

2,4,6-トリブロモフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 2,4,6-Tribromophenol on Bacteria

要約

2,4,6-トリブロモフェノールについて、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⁾の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められたことから、本試験はS9 mix無添加試験では、TA100, TA1535およびTA98は15.6~500 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA1537は31.3~1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$, WP2 *uvrA*は156~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で、S9 mix添加試験ではTA100, TA1535およびTA1537は15.6~500 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA98は31.3~1000 $\mu\text{g}/\text{plate}$, WP2 *uvrA*は156~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。

その結果、2回の本試験とも用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、2,4,6-トリブロモフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

方法

1. 検定菌

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

*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博士から分与された。

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のを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)およびアンピシリン耐性因子pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid Ltd.)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。

分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

2. 被験物質

2,4,6-トリブロモフェノールは、白色フレーク状の粉末である。用いた被験物質は、ロット番号70909、純度99.8%(不純物：不明)であり、マナック(株)(広島)から供与された。被験物質は、使用時まで密栓、遮光して冷蔵した。本被験物質は試験期間中安定であったことが確認された。

2,4,6-トリブロモフェノールは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:TPJ5678, 和光純薬工業(株))に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

3. 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(和光純薬工業(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, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを-20℃で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

4. 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 Ltd.) 0.6 w/v%

塩化ナトリウム 0.5 w/v%

(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)製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地1 Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物 0.2 g

クエン酸・1水和物 2 g

リン酸水素二カリウム 10 g

リン酸一アンモニウム 1.92 g

水酸化ナトリウム 0.66 g

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：原 巧, 川上久美子
（財）食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Takumi Hara, Kumiko Kawakami
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

グルコース	20 g
大洋寒天(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

3) S9 mix

1 mL中下記の成分を含む。

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

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

5. 試験方法

プレインキュベーション法³⁾により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 mL)、検定菌液0.1 mLを混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、約45°Cに保温したトップアガー2mLを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。同時に実施した試験については、溶媒および陽性対照群を共通とした。培養は37°Cで48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を目視またはコロニーアナライザーを用いて算定した。抗菌性の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、溶媒および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。

6. 判定基準

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定することとした。

結果および考察

50.0~5000 μ g/plateの範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した。その結果、S9 mix無添加試験ではTA100、TA1535およびTA98で500 μ g/plate以上、TA1537で1500 μ g/plate以上、WP2 *uvrA*で5000 μ g/plateの用量で抗菌性が認められた。また、S9 mix添加試験ではTA100、TA1535およびTA1537で500 μ g/plate以上、TA98で1500 μ g/plate以上、WP2 *uvrA*で5000 μ g/plateの用量で抗菌性が認められた。

これらの結果から、本試験における最高用量は、S9 mix無添加試験ではTA100、TA1535およびTA98は500 μ g/plate、TA1537は1000 μ g/plate、WP2 *uvrA*は5000 μ g/plateとし、S9 mix添加試験ではTA100、TA1535およびTA1537は500 μ g/plate、TA98は1000 μ g/plate、WP2 *uvrA*は5000 μ g/plateとした。

上記の最高用量に基づいて公比2で6用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、陰性であった。

以上の結果に基づき、2,4,6-トリブロモフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

なお、本被験物質はチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では、S9 mix非存在下および存在下で染色体の構造異常が誘発され陽性であった⁴⁾。また、本被験物質の類縁化合物の1,4-ジプロモベンゼンでは、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で陽性、細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が得られている⁵⁾。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F. J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York 1981, pp. 351-360.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1980, pp. 273-285.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 418.
- 5) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 2, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1995, p. 353.

Table 1-1 Mutagenicity of 2,4,6-tribromophenol on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535		TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	136 130 128 (131 \pm 4.2)	16 9 18 (14 \pm 4.7)		20 25 21 (22 \pm 2.6)	17 7 7 (10 \pm 5.8)	
	15.6	105 132 129 (122 \pm 14.8)	7 9 8 (8 \pm 1.0)		18 14 26 (19 \pm 6.1)	NT	
	31.3	132 126 166 (141 \pm 21.6)	13 11 10 (11 \pm 1.5)		19 13 29 (20 \pm 8.1)	8 3 6 (6 \pm 2.5)	
	62.5	157 115 125 (132 \pm 21.9)	12 11 9 (11 \pm 1.5)		17 23 25 (22 \pm 4.2)	4 5 6 (5 \pm 1.0)	
	125	136 146 133 (138 \pm 6.8)	11 18 12 (14 \pm 3.8)		19 13 21 (18 \pm 4.2)	3 12 6 (7 \pm 4.6)	
	250	118 108 102 (109 \pm 8.1)	13 14 10 (12 \pm 2.1)		14 13 17 (15 \pm 2.1)	3 3 2 (3 \pm 0.6)	
	500	33* 36* 27* (32 \pm 4.6)	2* 3* 3* (3 \pm 0.6)		10* 10* 8* (9 \pm 1.2)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	
	1000	NT	NT		NT	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	
S9 mix (+)	0	154 161 177 (164 \pm 11.8)	8 10 11 (10 \pm 1.5)		28 40 42 (37 \pm 7.6)	17 10 18 (15 \pm 4.4)	
	15.6	177 160 156 (164 \pm 11.2)	9 7 8 (8 \pm 1.0)		NT	15 15 12 (14 \pm 1.7)	
	31.3	149 171 158 (159 \pm 11.1)	6 9 18 (11 \pm 6.2)		25 37 36 (33 \pm 6.7)	10 18 15 (14 \pm 4.0)	
	62.5	176 170 181 (176 \pm 5.5)	10 6 14 (10 \pm 4.0)		21 29 35 (28 \pm 7.0)	13 10 8 (10 \pm 2.5)	
	125	160 167 170 (166 \pm 5.1)	9 10 12 (10 \pm 1.5)		47 45 29 (40 \pm 9.9)	13 8 12 (11 \pm 2.6)	
	250	135 140 153 (143 \pm 9.3)	9 9 12 (10 \pm 1.7)		22 23 20 (22 \pm 1.5)	5 2 7 (5 \pm 2.5)	
	500	69* 61* 49* (60 \pm 10.1)	3* 3* 3* (3 \pm 0.0)		12 8 9 (10 \pm 2.1)	1* 2* 3* (2 \pm 1.0)	
	1000	NT	NT		0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	NT	
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA		AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5		0.1	80	
	Number of colonies/plate	522 507 480 (503 \pm 21.3)	554 512 577 (548 \pm 33.0)		518 562 563 (548 \pm 25.7)	401 350 380 (377 \pm 25.6)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA		2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2		0.5	2	
	Number of colonies/plate	1241 1073 1020 (1111 \pm 115.4)	526 387 397 (437 \pm 77.5)		549 515 570 (545 \pm 27.8)	357 394 365 (372 \pm 19.5)	

Purity was 99.8%.

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

*:Growth inhibition was observed.

NT:Not tested

Table 1-2 Mutagenicity of 2,4,6-tribromophenol on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)					
		Base-pair substitution type					
				WP2 <i>uvrA</i>			
S9 mix (-)	0			26 28 16 (23 \pm 6.4)			
	156			21 27 22 (23 \pm 3.2)			
	313			24 22 28 (25 \pm 3.1)			
	625			24 19 24 (22 \pm 2.9)			
	1250			8 15 18 (14 \pm 5.1)			
	2500			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
	5000			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
S9 mix (+)	0			40 23 31 (31 \pm 8.5)			
	156			27 46 40 (38 \pm 9.7)			
	313			33 40 40 (38 \pm 4.0)			
	625			31 26 26 (28 \pm 2.9)			
	1250			17 27 26 (23 \pm 5.5)			
	2500			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
	5000			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			0.01			
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies/plate			170 171 175 (172 \pm 2.6)			
	Chemical			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			10			
S9 mix (+)	Number of colonies/plate			876 693 718 (762 \pm 99.2)			

Purity was 99.8 %.

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA:2-Aminoanthracene

*:Growth inhibition was observed.

Table 2-1 Mutagenicity of 2,4,6-tribromophenol on 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 substitution type						Frameshift type			
		TA100			TA1535			TA98			TA1537
S9 mix (-)	0	155 155 138 (149 \pm 9.8)	12 13 16 (14 \pm 2.1)				18 18 19 (18 \pm 0.6)	16 7 10 (11 \pm 4.6)			
	15.6	181 104 155 (147 \pm 39.2)	15 12 4 (10 \pm 5.7)				32 16 24 (24 \pm 8.0)	NT			
	31.3	150 124 128 (134 \pm 14.0)	14 11 11 (12 \pm 1.7)				22 23 20 (22 \pm 1.5)	7 5 4 (5 \pm 1.5)			
	62.5	150 133 124 (135 \pm 13.2)	14 12 12 (13 \pm 1.2)				16 20 17 (18 \pm 2.1)	4 9 5 (6 \pm 2.6)			
	125	138 112 115 (122 \pm 14.2)	11 12 11 (11 \pm 0.6)				16 22 11 (16 \pm 5.5)	6 8 7 (7 \pm 1.0)			
	250	115 97 102 (105 \pm 9.3)	7 9 8 (8 \pm 1.0)				17 10 5 (11 \pm 6.0)	3 3 4 (3 \pm 0.6)			
	500	28* 26* 7* (20 \pm 11.6)	1* 1* 3* (2 \pm 1.2)				5* 8* 3* (5 \pm 2.5)	1* 1* 0* (1 \pm 0.6)			
	1000	NT	NT				NT	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
S9 mix (+)	0	130 158 170 (153 \pm 20.5)	11 8 14 (11 \pm 3.0)				40 30 26 (32 \pm 7.2)	15 20 13 (16 \pm 3.6)			
	15.6	152 154 190 (165 \pm 21.4)	14 13 18 (15 \pm 2.6)				NT	18 20 9 (16 \pm 5.9)			
	31.3	174 165 181 (173 \pm 8.0)	9 11 15 (12 \pm 3.1)				32 34 40 (35 \pm 4.2)	16 9 11 (12 \pm 3.6)			
	62.5	199 190 204 (198 \pm 7.1)	11 14 9 (11 \pm 2.5)				27 38 24 (30 \pm 7.4)	12 10 15 (12 \pm 2.5)			
	125	192 179 184 (185 \pm 6.6)	7 12 11 (10 \pm 2.6)				31 22 33 (29 \pm 5.9)	11 10 11 (11 \pm 0.6)			
	250	108 173 156 (146 \pm 33.7)	9 8 6 (8 \pm 1.5)				35 29 31 (32 \pm 3.1)	3 7 6 (5 \pm 2/1)			
	500	124* 70* 63* (86 \pm 33.4)	2* 1* 1* (1 \pm 0.6)				9 13 6 (9 \pm 3.5)	3* 4* 6* (4 \pm 1.5)			
	1000	NT	NT				0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	NT			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA				AF2	9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5				0.1	80			
	Number of colonies/plate	555 518 493 (522 \pm 31.2)	551 557 568 (559 \pm 8.6)				597 601 621 (606 \pm 12.9)	483 382 572 (479 \pm 95.1)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA				2AA	2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2				0.5	2			
	Number of colonies/plate	939 909 948 (932 \pm 20.4)	357 372 388 (372 \pm 15.5)				388 473 472 (444 \pm 48.8)	443 483 361 (429 \pm 62.2)			

Purity was 99.8 %.

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

*:Growth inhibition was observed.

NT:Not tested

Table 2-2 Mutagenicity of 2,4,6-tribromophenol on 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 substitution type					
				WP2 <i>uvrA</i>			
S9 mix (-)	0			25 25 29 (26 \pm 2.3)			
	156			21 29 27 (26 \pm 4.2)			
	313			17 24 23 (21 \pm 3.8)			
	625			24 19 18 (20 \pm 3.2)			
	1250			17 9 17 (14 \pm 4.6)			
	2500			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
	5000			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
S9 mix (+)	0			30 32 30 (31 \pm 1.2)			
	156			34 44 30 (36 \pm 7.2)			
	313			37 30 34 (34 \pm 3.5)			
	625			23 26 27 (25 \pm 2.1)			
	1250			12 26 26 (21 \pm 8.1)			
	2500			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
	5000			0* 0* 0* (0 \pm 0.0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			0.01			
	Number of colonies/plate			166 203 159 (176 \pm 23.6)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)			10			
	Number of colonies/plate			675 652 609 (645 \pm 33.5)			

Purity was 99.8 %.

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Growth inhibition was observed.

2,4,6-トリブロモフェノ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 2,4,6-Tribromophenol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2,4,6-トリブロモフェノ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)および短時間処理(6時間)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理では0.25 mg/mL, S9 mix非存在下およびS9 mix存在下における短時間処理ではそれぞれ0.31 mg/mLおよび0.33 mg/mLであった。各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度設定した。連続処理では、24時間および48時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。染色体分析が可能な濃度は、48時間連続処理および短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下において2濃度ずつしか得られなかったため、濃度を設定し直し再度試験を行った。その結果、染色体分析が可能な最高濃度は24時間連続処理では0.10 mg/mL, 48時間連続処理では0.050 mg/mLの濃度であったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。S9 mix非存在下およびS9 mix存在下における短時間処理ではそれぞれ0.050 mg/mLおよび0.10 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、この濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した群では、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非存在下の高濃度群(0.050 mg/mL)およびS9 mix存在下で処理した高濃度群(0.10 mg/mL)でそれぞれ10.5%および23.5%(gapを含む)の染色体異常が誘発された。一方、S9 mix非存在下および存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下で2,4,6-トリブロモフェノールは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月, 入手時:継代4代, 現在21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、仔牛血清(CS:Cansera International)を10 vol%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. S9

S9(キッコーマン(株))は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

2,4,6-トリブロモフェノール(ロット番号:70909, マナック(株), 広島)は、白色フレーク状の粉末で、水に対しては100 mM未満, DMSOでは2 M以上, アセトンでは50 mg/mL以上で溶解し、融点87-89°C, 沸点119°C/2.0 kPaで、純度99.8%の物質であった。本物質は空気中で変色し、昇華性を示す物質である。

6. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(ロット番号:DLF7049, 和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5 vol%になるように加えた。

7. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒

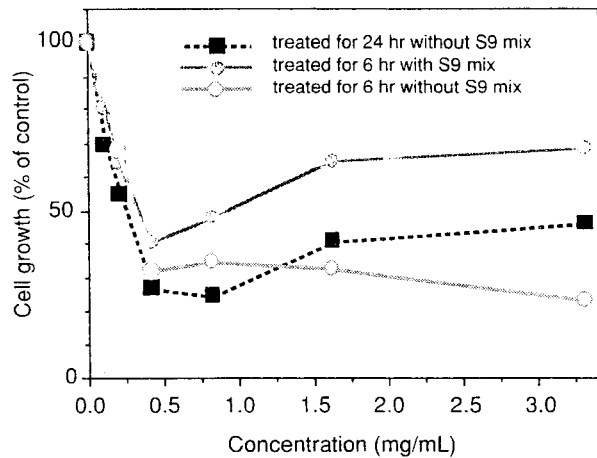


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2,4,6-tribromophenol

対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%細胞増殖抑制濃度は0.25 mg/mL、S9 mix非存在下および存在下における短時間処理では、それぞれ0.31 mg/mLおよび0.33 mg/mLであった(Fig. 1)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度である0.60 mg/mLを最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(0.038, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/mL)。しかし、染色体分析が可能な濃度は、48時間連続処理および短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下において2濃度ずつしか得られなかったため、濃度を設定し直し(0.013, 0.025, 0.050, 0.10, 0.20 mg/mL)、再度試験を行った。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、注射用蒸留水(株大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

9. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように培養液に加えた。染色体標本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 vol% ギムザ溶液で染色した。

10. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の

分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2)、24時間および48時間連続処理では、それぞれ0.10 mg/mLおよび0.050 mg/mLが、S9 mix非存在下およびS9 mix存在下における短時間処理では、それぞれ0.050 mg/mLおよび0.10 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1つの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・哺乳動物試験研究会(MMS)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。

11. 記録と判定

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

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法²⁾により、有意差検定を実施した($p < 0.01$)。また、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³⁾($p < 0.01$)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

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。2,4,6-トリブロモフェノールを加えて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、染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。倍数性細胞については、24時間処理した濃度群(0.10 mg/mL)では、細胞毒性のために740細胞しか観察できなかったが、24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。2,4,6-トリブロモフェノールを加えた短時間処理では、S9 mix非存在下で処理した高濃度群(0.050 mg/mL)およびS9 mix存在下で処理した高濃度群(0.10 mg/mL)でそれぞれ10.5%および23.5%(gapを含む)の染色体異常が誘発された。一方、倍数性細胞の誘発作用については、S9 mix非存在下および存在下で6時間処理したいずれの処理群でも、倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。

従って、2,4,6-トリブロモフェノールは、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すると結論した。

本物質は、細菌を用いる復帰突然変異試験においては、変異原活性が認められなかった⁴⁾。これまでに、多くの臭素化合物(bromoacetic acid, 2-bromopropionic acid, 1-bromo-2-chloroethane, bromochloromethane, 2-bromo-2-methylpropionic acid, 1-bromo-3-chloropropane, 1,4-dibromobenzene等)が、染色体異常を誘発することが報告されており^{5,6)}、ハロゲン類としての反応性の強さから、DNAに対する傷害性も強いことが示唆された。

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, pp. 16-37.
- 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, pp. 76-78.
- 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. 213-223.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, “化学物質毒性試験報告,” Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 411.
- 5) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課監修, “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, pp. 167-538.
- 6) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, “化学物質毒性試験報告,” Vol. 2, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1995, p. 367.

連絡先

試験責任者: 佐々木澄志
試験担当者: 日下部博一, 高橋俊孝, 橋本恵子
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Kiyoshi Sasaki (Study director)
Hirokazu Kusakabe,
Toshitaka Takahashi, Keiko Hashimoto
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2,4,6-tribromophenol (TBP)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾ Concurrent cytotoxicity ⁶⁾ (%)		Mitotic index ⁷⁾ (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Non-treatment			200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38			
Solvent ¹⁾ 0		24	200	0	0	0	2	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		100.0	-
TBP 0.025		24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		93.5	-
TBP 0.050		24	200	0	0	1	2	1	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.00	-	69.5	-
TBP 0.10		24	200	0	2	0	3	0	0	5	1	4 (2.0)	4 (2.0)	0.00 ⁸⁾		43.0	7.0
TBP 0.20***		24	-													29.5	0.0 ⁹⁾
MC 0.00005		24	200	3	27	115	1	0	0	146	0	94*(47.0)	92*(46.0)	0.00		-	-
Solvent ¹⁾ 0		48	200	0	0	0	4	0	0	4	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		100.0	-
TBP 0.013		48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		98.5	-
TBP 0.025		48	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	-	92.5	-
TBP 0.050		48	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		49.5	4.0
TBP 0.10***		48	-													14.0	-
TBP 0.20***		48	-													6.0	-
MC 0.00005		48	200	5	51	180	11	1	50	298	7	134*(67.0)	133*(66.5)	0.88*		-	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. 7) Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose able to analyse chromosomes. 8) Seven hundred and forty cells were analysed. 9) Eight hundred and ten cells were analysed from two dishes.

*: Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test. **: Purity was more than 99.8% ***: Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphases due to cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,4,6-tribromophenol (TBP)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾ Concurrent cytotoxicity ⁶⁾ (%)		Mitotic index ⁷⁾ (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Non-treatment				200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			
Solvent ¹⁾ 0		-	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		100.0	-
TBP 0.013		-	6-(18)	200	0	1	4	1	0	0	6	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		94.0	-
TBP 0.025		-	6-(18)	200	0	0	1	1	0	0	2	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	+	88.0	-
TBP 0.050		-	6-(18)	200	1	16	30	4	0	0	51	0	21*(10.5)	20*(10.0)	0.63		47.0	5.1
TBP 0.10***		-	6-(18)	-													19.0	-
TBP 0.20***		-	6-(18)	-													1.5	-
CPA 0.005		-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		-	-
Solvent ¹⁾ 0		+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13		100.0	-
TBP 0.025		+	6-(18)	200	1	0	0	1	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		91.5	-
TBP 0.050		+	6-(18)	200	0	0	2	1	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38	+	78.5	-
TBP 0.10		+	6-(18)	200	1	19	84	11	0	20	135	2	47*(23.0)	46*(23.0)	0.13		40.5	11.7
TBP 0.20***		+	6-(18)	-													24.5	Tox
CPA 0.005		+	6-(18)	200	0	6	19	4	0	0	29	1	25*(12.5)	25*(12.5)	0.00		-	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), 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, Tox: cytotoxicity.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. 7) Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose able to analyse chromosomes. *: Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test. **: Purity was more than 99.8%.

***: Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphases due to cytotoxicity.

2,4,6-トリブロモフェノールのラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2,4,6-Tribromophenol by Oral Administration in Rats

要約

2,4,6-トリブロモフェノールの100, 300および1000 mg/kgをSD系(Crj:CD)のラットの交配前2週間および交配期間の2週間を通じて経口投与し、さらには雄では交配期間終了後20日間、雌では妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで連続投与し、親動物の反復投与毒性および生殖能ならびに児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

1. 反復投与毒性

雌雄いずれの群にも死亡動物は観察されなかった。一般状態の観察で雌雄の300 mg/kg以上の投与群では被験物質投与後に流涎が認められた。また、雌雄の1000 mg/kg群で体重増加抑制および摂餌量の低値が認められた。雄の血液学検査および血液凝固能検査には被験物質投与の影響は認められなかった。雄の血液生化学検査では300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し、1000 mg/kg群で総タンパク、アルブミン、A/G、ALPおよび塩素が有意な高値を、BUNが高値傾向を、カリウムが有意な低値を示した。

器官重量では雌雄の1000 mg/kg群で肝臓および腎臓重量が高値を示し、雄の同群で胸腺重量が低値を示した。

剖検では雄の1000 mg/kg群で肝臓の肥大が観察され、病理組織学検査では肝細胞肥大の発生率が増加し、肝臓の脂肪化の発生率が減少した。また、雄の同群に腎乳頭壊死、尿細管拡張、リンパ球浸潤、尿細管の好塩基化および硝子円柱が認められた。

2. 生殖発生毒性

平均性周期、交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。分娩時観察では妊娠動物の全例が正常に分娩し、妊娠期間にも被験物質投与の影響は認められなかった。妊娠黄体数、着床痕数、出産児数、出生児数、着床率および分娩率に明らかな被験物質投与の影響は認められなかった。1000 mg/kg群で雌雄の新生児の哺育0および4日体重、哺育4日の生児数および生存率が低値を示し、被験物質投与による出生前後の新生児の発育抑制および生存性に対する影響が示唆された。新生児の外表面、死亡児および哺育4日の剖検でも被験物質投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では2,4,6-トリブロモフェノールの反復投与により投与後の一般状態の変化で

雌雄の300 mg/kg以上の投与群で流涎が観察され、雌雄ともに1000 mg/kg群で体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められた。さらに、雄の血液生化学検査で300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し、1000 mg/kg群の病理学検査および血液生化学検査において、被験物質投与による主として肝臓および腎臓に及ぼす影響が示唆される変化が認められた。したがって、雌雄とも無影響量(NOEL)は100 mg/kg/dayと判断された。雌雄の生殖能に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与でも認められず、無影響量は1000 mg/kg/dayと判断された。児動物の発生・発育に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与で発育抑制が認められ、哺育4日生児数および生存率が低値を示したことから無影響量は300 mg/kg/dayと判断された。

方法

1. 被験物質

2,4,6-トリブロモフェノール [マナック(株)製造(広島), Lot No. 70909, 純度99.8 wt%] は、白色のフレーク状の粉末であり、使用時まで直射日光を避け、適当な換気のある冷暗所に保管した。本ロットは投与期間中安定であったことを確認した。

被験物質は、トウモロコシ油 (Lot No. V7P1509, V7R2400, ナカライテスク(株)製造) に溶解し、20, 60 および200 mg/mLの濃度になるよう投与液を調製した。調製後は、使用時まで冷暗条件下で密閉保管した。投与液中の被験物質は、20および200 mg/mLについて、調製後遮光下冷蔵庫保存で8日目まで安定であることが予備試験において確認されているため、調製後8日以内に使用した。

投与液の濃度確認のため全試験群について、調製開始時に調製した投与液から無作為にサンプルを抽出し、投与液中の被験物質濃度の分析を実施した。その結果、投与液中の平均濃度は100.5~100.7%の濃度範囲で調製されていた。したがって、投与液はほぼ所定量の2,4,6-トリブロモフェノールが含有されていることを確認した。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバー(株)(神奈川)から購入した生後8週齢のSprague-Dawley(Crj:CD(SD), SPF)系雌雄ラットを使用した。購入した動物は7日間検査・馴化飼育した後、一般状態に異常が認められなかったものを10週齢で群分けして試験に用いた。群分け

終了時の体重は、雄で361～397 g、雌で233～258 gの範囲であった。

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

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

3. 群分け

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

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本被験物質の製品安全データシート(MSDS)に経口投与によるラットの LD_{50} が2000 mg/kg以上であり、2000 mg/kgのラットを用いた14日間経口投与試験で特異的な病理学的所見は認められなかったことが報告されている。この情報に基づき、0、30、100、300および1000 mg/kgの用量で予備試験「2,4,6-トリブプロフェノールのラットを用いる反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験-2週間投与予備試験」を実施した。その結果、1000 mg/kg群で雄の1例が投与2日に死亡した。一般状態の変化として、流涎が雌雄ともに300および100 mg/kg群で観察された。また、1000 mg/kg群の雌雄に体重増加抑制傾向が認められ、同群の雌雄で投与1から3日の平均1日摂餌量が低値を示した。

雄の血液学検査では変化は認められなかったが、血液生化学検査では1000 mg/kg群でアルブミン、A/GおよびGPTが高値を示した。

剖検では、被験物質投与の影響と考えられる所見は認められなかった。

剖検時の器官重量では、1000 mg/kg群で雌雄ともに肝臓の絶対および相対重量が高値を示した。さらに、雄の1000 mg/kg群で肺および腎臓の相対重量が高値を示した。

以上の結果から、本試験の最高用量を明らかな毒性兆候が現れることが予想される1000 mg/kgに設定し、以下公比約3で除し、300および100 mg/kgを設定した。

投与容量は、体重100 g当り0.5 mLとし、交配前および交配期間中の雌雄では、個体別に測定した最新体重に基づいて算出を行った。また、妊娠期間および哺育期間中の雌は、妊娠0、7、14、21および哺育0日に測定した個体別体重に基づいて算出を行った。胃ゾンデを用いて毎日1回(7日/週)強制経口投与した。対照群にはトウモロコシ油のみを同様に投与した。雄の投与期間は、交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後20日間の連続48日間とした。雌の投与期間は、交配前14日

間と交配期間中(最長14日間)ならびに交尾成立雌の妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで(41～45日間)とした。なお、交尾不成立の雌は交配期間終了後20日間の連続48日間とした。

5. 観察および検査

1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

2) 体重

雄では、投与1(投与開始日)、8、15、22、29、36、43および49日(剖検日)に測定し、投与1から43日までの体重増加量を算出した。

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

3) 摂餌量

雄では、投与1(投与開始日)、8、15、22、29、36、43および48日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日および投与22から48日までの累積摂餌量を算出した。

雌では、投与1(投与開始日)、8および15日に測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日までの累積摂餌量を算出した。また、交尾成立の雌は妊娠0、7、14および21日に、分娩した雌は哺育0および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め、平均1日摂餌量を算出するとともに妊娠0から21日までの累積摂餌量を算出した。なお、交配期間中の摂餌量は測定しなかった。

4) 交配

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

5) 自然分娩時および新生児の観察

妊娠動物は全例を自然分娩させた。分娩の確認は午前9～10時に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した個体についてその日を哺育0日とした。午前10時を過ぎて分娩が完了した個体については、翌日を哺育0日とした。分娩を確認した全例について妊娠期間(哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数)、受胎率 $[(\text{受胎動物数}/\text{交尾動物数}) \times 100]$ 、出産率

[(生児出産雌数/妊娠雌数)×100], 着床率 [(着床痕数/妊娠黄体数)×100], 分娩率 [(総出産児数/着床痕数)×100], 出生率 [(出産生児数/総出産児数)×100] を算出した。

