

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 2-Hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone in Rats

要約

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンは、プラスチックや合成繊維の耐候性改良、食品や医薬品などの容器・包装材に使用して内容物の紫外線からの保護、日焼け防止、シャンプーの分離防止、UVカットフィルムに用いる紫外線吸収材の目的で利用されているベンゾフェノン系紫外線吸収材である。毒性情報として、経口投与のLD₅₀値はマウスで10985 mg/kg以上と報告されている¹⁾。

今回、2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの20, 140および1000 mg/kg/dayをSD系ラットの雌雄に28日間反復投与し、その毒性について検討した。対照および1000 mg/kg/day群については14日間回復群を設けた。

全試験期間を通して死亡はみられず、一般状態、体重、摂餌量に変化はなく、血液学検査、血液生化学検査、尿検査および病理検査結果に、被験物質投与に起因した毒性変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下における2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの無影響量は、雌雄ともに1000 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノン(住友化学工業(株)、ロット番号:40650, 純度:99%以上)は、融点45~50℃, 水, 熱, 光等に安定, *n*-ヘキサンおよびベンゼンに可溶で, 水には不溶の淡黄(白)色粉末である。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。投与液は被験物質を0.1% Tween80添加0.5%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液に懸濁させ調製し、冷蔵保存した。投与液中の被験物質は冷蔵保存条件下で少なくとも8日間安定であり、また使用した投与液にはほぼ所定量の被験物質が均一に含有されていることを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より入手したSD系ラット(Crj:CD, SPF)の雌雄を8日間検疫・馴化し、試験に使用した。投与開始前に動物を体重別層化無作為抽出法により群分けした。1群の動物数は雌雄各6匹とし、対照および高用量群についてはこの他に雌雄各6匹の14日間

回復群を設けた。投与開始時の週齢は雌雄とも5週齢、体重範囲は雄が165~190 g, 雌が129~153 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中、温度20~25℃, 湿度40~70%, 換気約12回/時, 照明12時間(7:00~19:00)に自動調節された飼育室を使用した。動物は、実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに1ケージ当り2匹で収容し飼育した。

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

3. 投与量および投与方法

被験物質を500および1000 mg/kgの各用量でSD系ラットに7日間反復経口投与した結果、1000 mg/kg群でも毒性変化は認められなかった。従って、本試験では高用量をガイドラインの上限である1000 mg/kgとし、以下公比約7で中用量を140 mg/kg, 低用量を20 mg/kgとした。

被験物質は28日間毎日1回、午前中に胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与液量は10 ml/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。対照群には同様に溶媒を投与した。

4. 観察および検査方法

1) 一般状態、体重および摂餌量

全例について一般状態を毎日観察した。体重は投与開始日およびその後週1回測定した。また、摂餌量については、投与開始日およびその後週1回測定し、各期間毎の1匹当りの1日の平均摂餌量を算出した。

2) 血液学検査

各計画剖検時の全動物について、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採血し、赤血球数(シースフローDCインピーダンス検出法)、白血球数(RF/DCインピーダンス検出法)、血小板数(シースフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度(SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500:東亜医用電子(株))、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A:(株)立石電機)、網状赤血球数(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網赤血球測定装置(R-2000:東亜医用電子(株))、プロトンビン時間(PT:

Quick一段法), 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT: 活性化セファロプラスチン法) を血液凝固自動測定装置 (KC 10A: アメルング社) により測定した。また, 検査の結果から平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球色素量 (MCH), 平均赤血球色素濃度 (MCHC) を算出した。凝固阻止剤として, プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間測定には 3.13% クエン酸ナトリウム水溶液を, それ以外の項目の測定には EDTA-2K を用いた。

3) 血液生化学検査

採取した血液を室温で約 30 分間放置した後, 3000 r.p.m., 10 分間遠心分離し, 得られた血清を用いて総蛋白 (Biuret 法), アルブミン (BCG 法), A/G 比 (総蛋白およびアルブミンから算出), グルコース (GK-G6PDH 法), トリグリセライド (LPL-GK-G3PO-POD 法), 総コレステロール (CES-CO-POD 法), 尿素窒素 (Urease-GLDH 法), クレアチニン (Jaffé 法), カルシウム (O-CPC 法), 無機リン (UV 法), GOT (SSCC 改良法), GPT (SSCC 改良法), γ -GTP (SSCC 改良法), ALP (GSCC 改良法), ナトリウム, カリウム, クロール (イオン選択電極法) を自動分析装置 (日立 736-10 形: 株式会社日立製作所) により測定した。

4) 尿検査

投与終了時の解剖の 2 日前に全生存動物の新鮮尿を採取し, pH, 潜血, 蛋白, 糖, ケトン体, ビリルビン, ウロビリノーゲン (試験紙法, マルティスティックス: マイルス・三共株) を尿分析器 (クリニテック 100: マイルス・三共株) で検査した。その結果, 1000 mg/kg 群の雌で変化がみられたので, 雌のみ更に 21 時間蓄積尿を採取し, 尿量をメスシリンダーで, 比重 (屈折法) を尿比重計 (ユリコン-S: 株式会社アタゴ) で, ナトリウムおよびカリウム (炎光光度法) を全自動炎光光度計 (FLAME-30C/AD-3: 日本分光メディカル株) で, クロール (電量滴定法) をクロライドメーター (Model 925: コーニングメディカル株) により測定した。

投与期間に変化のみられた雌については, 回復期間終了時の解剖の 2 日前にも同様の検査を実施した。

5) 病理検査

各計画殺時, 全動物について採血後に腹大動脈を切断して放血致死させ剖検し, 脳, 肝臓, 腎臓, 副腎, 胸腺, 脾臓, 精巣および卵巣の重量を測定した。また, これらの器官に加え, 下垂体, 眼球 (付属腺を含む), 肺, 胃, 甲状腺 (上皮小体を含む), 心臓, 膀胱, 骨髄 (大腿骨) を採取し, 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン液 (眼球およびハーダー腺は Davidson 液) にて固定後保存した。

