

# 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-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 4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) in Rats

### 要約

既存化学物質の毒性評価の一環として、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の0(5%アラビアゴム水溶液)、15, 60, および250 mg/kgをSD系ラットに28日間強制経口投与し、その毒性を検討した。0, 60および250 mg/kg群については、別に14日間の回復群を設けた。

被験物質投与に起因する一般状態の変化はみられず、体重への影響もみられなかった。

摂餌量では、投与開始初期に一時的な減少が250 mg/kg群の雌雄でみられたが、雄ではその後対照群をやや上回って推移した。60 mg/kg群の雄の摂餌量も対照群をやや上回って推移した。尿検査では、pHの低下が60 mg/kg群の雌と250 mg/kg群の雌雄に、尿蛋白およびケトン体の増加が60および250 mg/kg群の雌に、血液学検査では、血小板数の増加が250 mg/kg群の雌雄に、分葉核好中球比率の増加およびリンパ球比率の減少が250 mg/kg群の雌に、血液生化学検査では、無機リンの増加が60 mg/kg以上の投与群の雌に、総コレステロールの増加が250 mg/kg群の雌雄に、リン脂質および尿素窒素の増加と血糖値の低下が250 mg/kg群の雌にみられた。

病理学検査では、250 mg/kg群の雌雄に肝臓重量の増加、肉眼的な小腸壁の肥厚と盲腸の拡張がみられた。組織学的には、肝臓で小葉中心帯肝細胞の肥大と回腸における腸絨毛の過形成が250 mg/kg群の雌雄に、盲腸と結腸で吸収上皮細胞の空胞化が60 mg/kg以上の投与群の雌雄に、また、盲腸粘膜の細胞浸潤が60 mg/kg以上の投与群の雌雄に、結腸粘膜の細胞浸潤が60 mg/kg以上の投与群の雌にみられた。さらに、腸間膜リンパ節では、傍皮質領域における“tingible body macrophage”が250 mg/kg群の雌に多くみられた。回復群においては、回腸以外のほとんどの変化は消失した。

以上の結果から、本試験条件下における4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の無影響量は雌雄とも15 mg/kg/dayと考えられた。

### 方法

#### 1. 被験物質および被験液の調製

被験物質4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)は、分子量358.54, 融点160~165℃, 水に不溶, アセ

トンおよびメタノールに可溶の白色結晶性粉末である。本試験にはロット番号40701(住友化学工業(株)製), 純度98%以上のものを用いた。なお、投与終了後の残余被験物質について分析を行った結果、使用期間中は安定であったことが確認された。

投与容量が5 ml/kg体重となるよう、5%アラビアゴム水溶液に懸濁して0.3, 1.2および5%(w/v)懸濁液を調製した。0.1~5%(w/v)懸濁液は、室温で1日間および冷蔵(約4℃)・暗所(褐色ガラス瓶)で8日間まで安定であったことから、最大1週間分を一括して調製し、1日分ずつ褐色ガラス瓶に分注して冷蔵庫(約4℃)に保存した。また、投与開始前および投与終了週の2回、投与に使用する各濃度液について当施設で測定した結果、いずれも濃度は適正でかつ均一であった。

#### 2. 使用動物および飼育条件

5週齢のCrj:CD(SD)系SPF雌雄ラットを日本チャールス・リバー(株)から購入し、当所で約1週間検疫・馴化飼育した後、体重増加が順調で一般状態に異常を認めなかった雌雄各42匹を選び、6週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で193~222 g(平均値:208.0 g), 雌で148~171 g(平均値:157.4 g)であった。

動物は、群分け当日の体重に基づいて層別化し、各群平均体重がほぼ均等となるよう、コンピュータを用いて各群に割り付けた。

動物は、温度23±3℃, 相対湿度50±20%, 換気回数1時間当たり11~13回, 照明1日12時間の飼育室で、金属製網ケージに1匹ずつ収容し、固型飼料(放射線滅菌CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))および飲料水(水道水)を自由に摂取させ飼育した。

#### 3. 投与量および投与方法

2週間投与による予備試験(投与量:0, 5, 60, 250および1000 mg/kg)の結果、1000 mg/kg群で多数例が死亡し、250 mg/kg群ではGOTおよびGPTの上昇、血糖値の低下、盲腸の拡張などがみられた。一方、60 mg/kg以下の投与群では変化はみられなかった。これらの成績から、本試験では250, 60および15 mg/kgの3用量を設定し、これに対照群を加えて計4群を使用した。さらに、対照群、60および250 mg/kg群では回復群を設けた。動物数はいずれの群も雌雄各6匹とした。

