアントラキノンは、アントラキノンの1つで、光重合増感剤、アントラキノン法過酸化水素製造用水素キャリアーなどに使用されている化学物質である。2-ペンチルアントラキノンの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系ラットを用いて実施した。雌雄とも3.75, 15および60 mg/kgの用量の被験物質投与群ならびに媒体(コーン油)を投与する対照群の計4群を設定し、28日間の反復強制経口投与を行った。試験には雌雄とも各群5匹の他、対照群および60 mg/kg投与群には回復試験として各5匹を加え、計60匹の動物を使用した。

その結果、一般状態の変化として、投与直後の一過性の流涎が60 mg/kg投与群の雌雄で散見された。

投与期間終了時の血液学検査では、プロトロンビン時間の有意な延長が15および60 mg/kg投与群の雄で観察された。また、投与期間終了時の剖検では前胃粘膜の肥厚が60 mg/kg投与群の雄で認められ、同群の雄では、肝臓の実重量および相対重量が有意に増加し、組織学検査では軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が観察された。

回復試験期間終了時では、投与期間終了時にみられた上記の変化は観察されず、被験物質投与の影響は14日間の休業により回復することが示唆された。

その他、体重、摂餌量、尿検査および血液生化学検査に被験物質投与の影響は認められなかった。また、詳細な症状観察および機能検査に異常は認められず、神経毒性を示唆する所見はみられなかった。

以上の結果から、本試験条件下における2-ペンチルアントラキノンの無毒性量は雄では3.75 mg/kg/day、雌では15 mg/kg/dayであると考えられた。

#### 方法

##### 1. 被験物質および投与検体の調製

被験物質として、山本化成(東京)より提供された2-ペンチルアントラキノンのロット番号01-13001-50、含量98.6%を使用した。被験物質は、密閉容器に入れ冷所(冷蔵)で保管した。山本化成において、動物試験前後に被験物質の品質試験を実施し、試験期間中の被験物質の安定性を確認した。

投与検体は、被験物質を秤量し、メスシリンダーを用いて媒体であるコーン油(ナカライテスク)を加えて、1.2 w/v%溶液を調製した。この1.2 w/v%溶液を段階希

釈して0.3および0.075 w/v%溶液を作製した。調製後の投与検体はガラス瓶に分取し、冷蔵保管した。また、0.05および5 w/v%の調製検体について、冷蔵条件下における8日間の安定性がHPLC法で確認されたため、投与検体の調製は投与前8日以内に行った。さらに、初回調製時の投与検体について含量測定をHPLC法で実施した結果、被験物質の平均含量は所定濃度であったことが確認された。

##### 2. 使用動物および飼育方法

4週齢のSprague-Dawley(SD)系(Crj:CD(SD)IGS, SPF)の雌雄ラット(日本チャールス・リバー)を購入し、検疫と飼育環境への馴化を兼ねて、入荷日を含め8日間予備飼育した。試験には雌雄各30匹を使用し、検疫終了時の体重を基に、体重別層化無作為抽出法により群分けした。投与開始時の週齢は5週齢であった。

動物は、温度21.0~25.0°C、湿度40.0~75.0%、換気回数約15回/時間、照明12時間(7時~19時点灯)に制御された飼育室内で、金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。

##### 3. 投与量の設定および投与方法

投与用量は、本試験に先立って実施した予備試験の結果を基に決定した。即ち、2-ペンチルアントラキノンを62.5, 250および1000 mg/kgの用量で、雌雄各群3匹のラットに7日間反復投与した結果、1000 mg/kg投与群では雌雄各1例が死亡し、体重減少、軟便、被毛の汚れ、皮膚蒼白、自発運動の低下、褐色尿等が認められた。また、同投与群の雌雄では血液学検査で赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値の減少が認められ、剖検所見では肝臓および腎臓の大型化、前胃粘膜の肥厚、剥離および潰瘍が認められた。250 mg/kg投与群では投与初期に軽度の体重増加抑制がみられ、62.5および250 mg/kg投与群では肝臓、腎臓および脾臓の大型化、前胃粘膜の肥厚が観察され、低用量群でも被験物質投与の影響が認められた。以上の結果から、60 mg/kgの用量を28日間反復投与した場合でも被験物質投与の影響が認められると予想されたことから、60 mg/kgを本試験の高用量とし、以下公比4で除して、中用量および低用量をそれぞれ15および3.75 mg/kgに設定した。各群の動物数は、雌雄とも対照群および高用量群を各10匹、低および中用量群を各5匹とし、対照群および高用量群の雌雄各5匹は回復試験に用いた。

投与は1日1回、28日間、ラット用胃管を用いて強制的に経口投与した。投与容量は5 mL/kgとし、各投与時の最近時の体重を基に個体別に投与液量を算出した。なお、回復試験は14日間とした。

#### 4. 観察および検査

##### 1) 一般状態

毎日(投与期間中は投与前および投与後1回以上、回復試験期間中は1日1回)、生死を含む一般状態を観察した。

##### 2) 詳細な症状観察および機能検査

毎週1回の頻度で、毎回13時～16時にスコアリング法を用いた詳細な症状観察を行った。まず、ケージ越しでの観察(姿勢・体位、自発運動、発声、振戦、痙攣)を行った後、動物をケージから取り出して外表を観察し(取り出し易さ、扱い易さ、心拍動、体温、被毛、皮膚色、可視粘膜、流涙、眼球突出、瞳孔径、流涎)、作業台上での観察(体位・姿勢、探索行動、身づくろい、発声、挙尾反応、歩行、常同行動、奇妙な行動、振戦、痙攣、呼吸数、立毛、眼裂、排尿回数、排便回数、接触に対する反応、撤去反応、耳介反射)を行った。投与量および動物番号の情報はブラインドにして実施した。また、投与第4週および回復第2週の詳細な症状観察時に機能検査を行った。機能検査は聴覚刺激に対する反応(驚愕反応)、視覚刺激に対する反応(視覚定位、瞳孔反射)、固有感覚刺激に対する反応(正向反射)を観察した。

##### 3) 体重および摂餌量

体重は、投与第1週は3回、それ以降は毎週2回の頻度で測定した。また、投与期間終了日(投与第28日)、回復試験期間終了日(回復第14日)および剖検日にも体重を測定した。摂餌量は、毎週1回の頻度で1日あたりの摂餌量を測定した。

##### 4) 尿検査

投与第4週(投与後)および回復第2週に動物を代謝ケージに収容し、採尿開始後4時間の時点で尿を採取し、視診により色調および濁度を、試験紙法(クリニテック200+, バイエル・三共)によりpH、潜血、蛋白、ブドウ糖、ケトン体、ウロビリノーゲンおよびビリルビンを、光学顕微鏡を用いて沈渣を検査した。

##### 5) 採血

投与期間あるいは回復試験期間終了日から翌日の剖検日にかけて、動物を18～21時間絶食させた。その後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、腹部後大静脈から、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の測定にはクエン酸ナトリウムを抗凝固剤として、その他の血液学検査用にはEDTA-2Kを抗凝固剤として採血し、血液生化学検査用にはヘパリンを抗凝固剤として採血した。採血は可能な限り対照群から低、中、高用量群の順に各群1匹ずつ、動物番号の若いほうから

選抜して行った。

##### 6) 血液学検査

血液自動分析装置(CELL-DYN3500, ダイナボット)を用いて、電気抵抗法により赤血球数(RBC)、平均赤血球容積(MCV)および血小板数、フローサイトメトリー・レーザー光散乱法/電気抵抗法により白血球数(WBC)、フローサイトメトリー・レーザー光散乱法により白血球分類、吸光度法により血色素量を測定し、これらを基にヘマトクリット値、平均赤血球血色素量(MCH)および平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。また、全自動血液凝固測定装置(CA-1000, 東亜医用電子)を用いて、光散乱検出法によりプロトロンビン時間(PT)および活性部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定した。さらに、光学顕微鏡を用いたBrecher法により、網状赤血球比率を算出した。

##### 7) 血液生化学検査

生化学自動分析装置(COBAS MIRA plus, ロシュ・グアイアグノスティックス)を用いて、ビウレット法により総蛋白濃度、BCG法によりアルブミン濃度、コレステロールオキシダーゼ・HDAOS法により総コレステロール濃度、GPO・HDAOS(グリセリン消去)法によりトリグリセライド濃度、ヘキソキナーゼ・G-6-PDH法によりグルコース濃度、ウレアーゼ・GIDH法により尿素窒素濃度(BUN)、Jaffe法によりクレアチニン濃度、アゾビルルビン法により総ビルルビン濃度、GSCC法によりアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、IFCC法によりアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)活性、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性および $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ( $\gamma$ -GTP)活性、OCPC法によりカルシウム濃度、モリブデン酸直接法により無機リン濃度を測定し、アルブミン/グロブリン(A/G)比を算出した。また、全自動電解質分析装置(EA05, エイアンドティー)を用いたイオン電極法によりナトリウムイオン濃度、カリウムイオン濃度および塩素イオン濃度を測定した。

##### 8) 病理学検査

採血後、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺し、器官および組織の肉眼的観察を実施した。また、各動物の肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、胸腺、脾臓、脳、心臓および甲状腺の重量(実重量)を測定したほか、各器官の重量を剖検日の体重で除して比体重値(相対重量)を算出した。肉眼的観察に引き続き、全例の肉眼的病変部、脳、脊髄、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(結腸、直腸)、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、心臓、胸腺、甲状腺、気管、肺(気管支を含む)、生殖腺(精巣・卵巣)、副生殖腺(精巣上体、前立腺、子宮、精囊、陰)、膀胱、リンパ節(腸間膜リンパ節、下顎リンパ節)、坐骨神経(腓腹筋を含む)、大腿骨および骨髄、大動脈、舌、食道、膵臓、顎下腺、舌下腺、下垂体、上皮小体および眼球を0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液

に固定した。ただし、精巣および精巣上体はブアン液に固定した。次いで、投与期間終了時の対照群および高用量群の固定した器官および組織(ただし、十二指腸、空腸、直腸、精囊、陰、大腿骨、大動脈、舌、食道および上皮小体を除く)をパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した後、光学顕微鏡を用いて病理組織学的に検査した。この検査の結果、肝臓に被験物質投与に起因した可能性のある変化が認められたため、回復試験群を含む全例の肝臓の組織学的検査を実施した。

