

Fig. 1 Body weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

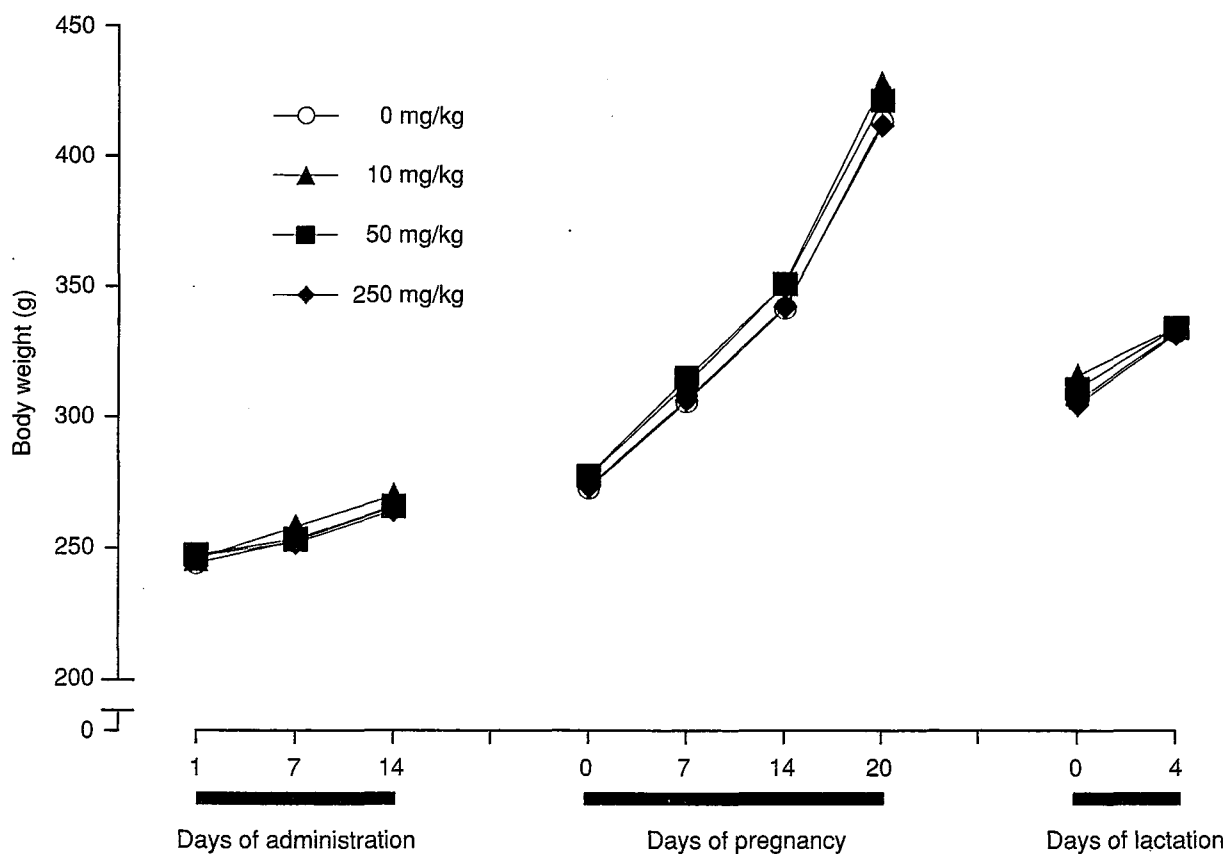


Fig. 2 Body weight of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

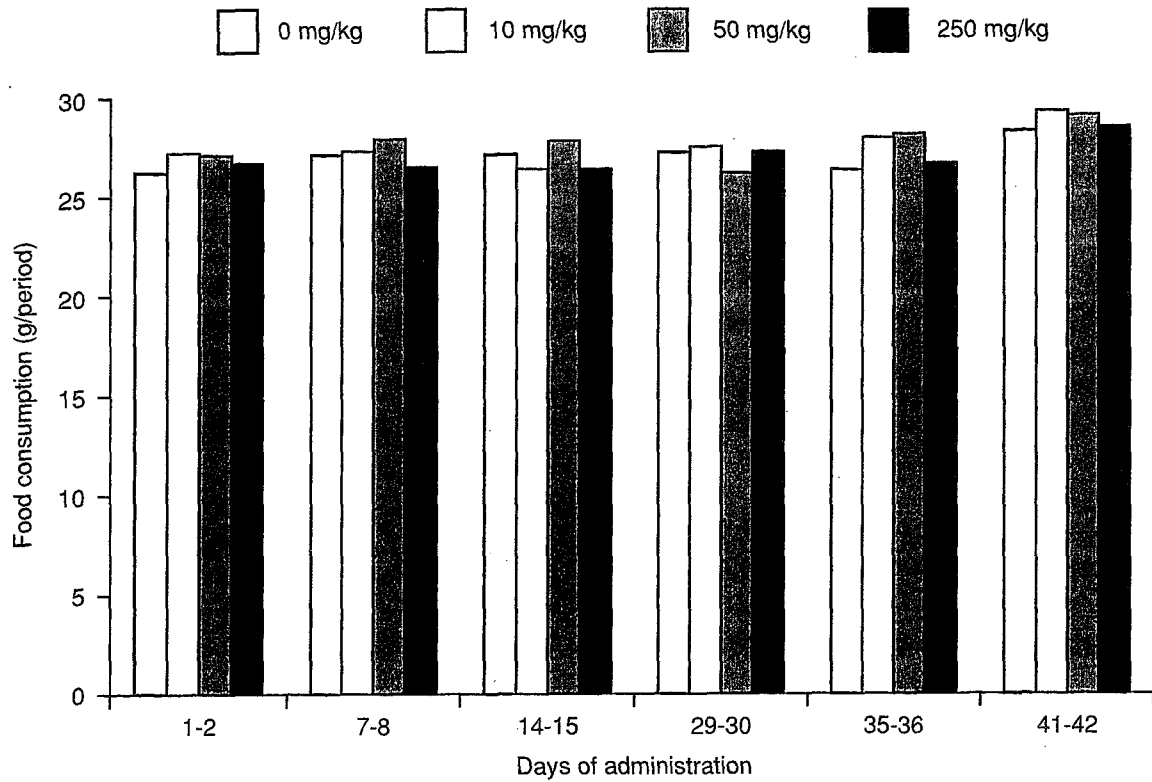


Fig. 3 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

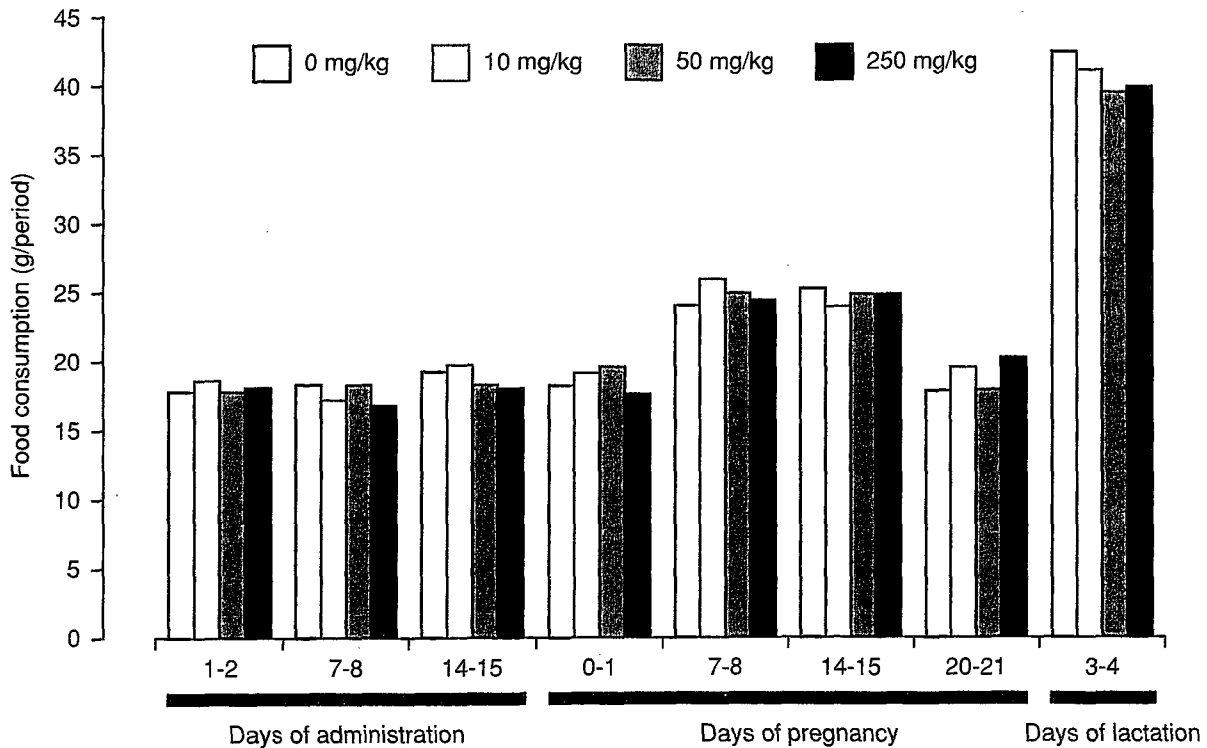


Fig. 4 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

雌でも子宮、肝臓、腎臓、脾臓、肺および気管、胸腺、膀胱、甲状腺に所見が認められたが、いずれも被験物質投与に起因した変化ではなかった。また、対照群の1例において右腋窩皮下に腫瘤が認められた例には、腋窩部の乳腺にリンパ球およびマクロファージの浸潤が認められ、乳管内には細胞残屑が認められた。

2. 生殖発生毒性

1) 性周期所見 (Table 5)

投与開始後に性周期の変化した動物の頻度および平均発情回帰日数には、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

2) 交配成績 (Table 5)

全例が交尾し、対照群および50 mg/kg投与群の各1例を除き受胎した。また、同居開始から交尾までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数にも対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

3) 分娩および哺育所見

対照群において分娩を直接観察した6例中1例は、妊娠22日の分娩中に死亡したが、分娩状態に異常は認められなかった。しかし、娩出された産児の中に皮下出血が認められたことから、これら2例の娩出時には分娩困難があったものと推測された。被験物質投与群では、10 mg/kg投与群の9例、50 mg/kg投与群の5例、および250 mg/kg投与群の9例の分娩を直接観察した。これらのうち、50 mg/kg投与群の2例には産児を集める行動が認められず、出生児が多数死亡した例が認められた。また、妊娠22日に分娩を開始したが、分娩が遷延して4時間が経過しても3匹しか分娩せず、翌日に死亡児1匹を含む18匹の分娩が確認された例も認められた。250 mg/kg投与群の1例には妊娠23日の分娩時に胎盤処理および産児を集める行動が認められず出生児の多数が死亡した例が認められ、この例の分娩状態は不良であったと判断された。しかし、10 mg/kg投与群の動物に分娩状態の異常は観察されず、妊娠期間および出産率については対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった (Table 6)。

哺育状態の異常はいずれの投与群の動物にも認められなかった。

4) 黄体数および着床数 (Table 6)

対照群と被験物質投与群の間に有意差は認められず、排卵および着床には被験物質投与の影響は認められなかった。

5) 出生児所見 (Table 6)

いずれの投与群の動物も行動を含む一般状態に異常は認められなかった。

出生児の生存性を対照群と比較すると、250 mg/kg投与群において出産生児数、生児出産率および出生率が有意 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) に低下した。産児数および分娩率

