

4-クロロ-*o*-クレゾ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-Chloro-*o*-cresol in Rats

要約

消毒剤や除草剤の合成原料等に用いられている既存化学物質、4-クロロ-*o*-クレゾールの28日間反復経口投与毒性試験をSD系[Crj:CD(SD)]ラットを用い、0(対照)、15、60、250および1000 mg/kg/day用量の投与により実施した。動物数は1群雌雄各5匹とし、7群を設け、5群は投与期間終了時屠殺群、2群は対照および1000 mg/kgの14日間回復群とした。

15および60 mg/kg群では、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。250 mg/kg群では、膀胱粘膜に上皮の過形成が雌雄に、前胃粘膜に扁平上皮の過形成が雄に認められた。また、雄の血清総ビリルビンおよび雌の腎臓相対重量は増加した。1000 mg/kg群では、250 mg/kg群で認められた変化に加えて、前胃粘膜の扁平上皮過形成が雌にも認められた。さらに、自発運動低下、深大呼吸、筋の弛緩、腹臥姿勢、流涎などの一般状態の変化および盲腸の拡張が雌雄に、体重増加抑制、血清GPTの増加、副腎皮質細胞の空砲化が雄に、血清コリンエステラーゼの減少、肝細胞の肥大が雌に認められ、雄1匹と雌3匹は死亡した。これらの変化は、回復群においては回復あるいは回復傾向を示し、可逆的であることが確認された。

以上の結果から、4-クロロ-*o*-クレゾールは、ラットへの28日間反復経口投与により、主な毒性影響として、投与経路である消化管、特に胃、排泄経路である膀胱、および肝臓に変化が認められ、腎臓および副腎に対する影響も認められた。無影響量は、雌雄とも60 mg/kg/dayと推定された。

方法

1. 被験物質

4-クロロ-*o*-クレゾールは、分子量142.60、融点43-46℃の水に溶けにくく、エタノール、エーテルには溶け易いフェノール様の臭いのする褐色がかかった結晶で、東京化成工業(株)製造の試薬〔ロット番号FBY01、純度93.6% (不純物として異性体3.3%、クレゾール1.5%等を含む)]を入手し、冷暗所(4℃)で密栓保管し、使用した。投与液は、局方ゴマ油(宮澤薬品)を用い、純度換算で所定の投与用量になるような濃度の溶液として調製し、使用時まで冷所遮光下で密栓保管した。被験物質の原体および投与液中の被験物質は、安定であることを確認した。

2. 使用動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より搬入したSD系[Crj:CD(SD)]ラットを、雄は6日、雌は7日間検疫・馴化飼育し、5週齢(雄145-159 g、雌133-147 g)で、1群雌雄各5匹として試験に用いた。ラットは、温度22±3℃、湿度55±10%、換気回数10回以上/時、照明12時間(6-18時)に設定された飼育室で、金網ケージに個別に収容し、固型飼料〔日本農産工業(株)、ラボMRストック]および水を自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

4-クロロ-*o*-クレゾールの単回経口投与におけるLD₅₀値は、1194 mg/kgと報告されている¹⁾。投与量設定試験を、ラットを1群雌雄各4匹とし、0、10、30、100、300および1000 mg/kg/day用量の14日間反復経口投与により実施した。剖検で、前胃粘膜の肥厚が300 mg/kg以上の群の雌雄に認められた。1000 mg/kg群では、自発運動低下、流涎、深大呼吸、筋弛緩、腹臥姿勢などの症状、体重増加の抑制、摂餌量の減少傾向、肝臓重量の増加が雌雄に認められた。尿検査、血液学検査、血液生化学検査では、明らかな変化は認められなかった。したがって、本試験における投与量は、1000 mg/kg/dayを最高用量とし、以下250、60、15 mg/kg/dayの4用量および対照を設定した。試験群は、以上の5群の他に、1000 mg/kgおよび対照の14日間回復群を設けた。投与は、胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を1日1回、28日間にわたって経口投与した。投与液量は、体重100 g当たり0.5 mlとした。対照群には局方ゴマ油を同様に投与した。

4. 観察および検査項目

1) 一般状態観察

投与および回復期間中毎日、生死および外観、行動等を観察した。

2) 体重および摂餌量測定

体重は、投与1日(投与初日の投与直前)、3日およびその後は週2回、3あるいは4日ごと、ならびに屠殺日あるいは死亡発見日に測定した。摂餌量は、ケージごとに週1回(雄は投与3、10、17、24日および投与終了後3、10日、雌は投与2、9、16、23日および投与終了後2、9日)、翌日までの24時間の飼料消費量を測定した。

3) 尿検査

投与27日および投与終了後10日にラットを代謝ケージに約3時間収容して採尿し、pH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン [以上、マルティステックス、マイルス・三共(株)], 外観および沈渣 (URI-CEL液で染色、ケンブリッジケミカルプロダクト社) を検査した。

4) 血液学検査

供試血液の採取は、投与期間および回復期間終了翌日における屠殺剖検時に行った。動物は採血前日の午後5時より除餌し、水のみを給与した。採取した血液は3分割し、その一部はEDTA-2Kで凝固防止処理し、多項目自動血球計数装置 [東亜医用電子(株)、E-4000] により、赤血球数(電気抵抗検出方式)、血色素量(ラウリル硫酸ナトリウム-ヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(パルス検出方式)、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度(以上、計算値)、白血球数および血小板数(以上、電気抵抗検出方式)を、また塗抹標本を作製して網状赤血球数(Brilliant cresyl blue染色)および白血球百分率(May-Giemsa染色)を測定した。さらに一部は3.8%クエン酸ナトリウム液で処理して血漿を得、血液凝固自動測定装置(アメルング社、KC-10A)により、プロトロンビン時間(Quick一段法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸活性化法)を測定した。

5) 血液生化学検査

採取した血液の一部から血清を分離し、生化学自動分析装置 [日本電子(株)、JCA-VX-1000型クリナライザー] により、総タンパク(Biuret法)、アルブミン(BCG)、A/G比(計算値)、血糖、トリグリセライド、総コレステロール(以上、酵素法)、総ビリルビン(Jendrassik法)、尿素窒素(Urease-UV法)、クレアチニン(Jaffé法)、GOT、GPT、 γ -GTP、LDH(以上、SSCC法)、アルカリホスファターゼ(GSCC法)、コリンエステラーゼ(BTC-DTNB法)、カルシウム(OCPC法)および無機リン(酵素法)を、電解質自動分析装置 [東亜電波工業(株)、NAKL-1] により、ナトリウム、カリウムおよび塩素を測定した。

