

1,4ジエチルベンゼンのラットを用いる単回経口投与毒性試験

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

要約

既存化学物質の安全性を評価するため、1,4ジエチルベンゼンを雌雄のCrj: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が、雌ではさらに流涙が認められた。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

1,4ジエチルベンゼン (CAS No.105-05-5, 東レ(株)製造, (社)日本化学工業協会提供) は芳香性の臭気がある無色透明の液体で分子式C₁₀H₁₄, 分子量134.22の物質である。本試験に用いたロット40803の純度は97.2%であった。

2. 供試動物

5週齢のCrj: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158~170g, 雌で126~132g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、株式会社 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(ナカライテスト株式会社, 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ダを用い、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雌雄全例にみられ、さらに投与後4時間に流涙が雌1例に認められた。これらの症状は比較的軽度で、投与後5時間までに全て消失した。

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。

単回投与毒性試験

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 1,4-diethylbenzene

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Mortality (mg/kg)	LD ₅₀ values
Male	2,000	5	0/5	>2,000
Female	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 81-538-58-1393

Correspondence

Authors: Kousuke Oba (Study director),
Atsushi Fujishima
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-Pyo Center)
582-2 Shioshinden Arahama, Fukuda-cho, Iwata-gun,
Shizuoka, 437-12, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

1,4ジエチルベンゼンのラットを用いる単回経口投与毒性試験

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

要約

既存化学物質の安全性を評価するため、1,4ジエチルベンゼンを雌雄のCrj: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が、雌ではさらに流涙が認められた。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

1,4ジエチルベンゼン (CAS No.105-05-5, 東レ(株)製造, (社)日本化学工業協会提供) は芳香性の臭気がある無色透明の液体で分子式C₁₀H₁₄, 分子量134.22の物質である。本試験に用いたロット40803の純度は97.2%であった。

2. 供試動物

5週齢のCrj: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158~170g, 雌で126~132g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、株式会社 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(ナカライテスト株式会社, 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ダを用い、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雌雄全例にみられ、さらに投与後4時間に流涙が雌1例に認められた。これらの症状は比較的軽度で、投与後5時間までに全て消失した。

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。

3. 群分け

雌雄とも投与開始日の体重をもとに層別化し、無作為抽出法により1群当たり12匹を振り分けた。群分け後の動物の識別は個体別に耳パンチをするとともにケージごとに動物標識番号(Animal ID-No.)をつけた。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験の用量は、先に実施したラットを用いた予備試験の結果を参考にして決定した。すなわち、0, 500, 750および1000mg/kgを雄および雌に2週間連続経口投与した結果、雌雄の750mg/kg以上の投与群で肝臓の肥大が認められた。器官重量では、雌雄の500mg/kg以上の投与群で肝臓重量が増加し、さらに雄の750mg/kg以上の投与群で腎臓重量が増加した。以上の結果を基に本試験の高用量を750mg/kgに設定し、以下公比5にて除し、中用量を150mg/kg、低用量を30mg/kgにそれぞれ設定した。

投与経路は、OECDガイドライン「反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験」で指示されている投与経路に準じて強制経口投与とした。投与容量は、体重100g当り0.5mlとし、個体別に測定した最新体重に基づいて算出を行い、胃ゾンデを用いて毎日1回(7日/週)強制経口投与した。対照群にはコーンオイルのみを投与した。

雄の投与期間は、交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後16日間の連続44日間とした。雌の投与期間は、交配前14日間と交配期間中(交尾成立まで最長14日間)ならびに交尾成立雌の妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで(40~51日間)とした。なお、交尾の成立しなかった雌は交配期間終了後の解剖前日まで44日間とし、交尾は成立したが妊娠が成立しなかった雌は妊娠25日の解剖前日までの40日間とした。

5. 観察および検査

1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

2) 体重

雄では、投与1(投与開始日)、8, 15, 22, 29, 36, 43および45日(剖検日)に測定し、投与1から43日までの体重増加量を算出した。雌では、投与1(投与開始日)、8, 15および22日に測定し、投与1から15日までの体重増加量を算出した。交尾の成立しなかった雌はそれ以後の投与29, 36, 43および45日に測定した。また、交尾が成立した雌は、妊娠0, 7, 14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に測定し、それぞれ妊娠0から21日および哺育0から4日までの体重増加量を算出した。

3) 摂餌量

雄では、投与1(投与開始日)、8, 15, 29, 36, 43および44日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日および投与29から44日までの累積摂餌量を算出した。雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に、交尾の成立しなかった雌はそれ以降の投与29, 36および43日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日までの累積摂餌量を算出した。また、交尾成立の雌は妊娠0, 7, 14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂

餌量を算出するとともにそれぞれ妊娠0から21日および哺育0から4日までの累積摂餌量を算出した。なお、交配期間中の摂餌量は測定しなかった。

4) 交配

交配前7日間(交配開始日を含めて8日間)の性周期観察を行った雌を同群内の雄のケージに入れ1対1で最長2週間毎晩同居させた。翌朝、陰垢中の精子確認をもって交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。交配結果から、各群について交尾率[(交尾成立動物数/同居動物数)×100]および受胎率[(受胎動物数/交尾成立動物数)×100]を求めた。性周期の観察は交尾成立日まで行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数とし平均性周期を算出した。

5) 自然分娩時および新生児の観察

交尾成立動物は全例を自然分娩させた。分娩の確認は午前中(午前9~12時)に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した個体についてその日を哺育0日とした。午前12時以降に分娩したものは、翌日を哺育0日とした。分娩を確認した全例について妊娠期間(哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数)および出産率[(生児出産雌数/受胎雌数)×100]を求めた。

新生児は哺育0日に出生児数(生存児+死亡児)を調べ、分娩率[(総出生児数/着床数)×100]および出生率[(出生児数/総出生児数)×100]を求めた。生存児については性別を判定するとともに外形異常の有無を調べた。また、哺育0および4日に雌雄別の同腹児重量を測定し、雌雄別1匹当たりの平均重量を算出した。哺育4日の新生児の同腹児重量を測定後に新生児全例をエーテル麻酔により屠殺し、主要器官の肉眼観察を行った。なお、哺育期間中の死亡児についても同様に主要器官の肉眼観察を行った。また、新生児の4日生存率[(哺育4日生児数/出生児数)×100]を求めた。

6) 臨床検査

各群の雌全例について剖検時に実施した。動物を約16時間絶食させた後、エーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血した。

a) 血液学的検査

検査はEDTA-3Kを添加した初血について、THMS H 6000(テクニコン社)を用いて白血球数(WBC:暗視野板法)、赤血球数(RBC:暗視野板法)、ヘマトクリット値(HCT:全赤血球の容積より補正)、ヘモグロビン量(HGB:シアンメトヘモグロビン法)、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)を測定した。

b) 血液生化学的検査

検査はクリーンシール(株)ヤトロン)に血液を採取し、30分間放置後3,000r.p.m.7分間遠心分離して得た血清について、多項目生化学自動分析装置CentrifChem ENCORE II(ベーカー社)およびEKTACHEM 700N(コダック社)を用いて総蛋白(ビューレット法)、アルブミン(B.C.G法)、A/G(計算値)、血糖(グルコースオキシダーゼ法)、尿素窒素(ウレアーゼ改良

