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[1]．毒性に関する情報としては，ラットの経口投与によるLD_{50}値は2527 mg/kg[2]で，皮膚や粘膜に刺激性を有する報告[3]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，出産生児数および哺育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［㈱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㈱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㈱)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㈱)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，膣，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，毎日午前中に雌の膣垢を採取し，ギムザ染色して鏡検した．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/出産生児数)×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χ^2検定を行い，有意差が認められた場合はArmitageのχ^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[3]ことな

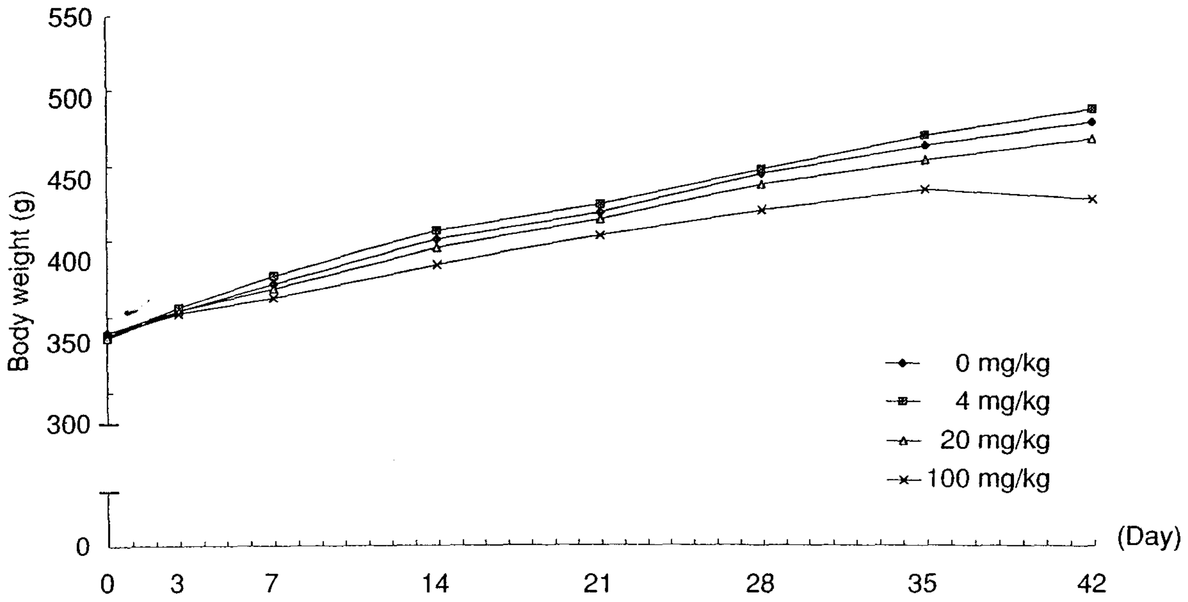

Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 5-Ethylidene-2-norbornene in the preliminaly reproduction toxicity screening test

