

## 既存化学物質の人健康影響に関する情報（第二種監視化学物質審議関係）

（平成17年11月18日開催）

官報公示 整理番号	CAS No.	物質名称	単回	28日間	Repro Tox	簡易生殖	Ames	染色体	小核	評価文書	頁
5-776	2403-88-5	2, 2, 6, 6-テトラメチル-4-ヒドロキシビ ペリジン	○		○		○	○			1
4-602	16219-75-3	5-エチリデン-2-ノルボルネン		○		○	○	○			27
4-581	3048-65-5	3a, 4, 7, 7a-テトラヒドロ-1H-インデ ン			○		○	○			56
3-1978	88-44-8	2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸		○		○	○	○		SIAR	80
3-1124	882-33-7	ジフェニルジスルフィド	○		○		○	○			107
5-242 5-243	149-30-4	2-メルカプトベンゾチアゾール								NTP	138
3-779	824-78-2	p-ニトロフェノールナトリウム	○	○			○	○		CICAD	133
4-498	135-51-3	2-ナフトール-3, 6-ジスルホン酸ナトリ ウム		○			○	○			239
2-2022	78-51-3	リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステル		○			○	○		EHC	256
3-2520	1241-94-7	リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエ ステル		○			○	○			312
3-752	3586-14-9	3-フェノキシトルエン		○			○	○			333
3-2694	56-93-9	ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド		○			○	○			352
4-514	87-02-5	7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレン スルホン酸		○			○	○			372
3-521	89-83-8	チモール			○		○	○			388

# 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジ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 2,2,6,6-Tetramethyl-4-hydroxypiperidine in Rats

### 要約

既存化学物質の安全性を評価するため、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンを雌雄のCrj:CD(SD)系ラットに単回経口投与し、急性毒性を検討した。

投与量は雌雄ともに592, 769, 1000, 1300, 1690 および 2197 mg/kgの6用量とした。

死亡動物は、雌雄とも 1300 mg/kg以上の用量群で投与後3時間以降13日までみられ、その多くが投与翌日に認められた。LD<sub>50</sub>値(95%信頼限界)は雄が1482(1239~1774)mg/kg, 雌が1564(1326~1842)mg/kgであった。

一般状態の観察では雌雄ともすべての用量群で自発運動低下、散瞳および眼瞼下垂がみられ、1300 mg/kg以上の用量群で腹臥位、体温低下、振戦が認められた。さらに雄の1300 mg/kg群で消瘦、腹部膨満および耳介等の蒼白、1690 mg/kg群で立毛、雌の1690 mg/kg群で腹部膨満、耳介等の蒼白および脱毛が観察された。すべての用量群でみられた自発運動低下、散瞳および眼瞼下垂の多くは投与当日にみられ投与翌日には回復していた。また、2197 mg/kg群の雌雄でみられた散瞳の程度は重度で他の用量群に比較して強いものであった。

生存動物の体重は、1690 mg/kg群の雌雄では投与後7日の測定値が投与前の値に比較して減少したが、その他の用量群においては雌雄とも投与後7および14日の測定で前回の測定値に比較して増加していた。

剖検では、雌雄の死亡動物において腺胃のび慢性出血、十二指腸の赤色斑点が多数認められた。死亡動物の雌雄各1例および観察終了時解剖動物の雌1例について病理組織学検査を行った結果、腺胃に出血、壊死および空胞変性、十二指腸に浮腫、出血、壊死および空胞変性が観察されたことから消化管出血が死因と考えられた。

### 方法

#### 1. 被験物質

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジン(三井石油化学工業㈱)は、白色の顆粒で水に15~16%可溶、アセトンに易溶、分子量157.26の物質である。本試験に用いたロット番号6509051の純度は99.8 wt%であった。

#### 2. 供試動物

5週齢のCrj:CD(SD)系ラット(SPF)雌雄各35匹を日本チャールス・リバー(株)から購入した。動物は検収後、試験環境に馴化し、7週齢で投与した。

投与時の体重は、雄が177~195 g, 雌が139~153 gであった。

#### 3. 飼育

動物は、温度23±2℃, 湿度55±10%, 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で、(株)東京技研サービスの自動水洗式飼育機を使用し、ステンレス製網目飼育ケージに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)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。なお、動物飼育期間中の温湿度の実測値は22.4~23.2℃, 51~61%であり、動物の馴化期間を含め、観察期間中データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

#### 4. 用量設定理由

本試験に先立ち、雌雄各3匹のラットに500, 1000 および 2000 mg/kgの被験物質を投与した予備試験の結果、2000 mg/kg群で雌雄全例、1000 mg/kg群の雌で3例中1例が死亡し、1000 mg/kg群の雄および500 mg/kg群の雌雄には死亡例が認められなかった。また、中毒症状として自発運動低下、眼瞼下垂、散瞳、体温低下が雌雄とも全投与群で観察された。

以上の結果を参考として、本試験では雌雄とも1000 mg/kgを中心に公比約1.3で592, 769, 1000, 1300 および 1690 mg/kgの5用量を設定したが、1690 mg/kgの雌雄で生存動物が認められたため、雌雄とも2197 mg/kgを追加投与し6用量とした。

#### 5. 群分け

動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした。

#### 6. 投与液の調製および投与方法

所定量の被験物質を注射用蒸留水(株)大塚製薬工場、ロット番号6B77N)に溶解した。溶液の濃度は、592, 769, 1000, 1300, 1690 および 2197 mg/kg群で、それぞれ3.0, 3.8, 5.0, 6.5, 8.5および11.0 w/v%であった。すべての投与群について投与液の濃度分析を(株)帝人バイオ・ラボラトリーズで実施した結果、設定濃度の99.6~104%の範囲であり、適切に調製されていた。

投与経路は経口とし、16時間絶食させた動物に上述

の被験物質溶液を注射ポンプおよび胃ゾンデを用い、投与した。投与容量は体重100 gあたり2 mLとし、個体別に測定した体重に基づいて投与容量を算出し、投与した。給餌は被験物質投与3時間後に行った。

### 7. 一般状態の観察

中毒症状および生死の観察は、投与6時間までは1時間毎に、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。

### 8. 体重

体重は投与直前、投与後7および14日に測定した。また、死亡例については死亡発見時に測定した。

### 9. 50%致死量(LD<sub>50</sub>)の算出

Litchfield-Wilcoxon(1949)の方法により、投与14日の死亡率からLD<sub>50</sub>値およびその95%信頼限界を算出した。

### 10. 病理学検査

観察期間中の死亡例については死亡発見時に、また生存例については観察期間終了時にエーテル麻酔後放血安楽死させ解剖した。肉眼的に異常の認められた器官、組織について記録するとともに、10%中性緩衝ホルマリン液に保存し、その一部を病理組織学検査に供した。

## 結果

### 1. 死亡率およびLD<sub>50</sub>値

死亡動物は、雌雄とも1300 mg/kg以上の用量群で投与後3時間以降13日までみられ、その多くが投与翌日に認められた。592, 769, 1000, 1300, 1690 および 2197 mg/kg群の死亡率は雄がそれぞれ0, 0, 0, 20, 80 および 100%, 雌がそれぞれ0, 0, 0, 20, 60 および 100%であった。LD<sub>50</sub>値は雄が1482 mg/kg(95%信頼限界1239~1774 mg/kg), 雌が1564 mg/kg(95%信頼限界1326~1842 mg/kg)であった。

### 2. 一般状態

雌雄とも全ての用量群で自発運動低下および散瞳が投与後1時間から、眼瞼下垂が投与後1~3時間からみられた。また、1300 mg/kg群の雄では投与後13日に死亡した1例で削瘦と耳介等の蒼白が投与後8日から、体温低下および腹部膨満が投与後10日から死亡するまで観察された。雌の1300 mg/kg群では腹臥位および振戦が投与後6時間に観察された。1690 mg/kg群の雌雄では、腹臥位、振戦および体温低下、さらに雄では立毛が投与後7日のみに1例、雌では腹部膨満、耳介等の蒼白および脱毛が投与後7日から観察終了日まで2例にみられた。2197 mg/kg群の雌雄では体温低下が投与後2~6時間に認められた。

全ての用量群でみられた自発運動低下、散瞳および眼瞼下垂の多くは投与日にみられ投与翌日には回復していた。また、2197 mg/kg群の雌雄でみられた散瞳の程度

は重度で他の試験群に比較して強いものであった。

### 3. 体重

投与後7日の測定で1690 mg/kg群の生存動物は雌雄とも前回の測定値に比較して減少したが、投与後14日の測定ではすべての動物が前回の測定値と比較して増加していた。

その他の用量群においては雌雄とも投与後7および14日の測定で前回の測定値に比較して増加していた。

### 4. 病理所見

剖検では、雌雄とも592, 769 および 1000 mg/kg群には異常所見が認められなかった。1300 mg/kg群では雌雄とも生存動物に異常所見はなかったが、死亡動物の雌雄各1例には胃の内腔拡大がみられた。1690 mg/kg群の死亡動物では雌雄とも腺胃のび漫性出血、十二指腸の赤色斑点が多数みられ、さらに雌の1例には十二指腸の局所的な出血が認められた。また、雄の生存動物および投与後7日の死亡例には胃と肝臓の局所的な癒着、胃の内腔拡大がみられ、雌の生存動物には胃と脾臓の局所的な癒着、胃の内腔拡大および腺胃の赤色斑点がみられた。2197 mg/kg群の死亡動物には雌雄とも腺胃のび漫性出血および小腸の赤色化が認められた。

病理組織学検査は1690 mg/kg群の死亡動物で比較的死後変化の進んでいない雌雄各1例および観察終了時解剖動物の雌1例について胃および十二指腸を対象に行った。その結果、死亡動物の雄では腺胃に出血、壊死および空胞変性、前胃に空胞変性、十二指腸に浮腫、出血および空胞変性が、雌では腺胃に壊死、十二指腸に出血、壊死および空胞変性が観察された。観察終了時解剖動物の雌では腺胃に局所的なびらんが観察され出血および再生像を伴っていた。また、前胃は角化亢進が顕著であったが、十二指腸には異常病変はなかった。

## 考察

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンについてラットを用いる急性経口毒性試験を実施した。

その結果、死亡動物は投与後3時間以降13日までみられ、その多くが投与翌日に認められた。中毒症状として、雌雄とも自発運動低下、散瞳、眼瞼下垂、腹臥位、体温低下、振戦、腹部膨満および耳介等の蒼白、さらに雄で立毛および削瘦、雌で脱毛がみられた。これらのうち、自発運動低下、散瞳、眼瞼下垂および振戦は被験物質の直接的な作用、腹臥位および体温低下は死に至る過程でみられた所見と考えられた。

剖検では雌雄の1690 mg/kg以上の用量群の死亡動物において腺胃のび漫性出血、十二指腸の赤色斑点が多数認められた。1690 mg/kg群の死亡動物の雌雄各1例について病理組織学検査を行った結果、腺胃に出血、壊死および空胞変性、前胃に空胞変性および十二指腸に浮腫、出血、壊死および空胞変性が観察されたことからいずれの動物も消化管出血が死因と考えられた。また、消化管

Table 1. Mortality and LD<sub>50</sub> values of rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Number of deaths <sup>a)</sup>								Mortality	LD <sub>50</sub> values <sup>b)</sup> (mg/kg)	
			1	2	3	4	5	6	7	8~14			
Male	592	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	1482 1239-1774 <sup>c)</sup>
	769	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1300	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>d)</sup>	1/5	
	1690	5	3	0	0	0	0	0	0	1	0	4/5	
	2197	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5	
Female	592	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	1564 1326-1842 <sup>c)</sup>
	769	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1300	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1/5	
	1690	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3/5	
	2197	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5	

a) :Days after administration

b) :LD<sub>50</sub> values estimated by Litchfield-Wilcoxon method

c) :95 % confidence limits

d) :Day13

出血を引き起こした原因は本被験物質が強アルカリ性物質(原液; pH 約14, 投与液; pH 11.8)であることによるものと考えられた。

## 連絡先

試験責任者: 山本利男

試験担当者: 藤島 敦

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

## Correspondence

Authors: Toshio Yamamoto (Study director)

Atsushi Fujishima

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and

Pesticides (An-Pyo Center)

582-2 Shioshinden, Fukude-cho, Iwata-gun,

Shizuoka, 437-1213, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

# p-ニトロフェノールナトリウムのラットを用いる単回経口投与毒性試験

## Single Dose Oral Toxicity Test of p-Nitrophenol sodium salt in Rats

### 要約

p-ニトロフェノールナトリウムをCrj:CD(SD)IGS系雌雄ラットに単回経口投与し、その毒性を検討した。なお、被験物質としては、安定でありかつ市販されているナトリウム=p-ニトロフェノキシド二水和物(p-ニトロフェノールナトリウムの二水和物)を用いた。投与量(二水和物としての量)は、雌雄とも125, 250, 500および1000 mg/kgの4用量とし、対照群には媒体(0.5 w/v%カルメロースナトリウム水溶液)を投与した。

500 mg/kg群の雌雄各3例と1000 mg/kg群の雄4例および雌全例が死亡した。一般状態では、250 mg/kg以上の投与群で自発運動の減少および腹臥/横臥、500 mg/kg以上の投与群で強直性痙攣がみられ、死亡動物は投与直後から投与30分後の間に認められた。一方、生存動物にみられた症状は、投与2時間後までに全て消失した。体重推移および剖検では、雌雄ともに被験物質投与による変化は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下におけるp-ニトロフェノールナトリウムのLD<sub>50</sub>値(95%信頼限界値)は、雄で550 mg/kg(303~1160 mg/kg)、雌で467 mg/kg(334~651 mg/kg)であった。

### 方法

#### 1. 被験物質および被験液の調製

被験物質ナトリウム=p-ニトロフェノキシド二水和物(三井化学㈱, 東京, 純度98.5%, ロット番号8J-001)は、融点>300℃の黄色晶の化合物である。なお、投与終了後の残余被験物質について分析を行った結果、使用期間中は安定であったことが確認された。

投与容量が10 mL/kg体重となるよう、0.5 w/v%カルメロースナトリウム水溶液に懸濁して12.5, 25, 50および100 mg/mL懸濁液(濃度は二水和物としての濃度)を調製した。1~100 mg/mL懸濁液は、冷蔵(約4℃)8日後室温24時間、暗所(褐色ガラス瓶)保存で安定であったことから、被験液は投与日の4日前に調製し、褐色ガラス瓶に入れて使用時まで冷蔵庫(約4℃)に保存した。また、本投与に用いた被験液について当施設で測定した結果、濃度は適正でかつ均一であった。

#### 2. 試験動物および飼育条件

4週齢のCrj:CD(SD)IGS系SPFラットを日本チャールス・リバー㈱から購入し、当所で15日間検疫・馴化

飼育した後、健康な動物を選び6週齢で試験に供した。投与日の体重範囲は雄で174~200 g(平均値: 183.8 g)、雌で126~146 g(平均値: 134.4 g)であった。

動物は、投与前日の体重により層別化し、無作為抽出法により各群の平均体重ができるだけ均等となるように割りつけた。

動物は、温度23±3℃、相対湿度50±20%、換気回数1時間当たり10~15回、照明1日12時間の飼育室で、金属製網ケージに2~3匹ずつ収容し、固型飼料(放射線滅菌CRF-1, オリエンタル酵母工業㈱)および飲料水(水道水)を自由に摂取させて飼育した。

#### 3. 投与量および投与方法

125, 250, 500, 1000および2000 mg/kgを1群雌雄各3匹のラットに投与した予備試験では、1000および2000 mg/kg群の雌雄全例、500 mg/kg群の雌雄各2例および250 mg/kg群の雄2例と雌1例が死亡した。これらの結果から、1000 mg/kg群を最高用量とし、以下公比2で500, 250および125 mg/kgを設定し、これに対照群を加えて5群構成とした。

動物は、投与前に約16時間絶食させたのち、所定濃度の被験液を10 mL/kg体重の容量で、金属製胃ゾンデを用いて1回強制経口投与した。対照群には溶媒(0.5 w/v%カルメロースナトリウム水溶液)を同様に投与した。1群の動物数は雌雄とも5匹とした。なお、投与後の給餌は投与6時間後に実施し、給水は投与に関係なく継続して行った。

#### 4. 検査項目

##### 1) 一般状態および生死の観察

投与後6時間までは頻繁に、その後は1日1回、14日間にわたって実施した。

##### 2) 体重測定

投与直前に体重を測定し、これを投与液量の算出基準にした。さらに、投与後1, 2, 3, 7, 10および14日に体重を測定した。

##### 3) 病理学検査

14日間の観察期間終了後にエーテル深麻酔下で放血致死させ、体外表の観察を行った後、頭部、胸部、腹部を含む全身の器官・組織の異常の有無を肉眼的に観察した。

Table 1 Mortality and LD<sub>50</sub> values of rats treated orally with *p*-nitrophenol sodium salt in single dose toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Distribution of death (days after administration)														Mortality <sup>a</sup>	LD <sub>50</sub> values (mg/kg) [95 % confidence limits]		
			0							1	2	3	4	5	6	7			8~14	
			minutes			hours														
			~5	~15	~30	~1	~2	~4	~6											
Male	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	550 [303 - 1160]
	125	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	500	5	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/5	
	1000	5	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/5	
Female	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	467 [334 - 651]
	125	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	500	5	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/5	
	1000	5	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5/5	

a) number of dead animals/number of animals examined

5. 統計解析

投与後14日間の累積死亡率をもとに、雄はProbit法、雌はVan der Waerden法を用いてLD<sub>50</sub>値とその95%信頼限界値を求めた。体重については、まずBartlett法により各群の分散の均一性の検定を行った。その結果、分散が均一の場合にはDunnett法を用いて対照群と各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が均一でない場合にはDunnett型のmean rank testを用いて対照群と各投与群との平均順位差の検定を行った。

結果

1. 死亡状況およびLD<sub>50</sub>値 (Table 1)

125および250 mg/kg群では死亡は認められなかったが、500 mg/kg群の雌雄各3/5例および1000 mg/kg群の雄4/5例と雌5/5例が死亡した。LD<sub>50</sub>値(95%信頼限界値)は、雄で550 mg/kg(303~1160 mg/kg)、雌で467 mg/kg(334~651 mg/kg)であった。

2. 一般状態

125 mg/kg群では、いずれの動物にも異常はみられなかった。

250 mg/kg群では、投与15分後に雄の2例で自発運動の減少、更に腹臥/横臥がみられたが、投与1時間後には消失した。

500 mg/kg群では、投与直後~5分後あるいは投与15分後から自発運動の減少がみられ、その後腹臥/横臥、更にほとんどの例では強直性痙攣を呈して投与直後~5分後から投与30分後の間に雌雄各3例が死亡した。生存例では、投与直後~5分後から雄1例、投与15分後から雌2例に自発運動の減少、その後腹臥/横臥がみられたが、すべて投与1時間後には消失した。

1000 mg/kg群では、投与直後~5分後から自発運動の減少がみられ、その後腹臥/横臥、更にほとんどの例で

は強直性痙攣を呈して投与直後~5分後から投与15分後の間に雄4例と雌全例が死亡した。雄の生存例1例は、投与直後~5分後に自発運動の減少、投与15分後に腹臥/横臥がみられたが、投与2時間後には消失した。

3. 体重

各投与群の体重は、対照群とほぼ同様に推移した。

4. 剖検

いずれの動物にも異常は認められなかった。

考察

死亡動物は、雌雄ともに500 mg/kg群から認められ、LD<sub>50</sub>値(95%信頼限界値)は、雄で550 mg/kg(303~1160 mg/kg)、雌で467 mg/kg(334~651 mg/kg)であった。

一般状態では、250 mg/kg以上の投与群で自発運動の減少および腹臥/横臥、500 mg/kg以上の投与群で強直性痙攣がみられ、死亡動物は投与直後~5分後から投与30分後にかけて認められた。一方、生存動物にみられた症状は、投与2時間後までにはすべて消失した。

体重および剖検では、被験物質投与による変化は認められなかった。

連絡先

試験責任者：榎並倫宣  
試験担当者：鷹野正生, 津田敏治  
(株)ボゾリサーチセンター 御殿場研究所  
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284  
Tel 0550-82-2000 Fax 0550-82-2379

Correspondence

Authors: Tomonori Enami (Study director)  
Masao Takano, Toshiharu Tsuda  
Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.  
1284 Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka, 412-0039,  
Japan  
Tel +81-550-82-2000 Fax +81-550-82-2379

# p-ニトロフェノールナトリウムのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

## Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of p-Nitrophenol sodium salt in Rats

### 要約

p-ニトロフェノールナトリウムをCrj:CD(SD)IGS系雌雄ラットに28日間強制経口投与し、その毒性を検討した。なお、被験物質としては、安定でありかつ市販されているナトリウム=p-ニトロフェノキシド二水和物(p-ニトロフェノールナトリウムの二水和物)を用いた。投与量(二水和物としての量)は0(対照群), 60, 160, 400および1000 mg/kgの用量で対照群, 160および400 mg/kg群については、別に14日間の回復群を設けた。

投与期間中1000 mg/kgの雌雄各10例が死亡したが、器質の変化を伴わない中枢神経系への作用が死因と考えられた。生存動物の一般状態では、1000 mg/kg群の雌雄で自発運動の減少、呼吸数の減少及び腹臥/横臥が投与期間のごく初期のみにみられた。

体重および摂餌量では、被験物質投与の影響は認められなかった。

尿検査では、pHの低下が400 mg/kg群の雄でみられた。

血液学・血液生化学検査、剖検および器官重量では、被験物質投与の影響は認められなかった。

病理学検査では、雄の腎臓で尿管上皮の好酸性小体の出現が400および1000 mg/kg群で増強された。

回復群では、上記の変化はすべて消失し、回復性が認められた。

以上の結果から、本試験条件下におけるp-ニトロフェノールナトリウムの無影響量は、雄で160 mg/kg/day、雌で400 mg/kg/dayと考えられた。

### 方法

#### 1. 被験物質および被験液の調製

ナトリウム=p-ニトロフェノキシド二水和物(三井化学(株), 東京, 純度98.5%, ロット番号8J-001)は、融点 $>300^{\circ}\text{C}$ の黄色晶の化合物である。なお、投与終了後の残余被験物質について分析を行った結果、使用期間中は安定であったことが確認された。

投与容量が10 mL/kg体重となるよう、0.5 w/v%カルメロースナトリウム水溶液に懸濁して6, 16, 40および100 mg/mL懸濁液を調製した。また、投与開始前および投与終了週の2回、投与に使用する各濃度液について当施設で測定した結果、いずれも濃度は適正でかつ均一であった。

#### 2. 使用動物および飼育条件

5週齢のCrj:CD(SD)IGS系SPF雌雄ラットを日本チャールス・リバー(株)から購入し、当所で8日間検疫・馴化飼育した後、体重増加が順調で一般状態に異常を認めなかった雌雄各54匹を選び、6週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で190~217 g(平均値: 199.6 g)、雌で144~169 g(平均値: 156.9 g)であった。

動物は、投与開始4日前にその日の体重に基づいて層別化し、各群平均体重がほぼ均等となるよう、コンピュータを用いて各群に割り付けた。

動物は、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数1時間当たり10~15回、照明1日12時間の飼育室で、金属製網ケージに1匹ずつ収容し、固型飼料(放射線滅菌CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))および飲料水(水道水)を自由に摂取させ飼育した。

#### 3. 投与量、群構成および動物数

単回投与による予備試験(投与量: 125, 250, 500, 1000および2000 mg/kg, 1群雌雄各3例)では、1000および2000 mg/kg群の雌雄全例, 500 mg/kg群の雌雄各2例および250 mg/kg群の雄2例と雌1例が死亡した。一方、2週間投与による予備試験(投与量: 3, 12.5, 50および200 mg/kg)では、一般状態で被験物質の色に起因すると思われる黄色尿の排泄が50および200 mg/kg群の雌雄にみられたのみで、体重、摂餌量、血液・血液生化学検査、剖検および器官重量のいずれの検査においても被験物質投与の影響は認められなかった。これらの成績から、本試験では60, 160, 400および1000 mg/kgの4用量を設定し、これに対照群を加えて計5群を使用した。更に、対照群, 160, 400および1000 mg/kg群では回復群を設けた。動物数はいずれの群も雌雄各6匹とした。ただし、1000 mg/kg群では投与期間中にほとんどの動物が死亡したため、回復群の動物を含む全生存例を投与終了時に剖検して全例を主群扱いとしたため、この群のみ雌雄各12例となった。

被験液の投与容量は10 mL/kg体重とし、金属製胃ゾンデを用いて1日1回28日間強制経口投与した。対照群には溶媒(0.5 w/v%カルメロースナトリウム水溶液)を同様に投与した。投与液量は最新の体重を基準に算出した。回復期間は14日間とした。

#### 4. 検査項目

##### 1) 一般状態の観察

投与期間中は毎日2回以上、回復期間中は毎日1回観



察した。

## 2) 体重

投与期間および回復期間を通じ、週2回(投与第1週と回復第1週は3回)の頻度で体重を測定した。

## 3) 摂餌量測定

投与期間および回復期間を通じ、週2回(投与第1週は3回)の頻度で摂餌量を測定した。

## 4) 血液学検査

投与期間および回復期間終了の翌日の剖検時に検査を行った。前日から一夜(約16時間)絶食させた動物をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から抗凝固剤(EDTA-2K)を加えた採血ビンに血液を採取し、赤血球数(電気抵抗変化検出法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(平均赤血球容積および赤血球数から算出)、平均赤血球容積(電気抵抗変化検出法)、平均赤血球血色素量(ヘモグロビン量および赤血球数から算出)、平均赤血球血色素濃度(ヘモグロビン量およびヘマトクリット値から算出)、血小板数(電気抵抗変化検出法)、白血球数(電気抵抗変化検出法)(以上コールター全自動8項目血球アナライザーT890, コールター(株)、網赤血球率(Brecher法)および白血球百分率(May-Giemsa鏡検法)を測定した。また、3.8%クエン酸ナトリウムを加えた容器に採取した血液を遠心分離(3000 rpm, 10分間)し、得られた血漿を用いてプロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間(以上クロット法, 血液凝固自動測定装置, ACL 100, Instrumentation Laboratory)を測定した。

## 5) 血液生化学検査

血液学検査のための採血と同時に腹大動脈から採血し、遠心分離(3000 rpm, 10分間)により得られた血清を用いてAIP(Bessey-Lowry法)、総コレステロール(CEH-COD-POD法)、トリグリセライド(GK-GPO-POD法)、リン脂質(PLD-ChOD-POD法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、グルコース(Hexokinase-G6PD法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、ナトリウム、カリウムおよび塩素(イオン選択電極法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(モリブデン酸法)、総たん白質(Biuret法)、アルブミン(BCG法)およびA/G比(総たん白質およびアルブミンから算出)を測定した。また、ヘパリンを加えた容器に採血し、遠心分離(3000 rpm, 10分間)により得られた血漿を用いてGOT, GPT, LDH(UV-rate法)および $\gamma$ -GTP( $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド法)(以上いずれも全自動分析装置 Monarch, Instrumentation Laboratory)を測定した。

## 6) 尿検査

投与第4週(検査当日の投与後)と回復第2週に検査を行った。検査動物(検査時点における全生存例)を代謝ケージに個別に収容し、絶食・自由摂水下で4時間尿を、

次いで自由摂食・自由摂水下でその後の20時間尿を採取した。採取した最初の4時間尿を用いてpH, たん白質, ケトン体, グルコース, 潜血, ビリルビン, ウロビリノーゲン(以上URIFLET7A試験紙, (株)京都第一科学), 色調(肉眼観察)および沈渣(鏡検)を検査した。また、その後に得られた20時間尿を用いて浸透圧(氷点降下法, 全自動浸透圧測定装置 オートアンドスタットOM-6030, (株)京都第一科学)を測定し、4時間尿量および20時間尿量から1日の尿量を算出した。更に、代謝ケージに収容した状態で、前日からの1日の摂水量を給水瓶を用いて測定した。

## 7) 剖検および器官重量

上記血液学検査および血液生化学検査のための採血後に放血致死させ、外表異常の有無を観察した後、頭部、胸部および腹部を含む全身の器官・組織について肉眼的に異常の有無を観察した。続いて、以下に示す器官を摘出後、器官重量(絶対重量)を測定した。また、絶食後の体重および絶対重量から体重100 g当たりの相対重量を算出した。死亡動物は、発見後すみやかに剖検した。

脳, 甲状腺(上皮小体を含む)胸腺, 心臓, 肺(気管支を含む), 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 卵巣

## 8) 病理組織学検査

全動物について器官・組織〔脳, 脊髄, 坐骨神経, 心臓, 気管, 肺(気管支を含む), 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 肝臓, 甲状腺(上皮小体を含む), 副腎, 胸腺, 脾臓, 腸間膜リンパ節, 顎下リンパ節, 腎臓, 膀胱, 精巣, 前立腺, 卵巣, 子宮, 骨および骨髄(胸骨・大腿骨), 大腿部骨格筋)を採取し、リン酸緩衝10%ホルマリン液(ただし、精巣はブアン液で固定した後リン酸緩衝10%ホルマリン液で保存した)で固定した後パラフィンに包埋した。投与期間終了時剖検動物では、このうち対照群と高および最高用量群は包埋した全ての器官・組織について、また、中および低用量群は被験物質投与による変化が疑われた雌雄の胃および雄の腎臓についてそれぞれ切片とし、ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を施して鏡検した。回復群では、被験物質投与による変化が疑われた上記の胃および腎臓について、全例を検査した。また、死亡動物については用量に関係なく鏡検した。

## 5. 統計解析

各検査項目のうち、数値化した成績についてまずBartlett法により各群の分散の均一性の検定を行った。その結果、分散が均一の場合には一元配置法による分散分析を行い、群間に有意差が認められたならば、Dunnnett法を用いて対照群と各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が均一でない場合には、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、有意であればDunnnett型の方法(Steel法)を用いて対照群と各投与群との平均順位の差の検定を行った。また、尿の定性的項目については累積 $\chi^2$ 検定法を行った。検定はいずれも両側で、有意水準

は5および1%とした。病理組織学検査の成績についてはMann-WhitneyのU検定を行った。検定は片側で、有意水準は5および1%とした。

## 結果

### 1. 一般状態

#### 1) 投与期間

投与期間中、1000 mg/kg群の雌雄各10例が死亡した。このうち、雄7例と雌6例は投与開始日の投与直後から自発運動の減少、呼吸数の減少および腹臥/横臥がみられ、一部はこれに加えて強直性痙攣を呈して死亡した。その他の雄3例と雌4例では、投与開始日の投与直後に自発運動の減少および呼吸数の減少がみられ、ほとんどの例では腹臥/横臥も認められた。投与2日では約半数で投与直後に自発運動の減少がみられた。これ以降、これらの症状はみられなくなったが、投与6から14日にかけて雄2例と雌3例が症状を示すことなく投与30分～3時間後に死亡、投与17日に雌雄各1例が投与直後に呼吸数の減少、腹臥/横臥および強直性痙攣を示して死亡した。なお、投与開始日に死亡した例以外では、被験物質の色に起因すると考えられる黄色尿の排泄が投与開始日から連日観察された。

生存動物では、黄色尿の排泄が各投与群の雌雄全例で投与開始日から連日みられた。更に、1000 mg/kg群では黄色尿の排泄に加えて投与開始日の投与直後に自発運動の減少および呼吸数の減少が雌雄各2例(生存例全例)にみられ、雌雄各1例では腹臥/横臥も認められた。投与2日には投与直後に自発運動の減少が雄1例にみられた。

#### 2) 回復期間

いずれの動物にも異常は認められなかった。

### 2. 体重(Fig. 1)

#### 1) 投与期間

雌雄ともに、各投与群の体重は対照群と同様に推移した。

#### 2) 回復期間

雌雄ともに、各投与群の体重は対照群と同様に推移した。

### 3. 摂餌量

#### 1) 投与期間

投与期間を通じて、雌雄の各投与群の摂餌量は対照群と同様であった。

#### 2) 回復期間

雄では、160および400 mg/kg群で対照群に比べて有意な低値が回復10日にみられた。なお、投与14日に摂餌量の有意な低値が160 mg/kg群にみられたが、400 mg/kg群では対照群との差がなく、用量に関連した変

化ではなかった。

雌では、回復期間を通じて各投与群の摂餌量は対照群と同様であった。

### 4. 血液学検査(Table 1)

#### 1) 投与期間終了時検査

雌雄ともに、被験物質投与による変化はみられなかった。

#### 2) 回復期間終了時検査

雌雄ともに、被験物質投与による変化はみられなかった。

### 5. 血液生化学検査(Table 2)

#### 1) 投与期間終了時検査

雌雄ともに、被験物質投与による変化はみられなかった。なお、アルブミンの有意な増加が400 mg/kg群の雄、A/G比の有意な高値が160 mg/kg群の雄、総コレステロールの有意な減少が160 mg/kg群の雌、更にカリウムの有意な増加が60 mg/kg群の雌にみられたが、いずれも用量に関連した変化ではなかった。

#### 2) 回復期間終了時検査

雌雄ともに、被験物質投与による変化は認められなかった。

### 6. 尿検査(Table 3)

#### 1) 投与第4週検査

雄では、pHの有意な低下が400 mg/kg群にみられた。雌では、pHの有意な低下がすべての投与群にみられた。

#### 2) 回復第2週検査

雌雄ともに、被験物質投与による変化はみられなかった。

### 7. 器官重量(Table 4)

#### 1) 投与期間終了時剖検例

雌雄ともに、被験物質投与による変化は認められなかった。なお、心臓の相対重量の有意な減少が400 mg/kg群の雄に、肝臓、副腎および卵巣の相対重量の有意な増加が400 mg/kg群の雌にみられたが、いずれも用量に関連した変化ではなかった。

#### 2) 回復期間終了時剖検例

雄では、被験物質投与による変化はみられなかった。雌では、副腎の絶対重量の有意な増加が400 mg/kg群にみられた。

### 8. 剖検所見(Table 5)

#### 1) 死亡例

雌雄ともに、異常は認められなかった。

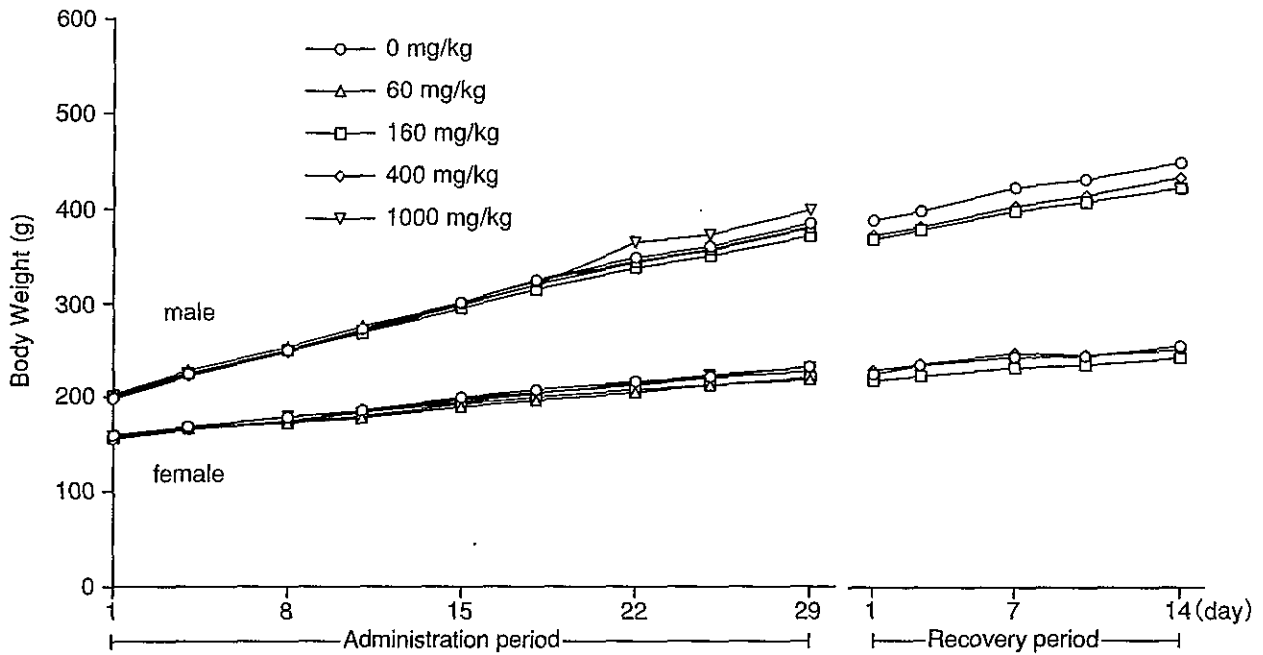


Fig. 1 Body weight of rats administered orally with p-nitrophenol sodium salt for 28 days

2) 投与期間終了時剖検例

雌雄ともに、被験物質投与による変化は認められなかった。なお、腺胃の暗赤色点が60 mg/kg群の雄1例と400 mg/kg群の雌1例に、精巣上体の白色斑(片側性)が400 mg/kg群の1例にみられたが、正常ラットでもしばしば認められる変化であることあるいはその出現状況からいずれも偶発所見と判断した。

3) 回復期間終了時剖検例

雌雄ともに、被験物質投与による変化は認められなかった。なお、腎臓の一部陥凹(片側性)が400 mg/kg群の雄1例に、腺胃の暗赤色点(片側性)が160および400 mg/kg群の雌各1例にみられたが、正常ラットでもしばしば認められる変化であることあるいはその出現状況からいずれも偶発所見と判断した。

9. 病理組織学検査(Table 6)

1) 死亡例

被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。なお、雄で肝臓における髓外造血の増加および脾臓における髓外造血の亢進が有意にみられ、雌でも同様の傾向が認められたが、大半の動物が投与開始日に死亡していることから、動物の週齢の違いによる差と判断した。また、雄の1例で大腿骨骨髓に限局性の線維化がみられたが、その出現状況から偶発所見と判断した。

2) 投与期間終了時剖検例

被験物質投与によると考えられる変化が、雄の腎臓にみられた。なお、胃は被験物質投与の影響が疑われたため雌雄全例について検索したが、最終的には被験物質投与の影響はないと判断した。

腎臓：雄における尿管上皮の好酸性小体が、対照群

では軽微3例、60 mg/kg群では軽微1例と軽度1例、160 mg/kg群では軽微1例なのに対し、400 mg/kg群では軽微3例と軽度3例、1000 mg/kg群では軽度2例(生存例全例)であり、400および1000 mg/kg群で変化の程度が増強され、400 mg/kg群では有意差も認められた。

上記以外の所見は正常ラットでもしばしば認められる変化であること、あるいはその出現状況から、いずれも偶発所見と判断した。

3) 回復期間終了時剖検例

被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

考察

投与期間中、1000 mg/kg群の雌雄各10例が死亡した。発現した症状は中枢神経系への影響を示唆するものであったこと、一方、剖検および病理組織検査では神経系に変化がみられず、脳重量の変化も認められなかったことから、器質的変化を伴わない中枢神経系への作用が死因と考えられた。

生存動物の一般状態では、死亡が認められた1000 mg/kg群の雌雄で死亡動物と同様に自発運動の減少、呼吸数の減少および腹臥/横臥がみられた。しかし、呼吸数の減少と腹臥/横臥は投与開始日のみ、自発運動の減少も投与3日以降は認められなかった。このように、投与開始時にみられた症状が投与を繰り返すことにより消失する場合には、肝臓の薬物代謝酵素の誘導が認められることが多いが、本試験では薬物代謝酵素の誘導を示唆する小葉中心性の肝細胞肥大はみられず、肝臓重量の増加も明らかではないことからその機序は不明であった。なお、投与開始日以降、雌雄の投与群全例で黄色尿

の排泄が連日みられたが、黄色を有する被験物質自身あるいはその代謝物が尿中に排泄された結果と考えられ、毒性とはみなさなかつた。

体重および摂餌量では、被験物質投与の影響は認められなかつた。

尿検査では、pHの低下が400 mg/kg群の雄でみられ、後述の腎臓の組織学的変化とともに被験物質の腎臓への影響が示唆された。なお、pHの低下は雌のすべての投与群にもみられたが、その変化の程度が用量に関連していないこと、他の尿検査の項目や腎臓の病理学検査において何ら変化がみられないことから毒性ではないと判断した。

血液および血液生化学検査では、被験物質投与の影響は認められなかつた。

病理学検査では、雄の腎臓で尿管上皮の好酸性小体の出現が400および1000 mg/kg群で増強された。しかし、この変化は雄ラットで性成熟に伴って生理的に認められるものであり、本試験では尿管の障害性を示唆する変化がみられないことから、毒性学的意義は乏しいと推察された。

休薬により、上記の変化はすべて消失し、回復性が認められた。なお、摂餌量で有意な低値が160および400 mg/kg群の雄にみられたが、回復10日の1時点のみの変化であり、その前後では対照群との差は認められないことから偶発的な変化と判断した。また、副腎重量の増加が400 mg/kg群の雌にみられたが、絶対重量のみの変化で相対重量に差がないことや投与終了時に被験物質の副腎への影響が認められないことから偶発的な変化と判断した。

以上の如く、*p*-ニトロフェノールナトリウムをラットに28日間反復経口投与した結果、1000 mg/kg群の雌雄で死亡が認められ、400および1000 mg/kg群の雄で腎臓の組織学的変化、400 mg/kg群の雄で尿pHの低下がみられた。一方、400 mg/kg群の雌と160 mg/kg以下の投与群の雌雄では変化は認められなかつた。

これらの結果から、本試験における*p*-ニトロフェノールナトリウムの無影響量は雄で160 mg/kg/day、雌で400 mg/kg/dayと推定された。

#### 文献

- 1) S. C. Gad and C. S. Weil, "Principles and Methods of Toxicology," 2, ed. by A. W. Hayes, Raven Press Ltd., New York, 1989, pp. 435-483.

#### 連絡先

試験責任者：榎並倫宣

試験担当者：鷹野正生，畠山和久，田村一利，  
津田敏治，勝亦俱慶

(株)ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284

Tel 0550-82-2000 Fax 0550-82-2379

#### Correspondence

Authors: Tomonori Enami (Study director)

Masao Takano, Kazuhisa Hatayama,

Kazutoshi Tamura, Toshiharu Tsuda,

Toyohisa Katsumata

Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.

1284 Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka, 412-0039,

Japan

Tel +81-550-82-2000 Fax +81-550-82-2379

Table 1 Hematology of rats treated orally with p-nitrophenol sodium salt in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	60	160	400	1000	0	160	400
<b>Male</b>								
No. of animals	6	6	6	6	2	6	6	6
RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	781±27	801±31	818±15	804±52	762±18	829±54	823±37	823±32
Hb (g/dL)	15.3±0.4	15.7±0.7	15.7±0.3	15.6±0.6	15.5±0.0	15.8±0.6	15.8±0.5	15.5±0.7
Ht (%)	46±1	48±1	48±1	47±2	47±0	47±2	47±1	46±1
MCV (fL)	59.1±1.2	59.5±1.7	57.9±1.5	58.4±1.0	61.6±1.6	56.2±1.9	57.1±1.4	55.9±1.3
MCH (pg)	19.6±0.5	19.6±0.5	19.1±0.6	19.4±0.6	20.3±0.4	19.1±0.6	19.2±0.5	18.9±0.5
MCHC (%)	33.0±0.4	32.9±0.5	33.1±0.3	33.1±0.7	33.0±0.1	33.9±0.6	33.6±0.3	33.8±0.4
Reticulocyte (%)	2.0±0.4	2.2±0.3	2.0±0.3	2.3±0.4	2.6±0.3	1.8±0.2	1.8±0.2	2.0±0.4
Platelet (10 <sup>4</sup> /μL)	103.2±7.2	103.2±14.7	95.8±6.5	99.2±4.0	107.6±20.6	95.5±13.7	86.6±7.6	91.4±3.2
WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	81±19	85±27	82±22	89±27	102±4	95±18	84±19	82±18
Differential leukocyte counts (%)								
Lymph	84.3±7.1	89.6±4.0	84.4±5.4	86.3±5.6	87.3±3.2	86.9±4.3	88.0±5.1	87.8±2.2
Stab	0.4±0.4	0.2±0.3	0.2±0.3	0.5±0.6	0.0±0.0	0.4±0.4	0.3±0.3	0.1±0.2
Seg	14.2±7.4	9.4±3.9	14.4±5.0	12.7±5.2	12.8±3.2	11.3±4.2	10.8±5.3	10.7±2.6
Eosino	0.6±0.7	0.6±0.6	0.7±0.5	0.3±0.6	0.0±0.0	1.3±0.7	0.8±0.7	1.1±0.6
Baso	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Mono	0.5±0.3	0.3±0.3	0.3±0.4	0.3±0.3	0.0±0.0	0.2±0.3	0.2±0.3	0.3±0.3
Others	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
PT (S)	12.9±0.9	14.0±1.3	14.8±2.2	13.9±1.7	14.9±3.1	13.3±1.3	13.7±1.5	13.4±1.2
APTT (S)	16.0±2.7	18.7±1.1	17.3±2.4	16.3±1.4	16.0±1.3	16.5±1.1	18.1±1.9	15.4±1.9
<b>Female</b>								
No. of animals	6	6	6	6	2	6	6	6
RBC (10 <sup>6</sup> /μL)	786±34	801±36	789±40	788±39	728±40	822±25	807±44	831±39
Hb (g/dL)	15.4±0.6	15.9±0.6	15.3±0.7	15.9±0.8	14.9±0.6	15.8±0.4	15.3±0.5	15.8±0.9
Ht (%)	46±2	47±2	46±2	47±3	44±1	48±1	46±2	47±2
MCV (fL)	58.4±2.0	58.6±2.5	57.9±1.6	59.8±0.9	59.9±1.8	57.9±5.0	56.7±1.8	56.6±2.0
MCH (pg)	19.5±1.0	19.9±1.0	19.5±0.8	20.2±0.6	20.5±0.4	19.2±0.5	19.0±0.5	19.0±0.7
MCHC (%)	33.5±0.7	33.8±0.4	33.6±0.8	33.7±0.6	34.2±0.4	33.2±0.6	33.5±0.3	33.5±0.4
Reticulocyte (%)	1.9±0.1	1.9±0.3	2.1±0.2	2.1±0.3	2.9±0.6	1.9±0.3	2.0±0.2	1.9±0.4
Platelet (10 <sup>4</sup> /μL)	101.3±11.4	93.6±5.4	99.7±7.7	100.9±12.3	102.9±8.8	105.5±4.9	101.4±11.2	106.5±11.8
WBC (10 <sup>3</sup> /μL)	75±14	56±15	54±15	88±32	67±23	64±15	74±24	76±32
Differential leukocyte counts (%)								
Lymph	83.3±13.2	83.9±6.1	80.5±7.6	89.0±4.4	87.0±7.8	83.7±6.9	88.5±2.3	84.4±5.6
Stab	0.7±0.8	0.3±0.3	0.2±0.3	0.3±0.4	0.3±0.4	0.6±0.5	0.2±0.3	0.3±0.3
Seg	14.5±12.0	14.6±6.1	17.3±7.0	9.4±4.4	11.8±7.4	14.5±7.0	10.9±2.3	14.4±5.4
Eosino	1.1±0.6	0.8±0.4	1.5±1.1	0.8±0.7	0.3±0.4	0.9±0.7	0.3±0.4	0.7±0.6
Baso	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Mono	0.5±0.4	0.5±0.3	0.5±0.4	0.4±0.2	0.8±0.4	0.3±0.3	0.2±0.3	0.3±0.3
Others	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
PT (S)	11.3±0.5	11.5±0.4	11.1±0.5	11.2±0.3	12.0±0.1	10.7±0.5	10.8±0.3	10.6±0.5
APTT (S)	14.4±0.7	14.3±1.1	13.9±0.9	14.5±1.4	15.2±0.4	12.4±1.5	14.4±1.2	13.1±1.8

Values are expressed as Mean±S.D.

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with *p*-nitrophenol sodium salt in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	60	160	400	1000	0	160	400
Male								
No. of animals	6	6	6	6	2	6	6	6
GOT (IU/L)	52±6	44±9	43±10	51±7	37±11	47±15	41±11	44±6
GPT (IU/L)	27±3	28±6	27±4	30±2	33±9	27±6	29±5	31±2
LDH (IU/L)	28±8	35±6	37±7	32±3	42±8	41±8	41±4	43±7
AIP (IU/L)	383±70	432±129	387±55	435±96	355±107	379±99	312±67	314±91
γ-GTP (IU/L)	2.0±0.2	1.9±0.3	2.1±0.4	2.1±0.1	2.1±0.0	2.3±0.9	1.9±0.3	1.9±0.2
TP (g/dL)	6.1±0.3	6.2±0.2	6.0±0.3	6.3±0.3	6.3±0.1	6.5±0.3	6.4±0.1	6.3±0.2
Albumin (g/dL)	3.3±0.1	3.4±0.1	3.4±0.1	3.4±0.1*	3.5±0.0	3.5±0.1	3.4±0.1	3.4±0.2
A/G (%)	1.19±0.09	1.22±0.06	1.32±0.09*	1.21±0.06	1.26±0.06	1.16±0.07	1.14±0.07	1.17±0.04
T. cho (mg/dL)	57±9	55±5	51±9	55±3	83±8	57±10	56±6	60±9
TG (mg/dL)	42±16	57±5	61±29	52±13	79±34	63±20	81±30	70±17
PL (mg/dL)	92±12	98±5	90±12	95±6	134±20	100±14	101±10	99±14
T. bilirubin (mg/dL)	0.11±0.01	0.12±0.01	0.11±0.01	0.12±0.01	0.14±0.01	0.13±0.02	0.12±0.02	0.11±0.01
Glucose (mg/dL)	128±13	130±14	124±11	137±12	143±24	142±13	140±11	139±15
BUN (mg/dL)	14±2	14±2	13±1	14±2	15±0	14±2	14±1	15±2
Creatinine (mg/dL)	0.54±0.04	0.56±0.05	0.57±0.05	0.58±0.03	0.62±0.10	0.57±0.05	0.61±0.06	0.59±0.02
Na (mmol/L)	141±1	142±1	142±1	142±1	143±2	142±1	142±1	142±2
K (mmol/L)	4.6±0.2	4.7±0.4	4.8±0.2	4.6±0.5	4.6±0.9	4.7±0.2	4.7±0.3	4.7±0.4
Cl (mmol/L)	110±2	109±1	110±1	110±2	110±0	109±2	110±2	110±2
Ca (mg/dL)	9.3±0.2	9.5±0.3	9.4±0.4	9.5±0.4	9.6±0.0	9.4±0.4	9.3±0.3	9.5±0.3
P (mg/dL)	9.0±0.3	9.4±0.7	8.7±0.5	8.9±0.5	10.1±0.4	7.7±0.7	7.6±0.4	8.2±0.6
Female								
No. of animals	6	6	6	6	2	6	6	6
GOT (IU/L)	49±9	55±12	60±22	54±11	82±28	53±7	60±19	69±35
GPT (IU/L)	22±3	30±13	29±12	25±3	36±3	23±3	26±8	40±29
LDH (IU/L)	27±3	26±3	30±11	30±4	34±4	25±6	23±4	28±13
AIP (IU/L)	210±45	243±40	227±45	241±51	194±59	180±32	152±27	167±49
γ-GTP (IU/L)	2.5±0.4	2.4±0.2	2.2±0.2	2.4±0.3	2.2±0.3	2.0±0.3	2.0±0.4	2.2±0.3
TP (g/dL)	6.5±0.4	6.4±0.2	6.6±0.2	6.4±0.1	6.3±0.1	6.8±0.3	6.8±0.2	6.9±0.3
Albumin (g/dL)	3.6±0.1	3.6±0.1	3.6±0.1	3.6±0.1	3.6±0.0	3.7±0.1	3.6±0.1	3.6±0.1
A/G (%)	1.23±0.11	1.29±0.09	1.19±0.08	1.25±0.04	1.36±0.04	1.19±0.08	1.16±0.10	1.12±0.07
T. cho (mg/dL)	77±10	72±13	60±7*	68±14	60±28	74±14	83±14	83±17
TG (mg/dL)	32±7	29±5	27±2	26±9	20±7	29±7	30±6	34±11
PL (mg/dL)	130±10	120±26	105±11	115±19	108±36	124±17	140±11	137±28
T. bilirubin (mg/dL)	0.10±0.02	0.12±0.01	0.11±0.01	0.12±0.01	0.15±0.02	0.1±0.02	0.09±0.01	0.09±0.01
Glucose (mg/dL)	126±13	115±10	112±13	125±18	116±4	116±15	118±10	116±15
BUN (mg/dL)	16±3	14±1	15±1	15±3	16±1	18±3	18±1	18±3
Creatinine (mg/dL)	0.59±0.05	0.58±0.02	0.60±0.04	0.58±0.04	0.60±0.01	0.61±0.03	0.62±0.06	0.62±0.10
Na (mmol/L)	141±1	142±1	142±1	141±1	142±1	141±1	141±1	140±1
K (mmol/L)	4.8±0.2	5.3±0.3*	5.1±0.4	5.2±0.3	5.3±0.1	4.8±0.2	4.8±0.2	4.7±0.1
Cl (mmol/L)	112±2	113±1	113±1	112±2	112±3	113±1	113±1	113±1
Ca (mg/dL)	9.3±0.2	9.1±0.2	9.4±0.1	9.2±0.2	8.8±0.3	9.3±0.3	9.5±0.3	9.3±0.2
P (mg/dL)	8.0±1.4	7.9±0.9	8.0±1.2	7.6±1.0	8.6±1.1	8.1±0.8	7.9±0.9	7.6±0.9

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group; \**p*<0.05

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with p-nitrophenol sodium salt in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	60	160	400	1000	0	160	400
Male								
No. of animals	12	6	12	12	2	6	6	6
Volume (mL)	15.8±4.9	13.1±5.8	12.5±5.8	14.8±4.2	18.6±5.5	15.9±8.3	13.1±6.4	10.6±5.2
Osmolality (mOsm/kg)	1614±392	1462±554	1827±490	1720±321	1654±240	1829±447	1994±561	2187±169
Water intake (mL)	44±10	46±18	40±9	42±8	54±25	50±14	39±11	39±6
pH	6.5	0	0	1	0	0	0	0
	7	0	0	1	0	0	0	0
	7.5	3	0	2	6	0	3	2
	8	3	1	7	4	2	1	2
	8.5	6	5	3	0	1	2	1
	9	0	0	0	0	0	0	1
				*				
Protein	-	0	0	0	0	1	0	0
	-/+	5	3	3	5	2	3	1
	1+	6	1	8	7	3	2	3
	2+	1	2	1	0	0	1	2
Ketons	-	11	5	12	12	2	6	4
	-/+	0	1	0	0	0	2	1
	1+	1	0	0	0	0	0	0
Glucose		12	6	12	12	2	6	6
Occult blood	-	11	6	11	10	1	6	5
	-/+	0	0	1	1	1	0	1
	1+	0	0	0	0	0	0	0
	2+	1	0	0	1	0	0	0
Bilirubin	-	12	6	12	12	2	6	6
Urobilinogen	-/+	10	5	11	12	2	6	4
	1+	2	1	1	0	0	2	1
Color	Yellow	12	6	12	12	2	6	6
RBC	-	11	6	12	12	2	6	6
	-/+	0	0	0	0	0	0	0
	1+	1	0	0	0	0	0	0
WBC	-	12	6	12	12	2	6	6
SEC	-/+	12	6	12	12	2	6	6
SREC	-	12	6	12	12	2	6	6
Cast	-	12	6	12	12	2	6	6
PS	-	10	5	10	10	1	5	6
	-/+	2	1	2	2	1	1	0
Co	-	12	6	12	12	2	6	6

Values of volume, specific gravity and water intake are expressed as Mean±S.D., other values are expressed as No. of animals  
Significant difference from control group; \*p<0.05

28日間反復投与毒性試験

Table 3 (Continued)

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	60	160	400	1000	0	160	400
Female								
No. of animals	12	6	12	12	2	6	6	6
Volume (mL)	10.1±3.9	10.8±7.8	6.1±3.3	8.1±4.5	8.6±2.2	10.2±4.8	7.9±4.6	7.6±3.4
Osmolality (mOsm/kg)	1686±426	1680±365	2037±420	1864±439	1783±253	1639±258	1978±536	1874±429
Water intake (mL)	37±8	36±10	32±6	34±7	38±1	39±9	35±7	40±9
pH	6	0	1	0	0	1	0	0
	6.5	0	1	3	0	1	2	1
	7	0	1	1	4	1	1	0
	7.5	0	1	1	2	0	0	1
	8	3	1	2	3	3	2	3
	8.5	9	1	5	2	0	1	1
	9	0	0	0	1	0	0	0
			**	*	**	*		
Protein	-	4	3	6	6	1	1	2
	-/+	5	2	4	3	0	3	3
	1+	3	1	2	3	1	2	1
Ketons	-	12	6	12	11	2	6	6
	-/+	0	0	0	1	0	0	0
Glucose	-	12	6	12	12	2	6	6
Occult blood	-	10	5	10	11	2	5	5
	-/+	0	0	0	0	0	0	0
	1+	1	1	1	1	0	0	0
	2+	1	0	0	0	0	1	1
	3+	0	0	1	0	0	0	0
Bilirubin	-	12	6	12	12	2	6	6
Urobilinogen	-/+	11	6	12	12	2	6	6
	1+	1	0	0	0	0	0	0
Color	Yellow	12	6	12	12	2	6	6
RBC	-	12	6	12	12	2	6	6
WBC	-	12	6	12	12	2	6	6
SEC	-	12	6	12	12	2	6	6
SREC	-	12	6	12	12	2	6	6
Cast	-	12	6	12	12	2	6	6
PS	-	9	6	10	10	1	4	4
	-/+	2	0	2	2	1	2	2
	1+	1	0	0	0	0	0	0
Co	-	12	6	12	12	2	6	6

Values of volume, specific gravity and water intake are expressed as Mean±S.D., other values are expressed as No. of animals  
 Significant difference from control group; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$



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

Item	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	60	160	400	1000	0	160	400
<b>Male</b>								
No. of animals	6	6	6	6	2	6	6	6
Body weight (g)	348±20	349±24	338±27	351±22	367±37	423±32	400±28	408±18
Absolute organ weight								
Brain (g)	2.06±0.13	2.03±0.08	2.00±0.11	2.03±0.04	1.95±0.08	2.10±0.07	2.05±0.06	2.07±0.05
Thyroid (mg)	21.1±1.6	18.6±2.0	19.0±3.8	19.0±2.7	22.3±1.8	21.6±3.1	21.0±2.4	22.9±4.2
Thymus (mg)	500±79	615±141	435±81	522±122	539±19	530±152	419±72	401±86
Heart (g)	1.23±0.12	1.15±0.08	1.17±0.08	1.15±0.09	1.20±0.11	1.32±0.16	1.25±0.09	1.27±0.05
Lung (g)	1.28±0.10	1.35±0.13	1.25±0.10	1.29±0.12	1.33±0.12	1.45±0.09	1.34±0.11	1.39±0.06
Liver (g)	10.12±0.97	10.50±1.15	9.75±1.00	10.82±1.04	13.20±0.11	12.12±1.00	10.91±1.15	11.79±0.59
Spleen (g)	0.70±0.13	0.70±0.11	0.65±0.12	0.65±0.10	0.75±0.09	0.73±0.09	0.66±0.06	0.73±0.11
Kidneys (g)	2.77±0.19	2.82±0.24	2.66±0.31	2.71±0.17	3.02±0.18	3.09±0.23	2.87±0.30	3.02±0.20
Adrenals (mg)	57±5	61±2	59±9	57±7	55±8	55±9	60±6	59±5
Testes (g)	3.00±0.27	3.14±0.23	3.15±0.24	3.19±0.32	3.22±0.20	3.12±0.19	3.12±0.26	2.84±0.57
Relative organ weight								
Brain (%)	0.59±0.04	0.58±0.04	0.59±0.05	0.58±0.03	0.53±0.03	0.50±0.05	0.51±0.03	0.51±0.03
Thymus (%)	6.1±0.7	5.3±0.7	5.6±0.9	5.5±1.1	6.1±1.1	5.1±0.8	5.2±0.3	5.6±1.2
Thyroid (%)	144±23	176±38	129±17	148±25	147±10	125±32	105±16	99±23
Heart (%)	0.35±0.02	0.33±0.01	0.35±0.02	0.33±0.03*	0.33±0.00	0.31±0.03	0.31±0.03	0.31±0.02
Lung (%)	0.37±0.02	0.38±0.02	0.37±0.02	0.37±0.02	0.37±0.06	0.34±0.01	0.34±0.01	0.34±0.01
Liver (%)	2.91±0.12	3.00±0.16	2.88±0.12	3.08±0.17	3.62±0.39	2.87±0.15	2.72±0.17	2.89±0.13
Spleen (%)	0.20±0.04	0.20±0.03	0.19±0.03	0.18±0.03	0.21±0.05	0.17±0.01	0.17±0.02	0.18±0.03
Kidneys (%)	0.80±0.05	0.81±0.06	0.79±0.05	0.77±0.05	0.83±0.04	0.73±0.03	0.72±0.05	0.74±0.04
Adrenals (%)	16±1	18±2	18±3	16±2	15±1	13±3	15±2	15±2
Testes (%)	0.87±0.08	0.90±0.07	0.94±0.09	0.91±0.06	0.88±0.04	0.74±0.03	0.78±0.08	0.70±0.15
<b>Female</b>								
No. of animals	6	6	6	6	2	6	6	6
Body weight (g)	216±15	203±13	206±19	208±17	213±6	235±9	226±18	235±16
Absolute organ weight								
Brain (g)	1.90±0.04	1.84±0.10	1.89±0.09	1.85±0.07	1.92±0.09	1.91±0.02	1.89±0.06	1.92±0.04
Thyroid (mg)	16.6±2.8	16.1±2.8	16.2±1.9	15.9±2.0	17.2±0.4	14.8±3.0	17.7±5.0	16.1±2.9
Thymus (mg)	444±63	383±75	427±110	496±99	368±67	393±74	348±70	415±111
Heart (g)	0.78±0.05	0.75±0.05	0.73±0.06	0.76±0.06	0.79±0.07	0.83±0.08	0.76±0.06	0.83±0.08
Lung (g)	1.03±0.08	1.02±0.09	1.03±0.12	1.04±0.11	1.02±0.03	1.07±0.04	1.01±0.05	1.07±0.10
Liver (g)	6.29±0.49	5.94±0.48	5.93±0.60	6.37±0.68	6.82±0.37	6.40±0.54	6.22±0.25	6.60±0.64
Spleen (g)	0.45±0.11	0.41±0.05	0.43±0.03	0.52±0.09	0.53±0.03	0.50±0.07	0.44±0.05	0.48±0.09
Kidneys (g)	1.71±0.15	1.69±0.08	1.66±0.20	1.73±0.12	1.77±0.08	1.81±0.12	1.77±0.17	1.78±0.11
Adrenals (mg)	64±6	59±8	68±5	69±7	77±11	60±5	62±3	68±7*
Ovaries (mg)	76.1±14.2	79.2±15.0	75.7±17.0	92.4±11.3	82.7±12.1	82.4±8.1	75.0±13.0	85.1±16.7
Relative organ weight								
Brain (%)	0.89±0.07	0.91±0.06	0.92±0.05	0.89±0.06	0.90±0.01	0.82±0.04	0.84±0.05	0.82±0.05
Thyroid (%)	7.8±1.6	7.9±1.2	7.9±1.2	7.7±0.8	8.1±0.0	6.3±1.2	7.9±2.6	7.0±1.6
Thymus (%)	207±31	189±38	206±42	243±69	172±27	167±27	153±23	176±40
Heart (%)	0.36±0.01	0.37±0.01	0.36±0.04	0.37±0.02	0.37±0.03	0.35±0.03	0.34±0.02	0.35±0.02
Lung (%)	0.48±0.02	0.50±0.02	0.50±0.02	0.50±0.02	0.48±0.03	0.46±0.02	0.45±0.01	0.45±0.02
Liver (%)	2.92±0.06	2.92±0.07	2.88±0.11	3.06±0.12*	3.20±0.09	2.72±0.17	2.76±0.19	2.81±0.09
Spleen (%)	0.21±0.04	0.20±0.02	0.21±0.03	0.25±0.03	0.25±0.01	0.22±0.03	0.20±0.02	0.20±0.03
Kidneys (%)	0.79±0.06	0.84±0.04	0.80±0.05	0.84±0.07	0.83±0.01	0.77±0.05	0.78±0.06	0.76±0.05
Adrenals (%)	30±3	29±3	33±2	33±2*	36±4	26±3	28±2	29±3
Ovaries (%)	35.2±5.6	38.8±5.3	36.5±5.7	44.4±4.0*	38.8±4.6	35.1±3.5	33.3±5.9	36.2±5.9

Values are expressed as Mean±S.D.  
Significant difference from control group; \*p<0.05

28日間反復投与毒性試験

Table 5 Summary of gross findings of rats treated orally with *p*-nitrophenol sodium salt in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item Organ Findings	28 days dosing groups (mg/kg)					14 days recovery groups (mg/kg)			Dead
	0	60	160	400	1000	0	160	400	1000
<b>Male</b>									
No. of animals necropsied	6	6	6	6	2	6	6	6	10
<b>Stomach</b>									
Dark red spot (s) /glandular stomach	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>Epididymis</b>									
White area	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>Kidney</b>									
Focal concave	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<b>Female</b>									
No. of animals necropsied	6	6	6	6	2	6	6	6	10
<b>Stomach</b>									
Dark red spot (s) /glandular stomach	0	0	0	1	0	0	1	1	0

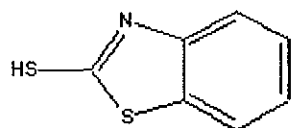
Table 6 Summary of histopathological findings of rats treated orally with p-nitrophenol sodium salt in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)															14 days recovery groups									Dead								
	0			60			160			400			1000			0			160			400			1000								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	P	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3					
<b>Male</b>																																	
No. of animals necropsied	6			6			6			6			2			6			6			6			10								
Liver	(6)			(0)			(0)			(6)			(2)			(0)			(0)			(0)			(10)								
hematopoiesis/extramedullary	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	1	0
Stomach	(6)			(6)			(6)			(6)			(2)			(6)			(6)			(6)			(10)								
erosion/glandular stomach	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spleen	(6)			(0)			(0)			(6)			(2)			(0)			(0)			(0)			(10)								
hematopoiesis/extramedullary	6	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1	0	2	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	8
Kidney	(6)			(6)			(6)			(6)			(2)			(6)			(6)			(6)			(10)								
eosinophilic body/tubula epithelium	3	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	3	3	0*	0	2	0	4	0	0	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
basophilic tubule	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
cell infiltration/interstitium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
fibrosis/focal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Prostate	(6)			(0)			(0)			(6)			(2)			(0)			(0)			(0)			(10)								
cellular infiltration/interstitium	2	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	1	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
Epididymis	(6)			(0)			(0)			(6)			(2)			(0)			(0)			(0)			(10)								
granuloma/spermatic	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
Femur (Bone marrow)	(6)			(0)			(0)			(6)			(2)			(0)			(0)			(0)			(2)								
fibrosis/bone marrow/focal	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
<b>Female</b>																																	
No. of animals necropsied	6			6			6			6			2			6			6			6			10								
Liver	(6)			(0)			(0)			(6)			(2)			(0)			(0)			(0)			(10)								
hematopoiesis/extramedullary	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	0	0
Stomach	(6)			(6)			(6)			(6)			(2)			(6)			(6)			(6)			(10)								
erosion/glandular stomach	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Spleen	(6)			(0)			(0)			(6)			(2)			(0)			(0)			(0)			(10)								
hematopoiesis/extramedullary	6	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	0	0	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	6	0
Kidney	(6)			(0)			(0)			(6)			(6)			(0)			(0)			(0)			(10)								
basophilic tubule	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
cell infiltration/interstitium	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
fibrosis/focal	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
cyst	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0

Grade of histopathological findings; 1:Slight, 2:Mild, 3:Moderate, P:Present (used when grading of severity was not done)  
 Numbers in parenthesis indicate No. of animals examined microscopically at this site.  
 Significant difference from control group; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

## TR-332

### Toxicology and Carcinogenesis Studies of 2-Mercaptobenzothiazole (CAS No. 149-30-4) in F344/N Rats and B6C3F<sub>1</sub> Mice (Gavage Studies)



Chemical Formula: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>NS<sub>2</sub> - [3D Structure\\*](#)

\*To view structure, download free [Chemscape Chime Plug-in](#)

Toxicology and carcinogenesis studies of technical-grade 2-mercaptobenzothiazole (96%-97% pure), a rubber accelerant and preservative, were conducted by administering the chemical by gavage in a corn oil vehicle to groups of F344/N rats and B6C3F<sub>1</sub> mice of each sex for 16 days, 13 weeks, or 2 years. 2-Mercaptobenzothiazole was nominated for study by the National Institute of Environmental Health Sciences and the National Institute for Occupational Safety and Health.

#### Sixteen-Day and Thirteen-Week Studies:

In 16-day studies, mean body weight gains of rats receiving 2,500 mg/kg were 6-7 g lower than those of vehicle controls; 4/5 male and 5/5 female mice dosed with 3,000 mg/kg and 4/5 female mice dosed with 1,500 mg/kg died; lethargy and prostration occurred in most of these animals after gavage. Based on these results, doses were selected for both species in the 13-week studies were 0, 94 (mice only), 188, 375, 750, and 1,500 mg/kg.

In the 13-week studies, no chemical-related deaths occurred in rats, but body weight gains in males dosed with 1,500 mg/kg and in females dosed with 750 or 1,500 mg/kg were lower than those in the vehicle control groups. Hepatomegaly occurred at the two highest doses in males and at all doses in females; however, no microscopic pathologic changes were noted in any tissue. More than half the mice dosed with 1,500 mg/kg died, but no compound-related body weight changes occurred. Clinical signs in mice were dose related and included lethargy in animals dosed with 375 mg/kg and lacrimation, salivation, and clonic seizure in some dosed with 750 or 1,500 mg/kg. No association between these clinical signs of toxicity and gross or microscopic pathologic effects were observed. Doses selected for the 2-year studies were 0, 375, and 750 mg/kg for male rats and for mice of each sex and 0, 188, or 375 mg/kg for female rats.

#### Body weight and Survival in the Two-Year Studies:

Fifty animals of each species and sex were administered 2-mercaptobenzothiazole in corn oil by gavage 5 days per week for 103 weeks. Administration of 2-mercaptobenzothiazole resulted in decreased survival in dosed male rats (vehicle control, 42/50; low dose, 22/50; high dose, 20/50) and in the high dose group of female mice (37/50; 39/50; 22/50) but not in female rats (28/50; 31/50; 25/50) or in male mice (38/50; 33/50; 30/50). No effect on body

weight gain in dosed rats was observed; in dosed mice, minor reductions occurred between weeks 3 and 64, with recovery thereafter. Postgavage lethargy and prostration occurred frequently in dosed rats and mice.

### **Nonneoplastic and Neoplastic Effects in the Two-Year Studies:**

The severity of nephropathy was increased in dosed male rats. Ulcers and inflammation of the forestomach were prevalent in dosed rats, as were increased incidences of epithelial hyperplasia and hyperkeratosis in male rats, but no neoplasms of the forestomach were observed. There were no increases of nonneoplastic lesions in mice which were considered to be compound related.

The incidences of a variety of tumors were increased in rats dosed with 2-mercaptobenzothiazole; some of the increased incidences were not dose related. In low dose male rats, increased incidences ( $P < 0.01$ ) were observed for mononuclear cell leukemia (7/50; 16/50; 3/50) and pancreatic acinar cell adenomas (2/50; 13/50; 6/49). Increased tumor incidences with dose-related trends ( $P < 0.05$ ) included pituitary gland adenomas in females (15/49; 24/50; 25/50), preputial gland adenomas or carcinomas (combined) in males (1/50; 6/50; 5/50), adrenal gland pheochromocytomas or malignant pheochromocytomas (combined) in males (18/50; 27/50; 24/49), and pheochromocytomas in females (1/50; 5/50; 6/50). These tumors were observed at significantly greater incidences ( $P \leq 0.05$ ) in the high dose groups than in the vehicle controls.

An increased incidence ( $P = 0.028$ ) of hepatocellular adenomas or carcinomas (combined) was observed only in low dose female mice (4/50; 12/49; 4/50). No significant increases in tumor incidences were seen in male mice.

### **Genetic Toxicology:**

2-Mercaptobenzothiazole was not mutagenic in *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, or TA1537 with or without metabolic activation. In the presence of rat liver S9, 2-mercaptobenzothiazole increased the frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges (SCEs) in Chinese hamster ovary (CHO) cells, as well as mutations at the TK locus of mouse L5178Y lymphoma cells.

### **Audit:**

The data, documents, and pathology materials from the 2-year studies of 2-mercaptobenzothiazole were audited at the NTP Archives. The audit findings show that the conduct of the studies is documented adequately and support the data and results given in this Technical Report.

### **Conclusions:**

Under the conditions of these 2-year gavage studies, there was some evidence of carcinogenic activity of 2-mercaptobenzothiazole for male F344/N rats, indicated by increased incidences of mononuclear cell leukemia, pancreatic acinar cell adenomas, adrenal gland pheochromocytomas, and preputial gland adenomas or carcinomas (combined). There was some evidence of carcinogenic activity for female F344/N rats, indicated by increased incidences of adrenal gland pheochromocytomas and pituitary gland adenomas. There was no evidence of carcinogenic activity of 2-mercaptobenzothiazole for male B6C3F<sub>1</sub> mice dosed with 375 or 750 mg/kg. There was equivocal evidence of carcinogenic activity for female B6C3F<sub>1</sub> mice, indicated by increased incidences of hepatocellular adenomas or carcinomas (combined).

The National Toxicology Program

Levels from TR-332 2-Mercaptobenzo-Thiazole

**Target Organs and Levels of Evidence  
NTP Technical Report Number 332**

Produced from Chemtrack Database 09/19/01

CHEMICAL/ CAS NUMBER	PEER REVIEW DATE	PRIMARY USES	ROUTE/EXPOSURE LEVELS	STUDY LABOI
2- MERCAPTOBENZOTHIAZOLE  <u>149-30-4</u>	03/04/87	RUBBER VULCANIZATION ACCELERATOR. SALTS USED AS FUNGICIDE. CORROSION INHIBITOR FOR COPPER IN AQUEOUS SYSTEMS,CUTTING OILS AND PETROLEUM PRODUCTS. ADDITIVE IN EXTREME- PRESSURE GREASES. (TDB)	Gavage FR: 0,188,375, MR&M: 0,375,750 MG/KG/50 PER GROUP	Physiol. Researc Laborat

LEVELS OF EVIDENCE OF CARCINOGENICITY--ORGAN/TISSUE (NEOPLASM):

MR: SOME EVIDENCE      HEMATOPOIETIC SYSTEM: LEUKEMIA 7/50 16/50  
3/50  
PANCREAS ACINAR CELL: ADENOMA 2/50 13/50  
6/50  
ADRENAL GLAND MEDULLA:  
PHEOCHROMOCYTOMA 18/50 25/50 22/49 OR  
MALIGNANT PHEOCHROMOCYTOMA 0/50 2/50  
2/49 COMBINED 18/50 27/50 24/49  
PREPUTIAL GLAND: ADENOMA 0/50 4/50 4/50 OR  
CARCINOMA 1/50 2/50 1/50 COMBINED 1/50 6/50  
5/50

FR: SOME EVIDENCE      ADRENAL GLAND MEDULLA:  
PHEOCHROMOCYTOMA 1/50 5/50 6/50  
PITUITARY GLAND: ADENOMA 15/49 24/50 25/50

MM: NO EVIDENCE

FM: EQUIVOCAL EVIDENCE      LIVER: ADENOMA 3/50 7/49 4/50 OR CARCINOMA  
1/50 5/49 0/50 COMBINED 4/50 12/49 4/50

# ジフェニルジスルフィドの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Diphenyl disulfide in Bacteria

### 要約

ジフェニルジスルフィドについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101 を用いる復帰変異試験を実施した。

予備試験の結果をもとに本試験では, S9 mix 非共存下の TA100, TA1535 は 9.77~0.153  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の7用量, WP2 *uvrA*/pKM101 は 2500~39.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の7用量, TA98, TA1537 は 19.5~0.305  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の7用量を, S9 mix 共存下の TA100, TA1535 は 78.1~1.22  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の7用量, WP2 *uvrA*/pKM101 は 5000~78.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の7用量, TA98, TA1537 は 156~2.44  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の7用量をそれぞれ設定した。

2回の本試験の結果, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から, ジフェニルジスルフィドは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

### 方法

#### 1. テスト菌株

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1)</sup> および日本バイオアッセイ研究センターより 1997 年 9 月 18 日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101<sup>2)</sup> の 5 菌株を用いた。テスト菌株は菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO: 関東化学)を加え, 0.2 mL ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結した後, 超低温槽で  $-80^{\circ}\text{C}$  以下に凍結保存したものを使用した。これら菌株はアミノ酸要求性, 紫外線感受性, 膜変異, 薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ, 特性を備えていることを確認した。

#### 2. テスト菌株の前培養

L 字型試験管に 2.5% ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No.2, Oxoid 社)溶液を 10 mL 分注し, これに凍結保存した菌懸濁液を解凍して 20  $\mu\text{L}$  を接種した。37°C で 8 時間振盪培養した後, 濁度計を用いて菌濃度を測定し, 生菌数が  $1 \times 10^9/\text{mL}$  以上であることを確認した。

#### 3. 被験物質

ジフェニルジスルフィド(ロット番号: 15322AB, Sigma-Aldrich (Missouri, USA) 製造)は, 純度 99.8% の白色粉体である。被験物質は使用時まで冷蔵, 暗所に気密保存した。実験終了後, 残余被験物質を分析した結果, 安定性に問題はなかった。

#### 4. 被験物質溶液の調製

DMSO を用いて最高用量の溶液を調製した後, 同溶媒で所定用量に段階希釈し, 速やかに試験に使用した。

#### 5. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを用いた。陽性対照物質溶液は, あらかじめ所定の濃度に調製し,  $-80^{\circ}\text{C}$  以下に凍結保存したものを使用した。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業)

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム(和光純薬工業)

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩(Sigma-Aldrich Fine Chemicals)

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業)

NaN<sub>3</sub> は注射用水(DW: 大塚製薬工場)に, その他は DMSO に溶解したものを使用した。

#### 6. 培地および S9 mix の組成

##### 1) トップアガー

アミノ酸水溶液として, 精製水を用いて 0.5 mmol/L D-ビオチン, 0.5 mmol/L L-ヒスチジン混合水溶液(サルモネラ用)または 0.5 mmol/L L-トリプトファン水溶液(大腸菌用)を調製し, これをろ過滅菌後, 冷蔵庫に保管した。精製水 100 mL に対して, 粉末寒天(Bacto-agar, Difco 社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え, オートクレープで滅菌し完全に溶解させた後, 上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し, 約 45°C に保温した。

##### 2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地(オリエンタル酵母工業)を購入し, 使用した。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・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸二カリウム・無水塩	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
寒天(OXOID Agar No.1)	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

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
D-グルコース6-リン酸	5 $\mu$ mol
$\beta$ -NADPH	4 $\mu$ mol
$\beta$ -NADH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu$ mol
滅菌精製水	残量

\*:購入したS9(キッコマン)を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを用いて併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 $\times$ g遠心沈清分画である。

## 7. 試験方法

試験はプレインキュベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を0.1 mL、0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)を0.5 mLおよび菌懸濁液を0.1 mL加え、37°Cで20分間振盪培養した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 mL添加した。プレインキュベーション後、トップアガー2 mLを上記の混合液に加え混和し、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37°Cで48時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターまたは目視で計測した。予備試験は各用量につき1枚のプレートを使用した。本試験は各用量につき3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

## 8. 試験結果の判定基準

いずれかの試験菌株で、S9 mixの有無にかかわらず、被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数(平均値)が陰性(溶媒)対照値の2倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は変異原性を有する(陽性)と判定した。なお、試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

## 結果及び考察

### 1. 予備試験

予備試験を *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*/pKM101 を用いて5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22  $\mu$ g/plateの7用量で実施した結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix非共存下ではTA100, TA1535の4.88  $\mu$ g/plate以上、WP2 *uvrA*/pKM101の1250  $\mu$ g/plate以上、TA98, TA1537の19.5  $\mu$ g/plate以上で、共存下ではTA100, TA1535, TA98, TA1537の78.1  $\mu$ g/plate以上、WP2 *uvrA*/pKM101の5000  $\mu$ g/plateで抗菌性が認められた。なお、S9 mix非共存下および共存下の1250  $\mu$ g/plate以上で沈殿物が認められた。従って本試験では、S9 mix非共存下のTA100 TA1535は9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610, 0.305, 0.153  $\mu$ g/plateの7用量、WP2 *uvrA*/pKM101は2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1  $\mu$ g/plateの7用量、TA98, TA1537は19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610, 0.305  $\mu$ g/plateの7用量を、共存下のTA100, TA1535は78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22  $\mu$ g/plateの7用量、WP2 *uvrA*/pKM101は5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1  $\mu$ g/plateの7用量、TA98, TA1537は156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44  $\mu$ g/plateの7用量をそれぞれ設定した。

### 2. 本試験

試験の結果をTable 1, 2に示した。本試験を2回実施した結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix非共存下ではTA100, TA1535の4.88  $\mu$ g/plate以上、WP2 *uvrA*/pKM101の625  $\mu$ g/plate以上、TA98, TA1537の9.77  $\mu$ g/plate以上で、共存下ではTA100, TA1535の78.1  $\mu$ g/plate, TA98, TA1537の78.1  $\mu$ g/plate以上、WP2 *uvrA*/pKM101の2500  $\mu$ g/plate以上で抗菌性が認められた。なお、S9 mix非共存下および共存下の625  $\mu$ g/plate以上で沈殿物が認められた。

なお、S9 mix非共存下および共存下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数は、各菌株の陰性対照の復帰変異コロニー数と比較して、明らかに2倍を超えて増加し、陽性の結果を示した。

以上の結果から、ジフェニルジスルフィドは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

なお、類似化合物であるBiphenyl<sup>13)</sup>は、細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が報告されている。



文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*, 113: 173-215(1983).
- 2) Green MHL, Muriel WJ: Mutagen testing using *Trp*<sup>r</sup> reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Res*, 38:3-32(1976).
- 3) 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(2000)p.492.

連絡先

試験責任者: 榎本佳明  
試験担当者: 榎本佳明, 清水優子, 大西千絵美  
(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所  
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Yoshiaki Enomoto (Study director)  
Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu,  
Chiemi Oonishi  
Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety  
Institute Ltd.  
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
Ibaraki, 314-0255 Japan  
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1-1 Mutagenicity of diphenyl disulfide 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 change type		Frameshift type	
		TA100	TA1535	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	105 102 ( $\pm$ 102) 99 ( $\pm$ 3)	10 10 ( $\pm$ 10) 9 ( $\pm$ 1)	14 24 ( $\pm$ 18) 16 ( $\pm$ 5)	11 11 ( $\pm$ 13) 16 ( $\pm$ 3)
	0.153	118 101 ( $\pm$ 110) 111 ( $\pm$ 9)	9 11 ( $\pm$ 9) 8 ( $\pm$ 2)		
	0.305	110 111 ( $\pm$ 107) 101 ( $\pm$ 6)	10 10 ( $\pm$ 12) 15 ( $\pm$ 3)	14 15 ( $\pm$ 14) 12 ( $\pm$ 2)	16 12 ( $\pm$ 13) 12 ( $\pm$ 2)
	0.610	100 99 ( $\pm$ 101) 104 ( $\pm$ 3)	9 10 ( $\pm$ 9) 8 ( $\pm$ 1)	20 21 ( $\pm$ 21) 22 ( $\pm$ 1)	11 14 ( $\pm$ 12) 11 ( $\pm$ 2)
	1.22	106 116 ( $\pm$ 108) 103 ( $\pm$ 7)	10 8 ( $\pm$ 11) 14 ( $\pm$ 3)	17 19 ( $\pm$ 18) 17 ( $\pm$ 1)	12 10 ( $\pm$ 13) 16 ( $\pm$ 3)
	2.44	108 100 ( $\pm$ 104) 105 ( $\pm$ 4)	15 11 ( $\pm$ 12) 11 ( $\pm$ 2)	12 21 ( $\pm$ 15) 13 ( $\pm$ 5)	11 14 ( $\pm$ 13) 14 ( $\pm$ 2)
	4.88	75* 83* ( $\pm$ 82) 87* ( $\pm$ 6)	8* 10* ( $\pm$ 10) 11* ( $\pm$ 2)	21 21 ( $\pm$ 21) 20 ( $\pm$ 1)	15 15 ( $\pm$ 16) 18 ( $\pm$ 2)
	9.77	0* 0* ( $\pm$ 0) 0* ( $\pm$ 0)	0* 0* ( $\pm$ 0) 0* ( $\pm$ 0)	11* 14* ( $\pm$ 13) 13* ( $\pm$ 2)	8* 6* ( $\pm$ 8) 10* ( $\pm$ 2)
	19.5			0* 0* ( $\pm$ 0) 0* ( $\pm$ 0)	0* 0* ( $\pm$ 0) 0* ( $\pm$ 0)
	S9 mix (+)	0	128 114 ( $\pm$ 119) 114 ( $\pm$ 8)	14 12 ( $\pm$ 12) 11 ( $\pm$ 2)	24 24 ( $\pm$ 23) 21 ( $\pm$ 2)
1.22		120 104 ( $\pm$ 115) 120 ( $\pm$ 9)	15 10 ( $\pm$ 12) 11 ( $\pm$ 3)		
2.44		127 107 ( $\pm$ 119) 123 ( $\pm$ 11)	10 12 ( $\pm$ 11) 12 ( $\pm$ 1)	17 23 ( $\pm$ 20) 19 ( $\pm$ 3)	23 17 ( $\pm$ 21) 24 ( $\pm$ 4)
4.88		130 101 ( $\pm$ 115) 114 ( $\pm$ 15)	15 13 ( $\pm$ 14) 14 ( $\pm$ 1)	27 22 ( $\pm$ 25) 27 ( $\pm$ 3)	20 19 ( $\pm$ 17) 13 ( $\pm$ 4)
9.77		103 107 ( $\pm$ 107) 112 ( $\pm$ 5)	15 15 ( $\pm$ 14) 13 ( $\pm$ 1)	28 26 ( $\pm$ 29) 33 ( $\pm$ 4)	19 19 ( $\pm$ 21) 24 ( $\pm$ 3)
19.5		117 120 ( $\pm$ 114) 106 ( $\pm$ 7)	14 16 ( $\pm$ 15) 15 ( $\pm$ 1)	19 25 ( $\pm$ 22) 23 ( $\pm$ 3)	23 22 ( $\pm$ 22) 22 ( $\pm$ 1)
39.1		103 105 ( $\pm$ 105) 107 ( $\pm$ 2)	9 13 ( $\pm$ 11) 10 ( $\pm$ 2)	15 17 ( $\pm$ 18) 23 ( $\pm$ 4)	18 21 ( $\pm$ 20) 20 ( $\pm$ 2)
78.1		86* 72* ( $\pm$ 79) 79* ( $\pm$ 7)	7* 8* ( $\pm$ 8) 8* ( $\pm$ 1)	29* 23* ( $\pm$ 26) 25* ( $\pm$ 3)	13* 18* ( $\pm$ 16) 17* ( $\pm$ 3)
156				22* 16* ( $\pm$ 17) 14* ( $\pm$ 4)	9* 6* ( $\pm$ 7) 7* ( $\pm$ 2)
Positive control S9 mix (-)		Name	AF-2 <sup>a)</sup>	NaN <sub>3</sub> <sup>b)</sup>	AF-2
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.1	80
	Number of colonies/plate	752 707 ( $\pm$ 745) 777 ( $\pm$ 35)	453 451 ( $\pm$ 451) 448 ( $\pm$ 3)	708 628 ( $\pm$ 646) 602 ( $\pm$ 55)	438 477 ( $\pm$ 458) 458 ( $\pm$ 20)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA <sup>d)</sup>	2-AA	2-AA	2-AA
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	0.5	2
	Number of colonies/plate	1587 1477 ( $\pm$ 1534) 1538 ( $\pm$ 55)	184 194 ( $\pm$ 191) 196 ( $\pm$ 6)	500 500 ( $\pm$ 504) 513 ( $\pm$ 8)	255 243 ( $\pm$ 253) 261 ( $\pm$ 9)

a) AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

b) NaN<sub>3</sub>: sodium azide

c) 9-AA:9-aminoacridine hydrochloride

d) 2-AA:2-aminoanthracene

\*: Microbial toxicity was observed.

Table 1-2 Mutagenicity of diphenyl disulfide 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 change type	
		WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	
S9 mix (-)	0	71 86 ( 75) 68 ( $\pm$ 10)	
	39.1	80 74 ( 73) 65 ( $\pm$ 8)	
	78.1	75 72 ( 76) 82 ( $\pm$ 5)	
	156	76 74 ( 77) 80 ( $\pm$ 3)	
	313	86 69 ( 79) 83 ( $\pm$ 9)	
	625†	60* 63* ( 62) 63* ( $\pm$ 2)	
	1250†	61* 56* ( 60) 64* ( $\pm$ 4)	
	2500†	55* 61* ( 58) 58* ( $\pm$ 3)	
S9 mix (+)	0	87 94 ( 93) 99 ( $\pm$ 6)	
	78.1	104 86 ( 95) 96 ( $\pm$ 9)	
	156	98 88 ( 91) 88 ( $\pm$ 6)	
	313	95 85 ( 88) 83 ( $\pm$ 6)	
	625†	80 77 ( 79) 81 ( $\pm$ 6)	
	1250†	86 81 ( 85) 87 ( $\pm$ 3)	
	2500†	57* 57* ( 62) 73* ( $\pm$ 9)	
	5000†	61* 54* ( 62) 71* ( $\pm$ 9)	
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2 <sup>a)</sup>	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.005	
	Number of colonies/plate	751 780 ( 755) 733 ( $\pm$ 24)	
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA <sup>b)</sup>	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	2	
	Number of colonies/plate	1372 1238 ( 1298) 1284 ( $\pm$ 68)	

a) AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

b) 2-AA:2-aminoanthracene

\*:Microbial toxicity was observed.

†:Precipitates were observed.

Table 2-1 Mutagenicity of diphenyl disulfide in bacteria (II)

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 change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535		TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	104 103 ( $\pm$ 110) 122 ( $\pm$ 11)	7 11 ( $\pm$ 10) 13 ( $\pm$ 3)		13 16 ( $\pm$ 15) 17 ( $\pm$ 2)	12 13 ( $\pm$ 12) 11 ( $\pm$ 1)
	0.153	100 106 ( $\pm$ 103) 103 ( $\pm$ 3)	11 14 ( $\pm$ 12) 10 ( $\pm$ 2)			
	0.305	100 102 ( $\pm$ 101) 102 ( $\pm$ 1)	15 16 ( $\pm$ 14) 12 ( $\pm$ 2)		14 21 ( $\pm$ 17) 17 ( $\pm$ 4)	12 15 ( $\pm$ 13) 11 ( $\pm$ 2)
	0.610	120 100 ( $\pm$ 107) 101 ( $\pm$ 11)	14 12 ( $\pm$ 12) 11 ( $\pm$ 2)		20 17 ( $\pm$ 19) 19 ( $\pm$ 2)	12 10 ( $\pm$ 12) 14 ( $\pm$ 2)
	1.22	108 101 ( $\pm$ 104) 102 ( $\pm$ 4)	9 14 ( $\pm$ 12) 12 ( $\pm$ 3)		17 14 ( $\pm$ 16) 18 ( $\pm$ 2)	10 12 ( $\pm$ 12) 15 ( $\pm$ 3)
	2.44	110 106 ( $\pm$ 105) 100 ( $\pm$ 5)	11 12 ( $\pm$ 11) 11 ( $\pm$ 1)		17 19 ( $\pm$ 19) 20 ( $\pm$ 2)	14 13 ( $\pm$ 12) 10 ( $\pm$ 2)
	4.88	70* 85* ( $\pm$ 83) 94* ( $\pm$ 12)	10* 9* ( $\pm$ 9) 8* ( $\pm$ 1)		16 17 ( $\pm$ 18) 20 ( $\pm$ 2)	10 10 ( $\pm$ 11) 12 ( $\pm$ 1)
	9.77	0* 0* ( $\pm$ 0) 0* ( $\pm$ 0)	0* 0* ( $\pm$ 0) 0* ( $\pm$ 0)		11* 12* ( $\pm$ 12) 12* ( $\pm$ 1)	6* 10* ( $\pm$ 7) 6* ( $\pm$ 2)
	19.5				0* 0* ( $\pm$ 0) 0* ( $\pm$ 0)	0* 0* ( $\pm$ 0) 0* ( $\pm$ 0)
S9 mix (+)	0	108 104 ( $\pm$ 107) 109 ( $\pm$ 3)	16 19 ( $\pm$ 17) 17 ( $\pm$ 2)		25 28 ( $\pm$ 28) 30 ( $\pm$ 3)	14 16 ( $\pm$ 15) 16 ( $\pm$ 1)
	1.22	123 106 ( $\pm$ 114) 113 ( $\pm$ 9)	18 18 ( $\pm$ 17) 14 ( $\pm$ 2)			
	2.44	119 119 ( $\pm$ 116) 109 ( $\pm$ 6)	17 17 ( $\pm$ 17) 18 ( $\pm$ 1)		24 24 ( $\pm$ 25) 27 ( $\pm$ 2)	16 19 ( $\pm$ 17) 15 ( $\pm$ 2)
	4.88	119 108 ( $\pm$ 116) 122 ( $\pm$ 7)	18 16 ( $\pm$ 17) 18 ( $\pm$ 1)		24 24 ( $\pm$ 24) 25 ( $\pm$ 1)	19 17 ( $\pm$ 19) 20 ( $\pm$ 2)
	9.77	108 109 ( $\pm$ 112) 119 ( $\pm$ 6)	19 17 ( $\pm$ 17) 14 ( $\pm$ 3)		24 28 ( $\pm$ 25) 22 ( $\pm$ 3)	19 19 ( $\pm$ 19) 19 ( $\pm$ 0)
	19.5	107 104 ( $\pm$ 109) 116 ( $\pm$ 6)	14 15 ( $\pm$ 15) 15 ( $\pm$ 1)		22 29 ( $\pm$ 26) 26 ( $\pm$ 4)	18 19 ( $\pm$ 18) 18 ( $\pm$ 1)
	39.1	115 107 ( $\pm$ 109) 106 ( $\pm$ 5)	14 15 ( $\pm$ 14) 14 ( $\pm$ 1)		23 26 ( $\pm$ 24) 23 ( $\pm$ 2)	18 17 ( $\pm$ 17) 15 ( $\pm$ 2)
	78.1	92* 66* ( $\pm$ 85) 96* ( $\pm$ 16)	5* 10* ( $\pm$ 8) 8* ( $\pm$ 3)		17* 16* ( $\pm$ 16) 15* ( $\pm$ 1)	9* 10* ( $\pm$ 10) 12* ( $\pm$ 2)
	156				13* 15* ( $\pm$ 13) 12* ( $\pm$ 2)	9* 7* ( $\pm$ 7) 5* ( $\pm$ 2)
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2 <sup>a)</sup>	NaN <sub>3</sub> <sup>b)</sup>		AF-2	9-AA <sup>c)</sup>
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5		0.1	80
	Number of colonies/plate	608 632 ( $\pm$ 665) 755 ( $\pm$ 79)	553 464 ( $\pm$ 509) 511 ( $\pm$ 45)		577 600 ( $\pm$ 580) 562 ( $\pm$ 19)	466 441 ( $\pm$ 442) 419 ( $\pm$ 24)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA <sup>d)</sup>	2-AA		2-AA	2-AA
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2		0.5	2
	Number of colonies/plate	1326 1320 ( $\pm$ 1345) 1388 ( $\pm$ 38)	222 210 ( $\pm$ 219) 226 ( $\pm$ 8)		367 431 ( $\pm$ 417) 453 ( $\pm$ 45)	237 222 ( $\pm$ 222) 207 ( $\pm$ 15)

a) AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

b) NaN<sub>3</sub>: sodium azide

c) 9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride

d) 2-AA: 2-aminoanthracene

\*: Microbial toxicity was observed.

Table 2-2 Mutagenicity of diphenyl disulfide in bacteria (II)

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 change type	
			WP2 <i>uvrA</i> /pKM101
S9 mix (-)	0		61 75 ( 68) 68 ( $\pm$ 7)
	39.1		61 70 ( 67) 70 ( $\pm$ 5)
	78.1		70 78 ( 74) 73 ( $\pm$ 4)
	156		63 73 ( 67) 65 ( $\pm$ 5)
	313		75 87 ( 83) 86 ( $\pm$ 7)
	625†		73* 52* ( 65) 71* ( $\pm$ 12)
	1250†		65* 63* ( 60) 53* ( $\pm$ 6)
	2500†		52* 56* ( 51) 44* ( $\pm$ 6)
S9 mix (+)	0		85 86 ( 87) 90 ( $\pm$ 3)
	78.1		93 84 ( 88) 87 ( $\pm$ 5)
	156		90 88 ( 86) 79 ( $\pm$ 6)
	313		82 85 ( 82) 78 ( $\pm$ 4)
	625†		70 60 ( 65) 64 ( $\pm$ 5)
	1250†		64 48 ( 59) 66 ( $\pm$ 10)
	2500†		56* 50* ( 50) 45* ( $\pm$ 6)
	5000†		56* 60* ( 61) 66* ( $\pm$ 5)
Positive control S9 mix (-)	Name		AF-2 <sup>a)</sup>
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		0.005
	Number of colonies/plate		1222 986 ( 1105) 1107 ( $\pm$ 118)
Positive control S9 mix (+)	Name		2-AA <sup>b)</sup>
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		2
	Number of colonies/plate		1528 1599 ( 1497) 1364 ( $\pm$ 121)

a) AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide

b) 2-AA: 2-aminoanthracene

\*: Microbial toxicity was observed.

†: Precipitates were observed.

*In Vitro* Chromosomal Aberration Test  
of Diphenyl disulfide in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

ジフェニルジスルフィドの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を調べるため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下では30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を、短時間処理法のS9 mix非存在下ならびに連続処理法の24時間処理では25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、各々公差5で5濃度を設定した。

短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下ならびに24時間連続処理のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下ではジフェニルジスルフィドは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

大日本製薬から入手(2002年3月, 入手時:継代14代, 凍結時:17代)したチャイニーズ・ハムスター肺由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代4週間以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(Invitrogen Corp., ロット番号:353445)を10vol%添加したイーグルMEM(日本製薬)培養液を用いた。

3. 培養条件

$2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5%CO<sub>2</sub>)内で培養した。

短時間処理法では、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。また連続処理法では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間処理した。

4. 被験物質

ジフェニルジスルフィド(ロット番号:15322AB, Sigma-Aldrich(Missouri, USA))は、純度99.8%の白色粉末である。被験物質は使用時まで冷蔵、暗所に気密保存した。

実験終了後、残余被験物質を分析した結果、安定性に

問題はなかった。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。ジメチルスルホキシド(関東化学, ロット番号:411F1738, 純度:99.7%以上)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1 vol%になるように加えた。

6. 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(オリンパス光学工業)を用いて測定し、陰性対照群に対する割合をもって指標とした。

その結果、ジフェニルジスルフィドによって約50%の細胞増殖抑制を示す濃度を、細胞増殖率が50%を示す濃度を挟む2点を結ぶ直線式より算出したところ、短時間処理法のS9 mix存在下で17  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非存在下で13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の24時間処理で8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった(Fig.1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下では30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を、短時間処理法のS9 mix

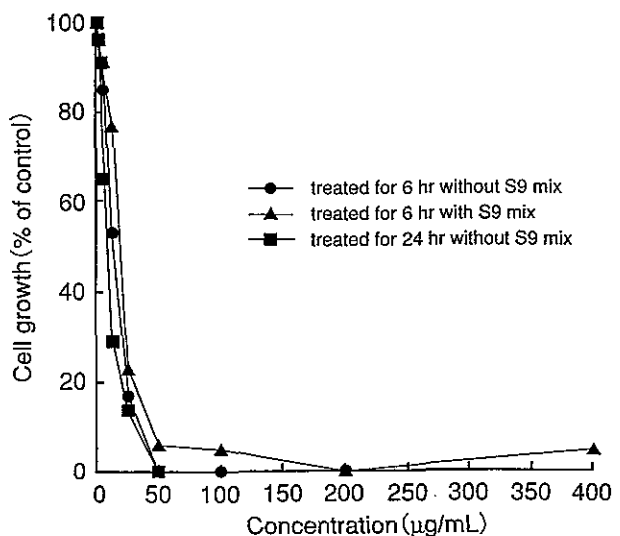


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with diphenyl disulfide

非存在下ならびに連続処理法の24時間処理では25 µg/mLを最高濃度として、各々公差5で5濃度を設定した。

陽性対照として、短時間処理法のS9 mix存在下では、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業、ロット番号:GG01)の濃度を20 µg/mL、S9 mix非存在下では、マイトマイシンC(協和発酵工業、ロット番号:380ABC)の濃度を0.1 µg/mL、連続処理法では、マイトマイシンCの濃度を0.05 µg/mLに設定した。

各濃度4枚のディッシュに処理し、2枚を染色体標本作製、2枚を細胞増殖率測定に使用した。

#### 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になるように染色体標本作成用ディッシュの培養液に加えた。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2枚作製した。作製した標本を、3 vol%ギムザ溶液で20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枚のディッシュから得られたスライドを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>1)</sup>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切断、交換などの構造異常およびギャップの有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。ギャップは構造異常には含めなかった。また、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

#### 10. 記録と測定

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。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら<sup>2)</sup>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。

#### 11. 細胞増殖の測定

染色体標本作製と同一のサンプルにおける細胞増殖を測定した。細胞増殖測定用のディッシュを用いて、細胞増殖抑制試験と同様に測定した。

### 結果および考察

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。ジフェニルジスルフィドを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

連続処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。ジフェニルジスルフィドを加えて24時間連続処理

したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果から、ジフェニルジスルフィドは本試験条件下において、染色体異常を誘発しないと結論した。

なお、類似化合物であるBiphenylは、染色体異常試験で陽性の結果が報告されている<sup>2)</sup>。また、Diphenylamineは、染色体異常試験で陰性の結果が報告されている<sup>2)</sup>。

### 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) 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(2000)p.77, p.202.

### 連絡先

試験責任者: 成見香瑞範

試験担当者: 堀 一成, 齋藤 準, 石毛裕子,  
齋藤宏美, 梶原昭彦

(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所  
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

### Correspondence

Authors: Kazunori Narumi (Study director)  
Kazushige Hori, Hitoshi Saitou,  
Yuko Ishige, Hiromi Saitou,  
Akihiko Kaijwara

Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety  
Institute Ltd.  
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
Ibaraki, 314-0255 Japan  
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with diphenyl disulfide with and without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9 mix	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid <sup>b)</sup> (%)	Judgement <sup>c)</sup>	
						ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Solvent <sup>a)</sup>	0	-	6-18	100	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	5	-	6-18	93	200	1	0	1	1	0	3	3(1.5)	0	0.0	-	-
	10	-	6-18	73	200	1	0	2	1	0	4	4(2.0)	0	0.5	-	-
	15	-	6-18	53	200	0	1	2	0	0	3	3(1.5)	0	1.0	-	-
	20	-	6-18	41	200	0	2	1	0	0	3	3(1.5)	0	0.0	-	-
	25	-	6-18	24	200	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	0	0.0	-	-
MMC	0.1	-	6-18	N.D.	200	10	37	2	0	0	49	46(23.0)	0	0.0	+	-
Solvent	0	+	6-18	100	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	10	+	6-18	84	200	1	0	1	1	0	3	3(1.5)	0	0.0	-	-
	15	+	6-18	62	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0	0.0	-	-
	20	+	6-18	40	200	0	2	0	0	0	2	2(1.0)	0	0.5	-	-
	25	+	6-18	24	200	0	1	2	0	0	3	3(1.5)	0	0.0	-	-
	30	+	6-18	7	200	4	2	0	0	0	6	6(3.0)	0	0.0	-	-
BP	20	+	6-18	N.D.	200	8	96	2	0	0	106	103(51.5)	1	0.0	+	-

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment

SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C (positive control), BP:benzo[a]pyrene (positive control)

N.D.:Not determined

a) Dimethyl sulfoxide was used as solvent.

b) Two hundred cells were analyzed in each group.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with diphenyl disulfide without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid <sup>b)</sup> (%)	Judgement <sup>c)</sup>	
					ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Solvent <sup>a)</sup>	0	24	100	200	1	2	0	1	0	4	4(2.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	5	24	90	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0	0.0	-	-
	10	24	57	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0	0.0	-	-
	15	24	24	200	0	1	1	0	0	2	2(1.0)	0	1.0	-	-
	20	24	15	200	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	0	1.0	-	-
	25	24	7	200	0	1	0	0	0	1	1(0.5)	0	0.0	-	-
MMC	0.05	24	N.D.	200	14	42	1	0	0	57	53(26.5)	0	0.0	+	-

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment

SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C (positive control)

N.D.:Not determined

a) Dimethyl sulfoxide was used as solvent.

b) Two hundred cells were analyzed in each group.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).



# ジフェニルジスルフィドのラットを用いる単回経口投与毒性試験

## Single Dose Oral Toxicity Test of Diphenyl disulfide in Rats

### 要約

ジフェニルジスルフィドを OECD Test Guideline 423; Acute oral toxicity test に従って 8~8.5 週齢の Crj:CD(SD)IGS 系雌ラットに強制経口投与し、その急性毒性を検討した。投与用量は第一回投与用量を 300 mg/kg とし、第二回、第三回および第四回投与用量はそれぞれ 300, 2000 および 2000 mg/kg とした。ジフェニルジスルフィドは 0.5 w/v% トラガントゴム水溶液に懸濁調製し、投与前日の夕方から絶食したラットに 10 mL/kg の投与容量で投与した。

300 mg/kg 群では、死亡・瀕死期解剖動物は認められず、一般状態、体重および剖検で異常は認められなかった。

2000 mg/kg 群では、第 4 日以降に消瘦、横臥位、円背位、自発運動の低下、緩徐呼吸あるいは体温低下が認められた。また、第 1 日から第 8 日に体重減少が認められた。その結果、第 8 日から第 10 日にかけて同群の 1 例が死亡し、2 例を瀕死期解剖した。死亡・瀕死期解剖動物の剖検では、腺胃の出血、前胃の隆起巣と壁の肥厚、胸腺の小型化、脾臓の小型化と暗赤色化、結腸の膨満、副腎の腫大、空腸の異常内容物および膀胱の着色尿(黄色)貯留が認められた。第 15 日まで生存した動物では、異常症状は第 14 日までに消失し、体重は第 8 日以降増加した。また、生存動物の剖検では、前胃の隆起巣および胸腺の小型化が認められた。

以上、ジフェニルジスルフィドを雌ラットに単回経口投与した結果、2000 mg/kg 群で 1/6 例が死亡し、2/6 例を瀕死期解剖した。従って、本試験条件下におけるジフェニルジスルフィドは GHS (Globally Harmonized Classification System) の基準で Category 4 (>300-2000 mg/kg) と分類された。

### 方法

#### 1. 被験物質

Aldrich Chemical (USA) から提供されたジフェニルジスルフィド(純度:99.8%, ロット番号: 15322AB)を冷蔵、暗所、気密条件下で保存し、使用した。

被験物質を 0.5 w/v% トラガントゴム水溶液(トラガントゴム; 和光純薬工業)に懸濁して投与液を用時調製した。

#### 2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバーから Crj:CD(SD)IGS ラット (SPF) を入手後、5 日間検疫・馴化し、その後投与日まで馴化した。各投与につき、動物数は雌 3 匹とし、投与前日に無作為に抽出・選抜した。投与日の週齢は 8~8.5 週齢、体重範囲は 186~210 g であった。

検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通じて、温度 19.0~25.0°C (許容範囲)、相対湿度 35.0~75.0% (許容範囲)、換気 6~20 回/時(オールフレッシュエアー供給)、照明 12 時間/日 (7:00-19:00) に自動調節した飼育室を使用した。

動物は、実験動物用床敷(ベータチップ、日本チャールス・リバー)を敷いたポリカーボネート製ケージに、動物選抜前は 1 ケージあたり 4 匹以下、動物選抜後は 1 ケージあたり 3 匹収容し、飼育した。

動物には、実験動物用固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業)と、5 μm のフィルター濾過後、紫外線照射した水道水をそれぞれ自由に摂取させた。

#### 3. 投与量および投与方法

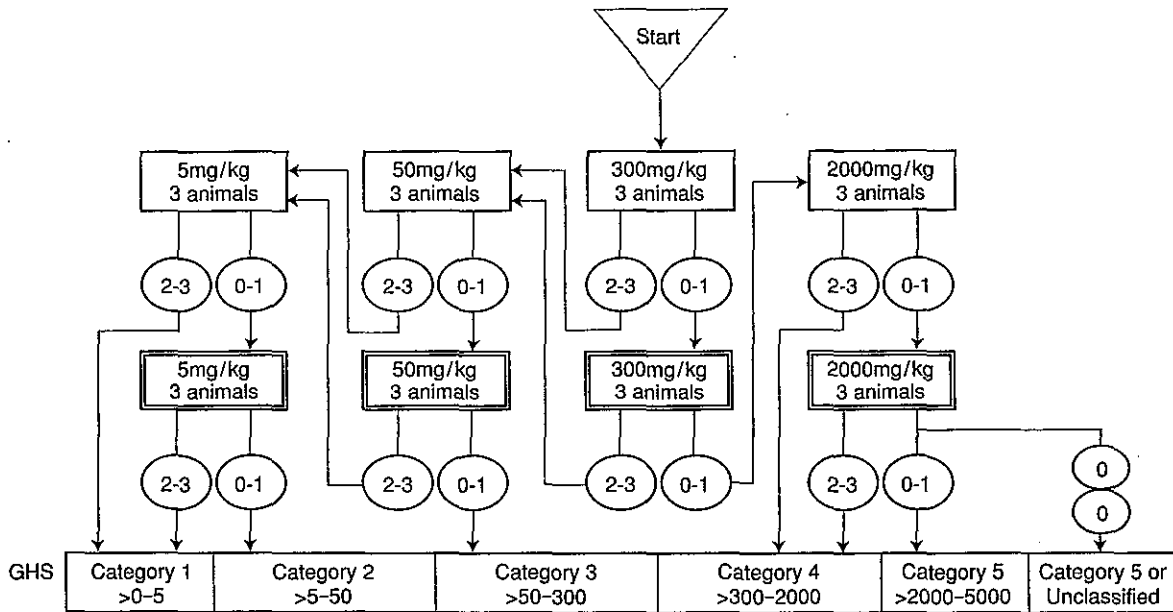
被験物質製造者(Aldrich Chemical, USA)の MSDS (Material Safety Data Sheet) にマウスの LD<sub>50</sub>(腹腔内投与)が 100 mg/kg とのデータがある。よって、本試験の第一回投与用量は 300 mg/kg とし、下図のフローチャートに従って試験を開始した。

投与前日の夕方から約 18 時間絶食させたラットに胃ゾンデを装着したディスプレイシリンジを用いて投与した。投与終了後約 3 時間は飼料を与えなかった。投与液量は 10 mL/kg とし、投与直前に測定した体重に基づいて算出した。

第一回投与用量である 300 mg/kg の投与の結果、死亡は認められなかった。そのため、第二回投与用量を 300 mg/kg とした。第二回投与の結果、死亡は認められなかった。そのため、第三回投与用量は 2000 mg/kg とした。第三回投与の第 3 日まで(第 4 日までの死亡・瀕死期解剖動物の有無で第四回投与の投与量を判断した)、死亡・瀕死期解剖動物が認められなかったため、第四回投与用量は 2000 mg/kg とした。なお、第三回投与の結果、第 8 日に 1 例を瀕死期解剖、第 9 日に 1 例が死亡した。以下に実際の流れを示した。

#### 4. 観察・測定項目

生死および一般状態を投与日には投与後 10 分、30 分、



※楕円の中の数字は死亡動物数を示す(死亡動物数には瀕死のため屠殺した動物を含む)。

GHS: Globally Harmonized Classification System (mg/kg b.w.)

1, 3および6時間の5回, その後は1日1回, 14日間観察した。体重は, 全生存動物について投与直前, 第4, 8および15日に測定した。また, 各測定日間の増加量を算出した。死亡動物は発見時に剖検した。瀕死期解剖および生存動物は, それぞれ瀕死期解剖決定時および観察終了時(第15日)にチオペンタールナトリウム麻酔下で放血し, 安楽死させた後剖検した。

結果

1. 死亡状況 (Table 1)

300 mg/kg群では死亡は認められなかった。2000 mg/kg群では, 第三回投与の第8日に1例を瀕死期解剖, 第9日に1例が死亡し, 第四回投与の第10日に1例を瀕死期解剖した。

2. 一般状態

2000 mg/kg群では, 削瘦, 横臥位, 円背位, 自発運

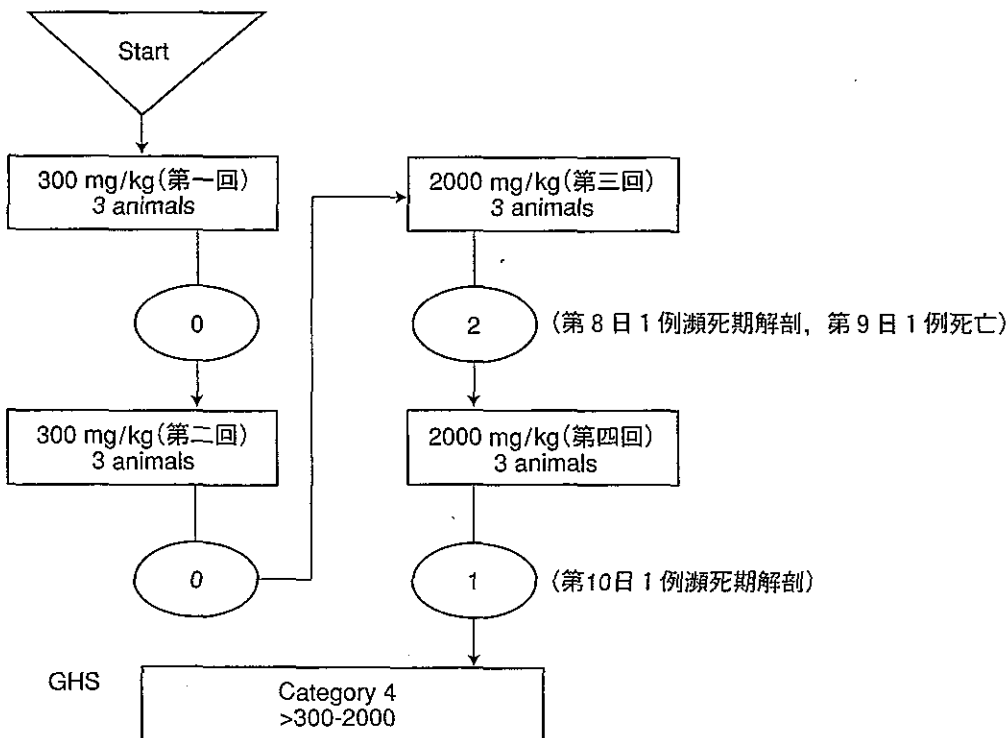


Table 1 Mortality in rats after single dose oral toxicity test of diphenyl disulfide

Sex	Step	Dose (mg/kg)	Number of animals	Number of dead animals											Mortality <sup>a)</sup>
				Day:	1-7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Female	1st	300	3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
	2nd	300	3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
	3rd	2000	3		0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2/3
	4th	2000	3		0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1/3

a) number of dead animals / number of animals examined

動の低下(第三および第四回投与で共通), 緩徐呼吸(第三回投与)および体温低下(第四回投与)が認められた。これらの症状は第4日以降に発現した。これらの症状が発現した後, 上記の通り同群の1例が第9日(第三回投与)に死亡し, 2例(第三回および第四回投与の各1例)を第8および10日に瀕死期解剖した。第15日まで生存した3例(第三回投与1例, 第四回投与2例)の症状は, 第14日までに消失した。

300 mg/kg群では, 被験物質に起因した異常は認められなかった。

### 3. 体重

2000 mg/kg群の体重および体重増加量は, 第1~4日および第4~8日に体重減少または増加抑制を示した。第15日まで生存した動物は, 第8日まで体重減少を示したが, 第8日以降体重は増加し, 第8~15日の体重増加量は300 mg/kg群よりも高値を示した。

300 mg/kg群の体重は順調に増加した。

### 4. 剖検所見

死亡・瀕死期解剖例(死亡1例, 瀕死期解剖2例)では, 胸腺および脾臓の小型化が全例, 脾臓の暗赤色化が1例, 腺胃の限局性出血が全例, 前胃の隆起巣が2例, 前胃の壁の肥厚, 結腸の膨満, 空腸の異常内容物(タール様), 膀胱の着色尿(黄色)貯留がそれぞれ1例, 副腎の腫大(両側)が2例に認められた。

2000 mg/kg群の生存例(3例)では, 胸腺の小型化が1例, 前胃の隆起巣が全例に認められた。

300 mg/kg群では, 異常は認められなかった。

## 考察

ジフェニルジスルフィドを300または2000 mg/kgの用量で雌ラットに単回経口投与した。

その結果, 2000 mg/kg群で第4日以降に削瘦, 横臥位等の諸症状が発現し, 体重が減少した。第8日から第10日にかけて同群の1例が死亡し, 2例を瀕死期解剖した。死亡・瀕死期解剖動物の剖検では, 全例で腺胃の出血, 前胃の隆起巣あるいは肥厚が認められ, 被験物質の胃粘膜への刺激性が示唆された。これらの胃の傷害性変化が, 死亡あるいは衰弱の原因と考えられた。死亡・瀕死期解剖動物では, 胃の変化の他に衰弱あるいはストレスに起

因すると考えられる胸腺および脾臓の小型化あるいは副腎の肥大等の変化が認められた。第15日まで生存した動物では, 上記の症状の発現および体重減少が認められたが, 症状は第14日までに消失し, 第8日以降体重は増加した。生存動物の剖検では, 前胃の隆起巣および胸腺の小型化が認められた。

以上, ジフェニルジスルフィドを雌ラットに単回経口投与した結果, 2000 mg/kg群で1/6例が死亡し, 2/6例を瀕死期解剖した。従って, 本試験条件下におけるジフェニルジスルフィドはGHSの基準でCategory 4(>300-2000 mg/kg)と分類された。

### 連絡先

試験責任者: 平塚秀明

試験担当者: 大塚直美, 松本和代

(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所

〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

### Correspondence

Authors: Hideaki Hiratsuka (Study director)

Naomi Outsuka, Kazuyo Matsumoto

Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,

Ibaraki, 314-0255, Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test  
of Diphenyl disulfide by Oral Administration in Rats

要約

ジフェニルジスルフィドはスルフェニル化試薬として、またシクロヘキサン類の脱水素芳香族化試薬として用いられている<sup>1)</sup>。毒性情報としては、OECD TG423で実施した経口投与による急性毒性試験ではCategory 4(>300-2000)に分類された<sup>2)</sup>。しかし、反復投与および生殖発生毒性についての知見はない。ジフェニルジスルフィドを1, 6および30 mg/kg/dayの用量でSD系ラット(1群雌雄各12匹、雌はサテライト動物として対照群および30 mg/kg群に各5匹を追加)に交配前14日から交配を経て雄は42日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育4日、雌サテライト動物は雄と同様に42日間までそれぞれ経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

1. 反復投与毒性

脾臓および大腿骨骨髓に対する影響として、30 mg/kg群で脾臓重量の増加が雌雄、脾臓の腫大と暗赤色化が雌、病理組織検査では脾臓のヘモジデリン沈着および赤血球系髄外造血の増強が雌雄でみられ、大腿骨骨髓の赤血球系造血細胞の増加が6 mg/kg以上の群の雌で認められた。造血系に関連すると考えられる血液学変化として、30 mg/kg群の雌雄で赤血球数の低値、雄でヘモグロビン濃度の低値、網赤血球数の高値など貧血を示唆する変化が認められた。

肝臓に対する影響として、30 mg/kg群の雌雄で重量の増加、腫大および小葉中心性肝細胞肥大がみられ、組織変化は6 mg/kg群の雄でも認められた。血液生化学変化として、30 mg/kg群の雄で総コレステロールの高値、グルコースの低値、雌で総コレステロール、総蛋白およびアルブミンの高値が認められた。

腎臓に対する影響として、腎臓重量の増加が6 および30 mg/kg群の雄、30 mg/kg群の雌で、腎臓の腫大が1 mg/kg以上の群の雄で認められ、組織学的には雄で近位尿細管上皮における硝子滴の発現、好塩基性近位尿細管の発現、雌で尿細管上皮のリポフスチン沈着が認められた。

甲状腺に対する影響として、濾胞上皮の肥大が30 mg/kg群の雄に認められた。

投与終了後検査で認められたこれらの病理組織学変化は、2週間の回復期間により消失するか、変化がみられても発現頻度および病変程度が明らかに軽減していることから、回復傾向を示しているものと判断された。

2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能検査において性周期、交尾率、受胎率、分娩率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩および哺育行動のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。新生児の検査において出産児数、出生児数、性比、出生率、新生児の4日生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、ジフェニルジスルフィドの本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雄で1 mg/kg/day未満、雌で1 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄の親動物ならびに児動物のいずれも30 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質

ジフェニルジスルフィド(Aldrich Chemical(米国)、ロット番号15322AB、純度99.8%)は、キシレンに3%の溶解性を有する白色の粉末である。被験物質は冷蔵、暗所、気密容器にて保存し、試験期間中安定であることを確認した。投与液の調製には、被験物質を各用量ごとに秤量し、媒体(0.5%トラガントゴム水溶液、和光純薬工業)に懸濁した。投与液中の被験物質の安定性を投与開始前に調製後8日間安定であることを確認した。投与液は投与に供するまで冷蔵・遮光下で保存し、調製後7日以内に使用した。また、初回および最終調製時に投与液中の被験物質濃度が設定濃度±10%以内であることを確認した。

2. 試験動物

日本チャールス・リバー(厚木生産所)から入手した雌雄のSD系ラット(Crj:CD(SD)IGS,SPF)を5日間検疫・馴化した。その後も馴化を継続し雌雄の一般状態、さらに雌は性周期を7日間観察し、異常のない動物を試験に供した。投与開始前日に体重層別化無作為抽出法により、1群あたり雌雄各12匹に振り分けた。さらに、雌サテライト動物(回復動物)として対照群および30 mg/kg群に各5匹の雌を追加した。投与開始時の週齢は雌雄とも9週齢、体重範囲は雄327~385 g、雌が208~258 gであった。検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通じて、温度22±2°C、相対湿度55±15%、換気約12回/時、照明12時間/日(7:00-19:00)に自動調節した飼育室を使用した。

動物飼育には、妊娠・哺育期間を除く期間はステンレス製つり下げ式金網製ケージを、妊娠・哺育期間は実験動物用床敷(ベータチップ, 日本チャールス・リバー)を敷いたポリカーボネート製ケージを使用した。交配期間は雌雄各1匹, 哺育期間は1腹, 検疫・馴化期間を含むその他の期間は1匹ずつ収容した。動物には、オートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業)と、孔径5  $\mu\text{m}$ のフィルター濾過後、紫外線照射した水道水を自由に摂取させた。

### 3. 投与量および投与方法

投与用量は用量設定試験の結果を参考に決定した。すなわち被験物質を0, 30, 100, 300および1000 mg/kgの用量で、1群雌雄各3匹のSD系ラットに14日間反復経口投与した結果、300 mg/kg以上の群で死亡あるいは瀕死が雌雄全例に認められた。100 mg/kg群では一般状態、体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学検査、器官重量、剖検の検査項目のすべてに被験物質に起因する変化が認められた。30 mg/kg群でも血液学検査、血液生化学検査に変化がみられ、器官重量では肝臓、脾臓および腎臓重量の高値、剖検では脾臓の暗赤色化および腫大、前胃の壁の肥厚が認められた。これらの結果および本試験の投与期間を考慮し、本試験の高用量は明らかな毒性発現が予想される30 mg/kgとし、以下公比約5で中用量は6 mg/kg、低用量は1 mg/kgの3用量を設定した。また、媒体(0.5%トラガントゴム水溶液)のみを投与する対照群を設けた。

投与経路は経口とした。投与期間は、雄は交配前14日間および交配期間を経て剖検前日までの計42日間、雌は交配前14日間、交配期間、妊娠期間および分娩を経て哺育4日までとした。交尾しなかった雌および分娩しなかった雌は剖検前日までとした。なお、雌サテライト動物は交配は行わず雄と同様42日間投与した。また、対照群と30 mg/kg群の雄各5匹および同群の雌サテライト動物各5匹については、投与期間終了後14日間の回復期間を設けた。

投与の際はテフロン製胃ゾンデを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与液量は5 mL/kgとし、至近日に測定した体重に基づいて算出した。

### 4. 反復投与毒性に関する観察・検査項目

#### 1) 一般状態

全例について、生死、外観、行動等を投与前および投与後に毎日観察した。回復動物は1日1回午前中に観察した。

#### 2) 行動検査

雌雄全例について、詳細な症状観察(ホームケージ内、ハンドリング時、オープンフィールドでの観察)を、投与開始前日に1回、投与期間中は1回/週、いずれも午後に行った。雌雄とも各群5匹を選抜し、機能検査(刺激に対する反応性、握力)および自発運動の測定を、第6週の午後に1回行った。握力はデジタルフォースゲージ

(DPS-5)、自発運動量にはSUPERMEX(室町機械)を用いて測定した。投与期間中の検査で被験物質の影響が疑われる変化が認められなかったため、回復期間の検査は行わなかった。

#### 3) 体重および摂餌量

雄では第1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 42および43日、さらに雄回復動物では第50および56日に測定した。雌サテライト動物は雄と同様の頻度で測定した。雌では第1, 4, 8および15日、交尾した雌は妊娠0, 7, 14および20日、分娩した雌は哺育0および4日に測定した。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定し、各測定日間の1匹あたりの1日平均摂餌量を算出した。

#### 4) 血液学検査

雄では第42日、雄回復動物および雌サテライト動物では第56日、雌では哺育4日に、全生存動物を午後4時頃より絶食させた。測定対象動物(採血動物)は雄は5例、雄回復動物および雌サテライト動物は全例、雌は分娩日が早く動物番号の小さい順に5例とした。これらの動物は、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で、後大静脈より採血した。採取した血液を用いて以下に示す項目を測定した。

EDTA-2 Kにより抗凝固処理し、赤血球数(球状化処理二次元レーザーFCM法)、ヘモグロビン濃度(シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(球状化処理二次元レーザーFCM法)、網赤血球数(RNA染色によるレーザーFCM法)、血小板数(球状化処理二次元レーザーFCM法)、白血球数(酸性界面活性剤によるレーザーFCM法)を多項目自動血球分析装置(ADVIA120, バイエルメディカル)、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-50, HEG-50VFオムロン)を用いて測定した。また、検査結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。血液の一部を3.2 w/v%クエン酸三ナトリウム水溶液で抗凝固処理し、遠心分離して得られた血漿を用いてプロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)(光散乱検出方式)を血液凝固自動分析装置(CA-510, シスメックス)を用いて測定した。

#### 5) 血液生化学検査

計画解剖日に採取した血液の一部を室温で約30分間静置後遠心分離し、得られた血清を用いて以下の項目を測定した。

GOTおよびGPT(UV-rate法(JSCC改良法)),  $\gamma$ -GT( $\gamma$ -グルタミン-p-ニトロアニリド基質法(SSCC改良法)), ALP(p-ニトロフェニルリン酸基質法(JSCC改良法)), 総ビリルビン(酵素法(BOD法)), 尿素窒素(酵素-UV法(Urease-LEDH法)), クレアチニン(酵素法(Creatininase-POD法)), グルコース(酵素-UV法(HK-G6PDH法)), 総コレステロール(酵素法(CO-HDAOS法)), トリグリセライド(酵素法(GPO-HDAOS法), グ

リセリン消去法)), 総蛋白(Biuret法), アルブミン(BCG法), A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出), カルシウム(OCPC法), 無機リン(酵素法(PNP-XOD-POD法)), ナトリウム, カリウムおよびクロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(TBA-200FR, 東芝)を用いて測定した。

#### 6) 雄の尿検査

雄について, 第38日の投与前に各用量群5匹の新鮮尿を採取し, pH, 蛋白, グルコース, ケトン体, ビリルビン, 潜血およびウロビリノーゲン(試験紙法, マルティスティックス:バイエルメディカル)を自動尿分析器(クリニテック100, バイエルメディカル)により測定した。被験物質の影響が疑われる変化が認められなかったため, 尿沈渣, 蓄積尿を用いた検査, 回復動物の尿検査は行わなかった。

#### 7) 病理学検査

雌雄全例について, 解剖日にチオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で, 腹大動脈の切断・放血により安楽死させて解剖した。計画解剖動物のうち, 血液学検査の対象動物と同じ雌雄各5匹(回復動物は全例)の脳, 心臓, 肝臓, 腎臓, 副腎, 胸腺, 脾臓, 精巣および精巣上体の重量を測定した。ただし, 精巣および精巣上体は雄全例について測定した。また, 解剖日の体重を基に相対重量(対体重比)を算出した。さらに, 雌雄全例については上記の器官に加えて, 下垂体, リンパ節(下顎・腸間膜), 気管, 肺, 胃, 腸管(十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸), 甲状腺・上皮小体, 膀胱, 精のう, 前立腺腺葉, 卵巣, 子宮, 陰, 骨髄(大腿骨), 坐骨神経, 脊髄および肉眼的異常部位を採取し, 10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定して保存した。ただし, 精巣および精巣上体はブアン液で固定後, 保存した。病理組織学検査は, 対照群と30 mg/kg群の投与後解剖動物のうち, 雌雄各5例(血液学検査および器官重量測定対象動物と同様)の上記器官, 瀕死期解剖動物の上記器官ならびに乳腺, 対照群を含む全動物の肉眼的異常部位および非妊娠雌1例の卵巣について, 常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し, 鏡検した。この結果, 被験物質に起因すると思われる変化が雌雄の肝臓, 脾臓, 腎臓および雄の甲状腺と雌の大腿骨骨髄に認められた。このため, 1および6 mg/kg群の投与後解剖動物の各5例と回復後解剖動物の雌雄全例の当該器官・組織(甲状腺は雄のみ, 大腿骨骨髄は雌のみ)についても検査を行った。さらに, 雌の腎臓にみられた黄褐色色素の性質を確認し, その程度を比較するためにヘマトキシリン・エオジン染色を行った雌全例の腎臓についてシェモール反応を, 雄の脾臓にみられた黄褐色色素の性質を確認するために, 対照群の雄2例, 30 mg/kg群の雄5例の脾臓についてベルリンブルー染色を実施した。

#### 5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

##### 1) 生殖機能検査

投与開始日から交配開始日まで雌の膣垢を毎日午前中に採取, 性周期を検査し, 平均性周期日数および異常性周期動物の発現率を算出した。交配前の投与期間終了後, 各群内で雄1雌1の交配对を設けて最長14日間昼夜同居させた。交尾確認は毎日午前中に行い, 膣栓形成あるいは膣垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし, その日を妊娠0日とした。交配した対は雌雄を分離し, 以後の検査に供した。これらの結果から, 交尾所要日数(交配開始後, 交尾成立までに要した日数), 交尾成立までに逸した発情期の回数, 交尾率[(交尾動物数/同居動物数)×100], 受胎率[(受胎動物数/交尾動物数)×100]を算出した。

##### 2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ, 分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が完了している動物を当該日分娩とし, その日を哺育0日とした。交尾確認後25日を経ても分娩しない場合は, 非分娩雌とした。分娩した動物は新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ, 授乳, 営巣, 食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。母動物は剖検時に卵巣および子宮を摘出し, 黄体数および着床数を検査した。これらの結果から, 妊娠期間(妊娠0日から分娩完了日までの期間), 出産率[(生児出産雌数/受胎雌数)×100], 着床率[(着床数/黄体数)×100], 分娩率[(総出産児数/着床数)×100]を算出した。

##### 3) 新生児の観察・検査

###### (1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数(出生児数, 死産児数), 性別および外表異常の有無を検査した。その後は, 一般状態, 死亡の有無を哺育4日まで毎日観察した。哺育0および4日の生存児数から出生率[(出生児数/総出産児数)×100], 新生児の4日の生存率[(哺育4日生児数/出生児数)×100]を算出した。

###### (2) 体重

生後0および4日に全生存児を個体ごとに測定した。

###### (3) 剖検

生後4日に全生存児の口腔を含む外表を検査した後, 親動物と同様に安楽死させ, 剖検した。死亡動物については10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬, 固定した後, 実体顕微鏡下で剖検した。

#### 6. 統計解析

計量データについては, パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い, 分散が等しい場合は一元配置分散分析を行った。分散が等しくない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意差が認められた場合はDunnett法またはDunnett型の多重比較を行った。計数データのうち尿検査および病理組織所見はa×bの $\chi^2$ 検定を行い, 有意差が認められた場合はArmitageの $\chi^2$ 検定

により対照群と各被験物質投与群間の比較を行った。その他の計数データはFisherの直接確率法により検定した。各検定の有意水準は5%とした。新生児に関するデータは各母動物ごとに算出した平均値を標本単位とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 一般状態

死亡例は雌雄ともいずれの投与群においても認められなかった。

投与期間および回復期間の雌雄とも被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

なお、30 mg/kg群の1例は分娩開始から完了まで約1.5日を要し、哺育0日(分娩完了日)には耳介、眼球等が蒼白化を示し貧血様の症状を呈し、翌日には全出生児が死亡したため瀕死期解剖とした。本動物は分娩困難な状態が継続した影響で貧血様を示し、その延長で正常な哺育行動を示すことができず、全出生児が死亡したものと考えられる。

#### 2) 行動検査

詳細な症状観察、機能検査および自発運動量測定の内いずれも被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

#### 3) 体重(Fig. 1, 2)

30 mg/kg群の雌で体重増加量が第4および15日に有意に低下した。雌サテライト動物では同群の体重は第22, 29, 36および56日、体重増加量では第29および36

日に対照群と比べ有意に低下した。なお、母動物では妊娠および哺育期間とも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

対照群では第1日(投与開始前)より体重の重い動物が雌サテライト動物に偏った。また、雌サテライト動物の各測定日間の体重増加量をみると、30 mg/kg群の第4日に有意な低値、第50日に有意な高値を示したが、投与期間および回復期間を通して対照群と同程度の体重増加が認められた。これらのことから、30 mg/kg群で体重増加抑制を疑う変化がみられたが、投与開始前の体重の偏りによる差に起因するものと考えられ、被験物質の影響を示すものではないと判断した。

#### 4) 摂餌量

被験物質の影響と考えられる変化は雌雄とも認められなかった。

30 mg/kg群の雄で第29日の摂餌量が有意に増加したが、一過性の変化でわずかな増加であることから毒性的に意義のない変化と考えられる。回復期間では変化は認められなかった。雌では、投与、妊娠および哺育期間ならびに回復期間のいずれにも変化は認められず、対照群と同様に推移した。

#### 5) 血液学検査(Table 1)

被験物質の影響と考えられる変化が、30 mg/kg群の雄では投与および回復終了後検査で、赤血球数およびヘモグロビン濃度の低値あるいは低値傾向、網赤血球数の高値が認められた。30 mg/kg群の雌では投与および回復終了後検査で、赤血球数の低値あるいは低値傾向、投与終了後検査で網赤血球数の高値傾向が認められた。なお、30 mg/kg群の雄では、回復終了後検査で平均赤血球色素濃度の低値がみられたが、投与終了後検査では

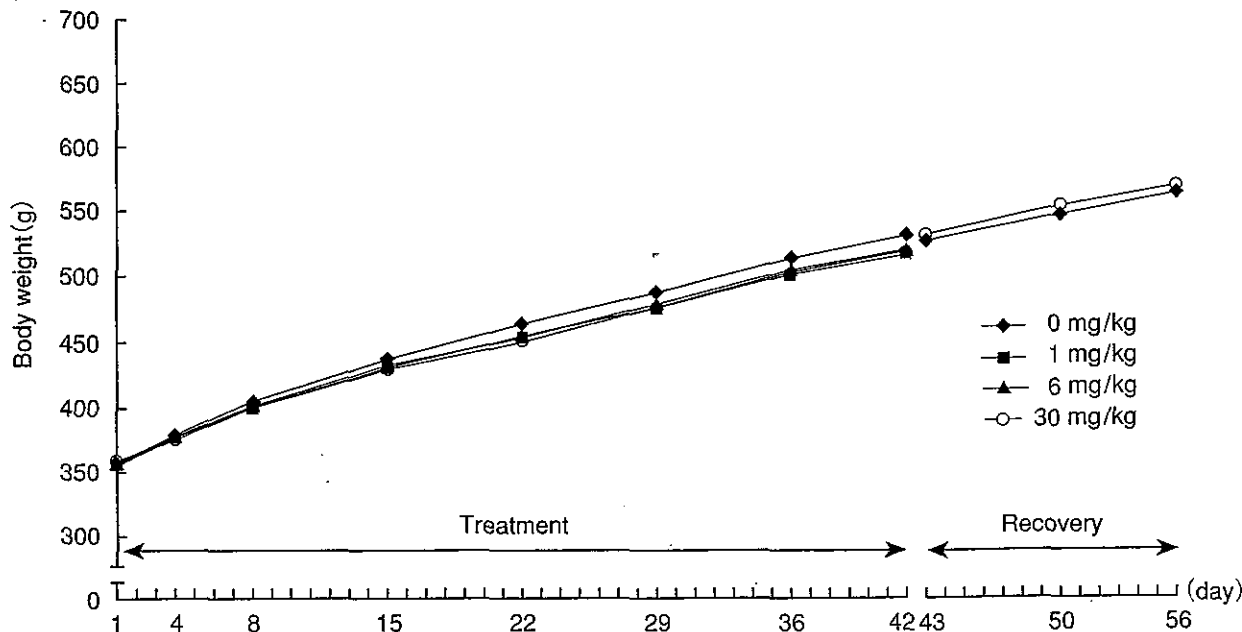


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

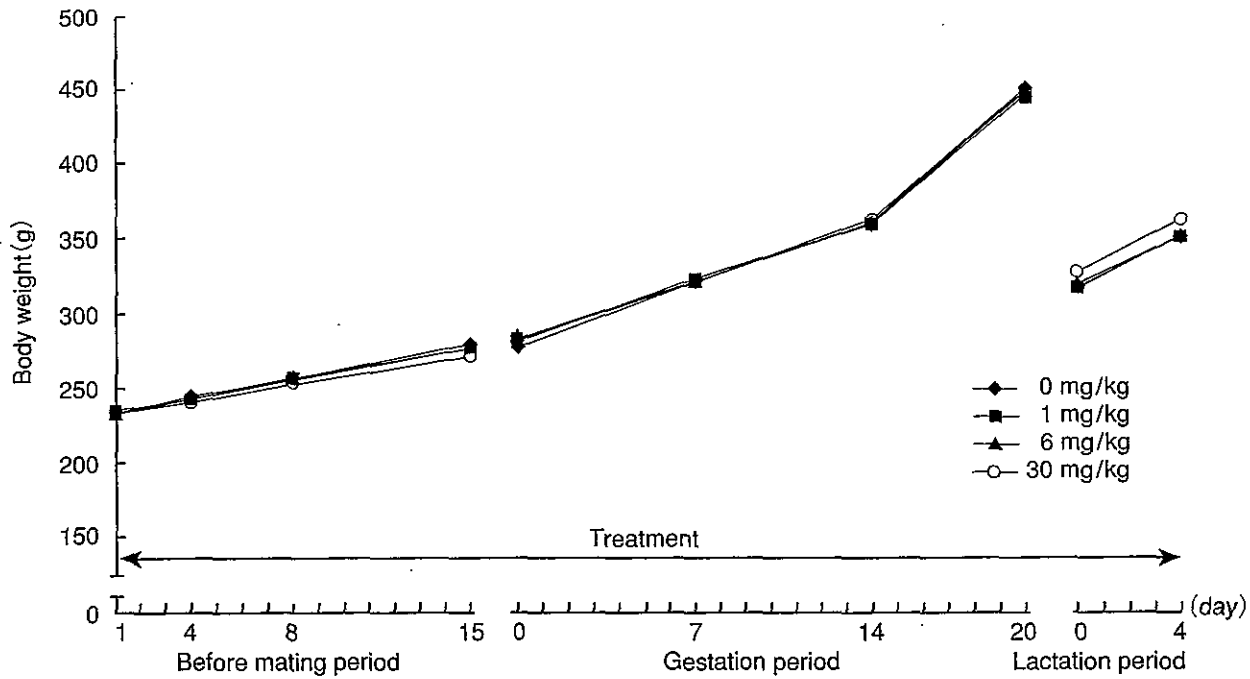


Fig. 2-1 Body weight changes of female rats treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

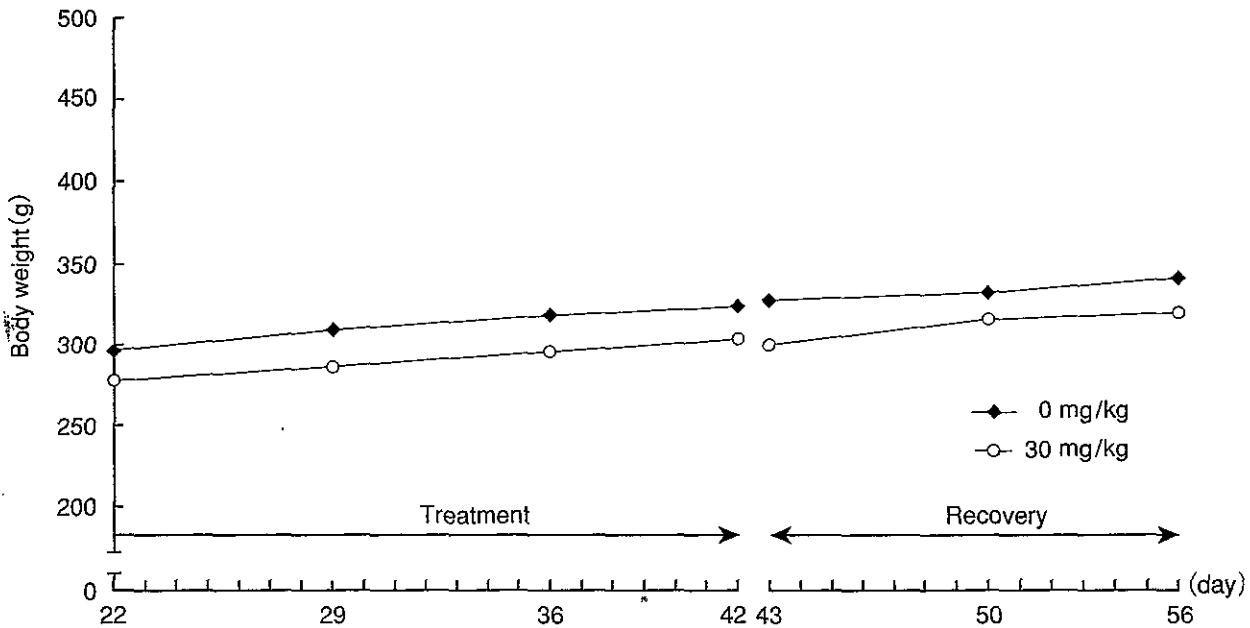


Fig. 2-2 Body weight changes of female rats (satellite animal) treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

変化はなかった。

1および6 mg/kg群の雌雄とも対照群との間に有意な差は認められなかった。

#### 6) 血液生化学検査 (Table 2)

被験物質の影響と考えられる変化が、30 mg/kg群の雄では投与終了後検査で総コレステロールの高値、グルコースの低値、さらに、回復終了後検査でも総コレステ

ロールの高値が認められた。30 mg/kg群の雌では投与終了後検査で総コレステロール、総蛋白およびアルブミンの高値が認められた。

また、30 mg/kg群の雄の回復終了後検査でALPの低値、同群の雌の投与終了後検査でGOTの低値が認められたが、これらの変化は減少方向であることから、毒性的意義に乏しい変化と考えられる。その他、1 mg/kg群の雄の投与終了後検査で総蛋白およびアルブミンの低



値, 30 mg/kg群の雄の回復終了後検査でアルブミンおよびA/G比の低値, 同群の雌の回復終了後検査でクレアチニンの低値が認められた。これらは用量に関連のないことや, 投与終了後検査ではみられていないことから, 被験物質とは関連のない偶発的な変化と判断した。

6 mg/kg群の雄, 1および6 mg/kg群の雌では対照群との間に有意な差は認められなかった。

#### 7) 雄の尿検査 (Table 3)

各被験物質投与群とも, 被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

#### 8) 器官重量 (Table 4)

被験物質の影響と考えられる変化が肝臓, 腎臓および脾臓で認められた。

雄の投与終了後検査では, 30 mg/kg群の肝臓と腎臓, ならびに6 mg/kg群の腎臓に絶対および相対重量の高値が認められた。回復終了後検査では, 30 mg/kg群の脾臓と腎臓に絶対および相対重量の高値が認められた。雌の投与終了後検査では, 30 mg/kg群の肝臓と脾臓に絶対および相対重量, 腎臓に相対重量の高値が認められた。回復終了後検査では変化は認められなかった。

その他, 投与終了後の検査では6 mg/kg群の雄で心臓の相対重量の高値, 回復終了後の検査では30 mg/kg群の雌で副腎の絶対重量の低値がみられた。しかし, 雄の心臓は30 mg/kg群で変化がないこと, 雌の副腎は投与終了後検査では変化がないことから被験物質と関連のないものと考えられる。

#### 9) 剖検所見

被験物質の影響と考えられる変化が雌雄の肝臓, 雄の腎臓および雌の脾臓に認められた。

肝臓の腫大が投与後解剖動物の30 mg/kg群の雄2例, 雌3例に認められた。回復後解剖動物では, この変化は認められなかった。腎臓の腫大が投与後解剖動物の1 mg/kg群の雄1例, 6 mg/kg群の雄2例, 30 mg/kg群の雄4例に認められた。回復後解剖動物でもこの変化は30 mg/kg群の雄2例に認められた。脾臓の腫大と暗赤色化が投与後解剖動物の30 mg/kg群の雌1例に認められた。回復後解剖動物ではこの変化は認められなかった。

瀕死期解剖動物では, 肺の全葉にわたる直径1.0~3.0 mmの褐色斑の散発, 肝臓の白色斑(内側左葉に2つ), 脾臓の腫大が認められた。

#### 10) 病理組織所見 (Table 5)

被験物質の影響と考えられる変化が雌雄の肝臓, 脾臓, 腎臓および雄の甲状腺, 雌の大腿骨骨髓に認められた。

肝臓: 小葉中心性肝細胞肥大が, 投与後解剖動物の6 mg/kg群の雄4例, 30 mg/kg群の雌雄全例に認められた。このうち, 30 mg/kg群の雄全例, 雌5例では中等度の変化を示した。この変化は回復後解剖動物では認められなかった。

脾臓(雄): ヘモジデリン沈着が, 投与後解剖動物の30

mg/kg群全例で認められた。この変化は回復後解剖動物では30 mg/kg群1例のみに認められた。なお, ヘモジデリンは, ベルリンブルー染色で青染することによって確認した。その他, 赤血球系髄外造血が投与後解剖動物の30 mg/kg群の1例で認められた。

脾臓(雌): 中等度の赤血球系髄外造血が, 投与後解剖動物の30 mg/kg群の5例で認められた。赤血球系髄外造血は, 対照群および1 mg/kg群の各3例, 6 mg/kg群の4例にも軽度認められたが, 30 mg/kg群の5例では程度が強かった。回復後解剖動物ではこの変化は認められなかったが, 30 mg/kg群全例でヘモジデリン沈着が認められた。

大腿骨骨髓(雌): 赤血球系造血細胞の増加が, 投与後解剖動物の6および30 mg/kg群の雌各4例に認められた。この変化は, 回復後解剖動物では認められなかった。

腎臓(雄): 近位尿細管上皮における硝子滴の軽度の発現が, 投与後解剖動物の対照群の2例および1 mg/kg群の5例, 中等度の発現が1 mg/kg群の2例, 6 mg/kg群の5例および30 mg/kg群の2例, 重度の発現が6 mg/kg群の1例および30 mg/kg群の5例に認められ, 投与群では対照群に比べて発現程度が増強していた。回復後解剖動物では, この変化は対照群の1例および30 mg/kg群の2例に軽度認められたのみで, 発現程度の増強は認められなかった。また, 好塩基性近位尿細管の軽度の発現が, 投与後解剖動物の対照群の1例, 1 mg/kg群の5例および6 mg/kg群の2例, 中等度の発現が1 mg/kg群の1例, 6 mg/kg群の4例および30 mg/kg群の5例, 重度の発現が30 mg/kg群の1例に認められ, 投与群では対照群に比べて発現程度が増強していた。回復後解剖動物においても, この変化は対照群で軽度の発現が1例だけに認められたのに対し, 30 mg/kg群では軽度の発現が1例, 中等度の発現が1例, 重度の発現が3例に認められ, 発現程度の増強が認められた。

腎臓(雌): 尿管上皮のリポフスチン沈着が, 投与後解剖動物の6および30 mg/kg群の各2例で認められた。この変化は回復後解剖動物では認められなかった。なお, リポフスチンはシュモール反応で青染することによって確認した。

甲状腺: 濾胞上皮の肥大が, 投与後解剖動物の30 mg/kg群の雄4例で認められ, うち1例では中等度の変化であった。この変化は回復後解剖動物では認められなかった。

瀕死期解剖(全出生児死亡)を行った30 mg/kg群の雌1例では, 衰弱原因と考えられる変化として, 子宮内膜炎, 肺の血管周囲性の浮腫および出血を伴う炎症細胞浸潤, 肝臓の炎症性細胞浸潤を伴う限局性肝細胞壊死が認められた。被験物質起因と判断したものと同質の変化として, 脾臓の赤血球系髄外造血, 大腿骨骨髓の赤血球系造血細胞の増加, 肝臓の小葉中心性肝細胞肥大, 腎臓のリポフスチン沈着が認められた。また, 衰弱に関連する非特異的变化として, 胸腺の萎縮が認められた。この他にもいくつかの変化が認められたが, ラットでは非特異的に発現する変化であることから偶発的な変化と判断した。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 生殖機能 (Table 6)

性周期検査では、4日周期を示した動物が対照群、1、6および30 mg/kg群でそれぞれ各群12例中、12、10、11および12例にみられ、被験物質投与による性周期の延長あるいは短縮は認められなかった。さらに、連続発情あるいは発情休止期の継続などの異常性周期を示す動物も認められなかった。

交尾は対照群の1対を除き各群の全例で成立し、交尾率、交尾所要日数、交尾成立までに逸した発情期の回数ともに被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。非妊娠の動物は6 mg/kg群の1例にみられただけで、受胎率にも被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

交尾しなかった雌雄、非妊娠雌ならびに相手雄のいずれにも生殖機能に影響を及ぼすと考えられる生殖器の異常は認められなかった。

### 2) 分娩・哺育状態 (Table 7)

妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出生率および分娩率のいずれにも被験物質投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

分娩開始から完了まで1.5日を要した動物が、30 mg/kg群の1例で認められた。哺育0日(分娩完了日)には娩出した児(雄2、雌10)のうち生存児は雄1例だけで、その後母動物は哺育行動を示さず、翌日には全出生児が死亡した。他の母動物に分娩および哺育行動の異常は認められなかった。

### 3) 新生児に及ぼす影響

#### (1) 新生児の観察 (Table 7)

出産児数、出生生児数、性比、出生率および新生児の4日生存率ともに被験物質投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。一般状態の観察では、被験物質に起因する異常は認められなかった。また、対照群を含む各群で出産児の外表面に異常は認められなかった。

#### (2) 体重 (Table 7)

雌雄の体重および体重増加量とも被験物質投与群に変化は認められなかった。

#### (3) 剖検

哺育4日の生存児の剖検および死亡児の剖検では、被験物質に起因する異常所見は認められなかった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

脾臓および大腿骨髄に対する影響として、脾臓重量の増加、脾臓の腫大と暗赤色化、病理組織検査では脾臓のヘモジデリン沈着および赤血球系髄外造血の増強が30 mg/kg群の雄あるいは雌でみられ、大腿骨髄の赤血球系造血細胞の増加が6 mg/kg以上の群の雌で認められた。骨髄における赤血球系造血細胞の増加は、出血、溶血性貧血、赤血球の酸素運搬能の低下あるいは赤血球

寿命の短縮などで引き起こされる<sup>3)</sup>。このような場合には、骨髄に加え脾臓においても髄外造血の発現がみられることが多い<sup>3)</sup>。投与後解剖動物の雌の対照群、1および6 mg/kg群に認められた軽度の髄外造血は、妊娠・出産による髄外造血の亢進と考えられるが<sup>4)</sup>、30 mg/kg群でみられた中等度の髄外造血は被験物質の影響によって増強した結果と考えられる。髄外造血は原因が除去されれば速やかに回復するとされている<sup>5)</sup>が、回復後解剖動物はいずれも非妊娠動物であるため、回復性は明らかではなかった。また、脾臓のヘモジデリン沈着は、溶血性貧血の際にしばしば認められる<sup>6)</sup>変化であり、被験物質により溶血性貧血を起こしている可能性が示唆された。造血系に関連すると考えられる血液学変化として、30 mg/kg群の雌雄で赤血球数の低値、雄でヘモグロビン濃度の低値、網赤血球数の高値など貧血を示唆する変化が認められた。被験物質が属する有機硫黄化合物のうち類似化合物であるジメチルジスルフィドをウサギの皮膚に投与した結果、上述の血液学変化と造血の亢進が認められている<sup>7)</sup>。回復終了後の検査では、雌雄とも脾臓のヘモジデリン沈着が消失することはなかった。

肝臓に対する影響として、肝臓重量の増加、腫大および小葉中心性肝細胞肥大が30 mg/kg群の雌雄でみられ、組織変化は6 mg/kg群の雄でも認められた。肝臓の小葉中心性肝細胞肥大は種々の化学物質の投与によってしばしば発現する変化で、一般に薬物代謝酵素誘導による生体の適応性変化と考えられている<sup>8,9)</sup>。この変化は、投薬を中止することで軽減するとされており<sup>9)</sup>、本試験でも、回復後解剖動物では認められなかった。血液生化学変化として、総コレステロールの高値およびグルコースの低値が30 mg/kg群の雄、総コレステロール、総蛋白およびアルブミンの高値が30 mg/kg群の雌で認められた。

腎臓に対する影響として、腎臓重量の増加が6および30 mg/kg群の雄、30 mg/kg群の雌、腎臓の腫大が1 mg/kg以上の群の雄で認められた。組織学的には雄で近位尿細管上皮における硝子滴の発現、好塩基性近位尿細管の発現、雌で尿細管上皮のリポフスチン沈着が認められた。腎臓の尿細管上皮へのリポフスチン沈着は、種々の薬物投与によって発現する変化であり、シュモール反応で陽性を示す<sup>10,11)</sup>。腎臓の近位尿細管における硝子滴は蛋白質が尿細管上皮に再吸収されることで発現し、特に雄ラットでは $\alpha_2$ グロブリンを含む硝子滴の発現が種々の化学物質によって増強することが知られている<sup>12)</sup>。回復後解剖動物における硝子滴の発現状況は、対照群と被験物質投与群で差はみられず、速やかな回復が認められた。また、硝子滴の増強に伴い、尿細管上皮の細胞死や再生、修復が起こることが知られており<sup>12)</sup>、本試験でも好塩基性尿細管の発現増強がみられた。特に、回復後解剖動物において病変の程度が増強していたが、硝子滴発現による尿細管上皮の傷害に対する再生像であり、回復に向かっていることを示す像であると考えられる。

甲状腺に対する影響として、濾胞上皮の肥大が30

mg/kg群の雄で認められた。甲状腺の濾胞上皮の肥大は、肝臓における酵素誘導に関連することが示唆されている<sup>13)</sup>。本試験では肝臓の小葉中心性肝細胞肥大を伴って、その二次的影響により濾胞上皮の肥大がみられたものと考えられる。

被験物質に起因するこれらの病理組織変化は、いずれも2週間の回復期間により消失するか、変化がみられても発現頻度および病変程度が明らかに軽減していることから、2週間で回復もしくはその傾向を示しているものと判断された。

## 2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能への影響を示唆する変化は認められなかった。

全出生児死亡が認められた30 mg/kg群の母動物1例は、分娩困難な状況が続きその延長で正常な哺育行動を示すことができなかつたものと考えられる。また、分娩困難に伴うと考えられる衰弱性の病理組織変化が認められた。妊娠動物では同じような状況の動物が稀にみられ、当研究所の過去10年間の背景データ(1994-2004)では全出生児死亡が3腹、分娩困難による母動物の死亡が1腹に認められている。また、本試験では他の母動物でも各検査において被験物質の影響がみられているが、本動物以外に分娩および哺育異常を示す母動物がいないことから、被験物質による異常とは考え難く、偶発的な変化の可能性が強いと考えられる。

この他、性周期、交尾率、受胎率、分娩率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率および出産率には被験物質に起因する変化は認められなかった。親雄動物には被験物質に起因する生殖機能への影響は認められなかった。

新生児の検査において出産児数、出生生児数、性比、出生率、新生児の4日生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。したがって、次世代の発育への影響はないと考えられる。

被験物質が属する有機硫黄化合物のうち類似化合物のジメチルジスルフィドをラットに吸入させ生殖発生毒性試験を行った結果、50 ppmで母体毒性が起こり、胎児の体重低下や骨化遅延が報告されている<sup>7)</sup>。吸入試験による50 ppmが経口投与でどの程度の用量となるか不明であるが、本試験条件下では次世代への影響は認められなかった。

以上のように、ジフェニルジスルフィドを反復経口投与した結果、一般毒性学的な主な変化として30 mg/kg群の雌雄で貧血性の変化、それに対する生体の反応として脾臓および大腿骨髄の造血亢進が認められた。さらに肝臓および腎臓でも変化がみられ、特に腎臓では1 mg/kg群の雄で近位尿細管上皮における硝子滴発現の増強が認められた。これら投与期間で認められた変化は2週間の回復期間により消失するか、変化がみられても発現頻度および病変程度が明らかに軽減し、回復傾向を示しているものと判断された。生殖発生毒性に及ぼす影

響は親動物ならびに新生児とも被験物質に起因する変化は認められなかった。したがって、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雄で1 mg/kg/day未満、雌で1 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄の親動物ならびに児動物のいずれも30 mg/kg/dayと考えられる。

## 文献

- 1) 有機合成化学協会(編):「有機化合物辞典」講談社, 東京(1985)p.428.
- 2) 平塚秀明ら:ジフェニルジスルフィドのラットを用いた経口投与による急性毒性試験. 化学物質毒性試験報告, 12:405-407(2005).
- 3) William F. Mackenzie, Bone marrow. In "Pathology of the Fischer rat", Gary A. Boorman, Scot L. Eustis, Michael R. Elwell, Charles A. Montgomery, Jr., William F. Mackenzie editors. San Diego, Academic Press(1990)pp.395-403.
- 4) Piersma AH, Verhoef A, Biesebeek J, Pieters MN, Slob W:Developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in the rat using a multiple dose study design. Reproductive Toxicology, 14:417-425 (2000).
- 5) Greaves P. Haemopoietic and Lymphatic Systems. Spleen:Extramedullary haemopoiesis, In "Histopathology of preclinical toxicity studies, editor. 2nd. ed." Greaves P, Amsterdam, Elsevier (2000)pp.114-115.
- 6) 大滝サチ:造血器, 非腫瘍性病変, 造血臓器の色素沈着. In:「毒性病理組織学」前川昭彦(責任編集), 日本毒性病理学会, 名古屋(2000)pp.394-395
- 7) Farr CH, Kirwin CJ Jr. 加茂谷裕子(訳):有機硫黄化合物, メルカプタン. In:「化学物質毒性ハンドブックVI」内藤裕史, 横手規子(監修), 丸善, 東京(2000)pp.3-18.
- 8) Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ, The liver: Morphological lesions in the liver. Hypertrophy. In: "Atlas of experimental toxicological pathology", Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ, editors, Lancaster, MTP Press(1987)p.53.
- 9) Greaves P. Digestive system 2. Liver: Hepatocellular hypertrophy and hyperplasia. In: "Histopathology of preclinical toxicity studies, 2nd. ed." Greaves P, editor, Amsterdam:Elsevier (2000)pp.445-452.
- 10) 渡辺満利, 西川秋佳:腎臓, 非腫瘍性病変, 色素沈着. In:「毒性病理組織学」前川昭彦(責任編集), 日本毒性病理学会, 名古屋(2000)p.252
- 11) Greaves P. Urinary system. Kidney, Pigment droplets, In: "Histopathology of preclinical toxicity studies. 2nd. ed." Greaves P, editor, Amsterdam, Elsevier (2000)pp.579-580.

