

テトラヒドロフルフリルアルコールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of Tetrahydrofurfuryl alcohol in Bacteria

要約

テトラヒドロフルフリルアルコールについて *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 非共存下および共存下の各菌株について 5000 ~ 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の5用量を設定した。

2回の本試験の結果, 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。

以上の結果から, テトラヒドロフルフリルアルコール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, TA1537¹⁾ 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*²⁾ 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(株))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°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, Unipath)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 μL 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

テトラヒドロフルフリルアルコール(ロット番号: 2002-4, 高压化学工業(大阪)提供)は, 純度99.5%(不純物として5-メチルテトラヒドロフルフリルアルコール: 0.34%含有)の無色液体である。被験物質は使用

時まで室温で保存した。

被験物質原体は安定であり, 反応しない。

4. 被験物質溶液の調製

注射用水(DW: 大塚製薬工場)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°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)

NaN₃: アジ化ナトリウム(和光純薬工業)

ENNG: N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(Sigma Chemical)

9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩(Sigma Chemical)

2-AA: 2-アミノアントラセン(和光純薬工業)

NaN₃はDW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)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 μmol
塩化カリウム	33 μmol
D-グルコース6-リン酸	5 μmol
β-NADPH	4 μmol
β-NADH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μmol
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×g遠心上清分画である。

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の有無によらず、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 μg/plateの7用量で実施した結果、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の有無にかかわらず、いずれの菌株においても抗菌性および沈殿物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 μg/plateの5用量を設定した。

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。S9 mixの有無にかかわらず、いずれの菌株においても抗菌性および沈殿物は認められなかった。

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、テトラヒドロフルフリルアルコール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、類似化合物であるテトラヒドロフラン³⁾、フルフラール³⁾は、いずれも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*⁺ reversion in *Escherichia coli*. *Mutation Res*, 38: 3-32(1976).
- 3) 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 日本化学物質安全・情報センター, 東京(1996)p.178, pp.233-234.

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
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 Mutagenicity of tetrahydrofurfuryl alcohol 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	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	103 123 (113) 113 (\pm 10)	14 11 (12) 11 (\pm 2)	82 75 (81) 87 (\pm 6)	22 20 (21) 22 (\pm 1)	17 16 (17) 17 (\pm 1)
	313	97 103 (107) 122 (\pm 13)	11 8 (10) 10 (\pm 2)	93 73 (86) 92 (\pm 11)	17 23 (20) 21 (\pm 3)	16 21 (17) 15 (\pm 3)
	625	112 122 (114) 108 (\pm 7)	10 8 (10) 12 (\pm 2)	76 76 (83) 98 (\pm 13)	21 20 (20) 19 (\pm 1)	15 18 (16) 14 (\pm 2)
	1250	110 134 (113) 96 (\pm 19)	14 11 (12) 10 (\pm 2)	63 77 (78) 95 (\pm 16)	31 18 (25) 25 (\pm 7)	18 20 (18) 15 (\pm 3)
	2500	116 109 (112) 111 (\pm 4)	11 9 (10) 9 (\pm 1)	93 81 (89) 92 (\pm 7)	20 17 (20) 24 (\pm 4)	17 11 (15) 17 (\pm 3)
	5000	118 119 (113) 102 (\pm 10)	10 16 (12) 11 (\pm 3)	87 70 (83) 91 (\pm 11)	17 21 (18) 17 (\pm 2)	17 23 (18) 15 (\pm 4)
S9 mix (+)	0	128 127 (119) 102 (\pm 15)	13 8 (12) 15 (\pm 4)	99 106 (101) 99 (\pm 4)	33 24 (27) 23 (\pm 6)	25 24 (24) 22 (\pm 2)
	313	114 120 (118) 119 (\pm 3)	9 11 (10) 11 (\pm 1)	87 111 (97) 92 (\pm 13)	40 23 (31) 29 (\pm 9)	26 27 (25) 21 (\pm 3)
	625	137 98 (120) 125 (\pm 20)	13 10 (12) 12 (\pm 2)	92 102 (90) 77 (\pm 13)	33 30 (29) 23 (\pm 5)	27 23 (24) 22 (\pm 3)
	1250	108 126 (113) 106 (\pm 11)	12 11 (13) 17 (\pm 3)	104 111 (109) 112 (\pm 4)	30 31 (33) 37 (\pm 4)	22 27 (24) 24 (\pm 3)
	2500	113 120 (119) 123 (\pm 5)	10 16 (14) 15 (\pm 3)	109 95 (105) 112 (\pm 9)	29 29 (30) 33 (\pm 2)	26 24 (23) 18 (\pm 4)
	5000	101 120 (111) 113 (\pm 10)	10 18 (14) 13 (\pm 4)	86 113 (105) 116 (\pm 17)	23 33 (26) 23 (\pm 6)	25 30 (28) 29 (\pm 3)
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2 ^{a)}	NaN ₃ ^{b)}	ENNG ^{c)}	AF-2	9-AA ^{d)}
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
	Number of colonies/plate	564 555 (551) 533 (\pm 16)	520 476 (488) 468 (\pm 28)	4412 4259 (4221) 3992 (\pm 213)	632 644 (634) 625 (\pm 10)	292 237 (292) 346 (\pm 55)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA ^{e)}	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	2	0.5	2
	Number of colonies/plate	1381 1446 (1423) 1443 (\pm 37)	169 149 (163) 171 (\pm 12)	935 955 (938) 925 (\pm 15)	436 437 (441) 451 (\pm 8)	171 167 (171) 175 (\pm 4)

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

b) NaN₃:sodium azide

c) ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

d) 9-AA:aminoacridine hydrochloride

e) 2-AA:2-aminoanthracene

Table 2 Mutagenicity of tetrahydrofurfuryl alcohol 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	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	121 118 (114) 102 (\pm 10)	16 15 (15) 14 (\pm 1)	82 85 (85) 88 (\pm 3)	19 22 (21) 22 (\pm 2)	18 14 (14) 11 (\pm 4)
	313	127 111 (115) 108 (\pm 10)	14 11 (12) 12 (\pm 2)	96 94 (92) 86 (\pm 5)	24 24 (25) 26 (\pm 1)	17 16 (16) 15 (\pm 1)
	625	95 106 (103) 107 (\pm 7)	9 10 (10) 10 (\pm 1)	95 86 (90) 89 (\pm 5)	16 24 (22) 25 (\pm 5)	16 16 (16) 15 (\pm 1)
	1250	110 112 (113) 117 (\pm 4)	10 11 (11) 12 (\pm 1)	76 90 (85) 88 (\pm 8)	17 25 (21) 21 (\pm 4)	14 18 (16) 17 (\pm 2)
	2500	101 105 (104) 105 (\pm 2)	13 9 (12) 15 (\pm 3)	86 90 (89) 91 (\pm 3)	16 17 (18) 20 (\pm 2)	15 13 (15) 17 (\pm 2)
	5000	121 98 (116) 130 (\pm 17)	8 11 (11) 14 (\pm 3)	93 87 (87) 81 (\pm 6)	26 18 (22) 23 (\pm 4)	12 10 (11) 12 (\pm 1)
S9 mix (+)	0	110 127 (115) 108 (\pm 10)	11 11 (13) 16 (\pm 3)	93 95 (92) 87 (\pm 4)	32 29 (32) 35 (\pm 3)	23 23 (20) 15 (\pm 5)
	313	123 114 (121) 116 (\pm 6)	12 13 (13) 13 (\pm 1)	88 111 (97) 91 (\pm 13)	24 31 (27) 27 (\pm 4)	20 17 (20) 22 (\pm 3)
	625	124 119 (118) 110 (\pm 7)	14 16 (15) 14 (\pm 1)	90 87 (93) 103 (\pm 9)	39 21 (28) 24 (\pm 10)	18 22 (23) 29 (\pm 6)
	1250	121 115 (116) 112 (\pm 5)	10 13 (11) 10 (\pm 2)	87 95 (95) 102 (\pm 8)	25 28 (29) 33 (\pm 4)	22 25 (23) 22 (\pm 2)
	2500	108 99 (108) 116 (\pm 9)	14 10 (12) 13 (\pm 2)	90 96 (98) 108 (\pm 9)	24 27 (27) 30 (\pm 3)	22 16 (19) 20 (\pm 3)
	5000	108 114 (108) 102 (\pm 6)	9 13 (11) 10 (\pm 2)	101 87 (99) 108 (\pm 11)	25 25 (26) 28 (\pm 2)	22 19 (20) 19 (\pm 2)
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2 ^{a)}	NaN ₃ ^{b)}	ENNG ^{c)}	AF-2	9-AA ^{d)}
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
	Number of colonies/plate	563 520 (522) 482 (\pm 41)	369 387 (399) 440 (\pm 37)	4358 4439 (4357) 4275 (\pm 82)	632 618 (613) 590 (\pm 21)	242 209 (220) 209 (\pm 19)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA ^{e)}	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	2	0.5	2
	Number of colonies/plate	1398 1398 (1366) 1301 (\pm 56)	150 147 (145) 138 (\pm 6)	1347 1373 (1264) 1072 (\pm 167)	432 428 (428) 423 (\pm 5)	200 182 (192) 194 (\pm 9)

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

b) NaN₃: sodium azide

c) ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

d) 9-AA: aminoacridine hydrochloride

e) 2-AA: 2-aminoanthracene

テトラヒドロフルフリルアルコールの 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 Tetrahydrofurfuryl alcohol in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

テトラヒドロフルフリルアルコー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、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下ならびに連続処理法の24時間処理で、1030 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (約10 mmol/L)を最高濃度として公比2で3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、本試験条件下ではテトラヒドロフルフリルアルコールは、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(2001年7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, ロット番号:296130)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

2×10^4 個のCHL/IU細胞を, 培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson)に播き, 37 °CのCO₂インキュベーター(5%CO₂)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

テトラヒドロフルフリルアルコール(ロット番号:2002-4, 高压化学工業(大阪)提供)は, 純度99.5% (不純物として5-メチルテトラヒドロフルフリルアルコール:0.34%含有)の無色液体である。被験物質は使用時まで室温で保存した。

被験物質原体は安定であり, 反応しない。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は, 用時調製した。溶媒は生理食塩水(大塚製薬工場, ロット番号:K2A79)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 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, テトラヒドロフルフリルアルコールによる50%以上の細胞増殖抑制は, 短時間処理法および連続処理法のいずれにおいても認められなかった(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存在下および非存在下ならびに連続処理法の24時間処理で, 1030 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として公比2で3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 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 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:342AJH)の濃度を0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 連続処理法では, マイトマイシンCの濃度を0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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

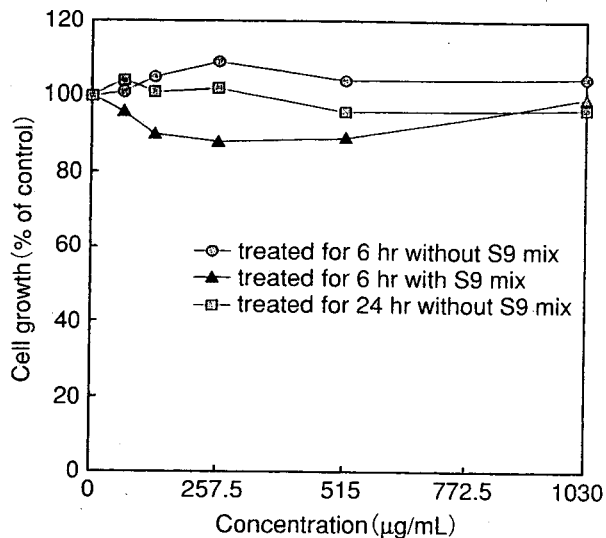


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with tetrahydrofurfuryl alcohol

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)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²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

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。テトラヒドロフルフリルアルコールを加えて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。テトラヒドロフルフリルアルコールを加えて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、テトラヒドロフルフリルアルコール

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Dibenzofuranは、染色体異常試験で陰性の結果が報告されている。また、Maleic anhydrideは、染色体異常試験の連続処理法48時間処理で陽性の結果が報告されている²⁾。

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(1999).

連絡先

試験責任者: 中川宗洋

試験担当者: 成見香瑞範, 石毛裕子, 齋藤 準,
齋藤宏美, 長友弘子, 須之内みどり

(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: Munehiro Nakagawa (Study director)
Kazunori Narumi, Yuko Ishige,
Hitoshi Saitou, Hiromi Saitou,
Hiroko Nagatomo, Midori Sunouchi

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) treated with tetrahydrofurfuryl alcohol with and without S9 mix

Group	Concentration (μg/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 ^{b)} (%)	Judgement ^{c)}	
						ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Vehicle ^{a)}	0	-	6-18	100	200	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	0	0.0	-	-
Test Substance	257.5	-	6-18	105	200	2	0	0	1	1	4	4 (2.0)	0	0.0	-	-
	515	-	6-18	104	200	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	0	0.0	-	-
	1030	-	6-18	106	200	1	1	1	0	0	3	2 (1.0)	0	0.0	-	-
MMC	0.1	-	6-18	N.D.	200	34	51	0	0	0	85	82(41.0)	0	0.0	+	-
Vehicle	0	+	6-18	100	200	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1	0.0	-	-
Test Substance	257.5	+	6-18	108	200	0	1	1	0	0	2	2 (1.0)	0	0.0	-	-
	515	+	6-18	107	200	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	0	0.0	-	-
	1030	+	6-18	112	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0.0	-	-
BP	20	+	6-18	N.D.	200	24	157	2	0	0	183	163(81.5)	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) Isotonic sodium chloride solution was used as vehicle.

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 tetrahydrofurfuryl alcohol without S9 mix

Group	Concentration (μg/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 ^{b)} (%)	Judgement ^{c)}	
					ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Vehicle ^{a)}	0	24	100	200	1	0	1	0	0	2	2 (1.0)	1	0.0	-	-
Test Substance	257.5	24	103	200	0	1	1	1	0	3	3 (1.5)	0	0.0	-	-
	515	24	102	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0.0	-	-
	1030	24	101	200	0	2	0	0	0	2	2 (1.0)	0	0.0	-	-
MMC	0.05	24	N.D.	200	21	33	1	9	0	64	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) Isotonic sodium chloride solution was used as vehicle.

b) Two hundred cells were analyzed in each group.

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

テトラヒドロフルフリルアルコー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 Tetrahydrofurfuryl alcohol in Rats

要約

テトラヒドロフルフリルアルコールは、溶剤、可塑剤、防かび剤、リジンの中間体、樹脂改質剤、塗料、ジヒドロピラン原料、合成医薬品中間体原料等に用いられている化学物質である¹⁾。本物質の毒性については、ラット経口投与におけるLD₅₀値は1.6-3.2 g/kgで、皮膚や粘膜に対して刺激性を有すること²⁾が知られている。また、ラットへの90日間混餌投与による亜慢性毒性試験では、精巣に対する毒性影響が認められているほか、血色素量、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、血小板数、血糖値、総タンパク、グロブリンおよびカルシウムの低値が認められている³⁾。また、本物質の基本骨格であるテトラヒドロフランの毒性として、マウスへの単回経口投与により麻酔作用が認められ⁴⁾、マウス或いはラットへの反復吸入暴露試験においては、副腎の肥大、肝臓の肝細胞肥大および肝細胞逸脱酵素活性の上昇、白血球数減少、運動失調等⁵⁻⁹⁾が認められている。さらに、発癌性試験においては、マウスで肝細胞腺腫/癌の発生率の有意な増加、ラットで腎細胞腺腫/癌の発生率の増加傾向¹⁰⁾が認められている。

今回、テトラヒドロフルフリルアルコールについて、SD系[Crl:CD(SD)IGS]ラットを用い、0(溶媒)、10、40、150および600 mg/kg用量で、28日間反復経口投与毒性試験を実施した。動物数は1群雌雄各5匹とし、投与期間終了後屠殺の5群、ならびに対照および600 mg/kgの14日間回復群を設定した。

その結果、600 mg/kg群で、雌雄に自発運動亢進、続いて自発運動低下および腹臥姿勢、さらに雄には後肢握力の低下、摂餌量の減少および体重増加の抑制、雌には投与1週のための摂餌量の減少が認められた。150 mg/kg群では、雌に自発運動亢進が認められた。尿検査では、600 mg/kg群で雄にpHの低下が認められた。血液学検査では、600 mg/kg群で雌雄に平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度、白血球数および血小板数の減少並びにプロトロンビン時間の延長、さらに雄には網状赤血球数、雌には血色素量の減少が認められた。血液生化学検査では、600 mg/kg群で雌雄にALP、総タンパク、アルブミン、総ビリルビンおよびカルシウム、さらに雄にはLDH、トリグリセライドおよびナトリウムのいずれも減少並びに尿素窒素の増加が認められた。150 mg/kg群では、雄に総タンパクの減少が認められた。器官重量では、600 mg/kg群で雌雄に胸腺、雌に下垂体の絶対および相対重量に共通した減少、雄で脳絶対重量の減少、

雌で腎臓相対重量の増加が認められた。150 mg/kg群では、雌に下垂体相対重量の減少が認められた。病理組織学検査では、600 mg/kg群で雌雄に胸腺の萎縮、雄に脾臓の髓外造血低下による赤脾髄萎縮および被膜炎並びに精巣の精上皮細胞壊死、150 mg/kg群で雄に脾臓の被膜炎並びに精巣の精上皮細胞壊死が認められ、精巣の精子形成サイクル検査では、600 mg/kg群でセルトリ細胞に対する精子細胞の比率の減少が認められた。

回復群においては、これらの投与期間中或いは投与期間終了時の観察および検査で認められた変化のうち、精巣の変化は増強する傾向にあり、精子細胞に加えてパキテン期精母細胞の比率も減少したが、その他の変化は回復或いは回復傾向を示した。

以上の結果から、テトラヒドロフルフリルアルコールのラットへの28日間反復投与による主な毒性は、胸腺、脾臓、腎臓および精巣に対する影響並びに血液学および血液生化学的影響であった。無影響量は、雌雄とも40 mg/kg/dayであると考えられた。

方法

1. 被験物質

テトラヒドロフルフリルアルコールは水、アセトンに易溶な無色の液体である。試験には、高圧化学工業(大阪)から提供されたロット番号2002-4(純度99.5%)を入手し、冷暗(4℃)条件下で保管し、使用した。被験物質の投与液は、局方精製水(共栄製薬)を溶媒として、所定の投与用量になるような濃度の溶液として調製し、使用時まで冷所(4℃)遮光下で密栓保管し、調製後7日以内に使用した。なお、保管条件下および投与形態での被験物質は安定であることを確認した。

2. 供試動物および飼育条件

動物は、SD系[Crl:CD(SD)IGS]ラットを、日本チャールス・リバー(神奈川)より搬入し、雄は7日、雌は8日間検疫を兼ねて試験環境に馴化させた後、5週齢で試験に供した。1群の動物数は雌雄各5匹とし、投与期間終了後屠殺の5群のほか、対照群および最高用量群については別に雌雄各5匹の14日間回復群を設けた。群分けは、投与開始前日の体重に基づく層化無作為抽出法により行なった。投与開始時の体重は雄で157~181 g、雌で141~161 gであった。ラットは、温度22.4~22.8℃、湿度47~62%に制御した飼育室で、金網ケージに個体別に収容し、固型飼料[ラボMRストック、日本農産工

業]および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

投与量設定試験として、1群雌雄各4匹のラットに、被験物質を0, 50, 100, 200, 500および1000 mg/kg用量で14日間反復経口投与した結果、100 mg/kg群では、自発運動の亢進が認められたが、雌1匹のみの変化であった。200 mg/kg群では、自発運動の亢進が雌に認められたほか、雌雄に血小板数、雄に尿pH、平均赤血球色素濃度、アルブミンおよび総タンパク、雌に平均赤血球色素量、胸腺および下垂体の絶対および相対重量のいずれも低値が認められた。500 mg/kg群では、雌雄に自発運動亢進および低下、摂餌量、尿pH、血小板数、平均赤血球色素量、平均赤血球色素濃度、白血球数、血清アルブミン、総タンパク、LDH、総ビリルビンおよびカルシウムの低値並びに γ -GTPの高値、盲腸の拡張、雄に立毛例、体重増加の抑制傾向、血清ALPの低値並びに尿素窒素およびクレアチニンの高値、雌にプロトロンビン時間の高値、ナトリウム、胸腺および下垂体の絶対および相対重量のいずれも低値が認められた。1000 mg/kg群では、500 mg/kg群で認められた変化に加えて、雄にプロトロンビン時間および血清ChEの高値並びにナトリウム、胸腺の絶対および相対重量のいずれも低値、雌に立毛例、色素量の低値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間およびトリグリセライドの高値が認められた。以上の結果から、本試験における投与量は、600 mg/kg/dayを最高用量とし、以下150, 40および10 mg/kg/dayの4用量を設定した。投与方法は、投与液量を体重1 kg当たり5 mLとし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、1日1回(午前中)、28日間にわたって経口投与した。対照群には、局方精製水を同様に投与した。

4. 観察および検査

1) 一般状態観察

28日間の投与期間およびそれに続く14日間の回復期間を通じて、動物の生死、外観、行動等を毎日観察した。

2) 詳細な臨床観察

週1回(投与7, 14, 21および28日並びに回復群ではさらに回復7および14日)、午後の概ね一定時刻に、動物をケージから取り出す時およびケージ外のアルミ製オープンフィールド(370 W×560 D×40 Hmm)で観察(ケージからの出し易さ、ケージから出す時の扱い易さ、体躯緊張、皮膚、毛並み、立毛、眼分泌液、眼瞼閉鎖状態、眼球突出、流涙、口鼻分泌液、流涎、下腹部被毛の尿による汚れ、肛門周囲の便による汚れ、異常発声、呼吸、姿勢、痙攣、振戦、探索行動、警戒性、自発運動、歩行、異常行動、常同、意識不全、四肢筋緊張、排尿、排便)し、認められた変化を評点で記録した。各個体の行動の特性を把握するため、投与開始前日にも観察した。観察は、ブラインドで行った。

3) 感覚反射機能検査

投与28日および回復14日においては、詳細な臨床観察に加えて、聴覚反応(ピンセットで軽くケージを叩く音に対する耳介のPreyer反射)、視覚反応(顔面に棒を近づけた場合の接近反射)、触覚反応(腰部に触れた場合の反応)、耳介反射(耳介に触れた場合の耳介の反射)、痛覚反応(尾根部をピンセットで摘んだ場合の逃避、発声などの反応)、瞳孔反射(暗所から急に明るい場所に移した時の瞳孔の反射)、同側屈筋反射(後肢の足趾をピンセットで摘んだ場合の屈筋の反応)、眼瞼反射(眼瞼に接触した場合の眼瞼の反応)および正向反射(面上で動物を背臥位にした場合の正常姿勢にもどる反射)を調べ、認められた変化を評点で記録した。

4) 着地開脚幅、握力および自発運動量測定

投与4週(投与23日)および回復2週(回復13日)において、午後の概ね一定時刻に、着地開脚幅(足趾に墨を塗り、30 cmの高さから落とした時の足跡の幅を測定)、前肢および後肢の握力(ラット・マウス用握力測定装置、MK-380R/FR、室町機械)並びに自発運動量(自発運動量測定装置、SUPERMEX、室町機械、測定装置内の区画間の60分間における移動回数を測定)を測定した。

5) 体重および摂餌量測定

体重は、週2回、3あるいは4日ごと、および屠殺日に測定した。摂餌量は、毎週1回、1日(24時間)の飼料消費量を測定した。

6) 尿検査

投与26日および回復12日に、動物の腰部を刺激して新鮮尿を採取し、外観の観察並びにpH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンの検査(以上、試験紙法:マイルス・三共、マルティステイクス®)を行った。

7) 血液学検査

採血は、投与期間および回復期間終了翌日にエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より行なった。動物は採血前日の午後5時から除餌し、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-2 K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)、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(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC、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、また塗抹標本作製して網状赤血球数(Brilliant cresyl blueで染色して鏡検)および白血球百分率(May-Giemsaで染色して鏡検)を測定した。また一部は、3.8%クエン酸ナトリウム液で凝固阻止処理して血漿を分離し、血液凝固自動測定装置(アメルング社、KC-10 A)により、プロトロンビン時間(PT、Quick一段法)および活性化部分トロンボプラスチン時間

(APTT, エラジン酸活性化法)を測定した。

8) 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-BM8〕により、総タンパク (Biuret法), アルブミン (BCG法), A/G比 (計算値), グルコース, 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 (ジアゾ法), 尿素窒素 (Urease-UV法), クレアチニン (Jaffé法), GOT, GPT, γ -GTP, ALP (以上, JSCC法), LDH (SFBC法), コリンエステラーゼ (BTC-DTNB法), カルシウム (OCPC法) および無機リン (酵素法) を, また電解質自動分析装置〔東亜電波工業, NAKL-132〕により, ナトリウム, カリウムおよび塩素を測定した。

9) 病理学検査

投与期間あるいは回復期間終了翌日の採血に続いて放血屠殺し, 剖検を行った。また, 脳, 心臓, 胸腺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 精巣, 精巣上体, 卵巣および子宮を秤量 (絶対重量) し, また対体重比 (相対重量) を算出した。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 (精巣および精巣上体のみブアン液で固定) で固定後, 対照群および600 mg/kg群については, 脳, 下垂体, 甲状腺 (上皮小体を含む), 胸腺, 心臓, 肺, 気管, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 胃, 腸, 膀胱, 脊髄, リンパ節, 坐骨神経, 骨髄, さらに雄では精巣, 精巣上体, 前立腺, 雌では卵巣, 子宮を検査した。また, 600 mg/kg群で, 雌雄の胸腺並びに雄の精巣および脾臓に病理組織学的変化が認められたので, 雌雄の胸腺, 雄の精巣および脾臓については, 10, 40および150 mg/kg群並びに回復群も検査した。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。精巣についてはPAS染色標本も作製し, 精子形成サイクル (ステージII-III, V, VIIおよびXII) の検査^{11, 12)}も行なった。さらに, 沈着物を同定するため, 対照群の雄の2匹の腎臓にもPAS染色を行なった。