被験液の投与容量は5 ml/kg体重とし、金属製胃ゾンデを用いて1日1回28日間強制経口投与した。対照群には溶媒(5%アラビアゴム水溶液)を同様に投与した。投

与液量は最新の体重を基準に算出した。回復期間は14日間とした。

#### 4. 検査項目

##### 1) 一般状態の観察

投与期間中は毎日2回以上、回復期間中は毎日1回観察した。

##### 2) 体重

投与期間および回復期間を通じ、週2回の頻度で体重を測定した。

##### 3) 摂餌量測定

投与期間および回復期間を通じ、週2回の頻度で摂餌量を測定した。

##### 4) 血液学検査

投与期間および回復期間終了の翌日の剖検時に検査を行った。前日から一夜(約16時間)絶食させた動物をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から抗凝固剤(EDTA-2K)を加えた採血ビンに血液を採取し、赤血球数(電気抵抗変化検出法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(平均赤血球容積および赤血球数から算出)、平均赤血球容積(電気抵抗変化検出法)、平均赤血球色素量(ヘモグロビン量および赤血球数から算出)、平均赤血球色素濃度(ヘモグロビン量およびヘマトクリット値から算出)、血小板数(電気抵抗変化検出法)、白血球数(電気抵抗変化検出法)(以上コールター全自動8項目血球アナライザーT890、(株)日科機)、網赤血球率(Brecher法)および白血球百分率(May-Giemsa鏡検法)を測定した。また、3.8%クエン酸ナトリウムを加えた容器に採取した血液を遠心分離(3000 rpm, 10分間)し、得られた血漿を用い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(以上クロット法、血液凝固自動測定装置、ACL-100, Instrumentation Laboratory)を測定した。

##### 5) 血液生化学検査

血液学検査のための採血と同時に腹大動脈から採血し、遠心分離(3000 rpm, 10分間)により得られた血清を用いてAIP(Bessey-Lowry法)、総コレステロール(CEH-COD-POD法)、トリグリセライド(GK-GPO-POD法)、リン脂質(PLD-ChOD-POD法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、血糖(Hexokinase-G6PD法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、ナトリウム、カリウムおよび塩素(イオン選択電極法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(モリブデン酸法)、総蛋白質(Biuret法)、アルブミン(BCG法)およびA/G比(総蛋白質およびアルブミンから算出)を測定した。また、ヘパリンを加えた容器に採血し、遠心分離(3000 rpm, 10分間)により得られた血漿を用いてGOT, GPT, LDH(UV-rate法)、 $\gamma$ -GTP( $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド法)およびChE(DTNB法)(以上いずれ

も自動分析装置Monarch, Instrumentation Laboratory)を測定した。

##### 6) 尿検査

投与終了時剖検動物は投与第4週(検査当日の投与後)に、回復群の動物は回復第2週に検査を行った。検査動物を代謝ケージに個別に収容し、絶食・自由摂水下で4時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の20時間尿を採取した。採取した最初の4時間尿を用いてpH, 蛋白質, ケトン体, ブドウ糖, 潜血, ビリルビン, ウロビリノーゲン(以上URIFLET7A試験紙, (株)京都第一科学), 色調(肉眼観察)および沈渣(鏡検)を検査した。また、その後に得られた20時間尿を用いて比重(屈折法, アタゴ屈折計, (株)アタゴ)を測定し、4時間尿量および20時間尿量から1日の尿量を算出した。さらに、代謝ケージに収容した状態で、前日からの1日の摂水量を給水瓶を用いて測定した。

##### 7) 剖検および器官重量

上記血液学検査および血液生化学検査のための採血後に放血致死させ、外表異常の有無を観察した後、頭部、胸部および腹部を含む全身の器官・組織について肉眼的に異常の有無を観察した。続いて、以下に示す器官を摘出後、器官重量(絶対重量)を測定した。また、絶食後の体重および絶対重量から体重100 g当たりの相対重量を算出した。

脳, 胸腺, 心臓, 肺(気管支を含む), 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 卵巣

##### 8) 病理組織学検査

全動物について以下に示す全器官・組織を採取し、リン酸緩衝10%ホルマリン液(但し、眼球およびハーダー腺は3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン液)で固定した。さらに、\*印を施した器官・組織についてパラフィンに包埋した。投与終了時剖検動物では、このうち対照群と高用量群は包埋した全ての器官・組織について、また、中および低用量群は被験物質投与による変化が疑われた小腸(十二指腸~回腸), 大腸(盲腸~直腸), 肝臓および腸間膜リンパ節についてそれぞれ切片とし、ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を施して鏡検した。回復群では、被験物質投与による変化が疑われた上記の腸管, 肝臓および腸間膜リンパ節について全動物を検査した。

脳\*, 脊髄\*, 坐骨神経\*, 胸大動脈, 心臓\*, 気管\*, 肺(気管支を含む)\*, 舌, 食道, 胃\*, 十二指腸\*, 空腸\*, 回腸\*, 盲腸\*, 結腸\*, 直腸\*, 唾液腺(顎下腺・舌下腺), 肝臓\*, 脾臓\*, 下垂体\*, 甲状腺(上皮小体を含む)\*, 副腎\*, 胸腺\*, 脾臓\*, 腸間膜リンパ節\*, 頸部リンパ節\*, 腎臓\*, 膀胱\*, 精巣\*, 精巣上体\*, 精囊, 前立腺\*, 卵巣\*, 子宮\*, 腔\*, 乳腺, 皮膚, 眼球\*, ハーダー腺, 骨及び骨髓(胸骨・大腿骨)\*, 大腿筋, 肉眼的異常部位\*