法), クレアチニン (Jaffe法), 総ビリルビン (ジアゾ色素法), グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (Karmen改良法), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (Karmen改良法), γ -グルタミルトランスアミナーゼ (Szasz 改法), カリウム (電極法), 塩素 (電極法), カルシウム (アルセナゾIII色素法) および無機リン (モリブデン酸アンモニウム法) を測定した。

6. 病理学検査

1) 剖検および器官重量

a) 雄動物

44日間投与した日の夕方から餌を除き, 約16時間の絶食させた翌日にエーテル麻酔下で安楽死させた。剖検では主要器官の肉眼的観察を行い, 胸腺, 肝臓, 腎臓, 精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比 (相対重量) を求めた。また, 全動物の重量測定器官に加えて脳, 心臓, 脾臓, 副腎, 精囊, 前立腺, 下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として肺を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお, 精巣および精巣上体はブアン氏液で固定した。

b) 自然分娩した雌

哺育4日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた。剖検では主要器官の肉眼的観察を行った後, 胸腺, 肝臓, 腎臓および卵巣重量を測定し器官重量・体重比 (相対重量) を求めた。また, 全動物の重量測定器官に加えて脳, 心臓, 脾臓, 副腎, 下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として腹腔内の塊を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。剖検時に黄体数および着床数を調べ, 着床率 [(着床数/妊娠黄体数) \times 100] を求めた。

c) 交尾不成立の雌

44日間投与した翌日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた。剖検では主要器官の肉眼的観察を行い, 皮膚, 乳腺, リンパ節, 唾液腺, 胸骨, 大腿骨 (骨髄を含む), 胸腺, 気管, 肺および気管支, 心臓, 甲状腺および上皮小体, 舌, 食道, 胃, 十二指腸, 小腸, 大腸, 肝臓, 脾臓, 膵臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 卵巣, 子宮, 陰, 眼球, ハーダー腺, 脳, 下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

d) 自然分娩の認められない雌

妊娠25日に, エーテル麻酔下で放血安楽死させた。剖検では主要器官の肉眼的観察を行った後, 皮膚, 乳腺, リンパ節, 唾液腺, 胸骨, 大腿骨 (骨髄を含む), 胸腺, 気管, 肺および気管支, 心臓, 甲状腺および上皮小体, 舌, 食道, 胃, 十二指腸, 小腸, 大腸, 肝臓, 脾臓, 膵臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 卵巣, 子宮, 陰, 眼球, ハーダー腺, 脳, 下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。着床痕が認められない動物は妊娠不成立と判定した。

e) 全児死亡の認められた雌

生存児すべての死亡または喉殺が確認された日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた。剖検では主要器官の肉眼的観察を行った後, 皮膚, 乳腺, リンパ節, 唾液腺, 胸骨, 大腿骨 (骨髄を含む), 胸腺, 気管, 肺および気管支, 心臓, 甲状腺および上皮小体, 舌, 食道, 胃, 十二指腸, 小腸, 大腸, 肝臓, 脾臓, 膵臓, 腎臓, 副腎,

膀胱, 卵巣, 子宮, 陰, 眼球, ハーダー腺, 脳, 下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

2) 病理組織学検査

a) 妊娠を成立させた雄

対照群と高用量群全例の脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 精巣および病変部組織として肺について実施した。なお, 150 mg/kg 以上の投与群で腎臓重量が, 750 mg/kg 群で肝臓重量がそれぞれ増加したため, 30および150 mg/kg群の全例の肝臓および腎臓についても組織学検査を実施した。

b) 自然分娩した雌

対照群と高用量群全例の脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 卵巣および病変部組織として腹腔内の塊について実施した。なお, 750 mg/kg 群で肝臓重量が増加し, 雄で腎臓重量の増加が認められたため, 30および150 mg/kg群の全例の肝臓および腎臓についても組織学検査を実施した。

c) 交尾の成立しなかった雌雄

全例の脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 陰, 子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上体, 精囊, 前立腺および下垂体について実施した。

d) 妊娠を成立させなかった雄および妊娠不成立の雌

全例の脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 陰, 子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上体, 精囊, 前立腺および下垂体について実施した。

e) 全児死亡の認められた雌

皮膚, 乳腺, リンパ節, 唾液腺, 胸骨, 大腿骨 (骨髄を含む), 胸腺, 気管, 肺および気管支, 心臓, 甲状腺および上皮小体, 舌, 食道, 胃, 十二指腸, 小腸, 大腸, 肝臓, 脾臓, 膵臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 卵巣, 子宮, 陰, 眼球, ハーダー腺, 脳, 下垂体および脊髄について実施した。

7. 統計解析

体重, 摂餌量, 黄体数, 着床痕数, 出産児数, 性比, 平均性周期, 妊娠期間, 着床率, 分娩率, 出生率, 外形異常発現率, 新生児の4日生存率, 器官重量, 器官重量・体重比 (相対重量), 血液学的および血液生化学的検査値についてはまず Bartlett の等分散検定²⁾を実施した。等分散の場合は一元配置分散分析を行った。分散が有意で各群の標本数が同数の場合は Dunnett の多重比較検定, 各群の標本数が異なる場合は Scheffe 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。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た。有意で各群の標本数が同数の場合は Dunnett の順位検定, 各群の標本数が異なる場合は Scheffe の順位検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。出産率, 交尾率および受胎率については χ^2 検定^{3) 4)}を用いた。病理学検査の異常所見頻度については Fisher の直接確率検定法⁴⁾を用いた。但し, 病理組織学検査の肝細胞小葉中心性腫大については累積カイ自乗検定⁴⁾を実施した。なお, 哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は*: $P < 0.05$ および **: $P < 0.01$ の2段階とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡および一般状態

死亡例は、投与期間を通じ雌雄いずれの群にも観察されなかった。一般状態の観察では、雌の30 mg/kg群で背部の外傷が投与3週目に1例、被毛の汚れおよび眼分泌物が哺育1日目の同一個体の1例に観察され、また、150 mg/kg群で頭部の外傷が妊娠0から9日に、痂皮形成が妊娠10から14日に同一個体の1例に観察された。雄については、投与期間を通じいずれの投与群にも異常は観察されなかった。

2) 体重 (Fig. 1, 2)

雄では、750 mg/kg 群で対照群に比べて投与期間を通じ体重が減少傾向を示し、投与1 から43日の体重増加量も減少傾向を示した。雌では、30および750 mg/kg 群で対照群に比べて妊娠期間を通じ体重が減少傾向を示し、750 mg/kg 群の妊娠0から21日の体重増加量も減少傾向を示した。交配前および分娩後の投与期間では、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。

3) 摂餌量 (Fig. 3, 4)

雄では、750 mg/kg 群で対照群に比べて投与8日まで摂

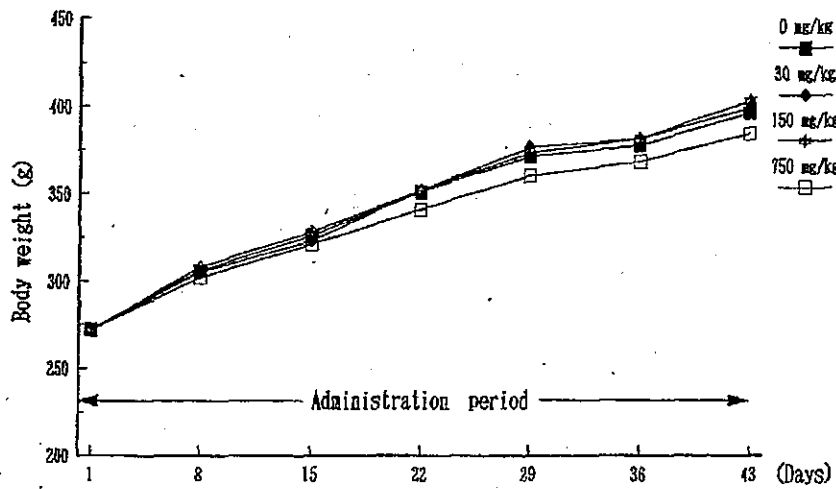


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with 1,4-diethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