もやや低下したが、有意差は認められなかった。哺育0日における性比については対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。哺育期間中はいずれの投与群においても死亡児が増加することはなく、新生児の4日の生存率は対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。しかし、250 mg/kg投与群では哺育0日において低下していた生児数そのまま維持されたため、対照群と比較すると、哺育4日における生児数に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。哺育4日における性比については対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

体重については雌雄ともにいずれの時期も対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

生存産児の形態観察 (表には示さず) では、分娩途中で母動物が死亡した対照群の1腹の雌産児2例に、胸部および両前肢皮下に血液の貯留、皮膚の乾燥、ならびに左側後肢末端の皮下血腫および尾の小血腫あるいは吻部および両後肢の皮下血腫が認められたが、内臓に異常は観察されなかった。死亡児の形態に異常は観察されなかった。哺育4日における剖検では50 mg/kg投与群の1腹の雌2例に曲尾が観察された他に、いずれの投与群にも異常は観察されなかった。

考察

1. 反復投与毒性

雌雄ともに250 mg/kg投与群において流涎が観察されたが、各1例に投与後一過性に認められた軽微な変化であった。

予備試験では1000 mg/kgの反復投与を受けた雄が呼吸異常を示して瀕死状態に至ったが、本試験では瀕死あるいは死亡動物は認められなかった。Narotsky¹⁾は、器官形成期にあたる妊娠時期に2-エチル酪酸を150あるいは250 mg/kg経口投与すると母動物が誤嚥により呼吸異常を示して死亡することを報告し、これは被験物質の消化管に対する刺激作用によるものであると推定している。予備試験において瀕死状態に至った動物に誤嚥は認められなかったが、呼吸異常の成因を知るために本試験では病理組織学検査に上部気道を加えた。また、予備試験のそれより最高用量を減らし、胃管の外壁に被験物質が全く付着しないように投与したところ、死亡および瀕死のみならず呼吸異常も観察されなかった。病理学検査においても上部気道から肺に至るまで呼吸器に異常は観察されなかったため、予備試験でみられた呼吸異常の成因を知ることはできなかった。

体重増加および摂餌量には被験物質投与の影響は認められなかった。

雌雄ともに、250 mg/kg投与群において腎臓重量あるいはその相対重量が増加した。高用量群に認められた変化であり、予備試験においても腎臓重量の増加が雌雄に認められていたことから被験物質投与による影響であると考えられる。しかし、血液生化学検査では腎機能を示す各指標に被験物質投与の影響は認められず、病理組織

学検査においても異常は観察されなかったことからその成因は不明である。その他の器官の重量には雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学検査では、50 mg/kg以上の投与群の雄において白血球数が軽度に減少し、250 mg/kg投与群では血小板数も減少した。いずれも軽微な変化であるが、用量に依存して変動していることから被験物質投与に起因した変化であると考えられる。白血球数の減少については、リンパ球以外の白血球比率はむしろ対照群より高い値を示していたことから、リンパ球数の減少に由来するものと推測される。雌動物の血液学検査には投与の影響は認められなかった。

雌の血液生化学検査において50 mg/kg以上の投与群のγ-GTP活性がやや上昇した。しかしその程度はごく軽微であり、50 mg/kgおよび250 mg/kg両群間で被験物質の用量に関連した変化が認められなかった。また、その他の肝機能を表す指標に投与の影響は認められず、肝臓重量および肝臓の病理組織学検査においても投与に起因する異常は観察されなかったことから、50 mg/kg以上の投与群において認められたγ-GTP活性の僅かな上昇は偶発的な変化であると判断された。その他の変化はいずれも被験物質の投与量とは無関係に認められた変化であることから被験物質投与による影響ではないものと考えられる。雄の血液生化学検査成績には投与の影響は認められなかった。