## 5. 統計解析

各検査項目のうち、数値化した成績についてまず Bartlett法により各群の分散の均一性の検定を行った。その結果、分散が均一の場合には一元配置法による分散分析を行い、群間に有意差が認められたならば、Dunnett法(各群の例数が等しいとき)または Scheffé法(各群の例数が異なるとき)を用いて対照群と各投与群との平均値の差の検定を行った。分散が均一でない場合には、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、有意であれば Dunnett型(各群の例数が等しいとき)または Scheffé型(各群の例数が異なるとき)を用いて対照群と各投与群との平均順位の差の検定を行った。検定はいずれも両側で、有意水準は5および1%とした。

## 結果

## 1. 一般状態

死亡はみられず、いずれの動物にも異常はみられなかった。

## 2. 体重(Fig.1)

## 1) 投与期間

雌雄ともに、各投与群の体重は対照群と同様に推移した。

## 2) 回復期間

雌雄ともに、各投与群の体重は対照群と同様に推移した。

## 3. 摂餌量

## 1) 投与期間

雄では、250 mg/kg群で投与4日に対照群を有意に下回った。しかし、その後は対照群をやや上回って推移し、有意差もみられた。また、60 mg/kg群でも対照群をやや上回って推移し、有意差もみられた。雌では、250 mg/kg群で投与4日に対照群を有意に下回った。しかし、その後は対照群と同様に推移した。

## 2) 回復期間

雌雄ともに、各投与群の摂餌量は対照群と同様に推移した。

## 4. 血液学検査(Table 1)

## 1) 投与終了時

雄では、250 mg/kg群で血小板数の有意な増加がみられた。他に、プロトロンビン時間の有意な短縮が60 mg/kg群にみられたが、用量に関連した変化ではなかった。雌では、250 mg/kg群で血小板数および分葉核好中球比率の有意な増加とリンパ球比率の有意な減少がみられた。