投与終了時解剖動物の対照および 1000 mg/kg 群の雌雄の心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎を対象に, 常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し, 鏡検した。また, 肉眼的に変化のみられた投与期間終了時の 20 mg/kg 群の雄 1 例および 140 mg/kg 群の雄 2 例の腎

臓, 1000 mg/kg 群の雄 1 例の精巣と回復期間終了時の対照群の雄 1 例の肺, 1000 mg/kg 群の雄 1 例の胸腺についても同様に検査した。

6) 統計解析

計量データについては, Bartlett 法による等分散の検定を行い, 分散が一樣の場合は一元配置分散分析を行った後, Dunnett 法または Scheffé 法により平均値の比較検定を行った。分散が一樣でない場合には Kruskal-Wallis の検定を行い, Dunnett 型または Scheffé 型の順位和検定を行った。尿検査で得られた計数データについては, Armitage の χ^2 検定を用いた。有意水準は 5% 以下とした。

結果

1. 一般状態, 体重および摂餌量

全試験期間を通して, 死亡および異常所見は認められなかった。体重および摂餌量は全ての被験物質投与群で対照群と同様な推移を示した。

2. 血液学検査 (Table 1)

投与期間終了時の検査において, 20 mg/kg 群の雄で MCHC の低値がみられたが, 140 および 1000 mg/kg 群では認められないことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。また, 回復期間終了時の検査において, 1000 mg/kg 群の雌で単球比の高値がみられたが, 投与期間終了時にはみられなかったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

3. 血液生化学検査 (Table 2)

投与期間終了時の検査において, 変化の認められた項目はなかった。なお, 回復期間終了時の検査において, 1000 mg/kg 群の雌で尿素窒素の低値がみられたが, 投与期間終了時にはみられなかったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

4. 尿検査 (Table 3)

投与期間の検査において, 1000 mg/kg 群の雌で pH のアルカリ側への変動がみられた。なお, 20 mg/kg 群の雄でビリルビンの上昇がみられたが, 140 および 1000 mg/kg 群では認められなかったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

雌のみについて実施した回復期間の検査においては, pH の変化は認められなかった。なお, 1000 mg/kg 群でカリウムの低値が認められたが, 投与期間にはみられなかったことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

5. 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時の検査において, 140 mg/kg 群の雌で副腎の相対重量の低値がみられたが, 1000 mg/kg 群では認められなかったことから, 被験物質投与とは関連の

Table 1 Hematology of rats treated orally with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level	28 Days				Recovery	
		0mg/kg	20mg/kg	140mg/kg	1000mg/kg	0mg/kg	1000mg/kg
Male							
	Number of animals	6	6	6	6	6	6
	RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	743 \pm 21.9	720 \pm 40.9	753 \pm 19.0	739 \pm 23.2	779 \pm 23.1	770 \pm 41.1
	Hematocrit (%)	43.6 \pm 0.64	43.1 \pm 1.74	44.6 \pm 0.83	44.3 \pm 1.67	43.4 \pm 1.33	43.9 \pm 1.25
	Hemoglobin (g/dl)	15.0 \pm 0.21	14.6 \pm 0.57	15.2 \pm 0.25	15.1 \pm 0.50	14.9 \pm 0.41	15.1 \pm 0.60
	Reticulocyte (%)	36 \pm 3.6	33 \pm 3.2	31 \pm 2.3	32 \pm 2.9	29 \pm 2.9	29 \pm 1.6
	MCV (μm^3)	58.8 \pm 1.61	60.0 \pm 1.87	59.2 \pm 1.08	60.0 \pm 2.09	55.7 \pm 2.22	57.1 \pm 2.22
	MCH (pg)	20.2 \pm 0.51	20.3 \pm 0.67	20.2 \pm 0.34	20.5 \pm 0.73	19.1 \pm 0.73	19.7 \pm 0.81
	MCHC (%)	34.3 \pm 0.18	33.9 \pm 0.14*	34.1 \pm 0.29	34.2 \pm 0.27	34.3 \pm 0.14	34.5 \pm 0.50
	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	114.2 \pm 13.61	106.9 \pm 8.42	103.8 \pm 6.81	117.6 \pm 15.41	103.9 \pm 14.43	108.2 \pm 13.03
	PT (sec)	13.6 \pm 0.21	13.5 \pm 0.37	13.5 \pm 0.36	13.5 \pm 0.35	13.2 \pm 0.28	13.2 \pm 0.27
	APTT (sec)	17.7 \pm 1.14	17.4 \pm 0.95	16.6 \pm 1.30	18.2 \pm 0.75	18.3 \pm 1.16	17.0 \pm 1.54
	WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	121 \pm 24.4	120 \pm 33.0	140 \pm 26.9	143 \pm 35.9	102 \pm 23.6	105 \pm 14.9
	Differential leukocyte counts (%)						
	Lymphocytes	88 \pm 5.7	84 \pm 3.0	91 \pm 6.2	88 \pm 4.9	86 \pm 4.9	85 \pm 4.1
	Neutrophils						
	segmented	8 \pm 3.4	11 \pm 3.5	5 \pm 4.0	7 \pm 4.0	9 \pm 3.7	8 \pm 2.2
	band	1 \pm 0.5	1 \pm 0.5	0 \pm 0.8	0 \pm 0.4	0 \pm 0.5	0 \pm 0.5
	Eosinophils	1 \pm 0.5	1 \pm 0.5	0 \pm 0.8	1 \pm 0.8	1 \pm 0.8	1 \pm 0.5
	Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
	Monocytes	4 \pm 2.7	5 \pm 3.7	4 \pm 2.6	5 \pm 1.0	4 \pm 1.4	6 \pm 3.5
Female							
	Number of animals	6	6	6	6	6	6
	RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	703 \pm 26.1	727 \pm 29.2	727 \pm 29.3	737 \pm 24.6	724 \pm 34.3	740 \pm 9.1
	Hematocrit (%)	41.7 \pm 1.20	42.1 \pm 1.05	43.0 \pm 1.45	42.5 \pm 0.92	40.8 \pm 1.19	41.1 \pm 1.08
	Hemoglobin (g/dl)	14.5 \pm 0.45	14.5 \pm 0.32	14.8 \pm 0.34	14.7 \pm 0.24	14.1 \pm 0.55	14.2 \pm 0.31
	Reticulocyte (%)	27 \pm 4.1	28 \pm 1.5	22 \pm 3.9	23 \pm 4.0	26 \pm 5.2	25 \pm 4.7
	MCV (μm^3)	59.3 \pm 1.10	57.9 \pm 1.41	59.2 \pm 1.35	57.7 \pm 1.87	56.4 \pm 1.81	55.5 \pm 1.28
	MCH (pg)	20.6 \pm 0.32	20.0 \pm 0.54	20.4 \pm 0.48	20.0 \pm 0.55	19.5 \pm 0.68	19.1 \pm 0.29
	MCHC (%)	34.7 \pm 0.18	34.5 \pm 0.28	34.4 \pm 0.58	34.6 \pm 0.27	34.6 \pm 0.34	34.5 \pm 0.42
	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	99.8 \pm 9.57	92.1 \pm 10.67	99.5 \pm 9.38	102.0 \pm 6.27	95.1 \pm 8.26	101.1 \pm 8.16
	PT (sec)	13.8 \pm 0.45	13.6 \pm 0.51	13.4 \pm 0.78	14.1 \pm 0.45	14.1 \pm 0.70	14.0 \pm 0.71
	APTT (sec)	14.6 \pm 1.20	15.3 \pm 0.74	15.2 \pm 1.36	15.5 \pm 1.70	15.2 \pm 0.98	14.5 \pm 0.68
	WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	102 \pm 24.0	89 \pm 36.1	99 \pm 19.2	97 \pm 22.9	72 \pm 23.3	80 \pm 23.1
	Differential leukocyte counts (%)						
	Lymphocytes	90 \pm 4.1	88 \pm 3.9	90 \pm 3.8	89 \pm 3.9	85 \pm 5.6	84 \pm 5.2
	Neutrophils						
	segmented	6 \pm 2.3	6 \pm 2.4	6 \pm 4.1	6 \pm 2.5	12 \pm 5.2	9 \pm 3.2
	band	0 \pm 0.5	0 \pm 0.5	1 \pm 0.5	0 \pm 0.4	1 \pm 0.5	0 \pm 0.4
	Eosinophils	1 \pm 0.8	2 \pm 1.5	1 \pm 1.0	0 \pm 0.5	1 \pm 0.8	1 \pm 1.1
	Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
	Monocytes	4 \pm 2.4	4 \pm 2.6	3 \pm 1.9	5 \pm 2.5	2 \pm 1.0	6 \pm 6.2*