5. 統計解析

パラメトリックデータについては, Bartlettの分散検定を行い, 分散が一樣な場合は一元配置の分散分析を行った。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の順位検定を行った。それらの結果, 有意差を認めた場合, DunnettまたはSheffé (群間で標本数が異なる場合) の方法により対照群に対する各群の比較検定を行った。カテゴリカルデータにはFisherの直接確率法を用いた。ただし, 回復群のパラメトリックデータはF検定を行い, その結果分散が一樣な場合はStudentのt検定を, 一樣でない場合はAspinn-Welchのt検定を行った。ノンパラメトリックデータには, Mann-WhitneyのU検定を用いた。有意水準は, いずれの場合も5%とした。

結果

1. 死亡および一般状態

投与期間において, 概ね投与後5~40分間に軽度な自発運動亢進が150 mg/kg群の雌の5匹中5匹並びに600 mg/kg群の各10匹中雄の4匹および雌の9匹に認められ, これらの発現率はいずれも対照群と比べて有意差が認められた。また, 自発運動亢進が消失した後, 続いて軽度ないし中等度な自発運動低下および自発運動低下中の一時的な腹伏姿勢が600 mg/kg群の雌雄全例に認められた。自発運動低下は, 投与開始後数日間は投与後概ね6時間まで認められたが, 4~6日以降においては, 投与後2~3時間以内に回復した。

回復期間においては, 一般状態の変化は認められなかった。

死亡は, 投与および回復期間を通じて認められなかった。

2. 詳細な臨床観察

投与期間中および回復期間中の観察において, 各観察項目に有意な変化は認められなかった。

3. 感覚反射機能検査

投与期間中および回復期間中の検査において, 各検査項目に有意な変化は認められなかった。

4. 着地開脚幅, 握力および自発運動量 (Table 1)

投与期間中の測定において, 600 mg/kg群で雄の後肢握力に有意な減少が認められた。着地開脚幅および自発運動量には, 有意な変化は認められなかった。

回復期間中の測定においては, 着地開脚幅, 握力および自発運動量ともに, 有意な変化は認められなかった。

5. 体重 (Fig. 1)

投与期間において, 600 mg/kg群の雄の体重は対照群を下回り, 投与3日以降の体重および投与期間中の体重増加量に有意差が認められ, 対照群の体重との差は投与の経過とともに拡大する傾向にあった。150 mg/kg群の雄の体重も対照群を下回って推移する傾向にあったが, 各測定時点の体重および投与期間中の体重増加量に有意差は認められなかった。また, 雌においては, 体重に対する影響は認められなかった。

回復期間において, 600 mg/kg群の雄の体重に有意差は残るものの, 対照群と概ね平行して推移した。

6. 摂餌量 (Fig. 2)

投与期間において, 600 mg/kg群の雄の摂餌量は, 投与期間を通じて有意な低値を示した。同群の雌では, 投与1週にのみ, 有意な低値が認められた。150 mg/kg群では, 雄の摂餌量が投与期間を通じて低値傾向にあったが, 有意差は認められなかった。

回復期間において, 600 mg/kg群の雌雄の摂餌量は, 対照群と比べて有意差は認められなかった。

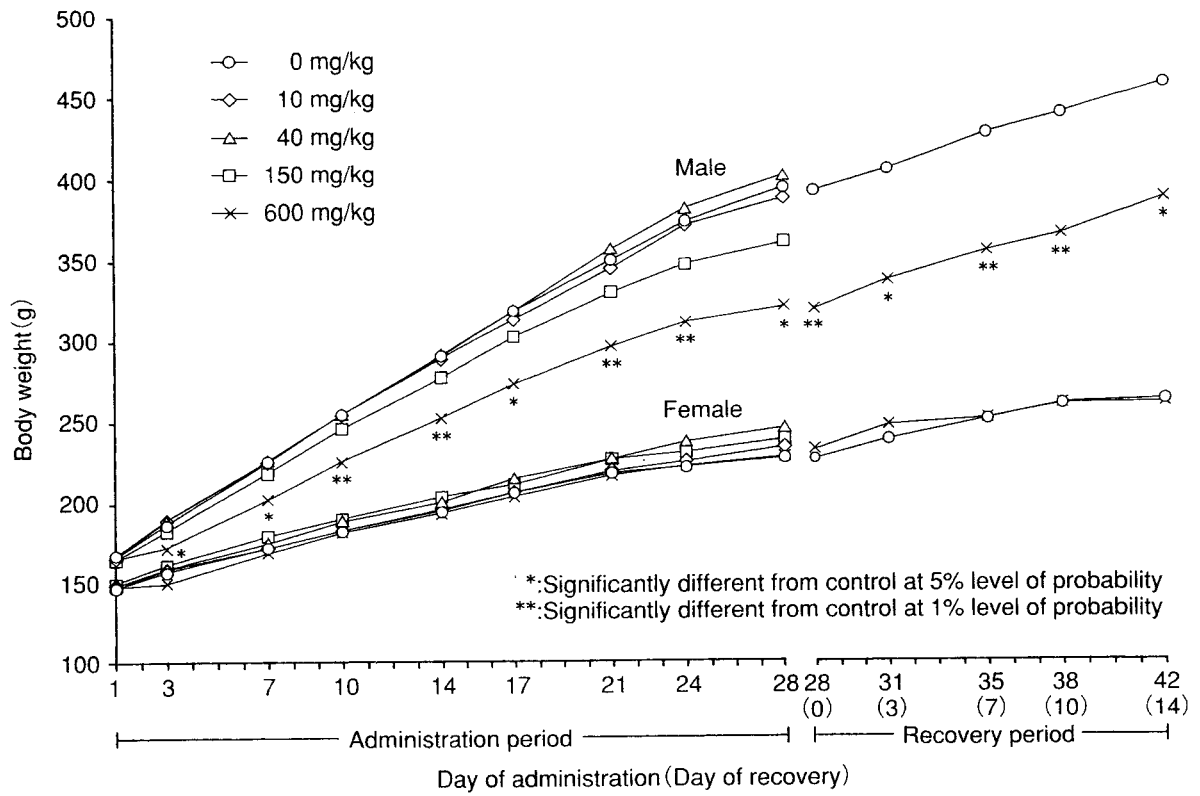


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

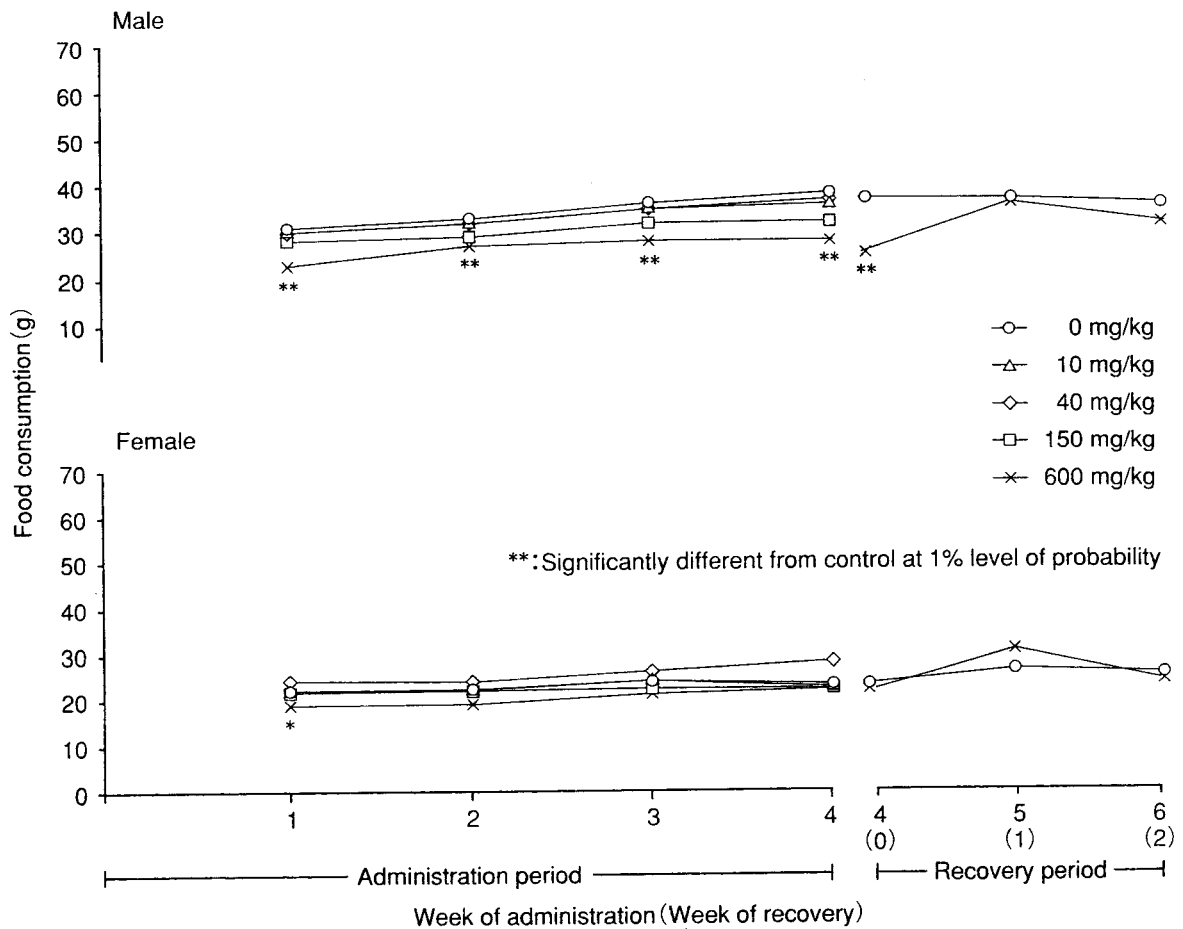


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

7. 尿検査 (Table 2)

投与期間中の検査において、600 mg/kg群の雄に尿pHの有意な低下が認められ、また有意差は認められなかったものの、同群の雌においても同様の傾向が認められた。

回復期間中の検査において、各検査項目に有意な変化は認められなかった。

8. 血液学検査 (Table 3)

投与期間終了時屠殺動物において、600 mg/kg群で雌雄に平均赤血球色素量、平均赤血球色素濃度、白血球数および血小板数の有意な減少並びにプロトロンビン時間の有意な延長、さらに雄に色素量の減少傾向および網状赤血球数の有意な減少、雌に色素量の有意な減少が認められた。

回復期間終了時屠殺動物において、投与期間終了時屠殺動物で認められた変化は認められなかった。なお、回復期間終了時屠殺動物では、投与期間終了時屠殺動物で認められなかった赤血球数の有意な増加が雌雄に認められ、雌雄の平均赤血球容積および平均赤血球色素量並びに雌の平均赤血球色素濃度はいずれも有意な低値を示した。また、雄に活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な短縮が認められた。

9. 血液生化学検査 (Table 4)

投与期間終了時屠殺動物において、600 mg/kg群で雌雄にALP、総タンパク、アルブミン、総ビリルビンおよびカルシウム、さらに雄にはLDH、トリグリセライドおよびナトリウムのいずれも有意な減少並びに尿素窒素の有意な増加、雌にはLDHの減少傾向が認められた。150 mg/kg群では、雄に総タンパクの有意な減少が認められた。なお、アルブミンおよびカルシウムの有意な減少は40 mg/kg群の雌にも認められたが、150 mg/kg群の雌のアルブミンおよびカルシウムには有意差は認められなかった。また、これらの変化以外にも有意差のある項目が認められたが、変化に用量相関性は認められなかった。

回復期間終了時屠殺動物においては、投与期間終了時屠殺動物において認められた変化のうち、雌雄のカルシウム並びに雄の総タンパクおよび尿素窒素に有意差が残るものの、その他の変化は回復し、また総タンパクおよび尿素窒素の変化にも回復傾向が認められた。なお、回復期間終了時屠殺動物では、雌のカリウムが有意な高値を示したほか、投与期間終了時屠殺動物において有意差は認められなかったものの低値傾向にあった雌のコリンエステラーゼにも有意差が認められた。

10. 剖検

投与期間終了時屠殺動物において、胸腺の小型化が600 mg/kg群で雄の5匹および雌の4匹に認められた。回復期間終了時屠殺動物においては、胸腺の小型化は雄の2匹に認められたほか、雄に精巣の小型化が3匹に認められた。なお、雌においては、被験物質の投与とは無

関係に、子宮腔水腫が散発的に認められた。

11. 器官重量 (Table 5)

投与期間終了時屠殺動物において、600 mg/kg群で雌雄に胸腺および雌に下垂体の絶対および相対重量に共通した有意な減少が認められた。また、600 mg/kg群の雌では腎臓相対重量の有意な増加、150 mg/kg群の雌では下垂体相対重量の有意な減少が認められた。なお、600 mg/kg群の雄の最終体重は対照群の雄と比べて約19%少なく、脳、肝臓、心臓、下垂体、副腎、精巣および精巣上体の絶対重量は有意な低値を示したが、相対重量には有意差は認められなかった。

回復期間終了時屠殺動物において、雄の胸腺の絶対および相対重量の減少に有意差が残るものの、投与期間終了時屠殺動物と比べて変化の程度は軽減する傾向にあった。また、雄の最終体重は対照群と比べて約15%少なく、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体は絶対重量のみの有意な低値、脳、心臓および下垂体は相対重量のみの有意な高値を示した。さらに、雌では甲状腺の絶対および相対重量の有意な高値が認められた。

12. 病理組織学検査 (Table 6)

投与期間終了時屠殺動物において、被験物質の投与に起因する変化が、雌雄の胸腺並びに雄の脾臓および精巣に認められた。

胸腺では、600 mg/kg群の雌雄の全例で、皮質および髄質領域のリンパ球が低形成となり、軽度な萎縮が認められた。

脾臓では、対照群の雄の全例の赤脾髄に中等度な髄外造血が認められた。一方、600 mg/kg群の雄の髄外造血は全例が軽度であり、赤脾髄の萎縮が認められた。また、被膜の一部に細胞浸潤や線維化等を伴う軽度な炎症が、150 mg/kg群で雄の1匹および600 mg/kg群で雄の3匹に認められた。

精巣では、精上皮細胞の壊死が150 mg/kg群の2匹および600 mg/kg群の5匹に認められた。精子形成サイクル検査によりセルトリ細胞に対する生殖細胞の比率を算定した結果、ステージII-III、VおよびVIIにおいて、精子細胞(round)の比率が減少傾向にあり、ステージII-IIIおよびVIIで有意差が認められた。

回復期間終了時屠殺動物では、雌雄の胸腺、雄の脾臓の変化には回復傾向が認められた。しかしながら、精巣の精上皮細胞の壊死の程度は増強する傾向にあり、精子形成サイクル検査ではステージII-IIIおよびVでパキテン期精母細胞および精子細胞(round)の比率の有意な減少が認められた。

なお、被験物質の投与とは無関係と考えられる変化として、肺の動脈壁鉍質沈着、肝臓の微小肉芽腫および巣状壊死、腎臓の嚢胞、好塩基性尿細管および皮質リンパ球浸潤、脾臓の褐色色素沈着、胸腺の出血が認められたが、対照群にも認められ、被験物質投与群の発現率や変化の程度に差は認められなかった。肺の泡抹細胞は、対照群には認められず、600 mg/kg群の雌の1匹に認め

られたが、この変化はラットに自然発生的にしばしば認められる病変であることから、被験物質の投与とは無関係な所見と判断された。また、剖検で被験物質の投与とは無関係に認められた子宮の子宮腔水腫の例では、子宮腔の拡張が認められた。

考察

テトラヒドロフルフリルアルコールのラットへの28日間反復経口投与において、胸腺、脾臓、腎臓および精巣に対する影響並びに血液学および血液生化学的影響が認められた。

胸腺に対する影響について、600 mg/kg群で雌雄に胸腺重量の減少が認められ、病理組織学的には、胸腺の萎縮が認められた。この胸腺の変化は、副腎の肥大を伴っていないことから、毒性によるストレスに伴う二次的影響ではなく、被験物質の胸腺に対する直接的な毒性影響によるものと推察される。

血液学検査では、600 mg/kg群で雌に血色素濃度、雌雄に平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度並びに白血球数および血小板数の減少が認められた。これに関連して、骨髓造血細胞には変化は認められなかったものの、雄で脾臓の髓外造血低減による赤脾髄の萎縮および末梢血中網状赤血球数の減少が認められ、被験物質の造血機能に対する抑制的影響が示唆された。また、雌雄で血小板数の減少に加えてプロトロンビン時間の延長も認められ、血液凝固系に対する影響も認められた。なお、脾臓の病理組織学的変化として、赤脾髄の萎縮に加えて、脾臓の被膜の炎症が150および600 mg/kg群の雄に認められた。この変化は、本物質のラットにおける簡易生殖・発生毒性試験¹³⁾では雌雄に認められており、雄に特有の変化ではないと思われるが、その病理発生については不明である。

腎臓に対する影響について、600 mg/kg群で、雄では尿素窒素の増加、雌では腎臓相対重量の増加が認められた。病理組織学検査では、腎臓に被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。しかしながら、血液生化学検査におけるナトリウムの減少や600 mg/kg群の雄に認められた尿pHの低下も腎臓に対する影響を示唆する変化である可能性も考えられ、テトラヒドロフルフリルアルコールは腎臓に対しても軽度な影響を有するものと思われる。

精巣に対する影響について、150および600 mg/kg群で精上皮細胞の壊死が認められ、14日間の回復群では精上皮細胞の壊死は増強する傾向にあった。精子形成サイクル検査では、600 mg/kg群でセルトリ細胞に対するパキテン期精母細胞および精子細胞(round)の比率が減少していることが確認され、精祖細胞の比率には明らかな変化が認められなかった。しかしながら、簡易生殖毒性試験¹³⁾でテトラヒドロフルフリルアルコールを47日間経口投与したラットや亜慢性毒性試験³⁾で3か月間混餌投与したラットの精巣では、セルトリ細胞のみを残して萎縮した精細管が認められており、精祖細胞を含む生

殖細胞全般に影響を及ぼすものと考えられる。

血液生化学検査では、600 mg/kg群で雌雄に総タンパク、アルブミン、カルシウム、ALP、総ビリルビン、さらに雄にLDH、トリグリセライドおよびナトリウムの減少が認められ、総タンパクの減少は150 mg/kg群の雄にも認められた。総タンパクおよびカルシウムの減少は、テトラヒドロフルフリルアルコールのラットへの90日間混餌投与による亜慢性毒性試験³⁾においても認められており、総タンパクの減少と関連するアルブミンの減少も含めて、テトラヒドロフルフリルアルコールによる特徴的な変化と考えられる。ALP、LDHおよび総ビリルビンの変化は減少性のものであり、毒性学的意義は小さいものと判断され、トリグリセライドおよびナトリウムの減少も背景データにおける正常範囲の変化であった。

雌の下垂体重量は、600 mg/kg群では絶対および相対重量に共通して、また150 mg/kg群では相対重量の減少が認められた。下垂体に病理組織学的変化は認められなかったものの、雌の600 mg/kg群および150 mg/kg群では体重の変化は認められていないことから、下垂体重量の変化は被験物質の投与による影響と判断される。また、下垂体重量の変化と関連する可能性のある変化として、本物質のラットにおける簡易生殖・発生毒性試験¹³⁾では、雌の性周期に対する影響が認められている。

回復期間中或いは回復期間終了時の検査では、上述の投与期間中あるいは投与期間終了時の検査で認められた変化のうち、精巣の変化は増強する傾向にあった以外、回復あるいは回復傾向を示した。なお、回復群では、投与期間終了時屠殺動物で認められなかった赤血球数の増加が雌雄に認められ、雌雄の平均赤血球容積および平均赤血球血色素量並びに雌の平均赤血球血色素濃度はいずれも低値を示したが、これは投与による貧血傾向に対するリバウンド現象と解せられる。また、その他にも回復群で認められられた変化はあったが、投与期間終了時屠殺動物では認められておらず、偶発的所見と判断された。

以上の結果から、テトラヒドロフルフリルアルコールのラットへの28日間反復投与による主な毒性として、胸腺、脾臓、腎臓および精巣に対する影響並びに血液学および血液生化学的影響が認められた。無影響量は、雌雄とも40 mg/kg/dayと考えられた。

文献

- 1) 「12394の化学商品」化学工業日報社、東京(1994) p.701.
- 2) Richardson ML and Gangolli S: "The Dictionary of Substances and their Effects", Vol. 7, The royal society of chemistry, England(1994) pp.353-354.
- 3) TSCA Section 8, (e) Data, 8EHQ-1091-1381 A, -0692-1381B, and -0992-1381C.
- 4) IUCLID (International Uniform Chemical Information Data Base) Data Sheet, EU (1995).
- 5) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), US NIOSH(1996).

- 6) David EM: Drug and chemical Toxicology, 14: 319-342(1991).
- 7) Hazardous Substances Data Bank (HSDB), U.S. National Library of Medicine (1998).
- 8) ACGIH, Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices (1991).
- 9) 片平卓男: 産業医学, 24: 379-387(1982).
- 10) Chabra RS: Toxicological Sciences, 41: 183-188 (1992).
- 11) 高橋道人: 精巢毒性評価のための精細管アトラス, ソフトサイエンス, 東京(1994)pp.15-20.
- 12) Matui H, Toyoda K, Kawanishi T, Mitumori K, Takahashi M: J Toxicologic Pathology, 9: 285-292(1996).
- 13) 野田篤ら: テトラヒドロフルフリルアルコールのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験. 化学物質毒性試験報告, 11: 175-186(2004).

連絡先

試験責任者: 伊藤義彦
試験担当者: 野田 篤, 山口真樹子,
伊藤雅也, 赤木 博
(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: Yoshihiko Ito (Study director)
Atushi Noda, Makiko Yamaguchi,
Masaya Ito, Hiroshi Akagi
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 Mean value of landing foot splay, grip strength and motor activity of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Dose(mg/kg)	End of administration period					End of recovery period	
		0	10	40	150	600	0	600
Male								
	Number of animals	10	5	5	5	10	5	5
	Landing foot splay(cm)	8.3 ± 2.3	8.8 ± 1.4	7.7 ± 1.9	9.7 ± 3.5	8.7 ± 1.5	9.2 ± 2.9	7.5 ± 2.0
	Grip strength(g)							
	Forelimb	670 ± 141	744 ± 142	621 ± 132	532 ± 117	554 ± 114	686 ± 271	548 ± 149
	Hindlimb	235 ± 61	270 ± 60	296 ± 102	138 ± 50	126 ± 54*	405 ± 54	339 ± 85
	Motor activity (Counts/0~60min)	11491 ± 3793	11600 ± 1989	9427 ± 2332	13066 ± 2925	12451 ± 2976	11064 ± 2351	12098 ± 3876
Female								
	Number of animals	10	5	5	5	10	5	5
	Landing foot splay(cm)	5.1 ± 1.1	5.5 ± 1.7	4.4 ± 0.7	4.9 ± 1.1	5.2 ± 0.9	6.4 ± 2.8	6.4 ± 2.4
	Grip strength(g)							
	Forelimb	451 ± 107	447 ± 91	438 ± 158	454 ± 122	342 ± 133	541 ± 265	428 ± 117
	Hindlimb	241 ± 93	239 ± 109	124 ± 17	170 ± 71	150 ± 88	301 ± 73	228 ± 43
	Motor activity (Counts/0~60min)	12863 ± 2122	12810 ± 1167	12782 ± 2910	13399 ± 5001	13142 ± 2540	13376 ± 3307	11772 ± 2986

Each value is expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control(* $p < 0.05$)

Table 2 Urinary examination of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	Administration period					Recovery period	
		0	10	40	150	600	0	600
Male								
Number of animals:		10	5	5	5	10	5	5
Color:	Pale yellow	10	5	5	5	10	5	5
Cloudy:	-	10	5	5	5	10	5	5
pH:	6.0					4		
	6.5					1		
	7.0					3	1	
	7.5	4	4	3	1	2**	1	2
	8.0	1	1				3	1
	8.5	5		2	4			2
Protein:	-							
	±	1	1				4	2
	+	5	2	2	2	1	1	3
	++	4	2	3	3	9		
Glucose:	-	10	5	5	5	10	5	5
Ketone body:	-	1				2	2	4
	±	9	5	4	5	8	3	1
	+			1				
Occult blood:	-	10	5	5	5	10	5	5
Urobilinogen:	0.1	10	5	5	5	10	5	5
Bilirubin:	-	10	5	5	5	10	5	5
Female								
Number of animals:		10	5	5	5	10	5	5
Color:	Pale yellow	10	5	5	5	10	5	5
Cloudy:	-	10	5	5	5	10	5	5
pH:	6.0					5		
	6.5	2	1					
	7.0		1			1		1
	7.5	2	1	1	1	3	4	1
	8.0	4	2	3	3	1	1	2
	8.5	2		1	1			1
Protein:	-	4	1	1				2
	±	4	2			1	4	3
	+	2	2	2	5	9	1	
	++			2				
Glucose:	-	10	5	5	5	10	5	5
Ketone body:	-	10	5	5	5	7	5	5
	±					3		
	+							
Occult blood:	-	9	5	5	5	10	4	5
	±	1					1	
Urobilinogen:	0.1	10	5	5	5	10	5	5
Bilirubin:	-	10	5	5	5	10	5	5

Cloudy:-(negligible)

Protein:-(negligible), ±(15-30 mg/dL), +(30 mg/dL), ++(100 mg/dL)

Glucose:-(negligible)

Ketone body:-(negligible), ±(5 mg/dL), +(15 mg/dL)

Occult blood:-(negligible)

Urobilinogen: Ehrlich unit/dL

Bilirubin:-(negligible)

Significantly different from control (** $p < 0.01$)