6) 病理学検査

死亡動物は発見後速やかに、計画屠殺動物は所定の投与期間あるいは回復期間終了翌日の採血に続いて放血屠殺し、剖検した。また、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣、卵巣を秤量した。病理組織学検査は、採取した器官を10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後、対照群および1000 mg/kg群では脳、下垂体、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胃、小腸(十二指腸・空腸・回腸)、大腸(盲腸・結腸・直腸)、膵臓、精巣、卵巣、膀胱、骨髄について、15、60および250 mg/kg群ならびに回復群では、毒性影響がうかがわれた雄では胃、副腎、膀胱、

雌では肝臓、胃、膀胱について、常法によりパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。

5. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について、DunnettあるいはScheffé(群の大きさが異なる場合)の多重比較検定を行った。ただし、回復群については、t検定およびU検定を行った。

結果

1. 一般状態および死亡

死亡については、1000 mg/kgにおいて、回復群の5匹を含む雌雄各10匹中雄の1匹(投与11日、回復群)および雌の3匹(投与7、16および22日、2匹は回復群)が死亡した。一般状態については、1000 mg/kg群の雌雄で、自発運動低下、筋弛緩およびそれによると思われる無力性の歩行異常、腹臥姿勢、深大呼吸、流涎がほぼ全例に認められた。これらの症状は毎日の投与直後から概ね1~3時間認められたが、翌日の投与時には回復していた。さらに、1000 mg/kg群では、立毛、腹部膨満、眼瞼下垂、削瘦が雌雄に、下腹部被毛の尿による汚染が雌に、いずれも低い頻度で認められた。回復期間においては、回復群に異常は認められなかった。

2. 体重(Fig. 1)

1000 mg/kg群の雄で体重増加の抑制が認められ、投与7日以降の体重に対照群との間に有意差が認められた。250 mg/kg群の雄および1000 mg/kg群の雌にも体重増加の抑制傾向がうかがわれたが、有意な変化ではなかった。1000 mg/kgの回復群においては、雄で投与終了後3日までは有意差が残るものの、それ以降は対照群に比べ有意差は認められなくなった。

3. 摂餌量

各群の雌雄とも、有意な変化は認められなかった。1000 mg/kg群の雄の摂餌量は、投与1および2週において対照群に比べてやや少なかったが、統計学的有意差は認められなかった。

4. 尿所見

タンパクおよびケトン体濃度の減少が1000 mg/kg群の雄に認められたが、毒性学的に有意と思われる変化は、雌雄とも認められなかった。

5. 血液学所見(Table 1, 2)

各群の雌雄とも、各検査項目において、統計学的に有意な変化は認められなかった。

6. 血液生化学所見(Table 3, 4)

有意な総ビリルビンの増加が250 mg/kg以上の群の雄に用量依存的に、GPTの増加が1000 mg/kg群の雄に、

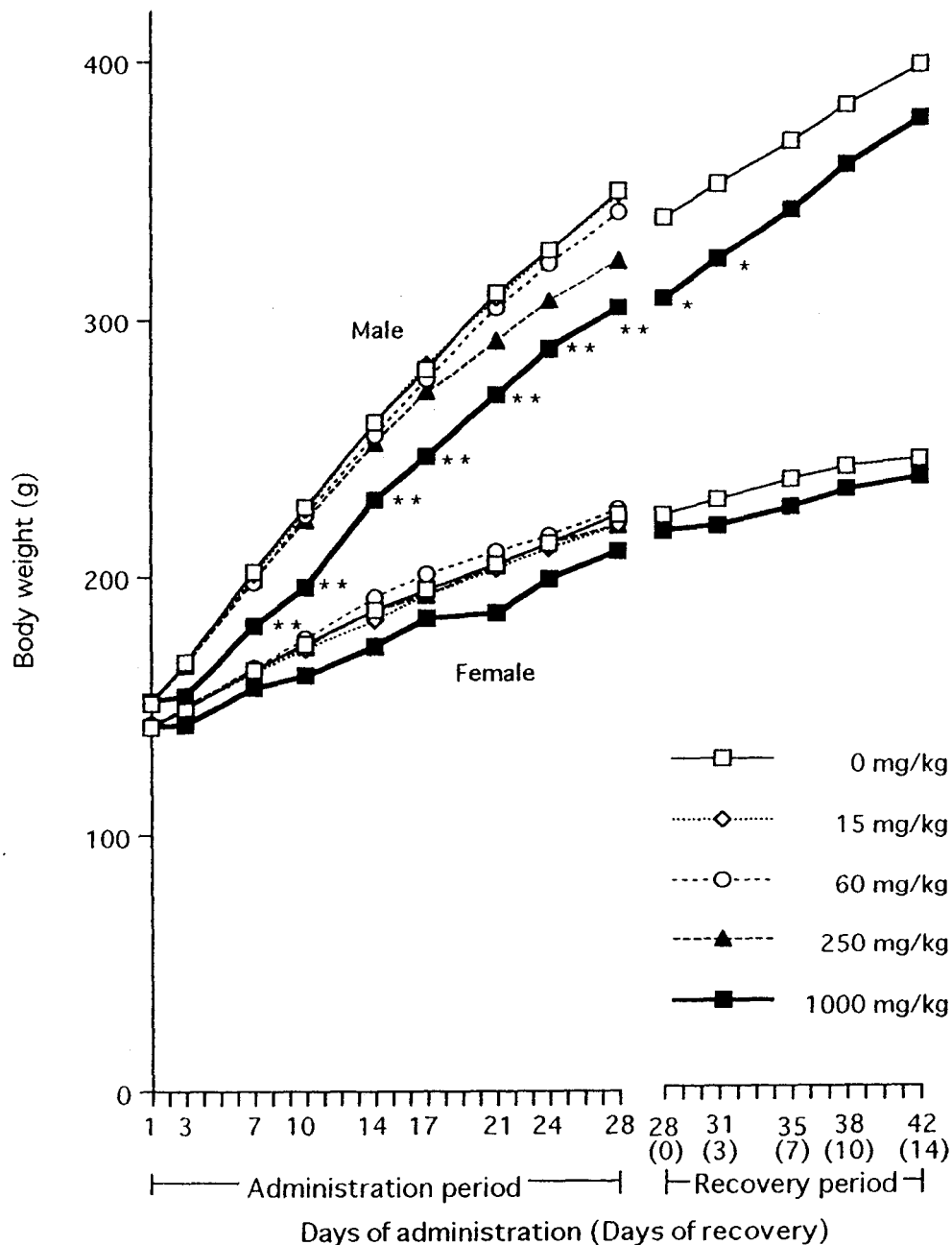


Fig. 1 Body weight changes in rats treated orally with 4-chloro-*o*-cresol in the 28-day repeat dose toxicity test