- 12) Greaves P. Urinary system. Kidney, Hyaline droplets, *In*: "Histopathology of preclinical toxicity studies. 2nd. ed." Greaves P, editor, Amsterdam, Elsevier (2000)pp.575-579.
- 13) Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ. The endocrine glands, Thyroid, *In*: "Atlas of experimental toxicological pathology", Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ, editors, Lancaster, MTP Press (1987)pp.112-113.

連絡先

試験責任者: 星野信人  
試験担当者: 佐藤ゆかり, 藤代真弓, 小山 隆  
爰島洋子, 豊田直人  
(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Nobuhito Hoshino (Study director)  
Yukari Sato, Mayumi Fujishiro,  
Takashi Koyama, Hiroko Kokoshima,  
Naoto Toyota  
Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety  
Institute Ltd.  
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
Ibaraki, 314-0255, Japan  
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Hematological examination in rats treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	1	6	30	0	30
Male							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	RBC ( $\times 10^9/\mu\text{L}$ )	8.424 $\pm$ 0.224	8.190 $\pm$ 0.365	8.254 $\pm$ 0.372	7.960 $\pm$ 0.370	8.656 $\pm$ 0.189	7.962 $\pm$ 0.558*
	Hemoglobin (g/dL)	15.30 $\pm$ 0.23	14.82 $\pm$ 0.65	15.06 $\pm$ 0.67	14.48 $\pm$ 0.28	15.26 $\pm$ 0.50	14.18 $\pm$ 0.80*
	Hematocrit (%)	45.40 $\pm$ 0.54	43.98 $\pm$ 1.96	44.70 $\pm$ 2.15	43.62 $\pm$ 1.19	44.96 $\pm$ 1.84	42.36 $\pm$ 2.50
	Reticulocyte (%)	2.30 $\pm$ 0.58	2.60 $\pm$ 0.19	3.02 $\pm$ 0.57	3.80 $\pm$ 0.46**	2.70 $\pm$ 0.42	3.74 $\pm$ 0.90*
	MCV (fL)	53.92 $\pm$ 0.90	53.70 $\pm$ 1.42	54.14 $\pm$ 0.96	54.88 $\pm$ 1.65	51.94 $\pm$ 2.05	53.26 $\pm$ 1.13
	MCH (pg)	18.14 $\pm$ 0.32	18.12 $\pm$ 0.60	18.22 $\pm$ 0.15	18.22 $\pm$ 0.74	17.64 $\pm$ 0.61	17.82 $\pm$ 0.39
	MCHC (%)	33.62 $\pm$ 0.22	33.70 $\pm$ 0.32	33.66 $\pm$ 0.41	33.20 $\pm$ 0.41	33.96 $\pm$ 0.34	33.48 $\pm$ 0.29*
	Platelet ( $\times 10^9/\mu\text{L}$ )	1085.4 $\pm$ 113.4	1018.2 $\pm$ 95.8	1101.2 $\pm$ 80.2	1108.2 $\pm$ 63.6	1000.8 $\pm$ 77.6	1071.4 $\pm$ 62.5
	PT (sec)	18.52 $\pm$ 0.99	17.88 $\pm$ 1.01	17.66 $\pm$ 0.96	17.02 $\pm$ 1.37	18.58 $\pm$ 1.85	18.22 $\pm$ 2.49
	APTT (sec)	20.78 $\pm$ 1.17	19.72 $\pm$ 0.87	19.30 $\pm$ 0.75	20.12 $\pm$ 1.35	19.4 $\pm$ 1.05	18.00 $\pm$ 1.25
	WBC ( $\times 10^9/\mu\text{L}$ )	10.600 $\pm$ 4.840	8.764 $\pm$ 0.936	11.146 $\pm$ 2.421	10.202 $\pm$ 1.572	8.842 $\pm$ 3.155	11.090 $\pm$ 0.443
Female							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	RBC ( $\times 10^9/\mu\text{L}$ )	7.022 $\pm$ 0.690	7.190 $\pm$ 0.361	6.884 $\pm$ 0.310	6.274 $\pm$ 0.414	8.060 $\pm$ 0.453	7.490 $\pm$ 0.183*
	Hemoglobin (g/dL)	13.68 $\pm$ 1.03	13.86 $\pm$ 0.64	13.42 $\pm$ 0.51	12.56 $\pm$ 0.47	14.96 $\pm$ 0.74	14.28 $\pm$ 0.24
	Hematocrit (%)	40.58 $\pm$ 2.67	40.86 $\pm$ 1.94	39.64 $\pm$ 1.93	37.68 $\pm$ 1.13	42.84 $\pm$ 2.17	40.98 $\pm$ 0.72
	Reticulocyte (%)	7.06 $\pm$ 2.45	6.96 $\pm$ 1.99	7.96 $\pm$ 1.96	9.74 $\pm$ 1.96	2.22 $\pm$ 0.35	2.42 $\pm$ 0.43
	MCV (fL)	57.96 $\pm$ 2.59	56.86 $\pm$ 0.99	57.62 $\pm$ 1.36	60.22 $\pm$ 2.38	53.18 $\pm$ 1.29	54.72 $\pm$ 1.55
	MCH (pg)	19.50 $\pm$ 0.54	19.28 $\pm$ 0.42	19.48 $\pm$ 0.47	20.02 $\pm$ 0.77	18.54 $\pm$ 0.65	19.12 $\pm$ 0.47
	MCHC (%)	33.66 $\pm$ 0.63	33.92 $\pm$ 0.45	33.78 $\pm$ 0.76	33.24 $\pm$ 0.42	34.90 $\pm$ 0.46	34.88 $\pm$ 0.36
	Platelet ( $\times 10^9/\mu\text{L}$ )	1179.4 $\pm$ 159.7	1206.2 $\pm$ 191.3	1089.4 $\pm$ 54.9	1198.0 $\pm$ 150.6	1021.6 $\pm$ 130.9	1054.4 $\pm$ 97.9
	PT (sec)	17.32 $\pm$ 0.54	17.12 $\pm$ 0.34	17.16 $\pm$ 0.33	16.62 $\pm$ 0.62	16.22 $\pm$ 0.73	16.58 $\pm$ 0.70
	APTT (sec)	16.36 $\pm$ 1.24	15.62 $\pm$ 0.56	16.08 $\pm$ 0.62	16.00 $\pm$ 0.89	15.44 $\pm$ 1.28	15.34 $\pm$ 1.42
	WBC ( $\times 10^9/\mu\text{L}$ )	8.252 $\pm$ 2.460	9.388 $\pm$ 1.966	7.384 $\pm$ 0.695	9.450 $\pm$ 1.494	5.056 $\pm$ 0.831	5.250 $\pm$ 0.654

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 2 Blood chemical examination in rats treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	1	6	30	0	30
<b>Male</b>							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	GOT (U/L)	116.0 ± 22.3	111.8 ± 17.0	105.8 ± 28.2	100.4 ± 9.9	142.4 ± 12.7	129.4 ± 30.1
	GPT (U/L)	32.2 ± 5.2	29.0 ± 2.7	32.4 ± 6.4	34.8 ± 8.8	39.2 ± 6.3	33.8 ± 15.0
	γ-GT (U/L)	2.0 ± 0.7	2.0 ± 0.7	2.2 ± 0.4	2.8 ± 0.4	1.6 ± 0.5	1.8 ± 1.1
	ALP (U/L)	336.0 ± 71.3	335.2 ± 43.1	345.8 ± 82.6	251.2 ± 48.3	376.8 ± 55.4	268.4 ± 23.4**
	Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.08 ± 0.04	0.10 ± 0.00	0.06 ± 0.05
	Urea nitrogen (mg/dL)	12.22 ± 2.56	12.00 ± 1.66	13.08 ± 1.65	13.36 ± 1.67	13.28 ± 2.28	14.84 ± 1.69
	Creatinine (mg/dL)	0.24 ± 0.05	0.24 ± 0.05	0.24 ± 0.05	0.30 ± 0.00	0.28 ± 0.04	0.24 ± 0.05
	Glucose (mg/dL)	126.4 ± 5.1	125.6 ± 9.4	123.6 ± 15.1	99.6 ± 6.9**	123.0 ± 5.6	125.0 ± 8.0
	Total chol. (mg/dL)	59.0 ± 13.8	58.2 ± 4.8	72.2 ± 13.4	95.8 ± 22.8**	51.2 ± 7.5	74.8 ± 12.1**
	Triglyceride (mg/dL)	22.8 ± 7.6	22.4 ± 8.4	21.2 ± 9.2	24.8 ± 7.4	33.8 ± 20.5	29.60 ± 17.4
	Total protein (g/dL)	7.06 ± 0.32	6.50 ± 0.36*	6.72 ± 0.32	7.20 ± 0.28	6.76 ± 0.21	6.62 ± 0.31
	Albumin (g/dL)	3.12 ± 0.13	2.94 ± 0.05*	3.04 ± 0.13	3.18 ± 0.04	3.22 ± 0.11	2.94 ± 0.11**
	A/G ratio	0.794 ± 0.018	0.834 ± 0.068	0.822 ± 0.044	0.806 ± 0.059	0.902 ± 0.023	0.810 ± 0.073*
	Calcium (mg/dL)	10.12 ± 0.36	9.74 ± 0.26	9.96 ± 0.21	10.14 ± 0.21	9.80 ± 0.31	9.58 ± 0.26
	Inorganic phos. (mg/dL)	7.94 ± 0.21	7.96 ± 0.32	7.92 ± 0.42	8.44 ± 0.29	7.82 ± 0.68	7.88 ± 0.70
	Na (mmol/L)	146.8 ± 1.1	146.2 ± 0.8	146.4 ± 1.3	146.6 ± 0.9	147.0 ± 0.0	147.8 ± 1.1
	K (mmol/L)	4.78 ± 0.56	4.64 ± 0.15	4.78 ± 0.08	4.66 ± 0.17	4.58 ± 0.33	4.76 ± 0.26
	Cl (mmol/L)	106.2 ± 2.2	107.6 ± 0.5	107.4 ± 1.5	105.8 ± 1.1	105.6 ± 0.9	105.4 ± 1.1
<b>Female</b>							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	GOT (U/L)	149.4 ± 13.8	139.2 ± 16.7	153.2 ± 13.1	120.6 ± 20.1*	164.6 ± 44.8	133.4 ± 21.9
	GPT (U/L)	60.6 ± 11.8	57.0 ± 14.3	71.2 ± 13.1	59.2 ± 7.6	40.0 ± 15.6	35.4 ± 5.4
	γ-GT (U/L)	1.6 ± 0.9	2.6 ± 0.9	2.2 ± 0.8	2.4 ± 0.5	2.0 ± 0.0	1.6 ± 0.5
	ALP (U/L)	235.2 ± 63.0	211.4 ± 46.9	242.4 ± 95.0	247.4 ± 60.7	207.2 ± 60.6	170.2 ± 32.8
	Total bilirubin (mg/dL)	0.06 ± 0.05	0.10 ± 0.00	0.08 ± 0.04	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
	Urea nitrogen (mg/dL)	19.50 ± 0.93	17.94 ± 2.99	22.24 ± 2.26	20.14 ± 1.07	17.80 ± 2.76	16.98 ± 4.18
	Creatinine (mg/dL)	0.32 ± 0.04	0.32 ± 0.04	0.32 ± 0.04	0.30 ± 0.00	0.40 ± 0.00	0.32 ± 0.04*
	Glucose (mg/dL)	119.2 ± 9.0	118.8 ± 4.3	117.8 ± 13.9	121.0 ± 5.9	122.8 ± 8.6	123.6 ± 7.1
	Total chol. (mg/dL)	61.0 ± 12.9	64.4 ± 14.1	67.0 ± 11.3	86.4 ± 12.5*	68.8 ± 15.4	77.4 ± 16.2
	Triglyceride (mg/dL)	58.4 ± 23.7	59.0 ± 25.7	69.6 ± 42.9	90.8 ± 27.9	16.8 ± 6.6	12.8 ± 1.6
	Total protein (g/dL)	7.22 ± 0.54	7.26 ± 0.31	7.30 ± 0.25	7.96 ± 0.30*	7.42 ± 0.29	7.12 ± 0.51
	Albumin (g/dL)	3.26 ± 0.24	3.32 ± 0.13	3.44 ± 0.09	3.64 ± 0.19**	3.62 ± 0.22	3.50 ± 0.22
	A/G ratio	0.830 ± 0.074	0.852 ± 0.037	0.896 ± 0.048	0.852 ± 0.047	0.964 ± 0.062	0.976 ± 0.050
	Calcium (mg/dL)	10.46 ± 0.47	10.58 ± 0.46	10.60 ± 0.44	11.18 ± 0.30	9.58 ± 0.22	9.78 ± 0.40
	Inorganic phos. (mg/dL)	8.80 ± 1.10	8.68 ± 1.10	9.04 ± 0.94	9.46 ± 0.71	6.32 ± 0.29	6.64 ± 0.67
	Na (mmol/L)	143.8 ± 1.1	144.4 ± 1.5	144.2 ± 1.8	144.6 ± 1.7	146.4 ± 0.5	146.8 ± 0.4
	K (mmol/L)	4.74 ± 0.22	4.66 ± 0.24	4.68 ± 0.31	4.48 ± 0.23	4.12 ± 0.28	4.14 ± 0.23
	Cl (mmol/L)	104.6 ± 1.5	105.0 ± 1.6	106.6 ± 1.8	104.6 ± 1.9	107.2 ± 1.1	108.4 ± 0.5

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

Table 3 Urinalysis of male rats treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period			
		0	1	6	30
Male					
Number of animals		5	5	5	5
pH	5.0	0	0	0	0
	5.5	0	0	0	0
	6.0	0	0	0	0
	6.5	0	0	0	0
	7.0	0	0	0	0
	7.5	0	1	0	0
	8.0	1	1	1	2
	8.5	4	3	4	3
	>=9	0	0	0	0
Protein	-	0	0	0	0
	+/-	2	3	0	1
	1+	2	1	4	1
	2+	1	1	1	3
	3+	0	0	0	0
Glucose	-	5	5	5	5
	+/-	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0
Ketones	-	0	0	0	0
	+/-	2	1	0	2
	1+	3	3	4	3
	2+	0	1	1	0
	3+	0	0	0	0
Bilirubin	-	5	5	5	5
	1+	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0
Occult blood	-	4	5	5	5
	+/-	0	0	0	0
	1+	1	0	0	0
	2+	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0
Urobilinogen (EU/dL)	0.1	4	3	5	2
	1.0	1	2	0	3
	2.0	0	0	0	0
	4.0	0	0	0	0
	>=8.0	0	0	0	0

Grade; -:negative, +/-:trace, 1+:slight, 2+:moderate, 3+:severe  
Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$

Table 4 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	1	6	30	0	30
<b>Male</b>							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	Final body weight (g)	497.7 ± 23.2(7)	482.1 ± 36.0(12)	486.3 ± 35.3(12)	474.4 ± 42.8(7)	523.2 ± 39.9	531.6 ± 41.3
	Absolute organ weight						
	Brain (g)	2.196 ± 0.048	2.120 ± 0.109	2.132 ± 0.121	2.094 ± 0.027	2.192 ± 0.095	2.220 ± 0.045
	Thymus (mg)	393.6 ± 160.9	319.8 ± 90.0	337.4 ± 81.9	319.8 ± 93.1	321.2 ± 71.4	379.8 ± 101.3
	Heart (g)	1.464 ± 0.132	1.500 ± 0.037	1.638 ± 0.135	1.502 ± 0.139	1.628 ± 0.189	1.716 ± 0.096
	Liver (g)	12.656 ± 1.542	12.428 ± 1.188	12.978 ± 0.948	15.858 ± 1.366**	13.640 ± 2.262	14.546 ± 1.480
	Spleen (g)	0.840 ± 0.165	0.806 ± 0.059	0.924 ± 0.073	0.874 ± 0.074	0.778 ± 0.078	1.006 ± 0.144*
	Kidneys (g)	3.462 ± 0.392	3.774 ± 0.329	4.346 ± 0.286*	4.368 ± 0.790*	3.672 ± 0.332	4.714 ± 0.528**
	Adrenals (mg)	71.50 ± 9.70	75.90 ± 9.19	73.56 ± 5.22	72.48 ± 10.32	65.8 ± 9.35	74.92 ± 5.85
	Testes (g)	3.441 ± 0.599	3.428 ± 0.213	3.466 ± 0.515	3.237 ± 0.434	3.500 ± 0.214	3.692 ± 0.386
	Epididymis (g)	1.246 ± 0.197	1.323 ± 0.103	1.289 ± 0.192	1.240 ± 0.212	1.342 ± 0.121	1.408 ± 0.142
	Relative organ weight						
	Brain (g%)	0.444 ± 0.026	0.432 ± 0.037	0.448 ± 0.013	0.450 ± 0.044	0.420 ± 0.026	0.420 ± 0.034
	Thymus (mg%)	79.46 ± 31.64	64.58 ± 14.43	70.60 ± 15.28	68.38 ± 19.32	61.08 ± 11.68	70.8 ± 14.44
	Heart (g%)	0.290 ± 0.023	0.306 ± 0.025	0.344 ± 0.015**	0.322 ± 0.027	0.312 ± 0.044	0.326 ± 0.028
	Liver (g%)	2.538 ± 0.195	2.534 ± 0.108	2.726 ± 0.109	3.396 ± 0.256**	2.596 ± 0.263	2.736 ± 0.172
	Spleen (g%)	0.168 ± 0.026	0.162 ± 0.013	0.194 ± 0.009	0.188 ± 0.013	0.148 ± 0.008	0.188 ± 0.018**
	Kidneys (g%)	0.694 ± 0.046	0.770 ± 0.029	0.916 ± 0.068**	0.930 ± 0.105**	0.704 ± 0.072	0.888 ± 0.106*
	Adrenals (mg%)	14.38 ± 1.76	15.50 ± 2.02	15.52 ± 1.53	15.48 ± 1.59	12.52 ± 0.97	14.22 ± 1.90
	Testes (g%)	0.691 ± 0.119	0.717 ± 0.085	0.718 ± 0.130	0.690 ± 0.114	0.672 ± 0.061	0.700 ± 0.092
	Epididymis (g%)	0.253 ± 0.041	0.277 ± 0.036	0.268 ± 0.051	0.261 ± 0.043	0.260 ± 0.034	0.264 ± 0.030
<b>Female</b>							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	Final body weight (g)	317.6 ± 12.1	311.8 ± 20.3	299.6 ± 24.4	318.2 ± 8.7	318.6 ± 10.3	298.0 ± 15.7*
	Absolute organ weight						
	Brain (g)	1.948 ± 0.145	1.956 ± 0.098	1.976 ± 0.051	1.914 ± 0.068	2.028 ± 0.100	1.960 ± 0.078
	Thymus (mg)	280.4 ± 46.3	235.6 ± 45.5	192.4 ± 50.3	252.6 ± 84.2	325.0 ± 65.0	306.8 ± 29.4
	Heart (g)	1.076 ± 0.123	0.998 ± 0.086	1.024 ± 0.059	1.060 ± 0.064	1.030 ± 0.080	0.990 ± 0.063
	Liver (g)	10.974 ± 0.533	10.714 ± 0.898	10.864 ± 1.124	13.646 ± 0.858**	8.354 ± 0.673	8.100 ± 0.342
	Spleen (g)	0.616 ± 0.111	0.710 ± 0.182	0.618 ± 0.109	0.846 ± 0.049*	0.604 ± 0.104	0.592 ± 0.052
	Kidneys (g)	2.196 ± 0.174	2.122 ± 0.223	2.082 ± 0.213	2.452 ± 0.159	2.124 ± 0.113	2.214 ± 0.307
	Adrenals (mg)	81.06 ± 10.93	89.84 ± 8.53	77.58 ± 11.44	77.10 ± 8.60	86.12 ± 10.34	72.56 ± 5.86*
	Relative organ weight						
	Brain (g%)	0.614 ± 0.063	0.630 ± 0.039	0.662 ± 0.044	0.602 ± 0.038	0.638 ± 0.031	0.658 ± 0.029
	Thymus (mg%)	88.48 ± 16.06	75.14 ± 10.19	63.52 ± 11.42	78.94 ± 25.01	101.96 ± 19.40	102.96 ± 8.30
	Heart (g%)	0.338 ± 0.029	0.320 ± 0.010	0.342 ± 0.026	0.332 ± 0.013	0.320 ± 0.020	0.332 ± 0.015
	Liver (g%)	3.454 ± 0.128	3.434 ± 0.146	3.626 ± 0.211	4.290 ± 0.268**	2.620 ± 0.182	2.720 ± 0.100
	Spleen (g%)	0.192 ± 0.027	0.224 ± 0.046	0.206 ± 0.030	0.266 ± 0.015**	0.186 ± 0.029	0.198 ± 0.013
	Kidneys (g%)	0.690 ± 0.043	0.680 ± 0.033	0.694 ± 0.026	0.772 ± 0.050*	0.666 ± 0.029	0.740 ± 0.082
	Adrenals (mg%)	25.60 ± 3.91	28.98 ± 4.13	25.98 ± 4.14	24.22 ± 2.63	27.02 ± 2.97	24.38 ± 1.91

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$



Table 5 Histopathological findings in rats treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
			0	1	6	30	1	30
	Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5
Male		(Grade)	<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Degeneration, myocardium, focal	1+	0			2		
	Mandibular lymph node		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Mesenteric lymph node		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Thymus		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Spleen		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
	Extramedullary hematopoiesis, erythrocytic	1+	0	0	0	1	0	0
	Hemosiderin deposition	1+	0	0	0	5**	0	1
	Bone marrow (femur)		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Trachea		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Lung		<5>	<0>	<0>	<5>	<1>	<0>
	Accumulation, foam cell	1+	1			2	0	
	Hemorrhage, focal	1+	1			0	0	
	Stomach		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Duodenum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Jejunum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Ileum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Cecum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Hyperplasia, mucosal epithelium, diffuse	1+	1			0		
	Inflammatory cell infiltration, diffuse	1+	1			0		
	Colon		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Erosion	1+	1			0		
	Rectum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Liver		<5>	<6>	<5>	<7>	<5>	<5>
	Fatty change, hepatocyte, focal	1+	0	1	0	1	0	0
	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	1+	0	0	4**	0**	0	0
		2+	0	0	0	7	0	0
	Inflammatory cell infiltration, focal	1+	2	2	1	2	3	4
	Microgranuloma	1+	0	0	1	1	0	0
	Necrosis, focal	1+	0	0	1	1	0	0
	Kidney		<5>	<7>	<6>	<7>	<5>	<5>
	Basophilic tubule, proximal	1+	1	5*	2**	0**	1	1**
		2+	0	1	4	5	0	1
		3+	0	0	0	1	0	3
	Cast, hyaline	1+	0	0	1	0	0	1
	Cast, proteinous	1+	0	0	0	0	1	0
	Cyst	1+	1	0	0	0	0	0
	Dilatation, tubule, proximal	1+	0	1	1	1	0	2
	Hyaline droplet, tubular epithelium, proximal	1+	2	5*	0**	0**	1	2
		2+	0	2	5	2	0	0
		3+	0	0	1	5	0	0
	Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, interstitium, focal	1+	0	0	1	0	0	1
	Mineralization, medulla	1+	0	1	0	0	0	0

&lt;&gt;: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 5 (Continued)

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
			0	1	6	30	1	30
	Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5
Male		(Grade)						
	Urinary bladder		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, focal	1+	0			1		
	Testis		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Atrophy, seminiferous tubule, diffuse	1+	1			0		
	Multinucleated giant cell, seminiferous tubule, focal	1+	1			0		
	Epididymis		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Cell debris, lumen	1+	1			0		
	Seminal vesicle		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Prostate		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, diffuse	1+	2			1		
	Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, focal	1+	1			2		
	Pituitary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Thyroid		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
	Hypertrophy, follicular cell	1+	0	0	0	3*	0	0
		2+	0	0	0	1	0	0
	Ultimobranchial remnant	1+	2	3	2	2	5	1
	Parathyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Adrenal		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Accessory adrenocortical tissue	1+	1			0		
	Increase in lipid droplet, fascicular zone	1+	0			1		
	Brain		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Spinal cord		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Sciatic nerve		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 5 (Continued)

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period		Total litter loss
			0	1	6	30	0	30	
	Finding	Number of animals	12	12	12	11	5	5	30
			12	12	12	11	5	5	1
Female		(Grade)							
	Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Mandibular lymph node		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Mesenteric lymph node		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Thymus		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Cyst	1+	1			2			0
	Atrophy	1+	0			0			1
	Spleen		<5>	<5>	<5>	<6>	<5>	<5>	<1>
	Extramedullary hematopoiesis, erythrocytic	1+	3	3	4	1**	1	0	0
		2+	0	0	0	5	0	0	1
	Hemosiderin deposition	1+	0	0	0	0	0	5**	0
	Bone marrow (femur)		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<1>
	Increase in hematopoietic cell, erythrocytic	1+	0	0	4**	4**	0	0	1
	Trachea		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Lung		<5>	<0>	<0>	<6>	<0>	<0>	<1>
	Accumulation, foam cell	1+	0			0			1
	Edema, perivascular tissue	2+	0			0			1
	Hemorrhage, focal	1+	1			1			1
	Inflammatory cell infiltration, perivascular	2+	0			0			1
	Stomach		<5>	<0>	<2>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Erosion, glandular stomach	1+	0		1	0			0
	Hyperkeratosis	1+	0		0	1			0
	Hyperplasia, squamous, forestomach, focal	1+	0		1	0			0
	Inflammatory cell infiltration, forestomach, focal	1+	0		1	0			0
	Duodenum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Jejunum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Ileum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Cecum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Hyperplasia, mucosal epithelium, diffuse	1+	0			1			0
	Colon		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Rectum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Liver		<5>	<5>	<5>	<7>	<5>	<5>	<1>
	Extramedullary hematopoiesis	1+	0	0	0	1	0	0	1
	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	1+	0	0	0	2**	0	0	1
		2+	0	0	0	5	0	0	0
	Inflammatory cell infiltration, focal	1+	1	0	0	3	1	1	1
	Microgranuloma	1+	0	1	1	1	2	3	0
	Pigment deposition	1+	0	0	0	0	0	1	0
	Necrosis, focal	1+	0	0	1	0	0	0	1

&lt;&gt;: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ 

\*:-

Table 5 (Continued)

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period		Total litter loss
			0	1	6	30	0	30	
	Finding	Number of animals	12	12	12	11	5	5	30
Female		(Grade)							
	Kidney		<5>	<6>	<5>	<5>	<5>	<5>	<1>
	Basophilic tubule, proximal	1+	1	0	0	2	0	1	0
	Cast, hyaline	1+	0	0	0	1	0	0	0
	Cyst	1+	1	1	0	0	0	0	0
	Dilatation, pelvis	1+	0	1	0	0	0	1	0
	Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, interstitium, focal	1+	0	0	0	0	2	1	0
	Inflammatory cell infiltration, focal	1+	0	1	0	0	0	0	0
	Lipofuscin deposition, tubular epithelium	1+	0	0	2	2	0	0	1
	Mineralization, corticomedullary junction	1+	0	1	0	0	0	0	0
	Mineralization, medulla	1+	1	0	2	0	1	0	0
	Pyelonephritis	1+	0	0	0	0	0	1	0
	Urinary bladder		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Edema	1+	0			1			0
	Erosion	1+	0			1			0
	Inflammatory cell infiltration, focal	1+	0			1			0
	Ovary		<5>	<0>	<1>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Uterus		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Endometritis	1+	0			0			1
	Vagina		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Mammary gland		<0>	<0>	<0>	<0>			<1>
	Pituitary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Cystic dilatation, Rathke's pouch	1+	1			3			0
	Thyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Ultimobranchial remnant	1+	1			0			1
	Parathyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Adrenal		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Brain		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Spinal cord		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>
	Sciatic nerve		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>

<>: Number of animals examined.

Grade, 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Table 6 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period			
		0	1	6	30
		12	12	12	12
		4.00 ± 0.00	4.17 ± 0.33	4.04 ± 0.14	4.00 ± 0.00
		0/12	0/12	0/12	0/12
		11	12	12	12
		91.7	100.0	100.0	100.0
		11	12	11	12
		100.0	100.0	91.7	100.0
		2.2 ± 1.1	2.3 ± 1.3	2.5 ± 1.1	2.7 ± 1.1
		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

a) Mating index (%) = (Number of pairs with successful mating/number of pairs examined) × 100

b) Fertility index (%) = (Number of pregnant animals/number of pairs with successful mating) × 100

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ 

Table 7 Delivery and litter data in rats treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period			
		0	1	6	30
		11	12	11	12
		11	12	11	12
		100.0	100.0	100.0	100.0
		22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.3 ± 0.5
		17.8 ± 1.2	17.6 ± 2.2	18.0 ± 1.8	17.7 ± 4.6
		17.0 ± 1.1	16.6 ± 2.2	17.2 ± 1.3	16.2 ± 4.5
		95.42 ± 2.29	94.38 ± 5.40	95.76 ± 4.87	90.28 ± 8.94
		93.87 ± 7.79	95.00 ± 4.63	91.69 ± 6.42	94.23 ± 7.66
		16.0 ± 1.9	15.8 ± 2.1	15.7 ± 1.3	15.2 ± 4.3
		15.8 ± 1.9	15.8 ± 2.1	15.5 ± 1.2	14.2 ± 6.0
		98.90 ± 2.45	100.00 ± 0.00	98.90 ± 2.45	92.31 ± 26.64
		0.80 (78/98)	1.05 (97/92)	1.01 (87/86)	0.87 (84/97)
		15.5 ± 2.1	15.3 ± 1.8	15.4 ± 1.1	13.2 ± 5.7
		97.76 ± 5.74	97.62 ± 2.95	98.90 ± 2.45	86.38 ± 27.97
	on day 0				
	male	6.9 ± 0.6	6.9 ± 0.7	6.8 ± 0.7	6.4 ± 0.8
	female	6.5 ± 0.6	6.5 ± 0.7	6.4 ± 0.6	6.2 ± 0.7
	on day 4				
	male	10.5 ± 1.4	10.3 ± 1.2	10.0 ± 1.2	9.5 ± 1.7
	female	10.1 ± 1.2	9.8 ± 1.3	9.5 ± 1.2	8.8 ± 1.5
	day 0 to 4				
	male	3.6 ± 1.0	3.4 ± 0.6	3.2 ± 0.8	3.0 ± 1.1
	female	3.5 ± 0.8	3.3 ± 0.7	3.1 ± 0.7	2.6 ± 0.9

a) Gestation index (%) = (Number of females with live pups/number of pregnant females) × 100

b) Implantation index (%) = (Number of implantation sites/number of corpora lutea) × 100

c) Delivery index (%) = (Number of pups delivered/number of implantation sites) × 100

d) Live birth index (%) = (Number of live pups on day 0/number of pups delivered) × 100

e) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4/number of live pups on day 0) × 100

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

## 2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

### Reverse Mutation Test of 2-Amino-5-methylbenzenesulfonic acid on Bacteria

#### 要約

既存化学物質安全性調査事業の一環として、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸について、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および本試験を行った。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無添加試験および添加試験のいずれも抗菌性は認められなかった。したがって、本試験ではS9 mix無添加試験および添加試験を313~5000 µg/プレートの範囲で用量を設定して実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても溶媒対照値の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ことから、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸は、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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>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、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-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸(CAS No. 88-44-8)は、分子量187.22の微黄白色粉末である。試験

には、三星化学業(株)製[ロット番号:4231, 純度98%以上(不純物:パラトルイジン200 ppm程度)]を、(株)日本化学工業協会から供与され、使用時まで冷蔵保管し、使用した。

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸は、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解性がよいことから、DMSOに50 mg/mlになるように溶解した後、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。

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の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、本試験IIで調製した低濃度(3.13 mg/ml)溶液および高濃度(50.0 mg/ml)溶液について、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、99.3および100%であった。また、含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、高濃度は99.4%、低濃度は100%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-ピオチン	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、被験物質調製液0.1 ml、リン酸緩衝液0.5 ml (S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 ml)、検定菌液0.1 mlおよびトップアガー2 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使用溶媒、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℃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〕

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸について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、すべての検定菌においてS9 mix無添加試験および添加試験のいずれも抗菌性は認められなかった。

〔本試験〕

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸について、2回の本試験の結果をそれぞれTable 1, 2に示した。用量を、S9 mix無添加試験および添加試験とともに313~5000 μg/プレートの範囲で公比を2として試験を実施した。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-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸は、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *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：原 巧, 坂本京子, 川上久美子,  
 清水ゆり, 松木容彦, 中込まどか,  
 阿部昌弘

(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)  
 Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,  
 Kumiko Kawakami, Yuri Shimizu,  
 Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi  
 and Masahiro Abe  
 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. Mutagenicity of 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid\*\* 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	
S9 mix (-)	0	97 114 127 (113 $\pm$ 15.0)	11 18 9 (13 $\pm$ 4.7)	29 21 23 (24 $\pm$ 4.2)	28 14 21 (21 $\pm$ 7.0)	11 14 9 (11 $\pm$ 2.5)	
	313	122 121 93 (112 $\pm$ 16.5)	15 18 21 (18 $\pm$ 3.0)	35 27 38 (33 $\pm$ 5.7)	25 25 35 (28 $\pm$ 5.8)	13 11 13 (12 $\pm$ 1.2)	
	625	95 114 112 (107 $\pm$ 10.4)	11 11 6 (9 $\pm$ 2.9)	30 23 22 (25 $\pm$ 4.4)	11 21 34 (22 $\pm$ 11.5)	4 12 13 (10 $\pm$ 4.9)	
	1250	110 110 98 (106 $\pm$ 6.9)	16 15 14 (15 $\pm$ 1.0)	25 21 30 (25 $\pm$ 4.5)	28 26 20 (25 $\pm$ 4.2)	9 16 9 (11 $\pm$ 4.0)	
	2500	97 106 108 (104 $\pm$ 5.9)	17 12 12 (14 $\pm$ 2.9)	25 23 17 (22 $\pm$ 4.2)	29 23 14 (22 $\pm$ 7.5)	13 11 12 (12 $\pm$ 1.0)	
	5000	114 133 114 (120 $\pm$ 11.0)	4 20 19 (14 $\pm$ 9.0)	28 27 25 (27 $\pm$ 1.5)	20 36 28 (28 $\pm$ 8.0)	13 7 10 (10 $\pm$ 3.0)	
S9 mix (+)	0	124 127 132 (128 $\pm$ 4.0)	15 12 12 (13 $\pm$ 1.7)	28 27 23 (26 $\pm$ 2.6)	27 32 44 (34 $\pm$ 8.7)	18 7 9 (11 $\pm$ 5.9)	
	313	148 122 126 (132 $\pm$ 14.0)	10 10 18 (13 $\pm$ 4.6)	24 22 22 (23 $\pm$ 1.2)	38 47 42 (42 $\pm$ 4.5)	9 8 15 (11 $\pm$ 3.8)	
	625	124 127 130 (127 $\pm$ 3.0)	18 14 7 (13 $\pm$ 5.6)	18 33 33 (28 $\pm$ 8.7)	34 46 28 (36 $\pm$ 9.2)	12 9 13 (11 $\pm$ 2.1)	
	1250	125 134 118 (126 $\pm$ 8.0)	12 20 21 (18 $\pm$ 4.9)	25 22 19 (22 $\pm$ 3.0)	22 36 33 (30 $\pm$ 7.4)	16 9 10 (12 $\pm$ 3.8)	
	2500	119 129 101 (116 $\pm$ 14.2)	15 15 12 (14 $\pm$ 1.7)	16 16 24 (19 $\pm$ 4.6)	37 38 27 (34 $\pm$ 6.1)	9 13 9 (10 $\pm$ 2.3)	
	5000	133 113 134 (127 $\pm$ 11.8)	21 18 18 (19 $\pm$ 1.7)	18 26 30 (25 $\pm$ 6.1)	25 30 30 (28 $\pm$ 2.9)	17 11 11 (13 $\pm$ 3.5)	
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	618 627 632 (626 $\pm$ 7.1)	174 215 208 (199 $\pm$ 21.9)	119 117 113 (116 $\pm$ 3.1)	840 892 847 (860 $\pm$ 28.2)	890 726 734 (783 $\pm$ 92.5)	
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	1068 1025 1025 (1039 $\pm$ 24.8)	270 272 221 (254 $\pm$ 28.9)	1270 1435 1069 (1258 $\pm$ 183.3)	450 432 416 (433 $\pm$ 17.0)	328 294 362 (328 $\pm$ 34.0)	

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

\*\* : Purity was above 98 % and *p*-toluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.



Table 2. Mutagenicity of 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid\*\* 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	120	114	135	20	17	14	23	32	30	30	32	20	17	16	23	
		(123 $\pm$ 10.8)			(17 $\pm$ 3.0)			(28 $\pm$ 4.7)			(27 $\pm$ 6.4)			(19 $\pm$ 3.8)			
	313	134	118	102	14	9	12	21	18	24	30	32	18	18	26	25	
		(118 $\pm$ 16.0)			(12 $\pm$ 2.5)			(21 $\pm$ 3.0)			(27 $\pm$ 7.6)			(23 $\pm$ 4.4)			
	625	106	115	135	20	17	9	21	26	36	24	29	28	24	33	26	
		(119 $\pm$ 14.8)			(15 $\pm$ 5.7)			(28 $\pm$ 7.6)			(27 $\pm$ 2.6)			(28 $\pm$ 4.7)			
	1250	111	125	114	15	14	12	30	14	21	28	24	42	30	21	26	
		(117 $\pm$ 7.4)			(14 $\pm$ 1.5)			(22 $\pm$ 8.0)			(31 $\pm$ 9.5)			(26 $\pm$ 4.5)			
2500	122	101	117	17	14	11	10	11	13	35	23	31	23	32	22		
	(113 $\pm$ 11.0)			(14 $\pm$ 3.0)			(11 $\pm$ 1.5)			(30 $\pm$ 6.1)			(26 $\pm$ 5.5)				
5000	99	112	110	11	14	11	26	24	39	33	39	22	30	18	22		
	(107 $\pm$ 7.0)			(12 $\pm$ 1.7)			(30 $\pm$ 8.1)			(31 $\pm$ 8.6)			(23 $\pm$ 6.1)				
S9mix (+)	0	126	129	117	16	13	10	44	24	21	37	34	28	17	11	12	
		(124 $\pm$ 6.2)			(13 $\pm$ 3.0)			(30 $\pm$ 12.5)			(33 $\pm$ 4.6)			(13 $\pm$ 3.2)			
	313	128	110	120	12	17	11	21	23	27	39	43	21	17	12	17	
		(119 $\pm$ 9.0)			(13 $\pm$ 3.2)			(24 $\pm$ 3.1)			(34 $\pm$ 11.7)			(15 $\pm$ 2.9)			
	625	121	126	134	12	18	17	21	21	11	31	30	31	8	14	16	
		(127 $\pm$ 6.6)			(16 $\pm$ 3.2)			(18 $\pm$ 5.8)			(31 $\pm$ 0.6)			(13 $\pm$ 4.2)			
	1250	128	114	141	9	16	16	29	21	22	24	33	39	7	10	17	
		(128 $\pm$ 13.5)			(14 $\pm$ 4.0)			(24 $\pm$ 4.4)			(32 $\pm$ 7.5)			(11 $\pm$ 5.1)			
2500	114	113	128	6	19	15	19	12	22	52	34	46	20	22	13		
	(118 $\pm$ 8.4)			(13 $\pm$ 6.7)			(18 $\pm$ 5.1)			(44 $\pm$ 9.2)			(18 $\pm$ 4.7)				
5000	97	116	160	14	11	15	19	19	15	38	38	46	20	12	14		
	(124 $\pm$ 32.3)			(13 $\pm$ 2.1)			(18 $\pm$ 2.3)			(41 $\pm$ 4.6)			(15 $\pm$ 4.2)				
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	678	599	627	247	269	266	145	157	153	959	967	925	1963	2099	1748	
		(635 $\pm$ 40.1)			(261 $\pm$ 11.9)			(152 $\pm$ 6.1)			(950 $\pm$ 22.3)			(1937 $\pm$ 177.0)			
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	1056	1405	1231	291	292	293	1477	1388	1534	501	502	487	287	280	283	
		(1231 $\pm$ 174.5)			(292 $\pm$ 1.0)			(1466 $\pm$ 73.6)			(497 $\pm$ 8.4)			(283 $\pm$ 3.5)			

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

\*\*Purity was above 98% and *p*-toluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の  
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-Amino-5-methylbenzenesulfonic acid 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-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸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)、短時間処理(6時間)ともに50%を越える増殖抑制濃度、すなわち1.9 mg/ml(10 mM)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時間および48時間連続処理した高濃度群(1.9 mg/ml)では、細胞毒性のため染色体を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix非存在下で6時間処理した高濃度群(1.9 mg/ml)において細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下では、高濃度群(1.9 mg/ml)において細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、中濃度群(0.95 mg/ml)において観察した細胞の7.0%に染色体異常が、また、1.38%に倍数性細胞の誘発が認められ陽性の結果が得られた。染色体構造異常や倍数性細胞の誘発作用が被験物質による培養液の酸性化による可能性が示唆されたため、確認試験を行った。その結果、pH調整後の短時間処理したS9 mix存在下では、いずれの濃度群においても染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸は、酸性化により染色体異常を誘発するが、DNAに直接作用して染色体異常を誘発することはないと結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/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

$2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたデイッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)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-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸(略号:AMBS, CAS No.: 88-44-8, ロット番号: 4231, 三星化学(株)製造, (株)日本化学工業協会提供)は、微黄白色粉末で、水に対して50 mg/100 ml(20°C)で溶解し、融点300°C以上、分子式C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>S, 分子量187.22, 純度98%以上(不純物としてパラトルイジン200 ppm程度, 不明1.98%を含む)の物質である。

被験物質原体は、苛性ソーダ水溶液中ではNa塩となり溶解する。また、媒体中(0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液, 以下0.5% CMC Na水溶液と略す)では、4.75~19.0 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。媒体は0.5% CMC Na水溶液(ナカライテスク(株))を用いた。原体を媒体に懸濁して原液を調製し、ついで原液を媒体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最終的に培養液の10%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(媒体中での平均含量が添加量の85.0~115%)の値であった。濃度の記載について、純度換算は行わなかった。なお、確認試験では、被験物質を含む培養液のpHを中性域に調整して試験を行った。

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、被験物質処理群の陰性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超える濃度(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、1.7 mg/mlであった。また、短時間処理のS9 mix非存在下では、1.7 mg/mlであった。一方、S9 mix存在下では、10 mM(1.9 mg/ml)の濃度において57%の増殖抑制が認められた(Fig. 1)。

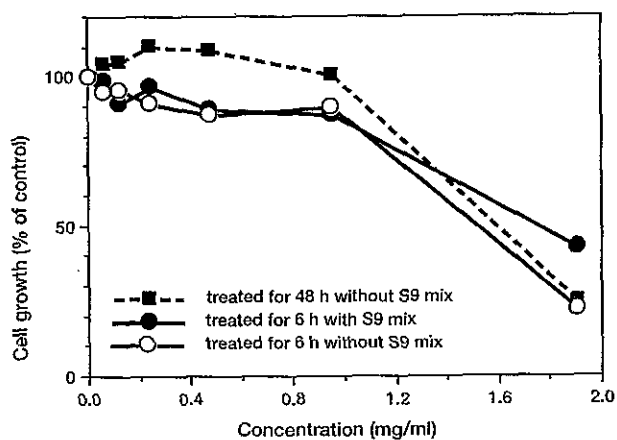


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid

## 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果、連続処理と短時間処理のS9 mix非存在下における50%の増殖抑制濃度を明らかに超える濃度が、10 mMと近似していることから、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、短時間処理とも1.9 mg/ml(10 mM)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<sup>1)</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(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、陰性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<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>(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クラン・アーミテッジの傾向性検定<sup>4)</sup>( $p < 0.05$ )を行った。原則として以上2回の検定で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-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸を加えて、24時間および48時間連続処理した高濃度群(1.9 mg/ml)では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸を加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した高濃度群(1.9 mg/ml)では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかった。S9 mix非存在下のその他の処理群では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下の中濃度群(0.95 mg/ml)では、観察した細胞の7.0%に染色体の構造異常(gapを含む)が、また、1.38%に倍数性細胞の誘発が認められ、陽性の結果が得られた。

培養液がpH 6.3以下の酸性条件下では、染色体異常が誘発される場合があることが報告<sup>5)</sup>されている。2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸を培養液に添加すると培養液の色が黄色化することから、処理直後と処理終了後の培養液のpHを測定したところ、陽性の結果が得られたS9 mix存在下の中濃度群では、処理直後のpHは5.84で、処理終了後では6.26であった。従って、本実験で誘発された染色体異常に関しては、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸それ自身によるDNA傷害作用に起因する可能性に加えて、2-アミノ-5-メチルベンゼン

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid (AMBS)\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	0	1	0	1	0	0	2	0	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	0.25		
Vehicle <sup>1)</sup>	0	24	200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 ( 1.5)	3 ( 1.5)	0.13		
AMBS	0.48	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.13		
AMBS	0.95	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.25	NT	NT
AMBS	1.9	24	0 <sup>T</sup>											T		
MC	0.00005	24	200	5	51	81	1	1	0	139	2	97 (48.5)	93 (46.5)	0.13		
Vehicle <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	3	0	0	0	3	0	3 ( 1.5)	3 ( 1.5)	0.38		
AMBS	0.48	48	200	0	1	0	1	1	0	3	1	3 ( 1.5)	3 ( 1.5)	0.13		
AMBS	0.95	48	200	4	1	0	0	1	0	6	0	6 ( 3.0)	2 ( 1.0)	0.25	NT	NT
AMBS	1.9	48	51 <sup>T</sup>	2	24	4	0	0	430	460	1	51 (100)	51 (100)	3.36 <sup>6)T</sup>		
MC	0.00005	48	200	8	58	125	2	7	10	210	16	103 (51.5)	102 (51.0)	0.25		

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, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) 0.5% carboxymethylcellulose sodium solution was used as vehicle. 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  $p < 0.05$  when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test. 6) One hundred and nineteen cells were analysed. \*: Purity was more than 98%. Paratoluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid (AMBS)\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.75		
Vehicle <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.63		
AMBS	0.48	-	6-(18)	200	1	0	0	1	1	0	3	0	3 ( 1.5)	2 ( 1.0)	0.25		
AMBS	0.95	-	6-(18)	200	1	0	0	1	0	0	2	0	2 ( 1.0)	1 ( 0.5)	0.25	NT	NT
AMBS	1.9	-	6-(18)	0 <sup>T</sup>											T		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.00		
Vehicle <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	1	2	0	0	0	3	0	3 ( 1.5)	3 ( 1.5)	0.38		
AMBS	0.48	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.25		
AMBS	0.95	+	6-(18)	200	0	19	23	0	0	0	42	0	14* ( 7.0)	14 ( 7.0)	1.38*	+	+
AMBS	1.9	+	6-(18)	5	0	4	6	0	0	0	10	0	4 (80.0)	4 (80.0)	0.00 <sup>6)T</sup>		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	5	66	189	1	5	20	286	3	122 (61.0)	122 (61.0)	0.25		

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, NT: not tested, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) 0.5% carboxymethylcellulose sodium solution was used as vehicle. 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) Five cells were analysed. \*: Significantly different from historical solvent control data with respect to TAG and polyploid at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\*: Purity was more than 98%. Paratoluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with pH-adjusted 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid (AMBS)\* under presence of S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	3	2	0	0	0	5	1	3 ( 1.5)	3 ( 1.5)	0.75		
AMBS <sup>6)</sup>	0.48	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.38		
AMBS	0.95	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.13	NT	NT
AMBS	1.9	+	6-(18)	200	2	6	0	0	1	0	9	0	6 ( 3.0)	4 ( 2.0)	0.13		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	6	71	169	6	1	0	253	0	123 (61.5)	121 (60.5)	0.25		

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, NT: not tested. 1) 0.5% carboxymethylcellulose sodium 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  $p < 0.05$  when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical data of negative control (vehicle) at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test. 6) The pH of treatment solution was adjusted with 0.1 N NaOH before adding to the dish. \*: Purity was more than 98%. Paratoluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

スルホン酸添加による培養液の酸性化による可能性が考えられた。このため、確認試験を行った。

確認試験における、S9 mix 存在下の短時間処理による染色体分析の結果を Table 3 に示した。2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸を加えて pH 調整後に、S9 mix 存在下で 6 時間処理したすべての処理群において染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。処理時における培地の pH は、溶媒対照、各処理群とも pH 6.80 ~ 7.19 を示した。

以上の結果より、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸は、培地の酸性化により、染色体異常を誘発するが、pH 調整によって中性条件下で処理すると染色体異常を誘発しないと結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 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.
- 5) T. Morita, et al., *Mutation Res.*, 268, 297 (1992).

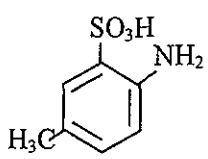
連絡先

試験責任者: 田中憲穂  
 試験担当者: 山影康次, 若栗 忍, 日下部博一,  
 橋本恵子, 太田 亮  
 (助) 食品薬品安全センター 秦野研究所  
 〒257 神奈川県秦野市落合 729-5  
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)  
 Kohji Yamakage, Shinobu Wakuri,  
 Hirokazu Kusakabe, Keiko Hashimoto,  
 Ryo Ohta  
 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

**SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE**

<b>CAS No.</b>	88-44-8
<b>Chemical Name</b>	4-Aminotoluene-3-sulfonic acid
<b>Structural Formula</b>	
<b>SUMMARY CONCLUSIONS OF THE SIAR</b>	
<p><b>Human Health</b></p> <p>From the outcome of a single dose administration reported in a preliminary examination of a 28-Day Repeat Dose Toxicity study [OECD TG407], the oral LD50 in rats is considered to be greater than 2000 mg/kg in both sexes. This substance was not corrosive or irritant to human skin.</p> <p>In the 28-Day Repeated Dose Toxicity study [OECD TG407], this substance was administered to male and female rats at 0, 100, 300, 1000 mg/kg/day dose by gavage. At 1000 mg/kg/day in males, a decrease of white blood cell count, total cholesterol and urine pH, also an enlargement of cecum were observed. At 1000 mg/kg in females, an increase of GPT and a decrease of glucose, also an enlargement of cecum were observed. All of those changes recovered within 14 days after cessation of the treatment. No other dose-dependent histopathological changes were observed in any dose groups. No changes in mortality, behavior or toxic effects on the body weight and food consumption were observed in any dose levels and in any sexes. The NOAEL for both sexes is considered to be 300 mg/kg/day.</p> <p>This substance was not mutagenic in bacteria up to 5,000 ug/plate [OECD TG471, TG472] and 10,000 ug/plate. A chromosomal aberration test tested up to 1.9 mg/mL (10mM) [OECD TG473] was negative except in the 6hr short-term test in the presence of an exogenous metabolic activation system. The positive response in the 6 hr short term test was based on the low pH, because the induction of chromosomal aberration was diminished after adjustment of the pH to a neutral range. The result of an unscheduled DNA synthesis up to 187 mg/L was negative. Furthermore, an <i>in vivo</i> micronucleus test was negative. Overall, this substance can be considered to be not genotoxic <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>.</p> <p>In a Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test [OECD TG421], this substance was administered to male and female rats at 0, 100, 300, 1000 mg/kg/day dose by gavage for 43 days in males and 41 – 46 days (from 14 days before mating to 3 days after parturition) in females. No compound-related dose effects were observed in the copulation index, fertility index, gestation length, number of corpora lutea or implantations, implantation index, gestation index and maternal behavior. As for pups, there were no significant differences in number of offspring or live offspring, sex ratio, the live birth index, the viability index or the body weight. No pups with malformations were found in any groups. No changes in clinical signs and necropsy findings were observed in offspring. From those results, the NOAEL for reproductive and developmental toxicity is considered to be 1000 mg/kg/day.</p> <p><b>Environment</b></p> <p>This substance is soluble in water (6.0 g/L at 20°C) and the vapor pressure is low (&lt; 0.00052 Pa at 100°C) [OECD TG104]. This substance was not readily biodegradable (0% after 14 days on BOD) [OECD TG301C] and is stable to hydrolysis in water at pH 4, 7 and 9 [OECD TG111]. The bioconcentration potential is low (BCF &lt; 4 (0.2 mg/L) and &lt; 0.4 (2 mg/L)) [OECD TG305C]. The log Pow is -0.67 at 25°C [OECD TG107]. This substance, if released into the atmosphere, will react with photochemically produced hydroxyl radical and decrease with a half-life of 4.5 hours. The pKa value of this substance is 3.28. It is present as a zwitterion under environmental condition. The behavior of this substance in the environment is considered to be similar to a weak acid.</p>	

The fugacity model (Mackay level III) suggests that if released to water, the majority of the substance would remain in the water compartment and, if released into air or soil, ca.50% would distribute to both water and the soil compartment.

In an acute toxicity test to fish, the LC50 was greater than 10 mg/L (*Oryzias latipes*, 96hr limit test) [OECD TG203].

In an acute toxicity test to daphnia, the EC50 was greater than 10 mg/L (*Daphnia magna*, 48hr limit test) [OECD TG202].

In an acute toxicity test to algae, the EC50 was greater than 10 mg/L (*Selenastrum capricornutum*: 0 – 72 hr biomass, and 24 – 72 hr growth rate) [OECD TG201].

In a chronic toxicity test to daphnia, the NOEC was 3.2 mg/L (*Daphnia magna*, 21 days reproduction) [OECD TG211] and in a chronic toxicity test to algae, the NOEC was 10 mg/L (*Selenastrum capricornutum*: 0 – 72 hr biomass, and 24 – 72 hr growth rate) [OECD TG201].

#### Exposure

The production volume of this substance in 2001 is estimated to be 2,000 - 3,000 metric tonnes/year in Japan and ca.18,000 metric tonnes/year in the world. The production countries are Japan, Korea, P.R. China, United Kingdom and U.S.A. In total there are about 20 manufacturing sites and about 55 use sites in the world.

This substance is produced in closed systems, and the packing process is performed in semi-closed or open systems. The user may use it in semi-closed systems. The only recognized use is as an industrial intermediate in the synthesis of organic pigments (Pigment Red 57 and its metal salts). These pigments are utilized in ink, paint, stationery goods, cosmetic goods and for the coloring of resin, fiber, leather, paper, rubber, etc. The concentration of the non-reacted parent substance in pigments is not known, but the consumer exposure is thought to be insignificant. There are no known direct uses of this substance in any consumer product. In the case of cosmetic goods (lip stick, etc.), regulations are in place in each region, for example the content of the substance in the colouring agent must be less than 0.2 % in the USA. Therefore, the possibility of consumer exposure from cosmetic goods is considered to be low.

Because of its use limited to the pigment industry and its low vapor pressure, the release of this substance into air and soil is very low. The concentration of this substance in effluent water from waste water treatment plant of manufacturer in Japan is less than 0.009 mg/L. The total emission from manufacturer's site through water in Japan is calculated to be less than 5 kg/year.

Based on the use and the properties of the substance, only occupational exposure by inhalation and dermal routes need to be considered.

### RECOMMENDATION

The chemical is currently of low priority for further work.

### RATIONALE FOR THE RECOMMENDATION AND NATURE OF FURTHER WORK RECOMMENDED

This chemical is currently of low priority for further work because of its low hazard potential.

## 2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験

### Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test of 2-Amino-5-methylbenzenesulfonic acid by Oral Administration in Rats

#### 要約

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の100, 300および1000 mg/kgをSD系(Crj:CD(SD))のラットの交配前2週間および交配期間の2週間を通じて経口投与し、さらには雄では交配期間終了後20日間、雌では妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで連続投与し、親動物の反復投与毒性および生殖能ならびに児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

#### 1. 反復投与毒性

いずれの群にも死亡例は認められなかった。また、一般状態、体重および摂餌量にも雌雄ともに被験物質投与による影響は認められなかった。雄の精巣および精巣上体重量には、被験物質投与による影響は認められなかった。

剖検および生殖器系の病理組織学検査では、雌雄とも被験物質投与に起因すると考えられる所見は観察されなかった。

#### 2. 生殖発生毒性

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

以上の結果から、本試験条件下における2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の親動物に対する無影響量(NOEL)は雌雄とも1000 mg/kg/dayと判断された。生殖能および次世代児に対する影響はともに1000 mg/kg/day投与によっても認められず、無影響量は1000 mg/kg/dayと判断された。

#### 方法

##### 1. 被験物質

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸 [三星化学工業(株)製造(東京)、純度99.3 wt%, Lot No. 7254] は微黄色の粉末であり、使用時まで冷暗所で密栓保管した。本ロットは、投与期間中安定であったことを確認した。

被験物質は、ゴマ油(ナカライテスク(株)製造)に懸濁し、20, 60および200 mg/mLの濃度になるよう各群の投与液を調製した。調製後は、使用時まで遮光・冷蔵条件下

で保管した。投与液中の被験物質は、6および200 mg/mLの濃度の場合、遮光・冷蔵条件下で少なくとも7日間安定であることを確認した。

投与液の濃度および均一性の分析は、調製開始時に調製した各群のバッチから無作為にサンプルを抽出し実施した。その結果、表示濃度に対する誤差が-12.5から-0.4%の範囲であり、基準範囲内(±15%以内)であった。したがって、使用した投与液にはほぼ所定量の2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸が含有されていたことが確認された。

##### 2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー(株)(神奈川)から購入した生後8.5週齢のSprague-Dawley(Crj:CD(SD), SPF)系雌雄ラットを使用した。購入した動物は5日間検疫・馴化飼育した後、一般状態に異常が認められなかったものを10週齢で群分けして試験に用いた。群分け時の体重は、雄で375~414 g、雌で239~266 gの範囲であった。

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

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

##### 3. 群分け

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

##### 4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

先に実施した「2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラットを用いる28日間の反復投与毒性試験」<sup>1)</sup>は上限量である1000 mg/kg群の雄で尿比重の増加、尿pH、白血球数および総コレステロールの低下あるいは減少が、雌でGPTの増加、血糖の減少が認められ、剖検では雌雄ともに盲腸の拡張が認められた。これらの結果をもとに、0, 30, 100, 300および1000 mg/kgの用量で実施した予備試験「2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラ



ットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験-2週間投与予備試験」では、投与後症状、体重、摂餌量、器官重量に明らかな被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

従って、本試験においても予備試験同様1000 mg/kgを高用量とし、以下公比約3で除し、300および100 mg/kgを設定した。

投与容量は、体重100 g当り0.5 mLとし、交配前および交配期間中の雌雄では、個体別に測定した最新体重に基づいて算出を行った。また、妊娠期間および哺育期間中の雌は、妊娠0, 7, 14, 21および哺育0日に測定した個体別体重に基づいて算出を行った。胃ゾンデを用いて毎日1回(7日/週)強制経口投与した。対照群にはゴマ油のみを同様に投与した。

雄の投与期間は、交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後20日間の連続48日間とした。雌の投与期間は、交配前14日間と交配期間中(最長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(41~46日間)とした。なお、交尾成立後分娩しなかった雌は妊娠25日の解剖前日までの41および43日間とした。交尾不成立の雌は交配期間終了後20日間の連続48日間とした。

## 5. 観察および検査

### 1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

### 2) 体重

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

### 3) 摂餌量

雄では、投与1(投与開始日)、8, 15, 22, 29, 36, 43および48日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日および投与22から48日までの累積摂餌量を算出した。雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に、交尾しなかった雌はそれ以降の投与29, 36, 43および48日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日までの累積摂餌量を算出した。また、交尾成立の雌は妊娠0, 7, 14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともにそれぞれ妊娠0から21日および哺育0から4日までの累積摂餌量を算出した。なお、交配期間中の摂餌量は測定しなかつ

た。

### 4) 交配

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

### 5) 自然分娩時および新生児の観察

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

新生児は哺育0日に出産児数(生存児+死亡児)を調べ、性別を判定するとともに外表異常の有無を調べた。また、哺育0および4日に雌雄別の同腹児重量を測定し、1腹の雌雄別1匹当りの平均体重を算出した。

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安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った。なお、哺育期間中の死亡児についてはブアン氏液に固定し、主要器官の肉眼観察を行った。また、新生児の4日の生存率 $[(哺育4日生児数/出產生児数) \times 100]$ を求めた。

### 6) 病理学検査

#### a) 剖検および器官重量

##### ① 雄動物

48日間投与した翌日、エーテル麻酔下で放血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比(相対重量)を算出した。また、全動物の精囊、前立腺および肉眼所見で変化が認められた器官・組織として肺、肝臓および皮膚を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。

##### ② 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。器官・組織の肉眼観察を行った後、卵巣、子宮、膣および肉眼所見で変化が認められた器官・組織として肺、皮膚、胸腺、胃および副腎を10%中性緩衝ホルマリン液で固

定した。また、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

### ③ 交尾しなかった雌

48日間投与した翌日、エーテル麻酔下で放血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、卵巣、子宮および膣を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

### ④ 自然分娩の認められない雌

妊娠25日に、エーテル麻酔下で放血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、卵巣、子宮および膣を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。

### ⑤ 哺育期間中に全児が死亡した母動物(全児死亡動物)

生存児すべての死亡または喰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。器官・組織の肉眼観察を行った後、卵巣、子宮、膣および肉眼所見で変化が認められた器官・組織として胸腺を10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

なお、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

## b) 病理組織学検査

### ① 全児死亡動物

対照群の2例の卵巣、子宮および膣、1例の胸腺について実施した。

### ② 妊娠を成立させた雄

対照群および1000 mg/kg群のそれぞれ11および12例で精巣および精巣上体について実施した。加えて、対照群および300 mg/kg群各1例の肺、300および1000 mg/kg群各1例の皮膚、300 mg/kg群1例の肝臓、精巣および精巣上体について実施した。

### ③ 自然分娩した雌

対照群および1000 mg/kg群のそれぞれ9および12例で卵巣について実施した。加えて、100 mg/kg群1例の卵巣および皮膚、300 mg/kg群1例の胸腺、1000 mg/kg群1例の胃、副腎、肺、2例の胸腺について実施した。

### ④ 交尾しなかった雌雄

100 mg/kg群の雌雄各1例の卵巣、子宮、膣、精巣、精巣上体、精囊および前立腺について実施した。

### ⑤ 妊娠を成立させなかった雄および妊娠不成立の雌

対照群および100 mg/kg群の雌雄各1例の卵巣、子宮、膣、精巣、精巣上体、精囊および前立腺について実施した。

## 6. 統計解析

体重、摂餌量、黄体数、着床痕数、出産児数、死産児数、性比、平均性周期、妊娠期間、着床率、分娩率、出生率、外表異常発現率、新生児の4日の生存率、器官重

量および相対重量については多重比較検定<sup>2,4)</sup>を行った。

出産率、交尾率および受胎率については $\chi^2$ 検定<sup>5,6)</sup>を用いた。病理学検査の所見の発生率については、Fisherの直接確率検定法<sup>6)</sup>を用いて検定した。なお、哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は\*: $P<0.05$ 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、被験物質投与に起因した変化は認められず、雄の100 mg/kg群で眼分泌物が1例、300 mg/kg群で脱毛が1例、1000 mg/kg群で痂皮および脱毛が1例に認められた。雌では妊娠期間および哺育期間を通じ100 mg/kg群で脱毛が1例、対照群で全児死亡動物が2例に認められた。

#### 2) 体重(Fig. 1, 2)

雄では、投与期間を通じて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。

雌では、100および1000 mg/kg群で対照群に比べ哺育4日にのみ統計学的に有意な低値を示した。しかし、他の測定日には明らかな差は認められず1日のみの変化であること、また、哺育期間の体重増加量には明らかな変化が認められていないことから、被験物質投与の影響では無く偶発的な変化と考えられた。

#### 3) 摂餌量(Fig. 3, 4)

雄では、1000 mg/kg群で投与8から15日の平均1日摂餌量が統計学的に有意な高値を示し、投与1から15日の累積摂餌量も高値を示した。

雌では、投与期間を通じて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。

#### 4) 器官重量(Table 1)

300 mg/kg群で対照群に比べ精巣上体の実重量が統計学的に有意な低値を示したが、相対重量には差はなく、1000 mg/kg群では同様の変化は認められなかった。精巣重量に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。

#### 5) 剖検所見

いずれの動物にも被験物質投与に起因すると考えられる所見は認められなかった。

雄では、所見として肺の黒色斑点が対照群および300 mg/kg群で各1例、肝臓の赤色斑点および白色斑点が300 mg/kg群で同一個体の1例、精巣および精巣上体の萎縮が300 mg/kg群で同一個体の1例、被毛の菲薄化が300および1000 mg/kg群で各1例に観察された。

自然分娩した雌は対照群、100、300および1000

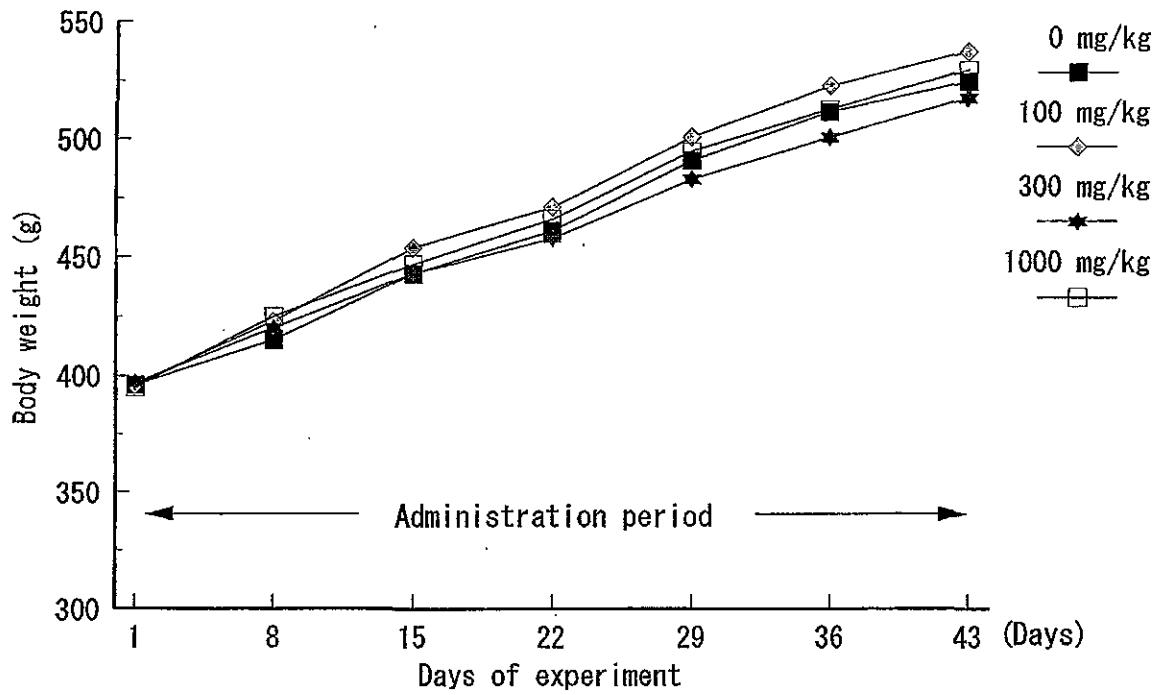


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

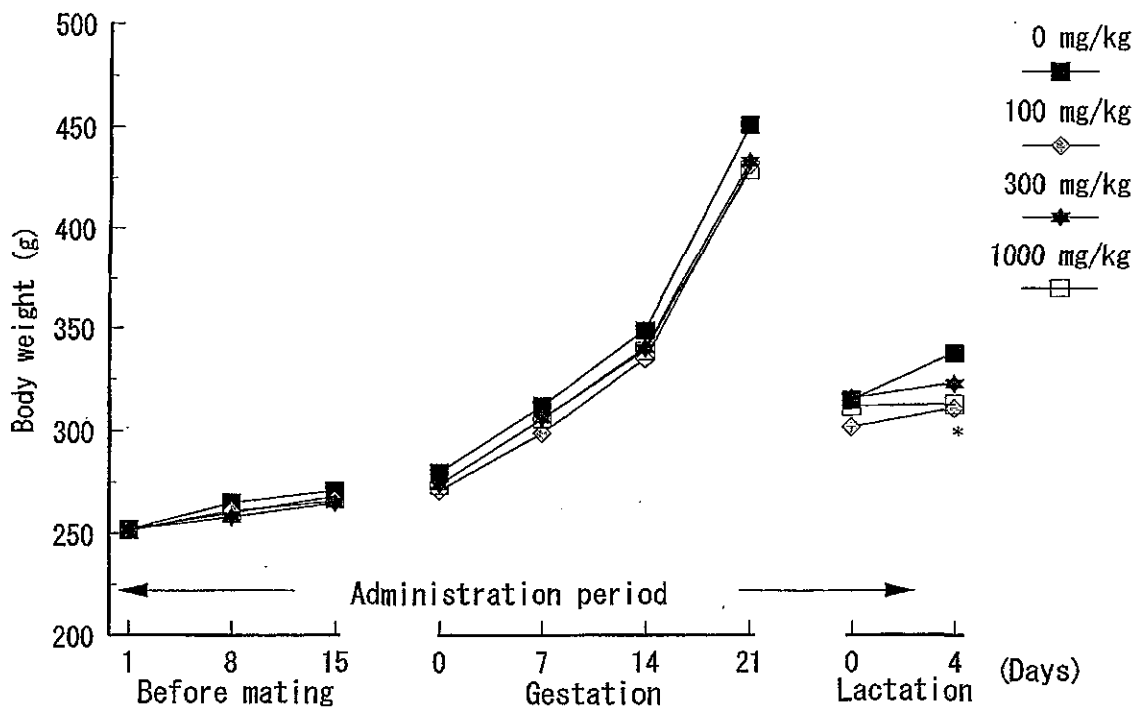


Fig. 2 Body weight change of female rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

Significant difference from control group; \*:  $P < 0.05$

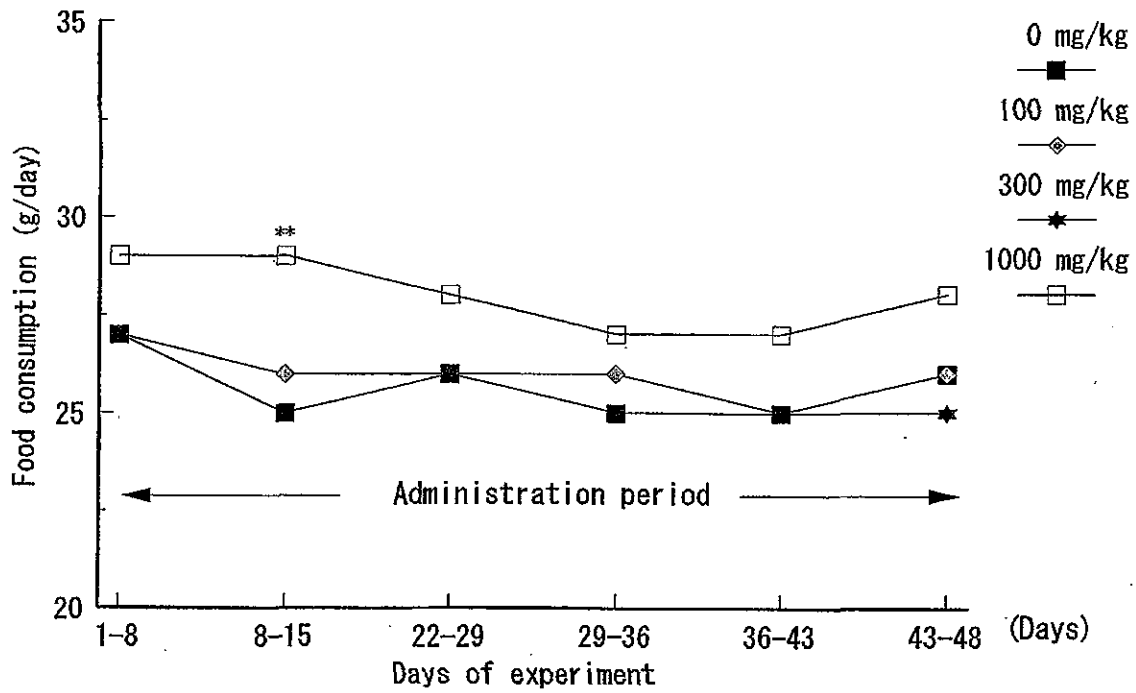


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

Significant difference from control group; \*\*:P<0.01

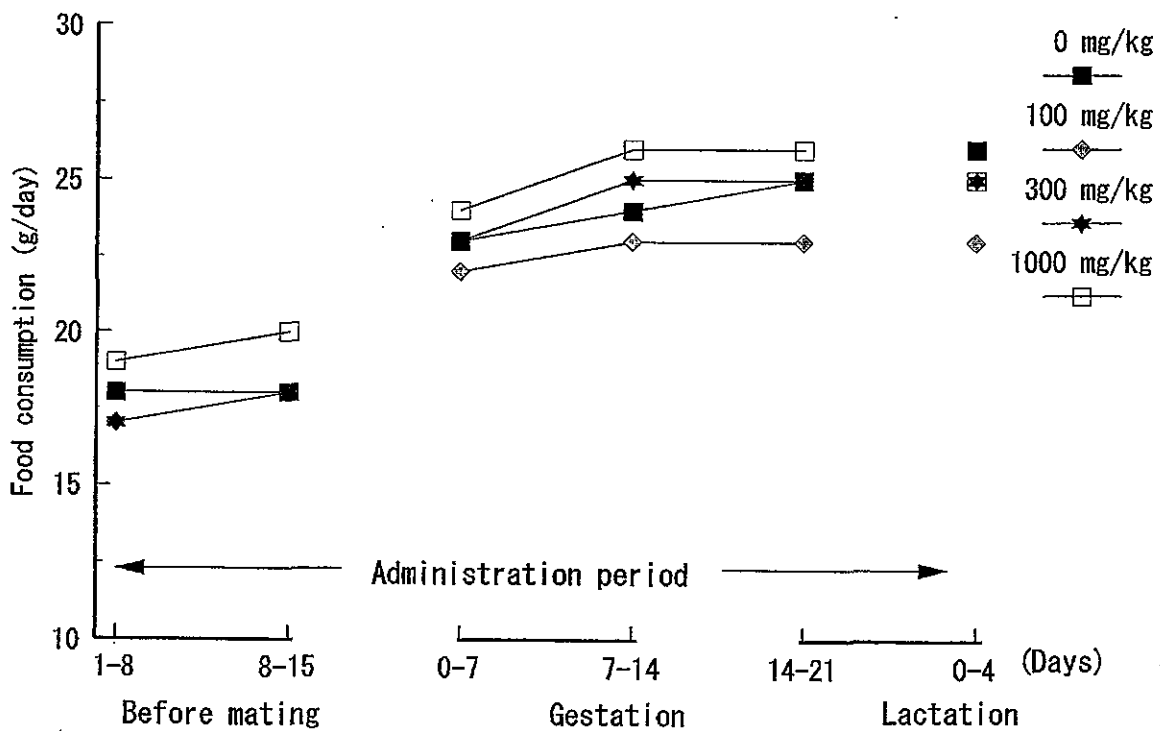


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

mg/kg群でそれぞれ9, 10, 12および12例であった。所見として胸腺の萎縮が300および1000 mg/kg群でそれぞれ1および2例, 肺の黒色斑点, 胃の潰瘍および副腎の白色斑点が1000 mg/kg群で各1例, 卵巣の嚢胞および被毛の菲薄化が100 mg/kg群で各1例に観察された。

交尾しなかった100 mg/kg群の雌1例では, 異常所見は観察されなかった。

自然分娩の認められない雌は対照群および100 mg/kg群で各1例であったが, いずれの動物にも異常所見は観察されなかった。

対照群の2例の全児死亡動物では, 胸腺の萎縮および子宮の結節が1例に観察され, 他の1例には異常所見は認められなかった。

## 6) 病理組織学検査 (Table 2)

雄では, 1000 mg/kg群で精巣上体の細胞浸潤が1例に観察された他, 剖検で精巣および精巣上体の萎縮が認められた300 mg/kg群の動物に精巣の精細管萎縮および間質細胞増生, 精巣上体の精子減少が観察された。しかしながら, 低頻度の発現であることから被験物質の影響ではないと考えた。その他, 肺の炎症が対照群および300 mg/kg群で各1例, 肝臓の壊死が300 mg/kg群で1例, 皮膚の糜爛および扁平上皮増生が1000 mg/kg群で1例に観察された。

自然分娩した雌では, 卵黄嚢嚢胞が100 mg/kg群の1例に観察されたのみで被験物質の卵巣におよぼす影響はないと考えられた。その他, 胸腺の萎縮が300および1000 mg/kg群でそれぞれ1および2例, 肺の炎症が1000 mg/kg群で1例, 胃の潰瘍が1000 mg/kg群で1例, 副腎皮質の局所的肥大が1000 mg/kg群で1例, 皮膚の炎症浸潤と扁平上皮増生が100 mg/kg群の1例に観察された。

交尾しなかった雌雄では, 雄に精巣の精細管萎縮が観察された。雌には異常所見は認められなかった。

妊娠を成立させなかった雄および不妊の雌では, いずれにも異常所見は観察されなかった。

全児死亡動物では, 胸腺の萎縮および子宮の化膿性炎症が1例に観察された。他の1例には異常所見は観察されなかった。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 交尾および受胎能 (Table 3)

交尾は, 100 mg/kg群を除くすべての群で全例成立し, 100 mg/kg群では1組が交尾不成立で12例中11例(91.7%)で成立した。受胎は, 300および1000 mg/kg群で交尾が成立した雌の全例で成立した。対照群および100 mg/kg群の各1例では, 妊娠25日剖検で着床痕が認められなかったため不妊と判断した。したがって, 対照群では12例中11例(91.7%), 100 mg/kg群では11例中10例(90.9%)で受胎が成立した。

性周期観察では, いずれの群もほぼ4から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 4)

分娩状態に異常は観察されず, 各群の妊娠期間, 黄体数, 着床痕数, 出産児数, 出產生児数および死産児数はほぼ同様な値を示し, 出産率, 着床率, 出生率および哺育4日生存率に群間差は認められなかった。

### 3) 新生児の形態, 体重および剖検所見

新生児の外表検査では, 異常をとまなう児は1例も認められなかった。

哺育期間中の体重では, 雌雄ともにいずれの測定日にも群間差は認められなかった。

哺育期間中の死亡児の剖検では, 被験物質投与に起因すると考えられる所見は認められず, 胸腺頸部残留および腎盂拡大が対照群の雄に認められたのみであった。雌には異常所見は認められなかった。哺育4日の剖検では, 雄では胸腺頸部残留が対照群で1例, 腎臓の腎盂拡大が300 mg/kg群で1例, 雌では腎臓の腎盂拡大が対照群および300 mg/kg群でそれぞれ1および3例に認められた。いずれも少数例での発現であり, 被験物質投与とは関連のない変化であった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

雌雄とも一般状態の変化および体重に被験物質投与の影響は認められなかった。

摂餌量については, 雄の1000 mg/kg群で投与8から15日の間の平均1日摂餌量および投与1から15日の累積摂餌量が高値を示した。しかし, 同群の体重には明らかな変化は認められていないこと, 28日間反復投与毒性試験および2週間投与予備試験では同様の結果は認められていないことから, 被験物質投与による毒性影響とは判断しなかった。

病理学検査では, 雄の精巣および精巣上体, 雌の卵巣に被験物質投与の影響は認められなかった。なお, 全児死亡動物, 妊娠を成立させなかった雄および不妊の雌については, 特に原因を示唆する所見は認められなかった。交尾しなかった雄では, 組織所見で精巣の精細管萎縮が認められた。しかし, 交尾不成立の一要因となった可能性が示唆されるものの, 発現頻度から被験物質投与との関連は無いと判断された。

したがって, 本試験条件下における2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の親動物に対する無影響量は, 最高用量の1000 mg/kgでも影響は認められなかったことから雌雄とも1000 mg/kg/dayと判断された。

### 2. 生殖発生毒性

性周期, 交尾率, 受胎率, 妊娠期間, 妊娠黄体数, 着床痕数, 出産児数, 出產生児数, 性比, 哺育4日生存率に被験物質投与の影響は認められなかった。また, 新生児の外表検査でも異常は認められず, 体重にも群間差は認められなかった。死亡児および哺育4日の剖検では, 被験物質

投与によると考えられる異常所見は観察されなかった。

以上のことから、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の生殖能および次世代児に対する影響はともに1000 mg/kg/day投与によっても認められず、無影響量は1000 mg/kg/dayと判断された。

### 文献

- 1) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修，“化学物質毒性試験報告,” Vol. 4, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1996, p. 99.
- 2) C. G. Shayne, “Statics and Experimental Design For Toxicologists,” Telford Press, New Jersey, 1986, pp. 43-45.
- 3) 佐野正樹, 医薬安全性研究会会報, 32, 21(1990).
- 4) M. Yoshida, *J. Japanese Soc. Comp. Statist.*, 1, 111(1988).
- 5) 佐久間昭, “薬効評価I-計画と解析-,” 東京大学出版会, 東京, 1977, pp. 109-117.
- 6) 石居進, “生物統計学入門,” 培風館, 東京, 1975, pp. 78-107.

### 連絡先

試験責任者：伊藤圭一  
 試験担当者：小川敏明, 伊賀達也, 木原 亨  
 (財)食品農医薬品安全性評価センター  
 〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜  
 582-2  
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

### Correspondence

Authors: Keiichi Ito (Study director)  
 Toshiaki Ogawa, Tatsuya Iga,  
 Tohru Kihara  
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
 Pesticides (An-pyo Center)  
 582-2 Shioshinden, Arahama, Fukude-cho, Iwata-  
 gun, Shizuoka, 437-1213, Japan.  
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

簡易生殖毒性試験

Table 1 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 2-amino-5-methyl benzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Male				
No. of animals examined	12	12	12	12
Body weight (g)	542 ± 33	554 ± 45	534 ± 36	546 ± 3
Absolute organ weight				
Testes (g)	3.62 ± 0.31	3.65 ± 0.44	3.28 ± 0.59	3.70 ± 0.23
Epididymides (mg)	1313 ± 98	1295 ± 138	1168 ± 121*	1316 ± 115
Relative organ weight				
Testes (g%)	0.671 ± 0.074	0.664 ± 0.094	0.616 ± 0.119	0.680 ± 0.066
Epididymides (mg%)	243.378 ± 27.682	235.898 ± 34.456	219.293 ± 27.989	242.189 ± 27.983

Values are expressed as Mean ± S.D.  
Significant difference from control group; \*: P < 0.05

Table 2 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Male animals				Female animals			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals necropsied	11	10	12	12	9	10	12	12
Organ Findings								
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
thymus								
atrophy	-	-	-	-	-	-	1 (1)	2 (2)
RESPIRATORY SYSTEM								
lung								
inflammation	1 (1)	-	1 (1)	-	-	-	-	1 (1)
DIGESTIVE SYSTEM								
stomach								
ulcer, forestomach	-	-	-	-	-	-	-	1 (1)
liver								
necrosis	-	-	1 (1)	-	-	-	-	-
REPRODUCTIVE SYSTEM								
testis								
atrophy, seminiferous tubule	0	-	1 (1)	0	-	-	-	-
interstitial cell hyperplasia	0	-	1 (1)	0	-	-	-	-
epididymis								
decrease, sperm	0	-	1 (1)	0	-	-	-	-
cellular infiltration	0	-	0 (1)	1	-	-	-	-
ovary								
cyst, brusa	-	-	-	-	0	1 (1)	-	0
ENDOCRINE SYSTEM								
adrenal gland								
hypertrophy	-	-	-	-	-	-	-	1 (1)
INTEGUMENTARY SYSTEM								
skin								
erosion	-	-	0 (1)	1 (1)	-	0 (1)	-	-
inflammatory infiltration	-	-	0 (1)	1 (1)	-	1 (1)	-	-
squamous hyperplasia	-	-	0 (1)	1 (1)	-	1 (1)	-	-

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

Table 3 Summary of reproductive performance in rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	12	11	12	12
No. of pregnant females	11	10	12	12
Copulation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	91.7	100.0	100.0
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	91.7	90.9	100.0	100.0
Estrus cycle (days, Mean±S.D.)	4.5 ± 0.7	4.2 ± 0.5	4.2 ± 0.4	4.5 ± 0.5

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

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

Values in parentheses are expressed no. of animals observed

Table 4 Findings of delivery in dams treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid and observations on their pups (F<sub>1</sub>) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of dams observed	11	10	12	12
No. of dams delivered live pups	11	10	12	12
Duration of gestation (Mean±S.D.)	22.7 ± 0.6	22.4 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.8 ± 0.4
No. of total corpora lutea (Mean±S.D.)	216 (19.6 ± 4.5)	170 (17.0 ± 2.1)	218 (18.2 ± 3.7)	222 (18.5 ± 3.2)
No. of total implants (Mean±S.D.)	188 (17.1 ± 1.6)	161 (16.1 ± 2.0)	186 (15.5 ± 3.0)	175 (14.6 ± 3.0)
No. of total pups born (Mean±S.D.)	172 (15.6 ± 1.6)	150 (15.0 ± 1.8)	178 (14.8 ± 2.6)	160 (13.3 ± 3.3)
No. of total live pups born (Mean±S.D.)	168 (15.3 ± 2.3)	150 (15.0 ± 1.8)	178 (14.8 ± 2.6)	160 (13.3 ± 3.3)
Male	81 ( 7.4 ± 1.9) <sup>n)</sup>	69 ( 6.9 ± 2.3) <sup>n)</sup>	91 ( 7.6 ± 2.4) <sup>n)</sup>	79 ( 6.6 ± 1.8)
Female	87 ( 7.9 ± 1.9) <sup>n)</sup>	81 ( 8.1 ± 1.7) <sup>n)</sup>	87 ( 7.3 ± 1.9) <sup>n)</sup>	81 ( 6.8 ± 2.7)
Sex ratio (male/female, Mean±S.D.)	1.00 ± 0.41	0.93 ± 0.51	1.13 ± 0.43	1.21 ± 0.81
No. of total live pups on day 4 (Mean±S.D.)				
Male	66 ( 6.0 ± 3.2)	66 ( 6.6 ± 2.2)	85 ( 7.1 ± 2.5)	78 ( 6.5 ± 1.7)
Female	66 ( 6.0 ± 3.3)	77 ( 7.7 ± 1.4)	80 ( 6.7 ± 1.6)	79 ( 6.6 ± 2.6)
No. of total dead pups born (Mean±S.D.)	4 ( 0.4 ± 1.2)	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)
stillbirth	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)
cannibalism	4 ( 0.4 ± 1.2)	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)	0 ( 0.0 ± 0.0)
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Implantation index (% , Mean±S.D.) <sup>b)</sup>	89.5 ± 12.3	94.7 ± 2.0	86.6 ± 15.8	80.2 ± 18.2
Delivery index (% , Mean±S.D.) <sup>c)</sup>	91.6 ± 5.6	93.5 ± 7.7	96.2 ± 4.8	90.9 ± 8.6
Live birth index (% , Mean±S.D.) <sup>d)</sup>	97.4 ± 8.6	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
Viability index on day 4 (% , Mean±S.D.) <sup>e)</sup>				
Male	77.8 ± 39.1	96.0 ± 8.4	93.1 ± 9.7	99.1 ± 3.2
Female	77.0 ± 39.1	95.7 ± 5.6	94.4 ± 15.8	98.0 ± 4.8

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

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

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

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

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

f) : Includes live pups died before observations



## 2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

### Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 2-Amino-5-methylbenzenesulfonic acid in Rats

#### 要約

赤色顔料の合成原料に用いられている既存化学物質2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の28日間反復経口投与毒性試験を、SD系[Crj:CD(SD)]ラットを用い、0(対照)、100、300および1000 mg/kg用量の投与により実施した。動物数は1群雌雄各6匹とし、6群を設け、4群は投与期間終了後屠殺群、2群は対照および1000 mg/kgの14日間回復群とした。

動物の一般状態、体重および摂餌量においては、被験物質の投与による影響は認められなかった。尿検査および血液学検査では、尿比重の増加、尿pHの低下および主にリンパ球の減少による白血球数の減少が、1000 mg/kg群の雄に認められた。血液生化学検査では、いずれも1000 mg/kg群で、総コレステロールの減少が雄に、GPTの増加および血糖の減少が雌に認められた。剖検では、軽度な盲腸の拡張が、1000 mg/kg群の雌雄各1匹に認められた。器官重量および病理組織学検査においては、被験物質の投与に起因すると考えられる変化は、認められなかった。これら被験物質の投与による変化は、回復群においては認められず、可逆的であることが確認された。

以上の結果から、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラットへの28日間反復経口投与により、軽度な臨床病理学的変化が認められた。無影響量は、雌雄とも300 mg/kg/dayと推定された。

#### 方法

##### 1. 被験物質

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸は、分子量187.22、融点300℃以上の水および有機溶媒に溶けにくい微黄白色の粉末で、赤色顔料の合成原料に用いられている。試験には、三星化学工業(株)製造のもの(ロット番号4231、純度99.96%)を入手し、冷暗(4℃)条件下で密栓保管し、使用した。投与液は、これを局方ゴマ油(宮澤薬品)に懸濁して調製し、使用時まで冷所遮光下で密栓保管した。被験物質の原体および投与液中の被験物質は、安定であることを確認した。

##### 2. 使用動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より搬入したSD系[Crj:CD(SD)]ラットを、雄は8日、雌は9日間検疫・馴化飼育し、5週齢(雄168-183 g、雌138-162 g)で、1群雌

雄各6匹として試験に用いた。ラットは、温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数10回以上/時、照明12時間(6-18時)に設定した飼育室で、金網ケージに個別に収容し、固型飼料[日本農産工業(株)、ラボMRストック]および水を自由摂取させた。

##### 3. 投与量および投与方法

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラットへの単回経口投与における $LD_{50}$ 値は、12000 mg/kgと報告されている<sup>1)</sup>。投与量設定試験として、ラットを1群雌雄各4匹とし、0、100、250、500、1000および2000 mg/kg/day用量を14日間反復経口投与した。一般状態、体重、摂餌量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査および器官重量において、被験物質の毒性を示唆する変化は認められなかった。剖検においては、盲腸の拡張が2000 mg/kg群の雌雄全例に認められた。したがって、本試験における投与量は、1000 mg/kg/dayを高用量とし、以下300および100 mg/kg/dayの3用量および対照を設定した。試験群は、以上の4群の他に、1000 mg/kg/dayおよび対照の14日間回復群を設けた。投与は、胃ゾンアを装着した注射筒を用いて、投与液を1日1回、28日間にわたって経口投与した。投与液量は、体重100 g当たり0.5 mlとした。対照群には局方ゴマ油を同様に投与した。

##### 4. 観察および検査項目

###### 1) 一般状態観察

投与および回復期間中毎日、生死および外観、行動等を観察した。

###### 2) 体重および摂餌量測定

体重は、投与1日(投与初日の投与直前)、3日およびその後は週2回、3あるいは4日ごと、ならびに屠殺日に測定した。摂餌量は、毎週1回(雄は投与5、12、19、26日および投与終了後5、12日、雌は投与4、11、16、23日および投与終了後4、11日)、翌日までの24時間の飼料消費量を測定した。

###### 3) 尿検査

雄は投与22日および投与終了後13日、雌は投与26あるいは27日および投与終了後12日にラットを代謝ケージに約3時間収容して採尿し、外観の観察、比重の測定(屈折計、エルマ光学)、pH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン[以上、マルテ

イステックス、マイルス・三共㈱) および沈渣(URI-CEL液で染色、ケンブリッジケミカルプロダクト社)を検査した。

#### 4) 血液学検査

供試血液の採取は、投与期間および回復期間終了翌日における屠殺剖検時に行った。動物は採血前日の午後5時より除餌し、水のみを給与した。採取した血液は3分割し、その一部はEDTA-2Kで凝固防止処理し、多項目自動血球計数装置〔東亜医用電子㈱、E-4000〕により、赤血球数(電気抵抗検出方式)、血色素量(ラウリル硫酸ナトリウム-ヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(パルス検出方式)、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度(以上、計算値)、白血球数および血小板数(以上、電気抵抗検出方式)を、また塗抹標本を作製して網状赤血球数(Brilliant cresyl blue染色)および白血球百分率(May-Giemsa染色)を測定した。さらに一部は3.8%クエン酸ナトリウム液で処理して血漿を得、血液凝固自動測定装置(アメルング社、KC-10A)により、プロトロンビン時間(Quick一段法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸活性化法)を測定した。

#### 5) 血液生化学検査

採取した血液の一部から血清を分離し、生化学自動分析装置〔日本電子㈱、JCA-VX-1000型クリナライザー〕により、総タンパク(Biuret法)、アルブミン(BCG)、A/G比(計算値)、血糖、トリグリセライド、総コレステロール(以上、酵素法)、総ビリルビン(Jendrassik法)、尿素窒素(Urease-UV法)、クレアチニン(Jaffé法)、GOT、GPT、 $\gamma$ -GTP(以上、SSCC法)、アルカリホスファターゼ(GSCC法)、カルシウム(OCPC法)および無機リン(酵素法)を、電解質自動分析装置〔東亜電波工業㈱、NAKL-1〕により、ナトリウム、カリウムおよび塩素を測定した。

#### 6) 病理学検査

採血に続いて剖検し、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣、精巣上部、卵巣を秤量した。病理組織学検査は、採取した器官を10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、対照群および1000 mg/kg群では脳、下垂体、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、胸腺、心臓、気管、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胃、小腸(十二指腸・空腸・回腸)、大腸(盲腸・結腸・直腸)、膵臓、精巣、精巣上部、精囊、前立腺、卵巣、子宮、陰、膀胱、リンパ節(頸部リンパ節・腸間膜リンパ節)、脊髄(頸膨大部・腰膨大部)、坐骨神経、骨髄を検査した。また、100 mg/kg群の雌で胸腺重量に変化が認められたので、雌の胸腺については、100および300 mg/kg群も検査した。検査は、常法によりパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。

#### 5. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について、Dunnettの多重比較検定を行った。ただし、回復群については、t検定およびU検定を行った。

### 結果

#### 1. 一般状態および死亡

各群の雌雄とも、投与および回復期間を通じて、一般状態の変化および死亡は認められなかった。

#### 2. 体重(Fig. 1)

被験物質投与各群の体重は、雌雄とも対照群と類似した推移を示し、体重増加量においても、対照群と比べ、有意な差は認められなかった。

#### 3. 摂餌量

被験物質投与各群の摂餌量は、雌雄とも対照群に比べ、有意な差は認められなかった。

#### 4. 尿所見(Table 1, 2)

有意な比重の増加およびpHの低下が、1000 mg/kg群の雄に認められた。1000 mg/kg群の回復群においては、各検査項目に有意な変化は認められなかった。

#### 5. 血液学所見(Table 3, 4)

白血球数の有意な減少が、1000 mg/kg群の雄に認められた。白血球数の減少は、白血球百分率からみて、主にリンパ球の減少によるものであった。1000 mg/kg群の回復群においては、白血球数に有意な変化は認められなかった。

#### 6. 血液生化学所見(Table 5, 6)

いずれも1000 mg/kg群で、総コレステロールの有意な減少が雄に、GPTの有意な増加が雌に認められた。さらに、血糖の有意な減少が100および1000 mg/kg群の雌に認められた。血糖の減少は300 mg/kg群では認められず、用量相関性に欠ける所見であったが、1000 mg/kg群の値は対照群と比べ明らかに低値であった。1000 mg/kgの回復群においては、このような変化は認められず、いずれも回復していた。投与期間終了後の検査で認められた変化とは別の検査項目に有意な変化が認められたが、当研究所の背景データからみて、正常範囲内の軽度な変動であった。

#### 7. 剖検所見

盲腸の内容物貯留による軽度な拡張が、1000 mg/kg群の雌雄各1匹に認められた。1000 mg/kgの回復群には、盲腸に変化は認められなかった。

#### 8. 器官重量(Table 7, 8)

胸腺の絶対および相対重量の有意な減少が100 mg/kg群の雌に、脾臓の相対重量のみの有意な増加が被験物質

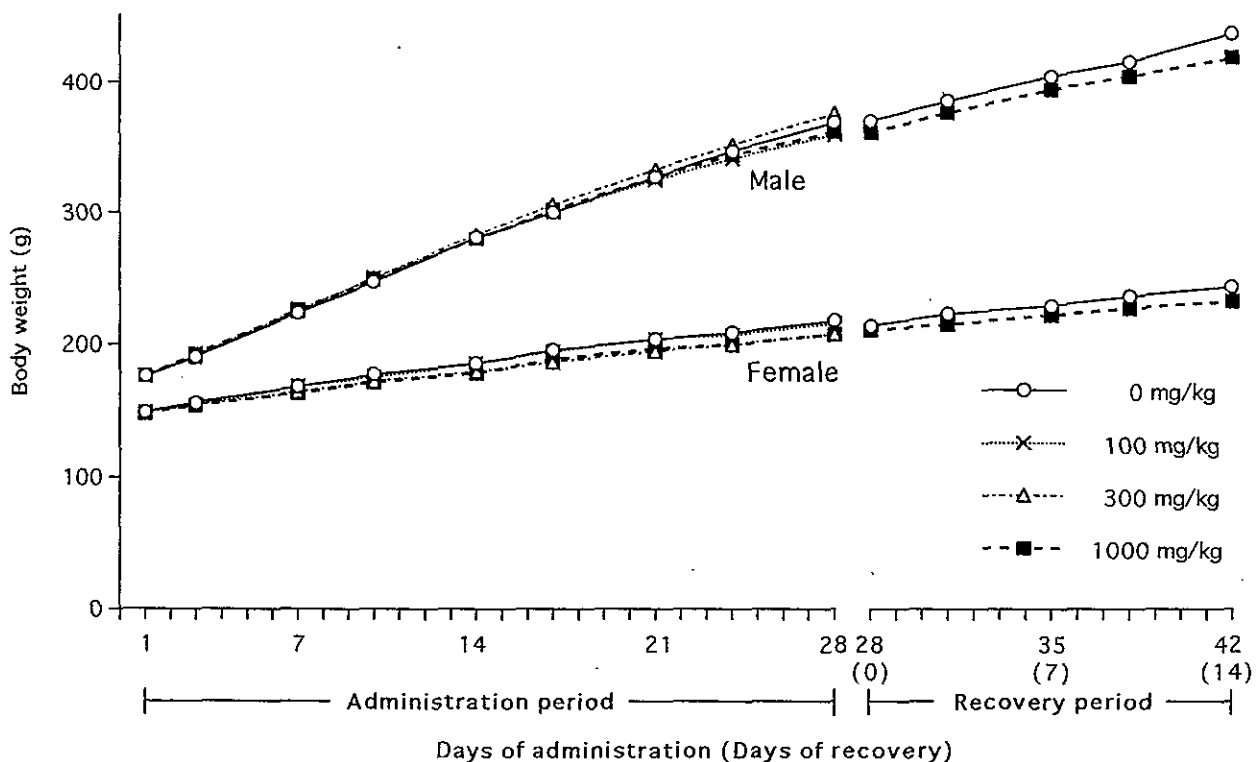


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

投与各群の雌に認められたが、両器官とも用量相関的な変化ではなかった。

#### 9. 病理組織学所見

被験物質の投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。肺、肝臓、脾臓、腎臓および前立腺に軽度な変化が対照群および1000 mg/kg群に認められたが、散発的、かつ、用量相関性が認められず、偶発的な変化と判断される所見であった。

#### 考察

2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の類縁化合物のラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験で、2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸は明らかな毒性影響を示さず<sup>2)</sup>、3-アミノベンゼンスルホン酸は1000 mg/kgで軽度な尿性状の変化が認められた<sup>3)</sup>、と報告されている。

今回実施した2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸の28日間反復経口投与毒性試験においては、動物の一般状態、体重および摂餌量において、被験物質の投与による影響は認められなかった。

尿検査、血液学検査、血液生化学検査においては、いずれも1000 mg/kg群で、尿比重の増加、尿pHの低下、白血球数および総コレステロールの減少が雌に、GPTの増加、血糖の減少が雌に認められた。

尿比重の変化は、腎臓における尿の濃縮機能の障害がうたがわれる減少性の変化ではなく、尿pHの低下につ

いても、アシドーシスの徴候が認められないことから、おそらく被験物質が酸性物質であることによる単純な変化と考えられる。いずれにしても、他の検査において、これらの尿所見と関連する変化は認められず、毒性学的意義は小さいものと判断される。

白血球数の減少については、主にリンパ球の減少によるものであった。用量相関的な変化ではなかったが、100 mg/kg群の雌で胸腺重量の減少が認められ、リンパ系組織に対し何らかの影響を有する可能性も考えられた。しかし、骨髄造血細胞および胸腺、リンパ節、脾臓等のリンパ系組織には病理組織学的に異常は認められなかった。また、白血球数の減少の程度も、軽度なものであった。

血液生化学的影響については、主に肝機能に対する影響がうたがわれる所見であった。しかし、肝臓を含む全身諸器官に、被験物質の投与に起因する病理組織学的な変化は認められなかった。また血液生化学的变化の程度も、軽度なものであった。

剖検で、盲腸の拡張が1000 mg/kg群に認められた。この盲腸の拡張は、軽度、かつ、雌雄各1匹の発現であったが、投与量設定試験において、2000 mg/kg群の雌雄全例に認められていることから、被験物質の投与に起因するものと判断された。

盲腸の拡張は、げっ歯類への抗菌性物質投与時に一般的に認められ、腸内細菌叢の変化によるものと考えられている<sup>4)</sup>。本試験で認められた盲腸の拡張の発現機序は不明であるが、下痢などの消化管症状や発育に対する影響を伴っておらず、生体に対する影響としては軽度なも

Table 1 Urinary examination of male rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	Color			Cloudy	Specific gravity	pH					Protein	Glucose	Ketone body	Occult blood	Urobilinogen						
			C	PY	Y	PB		-	+	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	++	+++	-	±	+	0.1
Administration period	0	12	8	4		8	4	1.037 ± 0.014 <sup>a</sup>	3	3	6		3	8	1	12	3	7	2	8	4	12	
	100	6	3	3		3	3	1.044 ± 0.014	3	1	1	1	1	4	1	6	2	2	2	6		6	
	300	6		6		2	4	1.046 ± 0.017	1	2	1	2		1	4	1	6	1	2	3	5	1	6
	1000	12	7	4	1	7	5	1.057 ± 0.019*	2	4	4	1	1**		9	3	12	8	1	3	9	3	12
Recovery period	0	6	2	3	1	2	4	1.045 ± 0.015	1	1	2	2		1	4	1	6	4	2	6		6	
	1000	6	1	5		4	2	1.047 ± 0.006	1	2	3			5	1	6	3	3	6		6		

	Dose (mg/kg)	No. of animals	Bilirubin			Erythrocytes <sup>b</sup>	Leukocytes <sup>b</sup>	Crystals <sup>b</sup>			Epithelial cells <sup>b</sup>			Casts <sup>b</sup>			Fat globules <sup>b</sup>				
			-	+	-	+	Mg	Ca	Ams	Sq	R	S	G	H	W						
Administration period	0	12	12			12		3	4	2	3	12	12	12	12	12	12	12	12		
	100	6	6			6		1	4	1	6	6	4	2	6	6	6	6	6	6	
	300	6	6			6		1	2	1	2	6	6	1	5	6	6	6	6	6	6
	1000	12	12			12		3	3	4	2	12	12	11	1	12	12	12	12	12	12
Recovery period	0	6	6			6		1	2	3	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	1000	6	6			6		1	3	2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

a) : Mean ± S.D.

Significantly different from control group (\*:p<0.05; \*\*:p<0.01)

Color: C(colorless), PY(pale yellow), Y(yellow), PB(pale brown); Cloudy: -(negligible), +(cloudy); Protein: -(negligible), ±(15-30 mg/dl), +(30 mg/dl), ++ (100 mg/dl); Glucose: -(negligible), ±(0.1 g/dl); Ketone body: -(negligible), ±(5 mg/dl), +(15 mg/dl), ++ (40 mg/dl); Occult blood: -(negligible), ±(trace), +(slight); Urobilinogen: Ehrlich unit/dl; Bilirubin: -(negligible), +(slight)

b) : -(not observed), +(a few in some fields), ++ (a few in all fields), +++ (many in all fields)

Crystal: Mg(ammonium magnesium phosphate), Ca(calcium phosphate), Ams(amorphous); Epithelial cells: Sq(squamous), R(round), S(spindle); Casts: G(granule), H(hyaline), W(waxy)

Table 2 Urinary examination of female rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	Color			Cloudy	Specific gravity	pH					Protein	Glucose	Ketone body	Occult blood	Urobilinogen						
			C	PY	Y	PB		-	+	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	++	+++	-	±	+
Administration period	0	12	5	5	2	4	8	1.067 ± 0.019 <sup>a</sup>	4	2	1	1	4	3	8	1	12	5	7		10	2	12
	100	6	4	1	1	4	2	1.068 ± 0.008	2	3	1			1	2	3	6	1	5		6		6
	300	6	3	3		3	3	1.059 ± 0.018	3	2	1			2	3	1	6	3	3		6		6
	1000	12	5	7		10	2	1.074 ± 0.029	3	5	2		2	1	1	4	6	12	8	4		12	12
Recovery period	0	6	1	2	3	6		1.068 ± 0.025	2	2	1	1		1	4	1	6	5	1		6		6
	1000	6	1	4	1	5	1	1.056 ± 0.016	3	1	1	1		2	3	1	6	5	1		6		6

	Dose (mg/kg)	No. of animals	Bilirubin			Erythrocytes <sup>b</sup>	Leukocytes <sup>b</sup>	Crystals <sup>b</sup>			Epithelial cells <sup>b</sup>			Casts <sup>b</sup>			Fat globules <sup>b</sup>					
			-	+	-	+	Mg	Ca	Ams	Sq	R	S	G	H	W							
Administration period	0	12	12			11	1	3	4	12	12	11	1	12	12	12	12	12	12	12	12	
	100	6	6			6		2	3	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	300	6	6			6		2	1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	1000	12	12			12		6	1	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Recovery period	0	6	6			6		2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	1000	6	6			6		2	1	6	6	4	2	6	6	6	6	6	6	6	6	6

a) : Mean ± S.D.

Color: C(colorless), PY(pale yellow), Y(yellow), PB(pale brown); Cloudy: -(negligible), +(cloudy); Protein: -(negligible), ±(15-30 mg/dl), +(30 mg/dl), ++ (100 mg/dl); Glucose: -(negligible), ±(0.1 g/dl); Ketone body: -(negligible), ±(5 mg/dl), +(15 mg/dl), ++ (40 mg/dl); Occult blood: -(negligible), ±(trace), +(slight); Urobilinogen: Ehrlich unit/dl; Bilirubin: -(negligible), +(slight)

b) : -(not observed), +(a few in some fields), ++ (a few in all fields), +++ (many in all fields)

Crystal: Mg(ammonium magnesium phosphate), Ca(calcium phosphate), Ams(amorphous); Epithelial cells: Sq(squamous), R(round), S(spindle); Casts: G(granule), H(hyaline), W(waxy)

Table 3 Hematological examination of male rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Erythrocyte ( $10^4/\text{mm}^3$ )	761 ± 29	775 ± 35	755 ± 36	787 ± 35	817 ± 30	829 ± 26
Hematocrit (%)	45.0 ± 0.9	44.8 ± 1.3	44.3 ± 1.7	45.5 ± 1.9	45.6 ± 1.4	44.6 ± 1.3
Hemoglobin (g/dl)	15.4 ± 0.3	15.6 ± 0.4	15.4 ± 0.4	15.6 ± 0.6	15.5 ± 0.5	15.3 ± 0.6
Reticulocyte (%)	42 ± 15	29 ± 4	35 ± 7	29 ± 9	31 ± 5	34 ± 5
Leukocyte ( $10^2/\text{mm}^3$ )	76 ± 16	67 ± 9	73 ± 26	49 ± 11*	88 ± 28	85 ± 17
Differential count (%)						
Lymphocyte	89 ± 2	85 ± 4	84 ± 7	82 ± 3	91 ± 3	89 ± 1
Neutrophil band	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
segmented	10 ± 3	14 ± 4	14 ± 6	16 ± 4	8 ± 3	9 ± 2
Eosinophil	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 1	1 ± 1
Basophil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Monocyte	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1
Platelet ( $10^4/\text{mm}^3$ )	154 ± 21	140 ± 14	158 ± 16	149 ± 12	141 ± 16	146 ± 9
PT (sec)	12.7 ± 0.4	13.1 ± 0.4	12.9 ± 0.3	13.1 ± 0.2	12.6 ± 0.3	12.6 ± 0.3
APTT (sec)	16.8 ± 0.9	17.1 ± 0.9	17.0 ± 0.9	17.8 ± 0.8	18.5 ± 1.0	18.6 ± 1.1

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group (\*:  $p < 0.05$ )

Table 4 Hematological examination of female rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Erythrocyte ( $10^4/\text{mm}^3$ )	766 ± 29	769 ± 34	775 ± 42	772 ± 25	819 ± 30	803 ± 1
Hematocrit (%)	43.1 ± 0.4	43.1 ± 1.2	43.4 ± 1.8	43.7 ± 0.9	44.7 ± 1.7	43.6 ± 0.9
Hemoglobin (g/dl)	15.0 ± 0.2	15.1 ± 0.6	15.2 ± 0.7	15.4 ± 0.3	15.4 ± 0.6	15.2 ± 0.4
Reticulocyte (%)	26 ± 7	28 ± 7	26 ± 6	24 ± 7	32 ± 7	28 ± 8
Leukocyte ( $10^2/\text{mm}^3$ )	41 ± 7	39 ± 13	49 ± 19	43 ± 7	45 ± 21	51 ± 18
Differential count (%)						
Lymphocyte	88 ± 6	88 ± 3	88 ± 5	86 ± 3	88 ± 5	86 ± 7
Neutrophil band	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
segmented	11 ± 6	11 ± 2	11 ± 5	13 ± 3	11 ± 5	14 ± 7
Eosinophil	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 2	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 1
Basophil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Monocyte	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 1	1 ± 1	0 ± 0
Platelet ( $10^4/\text{mm}^3$ )	145 ± 17	140 ± 17	136 ± 13	138 ± 5	146 ± 12	140 ± 21
PT (sec)	12.8 ± 0.5	13.0 ± 0.4	12.9 ± 0.2	13.0 ± 0.4	13.0 ± 0.3	13.2 ± 0.3
APTT (sec)	16.0 ± 0.8	16.5 ± 0.6	16.5 ± 1.0	16.8 ± 1.0	16.5 ± 0.4	17.0 ± 0.7

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 5 Blood chemical examination of male rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg) No. of animals	After administration period				After recovery period	
	0 6	100 6	300 6	1000 6	0 6	1000 6
GOT(IU/l)	61 ± 6	59 ± 6	63 ± 5	59 ± 2	58 ± 9	61 ± 6
GPT(IU/l)	32 ± 6	27 ± 3	31 ± 3	30 ± 6	26 ± 5	33 ± 6
γ-GTP(IU/l)	0.19 ± 0.12	0.24 ± 0.15	0.35 ± 0.14	0.36 ± 0.21	0.29 ± 0.31	0.28 ± 0.19
ALP(IU/l)	428 ± 50	399 ± 70	506 ± 77	441 ± 77	270 ± 32	332 ± 57*
T.protein(g/dl)	6.03 ± 0.12	6.10 ± 0.22	6.30 ± 0.22	6.14 ± 0.09	6.34 ± 0.15	6.32 ± 0.20
Albumin(g/dl)	2.96 ± 0.16	3.05 ± 0.12	3.04 ± 0.13	2.99 ± 0.12	2.98 ± 0.09	2.95 ± 0.15
A/G ratio	0.97 ± 0.09	1.00 ± 0.04	0.93 ± 0.07	0.95 ± 0.07	0.89 ± 0.06	0.88 ± 0.09
T.cholesterol(mg/dl)	90 ± 10	77 ± 9	85 ± 9	74 ± 10*	101 ± 14	91 ± 10
Triglyceride(mg/dl)	83 ± 44	80 ± 29	87 ± 28	50 ± 15	125 ± 36	76 ± 33*
Glucose(mg/dl)	138 ± 11	145 ± 11	148 ± 16	137 ± 10	174 ± 19	161 ± 17
T.bilirubin(mg/dl)	0.34 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.02
Urea nitrogen(mg/dl)	15.1 ± 1.9	14.7 ± 1.8	15.9 ± 2.2	14.9 ± 1.3	17.1 ± 2.0	18.0 ± 1.4
Creatinine(mg/dl)	0.51 ± 0.02	0.52 ± 0.04	0.56 ± 0.06	0.52 ± 0.04	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.09
Ca(mg/dl)	10.0 ± 0.5	10.1 ± 0.3	10.0 ± 0.2	9.8 ± 0.2	10.1 ± 0.3	9.9 ± 0.3
I.phosphorus(mg/dl)	7.7 ± 0.8	7.5 ± 0.7	7.5 ± 0.3	7.3 ± 0.3	8.0 ± 0.9	7.6 ± 0.3
Na(mEq/l)	141 ± 1	143 ± 0	142 ± 1	142 ± 1	141 ± 1	141 ± 1
K(mEq/l)	4.73 ± 0.13	4.39 ± 0.27	4.65 ± 0.31	4.58 ± 0.13	4.53 ± 0.35	4.41 ± 0.19
Cl(mEq/l)	103 ± 1	104 ± 1	104 ± 2	105 ± 1	104 ± 2	105 ± 1

Vales are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group (\*:p<0.05)

Table 6 Blood chemical examination of female rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg) No. of animals	After administration period				After recovery period	
	0 6	100 6	300 6	1000 6	0 6	1000 6
GOT (IU/l)	57 ± 7	60 ± 4	62 ± 5	66 ± 10	65 ± 9	65 ± 12
GPT (IU/l)	24 ± 4	27 ± 2	24 ± 5	32 ± 5**	25 ± 4	26 ± 6
γ-GTP (IU/l)	0.41 ± 0.27	0.20 ± 0.14	0.25 ± 0.19	0.33 ± 0.28	0.46 ± 0.43	0.31 ± 0.28
ALP (IU/l)	237 ± 82	280 ± 50	271 ± 53	225 ± 62	202 ± 30	189 ± 36
T.protein (g/dl)	6.47 ± 0.29	6.31 ± 0.19	6.31 ± 0.20	6.51 ± 0.18	6.59 ± 0.25	6.65 ± 0.23
Albumin (g/dl)	3.27 ± 0.27	3.23 ± 0.13	3.22 ± 0.14	3.19 ± 0.11	3.39 ± 0.27	3.36 ± 0.30
A/G ratio	1.02 ± 0.10	1.05 ± 0.05	1.05 ± 0.06	0.96 ± 0.08	1.07 ± 0.15	1.03 ± 0.13
T.cholesterol (mg/dl)	101 ± 20	80 ± 9	84 ± 14	86 ± 24	111 ± 19	92 ± 18
Triglyceride (mg/dl)	51 ± 37	43 ± 11	59 ± 24	36 ± 12	51 ± 24	52 ± 15
Glucose (mg/dl)	138 ± 6	121 ± 14*	126 ± 11	116 ± 9**	137 ± 15	130 ± 11
T.bilirubin (mg/dl)	0.24 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.24 ± 0.03*
Urea nitrogen (mg/dl)	17.0 ± 1.6	19.0 ± 2.7	17.3 ± 1.4	17.4 ± 2.6	20.5 ± 1.7	20.8 ± 1.4
Creatinine (mg/dl)	0.58 ± 0.05	0.57 ± 0.04	0.57 ± 0.04	0.56 ± 0.04	0.64 ± 0.06	0.62 ± 0.07
Ca (mg/dl)	10.2 ± 0.4	10.1 ± 0.2	9.9 ± 0.2	10.1 ± 0.3	10.0 ± 0.4	10.2 ± 0.1
I.phosphorus (mg/dl)	6.6 ± 0.7	6.6 ± 0.6	6.0 ± 0.4	6.3 ± 0.6	6.0 ± 0.9	5.8 ± 0.8
Na (mEq/l)	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 0	142 ± 1	142 ± 1
K (mEq/l)	4.27 ± 0.26	4.30 ± 0.23	4.38 ± 0.31	4.33 ± 0.19	4.39 ± 0.11	4.31 ± 0.25
Cl (mEq/l)	107 ± 2	107 ± 2	108 ± 1	108 ± 2	107 ± 2	107 ± 2

Vales are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group (\*:p<0.05; \*\*:p<0.01)

Table 7 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
No. of animals	6	6	6	6	6	5
Body weight (g)	340 ± 18	333 ± 14	346 ± 13	335 ± 26	399 ± 41	386 ± 22
Absolute weight						
Brain (g)	1.98 ± 0.08	2.00 ± 0.08	1.96 ± 0.07	2.02 ± 0.08	2.05 ± 0.10	2.01 ± 0.09
Liver (g)	10.44 ± 1.11	10.23 ± 0.88	10.95 ± 0.76	9.89 ± 1.51	12.01 ± 1.71	11.42 ± 1.11
Kidneys (g)	2.48 ± 0.14	2.36 ± 0.11	2.58 ± 0.25	2.51 ± 0.31	2.66 ± 0.29	2.67 ± 0.34
Spleen (g)	0.69 ± 0.09	0.65 ± 0.10	0.67 ± 0.04	0.65 ± 0.12	0.71 ± 0.08	0.76 ± 0.11
Heart (g)	1.21 ± 0.08	1.12 ± 0.11	1.21 ± 0.08	1.12 ± 0.10	1.41 ± 0.17	1.24 ± 0.09
Thymus (g)	0.61 ± 0.07	0.51 ± 0.07	0.64 ± 0.12	0.57 ± 0.14	0.49 ± 0.08	0.47 ± 0.04
Adrenals (mg)	53.7 ± 7.1	53.5 ± 2.8	53.5 ± 5.8	56.8 ± 8.9	57.6 ± 6.7	51.1 ± 7.1
Testes (g)	3.03 ± 0.18	3.27 ± 0.32	3.22 ± 0.20	3.23 ± 0.21	3.22 ± 0.18	3.11 ± 0.41
Epididymides (g)	0.87 ± 0.15	0.90 ± 0.13	0.87 ± 0.14	0.87 ± 0.10	1.11 ± 0.09	1.08 ± 0.18
Relative weight						
Brain (g%)	0.58 ± 0.03	0.60 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.61 ± 0.05	0.52 ± 0.04	0.52 ± 0.04
Liver (g%)	3.06 ± 0.18	3.07 ± 0.15	3.17 ± 0.20	2.94 ± 0.24	3.00 ± 0.15	2.95 ± 0.18
Kidneys (g%)	0.73 ± 0.04	0.71 ± 0.01	0.75 ± 0.06	0.75 ± 0.07	0.67 ± 0.02	0.69 ± 0.07
Spleen (g%)	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.03
Heart (g%)	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.36 ± 0.07	0.32 ± 0.02
Thymus (g%)	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.02
Adrenals (mg%)	15.79 ± 1.90	16.08 ± 1.03	15.54 ± 2.07	17.03 ± 2.71	14.50 ± 1.50	13.28 ± 1.93
Testes (g%)	0.89 ± 0.08	0.98 ± 0.11	0.93 ± 0.07	0.97 ± 0.10	0.82 ± 0.10	0.81 ± 0.10
Epididymides (g%)	0.26 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.28 ± 0.05

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 8 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid in the 28-day repeat dose toxicity test

Dose level (mg/kg)	After administration period				After recovery period	
	0	100	300	1000	0	1000
No. of animals	6	6	6	6	6	5
Body weight (g)	205 ± 16	200 ± 16	192 ± 13	191 ± 15	218 ± 15	214 ± 16
Absolute weight						
Brain (g)	1.78 ± 0.08	1.84 ± 0.09	1.85 ± 0.07	1.80 ± 0.03	1.82 ± 0.10	1.86 ± 0.07
Liver (g)	6.33 ± 0.89	5.86 ± 0.50	5.75 ± 0.57	5.49 ± 0.73	5.98 ± 0.60	5.91 ± 0.55
Kidneys (g)	1.55 ± 0.12	1.49 ± 0.21	1.50 ± 0.14	1.52 ± 0.17	1.58 ± 0.13	1.51 ± 0.06
Spleen (g)	0.40 ± 0.06	0.43 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.43 ± 0.05	0.47 ± 0.05	0.47 ± 0.04
Heart (g)	0.80 ± 0.05	0.75 ± 0.05	0.74 ± 0.05	0.75 ± 0.10	0.80 ± 0.07	0.79 ± 0.04
Thymus (g)	0.50 ± 0.08	0.37 ± 0.05*	0.47 ± 0.09	0.43 ± 0.04	0.37 ± 0.10	0.33 ± 0.06
Adrenals (mg)	57.3 ± 7.0	60.2 ± 10.8	64.7 ± 11.5	55.2 ± 8.3	56.1 ± 5.7	58.2 ± 6.6
Ovaries (g)	78.6 ± 5.4	77.1 ± 11.1	83.8 ± 10.5	83.8 ± 20.2	78.0 ± 13.7	78.2 ± 14.6
Relative weight						
Brain (g%)	0.88 ± 0.06	0.92 ± 0.08	0.96 ± 0.05	0.95 ± 0.08	0.83 ± 0.04	0.88 ± 0.06
Liver (g%)	3.09 ± 0.25	2.94 ± 0.15	2.99 ± 0.14	2.86 ± 0.19	2.74 ± 0.25	2.77 ± 0.05
Kidneys (g%)	0.76 ± 0.04	0.74 ± 0.06	0.78 ± 0.06	0.80 ± 0.04	0.72 ± 0.06	0.71 ± 0.07
Spleen (g%)	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.02*	0.23 ± 0.01**	0.22 ± 0.01**	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.02
Heart (g%)	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.37 ± 0.02
Thymus (g%)	0.24 ± 0.02	0.19 ± 0.02**	0.24 ± 0.04	0.23 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.16 ± 0.02
Adrenals (mg%)	28.00 ± 2.67	29.95 ± 3.39	33.70 ± 5.51	28.82 ± 3.76	25.64 ± 1.46	27.24 ± 2.32
Ovaries (g%)	38.4 ± 1.4	38.8 ± 6.2	43.6 ± 2.6	43.8 ± 9.8	35.6 ± 5.3	36.9 ± 7.9

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group (\*:p<0.05; \*\*:p<0.01)

のと考えられる。

このような、投与期間終了後屠殺動物で認められた変化は、回復期間終了後屠殺動物には認められず、可逆的な変化であることが確認された。

以上の結果から、2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸のラットへの28日間反復投与により、主な毒性影響として、いずれも軽度な白血球数の減少および主に肝機能に対する影響が示唆される血液生化学的变化が発現し、尿性状および盲腸に対する影響も認められた。無影響量は、300 mg/kg/dayと推定された。

#### 文献

- 1) Registry of toxic effects of chemical substances, 1981-1982.
- 2) 井上博之, 化学物質毒性試験報告, 1, 339 (1994).
- 3) 釜田悟, 化学物質毒性試験報告, 2, 379 (1995).
- 4) 小野寺威, “毒性試験法講座15-医薬品,” 福田英臣, 秋本健, 坂口孝編, 地人書館, 東京, 1990, pp.37-38.

#### 連絡先

試験責任者：伊藤義彦  
試験担当者：山本譲, 下平裕二, 赤木博,  
福田苗美, 藩栗緒  
(財)畜産生物科学安全研究所  
〒229-11 神奈川県相模原市橋本台3-7-11  
Tel 0427-62-2775 Fax 0427-62-7979

#### Correspondence

Authors: Yoshihiko Ito (Study director)  
Yuzuru Yamamoto, Yuuji Shimodaira,  
Hiroshi Akagi, Naemi Fukuda, Cleo Pan  
Research Institute for Animal Science in  
Biochemistry and Toxicology  
3-7-11 Hashimotodai, Sagamihara-shi, Kanagawa,  
229-11, Japan  
Tel +81-427-62-2775 Fax +81-427-62-7979



# 3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 3a,4,7,7a-Tetrahydro-1H-indene on Bacteria

### 要約

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンについて、細菌を用いる復帰突然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>2,3)</sup>の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められたことから、本試験はS9 mix 無添加試験および添加試験ともに、78.1~250 μg/プレートの範囲(TA1535 および TA1537 ではS9 mix 無添加試験は3.91~125 μg/プレート、添加試験は7.81~250 μg/プレート)で実施した。その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。以上の結果から、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

### 方法

#### [検定菌]

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

*S. typhimurium* の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを用い、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、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無について調べ、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字型試験管に凍結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]

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン(CAS No. 3048-65-5)は、分子量 120.21 の無色透明液体である。用いた

被験物質は、日本石油化学(株)製造、ロット番号 DIG02、純度 99.0 wt%(不純物:0.8 wt% ブタジエン-イソプレン-ピペリレン, 0.1 wt% ジシクロペンタジエン, 0.1 wt% 未知成分)であり、日本石油化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:ESK4546, 和光純薬工業(株))に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、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。

#### [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 および 2AA は DMSO 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(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
D-ピオチン	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、極東製薬工業(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〕

プレインキュベーション法<sup>1)</sup>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, 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, 37℃で20分間往復振とう培養したのち, 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, 対照群として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。溶媒および陽性対照群は, 同時に実施した他の試験と共通とした。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, それぞれそ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。ただし, 2回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の2倍以上となる用量が認められた場合において, その溶媒対照値が10以下であり, 変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンについて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。その結果, S9 mix 無添加試験では150 μg/プレート以上で, S9 mix 添加試験では TA1535 と TA1537 において150 μg/プレート以上で, その他の検定菌においては500 μg/プレート以上で抗菌性が認められた。

したがって, 本試験における最高用量は, S9 mix 無添加試験および添加試験とも250 μg/プレート (TA100, TA98 および WP2 *uvrA* の S9 mix 添加試験は500 μg/プレート)とした。しかし, TA1535 と TA1537 の S9 mix 無添加試験においては, 本試験Iで抗菌性のない用量が4用量に達しなかったため, 本試験の最高用量を125 μg/プレートに下げるとともに, 試験をやり直し, その結果を本試験Iの結果とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で, とともに上記の最高用量に基づいて公比2で6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, いずれの検定菌においても, 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, 3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは, 用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) 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.
- 4) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K.H. Norpoth, R.C. Garner, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子  
(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)  
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,  
Kumiko Kawakami  
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. Mutagenicity of 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene 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	
S9 mix (-)	0	110 107 95 (104 $\pm$ 7.9)	17 5 9 ( 10 $\pm$ 6.1)	15 20 18 ( 18 $\pm$ 2.5)	18 13 19 ( 17 $\pm$ 3.2)	13 8 9 ( 10 $\pm$ 2.6)	
	3.91	ND	11 12 9 ( 11 $\pm$ 1.5)	ND	ND	6 7 6 ( 6 $\pm$ 0.6)	
	7.81	93 83 83 ( 86 $\pm$ 5.8)	7 16 12 ( 12 $\pm$ 4.5)	23 20 19 ( 21 $\pm$ 2.1)	9 14 20 ( 14 $\pm$ 5.5)	10 14 6 ( 10 $\pm$ 4.0)	
	15.6	129 110 125 (121 $\pm$ 10.0)	8 7 10 ( 8 $\pm$ 1.5)	24 22 27 ( 24 $\pm$ 2.5)	22 16 15 ( 18 $\pm$ 3.8)	7 6 7 ( 7 $\pm$ 0.6)	
	31.3	113 127 114 (118 $\pm$ 7.8)	10 12 4 ( 9 $\pm$ 4.2)	24 15 15 ( 18 $\pm$ 5.2)	14 19 15 ( 16 $\pm$ 2.6)	9 7 9 ( 8 $\pm$ 1.2)	
	62.5	114 117 103 (111 $\pm$ 7.4)	10* 7* 12* ( 10 $\pm$ 2.5)	28 15 17 ( 20 $\pm$ 7.0)	8 16 11 ( 12 $\pm$ 4.0)	10* 12* 10* ( 11 $\pm$ 1.2)	
	125	82* 84* 92* ( 86 $\pm$ 5.3)	3* 6* 0* ( 3 $\pm$ 3.0)	7* 22* 12* ( 14 $\pm$ 7.6)	6* 7* 13* ( 9 $\pm$ 3.8)	3* 5* 2* ( 3 $\pm$ 1.5)	
	250	2* 7* 4* ( 4 $\pm$ 2.5)		11* 7* 7* ( 8 $\pm$ 2.3)	4* 0* 3* ( 2 $\pm$ 2.1)		
S9 mix (+)	0	145 121 138 (135 $\pm$ 12.3)	9 7 18 ( 11 $\pm$ 5.9)	27 9 21 ( 19 $\pm$ 9.2)	26 26 19 ( 24 $\pm$ 4.0)	11 9 10 ( 10 $\pm$ 1.0)	
	7.81	ND	11 10 13 ( 11 $\pm$ 1.5)	ND	ND	6 11 4 ( 7 $\pm$ 3.6)	
	15.6	110 116 119 (115 $\pm$ 4.6)	9 12 12 ( 11 $\pm$ 1.7)	34 25 30 ( 30 $\pm$ 4.5)	21 24 21 ( 22 $\pm$ 1.7)	7 7 6 ( 7 $\pm$ 0.6)	
	31.3	123 126 97 (115 $\pm$ 15.9)	11 15 12 ( 13 $\pm$ 2.1)	23 32 15 ( 23 $\pm$ 8.5)	26 14 20 ( 20 $\pm$ 6.0)	5 6 10 ( 7 $\pm$ 2.6)	
	62.5	99 119 118 (112 $\pm$ 11.3)	12 15 5 ( 11 $\pm$ 5.1)	20 20 21 ( 20 $\pm$ 0.6)	27 29 14 ( 23 $\pm$ 8.1)	10 15 10 ( 12 $\pm$ 2.9)	
	125	120 124 99 (114 $\pm$ 13.4)	14* 7* 12* ( 11 $\pm$ 3.6)	19 27 24 ( 23 $\pm$ 4.0)	22 19 21 ( 21 $\pm$ 1.5)	10 5 7 ( 7 $\pm$ 2.5)	
	250	93* 96* 110* (100 $\pm$ 9.1)	10* 4* 6* ( 7 $\pm$ 3.1)	22* 13* 25* ( 20 $\pm$ 6.2)	15* 13* 10* ( 13 $\pm$ 2.5)	8* 9* 3* ( 7 $\pm$ 3.2)	
	500	22* 19* 14* ( 18 $\pm$ 4.0)		18* 13* 9* ( 13 $\pm$ 4.5)	0* 3* 5* ( 3 $\pm$ 2.5)		
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	775 794 860 (810 $\pm$ 44.6)	235 321 352 (303 $\pm$ 60.6)	314 275 290 (293 $\pm$ 19.7)	724 638 737 (700 $\pm$ 53.8)	884 976 1205 (1022 $\pm$ 165.3)	
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	632 740 739 (704 $\pm$ 62.1)	301 300 326 (309 $\pm$ 14.7)	680 665 634 (660 $\pm$ 23.5)	282 318 334 (311 $\pm$ 26.6)	315 338 356 (336 $\pm$ 20.6)	

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 99.0 wt% and 0.8 wt% butadiene-isoprene-piperylene and 0.1 wt% dicyclopentadiene were contained as impurities.

ND:Not done

Table 2. Mutagenicity of 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene 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	
S9 mix (-)	0	117 108 101 (109 $\pm$ 8.0)	11 10 14 ( 12 $\pm$ 2.1)	28 19 24 ( 24 $\pm$ 4.5)	19 21 14 ( 18 $\pm$ 3.6)	11 16 13 ( 13 $\pm$ 2.5)	
	3.91	ND	12 11 11 ( 11 $\pm$ 0.6)	ND	ND	13 13 11 ( 12 $\pm$ 1.2)	
	7.81	97 106 106 (103 $\pm$ 5.2)	10 5 11 ( 9 $\pm$ 3.2)	25 21 33 ( 26 $\pm$ 6.1)	16 14 22 ( 17 $\pm$ 4.2)	6 18 21 ( 15 $\pm$ 7.9)	
	15.6	99 108 106 (104 $\pm$ 4.7)	18 11 14 ( 14 $\pm$ 3.5)	17 17 16 ( 17 $\pm$ 0.6)	19 16 17 ( 17 $\pm$ 1.5)	13 5 10 ( 9 $\pm$ 4.0)	
	31.3	107 97 96 (100 $\pm$ 6.1)	6 11 10 ( 9 $\pm$ 2.6)	21 26 22 ( 23 $\pm$ 2.6)	11 20 14 ( 15 $\pm$ 4.6)	12 14 6 ( 11 $\pm$ 4.2)	
	62.5	105 108 93 (102 $\pm$ 7.9)	8 10 6 ( 8 $\pm$ 2.0)	10 20 28 ( 19 $\pm$ 9.0)	13 18 25 ( 19 $\pm$ 6.0)	8 10 12 ( 10 $\pm$ 2.0)	
	125	89* 66* 89* ( 81 $\pm$ 13.3)	4* 3* 4* ( 4 $\pm$ 0.6)	24* 16* 20 ( 20 $\pm$ 4.0)	9* 9* 8* ( 9 $\pm$ 0.6)	11* 7* 2* ( 7 $\pm$ 4.5)	
	250	1* 22* 60* ( 28 $\pm$ 29.9)		17* 13* 28* ( 19 $\pm$ 7.8)	6* 10* 1* ( 6 $\pm$ 4.5)		
S9 mix (+)	0	112 106 107 (108 $\pm$ 3.2)	12 6 8 ( 9 $\pm$ 3.1)	25 23 40 ( 29 $\pm$ 9.3)	30 31 22 ( 28 $\pm$ 4.9)	22 8 6 ( 12 $\pm$ 8.7)	
	7.81	ND	8 11 9 ( 9 $\pm$ 1.5)	ND	ND	9 14 4 ( 9 $\pm$ 5.0)	
	15.6	93 114 103 (103 $\pm$ 10.5)	7 17 10 ( 11 $\pm$ 5.1)	25 23 17 ( 22 $\pm$ 4.2)	16 21 19 ( 19 $\pm$ 2.5)	6 13 9 ( 9 $\pm$ 3.5)	
	31.3	107 122 112 (114 $\pm$ 7.6)	11 16 15 ( 14 $\pm$ 2.6)	22 25 26 ( 24 $\pm$ 2.1)	22 25 32 ( 26 $\pm$ 5.1)	16 6 8 ( 10 $\pm$ 5.3)	
	62.5	114 122 128 (121 $\pm$ 7.0)	7 10 10 ( 9 $\pm$ 1.7)	32 23 19 ( 25 $\pm$ 6.7)	26 27 27 ( 27 $\pm$ 0.6)	11 12 10 ( 11 $\pm$ 1.0)	
	125	99 105 111 (105 $\pm$ 6.0)	7 10 13 ( 10 $\pm$ 3.0)	32 32 20 ( 28 $\pm$ 6.9)	31 12 22 ( 22 $\pm$ 9.5)	13 6 5 ( 8 $\pm$ 4.4)	
	250	81* 58* 86* ( 75 $\pm$ 14.9)	1* 2* 4* ( 2 $\pm$ 1.5)	17* 25* 20* ( 21 $\pm$ 4.0)	9* 11* 12* ( 11 $\pm$ 1.5)	2* 2* 7* ( 4 $\pm$ 2.9)	
	500	38* 8* 10* ( 19 $\pm$ 16.8)		16* 19* 12* ( 16 $\pm$ 3.5)	2* 2* 2* ( 2 $\pm$ 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	563 575 567 (568 $\pm$ 6.1)	380 384 351 (372 $\pm$ 18.0)	303 312 331 (315 $\pm$ 14.3)	531 522 545 (533 $\pm$ 11.6)	1349 1188 1356 (1298 $\pm$ 95.0)	
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	512 607 650 (590 $\pm$ 7.6)	274 271 345 (297 $\pm$ 41.9)	485 499 470 (485 $\pm$ 14.5)	308 348 287 (314 $\pm$ 31.0)	227 292 311 (277 $\pm$ 44.0)	

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 99.0 wt% and 0.8 wt% butadiene-isoprene-piperylene and 0.1 wt% dicyclopentadiene were contained as impurities.

ND:Not done

# 3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの 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 3a,4,7,7a-Tetrahydro-1H-indene on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)において、0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度(MI max)は、連続処理(24時間)では0.050 mg/ml、短時間処理(6時間)のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下ではそれぞれ0.050 mg/mlおよび0.10 mg/mlであった。各系列での処理濃度は、MI maxの2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度設定した。なお、48時間連続処理の濃度は、24時間連続処理と同じ濃度に設定した。連続処理では、S9 mix非存在下で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。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間および48時間連続処理では0.050 mg/ml、短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下ではそれぞれ0.050 mg/mlおよび0.10 mg/mlの濃度であったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理濃度群においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。短時間処理では、S9 mix非存在下において、いずれの処理群においても染色体異常は誘発されなかった。倍数性細胞については、高濃度群(0.050 mg/ml)で、細胞毒性のため規定の細胞数を観察できなかったが、いずれの処理群でも誘発されなかった。S9 mix存在下では、高濃度(0.10 mg/ml)において、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発された(14.5%)。また、高濃度(0.10 mg/ml)において、細胞毒性のため規定の細胞数を観察できなかったが、いずれの処理群でも倍数性細胞の誘発は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下で3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、染色体異常を誘発する(陽性)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: Cansera International)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

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、揮発しやすいこと、またプラスチック底面を溶解することから、培養にはガラス製培養フラスコ(25 cm<sup>2</sup>、池本理化)を用いた。2×10<sup>4</sup>個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたフラスコに播き、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)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

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン(略号:THI, CAS No.:3048-65-5, ロット番号:D1G02, 日本石油化学(株))は、無色透明液体で、水に対しては50.0 mg/ml未満、DMSOでは1 M以上1.5 M未満、アセトンでは50 mg/ml以下で溶解し、融点-80℃、沸点160.3℃、蒸気圧4 mmHgで、分子式C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>、分子量120.21、純度99.0 wt%(不純物としてブタジエン-イソプレン-ピペリレン0.8 wt%、ジシクロペンタジエン0.1 wt%、未知成分0.1 wt%を含む)の物質である。

被験物質原体は、通常の取り扱い条件においては安定である。

#### 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1%(v/v)になるように加えた。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

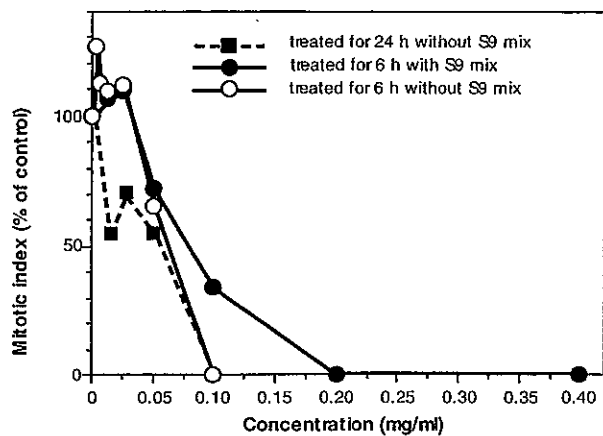


Fig. 1 Mitotic inhibition of CHL/IU cells treated with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene

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、フラスコあたりの観察細胞(1000細胞)における分裂中期細胞の頻度(分裂指数:Mitotic index)を調べ、2つのフラスコともに 0.5% 以上の分裂指数を示した最も高い濃度(MI max)を指標とした。

その結果、連続処理における MI max は、0.050 mg/ml、短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では、それぞれ 0.050 mg/ml および 0.10 mg/ml であった(Fig. 1)。

#### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、MI max の2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(24時間および48時間連続処理および短時間処理の S9 mix 非存在下:0.0063, 0.013, 0.025, 0.050, 0.10 mg/ml, 短時間処理の S9 mix 存在下:0.013, 0.025, 0.05, 0.10, 0.20 mg/ml)。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。

染色体異常試験においては1濃度あたり2枚フラスコを用い、染色体標本作製と同時に分裂指数を測定した。

#### 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  $\mu$ g/ml になるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各フラスコにつき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

分裂指数の測定結果から、MI max 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), 連続処理では 0.050 mg/ml が、短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では、それぞれ 0.050 mg/ml および 0.10 mg/ml が MI max を示したことから、これらの濃度を含む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つのフラスコ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)研究会<sup>2)</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(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、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<sup>3)</sup>(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クラン・アーミテッジの傾向性検定<sup>3)</sup>( $p < 0.05$ )を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

#### 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。3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンを加えて S9 mix 非存在下における短時間処理では、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。高濃度群(0.050 mg/ml)では細胞毒性のため、規定の細胞数が観察できなかったが、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。S9 mix 存在下では、高濃度群(0.10 mg/ml)において染色体の構造異常(gap を含む)が有意に誘発され、その頻度は 14.5% であった。また、高濃度群(0.10 mg/ml)では細胞毒性のため、規定の細胞数が観察できなかったが、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。

従って、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

## 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 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.
- 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.

## 連絡先

試験責任者: 田中憲穂

試験担当者: 山影康次, 日下部博一,  
中川ゆづき, 水谷正寛, 渡辺美香,  
出石由紀, 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, Hirokazu Kusakabe,  
Yuzuki Nakagawa, Masahiro Mizutani,  
Mika Watanabe, Yuki Izushi,  
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



Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL/IU) continuously treated with 3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-1H-indene(THI)\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								No. of cells				Concurrent <sup>6)</sup> cytotoxicity (%)	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total	Others <sup>3)</sup>	with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		
												TAG (%)	TA (%)		SA		NA
Control			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.13			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	0 ( 0.0)	0.25			100.0
THI	0.013	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.25			155.7
THI	0.025	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.38	NT	NT	116.4
THI	0.050	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.25			96.7
THI	0.10 **	24	-											-			-
MC	0.00005	24	200	10	42	109	3	0	0	164	0	96 (48.0)	93 (46.5)	0.25			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.38			100.0
THI	0.013	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.13			146.9
THI	0.025	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.25	NT	NT	124.5
THI	0.050	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.25			167.3
THI	0.10 **	48	-											-			-
MC	0.00005	48	200	2	25	87	1	1	0	116	3	69 (34.5)	67 (33.5)	0.38			-

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), 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)Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2)More than nine 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(p<0.05)when the incidence of TAG or polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control data(p<0.05)by Fisher's exact test. 6)Relative metaphase frequency to the solvent control, representing cytotoxicity, was calculated. \*:Purity of test substance was 99.0 wt%. Butadiene-isoprene-piperylene(0.8 wt%) and dicyclopentadiene(0.1 wt%)were contained as impurities. \*\*:Chromosome analysis was not performed because there were small number of metaphases due to cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL/IU) treated with 3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-1H-indene(THI)\*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								No. of cells				Concurrent <sup>6)</sup> cytotoxicity (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total	Others <sup>3)</sup>	with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		
													TAG (%)	TA (%)		SA		NA
Control				200	0	0	1	1	0	0	2	0	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	0.25			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	2	1	0	0	0	0	3	0	3 ( 1.5)	1 ( 0.5)	0.25			100.0
THI	0.013	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.00			74.7
THI	0.025	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.25	NT	NT	101.9
THI	0.050	-	6-(18)	156	0	0	2	2	0	0	4	0	3 ( 1.9)	3 ( 1.9)	0.43 <sup>7)</sup>			42.6
THI	0.10 ***	-	6-(18)	-										-			-	
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.13			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	2	0	1	2	0	0	5	0	4 ( 2.0)	2 ( 1.0)	0.13			100.0
THI	0.025	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.25			91.3
THI	0.050	+	6-(18)	200	0	1	1	0	1	0	3	1	3 ( 1.5)	3 ( 1.5)	0.38	+	NT	57.7
THI	0.10	+	6-(18)	200	4	17	24	0	1	0	46	0	29*(14.5)	27 (13.5)	0.22 <sup>8)</sup>			38.5
THI	0.20 ***	+	6-(18)	-										-			-	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	3	28	43	2	0	10	86	1	46 (23.0)	46 (23.0)	0.25			-

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, TAG:total no. of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide, NT:not tested.

1)Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2)More than nine 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(p<0.05). 6)Relative metaphase frequency to the solvent control, representing cytotoxicity, was calculated. 7)Four hundred and sixty eight cells were analysed, 8)Four hundred and fifty nine cells were analysed. \*:Significantly different from historical solvent control(p<0.05)by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\*:Purity of test substance was 99.0 wt%. Butadiene-isoprene-piperylene(0.8 wt%)and dicyclopentadiene(0.1 wt%)were contained as impurities. \*\*\*:Chromosome analysis was not performed because there were small number of metaphases due to cytotoxicity.