Values are expressed as Mean \pm S.D.Significantly different from control group; *, $P < 0.05$.

Table 2 Blood chemical examination of rats treated orally with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose leve	28 Days				Recovery	
		0mg/kg	20mg/kg	140mg/kg	1000mg/kg	0mg/kg	1000mg/kg
Male							
	Number of animals	6	6	6	6	6	6
	GOT (IU/l)	87 ± 17.3	85 ± 14.6	95 ± 26.4	82 ± 14.6	95 ± 17.3	89 ± 22.3
	GPT (IU/l)	27 ± 4.2	31 ± 5.7	28 ± 4.2	29 ± 4.8	25 ± 4.2	23 ± 3.4
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	ALP (IU/l)	566 ± 189.7	577 ± 90.0	642 ± 97.8	533 ± 97.8	556 ± 94.8	520 ± 71.7
	Urea nitrogen (mg/dl)	15.2 ± 3.33	16.5 ± 1.49	16.4 ± 2.16	16.8 ± 2.16	20.8 ± 2.82	20.2 ± 1.46
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.00	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.05
	Glucose (mg/dl)	147 ± 9.4	149 ± 12.9	151 ± 4.6	143 ± 9.5	160 ± 10.0	153 ± 7.5
	Total chol. (mg/dl)	69 ± 8.5	68 ± 9.3	64 ± 5.6	74 ± 9.6	67 ± 12.5	73 ± 7.4
	Triglyceride (mg/dl)	210 ± 55.0	172 ± 64.0	187 ± 72.6	173 ± 45.0	195 ± 54.2	181 ± 71.1
	Total protein (g/dl)	6.83 ± 0.360	6.59 ± 0.231	6.70 ± 0.150	6.78 ± 0.271	6.79 ± 0.258	6.81 ± 0.364
	Albumin (g/dl)	3.75 ± 0.072	3.65 ± 0.063	3.80 ± 0.037	3.78 ± 0.091	3.63 ± 0.118	3.63 ± 0.093
	A/G ratio	1.23 ± 0.099	1.25 ± 0.083	1.31 ± 0.055	1.27 ± 0.076	1.15 ± 0.046	1.15 ± 0.077
	Calcium (mg/dl)	9.7 ± 0.26	9.6 ± 0.16	9.8 ± 0.12	9.8 ± 0.23	9.4 ± 0.13	9.4 ± 0.23
	Inorganic phos. (mg/dl)	9.5 ± 0.28	9.9 ± 0.15	9.3 ± 0.55	9.4 ± 0.54	7.4 ± 0.38	7.3 ± 0.59
	Na (mEq/l)	142 ± 0.8	143 ± 0.9	143 ± 1.5	143 ± 1.5	143 ± 0.9	143 ± 1.2
	K (mEq/l)	4.9 ± 0.18	4.7 ± 0.13	4.7 ± 0.20	4.6 ± 0.18	4.4 ± 0.15	4.6 ± 0.10
	Cl (mEq/l)	98 ± 1.4	99 ± 2.1	99 ± 1.2	99 ± 1.0	100 ± 1.2	101 ± 1.4
Female							
	Number of animals	6	6	6	6	6	6
	GOT (IU/l)	78 ± 7.1	90 ± 21.6	82 ± 16.7	83 ± 9.9	89 ± 9.3	86 ± 15.8
	GPT (IU/l)	24 ± 2.3	24 ± 3.6	20 ± 1.2	27 ± 8.0	26 ± 5.2	23 ± 3.1
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.0	0 ± 0.4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	ALP (IU/l)	322 ± 65.3	296 ± 41.2	280 ± 71.9	399 ± 88.9	362 ± 68.6	296 ± 58.4
	Urea nitrogen (mg/dl)	15.2 ± 3.29	14.1 ± 1.96	14.1 ± 1.85	16.8 ± 2.51	21.2 ± 2.38	15.8 ± 1.54**
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.05	0.6 ± 0.05	0.6 ± 0.05	0.6 ± 0.08	0.6 ± 0.04	0.6 ± 0.00
	Glucose (mg/dl)	144 ± 7.0	146 ± 5.3	143 ± 7.6	139 ± 11.1	161 ± 15.8	158 ± 7.3
	Total chol. (mg/dl)	69 ± 5.0	77 ± 13.7	78 ± 8.2	70 ± 10.7	71 ± 10.3	76 ± 15.4
	Triglyceride (mg/dl)	69 ± 30.9	61 ± 14.6	60 ± 15.3	87 ± 61.6	77 ± 34.1	75 ± 10.5
	Total protein (g/dl)	6.77 ± 0.250	6.80 ± 0.333	6.75 ± 0.221	6.84 ± 0.354	6.89 ± 0.181	7.11 ± 0.262
	Albumin (g/dl)	3.96 ± 0.113	3.94 ± 0.186	3.95 ± 0.081	3.99 ± 0.142	3.86 ± 0.056	3.85 ± 0.142
	A/G ratio	1.41 ± 0.066	1.38 ± 0.055	1.42 ± 0.109	1.41 ± 0.065	1.28 ± 0.086	1.19 ± 0.112
	Calcium (mg/dl)	9.4 ± 0.17	9.2 ± 0.20	9.4 ± 0.15	9.5 ± 0.20	9.1 ± 0.20	9.2 ± 0.20
	Inorganic phos. (mg/dl)	8.6 ± 0.37	7.9 ± 0.39	8.5 ± 0.48	8.7 ± 0.73	6.3 ± 0.98	6.6 ± 0.58
	Na (mEq/l)	143 ± 1.0	143 ± 0.5	142 ± 0.8	143 ± 0.4	142 ± 0.8	142 ± 0.9
	K (mEq/l)	4.2 ± 0.19	4.2 ± 0.08	4.4 ± 0.18	4.2 ± 0.12	3.9 ± 0.28	3.9 ± 0.12
	Cl (mEq/l)	101 ± 1.4	102 ± 1.0	101 ± 1.4	101 ± 1.2	102 ± 1.8	102 ± 0.9