病理学検査ではいずれの器官にも被験物質投与の影響は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

雌動物について観察した性周期には被験物質投与の影響は認められなかった。また、交配成績にも被験物質投与の影響は認められなかったことから、250 mg/kgまでの2-エチル酪酸は親動物の生殖能力に影響を及ぼさないものと考えられる。

対照群の1例が分娩中にフィブリン血栓に関連した原因により死亡した。分娩状態の異常は50 mg/kg以上の投与群にも少数例ずつ認められたが、いずれも分娩翌日以降の哺育状態には異常が認められなかったことから、対照群の死亡例とは異なる原因により分娩状態に異常をきたしたものと推測される。

250 mg/kg投与群において出産生児数が減少した。着床数には投与の影響は認められず、産児数は軽度な減少に留まっていたことから、出生時の死亡が増加したことによるものと考えられる。250 mg/kg投与では、1例ではあるが、分娩状態の異常が認められ、その例では生児出産率および出生率も著しい低値(いずれも38.5%)を示した。その他の動物の分娩状態に異常は認められなかったが、250 mg/kg投与では生児出産率および出生率が有意に低下していたことから、250 mg/kgの2-エチル酪酸投与は分娩に影響を及ぼし、産児の生存性を低下させるものと考えられる。50 mg/kg投与群においても2例に分娩の異常が観察された。2例のうち1例は生児出産率および出生率がやや低かった(いずれも68.8%)。また、50

mg/kg投与群の生児出産率および出生率は対照群との間に有意差は認められなかったが、やや低い値を示していたことから50 mg/kg投与も分娩に影響を及ぼす可能性があるものと推測される。10 mg/kg投与群では分娩および出生児の生存性のいずれにも投与の影響は認められなかった。出生児の性比および発育ならびに分娩翌日以降の生存性についてはいずれの投与群においても被験物質投与の影響は認められなかった。

2-エチル酪酸は、催奇形物質であるバルプロ酸と類似した化学構造を有する化学物質である。本試験では50 mg/kg投与群の同腹の2例に曲尾が認められた。曲尾は本系統のラットでしばしば観察される奇形であり、用量とは無関係に1腹のみに観察されたことから、本例は自然発生によるものと判断された。従って、250 mg/kgまでの投与量の2-エチル酪酸に催奇形性はないものと判断された。

3. 無作用量

以上の試験成績から、本試験条件下における2-エチル酪酸の無作用量は、雄に対する反復投与毒性に関しては、白血球数が軽度に減少したことから10 mg/kg/dayと推定された。雌に対する反復投与毒性に関しては、投与後一過性の流涎が認められ、腎臓重量およびその相対重量が増加したことから50 mg/kg/dayと推定された。生殖発生毒性に関しては雄では250 mg/kg/dayと推定された。雌では50 mg/kg/day以上の投与群の少数例に分娩異常が認められたことから10 mg/kg/dayであると推定された。出生児では、250 mg/kg/day投与群において出生日における生存性が低下したことから50 mg/kg/dayであると推定された。

文献

- 1) M. G. Narotsky, E. Z. Francis, R. J. Kavlock, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **22**, 251(1994).

連絡先

試験責任者：代田眞理子
 試験担当者：佐藤昌子，一原佐知子
 (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: Mariko Shirota (Study director)
 Masako Sato, Sachiko Ichihara
 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 Organ weights of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
Male				
Number of animals	13	13	13	13
Final body weight (g)	502.1 ± 47.6	509.8 ± 52.2	492.1 ± 52.0	501.7 ± 45.2
Brain (g)	2.02 ± 0.07	2.02 ± 0.08	2.01 ± 0.08	1.99 ± 0.10
(g%)	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.05	0.40 ± 0.04
Heart (g)	1.36 ± 0.13	1.38 ± 0.21	1.35 ± 0.13	1.36 ± 0.10
(g%)	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02
Thymus (mg)	270.5 ± 75.2	270.4 ± 78.9	290.1 ± 129.6	259.6 ± 98.2
(mg%)	53.3 ± 11.4	52.7 ± 12.8	58.1 ± 21.9	51.5 ± 18.5
Liver (g)	13.75 ± 2.19	13.80 ± 2.41	13.64 ± 2.58	13.89 ± 2.05
(g%)	2.73 ± 0.21	2.69 ± 0.23	2.76 ± 0.30	2.76 ± 0.20
Kidneys (g)	3.05 ± 0.42	3.13 ± 0.37	3.09 ± 0.26	3.36 ± 0.29
(g%)	0.61 ± 0.06	0.61 ± 0.03	0.63 ± 0.06	0.67 ± 0.05*
Spleen (g)	0.82 ± 0.15	0.83 ± 0.13	0.83 ± 0.14	0.77 ± 0.09
(g%)	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.02
Adrenal glands (mg)	57.1 ± 6.1	53.5 ± 10.9	58.6 ± 9.2	54.0 ± 6.3
(mg%)	11.5 ± 1.5	10.5 ± 1.6	12.0 ± 2.1	10.8 ± 1.3
Testes (g)	3.25 ± 0.33	3.26 ± 0.27	3.36 ± 0.32	3.08 ± 0.24
(g%)	0.65 ± 0.07	0.64 ± 0.07	0.69 ± 0.11	0.62 ± 0.07
Epididymides (g)	1.21 ± 0.10	1.24 ± 0.13	1.25 ± 0.10	1.18 ± 0.11
(g%)	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.24 ± 0.03
Female				
Number of animals	11	13	12	13
Final body weight (g)	307.8 ± 27.0	309.5 ± 29.4	306.6 ± 17.3	306.1 ± 20.4
Brain (g)	1.89 ± 0.10	1.91 ± 0.05	1.91 ± 0.08	1.92 ± 0.06
(g%)	0.62 ± 0.05	0.62 ± 0.06	0.62 ± 0.03	0.63 ± 0.04
Heart (g)	0.93 ± 0.09	0.90 ± 0.06	0.92 ± 0.09	0.93 ± 0.08
(g%)	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Thymus (mg)	169.7 ± 59.3	172.7 ± 70.8	197.4 ± 78.6	185.4 ± 81.2
(mg%)	54.8 ± 17.7	55.2 ± 19.9	64.3 ± 24.5	60.2 ± 26.0
Liver (g)	10.24 ± 1.29	9.85 ± 0.66	10.19 ± 0.78	10.25 ± 0.94
(g%)	3.32 ± 0.22	3.19 ± 0.22	3.32 ± 0.12	3.35 ± 0.24
Kidneys (g)	1.89 ± 0.16	1.94 ± 0.16	2.01 ± 0.21	2.12 ± 0.24*
(g%)	0.62 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.65 ± 0.05	0.70 ± 0.08*
Spleen (g)	0.71 ± 0.09	0.67 ± 0.08	0.69 ± 0.07	0.68 ± 0.13
(g%)	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.04
Adrenal glands (mg)	69.3 ± 8.4	72.5 ± 10.4	67.9 ± 10.3	67.7 ± 7.9
(mg%)	22.5 ± 1.8	23.6 ± 3.8	22.2 ± 3.4	22.2 ± 2.6