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

哺育4日の新生児の同腹児重量を測定後に新生児全例をエーテル麻酔により安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った。なお、哺育期間中の死亡児についても同様に器官・組織の肉眼観察を行った。また、新生児の4日の生存率 [(哺育4日生児数/出産生児数)×100] を求めた。

6) 臨床検査

各群の雄全例について剖検時に実施した。動物を最終投与日(投与期間:48日間)の夕方から翌朝まで約16時間絶食させた後、エーテル麻酔下で開腹し、腹部大動脈から採血した。

a) 血液学検査

検査はEDTA-2Kを添加した初血について、THMS H・1E(米国マイルス社)を用いて白血球数(WBC:暗視野板法)、赤血球数(RBC:暗視野板法)、ヘマトクリット値(HCT:RBC, MCVより算出)、ヘモグロビン量(HGB:シアンメトヘモグロビン法)、平均赤血球容積(MCV:暗視野板法)、平均赤血球血色素量(MCH:HGB, RBCより算出)、平均赤血球血色素濃度(MCHC:HGB, HCTより算出)、血小板数(PLT:暗視野板法)および白血球百分率(フローサイトケミストリー法)を測定した。白血球百分率は前述の機器で測定したが、別途血液塗末標本を作製し、メイ・グリュンワルド・ギムザ染色して保管した。網赤血球(RC)比率の算定については、EDTA-2K添加血液をニューメチレンブルーで染色後、血液塗末標本を作製した。高用量群で貧血傾向が認められたため、全群全例の標本の観察を行った。

b) 血液凝固能検査

検査にはクエン酸ソーダ添加血液を3000 r.p.m., 13分間遠心分離して得た血漿について、血液凝固測定装置KC-40(独国アメルング社)を用いてプロトロンビン時間(PT:Quick 1段法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT:クロット法)およびフィブリノーゲン量(Fibrinogen:トロンビン時間法)を測定した。

c) 血液生化学検査

検査は採血管に血液を採取、30分間静置後3000 r.p.m. 7分間遠心分離して得た血清について、多項目生化学自動分析装置CentrifChem ENCORE II(米国ベーカー社)およびEKTACHEM 700N(米国コダック社)を用いて総蛋白(ビュレット法)、アルブミン(B.C.G.法)、A/G(計算値)、血糖(グルコースオキシダーゼ法)、中性脂肪(酵素色素法)、総コレステロール(コレステロールオキシダーゼ法)、尿素窒素(ウレアーゼアンモニウム指示薬法)、クレアチニン(Jaffé法)、総ビリルビン(ジア

ゾ法)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(IFCC法)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(IFCC法)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(Orlowski法)、ナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)、塩素(電極法)、カルシウム(アルセナゾIII法)および無機リン(モリブデン酸青法)を測定した。

7) 病理学検査

a) 剖検および器官重量

① 雄動物

48日間投与した日の夕方から、約16時間絶食をさせた後エーテル麻酔下で採血し安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体重量を測定し器官重量・体重比(相対重量)を算出した。また、全動物の重量測定器官に加えて心臓、精囊、前立腺、下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として皮膚を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、精巣および精巣上体はブアン氏液で固定した。

② 雌動物

哺育4日にエーテル麻酔下で放血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および卵巣重量を測定し相対重量を算出した。また、全動物の重量測定器官に加えて心臓、下垂体および肉眼所見として変化が認められた器官・組織として肺および皮膚を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。また、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

③ 交尾しなかった雌

48日間投与した翌日、エーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、脾臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

④ 哺育期間中に全児が死亡した母動物(全児死亡動物)

生存児すべての死亡または喰殺が確認された日にエーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨(骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、肝臓、脾臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、膣、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。なお、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

b) 病理組織学検査

① 全児死亡動物

全児死亡動物(雌の1000 mg/kg群の1例)の皮膚、乳

腺, リンパ節, 唾液腺, 胸骨, 大腿骨(骨髄を含む), 胸腺, 気管, 肺および気管支, 心臓, 甲状腺および上皮小体, 舌, 食道, 胃, 十二指腸, 小腸, 大腸, 肝臓, 脾臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 卵巣, 子宮, 陰, 眼球, ハーダー腺, 脳, 下垂体および脊髄について実施した。

② 妊娠を成立させた雄

対照群と高用量群では脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 精巣および精巣上体について実施し, 加えて, 1000 mg/kg群の1例の腹膜および1例の皮下についても実施した。また, 低および中用量群では胸腺, 肝臓および腎臓について実施した。

③ 自然分娩した雌

対照群と高用量群では脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎および卵巣について実施し, 加えて, 対照群の1例の皮膚, 1000 mg/kg群の1例の皮膚および1例の肺についても実施した。また, 低および中用量群では肝臓について実施した。

④ 交尾しなかった雄雌

対照群の雌雄各1例の脳, 胸腺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 陰, 子宮, 卵巣, 精巣, 精巣上体, 精囊, 前立腺, 下垂体について実施した。

6. 統計解析

体重, 摂餌量, 黄体数, 着床痕数, 出産児数, 死産児数, 性比, 平均性周期, 妊娠期間, 着床率, 分娩率, 出生率, 外表異常発現率, 新生児の4日の生存率, 器官重量, 相対重量, 血液学および血液生化学検査値については多重比較検定¹⁻³⁾を行った。

出産率, 交尾率および受胎率については χ^2 検定^{4,5)}を用いた。病理学検査の所見の発生率については, Fisherの直接確率検定法⁶⁾を用いて検定し, グレードのある所見は, -を「1」, +1を「2」, +2を「3」および+3を「4」に割り当てた後, 順位和検定であるMann-WhitneyのU検定⁷⁾を用いて検定した。なお, 哺育期間中の新生児に関する成績は1母体当りの平均を1標本とした。有意水準は*: $P<0.05$ および**: $P<0.01$ の2段階とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡および一般状態

1000 mg/kg群で哺育4日に全児死亡動物が1例(動物番号2306)認められた。

一般状態の観察では, 主な投与後の症状として流涎が雌雄の300および1000 mg/kg群で観察された。この症状は投与期間を通じて雄の300 mg/kg群で複数例に, 1000 mg/kg群で全例にほぼ毎日継続して観察され, 雌の300 mg/kg群で複数例に散発的に, 1000 mg/kg群で全例にほぼ毎日継続して観察された。症状の発現は, 投与後約5分から認められ, 30分後には消失した。また,

1000 mg/kg群で体表面の腫瘍(鼻部)および皮下部の腫瘍(口唇部)が各1例認められたが, それぞれ単発性の発現であり, 体表面の腫瘍は剖検日までに消失した。皮下部の腫瘍は組織学的には膿瘍であった。これらのことから被験物質投与との関連はないものと考えられた。

その他, 雄では脱毛が100 mg/kg群で1例, 被毛の汚れが1000 mg/kg群で2例, 痂皮が対照群で1例, 投与前の流涎が対照群で1例, 歯異常(上顎切歯折れ)が300 mg/kg群で1例にそれぞれ観察された。雌では交配前・交配期間中に脱毛が対照群および1000 mg/kg群で1および2例, 痂皮が300 mg/kg群で1例, 妊娠期間中に脱毛が対照群, 100および1000 mg/kg群で1, 1および3例, 哺育期間中に脱毛が対照群, 100および1000 mg/kg群で1, 1および2例にそれぞれ観察された。これらの所見はしばしば対照群でも認められるものであり, 被験物質投与の影響とは考えなかった。

2) 体重(Fig. 1, 2)

雄では, 対照群に比べて1000 mg/kg群で投与8日以降, 統計学的に有意な低値を示し, 同群の投与1から43日の体重増加量も有意な低値を示した。

雌では交配前の投与期間には対照群と被験物質投与群の間に有意な差は認められなかったが, 妊娠期間において対照群に比べ1000 mg/kg群で妊娠7日以降有意な低値を示し, 同群の妊娠0から21日の体重増加量も有意な低値を示した。また, 哺育期間においても対照群に比べて1000 mg/kg群で哺育4日に有意な低値を示し, 哺育0から4日の体重増加量も低値傾向を示した。

3) 摂餌量(Fig. 3, 4)

雄では, 対照群に比べて1000 mg/kg群で投与1から8日の平均1日摂餌量が統計学的に有意な低値を示した。

雌では交配前の投与期間に對照群に比べ1000 mg/kg群で投与1から8日の平均1日摂餌量が有意な低値を示し, また, 哺育0から4日の平均1日摂餌量が低値傾向を示した。妊娠期間中は, 対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

4) 雄の血液学検査(Table 1)

血液学検査ではいずれの検査項目についても対照群と被験物質投与群の間に統計学的に有意な差は認められなかった。血液凝固能検査では1000 mg/kg群でプロトロンビン時間が対照群に比べ有意な延長を示したが, 軽微な変化であり毒性学的意義の乏しいものと考えられた。

5) 雄の血液生化学検査(Table 2)

対照群に比べ300および1000 mg/kg群でクレアチニンが統計学的に有意な高値を示した。また, 1000 mg/kg群で総タンパク, アルブミン, A/G, ALPおよび塩素が有意な高値を, BUNが高値傾向を, 総ビリルビンおよびカリウムが有意な低値を示した。その他の検査項目では対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

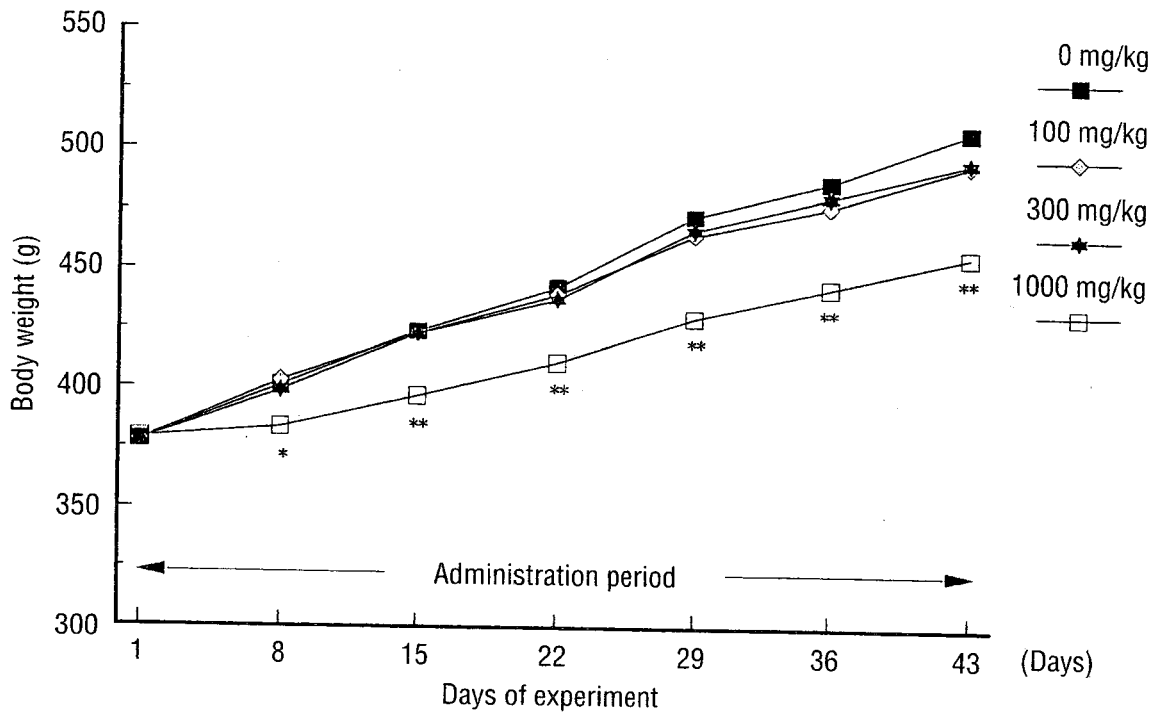


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

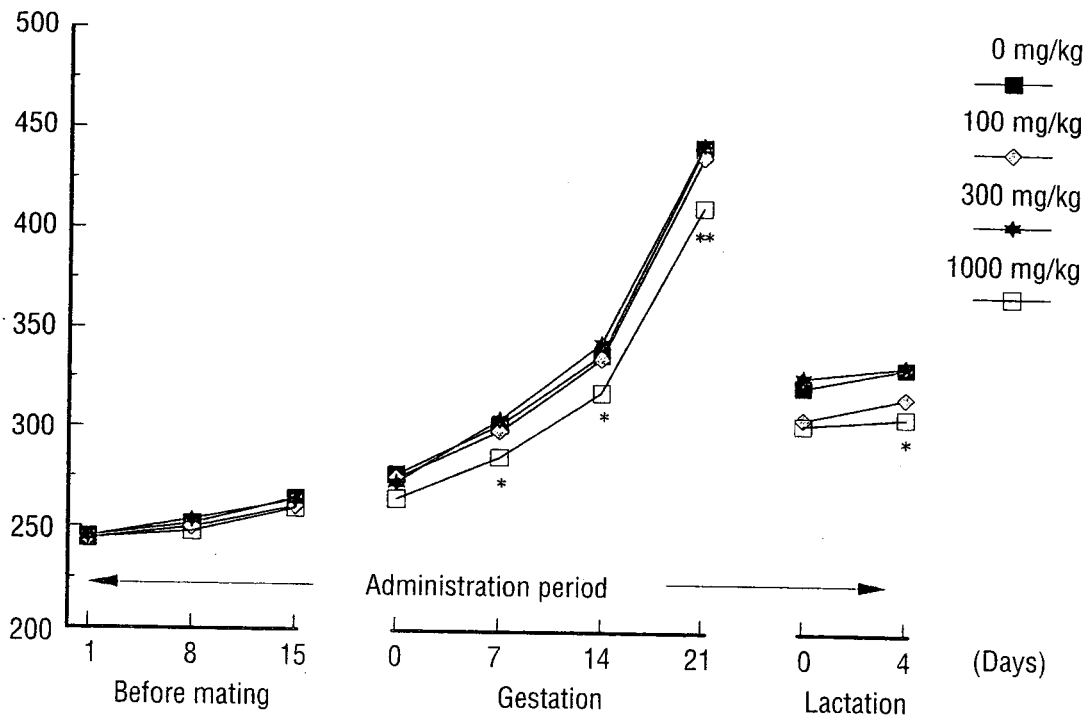


Fig. 2 Body weight change of female rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

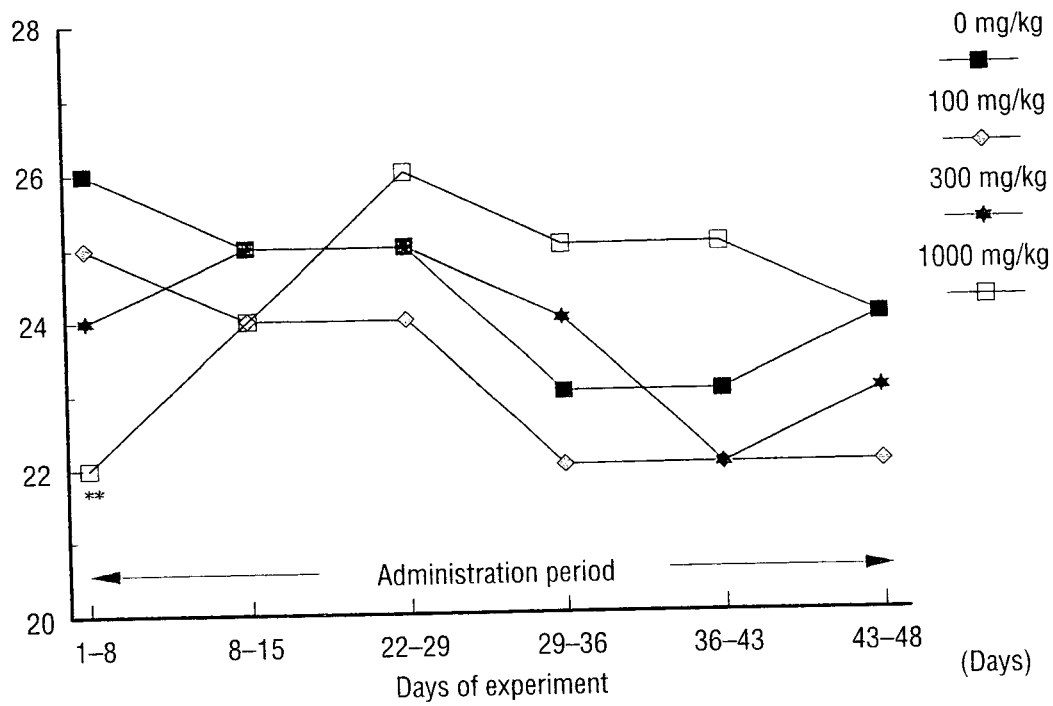


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

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

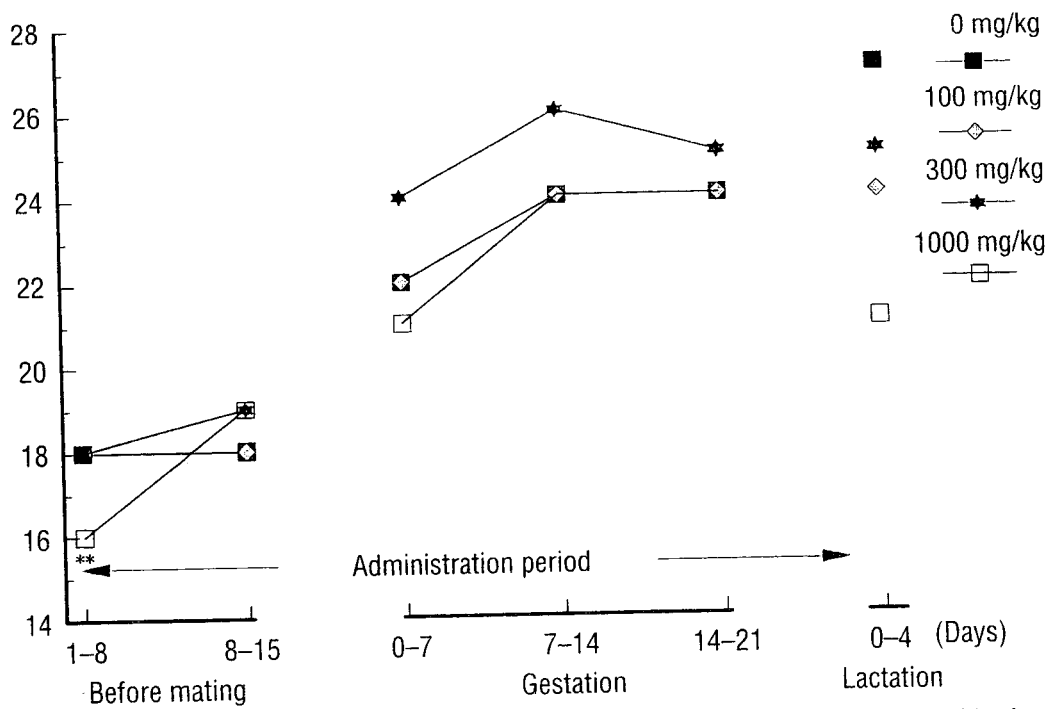


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

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

6) 器官重量 (Table 3)

雌雄ともに対照群に比べ1000 mg/kg群で肝臓の絶対および相対重量, 脳, 腎臓および副腎の相対重量が統計学的に有意な高値を示した。さらに雄では1000 mg/kg群で胸腺の絶対重量が有意な低値を, 精巣の相対重量が有意な高値を示した。

7) 剖検所見

1000 mg/kg群の1例に認められた全児死亡動物(動物番号 2306)には異常所見は認められなかった。

雄では, 1000 mg/kg群で胸腺の萎縮が4例, 肝臓の肥大が3例観察された。その他, 1000 mg/kg群で腎臓の白色斑点および副腎の肥大が各2例に観察され, 胸腺の赤色斑点, 肝臓の白色斑点, 皮下の塊, 腹腔の塊, 精巣上体の結節および被毛の菲薄化が300 mg/kg群を除く各群に単発性に観察された。

雌では, 胸腺の赤色斑点, 肺の褐色斑点, 肝臓の肥大, 癍痕および白色斑点, 卵巣の嚢胞, 子宮の内腔拡張, 副腎の肥大および被毛の菲薄化が対照群を含む各群に1ないし少数例に観察された。

交尾しなかった動物は対照群で雌雄各1例であった。雄では異常所見は認められず, 雌では脾臓の表面粗および結節, 肺の褐色斑点および子宮の内腔拡張が観察された。

8) 病理組織学検査 (Table 4, 5)

1000 mg/kg群の全児死亡動物では, 脾臓の色素沈着, 肺の細胞浸潤, 肝臓の脂肪化および子宮の小肉芽腫が観察された。

雄では, 1000 mg/kg群で胸腺の萎縮が3例, 肝細胞肥大が12例, 腎臓の硝子円柱が8例, 尿管拡張が7例, 腎乳頭壊死が5例, リンパ球浸潤が6例に発生し, 対照群と比べて統計学的に有意な発生率の増加が認められた。また, 肝臓の脂肪化が対照群で6例の発生に対し, 1000 mg/kg群では認められず有意な減少を示した。さらに腎尿管の好塩基化が対照群, 100, 300および1000 mg/kg群でそれぞれ8(全例軽度), 9(全例軽度), 9(軽度8, 中等度1)および12例(軽度8, 中等度4)観察され, 発生率に有意差は認められなかったが1000 mg/kg群で程度の増強が認められた。一方, 100 mg/kg群で腎臓の好酸性小体の発生率に有意な高値が認められたが, 用量に関連した発現の増加および程度の増強は認められなかった。脾臓の色素沈着, 胸腺の出血, 肝臓の小肉芽腫および副腎束状帯の空胞変性が対照群を含め比較的多く観察されたが発生率に有意な変化は認められなかった。なお, 1000 mg/kgの雄の1例に認められた皮下の塊は, 組織学的には膿瘍であった。その他, 観察された所見は単発性あるいは少数例の発生であった。

雌で認められた所見はいずれも単発性の変化かあるいは群間の発生率に差がない変化であった。

交尾しなかった動物では, 雌雄に共通して脾臓の色素沈着および腎臓のリンパ球浸潤が認められ, その他雄では肝臓のリンパ球浸潤, 腎臓の尿管の好塩基化および

副腎の血管拡張ならびに束状帯の空胞変性, 雌では脾臓の包膜炎, 肺炎, 肝臓の小肉芽腫, 腎臓の腎盂炎, 子宮の内腔拡張および細胞浸潤が観察された。

2. 生殖発生毒性

1) 交尾および受胎能 (Table 6)

交尾は対照群を除くすべての被験物質投与群で全例成立した。対照群では1組が交尾不成立であり, 交尾率は91.7%であった。受胎はすべての群の交尾成立雌で成立した。

性周期観察では, いずれの群もほぼ4~5日の性周期を示し平均性周期に群間差は認められなかった。

2) 分娩および哺育 (Table 7)

1000 mg/kg群で対照群に比べ妊娠期間が統計学的に有意な低値を示したが, 個体別の妊娠期間はすべて22日であり, 正常の範囲内であった。また, 同群で対照群に比べ哺育4日の生児数が雌雄ともに有意な低値を示し, 哺育4日の生存率も雌雄ともに有意な低値を示した。その他, 分娩状態には異常が観察されず, 対照群を含む各群の黄体数, 着床痕数, 出産生児数および死産児数はほぼ同様な値を示し, 出産率, 着床率, 分娩率および出生率に群間差は認められなかった。

3) 新生児の形態, 体重および剖検所見

新生児の外表検査では, 100 mg/kg群で鎖肛および無尾が同一個体の1例に, 300 mg/kg群で鎖肛および痕跡尾が同一個体の1例にそれぞれ観察された。

哺育期間中の体重では, 哺育0および4日に対照群に比べ1000 mg/kg群で雌雄とも統計学的に有意な低値を示した。死亡児の剖検では, 右鎖骨下動脈起始異常が100および1000 mg/kg群で1および3例観察された。その他, 腎盂拡張が100 mg/kg群の1例, 脳低形成および食道位置異常が300 mg/kg群の同一個体の1例, 小眼球が1000 mg/kg群の1例にそれぞれ観察された。哺育4日の剖検で, 雄では胸腺頸部残留が対照群, 100および300 mg/kg群でそれぞれ3, 2および1例観察された。また, 肝臓の白色斑点が対照群および1000 mg/kg群で各1例に観察された。その他, 肝臓の赤色斑点, 黒色斑点および淡色が300あるいは1000 mg/kg群で1から2例に観察された。雌では胸腺頸部残留が対照群, 100および1000 mg/kg群でそれぞれ2, 1および1例に観察された。また, 肝臓の白色斑点が100および1000 mg/kg群で1および4例に観察され, 対照群に比べて1000 mg/kg群で有意な発生率の高値を示した。その他, 肝臓の赤色斑点, 黒色斑点および緑色, 鎖肛, 眼球の赤色, 尾の欠損, 痕跡尾および痂皮が被験物質投与群で単発性に散見された。

考察

1. 反復投与毒性

死亡例は, 投与期間を通じ雌雄いずれの群にも認めら

れなかった。

一般状態の観察では、流涎が投与期間を通じ雌雄ともに300 mg/kg以上の被験物質投与群で認められた。この症状は用量に対応して発現頻度が増強し、被験物質投与に関連した変化と考えられた。

体重は、雌雄ともに1000 mg/kg群で増加抑制が認められ、摂餌量についても雌雄ともに同群で投与開始直後低値を示し、被験物質投与の影響が示唆された。

雄の血液学検査および血液凝固能検査には被験物質投与の影響は認められなかった。

雄において、1000 mg/kg群で肝臓重量が高値を示し、剖検でも肝臓の肥大が観察された。また、病理組織学検査においても肝細胞肥大の発生率は増加を示したのに対し、肝臓の脂肪化は発生率の減少が観察され、肝臓に対する被験物質投与の影響が認められた。また、同群で腎臓重量が高値を示し、病理組織学検査で腎乳頭壊死、尿細管拡張、リンパ球浸潤、尿細管の好塩基化および硝子円柱が認められた。腎乳頭壊死は鎮痛剤および非ステロイド系抗炎症剤の投与により実験的に誘発されることが知られており^{6,7)}、本試験においても尿細管の好塩基化や硝子円柱の程度の強いものに腎乳頭壊死および尿細管拡張が観察されていることから、被験物質による尿細管の障害とともに尿濃縮による腎乳頭への障害が考えられた。また、血液生化学検査においても300および1000 mg/kg群でクレアチニンが、また、1000 mg/kg群でBUNの高値が認められ、腎障害が示唆された。その他、血液生化学検査で1000 mg/kg群に認められた総タンパク、アルブミン、A/G、ALP、塩素およびカリウムの変化も肝臓あるいは腎臓に対する被験物質の影響を反映するものと考えられた。同群で認められた総ビリルビンの減少は毒性学的意義が乏しいものと考えられるため被験物質投与の影響とは判断しなかった。1000 mg/kg群で観察された胸腺の萎縮は、組織学的には皮質および髄質領域の萎縮であり、器官重量にも低値が認められていることから被験物質投与の影響と考えられた。

雌においても1000 mg/kg群で肝臓および腎臓重量が高値を示し、剖検で肝臓の肥大が観察され、肝臓および腎臓に及ぼす被験物質投与の影響が示唆された。しかし、病理組織学検査では影響を示唆する変化は認められず、雄に比べ雌に対する被験物質投与の影響は軽度なものと考えられた。

その他、雌雄の1000 mg/kg群で脳、副腎および精巣重量の高値が認められたが、病理組織学検査では相当する所見は認められず、相対重量のみの変化であることから同群の低体重に起因する二次的な変化と考えられた。

以上のことから、2,4,6-トリプロモフェノールの反復投与により投与後の一般状態の変化で雌雄の300 mg/kg以上の投与群で流涎が観察された。また、雌雄とも1000 mg/kg群で体重の増加抑制および摂餌量の低値が認められた。さらに、雄の血液生化学検査で300 mg/kg以上の投与群でクレアチニンが高値を示し、1000 mg/kg群の病理学検査および血液生化学検査において、被験物質投与による主として肝臓および腎臓に及ぼす影

響が示唆される変化が認められた。したがって、雌雄とも無影響量は100 mg/kg/dayと判断された。

2. 生殖発生毒性

性周期、交尾能および受胎能に被験物質投与の影響は認められなかった。交尾しなかった動物の病理学検査では生殖器系に特異的な変化は認められなかった。分娩時観察では妊娠動物の全例が正常に分娩し、妊娠期間にも被験物質投与の明らかな影響は認められなかった。1000 mg/kg群で雌雄の新生児の哺育0および4日の体重が低値を示し、哺育4日の生児数および生存率が低値を示したことから、被験物質投与による出生前後の新生児の発育抑制および生存性に対する影響が示唆された。なお、1000 mg/kg群で全児死亡動物が1例観察されたが、病理学検査の結果からは母動物には被験物質投与の影響と考えられる所見は認められなかった。しかし、前述のごとく新生児の哺育4日の生存率が明らかな低値を示していることから、新生児に対する本被験物質の影響に起因したものと考えられた。その他、出産率、出生率に被験物質投与の影響は認められず、新生児の外表面にも被験物質投与の影響は認められなかった。また、死亡児の剖検で1000 mg/kg群に認められた右鎖骨下動脈起始異常{Crj:CD(SD)胎児の背景値⁸⁾ [12施設分:施設間の変動(施設内変動)] :0.03~0.63%(0~4.55%)}は3例中2例が同腹児の発現であり、被験物質投与との関連は明らかではなかった。哺育4日の剖検では雌の1000 mg/kg群で肝臓の白色斑点の発生率が増加を示したが、母動物2例から各2例の発現であり、雄ではこの所見は対照群でも認められ、発生率の増加も認められないことから被験物質投与の影響とは考えなかった。

以上のことから、2,4,6-トリプロモフェノールの雌雄の生殖に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与でも認められず、無影響量は1000 mg/kg/dayと判断された。

児動物の発生・発育に及ぼす影響は1000 mg/kg/day投与で発育抑制が認められ、哺育4日生児数および生存率が低値を示したことから無影響量は300 mg/kg/dayと判断された。

文献

- 1) S. Gad and C. S. Weil, "Statistics and Experimental Design For Toxicologists," Telford Press, New Jersey, 1986, pp. 43-45.
- 2) 佐野正樹, 岡山佳弘, 医薬安全性研究会会報, 32, 21(1990).
- 3) M, Yoshida, *J. Japanese Soc. Comp. Statist.*, 1, 111(1988).
- 4) 佐久間昭, "薬効評価-計画と解析-I," 東京大学出版会, 東京, 1977, pp. 109-117.
- 5) 石居進, "生物統計学入門," 培風館, 東京, 1975, pp. 78-107.
- 6) 高橋道人監訳, "毒性病理学の基礎," ソフトサイエンス社, 東京, 1992, pp. 59-152.