### 5. 統計解析

体重、摂餌量、血液学検査および血液生化学検査値ならびに器官重量の各測定値については、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。検定対象が対照群を含めて4群の場合、Bartlettの方法により分散の一様性について検定を行い、一元配置型の分散分析およびDunnnett法、あるいはKruskal-Wallisの順位検定およびDunnnett型の検定法で多重比較を行った。検定対象が対照群を含めて2群の場合、F検定を行い、Studentのt検定あるいはAspin-Weichのt検定を行った。

尿の試験紙による検査成績、尿の色調および濁度については、投与第4週に得られた各検査値は、列の累積または分割表を用いる $\chi^2$ 検定を行い、Dunnnett型の検定法により多重比較を行った。回復第2週に得られた各検査値は、Wilcoxonの順位和検定を行った。

病理組織所見のグレード分けしたデータはMann-WhitneyのU検定により、また陽性グレードの合計値はFisherの直接確率の片側検定を行った。

なお、いずれの場合も有意水準は5%とした。

## 結果

### 1. 死亡例

死亡例および切迫屠殺例はいずれの群にもみられなかった。

### 2. 一般状態

投与期間中、60 mg/kg投与群の雄3例、雌4例で、投与直後の一過性の流涎が投与第3週以降に散見された。その他、15 mg/kg投与群の雌1例では解剖当日に爪をケージ等に引っかけたためと思われる爪剥がれによる出血が認められた。

回復試験期間中には、いずれの群にも一般状態の変化は認められなかった。

### 3. 詳細な症状観察および機能検査

投与期間中および回復試験期間中ともに、いずれの群にも詳細な症状観察に特記すべき変化は認められず、神経毒性を示唆する所見は観察されなかった。また、投与第4週および回復第2週の機能検査でも、いずれの群においても異常は認められなかった。

### 4. 体重(Fig. 1)

投与期間中および回復試験期間中ともに、各被験物質投与群の体重および体重増加量は対照群との間に差は認められなかった。

### 5. 摂餌量(Fig. 2)

投与期間中および回復試験期間中ともに、各被験物質投与群の摂餌量は対照群との間に差は認められなかった。

### 6. 尿検査(Table 1)

投与第4週および回復第2週の検査とともに、いずれの群においても異常は認められず、対照群と各被験物質投与群との間に差は認められなかった。

### 7. 血液学検査(Table 2)

投与期間終了時の検査では、プロトロンビン時間の有意な延長が15および60 mg/kg投与群の雄でみられた。また、60 mg/kg投与群の雄では赤血球数が低い傾向がみられた。その他、好中球比率の減少およびリンパ球比率の増加が15 mg/kg投与群の雄で、単球比率の増加が15 mg/kg投与群の雌でそれぞれ有意に認められた。白血球百分比を絶対数に換算して比較すると、各被験物質投与群の各白血球数は対照群との間に差は認められなかったことから、白血球百分比の変化は被験物質投与による影響ではないと判断した。

回復試験期間終了時の検査では、赤血球数および血色素量の有意な減少が60 mg/kg投与群の雌でみられた。

### 8. 血液生化学検査(Table 3)

投与期間終了時の検査では、アルカリフォスファターゼ活性の有意な低下が60 mg/kg投与群の雄でみられた。また、総蛋白濃度の有意な減少が15 mg/kg投与群の雄で認められたが、アルブミン濃度やA/G比に変化はみられず、60 mg/kg投与群では有意差が認められなかったことから、被験物質投与による影響ではないと判断した。

回復試験期間終了時の検査では、グルコース濃度の有意な減少が60 mg/kg投与群の雌で認められた。

### 9. 病理学検査

#### 1) 器官重量(Table 4)

投与期間終了時剖検例では、肝臓の実重量および相対重量の有意な増加が60 mg/kg投与群の雄でみられた。また、甲状腺の実重量の有意な増加が60 mg/kg投与群の雌で、甲状腺の相対重量の有意な増加が15 mg/kg投与群の雄で認められた。

回復試験期間終了時剖検例では、精巣上体の実重量の有意な減少が60 mg/kg投与群の雌でみられたが、相対重量に変化は認められなかったこと、投与期間終了時剖検例の精巣上体重量や組織学的変化はみられなかったことから、被験物質投与による影響ではないと判断した。

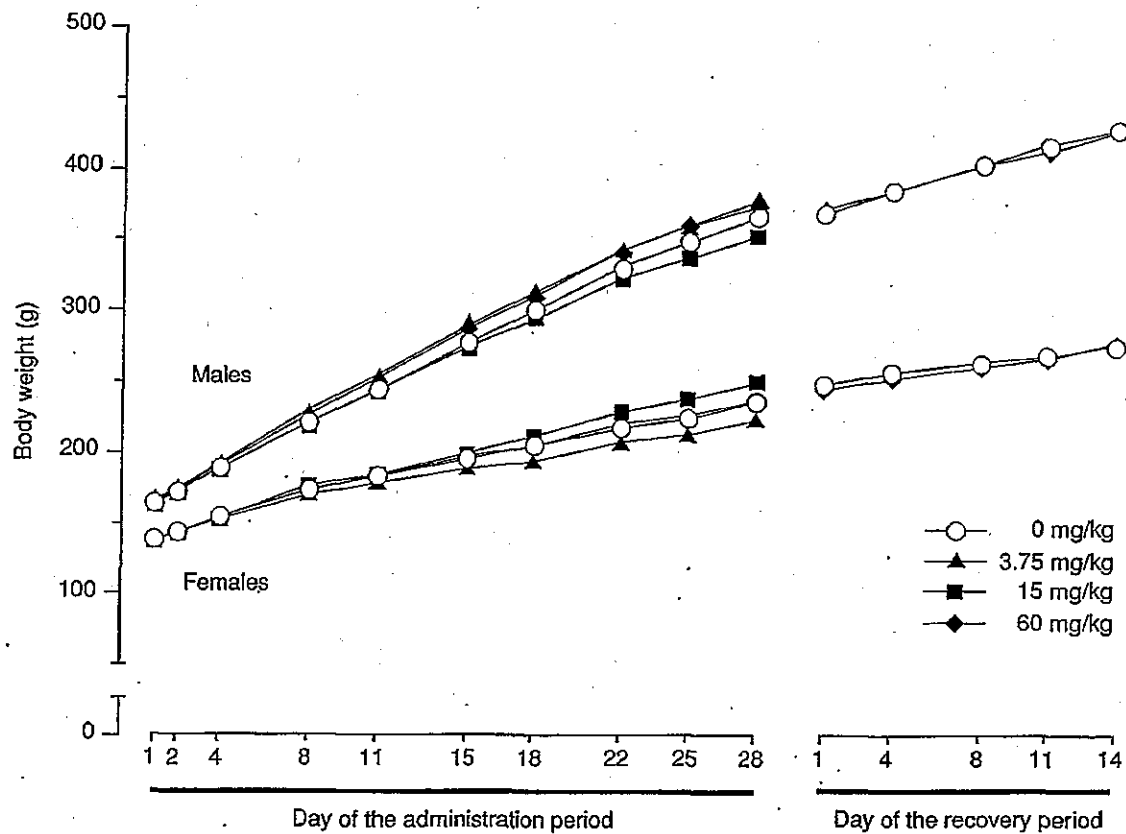


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with 2-pentylanthraquinone in 28-day repeated dose toxicity test

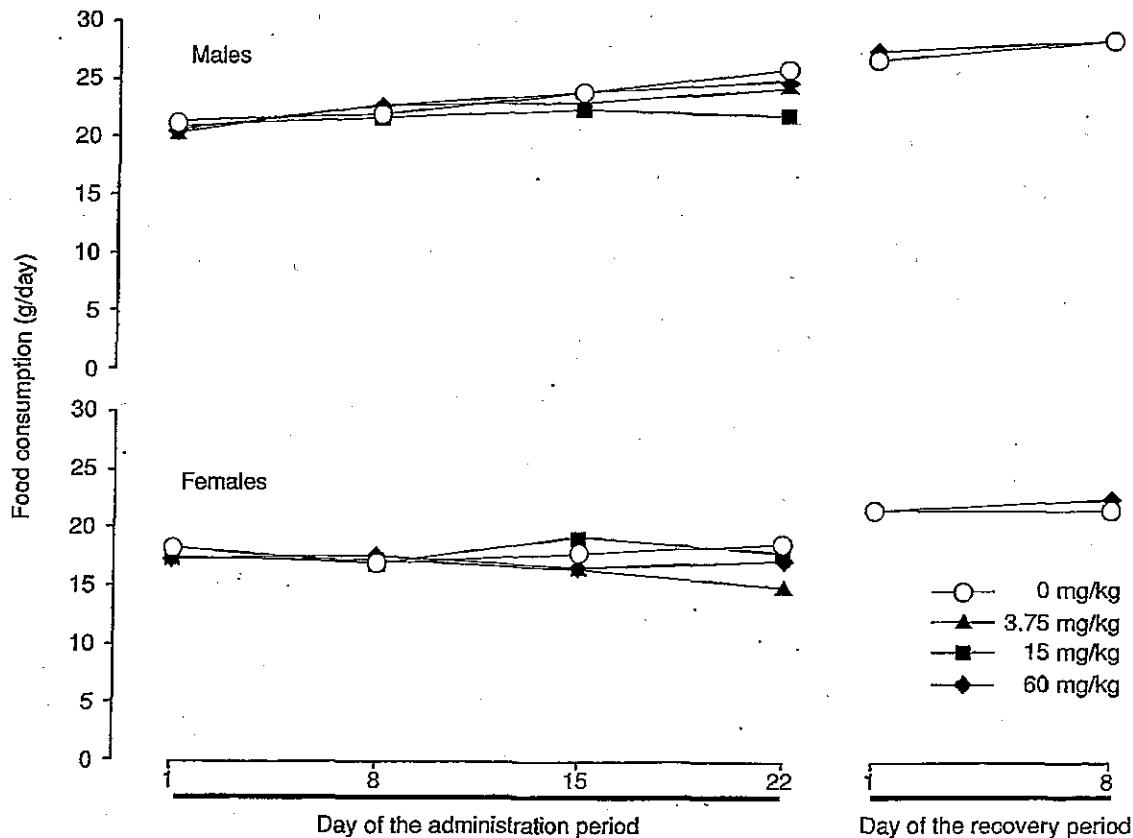


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with 2-pentylanthraquinone in 28-day repeated dose toxicity test