Significantly different from control group (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$)

コリンエステラーゼの減少が1000 mg/kg群の雌に認められた。1000 mg/kgの回復群においては各検査項目に有意な変化は認められず、投与期間終了時屠殺動物で認められた変化は回復していた。

7. 剖検所見

投与期間終了時生存動物においては、1000 mg/kg群で前胃粘膜の軽度～中等度な肥厚が雄5匹、雌4匹の全例に認められ、雌雄各1匹は表面が粗造であった。また、盲腸の軽度な拡張が雄4匹、雌1匹に認められた。投与期間中に死亡した1000 mg/kg群の雄1匹および雌3匹では、胃および腸のガス貯留による膨満が共通した所見で、

特に雄と雌の2匹では風船様の外観を呈する重度な変化であった。さらに、前胃に粘膜の肥厚、表面粗造あるいは褐色点散在、胸腺、脾臓あるいは雄の副生殖腺の萎縮などが認められた。回復群においては、異常は認められなかった。

8. 器官重量 (Table 5, 6)

雄においては、剖検直前の体重が対照群に比べて250 mg/kg群は12%、1000 mg/kg群は19%少なく、それに伴って両群の肝臓、腎臓、心臓および1000 mg/kg群の脾臓は絶対重量が減少する傾向にあり、1000 mg/kg群の心臓重量は有意に減少した。しかし、これらの器官の

Table 1 Hematological examination in male rats after the oral administration of 4-chloro-*o*-cresol for 28 days and a recovery period for 14 days

Dose level (mg/kg)	After administration period					After recovery period	
	0	15	60	250	1000	0	1000
No. of animals	5	5	5	5	5	5	4
Erythrocyte ($10^4/\text{mm}^3$)	740 ± 38	758 ± 34	773 ± 26	779 ± 35	790 ± 38	812 ± 53	763 ± 22
Hemoglobin (g/dl)	15.5 ± 0.5	15.4 ± 1.1	15.3 ± 0.3	15.7 ± 0.4	16.3 ± 0.5	15.6 ± 0.6	14.7 ± 0.4
Hematocrit (%)	43.9 ± 1.5	44.2 ± 2.4	44.0 ± 0.8	45.1 ± 1.2	45.6 ± 1.4	45.2 ± 1.6	43.1 ± 0.8
MCV (fl)	60 ± 2	59 ± 1	57 ± 2	58 ± 2	58 ± 1	56 ± 2	57 ± 1
MCH (pg)	21.0 ± 0.5	20.3 ± 0.7	19.8 ± 0.7	20.3 ± 1.1	20.7 ± 0.8	19.2 ± 0.7	19.3 ± 0.6
MCHC (%)	35.4 ± 0.2	34.8 ± 0.8	34.8 ± 0.5	34.9 ± 0.8	35.8 ± 0.9	34.4 ± 0.4	34.2 ± 0.6
Reticulocyte (%)	29 ± 9	31 ± 8	27 ± 6	27 ± 3	32 ± 8	26 ± 8	30 ± 7
PT (sec)	12.8 ± 0.2	12.9 ± 0.3	12.7 ± 0.3	13.0 ± 0.3	13.1 ± 0.5	13.2 ± 0.6	13.1 ± 0.4
APTT (sec)	16.8 ± 0.8	16.3 ± 0.4	16.8 ± 0.7	17.1 ± 0.5	17.3 ± 1.0	16.9 ± 1.2	17.3 ± 0.7
Leukocyte ($10^2/\text{mm}^3$)	70 ± 16	80 ± 23	82 ± 37	77 ± 21	90 ± 14	74 ± 20	77 ± 27
Differential count (%)							
Basophil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Eosinophil	2 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 1	0 ± 1
Neutrophil band	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
segmented	15 ± 5	20 ± 13	16 ± 8	13 ± 4	12 ± 5	17 ± 6	13 ± 5
Lymphocyte	82 ± 7	79 ± 12	81 ± 9	86 ± 4	86 ± 5	82 ± 6	86 ± 5
Monocyte	1 ± 2	1 ± 1	2 ± 2	0 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
Platelet ($10^4/\text{mm}^3$)	160 ± 12	159 ± 17	152 ± 17	140 ± 19	147 ± 12	141 ± 13	140 ± 14

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 2 Hematological examination in female rats after the oral administration of 4-chloro-*o*-cresol for 28 days and a recovery period for 14 days