Values represent mean ± S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$

Table 2 Hematological examination of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose(mg/kg)	0	10	50	250
Male				
Number of animals	13	13	13	13
RBC($\times 10^4/\mu\text{L}$)	850 \pm 48	825 \pm 42	850 \pm 60	828 \pm 31
Hemoglobin(g/dL)	15.2 \pm 0.7	15.0 \pm 0.5	15.1 \pm 0.9	15.0 \pm 0.6
Hematocrit(%)	44.6 \pm 1.9	44.2 \pm 1.6	44.5 \pm 2.9	44.5 \pm 1.6
MCV(fL)	52.5 \pm 1.4	53.6 \pm 1.2	52.4 \pm 1.8	53.7 \pm 1.4
MCH(pg)	17.9 \pm 0.5	18.3 \pm 0.5	17.8 \pm 0.6	18.1 \pm 0.5
MCHC(g/dL)	34.1 \pm 0.3	34.0 \pm 0.4	34.0 \pm 0.4	33.8 \pm 0.4
Platelet($\times 10^4/\mu\text{L}$)	111.4 \pm 20.3	103.8 \pm 13.2	103.6 \pm 10.2	93.8 \pm 7.4**
PT(sec)	16.2 \pm 3.4	14.7 \pm 1.3	15.9 \pm 3.0	15.9 \pm 2.6
APTT(sec)	22.1 \pm 2.6	21.1 \pm 2.4	21.9 \pm 2.3	21.5 \pm 1.9
WBC($\times 100/\text{mm}^3$)	87.8 \pm 20.2	75.1 \pm 23.5	65.0 \pm 20.1*	64.7 \pm 16.0*
Differential leukocyte counts(%)				
Neutrophil(%)	13 \pm 4	14 \pm 3	15 \pm 5	16 \pm 5
Eosinophil(%)	1 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1
Basophil(%)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte(%)	3 \pm 2	4 \pm 2	4 \pm 1	4 \pm 2
Lymphocyte(%)	82 \pm 4	79 \pm 5	79 \pm 6	78 \pm 7
Female				
Number of animals	11	13	12	13
RBC($\times 10^4/\mu\text{L}$)	646 \pm 32	633 \pm 48	650 \pm 46	657 \pm 40
Hemoglobin(g/dL)	12.7 \pm 0.7	12.5 \pm 0.7	12.7 \pm 0.7	12.9 \pm 0.6
Hematocrit(%)	37.5 \pm 2.2	36.9 \pm 2.1	37.4 \pm 2.2	38.1 \pm 1.9
MCV(fL)	58.1 \pm 1.5	58.4 \pm 2.0	57.6 \pm 1.8	58.1 \pm 3.1
MCH(pg)	19.7 \pm 0.6	19.8 \pm 0.7	19.5 \pm 0.7	19.7 \pm 1.0
MCHC(g/dL)	33.9 \pm 0.5	33.9 \pm 0.3	33.9 \pm 0.4	34.0 \pm 0.3
Platelet($\times 10^4/\mu\text{L}$)	111.7 \pm 15.9	119.1 \pm 11.5	110.2 \pm 15.0	102.8 \pm 10.8
PT(sec)	13.2 \pm 0.7	13.2 \pm 0.7	12.9 \pm 0.5	13.2 \pm 0.6
APTT(sec)	17.7 \pm 2.4	16.6 \pm 1.0	16.9 \pm 0.8	16.7 \pm 0.8
WBC($\times 100/\text{mm}^3$)	97.4 \pm 24.5	91.2 \pm 22.8	96.4 \pm 25.8	90.0 \pm 18.8
Differential leukocyte counts(%)				
Neutrophil(%)	19 \pm 5	24 \pm 9	21 \pm 5	20 \pm 6
Eosinophil(%)	1 \pm 0	1 \pm 0	1 \pm 1	1 \pm 0
Basophil(%)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Monocyte(%)	8 \pm 5	5 \pm 3	5 \pm 2	6 \pm 3
Lymphocyte(%)	72 \pm 9	70 \pm 10	72 \pm 6	73 \pm 5

Values represent mean \pm S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$

** : Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 3 Blood chemical examination of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
Male				
Number of animals	13	13	13	13
Total protein (g/dL)	5.5 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.3
Albumin (g/dL)	3.2 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.2
A/G	1.36 ± 0.13	1.26 ± 0.11	1.28 ± 0.15	1.34 ± 0.09
BUN (mg/dL)	16 ± 3	17 ± 3	17 ± 3	16 ± 2
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	152 ± 21	144 ± 24	140 ± 15	148 ± 17
Total cholesterol (mg/dL)	44 ± 7	44 ± 7	40 ± 10	41 ± 9
Triglyceride (mg/dL)	47 ± 18	41 ± 13	35 ± 14	39 ± 18
ALP (U/L)	193 ± 42	214 ± 39	233 ± 53	225 ± 44
GPT (U/L)	30 ± 3	32 ± 4	31 ± 5	39 ± 29
GOT (U/L)	67 ± 10	66 ± 6	69 ± 10	79 ± 35
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1
Total bilirubin (mg/dL)	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02
Inorganic phosphate (mg/dL)	5.7 ± 0.7	5.8 ± 0.8	5.8 ± 0.8	6.1 ± 0.7
Ca (mg/dL)	8.9 ± 0.2	8.8 ± 0.3	8.8 ± 0.3	8.9 ± 0.2
Na (mEq/L)	145.5 ± 1.3	145.5 ± 1.1	146.3 ± 1.2	145.4 ± 1.5
K (mEq/L)	4.00 ± 0.35	3.91 ± 0.31	3.96 ± 0.25	4.10 ± 0.22
Cl (mEq/L)	109.0 ± 1.8	109.4 ± 1.5	110.0 ± 0.8	108.3 ± 1.7
Female				
Number of animals	11	13	12	13
Total protein (g/dL)	5.4 ± 0.4	5.4 ± 0.2	5.7 ± 0.4	5.4 ± 0.4
Albumin (g/dL)	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.1	3.3 ± 0.3	3.2 ± 0.2
A/G	1.34 ± 0.12	1.33 ± 0.12	1.38 ± 0.13	1.46 ± 0.18
BUN (mg/dL)	17 ± 3	15 ± 3	17 ± 3	18 ± 3
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	124 ± 12	128 ± 9	135 ± 13	136 ± 15
Total cholesterol (mg/dL)	49 ± 11	48 ± 14	49 ± 11	47 ± 10
Triglyceride (mg/dL)	63 ± 20	64 ± 22	76 ± 28	53 ± 18
ALP (U/L)	103 ± 25	129 ± 51	128 ± 53	138 ± 57
GPT (U/L)	40 ± 6	40 ± 5	38 ± 7	41 ± 9
GOT (U/L)	62 ± 7	65 ± 10	59 ± 8	64 ± 13
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0*	1 ± 1**
Total bilirubin (mg/dL)	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.03**	0.10 ± 0.03
Inorganic phosphate (mg/dL)	6.8 ± 0.7	6.3 ± 0.5	6.6 ± 0.9	6.6 ± 1.0
Ca (mg/dL)	9.0 ± 0.5	9.2 ± 0.3	9.7 ± 0.2**	9.4 ± 0.5
Na (mEq/L)	143.2 ± 1.0	143.7 ± 1.0	142.9 ± 1.0	143.4 ± 1.0
K (mEq/L)	4.31 ± 0.55	3.98 ± 0.27	4.04 ± 0.29	3.95 ± 0.25
Cl (mEq/L)	107.6 ± 1.7	108.4 ± 1.2	107.5 ± 1.4	107.9 ± 1.6