## 2) 剖検所見

投与期間終了時剖検例において、前胃粘膜の肥厚が60 mg/kg投与群の雄1例で観察された。回復試験期間終了時剖検例では、肉眼的異常所見は認められなかった。

## 3) 組織学検査所見 (Table 5)

## ① 投与期間終了時剖検例

肝臓では、軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が60 mg/kg投与群の雄4例でみられ、この所見の発現頻度は対照群と比較して有意に高かった。また、軽微な単細胞壊死が3.75および60 mg/kg投与群の各雄1例で、軽微あるいは軽度の門脈周囲性の肝細胞脂肪化が対照群を含む雌雄の各群で認められたが、いずれの変化も対照群に比較して差はなかった。

腎臓では、軽微な好塩基性尿管およびリンパ球浸潤が対照群および60 mg/kg投与群の雌雄で、軽微あるいは軽度の硝子滴が対照群および60 mg/kg投与群の雄で認められたが、いずれの変化も対照群に比較して差はなかった。

脾臓では、軽微から中等度の髓外造血が対照群および60 mg/kg投与群の雌雄全例で認められたが、対照群に比較して差はなかった。

前立腺では、軽微あるいは中等度のリンパ球浸潤が対照群および60 mg/kg投与群の各雄1例で認められたが、対照群に比較して差はなかった。

心臓では、軽微な心筋の変性/線維化が対照群の雄1例で観察された。

剖検で前胃粘膜の肥厚が観察された60 mg/kg投与群を含め、胃には組織学的異常所見は認められなかった。

病理組織学検査を実施したその他の器官には、組織学的異常所見は認められなかった。

## ② 回復試験期間終了時剖検例

肝臓では、軽微な門脈周囲性の肝細胞脂肪化が対照群および60 mg/kg投与群の雌雄で認められたが、対照群に比較して差はなかった。

## 考察

2-ベンチルアントラキノン(3.75, 15および60 mg/kg)の用量で雌雄のSprague-Dawley系ラットに28日間反復経口投与し、その後14日間の回復試験を実施した。

その結果、高用量群の雄では、投与期間終了時に肝臓の実重量および相対重量が有意に増加し、組織学検査では軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。本被験物質と同じアントラキノン類である2-エチルアントラキノン<sup>1)</sup>やアントラキノン<sup>2)</sup>の28日間経口投与試験あるいは1-アミノ-2,4-ジプロモアントラキノンの13週間混餌投与試験<sup>3)</sup>でも、肝臓に同様の変化が観察されていることから、本試験でみられた肝臓の変化は被験物質投与の影響であると考えられた。

また、高用量群の雄1例では投与期間終了時に前胃粘膜の肥厚が観察された。予備試験でも2-ベンチルアント

ラキノン1000 mg/kg投与群で前胃粘膜の肥厚、剥離および潰瘍がみられ、62.5および250 mg/kg投与群でも前胃粘膜の肥厚が観察されたことから、被験物質が刺激性物質であり、前胃粘膜に軽度の傷害を生じたものと考えられた<sup>4)</sup>。また、高用量群の雌雄で投与期間中に散見された投与直後の一過性の流涎も、被験物質の刺激によって生じたと考えられた。

血液学検査では、投与期間終了時に15および60 mg/kg投与群の雄で用量依存的なプロトロンビン時間の延長がみられた。アントラキノン類である2-ベンチルアントラキノンとp-ナフトキノンの誘導体であるビタミンKは同じキノン化合物であることから、肝臓でプロトロンビン生成や血液凝固因子形成促進の役割を果たしているビタミンKの作用に被験物質が影響を及ぼしている可能性は十分にある。よって、プロトロンビン時間の延長は被験物質投与による影響であると考えられた。また、高用量群の雄で、投与期間終了時に赤血球数の減少傾向が、回復試験期間終了時に赤血球数および血色素量の有意な減少がみられた。予備試験の血液学検査でも貧血所見がみられたほか、脾臓の大型化が認められた。また、前述したアントラキノン類<sup>1-3)</sup>のほか1-アミノアントラキノンの反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験<sup>5)</sup>でも貧血所見が認められており、溶血性貧血の可能性が示唆されている。一方、本試験では網状赤血球の増加や骨髓の造血充進像、脾臓の髓外造血増強は認められておらず、尿検査および血液生化学検査でも溶血を示唆する所見はみられていない。また、出血所見もみられず血液生化学検査から血液希釈の可能性も考えられない。従って、赤血球数および血色素量の減少と被験物質投与との関連も疑われたが、その原因を明らかにすることはできなかった。

その他、血液生化学検査では、アルカリフォスファターゼ活性の有意な低下が投与期間終了時に高用量群の雄でみられたが、血中カルシウム濃度に変動はみられないことから、被験物質投与による影響ではないと判断した。また、回復試験期間終了時にグルコース濃度の有意な減少が高用量群の雌で認められたが、投与期間終了時ではグルコースに変動はみられず、脾臓、副腎および甲状腺に器質的な変化は認められなかったことから、被験物質との関連はないと考えられた。さらに、投与期間終了時に甲状腺の実重量の有意な増加が60 mg/kg投与群の雄で、甲状腺の相対重量の有意な増加が15 mg/kg投与群の雄で認められたが、甲状腺に組織学的な変化は認められなかった。また、これらの甲状腺重量の変化と背景データを比較すると大きな差は認められなかったことから、被験物質投与による影響ではないと判断した。

体重、摂餌量および尿検査に被験物質投与の影響は認められなかった。詳細な症状観察および機能検査でも異常は認められず、2-ベンチルアントラキノンの神経毒性を示唆する所見は観察されなかった。

以上の結果から、2-ベンチルアントラキノン投与によりプロトロンビン時間の延長、肝重量の増加および肝細胞肥大が認められ、また、被験物質の刺激による流涎や

前胃粘膜の肥厚が観察された。これらの変化は14日間の休薬により回復することが示唆された。従って、本試験条件下における2-ベンチルアントラキノンの無毒性量は雄では3.75 mg/kg/day, 雌では15 mg/kg/dayであると考えられた。

#### 文献

- 1) 畔上二郎ら: 2-エチルアントラキノンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験。化学物質毒性試験報告, 8:179-188(2001).
- 2) IUCLID(International Uniform Chemical Information Data Base)Data Sheet, Substance ID:84-65-1. EU(2000).
- 3) Fleischman RW, Esber HJ, Hagopian M, Lilja HS, Huff J:Thirteen-week toxicology studies of 1-amino-2,4-dibromoanthraquinone in Fischer 344/N rats and B6C3F<sub>1</sub> mice. Toxicol Appl Pharmacol, 82: 389-404(1986).
- 4) 高橋道人(監訳):「毒性病理学の基礎」第1版, ソフトサイエンス社, 東京(1992) pp.85-93.
- 5) 長尾哲二ら:1-アミノアントラキノンのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験。化学物質毒性試験報告, 3:87-101(1996).

#### 連絡先

試験責任者: 立花滋博  
試験担当者: 田子和美, 野口早苗, 加藤博康,  
関 剛幸, 古谷真美, 永田侘子,  
堀内伸二, 稲田浩子, 三枝克彦,  
安生孝子

(財)食品薬品安全センター秦野研究所  
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

#### Correspondence

Authors: Shigehiro Tachibana (Study Director)  
Kazumi Tago, Sanae Noguchi,  
Hiroyasu Kato, Takayuki Seki,  
Mami Furuya, Tomoko Nagata,  
Shinji Horiuchi, Hiroko Inada,  
Katsuhiko Saegusa, Takako Anjo  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa,  
257-8523, Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Urinalysis of rats treated orally with 2-pentylanthraquinone in 28-day repeated dose toxicity test

	Dose (mg/kg)	On day 23 of the administration period				On day 11 of the recovery period	
		0	3.75	15	60	0	60
<b>Male</b>							
Number of animals		10	5	5	10	5	5
Color	Light yellow	10	4	5	7	5	5
	Yellow	0	1	0	3	0	0
pH	6.5	1	0	0	0	0	0
	7.0	2	1	4	4	5	3
	7.5	1	1	1	5	0	1
	8.0	2	0	0	0	0	0
	8.5	3	2	0	1	0	1
	≥9.0	1	1	0	0	0	0
Protein <sup>a)</sup>	±	0	0	0	0	0	0
	+	4	3	2	4	3	3
	+	6	2	3	6	2	2
Ketone <sup>b)</sup>	±	5	3	1	5	0	2
	+	3	1	3	3	4	2
	+	1	0	0	0	0	0
Bilirubin <sup>b)</sup>	+	0	1	0	2	0	0
Urobilinogen <sup>c)</sup>	±	5	4	3	6	3	1
	+	5	1	2	4	2	4
Urinary sediment <sup>d)</sup>							
Crystal	±	9	5	5	10	5	5
Epithelial cells	±	0	0	0	0	1	1
<b>Female</b>							
Number of animals		10	5	5	10	5	5
Color	Light yellow	10	5	5	8	5	5
	Yellow	0	0	0	2	0	0
pH	5.5	1	1	0	0	0	0
	6.0	0	0	0	2	0	0
	6.5	1	1	1	2	1	0
	7.0	4	2	1	1	0	1
	7.5	2	1	1	4	2	3
	8.0	1	0	1	0	1	1
	8.5	1	0	1	0	1	0
	≥9.0	0	0	0	1	0	0
Protein <sup>a)</sup>	±	0	1	2	0	0	1
	+	6	2	1	5	0	1
	+	0	1	2	3	0	0
Ketone <sup>b)</sup>	±	3	3	3	4	0	0
Bilirubin <sup>b)</sup>	+	0	0	0	3	0	0
Urobilinogen <sup>c)</sup>	±	5	2	2	5	5	3
	+	5	3	3	5	0	2
Urinary sediment <sup>d)</sup>							
Crystal	±	8	4	4	9	3	5

a) ±:trace, +:30 mg/dL, ++:100 mg/dL.

b) ±:trace, +:slight, ++:mederate.

c) ±:0.1 EU/dL, +:1.0 EU/dL.

d) ±:a few.