Table 3 Hematological findings of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Dose(mg/kg)	End of administration period					End of recovery period	
		0	10	40	150	600	0	600
Male								
	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
	Erythrocyte ($10^6/\mu\text{L}$)	840 ± 31	806 ± 42	814 ± 34	824 ± 18	829 ± 35	813 ± 23	876 ± 53*
	Hemoglobin (g/dL)	16.3 ± 0.6	16.0 ± 0.9	15.7 ± 0.5	15.9 ± 0.5	15.2 ± 0.3	15.6 ± 0.7	15.5 ± 0.7
	Hematocrit (%)	48.2 ± 2.1	47.1 ± 2.5	47.4 ± 0.7	48.0 ± 1.6	46.9 ± 0.7	45.4 ± 1.0	46.5 ± 2.1
	MCV (fL)	58 ± 2	58 ± 1	58 ± 2	58 ± 1	57 ± 2	56 ± 1	53 ± 1**
	MCH (pg)	19.4 ± 0.5	19.8 ± 0.6	19.4 ± 0.4	19.3 ± 0.4	18.3 ± 0.8*	19.3 ± 0.8	17.8 ± 0.7*
	MCHC (%)	33.8 ± 0.3	33.9 ± 0.4	33.2 ± 0.7	33.1 ± 0.5	32.3 ± 0.5**	34.5 ± 1.0	33.4 ± 0.5
	Leukocyte ($10^2/\mu\text{L}$)	63 ± 15	63 ± 11	61 ± 16	54 ± 12	37 ± 9*	77 ± 18	56 ± 17
	Differential leukocyte counts (%)							
	Baso.	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Eosin.	2 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 1	2 ± 1	1 ± 1
	Neutro.	12 ± 5	13 ± 5	11 ± 3	9 ± 4	7 ± 3	14 ± 4	13 ± 7
	Lymph.	85 ± 6	85 ± 5	88 ± 2	89 ± 4	93 ± 4	82 ± 5	83 ± 7
	Mono.	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 1	3 ± 2	3 ± 1
	Other	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Platelet ($10^4/\mu\text{L}$)	152 ± 6	151 ± 12	159 ± 18	134 ± 15	87 ± 12**	147 ± 12	143 ± 30
	Reticulocyte (%)	37 ± 6	42 ± 5	41 ± 3	30 ± 5	21 ± 6**	25 ± 3	24 ± 3
	PT (sec)	12.9 ± 0.5	12.8 ± 0.2	12.7 ± 0.3	13.2 ± 0.6	13.9 ± 0.1*	12.9 ± 0.3	12.6 ± 0.2
	APTT (sec)	19.0 ± 1.9	18.5 ± 2.7	18.3 ± 1.1	19.6 ± 1.8	19.0 ± 2.9	22.8 ± 1.6	19.8 ± 0.9**
Female								
	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
	Erythrocyte ($10^6/\mu\text{L}$)	823 ± 20	803 ± 52	816 ± 49	833 ± 29	815 ± 37	794 ± 49	876 ± 13*
	Hemoglobin (g/dL)	15.7 ± 0.4	15.8 ± 0.6	15.4 ± 0.7	15.8 ± 0.3	14.6 ± 0.4**	15.2 ± 1.1	15.3 ± 0.6
	Hematocrit (%)	46.5 ± 0.3	45.7 ± 1.5	46.6 ± 2.2	46.7 ± 1.5	45.7 ± 2.5	44.4 ± 2.6	46.7 ± 1.0
	MCV (fL)	57 ± 1	57 ± 2	57 ± 1	56 ± 0	56 ± 1	56 ± 2	53 ± 1*
	MCH (pg)	19.1 ± 0.3	19.7 ± 1.2	18.8 ± 0.5	18.9 ± 0.4	18.0 ± 0.5*	19.2 ± 0.6	17.5 ± 0.7**
	MCHC (%)	33.8 ± 0.7	34.5 ± 0.8	32.9 ± 0.7	33.7 ± 0.6	32.1 ± 0.8**	34.2 ± 0.8	32.9 ± 0.7*
	Leukocyte ($10^2/\mu\text{L}$)	50 ± 19	52 ± 15	50 ± 11	40 ± 13	23 ± 7*	48 ± 20	42 ± 14
	Differential leukocyte counts (%)							
	Baso.	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Eosin.	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	3 ± 1	2 ± 2
	Neutro.	14 ± 4	11 ± 7	9 ± 4	8 ± 2	13 ± 7	18 ± 10	16 ± 8
	Lymph.	85 ± 5	87 ± 7	90 ± 4	91 ± 2	86 ± 6	78 ± 9	81 ± 8
	Mono.	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 1	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0
	Other	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Platelet ($10^4/\mu\text{L}$)	141 ± 22	153 ± 14	145 ± 9	134 ± 22	85 ± 15**	135 ± 8	135 ± 14
	Reticulocyte (%)	26 ± 3	26 ± 4	21 ± 5	23 ± 2	22 ± 8	23 ± 6	21 ± 4
	PT (sec)	13.3 ± 0.6	13.2 ± 0.3	13.8 ± 0.6	13.6 ± 0.2	14.6 ± 0.6**	12.7 ± 0.5	13.1 ± 0.4
	APTT (sec)	17.6 ± 0.9	16.6 ± 1.1	16.4 ± 1.0	18.1 ± 2.5	18.1 ± 0.3	17.7 ± 0.6	17.3 ± 1.1

Each value is expressed as Mean ± S.D.

Baso.: Basophil, Eosin.: Eosinophil, Neutro.: Neutrophil, Lymph.: Lymphocyte, Mono.: Monocyte

Significantly different from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 4 Blood biochemical findings of male rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	End of administration period					End of recovery period	
		0	10	40	150	600	0	600
Male								
Number of animals		5	5	5	5	5	5	5
LDH (IU/L)		251 ± 65	421 ± 212	242 ± 41	186 ± 38	134 ± 32*	221 ± 66	296 ± 134
GOT (IU/L)		71 ± 5	74 ± 9	73 ± 6	70 ± 7	68 ± 6	73 ± 3	78 ± 11
GPT (IU/L)		30 ± 4	30 ± 3	33 ± 3	28 ± 2	27 ± 6	36 ± 5	38 ± 7
ALP (IU/L)		761 ± 170	765 ± 148	736 ± 115	650 ± 103	499 ± 79*	591 ± 176	702 ± 120
γ-GTP (IU/L)		0.73 ± 0.11	0.65 ± 0.27	1.01 ± 0.69	0.76 ± 0.09	0.75 ± 0.17	0.61 ± 0.23	0.64 ± 0.22
ChE (IU/L)		36 ± 8	49 ± 8	54 ± 24	50 ± 12	67 ± 19	48 ± 15	49 ± 6
T.protein (g/dL)		5.89 ± 0.12	5.74 ± 0.10	5.77 ± 0.12	5.51 ± 0.20**	5.20 ± 0.17**	5.77 ± 0.23	5.44 ± 0.18*
Albumin (g/dL)		2.89 ± 0.12	2.84 ± 0.09	2.85 ± 0.15	2.69 ± 0.16	2.59 ± 0.16*	2.85 ± 0.24	2.68 ± 0.18
A/G ratio		0.96 ± 0.06	0.98 ± 0.06	0.98 ± 0.08	0.95 ± 0.05	0.99 ± 0.06	0.98 ± 0.11	0.97 ± 0.08
T.cholesterol (mg/dL)		62 ± 19	71 ± 15	74 ± 15	54 ± 12	63 ± 8	61 ± 9	56 ± 12
Triglyceride (mg/dL)		50 ± 11	61 ± 11	49 ± 26	28 ± 6	26 ± 8*	89 ± 18	66 ± 30
Glucose (mg/dL)		142 ± 13	155 ± 20	141 ± 15	141 ± 15	140 ± 10	165 ± 14	153 ± 6
BUN (mg/dL)		13.0 ± 1.0	15.6 ± 2.4	13.5 ± 1.1	14.8 ± 1.8	17.0 ± 3.1*	13.6 ± 1.0	15.8 ± 1.1*
Creatinine (mg/dL)		0.36 ± 0.01	0.40 ± 0.07	0.42 ± 0.02*	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.51 ± 0.07	0.48 ± 0.13
T.bilirubin (mg/dL)		0.34 ± 0.04	0.32 ± 0.04	0.34 ± 0.04	0.30 ± 0.01	0.25 ± 0.01*	0.31 ± 0.05	0.31 ± 0.03
Ca (mg/dL)		10.2 ± 0.3	10.0 ± 0.2	10.1 ± 0.1	9.9 ± 0.1	9.7 ± 0.2**	9.7 ± 0.1	9.3 ± 0.2*
I.phosphorus (mg/dL)		7.6 ± 0.4	7.8 ± 0.6	8.0 ± 0.4	8.0 ± 0.4	7.8 ± 0.3	7.1 ± 0.4	6.9 ± 0.4
Na (mEq/L)		148 ± 1	147 ± 1	148 ± 1	146 ± 1	145 ± 1**	145 ± 1	145 ± 0
K (mEq/L)		5.05 ± 0.15	5.29 ± 0.33	5.17 ± 0.23	5.23 ± 0.22	5.20 ± 0.12	5.05 ± 0.2	5.16 ± 0.17
Cl (mEq/L)		106 ± 1	107 ± 1	107 ± 1	107 ± 1	107 ± 1	106 ± 2	108 ± 2
Female								
Number of animals		5	5	5	5	5	5	5
LDH (IU/L)		202 ± 74	235 ± 57	230 ± 57	178 ± 27	115 ± 10	336 ± 120	393 ± 151
GOT (IU/L)		70 ± 7	71 ± 9	72 ± 4	62 ± 7	63 ± 4	69 ± 8	81 ± 11
GPT (IU/L)		28 ± 4	27 ± 6	27 ± 4	20 ± 2*	21 ± 5	29 ± 5	32 ± 7
ALP (IU/L)		485 ± 97	414 ± 144	459 ± 70	375 ± 56	277 ± 43**	350 ± 49	515 ± 171
γ-GTP (IU/L)		1.46 ± 0.94	1.26 ± 0.38	1.66 ± 0.39	1.01 ± 0.22	2.01 ± 0.73	1.23 ± 0.39	1.74 ± 0.78
ChE (IU/L)		367 ± 135	354 ± 91	264 ± 66	297 ± 61	256 ± 102	459 ± 84	266 ± 43**
T.protein (g/dL)		6.16 ± 0.41	6.14 ± 0.14	5.83 ± 0.23	5.76 ± 0.16	5.30 ± 0.23**	6.42 ± 0.37	5.83 ± 0.50
Albumin (g/dL)		3.20 ± 0.31	3.08 ± 0.11	2.82 ± 0.26*	3.02 ± 0.14	2.58 ± 0.22**	3.43 ± 0.36	2.91 ± 0.41
A/G ratio		1.08 ± 0.08	1.01 ± 0.06	0.94 ± 0.13	1.10 ± 0.05	0.95 ± 0.11	1.15 ± 0.13	0.99 ± 0.11
T.cholesterol (mg/dL)		73 ± 11	85 ± 8	68 ± 14	86 ± 13	71 ± 10	79 ± 14	64 ± 12
Triglyceride (mg/dL)		22 ± 7	21 ± 6	16 ± 5	21 ± 10	26 ± 10	26 ± 6	32 ± 20
Glucose (mg/dL)		139 ± 11	127 ± 13	119 ± 8	121 ± 12	127 ± 10	156 ± 10	150 ± 22
BUN (mg/dL)		17.4 ± 3.4	16.0 ± 3.1	13.9 ± 0.9	16.4 ± 2.0	13.4 ± 2.7	14.5 ± 1.2	17.3 ± 3.6
Creatinine (mg/dL)		0.45 ± 0.05	0.43 ± 0.05	0.41 ± 0.04	0.46 ± 0.06	0.39 ± 0.03	0.73 ± 0.08	0.74 ± 0.05
T.bilirubin (mg/dL)		0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.04	0.17 ± 0.01**	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.02
Ca (mg/dL)		10.1 ± 0.3	9.9 ± 0.1	9.7 ± 0.0*	9.9 ± 0.2	9.7 ± 0.0*	9.9 ± 0.4	9.4 ± 0.3*
I.phosphorus (mg/dL)		7.1 ± 0.7	6.5 ± 0.3	6.8 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.1 ± 0.5	5.7 ± 0.9	5.4 ± 0.4
Na (mEq/L)		147 ± 2	148 ± 1	149 ± 0	147 ± 2	146 ± 1	147 ± 1	146 ± 1
K (mEq/L)		5.18 ± 0.21	4.92 ± 0.16	4.98 ± 0.32	5.06 ± 0.07	5.07 ± 0.33	4.59 ± 0.31	5.01 ± 0.24*
Cl (mEq/L)		108 ± 2	108 ± 2	110 ± 1	110 ± 2	110 ± 1	109 ± 1	108 ± 2

Each value is expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 5 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	End of administration period					End of recovery period	
		0	10	40	150	600	0	600
Male								
	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
	Body weight (g)	357 ± 30	348 ± 28	362 ± 43	326 ± 16	290 ± 28**	420 ± 10	355 ± 39**
	Absolute weight							
	Brain (g)	1.94 ± 0.07	1.87 ± 0.04	1.99 ± 0.07	1.82 ± 0.08	1.77 ± 0.08**	1.98 ± 0.12	1.88 ± 0.09
	Liver (g)	10.11 ± 1.34	10.24 ± 0.54	10.32 ± 1.32	8.76 ± 0.70	7.32 ± 0.60**	11.97 ± 0.58	9.81 ± 1.12**
	Kidneys (g)	2.75 ± 0.25	2.74 ± 0.27	2.89 ± 0.31	2.54 ± 0.08	2.46 ± 0.28	2.87 ± 0.05	2.57 ± 0.15**
	Spleen (g)	0.70 ± 0.10	0.66 ± 0.06	0.74 ± 0.09	0.61 ± 0.05	0.63 ± 0.10	0.73 ± 0.05	0.63 ± 0.07*
	Heart (g)	1.24 ± 0.08	1.24 ± 0.23	1.21 ± 0.08	1.15 ± 0.04	1.04 ± 0.09*	1.38 ± 0.08	1.30 ± 0.17
	Thymus (g)	0.64 ± 0.14	0.56 ± 0.05	0.61 ± 0.16	0.42 ± 0.04	0.25 ± 0.04**	0.50 ± 0.06	0.34 ± 0.06**
	Thyroids (mg)	25.1 ± 3.0	26.3 ± 3.3	26.1 ± 3.9	25.0 ± 2.4	22.4 ± 1.0	25.2 ± 4.8	25.7 ± 5.2
	Pituitary (mg)	12.6 ± 1.6	11.8 ± 1.6	11.8 ± 0.9	10.8 ± 0.8	9.1 ± 0.6**	11.8 ± 1.3	11.2 ± 0.9
	Adrenals (mg)	58.0 ± 9.6	59.1 ± 10.1	56.0 ± 6.6	52.2 ± 4.9	41.9 ± 4.0**	66.5 ± 8.5	49.8 ± 2.7**
	Testes (g)	3.50 ± 0.33	3.17 ± 0.28	3.49 ± 0.33	3.21 ± 0.20	2.78 ± 0.24**	3.33 ± 0.12	2.47 ± 0.52**
	Epididymides (g)	0.85 ± 0.05	0.89 ± 0.11	0.83 ± 0.08	0.78 ± 0.03	0.68 ± 0.06**	1.05 ± 0.07	0.79 ± 0.09**
	Relative weight							
	Brain (g%)	0.55 ± 0.06	0.54 ± 0.03	0.56 ± 0.07	0.56 ± 0.05	0.62 ± 0.07	0.47 ± 0.02	0.53 ± 0.05*
	Liver (g%)	2.83 ± 0.18	2.95 ± 0.08	2.85 ± 0.05	2.68 ± 0.18	2.53 ± 0.06	2.85 ± 0.10	2.77 ± 0.08
	Kidneys (g%)	0.77 ± 0.04	0.79 ± 0.04	0.80 ± 0.05	0.78 ± 0.06	0.85 ± 0.04	0.68 ± 0.02	0.73 ± 0.07
	Spleen (g%)	0.20 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.03
	Heart (g%)	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.05	0.34 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.33 ± 0.01	0.37 ± 0.01**
	Thymus (g%)	0.18 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.04	0.13 ± 0.01	0.09 ± 0.01**	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.02*
	Thyroids (mg%)	7.1 ± 1.0	7.6 ± 0.8	7.2 ± 0.4	7.7 ± 1.0	7.8 ± 0.7	6.0 ± 1.3	7.2 ± 1.2
	Pituitary (mg%)	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.3	3.3 ± 0.3	3.3 ± 0.3	3.1 ± 0.2	2.8 ± 0.3	3.2 ± 0.2*
	Adrenals (mg%)	16.2 ± 1.5	17.1 ± 3.8	15.5 ± 0.6	16.0 ± 1.0	14.5 ± 1.5	15.8 ± 1.8	14.2 ± 1.2
	Testes (g%)	0.98 ± 0.04	0.91 ± 0.06	0.97 ± 0.13	0.99 ± 0.10	0.97 ± 0.13	0.79 ± 0.04	0.71 ± 0.19
	Epididymides (g%)	0.24 ± 0.01	0.26 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.04
Female								
	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5
	Body weight (g)	208 ± 16	213 ± 15	222 ± 15	219 ± 14	201 ± 13	237 ± 15	240 ± 29
	Absolute weight							
	Brain (g)	1.84 ± 0.06	1.78 ± 0.04	1.87 ± 0.10	1.78 ± 0.05	1.77 ± 0.07	1.83 ± 0.06	1.79 ± 0.07
	Liver (g)	5.99 ± 0.62	6.08 ± 0.68	6.22 ± 0.53	6.21 ± 0.43	5.89 ± 0.57	6.58 ± 0.73	6.56 ± 0.90
	Kidneys (g)	1.62 ± 0.21	1.61 ± 0.12	1.77 ± 0.23	1.74 ± 0.12	1.75 ± 0.21	1.65 ± 0.06	1.72 ± 0.13
	Spleen (g)	0.43 ± 0.07	0.49 ± 0.09	0.49 ± 0.07	0.46 ± 0.05	0.38 ± 0.03	0.45 ± 0.05	0.50 ± 0.08
	Heart (g)	0.77 ± 0.11	0.74 ± 0.04	0.83 ± 0.08	0.79 ± 0.05	0.79 ± 0.09	0.84 ± 0.04	0.89 ± 0.11
	Thymus (g)	0.42 ± 0.04	0.43 ± 0.07	0.52 ± 0.11	0.42 ± 0.10	0.25 ± 0.04**	0.40 ± 0.08	0.42 ± 0.10
	Thyroids (mg)	20.8 ± 1.6	19.9 ± 2.4	23.2 ± 2.2	19.4 ± 2.8	19.9 ± 2.0	19.4 ± 2.7	24.7 ± 3.0*
	Pituitary (mg)	13.2 ± 1.0	13.6 ± 1.1	14.0 ± 2.5	12.1 ± 1.1	10.3 ± 1.1*	14.1 ± 1.4	12.0 ± 1.7
	Adrenals (mg)	63.0 ± 12.7	59.0 ± 7.6	65.5 ± 9.8	61.5 ± 6.4	51.1 ± 8.5	62.5 ± 3.9	57.8 ± 2.6
	Ovaries (mg)	84.0 ± 17.9	80.1 ± 10.9	81.6 ± 4.2	83.8 ± 5.3	74.9 ± 17.4	78.7 ± 5.6	86.4 ± 8.9
	Uterus (g)	0.46 ± 0.19	0.44 ± 0.10	0.58 ± 0.18	0.51 ± 0.20	0.39 ± 0.10	0.62 ± 0.14	0.51 ± 0.08
	Relative weight							
	Brain (g%)	0.88 ± 0.09	0.84 ± 0.06	0.84 ± 0.03	0.81 ± 0.04	0.88 ± 0.06	0.77 ± 0.03	0.75 ± 0.11
	Liver (g%)	2.87 ± 0.16	2.84 ± 0.14	2.80 ± 0.10	2.83 ± 0.11	2.93 ± 0.16	2.78 ± 0.24	2.73 ± 0.15
	Kidneys (g%)	0.78 ± 0.08	0.76 ± 0.04	0.79 ± 0.05	0.80 ± 0.03	0.87 ± 0.05*	0.70 ± 0.04	0.72 ± 0.07
	Spleen (g%)	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.21 ± 0.03
	Heart (g%)	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.39 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.01
	Thymus (g%)	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.04	0.23 ± 0.05	0.19 ± 0.06	0.12 ± 0.02*	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.04
	Thyroids (mg%)	10.0 ± 1.3	9.4 ± 1.5	10.4 ± 0.5	8.9 ± 1.4	9.9 ± 1.2	8.2 ± 1.3	10.3 ± 1.1*
	Pituitary (mg%)	6.4 ± 0.7	6.4 ± 0.3	6.3 ± 0.8	5.5 ± 0.4*	5.1 ± 0.4*	6.0 ± 0.4	5.1 ± 0.9
	Adrenals (mg%)	30.1 ± 5.2	27.7 ± 3.0	29.5 ± 4.4	28.1 ± 2.2	25.6 ± 5.2	26.4 ± 1.8	24.4 ± 3.8
	Ovaries (mg%)	40.1 ± 6.5	37.4 ± 2.8	36.8 ± 2.5	38.3 ± 2.4	37.3 ± 8.3	33.3 ± 2.7	36.2 ± 3.4
	Uterus (g%)	0.22 ± 0.08	0.21 ± 0.05	0.26 ± 0.08	0.23 ± 0.09	0.20 ± 0.04	0.26 ± 0.06	0.22 ± 0.05

Each value is expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 6 Incidence of histopathological findings of rats treated orally with tetrahydrofurfuryl alcohol in the 28-day repeated dose toxicity test

Sex	Organ:	Findings	Dose (mg/kg)	Number of animals	End of administration period					End of recovery period	
					0	10	40	150	600	0	600
				5	5	5	5	5	5	5	
Male											
Liver:	Microgranuloma	-		4	#	#	#	5	#	#	
		+		1	#	#	#	0	#	#	
Kidney:	Cyst, solitary	-		3	#	#	#	3	#	#	
		+		2	#	#	#	2	#	#	
	Basophilic tubules	-		4	#	#	#	4	#	#	
		+		1	#	#	#	1	#	#	
	Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	-		1	#	#	#	2	#	#	
		+		4	#	#	#	3	#	#	
	Cellular infiltration, lymphocyte, cortex	-		4	#	#	#	5	#	#	
		+		1	#	#	#	0	#	#	
Spleen:	Hematopoiesis, extramedullary	-, +		0	2	1	3	5**	0	2	
		++		5	3	4	2	0	5	3	
	Deposit, pigment, brown	-		0	0	0	0	0	0	0	
		+		5	5	5	5	5	5	5	
	Inflammation, capsule	-		5	5	5	4	2	5	4	
		+		0	0	0	1	3	0	1	
Testis:	Necrosis, seminiferous epithelium	-		5	5	5	3	0	5	0	
		+, ++		0	0	0	2	5**	0	5**	
Thymus:	Atrophy	-		5	5	5	5	0	5	5	
		+		0	0	0	0	5**	0	0	
	Hemorrhage	-		5	5	4	5	5	4	5	
		+		0	0	1	0	0	1	0	
Female											
Lung:	Mineralization, artery	-		4	#	#	#	5	#	#	
		+		1	#	#	#	0	#	#	
	Accumulation, foam cell	-		5	#	#	#	4	#	#	
		+		0	#	#	#	1	#	#	
Liver:	Small granuloma	-		4	#	#	#	4	#	#	
		+		1	#	#	#	1	#	#	
	Necrosis, focal	-		4	#	#	#	4	#	#	
		+		1	#	#	#	1	#	#	
Kidney:	Cyst, solitary	-		4	#	#	#	3	#	#	
		+		1	#	#	#	2	#	#	
Spleen:	Hematopoiesis, extramedullary	-		0	#	#	#	0	#	#	
		+		5	#	#	#	5	#	#	
	Deposit, pigment, brown	-		0	#	#	#	0	#	#	
		+		5	#	#	#	5	#	#	
Uterus:	dilatation, lumen	-		4	#	0/2 ^{a)}	0/1 ^{a)}	5	#	#	
		+		1	#	2/2	1/1	0	#	#	
Thymus:	Atrophy	-		5	5	5	5	0	5	5	
		+		0	0	0	0	5**	0	0	
	Hemorrhage	-		4	4	5	4	5	5	5	
		+		1	1	0	1	0	0	0	

-: Negative, +: Slight, ++: Moderate

#: Not examined, a): Examined the animal with macroscopic abnormalities

Significantly different from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

ジシクロヘキシルアミンの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Dicyclohexylamine on Bacteria

要約

ジシクロヘキシルアミン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。

156~5000 μg /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2500 μg /プレート以上の濃度で生育阻害が認められたが、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、全菌株とも2500 μg /プレートを最高濃度とし、以下公比2で計6濃度を設定して行った。

試験の結果、濃度設定試験と同様、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において2500 μg /プレート濃度で生育阻害が認められ、また、いずれの濃度においても復帰変異コロニー数は、陰性対照値の2倍を越えなかった。

但し、濃度設定試験および本試験ともに代謝活性化法のTA100で若干の濃度依存的な復帰変異コロニー数の増加傾向が認められたため、確認試験を行った。その結果、復帰変異コロニー数の明らかな増加は認められず、濃度依存性傾向も認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、ジシクロヘキシルアミンは、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, TA1537¹⁾ および *E. coli* WP2 *uvrA*²⁾ 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 μL 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 1×10^9 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

ジシクロヘキシルアミン(ロット番号26281, 関東電化工業(株)提供)は、無色透明の液体で、水に微溶(0.16 g/100 mL)、アルコール、エーテル、ベンゼンおよびアセトンに可溶であり、分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}$ 、分子量181.32、純度99.63%(不純物として、ジシクロヘキシルイミン0.119%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

溶媒にアセトン(和光純薬工業(株))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はジメチルスルホキシド(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-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

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0.05 mL、被験物質供試液0.05 mLあるいは陽性対照物質溶液0.1 mLを入れ、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℃で20分間振盪培養した。培養終了後、45℃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℃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 μg /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、全ての指標菌株において2500 μg /プレート以上の濃度で生育阻害が認められたが、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、本試験における被験物質の処理濃度は、最高濃度を2500 μg /プレートとし、以下公比2で1250, 625, 313, 156および78 μg /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2500 μg /プレートで生育阻害が認められた。

但し、濃度設定試験および本試験ともに代謝活性化法のTA100において、若干の濃度依存的な復帰変異コロニー数の増加傾向が認められたため、1250~2500 μg /プレート間でさらに濃度依存性の復帰変異コロニー数の増加が認められるか否かを調べる目的で750~2500 μg /プレートの範囲で濃度を設定(公差250)し、TA100の代謝活性化法による確認試験を行った。その結果(Table 5)、いずれの濃度においても復帰変異コロニー数の明らかな増加は認められず、濃度依存性傾向も認められなかった。また、1500 μg /プレート以上の濃度では菌の生育阻害が認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、ジシクロヘキシルアミンの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

ジシクロヘキシルアミンの変異原性については、すでに*S. typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537を用いた復帰突然変異試験³⁾および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⁴⁾で陰性と報告されており、一方、ヒトリンパ球を用いた染色体異常試験では陽性⁵⁾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) K. Mortelmans, S. Haworth, T. Lawlor, W. Speck, B. Tainer, E. Zeiger, *Environ. Mutagen.*, **8**(suppl.7), 1(1986).
- 4) 賀田恒夫, 石館基監修, "環境変異原データ集1," サイエンス社, 東京, 1980, p. 141.
- 5) International Agency for Research on Cancer (IARC), "IARC Monographs on Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans," suppl.6, World Health Organization, Lyon, 1987, pp. 240-241.