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; **, P<0.01.

Table 3 Urinary pH of female rats treated orally with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level	28 Days				Recovery	
		0mg/kg	20mg/kg	100mg/kg	500mg/kg	0mg/kg	500mg/kg
Female							
Number of animals		12	6	6	12	6	6
pH	6.5	2	0	1	0	0	0
	7.0	1	0	0	0	1	0
	7.5	0	1	1	0	2	2
	8.0	3	0	0	4	1	3
	8.5	6	4	3	5	2	1
	>9.0	0	1	1	3	0	0

Values are expressed as number of animals.

Significantly different from control group; *, P<0.05.

ない変化と判断した。なお、回復期間終了時の検査において、1000 mg/kg群の雌で卵巣の相対重量の低値がみられたが、投与期間終了時にはみられなかったことから、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

6. 剖検所見

被験物質投与に起因する変化は認められなかった。偶発性変化として腎臓の軽度の褪色、腎臓のう胞、副腎の腫大、精巣の小型化、肺の出血斑、胸腺の出血が認められた。

7. 組織所見

被験物質投与に起因する変化は認められなかった。偶発性変化として肝臓の微小肉芽腫、腎臓の尿細管上皮の好塩基性変化、腎臓の尿細管のう胞状拡張、腎臓の単核細胞浸潤、精細管の低形成、肺の出血、胸腺の出血が認められた。

考察

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの20, 140および1000 mg/kg/dayをSD系ラットの雌雄に28日間反復経口投与し、その毒性について検討した。

その結果、1000 mg/kg/dayを投与した群でも、死亡は認められず、一般状態、体重および摂餌量に変化はなく、血液学検査、血液生化学検査および病理検査においても被験物質投与に起因した毒性変化は認められなかった。

尿検査において、投与期間中に1000 mg/kg/day群の雌でpHのアルカリ側への変動がみられた。アルカリ尿は一般的には代謝性および呼吸性アルカローシス、腎不全や腎盂腎炎による腎臓のH⁺排泄障害でみられることが知られている²⁾。しかし、今回の変動は、当研究所の背景データの範囲内にあり、かつ、腎障害を示唆する病理変化は認められていないことから、偶発的な偏りによるものと判断した。

以上の結果から、本試験条件下における2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの無影響量は雌雄ともに1000 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 化学工業日報社編, "12093の化学商品," 化学工業日報社, 東京, 1993, pp. 938-941.
- 2) 谷本 義文, "実験動物の血液・尿生化学, 動物尿の性状とその検査意義," ソフトサイエンス社, 東京, 1988, pp. 119-134.