Table 2 Hematological examination of rats treated orally with 2-pentylanthraquinon in 28-day repeated dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of the administration period				End of the recovery period	
	0	3.75	15	60	0	60
<b>Male</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	729 $\pm$ 43	744 $\pm$ 40	710 $\pm$ 33	691 $\pm$ 33	806 $\pm$ 12	765 $\pm$ 31*
Hemoglobin (g/dL)	14.7 $\pm$ 0.7	15.1 $\pm$ 0.7	14.1 $\pm$ 0.5	14.1 $\pm$ 0.4	15.3 $\pm$ 0.3	14.6 $\pm$ 0.5*
Hematocrit (%)	44.0 $\pm$ 2.2	45.1 $\pm$ 1.9	42.2 $\pm$ 1.6	42.2 $\pm$ 1.3	45.3 $\pm$ 0.9	43.7 $\pm$ 2.0
MCV (fL)	60.3 $\pm$ 1.5	60.6 $\pm$ 1.5	59.5 $\pm$ 2.1	61.0 $\pm$ 1.1	56.2 $\pm$ 0.5	57.1 $\pm$ 2.4
MCH (pg)	20.2 $\pm$ 0.5	20.4 $\pm$ 0.4	19.9 $\pm$ 0.8	20.5 $\pm$ 0.5	18.9 $\pm$ 0.3	19.0 $\pm$ 0.8
MCHC (g/dL)	33.4 $\pm$ 0.2	33.7 $\pm$ 0.4	33.4 $\pm$ 0.3	33.6 $\pm$ 0.3	33.6 $\pm$ 0.6	33.3 $\pm$ 0.3
Reticulocyte (%)	1.8 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.7	2.3 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.8	2.8 $\pm$ 0.6	3.3 $\pm$ 1.2
Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	110.7 $\pm$ 11.4	109.5 $\pm$ 8.1	114.2 $\pm$ 9.4	117.3 $\pm$ 8.3	120.8 $\pm$ 10.3	105.3 $\pm$ 16.0
PT (sec)	17.9 $\pm$ 3.7	20.3 $\pm$ 3.1	23.7 $\pm$ 2.5*	25.1 $\pm$ 3.6**	23.4 $\pm$ 11.6	22.8 $\pm$ 6.0
APTT (sec)	23.2 $\pm$ 2.6	25.1 $\pm$ 2.4	25.4 $\pm$ 2.0	26.3 $\pm$ 2.4	24.8 $\pm$ 3.9	25.1 $\pm$ 1.4
WBC ( $\times 100/\mu\text{L}$ )	84.2 $\pm$ 18.6	86.0 $\pm$ 15.6	90.2 $\pm$ 22.0	82.9 $\pm$ 31.0	118.8 $\pm$ 18.5	124.9 $\pm$ 31.1
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophil	16 $\pm$ 5	12 $\pm$ 4	9 $\pm$ 2*	15 $\pm$ 3	9 $\pm$ 3	11 $\pm$ 5
Eosinophil	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
Basophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte	4 $\pm$ 3	4 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	3 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2
Lymphocyte	78 $\pm$ 4	84 $\pm$ 4	88 $\pm$ 2**	81 $\pm$ 4	86 $\pm$ 4	84 $\pm$ 5
<b>Female</b>						
Number of animals	5	5	4	5	5	5
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	710 $\pm$ 21	700 $\pm$ 42	709 $\pm$ 18	694 $\pm$ 56	745 $\pm$ 14	715 $\pm$ 26
Hemoglobin (g/dL)	14.2 $\pm$ 0.3	14.2 $\pm$ 0.6	14.3 $\pm$ 0.3	14.1 $\pm$ 0.8	14.4 $\pm$ 0.4	13.9 $\pm$ 0.6
Hematocrit (%)	42.1 $\pm$ 1.0	41.9 $\pm$ 2.2	42.6 $\pm$ 1.0	42.0 $\pm$ 2.3	42.8 $\pm$ 1.0	41.1 $\pm$ 2.1
MCV (fL)	59.2 $\pm$ 1.6	59.9 $\pm$ 2.0	60.0 $\pm$ 0.5	60.6 $\pm$ 2.0	57.5 $\pm$ 0.7	57.5 $\pm$ 2.4
MCH (pg)	20.0 $\pm$ 0.5	20.2 $\pm$ 0.9	20.1 $\pm$ 0.1	20.3 $\pm$ 0.7	19.3 $\pm$ 0.4	19.4 $\pm$ 0.7
MCHC (g/dL)	33.7 $\pm$ 0.1	33.8 $\pm$ 0.8	33.5 $\pm$ 0.2	33.5 $\pm$ 0.2	33.6 $\pm$ 0.4	33.9 $\pm$ 0.4
Reticulocyte (%)	1.5 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 1.0	1.2 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.5
Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	111.8 $\pm$ 9.2	114.4 $\pm$ 10.1	113.3 $\pm$ 8.9	106.6 $\pm$ 12.7	107.6 $\pm$ 10.0	112.3 $\pm$ 8.3
PT (sec)	12.6 $\pm$ 0.4	12.7 $\pm$ 1.6	12.3 $\pm$ 0.5	13.2 $\pm$ 1.0	12.3 $\pm$ 0.4	12.3 $\pm$ 0.5
APTT (sec)	21.2 $\pm$ 2.5	21.3 $\pm$ 2.8	21.1 $\pm$ 0.6	24.1 $\pm$ 1.8	19.7 $\pm$ 1.0	19.2 $\pm$ 1.2
WBC ( $\times 100/\mu\text{L}$ )	59.9 $\pm$ 27.9	61.2 $\pm$ 9.6	60.9 $\pm$ 21.2	64.0 $\pm$ 11.1	68.6 $\pm$ 13.7	70.8 $\pm$ 12.5
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophil	11 $\pm$ 6	18 $\pm$ 12	24 $\pm$ 10	9 $\pm$ 3	10 $\pm$ 5	10 $\pm$ 4
Eosinophil	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
Basophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2*	2 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1
Lymphocyte	85 $\pm$ 6	77 $\pm$ 14	69 $\pm$ 10	88 $\pm$ 3	85 $\pm$ 7	86 $\pm$ 6

Values represent mean  $\pm$  S.D.\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$



Table 3 Blood chemical examination of rats treated orally with 2-pentylanthraquinon in 28-day repeated dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of the administration period				End of the recovery period	
	0	3.75	15	60	0	60
<b>Male</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.5 ± 0.1	5.5 ± 0.2	5.3 ± 0.2*	5.3 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.6 ± 0.4
Albumin (g/dL)	3.6 ± 0.1	3.7 ± 0.3	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.2
A/G	1.90 ± 0.19	2.00 ± 0.34	2.15 ± 0.26	1.94 ± 0.25	1.74 ± 0.22	1.67 ± 0.15
BUN (mg/dL)	16 ± 3	14 ± 2	13 ± 2	15 ± 2	16 ± 1	17 ± 2
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	159 ± 14	162 ± 9	149 ± 6	161 ± 5	160 ± 16	163 ± 20
Total cholesterol (mg/dL)	44 ± 10	46 ± 5	40 ± 10	44 ± 10	52 ± 9	46 ± 3
Triglyceride (mg/dL)	23 ± 8	28 ± 12	25 ± 12	17 ± 6	29 ± 6	32 ± 15
Total bilirubin (mg/dL)	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01
Inorganic phosphorus (mg/dL)	7.0 ± 0.5	6.9 ± 0.3	7.2 ± 0.5	7.1 ± 0.9	7.1 ± 0.5	7.4 ± 0.7
Ca (mg/dL)	9.4 ± 0.2	9.5 ± 0.3	9.2 ± 0.1	9.3 ± 0.3	9.1 ± 0.3	9.0 ± 0.2
Na (mEq/L)	142.9 ± 0.7	141.9 ± 0.9	142.4 ± 0.7	142.3 ± 1.1	143.1 ± 1.0	142.3 ± 0.9
K (mEq/L)	3.87 ± 0.19	3.88 ± 0.33	3.82 ± 0.17	3.90 ± 0.33	4.02 ± 0.28	4.05 ± 0.20
Cl (mEq/L)	105.9 ± 0.8	105.4 ± 1.7	106.3 ± 0.8	105.2 ± 0.9	105.7 ± 1.0	104.6 ± 1.2
ALP (U/L)	354 ± 68	286 ± 62	413 ± 21	268 ± 45*	245 ± 38	252 ± 43
ALT (U/L)	24 ± 6	27 ± 8	23 ± 3	24 ± 3	26 ± 6	25 ± 6
AST (U/L)	56 ± 7	60 ± 15	59 ± 6	56 ± 5	62 ± 8	58 ± 9
γ-GTP (U/L)	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 0
<b>Female</b>						
Number of animals	5	5	4	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.8 ± 0.3	5.5 ± 0.3	5.9 ± 0.2	5.8 ± 0.2	6.0 ± 0.2	6.0 ± 0.3
Albumin (g/dL)	3.9 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.7 ± 0.3	3.9 ± 0.2	4.1 ± 0.4	3.9 ± 0.2
A/G	2.15 ± 0.31	2.14 ± 0.30	1.75 ± 0.32	2.03 ± 0.25	2.13 ± 0.40	1.91 ± 0.17
BUN (mg/dL)	21 ± 3	19 ± 3	20 ± 2	19 ± 2	21 ± 3	19 ± 1
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0
Glucose (mg/dL)	130 ± 8	136 ± 23	132 ± 24	129 ± 10	163 ± 13	142 ± 12*
Total cholesterol (mg/dL)	52 ± 14	46 ± 9	56 ± 14	53 ± 9	69 ± 13	60 ± 8
Triglyceride (mg/dL)	19 ± 14	11 ± 5	22 ± 16	12 ± 4	31 ± 18	21 ± 6
Total bilirubin (mg/dL)	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Inorganic phosphorus (mg/dL)	6.3 ± 0.6	6.5 ± 0.4	6.5 ± 0.8	6.8 ± 0.5	5.4 ± 0.9	6.1 ± 0.7
Ca (mg/dL)	9.2 ± 0.5	9.3 ± 0.3	9.6 ± 0.2	9.5 ± 0.2	9.1 ± 0.3	9.3 ± 0.2
Na (mEq/L)	141.0 ± 0.8	141.7 ± 1.4	140.6 ± 1.3	141.2 ± 0.9	142.2 ± 1.2	141.7 ± 0.3
K (mEq/L)	3.76 ± 0.35	3.74 ± 0.32	3.61 ± 0.22	3.74 ± 0.26	3.93 ± 0.28	4.10 ± 0.38
Cl (mEq/L)	107.1 ± 1.2	107.9 ± 1.7	106.4 ± 1.1	107.1 ± 1.2	107.0 ± 1.2	106.7 ± 0.9
ALP (U/L)	222 ± 59	207 ± 54	207 ± 17	185 ± 44	121 ± 19	141 ± 19
ALT (U/L)	21 ± 2	21 ± 4	23 ± 2	24 ± 5	15 ± 3	15 ± 2
AST (U/L)	60 ± 6	58 ± 7	56 ± 5	59 ± 8	56 ± 13	53 ± 7
γ-GTP (U/L)	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 1

Values represent mean ± S.D.