Values represent mean ± S.D.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$ **: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Table 4 Histopathological findings of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Organ [Number of animals examined]	Sex: Dose (mg/kg)	Male				Female			
		0	10	50	250	0	10	50	250
Testis		[13]	[13]	[13]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Atrophy, seminiferous tubule	-	10	13	13	12				
	±	3	0	0	0				
	+	0	0	0	1				
	total	3	0	0	1				
Epididymis		[13]	[13]	[13]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Cell debris, lumen	-	11	13	13	12				
	±	2	0	0	0				
	+	0	0	0	1				
	total	2	0	0	1				
Spermatic granuloma	-	11	13	11	11				
	±	0	0	2	2				
	+	1	0	0	0				
	++	1	0	0	0				
	total	2	0	2	2				
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	-	10	13	11	11				
	±	3	0	2	2				
	total	3	0	2	2				
Prostate: ventral lobe		[5]	[0]	[0]	[6]	[0]	[0]	[0]	[0]
Cellular infiltration, lymphocyte & plasma cell, interstitium/epithelium	-	2			2				
	±	2			1				
	+	0			1				
	++	1			2				
	total	3			4				
Uterus		[0]	[0]	[0]	[0]	[7]	[0]	[1]	[5]
Dilatation, cystic, lumen, focal	-					6		1	5
	++					1		0	0
	total					1		0	0
Cellular infiltration, macrophage, with brown pigment, muscular layer	-					7		0	5
	+					0		1	0
	total					0		1	0
Liver		[5]	[0]	[2]	[7]	[7]	[0]	[0]	[5]
Fatty change, periportal	-	0		0	0	1			0
	±	4		0	5	6			5
	+	1		1	2	0			0
	++	0		1	0	0			0
	total	5		2	7	6			5
Microgranuloma	-	1		1	5	7			4
	±	4		1	0	0			1
	+	0		0	2	0			0
	total	4		1	2	0			1
Hematopoiesis, extramedullary	-	5		2	7	7			4
	±	0		0	0	0			1
	total	0		0	0	0			1
Kidney		[5]	[0]	[2]	[7]	[7]	[0]	[0]	[5]
Ectopic tissue, epididymis-like duct, cortex, right side	-	5		2	6	7			5
	+	0		0	1	0			0
	total	0		0	1	0			0
Eosinophilic body	-	3		1	5	7			5
	±	0		0	2	0			0
	+	1		1	0	0			0
	++	1		0	0	0			0
	total	2		1	2	0			0

-: Negative, ±: Very slight, +: Slight, ++: Moderate, +++: Severe, total: Total of positive grade
[]: Number of animals examined

Table 4 (continued)

Organ [Number of animals examined]	Sex: Findings, grade and number of animals	Dose (mg/kg)	Male				Female			
			0	10	50	250	0	10	50	250
Kidney			[5]	[0]	[2]	[7]	[7]	[0]	[0]	[5]
Basophilic tubule, cortex	-		2		0	4	3			3
	±		3		2	2	4			2
	+		0		0	1	0			0
	total		3		2	3	4			2
Cast, hyalin, medulla	-		5		2	6	7			5
	+		0		0	1	0			0
	total		0		0	1	0			0
Cast, hyalin, cortex	-		5		2	6	7			5
	±		0		0	1	0			0
	total		0		0	1	0			0
Cyst, cortico-medullary junction	-		4		2	7	7			5
	±		1		0	0	0			0
	total		1		0	0	0			0
Mineralization	-		4		1	7	4			3
	±		1		1	0	3			1
	+		0		0	0	0			1
	total		1		1	0	3			2
Spleen			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Hematopoiesis, extramedullary	±		1			1	0			0
	+		4			5	1			0
	++		0			0	6			5
	total		5			6	7			5
Deposit, pigment, brown	±		5			6	7			5
	total		5			6	7			5
Lung & Bronchus			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Accumulation, foam cell	-		4			4	2			3
	±		1			2	5			1
	+		0			0	0			1
	total		1			2	5			2
Heart			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Degeneration/fibrosis, myocardium	-		4			5	7			5
	±		1			1	0			0
	total		1			1	0			0
Thymus			[5]	[0]	[0]	[8]	[8]	[1]	[1]	[5]
Atrophy	-		5			8	8	1	0	4
	±		0			0	0	0	0	1
	++		0			0	0	0	1	0
	total		0			0	0	0	1	1
Urinary bladder			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria	-		5			6	7			4
	±		0			0	0			1
	total		0			0	0			1
Thyroid gland			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Cellular infiltration, plasma cell & lymphocyte, interstitium	-		5			6	6			5
	±		0			0	1			0
	total		0			0	1			0
Ectopic thymus	-		5			5	7			5
	±		0			1	0			0
	total		0			1	0			0
Subcutaneous tissue of axilla			[0]	[0]	[0]	[0]	[1]	[0]	[0]	[0]
Cellular infiltration, lymphocyte & macrophage, mammary gland	±						1			
	total						1			
Cell debris, lactiferous duct, mammary gland	+						1			
	total						1			

-: Negative, ±: Very slight, +: Slight, ++: Moderate, +++: Severe, total: Total of positive grade
[]: Number of animals examined

Table 5 Estrous cycle and reproductive performance of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
Estrous cycle				
Number of females examined	13	13	13	13
Pre-treatment period				
Number of females showing 4-day cycle	13	13	13	13
Treatment period				
Number of animals showing:				
4-day cycle	12	13	13	12
4- and 5- day cycle	0	0	0	1
Irregular cycle	1	0	0	0
Mean length of estrous cycle in days				
Mean \pm S.D.	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.0	4.0 \pm 0.1
Number of vaginal estrus during mating period				
Mean \pm S.D.	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
Reproductive performance				
Number of pairs examined (A)	13	13	13	13
Number of pairs copulated (B)	13	13	13	13
Copulation index [(B/A) \times 100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of fertile pairs (C)	12	13	12	13
Fertility index [(C/B) \times 100,%]	92.3	100.0	92.3	100.0
Pairing days until copulation				
Mean \pm S.D.	2.6 \pm 1.7	2.0 \pm 1.1	2.8 \pm 1.2	2.3 \pm 1.3

Table 6 Development of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0		10		50		250	
Number of pregnant females	12		13		12		13	
Number of pregnant females with live newborns	11		13		12		13	
Gestation index	91.7		100.0		100.0		100.0	
Gestation length in days	22.5 ± 0.5	(11)	22.3 ± 0.5	(13)	22.4 ± 0.5	(12)	22.6 ± 0.5	(13)
Number of corpora lutea	16.1 ± 1.4	(12)	16.0 ± 1.9	(13)	16.2 ± 2.4	(12)	15.8 ± 1.8	(13)
Number of implantations	15.2 ± 1.9	(12)	15.4 ± 1.5	(13)	15.2 ± 2.5	(12)	15.1 ± 1.6	(13)
Implantation index	94.4 ± 9.2	(12)	96.4 ± 4.6	(13)	93.7 ± 6.7	(12)	95.8 ± 4.4	(13)
Day 0 of lactation								
Number of newborns	14.4 ± 2.2	(11)	14.5 ± 1.8	(13)	14.3 ± 3.2	(12)	13.5 ± 2.0	(13)
Delivery index	95.0 ± 6.2	(11)	94.4 ± 5.3	(13)	93.1 ± 9.8	(12)	89.3 ± 9.7	(13)
Number of live newborns	14.4 ± 2.2	(11)	14.4 ± 1.6	(13)	13.4 ± 3.1	(12)	11.5 ± 3.1*	(13)
Birth index	95.0 ± 6.2	(11)	93.5 ± 4.7	(13)	87.9 ± 11.2	(12)	76.0 ± 16.8**	(13)
Live birth index	100.0 ± 0.0	(11)	99.1 ± 2.3	(13)	94.8 ± 10.1	(12)	86.4 ± 21.1**	(13)
Sex ratio on day 0	1.49 ± 1.08	(11)	0.95 ± 0.56	(13)	1.27 ± 0.55	(12)	1.18 ± 1.05	(13)
Day 4 of lactation								
Number of live pups	14.1 ± 2.0	(11)	14.3 ± 1.7	(13)	13.4 ± 3.1	(12)	11.5 ± 3.0*	(13)
Viability index	98.3 ± 4.0	(11)	99.5 ± 2.0	(13)	100.0 ± 0.0	(12)	99.4 ± 2.1	(13)
Sex ratio on day 4	1.45 ± 1.07	(11)	0.96 ± 0.56	(13)	1.27 ± 0.55	(12)	1.18 ± 1.05	(13)
Body weights of pups (g)								
Day 0								
Male	6.8 ± 0.7	(11)	6.8 ± 0.4	(13)	6.8 ± 1.0	(12)	7.0 ± 0.9	(13)
Female	6.4 ± 0.6	(11)	6.5 ± 0.4	(13)	6.4 ± 0.8	(12)	6.6 ± 0.8	(13)
Day 4								
Male	10.6 ± 1.2	(11)	10.6 ± 0.9	(13)	11.4 ± 2.5	(12)	11.8 ± 2.0	(13)
Female	10.1 ± 1.2	(11)	10.2 ± 0.9	(13)	10.9 ± 1.9	(12)	11.2 ± 2.1	(13)