Dose level (mg/kg)	After administration period					After recovery period	
	0	15	60	250	1000	0	1000
No. of animals	5	5	5	5	4	5	3
Erythrocyte ($10^4/\text{mm}^3$)	771 ± 25	767 ± 26	756 ± 38	763 ± 37	783 ± 31	793 ± 28	762 ± 66
Hemoglobin (g/dl)	15.7 ± 0.6	15.7 ± 0.6	15.3 ± 0.5	15.2 ± 0.6	15.5 ± 0.1	15.4 ± 0.3	15.0 ± 1.0
Hematocrit (%)	43.4 ± 1.8	43.8 ± 1.6	43.0 ± 1.4	42.7 ± 1.4	43.5 ± 0.5	44.1 ± 0.8	42.6 ± 2.8
MCV (fl)	56 ± 1	57 ± 1	57 ± 2	56 ± 1	56 ± 2	56 ± 1	56 ± 1
MCH (pg)	20.4 ± 0.4	20.5 ± 0.4	20.3 ± 0.8	20.0 ± 0.4	19.8 ± 0.6	19.4 ± 0.4	19.7 ± 0.6
MCHC (%)	36.2 ± 0.7	35.9 ± 0.4	35.6 ± 0.2	35.7 ± 0.6	35.7 ± 0.1	34.9 ± 0.2	35.2 ± 0.2
Reticulocyte (%)	20 ± 6	20 ± 7	21 ± 5	23 ± 5	22 ± 11	25 ± 6	26 ± 2
PT (sec)	13.2 ± 0.4	13.0 ± 0.1	13.2 ± 0.2	13.3 ± 0.1	13.2 ± 0.4	13.2 ± 0.2	13.2 ± 0.4
APTT (sec)	16.9 ± 1.7	16.0 ± 0.9	17.1 ± 0.4	16.4 ± 0.8	17.7 ± 0.4	15.7 ± 0.3	16.7 ± 1.0
Leukocyte ($10^2/\text{mm}^3$)	42 ± 14	45 ± 13	38 ± 7	43 ± 15	37 ± 8	49 ± 8	47 ± 9
Differential count (%)							
Basophil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Eosinophil	2 ± 1	2 ± 2	2 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 2	2 ± 3
Neutrophil band	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
segmented	14 ± 6	15 ± 7	12 ± 3	16 ± 4	14 ± 11	10 ± 2	10 ± 3
Lymphocyte	82 ± 5	82 ± 8	86 ± 4	83 ± 4	86 ± 11	87 ± 3	87 ± 6
Monocyte	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1
Platelet ($10^4/\text{mm}^3$)	135 ± 17	126 ± 8	152 ± 15	138 ± 11	145 ± 6	138 ± 8	134 ± 26

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 3 Blood chemical examination in male rats after the oral administration of 4-chloro-*o*-cresol for 28 days and a recovery period for 14 days

Dose level (mg/kg)	After administration period					After recovery period	
	0	15	60	250	1000	0	1000
No. of animals	5	5	5	5	5	5	4
LDH (IU/l)	295 ± 105	278 ± 112	386 ± 287	268 ± 24	258 ± 57	284 ± 117	218 ± 15
GOT (IU/l)	61 ± 7	61 ± 10	59 ± 6	64 ± 5	62 ± 9	61 ± 9	61 ± 2
GPT (IU/l)	29 ± 3	29 ± 7	31 ± 2	35 ± 6	41 ± 6**	30 ± 2	30 ± 4
ALP (IU/l)	431 ± 103	406 ± 86	558 ± 185	451 ± 117	552 ± 91	354 ± 18	325 ± 49
γ -GTP (IU/l)	0.26 ± 0.19	0.39 ± 0.34	0.19 ± 0.08	0.36 ± 0.25	0.38 ± 0.25	0.58 ± 0.22	0.34 ± 0.37
ChE (IU/l)	54 ± 28	32 ± 8	33 ± 15	36 ± 18	40 ± 18	24 ± 9	38 ± 11
T.protein (g/dl)	6.01 ± 0.18	5.98 ± 0.29	6.05 ± 0.24	6.03 ± 0.13	5.98 ± 0.23	6.29 ± 0.12	6.13 ± 0.16
Albumin (g/dl)	3.05 ± 0.11	2.87 ± 0.35	2.95 ± 0.10	3.03 ± 0.14	3.03 ± 0.20	2.98 ± 0.25	2.99 ± 0.16
A/G ratio	1.03 ± 0.07	0.94 ± 0.20	0.95 ± 0.07	1.02 ± 0.13	1.04 ± 0.12	0.91 ± 0.12	0.95 ± 0.06
T.cholesterol (mg/dl)	92 ± 14	82 ± 16	83 ± 11	90 ± 24	90 ± 20	96 ± 19	89 ± 10
Triglyceride (mg/dl)	94 ± 19	56 ± 8	103 ± 39	125 ± 54	85 ± 57	100 ± 35	73 ± 33
Glucose (mg/dl)	142 ± 15	160 ± 26	141 ± 11	139 ± 7	144 ± 13	162 ± 26	145 ± 4
T.bilirubin (mg/dl)	0.33 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.38 ± 0.01*	0.41 ± 0.04**	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.04
Urea nitrogen (mg/dl)	14.6 ± 1.7	14.3 ± 1.3	13.8 ± 2.0	13.3 ± 1.7	15.4 ± 1.4	16.8 ± 3.6	16.5 ± 0.1
Creatinine (mg/dl)	0.54 ± 0.02	0.52 ± 0.07	0.50 ± 0.02	0.49 ± 0.03	0.52 ± 0.03	0.54 ± 0.04	0.53 ± 0.04
Ca (mg/dl)	10.0 ± 0.1	9.9 ± 0.4	10.0 ± 0.3	10.1 ± 0.3	10.4 ± 0.3	10.1 ± 0.2	10.2 ± 0.1
I. phosphorus (mg/dl)	8.5 ± 0.3	8.8 ± 0.5	8.9 ± 0.3	8.4 ± 1.0	8.9 ± 0.3	7.5 ± 0.6	7.7 ± 0.2
Na (mEq/l)	140 ± 1	141 ± 1	141 ± 1	140 ± 1	141 ± 1	141 ± 1	140 ± 1
K (mEq/l)	4.59 ± 0.18	4.80 ± 0.37	4.72 ± 0.09	4.68 ± 0.11	4.48 ± 0.39	4.74 ± 0.27	4.79 ± 0.32
Cl (mEq/l)	104 ± 1	104 ± 1	105 ± 1	105 ± 2	103 ± 1	105 ± 1	104 ± 1

Vales are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group (*:p<0.05 **:p<0.01)

Table 4 Blood chemical examination in female rats after the oral administration of 4-chloro-*o*-cresol for 28 days and a recovery period for 14 days