\*p &lt; 0.05.

Table 4 Organ weights of rats treated orally with 2-pentylantraquinone in 28-day repeated dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of the administration period				End of the recovery period	
	0	3.75	15	60	0	60
<b>Male</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	340.3 ± 30.4	346.3 ± 18.7	328.1 ± 13.7	350.6 ± 21.1	391.4 ± 22.5	391.4 ± 18.5
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1869.7 ± 18.0	1955.8 ± 29.3	1947.5 ± 156.4	1915.4 ± 96.7	1929.8 ± 97.7	1920.4 ± 59.4
Thymus	505.1 ± 109.3	513.0 ± 125.7	519.4 ± 65.8	536.0 ± 108.5	368.8 ± 83.5	416.5 ± 119.5
Heart	1170.4 ± 117.0	1202.0 ± 131.1	1138.5 ± 151.1	1145.3 ± 122.1	1231.2 ± 119.0	1273.8 ± 95.4
Liver	11725.9 ± 1375.6	12016.7 ± 683.5	11025.2 ± 515.8	13687.2 ± 1158.5*	12134.8 ± 1083.4	12209.8 ± 890.4
Kidneys	2618.3 ± 285.6	2810.8 ± 386.0	2668.0 ± 113.2	2839.9 ± 157.5	2921.4 ± 64.8	3093.6 ± 191.1
Spleen	721.4 ± 81.1	759.8 ± 97.3	763.1 ± 120.6	881.8 ± 210.3	744.1 ± 55.8	835.3 ± 73.0
Thyroid gland	13.3 ± 2.6	18.9 ± 5.3	18.0 ± 0.9	17.8 ± 1.9*	15.1 ± 3.5	18.5 ± 2.8
Adrenal glands	52.1 ± 8.0	55.5 ± 8.6	46.1 ± 7.7	50.8 ± 7.2	54.4 ± 4.4	55.9 ± 5.3
Testes	2939.5 ± 268.1	3194.9 ± 424.9	2920.1 ± 250.3	3054.1 ± 161.8	2989.8 ± 168.7	3185.1 ± 259.2
Epididymides	738.0 ± 62.3	737.0 ± 88.1	712.3 ± 37.9	727.8 ± 54.3	961.3 ± 36.1	891.9 ± 24.9**
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	5.530 ± 0.500	5.660 ± 0.303	5.947 ± 0.576	5.481 ± 0.453	4.934 ± 0.186	4.914 ± 0.241
Thymus	1.490 ± 0.345	1.483 ± 0.363	1.582 ± 0.170	1.539 ± 0.359	0.951 ± 0.252	1.055 ± 0.265
Heart	3.438 ± 0.089	3.468 ± 0.289	3.471 ± 0.438	3.267 ± 0.274	3.149 ± 0.311	3.253 ± 0.162
Liver	34.458 ± 2.562	34.751 ± 2.184	33.611 ± 1.148	38.993 ± 1.096**	30.999 ± 2.186	31.171 ± 1.100
Kidneys	7.699 ± 0.559	8.093 ± 0.684	8.137 ± 0.333	8.113 ± 0.446	7.479 ± 0.382	7.921 ± 0.658
Spleen	2.122 ± 0.164	2.188 ± 0.184	2.338 ± 0.453	2.516 ± 0.577	1.910 ± 0.231	2.141 ± 0.244
Thyroid gland	0.039 ± 0.006	0.055 ± 0.015	0.055 ± 0.002**	0.051 ± 0.005	0.039 ± 0.011	0.047 ± 0.006
Adrenal glands	0.154 ± 0.026	0.161 ± 0.030	0.141 ± 0.025	0.144 ± 0.015	0.139 ± 0.015	0.144 ± 0.020
Testes	8.656 ± 0.617	9.199 ± 0.759	8.910 ± 0.803	8.736 ± 0.680	7.678 ± 0.872	8.152 ± 0.750
Epididymides	2.173 ± 0.146	2.123 ± 0.157	2.177 ± 0.187	2.080 ± 0.163	2.462 ± 0.168	2.282 ± 0.100
<b>Female</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight	205.4 ± 19.4	204.9 ± 22.2	227.4 ± 30.3	211.9 ± 15.4	252.1 ± 30.5	250.3 ± 21.8
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1759.2 ± 78.4	1770.8 ± 57.4	1815.2 ± 101.7	1745.5 ± 43.7	1829.0 ± 58.1	1842.0 ± 57.8
Thymus	441.1 ± 38.2	412.0 ± 101.4	428.5 ± 81.8	536.5 ± 71.8	437.5 ± 64.7	457.8 ± 173.9
Heart	756.8 ± 86.4	736.8 ± 90.6	829.9 ± 150.5	747.8 ± 54.1	838.4 ± 109.2	859.0 ± 66.8
Liver	6711.1 ± 890.2	6695.9 ± 1035.4	8097.3 ± 1438.9	7545.7 ± 856.5	8003.8 ± 1433.4	8029.0 ± 944.6
Kidneys	1683.7 ± 74.4	1706.8 ± 216.4	1900.3 ± 195.8	1776.6 ± 99.0	1867.3 ± 139.2	2054.5 ± 250.4
Spleen	453.3 ± 49.9	524.5 ± 81.5	500.5 ± 144.6	485.3 ± 61.3	523.9 ± 151.4	590.3 ± 44.7
Thyroid gland	13.3 ± 3.4	15.2 ± 0.5	13.8 ± 3.6	14.6 ± 3.3	16.1 ± 2.0	16.2 ± 3.5
Adrenal glands	66.8 ± 10.0	61.2 ± 7.0	69.7 ± 10.6	57.5 ± 7.2	69.5 ± 13.2	69.1 ± 7.7
Ovaries	81.0 ± 8.3	84.4 ± 7.6	79.5 ± 10.2	89.8 ± 7.7	82.3 ± 16.8	95.9 ± 18.2
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	8.611 ± 0.678	8.718 ± 0.947	8.062 ± 0.790	8.275 ± 0.651	7.329 ± 0.788	7.388 ± 0.460
Thymus	2.161 ± 0.240	2.019 ± 0.465	1.883 ± 0.244	2.542 ± 0.379	1.748 ± 0.259	1.810 ± 0.591
Heart	3.683 ± 0.199	3.598 ± 0.245	3.650 ± 0.463	3.533 ± 0.163	3.336 ± 0.354	3.446 ± 0.336
Liver	32.652 ± 2.721	32.575 ± 2.218	35.567 ± 4.354	35.550 ± 1.867	31.648 ± 2.856	32.076 ± 2.714
Kidneys	8.240 ± 0.627	8.325 ± 0.406	8.393 ± 0.503	8.418 ± 0.705	7.474 ± 0.881	8.204 ± 0.702
Spleen	2.217 ± 0.266	2.562 ± 0.317	2.170 ± 0.352	2.286 ± 0.167	2.067 ± 0.464	2.363 ± 0.135
Thyroid gland	0.065 ± 0.020	0.075 ± 0.009	0.062 ± 0.018	0.069 ± 0.015	0.064 ± 0.005	0.064 ± 0.012
Adrenal glands	0.328 ± 0.066	0.300 ± 0.029	0.309 ± 0.048	0.272 ± 0.030	0.276 ± 0.041	0.277 ± 0.030
Ovaries	0.397 ± 0.056	0.417 ± 0.070	0.354 ± 0.060	0.425 ± 0.034	0.324 ± 0.029	0.381 ± 0.051

Values represent mean ± S.D.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

Table 5 Histopathological findings of rats treated orally with 2-pentylanthraquinon in 28-day repeated dose toxicity test

	Sex	Male						Female					
		End of the administration period				End of the recovery period		End of the administration period				End of the recovery period	
		Dose(mg/kg)	0	3.75	15	60	0	60	0	3.75	15	60	0
<b>(Liver)</b>													
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	±	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]	[5]
	Total	0	0	0	4*	0	0	0	0	0	0	0	0
Single cell necrosis	±	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Fatty change, periportal	±	3	1	2	1	2	2	3	2	2	2	2	1
	+	0	1	0	0	0	0	0	3	1	2	0	0
	Total	3	2	2	1	2	2	3	5	3	4	2	1
<b>(Kidney)</b>													
Basophilic tubule	±	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]
	Total	2			2			1			3		
Hyaline droplet	±	5			3			0			0		
	+	0			1			0			0		
	Total	5			4			0			0		
Cellular infiltration, lymphocyte	±	1			1			2			2		
	Total	1			1			2			2		
<b>(Spleen)</b>													
Hematopoiesis, extramedullary	±	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]
	+	1			0			5			5		
	#	3			4			0			0		
	Total	5			5			5			5		
<b>(Heart)</b>													
Myocardial degeneration/fibrosis	±	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]
	Total	1			0			0			0		
<b>(Prostate)</b>													
Cellular infiltration, lymphocyte	+	[5]	[0]	[0]	[5]	[0]	[0]						
	#	1			0								
	Total	0			1								
Total		1			1								

[ ] number of animals examined

Grade of histopathological findings; ±:very slight, +:slight, #:moderate, total:total of positive grade.

\*p&lt;0.05(Fisher exact test).