Values represent mean ± S.D.

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

*: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.05$

**: Significant difference from 0 mg/kg, $p < 0.01$

Gestation index = (number of pregnant females with live newborns/number of pregnant females) × 100, %

Implantation index = (number of implantations/number of corpora lutea) × 100, %

Delivery index = (number of newborns/number of implantations) × 100, %

Birth index = (number of live newborns/number of implantations) × 100, %

Live birth index = (number of live newborns/number of newborns) × 100, %

Sex ratio on day 0 = number of male live newborns/number of female live newborns

Viability index = (number of live pups on day 4 of lactation/number of live newborns) × 100, %

Sex ratio on day 4 = number of male live pups on day 4 of lactation/number of female live pups on day 4 of lactation

2-ヒドロキシベンズアルデヒドの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 2-Hydroxybenzaldehyde on Bacteria

要約

OECD既存化学物質安全性調査事業の一環として、2-ヒドロキシベンズアルデヒドについて、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、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加の条件でプレート法により、用量設定試験を50～5000 μg/プレートの用量で行ったところ、すべての検定菌において、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験で抗菌性が認められた。したがって、本試験はS9 mix無添加試験を31.3～1000 μg/プレート(TA100は15.6～500 μg/プレート, WP2 *uvrA*は125～4000 μg/プレート), S9 mix添加試験を62.5～2000 μg/プレート(TA100は15.6～500 μg/プレート, WP2 *uvrA*は125～4000 μg/プレート)の範囲で用量を設定し、試験を実施した。

その結果、抗菌性は、S9 mix無添加試験では、500 μg/プレート(TA100 およびTA1537), 1000 μg/プレート(TA98 およびTA1535) および4000 μg/プレート(WP2)で、S9 mix添加試験では、500 μg/プレート(TA100), 2000 μg/プレート(TA1535, TA98およびTA1537) および4000 μg/プレート(WP2)で認められた。復帰突然変異コロニー数は、2回の本試験とも、用いたすべての検定菌で、いずれの用量においても増加は認められなかったことから、2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

[検定菌]

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

*S. typhimurium*の4菌株¹⁾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²⁾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ものを用い、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℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

[被験物質]

2-ヒドロキシベンズアルデヒド(CAS No. 90-02-8)は、分子量 122.12 の淡黄色液体である。試験には、セイミケミカル(株)製 [ロット番号: 082316, 純度 95%以上(不純物: 不明)] のものを、(社)日本化学工業協会から供与されたもの、使用時までガラス製容器に入れ、窒素ガスで空気と置換密栓して室温で遮光保管し用いた。

2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解性がよいことから、DMSOに20～50 mg/mlの範囲で溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、2-ヒドロキシベンズアルデヒドのDMSO溶液中での安定性試験および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、低濃度(156 μg/ml)溶液は本試験Ⅱで調製したものについて、また高濃度(40.0 mg/ml)溶液は染色体異常試験で調製したものについて、室温遮光条件下で、安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均値に対して、99.6および98.4%であった。また、本試験Ⅱで調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、調製後の濃度はそれぞれ低濃度は102%、高濃度は101%であった。

[陽性対照物質]

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (上野製薬(株))

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

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

[培地およびS9 mixの組成]

1) トップアガー

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 |
| D-ビオチン | 0.5 mM |
- *: WP2 *uvrA* 用には, 0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた.

2) 合成培地

培地は, 日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた. なお, 培地 1 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・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
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 mix

1 ml 中下記の成分を含む

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

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

[試験方法]

プレート法により, S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った.

小試験管中にトッパアガー 2 ml, 被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml), 検定菌液 0.1 ml 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 DMSO, または数種の陽性対照物質溶液を用いた. 各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した. 培養は 37°C で 48 時間行い, 生じた変異コロニー数を算定した. 抗菌性の有無については, 肉眼的あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌膜の状態から判断した.

用いた平板は用量設定試験においては, 溶媒および陽性対照群では 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群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. 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, 結果の再現性の確認を行った.

[判定基準]

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

結果および考察

[用量設定試験]

50 ~ 5000 μg/プレート の範囲で公比を約 3 として, 試験を実施したところ, S9 mix 無添加試験では WP2 *uvrA* 5000 μg/プレート で, TA100 が 500 μg/プレート 以上で, その他は 1500 μg/プレート 以上で抗菌性が認められた. また, S9 mix 添加試験では TA100 が 500 μg/プレート 以上で, その他は 1500 μg/プレート 以上の用量で抗菌性が認められた.

[本試験]

結果をそれぞれ Table 1, 2 に示した. 2-ヒドロキシベンズアルデヒドの用量を, S9 mix 無添加試験は 31.3 ~ 1000 μg/プレート (TA100 は 15.6 ~ 500 μg/プレート, WP2 *uvrA* は 125 ~ 4000 μg/プレート), S9 mix 添加試験は 62.5 ~ 2000 μg/プレート (TA100 および WP2 *uvrA* は S9 mix 添加試験と同一用量) の範囲で公比を 2 として設定し試験を実施した. その結果, 2 回の試験のいずれも, 用いた 5 種類の検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験において, 溶媒対照値の 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, 2-ヒドロキシベンズアルデヒドは, 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.