- 7) C. Gopinath, D. E. Prentice and D. J. Lewis, "Atlas of Experimental Toxicological Pathology," MTP Press Limited, Lancaster, 1987, pp. 77-90.
- 8) T. Nakatsuka et al., *Cong. Anom.*, **37**, 47-138 (1997).

連絡先

試験責任者：田中亮太
試験担当者：山田るみ，大庭耕輔，伊賀達也，
三上真一
(財)食品農医薬品安全性評価センター
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜
582-2
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Ryota Tanaka (Study director)
Rumi Yamada, Kousuke Oba,
Tatsuya Iga, Shinichi Mikami
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shiohinden, Arahama, Fukude-cho, Iwata-
gun, Shizuoka, 437-1213, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Hematology and coagulation of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
HCT(%)	44.1 ± 1.6	44.6 ± 1.1	44.1 ± 1.9	43.6 ± 1.9
HGB(g/dL)	15.3 ± 0.4	15.5 ± 0.4	15.3 ± 0.6	15.1 ± 0.7
RBC(× 10 ⁶ /mm ³)	8.23 ± 0.34	8.35 ± 0.19	8.23 ± 0.30	8.16 ± 0.48
MVC(μm ²)	53.7 ± 1.5	53.4 ± 1.2	53.7 ± 1.6	53.5 ± 1.6
MCH(pg)	18.6 ± 0.6	18.6 ± 0.5	18.6 ± 0.6	18.5 ± 0.7
MCHC(%)	34.6 ± 0.6	34.8 ± 0.6	34.7 ± 0.3	34.5 ± 0.5
PLT(× 10 ³ /mm ³)	1090 ± 115	1100 ± 111	1024 ± 116	1093 ± 124
WBC(× 10 ³ /mm ³)	9.3 ± 3.0	9.7 ± 3.8	9.5 ± 3.2	8.6 ± 2.2
Differential leukocyte counts(%)				
NEUT	15 ± 4	16 ± 6	16 ± 5	18 ± 6
LYMPH	80 ± 4	80 ± 7	80 ± 5	78 ± 7
MONO	3 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 1
EOSN	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1
PT(sec.)	14.2 ± 0.7	14.6 ± 0.5	15.0 ± 1.1	15.6 ± 1.2**
APTT(sec.)	24.8 ± 1.9	24.5 ± 2.0	25.3 ± 2.0	26.7 ± 2.6
Fibrinogen(mg/dL)	222 ± 16	208 ± 13	214 ± 19	240 ± 35

NEUT:Neutrophil LYMPH:Lymphocyte MONO:Monocyte EOSN:Eosinophil BASO:Basophil

LUC:Large unstained cells

Values are expressed as Mean±S.D.

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

Table 2 Blood chemistry chemical examination of male rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
T. protein(g/dL)	5.87 ± 0.22	5.84 ± 0.14	5.95 ± 0.26	6.45 ± 0.51**
Albumin(g/dL)	3.36 ± 0.13	3.33 ± 0.09	3.39 ± 0.19	3.88 ± 0.29**
A/G	1.34 ± 0.06	1.33 ± 0.09	1.33 ± 0.10	1.51 ± 0.08**
Glucose(mg/dL)	152 ± 25	157 ± 21	157 ± 18	149 ± 14
Triglyceride(mg/dL)	49.4 ± 17.9	47.7 ± 14.6	55.6 ± 28.8	62.0 ± 33.7
T. cholesterol(mg/dL)	61 ± 14	60 ± 14	54 ± 15	57 ± 14
BUN(mg/dL)	13.3 ± 1.4	13.6 ± 2.1	13.2 ± 2.3	20.9 ± 11.4
Creatinine(mg/dL)	0.27 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.33 ± 0.07*	0.47 ± 0.26**
T. bilirubin(mg/dL)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01**
GOT(U/L)	77 ± 10	77 ± 13	72 ± 7	71 ± 8
GPT(U/L)	32 ± 5	34 ± 7	29 ± 4	38 ± 7
ALP(U/L)	354 ± 74	440 ± 162	342 ± 102	514 ± 155*
γ-GTP(U/L)	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2
Sodium(mmol/L)	141.3 ± 1.2	141.5 ± 0.8	141.5 ± 0.7	141.9 ± 1.3
Potassium(mmol/L)	4.46 ± 0.29	4.40 ± 0.25	4.38 ± 0.30	4.03 ± 0.25**
Chloride(mmol/L)	106.6 ± 1.2	107.6 ± 1.1	107.8 ± 1.5	119.0 ± 3.6**
Calcium(mg/dL)	9.58 ± 0.51	9.38 ± 0.23	9.47 ± 0.27	9.88 ± 0.34
I. phosphorus(mg/dL)	6.31 ± 0.64	5.91 ± 0.52	5.68 ± 0.58	7.28 ± 1.24

Values are expressed as Mean±S.D.

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

Table 3 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Male				
No. of animals examined	12	12	12	12
Body weight (g)	492 ± 34	478 ± 31	478 ± 36	422 ± 25
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.25 ± 0.08	2.22 ± 0.08	2.25 ± 0.08	2.20 ± 0.06
Thymus (mg)	299 ± 81	269 ± 52	269 ± 66	201 ± 57**
Liver (g)	13.99 ± 1.72	13.18 ± 1.31	14.20 ± 1.99	16.23 ± 2.32*
Spleen (g)	0.73 ± 0.14	0.69 ± 0.09	0.73 ± 0.09	0.63 ± 0.10
Kidneys (g)	3.34 ± 0.36	3.15 ± 0.17	3.23 ± 0.31	3.47 ± 0.37
Adrenals (mg)	60 ± 7	56 ± 6	64 ± 7	64 ± 6
Testes (g)	3.55 ± 0.32	3.50 ± 0.25	3.47 ± 0.32	3.35 ± 0.25
Epididymides (mg)	1319 ± 75	1220 ± 124	1341 ± 109	1235 ± 111
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.460 ± 0.042	0.465 ± 0.033	0.473 ± 0.041	0.522 ± 0.032**
Thymus (mg%)	60.382 ± 14.897	56.587 ± 12.134	56.483 ± 13.955	47.291 ± 12.204
Liver (g%)	2.834 ± 0.218	2.751 ± 0.152	2.964 ± 0.285	3.837 ± 0.447**
Spleen (g%)	0.149 ± 0.023	0.144 ± 0.016	0.152 ± 0.016	0.149 ± 0.020
Kidneys (g%)	0.678 ± 0.054	0.661 ± 0.053	0.679 ± 0.083	0.824 ± 0.101**
Adrenals (mg%)	12.257 ± 1.299	11.807 ± 1.277	13.494 ± 1.966	15.304 ± 1.697**
Testes (g%)	0.721 ± 0.062	0.733 ± 0.067	0.729 ± 0.080	0.794 ± 0.046*
Epididymides (mg%)	268.582 ± 16.867	256.085 ± 31.810	281.498 ± 26.289	292.996 ± 27.221
Female				
No. of animals examined	11	12	12	11
Body weight (g)	332 ± 16	317 ± 27	333 ± 22	307 ± 15
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.03 ± 0.06	2.07 ± 0.10	2.00 ± 0.10	2.04 ± 0.05
Thymus (mg)	157 ± 46	134 ± 48	168 ± 75	137 ± 32
Liver (g)	13.70 ± 0.80	13.48 ± 2.07	14.39 ± 1.76	15.74 ± 1.28**
Spleen (g)	0.60 ± 0.09	0.64 ± 0.10	0.61 ± 0.13	0.57 ± 0.09
Kidneys (g)	2.15 ± 0.20	2.18 ± 0.11	2.22 ± 0.19	2.36 ± 0.25
Adrenals (mg)	77 ± 7	82 ± 11	87 ± 15	84 ± 8
Ovaries (mg)	108 ± 30	111 ± 15	98 ± 11	94 ± 12
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.613 ± 0.034	0.657 ± 0.067	0.602 ± 0.038	0.665 ± 0.025*
Thymus (mg%)	47.175 ± 13.289	41.733 ± 13.767	49.633 ± 20.449	44.365 ± 9.118
Liver (g%)	4.138 ± 0.287	4.230 ± 0.396	4.312 ± 0.393	5.117 ± 0.265**
Spleen (g%)	0.181 ± 0.029	0.201 ± 0.026	0.183 ± 0.031	0.185 ± 0.029
Kidneys (g%)	0.649 ± 0.072	0.694 ± 0.078	0.666 ± 0.047	0.772 ± 0.094**
Adrenals (mg%)	23.171 ± 1.572	25.991 ± 3.418	25.988 ± 4.091	27.315 ± 3.415**
Ovaries (mg%)	32.738 ± 9.135	35.252 ± 6.883	29.454 ± 3.137	30.501 ± 4.301

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: P < 0.05 **: P < 0.01

Table 4 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 2, 4, 6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Male animals				Female animals			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals necrosied	11	12	20	12	11	12	12	11
Organ Findings								
CARDIOVASCULAR SYSTEM								
heart								
cellular infiltration, lymphocyte	2	-	-	1	0	-	-	0
fibrosis	1	-	-	0	0	-	-	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
spleen								
deposit, pigment	11	-	-	12	11	-	-	11
hematopoiesis, extramedullary	0	-	-	0	3	-	-	3
thymus								
hemorrhage	2	4	4	4	0	-	-	1
atrophy	0	0	0	3	0	-	-	0
deposit, pigment	0	0	0	0	0	-	-	1
RESPIRATORY SYSTEM								
lung								
hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	1 (1)
cellular infiltration	-	-	-	-	-	-	-	1 (1)
DIGESTIVE SYSTEM								
liver								
cytological alteration	0	1	0	0	0	0	0	0
deposit, pigment	1	0	0	0	0	0	0	0
fatty change	6	5	3	0**	2	1	0	0
hypertrophy, hepatocyte	0	0	0	12**	0	0	0	0
necrosis, focal	0	0	0	1	0	3	0	2
accumulation of macrophage	0	0	0	1	0	0	0	2
cellular infiltration, lymphocyte	1	2	3	2	0	0	0	0
microgranuloma	5	4	4	3	0	0	1	0
hematopoiesis, extramedullary	0	0	0	0	3	2	2	3
peritoneum								
fat granuloma	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-
URINARY SYSTEM								
kidney								
basophilic tubules	8	9	9	12	2	-	-	3
case, hyaline	1	1	0	8**	1	-	-	0
dilatation, tubules	0	0	0	7**	0	-	-	0
eosinophilic body	5	11*	9	7	0	-	-	0
mineralization	1	0	0	1	3	-	-	1
papillary necrosis	0	0	0	5	0	-	-	0
cellular infiltration, lymphocyte	1	1	0	6*	0	-	-	0
inflammatory infiltration	0	1	0	0	0	-	-	0
= lipoma	0	1	0	0	0	-	-	0

=:benign #:malignant

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

Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

Table 4 (continued)

Dose level (mg/kg)	Male animals				Female animals			
	0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals necrosied	11	12	20	12	11	12	12	11
Organ Findings								
REPRODUCTIVE SYSTEM								
testis								
atrophy, seminiferous tubule	0	-	-	1	-	-	-	-
cellular infiltration	1	-	-	0	-	-	-	-
epididymis								
cellular infiltration, lymphocyte	1	-	-	1	-	-	-	-
ovary								
deosit, pigment	-	-	-	-	1	-	-	1
mineralization	-	-	-	-	0	-	-	1
ENDOCRINE SYSTEM								
adrenal gland								
angiectasis	1	-	-	1	1	-	-	0
accumulation of foamy cells	0	-	-	0	0	-	-	1
degeneration, vacuolar	4	-	-	3	0	-	-	0
NERVOUS SYSTEM								
brain								
dilatation, ventricle	0	-	-	0	1	-	-	0
INTEGUMENTARY SYSTEM								
skin								
hair follicle atrophy	-	-	-	-	1 (1)	-	-	1 (1)
subcutaneous tissue								
abscessy	-	-	-	1 (1)	-	-	-	-

=:benign #:malignant

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

Table 5 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 2, 4, 6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Male animals												Female animals																							
	0			100			300			1000			0			100			300			1000														
No. of animals necropsied	11			12			12			12			11			12			12			11														
Organ Findingsd	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3								
CARDIOVASCULAR SYSTEM																																				
heart																																				
cellular infiltration, lymphocyte	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
fibrosis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
HEMATOPOIETIC SYSTEM																																				
spleen																																				
deposit, pigment	-	11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	1	0	-	11	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	0	0				
hematopoiesis, extramedullary	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0				
thymus																																				
hemorrhage	-	2	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0				
atrophy	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
deposit, pigment	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
RESPIRATORY SYSTEM																																				
lung																																				
hemorrhage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
cellular infiltration	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
DEGESTIVE SYSTEM																																				
liver																																				
cytological alteration	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
deposit, pigment	-	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
fatty change	-	5	1	0	-	5	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	0	1	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
hypertrophy, hepatocyte	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	12	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
necrosis, focal	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0
accumulation of macrophage	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0
cellular infiltration, lymphocyte	-	1	0	0	-	2	0	0	-	3	0	0	-	2	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
microgranuloma	-	5	0	0	-	4	0	0	-	4	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0
hematopoiesis, extramedullary	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	3	0	0	-	2	0	0	-	2	0	0	-	3	0	0	-	0	0	0
peritoneum																																				
fat granuloma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
URINARY SYSTEM																																				
kidney																																				
basophilic tubules	-	8	0	0	-	9	0	0	-	8	1	0	-	8	4	0**	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0	0				
cast, hyaline	-	0	1	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	7	1	0**	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
dilatation, tubules	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	6	1	0**	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
eosinophilic body	-	4	1	0	-	11	0	0*	-	6	3	0	-	6	1	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
mineralization	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	1	0	0	-	3	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0				
parillary necrosis	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	3	2	0**	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
cellular infiltration, lymphocyte	-	1	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	6	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
inflammatory infiltration	-	0	0	0	-	1	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0				
= lipoma	0	-	-	-	1	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-				

1:slight 2:moderate 3:marked
 =:benign #:malignant
 ():No. of animals examined microscopically at this site. -:Not applicable
 Significant difference from control group; *:P<0.05 **:P<0.01

Table 5 (continued)

Dose level (mg/kg)	Male animals												Female animals															
	0			100			300			1000			0			100			300			1000						
No. of animals necropsied	11			12			12			12			11			12			12			11						
Organ Findings ^d	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3	T	1	2	3
REPRODUCTIVE SYSTEM																												
testis																												
atrophy, seminiferous tubule	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cellular infiltration	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
epididymis																												
cellular infiltration, lymphocyte	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ovary																												
deposit, pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
mineralization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																												
adrenal gland																												
angiectasis	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	1	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0
accumulation of foamy cells	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	1	0	0
degeneration, vacuolar	-	4	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	0	-	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0
NERVOUS SYSTEM																												
brain																												
dilatation, ventricle	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	1	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0
INTEGUMENTARY SYSTEM																												
skin													(1)													(1)		
hair follicle atrophy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
subcutaneous tissue													(1)															
abscess	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1:slight 2:moderate 3:marked

=:benign #:malignant

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

Table 6 Summary of reproductive performance in rats treated orally with 2,4,6-tribromophenol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	11	12	12	12
No. of pregnant females	11	12	12	12
Copulation index (%) ^{a)}	91.7	100.0	100.0	100.0
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Estrus cycle (days, Mean ± S.D.)	4.2 ± 0.3	4.3 ± 0.3	4.3 ± 0.5	4.2 ± 0.3

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

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

Values in parentheses are expressed no. of animals observed

Table 7 Findings of delivery in dams treated orally with 2,4,6-tribromophenol and observations on their pups (F₁) in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of dams observed	11	12	12	12
No. of dams delivered live pups	11	12	12	12
Duration of gestation (Mean±S.D.)	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.5 ± 0.7	22.0 ± 0.0*
No. of total corpora lutea (Mean±S.D.)	209 (19.0 ± 3.9)	231 (19.3 ± 3.7)	209 (17.4 ± 1.8)	200 (16.7 ± 2.0)
No. of total implants (Mean±S.D.)	175 (15.9 ± 2.0)	204 (17.0 ± 2.3)	195 (16.3 ± 1.9)	189 (15.8 ± 1.4)
No. of total pups born (Mean±S.D.)	161 (14.6 ± 2.0)	188 (15.7 ± 1.9)	175 (14.8 ± 3.2)	174 (14.5 ± 1.9)
No. of total live pups born (Mean±S.D.)	161 (14.6 ± 2.0)	187 (15.6 ± 1.9)	175 (14.5 ± 2.6)	174 (14.5 ± 1.9)
Male	87 (7.9 ± 1.4) ^b	97 (8.1 ± 2.3) ^b	89 (7.4 ± 2.5)	79 (6.6 ± 2.1) ^b
Female	74 (6.7 ± 1.9) ^b	90 (7.5 ± 1.8) ^b	85 (7.1 ± 1.0) ^{c,d}	95 (7.9 ± 1.2) ^b
Sex ratio (male/female, Mean±S.D.)	1.29 ± 0.54	1.17 ± 0.50	1.07 ± 0.42	0.88 ± 0.42
No. of total live pups on day 4 (Mean±S.D.)				
Male	83 (7.3 ± 1.2)	87 (7.3 ± 2.8)	86 (7.2 ± 2.3)	42 (3.5 ± 2.4)**
Female	72 (6.5 ± 1.9)	84 (7.0 ± 2.2)	80 (6.7 ± 1.2)	49 (4.1 ± 2.9)*
No. of total dead pups born (Mean±S.D.)	0 (0.0 ± 0.0)	1 (0.1 ± 0.3)	1 (0.1 ± 0.3)	0 (0.0 ± 0.0)
stillbirth	0 (0.0 ± 0.0)	0 (0.0 ± 0.0)	1 (0.1 ± 0.3)	0 (0.0 ± 0.0)
cannibalism	0 (0.0 ± 0.0)	1 (0.1 ± 0.0)	1 (0.0 ± 0.0)	0 (0.0 ± 0.0)
Gestation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Implantation index (% Mean±S.D.) ^{b)}	83.5 ± 11.7	90.1 ± 13.2	93.3 ± 6.9	94.9 ± 5.9
Delivery index (% Mean±S.D.) ^{c)}	92.1 ± 5.8	92.5 ± 6.6	89.3 ± 9.4	91.9 ± 7.0
Live birth index (% Mean±S.D.) ^{d)}	100.0 ± 0.0	99.5 ± 1.8	99.5 ± 1.7	100.0 ± 0.0
Viability index on day 4 (% Mean±S.D.) ^{e)}				
Male	96.2 ± 8.6	88.6 ± 23.7	97.4 ± 6.3	53.3 ± 34.2**
Female	97.6 ± 5.4	92.7 ± 15.5	94.0 ± 9.6	50.4 ± 35.1**

a) : (No. of females with live pups/no. of pregnant females) × 100
 b) : (No. of implants/no. of corpora lutea) × 100
 c) : (No. of pups born/no. of implants) × 100
 d) : (N. of live pups born/no. of pups born) × 100
 e) : (No. of live pups on day 4 after birth/no. of live pups born) × 100
 f) : Includes live pups died before observations
 g) : Includes a pup retained on day 1 after birth
 Values in parentheses are expressed number of animals examined
 Significant difference from control group; * : P<0.05 ** : P<0.01

4-エチルフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 4-Ethylphenol on Bacteria

要約

4-エチルフェノールについて、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⁾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1500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量で抗菌性が認められたことから、本試験はS9 mix無添加試験および添加試験ともに62.5~2000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。

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

以上の結果から4-エチルフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

方法

1. 被験物質

4-エチルフェノールは、白色結晶である。用いた被験物質は、ロット番号81029A、純度98.328%(キャピラリーGC)、製造丸善石油化学(株)(東京)であり、丸善石油化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

4-エチルフェノールは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号: ACQ2095, 和光純薬工業(株))に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌ごとに用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれTable中に示した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
(AF2, 和光純薬工業(株))

アジ化ナトリウム(SA, 和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン(9AA, Sigma Chem. Co.)

2-アミノアントラセン(2AA, 和光純薬工業(株))

AF2, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを-20℃で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

3. 検定菌

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

*S. typhimurium*の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA*株は1997年4月9日に日本バイオアッセイ研究センターの松島泰次郎博士から分与された。

検定菌は-80℃で凍結保存したのを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)およびアンピシリン耐性因子pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントブロス2(Oxoid Ltd.)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。分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

4. 培地およびS9 mixの組成

1) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地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
大洋寒天(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

2) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)または(C)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco Lab.)	0.6 w/v %
塩化ナトリウム	0.5 w/v %
(B) <i>Salmonella typhimurium</i> 用	
L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L
(C) <i>Escherichia coli</i> 用	
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたりの組成は下記のとおりである。

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(キッコーマン株)を用いた。

5. 試験方法

プレインキュベーション法³⁾により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 mL)、検定菌液0.1 mLを混合し、37 °Cで20分間プレインキュベーションしたのち、約45 °Cに保温したトップアガー2 mLを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。同時に実施した試験については、陰性および陽性対照群を共通とした。

培養は37 °Cで48時間行い、生じた復帰変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈殿の有無は、肉眼により観察した。また、抗菌性の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢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、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。

用量設定試験は1回、本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。

6. 判定基準

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定することとした。

結果および考察

50.0~5000 μg/plateの範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した。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1500

μg/plate以上の用量で抗菌性が認められた。被験物質に由来する沈殿はすべての用量で認められなかった。

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2000 μg/plateとした。

最高用量を2000 μg/plateとして公比2で6用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、4-エチルフェノールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

なお4-エチルフェノールは、当研究所で本試験と並行して実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では染色体の構造異常が誘発され、陽性であった⁴⁾。また、関連物質である4-(1-メチルプロピル)フェノールについては、復帰変異試験および染色体異常試験で陰性の結果が^{5, 6)}、また、3-エチルフェノール^{7, 8)}および*p-tert*-ブチルフェノール^{9, 10)}については、復帰変異試験で陰性、染色体異常試験で陽性の結果が得られている。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp.273-285.
- 4) 山影康次, 化学物質毒性試験報告, **8**, 572(2001).
- 5) 澁谷徹, 化学物質毒性試験報告, **2**, 343(1995).
- 6) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **2**, 347(1995).
- 7) 澁谷徹, 化学物質毒性試験報告, **8**, 759(2001).
- 8) 山影康次, 化学物質毒性試験報告, **8**, 764(2001).
- 9) 澁谷徹, 化学物質毒性試験報告, **4**, 295(1996).
- 10) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **4**, 301(1996).

連絡先

試験責任者：澁谷 徹

試験担当者：川上久美子, 原 巧, 山本明子,
三枝克彦, 加藤初美

(財)食品薬品安全センター秦野研究所

〒257-8523 秦野市落合729-5

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

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)

Kumiko Kawakami, Takumi Hara,

Akiko Yamamoto, Katsuhiko Saegusa,

Hatsumi Kato

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 Mutagenicity of 4-ethylphenol on bacteria (I)

With(+)or without(-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type						Frameshift type								
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98		TA1537			
S9 mix (-)	0	137	138	138	6	11	12	32	22	19	20	28	23	15	15	12
		(138 \pm 0.6)			(10 \pm 3.2)			(24 \pm 6.8)			(24 \pm 4.0)		(14 \pm 1.7)			
	62.5	140	140	130	10	8	15	23	29	25	19	26	24	9	10	14
		(137 \pm 5.8)			(11 \pm 3.6)			(23 \pm 3.1)			(23 \pm 3.6)		(11 \pm 2.6)			
	125	144	136	152	9	14	9	16	22	20	25	20	19	14	2	2
		(144 \pm 8.0)			(11 \pm 2.9)			(19 \pm 3.1)			(21 \pm 3.2)		(6 \pm 6.9)			
	250	145	105	131	7	9	13	19	18	28	14	22	20	5	15	10
		(127 \pm 20.3)			(10 \pm 3.1)			(22 \pm 5.5)			(19 \pm 4.2)		(10 \pm 5.0)			
500	141	129	140	9	10	8	15	20	20	18	25	18	14	14	11	
	(137 \pm 6.7)			(9 \pm 1.0)			(18 \pm 2.9)			(20 \pm 4.0)		(13 \pm 1.7)				
1000	47*	49*	54*	5*	2*	2*	17	21	23	7*	16*	3*	4*	2*	0*	
	(50 \pm 3.6)			(3 \pm 1.7)			(20 \pm 3.1)			(9 \pm 6.7)		(2 \pm 2.0)				
2000	0*	0*	0*	0*	0*	0	0*	0*	0	0*	0*	0	0*	0*	0	
	(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)		(0 \pm 0.0)				
S9 mix (+)	0	176	146	154	8	10	10	25	28	27	38	29	26	9	14	19
		(159 \pm 15.5)			(9 \pm 1.2)			(27 \pm 1.5)			(31 \pm 6.2)		(14 \pm 5.0)			
	62.5	174	182	172	10	12	12	34	31	24	36	23	23	15	17	14
		(176 \pm 5.3)			(11 \pm 1.2)			(30 \pm 5.1)			(27 \pm 7.5)		(15 \pm 1.5)			
	125	157	175	179	8	11	13	29	27	19	34	32	33	15	16	12
		(170 \pm 11.7)			(11 \pm 2.5)			(25 \pm 5.3)			(33 \pm 1.0)		(14 \pm 2.1)			
	250	181	163	188	12	16	15	23	28	21	27	29	34	10	14	11
		(177 \pm 12.9)			(14 \pm 2.1)			(24 \pm 3.6)			(30 \pm 3.6)		(12 \pm 2.1)			
500	165	158	160	15	10	11	20	20	20	28	35	35	21	12	18	
	(161 \pm 3.6)			(12 \pm 2.6)			(20 \pm 0.0)			(33 \pm 4.0)		(17 \pm 4.6)				
1000	136	132	119	3	9	7	18	20	16	22	20	23	5	12	9	
	(129 \pm 8.9)			(6 \pm 3.1)			(18 \pm 2.0)			(22 \pm 1.5)		(9 \pm 3.5)				
2000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)		(0 \pm 0.0)				
Positive control S9 mix(-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	598	557	565	714	702	739	183	260	252	639	628	654	380	585	453
	(573 \pm 21.7)			(718 \pm 18.9)			(232 \pm 42.3)			(640 \pm 13.1)			(473 \pm 103.9)			
Positive control S9 mix(+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	980	1121	1117	459	402	408	777	891	969	490	535	485	348	395	364
	(1073 \pm 80.3)			(423 \pm 31.3)			(879 \pm 96.6)			(503 \pm 27.5)			(369 \pm 23.9)			

The purity of the test substance was 98.328 %.