Dose level (mg/kg)	After administration period					After recovery period	
	0	15	60	250	1000	0	1000
No. of animals	5	5	5	5	4	5	3
LDH (IU/l)	501 ± 267	343 ± 197	399 ± 210	332 ± 99	274 ± 98	279 ± 132	198 ± 42
GOT (IU/l)	63 ± 6	63 ± 9	62 ± 8	68 ± 10	61 ± 6	57 ± 5	58 ± 5
GPT (IU/l)	22 ± 4	25 ± 6	27 ± 3	26 ± 5	28 ± 3	24 ± 2	25 ± 3
ALP (IU/l)	269 ± 44	270 ± 78	366 ± 90	339 ± 52	333 ± 67	192 ± 38	202 ± 45
γ -GTP (IU/l)	0.54 ± 0.37	0.40 ± 0.15	0.44 ± 0.38	0.42 ± 0.20	0.33 ± 0.18	0.43 ± 0.31	0.25 ± 0.22
ChE (IU/l)	263 ± 34	230 ± 69	267 ± 51	219 ± 33	131 ± 42*	337 ± 149	325 ± 85
T.protein (g/dl)	6.45 ± 0.14	6.45 ± 0.15	6.37 ± 0.27	6.23 ± 0.22	6.25 ± 0.14	6.77 ± 0.24	6.69 ± 0.07
Albumin (g/dl)	3.32 ± 0.12	3.26 ± 0.17	3.20 ± 0.30	3.10 ± 0.10	3.14 ± 0.22	3.49 ± 0.29	3.40 ± 0.09
A/G ratio	1.06 ± 0.07	1.03 ± 0.13	1.02 ± 0.12	0.99 ± 0.06	1.02 ± 0.13	1.07 ± 0.11	1.03 ± 0.06
T.cholesterol (mg/dl)	85 ± 28	108 ± 14	93 ± 19	91 ± 28	103 ± 14	101 ± 11	102 ± 7
Triglyceride (mg/dl)	27 ± 5	55 ± 16	42 ± 24	38 ± 16	39 ± 19	45 ± 14	61 ± 19
Glucose (mg/dl)	129 ± 12	139 ± 29	124 ± 12	130 ± 12	129 ± 7	143 ± 12	134 ± 6
T.bilirubin (mg/dl)	0.25 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.24 ± 0.01
Urea nitrogen (mg/dl)	18.7 ± 2.0	16.5 ± 2.0	18.7 ± 2.9	15.6 ± 2.2	18.2 ± 2.3	19.5 ± 0.6	21.3 ± 3.5
Creatinine (mg/dl)	0.59 ± 0.07	0.50 ± 0.04	0.53 ± 0.07	0.51 ± 0.04	0.50 ± 0.07	0.61 ± 0.03	0.63 ± 0.05
Ca (mg/dl)	10.0 ± 0.4	10.1 ± 0.1	9.9 ± 0.2	9.6 ± 0.2	10.0 ± 0.3	10.1 ± 0.3	10.2 ± 0.1
I. phosphorus (mg/dl)	6.7 ± 0.9	6.7 ± 0.4	6.3 ± 0.6	6.4 ± 1.0	7.0 ± 1.4	6.0 ± 0.6	6.0 ± 0.2
Na (mEq/l)	142 ± 1	142 ± 1	141 ± 1	141 ± 1	140 ± 2	142 ± 1	142 ± 0
K (mEq/l)	4.32 ± 0.18	4.41 ± 0.18	4.51 ± 0.21	4.39 ± 0.20	4.30 ± 0.15	4.73 ± 0.24	4.56 ± 0.22
Cl (mEq/l)	107 ± 1	106 ± 2	106 ± 1	106 ± 1	104 ± 2	105 ± 2	105 ± 1

Vales are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group(*:p<0.05)

Table 5 Absolute and relative organ weights in male rats after the oral administration of 4-chloro-*o*-cresol for 28 days and a recovery period for 14 days

Dose level (mg/kg)	After administration period					After recovery period	
	0	15	60	250	1000	0	1000
No. of animals	5	5	5	5	5	5	4
Body weight (g)	339 ± 13	321 ± 30	319 ± 15	300 ± 11**	274 ± 13**	366 ± 11	348 ± 28
Absolute weight							
Brain (g)	1.96 ± 0.05	1.91 ± 0.10	1.96 ± 0.08	1.94 ± 0.06	1.91 ± 0.05	1.99 ± 0.06	1.90 ± 0.06
Liver (g)	10.24 ± 0.66	10.67 ± 1.70	10.36 ± 0.80	9.72 ± 0.84	9.32 ± 1.00	10.55 ± 0.73	10.16 ± 0.85
Kidneys (g)	2.39 ± 0.16	2.54 ± 0.35	2.44 ± 0.12	2.29 ± 0.23	2.17 ± 0.17	2.55 ± 0.16	2.58 ± 0.23
Spleen (g)	0.62 ± 0.04	0.64 ± 0.09	0.59 ± 0.12	0.62 ± 0.15	0.53 ± 0.05	0.66 ± 0.08	0.64 ± 0.07
Heart (g)	1.10 ± 0.06	1.17 ± 0.14	1.15 ± 0.10	1.03 ± 0.06	0.93 ± 0.10*	1.19 ± 0.11	1.24 ± 0.17
Thymus (g)	0.63 ± 0.09	0.54 ± 0.04	0.58 ± 0.09	0.51 ± 0.09	0.57 ± 0.09	0.45 ± 0.16	0.47 ± 0.03
Adrenals (mg)	46.8 ± 5.8	54.8 ± 3.9	50.1 ± 4.7	45.9 ± 6.2	51.9 ± 5.3	53.8 ± 5.5	55.6 ± 7.8
Testes (g)	2.91 ± 0.25	2.97 ± 0.36	3.02 ± 0.06	2.98 ± 0.15	2.88 ± 0.05	3.26 ± 0.29	3.19 ± 0.20
Relative weight							
Brain (g%)	0.58 ± 0.04	0.60 ± 0.04	0.62 ± 0.01	0.65 ± 0.02**	0.70 ± 0.02**	0.55 ± 0.03	0.55 ± 0.03
Liver (g%)	3.02 ± 0.25	3.30 ± 0.26	3.25 ± 0.20	3.24 ± 0.20	3.40 ± 0.28	2.88 ± 0.16	2.92 ± 0.06
Kidneys (g%)	0.70 ± 0.03	0.79 ± 0.08	0.76 ± 0.05	0.76 ± 0.06	0.79 ± 0.05	0.70 ± 0.03	0.75 ± 0.05
Spleen (g%)	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.21 ± 0.04	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.01
Heart (g%)	0.32 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.36 ± 0.02
Thymus (g%)	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.12 ± 0.05	0.14 ± 0.01
Adrenals (mg%)	13.77 ± 1.31	17.11 ± 1.13*	15.77 ± 2.18	15.29 ± 1.92	18.99 ± 2.26**	14.71 ± 1.47	16.13 ± 2.81
Testes (g%)	0.86 ± 0.07	0.93 ± 0.11	0.95 ± 0.03	0.99 ± 0.05*	1.05 ± 0.04**	0.89 ± 0.06	0.93 ± 0.13