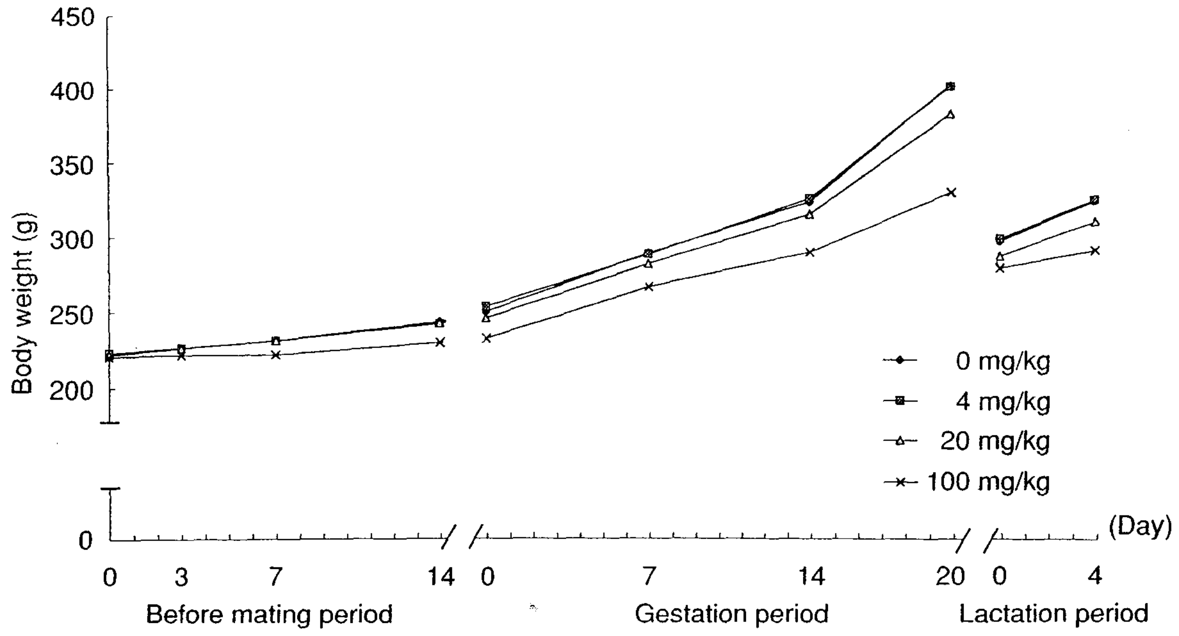

Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 5-Ethylidene-2-norbornene in the preliminaly reproduction toxicity screening test

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例に線維素性肝皮膜炎，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，心筋線維のび漫性変性，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例に胸腺のび漫性出血，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例に胸腺のび漫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，出産生児数および哺育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．この様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[4-5]，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[6]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砲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[7]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[7]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砲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，親動物および児動物の無影響量は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.1.
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

㈱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
Male				
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
Female				
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	Male					Female			
	Fate	Scheduled sacrifice				Death	Scheduled sacrifice			
	Dose (mg/kg)	0	4	20	100	100	0	4	20	100
Number of animals		12	12	12	10	2	12	12	12	12
Heart										
Degeneration, myocardium, diffuse	+	#	#	#	1/1$	#	#	#	#	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 (%) [a]	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	12	12	10	11
Fertility index (%) [b]	100.0	100.0	83.3	91.7
Pairing days until mating	2.6 ± 1.0 [c]	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 (%) [a]	100.0	100.0	100.0	90.9
Gestation length (days)	22.3 ± 0.5 [f]	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 (%) [b]	94.49 ± 6.35	94.57 ± 10.22	90.67 ± 15.92	72.79 ± 20.86**
Delivery index (%) [c]	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 (%) [d]	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 (%) [e]	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
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**
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**
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[1)]および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*[2)]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㈱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㈱)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㈱)
SA ：アジ化ナトリウム(和光純薬工業㈱)
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㈱)

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-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㈱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(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである.

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されたS9(キッコーマン㈱)を用いた.

〔試験方法〕

プレインキュベーション法[3]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分間プレインキュ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℃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.