Table 1 Results of reverse mutation test of dicyclohexylamine 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	121	139	133	12	11	13	19	12	16	19	18	14	6	6	5
	[131 \pm 9]			[12 \pm 1]			[16 \pm 4]			[17 \pm 3]			[6 \pm 1]		
156	121	107	133	12	9	12	26	16	10	26	20	18	8	7	7
	[120 \pm 13]			[11 \pm 2]			[17 \pm 8]			[21 \pm 4]			[7 \pm 1]		
313	120	134	141	7	10	14	15	17	16	15	19	22	7	6	4
	[132 \pm 11]			[10 \pm 4]			[16 \pm 1]			[19 \pm 4]			[6 \pm 2]		
625	110	119	112	10	11	12	18	10	16	19	15	21	8	10	7
	[114 \pm 5]			[11 \pm 1]			[15 \pm 4]			[18 \pm 3]			[8 \pm 2]		
1250	125	121	118	10	11	11	12	16	15	12	11	13	5	3	4
	[121 \pm 4]			[11 \pm 1]			[14 \pm 2]			[12 \pm 1]			[4 \pm 1]		
2500	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]		
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	829	964	904 ^{a)}	287	332	360 ^{b)}	888	934	948 ^{c)}	385	355	381 ^{d)}	731	819	739 ^{e)}
	[899 \pm 68]			[326 \pm 37]			[923 \pm 31]			[374 \pm 16]			[763 \pm 49]		

*: Toxic effect was observed.

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 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 dicyclohexylamine 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	108	116	128	10	9	13	19	21	14	31	27	33	12	11	10
	[117 \pm 10]			[11 \pm 2]			[18 \pm 4]			[30 \pm 3]			[11 \pm 1]		
156	120	121	125	10	13	15	23	23	24	33	28	30	14	11	12
	[122 \pm 3]			[13 \pm 3]			[23 \pm 1]			[30 \pm 3]			[12 \pm 2]		
313	126	122	115	8	11	10	15	14	14	33	30	41	11	9	14
	[121 \pm 6]			[10 \pm 2]			[14 \pm 1]			[35 \pm 6]			[11 \pm 3]		
625	134	147	135	17	10	8	17	17	14	37	42	45	15	9	14
	[139 \pm 7]			[12 \pm 5]			[16 \pm 2]			[41 \pm 4]			[13 \pm 3]		
1250	165	143	168	10	10	11	15	21	20	37	33	40	15	17	15
	[159 \pm 14]			[10 \pm 1]			[19 \pm 3]			[37 \pm 4]			[16 \pm 1]		
2500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	21*	13*	16*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[17 \pm 4]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]		
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	536	638	543 ^{a)}	196	193	211 ^{b)}	896	934	1001 ^{c)}	210	222	235 ^{d)}	86	80	76 ^{e)}
	[572 \pm 57]			[200 \pm 10]			[944 \pm 53]			[222 \pm 13]			[81 \pm 5]		

*: Toxic effect 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 dicyclohexylamine on bacteria [direct method:-S9]

Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertant colonies per plate [Mean±S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	127	119	110	11	13	15	20	14	22	27	27	26	7	8	6
	[119 ± 9]			[13 ± 2]			[19 ± 4]			[27 ± 1]			[7 ± 1]		
78	122	117	131	8	12	8	20	13	21	31	32	25	5	4	6
	[123 ± 7]			[9 ± 2]			[18 ± 4]			[29 ± 4]			[5 ± 1]		
156	107	108	107	8	11	15	16	19	15	21	20	15	7	7	7
	[107 ± 1]			[11 ± 4]			[17 ± 2]			[19 ± 3]			[7 ± 0]		
313	112	124	126	12	10	15	15	13	13	25	21	30	8	7	5
	[121 ± 8]			[12 ± 3]			[14 ± 1]			[25 ± 5]			[7 ± 2]		
625	103	125	115	8	10	10	11	10	14	25	21	22	10	7	7
	[114 ± 11]			[9 ± 1]			[12 ± 2]			[23 ± 2]			[8 ± 2]		
1250	106	116	107	10	9	11	15	15	11	21	18	19	5	6	4
	[110 ± 6]			[10 ± 1]			[14 ± 2]			[19 ± 2]			[5 ± 1]		
2500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	1*	9*	12*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[0 ± 0]			[0 ± 0]			[7 ± 6]			[0 ± 0]			[0 ± 0]		
Positive control	1014	964	917 ^{a)}	426	421	394 ^{b)}	943	925	1011 ^{c)}	420	391	392 ^{d)}	856	868	994 ^{e)}
	[965 ± 49]			[414 ± 17]			[960 ± 45]			[401 ± 16]			[906 ± 76]		

*: Toxic effect was observed.

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μg/plate b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 μg/plate

c): AF-2, 0.04 μg/plate d): AF-2, 0.1 μg/plate e): 9-AA; 9-Aminoacridine, 80 μg/plate

Table 4 Results of reverse mutation test of dicyclohexylamine on bacteria [activation method:+S9]

Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertant colonies per plate [Mean±S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	113	106	117	13	12	12	20	21	17	34	38	33	10	17	14
	[112 ± 6]			[12 ± 1]			[19 ± 2]			[35 ± 3]			[14 ± 4]		
78	117	112	119	13	10	13	18	22	17	30	43	38	10	19	12
	[116 ± 4]			[12 ± 2]			[19 ± 3]			[37 ± 7]			[14 ± 5]		
156	113	114	123	16	14	8	14	12	19	30	34	37	14	15	16
	[117 ± 6]			[13 ± 4]			[15 ± 4]			[34 ± 4]			[15 ± 1]		
313	124	125	141	11	12	12	23	14	16	39	41	46	10	13	17
	[130 ± 10]			[12 ± 1]			[18 ± 5]			[42 ± 4]			[13 ± 4]		
625	136	128	136	8	15	14	17	19	12	36	36	42	15	17	13
	[133 ± 5]			[12 ± 4]			[16 ± 4]			[38 ± 3]			[15 ± 2]		
1250	125	144	149	12	11	4	21	19	12	30	33	28	12	9	13
	[139 ± 13]			[9 ± 4]			[17 ± 5]			[30 ± 3]			[11 ± 2]		
2500	0*	0*	0*	5*	3*	5*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	3*	0*
	[0 ± 0]			[4 ± 1]			[0 ± 0]			[0 ± 0]			[1 ± 2]		
Positive control	590	514	502 ^{a)}	237	276	242 ^{b)}	907	965	901 ^{c)}	272	278	294 ^{d)}	85	83	79 ^{e)}
	[535 ± 48]			[252 ± 21]			[924 ± 35]			[281 ± 11]			[82 ± 3]		

*: Toxic effect was observed.

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 μg/plate b): 2-AA, 2 μg/plate c): 2-AA, 10 μg/plate

Table 5 Results of reverse mutation test of dicyclohexylamine on bacteria (Confirmative 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	134 135 128 [132 \pm 4]	-	-	-	-	
750	155 166 170 [164 \pm 8]	-	-	-	-	
1000	176 170 139 [162 \pm 20]	-	-	-	-	
1250	129 146 147 [141 \pm 10]	-	-	-	-	
1500	127* 130* 127* [128 \pm 2]	-	-	-	-	
1750	137* 149* 138* [141 \pm 7]	-	-	-	-	
2000	144* 189* 137* [157 \pm 28]	-	-	-	-	
2250	115* 135* 136* [129 \pm 12]	-	-	-	-	
2500	12* 8* 17* [12 \pm 5]	-	-	-	-	
Positive control	609 693 593** [632 \pm 54]	-	-	-	-	

*:Toxic effect was observed. -:Not tested.

a):2-AA;2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$

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

ジシクロヘキシルアミンの 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 Dicyclohexylamine on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

ジシクロヘキシルアミン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、細胞増殖抑制試験を行った結果、連続処理法の場合は、24時間および48時間処理でそれぞれ400および250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、短時間処理法の場合は、S9 mix非存在および存在下でそれぞれ600および1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で、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濃度は、連続処理法の場合100, 200, 250, 300, 400および500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法の場合100, 200, 400, 600, 800および1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

試験の結果、連続処理法においては、染色体異常を有する細胞の増加は認められなかった。48時間処理の400および500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度では、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。一方、短時間処理法においては、S9 mix非存在下で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高濃度を除く100~600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のうち600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度でのみ染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度10.0%)が認められた。S9 mix存在下では、800および1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度13.5および31.0%)が認められ、600~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間では濃度依存性傾向も認められた。

以上の成績から、本実験条件下において、ジシクロヘキシルアミンは、CHL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

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4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

4×10^3 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CO₂インキュベーター(5% CO₂)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

ジシクロヘキシルアミン(ロット番号26281, 関東電化工業株提供)は、無色透明の液体で、水に微溶(0.16 g/100 mL)、アルコール、エーテル、ベンゼンおよびアセトンに可溶であり、分子式C₁₂H₂₃N, 分子量181.32, 純度99.63% (不純物として、ジシクロヘキシルイミン0.119%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

溶媒にアセトン(和光純薬工業株)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1.0% (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), 連続処理法の場合は, 24時間処理で400 µg/mL以上, 48時間処理では250 µg/mL以上の濃度で, 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ, 50%細胞増殖抑制濃度は, それぞれ300~400 µg/mL間および200~250 µg/mL間にあるものと判断された。

短時間処理法の場合は, S9 mix非存在および存在下でそれぞれ600および1000 µg/mL以上の濃度で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ, 50%細胞増殖抑制濃度は, それぞれ400~600 µg/mL間および800~1000 µg/mL間にあるものと判断された。

Appendix 1 Cell growth inhibition test of CHL cells continuously treated with dicyclohexylamine without S9 mix

Concentration (µg/mL)	Average cell growth rate (%)	
	24-hour treatment	48-hour treatment
0(Solvent)	100	100
100	99.5	86.5
150	-	73.5
200	77.0	60.5
250	-	43.5
300	65.0	36.0
350	-	18.5
400	44.0	-
500	42.0	-
600	34.0	-

-: not tested

Appendix 2 Cell growth inhibition test of CHL cells treated with dicyclohexylamine with and without S9 mix

Concentration (µg/mL)	Average cell growth rate (%)	
	without S9 mix	with S9 mix
0(Solvent)	100	100
400	79.5	90.0
600	34.0	79.0
800	11.0	60.0
1000	3.5	35.0
1200	3.0	8.5
1400	4.0	7.0

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濃度は, 50%細胞増殖抑制濃度の前後が含まれ, かつ3濃度以上のデータが得られることを考慮して, 連続処理法では100, 200, 250, 300, 400および500 µg/mL, 短時間処理法では100, 200, 400, 600, 800および1000 µg/mLの各6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 µg/mL, 短時間処理法では3,4-benzo [a] pyrene(B [a] P, Sigma Chemical Co.)を10 µg/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 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%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¹⁾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 χ^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。ジシクロヘキシルアミンを加えて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非存在下では, 600 µg/mL濃度で染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度10.0%)が認められた。S9 mix存

在下においては、800および1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度13.5および31.0%)が認められ、600~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間では濃度依存性傾向も認められた。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。

なお、連続処理法48時間処理の400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上および短時間処理法S9 mix非存在下の800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では、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。

以上の成績から、本実験条件下では、ジシクロヘキシルアミンのCHL細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。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10%以上を陽性とする生物学的判定基準²⁾からみても明らかに陽性を示すものであった。陽性結果が得られたため、 D_{20} 値³⁾(分裂中期像の20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の濃度)を算出したところ、本被験物質の D_{20} 値は、短時間処理法において0.96 mg/mLであった。

ジシクロヘキシルアミンの変異原性については、すでにヒトリンパ球を用いた染色体異常試験においても陽性⁴⁾と報告されており、一方、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537を用いた復帰突然変異試験⁵⁾および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⁶⁾では陰性と報告されている。

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) 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.
- 3) 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.
- 4) International Agency for Research on Cancer (IARC), “IARC Monographs on Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans,” suppl. 6, World Health Organization, Lyon, 1987, pp. 240-241.
- 5) K. Mortelmans, S. Haworth, T. Lawlor, W. Speck, B. Tainer, E. Zeiger, *Environ. Mutagen.*, **8(suppl.7)**, 1(1986).
- 6) 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. 141.

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) continuously treated with dicyclohexylamine 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 ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
DCHA	100	24	200	0	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
	200	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	0	-	-
	250	24	200	0	0	2	1	0	0	3	3(1.5)	3(1.5)	0	-	-
	300	24	200	1	1	0	0	0	0	2	1(0.5)	2(1.0)	0	-	-
	400	24	200	1	0	2	0	0	0	3	2(1.0)	3(1.5)	0	-	-
	500	24	200	0	2	2	1	0	0	5	3(1.5)	3(1.5)	0	-	-
MNNG	2.5	24	200	3	15	182	2	0	0	202	183(91.5)	183(91.5)**	0	+	-
Solvent	0	48	200	0	0	1	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
DCHA	100	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0(0)	1(0.5)	0	-	-
	200	48	200	0	0	2	0	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0	-	-
	250	48	200	0	0	1	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
	300	48	200	0	0	0	1	1	0	2	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
	400	48	Toxic												
	500	48	Toxic												
MNNG	2.5	48	200	3	33	152	19	7	0	214	164(82.0)	164(82.0)**	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, DCHA: Dicyclohexylamine, MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample χ^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 dicyclohexylamine 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 ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	2	0	1	0	0	0	3	1(0.5)	3(1.5)	0	-	-
DCHA	100	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0	-	-
	200	-	6-(18)	200	1	0	0	1	1	0	3	1(0.5)	2(1.0)	0	-	-
	400	-	6-(18)	200	0	0	3	0	2	0	5	5(2.5)	5(2.5)	1.5	-	-
	600	-	6-(18)	200	2	3	18	4	0	0	27	19(9.5)	20(10.0)**	0	+	-
	800	-	6-(18)	Toxic												
	1000	-	6-(18)	Toxic												
BP	10	-	6-(18)	200	0	1	0	1	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0(0)	1(0.5)	0	-	-
DCHA	100	+	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
	200	+	6-(18)	200	2	0	1	0	0	0	3	1(0.5)	3(1.5)	0	-	-
	400	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	1.0	-	-
	600	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	1.0	-	-
	800	+	6-(18)	200	1	10	26	2	1	0	40	27(13.5)	27(13.5)**	0.5	+	-
	1000	+	6-(18)	200	7	35	57	16	0	0	115	60(30.0)	62(31.0)**	0	+	-
BP	10	+	6-(18)	200	8	13	103	1	3	0	128	108(54.0)	113(56.5)**	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, DCHA: Dicyclohexylamine, BP: benzo[a]pyrene
 1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample χ^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.

ジシクロヘキシルアミ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 Dicyclohexylamine in Rats

要約

ジシクロヘキシルアミンの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系(Crj:CD)ラットを用いて実施した。投与量は、雌雄いずれも0(溶媒対照群)、20、70および200 mg/kgとした。雌雄とも溶媒対照群および200 mg/kg投与群では1群13例、20および70 mg/kg投与群では1群5例を使用し、このうち溶媒対照群の雌雄各5例および200 mg/kg投与群の雌雄各2例については14日間の回復試験を行った。一方、投与期間終了時に生存していた溶媒対照群ならびに200 mg/kg投与群の一部の動物については、神経系の病理組織学検査に使用した。その結果、以下の成績を得た。

雌雄とも200 mg/kg投与群の13例中8例で死亡がみられ、雄では投与第11日から、雌では投与第4日から、それぞれ投与期間終了まで断続的に認められた。雄の死亡動物のうち1例の病理組織学検査では、広汎な心筋変性がみられたが、他の死亡動物においては同様の変化はみられず、他の器官においても異常は認められなかった。

一般状態の変化として、雌雄とも200 mg/kg投与群で流涎や痙攣、姿勢の異常、散瞳、呼吸異常、異常発声等の神経症状がみられ、70 mg/kg投与群では雌雄で流涎が、雄で痙攣が認められた。これらの神経症状は投与期間の終了とともに消失した。ジシクロヘキシルアミンには、交感神経終末におけるノルアドレナリンの再吸収阻害作用が認められており¹⁻³⁾、本試験においてみられた一般状態の変化および死亡の原因は、交感神経の過剰な興奮によるものと推察される。

200 mg/kg投与群の雌および雄では、体重ならびに摂餌量が溶媒対照群と比較して低値を示した。体重の低値は投与期間終了後も継続したが、摂餌量は休薬とともに回復した。

投与期間終了時の血液学検査では、200 mg/kg投与群の雌の白血球数が増加した。

投与期間終了時の血液生化学検査では、200 mg/kg投与群の雌雄で無機リンおよびカルシウム濃度の上昇が認められ、リン・カルシウム代謝に対するジシクロヘキシルアミン投与の影響が疑われた。

投与期間終了時の剖検において、副腎重量の増加が200 mg/kg投与群の雌雄で、卵巣重量の減少が70 mg/kg以上の投与群で観察された。200 mg/kg投与群では多数の死亡がみられ、また重度の神経症状の発現あるいは全身状態の悪化などが認められたことから、著しい症状の継続的発現によるストレス負荷により、コルチコ

トロンピン放出因子の分泌が増加し、これらの器官重量に変化を及ぼしている可能性が示唆された。

以上の結果、本試験条件下におけるジシクロヘキシルアミンの無影響量(NOEL)は、雌雄とも20 mg/kgであると判断した。

方法

1. 被験物質および投与検体の調製

被験物質として、関東電化工業(株)より提供されたジシクロヘキシルアミン〔ロット番号:26281, 無色透明液体, 融点:-0.1℃, 沸点:255.8℃, 純度:99.63 wt%〕を用い、入手後、遮光条件下に室温にて保管した。

被験物質を40.0 mg/mLの濃度になるよう、コーン油〔ロット番号:V6N3521, ナカライテスク(株)〕に溶解し、さらにこの40.0 mg/mL液を14.0および4.0 mg/mLの濃度に段階希釈した後、投与時まで冷暗所で保管した。調製された検体は、調製後6日以内に使用した。なお、調製検体の安定性試験および含量試験を実施した結果、1.00および100 mg/mLコーン油溶液の被験物質は、冷暗所で7日間は安定であり、また、投与検体中の被験物質の平均含量は、所定濃度の107~109%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))を9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36匹を試験に供した。動物は、全飼育期間を通じて、温度24.0~24.6℃, 湿度46~63%, 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に1匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2, 日本クレア(株)製)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

投与量は、本試験開始前に予備試験として秦野研究所で実施した、ジシクロヘキシルアミンのラットにおける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、ジシクロヘキシルアミンを0, 50, 100, 250および500 mg/kgの用量で7日間反復投与した結果、500 mg/kgを投与したラット5例全例、250 mg/kgを投与したラット5例中4例が1週間の投与期間内に死亡し、これらの用量は最大耐量

を超える量と判断した。一方、100 mg/kgを投与したラットでは、体重、一般状態、剖検所見等に何ら毒性変化は認められなかった。この結果から、本試験における最高用量は100から250 mg/kgの範囲内で設定することが適切であると判断し、同一週齢の雄ラット各5例に被験物質の150ならびに200 mg/kgを7日間投与して確認した。その結果、200 mg/kgが最高用量として適当であると判断し、以下公比約3で除し、中ならびに低用量には70および20 mg/kgを設定した。なお、雌雄とも溶媒対照群にはコーン油を経口投与した。

群分けは、検疫期間中に異常のない動物の中から、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。動物数は、溶媒対照群および200 mg/kg投与群では雌雄各13匹とし、20および70 mg/kg投与群では各5匹の動物を用いた。また、溶媒対照群の雌雄各5匹および200 mg/kg投与群の雌雄各2匹を、投与期間終了後、14日間の回復試験に用いた。一方、溶媒対照群および200 mg/kg投与群の各13匹中3匹を投与期間終了時に神経系の病理組織学検査を行う動物として、一般状態の観察ならびに病理組織学検査を実施した。これらの病理組織学検査対象動物のうち、投与期間中に溶媒対照群の雄の1例、200 mg/kg投与群の雌雄各2例が死亡したため、残りの動物を投与期間終了時に、0.1 Mリン酸緩衝1.25%グルタルアルデヒド2%パラホルムアルデヒド固定液で灌流固定し、脳、脊髄および坐骨神経の一部を電子顕微鏡用樹脂包埋し、病理組織学的に検査した。これらの神経系の病理組織学検査の結果、被験物質投与によると考えられる異常は認められなかった。

4. 投与方法

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、毎日9時～12時の間に、ラット用胃管を用いて強制的に行い、投与量は、雌雄とも5 mL/kgとして、各投与時に最も近い時点で測定された体重に基づいて個別に算出した。

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、毎日、死亡例の有無を調べた。また、生存動物全例について、一般状態を投与期間中は毎日、投与前および投与後の1日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1週に2回の頻度で、生存動物全例について体重を測定し、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1週に1回の頻度で、生存動物全例について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26日)に、溶媒対照群ならびに70 mg/kg以下の被験物質投与群では雌雄とも各5匹を、200 mg/kg投与群では検査日まで生存していた雌雄各4匹を選択し、また回復試験期間終了週(回復第12日)には回復試験を行った動物全例を、いずれも約24時間代謝ケージに収容して採尿し、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、使用天秤(AE200, メトラー)〕、ナトリウム濃度、カリウム濃度および塩素濃度(イオン電極法、全自動電解質分析装置EA05, A&T)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, バイエル三共)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、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, コールターエレクトロニクス)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。さらに、プロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間の測定には、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液を用いて、光散乱検出法(CA-3000, 東亜医用電子(株))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, ロシュ)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・DOS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Gl-DH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(パラ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(Wröblewski-La Due法)、カルシウム濃度(OCPC法)、無機リン濃度(モリブデン酸直接法)、トリグリセライド濃度(GPO・DAOS法)、 γ -GTP活性(γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-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。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、精巣または卵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、脊髄、下垂体、眼球、ハーダー腺、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、精巣または卵巣、精嚢腺、膀胱、前立腺、骨髄(大腿骨)、坐骨神経、骨格筋(下腿部)および病変部については、0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン液(pH 7.2)で固定した。病理組織学検査は、投与期間終了時ならびに回復試験期間終了時に剖検した雄の全動物の心臓、200 mg/kg投与群ならびに溶媒対照群の脳、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、坐骨神経、下垂体および卵巣について、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して実施した。また、投与期間終了時および回復試験期間終了時の剖検時に、肉眼的に異常が認められた動物の病変部についても実施した。

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値をもとにして、各群ごとに平均および標準偏差を求めた。また、1群の例数が3例以上の群が溶媒対照群を含め3群ある場合は、Bartlettの方法による分散の一様性の検定(有意水準:5%)を行い、ついで、分散が一様な場合は、一元配置型の分散分析を行い、有意(有意水準:5%)の時はDunnettあるいはSchefféの方法で多重比較を行った。一方、分散が一様でない場合はKruskal-Wallisの順位検定を行い、有意(有意水準:5%)ならばDunnett型あるいはScheffé型の方法で多重比較を行った。さらに、病理組織所見については、グレード分けしたデータは、Mann-WhitneyのU検定により、また、陽性グレードの合計値は、Fisherの直接確率の片側検定により、溶媒対照群と各被験物質投与群との間の有意差検定を行った(有意水準:5%)。200 mg/kg投与群の雌雄の、半定量検査を除く尿検査、血液学検査および血液生化学検査結果、器官重量測定値ならびに回復期間中の体重および摂餌量は、平均値のみを求め、検定は行わなかった。

結果

1. 一般状態

神経の病理組織学的検討を行った動物を除く、溶媒対照群および200 mg/kg投与群の雌雄各10例、20および70 mg/kg投与群の雌雄各5例のうち、200 mg/kg投与群の雄では投与第11日から、雌では投与第4日から死亡が発現し、投与期間終了まで各10例中6例が死亡した。流涎が70 mg/kg以上の投与群の雌雄で、痙攣が70 mg/kg以上の投与群の雄ならびに200 mg/kg投与群の雌でみられた。さらに、200 mg/kg投与群では姿勢の異常、自発

運動の低下、異常発声、呼吸異常、被毛の汚染および散瞳が雌雄で、挙尾が雄で、振戦、立毛および紅涙が雌で認められた。200 mg/kg投与群の雌で認められた被毛汚染は回復第6日まで継続したが、他の症状は回復試験期間中には認められなかった。溶媒対照群の雄の1例では潰瘍ならびに痂皮形成が投与期間中に認められ、回復試験期間終了まで継続したが、用量依存性の認められない変化であった。

中枢神経の病理組織学的検討を実施した動物のうち、200 mg/kg投与群の雄では流涎、痙攣、姿勢の異常、自発運動の低下、被毛の汚染および散瞳がみられ、3例のうち2例が死亡した。同群の雌では雄でみられた症状の他、振戦、紅涙および立毛がみられ、3例中2例が死亡した。溶媒対照群の雄の1例は、投与期間中に死亡したが、剖検の結果、肺全葉の暗赤色、無気域が認められ、病理組織学検査の結果、肺の出血と浮腫が認められたことから、投与過誤による死亡と判断した。