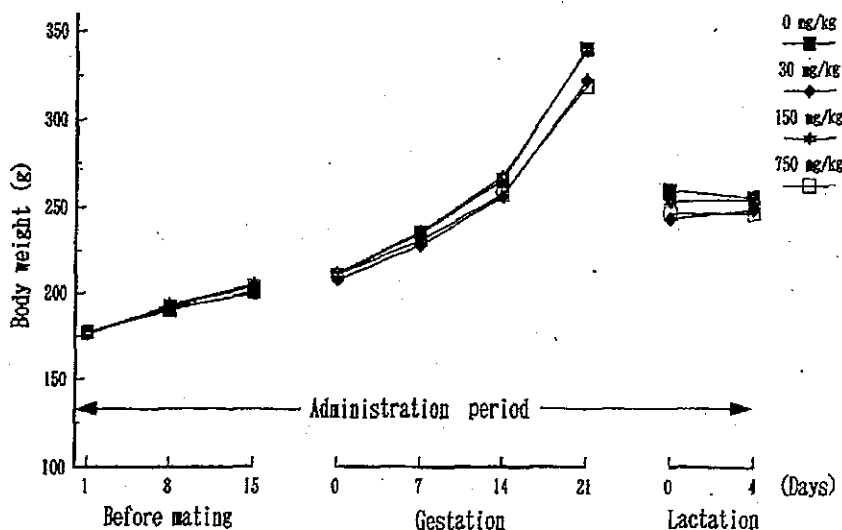


Fig. 2 Body weight change of female rats treated orally with 1,4-diethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

餌量が減少し、その後投与29から43日までは逆に増加を示した。同群の投与29日から44日の累積摂餌量も対照群に比べて増加した。雌では、30 mg/kg群で対照群に比べて妊娠14から21日で摂餌量が減少したが、150および750 mg/kg群では対照群と比べて差はなかった。

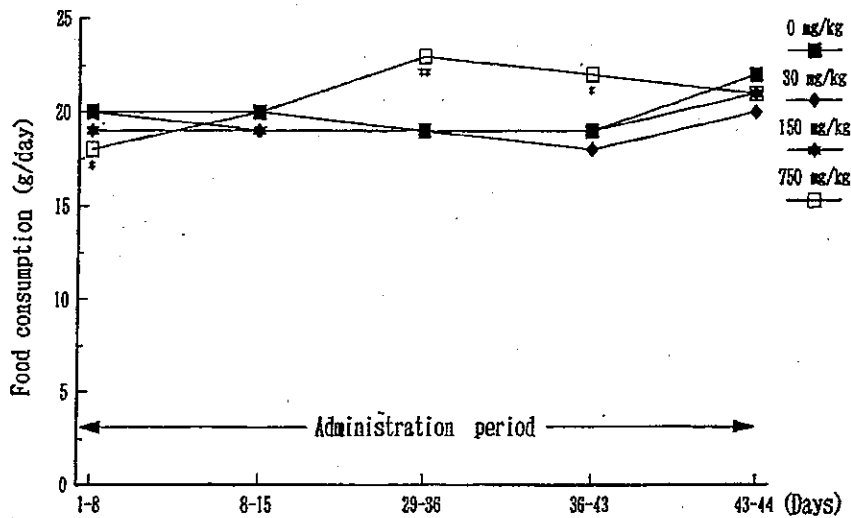


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 1,4-diethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significantly different from control group: *: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$

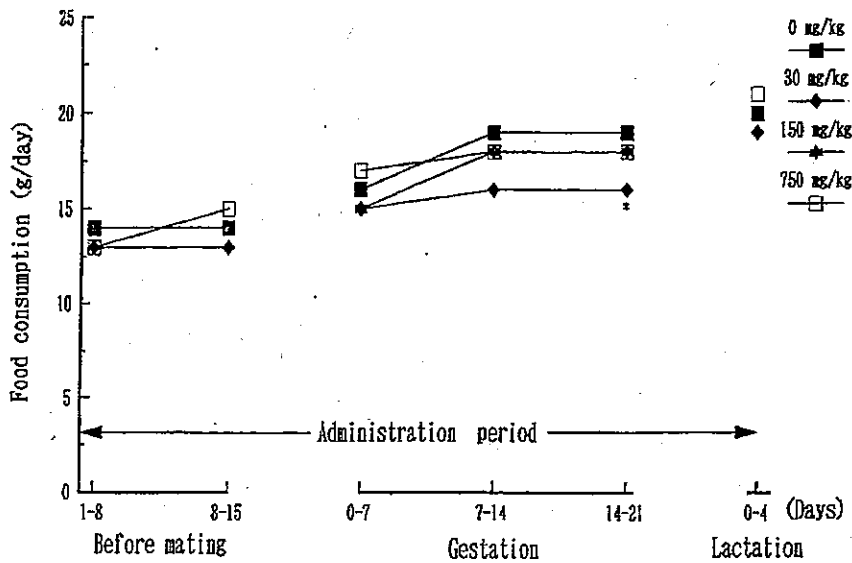


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 1,4-diethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significantly different from control group: *: $P < 0.05$

4) 雄の血液学的検査

白血球数は対照群と被験物質投与群との間に差はなかった。30および150mg/kg群で対照群に比べ好中球比率および好酸球比率の増加、リンパ球比率の減少が認められたが用量に関連した変化ではなかった。赤血球数は対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。すべての投与群で対照群に比べヘモグロビン量、平均赤血球色素量、平均赤血球色素容積が僅かに減少したが、ほぼ対照群の変動の範囲内(対照群の2標準偏差の範囲)であった。なお、各投与群とも貧血傾向が認められなかったことから、網赤血球率の算定は行わなかった。

5) 雄の血液生化学的検査 (Table 1)

150および750 mg/kg群で、対照群に比べ尿素窒素およびGPT活性の増加、 γ -GTP活性の減少が認められ、さらに、750 mg/kg群でクレアチニン、総ビリルビン、総蛋白、アルブミン、A/Gおよびカリウムの増加、血糖の減少が認められた。その他、30 mg/kg群で対照群に比べ増加あるいは減少を示す項目もあったが、用量に関連した変化ではなかった。

6) 器官重量 (Table 2, 3)

雄では、150および750 mg/kg群で対照群に比べて腎臓の実重量または相対重量が増加し、さらに、750 mg/kg群で、肝臓の実重量および相対重量がともに増加した。

その他、750 mg/kg群で対照群に比べて精巣上体の実重量が減少した。雌では、750 mg/kg群で対照群に比べて肝臓の実重量および相対重量がともに増加した。

7) 剖検所見

雄では、肝臓の褐色化が750mg/kg群で対照群に比べて発現頻度の有意な増加が認められた。また、同群の2例に肝臓の肥大が観察された。その他、被験物質投与群で心臓の白色斑/区域、胸腺の赤色斑/区域、肺の有色斑/区域(褐色)が単発的に認められた。