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデ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

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of  
3a,4,7,7a-Tetrahydro-1H-indene by Oral Administration in Rats

要約

OECD既存化学物質の安全性点検事業の一環として、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン(CAS No. 3048-65-5)の67, 200および600 mg/kgを雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後の計46日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育3日までの期間経口投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および次世代の発生に及ぼす影響について反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。

雌雄動物への反復投与により、体重増加抑制が雌雄の200および600 mg/kg群で認められた。血液学検査では、赤血球数、ヘマトクリット値および血色素量の軽度の減少が雄の600 mg/kg群で認められた。器官重量では、肝臓重量の増加ないし増加傾向ならびに体重重量比の増加が雄の600 mg/kg群および雌の200 mg/kg以上の群で認められ、さらに左右の腎臓重量の増加ないし増加傾向ならびに体重重量比の増加が雄の67 mg/kg以上の群および雌の600 mg/kg群で認められた。また、病理組織学検査では、肝臓に軽度の小葉中心性肝細胞肥大が雌雄の600 mg/kg群で、腎臓において近位尿細管上皮の硝子滴沈着および好酸性小体の発現数の増加が雄の67 mg/kg以上の群に、さらに軽度の尿細管上皮の再生が雄の200および600 mg/kg群で認められた。

以上より、雄の67 mg/kg以上の群の腎臓の重量および体重重量比の増加(増加傾向を含む)、雌の200 mg/kg以上の群の体重増加抑制ならびに肝臓の重量および体重重量比の増加(増加傾向を含む)から、本試験における3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの反復投与による無影響量は雄で67 mg/kg/day未満、雌で67 mg/kg/dayと判断した。

雌雄動物の生殖能に対しては、雄動物での影響はみられなかったが、雌の母動物の剖検および分娩観察で、妊娠期間の延長、ならびに妊娠黄体数および着床数の減少が600 mg/kg群で認められた。また、雌雄動物の次世代に対する影響として出産児数および出生児数の減少が600 mg/kg群で認められたことから、本試験における3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの雄動物の生殖に対する無影響量は600 mg/kg/day、雌動物および次世代に対する無影響量は200 mg/kg/dayと判断した。

方法

1. 被験物質

被験物質は3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン(CAS No.3048-65-5)で、不快臭のある無色透明液体であり、遮光気密容器に入れ、冷蔵庫内に保存した。本試験では、日本石油化学(株)製造のロット番号DIG02(純度:99.0%)を使用した。なお、被験物質は投与期間中安定であったことが製造業者の分析により確認された。

投与には、被験物質を1.34, 4および12 w/v%の濃度となるようにオリーブ油(日本薬局方、ヤクハン製薬(株))に溶解して調製した。調製頻度は7日間に1回以上とし、投与に用いるまで遮光気密容器に入れ、冷蔵庫内に保存した。各濃度の調製液は規定の濃度であり、かつ均一であることが(財)日本食品分析センターにより確認された。

2. 試験動物および飼育条件

生後8週齢のCrj:CD(SD)系のSPFラットを日本チャールス・リバー(株)から受け入れ、15日間の検疫・馴化飼育を行い、順調な発育を示した動物を試験に用いた。雌については10日間の性周期検査を併せて行い、性周期に異常の認められない動物を用いた。

動物は、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数10~15回/時間および照明時間12時間に設定されたバリアシステムの飼育室において、ブラケット式金属製金網床ケージを用いて飼育した。雌は、妊娠17日から金網床のかわりに実験動物用床敷(ホワイトフレック、日本チャールス・リバー(株))を敷いたステンレス製受皿を使用した。ケージ当たりの収容匹数は、群分け前は2匹以内、群分け後は1匹、交配中は雌雄各1匹、妊娠期間中は1母動物、哺育期間中は1腹とした。飼料は固型飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて、飲料水は水道水(札幌市水道水)を自動給水装置あるいは給水器を用いて、それぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量の設定、試験群の構成および群分け

試験群は、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの100, 300および1000 mg/kgを雌雄各5例に14日間反復経口投与した用量設定試験の結果を参考に設定した。すなわち、1000 mg/kg群では衰弱による屠殺例が雄5例中1例にみられたほか、同群の雌雄でよろめき歩行、呼吸緩徐、自発運動の減少、体重増加抑制、摂餌量の低値、肝臓の重量および体重重量比の増加、肝臓の暗褐色化、前胃粘膜

の肥厚が認められ、300 mg/kg群の雄では肝臓の重量および体重重量比の増加が認められた。本試験では投与期間が用量設定試験の約3倍になることから、高用量は明らかな毒性徴候がみられる用量として、1000 mg/kg群と300 mg/kg群のほぼ等比中項である600 mg/kgとし、以下公比3で200および67 mg/kgを設定した。さらに、媒体であるオリーブ油を投与する対照群を加えて計4群とし、動物数は1群当たり雌雄各12匹を用いた。群分けは、投与開始前日に投与開始前々日の体重値をもとに各群の体重が均一になるように体重別層化無作為抽出法を用いて行った。

#### 4. 投与方法

投与経路は経口投与とし、胃ゾンデを用いて強制的に胃内に行った。

投与期間は、雄については交配前14日間、交配期間および交配後の計46日間、雌については交配前14日間および交尾までの交配期間、さらに交尾例は妊娠期間および哺育3日までの期間とした。

投与容量は、体重1 kg当たり5 mlとして投与日に最も近い日に測定した体重に基づいて算出し、体重測定当日の投与容量はその日の体重に基づいて算出した。投与は10週齢から開始し、投与開始時の平均体重(体重範囲)は雄で416.4 g(392~447g)、雌で240.0 g(222~270g)であった。

#### 5. 観察、測定および検査項目

##### (1) 一般状態観察

雌雄全例について、試験期間中1日1回以上の頻度で、視診および触診により行動、外観などを観察した。

##### (2) 体重測定

体重は投与1日(投与前)、投与2, 5, 7, 10および14日、その後は雄については7日毎(投与終了日)および剖検日に、雌については妊娠0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 17および20日、哺育0, 1および4日に、また交配期間中(雄と同居中)は相手雄の測定日と同じ日に電子天秤を用いて体重を測定した。また、雄については投与1日から46日の、雌については投与1日から14日、妊娠0から20日および哺育0日から4日の体重増加量および体重増加率を算出した。

##### (3) 摂餌量測定

摂餌量は、雄については交配期間および剖検日を除き、雌については妊娠0日および哺育0日を除き体重測定日と同じ日(投与終了日を含む)に、電子天秤を用いて測定した。測定前日に適当量の飼料をケージ毎にセットし、翌日(測定日)に残量を測定して1匹当たりの1日分の摂餌量を算出した。

##### (4) 尿検査

投与期間の最終週(投与43~44日)に雄の各群6例について、ラット用代謝ケージ(KN-646 B-1型、夏目製作所)に収容して非絶食下で採尿を行った。約3時間の蓄尿の一部を用いて、pH、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血反応(以上、試験紙マル

チスティックス;バイエル・三共)および沈渣(鏡検)を検査し、21時間蓄尿を用いて比重(アタゴ製屈折計ユリコン)および尿量(容量)を測定した。また、採尿中の飲水量測定も併せて実施した。

##### (5) 血液学検査

投与46日の翌日の剖検時に約16時間絶食した雄の全例について、エーテル麻酔下で大腿静脈から採血した。EDTA・2Kで処理した血液を用いて、赤血球数、平均赤血球容積、血小板数、白血球数(以上、電気抵抗法;コールターカウンター T660型)、血色素量(シアンメトヘモグロビン法;コールターカウンター T660型)、ハマトクリット値(赤血球数、平均赤血球容積より算出)、平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数、血色素量より算出)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(ハマトクリット値、血色素量より算出)、網赤血球率(Brecher法)および白血球百分比(メイ・ギムザ染色法)を鏡検により測定した。また、大腿静脈から採取した無処理血液を用いて凝固時間(流体粘度変化による空気圧測定法;グライナー社製マイクロアグロメーター)を測定した。さらに、腹部大動脈から採取した血液をクエン酸ナトリウムで処理した後、3000 r.p.m.で10分間遠心し、得られた血漿を用いてプロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上、AMELUNG KC-10A, バクスターKK)を測定した。

##### (6) 血液生化学検査

投与46日の翌日の剖検時に約16時間絶食した雄の全例について、血液学検査のための採血後、腹部大動脈から採取した血液を3000 r.p.m.で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて、GOT, GPT(以上、IFCC法)、 $\gamma$ -GTP(包接L- $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法)、コリンエステラーゼ(ヨウ化ブチリルチオコリン基質法)、血糖(ヘキソキナーゼ法)、総コレステロール(酵素法)、トリグリセリド(遊離グリセロール消去法)、リン脂質(酵素法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法)、クレアチニン(ヤッフエ法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(フィスケ・サバロー法)、総蛋白(ビウレット法)およびアルブミン(BCG法)(以上、日立7150形自動分析装置)、ナトリウムおよびカリウム(以上、炎光法;コーニング480型炎光光度計)、クロール(電量滴定法;平沼CL-6M型クロライドカウンター)、A/G比(総蛋白、アルブミンより算出)および蛋白分画(セルロースアセテート膜電気泳動法)を測定した。

##### (7) 剖検および器官重量測定

雄については投与46日の翌日にエーテル麻酔下で採血後放血致死させ、全身の器官および組織を肉眼的に観察した。雌は全哺育児死亡例は発見後直ちに、哺育3日まで生存児のみられた例は哺育4日に、妊娠25日まで分娩の認められない例は妊娠26日に、エーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官および組織を肉眼的に観察し、子宮の着床痕および卵巣の妊娠黄体を計数した。さらに、雌雄の全例について肝臓、腎臓(左右)、胸腺、副腎(左

右), 精巣, 精巣上体(左右)および卵巣の重量を電子天秤を用いて測定するとともに, 器官体重重量比を算出した。

#### (8) 病理組織学検査

雌雄の全例について, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 心臓, 肺, 脳, 下垂体, 胸腺, 副腎, 甲状腺, 胃(前胃・腺胃), 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 前立腺および卵巣を10%中性緩衝ホルマリン液, 精巣および精巣上体をブアン液で固定後, パラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色標本ならびに必要に応じて特殊染色(PAS染色, PTAH染色)標本を作製して病理組織検査を行った。

#### (9) 生殖能検査

雌全例について, 投与開始日の10日前から交尾までの連日, ギムザ染色による腔垢塗抹標本を作製し, 光学顕微鏡下で性周期段階(発情前期, 発情期前期, 発情期後期, 発情後期および発情休止期)の判定を行い, 性周期の異常の有無を検索した。投与14日の雌雄について, 同試験群内で夕方から1対1(無作為組合せ)で14日間を限度として同居させ, 雌の腔垢中に精子が確認された日を妊娠0日とした。妊娠の成立は雌の子宮に着床痕が確認された場合とし, 交尾率〔(交尾動物数/同居動物数)×100〕および受胎率〔(受胎動物数/交尾動物数)×100〕を算出した。

#### (10) 分娩および母性行動観察

交尾した雌全例について, 妊娠21日から分娩終了日まで分娩状態を観察し, 午前9時に分娩が終了していた動物を当該日分娩とし, その日を哺育0日とした。分娩終了が確認された母動物について母性行動, 総出産児数, 生存児数および死亡児数, 出産児の性別および外表を観察した。また, 妊娠期間〔妊娠0日から哺育0日までの日数〕, 出産率〔(生児出産雌数/妊娠雌数)×100〕, 分娩率〔(総出産児数/着床痕数)×100〕, 出生率〔(出生児数/総出産児数)×100〕, 哺育4日時哺育率〔(哺育4日時に哺育児の認められる雌動物数/正常に分娩した雌動物数)×100〕および性比〔(雄生児数/雌生児数)〕を算出した。また, 剖検時の計測結果から着床率〔(着床痕数/妊娠黄体数)×100〕を算出した。

#### (11) 新生児の一般状態観察および生存性

全例について, 哺育0日から哺育4日まで1日1回生存および死亡を確認し, 一般状態および外表について観察した。観察結果から新生児の哺育4日の生存率〔(哺育4日生存児数/出生児数)×100〕を1腹を単位として算出した。なお, 喰殺を受け死亡あるいは不明例となった新生児は死亡例として扱った。

#### (12) 新生児の体重測定

測定対象となる全例について, 哺育0, 1および4日に電子天秤を用いて測定し, 体重値は1腹毎に雌雄別に1匹あたりの平均値で示した。得られた測定値から体重増加量(哺育4日体重-哺育0日体重)および体重増加率〔(体重増加量/哺育0日体重)×100〕を算出した。

#### (13) 新生児の剖検

死亡例は直ちに剖検し, その他の例については哺育4

日に二酸化炭素吸入法を用いて安楽致死させた後, 体外表(口腔内を含む)および全身の器官および組織を肉眼的に観察した。死亡例および異常所見部位の認められた例については, whole bodyを10%中性緩衝ホルマリン液で固定し, 保存した。

## 6. 統計解析

性周期, 交尾率, 受胎率, 出産率および哺育率, ならびに病理組織学検査結果のうち1段階の陽性グレードがみられた所見については, 多試料 $\chi^2$ -検定を行い, 有意な場合, 2試料 $\chi^2$ -検定をおこなった。また, これらの検定に不適な場合はFisherの直接確率検定法を用いた。その他の項目ならびに病理組織学検査結果のうち2段階以上の陽性グレードがみられた所見については, Bartlettの等分散検定後, 一元配置分散分析法あるいはKruskal-Wallis法により解析し, 有意な場合, Dunnettの検定法あるいはMann-WhitneyのU-検定法により, 対照群と3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン各投与群との比較を行った。対照群との検定に際しては, 有意水準を5および1%とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### (1) 一般状態観察

雄では, 流涎が600 mg/kg群の10例で投与15日以降, 投与46日までのほぼ毎日, 投与直後あるいは投与前から投与後3時間までの間に観察された。600 mg/kg群の他の1例では投与24日にのみ流涎が認められたが, 残り1例では流涎は認められなかった。

雌においては, 妊娠前投与期間で流涎が600 mg/kg群の7例で投与15日以降, 投与前ないし投与直後より1時間程度の間認められた。妊娠期間では600 mg/kg群の11例で妊娠1日以降, 妊娠期間のほぼ毎日, 投与前ないし投与直後より2時間程度の間断続的に認められた。哺育期間では哺育0日より3日の間に, 600 mg/kg群の8例で投与直後より1時間程度の間散発的に認められた。

#### (2) 体重推移(Table 1,2)

雄では, 体重の低値が200 mg/kg群の投与21~46日, 600 mg/kg群の投与5~46日に認められ, これらの群では体重増加量および体重増加率の低値も認められた。

雌の妊娠前投与期間では, 体重の低値が600 mg/kg群で投与7日以降にみられ, 体重増加量および体重増加率の低値も200および600 mg/kg群で認められた。妊娠期間でも, 体重の低値が200 mg/kg群で妊娠1~20日に, 600 mg/kg群で妊娠0~20日にみられ, 600 mg/kg群では体重増加量の低値も認められた。哺育期間では, 体重の低値が200 mg/kg群で哺育1日に, 600 mg/kg群で哺育0および1日にみられたが, 哺育期間の体重増加量および体重増加率は対照群を上回り, 600 mg/kg群ではいずれも統計学的に有意な高値を示した。

(3) 摂餌量 (Table 3,4)

摂餌量の低値が雄の200 mg/kg群の投与2, 7, 14および21日, ならびに600 mg/kg群の投与2日に認められた。

雌においては, 妊娠前投与期間で200 mg/kg群の投与7日, 妊娠期間では67および200mg/kg群の妊娠7日に低値が認められた。哺育期間に異常は認められなかった。

(4) 尿検査

いずれの検査項目にも対照群と比較して雄に異常は認められなかった。

(5) 血液学検査 (Table 5)

赤血球数, ヘマトクリット値および血色素量の軽度の減少が雄の600 mg/kg群で認められた。

(6) 血液生化学検査 (Table 6)

いずれの検査項目にも対照群と比較して雄に異常は認められなかった。

(7) 器官重量 (Table 7,8)

雄では, 剖検時体重の減少が200および600 mg/kg群で, 肝臓の体重重量比の増加が600 mg/kg群で, 左右の腎臓の重量の増加が200および600 mg/kg群で, 左右の腎臓の体重重量比の増加が67, 200および600 mg/kg群で, 左右の精巣の体重重量比の増加が600 mg/kg群で認められた。なお, 600 mg/kg群の肝臓重量および67 mg/kg群の左右の腎臓重量に統計学的有意差はないが, 対照群と比較して高値が認められた。

一方, 600 mg/kg群の左右の精巣重量には対照群との差は認められなかった。

雌では, 肝臓の重量の増加が600 mg/kg群で, 肝臓の体重重量比の増加が200および600 mg/kg群で, 左右の腎臓の重量および体重重量比の増加が600 mg/kg群で認められた。なお, 200 mg/kg群の肝臓重量にも統計学的な有意差はないが, 対照群と比較して高値が認められた。

(8) 剖検

雄で, 回腸憩室が600 mg/kg群で1例に認められた。雌では, いずれの例にも異常は認められなかった。なお, 流涎を示した例では唾液腺に異常は認められなかった。

(9) 病理組織学検査 (Table 9, 10)

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与による影響と考えられる所見として, 雄では, 肝臓で軽度の小葉中心性肝細胞肥大が600 mg/kg群で9例に, 腎臓で軽度の近位尿細管上皮の硝子滴沈着が67および200 mg/kg群で各1例, 中等度の硝子滴沈着が67および200 mg/kg群で各11例, 600 mg/kg群で12例全例に, 軽度の近位尿細管上皮の好酸性小体が67および200 mg/kg群で各8例, 600 mg/kg群で9例に認められ, 統計学的にも有意な変化であった。また, 統計学的有意差は認められないものの, 高用量群でより多くの例に認められ, 3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与との関連が考えられる所見として, 腎臓の尿細管上皮の再生が200 mg/kg群で4例, 600 mg/kg群で3例に認められた。

雌では, 600 mg/kg群の1例に, 肝臓で軽度の小葉中

心性肝細胞肥大が認められた。その他に被験物質投与と関連する変化は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

(1) 生殖能検査 (Table 11)

雌の性周期検査では全例に異常は認められなかった。また, 雌雄の交尾までに要した日数, 交尾率および受胎率にも3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与の影響は認められなかった。

(2) 分娩および母性行動観察 (Table 12)

妊娠期間の延長ならびに妊娠黄体数, 着床数, 出産児数および出生児数の減少が600 mg/kg群で認められた。

分娩異常として, 分娩中から分娩終了時まで生児のみられない例が600 mg/kg群で1例, また哺育異常として, 全哺育児死亡例が600 mg/kg群で1例みられた。分娩異常例は着床数15, 出産児数が5例であったが, 分娩終了時に5例全例が死亡し, 喰殺を受けた例もみられた。母動物の病理組織学検査では胸腺の萎縮が認められた。全哺育児死亡例では, 着床数2, 出産児数が1例であり, その1例が哺育2日に死亡した。母動物の病理組織学検査では下垂体に嚢胞が認められたのみであった。

分娩終了時の死亡児が67および200 mg/kg群で各雌3例, 600 mg/kg群で雄3例, 雌5例および性別不明例2例が認められ, 67 mg/kg群の雌1例に腰椎の欠損, 痕跡尾および鎖肛が認められた。

(3) 新生児の生存性 (Table 12)

600 mg/kg群で, 哺育4日の生存児数の低値が認められた。

(4) 新生児の一般状態観察

死亡あるいは不明例が対照群で雄2例, 67 mg/kg群で雌雄各1例, 200 mg/kg群で雄3例, 600 mg/kg群で雄9例および雌5例に認められた。これらのうち, 痕跡尾および鎖肛が600 mg/kg群で雄1例に認められた。

生存例では痕跡尾およびその痕跡尾の脱落が200 mg/kg群で雄1例に認められ, 外傷が200 mg/kg群の他の1例に認められた。

(5) 新生児の体重推移 (Table 12)

いずれの3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与群にも, 対照群と比較して体重推移に異常は認められなかった。

(6) 新生児の剖検

一般状態観察でみられた600 mg/kg群の痕跡尾および鎖肛の1例, 哺育4日に屠殺した200 mg/kg群の痕跡尾の欠損の1例および外傷の1例の他に, 異常は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性

一般状態観察では, 流涎が雄においては600 mg/kg群の12例中10例で投与15日以降のほぼ毎日, また他1例では一過性に認められた。雌でも, 雄と同様に, 流涎が

600 mg/kg群で妊娠前、投与期間および哺育期間を通して投与15日以降に計11例にみられた。剖検ではいずれの例にも唾液腺に異常は認められず、投与前から流涎がみられた例もいたことから、投与された3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンによる影響ではなく、投与薬物の臭いや口腔内への刺激による条件づけが成立したことによると考えられた。

体重推移では、体重増加抑制が雄の投与期間、雌の妊娠前交配期間および妊娠期間を通して200および600 mg/kg群で認められ、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与の影響と考えられた。雌の600 mg/kg群では他に、哺育期間の体重増加量および増加率の高値が認められたが、それまでの体重増加抑制に対する哺育期間中の代償的応答と考えられた。

摂餌量では、雄の200 mg/kg群で投与2, 7, 14および21日に低値が認められた。しかし、高用量である雄の600 mg/kg群では投与2日に一過性の低値を示したのみであり、雌で67あるいは200 mg/kg群の哺育期間を除いた期間にみられた低値も一過性であったことから、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与による摂餌量への影響はないと考えられた。

血液に及ぼす影響として、赤血球数、ヘマトクリット値および色素量の減少が雄の600 mg/kg群で認められたが、いずれも軽度であり、尿検査、血液生化学検査ならびに脾臓を含む病理組織学検査においても異常は認められなかった。

肝臓に対する3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与の影響として、雄の600 mg/kg群で重量の増加傾向および体重重量比の増加がみられ、同群の病理組織学検査では軽度の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。雌でも肝臓の重量の増加ないし増加傾向および体重重量比の増加が200 mg/kg以上の群で認められ、病理組織学検査でも、1例のみの発現であったが600 mg/kg群で肝臓に軽度の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。

腎臓では、雄の67 mg/kg群で重量の増加傾向および体重重量比の増加、200および600 mg/kg群で重量および体重重量比の増加が認められ、雌でも腎臓の重量および体重重量比の増加が600 mg/kg群で認められた。病理組織学検査では、雄の3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与群全群で、近位尿細管上皮の硝子滴沈着および好酸性小体の発現に有意差が認められた。尿細管上皮の再生についても雄の200および600 mg/kg群で出現頻度の増加傾向が認められ、いずれも3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与による影響と考えられた。炭水化合物をラットに投与した場合、特に雄では腎臓の近位尿細管に硝子滴が沈着することが知られており、それ自体に毒性学的意義はないと考えられるが、硝子滴の沈着の程度が強い場合には尿細管上皮の障害および再生を引き起こすと考えられている<sup>1)</sup>。また、好酸性小体についても硝子滴と同一物質であるという報告がある<sup>2)</sup>。したがって、本試験では近位尿細管上皮への硝子滴あるいは好酸性小体の出現数の増加を認めたものの、毒性病理学的影響は200および600 mg/kg群でみられた尿細管上

皮の再生の出現頻度の増加と考えるのが妥当と判断した。

また、雄の腎臓重量および体重重量比の増加は、硝子滴および好酸性小体の増加と関連していると思われるが、雌の600 mg/kg群ではこのような病理組織学的変化を伴わずに重量および体重重量比の増加が生じており、一元的には説明できなかった。

以上のことから、雄の67 mg/kg以上の群の腎臓の重量および体重重量比の増加(増加傾向を含む)、雌の200 mg/kg以上の群の体重増加抑制ならびに肝臓の重量および体重重量比の増加(増加傾向を含む)から、本試験における3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの反復投与による無影響量は雄で67 mg/kg/day未満、雌で67 mg/kg/dayと判断した。

## 2. 生殖発生毒性

生殖能検査では雌の性周期、雌雄の交尾および受胎、雌雄の生殖器および内分泌器官の重量、あるいは剖検および病理組織学検査において3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与による影響は認められなかった。なお、600 mg/kg群で認められた精巣の体重重量比の増加は重量に影響が認められないことから、同群の体重低値に基づくものと判断された。3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与群の不妊例の生殖器では、その原因を示唆する病理組織学所見は認められなかった。

分娩異常として分娩終了時に生児のみられない例、ならびに哺育異常として全哺育児死亡例が600 mg/kg群でそれぞれ1例認められた。しかし、後述のように、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与による妊娠黄体数の減少はみられるものの、着床率および胎児の生存性に及ぼす影響はみられず、またこれら2例の母動物では共通した所見がみられないことから、偶発的なものと考えられた。

母動物の剖検および分娩観察では、妊娠期間の延長ならびに妊娠黄体数、着床数、出産児数および出産生児数の減少が600 mg/kg群で認められた。着床数、出産児数、生存児数の減少については、それぞれ着床率、出産率および新生児の哺育4日の生存率に3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与の影響は認められないことから、これらは妊娠黄体数(排卵数)の減少に起因した変化であると考えられ、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンが着床および胎児の生存性に直接影響を及ぼしたとは考えられなかった。妊娠期間の延長については、ウサギで産児数の少ない場合に妊娠期間が長くなることが知られており<sup>3)</sup>、本試験の場合も出産児数の減少との関連が考えられた。

新生児では、一般状態観察および剖検で痕跡尾、鎖肛および腰椎の欠損が67 mg/kg群で1例、痕跡尾が200 mg/kg群で1例、痕跡尾および鎖肛が600 mg/kg群で1例にみられたが、各群1例のみの出現であり、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与との関連はないものと考えられた。また、哺育4日の生存児数の低値が600 mg/kg群で認められたが、前述した全哺育児死亡例お

よび妊娠黄体数の減少に起因するものであり、体重推移にも異常はみられないことから、新生児の生存性に対する3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン投与の影響はないと考えられた。

以上のことから、雄動物の生殖能に対する影響は600 mg/kg群でも認められず、一方、雌動物では600 mg/kg群で妊娠黄体数の減少ならびにそれに起因すると考えられる着床数の減少および妊娠期間の延長が、次世代に対しては出産児数および出産生児数の減少が認められたことから、本試験における3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの親世代の生殖に対する無影響量は、雄動物では600 mg/kg/day、雌動物では200 mg/kg/dayであり、また、次世代に対する無影響量は200 mg/kg/dayと判断した。

#### 文献

- 1) P.Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation," Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1990, pp. 532-538.
- 2) 海平充代ら, ラット慢性腎症の病理組織学的解析-硝子滴変性について-, 第8回日本毒性病理学会講演要旨集, 76(1992).
- 3) 佐久間勇次 監, "ウサギ-生殖生理と実験手技-, " 近代出版, 東京, 1988, p.24.

#### 連絡先

試験責任者: 吉村浩幸  
試験担当者: 茂野 均, 長谷淳一, 古川正敏  
(株)化合物安全性研究所  
〒229 北海道札幌市清田区真栄363番24号  
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

#### Correspondence

Authors: Hiroyuki Yoshimura (Study director)  
Hitoshi Shigeno, Jyunichi Nagaya,  
Masatoshi Furukawa  
Safety Research Institute for Chemical  
Compounds Co., Ltd.  
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,  
004, Japan  
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Body weight changes in male rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Day 1	418.2 ± 13.4	414.7 ± 12.3	415.8 ± 15.6	416.8 ± 12.8
2	422.5 ± 15.4	419.5 ± 12.0	416.5 ± 15.8	411.6 ± 16.6
5	444.3 ± 18.3	439.3 ± 13.7	434.3 ± 18.2	424.8 ± 12.8*
7	455.0 ± 18.6	451.9 ± 16.3	441.8 ± 17.4	432.2 ± 15.5**
10	471.8 ± 19.6	465.3 ± 16.6	457.4 ± 20.1	448.0 ± 18.0**
14	496.4 ± 24.1	487.7 ± 19.9	474.2 ± 25.7	465.9 ± 21.1**
21	519.4 ± 29.5	514.0 ± 20.8	493.3 ± 27.4*	485.2 ± 25.0**
28	553.4 ± 31.7	547.3 ± 24.8	522.7 ± 34.0*	510.8 ± 27.2**
35	583.6 ± 33.8	575.8 ± 27.9	547.3 ± 37.7*	533.0 ± 27.5**
42	597.1 ± 39.3	588.8 ± 42.0	551.8 ± 45.3*	546.5 ± 31.6**
46	608.3 ± 45.9	600.1 ± 47.3	560.6 ± 49.1*	555.6 ± 33.8*
Day 1-46, gain	190.1 ± 34.3	185.4 ± 41.0	144.8 ± 42.8*	138.8 ± 24.9**
Body weight gain <sup>a)</sup> (%)	45.3 ± 7.2	44.6 ± 9.3	34.8 ± 10.0**	33.2 ± 5.4**

Values are expressed as Mean±S.D. (gram).

a: (Body weight gain/body weight on day 1) × 100

Significantly different from 0 mg/kg group; \*: p ≤ 0.05, \*\*: p ≤ 0.01



Table 2 Body weight changes in female rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
Before the gestation period				
No. of animals	12	12	12	12
Day 1	238.3 ± 7.8	239.5 ± 6.2	241.2 ± 11.0	240.9 ± 9.2
2	241.6 ± 11.7	241.5 ± 9.2	241.2 ± 11.1	240.6 ± 10.6
5	247.6 ± 8.9	249.1 ± 7.2	246.9 ± 11.7	240.6 ± 10.7
7	255.4 ± 12.0	252.9 ± 8.9	248.4 ± 10.1	243.3 ± 9.8*
10	260.6 ± 14.6	259.2 ± 9.4	255.5 ± 14.2	247.1 ± 10.8*
14	268.2 ± 16.6	265.2 ± 8.9	258.9 ± 15.9	250.6 ± 11.8**
Day 1-14, gain	29.8 ± 12.3	25.7 ± 8.7	17.8 ± 8.9*	9.7 ± 9.3**
Body weight gain <sup>a</sup> (%)	12.5 ± 4.9	10.8 ± 3.8	7.3 ± 3.7**	4.0 ± 3.9**
During the gestation period				
No. of animals	10	11	12	11
Day 0	278.9 ± 8.7	277.9 ± 13.4	267.9 ± 11.5	253.3 ± 9.1**
1	285.8 ± 7.7	285.5 ± 11.2	274.9 ± 11.8*	265.2 ± 8.4**
3	298.6 ± 8.4	294.3 ± 11.8	284.8 ± 12.5*	278.0 ± 8.2**
5	308.1 ± 7.9	303.5 ± 13.0	293.1 ± 12.1**	283.0 ± 7.8**
7	318.8 ± 10.7	310.6 ± 11.4	301.1 ± 14.5**	291.3 ± 9.2**
10	335.2 ± 10.6	325.8 ± 14.8	315.4 ± 15.2**	305.5 ± 10.8**
14	360.0 ± 14.5	348.1 ± 18.9	338.5 ± 17.9**	323.9 ± 11.3**
17	393.4 ± 16.2	381.4 ± 22.6	371.9 ± 17.7*	350.8 ± 13.5**
20	445.9 ± 20.3	425.1 ± 30.4	417.8 ± 20.2*	388.7 ± 21.9**
Day 0-20, gain	167.0 ± 14.9	147.2 ± 25.4	149.9 ± 16.1	135.5 ± 21.3**
Body weight gain <sup>b</sup> (%)	59.9 ± 4.8	53.0 ± 9.0	56.0 ± 6.4	53.6 ± 8.9
During the lactation period				
No. of animals	10	11	12	10
Day 0	339.6 ± 15.3	331.2 ± 24.3	321.0 ± 22.1	306.5 ± 13.7**
1	336.2 ± 12.8	329.2 ± 21.9	318.9 ± 22.7*	311.0 ± 7.9**
4	342.9 ± 12.8	335.5 ± 21.0	330.3 ± 20.5	323.3 ± 13.7(9)
Day 0-4, gain	3.3 ± 10.7	4.4 ± 5.4	9.3 ± 16.2	19.1 ± 9.6(9)**
Body weight gain <sup>b</sup> (%)	1.0 ± 3.2	1.4 ± 1.7	3.1 ± 5.3	6.3 ± 3.2(9)**

Values are expressed as Mean±S.D.(gram).

Values in parentheses are no. of animals examined.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:p≤0.05, \*\*:p≤0.01

a: (Body weight gain/body weight on day 1)×100

b: (Body weight gain/body weight on day 0)×100

Table 3 Food consumption in male rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Day 1	28.8 ± 4.1	27.3 ± 2.4	26.9 ± 3.1	28.0 ± 2.4
2	27.8 ± 3.3	27.3 ± 2.3	23.8 ± 3.5*	21.2 ± 5.9**
5	28.3 ± 4.5	26.5 ± 1.9	24.5 ± 3.6	27.3 ± 2.7
7	26.3 ± 3.5	24.5 ± 3.4	22.6 ± 3.4*	25.1 ± 3.3
10	26.9 ± 3.4	25.3 ± 2.2	24.3 ± 3.4	27.3 ± 2.3
14	27.5 ± 4.2	26.1 ± 2.3	24.0 ± 3.5*	27.3 ± 3.3
21	24.2 ± 3.2	22.9 ± 2.3(11)	21.1 ± 2.8*	25.3 ± 3.3
28	24.3 ± 3.4	23.2 ± 2.0	24.8 ± 3.9	26.3 ± 2.3
35	24.6 ± 3.9	24.0 ± 3.5	25.3 ± 3.3	27.3 ± 2.1
42	22.0 ± 3.6	22.4 ± 4.8	20.4 ± 3.2	25.6 ± 3.0
46	24.4 ± 4.0	23.9 ± 4.5	23.0 ± 3.4	26.2 ± 2.2

Values are expressed as Mean±S.D. (gram/day).

Values in parentheses are no. of animals examined.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$

Table 4 Food consumption in female rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
Before the gestation period				
No. of animals	12	12	12	12
Day 1	16.4 ± 2.5	16.3 ± 2.4	17.4 ± 3.0	15.8 ± 3.9
2	15.6 ± 3.3	15.4 ± 3.3	14.2 ± 2.7	13.8 ± 3.7
5	14.4 ± 3.2	14.2 ± 2.8	13.3 ± 2.3	12.3 ± 3.0
7	16.3 ± 2.4	14.3 ± 2.0	13.6 ± 1.9*	14.7 ± 2.3
10	17.3 ± 3.2	15.8 ± 2.2	15.4 ± 3.3	14.8 ± 2.1
14	15.9 ± 3.6	15.4 ± 2.6	15.2 ± 3.4	15.1 ± 3.2
During the gestation period				
No. of animals	10	11	12	11
Day 1	19.1 ± 3.2	18.9 ± 1.6	17.3 ± 2.6	16.8 ± 3.3
3	20.4 ± 3.2	18.2 ± 2.6	18.4 ± 3.3	19.6 ± 2.3
5	19.4 ± 3.2	19.5 ± 3.3	18.0 ± 1.7	19.8 ± 3.1
7	21.6 ± 2.6	18.7 ± 2.0*	18.8 ± 2.3*	19.5 ± 2.0
10	21.6 ± 2.1	20.2 ± 2.4	20.2 ± 3.1	21.1 ± 2.8
14	20.4 ± 2.3	18.5 ± 4.3	20.2 ± 1.7	21.1 ± 3.1
17	21.4 ± 2.8	20.7 ± 3.1	22.0 ± 2.4	23.0 ± 3.1
20	19.0 ± 3.2	17.8 ± 4.5	19.8 ± 3.9	19.8 ± 3.0
During the lactation period				
No. of animals	10	11	12	10
Day 1	13.4 ± 4.2	12.1 ± 2.7	15.0 ± 4.7	16.6 ± 4.0
4	31.5 ± 7.4	28.5 ± 5.2	32.0 ± 6.1	30.7 ± 5.5(9)

Values are expressed as Mean±S.D. (gram/day).

Values in parentheses are no. of animals examined.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$

Table 5 Hematological findings in male rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1*H*-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	9.35 $\pm$ 0.266	9.09 $\pm$ 0.246	9.10 $\pm$ 0.444	8.76 $\pm$ 0.337**
Hemoglobin (g/dl)	16.4 $\pm$ 0.48	16.0 $\pm$ 0.71	15.9 $\pm$ 0.63	15.4 $\pm$ 0.58**
Hematocrit (%)	52.4 $\pm$ 0.85	51.1 $\pm$ 1.88	51.4 $\pm$ 2.25	49.9 $\pm$ 1.41**
MCV (fl)	56.1 $\pm$ 1.59	56.2 $\pm$ 1.07	56.5 $\pm$ 1.35	57.1 $\pm$ 1.68
MCH (pg)	17.5 $\pm$ 0.74	17.6 $\pm$ 0.47	17.5 $\pm$ 0.63	17.6 $\pm$ 0.69
MCHC (%)	31.3 $\pm$ 0.73	31.3 $\pm$ 0.52	31.0 $\pm$ 0.63	30.8 $\pm$ 0.70
Platelet ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1124 $\pm$ 117.0	1075 $\pm$ 91.4	1071 $\pm$ 95.2	1116 $\pm$ 91.1
PT (sec)	12.1 $\pm$ 0.51	12.2 $\pm$ 0.24	12.6 $\pm$ 0.63	12.3 $\pm$ 0.55(11)
APTT (sec)	28.1 $\pm$ 2.24	27.1 $\pm$ 2.44	29.2 $\pm$ 3.51	29.8 $\pm$ 4.13(11)
CT (sec)	307 $\pm$ 110.9	382 $\pm$ 121.7	289 $\pm$ 122.9	351 $\pm$ 100.0
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	14.4 $\pm$ 2.85	11.8 $\pm$ 2.11	15.4 $\pm$ 3.30	15.5 $\pm$ 2.97
Differential leukocyte counts (%)				
Lymphocytes	87 $\pm$ 4.2	83 $\pm$ 6.3	89 $\pm$ 5.2	88 $\pm$ 5.2
Neutrophils				
Band	1 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 0.8	0 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0.5
Segmented	12 $\pm$ 3.9	15 $\pm$ 6.2	9 $\pm$ 4.5	11 $\pm$ 4.4
Eosinophils	1 $\pm$ 0.8	1 $\pm$ 0.8	1 $\pm$ 1.0	1 $\pm$ 1.2
Basophils	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
Monocytes	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
Reticulocyte (%)	12 $\pm$ 2.6	15 $\pm$ 3.9	14 $\pm$ 3.7	14 $\pm$ 3.6

Values are expressed as Mean $\pm$ S.D.

Values in parentheses are no. of animals examined.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*\*:p $\leq$ 0.01

fl:femtoliter, pg:picogram.

Table 6 Blood chemical findings in male rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
TP (g/dl)	6.53 ± 0.31	6.48 ± 0.25	6.30 ± 0.36	6.59 ± 0.27
Alb (g/dl)	2.49 ± 0.08	2.44 ± 0.13	2.45 ± 0.14	2.60 ± 0.14
Alb (%)	40.96 ± 4.25	39.22 ± 3.97	40.98 ± 4.33	40.79 ± 3.79
α <sub>1</sub> -glob (%)	25.33 ± 2.82	25.44 ± 2.33	23.03 ± 3.22	23.95 ± 1.24
α <sub>2</sub> -glob (%)	10.96 ± 2.15	11.43 ± 2.13	12.33 ± 1.67	11.85 ± 2.28
β-glob (%)	16.73 ± 1.96	18.17 ± 1.92	16.75 ± 1.77	17.41 ± 2.35
γ-glob (%)	6.03 ± 1.91	5.75 ± 1.33	6.91 ± 2.34	6.00 ± 1.90
A/G	0.612 ± 0.035	0.603 ± 0.042	0.633 ± 0.039	0.648 ± 0.039
BUN (mg/dl)	15.77 ± 1.50	16.58 ± 1.89	16.61 ± 1.94	16.94 ± 1.94
Creatinine (mg/dl)	0.54 ± 0.07	0.54 ± 0.07	0.53 ± 0.07	0.51 ± 0.05
Glucose (mg/dl)	166.8 ± 15.7	163.8 ± 15.7	158.3 ± 18.5	154.5 ± 21.1
PL (mg/dl)	138.6 ± 28.5	135.3 ± 27.2	124.5 ± 22.6	146.2 ± 17.1
TG (mg/dl)	124.3 ± 72.9	94.3 ± 47.7	74.1 ± 37.9	72.0 ± 26.5
T-Cho (mg/dl)	69.2 ± 11.3	71.7 ± 15.4	66.7 ± 11.6	77.8 ± 10.1
T-Bil (mg/dl)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
GOT (IU/l)	110.4 ± 18.7	110.6 ± 25.9	117.9 ± 22.4	94.8 ± 13.7
GPT (IU/l)	26.9 ± 5.6	25.3 ± 4.7	24.3 ± 3.6	24.0 ± 3.8
ChE (IU/l)	77.2 ± 25.1	77.3 ± 13.4	65.9 ± 17.0	72.5 ± 17.0
γ-GTP (IU/l)	1.05 ± 0.48	1.09 ± 0.43	1.20 ± 0.48	1.30 ± 0.30
Ca (mg/dl)	9.66 ± 0.62	9.55 ± 0.62	9.53 ± 0.63	9.42 ± 0.48
P (mg/dl)	7.44 ± 0.58	7.80 ± 0.80	7.71 ± 0.48	7.82 ± 0.68
Na (mEq/l)	142.21 ± 1.68	142.83 ± 1.07	142.54 ± 1.39	141.83 ± 1.13
K (mEq/l)	4.614 ± 0.375	4.808 ± 0.391	4.632 ± 0.323	4.805 ± 0.301
Cl (mEq/l)	104.7 ± 2.0	105.6 ± 2.0	104.9 ± 1.4	104.3 ± 1.2

Values are expressed as Mean±S.D.

Table 7 Absolute and relative organ weights in male rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Body weight (g)	584.3 ± 41.3	575.1 ± 41.1	535.3 ± 47.2*	520.5 ± 32.4**
Absolute organ weight				
Thymus (g)	0.353 ± 0.091	0.351 ± 0.119	0.303 ± 0.071	0.314 ± 0.062
Liver (g)	16.557 ± 2.672	16.931 ± 2.591	15.240 ± 1.892	17.684 ± 1.591
Kidney (right, g)	1.688 ± 0.155	1.853 ± 0.213	2.013 ± 0.168**	2.106 ± 0.171**
Kidney (left, g)	1.659 ± 0.161	1.829 ± 0.211	1.961 ± 0.141**	2.063 ± 0.194**
Testis (right, g)	1.846 ± 0.101	1.794 ± 0.133	1.782 ± 0.137	1.811 ± 0.156
Testis (left, g)	1.798 ± 0.099	1.780 ± 0.125	1.668 ± 0.331	1.778 ± 0.158
Epididymis (right, g)	0.693 ± 0.046	0.679 ± 0.036	0.672 ± 0.068	0.666 ± 0.046
Epididymis (left, g)	0.670 ± 0.050	0.664 ± 0.038	0.635 ± 0.119	0.659 ± 0.061
Adrenal gland (right, mg)	30.6 ± 4.7	31.1 ± 3.4	30.4 ± 3.8	29.1 ± 3.2
Adrenal gland (left, mg)	32.8 ± 4.8	32.8 ± 4.0	32.7 ± 4.3	30.4 ± 3.5
Relative organ weight				
Thymus (g%)	0.060 ± 0.014	0.061 ± 0.019	0.057 ± 0.014	0.060 ± 0.012
Liver (g%)	2.822 ± 0.322	2.933 ± 0.292	2.840 ± 0.165	3.397 ± 0.202**
Kidney (right, g%)	0.290 ± 0.019	0.322 ± 0.027*	0.378 ± 0.027**	0.405 ± 0.033**
Kidney (left, g%)	0.284 ± 0.019	0.317 ± 0.027*	0.368 ± 0.028**	0.398 ± 0.034**
Testis (right, g%)	0.317 ± 0.029	0.312 ± 0.026	0.334 ± 0.028	0.348 ± 0.038*
Testis (left, g%)	0.308 ± 0.032	0.311 ± 0.026	0.314 ± 0.066	0.343 ± 0.034*
Epididymis (right, g%)	0.119 ± 0.010	0.119 ± 0.008	0.126 ± 0.013	0.128 ± 0.011
Epididymis (left, g%)	0.115 ± 0.013	0.117 ± 0.009	0.120 ± 0.025	0.127 ± 0.014
Adrenal gland (right, mg%)	5.24 ± 0.78	5.43 ± 0.66	5.73 ± 0.94	5.60 ± 0.62
Adrenal gland (left, mg%)	5.61 ± 0.76	5.74 ± 0.85	6.15 ± 1.00	5.85 ± 0.62

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:p≤0.05, \*\*:p≤0.01

Table 8 Absolute and relative organ weights in female rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	10	11	12	9
Body weight (g)	342.9 ± 12.8	335.5 ± 21.0	330.3 ± 20.5	323.3 ± 13.7
Absolute organ weight				
Thymus (g)	0.209 ± 0.065	0.178 ± 0.041	0.179 ± 0.059	0.164 ± 0.034
Liver (g)	14.091 ± 1.295	14.014 ± 1.177	15.007 ± 1.161	15.920 ± 1.532**
Kidney (right, g)	0.996 ± 0.079	1.002 ± 0.077	1.038 ± 0.058	1.102 ± 0.087*
Kidney (left, g)	0.954 ± 0.080	0.980 ± 0.075	0.998 ± 0.054	1.058 ± 0.066**
Ovary (right, mg)	56.0 ± 9.0	54.3 ± 9.4	55.9 ± 11.0	51.7 ± 8.5
Ovary (left, mg)	47.7 ± 6.1	55.4 ± 9.4	49.1 ± 10.7	42.0 ± 8.5
Adrenal gland (right, mg)	33.8 ± 4.7	34.2 ± 5.4	33.6 ± 3.9	30.0 ± 2.4
Adrenal gland (left, mg)	35.0 ± 4.8	36.6 ± 6.7	36.0 ± 4.0	33.4 ± 2.2
Relative organ weight				
Thymus (g%)	0.061 ± 0.018	0.053 ± 0.011	0.054 ± 0.016	0.051 ± 0.010
Liver (g%)	4.110 ± 0.346	4.177 ± 0.270	4.557 ± 0.411*	4.921 ± 0.406**
Kidney (right, g%)	0.292 ± 0.024	0.299 ± 0.037	0.313 ± 0.016	0.342 ± 0.027**
Kidney (left, g%)	0.278 ± 0.029	0.294 ± 0.032	0.303 ± 0.014	0.329 ± 0.021**
Ovary (right, mg%)	16.303 ± 2.371	16.181 ± 2.780	17.024 ± 3.643	16.041 ± 2.985
Ovary (left, mg%)	13.893 ± 1.560	16.549 ± 2.929	14.939 ± 3.439	13.040 ± 2.784
Adrenal gland (right, mg%)	9.87 ± 1.39	10.22 ± 1.68	10.16 ± 0.82	9.29 ± 0.86
Adrenal gland (left, mg%)	10.20 ± 1.32	10.94 ± 2.01	10.90 ± 1.01	10.36 ± 0.79

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:p≤0.05, \*\*:p≤0.01

Table 9 Histopathological findings in male rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item		0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings	Grade				
Liver:					
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	+	0	0	0	9**
Fibrosis, focal	+	0	0	1	0
Kidney:					
Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	Total	3	12**	12**	12**
	+	3	1	1	0
	++	0	11	11	12
Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	+	3	8	8	9*
Cast, cellular	+	0	0	1	0
Regeneration, tubular epithelium	+	1	1	4	3
Heart:					
Cellular infiltration, histiocyte	+	0	2	1	0
Lung:					
Accumulation, foam cell	+	0	1	0	1
Pituitary gland:					
Cyst	<+>	0	0	0	1
Ileum:					
Diverticulum	<+>	0	0	0	1
Testis:					
Atrophy, tubule	Total	0	1	1	0
	+	0	1	0	0
	+++	0	0	1	0
Epididymis:					
Decrease, sperm, intraductal	+++	0	0	1	0
Appearance, desquamative spermatogenic cell	++	0	0	1	0
Prostate:					
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitial	Total	1	3	5	2
	+	1	2	5	1
	++	0	1	0	1

Values are no. of animals with findings.

Grade: +=slight, ++=moderate, +++=severe change and <+>=detected.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ .

Table 10 Histopathological findings in female rats treated orally with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1*H*-indene in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item		0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals examined		12 <sup>a</sup>	12 <sup>b</sup>	12	12 <sup>b</sup>
Organ: Findings	Grade				
Liver:					
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	+	0	0	0	1
Kidney:					
Regeneration, tubular epithelium	+	0	0	1	0
Cast, hyaline	++	1	0	0	0
Mineralization, cortico-medullary junction	+	0	0	0	1
Spleen:					
Hematopoiesis, extramedullary, increased	+	1	0	0	0
Lung:					
Accumulation, foam cell	+	0	0	1	0
Thymus:					
Atrophy	Total	1	0	1	2
	+	1	0	1	1
	++	0	0	0	1
Pituitary gland:					
Cyst	<+>	0	0	0	1
Thyroid:					
Cyst	<+>	0	0	0	1
Ovary:					
Loss, corpus luteum	<+>	1	0	0	0
Cyst, corpus luteum	<+>	0	0	0	1

Values are no. of animals with findings.

Grade: +=slight, ++=moderate, +++=severe change and <+>=detected.

a: Includes two animals that had no evidence of pregnancy.

b: Includes one animal that had no evidence of pregnancy.

Table 11 Influence of 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene on reproductive performances of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals examined	12	12	12	12
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs with successful copulation	12	12	12	12
Duration of mating (days, Mean±S.D.)	3.1 ± 0.9	2.7 ± 1.7	2.9 ± 1.2	2.3 ± 1.3
Copulation index <sup>a)</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
No. of pregnant animals	10	11	12	11
Fertility index <sup>b)</sup> (%)	83.3	91.7	100.0	91.7

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

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

Table 12 Influence of 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene on developmental performances of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	67 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of pregnant females	10	11	12	11
No. of corpora lutea	18.8 ± 1.8	17.8 ± 2.8	18.3 ± 2.2	15.9 ± 1.8*
No. of implantation sites	18.0 ± 1.1	16.0 ± 3.9	16.8 ± 1.6	13.7 ± 4.3**
Implantation index <sup>a)</sup> (%)	96.2 ± 5.8	88.9 ± 15.9	91.8 ± 5.6	85.5 ± 24.4
No. of pups born	16.4 ± 1.1	14.4 ± 3.5	15.3 ± 1.6	11.8 ± 4.8**
Delivery index <sup>b)</sup> (%)	91.2 ± 5.2	90.6 ± 9.7	91.8 ± 6.9	83.2 ± 21.5
Live pups born				
No.	16.4 ± 1.1	14.1 ± 3.8	15.1 ± 1.7	10.9 ± 5.4**
Live birth index <sup>c)</sup> (%)	100.0 ± 0.0	97.2 ± 5.4	98.4 ± 5.4	88.0 ± 29.7
Sex ratio (M/F)	1.23 ± 0.92	1.03 ± 0.60	1.53 ± 1.72	1.22 ± 0.50(10)
Dead pups born				
No.	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.9	0.9 ± 1.6(10)
Gestation length (day)	22.3 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.2 ± 0.6	23.0 ± 0.6(10)*
Gestation index <sup>d)</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	90.9(10)
Nursing index <sup>e)</sup> (%)	100.0	100.0	100.0	90.0(10)
Live pups on day 4				
No.	16.2 ± 1.0	13.9 ± 3.6	14.8 ± 1.7	10.6 ± 4.4(10)**
Viability index <sup>f)</sup> (%)	98.8 ± 2.5	98.9 ± 2.4	98.4 ± 3.9	80.8 ± 33.4(10)
Body weight of pups (g)				
Male				
Day 0	6.47 ± 0.54	6.75 ± 0.85	6.33 ± 0.71	6.26 ± 0.66(10)
Day 4	9.93 ± 1.03	10.66 ± 1.97	10.06 ± 1.40	9.53 ± 1.23(9)
Day 0-4, gain (g)	3.46 ± 0.64	3.92 ± 1.14	3.73 ± 0.81	3.46 ± 0.94(9)
Body weight gain <sup>g)</sup> (%)	53.45 ± 8.68	57.14 ± 9.58	58.82 ± 9.09	56.41 ± 12.65(9)
Female				
Day 0	6.18 ± 0.47	6.33 ± 0.78	58.82 ± 9.09	5.78 ± 0.59(9)
Day 4	9.45 ± 0.81	10.00 ± 2.08	9.28 ± 1.22	8.93 ± 1.34(9)
Day 0-4, gain (g)	3.27 ± 0.42	3.67 ± 1.31	3.40 ± 0.77	3.16 ± 1.07(9)
Body weight gain (%)	52.90 ± 5.50	56.67 ± 12.93	57.63 ± 9.79	54.71 ± 16.64(9)

Values are expressed as Mean±S.D.

Values in parentheses are no. of animals examined.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*: p≤0.05, \*\*: p≤0.01

a: (No. of implantation sites/no. of corpora lutea)×100

b: (No. of pups born/no. of implantation sites)×100

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

d: (No. of females with live pups delivered/no. of pregnant females)×100

e: (No. of females nursing live pups/no. of females with normal delivery)×100

f: (No. of live pups on day 4/no. of live pups born)×100

g: (Body weight gain/body weight on day 0)×100



## 5-エチリデン-2-ノルボルネンの細菌を用いる復帰変異試験

### Reverse Mutation Test of 5-Ethylidene-2-norbornene on Bacteria

#### 要約

5-エチリデン-2-ノルボルネンについて、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>+</sup>および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>-</sup>の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加試験のいずれも用量設定試験で抗菌性が認められたことから、本試験はS9 mix無添加試験では、TA1535およびTA1537は3.91～125 μg/プレート、TA100, TA98およびWP2 *uvrA*は7.81～250 μg/プレート、S9 mix添加試験ではTA100, TA1535およびTA98は7.81～250 μg/プレート、TA1537およびWP2 *uvrA*は15.6～500 μg/プレートの範囲で実施した。

その結果、2回の本試験とも用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の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。

以上の結果から、5-エチリデン-2-ノルボルネンは、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。

#### 方法

##### 【検定菌】

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

*S. typhimurium* の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames博士から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを用い、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感受性および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、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℃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】

5-エチリデン-2-ノルボルネンは、分子量120.20の無色透明液体である。用いた被験物質は、ロット番号6J01、純度99.4 wt%〔不純物として軽質分:0.5% (このうちビニルシクロヘプテンを0.3 wt%含み、未知成分は0.2 wt%)、重質分:0.1 wt%〕であり、日本石油化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで酸化劣化を防止するため窒素シールを行い、室温で保管した。

5-エチリデン-2-ノルボルネンは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:DLR7825およびDLF7632, 和光純薬工業(株))に溶解して最高濃度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。

##### 【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および2AAはDMSO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は超純水に溶解し、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(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
D-ピオチン	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、極東製薬工業(株)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・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-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
バクテアガー(清水食品)	15 g

結果および考察

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。

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 $\mu$ 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されたS9(キッコーマン(株))を用いた。

〔試験方法〕

ブレインキューベーション法<sup>3)</sup>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、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、37°Cで20分間ブレインキューベーションしたのち、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、対照群として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た。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。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。

〔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 無添加試験あるいはS9 mix 添加試験において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照値の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。

〔用量設定試験〕

5-エチリデン-2-ノルボルネンについて50.0~5000  $\mu$ g/プレート の範囲で公比を約3として、試験を実施した。その結果、S9 mix 無添加試験においては、すべての検定菌で150  $\mu$ g/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TA1535とTA98では150  $\mu$ g/プレート以上で、その他の検定菌では500  $\mu$ g/プレート以上で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験については250  $\mu$ g/プレートとし、S9 mix 添加試験についてはTA1535とTA98は250  $\mu$ g/プレート、その他の検定菌は500  $\mu$ g/プレートとした。

〔本試験〕

上記の最高用量に基づいて、それぞれ公比2で6用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。ただし、TA1535とTA1537のS9 mix 無添加試験、およびTA100のS9 mix 添加試験では、本試験Iにおいて抗菌性のない用量が4用量に満たなかったため、最高用量をそれぞれ250  $\mu$ g/プレートから125  $\mu$ g/プレートに、500  $\mu$ g/プレートから250  $\mu$ g/プレートに下げ、本試験Iをやり直すとともに、本試験IIを実施した。その結果、すべての検定菌において、2回の本試験とも溶媒対照値の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、5-エチリデン-2-ノルボルネンは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York 1981, pp. 351-360.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K.H. Norpoth, R.C. Garner, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1980, pp. 273-285.

Table 1. Mutagenicity of 5-ethylidene-2-norbornene on 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	93 110 91 ( 93 $\pm$ 10.4)	10 11 16 ( 12 $\pm$ 3.2)	20 19 23 ( 21 $\pm$ 2.1)	25 9 24 ( 19 $\pm$ 9.0)	11 5 9 ( 8 $\pm$ 3.1)	
	3.91	ND	14 8 9 ( 10 $\pm$ 3.2)	ND	ND	2 7 4 ( 4 $\pm$ 2.5)	
	7.81	84 79 92 ( 85 $\pm$ 6.6)	14 7 8 ( 10 $\pm$ 3.8)	26 25 13 ( 21 $\pm$ 7.2)	14 16 14 ( 15 $\pm$ 1.2)	6 7 7 ( 7 $\pm$ 0.6)	
	15.6	89 84 82 ( 85 $\pm$ 3.6)	9 14 18 ( 14 $\pm$ 4.5)	19 22 22 ( 21 $\pm$ 1.7)	18 22 12 ( 17 $\pm$ 5.0)	3 1 6 ( 3 $\pm$ 2.5)	
	31.3	101 98 80 ( 93 $\pm$ 11.4)	10 11 14 ( 12 $\pm$ 2.1)	21 20 18 ( 20 $\pm$ 1.5)	12 19 13 ( 15 $\pm$ 3.8)	4 7 7 ( 6 $\pm$ 1.7)	
	62.5	69 73 75 ( 72 $\pm$ 3.1)	9* 7* 13* ( 10 $\pm$ 3.1)	23 21 17 ( 20 $\pm$ 3.1)	15 14 10 ( 13 $\pm$ 2.6)	5* 4* 3* ( 4 $\pm$ 1.0)	
	125	36* 83* 77* ( 65 $\pm$ 25.6)	1* 6* 4* ( 4 $\pm$ 2.5)	14* 11* 20* ( 15 $\pm$ 4.6)	7* 14* 13* ( 11 $\pm$ 3.8)	3* 1* 2* ( 2 $\pm$ 1.0)	
	250	56* 0* 9* ( 22 $\pm$ 30.1)	ND	26* 17* 18* ( 20 $\pm$ 4.9)	0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	ND	
S9 mix (+)	0	72 88 84 ( 81 $\pm$ 8.3)	22 11 17 ( 17 $\pm$ 5.5)	31 32 40 ( 34 $\pm$ 4.9)	32 32 39 ( 34 $\pm$ 4.0)	11 8 12 ( 10 $\pm$ 2.1)	
	7.81	64 81 69 ( 71 $\pm$ 8.7)	21 10 13 ( 15 $\pm$ 5.7)	ND	28 32 22 ( 27 $\pm$ 5.0)	ND	
	15.6	75 68 63 ( 69 $\pm$ 6.0)	20 14 17 ( 17 $\pm$ 3.0)	25 28 19 ( 24 $\pm$ 4.6)	31 26 26 ( 28 $\pm$ 2.9)	7 10 7 ( 8 $\pm$ 1.7)	
	31.3	72 85 69 ( 75 $\pm$ 8.5)	9 10 16 ( 12 $\pm$ 3.8)	23 29 30 ( 27 $\pm$ 3.8)	24 40 30 ( 31 $\pm$ 8.1)	6 8 9 ( 8 $\pm$ 1.5)	
	62.5	64 91 83 ( 79 $\pm$ 13.9)	9 15 12 ( 12 $\pm$ 3.0)	33 21 21 ( 25 $\pm$ 6.9)	38 30 28 ( 32 $\pm$ 5.3)	13 8 9 ( 10 $\pm$ 2.6)	
	125	61* 62* 39* ( 54 $\pm$ 13.0)	11* 4* 8* ( 8 $\pm$ 3.5)	30 22 23 ( 25 $\pm$ 4.4)	37 27 21 ( 28 $\pm$ 8.1)	5 5 8 ( 6 $\pm$ 1.7)	
	250	33* 44* 38* ( 38 $\pm$ 5.5)	6* 10* 6* ( 7 $\pm$ 2.3)	27 24 26 ( 26 $\pm$ 1.5)	23* 18* 20* ( 20 $\pm$ 2.5)	2* 8* 5* ( 5 $\pm$ 3.0)	
	500	ND	ND	28* 37* 22* ( 29 $\pm$ 7.5)	ND	5* 0* 5* ( 3 $\pm$ 2.9)	
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	456 465 416 (446 $\pm$ 26.1)	377 409 401 (396 $\pm$ 16.7)	127 128 150 (135 $\pm$ 13.0)	639 636 634 (636 $\pm$ 2.5)	1641 1498 1585 (1575 $\pm$ 72.1)	
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	290 279 280 (283 $\pm$ 6.1)	182 201 210 (198 $\pm$ 14.3)	442 484 533 (486 $\pm$ 45.5)	434 389 405 (409 $\pm$ 22.8)	185 167 153 (168 $\pm$ 16.0)	

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 99.4 wt% and 0.3 wt% vinylbicycloheptene and 0.3 wt% unidentified compounds were contained as impurities.

ND:Not done

Table 2. Mutagenicity of 5-ethylidene-2-norbornene on bacteria ( II )

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu$ g/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	92 83 72 ( 82 $\pm$ 10.0)	16 14 11 ( 14 $\pm$ 2.5)	22 20 15 ( 19 $\pm$ 3.6)	24 17 15 ( 19 $\pm$ 4.7)	8 8 5 ( 7 $\pm$ 1.7)	
	3.91	ND	14 10 15 ( 13 $\pm$ 2.6)	ND	ND	2 5 11 ( 6 $\pm$ 4.6)	
	7.81	82 89 109 ( 93 $\pm$ 14.0)	16 13 8 ( 12 $\pm$ 4.0)	23 21 17 ( 20 $\pm$ 3.1)	25 23 19 ( 22 $\pm$ 3.1)	6 5 9 ( 7 $\pm$ 2.1)	
	15.6	92 85 91 ( 89 $\pm$ 3.8)	18 9 13 ( 13 $\pm$ 4.5)	13 17 19 ( 16 $\pm$ 3.1)	28 13 16 ( 19 $\pm$ 7.9)	7 4 3 ( 5 $\pm$ 2.1)	
	31.3	82 72 75 ( 76 $\pm$ 5.1)	8 14 11 ( 11 $\pm$ 3.0)	31 16 21 ( 23 $\pm$ 7.6)	11 27 21 ( 20 $\pm$ 8.1)	5 3 8 ( 5 $\pm$ 2.5)	
	62.5	70 72 86 ( 76 $\pm$ 8.7)	6* 5* 1* ( 4 $\pm$ 2.6)	14 15 20 ( 16 $\pm$ 3.2)	15 20 25 ( 20 $\pm$ 5.0)	0* 3* 4* ( 2 $\pm$ 2.1)	
	125	41* 38* 56* ( 45 $\pm$ 9.6)	0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	21* 21* 31* ( 24 $\pm$ 5.8)	2* 2* 1* ( 2 $\pm$ 0.6)	0* 3* 0* ( 1 $\pm$ 1.7)	
	250	0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	ND	12* 9* 13* ( 11 $\pm$ 2.1)	0* 2* 3* ( 2 $\pm$ 1.5)	ND	
S9 mix (+)	0	98 82 88 ( 89 $\pm$ 8.1)	17 15 13 ( 15 $\pm$ 2.0)	31 21 25 ( 26 $\pm$ 5.0)	39 38 28 ( 35 $\pm$ 6.1)	11 10 22 ( 14 $\pm$ 6.7)	
	7.81	74 100 101 ( 92 $\pm$ 15.3)	5 15 11 ( 10 $\pm$ 5.0)	ND	33 29 28 ( 30 $\pm$ 2.6)	ND	
	15.6	88 96 92 ( 92 $\pm$ 4.0)	5 6 9 ( 7 $\pm$ 2.1)	28 20 25 ( 24 $\pm$ 4.0)	24 30 19 ( 24 $\pm$ 5.5)	4 7 10 ( 7 $\pm$ 3.0)	
	31.3	79 120 87 ( 95 $\pm$ 21.7)	11 17 14 ( 14 $\pm$ 3.0)	21 27 25 ( 24 $\pm$ 3.1)	25 34 30 ( 30 $\pm$ 4.5)	11 11 4 ( 9 $\pm$ 4.0)	
	62.5	100 91 82 ( 91 $\pm$ 9.0)	14 14 16 ( 15 $\pm$ 1.2)	19 27 15 ( 20 $\pm$ 6.1)	30 26 29 ( 28 $\pm$ 2.1)	10 5 10 ( 8 $\pm$ 2.9)	
	125	48* 67* 82* ( 66 $\pm$ 17.0)	9* 13* 5* ( 9 $\pm$ 4.0)	23 17 24 ( 21 $\pm$ 3.8)	21 30 26 ( 26 $\pm$ 4.5)	12 11 14 ( 12 $\pm$ 1.5)	
	250	35* 38* 59* ( 44 $\pm$ 13.1)	9* 8* 11* ( 9 $\pm$ 1.5)	29 23 26 ( 26 $\pm$ 3.0)	33* 17* 31* ( 27 $\pm$ 8.7)	6* 7* 4* ( 6 $\pm$ 1.5)	
	500	ND	ND	25* 19* 25* ( 23 $\pm$ 3.5)	ND	0* 0* 1* ( 0 $\pm$ 0.6)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose( $\mu$ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix(-)	Number of colonies/plate	453 477 416 (449 $\pm$ 30.7)	499 491 505 (498 $\pm$ 7.0)	67 75 72 ( 71 $\pm$ 4.0)	555 542 494 (530 $\pm$ 32.1)	825 843 749 (806 $\pm$ 49.9)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose( $\mu$ g/plate)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix(+)	Number of colonies/plate	517 415 396 (443 $\pm$ 65.1)	259 210 200 (223 $\pm$ 31.6)	293 275 260 (276 $\pm$ 16.5)	330 332 502 (388 $\pm$ 98.7)	209 190 159 (186 $\pm$ 25.2)	

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

\*:Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.4 wt% and 0.3 wt% vinylbicycloheptene and 0.3 wt% unidentified compounds were contained as impurities.

ND:Not done

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：原 巧, 川上久美子,  
堀谷尚古  
(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: Tohru Shibuya (Study Director)  
Takumi Hara, Kumiko Kawakami,  
Naoko Horiya  
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

# 5-エチリデン-2-ノルボルネンの 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 5-Ethylidene-2-norbornene on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

5-エチリデン-2-ノルボルネンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理では0.07 mg/mL、S9 mix存在下およびS9 mix非存在下での短時間処理では0.1 mg/mLおよび0.06 mg/mLであった。各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、それぞれ公比2で5濃度設定した。連続処理では、24時間および48時間処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、新鮮培地で18時間培養後、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。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間および48時間連続処理では0.050 mg/mL、短時間処理のS9 mix存在下および非存在下では0.10 mg/mLであったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、5-エチリデン-2-ノルボルネンは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/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:Filtron)を10 vol%添加したイーグルMEM(日本製薬㈱)培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

5-エチリデン-2-ノルボルネンはプラスチック底面を溶解することから、培養にはガラスフラスコ(T25 cm<sup>2</sup>、池本理化工業㈱)を用いた。2×10<sup>4</sup>個のCHL/IU細胞を、

培養液5 mLを入れたフラスコに播き、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)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

5-エチリデン-2-ノルボルネン(ロット番号:6J01、日本石油化学㈱)は、無色透明液体で、水に対しては100 mmol/L未満、DMSOでは50 mg/mL以上、1 mol/L未満、アセトンでは2 mol/L以上で溶解し、油性で、分子量120.20、凝固点-80℃以下、沸点147℃、純度99.4 wt%(不純物として軽質分0.5%(うちビニルピシクロヘプテンが0.3 wt%、未知成分が0.2 wt%)、重質分0.1 wt%)の物質である。被験物質原体は、水との反応性はなく、320℃以上で異常発熱する。光によって着色する。

#### 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(ロット番号:KCJ7945、和光純薬工業㈱)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 vol%になるように加えた。

#### 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、コールターカウンター(Coulter Electronics Ltd.)を用いて各群の細胞数を計測し、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%細胞増殖抑制濃度は、0.07 mg/mLであった。また、S9 mix存在下およびS9 mix非存在下における短時間処理では、それぞれ0.1 mg/mLおよび0.06 mg/mLであった(Fig. 1)。

#### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、50%増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(連続処理およびS9 mix存在下での

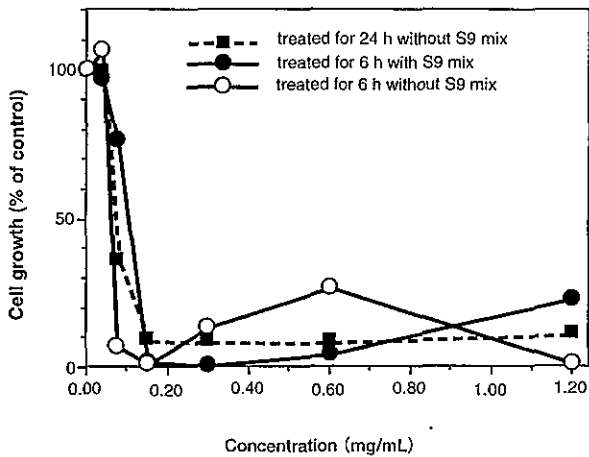


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 5-ethylidene-2-norbornene

短時間処理:0.013, 0.025, 0.050, 0.10, 0.20 mg/mL, S9 mix非存在下での短時間処理:0.0063, 0.013, 0.025, 0.050, 0.10 mg/mL). 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, 注射用蒸留水(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。

染色体異常試験において, 溶媒対照群と処理群では1濃度あたり2フラスコを用い, 染色体標本の作製およびコールターカウンターによる細胞増殖率測定を行った。

#### 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。スライド標本は各フラスコにつき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

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により, 20%以上の相対増殖率で, かつ2フラスコともに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), 連続処理では0.050 mg/mL, 短時間処理においてはS9 mix存在下および非存在下ともに0.10 mg/mLが, 染色体分析の可能な最高濃度であったことから, これらの濃度を含む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つのフラスコ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・哺乳動物試験研究会(MMS)<sup>1)</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(polyplod)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, 溶媒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( $p < 0.01$ )。また, 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>( $p < 0.01$ )を行った。最終的な判定は, 統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

#### 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。5-エチリデン-2-ノルボルネンを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても, 染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。5-エチリデン-2-ノルボルネンを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても, 染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って, 5-エチリデン-2-ノルボルネンは, 上記の試験条件下で, 試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

#### 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 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.
- 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.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 5-ethylidene-2-norbornene (ENB)\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>1</sup>	No. of cells			Concurrent		Mitotic index <sup>7</sup> (%)		
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2</sup>	total		with aberrations TAG (%)	Polyploid <sup>4</sup> TA (%)	Trend test <sup>5</sup> SA NA	cytotoxicity <sup>6</sup> (%)				
Control			200	1	0	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.50			—	—
Solvent <sup>1</sup>	0	24	200	1	0	1	1	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.38			100.0	—
ENB	0.013	24	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			135.0	—
ENB	0.025	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-	115.3	—
ENB	0.050	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			124.1	4.7
ENB	0.10***	24	—												—			7.2	—
ENB	0.20***	24	—												—			6.3	—
MC	0.00005	24	200	0	4	27	1	0	0	0	32	0	24*(12.0)	24*(12.0)	0.13			—	—
Solvent <sup>1</sup>	0	48	200	0	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
ENB	0.013	48	200	0	3	0	0	0	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38			99.8	—
ENB	0.025	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-	105.8	—
ENB	0.050	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			97.2	1.2
ENB	0.10***	48	—												—			5.3	—
ENB	0.20***	48	—												—			8.4	—
MC	0.00005	48	200	5	17	37	0	4	0	0	63	1	48*(24.0)	46*(23.0)	0.50			—	—

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no. of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C.

1)Acetone was used as solvent. 2)More than nine 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<0.01. 6)Cell number, representing cytotoxicity, was measured with Coulter Counter. 7)Number of metaphase per 500 cells was scored in each flask in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes.

\*:Significantly different from solvent control at p<0.01 by Fisher's exact test. \*\*:Purity was 99.4%. Vinylbicycloheptene (0.3 wt%) and unidentified compounds (0.3 wt%) were contained as impurities. \*\*\*:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 5-ethylidene-2-norbornene (ENB)\*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>1</sup>	No. of cells			Concurrent		Mitotic index <sup>7</sup> (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2</sup>	total		with aberrations TAG (%)	Polyploid <sup>4</sup> TA (%)	Trend test <sup>5</sup> SA NA	cytotoxicity <sup>6</sup> (%)			
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			—	—
Solvent <sup>1</sup>	0	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13			100.0	—
ENB	0.025	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			101.6	—
ENB	0.050	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	-	-	98.4	—
ENB	0.10	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25			48.8	5.1
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			—	—
Solvent <sup>1</sup>	0	+	6-(18)	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.50			100.0	—
ENB	0.025	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			108.3	—
ENB	0.050	+	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	-	-	109.0	—
ENB	0.10	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38			43.3	4.5
ENB	0.20***	+	6-(18)	—											—			10.7	—
CPA	0.005	+	6-(18)	200	8	22	65	0	0	0	95	1	61*(30.5)	58*(29.0)	0.38			—	—

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, 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 nine 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<0.01. 6)Cell number, representing cytotoxicity, was measured with Coulter Counter. 7)Number of metaphase per 500 cells was scored in each flask in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes.

\*:Significantly different from solvent control at p<0.01 by Fisher's exact test. \*\*:Purity was 99.4%. Vinylbicycloheptene (0.3 wt%) and unidentified compounds (0.3 wt%) were contained as impurities. \*\*\*:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.



連絡先

試験責任者：田中憲穂  
試験担当者：日下部博一，渡辺美香，  
中川ゆづき，井上みゆき，橋本恵子  
(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: Noriho Tanaka (Study director)  
Hirokazu Kusakabe, Mika Watanabe,  
Yuzuki Nakagawa, Miyuki Inoue,  
Keiko Hashimoto  
Hatano Research Institute, Food and Drug  
Safety Center  
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

# 5-エチリデン-2-ノルボルネンのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験

## Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test of 5-Ethylidene-2-norbornene by Oral Administration in Rats

### 要約

5-エチリデン-2-ノルボルネンは、高分子ゴム改質剤、塗料、接着剤などの製造に使用されている<sup>1)</sup>。毒性に関する情報としては、ラットの経口投与によるLD<sub>50</sub>値は2527 mg/kg<sup>2)</sup>で、皮膚や粘膜に刺激性を有する報告<sup>3)</sup>などがあるが、生殖発生毒性については知られていない。今回、SDラット(1群雌雄各12匹)に4, 20および100 mg/kgの用量を交配前14日から交配を経て雄は計45日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育3日まで経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

#### 1. 反復投与毒性

100 mg/kg群において、雄で死亡が投与25および36日にそれぞれ1例認められ、雌雄とも投与開始後7日から剖検時まで体重増加の抑制および摂餌量の減少が認められた。また、雄では肝臓の相対重量の増加および暗褐色化がみられ、病理組織学的には小葉中心性肝細胞肥大および肝細胞の空胞化などが認められた。

#### 2. 生殖発生毒性

親動物では、100 mg/kg群において、交尾率、受胎率、出産率、黄体数、分娩状態および哺育行動には被験物質に起因する変化は認められなかったが、妊娠期間の延長、着床数の低値傾向、着床率および分娩率の減少が認められた。

児動物では、100 mg/kg群において、総出産児数、出生産児数および哺育4日の生児数に低値が認められた。

その他、性比、出生率、新生児の4日の生存率、剖検所見および外表に被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果より、5-エチリデン-2-ノルボルネンの反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも20 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量についても親動物および児動物ともに20 mg/kg/dayと考えられた。

### 方法

#### 1. 被験物質

5-エチリデン-2-ノルボルネン [(株)サン・ペトロケミカル、茨城、Lot No. 7K03、純度99.5%] は、融点-80℃以下、沸点147℃、蒸気圧6 mmHg/25℃、水との反応性はなく、320℃以上で異常発熱し、光で着色、水に0.01 g以下/100 g(25℃)溶解し、有機溶剤に易溶の不快

臭がある無色透明な液体である。被験物質は酸化劣化を防止するため窒素シールを行い、密閉、冷蔵、遮光下で保管した。なお、被験物質は試験期間中安定であったことが確認された。被験物質はコーン油に溶解させ、投与に供するまで冷蔵・遮光保存し、調製後8日以内に使用した。投与開始前に投与液中の被験物質の調製後8日間の安定性および濃度を確認した。

#### 2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)から入手した雌雄のSDラット [Crj:CD(SD)IGS] を6日間検疫・馴化後、試験に供した。投与開始前日に体重別層化無作為抽出法により、1群につき雌雄各12匹を振り分けた。投与開始時の週齢は雌雄とも9週齢、体重範囲は雄が320~356 g、雌が203~237 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中、温度22±2℃、湿度55±15%、換気約12回/時、照明12時間/日(7:00~19:00)に設定した飼育室を使用した。動物は実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに、群分け後は1匹、交配期間は雌雄各1匹、哺育期間は1腹で収容し、飼育した。

動物には、オートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1:オリエンタル酵母工業(株))および孔径5 μmのフィルターで濾過後、紫外線照射した水道水をそれぞれ自由に摂取させた。

#### 3. 投与量および投与方法

SDラットの雌雄を用いて、被験物質を30, 100および300 mg/kgの用量で14日間経口投与した結果、100 mg/kg以上の群の雌雄で体重の増加抑制あるいは減少、肝臓重量の増加がみられ、さらに300 mg/kg群では摂餌量の減少も認められた。以上の結果から、本試験では高用量を100 mg/kgとし、以下公比5で中用量を20 mg/kg、低用量を4 mg/kgとした。また、媒体(コーン油)のみを投与する対照群を設けた。

投与期間は、雌雄とも交配前14日間、交配期間および雄は剖検前日までの計45日間、雌は交尾成立後、妊娠、分娩を経て哺育3日(交尾確認日を妊娠0日、分娩確認日を哺育0日とする)までの計40~45日間とし、テフロン製胃ゾンデを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与液量は5 mL/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。

4. 反復投与毒性に関する観察・検査

1) 一般状態

全例について生死, 外観, 行動等を投与前および投与後に毎日観察した。

2) 体重および摂餌量

体重は, 雌雄とも投与開始日, 投与開始後3, 7, 14日およびその後は週1回, 交尾した雌は妊娠0, 7, 14, 20日および哺育0, 4日に測定した。また, 雄では投与開始日の体重を基準に, 雌では交配前期間, 妊娠期間, 哺育期間について, それぞれ投与開始日, 妊娠0日, 哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。摂餌量は, 交配期間を除き体重測定日に測定した。

3) 病理学検査

雌雄とも最終投与日の翌日に, 全生存動物についてペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈の切断・放血により安楽死させて剖検し, 肝臓, 精巣および精巣上体の重量を測定した。また, 解剖日の体重を基に相対重量(対体重比)を算出した。さらに, これらの器官に加えて, 精のう, 前立腺, 卵巣, 子宮, 膈, 全新生児が死亡した母動物の乳腺および肉眼的異常部位を採取し, 10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後保存した。ただし, 死亡動物以外の精巣および精巣上体はブアン液で固定した。

病理組織学検査は, 雌雄の対照群および100 mg/kg群の肝臓, 精巣および精巣上体, 全動物の肉眼的異常部位, 非妊娠雌の卵巣について, 常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検した。なお, 雄の肝臓で被験物質に起因する変化が認められたため, 4および20 mg/kg群の雄の肝臓についても検査した。また, 100 mg/kg群の代表例の肝臓は脂肪(オイルレッドO)染色標本を作製し, 鏡検した。

5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

1) 生殖機能

交配前の投与期間終了後, 各群内で雄1雌1の交配対を設け, 昼夜同居させ, 毎日午前中に雌の膈垢を採取し, ギムザ染色して鏡検した。膈垢形成あるいは膈垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし, その日を妊娠0日とした。交尾した対は雌雄を分離し, 以後の検査に供した。これらの結果から, 交尾所要日数(交配開始後, 交尾成立までに要した日数), 交尾成立までに逸した発情期の回数, 交尾率 [(交尾動物数/同居動物数) × 100], 受胎率 [(受胎動物数/交尾動物数) × 100] を算出した。

2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ, 分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が完了している動物を当該日分娩とし, その日を哺育0日とした。その後, 新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ, 授乳, 営巣, 食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。

母動物は, 哺育4日の剖検時に卵巣, 子宮を摘出し,

黄体数および着床数を検査した。分娩しなかった雌は交尾確認後26日に剖検し, 肉眼的に着床が認められない動物の子宮は10%硫化アンモニウム水溶液に浸漬して着床の有無を確認した。これらの結果から, 妊娠期間(妊娠0日から出産が確認された日までの期間), 出産率 [(生児出産雌数/受胎雌数) × 100], 着床率 [(着床数/黄体数) × 100], 分娩率 [(総出産児数/着床数) × 100] を算出した。

3) 新生児の観察・検査

(1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数(出産児数, 死産児数), 性別および外表異常の有無を検査した。その後, 一般状態, 死亡の有無を哺育4日まで毎日観察した。哺育0および4日の生存児数から出生率 [(出産児数/総出産児数) × 100], 新生児の4日の生存率 [(哺育4日生存児数/出産児数) × 100] を算出した。

(2) 体重

哺育0および4日に全生存児を個体ごとに測定した。また, 哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。

(3) 剖検

哺育4日に全生存児の口腔を含む外表を検査した後, 親動物と同様にして安楽死させ, 剖検した。死亡動物は食殺等で検査に耐えないものを除き, 10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬・固定後, 実体顕微鏡下で剖検した。

6. 統計解析

計量データについては, パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い, 分散が一様の場合は一元配置分散分析を行った。分散が一様でない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合はDunnett法またはDunnett型の多重比較を行った。計数データのうち, 病理組織所見はa × bの $\chi^2$ 検定を行い, 有意差が認められた場合はArmitageの $\chi^2$ 検定により対照群と各被験物質投与群間の比較を行った。その他の計数データはFisherの直接確率法により検定した。有意水準は5%とし, 新生児に関するデータは各母動物ごとに算出した平均値を標本単位とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡動物

死亡が, 100 mg/kg群の雄で投与開始後25日および36日にそれぞれ1例認められた。

2) 一般状態

投与直後の流涎が100 mg/kg群の雌雄で投与開始後16日以降から投与終了時まで数例に散見されたが, いずれも投与後約30分には回復したことや被験物質が皮膚や粘膜に対し刺激性を有することが知られている<sup>3)</sup>ことな

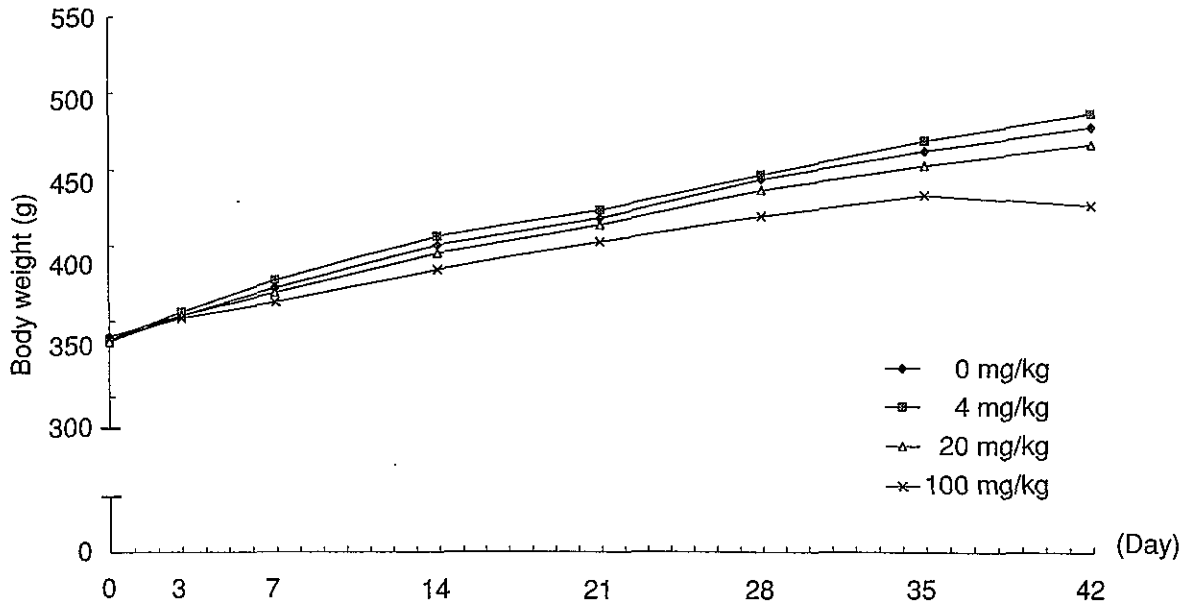


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 5-Ethylidene-2-norbornene in the preliminary reproduction toxicity screening test

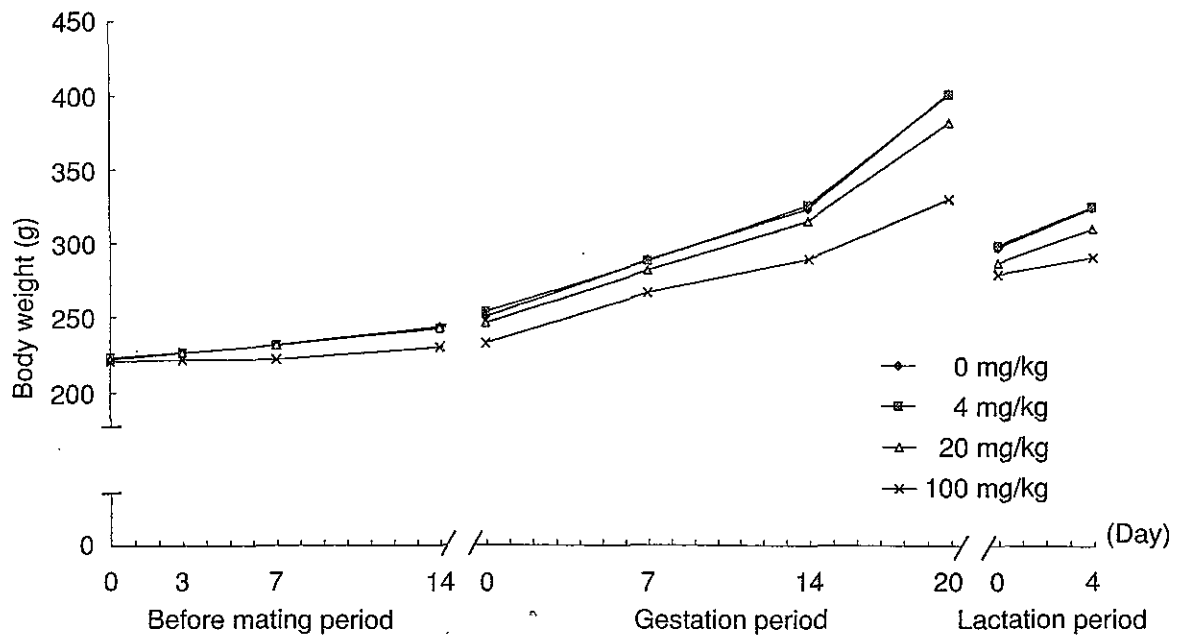


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 5-Ethylidene-2-norbornene in the preliminary reproduction toxicity screening test

どから、被験物質の物理化学的な刺激作用によって生じたものと思われ、反復投与による毒性を示唆する変化ではないと考えられた。その他、前肢の脱毛が対照群、4 および20 mg/kg 群で散見されたが、100 mg/kg 群で認められなかったことから、被験物質との関連はないと判断した。

### 3) 体重 (Fig. 1, 2)

100 mg/kg 群の雌雄で投与開始後7日から剖検時まで体重増加の抑制がみられ、体重および体重増加量に対照群と比較して有意な差が散見された。その他、4 mg/kg 群の雄で投与開始後7日の体重増加量が対照群と比較して有意な高値を示したが、以降は有意な変化は認められなかった。

4) 摂餌量

100 mg/kg群の雌雄で投与開始後7日から剖検時まで摂餌量の減少がみられ、対照群と比較して有意な差が散見された。4および20 mg/kg群の雌雄では対照群との間に有意な差は認められなかった。

5) 器官重量 (Table 1)

100 mg/kg群の雄で肝臓の相対重量の高値、精巣および精巣上体の絶対重量の低値がみられ、それぞれ対照群と比較して有意な差を示した。雌の肝臓では、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。4および20 mg/kg群の雌雄ではいずれの器官においても対照群との間に有意な差は認められなかった。

6) 剖検所見

投与期間終了時の動物では、100 mg/kg群の雄9例に肝臓の暗褐色化がみられ、このうち2例で肝臓表面の顆粒状化およびフィブリンの析出が認められ、さらに、1例では葉間の癒着を伴っていた。また、100 mg/kg群の雌雄各1例に心室の拡張、胸腺および肺の水腫、雄1例に胸腺の出血点および肺の褐色化が認められた。その他、対照群および4 mg/kg群で肝横隔膜面結節および片側精巣表面の出血点などが散発的に認められたが、100 mg/kg群で認められなかったことから、被験物質との関連はないと判断した。

死亡した動物では、2例に肺および肝臓のうっ血がみられ、1例に胸腺の白濁および出血点が認められた。なお、20 mg/kg群で全新生児が死亡した母動物には異常は認められなかった。

7) 組織所見 (Table 2)

被験物質に起因する変化が100 mg/kg群の雄の肝臓で認められた。投与期間終了時の動物では、雄の100 mg/kg群の8例に小葉中心性肝細胞肥大、4例に小葉中心部から中間帯の肝細胞の空胞化、2例に線維索性肝皮膜炎、1例に小葉中心性肝細胞壊死が認められ、肥大肝細胞はくもり硝子様を呈していた。また、代表例の肝臓に対する脂肪染色標本で上述の空胞の大部分は白く抜けてみえたが、一部に陽性の微小滴状物を含む空胞も認められた。

剖検時に心臓、胸腺および肺に肉眼的変化の認められた100 mg/kg群の雌雄各1例では、心筋線維のび慢性変性、胸腺間質の水腫、肺胞内マクロファージの集積が共通してみられ、さらに、雄1例に胸腺のび慢性出血、雌1例に肺の巣状壊死と血栓が認められた。

100 mg/kg群の死亡例では、1例に肝臓の小葉中間帯肝細胞の空胞化、2例に肺のうっ血と水腫、1例に胸腺のび慢性出血が認められた。

その他、対照群を含む各群で肝臓における肝細胞の脂肪化、炎症性細胞浸潤、小肉芽腫および巣状壊死、精巣の精細管萎縮および巣状出血、精巣上体管内の変性精細胞および炎症性細胞浸潤などが散発的に認められたが、100 mg/kg群で多発する傾向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判断した。なお、非妊娠動物の卵巣には異常は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 生殖機能 (Table 3)

交尾は各群の全例で成立し、交尾率、交尾所要日数、交尾成立までに逸した発情期の回数および受胎率とも対照群との間に有意な差は認められなかった。

2) 分娩・哺育状態 (Table 4)

100 mg/kg群の妊娠期間が対照群と比較して有意な延長を示したが、分娩状態に異常は認められなかった。また、100 mg/kg群の黄体数に変化はみられなかったが、着床率、総出産児数および分娩率に対照群と比較して有意な低値が認められた。100 mg/kg群の着床数(11.4)には有意な差はみられなかったが、対照群(15.3)ならびに当研究所の背景データ(平均16.0, 最小-最大15.0-17.8, 1991-1996年)と比較して低値の傾向であった。

哺育状態では、20 mg/kg群の1例で哺育2日に全新生児の死亡がみられたが、他の被験物質投与群で全新生児の死亡が多発する傾向はみられなかったことから、被験物質との関連はないと判断した。その他、対照群を含む各群いずれの母動物にも哺育行動に異常は認められなかった。

3) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存率 (Table 4)

100 mg/kg群の総出産児数、出生生児数および哺育4日の生児数に対照群と比較して有意な低値が認められた。その他、性比、出生率および新生児の4日の生存率に被験物質投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

(2) 外表および一般状態

対照群を含む各群の新生児の外表および一般状態に異常は認められなかった。

(3) 体重 (Table 4)

雄では、100 mg/kg群で哺育0日の体重に有意な差はみられないが高値の傾向がみられ、哺育4日の体重および体重増加量に対照群と比較して有意な高値が認められた。雌では、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

(4) 剖検

哺育4日の生存児では、20 mg/kg群の1腹の3例に膀胱結石がみられたが、被験物質投与群に多発する傾向はみられなかったことから、被験物質との関連はない変化と判断した。その他、対照群を含む各群の死亡児に異常は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性

反復投与による影響について、雌雄とも100 mg/kg群で投与開始後7日から剖検時まで体重増加の抑制および

摂餌量の減少が認められた。また、100 mg/kg群の雄では肝臓の相対重量の増加および暗褐色化などがみられ、病理組織検査では小葉中心性肝細胞肥大が主要な変化として認められ、肥大肝細胞はくもり硝子様変化を示した。このような組織像は一般に種々の化学物質の投与によって薬物代謝酵素が誘導された場合に発現する生体の適応反応と考えられており<sup>4,5)</sup>、また、同様の変化が同被験物質のラットを用いた吸入暴露試験<sup>6)</sup>においても認められていることから、被験物質による同質の変化と思われる。これに対し肝細胞の空胞化は適応の範囲を越えた細胞障害性の変化であり、被験物質の影響がより強く現れた結果と推察される。なお、100 mg/kg群の生存例の雌雄各1例にみられた心筋線維の変性を伴った心室の拡張、胸腺間質の水腫、肺胞内マクロファージの集積および雄2例の死亡例にみられた肺のうっ血と水腫などから被験物質の全身循環への影響も考えられるが、一部の例にのみ限られており、その詳細は不明であった。

## 2. 生殖発生毒性

親動物の検査において、100 mg/kg群で黄体数に変化は認められなかったが、着床数の低値傾向、着床率および総出産児数の減少がみられ、着床数に対する総出産児数の割合である分娩率が53.11%と減少した。総出産児数の減少は着床前および着床後の死亡胚の増加が原因と考えられ、被験物質による胚・胎児への影響が推察される。

100 mg/kg群で妊娠期間が23.1日と有意な延長を示したが、当研究所の背景データ(平均22.4日、最小-最大21-23日、1991-1996年)と比較して正常範囲内のわずかな変動で、分娩状態に異常は認められなかった。産児数の少ないものは分娩が遅れるという傾向は従来から知られている<sup>7)</sup>ことから、100 mg/kg群の妊娠期間のわずかな延長は、出産児数が対照群の約半数の6.5と減少したことも一因と考えられる。さらに、新生児の観察で出産児数と哺育4日の生児数の減少、哺育0および4日の出生児の体重の高値がみられたが、出産児数と児体重とは逆相関関係がある<sup>7)</sup>ことから、出産児の体重の高値は出産児数の減少が原因と考えられる。なお、死産児数や出生率、新生児の4日の生存率、剖検所見および外表に異常は認められなかったことから、被験物質による出生後の新生児の成長には影響ないものと考えられる。

以上のように、本試験では反復投与による一般毒性学的影響として、100 mg/kg群で雄2例が死亡し、雌雄で体重増加の抑制および摂餌量の減少、雄で肝臓の重量の増加ならびに肝細胞の肥大および空胞化などが認められたことから、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも20 mg/kg/dayと判断される。また、生殖に及ぼす影響として、100 mg/kg群で妊娠期間の延長、総出産児数、分娩率および着床率の低下などが認められたことから、親動物および子動物の無影響量は20 mg/kg/dayと判断される。

## 文献

- 1) 化学工業日報社編“新化学インデックス1994,” 化学工業日報社, 東京, 1993, p. 91.
- 2) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances 1985-86 Edition Vol. I.
- 3) B. Ballantyne, et al., *J. Appl. Toxicol.*, 17(4), 211(1997).
- 4) C. Gopinath, D. E. Prentice and D. J. Lewis, “Atlas of Experimental Toxicological Pathology,” eds. by C. Gopinath, D. E. Prentice and D. J. Lewis, MTP Press, Lancaster, 1987, pp. 43-60.
- 5) J. A. Popp and R. C. Cattley, “Handbook of Toxicologic Pathology,” eds. by W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, Academic Press, San Diego, 1991, pp. 279-314.
- 6) B. Ballantyne, et al., *J. Appl. Toxicol.*, 17(4), 197(1997).
- 7) 泉水直人, 梅村建夫, 水野秀夫, 家畜繁殖誌, 20(4), 125(1975).

## 連絡先

試験責任者: 東川国男  
 試験担当者: 青山涼子, 土谷 稔, 鈴木美江  
 (株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所  
 〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

## Correspondence

Authors: Kunio Higashikawa (Study director)  
 Ryoko Aoyama,  
 Minoru Tsuchitani, Yoshie Suzuki  
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
 Kashima Laboratory  
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
 Ibaraki, 314-0255, Japan.  
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 5-Ethylidene-2-norbornene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	4	20	100
<b>Male</b>				
Number of animals	12	12	12	10
Body weight (g)	488.3 ± 30.4	497.1 ± 34.1	475.4 ± 26.0	425.0 ± 19.7**
Absolute organ weight				
Liver (g)	15.795 ± 2.200	16.378 ± 1.850	16.213 ± 1.993	15.487 ± 1.583
Testes (g)	3.401 ± 0.202	3.238 ± 0.265	3.277 ± 0.284	2.918 ± 0.331**
Epididymides (g)	1.260 ± 0.058	1.238 ± 0.082	1.220 ± 0.068	1.158 ± 0.054**
Relative organ weight				
Liver (g%)	3.223 ± 0.265	3.296 ± 0.296	3.399 ± 0.283	3.640 ± 0.261**
Testes (g%)	0.698 ± 0.053	0.655 ± 0.074	0.693 ± 0.069	0.685 ± 0.066
Epididymides (g%)	0.259 ± 0.018	0.252 ± 0.027	0.258 ± 0.018	0.273 ± 0.017
<b>Female</b>				
Number of animals	12	12	8	10
Body weight (g)	323.2 ± 23.8	323.9 ± 22.4	309.5 ± 18.8	290.2 ± 19.3**
Absolute organ weight				
Liver (g)	14.437 ± 1.342	14.214 ± 1.382	14.648 ± 1.838	13.427 ± 1.603
Relative organ weight				
Liver (g%)	4.467 ± 0.233	4.386 ± 0.233	4.721 ± 0.382	4.620 ± 0.386

Values are expressed as Mean±S.D.  
Significantly different from control; \*\*:p<0.01.

Table 2 Summary of histopathological findings in rats treated orally with 5-Ethylidene-2-norbornene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organ Findings	Sex Fate Dose (mg/kg)	Male					Female			
		Scheduled sacrifice				Death	Scheduled sacrifice			
		0	4	20	100		100	0	4	20
Number of animals		12	12	12	10	2	12	12	12	12
Heart										
Degeneration, myocardium, diffuse	+	#	#	#	1/1 <sup>‡</sup>	#	#	#	#	1/1
Thymus										
Edema	+	#	#	#	1/1	#	#	#	#	1/1
Hemorrhage, diffuse	+	#	#	#	1/1	0/1	#	#	#	0/1
	++	#	#	#	0/1	1/1	#	#	#	0/1
Lung										
Accumulation, macrophage	++	#	#	#	1/1	#	#	#	#	1/1
Congestion	++	#	#	#	#	2/2	#	#	#	#
Edema	+	#	#	#	#	1/2	#	#	#	#
	++	#	#	#	#	1/2	#	#	#	#
Necrosis, focal	+	#	#	#	0/1	#	#	#	#	1/1
Thrombus	++	#	#	#	0/1	#	#	#	#	1/1
Liver										
Capsulitis, fibrinous	+	0	0	0	2	#	0	#	#	0
Fatty change, hepatocyte, diffuse	+	0	1	0	1	#	0	#	#	0
Fatty change, hepatocyte, periportal	+	1	2	0	1	1/2	1	#	#	1
	++	1	0	0	0	0/2	0	#	#	0
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	+	0	0	0	5**	#	0	#	#	0
	++	0	0	0	3	#	0	#	#	0
Inflammatory cell infiltration, focal	+	0	0	2	0	#	1	#	#	2
Microgranuloma	+	0	0	0	0	#	2	#	#	1
Necrosis, centrilobular	++	0	0	0	1	#	0	#	#	0
Necrosis, focal	+	0	0	1	0	#	1	#	#	0
Vacuolation, hepatocyte	+	0	0	0	2*	1/2	0	#	#	0
	++	0	0	0	2	0/2	0	#	#	0
Testis										
Atrophy, seminiferous tubule, diffuse	+	0	#	#	1	0/2				
Atrophy, seminiferous tubule, focal	+	1	#	#	0	0/2				
Hemorrhage, focal	+	1	#	#	0	0/2				
Epididymis										
Cell debris, lumen	+	0	#	#	1	0/2				
Inflammatory cell infiltration, focal	+	1	#	#	0	0/2				
Ovary							#	#	ND/2	ND/1

+ : Slight, ++ : Moderate, # : Not examined, ND : No abnormalities were detected.

Significantly different from control; \* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01.

‡ : Number of animals showing lesion/number of animals examined.



Table 3 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with 5-Ethylidene-2-norbornene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	4	20	100
Number of pairs examined	12	12	12	12
Number of pairs with successful mating	12	12	12	12
Mating index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	12	12	10	11
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	100.0	100.0	83.3	91.7
Pairing days until mating	2.6 ± 1.0 <sup>c)</sup>	2.8 ± 1.2	1.8 ± 1.0	2.3 ± 1.2
Number of estrous stages without mating	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

a) Mating index (%) = (Number of pairs with successful mating/number of pairs examined) × 100

b) Fertility index (%) = (Number of pregnant animals/number of pairs with successful mating) × 100

c) Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 4 Delivery and litter data in rats treated orally with 5-Ethylidene-2-norbornene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	4	20	100
Number of females examined	12	12	9	11
Number of females with live pups	12	12	9	10
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	90.9
Gestation length (days)	22.3 ± 0.5 <sup>f)</sup>	22.5 ± 0.5	22.7 ± 0.7	23.1 ± 0.3**
Number of corpora lutea	16.3 ± 1.3	16.5 ± 1.6	15.9 ± 2.6	15.2 ± 2.8
Number of implantation sites	15.3 ± 1.4	15.6 ± 2.2	14.7 ± 3.8	11.4 ± 4.5
Implantation index (%) <sup>b)</sup>	94.49 ± 6.35	94.57 ± 10.22	90.67 ± 15.92	72.79 ± 20.86**
Delivery index (%) <sup>c)</sup>	93.15 ± 6.11	92.08 ± 12.40	84.69 ± 25.13	53.11 ± 26.72**
Number of pups delivered	14.3 ± 1.3	14.5 ± 3.1	13.2 ± 4.9	7.1 ± 3.5**
Number of live pups on day 0	14.3 ± 1.3	14.5 ± 3.1	13.2 ± 4.9	7.1 ± 3.5**
Live birth index (%) <sup>d)</sup>	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
Sex ratio (male/female)	1.14 (91/80)	0.93 (84/90)	0.86 (55/64)	0.87 (33/38)
Number of live pups on day 4	14.2 ± 1.3	14.3 ± 3.0	12.9 ± 5.0	6.8 ± 3.7**
Viability index on day 4 (%) <sup>e)</sup>	99.44 ± 1.93	98.98 ± 2.41	87.58 ± 33.07	90.76 ± 17.76
Body weight of pups (g)				
on day 0 male	6.7 ± 0.4	6.7 ± 1.1	6.6 ± 0.6	7.2 ± 0.6
on day 0 female	6.4 ± 0.5	6.4 ± 0.9	6.2 ± 0.6	6.9 ± 0.9
on day 4 male	10.8 ± 0.7	11.1 ± 2.4	10.6 ± 1.4	12.8 ± 1.1**
on day 4 female	10.2 ± 1.0	10.6 ± 2.0	10.3 ± 1.4	11.7 ± 1.6
Body weight gain of pups (g)				
day 0 to 4 male	4.1 ± 0.5	4.3 ± 1.5	4.1 ± 1.0	5.6 ± 0.7**
day 0 to 4 female	3.9 ± 0.7	4.2 ± 1.4	4.2 ± 0.9	4.8 ± 1.1

a) Gestation index (%) = (Number of females with live pups/number of pregnant females) × 100

b) Implantation index (%) = (Number of implantation sites/number of corpora lutea) × 100

c) Delivery index (%) = (Number of pups delivered/number of implantation sites) × 100

d) Live birth index (%) = (Number of live pups on day 0/number of pups delivered) × 100

e) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4/number of live pups on day 0) × 100

f) Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control; \*\*: p < 0.01.

## 5-エチリデン-2-ノルボルネンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

### Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 5-Ethylidene-2-norbornene in Rats

#### 要約

5-エチリデン-2-ノルボルネンの0(トウモロコシ油), 4, 20および100 mg/kgを1群あたり雌雄各7あるいは14匹のCrj:CD(SD)IGSラットに28日間反復経口投与して毒性を検討し, さらに0および100 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて14日間の回復性も併せて検討した. その結果, 以下の成績を得た.

100 mg/kg群の雄1例を投与9日に衰弱のため屠殺し, 盲腸の炎症などが認められたが, 5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連は明らかにならなかった. また, 同群の雄1例が投与25日の投与前に死亡し, 5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による死亡が疑われた. 体重推移では, 雌雄の100 mg/kg群で体重増加量および増加率の低値が認められた. 尿検査では, 雄の100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加および尿検査時の飲水量の低値が, 雌の100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加傾向が認められた. 血液生化学検査では, 雄の20および100 mg/kg群ならびに雌の100 mg/kg群で $\alpha_1$ -グロブリン分画比の低値傾向が認められた. 剖検では, 雄の100 mg/kg群で腎臓の褪色が認められ, 雌雄の100 mg/kg群で腎臓の相対重量の高値あるいは高値傾向が認められた. 病理組織学検査では, 雄の4, 20および100 mg/kg群で腎臓に近位尿細管上皮の硝子滴が, 甲状腺に胞細胞の肥大, コロイドの減少あるいはろ胞の不整形化が認められた. 雌では100 mg/kg群で甲状腺に胞細胞の肥大およびコロイドの減少が認められた.

以上のことから, 本試験における5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による無影響量(NOEL)は, 雄で4 mg/kg/day未満, 雌で20 mg/kg/dayであると考えられた.

#### 方法

##### 1. 被験物質および投与液の調製

5-エチリデン-2-ノルボルネン(純度:99.4%, Lot No. 6J01, 日本石油化学(株), 東京)は不快臭のある無色透明な液体である. 入手後の被験物質は気密容器に入れ, 遮光, 室温で保存し, 残余被験物質を製造業者が分析し, 投与期間中の被験物質の安定性を確認した. 溶媒は日本薬局方トウモロコシ油(片山化学工業(株))を用い, これに被験物質を所定の濃度となるように溶解させた. 調製液は, 調製後4時間以内に投与に使用した. また, これらの調製液について濃度を分析し, 設定値の $\pm 5\%$ 以内に

あることを確認した.

##### 2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた4週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS)の雄を7日間, 雌を8日間の検疫・馴化を行った後, 雌雄各42匹を選択して5週齢で試験に供した. 投与日の体重範囲は雄が142~163 g, 雌が126~147 gであった. 動物は, 温度22~24 °C, 湿度31~79%, 換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(8:00から20:00まで点灯)に制御されたバリアシステムの飼育室で, ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は5匹以内, 群分け後は個別で飼育した. 飼料は固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて, 飲料水は札幌市水道水を自動給水装置あるいは給水器を用いて, 自由に摂取させた.

##### 3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では1群あたり雌雄各5例のラットに100, 300および1000 mg/kgの5-エチリデン-2-ノルボルネンを14日間反復経口投与した結果, 雌雄の1000 mg/kg群の全例が死亡あるいは衰弱屠殺に至り, 100および300 mg/kg群では体重の低値傾向, 器官重量の変化などが認められた.

以上のことから, 高用量群には100 mg/kgを設定し, 以下公比5で除して, 中用量群には20 mg/kgを, 低用量群には4 mg/kgを, さらに, 媒体のみを投与する対照群も加え, 雌雄各4群を設定した. 1群の動物数は雌雄とも7匹とし, 対照群および100 mg/kg群には2群を割り付け, 投与前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行った.

各個体の投与液量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて5 mL/kgの容量でラット用胃ゾンデを用いて, 1日1回連続28日間, 強制的に胃内に投与した.

##### 4. 検査項目

###### 1) 一般状態観察

投与期間中および回復期間中に, 全例について1日1回以上の頻度で観察した.

###### 2) 体重測定および摂餌量測定

体重は全例について, 投与1日(投与前), 投与2, 5, 7, 10, 14, 21および28日(投与終了日), 回復1, 2, 5, 7および14日ならびに剖検日に測定し, 投与1日から28

日、回復1日から14日の体重増加量および体重増加率を算出した。摂餌量は剖検日を除いて体重と同じ日に測定した。

### 3) 尿検査

投与4週および回復2週に生存例全例を代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行い、同時に採尿中の飲水量(重量)も測定した。約3時間の蓄尿についてpH、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビンおよび潜血反応(以上、マルティスティックス、バイエル・三共)、色調(肉眼観察)ならびに沈渣(鏡検)を検査し、21時間蓄尿について尿量(容量)、比重(屈折計、アタゴ)、ナトリウムおよびカリウム(以上、炎光光度法、自動炎光光度計480型、コーニング)、クロール(電量滴定法、クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)、カルシウム(OCPC法)ならびに無機リン(Fiske-SubbaRow法)(以上、自動分析装置7150形、日立製作所)を測定した。

### 4) 血液学検査

生存例全例について約16時間絶食させた後、エーテル麻酔下で大腿静脈より採血し、EDTA・2Kで処理した血液を用いて、赤血球数、平均赤血球容積、血小板数、白血球数(以上、電気抵抗法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)(以上、コールターカウンターT660型、コールター)、ヘマトクリット値(赤血球数、平均赤血球容積より算出)、平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数、ヘモグロビン量より算出)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(ヘマトクリット値、ヘモグロビン量より算出)、網赤血球率(Brecher法)および白血球百分比(May-Grünwald-Giemsa染色)を測定し、大腿静脈から採取した無処理血液を用いて凝固時間(流体粘度変化による空気圧測定法、マイクロコアグロメーター、グライナー)を測定した。さらに、腹部大動脈より採取した血液をクエン酸ナトリウムで処理した後、3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いて、プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上、血液凝固自動測定装置アメルングKC-10A、バクスター)を測定した。

### 5) 血液生化学検査

生存例全例について約16時間絶食した後、エーテル麻酔下で、腹部大動脈より採取した血液を3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血清を用いてGOT(IFCC法)、GPT(IFCC法)、アルカリフォスファターゼ(Bessey-Lawry法)、乳酸脱水素酵素(Wróblewski & La Due法)、 $\gamma$ -GTP(包接L- $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法)、グルコース(ヘキソキナーゼ法)、総コレステロール(酵素法)、トリグリセリド(遊離グリセロール消去法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法)、クレアチニン(Jaffé法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(Fiske-SubbaRow法)、総蛋白(ビウレット法)およびアルブミン(BCG法)(以

上、自動分析装置7150形、日立製作所)、ナトリウムおよびカリウム(以上、炎光光度法、自動炎光光度計480型、コーニング)、クロール(電量滴定法、クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)、A/G比(総蛋白、アルブミンより算出)ならびに蛋白分画(セルロースアセテート膜電気泳動法、全自動電気泳動装置CTE-150、常光)を測定した。

### 6) 剖検および器官重量測定

生存例については投与28日および回復14日の翌日に、衰弱のため屠殺した例については屠殺時に、体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。死亡例については死亡発見後剖検した。また、脳、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体含む)、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および卵巣の重量を測定するとともに、絶対重量を剖検当日の体重で除し100を乗じて相対重量を算出した。

### 7) 病理組織学検査

全例について肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳(大脳・小脳)、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、膵臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、胸骨および大腿骨(骨髄を含む)、脊髄(頸部)、骨格筋(外側広筋)、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃(前胃・腺胃)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、精囊(凝固腺を含む)、前立腺、卵巣、子宮、膣および坐骨神経を10%中性緩衝ホルマリン液で、精巣および精巣上体をブアン液で、眼球およびハーダー腺をデビッドソン液で固定した。これらの摘出器官・組織を常法にしたがってパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいはPAS染色標本を作製し、鏡検した。

### 5. 統計解析

体重、体重増加量および体重増加率、摂餌量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液生化学検査、器官の絶対重量および相対重量の結果についてBartlettの検定法を行い、等分散性を解析した。等分散の場合は一元配置分散分析法により解析し、不等分散の場合はKruskal-Wallisの検定法で解析した。Kruskal-Wallis法の解析の結果、有意差が認められた場合には、Mann-WhitneyのU-検定法で解析した。

尿比重および尿検査の定性的項目の結果については、Kruskal-Wallisの検定法で解析し、有意差が認められた場合は、Mann-WhitneyのU-検定法を用いて解析した。

これら対照群と被験物質投与群との間の検定においては、いずれも有意水準を5%とした。

## 結果

### 1. 一般状態

雄の100 mg/kg群の1例で、腹腔内腫瘍、自発運動の減少、呼吸不整、下痢および肛門周囲の被毛汚染が認め

られ衰弱したため投与9日に屠殺した。また、同群の1例が投与25日の投与前に死亡した。

生存例では、投与期間中に雌雄の100 mg/kg群の各1例に流涎が認められたが、回復期間には5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連する変化は認められなかった。

## 2. 体重 (Table 1, 2)

雄では100 mg/kg群で投与21日の体重に低値が認められ、投与期間中の体重増加量および体重増加率の低値も認められた。雌では100 mg/kg群で投与期間中の体重増加量および体重増加率の低値が認められた。

回復期間中の体重推移には、雌雄ともに対照群との間に差は認められなかった。

## 3. 摂餌量

雌雄ともに対照群との間に差は認められなかった。

## 4. 尿検査

投与期間最終週には、雄では100 mg/kg群で蛋白の陽性例の増加および採尿中の飲水量の低値が認められた。雌では100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加傾向がみられた。

その他に、雄の4 mg/kg群で蛋白陽性例およびケトン体陽性例の増加、カリウムおよびクロール排泄量の低値が認められたが、20 mg/kg群ではこれらの変化は認められないことから、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連はないものと考えられた。

回復期間最終週には、雄の100 mg/kg群で無機リン排泄量の高値が認められた。雌では対照群との間に差は認められなかった。

## 5. 血液学検査

投与期間終了時に雄の100 mg/kg群で白血球数の高値が認められた。雌では対照群との間に差は認められなかった。

回復期間終了時には、雄の100 mg/kg群で網赤血球率の高値が、雌の100 mg/kg群でヘモグロビン量の高値が認められた。

## 6. 血液生化学検査 (Table 3, 4)

投与期間終了時には、雄の20および100 mg/kg群でアルブミン分画比の高値および $\alpha_1$ -グロブリン分画比の低値、100 mg/kg群でA/G比の高値が認められた。雌では、100 mg/kg群でA/G比の高値、アルブミン分画比の高値、 $\alpha_1$ -グロブリン分画比の低値傾向およびグルコースの低値が認められた。

回復期間終了時には、雄の100 mg/kg群でクロールの低値が認められ、雌の100 mg/kg群では総蛋白の低値、アルブミンの低値、 $\beta$ -グロブリン分画比の高値およびカルシウムの低値が認められた。

## 7. 器官重量 (Table 5, 6)

投与期間終了時には、雄では20 mg/kg以上の群で脳の相対重量の高値、100 mg/kg群で剖検時体重の低値、心臓および肺の絶対重量の低値ならびに腎臓の相対重量の高値が認められた。雌では、100 mg/kg群で剖検時体重の低値傾向、胸腺および腎臓の相対重量の高値が認められた。その他に、4 mg/kg群で肝臓の絶対重量および相対重量の低値が認められたが、低用量群のみでの変化であった。

回復期間終了時には雄の100 mg/kg群で肝臓の相対重量ならびに心臓の絶対重量および相対重量の高値が認められた。雌では、100 mg/kg群で肝臓の相対重量の高値が認められた。

## 8. 剖検

雄の100 mg/kg群の衰弱屠殺例では盲腸と腹腔内脂肪織との癒着、盲腸の内腔拡張および粘膜灰白色化が認められたが、死亡例では異常所見は認められなかった。

投与期間終了時には、雄の100 mg/kg群で腎臓の褪色が3例に認められた。雌では5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連する異常所見は認められなかった。

回復期間終了時には、雌雄ともに5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連する異常所見は認められなかった。

## 9. 病理組織学検査 (Table 7, 8)

雄の100 mg/kg群の衰弱屠殺例では盲腸の壊死、炎症などが認められ、死亡例では腎臓に軽度の近位尿細管上皮の硝子滴が認められた。

投与期間終了時剖検例では、雄の腎臓で4および20 mg/kg群のそれぞれ5および7例に軽度の近位尿細管上皮の硝子滴が、100 mg/kg群の6例に中等度の近位尿細管上皮の硝子滴が、20および100 mg/kg群のそれぞれ2および3例に軽度の近位尿細管上皮の好酸性小体が、20および100 mg/kg群の各1例に中等度の近位尿細管上皮の好酸性小体が認められた。雄の甲状腺では、4、20および100 mg/kg群のそれぞれ1、1および6例にろ胞細胞の軽度の肥大およびコロイドの軽度の減少が、4および100 mg/kg群の各1例にろ胞の軽度の不整形化が認められた。雌の甲状腺では、100 mg/kg群の1例にろ胞細胞の軽度の肥大およびコロイドの軽度の減少が認められた。その他の所見は、発生例数が少なく、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連のない変化と考えられた。

回復期間終了時剖検例では、雄の腎臓で100 mg/kg群の4例に近位尿細管上皮の軽度の硝子滴が、100 mg/kg群の2例に近位尿細管上皮の軽度の好酸性小体が認められた。その他の所見は、発生例数が少なく、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与と関連のない変化と考えられた。

## 考察

5-エチリデン-2-ノルボルネンの0(トウモロコシ油)、4、20および100 mg/kgを1群あたり雌雄各7あるいは14

匹のCrj:CD(SD)IGSラットに28日間反復経口投与して毒性を検討し、さらに0および100 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて14日間の回復性も併せて検討した。

100 mg/kg群の雄1例に腹腔内腫瘍、自発運動の減少、呼吸不整、下痢および肛門周囲の被毛汚染が認められ、衰弱したため投与9日に屠殺した。この例では剖検で盲腸と腹腔内脂肪織との癒着、盲腸の内腔拡張および粘膜灰白色化が認められ、病理組織学検査では盲腸の壊死、炎症などが認められた。しかし、同群の他の例には盲腸への影響は認められておらず、本屠殺例の衰弱の原因と考えられる盲腸の変化と5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連は明らかにはならなかった。また、100 mg/kg群の雄1例が投与25日の投与前に死亡し、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による死亡が疑われたが、死因と考えられる変化は認められなかった。

生存例では、投与期間中に雌雄の100 mg/kg群の各1例に流涎が認められたが、5-エチリデン-2-ノルボルネンの粘膜に対する刺激性<sup>2)</sup>あるいは不快臭によるものと考えられ、毒性を示唆する変化ではないと考えられた。

体重推移では、雌雄の100 mg/kg群で投与期間中の体重増加量および増加率の低値が認められたが、回復期間には対照群との差は認められず、可逆的な変化と考えられた。

尿検査では、投与期間最終週に雄の100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加および採尿中の飲水量の低値が、雌の100 mg/kg群で蛋白陽性例の増加傾向が認められた。しかし、回復期間にはこれらの変化は認められず、可逆的な変化と考えられた。

血液生化学検査では投与期間終了時に、雄の20および雌の100 mg/kg群でアルブミン分画比およびA/G比の高値ならびに $\alpha_1$ -グロブリン分画比の低値あるいは低値傾向が認められた。これらの群では総蛋白およびアルブミン量に変化は認められないことから、アルブミン分画比の高値は $\alpha_1$ -グロブリン分画比の低値による相対的増加と考えられ、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与により、 $\alpha_1$ -グロブリン量の低値をもたらしたと考えられた。しかし、これらの変化は回復期間終了時には認められず、可逆的な変化と考えられた。

器官重量では、投与期間終了時に雌雄の100 mg/kg群で腎臓の相対重量の高値が認められ、雄の100 mg/kg群では剖検で腎臓の褐色が認められた。

病理組織学検査では、雄の4、20および100 mg/kg群で近位尿細管上皮の硝子滴が認められ、20および100 mg/kg群では近位尿細管上皮の好酸性小体も認められた。炭化水素化合物をラットに経口投与した場合、特に雄では腎臓の近位尿細管に硝子滴として沈着し、硝子滴の沈着の程度が強い場合には尿細管上皮の障害を引き起こすことが知られ<sup>2)</sup>、好酸性小体については硝子滴と同一物質との報告もある<sup>3)</sup>。したがって、本試験の雄の4 mg/kg以上の群で認められた近位尿細管上皮の硝子滴ならびに20 mg/kg以上の群で認められた好酸性小体は5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による影響と推察された。回復期間終了時には雄の100 mg/kg群で近位尿細管

上皮の硝子滴が認められたが、発生頻度は減少しており、器官重量および剖検で腎臓に異常は認められなかったことから、回復性のある変化と考えられた。

また、投与期間終了時には雄の4 mg/kg以上の群で甲状腺にろ胞細胞の肥大、コロイドの減少あるいはろ胞の不整形化が認められ、雌の100 mg/kg群でもろ胞細胞の肥大およびコロイドの減少が認められた。この甲状腺の重量増加を伴わない変化は、下垂体などの上位の内分泌系への影響を介した甲状腺機能の低下によると報告されている<sup>4)</sup>。しかし、本試験では下垂体の重量測定および病理組織学検査において異常は認められず、血中のTSHあるいは $T_3$ 、 $T_4$ 濃度等の測定を行っていないため、甲状腺でみられた変化の機序は明らかとはならなかった。また、回復期間終了時には甲状腺に異常は認められず、可逆的な変化と考えられた。

以上のほかに、尿検査では、回復期間最終週に、雄の100 mg/kg群で無機リン排泄量の高値が認められた。また、血液生化学検査では、投与期間終了時に雌の100 mg/kg群でグルコースの低値が認められ、回復期間終了時には、雄の100 mg/kg群でクロールの低値、雌の100 mg/kg群で総蛋白の低値、アルブミン量の低値、 $\beta$ -グロブリン分画比の高値およびカルシウムの低値が認められた。しかし、いずれも軽微な変化であり5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連はないと考えられた。

血液学検査では、投与期間終了時に雄の100 mg/kg群で白血球数の高値が認められたが、生存例では炎症性的変化は認められず、造血系の器官にも異常は認められなかった。また、白血球百分比でも異常は認められていないことから5-エチリデン-2-ノルボルネン投与との関連は明らかにはならなかった。回復期間終了時には、雄の100 mg/kg群で網赤血球率の高値が、雌の100 mg/kg群でヘモグロビン量の高値が認められた。しかし、他の赤血球パラメーターに異常は認められなかったことから、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与とは関連のない変化と考えられた。

器官重量では、投与期間終了時に雄の20 mg/kg以上の群で脳の相対重量の高値、100 mg/kg群で心臓および肺の絶対重量の低値が認められ、雌の100 mg/kg群で胸腺の相対重量の高値が認められたが、いずれも体重の低値に伴う変化であった。また、回復期間終了時には雌雄の100 mg/kg群で肝臓の相対重量の高値が認められ、雄の100 mg/kg群では心臓の絶対重量および相対重量の高値が認められたが、病理組織学検査では特記すべき所見は認められず、5-エチリデン-2-ノルボルネン投与とは関連のない変化と考えられた。

以上のように、雄の4 mg/kg以上の群で腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴、甲状腺のろ胞細胞の肥大、ろ胞の不整形化およびコロイドの減少が認められ、雌の100 mg/kg群で尿蛋白陽性例の増加傾向、 $\alpha_1$ -グロブリンの低値傾向ならびに腎臓の相対重量の高値、甲状腺のろ胞細胞の肥大およびコロイドの減少が認められたことから、本試験における5-エチリデン-2-ノルボルネン投与による無影響量(NOEL)は、雄で4 mg/kg/day未満、雌

で20 mg/kg/dayであると考えられた。

#### 文献

- 1) B. Ballantyne, et al., *J. Appl. Toxicol.*, **17**, 211 (1997).
- 2) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation," Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands, 1990, pp.532-538.
- 3) S. Uwagasa, *J. Toxicol. Pathol.*, **5**, 195 (1992).
- 4) 長瀬すみら, "実験動物の臨床生化学データ-病理組織像との関連-", ソフトサイエンス社, 東京, 1976, p.339.

#### 連絡先

試験責任者: 吉村浩幸  
試験担当者: 茂野 均, 長谷淳一, 古川正敏,  
河村公太郎, 武田みよ子,  
引地のゆみ

(株)化合物安全性研究所  
〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24  
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

#### Correspondence

Authors: Hiroyuki Yoshimura (Study director)  
Hitoshi Shigeno, Junichi Nagaya,  
Masatoshi Furukawa,  
Kotaro Kawamura, Miyoko Takeda,  
Noyumi Hikichi

Safety Research Institute for Chemical  
Compounds Co., Ltd.  
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,  
004-0839, Japan  
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Body weight changes of male rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
Administration period				
Number of animals	14	7	7	14
Day 1	151.7 ± 6.1	153.1 ± 3.8	150.4 ± 4.7	152.2 ± 4.1
2	160.6 ± 6.6	161.1 ± 4.6	159.3 ± 4.8	160.8 ± 4.8
5	188.4 ± 9.0	189.3 ± 5.6	185.7 ± 7.3	186.6 ± 5.3
7	205.4 ± 11.3	207.3 ± 6.4	202.9 ± 8.0	202.9 ± 6.0
10	232.9 ± 13.9	234.9 ± 8.3	229.3 ± 9.8	229.3 ± 7.3 (13)*
14	267.9 ± 15.4	269.0 ± 9.9	262.7 ± 13.5	258.8 ± 11.7 (13)
21	328.2 ± 19.6	324.7 ± 16.7	319.6 ± 18.0	309.6 ± 16.8* (13)
28	372.4 ± 23.4	362.0 ± 21.2	360.6 ± 25.0	350.5 ± 19.8 (12)
Day 1-28, gain	220.7 ± 20.6	208.9 ± 19.7	210.1 ± 23.6	197.9 ± 19.1* (12)
Body weight gain <sup>b</sup> (%)	145.5 ± 12.8	136.4 ± 12.2	139.7 ± 15.3	129.8 ± 12.8* (12)
Recovery period				
Number of animals	7			6
Day 1	369.7 ± 26.4	-	-	366.5 ± 19.7
2	373.0 ± 26.8	-	-	371.0 ± 20.9
5	392.4 ± 26.2	-	-	391.7 ± 24.8
7	401.4 ± 26.7	-	-	403.8 ± 28.1
14	434.4 ± 30.9	-	-	436.5 ± 34.4
Day 1-14, gain	64.7 ± 5.6	-	-	70.0 ± 16.4
Body weight gain <sup>b</sup> (%)	17.5 ± 1.0	-	-	19.0 ± 3.6

Values are expressed as Mean ± S.D. (gram)

- : blank value.

Significantly different from 0 mg/kg group (\*p &lt; 0.05)

a) Values in parentheses are number of animals examined.

b) (Body weight gain/body weight on day 1) × 100.

Table 2 Body weight changes of female rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg
Administration period				
Number of animals	14	7	7	14
Day 1	136.1 ± 6.0	137.1 ± 6.7	135.4 ± 5.3	136.1 ± 6.2
2	141.0 ± 6.4	139.6 ± 5.3	142.3 ± 6.0	141.7 ± 6.4
5	155.7 ± 9.1	156.3 ± 8.3	155.0 ± 8.7	152.9 ± 10.6
7	164.6 ± 9.2	161.7 ± 8.4	163.4 ± 7.3	159.2 ± 9.3
10	176.8 ± 10.6	169.4 ± 9.5	173.3 ± 7.8	169.1 ± 10.6
14	191.5 ± 13.4	181.4 ± 11.7	188.9 ± 9.6	182.4 ± 12.8
21	216.1 ± 17.6	204.9 ± 17.2	211.9 ± 7.8	202.9 ± 17.4
28	236.5 ± 20.2	225.6 ± 21.6	235.4 ± 7.2	221.8 ± 18.6
Day 1-28, gain	100.4 ± 16.4	88.4 ± 15.5	100.0 ± 7.9	85.7 ± 13.4*
Body weight gain* (%)	73.6 ± 10.8	64.2 ± 8.5	74.0 ± 7.8	62.8 ± 8.0**
Recovery period				
Number of animals	7			7
Day 1	241.7 ± 31.0	-	-	226.3 ± 19.0
2	245.0 ± 33.3	-	-	232.9 ± 17.8
5	251.4 ± 33.9	-	-	239.9 ± 20.2
7	260.7 ± 37.9	-	-	252.7 ± 18.8
14	275.0 ± 43.1	-	-	264.1 ± 19.0
Day 1-14, gain	33.3 ± 13.7	-	-	37.9 ± 5.3
Body weight gain* (%)	13.4 ± 4.3	-	-	16.9 ± 2.9

Values are expressed as Mean ± S.D. (gram)

- : blank value.

Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

a) (Body weight gain / body weight on day 1) × 100.



Table 3 Blood chemical findings of male rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals	7	7	7	6	7	6
Total protein(g/dL)	5.63 ± 0.20	5.51 ± 0.23	5.57 ± 0.22	5.42 ± 0.17	5.87 ± 0.29	6.00 ± 0.25
Albumin(g/dL)	2.31 ± 0.07	2.33 ± 0.08	2.40 ± 0.12	2.38 ± 0.04	2.41 ± 0.11	2.42 ± 0.08
A/G	0.701 ± 0.053	0.736 ± 0.054	0.759 ± 0.043	0.790 ± 0.057*	0.704 ± 0.076	0.680 ± 0.042
Protein fraction(%)						
Albumin	53.34 ± 2.19	54.31 ± 1.99	55.70 ± 1.44*	57.48 ± 0.98**	52.80 ± 3.37	51.38 ± 1.36
$\alpha_1$ -globulin	23.56 ± 1.66	22.50 ± 1.92	21.06 ± 1.55*	19.02 ± 0.81**	24.49 ± 2.30	25.65 ± 1.84
$\alpha_2$ -globulin	7.09 ± 0.85	6.74 ± 1.57	6.54 ± 0.87	7.40 ± 0.46	5.77 ± 0.62	5.97 ± 0.57
$\beta$ -globulin	15.04 ± 0.84	15.41 ± 1.11	15.49 ± 1.21	15.28 ± 0.71	15.21 ± 0.97	15.43 ± 1.52
$\gamma$ -globulin	0.97 ± 0.52	1.03 ± 0.44	1.21 ± 0.92	0.82 ± 0.38	1.73 ± 0.69	1.57 ± 0.50
GOT(IU/L)	93.0 ± 12.8	80.4 ± 5.9	93.1 ± 19.6	89.7 ± 23.2	104.0 ± 16.6	98.3 ± 14.2
GPT(IU/L)	22.9 ± 3.8	23.6 ± 4.3	23.0 ± 4.6	22.3 ± 4.5	25.7 ± 3.0	22.8 ± 4.0
ALP(IU/dL)	425.6 ± 110.7	478.1 ± 77.5	482.4 ± 43.4	360.5 ± 80.2	416.9 ± 101.4	355.3 ± 56.9
LDH(IU/dL)	1991.6 ± 634.9	1197.3 ± 257.8	1804.6 ± 723.5	1644.7 ± 968.3	1959.4 ± 633.6	1779.8 ± 462.1
$\gamma$ -GTP(IU/dL)	1.00 ± 0.30	1.16 ± 0.43	1.23 ± 0.65	1.12 ± 0.33	1.04 ± 0.13	0.90 ± 0.38
Total bilirubin(mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose(mg/dL)	139.4 ± 19.3	141.7 ± 16.9	132.9 ± 11.7	126.3 ± 16.8	145.9 ± 16.6	151.0 ± 20.4
Total cholesterol(mg/dL)	53.6 ± 5.1	47.0 ± 7.3	56.4 ± 9.1	60.8 ± 5.5	48.4 ± 11.6	50.0 ± 4.8
Triglyceride(mg/dL)	42.9 ± 11.7	42.1 ± 12.2	40.3 ± 14.5	57.2 ± 24.2	37.0 ± 15.0	42.7 ± 11.4
Urea nitrogen(mg/dL)	13.43 ± 2.16	13.41 ± 1.27	13.39 ± 1.09	14.05 ± 1.10	17.43 ± 1.60	16.68 ± 1.98
Creatinine(mg/dL)	0.47 ± 0.05	0.47 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.48 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.50 ± 0.00
Sodium(mEq/L)	145.79 ± 1.58	143.57 ± 2.17	145.00 ± 1.50	145.33 ± 1.57	145.86 ± 1.28	145.17 ± 0.93
Potassium(mEq/L)	5.021 ± 0.309	4.986 ± 0.458	5.324 ± 0.233	5.453 ± 0.222	4.734 ± 0.309	4.887 ± 0.316
Chlorine(mEq/L)	106.4 ± 1.4	105.9 ± 2.0	106.6 ± 1.1	105.3 ± 0.8	108.3 ± 1.4	106.0 ± 1.4*
Calcium(mg/dL)	10.20 ± 0.26	9.80 ± 0.42	10.00 ± 0.34	10.07 ± 0.26	9.57 ± 0.39	9.72 ± 0.40
Inorganic phosphorous(mg/dL)	9.01 ± 0.67	8.99 ± 0.27	9.06 ± 0.69	9.47 ± 0.43	7.70 ± 0.23	8.05 ± 0.44

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table 4 Blood chemical findings of female rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	6.14 ± 0.36	5.83 ± 0.28	5.99 ± 0.31	5.83 ± 0.21	6.51 ± 0.40	6.04 ± 0.22*
Albumin (g/dL)	2.64 ± 0.20	2.49 ± 0.16	2.59 ± 0.12	2.69 ± 0.18	2.76 ± 0.16	2.57 ± 0.13*
A/G	0.757 ± 0.030	0.744 ± 0.047	0.761 ± 0.035	0.857 ± 0.070**	0.736 ± 0.056	0.740 ± 0.040
Protein fraction (%)						
Albumin	59.26 ± 1.77	58.81 ± 2.80	60.14 ± 1.01	62.79 ± 1.52**	58.50 ± 2.38	57.13 ± 2.80
$\alpha_1$ -globulin	18.04 ± 2.12	18.59 ± 2.09	18.07 ± 1.04	16.06 ± 0.93	19.37 ± 1.90	19.11 ± 1.35
$\alpha_2$ -globulin	6.17 ± 0.74	6.46 ± 0.79	5.33 ± 0.48	5.69 ± 0.75	5.40 ± 0.68	5.07 ± 0.94
$\beta$ -globulin	15.24 ± 1.35	14.54 ± 1.38	14.99 ± 0.95	14.10 ± 0.81	14.09 ± 1.18	15.81 ± 1.38*
$\gamma$ -globulin	1.29 ± 0.30	1.60 ± 0.68	1.47 ± 0.24	1.37 ± 0.59	2.64 ± 1.03	2.87 ± 0.94
GOT (IU/L)	123.4 ± 31.1	106.0 ± 34.1	108.4 ± 14.9	117.7 ± 25.4	107.0 ± 17.7	113.1 ± 22.8
GPT (IU/L)	20.9 ± 4.2	20.6 ± 2.6	21.9 ± 4.6	22.3 ± 5.6	25.9 ± 4.0	22.7 ± 2.9
ALP (IU/dL)	279.6 ± 41.4	287.4 ± 55.9	289.1 ± 64.8	269.9 ± 79.2	163.0 ± 44.1	146.3 ± 27.8
LDH (IU/dL)	3080.9 ± 1547.7	2206.0 ± 1244.4	2317.7 ± 637.7	2802.4 ± 1042.1	2261.4 ± 799.1	2820.7 ± 1117.0
$\gamma$ -GTP (IU/dL)	1.13 ± 0.38	1.17 ± 0.35	1.26 ± 0.43	1.04 ± 0.46	1.03 ± 0.45	0.97 ± 0.26
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose (mg/dL)	132.6 ± 15.3	122.0 ± 12.1	135.0 ± 18.0	113.3 ± 6.0*	132.3 ± 23.6	138.9 ± 21.7
Total cholesterol (mg/dL)	62.6 ± 21.6	53.4 ± 12.9	58.0 ± 4.0	54.3 ± 15.0	70.4 ± 7.9	73.1 ± 13.1
Triglyceride (mg/dL)	15.9 ± 6.8	11.0 ± 2.6	16.0 ± 4.7	19.3 ± 5.5	19.0 ± 21.0	19.4 ± 8.6
Urea nitrogen (mg/dL)	16.21 ± 2.28	16.04 ± 0.91	16.94 ± 1.43	15.96 ± 2.25	17.20 ± 1.71	17.27 ± 0.73
Creatinine (mg/dL)	0.51 ± 0.09	0.47 ± 0.08	0.51 ± 0.07	0.51 ± 0.04	0.57 ± 0.05	0.56 ± 0.05
Sodium (mEq/L)	143.86 ± 0.63	143.71 ± 0.76	143.64 ± 0.75	143.50 ± 1.63	144.29 ± 1.32	144.86 ± 1.03
Potassium (mEq/L)	4.613 ± 0.263	4.533 ± 0.275	4.404 ± 0.255	4.719 ± 0.255	4.344 ± 0.376	4.377 ± 0.462
Chlorine (mEq/L)	107.1 ± 1.8	108.1 ± 1.6	107.6 ± 1.4	106.9 ± 2.8	107.9 ± 1.7	107.0 ± 0.8
Calcium (mg/dL)	9.91 ± 0.23	9.81 ± 0.21	9.99 ± 0.50	9.89 ± 0.36	9.84 ± 0.25	9.54 ± 0.21*
Inorganic phosphorous (mg/dL)	7.86 ± 0.94	7.61 ± 1.07	7.99 ± 0.95	8.00 ± 1.10	6.23 ± 0.59	6.71 ± 0.27

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table 5 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals	7	7	7	6	7	6
Body weight (g)	354.1 ± 14.7	335.6 ± 19.5	333.1 ± 22.5	310.7 ± 13.8**	397.3 ± 27.0	402.8 ± 31.4
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.036 ± 0.054	1.963 ± 0.135	2.057 ± 0.078	1.995 ± 0.104	2.091 ± 0.063	2.085 ± 0.078
Liver (g)	11.297 ± 0.854	10.237 ± 0.960	10.649 ± 1.357	10.915 ± 1.669	11.023 ± 1.162	12.588 ± 1.575
Heart (g)	1.270 ± 0.096	1.169 ± 0.070	1.194 ± 0.109	1.118 ± 0.065*	1.323 ± 0.106	1.480 ± 0.076*
Lung (g)	1.349 ± 0.061	1.253 ± 0.099	1.343 ± 0.081	1.220 ± 0.045*	1.360 ± 0.077	1.332 ± 0.127
Spleen (g)	0.653 ± 0.079	0.623 ± 0.106	0.646 ± 0.089	0.578 ± 0.055	0.690 ± 0.102	0.688 ± 0.085
Kidney (g)	2.683 ± 0.204	2.561 ± 0.245	2.719 ± 0.267	2.657 ± 0.231	2.876 ± 0.313	3.045 ± 0.353
Pituitary gland (mg)	11.51 ± 1.42	10.87 ± 1.50	10.79 ± 0.78	10.05 ± 0.87	13.14 ± 1.27	13.42 ± 1.75
Thymus (mg)	613.4 ± 131.1	574.0 ± 98.4	577.7 ± 57.5	626.0 ± 140.4	601.6 ± 132.4	620.8 ± 112.3
Thyroid (mg)	22.129 ± 3.036	21.086 ± 2.806	21.086 ± 2.490	19.350 ± 2.089	20.000 ± 3.643	21.450 ± 3.313
Adrenal (mg)	58.000 ± 8.981	55.143 ± 6.842	50.571 ± 5.159	54.667 ± 7.230	60.571 ± 7.413	65.833 ± 4.355
Testis (g)	3.150 ± 0.181	2.969 ± 0.360	3.120 ± 0.182	2.828 ± 0.199	3.174 ± 0.185	3.080 ± 0.166
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.574 ± 0.018	0.587 ± 0.052	0.621 ± 0.041*	0.643 ± 0.010**	0.527 ± 0.039	0.520 ± 0.046
Liver (g%)	3.191 ± 0.226	3.050 ± 0.202	3.190 ± 0.238	3.503 ± 0.412	2.773 ± 0.217	3.120 ± 0.260*
Heart (g%)	0.359 ± 0.021	0.350 ± 0.018	0.359 ± 0.024	0.360 ± 0.019	0.333 ± 0.010	0.372 ± 0.026**
Lung (g%)	0.381 ± 0.025	0.376 ± 0.030	0.406 ± 0.021	0.393 ± 0.023	0.344 ± 0.026	0.332 ± 0.042
Spleen (g%)	0.184 ± 0.023	0.186 ± 0.028	0.193 ± 0.023	0.187 ± 0.020	0.173 ± 0.024	0.170 ± 0.011
Kidney (g%)	0.756 ± 0.044	0.761 ± 0.052	0.814 ± 0.044	0.855 ± 0.062**	0.724 ± 0.053	0.757 ± 0.083
Pituitary gland (mg%)	3.254 ± 0.405	3.229 ± 0.288	3.240 ± 0.171	3.237 ± 0.280	3.309 ± 0.269	3.328 ± 0.290
Thymus (mg%)	173.669 ± 38.209	172.611 ± 37.170	173.874 ± 19.136	201.773 ± 44.644	151.024 ± 28.834	153.898 ± 23.674
Thyroid (mg%)	6.246 ± 0.794	6.294 ± 0.866	6.383 ± 1.083	6.248 ± 0.799	5.007 ± 0.594	5.343 ± 0.840
Adrenal (mg%)	16.373 ± 2.392	16.459 ± 1.979	15.161 ± 0.788	17.592 ± 2.072	15.277 ± 1.885	16.463 ± 2.079
Testis (g%)	0.890 ± 0.040	0.886 ± 0.100	0.940 ± 0.082	0.910 ± 0.065	0.801 ± 0.062	0.767 ± 0.069

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table 6 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Body weight (g)	219.1 ± 10.0	209.1 ± 18.6	217.9 ± 5.7	203.1 ± 19.9	253.7 ± 39.0	245.0 ± 18.2
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.930 ± 0.103	1.947 ± 0.074	1.869 ± 0.135	1.849 ± 0.088	2.010 ± 0.108	1.949 ± 0.053
Liver (g)	6.829 ± 0.425	6.030 ± 0.623*	6.684 ± 0.485	6.651 ± 0.784	6.797 ± 1.149	6.931 ± 0.645
Heart (g)	0.834 ± 0.036	0.760 ± 0.052	0.823 ± 0.049	0.806 ± 0.079	0.917 ± 0.068	0.911 ± 0.082
Lung (g)	1.046 ± 0.094	1.011 ± 0.057	1.049 ± 0.045	1.027 ± 0.111	1.080 ± 0.067	1.086 ± 0.028
Spleen (g)	0.487 ± 0.101	0.463 ± 0.064	0.453 ± 0.057	0.466 ± 0.100	0.464 ± 0.043	0.501 ± 0.084
Kidney (g)	1.663 ± 0.128	1.699 ± 0.143	1.654 ± 0.091	1.681 ± 0.140	1.794 ± 0.210	1.826 ± 0.165
Pituitary gland (mg)	13.13 ± 2.98	13.04 ± 2.05	12.69 ± 1.62	12.80 ± 1.53	14.11 ± 1.80	13.87 ± 2.19
Thymus (mg)	481.3 ± 66.6	482.1 ± 66.8	485.9 ± 51.8	578.0 ± 107.5	455.7 ± 103.9	466.1 ± 50.7
Thyroid (mg)	14.429 ± 3.355	15.371 ± 3.042	14.933 ± 2.252	15.343 ± 3.260	15.857 ± 2.293	14.000 ± 1.697
Adrenal (mg)	68.143 ± 11.908	59.857 ± 6.094	64.571 ± 9.090	67.286 ± 7.675	63.286 ± 6.047	65.429 ± 4.860
Ovary (mg)	91.143 ± 9.245	91.714 ± 8.902	89.714 ± 9.827	92.714 ± 11.743	92.143 ± 12.240	91.714 ± 13.363
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.881 ± 0.048	0.934 ± 0.084	0.856 ± 0.066	0.914 ± 0.058	0.809 ± 0.141	0.799 ± 0.069
Liver (g%)	3.119 ± 0.150	2.886 ± 0.195*	3.069 ± 0.203	3.270 ± 0.123	2.679 ± 0.122	2.827 ± 0.098*
Heart (g%)	0.380 ± 0.018	0.366 ± 0.014	0.379 ± 0.016	0.399 ± 0.019	0.369 ± 0.032	0.371 ± 0.011
Lung (g%)	0.477 ± 0.031	0.486 ± 0.024	0.483 ± 0.022	0.504 ± 0.017	0.431 ± 0.047	0.444 ± 0.030
Spleen (g%)	0.223 ± 0.039	0.220 ± 0.014	0.209 ± 0.024	0.229 ± 0.038	0.184 ± 0.028	0.206 ± 0.033
Kidney (g%)	0.759 ± 0.045	0.814 ± 0.047	0.759 ± 0.045	0.830 ± 0.052*	0.711 ± 0.042	0.744 ± 0.033
Pituitary gland (mg%)	5.991 ± 1.325	6.251 ± 0.952	5.831 ± 0.820	6.317 ± 0.672	5.630 ± 0.832	5.686 ± 0.962
Thymus (mg%)	219.017 ± 22.731	230.400 ± 22.794	222.671 ± 19.395	283.333 ± 34.332**	180.579 ± 40.788	190.486 ± 17.852
Thyroid (mg%)	6.556 ± 1.353	7.367 ± 1.410	6.855 ± 0.973	7.576 ± 1.554	6.323 ± 0.992	5.714 ± 0.555
Adrenal (mg%)	31.234 ± 6.143	28.616 ± 1.385	29.701 ± 4.727	33.244 ± 3.710	25.323 ± 3.618	26.839 ± 2.857
Ovary (mg%)	41.711 ± 5.073	43.959 ± 3.815	41.134 ± 3.813	46.126 ± 7.555	36.831 ± 6.477	37.567 ± 5.791

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

Table 7 Histopathological findings of male rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item		End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals examined		7	7	7	6	7	6
Organ: Findings	Grade						
Kidney: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	Total	1	5	7	6	0	4
	+	1	5	7	0	0	4
	++	0	0	0	6	0	0
Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	Total	0	0	3	4	0	2
	+	0	0	2	3	0	2
	++	0	0	1	1	0	0
Thyroid: Hypertrophy, follicular cell	+	0	1	1	6	0	0
	Decrease, colloid	+	0	1	1	6	0
	Irregular, shape, follicle	+	0	1	0	1	0

Values are number of animals with findings.

Grade of histopathological finding; +: slight, ++: moderate.

Table 8 Histopathological findings of female rats treated orally with 5-ethylidene-2-norbornene in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item		End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	4 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg
Number of animals examined		7	7	7	7	7	7
Organ: Findings	Grade						
Thyroid: Hypertrophy, follicular cell	+	0	0	0	1	0	0
	Decrease, colloid	+	0	0	0	1	0

Values are number of animals with findings.

Grade of histopathological finding; +: slight.

# 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 2,2,6,6-Tetramethyl-4-hydroxypiperidine on Bacteria

### 要約

OECD既存化学物質安全点検に係わる毒性調査事業の一環として、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法により実施した。

予備試験における抗菌性の結果をもとに、本試験では S9 mix 非共存下および共存下の各菌株について 5000 ~ 156  $\mu\text{g}$ /プレート (公比2) の6濃度を設定した。

本試験を2回実施した結果、被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mix 非共存下の TA1535, WP2 *uvrA* では 5000  $\mu\text{g}$ /プレート、TA100, TA98, TA1537 では 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上で、共存下の TA100, TA1537 では 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上、TA100, TA98, TA1537 では 5000  $\mu\text{g}$ /プレートでそれぞれ抗菌性が認められた。従って2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの変異原性は陰性と結論した。

### 方法

#### 〔使用菌株〕

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1)</sup> および東京大学医科学研究所 松島教授より 1985 年 10 月 14 日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> の 5 菌株を用いた。各菌株は超低温槽で -80℃ 以下に凍結保存したものを使用した。

試験に際して、各凍結菌株を融解後、その 20  $\mu\text{L}$  をニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath 社) 25 g を 1 L の精製水に溶解して作製した液体完全培地 10 mL に接種し、37℃ で 8 時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は菌濃度を測定した後、試験に使用した。

#### 〔被験物質〕

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジン (ロット番号: 6509051, 三井石油化学工業(株)提供) は、分子式  $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}$ , 分子量 157.26, 純度 99.8% (不純物として、トリアセトンアミン 0.1% 以下, 2,2,6,6-テトラメチル-4-アミノピペリジン 0.02%, 2,2,6,6-テトラメチルテトラヒ

ドロピラン-4-オール 0.04% を含む) の白色顆粒であり、通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し、確認した。

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンは注射用水 (DW, (株)大塚製薬工場) を用いて最高濃度 (50 mg/mL) の溶液を調製した後、同溶媒で所定濃度に段階希釈したものをを用いた。

#### 〔陽性対照物質〕

陽性対照物質として下記のものを用いた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業(株))

$\text{NaN}_3$  : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))

ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (Sigma Chemical Co.)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chemical Co.)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

$\text{NaN}_3$  は DW に、その他はジメチルスルホキシド (関東化学(株)) に溶解したものを使用した。

#### 〔培地および S9 mix の組成〕

##### 1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いて D-ビオチン、L-ヒスチジンおよび L-トリプトファン の 0.5 mM 混合水溶液を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水 100 mL に対して、粉末寒天 (Bacto-Agar, Difco 社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し、約 45℃ に保温した。

##### 2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 (オリエンタル酵母工業(株)) を購入し、使用した。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塩	0.2 g
クエン酸一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム無水塩	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
ブドウ糖	20 g
寒天 (OXOID Agar No.1)	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

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム六水塩	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
D-グルコース6-リン酸	5 $\mu$ mol
$\beta$ -NADPH	4 $\mu$ mol
$\beta$ -NADH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu$ mol
滅菌精製水	残量

\*:購入したS9(キッコーマン(株))を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボン併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 $\times$ g遠心上清分画である。

## 〔試験方法〕

試験はプレインキュベーション法で実施した。

試験管に被験物質溶液0.1 mLを分注し、S9 mix 0.5 mLと菌懸濁液0.1 mLを加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間振盪し、プレインキュベーションを行った。S9 mixを共存させない場合には、S9 mixの代わりに0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mLを加えた。プレインキュベーション後、トップアガー2 mLを上記の試験管に加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養し、復帰変異コロニー数を計測した。同時に実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた。予備試験では各濃度につき1枚のプレートを使用し、本試験では各濃度につき3枚のプレートを使用した。本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

## 〔試験結果の判定基準〕

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照値の2倍以上を示し、明確な用量相関性および再現性が認められる場合に陽性と判定した。

## 結果および考察

## 〔予備試験〕

5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22  $\mu$ g/プレートの濃度で実施した結果、S9 mix非共存下および共存下のすべての菌株の5000  $\mu$ g/プレートで抗菌性が認められた。従って、本試験ではS9 mix非共存下および共存下の各菌株について5000, 2500, 1250, 625, 313, 156  $\mu$ g/プレートの6濃度を設定した。

## 〔本試験〕

結果をTable 1, 2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施した結果、2回の本試験ともに、被験物質の各濃度

において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mix非共存下のTA1535, WP2uvrAでは5000  $\mu$ g/プレート、TA100, TA98, TA1537では2500  $\mu$ g/プレート以上で、共存下のTA100, TA1537では2500  $\mu$ g/プレート以上、TA100, TA98, TA1537では5000  $\mu$ g/プレートでそれぞれ抗菌性が認められた。

以上の結果から、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの変異原性は陰性と結論した。

## 文献

- 1) D.M. Maron and B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173(1983).
- 2) M.H.L. Green and W.J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3(1976).

## 連絡先

試験責任者：宮川 誠  
 試験担当者：榎本佳明, 清水優子  
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
 314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

## Correspondence

Authors: Makoto Miyagawa (Study director)  
 Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu  
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
 Kashima Laboratory  
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
 Ibaraki, 314-0255, Japan  
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine on bacteria

With (+) or Without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	150 139 (148) 154 ( $\pm 8$ )	14 16 (15) 16 ( $\pm 1$ )	49 36 (45) 51 ( $\pm 8$ )	24 17 (21) 22 ( $\pm 4$ )	9 17 (13) 14 ( $\pm 4$ )
	156	166 164 (165) 164 ( $\pm 1$ )	12 17 (16) 20 ( $\pm 4$ )	48 38 (41) 36 ( $\pm 6$ )	17 26 (22) 24 ( $\pm 5$ )	10 5 (8) 9 ( $\pm 3$ )
	313	163 149 (157) 158 ( $\pm 7$ )	11 10 (11) 12 ( $\pm 1$ )	44 46 (48) 53 ( $\pm 5$ )	19 15 (16) 15 ( $\pm 2$ )	9 11 (12) 16 ( $\pm 4$ )
	625	141 140 (141) 143 ( $\pm 2$ )	11 15 (13) 13 ( $\pm 2$ )	38 57 (48) 49 ( $\pm 10$ )	18 20 (19) 20 ( $\pm 1$ )	11 9 (10) 9 ( $\pm 1$ )
	1250	144 136 (139) 138 ( $\pm 4$ )	8 17 (13) 15 ( $\pm 5$ )	38 44 (42) 44 ( $\pm 3$ )	11 22 (18) 21 ( $\pm 6$ )	6 6 (8) 12 ( $\pm 3$ )
	2500	116* 113* (114) 113* ( $\pm 2$ )	10 6 (8) 7 ( $\pm 2$ )	29 35 (33) 34 ( $\pm 3$ )	24* 22* (22) 20* ( $\pm 2$ )	3* 8* (5) 4* ( $\pm 3$ )
	5000	107* 93* (101) 102* ( $\pm 7$ )	12* 12* (9) 3* ( $\pm 5$ )	22* 13* (18) 18* ( $\pm 5$ )	10* 12* (11) 12* ( $\pm 1$ )	3* 2* (3) 3* ( $\pm 1$ )
S9 mix (+)	0	160 172 (167) 170 ( $\pm 6$ )	12 18 (16) 19 ( $\pm 4$ )	50 36 (44) 47 ( $\pm 7$ )	28 25 (26) 25 ( $\pm 2$ )	11 9 (10) 11 ( $\pm 1$ )
	156	130 160 (161) 192 ( $\pm 31$ )	13 12 (14) 16 ( $\pm 2$ )	54 51 (54) 56 ( $\pm 3$ )	27 17 (22) 21 ( $\pm 5$ )	8 10 (11) 14 ( $\pm 3$ )
	313	146 168 (169) 192 ( $\pm 23$ )	15 17 (14) 10 ( $\pm 4$ )	42 47 (44) 44 ( $\pm 3$ )	32 23 (27) 27 ( $\pm 5$ )	16 10 (11) 6 ( $\pm 5$ )
	625	147 169 (161) 166 ( $\pm 12$ )	18 13 (16) 16 ( $\pm 3$ )	42 42 (42) 43 ( $\pm 1$ )	20 27 (23) 22 ( $\pm 4$ )	12 11 (11) 9 ( $\pm 2$ )
	1250	161 175 (162) 151 ( $\pm 12$ )	8 11 (15) 25 ( $\pm 9$ )	46 59 (49) 43 ( $\pm 9$ )	30 33 (29) 23 ( $\pm 5$ )	9 13 (10) 9 ( $\pm 2$ )
	2500	146* 152* (146) 140* ( $\pm 6$ )	12 12 (14) 18 ( $\pm 3$ )	58 57 (56) 52 ( $\pm 3$ )	23 32 (26) 24 ( $\pm 5$ )	11* 9* (10) 10* ( $\pm 1$ )
	5000	98* 105* (108) 122* ( $\pm 12$ )	6* 14* (9) 8* ( $\pm 4$ )	38* 25* (30) 28* ( $\pm 7$ )	18* 23* (19) 15* ( $\pm 4$ )	6* 4* (7) 10* ( $\pm 3$ )
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	755 748 (735) 703 ( $\pm 28$ )	393 361 (406) 463 ( $\pm 52$ )	642 560 (582) 544 ( $\pm 53$ )	752 704 (707) 665 ( $\pm 44$ )	566 418 (490) 486 ( $\pm 74$ )
	Number of revertants	1076 1190 (1112) 1070 ( $\pm 68$ )	420 401 (419) 437 ( $\pm 18$ )	1812 1825 (1807) 1785 ( $\pm 20$ )	476 425 (422) 366 ( $\pm 55$ )	180 136 (166) 182 ( $\pm 26$ )

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN<sub>3</sub>: sodium azide (Mean)  
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene ( $\pm$ S.D.)

\*: Microbial toxicity was observed.



Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine on bacteria

With (+) or Without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	134 134 (134) 133 ( $\pm 1$ )	17 18 (18) 18 ( $\pm 1$ )	37 43 (42) 45 ( $\pm 4$ )	20 19 (20) 22 ( $\pm 2$ )	7 6 (6) 6 ( $\pm 1$ )
	156	150 147 (139) 119 ( $\pm 17$ )	20 20 (20) 19 ( $\pm 1$ )	51 31 (39) 36 ( $\pm 10$ )	17 19 (16) 12 ( $\pm 4$ )	8 7 (6) 4 ( $\pm 2$ )
	313	117 137 (134) 149 ( $\pm 16$ )	15 25 (20) 20 ( $\pm 5$ )	31 35 (34) 36 ( $\pm 3$ )	23 20 (20) 17 ( $\pm 3$ )	6 4 (6) 9 ( $\pm 3$ )
	625	111 155 (136) 142 ( $\pm 23$ )	22 20 (22) 23 ( $\pm 2$ )	37 38 (38) 38 ( $\pm 1$ )	18 18 (18) 19 ( $\pm 1$ )	4 4 (4) 3 ( $\pm 1$ )
	1250	161 125 (140) 135 ( $\pm 19$ )	20 18 (20) 23 ( $\pm 3$ )	29 32 (33) 37 ( $\pm 4$ )	18 16 (17) 18 ( $\pm 1$ )	5 11 (8) 8 ( $\pm 3$ )
	2500	121* 120* (111) 91* ( $\pm 17$ )	12 13 (13) 13 ( $\pm 1$ )	35 29 (29) 24 ( $\pm 6$ )	23* 18* (19) 16* ( $\pm 4$ )	10* 5* (7) 5* ( $\pm 3$ )
	5000	104* 98* (99) 96* ( $\pm 4$ )	9* 8* (9) 10* ( $\pm 1$ )	13* 12* (14) 16* ( $\pm 2$ )	11* 10* (10) 10* ( $\pm 1$ )	5* 6* (5) 5* ( $\pm 1$ )
S9 mix (+)	0	158 158 (159) 161 ( $\pm 2$ )	24 18 (21) 22 ( $\pm 3$ )	40 36 (38) 37 ( $\pm 2$ )	27 23 (24) 22 ( $\pm 3$ )	9 9 (9) 10 ( $\pm 1$ )
	156	178 155 (158) 141 ( $\pm 19$ )	20 25 (23) 25 ( $\pm 3$ )	48 35 (44) 48 ( $\pm 8$ )	30 33 (27) 19 ( $\pm 7$ )	4 11 (7) 6 ( $\pm 4$ )
	313	162 145 (158) 167 ( $\pm 12$ )	17 18 (21) 28 ( $\pm 6$ )	48 43 (41) 33 ( $\pm 8$ )	25 30 (32) 42 ( $\pm 9$ )	11 5 (9) 11 ( $\pm 3$ )
	625	139 146 (141) 138 ( $\pm 4$ )	25 23 (23) 20 ( $\pm 3$ )	28 36 (34) 37 ( $\pm 5$ )	21 33 (28) 30 ( $\pm 6$ )	13 9 (9) 6 ( $\pm 4$ )
	1250	163 149 (159) 165 ( $\pm 9$ )	25 16 (20) 18 ( $\pm 5$ )	45 35 (41) 43 ( $\pm 5$ )	28 33 (28) 23 ( $\pm 5$ )	6 6 (7) 9 ( $\pm 2$ )
	2500	112* 136* (133) 150* ( $\pm 19$ )	17 28 (21) 18 ( $\pm 6$ )	27 39 (36) 42 ( $\pm 8$ )	30 41 (33) 28 ( $\pm 7$ )	8* 11* (9) 9* ( $\pm 2$ )
	5000	103* 105* (110) 123* ( $\pm 11$ )	10* 5* (8) 10* ( $\pm 3$ )	30* 48* (39) 38* ( $\pm 9$ )	16* 17* (17) 17* ( $\pm 1$ )	12* 5* (8) 8* ( $\pm 4$ )
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
S9 mix (+)	Number of revertants	685 633 (669) 690 ( $\pm 32$ )	406 371 (367) 325 ( $\pm 41$ )	493 432 (435) 381 ( $\pm 56$ )	655 653 (645) 626 ( $\pm 16$ )	336 493 (377) 303 ( $\pm 102$ )
	Number of revertants	1052 1017 (1026) 1009 ( $\pm 23$ )	378 312 (356) 379 ( $\pm 38$ )	1703 1824 (1802) 1879 ( $\pm 90$ )	395 387 (397) 410 ( $\pm 12$ )	183 187 (184) 183 ( $\pm 2$ )

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN<sub>3</sub>: sodium azide  
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)  
( $\pm$ S.D.)

\*: Microbial toxicity was observed.

# 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの 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 2,2,6,6-Tetramethyl-4-hydroxypiperidine on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても800 µg/mLを最高濃度とし、それぞれ公比2で4用量を設定した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。しかしながら、短時間処理法のS9 mix非存在下の最高濃度(800 µg/mL)の分裂指数が6.6であることから、さらに高濃度において分裂中期細胞の観察が可能と推測されたため、1200 µg/mLを最高濃度とし、1000, 800 µg/mLの3用量で追加試験1を実施した。その結果、いずれの濃度においても、染色体構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められず、また、1200 µg/mLの分裂指数が6.3であったことから、さらに同条件下において2000, 1500, 1000 µg/mLの3用量で追加試験2を実施した。その結果、2000 µg/mLで染色体構造異常および数的異常細胞の出現頻度はそれぞれ6.0, 7.0%となった。そこで、さらに再現性確認のため追加試験2と同条件で追加試験3を実施したところ、2000 µg/mLで染色体構造異常細胞の出現頻度は17.5%となり、再現性が認められた。なお、追加試験2および3における2000 µg/mLの分裂指数はそれぞれ1.6, 3.3であった。

以上の結果より、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1996年11月, 入手時:継代14代, 凍結時:17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5代以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(CS:GIBCO BRL, ロット番号:35K7844, 39K0464)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<sup>4</sup>個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。

連続処理法では、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、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mix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

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジン(ロット番号:6509051, 三井石油化学工業(株)一現三井化学(株)一提供)は、分子式C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>NO, 分子量157.26, 純度99.8%(不純物として、トリアセトンアミン0.1%以下, 2,2,6,6-テトラメチル-4-アミノピペリジン0.02%, 2,2,6,6-テトラメチルテトラヒドロピラン-4-オール0.04%を含む)の白色顆粒である。通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し、確認した。

#### 5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒は局方生理食塩液(生食, (株)大塚製薬工場, ロット番号:K6F82, K7F75, K8B74)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10(v/v)%になるように加えた。なお、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(Fig.1, 2)。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(Monocellator™, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を測定し、被験物質処理群の陰性対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。なお、連続処理法は、500~1000 µg/mLで

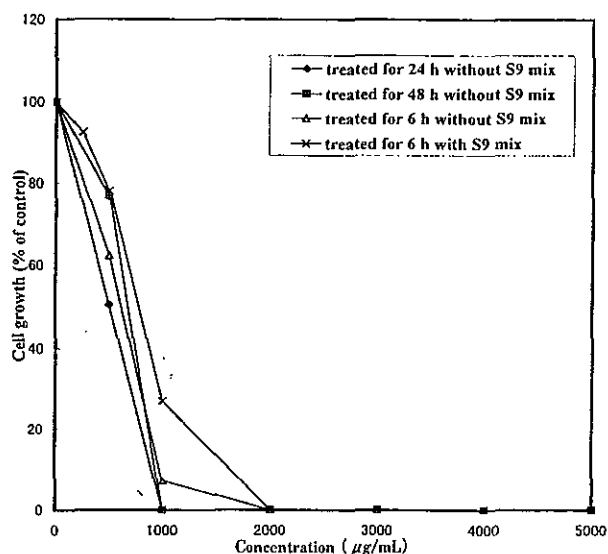


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine

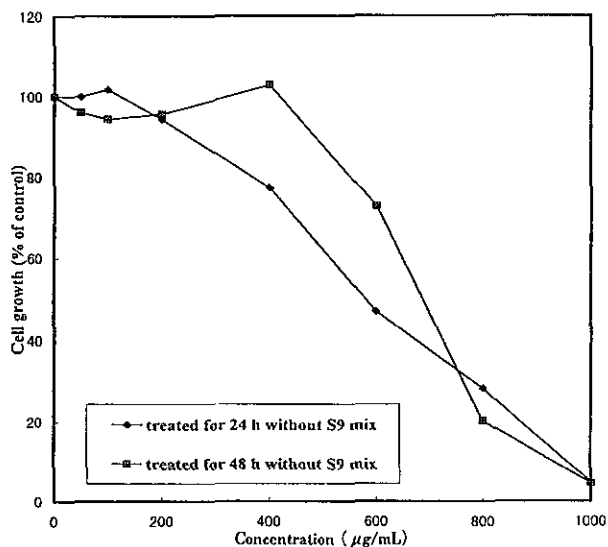


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine

細胞生存率に急激な変化が認められたため、1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として追加試験を実施した(Fig.2).