## 2) 回復終了時

雌雄ともに、250 mg/kg群で血小板数の有意な増加がみられた。

## 5. 血液生化学検査(Table 2)

## 1) 投与終了時

雄では、250 mg/kg群で総コレステロールの有意な増加がみられた。雌では、60 mg/kg以上の投与群で無機

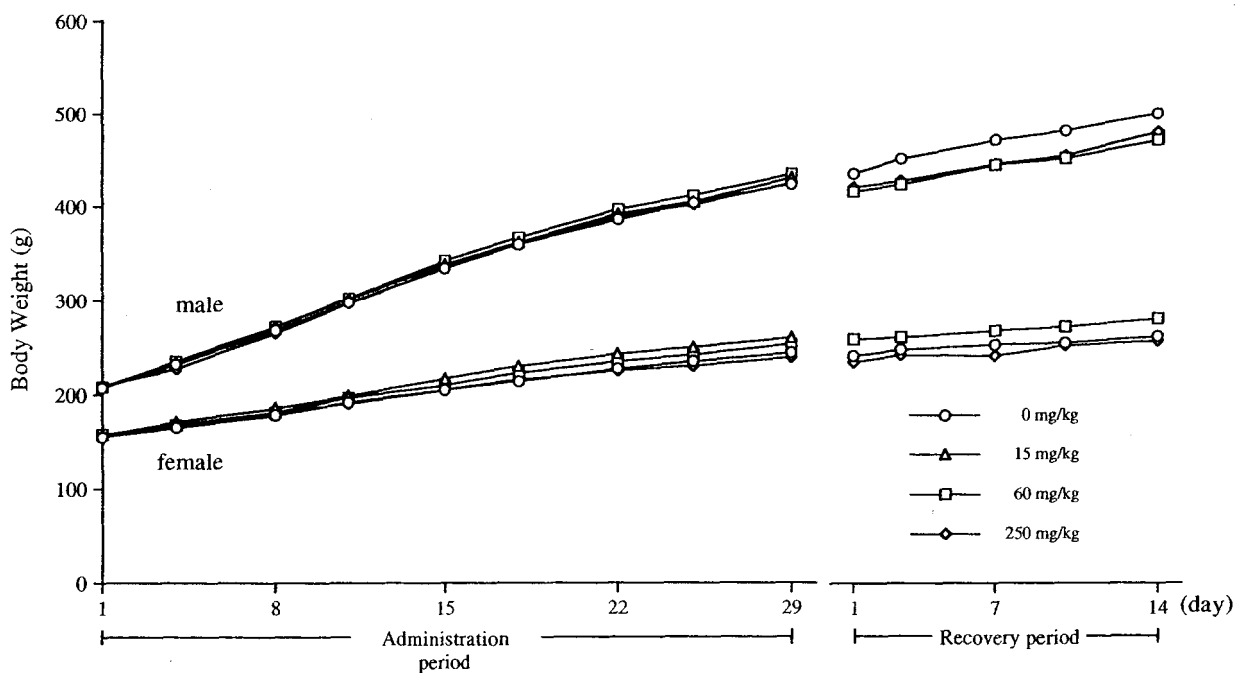


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Table 1 Hematology of rats treated orally with 4,4'-thiobis(6-*tert*-butyl-*m*-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	15	60	250	0	60	250
<b>Male</b>							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
RBC ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	800 $\pm$ 38	791 $\pm$ 28	790 $\pm$ 38	793 $\pm$ 27	806 $\pm$ 21	812 $\pm$ 28	801 $\pm$ 15
Hb (g/l)	16.0 $\pm$ 0.4	15.9 $\pm$ 0.4	15.6 $\pm$ 0.4	15.9 $\pm$ 0.7	15.8 $\pm$ 0.4	15.9 $\pm$ 0.3	15.4 $\pm$ 0.4
Ht (%)	48 $\pm$ 2	48 $\pm$ 1	47 $\pm$ 2	48 $\pm$ 2	47 $\pm$ 1	47 $\pm$ 1	46 $\pm$ 1
MCV ( $\mu^2$ )	59.8 $\pm$ 1.9	60.4 $\pm$ 0.6	59.8 $\pm$ 2.1	60.0 $\pm$ 0.9	58.1 $\pm$ 1.0	58.1 $\pm$ 2.4	57.6 $\pm$ 2.5
MCH (pg)	20.0 $\pm$ 0.7	20.1 $\pm$ 0.5	19.8 $\pm$ 0.7	20.0 $\pm$ 0.3	19.6 $\pm$ 0.2	19.6 $\pm$ 0.8	19.3 $\pm$ 0.8
MCHC (%)	33.5 $\pm$ 0.4	33.2 $\pm$ 0.6	33.2 $\pm$ 0.4	33.3 $\pm$ 0.4	33.8 $\pm$ 0.4	33.8 $\pm$ 0.4	33.4 $\pm$ 0.3
Reticulocyte (%)	20 $\pm$ 3	22 $\pm$ 3	21 $\pm$ 3	22 $\pm$ 6	21 $\pm$ 5	20 $\pm$ 4	23 $\pm$ 4
Platelet ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	118.0 $\pm$ 7.3	122.2 $\pm$ 8.1	116.5 $\pm$ 11.9	135.0 $\pm$ 9.2*	107.4 $\pm$ 3.6	109.3 $\pm$ 7.4	118.8 $\pm$ 9.2*
WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	95 $\pm$ 34	105 $\pm$ 39	96 $\pm$ 28	97 $\pm$ 37	92 $\pm$ 18	99 $\pm$ 24	97 $\pm$ 8
Differential leukocyte counts (%)							
Lymph	84.5 $\pm$ 5.5	88.3 $\pm$ 4.1	81.1 $\pm$ 2.2	87.8 $\pm$ 3.6	79.9 $\pm$ 9.2	84.0 $\pm$ 4.8	80.3 $\pm$ 8.9
Stab	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.2	0.0 $\pm$ 0.0
Seg	14.8 $\pm$ 5.6	10.7 $\pm$ 4.7	17.8 $\pm$ 1.9	11.5 $\pm$ 3.4	18.7 $\pm$ 8.6	14.9 $\pm$ 4.3	18.7 $\pm$ 9.0
Eosino	0.4 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 1.0	0.3 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.6
Baso	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	0.0 $\pm$ 0.0
Mono	0.2 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.4
Others	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	0.0 $\pm$ 0.0
PT (Sec.)	12.8 $\pm$ 1.1	11.8 $\pm$ 0.8	11.4 $\pm$ 0.5*	13.6 $\pm$ 1.3	12.3 $\pm$ 1.5	12.5 $\pm$ 1.1	12.1 $\pm$ 0.8