Table 1. Mutagenicity of 2-hydroxybenzaldehyde** in reverse mutation test (I) on bacteria

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	
S9mix (-)	0	115 127 83 (108 \pm 22.7)	11 9 13 (11 \pm 2.0)	21 23 26 (23 \pm 2.5)	21 18 22 (20 \pm 2.1)	8 7 7 (7 \pm 0.6)	
	15.6	97 81 93 (90 \pm 8.3)	ND	ND	ND	ND	
	31.3	84 83 79 (82 \pm 2.6)	17 8 21 (15 \pm 6.7)	ND	20 22 28 (23 \pm 4.2)	7 6 8 (7 \pm 1.0)	
	62.5	82 79 80 (80 \pm 1.5)	8 7 27 (14 \pm 11.3)	ND	16 28 22 (22 \pm 6.0)	2 11 7 (7 \pm 4.5)	
	125	87 83 85 (85 \pm 2.0)	11 12 15 (13 \pm 2.1)	20 12 19 (17 \pm 4.4)	13 18 19 (17 \pm 3.2)	10 6 1 (6 \pm 4.5)	
	250	58 38 55 (50 \pm 10.8)	18 8 12 (13 \pm 5.0)	22 19 26 (22 \pm 3.5)	22 23 18 (21 \pm 2.6)	8 7 7 (7 \pm 0.6)	
	500	40* 41* 51* (44 \pm 6.1)	19 3 7 (10 \pm 8.3)	14 18 24 (19 \pm 5.0)	19 18 20 (19 \pm 1.0)	5* 8* 3* (5 \pm 2.5)	
	1000		1* 0* 0* (0 \pm 0.6)	23 21 15 (20 \pm 4.2)	14* 11* 17* (14 \pm 3.0)	1* 1* 7* (3 \pm 3.5)	
	2000			2 4 6 (4 \pm 2.0)			
4000			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)				
S9mix (+)	0	123 144 155 (141 \pm 16.3)	7 12 10 (10 \pm 2.5)	30 18 23 (24 \pm 6.0)	37 41 32 (37 \pm 4.5)	12 14 15 (14 \pm 1.5)	
	15.6	103 114 121 (113 \pm 9.1)	ND	ND	ND	ND	
	31.3	81 117 111 (103 \pm 19.3)	ND	ND	ND	ND	
	62.5	93 95 105 (98 \pm 6.4)	9 14 13 (12 \pm 2.6)	ND	26 35 22 (28 \pm 6.7)	7 16 12 (12 \pm 4.5)	
	125	96 98 93 (96 \pm 2.5)	17 10 8 (12 \pm 4.7)	29 21 18 (23 \pm 5.7)	26 22 25 (24 \pm 2.1)	7 6 14 (9 \pm 4.4)	
	250	56 71 83 (70 \pm 13.5)	10 10 7 (9 \pm 1.7)	32 26 22 (27 \pm 5.0)	21 27 28 (25 \pm 3.8)	9 10 15 (11 \pm 3.2)	
	500	45* 57* 68* (57 \pm 11.5)	7 4 7 (6 \pm 1.7)	26 12 19 (19 \pm 7.0)	25 18 22 (22 \pm 3.5)	10 8 4 (7 \pm 3.1)	
	1000		4 1 3 (3 \pm 1.5)	20 23 29 (24 \pm 4.6)	20 14 23 (19 \pm 4.6)	5 8 7 (7 \pm 1.5)	
	2000		0* 0* 1* (0 \pm 0.6)	15 12 6 (11 \pm 4.6)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	
4000			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)				
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	591 481 463 (512 \pm 69.3)	263 262 225 (250 \pm 21.7)	108 121 101 (110 \pm 10.1)	785 800 745 (777 \pm 28.4)	1064 1104 971 (1046 \pm 68.2)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	2008 1637 1544 (1730 \pm 245.5)	212 229 230 (224 \pm 10.1)	1166 1335 1277 (1259 \pm 85.9)	573 498 438 (503 \pm 67.6)	262 217 221 (233 \pm 24.9)	

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 above 95% and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 2. Mutagenicity of 2-hydroxybenzaldehyde** in reverse mutation test (II) on bacteria

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	
S9mix (-)	0	102 98 89 (96 \pm 6.7)	16 13 12 (14 \pm 2.1)	23 22 21 (22 \pm 1.0)	27 19 27 (24 \pm 4.6)	5 11 10 (9 \pm 3.2)	
	15.6	82 74 82 (79 \pm 4.6)	ND	ND	ND	ND	
	31.3	88 92 99 (93 \pm 5.6)	10 8 10 (9 \pm 1.2)	ND	21 28 28 (26 \pm 4.0)	12 7 10 (10 \pm 2.5)	
	62.5	75 74 82 (77 \pm 4.4)	15 10 11 (12 \pm 2.6)	ND	31 30 35 (32 \pm 2.6)	4 11 8 (8 \pm 3.5)	
	125	96 64 78 (79 \pm 16.0)	11 10 13 (11 \pm 1.5)	31 31 23 (28 \pm 4.6)	27 23 31 (27 \pm 4.0)	10 4 7 (7 \pm 3.0)	
	250	66 50 59 (58 \pm 8.0)	6 6 5 (6 \pm 0.6)	31 24 38 (31 \pm 7.0)	22 23 11 (19 \pm 6.7)	7 3 2 (4 \pm 2.6)	
	500	34* 50* 44* (43 \pm 8.1)	5 7 3 (5 \pm 2.0)	20 12 28 (20 \pm 8.0)	21 23 23 (22 \pm 1.2)	4 12 8 (8 \pm 4.0)	
	1000		3* 0* 2* (2 \pm 1.5)	23 21 25 (23 \pm 2.0)	11* 19* 17* (16 \pm 4.2)	6* 5* 7* (6 \pm 1.0)	
	2000			8 9 8 (8 \pm 0.6)			
	4000			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
S9mix (+)	0	100 112 109 (107 \pm 6.2)	14 10 8 (11 \pm 3.1)	30 25 29 (28 \pm 2.6)	40 31 37 (36 \pm 4.6)	5 18 12 (12 \pm 6.5)	
	15.6	89 120 104 (104 \pm 15.5)	ND	ND	ND	ND	
	31.3	115 116 105 (112 \pm 6.1)	ND	ND	ND	ND	
	62.5	103 76 96 (92 \pm 14.0)	10 10 11 (10 \pm 0.6)	ND	29 40 29 (33 \pm 6.4)	9 5 11 (8 \pm 3.1)	
	125	94 98 88 (93 \pm 5.0)	7 19 13 (13 \pm 6.0)	37 29 37 (34 \pm 4.6)	28 38 24 (30 \pm 7.2)	7 13 11 (10 \pm 3.1)	
	250	63 49 72 (61 \pm 11.6)	20 7 3 (10 \pm 8.9)	47 42 34 (41 \pm 6.6)	28 23 27 (26 \pm 2.6)	11 13 8 (11 \pm 2.5)	
	500	41* 49* 52* (47 \pm 5.7)	8 5 5 (6 \pm 1.7)	33 24 31 (29 \pm 4.7)	27 29 20 (25 \pm 4.7)	7 7 3 (6 \pm 2.3)	
	1000		1* 0* 1* (1 \pm 0.6)	27 29 21 (26 \pm 4.2)	30 19 20 (23 \pm 6.1)	8 8 4 (7 \pm 2.3)	
	2000		0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	17 8 14 (13 \pm 4.6)	17* 13* 9* (13 \pm 4.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	
	4000			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies / plate	535 591 587 (571 \pm 31.2)	267 284 275 (275 \pm 8.5)	152 146 140 (146 \pm 6.0)	761 734 764 (753 \pm 16.5)	1132 929 1397 (1153 \pm 234.7)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies / plate	1464 1444 1498 (1469 \pm 27.3)	291 304 309 (301 \pm 9.3)	1422 1450 1427 (1433 \pm 14.9)	342 363 371 (359 \pm 15.0)	263 294 277 (278 \pm 15.5)	

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

** : Purity was above 95% and impurity was unknown.

ND : Not done

文献

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

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：坂本京子, 川上久美子, 原 巧,
堀谷尚古, 松木容彦, 中込まどか,
中尾美津男, 北嶋美以子
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 秦野市落合 729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Kyoko Sakamoto, Kumiko Kawakami,
Takumi Hara, Naoko Horiya,
Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi,
Mitsuo Nakao, and Miiko kitashima
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