哺育4日の母動物では、対照群または750mg/kg群で胸腺の赤色化、肺の有色斑/区域(褐色)、腹腔内の塊(脂肪壊死)が単発的に認められた。妊娠が成立しなかった30mg/kg群の雌2例に子宮の内腔拡大が観察された。

8) 病理組織学検査 (Table 4, 5)

妊娠を成立させた雄では、小葉中心性肝細胞腫脹が750 mg/kg群の10例全例に認められた。その他の所見は、対照群と差がないかあるいは少数例の発生であった。

自然分娩した動物では、観察された所見は対照群と差がないかあるいは少数例の発生であった。30および150 mg/kg群で実施した肝臓および腎臓の組織学所見では、被験物質投与の影響が示唆される異常所見は認められなかった。

交尾の成立しなかった750 mg/kg群の雌雄各1例の動物のうち、雄に前述した小葉中心性肝細胞腫脹が認められた。また、雌に子宮水腫が認められた。その他、脾臓の色素沈着や肝臓の小肉芽巣などの変化が観察された。

妊娠を成立させなかった雄および妊娠不成立の雌は、30 mg/kg群で雌雄2例、750 mg/kg群で雌雄1例であり、これらのうち、雄の750 mg/kg群の1例に前述した小葉中

Table 1 Blood chemistry of male rats treated orally with 1,4-diethylbenzene in the combine drepeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg	750 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
T.protein(g/dl)	5.74± 0.15	5.65± 0.17	5.71± 0.19	6.01± 0.15 **
Albumin(g/dl)	3.41± 0.09	3.41± 0.15	3.43± 0.14	3.71± 0.18 **
A/G	1.46± 0.07N	1.52± 0.10	1.50± 0.06	1.62± 0.13 **
Glucose(mg/dl)	153± 15	141± 10 *	146± 16	136± 13 **
BUN(mg/dl)	12.0± 0.6N	12.5± 1.6	13.6± 2.1 *	13.8± 1.8 *
Creatinine(mg/dl)	0.62± 0.05	0.64± 0.06	0.67± 0.06	0.81± 0.10 **
T.bilirubin(mg/dl)	0.09± 0.03	0.09± 0.04	0.12± 0.03	0.16± 0.03 **
GOT(U/l)	46± 7N	46± 5	42± 12	45± 14
GPT(U/l)	17± 6	18± 8	23± 7 *	25± 5 *
Gamma-GTP(U/l)	2.9± 0.4	3.0± 0.4	2.2± 0.6 **	2.1± 0.5 **
Potassium(mmol/l)	4.72± 0.22	5.01± 0.20 **	4.80± 0.26	5.13± 0.20 **
Chloride(mmol/l)	104.4± 0.9	105.6± 1.2 *	105.0± 1.4	103.8± 0.9
Calcium(mg/dl)	9.50± 0.16	9.33± 0.19 *	9.50± 0.20	9.62± 0.17
I.phosphate(mg/dl)	5.86± 0.22N	5.66± 0.33	5.87± 0.21	5.67± 0.46

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; *P<0.05 **P<0.01

N: Non parametric analysis

心性肝細胞腫大が認められた。また、雌の30 mg/kg群の2例に子宮水腫が認められた。その他、脾臓の色素沈着や腎臓の尿管好塩基性化・好酸性小体、副腎の空胞化などの変化が観察された。哺育期間中の全児死亡の母動物1例では、子宮の出血・壊死・毛細血管増殖をともなった肉芽果・細胞浸潤、乳腺の増生、肺のマクロファージ集簇、胸腺萎縮などの変化が観察された。

2. 生殖発生毒性

1) 交尾および受胎能

交尾は、750 mg/kg群を除き対照群を含むすべての群で全例成立した。750 mg/kg群では1組が交尾不成立で、交尾率は91.7%であった。受胎は、対照群および150 mg/kg群の交尾成立した雌の全例で成立し、30 mg/kg群では12例中10例(83.3%)、750 mg/kg群では11例中10例

(90.9%)で成立した。性周期観察では、いずれの群もほぼ4~5日の性周期を示し、平均性周期に群間差は認められなかった。

2) 分娩および哺育 (Table 6)

分娩状態には異常は観察されず、出産率、分娩率および出生率にも対照群と比べて群間差は認められなかった。妊娠期間では、対照群の21.3日に比べて750 mg/kg群では22.0日と僅かに長く、統計学的有意差が認められた。生後4日生存率は、対照群に比べて750 mg/kg群の雄で減少した。30 mg/kg群では対照群に比べて雌雄ともに減少傾向を示したが、生後2日までに全児死亡した1腹による数値の片寄りと考えられ、この1腹を除けば対照群と差はなかった。

Table 2 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 1,4-diethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg	750 mg/kg
No. of animals examined	12	12	12	12
Body weight (g)	377±29	381±22	385±26	359±19
Absolute organ weight				
Thymus (mg)	383±71	369±75	405±144	344±85
Liver (g)	11.80±1.48	11.77±1.01	12.08±1.39	13.95±1.06 **
Kidneys (g)	2.41±0.18	2.59±0.23	2.76±0.31 **	2.64±0.18
Testes (g)	3.33±0.16	3.41±0.21	3.46±0.23	3.25±0.12
Epididymides (g)	1.24±0.11	1.22±0.11	1.19±0.08	1.11±0.11 **
Relative organ weight				
Thymus (mg%)	101.942±20.066	96.869±20.606	105.184±37.277	95.465±20.538
Liver (g%)	3.119±0.215	3.083±0.145	3.128±0.178	3.889±0.168 **
Kidneys (g%)	0.641±0.040	0.678±0.049	0.715±0.064 **	0.737±0.047 **
Testes (g%)	0.887±0.076	0.896±0.079	0.901±0.089	0.909±0.055
Epididymides (g%)	0.331±0.040	0.322±0.032	0.309±0.025	0.309±0.029

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; **:P<0.01

Table 3 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 1,4-diethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg	750 mg/kg
No. of animals examined	12	9	12	10
Body weight (g)	255±15	248±16	254±25	246±18
Absolute organ weight				
Thymus (mg)	221±47	246±33	229±63	168±34
Liver (g)	9.80±1.10	9.09±1.08	10.08±1.71	11.52±1.29 *
Kidneys (g)	1.75±0.15	1.67±0.17	1.77±0.21	1.75±0.12
Ovaries (mg)	103±19	108±12	113±18	107±16
Relative organ weight				
Thymus (mg)	86.343±16.596	99.294±11.578	89.208±19.337	68.263±12.400
Liver (g)	3.848±0.350	3.661±0.244	3.961±0.443	4.674±0.337 **
Kidneys (g)	0.685±0.040	0.674±0.043	0.697±0.050	0.712±0.028
Ovaries (mg)	40.361±6.245	43.412±3.448	44.655±7.096	43.605±6.379

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

3) 新生児の形態、体重および剖検所見

新生児の外検検査では、外傷（頸部）および皮下出血（背部）が750mg/kg群の各1例に観察されたのみで、その他の異常は観察されなかった。哺育期間中の体重は、雌雄ともに群間差は認められなかった。死亡児の剖検では、胸腺の頸部残留が対照群および750mg/kg群の各1例に観察されたのみであった。哺育4日の剖検では、胸腺の頸部残留および肝臓の奇形結節（過形成）が散見された。

