

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," サイエンティスト社, 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 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm 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 \pm 9]			[13 \pm 2]			[19 \pm 4]			[27 \pm 1]			[7 \pm 1]		
78	122	117	131	8	12	8	20	13	21	31	32	25	5	4	6
	[123 \pm 7]			[9 \pm 2]			[18 \pm 4]			[29 \pm 4]			[5 \pm 1]		
156	107	108	107	8	11	15	16	19	15	21	20	15	7	7	7
	[107 \pm 1]			[11 \pm 4]			[17 \pm 2]			[19 \pm 3]			[7 \pm 0]		
313	112	124	126	12	10	15	15	13	13	25	21	30	8	7	5
	[121 \pm 8]			[12 \pm 3]			[14 \pm 1]			[25 \pm 5]			[7 \pm 2]		
625	103	125	115	8	10	10	11	10	14	25	21	22	10	7	7
	[114 \pm 11]			[9 \pm 1]			[12 \pm 2]			[23 \pm 2]			[8 \pm 2]		
1250	106	116	107	10	9	11	15	15	11	21	18	19	5	6	4
	[110 \pm 6]			[10 \pm 1]			[14 \pm 2]			[19 \pm 2]			[5 \pm 1]		
2500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	1*	9*	12*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[7 \pm 6]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]		
Positive control	1014	964	917**	426	421	394**	943	925	1011**	420	391	392**	856	868	994**
	[965 \pm 49]			[414 \pm 17]			[960 \pm 45]			[401 \pm 16]			[906 \pm 76]		

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

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

*: 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 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)と含まない場合(-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

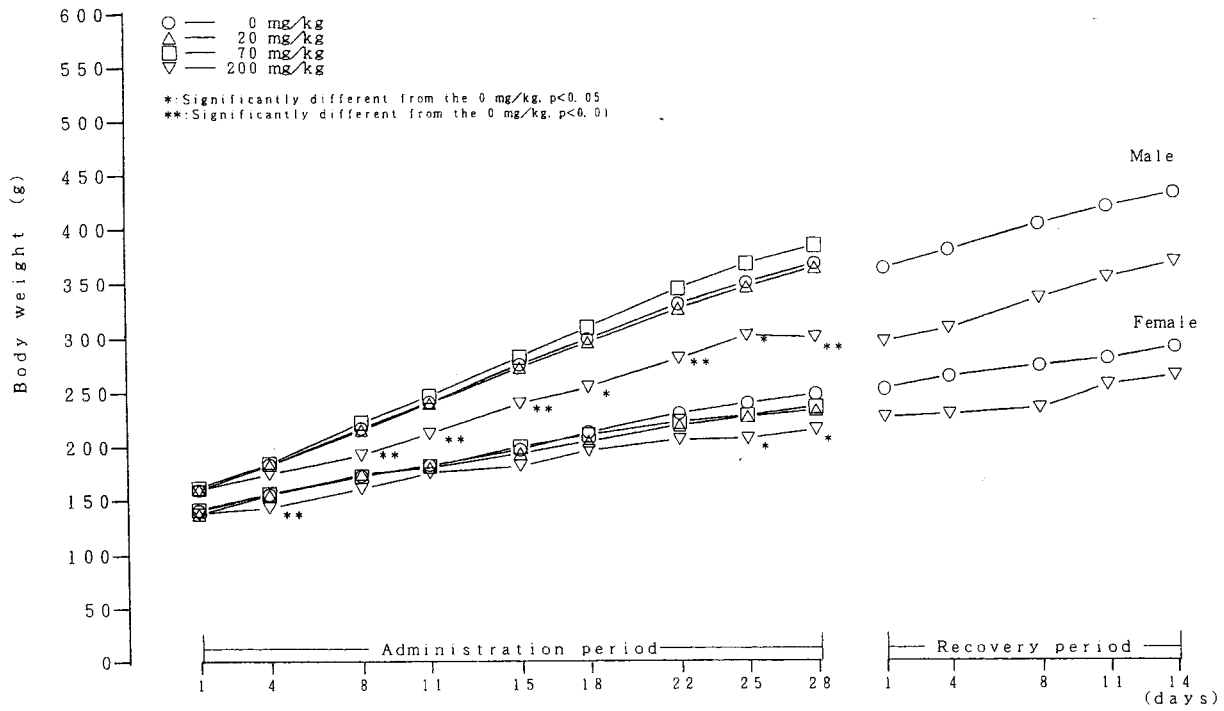


Fig. 1 Body weight changes of rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