2-ヒドロキシベンズアルデヒドの 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-Hydroxybenzaldehyde on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、2-ヒドロキシベンズアルデヒドの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.02 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。また、短時間処理(6時間)のS9 mix存在下および非存在下においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.2 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間処理した高濃度群(0.02 mg/ml)では、観察した細胞の5.5%に染色体の構造異常が認められた。また、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、48時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常は認められなかったが、高濃度群(0.02 mg/ml)においては倍数性細胞が誘発され、その頻度は18.12%であった。

短時間処理では、S9 mix非存在下で6時間処理した中濃度群(0.1 mg/ml)および高濃度群(0.2 mg/ml)では、観察した細胞のそれぞれ4.0%と25.1%に染色体の構造異常が認められた。また、低濃度群(0.05 mg/ml)では、有意な倍数性細胞の増加が認められたが疑陽性であった。

いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下では、中濃度群(0.1 mg/ml)および高濃度群(0.2 mg/ml)において、観察した細胞のそれぞれ5.0%と16.5%に染色体の構造異常が認められた。また、すべての処理群において倍数性細胞が誘発され、その頻度は1.63~6.25%であった。

以上の結果より、2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、染色体異常を誘発すると結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2

月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS:Biocell)を10%添加したイーグルMEM(日水製薬株)培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

2-ヒドロキシベンズアルデヒド(略号:HBA, CAS No.:90-02-8, ロット番号:082316, セイメケミカル株製造, 株)日本化学工業協会提供)は、無色~淡黄色透明液体で、水に対して1.4 g/100 ml(20°C)で溶解し、アルコール、エーテル等に可溶であり、融点-7°C, 沸点196~197°C, 蒸気圧1 hPa(30°C), 分子式C₇H₆O₂, 分子量122.12, 純度95.0%以上(不純物は不明)の物質である。

被験物質原体の安定性に関する情報は得られなかったが、溶媒中(DMSO)では、156 μg/ml~40.0 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

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DMSO(和光純薬工業株)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被

験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業(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、連続処理における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%増殖抑制濃度をはさむ2濃度より算出したところ、0.02 mg/mlであった。短時間処理のS9 mix存在下および非存在下における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度は、ともに0.2 mg/mlであった(Fig. 1)。

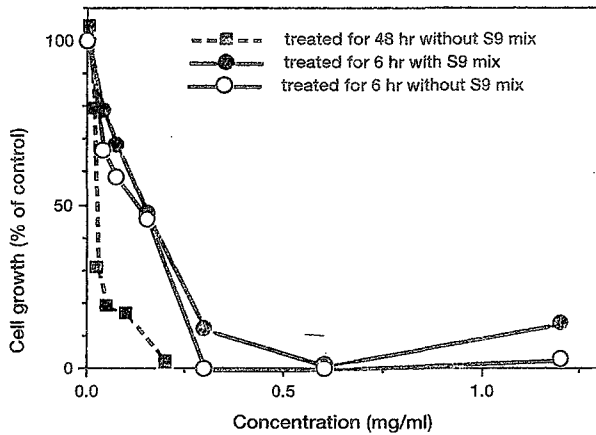


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-hydroxybenzaldehyde

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理では、0.02 mg/ml、短時間処理のS9 mix存在下および非存在下では、0.2 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8. 染色体標本作製法

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

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、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、林²⁾の方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法³⁾(多重性を考慮してfamilywiseの有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定⁴⁾($p < 0.05$)を行った。原則として以上2回の検定でもともに有意差が認められた場合を陽性とした。傾向性検定で有意差が認められない場合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。2-ヒドロキシベンズアルデヒドを加えて24時間処理した高濃度群(0.02 mg/ml)では、観察した細胞の5.5%(gapを含む)に染色体の構造異常が認められた。また、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、48時間処理したいずれの処理群でも染色体の構造異常は認められなかったが、高濃度群(0.02 mg/ml)において、倍数性細胞の誘発作用が認められ、その頻度は18.12%であった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。2-ヒドロキシベンズアルデヒドを加えてS9 mix非存在下で6時間処理した中濃度群(0.1 mg/ml)および高濃度群(0.2 mg/ml)では、観察した細胞のそれぞれ4.0%と25.1%に染色体の構造異常が認められ、傾向性検定の結果、濃度依存性が認められた。また、低濃度群(0.05 mg/ml)において、有意な倍数性細胞の増加が認められ、その頻度は対照群が0.13%であるのに対して0.88%であったが、その他の処理群においては増加が認められず、傾向性検定の結果、濃度依存性は認められなかったため、疑陽性と判定した。一方、S9 mix存在下では、中濃度群(0.1 mg/ml)および高濃度群(0.2 mg/ml)では、観察した細胞のそれぞれ5.0%と16.5%に染色体の構造異常が誘発され、傾向性検定の結果、濃度依存性が認められた。また、すべての処理群において倍数性細胞が誘発され、その頻度は1.63~6.25%で、傾向性検定の結果、濃度依存性が認められた。

従って、2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-hydroxybenzaldehyde (HBA)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Trend test ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		with aberrations	Polyloid ⁴⁾	SA	NA	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)	(%)		
Control			200	0	3	1	1	0	0	5	2	5 (2.5)	5 (2.5)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38		
HBA	0.0050	24	200	1	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
HBA	0.010	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	+	NT
HBA	0.020	24	200	3	8	2	0	0	0	13	0	11* (5.5)	8 (4.0)	0.50		
MC	0.00005	24	200	4	35	93	2	1	0	135	2	85 (42.5)	82 (41.0)	0.00		
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
HBA	0.0050	48	200	0	1	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
HBA	0.010	48	200	0	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25	NT	+
HBA	0.020	48	200	1	3	1	0	0	0	5	1	4 (2.0)	4 (2.0)	18.12*		
MC	0.00005	48	200	6	38	81	7	2	10	144	7	81 (40.5)	77 (38.5)	0.50		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), 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, NT: not tested. 1) Dimethyl sulfoxide 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) Cochran Armitage's trend test was done at $p < 0.05$. *: Significantly different from historical solvent control data with respect to TAG and polyloid at $p < 0.05$ by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **: Purity was more than 95%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-hydroxybenzaldehyde (HBA)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Trend test ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		with aberrations	Polyloid ⁴⁾	SA	NA	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)	(%)		
Control				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50		
HBA	0.050	-	6-(18)	200	1	0	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.88*		
HBA	0.10	-	6-(18)	200	0	8	6	5	0	0	19	2	8* (4.0)	8 (4.0)	0.38	+	-
HBA	0.20	-	6-(18)	179	11	36	40	5	0	0	92	0	45* (25.1)	42 (23.5)	0.66 ⁶⁾		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	0	2	0	1	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	1.00		
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
HBA	0.050	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.63*		
HBA	0.10	+	6-(18)	200	4	7	14	0	0	10	35	0	10* (5.0)	10 (5.0)	4.13*	+	+
HBA	0.20	+	6-(18)	200	6	12	51	1	2	10	82	0	33* (16.5)	31 (15.5)	6.25*		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	6	25	25	1	0	0	57	2	43 (21.5)	40 (20.0)	0.50		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), 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) Dimethyl sulfoxide 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) Cochran Armitage's trend test was done at $p < 0.05$. 6) Four hundred and fifty-eight cells were analysed. *: Significantly different from historical solvent control data with respect to TAG and polyloid at $p < 0.05$ by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **: Purity was more than 95%.

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 林 真, 変異原性試験, 1, 255 (1992).
- 3) 吉村 功 編著, “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.
- 4) 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.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
試験担当者: 山影康次, 中川ゆづき, 日下部博一,
橋本恵子, 水谷正寛, 古畑紀久子
(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, Yuzuki Nakagawa,
Hirokazu Kusakabe, Keiko Hashimoto,
Masahiro Mizutani, Kikuko Furuhata
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