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

*:Growth inhibition was observed.

Table 2 Mutagenicity of 4-ethylphenol on 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 substitution type						Frameshift type								
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	134	163	129	13	13	11	26	22	31	24	26	19	7	12	7
		(142 \pm 18.4)			(12 \pm 1.2)			(26 \pm 4.5)			(23 \pm 3.6)			(9 \pm 2.9)		
	62.5	156	124	142	10	8	11	28	12	21	29	18	27	11	17	7
		(141 \pm 16.0)			(10 \pm 1.5)			(20 \pm 8.0)			(25 \pm 5.9)			(12 \pm 5.0)		
	125	157	145	159	16	12	15	13	12	14	24	27	16	16	11	9
		(154 \pm 7.6)			(14 \pm 2.1)			(13 \pm 1.0)			(22 \pm 5.7)			(12 \pm 3.6)		
	250	175	159	113	10	17	4	22	20	16	24	17	18	10	9	8
		(149 \pm 32.2)			(10 \pm 6.5)			(19 \pm 3.1)			(20 \pm 3.8)			(9 \pm 1.0)		
500	151	150	150	13	8	14	13	12	13	24	28	17	11	9	10	
	(150 \pm 0.6)			(12 \pm 3.2)			(13 \pm 0.6)			(23 \pm 5.6)			(10 \pm 1.0)			
1000	59*	92*	75*	2*	5*	2*	17	18	15	5*	6*	12*	3*	2*	3*	
	(75 \pm 16.5)			(3 \pm 1.7)			(17 \pm 1.5)			(8 \pm 3.8)			(3 \pm 0.6)			
2000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			
S9 mix (+)	0	148	144	132	8	12	12	28	19	20	31	34	34	10	18	16
		(141 \pm 8.3)			(11 \pm 2.3)			(22 \pm 4.9)			(33 \pm 1.7)			(15 \pm 4.2)		
	62.5	162	168	152	11	10	14	29	31	27	42	35	29	18	17	17
		(161 \pm 8.1)			(12 \pm 2.1)			(29 \pm 2.0)			(35 \pm 6.5)			(17 \pm 0.6)		
	125	193	185	186	16	21	11	25	25	29	25	27	45	14	6	11
		(188 \pm 4.4)			(16 \pm 5.0)			(26 \pm 2.3)			(32 \pm 11.0)			(10 \pm 4.0)		
	250	176	157	160	13	10	15	18	26	21	24	26	28	20	19	17
		(164 \pm 10.2)			(13 \pm 2.5)			(22 \pm 4.0)			(26 \pm 2.0)			(19 \pm 1.5)		
500	150	172	152	8	16	12	17	32	28	41	40	37	15	14	15	
	(158 \pm 12.2)			(12 \pm 4.0)			(26 \pm 7.8)			(39 \pm 2.1)			(15 \pm 0.6)			
1000	130	124	119	1	5	10	32	29	23	33	20	30	5	17	13	
	(124 \pm 5.5)			(5 \pm 4.5)			(28 \pm 4.6)			(28 \pm 6.8)			(12 \pm 6.1)			
2000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	637	601	526	792	701	662	260	236	212	622	586	637	507	568	625
	(588 \pm 56.6)			(718 \pm 66.7)			(236 \pm 24.0)			(615 \pm 26.2)			(567 \pm 59.0)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	939	994	968	324	358	433	825	803	912	478	427	428	386	322	395
	(967 \pm 27.5)			(372 \pm 55.8)			(847 \pm 57.6)			(444 \pm 29.2)			(368 \pm 39.8)			

The purity of the test substance was 98.328 %.

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

*: Growth inhibition was observed.

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 4-Ethylphenol
on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

4-エチルフェノ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)および短時間処理(6時間)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理では0.15 mg/mL, S9 mix非存在下およびS9 mix存在下における短時間処理ではそれぞれ0.41 mg/mLおよび0.15 mg/mLであった。従って、各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度設定した。連続処理では、24時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間連続処理では0.075 mg/mL, S9 mix非存在下および存在下での短時間処理では0.20 mg/mLおよび0.075 mg/mLであったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理した群では、中濃度群(0.038 mg/mL)および高濃度群(0.075 mg/mL)において染色体の構造異常が誘発され、その頻度はそれぞれ6.5%および21.0%(gapを除く)であった。S9 mix非存在下の短時間処理では、いずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix存在下での短時間処理では、高濃度群(0.075 mg/mL)において染色体の構造異常が誘発され、その頻度は11.0%(gapを除く)であった。倍数性細胞の誘発作用については、傾向性検定で有意差($p < 0.01$)が認められたが、その誘発頻度が低いことから、陰性と判定した。

以上の結果より、本試験条件下で4-エチルフェノールは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月, 入手時:継代4代, 現在21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、仔牛血清(CS, Cansera International)を10

vol%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時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix非存在下および存在下で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. S9

S9(キッコーマン(株))は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

4-エチルフェノール(ロット番号:81029A, 丸善石油化学(株), 東京)は、白色結晶で、水に対しては100 mmol/L未滿, DMSOでは2 mol/L以上, アセトンでは50 mg/mL以上で溶解し、融点44.8°C, 沸点219°C, 蒸気圧2.7kPa(115°C)で、純度98.328%(不純物は不明)の物質で、室温で保存した。被験物質原体は、常温で安定であった。

6. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に用いた。溶媒はDMSO(ロット番号:ACL5008, 和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5 vol%になるように加えた。

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。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%細胞増殖抑制濃度は0.15 mg/mL, S9 mix非存在下および存在下における

短時間処理では、それぞれ0.41 mg/mLおよび0.15 mg/mLであった (Fig. 1).

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(連続処理およびS9 mix存在下での短時間処理:0.019, 0.038, 0.075, 0.15, 0.30 mg/mL, S9 mix非存在下での短時間処理:0.050, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 mg/mL). 陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、局方注射用水(株大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

9. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように培養液に加えた。染色体標本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 vol%ギムザ溶液で染色した。

10. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果 (Table 1, 2), 連続処理では0.075 mg/mLが、S9 mix非存在下およびS9 mix存在下での短時間処理では0.20 mg/mLおよび0.075 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会(MMS)²¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

11. 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。

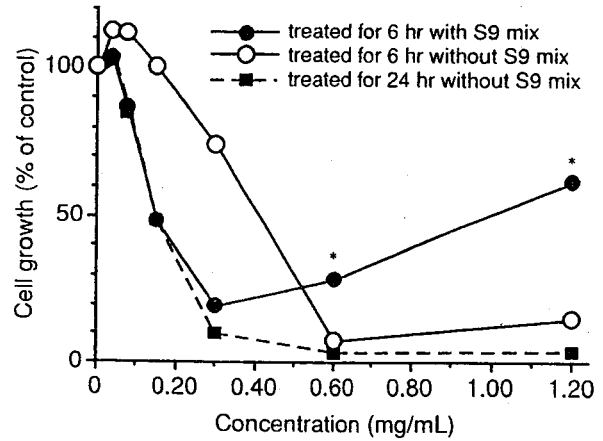


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4-ethylphenol

*: Dead cells remained adhering onto the culture dishes.

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法²¹⁾により、有意差検定を実施した ($p < 0.01$). また、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³¹⁾ ($p < 0.01$)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

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。4-エチルフェノールを加えて24時間連続処理した群では、中濃度群 (0.038 mg/mL) および高濃度群 (0.075 mg/mL) において染色体異常が誘発され、その頻度はそれぞれ6.5%および21.0% (gapを除く)であった。一方、倍数性細胞の誘発作用については、高濃度群 (0.075 mg/mL) では毒性のために800細胞の観察できず、それぞれの観察細胞数は722細胞であったが、すべての処理群において、有意な倍数性細胞の増加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。4-エチルフェノールを加え、S9 mix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。S9 mix存在下で6時間処理した場合は、高濃度群 (0.075 mg/mL) で有意な染色体異常の増加が認められ、その頻度は11.0% (gapを除く)であった。また、中および高濃度群 (0.038 mg/mL および 0.075 mg/mL) において、倍数性細胞の出現頻度に有意差が認められ、傾向性検定 ($p < 0.01$) でも有意差が認められたが、その誘発頻度が1.50~1.63%と低いことから、陰性と判定した。

従って、4-エチルフェノールは、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すると結論した。

フェノール類のうち、側鎖に炭化水素を有している化合物の一つである4-(1-メチルプロピル)フェノールにつ

いては、染色体異常を誘発しないことが報告されている⁴⁾。一方、*p-tert*-ブチルフェノールは、染色体の構造異常を誘発することに加え、倍数性細胞の高頻度誘発(最高出現頻度:93.18%)が特徴的である⁵⁾。また、本試験と平行して実施した、3-エチルフェノールの染色体異常試験結果についても陽性の結果が得られている⁶⁾が、本物質の結果とは異なり、代謝活性化の処理系列においてのみ構造異常の誘発が認められている。これらのことから、側鎖に炭化水素を有するフェノール類は、炭化水素の結合位置および種類が染色体異常の発現と関わっており、発現する異常のタイプ(構造異常および倍数性細胞)または細胞に対する作用様式を決定している可能性が示唆された。

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, pp. 16-37.
- 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, pp. 76-78.
- 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.
- 4) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **2**, 347(1995).
- 5) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **4**, 301(1996).
- 6) 日下部博一, 化学物質毒性試験報告, **8**, 764(2001).

連絡先

試験責任者: 山影康次
試験担当者: 日下部博一, 佐々木澄志, 高橋俊孝,
若栗 忍, 橋本恵子
財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Kohji Yamakage (Study director)
Hirokazu Kusakabe, Kiyoshi Sasaki,
Toshitaka Takahashi, Shinobu Wakuri,
Keiko Hashimoto
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 4-ethylphenol (4EP)^{a)} without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations								Others ^{d)}	No. of cells with aberrations		POL ^{e)} (%)	Trend test ^{f)}		Concurrent cytotoxicity ^{g)} (%)	Mitotic index ^{h)} (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ^{e)}	total	TAG (%)		TA (%)	TA		POL			
Solvent ^{b)} 0		24	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—	
4EP 0.019		24	200	4	1	5	3	1	0	14	0	11 (5.5)	8 (4.0)	0.00			102.0	—	
4EP 0.038		24	200	3	6	7	0	1	0	17	3	16* (8.0)	13* (6.5)	0.13	+	-	89.0	—	
4EP 0.075		24	200	4	24	18	0	4	0	50	1	45* (22.5)	42* (21.0)	0.00 ⁱ⁾			68.5	1.4, 1.2	
4EP 0.15 ^{j)}		24	—														33.0	0.4, 0.0	
4EP 0.30 ^{k)}		24	—														6.5	—	
MC 0.05 μg/mL		24	200	2	49	119	2	3	10	185	0	105* (52.5)	104* (52.0)	0.00			—	—	

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, POL: polyploid, MC: mitomycin C.

a) Purity was 98.328%. b) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. g) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Seven hundred and twenty-two cells were analysed. j) Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity. k) Chromosome specimens were not made because of severe cytotoxicity.

*: Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4-ethylphenol (4EP)^{a)} with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations								Others ^{d)}	No. of cells with aberrations		POL ^{e)} (%)	Trend test ^{f)}		Concurrent cytotoxicity ^{g)} (%)	Mitotic index ^{h)} (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ^{e)}	total	TAG (%)		TA (%)	TA		POL			
Non-treatment				200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			—	—	
Solvent ^{b)} 0		-	6 (18)	200	0	2	0	0	1	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—	
4EP 0.050		-	6 (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			85.0	—	
4EP 0.10		-	6 (18)	200	1	2	2	0	0	0	5	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38		-	88.5	—	
4EP 0.20		-	6 (18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38			76.0	12.8, 9.8	
4EP 0.40 ⁱ⁾		-	6 (18)	—														2.0	—	
4EP 0.80 ^{j)}		-	6 (18)	—														19.0	—	
MC 0.1 μg/mL		-	6 (18)	200	1	53	131	7	1	0	193	3	101* (50.5)	100* (50.0)	0.00			—	—	
Solvent ^{b)} 0		+	6 (18)	200	0	1	0	2	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			100.0	—	
4EP 0.019		+	6 (18)	200	2	2	1	1	0	0	6	0	5 (2.5)	3 (1.5)	0.00			95.0	—	
4EP 0.038		+	6 (18)	200	2	2	7	5	0	0	16	1	10 (5.0)	8 (4.0)	1.50*	+	+	83.5	—	
4EP 0.075		+	6 (18)	200	1	13	35	2	0	10	61	0	22* (11.0)	22* (11.0)	1.63*			56.0	4.6, 6.8	
4EP 0.15 ^{j)}		+	6 (18)	—														38.0	2.0, 0.4	
4EP 0.30 ^{k)}		+	6 (18)	—														21.0	Tox, Tox	
CPA 5 μg/mL		+	6 (18)	200	11	45	193	3	1	0	253	1	124* (62.0)	121* (60.5)	0.00			—	—	

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, POL: polyploid, MC: mitomycin C, CPA: cyclophosphamide, Tox: cytotoxic.

a) Purity was 98.328%. b) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. g) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome specimens were not made because of severe cytotoxicity. j) Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity.

*: Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test.

4-エチルフェノ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 4-Ethylphenol in Rats

要約

4-エチルフェノールは、反応性高分子(ポリパラビニルフェノール)原料、酸化防止剤、医薬品・農薬・染料などの原料として使用されている。4-エチルフェノールを0(オリブ油)、100、300および1000 mg/kgの投与量で、1群当たり雌雄各7あるいは14匹のCrj:CD(SD)IGSラットに28日間反復経口投与してその毒性を検討した。さらに、0および1000 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて投与終了の翌日から14日間観察を継続して投与期間終了時にみられた毒性の回復性についても併せて検討した。

100 mg/kg群では、いずれの検査項目にも変化はみられなかった。

300 mg/kg群では、投与期間終了時に雄の肝臓の絶対重量および相対重量に高値がみられた。病理組織学検査では、雄で前胃に扁平上皮過形成が認められた。

1000 mg/kg群の一般状態は、投与期間を通して投与後約1時間までの間によるめき歩行または流涎が雌雄とも観察された。回復期間中には異常は観察されなかった。体重は、雄で投与7日から28日に、雌で投与14日から28日に低値がみられた。回復期間中は、雌雄とも体重は対照群より低値であったが、体重増加率は対照群を上回り、回復傾向がみられた。摂餌量は、雌雄とも投与期間中低値がみられた。投与4週の尿検査では、雌の尿量に高値がみられた。投与期間終了時の血液生化学検査では、雄でGPTの高値、雌で総コレステロールの高値がみられた。器官重量は、雄で肝臓および腎臓の相対重量、雌で肝臓の相対重量に高値がみられた。剖検では、雌雄とも前胃の粘膜肥厚が高頻度でみられ、病理組織学検査では、雌雄とも前胃に扁平上皮過形成が認められた。これらの変化は、回復期間終了時にはみられなかった。

以上のことから、本試験条件下における無影響量(NOEL)は、雄で100 mg/kg/day、雌で300 mg/kg/dayであると結論される。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

4-エチルフェノール(純度:98.3%, Lot No. 81029A, 丸善石油化学(株), 東京)は、白色結晶で、融点が44.8℃、沸点が219℃、水に不溶、アセトン、DMSOおよびエーテルに可溶である。入手後の被験物質は遮光気密容器に入れ、冷所で保存した。残余被験物質を製造業者が分析し、投与期間中の被験物質の安定性を確認した。投与液

の調製は、投与量ごとに被験物質を精秤し、所定の濃度となるように溶媒である日本薬局方オリブ油(ヤクハン製薬(株))を加えて溶解することによって行った。調製液は、室温で3時間、冷暗所保存条件下で8日間安定であることが確認されていることから、調製後直ちに遮光気密容器に入れて冷蔵庫内(2~8℃)に保存し、調製後7日以内に使用した。投与に用いる初回および最終調製時の各濃度の調製液について被験物質の濃度を分析した結果、含有率は設定値の98.5~102%であり、調製液は規定の濃度を含有することを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)よりSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS)の雌雄を4週齢で購入して雄は6日間、雌は7日間の検疫・馴化を行った後、健康な動物を雌雄各42匹選択して5週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は雄が150~168g、雌が122~147gであった。動物は、温度21~24℃、湿度37~61%、換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(8:00から20:00まで点灯)に制御されたバリアシステムの飼育室で、ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は5匹以内、群分け後は個別で飼育した。飼料はγ線照射固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて、飲料水は札幌市水道水を自動給水装置を用いてそれぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では、0、250、500、1000および2000 mg/kg/dayの投与量で1群雌雄各5匹のSD系ラットに14日間経口投与した。その結果、2000 mg/kg群では投与3日までに雌雄とも全例死亡した。1000 mg/kg群では、雌1例の死亡、雌雄の体重および摂餌量の低値、前胃粘膜の肥厚、肝臓の相対重量の高値がみられた。血液生化学検査では、1000 mg/kg群の雄でGPTと総コレステロールの高値がみられた。500 mg/kg群の雄ではGPTの高値がみられた。250 mg/kg群には被験物質の投与によると思われる変化は認められなかった。以上のことから、28日間反復経口投与毒性試験の本試験では、雌雄のラットに確実に毒性が認められると予測される1000 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3で除して300および100 mg/kgの3用量群とし、これに溶媒(オリブ油)のみを同様に投与する対照群を含めた計4群を設定した。1群の動物数は雌雄とも7または14匹とし、投与前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行っ

た。

投与に際しては、ラット用胃ゾンデを用いて1日1回、28日間の計28回、強制的に胃内に投与した。投与容量を5 mL/kgとし、各動物の投与液量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて算出した。

4. 検査項目

1) 一般状態観察

投与期間および回復期間中、全例について1日1回以上の頻度で観察した。

2) 体重および摂餌量測定

体重は全例について、投与1日(投与前)、投与2, 7, 14, 21および28日(投与終了日)、回復1, 7および14日ならびに剖検日に測定し、投与1日から28日、回復1日から14日の体重増加量および体重増加率を算出した。また、摂餌量は剖検日を除いて体重と同じ日に測定した。

3) 尿検査

投与4週および回復2週に全例を代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行い、同時に採尿中の飲水量(重量)も測定した。約3時間の蓄尿についてpH, 蛋白, 糖, ケトン体, ウロビリノーゲン, ビリルビン, 潜血反応(以上, マルティスティックス, バイエル・三共)および色調(肉眼観察)ならびに沈渣(鏡検)を検査し, 21時間蓄尿について尿量(容量)および比重(屈折計法, アタゴ)を測定した。

4) 血液学検査

全例について剖検時に16~20時間絶食させた後, エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し, EDTA・2Kで処理した血液を用いて赤血球数, ヘマトクリット値, 血小板数, 白血球数(以上, 電気抵抗法), ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)(以上, 自動血球計数装置F-820, シスメックス), 平均赤血球容積(赤血球数, ヘマトクリット値より算出), 平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数, ヘモグロビン量より算出), 平均赤血球ヘモグロビン濃度(ヘマトクリット値, ヘモグロビン量より算出), 網赤血球数(Brecher法)および白血球百分比(May-Grünwald-Giemsa染色)を測定した。また, 3.8%クエン酸ナトリウムで処理した後, 3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いて, プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上, 血液凝固自動測定装置アメルングKC-10A, バクスター)を測定した。

5) 血液生化学検査

血液学検査と同様に, 全例について腹部大動脈より採血し, ヘパリン処理した後, 3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いてGOT(IFCC法), 乳酸脱水素酵素(Wróblewski & La Due法)およびグルコース(ヘキソキナーゼ法)を測定し, 無処理血液を3000回転/

分で10分間遠心分離して得られた血清を用いてGPT(IFCC法), アルカリホスファターゼ(Bessey-Lowry法), γ -GTP(包接L- γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法), 総コレステロール(酵素法), トリグリセリド(遊離グリセロール消去法), 総ビリルビン(アゾビリルビン法), 尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法), クレアチニン(Jaffé法), カルシウム(OCPC法), 無機リン(Fiske-SubbaRow法), 総蛋白(ビウレット法)(以上, 自動分析装置7150形, 日立製作所), ナトリウム, カリウム(以上, 炎光光度法, 自動炎光光度計480型, コーニング), クロール(電量滴定法, クロライドカウンターCL-6M, 平沼産業), 蛋白分画およびA/G比(以上, セルロースアセテート膜電気泳動法, 全自動電気泳動装置CTE-150, 常光)を測定した。

6) 剖検および器官重量測定

投与28日および回復14日の翌日に全例について, 体外表を観察し, エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。また, 脳, 肺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 下垂体, 胸腺, 甲状腺(上皮小体含む), 精巣, 精巣上体および卵巣の重量を測定するとともに, 絶対重量を剖検日の体重で除し100を乗じて相対重量を算出した。

7) 病理組織学検査

全例について脳(大脳および小脳), 下垂体, 胸腺, 甲状腺, 上皮小体, 副腎, 脾臓, 心臓, 胸部大動脈, 舌, 食道, 胃(前胃および腺胃), 肝臓, 脾臓, 十二指腸, 空腸, 回腸(パイエル板含む), 盲腸, 結腸, 直腸, 喉頭, 気管, 肺(気管支含む), 腎臓, 膀胱, 前立腺, 精囊(凝固腺含む), 卵巣, 子宮(角部および頸部), 膈, 乳腺(原則として右腹部, 雌のみ), 皮膚(腹部), 胸骨(骨髓含む), 大腿骨(骨髓含む), 脊髄(頸部), 骨格筋(大腿部), 腸間膜リンパ節, 下顎リンパ節, 顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および坐骨神経を10%中性緩衝ホルマリン液で, 眼球およびハーダー腺をデビッドソン液で固定・保存し, 精巣および精巣上体をブアン液で固定後70%エタノールで保存した。これらの器官・組織を常法に従ってパラフィン包埋後, 薄切してヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し, 対照群および高用量群の全例を鏡検した。さらに前胃, 喉頭, 食道および腺胃は, その他の用量群の雌雄の動物全例, ならびに腎臓は雄全例を鏡検した。

5. 統計解析

体重, 体重増加量, 体重増加率, 摂餌量, 尿検査の定量的項目, 血液学検査, 血液生化学検査, 器官の絶対重量および相対重量の結果についてBartlettの検定法を行い, 等分散性を解析した。等分散の場合は一元配置分散分析法で解析し, 不等分散の場合はKruskal-Wallisの検定法で解析した。一元配置分散分析の結果, 有意差がみられた場合は, Dunnettの検定法で解析した。Kruskal-Wallis法の解析の結果, 有意差がみられた場合は, Mann-WhitneyのU-検定法で解析した。

尿比重および尿検査の定性的項目の結果については,

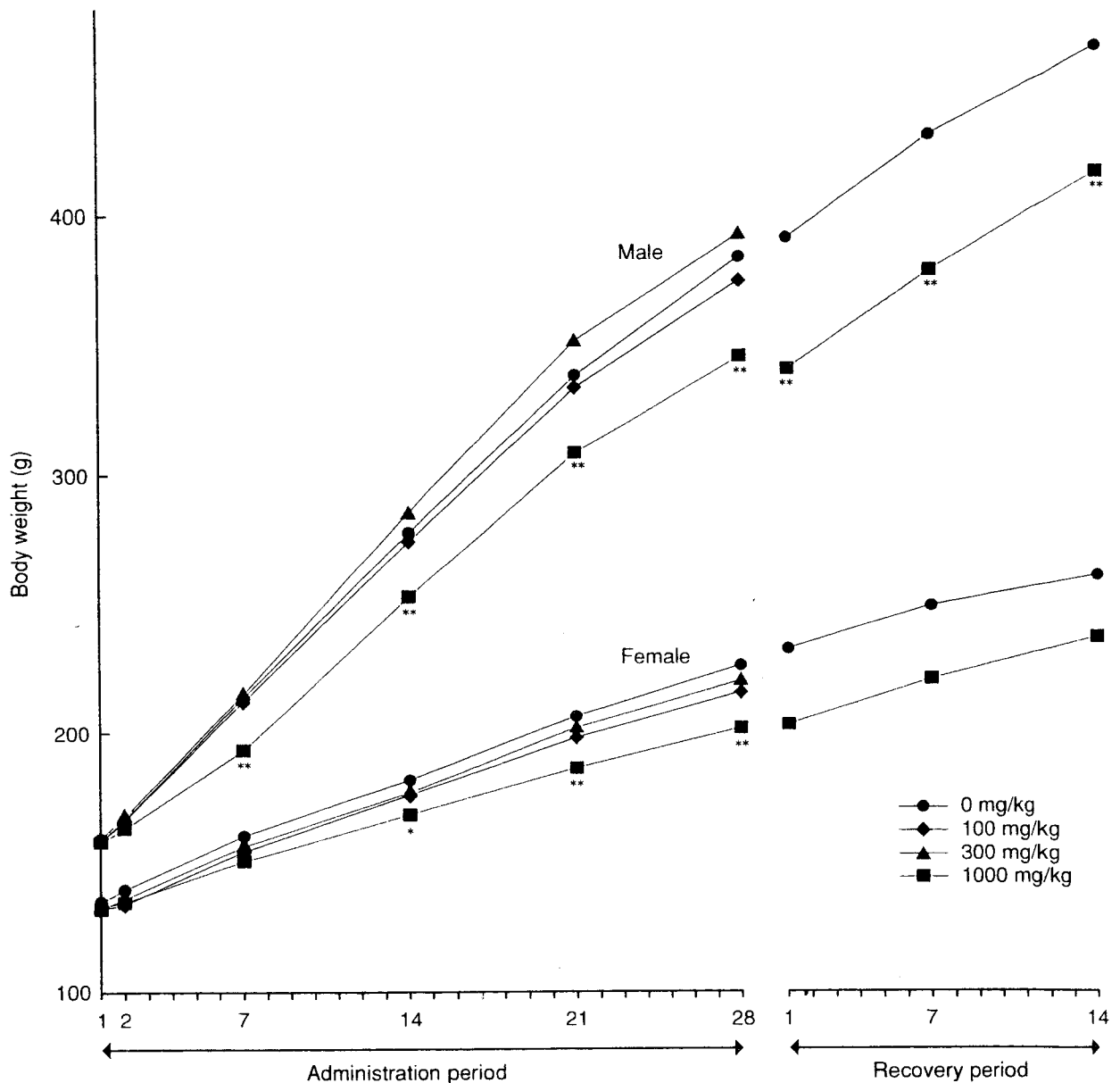


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test
Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Kruskal-Wallisの検定法で解析し、有意差がみられた場合は、Mann-WhitneyのU検定法を用いて解析した。

これら対照群と被験物質投与群との間の検定においては、いずれも有意水準を5%とした。

結果

1. 一般状態

1000 mg/kg群では、流涎が投与6日以降投与終了日までの期間中、雄で9例、雌で6例に投与直後から30分の間に観察された。また、よろめき歩行が雄で投与1, 3, 10, 17日に、雌で投与3, 14, 16日に各1例観察され、これらのうち、投与1日の雄1例および投与3日の雌1例には横臥も観察された。これらの症状は、投与後数分から発現し、発現後約1時間で消失した。その他に、外尿

道口周囲の被毛の汚れが雄で投与15日に1例観察され、雌では投与期間を通して散見された。回復期間にはいずれの動物にも変化は認められなかった。

2. 体重(Fig. 1)

投与期間中、100および300 mg/kg群では雌雄とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。1000 mg/kg群では、雄で投与7日から28日まで、雌で投与14日から28日までの各測定日の体重に対照群と比較して有意な低値が認められた。投与期間中の体重増加量および体重増加率も雌雄とも有意な低値であった。

1000 mg/kg群の回復期間の体重は、期間を通して雄は有意な低値、雌は低値傾向を示した。しかし、雌雄とも体重増加量は対照群を上回り、体重増加率は有意な高値であった。