結果および考察

〔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 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無添加試験においては，すべての検定菌で150 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TA98では150 μg/プレート以上で，その他の検定菌では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無添加試験については250 μg/プレートとし，S9 mix添加試験についてはTA1535とTA98は250 μg/プレート，その他の検定菌は500 μg/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 μg/プレートから125 μg/プレートに，500 μg/プレートから250 μg/プレートに下げて，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 (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	93 110 91 (98±10.4)	10 11 16 (12± 3.2)	20 19 23 (21± 2.1)	25 9 24 (19± 9.0)	11 5 9 (8± 3.1)	
	3.91	ND	14 8 9 (10± 3.2)	ND	ND	2 7 4 (4± 2.5)	
	7.81	84 79 92 (85± 6.6)	14 7 8 (10± 3.8)	26 25 13 (21± 7.2)	14 16 14 (15± 1.2)	6 7 7 (7± 0.6)	
	15.6	89 84 82 (85± 3.6)	9 14 18 (14± 4.5)	19 22 22 (21± 1.7)	18 22 12 (17± 5.0)	3 1 6 (3± 2.5)	
	31.3	101 98 80 (93±11.4)	10 11 14 (12± 2.1)	21 20 18 (20± 1.5)	12 19 13 (15± 3.8)	4 7 7 (6± 1.7)	
	62.5	69 73 75 (72± 3.1)	9* 7* 13* (10± 3.1)	23 21 17 (20± 3.1)	15 14 10 (13± 2.6)	5* 4* 3* (4± 1.0)	
	125	36* 83* 77* (65±25.6)	1* 6* 4* (4± 2.5)	14* 11* 20* (15± 4.6)	7* 14* 13* (11± 3.8)	3* 1* 2* (2± 1.0)	
	250	56* 0* 9* (22±30.1)	ND	26* 17* 18* (20± 4.9)	0* 0* 0* (0± 0.0)	ND	
S9 mix (+)	0	72 88 84 (81± 8.3)	22 11 17 (17± 5.5)	31 32 40 (34± 4.9)	32 32 39 (34± 4.0)	11 8 12 (10± 2.1)	
	7.81	64 81 69 (71± 8.7)	21 10 13 (15± 5.7)	ND	28 32 22 (27± 5.0)	ND	
	15.6	75 68 63 (69± 6.0)	20 14 17 (17± 3.0)	25 28 19 (24± 4.6)	31 26 26 (28± 2.9)	7 10 7 (8± 1.7)	
	31.3	72 85 69 (75± 8.5)	9 10 16 (12± 3.8)	23 29 30 (27± 3.8)	24 40 30 (31± 8.1)	6 8 9 (8± 1.5)	
	62.5	64 91 83 (79±13.9)	9 15 12 (12± 3.0)	33 21 21 (25± 6.9)	38 30 28 (32± 5.3)	13 8 9 (10± 2.6)	
	125	61* 62* 39* (54±13.0)	11* 4* 8* (8± 3.5)	30 22 23 (25± 4.4)	37 27 21 (28± 8.1)	5 5 8 (6± 1.7)	
	250	33* 44* 38* (38± 5.5)	6* 10* 6* (7± 2.3)	27 24 26 (26± 1.5)	23* 18* 20* (20± 2.5)	2* 8* 5* (5± 3.0)	
	500	ND	ND	28* 37* 22* (29± 7.5)	ND	5* 0* 5* (3± 2.9)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies/plate	456 465 416 (446±26.1)	377 409 401 (396±16.7)	127 128 150 (135±13.0)	639 636 634 (636± 2.5)	1641 1498 1585 (1575±72.1)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg/plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies/plate	290 279 280 (283± 6.1)	182 201 210 (198±14.3)	442 484 533 (486±45.5)	434 389 405 (409±22.8)	185 167 153 (168±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 (μg/plate)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	92 83 72 (82±10.0)	16 14 11 (14± 2.5)	22 20 15 (19± 3.6)	24 17 15 (19± 4.7)	8 8 5 (7± 1.7)	
	3.91	ND	14 10 15 (13± 2.6)	ND	ND	2 5 11 (6± 4.6)	
	7.81	82 89 109 (93±14.0)	16 13 8 (12± 4.0)	23 21 17 (20± 3.1)	25 23 19 (22± 3.1)	6 5 9 (7± 2.1)	
	15.6	92 85 91 (89± 3.8)	18 9 13 (13± 4.5)	13 17 19 (16± 3.1)	28 13 16 (19± 7.9)	7 4 3 (5± 2.1)	
	31.3	82 72 75 (76± 5.1)	8 14 11 (11± 3.0)	31 16 21 (23± 7.6)	11 27 21 (20± 8.1)	5 3 8 (5± 2.5)	
	62.5	70 72 86 (76± 8.7)	6* 5* 1* (4± 2.6)	14 15 20 (16± 3.2)	15 20 25 (20± 5.0)	0* 3* 4* (2± 2.1)	
	125	41* 38* 56* (45± 9.6)	0* 0* 0* (0± 0.0)	21* 21* 31* (24± 5.8)	2* 2* 1* (2± 0.6)	0* 3* 0* (1± 1.7)	
	250	0* 0* 0* (0± 0.0)	ND	12* 9* 13* (11± 2.1)	0* 2* 3* (2± 1.5)	ND	
S9 mix (+)	0	98 82 88 (89± 8.1)	17 15 13 (15± 2.0)	31 21 25 (26± 5.0)	39 38 28 (35± 6.1)	11 10 22 (14± 6.7)	
	7.81	74 100 101 (92±15.3)	5 15 11 (10± 5.0)	ND	33 29 28 (30± 2.6)	ND	
	15.6	88 96 92 (92± 4.0)	5 6 9 (7± 2.1)	28 20 25 (24± 4.0)	24 30 19 (24± 5.5)	4 7 10 (7± 3.0)	
	31.3	79 120 87 (95±21.7)	11 17 14 (14± 3.0)	21 27 25 (24± 3.1)	25 34 30 (30± 4.5)	11 11 4 (9± 4.0)	
	62.5	100 91 82 (91± 9.0)	14 14 16 (15± 1.2)	19 27 15 (20± 6.1)	30 26 29 (28± 2.1)	10 5 10 (8± 2.9)	
	125	48* 67* 82* (66±17.0)	9* 13* 5* (9± 4.0)	23 17 24 (21± 3.8)	21 30 26 (26± 4.5)	12 11 14 (12± 1.5)	
	250	35* 38* 59* (44±13.1)	9* 8* 11* (9± 1.5)	29 23 26 (26± 3.0)	33* 17* 31* (27± 8.7)	6* 7* 4* (6± 1.5)	
	500	ND	ND	25* 19* 25* (23± 3.5)	ND	0* 0* 1* (0± 0.6)	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies/plate	453 477 416 (449±30.7)	499 491 505 (498± 7.0)	67 75 72 (71± 4.0)	555 542 494 (530±32.1)	825 843 749 (806±49.9)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg/plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies/plate	517 415 396 (443±65.1)	259 210 200 (223±31.6)	293 275 260 (276±16.5)	330 332 502 (388±98.7)	209 190 159 (186±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(日水製薬㈱)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^2，池本理化工業㈱)を用いた．2×10^4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_2インキュベーター(5 % CO_2)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，油溶性で，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 %(うちビニルビシクロヘプテンが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