連絡先

試験責任者: 高橋 要

試験担当者: 山下弘太郎, 三上由紀子, 松本 忍,
土谷 稔, 横山光恵, 豊田直人,
高野克代, 鈴木美江

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

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

Correspondence

Authors: Kaname Takahashi (Study director)
Koutarou Yamashita, Yukiko Mikami,
Shinobu Matsumoto, Minoru
Tsuchitani,
Mitsue Yokoyama, Naoto Toyota,
Katsuyo Takano, Yoshie Suzuki
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
Kashima Laboratory
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-02 Japan
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 4 Absolute and relative organ weight of rats treated orally with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level	28 Days				Recovery	
		0mg/kg	20mg/kg	140mg/kg	1000mg/kg	0mg/kg	1000mg/kg
Male							
	Number of animals	6	6	6	6	6	6
	Body weight (g)	418 ± 44.1	398 ± 21.4	412 ± 33.5	398 ± 20.8	479 ± 21.3	475 ± 25.0
	Absolute organ weight						
	Brain (g)	2.08 ± 0.072	2.09 ± 0.056	2.09 ± 0.096	2.01 ± 0.059	2.13 ± 0.123	2.17 ± 0.031
	Thymus (mg)	712 ± 108.0	618 ± 91.4	691 ± 73.4	698 ± 99.9	577 ± 152.6	642 ± 125.3
	Liver (g)	16.71 ± 2.869	15.10 ± 1.309	16.15 ± 1.756	15.92 ± 1.752	19.33 ± 0.823	18.03 ± 2.196
	Kidneys (g)	2.84 ± 0.267	2.71 ± 0.185	2.94 ± 0.196	2.81 ± 0.150	3.09 ± 0.243	3.05 ± 0.315
	Adrenals (mg)	62.1 ± 14.38	55.8 ± 12.32	54.4 ± 4.52	53.0 ± 7.27	56.7 ± 5.82	57.7 ± 6.70
	Spleen (g)	0.87 ± 0.079	0.80 ± 0.086	0.82 ± 0.086	0.80 ± 0.138	0.91 ± 0.122	0.90 ± 0.039
	Testes (g)	3.18 ± 0.185	3.02 ± 0.229	3.19 ± 0.357	2.73 ± 0.911	3.32 ± 0.336	3.26 ± 0.224
	Relative organ weight						
	Brain (g%)	0.50 ± 0.049	0.53 ± 0.037	0.51 ± 0.046	0.51 ± 0.024	0.45 ± 0.024	0.46 ± 0.026
	Thymus (mg%)	171 ± 27.5	155 ± 17.9	169 ± 25.0	176 ± 24.2	120 ± 26.4	136 ± 28.5
	Liver (g%)	3.98 ± 0.279	3.80 ± 0.231	3.92 ± 0.266	3.99 ± 0.260	4.04 ± 0.128	3.78 ± 0.276
	Kidneys (g%)	0.68 ± 0.011	0.68 ± 0.037	0.72 ± 0.024	0.71 ± 0.056	0.65 ± 0.039	0.64 ± 0.033
	Adrenals (mg%)	14.8 ± 2.47	14.0 ± 2.78	13.2 ± 1.23	13.4 ± 2.33	11.9 ± 1.30	12.2 ± 1.45
	Spleen (g%)	0.21 ± 0.019	0.20 ± 0.016	0.20 ± 0.032	0.20 ± 0.033	0.19 ± 0.021	0.19 ± 0.013
	Testes (g%)	0.77 ± 0.076	0.76 ± 0.072	0.78 ± 0.121	0.69 ± 0.233	0.69 ± 0.066	0.69 ± 0.066
Female							
	Number of animals	6	6	6	6	6	6
	Body weight (g)	241 ± 14.8	234 ± 13.9	243 ± 10.5	246 ± 18.8	258 ± 10.6	258 ± 14.6
	Absolute organ weight						
	Brain (g)	1.89 ± 0.049	1.92 ± 0.050	1.91 ± 0.086	1.84 ± 0.087	1.95 ± 0.045	1.94 ± 0.043
	Thymus (mg)	494 ± 97.5	546 ± 147.1	557 ± 91.6	589 ± 131.9	488 ± 89.8	437 ± 94.9
	Liver (g)	8.70 ± 0.626	8.39 ± 0.720	8.34 ± 0.353	8.59 ± 0.787	9.07 ± 0.620	9.12 ± 0.560
	Kidneys (g)	1.62 ± 0.063	1.65 ± 0.137	1.61 ± 0.149	1.70 ± 0.088	1.68 ± 0.089	1.62 ± 0.111
	Adrenals (mg)	76.3 ± 2.58	72.5 ± 14.17	63.3 ± 5.59	71.6 ± 9.33	64.4 ± 2.59	62.4 ± 5.18
	Spleen (g)	0.56 ± 0.070	0.57 ± 0.099	0.53 ± 0.071	0.52 ± 0.048	0.54 ± 0.034	0.59 ± 0.090
	Ovaries (mg)	97.9 ± 14.11	102.9 ± 11.55	100.2 ± 19.82	90.6 ± 11.17	100.9 ± 10.08	91.9 ± 6.06
	Relative organ weight						
	Brain (g%)	0.79 ± 0.059	0.82 ± 0.042	0.79 ± 0.035	0.75 ± 0.042	0.76 ± 0.046	0.76 ± 0.039
	Thymus (mg%)	205 ± 42.2	232 ± 53.7	231 ± 43.5	240 ± 52.9	189 ± 29.5	170 ± 34.9
	Liver (g%)	3.61 ± 0.125	3.58 ± 0.128	3.44 ± 0.086	3.48 ± 0.151	3.52 ± 0.193	3.54 ± 0.065
	Kidneys (g%)	0.67 ± 0.036	0.71 ± 0.030	0.67 ± 0.085	0.69 ± 0.030	0.65 ± 0.048	0.63 ± 0.023
	Adrenals (mg%)	31.8 ± 1.40	30.9 ± 4.75	26.2 ± 2.99*	29.0 ± 2.43	25.0 ± 1.37	24.4 ± 3.14
	Spleen (g%)	0.23 ± 0.025	0.24 ± 0.036	0.22 ± 0.028	0.21 ± 0.019	0.21 ± 0.008	0.23 ± 0.041
	Ovaries (mg%)	40.6 ± 5.05	43.9 ± 3.17	41.6 ± 9.71	37.0 ± 6.03	39.1 ± 3.21	35.7 ± 1.85*

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from control group; *, P<0.05.