その結果、約50%の増殖抑制を示す濃度を、プロビット法により算出したところ、連続処理法の24時間および48時間処理ではそれぞれ572, 683  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ726, 565  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった(Fig.1, 2)。

#### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果を基に、染色体異常試験は連続処理法および短時間処理法のいずれの処理条件においても800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度とし、それぞれ公比2で4用量を設定した。

追加試験は、分裂指数を基に追加試験1では1200, 1000, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定し、追加試験2, 3では2000, 1500, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定した。

陽性対照として、連続処理法は、マイトマイシンC(MMC, 協和発酵工業株, ロット番号:119AFG)を0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法は、ベンゾ[a]ピレン(BP, 東京化成工業株, ロット番号:AX01)を20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 設定した。

#### 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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2枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で20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枚のディッシュから得られたスライドを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>1)</sup>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、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

#### 10. 記録と測定

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。構造異常は、ギャップを持つ細胞を含めた場合(+gap)と含めない場合(-gap)とに区別して集計した。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とした。

#### 結果および考察

連続処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞は、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 2-5に示した。細胞増殖抑制試験の結果を基に、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。しかしながら、S9 mix非存

在下の800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の分裂指数が6.6であり、さらに高濃度においても分裂中期細胞の観察が可能と判断して1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度とし、1000, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量で追加試験1を実施した。その結果、いずれの濃度においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。また、この時の1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の分裂指数が6.3であったことから、さらに同条件下において2000, 1500, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量で追加試験2を実施した。その結果、2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の染色体構造異常および数的異常細胞の出現頻度はそれぞれ6.0, 7.0%となった。そこで、さらに再現性確認のため同条件、同濃度で追加試験3を実施したところ、2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で染色体構造異常細胞の出現頻度は17.5%となり、再現性が認められた。

なお、追加試験2および3の2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の分裂指数はそれぞれ1.6および3.3であった。

一方、陽性対照物質のBPで処理した細胞は、S9 mix存在下でのみ染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

従って、上記の試験条件下で、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンは、染色体異常を誘発すると結論した。

なお、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンおよび類似化合物における染色体異常に関する他の情報は得られなかった。

## 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 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: 太田絵律奈  
試験担当者: 中川宗洋, 石毛裕子, 穴澤由美子  
(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

## Correspondence

Authors: Erina Ohta (Study director)  
Munehiro Nakagawa, Yuko Ishige,  
Yumiko Anazawa  
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
Kashima Laboratory  
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
Ibaraki, 314-0255, Japan  
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine without S9 mix [main test]

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>		
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap(%)	+gap(%)		SA	NA	
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0		
TH	100	24	200	0	1	0	0	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
	200	24	200	0	1	1	1	0	0	3	3	3(1.5)	3(1.5)	0.0	-	-
	400	24	200	0	0	0	1	0	0	1	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
	800	24	176	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.6	-	-
MMC	0.03	24	200	0	15	41	3	1	0	60	58	58(29.0)	58(29.0)	0.0	+	-
Solvent	0	48	200	0	0	0	2	0	0	2	2	2(1.0)	2(1.0)	0.0		
TH	100	48	200	1	1	0	1	0	0	3	2	2(1.0)	3(1.5)	0.0	-	-
	200	48	200	1	0	0	1	0	0	2	1	1(0.5)	2(1.0)	0.0	-	-
	400	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
	800	48	200	0	0	3	2	0	0	5	4	4(2.0)	4(2.0)	2.0	-	-
MMC	0.03	48	200	2	14	50	6	0	0	72	64	64(32.0)	65(32.5)	0.0	+	-

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), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, TH: 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine, MMC: mitomycin C (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine with and without S9 mix [main test]

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap(%)	+gap(%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	1	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.0		
TH	100	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
	200	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.5	-	-
	400	-	6-(18)	200	0	1	0	0	1	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.0	-	-
	800	-	6-(18)	100	0	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.5	-	-
BP	20	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.5		
TH	100	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
	200	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
	400	+	6-(18)	200	0	1	0	1	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.0	-	-
	800	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
BP	20	+	6-(18)	200	2	19	157	1	0	0	179	160(80.0)	160(80.0)	0.0	+	-

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), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, TH: 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine, BP: benzo[a]pyrene (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

Table 3 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine without S9 mix [additional test 1]

Group	Concentration (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap (%)	+gap (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
TH	800	-	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.5	-	-
	1000	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	1.0	-	-
	1200	-	6-(18)	200	0	0	1	0	1	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.5	-	-
BP	20	-	6-(18)	200	0	1	0	1	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.0	-	-

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), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, TH: 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine, BP: benzo[a]pyrene (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

Table 4 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine without S9 mix [additional test 2]

Group	Concentration (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap (%)	+gap (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
TH	1000	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
	1500	-	6-(18)	200	2	1	0	0	0	0	3	1(0.5)	3(1.5)	4.0	-	-
	2000	-	6-(18)	100	1	0	4	0	1	0	6	5(5.0)	6(6.0)	7.0	±	±
BP	20	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-

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), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, TH: 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine, BP: benzo[a]pyrene (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

Table 5 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine without S9 mix [additional test 3]

Group	Concentration (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap (%)	+gap (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	1	3	0	0	0	0	4	3(1.5)	4(2.0)	0.0	-	-
TH	1000	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0(0.0)	1(0.5)	0.0	-	-
	1500	-	6-(18)	200	0	1	4	1	0	0	6	6(3.0)	6(3.0)	0.5	-	-
	2000	-	6-(18)	200	1	5	32	0	0	0	38	35(17.5)	35(17.5)	0.0	+	-
BP	20	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-

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), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, TH: 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine, BP: benzo[a]pyrene (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

## 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの 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

### Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2,2,6,6-Tetramethyl-4-hydroxypiperidine by Oral Administration in Rats

#### 要約

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの60, 200および600 mg/kgをSD系(Crj:CD)のラットの交配前2週間および交配期間の2週間を通じて経口投与し、さらに雄では交配期間終了後20日間、雌では妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで連続投与し、親動物の反復投与毒性および生殖能ならびに児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

#### 1. 反復投与毒性

被験物質投与に起因すると考えられる死亡が、雌の60 mg/kg群および雌雄の600 mg/kg群で観察された。一般状態の観察で被験物質投与後に眼瞼下垂および散瞳が雌雄の60 mg/kg以上の投与群で、自発運動低下が雌雄の600 mg/kg群で認められた。また、雌雄の200 mg/kg以上の投与群で体重増加抑制が認められ、摂餌量の高値が雌雄の600 mg/kg群で認められた。雄の血液学検査、血液凝固能検査および血液生化学検査には被験物質投与の明らかな影響は認められなかった。器官重量では雌雄の600 mg/kg群で副腎重量が高値を示し、雌の600 mg/kg群で肝臓重量が高値を示した。

病理学検査の結果、生存例には被験物質投与の影響が示唆される病変は観察されなかった。600 mg/kg群の死亡例では被験物質投与の直接的な刺激に起因すると考えられる消化管の赤色斑点や腺胃の潰瘍に伴う所見が認められた。また、死亡動物に共通して腎臓の皮質や皮髄境界部に尿細管上皮の空胞変性が観察され、被験物質投与の影響が示唆された。しかし、生存例では腎臓の異常は認められなかった。

#### 2. 生殖発生毒性

600 mg/kg群で連続した発情休止期像が観察される性周期の停止が3例認められ、平均性周期が延長した。交尾能および受胎能に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、妊娠期間にも被験物質投与の影響は認められなかった。妊娠黄体数、着床痕数、出産児数、出産生児数、着床率および分娩率に明らかな被験物質投与の影響は認められなかった。600 mg/kg群で雌雄の新生児の生後0日体重および4日の生存率が低値を示した。新生児の外表に異常は認められず、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。

以上の結果から、本試験条件下における2,2,6,6-テ

トラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの反復投与毒性に関する無影響量(NOEL)は雌雄とも60 mg/kg/day未満と判断された。雄の生殖に及ぼす影響は600 mg/kg/day投与でも認められず、無影響量は600 mg/kg/dayと判断された。雌の生殖に及ぼす影響は600 mg/kg/day投与で平均性周期が延長したことから、無影響量は200 mg/kg/dayと判断された。児動物の発生・発育に及ぼす影響は600 mg/kg/day投与で発育抑制が認められ、生後4日生存率が低値傾向を示し、無影響量は200 mg/kg/dayと判断された。

#### 方法

##### 1. 被験物質

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジン〔別名TAAM, 三井石油化学工業(株)製造, Lot No. 650905, 純度99.8 wt%, 分子量157.26, 融点129℃〕は、白色の顆粒であり、使用時まで室温で遮光下密栓保管した。本ロットは、投与期間中安定であったことを確認した。

被験物質は、注射用蒸留水(㈱大塚製薬工場製)に溶解し、6, 20および60 mg/mLの濃度になるよう各群の投与液を調製した。調製後は、使用時まで冷暗条件下で密閉保管した。調製液中の被験物質は、6 mg/mL溶液の場合冷暗条件下で少なくとも7日間安定であることを確認した。

投与液の濃度および均一性の分析は、調製開始時に調製した各群のバッチから無作為にサンプルを抽出し実施した。その結果、誤差範囲が設定濃度の-2.70~0.68%であり、基準範囲内(±10%以内)であった。したがって、投与液にはほぼ所定量の2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンが含有されており、適切に混合されていたことを確認した。

##### 2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー(株)から購入した生後8週齢のSprague-Dawley(Crj:CD(SD), SPF)系雌雄ラットを使用した。購入した動物は7日間検疫・馴化飼育した後、一般状態に異常が認められなかったものを10週齢で群分けして試験に用いた。群分け時の体重は、雄で359~400 g, 雌で227~282 gの範囲であった。

動物は、温度24±2℃, 湿度55±10%, 換気回数15回/時間, 照度150~300 lux, 照明時間12時間(午前7時点灯, 午後7時消灯)に設定されたバリアシステムの飼育室でアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに

1匹ずつ収容し飼育した。妊娠18日以降の母動物は哺育4日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに哺育トレーおよび巣作り材料(CareFRESH<sub>m</sub>)を入れて飼育した。

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

### 3. 群分け

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

### 4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験の用量は先に実施した予備試験「2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンのラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験-2週間毒性試験(試験番号3184)」の結果を参考にして決定した。すなわち、0, 20, 60, 200および600 mg/kgを雄および雌に14日間連続経口投与した結果、雄の600 mg/kg群で投与11日に1例死亡した。一般状態の変化として、投与後に眼瞼下垂および自発運動低下が200および600 mg/kg群で雌雄ともに全例に観察され、散瞳および流涎が200 mg/kg群で少数例に、600 mg/kg群ではほぼ全例に観察された。その他、縮瞳が200および600 mg/kg群で少数例に観察された。また、600 mg/kg群の雄に体重増加抑制が認められ、同群の雌雄で投与1から3日の平均1日摂餌量が低値を示した。雄の血液学検査では600 mg/kg群で好中球比率が高値を示し、リンパ球比率が低値を示した。血液生化学検査では60 mg/kg以上の投与群で総コレステロールが高値を示したが、対照群の値が背景値に比べ低かったため被験物質投与の影響かどうかは明らかではなかった。剖検では、雌雄のいずれの投与群にも被験物質投与の影響と考えられる所見は認められなかった。剖検時の器官重量では、雄の600 mg/kg群で肝臓の絶対重量が低値を示した。以上の結果から、本試験の最高用量を明らか毒性兆候が現れることが予想される600 mg/kgに設定し、以下公比3で除し、200および60 mg/kgを設定した。

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

雄の投与期間は、交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後20日間の連続48日間とした。雌の投与期間は、交配前14日間と交配期間中(最長14日間)ならびに交尾雌の妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで(41~52日間)とした。なお、交尾しなかった雌は交配期間終了後20日間の連続48日間とした。

### 1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

### 2) 体重

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

### 3) 摂餌量

雄では、投与1(投与開始日)、8, 15, 22, 29, 36, 43および48日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日および投与22から48日までの累積摂餌量を算出した。雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日までの累積摂餌量を算出した。また、交尾成立の雌は妊娠0, 7, 14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともにそれぞれ妊娠0から21日および哺育0から4日までの累積摂餌量を算出した。なお、交配期間中の摂餌量は測定しなかった。

### 4) 交配

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

### 5) 自然分娩時および新生児の観察

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



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

哺育4日に出生児の重量を測定後、全例をエーテル麻酔により安楽死させ、主要器官の肉眼観察を行った。なお、哺育期間中の死亡児についても同様に主要器官の肉眼観察を行った。また、出生児の4日生存率〔(哺育4日生存児数/出産生児数)×100〕を求めた。

#### 6) 臨床検査

各群の雄全例について剖検時に実施した。動物を最終投与日(投与期間:48日間)の夕方から翌朝まで約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) 血液学検査

検査はEDTA-3Kを添加した初血について、THMS H-1E(米国マイルス社)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:全赤血球の容積により補正)、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:暗視野板法)、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。白血球百分率は前述の機器で測定したが、別途血液塗抹標本を作製し、メイ・グリウンワルド・ギムザ染色して保管した。網赤血球(RC)比率の算定については、EDTA-3K添加血液をニューメチレンブルーで染色後、血液塗抹標本を作製した。各群とも貧血傾向が認められなかったため、標本の観察は行わなかった。

##### b) 血液凝固能検査

検査にはクエン酸ソーダ添加血液を3000 r.p.m., 13分間遠心分離して得た血漿について、血液凝固測定装置KC-40(独国アメルング社)を用いてプロトロンビン時間(PT:Quick 1段法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT:クロット法)およびフィブリノーゲン量(Fibrinogen:トロンビン時間法)を測定した。

##### c) 血液生化学検査

検査はクリーンシール(株ヤトロン)に血液を採取し、30分間静置後3000 r.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CentrifiChem ENCORE II(米国ベーカー社)およびEKTACHEM 700N(米国コダック社)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)、中性脂肪(酵素色素法)、総コレステロール(コレステロールオキシダーゼ法)、尿素窒素(ウレアーゼアンモニウム指示薬法)、クレアチニン(Jaffé法)、総ビリルビン(ジアゾ法)、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(IFCC法)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(IFCC法)、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(Orłowski法)、ナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)、塩素(電極法)、カルシウ

ム(アルセナゾⅢ法)および無機リン(モリブデン酸青法)を測定した。

#### 7) 病理学検査

##### a) 剖検および器官重量

###### ① 死亡動物

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、精囊、前立腺、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。精巢および精巢上体はブアン氏液に固定した。

###### ② 雄動物

48日間投与した日の夕方から、約16時間絶食をさせた後エーテル麻酔下で採血し安楽死させた。主要器官の肉眼的観察を行った後、脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巢および精巢上体重量を測定し器官重量・体重比(相対重量)を算出した。また、全動物の重量測定器官に加えて心臓、精囊、前立腺および下垂体を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、精巢および精巢上体はブアン氏液で固定した。

###### ③ 自然分娩した雌

哺育4日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた。主要器官の肉眼的観察を行った後、脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および卵巣重量を測定し器官重量・体重比(相対重量)を算出した。また、全動物の重量測定器官に加えて心臓、下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として皮膚を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。また、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

###### ④ 交尾の成立しなかった雌

48日間投与した翌日、エーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織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、膣、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。

###### ⑤ 哺育期間中に全児が死亡した母動物(全児死亡動物)

生存児すべての死亡または喰殺が確認された翌日にエーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織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、膣、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。なお、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

## b) 病理組織学検査

## ① 死亡動物および全児死亡動物

死亡動物(雄の600 mg/kg群の3例, 雌の60および600 mg/kg群の各1例)および全児死亡動物(雌の600 mg/kg群の1例)の皮膚, 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, 精囊, 前立腺, 精巣, 精巣上部, 卵巣, 子宮, 陰, 眼球, ハーグー腺, 脳, 下垂体および脊髄について実施した。

## ② 妊娠を成立させた雄

対照群と高用量群では脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎および精巣について実施し, 低および中用量群では腎臓について実施した。

## ③ 自然分娩した雌

対照群と高用量群では脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎および卵巣について実施し, 加えて高用量群の1例の皮膚について実施した。また, 低および中用量群では腎臓について実施した。

## ④ 交尾の成立しなかった雄雌

600 mg/kg群の雌雄各1例の脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 陰, 子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上部, 精囊, 前立腺, 下垂体について実施した。脳, 胸腺, 心臓, 肺, 胃, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 陰, 子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上部, 精囊, 前立腺, 下垂体および腹腔の塊について実施した。

## 5. 統計解析

体重, 摂餌量, 黄体数, 着床痕数, 出産児数, 死産児数, 性比, 平均性周期, 妊娠期間, 着床率, 分娩率, 出生率, 外表異常発現率, 新生児の4日の生存率, 器官重量, 器官重量・体重比(相対重量), 血液学および血液生化学検査値については多重比較検定<sup>1, 2)</sup>を行った。

出産率, 交尾率および受胎率については $\chi^2$ 検定<sup>4, 5)</sup>を用いた。病理学検査の所見の発生率については, Fisherの直接確率検定法<sup>5)</sup>を用いて検定し, グレードのある所見は, -を「1」, +1を「2」, +2を「3」および+3を「4」に割り当てた後, 順位と検定であるMann-WhitneyのU検定<sup>6)</sup>を用いて検定した。なお, 哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は\*: $P<0.05$ 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

死亡例が雄では, 600 mg/kg群で投与6および9日に1および2例観察された。雌では, 60 mg/kg群で投与16日に1例, 600 mg/kg群で投与3日に1例観察された。

雄の一般状態の変化では, 投与後の症状として, すべての被験物質投与群で散瞳および眼瞼下垂が認められた。散瞳は60 mg/kg群の1例でごくまれに, 200 mg/kg

群のほぼ全例で散発的に, 600 mg/kg群の全例で毎日観察され, 発現の強さは60 mg/kg群で軽度, 200および600 mg/kg群で軽度から重度であった。眼瞼下垂は60 mg/kg群のほぼ全例で散発的に, 200および600 mg/kg群の全例で毎日観察され, 発現の強さは60 mg/kg群で軽度, 200 mg/kg群で軽度から中等度, 600 mg/kg群で軽度から重度であった。また, これらの症状の発現はいずれの群も投与後30分から認められ, 60 mg/kg群では投与後2時間, 200 mg/kg群では投与後4時間以内にはほぼ消失したが, 600 mg/kg群では投与後2時間でもっとも強く発現し, 投与後6時間でもほぼ全例が軽度または中等度の症状を呈していた。また, 自発運動低下が600 mg/kg群で交配前・交配期間中ほぼ全例で低頻度に認められた。その他, 脱毛が60 mg/kg群で交配前・交配期間中に1例(両前肢), 600 mg/kg群の死亡例に被毛の汚れ, 体温低下, 眼分泌物, 鼻分泌物, 流涎, 腹臥位, よろめき歩行および振戦が1から3例に認められた。

雌の一般状態の変化では, 投与後の症状として, すべての被験物質投与群で散瞳および眼瞼下垂が認められた。散瞳は, 60 mg/kg群の1例で投与期間中ごくまれに, 200 mg/kg群の少数例で妊娠期間までは散発的, 哺育期間では毎日, 600 mg/kg群のほぼ全例で投与期間中毎日観察された。眼瞼下垂は60 mg/kg群では交配前・交配期間中はほぼ全例に毎日, 妊娠期間中はほぼ全例で散発的に, 哺育期間は少数例で散発的に, 200および600 mg/kg群では全例に投与期間中はほぼ毎日観察された。その他交配前・交配期間では, 体温低下および自発運動低下が600 mg/kg群で少数例に, 同群の交尾不成立の雌で消瘦, 軟便および流涎が認められた。妊娠期間では, 脱毛(胸部, 両前肢)が600 mg/kg群で1例, 自発運動低下が200 mg/kg群で1例, 600 mg/kg群で4例, 血尿が60 mg/kg群で1例, 流涎が600 mg/kg群で1例認められた。哺育期間では, 全児死亡が600 mg/kg群で哺育2日に1例, 自発運動低下が600 mg/kg群で哺育0日に1例認められた。

## 2) 体重(Fig. 1, 2)

雄では, 対照群に比べて200 mg/kg群で投与29日以降, 600 mg/kg群では投与22日以降に低値を示し, 両群ともに投与1~43日の体重増加量も低値を示した。雌の交配前投与期間で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。妊娠期間では, 対照群に比べて200および600 mg/kg群で妊娠21日に低値を示し, 両群ともに妊娠0~21日の体重増加量も低値を示した。哺育期間では, 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。

## 3) 摂餌量(Fig. 3, 4)

雄では, 対照群に比べて600 mg/kg群で投与8日以降高値を示し, 投与22~48日の累積摂餌量も高値を示した。

雌の交配前期間では, 対照群に比べ600 mg/kg群で投与8から15日の平均1日摂餌量が高値を示し, 投与1~

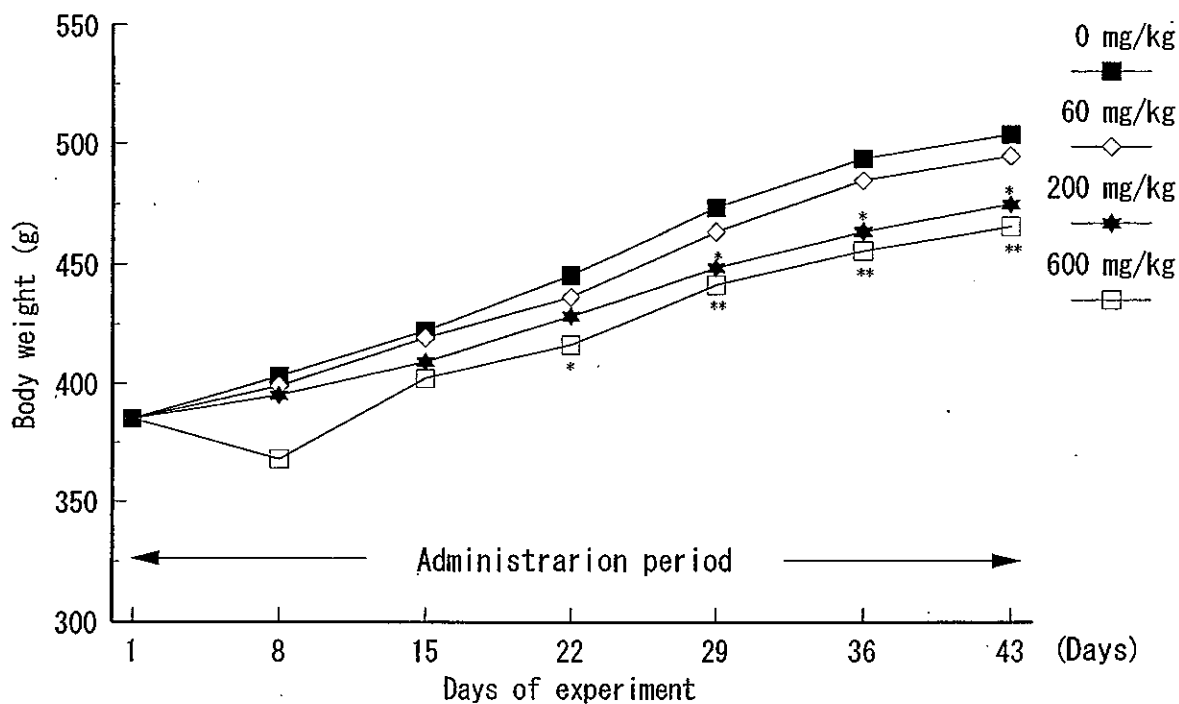


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significant difference from control group; \*:p<0.05 \*\*:P<0.01

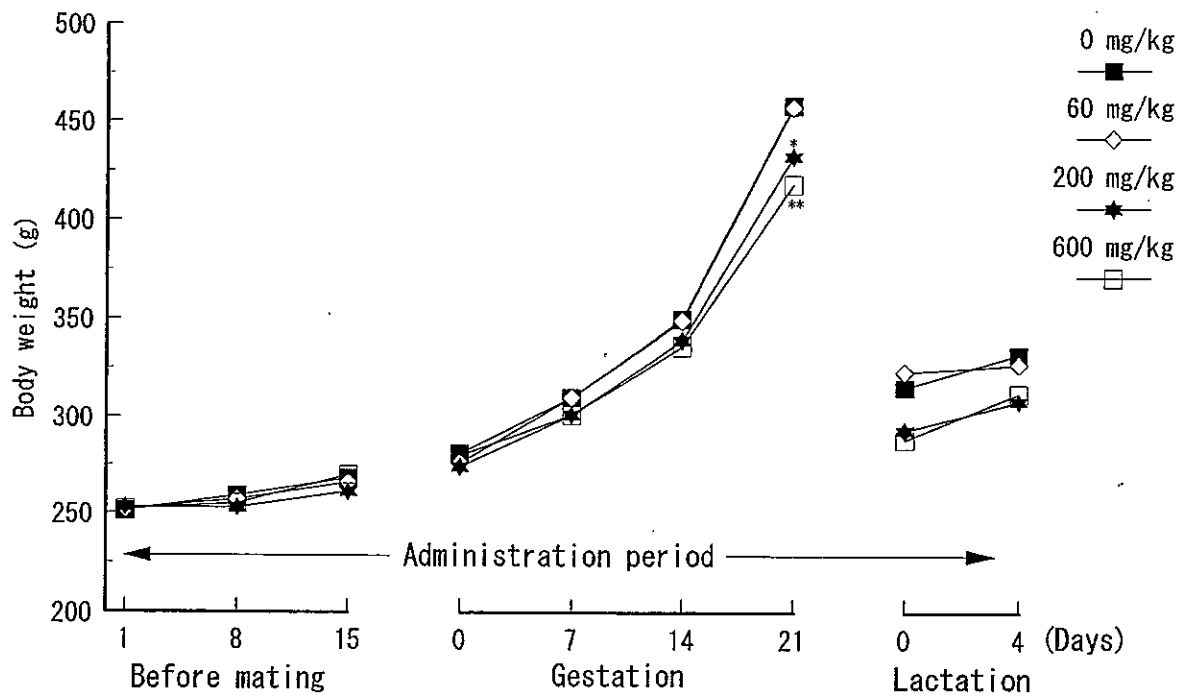


Fig. 2 Body weight change of female rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significant difference from control group; \*:p<0.05 \*\*:P<0.01

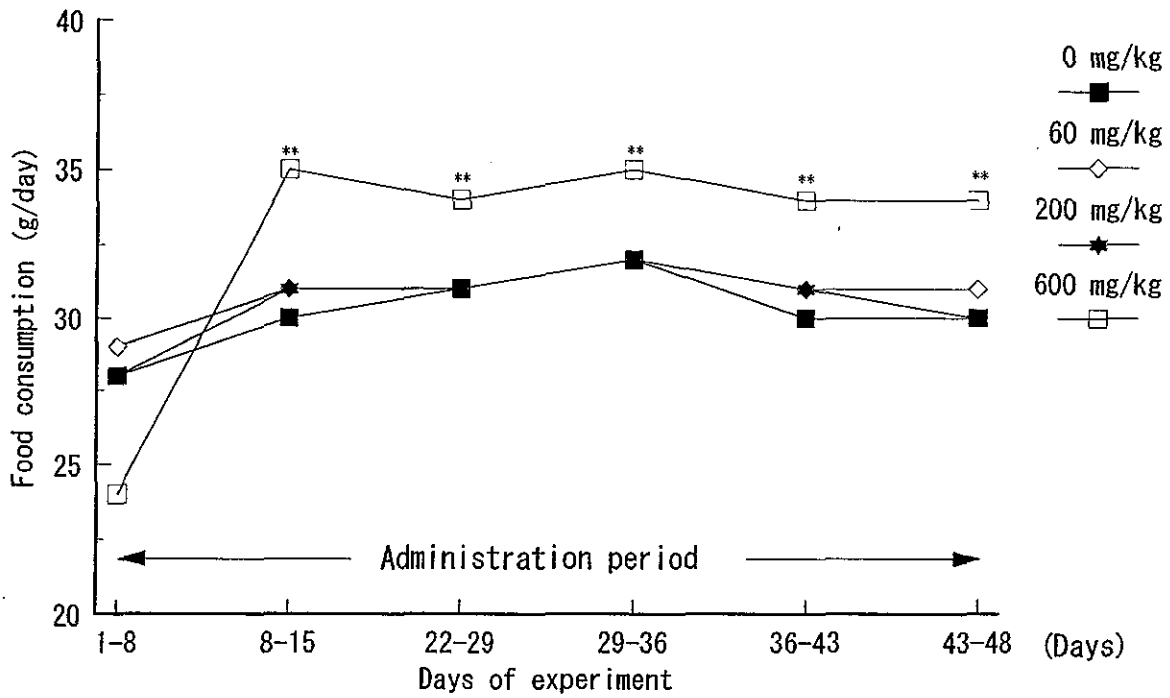


Fig. 1 Food consumption of male rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test  
Significant difference from control group; \*\*: P<0.01

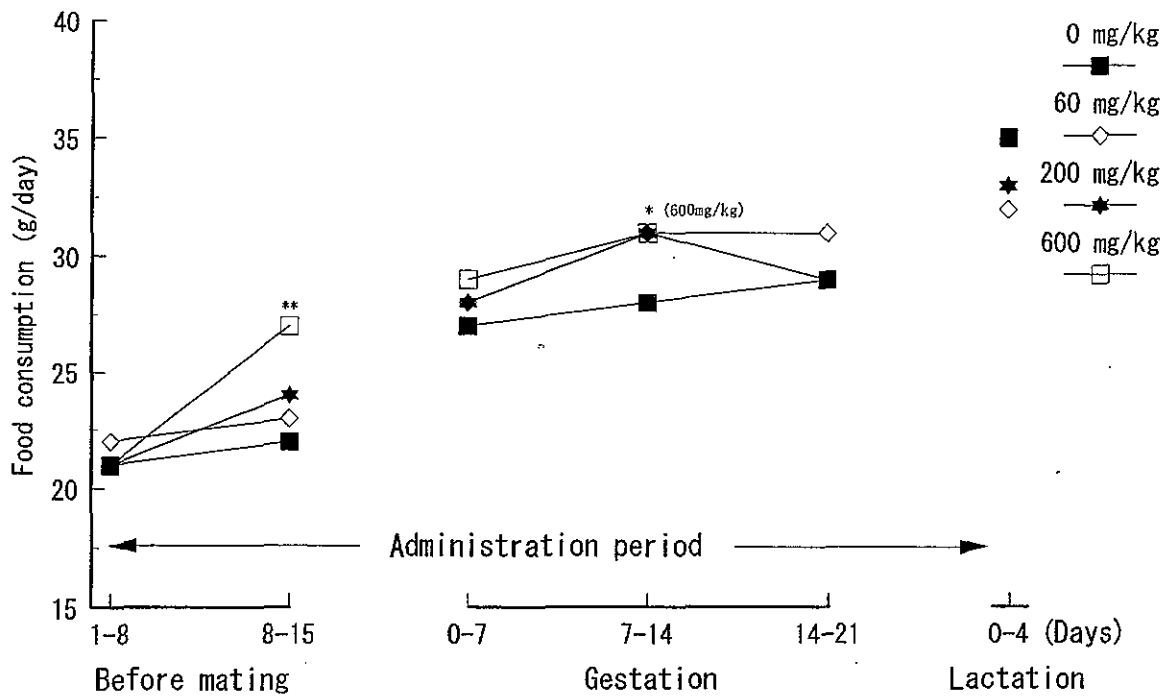


Fig. 2 Food consumption of female rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test  
Significant difference from control group; \*: p<0.05 \*\*: P<0.01

15日の累積摂餌量も高値を示した。妊娠期間では、同群で妊娠7から14日の平均1日摂餌量が高値を示した。哺育期間では、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。

#### 4) 雄の血液学検査 (Table 1)

血液学検査および血液凝固能検査では、いずれの検査項目についても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。

#### 5) 雄の血液生化学検査 (Table 2)

200 mg/kg群で対照群に比べカルシウムが高値を示したが、用量に関連した変化ではなかった。他の検査項目で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。

#### 6) 器官重量 (Table 3)

雌雄ともに対照群に比べ600 mg/kg群で副腎の相対重量が高値を示し、絶対重量も高値傾向を示した。さらに雌では600 mg/kg群で肝臓の相対重量が高値を示し、絶対重量も高値傾向を示した。その他、体重の低値に起因すると考えられる変化として雄では200および600 mg/kg群で脳の相対重量が高値を、精巣上体の絶対重量が低値を示し、さらに600 mg/kg群で肝臓の絶対重量が低値を示した。雌では、対照群に比べ200 mg/kg群で胸腺の絶対重量が低値を示し、腎臓の相対重量が高値を示した。

#### 7) 剖検所見

死亡例は、雄の600 mg/kg群で3例、雌の60および600 mg/kg群で各1例であった。雄の死亡例の剖検では1例に胃の穿孔性潰瘍、内腔拡大および肝臓との癒着、小腸の内腔拡大および赤色斑点、大腸の内腔拡大および内容物の赤色化、腹水貯留、胸腺の萎縮および全身性の削瘦が観察された。その他2例の雄では、胸腺の赤色斑点、肺の赤色化、胃の内容物の赤色化、小腸ならびに大腸の内腔拡大および内容物の赤色化、大腸の赤色斑点、胸水貯留、全身性の削瘦がいずれかの1例、膀胱の内腔拡大が2例に観察された。雌の死亡例の剖検では、60 mg/kg群の1例に胸腺および肺の赤色斑点、胃の内腔拡大および内容物の赤色化および小腸の内容物の赤色化が、600 mg/kg群の1例に胸腺および肺の赤色斑点、胃および小腸の赤色化、肝臓の黒色斑点が観察された。

雄では、200 mg/kg群で肺の褐色斑点および横隔膜との癒着が各1例、腎臓の癒痕および嚢胞が1例、600 mg/kg群で精巣上体の黄色結節が1例に観察された。

雌では、対照群で腎臓の癒痕および肺の赤色斑点が同一個体の1例に、胸腺の赤色斑点および肺の褐色斑点が各1例、60 mg/kg群で卵巣の嚢胞が2例、600 mg/kg群で胸腺の赤色斑点および卵巣の嚢胞が同一個体の1例に、脱毛が1例に観察された。

交尾の成立しなかった動物は600 mg/kg群で雌雄各1例であった。剖検で異常は認められなかった。

全児死亡動物は600 mg/kg群で1例認められ、胸腺の萎縮が観察された。

#### 8) 病理組織学検査 (Table 4,5)

600 mg/kg群の死亡動物で雌雄に共通して腎臓の皮質ないし皮髄境界部における尿細管上皮の空胞変性が認められ、被験物質投与の影響が示唆された。その他これら死亡動物の腎臓には、皮髄境界部の尿細管上皮の壊死および尿細管上皮の好塩基化が雌雄に、硝子円柱が雄に観察された。また、600 mg/kg群の死亡動物では空胞変性が腎臓以外の臓器にも認められ、全例の脾臓および唾液腺、雌雄各1例の脾臓の外分泌腺および肺、雌1例および雄2例の毛嚢、雄1例の舌、前胃、肝臓、胸腺および上皮小体にそれぞれ空胞変性が観察された。これら600 mg/kg群の死亡例に観察された空胞は中性脂肪とは異なり、大小の球状空胞形成が数個から多数認められ、内部に弱好酸性の無構造もしくは網状構造物が認められるものも存在しており、リン脂質様であった。さらに、これらの動物には腺胃の潰瘍および胸腺の萎縮が雄の全例に、骨髄の造血低下ならびに脾臓の萎縮が雌雄とも全例に、胸腺の核崩壊ならびに肝臓の壊死が雌雄各1例に観察された。

60 mg/kg群の死亡動物の雌1例では600 mg/kg群の死亡動物と同様な腎臓の皮髄境界部と脾臓の外分泌腺の空胞変性が観察された他、胸腺の出血も観察された。その他観察された所見は単発性の発生であった。600 mg/kg群の全児死亡動物では、腺胃の浮腫、細胞浸潤、糜爛ならびに上皮の再生、肺では巣状の浮腫、気管支上皮の糜爛や扁平上皮化生ならびに線維化、胸腺の萎縮が観察された。

雄では、腎臓の尿細管の好塩基化が対照群、60、200および600 mg/kg群でそれぞれ6、7、6および3例、好酸性小体がそれぞれ5、3、2および1例、リンパ球浸潤がそれぞれ4、0、2および0例、巣状の尿細管上皮の壊死が200 mg/kg群で1例に観察され、リンパ球浸潤の60 mg/kg群の発現率が対照群に比べ低値を示した。さらに肝臓の小肉芽腫が対照群および600 mg/kg群でそれぞれ5および2例、脾臓の色素沈着が4および3例、精巣上体の精子肉芽腫が600 mg/kg群で1例に観察された。その他観察された所見は単発性の所見であった。なお、死亡動物の腎臓で認められた空胞変性は生存例の雄では観察されなかった。

雌では、腎臓の尿細管の好塩基化が対照群、60、200および600 mg/kg群でそれぞれ1、2、4および2例、脾臓の色素沈着が対照群および600 mg/kg群でそれぞれ5および7例、脾臓の髓外造血が7および5例、肝臓の糖質沈着が1および3例、肝臓の髓外造血が5および3例、心臓の小肉芽腫が1および2例に観察された。生存例の雌にも死亡動物の腎臓で認められた空胞変性は観察されなかった。

交尾の成立しなかった雌雄動物では、脾臓の色素沈着が雌雄に、腎臓の尿細管の好塩基化および好酸性小体の出現が雄、肝臓の小肉芽腫が雌で観察された。死亡した

10 mg/kg 群の雄の1例には肺の鬱血、細胞浸潤および肝臓の鬱血が、100 mg/kg 群の雄の1例には肺の鬱血および前胃の角化亢進がそれぞれ認められたが、死因については不明であった。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 交尾および受胎能 (Table 6)

交尾は 600 mg/kg 群を除き対照群を含むすべての群で全例成立した。600 mg/kg 群では1組が交尾不成立であり、交尾率は90.9%であった。受胎は全ての群の交尾成立雌で成立した。

性周期観察では、600 mg/kg 群で連続した発情休止期像が観察される性周期の停止が3例に認められ、対照群に比べ平均性周期の延長が認められた。

### 2) 分娩および哺育 (Table 7)

600 mg/kg 群で対照群に比べ雌雄の哺育4日生児数が低値傾向を示し、4日生存率も低値傾向を示した。その他、妊娠期間、妊娠黄体数、着床痕数、出産児数、出産生児数、性比、死産児数、着床率、分娩率および出生率に群間差は認められなかった。

### 3) 新生児の形態、体重および剖検所見

新生児の外表検査では、600 mg/kg 群で皮下出血が1例認められたのみであった。哺育期間中の体重では、生後0日に対照群に比べ600 mg/kg 群で雌雄とも低値を、生後4日に雌雄とも低値傾向を示した。死亡児の剖検では、200 mg/kg 群の雄の1例に腎盂拡大が観察された。哺育4日の剖検で、雄では対照群で胸腺頸部残留が5例および肝臓の結節が1例、60 mg/kg 群で腎臓の腎盂拡大が2例に観察された。雌では対照群で腎臓の腎盂拡大が2例、600 mg/kg 群で胸腺の頸部残留が1例に観察された。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

死亡例が、雄では600 mg/kg 群の3例、雌では60および600 mg/kg 群で各1例に認められた。これら死亡例の病理学検査の結果、600 mg/kg 群の剖検所見では胃の穿孔性潰瘍、内容物の赤色化、小腸および大腸の内腔拡大、赤色斑点および内容物の赤色化等が認められ、組織所見では腺胃の潰瘍に伴う所見が認められた。600 mg/kg 群の全例死亡動物の腺胃に糜爛が認められた。同一被験物質のラットを用いる急性経口毒性試験では、1690 mg/kg 以上の用量群の死亡動物における剖検で、腺胃のび慢性出血や十二指腸の赤色斑点、組織学的検査で腺胃の出血、壊死および空胞変性、十二指腸の浮腫、出血および壊死が観察され、強アルカリ性物質である本被験物質の直接的な影響による消化管出血を死因としている。本試験で600 mg/kg 群の死亡例の消化管に認められた上記の所見も被験物質投与による直接的な刺激に起因

した変化と考えられた。また、死亡例には共通して腎臓で皮質や皮髄境界部に尿細管上皮の空胞変性が観察され、被験物質投与の影響が示唆された。600 mg/kg 群の中には肝臓、脾臓、胸腺、肺、舌、前胃、脾臓、唾液腺および毛嚢にまで空胞変性が観察される例もあった。

一般状態の観察では、投与期間を通じ散瞳および眼瞼下垂が、雌雄ともにすべての被験物質投与群で認められた。これらの症状は用量に関連した発現頻度および持続時間の増強が認められ、被験物質投与による影響と考えられた。また、600 mg/kg 群で観察された自発運動低下は低頻度ながら雌雄ともに認められ被験物質投与によるものと考えられた。主に600 mg/kg 群の死亡例で認められた流涎、体温低下および消瘦は被験物質の影響が強く現れたことによる全身状態の悪化に伴った変化と考えられた。その他、認められた所見はしばしば対照群でも認められるものであり、被験物質投与の影響とは考えなかった。

体重について、雄では200および600 mg/kg 群で投与期間の半ばから明らかな低値を示し、被験物質投与による体重増加抑制と考えられた。雌では200および600 mg/kg 群で妊娠21日に低値を示し被験物質投与の影響が示唆された。摂餌量について、雄では600 mg/kg 群で投与開始以降高値を示した。雌では600 mg/kg 群で交配前から妊娠期間にかけて高値を示す期間が認められた。いずれも機序は不明であるが被験物質投与の影響が示唆された。

雄の血液学検査、血液凝固能検査および血液生化学検査では、被験物質投与の影響は認められなかった。

器官重量について、雌雄ともに対照群に比べ600 mg/kg 群で副腎重量が高値を示し、さらに雌では600 mg/kg 群で肝臓重量が高値を示し被験物質投与に起因した変化と考えられた。その他の器官で認められた変化は体重の低値に起因する二次的な変化と考えられた。

病理学検査の結果、妊娠を成立させた雄および自然分娩した雌の剖検所見は、いずれも単発性あるいは少数例の発生であり被験物質投与の影響が示唆される病変は観察されなかった。また、組織所見では腎臓のリンパ球浸潤の発現率が60 mg/kg 群で低値を示したが、用量に関連した変化ではないことから被験物質投与の影響とは考えなかった。その他認められた組織所見は群間の発現率に差はなかった。死亡動物の組織所見から被験物質の腎臓への影響が示唆されたが、生存例では腎臓に対する影響は認められなかった。

以上のことから、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの反復投与により雌の60 mg/kg 群および雌雄の600 mg/kg 群で死亡例が認められ、投与後の一般状態の変化では60 mg/kg 以上の投与群で眼瞼下垂および散瞳が、600 mg/kg 群で自発運動低下が観察された。死亡例には腺胃の潰瘍に伴う所見および腎臓で皮質や皮髄境界部に尿細管上皮の空胞変性が観察された。また、雌雄とも200 mg/kg 以上の投与群で体重の増加抑制が、600 mg/kg 群で摂餌量の高値が認められた。したがって、雌雄とも無影響量は60 mg/kg/day未満と判断された。

## 2. 生殖発生毒性

600 mg/kg 群で連続した発情休止期像が観察される性周期の停止が3例認められ、平均性周期も延長を示し、被験物質投与の影響が疑われた。交尾率および受胎率に被験物質投与の影響は認められなかった。交尾の成立しなかった動物の病理学検査では特に生殖器系に変化は認められなかった。600 mg/kg 群で雌雄の新生児の生後0日体重が低値を示し、4日の生存率が低値傾向を示したことから、被験物質投与による新生児の発育抑制または周産期の母動物の哺育行動に対する影響が疑われた。

その他、出産率、出生率に被験物質投与の影響は認められず、新生児の外表面にも被験物質投与の影響は認められなかった。また、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、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの雄の生殖に及ぼす影響は600 mg/kg投与でも認められず、無影響量は600 mg/kg/dayと判断された。雌の生殖に及ぼす影響は600 mg/kg投与で平均性周期が延長したことから、無影響量は200 mg/kg/dayと判断された。新生児の発生・発育に及ぼす影響は600 mg/kg投与で発育抑制が認められ、新生児の4日の生存率が低値傾向を示したことから無影響量は200 mg/kg/dayと判断された。

## 文献

- 1) C.G. Shayne, S.W. Carrol, "Statics and Experimental Design For Toxicologists," Telford Press, 1986.
- 2) 佐野正樹, 岡山佳弘, 医薬安全性研究会会報, 32, 21, (1990).
- 3) M. Yoshida, *J. J. Soc. Comp. Stat.*, 1, 111 (1988).
- 4) 佐久間昭, "薬効評価 I - 計画と解析 -," 東京大学出版会, 東京, 1977.
- 5) 石居 進, "生物統計学入門," 培風館, 東京, 1975.

## 連絡先

試験責任者：田中亮太  
試験担当者：伊藤圭一, 大庭耕輔, 宮島留美子  
財団法人 食品農医薬品安全性評価センター  
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜  
582-2  
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

## Correspondence

Authors: Ryota Tanaka (Study director),  
Keiichi Ito, Kousuke Oba,  
Rumiko Miyajima  
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)  
582-2 Shioshinden Arahama, Fukude-cho,  
Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan  
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Hematology and coagulation of male rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	60 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
HCT (%)	44.5 ± 1.4	44.6 ± 1.4	45.6 ± 1.4	45.1 ± 1.9
HGB (g/dL)	15.4 ± 0.4	15.3 ± 0.4	15.7 ± 0.5	15.5 ± 0.6
RBC (×10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	8.24 ± 0.26	8.25 ± 0.39	8.48 ± 0.34	8.22 ± 0.33
MCV (μm <sup>3</sup> )	54.0 ± 1.1	54.2 ± 1.8	53.8 ± 2.0	54.8 ± 1.4
MCH (pg)	18.7 ± 0.4	18.6 ± 0.6	18.5 ± 0.7	18.8 ± 0.3
MCHC (%)	34.7 ± 0.5	34.4 ± 0.5	34.4 ± 0.7	34.3 ± 0.4
PLT (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1177 ± 124	1137 ± 81	1195 ± 64	1215 ± 133
WBC (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	10.8 ± 3.8	10.2 ± 3.0	10.1 ± 3.6	11.1 ± 3.3
Differential leukocyte counts (%)				
NEUT	13 ± 5	11 ± 4	14 ± 5	14 ± 5
LYMPH	83 ± 6	85 ± 5	82 ± 5	82 ± 6
MONO	2 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1
EOSN	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 0
PT (sec.)	14.6 ± 0.9	14.5 ± 1.1	14.4 ± 0.8	14.0 ± 0.8
APTT (sec.)	25.4 ± 1.7	25.3 ± 2.0	24.8 ± 2.7	24.1 ± 1.5
Fibrinogen (mg/dL)	245 ± 26	240 ± 17	254 ± 28	249 ± 52

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil

LUC: Large unstained cells

Values are expressed as Mean±S.D.

Table 2 Blood chemistry chemical examination of male rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	60 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of animals	12	12	12	9
T.protein (g/dL)	6.20 ± 0.23	6.32 ± 0.23	6.29 ± 0.31	5.96 ± 0.25
Albumin (g/dL)	3.19 ± 0.09	3.22 ± 0.16	3.27 ± 0.16	3.05 ± 0.13
A/G	1.06 ± 0.05	1.04 ± 0.05	1.08 ± 0.04	1.05 ± 0.03
Glucose (mg/dL)	148 ± 20	151 ± 17	135 ± 20	142 ± 10
Triglyceride (mg/dL)	59.3 ± 23.2	54.1 ± 14.5	50.8 ± 16.8	46.2 ± 10.0
T.cholesterol (mg/dL)	53 ± 7	50 ± 10	58 ± 9	62 ± 10
BUN (mg/dL)	14.2 ± 1.6	13.2 ± 2.5	13.6 ± 1.1	14.0 ± 2.1
Creatinine (mg/dL)	0.58 ± 0.08	0.57 ± 0.10	0.57 ± 0.10	0.57 ± 0.09
T.bilirubin (mg/dL)	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.03
GOT (U/L)	41 ± 11	41 ± 9	45 ± 11	44 ± 14
GPT (U/L)	17 ± 2	19 ± 4	20 ± 4	17 ± 4
ALP (U/L)	85 ± 18	101 ± 25	106 ± 25	91 ± 21
Gamma-GTP (U/L)	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.2
Sodium (mmol/L)	144.8 ± 1.4	145.1 ± 1.6	145.6 ± 1.2	144.4 ± 0.7
Potassium (mmol/L)	4.51 ± 0.31	4.65 ± 0.25	4.92 ± 0.81	4.52 ± 0.28
Chloride (mmol/L)	109.5 ± 2.1	109.5 ± 1.0	109.3 ± 2.1	108.8 ± 1.6
Calcium (mg/dL)	9.34 ± 0.25	9.59 ± 0.23	9.68 ± 0.34**	9.49 ± 0.14
I.phosphorus (mg/dL)	6.26 ± 0.69	6.64 ± 0.52	6.89 ± 0.83	6.79 ± 0.54

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group; \*\*: P&lt;0.01



Table 3 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	60 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
<b>Male</b>				
No. of animals examined	12	12	12	9
Body weight (g)	482 ± 19	475 ± 32	450 ± 26**	438 ± 19**
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.19 ± 0.09	2.20 ± 0.06	2.18 ± 0.07	2.12 ± 0.08
Thymus (mg)	309 ± 70	293 ± 60	260 ± 71	247 ± 47
Liver (g)	13.56 ± 0.68	12.95 ± 1.37	12.94 ± 1.92	11.76 ± 1.07**
Spleen (g)	0.74 ± 0.09	0.71 ± 0.16	0.74 ± 0.11	0.71 ± 0.09
Kidneys (g)	3.39 ± 0.19	3.28 ± 0.22	3.24 ± 0.28	3.12 ± 0.22
Adrenals (mg)	66 ± 2	63 ± 7	67 ± 12	71 ± 8
Testes (g)	3.45 ± 0.22	3.27 ± 0.26	3.29 ± 0.19	3.32 ± 0.20
Epididymides (mg)	1262 ± 71	1219 ± 82	1161 ± 70**	1153 ± 69**
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.455 ± 0.027	0.465 ± 0.034	0.486 ± 0.025*	0.485 ± 0.016*
Thymus (mg%)	64.107 ± 13.590	61.342 ± 10.685	57.534 ± 13.952	56.234 ± 10.322
Liver (g%)	2.815 ± 0.086	2.724 ± 0.150	2.867 ± 0.315	2.682 ± 0.206
Spleen (g%)	0.154 ± 0.017	0.149 ± 0.028	0.163 ± 0.019	0.161 ± 0.017
Kidneys (g%)	0.704 ± 0.051	0.695 ± 0.073	0.720 ± 0.052	0.713 ± 0.046
Adrenals (mg%)	13.688 ± 1.934	13.367 ± 1.403	14.865 ± 2.922	16.250 ± 1.836*
Testes (g%)	0.717 ± 0.060	0.692 ± 0.072	0.732 ± 0.034	0.757 ± 0.033
Epididymides (mg%)	262.543 ± 21.364	258.047 ± 26.833	258.166 ± 12.805	263.432 ± 16.636
<b>Female</b>				
No. of animals examined	12	11	12	9
Body weight (g)	332 ± 23	327 ± 21	308 ± 26	312 ± 26
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.05 ± 0.07	2.07 ± 0.06	2.03 ± 0.07	2.05 ± 0.09
Thymus (mg)	180 ± 66	153 ± 65	118 ± 35*	130 ± 35
Liver (g)	14.45 ± 1.82	15.10 ± 1.52	14.56 ± 1.07	15.43 ± 2.43
Spleen (g)	0.61 ± 0.12	0.69 ± 0.11	0.60 ± 0.08	0.65 ± 0.13
Kidneys (g)	2.30 ± 0.20	2.38 ± 0.25	2.33 ± 0.16	2.35 ± 0.22
Adrenals (mg)	80 ± 10	86 ± 9	82 ± 8	87 ± 10
Ovaries (mg)	107 ± 11	110 ± 13	100 ± 7	102 ± 11
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.619 ± 0.048	0.635 ± 0.040	0.663 ± 0.052	0.661 ± 0.056
Thymus (mg%)	53.869 ± 18.435	46.169 ± 18.173	38.455 ± 10.913	41.643 ± 10.913
Liver (g%)	4.341 ± 0.396	4.618 ± 0.403	4.741 ± 0.270	4.927 ± 0.535**
Spleen (g%)	0.184 ± 0.032	0.211 ± 0.026	0.195 ± 0.037	0.209 ± 0.034
Kidneys (g%)	0.694 ± 0.051	0.727 ± 0.065	0.760 ± 0.065*	0.754 ± 0.048
Adrenals (mg%)	24.142 ± 2.978	26.456 ± 2.873	26.647 ± 2.910	27.825 ± 2.976*
Ovaries (mg%)	32.306 ± 4.592	33.735 ± 4.443	32.679 ± 3.317	32.751 ± 2.276

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group;\*: P<0.05\*\*; P<0.01

Table 4 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Male animals				Female animals				
	0	60	200	600	0	60	200	600	
No. of animals necropsied	12	12	12	8	12	11	12	9	
Organ	Findings								
CARDIOVASCULAR SYSTEM									
heart									
	cellular infiltration	1	-	-	0	0	-	-	0
	microgranuloma	1	-	-	1	1	-	-	2
HEMATOPOIETIC SYSTEM									
spleen									
	deposit, pigment	4	-	-	3	5	-	-	7
	hematopoiesis, extramedullary	0	-	-	0	7	-	-	5
thymus									
	hemorrhage	0	-	-	0	1	-	-	1
	cortical atrophy	0	-	-	0	1	-	-	1
RESPIRATORY SYSTEM									
lung									
	hemorrhage	-	-	-	-	2(2)	-	-	-
DIGESTIVE SYSTEM									
liver									
	deposit, glycogen	0	-	-	0	1	-	-	3
	fatty change	1	-	-	0	0	-	-	0
	necrosis	0	-	-	0	0	-	-	1
	microgranuloma	5	-	-	2	0	-	-	1
	hematopoiesis, extramedullary	0	-	-	0	5	-	-	3
URINARY SYSTEM									
kidney									
	basophilic tubules	6	7	6	3	1	2	4	2
	cyst	0	0	1	0	0	0	0	0
	dilatation, tubules	0	0	0	1	0	0	0	0
	eosinophilic body	5	3	2	1	0	0	0	0
	necrosis, tubular epithelium	0	0	1	0	0	0	0	0
	cellular infiltration, lymphocyte	4	0*	2	0	0	0	0	0
	fibrosis, scar	0	0	0	0	1	0	0	1
REPRODUCTIVE SYSTEM									
epididymis									
	spermatic granuloma	-	-	-	1(1)	-	-	-	-
ovary									
	cyst, brusa	-	-	-	-	0	-	-	1

( ): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.  
Significant difference from control group; \*: P<0.05

Table 5 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Male animals				Female animals			
	0	60	200	600	0	60	200	600
No. of animals necropsied	12	12	12	8	12	12	12	9
Organ Findings	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3
<b>CARDIOVASCULAR SYSTEM</b>								
heart								
cellular infiltration	1 0 0	- - -	- - -	0 0 0	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0
microgranuloma	1 0 0	- - -	- - -	1 0 0	1 0 0	- - -	- - -	2 0 0
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>								
spleen								
deposit, pigment	4 0 0	- - -	- - -	3 0 0	5 0 0	- - -	- - -	7 0 0
hematopoiesis, extramedullary	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	6 1 0	- - -	- - -	4 1 0
thymus								
hemorrhage	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	1 0 0	- - -	- - -	1 0 0
cortical atrophy	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	1 0 0	- - -	- - -	1 0 0
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>								
lung					(2)			
hemorrhage	- - -	- - -	- - -	- - -	2 0 0	- - -	- - -	- - -
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>								
liver								
deposit, glycogen	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	1 0 0	- - -	- - -	3 0 0
fatty change	1 0 0	- - -	- - -	0 0 0	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0
necrosis	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	0 0 0	- - -	- - -	1 0 0
microgranuloma	5 0 0	- - -	- - -	2 0 0	0 0 0	- - -	- - -	1 0 0
hematopoiesis, extramedullary	0 0 0	- - -	- - -	0 0 0	5 0 0	- - -	- - -	3 0 0
<b>URINARY SYSTEM</b>								
kidney								
basophilic tubules	6 0 0	7 0 0	6 0 0	3 0 0	1 0 0	2 0 0	4 0 0	2 0 0
cyst	0 0 0	0 0 0	1 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
dilatation, tubules	0 0 0	0 0 0	0 0 0	1 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
eosinophilic body	4 1 0	2 1 0	1 1 0	1 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
necrosis, tubular epithelium	0 0 0	0 0 0	1 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
cellular infiltration, lymphocyte	4 0 0	0 0 0	2 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
fibrosis, scar	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	1 0 0	0 0 0	0 0 0	1 0 0
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>								
epididymis				(1)				
spermatic granuloma	- - -	- - -	- - -	1 0 0	- - -	- - -	- - -	- - -
ovary								
cyst, brusa	- - -	- - -	- - -	- - -	0 0 0	- - -	- - -	1 0 0

1:slight 2:moderate 3:marked

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

Table 6 Summary of reproductive performance in rats treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	60 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of pairs mated	12	11	12	10
No. of pairs copulated	12	11	12	10
No. of pregnant females	12	11	12	10
Copulation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	90.9
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Estrus cycle (days, Mean±S.D.)	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.3 ± 0.5	4.5 ± 0.4*

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

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

Values in parentheses are expressed no. of animals observed

Significant difference from control group; \*, P&lt;0.05

Table 7 Findings of delivery in dams treated orally with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine and observations on their pups (F<sub>1</sub>) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	60 mg/kg	200 mg/kg	600 mg/kg
No. of dams observed	12	11	12	10
No. of dams delivered live pups	12	11	12	10
Duration of gestation (Mean±S.D.)	22.7 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.6 ± 0.5	22.4 ± 0.5
No. of total corpora lutea (Mean±S.D.)	226(18.8 ± 1.5)	227(20.6 ± 2.9)	235(19.6 ± 2.5)	186(18.6 ± 1.7)
No. of total implants (Mean±S.D.)	211(17.6 ± 1.6)	189(17.2 ± 3.3)	218(18.2 ± 1.9)	170(17.0 ± 2.3)
No. of total pups born (Mean±S.D.)	196(16.3 ± 2.0)	168(15.3 ± 3.3)	185(15.4 ± 1.5)	157(15.7 ± 2.7)
No. of total live pups born (Mean±S.D.)	196(16.3 ± 2.0)	167(15.2 ± 3.3)	184(15.3 ± 1.4)	157(15.7 ± 2.7)
Male	98( 8.2 ± 2.2) <sup>c)</sup>	85( 7.7 ± 2.3)	95( 7.9 ± 1.8) <sup>c)</sup>	70( 7.0 ± 3.0) <sup>c)</sup>
Female	98( 8.2 ± 1.5) <sup>c)</sup>	82( 7.5 ± 2.6) <sup>c)</sup>	89( 7.4 ± 2.2) <sup>c)</sup>	87( 8.7 ± 2.3) <sup>c)</sup>
Sex ratio (male/female, Mean±S.D.)	1.05 ± 0.37	1.15 ± 0.46	1.22 ± 0.60	0.90 ± 0.57
No. of total live pups on day 4 (Mean±S.D.)				
Male	94( 7.8 ± 2.0)	82( 7.5 ± 2.2)	78( 6.5 ± 2.7)	43( 4.3 ± 2.9)
Female	89( 7.4 ± 1.1)	71( 6.5 ± 2.5)	76( 6.3 ± 2.5)	64( 6.4 ± 3.7)
No. of total dead pups born (Mean±S.D.)	0( 0.0 ± 0.0)	1( 0.1 ± 0.3)	1( 0.1 ± 0.3)	0( 0.0 ± 0.0)
stillbirth	0( 0.0 ± 0.0)	0( 0.0 ± 0.0)	0( 0.0 ± 0.0)	0( 0.0 ± 0.0)
cannibalism	0( 0.0 ± 0.0)	1( 0.1 ± 0.3)	1( 0.1 ± 0.3)	0( 0.0 ± 0.0)
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Implantation index (% , Mean±S.D.) <sup>b)</sup>	93.4 ± 5.4	83.5 ± 14.3	93.2 ± 7.5	91.3 ± 8.0
Delivery index (% , Mean±S.D.) <sup>c)</sup>	92.9 ± 7.0	90.3 ± 16.2	85.2 ± 6.9	92.1 ± 6.0
Live birth index (% , Mean±S.D.) <sup>d)</sup>	100.0 ± 0.0	99.5 ± 1.8	99.5 ± 1.7	100.0 ± 0.0
Viability index on day 4 (% , Mean±S.D.) <sup>e)</sup>				
Male	96.1 ± 7.5	96.8 ± 5.4	82.7 ± 28.4	67.2 ± 39.2
Female	91.9 ± 9.9	86.2 ± 10.4	85.8 ± 20.3	70.7 ± 35.0

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

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

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

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

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

f): Includes live pups died before observations

Values in parentheses are expressed number of animals examined

# リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of Diphenyl 2-ethylhexyl phosphate on Bacteria

### 要約

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium*(TA100, TA1535, TA98, TA1537)および*Escherichia coli*(WP2 *uvrA*)を用い、プレインキュベーション法により実施した。予備試験の結果をもとに、本試験ではS9 mix非共存下および共存下の各菌株について5000~313  $\mu\text{g}$ /プレート(公比2)の5濃度を設定した。

2回の本試験の結果とも、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではリン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルは、変異原性を有さない(陰性)と判定された。

### 方法

#### 〔使用菌株〕

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より1983年5月27日に入手した*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1)</sup>および東京大学医科学研究所 松島教授より1985年10月14日に入手した*Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup>の5菌株を用いた。各使用菌株は超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を融解後、その20  $\mu\text{l}$ をニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath社)25 gを1 lの精製水に溶解して作成した液体完全培地10 mlに接種し、37℃で8時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は菌濃度を測定した後、試験に使用した。

#### 〔被験物質〕

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステル(CAS No.:1241-94-7, ロット番号:K70801, 純度:91.4%; 大八化学工業(株)製造)は、分子量362.44の水に不溶の無色透明液体であり通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットについては試験期間中安定であることを確認した。

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルはジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:708S1611, 関東化学(株))を用いて最高濃度(50 mg/ml)の溶液を調製した後、同溶媒で公比2で希釈したものを用いた。

#### 〔陽性対照物質〕

陽性対照物質として下記のものを用いた。

- AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(純度:98.8%, 和光純薬工業(株))
- NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム(純度:96.5%, 和光純薬工業(株))
- ENNG : *N*-エチル-*N*'-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン(純度:99.0%, Sigma Chemical Co.)
- 9-AA : 9-アミノアクリジン(純度:99%, Sigma Chemical Co.)
- 2-AA : 2-アミノアントラセン(純度:98.0%, 和光純薬工業(株))

NaN<sub>3</sub>は注射用水(株大塚製薬工場)に、その他はDMSOに溶解したものを使用した。

#### 〔培地およびS9 mixの組成〕

##### 1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いてD-ピオチン、L-ヒスチジンおよびL-トリプトファン(0.5 mM混合水溶液)を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水100 mlに対して、粉末寒天(Bacto-Agar; Difco社)0.6 g, 塩化ナトリウム0.5 gの割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を1/10量加えて混和し、約45℃に保温した。

##### 2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディアAM-N培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。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塩	0.2 g
クエン酸一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム無水塩	10 g
リン酸-アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
ブドウ糖	20 g
寒天(OXOID Agar No.1)	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

S9 mix 1 mlあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

S9*	0.1 ml
塩化マグネシウム六水塩	8 $\mu\text{mol}$

塩化カリウム	33 $\mu$ mol
D-グルコース6-リン酸	5 $\mu$ mol
$\beta$ -NADPH	4 $\mu$ mol
$\beta$ -NADH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu$ mol
滅菌精製水	残量

\*: 購入したS9(キッコーマン株)を使用した。このS9は、7週齢の雄性SD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを用いて併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 $\times$ g遠心上清分画である。

〔試験方法〕

試験はプレインキュベーション法で実施した。

試験管に被験物質溶液0.1 mlを分注し、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mlと菌懸濁液0.1 mlを加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間振盪した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 ml加えた。プレインキュベーション後、トップアガー2 mlを上記の試験管に加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各濃度あたり1枚のプレートを使用した。本試験は各濃度あたり3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

〔試験結果の判定基準〕

いずれかの試験菌株で、S9 mixの有無によらず、被験物質濃度の増加にともなって復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照値の2倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は陽性と判定した。その他の場合はすべて陰性と判定した。試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

結果および考察

〔予備試験〕

5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22  $\mu$ g/プレートの濃度で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。従って、本試験ではS9 mix非共存下および共存下の各菌株について5000, 2500, 1250, 625, 313  $\mu$ g/プレートの5濃度を設定した。

〔本試験〕

結果をTable 1,2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施した結果、2回の本試験ともにS9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかつ

た。また、抗菌性も、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても認められなかった。

S9 mix非共存下および共存下の625  $\mu$ g/プレート以上で沈殿物が認められた。

以上の結果から、リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの変異原性は陰性と結論した。

文献

- 1) D.M. Maron and B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215(1983).
- 2) M.H.L. Green and W.J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3-32(1976).

連絡先

試験責任者: 水野 文夫  
 試験担当者: 榎本 佳明, 石毛 裕子  
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
 314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Fumio Mizuno (Study director)  
 Yoshiaki Enomoto, Yuko Ishige  
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
 Kashima Laboratory  
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
 Ibaraki, 314-02 Japan  
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of diphenyl 2-ethylhexyl phosphate on bacteria

With(+)or Without(-) S9 Mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S9 Mix (-)	0	103 126 (110) 102 ( $\pm 14$ )	17 16 (15) 12 ( $\pm 3$ )	33 27 (34) 43 ( $\pm 8$ )	13 15 (14) 14 ( $\pm 1$ )	9 10 (11) 13 ( $\pm 2$ )
	313	132 95 (111) 105 ( $\pm 19$ )	15 14 (16) 18 ( $\pm 2$ )	24 56 (39) 37 ( $\pm 16$ )	14 20 (15) 12 ( $\pm 4$ )	11 13 (11) 8 ( $\pm 3$ )
	625 C	121 94 (105) 100 ( $\pm 14$ )	10 9 (12) 16 ( $\pm 4$ )	56 32 (41) 34 ( $\pm 13$ )	14 20 (18) 21 ( $\pm 4$ )	9 5 (8) 10 ( $\pm 3$ )
	1250 C	124 122 (117) 105 ( $\pm 10$ )	10 14 (14) 17 ( $\pm 4$ )	43 46 (42) 37 ( $\pm 5$ )	15 19 (17) 18 ( $\pm 2$ )	8 8 (8) 7 ( $\pm 1$ )
	2500 C	106 83 (107) 133 ( $\pm 25$ )	16 11 (14) 15 ( $\pm 3$ )	42 42 (38) 29 ( $\pm 8$ )	14 19 (18) 21 ( $\pm 4$ )	7 14 (11) 13 ( $\pm 4$ )
	5000 C	104 113 (107) 105 ( $\pm 5$ )	20 15 (16) 13 ( $\pm 4$ )	37 34 (38) 42 ( $\pm 4$ )	20 14 (18) 21 ( $\pm 4$ )	12 9 (10) 9 ( $\pm 2$ )
S9 Mix (+)	0	118 122 (118) 114 ( $\pm 4$ )	19 16 (16) 18 ( $\pm 4$ )	35 50 (42) 41 ( $\pm 8$ )	35 30 (31) 29 ( $\pm 3$ )	13 9 (12) 14 ( $\pm 3$ )
	313	143 131 (126) 103 ( $\pm 21$ )	14 14 (14) 13 ( $\pm 1$ )	31 43 (35) 31 ( $\pm 7$ )	30 25 (28) 30 ( $\pm 3$ )	10 13 (11) 9 ( $\pm 2$ )
	625 C	121 146 (132) 130 ( $\pm 13$ )	21 16 (20) 23 ( $\pm 4$ )	50 42 (44) 39 ( $\pm 6$ )	25 28 (27) 27 ( $\pm 2$ )	14 9 (12) 14 ( $\pm 3$ )
	1250 C	121 138 (129) 127 ( $\pm 9$ )	20 11 (15) 14 ( $\pm 5$ )	42 31 (39) 44 ( $\pm 7$ )	38 22 (27) 20 ( $\pm 10$ )	11 13 (10) 7 ( $\pm 3$ )
	2500 C	118 129 (126) 120 ( $\pm 6$ )	14 20 (17) 18 ( $\pm 3$ )	38 24 (35) 44 ( $\pm 10$ )	26 26 (26) 25 ( $\pm 1$ )	15 8 (10) 7 ( $\pm 4$ )
	5000 C	135 115 (122) 129 ( $\pm 10$ )	16 24 (18) 15 ( $\pm 5$ )	33 35 (39) 50 ( $\pm 9$ )	24 27 (24) 20 ( $\pm 4$ )	7 10 (10) 13 ( $\pm 3$ )
Positive control S9 Mix (-)	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
	Number of revertants	656 638 (659) 684 ( $\pm 23$ )	303 335 (315) 307 ( $\pm 17$ )	518 599 (549) 529 ( $\pm 44$ )	516 508 (516) 523 ( $\pm 8$ )	383 539 (474) 499 ( $\pm 81$ )
Positive control S9 Mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	906 945 (921) 913 ( $\pm 21$ )	354 359 (337) 297 ( $\pm 34$ )	1272 1270 (1239) 1176 ( $\pm 55$ )	292 236 (262) 257 ( $\pm 28$ )	199 171 (181) 173 ( $\pm 16$ )

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN<sub>3</sub>:sodium azide

ENNG:N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine, 2-AA:2-aminoanthracene

(Mean)  
( $\pm$ S.D.)

C: Precipitates were observed on the surface of agar plates

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of diphenyl 2-ethylhexyl phosphate on bacteria

With (+) or Without (-) S9 Mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 Mix (-)	0	98 118 ( 105) 98 ( $\pm 12$ )	10 7 ( 9) 10 ( $\pm 2$ )	21 27 ( 23) 21 ( $\pm 3$ )	14 35 ( 26) 28 ( $\pm 11$ )	8 6 ( 9) 14 ( $\pm 4$ )
	313	91 108 ( 97) 92 ( $\pm 10$ )	10 11 ( 12) 16 ( $\pm 3$ )	20 31 ( 27) 29 ( $\pm 6$ )	24 36 ( 32) 35 ( $\pm 7$ )	3 5 ( 5) 7 ( $\pm 2$ )
	625 C	98 85 ( 97) 107 ( $\pm 11$ )	6 13 ( 9) 8 ( $\pm 4$ )	29 39 ( 32) 28 ( $\pm 6$ )	29 39 ( 29) 18 ( $\pm 11$ )	9 5 ( 8) 10 ( $\pm 3$ )
	1250 C	105 105 ( 111) 124 ( $\pm 11$ )	16 14 ( 13) 10 ( $\pm 3$ )	34 31 ( 31) 29 ( $\pm 3$ )	38 20 ( 31) 35 ( $\pm 10$ )	11 8 ( 9) 7 ( $\pm 2$ )
	2500 C	111 105 ( 111) 118 ( $\pm 7$ )	11 5 ( 8) 7 ( $\pm 3$ )	29 26 ( 32) 41 ( $\pm 8$ )	31 30 ( 27) 21 ( $\pm 6$ )	10 9 ( 10) 10 ( $\pm 1$ )
	5000 C	93 113 ( 97) 84 ( $\pm 15$ )	10 8 ( 9) 9 ( $\pm 1$ )	32 28 ( 34) 42 ( $\pm 7$ )	31 27 ( 29) 30 ( $\pm 2$ )	11 4 ( 7) 5 ( $\pm 4$ )
S9 Mix (+)	0	116 124 ( 120) 119 ( $\pm 4$ )	21 15 ( 17) 16 ( $\pm 3$ )	31 35 ( 34) 37 ( $\pm 3$ )	39 33 ( 37) 39 ( $\pm 3$ )	10 13 ( 12) 12 ( $\pm 2$ )
	313	96 121 ( 117) 135 ( $\pm 20$ )	9 12 ( 11) 11 ( $\pm 2$ )	40 38 ( 39) 38 ( $\pm 1$ )	37 34 ( 36) 36 ( $\pm 2$ )	11 10 ( 10) 9 ( $\pm 2$ )
	625 C	119 136 ( 126) 123 ( $\pm 9$ )	14 12 ( 12) 10 ( $\pm 2$ )	37 42 ( 39) 37 ( $\pm 3$ )	30 30 ( 33) 39 ( $\pm 5$ )	10 15 ( 15) 20 ( $\pm 5$ )
	1250 C	126 123 ( 129) 137 ( $\pm 7$ )	13 22 ( 15) 11 ( $\pm 6$ )	31 37 ( 31) 26 ( $\pm 6$ )	45 38 ( 40) 37 ( $\pm 4$ )	14 16 ( 15) 15 ( $\pm 1$ )
	2500 C	149 129 ( 136) 129 ( $\pm 12$ )	13 13 ( 15) 18 ( $\pm 3$ )	34 46 ( 37) 30 ( $\pm 8$ )	38 27 ( 34) 38 ( $\pm 6$ )	15 16 ( 12) 6 ( $\pm 6$ )
	5000 C	119 129 ( 122) 119 ( $\pm 6$ )	14 20 ( 17) 18 ( $\pm 3$ )	44 33 ( 33) 23 ( $\pm 11$ )	33 41 ( 39) 42 ( $\pm 5$ )	15 13 ( 15) 16 ( $\pm 2$ )
Positive control S9 Mix (-)	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 Mix (-)	Number of revertants	787 755 ( 758) 733 ( $\pm 27$ )	351 323 ( 329) 313 ( $\pm 20$ )	884 828 ( 828) 772 ( $\pm 56$ )	564 521 ( 539) 531 ( $\pm 23$ )	471 435 ( 446) 432 ( $\pm 22$ )
	Positive control S9 Mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
S9 Mix (+)	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	1014 974 ( 984) 963 ( $\pm 27$ )	370 368 ( 379) 400 ( $\pm 18$ )	1051 1053 (1064) 1087 ( $\pm 20$ )	258 360 ( 307) 303 ( $\pm 51$ )	111 192 ( 167) 198 ( $\pm 49$ )

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN<sub>3</sub>:sodium azide  
 NNG:N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine, 2-AA:2-aminoanthracene

(Mean)  
( $\pm$ S.D.)

C: Precipitates were observed on the surface of agar plates



# リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの 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 Diphenyl 2-ethylhexyl phosphate on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、連続処理法の24時間処理では50  $\mu\text{g/ml}$ 、48時間処理では25  $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法のS9 mix存在下では200  $\mu\text{g/ml}$ 、S9 mix非存在下では80  $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、以下、それぞれ公比2で4用量を設定した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下ではリン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

### 材料および方法

#### 1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1994年8月、入手時:継代14代、凍結時:17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5代以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(CS:GIBCO LABORATORIES, ロット番号:43N1140)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

$2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたデイツシュ(径6cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5%CO<sub>2</sub>)内で培養した。

連続処理法では、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、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mix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

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステル(CAS No.:1241-94-7, ロット番号:K70801, 純度:91.4%, 大八化学工業(株)製造)は、分子量362.44の水に不溶な無色透明液体であり通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットについては試験期間中安定であることを確認した。

#### 5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒はアセトン(和光純薬工業(株), ロット番号:ESP2354)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1(v/v)%になるように加えた。なお、被験物質の秤量に際しては、純度換算を実施した。

#### 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、血球計算盤を用いて各群の生存細胞を数え、陰性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、リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの約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、連続処理法の24時間および48時間処理ではそれぞれ33, 13  $\mu\text{g/ml}$ であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ131, 57  $\mu\text{g/ml}$ であった(Fig.1)。

#### 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最高濃度は、連続処理法の24時間処理では50  $\mu\text{g/ml}$ 、48時間処理では25  $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法のS9 mix存在下では200  $\mu\text{g/ml}$ 、S9 mix非存在下では80  $\mu\text{g/ml}$ とし、以下、それぞれ公比2で4用量を設定した。

陽性対照として、連続処理法は、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:051AEG)を0.03  $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法は、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業(株), ロット番号:AX01)を20  $\mu\text{g/ml}$ を設定した。

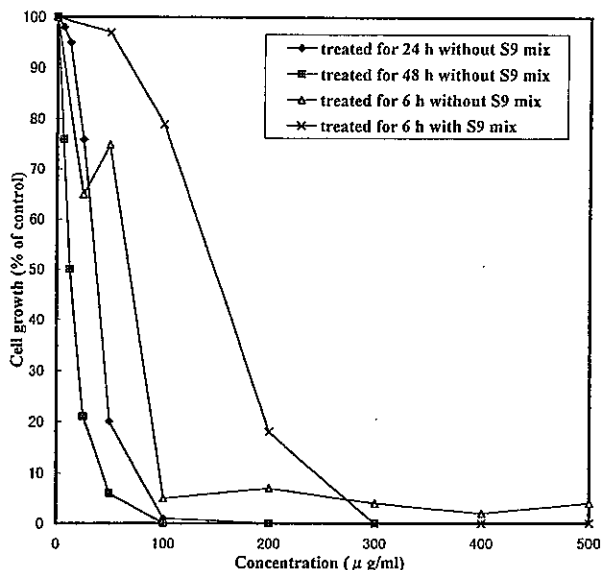


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate

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2枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で20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枚のディッシュから得られたスライドを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>1)</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(polyploid)の有無について観察した。また、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と測定

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。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

結果および考察

連続処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘

発作用は認められなかった。

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

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: 西富 保  
 試験担当者: 水野 文夫, 太田 絵律奈  
 中川 宗洋, 穴澤(岩井)由美子  
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
 〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Tamotsu Nishitomi (Study director)  
 Fumio Mizuno, Erina Ohta  
 Munehiro Nakagawa,  
 Yumiko Anazawa (Iwai)  
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
 Kashima Laboratory  
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
 Ibaraki, 314-02 Japan  
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate without S9 mix

Group	Concentration (μg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>		
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA	
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
DEP	6.25	24	200	1	1	0	0	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.5	-	-	
	12.5	24	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
	25	24	200	0	0	1	1	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-	
	50	24	200	0	1	2	0	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0	-	-	
MC	0.03	24	200	1	27	18	0	1	0	47	41 (20.5)	41 (20.5)	0.0	+	-	
Solvent	0	48	200	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
DEP	3.13	48	200	1	0	0	1	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.0	-	-	
	6.25	48	200	1	0	0	1	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.0	-	-	
	12.5	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-	
	25	48	200	0	0	0	1	1	0	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
MC	0.03	48	200	0	14	32	5	1	1	53	48 (24.0)	48 (24.0)	0.0	+	-	

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), -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, DEP: diphenyl 2-ethylhexyl phosphate, MC: mitomycin C

1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate with and without S9 mix

Group	Concentration (μg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-
DEP	10	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	20	-	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	40	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
	80	-	6-(18)	100	0	0	0	1	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.5	-	-
BP	20	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
DEP	25	+	6-(18)	200	0	1	0	1	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-
	50	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
	100	+	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.5	-	-
BP	20	+	6-(18)	Toxic 200	4	55	162	0	0	0	221	166 (83.0)	167 (83.5)	0.0	+	-

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), -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, DEP: diphenyl 2-ethylhexyl phosphate, BP: benzo[a]pyrene

1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

# リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルのラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

## Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in Rats

### 要約

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルは、リン酸エステル系の可塑剤である<sup>1)</sup>。今回、既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルを0, 4, 20, 100および500 mg/kgの用量でSD系ラットの雌雄に28日間反復経口投与し、その毒性について検討した。対照群, 100および500 mg/kg群については14日間回復群を設けた。

摂餌量の低値が500 mg/kg群の雌で認められた。血液学検査では、活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が500 mg/kg群の雌で認められた。血液生化学検査では、血漿コリンエステラーゼの低値が500 mg/kg群の雌雄、血球コリンエステラーゼの低値が100 mg/kg群の雌と500 mg/kg群の雌雄、総コレステロールの高値が500 mg/kg群の雌、総タンパクの高値が100 mg/kg群の雄と500 mg/kg群の雌雄、アルブミンの高値が100 および500 mg/kg群の雄、GOTの低値が500 mg/kg群の雌、アルカリフォスファターゼの低値が100 および500 mg/kg群の雌で認められた。尿検査では、異常は認められなかった。病理学検査では、肝臓の変化として相対重量の高値が100 mg/kg群の雄、絶対重量および相対重量の高値が500 mg/kg群の雌雄、褐色化が100 および500 mg/kg群の雌雄、腫大が500 mg/kg群の雌雄、小葉中心性の肝細胞肥大が100および500 mg/kg群の雌雄で認められた。腎臓の変化として、近位尿管上皮内の硝子滴の増強が500 mg/kg群の雄で認められ、一部の動物では好酸性小体の発現も伴われていた。甲状腺の変化として、腫大が100 mg/kg群の雄と500 mg/kg群の雌雄、ろ胞上皮細胞の肥大が100 および500 mg/kg群の雌雄で認められた。副腎の変化として、絶対重量と相対重量の高値が100 mg/kg群の雌と500 mg/kg群の雌雄、腫大が100 および500 mg/kg群の雌雄、束状帯の脂肪滴の増加が500 mg/kg群の雌雄で認められた。これらの変化は、投与を止めることにより軽減ないし回復していた。20 mg/kg群では雌雄いずれも被験物質に起因した変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下におけるリン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの無影響量は雌雄いずれも20 mg/kg/dayであると判断した。

### 方法

#### 1. 被験物質

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステル(大八化学工業㈱, 製品名#41, CAS No. 1241-94-7, Lot No. K70801, 純度91.4%)は、凝固点-54℃, 融点239℃/13.3 hPa, 油溶性の無色透明液体である。本ロットは投与期間中安定であることが確認された。投与液は被験物質を0.1%Tween 80水溶液に乳化させ調製し、冷蔵保存した。投与液中の被験物質は冷蔵保存条件下で8日間安定であり、使用した投与液にはほぼ所定量の被験物質が均一に含有されていることを確認した。

#### 2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より入手したSD系ラット(Crj:CD, SPF)の雌雄を7~8日間検疫・馴化し、試験に使用した。投与開始前日に体重別層化無作為抽出法により群分けした。1群の動物数は雌雄各6匹とし、対照群, 100および500 mg/kg群については雌雄各6匹の14日間回復群を設けた。投与開始時の週齢は5週齢, 体重範囲は雄が156~177 g, 雌が137~158 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中, 温度20~25℃, 湿度40~70%, 換気約12回/時, 照明12時間(7:00~19:00)に自動調節された飼育室を使用した。動物は, 実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに1ケージあたり2匹で収容し飼育した。

動物には, 実験動物用固型飼料(MF:オリエンタル酵母工業(株))および5 μmのフィルター濾過後, 紫外線照射した水道水を, それぞれ自由に摂取させた。

#### 3. 投与量および投与方法

被験物質を0, 100, 500および1000 mg/kgの各用量でSD系ラットに14日間反復経口投与した結果, 全投与群で流涎が発現し, 体重増加抑制とヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の低値が1000 mg/kg群の雄で認められた。また, 肝臓の絶対重量および相対重量の高値が全投与群の雌雄で認められ, 1000 mg/kg群の雌雄では肝肥大が顕著であった。その他, 副腎の絶対重量および相対重量の高値が500 mg/kg以上の投与群の雌, 副腎の相対重量の高値が1000 mg/kg群の雄, 腎臓の相対重量の高値が1000 mg/kg群の雌雄で認められた。従って, 本試験では高用量を500 mg/kgとし, 以下公比5で中間量を100および20 mg/kg, 低用量を4 mg/kgとした。

被験物質は28日間毎日1回、午前中に胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与液量は10 mL/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。対照群には同様に溶媒を投与した。

#### 4. 観察および検査方法

##### 1) 一般状態、体重および摂餌量

全例について一般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は投与開始日およびその後週1回測定した。摂餌量については、各期間毎の1匹あたりの1日平均摂取量を算出した。

##### 2) 血液学検査

各計画殺時の全例について、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採血し、赤血球数(シースフローDCインピーダンス検出法)、白血球数(RF/DCインピーダンス検出法)、血小板数(シースフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度(SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500: 東亜医用電子)、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A: 立石電機)、網状赤血球数(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網状赤血球測定装置(R-2000: 東亜医用電子)、プロトロンビン時間(PT; Quick一段法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT; 活性化セファロプラスチン法)を血液凝固自動測定装置(KC10A: アメルング社)により測定した。また、検査の結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。凝固阻止剤として、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間測定には3.13%クエン酸ナトリウム水溶液を、それ以外の項目の測定にはEDTA-2Kを用いた。

##### 3) 血液生化学検査

採取した血液の一部をヘパリン(リチウム塩)処理後、3000 r.p.m., 10分間遠心分離し、得られた血漿を用いてGOT(SSCC改良法)、GPT(SSCC改良法)、ALP(GSCC改良法)、 $\gamma$ -GTP(SSCC改良法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、グルコース(GK-G6PDH法)、総コレステロール(CES-CO-POD法)、トリグリセライド(LPL-GK-G3PO-POD法)、クレアチニン(Jaffé法)、総蛋白(Biuret法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出)、カルシウム(O-CPC法)、無機リン(UV法)、ナトリウム、カリウム、クロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(日立736-10形: 日立製作所)により測定した。

全例の血漿コリンエステラーゼ(アセチルチオコリン-DTNB法)を自動分析装置(日立736-10形: 日立製作所)、血球コリンエステラーゼ(アセチルチオコリン-DTNB法)を自記分光光度計(日立U-3200形: 日立製作所)および脳コリンエステラーゼ(アセチルチオコリン-DTNB法)を自動分析装置(COBAS FARA:F.

Hoffmann La Roche & Co.)により測定した。

##### 4) 尿検査

雄は投与開始後26日、雌は投与開始後25日に各群雌雄6匹の新鮮尿を採取して、pH、潜血、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン(試験紙法、マルティステックス、マイルス・三共(株))を尿分析器(クリニテック100: マイルス・三共(株))により測定した。

##### 5) 病理学検査

全例について採血後に腹大動脈を切断して放血致死させ剖検した。剖検後、全例の脳、肝臓、腎臓、副腎、胸腺、脾臓、甲状腺(上皮小体を含む)、精巣および卵巣の重量を測定した。また、全例の上記器官に加え、下垂体、眼球、ハーダー腺、肺、胃、心臓、膀胱、骨髄(大腿骨)、坐骨神経、脊髄を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定、保存した。ただし、眼球およびハーダー腺はDavidson液で固定した。

投与期間終了時解剖動物の対照群および500 mg/kg群の雌雄の心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、脳、坐骨神経、脊髄、甲状腺、下垂体および全動物の肉眼的異常部位を対象に、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し鏡検した。その結果、雌雄の肝臓、副腎、甲状腺と雄の腎臓に被験物質投与に起因すると考えられる変化が認められたため、投与期間終了時解剖動物の他の群と回復試験終了時解剖動物の当該器官(腎臓は雄のみ)を検査した。また、代表例の肝臓および副腎についてオイルレッドO染色と甲状腺の渡辺鍍銀染色を行い、鏡検した。

##### 6) 統計解析

計量データについては、Bartlett法による等分散の検定を行い、分散が一様の場合は一元配置分散分析を行った後、Dunnett法またはScheffé法により検定した。分散が一様でない場合はKruskal-Wallisの検定を行い、Dunnett型またはScheffé型の順位和検定を行った。計数データおよび病理組織所見については、Armitageの $\chi^2$ 検定を行った。有意水準は5%未満とした。

## 結果

### 1. 一般状態

投与後の流涎が100 mg/kg群の雄で投与開始後6日以降、雌で投与開始後5日以降、500 mg/kg群の雄で投与開始後1日以降、雌で投与開始後4日以降に発現した。また、投与前の流涎が100 mg/kg群の雌で投与開始後8日に、500 mg/kg群の雄で投与開始後7日以降、雌で投与開始後13日以降に発現した。投与後の流涎は、投与直後に発現する一過性的変化であり、投与前の流涎は動物の体に触れることにより発現した。回復期間にはこれらの変化は認められなかった。

## 2. 体重(Fig. 1)

全試験期間を通じて、いずれの投与群も対照群と同様の体重推移を示した。

## 3. 摂餌量

投与開始後3週に摂餌量の低値が500 mg/kg群の雌で認められた。回復期間には本変化は認められなかった。

## 4. 血液学検査(Table 1)

投与期間終了時の検査で、活性化部分トロンボプラスチン(APTT)時間の延長が500 mg/kg群の雄で認められた。回復期間終了時の検査では、本変化は認められなかった。

なお、回復期間終了時の検査で網状赤血球数の低値が100 mg/kg群の雄で認められたが、軽微な変動であることやその発現状況から被験物質に起因した変化ではないと判断した。

## 5. 血液生化学検査(Table 2)

投与期間終了時の検査で、血漿コリンエステラーゼの低値が500 mg/kg群の雌雄、血球コリンエステラーゼの低値が100 mg/kg群の雌と500 mg/kg群の雌雄で認められた。また、総コレステロールの高値が500 mg/kg群の雌、総タンパクの高値が100 mg/kg群の雄と500 mg/kg群の雌雄、アルブミンの高値が100 および500 mg/kg群の雄で認められた。さらにGOTの低値が500 mg/kg群の雌、アルカリフォスファターゼの低値が100 および500 mg/kg群の雌で認められた。回復期間終了時の検査では、これらの変化のうち血漿コリンエステラーゼの低値が100 および500 mg/kg群の雌、血球コリンエステラーゼの低値が500 mg/kg群の雌雄で認められたが、いずれもその程度は軽減していた。

なお、回復期間終了時の検査で A/G 比と無機リンの高値が500 mg/kg群の雄で認められたが、いずれも軽微

な変動であることやその発現状況から被験物質に起因した変化ではないと判断した。

## 6. 尿検査

投与期間中の検査において、いずれの投与群にも異常は認められなかった。

## 7. 器官重量(Table 3)

投与期間終了時の検査で、肝臓の相対重量の高値が100 mg/kg群の雄、絶対重量と相対重量の高値が500 mg/kg群の雌雄で認められた。また、副腎の絶対重量と相対重量の高値が100 mg/kg群の雌と500 mg/kg群の雌雄で認められた。回復期間終了時の検査では、これらの変化のうち肝臓の相対重量の高値が500 mg/kg群の雌で認められたが、その程度は軽減していた。また、甲状腺の絶対重量および相対重量の高値が500 mg/kg群の雄で認められた。

## 8. 剖検所見(Table 4)

投与期間終了時の検査で、肝臓の褐色化が100 mg/kg群の雄4例、雌6例と500 mg/kg群の雄5例、雌6例に、腫大が500 mg/kg群の雌雄全例に認められた。回復期間終了時の検査では、上記変化のうち肝臓の腫大が500 mg/kg群の雌2例に認められた。なお、肝臓の腫大は100 mg/kg群の雄1例と4 mg/kg群の雌1例にも認められたが、いずれも遺伝性疾患である'Polycystic disease'に伴う変化であり、被験物質に起因した変化ではないと判断した。甲状腺の腫大が100 mg/kg群の雄1例と500 mg/kg群の雄3例、雌2例に認められた。回復期間終了時の検査では、本変化が500 mg/kg群の雌2例に認められた。副腎の腫大が100 mg/kg群の雌2例、雄1例と500 mg/kg群の雄5例、雌6例に認められた。腫大した副腎は全体に白色調を呈していた。回復期間終了時の検査では、本変化は認められなかった。

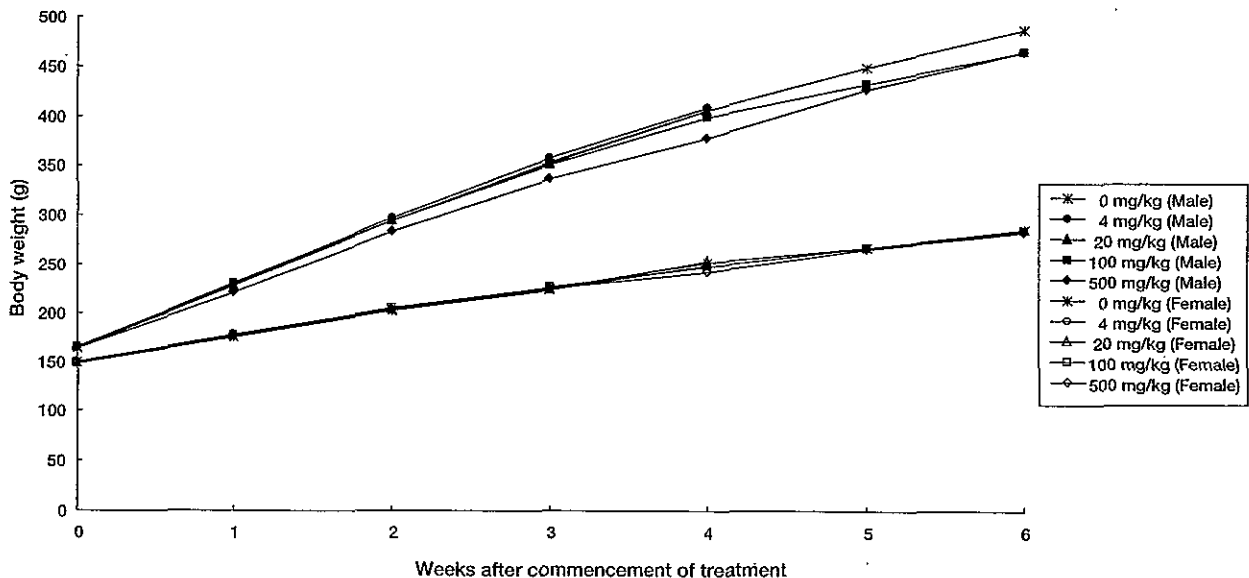


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

その他、被験物質投与群に種々の変化が認められたが、その発現状況からいずれも被験物質に起因した変化ではないと判断した。

### 9. 病理組織所見 (Table 5)

投与期間終了時解剖動物の検査で、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が100 mg/kg群の雄2例、雌4例と500 mg/kg群の雌雄全例に認められた。肥大した肝細胞は好酸性を増し、くもり硝子様変化を呈した。雄では肥大した肝細胞内にオイルレッドO染色陰性の空胞が増加する例もみられた。回復期間終了時解剖動物の検査では、肝細胞肥大が100 mg/kg群の雌1例と500 mg/kg群の雌2例に認められたが、その程度は軽減していた。腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴の増加が500 mg/kg群の雄4例で認められ、そのうち1例では近位尿細管上皮内の好酸性小体の出現も伴っていた。回復期間終了時解剖動物の検査では、近位尿細管上皮内の硝子滴の程度の増強が500 mg/kg群の雄2例、近位尿細管上皮内の好酸性小体が500 mg/kg群の雄4例、程度の強い好塩基性尿細管が500 mg/kg群の雄1例で認められた。甲状腺のろ胞上皮細胞の肥大が100 mg/kg群の雌雄各2例と500 mg/kg群の雄6例、雌5例に認められた。回復期間終了時解剖動物の検査でも、ろ胞上皮細胞の肥大が100 mg/kg群の雄2例と500 mg/kg群の雄3例、雌1例に認められた。副腎の束状帯の脂肪滴の増加が500 mg/kg群の雌雄全例に認められた。雄では大小様々な脂肪滴、雌では小型で均一な脂肪滴が出現していた。回復期間終了時解剖動物の検査では、本変化は認められなかった。

その他、被験物質投与群で種々の変化が認められたが、その発現状況からいずれも被験物質に起因した変化ではないと判断した。

### 考察

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルを0, 4, 20, 100, 500 mg/kgの用量でSD系ラットの雌雄に28日間反復経口投与し、その毒性を検討した。

一般症状として、投与前後の流涎が100および500 mg/kg群の雌雄で認められた。しかし、投与後の流涎は投与直後に発現する一過性の変化であり、投与前の流涎は動物の体に触れることによって発現する条件反射的な変化であることや、これらの変化は投与を止めることにより発現しないことから、被験物質の味等に起因した変化であり、毒性学的意義はないと判断した。従って、流涎は無影響量の評価の対象からは除外した。

体重に変化はみられなかったが、摂餌量の低値が500 mg/kg群の雌で認められた。本変化は投与を止めることにより回復した。

血液学検査で、活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が500 mg/kg群の雄で認められた。しかし、軽微な変化であることやプロトロンビン時間に異常がないことや肝傷害性の変化がないことなどから本変化の毒性学的意義は低いと思われる。本変化は投与を止めることによ

り回復した。

血液生化学検査で、血漿あるいは血球コリンエステラーゼの低値が100 mg/kg群の雌と500 mg/kg群の雌雄で認められた。被験物質はコリンエステラーゼ活性の阻害作用を有することが知られている有機リン化合物の一種であることから、同様のコリンエステラーゼ活性の阻害が惹起されたものと思われる。また、総コレステロール、総蛋白あるいはアルブミンの高値が100 mg/kg群の雄と500 mg/kg群の雌雄で認められたが、これらの変化はコリンエステラーゼ活性阻害に伴い代償性に肝臓でのタンパク質や脂質の合成が亢進した結果生じたものと思われる。回復期間終了時には、上記変化のうち血漿あるいは血球コリンエステラーゼの低値が100および500 mg/kg群で認められたが、その程度は明らかに軽減していた。なお、投与期間終了時にGOTの低値が500 mg/kg群の雌、アルカリフォスファターゼの低値が100および500 mg/kg群の雌で認められたが、一般的に問題となる値の上昇ではなく、減少であることから毒性学的には意義の乏しい変化と思われる。

病理学検査では、肝臓の絶対重量あるいは相対重量の増加が100 mg/kg群の雄と500 mg/kg群の雌雄、褐色化が100および500 mg/kg群の雌雄、小葉中心性の肝細胞肥大が500 mg/kg群の雌雄で認められた。小葉中心性の肝細胞肥大はくもり硝子様変化を特徴としており、これらの肝肥大性の変化は薬物代謝酵素誘導によるものと思われる。腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴の増強が500 mg/kg群の雄で認められた。近位尿細管上皮の硝子滴は $\alpha_{2u}$ グロブリンを含む蛋白の再吸収像であり、正常な成熟ラットでしばしばみられる変化である。そして、種々の化学物質投与により硝子滴の増数の特徴とした $\alpha_{2u}$ グロブリン腎症が雄ラットに特異的に発現することが知られている<sup>23)</sup>。被験物質投与により同様の $\alpha_{2u}$ グロブリン腎症が惹起されたものと思われる。また、近位尿細管上皮の好酸性小体あるいは好塩基性尿細管は硝子滴の過剰な蓄積に伴う変化と思われる。甲状腺の腫大が100 mg/kg群の雄と500 mg/kg群の雌雄、ろ胞上皮細胞の肥大が100および500 mg/kg群の雌雄で認められた。薬物代謝酵素誘導を起こす化学物質は、肝臓での甲状腺ホルモン代謝を促進し、二次的に視床下部-下垂体系を介して甲状腺ろ胞上皮細胞の肥大を惹起することが知られている<sup>45)</sup>。前述のように本試験でも薬物代謝酵素誘導の発現を示唆する肝肥大が認められることから、同様の機序でろ胞上皮細胞の肥大が生じた可能性が考えられる。一方、被験物質の甲状腺への直接作用の可能性も考えられるが、本試験の結果のみからは明らかにはできなかった。副腎の絶対重量および相対重量の高値が100 mg/kg群の雌と500 mg/kg群の雌雄、腫大が100および500 mg/kg群の雌雄、束状帯の脂肪滴の増加が500 mg/kg群の雌雄で認められた。束状帯の脂肪滴の増加は、ステロイド合成阻害によって発現する脂質増生(lipid hyperplasia)の組織像と類似していた<sup>46)</sup>。回復期間終了後解剖動物では、これらの変化は回復あるいは軽減していた。

なお、被験物質は有機リン化合物であり、ネコおよびサルに運動神経麻痺と脊髄の脱髄を起こすことが知られているトリフェニルフォスフェートが不純物として含まれている<sup>7,8)</sup>。しかし、本試験では神経症状や中枢神経系の病理組織変化は認められなかった。

これらの試験結果から、本試験条件下におけるリン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの無影響量は雌雄いずれも20 mg/kg/dayと結論した。

#### 文献

- 1) 化学工業日報社編, "12093 の化学商品," 化学工業日報社, 東京, 1993, pp. 911-914.
- 2) C.L. Alden, C.H. Frith, "Handbook of Toxicologic Pathology," eds. by W. M. Haschek, C.G. Rousseaux, Academic Press, San Diego, 1991, pp.340-342.
- 3) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies," ed. by P. Greaves, Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation, Elsevier, Amsterdam, 1990, pp.532-538.
- 4) C.C. Capen, R.A. DeLellis, and J.T. Yarrington, "Handbook of Toxicologic Pathology," eds. by W.M. Haschek, C.G. Rousseaux, Academic Press, San Diego, 1991, pp.723-725.
- 5) G.O. Lumb and J.H. Rust, *Toxicol. Pathol.* 13, 315 (1985).
- 6) F. Zak, "Endocrine System. Monographs on Pathology of Laboratory Animals," eds. by T.C. Jones, U. Mohr, R.D. Hunt, Springer-Verlag, Berlin, 1983, pp.80-84.
- 7) W.L. Sutton, C.J. Terhaar, F.A. Miller, R.F. Scherberger, E.C. Riley, R.L. Roudabush and D.W. Fassett, *Arch. Environmental Health*, 1, 33(1960).
- 8) D. Tanaka, S.J. Bursian, E.J. Lehning and R.J. Aulerich, *Brain Research*, 531, 294(1990).

#### 連絡先

試験責任者：須藤雅人  
 試験担当者：清水優子, 土谷 稔, 勝田 修,  
 豊田直人, 高野克代  
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
 〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

#### Correspondence

Authors: Masato Sudo (Study director)  
 Yuko Shimizu, Minoru Tsuchitani,  
 Osamu Katsuta, Naoto Toyota,  
 Katsuyo Takano  
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
 Kashima Laboratory  
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
 Ibaraki, 314-02 Japan  
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874



Table 1 Hematology of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level (mg/kg)	28 Day				
		0	4	20	100	500
Male						
Number of animals		6	6	6	6	6
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )		697 $\pm$ 18.1	691 $\pm$ 15.7	711 $\pm$ 36.0	706 $\pm$ 19.9	698 $\pm$ 23.7
Hematocrit (%)		42.3 $\pm$ 1.16	41.9 $\pm$ 0.76	42.6 $\pm$ 1.67	42.3 $\pm$ 0.99	42.4 $\pm$ 1.42
Hemoglobin (g/dl)		14.6 $\pm$ 0.39	14.3 $\pm$ 0.40	14.8 $\pm$ 0.31	14.6 $\pm$ 0.33	14.6 $\pm$ 0.46
Reticulocyte (%)		34 $\pm$ 1.9	36 $\pm$ 3.9	34 $\pm$ 3.9	35 $\pm$ 4.0	34 $\pm$ 4.9
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )		60.6 $\pm$ 1.77	60.6 $\pm$ 0.92	59.9 $\pm$ 1.46	59.9 $\pm$ 0.79	60.7 $\pm$ 0.85
MCH (pg)		20.9 $\pm$ 0.57	20.7 $\pm$ 0.38	20.8 $\pm$ 0.90	20.6 $\pm$ 0.28	20.9 $\pm$ 0.32
MCHC (%)		34.5 $\pm$ 0.13	34.2 $\pm$ 0.51	34.6 $\pm$ 1.07	34.4 $\pm$ 0.42	34.4 $\pm$ 0.30
Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )		100.8 $\pm$ 9.32	104.8 $\pm$ 16.55	105.2 $\pm$ 4.48	103.1 $\pm$ 9.80	115.3 $\pm$ 17.63
PT (sec)		13.1 $\pm$ 0.28	13.5 $\pm$ 0.50	13.3 $\pm$ 0.44	12.8 $\pm$ 0.45	13.9 $\pm$ 0.87
APTT (sec)		16.5 $\pm$ 1.34	16.1 $\pm$ 1.72	14.9 $\pm$ 2.42	16.7 $\pm$ 0.88	20.8 $\pm$ 2.18**
WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )		98 $\pm$ 31.9	119 $\pm$ 23.2	122 $\pm$ 30.4	118 $\pm$ 23.3	106 $\pm$ 15.8
Differential leukocyte counts (%)						
Lymphocytes		89 $\pm$ 2.5	92 $\pm$ 5.3	91 $\pm$ 2.1	88 $\pm$ 4.6	89 $\pm$ 3.6
Neutrophils						
segmented		8 $\pm$ 1.9	4 $\pm$ 2.3	4 $\pm$ 1.1	8 $\pm$ 3.9	8 $\pm$ 3.3
band		0 $\pm$ 0.8	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.4
Eosinophils		1 $\pm$ 0.8	1 $\pm$ 1.1	1 $\pm$ 0.8	1 $\pm$ 1.5	0 $\pm$ 0.5
Basophils		0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
Monocytes		2 $\pm$ 1.5	3 $\pm$ 3.0	4 $\pm$ 1.4	3 $\pm$ 1.5	3 $\pm$ 1.6
Female						
Number of animals		6	6	6	6	6
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )		691 $\pm$ 22.5	700 $\pm$ 30.9	685 $\pm$ 27.9	709 $\pm$ 11.1	696 $\pm$ 35.8
Hematocrit (%)		41.2 $\pm$ 0.95	40.7 $\pm$ 2.18	40.6 $\pm$ 1.50	41.9 $\pm$ 0.86	41.0 $\pm$ 1.73
Hemoglobin (g/dl)		14.3 $\pm$ 0.34	14.3 $\pm$ 0.89	14.2 $\pm$ 0.44	14.7 $\pm$ 0.44	14.2 $\pm$ 0.50
Reticulocyte (%)		30 $\pm$ 5.5	23 $\pm$ 3.0	26 $\pm$ 3.1	24 $\pm$ 5.2	27 $\pm$ 6.1
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )		59.6 $\pm$ 1.78	58.1 $\pm$ 2.36	59.3 $\pm$ 1.84	59.0 $\pm$ 0.87	58.9 $\pm$ 0.80
MCH (pg)		20.7 $\pm$ 0.58	20.3 $\pm$ 1.00	20.8 $\pm$ 0.52	20.8 $\pm$ 0.39	20.4 $\pm$ 0.49
MCHC (%)		34.7 $\pm$ 0.34	35.0 $\pm$ 0.62	35.1 $\pm$ 0.54	35.2 $\pm$ 0.59	34.7 $\pm$ 0.61
Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )		91.8 $\pm$ 11.07	85.6 $\pm$ 9.78	82.6 $\pm$ 3.45	90.1 $\pm$ 6.08	95.9 $\pm$ 17.13
PT (sec)		14.1 $\pm$ 0.39	15.0 $\pm$ 0.85	14.2 $\pm$ 0.46	13.3 $\pm$ 0.60	13.1 $\pm$ 1.25
APTT (sec)		16.6 $\pm$ 1.34	17.7 $\pm$ 2.38	15.9 $\pm$ 1.32	15.7 $\pm$ 1.96	17.5 $\pm$ 2.54
WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )		77 $\pm$ 17.3	80 $\pm$ 33.8	68 $\pm$ 23.5	83 $\pm$ 37.6	100 $\pm$ 22.3
Differential leukocyte counts (%)						
Lymphocytes		90 $\pm$ 2.7	80 $\pm$ 18.4	89 $\pm$ 4.2	90 $\pm$ 4.8	94 $\pm$ 2.5
Neutrophils						
segmented		7 $\pm$ 2.1	13 $\pm$ 14.5	7 $\pm$ 3.9	8 $\pm$ 3.7	5 $\pm$ 1.8
band		0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0.0
Eosinophils		1 $\pm$ 0.4	1 $\pm$ 0.8	1 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0.4	1 $\pm$ 0.8
Basophils		0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
Monocytes		2 $\pm$ 1.2	6 $\pm$ 8.6	3 $\pm$ 0.8	2 $\pm$ 1.9	2 $\pm$ 1.4

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*\*,  $p < 0.01$ .

Table 1 (continued)

Sex	Period Dose level (mg/kg)	Recovery		
		0	100	500
Male				
	Number of animals	6	6	6
	RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	786 $\pm$ 30.3	781 $\pm$ 26.8	783 $\pm$ 32.2
	Hematocrit (%)	43.2 $\pm$ 1.28	43.5 $\pm$ 1.04	43.9 $\pm$ 1.22
	Hemoglobin (g/dl)	15.1 $\pm$ 0.38	15.1 $\pm$ 0.28	15.1 $\pm$ 0.42
	Reticulocyte (%)	29 $\pm$ 1.8	25 $\pm$ 2.4**	31 $\pm$ 2.4
	MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	55.1 $\pm$ 1.50	55.7 $\pm$ 1.12	56.1 $\pm$ 1.45
	MCH (pg)	19.2 $\pm$ 0.59	19.3 $\pm$ 0.42	19.3 $\pm$ 0.46
	MCHC (%)	34.9 $\pm$ 0.33	34.7 $\pm$ 0.35	34.4 $\pm$ 0.40
	Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	103.1 $\pm$ 13.98	99.2 $\pm$ 5.92	97.4 $\pm$ 10.34
	PT (sec)	14.1 $\pm$ 0.65	14.0 $\pm$ 0.39	13.5 $\pm$ 0.46
	APTT (sec)	18.0 $\pm$ 1.54	18.8 $\pm$ 1.34	16.8 $\pm$ 1.99
	WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	109 $\pm$ 22.9	109 $\pm$ 32.3	131 $\pm$ 36.3
	Differential leukocyte counts (%)			
	Lymphocytes	86 $\pm$ 3.6	83 $\pm$ 4.5	87 $\pm$ 4.4
	Neutrophils			
	segmented	10 $\pm$ 3.5	13 $\pm$ 4.1	10 $\pm$ 3.3
	band	0 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.4
	Eosinophils	1 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 0.8
	Basophils	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
	Monocytes	4 $\pm$ 1.4	4 $\pm$ 1.4	2 $\pm$ 1.9
Female				
	Number of animals	6	6	6
	RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	721 $\pm$ 41.5	739 $\pm$ 27.8	741 $\pm$ 20.5
	Hematocrit (%)	41.8 $\pm$ 1.72	41.4 $\pm$ 1.32	42.2 $\pm$ 1.03
	Hemoglobin (g/dl)	14.6 $\pm$ 0.60	14.5 $\pm$ 0.55	14.7 $\pm$ 0.14
	Reticulocyte (%)	29 $\pm$ 4.2	26 $\pm$ 3.8	29 $\pm$ 4.0
	MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	58.0 $\pm$ 2.02	56.0 $\pm$ 1.63	56.9 $\pm$ 0.90
	MCH (pg)	20.3 $\pm$ 0.77	19.6 $\pm$ 0.77	19.9 $\pm$ 0.49
	MCHC (%)	35.0 $\pm$ 0.38	34.9 $\pm$ 0.43	34.9 $\pm$ 0.72
	Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	89.4 $\pm$ 7.95	94.8 $\pm$ 6.88	92.1 $\pm$ 3.02
	PT (sec)	13.7 $\pm$ 0.23	13.6 $\pm$ 0.51	13.5 $\pm$ 0.22
	APTT (sec)	16.5 $\pm$ 1.31	16.3 $\pm$ 1.86	16.8 $\pm$ 1.31
	WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	61 $\pm$ 24.2	66 $\pm$ 12.3	76 $\pm$ 26.7
	Differential leukocyte counts (%)			
	Lymphocytes	84 $\pm$ 5.5	87 $\pm$ 4.5	84 $\pm$ 5.2
	Neutrophils			
	segmented	12 $\pm$ 5.0	10 $\pm$ 3.0	12 $\pm$ 6.0
	band	1 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.8
	Eosinophils	1 $\pm$ 1.0	1 $\pm$ 0.9	1 $\pm$ 1.0
	Basophils	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
	Monocytes	2 $\pm$ 1.5	2 $\pm$ 1.4	2 $\pm$ 1.5

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*\* ;  $p < 0.01$ .

Table 2 Blood chemical examination of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Period Dose level (mg/kg)	28 Day				
		0	4	20	100	500
<b>Male</b>						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	Choline esterase brain <sup>1)</sup>	6.2 ± 1.54	7.2 ± 1.80	7.4 ± 1.41	7.2 ± 0.82	6.8 ± 0.51
	Choline esterase plasma (IU/ml)	0.40 ± 0.092	0.36 ± 0.037	0.40 ± 0.081	0.33 ± 0.056	0.24 ± 0.030**
	Choline esterase RBC (IU/ml)	1.62 ± 0.114	1.47 ± 0.096	1.53 ± 0.148	1.56 ± 0.128	1.05 ± 0.099**
	GOT (IU/l)	55 ± 4.9	55 ± 5.5	50 ± 5.0	50 ± 8.4	50 ± 5.3
	GPT (IU/l)	32 ± 3.1	33 ± 4.8	32 ± 5.2	32 ± 3.3	40 ± 9.1
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.0	1 ± 0.5	0 ± 0.8	1 ± 1.2	4 ± 1.5
	ALP (IU/l)	631 ± 192.5	634 ± 166.4	507 ± 73.6	514 ± 52.0	501 ± 66.4
	Urea nitrogen (mg/dl)	19.2 ± 2.41	18.8 ± 1.46	18.7 ± 1.76	17.9 ± 2.65	20.7 ± 4.13
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.04
	Glucose (mg/dl)	165 ± 5.6	166 ± 11.7	166 ± 13.1	161 ± 13.7	154 ± 8.7
	Total chol. (mg/dl)	69 ± 4.8	78 ± 14.8	75 ± 12.7	83 ± 7.4	80 ± 10.8
	Triglyceride (mg/dl)	113 ± 32.7	157 ± 53.2	127 ± 46.0	147 ± 67.6	76 ± 23.2
	Total protein (g/dl)	6.60 ± 0.259	6.75 ± 0.244	6.76 ± 0.294	7.03 ± 0.091*	7.19 ± 0.197**
	Albumin (g/dl)	3.53 ± 0.106	3.58 ± 0.092	3.57 ± 0.130	3.69 ± 0.048*	3.79 ± 0.104**
	A/G ratio	1.15 ± 0.036	1.13 ± 0.047	1.12 ± 0.053	1.11 ± 0.048	1.12 ± 0.034
	Calcium (mg/dl)	10.1 ± 0.22	10.1 ± 0.23	10.3 ± 0.29	10.2 ± 0.31	10.3 ± 0.29
	Inorganic phos. (mg/dl)	8.3 ± 0.39	8.3 ± 0.39	8.7 ± 0.46	8.2 ± 0.46	8.2 ± 0.38
	Na (mEq/l)	142 ± 1.3	141 ± 1.3	142 ± 1.0	142 ± 0.5	142 ± 0.5
	K (mEq/l)	3.8 ± 0.15	3.8 ± 0.29	4.0 ± 0.12	4.0 ± 0.14	3.8 ± 0.11
	Cl (mEq/l)	101 ± 1.1	99 ± 0.8	100 ± 0.8	100 ± 0.8	100 ± 1.2
<b>Female</b>						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	Choline esterase brain <sup>1)</sup>	7.9 ± 0.82	7.6 ± 0.76	7.3 ± 1.18	7.3 ± 0.95	7.0 ± 0.61
	Choline esterase plasma (IU/ml)	1.02 ± 0.211	1.29 ± 0.519	1.06 ± 0.397	0.77 ± 0.210	0.39 ± 0.095**
	Choline esterase RBC (IU/ml)	1.44 ± 0.168	1.41 ± 0.093	1.39 ± 0.106	1.26 ± 0.084*	0.90 ± 0.115**
	GOT (IU/l)	51 ± 3.1	55 ± 14.0	50 ± 4.8	45 ± 4.4	40 ± 3.9**
	GPT (IU/l)	28 ± 8.7	30 ± 8.2	31 ± 7.0	24 ± 4.9	25 ± 3.7
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.4	0 ± 0.4	0 ± 0.0	1 ± 0.5	3 ± 1.0
	ALP (IU/l)	480 ± 121.7	390 ± 77.3	385 ± 44.4	339 ± 59.2*	286 ± 51.8**
	Urea nitrogen (mg/dl)	24.3 ± 5.00	20.4 ± 2.76	20.1 ± 2.77	20.2 ± 3.06	27.9 ± 8.32
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.6 ± 0.05
	Glucose (mg/dl)	176 ± 24.6	163 ± 10.4	175 ± 20.5	169 ± 17.6	154 ± 6.6
	Total chol. (mg/dl)	80 ± 14.4	76 ± 21.4	76 ± 11.6	96 ± 17.6	105 ± 17.5*
	Triglyceride (mg/dl)	74 ± 70.2	50 ± 19.7	68 ± 41.3	52 ± 33.1	50 ± 38.9
	Total protein (g/dl)	6.83 ± 0.204	6.96 ± 0.449	6.78 ± 0.300	7.17 ± 0.275	7.48 ± 0.436*
	Albumin (g/dl)	3.71 ± 0.129	3.65 ± 0.183	3.71 ± 0.098	3.90 ± 0.147	3.89 ± 0.156
	A/G ratio	1.20 ± 0.044	1.13 ± 0.163	1.21 ± 0.088	1.20 ± 0.030	1.09 ± 0.071
	Calcium (mg/dl)	9.8 ± 0.24	9.9 ± 0.46	9.8 ± 0.19	9.9 ± 0.41	10.2 ± 0.37
	Inorganic phos. (mg/dl)	7.8 ± 0.59	7.2 ± 0.71	7.7 ± 0.81	7.3 ± 1.10	7.0 ± 0.39
	Na (mEq/l)	142 ± 0.8	142 ± 0.5	141 ± 1.0	142 ± 2.0	141 ± 0.8
	K (mEq/l)	4.0 ± 0.55	3.8 ± 0.61	3.8 ± 0.29	4.2 ± 1.20	4.0 ± 0.42
	Cl (mEq/l)	101 ± 0.8	102 ± 1.0	102 ± 1.2	101 ± 1.7	101 ± 1.2

Values are expressed as Mean ± S.D. 1), IU/g wet tissue.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*; P < 0.05, \*\*; P < 0.01.

Table 2 (Continued)

Sex	Period	Recovery		
	Dose level (mg/kg)	0	100	500
Male				
	Number of animals	6	6	6
	Choline esterase brain <sup>1)</sup>	7.3 ± 1.08	7.5 ± 0.67	7.2 ± 0.64
	Choline esterase plasma (IU/ml)	0.30 ± 0.026	0.39 ± 0.081	0.32 ± 0.075
	Choline esterase RBC (IU/ml)	1.56 ± 0.105	1.51 ± 0.132	1.36 ± 0.098*
	GOT (IU/l)	60 ± 9.2	57 ± 4.5	59 ± 7.6
	GPT (IU/l)	35 ± 4.9	31 ± 3.9	37 ± 6.8
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.4	0 ± 0.0	0 ± 0.4
	ALP (IU/l)	516 ± 162.4	432 ± 118.5	445 ± 53.9
	Urea nitrogen (mg/dl)	19.2 ± 4.02	18.8 ± 0.96	20.3 ± 2.83
	Creatinine (mg/dl)	0.4 ± 0.05	0.4 ± 0.05	0.4 ± 0.04
	Glucose (mg/dl)	166 ± 6.2	162 ± 4.8	164 ± 4.5
	Total chol. (mg/dl)	82 ± 15.2	69 ± 9.6	72 ± 19.9
	Triglyceride (mg/dl)	189 ± 76.0	164 ± 44.2	165 ± 107.3
	Total protein (g/dl)	6.96 ± 0.201	6.96 ± 0.367	7.05 ± 0.495
	Albumin (g/dl)	3.70 ± 0.119	3.65 ± 0.133	3.85 ± 0.209
	A/G ratio	1.13 ± 0.031	1.10 ± 0.045	1.21 ± 0.059*
	Calcium (mg/dl)	10.1 ± 0.21	10.1 ± 0.19	10.3 ± 0.41
	Inorganic phos. (mg/dl)	7.9 ± 0.29	8.1 ± 0.26	8.5 ± 0.34**
	Na (mEq/l)	142 ± 1.0	142 ± 0.5	142 ± 1.0
	K (mEq/l)	3.7 ± 0.12	3.6 ± 0.17	3.8 ± 0.15
	Cl (mEq/l)	100 ± 1.4	100 ± 1.6	99 ± 3.0
Female				
	Number of animals	6	6	6
	Choline esterase brain <sup>1)</sup>	7.5 ± 0.68	8.0 ± 0.76	7.5 ± 0.35
	Choline esterase plasma (IU/ml)	1.25 ± 0.220	1.02 ± 0.149*	0.84 ± 0.074**
	Choline esterase RBC (IU/ml)	1.26 ± 0.118	1.31 ± 0.083	1.08 ± 0.089*
	GOT (IU/l)	55 ± 11.3	49 ± 4.1	46 ± 3.7
	GPT (IU/l)	35 ± 7.7	33 ± 8.4	33 ± 6.2
	γ-GTP (IU/l)	1 ± 0.8	1 ± 0.8	1 ± 1.2
	ALP (IU/l)	373 ± 127.9	385 ± 108.3	356 ± 116.1
	Urea nitrogen (mg/dl)	20.8 ± 3.90	20.3 ± 2.30	24.8 ± 4.01
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.06	0.5 ± 0.04
	Glucose (mg/dl)	167 ± 10.1	162 ± 8.5	167 ± 10.3
	Total chol. (mg/dl)	77 ± 13.7	78 ± 10.1	84 ± 7.0
	Triglyceride (mg/dl)	79 ± 24.0	99 ± 22.4	97 ± 37.0
	Total protein (g/dl)	6.91 ± 0.200	7.02 ± 0.245	7.14 ± 0.330
	Albumin (g/dl)	3.87 ± 0.055	3.93 ± 0.064	3.96 ± 0.184
	A/G ratio	1.28 ± 0.071	1.28 ± 0.094	1.24 ± 0.037
	Calcium (mg/dl)	9.5 ± 0.32	9.5 ± 0.20	9.5 ± 0.21
	Inorganic phos. (mg/dl)	4.4 ± 0.88	5.2 ± 0.70	5.1 ± 0.55
	Na (mEq/l)	141 ± 0.0	141 ± 0.8	140 ± 0.8
	K (mEq/l)	3.4 ± 0.18	3.3 ± 0.22	3.5 ± 0.14
	Cl (mEq/l)	103 ± 1.0	102 ± 1.2	102 ± 1.2

Values are expressed as Mean ± S.D. 1), IU/g wet tissue.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*; P<0.05, \*\*; P<0.01.

Table 3 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Period Dose level (mg/kg)	28 Day				
		0	4	20	100	500
Male						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	Final body weight	407 ± 10.6	408 ± 29.8	406 ± 24.0	405 ± 43.7	372 ± 32.7
	Absolute organ weight					
	Brain (g)	2.05 ± 0.031	1.99 ± 0.042	2.02 ± 0.047	2.06 ± 0.073	2.00 ± 0.037
	Thyroids (mg)	26.0 ± 4.10	26.0 ± 2.53	22.7 ± 3.08	25.8 ± 4.79	28.2 ± 5.04
	Thymus (mg)	732 ± 42.4	671 ± 47.9	696 ± 89.7	658 ± 110.9	681 ± 139.8
	Liver (g)	16.29 ± 1.104	16.61 ± 0.707	16.52 ± 0.832	18.94 ± 2.014	20.80 ± 2.809**
	Kidneys (g)	2.79 ± 0.294	2.79 ± 0.141	2.72 ± 0.187	3.37 ± 0.922	2.78 ± 0.164
	Adrenals (mg)	53.9 ± 5.03	56.1 ± 9.71	59.7 ± 2.98	56.4 ± 5.84	71.4 ± 12.93*
	Spleen (g)	0.76 ± 0.042	0.88 ± 0.103	0.78 ± 0.085	0.90 ± 0.153	0.74 ± 0.070
	Testes (g)	3.04 ± 0.166	2.97 ± 0.187	3.12 ± 0.232	3.08 ± 0.202	3.02 ± 0.202
	Relative organ weight					
	Brain	0.50 ± 0.014	0.49 ± 0.032	0.50 ± 0.033	0.51 ± 0.049	0.54 ± 0.044
	Thyroids (×10 <sup>-3</sup> )	6.4 ± 1.08	6.4 ± 0.88	5.6 ± 0.79	6.4 ± 1.17	7.7 ± 1.49
	Thymus (×10 <sup>-3</sup> )	180 ± 11.5	165 ± 17.3	172 ± 26.5	163 ± 20.0	184 ± 40.4
	Liver	4.00 ± 0.216	4.09 ± 0.291	4.08 ± 0.277	4.68 ± 0.315**	5.58 ± 0.300**
	Kidneys	0.69 ± 0.073	0.69 ± 0.035	0.67 ± 0.038	0.84 ± 0.248	0.75 ± 0.068
	Adrenals (×10 <sup>-3</sup> )	13.2 ± 1.21	13.7 ± 1.77	14.7 ± 0.99	14.0 ± 1.25	19.3 ± 3.84**
	Spleen	0.19 ± 0.014	0.22 ± 0.020	0.19 ± 0.017	0.22 ± 0.044	0.20 ± 0.024
	Testes	0.75 ± 0.051	0.73 ± 0.028	0.77 ± 0.067	0.77 ± 0.086	0.82 ± 0.058
Female						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	Final body weight	254 ± 19.3	249 ± 13.1	252 ± 23.0	242 ± 22.4	242 ± 6.1
	Absolute organ weight					
	Brain (g)	1.88 ± 0.063	1.88 ± 0.040	1.94 ± 0.059	1.88 ± 0.087	1.87 ± 0.055
	Thyroids (mg)	22.2 ± 0.75	19.5 ± 2.35	20.8 ± 1.17	21.5 ± 1.52	24.7 ± 3.14
	Thymus (mg)	492 ± 83.6	516 ± 83.4	543 ± 82.5	558 ± 177.5	548 ± 38.2
	Liver (g)	10.09 ± 0.962	10.32 ± 2.573	9.77 ± 1.397	10.54 ± 1.593	13.94 ± 0.725**
	Kidneys (g)	1.87 ± 0.147	2.20 ± 0.872	1.87 ± 0.131	1.84 ± 0.159	1.96 ± 0.179
	Adrenals (mg)	65.7 ± 10.72	72.9 ± 4.46	69.7 ± 10.14	80.7 ± 11.43*	95.3 ± 7.11**
	Spleen (g)	0.58 ± 0.096	0.64 ± 0.173	0.55 ± 0.077	0.52 ± 0.106	0.52 ± 0.068
	Ovaries (mg)	101.0 ± 21.93	101.8 ± 15.43	95.6 ± 14.11	94.5 ± 15.27	115.9 ± 15.91
	Relative organ weight					
	Brain	0.74 ± 0.052	0.75 ± 0.031	0.78 ± 0.062	0.78 ± 0.061	0.77 ± 0.017
	Thyroids (×10 <sup>-3</sup> )	8.8 ± 0.88	7.8 ± 1.02	8.3 ± 0.95	9.0 ± 1.10	10.2 ± 1.36
	Thymus (×10 <sup>-3</sup> )	193 ± 20.7	206 ± 25.5	215 ± 18.0	227 ± 55.8	226 ± 15.2
	Liver	3.97 ± 0.228	4.13 ± 0.989	3.87 ± 0.314	4.33 ± 0.285	5.76 ± 0.288*
	Kidneys	0.74 ± 0.104	0.88 ± 0.335	0.75 ± 0.062	0.77 ± 0.069	0.81 ± 0.088
	Adrenals (×10 <sup>-3</sup> )	26.2 ± 5.79	29.3 ± 2.23	28.0 ± 5.57	33.5 ± 5.35*	39.3 ± 2.17**
	Spleen	0.23 ± 0.022	0.26 ± 0.069	0.22 ± 0.025	0.22 ± 0.029	0.22 ± 0.028
	Ovaries (×10 <sup>-3</sup> )	40.5 ± 11.50	40.7 ± 4.88	37.9 ± 3.53	39.3 ± 7.05	47.8 ± 6.29

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*, P&lt;0.05; \*\*, P&lt;0.01.

Table 3 (Continued)

Sex	Period Dose level (mg/kg)	Recovery		
		0	100	500
Male				
	Number of animals	6	6	6
	Final body weight	485 ± 35.1	464 ± 20.7	463 ± 17.7
	Absolute organ weight			
	Brain (g)	2.08 ± 0.093	2.06 ± 0.079	2.03 ± 0.068
	Thyroids (mg)	24.0 ± 1.67	26.3 ± 4.23	30.3 ± 2.16**
	Thymus (mg)	643 ± 83.8	571 ± 64.7	552 ± 52.0
	Liver (g)	18.89 ± 2.317	17.25 ± 1.870	18.81 ± 1.796
	Kidneys (g)	3.20 ± 0.326	3.09 ± 0.360	3.31 ± 0.337
	Adrenals (mg)	59.5 ± 4.58	58.0 ± 7.04	57.8 ± 7.37
	Spleen (g)	0.81 ± 0.196	0.79 ± 0.094	0.89 ± 0.107
	Testes (g)	3.25 ± 0.196	3.21 ± 0.136	3.35 ± 0.290
	Relative organ weight			
	Brain	0.43 ± 0.023	0.44 ± 0.031	0.44 ± 0.010
	Thyroids (×10 <sup>-3</sup> )	4.9 ± 0.48	5.7 ± 0.72	6.6 ± 0.45**
	Thymus (×10 <sup>-3</sup> )	133 ± 16.2	123 ± 13.0	120 ± 13.8
	Liver	3.88 ± 0.250	3.71 ± 0.266	4.06 ± 0.320
	Kidneys	0.66 ± 0.055	0.67 ± 0.050	0.71 ± 0.055
	Adrenals (×10 <sup>-3</sup> )	12.3 ± 1.00	12.5 ± 1.25	12.5 ± 1.45
	Spleen	0.16 ± 0.032	0.17 ± 0.015	0.19 ± 0.025
	Testes	0.67 ± 0.026	0.69 ± 0.045	0.73 ± 0.063
Female				
	Number of animals	6	6	6
	Final body weight	284 ± 16.8	284 ± 28.3	282 ± 22.3
	Absolute organ weight			
	Brain (g)	1.96 ± 0.080	1.87 ± 0.055	1.91 ± 0.043
	Thyroids (mg)	18.5 ± 2.43	20.3 ± 2.66	21.7 ± 3.44
	Thymus (mg)	507 ± 95.2	430 ± 91.8	540 ± 93.9
	Liver (g)	10.40 ± 0.885	10.82 ± 1.003	11.75 ± 1.170
	Kidneys (g)	1.86 ± 0.163	1.86 ± 0.202	1.90 ± 0.194
	Adrenals (mg)	73.4 ± 10.94	66.5 ± 8.21	68.2 ± 11.04
	Spleen (g)	0.58 ± 0.102	0.61 ± 0.098	0.62 ± 0.065
	Ovaries (mg)	108.2 ± 9.30	102.0 ± 13.88	104.2 ± 12.53
	Relative organ weight			
	Brain	0.69 ± 0.048	0.66 ± 0.074	0.68 ± 0.057
	Thyroids (×10 <sup>-3</sup> )	6.5 ± 0.80	7.2 ± 0.61	7.7 ± 1.33
	Thymus (×10 <sup>-3</sup> )	179 ± 34.9	152 ± 27.4	191 ± 28.0
	Liver	3.65 ± 0.142	3.82 ± 0.220	4.16 ± 0.121**
	Kidneys	0.65 ± 0.040	0.66 ± 0.045	0.68 ± 0.083
	Adrenals (×10 <sup>-3</sup> )	25.8 ± 3.65	23.5 ± 1.93	24.4 ± 4.90
	Spleen	0.20 ± 0.032	0.22 ± 0.025	0.22 ± 0.019
	Ovaries (×10 <sup>-3</sup> )	38.0 ± 2.30	36.0 ± 3.49	37.2 ± 5.83

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*, P<0.05; \*\*, P<0.01.

Table 4 Summary of gross findings of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Period	28day					Recovery			
		Dose level (mg/kg)		0	4	20	100	500	0	100
Male	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Spleen										
Nodule		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Liver										
Brownish		0	0	0	4	5	0	0	0	0
Enlargement		0	0	0	1	6	0	0	0	0
Granular, surface		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Kidney										
Cyst, multiple		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Testis										
Small		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Thyroid										
Enlargement		0	0	0	1	3	0	0	0	0
Adrenal										
Enlargement		0	0	0	2	5	0	0	0	0
Female	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Liver										
Brownish		0	0	0	6	6	0	0	0	0
Enlargement		0	1	0	0	6	0	0	0	2
Granular, surface		0	1	0	0	0	0	0	0	0
Hepatodiaphragmatic nodule		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Kidney										
Cyst, multiple		0	1	0	0	0	0	0	0	0
Dilatation, pelvis		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Ovary										
Cystic dilatation, bursa		0	0	0	0	0	1	0	0	0
Uterus										
Cyst		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Thyroid										
Enlargement		0	0	0	0	2	0	0	0	2
Adrenal										
Enlargement		0	0	0	1	6	0	0	0	0

Table 5 Summary of histopathological findings of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Period	Male							
		28day					Recovery		
		0	4	20	100	500	0	100	500
Organ findings	Dose level (mg/kg)	6	6	6	6	6	6	6	6
	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Liver	(Grade)								
Fibrosis, focal	total	1	0	0	0	0	0	0	0
	1+	1	0	0	0	0	0	0	0
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	total	0	0	0	2	6**	0	0	0
	1+	0	0	0	2	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	6	0	0	0
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, focal	total	1	0	1	1	1	1	0	1
	1+	1	0	1	1	1	1	0	1
Microgranuloma	total	4	4	4	2	3	5	4	4
	1+	4	4	4	2	3	5	4	4
Necrosis, focal	total	0	0	0	0	0	1	0	0
	1+	0	0	0	0	0	1	0	0
Polycystic disease	total	0	0	0	1	0	0	0	0
	2+	0	0	0	1	0	0	0	0
Kidney									
Basophilic tubule	total	4	4	4	2	4	5	6	4
	1+	4	4	4	2	4	5	6	3
	2+	0	0	0	0	0	0	0	1
Cast, hyaline	total	2	0	0	0	0	0	0	0
	1+	2	0	0	0	0	0	0	0
Cyst	total	0	0	0	0	0	0	1	0
	1+	0	0	0	0	0	0	1	0
Eosinophilic body, tubular epithelium, proximal	total	0	0	0	0	1	0	1	4*
	1+	0	0	0	0	1	0	1	3
	2+	0	0	0	0	0	0	0	1
Hyaline droplet, tubular epithelium, proximal	total	6	6	6	6	6*	6	6	6
	1+	6	6	6	6	2	6	6	4
	2+	0	0	0	0	4	0	0	2
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, focal	total	0	2	0	1	0	2	1	0
	1+	0	2	0	1	0	2	1	0
Polycystic disease	total	0	0	0	1	0	0	0	0
	2+	0	0	0	1	0	0	0	0
Thyroid									
Ectopic thymic tissue	total	0	0	0	1	0	1	0	0
	1+	0	0	0	1	0	1	0	0
Hypertrophy, follicular cell	total	0	0	0	2	6**	0	2	3*
	1+	0	0	0	2	6	0	2	3
Adrenal									
Increase in lipid droplet, fascicular zone	total	0	0	0	0	6**	0	0	0
	1+	0	0	0	0	6	0	0	0

1+, Slight; 2+, Moderate; 3+, Severe.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*, P&lt;0.05; \*\*, P&lt;0.01.



Table 5 Summary of histopathological findings of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

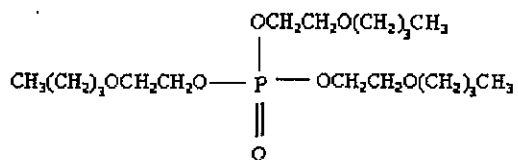
Organ findings	Sex	Female							
	Period	28day					Recovery		
	Dose level (mg/kg)	0	4	20	100	500	0	100	500
	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Liver	(Grade)								
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	total	0	0	0	4*	6**	0	1	2
	1+	0	0	0	4	0	0	1	2
	2+	0	0	0	0	6	0	0	0
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, focal	total	0	0	0	2	1	1	1	0
	1+	0	0	0	2	1	1	1	0
Microgranuloma	total	5	2	4	4	4	2	4	6*
	1+	5	2	4	4	4	2	4	6
Polycystic disease	total	0	1	0	0	0	0	0	0
	2+	0	1	0	0	0	0	0	0
Kidney									
Basophilic tubule	total	1	0/1 <sup>s</sup>	#	0/1	1	#	#	#
	1+	1	0/1	#	0/1	1	#	#	#
	2+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
Cast, hyaline	total	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
Cyst	total	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
Dilatation, pelvis	total	0	0/1	#	1/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	1/1	0	#	#	#
Eosinophilic body, tubular epithelium, proximal	total	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	2+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
Hyaline droplet, tubular epithelium, proximal	total	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	2+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, focal	total	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
Mineralization, papilla	total	1	0/1	#	0/1	1	#	#	#
	1+	1	0/1	#	0/1	1	#	#	#
Polycystic disease	total	0	1/1	#	0/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	2+	0	1/1	#	0/1	0	#	#	#
Thyroid									
Ectopic thymic tissue	total	1	0	0	0	0	0	1	2
	1+	1	0	0	0	0	0	1	2
Hypertrophy, follicular cell	total	0	0	0	2	5**	0	0	1
	1+	0	0	0	2	5	0	0	1
Adrenal									
Increase in lipid droplet, fascicular zone	total	0	0	0	0	6**	0	0	0
	1+	0	0	0	0	6	0	0	0

1+, Slight; 2+, Moderate; 3+, Severe.

#, Not examined. \$, Number of animals showing the finding/Number of animals examined.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*, P&lt;0.05; \*\*, P&lt;0.01.

Molecular structure:



Empirical formula:  $\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{P}$

Relative molecular mass: 398.54

Common name: tris(2-butoxyethyl) phosphate

Synonyms: phosphoric acid, tris(2-butoxyethyl) ester;  
tri(2-butoxyethanol) phosphate;  
tris(2-*n*-butoxyethyl) phosphate;  
tributoxyethyl phosphate; TBOP; TBEP; TBXP  
(only in Japanese literature);  
2-butoxyethanol phosphate (RTCES, 1989);  
tri(2-butylethylether) phosphate;  
tris(butylglycol) phosphate; tributyl cello  
solve phosphate

Trade names: Kronitex KP-140; KP-140; Phosflex T-BEP;  
Phosflex 176C; Amgard TBEP

CAS registry number: 78-51-3

CAS name: Ethanol, 2-butoxy, phosphate (3:1)

EINECS number: 201-122-9

RTECS number: KJ9800000

#### A2.2 Physical and chemical properties

TBEP is a technical product that may contain as impurities tributyl phosphate (about 3%) and traces of 2-butoxyethanol and phosphoric acid (FMC, 1990; Albright & Wilson (1999) personal communication to IPCS). There is no information on the concentration of mono- or diesters or other impurities in the technical product.

TBEP is a light-coloured, high-boiling, non-flammable viscous liquid with a butyl-like odour under normal conditions. It is more soluble in non-polar than in polar solvents.

Boiling point: 200-230°C at 5.0-5.3 hPa

Melting point: -70°C

Density: 1.02 g/ml at 20°C

Viscosity: 11-15 mPa.s at 20°C

Vapour pressure:  
at 25°C  $2.8 \times 10^{-7}$  hPa  
at 150°C 0.33 hPa (0.03 mmHg)

Refractive index: 1.434 at 25°C

Solubility: 1.1-1.3 g/litre water at 20°C; miscible  
in petroleum at 20°C

Acidity/alkalinity: (1 g/litre water at 20°C)	neutral
Flashpoint:	210°C (approximately); 159 ± 2°C
Ignition point:	251-52°C
Auto-ignition temperature:	322 ± 5°C; 261°C
Log $K_{oc}$ :	4.38 (calculated)
<i>n</i> -Octanol/water partition coefficient:	4.78 (calculated); 3.65

References: Eldefrawi et al. (1977); Keith & Walters (1985); Laham et al. (1985b); Hoechst (1987); Watts & Moore (1988); Leo (1989); FMC (1990); Hinckley et al. (1990); Lenga (1993); Tremain & Bartlett (1994).

#### A2.3 Conversion factors

1 ppm = 16.53 mg/m<sup>3</sup> at 20°C  
1 mg/m<sup>3</sup> = 0.0605 ppm at 20°C

#### A2.4 Analytical methods

TBEP is usually analysed by gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (MS), infrared spectroscopy or nuclear magnetic resonance spectrometry. The detection limit is <1 ng/g (adipose tissue) using any of these methods or a nitrogen/phosphorus-selective detector (LeBel et al., 1981; Rivera et al., 1987).

##### A2.4.1 Air

TBEP has been found associated with particulate matter in the air of offices. Of the methods that can be used to collect the particles, Weschler (1980) used a four-stage impactor with a back-up filter and extracted with a mixture of water and methanol. Later Weschler (1984) and Weschler & Fong (1986) collected particles on Teflon(R) membranes, separating the particles according to whether the aerodynamic diameter was greater or less than 2.5 µm. The samples were analysed by GC/MS after thermal desorption of the collector membranes. Sometimes samples were desorbed or dissolved with toluene.

##### A2.4.2 Water

TBEP has been extracted either with dichloromethane after acidification to pH 2 or by passage through a column filled with Amberlite XAD-2 resin which is subsequently extracted with acetone and hexane. After dehydration and concentration, extracts are analysed. The concentrated extracts are determined by GC/MS, or with other detection methods, as described above (LeBel et al., 1981; Watts & Moore, 1988). LeBel et al. (1987) used large-volume resin sampling cartridges to obtain sufficient organic extracts from water for analysis. Recovery at 10 ng TBEP/litre fortification level was 103.4%.

Frimmel et al. (1987) described an analytical method to determine TBEP in water by extracting TBEP with granulated activated carbon and analysing the extract with GC/MS.

Rivera et al. (1987) analysed water samples with different

procedures, liquid-liquid extraction, adsorption on granular activated carbon, extraction with dichloromethane, followed by GC/MS/DS (Daughter spectral) detection. Ether-insoluble organic fractions were analysed and fractionated by high-performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet absorbency detection was carried out with a 2140 diode-array detector, followed by fast atom bombardment (FAB) and FAB-collision-induced dissociation - mass analysis kinetic energy spectroscopy (CID-MIKES) mass spectrometry.

#### A2.4.3 Sediment

After decanting the supernatant water, the sediment samples are mixed with an equal volume of pre-extracted anhydrous sodium sulfate and transferred to a Soxhlet thimble. Soxhlet extraction is carried out overnight using dichloromethane (300 ml) (Watts & Moore, 1988).

#### A2.4.4 Soils and foodstuffs

There are no reports of extraction or clean-up methods for soil or food (ECETOC, 1992b).

#### A2.4.5 Biological media

LeBel & Williams (1983b, 1986) and LeBel et al. (1989) analysed human adipose tissue for TBEP by extraction with a mixture of acetone/hexane in the presence of anhydrous sodium sulfate. The solution was centrifuged and the supernatant filtered and evaporated. The resulting extract was dissolved in a mixture of 5% dichloromethane in cyclohexane for gel permeation chromatography (GPC) to separate residual lipids from phosphate esters. Using this method the recovery of TBEP from adipose tissue was approximately 90%.

Anderson et al. (1984) measured peaks of TBEP determined by HPLC in spiked samples of serum during the development of an analytical refinement. There was a marked inter-individual variation in peak height, which correlated with serum lipoprotein concentration.

### A3. SOURCES OF HUMAN AND ENVIRONMENTAL EXPOSURE

#### A3.1 Natural occurrence

TBEP has not been found to occur naturally in the environment (ECETOC, 1992b).

#### A3.2 Anthropogenic sources

##### A3.2.1 Production levels and processes

TBEP is produced by reacting phosphorus oxychloride and butoxyethanol (butyl glycol) and stripping hydrochloric acid and excess of butoxyethanol. Another production method uses the sodium salt of the glycol. In this case, the by-product is sodium chloride (ECETOC, 1992b).

The world global production has been estimated to be 5000-6000 tonnes, with less than 1000 tonnes in Europe.

##### A3.2.2 Uses

TBEP is used mainly as a component in floor polishes, a solvent in some resins, a viscosity modifier in plastisols, an antifoam and also as a plasticizer in synthetic rubber, plastics and lacquers. TBEP is widely used as a plasticizer in rubber stoppers for vacutainer

tubes and plastic ware.

#### A4. ENVIRONMENTAL TRANSPORT, DISTRIBUTION AND TRANSFORMATION

##### A4.1 Transport and distribution between media

All environmental TBEP derives from human activities but the input rate to the environment cannot be estimated from the available data. The input is expected to be mainly to soil, sediments and surface waters from leachates from plastics on landfills, from spillages and from effluents (ECETOC, 1992b).

The low vapour pressure, the high soil sorption coefficient ( $K_{oc}$ ) and the water solubility of approximately 1 g/litre suggests that TBEP in the environment will be found mainly in water and sediment. TBEP has been detected in surface water and sediments (ECETOC, 1992b).

##### A4.2 Biodegradation

No data are available on mechanisms of abiotic or biotic transformation. Analogy with other phosphate esters suggests that enzymatic hydrolysis would be expected to dominate (ECETOC, 1992b).

TBEP was readily biodegradable when tested in the OECD 301B assay, achieving 87% degradation within 28 days (Mead & Handley 1998).

In a test of primary biodegradation using the semi-continuous activated sludge procedure and an addition rate of 3 mg TBEP/litre per test cycle, 88% of TBEP was eliminated. The ultimate biodegradability (using the Monsanto shake-flask procedure) was 51% of the theoretical  $CO_2$  generated after 28 days (Monsanto, 1976).

Hattori et al. (1981) studied the degradation of TBEP in environmental water in 1979-1980. Using the molybdenum blue colorimetric method, the increase of phosphate ions was analysed in Oh and Neya river water and seawater from Osaka Bay to which 1 mg TBEP/litre had been added. The degradation depended on the source of the water (Table 1).

Table 1. Biodegradation of TBEP in water in percentages  
(from Hattori et al., 1981)

Test duration (days)	Oh River	Neya River	Osaka Bay	
			Tomagashima seawater	Senboku seawater
7	29.1	0	1.9 <sup>a</sup>	0
14	100 <sup>b</sup>	100	17.6	100

<sup>a</sup> Test duration 8 days

<sup>b</sup> Test duration 15 days

A sterilized distilled water control did not show any degradation after 15 days. TBEP was rapidly degraded in less than 14 days after an acclimatization period of several days in water containing micro-organisms. Where degradation was rapid, the phosphatase activity increased during the test period.

TBEP was eliminated from estuarine water with a half-life of

approximately 50 days (Ernst, 1988).

#### A4.2.1 Migration

LeBel & Williams (1983a) investigated the difficulties of obtaining representative water samples and the importance of designing suitable sampling protocols. TBEP was detected in tap water at concentrations from 11.0 to 5400 ng/litre. The authors suggested that the TBEP originated from the O-ring and seal in the tap.

### A5. ENVIRONMENTAL LEVELS AND HUMAN EXPOSURE

#### A5.1 Environmental levels

##### A5.1.1 Air

An indoor aerosol sample was collected in a large building in New Jersey, USA. The abundance of TBEP was greatest both for particles larger than 7.0  $\mu\text{m}$  diameter and for those smaller than 1.1  $\mu\text{m}$ ; there was considerably less material present in the intermediate size ranges. This pattern is consistent with its use in floor polish. Buffing operations generate relatively large particles which are likely to contain TBEP. However, this compound may also migrate from the floor polish and be attached to particles. In this case the majority of the adsorbed TBEP would accumulate in the submicron size range (Weschler, 1980). The mean concentrations measured in representative samples of dust from air in 7 offices in the USA was reported to be 15 ng/m<sup>3</sup> (Weschler & Shields, 1986). The significance of floor polish, which may contain 1% TBEP (Nakashima et al., 1993), as a source of these particulates is suggested by the fact that the highest concentration measured (25 ng/m<sup>3</sup>) was found immediately following floor polishing work by a night crew.

Airborne concentrations of fine (2.5  $\mu\text{m}$ ) and coarse aerosol (2.5-15  $\mu\text{m}$ ) particles were simultaneously measured outside and inside two buildings, one in Wichita, Kansas, USA, during the fall and early winter (1981-1982) and the second one in Lubbock, Texas, USA, during late winter and spring 1982. The average indoor concentrations of TBEP in Wichita and Lubbock were 4 and 25 ng/m<sup>3</sup>, mainly in fine aerosol particles. TBEP was not found in outdoor aerosol particles (Weschler, 1984).

Yasuda (1980) reported the results of a study of 19 outdoor air samples from 7 locations in 1976. Two samples from Kawauchi Town contained 149.1 and 176.8 ng TBEP/m<sup>3</sup> and one from Ehime University 9.6 ng TBEP/m<sup>3</sup>. TBEP was not detected in the other 16 samples.

##### A5.1.2 Water (drinking-water and surface water)

Levels of TBEP have been determined in rivers, sewage, tap water, lakes and estuaries. The investigations have been carried out in the Great Lakes area of Canada, USA, Japan, Germany and the United Kingdom.

The lower part of the River Weser (over 33 km), Germany, was examined for the presence of TBEP during the period May 1985 to April 1987. TBEP was found at a mean concentration of 125 ng/litre. Systematic measurements of effluent samples from five sewage treatment plants in the Bremen region showed concentrations of TBEP ranging from 800 to 34 900 ng/litre (Bohlen et al., 1989).

Ernst (1988) analysed water of the estuary of the Rivers Elbe and Weser, Germany, for the presence of TBEP during the period 1983-1985.

The concentrations that were found ranged from 5 to 70 ng/litre.

One hundred samples of surface water were collected from various locations throughout Japan in 1975 and analysed for the presence of TBEP. TBEP was identified in none of the samples (the limit of determination ranged from 0.02 to 0.5 µg/litre). In 1978, 114 samples were analysed in Japan and TBEP was not identified (the limit of determination ranged from 0.005 to 1.5 µg/litre) (Environmental Agency Japan, 1978, 1983, 1987).

In a survey conducted between 1989 and 1990, Fukushima et al. (1992) identified TBEP in Lake Biwa, Yodo River and also in the Yamato Osaka Rivers and Osaka Bay at levels of about 0.2-2.5 µg/litre.

Drinking-water was collected in Japan over a 12-month period and analysed. Concentrations ranging up to 0.0585 ng/litre were found (Adachi et al., 1984).

Two samples of drinking-water collected from six Eastern Ontario water treatment plants in the period June-October 1978 contained 0.9-75.4 ng/litre (LeBel et al., 1981). In another study two samples of drinking-water were collected from five Great Lakes water treatment plants of Eastern Ontario and analysed for TBEP. The concentration found in surface water samples ranged from 9.8 to 54.4 ng/litre as determined by GC/MS. When determined by GC/NPD, concentrations of 0.4 to 73.8 ng/litre were found (LeBel et al., 1987).

Williams et al. (1982) collected samples of drinking-water from 12 Ontario municipal water treatment plants which draw their water from the Great Lakes system in January and August 1980. All samples contained TBEP at concentrations ranging from 1.6 to 271.6 µg/litre. The authors noted that TBEP is a common constituent of rubber gaskets and washers and can be introduced into water from components of the tap used for sampling.

In 1983, LeBel et al. (1983a) found up to 5400 ng/litre in a sample of drinking-water taken after non-use of the tap for 65 h.

In the period August 1976 to March 1977, 16 grab samples of river water were collected from the Delaware River, USA (between river mile 78 and 132). In addition to other compounds, TBEP was identified in all samples. The concentrations ranged from 0.3 to 3.0 µg/litre in the winter and from 0.4 to 2.0 µg/litre in the summer (Sheldon & Hites, 1978).

#### A5.1.3 Soils and sediment

TBEP was detected in 7 out of 80 samples of sediment collected at different locations in Japan in 1975. The concentrations ranged from 0.22 to 0.54 mg/kg and the limit of determination was 0.002-0.1 mg/kg. In 1978, none of the 114 sediment samples collected at different places in Japan contained TBEP (limit of determination 0.0005-0.12 mg/kg) (Environmental Agency Japan, 1978, 1983).

Watts & Moore (1988) did not detect TBEP in suspended particles or bottom sediments in a river in the United Kingdom, even though TBEP was found in corresponding water columns.

#### A5.1.4 Aquatic organisms

No TBEP could be detected in 74 samples of fish from numerous locations throughout Japan (limit of determination 0.005-0.1 mg/kg). Another report from the same agency stated that TBEP was not found in 93 fish samples (limit of determination 0.0005-0.15 mg/kg)

(Environmental Agency Japan, 1978).

#### A5.2 Human tissue levels

LeBel & Williams (1983b) analysed 16 samples of human adipose tissue for TBEP. Four of sixteen samples contained TBEP at concentrations of 4.0-26.8 µg/kg. LeBel & Williams (1986) reported the results of 115 human adipose tissue (omentum) samples for TBEP, obtained at autopsy of humans from the Eastern Ontario cities, Kingston and Ottawa, Canada. TBEP was detectable in 21 out of 68 male adipose tissue samples and in 20 out of 47 female samples. Although the frequency of detection was similar in the two cities, mean concentrations in Ottawa were about 2.5 times those in Kingston. In both cities the concentrations in women were 2-3 times greater than in men. The arithmetic mean concentration of TBEP in the 41 detectable samples was 11.3 µg/kg in extracted fat (in males 6.3 µg/kg and in females 16.6 µg/kg). The mean concentration overall was 4.2 µg/kg in extracted fat. In a different study, LeBel et al. (1989) showed the presence of TBEP in human adipose tissue autopsy samples from 3 out of 6 Ontario (Canada) municipalities (based on a detection limit of 20 ng/g). No statistical difference between sexes was found, the mean concentration being  $396 \pm 56$  ng/g in Toronto and  $173 \pm 32$  ng/g in Cornwall.

#### A5.3 Food

In a series of articles Gunderson (1988, 1995a,b) reported data on daily intake of TBEP for a range of age groups and for a period between 1982 and 1991 from the USA FDA Total Diet Study (see Table 2).

Similar data were collected in a parallel study on ready-to-eat food from 1982 to 1991. TBEP was found in 5 out of 230 food items (baby food, ketchup, grapefruit juice, strawberries, tomatoes) and in 5 out of 17 050 chemical or pesticide samples, with an average concentration per residue of 0.28 µg/g (Kan-Do Office and Pesticides Team, 1995).

#### A5.4 Occupational exposure

The only data on occupational exposure to TBEP is from an office environment. Weschler & Shields (1986) measured a mean concentration of 15 ng/m<sup>3</sup> in dust samples from some offices in the USA. NIOSH (USA) has estimated that the number of workers exposed to TBEP is more than 200 000.

Table 2. Mean daily intake of TBEP per unit body weight (µg/kg body weight p according to age and gender

	6-11 months old	2 years old	14-16 years old		25-30 years o	
			females	males	females	ma
1982-1984	0.0029	0.0144	0.0084	0.0077	0.0129	0.
1984-1986	0.0002	0.0015	0.0007	0.0011	0.0004	0.
1986-1991	0.0052	0.0037	0.0012	0.0011	0.0020	0.



## A6. KINETICS AND METABOLISM IN LABORATORY ANIMALS AND HUMANS

No data are available on the kinetics or metabolism of TBEP either in animals or humans.

The Task Group considered that 2-butoxyethanol is a metabolite. Information on the toxicity of 2-butoxyethanol is given in IPCS (1998).

## A7. EFFECTS ON LABORATORY MAMMALS AND IN VITRO TEST SYSTEMS

## A7.1 Single exposure

## A7.1.1 Oral and dermal

The acute toxicity of TBEP following oral or dermal administration is low (Table 3).

Table 3. Acute toxicity of TBEP

Species	Route	LD <sub>50</sub> (mg/kg body weight)	Reference
Rat	oral	3000	Eldefrawi et al. (1977)
Rat	oral	4700	Monsanto (1984c)
Rabbit	dermal	>5000	Gabriel (1980c)
Rabbit	dermal	>10 000	Report ICD/T.76.019 by FMC Corporation, Princeton, NJ, USA (1976)

An acute oral toxicity study was conducted according to the "fixed dose" procedure. Two out of three male rats but no females died at 5000 mg/kg body weight; no rats died at 500 mg/kg body weight. Signs of toxicity included chromorrhoea, dyspnoea and decreased locomotion (Freeman, 1991a).

## A7.1.2 Inhalation

The median lethal concentration in air has been investigated in a 4-h aerosol inhalation test (Hoechst, 1989). Groups of five male and five female Wistar rats were exposed to measured TBEP concentrations of 3.3, 3.4 or 6.4 mg/litre. No animal died but at all concentrations the animals exhibited depressed and irregular respiration, increased salivation, sneezing, unsteadiness and tremor, but these symptoms had cleared in most animals 9 days later. There were no body weight changes and gross necropsy revealed no abnormality. The 4-h LC<sub>50</sub> was thus >6.4 mg/litre.

The 4-h LC<sub>50</sub> in rats was reported to be greater than 4.43 mg/litre determined gravimetrically (particle size 2.46 ± 2.52 µm) (Mount 1991).

## A7.2 Short-term repeated exposure

## A7.2.1 Oral

In a 14-day oral dosing regime using male and female rats, where the highest dose was 100 mg/kg body weight per day, a comprehensive

biochemical, haematological and histopathological evaluation showed no changes (Komsta et al., 1989).

In a 4-week study, diets containing 0, 500, 2000, 7500 or 15 000 mg TBEP/kg were fed to male and female Sprague-Dawley rats. No signs of toxicity were found in male rats of any group whereas there was a slight decrease in body weight and food consumption in females receiving diets containing 7500 or 15 000 mg/kg diet. No compound-related changes were observed at necropsy (Monsanto, 1985a).

In a 14-week oral toxicity study with TBEP, Wistar rats (5 weeks old, male and female, 15 rats/group) were given a diet containing 0, 0.3, 3 or 30 g TBEP/kg. Suppression of body weight gain was observed in both sexes at 30 g/kg. Serum cholinesterase activity was significantly decreased in both sexes at 3 and 30 g/kg, and serum gammaglutamyl transferase activity was significantly increased in both sexes at 30 g/kg. Examination of the liver in both sexes revealed moderate periportal hepatocyte swelling in male rats at 30 g/kg after 14 weeks of exposure but this change was not found in male rats given 3 g/kg or less. The no-observed-effect level (NOEL) of TBEP in the diet was 0.3 g/kg diet (for males 20 mg/kg body weight per day and for females 22 mg/kg body weight per day. The Task Group considered the NOAEL of this study to be 3 g/kg diet (Tsuda et al., 1993; Saitoh et al., 1994).

In a gavage study, groups of 12 male and 12 female Sprague-Dawley rats were administered 0, 0.25 or 0.5 ml/kg body weight undiluted TBEP on 5 days/week for 18 weeks. During the first week, two high-dose females showed muscular weakness and ataxia which had disappeared by the end of the fourth week. After about 7 weeks, nearly all animals exhibited some signs of toxicity, which seemed to be treatment related. All treated animals appeared less active, and one female died during week 13. Breathing difficulties and ataxia were present in several males and females in both treatment groups, though the low-dose group was affected to a lesser extent. Tremors, piloerection, lacrimation and increased urination were observed in both males and females of the high-dose group. After the last dose, the clinical signs observed in the high-dose group decreased in intensity. High-dose females had significantly elevated level of serum gamma-glutamyltransferase. Red cell acetylcholinesterase (AChE) activity was significantly reduced in males at both doses. There were no haematological changes. Animals were necropsied one week after the last dose. Liver weight was significantly increased (about 20%) in both high- and low-dose groups. Kidney weight was increased by about 20% in both groups and the increase was statistically significant in high-dose groups. Histopathological changes were confined to the heart of male rats of both groups. Three of six high-dose and two of six

low-dose animals had multiple foci of mononuclear cell infiltration, haemorrhages and/or myocardial fibre degeneration. Two of six high-dose, three of six low-dose and one of six control rats demonstrated multifocal interstitial fibrosis with or without macrophage containing haemosiderin pigment. The authors concluded that TBEP may have accelerated the development of focal myocarditis, which is a normal feature of older male Sprague-Dawley rats. A NOAEL was not ascertained in this study (Laham et al., 1984a, 1985a).