APTT (Sec.)	19.4 $\pm$ 1.8	18.0 $\pm$ 1.2	17.3 $\pm$ 1.4	21.3 $\pm$ 1.8	19.8 $\pm$ 2.4	19.0 $\pm$ 1.4	18.9 $\pm$ 1.8
<b>Female</b>							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
RBC ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	753 $\pm$ 35	760 $\pm$ 36	724 $\pm$ 26	758 $\pm$ 49	812 $\pm$ 46	810 $\pm$ 27	808 $\pm$ 19
Hb (g/l)	15.5 $\pm$ 0.5	16.1 $\pm$ 0.6	15.3 $\pm$ 0.4	15.8 $\pm$ 0.8	15.6 $\pm$ 0.3	15.8 $\pm$ 0.5	15.5 $\pm$ 0.2
Ht (%)	45 $\pm$ 2	45 $\pm$ 2	43 $\pm$ 1	44 $\pm$ 2	46 $\pm$ 1	47 $\pm$ 2	46 $\pm$ 1
MCV ( $\mu^2$ )	59.2 $\pm$ 1.4	59.8 $\pm$ 1.2	59.5 $\pm$ 1.2	58.5 $\pm$ 1.0	56.8 $\pm$ 2.3	57.3 $\pm$ 0.5	57.1 $\pm$ 0.8
MCH (pg)	20.6 $\pm$ 0.6	21.2 $\pm$ 0.5	21.2 $\pm$ 0.5	20.8 $\pm$ 0.4	19.2 $\pm$ 0.9	19.4 $\pm$ 0.2	19.2 $\pm$ 0.4
MCHC (%)	34.8 $\pm$ 0.9	35.4 $\pm$ 0.4	35.6 $\pm$ 0.4	35.5 $\pm$ 0.2	33.9 $\pm$ 0.4	33.9 $\pm$ 0.4	33.6 $\pm$ 0.3
Reticulocyte (%)	22 $\pm$ 4	17 $\pm$ 5	19 $\pm$ 3	19 $\pm$ 4	20 $\pm$ 2	23 $\pm$ 5	22 $\pm$ 5
Platelet ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	114.6 $\pm$ 8.7	120.6 $\pm$ 11.6	116.2 $\pm$ 6.3	136.6 $\pm$ 9.2**	113.3 $\pm$ 10.8	112.4 $\pm$ 8.3	128.1 $\pm$ 7.2*
WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	66 $\pm$ 10	76 $\pm$ 18	86 $\pm$ 23	93 $\pm$ 37	84 $\pm$ 32	100 $\pm$ 23	80 $\pm$ 26
Differential leukocyte counts (%)							
Lymph	86.0 $\pm$ 3.1	84.3 $\pm$ 3.2	83.2 $\pm$ 6.8	73.0 $\pm$ 9.0**	79.2 $\pm$ 9.0	88.6 $\pm$ 2.2	85.4 $\pm$ 8.0
Stab	0.0 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.3
Seg	13.2 $\pm$ 3.2	14.1 $\pm$ 2.4	15.4 $\pm$ 6.3	24.4 $\pm$ 7.7**	19.6 $\pm$ 8.8	9.9 $\pm$ 1.7	13.3 $\pm$ 7.9
Eosino	0.7 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.9	1.2 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 1.3	0.8 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.8	0.8 $\pm$ 0.5
Baso	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	0.0 $\pm$ 0.0
Mono	0.2 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.3
Others	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	0.0 $\pm$ 0.0
PT (Sec.)	10.6 $\pm$ 0.5	10.9 $\pm$ 0.3	10.5 $\pm$ 0.7	10.0 $\pm$ 0.3	10.7 $\pm$ 0.5	10.5 $\pm$ 0.6	10.8 $\pm$ 0.3
APTT (Sec.)	14.0 $\pm$ 0.9	13.7 $\pm$ 0.5	14.1 $\pm$ 1.4	14.3 $\pm$ 1.6	16.6 $\pm$ 1.4	16.3 $\pm$ 1.9	16.4 $\pm$ 1.2