## 2-ペンチルアントラキノンの細菌を用いる復帰変異試験

### Reverse Mutation Test of 2-Pentylanthraquinone in Bacteria

#### 要約

2-ペンチルアントラキノンの細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537<sup>1)</sup>および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup>の5菌株を用いた。用量設定試験において、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。なお、TA1537のS9 mix添加条件において、150および500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量で復帰変異コロニー数の増加傾向が認められたことから、本試験はTA1537のS9 mix添加条件では78.1~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、TA1537のS9 mix無添加条件およびそれ以外の検定菌では313~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。

その結果、TA1537のS9 mix添加条件において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められ、その増加には、再現性および用量依存性がみられた。

以上の結果から2-ペンチルアントラキノンは、用いた試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定した。

#### 方法

##### 1. 被験物質

2-ペンチルアントラキノンは、淡黄色固化固体である。用いた被験物質は、ロット番号:01-13001-50、純度:98.60%、製造:山本化成(福岡)であり、山本化成から供与された。被験物質は使用時まで密閉し、冷蔵した。本ロットの被験物質について、実験期間中安定であることが被験物質提供者において確認された。

2-ペンチルアントラキノンは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:PKJ4820, 和光純薬工業)に、超音波処理により溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。調製時に、発熱、発泡および変色は認められなかった。

##### 2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌に用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれTable中に示した。

##### 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)

アクリルアミド (AF2, 和光純薬工業)

アジ化ナトリウム (SA, 和光純薬工業)

9-アミノアクリジン (9AA, Sigma Chem.)

2-アミノアントラセン (2AA, 和光純薬工業)

AF2, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは日局注射用水に溶解したものを $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

##### 3. 検定菌

試験には、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

*S. typhimurium*の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA*株は1997年4月9日に日本バイオアッセイ研究センターの松島泰次郎博士から分与された。

検定菌は $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存したものを、各菌株の特性確認は凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)、アンピシリン耐性因子pKM101(プラスミド)の有無および陰性対照と陽性対照の復帰変異コロニー数について調べ、特性が維持されていることを確認した。

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字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

##### 4. 培地およびS9 mixの組成

###### 1) 合成培地

培地は、極東製薬工業製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地1 Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・七水和物	0.2 g
クエン酸・一水和物	2 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
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
大洋寒天(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

## 2) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)または(C)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco)	0.6 w/v%
塩化ナトリウム	0.5 w/v%
(B) <i>Salmonella typhimurium</i> 用	
L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L
(C) <i>Escherichia coli</i> 用	
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

## 3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたりの組成は下記のとおりである。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol
NADH	4 $\mu$ mol
NADPH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu$ 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)を用いた。

## 5. 試験方法

プレインキュベーション法<sup>3)</sup>により、S9 mix無添加条件およびS9 mix添加条件で試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、S9 mix無添加条件では0.1 mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mL、S9 mix添加条件ではS9 mix 0.5 mL、検定菌液0.1 mLを混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、約45°Cに保温したトップアガー2 mLを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いてそれぞれ陰性対照および陽性対照とした。用量設定試験においては、同時に実施した他試験と陰性および陽性対照の結果を共通とした。

培養は37°Cで48時間行い、発生した復帰変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈澱の有無は、肉眼により確認した。また生育阻害の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で寒天表面の菌叢の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また本試験においては、両対照および各用量につき3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。陰性および陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、結果の再現性を確認した。

## 6. 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無添加条件あるいはS9 mix添加条件において、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、陰性対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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もの(陽性)と判定することとした。

## 結果及び考察

50.0~5000  $\mu$ g/plateの範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した。その結果、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。また、被験物質に由来する沈澱は、S9 mix無添加および添加条件ともに150  $\mu$ g/plate以上の用量で認められた。なお、TA1537のS9 mix添加条件において、150および500  $\mu$ g/plateの用量で復帰変異コロニー数の増加傾向が認められた。

したがって、最高用量をすべての検定菌で5000  $\mu$ g/plateとし、公比2で5あるいは7(TA1537のS9 mix添加条件のみ)用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。復帰変異コロニー数は、TA1537のS9 mix添加条件で陰性対照値の2倍以上に増加し、その増加には再現性および用量依存性がみられた。TA1537のS9 mix無添加条件とそれ以外の検定菌においては、陰性対照値の2倍以上となる復帰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、2-ベンチルアントラキノンは、用いた試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定した。2-ベンチルアントラキノンの最大比活性は422.5(本試験I, TA1537, S9 mix添加条件の78.1  $\mu$ g/plate)で、同一条件下における陽性対照物質2AAの値の約240分の1であった。

なお2-ベンチルアントラキノンは、化学物質等安全データシート(山本化成提供資料)においてTA98およびTA1538を用いた復帰変異試験で陽性と記載されており、当研究所で実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験でも陽性の結果が得られている<sup>4)</sup>。また、関連物質であるAnthraceneについては、復帰変異試験では陰性、染色体異常試験では代謝活性化法で陽性の結果が報告されている<sup>5-7)</sup>。Anthraquinoneについては復帰変異試験で弱いながらも陽性の結果が報告されている<sup>8)</sup>。2-Ethylanthraquinoneについては復帰変異試験では陰性、染色体異常試験では陽性の結果が報告されている<sup>9,10)</sup>。2-Aminoanthraquinoneについては染色体異常試験で陽性の結果が報告されている<sup>11)</sup>。

## 文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res*, 113:173-215(1983).

- 2) Green MHL: Mutagen testing using Trp<sup>+</sup> reversion in *Escherichia coli*. In "Handbook of Mutagenicity Test Procedures", Kilbey BJ, Legator M, Nichols W et al. (eds.), Elsevier, Amsterdam(1984)pp.161-187.
- 3) Matsushima T, Sugimura T, Nagao M et al.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. In "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens", Norpoth KH, Garner RC(eds.), Springer, Berlin(1980)pp.273-285.
- 4) 山影康次ら:2-ベンチルアントラキノンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験. 化学物質毒性試験報告, 13:309-313(2006).
- 5) 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 日本化学物質安全・情報センター, 東京(1996)p.185.
- 6) 賀田恒夫, 石館基(監修):「環境変異原性データ集1」サイエンティスト社, 東京(1980)pp.50-51.
- 7) 祖父尼俊雄(監修):「染色体異常試験データ集」1998年版, エル・アイ・シー, 東京(1999)p.60.
- 8) 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 日本化学物質安全・情報センター, 東京(1996)pp.206-208.
- 9) 中嶋圓ら:2-エチルアントラキノンの細菌を用いる復帰変異試験. 化学物質毒性試験報告, 8:190-195(2001).
- 10) 中嶋圓ら:2-エチルアントラキノンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験. 化学物質毒性試験報告, 8:196-199(2001).
- 11) 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 日本化学物質安全・情報センター, 東京(1996)pp.504-505.

連絡先

試験責任者: 須井 哉  
 試験担当者: 川上久美子, 大山徳子, 三枝克彦,  
 加藤初美  
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
 〒257-8523 秦野市落合729-5  
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Hajime Sui (Study Director)  
 Kumiko Kawakami, Noriko Ohyama,  
 Katsuhiko Saegusa, Hatsumi Kato  
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
 Center  
 729-5 Ochiai, Hadano-shi,  
 Kanagawa, 257-8523, Japan  
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Mutagenicity of 2-pentylanthraquinone in bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)														
		Base-pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	130	126	137	13	19	18	23	18	26	14	18	21	6	7	8
		(131 $\pm$ 6)			(17 $\pm$ 3)			(22 $\pm$ 4)			(18 $\pm$ 4)			(7 $\pm$ 1)		
	313 †	113	101	112	17	14	15	23	28	22	19	18	19	9	12	4
		(109 $\pm$ 7)			(15 $\pm$ 2)			(24 $\pm$ 3)			(19 $\pm$ 1)			(8 $\pm$ 4)		
	625 †	149	127	146	16	11	17	31	21	20	15	18	15	10	9	6
		(141 $\pm$ 12)			(15 $\pm$ 3)			(24 $\pm$ 6)			(16 $\pm$ 2)			(8 $\pm$ 2)		
	1250 †	108	106	146	13	17	16	28	25	23	13	11	12	6	7	9
		(120 $\pm$ 23)			(15 $\pm$ 2)			(25 $\pm$ 3)			(12 $\pm$ 1)			(7 $\pm$ 2)		
	2500 †	97	115	116	13	15	16	25	26	23	19	16	11	4	5	4
		(109 $\pm$ 11)			(15 $\pm$ 2)			(25 $\pm$ 2)			(15 $\pm$ 4)			(4 $\pm$ 1)		
	5000 †	114	139	128	13	12	15	21	15	25	19	20	16	8	9	6
		(127 $\pm$ 13)			(13 $\pm$ 2)			(20 $\pm$ 5)			(18 $\pm$ 2)			(8 $\pm$ 2)		
S9 mix (+)	0	157	115	130	18	16	9	17	21	26	24	26	22	8	10	16
		(134 $\pm$ 21)			(14 $\pm$ 5)			(21 $\pm$ 5)			(24 $\pm$ 2)			(11 $\pm$ 4)		
	78.1	NT			NT			NT			NT			45	48	39
														(44 $\pm$ 5)		
	156 †	NT			NT			NT			NT			45	55	60
														(53 $\pm$ 8)		
	313 †	162	176	136	8	6	10	23	32	28	33	28	15	36	49	50
		(158 $\pm$ 20)			(8 $\pm$ 2)			(28 $\pm$ 5)			(25 $\pm$ 9)			(45 $\pm$ 8)		
625 †	163	153	152	6	7	11	26	24	28	23	28	37	26	46	50	
	(156 $\pm$ 6)			(8 $\pm$ 3)			(26 $\pm$ 2)			(29 $\pm$ 7)			(41 $\pm$ 13)			
1250 †	126	121	132	12	10	17	19	28	26	16	27	14	42	32	33	
	(126 $\pm$ 6)			(13 $\pm$ 4)			(24 $\pm$ 5)			(19 $\pm$ 7)			(36 $\pm$ 6)			
2500 †	103	130	123	13	7	6	30	34	24	20	26	29	27	30	30	
	(119 $\pm$ 14)			(9 $\pm$ 4)			(29 $\pm$ 5)			(25 $\pm$ 5)			(29 $\pm$ 2)			
5000 †	115	116	139	8	13	13	23	33	24	21	25	17	28	20	26	
	(123 $\pm$ 14)			(11 $\pm$ 3)			(27 $\pm$ 6)			(21 $\pm$ 4)			(25 $\pm$ 4)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2 <sup>a</sup>			SA <sup>b</sup>			AF2			AF2			9AA <sup>c</sup>		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	467	487	492	575	526	564	155	186	166	512	495	550	306	209	367
	(482 $\pm$ 13)			(555 $\pm$ 26)			(169 $\pm$ 16)			(519 $\pm$ 28)			(294 $\pm$ 80)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA <sup>d</sup>			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	712	705	773	363	333	357	979	990	970	398	398	334	212	211	228
	(730 $\pm$ 37)			(351 $\pm$ 16)			(980 $\pm$ 10)			(377 $\pm$ 37)			(217 $\pm$ 10)			

Negative control; Dimethyl sulfoxide

The purity of the test substance was 98.60 %.