2. 体重(Fig. 1)

投与開始後、200 mg/kg投与群の雌雄では、体重が溶媒対照群の値を下回り、雄では投与第8日以降投与期間終了時剖検まで継続的に、雌では投与第4、25および28日に、それぞれ溶媒対照群と比較して有意差が認められた。体重は、雌雄とも投与期間終了後も継続して低値を示した。70 mg/kg以下の投与群の体重には変化は認められなかった。

3. 摂餌量(Fig. 2)

摂餌量の減少が200 mg/kg投与群の雌雄で認められた。摂餌量の減少は雄では投与第8日以降、投与期間を通してみられ、投与第22日には有意差が認められた。雌では投与第22日の測定においてのみ減少がみられた。回復試験期間中の摂餌量は雌雄とも回復第8日には回復傾向を示した。70 mg/kg以下の投与群の摂餌量には変化は認められなかった。

4. 尿検査(Table 1)

溶媒対照群を含む各投与群において、雌雄とも投与期間終了週ならびに回復試験期間終了週のいずれの時期にも、蛋白、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンが陽性または疑陽性となる動物があり、尿沈渣中に上皮細胞または結晶が観察される動物も存在した。投与期間終了週の検査において、尿中カリウム濃度の低下が20および200 mg/kg投与群の雌で、ナトリウムならびに塩素濃度の低下が200 mg/kg投与群の雌で認められたが、これらの電解質の24時間排泄量には溶媒対照群と比較して差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において、雄では平均赤血球血色素濃度ならびに平均赤血球血色素量の増加が70 mg/kg投与群で認められたが、赤血球数ならびにヘマトクリット値には変化がみられないことから、偶発的な

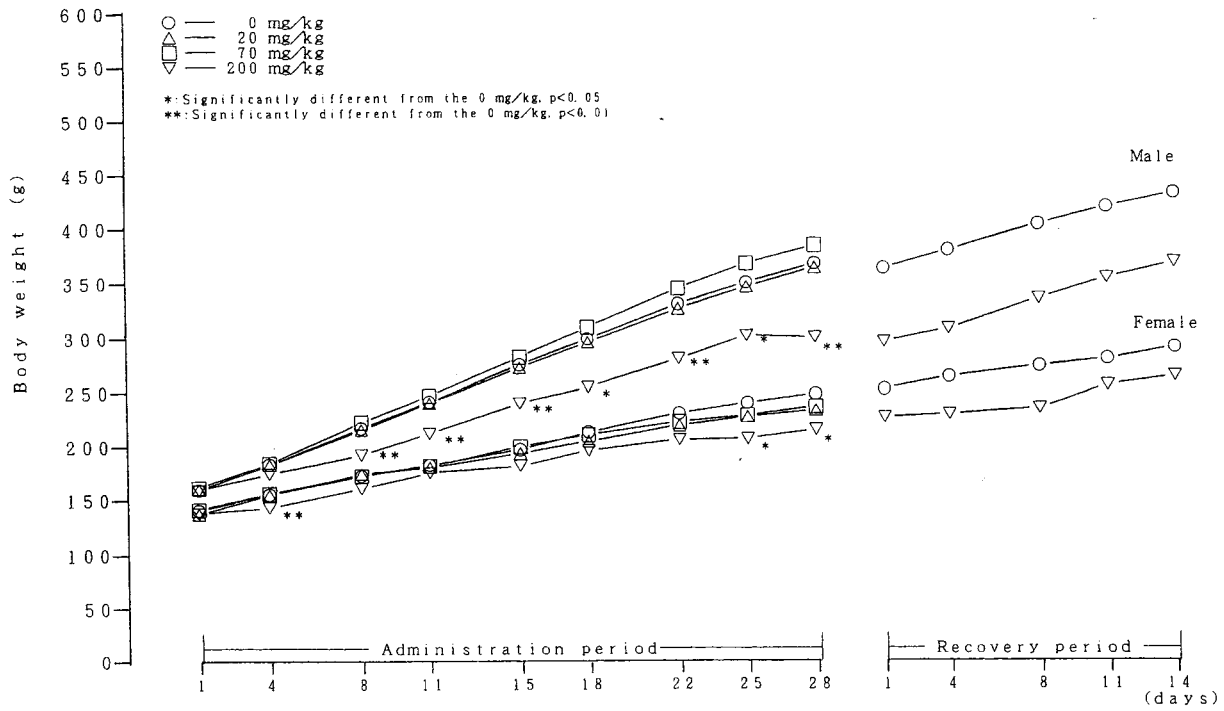


Fig. 1 Body weight changes of rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

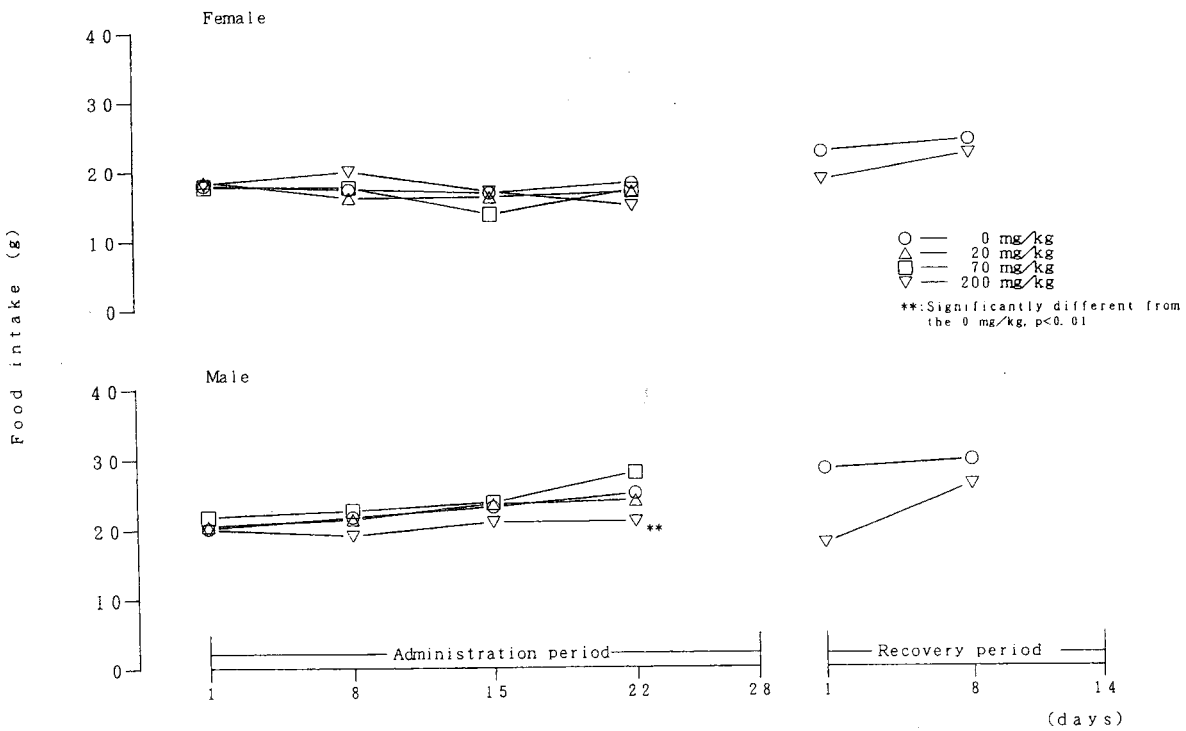


Fig. 2 Food intake of rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

差と判断した。一方、雌では分葉核好中球百分比の有意な低下ならびにリンパ球百分比の有意な上昇が70 mg/kg投与群で認められたが、用量依存性のみられない変化であることから、被験物質投与による変化ではないと判断した。雌では投与期間終了時ならびに回復試験期間終了時の白血球数の増加が200 mg/kg投与群で認められた。

6. 血液生化学検査 (Table 3)

投与期間終了時の検査において、血中トリグリセライド濃度の有意な上昇が70 mg/kg投与群の雄で、無機リン濃度の上昇が200 mg/kg投与群の雄および70 mg/kg以上の投与群の雌で、カルシウム濃度の上昇が70 mg/kg以上の投与群の雌で、ナトリウム濃度の上昇が70 mg/kg以上の投与群の雄で、カリウム濃度の上昇が200 mg/kg投与群の雌で、塩素濃度の上昇が20 mg/kg投与群の雄で、アルカリフォスファターゼ活性の上昇が200 mg/kg投与群の雌で認められた。

回復試験期間終了時の検査においては、トリグリセライド濃度の低下ならびに無機リン濃度の上昇が200 mg/kg投与群の雌で認められた。

7. 病理学検査

1) 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時剖検例においては、副腎の絶対重量および相対重量の増加が200 mg/kg投与群の雌雄で、肝臓の絶対重量の減少が200 mg/kg投与群の雌雄で、また、相対重量の減少が200 mg/kg投与群の雄で、相対重量の増加が200 mg/kg投与群の雌で、卵巣の絶対重量ならびに相対重量の減少が70 mg/kg以上の投与群で認められた。200 mg/kg投与群においては、雌雄とも剖検時まで体重増加抑制が認められていたため、精巣および雌雄の脳ならびに腎臓の相対重量が増加したが、絶対重量には変化はみられなかった。

回復試験期間終了時剖検例において、200 mg/kg投与群では、副腎の絶対重量および相対重量の増加が雌で、肝臓の絶対重量の減少が雌雄で、卵巣の絶対重量の減少がそれぞれ認められた。また、回復試験期間中も体重増加抑制が継続したため、脳および腎臓の相対重量の増加が雌雄で、精巣および副腎の相対重量の増加が雄で認められたが、絶対重量には変化はみられなかった。

2) 剖検所見

200 mg/kg投与群の雌雄の死亡例において、胸腺の赤色点、肺の暗赤色または暗色領域、脾臓の淡色化ならびに被毛あるいは口・鼻孔周囲の被毛の汚染あるいは湿潤が認められたが、いずれも死因と考えられる著しい変化ではなかった。

投与期間終了時剖検例において、肺の暗色点または暗色領域、肺の淡色領域、腎盂の拡張、肝臓の淡色領域、肝臓の横隔膜結節、卵巣の暗色点が散見され、被毛の汚染が200 mg/kg投与群の雌雄各1例で、痂皮の形成が溶媒対照群の雄の1例でそれぞれ認められたが、被毛の汚染

を除くいずれの所見にも、用量依存性は認められないことから、被験物質投与による変化ではないと判断した。

回復試験期間終了時の剖検例において、下顎リンパ節の腫大、肺の暗色点または暗色領域、肝臓の淡色領域、腹腔内器官の軽度の癒着ならびに皮膚の痂皮形成が認められたが、いずれの所見も同週齢のラットにときおり認められる所見であることから、被験物質投与によると考えられる明らかな変化ではないと判断した。

3) 病理組織学所見 (Table 5)

200 mg/kg投与群の途中死亡例の病理組織学検査の結果、広範囲の心筋変性が雄の1例で認められた。雄の他の1例にもごく軽度な心筋変性が認められたが、程度も軽く、自然発生的な変化と考えられた。その他の所見として、肝臓では門脈周囲性の脂肪化、脾臓では髓外造血や褐色色素沈着、腎臓では皮質の好塩基性尿細管ならびに円柱が認められたが、いずれも対照群の動物でときおり認められる所見であり、被験物質投与の影響を示唆する変化ではなかった。

投与期間終了時剖検例における溶媒対照群と200 mg/kg投与群の比較において、肝臓では門脈周囲性の脂肪化が両群の雌雄全例で、脾臓では髓外造血が両群の雌雄全例でみられ、雌の両群全例に褐色色素沈着が認められた。また、腎臓では、雄の溶媒対照群の5例全例、雄の200 mg/kg投与群の2例中1例、雌の溶媒対照群の5例中3例、雌の200 mg/kg投与群の2例中1例で皮質の好塩基性尿細管が認められ、eosinophilic bodyが雄の溶媒対照群の5例中3例で、円柱が雌の溶媒対照群の5例中1例でそれぞれみられたが、いずれの病理組織学所見にもその発現頻度には溶媒対照群と200 mg/kg投与群の間で有意差は認められなかった。雄全例の心臓の病理組織学検査では、ごく軽度な心筋変性が溶媒対照群に1例、70 mg/kg投与群に3例みられた。

回復期間終了時剖検例には、被験物質投与の影響と考えられる病理組織学所見はみられなかった。雄全例の心臓の病理組織学検査においても、異常はみられなかった。

考察

染料、ゴム製品等の合成過程での触媒ならびにボイラーの錆防止剤や軟鋼の腐食防止などに広く使われているジシクロヘキシルアミンの20, 70および200 mg/kgを、雌雄のSprague-Dawley系(Crj: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、200 mg/kg投与群の雌雄で死亡が認められ、一般状態の変化として、雌雄とも被験物質投与群で流涎や痙攣、姿勢の異常、散瞳、呼吸異常、異常発声等の神経症状がみられた。特に流涎は70 mg/kg以上の投与群の雌雄の多くの動物で認められ、200 mg/kg投与群では発現例数も多かった。また、散瞳および痙攣も200 mg/kg投与群においては多数例で認められた。ジシクロヘキシルアミンは、ラット精管のノルアドレナリン誘発収縮の際、フェント

ラミンによる阻害に拮抗することが報告されている¹⁾。また、同じく、ラット精管を用いた実験で、ノルアドレナリンによる収縮を増強することが知られている^{2,3)}。ノルアドレナリンによるラット精管の収縮に対する、ジシクロヘキシルアミンによる増強作用は、レセルピンにより神経終末のノルアドレナリンを枯渇させると抑制されることから、コカインと同様の作用機序であることが明らかになっている²⁾。また、高濃度のジシクロヘキシルアミンでは、交感神経興奮による間接的な精管収縮を示すことも知られている²⁾。すなわち、本試験において認められた一般状態の変化ならびに死亡の原因は主に、ジシクロヘキシルアミンによるノルアドレナリンの交感神経終末への再取り込み阻害による、交感神経興奮作用によるものと推察される。病理学所見においては、脳、脊髄および坐骨神経には病理学的変化は認められず、雄の死亡例のうち広範囲の心筋変性が認められた1匹を除き、剖検ならびに病理組織検査の結果、被験物質投与による影響を疑わせる変化は認められなかった。

尿検査においては、溶媒対照群を含む各投与群において、雌雄とも投与期間終了週ならびに回復試験期間終了週のいずれの時期にも、蛋白、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンが陽性または疑陽性となる動物が認められた。しかし、これらの成績を当研究所において過去2年間に「既存化学物質の安全性点検事業」として行われた3試験の28日間反復経口投与毒性試験の対照群の結果との比較した結果、陽性および疑陽性の発現頻度ならびに程度には差が認められないことから、被験物質投与の影響はないものと判断された。また、尿沈渣中にみられた上皮細胞ならびに結晶は、いずれもラットにおいて通常観察されるものであった。

血液学検査においては、雌で白血球数の増加が200 mg/kg投与群の、投与期間終了時ならびに回復試験期間終了時の検査で認められた。このうち、回復試験期間終了時の白血球数は、先に述べた3試験の回復試験期間終了時の白血球数と比較した結果、正常値の範囲内であると判断した。一方、投与期間終了時の白血球数の増加は雄では認められないこと、雌においても白血球百分比には変化がみられないことから、被験物質投与による影響であるか否かは明らかにならなかった。

血液生化学検査では、投与期間終了時の血中塩素濃度の上昇ならびにナトリウム濃度の上昇が雄で、カリウム濃度の上昇が雌で認められた。また、尿検査においては投与期間末期の検査において、尿中カリウム濃度が雌で、ナトリウムならびに塩素濃度が雌雄でそれぞれ溶媒対照群と比較して低下した。これらのことから、ジシクロヘキシルアミン投与による水、電解質代謝に対する影響が疑われたが、これらの変化も、先に述べた3試験のデータと比較すると正常値の範囲内であると判断された。一方、無機リン濃度の上昇が200 mg/kg投与群の雄および70 mg/kg以上の投与群の雌で、カルシウム濃度の上昇が70 mg/kg以上の投与群の雌で、アルカリフォスファターゼ活性の上昇が200 mg/kg投与群の雌で認められた。また、回復試験期間終了時の検査においても、雌で

は無機リン濃度の上昇が認められることから、ジシクロヘキシルアミン投与によるリン・カルシウム代謝に対する影響が疑われた。これらのうち、70 mg/kg投与群の雌における変化は、先に述べた3試験における投与期間終了時の溶媒対照群の検査結果と比較して、差がないと判断されるものの、200 mg/kg投与群における変化は、アルカリフォスファターゼ活性を除いて、いずれも正常範囲を逸脱した値と考えられることから、ジシクロヘキシルアミンの200 mg/kgの反復投与は、リン・カルシウム代謝に対して影響を及ぼす可能性が示唆された。

器官重量では、投与期間終了時剖検例において、副腎重量の増加ならびに肝臓重量の減少が200 mg/kg投与群の雌雄で、卵巣重量の減少が70 mg/kg以上の投与群で認められた。ストレスに伴い視床下部からコルチコロンピン放出因子(CRF)が分泌され、視床下部-脳下垂体-性腺系におけるエストロゲン濃度の低下が引き起こされることにより、卵巣重量に変化が起きることが知られている^{4,5)}。本試験においては、副腎および卵巣重量に主に変化がみられた200 mg/kg投与群では、半数以上の動物に死亡が発現し、また痙攣を連日起こすなどの、かなりのストレスが負荷されたものと考えられることから、本試験における副腎ならびに卵巣重量の変化には、著しい症状の継続的発現により引き起こされたCRF分泌増加の影響が及んでいる可能性が考えられる。しかし、回復試験期間終了時剖検動物において、雄の200 mg/kg投与群の副腎重量の増加や雌の70 mg/kg投与群の卵巣重量の減少は回復傾向が認められたことから、ジシクロヘキシルアミンによる卵巣ならびに副腎に対する影響は、機能的な変化であり、可逆性を有することが明らかになった。一方、肝臓重量の減少については、病理組織学検査所見にも被験物質投与によるものと考えられる明らかな異常は認められず、血液生化学検査結果にも異常は認められないことから、被験物質投与による肝臓に対する影響が、いかなる機序によるものかについては明らかでなかった。しかし、回復試験期間終了時剖検動物においても、雌雄とも200 mg/kg投与群で肝臓重量の減少がみられたことから、14日間の休薬後の剖検でも回復傾向は認められないものと考えられた。ジシクロヘキシルアミンは培養細胞において、細胞の成長や分化に重要な因子である⁶⁾ポリアミン、特にスペルミジンの合成を抑制することが報告されている⁷⁾。In vivoでもジシクロヘキシルアミンには、Ehrlich ascites carcinomaやSacroma 180等の動物移植癌に対する抗腫瘍活性があることが明らかになっている。また、スペルミジンはラット肝臓ミトコンドリア中に、1.8 nmol/mg蛋白程度の濃度で存在することが報告されている⁸⁾。スペルミジンの合成抑制が、肝臓においていかなる変化を惹起するかはなお明らかでないが、ジシクロヘキシルアミンの反復投与により、肝臓を標的とした変化が生じた可能性も考えられる。200 mg/kg投与群における体重増加の抑制が回復試験期間中も継続して認められたことから、ジシクロヘキシルアミンの反復投与による毒性的影響は、投与終了後もかなり継続しているものと考えられた。

以上の結果, ジシクロヘキシルアミンの70 mg/kgの投与では, 一般状態の観察において流涎や痙攣が認められ, 被験物質による自律神経に対する毒性学的影響が疑われることから, 本試験条件下におけるジシクロヘキシルアミンの無影響量は, 雌雄とも20 mg/kgであると判断した.

文献

- 1) J.A. Hickman, D.R. Mottram, C. Kidman, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **228**, 191(1977).
- 2) D.R. Mottram, J.A. Hickman, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **242**, 50(1979).
- 3) C.D. Kidman, D.R. Mottram, J.A. Hickman, *Arch. int. Pharmacodyn.*, **238**, 180(1979).
- 4) C. Rivier, S. Rivest, *Biol. Reprod.*, **45**, 525(1991).
- 5) A.E. Calogero, N. Burrello, P. Negri-Cesi, et al, *Endocrinology*, **137**, 4161(1996).
- 6) J. Ibrahim, A.D. Hughes, M. Schachter, P.S. Sever, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **23**, 410(1996).
- 7) H. Hibasami, M. Tanaka, J. Nagai, T. Ikeda, *FEBS Letters*, **116**, 99(1980).
- 8) V. Tasani, M. Campagnolo, A. Toninello, D. Siliprandi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 850(1996).

連絡先

試験責任者: 大原直樹
 試験担当者: 高島宏昌, 田中あづさ,
 加藤博康, 関 剛幸, 小島幸一,
 稲田浩子, 安生孝子, 畔上二郎,
 吉村慎介, 三枝克彦

(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: Naoki Ohara (Study Director)
 Hiromasa Takashima, Azusa Tanaka,
 Hiroyasu Katoh, Takayuki Seki,
 Kohichi Kojima, Hiroko Inada,
 Takako Anjo, Jiro Azegami,
 Shinsuke Yoshimura, Katsuhiko Saegusa
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa,
 257-8523, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Urinalysis in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Test period		Sex	Group N	Volume (mL/24hr)	Specific gravity	Color ^{b)}		Turbidity ^{c)}		pH					Protein ^{d)}		Glucose ^{e)}	Ketone ^{f)}		Bilirubin ^{g)}	Occult blood ^{h)}	Urobilinogen ⁱ⁾								
						ly	y	-	+	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	≥9.0	-	±	++	-	-	±	+	-	±	±	+		
Administration																														
Male	0	5	9.5± 3.8 ^{a)}	1.046± 0.022 ^{a)}	3	2	3	2	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	4	1	5	2	3	0	4	1	5	0	4	1
	20	5	14.3± 4.4	1.030± 0.014	4	1	4	1	0	0	0	1	0	0	1	3	0	0	4	1	5	2	2	1	5	0	5	0	5	0
	70	5	24.1±17.9	1.024± 0.023	4	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1	3	1	5	3	1	1	5	0	5	0	5	0
	200	4	10.0± 4.2	1.039± 0.020	1	3	4	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	1	2	1	4	2	1	1	4	0	4	0	3	1
Female	0	5	10.5± 1.0	1.026± 0.006	4	1	4	1	0	0	0	2	0	0	1	2	3	2	0	0	5	5	0	0	5	0	5	0	5	0
	20	5	10.8± 4.7	1.020± 0.009	5	0	3	2	0	1	0	0	0	0	1	3	3	1	1	0	5	4	1	0	5	0	5	0	4	1
	70	5	13.0± 4.5	1.028± 0.010	4	1	4	1	0	0	0	1	1	1	0	2	4	0	1	0	5	4	1	0	5	0	5	0	5	0
	200	4	18.1± 8.6	1.013± 0.002	4	0	4	0	0	0	0	0	1	1	0	2	3	1	0	0	4	4	0	0	4	0	4	0	4	0
Recovery																														
Male	0	5	15.2± 4.8	1.068± 0.011	4	1	4	1	0	0	1	3	1	0	0	0	0	5	0	5	5	1	3	1	5	0	4	1	4	1
	200	2	16.0	1.059	2	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	2	1	1	0	2	0	2	0	2	0
Female	0	5	15.2± 4.0	1.058± 0.009	5	0	3	2	1	0	1	3	0	0	0	0	3	1	1	0	5	5	0	0	5	0	5	0	4	1
	200	2	12.4	1.065	2	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	2	0	0	2	0	2	0	2	0
Test period																														
Sex	Group N	Red blood cell ^{a)}	Crystal ^{b)}	Cast ^{c)}	White blood cell ^{d)}	Epithelial cell ^{e)}	Na			K			Cl																	
							(mEq/L)	(mEq/L)	(mEq/L)	(mEq/day)	(mEq/day)	(mEq/day)	(mEq/day)	(mEq/day)	(mEq/day)															
Administration																														
Male	0	5	5	0	4	1	5	5	2	3	0	132.6±77.6 ^{a)}	358.3± 81.9 ^{a)}	148.8±45.7 ^{a)}	1.08±0.34 ^{a)}	3.16±0.89 ^{a)}	1.31±0.43 ^{a)}													
	20	5	5	0	3	2	5	5	1	4	0	96.2±20.9	287.7± 85.8	133.1±30.9	1.32±0.25	3.84±0.30	1.80±0.17													
	70	5	5	0	2	3	5	5	0	5	0	93.7±84.3	216.9±159.4	109.2±87.2	1.39±0.61	3.43±1.22	1.71±0.60													
	200	4	4	0	1	3	4	4	1	2	1	89.6±55.1	253.9±106.0	119.2±39.3	0.76±0.31	2.23±0.49	1.08±0.12													
Female	0	5	5	0	5	0	5	5	1	4	0	85.5±24.0	247.1± 15.3	111.0±19.3	0.88±0.17	2.60±0.16	1.16±0.09													
	20	5	5	0	5	0	5	5	2	3	0	54.6±16.2	152.1± 61.3 [*]	75.3±27.9	0.60±0.35	1.72±1.15	0.86±0.59													
	70	5	5	0	5	0	5	5	1	4	0	76.2±27.0	187.3± 69.7	96.5±28.6	0.91±0.25	2.33±0.84	1.19±0.35													
	200	4	4	0	2	2	4	4	1	3	0	46.2± 7.9 [*]	100.3± 29.5 ^{**}	60.9±13.0 [*]	0.81±0.31	1.72±0.63	1.05±0.34													
Recovery																														
Male	0	5	5	0	2	3	5	5	2	3	0	83.0±22.8	244.6± 42.6	85.4±25.7	1.19±0.34	3.59±0.89	1.31±0.52													
	200	2	2	0	2	0	2	2	1	1	0	74.6	222.6	83.5	1.20	3.56	1.34													
Female	0	5	5	1	3	1	5	5	1	3	1	62.1± 8.1	207.8± 43.6	78.5± 8.7	0.97±0.34	3.03±0.49	1.17±0.27													
	200	2	2	1	0	1	2	2	0	2	0	66.0	235.2	99.2	0.87	2.77	1.24													