験物質投与の影響と考えられた。30 mg/kg群の雌の妊娠期間で認められた体重の増加抑制傾向は体重増加量に差が出ない程度の軽微な変化であった。摂餌量については、雄の750 mg/kg群で投与1~8日に減少し、その後は逆に増加を示した。雌の30 mg/kg群において妊娠15から21日で減少したが、用量に関連して認められた変化ではなく被験物質投与の影響を示唆する変化とは考えられなかった。

血液学的検査では、被験物質投与の影響は認められなかった。血液生化学的検査では150および750mg/kg群で尿素窒素およびGPT活性の増加が、さらに750 mg/kg群で総蛋白、アルブミン、クレアチニンおよび総ビリルビンの増加、血糖の減少が認められ、腎臓および肝臓に対する被験物質投与の影響が示唆された。その他、150および750mg/kg群でγ-GIPの減少、750mg/kg群でA/Gおよびカリウムの増加が認められたが、これらは相互に関連した変化ではなく、特定臓器における障害を示唆するものとは考えられなかった。

考察

1. 反復投与毒性

死亡例は、投与期間を通じ雌雄いずれの群にも認められなかった。一般状態にも被験物質投与の影響は認められなかった。

体重については、750 mg/kg 群の雄の投与期間および雌の妊娠期間で増加抑制傾向が認められ、軽微ながら被

Table 4 Summary of histological findings in male rats treated orally with 1,4-diethylbenzenin the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	0	30	150	750
No. of animals sacrificed	12	10	12	10
No. of animals necropsied	12	10	12	10
No. of animals examined histologically	12	10	12	10
Organ Findings	T 1 2 3	T 1 2 3	T 1 2 3	T 1 2 3
CARDIOVASCULAR SYSTEM				
heart	(12)	(0)	(0)	(10)
infiltration/cellular fibrosis	- 2 0 0	- - - -	- - - -	- 0 0 0
	- 1 0 0	- - - -	- - - -	- 0 0 0
HEMATOPOIETIC SYSTEM				
spleen	(12)	(0)	(0)	(10)
deposit of pigment	-10 0 0	- - - -	- - - -	-10**0 0
DIGESTIVE SYSTEM				
liver	(12)	(10)	(12)	(10)
fatty change	- 1 0 0	- 2 0 0	- 1 0 0	- 0 0 0
swelling of liver cells	- 0 0 0	- 0 0 0	- 0 0 0	-10 0 0
granulation	- 3 0 0	- 5 0 0	- 2 0 0	- 1 0 0
lymphocytic infiltration	- 0 0 0	- 0 0 0	- 2 0 0	- 2 0 0
URINARY SYSTEM				
kidney	(12)	(10)	(12)	(10)
basophilic change	-10 0 0	- 8 0 0	- 9 0 0	- 8 0 0
cyst	- 0 0 0	- 1 0 0	- 1 0 0	- 0 0 0
deposit of calcium	- 0 0 0	- 1 0 0	- 1 0 0	- 1 0 0
eosinophilic body	-12 0 0	-10 0 0	-12 0 0	-10 0 0
hyaline droplet	-12 0 0	-10 0 0	-12 0 0	-10 0 0
tubular dilatation	- 0 0 0	- 0 0 0	- 0 0 0	- 2 0 0
vacuolic change	- 0 0 0	- 0 0 0	- 0 0 0	- 2 0 0
ENDOCRINE SYSTEM				
adrenal gland	(12)	(0)	(0)	(10)
vacuolic change	-11 0 0	- - - -	- - - -	-10 0 0
NERVOUS SYSTEM				
brain	(12)	(0)	(0)	(10)
dilated ventricle	- 1 0 0	- - - -	- - - -	- 0 0 0

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

=: benign #: malignant

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

Significantly different from control group; **P≤0.01

器官重量は、雄の150および750 mg/kg群で腎臓の実重量または相対重量が増加し、さらに750 mg/kg 群で肝臓の実重量および相対重量が増加した。雌では、750 mg/kg 群で肝臓の実重量および相対重量が増加した。これらの重量変化は被験物質投与に起因した変化と考えられた。その他、雄の750 mg/kg 群で精巣上体の実重量が減少したが、体重増加抑制傾向に起因する変化と考えられた。

病理学検査の結果では、雄の750 mg/kg群で肝臓重量の増加が認められ、関連する肉眼所見として、肝臓の褐色化あるいは肥大が観察され、組織学的には、小葉中心性肝細胞腫脹が認められた。肝細胞の腫脹は薬物充進によりみられることが知られており⁵⁾、今回認められた所見の程度は軽度であり、なおかつ壊死や線維化などの強い肝障害が認められないことから、薬物代謝充進に適應した変化と考えられた。なお、雄の150および750 mg/kg群の腎臓重量の増加に関連する剖検所見および組織学的変化は認められなかった。交尾および妊娠不成立の雌4例中3例に組織学所見で妊娠不成立の原因と考えられる子

宮水腫が認められたが、用量に関連して認められた変化ではないことから、被験物質投与との関連はないものと考えられた。その他認められた組織学的変化は、いずれも被験物質投与に関連しない自然発生的な病変と考えられた。

以上のことから、1,4-ジエチルベンゼンの反復投与による標的器官は肝臓および腎臓と考えられ、雄では、150 mg/kg/day 以上の投与で尿素窒素およびGPT活性の増加、腎臓重量の増加が、さらに、750 mg/kg/day 投与で体重増加抑制、摂餌量の減少または増加、総蛋白、アルブミン、クレアチニンおよび総ビリルビンの増加、血糖の減少、肝臓重量の増加、肝臓の褐色化あるいは肥大、小葉中心性肝細胞腫脹が認められた。雌では、750 mg/kg/day 投与で体重増加抑制および肝臓重量の増加が認められた。したがって、無影響量は雄では30 mg/kg/day、雌では150 mg/kg/day と判断される。

Table 5 Summary of histological findings in female rats treated orally with 1,4-diethylbenzen in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	0				30				150				750				
	No. of animals sacrificed		12		9		12		12		10		12		10		
No. of animals necropsied		12		9		12		12		10		12		10			
No. of animals examined histologically		12		9		12		12		10		12		10			
Organ	Findings	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
CARDIOVASCULAR SYSTEM																	
heart		(12)				(0)				(0)				(10)			
	infiltration/cellular	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	0
	capillary proliferation	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM																	
spleen		(12)				(0)				(0)				(10)			
	deposit of pigment	-	6	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	0	0
	hematopoiesis, increased	-	5	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0
thymus		(12)				(0)				(0)				(10)			
	hemorrhage	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
RESPIRATORY SYSTEM																	
lung		(1)				(0)				(0)				(0)			
	congestion	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DIGESTIVE SYSTEM																	
liver		(12)				(9)				(12)				(10)			
	fatty change	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
	granulation	-	2	0	0	-	1	0	0	-	3	0	0	-	1	0	0
	extramedullary hematopoiesis	-	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
peritoneum		(1)				(0)				(0)				(0)			
	fat necrosis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URINARY SYSTEM																	
kidney		(12)				(9)				(12)				(10)			
	basophilic change	-	1	0	0	-	1	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0
	deposit of calcium	-	3	0	0	-	3	0	0	-	3	0	0	-	4	0	0
	tubular dilatation	-	5	0	0	-	4	0	0	-	6	0	0	-	7	0	0
	hyperplasia	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0