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

Table 6 Absolute and relative organ weights in female rats after the oral administration of 4-chloro-*o*-cresol for 28 days and a recovery period for 14 days

Dose level (mg/kg)	After administration period					After recovery period	
	0	15	60	250	1000	0	600
No. of animals	5	5	5	5	4	5	3
Body weight (g)	206 ± 15	205 ± 12	209 ± 14	202 ± 10	191 ± 15	224 ± 10	217 ± 6
Absolute weight							
Brain (g)	1.87 ± 0.11	1.80 ± 0.05	1.89 ± 0.07	1.91 ± 0.08	1.78 ± 0.05	1.84 ± 0.03	1.78 ± 0.04*
Liver (g)	6.42 ± 0.90	6.36 ± 0.68	6.29 ± 0.58	6.45 ± 0.44	6.76 ± 0.79	6.25 ± 0.51	6.40 ± 0.30
Kidneys (g)	1.54 ± 0.13	1.62 ± 0.05	1.61 ± 0.07	1.68 ± 0.13	1.63 ± 0.11	1.67 ± 0.09	1.63 ± 0.15
Spleen (g)	0.45 ± 0.08	0.44 ± 0.02	0.44 ± 0.05	0.43 ± 0.05	0.42 ± 0.05	0.47 ± 0.04	0.44 ± 0.04
Heart (g)	0.74 ± 0.08	0.76 ± 0.04	0.80 ± 0.07	0.76 ± 0.03	0.70 ± 0.04	0.82 ± 0.05	0.77 ± 0.05
Thymus (g)	0.48 ± 0.10	0.45 ± 0.04	0.46 ± 0.04	0.47 ± 0.09	0.37 ± 0.04	0.42 ± 0.07	0.38 ± 0.01
Adrenals (mg)	58.2 ± 9.4	59.8 ± 7.8	60.5 ± 8.9	65.2 ± 10.4	52.0 ± 4.9	62.4 ± 9.0	56.0 ± 2.6
Ovaries (mg)	92.5 ± 19.5	83.5 ± 11.6	82.6 ± 22.3	83.8 ± 7.5	75.6 ± 6.9	82.3 ± 11.5	81.9 ± 11.4
Relative weight							
Brain (g%)	0.91 ± 0.03	0.88 ± 0.07	0.91 ± 0.05	0.94 ± 0.05	0.94 ± 0.09	0.82 ± 0.04	0.82 ± 0.01
Liver (g%)	3.10 ± 0.27	3.10 ± 0.21	3.01 ± 0.18	3.18 ± 0.11	3.55 ± 0.19*	2.78 ± 0.14	2.95 ± 0.12
Kidneys (g%)	0.75 ± 0.02	0.79 ± 0.04	0.77 ± 0.04	0.83 ± 0.04**	0.86 ± 0.03	0.74 ± 0.03	0.75 ± 0.05
Spleen (g%)	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.02
Heart (g%)	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.02
Thymus (g%)	0.23 ± 0.05	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.04	0.19 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.17 ± 0.01
Adrenals (mg%)	28.16 ± 3.86	29.30 ± 4.24	28.97 ± 3.73	32.09 ± 3.54	27.26 ± 0.95	27.77 ± 3.07	25.88 ± 1.53
Ovaries (mg%)	44.5 ± 7.1	40.9 ± 6.2	39.1 ± 9.0	41.4 ± 2.5	39.9 ± 5.1	36.7 ± 4.8	37.9 ± 6.1

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

相対重量には有意な変化は認められなかった。250 mg/kgおよび1000 mg/kg群の脳および精巣は、絶対重量に変化は認められなかったが、相対重量では有意に増加した。また、副腎は、1000 mg/kg群で相対重量の有意な増加が認められた。15 mg/kg群においても有意な副腎の相対重量増加が認められたが、変化は軽度で、60および250 mg/kg群では有意な変化は認められず、用量依存的でなかった。一方、雌においては、体重に有意な変化は認められなかったが、肝臓相対重量の有意な増加が1000 mg/kg群、腎臓相対重量の有意な増加が250および1000 mg/kg群に認められた。1000 mg/kgの回復群においては、これらの変化は認められず回復していた。以上の変化とは別に、1000 mg/kgの回復群の雌の脳絶対重量が対照群の平均値1.84 gに対し1.78 gとわずかに下回り、有意差が認められたが、これは両群とも測定値のバラツキが極めて小さかったため、その差は約3%のわずかなものであった。

9. 病理組織学所見 (Table 7, 8)

被験物質の投与に起因すると考えられる変化が、胃、膀胱、肝臓および副腎に認められた。投与期間終了後屠殺動物において、胃では、前胃の粘膜に扁平上皮の過形成が、250 mg/kg群の雄1匹および1000 mg/kg群の雌雄全例に認められた。膀胱では、上皮の過形成が、250および1000 mg/kg群の雌雄の半数以上ないし全例に認められた。以上の変化に加えて、1000 mg/kg群で、小葉中心性の軽度な肝細胞の肥大が雌に、副腎皮質細胞の軽度な空胞化が雄に、いずれも約半数の動物で認められた。1000 mg/kg群の投与期間中死亡した雄1匹および雌3匹においては、投与期間終了後屠殺動物で認められた変化のほか、雄の例の肝臓には肝細胞の単細胞壊死、雌の全例の前胃には粘膜上皮の変性および1例に潰瘍が認められた。また、雌雄とも全身諸器官に萎縮性的変化が認められた。

回復期間終了後屠殺動物においては、雌雄とも前胃および膀胱の変化は認められたが、投与期間終了後屠殺動物に比べて軽減しており、また雄の副腎および雌の肝臓には異常は認められなかった。

以上の所見のほかにも、検査した各器官に異常が認められたが、いずれも散発的あるいは用量相関性のない変化で、自然発生病変と考えられる所見であった。

考察

クロロクレゾールの毒性について、4-クロロ-*m*-クレゾールについては、ラットを用いた28日間の反復経口投与毒性試験の結果が報告されており、400 mg/kgで体重の有意な増加抑制が認められるが、一般状態、血液学検査、血液生化学検査および病理学検査では異常は認められず、NOELは200 mg/kgと推定されている²⁾。