a) Mean±S.D. b) ly, Light yellow; y, Yellow

d) -, Negative; ±, Trace; +, 30 mg/dL; ++, 100 mg/dL

f) ±, 0.1 EU/dL; +, 1.0 EU/dL g) -, Not observed

c) -, Negative; ±, Trace; +, Slight

e) -, Negative

h) -, Not observed; ±, A few; +, Abundant

*, Significantly different from 0 mg/kg, p<0.05

**, Significantly different from 0 mg/kg, p<0.01

Table 3 Biochemical findings in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Test period		Sex	Group	N	Total protein	Albu- min	A/G	BUN	Creati- nine	Glucose	Total choles- terol	Triglyce- ride	Inorg. phos.	Ca	Na	K	Cl	ALP	LDH	GPT	GOT	γ -GTP
					(mg /kg)	(g/dL)	(g/dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mg /dL)	(mEq /L)	(mEq /L)	(mEq /L)	(U/L)	(U/L)	(U/L)
Administration																						
Male	0	5	5.3 ±0.0	3.1 ±0.1	1.38 ±0.13	15 ±3	0.7 ±0.1	130 ±7	39 ±3	45 ±13	6.5 ±0.3	9.0 ±0.2	141.9 ±0.5	3.95 ±0.22	104.9 ±0.7	339 ±73	213 ±113	27 ±3	68 ±13	0 ±0		
	20	5	5.2 ±0.1	3.0 ±0.1	1.35 ±0.12	11 ±2	0.6 ±0.1	117 ±6	44 ±7	61 ±16	6.8 ±0.2	9.1 ±0.2	143.0 ±0.2	3.82 ±0.15	107.2* ±0.8	345 ±31	129 ±75	26 ±8	58 ±11	0 ±0		
	70	5	5.3 ±0.1	3.1 ±0.2	1.45 ±0.23	11 ±2	0.7 ±0.1	126 ±14	40 ±6	85* ±19	6.9 ±0.3	9.2 ±0.2	143.4* ±1.0	3.73 ±0.13	105.7 ±1.1	360 ±20	100 ±17	27 ±7	57 ±7	0 ±0		
	200	2	5.2 ±0.2	3.0 ±0.2	1.40 ±0.12	15 ±1	0.8 ±0.1	137 ±15	45 ±13	51 ±10	9.2 ±0.5	9.4 ±0.1	144.9 ±0.9	3.89 ±0.14	105.6 ±0.7	289 ±43	159 ±63	26 ±9	64 ±19	0 ±0		
Female	0	5	5.2 ±0.1	3.2 ±0.1	1.61 ±0.07	13 ±2	0.5 ±0.0	112 ±7	48 ±6	30 ±8	6.8 ±0.5	9.0 ±0.1	143.7 ±0.4	3.56 ±0.17	108.9 ±0.9	174 ±23	99 ±9	18 ±2	53 ±3	1 ±1		
	20	5	5.2 ±0.4	3.1 ±0.3	1.52 ±0.10	15 ±3	0.6 ±0.0	117 ±7	63 ±17	40 ±14	7.2* ±0.3	9.3* ±0.3	142.4 ±1.8	3.88 ±0.20	107.3 ±1.5	177 ±52	109 ±32	19 ±3	55 ±4	0 ±0		
	70	5	5.0 ±0.3	2.9 ±0.3	1.33 ±0.16	17 ±3	0.6 ±0.0	126 ±11	52 ±8	46 ±12	10.5 ±0.6	10.7 ±0.2	142.8 ±1.0	4.34 ±0.16	106.0 ±1.7	270 ±61	191 ±19	30 ±3	57 ±6	1 ±0		
	200	2	5.1 ±0.1	2.9 ±0.1	1.32 ±0.14	17 ±1	0.7 ±0.1	100 ±5	45 ±6	43 ±11	6.3 ±0.7	8.9 ±0.2	144.1 ±0.4	4.03 ±0.12	108.8 ±1.0	263 ±31	104 ±14	25 ±1	63 ±6	0 ±0		
Recovery																						
Male	0	5	5.1 ±0.3	2.9 ±0.3	1.32 ±0.16	17 ±3	0.7 ±0.0	100 ±11	45 ±8	43 ±12	6.3 ±0.6	8.9 ±0.2	144.1 ±1.0	4.03 ±0.16	108.8 ±1.7	263 ±61	104 ±19	25 ±3	63 ±6	0 ±0		
	200	2	5.1 ±0.1	2.9 ±0.1	1.32 ±0.14	17 ±1	0.7 ±0.1	100 ±5	45 ±6	43 ±11	6.3 ±0.7	8.9 ±0.2	144.1 ±0.4	4.03 ±0.12	108.8 ±1.0	263 ±31	104 ±14	25 ±1	63 ±6	0 ±0		
Female	0	5	5.1 ±0.1	3.0 ±0.1	1.37 ±0.14	15 ±1	0.6 ±0.1	95 ±5	50 ±6	28 ±11	7.7 ±0.7	8.9 ±0.2	144.9 ±0.4	3.31 ±0.12	111.8 ±1.0	172 ±31	124 ±14	26 ±1	60 ±6	1 ±0		
	200	2	5.1 ±0.1	3.0 ±0.1	1.37 ±0.14	15 ±1	0.6 ±0.1	95 ±5	50 ±6	28 ±11	7.7 ±0.7	8.9 ±0.2	144.9 ±0.4	3.31 ±0.12	111.8 ±1.0	172 ±31	124 ±14	26 ±1	60 ±6	1 ±0		

Parameter, Mean±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, p<0.05

Table 4 Absolute and relative organ weights in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Test period			Absolute					Relative					
Sex	Group	N	Body weight	Brain	Liver	Kidneys	Adrenal glands	Ovaries/ Testes	Brain	Liver	Kidneys	Adrenal glands	Ovaries/ Testes
	(mg/kg)		(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
Administration													
	0	5	355.1 ± 16.4	1951.8 ± 64.1	11761.2 ± 521.6	2606.3 ± 194.9	47.3 ± 2.9	2845.8 ± 115.3	5.500 ± 0.118	33.144 ± 1.310	7.343 ± 0.491	0.134 ± 0.014	8.032 ± 0.578
Male	20	5	339.1 ± 12.7	1959.0 ± 115.2	11199.8 ± 354.7	2501.9 ± 242.1	44.0 ± 4.2	2804.2 ± 208.6	5.780 ± 0.318	33.080 ± 1.942	7.375 ± 0.618	0.130 ± 0.011	8.282 ± 0.740
	70	5	357.5 ± 29.1	1905.6 ± 63.2	12084.4 ± 927.8	2573.3 ± 221.7	49.6 ± 5.5	2803.1 ± 184.3	5.359 ± 0.465	33.840 ± 1.671	7.209 ± 0.515	0.139 ± 0.020	7.886 ± 0.896
	200	2	285.0	1935.1	8733.8	2329.7	62.5	2858.2	6.819	30.599	8.231	0.220	10.108
	0	5	232.0 ± 13.3	1813.4 ± 90.0	7127.4 ± 524.1	1763.3 ± 112.7	61.0 ± 5.4	98.2 ± 6.0	7.830 ± 0.464	30.713 ± 1.232	7.599 ± 0.151	0.263 ± 0.022	0.425 ± 0.044
Female	20	5	215.9 ± 9.6	1741.1 ± 46.9	6781.1 ± 220.9	1734.7 ± 30.5	66.9 ± 6.2	89.2 ± 13.2	8.073 ± 0.249	31.473 ± 1.941	8.048 ± 0.368	0.311 ± 0.035	0.414 ± 0.065
	70	5	224.3 ± 19.5	1798.4 ± 69.0	7083.0 ± 853.0	1663.6 ± 85.6	68.6 ± 10.6	79.6* ± 7.2	8.046 ± 0.404	31.530 ± 1.803	7.443 ± 0.456	0.309 ± 0.059	0.357 ± 0.045
	200	2	184.3	1649.9	5960.2	1597.9	88.2	59.9	8.949	32.352	8.668	0.478	0.325
Recovery													
	0	5	399.9 ± 40.9	1970.1 ± 65.6	11753.2 ± 1667.9	2543.1 ± 173.0	53.5 ± 2.8	3154.4 ± 172.6	4.974 ± 0.610	29.301 ± 1.574	6.382 ± 0.338	0.135 ± 0.014	7.939 ± 0.714
Male	200	2	333.3	1942.3	8968.3	2211.7	53.8	3082.9	5.830	26.888	6.639	0.161	9.262
	0	5	266.2 ± 17.3	1834.6 ± 38.3	7852.3 ± 612.6	1854.0 ± 112.8	71.2 ± 10.6	94.5 ± 6.7	6.909 ± 0.358	29.556 ± 2.495	6.975 ± 0.410	0.270 ± 0.054	0.356 ± 0.030
Female	200	2	236.9	1805.8	6429.9	1731.7	94.9	78.2	7.649	27.221	7.325	0.401	0.330

Parameter, Mean±S.D.

*, Significantly different from 0 mg/kg, p<0.05

Table 5 Histopathological findings in rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

Sex, Male Fate	Died during administration period		Sacrificed at the end of administration period				Sacrificed at the end of recovery period	
	0 mg/kg	200 mg/kg	0 mg/kg	20 mg/kg	70 mg/kg	200 mg/kg	0 mg/kg	200 mg/kg
	- ± +++ Pos.	- ± +++ Pos.	- ± +++ Pos.	- ± +++ Pos.	- ± +++ Pos.	- ± +++ Pos.	- ± +++ Pos.	- ± +++ Pos.
(Brain)	[1]	[8]	[7]	[0]	[0]	[3]	[0]	[0]
No remarkable change								
(Spinal cord)	[1]	[8]	[7]	[0]	[0]	[3]	[0]	[0]
No remarkable change								
(Liver)	[1]	[8]	[5]	[1]	[0]	[2]	[0]	[1]
Fatty change, periportal	1 0 0 0 0	6 2 0 0 0	0 1 4 0 0	5 0 0 1 0	0 1 0 0 1	0 2 0 0 0	0 1 0 0 0	1 0 1 0 0
Fatty change, focal	1 0 0 0 0	8 0 0 0 0	5 0 0 0 0	0 0 1 0 0	1 0 0 0 1	2 0 0 0 0	0 0 1 0 0	1 0 1 0 0
(Heart)	[1]	[8]	[5]	[5]	[5]	[2]	[5]	[2]
Myocardial degeneration	1 0 0 0 0	6 1 0 1 0	4 1 0 0 0	1 5 0 0 0	0 0 2 3 0	0 0 0 0 0	5 0 0 0 0	2 0 0 0 0
(Spleen)	[1]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]	[0]	[0]
Hematopoiesis, extramedullary	0 0 1 0 0	1 0 6 2 0	0 1 4 0 0	5 0 1 1 0	0 0 1 0 0	2 0 1 0 0	0 1 1 0 0	2 0 1 0 0
(Kidney)	[1]	[8]	[5]	[1]	[0]	[2]	[0]	[0]
Basophilic tubule, cortex	0 1 0 0 0	1 3 5 0 0	0 5 0 0 0	5 0 1 0 0	0 1 0 0 0	1 1 0 0 0	1 1 0 0 0	1 1 0 0 0
Eosinophilic body	1 0 0 0 0	8 0 0 0 0	2 0 1 0 2	3 1 0 0 0	0 0 0 0 0	2 0 0 0 0	2 0 0 0 0	2 0 0 0 0
Dilatation, renal pelvis	1 0 0 0 0	8 0 0 0 0	5 0 0 0 0	0 0 0 1 0	1 0 1 0 1	2 0 0 0 0	2 0 0 0 0	2 0 0 0 0
Cast	1 0 0 0 0	7 1 0 0 0	1 5 0 0 0	0 0 0 0 0	1 0 0 0 0	2 0 0 0 0	2 0 0 0 0	2 0 0 0 0
(Adrenal gland)	[1]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]	[0]	[0]
No remarkable change								
(Sciatic nerve)	[1]	[8]	[7]	[0]	[0]	[3]	[0]	[0]
No remarkable change								
(Lung)	[1]	[3]	[2]	[1]	[3]	[0]	[2]	[0]
Hemorrhage	0 0 1 0 0	1 0 0 3 0	0 0 2 0 0	2 0 1 0 0	0 1 0 0 0	1 1 0 2 0	0 0 2 0 0	2 0 2 0 0
Accumulation, foam cell	1 0 0 0 0	1 0 2 0 0	2 2 0 0 0	0 0 1 0 0	0 0 0 0 0	3 0 0 0 0	2 0 0 0 0	2 0 0 0 0
Edema	0 0 1 0 0	1 2 1 0 0	0 2 0 0 0	0 0 1 0 0	0 0 0 0 0	3 0 0 0 0	2 0 0 0 0	2 0 0 0 0
(Thymus)	[0]	[1]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]
Hemorrhage		0 1 0 0 0	1 0 1 0 0	1 0 1 0 0	1 0 1 0 0	1 0 1 0 0	1 0 1 0 0	1 0 1 0 0
(Skin)	[0]	[1]	[1]	[0]	[0]	[0]	[1]	[0]
Ulcer		0 0 1 0 0	1 0 0 1 0	1 0 1 0 0	1 0 1 0 0	1 0 1 0 0	0 0 0 1 0	1 0 0 1 0

Sex, Female Fate	Died during administration period		Sacrificed at the end of administration period			
	0 mg/kg	200 mg/kg	0 mg/kg	20 mg/kg	70 mg/kg	200 mg/kg
	- ± +++ Pos.	- ± +++ Pos.	- ± +++ Pos.	- ± +++ Pos.	- ± +++ Pos.	- ± +++ Pos.
(Brain)	[0]	[8]	[8]	[0]	[0]	[3]
No remarkable change						
(Spinal cord)	[0]	[8]	[8]	[0]	[0]	[3]
No remarkable change						
(Liver)	[0]	[8]	[5]	[1]	[0]	[2]
Fatty change, periportal		5 3 0 0 0	3 0 1 4 0	0 0 1 0 0	0 1 0 0 0	1 0 1 1 0
Hemorrhage, diaphragmatic nodule		8 0 0 0 0	0 5 0 0 0	0 0 1 0 0	1 0 0 0 0	2 0 0 0 0
(Heart)	[0]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]
No remarkable change						
(Spleen)	[0]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]
Deposit, pigment, brown		5 3 0 0 0	3 0 5 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	2 0 2 0 0
Hematopoiesis, extramedullary		0 6 2 0 0	8 0 5 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	2 0 2 0 0
(Kidney)	[0]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]
Basophilic tubule, cortex		6 2 0 0 0	2 2 1 0 0	3 0 0 0 0	0 0 0 0 0	1 1 0 0 0
Cyst		8 0 0 0 0	4 0 1 0 0	1 0 0 0 0	0 0 0 0 0	2 0 0 0 0
(Adrenal gland)	[0]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]
Hyperplasia, cortex, focal		8 0 0 0 0	0 4 0 1 0	0 0 1 0 0	0 0 0 0 0	2 0 0 0 0
(Sciatic nerve)	[0]	[8]	[8]	[0]	[0]	[3]
No remarkable change						
(Pituitary gland)	[0]	[8]	[5]	[0]	[0]	[2]
No remarkable change						
(Ovary)	[0]	[8]	[5]	[0]	[1]	[2]
Hemorrhage, corpus luteum		8 0 0 0 0	0 5 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 1 0 0	1 2 0 0 0
(Lung)	[0]	[5]	[1]	[1]	[0]	[0]
Hemorrhage		3 0 2 0 0	2 0 0 1 0	0 1 0 0 0	1 0 0 0 0	0 1 0 0 0

-, Negative; ±, Very slight; +, Slight; ++, Moderate; +++, Severe; Pos., Total of positive grade
[], Number of animals examined

1,4-ブタンジオールの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 1,4-Butanediol on Bacteria

要約

1,4-ブタンジオールについて、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, TA1537¹⁾および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*^{2,3)}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なかったことから、本試験では S9 mix 無添加および添加試験を 313～5000 μg/プレートの範囲で実施した。また、TA1537 の S9 mix 無添加試験では、本試験と同一の用量で再現性試験を実施した。

その結果、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、1,4-ブタンジオールは、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〕

1,4-ブタンジオール(CAS No. 110-63-4)は、分子量90.14の無色透明液体である。用いた被験物質は、三菱化学(株)製造、ロット番号 B5I04、純度99.8 wt%(不純

物:0.06 wt% 1,4-アセトキシヒドロキシブテン-2, 0.07 wt% 2-(4-ヒドロキシブチルオキシ)テトラヒドロフラン)であり、三菱化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで乾燥窒素でシールし、室温で遮光保管した。

1,4-ブタンジオールは、局方注射用水(ロット番号:K5A80, (株)大塚製薬工場)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 はジメチルスルホキシド(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⁴⁾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、本試験および再現性試験においては、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。また、TA1537 の S9 mix 無添加試験については、本試験Iと本試験IIの結果が異なるため、再現性試験を行った。

〔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〕

1,4-ブタンジオールについて 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、すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

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 5000 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で、ともに 313~5000 μg/プレートの範囲で公比を2として2回の本試験を実施した (Table 1, 2)。その結果、TA1537 の S9 mix 無添加試験においては、本試験Iの 625 μg/プレートで、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数を示したが、本試験IIでは溶媒対照値の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。また、TA1537 の S9 mix 添加試験と、その他の検定菌においては、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。

〔再現性試験〕

TA1537 の S9 mix 無添加試験では、本試験Iと本試験IIの結果が異なるため、本試験と同一の用量で再現性試験を行った (Table 3)。その結果、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、1,4-ブタンジオールは、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, 堀谷尚古,
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,
Naoko Horiya, 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 1,4-butanediol 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	177 161 156 (165 \pm 11.0)	9 9 12 (10 \pm 1.7)	25 27 23 (25 \pm 2.0)	25 20 24 (23 \pm 2.6)	14 16 15 (15 \pm 1.0)	
	313	159 167 160 (162 \pm 4.4)	14 13 21 (16 \pm 4.4)	20 29 24 (24 \pm 4.5)	31 40 27 (33 \pm 6.7)	15 14 28 (19 \pm 7.8)	
	625	156 151 144 (150 \pm 6.0)	22 14 22 (19 \pm 4.6)	29 29 30 (29 \pm 0.6)	25 23 36 (28 \pm 7.0)	27 40 27 (31 \pm 7.5)	
	1250	178 186 162 (175 \pm 12.2)	21 11 11 (14 \pm 5.8)	29 30 26 (28 \pm 2.1)	29 39 29 (32 \pm 5.8)	24 20 29 (24 \pm 4.5)	
	2500	148 139 145 (144 \pm 4.6)	8 13 9 (10 \pm 2.6)	29 20 21 (23 \pm 4.9)	37 27 22 (29 \pm 7.6)	20 28 15 (21 \pm 6.6)	
	5000	114 159 156 (143 \pm 25.2)	5 11 10 (9 \pm 3.2)	30 29 18 (26 \pm 6.7)	29 38 37 (35 \pm 4.9)	24 27 27 (26 \pm 1.7)	
S9 mix (+)	0	176 165 163 (168 \pm 7.0)	13 14 20 (16 \pm 3.8)	38 22 21 (27 \pm 9.5)	34 34 32 (33 \pm 1.2)	29 18 20 (22 \pm 5.9)	
	313	157 166 173 (165 \pm 8.0)	14 17 12 (14 \pm 2.5)	35 29 33 (32 \pm 3.1)	25 39 46 (37 \pm 10.7)	17 21 14 (17 \pm 3.5)	
	625	177 158 173 (169 \pm 10.0)	11 5 8 (8 \pm 3.0)	29 33 21 (28 \pm 6.1)	26 21 31 (26 \pm 5.0)	31 31 27 (30 \pm 2.3)	
	1250	169 149 178 (165 \pm 14.8)	20 12 10 (14 \pm 5.3)	35 23 33 (30 \pm 6.4)	26 29 40 (32 \pm 7.4)	21 29 12 (21 \pm 8.5)	
	2500	158 155 166 (160 \pm 5.7)	14 10 8 (11 \pm 3.1)	31 20 19 (23 \pm 6.7)	30 34 37 (34 \pm 3.5)	11 11 14 (12 \pm 1.7)	
	5000	150 186 173 (170 \pm 18.2)	10 12 20 (14 \pm 5.3)	18 23 33 (25 \pm 7.6)	32 29 19 (27 \pm 6.8)	18 23 20 (20 \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	624 657 656 (646 \pm 18.8)	294 292 291 (292 \pm 1.5)	258 279 307 (281 \pm 24.6)	565 503 552 (540 \pm 32.7)	1259 1270 880 (1136 \pm 222.1)	
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	719 785 817 (774 \pm 50.0)	305 293 259 (286 \pm 23.9)	459 662 617 (579 \pm 106.6)	396 367 373 (379 \pm 15.3)	304 332 364 (333 \pm 30.0)	

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy)tetrahydrofuran were contained as impurities.

Table 2. Mutagenicity of 1,4-butanediol 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	
S9 mix (-)	0	156 161 158 (158 \pm 2.5)	5 14 14 (11 \pm 5.2)	28 27 30 (28 \pm 1.5)	32 39 39 (37 \pm 4.0)	27 21 14 (21 \pm 6.5)						
	313	158 172 136 (155 \pm 18.1)	12 24 15 (17 \pm 6.2)	31 24 27 (27 \pm 3.5)	41 33 31 (35 \pm 5.3)	21 26 29 (25 \pm 4.0)						
	625	169 162 185 (172 \pm 11.8)	11 8 20 (13 \pm 6.2)	27 21 33 (27 \pm 6.0)	30 39 52 (40 \pm 11.1)	33 35 33 (34 \pm 1.2)						
	1250	136 163 163 (154 \pm 15.6)	15 7 14 (12 \pm 4.4)	20 16 19 (18 \pm 2.1)	55 51 51 (52 \pm 2.3)	19 24 30 (24 \pm 5.5)						
	2500	172 173 161 (169 \pm 6.7)	19 17 14 (17 \pm 2.5)	22 28 20 (23 \pm 4.2)	57 64 36 (52 \pm 14.6)	19 31 18 (23 \pm 7.2)						
	5000	156 171 155 (161 \pm 9.0)	9 9 13 (10 \pm 2.3)	23 28 20 (24 \pm 4.0)	43 59 43 (48 \pm 9.2)	24 29 26 (26 \pm 2.5)						
S9 mix (+)	0	183 176 178 (179 \pm 3.6)	20 10 19 (16 \pm 5.5)	27 37 33 (32 \pm 5.0)	43 42 38 (41 \pm 2.6)	7 19 23 (16 \pm 8.3)						
	313	168 163 181 (171 \pm 9.3)	15 13 17 (15 \pm 2.0)	27 37 44 (36 \pm 8.5)	31 31 26 (29 \pm 2.9)	22 25 13 (20 \pm 6.2)						
	625	177 147 166 (163 \pm 15.2)	11 15 23 (16 \pm 6.1)	29 17 37 (28 \pm 10.1)	29 44 39 (37 \pm 7.6)	18 23 21 (21 \pm 2.5)						
	1250	140 204 180 (175 \pm 32.3)	19 21 20 (20 \pm 1.0)	41 27 21 (30 \pm 10.3)	24 33 30 (29 \pm 4.6)	35 25 16 (25 \pm 9.5)						
	2500	163 150 166 (160 \pm 8.5)	19 20 23 (21 \pm 2.1)	22 26 29 (26 \pm 3.5)	28 40 34 (34 \pm 6.0)	15 18 17 (17 \pm 1.5)						
	5000	166 181 181 (176 \pm 8.7)	20 12 11 (14 \pm 4.9)	32 20 34 (29 \pm 7.6)	30 39 34 (34 \pm 4.5)	26 22 9 (19 \pm 8.9)						
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	492 666 699 (619 \pm 111.2)	140 125 102 (122 \pm 19.1)	402 392 361 (385 \pm 21.4)	691 637 688 (672 \pm 30.3)	623 753 427 (601 \pm 164.1)						
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	826 842 883 (850 \pm 29.4)	254 240 271 (255 \pm 15.5)	694 707 753 (718 \pm 31.0)	436 429 442 (436 \pm 6.5)	277 296 341 (305 \pm 32.9)						

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy)tetrahydrofuran were contained
as impurities.

Table 3. Mutagenicity of 1,4-butanediol in confirmation test of reverse mutation test 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.)					
						Frameshift type	
						TA1537	
S9 mix (-)	0					12 12 10 (11 \pm 1.2)	
	313					7 10 11 (9 \pm 2.1)	
	625					11 11 18 (13 \pm 4.0)	
	1250					9 10 11 (10 \pm 1.0)	
	2500					5 13 11 (10 \pm 4.2)	
	5000					7 13 14 (11 \pm 3.8)	
Positive control	Chemical					9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)					80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate					622 621 787 (677 \pm 95.6)	

9AA: 9-Aminoacridine
 Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy) tetrahydrofuran were contained as impurities.