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

=: benign #: malignant

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

Table 6 Findings of delivery in dams treated with 1,4-diethylbenzene and observations on their pups(F1) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	30 mg/kg	150 mg/kg	750 mg/kg
No. of dams observed	12	10	12	10
No. of dams delivered live pups	12	10	12	10
Duration of gestation(Mean±S.D.)	21.3±0.5N	21.5±0.5	21.5±0.5	22.0±0.0*
No. of total corpora lutea(Mean±S.D.)	175(14.6±1.2)	147(14.7±1.8)	178(14.8±1.3)	147(14.7±1.0)
No. of total implants(Mean±S.D.)	165(13.8±1.4)	137(13.7±1.3)	171(14.3±1.4)	135(13.5±2.5)
No. of total pups born(Mean±S.D.)	149(12.4±1.4)	122(12.2±2.7)	155(12.9±2.3)	124(12.4±3.0)
No. of total live pups born(Mean±S.D.)	149(12.4±1.4)	122(12.2±2.7)	155(12.9±2.3)	124(12.4±3.0)
Male	71(5.9±1.6)	63(6.3±2.5) f)	79(6.6±2.2)	56(5.6±2.3) f)
Female	78(6.5±1.8) f)	59(5.9±3.0) f)	76(6.3±1.5)	68(6.8±2.9) f)
Sex ratio (Male/Female)	0.91(71/78)N	1.07(63/59)	1.04(79/76)	0.82(56/68)
No. of live pups on day 4(Mean±S.D.)				
Male	71(5.9±1.6)	55(5.5±3.1)	79(6.6±2.2)	49(4.9±2.4)
Female	76(6.3±1.7)	48(4.8±3.2)	75(6.3±1.5)	66(6.6±2.8)
No. of dead pups born(Mean±S.D.)	0	0	0	0
Gestation index (%) a)	100	100	100	100
Implantation index (% Mean±S.D.) b)	94.4±5.6N	94.5±13.5	96.2±5.7	91.7±15.3
Delivery index (% Mean±S.D.) c)	90.5±8.6	88.7±15.7	90.4±11.8	90.8±10.7
Live birth index (% Mean±S.D.) d)	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0
Viability index on day 4 (% Mean±S.D.) e)				
Male	100.0±0.0N	87.1±31.9	100.0±0.0	86.2±14.5**
Female	97.9±5.0N	88.0±31.6	98.8±4.1	97.2±5.5

a) : (Number of females with live pups / number of pregnant females) x 100
 b) : (Number of implants / number of corpora lutea) x 100
 c) : (Number of pups born / number of implants) x 100
 d) : (Number of live pups born / number of pups born) x 100
 e) : (Number of live pups on day 4 after birth / number of live pups born) x 100
 f) : Includes live pups died before observations
 Significantly different from control group; *:P<0.05 **:P<0.01
 N : Non parametric analysis

2. 生殖発生毒性

交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められず、性周期観察でも、いずれの群もほぼ4~5日の性周期を示し、被験物質投与の影響は認められなかった。分娩時観察では妊娠動物の全例が正常に分娩した。新生児の外表面検査で認められた異常はいずれも単発性であり自然発生性の所見と考えられた。妊娠期間では、750 mg/kg群で対照群の21.3日に比べて22.0日と僅かに延長したが、当センター背景値(過去3年間:平均21.1~22.4日)と比較して差はなかった。750 mg/kg群で雄の4日生存率が減少したが、雌では対照群と比べて差はなく、毒性学的意義は小さいものとする。また、新生児の体重も哺育4日まで順調に増加し、死産児、死亡児および哺育4日の剖検でも被験物質投与による影響は認められなかった。

以上のことから、1,4-ジエチルベンゼンによる雌雄の生殖に及ぼす影響および児動物の発生・発育に及ぼす影響は、750 mg/kg/day投与によっても認められず、無影響量はともに750 mg/kg/dayと判断される。

文献

- 1) Govt. Reports Announcements & Index, NTIS/PB 89-215776 (1982).
- 2) C.G.Shayne and S.W.Carrol, "Statistics and Experimental Design For Toxicologists," Telford Press, 1986.

- 3) 佐久間昭"薬効評価 I - 計画と解析 -," 東京大学出版会, 1977.
- 4) 石居 進"生物統計学入門," 培風館, 1975.
- 5) P.Grasso and R.H.Hinton, Mutation research, 248, 271-290 (1991).

連絡先

試験責任者: 萩田孝一
 試験担当者: 田中亮太, 渡 修明, 庄子明徳,
 岩田 聖, 小林和雄
 (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: Koichi Hagita (Study director),
 Ryota Tanaka, Nobuaki Watari, Akinori Shoji,
 Hijiri Iwata, Kazuo Kobayashi
 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

1,4-ジエチルベンゼンの細菌を用いる 復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 1,4-Diethylbenzene on Bacteria

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

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvr A* を用い、用量設定試験は直接法および代謝活性化法のいずれも、0.5~5000 µg/プレートの用量で、本試験は用量設定試験で抗菌性が認められたことから、直接法および代謝活性化法のいずれも 2.441~78.12 µg/プレートの用量で試験を実施した。

その結果、それぞれ2回実施した本試験において、用いた5種類の検定菌とも、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、1,4-ジエチルベンゼンは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvr A*
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、ニュートリエントプロスNo. 2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37℃、11~12時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

1,4-ジエチルベンゼン (CAS No 105-05-5) は、分子量 134.22, 比重0.862 の無色透明の液体である。純度 97.0%のもの (ロット番号: 40819, 東レ(株)製造, 不純物: メタジエチルベンゼン3%以下) を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで密栓して冷所に保管した。

1,4-ジエチルベンゼンは、アセトン (ロット番号: DSR3251, 和光純薬工業(株)) を用いて 50 mg/ml と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。なお、調製にあたって、純度および比重換算は行わなかった。

試験の開始に先立って、秦野研究所において1,4-ジエ

チルベンゼンのアセトン溶液中での安定性試験を行った。すなわち、本試験および染色体異常試験における最高濃度 (260 mg/ml) および最低濃度 (24.41 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95.0%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、781.2 µg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、102~104%、また、24.41 µg/ml 溶液は、99.9~112%であった。

以上の結果から、1,4-ジエチルベンゼ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 は蒸留水に溶解して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 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol
NADPH	4 μmol
塩化カリウム	33 μmol
0.2M リン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 μmol

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

【試験方法】

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトップアガー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℃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、寒天表面上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】

1,4-ジエチルベンゼンについて、0.5~5000 μg/プレート の範囲で試験を実施したところ、直接法および代謝活性化法とも、50 μg/プレート付近で抗菌性を認めた。

そこで、本試験における最高用量は、5000 μg/プレートより公比希釈し抗菌性の認められる用量範囲の78.12 μg/プレートとし、6用量を設定することとした。

【本試験】

結果を Table 1, 2 に示した。1,4-ジエチルベンゼンについて上記の用量範囲で試験を実施した。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、用量依存性のある陰性対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