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.

Significant difference from control group; \*:P&lt;0.05 \*\*:P&lt;0.01

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	15	60	250	0	60	250
Male							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
GOT (IU/l)	54 ± 9	57 ± 10	53 ± 5	60 ± 5	56 ± 11	57 ± 16	61 ± 17
GPT (IU/l)	36 ± 6	34 ± 4	35 ± 5	36 ± 9	41 ± 4	36 ± 8	33 ± 5
LDH (IU/l)	26 ± 5	25 ± 3	24 ± 6	27 ± 8	33 ± 9	25 ± 6	28 ± 12
AIP (IU/l)	289 ± 61	297 ± 38	312 ± 65	326 ± 69	232 ± 67	247 ± 56	244 ± 25
γ-GTP (IU/l)	1.5 ± 0.7	1.4 ± 0.5	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.4	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.8 ± 0.2
ChE (IU/l)	672 ± 39	707 ± 92	690 ± 74	787 ± 95	693 ± 89	802 ± 229	650 ± 52
TP (g/dl)	6.0 ± 0.2	6.0 ± 0.2	5.8 ± 0.2	5.7 ± 0.3	6.3 ± 0.1	6.2 ± 0.2	6.2 ± 0.2
Albumin (g/dl)	3.5 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.1
A/G (%)	1.39 ± 0.12	1.32 ± 0.09	1.41 ± 0.09	1.41 ± 0.13	1.19 ± 0.08	1.24 ± 0.13	1.22 ± 0.10
T. cho (mg/dl)	59 ± 13	62 ± 12	62 ± 15	81 ± 9*	66 ± 15	65 ± 14	67 ± 14
TG (mg/dl)	74 ± 23	94 ± 20	97 ± 22	77 ± 33	113 ± 36	110 ± 54	88 ± 38
PL (mg/dl)	113 ± 22	114 ± 15	122 ± 22	132 ± 11	125 ± 21	125 ± 26	123 ± 18
T. bilirubin (mg/dl)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.07	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.01
Glucose (mg/dl)	119 ± 22	118 ± 8	124 ± 10	106 ± 11	139 ± 15	127 ± 11	122 ± 4*
BUN (mg/dl)	12 ± 1	12 ± 1	13 ± 2	13 ± 1	14 ± 2	13 ± 1	16 ± 2
Creatinine (mg/dl)	0.57 ± 0.03	0.58 ± 0.03	0.58 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.56 ± 0.05	0.60 ± 0.05	0.62 ± 0.06
Na (mEq/l)	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 1	145 ± 1	145 ± 1	145 ± 1
K (mEq/l)	4.8 ± 0.4	4.6 ± 0.3	4.4 ± 0.3	4.6 ± 0.2	4.8 ± 0.3	4.7 ± 0.3	4.7 ± 0.3
Cl (mEq/l)	110 ± 1	110 ± 1	110 ± 1	110 ± 1	111 ± 1	112 ± 1	111 ± 2
Ca (mg/dl)	9.3 ± 0.2	9.2 ± 0.2	9.2 ± 0.3	9.3 ± 0.3	9.0 ± 0.2	8.9 ± 0.1	9.0 ± 0.2
P (mg/dl)	9.2 ± 0.5	9.2 ± 0.5	9.2 ± 0.5	9.8 ± 0.2	7.8 ± 0.5	7.8 ± 0.4	8.4 ± 0.4
Female							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
GOT (IU/l)	63 ± 10	59 ± 8	64 ± 4	57 ± 8	64 ± 5	69 ± 7	66 ± 11
GPT (IU/l)	36 ± 7	33 ± 3	35 ± 3	37 ± 9	34 ± 5	35 ± 8	31 ± 4
LDH (IU/l)	24 ± 17	20 ± 6	22 ± 7	26 ± 6	23 ± 6	24 ± 5	27 ± 10
AIP (IU/l)	192 ± 34	185 ± 26	198 ± 71	186 ± 25	142 ± 36	147 ± 32	131 ± 30
γ-GTP (IU/l)	1.7 ± 0.7	1.9 ± 0.7	1.5 ± 0.4	1.4 ± 0.8	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.6	1.3 ± 0.6
ChE (IU/l)	2610 ± 663	2268 ± 695	1857 ± 508	1832 ± 592	2410 ± 703	2665 ± 927	2275 ± 473
TP (g/dl)	6.4 ± 0.5	6.2 ± 0.3	6.1 ± 0.3	6.5 ± 0.4	6.7 ± 0.2	7.1 ± 0.4	6.9 ± 0.3
Albumin (g/dl)	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.7 ± 0.3	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.2
A/G (%)	1.36 ± 0.10	1.48 ± 0.10	1.35 ± 0.10	1.30 ± 0.08	1.18 ± 0.09	1.12 ± 0.10	1.12 ± 0.08
T. cho (mg/dl)	70 ± 14	68 ± 8	84 ± 16	101 ± 15**	62 ± 12	88 ± 18*	63 ± 15
TG (mg/dl)	32 ± 4	37 ± 9	36 ± 5	54 ± 28	39 ± 10	42 ± 7	36 ± 14
PL (mg/dl)	133 ± 24	134 ± 15	161 ± 30	192 ± 39**	138 ± 23	178 ± 20*	136 ± 30
T. bilirubin (mg/dl)	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.48 ± 0.38	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02
Glucose (mg/dl)	107 ± 12	104 ± 9	107 ± 9	83 ± 16**	108 ± 14	120 ± 18	105 ± 8
BUN (mg/dl)	14 ± 2	15 ± 1	13 ± 1	17 ± 3*	15 ± 2	14 ± 2	15 ± 2
Creatinine (mg/dl)	0.60 ± 0.06	0.60 ± 0.06	0.58 ± 0.04	0.63 ± 0.05	0.59 ± 0.04	0.61 ± 0.08	0.60 ± 0.05
Na (mEq/l)	141 ± 1	141 ± 1	140 ± 1	140 ± 2	142 ± 1	142 ± 0	142 ± 1
K (mEq/l)	4.8 ± 0.4	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.2	5.2 ± 0.6	5.1 ± 0.3	5.1 ± 0.3	5.2 ± 0.3
Cl (mEq/l)	112 ± 2	111 ± 1	112 ± 2	114 ± 2	114 ± 1	114 ± 1	114 ± 1
Ca (mg/dl)	9.0 ± 0.1	9.1 ± 0.2	8.9 ± 0.2	9.2 ± 0.4	9.2 ± 0.3	9.2 ± 0.2	9.1 ± 0.2
P (mg/dl)	8.2 ± 0.7	8.6 ± 0.6	9.2 ± 0.5*	9.2 ± 0.8*	8.2 ± 0.3	7.9 ± 0.7	8.3 ± 1.0

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; \*:P&lt;0.05 \*\*:P&lt;0.01

リンの有意な増加がみられたほか、250 mg/kg群で総コレステロール、リン脂質および尿素窒素の有意な増加と血糖値の有意な低下がみられた。

## 2) 回復終了時

雄では、血糖の有意な低下が250 mg/kg群でみられた。雌では、総コレステロールとリン脂質の有意な増加が60 mg/kg群でみられたが、用量に関連した変化ではなかった。

## 6. 尿検査 (Table 3)

### 1) 投与第4週

雄では、250 mg/kg群に尿pHの低下傾向と尿沈渣中のリン酸塩の増加傾向がみられた。雌では、60 mg/kg以上の投与群で尿pHの低下傾向、尿蛋白、ケトン体および尿沈渣中のリン酸塩の増加傾向がみられた。

### 2) 回復第2週

雄では、250 mg/kg群に尿蛋白の増加傾向がみられた。雌では、250 mg/kg群で尿pHの低下傾向がみられた。

## 7. 器官重量 (Table 4)

### 1) 投与終了時剖検例

肝臓で、相対重量の有意な増加が250 mg/kg群の雌雄にみられた。

### 2) 回復終了時剖検例

心臓で、相対重量の有意な増加が雄の各投与群にみられた。

他に、脳の絶対重量の有意な増加が雌の60 mg/kg群にみられたが、用量と関連した変化ではなかった。

## 8. 剖検所見 (Table 5)

### 1) 投与終了時剖検例

盲腸の拡張が250 mg/kg群の雄5例と雌4例に、小腸壁の肥厚が250 mg/kg群の雌雄各4例にみられた。他には被験物質投与によると考えられる変化はみられなかった。