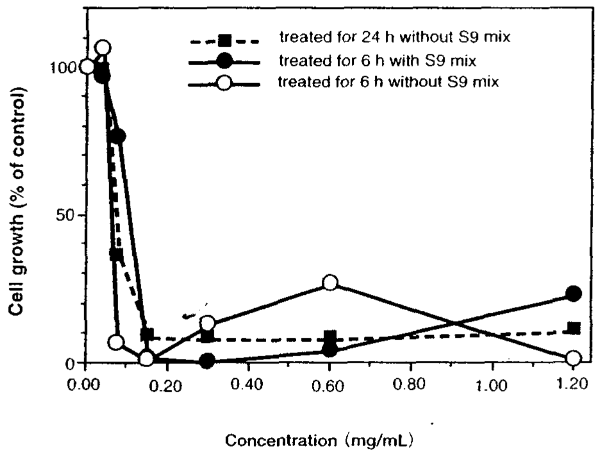

Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 5-ethylidene-2-norbornene

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㈱）およびシクロホスファミド（CPA，Sigma Chemical Co.）は，注射用蒸留水（㈱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 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）[1]による分類法に基づいて行い，染色体型あるいは染色分体型のギャップ，切断，交換などの構造異常の有無と倍数性細胞（polyploid）の有無について観察した．また，構造異常については1群200個，倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した．

10. 記録と判定

無処理対照，溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は，観察した細胞数，構造異常の種類と数，倍数性細胞の数について集計し，各群の値を記録用紙に記入した．

染色体異常を有する細胞の出現頻度について，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[2]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クラン・アーミテッジの傾向性検定[3]（$p<0.01$）を行った．最終的な判定は，統計学的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: gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total	Others[3]	No. of cells with aberrations: TAG (%)	TA (%)	Polyploid[4] (%)	Trend test[5]: SA	NA	Concurrent cytotoxicity[6] (%)	Mitotic index[7] (%)
Control			200	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.50			—	—
Solvent[1]	0	24	200	1	0	1	1	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	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)	0.13	-	-	115.3	—
ENB	0.050	24	200	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	32	0	24*(12.0)	24*(12.0)	0.13			—	—
Solvent[1]	0	48	200	0	1	1	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	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)	0.25	-	-	105.8	—
ENB	0.050	48	200	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	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: gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total	Others[3]	No. of cells with aberrations: TAG (%)	TA (%)	Polyploid[4] (%)	Trend test[5]: SA	NA	Concurrent cytotoxicity[6] (%)	Mitotic index[7] (%)
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			—	—
Solvent[1]	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[1]	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