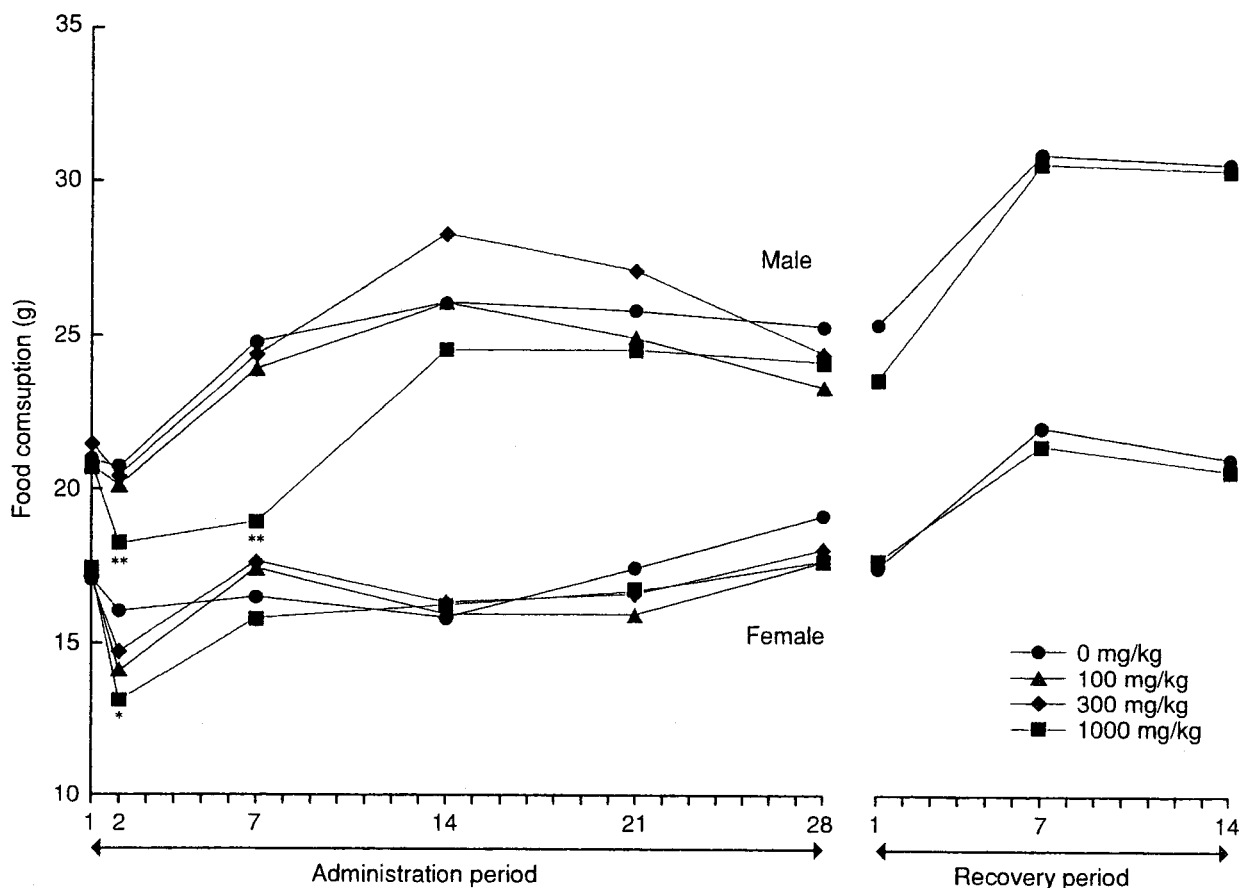


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test
Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

3. 摂餌量 (Fig. 2)

投与期間中、100および300 mg/kg群では雌雄とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。1000 mg/kg群の摂餌量は、雄で投与2日および7日に、雌で投与2日に対照群と比較して有意な低値が認められた。

1000 mg/kg群の回復期間の摂餌量には、雌雄とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

4. 尿検査および飲水量

投与4週の検査では、1000 mg/kg群の雌で尿量が有意な高値であったこと以外、雌雄ともいずれの投与群においても、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

回復2週の検査では、いずれの検査項目にも変化は認められなかった。

5. 血液学検査 (Table 1, 2)

投与期間終了時の検査では、300 mg/kg群において、雄の平均赤血球容積および雌の桿状核好中球の比率が対照群と比較して有意な高値であったが、1000 mg/kg群におけるそれらの値は対照群とはほぼ同じであったことから偶発的な変動と考えられた。その他の検査項目では、いずれの投与群においても対照群と比較して有意な差は認められなかった。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群の雌で赤血球数

の有意な低値および平均赤血球ヘモグロビン量の有意な高値がみられたが、いずれも偶発的な変化と考えられた。

6. 血液生化学検査 (Table 3, 4)

投与期間終了時の検査では、100 mg/kg群の雄でアルブミン分画およびA/G比の低値、雌でナトリウムの高値、300 mg/kg群の雄でグルコースの高値がみられたが、これらはいずれも1000 mg/kg群では認められない変化であった。1000 mg/kg群では、雄でGPTが対照群と比較して有意な高値を示した。その他にγグロブリン分画およびナトリウムの有意な低値がみられたが、関連項目に明らかな変化のないことから、4-エチルフェノール投与と関連のない変化と考えられた。雌では、γ-GTP、総コレステロールおよびトリグリセリドに有意な高値がみられた。これらのうちγ-GTPの高値は対照群の変動範囲が狭いことによるもの、トリグリセリドの高値は特に高値を示した個体が1例みられたことによる変動であり、4-エチルフェノール投与と関連のない変化と考えられた。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群で、雄の総ビリルビンおよび無機リンならびに雌のアルカリホスファターゼに有意な高値がみられたが、いずれも軽度な変化であり、偶発的な変動と考えられた。

7. 剖検

投与期間終了時には、100および300 mg/kg群では、雌雄とも異常は認められなかった。1000 mg/kg群では、前胃粘膜の肥厚が雄で5例、雌で6例にみられた。さらに同群の雌1例の腺胃粘膜に暗赤色斑がみられた。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群の雌雄とも異常は認められなかった。

8. 器官重量 (Table 5, 6)

投与期間終了時には、雄では、300 mg/kg群において肝臓の絶対重量および相対重量に对照群と比較して有意な高値が認められた。1000 mg/kg群では、肝臓の絶対重量に高値傾向がみられ、相対重量は有意な高値であった。また、腎臓の相対重量に有意な高値がみられた。雌では、1000 mg/kg群で肝臓の絶対重量に高値傾向がみられ、相対重量が有意な高値であった。

回復期間終了時には、1000 mg/kg群の雄では、剖検日の体重が有意な低値を示し、肺、下垂体、胸腺および精巣の絶対重量に有意な低値がみられたが、相対重量には有意差はなかった。脳および精巣上体の相対重量は有意な高値であった。雌では、いずれの器官の重量にも对照群との間に有意な差はみられなかった。

9. 病理組織学検査 (Table 7, 8)

投与期間終了時の検査では、1000 mg/kg群の雌雄において消化管に変化が認められ、雄で、前胃境界線におけるびらんが1例と扁平上皮過形成が4例、前胃のその他の部位の扁平上皮の変性と粘膜下織の水腫が各2例、扁平上皮過形成が7例全例(軽度;4例, 中等度;3例)にみられた。雌では、喉頭の粘膜固有層における好中球浸潤、喉頭のびらん、食道の扁平上皮過形成が各1例、前胃の扁平上皮の変性と粘膜下織の水腫が各2例、粘膜下織における肉芽形成が1例、扁平上皮過形成が6例(軽度;1例, 中等度;5例)、潰瘍が1例にみられた。300 mg/kg群では、雄で前胃境界線における扁平上皮過形成、前胃のその他の部位の扁平上皮過形成(軽度)が各1例みられた。さらに、雄では近位尿細管上皮の硝子滴が、100, 300および1000 mg/kg群でそれぞれ、3例、1例および4例みられた。これらの変化は、回復期間終了時には認められなかった。

考察

1000 mg/kg群では、一般状態の変化として雌雄ともよろめき歩行または流涎が投与直後から1時間の間に認められた。これらの症状は回復期間中にはみられなかった。体重は雌雄とも投与期間中増加が抑制され、低値がみられた。回復期間には雌雄とも体重は对照群より低値であったが、回復期間終了時の体重増加率は对照群を上回っており、回復傾向がみられた。摂餌量には投与期間中のみ雌雄で低値がみられた。

投与4週の尿検査で認められた雌の尿量の高値については、同時期に当試験施設で実施された3-メチルフェノールおよび3-アミノフェノールの28日間反復経口投与

毒性試験^{2,3)}の高用量群の雄または雌において同様の変化が認められていることから、フェノール類に共通の変化であり、4-エチルフェノール投与に起因するものと考えられた。回復2週の検査では同じ変化はみられなかった。

投与期間終了時の血液生化学検査で雄のGPTおよび雌の総コレステロールの高値がみられた。雄のGPTの高値は、用量設定試験でも認められているが、GOT、アルカリホスファターゼ、 γ -GTP、総ビリルビン等の肝機能検査に変化がないことから、肝障害に基づく変化ではないと考えられた。総コレステロールの高値は、用量設定試験では雄に、本試験では雌に認められ、4-エチルフェノールが脂質代謝系に対して影響を及ぼす可能性が考えられた。回復期間終了時には、投与期間終了時に変化のみられた項目にはいずれも異常はなく、回復性が認められた。

剖検では、前胃の粘膜肥厚が雌雄とも高頻度で発現し、病理組織学検査においても前胃に扁平上皮過形成が雄では全例に、雌では7例中6例にみられ、その他にびらん、扁平上皮の変性と粘膜下織の水腫、粘膜下織における肉芽形成または潰瘍等の変化がみられた。その他の消化管の病理組織学検査では雌で腺胃粘膜のびらん、喉頭の粘膜固有層における好中球浸潤、喉頭のびらん、食道の扁平上皮過形成が各1例認められた。これらの変化はいずれも、4-エチルフェノールが皮膚・粘膜に刺激性を持つことによるものと考えられた。回復期間終了時には、これらの変化は認められなかった。

器官重量は、投与期間終了時に雌雄の肝臓の重量および相対重量に高値傾向または高値がみられた。雄では、さらに腎臓の相対重量に有意な高値がみられた。しかし、雌雄の肝臓および雄の腎臓には4-エチルフェノール投与に起因すると考えられる病理組織学的異常は認められなかった。回復期間終了時に雄で肺、下垂体、胸腺および精巣の絶対重量の低値、脳および精巣上体の相対重量の高値がみられたが、体重の低値に伴った変化と考えられた。

その他の1000 mg/kg群における病理組織学的所見のうち、投与期間終了時に雄において腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴の発現率が对照群の0%に対して57.1%と高かったが、変化の程度が軽度であること、自然発生で認められることが知られている^{4,5)}こと、ならびに当試験施設の過去5年間9試験での背景データにおける発現率(0~71.4%)の範囲内であることから、毒性学的意義は低いと考えられた。100および300 mg/kg群では、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴の発現の増加は認められなかった。

300 mg/kg群では、雄において投与期間終了時に、肝臓の絶対重量と相対重量に有意な高値がみられ、前胃に病理組織学的に扁平上皮過形成が認められた。これらはいずれも1000 mg/kg群でみられている変化であることから、4-エチルフェノール投与に起因するものと考えられた。

100 mg/kg群では、いずれの検査項目にも変化はみられなかった。

以上のことから、本試験条件下における無影響量 (NOEL) は、雄で100 mg/kg/day, 雌で300 mg/kg/day であると結論される。

文献

- 1) “13398の化学商品,” 化学工業日報社, 東京, 1998, p. 613.
- 2) 藤井咲子, 化学物質毒性試験報告, 8, 460(2001).
- 3) 須永昌男, 化学物質毒性試験報告, 8, 486(2001).
- 4) 田中寿子, “実験動物の病理組織,” 榎本真, 林裕造, 田中寿子 編, ソフトサイエンス社, 東京, 1981, pp. 380-398.
- 5) 高橋道人 監訳, “毒性病理学の基礎-実験動物の病理,” ソフトサイエンス社, 東京, 1992, pp. 155-170.

連絡先

試験責任者: 藤井咲子
試験担当者: 堀川裕尚, 咲間正志, 平田真理子,
古川正敏, 山本美代子
(株)化合物安全性研究所
〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors: Sakiko Fujii (Study director)
Hironao Horikawa, Masashi Sakuma,
Mariko Hirata, Masatoshi Furukawa,
Miyoko Yamamoto
Safety Research Institute for Chemical
Compounds Co., Ltd.
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,
004-0839, Japan
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Hematological findings of male rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	777.4 \pm 24.7	784.9 \pm 41.2	758.6 \pm 26.3	765.9 \pm 28.8	820.3 \pm 46.0	835.9 \pm 34.2
Hematocrit (%)	47.60 \pm 0.83	47.61 \pm 2.31	48.34 \pm 1.84	47.03 \pm 1.60	47.07 \pm 2.61	48.39 \pm 1.65
Hemoglobin (g/dL)	15.81 \pm 0.25	15.77 \pm 0.50	16.00 \pm 0.60	15.56 \pm 0.53	16.04 \pm 0.79	16.36 \pm 0.51
MCV (fL)	61.27 \pm 1.66	60.69 \pm 1.33	63.73 \pm 1.26*	61.43 \pm 1.47	57.41 \pm 1.77	57.94 \pm 2.25
MCH (pg)	20.37 \pm 0.58	20.10 \pm 0.64	21.09 \pm 0.50	20.31 \pm 0.49	19.59 \pm 0.79	19.57 \pm 0.63
MCHC (g/dL)	33.21 \pm 0.44	33.16 \pm 0.85	33.11 \pm 0.73	33.09 \pm 0.82	34.11 \pm 0.86	33.81 \pm 0.50
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	123.0 \pm 36.5	139.1 \pm 48.0	146.1 \pm 31.7	134.4 \pm 41.5	109.7 \pm 28.9	117.7 \pm 21.8
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	122.11 \pm 17.85	119.30 \pm 13.38	112.63 \pm 7.71	118.29 \pm 8.66	107.37 \pm 8.67	108.71 \pm 6.89
Reticulocyte (%)	28.3 \pm 6.2	23.7 \pm 5.7	26.9 \pm 7.5	30.3 \pm 7.6	20.9 \pm 4.0	19.1 \pm 3.3
PT (sec)	13.90 \pm 0.66	15.29 \pm 1.53	15.04 \pm 1.63	14.33 \pm 0.79	14.61 \pm 1.57	14.39 \pm 1.52
APTT (sec)	23.24 \pm 2.09	26.10 \pm 2.66	25.39 \pm 3.42	24.96 \pm 2.46	26.27 \pm 2.24	24.29 \pm 3.02
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophils						
Stab form	0.9 \pm 1.2	1.3 \pm 1.1	1.9 \pm 1.6	2.6 \pm 2.0	2.1 \pm 1.2	2.0 \pm 1.5
Segmented	7.3 \pm 2.8	5.6 \pm 3.1	7.6 \pm 3.9	4.0 \pm 1.7	7.3 \pm 2.5	5.6 \pm 2.2
Eosinophils	1.1 \pm 1.1	1.0 \pm 1.2	0.9 \pm 0.7	0.9 \pm 1.2	0.9 \pm 1.1	1.0 \pm 0.8
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocytes	0.7 \pm 1.0	0.7 \pm 1.3	0.6 \pm 0.5	1.0 \pm 0.8	1.3 \pm 1.1	1.1 \pm 0.9
Lymphocytes	90.0 \pm 3.5	91.4 \pm 4.9	89.1 \pm 4.6	91.6 \pm 3.5	88.4 \pm 1.6	90.3 \pm 2.8

Values are expressed as Mean \pm S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* p <0.05)

Table 2 Hematological findings of female rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	769.4 \pm 46.4	782.6 \pm 41.5	765.0 \pm 36.6	772.3 \pm 46.4	793.7 \pm 28.2	752.1 \pm 28.0*
Hematocrit (%)	45.86 \pm 3.20	45.93 \pm 2.05	45.43 \pm 1.88	45.71 \pm 2.18	44.51 \pm 1.63	42.94 \pm 2.24
Hemoglobin (g/dL)	15.63 \pm 0.90	15.69 \pm 0.61	15.56 \pm 0.58	15.69 \pm 0.58	15.47 \pm 0.57	15.09 \pm 0.61
MCV (fL)	59.57 \pm 1.35	58.73 \pm 1.48	59.43 \pm 1.59	59.24 \pm 1.70	56.10 \pm 0.97	57.07 \pm 1.48
MCH (pg)	20.31 \pm 0.45	20.07 \pm 0.68	20.34 \pm 0.51	20.34 \pm 0.71	19.49 \pm 0.44	20.06 \pm 0.45*
MCHC (g/dL)	34.13 \pm 0.63	34.17 \pm 0.41	34.24 \pm 0.48	34.34 \pm 1.07	34.79 \pm 0.47	35.16 \pm 1.14
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	92.6 \pm 17.9	72.7 \pm 20.0	71.6 \pm 14.7	100.3 \pm 35.0	78.9 \pm 16.5	84.1 \pm 29.6
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	121.40 \pm 10.06	119.86 \pm 14.04	121.86 \pm 18.87	113.46 \pm 11.26	102.49 \pm 9.24	95.79 \pm 6.78
Reticulocyte (%)	24.9 \pm 3.1	25.4 \pm 6.2	26.1 \pm 3.7	23.6 \pm 6.2	19.4 \pm 3.8	21.9 \pm 4.3
PT (sec)	14.20 \pm 0.46	13.99 \pm 0.61	13.73 \pm 0.58	13.93 \pm 0.50	13.77 \pm 0.38	13.50 \pm 0.43
APTT (sec)	20.76 \pm 2.61	20.20 \pm 1.37	20.30 \pm 1.28	21.24 \pm 0.98	19.60 \pm 1.70	20.11 \pm 1.56
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophils						
Stab form	0.6 \pm 0.5	0.9 \pm 1.2	2.4 \pm 1.7**	0.9 \pm 0.4	1.9 \pm 2.1	1.4 \pm 1.3
Segmented	5.3 \pm 2.3	5.4 \pm 2.4	6.6 \pm 3.2	4.3 \pm 3.4	4.0 \pm 2.3	7.6 \pm 6.5
Eosinophils	1.0 \pm 1.2	0.4 \pm 0.5	0.9 \pm 0.9	0.4 \pm 0.5	1.0 \pm 1.2	1.7 \pm 1.7
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocytes	1.0 \pm 1.2	1.1 \pm 0.9	0.6 \pm 0.5	0.7 \pm 0.8	1.1 \pm 0.7	0.7 \pm 0.8
Lymphocytes	92.1 \pm 3.2	92.1 \pm 3.8	89.6 \pm 4.1	93.9 \pm 3.6	92.0 \pm 3.5	88.6 \pm 7.6

Values are expressed as Mean \pm S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* p <0.05, ** p <0.01)

Table 3 Blood chemical findings of male rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	5.69 ± 0.18	5.79 ± 0.20	5.76 ± 0.05	5.66 ± 0.21	5.54 ± 0.19	5.44 ± 0.16
A/G	1.314 ± 0.084	1.204 ± 0.095*	1.209 ± 0.035	1.237 ± 0.092	1.101 ± 0.067	1.130 ± 0.070
Protein fraction (%)						
Albumin	56.86 ± 1.52	54.69 ± 1.94*	54.80 ± 0.70	55.37 ± 1.86	52.50 ± 1.52	53.14 ± 1.55
α_1 -globulin	19.77 ± 1.84	22.00 ± 2.01	21.74 ± 1.41	21.69 ± 1.74	23.61 ± 2.40	22.79 ± 2.15
α_2 -globulin	9.37 ± 1.05	9.06 ± 0.71	8.69 ± 0.62	9.76 ± 0.81	9.43 ± 0.81	9.74 ± 0.66
β -globulin	12.87 ± 1.10	12.87 ± 0.73	13.43 ± 1.01	12.56 ± 0.60	12.77 ± 0.92	12.30 ± 1.09
γ -globulin	1.13 ± 0.44	1.39 ± 0.32	1.34 ± 0.47	0.63 ± 0.18*	1.69 ± 0.76	2.03 ± 1.15
GOT (IU/L)	60.6 ± 3.6	60.9 ± 3.0	61.4 ± 4.4	62.0 ± 7.0	71.4 ± 12.4	66.9 ± 7.8
GPT (IU/L)	24.4 ± 3.3	23.6 ± 1.1	27.7 ± 3.0	40.6 ± 8.8**	31.3 ± 11.8	28.1 ± 3.5
ALP (IU/L)	496.4 ± 61.2	504.1 ± 98.8	534.4 ± 99.5	455.1 ± 87.1	308.3 ± 59.7	380.6 ± 87.3
LDH (IU/L)	267.7 ± 67.0	257.0 ± 56.0	302.7 ± 110.2	300.3 ± 40.1	318.4 ± 104.6	284.3 ± 64.2
γ -GTP (IU/L)	0.77 ± 0.28	0.81 ± 0.20	0.73 ± 0.14	0.89 ± 0.23	0.39 ± 0.12	0.46 ± 0.22
Total bilirubin (mg/dL)	0.060 ± 0.006	0.059 ± 0.007	0.057 ± 0.005	0.064 ± 0.011	0.061 ± 0.007	0.074 ± 0.013*
Glucose (mg/dL)	148.0 ± 21.3	164.0 ± 8.9	171.4 ± 6.9*	149.9 ± 15.3	178.1 ± 27.4	153.9 ± 17.2
Total cholesterol (mg/dL)	65.9 ± 5.7	58.0 ± 8.2	63.4 ± 9.1	67.9 ± 9.2	66.3 ± 8.0	65.7 ± 22.5
Triglyceride (mg/dL)	45.9 ± 18.7	51.7 ± 11.5	72.6 ± 27.0	40.3 ± 23.5	52.0 ± 23.5	37.7 ± 12.4
Urea nitrogen (mg/dL)	13.71 ± 0.89	13.79 ± 1.12	13.31 ± 1.99	14.21 ± 2.17	16.17 ± 2.14	17.44 ± 2.16
Creatinine (mg/dL)	0.430 ± 0.019	0.429 ± 0.023	0.434 ± 0.024	0.409 ± 0.023	0.474 ± 0.044	0.441 ± 0.037
Sodium (mEq/L)	142.86 ± 1.14	141.79 ± 0.95	141.93 ± 0.53	140.57 ± 1.48**	143.79 ± 1.63	143.14 ± 1.57
Potassium (mEq/L)	4.813 ± 0.309	4.991 ± 0.313	4.730 ± 0.256	5.044 ± 0.298	4.526 ± 0.416	4.871 ± 0.175
Chlorine (mEq/L)	106.3 ± 1.8	105.7 ± 1.4	104.7 ± 1.4	104.3 ± 1.4	106.6 ± 1.6	107.6 ± 1.8
Calcium (mg/dL)	9.10 ± 0.21	9.11 ± 0.41	9.21 ± 0.24	8.97 ± 0.33	9.53 ± 0.26	9.50 ± 0.24
Inorganic phosphorous (mg/dL)	8.79 ± 0.71	8.77 ± 0.64	8.74 ± 0.61	9.50 ± 0.84	7.04 ± 0.61	7.66 ± 0.36*

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 4 Blood chemical findings of female rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	5.54 ± 0.22	5.56 ± 0.20	5.61 ± 0.18	5.79 ± 0.29	5.73 ± 0.56	5.59 ± 0.31
A/G	1.410 ± 0.063	1.436 ± 0.041	1.434 ± 0.094	1.471 ± 0.057	1.426 ± 0.059	1.313 ± 0.139
Protein fraction (%)						
Albumin	58.57 ± 1.11	59.01 ± 0.69	58.96 ± 1.61	59.61 ± 0.93	58.84 ± 1.01	56.71 ± 2.83
α_1 -globulin	19.14 ± 0.91	19.51 ± 0.73	18.77 ± 1.43	18.16 ± 0.87	19.17 ± 1.64	19.29 ± 0.98
α_2 -globulin	8.27 ± 0.76	8.14 ± 0.86	8.50 ± 1.14	8.40 ± 0.84	8.56 ± 1.09	8.83 ± 0.62
β -globulin	12.47 ± 1.03	11.71 ± 0.84	12.31 ± 1.59	12.06 ± 1.17	11.24 ± 1.09	12.39 ± 2.81
γ -globulin	1.54 ± 0.38	1.61 ± 0.39	1.46 ± 0.45	1.77 ± 0.43	2.19 ± 0.52	2.79 ± 0.93
GOT (IU/L)	65.6 ± 19.5	54.6 ± 2.6	59.3 ± 2.9	59.7 ± 4.6	57.3 ± 6.9	66.4 ± 11.1
GPT (IU/L)	22.3 ± 8.4	20.7 ± 1.9	20.3 ± 1.8	26.6 ± 4.1	20.6 ± 2.7	23.4 ± 4.0
ALP (IU/L)	269.6 ± 43.1	310.0 ± 99.4	281.9 ± 50.7	292.1 ± 51.8	156.3 ± 44.7	218.6 ± 53.8*
LDH (IU/L)	287.7 ± 60.1	239.7 ± 50.1	262.9 ± 60.0	276.4 ± 50.4	316.3 ± 94.8	280.0 ± 37.0
γ -GTP (IU/L)	0.83 ± 0.10	1.00 ± 0.20	0.99 ± 0.23	1.13 ± 0.28*	0.53 ± 0.26	0.60 ± 0.23
Total bilirubin (mg/dL)	0.061 ± 0.007	0.054 ± 0.008	0.056 ± 0.008	0.061 ± 0.011	0.083 ± 0.014	0.079 ± 0.020
Glucose (mg/dL)	130.3 ± 10.2	135.6 ± 14.5	127.6 ± 12.4	124.0 ± 16.6	140.4 ± 28.9	122.0 ± 13.2
Total cholesterol (mg/dL)	61.4 ± 13.1	69.1 ± 9.9	65.4 ± 5.1	81.6 ± 14.3**	78.9 ± 17.7	80.7 ± 18.9
Triglyceride (mg/dL)	11.7 ± 6.4	17.4 ± 10.1	12.1 ± 4.1	24.4 ± 14.0*	38.1 ± 49.1	17.4 ± 7.9
Urea nitrogen (mg/dL)	16.89 ± 2.29	16.97 ± 2.02	16.33 ± 1.92	16.86 ± 1.41	18.67 ± 2.08	17.99 ± 2.35
Creatinine (mg/dL)	0.427 ± 0.042	0.417 ± 0.024	0.430 ± 0.035	0.413 ± 0.027	0.484 ± 0.037	0.469 ± 0.033
Sodium (mEq/L)	140.64 ± 1.31	141.57 ± 0.67*	140.71 ± 0.39	140.79 ± 0.70	140.71 ± 0.70	140.93 ± 1.24
Potassium (mEq/L)	4.771 ± 0.113	4.564 ± 0.265	4.546 ± 0.382	4.754 ± 0.272	4.410 ± 0.286	4.496 ± 0.311
Chlorine (mEq/L)	108.6 ± 0.5	109.1 ± 0.7	108.1 ± 0.9	107.9 ± 0.7	108.1 ± 1.9	109.0 ± 2.0
Calcium (mg/dL)	8.96 ± 0.35	8.91 ± 0.24	8.89 ± 0.31	9.24 ± 0.17	9.34 ± 0.35	9.14 ± 0.42
Inorganic phosphorous (mg/dL)	7.56 ± 0.67	6.86 ± 0.86	7.34 ± 0.82	7.49 ± 0.74	5.84 ± 0.75	6.04 ± 0.30