### 2) 回復終了時剖検例

被験物質投与によると考えられる変化はみられなかった。

## 9. 病理組織学検査 (Table 6)

### 1) 投与終了時剖検例

被験物質投与によると考えられる変化が小腸、大腸、肝臓および腸間膜リンパ節にみられた。

回腸：腸絨毛のごく軽度な過形成が250 mg/kg群の雄1例と雌3例にみられた。本所見は、腸絨毛の丈の高さの増大として観察され、組織構築の変化あるいは炎症反応は認められなかった。

盲腸：吸収上皮細胞のごく軽度から軽度な空胞化が60 mg/kg群の雄3例と雌1例、250 mg/kg群の雌雄各5

例にみられた。また、粘膜におけるごく軽度から軽度な細胞浸潤が60 mg/kg群の雄5例と雌1例、250 mg/kg群の雌雄各3例にみられたが、吸収上皮細胞の空胞化を示す個体と細胞浸潤を示す個体とは必ずしも一致していなかった。

結腸：吸収上皮細胞のごく軽度な空胞化が60 mg/kg群の雌雄各1例、250 mg/kg群の雄1例と雌2例にみられた。また、粘膜におけるごく軽度な細胞浸潤が雌の60および250 mg/kg群でそれぞれ1および2例にみられた。

直腸：粘膜におけるごく軽度な細胞浸潤が250 mg/kg群の雌雄各1例にみられた。

肝臓：小葉中心帯肝細胞のごく軽度な肥大が250 mg/kg群の雌雄各5例にみられた。

腸間膜リンパ節：傍皮質領域において、核崩壊物を容れたマクロファージ“tingible body macrophage”の出現が、対照群で雄1例(ごく軽度)、15 mg/kg群で雌雄各1例(いずれもごく軽度)、60 mg/kg群で雄1例と雌2例(いずれもごく軽度)にみられたのに対し、250 mg/kg群では雄で2例(1例がごく軽度、残る1例が軽度)と雌で5例(4例がごく軽度、残る1例が軽度)にみられ、250 mg/kg群の雌で例数がやや多かった。

上記以外の所見は出現状況とその病理学的性状からいずれも偶発所見と判断した。

### 2) 回復終了時剖検例

回腸：腸絨毛のごく軽度から軽度な過形成が、250 mg/kg群の雌雄各2例にみられた。

盲腸：吸収上皮細胞の変化は認められなかった。なお、粘膜におけるごく軽度から軽度な細胞浸潤が対照群で雌雄各2例、60 mg/kg群で雄2例と雌1例、250 mg/kg群で雄3例と雌4例にみられた。

直腸：粘膜におけるごく軽度な細胞浸潤が60 mg/kg群の雌1例、250 mg/kg群の雄1例にみられた。

肝臓：肝細胞の肥大は認められなかった。なお、ごく軽度な微小肉芽腫が対照群の雌雄各1例、250 mg/kg群の雄1例にみられた。

十二指腸、空腸、結腸および腸間膜リンパ節には異常所見は認められなかった。

## 考察

試験期間を通じて死亡はみられず、また、一般状態および体重にも被験物質投与による変化は認められなかった。

摂餌量では、250 mg/kg群の雌雄で投与開始4日に減少を示したが、雄ではその後対照群をやや上回った。60 mg/kg群でも雄の摂餌量は対照群をやや上回った。これらの投与群の体重は、対照群とほぼ同様であったことから、食餌効率は低下しているものと考えられ、後述の腸管に対する障害がその要因と推察される。

尿検査では、60 mg/kg以上の投与群で尿pHの低下、尿蛋白およびケトン体の増加が主として雌にみられた。同時に、血液生化学検査において、雌で尿素窒素や無機

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with 4,4'-thiobis (6-tert-butyl-m-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	15	60	250	0	60	250
Male							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
Volume (ml)	9.9 ± 3.6	9.3 ± 5.3	12.9 ± 5.4	13.5 ± 5.0	10.4 ± 3.3	9.2 ± 6.5	8.9 ± 6.0
Specific gravity	1.072 ± 0.012	1.073 ± 0.018	1.063 ± 0.015	1.058 ± 0.011	1.079 ± 0.019	1.074 ± 0.017	1.078 ± 0.019
Water intake (ml)	40 ± 8	41 ± 6	45 ± 4	51 ± 12	44 ± 5	41 ± 8	42 ± 4
pH	7.5	0	0	1	0	0	0
	8	0	0	2	0	0	0
	8.5	1	4	2	1	0	1
	9	5	2	4	2	6	5
Protein	-	1	1	0	1	0	0
	-/+	4	3	3	1	3	2
	1+	1	1	2	3	3	1
	2+	0	1	1	1	0	3
Ketons	-	6	5	5	6	6	4
	-/+	0	1	1	0	0	1
	1+	0	0	0	0	0	1
Glucose	-	6	6	6	6	6	6
Occult blood	-	4	5	5	5	3	6
	-/+	1	1	0	0	1	0
	1+	1	0	0	0	1	0
	2+	0	0	1	0	1	0
Bilirubin	-	6	6	6	6	6	6
	-/+	6	6	6	6	6	4
Urobilinogen	1+	0	0	0	0	0	2
	2+	0	0	0	1	0	0
Color	Yellow	6	6	6	5	6	6
	Dark yellow	0	0	0	1	0	0
RBC	-	6	6	6	5	6	6
	-/+	0	0	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	1	0	0
WBC	-	6	6	6	6	6	6
SEC	-	0	0	0	0	0	0
	-/+	6	6	6	6	6	6
	3+	0	0	0	0	0	0
SREC	-	6	6	6	6	6	6
Cast	-	6	6	6	6	6	6
PS	-	6	4	5	3	3	4
	-/+	0	2	1	2	3	2
	1+	0	0	0	1	0	0
Co	-	6	6	6	6	6	6