This substance contained 0.5 % anthraquinone and 0.9 % unspecified as impurities.

a) 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, b) Sodium azide, c) 9-Aminoacridine, d) 2-Aminoanthracene

†; Precipitate was observed on the surface of agar plates.

NT; Not tested

Table 2 Mutagenicity of 2-pentylantraquinone in bacteria (II)

With(+) or without(-) S9 mix	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>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	115	122	117	6	12	6	22	16	18	26	14	23	7	13	10
		(118 ± 4)			(8 ± 3)			(19 ± 3)			(21 ± 6)			(10 ± 3)		
	313 †	133	129	136	7	8	8	19	18	17	20	15	19	9	14	8
		(133 ± 4)			(8 ± 1)			(18 ± 1)			(18 ± 3)			(10 ± 3)		
	625 †	122	127	107	6	5	10	24	16	27	23	21	21	9	12	6
		(119 ± 10)			(7 ± 3)			(22 ± 6)			(22 ± 1)			(9 ± 3)		
1250 †	110	134	113	9	5	10	17	16	20	23	23	19	8	10	9	
	(119 ± 13)			(8 ± 3)			(18 ± 2)			(22 ± 2)			(9 ± 1)			
2500 †	142	127	149	7	8	11	24	20	22	16	19	17	5	6	4	
	(139 ± 11)			(9 ± 2)			(22 ± 2)			(17 ± 2)			(5 ± 1)			
5000 †	118	137	130	11	11	9	24	13	20	23	26	17	10	9	9	
	(128 ± 10)			(10 ± 1)			(19 ± 6)			(22 ± 5)			(9 ± 1)			
S9 mix (+)	0	132	149	110	5	11	7	30	25	26	36	34	30	15	14	14
		(130 ± 20)			(8 ± 3)			(27 ± 3)			(33 ± 3)			(14 ± 1)		
	78.1	NT			NT			NT			NT			47	37	45
														(43 ± 5)		
	156 †	NT			NT			NT			NT			48	57	51
														(52 ± 5)		
	313 †	190	187	160	8	7	11	29	34	29	27	25	25	36	47	50
		(179 ± 17)			(9 ± 2)			(31 ± 3)			(26 ± 1)			(44 ± 7)		
625 †	170	164	123	11	7	5	20	24	23	28	23	18	53	40	31	
	(152 ± 26)			(8 ± 3)			(22 ± 2)			(23 ± 5)			(41 ± 11)			
1250 †	142	139	131	4	9	8	21	31	21	28	22	33	20	29	28	
	(137 ± 6)			(7 ± 3)			(24 ± 6)			(28 ± 6)			(26 ± 5)			
2500 †	120	125	127	9	7	6	23	24	20	19	27	22	25	22	26	
	(124 ± 4)			(7 ± 2)			(22 ± 2)			(23 ± 4)			(24 ± 2)			
5000 †	140	133	145	6	18	5	23	18	19	26	25	18	18	20	19	
	(139 ± 6)			(10 ± 7)			(20 ± 3)			(23 ± 4)			(19 ± 1)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2 <sup>a)</sup>			SA <sup>b)</sup>			AF2			AF2			9AA <sup>c)</sup>		
	Dose (μg/plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	479	473	500	555	599	602	164	136	128	529	543	481	247	315	332
	(484 ± 14)			(585 ± 26)			(143 ± 19)			(518 ± 33)			(298 ± 45)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA <sup>d)</sup>			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg/plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	689	752	730	334	365	362	913	921	884	441	388	399	190	243	188
	(724 ± 32)			(354 ± 17)			(906 ± 19)			(409 ± 28)			(207 ± 31)			

Negative control; Dimethyl sulfoxide

The purity of the test substance was 98.60 %.

This substance contained 0.5 % anthraquinone and 0.9 % unspecified as impurities.

a) 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, b) Sodium azide, c) 9-Aminoacridine, d) 2-Aminoanthracene

†; Precipitate was observed on the surface of agar plates.

NT; Not tested



## 2-ペンチルアントラキノンのチャイニーズ・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 2-Pentylanthraquinone in Cultured Chinese Hamster Cells

#### 要約

2-ペンチルアントラキノンのチャイニーズ・ハムスター肺由来細胞(CHL/IU細胞)を用いる染色体異常試験を実施した。

S9 mix非存在下および存在下で短時間処理(6時間処理後18時間の回復時間)および24時間連続処理(S9 mix非存在下)で、濃度に依存して急激に増殖率が低下した。50%の増殖抑制濃度はそれぞれ0.040 mg/mL, 0.060 mg/mLおよび0.034 mg/mLと推定された。

これらの結果に基づき、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理ともに、50%増殖抑制濃度の約1.5倍の濃度を最高処理濃度とし、公比1.5で5段階の濃度群(S9 mix非存在下:0.012~0.060 mg/mL, S9 mix存在下:0.018~0.090 mg/mL)を設定し、染色体異常試験を実施した。

細胞増殖率および分裂指数より、S9 mix非存在下および存在下ともに0.027, 0.040, 0.060 mg/mLの3濃度について染色体分析を行った。

その結果、S9 mix非存在下で短時間処理した場合は、染色体の構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的な有意差は認められなかった。一方、S9 mix存在下で短時間処理した場合においては、濃度に依存して構造異常を有する細胞が増加し、高濃度群(0.060 mg/mL)において、統計学的な有意差が認められた(15.5%)。また倍数性細胞については中濃度群(0.040 mg/mL)および高濃度群(0.060 mg/mL)で倍数性細胞の統計学的な有意差が認められた(2.4%および1.4%)。

以上の結果より、2-ペンチルアントラキノンは、本試験条件下でCHL/IU細胞に染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

#### 方法

##### 1. 細胞

CHL/IU細胞はチャイニーズ・ハムスター、肺由来で、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23代)した。試験には、解凍後継代10代以内で試験に用いた。仔牛血清(CS, Cansera International)を10 vol%添加したイーグルMEM(日本製薬)培養液を用い、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。

##### 2. S9 mix

S9(キッコーマン)は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入し、S9 mixは使用時に調製した。各成分の最終濃度はS9 5 vol%, グルコース-6-リン酸(Sigma Chemical)0.83 mmol/L, β-ニコチンアミドアデニンジスクレオチドリン酸(オリエンタル酵母工業)0.67 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 0.83 mmol/L, KCl 5.5 mmol/L, HEPES緩衝液(pH 7.2)0.67 mmol/Lとした。

##### 3. 被験物質

被験物質である2-ペンチルアントラキノンのロット番号:01-13001-50, 山本化成(福岡)は純度:98.6%(GC, 不純物としてフリーアントラセン0.5%を含む)、淡黄色固状物である。被験物質は使用時まで密閉容器に入れ、冷蔵(2~8°C)で保管した。また、被験物質は実験期間中安定であったことが、被験物質提供者において確認された。

##### 4. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に用いた。溶媒はアセトン(和光純薬工業)を用いて原液を調製した(細胞増殖抑制試験では560 mg/mL, 染色体異常試験では18 mg/mL)。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 vol%になるように加えた。なお、被験物質を溶媒に溶解させた際、発熱、発泡、変色などの変化はなかった。

##### 5. 陽性対照物質

陽性対照群については、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理では、マイトマイシンC(MMC, 協和醗酵工業)およびシクロホスファミド(CP, Sigma Chemical)溶液を日局注射用水(大塚製薬工場)で調製し、最終濃度がそれぞれ0.1 μg/mLおよび10 μg/mLとなるように添加した。

##### 6. 培養条件

4×10<sup>5</sup>個/mLのCHL/IU細胞懸濁液をディッシュ(直径6 cm)あたり5 mL(2×10<sup>4</sup>個)に加え、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で3日間培養した。その後、短時間処理では、血清入りの培地によりS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、リン酸緩衝塩類溶液で洗浄、新鮮な培養液でさらに18時間培養した。また、連続処理では、新鮮培地

と交換後、被験物質を加え、24時間処理した。

7. 細胞増殖抑制試験

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およぼす影響を調べた。

いずれの処理条件においても、2.8 mg/mL (10 mmol/L) を最高処理濃度とし、0.022~2.8 mg/mL の濃度範囲(公比2, 8濃度)で処理を行い、各用量2枚のディッシュを用いた。なお、処理開始時において、短時間処理した場合には0.35 mg/mL以上の濃度で、連続処理した場合には0.18 mg/mL以上の濃度で肉眼観察による沈殿が認められた。処理終了時にはS9 mix非存在下で短時間処理した場合、0.18 mg/mL以上、S9 mix存在下で短時間処理した場合および24時間連続処理した場合には、0.088 mg/mL以上で肉眼観察による沈殿が認められた。

培養終了後、10 vol%ホルマリン溶液で細胞を固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス販売)を用い、溶媒を添加した陰性対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測した。処理系列は陰性対照群と被験物質処理群とした。

その結果、S9 mix非存在下および存在下で短時間処理した場合には、50%の増殖抑制濃度はそれぞれ0.040 mg/mLおよび0.060 mg/mLと推定された(Fig. 1)。また、24時間連続処理した場合、50%の増殖抑制濃度は0.034 mg/mLと推定された(Fig. 1)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理ともに、50%増殖抑制濃度の約

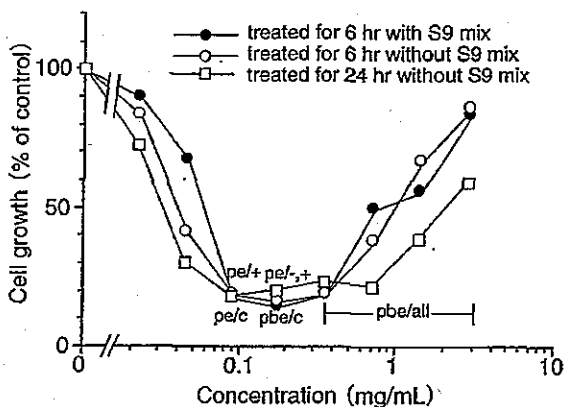


Fig. 1. Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-pentylanthraquinone

- pbe/all: Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in all test systems.
- pbe/c: Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in 24 hr continuous treatment.
- pe/c: Precipitation was observed at the end of the treatment in the 24 hr continuous treatment.
- pe/+,+: Precipitation was observed at the end of the treatment in the short-term treatment with and without S9 mix.
- pe/+: Precipitation was observed at the end of the treatment in the short-term treatment with S9 mix.