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 5 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Body weight (g)	352.1 ± 27.3	347.9 ± 20.1	363.4 ± 15.6	329.4 ± 28.8	425.6 ± 28.9	380.6 ± 25.7**
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.073 ± 0.073	2.121 ± 0.038	2.089 ± 0.037	2.019 ± 0.048	2.107 ± 0.054	2.084 ± 0.088
Lungs (g)	1.326 ± 0.084	1.361 ± 0.124	1.397 ± 0.100	1.277 ± 0.073	1.423 ± 0.093	1.297 ± 0.112*
Heart (g)	1.216 ± 0.132	1.256 ± 0.092	1.314 ± 0.085	1.229 ± 0.132	1.394 ± 0.133	1.279 ± 0.118
Liver (g)	11.023 ± 1.183	11.414 ± 0.878	12.603 ± 1.059*	11.783 ± 1.181	12.487 ± 1.413	11.043 ± 1.477
Kidneys (g)	2.821 ± 0.285	2.737 ± 0.226	2.874 ± 0.193	2.930 ± 0.308	3.044 ± 0.126	2.910 ± 0.359
Spleen (g)	0.671 ± 0.093	0.699 ± 0.099	0.746 ± 0.075	0.659 ± 0.064	0.759 ± 0.135	0.684 ± 0.078
Adrenals (mg)	54.6 ± 7.1	55.4 ± 6.8	55.6 ± 7.1	51.4 ± 6.0	63.9 ± 8.1	57.4 ± 9.2
Pituitary gland (mg)	11.39 ± 1.84	11.69 ± 2.05	12.06 ± 1.55	10.36 ± 1.26	13.96 ± 1.47	12.19 ± 1.35*
Thymus (mg)	592.4 ± 118.3	673.6 ± 80.7	642.4 ± 139.7	567.1 ± 135.8	553.9 ± 60.8	484.7 ± 48.2*
Thyroids (mg)	21.96 ± 4.89	21.26 ± 4.15	19.43 ± 2.42	20.04 ± 4.78	23.51 ± 5.36	25.46 ± 7.04
Testes (g)	3.099 ± 0.204	3.146 ± 0.323	3.127 ± 0.212	2.934 ± 0.182	3.516 ± 0.466	3.029 ± 0.283*
Epididymides (g)	0.716 ± 0.073	0.740 ± 0.067	0.727 ± 0.043	0.709 ± 0.057	0.960 ± 0.060	0.964 ± 0.078
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.591 ± 0.062	0.613 ± 0.043	0.574 ± 0.021	0.616 ± 0.045	0.496 ± 0.026	0.549 ± 0.039*
Lungs (g%)	0.377 ± 0.019	0.391 ± 0.025	0.384 ± 0.027	0.389 ± 0.021	0.336 ± 0.019	0.340 ± 0.021
Heart (g%)	0.344 ± 0.019	0.360 ± 0.017	0.360 ± 0.019	0.373 ± 0.027	0.327 ± 0.023	0.336 ± 0.020
Liver (g%)	3.129 ± 0.176	3.283 ± 0.178	3.461 ± 0.161**	3.577 ± 0.171**	2.929 ± 0.195	2.891 ± 0.229
Kidneys (g%)	0.800 ± 0.045	0.787 ± 0.047	0.791 ± 0.046	0.890 ± 0.030**	0.719 ± 0.052	0.764 ± 0.073
Spleen (g%)	0.190 ± 0.021	0.199 ± 0.023	0.204 ± 0.017	0.199 ± 0.015	0.179 ± 0.035	0.180 ± 0.013
Adrenals (mg%)	15.500 ± 1.621	15.944 ± 1.836	15.317 ± 2.042	15.621 ± 1.323	15.074 ± 2.273	15.123 ± 2.401
Pituitary gland (mg%)	3.219 ± 0.320	3.356 ± 0.518	3.319 ± 0.430	3.146 ± 0.300	3.289 ± 0.371	3.213 ± 0.379
Thymus (mg%)	168.367 ± 31.665	194.710 ± 29.527	176.601 ± 35.232	171.761 ± 37.547	130.874 ± 18.764	128.313 ± 19.821
Thyroids (mg%)	6.199 ± 1.030	6.084 ± 0.949	5.344 ± 0.629	6.116 ± 1.436	5.499 ± 1.042	6.707 ± 1.845
Testes (g%)	0.883 ± 0.062	0.904 ± 0.081	0.861 ± 0.076	0.894 ± 0.071	0.830 ± 0.118	0.799 ± 0.075
Epididymides (g%)	0.203 ± 0.021	0.213 ± 0.029	0.200 ± 0.018	0.214 ± 0.010	0.229 ± 0.018	0.254 ± 0.016*

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 6 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals	7	7	7	7	7	7
Body weight (g)	200.9±12.8	198.3±14.7	204.7±9.7	185.0±17.6	211.9±41.9	219.9±14.1
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.921±0.020	1.884±0.040	1.883±0.068	1.883±0.076	1.946±0.105	1.940±0.083
Lungs (g)	0.934±0.046	0.919±0.056	0.949±0.083	0.909±0.084	1.024±0.116	0.957±0.078
Heart (g)	0.781±0.070	0.770±0.070	0.761±0.023	0.736±0.068	0.857±0.099	0.830±0.078
Liver (g)	6.173±0.598	5.911±0.384	6.380±0.166	6.434±0.773	6.887±1.359	6.504±0.427
Kidneys (g)	1.650±0.135	1.669±0.162	1.694±0.124	1.624±0.123	1.841±0.264	1.754±0.183
Spleen (g)	0.443±0.068	0.393±0.026	0.434±0.086	0.396±0.085	0.473±0.090	0.476±0.058
Adrenals (mg)	62.7±9.5	59.1±8.5	67.3±5.9	55.6±8.1	63.9±8.5	60.3±10.2
Pituitary gland (mg)	12.94±1.34	12.57±2.08	13.40±0.96	11.56±1.61	13.89±1.59	13.16±1.17
Thymus (mg)	463.9±83.5	443.7±50.2	453.0±68.0	403.0±81.1	490.9±101.3	410.7±81.4
Thyroids (mg)	14.17±3.31	14.44±2.87	15.97±4.84	14.40±2.50	16.91±1.60	15.40±2.97
Ovaries (mg)	81.0±15.5	79.3±11.1	83.6±11.1	74.9±8.2	80.3±14.3	85.3±7.5
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.959±0.064	0.954±0.061	0.920±0.048	1.026±0.109	0.821±0.117	0.886±0.058
Lungs (g%)	0.464±0.017	0.464±0.023	0.463±0.038	0.490±0.026	0.427±0.048	0.434±0.020
Heart (g%)	0.390±0.026	0.389±0.029	0.373±0.020	0.399±0.017	0.357±0.033	0.377±0.022
Liver (g%)	3.070±0.172	2.986±0.153	3.121±0.116	3.474±0.212**	2.841±0.147	2.961±0.121
Kidneys (g%)	0.821±0.036	0.843±0.056	0.826±0.046	0.880±0.052	0.764±0.043	0.799±0.066
Spleen (g%)	0.220±0.025	0.200±0.019	0.211±0.043	0.214±0.047	0.197±0.039	0.217±0.025
Adrenals (mg%)	31.367±5.384	29.964±4.909	32.877±2.611	29.994±2.692	26.857±4.679	27.589±5.655
Pituitary gland (mg%)	6.453±0.631	6.340±0.908	6.554±0.522	6.243±0.591	5.850±0.953	6.001±0.640
Thymus (mg%)	230.357±35.020	224.364±26.085	221.616±33.626	216.154±25.600	206.383±49.790	186.273±32.202
Thyroids (mg%)	7.121±1.894	7.311±1.489	7.783±2.196	7.849±1.599	7.153±1.324	7.003±1.275
Ovaries (mg%)	40.451±8.158	40.147±6.134	40.736±4.323	40.571±3.755	33.646±6.213	38.980±4.758

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (**p<0.01)

Table 7 Histopathological findings of male rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Grade	End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals examined		7	7	7	7	7	7
Organ: Findings	Grade						
Lung: Accumulation, foam cell	+	0	*	*	1	0	0
Forestomach							
Limiting ridge: Erosion	+	0	0	0	1	0	0
Hyperplasia, squamous cell	+	0	0	1	4	0	0
Other part: Degeneration, squamous cell	+	0	0	0	2	0	0
Edema, submucosa	++	0	0	0	2	0	0
Hyperplasia, squamous cell	Total	0	0	1	7	0	0
	+	0	0	1	4	0	0
	++	0	0	0	3	0	0
Pancreas: Atrophy, acinar cell	+	0	*	*	0	1	1
Liver: Microgranuloma	+	3	*	*	1	1	2
Kidney: Cast, hyaline	+	0	0	0	0	1	1
Eosinophilic body, proximal tubular epithelium	+	0	2	1	0	0	0
Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	+	0	3	1	4	1	0
Regeneration, tubular epithelium	+	1	0	1	1	2	1
Epididymis: Cell debris, lumen	+	0	*	*	0	0	1
Prostate: Cellular infiltration, lymphocyte	+	1	*	*	1	0	1
Pituitary gland: Cyst	<+>	0	*	*	1	0	0

Values are number of animals with findings

Grade of histopathological finding; +: slight, ++: moderate, <+>: detected

*: not examined

Table 8 Histopathological findings of female rats treated orally with 4-ethylphenol in twenty-eight-day repeat dose toxicity test

Item	Grade	End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	0 mg/kg	1000 mg/kg
Number of animals examined		7	7	7	7	7	7
Organ: Findings	Grade						
Lung: Accumulation, foam cell	+	2	*	*	1	0	1
Larynx: Cellular infiltration, neutrophil, lamina propria	+	0	0	0	1	0	0
Erosion	+	0	0	0	1	0	0
Esophagus: Hyperplasia, squamous cell	+	0	0	0	1	0	0
Forestomach:							
Degeneration, squamous cell	+	0	0	0	2	0	0
Edema, submucosa	++	0	0	0	2	0	0
Granulation, submucosa	+	0	0	0	1	0	0
Hyperplasia, squamous cell	Total	0	0	0	6	0	0
	+	0	0	0	1	0	0
	++	0	0	0	5	0	0
Ulcer	+	0	0	0	1	0	0
Glandular stomach: Erosion	+	0	0	0	1	0	0
Liver: Microgranuloma	+	0	*	*	1	2	2
Kidney: Cyst	<+>	0	*	*	2	0	0
Mineralization, cortico-medullary junction	+	0	*	*	1	0	0

Values are number of animals with findings

Grade of histopathological finding; +: slight, ++: moderate, <+>: detected

*: not examined

メタクリロニトリルの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of Methacrylonitrile on Bacteria

要約

メタクリロニトリルについて、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⁾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、本試験はS9 mix無添加試験および添加試験ともに313~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。

その結果、2回の本試験とも用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果からメタクリロニトリルは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

方法

1. 被験物質

メタクリロニトリルは、無色透明の液体である。用いた被験物質は、ロット番号P-30A、純度99%、製造 旭化成工業(株)(岡山)であり、旭化成工業(株)から供与された。被験物質は、使用時まで遮光して冷蔵した。本ロットについては、試験期間中安定であることが確認された。

メタクリロニトリルは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:ACQ2095, 和光純薬工業(株))に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌ごとに用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれTable中に示した。

- 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF2, 和光純薬工業(株))
アジ化ナトリウム (SA, 和光純薬工業(株))
9-アミノアクリジン (9AA, Sigma Chem. Co.)
2-アミノアントラセン (2AA, 和光純薬工業(株))

AF2, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを-20℃で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

3. 検定菌

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

*S. typhimurium*の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA*株は1997年4月9日に日本バイオアッセイ研究センターの松島泰次郎博士から分与された。

検定菌は-80℃で凍結保存したのを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)およびアンピシリン耐性因子pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントプロスNo. 2(Oxoid Ltd.)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。

分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

4. 培地およびS9 mixの組成

1) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地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
大洋寒天(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

2) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)または(C)を容量比10:1の割合で混合した。

(A)バクトアガー(Difco Lab.)	0.6 w/v %
塩化ナトリウム	0.5 w/v %
(B) <i>Salmonella typhimurium</i> 用	
L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
D-ビオチン	0.5 mmol/L
(C) <i>Escherichia coli</i> 用	
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたりの組成は下記のとおりである。

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(キッコーマン株)を用いた。

5. 試験方法

プレインキュベーション法³⁾により, S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に, 被験物質調製液0.1 mL, リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 mL), 検定菌液0.1 mLを混合し, 37℃で20分間プレインキュベーションしたのち, 約45℃に保温したトッパアガー2 mLを加えて混和し, 合成培地平板上に流して固めた。また, 対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。同時に実施した試験については, 陰性および陽性対照群を共通とした。

培養は37℃で48時間行い, 生じた復帰変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈殿の有無は, 肉眼により観察した。また, 抗菌性の有無については, 肉眼あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌叢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, 陰性および陽性対照群では3枚ずつ, 各用量については1枚ずつとした。また, 本試験においては, 両対照群および各用量につき, 3枚ずつを用い, それぞれの平均値と標準偏差を求めた。

用量設定試験は1回, 本試験は2回実施し, 結果の再現性を確認した。

6. 判定基準

用いた5種の検定菌のうち, 1種以上の検定菌のS9 mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において, 被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が, 陰性対照値の2倍以上に増加し, その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に, 当該被験物質は本試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定することとした。

結果および考察

50.0~5000 μg/plateの範囲で公比を約3として, 用量設定試験を実施した。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。また, 被験物質に由来する沈殿もすべての用量で認められなかった。

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/plateとした。

最高用量を5000 μg/plateとして公比2で5用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果, すべての検定菌において, 2回の試験とも陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき, メタクリロニトリルは, 用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

なおメタクリロニトリルは, 復帰変異試験およびショウジョウバエを用いた伴性劣性致死突然変異試験とともに陰性の結果が得られており^{4, 5)}, 当研究所で本試験と並行して実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では染色体の構造異常および倍数性細胞が誘発され, 陽性であった⁶⁾。また, 関連物質であるアクリロニトリルについては, 復帰変異試験および染色体異常試験とともに陽性の結果が⁷⁾, メチルメタクリレートについては, 復帰変異試験で陰性, 染色体異常試験および培養細胞を用いた突然変異試験で陽性の結果が得られている⁸⁻¹⁰⁾。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L.Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp. 273-285.
- 4) E. Zeiger, *et al.*, *Environ. Mutagenesis* **9** (Suppl. 9), 1(1987).
- 5) S. Zimmering, *et al.*, *Environ. Mol. Mutagenesis* **14**, 245(1989).
- 6) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **8**, 656(2001).
- 7) 石館基, "<改定>染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 9.
- 8) T. H. J. M. Waegemaekers, M. P. M. Bensink, *Mutat. Res.*, **37**, 95(1984).
- 9) C. L. Doerr, *et al.*, *Mutat. Res.*, **22**, 191(1989).
- 10) H. Schweikl, *et al.*, *Mutat. Res.*, **15**, 119(1998).

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：原 巧, 川上久美子, 山本明子,
三枝克彦, 加藤初美
(財)食品薬品安全センター秦野研究所
〒257-8523 秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Takumi Hara, Kumiko Kawakami,
Akiko Yamamoto, Katsuhiko Saegusa,
Hatsumi Kato
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 Mutagenicity of methacrylonitrile on bacteria (I)

With(+)or without(-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants(number of colonies/plate, mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type						Frameshift type								
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	137	138	138	6	11	12	32	22	19	20	28	23	15	15	12
		(138 \pm 0.6)			(10 \pm 3.2)			(24 \pm 6.8)			(24 \pm 4.0)			(14 \pm 1.7)		
	313	134	145	143	11	7	15	25	26	19	20	23	22	2	4	12
		(141 \pm 5.9)			(11 \pm 4.0)			(23 \pm 3.8)			(22 \pm 1.5)			(6 \pm 5.3)		
	625	117	167	155	10	15	8	27	22	33	20	24	31	18	9	12
		(146 \pm 26.1)			(11 \pm 3.6)			(27 \pm 5.5)			(25 \pm 5.6)			(13 \pm 4.6)		
	1250	122	145	143	12	13	11	19	17	30	19	26	27	10	14	7
	(137 \pm 12.7)			(12 \pm 1.0)			(22 \pm 7.0)			(24 \pm 4.4)			(10 \pm 3.5)			
2500	145	117	147	7	8	15	15	23	31	20	21	18	17	11	7	
	(136 \pm 16.8)			(10 \pm 4.4)			(23 \pm 8.0)			(20 \pm 1.5)			(12 \pm 5.0)			
5000	136	148	168	10	10	10	25	24	25	18	27	27	10	11	11	
	(151 \pm 16.2)			(10 \pm 0.0)			(25 \pm 0.6)			(24 \pm 5.2)			(11 \pm 0.6)			
S9 mix (+)	0	176	146	154	8	10	10	25	28	27	38	29	26	9	14	19
		(159 \pm 15.5)			(9 \pm 1.2)			(27 \pm 1.5)			(31 \pm 6.2)			(14 \pm 5.0)		
	313	159	168	142	7	13	4	21	27	28	20	28	31	12	17	15
		(156 \pm 13.2)			(8 \pm 4.6)			(25 \pm 3.8)			(26 \pm 5.7)			(15 \pm 2.5)		
	625	147	170	166	13	7	8	34	29	20	29	26	21	8	14	15
		(161 \pm 12.3)			(9 \pm 3.2)			(28 \pm 7.1)			(25 \pm 4.0)			(12 \pm 3.8)		
	1250	166	157	130	9	14	9	23	31	22	18	34	28	12	18	20
	(151 \pm 18.7)			(11 \pm 2.9)			(25 \pm 4.9)			(27 \pm 8.1)			(17 \pm 4.2)			
2500	148	147	154	6	8	12	32	25	32	33	29	30	16	20	16	
	(150 \pm 3.8)			(9 \pm 3.1)			(30 \pm 4.0)			(31 \pm 2.1)			(17 \pm 2.3)			
5000	148	160	154	7	11	16	35	36	33	28	19	30	13	16	20	
	(154 \pm 6.0)			(11 \pm 4.5)			(35 \pm 1.5)			(26 \pm 5.9)			(16 \pm 3.5)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	598	557	565	714	702	739	183	260	252	639	628	651	380	585	453
	(573 \pm 21.7)			(718 \pm 18.9)			(232 \pm 42.3)			(640 \pm 13.1)			(473 \pm 103.9)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	980	1121	1117	459	402	408	777	891	969	490	535	485	348	395	364
	(1073 \pm 80.3)			(423 \pm 31.3)			(879 \pm 96.6)			(503 \pm 27.5)			(369 \pm 23.9)			

The purity of the test substance was 99 %.

This substance contained 51 ppm *p*-methoxyphenol as polymerization inhibitor, and 19 ppm acetone, 59 ppm acrylonitrile, 55 ppm propionitrile, 72 ppm methacrolein, 48 ppm isobutyronitrile, 35 ppm hydrogen cyanide, and trace amount of acetonitrile and *cis*-crotonitrile as impurities.

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

Table 2 Mutagenicity of methacrylonitrile on 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 substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	134	163	129	13	13	11	26	22	31	24	26	19	7	12	7
		(142 \pm 18.4)			(12 \pm 1.2)			(26 \pm 4.5)			(23 \pm 3.6)			(9 \pm 2.9)		
	313	151	147	128	16	17	12	14	24	19	31	21	21	5	8	9
		(142 \pm 12.3)			(15 \pm 2.6)			(19 \pm 5.0)			(24 \pm 5.8)			(7 \pm 2.1)		
	625	111	148	138	7	8	20	12	20	10	24	28	29	12	15	4
		(132 \pm 19.1)			(12 \pm 7.2)			(14 \pm 5.3)			(27 \pm 2.6)			(10 \pm 5.7)		
	1250	144	138	124	17	17	17	21	21	20	26	17	17	9	5	10
		(135 \pm 10.3)			(17 \pm 0.0)			(21 \pm 0.6)			(20 \pm 5.2)			(8 \pm 2.6)		
2500	140	134	123	6	5	11	20	23	11	30	21	26	9	11	8	
	(132 \pm 8.6)			(7 \pm 3.2)			(18 \pm 6.2)			(26 \pm 4.5)			(9 \pm 1.5)			
5000	134	132	129	15	8	18	15	18	12	20	36	34	9	10	10	
	(132 \pm 2.5)			(14 \pm 5.1)			(15 \pm 3.0)			(30 \pm 8.7)			(10 \pm 0.6)			
S9 mix (+)	0	148	144	132	8	12	12	28	19	20	31	34	34	10	18	16
		(141 \pm 8.3)			(11 \pm 2.3)			(22 \pm 4.9)			(33 \pm 1.7)			(15 \pm 4.2)		
	313	129	150	168	13	16	12	25	18	24	35	38	33	15	12	19
		(149 \pm 19.5)			(14 \pm 2.1)			(22 \pm 3.8)			(35 \pm 2.5)			(15 \pm 3.5)		
	625	138	166	145	12	16	12	22	32	25	32	34	30	17	18	18
		(150 \pm 14.6)			(13 \pm 2.3)			(26 \pm 5.1)			(32 \pm 2.0)			(18 \pm 0.6)		
	1250	148	168	154	15	9	11	28	16	27	43	32	42	15	19	9
		(157 \pm 10.3)			(12 \pm 3.1)			(24 \pm 6.7)			(39 \pm 6.1)			(14 \pm 5.0)		
2500	155	152	167	10	13	11	23	31	29	26	25	34	12	20	13	
	(158 \pm 7.9)			(11 \pm 1.5)			(28 \pm 4.2)			(28 \pm 4.9)			(15 \pm 4.4)			
5000	160	163	154	15	16	13	34	34	31	33	29	35	11	18	16	
	(159 \pm 4.6)			(15 \pm 1.5)			(33 \pm 1.7)			(32 \pm 3.1)			(15 \pm 3.6)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	637	601	526	792	701	662	260	236	212	622	586	637	507	568	625
	(588 \pm 56.6)			(718 \pm 66.7)			(236 \pm 24.0)			(615 \pm 26.2)			(567 \pm 59.0)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	939	994	968	324	358	433	825	803	912	478	427	428	386	322	395
	(967 \pm 27.5)			(372 \pm 55.8)			(847 \pm 57.6)			(444 \pm 29.2)			(368 \pm 39.8)			

The purity of the test substance was 99 %.

This substance contained 51 ppm *p*-methoxyphenol as polymerization inhibitor, and 19 ppm acetone, 59 ppm acrylonitrile, 55 ppm propionitrile, 72 ppm methacrolein, 48 ppm isobutyronitrile, 35 ppm hydrogen cyanide, and trace amount of acetonitrile and *cis*-crotonitrile as impurities.

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

In Vitro Chromosomal Aberration Test of Methacrylonitrile
on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

メタクリロニトリルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)およびS9 mix非存在下の短時間処理(6時間)では、0.67 mg/mL(10 mM)の濃度においても50%を超える細胞増殖抑制は認められなかった。S9 mix存在下の短時間処理における50%細胞増殖抑制濃度は、0.27 mg/mLであった。従って、連続処理およびS9 mix非存在下での短時間処理では、0.67 mg/mL(10 mM)を最高濃度とし、公比2で3濃度設定した。S9 mix存在下での短時間処理では、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度設定した。連続処理では、24時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、標本作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間連続処理およびS9 mix非存在下の短時間処理では0.67 mg/mL(10 mM)、S9 mix存在下での短時間処理では0.27 mg/mLであったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理およびS9 mix非存在下で短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。S9 mix存在下の短時間処理では、すべての処理群(0.068-0.27 mg/mL)で染色体異常の誘発作用が認められ、その誘発頻度は7.5-62.0%(gapを除く)であった。倍数性細胞の誘発作用は低濃度群(0.068 mg/mL)および中濃度(0.14 mg/mL)で観察され、出現頻度はそれぞれ3.13%および1.88%であった。傾向性検定では有意差($p < 0.01$)が認められなかったが、それは分裂遅延による可能性が考えられた。

以上の結果より、本試験条件下でメタクリロニトリルは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在21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、仔牛血清(CS, Cansera International)を10 vol%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

メタクリロニトリルはプラスチック底面を溶解し、揮発性があることから、培養にはガラスフラスコ(25 cm², ハリオ)を用いた。2 × 10⁴個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたフラスコに播き、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時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix非存在下および存在下で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. S9

S9(キッコーマン(株))は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

メタクリロニトリル(ロット番号:P-30A, 旭化成工業(株)(岡山))は、無色透明液体で、水に対しては100 mmol/L以上50 mg/mL未満、DMSOでは50 mg/mL以上、アセトンでは50 mg/mL以上で溶解し、凝固点-35.8 °C、沸点90.3 °C、蒸気圧8.7 kPaで、純度99%(不純物としてパラメトキシフェノール51 ppm, アセトン19 ppm, アクリロニトリル59 ppm, プロピオニトリル55 ppm, メタクロレイン72 ppm, イソブチロニトリル48 ppm, 青酸35 ppm, アセトニトリルとシクロトニトリルは痕跡程度を含む)の物質で、冷蔵、遮光で保存した。被験物質原体は、冷蔵、遮光下で安定であった。

6. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に使用した。溶媒は局方注射用水(ロット番号:K8H73, (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 vol%になるように加えた。

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。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、コールターカウンター(Coulter Electronics Ltd.)を用いて各群の細胞数を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理およびS9 mix非存在下での短時間処理では、最高処理濃度の0.67 mg/mL (10 mM)においても50%を越える細胞増殖抑制作用は認められなかった。S9 mix存在下の短時間処理における50%細胞増殖抑制濃度は0.27 mg/mLであった(Fig. 1)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、連続処理およびS9 mix非存在下の短時間処理では、0.67 mg/mL (10 mM)を最高濃度とし、公比2で3濃度を設定した(0.17, 0.34, 0.67 mg/mL)。S9 mix存在下の短時間処理では、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(0.034, 0.068, 0.14, 0.27, 0.54 mg/mL)。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC (MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド (CPA, Sigma Chemical Co.)は、局方注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験において、溶媒対照群と処理群では1濃度あたり2フラスコを用い、染色体標本の作製およびコールターカウンターによる細胞増殖率測定を行った。無処理対照群および陽性対照群についてはコールターカウンターによる細胞増殖率測定は行わなかった。

9. 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 μ g/mLになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各フラスコにつき6枚作製した。作製した標本を3 vol%ギムザ溶液で染色した。

10. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20%以上の相対増殖率で、かつ2フラスコともに0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2)、連続処理およびS9 mix非存在下での短時間処理では0.67 mg/mL (10 mM)が、S9 mix存在下の短時間処理では0.27 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1つのフラスコから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会(MMS)¹¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型

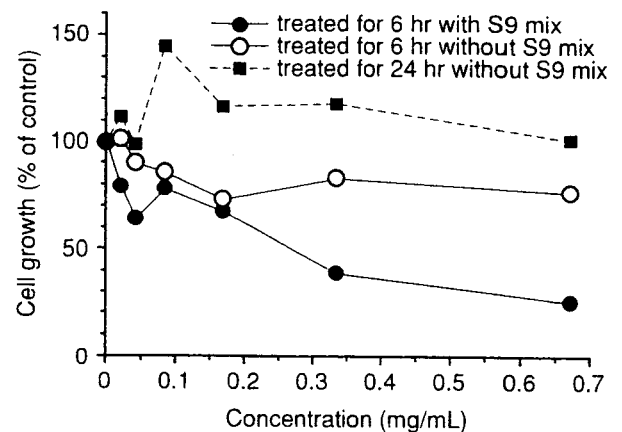


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with methacrylonitrile

あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyplloid)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。

11. 記録と判定

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

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法¹²⁾により、有意差検定を実施した($p < 0.01$)。また、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定¹³⁾($p < 0.01$)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

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。メタクリロニトリルを加えて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。メタクリロニトリルを加え、S9 mix非存在下で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。一方、S9 mix存在下で短時間処理したすべての処理群(0.068~0.27 mg/mL)において、染色体の構造異常の誘発が見られ、その出現頻度は7.5~62.0%(gapを除く)であった。また、低濃度群(0.068 mg/mL)および中濃度群(0.14 mg/mL)で倍数性細胞の有意な($p < 0.01$)増加が認められ、その出現頻度は3.13%および1.88%であったが、傾向性検定の結果、濃度依存性は認められなかった($p < 0.01$)。これは、高濃度群(0.27 mg/mL)では細胞増殖率が57.5%と高い値であったにもかかわらず、分裂指数が低下していることや毒性のため800細胞観察できな

かった(観察細胞数:733細胞)ことから、分裂遅延により倍数性細胞の頻度が濃度依存的に減少した可能性が考えられた。

メタクリロニトリルのメチル基が水素に置換しているアクリロニトリルは、代謝活性化の有無に関係なく染色体の構造異常を誘発するが、倍数性細胞を誘発しないことが報告されている⁴⁾。また、メタクリロニトリルのニトリル基がメチルエステルに置換しているメチルメタクリラートは染色体の構造異常を誘発するが、その作用は弱い⁵⁾。これらのことから、化学構造が類似したこれらの3物質は、ともに染色体の構造異常を誘発するがその作用機序が異なる可能性が示唆された。

なお、メタクリロニトリルやメチルメタクリラートについては、復帰変異試験およびショウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験において陰性の結果が報告されている⁶⁻⁹⁾が、アクリロニトリルは、復帰変異試験で陽性の結果が得られている⁴⁾。

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) 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, pp. 76-78.
- 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.
- 4) 石館基監修, “改訂増補 染色体異常試験データ集,” 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 9.
- 5) C. L. Doerr *et al.*, *Mutat. Res.*, **222**, 191 (1989).
- 6) E. Zeiger *et al.*, *Environ. Mutagen.*, **9**, 1 (1987).
- 7) S. Zimmering *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.*, **14**, 245 (1989).
- 8) T. H. J. M. Waegemaekers and M. P. M. Bensink, *Mutat. Res.*, **137**, 95 (1984).
- 9) H. Schweikl *et al.*, *Mutat. Res.*, **415**, 119 (1998).