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

文献

- (1) D.M. Maron, 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: 高島浩介
 試験担当者: 鈴木文子, 亀地礼子, 川上久美子,
 松木容彦, 中込まどか
 (財) 食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 神奈川県秦野市落合 729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Kosuke Takatori (Study director)
 Fumiko Suzuki, Reiko Kameji,
 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 1,4-diethylbenzene ** 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			WP 2uvr A			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	0	117	123	115	16	18	24	11	14	12	22	25	17	6	5	6
		(118 \pm 4.2)			(19 \pm 4.2)			(12 \pm 1.5)			(21 \pm 4.0)			(6 \pm 0.6)		
	2.441	89	116	107	20	20	18	19	17	16	24	15	19	9	5	4
		(104 \pm 13.7)			(19 \pm 1.2)			(17 \pm 1.5)			(19 \pm 4.5)			(6 \pm 2.6)		
	4.882	102	103	89	18	23	18	24	15	27	26	23	19	6	8	8
		(98 \pm 7.8)			(20 \pm 2.9)			(22 \pm 6.2)			(23 \pm 3.5)			(7 \pm 1.2)		
	9.765	127	134	121	16	12	18	14	14	14	22	19	16	2	7	7
	(127 \pm 6.5)			(15 \pm 3.1)			(14 \pm 0.0)			(19 \pm 3.0)			(5 \pm 2.9)			
S9 Mix (+)	19.53	101	88	92	10	15	11	21	14	21	14	22	11	9	8	2
		(94 \pm 6.7)			(12 \pm 2.6)			(19 \pm 4.0)			(16 \pm 5.7)			(6 \pm 3.8)		
	39.06	27*	78*	69*	5*	9*	10*	12*	18*	15*	10*	11*	13*	4*	6*	4*
		(58 \pm 27.2)			(8 \pm 2.6)			(15 \pm 3.0)			(11 \pm 1.5)			(5 \pm 1.2)		
78.12	59*	99*	60*	1*	2*	11*	3*	0*	7*	15*	18*	17*	0*	0*	0*	
	(73 \pm 22.8)			(5 \pm 5.5)			(3 \pm 3.5)			(17 \pm 1.5)			(0 \pm 0.0)			
S9 Mix (+)	0	123	113	125	17	12	18	12	18	12	28	21	29	13	13	17
		(120 \pm 6.4)			(16 \pm 3.2)			(14 \pm 3.5)			(26 \pm 4.4)			(14 \pm 2.3)		
	2.441	90	98	105	13	15	23	21	14	13	26	26	16	23	16	14
		(98 \pm 7.5)			(17 \pm 5.3)			(16 \pm 4.4)			(23 \pm 5.8)			(18 \pm 4.7)		
	4.882	116	104	99	22	17	13	18	12	14	27	26	31	12	15	10
		(106 \pm 8.7)			(17 \pm 4.5)			(15 \pm 3.1)			(28 \pm 2.6)			(12 \pm 2.5)		
	9.765	109	119	100	17	17	12	14	17	16	42	41	36	23	21	19
	(109 \pm 9.5)			(15 \pm 2.9)			(16 \pm 1.5)			(40 \pm 3.2)			(21 \pm 2.0)			
19.53	100	97	124	19	14	5	22	24	19	41	45	37	25	21	25	
	(107 \pm 14.8)			(13 \pm 7.1)			(22 \pm 2.5)			(41 \pm 4.0)			(24 \pm 2.3)			
39.06	113	106	119	16	14	11	9*	9*	6*	35*	27*	40*	3*	9*	10*	
	(113 \pm 6.5)			(14 \pm 2.5)			(8 \pm 1.7)			(34 \pm 6.6)			(7 \pm 3.8)			
78.12	120*	102*	106*	8*	11*	14*	3*	5*	8*	27*	27*	26*	9*	0*	4*	
	(109 \pm 9.5)			(11 \pm 3.0)			(5 \pm 2.5)			(27 \pm 0.6)			(4 \pm 4.5)			
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	609	641	675	264	260	279	124	115	130	227	254	205	2561	2298	2525
		(642 \pm 33.0)			(268 \pm 10.0)			(123 \pm 7.5)			(229 \pm 24.5)			(2461 \pm 142.6)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μ g /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	694	648	666	215	187	173	536	615	645	162	129	114	247	205	227
		(669 \pm 23.2)			(192 \pm 21.4)			(599 \pm 56.3)			(135 \pm 24.6)			(226 \pm 21.0)		

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.

**: Purity was 97.0 % and metadiethylbenzene (below 3%) was contained as impurity.

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 1,4-diethylbenzene ** 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	146	142	138	19	16	14	19	21	21	12	25	18	9	10	7
		(142 \pm 4.0)			(16 \pm 2.5)			(20 \pm 1.2)			(18 \pm 6.5)			(9 \pm 1.5)		
	2.441	135	135	158	8	13	8	19	14	12	18	18	19	7	8	5
		(143 \pm 13.3)			(10 \pm 2.9)			(15 \pm 3.6)			(18 \pm 0.6)			(7 \pm 1.5)		
	4.882	130	125	133	15	11	12	20	16	25	18	20	16	5	3	11
		(129 \pm 4.0)			(13 \pm 2.1)			(20 \pm 4.5)			(18 \pm 2.0)			(6 \pm 4.2)		
	9.765	118	127	102	9	16	11	23	16	15	14	9	16	5	3	4
		(116 \pm 12.7)			(12 \pm 3.6)			(18 \pm 4.4)			(13 \pm 3.6)			(4 \pm 1.0)		
S9 Mix (+)	19.53	101	90	98	9	7	11	14	11	24	19	14	18	5	5	6
		(96 \pm 5.7)			(9 \pm 2.0)			(16 \pm 6.8)			(17 \pm 2.6)			(5 \pm 0.6)		
	39.06	5*	8*	36*	4*	6*	0*	0*	15*	5*	10*	9*	6*	2*	9*	6*
		(16 \pm 17.1)			(3 \pm 3.1)			(7 \pm 7.6)			(8 \pm 2.1)			(6 \pm 3.5)		
	78.12	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	5*	11*	7*	3*	7*
		(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(5 \pm 5.5)			(6 \pm 2.3)		
S9 Mix (+)	0	158	157	163	16	14	16	22	19	16	32	31	24	19	14	16
		(159 \pm 3.2)			(15 \pm 1.2)			(19 \pm 3.0)			(29 \pm 4.4)			(16 \pm 2.5)		
	2.441	121	119	119	9	11	9	8	19	11	20	19	20	6	6	7
		(120 \pm 1.2)			(10 \pm 1.2)			(13 \pm 5.7)			(20 \pm 0.6)			(6 \pm 0.6)		
	4.882	117	116	109	16	12	13	18	28	34	27	21	24	12	6	4
		(114 \pm 4.4)			(14 \pm 2.1)			(27 \pm 8.1)			(24 \pm 3.0)			(7 \pm 4.2)		
	9.765	99	110	105	14	12	18	20	23	16	29	26	19	4	5	8
	(105 \pm 5.5)			(15 \pm 3.1)			(20 \pm 3.5)			(25 \pm 5.1)			(6 \pm 2.1)			
S9 Mix (+)	19.53	102	116	112	14	13	11	32	27	24	27	24	28	5	6	12
		(110 \pm 7.2)			(13 \pm 1.5)			(28 \pm 4.0)			(26 \pm 2.1)			(8 \pm 3.8)		
	39.06	108	96	94	10	11	15	19	17	21	18	33	27	6	8	5
		(99 \pm 7.6)			(12 \pm 2.6)			(19 \pm 2.0)			(26 \pm 7.5)			(6 \pm 1.5)		
	78.12	91*	98*	93*	13*	11*	10*	12*	16*	14*	12*	19*	17*	7*	7*	7*
		(94 \pm 3.6)			(11 \pm 1.5)			(14 \pm 2.0)			(16 \pm 3.6)			(7 \pm 0.0)		
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	711	655	704	291	265	314	149	152	114	710	692	732	2980	2544	2129
		(690 \pm 30.5)			(290 \pm 24.5)			(138 \pm 21.1)			(711 \pm 20.0)			(2551 \pm 425.5)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μ g /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	645	840	869	291	253	255	404	355	446	336	370	380	291	312	301
		(785 \pm 121.8)			(266 \pm 21.4)			(402 \pm 45.5)			(362 \pm 23.1)			(301 \pm 10.5)		