今回実施した、4-クロロ-*o*-クレゾールのラットを用いた28日間の反復経口投与毒性試験では、消化管、特に胃および膀胱の粘膜、肝臓、腎臓、副腎などに変化が

発現した。

消化管に対する影響としては、前胃粘膜に扁平上皮の過形成が、250 mg/kg群の雄および1000 mg/kg群の雌雄に認められた。投与期間中の死亡動物においては、粘膜上皮の変性および潰瘍を認める例があった。また、盲腸の拡張が1000 mg/kg群の雌雄に認められ、死亡動物では胃および腸がガスで膨満していた。

o-クレゾールには腐食性があり³⁾、4-クロロ-*o*-クレゾールについても、刺激性が強いことが知られている⁴⁾。さらに、4-クロロ-*o*-クレゾールは殺菌剤として用いられている物質で、これの経口投与により腸内細菌叢に対し影響し、盲腸などの拡張を引き起こすことは十分考えられる。したがって、消化管に対する影響は、主に本被験物質の局所刺激性および殺菌作用が関与して発現したものと考えられる^{5,6)}。

クロロクレゾールの代謝について、大部分がグルクロン酸および硫酸抱合され、尿中排泄されることが、4-クロロ-*m*-クレゾールにおいて確認されている⁷⁾。

膀胱粘膜にも上皮の過形成が250および1000 mg/kg群の雌雄に認められた。この変化は排泄器官である腎臓を経て濃縮された尿中の主に代謝物の、膀胱粘膜への直接的な作用に対する組織の反応性増殖と解せられる。

なお、腎臓においては、相対重量の増加が250および1000 mg/kg群の雌に認められたが、病理組織学的には著変は認められず、影響としては、軽度なものと考えられる。

肝臓に対する影響については、肝細胞の肥大および肝臓相対重量の増加が1000 mg/kg群の雌に認められた。雄の血清GPTおよび総ビリルビンの増加、雌のコリンエステラーゼの減少も、肝機能の異常を示唆する変化と考えられる。

4-クロロ-*o*-クレゾールは、NAD依存の脱水素酵素を抑制することにより、ラット肝ミトコンドリアの電子伝達系を阻害する⁷⁾。これを投与したラットにおける組織内残留量と病理組織学的変化の関連性をみたHattulaら¹⁾の報告では、1200 mg/kgの単回経口投与により、肝細胞に核濃縮や単細胞壊死が認められている。本試験で雄の死亡動物の肝臓に認められた単細胞壊死も、被験物質の投与に起因するものと判断される。

副腎では、1000 mg/kg群の雄で相対重量が増加し、病理組織学的には皮質細胞の軽度な空胞化が観察された。空胞化は細胞内のリポイドの増加によるもので、被験物質の全般的な毒性によるストレスを反映した二次的な変化と推察される。

臨床観察で、1000 mg/kg群の雌雄に一般状態の変化が認められ、自発運動低下、深大呼吸、腹臥姿勢、流涎などに加えて、筋弛緩およびそれによると思われる無力性の歩行異常が特徴的な症状として観察された。しかし、これらの症状の発現時間は毎日の投与後1～3時間と短く、投与の反復につれて蓄積的に症状が増強する傾向は認められなかった。体重は、1000 mg/kg群の雄で増加抑制が認められ、同群の雌雄各10匹中雄1匹および雌3匹が死亡した。15および60 mg/kg群では、各観察およ

Table 7 Incidence of histopathological findings in male rats after the oral administration of 4-chloro-*o*-cresol for 28 days and a recovery period for 14 days

Organ:Findings	Dose level (mg/kg)	After administration period					After recovery period		
		0	15	60	250	1000	0	1000	
		KT	KT	KT	KT	KT(FD) T	KR	KR	
	Fate								
	No. of animals	5	5	5	5	5(1)#	6	5	4
Heart:Myocardial degeneration/fibrosis	+	1	-	-	-	0(0)	0	-	-
Lung:Arterial wall mineralization	+	2	-	-	-	3(0)	3	-	-
Foamy cell accumulation	+	1	-	-	-	0(0)	0	-	-
Liver:Single cell necrosis	+	0	-	-	-	0(1)	1	-	-
Forestomach:Squamous hyperplasia	+	0	0	0	1	1(1)	2	0	3
	++	0	0	0	0	3(0)	3	0	0
	+++	0	0	0	0	1(0)	1	0	0
Kidney:Basophilic tubules	+	3	-	-	-	3(0)	3	-	-
	++	0	-	-	-	1(0)	1	-	-
Hyaline cast	+	2	-	-	-	0(0)	0	-	-
Cellular infiltration	+	1	-	-	-	0(0)	0	-	-
Urinary bladder:Epithelial hyperplasia	+	0	0	0	4	3(1)	4	0	3
	++	0	0	0	0	2(0)	2	0	0
Adrenal:Cortical cell vacuolization	+	0	0	0	0	2(0)	2	0	0
Thymus:Atrophy	+	0	-	-	-	0(1)	1	-	-
Spleen:Atrophy	+	0	-	-	-	0(1)	1	-	-
Seminal vesicle:Atrophy	++	0	-	-	-	0(1)	1	-	-
Prostate:Atrophy	++	0	-	-	-	0(1)	1	-	-

KT:Killed by design after the administration period;FD:Found dead;T:Total;KR:Killed by design after a recovery period

+:Slight;+:Moderate;+:Marked;-:Not examined

#:Animal supposed to be killed after a recovery period

No abnormalities detected in the pancreas, glandular stomach, testis, pituitary, thyroid, parathyroid, bone marrow, brain and eye ball from animals of control and 1000 mg/kg groups.