1.5倍の濃度を最高処理濃度とし、公比1.5で5段階の濃度群(S9 mix非存在下:0.012, 0.018, 0.027, 0.040, 0.060 mg/mL, S9 mix存在下:0.018, 0.027, 0.040, 0.060, 0.090 mg/mL)を設定した。

染色体異常試験においては、各用量4枚のディッシュ(陽性対照群では2枚)を用いた。陽性対照群以外では2枚のディッシュを用い染色体標本作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。処理系列は陰性対照群、陽性対照群および被験物質処理群とした。

9. 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。作製した標本は3 vol%ギムザ溶液で染色した。

10. 染色体分析

細胞増殖率と分裂指数を細胞毒性の指標として、20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2), 観察可能な最高濃度は、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理ともに0.060 mg/mLであったことから、この濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

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・哺乳動物試験分科会(MMS)<sup>11)</sup>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(染色体数が38本以上)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。

11. 判定

染色体異常(ギャップを除く)を有する細胞の出現頻度について、陰性対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法<sup>2)</sup>により、有意差検定を実施した( $p < 0.01$ , 片側)。また、フィッシャーの直接確率法により有意差が認められた群を有する処理条件については、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定<sup>3)</sup> ( $p < 0.01$ , 片側)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

結果および考察

2-ベンチルアントラキノンにS9 mix非存在下で短時間処理した場合、いずれの濃度群においても染色体の構

造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的な有意差は認められなかった (Table 1). なお、高濃度群 (0.060 mg/mL) では強い増殖抑制のために800個の分裂中期細胞について倍数性細胞の分析を行うことが出来なかった。一方、S9 mix存在下で短時間処理した場合には、濃度に依存して染色体の構造異常を有する細胞の出現率が増加し、高濃度群 (0.060 mg/mL) では統計学的に有意な増加 (15.5%) が認められ、陽性の結果が得られた (Table 2)。また、倍数性細胞についても、中濃度群 (0.040 mg/mL) および高濃度群 (0.060 mg/mL) で統計学的に有意な増加 (それぞれ2.4%および1.4%) が認められ、陽性の結果が得られた (Table 2)。なお、2-ベンチルアントラキノンにより誘発された倍数性細胞には、核内倍加した細胞が多く観察された。

陽性の結果が得られたS9 mix存在下の短時間処理について  $D_{20}$  値<sup>4)</sup>を求めたところ、構造異常については0.098 mg/mLとなった。倍数性細胞については0.76 mg/mLとなったが、染色体分析を行った最高濃度 (0.060 mg/mL) の10倍以上の濃度であることから対象外となった。

陽性対照物質として用いたMMCは、S9 mix非存在下で短時間処理した場合において染色体の構造異常を誘発し (Table 1)、CPはS9 mix存在下で短時間処理した場合において染色体の構造異常を誘発した (Table 2)。これらの陽性対照物質の結果より、本実験系の成立が確認された。

なお、2-ベンチルアントラキノンについては、当研究所で実施した細菌を用いる復帰変異試験で陽性の結果が得られている<sup>9)</sup>。また、2-ベンチルアントラキノンの基本骨格と考えられるAnthraceneや2-ベンチルアントラキノンのベンチル基がエチル基あるいはアミノ基に置換した2-Ethylanthraquinoneや2-Aminoanthraquinoneについても染色体異常試験で陽性の結果が報告されている<sup>6-8)</sup>。これらのことから、Anthraceneを基本骨格とする化合物は直接あるいは代謝活性化されて染色体異常誘発作用を示すと考えられる。

以上の結果より、2-ベンチルアントラキノンには、本試験条件下でCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

#### 参考文献

- 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)pp.16-37.
- 2) 吉村功(編):「毒性・薬効データの統計解析、事例研究によるアプローチ」サイエンティスト社、東京(1987)pp.76-78.
- 3) 吉村功、大橋靖夫(編):「毒性試験講座14、毒性試験データの統計解析」地人書館、東京(1992)pp.218-223.
- 4) 石館基(監修):「<改定>染色体異常試験データ集」エル・アイ・シー、東京(1987)p.23.

- 5) 須井哉ら:2-ベンチルアントラキノンの細菌を用いる復帰変異試験. 化学物質毒性報告, 13:304-308 (2006).
- 6) 祖父尼俊雄(監修):「染色体異常試験データ集」改訂1998年版, エル・アイ・シー, 東京(1999)p.60.
- 7) 中嶋圓ら:2-エチルアントラキノンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験. 化学物質毒性試験報告, 8:196-199(2001).
- 8) 労働安全衛生法有害性調査精度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 社団法人化学物質安全・情報センター, 東京(1986)pp.504-505.

#### 連絡先

試験責任者: 山影康次

試験担当者: 山影康次, 浅田 晋, 高橋俊孝,  
若栗 忍, 中川ゆづき, 橋本恵子,  
三枝克彦, 加藤初美

(財)食品薬品安全センター-秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

#### Correspondence

Authors: Kohji Yamakage (Study director)

Kohji Yamakage, Shin Asada,

Toshitaka Takahashi,

Shinobu Wakuri, Yuzuki Nakagawa,

Keiko Hashimoto, Katsuhiko Saegusa,

Hatsumi Kato

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,

Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

染色体異常試験

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-pentylanthraquinone (PAQ) for 6 hr without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Concurrent cell growth (%)	Mitotic index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others <sup>5)</sup>	Number of cells with aberrations		Number of polyploid cells <sup>6)</sup> (%)	Trend test <sup>7)</sup>
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>8)</sup>	total		+gap (%)	-gap (%)		
Negative <sup>9)</sup>	0	-	6-(18)	100	—	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)	
						100	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	
						200	0	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	1 (0.1)	
PAQ	0.012	-	6-(18)	92	—	not observed												
PAQ	0.018	-	6-(18)	91	—	not observed												
PAQ	0.027	-	6-(18)	87	—	100	0	3	0	0	1	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	2 (0.5)	
						100	1	5	0	1	0	0	7	0	7 (7.0)	6 (6.0)	1 (0.3)	
						200	1	8	0	1	1	0	11	0	11 (5.5)	10 (5.0)	3 (0.4)	
PAQ	0.040	-	6-(18)	66	—	100	1	1	0	1	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	1 (0.3)	
						100	0	2	0	0	0	0	2	1	2 (2.0)	2 (2.0)	2 (0.5)	
						200	1	3	0	1	0	0	5	1	5 (2.5)	4 (2.0)	3 (0.4)	
PAQ	0.060	-	6-(18)	38	2.0, 2.2	100	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)	
						100	0	2	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)	
						200	0	5	1	0	0	0	6	0	6 (3.0)	6 (3.0)	1 (0.1) <sup>1)</sup>	
MMC	0.1 µg/mL	-	6-(18)	—	—	100	5	19	35	3	0	0	62	0	41 (41.0)	39 (39.0)	1 (0.3)	
						100	4	17	17	2	0	0	40	0	31 (31.0)	29 (29.0)	1 (0.3)	
						200	9	36	52	5	0	0	102	0	72 (36.0)	68* (34.0)	2 (0.3)	

Abbreviations; gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), mul:multiple aberrations, POL:polyploid, MMC:mitomycin C, NT:not tested.  
 1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 0.5 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater<sup>TM</sup>. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test at p<0.01 (one-side). 8) Seven hundred and seventy-five cells were analyzed.  
 \*; Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-pentylanthraquinone (PAQ) for 6 hr with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Concurrent cell growth <sup>2)</sup> (%)	Mitotic index <sup>3)</sup> (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others <sup>5)</sup>	Number of cells with aberrations		Number of polyploid cells <sup>6)</sup> (%)	Trend test <sup>7)</sup>
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>4)</sup>	total		+gap (%)	-gap (%)		
Negative <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	100	—	100	1	2	2	3	2	0	10	0	7 (7.0)	7 (7.0)	0 (0.0)	
						100	2	0	0	1	0	0	3	0	3 (3.0)	1 (1.0)	1 (0.3)	
						200	3	2	2	4	2	0	18	0	10 (5.0)	8 (4.0)	1 (0.1)	
PAQ	0.018	+	6-(18)	89	—		not observed											
PAQ	0.027	+	6-(18)	89	—	100	4	3	1	0	0	0	8	0	8 (8.0)	4 (4.0)	1 (0.3)	
						100	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	8 (2.0)	
						200	4	5	1	0	0	0	10	0	10 (5.0)	6 (3.0)	9 (1.1)	
PAQ	0.040	+	6-(18)	84	—	100	0	3	1	0	0	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	6 (1.5)	
						100	2	8	7	2	0	0	19	0	13 (13.0)	11 (11.0)	13 (3.3)	
						200	2	11	8	2	0	0	23	0	17 (8.5)	15 (7.5)	19* (2.4)	+
PAQ	0.060	+	6-(18)	67	1.2, 1.4	100	0	2	6	3	0	0	11	0	7 (7.0)	7 (7.0)	3 (0.8)	
						100	2	17	30	0	0	10	59	0	24 (24.0)	24 (24.0)	8 (2.0)	
						200	2	19	36	3	0	10	70	0	31 (15.5)	31* (15.5)	11* (1.4)	
PAQ	0.090	+	6-(18)	23	1.4, 0.0	not observed due to the small number of metaphases												
CP	10 µg/mL	+	6-(18)	—	—	100	4	20	43	3	0	0	70	0	43 (43.0)	42 (42.0)	4 (1.0)	
						100	1	21	55	1	1	10	89	0	50 (50.0)	49 (49.0)	0 (0.0)	
						200	5	41	98	4	1	10	159	0	93 (46.5)	91* (45.5)	4 (0.5)	

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, POL: polyploid, CP: cyclophosphamide.

1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 0.5 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at  $p < 0.01$  (one-side).

\*: Significantly different from the negative control at  $p < 0.01$  (one-side) by Fisher's exact probability test.