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 2-Hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone on Bacteria

要約

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法により実施した。

予備試験の結果、いずれの菌株にも抗菌性が認められなかったことから、本試験では S9 mix 非共存下および共存下のいずれも、5000~313 μg /プレート の公比2で5濃度を設定した。

本試験を2回実施した結果、被験物質の各濃度において誘発された復帰突然変異コロニー数は、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上を示さなかった。従って、2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの変異原性は、陰性と結論した。

方法

〔使用菌株〕

カリフォルニア大学 B. N. Ames 教授より 1983年5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および 東京大学医科学研究所 松島教授より 1985年10月14日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA* の5菌株を用いた。各使用菌株は超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を融解後、その20 μl をニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2, ロット番号: 067 54134, Unipath社) 25 g を 1 l の精製水に溶解して作成した液体完全培地 10 ml に接種し、37℃で8時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は菌濃度を測定した後、試験に使用した。

〔被験物質〕

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノン (CAS No.: 1843-05-6, ロット番号: 40650, 純度: 99%以上; 住友化学工業(株)製造, 日本化学工業協会提供) は分子量 326.44, 融点 45~50℃ の淡黄(白)色粉末であり、水、熱、光等に安定である。また、*n*-ヘキサンおよびベンゼンに可溶で、水には不溶である。なお、本ロットについては試験期間中安定であることを確認した。

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンはジメチルスルホキシド (DMSO, ロット番号: 603E2089,

純度: 99.7%, 関東化学(株)) を用いて最高濃度 (50 mg/ml) の溶液を調製した後、同溶媒で公比2で希釈したものをを用いた。なお、本試験の1回目に調製した最高および最低濃度の溶液について濃度分析を実施し、いずれも所定濃度の 100 \pm 5% 以内であることを確認した。

〔陽性対照物質〕

陽性対照物質として下記のものを用いた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (純度: 98.0%, 和光純薬工業(株))

NaN₃ : アジ化ナトリウム (純度: 96.5%, 和光純薬工業(株))

ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (純度: 99.0%, Sigma Chemical Co.)

9-AA : 9-アミノアクリジン (純度: 99%, Sigma Chemical Co.)

2-AA : 2-アミノアントラセン (純度: 95.0%, 和光純薬工業(株))

NaN₃ は注射用水 (株大塚製薬工場) に、その他は DMSO に溶解したものを使用した。

〔培地および S9 mix の組成〕

1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いて D-ビオチン、L-ヒスチジンおよび L-トリプトファン の 0.5 mM 混合水溶液を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水 100 ml に対して、粉末寒天 (Bacto-Agar; Difco社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し、約 45℃ に保温した。

2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 (日清製粉(株)) を購入し、使用した。なお、培地 1 l あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム七水塩	0.2 g
クエン酸一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム無水塩	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
ブドウ糖	20 g
寒天 (OXOID Agar No.1)	15 g

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 mix

S9 mix 1 mlあたり以下の組成で調製し、使用時まで氷中に保存した。

S9*	0.1 ml
塩化マグネシウム六水塩	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
D-グルコース6-リン酸	5 μmol
β-NADPH	4 μmol
β-NADH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μmol
滅菌精製水	残量

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

〔試験方法〕

試験はプレインキュベーション法で実施した。

試験管に被験物質溶液0.1 mlを分注し、S9 mix 0.5 mlと菌懸濁液0.1 mlを加え、37℃で20分間振盪し、プレインキュベーションを行った。S9 mixを共存させない場合には、S9 mixの代わりに0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5 mlを加えた。プレインキュベーション後、トップアガー2 mlを上記の試験管に加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37℃で48時間培養し、復帰変異コロニー数を数えた。同時に実体顕微鏡を用いてバックグラウンドの菌の生育を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた。予備試験は各濃度あたり1枚のプレートを使用した。本試験は各濃度あたり3枚のプレートを用い、2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

〔試験結果の判定基準〕

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照値の2倍以上を示し、明確な用量相関性および再現性が認められる場合に陽性と判定した。

結果および考察

〔予備試験〕

5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 μg/プレート
の濃度で実施したところ、S9 mix非共存下および共存

下のいずれについても、すべての菌株で抗菌性が認められなかった。従って、S9 mix非共存下および共存下のいずれについても本試験では5000, 2500, 1250, 625, 313 μg/プレートの5濃度を設定した。

〔本試験〕

結果をTable 1, 2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施したところ、2回の本試験とも各テスト菌株の復帰変異コロニー数は、S9 mix非共存下および共存下のいずれにおいても、陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、抗菌性はS9 mixの有無によらずいずれの菌株も5000 μg/プレートまで認められなかった。S9 mix非共存下および共存下の625 μg/プレート以上の濃度で、沈殿物が認められた。

以上の結果から、2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの変異原性は陰性と結論した。

参考文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, **113**, pp. 173-215 (1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutation Research*, **38**, pp. 3-32 (1976).

連絡先

試験責任者: 西富 保
 試験担当者: 水野文夫, 榎本佳明, 石毛裕子,
 藤代洋子, 村田久美, 鈴木美江
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
 〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Tamotsu Nishitomi (Study director)
 Fumio Mizuno, Yoshiaki Enomoto,
 Yuko Ishige, Yoko Fujishiro,
 Kumi Murata, Yoshie Suzuki
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
 Kashima Laboratory
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
 Ibaraki, 314-02 Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Results of reverse mutation test(I) of 2-hydroxy-4-(octyloxy) benzophenone on bacteria