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, 佐々木澄志,
 高橋俊孝, 若栗 忍, 橋本恵子
 (財)食品薬品安全センター秦野研究所
 〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
 Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,
 Kiyoshi Sasaki, Toshitaka Takahashi,
 Shinobu Wakuri, Keiko Hashimoto
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with methacrylonitrile (MPN)^a without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others ^d	No. of cells with aberrations		POL ^e (%)	Trend test ^f		Concurrent cytotoxicity ^g (%)	Mitotic index ^h (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁱ	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Solvent ^b	0	24	200	1	0	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00	-	-	100.0	-
MPN	0.17	24	200	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	-	-	119.6	-
MPN	0.34	24	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.00	-	-	120.7	-
MPN	0.67	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-	109.0	10.2, 9.0
MC	0.05 μ g/mL	24	200	3	19	87	3	2	0	114	0	81*(40.5)	80*(40.0)	0.00	-	-	-	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, POL: polyploid, MC: mitomycin C.

a) Purity was 99%. This substance contained impurities as follows: *p*-methoxyphenol as polymerization inhibitor (51 ppm), acetone (19 ppm), acrylonitrile (59 ppm), propionitrile (55 ppm), methacrolein (72 ppm), isobutyronitrile (48 ppm), hydrogen cyanide (35 ppm), and trace amount of acetonitrile and *cis*-crotonitrile.

b) Distilled water was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran · Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. g) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter[®]. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish.

*: Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with methacrylonitrile (MPN)^a with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others ^d	No. of cells with aberrations		POL ^e (%)	Trend test ^f		Concurrent cytotoxicity ^g (%)	Mitotic index ^h (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁱ	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Non-treatment				200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-	-	-
Solvent ^b	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-	100.0	-
MPN	0.17	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-	102.9	-
MPN	0.34	-	6-(18)	200	0	0	1	4	0	0	5	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	-	-	104.9	-
MPN	0.67	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25	-	-	87.5	12.0, 11.2
MC	0.1 μ g/mL	-	6-(18)	200	10	59	184	1	3	0	257	4	122*(61.0)	119*(59.5)	0.00	-	-	-	-
Solvent ^b	0	+	6-(18)	200	2	3	0	1	0	0	6	0	5 (2.5)	4 (2.0)	0.50	-	-	100.0	-
MPN	0.068	+	6-(18)	200	4	10	7	1	0	0	22	0	19*(9.5)	15*(7.5)	3.13*	-	-	80.3	-
MPN	0.14	+	6-(18)	200	3	16	27	1	0	0	47	0	31*(15.5)	30*(15.0)	1.88*	+	-	80.7	-
MPN	0.27	+	6-(18)	200	20	146	126	4	0	320	616	0	129*(64.5)	124*(62.0)	0.14 ^j	-	-	57.5	0.8, 1.6
MPN	0.54 ^k	+	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-	-	20.0	Tox, Tox
CPA	5 μ g/mL	+	6-(18)	200	9	47	169	4	0	0	229	1	127*(63.5)	124*(62.0)	0.13	-	-	-	-

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, POL: polyploid, MC: mitomycin C, CPA: cyclophosphamide, Tox: cytotoxic.

a) Purity was 99%. This substance contained impurities as follows: *p*-methoxyphenol as polymerization inhibitor (51 ppm), acetone (19 ppm), acrylonitrile (59 ppm), propionitrile (55 ppm), methacrolein (72 ppm), isobutyronitrile (48 ppm), hydrogen cyanide (35 ppm), and trace amount of acetonitrile and *cis*-crotonitrile. b) Distilled water was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10.

d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran · Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. g) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter[®]. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish.

i) Chromosome analysis was not performed because there was no metaphase due to cytotoxicity. j) Seven hundred and thirty-three cells were analysed.

*: Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test.

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test
of Methacrylonitrile by Oral Administration in Rats

要約

プラスチック、エラストマー、単重合体、共重合体、被覆剤等の合成に使用され、酸、アミド、アミン、エステル、ニトリル等の合成時には化学反応中間体として、また特殊な用途としては炭酸飲料容器の製造時にアクリロニトリルの置換剤としても使用されているメタクリロニトリルをオリブ油に溶解し、1群あたり雌雄各12匹のCrj:CD(SD)IGSラットに0, 7.5, 15および30 mg/kgの投与量で雄ラットに対しては交配前、交配期間および交配後を含む計46日間、雌ラットに対しては交配前、交配および妊娠期間、ならびに哺育4日までの期間、反復経口投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および新生児の発生に及ぼす影響について検討し、以下の成績を得た。

1. 反復投与毒性

血液学検査では、30 mg/kg群の雄に赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量の低値が認められた。血液生化学検査では、15および30 mg/kg群の雄にカリウムの低値、30 mg/kg群の雄にクレアチニンの高値、雌に総ビリルビンおよびグルコースの高値が認められた。剖検では、7.5および15 mg/kg群の雌各1例、30 mg/kg群の雄1例および雌2例に腺胃粘膜の暗赤色斑がみられ、病理組織学検査でびらんが確認された。器官重量では、肝臓について30 mg/kg群の雄および各投与群の雌に相対重量、雌に絶対重量の高値が認められた。雌では、脾臓の絶対重量および相対重量の高値が30 mg/kg群で、心臓の絶対重量の高値が各投与群で、また、心臓の相対重量の高値が15および30 mg/kg群で認められた。病理組織学検査では、雌の脾臓に髄外造血が15 mg/kg群で3例、30 mg/kg群で7例に認められた。

以上のことから、雄の15 mg/kg以上の群においてカリウムの低値、雌の7.5 mg/kg以上の群において心臓の絶対重量の高値および腺胃粘膜のびらんがそれぞれ認められた。したがって、本試験条件下におけるメタクリロニトリルの無影響量(NOEL)は雄で7.5 mg/kg/dayであり、雌では7.5 mg/kg/day未満と考えられた。

2. 生殖発生毒性

生殖能検査では、各投与群の雌雄ともに異常は認められず、新生児にも変化は認められなかった。

したがって、本試験条件下におけるメタクリロニトリルの反復投与による親動物の生殖ならびに新生児の発

生に対する無影響量(NOEL)はいずれも30 mg/kg/day以上と考えられた。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

メタクリロニトリル(純度:99%, Lot No. P-30A, 旭化成工業(株), 東京)は、常温において刺激臭のある無色透明の液体である。入手後の被験物質は遮光気密容器に入れ、4~10℃の冷暗所で保存し、残余被験物質を製造業者が分析し、投与期間中の被験物質の安定性を確認した。溶媒は日本薬局方オリブ油(ヤクハン製薬(株))を用い、これに被験物質を所定の濃度となるように溶解させた。調製液は、冷暗所保存条件下で8日間安定であることから、調製後直ちに遮光気密容器に入れて冷所保存し、室温に戻して使用した。また、これらの調製液について濃度を確認し、設定値の±5%以内であることを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた8週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS)の雌雄を14日間の検疫および馴化を行い、雌については10日間の性周期検査も併せて行った後、雌雄各48匹を選択して10週齢で試験に供した。投与開始日の体重は雄が354~434 g、雌が210~259 gであった。動物は、温度21~24℃、湿度37~62%、換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(8時から20時まで点灯)に制御されたバリアシステムの飼育室で、ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は1ケージあたり雌雄別に3匹以内を収容し、群分け後は1匹、交配中は雌雄各1匹、妊娠期間中は1母動物を収容した。雌は、妊娠17日から金網床のかわりに実験動物用床敷(ホワイトフレック, 日本チャールス・リバー(株))を敷いたステンレス製受皿を使用して1腹を収容した。飼料は、γ線照射固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて、飲料水は札幌市水道水を自動給水装置を用いてそれぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では雌雄のラットに5, 15および30 mg/kgの3用量を1群5匹に1日1回14日間投与し、30 mg/kg群の雄で体重増加量の低値、雌で投与14日に摂餌量の低値が認められ、その他の検査項目には異常は認

められなかった。このことから、本試験の投与量は高用量を死亡あるいは衰弱例がみられず、体重推移に影響が予測される用量として30 mg/kg/dayを設定し、以下、公比2で15および7.5 mg/kg/dayを雌雄ともに設定し、これに日本薬局方オリブ油を投与する対照群を含めた雌雄各4群を設定した。1群の動物数は雌雄とも12匹とし、投与前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行った。

各個体の投与量は投与日に最も近い測定日の体重に基づいて算出し、5 mL/kgの容量でラット用胃ゾンデを用いて1日1回強制的に胃内に投与した。投与期間は、雄については交配前14日間および交配期間を含む46日間、雌については交配前14日間および交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は妊娠期間および哺育4日までの期間、交尾不成立例は交配期間終了後23日までの期間とした。

4. 検査項目

1) 一般状態観察

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

2) 体重測定

全例について、投与1, 2, 5, 7, 10および14日の投与前、その後は雄については7日毎(投与終了日を含む)および剖検日に、雌については妊娠0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 17および20日、哺育0, 1および4日の投与前ならびに哺育4日の翌日(剖検日)に、交尾不成立例については投与28, 35, 42および49日の投与前および51日の翌日(剖検日)に、また交配期間中(雄と同居中)は相手雄の測定日と同じ日に測定した。体重増加量および体重増加率を、雄については投与1から46日、雌については投与1から14日、妊娠0から20日および哺育0から4日について算出した。

3) 摂餌量測定

雄については交配期間を除き、雌については妊娠0日および哺育0日を除き体重測定と同じ日に、測定前日の給与量から翌日の残量を減じて個々の動物の1日分の摂餌量を算出した。

4) 尿検査

雄の各群6例について投与期間の最終週(投与43~44日)に、代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行い、同時に採尿中の飲水量(重量)も測定した。約3時間の蓄尿についてpH、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血反応(以上、マルティスティックス、バイエル・三共)および色調(肉眼観察)ならびに沈渣(鏡検)を検査し、21時間蓄尿について尿量(容量)および比重(屈折計法、アタゴ)を測定した。

5) 血液学検査

雄の全例について投与46日の翌日の剖検時に、雌の

哺育母動物各群6例について分娩後5日(哺育4日の翌日)に、16~22時間絶食させた後、エーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、EDTA・2Kで処理した血液を用いて赤血球数、ヘマトクリット値、血小板数、白血球数(以上、電気抵抗法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)、平均赤血球容積(赤血球数、ヘマトクリット値より算出)、平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数、ヘモグロビン量より算出)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(ヘマトクリット値、ヘモグロビン量より算出)(以上、自動血球計数装置F-820、シスメックス)、網赤血球数(Brecher法)および白血球百分比(May-Grünwald-Giemsa染色)を測定した。また、3.8%クエン酸ナトリウムで処理した後、3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いて、プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上、血液凝固自動測定装置アメルングKC-10A、バクスター)を測定した。

6) 血液生化学検査

雄の全例について投与46日の翌日の剖検時に、雌の哺育母動物各群6例について分娩後5日(哺育4日の翌日)に、16~22時間絶食させた後、血液学検査と同時に、腹部大動脈より採血し、ヘパリン処理した後、3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血漿を用いてGOT(IFCC法)およびグルコース(ヘキソキナーゼ法)を測定し、無処理血液を3000回転/分で10分間遠心分離して得られた血清を用いてGPT(IFCC法)、アルカリホスファターゼ(Bessey-Lowry法)、 γ -GTP(包接L- γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法)、コリンエステラーゼ(ヨウ化ブチリルチオコリン基質法)、総コレステロール、リン脂質(以上、酵素法)、トリグリセリド(遊離グリセロール消去法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法)、クレアチニン(Jaffe法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(Fiske-SubbaRow法)、総蛋白(ビウレット法)(以上、自動分析装置7150形、日立製作所)、ナトリウム、カリウム(以上、炎光度法、自動炎光度計480型、コーニング)、クロール(電量滴定法、クロライドカウンターCL-6M、平沼産業)、蛋白分画およびA/G比(以上、セルロースアセテート膜電気泳動法、全自動電気泳動装置CTE-150、常光)を測定した。

7) 剖検および器官重量測定

雄の全例について投与46日の翌日に、体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。雌の分娩例は分娩後5日(哺育4日の翌日)に、交尾不成立例は交配期間終了後24日(投与51日の翌日)に、妊娠25日まで分娩が認められない交尾成立例は妊娠26日に剖検した。また、脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺、精巣、精巣上体および卵巣の重量を測定するとともに、絶対重量を剖検当日の体重で除し100を乗じて相対重量を算出した。

8) 病理組織学検査

雌雄の全例について脳(大脳・小脳), 下垂体, 胸腺, 甲状腺(左右), 上皮小体(左右), 副腎(左右), 脾臓, 心臓, 胸部大動脈, 舌, 食道, 胃(前胃および腺胃), 肝臓, 膵臓, 十二指腸, 空腸, 回腸(パイエル板を含む), 盲腸, 結腸, 直腸, 喉頭, 気管, 肺(気管支含む), 腎臓(左右), 膀胱, 精巣(左右), 精巣上体(左右), 前立腺, 精囊(凝固腺含む, 左右), 卵巣(左右), 子宮(角部および頸部), 膣, 眼球(左右), ハーダー腺(左右), 乳腺(右腹部, 雌のみ), 皮膚(右腹部), 胸骨(骨髄含む), 大腿骨(骨髄含む, 右), 脊髄(頸部), 骨格筋(右大腿部), 腸間膜リンパ節, 下顎リンパ節(左右), 顎下腺(左右), 舌下腺(左右), 耳下腺(左右), 坐骨神経(右)を常法に従ってパラフィン包埋後, 薄切してヘマトキシリン・エオジン染色標本, 脾臓のベルリン青染色標本を作製して鏡検した。

9) 生殖能検査

雌全例について, 投与開始日の10日前から交尾までの連日, ギムザ染色による膣垢塗抹標本を作製し, 光学顕微鏡下で性周期段階(発情前期, 発情期前期, 発情期後期, 発情後期および発情休止期)の判定を行い, 性周期の各段階を4日から6日の間隔で2回以上繰り返すものを正常と判定した。発情休止期あるいは発情期が7日以上継続してみられる場合に性周期の異常と判定した。投与14日の雌雄について, 同試験群内で夕方から1対1(無作為組み合わせ)で14日間を限度として同居させた。交尾の成立は雌の膣内の膣栓あるいは膣垢スミア標本中に精子が確認された場合とし, 交尾日を妊娠0日とした。妊娠の成立は雌の子宮に着床痕が確認された場合とし, 交尾率 $[(交尾雌動物数/同居雌動物数) \times 100]$ および受胎率 $[(受胎動物数/交尾雌動物数) \times 100]$ を算出した。

10) 分娩および哺育状態観察

交尾した雌全例について, 妊娠21日から分娩終了日まで, 分娩段階, 哺育状態, 生存児数および死亡児数, 出産児の性別および外表を観察した。朝9時に分娩終了を確認した場合, その日を哺育0日とした。その結果から, 妊娠期間(妊娠0日から哺育0日(分娩終了日)までの日数), 出産率 $[(生児出産雌数/妊娠雌数) \times 100]$, 分娩率 $[(総出産児数/着床痕数) \times 100]$, 出生率 $[(出産確認時生存児数/総出産児数) \times 100]$, 哺育4日時哺育率 $[(哺育4日時に哺育児の認められる雌動物数/正常に分娩した雌動物数) \times 100]$ および性比 $[(雄生児数/雌生児数)]$ を算出した。

11) 新生児の一般状態観察および生存率

全例について, 哺育0日から哺育4日まで1日1回, 生存および死亡を確認し, 一般状態および外表について観察した。なお, 哺育日数は分娩終了日を哺育0日とした。

観察結果から新生児の4日の生存率 $[(哺育4日生存児数/出産確認時生存児数) \times 100]$ を1腹を単位として算出し, 喰殺あるいは不明例となった新生児は死亡例として扱った。

12) 新生児の体重測定

全例について, 哺育0, 1および4日に個体毎に測定し, 体重値は1腹あたりの生児全例の体重の合計ならびに1腹毎の雌雄別平均体重として取扱った。

13) 新生児の剖検

死亡例は直ちに剖検した。その他の例については, 哺育4日に体外表(口腔内を含む)を観察し, 二酸化炭素吸入法により安楽死させ, 全身の器官・組織を肉眼的に観察した。

5. 統計解析

性周期の異常の有無, 交尾率, 受胎率, 出産率および哺育4日時哺育率ならびに病理組織学検査結果のうち1段階の陽性グレードがみられた所見については多試料 χ^2 -検定を行い, その結果, 有意差がみられた場合は2試料 χ^2 -検定で解析した。ただし, これらの検定に不適合の場合はFisherの直接確率検定法を用いた。

尿検査の定性的項目ならびに病理組織学検査結果のうち2段階以上の陽性グレードがみられた所見についてはKruskal-Wallisの検定法で解析し, 有意差がみられた場合は, Mann-WhitneyのU-検定法を用いて解析した。

その他の項目について, Bartlettの検定法によって等分散性を解析し, 等分散の場合は, 一元配置分散分析法で解析し, 有意差がみられた場合は, Dunnettの検定法により解析した。不等分散の場合は, Kruskal-Wallis法で解析し, 有意差がみられた場合は, Mann-WhitneyのU-検定法を用いて解析した。なお, 新生児の観察および測定において, 出生率, 性比, 新生児生存率および雌雄別体重ならびに雌雄合計体重について, 1腹を標本単位として統計処理を行った。

これら対照群と被験物質投与群との間の検定においては, いずれも有意水準を5%とした。

結果

1. 反復投与毒性

(1) 一般状態

雄では, いずれの群にも異常は認められなかった。

雌では, 15 mg/kg群の1例で妊娠21日以降に, 30 mg/kg群の1例で妊娠17日以降に, 剖検日(分娩後5日)まで皮下腫瘍が認められた以外に異常は認められなかった。この皮下腫瘍は病理組織学検査で乳腺の腺癌と判定されたが, 妊娠を契機に自然発生的にしばしば発現することが知られていること¹³⁾から, 自然発生腫瘍と判断した。

(2) 体重(Fig. 1)

雌雄とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(3) 摂餌量(Fig. 2)

雄では15 mg/kg群で投与14日に低値が認められた。

雌では, 15および30 mg/kg群で妊娠前投与期間の投与2日に, 15 mg/kg群で妊娠5日に, 対照群と比較して

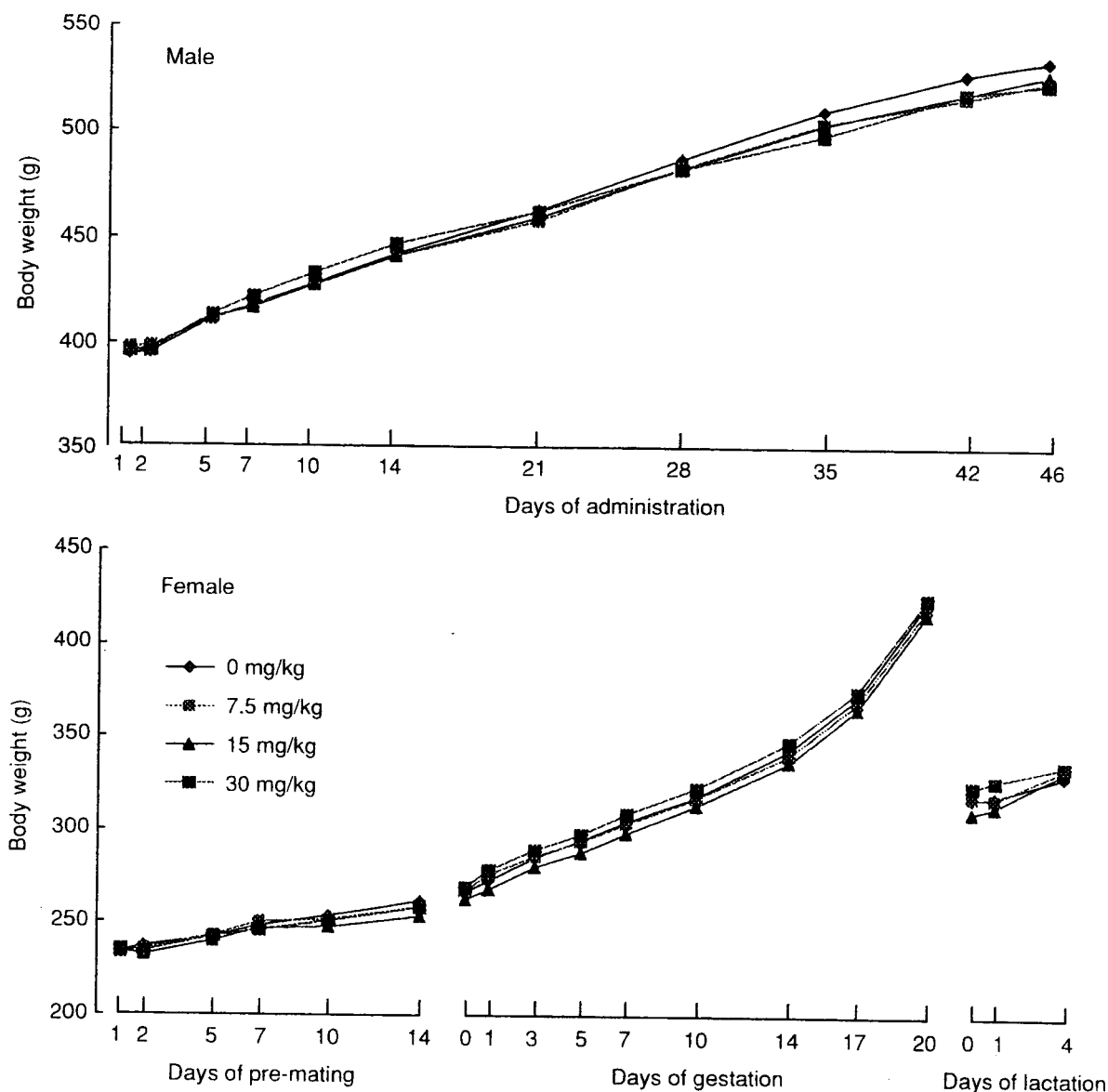


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

低値が認められたが、哺育期間には、各投与群とも有意な差は認められなかった。投与2日には対照群でも前日と比較して摂餌量の低下がみられていること、いずれも一過性的な変化であることから、被験物質による毒性的な変化ではないと考えられた。

(4) 尿検査

雄の各投与群とも対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

(5) 血液学検査 (Table 1, 2)

雄では30 mg/kg群で赤血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量に対照群と比較して低値、ならびにプロトロンビン時間に短縮が認められた。プロトロンビン時間の短縮については、軽度な短縮であり、血小板数に変化がみられていないことから、毒性学的意義はないものと考えられた。他に7.5 mg/kg群では分葉核好中球の高値、リンパ球の低値、15 mg/kg群で平均赤血球ヘモグロビン量の低値が認められたが、用量依存的でない

変化であり、被験物質との関連性はないものと考えられた。

雌では30 mg/kg群で平均赤血球ヘモグロビン濃度の低値、7.5および15 mg/kg群で桿状核好中球の低値が認められたが、関連する他の項目に変化がみられないことから、被験物質との関連性はないものと考えられた。

(6) 血液生化学検査 (Table 3, 4)

雄では15および30 mg/kg群でアルカリホスファターゼおよびカリウムの低値、30 mg/kg群でクレアチニンの高値が認められた。アルカリホスファターゼの低値については、毒性学的意義がないと考えられた。

雌では30 mg/kg群で総ビリルビンおよびグルコースの高値が認められた。他に7.5 mg/kg群で尿素窒素の高値が認められたが、低用量群のみの変化であり、被験物質との関連性はないものと考えられた。

(7) 剖検

雄では、30 mg/kg群の1例に腺胃粘膜の暗赤色斑が認

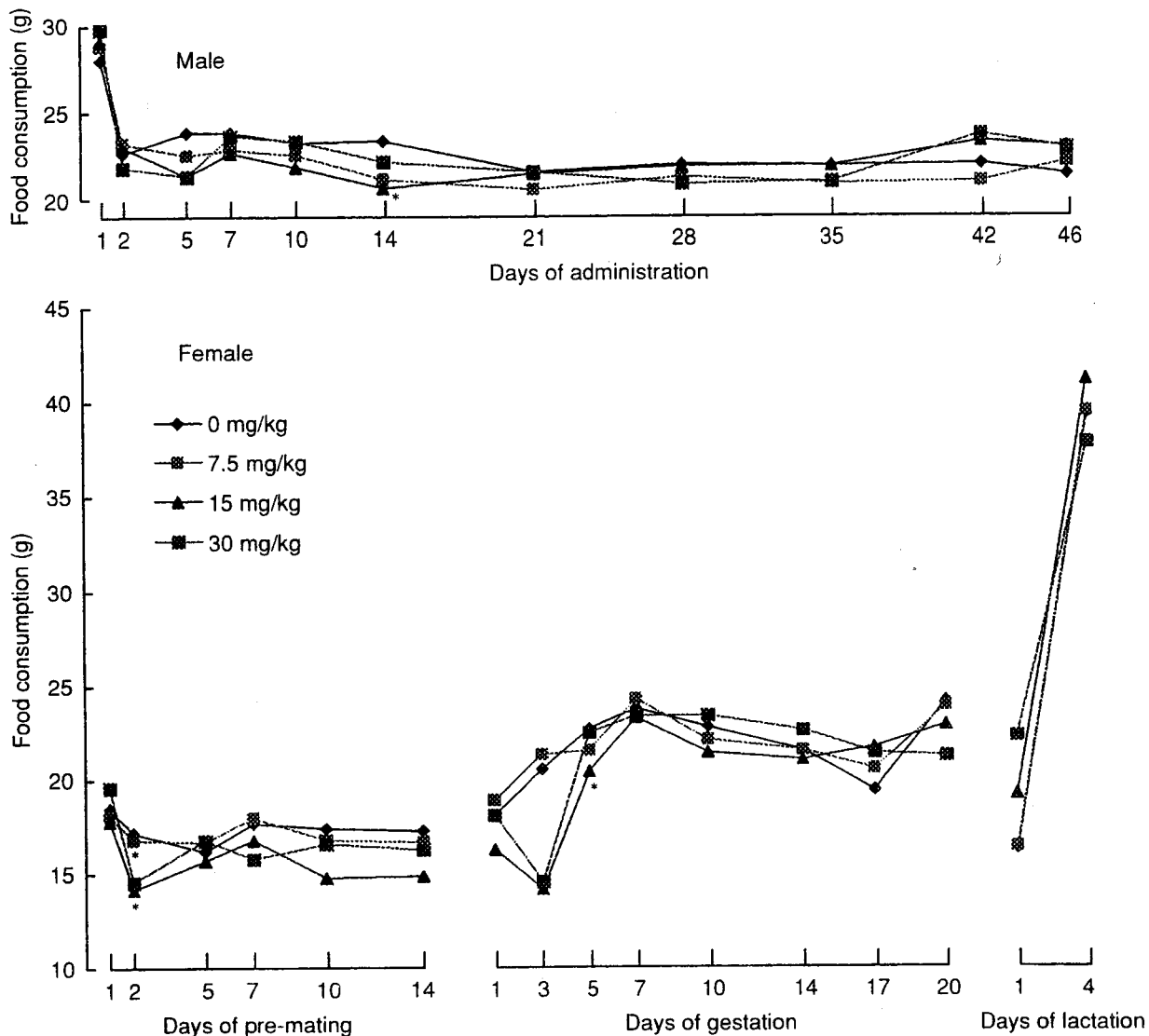


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test
Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$)