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

** : Purity was 97.0 % and metadiethylbenzene (below 3%) was contained as impurity.

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

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 1,4-Diethylbenzene 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、1,4-ジエチルベンゼンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/1U, 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0.11 mg/mlであった。一方、代謝活性化法のS9mix存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は1.10 mg/mlであった。また、S9mix非存在下では1.30 mg/ml (10 mM)の濃度においても50%を超える増殖抑制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0.11 mg/ml、代謝活性化法では10 mMに相当する1.30 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、最高処理濃度の0.11 mg/mlでは分裂抑制のため染色体分析ができなかったが、その他の処理群においては染色体の構造異常や倍數性細胞の誘発作用は認められなかった。また、代謝活性化法のS9mix存在下および非存在下のいずれの処理条件においても、染色体の構造異常や倍數性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、1,4-ジエチルベンゼンは、今回実施した試験条件下で、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・リソースバンク (JCRB) 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

2×10⁴個のCHL細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ (径6 cm, Corning) に播き、37℃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

1,4-ジエチルベンゼン (別名: パラジエチルベンゼン, CAS No.: 105-05-5, ロット番号: 40819, 東レ(株)製造, (社)日本化学工業協会提供) は、無色透明液体で、水、ジメチルスルホキシド (DMSO) に難溶、アセトンに可溶、分子式C₁₀H₁₄, 分子量134.22, 純度97.0% (不純物としてメタジエチルベンゼン3%以下), 融点-42.85℃, 可燃性(引火点: 56.7℃)の物質である。原体の安定性に関する情報は得られなかったが、溶媒中 (アセトン) での安定性試験では、0.02441~260 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、全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および代謝活性化法に用いた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、1,4-ジエチルベンゼンの約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0.11 mg/mlであった。被験物質は高濃度になるにつれ、培養液表面に膜を形成し、0.65 mg/ml以上の濃度では増殖抑制作用が認められなかった。一方、代謝活性化法のS9mix存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は1.10 mg/mlであった。また、S9mix非存在下では1.30 mg/ml (10 mM)の濃度においても50%を超える増殖抑制は認められなかった (Fig. 1)。

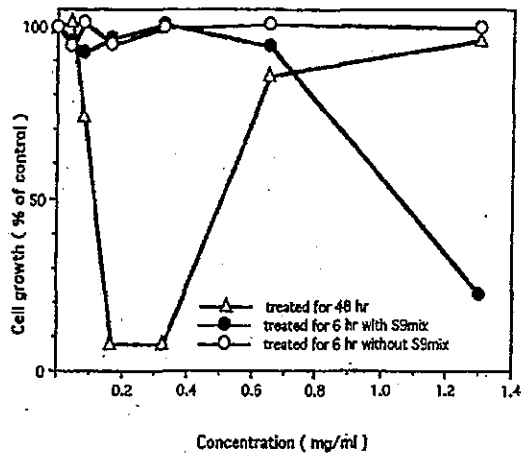


Fig.1 Growth inhibition of CHL cells treated with 1,4-dichlorobenzene

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 0.11 mg/ml, 代謝活性化法では 10mMに相当する 1.30 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⁹⁾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。1,4-ジエチルベンゼンを加えて 24時間および 48時間処理した最高処理濃度群 (0.11mg/ml) において、分裂抑制のため染色体分析ができなかったが、中濃度群および低濃度群では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発については陰性であった。なお、24時間処理の1,4-ジエチルベンゼン 0.03 mg/ml の濃度では、フィッシャーの検定では構造異常の出現頻度に有意差 (p=0.00364) がみられたが、その頻度は4%であり、背景データとの比較および石館らの判定基準では陰性となった。

代謝活性化法による染色体分析の結果を Table 2 に示した。1,4-ジエチルベンゼンを加えて S9mix 存在下および非存在下で 6時間処理した各濃度群において、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発については陰性であった。なお、S9mix 非存在下の 0.65 mg/ml の濃度では、倍数性細胞の出現頻度に有意差 (p=0.0189) がみられたが、その頻度は1.25%であり、背景データとの比較および石館らの判定基準では陰性となった。

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

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations				Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾		total	TAG	(%)	TA		(%)	SA
Control			200	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25			
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			
DEB	0.03	24	200	0	3	1	3	0	2	0	9	0	8* (4.0)	8* (4.0)	0.13	-	-	
DEB	0.06	24	200	0	0	0	3	0	4	0	7	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.63	-	-	
DEB	0.11	24	0													Tox	Tox	
MC	0.00005	24	200	9	43	104	4	5	6	0	171	6	97* (48.5)	94* (47.0)	0.13	+	-	
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	1	0	2	2	2	0	7	0	6 (3.0)	6 (3.0)	0.38			
DEB	0.03	48	200	2	0	0	0	0	1	0	3	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.88	-	-	
DEB	0.06	48	200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	-	-	
DEB	0.11	48	0													Tox	Tox	
MC	0.00005	48	200	5	34	87	9	2	10	10	157	19	89* (44.5)	86* (43.0)	0.75	+	-	

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C, Tox : Toxicity. 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 97% and metadiethylbenzene (less than 3%) was contained as impurity.

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

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations				Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾		total	TAG	(%)	TA		(%)	SA
Control				200	0	0	0	2	0	2	0	4	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	1	1	1	0	1	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.25			
DEB	0.33	-	6-(18)	200	1	1	1	9	0	2	0	14	1	5 (2.5)	4 (2.0)	1.00	-	-	
DEB	0.65	-	6-(18)	200	0	1	4	1	0	0	0	6	0	3 (1.5)	3 (1.5)	1.25*	-	-	
DEB	1.30	-	6-(18)	200	2	0	0	8	0	4	0	14	1	6 (3.0)	4 (2.0)	0.88	-	-	
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	0	1	4	0	3	0	9	1	4 (2.0)	3 (1.5)	0.63	-	-	
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	4	1	2	0	1	0	0	8	0	8 (4.0)	4 (2.0)	0.25			
DEB	0.33	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	-	-	
DEB	0.65	+	6-(18)	200	1	0	0	7	1	0	0	9	1	5 (2.5)	4 (2.0)	0.13	-	-	
DEB	1.30	+	6-(18)	200	0	1	0	2	0	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25	-	-	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	11	70	164	2	2	7	10	266	4	123* (61.5)	123* (61.5)	0.13	+	-	

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide.

1) 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 97% and metadiethylbenzene (less than 3%) was contained as impurity.

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: 田中憲穂
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