With(+) or Without(-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	85 81 (83) 82 (± 2)	9 11 (11) 12 (± 2)	32 17 (27) 32 (± 9)	16 20 (18) 17 (± 2)	4 7 (5) 4 (± 2)
	313	90 80 (80) 70 (± 10)	9 9 (9) 8 (± 1)	19 23 (23) 27 (± 4)	19 22 (17) 10 (± 6)	2 4 (5) 8 (± 3)
	625 C	67 88 (74) 67 (± 12)	8 8 (8) 7 (± 1)	28 31 (29) 29 (± 2)	17 17 (18) 19 (± 1)	10 7 (7) 5 (± 3)
	1250 C	87 82 (83) 79 (± 4)	9 12 (10) 10 (± 2)	18 31 (24) 23 (± 7)	24 17 (20) 18 (± 4)	4 5 (4) 4 (± 1)
	2500 C	82 81 (81) 80 (± 1)	10 12 (11) 10 (± 1)	34 24 (24) 14 (± 10)	19 18 (19) 20 (± 1)	5 4 (4) 3 (± 1)
	5000 C	91 72 (83) 87 (± 10)	5 4 (5) 5 (± 1)	22 32 (24) 19 (± 7)	14 14 (13) 12 (± 1)	4 2 (3) 4 (± 1)
S9 mix (+)	0	73 89 (86) 95 (± 11)	6 3 (6) 8 (± 3)	24 19 (23) 27 (± 4)	29 29 (29) 30 (± 1)	7 14 (10) 10 (± 4)
	313	85 87 (88) 92 (± 4)	6 9 (9) 11 (± 3)	26 29 (25) 20 (± 5)	23 30 (31) 39 (± 8)	7 9 (11) 18 (± 6)
	625 C	83 66 (68) 54 (± 15)	8 13 (10) 8 (± 3)	30 18 (22) 19 (± 7)	27 30 (29) 29 (± 2)	7 8 (8) 8 (± 1)
	1250 C	100 122 (99) 75 (± 24)	8 11 (10) 12 (± 2)	36 25 (29) 27 (± 6)	27 22 (27) 31 (± 5)	6 8 (8) 11 (± 3)
	2500 C	90 82 (84) 80 (± 5)	4 7 (7) 9 (± 3)	28 31 (29) 29 (± 2)	26 26 (27) 29 (± 2)	8 12 (10) 11 (± 2)
	5000 C	103 88 (86) 68 (± 18)	12 10 (11) 10 (± 1)	35 32 (30) 24 (± 6)	43 24 (32) 30 (± 10)	12 13 (13) 14 (± 1)
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN_3	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
	Number of revertants	385 412 (410) 433 (± 24)	283 331 (314) 327 (± 27)	301 308 (335) 397 (± 54)	406 486 (454) 470 (± 42)	876 836 (851) 842 (± 22)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	559 625 (572) 532 (± 48)	356 284 (303) 269 (± 47)	897 897 (888) 869 (± 16)	312 355 (316) 280 (± 38)	159 152 (163) 177 (± 13)

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN_3 : sodium azide

ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine, 2-AA:2-aminoanthracene

(Mean)
(\pm S.D.)

C: Precipitates were observed on the surface of agar plates.

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone on bacteria

With (+) or Without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	80 91 (83) 79 (± 7)	6 6 (7) 8 (± 1)	18 24 (21) 21 (± 3)	12 18 (14) 13 (± 3)	9 9 (7) 4 (± 3)
	313	88 83 (81) 71 (± 9)	11 5 (9) 12 (± 4)	32 27 (29) 28 (± 3)	13 15 (14) 14 (± 1)	7 5 (5) 2 (± 3)
	625 C	76 81 (78) 76 (± 3)	4 7 (8) 12 (± 4)	26 20 (19) 12 (± 7)	10 15 (15) 20 (± 5)	3 6 (5) 6 (± 2)
	1250 C	94 97 (99) 107 (± 7)	9 11 (9) 6 (± 3)	24 25 (24) 22 (± 2)	19 18 (20) 22 (± 2)	8 7 (7) 6 (± 1)
	2500 C	98 93 (93) 87 (± 6)	10 11 (9) 6 (± 3)	33 35 (34) 34 (± 1)	21 21 (21) 20 (± 1)	6 7 (8) 10 (± 2)
	5000 C	87 80 (84) 84 (± 4)	12 5 (8) 7 (± 4)	26 23 (26) 29 (± 3)	21 20 (18) 13 (± 4)	7 7 (5) 2 (± 3)
S9 mix (+)	0	97 80 (90) 92 (± 9)	13 7 (10) 10 (± 3)	22 31 (25) 22 (± 5)	34 27 (30) 30 (± 4)	15 14 (12) 8 (± 4)
	313	88 94 (92) 95 (± 4)	7 11 (8) 5 (± 3)	30 30 (27) 22 (± 5)	29 28 (30) 32 (± 2)	14 14 (14) 13 (± 1)
	625 C	83 84 (78) 66 (± 10)	5 6 (6) 6 (± 1)	31 37 (32) 27 (± 5)	27 26 (29) 33 (± 4)	10 11 (13) 19 (± 5)
	1250 C	123 85 (103) 101 (± 19)	13 6 (10) 11 (± 4)	43 31 (35) 31 (± 7)	35 32 (32) 30 (± 3)	13 13 (12) 9 (± 2)
	2500 C	98 89 (99) 110 (± 11)	12 5 (9) 9 (± 4)	36 25 (30) 28 (± 6)	37 28 (31) 29 (± 5)	5 11 (9) 11 (± 3)
	5000 C	98 107 (100) 96 (± 6)	9 9 (9) 8 (± 1)	32 30 (29) 25 (± 4)	30 21 (31) 41 (± 10)	12 9 (10) 9 (± 2)
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 mix (-)	Number of revertants	472 434 (443) 424 (± 25)	280 315 (308) 329 (± 25)	592 674 (651) 688 (± 52)	410 420 (428) 453 (± 23)	714 779 (751) 760 (± 33)
	Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
S9 mix (+)	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	560 715 (606) 542 (± 95)	304 337 (318) 312 (± 17)	696 722 (692) 658 (± 32)	217 234 (224) 221 (± 9)	111 131 (131) 150 (± 20)

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide (Mean)
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene (\pm S.D.)

C: Precipitates were observed on the surface of agar plates.