められた。

雌では、7.5および15 mg/kg群の各1例、ならびに30 mg/kg群の2例に腺胃粘膜の暗赤色斑が認められた。

(8) 器官重量 (Table 5, 6)

雄では、30 mg/kg群で対照群と比較して肝臓の相対重量に高値が認められた。

雌では、7.5 mg/kg以上の投与群で心臓の絶対重量、肝臓の相対重量に高値がみられ、15 mg/kg以上の投与群で心臓の相対重量、30 mg/kg群で肝臓の絶対重量に高値が認められた。30 mg/kg群では、脾臓の絶対重量および相対重量にも高値が認められた。

(9) 病理組織学検査 (Table 7)

雌雄とも剖検時に腺胃の暗赤色斑がみられた例には、軽度のびらんが認められた。

雌で、重量増加のみられた脾臓では、軽度の髄外造血が対照群の1例、15 mg/kg群の3例、30 mg/kg群の7例にみられ、有意な発現率増加が認められた。

2. 生殖発生毒性

(1) 生殖能検査 (Table 8)

交尾までの日数、交尾率および受胎率に各投与群とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。交尾不成立が30 mg/kg群で1組にみられたが、雌の性周期検査、雌雄の剖検および病理組織学検査で生殖器に異常は認められなかった。不妊例は対照群および7.5 mg/kg群で各1例、15 mg/kg群で2例に認められた。

性周期検査では交配中に発情休止期の連続が30 mg/kg群で1例にみられたが、この例は交尾および妊娠が成立した。

(2) 分娩および哺育状態観察 (Table 9)

妊娠期間、哺育率、出産率、着床数、出産児数、分娩率、出産確認時生存児数および出生率に、各投与群とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

なお、分娩終了確認時の死亡児が7.5 mg/kg群で雌1例、30 mg/kg群で雄3例および雌7例に認められた。30

mg/kg群の死亡児のうち雄3例および雌6例は1腹の児であったが、この母動物は雌雄各1例の新生児を哺育し、哺育行動に異常はみられなかった。

(3) 新生児の生存率(Table 9)

各投与群とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(4) 新生児の一般状態

死亡あるいは不明例が対照群で雌1例、7.5 mg/kg群で雌2例、15 mg/kg群で雄3例にみられたが、30 mg/kg群では死亡あるいは不明例はみられず、被験物質による影響はないものと考えられた。

生存例では30 mg/kg群の雌1例に外傷が認められたのみであった。

(5) 新生児の体重推移(Table 9)

各投与群とも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(6) 新生児の剖検

死亡例には異常は認められなかった。

哺育4日剖検例には、7.5 mg/kg群の雄1例に肝臓の黄白色斑が、30 mg/kg群の雌1例に外傷がみられたが、他に異常はみられなかった。

考察

1. 反復投与毒性

血液学検査では、30 mg/kg群の雄に赤血球数、ハマトクリット値およびヘモグロビン量の低値が認められた。この変化は、メタクリロニトリル投与により赤血球およびヘモグロビンの減少などの溶血性貧血が報告されていること⁴⁾から、被験物質による影響と考えられた。

血液生化学検査では、雄について15および30 mg/kg群にカリウムの低値、30 mg/kg群にクレアチニンの高値が認められた。被験物質の影響と推察されたが、病理組織学検査で腎臓に異常が認められないことから、その機序については明らかでなかった。雌について30 mg/kg群に総ビリルビンおよびグルコースの高値が認められた。肝臓については、30 mg/kg群の雄に相対重量、雌に絶対重量、また各投与群の雌に相対重量の高値が認められていることから、病理組織学的に肝臓の異常は認められなかったが、この変化は肝臓の機能亢進によるものと推察された。

剖検では、7.5および15 mg/kg群の雌各1例、30 mg/kg群の雄1例および雌2例に腺胃粘膜の暗赤色斑がみられ、病理組織学的にはびらんが確認された。この変化は、メタクリロニトリルに皮膚腐食性があることが報告されていること⁵⁾、また、メタクリロニトリルの急性経口投与毒性試験⁶⁾でも腺胃粘膜の暗赤色斑がみられたことから、被験物質による影響と考えられた。

器官重量では雌の30 mg/kg群に前述の肝臓の他、脾臓の絶対重量および相対重量の高値がみられ、病理組織学検査では15 mg/kg群で雌3例、30 mg/kg群で雌7例に髄外造血が認められた。この変化は、メタクリロニ

トリルによる溶血性貧血が報告されていること⁴⁾から、メタクリロニトリル投与による貧血に対する代償性的変化と考えられた。雌では、各投与群に心臓の絶対重量の高値がみられ、15および30 mg/kg群には相対重量の高値も認められた。心臓に病理組織学検査で異常はみられなかったが、げっ歯類では心肥大が心臓重量増加として認められ、組織学的変化は顕著でないと報告されており⁷⁾、心肥大の原因の一つに貧血が挙げられている⁷⁾。一方、メタクリロニトリルの急性経口投与毒性試験⁶⁾の死亡例では右心房の拡張および肺の明橙色化がみられ、メタクリロニトリルによる溶血との関連が考えられる。したがって、本試験でみられた心臓の絶対重量および相対重量の変化も被験物質による溶血性貧血の影響と推察された。

以上のことから、雄の15 mg/kg以上の投与群においてカリウムの低値、雌の7.5 mg/kg以上の投与群において心臓の相対重量の高値および腺胃粘膜のびらんがそれぞれ認められた。したがって、本試験条件下におけるメタクリロニトリルの無影響量(NOEL)は雄で7.5 mg/kg/dayであり、雌では7.5 mg/kg/day未満と考えられた。

2. 生殖発生毒性

生殖能検査では、各投与群とも雌雄の交尾率、雌の性周期および受胎率、また、生殖器(精巣、精巣上体および卵巣)および内分泌器官(副腎)の重量ならびに剖検に変化はみられず、30 mg/kg群の生殖器の病理組織学検査においても異常は認められなかった。

母動物の剖検、妊娠期間、着床数、出産率、分娩率、出産児数、出産確認時生存児数および出生率に、メタクリロニトリル投与による影響は認められなかった。なお、30 mg/kg群の母動物1例で分娩終了確認時に雄3例および雌6例の死亡児みられたが、この母動物の一般状態および剖検で異常はみられず、同例は雌雄各1例の新生児を哺育し、新生児の発育にも異常はみられなかったことから、死亡児と被験物質との関連性については明らかではなかった。

新生児の一般状態、新生児生存率、体重および剖検では、各投与群とも影響は認められなかった。

以上のことから、雌雄の生殖および新生児の発生に各投与群とも被験物質の影響は認められなかった。したがって、本試験条件下におけるメタクリロニトリルの反復投与による親動物の生殖ならびに新生児の発生に対する無影響量(NOEL)はいずれも30 mg/kg/day以上と考えられた。

文献

- 1) 村岡義博他, *Exp. Anim.*, **26**, 13(1977).
- 2) 森井外吉他, *Exp. Anim.*, **33**, 47(1984).
- 3) 今井清, 吉村慎介, *J. Toxicol. Pathol.*, **1**, 7(1988).
- 4) T. Samikkannu, V. Vasanthakumari, and S. N. Devaraj, *Toxicol. Letters*, **92**, 15(1997).
- 5) 製品安全データシート(未公刊).

- 6) 須永昌男他, 化学物質毒性試験報告, 8, 635(2001).
7) 伊東信行編著, “最新 毒性病理学,” 中山書店, 東京, 1994, pp. 179-187.

連絡先

試験責任者: 須永昌男
試験担当者: 堀川裕尚, 咲間正志, 山本美代子,
平田真理子, 古川正敏, 吉村浩幸
(株)化合物安全性研究所
〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors: Masao Sunaga (Study director)
Hironao Horikawa, Masashi Sakuma,
Miyoko Yamamoto, Mariko Hirata,
Masatoshi Furukawa,
Hiroyuki Yoshimura
Safety Research Institute for Chemical
Compounds Co., Ltd.
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,
004-0839, Japan
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Hematological findings of male rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	12	12	12	12
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	904.7 \pm 39.7	915.3 \pm 29.8	910.5 \pm 26.9	856.7 \pm 38.6**
Hematocrit (%)	48.68 \pm 2.65	48.39 \pm 2.42	48.01 \pm 2.01	46.23 \pm 1.61*
Hemoglobin (g/dL)	16.38 \pm 0.63	16.22 \pm 0.72	15.88 \pm 0.52	15.52 \pm 0.62**
MCV (fL)	53.81 \pm 1.65	52.87 \pm 1.81	52.73 \pm 1.40	53.99 \pm 1.48
MCH (pg)	18.11 \pm 0.55	17.71 \pm 0.48	17.43 \pm 0.39**	18.12 \pm 0.56
MCHC (g/dL)	33.68 \pm 1.03	33.54 \pm 0.86	33.07 \pm 0.77	33.57 \pm 0.52
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	107.1 \pm 27.9	113.8 \pm 24.1	117.3 \pm 28.0	114.0 \pm 23.4
Platelet ($10^3/\mu\text{L}$)	113.95 \pm 11.09	116.83 \pm 8.70	109.61 \pm 13.75	107.32 \pm 14.73
Reticulocyte (%)	21.3 \pm 3.8	19.8 \pm 3.5	18.8 \pm 4.0	23.3 \pm 4.6
PT (sec)	15.75 \pm 1.62	15.28 \pm 1.47	15.33 \pm 1.70	14.13 \pm 0.61**
APTT (sec)	26.21 \pm 2.24	25.65 \pm 2.60	26.01 \pm 2.45	24.66 \pm 2.55
Differential leukocyte counts (%)				
Neutrophils				
Stab form	1.5 \pm 1.6	1.9 \pm 1.3	1.6 \pm 1.8	2.3 \pm 1.2
Segmented	7.8 \pm 2.9	11.9 \pm 5.2*	9.1 \pm 3.9	10.3 \pm 3.2
Eosinophils	1.6 \pm 1.2	1.1 \pm 1.2	1.1 \pm 1.7	0.8 \pm 0.7
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocytes	0.4 \pm 0.7	1.0 \pm 1.0	0.8 \pm 0.9	0.9 \pm 0.9
Lymphocytes	88.8 \pm 3.9	84.1 \pm 4.4*	87.4 \pm 6.1	85.7 \pm 3.0

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

Table 2 Hematological findings of female rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	6	6	6	6
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	682.8 \pm 51.9	688.0 \pm 28.7	651.8 \pm 31.0	678.2 \pm 32.1
Hematocrit (%)	41.05 \pm 1.52	41.28 \pm 2.34	40.62 \pm 2.73	42.53 \pm 1.53
Hemoglobin (g/dL)	13.57 \pm 0.67	13.55 \pm 0.43	13.27 \pm 0.80	13.50 \pm 0.56
MCV (fL)	60.28 \pm 3.02	60.02 \pm 2.73	62.27 \pm 2.10	62.77 \pm 1.65
MCH (pg)	19.92 \pm 0.82	19.72 \pm 0.80	20.37 \pm 0.73	19.90 \pm 0.46
MCHC (g/dL)	33.05 \pm 0.73	32.87 \pm 1.23	32.70 \pm 0.64	31.77 \pm 0.57*
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	122.7 \pm 25.3	139.7 \pm 26.8	128.2 \pm 15.9	123.2 \pm 31.4
Platelet ($10^3/\mu\text{L}$)	114.18 \pm 9.81	113.38 \pm 16.29	122.58 \pm 16.71	123.28 \pm 9.72
Reticulocyte (%)	57.5 \pm 21.5	44.3 \pm 17.5	71.3 \pm 17.6	68.7 \pm 20.6
PT (sec)	13.85 \pm 0.27	13.90 \pm 0.27	14.13 \pm 0.43	14.07 \pm 0.18
APTT (sec)	19.38 \pm 1.10	18.38 \pm 1.25	19.42 \pm 1.15	19.13 \pm 0.94
Differential leukocyte counts (%)				
Neutrophils				
Stab form	4.0 \pm 2.4	1.3 \pm 1.2*	0.7 \pm 0.8**	2.3 \pm 1.5
Segmented	26.5 \pm 9.9	22.8 \pm 7.3	25.0 \pm 8.7	23.7 \pm 7.9
Eosinophils	0.7 \pm 0.8	1.0 \pm 1.3	0.0 \pm 0.0	0.5 \pm 1.2
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocytes	1.2 \pm 1.5	0.7 \pm 0.8	0.2 \pm 0.4	1.0 \pm 0.6
Lymphocytes	67.7 \pm 11.4	74.2 \pm 8.0	74.2 \pm 8.3	72.5 \pm 7.5

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

Table 3 Blood chemical findings of male rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	12	12	12	12
Total protein (g/dL)	5.88 ± 0.24	6.00 ± 0.24	6.03 ± 0.18	5.93 ± 0.34
A/G	1.092 ± 0.089	1.063 ± 0.067	1.107 ± 0.100	1.076 ± 0.097
Protein fraction (%)				
Albumin	52.23 ± 2.03	51.63 ± 1.56	52.53 ± 2.23	51.87 ± 2.20
α ₁ -globulin	21.89 ± 2.41	22.96 ± 1.36	22.23 ± 2.45	22.14 ± 2.28
α ₂ -globulin	9.17 ± 0.62	8.99 ± 0.64	8.74 ± 0.52	9.35 ± 0.89
β-globulin	13.93 ± 0.82	13.85 ± 0.99	14.03 ± 0.68	13.98 ± 1.24
γ-globulin	2.78 ± 0.87	2.58 ± 0.87	2.47 ± 0.54	2.66 ± 0.56
GOT (IU/L)	59.3 ± 6.0	72.5 ± 19.6	62.0 ± 14.7	73.8 ± 35.5
GPT (IU/L)	24.3 ± 5.8	34.0 ± 17.3	25.6 ± 5.5	30.3 ± 15.7
ALP (IU/L)	273.9 ± 59.8	235.2 ± 41.0	217.6 ± 63.4*	198.8 ± 41.8**
ChE (IU/L)	61.8 ± 28.6	69.7 ± 28.3	60.3 ± 15.7	55.2 ± 14.0
γ-GTP (IU/L)	0.37 ± 0.13	0.48 ± 0.24	0.40 ± 0.14	0.43 ± 0.17
Total bilirubin (mg/dL)	0.059 ± 0.010	0.068 ± 0.022	0.062 ± 0.006	0.070 ± 0.015
Glucose (mg/dL)	172.6 ± 19.2	176.6 ± 48.2	182.3 ± 18.6	184.3 ± 32.5
Total cholesterol (mg/dL)	60.4 ± 13.8	62.5 ± 12.9	60.8 ± 8.5	59.6 ± 9.3
Triglyceride (mg/dL)	51.1 ± 20.1	43.8 ± 24.8	66.6 ± 37.1	61.8 ± 38.1
Phospholipids (mg/dL)	101.9 ± 19.3	104.9 ± 17.1	109.4 ± 14.2	106.3 ± 19.8
Urea nitrogen (mg/dL)	15.38 ± 1.40	14.90 ± 1.30	15.27 ± 1.56	14.67 ± 2.42
Creatinine (mg/dL)	0.458 ± 0.033	0.475 ± 0.068	0.492 ± 0.042	0.513 ± 0.084**
Sodium (mEq/L)	141.42 ± 0.87	141.67 ± 1.30	141.29 ± 1.37	141.04 ± 1.03
Potassium (mEq/L)	4.861 ± 0.253	4.709 ± 0.212	4.522 ± 0.178**	4.613 ± 0.208*
Chlorine (mEq/L)	105.6 ± 1.6	105.9 ± 1.2	105.8 ± 1.3	105.4 ± 1.2
Calcium (mg/dL)	9.65 ± 0.33	9.54 ± 0.33	9.58 ± 0.15	9.56 ± 0.26
Inorganic phosphorous (mg/dL)	7.13 ± 0.43	6.93 ± 0.46	6.73 ± 0.44	7.07 ± 0.55

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (*p<0.05, **p<0.01)

Table 4 Blood chemical findings of female rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	6	6	6	6
Total protein (g/dL)	5.60 ± 0.44	5.53 ± 0.21	5.55 ± 0.15	5.48 ± 0.26
A/G	1.180 ± 0.114	1.152 ± 0.059	1.120 ± 0.038	1.175 ± 0.046
Protein fraction (%)				
Albumin	54.17 ± 2.46	53.57 ± 1.29	52.92 ± 0.84	54.07 ± 0.97
α_1 -globulin	21.13 ± 1.85	20.08 ± 1.54	21.65 ± 1.78	21.37 ± 2.87
α_2 -globulin	8.45 ± 1.33	10.00 ± 1.55	9.62 ± 0.88	8.87 ± 1.80
β -globulin	13.83 ± 1.15	14.17 ± 0.73	14.02 ± 1.11	13.52 ± 1.36
γ -globulin	2.42 ± 0.89	2.18 ± 0.66	1.80 ± 0.46	2.18 ± 0.67
GOT (IU/L)	80.2 ± 19.0	87.5 ± 15.2	83.8 ± 15.0	73.2 ± 11.7
GPT (IU/L)	38.5 ± 9.8	33.3 ± 4.7	38.5 ± 7.6	28.0 ± 7.2
ALP (IU/L)	127.5 ± 64.4	147.2 ± 30.1	117.2 ± 21.3	151.8 ± 57.4
ChE (IU/L)	246.0 ± 36.7	211.8 ± 40.4	226.2 ± 45.6	213.2 ± 53.4
γ -GTP (IU/L)	0.77 ± 0.33	0.83 ± 0.36	0.55 ± 0.19	0.75 ± 0.18
Total bilirubin (mg/dL)	0.058 ± 0.012	0.055 ± 0.015	0.078 ± 0.019	0.080 ± 0.011*
Glucose (mg/dL)	126.7 ± 8.2	128.3 ± 14.4	134.0 ± 16.4	148.0 ± 13.9*
Total cholesterol (mg/dL)	58.2 ± 3.5	57.5 ± 12.6	66.7 ± 9.3	54.0 ± 9.0
Triglyceride (mg/dL)	33.8 ± 8.2	41.7 ± 40.1	46.5 ± 19.6	62.3 ± 43.1
Phospholipids (mg/dL)	113.8 ± 6.7	111.3 ± 21.5	128.3 ± 13.0	108.8 ± 15.1
Urea nitrogen (mg/dL)	16.03 ± 1.34	19.62 ± 0.96**	16.83 ± 2.77	17.47 ± 3.58
Creatinine (mg/dL)	0.532 ± 0.034	0.560 ± 0.040	0.568 ± 0.041	0.557 ± 0.061
Sodium (mEq/L)	140.92 ± 1.24	141.25 ± 1.64	140.67 ± 1.03	140.42 ± 1.39
Potassium (mEq/L)	4.670 ± 0.280	4.657 ± 0.309	4.710 ± 0.374	4.790 ± 0.152
Chlorine (mEq/L)	109.0 ± 1.1	108.7 ± 1.8	108.3 ± 1.0	108.5 ± 1.1
Calcium (mg/dL)	9.85 ± 0.50	9.78 ± 0.25	9.65 ± 0.39	9.70 ± 0.40
Inorganic phosphorous (mg/dL)	8.53 ± 1.25	8.90 ± 0.92	8.02 ± 0.41	8.30 ± 0.39

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* p <0.05, ** p <0.01)

Table 5 Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	12	12	12	12
Body weight (g)	511.8 ± 50.2	501.9 ± 51.9	502.4 ± 46.0	500.2 ± 58.0
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.200 ± 0.066	2.240 ± 0.070	2.193 ± 0.078	2.235 ± 0.081
Heart (g)	1.504 ± 0.173	1.464 ± 0.196	1.433 ± 0.115	1.403 ± 0.119
Liver (g)	13.891 ± 2.222	13.664 ± 1.896	14.575 ± 2.256	15.398 ± 2.655
Kidneys (g)	3.329 ± 0.358	3.216 ± 0.313	3.084 ± 0.446	3.168 ± 0.280
Spleen (g)	0.748 ± 0.104	0.715 ± 0.082	0.703 ± 0.123	0.790 ± 0.128
Adrenals (mg)	57.8 ± 6.2	60.3 ± 10.0	60.3 ± 8.6	62.4 ± 7.4
Thymus (mg)	299.8 ± 52.6	276.1 ± 65.4	271.7 ± 53.2	282.2 ± 100.2
Testes (g)	3.234 ± 0.550	3.280 ± 0.236	3.191 ± 0.308	3.442 ± 0.245
Epididymides (g)	1.233 ± 0.205	1.243 ± 0.061	1.271 ± 0.120	1.301 ± 0.098
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.432 ± 0.043	0.450 ± 0.046	0.437 ± 0.033	0.452 ± 0.042
Heart (g%)	0.293 ± 0.021	0.292 ± 0.019	0.286 ± 0.018	0.283 ± 0.018
Liver (g%)	2.698 ± 0.199	2.717 ± 0.181	2.889 ± 0.244	3.063 ± 0.230**
Kidneys (g%)	0.651 ± 0.049	0.643 ± 0.053	0.612 ± 0.041	0.635 ± 0.038
Spleen (g%)*	0.147 ± 0.019	0.142 ± 0.016	0.139 ± 0.020	0.158 ± 0.019
Adrenals (mg%)	11.320 ± 0.859	12.008 ± 1.597	11.998 ± 1.305	12.512 ± 1.032
Thymus (mg%)	59.102 ± 12.036	54.784 ± 10.731	54.043 ± 9.930	56.000 ± 16.133
Testes (g%)	0.639 ± 0.131	0.658 ± 0.063	0.638 ± 0.083	0.696 ± 0.079
Epididymides (g%)	0.245 ± 0.054	0.250 ± 0.030	0.254 ± 0.027	0.262 ± 0.027

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (** $p < 0.01$)

Table 6 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals	11	11	10	11
Body weight (g)	309.1 ± 19.9	311.5 ± 21.5	306.9 ± 18.2	308.7 ± 21.6
Absolute organ weight				
Brain (g)	2.051 ± 0.107	2.029 ± 0.053	2.051 ± 0.062	2.013 ± 0.066
Heart (g)	0.922 ± 0.042	1.005 ± 0.132*	0.980 ± 0.051*	1.024 ± 0.135*
Liver (g)	9.694 ± 0.746	10.659 ± 1.004	10.478 ± 0.929	10.724 ± 1.210*
Kidneys (g)	1.968 ± 0.134	2.022 ± 0.154	2.010 ± 0.145	2.015 ± 0.178
Spleen (g)	0.613 ± 0.098	0.625 ± 0.110	0.673 ± 0.103	0.838 ± 0.119**
Adrenals (mg)	71.8 ± 8.3	80.5 ± 11.7	71.3 ± 7.0	79.0 ± 10.8
Thymus (mg)	219.6 ± 71.3	223.1 ± 77.3	196.8 ± 60.7	200.3 ± 54.6
Ovaries (mg)	106.3 ± 7.3	106.0 ± 7.2	106.8 ± 12.7	109.5 ± 10.1
Relative organ weight				
Brain (g%)	0.666 ± 0.053	0.653 ± 0.041	0.671 ± 0.034	0.655 ± 0.053
Heart (g%)	0.298 ± 0.017	0.324 ± 0.040	0.319 ± 0.018*	0.330 ± 0.036*
Liver (g%)	3.140 ± 0.213	3.420 ± 0.166**	3.413 ± 0.215**	3.465 ± 0.206**
Kidneys (g%)	0.637 ± 0.043	0.652 ± 0.053	0.655 ± 0.043	0.655 ± 0.042
Spleen (g%)	0.196 ± 0.024	0.200 ± 0.024	0.220 ± 0.038	0.274 ± 0.038**
Adrenals (mg%)	23.252 ± 2.416	25.780 ± 2.796	23.226 ± 1.744	25.562 ± 2.662
Thymus (mg%)	70.383 ± 19.754	71.106 ± 22.416	64.247 ± 20.346	65.323 ± 18.878
Ovaries (mg%)	34.480 ± 2.896	34.155 ± 2.995	34.797 ± 3.513	35.598 ± 3.475

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Table 7 Histopathological findings of rats treated orally with methacrylonitrile in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item		0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
<Male>					
Number of animals examined		12	12	12	12
Organ:Findings	Grade				
Glandular stomach:Erosion	+	0	0	0	1
<Female>					
Number of animals examined		12	12	12	12
Organ:Findings	Grade				
Glandular stomach:Erosion	+	0	1	1	2
Spleen:Hematopoiesis, extramedullary	+	1	0	3	7*

Values are number of animals with findings.
Grade of histopathological finding; +:slight.
Significantly different from 0 mg/kg group (* $p<0.05$)

Table 8 Influence of methacrylonitrile on reproductive performance of rats treated orally in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of animals examined	12	12	12	12
Number of pairs mated	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation	12	12	12	11
Duration of mating (day, Mean \pm S.D.)	2.3 \pm 0.8	2.9 \pm 0.9	2.9 \pm 1.1	3.5 \pm 3.6
Copulation Index ^a (%)	100.0	100.0	100.0	91.7
Number of pregnant animals	11	11	10	11
Fertility index ^b (%)	91.7	91.7	83.3	100.0

a) (Number of pairs with successful copulation/number of pairs mated) \times 100.

b) (Number of pregnant animals/number of pairs with successful copulation) \times 100.

Table 9 Influence of methacrylonitrile on developmental performance of rats treated orally in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Item	0 mg/kg	7.5 mg/kg	15 mg/kg	30 mg/kg
Number of pregnant animals	11	11	10	11
Number of implantation sites	15.2 ± 1.7	15.7 ± 1.3	15.8 ± 1.1	16.0 ± 2.0
Number of pups born	14.5 ± 1.7	14.4 ± 2.2	15.0 ± 1.6	14.5 ± 2.3
Delivery index ^a (%)	96.0 ± 7.2	91.5 ± 12.8	94.9 ± 6.5	91.2 ± 10.6
Number of live pups	14.5 ± 1.7	14.3 ± 2.1	15.0 ± 1.6	13.6 ± 4.3
Live birth index ^b (%)	100.0 ± 0.0	99.5 ± 1.8	100.0 ± 0.0	92.0 ± 24.6
Sex ratio (Male/Female)	1.21 ± 0.62	0.83 ± 0.30	1.09 ± 0.44	1.00 ± 0.61
Number of dead pups	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.9 ± 2.7
Gestation length (day)	22.5 ± 0.5	22.6 ± 0.5	22.8 ± 0.4	22.6 ± 0.5
Gestation index ^c (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Nursing index ^d (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of live pups on day 0	14.5 ± 1.7	14.3 ± 2.1	15.0 ± 1.6	13.6 ± 4.3
Number of live pups on day 4	14.5 ± 1.6	14.1 ± 2.0	14.7 ± 1.5	13.6 ± 4.3
Viability index ^e (%)	99.5 ± 1.8	98.9 ± 2.5	98.1 ± 3.1	100.0 ± 0.0
Body weight of pups (g)				
Litter Day 0	98.14 ± 9.61	96.65 ± 11.61	99.51 ± 8.17	91.38 ± 27.56
1	107.27 ± 11.26	104.83 ± 12.08	109.18 ± 8.54	100.35 ± 30.07
4	151.44 ± 13.34	150.61 ± 15.98	154.09 ± 13.99	143.23 ± 42.32
Male Day 0	6.99 ± 0.68	7.00 ± 0.53	6.90 ± 0.63	6.91 ± 0.55
1	7.64 ± 0.85	7.66 ± 0.82	7.55 ± 0.76	7.58 ± 0.79
4	10.80 ± 1.25	11.09 ± 1.46	10.99 ± 1.24	11.05 ± 1.31
Female Day 0	6.60 ± 0.63	6.68 ± 0.57	6.50 ± 0.53	6.60 ± 0.53
1	7.23 ± 0.74	7.32 ± 0.78	7.14 ± 0.73	7.27 ± 0.68
4	10.34 ± 1.12	10.61 ± 1.31	10.22 ± 1.25	10.40 ± 1.17

Values are expressed as Mean ± S.D.

a) (Number of pups born/number of implantation sites) × 100.

b) (Number of live pups born/number of pups born) × 100.

c) (Number of females with live pups delivery/number of pregnant females) × 100.

d) (Number of females nursing live pups/number of females with normal delivery) × 100.

e) (Number of live pups on day 4/number of live pups born) × 100.