In an 18-week study, four groups of 20 male and 20 female Sprague-Dawley rats were fed diets containing 0, 300, 3000 or 10 000 mg TBEP/kg. Body weight, food intake and clinical observations were similar in treated and control rats. Haematological and clinical chemistry parameters were normal except for increased platelet counts in the 10 000 mg/kg group, and increased serum gamma-glutamyl-transpeptidase and decreased plasma cholinesterase

activity in the 3000 and 10 000 mg/kg groups. Liver weight was increased in the 10 000 mg/kg group. Microscopic examination showed mild periportal hepatocellular hypertrophy and periportal vacuolization in males receiving 3000 and 10 000 mg/kg in the diet. The NOEL was 300 mg/kg diet, equivalent to 15 mg/kg body weight per day (Monsanto, 1987a).

#### A7.2.2 Dermal

In a 21-day dermal toxicity study on New Zealand White rabbits, groups of 6 male and 6 female animals were treated with TBEP applications of 0, 10, 100 or 1000 mg/kg body weight per day, 5 days/week for 3 weeks. The unabraded dorsal clipped skin was used. The tests sites were occluded for 6 h after each exposure. No animals died and no adverse clinical signs of pharmacological/toxicological effects were observed. There was no indication that dermal exposure to 1000 mg/kg body weight per day resulted in any adverse systemic effect, but local irritation, oedema, atonia and desquamation occurred at all dose levels (Monsanto, 1985b).

#### A7.3 Skin and eye irritation; sensitization

In three studies TBEP was non-irritating to intact and abraded skin when applied topically to albino rabbits. (Gabriel 1980b; Monsanto, 1984c; Freeman, 1991b).

In the 21-day dermal toxicity study on New Zealand White rabbits, slight to moderate erythema was noted. The skin irritation was dose-related and severity progressed over time. Microscopic observations of the skin (of the 1000 mg/kg group) showed squamous cell hyperplasia, hyperkeratosis, hair follicles distended with keratin and surface accumulation of keratin and cellular debris, erosions ulcers, acute/subacute inflammation and congestion and haemorrhages in various combinations (Monsanto, 1985b) (see also section A7.2.2).

In four studies TBEP was non-irritating to the eyes of albino rabbits (Gabriel 1980a; Monsanto, 1984c; Freeman, 1991c; personal communication from Hoechst AG, Frankfurt, Germany entitled: Eye irritation test on New Zealand rabbit with TBEP, 1988).

No animal data are available on skin sensitization potential.

#### A7.4 Reproductive toxicity, embryotoxicity and teratogenicity

TBEP was administered by gavage in corn oil to three groups of 25 mated Charles River CD female rats at dose levels of 0 (corn oil), 250, 500 or 1500 mg/kg body weight per day on days 6 to 15 of gestation. The treatment had no effect at any dose level on fetal resorption, fetal viability, post-implantation loss, total implantations or the incidence of fetal malformations. The NOEL was the highest dose level tested, 1500 mg/kg body weight (Monsanto, 1985e). In an earlier range-finding study maternal weight loss was observed in animals receiving 2000 mg/kg but not 1000 mg/kg body weight per day (Monsanto, 1985d).

#### A7.5 Mutagenicity and related end-points

A mutagenicity test was carried out with *Salmonella typhimurium* strains TA1535, TA1538, TA1537, TA98 and TA100, with and without metabolic activation. Liver S9 fractions were used from male Sprague-Dawley rats or from male Syrian hamsters induced by Aroclor 1254. TBEP was non-mutagenic (MacKeller, 1978)

TBEP was tested for mutagenic activity with *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535 and TA1537, in the presence and absence of rat liver metabolic system, in comparison with positive controls. The concentrations tested were 0, 50, 100, 500, 1000, 5000 and 10 000 µg/plate with and without S9. Toxicity to strain TA100 was observed at 5000 and 10 000 µg/plate in the presence and absence of metabolic activation. The same effect was seen at 10 000 µg/plate with TA1535 and TA98 in the absence of S9 mix. TBEP did not cause any mutagenic response either with or without metabolic activation (Monsanto, 1984d).

A CHO/HGPRT mammalian cell forward gene mutation assay with TBEP was carried out. The tests were conducted at 50, 100, 150, 225 and 300 µg/ml with S9 and at 5, 50, 75, 100 and 130 µg/ml without S9. TBEP was not mutagenic (Monsanto, 1985c).

#### A7.6 Carcinogenicity

No data on the carcinogenicity of TBEP are available.

#### A7.7 Special studies

##### A7.7.1 Neurotoxicity

###### A7.7.1.1 Acute administration

An acute delayed neurotoxicity study was carried out using groups of 20 hens. Dermal or oral (in gelatin capsules) TBEP doses of 5000 mg/kg body weight were administered at the start of the study and again 21 days later. Positive control hens were given 750 mg/kg body weight of tri-*ortho*-cresyl phosphate (TOCP) at the same time intervals. Negative controls were either untreated (dermal study) or given empty capsules (oral study). All hens were treated with 15 mg/kg body weight of atropine sulfate three times a day for 5 days following each dosing. Hens were killed 21 days after being given the final dose, and histological preparations were made from brain, spinal cord and peripheral nerves. No treatment-related lesions were detected in the nerves of TBEP-treated hens. TBEP had no effect on neuropathy target esterase (NTE). Brain and plasma cholinesterases were inhibited in treated hens (Carrington et al., 1990).

In another study, groups of five hens were treated orally with TBEP (5000 mg/kg), with TOCP (750 mg/kg) as positive control group, or with the capsules alone. The animals were killed 24 h after treatment. Brain AChE, brain neuropathy target esterase (NTE) and plasma butyrylcholinesterase (BuChE) activity was measured. No differences were seen between control and TBEP-treated brain NTE activity, although plasma BuChE and brain AChE levels in TBEP-treated hens were depressed to 5% and 13% of the control group, respectively (Monsanto, 1986).

Laham et al. (1985b) reported the results of the administration by gavage to Sprague-Dawley rats of a single dose of TBEP (98.2%). Groups of randomized female and male rats (10 rats of each sex per dose level) were used. The doses were 1.0, 1.5, 1.75, 2.0 and 3.2 g/kg for females and 1.0, 3.2, 6.8, 8.0 and 9.0 g/kg body weight for males. Three weeks after the administration of TBEP, electrophysiological parameters were determined in four or less surviving animals for each group, selected from survivors showing overt clinical signs. Reductions in caudal nerve conduction velocity and increases in refractory period (in males) were observed. Sciatic nerve sections showed degenerative changes in some myelinated and unmyelinated fibres. It should be noticed that the doses were in the region of or greater than the LD<sub>50</sub>. There was a high mortality. Survivors were ill

and had marked weight loss.

The Task Group considered this study of inadequate quality for use in risk evaluation.

A study of similar design as the oral study of Monsanto (1986) but with dermal application of 5000 mg/kg body weight both on day 0 and on day 21 showed no clinical signs of toxicity in chickens (Monsanto, 1986).

#### A7.7.1.2 Repeated oral administration

In a 14-day repeated-dose study on Sprague-Dawley rats dosed at 0.8 to 2.24 ml/kg body weight (0.8-2.28 g/kg), electro-physiological measurements were made on days 15 and 28. Apart from a significant decrease in the body weight of low-dose females at 7 days, there were no clinical signs or significant differences between dosed groups and controls in the 14-day study. Minor and inconsistent changes in electro-physiological parameters were reported. No morphological changes were found using light or electron microscopy (Laham et al., 1984b).

A second study (Lahman et al., 1984a) involved dosing on 5 days per week for 18 weeks at dose levels of 0 (0.5 ml water), 0.25 and 0.5 ml/kg body weight (0.25-0.51 g/kg) with observations at 6, 12 and 18 weeks. There were no significant body weight differences between exposed groups and their controls at any stage. A few females (2/12) from the high-dose group showed, at the beginning of the experiment, transient muscular weakness and ataxia which disappeared 4 weeks later. In the second half of the study almost all treated animals exhibited tremors, piloerection, lacrimation and increased urination. Males were less affected than females.

Electro-physiological changes were observed at 18 weeks in all test animals (Table 4) and included a statistically significant reduction in nerve conduction velocity and a significant increase of both relative and absolute refractory periods. The increased refractory period and the decreased conduction velocity were dose-related in females, but in males the maximum effect appears to have been reached by the low dose, suggesting that the magnitude of the maximum attainable neurophysiological changes is modest. Three animals of each sex at each dose level were examined for neurohistological abnormalities by light and electron microscopy of the sciatic nerve. Most of the treated animals showed the presence of some degenerative myelin sheaths accompanied by axonal swelling and an advanced stage of degeneration, indicated by the presence of lamellated electron-dense inclusions in unmyelinated nerve fibres (Laham et al., 1984a).

In the 18-week studies of Monsanto (1987a,b), TBEP was administered to four groups of 20 male and 20 female Sprague-Dawley rats at concentrations of 0, 300, 3000 and 10 000 mg/kg diet for approximately 18 weeks. No clinical signs of neurotoxicity were observed. The only neurophysiological alteration observed was reduced caudal nerve conduction velocity in high-dose females, and there were no treatment-related changes in peripheral nerve or spinal cord histopathology.

Table 4. Electro-physiological parameters at 18 weeks in rats treated with (Laham et al., 1984a)<sup>a</sup>

Control (water)

Low-dose TBEP

	Males	Females	Males	Females	Ma
Number of animals	12	12	12	12	12
Dose (ml/kg per day)	-	-	0.25	0.25	0.
Nerve conduction velocity (m/s)	36.3	36.3	30.7 <sup>b</sup>	32.0 <sup>b</sup>	30.
Absolute refractory period in caudal nerve (ms)	1.02	0.95	1.24 <sup>b</sup>	1.26 <sup>b</sup>	1.2
Relative refractory period in caudal nerve (ms)	2.06	1.93	2.39 <sup>b</sup>	2.33 <sup>b</sup>	2.3

<sup>a</sup> results at 6 and 12 weeks were quantitatively similar to those at 18 weeks

<sup>b</sup>  $p < 0.001$

#### A7.7.1.3 Effects on esterase activity

Laham et al. (1984b) reported a 5-7% reduction in red cell cholinesterase activity at 18 weeks in male rats dosed by gavage with 0.25 or 0.5 ml TBEP/kg body weight per day but no reductions in female rats.

A study was made of the effect of TBEP on NTE, brain AChE and plasma BuChE in three groups of five hens. Each was administered a single oral dose of 5000 mg TBEP/kg body weight. All animals were killed 24 h after treatment. The NTE activity was unchanged but plasma BuChE and brain AChE levels were depressed to 5% and 13%, respectively, of control levels (Monsanto, 1986).

In an acute delayed neurotoxicity study in hens, two doses of 5000 mg TBEP/kg body weight were given 21 days apart, each followed by antidote treatment with atropine. There was no effect on NTE activity, whereas brain AChE and serum BuChE were inhibited (Carrington et al., 1990).

#### A8. EFFECTS ON HUMANS

A repeat human insult patch test on a panel of 209 volunteers was undertaken by Monsanto (1984e). In the 3-week induction period, four applications per week of 0.2 ml of the test material were applied for 24 h to occluded skin. During the fourth week, four similar applications were made to previously untreated sites. During induction, minimal irritation was observed in 9 of the individuals. The irritation was only seen once or twice during the 12 applications. There was no dermal reaction to challenge applications. The results indicate minimal skin irritation and do not indicate any sensitizing potential.

#### A9. EFFECTS ON OTHER ORGANISMS IN THE LABORATORY AND FIELD

##### A9.1 Laboratory experiments

##### A9.1.1 Aquatic organisms

##### A9.1.1.1 Invertebrates

The 24-h and 48-h  $LC_{50}$  values for TBEP in *Daphnia magna* were 84 mg/litre and 75 mg/litre, respectively. The no-observed-effect concentration (NOEC) was 32 mg/litre (Monsanto, 1984a).

#### A9.1.1.2 Vertebrates

The 96-h  $LC_{50}$  in fathead minnow (*Pimephales promelas*) was 16 mg/litre (95% confidence interval 13-22 mg/litre) at 22°C (Monsanto, 1984b). The 48-h  $LC_{50}$  values in killifish (*Oryzias latipes*) at 10, 20 and 30°C were 44 mg, 27 mg and 6.8 mg/litre, respectively (Tsuji et al., 1986).

In goldfish (*Carassius auratus*) Eldefrawi et al. (1977) reported no death at 5 mg/litre after 168 h (temperature 20°C).

In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a 96-h  $LC_{50}$  of 24 mg/litre and a NOEC of 10 mg/litre were reported in a test conducted under OECD guideline 203 (Wetton & Handley, 1998).

## PART B

### TRIS(2-ETHYLHEXYL) PHOSPHATE (TEHP)

#### B. SUMMARY, EVALUATION AND RECOMMENDATIONS

##### B1. Tris (2-ethylhexyl) phosphate (TEHP)

###### B1.1 Summary

Tris(2-ethylhexyl) phosphate (TEHP) is a non-flammable, colourless liquid with low water solubility and very low vapour pressure, which is used as a flame retardant and plasticizer for PVC and cellulose acetate and as a solvent. It is produced from phosphorus oxychloride and 2-ethylhexanol. Figures for current worldwide production are not available. Approximately 1000 tonnes are currently produced in Germany.

TEHP has not been detected in outdoor air; it has been detected in indoor air at concentrations of less than 10 ng/m<sup>3</sup>, in river water at concentrations of up to 7500 ng/litre and in sediments at 2-70 ng/g. TEHP was detected in a single sample of drinking-water at 0.3 ng/litre. Reported daily dietary intake from market basket studies, from a range of age groups, was less than 0.05 µg/kg body weight per day.

TEHP is rapidly biodegraded in natural waters, but in laboratory tests with activated sludge the results were equivocal. There is no significant abiotic degradation.

TEHP has a low acute toxicity for mammals, the oral  $LD_{50}$  being >10 000 mg/kg body weight for rats.

TEHP is a skin irritant but not an eye irritant. Repeated application of 0.1 ml (93 mg) TEHP to the skin of rabbits produced no signs of systemic intoxication.

Thirteen-week gavage studies in rats and mice revealed no significant toxic effects. The no-observed-adverse-effect level (NOAEL) in rats was 2860 mg/kg body weight per day and in mice was

5710 mg/kg body weight per day, the highest dose tested in each species.

In a 3-month inhalation study at concentrations up to 85.0 mg TEHP/m<sup>3</sup>, the lungs of dogs showed mild chronic inflammatory changes, and conditioned avoidance performance deteriorated in relation to the concentration administered.

No studies on reproductive toxicity were available.

TEHP gave negative results in several *in vivo* and *in vitro* tests for mutagenicity.

TEHP was tested for chronic toxicity and carcinogenicity in rats and mice. The NOAEL for chronic toxicity in male rats was 2857 mg/kg body weight per day and in female rats was 1428 mg/kg body weight per day. In male and female mice, the lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL) for thyroid follicular cell hyperplasia was 357 mg/kg body weight per day. A NOAEL in mice was not established. The authors concluded there was some evidence of carcinogenicity based on an increased incidence of hepatocellular carcinomas in female mice at the high-dose level and equivocal evidence of carcinogenicity based on the increased incidence of adrenal phaeochromocytomas in male rats in both dose levels. Although there were increases in adrenal phaeochromocytomas in both dose groups of male rats and in hepatocellular carcinomas in female mice in the high-dose group, these results are not considered to indicate that TEHP presents a significant carcinogenic risk to humans. Phaeochromocytomas show a variable background incidence in rats. The incidences of these tumours in two previous National Toxicology Programme (NTP) bioassays were equal to the incidence observed in the TEHP bioassay. The only other significant neoplastic finding was hepatocellular carcinomas in the high-dose group of female mice. Considering the low incidence of this tumour, its occurrence in only one sex of one species, the lack of evidence of genetic toxicity, and the low exposure of humans to TEHP, it is unlikely that TEHP poses a significant carcinogenic risk to humans.

Neurotoxicity studies have been conducted in several species. TEHP causes no alteration in activity of plasma or red blood cell cholinesterase. No studies on delayed neurotoxicity have been reported.

In a study on human volunteers, no skin irritation was reported.

The few data available indicate a low acute aquatic toxicity of TEHP. The IC<sub>50</sub> for bacteria is greater than 100 mg/litre and the 96-h LC<sub>50</sub> for zebra fish (*Brachydanio rerio*) is greater than 100 mg/litre, which is the solubility limit of TEHP in water.

## B1.2 Evaluation

Occupational exposure to TEHP is likely to be by the dermal route during manufacture (accidental exposure) and from the use of some products. The compound is absorbed dermally in experimental animals but no information is available on its kinetics or metabolism via this route. Dermal exposure cannot, therefore, be quantified but is expected to be low. Inhalation exposure in the office environment has been measured to be 10 ng/m<sup>3</sup> or less.

Exposure of the general population is principally via food and drinking-water. Exposure from both sources is very low (estimated to be <0.05 µg/kg body weight per day from the diet; a single measured



concentration in drinking-water was 0.3 ng/litre).

Given the reported LOAEL for thyroid hyperplasia of 357 mg/kg body weight per day in mice, the risk to the general population is very low. The risk to those exposed occupationally is also considered to be very low, although this cannot be quantified.

TEHP is not considered to be carcinogenic in humans.

In the environment, TEHP is expected (from its low volatility, high adsorption coefficient and low water solubility) to partition to sediment. Measured data are too few to confirm this. Degradation in environmental media is expected, although laboratory data on degradation in sewage sludges are equivocal. No information is available on breakdown products; phosphate released during breakdown is not expected to contribute significantly to environmental nutrient levels. Fig. 2 plots measured environmental concentrations in environmental media against reported acute toxicity values (the latter indicating no toxic effects at the limit of water solubility). The margin of safety between highest reported concentrations and lowest reported toxicity values is several orders of magnitude, indicating low risk to organisms in the aquatic environment. No assessment of risk can be made for the terrestrial compartment.

### B1.3 Recommendations

For full scientific evaluation of the compound, identification and assessment of metabolites in mammals would be required, given the toxicological profile of one of the suggested metabolites, 2-ethylhexanol.

Reproductive toxicity needs to be investigated, in particular the potential for developmental effects.

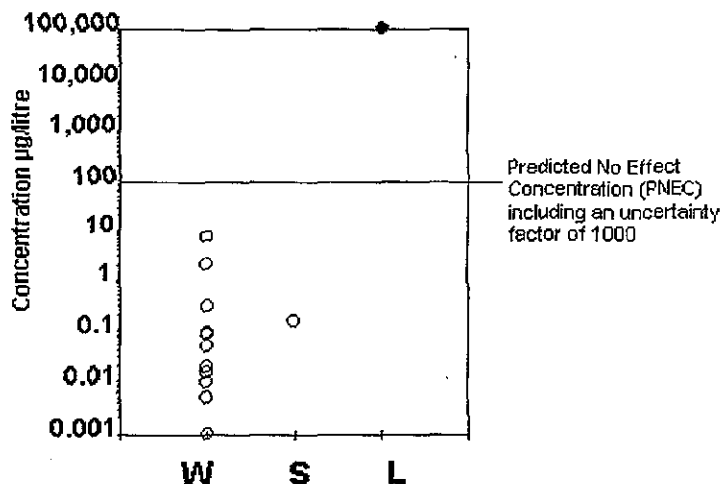


Fig. 2. Plot of measured concentrations in surface waters (W) and sewage effluents (S), and reported acute toxicity values (L) for TEHP (○= measured concentrations in the environment; ●= calculated  $LC_{50}$ )

## B2. IDENTITY, PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES, AND ANALYTICAL METHODS

### B2.1 Identity

Chemical structure:



Home

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME  
INTERNATIONAL LABOUR ORGANISATION  
WORLD HEALTH ORGANIZATION

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY

Environmental Health Criteria 218

FLAME RETARDANTS: TRIS(2-BUTOXYETHYL)  
PHOSPHATE, TRIS(2-ETHYLHEXYL)  
PHOSPHATE AND TETRAKIS(HYDROXYMETHYL)  
PHOSPHONIUM SALTS

This report contains the collective views of an international group of experts and does not necessarily represent the decisions or the stated policy of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, or the World Health Organization.

First draft prepared by Dr G.J. van Esch, Bilthoven, the Netherlands

Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization, and produced within the framework of the Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals.

World Health Organization  
Geneva, 2000

The International Programme on Chemical Safety (IPCS), established in 1980, is a joint venture of the United Nations Environment Programme (UNEP), the International Labour Organisation (ILO), and the World Health Organization (WHO). The overall objectives of the IPCS are to establish the scientific basis for assessment of the risk to human health and the environment from exposure to chemicals, through international peer review processes, as a prerequisite for the promotion of chemical safety, and to provide technical assistance in strengthening national capacities for the sound management of chemicals.

The Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC) was established in 1995 by UNEP, ILO, the Food and

Agriculture Organization of the United Nations, WHO, the United Nations Industrial Development Organization, the United Nations Institute for Training and Research, and the Organisation for Economic Co-operation and Development (Participating Organizations), following recommendations made by the 1992 UN Conference on Environment and Development to strengthen cooperation and increase coordination in the field of chemical safety. The purpose of the IOMC is to promote coordination of the policies and activities pursued by the Participating Organizations, jointly or separately, to achieve the sound management of chemicals in relation to human health and the environment.

#### WHO Library Cataloguing-in-Publication Data

Flame retardants : tris(2-butoxyethyl) phosphate, tris(2-ethylhexyl) phosphate, tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium salts.

(Environmental health criteria ; 218)

1.Organophosphorus compounds - toxicity 2.Phosphoric acid esters - toxicity 3.Flame retardants - toxicity  
4.No-observed-adverse-effect level 5.Environmental exposure  
6.Occupational exposure I.Series

ISBN 92 4 157218 3  
ISSN 0250-863X

(NLM Classification: QU 131)

The World Health Organization welcomes requests for permission to reproduce or translate its publications, in part or in full. Applications and enquiries should be addressed to the Office of Publications, World Health Organization, Geneva, Switzerland, which will be glad to provide the latest information on any changes made to the text, plans for new editions, and reprints and translations already available.

(c) World Health Organization 2000

Publications of the World Health Organization enjoy copyright protection in accordance with the provisions of Protocol 2 of the Universal Copyright Convention. All rights reserved.

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city, or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by the World Health Organization in preference to others of a similar nature that are not mentioned. Errors and omissions excepted, the names of proprietary products are distinguished by initial capital letters.

#### CONTENTS

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA FOR FLAME RETARDANTS:  
TRIS(2-BUTOXYETHYL) PHOSPHATE, TRIS(2-ETHYLHEXYL) PHOSPHATE,  
TETRAKIS-(HYDROXYMETHYL) PHOSPHONIUM SALTS

#### PREAMBLE

#### ABBREVIATIONS

## PART A: TRIS(2-BUTOXYETHYL) PHOSPHATE (TBEP)

## A1. SUMMARY, EVALUATION AND RECOMMENDATIONS

- A1.1 Summary
- A1.2 Evaluation
- A1.3 Recommendations

## A2. IDENTITY, PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES, AND ANALYTICAL METHODS

- A2.1 Identity
- A2.2 Physical and chemical properties
- A2.3 Conversion factors
- A2.4 Analytical methods
  - A2.4.1 Air
  - A2.4.2 Water
  - A2.4.3 Sediment
  - A2.4.4 Soils and foodstuffs
  - A2.4.5 Biological media

## A3. SOURCES OF HUMAN AND ENVIRONMENTAL EXPOSURE

- A3.1 Natural occurrence
- A3.2 Anthropogenic sources
  - A3.2.1 Production levels and processes
  - A3.2.2 Uses

## A4. ENVIRONMENTAL TRANSPORT, DISTRIBUTION AND TRANSFORMATION

- A4.1 Transport and distribution between media
- A4.2 Biodegradation
  - A4.2.1 Migration

## A5. ENVIRONMENTAL LEVELS AND HUMAN EXPOSURE

- A5.1 Environmental levels
  - A5.1.1 Air
  - A5.1.2 Water (drinking-water and surface water)
  - A5.1.3 Soils and sediment
  - A5.1.4 Aquatic organisms
- A5.2 Human tissue levels
- A5.3 Food
- A5.4 Occupational exposure

## A6. KINETIC AND METABOLISM IN LABORATORY ANIMALS AND HUMANS

A7. EFFECTS ON LABORATORY MAMMALS AND *IN VITRO* TEST SYSTEMS

- A7.1 Single exposure
  - A7.1.1 Oral and dermal
  - A7.1.2 Inhalation
- A7.2 Short-term repeated exposure
  - A7.2.1 Oral
  - A7.2.2 Dermal

- A7.3 Skin and eye irritation; sensitization
  - A7.4 Reproductive toxicity, embryotoxicity and teratogenicity
  - A7.5 Mutagenicity and related end-points
  - A7.6 Carcinogenicity
  - A7.7 Special studies
    - A7.7.1 Neurotoxicity
      - A7.7.1.1 Acute administration
      - A7.7.1.2 Repeated oral administration
      - A7.7.1.3 Effects on esterase activity
  - A8. EFFECTS ON HUMANS
  - A9. EFFECTS ON OTHER ORGANISMS IN THE LABORATORY AND FIELD
    - A9.1 Laboratory experiments
      - A9.1.1 Aquatics organisms
        - A9.1.1.1 Invertebrates
        - A9.1.1.2 Vertebrates
- PART B: TRIS(2-ETHYLHEXYL) PHOSPHATE (TEHP)
- B1. SUMMARY, EVALUATION AND RECOMMENDATIONS
    - B1.1 Summary
    - B1.2 Evaluation
    - B1.3 Recommendations
  - B2. IDENTITY, PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES, AND ANALYTICAL METHODS
    - B2.1 Identity
    - B2.2 Physical and chemical properties
    - B2.3 Conversion factors
    - B2.4 Analytical methods
      - B2.4.1 Air
      - B2.4.2 Water
      - B2.4.3 Sediment
  - B3. SOURCES OF HUMAN AND ENVIRONMENTAL EXPOSURE
    - B3.1 Natural occurrence
    - B3.2 Anthropogenic sources
      - B3.2.1 Production levels and processes
      - B3.2.2 Uses
  - B4. ENVIRONMENTAL TRANSPORT, DISTRIBUTION AND TRANSFORMATION
    - B4.1 Biodegradation
    - B4.2 Bioaccumulation
  - B5. ENVIRONMENTAL LEVELS AND HUMAN EXPOSURE
    - B5.1 Environmental levels
      - B5.1.1 Air
      - B5.1.2 Surface water
      - B5.1.3 Drinking-water

- B5.1.4 Effluents
- B5.1.5 Sediment
- B5.1.6 Food

## B6. KINETICS AND METABOLISM IN LABORATORY ANIMALS

B7. EFFECTS ON LABORATORY MAMMALS AND *IN VITRO* TEST SYSTEMS

- B7.1 Single exposure
- B7.2 Repeated exposure

- B7.2.1 Oral
- B7.2.2 Dermal
- B7.2.3 Inhalation

- B7.3 Skin and eye irritation; sensitization
- B7.4 Reproductive toxicity, embryo toxicity and teratogenicity
- B7.5 Mutagenicity

- B7.5.1 *In vitro* assays
- B7.5.2 *In vivo* assays

- B7.6 Carcinogenicity
- B7.7 Special studies

- B7.7.1 Neurotoxicity

## B8. EFFECTS ON HUMANS

## B9. EFFECTS ON OTHER ORGANISMS IN THE LABORATORY AND FIELD

## B9.1 Laboratory experiments

- B9.1.1 Microorganisms
- B9.1.2 Aquatic organisms

## B9.1.2.1 Vertebrates

- B9.1.3 Terrestrial organisms

## PART C: TETRAKIS (HYDROXYMETHYL) PHOSPHONIUM SALTS

## C1. SUMMARY AND EVALUATION

- C1.1 Summary
- C1.2 Evaluation

## C2. IDENTITY, PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES, AND ANALYTICAL METHODS

## C2.1 Identity

- C2.1.1 Tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium chloride (THPC)
- C2.1.2 Tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium sulfate (THPS)
- C2.1.3 Tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium chloride-urea condensate (THPC-urea)

## C2.2 Physical and chemical properties

- C2.2.1 Technical products

- C2.3 Conversion factors
- C2.4 Analytical methods
- C3. SOURCES OF HUMAN AND ENVIRONMENTAL EXPOSURE
  - C3.1 Natural occurrence
  - C3.2 Anthropogenic sources
    - C3.2.1 Production levels and processes
    - C3.2.2 Uses
- C4. ENVIRONMENTAL TRANSPORT, DISTRIBUTION AND TRANSPORTATION
  - C4.1 Transport and distribution between media
  - C4.2 Transformation
    - C4.2.1 Biodegradation
    - C4.2.2 Abiotic degradation
  - C4.3 Migration from textiles
- C5. ENVIRONMENTAL LEVELS AND HUMAN EXPOSURE
- C6. KINETICS AND METABOLISM IN LABORATORY ANIMALS
- C7. EFFECTS ON LABORATORY MAMMALS AND *IN VITRO* TEST SYSTEMS
  - C7.1 Single exposure
    - C7.1.1 Oral
    - C7.1.2 Dermal
    - C7.1.3 Inhalation
  - C7.2 Repeated exposure
    - C7.2.1 Oral
      - C7.2.1.1 THPC
      - C7.2.1.2 THPS
    - C7.2.2 Dermal
  - C7.3 Long-term exposure
    - C7.3.1 THPC
    - C7.3.2 THPS
  - C7.4 Skin and eye irritation; sensitization
    - C7.4.1 Skin irritation
      - C7.4.1.1 THPS
      - C7.4.1.2 THPC-urea
    - C7.4.2 Eye irritation
    - C7.4.3 Skin sensitization
      - C7.4.3.1 THPS
      - C7.4.3.2 THPC-urea
  - C7.5 Reproductive toxicity, embryotoxicity and teratogenicity
    - C7.5.1 THPS

C7.5.2 THPC-urea

C7.6 Mutagenicity and related end-points

C7.6.1 THPC-urea

C7.6.1.1 *In vitro* studies

C7.6.1.2 *In vivo* studies

C7.6.2 THPC

C7.6.3 THPS

C7.6.4 THPO

C7.6.5 Treated fabrics

C7.7 Carcinogenicity

C7.7.1 Oral studies

C7.7.1.1 Mice

C7.7.1.2 Rats

C7.7.2 Dermal studies: initiation and promotion

C7.8 Special studies

C8. EFFECTS ON HUMANS

C9. EFFECTS ON OTHER ORGANISMS IN THE LABORATORY AND FIELD

C9.1 Laboratory experiments

C9.1.1 Aquatic organisms

C9.1.2 Terrestrial organisms

C10. PREVIOUS EVALUATIONS BY INTERNATIONAL BODIES

REFERENCES

APPENDIX

RÉSUMÉ, EVALUATION ET RECOMMANDATIONS

RESUMEN, EVALUACION Y RECOMENDACIONES

NOTE TO READERS OF THE CRITERIA MONOGRAPHS

Every effort has been made to present information in the criteria monographs as accurately as possible without unduly delaying their publication. In the interest of all users of the Environmental Health Criteria monographs, readers are requested to communicate any errors that may have occurred to the Director of the International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland, in order that they may be included in corrigenda.

\* \* \*

A detailed data profile and a legal file can be obtained from the International Register of Potentially Toxic Chemicals, Case postale 356, 1219 Châtelaine, Geneva, Switzerland (telephone no. + 41 22 - 9799111, fax no. + 41 22 - 7973460, E-mail [irptc@unep.ch](mailto:irptc@unep.ch)).

\* \* \*



This publication was made possible by grant number 5 U01 ES02617-15 from the National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, USA, and by financial support from the European Commission.

## Environmental Health Criteria

### PREAMBLE

#### Objectives

In 1973 the WHO Environmental Health Criteria Programme was initiated with the following objectives:

- (i) to assess information on the relationship between exposure to environmental pollutants and human health, and to provide guidelines for setting exposure limits;
- (ii) to identify new or potential pollutants;
- (iii) to identify gaps in knowledge concerning the health effects of pollutants;
- (iv) to promote the harmonization of toxicological and epidemiological methods in order to have internationally comparable results.

The first Environmental Health Criteria (EHC) monograph, on mercury, was published in 1976 and since that time an ever-increasing number of assessments of chemicals and of physical effects have been produced. In addition, many EHC monographs have been devoted to evaluating toxicological methodology, e.g., for genetic, neurotoxic, teratogenic and nephrotoxic effects. Other publications have been concerned with epidemiological guidelines, evaluation of short-term tests for carcinogens, biomarkers, effects on the elderly and so forth.

Since its inauguration the EHC Programme has widened its scope, and the importance of environmental effects, in addition to health effects, has been increasingly emphasized in the total evaluation of chemicals.

The original impetus for the Programme came from World Health Assembly resolutions and the recommendations of the 1972 UN Conference on the Human Environment. Subsequently the work became an integral part of the International Programme on Chemical Safety (IPCS), a cooperative programme of UNEP, ILO and WHO. In this manner, with the strong support of the new partners, the importance of occupational health and environmental effects was fully recognized. The EHC monographs have become widely established, used and recognized throughout the world.

The recommendations of the 1992 UN Conference on Environment and Development and the subsequent establishment of the Intergovernmental Forum on Chemical Safety with the priorities for action in the six programme areas of Chapter 19, Agenda 21, all lend further weight to the need for EHC assessments of the risks of chemicals.

#### Scope

The criteria monographs are intended to provide critical reviews on the effect on human health and the environment of chemicals and of combinations of chemicals and physical and biological agents. As such, they include and review studies that are of direct relevance for

the evaluation. However, they do not describe every study carried out. Worldwide data are used and are quoted from original studies, not from abstracts or reviews. Both published and unpublished reports are considered and it is incumbent on the authors to assess all the articles cited in the references. Preference is always given to published data. Unpublished data are only used when relevant published data are absent or when they are pivotal to the risk assessment. A detailed policy statement is available that describes the procedures used for unpublished proprietary data so that this information can be used in the evaluation without compromising its confidential nature (WHO (1990) Revised Guidelines for the Preparation of Environmental Health Criteria Monographs. PCS/90.69, Geneva, World Health Organization).

In the evaluation of human health risks, sound human data, whenever available, are preferred to animal data. Animal and *in vitro* studies provide support and are used mainly to supply evidence missing from human studies. It is mandatory that research on human subjects is conducted in full accord with ethical principles, including the provisions of the Helsinki Declaration.

The EHC monographs are intended to assist national and international authorities in making risk assessments and subsequent risk management decisions. They represent a thorough evaluation of risks and are not, in any sense, recommendations for regulation or standard setting. These latter are the exclusive purview of national and regional governments.

#### Content

The layout of EHC monographs for chemicals is outlined below.

- \* Summary -- a review of the salient facts and the risk evaluation of the chemical
- \* Identity -- physical and chemical properties, analytical methods
- \* Sources of exposure
- \* Environmental transport, distribution and transformation
- \* Environmental levels and human exposure
- \* Kinetics and metabolism in laboratory animals and humans
- \* Effects on laboratory mammals and *in vitro* test systems
- \* Effects on humans
- \* Effects on other organisms in the laboratory and field
- \* Evaluation of human health risks and effects on the environment
- \* Conclusions and recommendations for protection of human health and the environment
- \* Further research
- \* Previous evaluations by international bodies, e.g., IARC, JECFA, JMPR

#### Selection of chemicals

Since the inception of the EHC Programme, the IPCS has organized meetings of scientists to establish lists of priority chemicals for subsequent evaluation. Such meetings have been held in: Ispra, Italy, 1980; Oxford, United Kingdom, 1984; Berlin, Germany, 1987; and North Carolina, USA, 1995. The selection of chemicals has been based on the following criteria: the existence of scientific evidence that the substance presents a hazard to human health and/or the environment; the possible use, persistence, accumulation or degradation of the substance shows that there may be significant human or environmental exposure; the size and nature of populations at risk (both human and other species) and risks for environment; international concern, i.e. the substance is of major interest to several countries; adequate data

on the hazards are available.

If an EHC monograph is proposed for a chemical not on the priority list, the IPCS Secretariat consults with the Cooperating Organizations and all the Participating Institutions before embarking on the preparation of the monograph.

#### Procedures

The order of procedures that result in the publication of an EHC monograph is shown in the flow chart. A designated staff member of IPCS, responsible for the scientific quality of the document, serves as Responsible Officer (RO). The IPCS Editor is responsible for layout and language. The first draft, prepared by consultants or, more usually, staff from an IPCS Participating Institution, is based initially on data provided from the International Register of Potentially Toxic Chemicals, and reference data bases such as Medline and Toxline.

The draft document, when received by the RO, may require an initial review by a small panel of experts to determine its scientific quality and objectivity. Once the RO finds the document acceptable as a first draft, it is distributed, in its unedited form, to well over 150 EHC contact points throughout the world who are asked to comment on its completeness and accuracy and, where necessary, provide additional material. The contact points, usually designated by governments, may be Participating Institutions, IPCS Focal Points, or individual scientists known for their particular expertise. Generally some four months are allowed before the comments are considered by the RO and author(s). A second draft incorporating comments received and approved by the Director, IPCS, is then distributed to Task Group members, who carry out the peer review, at least six weeks before their meeting.

The Task Group members serve as individual scientists, not as representatives of any organization, government or industry. Their function is to evaluate the accuracy, significance and relevance of the information in the document and to assess the health and environmental risks from exposure to the chemical. A summary and recommendations for further research and improved safety aspects are also required. The composition of the Task Group is dictated by the range of expertise required for the subject of the meeting and by the need for a balanced geographical distribution.

The three cooperating organizations of the IPCS recognize the important role played by nongovernmental organizations. Representatives from relevant national and international associations may be invited to join the Task Group as observers. While observers may provide a valuable contribution to the process, they can only speak at the invitation of the Chairperson. Observers do not participate in the final evaluation of the chemical; this is the sole responsibility of the Task Group members. When the Task Group considers it to be appropriate, it may meet *in camera*.

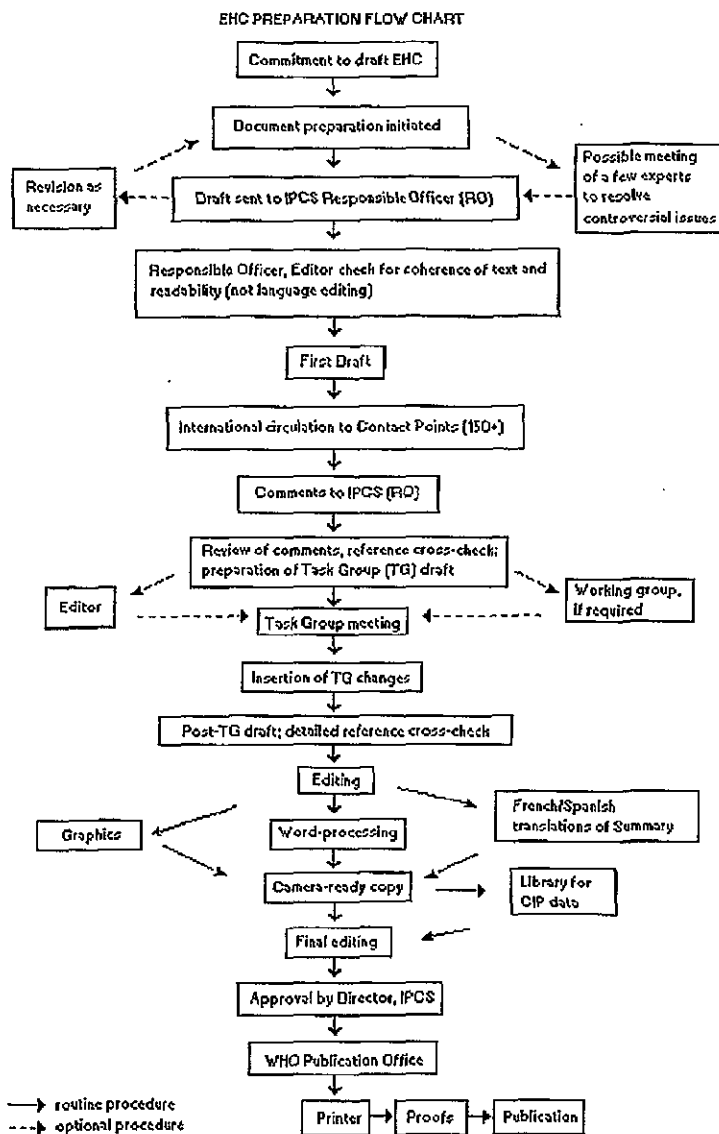
All individuals who as authors, consultants or advisers participate in the preparation of the EHC monograph must, in addition to serving in their personal capacity as scientists, inform the RO if at any time a conflict of interest, whether actual or potential, could be perceived in their work. They are required to sign a conflict of interest statement. Such a procedure ensures the transparency and probity of the process.

When the Task Group has completed its review and the RO is satisfied as to the scientific correctness and completeness of the

document, it then goes for language editing, reference checking, and preparation of camera-ready copy. After approval by the Director, IPCS, the monograph is submitted to the WHO Office of Publications for printing. At this time a copy of the final draft is sent to the Chairperson and Rapporteur of the Task Group to check for any errors.

It is accepted that the following criteria should initiate the updating of an EHC monograph: new data are available that would substantially change the evaluation; there is public concern for health or environmental effects of the agent because of greater exposure; an appreciable time period has elapsed since the last evaluation.

All Participating Institutions are informed, through the EHC progress report, of the authors and institutions proposed for the drafting of the documents. A comprehensive file of all comments received on drafts of each EHC monograph is maintained and is available on request. The Chairpersons of Task Groups are briefed before each meeting on their role and responsibility in ensuring that these rules are followed.



WHO TASK GROUP ON ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA FOR FLAME RETARDANTS:  
TRIS(2-BUTOXYETHYL) PHOSPHATE, TRIS(2-ETHYLHEXYL) PHOSPHATE AND  
TETRAKIS(HYDROXYMETHYL) PHOSPHONIUM SALTS

*Members*

Dr R. Benson, US Environmental Protection Agency, Denver, Colorado, USA

Dr P. Brantom, British Industry Biological Research Association (BIBRA) International, Carshalton, Surrey, United Kingdom

Dr S. Dobson, Institute of Terrestrial Ecology, Monks Wood, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom (*Chairman*)

Professor J. Liesivuori, Department of Pharmacology and Toxicology, University of Kuopio, Kuopio, Finland

Mr D. Renshaw, Department of Health, Elephant and Castle, London, United Kingdom

Dr E. Söderlund, National Institute of Public Health, Department of Environmental Medicine, Oslo, Norway (*Rapporteur*)

*Observers*

Dr L. Kotkoskic, FMC Corporation, Princetown, New Jersey, USA

Dr P. Martin, Albright and Wilson UK Limited, European Business Services - Product Stewardship, Oldbury, West Midlands, United Kingdom

*Secretariat*

Dr M. Baril, International Programme on Chemical Safety, Montreal, Quebec, Canada

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA FOR FLAME RETARDANTS:  
TRIS(2-BUTOXYETHYL) PHOSPHATE, TRIS(2-ETHYLHEXYL) PHOSPHATE AND  
TETRAKIS(HYDROXYMETHYL) PHOSPHONIUM SALTS

A WHO Task Group on Environmental Health Criteria for Flame retardants: tris(2-butoxyethyl) phosphate, tris(2-ethylhexyl) phosphate and tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium salts met at the British Industrial Biological Research Association, Carshalton, United Kingdom from 18 to 22 January 1999. Dr P. Brantom opened the meeting and welcome the participants on behalf of the host institute. Dr M. Baril, IPCS, welcomed the participants on behalf of IPCS and the three cooperating organizations (UNEP/ILO/WHO). The Task Group reviewed and revised the draft criteria monograph and made an evaluation of the risk to human health and the environment from exposure to these flame retardants.

Financial support for this Task Group was provided by the United Kingdom Department of Health as part of its contribution to the IPCS.

The first draft of this monograph was prepared by Dr G. J. van Esch, Bilthoven, the Netherlands. The second draft prepared by Dr M. Baril incorporated the comments received following circulation of the first draft to the IPCS contact points for Environmental Health Criteria.

Dr P.G. Jenkins (IPCS Central Unit, Geneva) and Dr M. Baril (IPCS technical advisor, Montreal) were responsible for the overall technical editing and scientific content, respectively.

The efforts of all who helped in the preparation and finalization of the monograph are gratefully acknowledged.

\* \* \*

#### ABBREVIATIONS

AChE	acetylcholinesterase
ALAT	alanine aminotransferase
ASAT	aspartate aminotransferase
BCME	bis(chloromethyl) ether
BEHP	bis(2-ethylhexyl) phosphate
BMPA	bishydroxymethyl phosphonic acid
BuChE	butyrylcholinesterase
CHO	Chinese hamster ovary
DMSO	dimethyl sulfoxide
EC <sub>50</sub>	median effective concentration
FDA	Food and Drug Administration (USA)
GC	gas chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
IC <sub>50</sub>	median inhibitory concentration
LC <sub>30</sub>	median lethal concentration
LD <sub>50</sub>	median lethal dose
LOAEL	lowest-observed-adverse-effect level
LOEL	lowest-observed-effect level
MS	mass spectrometry
nd	not detected
NOAEL	no-observed-adverse-effect level
NOEC	no-observed-effect concentration
NOEL	no-observed-effect level
NPD	nitrogen-phosphorus sensitive detector
NTE	neuropathy target esterase
NTP	National Toxicology Program (USA)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PVC	polyvinyl chloride
SCE	sister-chromatid exchange
TBEP	tris(2-butoxyethyl) phosphate
TEHP	tris(2-ethylhexyl) phosphate
THP	tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium
THPC	tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium chloride
THPO	trihydroxymethyl phosphine oxide
THPS	tetrakis(hydroxymethyl) phosphonium sulfate
TOCP	tri-ortho-cresyl phosphate

#### PART A

Tris(2-butoxyethyl) phosphate

(TBEP)

#### A. SUMMARY, EVALUATION AND RECOMMENDATIONS

A1. Tris(2-butoxyethyl) phosphate (TBEP)

A1.1 Summary

Tris(2-butoxyethyl) phosphate (TBEP) is used in floor polishes and as a plasticizer in rubber and plastics. The worldwide production volume is not available but is estimated to be in the range of 5000-6000 tonnes.

TBEP occurs in the environment only as a result of human

activity. Its distribution in the environment has been investigated in certain industrialized countries. Concentrations in surface water were found to be below 300 ng/litre, whereas concentrations in sediment were between 100 and 1000 µg/kg. None of 167 analyses detected TBEP in fish. It has been detected in outdoor air in a single study (<200 ng/m<sup>3</sup>). Measurement of TBEP in indoor air in offices showed concentrations of 25 ng/m<sup>3</sup> or less. TBEP is associated with particulates and the source is considered to be the application of floor polish. It has been detected at µg/kg levels in human adipose tissue. The reported daily dietary intake from market basket studies, for a range of age groups, was <0.02 µg/kg body weight per day. Drinking-water concentrations of up to 270 µg/litre have been reported, this is considered to arise from migration from rubber gaskets in the plumbing.

TBEP is considered to be readily biodegradable. Sewage treatment plant measurements and semi-continuous sludge laboratory tests have indicated substantial elimination of TBEP (>80%). In river and coastal water TBEP was completely degraded. The half-life in estuarine water was reported to be about 50 days and there was little degradation in unadapted seawater.

The acute systemic mammalian toxicity and irritation potential are low.

Several subchronic studies in laboratory animals have shown that the liver is the target organ for TBEP toxicity. One study in male Sprague-Dawley rats suggested that TBEP might cause focal myocarditis. Neurotoxic effects in rats after single doses of TBEP are inconsistent. In rats repeatedly given high doses by gavage, TBEP decreased nerve conduction velocity and increased the refractory period. It did not cause delayed neurotoxicity in hens but did inhibit brain and plasma cholinesterases.

Based on an 18-week repeated dose study in rats, the no-observed-effect level (NOEL) for liver effects was reported to be 15 mg/kg body weight per day, while the lowest-observed-effect level (LOEL) was 150 mg/kg body weight per day.

The long-term toxicity and carcinogenicity of TBEP have not been studied.

Bacterial and mammalian cell tests for gene mutation gave negative results, but no tests for chromosomal damage have been reported.

Teratogenicity was not observed in one study in rats. Other aspects of reproductive toxicity have not been reported.

A Repeat Human Insult Patch Test indicated no skin sensitization and minimal skin irritation.

The toxicity of TBEP to aquatic organisms is moderate. The 48-h LC<sub>50</sub> in *Daphnia magna* is 75 mg/litre and the 96-h LC<sub>50</sub> values in fish range between 16 and 24 mg/litre.

#### A1.2 Evaluation

Occupational exposure to TBEP is likely to be by the dermal route during manufacture (accidental exposure) and from the use of floor polishes. The compound is absorbed dermally in experimental animals but no information is available on its kinetics and metabolism. Dermal exposure cannot, therefore, be quantified but is expected to be low. Inhalation exposure in the office environment has been measured to be

25 ng/m<sup>3</sup> or less.

Exposure of the general population is principally via food (from use of TBEP as a plasticizer in packaging plastics) and drinking-water (contaminated by leaching from synthetic rubbers used in plumbing washers). Exposure from both sources is very low (estimated to be <0.2 µg/kg body weight per day from the diet and concentrations in drinking-water of <270 µg/litre).

Given the reported NOEL from animal studies of 15 mg/kg body weight per day from a repeated dose oral study, the risk to the general population is very low. The risk to the occupationally exposed is also considered to be very low, though this cannot be quantified.

In the environment, TBEP is expected (from its low volatility, high adsorption coefficient and moderate water solubility) to partition to sediment. The few measured data confirm this. Degradation in environmental media is expected to be rapid. No information is available on breakdown products; phosphate released during breakdown is not expected to contribute significantly to environmental nutrient levels. Fig. 1 plots measured environmental concentrations in surface water against reported acute toxicity values. The margin of safety between highest reported concentrations and lowest reported toxicity values is several orders of magnitude, indicating low risk to organisms in the aquatic environment. No assessment of risk can be made for the terrestrial compartment.

#### A1.3 Recommendations

For a full scientific evaluation of the compound, identification and assessment of metabolites in mammals would be required, given the toxicological profile of one of the suggested metabolites, 2-butoxyethanol.

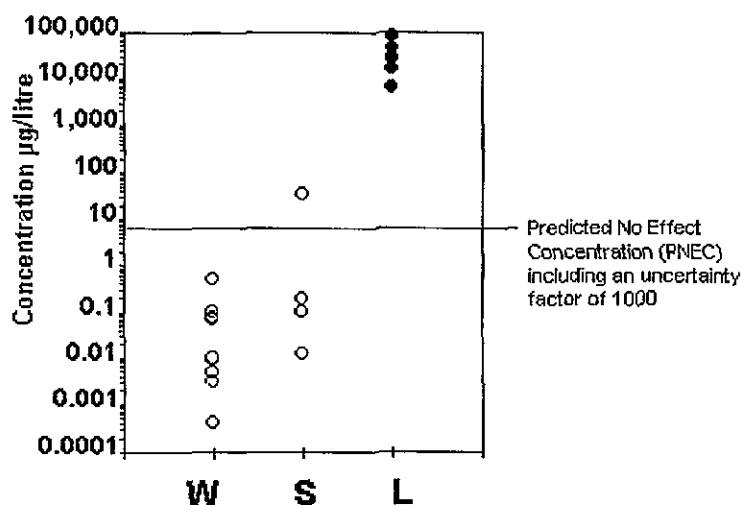


Fig. 1. Plot of measured concentrations in surface waters (W) and sewage effluents (S), and reported acute toxicity values (L) for TBEP (○ = measured concentrations in the environment; ● = calculated LC<sub>50</sub>)

#### A2. IDENTITY, PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES, AND ANALYTICAL METHODS

##### A2.1 Identity



# リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of Tris(2-butoxyethyl) phosphate on Bacteria

### 要約

リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537<sup>+</sup> および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>23</sup> の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められたことから、本試験は S9 mix 無添加試験および添加試験ともに、15.6~500  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲(S9 mix 無添加試験の TA100 と TA1537は 7.81~250  $\mu\text{g}$ /プレート、添加試験の TA98 および WP2 *uvrA* は 78.1~2500  $\mu\text{g}$ /プレート) で実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の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。

以上の結果から、リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

### 方法

#### 〔検定菌〕

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

*S. typhimurium* の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものをを用い、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、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無について調べ、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℃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〕

リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステル(CAS No. 78-51-3)は、分子量 398.54 の無色透明液体である。用いた被験物質は、大八化学工業(株)製造、ロット番号 K70702、純度 98.2% (不純物:不明)であり、大八化学工業(株)から供与された。被験物質は、使用時まで遮光、密封して室温で保管した。なお、試験終了後に大八化学工業(株)において、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 97.2% であった。

リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルは、ジメチルスルホキシド(DMSO、ロット番号:ESK4546、和光純薬工業(株))に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、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。

#### 〔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 および 2AA は DMSO 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(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
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、極東製薬工業(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-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
バクテアガー(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〕

ブレインキューベーション法<sup>9)</sup>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, 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, 37°C で 20 分間往復振とう培養したのち, 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, 対照群として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。溶媒および陽性対照群は, 同時に実施した他の試験と共通とした。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, それぞれそ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。ただし, 2 回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の 2 倍以上となる用量が認められた場合において, その溶媒対照値が 10 以下であり, 変異コロニー数の増加に用量依

存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルについて 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。その結果, S9 mix 無添加試験では, TA100 と TA1537 においては 150 μg/プレート以上で, TA1535 と TA98 においては 500 μg/プレート以上で, WP2 *uvrA* においては 5000 μg/プレートで抗菌性が認められた。また, S9 mix 添加試験では, TA100, TA1535 および TA1537 においては 500 μg/プレート以上で, TA98 と WP2 *uvrA* では 1500 μg/プレート以上で抗菌性が認められた。

したがって, 本試験における最高用量は, S9 mix 無添加試験および添加試験とも 500 μg/プレート (S9 mix 無添加試験の TA100 と TA1537 は 250 μg/プレート, WP2 *uvrA* は 5000 μg/プレート, S9 mix 添加試験の TA98 と WP2 *uvrA* は 2500 μg/プレート) とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験とともに, 上記の最高用量に基づいて公比 2 で 6 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, いずれの検定菌においても, 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, リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルは, 用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) 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.
- 4) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K.H. Norpoth, R.C. Garner, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子  
財団法人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)  
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,  
Kumiko Kawakami  
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 1-1. Mutagenicity of tris (2-butoxyethyl) phosphate 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		TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	110 107 95 (104 $\pm$ 7.9)	10 7 9 ( 9 $\pm$ 1.5)		18 13 19 ( 17 $\pm$ 3.2)	6 10 7 ( 8 $\pm$ 2.1)	
	7.81	122 134 106 (121 $\pm$ 14.0)	ND		ND	5 8 7 ( 7 $\pm$ 1.5)	
	15.6	141 93 139 ( 124 $\pm$ 27.2)	8 14 5 ( 9 $\pm$ 4.6)		21 23 17 ( 20 $\pm$ 3.1)	5 5 7 ( 6 $\pm$ 1.2)	
	31.3	117 116 117 (117 $\pm$ 0.6)	17 11 14 ( 14 $\pm$ 3.0)		15 26 23 ( 21 $\pm$ 5.7)	7 3 6 ( 5 $\pm$ 2.1)	
	62.5	128 122 108 (119 $\pm$ 10.3)	8 8 15 ( 10 $\pm$ 4.0)		15 17 14 ( 15 $\pm$ 1.5)	8 9 7 ( 8 $\pm$ 1)	
	125	127 118 112 (119 $\pm$ 7.5)	11 8 11 ( 10 $\pm$ 1.7)		21 24 14 ( 20 $\pm$ 5.1)	6 3 7 ( 5 $\pm$ 2.1)	
	250	89* 73* 94* ( 85 $\pm$ 11.0)	1* 6* 6* ( 4 $\pm$ 2.9)		18* 17* 20* ( 18 $\pm$ 1.5)	0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	
	500		2* 2* 4* ( 3 $\pm$ 1.2)		23* 13* 9* ( 15 $\pm$ 7.2)		
S9 mix (+)	0	145 121 138 (135 $\pm$ 12.3)	9 7 18 ( 11 $\pm$ 5.9)			11 9 10 ( 10 $\pm$ 1.0)	
	15.6	163 140 148 (150 $\pm$ 11.7)	11 17 15 ( 14 $\pm$ 3.1)			13 6 15 ( 11 $\pm$ 4.7)	
	31.3	142 150 172 (155 $\pm$ 15.5)	11 15 7 ( 11 $\pm$ 4.0)			9 13 12 ( 11 $\pm$ 2.1)	
	62.5	180 121 172 (158 $\pm$ 32)	10 9 8 ( 9 $\pm$ 1)			12 12 16 ( 13 $\pm$ 2.3)	
	125	153 129 137 (140 $\pm$ 12.2)	7 9 10 ( 9 $\pm$ 1.5)			12 6 12 ( 10 $\pm$ 3.5)	
	250	111 135 151 (132 $\pm$ 20.1)	11 15 6 ( 11 $\pm$ 4.5)			12 14 12 ( 13 $\pm$ 1.2)	
	500	133* 150* 134* (139 $\pm$ 9.5)	10* 5* 12* ( 9 $\pm$ 3.6)			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	
Positive control	Chemical	AF2	SA		AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5		0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	775 794 860 (810 $\pm$ 44.6)	378 396 365 (380 $\pm$ 15.6)		724 638 737 (700 $\pm$ 53.8)	725 1204 1329 (1086 $\pm$ 318.8)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA			2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2			2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	632 740 739 (704 $\pm$ 62.1)	301 300 326 (309 $\pm$ 14.7)			315 338 356 (336 $\pm$ 20.6)	

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 98.2 %.

ND:Not done

Table 1-2. Mutagenicity of tris (2-butoxyethyl) phosphate 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		
				WP2 <i>uvrA</i>	TA98		
S9 mix (-)	0			15 20 18 ( 18 $\pm$ 2.5)			
	156			24 19 27 ( 23 $\pm$ 4.0)			
	313			16 24 23 ( 21 $\pm$ 4.4)			
	625			18 22 21 ( 20 $\pm$ 2.1)			
	1250			25 13 18 ( 19 $\pm$ 6.0)			
	2500 c			20 18 25 ( 21 $\pm$ 3.6)			
	5000 c			11 20 17 ( 16 $\pm$ 4.6)			
S9 mix (+)	0			31 14 23 ( 23 $\pm$ 8.5)	26 26 19 ( 24 $\pm$ 4.0)		
	78.1			21 20 20 ( 20 $\pm$ 0.6)	21 31 25 ( 26 $\pm$ 5)		
	156			15 22 22 ( 20 $\pm$ 4.0)	30 28 16 ( 25 $\pm$ 7.6)		
	313			20 19 28 ( 22 $\pm$ 4.9)	25 25 25 ( 25 $\pm$ 0.0)		
	625			17 25 18 ( 20 $\pm$ 4.4)	12 29 25 ( 22 $\pm$ 8.9)		
	1250			18 17 20 ( 18 $\pm$ 1.5)	20 15* 18* ( 18 $\pm$ 2.5)		
	2500			21* 21* 19* ( 20 $\pm$ 1.2)	18* 25* 13* ( 19 $\pm$ 6.0)		
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			0.01			
	Number of colonies/plate			314 275 290 (293 $\pm$ 19.7)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA	2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			10	0.5		
	Number of colonies/plate			688 780 749 (739 $\pm$ 46.8)	282 318 334 (311 $\pm$ 26.6)		

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA:2-Aminoanthracene

\*:Inhibition was observed against growth of the bacteria. c:Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 98.2 %.

Table 2-1. Mutagenicity of tris (2-butoxyethyl) phosphate 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		TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	117 108 101 (109 $\pm$ 8)	11 10 14 ( 12 $\pm$ 2.1)		19 21 14 ( 18 $\pm$ 3.6)	11 16 13 ( 13 $\pm$ 2.5)	
	7.81	112 107 107 (109 $\pm$ 2.9)	ND		ND	6 7 2 ( 5 $\pm$ 2.6)	
	15.6	107 83 93 ( 94 $\pm$ 12.1)	9 8 7 ( 8 $\pm$ 1)		25 20 21 ( 22 $\pm$ 2.6)	8 4 11 ( 8 $\pm$ 3.5)	
	31.3	104 104 94 (101 $\pm$ 5.8)	9 5 11 ( 8 $\pm$ 3.1)		19 23 18 ( 20 $\pm$ 2.6)	9 6 10 ( 8 $\pm$ 2.1)	
	62.5	100 112 100 (104 $\pm$ 6.9)	8 8 8 ( 8 $\pm$ 0)		22 22 16 ( 20 $\pm$ 3.5)	4 4 8 ( 5 $\pm$ 2.3)	
	125	100 104 116 (107 $\pm$ 8.3)	11 10 8 ( 10 $\pm$ 1.5)		10 21 21 ( 17 $\pm$ 6.4)	7 7 6* ( 7 $\pm$ 0.6)	
	250	60* 73* 60* ( 64 $\pm$ 7.5)	5* 5* 5* ( 5 $\pm$ 0)		12* 15* 11 ( 13 $\pm$ 2.1)	0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	
	500		3* 2* 4* ( 3 $\pm$ 1)		12* 9* 10* ( 10 $\pm$ 1.5)		
S9 mix (+)	0	112 106 107 (108 $\pm$ 3.2)	12 6 8 ( 9 $\pm$ 3.1)			22 8 6 ( 12 $\pm$ 8.7)	
	15.6	97 100 104 (100 $\pm$ 3.5)	7 12 16 ( 12 $\pm$ 4.5)			11 10 5 ( 9 $\pm$ 3.2)	
	31.3	114 100 88 (101 $\pm$ 13)	11 10 10 ( 10 $\pm$ 0.6)			13 8 14 ( 12 $\pm$ 3.2)	
	62.5	132 122 90 (115 $\pm$ 21.9)	8 13 12 ( 11 $\pm$ 2.6)			14 13 12 ( 13 $\pm$ 1.0)	
	125	116 92 125 (111 $\pm$ 17.1)	7 8 12 ( 9 $\pm$ 2.6)			11 6 13 ( 10 $\pm$ 3.6)	
	250	92 90 108 ( 97 $\pm$ 9.9)	9 13 11 ( 11 $\pm$ 2.0)			11 9 9 ( 10 $\pm$ 1.2)	
	500	80* 80* 91* ( 84 $\pm$ 6.4)	7* 7* 9* ( 8 $\pm$ 1.2)			0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA		AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5		0.1	80	
	Number of colonies/plate	563 575 567 (568 $\pm$ 6.1)	380 384 351 (372 $\pm$ 18)		531 522 545 (533 $\pm$ 11.6)	1349 1188 1356 (1298 $\pm$ 95.0)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA			2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2			2	
	Number of colonies/plate	512 607 650 (590 $\pm$ 70.6)	274 271 345 (297 $\pm$ 41.9)			227 292 311 (277 $\pm$ 44)	

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 98.2 %.

ND: Not done

Table 2-2. Mutagenicity of tris(2-butoxyethyl) phosphate 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		
				WP2 <i>uvrA</i>	TA98		
S9 mix (-)	0			28 19 24 (24 $\pm$ 4.5)			
	156			28 22 24 (25 $\pm$ 3.1)			
	313			22 22 19 (21 $\pm$ 1.7)			
	625			17 22 30 (23 $\pm$ 6.6)			
	1250			20 17 15 (17 $\pm$ 2.5)			
	2500 c			16 24 20 (20 $\pm$ 4.0)			
	5000 c			16 20 20 (19 $\pm$ 2.3)			
S9 mix (+)	0			25 23 40 (29 $\pm$ 9.3)	30 31 22 (28 $\pm$ 4.9)		
	78.1			24 24 45 (31 $\pm$ 12.1)	25 16 25 (22 $\pm$ 5.2)		
	156			31 28 24 (28 $\pm$ 3.5)	28 18 20 (22 $\pm$ 5.3)		
	313			24 34 27 (28 $\pm$ 5.1)	29 28 31 (29 $\pm$ 1.5)		
	625			23 23 36 (27 $\pm$ 7.5)	23 18 26 (22 $\pm$ 4.0)		
	1250			24 30 24 (26 $\pm$ 3.5)	24* 17* 19* (20 $\pm$ 3.6)		
	2500			19* 22* 20* (20 $\pm$ 1.5)	17* 12* 16* (15 $\pm$ 2.6)		
Positive control	Chemical			AF2			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			0.01			
S9 mix(-)	Number of colonies/plate			303 312 331 (315 $\pm$ 14.3)			
Positive control	Chemical			2AA	2AA		
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			10	0.5		
S9 mix(+)	Number of colonies/plate			485 499 470 (485 $\pm$ 14.5)	308 348 287 (314 $\pm$ 31.0)		

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA:2-Aminoanthracene

\*:Inhibition was observed against growth of the bacteria. c:Precipitate was observed on the surface of agar plates.

Purity was 98.2 %.

# リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルの 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 Tris(2-butoxyethyl) phosphate on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)のS9 mix非存在下では0.090 mg/ml、短時間処理(6時間)のS9 mix存在下では0.40 mg/mlであった。各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の2倍濃度を最高処理濃度とし、それぞれ公比2で5濃度設定した。連続処理では、S9 mix非存在下で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。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間連続処理および短時間処理のS9 mix非存在下では0.090 mg/ml、48時間連続処理および短時間処理のS9 mix存在下ではそれぞれ0.045 mg/mlおよび0.20 mg/mlの濃度であったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理した高濃度群(0.090 mg/ml)では、細胞毒性により倍数性細胞の観察細胞が規定に満たなかったが、24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/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:Cansera International)

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

$2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたデイツシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)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

リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステル(略号:TBEP, CAS No.:78-51-3, ロット番号:K70702, 大八化学工業(株))は、無色透明液体で、水に対しては0.11%(25°C)、DMSOでは1 l/l、アセトンおよびエタノールで1 l/lで溶解し、融点-70°C以下、沸点222°C/5.3 hpaで、分子式C<sub>18</sub>H<sub>35</sub>O<sub>7</sub>P、分子量398.54、純度98.2 wt%(不純物は不明)の物質である。

被験物質原体は、通常の取り扱い条件においては安定であるが、水、熱、アルカリ中では分解する。

#### 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。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、連続処理および短時間処理のS9 mix非存在下における50%の増殖抑制濃度は、0.090 mg/mlであった。また、短時間処理のS9 mix存在下では、0.40 mg/mlであった(Fig. 1, 2)。



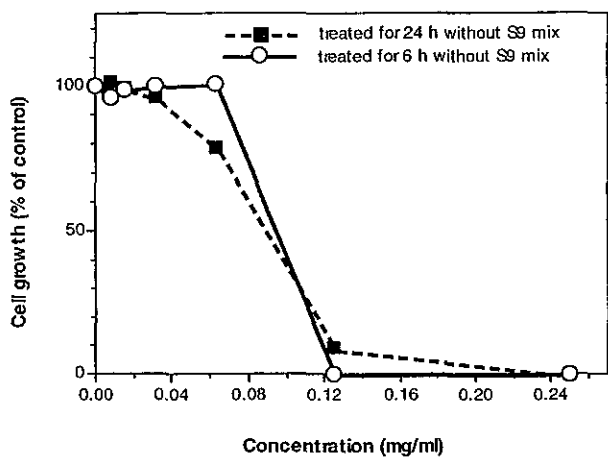


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with tris(2-butoxyethyl) phosphate

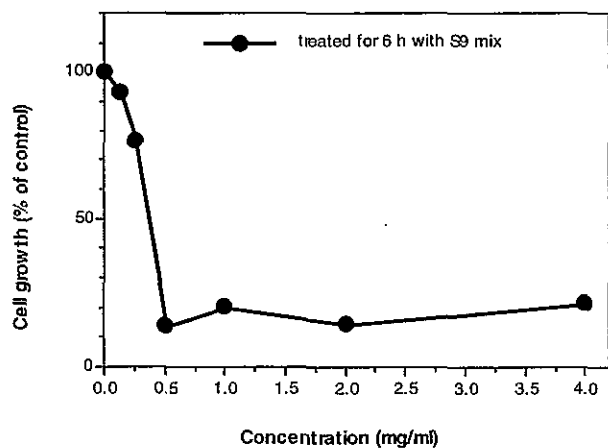


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with tris(2-butoxyethyl) phosphate

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、50% 増殖抑制濃度の2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(24時間および48時間連続処理および短時間処理の S9 mix 非存在下:0.011, 0.023, 0.045, 0.090, 0.18 mg/ml, 短時間処理の S9 mix 存在下:0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 mg/ml). 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。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚ディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、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。

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

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、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), 24時間連続処理および短時間処理の S9 mix 非存在下では0.090 mg/ml, 48時間連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では、それぞれ0.045 mg/ml および0.20 mg/ml が、染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む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(MMS)研究会<sup>1)</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(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、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<sup>2)</sup>(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クラン・アーミテッジの傾向性検定<sup>3)</sup>( $p < 0.05$ )を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

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。リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルを加えて24時間連続処理した高濃度群(0.090 mg/ml)では、細胞毒性により倍数性細胞の観察細胞が規定に満たなかったが、24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルを加えて S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性

細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

### 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 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.
- 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.

### 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,  
中川ゆづき, 若栗 忍, 日下部博一,  
古畑紀久子, 渡辺美香, 出石由紀,  
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, Sasaki Kiyoshi,

Yuzuki Nakagawa, Shinobu Wakuri,

Hirokazu Kusakabe, Kikuko Furuhata

Mika Watanabe, Yuki Izushi,

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

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with tris (2- butoxyethyl) phosphate (TBEP)\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								No. of cells			Concurrent <sup>6)</sup> cytotoxicity		
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total	Others <sup>3)</sup>	with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		cytotoxicity (%)
												TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Control			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.50			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.25			100.0
TBEP	0.023	24	200	1	1	0	0	0	10	12	0	3 ( 1.5)	2 ( 1.0)	0.13			85.5
TBEP	0.045	24	200	0	1	0	2	0	0	3	0	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	0.38	NT	NT	79.0
TBEP	0.090	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.40 <sup>7)</sup>			45.0
TBEP	0.18 **	24	-											-			0.0
MC	0.00005	24	200	3	61	96	5	1	10	176	0	93 (46.5)	91 (45.5)	0.00			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	0	1	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.63			100.0
TBEP	0.011	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.13			107.0
TBEP	0.023	48	200	0	1	0	3	0	0	4	0	3 ( 1.5)	3 ( 1.5)	0.25	NT	NT	101.5
TBEP	0.045	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.00			86.0
TBEP	0.090 **	48	-											-			18.5
TBEP	0.18 **	48	-											-			0.0
MC	0.00005	48	200	1	47	124	3	3	0	178	9	95 (47.5)	95 (47.5)	0.50			-

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), 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 nine 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 (p<0.05)when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control (p<0.05)by Fisher's exact test. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater<sup>TM</sup>. 7)Seven hundred and fifty-seven cells were analysed. \*:Purity was 98.2 %. \*\*:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with tris (2- butoxyethyl) phosphate (TBEP)\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								No. of cells			Concurrent <sup>6)</sup> cytotoxicity		
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total	Others <sup>3)</sup>	with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		cytotoxicity (%)
													TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.13			-	
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.13			100.0	
TBEP	0.023	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	1	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.13			99.5	
TBEP	0.045	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.50	NT	NT	105.0	
TBEP	0.090	-	6-(18)	200	0	1	0	2	0	3	0	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	0.25			80.5	
TBEP	1.8 **	-	6-(18)	-										-			0.0	
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	2	0	0	0	2	1	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	0.50			-	
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	1	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.13			100.0	
TBEP	0.050	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	2	2	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.13			99.0	
TBEP	0.10	+	6-(18)	200	1	1	0	4	0	6	0	5 ( 2.5)	4 ( 2.0)	0.38	NT	NT	91.5	
TBEP	0.20	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.13			87.0	
TBEP	0.40 **	+	6-(18)	-										-			7.5	
TBEP	0.80 **	+	6-(18)	-										-			16.5	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	0	102	226	7	1	50	386	0	134 (67.0)	134 (67.0)	0.00			-

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), 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, 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 (p<0.05)when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control (p<0.05)by Fisher's exact test. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater<sup>TM</sup>. \*:Purity was 98.2 %. \*\*:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

# リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルのラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

## Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Tris(2-butoxyethyl) phosphate in Rats

### 要約

リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルの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(Crj:CD) ラットを用いて実施した。投与量は、雌雄とも0(溶媒対照群)、100、300 および 1000 mg/kg とした。雌雄とも溶媒対照群および1000 mg/kg 投与群では1群10匹、100 および 300 mg/kg 投与群では1群5匹を使用し、このうち溶媒対照群および1000 mg/kg 投与群の雌雄各5匹について14日間の回復試験を行った。その結果、以下の成績を得た。

投与期間中および回復試験期間中に、溶媒対照群および被験物質投与群において死亡例は認められなかった。

一般状態の変化として、1000 mg/kg 投与群の雌において、初回投与時に、脱力、うつ伏せ状態、粗大呼吸が数例で認められたが、数時間後には回復した。また、雌雄とも被験物質投与群の全例で、投与直後に被験物質の刺激性に起因したと考えられる一過性の流涎が観察され、1000 mg/kg 投与群の雌では投与第16、17、23および25日に保定時から流涎が認められる例もあった。回復試験群では休薬によりこれらの変化はすみやかに消失した。

体重および摂餌量については、溶媒対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

投与期間終了時の尿検査、血液学検査において、被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

投与期間終了時の血液生化学検査では、雌雄において血漿中のコリンエステラーゼ活性が用量依存的に低下する傾向があり、1000 mg/kg 投与群の雌雄で有意差が認められた。しかし、赤血球中のコリンエステラーゼ活性に有意差は認められなかった。その他に、被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。一方、回復試験期間終了時の検査では、雌雄ともに血漿中および赤血球中のコリンエステラーゼ活性を含む各検査項目において、溶媒対照群と被験物質投与群との間で差は認められなかった。

投与期間終了時屠殺剖検例の1000 mg/kg 投与群の雌雄および300 mg/kg 投与群の雌において、肝臓の絶対重量および相対重量が有意に増加した。回復試験期間終了時屠殺剖検例では、1000 mg/kg 投与群の雌の腎臓で絶対重量が有意に低下した。

投与期間終了時屠殺剖検例の病理学検査において、肝臓の小肉芽腫が雌では300 mg/kg 投与群で変化の程度

が有意に増強した。また、300 mg/kg 以上の投与群では、小葉周辺帯の肝細胞の微細空胞化の発生頻度および程度がともに増強する傾向にあり、雌の1000 mg/kg 投与群では、統計学的に有意な差が認められた。一方、回復試験期間終了時の屠殺剖検例では、被験物質投与に起因すると思われる変化は認められなかった。

以上の結果、本試験条件下におけるリン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルの無影響量(NOEL)は、雌雄とも100 mg/kg/day であると考えられる。また、被験物質投与に起因すると考えられる上記の変化は、14日間の休薬によりいずれも回復することが明らかとなった。

### 方法

#### 1. 被験物質および投与検体の調製

被験物質として、大八化学工業(株)より提供されたリン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステル〔ロット番号:K70702, 無色透明, 刺激性を有する液体, 比重:1.019, 純度:98.2%〕を使用した。

被験物質を20% (w/v) の濃度になるようコーンオイル〔ロット番号:V5P5523, ナカライテスク(株)〕に溶解し、さらに、この20% 溶液を6および2% (w/v) 濃度となるように段階希釈して投与検体を調製した。投与検体の調製は3~7日間に1回の頻度で行った。なお、リン酸トリス(2-ブトキシエチル) エステルの安定性試験および含量試験を実施した結果、0.2および20.0% (w/v) コーンオイル溶液中の被験物質は、室温下で8日間は安定であり、また、投与検体中の被験物質の含量は、所定濃度の96.7~100% であることが確認された。

#### 2. 動物および飼育方法

生後4週で購入した雌雄の Sprague-Dawley 系ラット(Crj:CD;SPF, 日本チャールス・リバー(株), 厚木飼育センター生産)を8日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各30匹を試験に供した。動物は、全飼育期間を通じて、温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度50~65%、換気回数約15回/時間、照明時間12時間(7~19時点灯)に制御された飼育室内で、金属製金網床ケージ(220×270×190 mm)に1匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2, 日本クレア(株))および水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。

## 3. 群および群分け

本試験における投与量は、本試験開始前に秦野研究所で実施したリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルラットにおける7日間反復経口投与毒性試験の成績を参考にして決定した。即ち、雄の Sprague-Dawley 系ラットにリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルを 1000 mg/kg, 300 mg/kg および 100 mg/kg の用量で7日間反復投与した結果、死亡例はなく、投与直後に一過性の流涎が観察されたほかには一般状態に変化が認められなかった。また、8日目に行った剖検においても、被験物質投与に起因すると思われる異常所見は認められなかった。従って、本試験では、化審法ガイドライン「ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験」に従って、雌雄とも最高投与用量を 1000 mg/kg とし、以下 300 および 100 mg/kg 投与群を設定した。なお、雌雄とも1群を溶媒対照群としてコーンオイルのみを経口投与した。

群分けは、投与開始前日の体重に基づいて、体重別層化無作為抽出法により行った。各群の匹数および動物番号を以下に示した。

群 (投与液の濃度)	匹数(動物番号)	
	雌	雄
溶媒対照群(コーンオイル)	10(1~10)	10(31~40)
被験物質 100 mg/kg 投与群(2%, w/v)	5(11~15)	5(41~45)
被験物質 300 mg/kg 投与群(6%, w/v)	5(16~20)	5(46~50)
被験物質 1000 mg/kg 投与群(20%, w/v)	10(21~30)	10(51~60)

## 4. 投与方法

本試験の投与経路は、化審法ガイドライン「ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験」に従い経口投与とした。

投与は、1日1回、28日間、ラット用胃管を用いて強制的に行い、投与液量は、雌雄とも 5ml/kg とし、各投与時に最も近い時点で測定された体重値を基準にして個別に算出した。なお、雌雄とも溶媒対照群および 1000 mg/kg 投与群の各5匹を投与期間終了後、14日間の回復試験に用いた。

## 5. 検査項目

## 1) 一般状態の観察

投与期間および回復試験期間を通じて、死亡例の有無を調べたほか、生存例全例について、一般状態を投与期間中は毎日投与前および投与後の2回(回復試験期間中は1回)観察した。

## 2) 体重および摂餌量の測定

投与開始週では、投与開始直前と投与第4日、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は、生存例全例に

ついて1週に2回の頻度で体重を測定し、投与期間あるいは回復試験期間終了日および剖検日にも体重の測定を行った。また、投与開始週では、投与開始日に、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は、生存例全例について1週に1回の頻度で1日当たりの摂餌量の測定を行った。

## 3) 尿検査

投与期間終了週(投与第23日)に各群とも動物番号の若い方から5匹を選択し、また回復試験期間終了週(回復第9日)には回復試験例全例をいずれも、約24時間代謝ケージ(夏目製作所製)に収容して採尿し、尿量〔天秤で計量(尿重量を比重で除す)〕、色調および混濁(視診)、比重〔重量法、天秤(AE200)〕について検査した。なお、pH、潜血、蛋白質、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンおよび沈渣の検査は、代謝ケージに収容して約4時間以内に採取した尿について、試験紙法〔マルティスティックス/クリニテック200(マイルス三共)〕および鏡検(光学顕微鏡)によって実施した。

## 4) 血液学検査

投与期間終了時および回復試験期間終了時の剖検に先立ち、全例について、約18ないし24時間絶食させたのち、ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈より EDTA 2K を抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コルターエレクトロニクス社)により赤血球数(電気抵抗法)、白血球数(電気抵抗法)、血色素量(吸光度法)、平均赤血球容積(電気抵抗法)、および血小板数(電気抵抗法)を測定し、これらを基に平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度およびヘマトクリット値を算出した。また、血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa 染色)および網状赤血球比率(Brecher 法)を求めた。なお、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については、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血した血液を用いて、CA-3000〔光散乱検出法(東亜医用電子)〕により測定した。

## 5) 血液生化学検査

前述の血液学検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、それぞれ血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロッシュ社)により、総蛋白濃度(ビウレット法)、アルブミン濃度(BCG 法)、総コレステロール濃度(COD・DAOS 法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ・G6PDH 法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼ・GIDH 法)、クレアチニン濃度(Jaffé 法)、アルカリフォスファターゼ活性(p-ニトロフェニルリン酸基質法)、GOT 活性(SSCC 法)、GPT 活性(SSCC 法)、LDH 活性(Wroblews-LaDue 法)、コリンエステラーゼ活性(DTNB 法)、カルシウム濃度(OCPC 法)、無機リ濃度(モリブデン酸直接法)、トリグリセライド濃度(GPO・DAOS 法)、 $\gamma$ -GTP( $\gamma$ -グタミル-3-カルボキシ-p-ニトロアニリド基質法)、A/G 比(総蛋白濃

度およびアルブミン濃度より算出)を測定した。なお、赤血球のコリンエステラーゼ活性の測定は、血液生化学検査用に採血した血液を使用し、Pitzの方法を参考にし、まず、全血0.25 mlを0.9% NaCl 10 mlで3回洗い、洗浄した赤血球に精製水5 mlを加え溶血させ遠心後、上清についてコリンエステラーゼ活性およびヘモグロビン濃度を測定した。赤血球のコリンエステラーゼ活性は、ヘモグロビンあたりの活性として表示した。また、全自動電解質分析装置 EA05(A&T)により、ナトリウム濃度(イオン電極法)、カリウム濃度(イオン電極法)、塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

#### 6) 病理学検査

上記の採血に引き続き、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、肝臓、腎臓、副腎、卵巣または精巣の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、脳、頸髄、下垂体、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、顎下腺(舌下腺を含む)、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、卵巣または精巣、膀胱、大腿骨骨髓、坐骨神経は、0.1 M リン酸緩衝10%ホルマリン液(pH7.2)で固定した。脳、頸髄、顎下腺(舌下腺を含む)、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、副腎、坐骨神経のほか、剖検時に肉眼的変化の認められた一部の例の胃、胸腺、肺、直腸、皮膚をパラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、病理組織学検査を実施した。

#### 6. 統計処理法

体重、摂餌量、尿検査(半定量検査を除く)、血液学検査、血液生化学検査ならびに器官重量で得られた実測値をもとにして、各群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群の構成が溶媒対照群を含め3群以上ある場合は、Bartlettの方法による分散の一樣性の検定(有意水準:5%)を行い、ついで、分散が一樣な場合は、一元配置型の分散分析を行い、有意(有意水準:5%)の時はDunnnettあるいはSchefféの方法で多重比較を行った。一方、分散が一樣でない場合はKruskal-Wallisの順位検定を行い、有意(有意水準:5%)ならばDunnnett型あるいはScheffé型の方法で多重比較を行った。また、試験群が溶媒対照群を含め2群となる場合には、溶媒対照群と被験物質投与群の各平均値の差の検定は、等分散であればStudentのt検定、不等分散であればAspin-Welch検定を行った。病理組織検査所見中、溶媒対照群および被験物質投与群の双方に共通してみられ、被験物質投与群で頻度、程度が増強している所見については、Mann-Whitney U test および Fisher exact test を行った。

## 結果

### 1. 一般状態

一般状態の変化として、1000 mg/kg 投与群の雌において初回投与30分後に2例で全身または両後肢の脱力が認められ、うつ伏せ状態となりこのうちの1例で軟便の排泄も認められ、さらに30分後にはうずくまり、呼吸も荒くなった。この2例の症状は投与後2~3時間には回復した。また、他の1例においても投与後3時間に両後肢の脱力が認められたが、30分後に回復した。さらに、被験物質投与群の全例で、投与直後に一過性の流涎が観察され、その多くは投与第2日以降に発現し、投与を重ねるに従って流涎のみられる例数が増加する傾向にあった。特に1000 mg/kg 投与群では雌雄ともに全例で、投与第2日からほぼ毎日一過性の流涎が認められるようになり、投与第16、17、23および25日には投与時に保定だけで流涎が観察された例も雌で認められた。また、投与期間中頸部または頬の皮膚に痂皮形成が雌の溶媒対照群および1000 mg/kg 投与群で各1例、雄の溶媒対照群および100 mg/kg 投与群で各1例、300 mg/kg 投与群で2例認められた。投与期間中に痂皮の一部が脱落して潰瘍を形成する例も認められたが、その後、潰瘍あるいは痂皮は次第に縮小し、投与期間終了時の屠殺剖検では、1000 mg/kg 投与群の雌および300 mg/kg 投与群の雄の各1例に痂皮が認められたのみであった。その他に、被験物質投与群において投与直後に摂食行動が多く例で認められたが、用量に依存した変化ではなかった。

### 2. 体重(Fig. 1)

雌雄共に、投与期間および回復試験期間を通して、溶媒対照群と被験物質投与群との間で平均体重に有意差は認められなかった。

### 3. 摂餌量(Fig. 2)

雌雄共に、投与期間および回復試験期間を通して、溶媒対照群と被験物質投与群との間で平均摂餌量に有意差は認められなかった。

### 4. 尿検査(Table 1~4)

投与期間終了週の検査では、1000 mg/kg 投与群の雌雄において、尿量の増加傾向が認められた。また、300 mg/kg 投与群の雄の1例において、ビリルビンが陽性であった。その他、一部で蛋白質、ケトン体が陽性または疑陽性となる例があり、尿沈渣中に上皮細胞または結晶が観察される例もあったが、いずれも、その出現例数あるいは程度に用量依存性は認められなかった。なお、その他の検査項目については、溶媒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。また、回復試験期間終了週の検査では、いずれの検査項目にも溶媒対照群と1000 mg/kg 投与群との間で差は認められなかった。

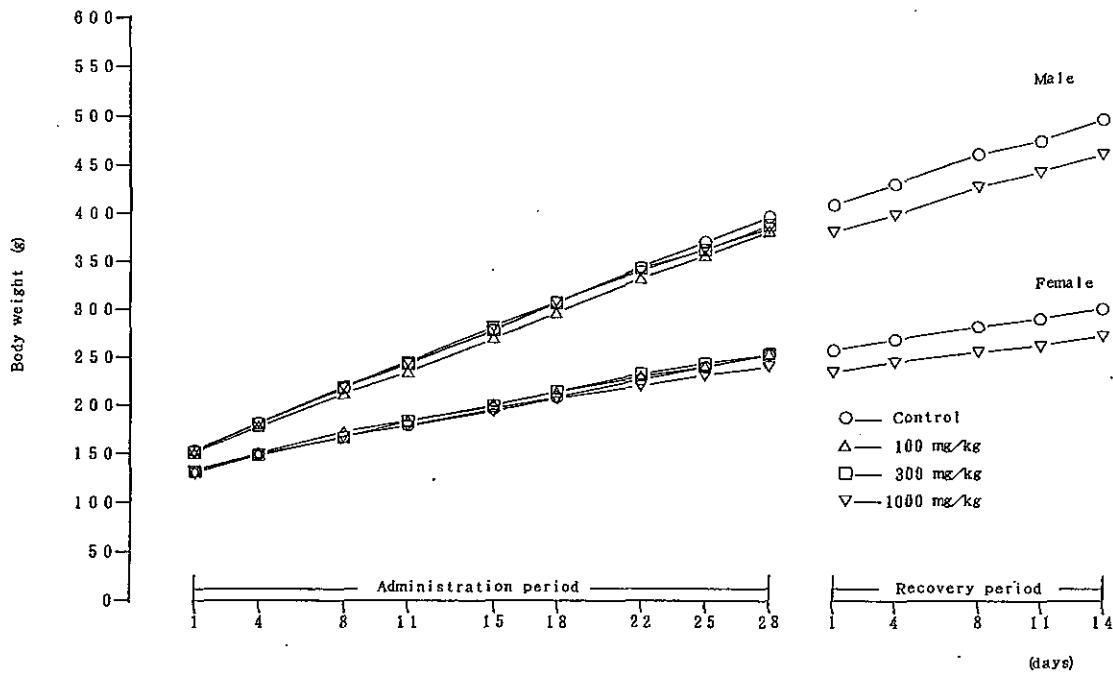


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

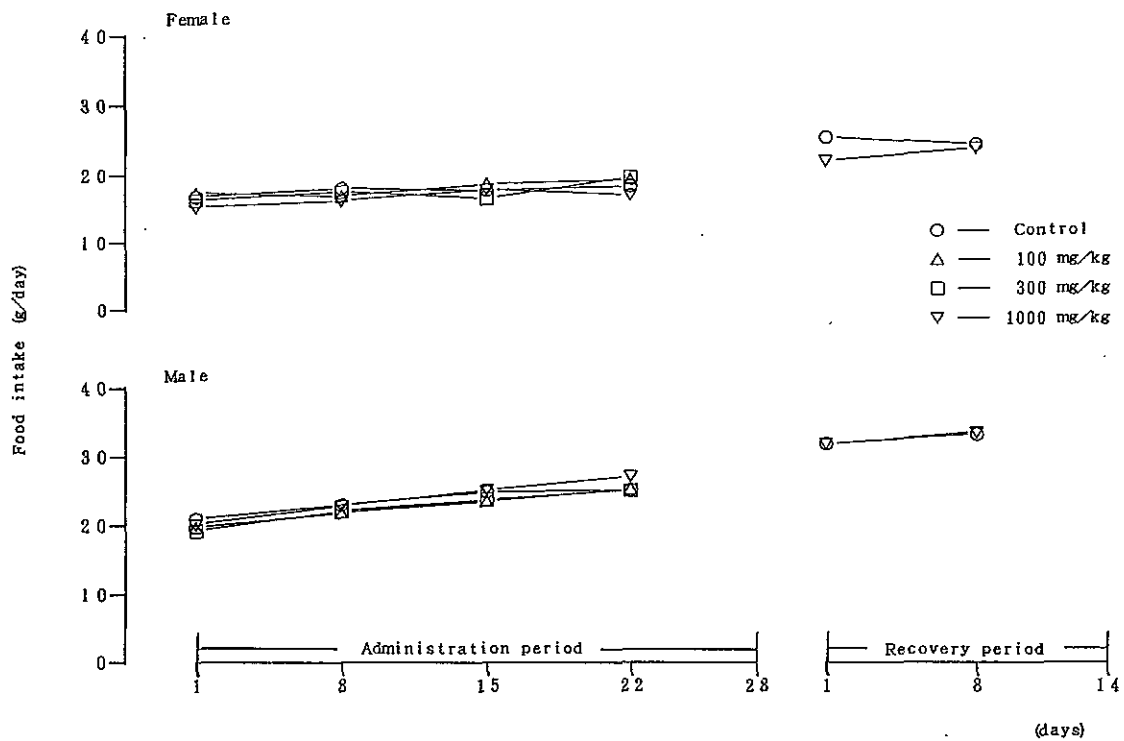


Fig. 2 Food intake of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

5. 血液学検査 (Table 5, 6)

投与期間終了時の検査では、1000 mg/kg 投与群の雌および 300 mg/kg 投与群の雄において、白血球数の有意な減少が認められ、300 mg/kg 投与群の雌および 1000 mg/kg 投与群の雄でも白血球数の減少傾向が認められた。その他の検査項目では、雌において100および 300 mg/kg 投与群の平均赤血球血色素濃度と 1000

mg/kg 投与群の血小板数が有意に増加した。

回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg 投与群の雄において白血球数の有意な減少が認められた。

6. 血液生化学検査 (Table 7~9)

投与期間終了時の検査では、雌雄において血漿中のコリンエステラーゼ活性が用量依存的に低下する傾向にあ

り、1000 mg/kg 投与群の雌雄で有意差が認められた。しかし、赤血球中のコリンエステラーゼ活性に変化は認められなかった。その他、統計学的に有意差のみられた変化として、雌では、300 および 1000 mg/kg 投与群において A/G 比の低下、100 および 1000 mg/kg 投与群において尿素窒素濃度が低下し、各被験物質投与群でクレアチニン濃度の低下が認められた。さらに、300 mg/kg 投与群で LDH 活性の低下、1000 mg/kg 投与群でカリウム濃度の低下、GPT および  $\gamma$ -GTP 活性の上昇が認められた。一方、雄では、各被験物質投与群でカリウム濃度の低下が認められたほか、300 mg/kg 投与群でアルブミン濃度の低下およびクレアチニン濃度の上昇が認められた。しかし、これらの変化には、いずれも用量依存性は認められなかった。また、雄の 1000 mg/kg 投与群でカルシウム濃度の上昇が認められた。その他の検査項目では、溶媒対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

回復試験期間終了時の検査では、1000 mg/kg 投与群において雌で総コレステロール濃度、雄で GOT 活性がそれぞれ有意に上昇し、さらに雄ではカルシウム濃度およびカリウム濃度が有意に低下した。

## 7. 病理学検査

### 1) 器官重量 (Table 10~11)

投与期間終了時屠殺剖検例では、1000 mg/kg 投与群の雌雄において、肝臓の絶対重量および相対重量が有意に増加した。また、300 mg/kg 投与群の雌においても肝臓の絶対重量および相対重量が有意に増加した。さらに、1000 mg/kg 投与群の雌において副腎の相対重量が有意に増加したが、その他には溶媒対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

回復試験期間終了時屠殺剖検例では、1000 mg/kg 投与群の雌の腎臓で絶対重量が有意に低下した。

### 2) 剖検所見

投与期間終了時屠殺剖検例では、肝臓に 1000 mg/kg 投与群の雌 5 例、雄 4 例、300 mg/kg 投与群の雌 3 例、および 100 mg/kg 投与群の雄 1 例に小葉像の明瞭化が認められ、1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に腫大が認められた。また、1000 mg/kg 投与群の雌 2 例、雄 1 例および 300 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に黄色化が、1000 mg/kg 投与群の雄 1 例、300 mg/kg 投与群の雌 1 例に褐色化が、1000 および 300 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に暗色化が観察された。その他、対照群あるいは被験物質投与群の 1 部の例で肺に暗色点あるいは赤色点、胃に暗色あるいは赤色点、陥凹部、ヘマチン様物質の付着、胸腺に赤色点、皮膚の脱毛あるいは痂皮が観察されたが、いずれも散発的で用量に依存した変化ではなかった。

回復試験期間終了時屠殺剖検例では、用量に依存した異常所見は認められなかった。

### 3) 病理組織学所見 (Table 12~13)

投与期間終了時屠殺剖検例では、雌雄の溶媒対照群を

含む各被験物質投与群の肝臓に小肉芽腫が観察され、雌では 300 mg/kg 投与群で変化の程度が有意に増強した。雄では溶媒対照群と被験物質投与群との間に発生頻度および病変の程度に差は見られなかった。また、溶媒対照群および各被験物質投与群の雌雄に小葉周辺帯に微細空胞を持つ肝細胞が観察され、1000 mg/kg 投与群の雌で、その発生頻度あるいは程度が有意に増強した。その他に、1000 mg/kg 投与群の雌の 2 例に軽微な細胞質のスリガラス状変化を伴った軽微な小葉中心性肝細胞の肥大が観察された。

腎臓では、その他、好塩基性尿細管上皮、尿細管上皮に好酸性微細顆粒あるいは eosinophilic body が観察され、好酸性円柱も認められたほか、脾臓では、単細胞壊死が、副腎では、束状帯の微細空胞化が、心臓では、右心室に小肉芽腫が観察されたが、いずれもその発生は散発的であり用量依存性も認められなかった。

回復試験期間終了時屠殺剖検例では、肝臓において、小肉芽腫が、小葉周辺帯の肝細胞の空胞化が、腎臓では、尿細管上皮に好酸性微細顆粒、eosinophilic body、軽微なリンパ球浸潤が、脾臓では、単細胞壊死が、副腎では、束状帯の空胞化が観察されたが、いずれも用量に依存した変化ではなかった。なお、脾臓では、溶媒対照群および 1000 mg/kg 投与群の雌雄全例に軽微から軽度の髄外造血が観察され、1000 mg/kg 投与群の雌雄ともに変化の程度が強くなる傾向が見られた。

この他、投与期間終了時あるいは回復試験期間終了時の屠殺剖検では、腎臓の鉍質沈着、脾臓の鬱血、腺胃のびらん等が観察されたが、いずれも用量に依存した変化ではなかった。

## 考察

プラスチックあるいは合成ゴムの可塑剤、難燃剤、床磨き剤の添加剤等として家庭用品に広く使用されているリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルの 100, 300 および 1000 mg/kg を、雌雄の Sprague-Dawley 系 (Cj:CD) ラットに 1 日 1 回、28 日間にわたって反復経口投与した。その結果、一般状態の変化として、1000 mg/kg 投与群の雌において、初回投与時に脱力、うずくまり、軟便等の急性症状が認められたが、3 時間前後で回復し、それ以後の投与時には認められなかった。さらに、雌雄とも被験物質投与群の全例で、投与直後に一過性の流涎が観察されたが、その多くは投与第 2 日以降に発現し、投与を重ねるに従って流涎のみられる例数が増加する傾向にあり、特に、1000 mg/kg 投与群の雌では、投与の保定時から認められることもあった。リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルは、粘膜に対して刺激性を有することが明らかにされていることから、本試験で観察された流涎は、被験物質の粘膜刺激性に対する反応であり、連続投与により条件反射が成立したものと考えられる。

血液生化学検査では、投与期間終了時の雌雄ともに血漿中のコリンエステラーゼ活性が用量依存的に低下する



傾向が認められ、1000 mg/kg 投与群の雌雄で有意差が認められた。リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルは、いわゆる有機燐剤の一つであり、ある種の有機燐剤は、コリンエステラーゼ活性阻害作用を有しており、神経接合部でのコリンエステラーゼ活性を阻害することにより神経障害を惹起することが明らかにされている<sup>2)</sup>。津田ら<sup>3)</sup>はリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルの Wistar 系ラットにおける14週間反復経口(混餌)投与毒性試験において血清中のコリンエステラーゼ活性が約50%低下するが、明らかな神経症状はみられないと報告している。従って、リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルがコリンエステラーゼ活性阻害作用を有している可能性が示唆されるが、本試験においてもコリンエステラーゼ活性阻害により惹起される特徴的な急性の神経症状は無く、赤血球中のコリンエステラーゼ活性にも差が認められなかったことから、その作用は非常に弱いものであると判断される。その他いくつかの検査項目で溶媒対照群と比べ有意差が認められたが、用量依存性がみられないことから、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。また、これらの血液生化学変化に対応した病理形態学的変化も認められなかった。

病理学検査では、投与期間終了時剖検屠殺例の肝臓において、1000 mg/kg 投与群の雌雄で絶対重量および相対重量の増加が、300 mg/kg 投与群の雌でも絶対重量および相対重量の増加が認められ、雌雄ともに、300 mg/kg 以上の投与群で小葉周辺帯の肝細胞の空胞性変化の発生頻度あるいは程度が増強する傾向が認められた。1000 mg/kg 投与群の雌の2例に軽微な小葉中心性の肝細胞の肥大が認められたが、細胞質がスリガラス状を呈していることから薬物代謝酵素が誘導されている可能性が示唆された。前述の Wistar 系ラットを用いた津田らの報告においてもリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステル3%混餌投与群で小葉周辺帯の肝細胞の腫大が認められることを明らかにしていることから、リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルは、肝細胞を標的臓器としている可能性が高いが、本試験からその作用機序を明らかにすることは出来なかった。なお、肝細胞の小肉芽腫は、通常のSD系ラットにもみられる変化であるが、雌のリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステル300 mg/kg 以上の投与群で、変化の程度が増強されていることから、小葉周辺帯の肝細胞の空胞変性のみならず、壊死、脱落が加わっている可能性が高い。その他の器官においても、変化が認められたが、発生頻度も少なく、用量依存性も認められなかったことから、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

尿検査では、投与期間終了週において、1000 mg/kg 投与群の雌雄で尿量の増加傾向が認められたが、生理的変動の範囲内であった。また、300 mg/kg 投与群の雄の1例にビリルビン陽性が見られたが、出現頻度も少なく、被験物質投与に起因した変化ではないと判断した。

血液学検査では、投与期間終了時の検査で、1000 mg/kg 投与群の雌および300 mg/kg 投与群の雄において、白血球数の減少が認められ、回復試験期間終了時の

検査においても1000 mg/kg 投与群の雄において白血球数の減少が認められた。しかし、これらはいずれも生理的変動範囲内の変化であり、これに伴う白血球百分比の変化がみられないことから偶発的な所見である可能性が高いと考えられる。また、その他の検査項目においても有意差が認められたが、いずれも、生理的変動範囲内を超えるものではなかった。

なお、リン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステル投与により発現したと考えられる上記の変化は、14日間の休業した例では観察されなかったことから、休業後すみやかに回復し得る変化であると考えられる。

以上のことから、本試験条件下におけるリン酸トリス(2-ブトキシエチル)エステルの無影響量は、雌雄とも100 mg/kg であると考えられる。

## 文献

- 1) W. Pilz, "Methods of Enzymatic Analysis," 2nd ed. vol. 2, Academic Press, New York, 1974, p. 844.
- 2) M. Tsuda, M. Saitoh, T. Umemura, *J. Toxicol.*, 18, 421(1993).

## 連絡先

試験責任者：今井 清

試験担当者：関 剛幸，加藤博康，小島幸一，  
稲田浩子，中尾美津男，畔上二郎，  
永田伴子，三枝克彦

(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: Kiyosi Imai (Study Director)

Takayuki Seki, Hiroyasu Katoh,

Kohichi Kojima, Hiroko Inada,

Mitsuo Nakao, Jiro Azegami,

Tomoko Nagata, Katsuhiko Saegusa

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 Urinalysis of rats treated orally with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

		(at day 23)																								
Sex	Group	N	Volume (ml/24hr)	Specific gravity	Color <sup>a)</sup>			Turbidity <sup>c)</sup>					pH					Protein <sup>d)</sup>	Glucose <sup>e)</sup>	Ketone <sup>e)</sup>	Bilirubin <sup>e)</sup>	Occult blood <sup>e)</sup>	Urobilinogen <sup>f)</sup>			
					ly	y	-	5	6	0	6	5	7	0	7	5	8							0	8	5
Female	Control	5	12.0±4.0 <sup>b)</sup>	1.058±0.009 <sup>b)</sup>	4	1	5	0	0	0	3	1	0	1	5	0	0	0	5	5	0	5	0	5	0	
	100 mg/kg	5	16.1±6.7	1.050±0.013	4	1	5	0	0	0	1	4	0	0	4	1	0	0	5	5	0	5	0	5	0	
	300 mg/kg	5	15.7±3.9	1.048±0.009	5	0	5	0	1	0	0	2	1	1	4	1	0	0	5	4	1	5	0	5	0	
	1000 mg/kg	5	18.7±6.0	1.043±0.010	5	0	5	1	0	2	0	2	0	0	3	1	1	0	5	4	1	5	0	5	4	1
Male	Control	5	14.8±1.6	1.055±0.006	5	0	5	0	0	0	1	2	0	2	0	0	5	0	5	2	3	5	0	5	0	
	100 mg/kg	5	12.9±2.3	1.058±0.015	3	2	5	0	0	0	1	3	0	1	0	1	4	0	5	2	1	5	0	5	5	0
	300 mg/kg	5	14.3±5.3	1.048±0.014	5	0	5	0	1	0	1	2	1	0	0	1	3	1	5	0	5	4	1	5	5	0
	1000 mg/kg	5	20.4±7.9	1.045±0.013	5	0	5	0	0	0	2	1	1	1	1	0	2	3	0	5	4	1	5	0	5	5

a) Mean±S.D.

b) ly:light yellow, y:yellow

c) -:negative, ±:trace, +:slight

d) -:negative, ±:trace, +:30 mg/dl, ++:100 mg/dl

e) -:negative,

f) ±:0.1 EU/dl, +:1.0 EU/dl

Table 2 Urinalysis (sediment) of rats treated orally with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

		(at day 23)										
Sex	Group	N	Red blood cell <sup>a)</sup>		Crystal <sup>b)</sup>			Cast <sup>a)</sup>	White blood cell <sup>a)</sup>		Epithelial cell <sup>b)</sup>	
			-	±	-	±	+	-	-	-	±	
Female	Control	5	5	0	5	0	5	5	5	2	3	
	100 mg/kg	5	5	0	5	0	5	5	3	2		
	300 mg/kg	5	5	0	2	3	5	5	2	3		
	1000 mg/kg	5	5	0	5	0	5	5	0	5		
Male	Control	5	5	0	3	2	5	5	2	3		
	100 mg/kg	5	5	0	3	2	5	5	1	4		
	300 mg/kg	5	5	0	3	2	5	5	0	5		
	1000 mg/kg	5	5	0	5	0	5	5	2	3		

a) -:not observed

b) -:not observed, ±:a few, +:abundant

Table 3 Urinalysis in rats at 9-day recovery period after oral administration with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex	Group	N	Volume (ml/24hr)	Specific gravity	Color <sup>a)</sup>		Turbidity <sup>c)</sup>		pH					Protein <sup>d)</sup>	Glucose <sup>e)</sup>	Ketone <sup>f)</sup>	Bilirubin <sup>e)</sup>	Occult blood <sup>e)</sup>	Urobilinogen <sup>f)</sup>				
					ly	y	-	+	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	-	±	+	-	-	±	+	-	-	±
Female	Control	5	21.1±4.9 <sup>a)</sup>	1.042±0.010 <sup>a)</sup>	5	0	4	1	1	0	2	1	1	5	0	0	5	5	0	0	5	5	5
	1000 mg/kg	5	18.1±3.1	1.048±0.004	5	0	4	1	0	2	1	1	1	5	0	0	5	5	0	0	5	5	5
Male	Control	5	22.0±1.2	1.048±0.002	5	0	4	1	0	0	3	1	1	0	1	4	5	0	1	4	5	5	5
	1000 mg/kg	5	30.2±14.6	1.042±0.020	4	1	3	2	0	1	0	1	3	1	2	2	5	2	2	1	5	5	5

a) Mean±S.D., b) ly:light yellow, y:yellow, c)-:negative, ±:trace, +:slight, d)-:negative, ±:trace, +:30 mg/dl, e)-:negative, f) ±:0.1 EU/dl

Table 4 Urinalysis (sediment) in rats at 9-day recovery period after oral administration with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex	Group	N	Red blood cell <sup>a)</sup>				Crystal <sup>b)</sup>			Cast <sup>a)</sup>	White blood cell <sup>a)</sup>			Epithelial cell <sup>b)</sup>	
			-	-	±	+	-	-	±	+	-	-	±	-	±
Female	Control	5	5	1	4	0	5	5	3	2					
	1000 mg/kg	5	5	1	4	0	5	5	2	3					
Male	Control	5	5	0	2	3	5	5	2	3					
	1000 mg/kg	5	5	0	4	1	5	5	0	5					

a)-:not observed, b)-:not observed, ±:a few, +:abundant

Table 5 Hematological findings of rats treated orally with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex	Group	N	RBC (×10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (μm <sup>3</sup> )	MCH (pg)	MCHC (%)	Reticulo-cyte (%)	WBC (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Differential count of WBC (%)							Platelet (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	PT (sec)	APTT (sec)
											Neutro.	Band	Seg.	Eos.	Baso.	Mon.	Lymph.			
Female	Control	5	674 ± 33	13.9 ± 0.6	40.7 ± 1.8	60.3 ± 1.6	20.6 ± 0.8	34.2 ± 0.6	1.9 ± 0.7	74 ± 15	0 ± 0	7 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	92 ± 3	103.9 ± 4.4	12.8 ± 0.5	24.6 ± 2.5	
	100 mg/kg	5	653 ± 43	13.7 ± 0.7	39.1 ± 1.9	59.8 ± 1.1	20.9 ± 0.5	35.0* ± 0.4	2.1 ± 0.5	67 ± 11	0 ± 0	9 ± 4	1 ± 1	0 ± 0	2 ± 2	88 ± 6	103.6 ± 9.1	12.5 ± 0.4	25.3 ± 2.2	
	300 mg/kg	5	647 ± 14	13.6 ± 0.2	38.5 ± 0.8	59.4 ± 0.6	21.0 ± 0.2	35.4** ± 0.2	2.0 ± 0.8	57 ± 8	0 ± 0	9 ± 5	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	89 ± 7	114.6 ± 11.7	12.7 ± 0.7	23.7 ± 1.9	
	1000 mg/kg	5	692 ± 30	14.2 ± 0.5	40.9 ± 1.4	59.1 ± 1.8	20.5 ± 0.9	34.7 ± 0.6	1.4 ± 0.2	51* ± 14	0 ± 0	11 ± 4	2 ± 3	0 ± 0	2 ± 2	85 ± 6	122.9* ± 10.2	13.8 ± 1.2	24.4 ± 1.9	
Male	Control	5	678 ± 13	14.1 ± 0.2	41.4 ± 0.7	61.1 ± 1.1	20.8 ± 0.3	34.1 ± 0.3	2.6 ± 0.5	78 ± 10	0 ± 0	8 ± 3	1 ± 1	0 ± 0	2 ± 1	89 ± 4	120.8 ± 6.0	18.0 ± 1.6	28.8 ± 1.2	
	100 mg/kg	5	654 ± 27	13.6 ± 0.4	40.4 ± 1.5	61.8 ± 1.6	20.8 ± 0.6	33.7 ± 0.3	2.6 ± 0.8	90 ± 25	0 ± 0	11 ± 6	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	88 ± 6	115.5 ± 13.1	19.1 ± 2.8	28.6 ± 3.0	
	300 mg/kg	5	665 ± 20	13.7 ± 0.4	40.4 ± 1.0	60.9 ± 1.1	20.6 ± 0.2	33.8 ± 0.4	2.2 ± 0.2	50* ± 6	0 ± 0	10 ± 2	1 ± 1	0 ± 0	2 ± 2	88 ± 3	110.9 ± 7.6	19.8 ± 2.2	30.6 ± 4.5	
	1000 mg/kg	5	672 ± 40	14.2 ± 0.5	41.9 ± 1.2	62.5 ± 2.7	21.2 ± 0.8	34.0 ± 0.5	2.0 ± 0.7	63 ± 13	0 ± 0	11 ± 6	1 ± 1	0 ± 0	2 ± 2	85 ± 7	124.5 ± 10.9	22.1 ± 5.4	32.4 ± 4.7	

Parameter: mean±S.D. \*:Significantly different from control, p<0.05  
 \*\*:Significantly different from control, p<0.01

Table 6 Hematological findings of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex	Group	N	RBC ( $\times 10^9/\text{mm}^3$ )	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	MCH (pg)	MCHC (%)	Reticulo- cyte (%)	WBC ( $\times 10^9/\text{mm}^3$ )	Differential count of WBC(%)							Platelet ( $\times 10^9/\text{mm}^3$ )	PT (sec)	APTT (sec)
											Neutro.		Eos.	Baso.	Mono.	Lymph.				
											Band	Seg.								
Female	Control	5	741 $\pm 52$	14.6 $\pm 1.2$	42.5 $\pm 2.4$	57.6 $\pm 1.3$	19.7 $\pm 0.5$	34.3 $\pm 1.1$	1.9 $\pm 0.8$	72 $\pm 20$	0 $\pm 0$	11 $\pm 7$	2 $\pm 1$	0 $\pm 0$	2 $\pm 2$	85 $\pm 9$	119.4 $\pm 4.7$	11.1 $\pm 0.2$	23.3 $\pm 1.1$	
	1000 mg/kg	5	763 $\pm 20$	15.1 $\pm 0.6$	43.6 $\pm 1.5$	57.2 $\pm 1.4$	19.8 $\pm 0.6$	34.6 $\pm 0.6$	1.8 $\pm 0.2$	66 $\pm 16$	0 $\pm 0$	9 $\pm 5$	2 $\pm 2$	0 $\pm 0$	1 $\pm 1$	88 $\pm 3$	111.7 $\pm 11.1$	11.3 $\pm 0.4$	24.3 $\pm 1.8$	
Male	Control	5	740 $\pm 71$	14.7 $\pm 1.1$	43.0 $\pm 2.7$	58.4 $\pm 2.9$	20.0 $\pm 1.0$	34.2 $\pm 0.5$	1.9 $\pm 1.0$	88 $\pm 19$	0 $\pm 0$	9 $\pm 7$	0 $\pm 0$	0 $\pm 0$	2 $\pm 1$	89 $\pm 7$	116.0 $\pm 9.1$	13.2 $\pm 1.6$	28.3 $\pm 2.9$	
	1000 mg/kg	5	762 $\pm 29$	15.0 $\pm 0.5$	43.9 $\pm 1.6$	57.7 $\pm 1.8$	19.7 $\pm 0.6$	34.1 $\pm 0.2$	2.0 $\pm 0.2$	57* $\pm 6$	0 $\pm 0$	12 $\pm 5$	1 $\pm 1$	0 $\pm 0$	1 $\pm 1$	86 $\pm 7$	109.7 $\pm 6.7$	15.5 $\pm 2.0$	30.6 $\pm 2.7$	

Parameter: mean $\pm$ S.D. \*:Significantly different from control,  $p < 0.05$ 

Table 7 Biochemical findings of female rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Group	N	Total	Albumin (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total	Triglyceride (mg/dl)	Inorg. phos. (mg/dl)	Ca (mg/dl)
		protein (g/dl)						cholesterol (mg/dl)			
Control	5	5.5 $\pm 0.2$	3.3 $\pm 0.2$	1.56 $\pm 0.08$	20 $\pm 3$	0.8 $\pm 0.1$	121 $\pm 11$	65 $\pm 12$	44 $\pm 5$	6.8 $\pm 0.6$	8.9 $\pm 0.2$
100 mg/kg	5	5.6 $\pm 0.3$	3.3 $\pm 0.2$	1.42 $\pm 0.10$	14** $\pm 3$	0.6** $\pm 0.1$	110 $\pm 9$	71 $\pm 10$	88 $\pm 34$	6.3 $\pm 0.6$	9.0 $\pm 0.2$
300 mg/kg	5	5.7 $\pm 0.2$	3.3 $\pm 0.2$	1.37** $\pm 0.08$	16 $\pm 2$	0.7** $\pm 0.1$	109 $\pm 6$	74 $\pm 7$	64 $\pm 30$	6.1 $\pm 0.5$	9.1 $\pm 0.1$
1000 mg/kg	5	5.8 $\pm 0.2$	3.2 $\pm 0.1$	1.23** $\pm 0.08$	14** $\pm 2$	0.6** $\pm 0.1$	111 $\pm 14$	73 $\pm 9$	73 $\pm 48$	6.0 $\pm 0.5$	9.1 $\pm 0.2$

Group	N	Na	K (mEq/dl)	Cl (mEq/dl)	ALP (U/l)	LDH (U/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	$\gamma$ -GTP (U/l)	ChE (U/l)	RBC-ChE (U/g Hb)
		(mEq/l)									
Control	5	145.8 $\pm 0.8$	4.44 $\pm 0.36$	108.8 $\pm 1.3$	270 $\pm 80$	142 $\pm 31$	19 $\pm 2$	54 $\pm 5$	0 $\pm 0$	1531 $\pm 638$	28.2 $\pm 2.6$
100 mg/kg	5	145.2 $\pm 1.2$	4.08 $\pm 0.24$	108.9 $\pm 1.0$	227 $\pm 53$	114 $\pm 27$	20 $\pm 3$	53 $\pm 5$	0 $\pm 0$	1070 $\pm 178$	30.1 $\pm 2.0$
300 mg/kg	5	144.6 $\pm 0.4$	4.19 $\pm 0.08$	109.6 $\pm 0.2$	216 $\pm 24$	89** $\pm 8$	23 $\pm 3$	51 $\pm 3$	1 $\pm 1$	772 $\pm 97$	31.0 $\pm 2.4$
1000 mg/kg	5	146.4 $\pm 1.3$	3.93* $\pm 0.27$	109.8 $\pm 2.3$	207 $\pm 43$	106 $\pm 20$	25* $\pm 3$	50 $\pm 7$	2* $\pm 2$	505** $\pm 160$	32.6 $\pm 2.1$

Parameter: Mean $\pm$ S.D. \*:Significantly different from control,  $p < 0.05$ \*\*:Significantly different from control,  $p < 0.01$

Table 8 Biochemical findings of male rats treated orally with tris (2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Group	N	Total					Total			Inorg. phos. (mg/dl)	Ca (mg/dl)
		protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)		
Control	5	5.4 ± 0.2	3.1 ± 0.1	1.40 ± 0.13	12 ± 2	0.6 ± 0.0	120 ± 7	46 ± 11	44 ± 6	6.7 ± 0.3	8.8 ± 0.3
100 mg/kg	5	5.1 ± 0.2	2.9 ± 0.1	1.33 ± 0.09	13 ± 1	0.6 ± 0.0	111 ± 13	50 ± 10	46 ± 17	7.0 ± 0.5	8.9 ± 0.2
300 mg/kg	5	5.2 ± 0.2	2.9* ± 0.1	1.29 ± 0.16	12 ± 2	0.7* ± 0.0	117 ± 12	48 ± 4	43 ± 14	6.7 ± 0.5	8.8 ± 0.2
1000 mg/kg	5	5.6 ± 0.1	3.1 ± 0.0	1.25 ± 0.04	13 ± 1	0.6 ± 0.1	119 ± 16	51 ± 10	49 ± 14	6.7 ± 0.4	9.5** ± 0.3

Group	N	Na	K	Cl	ALP	LDH	GPT	GOT	γ-GTP	ChE	RBC-ChE
		(mEq/l)	(mEq/dl)	(mEq/dl)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	(U/l)	(U/g Hb)
Control	5	144.0 ± 0.5	4.22 ± 0.11	106.8 ± 0.8	413 ± 45	174 ± 41	27 ± 4	67 ± 5	0 ± 0	382 ± 35	30.4 ± 1.5
100 mg/kg	5	144.9 ± 0.5	3.79** ± 0.12	107.6 ± 1.1	315 ± 32	132 ± 39	23 ± 4	60 ± 5	0 ± 0	341 ± 43	31.3 ± 2.2
300 mg/kg	5	145.2 ± 0.6	3.82** ± 0.11	108.3 ± 0.7	380 ± 96	228 ± 81	27 ± 5	73 ± 15	0 ± 0	335 ± 19	30.9 ± 1.5
1000 mg/kg	5	145.0 ± 0.9	3.76** ± 0.06	107.3 ± 1.5	365 ± 33	142 ± 33	27 ± 5	65 ± 5	0 ± 1	280** ± 49	31.5 ± 1.3

Parameter: Mean±S.D. \*: Significantly different from control, p&lt;0.05

\*\*: Significantly different from control, p&lt;0.01

Table 9 Biochemical findings of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test (recovery test)

Sex	Group	N	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G	BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	Inorg. phos. (mg/dl)	Ca (mg/dl)
Female	Control	5	5.8 ± 0.5	3.5 ± 0.3	1.51 ± 0.10	20 ± 3	0.8 ± 0.1	151 ± 24	66 ± 14	59 ± 23	7.1 ± 1.0	9.0 ± 0.3
	1000 mg/kg	5	6.0 ± 0.4	3.5 ± 0.2	1.42 ± 0.08	21 ± 3	0.8 ± 0.0	126 ± 20	85* ± 7	54 ± 16	7.0 ± 1.5	9.2 ± 0.3
Male	Control	5	5.6 ± 0.2	3.0 ± 0.2	1.16 ± 0.14	17 ± 1	0.7 ± 0.1	136 ± 11	56 ± 12	57 ± 18	6.4 ± 0.6	9.1 ± 0.1
	1000 mg/kg	5	5.6 ± 0.3	3.2 ± 0.3	1.32 ± 0.13	17 ± 2	0.7 ± 0.0	132 ± 17	46 ± 5	48 ± 8	6.2 ± 0.3	8.8* ± 0.2

Sex	Group	N	Na (mEq/l)	K (mEq/dl)	Cl (mEq/dl)	ALP (U/l)	LDH (U/l)	GPT (U/l)	GOT (U/l)	γ-GTP (U/l)	ChE (U/l)	RBC-ChE (U/g Hb)
Female	Control	5	144.9 ± 1.5	5.17 ± 0.56	109.2 ± 1.8	137 ± 35	337 ± 197	26 ± 7	64 ± 9	0 ± 0	1560 ± 681	23.2 ± 0.8
	1000 mg/kg	5	145.8 ± 1.3	4.68 ± 0.28	108.2 ± 1.4	165 ± 21	152 ± 53	21 ± 2	55 ± 5	1 ± 1	1109 ± 254	23.8 ± 2.0
Male	Control	5	147.1 ± 0.7	4.29 ± 0.30	109.7 ± 0.9	254 ± 42	183 ± 117	24 ± 3	59 ± 5	0 ± 0	396 ± 90	24.3 ± 1.3
	1000 mg/kg	5	147.7 ± 0.4	3.89* ± 0.08	109.4 ± 1.3	278 ± 81	215 ± 82	28 ± 7	73* ± 10	0 ± 1	337 ± 51	24.8 ± 0.8

Parameter: Mean±S.D. \*: Significantly different from control, p&lt;0.05

Table 10 Organ weights of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex	Group	N	Body weight (g)	Absolute					Relative				
				Brain (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries/Testes (mg)	Brain (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries/Testes (mg/g)
Female	Control	5	229.2 ± 11.4	1744.9 ± 58.6	7141.5 ± 592.3	1723.2 ± 121.3	59.2 ± 8.0	87.2 ± 10.8	7.630 ± 0.462	31.154 ± 1.971	7.515 ± 0.215	0.258 ± 0.025	0.381 ± 0.049
	100 mg/kg	5	232.6 ± 9.7	1801.1 ± 53.8	7593.6 ± 534.5	1693.6 ± 133.0	59.5 ± 8.0	89.5 ± 13.0	7.753 ± 0.371	32.615 ± 1.070	7.288 ± 0.624	0.255 ± 0.023	0.383 ± 0.041
	300 mg/kg	5	234.3 ± 22.8	1730.3 ± 37.3	8447.6* ± 1040.8	1804.8 ± 147.7	65.5 ± 5.3	92.3 ± 13.7	7.446 ± 0.792	36.026** ± 2.159	7.716 ± 0.364	0.280 ± 0.006	0.393 ± 0.032
	1000 mg/kg	5	227.4 ± 17.5	1712.5 ± 23.3	9288.2** ± 867.8	1753.8 ± 138.5	69.4 ± 5.1	75.5 ± 4.6	7.563 ± 0.561	40.848** ± 2.360	7.722 ± 0.491	0.306** ± 0.020	0.334 ± 0.036
Male	Control	5	363.6 ± 25.0	1971.3 ± 88.8	12306.8 ± 902.8	2562.4 ± 101.1	45.9 ± 3.7	2918.4 ± 220.2	5.440 ± 0.406	33.855 ± 1.249	7.076 ± 0.602	0.127 ± 0.018	8.086 ± 1.150
	100 mg/kg	5	351.0 ± 27.4	1924.2 ± 58.0	12336.4 ± 1655.8	2644.4 ± 217.3	48.6 ± 2.3	2946.6 ± 96.3	5.510 ± 0.476	35.070 ± 2.544	7.549 ± 0.526	0.139 ± 0.010	8.434 ± 0.670
	300 mg/kg	5	360.1 ± 14.6	1985.6 ± 42.9	12566.2 ± 1142.0	2685.7 ± 155.4	57.7 ± 20.6	3092.1 ± 132.9	5.518 ± 0.130	34.842 ± 1.892	7.455 ± 0.189	0.160 ± 0.059	8.603 ± 0.598
	1000 mg/kg	5	362.8 ± 20.5	1921.8 ± 48.4	15275.0** ± 1076.0	2668.7 ± 221.6	51.2 ± 7.5	3015.1 ± 160.4	5.306 ± 0.181	42.159** ± 2.991	7.350 ± 0.257	0.141 ± 0.021	8.334 ± 0.661

Parameter: mean±S.D. \*:Significantly different from control, p&lt;0.05

\*\*:Significantly different from control, p&lt;0.01

Table 11 Organ weights of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test (recovery test)

Sex	Group	N	Body weight (g)	Absolute					Relative				
				Brain (mg)	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Adrenal glands (mg)	Ovaries/Testes (mg)	Brain (mg/g)	Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Adrenal glands (mg/g)	Ovaries/Testes (mg/g)
Female	Control	5	273.4 ± 30.9	1803.9 ± 21.5	8166.7 ± 786.6	2038.9 ± 109.7	75.4 ± 15.6	90.0 ± 4.9	6.675 ± 0.851	29.976 ± 2.120	7.507 ± 0.609	0.278 ± 0.065	0.334 ± 0.054
	1000 mg/kg	5	246.7 ± 16.5	1773.2 ± 60.3	7370.0 ± 784.2	1723.7** ± 80.7	65.4 ± 5.3	83.2 ± 10.4	7.210 ± 0.487	29.877 ± 2.647	6.999 ± 0.355	0.266 ± 0.018	0.338 ± 0.044
Male	Control	5	456.6 ± 34.5	2031.3 ± 76.5	14512.9 ± 2481.9	3057.0 ± 224.3	59.2 ± 4.2	3452.8 ± 348.6	4.460 ± 0.225	31.615 ± 2.815	6.702 ± 0.344	0.130 ± 0.008	7.635 ± 1.232
	1000 mg/kg	5	420.1 ± 24.1	1984.1 ± 84.6	13268.0 ± 1322.1	2947.4 ± 136.1	58.3 ± 6.3	3277.4 ± 193.7	4.729 ± 0.187	31.524 ± 1.578	7.032 ± 0.464	0.140 ± 0.021	7.817 ± 0.537

Parameter: mean±S.D. \*\*:Significantly different from control, p&lt;0.01

Table 12 Summary of microscopic findings of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twentieth-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex	Pathological findings	Control					100 mg/kg					300 mg/kg					1000 mg/kg								
		-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.	-	±	+	++	+++	Pos.
Female	(Heart)	[ 5]					[ 5]					[ 5]					[ 5]								
	microgranuloma in the right ventricle	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
	(pancreas)	[ 5]					[ 5]					[ 5]					[ 5]								
	single cell necrosis	4	1	0	0	0	1	4	0	1	0	0	1	2	3	0	0	0	3	4	1	0	0	0	1
	(Liver)	[ 5]					[ 5]					[ 5]					[ 5]								
	microgranuloma	1	4	0	0	0	4	0	4	1	0	0	5	0	1	4	0	0*	5	1	1	3	0	0	4
	fine vacuolation of hepatocyte in the peripheral zone	1	4	0	0	0	4	1	3	1	0	0	4	0	3	2	0	0	5	0	0	2	3	0**	5
	Kupffer cell proliferation	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
	hypertrophy of hepatocyte, ground glass appearance in the central zone	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2
	(Kidney)	[ 5]					[ 5]					[ 5]					[ 5]								
	basophilic tubular epithelium	4	1	0	0	0	1	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3
	infiltration of lymphocytes	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0
	eosinophilic granules in the tubular epithelium	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
	mineral deposits	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
	eosinophilic cast	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
	(Spleen)	[ 5]					[ 5]					[ 5]					[ 5]								
	extramedullary hematopoiesis	0	5	0	0	0	5	1	3	1	0	0	4	0	5	0	0	0	5	0	4	1	0	0	5
	yellow pigments	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0
	acute congestion	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
	follicular hyperplasia	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	2	5	0	0	0	0	0
(Adrenal gland)	[ 5]					[ 5]					[ 5]					[ 5]									
fine vacuolation in the zona fasciculata	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	
Male	(Pancreas)	[ 5]					[ 5]					[ 5]					[ 5]								
	single cell necrosis	4	1	0	0	0	1	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	2	2	1	0	0	3
	(Liver)	[ 5]					[ 5]					[ 5]					[ 5]								
	microgranuloma	0	3	2	0	0	5	0	2	3	0	0	5	0	3	2	0	0	5	1	1	3	0	0	4
	fine vacuolation of hepatocyte in the peripheral zone	2	3	0	0	0	3	2	2	1	0	0	3	0	2	3	0	0	5	0	2	3	0	0	5
	(Kidney)	[ 5]					[ 5]					[ 5]					[ 5]								
	basophilic tubular epithelium	4	0	1	0	0	1	2	3	0	0	0	3	1	4	0	0	0	4	3	2	0	0	0	2
	eosinophilic granules in the tubular epithelium	0	3	2	0	0	5	3	2	0	0	0	2	1	1	3	0	0	4	0	0	5	0	0	5
	eosinophilic body in the tubular epithelium	4	0	1	0	0	1	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	3	1	1	0	0	2
	infiltration of lymphocytes	3	2	0	0	0	2	4	1	0	0	0	1	1	4	0	0	0	4	3	2	0	0	0	2
	eosinophilic cast	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
	(spleen)	[ 5]					[ 5]					[ 5]					[ 5]								
	extramedullary hematopoiesis	0	1	3	1	0	5	0	0	5	0	0	5	0	1	4	0	0	5	0	0	4	1	0	5
	(Adrenal gland)	[ 5]					[ 5]					[ 5]					[ 5]								
fine vacuolation in the zona fasciculata	3	2	0	0	0	2	2	3	0	0	0	3	3	2	0	0	0	2	2	3	0	0	0	3	

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[ ], Number of animals examined

\*, Significantly different from control  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U test)\*\*, Significantly different from control  $p < 0.01$  (Mann-Whitney U test)



Table 13 Summary of microscopic findings of rats treated orally with tris(2-butoxyethyl) phosphate in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test (recovery test)

Pathological findings	Female				Male			
	Control		1000 mg/kg		Control		1000 mg/kg	
	-	± + +++ Pos.	-	± + +++ Pos.	-	± + +++ Pos.	-	± + +++ Pos.
(Pancreas)	[ 5]		[ 5]		[ 5]		[ 5]	
single cell necrosis	4	1 0 0 0 1	2	3 0 0 0 3	3	2 0 0 0 2	0	2 2 1 0* 5
(Liver)	[ 5]		[ 5]		[ 5]		[ 5]	
microgranuloma	1	3 1 0 0 4	0	2 3 0 0 5	0	0 5 0 0 5	0	5 0 0 0** 5
fine vacuolation of hepatocyte in the peripheral zone	4	1 0 0 0 1	3	2 0 0 0 2	0	3 2 0 0 5	1	3 1 0 0 4
(Kidney)	[ 5]		[ 5]		[ 5]		[ 5]	
basophilic tubular epithelium	4	1 0 0 0 1	5	0 0 0 0 0	2	2 1 0 0 3	2	3 0 0 0 3
infiltration of lymphocytes	4	1 0 0 0 1	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0	1	4 0 0 0 4#
eosinophilic granules in the tubular epithelium	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0	3	0 2 0 0 2	0	0 5 0 0 5
eosinophilic body in the tubular epithelium	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0	2	1 2 0 0 3
eosinophilic cast	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0	4	1 0 0 0 1
(Spleen)	[ 5]		[ 5]		[ 5]		[ 5]	
extramedullary hematopoiesis	0	5 0 0 0 0	0	3 2 0 0 5	0	2 3 0 0 5	0	0 5 0 0 5
yellow pigments	3	1 1 0 0 2	4	1 0 0 0 1	5	0 0 0 0 0	5	0 0 0 0 0
(Adrenal gland)	[ 5]		[ 5]		[ 5]		[ 5]	
fine vacuolation in the zona fasciculata	5	0 0 0 0 0	4	1 0 0 0 1	1	3 1 0 0 4	1	3 1 0 0 4

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade

[ ], Number of animals examined

\*, Significantly different from control  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U test)\*\*, Significantly different from control  $p < 0.01$  (Mann-Whitney U test)#, significantly different from control  $p < 0.05$  (Fisher exact test)

# 2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of Sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate on Bacteria

### 要約

2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

試験は、指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、S9 mix 非存在(直接法)および存在(代謝活性化法)下でプレインキュベーション法により行った。

156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000  $\mu\text{g}$ /プレート濃度を設定して行った濃度設定試験では、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において生育阻害は認められず、いずれの濃度においても溶媒対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。したがって、本試験は、濃度設定試験と同じ濃度を用いて同様に行った。

試験の結果、濃度設定試験と同様、全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められず、また、菌の生育阻害も認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムは、細菌に対し遺伝子突然変異を誘発しない(陰性)と結論した。

### 方法

#### 1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1)</sup> および *E. coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> の5菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を解凍後、その30  $\mu\text{L}$  をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の菌懸濁液は、濁度を測定し、濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり $1 \times 10^8$ 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

#### 2. 被験物質

2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウム(ロット番号D-1101, スガイ化学工業(株)提供)は、緑がかった灰色の粉末で、水に可溶、ジメチルスルホキシド(DMSO)、メタノールに不溶であり、分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$ 、分子量348.26、純度96.4% (不純物として、水約3%、無機分0.1%以下、微量の異性体を含む)の物質である。

実験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 3. 被験物質供試液の調製

溶媒に蒸留水(株)大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製した。

#### 4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(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(Aldrich Chemical Co.)

AF-2 および 2-AA は DMSO (株)同仁化学研究所)に、SA および 9-AA は蒸留水(株)大塚製薬工場)に溶解した。

#### 5. 培地

##### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディアAN培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。培地1 Lあたりの組成は下記のとおりであり、径90 mmのシャーレ1枚あたりに30 mLを分注したものである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	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
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

##### 2) アミノ酸添加軟寒天培地(トップアガー)

0.6%寒天粉末(Difco Laboratories)および0.5%塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、*S. typhimurium*用には0.5 mM D-ピオチンおよび0.5 mM L-

ヒスチジン水溶液, *E. coli*用には0.5 mM L-トリプトファン水溶液を1/10容加え, トップアガーとした。

#### 6. S9 mix

製造後6ヶ月以内のエームステスト用凍結S9 mix(キッコマン(株))を購入し, 使用した。S9は, 誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

#### 7. 試験方法

試験は, プレインキュベーション法で行った。

試験管に使用溶媒, 被験物質供試液あるいは陽性対照物質溶液を0.1 mL, 次いで直接法では0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を0.5 mL, 代謝活性化法ではS9 mixを0.5 mL加え, 続いて試験菌液0.1 mLを分注し, 37°Cで20分間振盪培養した。培養終了後, 45°Cに保温したトップアガー2 mLを加えた混合液をプレート上に重層した。37°Cで48時間培養後, 復帰変異コロニーを計数し, 同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。プレートは, 各濃度とも3枚を使用した。

#### 8. 結果の判定

結果の判定は, 各濃度におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に, 以下の3基準を全て満たす場合を陽性とした。

- 1) 被験物質処理群において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
- 2) 被験物質濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する(濃度依存性)。
- 3) 濃度設定試験および本試験の結果から, 復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

#### 結果および考察

156~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲で濃度を設定(公比2)して行った濃度設定試験(Table 1, 2)では, 直接法および代謝活性化法ともに, いずれの指標菌株においても溶媒対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加は認められず, また, いずれの菌株においても被験物質による生育阻害は認められなかった。したがって, 本試験における被験物質の処理濃度は, 最高濃度を5000  $\mu\text{g}$ /プレートとし, 以下公比2で2500, 1250, 625, 313および156  $\mu\text{g}$ /プレートとした。

本試験の結果(Table 3, 4)は, 濃度設定試験と同様, 直接法および代謝活性化法のいずれの場合も, 供試した全ての菌株における復帰変異コロニー数は, 溶媒対照値の2倍を越えるものではなかった。また, いずれの菌株においても生育阻害は認められなかった。

以上の成績から, 本実験条件下では, 2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

なお, 2-ナフトールの変異原性については, *S. typhimurium*を用いた復帰突然変異試験で陰性, DNA修復試験では, *Bacillus subtilis*を用いた場合は陰性, *E. coli*を用いた場合は陽性であり, がん原性については陰性と報告されている<sup>3)</sup>。また, シリアンハムスター由来のBHK21cl13細胞を用いたトランスフォーメーション試験では陰性と報告されている<sup>4)</sup>。

#### 文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," 1, Vol.3, eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.
- 3) W. Suter, I. Jaeger, *Mutat. Res.*, **97**, 1 (1982).
- 4) 賀田恒夫, 石館基監修, "環境変異原データ集1," サイエンティスト社, 東京, 1980, p. 289.

#### 連絡先

試験責任者: 野田 篤

試験担当者: 野田 篤, 昆 尚美

(財)畜産生物科学安全研究所

〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11

Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

#### Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)

Naomi Kon

Research Institute for Animal Science in  
Biochemistry and Toxicology

3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi,  
kanagawa, 229-1132, Japan

Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Results of reverse mutation test of sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate on bacteria (Dose range finding test) [direct method:-S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate															[Mean $\pm$ S.D.]				
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
0	125	131	123	8	11	12	11	12	19	10	18	12	11	8	4	[126 $\pm$ 4]	[ 8 $\pm$ 2]	[ 14 $\pm$ 4]	[ 13 $\pm$ 4]	[ 8 $\pm$ 4]
156	153	151	155	6	10	7	11	14	16	11	28	19	9	7	4	[153 $\pm$ 2]	[ 8 $\pm$ 2]	[ 14 $\pm$ 3]	[ 19 $\pm$ 9]	[ 7 $\pm$ 3]
313	133	127	122	9	6	8	8	12	12	20	25	24	4	4	7	[127 $\pm$ 6]	[ 8 $\pm$ 2]	[ 11 $\pm$ 2]	[ 23 $\pm$ 3]	[ 5 $\pm$ 2]
625	137	136	117	9	6	10	10	14	19	23	17	18	3	8	4	[130 $\pm$ 11]	[ 8 $\pm$ 2]	[ 14 $\pm$ 5]	[ 19 $\pm$ 3]	[ 5 $\pm$ 3]
1250	121	138	122	11	9	10	14	16	16	25	15	20	4	9	5	[127 $\pm$ 10]	[ 10 $\pm$ 1]	[ 15 $\pm$ 1]	[ 20 $\pm$ 5]	[ 6 $\pm$ 3]
2500	159	125	131	8	6	9	19	14	12	25	12	24	4	9	10	[138 $\pm$ 18]	[ 8 $\pm$ 2]	[ 15 $\pm$ 4]	[ 20 $\pm$ 7]	[ 8 $\pm$ 3]
5000	139	170	153	6	8	9	16	7	21	10	24	13	4	7	3	[154 $\pm$ 16]	[ 8 $\pm$ 2]	[ 15 $\pm$ 7]	[ 16 $\pm$ 7]	[ 5 $\pm$ 2]
Positive control	951	904	894**	265	289	292**	847	819	926**	399	402	428**	586	482	585**	[916 $\pm$ 30]	[282 $\pm$ 15]	[864 $\pm$ 55]	[410 $\pm$ 16]	[551 $\pm$ 60]

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
 c): AF-2, 0.04  $\mu\text{g}/\text{plate}$     d): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     e): 9-AA; 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2 Results of reverse mutation test of sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate on bacteria (Dose range finding test) [activation method:+S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate															[Mean $\pm$ S.D.]				
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
0	121	140	139	8	8	9	13	12	20	33	47	36	11	16	14	[133 $\pm$ 11]	[ 8 $\pm$ 1]	[ 15 $\pm$ 4]	[ 39 $\pm$ 7]	[ 14 $\pm$ 3]
156	130	164	145	7	7	12	12	14	12	43	30	24	15	14	10	[146 $\pm$ 17]	[ 9 $\pm$ 3]	[ 13 $\pm$ 1]	[ 32 $\pm$ 10]	[ 13 $\pm$ 3]
313	142	135	117	17	11	14	15	22	15	31	34	47	9	12	15	[131 $\pm$ 13]	[ 14 $\pm$ 3]	[ 17 $\pm$ 4]	[ 37 $\pm$ 9]	[ 12 $\pm$ 3]
625	119	165	148	12	8	12	15	14	12	36	21	32	13	13	10	[144 $\pm$ 23]	[ 11 $\pm$ 2]	[ 14 $\pm$ 2]	[ 30 $\pm$ 8]	[ 12 $\pm$ 2]
1250	131	167	146	9	7	11	22	18	14	42	31	23	6	7	15	[148 $\pm$ 18]	[ 9 $\pm$ 2]	[ 18 $\pm$ 4]	[ 32 $\pm$ 10]	[ 9 $\pm$ 5]
2500	134	170	154	10	7	13	15	17	16	42	33	30	10	12	15	[153 $\pm$ 18]	[ 10 $\pm$ 3]	[ 16 $\pm$ 1]	[ 35 $\pm$ 6]	[ 12 $\pm$ 3]
5000	140	157	171	9	11	11	15	20	7	30	35	48	10	7	12	[156 $\pm$ 16]	[ 10 $\pm$ 1]	[ 14 $\pm$ 7]	[ 38 $\pm$ 9]	[ 10 $\pm$ 3]
Positive control	361	324	349**	129	137	149**	981	954	972**	244	266	249**	98	102	100**	[345 $\pm$ 19]	[138 $\pm$ 10]	[969 $\pm$ 14]	[253 $\pm$ 12]	[100 $\pm$ 2]

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b): 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$     c): 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3 Results of reverse mutation test of sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate on bacteria [direct method:-S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	152	154	155	9	15	18	20	11	17	20	16	16	6	7	4
	[154 $\pm$ 2]			[ 14 $\pm$ 5]			[ 16 $\pm$ 5]			[ 17 $\pm$ 2]			[ 6 $\pm$ 2]		
156	163	166	153	13	9	7	11	14	17	21	10	23	9	5	5
	[161 $\pm$ 7]			[ 10 $\pm$ 3]			[ 14 $\pm$ 3]			[ 18 $\pm$ 7]			[ 6 $\pm$ 2]		
313	137	153	168	14	13	11	12	15	14	19	24	13	3	4	5
	[153 $\pm$ 16]			[ 13 $\pm$ 2]			[ 14 $\pm$ 2]			[ 19 $\pm$ 6]			[ 4 $\pm$ 1]		
625	142	147	146	14	10	13	11	17	14	12	15	28	5	4	4
	[145 $\pm$ 3]			[ 12 $\pm$ 2]			[ 14 $\pm$ 3]			[ 18 $\pm$ 9]			[ 4 $\pm$ 1]		
1250	149	134	153	11	8	12	14	10	17	13	21	20	6	5	3
	[145 $\pm$ 10]			[ 10 $\pm$ 2]			[ 14 $\pm$ 4]			[ 18 $\pm$ 4]			[ 5 $\pm$ 2]		
2500	122	126	137	18	9	12	13	9	15	12	16	19	4	6	3
	[128 $\pm$ 8]			[ 13 $\pm$ 5]			[ 12 $\pm$ 3]			[ 16 $\pm$ 4]			[ 4 $\pm$ 2]		
5000	129	146	134	13	7	11	10	13	8	22	12	13	3	4	3
	[136 $\pm$ 9]			[ 10 $\pm$ 3]			[ 10 $\pm$ 3]			[ 16 $\pm$ 6]			[ 3 $\pm$ 1]		
Positive control	759	827	721 <sup>a</sup>	373	347	359 <sup>b</sup>	815	763	795 <sup>c</sup>	385	417	403 <sup>d</sup>	763	821	950 <sup>e</sup>
	[769 $\pm$ 54]			[360 $\pm$ 13]			[791 $\pm$ 26]			[402 $\pm$ 16]			[845 $\pm$ 96]		

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
 c): AF-2, 0.04  $\mu\text{g}/\text{plate}$     d): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     e): 9-AA; 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4 Results of reverse mutation test of sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate on bacteria [activation method:+S9]

Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	156	156	140	10	10	17	16	15	14	30	30	34	13	8	12
	[151 $\pm$ 9]			[ 12 $\pm$ 4]			[ 15 $\pm$ 1]			[ 31 $\pm$ 2]			[ 11 $\pm$ 3]		
156	150	141	158	15	14	10	18	13	16	38	25	30	8	16	13
	[150 $\pm$ 9]			[ 13 $\pm$ 3]			[ 16 $\pm$ 3]			[ 31 $\pm$ 7]			[ 12 $\pm$ 4]		
313	153	151	153	12	13	15	17	22	18	19	29	36	15	15	8
	[152 $\pm$ 1]			[ 13 $\pm$ 2]			[ 19 $\pm$ 3]			[ 28 $\pm$ 9]			[ 13 $\pm$ 4]		
625	173	158	160	14	13	10	16	18	20	33	22	27	11	6	6
	[164 $\pm$ 8]			[ 12 $\pm$ 2]			[ 18 $\pm$ 2]			[ 27 $\pm$ 6]			[ 8 $\pm$ 3]		
1250	176	153	167	11	12	11	13	19	17	37	28	29	9	16	5
	[165 $\pm$ 12]			[ 11 $\pm$ 1]			[ 16 $\pm$ 3]			[ 31 $\pm$ 5]			[ 10 $\pm$ 6]		
2500	181	179	188	9	15	10	20	13	17	35	34	37	11	14	10
	[183 $\pm$ 5]			[ 11 $\pm$ 3]			[ 17 $\pm$ 4]			[ 35 $\pm$ 2]			[ 12 $\pm$ 2]		
5000	178	160	185	14	12	8	21	23	23	24	18	20	9	8	9
	[174 $\pm$ 13]			[ 11 $\pm$ 3]			[ 22 $\pm$ 1]			[ 21 $\pm$ 3]			[ 9 $\pm$ 1]		
Positive control	503	479	483 <sup>a</sup>	272	219	260 <sup>b</sup>	1003	965	1068 <sup>c</sup>	285	279	293 <sup>a</sup>	112	104	92 <sup>b</sup>
	[488 $\pm$ 13]			[250 $\pm$ 28]			[1012 $\pm$ 52]			[286 $\pm$ 7]			[103 $\pm$ 10]		

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b): 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$     c): 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$

2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムの  
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  
Sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムの染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL)を用いて *in vitro* における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、5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を最高濃度として細胞増殖抑制試験を行ったところ、連続処理法24時間および48時間処理、並びに短時間処理法S9 mix非存在および存在下のいずれの場合においても50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。したがって、染色体異常試験における濃度は、連続処理法および短時間処理法ともに1250、2500および5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とした。

試験の結果、連続処理法および短時間処理法のいずれの方法においても、染色体異常を有する細胞の明らかな増加は認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下において、2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムは、CHL細胞に対し染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL)〔国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部(元:国立衛生試験所 変異原性部)から昭和60年1月13日入手〕を使用した。供試細胞は、浮遊細胞液に10%の割合でジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業(株))を添加し、液体窒素条件下で保存しておいたものを培養液に戻し、解凍後の継代数が3回までのものを使用した。

2. 培養液

Eagle-MEM粉末培地(Gibco Laboratories)を常法に従い調製し、これに非働化仔牛血清(Gibco Laboratories)を10%の割合で添加したものをを用いた。

3. 培養条件

$4 \times 10^3$ 個/mLの細胞を含む培養液5 mLをシャーレ(径6 cm, Becton Dickinson Co.)に加え、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。

連続処理法では、培養開始3日後に被験物質供試液を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理法では、培養開始3日後にS9 mix非存在および存在下

で6時間処理し、処理終了後、新鮮培養液でさらに18時間培養した。

4. S9 mix

製造後6ヶ月以内の染色体異常試験用凍結S9 mix(キッコマン(株))を購入し、使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

5. 被験物質

2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウム(ロット番号D-11001, スガイ化学工業(株)提供)は、緑がかった灰色の粉末で、水に可溶、DMSO、メタノールに不溶であり、分子式C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>、分子量348.26、純度96.4% (不純物として、水約3%、無機分0.1%以下、微量の異性体を含む)の物質である。

実験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質供試液の調製

溶媒に生理食塩液(株)大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製し、そのシャーレ内への添加量は培養液量の10%(v/v)とした。

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及ぼす影響を調べた。0.1%クリスタルバイオレット水溶液で染色した細胞の密度を単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業(株))を用いて測定し、溶媒対照群の細胞増殖率を100%とした時の各濃度群の細胞増殖率を求めた。

その結果(Appendix 1, 2)、連続処理法および短時間処理法ともに処理した全ての濃度で50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。

Appendix 1 Cell growth inhibition test of CHL cells continuously treated with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate without S9 mix

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Average cell growth rate (%)	
	24-hour treatment	48-hour treatment
0 (Solvent)	100	100
78	102.5	87.0
156	101.0	92.5
313	97.5	84.0
625	98.5	84.5
1250	94.0	84.5
2500	92.0	77.5
5000	82.0	60.0

Appendix 2 Cell growth inhibition test of CHL cells treated with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate with and without S9 mix

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Average cell growth rate (%)	
	without S9 mix	with S9 mix
0 (Solvent)	100	100
78	102.0	95.5
156	95.5	103.5
313	95.0	104.0
625	91.5	97.0
1250	94.0	97.5
2500	89.5	93.0
5000	88.5	90.0

#### 8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果を基に、染色体異常試験では、連続処理法、短時間処理法ともに1250、2500および5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (公比2)の3濃度を設定した。対照として、溶媒対照群と陽性対照群を設けた。

陽性対照として、連続処理法では *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, Sigma Chemical Co.) を2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法では3,4-benzo [a] pyrene (B [a] P, Sigma Chemical Co.) を10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で用いた。陽性対照物質の溶媒には、いずれもDMSO (和光純薬工業株) を使用した。

#### 9. 染色体標本の作製

培養終了2時間前にコルセミド (Gibco Laboratories) を最終濃度として0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加した。トリプシン処理で細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した。75 mM 塩化カリウム水溶液で低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.4% ギムザ液で約15分間染色した。スライド標本は、各シャーレにつき3枚作製した。

#### 10. 染色体の観察

各シャーレ当たり100個、すなわち、1濃度当たり2シャーレ、200個の分裂中期像を、総合倍率600倍の顕微鏡下で観察した。標本は全てコード化し、盲検法で観察を行った。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)による分類法<sup>1)</sup>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と倍数性細胞(Polyploid)の有無について観察した。

#### 11. 記録と判定

観察した細胞数、構造異常の種類と数および倍数性細胞の数について集計し、構造異常を有する細胞については、ギャップのみを有する細胞を含めた場合(+g)と含めない場合(-g)とに区別して記録した。

ギャップを含めた染色体構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度について、多試料 $\chi^2$ 検定を行い有意差(有意水準5%以下)が認められた場合は、フィッシャーの直接確率法を用いて溶媒対照群と各濃度群との間の有意差検定(有意水準は多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた)を行った。

その結果、溶媒対照群と比較して、被験物質による染色体異常細胞の出現頻度が2濃度以上で有意に増加し、かつ濃度依存性あるいは再現性が認められた場合、陽性と判定した。

#### 結果および考察

連続処理法による結果をTable 1に示した。2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムを加えて24時間および48時間処理したいずれの濃度群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理法による結果をTable 2に示した。S9 mix非存在および存在下で6時間処理したいずれの濃度群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

したがって、本実験条件下では、2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムのCHL細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。本試験結果は、CHL細胞において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性とする生物学的判定基準<sup>2)</sup>からみても明らかに陰性を示すものであった。

なお、2-ナフトールの変異原性については、*Salmonella typhimurium*を用いた復帰突然変異試験で陰性、DNA修復試験では、*Bacillus subtilis*を用いた場合は陰性、*Escherichia coli*を用いた場合は陽性であり、がん原性については陰性と報告されている<sup>3)</sup>。また、シリアンハムスター由来のBHK21cl13細胞を用いたトランスフォーメーション試験では陰性と報告されている<sup>4)</sup>。

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) 石館 基 監修, “改訂増補 染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 19.
- 3) W. Stuter, I. Jaeger, *Mutat. Res.*, **97**, 1(1982).
- 4) 賀田恒夫, 石館 基 監修, “環境変異原データ集1,” サイエンティスト社, 東京, 1980, p. 289.

連絡先

試験責任者: 野田 篤

試験担当者: 野田 篤, 昆 尚美

(財)畜産生物科学安全研究所

〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11

Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)

Naomi Kon

Research Institute for Animal Science in

Biochemistry and Toxicology

3-7-11 Hashimotodai, Sagamihara-shi,

kanagawa, 229-1132, Japan

Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979



Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations			Judgement <sup>3)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)	Polyploid <sup>2)</sup> (%)	SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	0	-	-
SNDS	1250	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0(0)	1(0.5)	0	-	-
	2500	24	200	0	2	0	0	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.5	-	-
	5000	24	200	1	2	0	0	0	0	3	2(1.0)	3(1.5)	0	-	-
MNNG	2.5	24	200	11	37	196	5	0	0	249	196(98.0)	197(98.5)**	0	+	-
Solvent	0	48	200	1	0	0	0	1	0	2	1(0.5)	2(1.0)	0	-	-
SNDS	1250	48	200	1	0	1	0	2	0	4	3(1.5)	4(2.0)	0	-	-
	2500	48	200	0	1	0	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
	5000	48	200	0	0	1	0	1	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.5	-	-
MNNG	2.5	48	200	18	41	178	22	8	0	267	183(91.5)	186(93.0)**	0.5	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, SNDS: Sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate, MNNG: *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample  $\chi^2$  test was done at  $p < 0.05$ , and then Fisher's exact test was done at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ .

\*\* : Significantly different from solvent group data at  $p < 0.01$  by Fisher's exact test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate with and without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations			Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)	Polyploid <sup>2)</sup> (%)	SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	1	0	1	0	1	0	3	2(1.0)	3(1.5)	0	-	-
SNDS	1250	-	6-(18)	200	1	0	0	0	1	0	2	1(0.5)	2(1.0)	0	-	-
	2500	-	6-(18)	200	1	0	1	0	0	0	2	1(0.5)	2(1.0)	0	-	-
	5000	-	6-(18)	200	0	0	1	0	1	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0	-	-
BP	10	-	6-(18)	200	3	0	1	0	1	0	5	2(1.0)	5(2.5)	0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
SNDS	1250	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	0.5	-	-
	2500	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	0	-	-
	5000	+	6-(18)	200	1	0	1	0	0	0	2	1(0.5)	2(1.0)	0	-	-
BP	10	+	6-(18)	200	13	9	111	5	0	0	138	114(57.0)	121(60.5)**	0	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, SNDS: Sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate, BP: benz[*a*]pyrene

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample  $\chi^2$  test was done at  $p < 0.05$ , and then Fisher's exact test was done at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ .

\*\* : Significantly different from solvent group data at  $p < 0.01$  by Fisher's exact test.