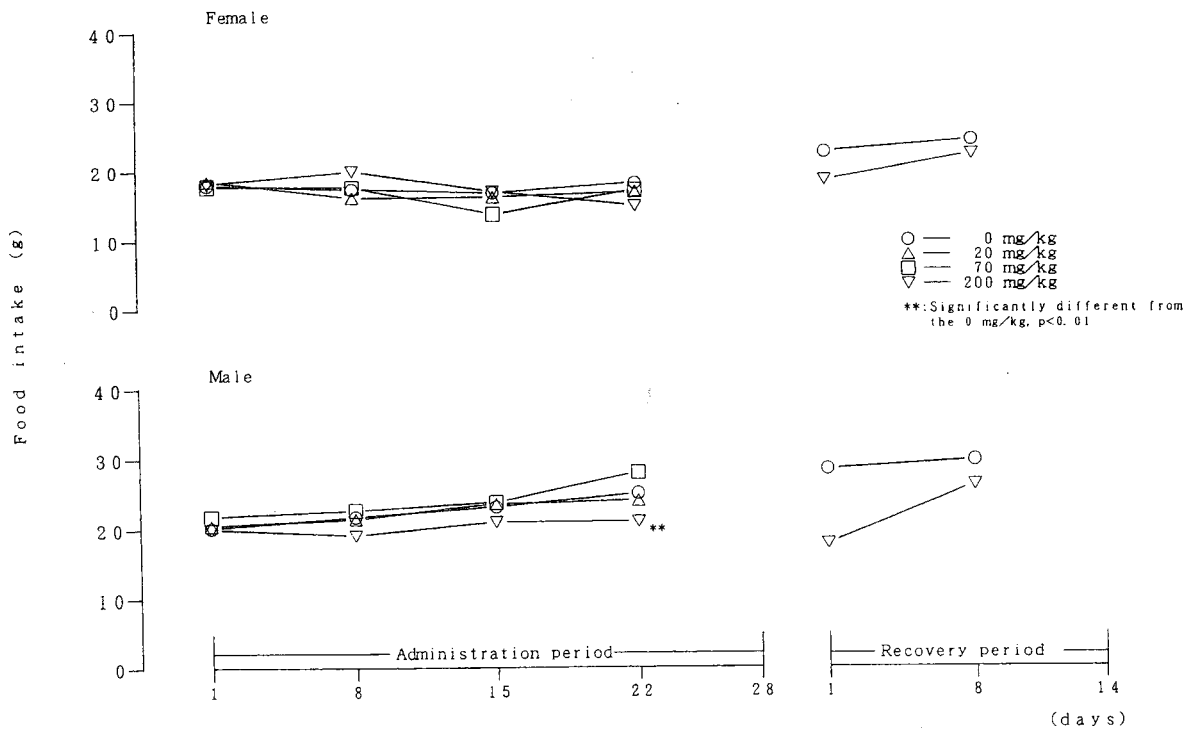


Fig. 2 Food intake of rats treated with dicyclohexylamine in twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test

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

Authers: 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	0	5	0	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	(mg/kg)	Red blood cell ^{a)}	Crystal ^{b)}	Cast ^{c)}	White blood cell ^{d)}	Epithelial cell ^{e)}	Na		K		Cl		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 (g/dL)	Albu- min (g/dL)	A/G	BUN (mg/dL)	Creati- nine (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	Total choles- terol (mg/dL)	Triglyce- ride (mg/dL)	Inorg. phos. (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	ALP (U/L)	LDH (U/L)	GPT (U/L)	GOT (U/L)	γ -GTP (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	5.3 ± 0.2	3.2 ± 0.2	1.51 ± 0.12	16 ± 1	0.6 ± 0.1	122 ± 15	54 ± 13	48 ± 10	6.2 ± 0.5	8.8 ± 0.1	142.4 ± 0.9	3.85 ± 0.14	107.0 ± 0.7	186 ± 43	155 ± 63	23 ± 9	70 ± 19	0 ± 0		
	20	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		
	70	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		
	200	2	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		
Recovery		0	5	5.3 ± 0.3	2.9 ± 0.3	1.22 ± 0.16	17 ± 3	0.6 ± 0.0	123 ± 11	46 ± 8	38 ± 12	5.7 ± 0.6	8.5 ± 0.2	143.9 ± 1.0	3.98 ± 0.16	108.5 ± 1.7	218 ± 61	100 ± 19	22 ± 3	56 ± 6	0 ± 0	
Male		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	5.2 ± 0.1	3.0 ± 0.1	1.40 ± 0.14	18 ± 1	0.7 ± 0.1	106 ± 5	51 ± 6	48 ± 11	5.1 ± 0.7	8.6 ± 0.2	143.7 ± 0.4	3.61 ± 0.12	110.6 ± 1.0	175 ± 31	94 ± 14	19 ± 1	52 ± 6	0 ± 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 \pm 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 0 0 1
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 0 0 1
(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 8 1 4 0	0 5 0 0 0	0 0 0 0 0	0 1 1 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 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	0 5 0 0 0	0 1 0 0 0	1 1 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 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	0 0 0 0 0	0 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 0 0 0	2 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 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	0 0 0 0 0	0 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 2 0 0	0 0 2 0 0	0 0 2 0 0	2 0 0 0 0
Accumulation, foam cell	1 0 0 0 0	1 0 2 0 0	2 2 0 0 0	0 0 0 0 0	1 0 0 0 0	3 0 0 0 0	2 0 0 0 0	0 0 0 0 0
Edema	0 0 1 0 0	1 2 1 0 0	0 2 0 0 0	0 0 0 0 0	1 0 0 0 0	3 0 0 0 0	2 0 0 0 0	0 0 0 0 0
(Thymus)	[0]	[1]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]	[0]
Hemorrhage		0 1 0 0 0	1 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0
(Skin)	[0]	[1]	[1]	[0]	[0]	[0]	[1]	[0]
Ulcer		0 0 1 0 0	1 0 0 0 1	0 0 0 1 0	1 0 0 0 0	0 0 0 1 0	0 0 0 1 0	1 0 0 0 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 5 0 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 0 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 0 0 0 0

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