1,4-ブタンジオールの 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 1,4-Butanediol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

1,4-ブタンジオー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)、短時間処理(6時間)ともに0.90 mg/ml(10 mM)の濃度においても50%を明らかに越える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において0.90 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。

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、1,4-ブタンジオールは、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

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

後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

1,4-ブタンジオール(略号:BD, CAS No.:110-63-4, ロット番号:B5I04, 三菱化学(株))は、無色透明液体で、水に対しては50.8 mg/ml以上、DMSOでは2 M以上、アセトンでは50 mg/ml以上で溶解し、融点20.1°C、沸点228°C、蒸気圧0.1 mmHg(25°C)で、分子式C₄H₁₀O₂、分子量90.14、純度99.8%(不純物として1,4-アセトキシヒドロキシブテン-2 0.06 wt%、2-(4-ヒドロキシブチルオキシ)テトラヒドロフラン 0.07 wt%を含む、他は不明)の物質である。

被験物質原体は、吸湿性があり、酸の存在下でテトラヒドロフラン化する。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用水(株)大塚製薬工場)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、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を明らかに越える増殖抑制作用は認められなかった(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高濃度群を、連続処理、短時間処理ともに0.90 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

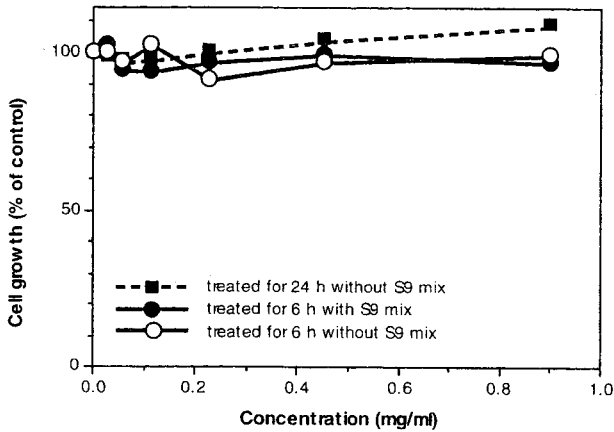


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,4-butanediol

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枚は染色体標本を作製し、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

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²⁾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²⁾(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³⁾($p < 0.05$)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。1,4-ブタンジオールを加えて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。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。1,4-ブタンジオールを加えて 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、1,4-ブタンジオールは、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, 日下部博一,
 渡辺千津子, 橋本恵子, 水谷正寛,
 澁谷 徹
 (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,
 Chizuko Watanabe, Keiko Hashimoto,
 Masahiro Mizutani, Tohru Shibuya
 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 1, 4- butanediol (BD)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								No. of cells			Concurrent ⁶⁾			
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total	Others ³⁾	with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		cytotoxicity (%)	
												TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Control			200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	1.00			-
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	5	0	0	5	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25			100.0	
BD	0.23	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38			100.5	
BD	0.45	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50	NT	NT	103.0	
BD	0.90	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.50			103.0	
MC	0.00005	24	200	4	41	109	0	1	0	155	0	88 (44.0)	88 (44.0)	0.63			-	
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			100.0	
BD	0.23	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13			99.0	
BD	0.45	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	NT	NT	100.0	
BD	0.90	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			100.5	
MC	0.00005	48	200	5	38	103	7	4	10	167	1	90 (45.0)	86 (43.0)	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, NT:not tested.

1)Distilled water 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<0.05 when the incidence of TAG and polyploid was significantly different from historical solvent control at p<0.05 by Fisher's exact test. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with MonocellaterTM. **:Purity of test substance was 99.8 wt%. 1,4-Acetoxyhydroxybutene-2(0.06 wt%)and 2-(4-hydroxybutyloxy)tetrahydrofuran(0.07 wt%)were contained as impurities.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU)treated with 1, 4- butanediol (BD)** 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 ⁶⁾		
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total	Others ³⁾	with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		cytotoxicity (%)
													TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Control				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38			-
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.00			100.0
BD	0.23	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.75			100.5
BD	0.45	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.75	NT	NT	97.5
BD	0.90	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.50			98.0
CPA	0.005	-	6-(18)	200	3	1	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	1 (0.5)	0.75			-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.63			100.0
BD	0.23	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.75			100.0
BD	0.45	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.88	NT	NT	98.0
BD	0.90	+	6-(18)	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.50			95.0
CPA	0.005	+	6-(18)	200	14	139	298	3	1	100	555	0	160 (80.0)	159 (79.5)	0.63			-

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)Distilled water 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 was significantly different from historical solvent control at p<0.05 by Fisher's exact test. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with MonocellaterTM. **:Purity of test substance was 99.8 wt%. 1,4-Acetoxyhydroxybutene-2(0.06 wt%)and 2-(4-hydroxybutyloxy)tetrahydrofuran(0.07 wt%)were contained as impurities.

1,4-ブタンジオ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 1,4-Butanediol in Rats

要約

1,4-ブタンジオールの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験(以下、併合試験)を行い、同化合物の雌雄動物に及ぼす反復投与毒性ならびに生殖発生毒性について検討した。すなわち、0(媒体対照)、200、400および800 mg/kgの1,4-ブタンジオールを、Sprague-Dawley系(Crj:CD)ラットの雌雄(各13匹/群)に、交配前2週間および交配期間2週間経口投与した。さらに、雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで投与を継続して、剖検した。

1. 反復投与毒性

いずれの被験物質投与群においても、投与後一過性に症状が発現し、投与量に依存してその重篤度は増加した。200 mg/kg投与群においては活動性が亢進した。400 mg/kg投与群においては活動性の亢進もみられたが、主として活動性は抑制され、800 mg/kg投与群においては昏睡状態に陥る動物もみられたが、5時間後には回復していた。

体重は400および800 mg/kg投与群において投与初期にその増加が抑制され、その後の増加率に変化はみられなかったが、初期の体重増加量の差が試験終了時まで継続した。また、これに付随して摂餌量も減少していた。

雄動物の血液学検査においては、何ら有意な変化は認められなかったが、血液生化学検査において、軽度で正常範囲内の変化であり、被験物質投与との関係は疑問視されるが、血糖値の統計的に有意な減少が観察された。

肉眼的解剖所見としては特筆すべき変化はみられなかったが、400 mg/kg以上の投与量群の膀胱の病理組織学観察により、移行上皮のびまん性過形成および粘膜固有層に線維化が認められた。

2. 生殖発生毒性

産児の形態および生存率については異常はみられなかったが、800 mg/kg投与群において軽度ではあったが有意な体重減少がみられた。

3. 無影響量

以上の試験成績から、本試験条件下では、1,4-ブタンジオールの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに200 mg/kg/dayを下回る量、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄ともに800 mg/kg/day、産児に対しては400 mg/kg/dayであると判断される。

方法

1. 被験物質

本試験に使用した1,4-ブタンジオール(ロット番号:KCM2119、純度:98.0%)は、和光純薬工業(株)(東京)より提供を受けたもので、入手後は室温、遮光条件下で保管した。

被験物質は、局方注射用水(三重製薬(株)、製造番号:DH004)に溶解し、いずれの用量においても1回の投与液量が5 mL/kg体重になるように含量を調整し、調製検体は、室温で密封保管して使用した。投与検体中に含まれる被験物質の含量については、当研究所において確認した。

2. 使用動物および飼育方法

試験には、雌雄ともに7週齢で購入した日本チャールス・リバー(株)厚木飼育センター生産のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD, SPF)を使用した。購入した動物は、入荷後1週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、雌雄とも投与開始日(投与1日)の体重をもとに体重別層化無作為抽出法に準じて群分けした。

各動物は、基準温湿度各 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、および50-60%、換気回数約15回/時間、照明12時間(午前7時-午後7時)に制御された飼育室で、金属製ケージに個別に収容して飼育し、固型飼料(CA-1、日本クレア(株))および飲料水(水道水、秦野市水道局給水)を自由に摂取させた。妊娠18日(精子確認日=妊娠0日)以後の母動物は、飼育ケージの床にステンレス製床板を敷き、床敷として木製チップ(ホワイトフレック、日本チャールス・リバー(株))を適宜供給した。

3. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験の投与量は、本試験と同系統のラット各群雌雄5匹に、1,4-ブタンジオールの200、400、600、800、1000 mg/kgを1週間強制的に連続経口投与した予備試験(以下予備試験と略記)の結果に基づき、体重増加の抑制傾向、活動性低下(投与4日まで)、活動性亢進(投与5日から)、血尿などの変化が認められた800 mg/kgを本試験の高用量に設定し、以下、公比2で減じて中用量には400 mg/kgを、低用量には200 mg/kgを設定した。

各用量の投与検体は、雌雄13匹から成る各群の動物に対して剖検日前日まで、毎日1回、ラット用胃管を用いて経口投与した。すなわち、雄に対しては交配期間14日間および交配期間終了後14日間までの連続42日間、

また、雌に対しては、交配前14日間と最長14日間の交配期間中(交尾まで)、ならびに交尾雌では妊娠期間を通して剖検前日までの哺育3日(分娩日=哺育0日)まで、交尾後、分娩の認められなかった動物に対しては妊娠24日相当日まで、それぞれ投与した。毎日の投与は、午前9時から12時の間に行い、各動物の投与液量(5 mL/kg)は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回の測定体重を基に、また、交尾後の雌については妊娠0日(交尾確認日)の体重を基にそれぞれ算出した。

4. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態の観察

雌雄とも、全例について飼育期間中毎日1回以上観察した。

B. 体重測定

雌雄とも、全例について体重を試験期間中週1回(雄:投与1, 8, 15, 22, 29, 36, 42日, 雌:投与1, 8, 15日)および剖検日に測定した。雄動物と同居中の雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾した雌では、妊娠0, 7, 14, 20日に、さらに、分娩した雌では、哺育0および4日の体重を測定した。

C. 摂餌量測定

雌雄とも、全例について体重測定日と同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算出した。2週間の交配期間中は摂餌量を測定しなかった。交尾した雌では、妊娠0-7, 7-14, 14-20日の、さらに、分娩した雌では、哺育0-4日の摂餌量を測定した。

D. 尿検査

検査日は投与1, 8, および15日とし、全例について投与後約4時間目の尿を強制排泄させて、尿中の血色素について試験紙法(マルティスティックス/クリニテック200, マイルス三共)により尿検査を実施した。採尿が困難な場合には、極度の刺激を避けるため採尿を中止した。

E. 交配

交配は、投与15日の夕方から最長14日間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾成立の確認は、毎朝、膣栓および膣垢標本中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率 [(交尾動物数/交配動物数) × 100]、受胎率 [(受胎動物数/交尾動物数) × 100]、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

F. 分娩・哺育状態の観察

各群とも交尾した雌は、全例を自然分娩させた。分娩

状態の観察は分娩を直接観察できたものについてのみ行った。また、直接観察できなかった例においても分娩後の徴候から分娩状態の良否が判定できるものについては、それを記録した。分娩後は哺育状態を観察し、異常の有無を記録した。

G. 分娩日の規定

分娩の確認は、午前9～11時に限定し、この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物について、その日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎて分娩を終了した動物については、翌日を分娩日とした。

分娩を確認した全例について妊娠期間(妊娠0日から分娩日までの日数)を算定し、出産率 [(生児出産雌数/受胎動物数) × 100] を各群について求めた。

H. 最終検査

(1) 雄動物

全例について、最終投与日に絶食を開始し、その翌日(絶食開始18～24時間後)に以下の検査を行った。

イ. 血液学検査

ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりEDTAを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コールターエレクトロニクス)を用いた電気抵抗法により; 赤血球数(RBC), 白血球数(WBC), 平均赤血球容積(MCV), 血小板数を自動測定し、また、吸光度法により血色素量(Hb)を自動測定してそれらの値から平均赤血球血色素量(MCH=Hb × 1000/RBC), ヘマトクリット値(Ht=RBC × MCV × 0.001), 平均赤血球血色素濃度(MCHC=Hb × 100/Ht)を算出した。白血球分類は、Wright-Giemsa染色した静脈血塗抹標本を光学顕微鏡下で観察することにより視算した。

ロ. 血液生化学検査

全例について、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、血漿を分離して、遠心方式生化学自動分析装置COBAS-FARA(ロシュ)を用いて総蛋白濃度(ピウレット法), 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(BUN;ウレアーゼGl.DH法), クレアチニン濃度(Jaffe法), アルカリフォスファターゼ活性(パラニトロフェニルリン酸基質法), GOTおよびGPT活性(SSCC法), 総ビリルビン濃度(ビリルビン「ロシュ」キットSシリーズ), カルシウム濃度(OCPC法), 無機リン濃度(Inorg. phos.;モリブデン酸直接法), γ -GTP活性(γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)を測定し、全自動電解質分析装置EA05(A&T)を用いてイオン電極法により、塩素, ナトリウムおよびカリウムの各濃度を測定した。また、A/G比は上記の測定結果に基づいて算出した。

ハ. 病理学検査

全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を実施した。その際、胸腺, 肝臓, 腎臓, 精巣および精巣上体の重量を測定し、併せて比体重値(相対重量)を算出した。

精巣および精巣上体を除くこれらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱ならびに右側ハーダー腺は10 w/v%ホルマリン液に、精巣および精巣上体はブアン液に固定して保存した。固定器官のうち、膀胱はすべての投与群について、また、その他の器官は対照群および高用量群について常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って病理組織学検査を行った。

(2) 雌動物

分娩した動物は哺育4日に、交尾は確認されたが分娩しなかった動物は妊娠25日相当日に、それぞれペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させて剖検した。妊・不妊のいずれの例においても卵巣および子宮を摘出し、子宮については着床数を数え、着床の認められた動物を妊娠例とした。卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数え、ブアン液に固定して保存した。不妊動物の子宮についてはSalewski法¹⁾により不妊を確認し、卵巣については病理組織学検査を行った。また、肝臓、腎臓および胸腺重量を測定した。これらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱および右側ハーダー腺は、10 w/v%ホルマリン液に固定して保存した。これらの固定器官は対照群および高用量群について雄と同様に病理組織学検査を行った。なお、膀胱、胸腺および脾臓に関しては、対照群と高用量群の所見の間に差異が認められたため、これらの器官に関しては、低および中用量群の雌動物についても病理組織学観察を行った。

2) 出生児

A. 産児数の算定

哺育0日に産児数(生存児+死亡児)を調べ、分娩率 $[(産児数/着床痕数) \times 100]$ および生児出産率 $[(出生生児数/着床痕数) \times 100]$ を求めた。また、産児の外表面奇形の有無および性別を調べ、生存児の性比 $[(雄の生児数/雌の生児数) \times 100]$ を算出した。

B. 死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ、出生率 $[(出生生児数/産児数) \times 100]$ および新生児の4日の生存率 $[(哺育4日の生児数/哺育0日の生児数) \times 100]$ を求めた。死亡児は剖検し、異常の有無、外表および内部器官の肉眼的観察を行った。

C. 体重測定

哺育0日および4日に一腹単位で雌雄別に体重(litter重量)を測定し、 $(litter重量/測定児数)$ を各腹について求めた。

D. 剖検

哺育4日に全例をエーテル吸入により致死させて剖検し、外表および内部器官の肉眼的観察を実施した。

5. 統計解析

交尾率および受胎率については χ^2 検定を行った。その

他のすべてのデータは、個体毎に得られた値あるいは各腹児の平均値を1標本として、まず、Bartlett法により各群の分散の均一性について検定した。その結果、分散が均一であると判定された場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合にはDunnett法²⁾あるいはScheffé法³⁾により対照群と各被験物質投与群との間で平均値の差の検定を行った。分散が均一でなかった場合は、Kruskal-Wallisの順位検定⁴⁾を行い、群間に有意性が認められた場合に対照群と各被験物質投与群との差についてDunnett型あるいはScheffé型の検定を行った。病理組織学検査所見中、対照群および被験物質投与群の両方に共通してみられ、被験物質投与群で頻度および程度が増加している所見についてはWilcoxonの順位和検定法により対照群と被験物質投与群の差について有意差検定を行った。有意水準は、5%および1%とした。

結果

1. 反復投与毒性(親動物所見)

1) 一般状態

いずれの投与群の雌雄動物にも死亡は認められなかった。

200 mg/kg 投与群の雌雄動物において、3回目投与後より、活動性の増加を示す動物がみられた。こうした動物の数は投与1週頃まで次第に増加し、雌雄動物それぞれ10および11匹に認められたが、その後は次第に減少し、投与23日以後はみられなくなった。この症状は投与後約20分頃より始まり、その後約30分程で消失した。400 mg/kg 投与群においては、全ての動物において、初回投与後より活動性の変化が観察され、投与回数増加と共に症状の現われ方に変化が認められた。すなわち投与初期には、投与約20分後より活動性の減少が現われ、約30分後には回復したが、投与3日頃より先ず活動性の増加が現し、その後に減少する動物も観察されるようになった。また、活動性の増加あるいは減少の後、腹臥位を呈する動物も少数みられた。雄動物においては、この症状は投与期間を通して観察されたが、雌動物においては、妊娠期間中は軽度となる傾向が認められた。800 mg/kg 投与群においても、投与20分後頃より全ての動物に毒性症状が認められたが、症状はさらに重篤で、活動性の減少から腹臥位を呈した。また、投与初期には昏睡に陥る動物も雌雄にそれぞれ数匹認められた。しかし、こうした症状も投与5時間後には消失していた。この投与群においても、投与開始後1週間を経過すると投与回数増加と共に、特に雌動物においては妊娠期間中の症状の程度および発現動物数は減少した。しかし、この投与群においては、投与期間の後半期に、雌動物においては妊娠後半期に、軽度の眼球突出を示す動物が雌雄にそれぞれ7および6匹認められた。哺育期間中は、妊娠期間中に比較して、活動性の減少および昏睡状態を呈する動物数は増加し、またこうした症状を示す時間も延長する傾向にあった。

2) 体重

A. 雄動物 (Table 1)

200 mg/kg 投与群においては、投与期間中の平均体重は対照群と比較して有意差は認められなかったが、400 mg/kg および 800 mg/kg 投与群においては、投与初期の体重増加抑制による平均体重の差が、実験終了時まで用量依存的に継続して認められた。すなわち、400 mg/kg 投与群では、投与期間中の平均体重は、対照群に比較して統計的に有意ではないが低値であった。また、800 mg/kg 投与群においては、投与期間を通じて、平均体重は有意 ($p < 0.01$) に減少した。

B. 雌動物 (Table 2)

(1) 交配前

200 mg/kg 投与群の平均体重は、対照群と殆ど同等であった。400 mg/kg 投与群では投与開始後の平均体重は、対照群と比較した場合、低値であったが、有意な変化ではなかった。800 mg/kg 投与群においては、投与開始後 1 週間および 2 週間後の平均体重は有意 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) に減少した。

(2) 妊娠期間

被験物質投与群の妊娠期間中の平均体重は、特に妊娠後半期において、投与量依存的な減少が認められた。200 mg/kg 投与群においては、対照群に比較して統計的に有意な減少ではなかったが、400 mg/kg 投与群においては、妊娠 14 日の平均体重は有意 ($p < 0.05$) に減少し、妊娠 20 日の平均体重も有意差は認められなかったが、低値のまま推移した。800 mg/kg 投与群の平均体重は、妊娠期間を通じて有意 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) に減少した。

(3) 哺育期間

哺育期間の体重は、妊娠末期の平均体重の差が継続的に示されていると考えられ、分娩日および哺育 4 日の平均体重は、400 mg/kg 投与群および 800 mg/kg 投与群で、対照群に比較して有意 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) に減少した。

3) 摂餌量

A. 雄動物 (Table 3)

200 mg/kg 投与群の摂餌量については、対照群に比較して殆ど差がみられなかった。400 mg/kg 投与群においては、投与開始後 2 週間の摂餌量が軽度 (7.6 % ~ 9.8 %) ではあったが有意 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) に減少していた。800 mg/kg 投与群においては、測定した全ての期間にわたって有意 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) に減少しており、減少の程度は約 7 % ~ 20 % であった。

B. 雌動物 (Table 4)

(1) 交配前

200 mg/kg 投与群の摂餌量は対照群と同等であった。400 mg/kg 投与群の摂餌量はいずれの週においても、対

照群に比較して減少 (6.3 % ~ 7.5 %) しており、投与開始後の 1 週間においてはこの減少は統計的に有意 ($p < 0.05$) であった。800 mg/kg 投与群においても統計的に有意 ($p < 0.01$) な減少が認められ、対照群に比較した減少の程度は約 10 % ~ 15 % であった。

(2) 妊娠期間

200 mg/kg 投与群の摂餌量は、いずれの測定時においても対照群より減少 (2.3 % ~ 4.7 %) していたが、統計的に有意なものではなかった。400 mg/kg 投与群においても摂餌量はすべての測定時に減少 (5.6 % ~ 10.2 %) しており、妊娠前半期の減少は統計的に有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) であった。800 mg/kg 投与群の摂餌量は、いずれの測定時においても有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) に減少しており、その減少は対照群に比較して約 9 % ~ 11 % であった。

(3) 哺育期間

被験物質各投与群の摂餌量はいずれの投与量群においても対照群に比較して減少 (8.8 % ~ 15.0 %) しており、減少の程度は投与量に依存していた。しかし、摂餌量の個体差が比較的大きかったため、統計的有意差はみられなかった。

4) 尿検査

いずれの被験物質各投与群およびいずれの検査日においても、尿中に血色素が認められた動物の頻度に有意差はみられなかった。しかし、800 mg/kg 投与群の投与初日の検査において、著しい量の血色素を排泄した動物が雌雄にそれぞれ 3 および 2 匹認められた。

5) 解剖時検査

A. 雄

(1) 血液学検査 (Table 5)

赤血球系の変化として 400 mg/kg 投与群の Hb (15.0 g/dL) および 800 mg/kg 投与群の Hb (14.9 g/dL) ならびに Ht (42.7 %) が統計的に有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) に減少していたが、その程度は極めて軽度のものであった。当研究所の 14 週齢雄ラットにおける過去 5 試験の Hb および Ht は、それぞれ 14.5 ~ 15.6 g/dL および 40.1 ~ 44.3 % であり、上記変化はすべてこれらの範囲内に含まれることから、毒性学的に無意味なものと考えられる。

(2) 血液生化学検査 (Table 6)

被験物質各投与群において、血糖値の軽度ではあるが有意 ($p < 0.01$) な減少が認められた。対照群における血糖値の変動幅は、129 ~ 150 mg/dL であったが、200、400 および 800 mg/kg 投与群ではそれぞれ 105 ~ 138、115 ~ 141 および 98 ~ 131 mg/dL であった。また、200 および 800 mg/kg 投与群においてカリウムの軽度ではあるが統計的に有意 ($p < 0.01$) な減少、および、これら投与群におけるリンの軽度ではあるが統計的に有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) な増加が認められた。これら

カリウムおよびリンの変化はいずれも正常範囲内の変化であり、毒性学的には無意味なものと考えられる。

(3) 器官重量 (Table 7)

400および800 mg/kg投与群の肝臓実重量が有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$)に減少していたが、体重比重量には有意差は認められなかった。この変化は体重減少を反映したものと考えられる。また、800 mg/kg投与群においては、腎臓実重量の有意 ($p < 0.05$)な減少および精巣の比重量の有意 ($p < 0.05$)な増加が認められたが、いずれも体重減少に関連して生じた変化であり、毒性学的に意味のある変化ではなかった。

(4) 剖検

被験物質投与に起因したと考えられる異常所見は認められなかった。

(5) 病理組織学検査 (Table 8)

膀胱、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、精巣、精巣上体およびハーダー腺に以下の所見が認められた。その他の組織に異常は観察されなかった。

(膀胱)

400 mg/kg投与群の5匹および800 mg/kg投与群の7匹に粘膜上皮のびまん性過形成がみられ、400 mg/kg投与群の4匹および800 mg/kg投与群の12匹の粘膜固有層に線維化が認められた。その他、対照群の3匹、400 mg/kg投与群の2匹および800 mg/kg投与群の1匹の粘膜固有層にリンパ球の浸潤が認められた。

(肝臓)

対照群および800 mg/kg投与群に小葉周辺性の肝細胞の脂肪化、小肉芽腫、髓外造血、巣状壊死および壊死巣への好中球の浸潤がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

(腎臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、萎縮あるいは再生尿細管、eosinophilic body、尿細管の限局性拡張、腎盂の拡張がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、対照群の1匹にリンパ球の浸潤が認められた。

(心臓)

対照群の1匹に心筋の線維化がみられ、対照群および800 mg/kg投与群の各1匹に巣状壊死が認められた。

(脾臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、髓外造血巣および色素沈着がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、対照群の1匹および800 mg/kg投与群の3匹に、極めて軽度の鬱血が認められた。

(精巣)

800 mg/kg投与群の1匹の精細管内に、多核巨細胞が認められた。

(精巣上体)

対照群および800 mg/kg投与群に、リンパ球の浸潤、

精子肉芽腫がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。

(ハーダー腺)

対照群の4匹および800 mg/kg投与群の1匹にリンパ球の浸潤がみられた以外に変化は認められなかった。

B. 雌動物

(1) 器官重量 (Table 7)

400 mg/kg投与群においては、肝臓の実重量が有意 ($p < 0.05$)に減少し、腎臓の比重量が有意 ($p < 0.05$)に増加していた。800 mg/kg投与群においては、肝臓の実重量および比重量が有意 ($p < 0.01$)に減少し、また、腎臓の実重量も有意 ($p < 0.05$)に減少していた。これらの変化はいずれも体重減少に伴って生じた変化であり、毒性学的に意味のある変化ではなかった。

(2) 剖検

被験物質投与に起因すると思われる異常所見はなかった。

(3) 病理組織学検査 (Table 8)

膀胱、胸腺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓およびハーダー腺に以下の所見が認められた。その他の組織に異常は観察されなかった。

各器官における観察所見の概要は以下の通りである。

(膀胱)

400 mg/kg投与群の1匹および800 mg/kg投与群の3匹に上皮のびまん性過形成がみられ、400 mg/kg投与群の2匹および800 mg/kg投与群の12匹の粘膜固有層に線維化が認められた。その他、200 mg/kg投与群の1匹の粘膜固有層にリンパ球の浸潤が認められた。

(胸腺)

対照群を含む各投与群に萎縮がみられたが、400および800 mg/kg投与群では、その頻度は対照群よりも高かった。その他、400および800 mg/kg投与群の各1匹に、出血が認められた。

(肝臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、小葉周辺性の脂肪化、小肉芽腫および髓外造血がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

(腎臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、萎縮あるいは再生尿細管がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。その他、800 mg/kg投与群の1匹に、皮髄境界部の石灰沈着が認められた。

(心臓)

対照群の1匹に巣状壊死がみられた。

(脾臓)

対照群を含む各群に髓外造血巣がみられたが、800 mg/kg投与群では造血細胞の減少が認められる例が多かった。その他、対照群を含む各群に色素沈着がみられたが、各群間に頻度および程度の差はなかった。その他、400 mg/kg投与群の2匹および800 mg/kg投与群の3匹

に鬱血が見られ、対照群の1匹に線維化が認められた。
(ハーダー腺)