# 2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムの ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

## Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in Rats

### 要約

2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸ナトリウムの安全性に関する毒性試験の一環として、本被験物質を0(対照), 100, 300および1000 mg/kgの用量で1群雌雄各6匹のCrj:CD(SD系)ラットに28日間反復経口投与する毒性試験を実施した。なお、対照群および1000 mg/kg群にはそれぞれ雌雄各6匹の14日間回復群も設けた。

死亡はいずれの群にもみられなかった。一般状態の観察では、1000 mg/kg群の雌雄において、投与期間の初期に散瞳が認められた。本症状は投与後約30分に観察され、4時間後には消失する変化であった。

体重、摂餌量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査および病理学検査では、被験物質投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

回復試験では、いずれの検査においても変化は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下での無影響量は雌雄とも300 mg/kg/dayと考えられた。

### 方法

#### 1. 被験物質および投与液の調製

2-ナフトール3,6-ジスルホン酸ナトリウム(純度96.4%, Lot No. D-11001, スガイ化学工業(株)提供)は、灰白色の粉末ではない。入手後の被験物質は室温遮光下で保管し、投与期間終了後に供給源にて分析を行い、試験期間中安定であったことを確認した。媒体には日本薬局方注射用水(大塚製薬工場, Lot No. 6B70)を使用し、これに被験物質を1.0, 3.0および10.0 w/v%になるように溶解して投与液を調製した。調製は週1又は2回の頻度で行い、調製した投与液は室温保管した。なお、初回調製時に投与液の濃度を測定し、設定値の±5%以内であることを確認した。また、本調製法による0.1~20 w/v%溶液が室温、遮光下で調製後8日間安定であることを確認した。

#### 2. 使用動物および飼育条件

4週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD, 日本チャールス・リバー(株))を雌雄各42匹購入し、10日間の検疫馴化を行ったのち、雌雄各36匹を選んで6週齢で試験に使用した。投与開始時の体重は、雄が189.3~220.2 g, 雌が144.7~170.8 gであった。動物は、温度24±2°C, 湿度55±10%, 照明時間7時~19時および換気回数13

~15回/時に設定したバリアーシステム飼育室でステンレススチール製ハンガーケージに個別に収容して、高圧蒸気滅菌処理した固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業(株))および次亜塩素酸ナトリウムを添加(約2 ppm)した水を自由に摂取させた。

#### 3. 投与量、投与方法、試験群構成および群分け

投与量は、先に当研究所で実施した2週間反復投与毒性予備試験(投与量:0, 100, 300および1000 mg/kg)の結果から設定した。すなわち、予備試験では、1000 mg/kg群の雌雄で散瞳が認められた。したがって、本試験では、予備試験と同様に1000 mg/kgを高用量とし、以下公比約3で除した300および100 mg/kgを設定した。

投与経路は経口とし、胃管を用いた強制投与を1日1回、28日間反復して行った。投与容量は10 mL/kgとし、個体ごとに最新の体重を基に算出した。

回復試験に供した動物は、投与期間終了後に14日間無処置で飼育した。

試験群は、上記3用量に、注射用水を投与する対照を加え、計4群とした。1群当たりの動物数は、投与期間終了時の剖検例として各群とも雌雄各6匹、さらに、対照群および高用量群については回復期間終了時の剖検例として雌雄各6匹を設けた。

群分けは、投与開始前日の体重を基に層別連続無作為化法で行った。

#### 4. 検査項目

##### 1) 一般状態の観察、体重および摂餌量の測定

投与期間中は毎日投与前、投与後約30分までおよび投与後約4時間に、回復期間中は毎日午前および午後一般状態および死亡の有無を観察した。また、体重および摂餌量を投与期間および回復期間を通して週2回の頻度で測定し、さらに、体重は投与開始日の投与前および剖検日にも測定した。

##### 2) 尿検査

投与4週目および回復2週目に、代謝ケージにて、絶食、給水下で8時から12時までの間に採取した新鮮尿を用いて、比色試験紙(プレテスト8a, 和光純薬工業(株))により、pH, 蛋白質, ブドウ糖, ケトン体, ビリルビン, 潜血およびウロビリノーゲンを検査した。さらに、新鮮尿を1500回転/分で5分間遠心分離し、得られた尿沈渣について鏡検した。また、新鮮尿採取後に給餌、給水下で採取した24時間蓄積尿を用いて、尿量、色調、

浸透圧(氷点降下法; OSMOMETER OM801, VOGEL社)および比重(屈折率法; 尿屈折計, ㈱アタゴ)を測定した。

### 3) 血液学検査

投与期間終了後および回復期間終了後に、すべての動物を18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウムを腹腔内投与して麻酔し、開腹後、後大静脈腹部から採血を行った。採取した血液の一部はEDTA-2K処理(EDTA-2K加血液)して多項目自動血球計数装置(Sysmex CC-780, 東亜医用電子㈱)を用いて、白血球数(電気抵抗検出方式)、赤血球数(電気抵抗検出方式)、ヘモグロビン量(オキシヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(血球パルス波高値検出方式)および血小板数(電気抵抗検出方式)を測定し、赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の測定結果を基にWintrobeの赤血球恒数[平均赤血球容積(MCV), 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。さらに、血液の一部は塗抹標本とし、May-Grünwald-Giemsa染色を施して白血球百分比を算出するとともに、網状赤血球率検査用のニューメチレンブルー超生体染色標本を作製して保管した。また、3.8%クエン酸ナトリウム加血液を3000回転/分で15分間遠心分離し、得られた血漿を用いて全自動血液凝固測定装置(Sysmex CA-5000, 東亜医用電子㈱)により、プロトロンビン時間(散乱光検出方式)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT, 散乱光検出方式)を測定した。

### 4) 血液生化学検査

血液学検査に引き続き採取した血液を室温で約60分間放置後、3000回転/分で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて自動分析装置(736-10, ㈱日立製作所)により、総蛋白質(ビウレット法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白質およびアルブミンより算出)、総ビリルビン(アルカリアゾビリルビン法)、GOT(Karmen法)、GPT(Wróblewski-La Due法)、 $\gamma$ -グルタミルトランスアミナーゼ(L- $\gamma$ -グルタミル-DBHA基質法)、アルカリ性フォスファターゼ(p-ニトロフェニルリン酸基質法)、コリンエステラーゼ(ヨウ化ブチリルチオコリン基質法)、アセチルコリンエステラーゼ(アセチルコリン基質法)、総コレステロール(COD-DAOS法)、トリグリセライド(GPO-DAOS法・グリセリン消去法)、リン脂質(酵素法・DAOS発色法)、グルコース(グルコキナーゼ・G-6-PDH法)、尿素窒素(ウレアーゼ・GIDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、無機リン(モリブデン酸直接法)およびカルシウム(OCPC法)を測定した。また、電解質分析装置(PVA- $\alpha$  III, ㈱アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)およびクロール(電量滴定法)を測定した。

### 5) 器官重量の測定、剖検および病理組織学検査

採血後に、外側腸骨動脈を切断して放血死させ、剖検

した。剖検時に、脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣および卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに、剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。これらの器官に加え、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、膵臓、胃、膀胱、大腿骨(骨髄を含む)および肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン溶液(眼球は2.5%グルタールアルデヒド溶液、精巣はブアン液で前固定)で固定した。

投与期間終了時の対照群および高用量群の心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎および肉眼的異常組織については、常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施して光学顕微鏡で観察した。

### 5. 統計解析

体重、摂餌量、尿検査(定性反応は除く)、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および体重比器官重量について、各群ごとに平均値と標準偏差を求め、Bartlett法により分散の均一性を検定した。分散が均一な場合はDunnnettの多重比較検定を用いて、異なる場合はSteelの多重比較検定を用いて対照群との比較を行った。なお、いずれの場合も有意水準は1および5%とした。ただし、病理学検査については、偶発的変化が散見された程度であったため、統計解析は行わなかった。

## 結果

### 1. 一般状態

すべての群で死亡例はみられなかった。

1000 mg/kg群では、投与後約30分の観察で散瞳が認められた。散瞳は、雄で投与初日から投与15日まで、雌で投与初日から投与8日まで連日あるいは散発的にみられた。発現例数の総数は雄で3例、雌で4例であった。しかし、いずれも投与後約4時間の観察時には消失していた。このほか、100 mg/kg群の雄1例で投与27日から左耳介付近の頸部皮膚に外傷が、対照群の雌1例で投与12日から右眼に眼内出血がいずれも投与期間終了時までみられたが、他の群にはみられておらず、偶発的変化と考えられた。

回復期間においては、1000 mg/kg群の雌雄では変化は認められなかった。

### 2. 体重(Fig.1)

投与期間又は回復期間を通して、各被験物質投与群は対照群とほぼ同様な推移を示した。

### 3. 摂餌量

300 mg/kg群の雄で、投与24日にごく軽度の増加がみられたが、一過性であることおよび1000 mg/kg群には変化は見られていないことから、毒性学的意義のない変化と考えられた。

回復期間では、1000 mg/kg群は対照群とほぼ同様な推移を示した。

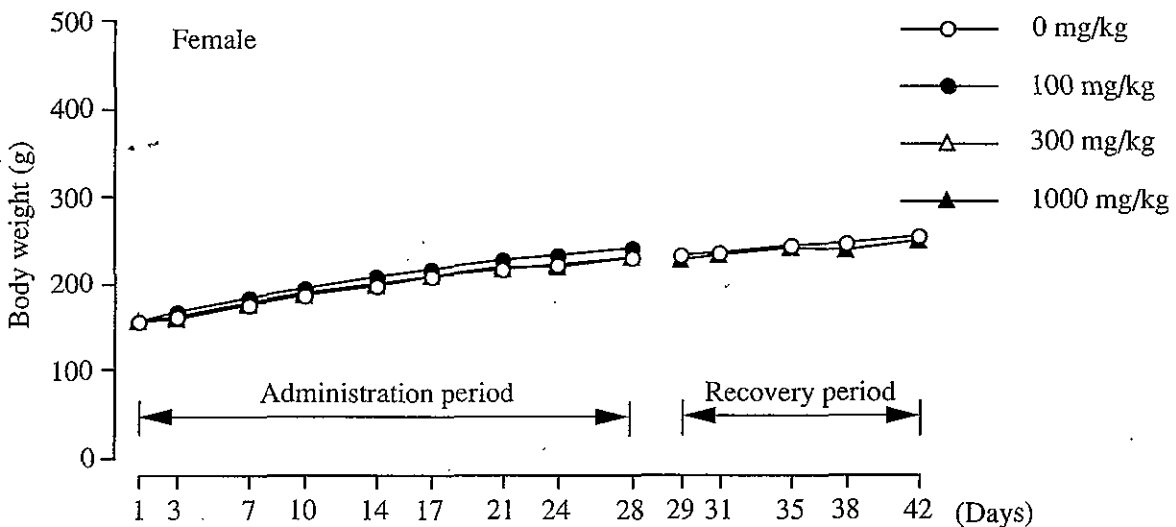
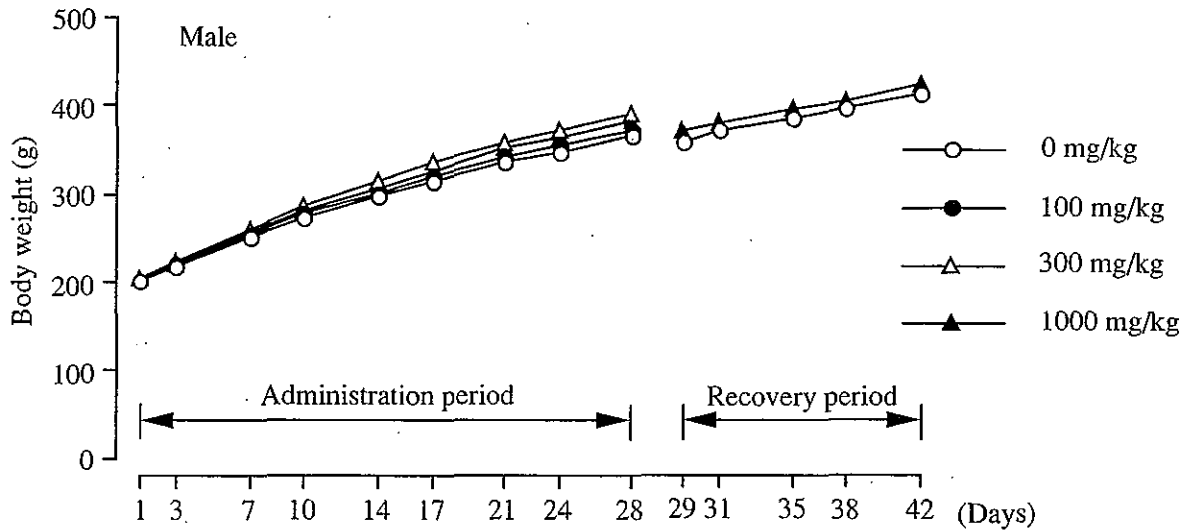


Fig. 1 Mean body weight changes of rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test.

#### 4. 尿検査 (Table 1)

投与4週目の検査では、300 mg/kg群の雄で尿量の増加が認められ、浸透圧および比重の減少も認められた。また、浸透圧の減少は100 mg/kg群の雄にもみられたが、同群の雌および1000 mg/kg群では変化はみられなかったことから、上記の変化には毒性学的意義はないと考えられた。

回復2週目の検査では、1000 mg/kg群の雌雄で変化は認められなかった。

#### 5. 血液学検査 (Table 2)

投与期間終了時の検査では、100 mg/kg以上の群の雄でMCVの増加および1000 mg/kg群の雄でMCHCの減少が認められたが、いずれも生理学的な変動範囲内の変化であり、赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値には変化は認められなかったことから、毒性学的に意義のない変化と考えられた。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雌雄で変化は認められなかった。

## 6. 血液生化学検査 (Table 3)

投与期間終了時の検査では、100 mg/kg群の雌でリン脂質の減少が、100 mg/kg群の雄でカルシウムの減少が認められたが、300および1000 mg/kg群にはみられなかったことから、毒性学的に意義のない変化と判断した。また、100 mg/kg以上の群の雄でナトリウムの減少が認められたが、いずれも生理学的な変動範囲内の変化であった。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雌でA/G比およびトリグリセライドの増加が認められたが、投与期間終了時には認められておらず、またいずれも生理学的な変動範囲内の変化であった。

## 7. 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時の検査では、300 mg/kg群の雄で胸腺の絶対および相対重量の増加が認められたが、同群の雌および1000 mg/kg群では変化はみられていないことから毒性学的意義はないと思われた。

回復期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雌で副腎の相対重量の減少が認められた。

## 8. 剖検

投与期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雄1例で肺の暗赤色点、100 mg/kg群の雄1例で左耳介付近の頸部皮膚に外傷が認められた。また、対照群の雌1例で両眼球に暗赤色点(右側でやや強い)が認められた。

回復期間終了時の検査では、対照群および1000 mg/kg群ともに変化は認められなかった。

## 9. 病理組織学検査 (Table 5)

投与期間終了時の剖検例において、組織学的変化は肉眼的変化に一致して認められた。すなわち、肺では、限局性の出血および細胞浸潤が1000 mg/kg群の雄1例に、眼球では、両側性の硝子体内出血が対照群の雌1例に認められた。また、頸部皮膚のびらんが100 mg/kg群の雄1例に認められた。

## 考察

死亡例はいずれの群でも認められなかった。一般状態の観察では、1000 mg/kg群の雌雄で散瞳が認められ、被験物質投与に関連した変化と考えられた。本症状は、雄で投与初日から投与15日まで、雌で投与初日から投与8日まで連日あるいは散発的にみられたが、投与後4時間には消失する変化であった。

体重、摂餌量、尿検査、血液学検査および血液生化学検査では、被験物質投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

病理学検査では、剖検で投与期間終了時にごく少数例の肺、眼球あるいは耳介付近の頸部皮膚に肉眼的変化がみられ、組織学的にも相応する変化がみられたが、これら以外には器官重量を含む病理学検査でまったく変化はみられなかった。

回復試験では、1000 mg/kg群の雌で副腎相対重量の減少が認められたが、投与期間終了時の検査では重量変化および組織学的変化はみられなかったことから、毒性学的意義はないと思われた。また、その他の諸検査あるいは測定においては、雌雄のいずれにも変化はみられなかった。

以上のように、本試験では1000 mg/kg群で散瞳が認められたことから、無影響量は雌雄とも300 mg/kg/dayと考えられた。

## 連絡先

試験責任者：一鬼 勉

試験担当者：古川浩美, 和泉宏幸, 幸 邦憲,  
村田英治, 神谷光一, 浜村政夫,  
楯先恵美子

(株)パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所  
〒869-0425 熊本県宇土市栗崎町1285  
Tel 0964-23-5111 Fax 0964-23-2282

## Correspondence

Authors: Tsutomu Ichiki (Study director)

Hiromi Furukawa, Hiroyuki Izumi,  
Kuninori Yuki, Eiji Murata,  
Koichi Kamiya, Masao Hamamura,  
Emiko Kuwasaki

Safety Assessment Laboratory, Panapharm  
Laboratories Co., Ltd.

1285 Kurisaki-machi, Uto-shi, Kumamoto,  
869-0425, Japan

Tel +81-964-23-5111 Fax +81-964-23-2282

Table 1 Urinary findings of rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
<b>Male</b>						
No. of animals	12	6	6	12	6	6
Urine volume (mL/24hr)	12.0 ± 4.0	18.0 ± 4.8	18.8 ± 5.9*	15.0 ± 5.3	13.5 ± 4.7	16.0 ± 6.7
Osmotic pressure (Osm/kg)	1.494 ± 0.394	1.016 ± 0.184**	1.008 ± 0.265**	1.233 ± 0.225	1.415 ± 0.408	1.350 ± 0.475
Specific gravity	1.045 ± 0.014	1.037 ± 0.010	1.031 ± 0.008*	1.040 ± 0.008	1.044 ± 0.013	1.043 ± 0.016
Color	1 pale yellow 11 yellow	2 4	3 3	4 8	0 6	1 5
pH	6.5 0 7.0 0 7.5 0 8.0 9 8.5 3	0 0 0 3 3	0 0 2 1 3	0 1 1 7 3	0 0 3 3 0	0 0 0 5 1
Protein	- 0 ± 9 + 3 ++ 0	1 5 0 0	3 2 1 0	6 5 0 1	1 2 3 0	3 2 1 0
Glucose	- 12	6	6	12	6	6
Ketone body	- 12	6	6	12	6	6
Bilirubin	- 12	6	6	12	6	6
Occult blood	- 12 + 0 ++ 0 +++ 0	5 0 0 1	5 1 0 0	9 3 0 0	4 0 2 0	6 0 0 0
Urobilinogen	<1 12	6	6	12	6	6
Epithelial cells	- 11 + 1	6 0	6 0	12 0	4 2	5 1
Erythrocytes	- 12 + 0	6 0	6 0	11 1	5 1	6 0
Leucocytes	- 12	6	6	12	6	6
Casts	- 12	6	6	12	6	6
Crystals	- 9 + 2 ++ 1 +++ 0	6 0 0 0	5 1 0 0	10 2 0 0	5 1 0 0	5 0 0 1
<b>Female</b>						
No. of animals	12	6	6	12	6	6
Urine volume (mL/24hr)	8.1 ± 5.1	6.0 ± 3.4	10.4 ± 3.6	9.0 ± 6.7	11.7 ± 5.1	14.2 ± 5.7
Osmotic pressure (Osm/kg)	1.488 ± 0.623	1.785 ± 0.366	1.127 ± 0.150	1.623 ± 0.771	1.355 ± 0.350	1.282 ± 0.591
Specific gravity	1.047 ± 0.021	1.059 ± 0.014	1.035 ± 0.005	1.053 ± 0.027	1.041 ± 0.011	1.038 ± 0.017
Color	2 pale yellow 9 yellow 1 yellowish brown	0 6 0	3 3 0	3 7 2	1 5 0	1 5 0
pH	6.0 1 6.5 1 7.0 1 7.5 3 8.0 2 8.5 4 9.0 0	0 0 1 0 3 2 0	0 0 1 0 3 2 0	0 2 0 3 4 2 1	0 0 1 2 1 2 0	0 0 0 2 2 2 0
Protein	- 10 ± 1 + 1 ++ 0	5 1 0 0	4 2 0 0	7 3 1 1	6 0 0 0	6 0 0 0
Glucose	- 12	6	6	12	6	6
Ketone body	- 12	6	6	12	6	6
Bilirubin	- 12	6	6	12	6	6
Occult blood	- 11 + 1 ++ 0 +++ 0	6 0 0 0	6 0 0 0	10 1 1 0	3 1 1 0	6 0 0 0
Urobilinogen	<1 12	6	6	12	6	6
Epithelial cells	- 12	6	6	12	6	6
Erythrocytes	- 12 + 0	6 0	6 0	12 0	5 1	6 0
Leucocytes	- 12	6	6	12	6	6
Casts	- 12	6	6	12	6	6
Crystals	- 12 + 0	6 0	6 0	11 1	6 0	6 0

Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, severe

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control)

Values are mean ± S.D.

Table 2 Hematological findings of rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
<b>Male</b>						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Leucocyte ( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	93 $\pm$ 21	71 $\pm$ 14	86 $\pm$ 36	87 $\pm$ 29	94 $\pm$ 30	103 $\pm$ 30
Erythrocyte ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	792 $\pm$ 30	743 $\pm$ 28	757 $\pm$ 45	766 $\pm$ 29	862 $\pm$ 31	844 $\pm$ 42
Hemoglobin (g/dL)	15.1 $\pm$ 0.4	14.6 $\pm$ 0.3	14.9 $\pm$ 0.6	14.9 $\pm$ 0.5	15.1 $\pm$ 0.6	15.0 $\pm$ 0.6
Hematocrit (%)	46.6 $\pm$ 1.6	45.6 $\pm$ 1.0	46.6 $\pm$ 2.0	46.9 $\pm$ 1.3	47.9 $\pm$ 1.6	47.3 $\pm$ 1.8
Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	101.2 $\pm$ 8.8	92.7 $\pm$ 8.5	108.6 $\pm$ 8.3	99.4 $\pm$ 4.7	100.9 $\pm$ 10.2	98.3 $\pm$ 10.2
MCV (fl)	59 $\pm$ 1	62 $\pm$ 1**	62 $\pm$ 1**	61 $\pm$ 2**	56 $\pm$ 1	56 $\pm$ 1
MCH (pg)	19.1 $\pm$ 0.5	19.6 $\pm$ 0.4	19.7 $\pm$ 0.5	19.5 $\pm$ 0.6	17.6 $\pm$ 0.4	17.8 $\pm$ 0.6
MCHC (%)	32.4 $\pm$ 0.5	32.0 $\pm$ 0.3	32.0 $\pm$ 0.2	31.8 $\pm$ 0.4*	31.6 $\pm$ 0.2	31.7 $\pm$ 0.6
Eosinophil (%)	0.5 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.8	0.5 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 1.3	0.2 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.4
Neutro-Stab. (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Neutro-Seg. (%)	13.0 $\pm$ 2.6	13.3 $\pm$ 5.6	14.2 $\pm$ 6.2	11.5 $\pm$ 4.4	6.3 $\pm$ 2.3	8.7 $\pm$ 5.0
Lymphocyte (%)	85.8 $\pm$ 2.7	85.7 $\pm$ 5.4	84.8 $\pm$ 6.5	86.7 $\pm$ 3.9	92.5 $\pm$ 2.6	90.2 $\pm$ 5.2
Basophil (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocyte (%)	0.7 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 1.2	1.0 $\pm$ 1.1	1.0 $\pm$ 0.9
Prothrombin time (sec)	13.3 $\pm$ 2.9	13.4 $\pm$ 1.7	12.4 $\pm$ 1.3	12.3 $\pm$ 1.2	13.3 $\pm$ 0.9	13.1 $\pm$ 1.6
APTT (sec)	25.2 $\pm$ 1.7	24.3 $\pm$ 2.0	23.2 $\pm$ 3.2	23.3 $\pm$ 0.9	24.2 $\pm$ 1.8	22.4 $\pm$ 2.6
<b>Female</b>						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Leucocyte ( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	60 $\pm$ 15	70 $\pm$ 19	64 $\pm$ 10	57 $\pm$ 9	64 $\pm$ 14	46 $\pm$ 14
Erythrocyte ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	751 $\pm$ 29	752 $\pm$ 32	781 $\pm$ 32	738 $\pm$ 31	795 $\pm$ 28	780 $\pm$ 32
Hemoglobin (g/dL)	14.8 $\pm$ 0.4	14.6 $\pm$ 0.6	15.2 $\pm$ 0.5	14.7 $\pm$ 0.6	14.7 $\pm$ 0.4	14.3 $\pm$ 0.2
Hematocrit (%)	45.4 $\pm$ 1.2	45.4 $\pm$ 2.5	46.4 $\pm$ 1.1	44.9 $\pm$ 1.9	45.9 $\pm$ 1.7	44.8 $\pm$ 1.4
Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	101.7 $\pm$ 8.5	102.4 $\pm$ 5.4	103.9 $\pm$ 10.2	100.9 $\pm$ 8.0	103.3 $\pm$ 7.7	107.1 $\pm$ 14.7
MCV (fl)	61 $\pm$ 1	60 $\pm$ 2	60 $\pm$ 2	61 $\pm$ 2	58 $\pm$ 1	58 $\pm$ 1
MCH (pg)	19.7 $\pm$ 0.4	19.4 $\pm$ 0.5	19.5 $\pm$ 0.7	20.0 $\pm$ 1.0	18.5 $\pm$ 0.4	18.4 $\pm$ 0.5
MCHC (%)	32.5 $\pm$ 0.5	32.1 $\pm$ 0.8	32.7 $\pm$ 0.3	32.8 $\pm$ 0.6	32.1 $\pm$ 0.5	32.0 $\pm$ 0.6
Eosinophil (%)	0.7 $\pm$ 1.0	1.0 $\pm$ 1.3	1.0 $\pm$ 0.9	1.5 $\pm$ 2.3	0.7 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 1.5
Neutro-Stab. (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Neutro-Seg. (%)	14.3 $\pm$ 3.3	10.5 $\pm$ 3.5	9.5 $\pm$ 3.8	10.5 $\pm$ 5.3	13.8 $\pm$ 5.4	17.3 $\pm$ 10.7
Lymphocyte (%)	84.3 $\pm$ 3.3	88.3 $\pm$ 4.5	88.7 $\pm$ 4.3	87.2 $\pm$ 7.7	85.0 $\pm$ 6.3	80.2 $\pm$ 10.8
Basophil (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocyte (%)	0.7 $\pm$ 0.8	0.2 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 1.0	0.8 $\pm$ 0.8	0.5 $\pm$ 0.8	1.2 $\pm$ 0.4
Prothrombin time (sec)	10.5 $\pm$ 0.2	10.5 $\pm$ 0.3	10.6 $\pm$ 0.4	10.5 $\pm$ 0.4	10.3 $\pm$ 0.6	10.2 $\pm$ 0.7
APTT (sec)	18.7 $\pm$ 1.1	19.7 $\pm$ 1.7	18.5 $\pm$ 0.9	20.1 $\pm$ 1.0	17.7 $\pm$ 1.2	16.2 $\pm$ 2.7

\*:P&lt;0.05, \*\*:P&lt;0.01 (significantly different from control)

Values are mean $\pm$ S.D.

Table 3 Blood chemical findings of rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
<b>Male</b>						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
T.protein (g/dL)	5.0 ± 0.1	4.9 ± 0.2	5.1 ± 0.3	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.1
Albumin (g/dL)	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.1
A/G ratio	2.60 ± 0.41	2.48 ± 0.26	2.39 ± 0.15	2.42 ± 0.16	2.24 ± 0.23	2.20 ± 0.10
T.bilirubin (mg/dL)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.1
GOT (IU/L)	88 ± 13	82 ± 10	95 ± 17	86 ± 14	99 ± 24	100 ± 18
GPT (IU/L)	19 ± 3	18 ± 3	17 ± 3	17 ± 2	19 ± 2	21 ± 3
γ-GTP (IU/L)	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2
ALP (IU/L)	281 ± 42	302 ± 53	246 ± 76	256 ± 67	235 ± 37	227 ± 53
Cholinesterase (IU/L)	50 ± 6	51 ± 13	52 ± 14	58 ± 10	53 ± 16	54 ± 13
Acetylcholinesterase (ΔpH)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02
T.cholesterol (mg/dL)	58 ± 13	55 ± 8	57 ± 8	57 ± 6	54 ± 11	54 ± 7
Triglycerides (mg/dL)	47 ± 16	60 ± 17	55 ± 24	65 ± 28	76 ± 31	67 ± 18
Phospholipids (mg/dL)	97 ± 16	98 ± 9	100 ± 11	101 ± 12	103 ± 15	100 ± 6
Glucose (mg/dL)	107 ± 14	107 ± 10	118 ± 21	108 ± 6	116 ± 12	116 ± 9
BUN (mg/dL)	16.7 ± 2.2	16.1 ± 1.6	16.3 ± 2.7	17.3 ± 2.1	16.4 ± 2.2	17.0 ± 1.0
Creatinine (mg/dL)	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1
IP (mg/dL)	7.7 ± 0.5	7.4 ± 0.6	7.4 ± 0.2	7.7 ± 0.4	6.9 ± 0.5	6.9 ± 0.4
Ca (mg/dL)	9.5 ± 0.1	9.3 ± 0.1*	9.5 ± 0.3	9.5 ± 0.3	9.5 ± 0.2	9.6 ± 0.2
Na (mEq/L)	147.8 ± 0.7	146.4 ± 0.4**	146.5 ± 0.6**	146.1 ± 0.6**	146.0 ± 1.2	144.9 ± 0.6
K (mEq/L)	4.22 ± 0.18	4.24 ± 0.17	4.36 ± 0.14	4.32 ± 0.12	4.25 ± 0.21	4.32 ± 0.18
Cl (mEq/L)	107.8 ± 0.8	107.5 ± 1.1	106.3 ± 2.1	106.2 ± 1.3	106.3 ± 1.4	105.5 ± 1.1
<b>Female</b>						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
T.protein (g/dL)	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.4	5.5 ± 0.3	5.3 ± 0.2	5.4 ± 0.4	5.5 ± 0.2
Albumin (g/dL)	4.0 ± 0.3	3.8 ± 0.2	4.0 ± 0.2	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.3	4.0 ± 0.1
A/G ratio	3.14 ± 0.42	2.74 ± 0.13	2.86 ± 0.17	2.77 ± 0.17	2.48 ± 0.10	2.73 ± 0.16**
T.bilirubin (mg/dL)	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
GOT (IU/L)	87 ± 20	81 ± 19	78 ± 10	88 ± 11	109 ± 20	103 ± 13
GPT (IU/L)	15 ± 3	15 ± 3	14 ± 2	15 ± 2	19 ± 2	17 ± 4
γ-GTP (IU/L)	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.3
ALP (IU/L)	172 ± 26	162 ± 24	188 ± 63	133 ± 41	144 ± 48	152 ± 18
Cholinesterase (IU/L)	489 ± 80	382 ± 119	433 ± 94	515 ± 127	510 ± 239	485 ± 73
Acetylcholinesterase (ΔpH)	0.39 ± 0.07	0.28 ± 0.10	0.32 ± 0.09	0.41 ± 0.12	0.45 ± 0.23	0.42 ± 0.07
T.cholesterol (mg/dL)	67 ± 5	54 ± 12	60 ± 12	56 ± 7	62 ± 14	71 ± 15
Triglycerides (mg/dL)	24 ± 8	20 ± 5	27 ± 8	22 ± 3	19 ± 4	29 ± 11*
Phospholipids (mg/dL)	132 ± 13	105 ± 18*	121 ± 23	110 ± 12	120 ± 27	139 ± 18
Glucose (mg/dL)	92 ± 14	92 ± 15	95 ± 13	90 ± 11	93 ± 10	99 ± 9
BUN (mg/dL)	24.9 ± 2.9	25.1 ± 2.0	23.8 ± 3.9	24.6 ± 6.3	22.2 ± 2.7	21.3 ± 1.2
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.0
IP (mg/dL)	8.6 ± 0.6	8.2 ± 1.1	7.7 ± 0.7	7.8 ± 0.7	6.1 ± 0.6	5.7 ± 0.6
Ca (mg/dL)	9.7 ± 0.2	9.6 ± 0.4	9.8 ± 0.3	9.8 ± 0.3	9.8 ± 0.3	9.6 ± 0.2
Na (mEq/L)	146.5 ± 0.7	146.6 ± 0.7	146.2 ± 0.8	145.8 ± 0.7	145.2 ± 0.5	145.7 ± 0.7
K (mEq/L)	4.44 ± 0.36	4.44 ± 0.23	4.48 ± 0.29	4.29 ± 0.16	4.20 ± 0.24	4.25 ± 0.24
Cl (mEq/L)	109.1 ± 1.1	109.8 ± 1.1	108.4 ± 1.0	108.8 ± 1.3	108.9 ± 1.5	109.0 ± 1.2

\*:P&lt;0.05, \*\*:P&lt;0.01 (significantly different from control)

Values are mean±S.D.



Table 4 Organ weights of rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days dosing groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
<b>Male</b>						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Final Body Weight (g)	339.9 ± 25.1	344.4 ± 27.4	360.1 ± 37.4	365.9 ± 26.8	380.2 ± 42.6	392.4 ± 40.7
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.12 ± 0.06	2.09 ± 0.06	2.07 ± 0.06	2.13 ± 0.02	2.12 ± 0.11	2.17 ± 0.12
Heart (g)	1.21 ± 0.17	1.19 ± 0.12	1.30 ± 0.12	1.24 ± 0.12	1.26 ± 0.25	1.30 ± 0.25
Lungs (g)	1.19 ± 0.07	1.19 ± 0.09	1.22 ± 0.08	1.27 ± 0.12	1.26 ± 0.16	1.28 ± 0.08
Thymus (g)	0.54 ± 0.07	0.53 ± 0.07	0.70 ± 0.09*	0.58 ± 0.14	0.44 ± 0.11	0.47 ± 0.05
Liver (g)	10.42 ± 1.12	10.78 ± 1.50	11.42 ± 2.22	11.73 ± 1.89	11.05 ± 1.60	11.10 ± 1.42
Spleen (g)	0.67 ± 0.05	0.69 ± 0.11	0.74 ± 0.13	0.77 ± 0.12	0.72 ± 0.10	0.73 ± 0.08
Kidneys (g)	2.40 ± 0.19	2.44 ± 0.12	2.55 ± 0.28	2.54 ± 0.20	2.66 ± 0.32	2.63 ± 0.34
Adrenals (mg)	50.9 ± 9.2	50.0 ± 7.1	49.6 ± 5.7	58.8 ± 7.0	52.2 ± 9.9	54.0 ± 9.7
Testes (g)	2.99 ± 0.13	2.85 ± 0.10	3.03 ± 0.23	3.05 ± 0.18	2.95 ± 0.27	3.14 ± 0.30
Relative organ weight						
Brain (g/100gB.W.)	0.63 ± 0.04	0.61 ± 0.05	0.58 ± 0.05	0.58 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.56 ± 0.06
Heart (g/100gB.W.)	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.04
Lungs (g/100gB.W.)	0.35 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.02
Thymus (g/100gB.W.)	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.20 ± 0.01*	0.16 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.02
Liver (g/100gB.W.)	3.06 ± 0.16	3.12 ± 0.22	3.15 ± 0.30	3.19 ± 0.36	2.90 ± 0.22	2.82 ± 0.10
Spleen (g/100gB.W.)	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.01
Kidneys (g/100gB.W.)	0.71 ± 0.03	0.71 ± 0.04	0.71 ± 0.05	0.69 ± 0.03	0.70 ± 0.04	0.67 ± 0.03
Adrenals (mg/100gB.W.)	15.0 ± 2.4	14.5 ± 1.4	13.8 ± 0.8	16.0 ± 1.2	13.9 ± 3.0	13.9 ± 2.5
Testes (g/100gB.W.)	0.88 ± 0.06	0.83 ± 0.07	0.84 ± 0.07	0.84 ± 0.10	0.78 ± 0.07	0.81 ± 0.09
<b>Female</b>						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Final Body Weight (g)	206.9 ± 12.2	222.6 ± 19.2	213.8 ± 14.8	218.6 ± 10.9	233.1 ± 14.7	231.7 ± 15.7
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.94 ± 0.06	1.96 ± 0.03	1.94 ± 0.09	2.02 ± 0.10	2.02 ± 0.03	2.02 ± 0.05
Heart (g)	0.80 ± 0.06	0.79 ± 0.06	0.79 ± 0.05	0.82 ± 0.06	0.88 ± 0.09	0.84 ± 0.06
Lungs (g)	0.96 ± 0.06	0.95 ± 0.07	0.97 ± 0.04	1.01 ± 0.06	1.03 ± 0.05	0.97 ± 0.07
Thymus (g)	0.39 ± 0.04	0.48 ± 0.09	0.46 ± 0.12	0.39 ± 0.08	0.34 ± 0.08	0.38 ± 0.06
Liver (g)	6.26 ± 0.50	6.62 ± 0.68	6.75 ± 0.47	6.70 ± 0.71	6.62 ± 0.69	6.74 ± 0.77
Spleen (g)	0.47 ± 0.02	0.49 ± 0.08	0.51 ± 0.08	0.50 ± 0.06	0.55 ± 0.03	0.52 ± 0.08
Kidneys (g)	1.62 ± 0.08	1.62 ± 0.10	1.72 ± 0.07	1.69 ± 0.08	1.62 ± 0.14	1.63 ± 0.08
Adrenals (mg)	64.5 ± 6.3	65.4 ± 9.8	60.1 ± 12.7	64.4 ± 8.2	70.9 ± 4.3	64.0 ± 8.9
Ovaries (mg)	76.1 ± 7.6	86.9 ± 5.5	86.0 ± 8.5	90.2 ± 16.6	86.2 ± 10.9	81.2 ± 9.5
Relative organ weight						
Brain (g/100gB.W.)	0.94 ± 0.04	0.89 ± 0.07	0.91 ± 0.07	0.92 ± 0.06	0.87 ± 0.05	0.88 ± 0.06
Heart (g/100gB.W.)	0.39 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.36 ± 0.02
Lungs (g/100gB.W.)	0.46 ± 0.04	0.43 ± 0.02	0.46 ± 0.05	0.46 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.42 ± 0.02
Thymus (g/100gB.W.)	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.04	0.22 ± 0.07	0.18 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.17 ± 0.03
Liver (g/100gB.W.)	3.03 ± 0.21	2.98 ± 0.25	3.16 ± 0.22	3.06 ± 0.23	2.84 ± 0.19	2.90 ± 0.17
Spleen (g/100gB.W.)	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.02
Kidneys (g/100gB.W.)	0.78 ± 0.04	0.73 ± 0.06	0.81 ± 0.07	0.77 ± 0.05	0.69 ± 0.04	0.71 ± 0.02
Adrenals (mg/100gB.W.)	31.3 ± 3.8	29.7 ± 6.2	28.0 ± 4.8	29.4 ± 3.1	30.4 ± 1.2	27.6 ± 2.3*
Ovaries (mg/100gB.W.)	36.9 ± 3.9	39.3 ± 3.6	40.2 ± 2.1	41.3 ± 7.8	37.0 ± 4.0	35.0 ± 3.2

\*: P&lt;0.05 (significantly different from control)

Values are mean ± S.D.

Table 5 Histopathological findings of rats treated orally with sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate in the twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)											
	0				100				1000			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
<b>Male</b>												
No. of animals	6				1				6			
Respiratory system												
Lung	(0)				(0)				(1)			
Hemorrhage, localized									0	1	0	0
Cellular infiltration, localized									0	1	0	0
Nervous system												
Eye ball	(0)				(0)				(0)			
Hemorrhage, vitreous body, bilateral												
Integumentary system												
Integument	(0)				(1)				(0)			
Erosion, cervical skin					0	1	0	0				
<b>Female</b>												
No. of animals	6				6							
Respiratory system												
Lung	(0)				(0)							
Hemorrhage, localized												
Cellular infiltration, localized												
Nervous system												
Eye ball	(1)				(0)							
Hemorrhage, vitreous body, bilateral	0	1	0	0								
Integumentary system												
Integument	(0)				(0)							
Erosion, cervical skin												

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

Figure in parentheses represents the number of animals with tissues examined histopathologically.

No remarkable changes were observed in the liver, spleen, heart, kidney and adrenal in the control group and 1000 mg/kg group.

IPCS

UNEP/ILO/WHO

國際簡潔評估文書

Concise International Chemical Assessment Document

No.20 Mononitrophenols (2000)

世界保健機關 國際化學物質安全計畫

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2004

## 目 次

1 . 要約 -----	4
2 . 物理的・化学的性質 -----	8
3 . 分析方法 -----	9
4 . ヒトおよび環境の暴露源 -----	10
5 . 環境中の移動・分布・変換 -----	13
6 . 環境中濃度およびヒトの暴露量 -----	17
6.1 環境中濃度 -----	18
6.2 ヒトの暴露量 -----	19
7 . 実験動物およびヒトでの体内動態・代謝の比較 -----	19
7.1 2-ニトロフェノール -----	20
7.2 4-ニトロフェノール -----	20
8 . 実験哺乳類および in vitro(試験管内)試験系への影響 -----	21
8.1 単回暴露 -----	21
8.2 刺激作用および感作 -----	22
8.3 短期暴露 -----	23
8.3.1 経口暴露 -----	23
8.3.2 吸入暴露 -----	24
8.3.2.1 2-ニトロフェノール -----	24
8.3.2.2 4-ニトロフェノール -----	24
8.3.3 皮膚暴露 -----	25
8.4 長期暴露 -----	26
8.4.1 亜慢性暴露 -----	26
8.4.2 慢性暴露と発がん性 -----	26
8.5 遺伝毒性と関連エンドポイント -----	27
8.6 生殖発生毒性 -----	32
8.6.1 生殖毒性 -----	32
8.6.2 発生毒性 -----	33
8.6.2.1 -----	33

8.6.2.2	-----	33
8.7	免疫学および神経学的影響 -----	34
8.8	メトヘモグロビン形成 -----	34
9	ヒトへの影響 -----	37
10	実験室および自然界におけるその他の生物への影響 -----	37
10.1	水生環境 -----	37
10.2	陸生環境 -----	39
11	影響評価 -----	40
11.1	健康への影響の評価 -----	40
11.1.1	ハザードの特定および用量反応評価 -----	40
11.1.2	2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの 参考指針値設定基準 -----	42
11.1.3	リスクの総合判定例 -----	42
11.2	環境影響の評価 -----	43
12	国際機関によるこれまでの評価 -----	45
13	健康の保護および緊急措置 -----	45
14	現行の規則、ガイドラインおよび基準 -----	45
国際化学物質安全性カード -----		46
文献 -----		49
付録1	3-ニトロフェノール -----	73
付録2	出典 -----	77
付録3	CICADのピアレビュー -----	79
付録3	CICADの最終検討委員会 -----	80

No.20 Mononitrophenols

(モノニトロフェノール)

序言 <http://www.nihs.go.jp/cicad/jogen.html> を参照

1. 要約

異性体 2-、3-、および 4-ニトロフェノールの CICAD は、ドイツのハンノーバにあるフラウンホーファー毒性・エアゾール研究所 Fraunhofer Institute for Toxicology and Aerosol Research で作成された。この CICAD は、2-および 4-ニトロフェノールの環境およびヒトに対する影響度を評価するために、環境中の既存化学物質に関する German Advisory Committee (BUA、1992) および米国有害物質・疾病登録局 US Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR、1992) によって編纂されたレビューに基づいている。1992 年までのデータがこれらのレビューで検討された。元の記録にある関連参考文献に続いて公表された 2-および 4-ニトロフェノールに関連する参考文献の確認のため、また、異性体 3-ニトロフェノールの関連データを含む全ての参考文献を確認するために、数種のデータベースで網羅的な文献検索が 1998 年に行われた。3-ニトロフェノールについて見つかった情報は極めて少なく、有意義な評価ができなかった。代わりに、この異性体に関するデータは付録 1 に要約している。ピアレビューの性格あるいは資料の入手先などを付録 2 に示す。また、CICAD の情報については付録 3 に示す。この CICAD は、1998 年 12 月 8-11 日に、米国ワシントン DC で開催された最終検討委員会の会議において、国際的な評価として承認された。最終検討委員会の会議参加者は付録 4 に示してある。国際化学物質安全性計画 International Programme on Chemical Safety (IPCS、1998) により作成されたモノニトロフェノール類の国際化学物質安全性カード (ICSC 1342) が本 CICAD に転載された。

ニトロフェノール異性体は水溶性の固体であり、水中では解離の結果やや酸性である。2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールは、多くの有機リン農薬やいくつかの医薬

品の合成中間体として使用される。環境への放出は主として、車公害および農薬の加水分解・光分解のような拡散源から大気、水域、土壌への排出による。水圏および地圏へのな お一層の放出が、大気からの気中浮遊ニトロフェノール類の乾性並びに湿性沈着により起 っている。大気中での2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの光酸化体の形成は 未だ論議中である。

参考になるデータから、2-ニトロフェノールの蒸発はあるもののその蒸発速度は遅く、そして4-ニトロフェノールは水域から大気への有意な蒸発はないものと予測される。2-ニトロフェノールが雲の液相に多くあるのに対し、4-ニトロフェノールは、粒子への広範にわたるな結合のために、物理化学的データから予測されるよりも多い量を雲の気相に認めることができる。水への溶解性と予測される気相での結合を考慮すると、大気から表層水と土壌へのニトロフェノール類の湿性沈着が予想される。対流圏へ放散された2-ニトロフェノールの主要な変換経路は2,4-ジニトロフェノールへの迅速なニトロ化であるのに対して、気中浮遊4-ニトロフェノールの大部分は粒子結合体であるため、光化学反応を受ける度合いは少ないものと予測されている。4-ニトロフェノールの大部分は、湿性並びに乾性沈着によって大気中から洗い流される筈である。ニトロフェノール類は、成層圏のオゾン層破壊あるいは地球温暖化の直接的な原因になるとは考えられていない。水域における4-ニトロフェノールの光化学分解半減期は2.8~13.7日の範囲であった。2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの生分解に関する多数の研究が、これらの異性体は好気的条件下の水域で本質的に生分解を受けることを示している。嫌気的条件下でのニトロフェノール類の無機化には、微生物群集の広域適応が必要である。

土壌に対する吸着係数(K<sub>oc</sub>)の測定値が44-530の範囲であったことは、低~中等度の土壌吸着性であることを示している。土壌へ放出されるニトロフェノール類は好気的条件下で生分解される筈である。地下水への浸透は、生分解には不向きな条件下だけと推測されている。2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの場合、測定されている生物濃縮係数が11~76の範囲であることは生物濃縮の可能性が低いことを示している。

2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの毒性の全容に関する情報は限られたものしかない。4-ニトロフェノールを実験動物に経口、静脈内または腹腔内経路で投与し

た場合に、適用量の大部分が 24-48 時間以内に尿中にグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体として排泄され、一方、極少量が糞便中または未変化の 4-ニトロフェノールとして排泄されていた。グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の割合は、種族と用量に依存していることが明らかにされている。4-ニトロフェノールはウサギで経口投与後に、グルクロン酸抱合体と硫酸化のみならず、p-アミノフェノールへの還元を受ける。生体内(in vivo)および試験管内(in vitro)の研究からの参考になるデータは、4-ニトロフェノールの皮膚からの取り込みを示唆している。2-ニトロフェノールのデータは極めて限られている。しかしながら、参考になるデータに基づけば、匹敵する代謝変換が想定されている。2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの生物濃縮は、これら化合物の迅速な代謝と排泄により期待されない。

急性試験では、経口摂取により 4-ニトロフェノールは有害であり、そして 2-ニトロフェノールよりも有毒であることが分かった。メトヘモグロビン形成の用量依存的増大が、ネコを 2-ニトロフェノールに経口暴露およびラットを 4-ニトロフェノールに吸入暴露させたときに見られた。4-ニトロフェノールへの反復暴露後に認められるメトヘモグロビン形成は、吸入暴露に対する最も重要なエンドポイントであることが明かされ、また、経口暴露の場合にも関連性があると考えられている。その他に認められる影響には、体重増加率の減少、器官重量の差異、肝の限局的脂肪変性および血液学的変化があった。これらの影響に対して、明確な用量 反応または信頼できる無(有害)影響量 no-observed-(adverse-)effect levels (NO(A)ELs)を確認することはできなかった。

2-ニトロフェノールは皮膚に対して軽度の刺激性があるが、眼に対しては刺激性がない。2-ニトロフェノールは、Buehler テストで感作作用がないことが立証されている。実験動物による確かな試験に基づき、4-ニトロフェノールの場合には、皮膚と眼に対する刺激作用があるものと考えられている。モルモットによる強化テスト maximization test で、4-ニトロフェノールは軽度の刺激性があると見なされた。ヒトの場合、特に、4-ニトロフェノールに暴露されたとと思われる工員の皮膚貼布試験で皮膚感作が認められていることから、4-ニトロフェノールに接触した後の感作を無視することはできない。

その 2 種のニトロフェノールの異性体はどちらも、遺伝毒性について十分には試験され



ていない。2-ニトロフェノールの変異原性について何らかの結論を出せるほど十分なデータがそろっていない。4-ニトロフェノールの場合は、十分な報告とはいええないものもあるが、より多くの変異原性の試験結果が参考にできる。4-ニトロフェノールは試験管内(in vitro)で染色体異常を引き起こすことを示唆する証拠がある。哺乳類における生体内(in vivo)の変異原性試験が行われない限り、4-ニトロフェノールの変異原性が生体内(in vivo)で発現するか否かを結論することはできない。

マウスにおいて、4-ニトロフェノールを78週間皮膚に適用したが、発がん作用は示されていない。マウスを用いたもう一つの研究(様々な限界があるが)で、2-ニトロフェノールあるいは4-ニトロフェノールを12週間にわたって皮膚に塗布し、皮膚の腫瘍は認められていない。経口または吸入経路による発がん性試験は、異性体のどちらに対しても参考にはならなかった。

4-ニトロフェノールの場合、参考になるデータは、ラットおよびマウスに皮膚または経口で適用したときに、特異的または統計学的に有意な生殖ないし発生毒性の証拠を示さなかった。ラットによる経口投与の試験において、2-ニトロフェノールは、母体毒性も引き起こす投与量の場合にのみ、出生児で発生影響を誘発した。しかし、これらの試験において、胎児は内部奇形については検査されていなかった。

2-ニトロフェノールのデータベースは非常に限られており、4-ニトロフェノールのデータベースは信頼できるNO(A)EL値を引き出すには不十分である。したがって、現在のところ、2-ニトロフェノールあるいは4-ニトロフェノールに対する耐容1日摂取量 tolerable daily intakes (TDIs)または耐容濃度 tolerable concentrations (TCs)を導くことができない。

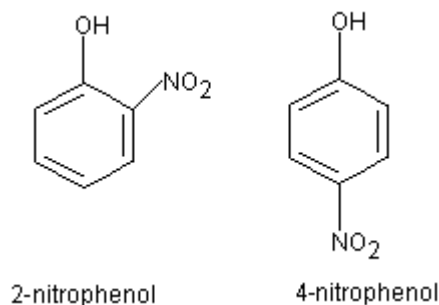
2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの種々の水生生物に対する毒性について参考になる確かな試験結果から、ニトロフェノール類を水生コンパートメントで中等度ないし高度な毒性を示す物質として分類できる。淡水生物による長期に渡る研究で認められた最低影響濃度(イカダモ緑藻 *Scenedesmus subspicatus* の96時間 EC50 が2-ニトロフェノールでは0.39 mg、鞭毛原虫 *Entosiphon sulcatum* の72時間の最小発育阻止濃度 MIC

が4-ニトロフェノールで0.83 mg)は、人口過密な高度に工業化されたアジアの河川流域で定量された最高濃度(2-ニトロフェノールでは0.0072 mg/L、4-ニトロフェノールで0.019 mg/L)よりも40-50倍高かった。このことから、生分解と光化学分解があるとはいえ、水域へ放出されたニトロフェノール類は、感応性の水生生物に対して、特に両方の除去経路が有利に働かない表層水の下方では、ある程度リスクを与えることもあり得る。ニトロフェノール類の使用実態と放出の筋書きによって、ニトロフェノール類は水生生物に対して小さなリスクしか与えていないと考えられる。

参考にできるデータは、陸生環境におけるニトロフェノール類の中程度の毒性についてのみ指摘している。農薬の分解に由来するニトロフェノール類の毒性暴露比(TER)の算定から、例え最悪の事態を想定しても、陸生環境では小さなリスクしか予想されない。

## 2. 物理的・化学的性質

2-ニトロフェノール(CAS番号 88-75-5; 2-ヒドロキシ-1-ニトロベンゼン、オルト-ニトロフェノール)および4-ニトロフェノール(CAS番号 100-02-7; 4-ヒドロキシ-1-ニトロベンゼン、パラ-ニトロフェノール)は実験式 $C_6H_5NO_3$ を共有する。それらの構造式は下記の通りである。



ドイツの生産者による工業銘柄の2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールは99%を超える標準的な純度がある。特定不純物は、各製品の対応する異性体(0.3%)と微量の3-ニトロクロロベンゼン(<0.05%)である。ポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン/ジベンゾフラン(PCDD/PCDF)およびテトラクロロジベンゾ-パラ-ジオキシン/ジベンゾフラン(TCDD/TCDF)異性体は、検出限界0.1~0.4 µg/kg 製品では検出されなかった(BUA, 1992)。

純粋なニトロフェノール異性体は室温で薄黄色から黄色の結晶を形成する。これらの物質は表1に示されている物理化学的性状が特徴となっている (Sax & Lewis, 1987)。

表1 2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの物理化学的性状

パラメータ	2-ニトロフェノール	4-ニトロフェノール
分子量(g/mol)	139.11	139.11
融点(°C)	44-45 (1)(2)(3)	113-114 (1)(2)(3)
沸点(°C)	214-217 (1)	279 (分解) (3)
蒸気圧(kPa)	$6.8 \times 10^{-3}$ (19.8 °C) (4)	$3.2 \times 10^{-6}$ (20 °C) (5)
水に対する溶解度(g/L)	1.26 (20 °C) (4)	12.4 (20 °C) (6)
n-オクタノール/水分配係数 (log Kow)	1.77-1.89 (7)	1.85-2.04 (7)
解離定数(pKa)	7.23 (21.5 °C) (8)	7.08 (21.5 °C) (8)
紫外スペクトル	$\lambda_{\max}$ (水) : 230; 276 nm; log $\epsilon_{\max}$ : 3.57; 3.80 (9)	$\lambda_{\max}$ (メタノール) : 吸収極大なし $\leq 290\text{nm}$ (9)
換算係数	1 mg/m <sup>3</sup> = 0.173 ppmv 1 ppmv = 5.78 mg/m <sup>3</sup>	

出典 : (1) Budavari et al. (1996); (2) Booth (1991); (3) Verschueren (1983); (4) Koerdel et al. (1981); (5) Sewekow (1983); (6) Andrae et al. (1981); (7) BUA (1992); (8) Schwarzenbach et al. (1988); (9) Weast (1979)

モノニトロフェノール類のその他の物理化学的性状については、本文書中に転載された国際化学物質安全性カード (ICSC 1342)に示されている。

### 3 . 分析方法

ニトロフェノール異性体は一般に誘導体化してから、質量分析検出器、水素炎イオン化検出器、電子捕獲検出器、または窒素検出器付きのガスクロマトグラフィーで通常定量される (BUA, 1992; Nick & Schoeler, 1992; Geissler & Schoeler, 1994; Harrison et al., 1994;

Luettke & Levsen, 1994; Mussmann et al., 1994)。液性試料（水、尿、血液）の場合は、濃度勾配溶出（アセトニトリル/メタノールまたは酢酸アンモニウム、塩化カリウム/メタノール併用酢酸）および紫外線または電気化学検出器を組み合わせた高速液体クロマトグラフィー（誘導体化をせずに行える）もまた利用されている（BUA, 1992; Nasserredine-Sebaei et al., 1993; Ruana et al., 1993; Paterson et al., 1996; Pocurull et al., 1996; Thompson et al., 1996）。異なる異性体の分離は水蒸気蒸留（BUA, 1992）または異なるイオン対の生成と抽出によって行われる（León-González et al., 1992）。

次の濃縮手順が用いられている（BUA, 1992 ; Puig & Barcelo, 1996 のレビューも参照）。

- 空気および水試料の場合の固相吸着と熱または液体溶媒による抽出（Luettke & Levsen, 1994; Mussmann et al., 1994）
- 水試料には、誘導体化後の液・液抽出（高度汚染試料の酸・塩基分画による初期の精製、連続抽出法による上昇回収率）（León-González et al., 1992; Nick & Schoeler, 1992; Geissler & Schoeler, 1994; Harrison et al., 1994）
- 土壌試料には、酸・塩基分画または固相濃縮を用いる液体溶媒による抽出と、水抽出による次の脱着（Vozňáková et al., 1996）
- 血液および尿試料（または変性試料）には、グルクロン酸抱合体の酸加水分解とその後の誘導体化（Nasserredine-Sebaei et al., 1993; Thompson et al., 1996）

検出限界は空気では $<10 \text{ ng/m}^3$ 、水では $0.03\sim 10 \text{ }\mu\text{g/L}$ 、土壌では $200\sim 1,600 \text{ }\mu\text{g/kg}$ である。生物試料でのニトロフェノール異性体の検出限界はラット肝灌流液の場合にのみ示されていた（ $0.5\sim 1 \text{ mg/L}$  ; Thompson et al., 1996 ）。

#### 4 . ヒトおよび環境の暴露源

ニトロフェノール異性体が天然産物として存在することは知られていない。

欧州連合内では、2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールは主に3社により製造されている。他の6大製造会社が米国と日本で知られている(1989年の時点において)。1983年に、西ヨーロッパ場合の生産量は、2-ニトロフェノールが約6,400トン、4-ニトロフェノールは20,500トンと推定された。1988~89年では、一製造会社に由来するドイツの生産量は、2-ニトロフェノールが約500トン、4-ニトロフェノールは約2,000トンであり、それぞれの約20トンは輸出された。2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールは共に、アゾ色素および多くの農薬、ほとんどが殺虫剤(2-ニトロフェノール:カルボフラン、ホサロン;4-ニトロフェノール:パラチオン、パラチオン-メチル、フルオロジフェン)と除草剤(4-ニトロフェノール:ニトロフェン、ピフェノックス)の合成の中間体である。還元によって得られる対応アミノフェノールは、現像液(2-アミノフェノール)として、また抗結核薬4-アミノサリチル酸および鎮痛薬の4-アセトアミノフェノール(パラセタモール)(4-アミノフェノール)の合成中間体として利用されている(Booth, 1991も参照のこと)。1980年代に、2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの生産量は、いくつかの有機リン農薬製造の変化・中止の結果としてドイツで減少傾向を示した。

その唯一のドイツの製造会社での製造と加工処理の間の2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの放出はあまり重要とは思われない。1988~89年に、約2.5kgの2-ニトロフェノールと10kgの4-ニトロフェノールが大気へ放散され、そして93kg以下の2-ニトロフェノールと64kg未満の4-ニトロフェノールが表層水へ放散された。

1996年について、以下の2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの環境への放出が米国の製造会社により報告された(TRI, 1998)。

- 2-ニトロフェノール:3製造会社(各々1箇所の生産拠点)から、生産量が450~45,000kg/年、総放出量は大気へ15kgと水系へ23kgが報告された。
- 4-ニトロフェノール:3製造会社(6箇所の生産拠点)から、生産量が45~450kg/年から最大45,000~450,000kg/年まで、総放出量は大気へ420kgが報告された。水系への放出データは提出されなかった。

軽自動車とディーゼル車の排気ガス中に 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールが検出されている。モータ負荷に応じて、異性体の排出濃度は、 $<50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 排気ガス(アイドル) および 4-ニトロフェノールが約  $1,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ と 2-ニトロフェノールは約  $2,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (等速運転)であった (Nojima et al., 1983; Tremp et al., 1993)。規制の三元触媒コンバーターがニトロフェノールの排出を高モータ負荷時の約 8%、通常モータ負荷時の約 2%に減少させた (Tremp et al., 1993)。上述の排気ガス濃度をドイツの車の交通による推計総排気ガス量に結びつけて、大まかな推計をすると年間に少なくとも数トンの大気中ニトロフェノールがこの発生源に繋がった (BUA, 1992)。他の燃焼プロセス (暖房、ゴミの燃焼) からのニトロフェノール放出に関するデータは確認されなかった。

室内実験により、一酸化窒素やヒドロキシラジカルと亜酸化窒素が存在すると、ベンゼンやトルエンのような芳香族化合物の光化学分解の間に 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールが生成されるという証拠がいくつかある。これらの結果は少なくとも部分的には非現実的に高い一酸化窒素濃度を用いたモデル実験で得られたものであったし、また、速度定数は分かっていないがニトロフェノールを形成しない競争反応が存在する (BUA, 1992)。しかしながら、スモッグチャンバー実験により、照射中のニトロフェノール異性体形成が確認された (Leone & Seinfeld, 1985; Leone et al., 1985)。最近の雲水モデル実験により、フェノールが特にアルカリ性条件下で二酸化窒素またはモノクロロ二酸化窒素と反応して 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールが形成されることも明らかになった (Scheer et al., 1996)。大気総排出量への光化学的に形成されるニトロフェノール類の影響は入手できるデータでは見積もりができなかった。

水圏への 4-ニトロフェノールのかなりの放出が、殺虫剤のパラチオンとパラチオン-メチルの加水分解および—より少ない程度ではあるが—除草剤のニトロフェンとピフェノックスの光分解で起こるかもしれない。放出の定量は入手できるデータでは可能でない。さらに、かなりの割合の気中浮遊ニトロフェノール類、特に 4-ニトロフェノールが乾性および湿性沈着により水圏および地圏へ放出される (5 節を参照) (Herterich & Herrmann, 1990; Luettker et al., 1997)。湿性沈着試料中の 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの濃度に関する多くの試験を利用できる (6.1 節を参照)。降水量データ (Baumgartner & Liebscher, 1990 による

と、陸地で年間平均 746 mm) と雨水中の 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの測定濃度から、雨を介したニトロフェノール類の放出は、地球規模では年間少なくとも数千トン程度であると推定できる。

光分解的に水溶液中で 4-ニトロフェノールに分解される除草剤のニトロフェンとピフェノックスの使用が、地圏および生物圏への排出の原因となる可能性がある。さらに、ニトロフェノールに汚染した雨、雪およびその他の湿・乾性沈着が土壌中のニトロフェノールのレベルに関係する可能性がある。生物圏へのニトロフェノール類の放出に関するデータは入手できない。

## 5 . 環境中の移動・分布・変換

ニトロフェノール類の環境への放出は大部分が大気、表層水、および—少しばかり—土壌である。非定常平衡モデルを用いて、種々の環境コンパートメントにおける 4-ニトロフェノールの分布が次のように予測されている：大気=0.0006%、表層水=94.6%、底質=4.44%、土壌=0.95%、生物相=0.000 09% (Yoshida et al., 1983)。標準化陸生生態系の自然界土壌に吹き掛けられた 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの分布パターンがラジオトレーサー手法<sup>(14C)</sup>によって測定された。適用された放射能 (2-ニトロフェノール/4-ニトロフェノール) のうち、大気で 49.45%/20.01%、土壌 (動物を含む) で 27.38%/40.21%、植物で 12.73%/7.57%、浸出水で 0.05%/0.02% が回収された (Figge et al., 1985)。人工土壌を用いた地球微小生態系試験槽における 4-ニトロフェノールの分布はこの結果に大体一致した (Gile & Gillett, 1981)。それぞれ 30 日と 28 日の培養期間以内の分解であるため、回収放射能の大部分は適用されたニトロフェノールの崩壊産物に相当したと想定できる。

経済協力開発機構 (OECD) ガイドラインに沿って行われた揮発性実験で、水中の 2-ニトロフェノールの半減期は 14.5~27.3 日の範囲にあったことより、蒸発速度は遅いことを示している (Koerdel et al., 1981; Rippen et al., 1984; Scheunert, 1984; Schoene & Steinhanses, 1984)。種々の雨模様のとときの雲の気相と液相間の分配に関する測定によって、2-ニトロフェノールは水溶解度と蒸気圧から予想されるよりもはるかに液相に多いことが明らかになった。これに反して、4-ニトロフェノールは大部分が粒子へ吸着されている。したがって、この異性体 4-ニトロフェノールの上昇レベルが雲の気相で検出されている (Luettke et al., 1997)。入手できるデ

ータから、4-ニトロフェノールは水域から大気への多くの蒸発はないものと予測される。ニトロフェノール類は水溶液で解離するから、表層水の pH 上昇が伴うと蒸発はさらに低下する。このことは、大気から表層水と土壌へのニトロフェノール類の乾性・湿性の沈着が予想されるところの結論を導く。この分配機構の存在は雨水と沈着試料中の 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの検出によって支持されている（6.1 節を参照）。

直接的な光分解（Koerdel et al., 1981）とヒドロキシラジカルによる大気中での光酸化（Zetzsch et al., 1984）に関する実験結果から、両経路は対流圏へ放散された 2-ニトロフェノールの除去にはあまり重要ではないことが分かった。そのため、気中浮遊 2-ニトロフェノールの主要な分解経路は 2,4-ジニトロフェノールへの迅速なニトロ化である（Herterich & Herrmann, 1990; Luettke et al., 1997）。気中浮遊 4-ニトロフェノールの大部分は粒子結合体であり、そのため光化学反応を受ける度合いは少ないものと予測されている。したがって、4-ニトロフェノールの大部分は湿性並びに乾性沈着によって大気中から洗い流される。水域で直接日光に暴露された 4-ニトロフェノールの光化学分解半減期は 2.8~13.7 日の範囲であり（Hustert et al., 1981; Mansour, 1996）、pH を大きくすると光化学分解半減期は長くなった（Hustert et al., 1981）。痕跡量の 4-アミノフェノールが河川水中に光化学反応の生成物として見出された（Mansour, 1996）。OECD のガイドラインに沿って行われた実験で、Andrae ら（1981）と Koerde ら（1981）は環境条件下では 2-ニトロフェノールまたは 4-ニトロフェノールの加水分解を認めなかった。

2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの生分解に関する多数の研究が行われた。易生分解性また本質性生分解性に関する標準化された試験の結果は大きなばらつきのあるデータを提出しており、2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールが好氣的条件下（植種源・植種密度および適用試験法に依存）（表 2 を参照）で本質的に生分解性であることを示唆している。種々の試験の結果は 4-ニトロフェノールの細菌に対する毒性濃度が 300 mg/L より高いことを示している（Gerike & Fischer, 1979; Nyholm et al., 1984; Kayser et al., 1994）。

表 2 好氣的条件下でのニトロフェノール類の生物分解

試験	被験物質	濃度 (mg/L)	追加炭素源	試験期間 (日)	除去率 (%)	出典



易生分解性に関する試験						
AFNOR 試験	2-NP	40 OC	なし	14	16	Gerike & Fischer (1979)
Sturm 試験	2-NP	10	なし	28	32	Gerike & Fischer (1979)
MITI I	2-NP	100	なし	14	0	Urano & Kato (1986)
		50	なし	14	7	Gerike & Fischer (1979)
クローズドボトル試験	4-NP	2	なし	28	55	Rott et al. (1982)
修正 OECD スクリーニング試験	4-NP	20 DOC	なし	28	1	Rott et al. (1982)
振盪フラスコ試験	4-NP	20 OC	なし	21	50	Means & Anderson (1981)
AFNOR 試験	4-NP	40 OC	なし	14	97	Gerike & Fischer (1979)
Sturm 試験	4-NP	10	なし	28	90	Gerike & Fischer (1979)
MITI I	4-NP	50	なし	14	1	Gerike & Fischer (1979)
		100	なし	14	0	Urano & Kato (1986)
		100	なし	14	4.3	CITI (1992)
本質性生分解性に関する試験						
Zahn-Wellens 試験	2-NP	400	なし	14	80	Gerike & Fischer (1979)
SCAS 試験	2-NP	20 TOC	あり	24	107	Broecker et al. (1984)
		13.3 TOC	あり	24	110	
Bunch および Chambers	2-NP	5-10	あり	28	100	Tabak et al. (1981)
Coupled units 試験	2-NP	12 OC	あり	7	61	Gerike & Fischer (1979)

バッチ試験、通気	2-NP	200 COD	なし	5	97	Pitter (1976)
Zahn-Wellens 試験	4-NP	300	なし	14	8	Andrae et al. (1981)
		100 DOC	なし	28	100	Pagga et al. (1982)
活性汚泥試験	4-NP	50	なし	19	100	Means & Anderson (1981)
		100	なし	19	90	
SCAS 試験	4-NP	20 TOC	あり	33	>90	Marquart et al. (1984)
				27	>97	Scheubel (1984)
				25/39	100	Ballhorn et al. (1984)
				12-15	100	Koerdel et al. (1984)
Coupled units 試験	4-NP	12 OC	あり	7	100	Gerike & Fischer (1979)
バッチ試験、通気	4-NP	200 COD	なし	5	95	Pitter (1976)

使用した略記号：2-NP =2-ニトロフェノール；4-NP =4-ニトロフェノール；OC =有機炭素；DOC =溶解有機炭素；TOC =全有機炭素；COD =化学的酸素要求量

異なる植種（例えば、天然水、土壌、底質）を用いた非標準化実験によって、ニトロフェノール類の微生物による分解が菌叢の適応後に種々の環境コンパートメントで起こり得ることが明らかになった（Rubin et al., 1982; Subba-Rao et al., 1982; Van Veld & Spain, 1983; Spain et al., 1984; Ou, 1985; Hoover et al., 1986; Aelion et al., 1987; Wiggins et al., 1987）。順化時間および除去効果度は被験物質の濃度、微生物群集、気候および添加基質に多く依存した。

嫌氣的条件下でのニトロフェノール類の生物分解には、微生物群集の広域順化が必要である。下水汚泥および都市污水处理場の初期嫌氣性段階の汚泥の各試験で、初期濃度 96.5~579 mg/L 範囲の 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールは 7~60 日以内では全く分解されなかった（Wagner & Braeutigam, 1981; Battersby & Wilson, 1989）。Boyd ら(1983)が 1 週間以内にすべてのニトロフェノール異性体（50 mg/L）の完全な嫌氣的除去を認めたが、完全な無機化

は培養期間を 10 週間まで延長した場合にだけ証明された。高い初期濃度のニトロフェノールであったが、その嫌氣的分解が Tseng および Lin (1994)により見出された。すなわち、彼等は 3 種の異なる種類の廃水による生物学的流動層反応器中で 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノール (350~650 mg/L) の 90%以上の除去を認めた。入手できる報告結果から、適応微生物による嫌氣的条件下でのニトロフェノール類の緩慢な分解を予想できる。

有機炭素含量の増加につれて、土壌吸着係数 ( $K_{oc}$ )が増大するのが分かった。実測 $K_{oc}$ 値は 44~230(2-ニトロフェノール)と 56~530(4-ニトロフェノール)の範囲であった (Boyd, 1982; Broecker et al., 1984; Koerdel et al., 1984; Lokke, 1984; Marquart et al., 1984)。土壌へ放出されたニトロフェノール類は好氣的条件下で生分解されると推定されている。地下水への浸透は、生分解には不向きな条件下だけと推測されている(例えば、嫌氣的条件)。入手できる実験結果から、ニトロフェノール類は低~中等度の土壌吸着性を有する物質として分類されねばならない。

2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの参考になる確かな試験結果から、生物濃縮の可能性が低いものと推測されている。生物濃縮係数 14.6~24.4 がゼブラフィッシュ (*Brachydanio rerio*)を用いた半止水試験で 2-ニトロフェノールの場合に測定された (Koerdel et al., 1984)。流水実験では、可能性のある抱合体含めて、生物濃縮係数はコイ (*Cyprinus carpio*)の場合に 30~76 の範囲にあった (Broecker et al., 1984)。止水試験で、11 日後に 4-ニトロフェノールの生物蓄積指数 11 が緑藻類 *Chlorella fusca* (Geyer et al., 1981)で、そして暴露 3 日後に淡水魚のゴールデンオルフェ (*Leuciscus idus melanotus*)で 57 が測定された (Freitag et al., 1982)。水道水と河川水中で暴露されたゼブラフィッシュは 48 時間以内に蓄積した $^{14}C$ -4-ニトロフェノールをほぼ完全に排泄した (Ensenbach & Nagel, 1991)。ヒトデ (*Pisaster ochraceus*)およびウニ (*Strongylocentrotus purpuratus*)は 8 時間以内に注射された $^{14}C$ -4-ニトロフェノール(各々、3.48 と 3.70 mg/kg体重)のそれぞれ 89%と 36%を排泄した (Landrum & Crosby, 1981)。

## 6 . 環境中濃度およびヒトの暴露量

### 6.1 環境中濃度

雨水中の濃度から、スイスにおける総大気ニトロフェノール汚染は約  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  と見積もられている (Leuenberger et al., 1988)。ヨーロッパの辺鄙な地域 (ドイツ・アルプスのフィヒテル山、ドイツ；プロッケン山、ドイツ；Great Dun Fellの山頂、英国) の空気の最近の測定によると、2-ニトロフェノールの濃度が  $0.8\sim 25 \text{ ng}/\text{m}^3$  で、4-ニトロフェノールの濃度は  $1.2\sim 360 \text{ ng}/\text{m}^3$  であった (Herterich & Herrmann, 1990; Luettke et al., 1997)。大気 4-ニトロフェノールの高い濃度は明らかにこの異性体の高い光化学的安定性に起因している (5 節を参照)。1994 年に日本で 2-ニトロフェノールが 27 の空気試料中 22 試料に認められ (範囲  $1\sim 140 \text{ ng}/\text{m}^3$  ; 検出限界  $1 \text{ ng}/\text{m}^3$ )、4-ニトロフェノールは 27 の空気試料中 27 試料で検出された (範囲  $1\sim 71 \text{ ng}/\text{m}^3$  ; 検出限界  $1 \text{ ng}/\text{m}^3$ ) (Japan Environment Agency, 1995)。日本のある都市の街頭の粉塵試料中に、2-ニトロフェノールが最高で  $3.9 \text{ mg}/\text{kg}$ 、4-ニトロフェノールは最高で  $42 \text{ mg}/\text{kg}$  検出された (Nojima et al., 1983)。

多くの試験研究が、雲と雨水における大気中 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの分布、沈着、分解挙動を論じている。雨水と雪の 2-ニトロフェノール濃度が  $0.03\sim 5.7 \mu\text{g}/\text{L}$ 、4-ニトロフェノールの濃度は 0.5 以下から最高  $19 \mu\text{g}/\text{L}$  が主にドイツと米国の報告に示されている (BUA, 1992)。ヨーロッパの農村および都市部の雨水、雲水および「霧」(水蒸気；それ以上の記述はなされていない) 中の最近の測定がこれらの濃度範囲を確認している (Herterich & Herrmann, 1990; Levsen et al., 1990; Richartz et al., 1990; Capel et al., 1991; Geissler & Schoeler, 1993; Levsen et al., 1993; Luettke et al., 1997)。2-ニトロフェノール濃度はほとんどが検出限界より低いかまたは僅かに超える (すなわち、 $< 0.1 \mu\text{g}/\text{L}$ ) 程度であるのに対して、平均の 4-ニトロフェノール濃度は、雨水と雲水で約  $5 \mu\text{g}/\text{L}$ 、霧水で  $20 \mu\text{g}/\text{L}$  が検出されていた。霧のニトロフェノール濃度が雨水や雲水中の濃度よりも有意に高いのは、雨に比べて溶滴表面が大きく、そして大気中での滞留時間が長いためである。4-ニトロフェノールに比べて、沈着試料中の 2-ニトロフェノール濃度が低いのはおそらくこの化合物の光化学的安定性が低いためである (5 節を参照)。

1970 年代と 1980 年代の初期には、ライン川のドイツとオランダ側といくつかのライン川支流における 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの濃度は  $0.1\sim 1 \mu\text{g}/\text{L}$  であった (BUA, 1992)。2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールは、1978、1979 および 1994 年

に、日本の表層水の 177 試料で検出されず（検出限界 0.04~10 µg/L）また 177 の底質でも検出されなかった（検出限界 0.002~0.8 µg/kg）(Japan Environment Agency, 1979, 1980, 1995)。1979 および 1994 年に 4-ニトロフェノールが 129 の魚試料で検出されなかったのに対して（検出限界 0.005~0.2 µg/kg）2-ニトロフェノールは 1994 年に 129 の海産魚試料のうち 1 試料で検出された（検出限界 0.005~0.3 µg/kg）(Japan Environment Agency, 1980, 1995)。0.15 µg/L（検出限界）未満から 7.2 µg/L 範囲濃度の 2-ニトロフェノール、および 0.1 µg/L 未満から 18.8 µg/L 範囲濃度の 4-ニトロフェノールが、1990 年と 1991 年における人口密度が高くそして高度に工業化されたマレーシアのクラン川流域の場合について報告されていた (Tan & Chong, 1993)。

## 6.2 ヒトの暴露量

作業員は製造と加工の間に吸入または皮膚接触を介して 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールに暴露される可能性がある（主に農薬製造において）。しかし、職場でのニトロフェノール濃度についてのデータは確認されなかった。

6.1 節で示された測定濃度に基づけば、一般住民の環境を介する—主に周囲空気と飲料水による—ニトロフェノール類への暴露を無視することはできない。

4-ニトロフェノールは霧に蓄積し、他方 2-ニトロフェノールは迅速に光化学的に変換される（5 節および 6.1 節を参照）。霧水中の 4-ニトロフェノールの平均濃度は約 20 µg/L である。オランダの飲料水試料の場合、1988 年に 2-ニトロフェノールの最高濃度 1 µg/L と 4-ニトロフェノールは 0.1 µg/L 未満が報告された (BUA, 1992)。これ以上のデータは入手されていない。

## 7. 実験動物およびヒトでの体内動態・代謝の比較

2-ニトロフェノールまたは 4-ニトロフェノールのヒトにおける吸収、代謝または排泄に関する定量的情報を提供している試験は確認されなかった。

### 7.1 2-ニトロフェノール

2-ニトロフェノールに関する情報は極めて限られている。胃管強制によって 200~330 mg/kg 体重を単回投与されたウサギで、適用量の大部分 (80%を超える) が 24 時間以内に尿に排泄された。約 71% がグルクロン酸と抱合し、約 11% が硫酸抱合したのに対して、約 3% はアミノフェノールに還元された (Robinson et al., 1951)。

2-ニトロフェノールに対する皮膚浸透がいくつかの *in vitro* (試験管内) 実験で明らかにされた (Huq et al., 1986; Jetzer et al., 1986; Ohkura et al., 1990)。

情報は限られているが、生物体内での 2-ニトロフェノールの生物濃縮は迅速な代謝と排泄により予期されない。

## 7.2 4-ニトロフェノール

数種の試験動物 (ラット、マウス、イヌ、ウサギ) に 4-ニトロフェノールを経口、経皮、静脈内、または腹腔内投与すると、適用量の大部分 (最高 95%) が 24~48 時間以内に尿中にグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体として排泄されていた。極少量が糞便中 (約 1%) または未変化の 4-ニトロフェノール (約 2~7%) として排泄されていた。グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の割合は、動物種、性および用量に依存していることが明らかにされていた。4-ニトロフェノールが低投与量のときは硫酸抱合体が優位を占めるが、高投与量のときはグルクロン酸抱合体の割合が増大する (Robinson et al., 1951; Gessner & Hamada, 1970; Machida et al., 1982; Rush et al., 1983; Snodgrass, 1983; Tremaine et al., 1984; Meerman et al., 1987)。経口投与後にウサギで示されたように、4-ニトロフェノールはグルクロン酸抱合と硫酸化のみならず、4-アミノフェノールへの還元を受ける。投与量の最大で 14% が尿中にアミノ化合物として検出されていた (Robinson et al., 1951)。マウスに腹腔内投与後に、4-ニトロフェニルグルコシドが 4-ニトロフェノールの僅かな代謝物 (投与量の約 1~2%) として同定された (Gessner & Hamada, 1970)。

4-ニトロフェノールの場合、実験動物のエタノール前処置 (チトクロム P-450 の誘導) が肝ミクロソーム水酸化の著明な増大をもたらした。その後形成された 4-ニトロカテコールがグルク

ロン酸抱合と硫酸の経路で 4-ニトロフェノールと競合した (Reinke & Moyer, 1985; Koop, 1986; McCoy & Koop, 1988; Koop & Laethem, 1992)。

非閉塞条件での皮膚吸収に関する特殊検査が、ウサギとイヌで 7 日以内に適用した<sup>14</sup>C-4-ニトロフェノールの約 35%と 11%がそれぞれ皮膚摂取されることを明らかにした。4-ニトロフェノールに対する皮膚浸透もいくつかの*in vitro*実験で明らかにされた (Huq et al., 1986; Jetzer et al., 1986; Ohkura et al., 1990)。

4-ニトロフェノールの生物濃縮は、その迅速な代謝と排泄により予期されない。

## 8 . 実験哺乳類動物および *in vitro* (試験管内)試験系への影響

### 8.1 単回暴露

2-ニトロフェノールの場合、経口LD<sub>50</sub>はラットで 2,830~5,376 mg/kg体重 (BASF AG, 1970; Vasilenko et al., 1976; Vernot et al., 1977; Koerdel et al., 1981)であり、マウスでは 1,300~2,080 mg/kg体重である (Vasilenko et al., 1976; Vernot et al., 1977)。経口暴露による臨床症状は非特異的であり、呼吸困難、歩行失調、震え、傾眠、無気力、痙攣が見られた。いくつかの試験で行われた肉眼的検査が高用量ラットで肝臓と腎臓のうっ血、および胃の潰瘍を明らかにした。被験物質で飽和した空気に対して 20°Cで 8 時間 (それ以上の情報はない)、ラットを吸入暴露しても死亡および毒性徴候をもたらさなかった (BASF AG, 1970)。限度試験で、ラットに対する経皮LD<sub>50</sub>は 5,000 mg/kg体重よりも大きかった (Koerdel et al., 1981)。ネコ (投与群当たり 2 匹)で、2-ニトロフェノールの経口適用 (50、100、250 mg/kg体重 ; 対照はなし)によってメトヘモグロビン形成の用量依存的増大 (それぞれ、6、44、57%)をもたらした<sup>1</sup>。250 mg/kg体重を投与された 1 匹が死亡した。2-ニトロフェノールの 50%水溶液のウサギへの皮膚適用 (用量は不明、暴露時間は背部に 1 分から 20 時間または耳介に 20 時間)ではメトヘモグロビン形成が認められなかった (BASF AG, 1970)。

4-ニトロフェノールの経口LD<sub>50</sub>はラットで 220~620 mg/kg体重の範囲 (BASF AG, 1969; Vasilenko et al., 1976; Hoechst AG, 1977a; Vernot et al., 1977; Andrae et al., 1981)であり、

マウスでは 380~470 mg/kg体重の範囲 (Vasilenko et al., 1976; Vernot et al., 1977)である。ラットでの経口暴露後の臨床症状は非特異的であり、頻呼吸と痙攣が見られ、そしていくつかの試験で行われた肉眼的検査が肺の暗赤斑を伴う灰色化を明らかにした。4,700 mg/m<sup>3</sup> (粉末として適用[ナトリウム塩]; 粒子の大きさは不明) で 4 時間単回暴露 (頭部のみ)したラットで死亡例は認められなかった。6 匹のラット中 4 匹で、暴露終了時に角膜混濁が認められ、この混濁は 14 日間の観察期間中持続した。1,510 mg/m<sup>3</sup>に暴露された 2 匹の追加ラットにおいて、メトヘモグロビン濃度は対照と比べて変わりがなかった。4,700 mg/m<sup>3</sup>に暴露後のメトヘモグロビン濃度の定量は行われなかった (Smith et al., 1988)。ラットでのもう 1 件の吸入試験 (被験物質で飽和した空気に対して 20°C で 8 時間; それ以上の情報は得られていない) で、死亡例と毒性徴候は見られなかった (BASF AG, 1969)。ラットおよびモルモットの場合の経皮 LD<sub>50</sub>は 1,000 mg/kg体重以上である (Hoechst AG, 1977b; Eastman Kodak Co., 1980; Andrae et al., 1981)。2-ニトロフェノールと対照的に、4-ニトロフェノールを 100、200 または 500 mg/kg体重用量で経口投与したがメトヘモグロビンの形成はネコ (投与群当たり 2 匹) で認められなかった。死亡率はそれぞれ 0/2、1/2、2/2 であった (BASF AG, 1969)。

---

<sup>1</sup>メトヘモグロビン形成は 8.8 節で極めて詳細に論じられる。

## 8.2 刺激作用および感作

OECD ガイドライン 404 および 405 に相当する試験から、2-ニトロフェノールは皮膚に対して軽度の刺激性があるが、眼に対しては刺激性がない (評点は不明) との結論を下すことができる。OECD ガイドライン 406 に相当するモルモットを用いる Buehler テストで、2-ニトロフェノールは皮膚感作作用を示さなかった (Koerdel et al., 1981)。

米国食品医薬品局 (FDA) のガイドラインに沿って行われた試験では、非溶解の 4-ニトロフェノールは皮膚に対して軽度の刺激性があった (評点 2/8) (Hoechst AG, 1977c)。しかしながら、OECD ガイドライン 404 に相当するもう一つの試験では、非溶解の 4-ニトロフェノールは皮膚刺激性を示さなかった (評点 0/4) (Andrae et al., 1981)。10%溶液として眼に適用された 4-ニトロフェノールは FDA ガイドラインに沿って行われた試験で軽度の刺激性があった (評点不明; Hoechst AG, 1977c)。非溶解の 4-ニトロフェノールによる結果は FDA のガイドライン



に沿って行われた試験で強い刺激性（評点不明；Hoechst AG, 1977c）または OECD ガイドライン 405 に相当する試験で軽度の刺激性があった（評点 1-2/4；Andrae et al., 1981）。

OECD ガイドライン 406 に相当するモルモットの強化テストで、皮膚感作が 20 匹中 5 匹で認められた（Andrae et al., 1981）。

2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールに対する呼吸器管感作に関するデータは文献で見当たらなかった。

### 8.3 短期暴露

#### 8.3.1 経口暴露

ラットにおける 2-ニトロフェノールの影響が OECD ガイドライン 407（5 匹/性/投与群；経口強制投与 1 日量が 0、22、67 または 200 mg/kg 体重）の 28 日間試験で調べられた。飼料摂取が高用量雄および中・高用量雌で低下し、最終体重がすべての投与ラットで有意とは言えないが低下した。肝臓と腎臓の絶対重量が中用量ラットで低下し、精巢の相対重量が低・中用量雄で増加、高用量雌では減少した。すべての投与ラットで、副腎の相対・絶対重量が増加した。主要な器官と組織の血液検査、臨床生化学検査、組織病理学的検査は、対照に比べて、被験物質に関連した何らの毒作用徴候を示さなかった（Koerdel et al., 1981）。不十分な文書化およびすべての暴露ラットで示された僅かな影響（副腎重量）だけがあったという事実のために、信頼できる NO(A)EL を推定できない。

さらに OECD ガイドライン 407 での評価のために行われた 28 日間試験で、Sprague-Dawley ラット（10 匹/性/投与群）が 4-ニトロフェノールの 1 日経口投与量として 0、70、210 または 630 mg/kg 体重を胃管強制で与えられた。投与後、自発運動の抑制（約 2 時間続いた）が中・高用量ラットで見られた。中用量ラットで、10 匹中 1 匹が死亡した。高用量の雄と雌で、死亡率はそれぞれ 4/10 と 6/10 であった（中毒に関する特定の徴候は示されていない）。最低用量群で、肉眼的検査が 7 例の肝の退色を明らかにし、組織病理学的検査は 14 例の緻密に分散した脂肪変性を明らかにした。また、肝の限局的脂肪変性が中用量ラットの 13/20 で観察されたが、高用量では観察されなかった。しかし、緻密に分散した脂肪変性は対照ラットの 6/20

でも見られたことに注意が必要である。高用量の雄の 4/10 (雌では認められない) で水症性の肝細胞腫脹が認められ、そして試験の終了前に死亡した高用量ラットの全例が肝の血管うっ血を示していた。白血球数の僅かな増加が 210 と 630 mg/kg 体重の用量投与の雌雄で見られ、その増加は高用量の雌では有意であった。高用量の雄で、アラニン・アミノトランスフェラーゼ (ALAT) 活性が有意に増大した。高用量ラットでのその他の被験物質に関連した影響には、ネフロローゼの増加 (2 匹の雄と 5 匹の雌)、精巣萎縮と精子形成阻害 (それぞれ 1 匹と 2 匹の雄) および卵巣の腺濾閉鎖症 (4 匹の雌) があつた (Andrae et al., 1981)。肝臓における明確ではない影響のために、NO(A)EL を推定できない。

### 8.3.2 吸入曝露

#### 8.3.2.1 2-ニトロフェノール

Sprague-Dawleyラット (15 匹/性/群) で、2-ニトロフェノール蒸気を 4 週間にわたり、0、5、30、60 mg/m<sup>3</sup> (「全身」曝露; 蒸気を発生させるために、溶かした 2-ニトロフェノールが使用された) の濃度で 6 時間/日、5 日間/週、曝露させたが死亡例は認められなかった。高用量の全ラットの上顎甲介と鼻甲介に沿った上皮の扁平上皮化生以外は、臨床並びに組織病理学的検査で一貫性がある曝露関連性の影響が見られなかった。11 回目の曝露後に測定されたメトヘモグロビン値が低用量ラットの場合だけで増大したが (雄: 1.0、2.3、1.8、1.6%; 雌: 2.0、4.1、2.1、1.1%) 試験終了時では対照値以内であった (Hazleton Lab., 1984)。

#### 8.3.2.2 4-ニトロフェノール

雄の白色Crl:CD<sup>R</sup>ラット (10 匹/群) で、4-ニトロフェノールの粉末を 2 週間に渡って 0、340、2,470 mg/m<sup>3</sup> (ナトリウム塩として適用; 「頭部のみ」曝露、空気動力的粒径 [MMAD] は 4.6~7.5 μm) の濃度で、6 時間/日、5 日間/週、曝露させたが死亡例は認められなかった。この 2 種の濃度で刺激性の徴候が生じた (それ以上に明確には特定されない)。340 と 2,470 mg/m<sup>3</sup> に曝露後に、黒っぽい尿、蛋白尿、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ASAT) 値の上昇およびメトヘモグロビン値の用量依存的増大が観察された。これらの影響は 14 日間の回復期間後でも未だ明らかであった。しかし、メトヘモグロビン値は高用量ラットのちの 2/5 だけがその時未だ上昇していた。メトヘモグロビン値は 10 回目の曝露後に 0.2、0.87 および 1.53%

であり、14 日間の回復期間後に 0.2、0.13 および 0.7%であった。赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット値は暴露期間中低下したが、14 日間の回復期間後に上昇した。投与ラットでは、暴露期間中および 14 日間の回復期間中に尿量が用量依存的に減少した。高用量ラットでは、絶対脾臓重量が暴露 10 日後に対照よりも有意に低く、回復期間の終了時には対照に比べて、脾臓と肺臓の絶対・相対重量が有意に低かった。著者等の言うところによれば、器管重量変化の生物学的意味合いは対応する病理学的影響が現れていないから不明である (Smith et al., 1988)。

2 回目の試行 (0、30 または 130 mg/m<sup>3</sup>に暴露 ; MMAD 4.0~4.8 μm) で、両暴露濃度はやはり有意な刺激性徴候をもたらした (それ以上に明確には特定されない)。メトヘモグロビン貧血、14 日間の回復期間内で可逆的であった影響は 130 mg/m<sup>3</sup>のときだけに見られた。メトヘモグロビン値は 10 回目の暴露後に 0.5、0.3 および 1.5%であり、14 日間の回復期間後に 0.4、0.5 および 0.2%であった。肉眼的並びに組織病理学的検査で何れの投与群においても有害影響は見られなかった。これらの結果から、この試験の著者等は NO(A)EL を 30 mg/m<sup>3</sup>と決定した (Smith et al., 1988)。

Sprague-Dawley ラット群 (15 匹/性) が 4-ニトロフェノールの粉末を 4 週間に渡って 0、1、5、30 mg/m<sup>3</sup> (「全身」暴露 ; MMAD 5.2~6.7 μm) の濃度で、6 時間/日、5 日間/週、暴露された。暴露による死亡は起こらず、そして血液または臨床生化学の値、肉眼的検査、病理組織、体重または器官重量の点に関して暴露に関係した影響は認められなかった。高用量ラットで、一側性および両側性のびまん性前部水晶体嚢白内障が観察された。暴露 2 週間後に測定されたメトヘモグロビン値は大きな変動を示し、数匹の非暴露対照で異常に高い (>3 %) ものもあった。しかしながら、群全体のメトヘモグロビン値は雄では有意だが雌ではなかった (雄: 0.8、0.5、2.2、1.1%; 雌: 1.3、1.1、2.0、1.0%) が、5 mg/m<sup>3</sup>の濃度で増加した (Hazleton Lab., 1983)。したがって、局所的影響 (白内障) には 5 mg/m<sup>3</sup>の NO(A)EL を導くことができるのに対して、全身的影響 (メトヘモグロビン形成) の場合の NO(A)EL はもっと低いかもしれない。

### 8.3.3 皮膚曝露

短期の皮膚曝露に関するデータは文献で見当たらなかった。

## 8.4 長期暴露

文献では、亜慢性と慢性試験は4-ニトロフェノールの場合だけに入手できる。

### 8.4.1 亜慢性暴露

Sprague-Dawley ラット (20 匹/性/用量群) での 13 週間の胃管強制投与試験において、4-ニトロフェノールの 0、25、70 または 140 mg/kg 体重の用量が水溶液で 5 日/週投与され、70 と 140 mg/kg 体重の投与ラットで早死が見られた (70 mg/kg 体重で雄 1 匹・雌 1 匹および 140 mg/kg 体重で雄 15 匹・雌 6 匹)。これらの死亡ラットでは通常、投与直後に、悪い血色、緩慢な挙動、虚脱、喘鳴、呼吸困難を含む臨床症状が先行して現れた。これらのラットの組織病理学的検査は、肺、肝、腎、副腎皮質、脳下垂体の軽微～中等度のうっ血を明らかにした。生存ラットでは、対照ラットと比べた投与関連の変化は報告されていなかった。メトヘモグロビン値の変化については、信頼できない分析法であったため (7 週目に対照でおよそ 13%)、説明をすることができない (Hazleton Lab., 1989)。したがって、この試験からは暫定的な NO(A)EL (肝、腎、肺の変化) としての 25 mg/kg 体重のみしか引き出せない。メトヘモグロビン形成に基づく NO(A)EL は多分もっと低いであろう。

Swiss-Webster マウスへの 4-ニトロフェノールの皮膚適用 (10 匹/性/用量群 ; 13 週間に渡って週に 3 回、0、22、44、88、175、350 mg/kg 体重の用量をアセトンに溶かして暴露) が、 $\geq 175$  mg/kg 体重の用量で皮膚刺激・炎症と壊死ばかりでなく用量依存性の死亡率をもたらした<sup>1</sup>。

---

<sup>1</sup> Gulf South Research Institute、日付なし ; それ以上の情報はない ; NTP (1993) からの引用結果

### 8.4.2 慢性暴露と発がん性

Swiss-Webster マウスを用いた長期試験 (50 匹/性/用量群) で、アセトンに溶かした 4-ニト

ロフェノールが肩甲間の皮膚に、用量 0、40、80 または 160 mg/kg 体重、3 日/週、78 週間の投与条件で適用された。試験終了時に、生存率が雄の場合に 29/60、17/60、26/60、24/60 で、雌の場合は 35/60、26/60、33/60、27/60 であった。60 週以降の死亡率の増大は全身性アミロイド症（アミロイド症の重篤度は投与マウスと対照マウスと同様であった）と二次性腎不全が原因であった。投与マウスの最終平均体重は対照マウスと同様であった。4-ニトロフェノールの経皮投与との関係では、被験物質に関連した腫瘍性または非腫瘍性作用はなく、また、雄または雌マウスにおいて 4-ニトロフェノールの発がん性の証拠はないと NTP (1993)は述べていた。

もう 1 件の試験はいくつかの手法上の欠陥（皮膚のみが試験され、暴露は僅かに 12 週間）があったが、31 匹の雌の Sutter マウスに 2-ニトロフェノールまたは 4-ニトロフェノールのジオキサン中 20%溶液を皮膚に適用（溶液 25  $\mu$ L を週に 2 回）して皮膚腫瘍を認めなかった (Boutwell & Bosch, 1959)。

#### 8.5 遺伝毒性と関連エンドポイント

2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの入手できる in vitro と in vivo の遺伝毒性試験を表 3 に要約している。

表 3 in vitro と in vivo での 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの遺伝毒性

種族（試験系）	エンドポイント	濃度範囲	結果 <sup>a</sup>		注釈	出典
			代謝活性化なし	代謝活性化あり		
2-ニトロフェノール (in vitro 試験)						
$\Lambda$ フェージ DNA	DNA 切断誘発	35 mg	-	0		Yamada et al (1987)
枯草菌 H17、M45	組換え試験	0.01~0.5 mg/プレート	-	0		Shimizu & Yano (1986)

ネズミチフス菌 TA1535、TA1537	復帰突然変異	0.003~2.5 mg/プレート	-	-		Koerdel et al. (1981); Haworth et al. (1983); Shimizu & Yano (1986)
ネズミチフス菌 TA1538	復帰突然変異	0.01~2.5 mg/プレート	-	-		Koerdel et al. (1981); Shimizu & Yano (1986)
ネズミチフス菌 TA98、TA100	復帰突然変異	0.0007~5 mg/プレート	-	-	また、Suzuki ら (1983) はノルハルマン存在下で両菌株を試験して、やはり陰性結果を出していた。	Chiu et al. (1978); Koerdel et al. (1981); Haworth et al. (1983); Suzuki et al. (1983); Shimizu & Yano (1986); Kawai et al. (1987); Dellarco & Prival (1989); Massey et al. (1994)
2-ニトロフェノール (in vivo 試験)						
キイロショウジョウバエ	SLRL 試験	混餌(400、500 ppm) または注射(2,500、5,000 ppm)	-			Foureman et al. (1994)
4-ニトロフェノール (in vitro 試験)						
Δファージ DNA	DNA 切断誘発	35 mg	-	0		Yamada et al. (1987)
枯草菌 H17、M45	組換え試験	0.01~5 mg/プレート	+	0	0.5 mg/プレートで陽性	Shimizu & Yano (1986)
大腸菌 WP2uvrA	遺伝子突然変	0.001~2.5 mg/プレート	-	-		Hoechst AG

	異	ト				(1980)
大腸菌 K-12 (Pol A1+/Pol1-), WP2 (WP2, WP2uvrA, WP67, CM611, CM571)	遺伝子突然変異	0.125~2 mg/プレート	-	0		Rashid & Mumma (1986)
大腸菌 Q13	DNA-細胞-結合試験	7または 70 mg	+	+	70 mg で陽性	Kubinski et al. (1981)
酵母菌 ade 2, trp 5	有糸分裂遺伝子変換	2.9 mg/mL	(+)	0		Fahrig (1974)
ネズミチフス菌 TA1535/pSK 1002	DNA 損傷 (umu 試験)	最高濃度 0.75 mg/mL	-	-		Nakamura et al. (1987)
ネズミチフス菌 TA1538	復帰突然変異	0.001~2.5 mg/プレート	+	-	≥0.1 mg/プレートで陽性	Hoechst AG (1980)
ネズミチフス菌 TA1538	復帰突然変異	0.01~5 mg/プレート	-	-		Andrae et al. (1981); Shimizu & Yano (1986)
ネズミチフス菌 TA1538, TA1978	復帰突然変異	0.125~2 mg/プレート	-	0		Rashid & Mumma (1986)
ネズミチフス菌 TA98, TA100	復帰突然変異	0.0007~5 mg/プレート	-	-	また、Suzuki ら (1983) は ノルハルマン存在下で両菌株を試験して、やはり陰性結果を出していた	McCann et al. (1975); Hoechst AG (1980); Andrae et al. (1981); Haworth et al. (1983); Suzuki et al. (1983); Shimizu & Yano (1986); Kawai et al.

						(1987); Dellarco & Prival (1989); Massey et al. (1994)
ネズミチフス菌 TA1535, TA1537	復帰突然変異	0.001~5 mg/プレート	-	-		McCann et al. (1975); Hoechst AG (1980); Andrae et al. (1981); Haworth et al. (1983); Shimizu & Yano (1986)
ラット肝細胞	DNA 損傷 (アルカリ溶出)	42~417 mg	(+)	0	≥97 mgで弱い陽性	Storer et al. (1996)
ラット肝細胞	DNA 修復	4.2~417 mg	-	0		Andrae et al. (1981)
チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞	染色体異常	S9 mix がないとき : 0.1~0.5 mg/mL S9 mix があるとき : 1.25~2 mg/mL	-	+		NTP (1993)
チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞	姉妹染色分体交換	S9 mix がないとき : 0.00017~0.025 mg/mL S9 mix があるとき : 0.05~1.5 mg/mL	-	-		NTP (1993)
マウスリンパ腫試験L5178Y TK <sup>+</sup> 細胞	正突然変異	S9 mix がないとき : 0.7~1.5 mg/mL S9 mix があるとき : 0.0001~0.03 mg/mL	-	-		Oberly et al. (1984)
マウスリンパ腫試験	正突然変異	0.06~0.78 mg/mL	0	-		Amacher &



験L5178Y TK <sup>+</sup> 細胞						Tumer (1982)
ラット肝細胞	不定期 DNA 合成	0.00007~0.14mg/mL	-	0		Probst et al. (1981)
ヒトリンパ球	染色体異常	記載なし	+		代謝活性化に関するデータはない;有効性を判定できない(評価するには文書化および試験計画が不十分)。最小陽性濃度 : 1.4 mg/mL	Huang et al. (1996)
ヒトリンパ球	染色体異常	0.001~0.3 mg/mL	+		代謝活性化に関するデータはない;有効性を判定できない(評価するには文書化および試験計画が不十分)	Huang et al. (1995)
ヒト線維芽細胞 (WI-38)	DNA 修復	0.14~139 mg	+		代謝活性化に関するデータはない;有効性を判定できない(評価するには文書化および試験計画が不十分)。≥13.9 mgで陽性	Poirier et al. (1975)
4-ニトロフェノール (in vivo 試験)						
NMRI マウス	宿主経由試験	単回皮下注射	-		腹腔内へ菌を注	Buselmaier et al.

	(試験菌ネズミ チフス菌 G 46 および 豊 菌 a21 Leu-)	75 mg/kg 体重			射後、直ちに被験 物質を適用；試験 時間 3 時間	(1972)
キイロショウジョ ウバエ	SLRL 試験	混餌(1,000、2,500、 6,000、7,500 ppm)ま たは注射(1,000、1,500 ppm)				Zimmering et al. (1985); Foureman et al. (1994)

<sup>a</sup>、陰性；+、陽性；(+)、弱い陽性；0、試験されなかった。

2-ニトロフェノールはいくつかの限られた細菌試験で変異原性を示さなかった。入手できるデータから、2-ニトロフェノールの変異原性に関する結論を引き出すことはできない。

4-ニトロフェノールの場合、哺乳類細胞における染色体異常の *in vitro* 試験で陽性結果が得られていた。しかしながら、NTP (1993)により公表された 1 件のよく考証された試験は別として、他の入手できる試験は十分な報告ではなかった。

4-ニトロフェノールはすべての細菌試験ではないが、いくつかの細菌試験で変異原性を示したが、他の試験（すなわち、細菌を用いる宿主経路試験、マウス・リンフォーマ試験、不定期 DNA 合成試験[明らかに *in vitro*]、姉妹染色分体交換試験、ショウジョウバエでの伴性劣性致死[SLRL]試験）では陰性結果であった。哺乳類における *in vivo* の変異原性試験が行われな限り、4-ニトロフェノールの変異原性が *in vivo* で発現するか否かを結論することはできない。

## 8.6 生殖発生毒性

### 8.6.1 生殖毒性

Angerhofer (1985)によって行われたSprague-Dawleyラットの雌 24 匹と雄 12 匹よりなる群での確かな 2 世代試験では、エタノールに溶解された 4-ニトロフェノールが 0、50、100、250 mg/kg体重/日の用量で経皮により 5 日/週適用された。F<sub>0</sub>世代は交配前の 140 日間暴露された。F<sub>0</sub>雌への投与は飼育、妊娠および授乳の全期間に渡って続けられた。次いで、F<sub>1</sub>世代の雌 26

匹と雄 13 匹よりなる群がF<sub>0</sub>ラットの場合と同じ方法で 168 日間暴露された。雌は再び飼育、妊娠および授乳の全期間に渡って暴露された。投与ラットにおける皮膚刺激の用量相関性の症状（紅斑、剥がれ、かさぶた、ひび割れ）以外に、肉眼的・組織病理学的検査は有意な有害作用の徴候を示さなかった。繁殖力、妊娠、生育性および授乳に関する計算された指数は対照の場合と変わらなかった。F<sub>0</sub>世代における体重に対する精巣比は影響を受けず、精巣に組織学的病変は観察されなかった。ラットの 28 日間試験（8.3.1 節を参照）で、精巣萎縮と精子形成の抑制が 630 mg/kg体重の用量で経口投与した数匹のラットに観察されたが、210 mg/kg体重では観察されなかった。

## 8.6.2 発生毒性

### 8.6.2.1 2-ニトロフェノール

Charles River COBS<sup>®</sup> CD<sup>®</sup>ラットを用いた用量設定試験（5 匹の母獣/群；妊娠 6 日から 15 日に胃管強制によって 0、50、125、250、500、1,000 mg/kg体重の用量を適用；20 日目に子宮検査）で、500 と 1,000 mg/kg体重の用量レベルは母体毒性徴候（処置の早期に一過性ではあるが用量関連性の体重増加率の低下）を引き起こした。1 匹の高用量ラットが死亡したが、死因は確定できなかった。その他の臨床所見には、 $\geq 250$  mg/kg体重で黒っぽい尿および $\geq 125$  mg/kg体重で被毛の黄染色（鼻、口、肛門性器の部位の）があった。解剖所見は生物学的に重要な差異を生存母獣で提示しなかった。最高用量レベルの 1,000 mg/kg体重で、群の平均着床後胚損失（対照の 8.2%に対して 13.8%）と平均早期再吸収胚（対照の 1.2 に対して 2.3）の僅かではあるが統計的に有意な増大（既存対照とも比較して）が見られた。生存胎児数、着床数、黄体数には影響が認められなかった（International Research and Developmental Corporation, 1983）。

### 8.6.2.2 4-ニトロフェノール

下記に示す両試験では、催奇形性作用に対する新生児の完全な検査は行われていなかった。さらに、これらの試験の限界（すなわち、一投与群のみの使用または混合物への暴露）のために、信頼できる NO(A)EL を引き出せない。

Booth ら (1983)により行われた試験で、50 匹の雌の CD-1 マウス群が、妊娠 7~14 日に 4-ニトロフェノールを 1 日経口用量として 400 mg/kg 体重を胃管強制投与された。妊娠マウス (n = 36)の生存率は対照の 100%に対して 81%であり、投与マウスでは母体体重増加の減少を示した。生殖指標 (生存分娩数と生存妊娠数の比) に変化は認められなかった。一腹当たりの生存胎児の平均数が僅かに増大したが、4-ニトロフェノールは肉眼的異常をもたらさなかった。

Kavlock (1990)はSprague-Dawleyラットで 4-ニトロフェノールの発生毒性を検討した。4-ニトロフェノール (水、Tween 20、プロピレン・グリコール、エタノールの混液[4:4:1:1]に溶解)が 12~13 匹ラットの群に胃管強制によって、妊娠 11 日目に 0、100、333、667、1,000 mg/kg 体重の用量を投与された。母体毒性に関するエンドポイントには、毒性徴候、死亡率、体重増加率、および離乳時の子宮内着床痕数があった。出生児では、生育性、出生後 1~6 日の体重、明白な奇形、出産時の死亡が記録された。母獣では、 $\geq 667$  mg/kg体重の用量レベルで死亡率が増大した。 $\geq 333$  mg/kg体重の用量レベルで、出生後 1 日と 6 日の同腹児サイズは有意とは言えないが減少した。

## 8.7 免疫学のおよび神経学的影響

特に免疫学のおよび神経学的影響に関連するような試験は見当たらない。in vitro の試験から、4-ニトロフェノールは細胞性免疫反応のサプレッサーとして作用することが示唆されている (Pruett & Chambers, 1988)。しかしながら、生物学的意味合いは不明である。

## 8.8 メトヘモグロビン形成

2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールによるメトヘモグロビン形成が、種々の動物種、投与経路、投与期間により試験されている。概要が表 4 に示されている。

表 4 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールによるメトヘモグロビン形成

種族 (系/数/用量/性)	投与経路	頻度/期間	用量	結果 (% metHb)	出典
2-ニトロフェノール					

ネコ 2匹 性は記載なし	経口	1回	50 mg/kg 体重	6		BASF AG (1970)
			100	44		
			250	57		
ウサギ 匹数と性は記載なし	経皮	1回	50%水溶液	増加せず		BASF AG (1970)
ラット Sprague-Dawley 雄15匹・雌15匹	吸入	6時間/日		<i>m</i>	<i>f</i>	Hazleton Lab. (1984)
		5日間/週	0 mg/m <sup>3</sup>	1.0	2.0	
		4週間	5	2.3	4.1	
			30	1.8	2.1	
			60	1.6	1.1	
				暴露後11日目		
4-ニトロフェノール						
ネコ 2匹 性は記載なし	経口	1回	100 mg/kg 体重	増加せず		BASF AG (1969)
			200			
			500			
ラット Sprague-Dawley 雄20匹・雌20匹	経口	5日間/週	0 mg/kg 体重	分析法が信頼できない(対照 で13%)		Hazleton Lab. (1989)
		13週間	25			
			70			
			140			
ラット CrI:CD <sup>R</sup> 雄10匹	吸入	6時間/日	0 mg/m <sup>3</sup>	0.2	0.2	Smith et al. (1988)
		5日間/週	340	0.87	0.13	
		2週間	2470	1.53	0.7	
				暴露終了時と回復期の14日後		

ラット CrI:CD <sup>R</sup> 雄 10 匹	吸入	6 時間/日 5 日間/週 2 週間	0 mg/m <sup>3</sup> 30 130	0.5 0.3 1.5	0.4 0.5 0.2	Smith et al. (1988)
			暴露終了時と回復期の 14 日後			
ラット Sprague-Dawley 雄 15 匹・雌 15 匹	吸入	6 時間/日 5 日間/週 4 週間		<i>m</i> 0 mg/m <sup>3</sup> 1 5 30	<i>f</i> 1.3 1.1 2.0 1.0	Hazleton Lab. (1983)
			暴露の 2 週間後、数匹の対照ラットで異常に高い値を示した			

使用した略記号：m =雄；f =雌；metHb =メトヘモグロビン

2-ニトロフェノールは、最も感受性が高い動物種のネコ (BASF AG, 1970)で、メトヘモグロビン形成を用量依存的に明らかにもたらしている。試験された最小用量の 50 mg/kg体重がメトヘモグロビン濃度を上昇させていた。ラットにおける吸入実験で、5 mg/m<sup>3</sup>の暴露濃度でメトヘモグロビン濃度の上昇が認められたが、30 と 60 mg/m<sup>3</sup>の暴露濃度ではメトヘモグロビン濃度の上昇が少なかった(Hazleton Lab., 1984)。

対照的に、4-ニトロフェノールはネコで最大 500 mg/kg体重の濃度でもメトヘモグロビン形成を引き起こさなかった (BASF AG, 1969)。ラットにおいては、吸入実験の高濃度で、メトヘモグロビン形成能は非常に低いように思われた (2470 mg/m<sup>3</sup>で 1.5%)。結論として、4-ニトロフェノールはメトヘモグロビン形成を誘起するかもしれないが、その作用はかなり弱くて、明確な用量反応がないように見える。

## 9 . ヒトへの影響

Naniwa (1979)は、4-ニトロフェノール、4-アミノフェノール、2-アミノ-4-クロロフェノール、3'-クロロジフェニルアミン-2-カルボン酸および 4-ジクロロニトロベンゼン（鉱油中 0.1、0.5、1%）を用いて、化学工場でこれらの薬品におそらく暴露された 31 名の従業員と 5 名の対照者についてパッチテストを行った。4 名の従業員において、4-ニトロフェノールに対する陽性反応が観察されたが、これらの従業員が 3 試験濃度のすべてに陽性反応を示したわけではなかった。4 名の従業員はすべてが 2-アミノ-4-クロロフェノールにも陽性反応を示し、この物質は強い感作物質であることがわかった。したがって、2-アミノ-4-クロロフェノールは一次アレルゲンとして作用し、4-ニトロフェノールで認められた作用は交差感作による可能性がある。

1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼンに主に感作された 27 名の患者で、4-ニトロフェノール（鉱油中 1~2%）による交差感作は認められなかった。さらに、クロラムフェニコールのアレルギー患者 15 名は 4-ニトロフェノールに反応し得なかった (Eriksen, 1978)。

## 10 . 実験室および自然界におけるその他の生物への影響

### 10.1 水生環境

最も感受性の高い種での試験結果を表 5 に要約している。水生生物に対する 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの毒性に関する追加データが BUA (1992) に引用されている。すべての試験実施生物のうち、鞭毛原虫と緑藻類のイカダモ緑藻が、淡水種での長期細胞増殖阻害作用に最も感受性が高いことが分かった。オオミジンコはミジンコ属生殖試験で、2-ニトロフェノールの 21 日間最小影響濃度 (LOEC) として 1.0 mg/L を示した (Koerdel et al., 1984)。内肛動物が試験された海洋無脊椎動物種で最も感受性があり、4-ニトロフェノールの 49 日間 EC<sub>50</sub> 値が 0.21 mg/L、最小影響濃度 (EC<sub>m</sub>) が 0.03 mg/L を示した (エンドポイント：発芽した胞子の発育) (Scholz, 1986)。淡水魚はより低い感度を示した。4-ニトロフェノールの最も低い 96 時間 LC<sub>50</sub> 値として 3.8 mg/L がニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) で測定された (Howe et al., 1994)。ゼブラフィッシュを用いた 28 日間の流水条件下での行動変化試験では、2-ニトロフェノールの測定無影響濃度 (NOEC) は 2 mg/L であった (Broecker et al., 1984)。4-ニトロフェノールへのゼブラフィッシュの長期暴露によって、0.1 mg/L の濃度でも、肝臓の小さな形態変

化が観察された。1 および 5 mg/Lでは、ゼブラフィッシュの約 25%が肝組織の変性変質症候を示した (Braunbeck et al., 1989)。

表 5 ニトロフェノール類の水生物毒性

最も感受性がある種 (試験法・エンドポイント)	被験物質	影響濃度 (mg/L)	出典
細菌			
シュードモナス・プチダ <i>Pseudomonas putida</i> (細胞増殖阻害試験)	2-NP	16-時間 MIC <sup>a</sup> : 0.9	Bringmann & Kuehn (1977)
	4-NP	16-時間 MIC: 4.0	
原生動物			
鞭毛原虫 <i>Entosiphon sulcatum</i> (細胞増殖阻害試験)	2-NP	72-時間 MIC: 0.40	Bringmann (1978);
	4-NP	72-時間 MIC: 0.83	Bringmann et al. (1980)
藻類			
イカダモ緑藻 <i>Scenedesmus subspicatus</i> クロレラ・ブルガリス <i>Chlorella vulgaris</i> (細胞増殖阻害試験)	2-NP	96-時間 EC <sub>50</sub> : 0.39	Broecker et al. (1984);
	2-NP	6-時間 EC <sub>50</sub> : 1.53	Kramer et al. (1986)
	4-NP	6-時間 EC <sub>50</sub> : 6.97	
無脊椎動物			
タマミジンコ <i>Moina macrocopa</i> (急性) (遊泳阻害)	2-NP	3-時間 LC <sub>50</sub> : 1.9	Yoshioka et al. (1985)
	4-NP	3-時間 LC <sub>50</sub> : 1.3	
オオミジンコ <i>Daphnia magna</i> (長期) (遊泳阻害・生殖)	2-NP	21-日 LOEC: 1.0	Koerdel et al. (1984)
	4-NP	21-日 NOEC: 1.3	
内肛動物 <i>Barentsia matsushimana</i> (海洋) (発芽した胞子の発育)	4-NP	49-日 EC <sub>50</sub> : 0.21	Kuehn et al. (1988)
	4-NP	49-日 EC <sub>m</sub> <sup>b</sup> : 0.03	Scholz (1986)
魚類			
コイ <i>Cyprinus carpio</i> (止水)	2-NP	96-時間 LC <sub>50</sub> : 36.6	Lang et al. (1996)
ニジマス <i>Oncorhynchus mykiss</i> (止水)	4-NP	96-時間 LC <sub>50</sub> : 3.8	Howe et al. (1994)
ニジマス <i>Oncorhynchus mykiss</i> (流水)	4-NP	96-時間 LC <sub>50</sub> : 7.93	

使用した略記号: 2-NP = 2-ニトロフェノール; 4-NP = 4-ニトロフェノール

<sup>a</sup> MIC = 最小発育阻止濃度



<sup>b</sup> EC<sub>m</sub> = 最小影響濃度

## 10.2 陸生環境

高等植物に対する2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの毒性が、OECDガイドライン 208 に沿って個々の試験で検討された。被験物質の種々の濃度で種子を培養した後、成長シュートの低下生体重についての14日間 EC<sub>50</sub>値は、2-ニトロフェノールが52~420 mg/kg土壌 (Broecker et al., 1984; Koerdel et al., 1984)、4-ニトロフェノールでは35~260 mg/kg土壌 (Ballhorn et al., 1984; Marquart et al., 1984)の範囲にあった。2-ニトロフェノールの場合の14日間 EC<sub>10</sub>値は両種いずれに対しても10 mg/kg土壌であった。全体的に見て、カブ(*Brassica rapa*)はカラスムギ (*Avena sativa*)よりも感受性が高かった。

OECDガイドライン 207 に沿って行われた試験で、2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールのミミズに対する有害作用が数件の個々の試験で検討された。動物を被験物質で浸された濾紙上で暴露する接触試験で、Neuhauserら (1985)は2-ニトロフェノールの*Eisenia fetida*に対する毒性の48時間 LC<sub>50</sub>値を5.9 µg/cm<sup>2</sup>と確立した。4-ニトロフェノールの場合、試験されたうちで最も感受性の高い種の*Eisenia fetida*と*Eudrilus eugeniae*で、48時間 LC<sub>50</sub>値は0.7~2.7 µg/cm<sup>2</sup>の範囲にあった (Roberts & Dorough, 1984; Neuhauser et al., 1985, 1986)。人工土壌混合体中で暴露されたとき、2-ニトロフェノールの28日間 LC<sub>50</sub>値 (*Eisenia fetida*で)は250~500 mg/kg土壌の範囲(Broecker et al., 1984; Koerdel et al., 1984)にあり、また試験されたうちで最も感受性の高い種の*Eisenia fetida*と*Eudrilus eugeniae*で、4-ニトロフェノールの場合の14日間 LC<sub>50</sub>値は38~67 mg/kg土壌の範囲にあった(Ballhorn et al., 1984; Marquart et al., 1984; Neuhauser et al., 1985, 1986)。

特にミミズの接触試験の環境との関連性は疑問視される。この試験から得られたクリティカルな結果が、陸生環境生物への唯一の影響データとして、試験した物質をミミズや他の土壌生物に対して強毒性という分類の根拠になってはいけない。微生物および植物に関して入手可能なデータは、陸生環境における中等度の毒性しか示唆していない。

### 11 . 影響評価

## 11.1 健康への影響の評価

### 11.1.1 ハザードの特定および用量反応評価

総体的に、2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの毒性の全容に関する情報は限られたものしかない。

4-ニトロフェノールを実験動物に経口、静脈内または腹腔内経路で投与した場合に、適用量の大部分が24~48時間以内に尿中にグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体として排泄され、一方、極少量が糞便中または未変化の4-ニトロフェノールとして排泄されていた。ウサギでは、4-ニトロフェノールは経口投与後に、グルクロン酸抱合と硫酸化のみならず4-アミノフェノールへの還元を受ける。in vivo および in vitro の試験は皮膚からの取り込みを示唆した。2-ニトロフェノールのデータは極めて限られている。しかしながら、参考になるデータに基づいて、匹敵する代謝変換が想定されている。2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの生物濃縮は、これら化合物の迅速な代謝と排泄により予期されない。

4-ニトロフェノールの経口LD<sub>50</sub>はラットで220~620 mg/kg体重とマウスでは380~470 mg/kg体重の範囲であり、経口摂取の4-ニトロフェノールは有害であり、そして2-ニトロフェノールよりも有毒であることが分かった。メトヘモグロビン形成の用量依存的増大が、ネコを2-ニトロフェノール(4-ニトロフェノールへの暴露では見られなかった)に経口暴露およびラットを4-ニトロフェノールに吸入暴露させたときに見られた。

実験動物での皮膚または眼刺激作用に関する大部分の試験は、不十分な文書化の結果のみに限られている。しかし、入手できるデータから、2-ニトロフェノールは皮膚に対して軽度の刺激性があるが、眼に対しては刺激性がないとの結論を下すことができる。そして2-ニトロフェノールは感作作用がないことが立証されている。OECDとFDAのガイドラインに沿って行われた試験に基づき、4-ニトロフェノールの場合には、皮膚と眼に対する刺激作用があるものと考えられている。さらに、亜慢性皮膚暴露ばかりでなく吸入暴露によっても刺激性徴候が報告されていた。モルモットによる強化テストで、4-ニトロフェノールは感作性があると見なされた。4-ニトロフェノールに暴露されたヒトで、パッチテストの陽性結果が報告されていた。

これは交差感作による可能性があったが、ヒトの 4-ニトロフェノールに対する感作を無視することはできない。

実験動物での 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールに対する反復経口暴露に関しては、少数の限られた試験が確認されたに過ぎない。2-ニトロフェノールでは、餌摂取量の減少を伴った体重増加率の低下および明確な用量依存性を示さない器官重量の差異が見られた。しかし、主要な器官と組織の血液検査、臨床生化学検査、組織病理学的検査は、対照に比べて、被験物質に関連した何らの毒作用徴候を示さなかった。4-ニトロフェノールを投与されたラットでは、いくつかの組織のうっ血のみならず肝の限局的脂肪変性が主要な組織病理学的所見であった。その他の報告された影響には、血液学的変化、ネフローゼ、精巣萎縮および卵巣の濾閉鎖症があった。2-ニトロフェノール蒸気への吸入暴露は上気道上皮の扁平上皮化生を引き起こし、4-ニトロフェノール粉末（ナトリウム塩として適用された）では、血液学的変化、メトヘモグロビン値の上昇、器官重量の差異が認められた。これらの試験で提示された影響に対して、明確な用量反応または信頼できる NO(A)EL を確認することは不可能だった。

2-ニトロフェノールの変異原性について何らかの結論を出せるほど十分なデータがそろっていない。4-ニトロフェノールの場合、もっと多くの変異原性試験が入手できており、4-ニトロフェノールはすべての細菌試験ではないが、いくつかの細菌試験で変異原性を示した。さらに、哺乳類細胞における染色体異常の *in vitro* 試験で陽性結果が得られていた。しかしながら、1 件のよく考証された分析評価は別として、他の入手できる試験は十分な報告ではなかった。哺乳類における *in vivo* の変異原性試験が行われない限り、4-ニトロフェノールの変異原性が *in vivo* で発現するか否かを結論することはできない。

4-ニトロフェノールは雄または雌のマウスで 78 週間に渡って皮膚に適用されたが、発がん性はなかった。雌マウスによる限界がある試験において、2-ニトロフェノールあるいは 4-ニトロフェノールを 12 週間に渡って皮膚に塗布し、皮膚の腫瘍は認められなかった。経口または吸入経路による発がん性試験は、異性体のどちら場合にも参考にはならなかった。

2 世代試験において、4-ニトロフェノールに暴露されたラットで生殖への影響は認められなかった。発生毒性については、入手できる試験は適切に行われていなかった（すなわち、1 用

量のみの適用、または供試動物は混合物を 1 日だけ投与されていた)。ラットによる経口投与の試験において、2-ニトロフェノールは、母体毒性も引き起こす投与量の場合にのみ、出生児で発生影響を誘起した。しかし、胎児の内部奇形については検査されていなかった。

有害作用評価に関連したヒトについてのデータは 4-ニトロフェノールで行われた数件のパッチテストに限られていた。

#### 11.1.2 2-ニトロフェノールおよび4-ニトロフェノールの指針値設定基準

8 節で示されたように、2-ニトロフェノールのデータベースは耐容 1 日摂取量 (TDI) または耐容濃度 (TC) を算定するには不十分である。

4-ニトロフェノールの場合、メトヘモグロビン形成は、吸入暴露に対する最もクリティカルなエンドポイントであることが明かされ、また、経口暴露の場合にも関連性があると考えられている。しかしながら、経口投与による 13 週間試験で使用された分析法が正確でなかったために、信頼できる NO(A)EL を引き出せていない。したがって、現在のところ、4-ニトロフェノールに対する耐容 1 日摂取量 TDI のデータベースの不十分なために設定できない。

吸入暴露に関する長期毒性試験は文献で見当たらず、そして短期試験による 4-ニトロフェノールの NO(A)EL 値はかなりの相違を示していた (2 週間暴露 : 約 30 mg/m<sup>3</sup> の NO(A)EL ; 4 週間暴露 : 約 5 mg/m<sup>3</sup> の NO(A)EL)。局所的影響 (白内障) には 5 mg/m<sup>3</sup> の NO(A)EL を導くことができたのに、全身的影響 (メトヘモグロビン形成) の場合の NO(A)EL はもっと低いかもしれない。したがって、メトヘモグロビン形成はクリティカルなエンドポイントであるから、吸入暴露の場合の信頼できる耐容濃度 (TC) を算定できない。

#### 11.1.3 リスクの総合判定例

6.2 節で示されたように、作業員は製造と加工の間に吸入または皮膚接触を介して 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールに暴露される可能性がある (主に農薬製造において)。しかし、職場でのニトロフェノール濃度についてのデータは確認されなかった。

一般住民の場合に、環境を介したニトロフェノール類への暴露を無視できない(6.2 節も参照)。環境大気中濃度が約  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、吸入摂取が 100%、成人の 1 日呼吸気量が  $22 \text{ m}^3$ 、男女の平均体重が  $64 \text{ kg}$ と仮定し、そして 24 時間中の 4 時間が戸外で過ごされるとすると (IPCS, 1994)、ニトロフェノール類の吸入摂取は  $0.06 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日であると算出される。その他に、4-ニトロフェノールは霧に蓄積している。霧の最大含水量を  $0.1 \text{ g}/\text{m}^3$  (Pruppacher & Klett, 1978)と仮定すると、平均の実測濃度の  $20 \mu\text{g}/\text{L}$ から、吸入による 4-ニトロフェノールの摂取は 1 時間暴露中に約  $8 \text{ ng}$  (すなわち、 $0.12 \text{ ng}/\text{kg}$ 体重) であると算出できる。飲料水中の最高濃度が  $1 \mu\text{g}/\text{L}$ 、1 日飲料水消費が  $1.4 \text{ L}$ 、男女の平均体重が  $64 \text{ kg}$ と仮定すると、飲料水を介した 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの摂取は約  $0.02 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日であると算出できる。

これらのデータから、一般住民のニトロフェノール異性体への暴露は主に周囲空気と飲料水を介しているとの結論を下すことができる。

## 11.2 環境影響の評価

環境への 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの放出は、主として、車公害および農薬の加水分解・光分解のような拡散源から大気、水域、土壌への排出による。

対流圏へ放散された 2-ニトロフェノールは主に雲の気相中に留まりそうであり、当然のことながらニトロ化によって迅速に除去される。気中浮遊 4-ニトロフェノールの大部分は粒子結合体と予測されており、湿性並びに乾性沈着によって表層水と土壌へ洗い流される。大気からの除去と問題にならない程度の揮発性のために、ニトロフェノール類は成層圏のオゾン層破壊あるいは地球温暖化の直接的な原因になるとは考えられていない。測定された生物濃縮係数が生物濃縮の可能性が低いことを示している。

ニトロフェノール類は水生生物に対して中等度ないし高度な毒性を示しており、藻類、ミジンコおよび水生無脊椎動物についての慢性試験で報告された最も低い影響濃度が分かっている。淡水生物による長期に渡る研究で認められた最も低い影響濃度 (イカダモ緑藻の 96 時間

EC<sub>50</sub>が2-ニトロフェノールでは0.39 mg、鞭毛原虫の72時間の最小発育阻止濃度MICが4-ニトロフェノールで0.83 mg)は、人口過密な高度に工業化されたアジアの河川流域で定量された最高濃度(2-ニトロフェノールでは0.0072 mg/L、4-ニトロフェノールで0.019 mg/L)よりも40~50倍高かった。これらのデータから、最小影響濃度LOECと最高表層水濃度との間の安全幅は、感受性のある水生生物に対するリスクを排除するのに十分ではない。特に、生分解と光化学分解の除去経路が有利に働かない表層水の下方において。魚類に対する慢性影響データの欠損を考慮に入れれば、環境リスク評価に対する標準的手順に従って予測無影響濃度(PNEC)を導き出すのに、不確定性/評価係数として100を適用しなければならない。しかし、急性実験(10.1節を参照)から、明らかに魚類は試験されたなかでは最も感受性が小さい水生生物種であるように見える。したがって、評価係数は10が適切であろう。さらに、4節で概説された使用実態と放出のシナリオにより、表層水に放散されたニトロフェノール類は水生生物に対して小さなリスクしか与えないであろうという結論が導かれる。

陸生コンパートメントにおけるニトロフェノール類の発生に関して入手可能なデータはなかった。したがって、このコンパートメントの場合の生物への影響評価は、農薬の分解についてだけでしか行えないであろう。4節で述べられた殺虫剤(パラチオン、パラチオン-メチル、カルボフラン、ホサロン、フルオロジフェン)および除草剤のビフェノックスとニトロフェンに対しては、植物防疫剤の環境リスク評価の欧州・地中海地方植物防疫機構EPPO(1993)ガイドラインに沿って、予測土壌濃度が最大散布量(Domsch, 1992より得られた)から算出された。農薬の相対分子質量(分子量)に基づいて、土壌の上方5cm中のニトロフェノール類の最高濃度が算出された(最悪状況;1回適用)。土壌が高度に植被されている時に散布される農薬の場合は、散布された量の半分しか土壌に達しないと仮定される。したがって、殺虫剤の予測環境濃度(PEC)は50%減少した。土壌の予測環境濃度PEC<sub>soil</sub>を陸生種で最も低いLC<sub>50</sub>値で除すと毒性暴露比(TER)を与える。ミミズの最も低いLC<sub>50</sub>値(38 mg/kg体重;10.2節を参照)は、天然農業土壌に比べて人工土壌中の有機物含有量が高いため、係数2で補正しなければならない。下記の毒性暴露比TERが導かれた。

殺虫剤

パラチオン : 244

パラチオン-メチル : 557

除草剤

ビフェノックス : 131

ニトロフェン : 18

カルボフラン：47

ホサロン：36

フルオロジフェン：69

EPPO (1993)ガイドラインによれば、影響を受ける懸念のある数値は10未満である。したがって、これらの農薬は例え最悪のシナリオを想定しても、ミミズに対して小さなリスクしか予想されない。さらに、除草剤のニトロフェン、および殺虫剤ホサロンとフルオロジフェンはもはや作物保護の用途のために製造または市販されていない。

## 12．国際機関によるこれまでの評価

モノニトロフェノール類の国際機関によるこれまでの評価はまちまちであった。

モノニトロフェノール類の国際的なハザード分類および表示に関する情報は、本文書に転載された国際化学物質安全性カードに収められている。

## 13．健康の保護および緊急処置

ヒトの健康障害は、予防・防止手段および適切な応急処置法と共に本文書に転載された国際化学物質安全性カード (ICSC 1342)に紹介されている。

## 14．現行の規則、ガイドラインおよび基準

各国の規則、ガイドラインおよび基準に関する情報は、国際有害化学物質登録制度 International Register of Potentially Toxic Chemicals (IRPTC) の法的ファイルから入手できる。

ある国で採用されている化学物質に関する規制決定は、その国の法律の枠組においてのみ十分に理解され得るものだということを読者は認識しておかねばならない。全ての国の規則およびガイドラインは、改定されるものであり、適用される前に適切な規制当局によって常に確か

められる必要がある。

国際化学物質安全性カード

モノニトロフェノール(異性体混合物)

ICSC 番号:1342

<p>モノニトロフェノール(異性体混合物)</p> <p>MONONITROPHENOLS</p> <p>Nitrophenols (mixed isomers)</p> <p>Nitrophenols</p> <p><math>C_6H_5O_3N</math></p> <p>分子量:139.1</p> <p>CAS登録番号:25154-55-6</p> <p>ICSC番号:1342</p> <p>国連番号:1663</p>
---

災害 / 暴露のタイプ	一次災害 / 急性症状	予防	応急処置 / 消火薬剤
火災	可燃性。火災時に刺激性もしくは有毒なフュームやガスを放出する。	裸火禁止。	粉末消火薬剤、水噴霧、泡消火薬剤、二酸化炭素。
爆発	空気中で粒子が細かく拡散して爆発性の混合気体を生じる。	粉塵の堆積を防ぐ;密閉系、粉塵防爆型電気および照明設備。	火災時:ドラム缶などに水を噴霧して冷却する。
身体への暴露		粉塵の拡散を防ぐ!作業環境管理を厳密に!	
吸入	紫色(チアノ - ゼ)の唇や爪、紫色(チアノ - ゼ)の皮膚、錯乱、痙攣、咳、めま	局所排気または呼吸用保護具。	新鮮な空気、安静。医療機関に連絡する。



	い、頭痛、吐き気、咽頭痛、意識喪失。		
皮膚	吸収される可能性あり！	保護手袋、保護衣。	汚染された衣服を脱がせる。洗い流してから水と石鹼で皮膚を洗浄する。医療機関に連絡する。
眼	発赤、痛み。	安全ゴーグル、または呼吸用保護具と眼用保護具の併用。	数分間多量の水で洗い流し(できればコンタクトレンズをはずして)、医師に連れて行く。
経口摂取	腹痛、咽頭痛、嘔吐。「吸入」参照。	作業中は飲食、喫煙をしない。	口をすすぐ。安静。医療機関に連絡する。

漏洩物処理	貯蔵	包装・表示
<ul style="list-style-type: none"> <li>こぼれた物質を密閉式の容器内に掃き入れる。</li> <li>残留分を注意深く集め、安全な場所に移す。</li> <li>この物質を環境中に放出してはならない。</li> <li>(特別個人用保護具:P2 有害粒子用フィルター付マスク)。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>可燃性物質、還元性物質、食品や飼料から離しておく。</li> <li>乾燥。</li> <li>密封。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>食品や飼料と一緒に輸送してはならない。</li> <li>国連危険物分類 (UN Haz Class) : 6.1</li> <li>国連包装等級 (UN Pack Group) : III</li> </ul>

重要データは次ページ参照

ICSC 番号:1342

Prepared in the context of cooperation between the International Programme on Chemical Safety & the Commission of the European Communities © IPCS CEC 1993

国際化学物質安全性カード

モノトロフェノール(異性体混合物)

ICSC 番号:1342

<b>重 要 デ ー タ</b>	<p><b>物理的状态；外觀：</b> 黄色の結晶</p> <p><b>物理的危険性：</b> 粉末や顆粒状で空気と混合すると、粉塵 吸入の危険性： 爆発の可能性がある。</p> <p><b>化学的危険性：</b> 加熱すると、爆発することがある。燃焼 すると、窒素酸化物を生成する。加熱す</p> <p><b>許容濃度：</b> TLV は設定されていない。</p>	<p><b>暴露の経路：</b> 体内への吸収経路：エアロゾルの吸入、 経皮、経口摂取。</p> <p>20℃ではほとんど気化しない；しかし、 浮遊粒子が急速に有害濃度に達するこ とがある。</p> <p><b>短期暴露の影響：</b> 眼、皮膚、気道を刺激する。血液に影響 物など)を生じる。強酸化剤と反応する。を 与え、メトヘモグロビンを生成するこ とがある。これらの影響は遅れて現われ ることがある。医学的な経過観察が必要 である。</p> <p><b>長期または反復暴露の影響：</b> 反復または長期の接触により、皮膚が感 作されることがある。</p>
<b>物理的性質</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 沸点：194～279℃</li> <li>・ 融点：44～116℃</li> <li>・ 密度：1.5 g/cm<sup>3</sup></li> <li>・ 水への溶解度：0.13～1.2 g/100 ml</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 蒸気圧：0.0032～7 Pa(20℃)</li> <li>・ 相対蒸気密度(空気 = 1)：4.81</li> <li>・ 引火点：169℃</li> </ul>
<b>環境に関する データ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 水生生物に対して毒性が強い。</li> <li>・ 通常の使用法と異なる状況での環境中への放出を避ける。</li> </ul>	
<b>注</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 暴露の程度によっては、定期検診が必要である。</li> </ul>		

・この物質により中毒を起こした場合は、特別の処置が必要である；指示のもとに適切な手段をとれるようにしておく。

#### 付加情報

ICSC 番号:1342

モノニトロフェノール(異性体混合物)

原案作成日：1998.11

© IPCS, CEC, 1993

<http://www.nihs.go.jp/ICSC/icssj-c/icss1342c.html>

#### 文献

Aelion CM, Swindoll CM, Pfaender FK (1987) Adaptation to and

biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a  
pristine aquifer. *Applied environmental microbiology*, 53:2212-2217.

Amacher DE, Turner GN (1982) Mutagenic evaluation of carcinogens and  
non-carcinogens in the L5178Y/TK assay utilizing postmitochondrial  
fractions (S9) from normal rat liver. *Mutation research*, 97:49-65.

Andrae U, Bieniek D, Freitag D, Goeggelmann W, Huber W, Klein W,  
Kotzias D, Lahaniatis E, Mansour M, Parlar H, Politzki G, Rohleder H,  
Rott B, Scheunert I, Spieser H, Viswanathan R (1981) *Feasibility of  
test guidelines and evidence of the base-set testing according to the  
chemicals legislation*. Muenchen, Gesellschaft für Strahlen- und  
Umweltforschung mbH (in German).

Angerhofer RA (1985) *Final phase: Effect of dermal applications of*

*paranitrophenol on the reproductive functions of rats.* Aberdeen Proving Ground, MD, US Army Environmental Hygiene Agency (Study No. 75-51-0047-85).

ATSDR (1992) *Toxicological profile for nitrophenols: 2- and 4-nitrophenol.* Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Report No. TP-91/23).

Ballhorn D, Freitag D, Geyer H, Quast I, Rott B, Scheunert I, Spieser H, Viswanathan R (1984) *Assessment of the feasibility and evidence of the test methods of levels I and II of the chemicals act.* Berlin, Umweltbundesamt (in German).

BASF AG (1969) *Results of the toxicological testing of Rongal-Stabilisator A.* Ludwigshafen (unpublished report) (in German).

BASF AG (1970) *Results of the toxicological testing of o-nitrophenol.* Ludwigshafen (unpublished report) (in German).

Battersby NS, Wilson V (1989) Survey of the anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge. *Applied environmental microbiology*, 55:433-439.

Baumgartner A, Liebscher H-J (1990) *Allgemeine Hydrologie. Quantitative Hydrologie.* Berlin, Gebrueder Borntraeger Verlag, pp. 93-96.

Booth G (1991) Nitro compounds, aromatic. In: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Vol. A17.* Weinheim, VCH VerlagsGmbH, pp.

411-455.

Booth GM, Bradshaw WS, Carter MW (1983) *Screening of priority chemicals for potential reproductive hazard*. Orem, UT, MESA Corp. (Report No. PB83-213017).

Boutwell RK, Bosch DK (1959) The tumor-promoting action of phenol and related compounds for mouse skin. *Cancer research*, 19:413-424.

Boyd SA (1982) Adsorption of substituted phenols by soil. *Soil science*, 134:337-343.

Boyd SA, Shelton DR, Berry D, Tiedje JM (1983) Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Applied environmental microbiology*, 46:50-54.

Braunbeck T, Storch V, Nagel R (1989) Sex-specific reaction of liver ultrastructure in zebra fish (*Brachydanio rerio*) after prolonged sublethal exposure to 4-nitrophenol. *Aquatic toxicology*, 14:185-202.

Bringmann G (1978) Determination of the toxicity of water pollutants on protozoa. I. Bacterivorous flagellates. *Zeitschrift fuer Wasser und Abwasser Forschung*, 11:210-215 (in German).

Bringmann G, Kuehn R (1977) Results of the damaging effects of water pollutants on *Daphnia magna*. *Zeitschrift fuer Wasser und Abwasser Forschung*, 10:161-165 (in German).

Bringmann G, Kuehn R, Winter A (1980) Determination of the biological effect of water pollutants in protozoa. III. Saprozoic flagellates.

*Zeitschrift fuer Wasser und Abwasser Forschung*, 13:170-173

(in German).

Broecker B, Fischer R, Gerber HG, Goerlitz G, Markert M, Wellens H

(1984) *Assessment of the feasibility and evidence of the test method*

of level 1 and 2 of the chemical act. Berlin, Umweltbundesamt

(in German).

BUA (1992) *BUA-Stoffbericht 2- und 4-Nitrophenol*. Beratergremium

fuer Umweltrelevante Altstoffe. Weinheim, VCH VerlagsGmbH (Report No.

75; February 1992).

Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelmann PE, Kinneary JE, eds.

(1996) *The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and*

*biologicals*, 12th ed. Whitehouse Station, NJ, Merck & Co. Inc.

Buselmaier W, Roehrborn G, Propping P (1972)

Mutagenitaets-Untersuchungen mit Pestiziden im Host-mediated assay und

mit dem Dominanten Letaltest an der Maus. *Biologisches Zentralblatt*,

91:311-325.

Capel PD, Leuenberger C, Giger W (1991) Hydrophobic organic chemicals

in urban fog. *Atmospheric environment*, 25A:1335-1346.

Chiu CW, Lee LH, Wang CY, Bryan GT (1978) Mutagenicity of some

commercially available nitro compounds for *Salmonella typhimurium*.

*Mutation research*, 58:11-22.

CITI (1992) *Biodegradation and bioaccumulation. Data of existing*

chemicals based on the CSCL Japan. Tokyo, Japan Chemical Industry

Ecology-Toxicology & Information Center, Chemicals Inspection & Testing Institute.

Dellarco VL, Prival MJ (1989) Mutagenicity of nitro compounds in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavin mononucleotide in a preincubation assay. *Environmental molecular mutagenesis*, 13:116-127.

Domsch KH (1992) *Pesticides in soil*. Weinheim, VCH-Verlag (in German).

Eastman Kodak Co. (1980) Toxicology Laboratory Report No. 125877V; US Environmental Protection Agency Report No. 86-890000202. Rochester, NY [cited in Cantilli R (1991) *Drinking water health advisory for p-nitrophenol*. Washington, DC, US Environmental Protection Agency (Report No. PB92-135490)].

Ensenbach U, Nagel R (1991) Toxicokinetics of xenobiotics in zebrafish - comparison between tap and river water. *Comparative biochemistry and physiology*, 100C:49-53.

EPPO (1993) *Decision-making scheme for the environmental risk assessment of plant protection products*. Paris, European and Mediterranean Plant Protection Organization.

Eriksen K (1978) Cross allergy between paranitro compounds with special reference to DNCB and chloramphenicol. *Contact dermatitis*, 4:29-32.

Fahrig R (1974) Comparative mutagenicity studies with pesticides.

*IARC scientific publications*, 10:161-181.

Figge K, Klahn J, Koch J (1985) Chemicals in ecosystems. Inventory, evaluation and application of distribution models. *Society for Water, Soil and Air Hygiene*, 61:1-234 (in German).

Foureman P, Mason JM, Valencia R, Zimmering S (1994) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. IX. Results of 50 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environmental molecular mutagenesis*, 23:51-63.

Freitag D, Geyer H, Kraus A, Viswanathan R, Kotzias D, Attar A, Klein W, Korte F (1982) Ecotoxicological profile analysis. VII. Screening chemicals for their environmental behavior by comparative evaluation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 6:60-81.

Geissler A, Schoeler HF (1993) Atmospheric deposition of pesticides and nitrophenols in the Rhine/Sieg-area (Germany). *Vom Wasser*, 80:357-370.

Geissler A, Schoeler HF (1994) Gas chromatographic determination of phenol, methylphenols, chlorophenols, nitrophenols and nitroquinones in water at 0.1 µg l<sup>-1</sup>. *Water research*, 28:2047-2053.

Gerike P, Fischer WK (1979) A correlation study of biodegradability determination with various chemicals in various tests. *Ecotoxicology and environmental safety*, 3:159-173.

Gessner T, Hamada N (1970) Identification of *p*-nitrophenol glucoside



as a urinary metabolite. *Journal of pharmaceutical sciences*,  
59:1528-1529.

Geyer H, Viswanathan R, Freitag D, Korte F (1981) Relationship between  
water solubility of organic chemicals and their bioaccumulation by the  
alga *Chlorella*. *Chemosphere*, 14:1307-1313.

Gile JD, Gillett JW (1981) Transport and fate of organophosphate  
insecticides in a laboratory model ecosystem. *Journal of agricultural  
and food chemistry*, 29:616-621.

Hansch C, Leo A (1979) *Substituent constants for correlation analysis  
in chemistry and biology*. New York, NY, John Wiley & Sons.

Harrison I, Leader RU, Higgs JJW, Tjell JC (1994) Determination of  
organic pollutants in small samples of groundwaters by liquid-liquid  
extraction and capillary gas chromatography. *Journal of  
chromatography*, 688:181-188.

Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W, Zeiger E (1983)  
*Salmonella* mutagenicity test results for 250 chemicals.  
*Environmental mutagenesis*, 5 (Suppl. 1):3-142.

Hazleton Lab. (1983) *Subacute dust inhalation toxicity study in rats.*  
p -Nitrophenol. Final report. Sponsored by Monsanto Co., St. Louis,  
MO (HLA Study No. 82-242).

Hazleton Lab. (1984) *Subacute inhalation toxicity study in rats.*  
o -Nitrophenol. Final report. Sponsored by Monsanto Co., St. Louis,  
MO (HLA Study No. 82-254).

Hazleton Lab. (1989) *Subchronic toxicity study in rats with paranitrophenol*. Sponsored by Monsanto Co., St. Louis, MO (HLA Study No. 241-221).

Herterich R, Herrmann R (1990) Comparing the distribution of nitrated phenols in the atmosphere of two German hill sites. *Environmental technology letters*, 11:961-972.

Hoechst AG (1977a) *Acute oral toxicity of p -nitrophenol in female SPF-Wistar rats*. Frankfurt/Main, Hoechst AG (unpublished report) (in German).

Hoechst AG (1977b) *Acute dermal toxicity of p -nitrophenol in female SPF-Wistar rats*. Frankfurt/Main, Hoechst AG (unpublished report) (in German).

Hoechst AG (1977c) *Skin and eye irritating effects of p -nitrophenol in rabbits*. Frankfurt/Main, Hoechst AG (unpublished report) (in German).

Hoechst AG (1980) *A mutagenicity screening of 408 / 80 A in bacteria (Ames test)*. Frankfurt/Main, Hoechst AG (unpublished report).

Hoover DG, Borgonovi GE, Jones SH, Alexander M (1986) Anomalies in mineralization of low concentrations of organic compounds in lake water and sewage. *Applied environmental microbiology*, 51:226-232.

Howe GE, Marking LL, Bills TD, Rach JJ, Mayer FLJ (1994) Effects of water temperature and pH on toxicity of terbufos, trichlorfon,

- 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol to the amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).  
*Environmental toxicology and chemistry*, 13:51-66.
- HSDB (1998) *Hazardous substances data bank*. Bethesda, MD, National Library of Medicine.
- Huang Q, Wang L, Han S (1995) The genotoxicity of substituted nitrobenzenes and the quantitative structure-activity relationship studies. *Chemosphere*, 30:915-923.
- Huang Q-G, Kong L-R, Liu Y-B, Wang L-S (1996) Relationships between molecular structure and chromosomal aberrations in *in vitro* human lymphocytes induced by substituted nitrobenzenes. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 57:349-353.
- Huq AS, Ho NFH, Husari N, Flynn GL, Jetzer WE, Condie LJ Jr (1986) Permeation of water contaminative phenols through hairless mouse skin. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 15:557-566.
- Hustert K, Mansour M, Parlar H, Korte F (1981) The EPA test - A method for the determination of the photochemical degradation of organic compounds in aquatic systems. *Chemosphere*, 10(9):995-998 (in German).
- International Research and Developmental Corporation (1983) *Range-finding teratology study in rats*. Sponsored by Monsanto Co., St. Louis, MO (IR-83-100).
- IPCS (1994) *Assessing human health risks of chemicals: derivation of*

*guidance values for health-based exposure limits*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 170).

IPCS (1998) *International Chemical Safety Card - Mononitrophenols*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (ICSC 1342).

Japan Environment Agency (1979) *Chemicals in the environment. Monitoring of the general environment in Japan 1978*. Tokyo.

Japan Environment Agency (1980) *Chemicals in the environment. Monitoring of the general environment in Japan 1979*. Tokyo.

Japan Environment Agency (1995) *Chemicals in the environment. Monitoring of the general environment in Japan 1994*. Tokyo.

Jetzer WE, Huq AS, Ho NFH, Flynn GL, Duraiswamy N, Condie L Jr (1986) Permeation of mouse skin and silicone rubber membranes by phenols: relationship to *in vitro* partitioning. *Journal of pharmaceutical sciences*, 75:1098-1103.

Kavlock RJ (1990) Structure-activity relationships in the developmental toxicity of substituted phenols: *In vivo* effects. *Teratology*, 41:43-59.

Kawai A, Goto S, Matsumoto Y, Matsushita H (1987) Mutagenicity of aliphatic and aromatic nitro compounds. *Japanese journal of industrial health*, 29:34-54.

Kayser G, Koch M, Ruck W (1994) Simultaneous quantitative measurement of biodegradation and toxicity of environmental chemicals.

*Vom Wasser*, 82:219-232.

Koerdel W, Schoene K, Bruckert J, Pfeiffer U, Schreiber G, Rittmann D, Hochrainer D, Otto F, Spielberg T, Fingerhut R, Kuhnen-Clausen D, Koenig J (1981) *Assessment of the feasibility of test guidelines as well as the evidence of the base set of the law on chemicals.*

Hanover, Fraunhofer Institute for Toxicology and Aerosol Research (in German).

Koerdel W, Kuhnen-Clausen D, Fabig W, Otto F (1984) *Evaluation of test guidelines for environmental chemicals.* Schmalleberg,

Fraunhofer Institute for Environmental Chemistry and Ecotoxicology (in German).

Koop DR (1986) Hydroxylation of *p*-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Molecular pharmacology*, 29:399-404.

Koop DR, Laethem CL (1992) Inhibition of rabbit microsomal cytochrome P-450 2E1-dependent *p*-nitrophenol hydroxylation by substituted benzene derivatives. *Drug metabolism and disposition*, 20:775-777.

Kramer CR, Truemper I, Berger L (1986) Quantitative structure-activity relations for the autotrophic growth inhibition of synchronic *Chlorella vulgaris* suspensions by monosubstituted nitrobenzenes. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 181:411-420 (in German).

Kubinski H, Gutzke GE, Kubinski ZO (1981) DNA-cell-binding (DCB) assay

for suspected carcinogens and mutagens. *Mutation research*, 89:95-136.

Kuehn R, Pattard M, Pernak K-D, Winter A (1988) *Damaging effects of environmental chemicals in the Daphnia reproductive toxicity test as a basis for the evaluation of environmental hazards in aquatic systems*. Berlin, Institute for Water, Soil and Air Hygiene (in German).

Landrum PF, Crosby DG (1981) Comparison of the disposition of several nitrogen-containing compounds in the sea-urchin and other marine invertebrates. *Xenobiotica*, 11:351-361.

Lang P-Z, Ma X-F, Lu G-H, Wang YI, Bian Y (1996) QSAR for the acute toxicity of nitroaromatics to the carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 32:1547-1552.

Leone JA, Seinfeld JH (1985) Comparative analysis of chemical reaction mechanism for photochemical smog. *Atmospheric environment*, 19:437-464.

Leone JA, Flagan RC, Grosjean D, Seinfeld JH (1985) An outdoor smog chamber and modeling study of toluene-NO<sub>x</sub> photooxidation. *International journal of chemical kinetics*, 17:177-216.

León-González ME, Perez-Arribas LV, Santos-Delgado MJ, Polo-Diez LM (1992) Simultaneous flow-injection determination of  $\sigma$  and  $p$ -nitrophenol using a photodiode-array detector. *Analytica Chimica Acta*, 258:269-273.

Leuenberger C, Czuczwa J, Tremp J, Giger W (1988) Nitrated phenols in rain: atmospheric occurrence of phytotoxic pollutants. *Chemosphere*, 17(3):511-516.

Levsen K, Behnert S, Priess B, Svoboda M, Winkeler H-D, Zietlow J (1990) Organic compounds in precipitation. *Chemosphere*, 21:1037-1061.

Levsen K, Behnert S, Mussmann P, Raabe M, Priess B (1993) Organic compounds in cloud and rain water. *International journal of environmental analytical chemistry*, 52:87-97.

Lokke H (1984) Sorption of selected organic pollutants in Danish soils. *Ecotoxicology and environmental safety*, 8:395-409.

Luettker J, Levsen K (1994) Partitioning of phenol and nitrophenols in gas and liquid phase of clouds. In: Borrell PM, Borrell P, Cvitas T, Seiler W, eds. *Transport and transformation of pollutants in the troposphere*. Proceedings of EUROTRAC Symposium '94 Garmisch-Patenkirchen, 11-15 April 1994. Garmisch-Patenkirchen, SPB Academic Publishing bv / EUROTRAC International Scientific Secretariat (ISS); Fraunhofer Institute for Atmospheric Environmental Research, pp.1075-1078.

Luettker J, Scheer V, Levsen K, Wuensch G, Cape JN, Hargreaves KJ, Storeton-West RL, Acker K, Wieprecht W, Jones B (1997) Occurrence and formation of nitrated phenols in and out of cloud. *Atmospheric environment*, 31:2637-2648.

Machida M, Morita Y, Hayashi M, Awazu S (1982) Pharmacokinetic

evidence for the occurrence of extrahepatic conjugative metabolism of *p*-nitrophenol in rats. *Biochemical pharmacology*, 31:787-791.

Mansour M (1996) Abiotic degradation of pesticides and other organic chemicals in aquatic systems. *Pesticide outlook*, 7:9-10.

Marquart HW, Sewekow B, Hamburger B, Harzdorf C, Hellbusch HD (1984) *Assessment of the feasibility and evidence of the test methods of levels I and II of the chemicals act. Part II.* Leverkusen, Bayer-AG, pp. 1-128 (in German).

Massey IJ, Aitken MD, Ball LM, Heck PE (1994) Mutagenicity screening of reaction products from the enzyme-catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Environmental toxicology and chemistry*, 13:1743-1752.

McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72:5135-5139.

McCoy GD, Koop DR (1988) Biochemical and immunochemical evidence for the induction of an ethanol-inducible cytochrome P-450 isoenzyme in male Syrian golden hamsters. *Biochemical pharmacology*, 37:1563-1568.

Means JL, Anderson SJ (1981) Comparison of five different methods for measuring biodegradability in aqueous environment. *Water, air, and soil pollution*, 16:301-315.

Meerman JH, Nijland C, Mulder GJ (1987) Sex differences in sulfation and glucuronidation of phenol, 4-nitrophenol and



*N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene in the rat *in vivo*. *Biochemical pharmacology*, 36:2605-2608.

Mussmann P, Levsen K, Radeck W (1994) Gas-chromatographic determination of phenols in aqueous samples after solid phase extraction. *Fresenius journal of analytical chemistry*, 348:654-659.

Nakamura S, Oda Y, Shimada T, Oki I, Sugimoto K (1987) SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: examination with 151 chemicals. *Mutation research*, 192:239-246.

Naniwa S (1979) Industrial contact dermatitis due to nitro and amino derivatives. 1st report: mass-examination of a factory. *Journal of dermatology*, 6:59-63.

Nasseredine-Sebaei SM, Crider AM, Carroll RT, Hinko CN (1993) Determination of *m*-nitrophenol and nipecotic acid in mouse tissues by high-performance liquid chromatography after administration of the anticonvulsant *m*-nitrophenyl-3-piperidinecarboxylate hydrochloride. *Journal of pharmaceutical sciences*, 82:39-43.

Neuhauser EF, Loehr RC, Malecki MR, Milligan DL, Durkin PR (1985) The toxicity of selected organic chemicals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of environmental quality*, 14:383-388.

Neuhauser EF, Durkin PR, Malecki MR, Anatra M (1986) Comparative toxicity of ten organic chemicals to four earthworm species. *Comparative biochemistry and physiology*, C 83:197-200.

Nick K, Schoeler HF (1992) Gas-chromatographic determination of nitrophenols after derivatization with diazomethane. *Fresenius journal of analytical chemistry*, 343:304-307.

Nojima K, Kawaguchi A, Ohya T, Kanno S, Hirobe M (1983) Studies on photochemical reaction of air pollutants. X. Identification of nitrophenols in suspended particulates. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 31:1047-1051.

NTP (1993) *Toxicology and carcinogenesis studies of p-nitrophenol* (CAS No. 100-02-7) in Swiss Webster mice (dermal studies). Research Triangle Park, NC, US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program (NTP Report No. TR-417).

Nyholm N, Lindgaard-Joergensen P, Hansen N (1984) Biodegradation of 4-nitrophenol in standardized aquatic degradation tests. *Ecotoxicology and environmental safety*, 8:451-470.

Oberly TJ, Bewsey BJ, Probst GS (1984) An evaluation of the L5178Y TK<sup>+</sup> mouse lymphoma forward mutation assay using 42 chemicals. *Mutation research*, 125:291-306.

Ohkura K, Iwamoto K, Terada H (1990) Transcellular permeation of nitrophenols through newborn rat skin epidermal cells in monolayer culture. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 38:2788-2791.

Ou L-T (1985) Methyl parathion degradation and metabolism in soil: Influence of high soil-water contents. *Soil biology and biochemistry*, 17:241-243.

Pagga U, Haltrich WG, Guenther W (1982) Investigations of the effect of 4-nitrophenol on activated sludge. *Vom Wasser*, 59:51-65 (in German).

Paterson B, Cowie CE, Jackson PE (1996) Determination of phenols in environmental waters using liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of chromatography, A* 731:95-102.

Pitter P (1976) Determination of biological degradability of organic substances. *Water research*, 10:231-235.

Pocurull E, Marce RM, Borrull F (1996) Determination of phenolic compounds in natural waters by liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection after on-line trace enrichment. *Journal of chromatography*, 738:1-9.

Poirier MC, De Cicco BT, Lieberman MW (1975) Nonspecific inhibition of DNA repair synthesis by tumor promoters in human diploid fibroblasts damaged with *N*-acetoxy-2-acetylaminofluorene. *Cancer research*, 35:1392-1397.

Probst GS, McMahon RE, Hill LE, Thompson CZ, Epp JK, Neal SB (1981) Chemically-induced unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: a comparison with bacterial mutagenicity using 218 compounds. *Environmental mutagenesis*, 3:11-32.

Pruett SB, Chambers JE (1988) Effects of paraoxon, *p*-nitrophenol, phenyl saligenin cyclic phosphate, and phenol on the rat interleukin 2 system. *Toxicology letters*, 40:11-20.

- Pruppacher HR, Klett JD (1978) Microphysics of clouds and precipitation. Dordrecht/Boston/London, D. Reidel Publishing Co.
- Puig D, Barcelo D (1996) Determination of phenolic compounds in water and waste water. *Trends in analytical chemistry*, 15:362-375.
- Rashid KA, Mumma RO (1986) Screening pesticides for their ability to damage bacterial DNA. *Journal of environmental science and health*, 21:319-334.
- Reinke LA, Moyer MJ (1985) *p*-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug metabolism and disposition*, 13:548-552.
- Richartz H, Reischl A, Trautner F, Hutzinger O (1990) Nitrated phenols in fog. *Atmospheric environment*, 24:3067-3072.
- Rippen G, Flothmann D, Witt W (1984) *Improvement of the OECD test guideline A 80/9 and comparative evaluation of other relevant methods for the measurement of volatility*. Frankfurt a. M., Batelle-Institut e.V. (Report No. 106 02 024/06) (in German).
- Roberts BL, Dorough HW (1984) Relative toxicities of chemicals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental toxicology and chemistry*, 3:67-78.
- Robinson D, Smith JN, Williams RT (1951) Studies in detoxication. 39. Nitro compounds. (a) The metabolism of  $\sigma$ ,  $m$ , and  $p$ -nitrophenols in the rabbit. (b) The glucuronides of the mononitrophenols and observations on the anomalous optical rotations

of triacetyl -- *o*-nitrophenylglucuronide and its methyl ester.

*Biochemical journal*, 50:221-227.

Rott B, Viswanathan R, Freitag D, Korte F (1982) Comparative investigation on the feasibility of different tests for the evaluation of the degradation of environmental chemicals. *Chemosphere*, 11:531-538 (in German).

Ruana J, Urbe I, Borrull F (1993) Determination of phenols at the ng/l level in drinking and river waters by liquid chromatography with UV and electrochemical detection. *Journal of chromatography, A* 655:217-226.

Rubin HE, Subba-Rao RV, Alexander M (1982) Rates of mineralization of trace concentrations of aromatic compounds in lake water and sewage samples. *Applied environmental microbiology*, 43:1133-1138.

Rush GF, Newton JF, Hook JB (1983) Sex differences in the excretion of glucuronide conjugates: The role of intrarenal glucuronidation. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 227:658-662.