Table 8 Incidence of histopathological findings in female rats after the oral administration of 4-chloro-*o*-cresol for 28- days and a recovery period for 14 days

Organ : Finding	Dose level (mg/kg)	After administration period					After recovery period		
		0	15	60	250	1000	0	1000	
		KT	KT	KT	KT	KT(FD) T	KR	KR	
	Fate								
	No. of animals	5	5	5	5	4(3)#	7	5	3
Heart:Myocardial degeneration/fibrosis	+	1	-	-	-	0(0)	0	-	-
Lung:Arterial wall mineralization	+	3	-	-	-	1(0)	1	-	-
Foamy cell accumulation	+	0	-	-	-	1(0)	1	-	-
Liver:Hepatocellular hypertrophy	+	0	0	0	0	2(1)	3	0	0
Forestomach:Epithelial degeneration	+	0	0	0	0	0(3)	3	0	0
Squamous hyperplasia	+	0	0	0	0	1(0)	1	0	1
	++	0	0	0	0	3(0)	3	0	0
Ulcer	++	0	0	0	0	0(1)	1	0	0
Kidney:Basophilic tubules	+	3	-	-	-	1(2)	3	-	-
Distal tubular dilatation	+	0	-	-	-	1(0)	1	-	-
Hyaline cast	+	0	-	-	-	1(0)	1	-	-
Urinary bladder : Epithelial hyperplasia	+	0	0	0	3	2(3)	5	0	2
	++	0	0	0	0	1(0)	1	0	0
Thymus:Atrophy	+	0	-	-	-	0(1)	1	-	-
Spleen:Atrophy	+	0	-	-	-	0(1)	1	-	-

KT:Killed by design after the administration period;FD:Found dead;T:Total;KR:Killed by design after a recovery period

+:Slight;+:Moderate;+:Marked;-:Not examined

#:One animal supposed to be killed after the administration period and two after a recovery period were found dead during the administration period

No abnormalities detected in the pancreas, glandular stomach, ovary, adrenal, pituitary, thyroid, parathyroid, bone marrow, brain and eye ball from animals of control and 1000 mg/kg groups.

び検査を通じて、被験物質の投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

以上の被験物質投与期間中あるいは投与期間終了後屠殺動物の観察および検査で認められた変化は、1000 mg/kgの回復群においてはいずれも回復あるいは回復傾向にあり、可逆的な変化であることが確認された。

なお、投与期間終了後の解剖で、最終体重が対照群に比べて少なかった250あるいは1000 mg/kg群の雄に、心臓の絶対重量減少や脳および精巣の相対重量増加が認められたが、これらの器官には病理組織学的な異常は認められず、低体重に伴う変化と判断された。

以上の結果から、4-クロロ-o-クレゾールは、ラットへの反復経口投与により、主な毒性影響として、投与経路である消化管特に胃、排泄器官である膀胱、および肝臓に変化が認められ、腎臓および副腎に対する影響も認められた。無影響量は、60 mg/kg/dayと推定された。

文献

- 1) M. L. Hattula, H. Reunanen, A. V. Arstila, *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **21**, 492(1979).
- 2) C. Madsen, P. H. Andersen, O. Meyer, G. Wurtzen, *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **37**, 651(1986).
- 3) W. B. Deichmann, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **80**, 233(1944).
- 4) R. A. Lenga, "Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data," 2, Vol.1, Sigma-Aldrich, Milwaukee, 1988, p.807.
- 5) 今井清, "毒性試験法講座5-毒性病理学," 前川昭彦, 林裕造編, 地人書館, 東京, 1991, pp.127-135.
- 6) 小野寺威, "毒性試験法講座15-医薬品," 福田英臣, 秋元健, 坂口孝編, 地人書館, 東京, 1991, pp.37-38.
- 7) M. L. Richardson, "The Dictionary of Substance and their Effects," 2-C, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1993, pp.332-334.

連絡先

試験責任者：伊藤義彦

試験担当者：藩栗緒, 福田苗美, 杉本忠美
伊藤雅也, 鈴木昭雄

(財)畜産生物科学安全研究所

〒229-11 神奈川県相模原市橋本台3-7-11

Tel 0427-62-2775 Fax 0427-62-7979

Correspondence

Authors: Yoshihiko Ito (Study director)

Cleo Pan, Naemi Fukuda,

Tadami Sugimoto, Masaya Ito,

Teruo Suzuki

Research Institute for Animal Science in

Biochemistry and Toxicology

3-7-11 Hashimotodai, Sagamihara-shi, Kanagawa,

229-11, Japan

Tel +81-427-62-2775 Fax +81-427-62-7979

4-クロロ-*o*-クレゾールの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 4-Chloro-*o*-cresol 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、4-クロロ-*o*-クレゾールについて *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。

予備試験における抗菌性の結果をもとに、本試験では S9 mix 非共存下の WP2 *uvrA* については 1250~39.1 μg /プレート、その他の菌株については 625~19.5 μg /プレートのそれぞれ公比 2 の 6 濃度を設定し、S9 mix 共存下についてはいずれの菌株も 1250~39.1 μg /プレートの公比 2 で 6 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。また、抗菌性が S9 mix 非共存下では 625 μg /プレート以上で、S9 mix 共存下では TA1535, WP2 *uvrA* は 1250 μg /プレートで、その他の菌株は 625 μg /プレート以上で認められた。従って、4-クロロ-*o*-クレゾールの変異原性は、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, 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〕

4-クロロ-*o*-クレゾール (CAS No. : 1570-64-5, ロット番号 : FBY01, 純度 : 93.9% ; 東京化成工業(株)) は分子量 142.58, 融点 40℃, 沸点 220~225℃ の白色結晶塊で通常の取り扱い条件では安定である。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。

4-クロロ-*o*-クレゾール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。また、調製に際しては純度換算 (93.9%) を実施した。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 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
D-グルコース6-リン酸	5 μ mol
β -NADPH	4 μ mol
β -NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol
滅菌精製水	残量

*: 購入したS9(キッコーマン(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-ベンゾフラボン併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 \times 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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 μ g/プレート
 の濃度で実施したところ、S9 mix非共存下ではすべての菌株の625 μ g/プレート以上で、S9 mix共存下では

WP2 *uvrA*の1250 μ g/プレート以上および他の菌株の625 μ g/プレート以上でそれぞれ抗菌性が認められた。ただし、S9 mix非共存下におけるWP2 *uvrA*の625 μ g/プレートでの抗菌性は他の菌株に比べ弱いものであった。従って、本試験ではS9 mix非共存下のWP2 *uvrA*については1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 μ g/プレートの6濃度を、その他の菌株については625, 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5 μ g/プレートの6濃度を設定した。S9 mix共存下ではすべての菌株について1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1 μ g/プレートの6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、抗菌性がS9 mix非共存下では625 μ g/プレート以上で、S9 mix共存下ではTA1535, WP2 *uvrA*は1250 μ g/プレートで、その他の菌株は625 μ g/プレート以上で認められた。

以上の結果から、4-クロロ-*o*-クレゾール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**, 173-215 (1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutation Research*, **38**, 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