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 2-Hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU, 以下CHLと略す)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、細胞増殖抑制試験を行ったところ、連続処理法の24時間処理および短時間処理法のいずれの処理濃度群(0.156~5.00 mg/ml)においても50%を超える増殖抑制作用は認められなかった。連続処理法の48時間処理では0.156~1.25 mg/mlの細胞増殖率はいずれも50%程度であり顕著な差が認められなかった。従って染色体異常試験において、連続処理法および短時間処理法では5.00 mg/mlを高濃度とし、それぞれその1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度に設定した。48時間処理では、さらに最低の細胞生存率を示した0.625 mg/ml(高濃度の1/8の濃度)を加えた4濃度を設定した。

CHL細胞を被験物質で24時間および48時間連続処理した結果、すべての処理群において、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下においても、すべての処理群において、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

材料および方法

1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1994年8月, 入手時: 継代14代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL細胞を、解凍後継代5代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、仔牛血清(CS: GIBCO LABORATORIES, ロット番号: 43N1140)を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10⁴個のCHL細胞を、培養液5mlを入れたディッシュ(径6cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37℃のCO₂インキュベーター(5%CO₂)内で培養した。

連続処理法では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mixの存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノン(CAS No.: 1843-05-6, ロット番号: 40650, 純度: 99%以上, 住友化学工業(株)製造, 日本化学工業協会提供)は、分子量326.44, 融点45~50℃の淡黄(白)色粉末であり、水、熱、光に安定である。また、*n*-ヘキサンおよびベンゼンに可溶で、水には不溶である。なお、本ロットについては試験期間中安定であることを確認した。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒はアセトン(和光純薬工業(株), ロット番号: KCF1401)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の1.0(v/v)%になるように加えた。染色体異常試験に用いた最高および最低濃度の被験物質調製液について濃度分析を実施し、いずれも所定濃度の100±5%以内であることを確認した。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL細胞に対する増殖抑制作用は、血球計算盤を用いて各群の生存細胞を数え、陰性対照群に対す細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンの約50%の増殖抑制を示す濃度を、50%をはさむ2濃度の値より算出したところ、連続処理法の48時間処理では0.404 mg/mlであったが、この値の前後の濃度の細胞生存率は50%前後で差が認められなかった。一方、連続処理法の24時間処理と短時間処理法ではいずれの処理濃度群(0.156~5.00 mg/ml)においても50%を超える増殖抑制は認められなかった(Fig. 1)。

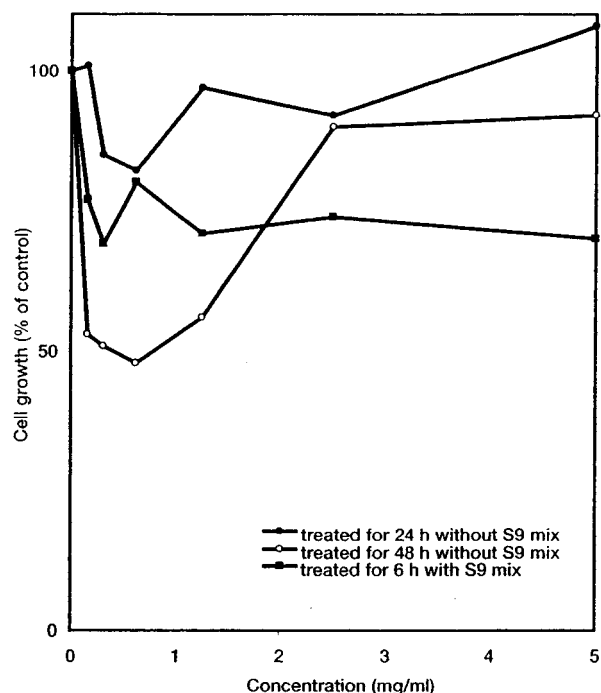


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を連続処理法および短時間処理法では5.00 mg/mlを高濃度とし、それぞれその1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。48時間処理では、さらに最低の細胞生存率を示した0.625 mg/ml(高濃度の1/8の濃度)を加えた4濃度を設定した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 µg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各シャーレにつき2枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で20分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のシャーレから得られたスライドを処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(MMS)²⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と測定

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

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

結果および考察

連続処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンを加えて24時間および48時間処理した各濃度群で、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。2-ヒドロキシ-4-(オクチルオキシ)ベンゾフェノンを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した各濃度群で、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 1988.
- 2) 石館 基 監修, “〈改訂〉染色体異常試験データ集”, エル・アイ・シー社, 1987.

連絡先

試験責任者: 西富 保
 試験担当者: 水野文夫, 太田絵律奈, 中川宗洋,
 岩井由美子, 鈴木美江
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
 〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Tamotsu Nishitomi (Study director)
 Fumio Mizuno, Erina Ohta, Munehiro
 Nakagawa, Yumiko Iwai, Yoshie Suzuki
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
 Kashima Laboratory
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
 Ibaraki, 314-02 Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾		
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA	
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0		
HOBP	1.25	24	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
	2.50	24	200	0	1	0	0	1	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-	
	5.00	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-	
MC	0.00003	24	200	2	35	17	1	0	0	55	48 (24.0)	49 (24.5)	0.0	+	-	
Solvent	0	48	200	1	0	0	1	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.5			
HOBP	0.625	48	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
	1.25	48	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
	2.50	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-	
	5.00	48	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.5	-	-	
MC	0.00003	48	200	2	34	23	7	1	0	67	57 (28.5)	59 (29.5)	0.0	+	-	

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), -g : total no. cells with aberrations except gap, +g : total no. of cells with aberrations, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, HOBP : 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone, MC : mitomycin C

1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al.(1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0		
HOBP	1.25	-	6-(18)	200	0	0	0	2	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-
	2.50	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
	5.00	-	6-(18)	200	0	1	0	0	1	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-
BP	0.020	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	1	0	1	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0		
HOBP	1.25	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-
	2.50	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
	5.00	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-
BP	0.020	+	6-(18)	200	2	25	140	3	0	0	170	142 (71.0)	144 (72.0)	0.0	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), -g : total no. cells with aberrations except gap, +g : total no. of cells with aberrations, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, HOBP : 2-hydroxy-4-(octyloxy)benzophenone, BP : benzo[a]pyrene

1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al.(1987).