Sax NI, Lewis RJ (1987) *Hawley's condensed chemical dictionary*, 11th ed. New York, NY, Van Nostrand Reinhold Co.

Scheer V, Luettker J, George C, Levsen K, Frenzel A, Behnke W, Zetzsch C (1996) Atmospheric nitration of phenol in clouds by N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and ClNO<sub>2</sub>. In: Borrell PM, Borrell P, Kelly K, Cvitas T, Seiler W, eds. *Transport and transformation of pollutants in the troposphere*.

Proceedings of EUROTRAC Symposium '96. Garmisch-Patenkirchen, 25-29 March 1996. Southampton, Computational Mechanics Publications.

Scheubel JB (1984) *Assessment of the feasibility and evidence of the test method of level 1 and 2 of the chemical act*. Marl, Chemische Werke Huels AG (Report No. 106 04 011/5 CWH) (in German).

Scheunert I (1984) *Examination and optimization of the "GSF-Cold-Finger-Method" and comparative calculations of the volatility*. Gesellschaft fuer Strahlen- und Umweltforschung (Report No. 10602024/08) (in German).

Schoene K, Steinhanses J (1984) *Comparative measurements of the volatility in open systems*. Schmallingenberg, Fraunhofer Institute for Toxicology and Aerosol Research (Report No. 10602024/7 Part II) (in German).

Scholz N (1986) *Development of test guidelines on marine species for ecotoxicological studies according to the chemicals act - Bryozota/Camptozoa*. Berlin, Umweltbundesamt (Report No. 10603042/02) (in German).

Schwarzenbach RP, Stierli R, Folsom BR, Zeyer J (1988) Compound properties relevant for assessing the environmental partitioning of nitrophenols. *Environmental science and technology*, 22:83-92.

Sewekow B (1983) *Feasibility of test guidelines and evidence of the base-set testing according to the chemicals legislation*. Muenchen, Gesellschaft fuer Strahlen- und Umweltforschung (in German).

Shimizu M, Yano E (1986) Mutagenicity of mono-nitrobenzene derivatives in the Ames test and rec assay. *Mutation research*, 170:11-22.

Smith LW, Hall GT, Kennedy GL (1988) Acute and repeated dose inhalation toxicity of para-nitrophenol sodium salt in rats. *Drug chemistry and toxicology*, 11:319-327.

Snodgrass HL Jr (1983) *Phase I, dermal penetration and distribution of <sup>14</sup>C-labeled paranitrophenol (PNP)*. Aberdeen Proving Ground, MD, US Army Environmental Hygiene Agency (Study No. 75-51-0047-84).

Spain JC, van Veld PA, Monti CA, Pritchard PH, Cripe CR (1984) Comparison of *p*-nitrophenol biodegradation in field and laboratory test systems. *Applied environmental microbiology*, 48:944-950.

Storer RD, McKelvey TW, Kraynak AR, Elia MC, Barnum JE, Harmon LS, Nichols WW, DeLuca JG (1996) Revalidation of the *in vitro* alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds. *Mutation research*, 368:59-101.

Subba-Rao RV, Rubin HE, Alexander M (1982) Kinetics and extent of mineralization of organic chemicals at trace levels in freshwater and sewage. *Applied environmental microbiology*, 43:1139-1150.

Suzuki J, Koyama T, Suzuki S (1983) Mutagenicities of mono-nitrobenzene derivatives in the presence of norharman. *Mutation research*, 120:105-110.

Tabak HH, Quave SA, Mashni CI, Barth EF (1981) Biodegradability studies with organic priority pollutant compounds. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 52:1503-1518.

Tan GH, Chong CL (1993) Trace monitoring of water-borne phenolics in the Klang River basin. *Environmental monitoring and assessment*, 24:267-277.

Thompson MJ, Ballinger LN, Cross SE, Roberts MS (1996) High-performance liquid chromatographic determination of phenol, 4-nitrophenol, beta-naphthol and a number of their glucuronide and sulfate conjugates in organ perfusate. *Journal of chromatography, B* 677:117-122.

Tremaine LM, Diamond GL, Quebbemann AJ (1984) *In vivo* quantification of renal glucuronide and sulfate conjugation of 1-naphthol and *p*-nitrophenol in the rat. *Biochemical pharmacology*, 33:419-427.

Tremp J, Mattrel P, Fingler S, Giger W (1993) Phenols and nitrophenols as tropospheric pollutants: Emissions from automobile exhausts and phase transfer in the atmosphere. *Water, air, and soil pollution*, 68:113-123.

TRI (1998) *Toxics release inventory*. Washington, DC, US Environmental Protection Agency, Office of Toxic Substances (17 December 1998).

Tseng S, Lin M (1994) Treatment of organic wastewater by anaerobic biological fluidized bed reactor. *Water science and technology*, 29:157-166.

Urano K, Kato Z (1986) Evaluation of biodegradation ranks of priority organic compounds. *Journal of hazardous materials*, 13:147-159.



- Van Veld PA, Spain JC (1983) Degradation of selected xenobiotic compounds in three types of aquatic test systems. *Chemosphere*, 12:1291-1305.
- Vasilenko NM, Volodchenko VA, Baturina TS, Kolodub FA (1976) Toxicological peculiarities of mononitrophenols with regard for their isomeric form. *Farmakologiya i Toksikologiya*, 39:718-721.
- Vernot EH, MacEwen JD, Haun CC, Kinkead ER (1977) Acute toxicity and skin corrosion data for some organic and inorganic compounds and aqueous solutions. *Toxicology and applied pharmacology*, 42:417-423.
- Verschueren K, ed. (1983) *Handbook of environmental data on organic chemicals*, 2nd ed. New York, NY, Van Nostrand Reinhold Co.
- Vozňáková Z, Podehradská J, Kohlicková M (1996) Determination of nitrophenols in soil. *Chemosphere*, 33:285-291.
- Wagner R, Braeutigam H-J (1981) Development and testing of a method for studying the degradation of organic compounds under anaerobic conditions (report no. 03 7221). In: Biehl HM, Fuehr F, Seibert K, eds. *Methods for the ecotoxicological evaluation of chemicals, Part 1, Aquatic systems*. Juelich, Forschungszentrum, pp. 20-41 (in German).
- Weast RC (1979) *CRC handbook of chemistry and physics*, 69th ed. Boca Raton, FL, CRC Press, Inc.
- Wiggins BA, Jones SH, Alexander M (1987) Explanations for the

acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Applied environmental microbiology*, 43:791-796.

Yamada K, Murakami H, Yasumura K, Shirahata S, Shinohara K, Omura H (1987) Production of DNA-breaking substance after treatment of monophenols with sodium nitrite and then with dimethyl sulfoxide. *Agricultural and biological chemistry*, 51:247-248.

Yoshida K, Shigeoka T, Yamauchi F (1983) Non-steady-state equilibrium model for the preliminary prediction of the fate of chemicals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 7:179-190.

Yoshioka Y, Ose Y, Sato T (1985) Testing for the toxicity of chemicals with *Tetrahymena pyriformis*. *The science of the total environment*, 43:149-157.

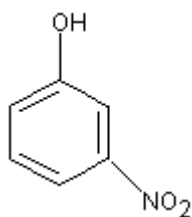
Zetzsch C, Rinke M, Scharpring H, Schueler P, Urbanik E, Wahner A, Wiedelmann A, Witte F (1984) *Upper limits of the persistence of chemicals in the atmosphere from their reactivity against OH radicals*. University of Bochum, Bochum, pp. 1-20 (BMFT Report No. PTU 037253).

Zimmering S, Mason JM, Valencia R, Woodruff RC (1985) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. II. Results of 20 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environmental mutagenesis*, 7:87-100.

付録1 3-ニトロフェノール

物質の同定並びに物理的・化学的特性

3-ニトロフェノール (CAS番号 554-84-7 ; 3-ヒドロキシ-1-ニトロベンゼン、メタ-ニトロフェノール)は実験式 $C_6H_5NO_3$ を有する。その構造式は下記の通りである。



3-ニトロフェノールの物理化学的性状を表 A-1 に示している。

表 A-1 3-ニトロフェノールの物理化学的性状

パラメータ	値
分子量(g/mol)	139.11
融点(°C)	96-97 (1)(2)
沸点(°C)	194 (1)
蒸気圧(kPa; 20 °C)	0.10 (3)
水に対する溶解度(g/L; 25 °C)	13.5 (1)
n-オクタノール/水分配係数(log Kow)	2.00 (4)
解離定数(pKa) (18 °C)	8.34 (2)
換算係数	1 mg/m <sup>3</sup> = 0.173 ppmv 1 ppmv = 5.78 mg/m <sup>3</sup>

出典 : (1) Verschueren (1983); (2) Budavari et al. (1996); (3) HSDB (1998);  
(4) Hansch & Leo (1979)

環境中の移動・分布・変換

3-ニトロフェノールの非生物的分解に関するデータは入手されなかった。

表 A-2 に要約されている 3 件の生物的分解に関する研究が、本異性体は好氣的条件下の水域で本質的に生分解を受けることを示している。

表 A-2 好氣的条件下における 3-ニトロフェノールの生物的分解

試験	濃度 (mg/L)	追加炭素源	試験期間(日)	除去率(%)	出典
易生分解性に関する試験					
MITI I	100	なし	14	0	Gerike & Fischer (1979); Urano & Kato (1986)
本質性生分解性に関する試験					
バッチ試験、通気 200 COD <sup>a</sup>	200 COD <sup>a</sup>	なし	5	95	Pitter (1976)
呼吸測定試験	300	あり	10	44	Kayser et al. (1994)

<sup>a</sup> COD =化学的酸素要求量

好氣的条件下での下水汚泥および都市污水处理場の初期嫌氣性段階の汚泥を用いた生物的分解に関する試験において、初期濃度が 96.5~579 mg/L 範囲の 3-ニトロフェノールは 7~60 日以内では全く分解されなかった (Wagner & Braeutigam, 1981; Battersby & Wilson, 1989)。しかし、Boyd ら(1983)は培養 1 週間以内に 50 mg/L の完全な嫌氣的除去を認めた。この試験で、無機化は培養期間を 10 週間まで延長した場合にだけ証明された。高い初期濃度のニトロフェノールであったが、その嫌氣的分解が Tseng および Lin (1994)により見出された。すなわち、彼等は 3 種の異なる種類の廃水による生物学的流動層反応器中で 3-ニトロフェノール (350~650 mg/L)の 90%の除去を認めた。入手できる報告結果から、適応微生物による嫌氣的条件下での 3-ニトロフェノールの緩慢な分解を予想できる。

Boyd (1982)によって測定された土壌吸着係数( $K_{oc}$ )の 52.83 と、HanschおよびLeo (1979)により報告されたn-オクタノール/水分配係数 ( $\log K_{ow}$ ) の 2.0 が、生物濃縮ばかりでなく土壌吸着性に対しても低~中等度であることを示している。

## 環境中濃度

1994年に、3-ニトロフェノールは日本の大気27試料で検出（検出限界8 ng/m<sup>3</sup>）されなかった（Japan Environment Agency, 1995）。3-ニトロフェノールは、1978、1979および1994年に、日本の表層水の177試料で検出されず（検出限界0.04~10 µg/L）、また177の底質でも検出されなかった（検出限界0.002~0.8 µg/kg）（Japan Environment Agency, 1979, 1980, 1995）。1979および1994年に3-ニトロフェノールは129の魚試料で検出されなかった（検出限界0.005~0.2 µg/kg）（Japan Environment Agency, 1980, 1995）。

## 実験動物およびヒトでの体内動態並びに代謝の比較

3-ニトロフェノールのヒトにおける吸収、代謝または排泄に関する定量的情報を提供している試験は確認されなかった。さらに、実験動物での情報は極めて限られている。胃管強制によって150~200 mg/kg体重を単回投与されたウサギで、適用量の大部分（80%を超える）が24時間以内に尿に排泄された。約68~86%がグルクロン酸とスルホン酸に抱合したのに対して、約7~13%はアミノフェノールに還元された（Robinson et al., 1951）。皮膚浸透もいくつかのin vitro 実験で明らかにされた（Huq et al., 1986; Jetzer et al., 1986; Ohkura et al., 1990）。情報は限られているが、生物体内での3-ニトロフェノールの生物濃縮はその迅速な代謝と排泄により予期されない。

## 実験哺乳類動物および in vitro（試験管内）試験系への影響

3-ニトロフェノールの経口LD<sub>50</sub>はラットでは≥930 mg/kg体重（Vasilenko et al., 1976; Vernot et al., 1977）およびマウスで≥1,070 mg/kg体重（Vasilenko et al., 1976; Vernot et al., 1977）であると見積もられている。

3-ニトロフェノールの入手できる in vitro と in vivo の遺伝毒性試験を表A-3に要約している。3-ニトロフェノールは変異原性試験（rec-assay）で変異原性が示され、サルモネラ菌・マイクロソーム試験では一貫性のない結果を出していた。1件の試験がネズミチフス菌のTA98とTA100

株で非変異原性であることを示したのに対し、別の 1 試験はこれらの両株で代謝活性化の存在・非存在のいずれの場合も変異原性を示した。サルモネラ菌・ミクロソーム試験の矛盾した結果と染色体異常に関するデータがないことを考慮すると、3-ニトロフェノールの変異原性に関する結論は出せない。

表 A-3 3-ニトロフェノールの in vitro および in vivo での遺伝毒性

種族 (試験系)	エンドポイント	濃度範囲	結果 <sup>a</sup>		注釈	出典
			代謝活性化なし	代謝活性化あり		
In vitro 試験						
枯草菌 H17、M45	組換え試験	0.01-5 mg/プレート	+	0	≥0.5 mg/プレートで陽性	Shimizu & Yano (1986)
ネズミチフス菌 TA1535、 TA1537、 TA1538	復帰突然変異	0.01-5 mg/プレート	-	-		Shimizu & Yano (1986)
ネズミチフス菌 TA98、TA100	復帰突然変異	0.1-5 mg/プレート	+	+	日本での試験 (表より得たデータ)	Kawai et al. (1987)
ネズミチフス菌 TA98、TA100	復帰突然変異	0.01-5 mg/プレート	-	-	また、Suzuki ら (1983) はノルハルマン存在下で両菌株を試験して、やはり陰性結果を出していた。	Suzuki et al. (1983); Shimizu & Yano (1986)
In vivo 試験						
キイロシヨウジ ヨウバエ	SLRL 試験	混餌 (5,000 ppm) または注射 (1,200 ppm)				Foureman et al. (1994)

<sup>a</sup>、陰性； +、陽性； 0、試験されなかった。

3-ニトロフェノールの場合、刺激作用または感作作用、反復暴露、生殖発生毒性、ヒトへの影響に関して入手できる試験はない。

#### 水生生物種への影響

各種の水生生物に対する3-ニトロフェノールの毒性について行われた試験（表A-4を参照）で、3-ニトロフェノールは中等度ないし高度な毒性を示した。

表A-4 3-ニトロフェノールの水生生物毒性

種族（試験法・エンドポイント）	影響濃度（mg/L）	出典
細菌		
シュードモナス・プチダ <i>Pseudomonas putida</i> （細胞増殖阻害試験）	16-時間 MIC <sup>a</sup> : 7.0	Bringmann & Kuehn (1977)
原生動物		
鞭毛原虫 <i>Entosiphon sulcatum</i> （細胞増殖阻害試験）	72-時間 MIC: 0.97	Bringmann (1978); Bringmann et al. (1980)
藻類		
イカダモ緑藻 <i>Scenedesmus subspicatus</i> クロレラ・ブルガリス <i>Chlorella vulgaris</i> （細胞増殖阻害試験）	6-時間 EC <sub>50</sub> : 6.21	Kramer et al. (1986)
無脊椎動物		
タマミジンコ <i>Moina macrocopa</i> （急性）（遊泳阻害）	3-時間 LC <sub>50</sub> : 1.7	Yoshioka et al. (1985)
魚類		
コイ <i>Cyprinus carpio</i> （止水）	96-時間 LC <sub>50</sub> : 17.5	Lang et al. (1996)

<sup>a</sup> MIC =最小発育阻止濃度

#### 付録2 出典

BUA (1992): *BUA-Stoffbericht 2- und 4-Nitrophenol.*

Beratergremium fuer Umweltrelevante Altstoffe. Weinheim, VCH VerlagsGmbH (Report No. 75; February 1992)

BUA の検討プロセスのために、報告書の作成を担当する会社（通常、ドイツにおける最大生産者）が広範な資料検索文献の他、自社試験結果を用いて素案を用意する。本草案は、政府機関、学会および業界からの代表者よりなる作業委員会の数度のピアレビューが読み込み期間に委ねられている。

BUA 報告 No. 75 (BUA 報告 2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノール。環境関連既存化学物質に関する GDCh-Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance. Stuttgart, Hirzel Verlag [1992 年 2 月]) の英訳は 1993 年に公開された。

ATSDR (1992): ニトロフェノール類の毒性学的全容：2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノール。Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (報告番号 TP-91/23)

ATSDR ニトロフェノール類の毒性学的全容：2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノール(ATSDR, 1992)の写しは下記の機関から入手できる。

Agency for Toxic Substances and Disease Registry  
Division of Toxicology  
1600 Clifton Road, E-29  
Atlanta, Georgia 30333  
USA

ニトロフェノール類の毒性学的全容：2-ニトロフェノールおよび 4-ニトロフェノールの初期の草案は Agency for Toxic Substances and Disease Registry、US Centers for Disease Control、US National Toxicology Program およびその他の連邦政府機関からの科学者達によって審査された。また、草案は次の委員より構成される非政府組織審査員の専門委員会により再検討された。



Dr Martin Alexander、コーネル大学  
Dr Gary Booth、ブリガムヤング大学  
Dr Samuel Cohen、ネブラスカ大学医療センター  
Dr Loren Koller、オレゴン州立大学  
Dr Frederick Oehme、カンザス州立大学

### 付録3 CICAD のピアレビュー

モノトロフェノール類に関する CICAD 草案を、IPCS の各国コンタクト・ポイントおよび参加機関と予め連絡を取って、国際化学物質安全性計画 IPCS により認定されている専門家ばかりでなく、機関および組織にも審査のために送付した。コメントを下記の機関から受け取った。

Federal Institute for Health Protection of Consumers & Veterinary Medicine, Berlin, Germany

Gesellschaft Deutscher Chemiker, Frankfurt, Germany

Institute of Occupational Medicine, Chinese Academy of Preventive Medicine, Ministry of Health, Beijing, People's Republic of China

Institute of Terrestrial Ecology, Huntingdon, United Kingdom

Joint Food Safety and Standards Group, Department of Health, London, United Kingdom

National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

United States Department of Health and Human Services [National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park], USA

United States Environmental Protection Agency [National Center for Environmental Assessment, Washington, DC; Region VIII], USA

World Health Organization/International Programme on Chemical Safety, Montreal, Canada

### 付録3 CICADの最終検討委員会

1998年12月8～11日

米国、ワシントンDC

#### 会議参加者

Dr T. Berzins, National Chemicals Inspectorate (KEMI), Solna, Sweden  
( *Vice-Chairperson* )

Mr R. Cary, Toxicology Unit, Health Directorate, Health and Safety  
Executive, Bootle, Merseyside, United Kingdom ( *Rapporteur* )

Dr S. Dobson, Institute of Terrestrial Ecology, Monks Wood, Abbots  
Ripton, Huntingdon, Cambridgeshire, United Kingdom

Dr O. Faroon, Agency for Toxic Substances and Disease Registry,  
Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA

Dr G. Foureman, National Center for Environmental Assessment, US  
Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC, USA

Dr H. Gibb, National Center for Environmental Assessment, US  
Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA ( *Chairperson* )

Dr R.F. Hertel, Federal Institute for Health Protection of Consumers &  
Veterinary Medicine, Berlin, Germany

Dr I. Mangelsdorf, Documentation and Assessment of Chemicals,  
Fraunhofer Institute for Toxicology and Aerosol Research, Hanover,  
Germany

Dr A. Nishikawa, Division of Pathology, National Institute of Health  
Sciences, Tokyo, Japan

Dr E.V. Ohanian, Office of Water/Office of Science and Technology,  
Health and Ecological Criteria Division, US Environmental Protection  
Agency, Washington, DC, USA

Dr J. Sekizawa, Division of Chem-Bio Informatics, National Institute  
of Health Sciences, Tokyo, Japan

Professor P. Yao, Institute of Occupational Medicine, Chinese Academy  
of Preventive Medicine, Ministry of Health, Beijing, People's Republic  
of China

#### Observers

Dr K. Austin, National Center for Environmental Assessment, US  
Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA

Dr I. Daly (ICCA representative), Regulatory and Technical Associates,  
Lebanon, NJ, USA

Ms K.L. Lang (CEFIC, European Chemical Industry Council,  
representative), Shell International, London, United Kingdom

Ms K. Roberts (ICCA representative), Chemical Self-funded Technical  
Advocacy and Research (CHEMSTAR), Chemical Manufacturers Association,  
Arlington, VA, USA

Dr W. Snellings (ICCA representative), Union Carbide Corporation,  
Danbury, CN, USA

Dr M. Sweeney, Document Development Branch, National Institute for  
Occupational Safety and Health, Cincinnati, OH, USA

Dr K. Ziegler-Skylakakis, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und  
Gesundheit GmbH, Institut für Toxikologie, Oberschleissheim, Germany

Secretariat

Dr M. Baril, Institut de Recherches en Santé et Sécurité du Travail du  
Québec (IRSST), Montreal, Quebec, Canada

Dr H. Galal-Gorchev, Chevy Chase, MD, USA

Ms M. Godden, Health and Safety Executive, Bootle, Merseyside, United  
Kingdom

Dr R.G. Liteplo, Environmental Health Directorate, Health Canada,  
Ottawa, Ontario, Canada

Ms L. Regis, Programme for the Promotion of Chemical Safety, World

Health Organization, Geneva, Switzerland

Mr A. Strawson, Health and Safety Executive, London, United Kingdom

Dr P. Toft, Programme for the Promotion of Chemical Safety, World

Health Organization, Geneva, Switzerland

# p-ニトロフェノールナトリウムの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of p-Nitrophenol sodium salt on Bacteria

### 要約

p-ニトロフェノールナトリウムの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

試験は、指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、S9 mix 非存在(直接法)および存在(代謝活性化法)下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験の結果、直接法および代謝活性化法ともに、全ての菌株において 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で生育阻害が認められたため、156~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の範囲(公比2)で設定した。

試験を2回行った結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害については、直接法の場合、TA1535, TA98 および TA1537 では 2500  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上で、TA100 および WP2 *uvrA* では 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で認められ、代謝活性化法の場合は全ての菌株とも 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で認められた。

以上の成績から、p-ニトロフェノールナトリウムの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

### 方法

#### 1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および *E. coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を解冻後、その25  $\mu\text{L}$  をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の懸濁菌液は濁度を測定し、濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり  $1 \times 10^9$  以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

#### 2. 被験物質

p-ニトロフェノールナトリウムは不安定な物質であるため、安定な二水和物として流通している。試験には二水和物(ロット番号8J-001, 純度79.4%, 水19.4%を含む、三井化学(株)(東京)提供)を用いた。二水和物は、黄色結晶で、水に59.7 mg/mL可溶およびエタノールに可溶である。被験物質は、冷暗所(4℃)で密栓保管した。

実験終了後、残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 3. 被験物質供試液の調製

溶媒に蒸留水(株大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高用量の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。供試液は、用時調製し、調製の際には純度換算を行った。

#### 4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

NaN<sub>3</sub> : 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(Aldrich Chemical Co.)

AF-2 および 2-AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に、NaN<sub>3</sub> および 9-AA は蒸留水(株大塚製薬工場)に溶解した。

#### 5. 培地

##### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。培地1 Lあたりの組成は下記のとおりであり、径90 mmのシャーレ1枚あたりに30 mLを分注したものである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	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
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

##### 2) アミノ酸添加軟寒天培地(トップアガー)

0.6 w/v% 寒天粉末(Difco Laboratories) および 0.5

w/v%塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、*S. typhimurium*用には0.5 mM D-ビオチンおよび0.5 mM L-ヒスチジン水溶液、*E. coli*用には0.5 mM L-トリプトファン水溶液を1/10容加え、トップアガーとした。

#### 6. S9 mix

エームステスト用凍結S9 mix(キッコーマン(株))を購入し、製造後6ヶ月以内に使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

#### 7. 試験方法

試験は、プレインキュベーション法で行った。

試験管に使用溶媒、被験物質供試液あるいは陽性対照物質溶液を0.1 mL入れ、次いで直接法では0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を0.5 mL、代謝活性化法ではS9 mixを0.5 mL加え、続いて試験菌液0.1 mLを分注し、37°Cで20分間振盪培養した。培養終了後、45°Cに保温したトップアガー2 mLを加えた混合液をプレート上に重層した。37°Cで48時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。プレートは、用量設定試験では各用量とも1枚、本試験では3枚を使用した。本試験は、同一用量を用いて2回行った。

#### 8. 結果の判定

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が溶媒対照値の2倍以上を示し、用量依存性および結果の再現性が認められる場合を陽性とした。

但し、明確な用量依存性が認められない場合においても、陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定することとした。

#### 結果および考察

100~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で行った用量設定試験においては、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株とも5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ で菌の生育阻害が認められた。したがって、本試験における被験物質の用量は、最高用量を5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、以下公比2で、2500, 1250, 625, 313および156  $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした。

試験を2回行った結果(Tables 1~4)、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、供試した全ての菌株において復帰変異コロニー数は、溶媒対照値の2倍を越えることはなかった。菌の生育阻害については、直接法の場合、TA1535, TA98およびTA1537では2500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で、また、TA100およびWP2 *uvrA*では5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ で認められ、代謝活性化法の場合は全ての菌株とも5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ で認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、p-ニトロフェノールナトリウムの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

なおp-ニトロフェノールナトリウムの類縁化合物であるp-ニトロフェノール<sup>3)</sup>およびo-ニトロフェノール<sup>3)</sup>は*S. typhimurium*を、また、3-メチル-4-ニトロフェノール<sup>4)</sup>は*S. typhimurium*および*E. coli*を用いた復帰変異試験でいずれも陰性と報告され、p-ニトロフェノールについては、*Proteus mirabilis*を用いたDNA修復試験で陽性<sup>5)</sup>、初代ラット肝細胞を用いた不定期DNA合成試験で陰性<sup>6)</sup>と報告されている。

#### 文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," 1, Vol.3, eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 3) S. Haworth, T. Lawlor, K. Mortelmans, W. Speck, E. Zeiger, *Environ. Mutagen.*, **5**, 3(1983).
- 4) 高島浩介, 鈴木文子, 亀地礼子, 川上久美子, 松木容彦, 北嶋美似子, 化学物質毒性試験報告, **2**, 163 (1995).
- 5) B. Adler, R. Braun, J. Schoneich, H. Bohme, *Biol. Zbl.*, **95**, 463(1976).
- 6) G. S. Probst, R. E. McMahon, L. E. Holl, C. Z. Thompson, J. K. Epp, S. B. Neal, *Environ. Mutagen*, **3**, 11(1981).

#### 連絡先

試験責任者: 野田 篤  
 試験担当者: 野田 篤, 昆 尚美  
 (財)畜産生物科学安全研究所  
 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11  
 Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

#### Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)  
 Naomi Kon  
 Research Institute for Animal Science in  
 Biochemistry and Toxicology  
 3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi, kanagawa,  
 229-1132 Japan  
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Results of reverse mutation test of *p*-nitrophenol sodium salt on bacteria (1st trial)  
[direct method: -S9 mix]

Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	121	141	115	8	13	5	23	12	15	18	21	17	8	7	14
	[126 $\pm$ 14]			[9 $\pm$ 4]			[17 $\pm$ 6]			[19 $\pm$ 2]			[10 $\pm$ 4]		
156	132	112	104	7	7	10	14	15	28	27	41	26	9	8	11
	[116 $\pm$ 14]			[8 $\pm$ 2]			[19 $\pm$ 8]			[31 $\pm$ 8]			[9 $\pm$ 2]		
313	100	97	102	8	14	10	23	10	20	28	17	23	11	9	13
	[100 $\pm$ 3]			[11 $\pm$ 3]			[18 $\pm$ 7]			[23 $\pm$ 6]			[11 $\pm$ 2]		
625	132	120	104	10	7	11	18	18	19	25	18	33	9	10	10
	[119 $\pm$ 14]			[9 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 1]			[25 $\pm$ 8]			[10 $\pm$ 1]		
1250	97	101	85	3	9	6	14	14	12	15	15	20	11	14	10
	[94 $\pm$ 8]			[6 $\pm$ 3]			[13 $\pm$ 1]			[17 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 2]		
2500	15	11	27	0*	0*	2*	4	2	0	3*	0*	0*	0*	0*	0*
	[18 $\pm$ 8]			[1 $\pm$ 1]			[2 $\pm$ 2]			[1 $\pm$ 2]			[0 $\pm$ 0]		
5000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	1*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 2]			[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]		
Positive control	1066	1056	1054*	379	445	424*	808	854	871*	397	347	396*	551	555	578*
	[1059 $\pm$ 6]			[416 $\pm$ 34]			[844 $\pm$ 33]			[380 $\pm$ 29]			[561 $\pm$ 15]		

\*:Growth inhibition was observed.

a) AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$

b) NaN<sub>3</sub>: Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

c) AF-2, 0.04  $\mu\text{g}/\text{plate}$

d) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$

e) 9 AA:9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2 Results of reverse mutation test of *p*-nitrophenol sodium salt on bacteria (1st trial)  
[activation method: +S9 mix]

Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	108	129	99	10	11	10	21	20	16	26	34	30	15	9	13
	[112 $\pm$ 15]			[10 $\pm$ 1]			[19 $\pm$ 3]			[30 $\pm$ 4]			[12 $\pm$ 3]		
156	125	116	111	6	11	14	17	14	24	44	31	30	7	15	9
	[117 $\pm$ 7]			[10 $\pm$ 4]			[18 $\pm$ 5]			[35 $\pm$ 8]			[10 $\pm$ 4]		
313	107	110	95	13	10	7	20	23	22	42	36	37	12	8	8
	[104 $\pm$ 8]			[10 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 2]			[38 $\pm$ 3]			[9 $\pm$ 2]		
625	120	111	97	12	10	7	12	19	20	22	33	32	8	7	12
	[109 $\pm$ 12]			[10 $\pm$ 3]			[17 $\pm$ 4]			[29 $\pm$ 6]			[9 $\pm$ 3]		
1250	100	89	87	10	7	4	10	19	14	26	20	22	3	5	5
	[92 $\pm$ 7]			[7 $\pm$ 3]			[14 $\pm$ 5]			[23 $\pm$ 3]			[4 $\pm$ 1]		
2500	0	9	12	0	0	0	5	4	2	0	0	0	0	0	1
	[7 $\pm$ 6]			[0 $\pm$ 0]			[4 $\pm$ 2]			[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 1]		
5000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]		
Positive control	643	586	634*	144	153	151*	736	790	847*	381	354	348*	80	109	86*
	[621 $\pm$ 31]			[149 $\pm$ 5]			[791 $\pm$ 56]			[361 $\pm$ 18]			[92 $\pm$ 15]		

\*:Growth inhibition was observed.

a) 2-AA:2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$

b) 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$

c) 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$



Table 3 Results of reverse mutation test of p-nitrophenol sodium salt on bacteria (2nd trial)  
[direct method: -S9 mix]

Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	117	113	111	8	11	10	14	27	18	28	29	23	10	8	8
	[114 $\pm$ 3]			[10 $\pm$ 2]			[20 $\pm$ 7]			[27 $\pm$ 3]			[9 $\pm$ 1]		
156	119	103	120	14	12	11	15	27	13	28	28	28	9	14	10
	[114 $\pm$ 10]			[12 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 8]			[28 $\pm$ 0]			[11 $\pm$ 3]		
313	111	105	106	8	15	8	18	16	21	21	25	21	7	13	11
	[107 $\pm$ 3]			[10 $\pm$ 4]			[18 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 2]			[10 $\pm$ 3]		
625	118	97	100	7	9	8	20	18	26	19	24	24	13	11	11
	[105 $\pm$ 11]			[8 $\pm$ 1]			[21 $\pm$ 4]			[22 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 1]		
1250	86	98	86	6	6	5	15	14	13	33	18	25	13	6	9
	[90 $\pm$ 7]			[6 $\pm$ 1]			[14 $\pm$ 1]			[25 $\pm$ 8]			[9 $\pm$ 4]		
2500	17	10	36	0*	0*	0*	5	2	7	6*	0*	3*	0*	0*	1*
	[21 $\pm$ 13]			[0 $\pm$ 0]			[5 $\pm$ 3]			[3 $\pm$ 3]			[0 $\pm$ 1]		
5000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]		
Positive control	805	823	787*	403	400	391 <sup>b</sup>	679	727	771 <sup>c</sup>	395	378	366 <sup>d</sup>	598	634	422 <sup>e</sup>
	[805 $\pm$ 18]			[398 $\pm$ 6]			[726 $\pm$ 46]			[380 $\pm$ 15]			[551 $\pm$ 113]		

\*:Growth inhibition was observed.  
a) AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
b) NaN<sub>3</sub>:Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
c) AF-2, 0.04  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
d) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
e) 9-AA:9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4 Results of reverse mutation test of p-nitrophenol sodium salt on bacteria (2nd trial)  
[activation method: +S9 mix]

Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	99	102	108	9	8	7	22	24	15	29	41	27	15	10	11
	[103 $\pm$ 5]			[8 $\pm$ 1]			[20 $\pm$ 5]			[32 $\pm$ 8]			[12 $\pm$ 3]		
156	119	112	87	12	12	11	24	17	26	48	23	32	10	15	12
	[106 $\pm$ 17]			[12 $\pm$ 1]			[22 $\pm$ 5]			[34 $\pm$ 13]			[12 $\pm$ 3]		
313	109	88	126	10	11	7	17	19	21	48	37	29	14	11	18
	[108 $\pm$ 19]			[9 $\pm$ 2]			[19 $\pm$ 2]			[38 $\pm$ 10]			[14 $\pm$ 4]		
625	113	98	94	11	10	6	25	19	25	34	24	30	6	9	14
	[102 $\pm$ 10]			[9 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 3]			[29 $\pm$ 5]			[10 $\pm$ 4]		
1250	104	110	112	11	5	6	16	13	17	25	20	21	8	3	2
	[109 $\pm$ 4]			[7 $\pm$ 3]			[15 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 3]			[4 $\pm$ 3]		
2500	22	18	25	0	0	1	5	1	5	4	0	0	0	0	0
	[22 $\pm$ 4]			[0 $\pm$ 1]			[4 $\pm$ 2]			[1 $\pm$ 2]			[0 $\pm$ 0]		
5000	3*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[1 $\pm$ 2]			[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]		
Positive control	629	569	520*	162	155	144 <sup>b</sup>	778	771	802 <sup>c</sup>	345	331	344*	123	99	80 <sup>b</sup>
	[573 $\pm$ 55]			[154 $\pm$ 9]			[784 $\pm$ 16]			[340 $\pm$ 8]			[101 $\pm$ 22]		

\*:Growth inhibition was observed.  
a) 2-AA:2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
b) 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
c) 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$

# *p*-ニトロフェノールナトリウムのチャイニーズ・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 *p*-Nitrophenol sodium salt on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

*p*-ニトロフェノールナトリウムの染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を用いて *in vitro* における短時間処理法による染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、細胞増殖抑制試験を行った結果、S9 mix非存在下では1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix存在下では1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。したがって、染色体異常試験における用量は、S9 mix非存在下では100, 200, 400, 800, 1200および1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix存在下では600, 800, 1000, 1200, 1400および1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

試験の結果、S9 mix非存在下では、用量依存的な染色体構造異常細胞の増加が認められ、800および1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ での増加(出現頻度7.5および28.0%)は統計学的に有意なものであった。S9 mix存在下においても用量依存的な染色体構造異常細胞の増加が認められ、600, 800, 1000および1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ での増加(出現頻度11.5, 19.0, 33.5および48.0%)は統計学的に有意なものであった。S9 mix非存在下の1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 並びにS9 mix存在下の1400および1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、細胞に対する毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

以上の成績から、*p*-ニトロフェノールナトリウムは、CHL/IU細胞に対し染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

### 方法

#### 1. 試験細胞株

国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部(元:国立衛生試験所変異原性部)から昭和60年1月13日に分与を受けたチャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を使用した。供試細胞は、浮遊細胞液に10 vol%の割合でジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業(株))を添加し、液体窒素条件下で保存したものを培養液に戻し、解凍後の継代数が2回までのものを使用した。

#### 2. 培養液

Eagle-MEM粉末培地(Gibco Laboratories)を常法に従い調製し、これに非働化仔牛血清(Gibco Laboratories)を10 vol%の割合で添加したものをを用いた。

#### 3. 培養条件

$4 \times 10^3$ 個/mLの細胞を含む培養液5 mLをディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson Co.)に加え、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。

培養開始3日後にS9 mix非存在および存在下で被験物質を6時間処理し、処理終了後、新鮮培養液でさらに18時間培養した。

#### 4. S9 mix

染色体異常試験用凍結S9 mix(キッコーマン(株))を購入し、製造後6ヶ月以内に使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

#### 5. 被験物質

*p*-ニトロフェノールナトリウムは不安定な物質であるため、安定な二水和物として流通している。試験には二水和物(ロット番号8J-001, 純度79.4%, 水19.4%を含む, 三井化学(株)(東京)提供)を用いた。二水和物は、黄色結晶で、水に59.7 mg/mL可溶およびエタノールに可溶である。被験物質は、冷暗所(4°C)で密栓保管した。

実験終了後、残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 6. 被験物質供試液の調製

溶媒に生理食塩水(株)大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高用量の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。供試液は、用時調製し、調製の際には純度換算を行った。供試液のディッシュ内への添加量は培養液量の10 vol%とした。

#### 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用量を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で染色した細胞の密度を単層培養細胞密度計(モノセレーター II, MI-60, オリンパス光学工業(株))を用いて測定し、溶媒対照群の細胞増殖率を100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果(Fig. 1), S9 mix非存在下では1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix存在下では1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量は、

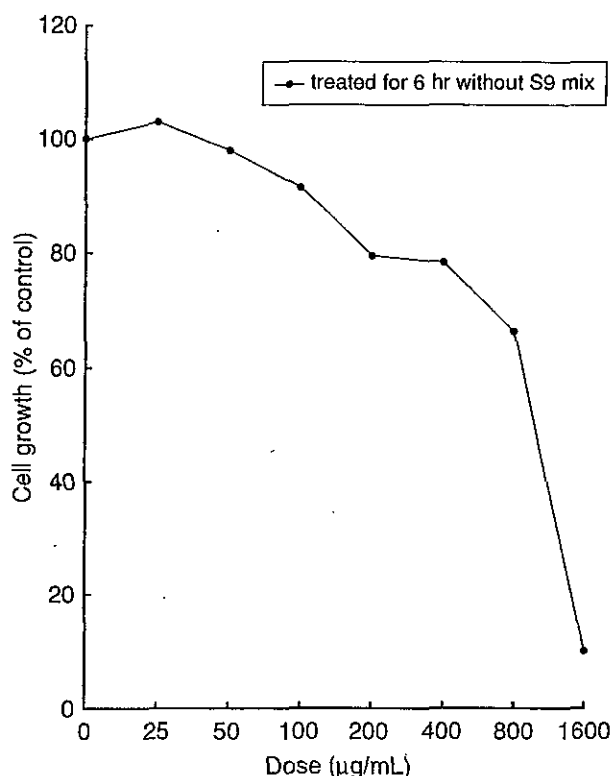


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with p-nitrophenol sodium salt

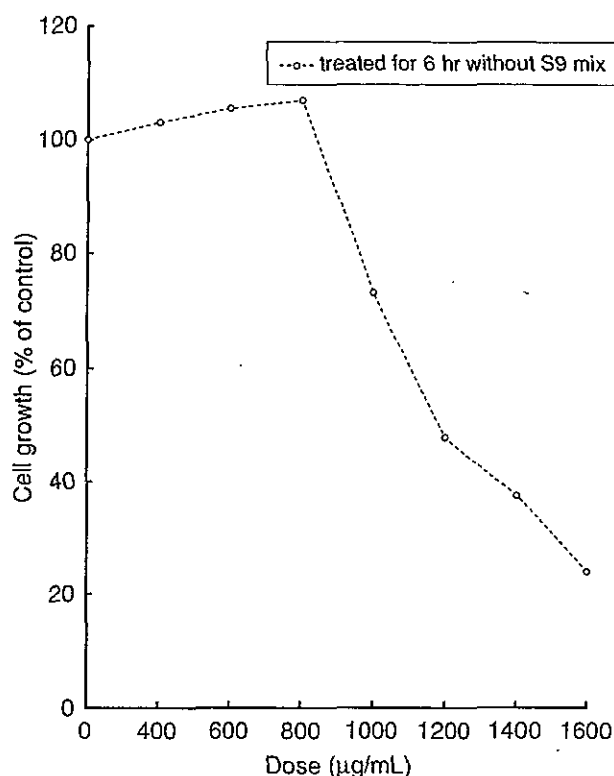


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with p-nitrophenol sodium salt

それぞれ800~1600 µg/mLの用量域および1200 µg/mLの近くにあるものと判断された。

### 8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果から、染色体異常試験における被験物質の用量は、50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ3用量以上のデータが得られることを考慮して、S9 mix非存在下では100, 200, 400, 800, 1200 および1600 µg/mL, S9 mix存在下では600, 800, 1000, 1200, 1400 および1600 µg/mLの各6用量を設定した。対照として、溶媒対照群と陽性対照群を設けた。

陽性対照として、短時間処理法S9 mix存在下では3,4-benzo[a]pyrene (B[a]P, Sigma Chemical Co.)を10 µg/mL, S9 mix非存在下では1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG, Aldrich Chemical Co.)を2.5 µg/mLの用量で用いた。陽性対照物質の溶媒には、いずれもDMSO(和光純薬工業(株))を使用した。

### 9. 染色体標本の作製

培養終了2時間前にコルセミド(Gibco Laboratories)を最終濃度として0.2 µg/mLとなるように添加した。トリプシン処理で細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.4 vol%ギムザ液で約15分間染色した。

### 10. 染色体の観察

各ディッシュあたり100個、すなわち、1用量当たり2

ディッシュ、200個の分裂中期像を、総合倍率600倍の顕微鏡下で観察した。標本は全てコード化し、盲検法で観察を行った。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)による分類法<sup>1)</sup>に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型の切断、交換などの構造異常と倍数性細胞(Polyploid)の有無について観察した。

### 11. 記録と判定

観察した細胞数、構造異常の種類と数および倍数性細胞の数について集計し、記録した。

染色体構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度について、多試料 $\chi^2$ 検定を行い有意差(有意水準5%以下)が認められた場合は、フィッシャーの直接確率法を用いて溶媒対照群と各用量群との間の有意差検定(有意水準は多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた)を行った。

その結果、溶媒対照群と比較して、被験物質による染色体異常細胞の出現頻度が2用量以上で有意に増加し、かつ用量依存性あるいは再現性が認められた場合、陽性と判定した。

### 結果および考察

短時間処理法による結果をTable 1に示す。S9 mix非存在下では、用量依存的な染色体の構造異常を有する細胞の増加が認められ、800および1200 µg/mLでの増加(出現頻度7.5および28.0%)は陰性対照群と比較して統計学的に有意なものであった。S9 mix存在下において

も、用量依存的な染色体の構造異常細胞の増加が認められ、600, 800, 1000および1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ での増加(出現頻度11.5, 19.0, 33.5および48.0%)は統計学的に有意なものであった。S9 mix非存在および存在下ともに、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix非存在下の1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 並びにS9 mix存在下の1400および1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、被験物質の細胞に対する毒性のため、観察可能な分裂中期像が認められなかった。

なお、本被験物質は黄色を呈しており、その供試液を培養液中に添加すると培養液は直ちに黄色化した。被験物質の溶解に伴う培養液のpHの変化を、400~1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用量の添加直後と添加培養6時間後の培養液について測定したところ、いずれもpHは7.0~7.2の中性域を保ち、変化は認められなかった。

以上の成績から、*p*-ニトロフェノールナトリウムは、染色体構造異常を誘発する作用があると考えられた。したがって、本実験条件下では、*p*-ニトロフェノールナトリウムのCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。陽性結果が得られたため、 $D_{20}$ 値<sup>2)</sup>(分裂中期像の20%に異常を誘発させる被験物質の推定用量)を算出したところ、本被験物質の $D_{20}$ 値は、短時間処理法S9 mix非存在下において1.08 mg/mL、S9 mix存在下では0.65 mg/mLであった。本試験結果は、CHL/IU細胞において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が10%以上を陽性とする石館らの判定基準<sup>3)</sup>からみても、明らかに陽性と判断されるものであった。

*p*-ニトロフェノールナトリウムの類縁化合物である3-メチル-4-ニトロフェノールは、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陽性<sup>4)</sup>と報告されている。

### 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) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, “化審法毒性試験法の解説 改訂版,” 化学工業日報社, 東京, 1992, pp.51-52.
- 3) 石館基 監修, “改定増補 染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p.19.
- 4) 田中憲穂, 山影康次, 日下部博一, 橋本恵子, 澁谷徹, 原巧, 加藤基恵, 石原尚古, 化学物質毒性試験報告, 2, 167(1995).

### 連絡先

試験責任者: 野田 篤  
試験担当者: 野田 篤, 昆 尚美  
(財)畜産生物科学安全研究所  
〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11  
Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

### Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)  
Naomi Kon  
Research Institute for Animal Science in  
Biochemistry and Toxicology  
3-7-11 Hashimoto-dai, Sagami-hara-shi, Kanagawa,  
229-1132 Japan  
Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with p-nitrophenol sodium salt with and without S9 mix

Group	Dose (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of cells with structural aberrations						gap (%)	No. of cells with numerical aberrations			Cell Growth rate(%)	
					ctb	cte	csb	cse	oth	total(%) <sup>2</sup>		Polyploid	Polyploid <sup>3</sup>	total(%) <sup>2</sup>		
Solvent <sup>1</sup>	0	-	6-(18)	200	2	0	0	1	0	3(1.5)	1(0.5)	0	0	0(0)	100.0	
PNPS	100	-	6-(18)	200	2	1	0	1	0	4(2.0)	2(1.0)	2	1	3(1.5)	82.0	
	200	-	6-(18)	200	1	3	0	0	0	4(2.0)	0(0)	0	3	3(1.5)	82.5	
	400	-	6-(18)	200	2	4	1	0	0	5(2.5)	0(0)	0	0	0(0)	80.5	
	800	-	6-(18)	200	4	12	0	1	0	15(7.5)*	0(0)	1	0	1(0.5)	66.0	
	1200	-	6-(18)	200	26	51	1	0	0	56(28.0)**	5(2.5)	0	0	0(0)	36.5	
	1600	-	6-(18)	Toxic	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11.0
MNNG	2.5	-	6-(18)	200	45	192	0	1	0	193(96.5)**	4(2.0)	0	0	0(0)	—	
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	1(0.5)	0(0)	2	0	2(1.0)	100.0	
PNPS	600	+	6-(18)	200	2	23	0	0	0	23(11.5)**	1(0.5)	1	2	3(1.5)	89.0	
	800	+	6-(18)	200	10	32	0	1	0	38(19.0)**	0(0)	0	0	0(0)	79.5	
	1000	+	6-(18)	200	20	60	0	2	0	67(33.5)**	2(1.0)	0	1	1(0.5)	61.0	
	1200	+	6-(18)	200	48	89	0	0	0	96(48.0)**	2(1.0)	0	0	0(0)	42.0	
	1400	+	6-(18)	Toxic	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25.0
	1600	+	6-(18)	Toxic	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	14.5
BP	10	+	6-(18)	200	9	86	2	0	0	91(45.5)**	3(1.5)	0	0	0(0)	—	

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, PNPS: p-nitrophenol sodium salt, MNNG: 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine, BP: 3,4-benzo[a]pyrene

1) JP saline was used as solvent. 2) Multi-sample  $\chi^2$  test was done at  $p < 0.05$  and then Fisher's exact test was done at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ . 3) endoreduplication

\*: Significantly different from solvent group data at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test.

\*\* : Significantly different from solvent group data at  $p < 0.01$  by Fisher's exact test.

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドのラットを用いる  
28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of  
Benzyltrimethylanmonium chloride in Rats

要約

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドは、有機合成反応の触媒として使用されている化合物である。本化合物の毒性については、ほとんど報告がないため、今回、既存化学物質の安全点検に関わる毒性調査事業の一環として、SD系ラットを用いる強制経口投与による28日間反復投与毒性試験を実施した。

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

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドは、超純水に溶解し、0, 30, 60および120 mg/kgを毎日1回、4週間連続経口投与し、一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、血液学検査、血液凝固能検査、血液生化学検査、尿検査、器官重量測定および病理学的検査を行った。なお、回復期間は2週間とし、投与終了時と同様な検査を実施した。

その結果は、次のとおりである。

雌の120 mg/kg群で1例が投与4週に死亡した。病理学検査の結果には死因に結びつく変化は認められなかった。

一般状態の観察では、雄の60 mg/kg群で流涎、雌雄の120 mg/kg群で流涎、流涙および被毛の汚れが、さらに雌の120 mg/kg群で立毛が認められた。雌雄の120 mg/kg群で観察された症状は回復試験では観察されず回復を示した。

体重は雄の120 mg/kg群で増加が抑制され、投与3週以降有意であった。摂餌量は、雄の120 mg/kg群で投与期間を通して減少が認められた。飼料効率は雄の120 mg/kg群で投与4週のみ低値であった。回復期間中は、体重変化を除き回復が認められた。

血液学検査の結果、雄の120 mg/kg群で、ヘモグロビン量、MCVおよびMCHの高値が認められた。回復期間終了時には、被験物質の投与と関連づけられる変化は認められなかった。

血液生化学検査の結果、雌雄とも被験物質投与と関連づけられる変化は認められなかった。

尿検査の結果、雌雄とも被験物質投与と関連づけられる変化は認められなかった。

器官重量測定の結果、雌雄とも被験物質投与と関連づけられる変化は認められなかった。

病理学的検査の結果、計画屠殺動物において剖検所見および組織所見では被験物質の影響が示唆される所見は

認められなかった。投与期間中に、120 mg/kg群の雌で1例死亡動物が観察され、組織学的検査の結果、肝細胞腫脹と好酸性小体の出現が認められた。

以上の結果、無影響量は雄で30 mg/kg/day、雌で60 mg/kg/dayと判断された。

材料および方法

1. 被験物質

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド(CAS No.56-93-9, 和光純薬工業(株)提供)は白色の固体(常温)で、水溶性、分子式 $C_{10}H_{16}ClN$ 、分子量185.70の化合物である。本試験に用いたロットRSL9083の純度は98%であった。

2. 供試動物

供試したラット [Crj:CD(SD)系, SPF] は日本チャールス・リバー(株)(神奈川県)から4週齢で購入した。動物を検収後、試験環境に9日間馴化させた後、6週齢で投与を開始した。動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした。動物の識別は、個別飼育ケージに動物標識番号(Animal ID-No.)を付すことにより行った。投与開始時の体重は雄で137~156 g、雌で117~131 gであった。

3. 飼育条件

動物はバリアシステムの飼育室で飼育し、環境調節の目標値は温度 $23 \pm 2^{\circ}C$ 、相対湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数20回/時、照明150~300 lux、12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)とした。(株)東京技研サービスの水洗式飼育機を使用し、金属製前面・床網目飼育ケージに動物を1匹ずつ収容し、オリエンタル酵母工業(株)製造の放射線滅菌改良NIH公開ラット・マウス飼料および水道水を自由に摂取させた。飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回取り換えた。

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

4. 試験群の構成

試験群は0, 30, 60および120 mg/kgの4群とし、1群雌雄各5匹を用い、0および120 mg/kg群に雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

## 〔用量設定理由〕

本試験に先立ち、投与量設定のための2週間投与試験を0, 10, 30, 90および180 mg/kgの5用量で実施した。その結果、雌雄とも180 mg/kg群で死亡が認められ、死亡率は雄で60%、雌で80%であった。90 mg/kg群では、雌雄とも器官重量に軽微な変化が認められたのみであった。従って、28日間反復投与毒性試験の最高用量は120 mg/kgとし、以下公比2で除した中用量を60 mg/kg、低用量を30 mg/kgに設定した。

## 5. 投与方法

被験物質の投与経路は経口とした。被験物質は超純水に溶解し、胃ゾンデを用いて経口投与した。投与容量は体重100 g当り0.5 mlとした。対照群には溶媒のみ投与した。

## 6. 投与液の調製、分析

被験物質は、各用量(30, 60および120 mg/kg)ごとに所定量を精秤し、超純水(NANO pureシステム、米国SYBRON社)に溶解した。投与液は調製後、冷蔵庫保存で1週間安定であることが確認されているので、本試験においては毎週1回調製を行い、1日分毎に小分けをし使用時まで冷蔵庫に保管した。投与液の濃度分析をすべての群に關し投与1および4週の調製液について実施した結果、設定濃度の104~107%の範囲であり、適切に調製されていた。

## 7. 投与期間

投与期間は28日間とし、投与終了後0および120 mg/kg群について2週間の回復試験を実施した。

## 8. 観察、測定および検査

## 1) 一般状態の観察

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

## 2) 体重

投与開始から回復試験終了時まで、毎週1回測定した。

## 3) 摂餌量

毎週1回給餌した残量を測定し、飼料摂取量(g/week)を算出した。

## 4) 臨床検査

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

## a. 血液学検査

EDTA-3Kを添加した初血を用い、白血球数(WBC：暗視野板法)、赤血球数(RBC：暗視野板法)、ヘモグロビン量(HGB：シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトク

リット値(HCT：RBC、MCVより算出)、平均赤血球容積(MCV：暗視野板法)、平均赤血球色素量(MCH：HGB、RBCより算出)、平均赤血球色素濃度(MCHC：HGB、HCTより算出)、血小板数(PLT：暗視野板法)および白血球百分率(フローサイトケミストリー法)を血液自動分析装置THMS H・1E(米国マイルス社)を用いて測定した。

網赤血球(RC)率算定用に、全血をキャピロット(テルモ株式会社)で染色後、血液塗抹標本を作製し鏡検した。

また、クエン酸ソーダ添加血液の血漿について、プロトロンビン時間(Quick 1段法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(クロット法)およびフィブリノーゲン量(トロンビン時間法)を血液凝固自動測定装置KC-40(独国Amelung社)を用いて測定した。

## b. 血液生化学検査

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

## c. 尿検査

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

## 5) 病理学検査

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

病理組織学検査は固定した器官・組織のうち、対照群

と高用量群の唾液腺、肝臓、心臓、脾臓、腎臓、副腎および骨髄(大腿骨)について実施した。常法に従って薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色し鏡検した。

6) データの記録および統計分析

各試験群の体重、摂餌量、血液学検査値、血液生化学検査値、尿検査値(尿量および尿比重のみ)、器官重量および器官重量・体重比は、下記に示した自動判別方式に従い、最初にBartlettの等分散検定を実施した。等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、分散が有意で各群の標本数が同数の場合はDunnettの多重比較検定、各群の標本数が異なる場合はDuncanの多重範囲検定で対照群と各投薬群間の有意差を検定した。Bartlettの等分散検定で不等分散の場合はKruskal-Wallisの順位検定を実施し、有意の場合はノンパラメトリックのDunnettの多重比較検定で対照群と各投薬群間の有意差を検定した。また、病理学的検査結果については、Fisherの直接確率検定を実施した。

有意水準は5および1%の片側検定で実施した。

試験結果

1. 死亡率

投与4週に、雌の120 mg/kg群で1例(動物番号2309)が死亡した。これを除き投与期間中、雌雄とも死亡例は認められなかった。

回復期間中には、雌雄とも対照群および120 mg/kg群で死亡例は認められなかった。

2. 一般状態の観察

雄では、120 mg/kg群で投与2週から流涎が観察され始め、投与2週は6例に、投与3週以降は9例に観察された。流涎は投与後1時間から発現し、3時間程度継続した後消失する繰り返しであり、程度は下顎がかなり濡れる程度であった。また、流涎は60 mg/kg群でも投与4週の5~7日に2例に発現したが、120 mg/kg群と比較し症状の程度は軽度で下顎が濡れる程度であった。その他の変化として、120 mg/kg群では、投与4週に5例に流涙が、また2例に被毛の汚れが認められた。これらはいずれも回復期間に入ると認められなかった。また、被毛の汚れについては、観察された2例がいずれも投与4週の計画屠殺動物であったため、回復性は明らかでなかった。

雌では、120 mg/kg群で投与2週から流涎が全例に、また、流涙および被毛の汚れが8例に、立毛が3例に観察され、投与4週には流涙および被毛の汚れが10例に、立毛が4例に増加し、このうち1例が投与4週に死亡したが、死亡例では流涎、流涙および被毛の汚れが投与2週から観察された以外、特記すべき変化は認められなかった。いずれの症状も回復期間に入ると認められなかった。なお、流涎の程度や発現時間は雄とほぼ同じであった。流涙についても発現時間は流涎と同様であったが、

程度は軽度で眼瞼が濡れる程度であった。

3. 体重(Figure 1)

雄では、120 mg/kg群で投与1週から増加抑制傾向が認められ、投与3および4週で対照群と比較して低値を示した。投与終了時の対照群と120 mg/kg群の体重差は、回復期間終了時でも大差がなかった。

雌では、投与期間中は120 mg/kg群で僅かに体重増加抑制傾向にあったもののいずれの被験物質投与群も対照群と有意な差は認められなかった。回復1週では、対照群と比較して120 mg/kg群で僅かに低値であったが、2週には有意な差は認められなかった。

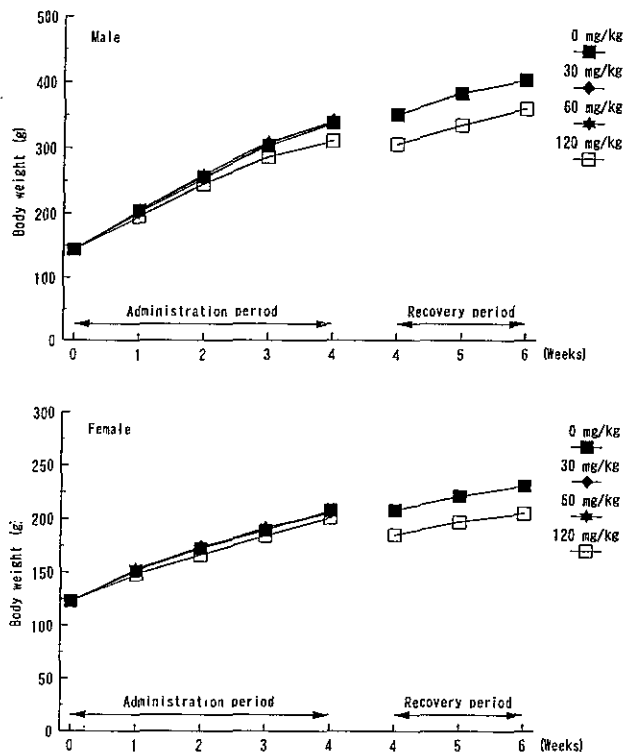


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

4. 摂餌量

雄では、対照群と比較して120 mg/kg群で投与期間を通じて減少が認められた。回復期間に入ると対照群と120 mg/kg群で明確な差は認められなかった。

雌では、投与期間および回復期間を通じて、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

5. 血液学検査(Table 1)

(投与終了時の検査結果)

雄では、対照群と比較して120 mg/kg群でヘモグロビン量、MCVおよびMCHの高値が認められた。また、MCVおよびMCHは、30および60 mg/kg群でも高値が認められたが、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数は対照群と差がなく、意義のある変化ではなかった。



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

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
HCT (%)	43.4 ± 1.7	43.2 ± 2.0	43.5 ± 1.4	45.8 ± 1.4	44.2 ± 0.4	43.1 ± 1.0
HGB (g/dl)	14.9 ± 0.3	15.1 ± 0.5	15.0 ± 0.5	16.1 ± 0.3**	15.2 ± 0.3	15.1 ± 0.4
RBC (×10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	7.52 ± 0.22	7.28 ± 0.38	7.27 ± 0.30	7.66 ± 0.23	7.85 ± 0.10	7.47 ± 0.07**
MCV (μm <sup>3</sup> )	57.7 ± 1.1	59.4 ± 1.1*	59.8 ± 0.8**	59.8 ± 0.9**	56.2 ± 0.7	57.7 ± 1.6
MCH (pg)	19.8 ± 0.3	20.7 ± 0.8*	20.7 ± 0.3*	21.0 ± 0.6**	19.4 ± 0.4	20.2 ± 0.5*
MCHC (%)	34.2 ± 0.7	34.8 ± 1.5	34.5 ± 0.5	35.1 ± 0.8	34.4 ± 0.4	35.0 ± 1.0
PLT (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1074 ± 66	1161 ± 132	1082 ± 98	1101 ± 156	1014 ± 96	1000 ± 121
WBC (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	9.9 ± 1.8	13.9 ± 2.2	12.6 ± 1.7	10.5 ± 3.6	11.5 ± 1.5	15.0 ± 4.4
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	12 ± 3	9 ± 3	9 ± 3	11 ± 3	10 ± 1N	9 ± 4
LYMPH	85 ± 3	87 ± 4	89 ± 3	86 ± 2	85 ± 1N	88 ± 4
MONO	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 0	2 ± 1	1 ± 1
EOSN	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1
LUC	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0
Reticulocyte (%)	30 ± 2	29 ± 8	31 ± 5	30 ± 6	21 ± 7	29 ± 4
PT (sec.)	13.8 ± 0.4	13.5 ± 0.3	13.6 ± 0.2	13.7 ± 0.3	13.6 ± 0.4	13.4 ± 0.3
APTT (sec.)	25.1 ± 1.5	25.4 ± 1.1	25.1 ± 1.5	25.9 ± 1.9	25.9 ± 1.3	23.8 ± 2.1
Fibrinogen (mg/dl)	255 ± 20	258 ± 5	266 ± 21	244 ± 10	277 ± 21	254 ± 15
Female						
No. of animals	4	5	5	5	5	4
HCT (%)	43.0 ± 1.3	42.2 ± 1.5	42.6 ± 1.3	42.9 ± 1.3	40.7 ± 1.1	41.3 ± 1.9
HGB (g/dl)	15.3 ± 0.5	15.2 ± 0.4	15.1 ± 0.3	15.3 ± 0.3	14.6 ± 0.1N	14.9 ± 0.8
RBC (×10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	7.49 ± 0.33	7.46 ± 0.36	7.36 ± 0.17	7.44 ± 0.19	7.32 ± 0.18	7.49 ± 0.22
MCV (μm <sup>3</sup> )	57.4 ± 1.1	56.7 ± 1.0	57.9 ± 1.0	57.7 ± 0.9	55.6 ± 0.9	55.2 ± 1.6
MCH (pg)	20.4 ± 0.2	20.4 ± 0.7	20.5 ± 0.5	20.6 ± 0.4	19.9 ± 0.5	19.9 ± 0.8
MCHC (%)	35.6 ± 0.5	36.0 ± 0.7	35.4 ± 0.7	35.7 ± 0.9	35.8 ± 0.9	36.0 ± 0.8
PLT (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1114 ± 43	1139 ± 57	1069 ± 90	1065 ± 112	994 ± 79	1187 ± 107*
WBC (×10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	6.5 ± 2.8	5.9 ± 2.2	6.3 ± 2.8	7.3 ± 2.5	5.5 ± 1.9	6.4 ± 1.1
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	12 ± 2	13 ± 4	11 ± 2	13 ± 5	18 ± 5	13 ± 2
LYMPH	84 ± 2	83 ± 4	84 ± 4	82 ± 6	79 ± 5	83 ± 3
MONO	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 0	2 ± 1
EOSN	2 ± 1	2 ± 0	2 ± 2	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 1
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Reticulocyte (%)	21 ± 7	18 ± 6	20 ± 3	19 ± 6	20 ± 5	23 ± 8
PT (sec.)	13.9 ± 0.5	13.9 ± 0.6	13.8 ± 0.2	14.0 ± 0.4	13.8 ± 0.5	14.1 ± 0.5
APTT (sec.)	21.0 ± 0.4	21.2 ± 1.2	21.8 ± 1.4	21.1 ± 1.6	19.8 ± 0.6	19.7 ± 0.8
Fibrinogen (mg/dl)	233 ± 26	214 ± 27	207 ± 23	213 ± 18	195 ± 9	204 ± 19

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

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

N:Non parametric analysis

雌では、いずれの検査項目も対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

#### [回復期間終了時の検査結果]

雄では、対照群に比較して120 mg/kg群で赤血球数の低値、MCHの高値が認められた。

雌では、対照群に比較して120 mg/kg群で血小板数が高値を示したが、背景値の範囲内の変化であった(背景値  $1103 \pm 124 \times 10^3 / \text{mm}^3$ ,  $n=50$ )。

#### 6. 血液凝固検査 (Table 1)

投与終了時および回復試験終了時のいずれにおいても、雌雄ともに対照群と被験物質投与群とで検査を行った3項目に差は認められなかった。

#### 7. 血液生化学検査 (Table 2)

##### [投与終了時の検査結果]

雄では、対照群に比較して30および120 mg/kg群でGOTが高値を示したが、背景値の正常範囲内の値であった。

雌では、すべての検査項目について、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

##### [回復期間終了時の検査結果]

雄では、すべての検査項目について、対照群と120 mg/kg群とで差が認められなかった。

雌では、対照群に比較して120 mg/kg群で総蛋白の低値が認められたが、対照群が僅かに高値傾向にあり、120 mg/kg群の値は正常範囲(背景値:  $5.66 \pm 0.20 \text{ g/dl}$ ,  $n=50$ )内の値であった。

#### 8. 尿検査 (Table 3)

投与終了時および回復試験終了時のいずれにおいても、雌雄ともに対照群と被験物質投与群とですべての検査項目について明らかな差は認められなかった。

#### 9. 器官重量 (Table 4)

##### [投与終了時の結果]

雄では、対照群に比較して30および60 mg/kg群で脳、腎臓および脾臓重量が高値、さらに60 mg/kg群で胸腺重量が高値を示した。

雌では、重量測定を行ったすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差は認められなかった。

##### [回復期間終了時の結果]

雌雄とも重量測定を行ったすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差は認められなかった。

#### 10. 器官重量・体重比(相対重量) (Table 4)

##### [投与終了時の結果]

雄では、対照群に比較して60 mg/kg群で胸腺相対重量の高値が認められた。

雌では、重量測定を実施したすべての器官について、

対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

##### [回復期間終了時の結果]

雄では、対照群に比較して120 mg/kg群で脳相対重量の高値が認められた。

雌では、重量測定を実施したすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

#### 11. 病理学検査

##### a) 剖検所見 (Table 5)

雌の120 mg/kg群の死亡例については、肉眼的には特筆すべき所見は観察されなかった。

投与終了時の計画屠殺された動物の剖検所見で被験物質による影響と考えられる所見は雌雄いずれの投与群にも認められなかった。

対照群を含め観察された所見としては、肺の赤色斑/区域と有色斑/区域が、それぞれ雌雄で少数例、胸腺の赤色斑/区域は雌で少数例認められた。その他観察された所見はごく僅かか、単発性の発生に止まった。

回復期間終了時の所見は、いずれも単発性の発生に止まり、被験物質による影響と考えられる所見は認められなかった。

##### b) 組織所見 (Table 6)

雌の120 mg/kg群の死亡例については、肝臓において、好酸性小体の出現と肝細胞腫脹が認められ、また、副腎皮質の増生が認められた。その他、肝臓の肉芽巣、骨髄の血管拡張や自己融解が観察された。

投与終了時の組織学的検査の結果、被験物質による影響と考えられる所見は認められなかった。対照群を含め観察された所見として、肝臓の周辺性脂肪化あるいは脂肪化、肉芽巣、腎臓の尿細管の好塩基化、繊維化や管腔拡張などの変化が認められた。

#### 考察および結論

雌の120 mg/kg群で死亡が1例認められ、この動物では、同群の他の動物でも観察された流涎、流涙および被毛の汚れが死亡の3週間前から観察された。病理学的検査の結果、肝臓に肝細胞腫脹と好酸性小体の出現等が認められたが、死因に結びつけられる変化ではなかった。しかしながら、予備試験での死亡例の状況等から、被験物質投与により死亡したものと考えられた。

一般状態の観察では、雌雄の120 mg/kg群で流涎、流涙および被毛の汚れが、さらに雌の120 mg/kg群で立毛が認められ、これらの症状のうち、流涎については雄の60 mg/kg群の1部の例でも観察された。投与中止により消失が認められいずれも被験物質投与による変化と考えられた。

体重、摂餌量および飼料効率は、雄の120 mg/kg群のみ低値または減少が認められ、摂餌量および飼料効率は投与の中止により回復した。体重については投与終了時の差が縮まらず、回復は認められなかった。

血液学検査の結果、雄の120 mg/kg群で認められたへ

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

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
<b>Male</b>						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
BUN (mg/dl)	11.8 ± 3.2	11.1 ± 0.7	11.7 ± 1.9	14.4 ± 2.4	10.8 ± 1.6	12.7 ± 2.5
Creatinine (mg/dl)	0.57 ± 0.09	0.56 ± 0.07	0.57 ± 0.09	0.63 ± 0.02	0.65 ± 0.10	0.63 ± 0.08
T.cholesterol (mg/dl)	47 ± 10	38 ± 11	46 ± 13	33 ± 12	33 ± 11	35 ± 13
T.protein (g/dl)	5.29 ± 0.26N	5.32 ± 0.16	5.20 ± 0.04	5.36 ± 0.18	5.43 ± 0.21	5.44 ± 0.27
Albumin (g/dl)	3.04 ± 0.15	3.04 ± 0.13	2.96 ± 0.07	3.15 ± 0.11	3.05 ± 0.12	3.12 ± 0.13
A/G	1.35 ± 0.03N	1.33 ± 0.08	1.32 ± 0.09	1.43 ± 0.02	1.29 ± 0.04	1.35 ± 0.07
Glucose (mg/dl)	128 ± 9	132 ± 15	125 ± 10	115 ± 10	146 ± 22	139 ± 25
Triglyceride (mg/dl)	42.1 ± 9.6	55.9 ± 21.4	44.4 ± 11.2	40.7 ± 8.8	62.5 ± 19.2N	52.1 ± 4.3
GOT (U/l)	48 ± 1N	55 ± 4*	52 ± 8	56 ± 3*	40 ± 4	45 ± 7
GPT (U/l)	13 ± 2	14 ± 2	12 ± 2	14 ± 2	14 ± 3	14 ± 2
ALP (U/l)	163 ± 29	166 ± 48	138 ± 21	166 ± 19	136 ± 30	138 ± 17
γ-GTP (U/l)	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.4	0.6 ± 0.5	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.2
T.bilirubin (mg/dl)	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.02
Sodium (mmol/l)	144.1 ± 1.0	143.5 ± 0.7	144.7 ± 1.4	143.1 ± 1.4	142.5 ± 0.7	141.5 ± 1.1
Potassium (mmol/l)	4.50 ± 0.31	4.61 ± 0.25	4.48 ± 0.24	4.74 ± 0.21	4.01 ± 0.13	4.22 ± 0.27
Chloride (mmol/l)	107.2 ± 0.7	107.0 ± 1.6	107.9 ± 1.5	106.3 ± 0.7	108.2 ± 1.3	107.1 ± 0.6
Calcium (mg/dl)	9.79 ± 0.35	9.82 ± 0.27	9.64 ± 0.28	9.63 ± 0.15	9.70 ± 0.26	9.77 ± 0.31
L.phosphate (mg/dl)	7.81 ± 0.28	7.80 ± 0.65	7.61 ± 0.25	8.12 ± 0.52	7.36 ± 0.51	7.80 ± 0.50
<b>Female</b>						
No. of animals	4	5	5	5	5	4
BUN (mg/dl)	13.7 ± 3.2	14.3 ± 2.5	14.9 ± 2.3	13.8 ± 1.3	13.6 ± 2.9	15.1 ± 2.4
Creatinine (mg/dl)	0.67 ± 0.06	0.58 ± 0.06	0.59 ± 0.06	0.55 ± 0.07	0.65 ± 0.03	0.63 ± 0.10
T.cholesterol (mg/dl)	45 ± 6	41 ± 6	46 ± 8	46 ± 12	42 ± 18	45 ± 17
T.protein (g/dl)	5.46 ± 0.06	5.34 ± 0.18	5.40 ± 0.33	5.29 ± 0.22	5.83 ± 0.28	5.44 ± 0.15*
Albumin (g/dl)	3.26 ± 0.10	3.23 ± 0.16	3.27 ± 0.27	3.19 ± 0.18	3.40 ± 0.24	3.16 ± 0.18
A/G	1.48 ± 0.08	1.54 ± 0.10	1.53 ± 0.08	1.52 ± 0.08	1.39 ± 0.08	1.39 ± 0.12
Glucose (mg/dl)	105 ± 6	106 ± 12	105 ± 13	103 ± 15	114 ± 15	103 ± 16
Triglyceride (mg/dl)	33.3 ± 5.8	30.5 ± 4.9	33.7 ± 8.2	28.2 ± 2.7	49.8 ± 20.2	38.3 ± 8.8
GOT (U/l)	57 ± 8	59 ± 11	53 ± 8	56 ± 10	46 ± 10	47 ± 5
GPT (U/l)	15 ± 2	16 ± 2	15 ± 2	16 ± 4	13 ± 1	13 ± 3
ALP (U/l)	132 ± 38	105 ± 34	109 ± 23	83 ± 22	73 ± 27	89 ± 24
γ-GTP (U/l)	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.6	1.0 ± 0.4
T.bilirubin (mg/dl)	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.05	0.14 ± 0.03	0.16 ± 0.05	0.15 ± 0.05
Sodium (mmol/l)	143.6 ± 0.7	142.2 ± 1.6	142.5 ± 1.4	141.4 ± 1.1	141.3 ± 1.3	140.9 ± 1.1
Potassium (mmol/l)	4.32 ± 0.25N	4.50 ± 0.28	4.91 ± 1.22	4.57 ± 0.37	4.00 ± 0.53	4.29 ± 0.25
Chloride (mmol/l)	111.2 ± 1.4	109.0 ± 0.7	109.2 ± 1.9	108.9 ± 1.8	107.9 ± 2.7	110.4 ± 1.7
Calcium (mg/dl)	9.74 ± 0.12N	9.64 ± 0.34	10.02 ± 0.49	9.77 ± 0.13	9.94 ± 0.40	9.60 ± 0.31
L.phosphate (mg/dl)	6.75 ± 0.55	6.28 ± 0.48	7.34 ± 0.83	6.96 ± 0.59	6.15 ± 0.80	5.94 ± 0.91

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

N: Non parametric analysis

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

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Volume (ml)	21 ± 10N	16 ± 3	19 ± 8	18 ± 3	16 ± 4	18 ± 6
Specific gravity	1.042 ± 0.016	1.055 ± 0.011	1.040 ± 0.017	1.043 ± 0.006	1.037 ± 0.011	1.037 ± 0.021
Color	Slight yellow	5	5	5	5	5
Turbidity	Clear muddy	5	5	5	5	5
pH	7	0	2	1	0	1
	7.5	2	1	0	0	1
	8	0	0	0	0	0
	8.5	2	1	1	2	0
	≥9	1	1	3	3	3
Occult blood	-	5	5	5	3	5
	+/-	0	0	0	0	1
	2+	0	0	0	0	1
Ketones	-	2	1	2	5	1
	+/-	1	1	1	0	0
	1+	2	3	2	0	4
Glucose (g/dl)	-	5	5	5	5	5
	Protein +/- (mg/dl)	0	0	0	1	0
Bilirubin	30	2	1	4	4	3
	100	1	3	0	0	2
	≥300	2	1	1	0	0
	-	5	5	5	5	5
Urobilinogen (E.U./dl)	0.1	2	1	2	5	4
	1.0	3	4	3	0	1
Erythrocytes	-	5	5	5	5	5
Leukocytes	-	5	5	5	5	5
Epith. cells	-	5	5	5	5	5
Casts	-	5	4	5	5	5
	+	0	1	0	0	0
Fat glob.	-	5	5	5	5	5
M. threads	-	5	5	5	5	4
	+	0	0	0	0	1
others	-	1	0	1	0	2
	+	4	5	4	5	3

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

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

N: Non parametric analysis

Table 3 (continued)

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	30	60	120	0	120	
Female							
No. of animals	4	5	5	5	5	4	
Volume (ml)	15 ± 9N	9 ± 2	11 ± 6	20 ± 12	16 ± 3	17 ± 10	
Specific gravity	1.056 ± 0.022	1.063 ± 0.007	1.070 ± 0.019	1.044 ± 0.027	1.049 ± 0.014	1.041 ± 0.016	
Color	Slight yellow	4	5	5	5	4	
Turbidity	Clear muddy	4	5	5	5	4	
pH	7	1	0	0	2	1	
	7.5	1	0	2	1	2	
	8	0	0	1	1	0	
	8.5	2	1	0	0	0	
	≥9	0	2	0	0	0	
Occult blood	-	4	5	5	4	5	
	1+	0	0	0	1	0	
Ketones	-	1	2	1	5	0	
	+/-	2	3	4	0	4	
	1+	1	0	0	0	1	
Glucose (g/dl)	-	4	5	5	5	5	
	Protein	-	1	0	0	1	0
	(mg/dl)	30	0	4	1	3	3
	100	3	1	3	1	2	
≥300	0	0	1	0	0	0	
Bilirubin	-	4	5	4	5	5	
	1+	0	0	1	0	0	
Urobilinogen (E.U./dl)	0.1	1	0	0	3	0	
	1.0	3	5	5	2	5	
Erythrocytes	-	4	3	5	5	5	
	+	0	2	0	0	0	
Leukocytes	-	4	5	5	5	5	
Epith. cells	-	4	4	5	4	5	
	+	0	1	0	1	0	
Casts	-	4	4	5	5	5	
	+	0	1	0	0	0	
Fat glob.	-	4	5	5	5	5	
M. threads	-	4	5	5	5	5	
others	-	1	0	0	0	0	
	+	3	5	5	5	5	

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

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

N: Non parametric analysis

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

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
<b>Male</b>						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	324 ± 11	342 ± 19	340 ± 16	316 ± 16	403 ± 17	360 ± 33*
<b>Absolute organ weight</b>						
Brain (g)	2.03 ± 0.06	2.12 ± 0.05*	2.13 ± 0.07*	2.02 ± 0.05	2.10 ± 0.07	2.05 ± 0.15
Liver (g)	9.26 ± 0.73	10.37 ± 1.24	10.04 ± 0.97	8.55 ± 0.53	11.42 ± 1.12	9.94 ± 1.42
Kidneys (g)	2.48 ± 0.17	2.84 ± 0.27*	2.81 ± 0.19*	2.47 ± 0.08	2.89 ± 0.37	2.62 ± 0.27
Spleen (g)	0.51 ± 0.06	0.67 ± 0.07*	0.66 ± 0.13*	0.44 ± 0.10	0.64 ± 0.08	0.61 ± 0.09
Adrenals (mg)	46 ± 7	53 ± 9	48 ± 4	53 ± 5	60 ± 14	54 ± 5
Testes (g)	2.91 ± 0.12	2.83 ± 0.17	2.88 ± 0.15	2.82 ± 0.19	3.08 ± 0.25	2.79 ± 0.19
Thymus (mg)	567 ± 133N	675 ± 19	740 ± 80*	564 ± 47	444 ± 104	511 ± 76
<b>Relative organ weight</b>						
Brain (%)	0.629 ± 0.035	0.621 ± 0.029	0.627 ± 0.030	0.639 ± 0.029	0.522 ± 0.015	0.570 ± 0.028**
Liver (%)	2.857 ± 0.157N	3.032 ± 0.290	2.955 ± 0.239	2.706 ± 0.046	2.828 ± 0.182	2.754 ± 0.218
Kidneys (%)	0.767 ± 0.049	0.833 ± 0.078	0.826 ± 0.050	0.783 ± 0.036	0.719 ± 0.105	0.730 ± 0.062
Spleen (%)	0.157 ± 0.014	0.197 ± 0.028	0.194 ± 0.038	0.139 ± 0.027	0.157 ± 0.015	0.170 ± 0.017
Adrenals (%)	0.014 ± 0.002N	0.016 ± 0.003	0.014 ± 0.001	0.017 ± 0.001	0.015 ± 0.003	0.015 ± 0.001
Testes (%)	0.899 ± 0.039	0.831 ± 0.082	0.849 ± 0.066	0.896 ± 0.090	0.764 ± 0.049	0.779 ± 0.060
Thymus (%)	0.175 ± 0.042N	0.198 ± 0.008	0.218 ± 0.020*	0.179 ± 0.015	0.111 ± 0.029	0.142 ± 0.016
<b>Female</b>						
No. of animals	4	5	5	5	5	4
Body weight (g)	207 ± 13	206 ± 12	206 ± 9	213 ± 19	231 ± 21	205 ± 19
<b>Absolute organ weight</b>						
Brain (g)	1.90 ± 0.07	1.89 ± 0.02	1.88 ± 0.05	1.89 ± 0.07	1.97 ± 0.06	1.94 ± 0.05
Liver (g)	5.93 ± 0.30	5.84 ± 0.35	5.91 ± 0.66	6.22 ± 0.39	6.14 ± 0.67	5.35 ± 0.46
Kidneys (g)	1.62 ± 0.11	1.71 ± 0.05	1.59 ± 0.08	1.74 ± 0.15	1.70 ± 0.06	1.56 ± 0.14
Spleen (g)	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.09	0.37 ± 0.05	0.44 ± 0.07	0.38 ± 0.05
Adrenals (mg)	58 ± 5	61 ± 6	58 ± 10	60 ± 6	64 ± 5	67 ± 6
Ovaries (mg)	74 ± 9	81 ± 8	80 ± 13	81 ± 8	78 ± 4	71 ± 9
Thymus (mg)	403 ± 93	430 ± 56	458 ± 53	381 ± 93	408 ± 90	326 ± 51
<b>Relative organ weight</b>						
Brain (%)	0.920 ± 0.045	0.922 ± 0.061	0.915 ± 0.058	0.887 ± 0.056	0.859 ± 0.102	0.952 ± 0.079
Liver (%)	2.896 ± 0.103	2.842 ± 0.197	2.870 ± 0.206	2.927 ± 0.270	2.661 ± 0.201	2.615 ± 0.150
Kidneys (%)	0.791 ± 0.083	0.834 ± 0.075	0.771 ± 0.018	0.822 ± 0.100	0.742 ± 0.066	0.764 ± 0.035
Spleen (%)	0.191 ± 0.019	0.186 ± 0.014	0.189 ± 0.035	0.171 ± 0.017	0.191 ± 0.023	0.186 ± 0.018
Adrenals (%)	0.028 ± 0.002	0.030 ± 0.005	0.028 ± 0.004	0.028 ± 0.003	0.028 ± 0.003	0.033 ± 0.006
Ovaries (%)	0.036 ± 0.004	0.040 ± 0.003	0.039 ± 0.005	0.038 ± 0.006	0.034 ± 0.002	0.035 ± 0.004
Thymus (%)	0.195 ± 0.043	0.210 ± 0.031	0.223 ± 0.022	0.179 ± 0.045	0.176 ± 0.030	0.160 ± 0.026

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

N: Non parametric analysis

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

Item	Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
			0	30	60	120	0	120
Male								
		No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
CARDIOVASCULAR SYSTEM								
	heart	white patch/zone	0	0	1	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
	spleen	deformed	0	0	0	0	0	1
RESPIRATORY SYSTEM								
	lung	black patch/zone	0	0	1	0	0	0
		colored patch/zone	1	0	0	1	0	0
		red patch/zone	1	1	1	2	0	0
DIGESTIVE SYSTEM								
	liver	colored patch/zone	0	0	1	0	0	0
		diaphragmatic hernia	0	0	0	1	0	0
		white patch/zone	0	0	0	1	0	0
URINARY SYSTEM								
	kidney	white patch/zone	0	0	0	0	1	0
ENDOCRINE SYSTEM								
	pituitary gland	cyst	0	1	0	0	0	0
		adrenal gland	enlarged	0	0	0	0	1
Female								
		No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
CARDIOVASCULAR SYSTEM								
	heart	black patch/zone	0	1	0	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
	spleen	enlarged	1	0	0	0	0	0
	lymph node	enlarged	1	0	0	0	0	0
	thymus	red patch/zone	2	1	0	0	0	0
RESPIRATORY SYSTEM								
	lung	black patch/zone	1	0	0	0	0	0
		colored patch/zone	1	0	0	0	0	1
		red patch/zone	0	0	0	2	0	0
DIGESTIVE SYSTEM								
	liver	enlarged	1	0	0	0	0	0
		granular	1	0	0	0	0	0
		pale	1	0	0	0	0	0
	choledochus	dilated lumen	1	0	0	0	0	0
URINARY SYSTEM								
	kidney	cyst	1	0	0	0	0	0
		dilated pelvis	0	0	0	1	0	0
		enlarged	1	0	0	0	0	0
		pale	1	0	0	0	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM								
	ovary	cyst	0	0	2	0	0	0
	uterus	dilated lumen	1	0	0	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM								
	pituitary gland	cyst	1	0	0	0	0	0

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

Item	Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)											
			0			30			60			120		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Male														
No. of animals necropsied			5			5			5			5		
DIGESTIVE SYSTEM														
liver			(5)			(0)			(0)			(5)		
		fatty change, peripheral	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		granulation	4	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
		infiltration/cellular	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		hepatodiaphragmatic nodule	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
URINARY SYSTEM														
kidney			(5)			(0)			(0)			(5)		
		basophilic change	3	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
		deposit of calcium	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		eosinophilic body	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		infiltration/cellular	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
MUSCULOSKELETAL SYSTEM														
bone			(5)			(0)			(0)			(5)		
		osteosclerosis	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
Female														
No. of animals necropsied			5			5			5			5		
HEMATOPOIETIC SYSTEM														
bone marrow			(5)			(0)			(0)			(5)		
		granulopoiesis, increased	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
spleen			(5)			(0)			(0)			(5)		
		capsulitis	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		hematopoiesis, increased	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM														
liver			(5)			(0)			(0)			(5)		
		bile duct dilatation	0	0	1	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		cytological alteration	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		fatty change	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		fatty change, peripheral	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		necrosis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		swelling of liver cells	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		cholangitis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		granulation	2	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
		bile duct hyperplasia	0	0	1	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		extramedullary hematopoiesis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
URINARY SYSTEM														
kidney			(5)			(0)			(0)			(5)		
		edema	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		basophilic change	2	0	0	-	-	-	-	-	-	3	0	0
		cyst	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		hydronephrosis	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		tubular dilatation	0	1	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		lymphocytic infiltration	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		fibrosis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
ENDOCRINE SYSTEM														
adrenal gland			(5)			(0)			(0)			(5)		
		vacuolic change	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0

1:slight 2:moderate 3:marked

Numbers in parenthesis indicate No. of animals examined microscopically at this site.



モグロビン量、MCVおよびMCHの高値のみが被験物質投与と関連づけられる変化であったが、変化の程度は僅かであり、被験物質の血液に対する影響は弱いものと考えられた。回復試験終了時に雌雄の120 mg/kg群で認められた変化も、軽微または投与終了時に認められなかった変化であり、被験物質投与との関連は示唆されない。血液凝固能検査に関しては、雌雄とも変化が認められなかった。

血液生化学検査および尿検査の結果、被験物質投与によると考えられる変化は、雌雄いずれの群にも認められなかった。

器官重量測定の結果、明確に被験物質投与の影響を示唆する変化では認められなかった。雄の30および60 mg/kg群で認められた脳、腎臓および脾臓の実重量の変化は、相対重量に有意な差が認められず、この両群の体重が高値傾向にあることから、体重による影響と考えられた。また、雄の60 mg/kg群で認められた胸腺の実重量および相対重量の高値についても、投与用量との関連性がなく、被験物質投与による変化とは考えられなかった。回復試験終了時に認められた雄の120 mg/kgの脳相対重量の高値も、この群の体重が低いことによるものと推察された。

病理学的検査の結果、剖検所見では計画屠殺動物、死亡動物ともに特筆すべき所見は観察されなかった。

組織所見では、計画屠殺動物においては、被験物質の影響を示唆する所見は観察されなかったが、死亡した1例の動物では肝細胞腫脹と好酸性小体の出現が観察された。しかし、いずれも軽度の変化であり、死に至らしめるほどの肝細胞腫脹、好酸性小体の出現とは考えがたく死因は不明であった。なお、予備試験において、計画屠殺動物の180 mg/kg群では肝臓の肥大は観察されなかつ

たが、投与期間中に死亡した180 mg/kg群の雌雄の大部分の例で肝臓の肥大が肉眼的に観察されている。本試験の死亡動物の肝臓では肥大が認められなかったが、組織学的に観察された肝細胞腫脹と好酸性小体の出現は被験物質投与による影響が考えられた。

以上のことから、本試験では雌雄で認められた一般状態の変化および雄の120 mg/kg群で認められた血液学検査値の変化が被験物質投与と関連づけられるものであり、無影響量は一般状態に変化が認められなかった、雄で30 mg/kg/day、雌で60 mg/kg/dayと判断された。

#### 連絡先

試験責任者：井上博之

試験担当者：各務 進、庄子明德、渡 修明、  
小林和雄、高木留美子

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜 582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

#### Correspondence

Authors: Hiroyuki Inoue (Study director),

Susumu Kakamu, Akinori Shoji,

Nobuaki Watari, Kazuo Kobayashi,

Rumiko Takagi

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,

Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan

Tel 81-538-58-1266 Fax 81-538-58-1393

### 3-フェノキシトルエンの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 3-Phenoxytoluene on Bacteria

#### 要約

3-フェノキシトルエンについて細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* (TA100, TA1535, TA98, TA1537) および *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) を用い、プレインキュベーション法により実施した。予備試験の結果をもとに、本試験では S9 mix 非共存下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 は 78.1 ~ 1.22  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比 2) の 7 濃度、WP2 *uvrA* は 5000 ~ 313  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の (公比 2) の 5 濃度を、共存下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 は 313 ~ 4.88  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比 2) の 7 濃度、WP2 *uvrA* は 2500 ~ 39.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比 2) の 7 濃度を設定した。

2回の本試験の結果とも、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下では3-フェノキシトルエンは、変異原性を有さない(陰性)と判定された。

#### 方法

##### 〔使用菌株〕

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1)</sup> および 東京大学医学研究所 松島教授より 1985 年 10 月 14 日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> の 5 菌株を用いた。各使用菌株は超低温槽で -80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を融解後、その 20  $\mu\text{l}$  をニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No. 2, Unipath 社) 25 g を 1 l の精製水に溶解して作成した液体完全培地 10 ml に接種し、37℃で 8 時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は菌濃度を測定した後、試験に使用した。

##### 〔被験物質〕

3-フェノキシトルエン (CAS No.: 3586-14-9, ロット番号: FAW01, 純度: 99.0%; 関東化学(株)製造) は、分子量 184.25 の水に不溶の無色透明液体であり通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットについては試験期間中安定であることを確認した。

3-フェノキシトルエンはジメチルスルホキシド (DMSO, ロット番号: 708S1611, 関東化学(株)) を用いて

最高濃度 (50 mg/ml) の溶液を調製した後、同溶媒で公比 2 で希釈したものをを用いた。

##### 〔陽性対照物質〕

陽性対照物質として下記のものを用いた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド (純度: 98.8%, 和光純薬工業(株))

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム (純度: 96.5%, 和光純薬工業(株))

ENNG: *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (純度: 99.0%, Sigma Chemical Co.)

9-AA : 9-アミノアクリジン (純度: 99%, Sigma Chemical Co.)

2-AA : 2-アミノアントラセン (純度: 98.0%, 和光純薬工業(株))

NaN<sub>3</sub> は注射用水 (株) 大塚製薬工場) に、その他は DMSO に溶解したものを使用した。

##### 〔培地および S9 mix の組成〕

###### 1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いて D-ビオチン、L-ヒスチジンおよび L-トリプトファン の 0.5 mM 混合水溶液を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水 100 ml に対して、粉末寒天 (Bacto-Agar; Difco 社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し、約 45℃ に保温した。

###### 2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 (オリエンタル酵母工業(株)) を購入し、使用した。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塩	0.2 g
クエン酸一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム無水塩	10 g
リン酸-アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
ブドウ糖	20 g
寒天 (OXOID Agar No. 1)	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

S9 mix 1 ml あたり以下の組成で調製し、使用時まで

水中に保存した。

S9*	0.1 ml
塩化マグネシウム六水塩	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
D-グルコース6-リン酸	5 $\mu$ mol
$\beta$ -NADPH	4 $\mu$ mol
$\beta$ -NADH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ mol
滅菌精製水	残量

\*: 購入したS9(キッコーマン㈱)を使用した。このS9は、7週齢の雄性SD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボン併用投与して作製した肝ホモジネートの9000×g遠心上清分画である。

〔試験方法〕

試験はプレインキュベーション法で実施した。

試験管に被験物質溶液0.1 mlを分注し、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mlと菌懸濁液0.1 mlを加え、37℃で20分間振盪した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 ml加えた。プレインキュベーション後、トップアガー2 mlを上記の試験管に加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37℃で48時間培養した。実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各濃度あたり1枚のプレートを使用した。本試験は各濃度あたり3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

〔試験結果の判定基準〕

いずれかの試験菌株で、S9 mixの有無によらず、被験物質濃度の増加にともなって復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照値の2倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は陽性と判定した。その他の場合はすべて陰性と判定した。試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

結果および考察

〔予備試験〕

5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22  $\mu$ g/プレートの濃度で実施した結果、S9 mix非共存下のTA100, TA1535, TA98, TA1537および共存下のすべての菌株で抗菌性が認められた。従って、本試験ではS9 mix非共存下のTA100, TA1535, TA98, TA1537は78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22  $\mu$ g/プレートの7濃度、WP2 *uvrA*は5000, 2500, 1250, 625, 313  $\mu$ g/プレートの5濃度を、共存下のTA100, TA1535, TA98, TA1537は313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88  $\mu$ g/プレート

の7濃度、WP2 *uvrA*は2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1  $\mu$ g/プレートの7濃度を設定した。

〔本試験〕

結果をTable 1,2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施した結果、2回の本試験ともにS9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix非共存下のTA100, TA1535, TA98, TA1537では39.1  $\mu$ g/プレート以上、WP2 *uvrA*では5000  $\mu$ g/プレートで、共存下のTA100, TA1535, TA98, TA1537では156  $\mu$ g/プレート以上、WP2 *uvrA*では625  $\mu$ g/プレートで以上で抗菌性が認められた。

S9 mix共存下の2500  $\mu$ g/プレート以上で沈殿物が認められた。

以上の結果から、フェノキシトルエンの変異原性は陰性と結論した。

文献

- 1) D.M. Maron and B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215(1983).
- 2) M.H.L. Green and W.J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3-32(1976).

連絡先

試験責任者：水野 文夫  
 試験担当者：榎本 佳明, 石毛 裕子  
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
 314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Fumio Mizuno (Study director)  
 Yoshiaki Enomoto, Yuko Ishige  
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
 Kashima Laboratory  
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
 Ibaraki, 314-02 Japan  
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of 3-phenoxytolene on bacteria

With (+) or Without (-) S9 Mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)					
		Base-pair change type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 Mix (-)	0	93 119 (107) 109 ( $\pm 13$ )	10 6 (10) 14 ( $\pm 4$ )	46 48 (47) 46 ( $\pm 1$ )	19 24 (21) 21 ( $\pm 3$ )	14 13 (12) 10 ( $\pm 2$ )	
	1.22	106 116 (110) 109 ( $\pm 5$ )	4 8 (7) 10 ( $\pm 3$ )	( ) ( ) ( )	24 24 (25) 26 ( $\pm 1$ )	13 14 (14) 16 ( $\pm 2$ )	
	2.44	99 104 (98) 90 ( $\pm 7$ )	9 14 (10) 6 ( $\pm 4$ )	( ) ( ) ( )	22 22 (22) 21 ( $\pm 1$ )	14 14 (14) 14 ( $\pm 0$ )	
	4.88	102 111 (104) 99 ( $\pm 6$ )	7 7 (8) 9 ( $\pm 1$ )	( ) ( ) ( )	26 24 (24) 21 ( $\pm 3$ )	10 16 (11) 7 ( $\pm 5$ )	
	9.77	91 82 (90) 96 ( $\pm 7$ )	9 8 (9) 9 ( $\pm 1$ )	( ) ( ) ( )	18 20 (21) 25 ( $\pm 4$ )	7 9 (9) 12 ( $\pm 3$ )	
	19.5	97 74 (86) 86 ( $\pm 12$ )	7 11 (7) 4 ( $\pm 4$ )	( ) ( ) ( )	12 16 (15) 5 ( $\pm 3$ )	12 12 (14) 18 ( $\pm 3$ )	
	39.1	57* 81* (68) 66* ( $\pm 12$ )	5* 5* (4) 3* ( $\pm 1$ )	( ) ( ) ( )	11* 16* (11) 5* ( $\pm 6$ )	3* 5* (5) 8* ( $\pm 3$ )	
	78.1	71* 68* (63) 49* ( $\pm 12$ )	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	( ) ( ) ( )	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	
	313	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	24 19 (22) 24 ( $\pm 3$ )	( ) ( ) ( )	( ) ( ) ( )	
	625	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	20 23 (20) 16 ( $\pm 4$ )	( ) ( ) ( )	( ) ( ) ( )	
	1250	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	21 21 (19) 15 ( $\pm 3$ )	( ) ( ) ( )	( ) ( ) ( )	
	2500 C	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	22 18 (20) 21 ( $\pm 2$ )	( ) ( ) ( )	( ) ( ) ( )	
	5000 C	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	21* 23* (21) 19* ( $\pm 2$ )	( ) ( ) ( )	( ) ( ) ( )	
	S9 Mix (+)	0	109 119 (117) 122 ( $\pm 7$ )	14 16 (15) 15 ( $\pm 1$ )	52 51 (48) 42 ( $\pm 6$ )	32 22 (27) 26 ( $\pm 5$ )	22 13 (14) 8 ( $\pm 7$ )
		4.88	123 136 (132) 137 ( $\pm 8$ )	12 15 (15) 19 ( $\pm 4$ )	( ) ( ) ( )	18 20 (23) 32 ( $\pm 8$ )	11 17 (13) 10 ( $\pm 4$ )
9.77		132 121 (133) 146 ( $\pm 13$ )	13 7 (10) 9 ( $\pm 3$ )	( ) ( ) ( )	33 34 (36) 41 ( $\pm 4$ )	13 19 (14) 9 ( $\pm 5$ )	
19.5		128 139 (128) 117 ( $\pm 11$ )	5 16 (10) 9 ( $\pm 6$ )	( ) ( ) ( )	28 27 (26) 24 ( $\pm 2$ )	26 20 (21) 16 ( $\pm 5$ )	
39.1		136 121 (130) 134 ( $\pm 8$ )	8 11 (10) 12 ( $\pm 2$ )	( ) ( ) ( )	22 36 (29) 29 ( $\pm 7$ )	21 20 (21) 23 ( $\pm 2$ )	
78.1		132 113 (115) 100 ( $\pm 16$ )	13 10 (11) 10 ( $\pm 2$ )	45 31 (40) 43 ( $\pm 8$ )	36 25 (30) 30 ( $\pm 6$ )	14 19 (15) 12 ( $\pm 4$ )	
156		106* 85* (94) 90* ( $\pm 11$ )	15* 9* (9) 4* ( $\pm 6$ )	53 40 (48) 50 ( $\pm 7$ )	21* 29* (22) 15* ( $\pm 7$ )	9* 8* (7) 4* ( $\pm 3$ )	
313		0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	46 28 (38) 39 ( $\pm 9$ )	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	
625		( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	29 28 (30) 34 ( $\pm 3$ )	( ) ( ) ( )	( ) ( ) ( )	
1250		( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	37* 35* (33) 28* ( $\pm 5$ )	( ) ( ) ( )	( ) ( ) ( )	
2500		( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	30* 22* (25) 16* ( $\pm 5$ )	( ) ( ) ( )	( ) ( ) ( )	
5000		( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	22* 22* (20) 16* ( $\pm 3$ )	( ) ( ) ( )	( ) ( ) ( )	
Positive control		Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
S9 Mix (-)		Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
		Number of revertants	586 558 (562) 543 ( $\pm 22$ )	325 286 (323) 358 ( $\pm 36$ )	474 507 (498) 513 ( $\pm 21$ )	430 452 (463) 506 ( $\pm 39$ )	309 400 (377) 422 ( $\pm 60$ )
	Positive control	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
S9 Mix (+)	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2	
	Number of revertants	792 853 (829) 842 ( $\pm 33$ )	309 336 (322) 321 ( $\pm 14$ )	886 841 (857) 844 ( $\pm 25$ )	266 232 (246) 240 ( $\pm 18$ )	198 159 (175) 168 ( $\pm 20$ )	

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN<sub>3</sub>:sodium azide (Mean)  
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine, 2-AA:2-aminoanthracene ( $\pm$ S.D.)  
 \*:Microbial toxicity was observed.  
 C:Precipitates were observed on the surface of agar plates.

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 3-phenoxytolene on bacteria

With(+)or Without(-) S9 Mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)					
		Base-pair change type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 Mix (-)	0	94 95 (95) 97 ( $\pm 2$ )	7 8 (8) 10 ( $\pm 2$ )	49 38 (39) 31 ( $\pm 9$ )	18 15 (18) 20 ( $\pm 3$ )	14 14 (13) 12 ( $\pm 1$ )	
	1.22	111 108 (103) 90 ( $\pm 11$ )	5 14 (9) 7 ( $\pm 5$ )	( )	24 18 (20) 8 ( $\pm 3$ )	15 14 (13) 11 ( $\pm 2$ )	
	2.44	123 108 (113) 108 ( $\pm 9$ )	11 7 (9) 10 ( $\pm 2$ )	( )	15 16 (18) 24 ( $\pm 5$ )	10 18 (16) 19 ( $\pm 5$ )	
	4.88	100 90 (94) 91 ( $\pm 6$ )	11 8 (10) 10 ( $\pm 2$ )	( )	15 11 (17) 24 ( $\pm 7$ )	13 11 (15) 20 ( $\pm 5$ )	
	9.77	92 105 (95) 89 ( $\pm 9$ )	9 6 (8) 10 ( $\pm 2$ )	( )	15 18 (18) 22 ( $\pm 4$ )	21 16 (19) 20 ( $\pm 3$ )	
	19.5	80 100 (85) 75 ( $\pm 13$ )	8 9 (8) 7 ( $\pm 1$ )	( )	10 27 (18) 16 ( $\pm 9$ )	13 7 (10) 10 ( $\pm 3$ )	
	39.1	45* 56* (55) 63* ( $\pm 9$ )	9* 7* (6) 3* ( $\pm 3$ )	( )	16* 17* (14) 8* ( $\pm 5$ )	7* 9* (7) 5* ( $\pm 2$ )	
	78.1	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	( )	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	
	313	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	23 29 (26) 27 ( $\pm 3$ )	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	
	625	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	26 20 (23) 22 ( $\pm 3$ )	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	
	1250	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	22 25 (24) 26 ( $\pm 2$ )	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	
	2500 C	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	21 28 (26) 29 ( $\pm 4$ )	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	
	5000 C	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	26* 23* (23) 21* ( $\pm 3$ )	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	
	S9 Mix (+)	0	127 109 (119) 120 ( $\pm 9$ )	15 8 (10) 8 ( $\pm 4$ )	46 43 (45) 46 ( $\pm 2$ )	36 22 (30) 33 ( $\pm 7$ )	14 11 (15) 21 ( $\pm 5$ )
4.88		119 139 (119) 98 ( $\pm 21$ )	8 15 (12) 12 ( $\pm 4$ )	( ) ( $\pm$ )	36 30 (31) 26 ( $\pm 5$ )	19 7 (13) 14 ( $\pm 6$ )	
9.77		134 107 (118) 113 ( $\pm 14$ )	9 5 (8) 11 ( $\pm 3$ )	( ) ( $\pm$ )	28 36 (33) 35 ( $\pm 4$ )	25 20 (20) 16 ( $\pm 5$ )	
19.5		146 144 (146) 147 ( $\pm 2$ )	10 15 (13) 15 ( $\pm 3$ )	( ) ( $\pm$ )	30 31 (30) 30 ( $\pm 1$ )	22 26 (21) 16 ( $\pm 5$ )	
39.1		164 159 (156) 144 ( $\pm 10$ )	20 10 (12) 7 ( $\pm 7$ )	( ) ( $\pm$ )	26 38 (34) 37 ( $\pm 7$ )	22 22 (20) 15 ( $\pm 4$ )	
78.1		139 122 (125) 113 ( $\pm 13$ )	5 15 (11) 14 ( $\pm 6$ )	55 58 (55) 51 ( $\pm 4$ )	26 24 (27) 31 ( $\pm 4$ )	20 16 (19) 20 ( $\pm 2$ )	
156		62* 64* (66) 72* ( $\pm 5$ )	7* 16* (10) 8* ( $\pm 5$ )	55 46 (48) 44 ( $\pm 6$ )	21* 24* (24) 26* ( $\pm 3$ )	9* 15* (11) 10* ( $\pm 3$ )	
313		0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	45 45 (41) 33 ( $\pm 7$ )	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	0* 0* (0) 0* ( $\pm 0$ )	
625		( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	45 33 (37) 34 ( $\pm 7$ )	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	
1250		( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	26* 27* (24) 19* ( $\pm 4$ )	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	
2500		( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	18* 20* (20) 22* ( $\pm 2$ )	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	
5000		( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	14* 18* (16) 16* ( $\pm 2$ )	( ) ( $\pm$ )	( ) ( $\pm$ )	
Positive control		Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
		Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 Mix (-)	Number of revertants	684 779 (704) 649 ( $\pm 67$ )	414 382 (393) 382 ( $\pm 18$ )	622 486 (526) 470 ( $\pm 84$ )	524 569 (522) 473 ( $\pm 48$ )	412 484 (468) 508 ( $\pm 50$ )	
Positive control	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2	
S9 Mix (+)	Number of revertants	1075 986 (1045) 1073 ( $\pm 51$ )	346 359 (351) 347 ( $\pm 7$ )	1197 1037 (1084) 1019 ( $\pm 98$ )	289 295 (274) 237 ( $\pm 32$ )	193 196 (196) 200 ( $\pm 4$ )	

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN<sub>3</sub>:sodium azide (Mean)  
ENNG:N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine, 2-AA:2-aminoanthracene (±S.D.)

\*:Microbial toxicity was observed.

C:Precipitates were observed on the surface of agar plates.

3-フェノキシトルエンの  
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  
3-Phenoxytoluene on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

3-フェノキシトルエンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、連続処理法の24時間処理と短時間処理法のS9 mix非存在下では400  $\mu\text{g/ml}$ 、連続処理法の48時間処理と短時間処理法のS9 mix存在下では200  $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、以下、それぞれ公比2で4濃度を設定した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下のいずれの処理群においても染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下では3-フェノキシトルエンは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

材料および方法

1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1994年8月、入手時:継代14代、凍結時:17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5代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(CS:GIBCO LABORATORIES, ロット番号:43N1140)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

$2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5%CO<sub>2</sub>)内で培養した。

連続処理法では、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、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mix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

3-フェノキシトルエン(CAS No.:3586-14-9, ロット番号:FAW01, 純度:99.0%, 関東化学(株)製造)は、分子量184.25の水に不溶な無色透明液体であり通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットについては試験期間中安定であることを確認した。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒はジメチルスルホキシド(DMSOと略す。関東化学(株), ロット番号:610E1229)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。

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、血球計算盤を用いて各群の生存細胞を数え、陰性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、3-フェノキシトルエンの約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、連続処理法の24時間および48時間処理ではそれぞれ176, 115  $\mu\text{g/ml}$ であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ147, 234  $\mu\text{g/ml}$ であった(Fig. 1)。

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最高濃度は、連続処理法の24時間処理と短時間処理法のS9 mix非存在下では400  $\mu\text{g/ml}$ 、連続処理法の48時間処理と短時間処理法のS9 mix存在下では200  $\mu\text{g/ml}$ とし、以下、それぞれ公比2で4濃度を設定した。

陽性対照として、連続処理法は、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:051AEG)を0.03  $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法は、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業(株), ロット番号:AX01)を20  $\mu\text{g/ml}$ を設定した。

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

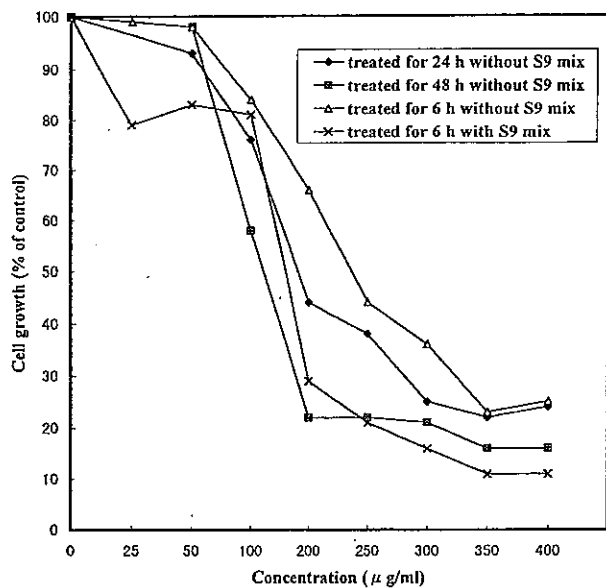


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 3-phenoxytoluene

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2枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で20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枚のディッシュから得られたスライドを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>1)</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(polyploid)の有無について観察した。また、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と測定

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。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

結果および考察

連続処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。3-フェノキシトルエンを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 2に示

した。3-フェノキシトルエンを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

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: 西富 保  
 試験担当者: 水野 文夫, 太田 絵律奈  
 中川 宗洋, 穴澤(岩井)由美子  
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
 〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Tamotsu Nishitomi (Study director)  
 Fumio Mizuno, Erina Ohta  
 Munehiro Nakagawa,  
 Yumiko Anazawa (Iwai)  
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
 Kashima Laboratory  
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
 Ibaraki, 314-02 Japan  
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with 3-phenoxytoluene without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2</sup> (%)	Judgement <sup>3</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent <sup>1</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
PT	50	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
	100	24	200	0	2	0	1	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0	-	-
	200	24	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	400	24	200	0	3	0	0	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0	-	-
MC	0.03	24	200	2	37	21	1	0	0	61	52 (26.0)	54 (27.0)	0.0	+	-
Solvent	0	48	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
PT	25	48	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	50	48	200	0	1	0	1	1	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0	-	-
	100	48	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	200	48	200	0	1	0	1	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	1.0	-	-
MC	0.03	48	200	1	41	40	0	0	0	82	69 (34.5)	70 (35.5)	0.0	+	-

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), -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, PT: 3-phenoxytoluene, MC: mitomycin C

1) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 3-phenoxytoluene with and without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2</sup> (%)	Judgement <sup>3</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent <sup>1</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	2	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-
PT	50	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
	100	-	6-(18)	200	0	0	0	0	2	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-
	200	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.5	-	-
	400	-	6-(18)	100	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.0	-	-
BP	20	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	1 (0.5)	0.0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
PT	25	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	50	+	6-(18)	200	2	0	0	0	0	0	2	0 (0.0)	2 (1.0)	0.5	-	-
	100	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.5	-	-
	200	+	6-(18)	200	0	0	2	1	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0	-	-
BP	20	+	6-(18)	200	0	69	142	1	0	0	212	146 (73.0)	146 (73.0)	0.0	+	-

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), -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, PT: 3-phenoxytoluene, BP: benzo[a]pyrene

1) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).



### 3-フェノキシトルエンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

## Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 3-Phenoxytoluene in Rats

### 要約

3-フェノキシトルエンは、農薬の原料や感圧複写紙用溶剤として用いられている<sup>1)</sup>。今回、既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、3-フェノキシトルエンを0, 4, 20, 100および500 mg/kgの用量でSD系ラットの雌雄に28日間反復経口投与し、その毒性について検討した。対照群, 100および500 mg/kg群については14日間回復群を設けた。

摂餌量の低値が500 mg/kg群の雌, 摂水量の高値が500 mg/kg群の雌雄で認められた。血液学検査では、活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮が500 mg/kg群の雄, 血小板数の低値が100および500 mg/kg群の雌で認められた。血液生化学検査では、アルブミンおよびA/G比の高値が500 mg/kg群の雌雄, 総コレステロール, トリグリセライド, 無機リンの低値が500 mg/kg群の雄, アルカリフォスファターゼおよび尿素窒素の高値とグルコースの低値が500 mg/kg群の雌で認められた。尿検査では、統計学的には有意ではないが明らかな尿量の増加が500 mg/kg群の雌雄で認められた。病理学検査では、肝臓の変化として絶対重量と相対重量の高値および小葉中心性の肝細胞肥大が500 mg/kg群の雌雄で認められた。これらの変化は、投与を止めることにより軽減ないし回復していた。雄の100 mg/kg群と雌の20 mg/kg群では被験物質投与に起因した変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下における3-フェノキシトルエンの無影響量は雄が100 mg/kg/day, 雌が20 mg/kg/dayであると判断した。

### 方法

#### 1. 被験物質

3-フェノキシトルエン(関東化学㈱, CAS No. 3586-14-9, Lot No. FAW01, 純度99.0%)は、沸点271~273℃, 水に不溶の無色透明液体である。本ロットは投与期間中安定であることが確認された。投与液は被験物質を0.1%Tween80水溶液に乳化させ調製し、冷蔵保存した。投与液中の被験物質は冷蔵保存条件下で8日間安定であり、使用した投与液にはほぼ所定量の被験物質が均一に含有されていることを確認した。

#### 2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より入手したSD系ラット

(Crj:CD, SPF)の雌雄を8日間検疫・馴化し、試験に使用した。投与開始前に体重別層化無作為抽出法により群分けした。1群の動物数は雌雄各6匹とし、対照群, 100および500 mg/kg群については雌雄各6匹の14日間回復群を設けた。投与開始時の週齢は5週齢, 体重範囲は雄が167~198 g, 雌が132~163 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中, 温度20~25℃, 湿度40~70%, 換気約12回/時, 照明12時間(7:00~19:00)に自動調節された飼育室を使用した。動物は、実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに1ケージあたり2匹で収容し飼育した。

動物には、実験動物用固型飼料(MF:オリエンタル酵母工業(株))および5 μmのフィルター濾過後, 紫外線照射した水道水を、それぞれ自由に摂取させた。

#### 3. 投与量および投与方法

被験物質を0, 100, 500および1000 mg/kgの各用量でSD系ラットに14日間反復経口投与した結果, 1000 mg/kg群では雌雄各1例が死亡し, 剖検で胃に出血が認められた。また, 500および1000 mg/kg群では投与後の流涎, 1000 mg/kg群の雌雄で自発運動量の減少, 500 mg/kg群の雌と1000 mg/kg群の雌雄で体重増加抑制, 500および1000 mg/kg群の雌雄で肝臓の絶対重量と相対重量の高値が認められた。従って, 本試験では高用量を500 mg/kgとし, 以下公比5で中間量を100および20 mg/kg, 低用量を4 mg/kgとした。被験物質は28日間毎日1回, 午前中に胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与液量は10 ml/kgとし, 至近測定日の体重を基に算出した。対照群には同様に溶媒を投与した。

#### 4. 観察および検査方法

##### 1) 一般状態, 体重, 摂餌量および摂水量

全例について一般状態を毎日観察した。体重, 摂餌量および摂水量は投与開始日およびその後週1回測定した。摂餌量と摂水量については, 各期間毎の1匹あたりの1日平均摂取量を算出した。

##### 2) 血液学検査

各計画殺時の全例について, チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採血し, 赤血球数(シースフローDCインピーダンス検出法), 白血球数(RF/DCインピーダンス検出法), 血小板数(シースフローDCインピーダンス検出法), ヘモグロビン濃度

(SLSヘモグロビン法), ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500: 東亜医用電子(株)), 白血球百分率(Wright 染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A: 立石電機(株)), 網状赤血球数(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網赤血球測定装置(R-2000: 東亜医用電子(株)), プロトロンビン時間(PT; Quick 一段法), 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT; 活性化セファロプラスチン法)を血液凝固自動測定装置(KC10A: アメルング社)により測定した。また, 検査の結果から平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球色素量(MCH), 平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。凝固阻止剤として, プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間測定には3.13%クエン酸ナトリウム水溶液を, それ以外の項目の測定にはEDTA-2Kを用いた。

### 3) 血液生化学検査

採取した血液の一部を約30分間静置した後, 3000 r.p.m.で10分間遠心分離し, 得られた血清を用いて GOT(SSCC改良法), GPT(SSCC改良法), ALP(GSCC改良法),  $\gamma$ -GTP(SSCC改良法), 尿素窒素(Urease-GLDH法), グルコース(GK-G6PDH法), 総コレステロール(CES-CO-POD法), トリグリセライド(LPL-GK-G3PO-POD法), クレアチニン(Jaffe法), 総蛋白(Biuret法), アルブミン(BCG法), A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出), カルシウム(O-CPC法), 無機リン(UV法), ナトリウム, カリウム, クロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(日立736-10形: (株)日立製作所)により測定した。

### 4) 尿検査

投与開始後26日および回復開始後12日に各群雌雄6匹の新鮮尿を採取して, pH, 潜血, 蛋白, 糖, ケトン体, ビリルビン, ウロビリノーゲン(試験紙法, マルティスティックス, マイルス・三共(株))を尿分析器(クリニテック100: マイルス・三共(株)), 尿量をメスシリンダー, 比重(屈折法)を尿比重計(ユリコン-S: (株)アタゴ社), ナトリウムおよびカリウム(炎光光度法)を全自動炎光光度計(FLAME-30C/AD-3: (株)日本分光メディカル), クロール(電量滴定法)をクロライドメーター(Model 925: コーニングメディカル(株))により測定した。

### 5) 病理学検査

全例について採血後に腹大動脈を切断して放血致死させ剖検した。剖検後, 全例の脳, 肝臓, 腎臓, 副腎, 胸腺, 脾臓, 精巣および卵巣の重量を測定した。また, 全例の上記器官に加え, 下垂体, 眼球, ハーダー腺, 肺, 胃, 甲状腺および上皮小体, 心臓, 膀胱, 骨髄(大腿骨)を採取し, 10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定, 保存した。ただし, 眼球およびハーダー腺はDavidson液で固定した。

投与期間終了時解剖動物の対照群および500 mg/kg群

の雌雄の心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 胃と両群の雌の骨髄(大腿骨)および全例の肉眼的異常部位を対象に, 常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し鏡検した。その結果, 肝臓に被験物質投与に起因すると考えられる変化が認められたため, 投与期間終了時解剖動物の他の群と回復期間終了時解剖動物の全例の肝臓を検査した。

### 6) 統計解析

計量データについては, Bartlett法による等分散の検定を行い, 分散が一樣の場合は一元配置分散分析を行った後, Dunnett法またはScheffé法により検定した。分散が一樣でない場合はKruskal-Wallisの検定を行い, Dunnett型またはScheffé型の順位和検定を行った。計数データおよび病理組織所見については, Armitageの $\chi^2$ 検定を行った。有意水準は5%未満とした。

## 結果

### 1. 一般状態

投与後の流涎が100 mg/kg群の雄で投与開始後8日以降, 雌で投与開始後12日以降, 500 mg/kg群の雄で投与開始後5日以降, 雌で投与開始後1日以降に発現した。また, 投与前の流涎が500 mg/kg群の雌2例で投与開始後25日に認められた。投与後の流涎は, 投与直後に発現する一過性的の変化であり, 投与前の流涎は動物の体に触れることにより発現した。回復期間中には, これらの変化は認められなかった。

### 2. 体重(Fig. 1)

全試験期間を通じて, いずれの投与群も対照群と同様の体重の推移を示した。

### 3. 摂餌量

摂餌量の低値が投与開始週および投与開始後3週に500 mg/kg群の雌で認められた。回復期間中には, 本変化は認められなかった。

### 4. 摂水量

摂水量の高値が500 mg/kg群の雄で投与開始後3週, 雌で投与開始後1~3週に認められた。回復期間中には, 本変化は認められなかった。

### 5. 血液学検査(Table 1)

投与期間終了時の検査で, 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の短縮が500 mg/kg群の雄, 血小板数の低値が100および500 mg/kg群の雌で認められた。回復期間終了時の検査では, これらの変化は認められなかった。

なお, 投与期間終了時の検査で血小板数の低値が20 mg/kg群の雄, プロトロンビン時間(PT)の延長が100 mg/kg群の雌で, また回復期間終了時の検査で網状赤血球数の高値が500 mg/kg群の雌で認められたが, いず

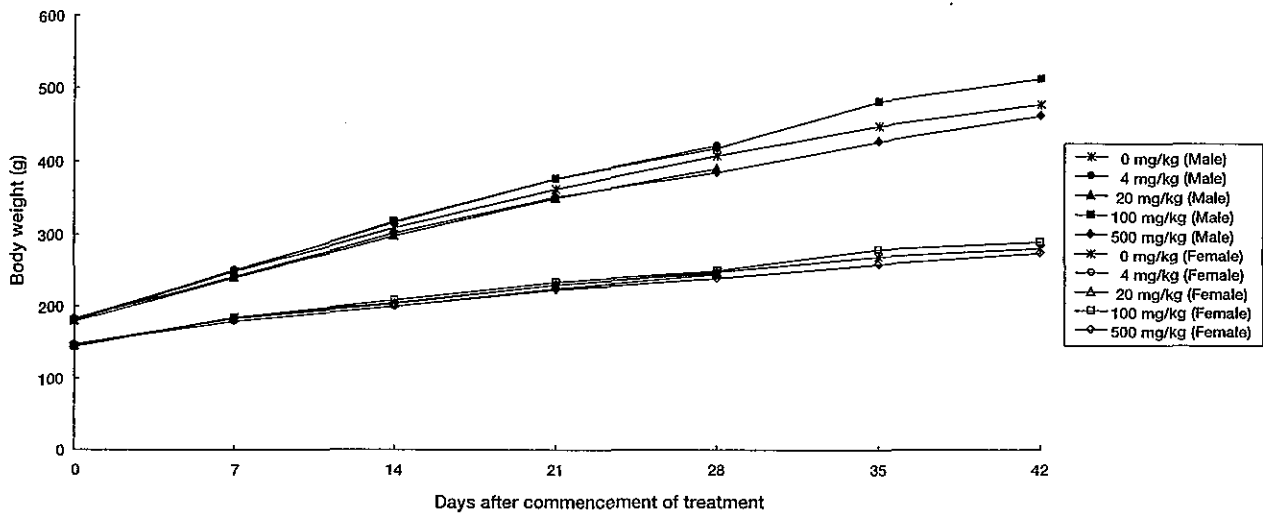


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with 3-phenoxytoluene in 28-day repeat dose toxicity test

れも軽微な変動であることやその発現状況から被験物質に起因した変化ではないと判断した。

#### 6. 血液生化学検査 (Table 2)

投与期間終了時の検査で、アルブミンおよびA/G比の高値が500 mg/kg群の雌雄、総コレステロール、トリグリセライドおよび無機リンの低値が500 mg/kg群の雄、アルカリフォスファターゼと尿素窒素の高値とグルコースの低値が500 mg/kg群の雌で認められた。回復期終了時の検査では、これらの変化は認められなかった。

なお、投与期間終了時の検査でクレアチニンの高値とカルシウムの低値が500 mg/kg群の雄、総コレステロールの低値が20 mg/kg群の雄、GOTの高値が4 mg/kg群の雄で、また回復期間終了時の検査で無機リンの高値が500 mg/kg群の雌で認められたが、いずれも軽微な変動であることやその発現状況から被験物質に起因した変化ではないと判断した。

#### 7. 尿検査 (Table 3)

投与期間中の検査で、統計的には有意でないが明らかな尿量の増加が500 mg/kg群の雌雄で認められた。回復期間中の検査では、500 mg/kg群の雌で尿量の増加傾向がみられたが、その程度は軽減していた。

なお、投与期間中の検査でケトン体の低値が500 mg/kg群の雄、蛋白の高値が4 mg/kg群の雄、ケトン体の高値が4および20 mg/kg群の雌で認められたが、いずれも軽微な変動であることやその発現状況から被験物質に起因した変化ではないと判断した。

#### 8. 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時の検査で、肝臓の絶対重量および相対重量の高値が500 mg/kg群の雌雄で認められた。回復期間終了時の検査では、肝臓の相対重量の高値が500 mg/kg群の雌で認められたが、その程度は軽減していた。

なお、回復期間終了時の検査で胸腺の相対重量の低値

が100 mg/kg群の雄で認められたが、その発現状況から被験物質に起因した変化ではないと判断した。

#### 9. 剖検所見 (Table 5)

投与期間終了時の検査で、肝臓の腫大が500 mg/kg群の雌雄各5例に認められた。回復期間終了時の検査では、本変化は認められなかった。

その他、被験物質投与群に種々の変化がみられたが、その発現状況からいずれも被験物質に起因した変化ではないと判断した。

#### 10. 病理組織所見 (Table 6)

投与期間終了時解剖動物の検査で、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が500 mg/kg群の雌雄全例に認められた。回復期間終了時解剖動物の検査では、本変化は認められなかった。

その他、被験物質投与群で種々の変化が認められたが、その発現状況からいずれも被験物質に起因した変化ではないと判断した。

### 考察

3-フェノキシトルエンを0, 4, 20, 100, 500 mg/kgの用量でSD系ラットの雌雄に28日間反復経口投与し、その毒性を検討した。

一般症状として、投与後の流涎が100および500 mg/kg群の雌雄、投与前の流涎が500 mg/kg群の雌で発現した。しかし、投与後の流涎は投与直後に発現する一過性的な変化であり、投与前の流涎は動物の体に触れることによって発現する条件反射的な変化であることや、これらの変化は投与をやめることにより発現しないことから、被験物質の味等に起因した変化であり、毒性学的意義はないと判断した。従って、本変化は無影響量の評価の対象からは除外した。

体重に変化はみられなかったが、摂餌量の低値が500 mg/kg群の雌で認められた。本変化は、投与を中止す

ことにより回復した。

摂水量の高値と統計的には有意ではないが明らかな尿の増加が500 mg/kg群の雌雄で認められた。しかし、肝臓には器質傷害性の変化がみられないことから、被験物質の利尿作用が示唆された。これらの変化は、投与を中止することにより回復あるいは軽減した。

血液学検査で、血小板数の低値が100および500 mg/kg群の雌で認められたが、骨髄や脾臓に血小板の産生低下や破壊亢進を示唆する変化は認められなかった。また、活性化部分トロンボプラスチン時間の短縮が500 mg/kg群の雄で認められた。これらの変化は投与を中止することにより回復した。

血液生化学検査で、アルブミンおよびA/G比の高値が500 mg/kg群の雌雄で認められた。同群では肝肥大が伴われていることから、肝臓での蛋白合成が亢進したことによるものと思われる。また、総コレステロールおよびトリグリセライドの低値が500 mg/kg群の雄で認められ、被験物質の脂質代謝への影響が示唆された。その他、尿量の増加に伴うと思われる無機リンの低値が500 mg/kg群の雄、摂餌量の低下に伴うと思われるグルコースの低値が500 mg/kg群の雌で認められた。また、アルカリフォスファターゼと尿素窒素の高値が500 mg/kg群の雌で認められたが、これらの変化に関連すると思われる肝臓あるいは腎臓の器質傷害性変化はみられなかった。これらの変化はいずれも投与を中止することにより回復した。

病理学検査では、肝臓の重量増加、腫大および小葉中心性の肝細胞肥大が500 mg/kg群の雌雄で認められた。小葉中心性の肝細胞肥大は、薬物代謝酵素誘導に伴って発現することが良く知られており、生体の適応現象と考えられている<sup>2)</sup>。これらの変化は投与を中止することにより回復した。

上記の試験結果から、本試験条件下における3-フェノキシトルエンの無影響量は、雄が100 mg/kg/day、雌が20 mg/kg/dayと結論した。

#### 文献

- 1) 化学工業日報社編, "新化学インデックス," 化学工業日報社, 東京, 1994, p 537.
- 2) C. Gopinath, D.E. Prentis and D.J. Lewis, "Atlas of Experimental Toxicological Pathology," eds. by C. Gopinath, D.E. Prentis, D.J. Lewis, MTP Press, Lancaster, 1987, pp.43-60.

#### 連絡先

試験責任者: 須藤雅人  
試験担当者: 大保真由美, 土谷 稔, 岡崎欣正,  
豊田直人, 高野克代, 井澤 修,  
鈴木美江

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

#### Correspondence

Authors: Masato Sudo (Study director)  
Mayumi Ohbo, Minoru Tsuchitani,  
Yoshimasa Okazaki, Naoto Toyota,  
Katsuyo Takano, Osamu Izawa,  
Yoshie Suzuki

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
Kashima Laboratory  
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
Ibaraki, 314-02 Japan  
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Hematology of rats treated orally with 3-phenoxytoluene in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Period Dose level (mg/kg)	28 Day				
		0	4	20	100	500
Male						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	718 $\pm$ 44.1	720 $\pm$ 22.4	732 $\pm$ 16.2	741 $\pm$ 32.9	707 $\pm$ 33.6
	Hematocrit (%)	43.2 $\pm$ 1.00	43.3 $\pm$ 1.04	44.0 $\pm$ 1.45	43.5 $\pm$ 1.85	42.5 $\pm$ 1.63
	Hemoglobin (g/dl)	14.8 $\pm$ 0.34	14.7 $\pm$ 0.39	15.0 $\pm$ 0.42	15.0 $\pm$ 0.51	14.8 $\pm$ 0.54
	Reticulocyte (%)	34 $\pm$ 4.7	34 $\pm$ 3.4	33 $\pm$ 3.2	30 $\pm$ 3.7	34 $\pm$ 2.8
	MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	60.3 $\pm$ 2.48	60.3 $\pm$ 0.56	60.2 $\pm$ 1.55	58.7 $\pm$ 2.31	60.1 $\pm$ 1.24
	MCH (pg)	20.7 $\pm$ 1.05	20.5 $\pm$ 0.58	20.5 $\pm$ 0.49	20.3 $\pm$ 1.24	21.0 $\pm$ 0.39
	MCHC (%)	34.3 $\pm$ 0.63	34.0 $\pm$ 0.89	34.1 $\pm$ 0.33	34.6 $\pm$ 1.17	34.9 $\pm$ 0.46
	Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	113.5 $\pm$ 8.40	110.8 $\pm$ 5.05	99.4 $\pm$ 7.05*	108.5 $\pm$ 8.09	103.0 $\pm$ 9.36
	PT (sec)	13.7 $\pm$ 0.23	13.9 $\pm$ 0.51	14.1 $\pm$ 0.54	13.5 $\pm$ 0.30	13.9 $\pm$ 0.34
	APTT (sec)	19.0 $\pm$ 0.48	18.1 $\pm$ 0.27	18.0 $\pm$ 0.71	19.0 $\pm$ 1.71	17.3 $\pm$ 1.33*
	WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	124 $\pm$ 15.7	146 $\pm$ 36.7	120 $\pm$ 35.1	152 $\pm$ 33.4	149 $\pm$ 48.8
	Differential leukocyte counts (%)					
	Lymphocytes	88 $\pm$ 3.1	89 $\pm$ 3.7	90 $\pm$ 4.6	90 $\pm$ 4.3	84 $\pm$ 9.7
	Neutrophils					
	segmented	6 $\pm$ 2.9	6 $\pm$ 4.0	6 $\pm$ 3.5	4 $\pm$ 2.2	11 $\pm$ 10.8
	band	0 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.4
	Eosinophils	0 $\pm$ 0.4	1 $\pm$ 1.0	0 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 0.8
	Basophils	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
	Monocytes	6 $\pm$ 1.8	5 $\pm$ 4.7	4 $\pm$ 3.2	6 $\pm$ 4.7	4 $\pm$ 2.5
Female						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	RBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	698 $\pm$ 28.9	688 $\pm$ 10.2	702 $\pm$ 12.3	693 $\pm$ 28.3	686 $\pm$ 17.8
	Hematocrit (%)	41.0 $\pm$ 0.81	40.5 $\pm$ 1.14	41.6 $\pm$ 0.59	41.1 $\pm$ 1.08	40.7 $\pm$ 1.08
	Hemoglobin (g/dl)	14.1 $\pm$ 0.37	14.1 $\pm$ 0.47	14.5 $\pm$ 0.21	14.6 $\pm$ 0.45	14.3 $\pm$ 0.36
	Reticulocyte (%)	26 $\pm$ 3.3	26 $\pm$ 2.1	22 $\pm$ 3.5	25 $\pm$ 3.9	22 $\pm$ 4.2
	MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	58.7 $\pm$ 2.04	58.9 $\pm$ 1.79	59.2 $\pm$ 0.69	59.4 $\pm$ 1.82	59.3 $\pm$ 1.57
	MCH (pg)	20.3 $\pm$ 0.83	20.5 $\pm$ 0.77	20.6 $\pm$ 0.20	21.0 $\pm$ 0.50	20.8 $\pm$ 0.69
	MCHC (%)	34.5 $\pm$ 0.51	34.8 $\pm$ 0.36	34.8 $\pm$ 0.55	35.4 $\pm$ 0.54	35.0 $\pm$ 0.65
	Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	101.4 $\pm$ 8.99	91.4 $\pm$ 5.92	93.5 $\pm$ 8.89	89.1 $\pm$ 8.91*	82.0 $\pm$ 5.47**
	PT (sec)	14.6 $\pm$ 0.35	14.8 $\pm$ 0.57	14.9 $\pm$ 0.33	15.5 $\pm$ 0.71*	15.0 $\pm$ 0.31
	APTT (sec)	17.6 $\pm$ 1.30	17.0 $\pm$ 1.00	17.6 $\pm$ 1.14	16.4 $\pm$ 1.33	15.7 $\pm$ 1.93
	WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	98 $\pm$ 27.9	97 $\pm$ 17.2	89 $\pm$ 26.2	100 $\pm$ 31.2	121 $\pm$ 37.9
	Differential leukocyte counts (%)					
	Lymphocytes	85 $\pm$ 6.0	90 $\pm$ 5.4	87 $\pm$ 6.7	86 $\pm$ 5.5	92 $\pm$ 2.9
	Neutrophils					
	segmented	10 $\pm$ 5.1	4 $\pm$ 2.7	9 $\pm$ 5.5	8 $\pm$ 5.2	4 $\pm$ 2.8
	band	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.5
	Eosinophils	1 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 0.8	1 $\pm$ 2.0	1 $\pm$ 0.8	1 $\pm$ 0.5
	Basophils	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
	Monocytes	5 $\pm$ 1.6	6 $\pm$ 3.7	3 $\pm$ 1.8	5 $\pm$ 1.6	4 $\pm$ 2.9

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$ .

Table 1 (Continued)

Sex	Period Dose level (mg/kg)	Recovery		
		0	100	500
Male				
	Number of animals	6	6	6
	RBC ( $\times 10^4/\mu l$ )	772 $\pm$ 55.9	772 $\pm$ 34.5	753 $\pm$ 32.6
	Hematocrit (%)	44.6 $\pm$ 2.37	44.3 $\pm$ 0.89	43.9 $\pm$ 1.40
	Hemoglobin (g/dl)	15.4 $\pm$ 0.74	15.3 $\pm$ 0.38	15.1 $\pm$ 0.46
	Reticulocyte (%)	29 $\pm$ 1.4	26 $\pm$ 3.2	29 $\pm$ 3.4
	MCV ( $\mu m^3$ )	57.8 $\pm$ 1.26	57.4 $\pm$ 1.70	58.4 $\pm$ 2.88
	MCH (pg)	20.0 $\pm$ 0.51	19.9 $\pm$ 0.55	20.0 $\pm$ 0.99
	MCHC (%)	34.6 $\pm$ 0.31	34.6 $\pm$ 0.36	34.3 $\pm$ 0.28
	Platelet ( $\times 10^4/\mu l$ )	108.3 $\pm$ 11.40	103.1 $\pm$ 7.10	106.4 $\pm$ 6.98
	PT (sec)	12.8 $\pm$ 0.48	13.0 $\pm$ 0.37	12.7 $\pm$ 0.33
	APTT (sec)	18.7 $\pm$ 1.12	18.6 $\pm$ 1.23	18.5 $\pm$ 0.72
	WBC ( $\times 10^2/mm^3$ )	134 $\pm$ 35.8	127 $\pm$ 24.8	126 $\pm$ 6.7
	Differential leukocyte counts (%)			
	Lymphocytes	85 $\pm$ 4.0	89 $\pm$ 5.2	89 $\pm$ 4.1
	Neutrophils			
	segmented	7 $\pm$ 5.9	5 $\pm$ 2.4	8 $\pm$ 2.9
	band	0 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.0
	Eosinophils	1 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 0.8	1 $\pm$ 1.6
	Basophils	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
	Monocytes	8 $\pm$ 4.9	6 $\pm$ 4.8	2 $\pm$ 1.0
Female				
	Number of animals	6	6	6
	RBC ( $\times 10^4/\mu l$ )	737 $\pm$ 27.0	752 $\pm$ 19.7	721 $\pm$ 39.2
	Hematocrit (%)	41.9 $\pm$ 0.75	42.8 $\pm$ 0.96	41.3 $\pm$ 1.74
	Hemoglobin (g/dl)	14.6 $\pm$ 0.25	14.9 $\pm$ 0.27	14.4 $\pm$ 0.53
	Reticulocyte (%)	22 $\pm$ 2.6	26 $\pm$ 3.7	27 $\pm$ 2.9*
	MCV ( $\mu m^3$ )	56.9 $\pm$ 1.77	56.9 $\pm$ 1.04	57.3 $\pm$ 1.54
	MCH (pg)	19.8 $\pm$ 0.65	19.8 $\pm$ 0.48	20.0 $\pm$ 0.55
	MCHC (%)	34.9 $\pm$ 0.23	34.8 $\pm$ 0.40	34.9 $\pm$ 0.26
	Platelet ( $\times 10^4/\mu l$ )	85.2 $\pm$ 11.73	88.8 $\pm$ 5.38	93.0 $\pm$ 10.79
	PT (sec)	13.6 $\pm$ 0.26	13.7 $\pm$ 0.46	13.5 $\pm$ 0.33
	APTT (sec)	17.5 $\pm$ 1.78	16.6 $\pm$ 1.89	16.5 $\pm$ 2.23
	WBC ( $\times 10^2/mm^3$ )	89 $\pm$ 31.7	83 $\pm$ 24.1	95 $\pm$ 15.9
	Differential leukocyte counts (%)			
	Lymphocytes	86 $\pm$ 4.6	87 $\pm$ 6.7	89 $\pm$ 3.1
	Neutrophils			
	segmented	8 $\pm$ 3.4	7 $\pm$ 3.4	5 $\pm$ 3.7
	band	0 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0.0
	Eosinophils	1 $\pm$ 1.2	1 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 1.8
	Basophils	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
	Monocytes	5 $\pm$ 2.9	6 $\pm$ 4.2	6 $\pm$ 3.1

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$ .

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

Sex	Period	28 Day				
	Dose level (mg/kg)	0	4	20	100	500
Male						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	GOT (IU/l)	84 ± 13.5	111 ± 18.9*	86 ± 15.3	88 ± 7.1	102 ± 13.9
	GPT (IU/l)	27 ± 4.0	31 ± 6.3	29 ± 4.9	30 ± 3.7	36 ± 6.1
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	ALP (IU/l)	582 ± 65.0	597 ± 159.9	491 ± 143.5	589 ± 107.2	678 ± 150.0
	Urea nitrogen (mg/dl)	17.1 ± 1.06	17.9 ± 1.58	15.7 ± 1.34	16.2 ± 1.26	18.5 ± 2.10
	Creatinine (mg/dl)	0.4 ± 0.04	0.5 ± 0.05	0.4 ± 0.04	0.4 ± 0.04	0.5 ± 0.04*
	Glucose (mg/dl)	155 ± 16.3	152 ± 11.3	148 ± 10.9	152 ± 10.7	143 ± 17.7
	Total chol. (mg/dl)	70 ± 10.8	60 ± 12.9	55 ± 4.4*	66 ± 10.8	48 ± 6.4**
	Triglyceride (mg/dl)	159 ± 69.4	149 ± 65.8	150 ± 35.3	143 ± 61.4	70 ± 16.0**
	Total protein (g/dl)	6.55 ± 0.165	6.61 ± 0.157	6.43 ± 0.188	6.70 ± 0.243	6.70 ± 0.175
	Albumin (g/dl)	3.67 ± 0.046	3.68 ± 0.047	3.64 ± 0.126	3.80 ± 0.093	3.99 ± 0.106**
	A/G ratio	1.28 ± 0.064	1.26 ± 0.047	1.31 ± 0.023	1.32 ± 0.054	1.48 ± 0.079**
	Calcium (mg/dl)	9.7 ± 0.23	9.6 ± 0.29	9.5 ± 0.21	9.7 ± 0.18	9.5 ± 0.05*
	Inorganic phos. (mg/dl)	9.6 ± 0.46	9.5 ± 0.31	8.9 ± 0.62	8.9 ± 0.21	8.6 ± 0.50**
	Na (mEq/l)	143 ± 0.8	143 ± 0.5	143 ± 1.2	143 ± 0.9	144 ± 0.8
	K (mEq/l)	4.5 ± 0.09	4.6 ± 0.14	4.5 ± 0.21	4.5 ± 0.27	4.4 ± 0.19
	Cl (mEq/l)	98 ± 1.2	99 ± 1.8	100 ± 1.4	99 ± 1.2	100 ± 0.8
Female						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	GOT (IU/l)	80 ± 11.3	100 ± 17.8	94 ± 13.4	87 ± 21.3	90 ± 16.8
	GPT (IU/l)	23 ± 3.1	23 ± 3.9	24 ± 3.8	25 ± 6.3	29 ± 5.5
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.4	0 ± 0.0	0 ± 0.5	0 ± 0.4	1 ± 0.8
	ALP (IU/l)	390 ± 77.8	371 ± 48.3	330 ± 160.8	375 ± 124.1	553 ± 64.4*
	Urea nitrogen (mg/dl)	16.9 ± 2.90	16.1 ± 2.83	16.3 ± 1.52	15.3 ± 3.64	22.3 ± 4.37*
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.00	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.06
	Glucose (mg/dl)	158 ± 6.0	159 ± 12.4	156 ± 7.6	147 ± 9.8	128 ± 5.1**
	Total chol. (mg/dl)	65 ± 9.1	67 ± 5.9	67 ± 10.7	61 ± 5.4	58 ± 7.7
	Triglyceride (mg/dl)	42 ± 13.6	45 ± 22.7	55 ± 21.5	44 ± 14.3	37 ± 3.3
	Total protein (g/dl)	6.61 ± 0.137	6.58 ± 0.087	6.78 ± 0.174	6.68 ± 0.134	6.68 ± 0.217
	Albumin (g/dl)	3.87 ± 0.063	3.78 ± 0.098	3.92 ± 0.141	3.97 ± 0.115	4.08 ± 0.092**
	A/G ratio	1.42 ± 0.034	1.35 ± 0.083	1.37 ± 0.054	1.47 ± 0.075	1.58 ± 0.069**
	Calcium (mg/dl)	9.4 ± 0.23	9.4 ± 0.20	9.4 ± 0.31	9.4 ± 0.24	9.4 ± 0.28
	Inorganic phos. (mg/dl)	8.1 ± 0.57	8.3 ± 0.43	8.3 ± 0.65	8.3 ± 0.51	8.0 ± 0.63
	Na (mEq/l)	142 ± 0.4	143 ± 1.0	143 ± 0.6	143 ± 1.1	144 ± 1.2
	K (mEq/l)	4.0 ± 0.24	4.1 ± 0.21	4.2 ± 0.28	4.2 ± 0.28	4.1 ± 0.23
	Cl (mEq/l)	101 ± 0.5	101 ± 1.0	101 ± 1.5	101 ± 1.9	102 ± 0.5

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, \* ;P<0.05, \*\* ;P<0.01.

Table 2 (Continued)

Sex	Period Dose level (mg/kg)	Recovery		
		0	100	500
Male				
	Number of animals	6	6	6
	GOT (IU/l)	105 ± 22.8	91 ± 21.0	94 ± 22.3
	GPT (IU/l)	31 ± 5.3	27 ± 1.3	30 ± 3.1
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	ALP (IU/l)	468 ± 117.8	426 ± 45.2	562 ± 209.6
	Urea nitrogen (mg/dl)	16.8 ± 3.08	16.3 ± 1.83	18.2 ± 2.06
	Creatinine (mg/dl)	0.4 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.4 ± 0.05
	Glucose (mg/dl)	164 ± 13.8	158 ± 9.3	160 ± 10.4
	Total chol. (mg/dl)	61 ± 6.5	69 ± 10.0	57 ± 5.3
	Triglyceride (mg/dl)	173 ± 106.4	217 ± 59.6	143 ± 42.2
	Total protein (g/dl)	6.83 ± 0.289	7.03 ± 0.310	6.89 ± 0.255
	Albumin (g/dl)	3.66 ± 0.123	3.72 ± 0.139	3.76 ± 0.133
	A/G ratio	1.16 ± 0.053	1.13 ± 0.051	1.20 ± 0.044
	Calcium (mg/dl)	9.6 ± 0.17	9.8 ± 0.23	9.7 ± 0.21
	Inorganic phos. (mg/dl)	8.6 ± 0.48	8.9 ± 0.49	8.6 ± 0.28
	Na (mEq/l)	143 ± 1.0	143 ± 0.8	144 ± 0.8
	K (mEq/l)	4.3 ± 0.25	4.6 ± 0.32	4.5 ± 0.09
	Cl (mEq/l)	99 ± 0.8	99 ± 1.2	99 ± 1.4
Female				
	Number of animals	6	6	6
	GOT (IU/l)	89 ± 11.4	80 ± 16.1	84 ± 16.9
	GPT (IU/l)	26 ± 4.5	25 ± 3.5	26 ± 3.3
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	ALP (IU/l)	279 ± 62.4	300 ± 75.3	359 ± 159.5
	Urea nitrogen (mg/dl)	18.5 ± 1.29	17.0 ± 3.50	17.0 ± 2.07
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.04
	Glucose (mg/dl)	152 ± 7.8	156 ± 6.9	159 ± 12.2
	Total chol. (mg/dl)	61 ± 24.3	72 ± 8.2	73 ± 9.2
	Triglyceride (mg/dl)	70 ± 20.5	55 ± 14.9	56 ± 25.2
	Total protein (g/dl)	7.20 ± 0.174	7.00 ± 0.444	7.14 ± 0.359
	Albumin (g/dl)	4.05 ± 0.174	3.90 ± 0.218	3.95 ± 0.151
	A/G ratio	1.28 ± 0.067	1.26 ± 0.050	1.24 ± 0.060
	Calcium (mg/dl)	9.5 ± 0.20	9.4 ± 0.32	9.8 ± 0.27
	Inorganic phos. (mg/dl)	7.6 ± 0.44	7.5 ± 0.57	8.5 ± 0.74*
	Na (mEq/l)	142 ± 0.9	141 ± 1.0	143 ± 1.2
	K (mEq/l)	3.9 ± 0.08	4.1 ± 0.29	4.1 ± 0.16
	Cl (mEq/l)	100 ± 1.3	100 ± 1.0	101 ± 1.2

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*; P < 0.05, \*\*; P < 0.01.



Table 3 Urinalysis of rats treated orally with 3-phenoxytoluene in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Period Dose level (mg/kg)	28 Day					Recovery		
		0	4	20	100	500	0	100	500
Male									
	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
	Protein (mg/dl)		*						
	-	0	0	0	0	0	0	0	0
	TR	1	0	2	0	3	0	0	0
	30	3	0	1	3	2	3	2	4
	100	2	6	3	3	1	3	4	2
	>300	0	0	0	0	0	0	0	0
						*			
	-	0	0	1	0	2	0	0	0
	5	4	1	3	3	4	3	1	3
	15	2	5	2	3	0	3	5	3
	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	>80	0	0	0	0	0	0	0	0
	Volume (ml/day)	18.7± 3.62	21.7± 6.20	18.3± 3.54	20.9± 2.48	31.7± 17.22	21.7± 4.87	22.4± 4.02	21.7± 13.82
Female									
	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
	Protein (mg/dl)								
	-	6	4	4	4	6	5	3	4
	TR	0	2	2	0	0	1	3	2
	30	0	0	0	1	0	0	0	0
	100	0	0	0	1	0	0	0	0
	>300	0	0	0	0	0	0	0	0
			*	*					
	-	6	3	2	4	6	5	4	5
	5	0	3	4	2	0	1	2	1
	15	0	0	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	0	0
	>80	0	0	0	0	0	0	0	0
	Volume (ml/day)	15.7± 4.05	9.5± 2.92	13.4± 4.36	15.1± 5.67	42.0± 21.48	15.2± 3.33	16.8± 2.72	26.3± 19.93

-, Negative; TR, Trace ;1+, Slight;2+, Moderate;3+, Severe.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*, P<0.05; \*\*, P<0.01.

Table 4 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 3-phenoxytoluene in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level	28 Day				
		0mg/kg	4mg/kg	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg
<b>Male</b>						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	Final body weight	411 ± 30.1	422 ± 45.0	389 ± 33.7	404 ± 24.0	385 ± 25.0
	Absolute organ weight					
	Brain (g)	2.03 ± 0.064	2.06 ± 0.069	1.99 ± 0.049	1.97 ± 0.084	2.04 ± 0.081
	Thymus (mg)	647 ± 94.8	820 ± 147.4	593 ± 180.3	674 ± 71.0	576 ± 71.7
	Liver (g)	17.54 ± 2.095	16.63 ± 2.827	15.10 ± 2.096	17.04 ± 2.344	22.43 ± 2.256**
	Kidneys (g)	3.02 ± 0.134	2.91 ± 0.224	2.83 ± 0.294	2.93 ± 0.283	2.98 ± 0.375
	Adrenals (mg)	53.6 ± 5.38	56.9 ± 8.40	56.9 ± 8.40	53.7 ± 8.01	51.7 ± 4.52
	Spleen (g)	0.90 ± 0.084	0.87 ± 0.111	0.87 ± 0.111	0.87 ± 0.141	0.81 ± 0.111
	Testes (g)	3.07 ± 0.132	3.06 ± 0.121	3.06 ± 0.121	3.15 ± 0.207	3.15 ± 0.200
	Relative organ weight					
	Brain	0.50 ± 0.032	0.49 ± 0.047	0.52 ± 0.045	0.49 ± 0.035	0.53 ± 0.018
	Thymus (×10 <sup>-3</sup> )	158 ± 19.3	197 ± 40.5	153 ± 49.8	167 ± 14.2	150 ± 22.5
	Liver	4.26 ± 0.226	3.92 ± 0.269	3.87 ± 0.220	4.21 ± 0.351	5.82 ± 0.265**
	Kidneys	0.74 ± 0.056	0.69 ± 0.056	0.73 ± 0.050	0.73 ± 0.047	0.77 ± 0.082
	Adrenals (×10 <sup>-3</sup> )	13.1 ± 1.91	13.5 ± 1.21	14.7 ± 1.62	13.4 ± 2.40	13.4 ± 0.67
	Spleen	0.22 ± 0.012	0.21 ± 0.015	0.20 ± 0.020	0.21 ± 0.030	0.21 ± 0.026
	Testes	0.75 ± 0.083	0.73 ± 0.071	0.80 ± 0.080	0.79 ± 0.077	0.82 ± 0.074
<b>Female</b>						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	Final body weight	252 ± 26.8	245 ± 21.0	245 ± 13.6	246 ± 18.0	243 ± 10.6
	Absolute organ weight					
	Brain (g)	1.89 ± 0.048	1.90 ± 0.074	1.92 ± 0.044	1.87 ± 0.020	1.90 ± 0.062
	Thymus (mg)	522 ± 67.8	487 ± 93.2	462 ± 33.2	487 ± 87.0	489 ± 96.8
	Liver (g)	9.46 ± 1.236	9.33 ± 0.976	9.43 ± 0.872	10.04 ± 1.246	14.17 ± 1.100**
	Kidneys (g)	1.91 ± 0.260	1.89 ± 0.218	1.89 ± 0.170	1.86 ± 0.058	1.92 ± 0.125
	Adrenals (mg)	77.8 ± 9.59	70.9 ± 9.33	71.9 ± 5.11	73.4 ± 5.28	64.2 ± 10.53
	Spleen (g)	0.57 ± 0.047	0.63 ± 0.099	0.61 ± 0.078	0.57 ± 0.118	0.60 ± 0.096
	Ovaries (mg)	106.2 ± 18.75	104.3 ± 23.79	103.9 ± 18.37	95.9 ± 4.32	83.5 ± 11.40
	Relative organ weight					
	Brain	0.75 ± 0.069	0.78 ± 0.097	0.79 ± 0.042	0.77 ± 0.061	0.78 ± 0.029
	Thymus (×10 <sup>-3</sup> )	210 ± 43.9	199 ± 35.8	189 ± 13.5	199 ± 33.9	201 ± 36.3
	Liver	3.75 ± 0.106	3.80 ± 0.165	3.84 ± 0.211	4.07 ± 0.262	5.83 ± 0.303**
	Kidneys	0.76 ± 0.045	0.77 ± 0.057	0.77 ± 0.053	0.76 ± 0.047	0.79 ± 0.067
	Adrenals (×10 <sup>-3</sup> )	30.9 ± 2.40	29.0 ± 3.39	29.3 ± 1.94	30.0 ± 3.01	26.3 ± 3.26
	Spleen	0.23 ± 0.024	0.26 ± 0.023	0.25 ± 0.033	0.23 ± 0.040	0.25 ± 0.038
	Ovaries (×10 <sup>-3</sup> )	42.1 ± 5.76	42.4 ± 7.77	42.2 ± 6.11	39.3 ± 4.71	34.4 ± 4.59

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*, P<0.05; \*\*, P<0.01.

Table 4 (Continued)

Sex	Period Dose level	Recovery		
		0mg/kg	100mg/kg	500mg/kg
Male				
	Number of animals	6	6	6
	Final body weight	479 ± 50.1	513 ± 28.2	462 ± 70.8
	Absolute organ weight			
	Brain (g)	2.13 ± 0.111	2.15 ± 0.045	2.11 ± 0.065
	Thymus (mg)	654 ± 158.4	577 ± 44.5	666 ± 123.0
	Liver (g)	18.78 ± 3.458	21.38 ± 2.121	18.70 ± 4.872
	Kidneys (g)	3.28 ± 0.203	3.65 ± 0.363	3.27 ± 0.540
	Adrenals (mg)	64.7 ± 5.07	61.6 ± 6.36	58.0 ± 5.87
	Spleen (g)	0.96 ± 0.113	1.00 ± 0.132	0.88 ± 0.138
	Testes (g)	3.26 ± 0.157	3.19 ± 0.362	3.33 ± 0.375
	Relative organ weight			
	Brain	0.45 ± 0.031	0.42 ± 0.029	0.46 ± 0.056
	Thymus (×10 <sup>-3</sup> )	136 ± 22.1	113 ± 6.4*	144 ± 15.7
	Liver	3.90 ± 0.371	4.16 ± 0.256	4.00 ± 0.418
	Kidneys	0.69 ± 0.050	0.71 ± 0.066	0.71 ± 0.021
	Adrenals (×10 <sup>-3</sup> )	13.7 ± 1.75	12.1 ± 1.81	12.8 ± 2.27
	Spleen	0.20 ± 0.018	0.20 ± 0.029	0.19 ± 0.023
	Testes	0.69 ± 0.063	0.62 ± 0.078	0.73 ± 0.101
Female				
	Number of animals	6	6	6
	Final body weight	283 ± 18.9	290 ± 19.3	276 ± 12.3
	Absolute organ weight			
	Brain (mg)	1.97 ± 0.051	1.95 ± 0.103	1.99 ± 0.063
	Thymus (mg)	456 ± 108.1	418 ± 72.2	500 ± 51.7
	Liver (g)	9.72 ± 0.857	10.30 ± 0.652	10.74 ± 0.473
	Kidneys (g)	1.98 ± 0.128	1.94 ± 0.162	1.90 ± 0.021
	Adrenals (mg)	77.4 ± 7.91	73.7 ± 11.16	74.7 ± 9.28
	Spleen (g)	0.61 ± 0.127	0.61 ± 0.093	0.63 ± 0.076
	Ovaries (mg)	99.6 ± 18.72	100.5 ± 11.60	94.0 ± 11.76
	Relative organ weight			
	Brain	0.70 ± 0.063	0.68 ± 0.015	0.72 ± 0.034
	Thymus (×10 <sup>-3</sup> )	161 ± 38.1	144 ± 18.0	181 ± 15.1
	Liver	3.43 ± 0.170	3.56 ± 0.185	3.89 ± 0.083**
	Kidneys	0.70 ± 0.024	0.67 ± 0.039	0.69 ± 0.026
	Adrenals (×10 <sup>-3</sup> )	27.5 ± 4.02	25.4 ± 3.28	27.1 ± 3.30
	Spleen	0.22 ± 0.042	0.21 ± 0.023	0.23 ± 0.023
	Ovaries (×10 <sup>-3</sup> )	35.1 ± 5.62	34.7 ± 3.07	34.2 ± 4.72

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*, P<0.05; \*\*, P<0.01.