対照群および800 mg/kg投与群の各1匹に色素沈着の亢進がみられた。

2. 生殖発生毒性

1) 生殖関連所見

A. 交配成績 (Table 9)

交尾率はいずれの投与群においても100%であった。不妊動物が、対照群、200および800 mg/kg投与群にそれぞれ1, 1および2匹認められたが、被験物質投与と関連する有意な変化ではなかった。

B. 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態に関しても異常所見はなかった。

C. 妊娠黄体数、着床数および着床率 (Table 10)

これら観察項目に関しても異常所見はなかった。

D. 出産率および妊娠期間 (Table 10)

対照群を含むいずれの投与群においても、全ての妊娠動物が分娩し、妊娠期間に関しても異常はみられなかった。

2) 出生児所見

A. 一般状態および生存性 (Table 10)

生存性に関しては、対照群を含むいずれの投与群においても異常所見はなかった。

B. 体重 (Table 10)

対照群に比較した雌雄産児の生後4日の体重が、800 mg/kg投与群において僅か(10.2%および8.8%)ではあるが有意($p < 0.05$)に減少した。

C. 形態

産児の形態に関しては、対照群を含むいずれの投与群においても異常所見はなかった。

考察

主要な変化として、行動あるいは一般状態に対する影響、血糖値の軽度の低下および膀胱における病理組織学変化が認められた。

1,4-ブタンジオール投与による毒性試験はいくつか報告されており⁵⁻⁸⁾、その中で共通して観察されている一般状態の変化としては、表現上の差異はあるものの、活動性の減少および睡眠であった。本試験においても、こうした変化は400 mg/kg以上の投与量において観察された。200 mg/kg投与群においては活動性はむしろ亢進したが、これは1,4-ブタンジオールの生物学的活性^{9), 10)}に起因する変化と考え、毒性変化とはみなさなかった。400 mg/kg投与群においては、投与の進行に伴って活動性の現われ方はやや変化し、亢進を示す動物も発現した。

また、こうした投与の進行に伴う変化は、1,4-ブタンジオールの代謝速度の変化を示唆していると思われる。妊娠期間中に症状が軽減する傾向がみられた理由としては、この期間中動物の体重が急速に増加し、妊娠末期までに約50%~60%増加していたのに対し、1,4-ブタンジオールの妊娠期間中の投与量が妊娠0日の体重に基づいていたことによるものと思われる。

雄動物の血液生化学検査において、軽度ではあるが、統計的に有意な減少が観察された。Jedrychowskiら⁷⁾は1,4-ブタンジオールの最高500 mg/kgまでの投与量を、Wistar系ラットに28日間経口投与したが、血糖値に関しては、統計的に有意差は認めていないがその平均値は投与量の増加とともにむしろ上昇していた。したがって本試験でみられた血糖値の軽度の減少は、被験物質投与によるものか否か、疑問視される。

膀胱の病理組織学観察において、移行上皮のびまん性過形成および粘膜固有層の線維化が400 mg/kg以上の投与量群において観察されたが、これらの所見は過去の報告には見当たらなかった。しかし1,4-ブタンジオールは各種器官に充血をもたらすことが報告されており¹¹⁾、充血による透過性の亢進が被験物質あるいはその代謝物の組織中への移行を助長し、その結果これら物質が膀胱粘膜を刺激したと考えることができよう。

生殖発生毒性に関しては、親世代の生殖能に関連した観察項目において、被験物質投与との関連を示す変化は認められなかった。産児に関しては、雌雄産児の生後4日の体重が、800 mg/kg投与群において減少した。この減少は母動物の哺育4日の平均体重が低値であったことに起因しているのかもしれないが、毒性学的意義は不明である。

以上の試験成績から、本試験条件下では、1,4-ブタンジオールの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに200 mg/kg/dayを下回る量、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄ともに800 mg/kg/day、産児に対しては400 mg/kg/dayであると判断される。

文献

- 1) E. Salewski, *Naunyn-schmiedebergs arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **247**, 367(1964).
- 2) C. W. Dunnett, *Biometrics.*, **20**, 482(1964).
- 3) H. Scheffé, *Biometrika.*, **40**, 87(1953).
- 4) W. H. Kruskal and W. A. Wallis, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **47**, 583(1952).
- 5) P. V. Taberner, J. T. Rick and G. A. Kerkut, *Life Sciences*, **11**, 335(1972).
- 6) P. V. Taberner and M. J. Pearce, *J. Pharm. Pharmac.*, **26**, 597(1974).
- 7) R. A. Jedrychowski, R. Görny, J. Stetkiewicz and I. Stetkiewicz, *Polish J. Occu. Med.*, **3**, 421(1990).
- 8) National Toxicology Program, *Final Study Report*. (1994).

- 9) F. Poidrugo and O. C. Snead III, *Neuropharmacol.*, **23**, 109(1984).
- 10) H. Sprince, J. A. Josephs Jr. and C. R. Wilpizeski, *Life Sciences*, **5**, 2041(1966).
- 11) S. P. Knyshova, *Hyg. Sanit.*, **33**, 41(1968).

連絡先

試験責任者：藤井孝朗

試験担当者：橋本 豊，佐藤昌子，宮原 敬，
田子和美，関 剛幸，小島幸一，
吉村慎介，畔上二郎，三枝克彦，
稲田浩子，松木容彦，中込まどか

(財)食品薬品安全センター

〒257-8523 神奈川県秦野市落合725-3

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

Correspondence

Authors: Takaaki Fujii (Study director)

Yutaka Hashimoto, Masako Sato,

Takashi Miyahara, Kazumi Tago,

Takayuki Seki, Kohichi Kojima,

Shinsuke Yoshimura, Jiro Azegami,

Katsuhiko Saegusa, Hiroko Inada,

Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center in Reproductive Toxicology

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

Japan

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

Table 1 Body weights of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration								
1 (Init. wt.)	296.6 ± 7.3	(13)	296.7 ± 8.2	(13)	297.0 ± 7.3	(13)	296.6 ± 8.2	(13)
8	335.0 ± 17.1	(13)	335.3 ± 16.3	(13)	323.1 ± 12.8	(13)	304.8 ± 14.6**	(13)
15	371.5 ± 20.6	(13)	372.3 ± 23.0	(13)	357.6 ± 16.6	(13)	335.0 ± 15.5**	(13)
22	395.9 ± 23.8	(13)	398.7 ± 25.4	(13)	381.4 ± 19.1	(13)	358.5 ± 18.7**	(13)
29	424.3 ± 27.7	(13)	428.2 ± 28.3	(13)	405.2 ± 21.1	(13)	381.5 ± 17.3**	(13)
36	446.2 ± 30.1	(13)	454.1 ± 31.7	(13)	425.3 ± 20.9	(13)	402.7 ± 18.9**	(13)
42	463.4 ± 31.1	(13)	470.0 ± 32.7	(13)	441.4 ± 23.2	(13)	416.4 ± 18.9**	(13)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.
 Parenthesis indicates number of animals.
 **:significant difference from control, p<0.01

Table 2 Body weights of female rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration (Pre-mating period)								
1 (Init. wt.)	216.5 ± 6.5	(13)	216.6 ± 7.4	(13)	216.1 ± 6.3	(13)	216.0 ± 6.3	(13)
8	235.1 ± 12.6	(13)	232.2 ± 10.9	(13)	229.2 ± 7.3	(13)	219.7 ± 8.8**	(13)
15	251.8 ± 15.4	(13)	251.8 ± 16.2	(13)	245.4 ± 7.4	(13)	237.9 ± 11.2*	(13)
Days of pregnancy								
0	259.2 ± 14.9	(12)	260.7 ± 16.5	(12)	252.5 ± 7.8	(13)	242.1 ± 13.5*	(11)
7	300.4 ± 20.1	(12)	292.5 ± 19.3	(12)	285.3 ± 10.9	(13)	279.4 ± 18.0*	(11)
14	339.0 ± 22.6	(12)	329.4 ± 22.2	(12)	318.1 ± 11.4*	(13)	312.7 ± 21.0**	(11)
20	412.9 ± 23.3	(12)	401.1 ± 27.1	(12)	391.0 ± 18.5	(13)	382.4 ± 29.4*	(11)
Days of lactation								
0	308.2 ± 32.1	(12)	302.4 ± 20.1	(12)	279.1 ± 12.1*	(13)	276.8 ± 21.7*	(11)
4	355.1 ± 23.4	(12)	321.1 ± 26.0	(12)	305.6 ± 16.9**	(13)	296.5 ± 23.4**	(11)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.
 Parenthesis indicates number of animals.
 * :significant difference from control, p<0.05
 **:significant difference from control, p<0.01

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

Dose(mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration								
1 ~ 8	198.2 ± 13.9	(13)	199.1 ± 13.8	(13)	183.1 ± 9.8*	(13)	159.5 ± 15.1**	(13)
8 ~ 15	197.6 ± 12.0	(13)	192.8 ± 14.1	(13)	178.3 ± 12.2**	(13)	162.7 ± 15.0**	(13)
29 ~ 36	187.9 ± 11.8	(13)	193.4 ± 15.2	(13)	178.3 ± 8.8	(13)	174.9 ± 11.2*	(13)
36 ~ 42	161.5 ± 9.8	(13)	164.4 ± 11.8	(13)	154.0 ± 7.9	(13)	145.9 ± 9.1**	(13)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.
 Parenthesis indicates number of animals.
 * :significant difference from control, p<0.05
 **:significant difference from control, p<0.01

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

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration (Pre-mating period)								
1~ 8	140.4 ± 13.1	(13)	139.9 ± 8.7	(13)	129.9 ± 9.0*	(13)	118.7 ± 8.9**	(13)
8~15	141.9 ± 11.7	(13)	145.5 ± 11.2	(13)	133.0 ± 7.4	(13)	128.1 ± 9.5**	(13)
Days of pregnancy								
0~ 7	173.2 ± 14.2	(12)	165.1 ± 13.2	(12)	157.8 ± 10.2*	(13)	158.3 ± 16.7*	(11)
7~14	183.6 ± 17.6	(12)	177.3 ± 15.3	(12)	164.8 ± 8.6**	(13)	167.6 ± 13.2*	(11)
14~20	154.1 ± 12.9	(12)	150.6 ± 14.3	(12)	145.5 ± 9.4	(13)	137.7 ± 10.5**	(11)
Days of lactation								
0~ 4	121.9 ± 12.5	(12)	111.2 ± 24.7	(12)	108.6 ± 21.6	(13)	103.6 ± 22.0	(11)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, p<0.05

** : significant difference from control, p<0.01

Table 5 Hematology of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Male								
Red blood cells								
Count (× 10 ⁶ /mm ³)	821 ± 24	(13)	805 ± 34	(13)	803 ± 37	(13)	797 ± 22	(13)
Hemoglobin (g/dl)	15.6 ± 0.6	(13)	15.1 ± 0.4	(13)	15.0 ± 0.6*	(13)	14.9 ± 0.5**	(13)
Hematocrit (%)	44.4 ± 1.5	(13)	43.5 ± 1.3	(13)	42.9 ± 1.8	(13)	42.7 ± 1.5*	(13)
MCV (μm ³)	54.1 ± 1.9	(13)	54.1 ± 2.0	(13)	53.5 ± 1.2	(13)	53.6 ± 2.0	(13)
MCH (pg)	19.0 ± 0.7	(13)	18.8 ± 0.7	(13)	18.6 ± 0.4	(13)	18.7 ± 0.7	(13)
MCHC (%)	35.1 ± 0.6	(13)	34.8 ± 0.3	(13)	34.8 ± 0.3	(13)	34.9 ± 0.3	(13)
White blood cells								
Count (× 10 ³ /mm ³)	71 ± 14	(13)	58 ± 14*	(13)	54 ± 10**	(13)	67 ± 14	(13)
Band neutrophil (%)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Segmented neutrophil (%)	14 ± 7	(13)	15 ± 6	(13)	17 ± 7	(13)	14 ± 7	(13)
Eosinophil (%)	1 ± 1	(13)	1 ± 1	(13)	1 ± 1	(13)	1 ± 2	(13)
Basophil (%)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Monocyte (%)	3 ± 2	(13)	4 ± 2	(13)	4 ± 2	(13)	4 ± 3	(13)
Lymphocyte (%)	82 ± 7	(13)	79 ± 8	(13)	78 ± 8	(13)	80 ± 9	(13)
Platelet								
Count (× 10 ⁴ /mm ³)	102.9 ± 12.3	(13)	100.1 ± 11.0	(13)	104.7 ± 10.8	(13)	97.8 ± 8.0	(13)

Values are expressed as mean±S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, p<0.05

** : significant difference from control, p<0.01

Table 6 Blood chemistry of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0		200		400		800	
Total protein(g/dL)	5.6 ± 0.2	(13)	5.5 ± 0.1	(13)	5.4 ± 0.2	(13)	5.4 ± 0.2	(13)
Albumin(g/dL)	3.0 ± 0.1	(13)	2.9 ± 0.1	(13)	2.9 ± 0.1	(13)	2.9 ± 0.1	(13)
A/G	1.12 ± 0.08	(13)	1.17 ± 0.12	(13)	1.16 ± 0.13	(13)	1.16 ± 0.14	(13)
BUN(mg/dL)	16 ± 1	(13)	15 ± 2	(13)	15 ± 2	(13)	17 ± 3	(13)
Creatinine(mg/dL)	0.7 ± 0.1	(13)	0.7 ± 0.0	(13)	0.7 ± 0.1	(13)	0.7 ± 0.1	(13)
Glucose(mg/dL)	139 ± 7	(13)	127 ± 10**	(13)	128 ± 9**	(13)	116 ± 9**	(13)
Total cholesterol(mg/dL)	29 ± 3	(13)	27 ± 6	(13)	27 ± 4	(13)	29 ± 4	(13)
Total bilirubin(mg/dL)	0.06 ± 0.02	(13)	0.06 ± 0.04	(13)	0.07 ± 0.02	(13)	0.06 ± 0.03	(13)
Na(mEq/L)	143.9 ± 0.9	(13)	144.5 ± 0.7	(13)	143.2 ± 0.8	(13)	143.6 ± 1.3	(13)
K(mEq/L)	4.17 ± 0.20	(13)	3.92 ± 0.17**	(13)	4.08 ± 0.20	(13)	3.89 ± 0.15**	(13)
Cl(mEq/L)	108.7 ± 1.3	(13)	108.8 ± 1.1	(13)	108.6 ± 1.3	(13)	108.2 ± 1.0	(13)
Ca(mg/dL)	8.5 ± 0.2	(13)	8.6 ± 0.2	(13)	8.6 ± 0.3	(13)	8.7 ± 0.2	(13)
Inorg. phos.(mg/dL)	5.6 ± 0.3	(13)	6.0 ± 0.5*	(13)	5.8 ± 0.3	(13)	6.5 ± 0.5**	(13)
ALP(U/L)	303 ± 44	(13)	280 ± 27	(13)	297 ± 34	(13)	307 ± 48	(13)
GPT(U/L)	31 ± 4	(13)	30 ± 5	(13)	34 ± 6	(13)	29 ± 3	(13)
GOT(U/L)	68 ± 6	(13)	65 ± 10	(13)	66 ± 7	(13)	66 ± 7	(13)
γ-GTP(U/L)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)

Values are expressed as mean±S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, p<0.05

** : significant difference from control, p<0.01

Table 7 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Male	Final body weight (g)	434.3 ± 29.3	(13)	443.5 ± 30.7	(13)	415.3 ± 20.4	(13)	390.8 ± 18.0**	(13)
	Liver (g)	12.15 ± 1.36 ^a	(13)	11.70 ± 0.96	(13)	11.09 ± 1.02*	(13)	10.34 ± 0.83**	(13)
		2.79 ± 0.20 ^b		2.64 ± 0.13		2.67 ± 0.17		2.64 ± 0.15	
	Kidneys (g)	2.82 ± 0.20	(13)	2.86 ± 0.22	(13)	2.64 ± 0.18	(13)	2.62 ± 0.16*	(13)
		0.65 ± 0.04		0.65 ± 0.03		0.64 ± 0.03		0.67 ± 0.03	
	Thymus (mg)	348.8 ± 103.5	(13)	343.3 ± 94.8	(13)	317.8 ± 79.6	(13)	286.2 ± 69.8	(13)
		80.9 ± 25.5		77.6 ± 21.6		76.2 ± 17.2		73.3 ± 18.0	
	Testes (g)	3.06 ± 0.20	(13)	3.11 ± 0.37	(13)	3.14 ± 0.21	(13)	3.06 ± 0.17	(13)
		0.71 ± 0.05		0.70 ± 0.08		0.76 ± 0.06		0.78 ± 0.07*	
Epididymides (g)	1.19 ± 0.06	(13)	1.16 ± 0.09	(13)	1.17 ± 0.08	(13)	1.13 ± 0.08	(13)	
	0.28 ± 0.02		0.26 ± 0.02		0.28 ± 0.03		0.29 ± 0.02		
Female	Final body weight (g)	335.1 ± 23.4	(12)	321.1 ± 26.0	(12)	305.6 ± 16.9**	(13)	296.5 ± 23.4**	(11)
	Liver (g)	14.27 ± 0.92	(12)	13.36 ± 1.40	(12)	13.08 ± 1.07*	(13)	11.68 ± 1.15**	(11)
		4.26 ± 0.15		4.17 ± 0.33		4.28 ± 0.26		3.94 ± 0.21**	
	Kidneys (g)	2.07 ± 0.15	(12)	2.07 ± 0.21	(12)	2.09 ± 0.18	(13)	1.88 ± 0.17*	(11)
		0.62 ± 0.06		0.65 ± 0.05		0.69 ± 0.06*		0.63 ± 0.04	
	Thymus (mg)	231.7 ± 88.9	(12)	221.1 ± 66.1	(12)	188.9 ± 62.0	(13)	167.0 ± 57.5	(11)
		68.6 ± 23.5		68.1 ± 16.7		61.3 ± 18.1		55.5 ± 15.9	

Values are expressed as mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

a: absolute weight

b: relative weight (g or mg per 100 g body weight)

*: significant difference from control, $p < 0.05$

**: significant difference from control, $p < 0.01$

Table 8 Histopathological findings of rats treated orally with 1, 4-butanediol in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ [Number of animals examined]	Sex:	male				female			
		Dose(mg/kg):				Dose(mg/kg):			
Findings, grade and number of animals		0	200	400	800	0	200	400	800
Urinary bladder		[13]	[13]	[12]	[13]	[13]	[12]	[13]	[13]
Diffuse hyperplasia of epithelium	total	0	0	5	7	0	0	1	3
	±	0	0	5	7	0	0	1	3
Fibrosis in lamina propria	total	0	0	4	12	0	0	2	12
	±	0	0	4	12	0	0	2	12
Infiltration of lymphocytes in lamina propria	total	3	0	2	1	0	1	0	0
	±	3	0	2	1	0	1	0	0
Thymus		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Atrophy	total	0			0	1	1	5	7
	±	0			0	0	1	2	2
	+	0			0	1	0	3	5
Hemorrhage	total	0			0	0	0	1	1
	±	0			0	0	0	1	0
	+	0			0	0	0	0	1
Spleen		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Extramedullary hematopoiesis	total	13			13	13	13	13	13
	±	6			4	1	1	0	4
	+	7			9	4	5	5	6
	++	0			0	8	7	8	3
Deposits of pigment	total	13			13	13	13	13	13
	±	2			0	0	1	1	3
	+	11			13	13	12	12	10
Congestion	total	1			3	0	0	2	3
	±	1			3	0	0	0	0
	+	0			0	0	0	2	3
Fibrosis	total	0			0	1	0	0	0
	+	0			0	1	0	0	0
Liver		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Fatty change of hepatocyte in peripheral zone	total	13			13	1			1
	±	0			0	0			1
	+	8			10	1			0
	++	5			3	0			0
Microgranuloma	total	10			11	6			7
	±	9			11	6			7
	+	1			0	0			0
Extramedullary hematopoiesis	total	1			2	4			3
	±	1			2	4			3
Focal necrosis	total	2			1	0			0
	±	1			0	0			0
	+	1			1	0			0
Infiltration neutrophils in necrotic focus	total	2			1	0			0
	±	1			1	0			0
	+	1			0	0			0

±:very slight, +:slight, ++:moderate, +++:severe

Table 8 (continued)

Organ [Number of animals examined] Findings, grade and number of animals	Sex: Dose (mg/kg) :	male				female			
		0	200	400	800	0	200	400	800
Kidney		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Atrophic/regenerated tubule	total	12			11	5			7
	±	10			11	5			7
	+	2			0	0			0
Eosinophilic body	total	8			4	0			0
	±	5			2	0			0
	+	3			2	0			0
Focal dilatation of tubule in medulla	total	1			1	0			0
	+	1			1	0			0
Dilatation of pelvis	total	2			2	0			0
	+	2			2	0			0
Infiltration of lymphocytes	total	1			0	0			0
	+	1			0	0			0
Calcification in cortico-medullary junction	total	0			0	0			1
	+	0			0	0			1
Brain		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Partial defect	total	1			0	0			0
	+	1			0	0			0
Heart		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Myocardial fibrosis	total	1			0	0			0
	±	1			0	0			0
Focal necrosis	total	1			1	1			0
	±	1			1	1			0
Harderian gland		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Infiltration of lymphocytes	total	4			1	0			0
	±	3			1	0			0
	+	1			0	0			0
Increased pigmentation	total	0			0	1			1
	+	0			0	1			1
Testis		[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Multinucleated giant cells in seminiferous tubules	total	0			1				
	±	0			1				
Epididymis		[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Infiltration of lymphocytes	total	8			8				
	±	5			6				
	+	3			2				
Spermatic granuloma	total	3			2				
	+	3			2				

±: very slight, +: slight, ++: moderate, +++: severe

Table 9 Summary of reproductive performance in parental rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	200	400	800
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	13
Copulation index ^{A)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant animals	12	12	13	11
Fertility index ^{B)}	92.3	92.3	100.0	84.6
Pairing days until copulation (mean±S.D.)	2.8 ± 1.2	2.8 ± 1.9	3.1 ± 1.2	3.0 ± 3.5
Frequency of vaginal estrus (mean±S.D.)	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3

A) : Copulation index = (Number of copulated pairs/Number of mated pairs) × 100; %

B) : Fertility index = (Number of pregnant animals/Number of copulated pairs) × 100; %

Table 10 Summary of development of pups from dams treated orally with 1, 4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Number of pregnant females	12		12		13		11	
Number of pregnant females with pups alive	12		12		13		11	
Gestation index ^{A)}	100.0		100.0		100.0		100.0	
Gestation length in days	22.0 ± 0.0	(12)	22.0 ± 0.0	(12)	22.2 ± 0.4	(13)	22.2 ± 0.4	(11)
Number of corpora lutea	17.6 ± 3.4	(12)	17.9 ± 4.4	(12)	17.0 ± 1.4	(13)	16.8 ± 1.9	(11)
Number of implantation sites	15.1 ± 2.0	(12)	15.8 ± 2.4	(12)	15.4 ± 1.3	(13)	15.9 ± 1.6	(11)
Implantation index ^{B)}	87.5 ± 13.9	(12)	89.6 ± 11.3	(12)	90.8 ± 8.0	(13)	94.9 ± 5.7	(11)
Day 0 of lactation								
Number of pups born	14.8 ± 1.9	(12)	14.6 ± 2.2	(12)	14.6 ± 1.9	(13)	15.0 ± 1.8	(11)
Delivery index ^{C)}	98.4 ± 2.9	(12)	92.9 ± 7.1	(12)	94.8 ± 6.3	(13)	94.2 ± 4.7	(11)
Number of pups alive	14.7 ± 1.9	(12)	14.4 ± 2.1	(12)	13.9 ± 2.1	(13)	14.7 ± 1.8	(11)
Birth index ^{D)}	97.3 ± 3.3	(12)	92.0 ± 8.3	(12)	90.4 ± 10.6	(13)	92.4 ± 4.4	(11)
Live birth index ^{E)}	98.9 ± 2.5	(12)	98.9 ± 2.5	(12)	95.5 ± 9.8	(13)	98.2 ± 3.1	(11)
Pup weight in grams								
Male	6.3 ± 0.3	(12)	6.0 ± 0.3	(12)	6.4 ± 0.3	(13)	6.1 ± 0.5	(11)
Female	6.0 ± 0.3	(12)	5.8 ± 0.3	(12)	6.0 ± 0.3	(13)	5.7 ± 0.6	(11)
Sex ratio ^{F)}	45.6 ± 13.4	(12)	47.8 ± 13.5	(12)	51.6 ± 15.1	(13)	46.2 ± 14.8	(11)
Day 4 of lactation								
Number of pups alive	14.4 ± 1.7	(12)	14.3 ± 2.0	(12)	13.8 ± 2.2	(13)	14.5 ± 1.5	(11)
Viability index ^{G)}	98.5 ± 2.8	(12)	99.5 ± 1.7	(12)	99.3 ± 2.5	(13)	98.4 ± 3.7	(11)
Pup weight in grams								
Male	10.2 ± 0.8	(12)	9.8 ± 0.7	(12)	10.0 ± 0.5	(13)	9.3 ± 0.8*	(11)
Female	9.8 ± 1.0	(12)	9.4 ± 0.8	(12)	9.6 ± 0.5	(13)	8.8 ± 0.8*	(11)
Sex ratio ^{H)}	46.3 ± 13.2	(12)	47.5 ± 13.4	(12)	51.9 ± 14.8	(13)	46.7 ± 15.1	(11)

Values are expressed as mean±S.D.

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

*: significant difference from control, $p < 0.05$

A) : Gestation index = (Number of pregnant females with pups alive/Number of pregnant females) × 100; %

B) : Implantation index = (Number of implantation sites/Number of corpora lutea) × 100; %

C) : Delivery index = (Number of pups born/Number of implantation sites) × 100; %

D) : Birth index = (Number of pups alive on day 0/Number of implantation sites) × 100; %

E) : Live birth index = (Number of pups alive on day 0/Number of pups born) × 100; %

F) : Sex ratio = (Number of male pups alive on day 0/Number of pups alive on day 0) × 100; %

G) : Viability index = (Number of pups alive on day 4/Number of pups alive on day 0) × 100; %

H) : Sex ratio = (Number of male pups alive on day 4/Number of pups alive on day 4) × 100; %