Table 5 Summary of gross findings of rats treated orally with 3-phenoxytoluene in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Period	28day					Recovery			
		Dose level (mg/kg)		0	4	20	100	500	0	100
Organ findings	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Male	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Thymus										
Thymic remnant in neck		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Spleen										
Enlargement, lymph follicle		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Lung										
Brown patch		1	1	2	0	2	0	0	0	0
Liver										
Enlargement		0	0	0	0	5	0	0	0	0
Kidney										
Dilatation, pelvis		0	0	0	0	0	0	0	0	2
Female	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Thymus										
Thymic remnant in neck		0	0	0	0	0	1	0	0	0
Lung										
Brown patch		0	0	2	1	0	0	0	0	0
Liver										
Enlargement		0	0	0	0	5	0	0	0	0
Hepatodiaphragmatic nodule		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Kidney										
Dilatation, pelvis		0	0	1	0	0	0	0	0	0
Ovary										
Cyst		0	1	0	0	1	0	0	0	0
Uterus										
Distention		0	0	1	0	0	0	0	0	0

Table 6 Summary of histopathological findings of rats treated orally with 3-phenoxytoluene in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Period	28day					Recovery			
		Dose level (mg/kg)		0	4	20	100	500	0	100
Organ findings	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Male	(Grade)									
Liver										
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	total	0	0	0	0	6**	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Inflammatory cell infiltration, focal	total	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1+	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Microgranuloma	total	2	0	3	2	3	2	1	1	1
	1+	2	0	3	2	3	2	1	1	1
Necrosis, focal	total	0	1	0	0	1	0	0	0	0
	1+	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Female	(Grade)									
Liver										
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	total	0	0	0	0	6**	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Microgranuloma	total	2	2	2	1	2	3	3	3	3
	1+	2	2	2	1	2	3	3	3	3

1+, Slight; 2+, Moderate; 3+, Severe.

Significantly different from 0 mg/kg group, \*, P&lt;0.05; \*\*, P&lt;0.01.

# チモールの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of Thymol on Bacteria

### 要約

OECD既存化学物質安全性調査事業の一環として、チモールについて、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50.0~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で行ったところ、すべての検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験とともに抗菌性が認められた。したがって、本試験ではS9 mix無添加試験を15.6~500  $\mu\text{g}$ /プレート、S9 mix添加試験を62.5~2000  $\mu\text{g}$ /プレート(TA1535およびTA1537は31.3~1000  $\mu\text{g}$ /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、すべての検定菌で500  $\mu\text{g}$ /プレート以上、また、S9 mix添加試験では、1000  $\mu\text{g}$ /プレート(TA1535およびTA1537では500  $\mu\text{g}$ /プレート)以上の用量で認められた。復帰変異コロニー数は、用いたすべての検定菌について、2回の本試験とともに、いずれの用量においても、2回の本試験とともに増加は認められなかったことから、チモールは、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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>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]

チモール(CAS No. 89-83-8)は、分子量150.22の白色結晶である。試験には、和光純薬工業(株)製[ロット番号: CAN1119, 純度98%以上(不純物: 不揮発物0.05%以下および他のフェノール類を限度内含有)]のものを購入して、使用時まで室温で保管して用いた。

チモールは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解性が良いことから、DMSOに20.0 mg/mlまたは50.0 mg/mlになるように溶解した後、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、チモールの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、本試験Iで調製した低濃度(156  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )溶液および高濃度(20.0 mg/ml)溶液について、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101および102%であった。また、含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、それぞれ低濃度は95.7%、高濃度は97.5%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。

小試験管中にトップアガー 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℃ 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〕

50.0 ~ 5000 μg/プレート の範囲で公比を約 3 とし、試験を実施したところ、S9 mix 無添加試験では 5 菌株すべてにおいて、500 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 TA1535 と TA1537 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。チモールの用量を、S9 mix 無添加試験では 15.6 ~ 500 μg/プレート, S9 mix 添加試験では 62.5 ~ 2000 μg/プレート (TA1535 および TA1537 は 31.3 ~ 1000 μg/プレート) の範囲で公比を 2 とし設定し、試験を実施した。

2 回の試験のいずれにおいても、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、チモールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの (陰性) と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *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,  
 清水ゆり, 松木容彦, 中込まどか,  
 飯田さやか  
 (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, Yuri Shimizu,  
 Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi,  
 Sayaka Iida  
 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. Mutagenicity of thymol\*\* 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	137 132 121 (130 $\pm$ 8.2)	11 19 24 (18 $\pm$ 6.6)	21 23 26 (23 $\pm$ 2.5)	28 35 36 (33 $\pm$ 4.4)	13 9 8 (10 $\pm$ 2.6)	
	15.6	140 132 128 (33 $\pm$ 6.1)	18 11 15 (15 $\pm$ 3.5)	21 24 12 (19 $\pm$ 6.2)	32 41 30 (34 $\pm$ 5.9)	6 8 9 (8 $\pm$ 1.5)	
	31.3	151 124 126 (134 $\pm$ 15.0)	22 16 18 (19 $\pm$ 3.1)	26 21 14 (20 $\pm$ 6.0)	30 30 35 (32 $\pm$ 2.9)	11 15 7 (11 $\pm$ 4.0)	
	62.5	125 129 125 (126 $\pm$ 2.3)	18 15 15 (16 $\pm$ 1.7)	19 12 11 (14 $\pm$ 4.4)	23 22 39 (28 $\pm$ 9.5)	6 10 10 (9 $\pm$ 2.3)	
	125	100 113 121 (111 $\pm$ 10.6)	17 16 19 (17 $\pm$ 1.5)	11 22 12 (15 $\pm$ 6.1)	29 26 27 (27 $\pm$ 1.5)	7 6 14 (9 $\pm$ 4.4)	
	250	106 100 118 (108 $\pm$ 9.2)	7 15 8 (10 $\pm$ 4.4)	16 9 7 (11 $\pm$ 4.7)	32 26 31 (30 $\pm$ 3.2)	5* 8* 5* (6 $\pm$ 1.7)	
	500	93* 79* 86* (86 $\pm$ 7.0)	4* 0* 2* (2 $\pm$ 2.0)	4* 12* 13* (10 $\pm$ 4.9)	14* 18* 16* (16 $\pm$ 2.0)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	
S9mix (+)	0	111 134 144 (130 $\pm$ 16.9)	11 19 13 (14 $\pm$ 4.2)	30 18 23 (24 $\pm$ 6.0)	39 34 37 (37 $\pm$ 2.5)	11 7 17 (12 $\pm$ 5.0)	
	31.3	ND	17 19 16 (17 $\pm$ 1.5)	ND	ND	5 14 9 (9 $\pm$ 4.5)	
	62.5	147 124 122 (131 $\pm$ 13.9)	13 25 20 (19 $\pm$ 6.0)	30 30 29 (30 $\pm$ 0.6)	36 43 48 (42 $\pm$ 6.0)	14 13 11 (13 $\pm$ 1.5)	
	125	133 128 122 (128 $\pm$ 5.5)	24 15 12 (17 $\pm$ 6.2)	16 27 31 (25 $\pm$ 7.8)	39 38 38 (38 $\pm$ 0.6)	12 9 5 (9 $\pm$ 3.5)	
	250	147 137 155 (146 $\pm$ 9.0)	15 10 7 (11 $\pm$ 4.0)	16 24 19 (20 $\pm$ 4.0)	42 45 39 (42 $\pm$ 3.0)	10 8 9 (9 $\pm$ 1.0)	
	500	117 110 127 (118 $\pm$ 8.5)	11* 8* 9* (9 $\pm$ 1.5)	31 18 14 (21 $\pm$ 8.9)	32 31 34 (32 $\pm$ 1.5)	11* 8* 8* (9 $\pm$ 1.7)	
	1000	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	14* 1* 7* (7 $\pm$ 6.5)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	
	2000	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)		0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	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	602 611 596 (603 $\pm$ 7.5)	147 120 145 (137 $\pm$ 15.0)	108 121 101 (110 $\pm$ 10.1)	800 744 777 (774 $\pm$ 28.1)	814 760 635 (736 $\pm$ 91.8)	
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	1234 1347 1501 (1361 $\pm$ 134.0)	278 249 236 (254 $\pm$ 21.5)	1166 1335 1277 (1259 $\pm$ 85.9)	456 476 462 (465 $\pm$ 10.3)	184 264 259 (236 $\pm$ 44.8)	

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 98% and fixed compounds and other phenols were contained as impurity.

ND : Not done

Table 2. Mutagenicity of thymol\*\* in reverse mutation test ( II ) on bacteria

With (+) or without (-) S9mix	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	
S9mix (-)	0	127 135 160 (141 $\pm$ 17.2)	13 14 8 (12 $\pm$ 3.2)	20 24 17 (20 $\pm$ 3.5)	27 13 30 (23 $\pm$ 9.1)	9 16 10 (12 $\pm$ 3.8)						
	15.6	110 108 114 (111 $\pm$ 3.1)	5 10 11 (9 $\pm$ 3.2)	23 29 20 (24 $\pm$ 4.6)	26 26 30 (27 $\pm$ 2.3)	5 11 11 (9 $\pm$ 3.5)						
	31.3	120 112 120 (117 $\pm$ 4.6)	15 10 11 (12 $\pm$ 2.6)	18 19 22 (20 $\pm$ 2.1)	26 22 21 (23 $\pm$ 2.6)	14 7 7 (9 $\pm$ 4.0)						
	62.5	125 125 112 (121 $\pm$ 7.5)	8 12 14 (11 $\pm$ 3.1)	25 19 15 (20 $\pm$ 5.0)	30 27 27 (28 $\pm$ 1.7)	13 5 9 (9 $\pm$ 4.0)						
	125	142 137 105 (128 $\pm$ 20.1)	13 13 17 (14 $\pm$ 2.3)	15 27 10 (17 $\pm$ 8.7)	22 21 19 (21 $\pm$ 1.5)	8 7 9 (8 $\pm$ 1.0)						
	250	106 106 100 (104 $\pm$ 3.5)	10 11 13 (11 $\pm$ 1.5)	15 15 18 (16 $\pm$ 1.7)	17 33 22 (24 $\pm$ 8.2)	5 4 5 (5 $\pm$ 0.6)						
	500	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	4* 0* 0* (1 $\pm$ 2.3)	14* 0* 4* (6 $\pm$ 7.2)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)						
S9mix (+)	0	131 150 134 (138 $\pm$ 10.2)	16 11 13 (13 $\pm$ 2.5)	23 22 20 (22 $\pm$ 1.5)	31 29 31 (30 $\pm$ 1.2)	13 13 13 (13 $\pm$ 0.0)						
	31.3	ND	12 20 16 (16 $\pm$ 4.0)	ND	ND	18 18 20 (19 $\pm$ 1.2)						
	62.5	148 138 167 (151 $\pm$ 14.7)	18 23 15 (19 $\pm$ 4.0)	19 27 24 (23 $\pm$ 4.0)	36 37 42 (38 $\pm$ 3.2)	15 13 14 (14 $\pm$ 1.0)						
	125	147 118 115 (127 $\pm$ 17.7)	8 19 19 (15 $\pm$ 6.4)	28 26 22 (25 $\pm$ 3.1)	31 40 56 (42 $\pm$ 12.7)	13 18 15 (15 $\pm$ 2.5)						
	250	156 140 126 (141 $\pm$ 15.0)	13 11 16 (13 $\pm$ 2.5)	28 23 17 (23 $\pm$ 5.5)	41 54 48 (48 $\pm$ 6.5)	18 15 8 (14 $\pm$ 5.1)						
	500	84 114 135 (111 $\pm$ 25.6)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	29 21 23 (24 $\pm$ 4.2)	11 20 16 (16 $\pm$ 4.5)	0* 6* 0* (2 $\pm$ 3.5)						
	1000	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	16* 13* 12* (14 $\pm$ 2.1)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)						
	2000	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)		0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	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	665 691 678 (678 $\pm$ 13.0)	294 315 320 (310 $\pm$ 13.8)	153 146 142 (147 $\pm$ 5.6)	878 865 935 (893 $\pm$ 37.2)	1270 1518 1580 (1456 $\pm$ 164.0)						
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	916 943 1176 (1012 $\pm$ 143.0)	265 268 313 (282 $\pm$ 26.9)	1423 1378 1280 (1360 $\pm$ 73.1)	270 324 303 (299 $\pm$ 27.2)	241 265 253 (253 $\pm$ 12.0)						

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 above 98% and fixed compounds and other phenols were contained as impurity.

ND : Not done



チモールの  
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  
Thymol 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、チモール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)、短時間処理(6時間)ともに50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.08 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時間および48時間連続処理した高濃度群(0.08 mg/ml)では、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix 非存在下で6時間処理した高濃度群(0.08 mg/ml)において細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix 存在下では、高濃度群(0.08 mg/ml)において、観察した細胞の5.5%に染色体異常が認められた。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。

以上の結果より、チモールは、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(水製薬株)培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10<sup>4</sup>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℃のCO<sub>2</sub>インキ

ュベーター(5% CO<sub>2</sub>)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

チモール(略号:TM, CAS No.: 89-83-8, ロット番号:CAN1119, 和光純薬工業(株)製造)は、白色結晶で、水にやや溶け、エタノール、クロロホルム、ベンゼン、酢酸に易溶であり、融点51.5℃、沸点233.5℃、分子式C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O、分子量150.22、純度98%以上(不純物として不揮発物0.05%以下、他のフェノール類(含量未定)含む)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、156.3 μg/ml~20.0 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、0.08 mg/mlであった(Fig. 1)。短時間処理のS9 mix 存在下および非存在下における50%の増殖濃度を明らかに越える濃度は、ともに0.07 mg/mlであった(Fig. 2)。なお、S9 mix 存在下において、高濃度になると増殖率の上昇が認められたが、これはディッシュの底面にS9もしくは被

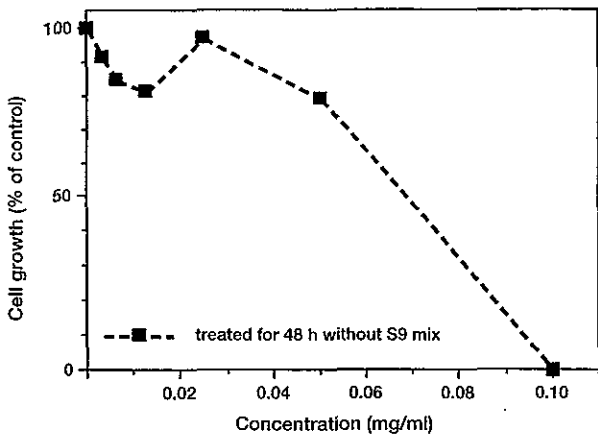


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells continuously treated with thymol

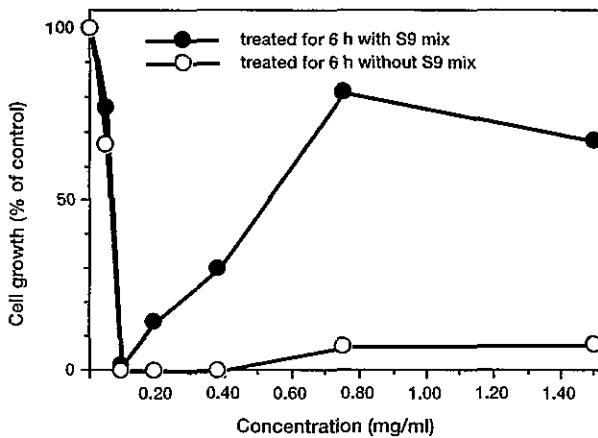


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with thymol

験物質と思われる沈殿が付着したためと考えられた。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果、50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度は、いずれも近似していることから、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、短時間処理とも0.08 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<sup>1)</sup>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、陰性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<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>(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<sup>4)</sup>(p<0.05)を行った。原則として以上2回の検定でも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。チモールを加えて24時間および48時間連続処理した高濃度群(0.08 mg/ml)では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。チモールを加えてS9 mix非存在下で6時間処理した高濃度群(0.08 mg/ml)では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下では、高濃度群(0.08 mg/ml)において観察した細胞の5.5%(gapを含む)に染色体の構造異常が認められ、陽性の結果が得られた。また、いずれの処理群でも、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、チモールは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に弱いながら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 thymol (TM)\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13		
TM	0.020	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38		
TM	0.040	24	200	2	0	1	0	0	0	3	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.00	NT	NT
TM	0.080	24	15 <sup>T</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00 <sup>6)T</sup>		
MC	0.00005	24	200	3	29	61	0	4	0	97	0	72 (36.0)	70 (35.0)	0.00		
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38		
TM	0.020	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
TM	0.040	48	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.63	NT	NT
TM	0.080	48	0 <sup>T</sup>											T		
MC	0.00005	48	200	4	31	59	0	1	20	115	5	60 (30.0)	57 (28.5)	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.), 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, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 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  $p < 0.05$  when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test. 6) Forty cells were analysed. \*: Purity was more than 98.0%, and unvolatile materials ( $\leq 0.05\%$ ) and other kinds of phenol ( $\leq 1.95\%$ ) were contained as impurities.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with thymol (TM)\*\* with and without S9 mix.

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	1	0	0	0	1	0	2	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13			
TM	0.020	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38			
TM	0.040	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	10	11	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00	NT	NT	
TM	0.080	-	6-(18)	77 <sup>T</sup>	1	1	2	0	0	0	4	4 (5.2)	3 (3.9)	0.58 <sup>6)T</sup>			
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	1	1	0	1	0	0	3	3 (1.5)	2 (1.0)	0.25			
TM	0.020	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13			
TM	0.040	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	+	NT	
TM	0.080	+	6-(18)	200	1	5	7	0	2	0	15	11*(5.5)	10 (5.0)	0.75			
CPA	0.005	+	6-(18)	200	10	193	272	1	1	360	837	176 (88.0)	175 (87.5)	0.00			

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), 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, NT: not tested, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 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) One hundred and seventy-three cells were analysed. \*: Significantly different from historical solvent control data with respect to TAG and polyploid at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\*: Purity was more than 98.0%, and unvolatile materials ( $\leq 0.05\%$ ) and other kinds of phenol ( $\leq 1.95\%$ ) were contained as impurities.

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, 日下部博一, 橋本恵子,  
長尾哲二, 太田 亮  
(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, Hirokazu Kusakabe,  
Keiko Hashimoto, Tetsuji Nagao,  
Ryo Ohta  
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

# チモールのマウスを用いる小核試験

## Micronucleus Test of Thymol on Mice

### 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、チモールの生体内における細胞遺伝学的影響を評価するために、Crj:BDF<sub>1</sub>雄および雌マウスを用い、強制経口投与による小核試験を、毒性予備試験および小核予備試験を行い、投与量および標本作製時期を設定した後、小核本試験を実施し、陰性の結果を得た。

毒性予備試験を行った結果、雄および雌マウスにおける最大耐量は、それぞれ2000 mg/kgおよび1250 mg/kgであった。小核予備試験において、2000、1750および1500 mg/kgを雄マウスに投与したところ、いずれの場合にも、死亡例が観察されたため、1250 mg/kgを雄および雌マウスに投与し、投与後24、48および72時間に骨髓の塗抹標本を作製した。小核出現頻度は、24時間群と他の群との間に明瞭な差は認められなかった。また、赤血球中に占める幼若赤血球の比率を指標とした骨髓細胞の増殖抑制も、認められなかった。これらの結果から、雄雌ともに小核本試験でのチモールの最高用量を1250 mg/kgとし、標本作製時期を投与後24時間に決定した。

チモールの312.5、625および1250 mg/kgを雄および雌マウスにそれぞれ投与し、投与後24時間目に標本を作製した。小核出現頻度はいずれの投与群においても、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、用量依存性も認められなかった。また、全赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、いずれの投与群においても、溶媒対照群との間に有意差は認められず、被験物質が標的細胞を充分暴露した証拠は得られなかった。しかし、高用量に近い用量で致死となっていることから、充分評価に耐える試験結果であると考えられる。

以上の結果から、チモールは、本試験条件下でCrj:BDF<sub>1</sub>雄および雌マウスの骨髓細胞において、小核誘発作用を示さないと結論した。

### 方法

#### 1. 実験動物および飼育条件

実験には、日本チャールス・リバー(株)(CRJ)から購入した8週齢のCrj:BDF<sub>1</sub>(C57BL/6とDBA/2の近交系間F<sub>1</sub>)雄および雌マウスを、1週間以上予備飼育した後、異常の認められなかった動物を9週齢で試験に供した。

動物は、床敷としてホワイト・フレーク®(CRJ)を入れたTPX樹脂製ケージ(CRJ)に1匹ずつ収容し、バリアシステムの飼育室(設定温度:23±1℃、設定湿

度:55±5%、換気回数:約15回/時間、明暗サイクル:午前7時点灯、午後7時消灯)で、マウス繁殖用固型飼料(NMF)と水道水を自由に摂取させて飼育した。動物の群分けは自由群分け(無作為抽出)により行った。

#### 2. 被験物質

チモール(CAS. No. 89-83-8, ロット番号:CAN1119, 和光純薬(株)製造)は、白色結晶で、融点51.5℃、沸点233.5℃、分子式C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O、分子量150.22、純度98%以上(不純物として、不揮発物0.05%以下、他のフェノール類を限度内含む)の物質である。被験物質は、室温に保存した。

#### 3. 検体の調製と投与方法

検体の投与容量はマウス体重kg当り10 mlとした。投与検体は所要量を正確に採取し、局方オリブ油に懸濁して最高用量の原液を調製した。それ以下の用量については、最高用量の調製液を上記の溶媒で希釈して所定の濃度に調製した。また、投与検体はすべて用時調製とし、単回強制経口投与した。

試験に先立ち、156.3 mg/kg群および1250 mg/kgの投与検体について室温遮光条件下でチモールの局方オリブ油中での安定性を調べた。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、103および96.6%であった。また、同検体について、含量測定試験を行った。その結果、156.3 mg/kg群および1250 mg/kgの投与検体について、含量はそれぞれ99.1および105%であった。

また、陽性対照物質、サイクロフォスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、局方生理食塩液に溶解して所定の濃度に調製し、50 mg/kgを単回強制経口投与した。

#### 4. 標本の作製

小核の観察のための骨髓標本は、Schmidの方法<sup>1,2)</sup>に従って作製した。すなわち、投与後所定の時間に頸椎脱臼法によりマウスを致死させて左右の大腿骨を摘出した。その両骨端を切断して、骨髓細胞を0.6 mlのウシ胎児血清(Hazleton)で洗い出し、遠沈管に集め、1000 rpmで5分間遠心分離して、上清を除いた。沈渣をピペティング後、細胞浮遊液の一部をスライドガラス上に塗抹(各個体につき3枚の標本)し、それぞれの骨髓標本に試験系識別番号および暗番号を記し、室温で一晩自然乾燥させた。乾燥した骨髓標本は5分間メタノールで固定し、標本観察時まで室温保存した。

### 5. 骨髓標本のアクリジンオレンジ(A.O.) 蛍光染色および小核試験の観察

骨髓標本のアクリジンオレンジ(A.O.) 蛍光染色および小核の観察は、林らの方法<sup>3,4)</sup>に従って行った。0.04 mg/mlのA.O.溶液を上記のメタノールで固定済の骨髓標本上に数滴滴下し、カバーガラスをかけ、カバーガラス上から濾紙で余分な溶液を十分吸い取り、蛍光顕微鏡下で観察した。

骨髓標本はそれぞれの個体について、2名の観察者によりブラインド法で観察した。1個体あたり2000個の幼若赤血球(polychromatic erythrocytes)を観察し、その中の小核を有するものの数を記録した。また赤血球を1個体あたり500個観察し、その中の幼若赤血球の比率を調べて、骨髓細胞の増殖抑制の指標とした。

### 6. 有意差検定

それぞれの小核出現頻度について、Fisherの正確確率検定法<sup>5)</sup>により、溶媒対照群と、各検体投与群および陽性対照群との間で5%水準で有意差検定を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して、Bonferroniの補正<sup>6)</sup>を行った。更に、小核出現頻度の用量(対数値)依存性についてCochran-Armitageの傾向検定<sup>7)</sup>を5%水準で行った。また、赤血球中に占める幼若赤血球の比率について、それぞれ溶媒対照群と、各検体投与群および陽性対照群との間で、t検定を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して、Bonferroniの補正を行った。

### 7. 毒性予備試験(投与用量の決定)

小核試験に用いるチモールの投与量を決定するために、雄雌ともに各群5匹からなる7群を設け、投与量をそれぞれ、500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750および2000 mg/kgとした。投与当日を0日として4日間にわたり毎日一般状態を観察し、死亡の有無を調べた。

その結果、投与直後、すべての投与群において自発運動の低下が認められ、用量の増加とともに、よろめき歩行、腹臥、呼吸促迫などの毒性徴候が現れた。死亡例は、雄では認められず、雌では1500および1750 mg/kg群で各2匹確認された。したがって、チモールの強制経口投与によるCrj:BDF<sub>1</sub>雄および雌マウスの最大耐量は、雄では2000 mg/kg、雌では1250 mg/kgであると判断し、それぞれを小核予備試験に用いる投与用量とした。

### 8. 小核予備試験(標本作製時期の決定)

雄マウスに、チモールの2000 mg/kgを投与したところ、15匹中7匹の死亡例が観察された。そこで雄マウスについて、さらに用量を下げて小核予備試験を実施したところ、1750mg/kg群で15匹中2匹、1500 mg/kg群で15匹中1匹の死亡が認められた。したがって小核予備試験において、雄、雌ともに同用量の1250 mg/kgを用いることとなったため、標本観察は雄マウスについてのみ行うこととした。雄マウス各5匹ずつからなる3群(24時間群、48時間群および72時間群)を設けた。

### 9. 小核本試験

小核予備試験において、雄雌いずれの投与群においても、小核の誘発および骨髓増殖抑制が観察されなかったため、小核本試験に用いる高用量を雄雌ともに1250 mg/kgとし、これをもとに公比2で減じ、中用量を625 mg/kg、低用量を312.5 mg/kgとした。また、高用量で、死亡が認められた場合にそなえて、低用量の1/2量の156.3 mg/kg群も用意し、溶媒対照群、陽性対照群を含めて雄雌それぞれ計6群を設定した。各群5匹の動物を無作為に割り当てた。標本作製時期は小核予備試験の結果に基づき、雄雌ともに投与後24時間とした。

### 結果および考察

雄および雌の小核本試験の結果をそれぞれTable 1および2に示す。雄雌ともに溶媒対照群と陽性対照群の小核出現頻度は、それぞれの過去5年間の背景データのばらつきの範囲内(平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差)であった。Fisherの正確確率検定法(Bonferroniの補正)による有意差検定の結果、小核出現頻度はチモールのいずれの投与群においても、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。さらに、Cochran-Armitageの傾向検定の結果においても、用量に依存した有意な増加傾向は認められなかった。一方、CPAを50 mg/kg投与した陽性対照群での小核出現頻度は、5%水準で有意な増加がみられた。また、全赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、いずれの投与群においても、溶媒対照群との間に有意差は認められず、被験物質が標的細胞を充分暴露した証拠は得られなかった。しかし、高用量に近い用量で致死となっていることから、充分評価に耐える試験結果であると考えられる。

以上の結果から、チモールは、本試験条件下でCrj:BDF<sub>1</sub>雄および雌マウスの骨髓細胞において、小核誘発作用を示さないと結論した。

Table 1. Results of micronucleus test in BDF<sub>1</sub> male mice after single administration of thymol by gavage

Group	Animal No.	MNPCE / PCE <sup>a)</sup>	PCE / ERY <sup>b)</sup>
Solvent control Olive oil 10 ml/kg	1	2 / 2000	261 / 500
	2	3 / 2000	261 / 500
	3	4 / 2000	174 / 500
	4	0 / 2000	232 / 500
	5	3 / 2000	286 / 500
	Total % (Mean ± S.D.)	12 / 10000 ( 0.12 ± 0.08 )	1214 / 2500 ( 48.6 ± 8.6 )
TM 312.5 mg/kg	11	5 / 2000	238 / 500
	12	3 / 2000	293 / 500
	13	1 / 2000	272 / 500
	14	5 / 2000	311 / 500
	15	6 / 2000	279 / 500
	Total % (Mean ± S.D.)	20 / 10000 ( 0.20 ± 0.10 )	1393 / 2500 ( 55.7 ± 5.4 )
TM 625 mg/kg	16	3 / 2000	152 / 500
	17	1 / 2000	263 / 500
	18	1 / 2000	207 / 500
	19	8 / 2000	306 / 500
	20	6 / 2000	276 / 500
	Total % (Mean ± S.D.)	19 / 10000 ( 0.19 ± 0.16 )	1204 / 2500 ( 48.2 ± 12.3 )
TM 1250 mg/kg	21	1 / 2000	228 / 500
	22	3 / 2000	198 / 500
	23	3 / 2000	308 / 500
	24	1 / 2000	319 / 500
	25	7 / 2000	287 / 500
	Total % (Mean ± S.D.)	15 / 10000 ( 0.15 ± 0.12 )	1340 / 2500 ( 53.6 ± 10.5 )
Positive control CPA 50 mg/kg	26	27 / 2000	179 / 500
	27	17 / 2000	164 / 500
	28	22 / 2000	201 / 500
	29	51 / 2000	298 / 500
	30	40 / 2000	299 / 500
	Total % (Mean ± S.D.)	157 / 10000 ( 1.57 ± 0.70 )***	1141 / 2500 ( 45.6 ± 13.1 )

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes/total number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes/total number of erythrocytes observed

TM: thymol (purity was above 98% and fixed compounds and other phenol were contained as impurity), CPA: Cyclophosphamide

\*\*\*: Data significantly different from the solvent control at 0.1 % level

Table2. Results of micronucleus test in BDF<sub>1</sub> female mice after single administration of thymol by gavage

Group	Animal No.	MNPCE / PCE <sup>a)</sup>	PCE / ERY <sup>b)</sup>
Solvent control Olive oil 10 ml/kg	51	7 / 2000	293 / 500
	52	4 / 2000	297 / 500
	53	0 / 2000	347 / 500
	54	5 / 2000	337 / 500
	55	1 / 2000	322 / 500
	Total	17 / 10000	1596 / 2500
	%(Mean ± S.D.)	( 0.17 ± 0.14 )	( 63.8 ± 4.8 )
TM 312.5 mg/kg	61	5 / 2000	242 / 500
	62	2 / 2000	302 / 500
	63	3 / 2000	302 / 500
	64	3 / 2000	352 / 500
	65	1 / 2000	318 / 500
	Total	14 / 10000	1516 / 2500
	%(Mean ± S.D.)	( 0.14 ± 0.07 )	( 60.6 ± 8.0 )
TM 625 mg/kg	66	3 / 2000	341 / 500
	67	1 / 2000	304 / 500
	68	3 / 2000	306 / 500
	69	2 / 2000	335 / 500
	70	6 / 2000	283 / 500
	Total	15 / 10000	1569 / 2500
	%(Mean ± S.D.)	( 0.15 ± 0.09 )	( 62.8 ± 4.8 )
TM 1250 mg/kg	71	2 / 2000	347 / 500
	72	3 / 2000	355 / 500
	73	1 / 2000	304 / 500
	74	3 / 2000	342 / 500
	75	2 / 2000	256 / 500
	Total	11 / 10000	1604 / 2500
	%(Mean ± S.D.)	( 0.11 ± 0.04 )	( 64.2 ± 8.2 )
Positive control CPA 50 mg/kg	76	28 / 2000	306 / 500
	77	31 / 2000	272 / 500
	78	31 / 2000	225 / 500
	79	17 / 2000	275 / 500
	80	36 / 2000	294 / 500
	Total	143 / 10000	1372 / 2500
	%(Mean ± S.D.)	( 1.43 ± 0.35 )***	( 54.9 ± 6.2 )

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes/total number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes/total number of erythrocytes observed

TM: thymol (purity was above 98% and fixed compounds and phenol were contained as impurity), CPA: Cyclophosphamide

\*\*\*: Data significantly different from the solvent control at 0.1 % level



## 文献

- 1) W. Schmid, *Mutat. Res.*, 31, 9, (1975).
- 2) W. Schmid, "Chemical Mutagens," Vol. 4. ed. by A. Hollender, Plenum Press, New York, London, 1976, pp. 76-78.
- 3) M. Hayashi, T. Sofuni, M. Ishidate, Jr., *Mutat. Res.*, 120, 241, (1983)
- 4) 林 真, "小核試験," サイエнтиスト社, 東京, 1991, pp. 44-55.
- 5) 吉村 功 編, "毒性・薬効データの統計解析," サイエнтиスト社, 東京, 1987, pp. 76-78.
- 6) 吉村 功, 大橋靖雄 責任編集, "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.18-222.
- 7) 吉村 功 編, "毒性・薬効データの統計解析," サイエнтиスト社, 東京, 1987, pp. 67-69.

## 連絡先

試験責任者: 澁谷 徹

試験担当者: 堀谷尚古, 加藤恵基, 原 巧,  
関野早苗, 松木容彦, 飯田さやか,  
中込まどか

## Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)

Naoko Horiya, Motoe Katoh, Takumi

Hara, Sanae Sekino, Yasuhiko Matsuki,

Sayaka Iida, 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

無断転載・複製（コピー）を禁ず

# チモール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

## Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of Thymol by Oral Administration in Rats

### 要約

チモールを8, 40および200 mg/kg/dayの用量でSD系ラット(Crj:CD)に交配前14日から交配を経て雄は計43日間, 雌は妊娠, 分娩を経て哺育3日まで経口投与し, 反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

#### 1. 反復投与毒性

200 mg/kg群において, 雄で体重増加抑制の傾向および死亡が1例, 雌で投与後の一過性の自発運動減少および歩行失調が認められた。病理組織検査では, 雌雄とも前胃に粘膜上皮の増生, 炎症性細胞の浸潤, 水腫など被験物質の刺激性を示唆する変化が認められた。また, 雌の一部で胸腺の退縮, 副腎束状帯の脂肪滴増加が認められた。

40 mg/kg群においても, 雌雄の胃および雌の胸腺に病理組織変化が認められた。摂餌量, 器官重量, 雄の血液学検査および血液生化学検査においては被験物質に起因する変化は認められなかった。

#### 2. 生殖発生毒性

親動物の検査において, 性周期, 交尾率, 受胎率, 妊娠期間, 黄体数, 着床数, 着床率, 出産率, 分娩率, 分娩および哺育行動には被験物質に起因する変化は認められなかった。

新生児の検査において, 200 mg/kg群で低体重および体重増加抑制の傾向が認められた。出産児数, 出生産児数, 性比, 出生率, 4日生存率, 外表, 一般状態および剖検においては被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果より, チモールの反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも8 mg/kg/day, 生殖発生毒性に関する無影響量は, 親動物に対して雌雄とも200 mg/kg/day, 児動物に対しては40 mg/kg/dayと考えられる。

### 方法

#### 1. 被験物質

チモール(和光純薬工業(株), Lot No.CAN1119, 純度99.6%)は, 融点50.4℃, 水酢酸, エタノール, エーテルに易容, 水には難溶, 光に対して不安定の白色結晶性の塊である。被験物質は室温・密閉・遮光下で保管した。また, 試験期間中安定であったことが製造者により確認

された。

#### 2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より入手した雌雄のSD系ラット(Crj:CD)を6日間検疫・馴化後, 試験に供した。投与開始前日に体重別層化無作為抽出法により, 1群につき雌雄各10匹を振り分けた。投与開始時の週齢は雌雄とも8週齢, 体重範囲は雄が333~371 g, 雌が193~221 gであった。

検疫・馴化を含めた全飼育期間中, 温度20~25℃, 湿度40~70%, 換気約12回/時, 照明12時間/日(7:00~19:00)に自動調節された飼育室を使用した。動物は実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに, 1ケージあたり投与開始後は1匹, 交配期間中は雌雄各1匹, 哺育期間は1腹で収容し, 飼育した。

動物には, オートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1:オリエンタル酵母工業(株))および5 μmのフィルターで濾過後, 紫外線照射した水道水をそれぞれ自由摂取させた。

#### 3. 投与量および投与方法

SD系ラットを用いて, 被験物質を30, 100および300 mg/kgの用量で雌雄とも交配前13日から4日間の交配を経て, 雄は計17日間, 雌は交尾確認後7~9日間投与した結果, 300 mg/kg群で自発運動減少, 歩行失調, 腹這い, 呼吸緩徐, 眼瞼下垂, 流涎などの投与後症状および体重減少が認められた。100 mg/kg群では流涎が散見されたのみで明瞭な変化は認められなかった。以上の結果から, 本試験では高用量を200 mg/kgとし, 以下公比5で中用量を40 mg/kg, 低用量を8 mg/kgとした。この他に媒体のみを投与する対照群を設けた。

投与期間は, 雌雄とも交配前14日間, 交配期間中, および雄は剖検前日までの計43日間, 雌は交尾後分娩を経て哺育3日までとし, 3%アラビアゴム水溶液に懸濁させた被験物質を胃ゾンデを用いて1日1回, 午前中に強制経口投与した。投与液量は5 ml/kgとし, 至近測定日の体重を基に算出した。

投与液の調製はイエローランプ照明下で行い, 投与に供するまで冷蔵・遮光下で保存した。投与液中の被験物質は本保存条件下で安定であること, 使用した投与液にはほぼ所定量の被験物質が均一に含有されていることを確認した。

4. 反復投与毒性に関する観察・検査

1) 一般状態

全例について生死、外観・行動等を投与前および投与後に毎日観察した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。

2) 体重および摂餌量

体重は、雄については投与開始日およびその後週1回、雌については投与開始日および交尾するまでは週1回、交尾後は妊娠0, 7, 14, 20日および哺育0, 4日に測定した(交尾確認日を妊娠0日, 分娩確認日を哺育0日とする)。また、体重増加量を交配前は投与開始日, 妊娠期間は妊娠0日, 哺育期間は哺育0日の体重を基準に算出した。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定した。

3) 雄の血液学検査

雄の全生存動物について、解剖日の前日より約21時間絶食させ、チオペンタールナトリウム(ラボナル: 田辺製薬株)の腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採取した血液の一部をEDTA-2Kにより凝固阻止し、赤血球数(シースフローDCインピーダンス検出法)、白血球数(RF/DCインピーダンス検出法)、血小板数(シースフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度(SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500: 東亜医用電子株)、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A: 立石電機株)、網状赤血球数(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網状赤血球測定装置(R-2000: 東亜医用電子株)により測定した。また、検査結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。

4) 雄の血液生化学検査

雄の全生存動物について、解剖日に採取した血液を室温で約30分間放置した後、3000 r.p.m.(2050G)で10分間遠心分離し、得られた血清について、GOT(SSCC改良法)、GPT(SSCC改良法)、ALP(GSCC改良法)、 $\gamma$ -GTP(SSCC改良法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、グルコース(GK-G6PDH法)、総コレステロール(CES-CO-POD法)、トリグリセライド(LPL-GK-G3PO-POD法)、クレアチニン(Jaffé法)、総ビリルビン(Jendrassik改良法)、総蛋白(Biuret法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出)、カルシウム(O-CPC法)、無機リン(UV法)、ナトリウム、カリウム、クロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(日立736-10形:株日立製作所)により測定した。

5) 病理検査

雌雄とも最終投与日の翌日に、全生存動物についてチオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈切断により放血致死させ剖検し、下垂体、胸腺、

肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体および前立腺の重量を測定した。また、これらの器官に加えて、脳、心臓、脾臓および卵巣を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巣および精巣上体はプアン液)にて固定後保存した。

病理組織検査は対照および200 mg/kg群の雌雄の脳、下垂体、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、前立腺および剖検で変化が認められた雌の胸腺について、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、鏡検した。その結果、雌の胸腺および副腎において被験物質の影響が疑われたので雌の8および40 mg/kg群のこれらの器官について検査した。また、雄の剖検時に被験物質による肉眼的変化が胃に認められたので、各群全例の雄の胃を検査するとともに、雌についても対照、8, 40および200 mg/kg群の各2, 5, 5, 5例の胃を代表例として採取し、組織検査を行った。なお、一部の例の副腎についてはオイルレッドO染色を実施した。

5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

1) 生殖機能

雌について、投与開始日から15日間、午前中に膈垢を採取し、ギムザ染色して性周期を検査した。交配前の投与終了後、各群内で雄1雌1の交配対を設け、最長14日間昼夜同居させ、毎日午前中に雌の膈垢を採取し、鏡検した。膈栓形成あるいは膈栓標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。交尾した対は雌雄を分離し、以後の検査に供した。これらの結果から、交尾所要日数(交配後、交尾までに要した日数)、交尾までに逸した発情期の回数、交尾率([交尾動物数/同居動物数]×100)、受胎率([受胎動物数/交尾動物数]×100)を算出した。

2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌については全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が終了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。その後、新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ、一般状態、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。

哺育4日の解剖時に卵巣、子宮を摘出して黄体数および着床数を検査した。交尾確認後25日を経ても分娩しない雌は剖検し、肉眼的に着床が認められない動物の子宮は2% KOH水溶液に浸漬し、着床の有無を確認した。これらの結果から、妊娠期間(妊娠0日から出産が確認された日までの期間)、出産率([生児出産雌数/受胎雌数]×100)、着床率([着床数/黄体数]×100)、分娩率([総出産児数/着床数]×100)を算出した。

3) 新生児の観察・検査

(1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数、出産生児数、死産児数、性別および外表異常の有無を検査した。その後、一般状態、死

亡の有無を毎日観察した。死亡動物は食殺等で検査に耐えないものを除き、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬・固定後、実体顕微鏡下で剖検した。哺育0および4日の生存児数から出生率([出生産児数/総出生産児数]×100)、4日生存率([哺育4日生児数/出生産児数]×100)を算出した。

### (2) 体重

哺育0および4日に1腹毎に雌雄単位でまとめて測定し、それぞれの平均値を算出した。また、哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。

### (3) 剖検

全ての生存児について哺育4日に口腔を含む外表を検査した後、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で開腹し、腹大動脈切断により放血致死させ剖検した。

## 6. 統計解析

パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い、分散が一樣の場合は一元配置分散分析を行った。分散が一樣でない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合で各群の例数が一定ならばDunnett法またはDunnett型、不定ならばScheffé法またはScheffé型により多重比較を行った。計数データはFisherの直接確率法により検定した。新生児に関するデータについては、各母動物毎に算出した平均値を統計単位とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 死亡動物

200 mg/kg群の雄1例が投与開始後43日に死亡した。この動物の一般状態には変化は認められなかったが、剖検で前胃壁の肥厚、心房の拡張、肝臓および肺のうっ血が認められた。また、病理組織検査では、前胃粘膜上皮の軽度の増生、肝臓の軽度のうっ血、肺における中等度のうっ血性水腫および軽度の炎症性細胞の浸潤が認められた。なお、この他に200 mg/kg群の雌1例が妊娠18日(投与開始後33日)に投与過誤により死亡した。

#### 2) 一般状態

200 mg/kg群において、雌の少数例で投与後の一過性の自発運動減少および歩行失調が投与開始後1日から13日までの間、継続または断続的に認められた。そのうち1例では妊娠19日および哺育1日にもそれらの症状が発現し、哺育1~2日には消瘦を示した。また、投与直後の一過性の流涎が、雄では投与開始後13日から継続して、雌では妊娠0日(投与開始後15日)から断続的に認められ、投与終了時までには雄のほぼ全例、雌の半数例に観察された。この他、200 mg/kg群の非分娩動物1例で妊娠24日に膈からの黒色粘液漏出が観察された。

#### 3) 体重(Fig. 1,2)

200 mg/kg群の雄において、有意差は認められなかったが、体重および体重増加量が投与開始後14日以降、対照群に比べて若干低値で推移し、体重増加抑制の傾向

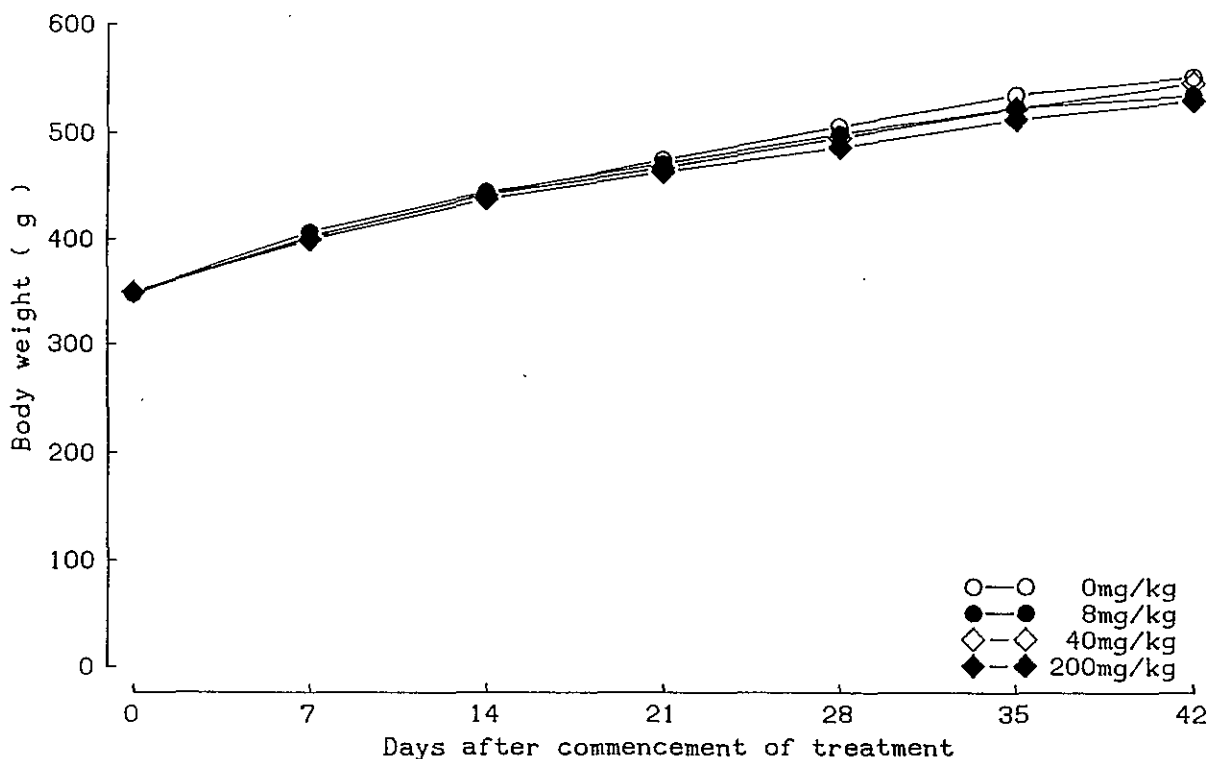


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

を示した。

4) 摂餌量

雌雄とも全期間を通して、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

5) 雄の血液学検査 (Table 1)

白血球百分比において、全被験物質投与群のリンパ球が有意な高値を、40および200 mg/kg群の単球が有意な低値を示したが、実数換算値においてリンパ球では各被験物質投与群とも有意な差は認められず、単球では200 mg/kg群で有意な差は認められなかった。また、いずれも当研究所の背景データの範囲内の変動であったことから、偶発的な変化と判断した。

6) 雄の血液生化学検査 (Table 2)

8 mg/kg群のトリグリセライドが有意な低値を示したが、40および200 mg/kg群では有意な変化が認められなかったことから偶発的なものと判断した。

7) 器官重量 (Table 3)

雌雄ともにいずれの器官においても、絶対重量および相対重量とも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

8) 剖検所見 (Table 4)

前胃壁の肥厚が200 mg/kg群の雄9例、雌1例に認められた。

肥厚した前胃粘膜の表面は白色化し、粗造を呈していた。また、胸腺の小型化が40および200 mg/kg群の雌で各1例に、副腎の白色化が200 mg/kg群の雌2例に認

められた。

その他、偶発的な変化として、脳室の拡張が200 mg/kg群の雄1例に認められた。なお、8 mg/kg群の雄1例は食道穿孔の形跡が観察されたため、投与過誤があったものと判断し、全データを集計から除外した。

9) 組織所見 (Table 5)

被験物質に起因する変化が前胃、胸腺および副腎に認められた。

前胃では、粘膜上皮の増生を主体とした変化が40および200 mg/kg群で雌雄ともに認められ、前胃粘膜は重層扁平上皮の増生および角化亢進により肥厚していた。肥厚した部分の粘膜下織に炎症性細胞の浸潤や水腫を伴う例が雄では多数、雌では少数認められた。

胸腺では、退縮が40および200 mg/kg群の雌で各1例に認められた。この2例は、剖検時に胸腺の小型化を示した例であった。

副腎では、皮質束状帯の脂肪滴の増加が200 mg/kg群の雌1例に認められた。この例は肉眼的に副腎の白色化を示した2例のうちの1例であった。同群の他の1例と8および40 mg/kg群の雌の副腎には変化は認められなかった。

その他に、対照あるいは被験物質投与群で認められた種々の変化については、いずれも自然発生的に観察される変化であり、発現状況に用量との関連が乏しいことから偶発病変と判断した。

2. 生殖発生毒性

1) 生殖機能 (Table 6)

各群ともほとんどが4~5日の正常な性周期を示し、交尾率および受胎率ともに対照群と被験物質投与群との

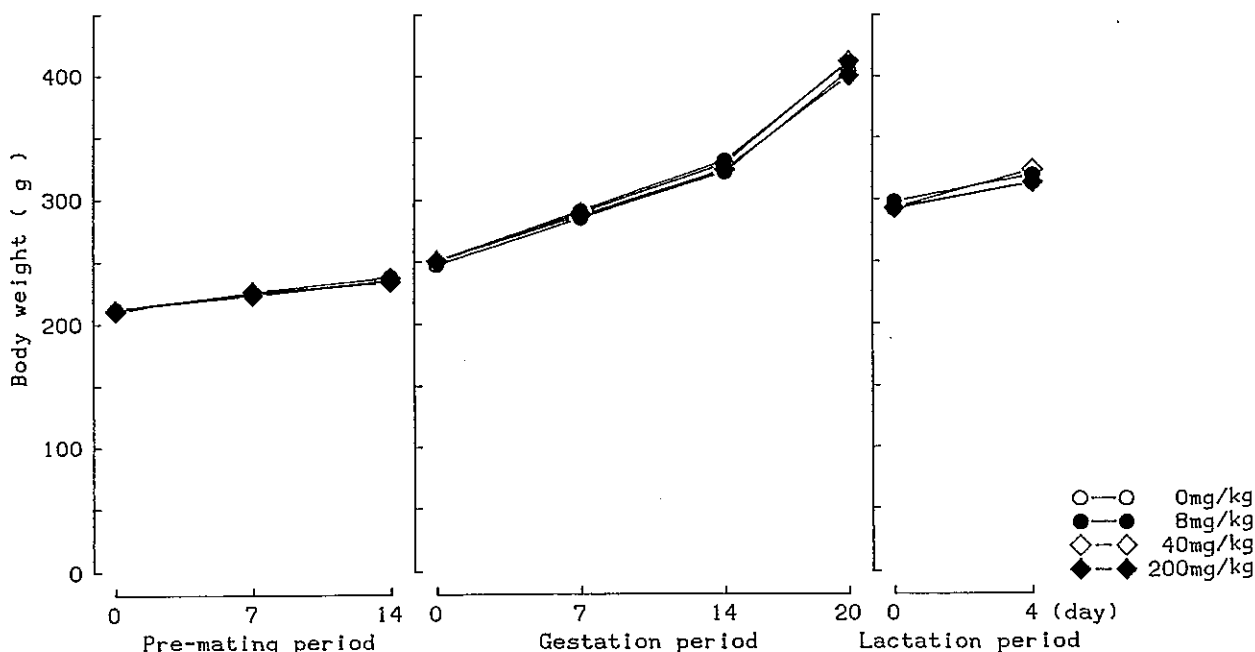


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Table 1 Hematological examination in male rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200
Number of animals	10	9	10	9
RBC ( $10^4/\mu l$ )	833 $\pm$ 25.4	844 $\pm$ 34.3	865 $\pm$ 30.3	850 $\pm$ 34.4
Ht (PCV) (%)	45.6 $\pm$ 1.39	46.3 $\pm$ 1.49	46.7 $\pm$ 1.39	45.8 $\pm$ 0.97
Hb (g/dl)	15.6 $\pm$ 0.45	16.0 $\pm$ 0.60	16.2 $\pm$ 0.49	15.8 $\pm$ 0.36
Reticulo (%)	24 $\pm$ 2.2	24 $\pm$ 3.0	26 $\pm$ 4.7	24 $\pm$ 3.9
MCV ( $\mu m^3$ )	54.7 $\pm$ 0.93	54.9 $\pm$ 1.39	54.1 $\pm$ 1.44	54.0 $\pm$ 1.44
MCH (pg)	18.7 $\pm$ 0.30	19.0 $\pm$ 0.52	18.7 $\pm$ 0.50	18.6 $\pm$ 0.61
MCHC (%)	34.3 $\pm$ 0.22	34.5 $\pm$ 0.39	34.6 $\pm$ 0.42	34.5 $\pm$ 0.40
Plt ( $10^4/\mu l$ )	99.3 $\pm$ 9.29	102.4 $\pm$ 10.22	106.5 $\pm$ 13.71	108.5 $\pm$ 7.85
WBC ( $10^2/\mu l$ )	103 $\pm$ 27.2	111 $\pm$ 26.8	112 $\pm$ 29.8	128 $\pm$ 23.2
Differential leukocyte counts (%)				
Lymphocytes	76 $\pm$ 3.2	82 $\pm$ 3.4*	84 $\pm$ 5.2**	85 $\pm$ 4.2**
Neutrophils				
segmented	14 $\pm$ 2.8	11 $\pm$ 3.4	10 $\pm$ 4.6	10 $\pm$ 3.4
band	0 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.0	1 $\pm$ 0.5	0 $\pm$ 0.0
Eosinophils	1 $\pm$ 0.7	1 $\pm$ 1.4	1 $\pm$ 0.7	1 $\pm$ 1.3
Basophils	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
Monocytes	9 $\pm$ 3.9	6 $\pm$ 1.5	4 $\pm$ 1.4**	4 $\pm$ 1.1*
Differential leukocyte counts ( $\times 10^2/\mu l$ )				
Lymphocytes	79 $\pm$ 21.2	91 $\pm$ 24.9	94 $\pm$ 25.2	108 $\pm$ 19.5
Neutrophils				
segmented	15 $\pm$ 4.4	12 $\pm$ 3.7	12 $\pm$ 6.5	13 $\pm$ 4.8
band	0 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.0	1 $\pm$ 0.7	0 $\pm$ 0.0
Eosinophils	1 $\pm$ 0.9	1 $\pm$ 1.6	1 $\pm$ 0.8	1 $\pm$ 1.9
Basophils	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
Monocytes	9 $\pm$ 4.6	7 $\pm$ 2.3	5 $\pm$ 2.2*	6 $\pm$ 2.3

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

\* , Significantly different from the control group value at  $P < 0.05$

\*\* , Significantly different from the control group value at  $P < 0.01$

Table 2 Blood chemical examination in male rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200
Number of animals	10	9	10	9
GOT (AsT) (IU/l)	101 $\pm$ 22.0	92 $\pm$ 17.8	80 $\pm$ 13.3	85 $\pm$ 19.2
GPT (AlT) (IU/l)	27 $\pm$ 12.9	24 $\pm$ 4.3	24 $\pm$ 3.6	22 $\pm$ 2.6
$\gamma$ -GTP (IU/l)	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0	0 $\pm$ 0.0
AIP (IU/l)	216 $\pm$ 42.8	197 $\pm$ 43.8	224 $\pm$ 36.0	232 $\pm$ 36.9
Total bilirbin (mg/dl)	0.2 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.04	0.1 $\pm$ 0.05
Urea nitrogen (mg/dl)	15.7 $\pm$ 2.18	15.4 $\pm$ 1.69	16.6 $\pm$ 2.29	16.1 $\pm$ 2.47
Creatinine (mg/dl)	0.5 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0.03	0.5 $\pm$ 0.06	0.5 $\pm$ 0.07
Glucose (mg/dl)	139 $\pm$ 15.3	137 $\pm$ 8.9	134 $\pm$ 11.7	136 $\pm$ 11.7
Total Chol. (mg/dl)	68 $\pm$ 10.1	70 $\pm$ 15.1	82 $\pm$ 13.1	70 $\pm$ 10.0
Triglyceride (mg/dl)	88 $\pm$ 37.1	50 $\pm$ 15.9*	74 $\pm$ 26.9	77 $\pm$ 72.2
Total protein (g/dl)	6.80 $\pm$ 0.226	6.78 $\pm$ 0.345	6.94 $\pm$ 0.393	6.88 $\pm$ 0.258
Albumin (g/dl)	3.60 $\pm$ 0.134	3.58 $\pm$ 0.109	3.67 $\pm$ 0.113	3.63 $\pm$ 0.106
A/G ratio	1.13 $\pm$ 0.058	1.12 $\pm$ 0.079	1.13 $\pm$ 0.070	1.12 $\pm$ 0.058
Inorganic phos. (mg/dl)	7.5 $\pm$ 0.48	7.6 $\pm$ 0.53	7.7 $\pm$ 0.43	7.2 $\pm$ 0.23
Ca (mg/dl)	9.6 $\pm$ 0.22	9.6 $\pm$ 0.21	9.8 $\pm$ 0.29	9.7 $\pm$ 0.27
Na (mEq/l)	144 $\pm$ 0.8	144 $\pm$ 0.3	144 $\pm$ 0.9	144 $\pm$ 0.7
K (mEq/l)	4.4 $\pm$ 0.16	4.7 $\pm$ 0.31	4.6 $\pm$ 0.54	4.5 $\pm$ 0.20
Cl (mEq/l)	100 $\pm$ 1.3	100 $\pm$ 1.1	100 $\pm$ 1.8	100 $\pm$ 0.7

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

\* , Significantly different from the control group value at  $P < 0.05$

Table 3 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200
<b>Male</b>				
Number of animals	10	9	10	9
Body weight (g)	528 ± 23.5	510 ± 24.7	519 ± 46.4	506 ± 27.7
Absolute organ weight				
Pituitary (mg)	14.3 ± 1.36	14.4 ± 1.30	14.2 ± 0.99	14.7 ± 1.45
Thymus (mg)	356 ± 54.4	353 ± 82.8	361 ± 108.4	391 ± 67.6
Liver (g)	14.48 ± 1.277	13.37 ± 0.817	14.55 ± 2.130	14.12 ± 1.455
Kidney (g)	3.14 ± 0.186	3.07 ± 0.330	3.34 ± 0.437	3.20 ± 0.211
Adrenal (mg)	70.2 ± 9.05	63.5 ± 11.04	64.9 ± 8.16	65.7 ± 10.00
Testis (g)	3.54 ± 0.210	3.45 ± 0.229	3.48 ± 0.398	3.55 ± 0.175
Prostate (g)	0.71 ± 0.209	0.63 ± 0.132	0.65 ± 0.109	0.73 ± 0.251
Epididymis (g)	1.28 ± 0.069	1.28 ± 0.091	1.29 ± 0.129	1.27 ± 0.058
Relative organ weight				
Pituitary (mg%)	2.7 ± 0.28	2.8 ± 0.23	2.8 ± 0.19	2.9 ± 0.26
Thymus (mg%)	67 ± 9.9	69 ± 16.2	69 ± 17.0	78 ± 16.3
Liver (g%)	2.74 ± 0.185	2.62 ± 0.174	2.79 ± 0.203	2.79 ± 0.186
Kidney (g%)	0.59 ± 0.032	0.60 ± 0.061	0.64 ± 0.058	0.64 ± 0.060
Adrenal (mg%)	13.3 ± 2.07	12.4 ± 1.88	12.6 ± 2.12	13.0 ± 1.84
Testis (g%)	0.67 ± 0.052	0.68 ± 0.070	0.67 ± 0.095	0.70 ± 0.037
Prostate (g%)	0.13 ± 0.039	0.12 ± 0.028	0.13 ± 0.031	0.14 ± 0.047
Epididymis (g%)	0.24 ± 0.018	0.25 ± 0.022	0.25 ± 0.030	0.25 ± 0.009
<b>Female</b>				
Number of animals	10	10	10	8
Body weight (g)	313 ± 12.2	320 ± 13.8	324 ± 11.5	314 ± 23.3
Absolute organ weight				
Pituitary (mg)	21.3 ± 2.95	21.3 ± 2.90	21.9 ± 1.29	20.3 ± 3.26
Thymus (mg)	212 ± 56.5	232 ± 39.5	216 ± 67.9	210 ± 79.7
Liver (g)	13.78 ± 0.612	13.50 ± 1.493	15.09 ± 1.021	14.91 ± 1.189
Kidney (g)	1.98 ± 0.163	1.98 ± 0.134	2.02 ± 0.157	2.05 ± 0.180
Adrenal (mg)	71.7 ± 11.83	71.9 ± 9.19	77.7 ± 9.04	70.1 ± 9.05
Relative organ weight				
Pituitary (mg%)	6.8 ± 0.94	6.7 ± 0.80	6.8 ± 0.31	6.5 ± 0.75
Thymus (mg%)	68 ± 18.3	73 ± 12.4	67 ± 22.6	65 ± 22.8
Liver (g%)	4.41 ± 0.172	4.22 ± 0.422	4.66 ± 0.259	4.75 ± 0.240
Kidney (g%)	0.63 ± 0.034	0.62 ± 0.039	0.63 ± 0.038	0.65 ± 0.073
Adrenal (mg%)	22.9 ± 3.33	22.5 ± 2.93	24.0 ± 2.60	22.3 ± 2.14

Values are expressed as Mean±S.D.



Table 4 Summary of necropsy findings in rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Sex	Fate	Dose (mg/kg/day)	Male				Female				
				Scheduled sacrifice				Dead	Scheduled sacrifice			
				0	8	40	200	200	0	8	40	200
Number of animals				10	9	10	9	1#	10	10	10	9
Thymus												
Small				0	0	0	0	0	0	0	1	1
Stomach												
Thickening of wall in forestomach				0	0	0	9	1	0	0	0	1
Heart												
Dilatation of atrium				0	0	0	0	1	0	0	0	0
Lung												
Congestion				0	0	0	0	1	0	0	0	0
Liver												
Congestion				0	0	0	0	1	0	0	0	0
Adrenal												
Whitish				0	0	0	0	0	0	0	0	2
Brain												
Dilatation of cerebral ventricle				0	0	0	1	0	0	0	0	0

#, One animal died at 43 days after commencement of treatment.

間に有意な差は認められなかった。また、ほとんどの雌が交配開始後4～5日以内に交尾し、交尾所要日数および交尾までに逸した発情期の回数ともに有意な差は認められなかった。

## 2) 分娩・哺育状態 (Table 7)

非分娩動物が200 mg/kg群で1例認められたが、他の母動物はいずれも正常な分娩を示した。妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率および分娩率には、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。なお、非分娩動物には、剖検で子宮内に3例の死亡児が観察された。また、200 mg/kg群の着床数、着床率および分娩率が他の群に比べ若干低値を示したが、非分娩動物の着床数が3個であったことが反映したものであり、同群の他の動物の検査値にはいずれも異常は認められなかった。

哺育期間の観察において、哺育1～2日に投与後症状および削瘦を示した200 mg/kg群の母動物では哺育1日に児の胃内乳汁量が少なく、同腹児の17例中5例が死亡した。その他にはいずれの群の母動物にも異常は認められなかった。

## 3) 新生児に及ぼす影響

### (1) 生存率 (Table 7)

出産児数、出産生存児数、性比、出生率および新生児生存率ともに対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

### (2) 出生児の観察

外表異常として、無尾および臍部の膨隆が40mg/kg群で各1例に認められたが、その他の新生児には異常は認められなかった。また、一般状態には各群いずれの新生児にも異常は認められなかった。

### (3) 体重 (Table 7)

200 mg/kg群において、有意差は認められなかったが、哺育0および4日の体重、ならびにその間の体重増加量が雌雄とも対照群に比べ若干低値を示した。8および40 mg/kg群においては、雌雄とも対照群とほぼ同様な値を示した。

### (4) 剖検

生存動物では、胸腺の頸部残留が8 mg/kg群で2例、臍ヘルニアが40 mg/kg群の腹部膨隆を示した例に観察されたが、他の新生児には異常は認められなかった。

Table 5 Summary of histopathological findings in rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ Findings	Sex Fate Dose (mg/kg/day)	Male					Female			
		Scheduled sacrifice				Dead	Scheduled sacrifice			
		0	8	40	200	200	0	8	40	200
Number of animals		10	9	10	9	1 <sup>#</sup>	10	10	10	9
Thymus										
Involution	+	*	*	*	*	*	0	0	1	1
Stomach										
Edema, forestomach	+	0	0	4	5	0	0/2 <sup>&amp;</sup>	0/5 <sup>&amp;</sup>	0/5 <sup>&amp;</sup>	0/5 <sup>&amp;</sup>
Erosion, forestomach	+	0	0	0	0	0	0/2	0/5	1/5	0/5
Hyperplasia, mucosa, forestomach	+	0	0	9	4	1	0/2	0/5	2/5	3/5
Inflammatory cell infiltration, forestomach	++	0	0	0	5	0	0/2	0/5	0/5	1/5
Inflammatory cell infiltration, forestomach	+	0	0	6	9	0	0/2	0/5	0/5	2/5
Heart										
Inflammatory cell infiltration, focal	+	6	*	*	1	0	0	*	*	1
Spleen										
Extramedullary hematopoiesis	+	0	*	*	0	0	0	*	*	1
Lung										
Congestive edema	++	*	*	*	*	1	*	*	*	*
Inflammatory cell infiltration	+	*	*	*	*	1	*	*	*	*
Liver										
Congestion	+	0	*	*	0	1	0	*	*	0
Extramedullary hematopoiesis	+	0	*	*	0	0	0	*	*	1
Hemorrhage, focal	+	2	*	*	0	0	0	*	*	0
Microgranuloma	+	9	*	*	6	0	1	*	*	0
Kidney										
Basophilic change, tubular epithelium	+	1	*	*	0	0	3	*	*	2
Calcification, corticomedullary junction	+	2	*	*	1	0	1	*	*	1
Cyst	+	1	*	*	0	0	1	*	*	0
Fibrosis, focal	+	0	*	*	0	0	1	*	*	1
Hyaline droplet, tubular epithelium	+	2	*	*	1	0	0	*	*	0
Testis										
Atrophy, seminiferous tubule	+	1	*	*	0	0				
Epididymis										
Inflammatory cell infiltration	+	1	*	*	1	0				
Prostate										
Inflammatory cell infiltration	+	10	*	*	4	0				
Pituitary										
Cyst	+	0	*	*	0	0	0	*	*	1
Hyperplasia, rathke's pouch	+	1	*	*	0	0	0	*	*	0
Adrenal										
Increase of fatty droplet, fascicular zone	+	0	*	*	0	0	0	0	0	1
Brain										
Dilatation of cerebral ventricle	+	0	*	*	1	0	0	*	*	0

+, Slight; ++, Moderate; \*, Not examined.

&, Number of animals showing lesion / number of animals examined.

#, One animal died at 43 days after commencement of treatment.

Table 6 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200
Estrous cycle (days)	4.3 ± 0.41 <sup>c</sup>	4.3 ± 0.35	4.6 ± 0.60	4.3 ± 0.42
Number of pairs examined	10	10	10	10
Number of pairs with successful mating	10	10	10	10
Mating index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	10	10	10	10
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Pairing days until mating	2.3 ± 1.06	2.7 ± 1.16	3.0 ± 0.94	3.6 ± 3.89
Number of estrous stages without mating	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00

a) Mating index (%) = (Number of pairs with successful mating/number of pairs examined) × 100

b) Fertility index (%) = (Number of pregnant animals/number of pairs with successful mating) × 100

c) Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 7 Delivery and litter data in rats treated orally with thymol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	8	40	200
Number of females examined	10	10	10	9
Number of females with live pups	10	10	10	8
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100.0	100.0	100.0	88.9
Gestation length (days)	22.3 ± 0.48 <sup>b)</sup>	22.5 ± 0.53	22.4 ± 0.52	22.4 ± 0.52
Number of corpora lutea	17.2 ± 1.81	17.5 ± 1.72	18.3 ± 2.26	17.9 ± 1.97
Number of implantation sites	15.9 ± 1.37	16.5 ± 1.96	17.2 ± 2.57	15.6 ± 4.58
Implantation index (%) <sup>b)</sup>	92.9	94.4	93.9	86.9
Delivery index (%) <sup>c)</sup>	96.7	90.7	93.5	84.9
Number of pups delivered	15.4 ± 1.78	15.0 ± 2.16	16.0 ± 2.05	16.4 ± 1.77
Number of live pups on day 0	15.3 ± 1.70	14.8 ± 2.10	15.8 ± 1.81	16.1 ± 1.73
Live birth index (%) <sup>d)</sup>	99.4	98.7	99.0	98.5
Sex ratio (male/female)	0.83(70/84)	0.74(64/86)	1.05(82/78)	0.87(61/70)
Number of live pups on day 4	15.3 ± 1.70	14.6 ± 2.46	15.6 ± 1.90	15.3 ± 1.98
Viability index on day 4 (%) <sup>e)</sup>	100.0	98.3	98.7	94.9
Body weight of pups (g)				
on day 0				
male	6.8 ± 0.66	6.7 ± 0.53	6.5 ± 0.85	6.1 ± 0.56
female	6.4 ± 0.62	6.3 ± 0.52	6.1 ± 0.78	5.8 ± 0.46
on day 4				
male	10.8 ± 1.06	10.7 ± 1.07	10.5 ± 1.09	9.7 ± 1.29
female	10.2 ± 1.06	10.2 ± 1.06	10.2 ± 1.11	9.3 ± 1.16
Body weight gain of pups (g)				
day 0 to 4				
male	4.1 ± 0.61	4.0 ± 0.59	4.0 ± 0.48	3.5 ± 0.79
female	3.8 ± 0.63	3.9 ± 0.57	4.1 ± 0.53	3.4 ± 0.78

a) Gestation index (%) = (Number of females with live pups/number of pregnant females) × 100

b) Implantation index (%) = (Number of implantation sites/number of corpora lutea) × 100

c) Delivery index (%) = (Number of pups delivered/number of implantation sites) × 100

d) Live birth index (%) = (Number of live pups on day 0/number of pups delivered) × 100

e) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4/number of live pups on day 0) × 100

f) Values are expressed as Mean ± S.D.

死産児では、卵円孔開存が8, 40および200 mg/kg群で、各々1, 2, 1例に認められた。哺育1日以降の死亡例には異常は認められなかった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

反復投与による影響として、200 mg/kg群の雄で体重増加抑制の傾向および死亡が1例、雌で投与後の一過性の自発運動減少および歩行失調が認められた。また、病理検査では、40 mg/kg以上の群で雌雄ともに前胃の粘膜上皮の増生などの被験物質に起因する変化が認められた。

雌で認められた投与後症状については、異性体である biosol および carvacrol で報告されている所見と同様の变化であり<sup>13)</sup>、いずれも投与後の時間経過とともに消失する一過性の変化であった。被験物質が属する phenol 誘導体は一般に中枢抑制作用を有することが知られており<sup>14)</sup>、被験物質も麻酔作用<sup>15)</sup>を有し、さらに筋収縮を直接抑制する作用<sup>16)</sup>もあることが報告されている。これらのことから、今回観察された投与後症状は被験物質の中枢抑制あるいは筋収縮抑制作用により発現した変化と考えられる。

病理検査において認められた前胃の変化については、肉眼的には肥厚として観察され、増生した粘膜の下織には炎症性細胞の浸潤あるいは水腫を伴うものも認められた。一般に phenol 類は刺激性を有し<sup>14)</sup>、被験物質および carvacrol も同様であることが報告されている<sup>16-18)</sup>。したがって、本変化については被験物質の刺激性に起因した変化と推察される。

200 mg/kg群の雄の死亡例には、病理検査で心房の拡張、炎症性細胞の浸潤を伴ったうっ血性肺水腫、および肝臓のうっ血など循環障害を示唆する変化が認められたが、死因につながる一般状態の変化は観察されず、原因を特定することはできなかった。しかし、雌では一部の動物に投与期間後半でも投与後症状が観察されていること、さらに被験物質が血圧降下作用および呼吸抑制作用<sup>16)</sup>を有することを考慮すると、この動物には何らかの要因で被験物質の作用が一時的に強く現れ、循環器系あるいは呼吸器系に異常を来して死亡した可能性が考えられる。

この他、胸腺の退縮が40および200 mg/kg群の雌で各1例に認められ、200 mg/kg群の動物では副腎束状帯の脂肪滴の増加を伴っていた。このうち40 mg/kg群の動物は同群の検査動物のなかで胃の変化が最も強く、また200 mg/kg群の例は分娩前後に投与後症状および消瘦を示した動物であった。胸腺の退縮はストレス状態の動物に認められる変化であり<sup>19)</sup>、他の動物では同様な所見は認められなかったことから、これらの変化は感受性の高い動物が妊娠、分娩および哺育などの生理的な負荷に加えて被験物質の影響を受けたことにより生じた二次的な変化である可能性が考えられる。なお、200 mg/kg群の胸腺退縮を示した動物および非分娩動物で肉眼的に観察

された副腎の白色化については病理組織変化が認められず、毒性学的意義は不明であった。また、投与直後の一過性の流涎が200 mg/kg群の雌雄で観察されたが、単回皮下投与試験で大量投与した場合には流涎は発現していないことから<sup>20)</sup>、被験物質の局所刺激性に起因したものであると考えられる。

### 2. 生殖発生毒性

親動物の検査において、性周期、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率には被験物質に起因する変化は認められなかった。分娩観察において、200 mg/kg群の1例は分娩せず、子宮内には未娩出の死亡胎児が観察されたが、同群の他の動物はいずれも正常に分娩し、分娩率にも異常はなかったことから、偶発的なものと判断した。また、哺育観察において、200 mg/kg群の1例で授乳量の減少が観察されたが、同群の他の母動物には異常は認められなかった。この動物には分娩前後に投与後症状および消瘦が観察されていることから、一時的に全身状態が悪化したことによる二次的な変化であり、被験物質の哺育行動への影響を示唆するものではないと考えられる。

新生児の検査において、200 mg/kg群で低体重および生後の体重増加抑制の傾向が認められ、被験物質の次世代発育への影響が示唆された。しかし、出産児数、出産生児数、性比、出生率および新生児生存率には被験物質の影響は認められなかった。また、外表、一般状態および剖検においても異常は認められなかった。したがって、被験物質の次世代に対する影響は比較的軽度なものと推察される。

被験物質は外因性 gonadotropin による幼若ラット子宮重量の増加作用を増強することから<sup>21)</sup>、内分泌系あるいは生殖器系への影響が示唆されている。しかし、本試験においては最高用量の200 mg/kg群でも生殖機能および分娩、哺育に対する影響は認められなかった。また、鶏卵胚を用いた試験では四肢、眼、顎骨などの複合奇形を発現することが報告されているが<sup>22)</sup>、ラットを用いた本試験においては催奇形性を示唆する変化は認められなかった。

以上のように、本試験では反復投与による影響として、親動物には40 mg/kg以上の群で、雌雄ともに前胃の病理変化、さらに200 mg/kg群では雄で体重増加抑制の傾向および死亡、雌で自発運動減少および歩行失調などの投与後症状が認められた。生殖・発生に及ぼす影響として、親動物の生殖機能および分娩、哺育機能には影響が認められなかったが、200 mg/kg群で新生児の発育への影響を示唆する変化が認められた。したがって、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも8 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は親動物に対して雌雄とも200 mg/kg/day、児動物に対しては40 mg/kg/dayと考えられる。

## 文献

- 1) P. M. Jenner et al., *Food Cosmet. Toxicol.*, **2**, 327 (1964).
- 2) 井関元八, 大阪市立大学医学誌, **5**, 111 (1956).
- 3) R. James and J. B. Glen, *J. Med. Chem.*, **23**, 1350 (1980).
- 4) C. W. Flickinger, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **37**, 596 (1976).
- 5) B. J. Dean, *Mut. Res.*, **47**, 75 (1978).
- 6) E. F. Davis et al., "Handbook of toxicology," ed by D. S. Dittmer, W. B. Saunders Company, Philadelphia and London, 1959, pp.172-173.
- 7) A. Manabe et al., *Japan. J. Pharmacol.*, **44**, 77 (1987).
- 8) D. L. J. Opdyke, *Food Cosmet. Toxicol.*, **17**, 743 (1979).
- 9) P. Greaves, "Histopathology of preclinical toxicity studies," Elsevier, Amsterdam, 1990, pp.112-114.
- 10) A. B. Kar et al., *J. Sci. Industr. Res.*, **19C**, 264 (1960).
- 11) M. J. Verrett et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **56**, 265 (1980).

## 連絡先

試験責任者: 松浦郁夫  
試験担当者: 田谷ゆかり, 土谷 稔, 涌生ゆみ,  
豊田直人, 高野克代  
(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所  
〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

## Correspondence

Authors: Ikuo Matsuura (Study director)  
Yukari Taya, Minoru Tsuchitani,  
Yumi Wako, Naoto Toyota,  
Katsuyo Takano  
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
Kashima Laboratory  
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
Ibaraki, 314-02, Japan  
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

# 7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

## Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in Rats

### 要 約

スルホン酸系化合物の毒性は一般に弱く、LD<sub>50</sub>値は1000 mg/kg以上で、多くの化合物では5000 mg/kgを上回ると報告されている<sup>1)</sup>。7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸についても、ラットでのLD<sub>50</sub>値は5000 mg/kgを上回ると言われているが、反復投与に関する報告はみあたらない<sup>1)</sup>。

今回、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性試験の一環として、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の0(対照)、250、500および1000 mg/kg/dayを1群雌雄各6匹のSprague-Dawley系(Crj:CD)ラットに28日間反復経口投与する毒性試験を実施し、以下の結果を得た。なお、対照群および1000 mg/kg群にはそれぞれ雌雄各6匹の14日間回復群も設けた。

一般状態、体重、摂餌量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、器官重量、剖検および病理組織学検査のいずれにおいても投与に起因した変化はみられず、本試験条件下における無影響量は雌雄ともに1000 mg/kg/dayと考えられた。

### 方 法

#### 1. 被験物質および投与液の調製

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸(純度91.8 wt%, Lot No.0901, スガイ化学工業(株)提供)は、水およびアセトンにほとんど不溶の灰白色粉末であり、水、熱、光などにほぼ安定である。入手後の被験物質は室温、遮光下で保管し、投与終了後の分析により被験物質が試験期間中安定であったことを確認した。媒体にはアラビアゴム(和光純薬工業(株), Lot No.PTG0424)の5%水溶液を使用し、これに被験物質を2.5、5および10 w/v%濃度になるように懸濁して投与液を調製した。調製した投与液は室温、遮光下で保管した。なお、初回調製時に、投与液の濃度を測定し、設定値の±10%以内であることを確認した。また、投与開始前に、本調製法による0.1、1および10 w/v%懸濁液が室温、遮光下で調製後11日間安定であり、かつ均一性についても問題ないことを確認した。

#### 2. 使用動物および飼育条件

5週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD, 日本チャールス・リバー(株))を雌雄各45匹購入し、8日間の検疫

馴化を行ったのち、雌雄各36匹を選んで6週齢で試験に使用した。投与開始時の体重は、雄が208.4~228.6 g、雌が137.6~165.0 gであった。動物は、温度24±2℃、湿度55±10%、照明時間7時~19時および換気回数13回/時に設定したバリアーシステム飼育室でステンレススチール製ハンガーケージに、検疫馴化期間中は1ケージ当たり3匹ずつ、群分け後は個別に収容して、高圧蒸気滅菌処理した固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業(株))および次亜塩素酸ナトリウムを添加(約2 ppm)した水を自由に摂取させた。

#### 3. 投与量、投与方法、試験群構成および群分け

投与量は、2週間反復投与による予備試験(投与量:0, 250, 500および1000 mg/kg)の結果から設定した。すなわち、当該試験において1000 mg/kg投与でも被験物質による毒性発現がなかったことから、本試験での投与量は、化審法ガイドラインに準じて1000 mg/kgを高用量とし、以下500および250 mg/kgの計3用量を設定した。

投与経路は経口とし、胃管を用いた強制投与を1日1回、28日間反復して行った。投与容量は10 ml/kgとし、個体ごとに最新の体重を基に算出した。

試験群は、上記3用量に、5%アラビアゴム水溶液を投与する対照を加えて計4群とした。1群当たりの動物数は、投与期間終了時の剖検例として各群とも雌雄各6匹、さらに、対照群および1000 mg/kg群には14日間の回復期間終了時の剖検例として雌雄各6匹を設けた。群分けは、投与開始前日の体重を基に層別連続無作為化法で行った。

#### 4. 検査項目

##### 1) 一般状態の観察、体重および摂餌量の測定

投与期間中は毎日投与前および投与後の計2回、回復期間中は毎日午前および午後の計2回、一般状態および死亡の有無を観察した。また、体重および摂餌量を投与期間および回復期間を通して週2回の割合で測定した。

##### 2) 尿検査

投与4週目および回復2週目に、代謝ケージにて絶食、給水下で8時から12時までの間に採取した新鮮尿を用いて、比色試験紙(プレテスト8 a, 和光純薬工業(株))によりpH、蛋白質、ブドウ糖、ケトン体、ビリルビン、潜血およびウロビリノーゲンを検査した。さらに、新鮮尿を1500回転/分で5分間遠心分離し、得られた尿沈渣について鏡検した。また、新鮮尿採取後に給餌、給水下で

採取した24時間蓄積尿を用いて、尿量、色調、浸透圧(氷点降下法; OSMOMETER OM801, VOGEL社)および比重(屈折率法; 尿屈折計, (株)アタゴ)を測定した。

### 3) 血液学検査

投与期間終了時および回復期間終了時に、動物を18時間以上絶食させたのち、ペントバルビタール・ナトリウム麻酔下に開腹し、腹部大静脈から採血を行った。採取した血液の一部はEDTA-2Kで処理し、多項目自動血球計数装置(Sysmex CC-780, 東亜医用電子(株))により白血球数(電気抵抗検出方式)、赤血球数(電気抵抗検出方式)、ヘモグロビン量(オキシヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(血球パルス波高値検出方式)および血小板数(電気抵抗検出方式)を測定し、これらを基に平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)および平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。また、血液の一部は塗抹標本とし、May-Grünwald-Giemsa染色を施して白血球百分比を視算した。さらに、3.8%クエン酸ナトリウム加血液を3000回転/分で15分間遠心分離し、得られた血漿を用いて全自動血液凝固測定装置(Sysmex CA-5000, 東亜医用電子(株))により、プロトロンビン時間(散乱光検出方式)および活性化部分トロンボプラスチン時間(散乱光検出方式)を測定した。

### 4) 血液生化学検査

血液学検査に引き続き採取した血液を室温で約60分間放置後、3000回転/分で10分間遠心分離し、得られた血清を用いて自動分析装置(736-10, (株)日立製作所)により、総蛋白質(ビウレット法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白質およびアルブミンより算出)、総ビリルビン(アルカリアゾビルルビン法)、GOT(Karmen法)、GPT(Wróblewski-La Due法)、 $\gamma$ -グルタミルトランスアミナーゼ(L- $\gamma$ -グルタミル-DBHA基質法)、アルカリ性フォスファターゼ(p-ニトロフェニルリン酸基質法)、総コレステロール(COD-DAOS法)、トリグリセライド(GPO-DAOS法・グリセリン消去法)、リン脂質(酵素法・DAOS発色法)、グルコース(グルコキナーゼ・G-6-PDH法)、尿素窒素(ウレアーゼ-GIDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、無機リン(モリブデン酸直接法)およびカルシウム(OCPC法)を測定した。また、電解質分析装置(PVA- $\alpha$ Ⅲ, (株)アナリティカル・インスツルメンツ)によりナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)およびクロール(電量滴定法)を測定した。

### 5) 器官重量の測定、剖検および病理組織学検査

採血終了後に、外側腸骨動脈を切断して放血死させ、剖検した。剖検時に脳、心臓、肺(気管支を含む)、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣および卵巣を摘出して器官重量(絶対重量)を測定するとともに、剖検日の体重を基に体重比器官重量(相対重量)を算出した。これらの器官に加え、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、脾臓、胃、膀胱、大腿骨(骨髄を含む)および肉眼的異常部位を採取して10%中性緩衝ホルマリン

溶液(眼球はグルタルアルデヒド溶液、精巣はプアン液で前固定)で固定した。

投与期間終了時の対照群および1000 mg/kg群の肝臓、脾臓、心臓、腎臓、副腎および肉眼的異常部位については、常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施して光学顕微鏡下で観察した。

### 5. 統計処理

体重、摂餌量、尿検査(定性反応は除く)、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および体重比器官重量について、各群ごとに平均値と標準偏差を求め、Bartlett法により分散の均一性を検定した。分散が均一な場合は一元配置型の分散分析を行い、この解析で群間に有意差が認められた場合はDunnnett法により各群の一对比較検定を行った。分散が均一でない場合はKruskal-Wallis法によって順位検定を行い、この検定で群間に有意差が認められた場合はDunnnett型的一对比較検定を行った。上述の分散分析あるいはKruskal-Wallis法による順位検定で群間に有意差が認められなかった場合は、各群間の多重比較は行わなかった。なお、いずれの場合も有意水準は5%とした。

## 結果および考察

### 1. 一般状態

投与4週目に、1000 mg/kg群の雄1例で上顎切歯先端部の欠損がみられたが、偶発的変化と考えられた。このほかには一般状態に変化はなかった。

### 2. 体重(Fig.1)および摂餌量

体重では、投与期間および回復期間を通して、対照群と各投与群との有意な差は認められなかった。

摂餌量では、投与4週目に1000 mg/kg群の雄で一過性の摂餌量の増加がみられたが、軽微な変動であり、毒性的意義はないものと考えられた。

### 3. 尿検査(Table 1)、血液学検査(Table 2)および血液生化学検査(Table 3)

尿検査では、投与4週目に500 mg/kg群の雄で尿比重の軽微な上昇がみられたのみであった。

血液学検査では、投与期間終了時および回復期間終了時ともに変化はなかった。

血液生化学検査では、投与期間終了時に変化はなく、回復期間終了時のみの軽微な変化として、1000 mg/kg群の雄でGOTの上昇、同群の雌でカルシウムの減少が認められた。

### 4. 器官重量(Table 4)

投与期間終了時に、全投与群の雌で心臓の相対重量の減少がみられた。また、このうち250および1000 mg/kg群では心臓の絶対重量の減少がみられ、500 mg/kg群の雌でも同様の傾向が認められた。しかし、いずれも軽微

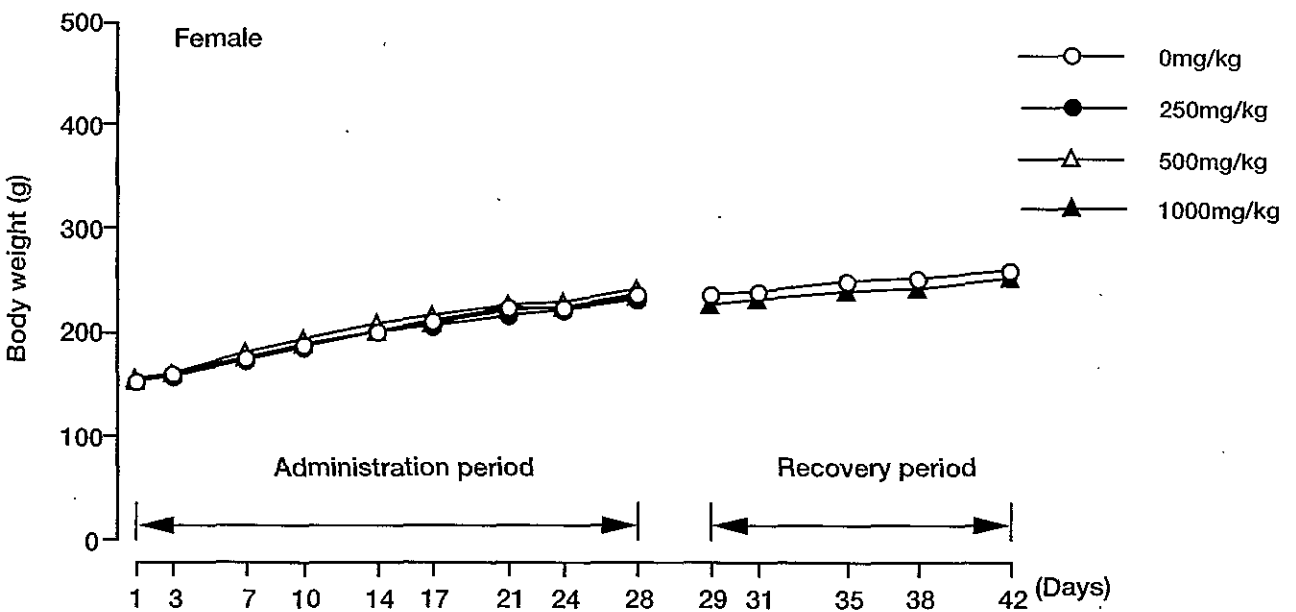
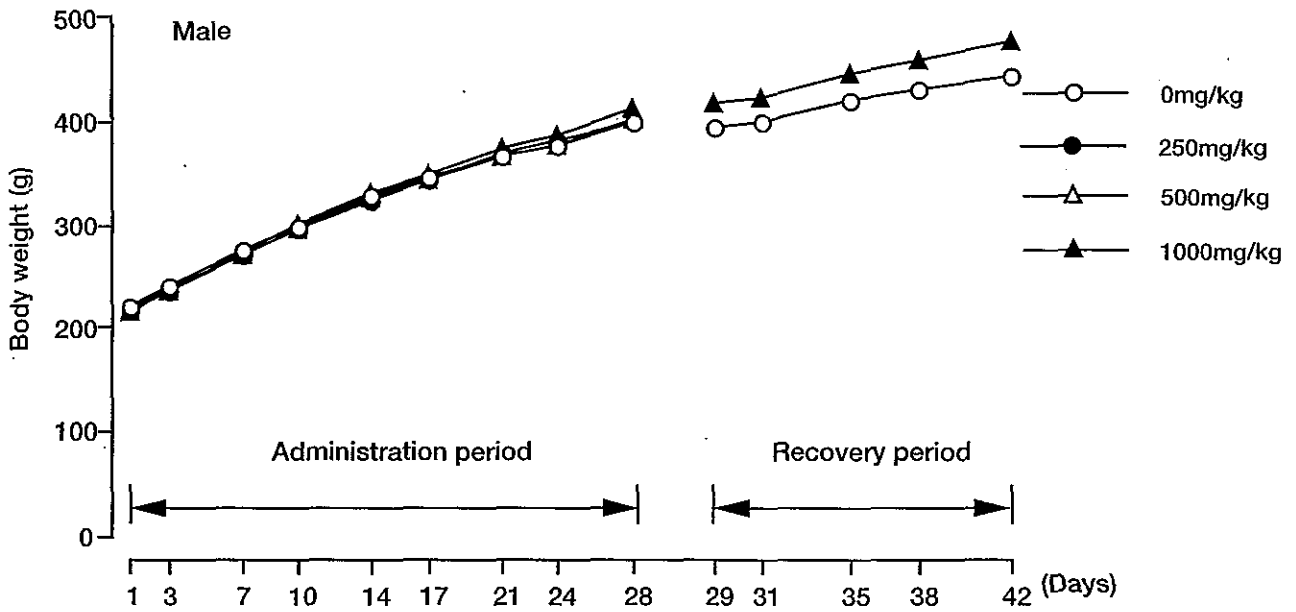


Fig. 1 Mean body weight changes of rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test



Table 1 Urinary findings of rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	250	500	1000	0	1000	
<b>Male</b>							
No. of animals	12	6	6	12	6	6	
Urine volume (ml/24 hr)	19.9 ± 6.0	16.8 ± 2.8	13.4 ± 5.9	18.4 ± 6.3	18.0 ± 6.4	21.4 ± 6.5	
Osmotic pressure (Osm/kg)	1.130 ± 0.287	1.250 ± 0.195	1.511 ± 0.306	1.394 ± 0.392	1.443 ± 0.424	1.333 ± 0.480	
Specific gravity	1.036 ± 0.009	1.042 ± 0.006	1.052 ± 0.011*	1.045 ± 0.013	1.046 ± 0.013	1.042 ± 0.016	
pH	8.0 ± 0.1	7.8 ± 0.3	8.2 ± 0.3	8.0 ± 0.3	7.8 ± 0.3	7.8 ± 0.5	
Color							
	pale yellow	10	2	1	5	2	5
	yellow	2	4	4	7	4	1
	yellowish brown	0	0	1	0	0	0
Protein	-	3	1	2	6	1	3
	±	6	5	1	6	3	1
	+	3	0	3	0	1	1
	++	0	0	0	0	1	1
Glucose	-	12	6	6	12	6	6
Ketone body	-	12	6	6	12	6	6
Bilirubin	-	12	6	6	12	6	6
Occult blood	-	11	6	4	11	5	5
	+	1	0	0	1	1	1
	++	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	2	0	0	0
Urobilinogen (mg/dl)	<1	11	6	6	12	4	6
	1	1	0	0	0	2	0
<b>Female</b>							
No. of animals	12	6	6	12	6	6	
Urine volume (ml/24 hr)	7.6 ± 3.9	6.8 ± 3.4	8.5 ± 4.0	7.3 ± 4.8	10.2 ± 7.0	9.9 ± 4.5	
Osmotic pressure (Osm/kg)	1.650 ± 0.605	1.520 ± 0.414	1.508 ± 0.417	1.910 ± 0.695	1.523 ± 0.524	1.600 ± 0.654	
Specific gravity	1.053 ± 0.017	1.050 ± 0.014	1.050 ± 0.013	1.060 ± 0.020	1.047 ± 0.017	1.049 ± 0.020	
pH	8.2 ± 0.4	8.1 ± 0.4	8.3 ± 0.3	8.3 ± 0.5	7.4 ± 0.6	7.8 ± 0.3	
Color							
	pale yellow	3	1	0	1	2	2
	yellow	9	5	6	11	4	4
	yellowish brown	0	0	0	0	0	0
Protein	-	11	6	5	7	5	2
	±	0	0	1	4	1	3
	+	1	0	0	1	0	1
	++	0	0	0	0	0	0
Glucose	-	12	6	6	12	6	6
Ketone body	-	12	6	6	12	6	6
Bilirubin	-	12	6	6	12	6	6
Occult blood	-	9	5	5	11	5	6
	+	1	1	1	1	0	0
	++	2	0	0	0	1	0
	+++	0	0	0	0	0	0
Urobilinogen (mg/dl)	<1	11	6	6	9	5	2
	1	1	0	0	3	1	4

\*: P &lt; 0.05 (significantly different from control)

Grade sign: -, none; ±, trace; +, slight; ++, moderate; +++, severe

Table 2 Hematological findings of rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
Male						
Male						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Leucocyte ( $10^2/\mu\text{l}$ )	64 ± 19	66 ± 19	77 ± 13	65 ± 10	87 ± 23	108 ± 46
Erythrocyte ( $10^4/\mu\text{l}$ )	816 ± 37	797 ± 35	805 ± 26	777 ± 31	806 ± 41	831 ± 38
Hemoglobin (g/dl)	14.8 ± 0.7	14.6 ± 0.3	14.5 ± 0.4	14.7 ± 0.3	15.0 ± 0.7	15.1 ± 0.6
Hematocrit (%)	47.9 ± 2.0	47.0 ± 1.2	45.8 ± 1.0	47.0 ± 1.8	46.7 ± 1.5	47.5 ± 1.8
Platelet ( $10^4/\mu\text{l}$ )	100.3 ± 7.0	104.1 ± 7.6	101.7 ± 11.2	108.1 ± 16.0	84.8 ± 37.1	100.5 ± 10.4
MCV (fl)	59 ± 2	59 ± 2	57 ± 2	60 ± 1	58 ± 3	58 ± 1
MCH (pg)	18.2 ± 0.7	18.3 ± 0.7	18.0 ± 0.6	18.9 ± 0.4	18.6 ± 0.9	18.2 ± 0.5
MCHC (%)	31.0 ± 0.4	31.0 ± 0.7	31.7 ± 0.2	31.3 ± 0.6	32.1 ± 0.5	31.8 ± 0.6
Prothrombin time (sec)	16.9 ± 4.1	17.7 ± 1.6	13.9 ± 1.3	14.1 ± 2.5	16.1 ± 2.2	16.1 ± 2.4
APTT (sec)	24.7 ± 1.8	24.5 ± 2.3	22.6 ± 0.7	22.8 ± 1.2	23.9 ± 1.4	23.9 ± 1.1
Female						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Leucocyte ( $10^2/\mu\text{l}$ )	60 ± 7	56 ± 13	72 ± 11	69 ± 21	44 ± 10	47 ± 10
Erythrocyte ( $10^4/\mu\text{l}$ )	780 ± 23	783 ± 20	780 ± 18	780 ± 20	759 ± 41	752 ± 20
Hemoglobin (g/dl)	14.5 ± 0.5	14.4 ± 0.5	14.4 ± 0.4	14.4 ± 0.4	13.8 ± 0.5	13.8 ± 0.2
Hematocrit (%)	45.6 ± 1.5	45.5 ± 1.5	45.8 ± 1.0	45.4 ± 1.6	43.3 ± 1.5	43.5 ± 1.0
Platelet ( $10^4/\mu\text{l}$ )	106.7 ± 6.3	112.9 ± 9.6	110.9 ± 9.8	109.9 ± 9.6	107.1 ± 9.5	104.3 ± 8.3
MCV (fl)	59 ± 1	58 ± 1	59 ± 1	58 ± 1	57 ± 2	58 ± 1
MCH (pg)	18.6 ± 0.2	18.3 ± 0.4	18.5 ± 0.4	18.4 ± 0.3	18.2 ± 0.5	18.4 ± 0.4
MCHC (%)	31.9 ± 0.7	31.6 ± 0.3	31.6 ± 0.6	31.7 ± 0.8	31.9 ± 0.8	31.7 ± 0.7
Prothrombin time (sec)	10.9 ± 0.6	11.2 ± 0.4	11.0 ± 0.4	11.1 ± 0.4	10.8 ± 0.5	10.5 ± 0.1
APTT (sec)	18.1 ± 0.9	18.8 ± 1.1	19.4 ± 1.9	20.1 ± 0.7	18.9 ± 0.9	18.1 ± 0.9

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  (significantly different from control)

Values are mean ± S.D.

Table 3 Blood chemical findings of rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
<b>Male</b>						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
T.protein (g/dl)	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2
Albumin (g/dl)	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.3	3.6 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.5 ± 0.1
A/G ratio	2.70 ± 0.26	2.70 ± 0.24	2.73 ± 0.49	2.81 ± 0.18	2.20 ± 0.10	2.57 ± 0.60
T.bilirubin (mg/dl)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
GOT (IU/l)	79 ± 10	91 ± 15	77 ± 9	92 ± 10	71 ± 10	86 ± 12*
GPT (IU/l)	22 ± 4	23 ± 3	19 ± 3	20 ± 3	22 ± 3	26 ± 3
ALP (IU/l)	325 ± 21	357 ± 39	330 ± 53	337 ± 27	265 ± 37	267 ± 17
T.cholesterol (mg/dl)	37 ± 7	32 ± 3	37 ± 2	34 ± 10	36 ± 7	34 ± 5
Triglycerides (mg/dl)	28 ± 8	21 ± 8	26 ± 5	29 ± 19	39 ± 15	42 ± 9
Phospholipids (mg/dl)	69 ± 10	60 ± 3	70 ± 3	65 ± 15	66 ± 7	66 ± 8
Glucose (mg/dl)	122 ± 13	124 ± 10	122 ± 12	130 ± 14	130 ± 13	126 ± 14
BUN (mg/dl)	16.3 ± 1.3	16.4 ± 3.0	15.3 ± 1.8	14.7 ± 1.2	15.7 ± 2.1	17.8 ± 1.9
Creatinine (mg/dl)	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
IP (mg/dl)	7.4 ± 0.2	7.9 ± 0.3	7.5 ± 0.6	7.2 ± 0.4	6.5 ± 0.7	6.6 ± 0.4
Ca (mg/dl)	9.1 ± 0.3	9.3 ± 0.2	9.3 ± 0.3	9.1 ± 0.2	9.2 ± 0.2	9.2 ± 0.2
Na (mEq/l)	147.0 ± 1.1	147.3 ± 0.7	146.1 ± 0.6	146.6 ± 0.4	146.1 ± 0.9	145.7 ± 0.9
K (mEq/l)	3.98 ± 0.20	4.19 ± 0.35	4.08 ± 0.16	4.09 ± 0.18	3.86 ± 0.34	4.14 ± 0.16
Cl (mEq/l)	107.6 ± 0.8	108.0 ± 1.1	107.0 ± 1.0	106.6 ± 2.3	106.3 ± 1.3	104.9 ± 0.8
<b>Female</b>						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
T.protein (g/dl)	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.3	5.2 ± 0.4	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.3
Albumin (g/dl)	3.8 ± 0.2	3.7 ± 0.3	3.8 ± 0.3	3.8 ± 0.4	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.2
A/G ratio	2.68 ± 0.46	2.84 ± 0.74	2.83 ± 0.67	2.75 ± 0.44	2.68 ± 0.35	2.78 ± 0.45
T.bilirubin (mg/dl)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
GOT (IU/l)	87 ± 11	94 ± 17	101 ± 27	101 ± 13	78 ± 6	78 ± 12
GPT (IU/l)	17 ± 2	16 ± 2	18 ± 4	21 ± 6	17 ± 3	17 ± 4
ALP (IU/l)	195 ± 49	218 ± 47	213 ± 24	216 ± 33	152 ± 19	161 ± 12
T.cholesterol (mg/dl)	48 ± 10	47 ± 7	44 ± 13	39 ± 7	39 ± 8	38 ± 2
Triglycerides (mg/dl)	13 ± 2	12 ± 2	11 ± 2	11 ± 3	14 ± 3	14 ± 3
Phospholipids (mg/dl)	88 ± 15	85 ± 9	80 ± 15	73 ± 12	75 ± 11	73 ± 4
Glucose (mg/dl)	123 ± 16	113 ± 4	111 ± 14	112 ± 15	107 ± 7	111 ± 15
BUN (mg/dl)	20.3 ± 2.2	22.4 ± 2.4	22.7 ± 4.0	23.6 ± 3.4	18.1 ± 1.7	18.1 ± 1.7
Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0
IP (mg/dl)	8.2 ± 0.8	9.2 ± 1.0	8.5 ± 0.5	7.9 ± 0.6	6.3 ± 0.4	6.5 ± 0.5
Ca (mg/dl)	9.7 ± 0.2	9.6 ± 0.3	9.6 ± 0.4	9.6 ± 0.4	9.5 ± 0.3	9.2 ± 0.2*
Na (mEq/l)	146.5 ± 0.4	147.1 ± 0.5	146.2 ± 0.6	147.1 ± 1.0	145.8 ± 0.9	145.1 ± 1.9
K (mEq/l)	4.19 ± 0.22	4.33 ± 0.26	4.27 ± 0.25	4.12 ± 0.26	4.36 ± 0.25	4.33 ± 0.27
Cl (mEq/l)	108.1 ± 1.0	108.3 ± 1.0	108.0 ± 1.4	109.2 ± 1.3	110.2 ± 1.0	109.2 ± 2.8

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control)

Values are mean ± S.D.

Table 4 Organ weights of rats treated orally with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	250	500	1000	0	1000
<b>Male</b>						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Final Body Weight (g)	365.5 ± 24.8	361.7 ± 16.0	367.4 ± 23.4	370.3 ± 14.9	408.2 ± 23.4	438.2 ± 36.3
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.08 ± 0.06	2.11 ± 0.09	2.09 ± 0.05	2.10 ± 0.06	2.08 ± 0.07	2.14 ± 0.03
Heart (g)	1.32 ± 0.17	1.43 ± 0.11	1.41 ± 0.20	1.37 ± 0.11	1.41 ± 0.10	1.38 ± 0.12
Lungs (g)	1.37 ± 0.09	1.28 ± 0.02	1.30 ± 0.04	1.31 ± 0.07	1.28 ± 0.06	1.38 ± 0.10*
Thymus (g)	0.49 ± 0.08	0.56 ± 0.06	0.50 ± 0.08	0.57 ± 0.10	0.50 ± 0.06	0.45 ± 0.13
Liver (g)	11.15 ± 1.21	10.59 ± 0.80	11.08 ± 1.14	10.94 ± 0.91	11.27 ± 1.20	12.17 ± 1.45
Spleen (g)	0.72 ± 0.07	0.72 ± 0.15	0.78 ± 0.10	0.65 ± 0.05	0.75 ± 0.06	0.76 ± 0.11
Kidneys (g)	2.68 ± 0.22	2.87 ± 0.34	2.83 ± 0.21	2.77 ± 0.40	2.70 ± 0.23	2.89 ± 0.30
Adrenals (mg)	65.0 ± 6.0	61.3 ± 4.7	63.1 ± 6.6	68.3 ± 8.2	69.4 ± 7.2	70.1 ± 10.6
Testes (g)	3.25 ± 0.09	3.08 ± 0.30	3.25 ± 0.23	3.17 ± 0.32	3.15 ± 0.24	3.40 ± 0.22
Relative organ weight						
Brain (g/100 gB.W.)	0.57 ± 0.03	0.59 ± 0.03	0.57 ± 0.04	0.57 ± 0.03	0.51 ± 0.04	0.49 ± 0.04
Heart (g/100 gB.W.)	0.36 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.31 ± 0.02*
Lungs (g/100 gB.W.)	0.38 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.03
Thymus (g/100 gB.W.)	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.03
Liver (g/100 gB.W.)	3.04 ± 0.16	2.92 ± 0.11	3.01 ± 0.14	2.95 ± 0.16	2.76 ± 0.17	2.77 ± 0.12
Spleen (g/100 gB.W.)	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02
Kidneys (g/100 gB.W.)	0.74 ± 0.09	0.79 ± 0.06	0.77 ± 0.07	0.75 ± 0.09	0.66 ± 0.03	0.66 ± 0.05
Adrenals (mg/100 gB.W.)	17.8 ± 1.4	17.0 ± 1.0	17.2 ± 1.3	18.4 ± 2.1	17.0 ± 1.7	16.0 ± 1.5
Testes (g/100 gB.W.)	0.89 ± 0.08	0.85 ± 0.08	0.89 ± 0.08	0.86 ± 0.10	0.77 ± 0.07	0.78 ± 0.10
<b>Female</b>						
No. of animals	6	6	6	6	6	6
Final Body Weight (g)	220.7 ± 14.7	210.9 ± 15.5	220.1 ± 12.5	218.8 ± 9.9	234.8 ± 19.3	227.8 ± 23.8
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.91 ± 0.07	1.88 ± 0.09	1.90 ± 0.09	1.94 ± 0.04	1.93 ± 0.06	1.91 ± 0.05
Heart (g)	0.94 ± 0.07	0.80 ± 0.08**	0.86 ± 0.05	0.84 ± 0.05*	0.82 ± 0.08	0.83 ± 0.07
Lungs (g)	1.03 ± 0.11	0.99 ± 0.08	1.02 ± 0.08	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.06	0.96 ± 0.05
Thymus (g)	0.50 ± 0.04	0.51 ± 0.07	0.55 ± 0.09	0.55 ± 0.09	0.45 ± 0.07	0.48 ± 0.14
Liver (g)	6.58 ± 0.72	6.29 ± 0.77	6.66 ± 0.32	6.74 ± 0.27	6.69 ± 0.60	6.43 ± 0.83
Spleen (g)	0.50 ± 0.09	0.44 ± 0.06	0.54 ± 0.05	0.50 ± 0.06	0.50 ± 0.07	0.47 ± 0.04
Kidneys (g)	1.60 ± 0.17	1.60 ± 0.19	1.65 ± 0.12	1.72 ± 0.16	1.67 ± 0.06	1.66 ± 0.10
Adrenals (mg)	69.7 ± 3.2	68.1 ± 6.9	67.5 ± 5.5	69.4 ± 6.5	71.6 ± 3.3	70.1 ± 7.1
Ovaries (mg)	87.6 ± 9.1	85.6 ± 10.8	86.2 ± 13.2	88.5 ± 10.9	97.9 ± 23.1	82.8 ± 18.9
Relative organ weight						
Brain (g/100 gB.W.)	0.87 ± 0.05	0.89 ± 0.04	0.87 ± 0.07	0.89 ± 0.04	0.83 ± 0.05	0.85 ± 0.08
Heart (g/100 gB.W.)	0.42 ± 0.03	0.38 ± 0.01**	0.39 ± 0.02*	0.39 ± 0.02*	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.01
Lungs (g/100 gB.W.)	0.47 ± 0.03	0.47 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.46 ± 0.04	0.43 ± 0.02	0.43 ± 0.03
Thymus (g/100 gB.W.)	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.05
Liver (g/100 gB.W.)	2.97 ± 0.13	2.98 ± 0.16	3.03 ± 0.08	3.08 ± 0.09	2.85 ± 0.17	2.82 ± 0.11
Spleen (g/100 gB.W.)	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.01
Kidneys (g/100 gB.W.)	0.73 ± 0.04	0.76 ± 0.06	0.75 ± 0.05	0.79 ± 0.06	0.72 ± 0.04	0.73 ± 0.03
Adrenals (mg/100 gB.W.)	31.6 ± 1.6	32.2 ± 1.1	30.7 ± 2.3	31.7 ± 2.3	30.6 ± 1.5	30.8 ± 1.5
Ovaries (mg/100 gB.W.)	39.8 ± 4.5	40.5 ± 3.1	39.1 ± 5.0	40.6 ± 6.2	41.4 ± 6.8	36.0 ± 4.5

\*: P&lt;0.05, \*\*: P&lt;0.01 (significantly different from control)

Values are mean ± S.D.

な変動であり、投与量と変化の程度に一定の傾向がないことから、投与とは関連のない偶発的な変動と考えられた。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群の雄で肺の絶対重量の増加および心臓の相対重量の減少がみられた。

#### 5.剖検および病理組織学検査

投与期間終了時の剖検では、1000 mg/kg群の雄1例で右腎臓に単発性の灰白色斑および軽度の腎盂拡張が認められた。右腎臓の同程度の腎盂拡張は250 mg/kg群の雄2例でもみられ、このうち1例には左精巣の軽度萎縮も認められた。これらの病理組織学検査では、腎臓に腎盂拡張がみられ、このうち1000 mg/kg群の雄1例には限局性の近位尿細管上皮の好塩基性化、遠位尿細管の拡張および間質へのリンパ球浸潤、並びに乳頭部の石灰沈着も認められた。また、精巣は病理組織学検査でも萎縮が確認された。これらの変化は、正常ラットでしばしば観察される変化であり、その出現頻度にも投与量との関連がなかったことから、いずれも自然発生の変化と考えられた。このほかには投与期間終了時に肉眼的および病理組織学的変化は観察されなかった。

回復期間終了時の剖検では、変化はみられなかった。

以上のことから、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸投与に起因した変化はいずれの検査においてもみられず、本試験条件下での無影響量は雌雄ともに1000 mg/kg/dayと考えられた。

#### 文 献

- 1) H. Greim, et al., *Chemosphere*, 28, 2203, (1994).

#### 連絡先

試験責任者：浜村 政夫

試験担当者：大塚辰雄，古川浩美，幸 邦憲，  
永井憲児，一鬼 勉，鋏先恵美子，  
津崎慎二

(株)パナファーム・ラボラトリーズ 安全性研究所  
〒869-04 熊本県宇土市栗崎町1285  
Tel 0964-23-5111 Fax 0964-23-2282

#### Correspondence

Authors: Masao Hamamura (Study director)  
Tatsuo Otsuka, Hiromi Furukawa,  
Kuninori Yuki, Kenji Nagai,  
Tutomu Ichiki, Emiko Kuwasaki,  
Shinji Tsusaki

Panapharm Laboratories Co., Ltd., Safety  
Assessment Laboratory  
1285 Kurisaki-machi, Uto-shi, Kumamoto, 869-04,  
Japan  
Tel +81-964-23-5111 Fax +81-964-23-2282

# 7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid on Bacteria

### 要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の変異原性について遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535およびTA1537株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2 *uvrA*株を用いる復帰突然変異試験を行った。予備的な試験の結果を基に、試験用量を設定した。すなわち、直接法(-S9 mix)ならびに代謝活性化法(+S9 mix)の各菌株についてそれぞれ、156~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの6用量を設定し試験した。その結果、代謝活性化法のネズミチフス菌4菌株で用量に依存した復帰突然変異コロニー数の増加傾向が認められ、再現性も確認された。特にTA98では溶媒対照に比較し90倍程度の増加を示した。直接法では、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。一方、各系での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。従って、本試験条件下において、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸は微生物に対し遺伝子突然変異を誘起するものと判断した。

### 材料および方法

#### 1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537<sup>2)</sup>ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup>の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所から分与を受けた。平成6年9月5日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK社)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mlずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

#### 2. 培地の調製

##### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

日清製粉(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを

含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム [いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID社:No.1)を加え、30mlをシャーレに分注したものである。

##### 2) トップアガー(軟寒天)

Bacto-agar(DIFCO社)0.6%を含む0.5%塩化ナトリウム水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mM D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

#### 3. 前培養条件

内容量200 mlの円筒容器(ストレージボトル: Corning Costar社)に2.5%ニュートリエントブロス(OXOID社)溶液を25 ml分注し、これに融解した菌懸濁液を50  $\mu\text{l}$ 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック(株))を用い、37℃で8時間振盪(往復振盪:120回/分)培養し、試験に使用した。

#### 4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンと投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1ml中の量
S9	0.1 ml
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADPH	4 $\mu\text{mol}$
NADH	4 $\mu\text{mol}$
リン酸緩衝Na-液(pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$

#### 5. 被験物質

被験物質の7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸(ロット番号:0901, CAS No.:87-02-5)は分子式C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>S, 分子量239.25, 純度91.8%(不純物として硫酸ナトリウム分2.0 wt%および水分3.5 wt%を含む)の粉末で、水、アセトンにほとんど溶けない。本試験にはス

ガイ化学工業(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

なお、本被験物質の純度は95%未満であるため秤量に際して換算した。

#### 6. 被験物質溶液の調製

DMSOに被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

#### 7. 試験用量の設定

8.00, 40.0, 200, 1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、直接法ならびに代謝活性化法のいずれの菌株においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。また、代謝活性化法の5000  $\mu\text{g}$ /プレートにおいてすべての試験菌株で溶媒対照に比較し復帰突然変異コロニー数の増加傾向が認められた。

従って、本試験においては直接法ならびに代謝活性化法の各菌株について5000  $\mu\text{g}$ /プレートを最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

#### 8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20℃)した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
(AF-2: 和光純薬工業(株))

アジ化ナトリウム( $\text{NaN}_3$ : 和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン(ACR:ALDRICH社)

2-アミノアントラセン(2-AA: 和光純薬工業(株))

#### 9. 試験方法

Amesらの原法の改良法であるプレインキュベーション法<sup>1)</sup>に準じて、直接法および代謝活性化法それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を100  $\mu\text{l}$ 、次いで直接法の場合、0.1 Mナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500  $\mu\text{l}$ 、代謝活性化法の場合、S9 mixを500  $\mu\text{l}$ および試験菌液100  $\mu\text{l}$ を加え、37℃で20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、トップアガーを2  $\mu\text{l}$ 添加し、混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡( $\times 60$ )を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11: システムサイエンス(株))を用いた。独立して試験を2回実施した。

#### 10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に

増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

また陽性結果を示した菌株については、当該用量における誘発コロニー数(当該用量のコロニー数-溶媒対照でのコロニー数)を試験用量( $\text{mg}$ /プレート)で除すことにより比活性を算出した。

### 結果および考察

試験結果を Table 1~4に示した。直接法(-S9 mix)ならびに代謝活性化法(+S9 mix)のいずれとも、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸による生育阻害作用は観察されなかった。また、復帰突然変異コロニー数については、代謝活性化法のネズミチフス菌4菌株で用量反応相関性を伴った明確な増加傾向が観察された。特に、TA98で顕著な増加が認められ、変異原性の強さに関する相対的比較値である比変異活性は498を示した。さらに、大腸菌についても溶媒対照の2倍を超えることはなかったが、復帰突然変異コロニーの増加傾向が認められた。直接法については、いずれの菌株においても溶媒対照と同等の値であり、増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、試験中析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から、本試験条件下において7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフトレンスルホン酸の微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陽性と判定した。

### 文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, 38, 3(1976)

#### 連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 北沢倫世, 菊池正憲, 板倉真由実

(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: Madoka Nakajima (Study director)

Michiyo Kitazawa, Masanori Kikuchi

Mayumi Itakura

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,

Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1. Results of the bacterial reversion test of 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (1st trial) [direct method:-S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	88	92	101	17	11	13	25	24	33	14	17	18	12	11	9
		[ 94 $\pm$ 7]			[ 14 $\pm$ 3]			[ 27 $\pm$ 5]			[ 16 $\pm$ 2]			[ 11 $\pm$ 2]		
Test sub.	156	92	74	90	16	14	12	27	23	14	18	17	23	10	9	9
		[ 85 $\pm$ 10]			[ 14 $\pm$ 2]			[ 21 $\pm$ 7]			[ 19 $\pm$ 3]			[ 9 $\pm$ 1]		
	313	114	95	123	13	14	14	18	23	21	26	23	26	14	8	11
		[111 $\pm$ 14]			[ 14 $\pm$ 1]			[ 21 $\pm$ 3]			[ 25 $\pm$ 2]			[ 11 $\pm$ 3]		
	625	97	82	103	10	6	12	28	23	26	22	17	27	10	11	8
		[ 94 $\pm$ 11]			[ 9 $\pm$ 3]			[ 26 $\pm$ 3]			[ 22 $\pm$ 5]			[ 10 $\pm$ 2]		
	1250	111	89	101	11	12	7	19	18	14	20	18	31	15	16	16
		[100 $\pm$ 11]			[ 10 $\pm$ 3]			[ 17 $\pm$ 3]			[ 23 $\pm$ 7]			[ 16 $\pm$ 1]		
	2500	102	92	94	14	6	19	23	25	26	20	14	25	15	18	11
		[ 96 $\pm$ 5]			[ 13 $\pm$ 7]			[ 25 $\pm$ 2]			[ 20 $\pm$ 6]			[ 15 $\pm$ 4]		
	5000	101	96	102	10	8	10	25	15	19	17	31	26	15	17	22
		[100 $\pm$ 3]			[ 9 $\pm$ 1]			[ 20 $\pm$ 5]			[ 25 $\pm$ 7]			[ 18 $\pm$ 4]		
Positive control		512	497	481 <sup>a)</sup>	305	325	345 <sup>b)</sup>	152	117	125 <sup>a)</sup>	624	622	553 <sup>a)</sup>	405	448	445 <sup>d)</sup>
		[497 $\pm$ 16]			[325 $\pm$ 20]			[131 $\pm$ 18]			[600 $\pm$ 40]			[433 $\pm$ 24]		

#: Solvent control

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): ACR; 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 

Table 2. Results of the bacterial reversion test of 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (1st trial) [activation method:+S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	90	83	90	12	12	17	28	29	29	27	34	22	15	11	10
		[ 88 $\pm$ 4]			[ 14 $\pm$ 3]			[ 29 $\pm$ 1]			[ 28 $\pm$ 6]			[ 12 $\pm$ 3]		
Test sub.	156	154	145	137	15	17	14	28	25	31	35	41	41	13	20	22
		[ 145 $\pm$ 9]			[ 15 $\pm$ 2]			[ 28 $\pm$ 3]			[ 39 $\pm$ 3]			[ 18 $\pm$ 5]		
	313	149	173	158	14	16	17	20	26	23	62	50	51	16	18	17
		[ 160 $\pm$ 12]			[ 16 $\pm$ 2]			[ 23 $\pm$ 3]			[ 54 $\pm$ 7]			[ 17 $\pm$ 1]		
	625	202	222	224	14	19	17	19	27	23	116	90	97	25	27	29
		[ 216 $\pm$ 12]			[ 17 $\pm$ 3]			[ 23 $\pm$ 4]			[ 101 $\pm$ 13]			[ 27 $\pm$ 2]		
	1250	399	455	385	28	28	29	23	22	23	289	308	239	62	82	60
		[ 413 $\pm$ 37]			[ 28 $\pm$ 1]			[ 23 $\pm$ 1]			[ 279 $\pm$ 36]			[ 68 $\pm$ 12]		
	2500	996	788	858	37	57	51	30	25	33	844	874	994	182	164	174
		[ 881 $\pm$ 106]			[ 48 $\pm$ 10]			[ 29 $\pm$ 4]			[ 904 $\pm$ 79]			[ 173 $\pm$ 9]		
	5000	1508	1273	1531	60	58	68	47	62	62	2480	2521	2545	426	501	482
		[1437 $\pm$ 143]			[ 62 $\pm$ 5]			[ 57 $\pm$ 9]			[2515 $\pm$ 33]			[470 $\pm$ 39]		
Positive control		657	574	665 <sup>a)</sup>	346	343	319 <sup>b)</sup>	719	597	772 <sup>c)</sup>	325	332	363 <sup>d)</sup>	127	120	128 <sup>b)</sup>
		[ 632 $\pm$ 50]			[336 $\pm$ 15]			[696 $\pm$ 90]			[ 340 $\pm$ 20]			[125 $\pm$ 4]		

#: Solvent control

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b): 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c): 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d): 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$



Table 3. Results of the bacterial reversion test of 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (2nd trial) [direct method: -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	91	97	110	12	15	15	20	19	21	19	16	25	6	10	7
		[ 99 $\pm$ 10]			[ 14 $\pm$ 2]			[ 20 $\pm$ 1]			[ 20 $\pm$ 5]			[ 8 $\pm$ 2]		
Test sub.	156	93	94	117	19	12	9	22	16	22	25	21	23	9	7	11
		[101 $\pm$ 14]			[ 13 $\pm$ 5]			[ 20 $\pm$ 3]			[ 23 $\pm$ 2]			[ 9 $\pm$ 2]		
	313	101	99	101	9	7	9	19	18	12	25	21	19	8	11	10
		[100 $\pm$ 1]			[ 8 $\pm$ 1]			[ 16 $\pm$ 4]			[ 22 $\pm$ 3]			[ 10 $\pm$ 2]		
	625	91	99	109	14	11	12	20	25	15	25	26	25	7	12	9
		[100 $\pm$ 9]			[ 12 $\pm$ 2]			[ 20 $\pm$ 5]			[ 25 $\pm$ 1]			[ 9 $\pm$ 3]		
	1250	114	108	118	13	11	5	22	21	21	18	21	24	6	11	9
		[113 $\pm$ 5]			[ 10 $\pm$ 4]			[ 21 $\pm$ 1]			[ 21 $\pm$ 3]			[ 9 $\pm$ 3]		
	2500	107	107	125	10	14	12	29	14	16	23	23	31	13	12	17
		[113 $\pm$ 10]			[ 12 $\pm$ 2]			[ 20 $\pm$ 8]			[ 26 $\pm$ 5]			[ 14 $\pm$ 3]		
	5000	123	110	123	14	12	13	20	17	23	23	26	21	9	14	15
		[119 $\pm$ 8]			[ 13 $\pm$ 1]			[ 20 $\pm$ 3]			[ 23 $\pm$ 3]			[ 13 $\pm$ 3]		
Positive control		424	421	499 <sup>a)</sup>	360	340	368 <sup>b)</sup>	126	152	117 <sup>a)</sup>	612	636	628 <sup>c)</sup>	492	427	462 <sup>d)</sup>
		[448 $\pm$ 44]			[356 $\pm$ 14]			[132 $\pm$ 18]			[625 $\pm$ 12]			[460 $\pm$ 33]		

#: Solvent control

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): ACR; 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid (2nd trial) [activation method: +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	106	116	125	13	10	12	27	24	23	26	34	27	17	13	13
		[ 116 $\pm$ 10]			[ 12 $\pm$ 2]			[ 25 $\pm$ 2]			[ 29 $\pm$ 4]			[ 14 $\pm$ 2]		
Test sub.	156	117	150	145	20	18	11	22	25	25	54	50	49	18	25	16
		[ 137 $\pm$ 18]			[ 16 $\pm$ 5]			[ 24 $\pm$ 2]			[ 51 $\pm$ 3]			[ 20 $\pm$ 5]		
	313	149	181	138	19	24	18	22	30	21	74	50	68	21	18	18
		[ 156 $\pm$ 22]			[ 20 $\pm$ 3]			[ 24 $\pm$ 5]			[ 64 $\pm$ 12]			[ 19 $\pm$ 2]		
	625	196	235	249	21	18	29	23	22	29	121	135	110	37	28	32
		[ 227 $\pm$ 27]			[ 23 $\pm$ 6]			[ 25 $\pm$ 4]			[ 122 $\pm$ 13]			[ 32 $\pm$ 5]		
	1250	477	411	467	38	37	26	32	24	30	306	292	364	75	72	76
		[ 452 $\pm$ 36]			[ 34 $\pm$ 7]			[ 29 $\pm$ 4]			[ 321 $\pm$ 38]			[ 74 $\pm$ 2]		
	2500	840	932	985	42	58	48	32	25	29	899	886	906	220	200	213
		[ 919 $\pm$ 73]			[ 49 $\pm$ 8]			[ 29 $\pm$ 4]			[ 897 $\pm$ 10]			[211 $\pm$ 10]		
	5000	1578	1495	1224	87	57	81	48	42	41	2731	2365	2193	537	541	549
		[1432 $\pm$ 185]			[ 75 $\pm$ 16]			[ 44 $\pm$ 4]			[2430 $\pm$ 275]			[542 $\pm$ 6]		
Positive control		675	675	641 <sup>a)</sup>	327	343	327 <sup>b)</sup>	571	774	781 <sup>c)</sup>	342	363	425 <sup>d)</sup>	145	104	123 <sup>b)</sup>
		[ 664 $\pm$ 20]			[332 $\pm$ 9]			[709 $\pm$ 119]			[ 377 $\pm$ 43]			[124 $\pm$ 21]		

#: Solvent control

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b): 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c): 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d): 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の  
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  
7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株(CHL)を用いる *in vitro* 染色体異常試験を行った。細胞増殖抑制試験結果において細胞毒性が溶解限界まで認められなかったため、OECDのガイドラインに従って溶解限界を最高用量とした。すなわち、連続処理法(24時間処理および48時間処理)ならびに短時間処理法(6時間処理の+S9 mixおよび-S9 mix)のいずれにおいても使用溶媒での溶解限界濃度を含む375, 750および1500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の3用量(公比2)について染色体標本を作製した後、顕微鏡観察を実施した。連続処理法ならびに短時間処理法のいずれにおいても被験物質処理による顕著な細胞増殖抑制作用は観察されず、染色体異常、構造異常あるいは倍数性細胞の誘発も認められなかった。一方、連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンC(MMC)および短時間処理+S9 mixの陽性対照物質シクロホスファミド(CP)は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。従って、本試験条件下の *in vitro* 試験系において、7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸には染色体異常を誘起する可能性がないものと判断した。

材料および方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK社)を10%添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3~5日ごとに継代した。なお、本染色体異常試験では解凍後継代数14の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM培地(LIFE TECHNOLOGIES社)を1000 mlの精製水で溶解した後、2.2 gの炭酸水素ナトリウム(関東化学株)を加えた。1N塩酸を用いてpHを7.2に調整した後、メンブランフィルター(0.2  $\mu\text{m}$ :Gelman Sciences社)を用いて加圧濾過除菌した。非働化(56℃, 30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終

濃度で10%になるよう加えた後、試験に使用した。

3. 培養条件

CO<sub>2</sub>インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機特機株)を用い、CO<sub>2</sub>濃度5%、37℃の条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成は松岡らの方法に従った<sup>1)</sup>。

5. 被験物質

被験物質の7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸(ロット番号:0901, CAS No.:87-02-5)は分子式C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>S, 分子量239.25, 純度91.8%(不純物として硫酸ナトリウム分2.0 wt%および水分3.5 wt%を含む)の粉末で、水、アセトンにほとんど溶けない。本試験にはスガイ化学工業(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質溶液の調製

DMSOに被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

なお、本被験物質の純度は95%未満であるため、秤量に際して換算した。

7. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質溶液を処理した。連続処理法の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理法ではS9 mix存在下(+S9 mix)あるいは非存在下(-S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

細胞を10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業株)で固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット(関東化学株)水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30%エタノール, 1%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、す

なわち細胞生存率を算出した。

その結果、連続処理法48時間の1500  $\mu\text{g/ml}$ (溶解限界濃度)において僅かな細胞増殖抑制が観察されたが、他の試験系では明確な抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。従って、50%細胞増殖抑制濃度はいずれの試験系とも溶解限界濃度の1500  $\mu\text{g/ml}$ 以上と考えられた。

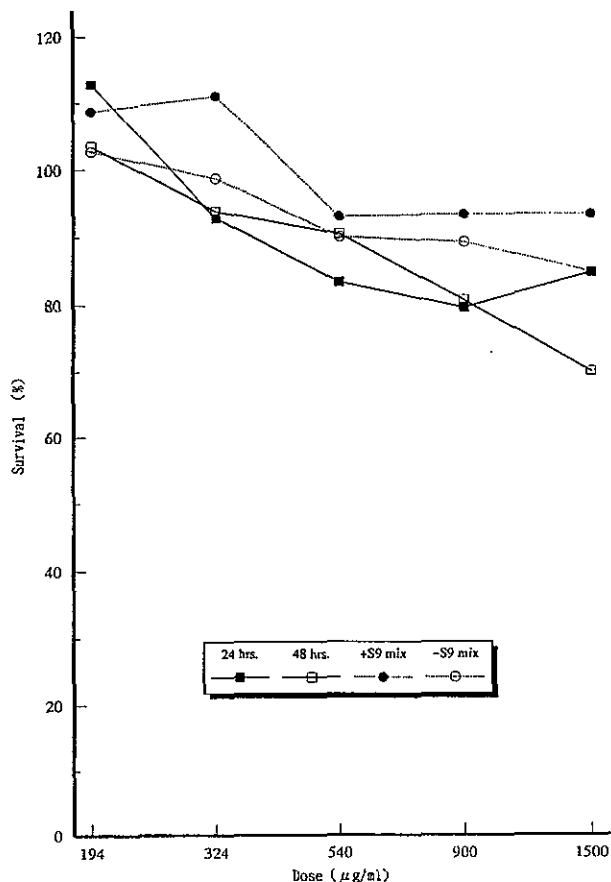


Fig. 1 Dose-survival curves of 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid

### 8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果を基に、染色体異常試験では連続処理法、短時間処理法とも溶解限界濃度の1500  $\mu\text{g/ml}$ を高用量とし、以下公比2で減じた750および350  $\mu\text{g/ml}$ の計3用量ならびに溶媒対照群を設定した。

陽性対照として、連続処理法の場合、マイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業(株))を、24時間処理で0.05  $\mu\text{g/ml}$ 、48時間処理で0.025  $\mu\text{g/ml}$ の用量で、短時間処理法の場合、シクロホスファミド(CP:塩野義製薬(株))を、12.5  $\mu\text{g/ml}$ の用量で試験した。

### 9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、予備試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃度で0.2  $\mu\text{g/ml}$ となるようコルセミド(LIFE TECHNOLOGIES社)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化

カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本作製した後、1.2%ギムザ染色液で12分間染色した。

### 10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)、染色体切断(csb)、染色分体交換(cte)、染色体交換(cse)およびその他(oth)の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。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<sup>2)</sup>による分類法に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、観察した。

### 11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めた場合(+gap)と、含まない場合(-gap)とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、石館ら<sup>3)</sup>の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が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。最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

### 結果および考察

連続処理群での試験結果をTable 1に示した。7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸処理群の場合、24時間ならびに48時間処理のいずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。短時間処理群での試験結果をTable 2に示した。被験物質処理群の場合、+S9 mixならびに-S9 mixのいずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。また、陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。以上の試験結果から、本試験条件下において7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸の哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陰性と判定した。

Table 1. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [long-term treatment]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO*	0	24	200	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	0.5	-
Test Sub.	375	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.0	-
	750	24	200	0	0	0	5	0	0	2.5	2.5	0.0	-
	1500	24	200	0	2	0	5	0	0	3.5	3.5	1.0	-
MMC**	0.05	24	200	10	30	0	100	0	0	55.0	55.0	0.0	+
DMSO*	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-
Test Sub.	375	48	200	0	1	0	2	0	0	1.5	1.5	0.5	-
	750	48	200	1	2	0	5	1	0	4.5	4.0	0.0	-
	1500	48	200	0	0	0	3	1	0	2.0	2.0	0.0	-
MMC**	0.025	48	200	7	38	0	100	2	0	55.0	55.0	0.0	+

\*:Solvent control    \*\*:Positive control (mitomycin C)

ctb:chromatid break    csb:chromosome break    cte:chromatid exchange    cse:chromosome exchange    oth:others

Table 2. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid [short-term treatment]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO*	0	+	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.5	-
Test Sub.	375	+	6	200	0	0	0	0	1	0	0.5	0.5	0.0	-
	750	+	6	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	1.5	-
	1500	+	6	200	0	0	0	2	0	0	1.0	1.0	0.0	-
CP**	12.5	+	6	200	4	20	0	71	0	0	40.5	39.0	0.0	+
DMSO*	0	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-
Test Sub.	375	-	6	200	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0	-
	750	-	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-
	1500	-	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-
CP**	12.5	-	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.5	-

\*:Solvent control    \*\*:Positive control (cyclophosphamide)

ctb:chromatid break    csb:chromosome break    cte:chromatid exchange    cse:chromosome exchange    oth:others

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat Res.*, **66**, 277(1979).
- 2) 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.31-35.
- 3) 石館基 監修, “<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 東京, 1987, pp.19-24.

連絡先

試験責任者：中嶋 圓  
試験担当者：北沢倫世, 藤原正孝, 菊池正憲  
(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: Madoka Nakajima (Study director)  
Michiyo Kitazawa, Masataka Fujiwara  
Masanori Kikuchi  
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)  
582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,  
Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan  
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

# ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of Benzyltrimethylammonium chloride on Bacteria

### 要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの変異原性について遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535およびTA1537株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA株を用いる復帰突然変異試験を行った。予備的な試験の結果を基に、試験用量を設定した。すなわち、直接法 (-S9 mix) ならびに代謝活性化法 (+S9 mix) の各菌株についてそれぞれ、156~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの6用量を設定し試験した。その結果、直接法および代謝活性化法のいずれにおいても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められず、再現性も確認された。一方、各系での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。従って、本試験条件下において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドは微生物に対し遺伝子突然変異を誘起しないものと判断した。

### 材料および方法

#### 1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537<sup>1)</sup>ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2uvrA<sup>2)</sup>の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所から分与を受けた。平成6年11月25日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド (DMSO: MERCK社) を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mlずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

#### 2. 培地の調製

##### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

日清製粉(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液 (0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエ

ン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム [いずれも最終濃度]) に2%のグルコース (和光純薬工業(株)) と1.5%の寒天 (OXOID社:No.1) を加え、30 mlをシャーレに分注したものである。

##### 2) トップアガー(軟寒天)

Bacto-agar (DIFCO社) 0.6%を含む0.5%塩化ナトリウム水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン (関東化学(株)) -0.5 mM D-ビオチン (関東化学(株)) 水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン (関東化学(株)) 水溶液を同じく1容量加え用いた。

#### 3. 前培養条件

内容量200 mlの円筒容器 (ストレージボトル: Corning Costar社) に2.5%ニュートリエントブロス (OXOID社) 溶液を25ml分注し、これに融解した菌懸濁液を50  $\mu\text{l}$ 接種した。ウォーターバスシェーカー (MM-10:タイテック(株)) を用い、37℃で8時間振盪 (往復振盪:120回/分) 培養し、試験に使用した。

#### 4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボン を投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1ml中の量
S9	0.1 ml
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADPH	4 $\mu\text{mol}$
NADH	4 $\mu\text{mol}$
リン酸緩衝Na-液 (pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$

#### 5. 被験物質

被験物質のベンジルトリメチルアンモニウムクロリド (ロット番号:RSL9083, CAS No.:56-93-9) は分子式C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>ClN, 分子量185.70, 純度99.0%以上の白色粉末である。和光純薬工業(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質溶液の調製

注射用蒸留水(大塚蒸留水:株大塚製薬工場)に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 試験用量の設定

8.00, 40.0, 200, 1000および5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、直接法のTA100およびTA1535で5000  $\mu\text{g}$ /プレートにおいて試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。従って、本試験においては直接法ならびに代謝活性化法の各菌株について5000  $\mu\text{g}$ /プレートを最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20°C)した。

- 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2:和光純薬工業株)
- アジ化ナトリウム( $\text{NaN}_3$ :和光純薬工業株)
- 9-アミノアクリジン(ACR:ALDRICH社)
- 2-アミノアントラセン(2-AA:和光純薬工業株)

9. 試験方法

Amesらの原法の改良法であるプレインキュベーション法<sup>1)</sup>に準じて、直接法および代謝活性化法それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を100  $\mu\text{l}$ 、次いで直接法の場合、0.1 Mナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500  $\mu\text{l}$ 、代謝活性化法の場合、S9 mixを500  $\mu\text{l}$ および試験菌液100  $\mu\text{l}$ を加え、37°Cで20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、トップアガーを2 ml添加し、混合液をプレート上に重層した。37°Cの条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡( $\times 60$ )を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアライザー(CA-11:システムサイエンス株)を用いた。独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

試験結果をTable 1~4に示した。直接法(-S9 mix)のTA100およびTA1535の5000  $\mu\text{g}$ /プレートにおいて、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理による生育阻害作用が観察された。直接法のTA98, TA1537およびWP2uvrAならびに代謝活性化法(+S9 mix)では、5000  $\mu\text{g}$ /プレートにおいても同作用は観察されなかった。また、復帰突然変異コロニー数については、直接法、代謝活性化法とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、試験中析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から、本試験条件下においてベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron, and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, **38**, 3 (1976)

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓  
 試験担当者: 北沢倫世, 熊平智司, 勝俣 勇  
 (財)食品農薬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: Madoka Nakajima (Study director)  
 Michiyo Kitazawa, Satoshi Kumadaira  
 Isami Katsumata  
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
 Pesticides (An-pyo Center)  
 582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,  
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan  
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride (1st trial) [direct method: -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
D.W.#	0	97	91	85	13	8	12	23	24	21	22	27	25	9	6	7
		[ 91 $\pm$ 6]			[ 11 $\pm$ 3]			[ 23 $\pm$ 2]			[ 25 $\pm$ 3]			[ 7 $\pm$ 2]		
Test sub.	156	103	93	88	17	7	8	19	22	24	27	30	21	10	5	9
		[ 95 $\pm$ 8]			[ 11 $\pm$ 6]			[ 22 $\pm$ 3]			[ 26 $\pm$ 5]			[ 8 $\pm$ 3]		
	313	91	95	94	16	10	10	18	22	18	23	21	23	11	5	10
		[ 93 $\pm$ 2]			[ 12 $\pm$ 3]			[ 19 $\pm$ 2]			[ 22 $\pm$ 1]			[ 9 $\pm$ 3]		
	625	95	83	101	9	9	15	19	21	24	29	28	27	11	5	9
		[ 93 $\pm$ 9]			[ 11 $\pm$ 3]			[ 21 $\pm$ 3]			[ 28 $\pm$ 1]			[ 8 $\pm$ 3]		
1250	90	96	102	11	10	14	23	24	20	20	35	27	10	11	9	
	[ 96 $\pm$ 6]			[ 12 $\pm$ 2]			[ 22 $\pm$ 2]			[ 27 $\pm$ 8]			[ 10 $\pm$ 1]			
2500	87	100	89	17	7	6	25	26	21	25	24	23	7	6	8	
	[ 92 $\pm$ 7]			[ 10 $\pm$ 6]			[ 24 $\pm$ 3]			[ 24 $\pm$ 1]			[ 7 $\pm$ 1]			
5000	97*	84*	96*	7*	13*	8*	23	21	22	22	30	23	10	9	8	
	[ 92 $\pm$ 7]			[ 9 $\pm$ 3]			[ 22 $\pm$ 1]			[ 25 $\pm$ 4]			[ 9 $\pm$ 1]			
Positive control		555	518	487 <sup>a1</sup>	464	409	411 <sup>b1</sup>	119	126	124 <sup>a1</sup>	631	595	660 <sup>c1</sup>	546	496	519 <sup>d1</sup>
		[520 $\pm$ 34]			[428 $\pm$ 31]			[123 $\pm$ 4]			[629 $\pm$ 33]			[520 $\pm$ 25]		

#: Solvent control \* : The background lawn was thin  
 a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b) : NaN<sub>3</sub>; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) : AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
 d) : ACR; 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride (1st trial) [activation method: +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
D.W.#	0	106	109	100	15	10	13	31	20	25	27	32	28	12	11	10
		[105 $\pm$ 5]			[ 13 $\pm$ 3]			[ 25 $\pm$ 6]			[ 29 $\pm$ 3]			[ 11 $\pm$ 1]		
Test sub.	156	109	93	102	14	9	12	24	21	19	31	25	32	9	7	7
		[101 $\pm$ 8]			[ 12 $\pm$ 3]			[ 21 $\pm$ 3]			[ 29 $\pm$ 4]			[ 8 $\pm$ 1]		
	313	99	96	94	14	10	13	26	20	26	31	43	35	15	11	11
		[ 96 $\pm$ 3]			[ 12 $\pm$ 2]			[ 24 $\pm$ 3]			[ 36 $\pm$ 6]			[ 12 $\pm$ 2]		
	625	90	93	89	17	13	16	22	19	17	33	33	43	11	10	9
		[ 91 $\pm$ 2]			[ 15 $\pm$ 2]			[ 19 $\pm$ 3]			[ 36 $\pm$ 6]			[ 10 $\pm$ 1]		
1250	96	94	98	15	15	13	23	23	26	34	47	34	14	6	9	
	[ 96 $\pm$ 2]			[ 14 $\pm$ 1]			[ 24 $\pm$ 2]			[ 38 $\pm$ 8]			[ 10 $\pm$ 4]			
2500	103	116	112	8	13	8	31	26	21	31	29	32	6	10	8	
	[110 $\pm$ 7]			[ 10 $\pm$ 3]			[ 26 $\pm$ 5]			[ 31 $\pm$ 2]			[ 8 $\pm$ 2]			
5000	95	86	93	18	14	7	23	21	23	47	35	30	12	5	11	
	[ 91 $\pm$ 5]			[ 13 $\pm$ 6]			[ 22 $\pm$ 1]			[ 37 $\pm$ 9]			[ 9 $\pm$ 4]			
Positive control		668	655	682 <sup>a1</sup>	319	333	376 <sup>b1</sup>	792	700	762 <sup>c1</sup>	391	335	316 <sup>d1</sup>	152	133	171 <sup>b1</sup>
		[668 $\pm$ 14]			[343 $\pm$ 30]			[751 $\pm$ 47]			[347 $\pm$ 39]			[152 $\pm$ 19]		

#: Solvent control  
 a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b) : 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) : 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) : 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$



Table 3. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride (2nd trial) [direct method: -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
D.W.#	0	116	97	93	17	16	15	29	33	29	32	29	26	7	11	8
		[102 $\pm$ 12]			[ 16 $\pm$ 1]			[ 30 $\pm$ 2]			[ 29 $\pm$ 3]			[ 9 $\pm$ 2]		
Test sub.	156	105	105	111	14	15	10	37	35	25	27	32	21	10	12	9
		[107 $\pm$ 3]			[ 13 $\pm$ 3]			[ 32 $\pm$ 6]			[ 27 $\pm$ 6]			[ 10 $\pm$ 2]		
	313	115	103	99	17	9	8	24	21	24	30	20	30	9	8	8
		[106 $\pm$ 8]			[ 11 $\pm$ 5]			[ 23 $\pm$ 2]			[ 27 $\pm$ 6]			[ 8 $\pm$ 1]		
	625	110	99	124	14	14	9	25	22	27	30	23	31	12	11	9
		[111 $\pm$ 13]			[ 12 $\pm$ 3]			[ 25 $\pm$ 3]			[ 28 $\pm$ 4]			[ 11 $\pm$ 2]		
	1250	110	99	102	18	12	14	23	24	21	35	27	25	4	9	7
		[104 $\pm$ 6]			[ 15 $\pm$ 3]			[ 23 $\pm$ 2]			[ 29 $\pm$ 5]			[ 7 $\pm$ 3]		
	2500	94	109	98	13	13	11	26	25	30	25	26	28	12	10	9
		[100 $\pm$ 8]			[ 12 $\pm$ 1]			[ 27 $\pm$ 3]			[ 26 $\pm$ 2]			[ 10 $\pm$ 2]		
	5000	91*	110*	104*	12*	13*	13*	29	26	28	25	27	32	11	11	10
		[102 $\pm$ 10]			[ 13 $\pm$ 1]			[ 28 $\pm$ 2]			[ 28 $\pm$ 4]			[ 11 $\pm$ 1]		
Positive control		441	437	458 <sup>a)</sup>	507	436	439 <sup>b)</sup>	122	111	121 <sup>a)</sup>	501	570	543 <sup>c)</sup>	450	482	448 <sup>d)</sup>
		[445 $\pm$ 11]			[461 $\pm$ 40]			[118 $\pm$ 6]			[538 $\pm$ 35]			[460 $\pm$ 19]		

#: Solvent control    \*: The background lawn was thin  
a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b):  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$     c): AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
d): ACR; 9-Aminoacridine, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride (2nd trial) [activation method: +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
D.W.#	0	111	114	92	12	15	15	28	21	26	30	34	25	15	9	11
		[106 $\pm$ 12]			[ 14 $\pm$ 2]			[ 25 $\pm$ 4]			[ 30 $\pm$ 5]			[ 12 $\pm$ 3]		
Test sub.	156	84	101	98	9	9	16	24	19	22	34	26	28	10	10	9
		[ 94 $\pm$ 9]			[ 11 $\pm$ 4]			[ 22 $\pm$ 3]			[ 29 $\pm$ 4]			[ 10 $\pm$ 1]		
	313	82	101	120	13	16	16	23	22	19	27	18	24	5	6	8
		[101 $\pm$ 19]			[ 15 $\pm$ 2]			[ 21 $\pm$ 2]			[ 23 $\pm$ 5]			[ 6 $\pm$ 2]		
	625	116	84	85	15	10	16	20	14	24	21	30	28	7	7	10
		[ 95 $\pm$ 18]			[ 14 $\pm$ 3]			[ 19 $\pm$ 5]			[ 26 $\pm$ 5]			[ 8 $\pm$ 2]		
	1250	114	109	96	14	11	10	20	20	24	28	26	19	8	11	13
		[106 $\pm$ 9]			[ 12 $\pm$ 2]			[ 21 $\pm$ 2]			[ 24 $\pm$ 5]			[ 11 $\pm$ 3]		
	2500	115	103	102	10	16	15	25	19	26	39	25	29	9	9	6
		[107 $\pm$ 7]			[ 14 $\pm$ 3]			[ 23 $\pm$ 4]			[ 31 $\pm$ 7]			[ 8 $\pm$ 2]		
	5000	104	118	110	16	13	10	27	22	20	25	26	26	10	13	7
		[111 $\pm$ 7]			[ 13 $\pm$ 3]			[ 23 $\pm$ 4]			[ 26 $\pm$ 1]			[ 10 $\pm$ 3]		
Positive control		614	625	618 <sup>a)</sup>	415	382	384 <sup>b)</sup>	795	730	745 <sup>c)</sup>	308	311	346 <sup>d)</sup>	103	113	135 <sup>b)</sup>
		[619 $\pm$ 6]			[394 $\pm$ 19]			[757 $\pm$ 34]			[322 $\pm$ 21]			[117 $\pm$ 16]		

#: Solvent control  
a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$     b): 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$     c): 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$     d): 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

# ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの 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 Benzyltrimethylammonium chloride on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株(CHL)を用いる *in vitro* 染色体異常試験を行った。細胞増殖抑制試験において細胞が死滅するほどの毒性が観察されなかったため、OECDのガイドラインに従って10 mM相当の濃度を最高用量とした。すなわち、連続処理法(24時間処理および48時間処理)ならびに短時間処理法(6時間処理の+S9 mixおよび-S9 mix)のいずれにおいても使用溶媒での10 mM相当を最高用量とした475, 950および1900  $\mu\text{g/ml}$ の3用量(公比2)について染色体標本作製した後、顕微鏡観察を実施した。短時間+S9 mix処理法の1900  $\mu\text{g/ml}$ において、僅かではあるが染色体構造異常の誘発傾向が観察された。同処理法において1000, 1300, 1600および1900  $\mu\text{g/ml}$ の4用量を用いた確認試験を2回繰り返して実施した結果、構造異常誘発頻度は1回目で各用量群2.5~3.5%であったが、2回目は4.0~6.5%の細胞に構造異常の誘発が認められた。一方、連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンC(MMC)および短時間+S9 mix処理の陽性対照物質シクロホスファミド(CP)は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。従って、本試験条件下の *in vitro* 試験系において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの染色体異常誘起性について疑陽性と判断した。

### 材料および方法

#### 1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK社)を10%添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3~5日ごとに継代した。なお、本染色体異常試験では解凍後継代数9の細胞を、確認試験においては同8および45の細胞を用いた。

#### 2. 培養液の調製

Eagle-MEM培地(LIFE TECHNOLOGIES社)を1000 mlの精製水で溶解した後、2.2 gの炭酸水素ナトリウム

(関東化学(株))を加えた。1N塩酸を用いてpHを7.2に調整した後、メンブランフィルター(0.2  $\mu\text{m}$ :Gelman Sciences社)を用いて加圧濾過除菌した。非働化(56°C, 30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終濃度で10%になるよう加えた後、試験に使用した。

#### 3. 培養条件

CO<sub>2</sub>インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機特機(株))を用い、CO<sub>2</sub>濃度5%、37°Cの条件で細胞を培養した。

#### 4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンに投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成は松岡らの方法に従った<sup>1)</sup>。

#### 5. 被験物質

被験物質のベンジルトリメチルアンモニウムクロリド(ロット番号:RSL9083, CAS No.:56-93-9)は分子式C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>ClN, 分子量185.70, 純度99.0%以上の白色粉末である。和光純薬工業(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 6. 被験物質溶液の調製

生理食塩液(株)大塚製薬工場)に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

#### 7. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質溶液を処理した。連続処理法の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理法ではS9 mix存在下(+S9 mix)あるいは非存在下(-S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

細胞を10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業(株))で固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット(関東化学(株))水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30%エタノール, 1%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、す

なわち細胞生存率を算出した。

その結果、連続処理法においては細胞増殖抑制作用が観察されたが、短時間処理法では明確な同作用は認められなかった (Fig. 1)。プロビット法を用いて算出した50%細胞増殖抑制濃度は連続24時間処理で1311  $\mu\text{g/ml}$ 、同48時間処理で585  $\mu\text{g/ml}$ と算出された。また、短時間処理では1900  $\mu\text{g/ml}$ 以上と考えられた。

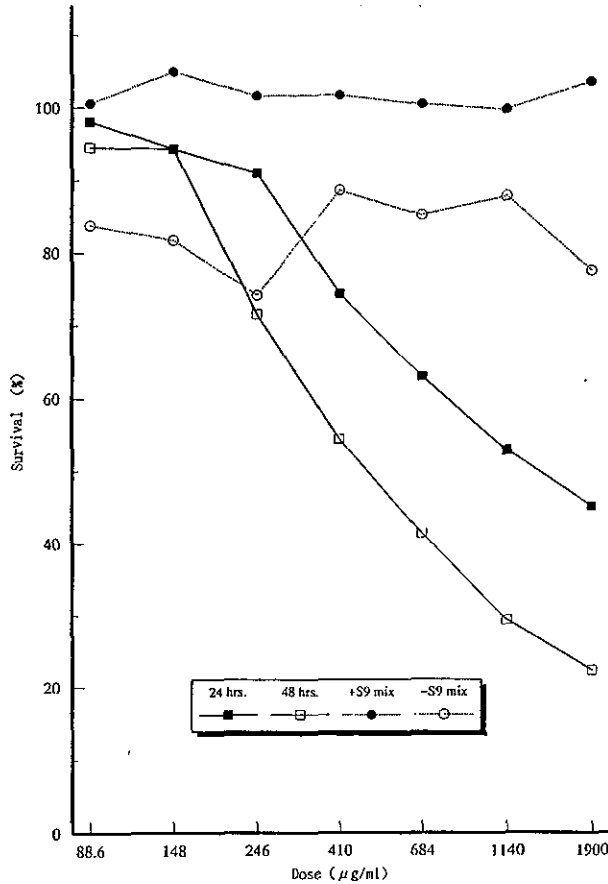


Fig. 1 Dose-survival curves of benzyltrimethylammonium chloride

### 8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果を基に、染色体異常試験では連続処理法、短時間処理法とも10 mM相当の1900  $\mu\text{g/ml}$ を高用量とし、以下公比2で減じた950および475  $\mu\text{g/ml}$ の計3用量ならびに溶媒対照群を設定した。

陽性対照として、連続処理法の場合、マイトマイシンC (MMC: 協和醸酵工業(株)) を、24時間処理で0.05  $\mu\text{g/ml}$ 、48時間処理で0.025  $\mu\text{g/ml}$ の用量で、短時間処理法の場合、シクロホスファミド (CP: 塩野義製薬(株)) を、12.5  $\mu\text{g/ml}$ の用量で試験した。

また、確認試験においては1000, 1300, 1600および1900  $\mu\text{g/ml}$ の4用量 (等差数列) を設定した。

### 9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、予備試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃

度で0.2  $\mu\text{g/ml}$ となるようコロセミド (LIFE TECHNOLOGIES社) を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液 (メタノール3容: 酢酸1容) で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.2%ギムザ染色液で12分間染色した。

### 10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ (gap)、染色体切断 (ctb)、染色体切断 (csb)、染色分体交換 (cte)、染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。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<sup>2)</sup>による分類法に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、観察した。

### 11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めた場合 (+gap) と、含めない場合 (-gap) とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、石館ら<sup>3)</sup>の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性 (-)、5%以上10%未満を疑陽性 ( $\pm$ )、10%以上を陽性 (+) とした。最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

### 結果および考察

連続処理群での試験結果をTable 1に示した。ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理群の場合、24時間ならびに48時間処理のいずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。短時間処理群での試験結果をTable 2に示した。被験物質処理群の場合、+S9 mix処理において高用量の1900  $\mu\text{g/ml}$ においてのみ染色体の構造異常の出現頻度が5%を示し、疑陽性と判定された。再現性を調査するため確認試験を実施した結果、1回目の試験では染色体構造異常の誘発頻度が2.5~3.5%であり疑陽性の判定基準である5%を超えることはなかった (Table 3)。2回目の確認試験では被験物質処理群において僅かではあるが染色体の構造異常の増加傾向が観察された (Table 4)。また、陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。以上の試験結果から、本試験条件下においてベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの哺乳動物培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、疑陽性と判定した。

Table 1. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with benzyltrimethylammonium chloride [long-term treatment]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline*	0	24	200	2	1	1	1	0	0	2.5	1.5	2.5	-
Test Sub.	475	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-
	950	24	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-
	1900	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-
MMC**	0.05	24	200	25	76	1	97	1	0	71.0	69.0	1.0	+
Saline*	0	48	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.5	-
Test Sub.	475	48	200	1	1	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-
	950	48	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	1.5	-
	1900	48	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	3.0	-
MMC**	0.025	48	200	15	45	1	66	3	0	50.5	47.5	0.5	+

\*:Solvent control    \*\*:Positive control (mitomycin C)  
 ctb:chromatid break    csb:chromosome break    cte:chromatid exchange    cse:chromosome exchange    oth:others

Table 2. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with benzyltrimethylammonium chloride [short-term treatment]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline*	0	+	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.5	-
Test Sub.	475	+	6	200	0	0	0	3	0	0	1.5	1.5	0.0	-
	950	+	6	200	1	4	0	5	1	1	4.0	4.0	3.5	-
	1900	+	6	200	3	3	0	9	0	0	5.0	5.0	2.5	±
CP**	12.5	+	6	200	7	36	0	61	2	1	43.5	42.0	0.5	+
Saline*	0	-	6	200	2	0	0	0	1	0	1.5	0.5	0.5	-
Test Sub.	475	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-
	950	-	6	200	3	1	0	0	0	0	2.0	0.5	1.0	-
	1900	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	2.0	-
CP**	12.5	-	6	200	0	1	0	1	0	0	1.0	1.0	0.0	-

\*: Solvent control    \*\*:Positive control (cyclophosphamide)  
 ctb:chromatid break    csb:chromosome break    cte:chromatid exchange    cse:chromosome exchange    oth:others

Table 3. Results of the confirmative examination using CHL cells of benzyltrimethylammonium chloride [short-term treatment: first trial]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline*	0	+	6	200	1	0	0	1	0	0	1.0	0.5	0.0	-
Test Sub.	1000	+	6	200	0	3	0	4	1	0	3.0	3.0	1.0	-
	1300	+	6	200	1	0	0	4	0	0	2.5	2.0	1.0	-
	1600	+	6	200	2	2	0	5	0	0	3.5	3.0	0.0	-
	1900	+	6	200	1	0	1	2	1	0	2.5	2.0	1.0	-
CP**	12.5	+	6	200	26	43	0	137	3	0	74.0	72.5	1.5	+

\*: Solvent control    \*\*: Positive control (cyclophosphamide)  
 ctb: chromatid break    csb: chromosome break    cte: chromatid exchange    cse: chromosome exchange    oth: others

Table 4. Results of the confirmative examination using CHL cells of benzyltrimethylammonium chloride [short-term treatment: second trial]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline*	0	+	6	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.0	-
Test Sub.	1000	+	6	200	1	2	0	8	0	0	4.0	4.0	0.0	-
	1300	+	6	200	2	2	0	9	0	0	5.0	4.5	0.5	±
	1600	+	6	200	1	2	0	10	0	0	5.5	5.5	0.0	±
	1900	+	6	200	0	2	0	12	0	1	6.5	6.5	1.0	±
CP**	12.5	+	6	200	11	37	0	116	0	0	63.0	62.0	1.0	+

\*: Solvent control    \*\*: Positive control (cyclophosphamide)  
 ctb: chromatid break    csb: chromosome break    cte: chromatid exchange    cse: chromosome exchange    oth: others

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat Res.*, **66**, 277 (1979).
- 2) 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. 31-35.
- 3) 石館基 監修, “<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 東京, 1987, pp. 19-24.

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓  
 試験担当者: 北沢倫世, 菊池正憲, 板倉真由実  
 (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: Madoka Nakajima (Study director)  
 Michiyo Kitazawa, Masanori Kikuchi  
 Mayumi Itakura  
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
 Pesticides (An-pyo Center)  
 582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,  
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan  
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393