Values of volume, specific gravity and water intake are expressed as Mean ± S.D., other values are expressed as No. of animals

Table 3 (Continued)

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)			
	0	15	60	250	0	60	250	
Female								
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6	
Volume (ml)	8.4±3.0	10.2 ± 7.1	4.8 ± 2.4	5.6 ± 3.7	6.1 ± 3.2	7.2 ± 3.6	6.6 ± 4.1	
Specific gravity	1.070 ± 0.018	1.060 ± 0.016	1.079 ± 0.018	1.066 ± 0.026	1.068 ± 0.013	1.066 ± 0.018	1.072 ± 0.023	
Water intake (ml)	35 ± 7	41 ± 8	39 ± 25	41 ± 12	30 ± 7	31 ± 8	42 ± 12	
pH	5.5	0	0	0	1	0	0	0
	6	0	1	0	1	0	0	0
	6.5	0	0	3	1	0	0	1
	7	0	1	1	0	0	0	1
	7.5	1	0	0	2	1	0	1
	8	2	2	1	0	0	1	1
	8.5	2	2	0	1	3	2	2
	9	1	0	1	0	2	3	0
	Protein	-	5	4	2	1	3	0
-/+		1	1	0	0	1	4	3
1+		0	1	2	4	1	0	2
2+		0	0	2	1	1	2	0
Ketons	-	6	5	3	2	5	6	5
	-/+	0	1	2	3	1	0	1
	1+	0	0	1	1	0	0	0
Glucose	-	6	6	6	6	6	6	6
Occult blood	-	5	5	6	4	6	6	6
	-/+	0	0	0	1	0	0	0
	1+	1	1	0	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	0	0	0
	3+	0	0	0	1	0	0	0
Bilirubin	-	6	6	6	6	6	6	6
Urobilinogen	-/+	6	6	6	6	5	6	6
	1+	0	0	0	0	1	0	0
Color	Yellow	6	6	6	4	6	6	6
	Dark yellow	0	0	0	2	0	0	0
RBC	-	6	6	6	6	6	6	6
WBC	-	6	6	6	6	6	6	6
SEC	-	0	0	0	0	0	0	0
	-/+	6	6	6	6	6	6	6
SREC	-	6	6	5	6	6	6	6
	-/+	0	0	1	0	0	0	0
Cast	-	6	6	6	6	6	6	6
PS	-	6	5	4	3	1	3	1
	-/+	0	1	2	3	5	3	4
	1+	0	0	0	0	0	0	1
Co	-	6	6	6	6	6	6	6

Values of volume, specific gravity and water intake are expressed as Mean±S.D., other values are expressed as No. of animals



Table 4 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	15	60	250	0	60	250
<b>Male</b>							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
Body weight (g)	375 ± 19	401 ± 26	415 ± 42	378 ± 18	475 ± 35	447 ± 40	455 ± 17
<b>Absolute organ weight</b>							
Brain (g)	2.01 ± 0.07	2.04 ± 0.05	2.03 ± 0.05	2.00 ± 0.03	2.10 ± 0.04	2.11 ± 0.12	2.12 ± 0.05
Thymus (mg)	535 ± 74	647 ± 105	553 ± 77	464 ± 76	468 ± 78	475 ± 136	489 ± 52
Heart (g)	1.27 ± 0.10	1.32 ± 0.11	1.32 ± 0.09	1.31 ± 0.20	1.43 ± 0.09	1.41 ± 0.11	1.44 ± 0.07
Lung (g)	1.29 ± 0.03	1.33 ± 0.12	1.39 ± 0.11	1.35 ± 0.07	1.47 ± 0.09	1.46 ± 0.11	1.50 ± 0.09
Liver (g)	11.65 ± 1.08	12.63 ± 1.30	13.07 ± 1.94	13.78 ± 1.64	14.63 ± 1.59	13.43 ± 1.26	14.67 ± 0.85
Spleen (g)	0.69 ± 0.07	0.72 ± 0.12	0.70 ± 0.11	0.73 ± 0.04	0.80 ± 0.13	0.73 ± 0.15	0.74 ± 0.12
Kidneys (g)	2.87 ± 0.22	2.96 ± 0.25	3.02 ± 0.27	2.98 ± 0.27	3.24 ± 0.20	3.09 ± 0.26	3.25 ± 0.18
Adrenals (mg)	60 ± 8	67 ± 11	63 ± 6	61 ± 9	64 ± 7	66 ± 5	65 ± 10
Testes (g)	3.15 ± 0.19	3.35 ± 0.18	3.27 ± 0.29	3.29 ± 0.28	3.36 ± 0.24	3.47 ± 0.61	3.22 ± 0.11
<b>Relative organ weight</b>							
Brain (%)	0.54 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.49 ± 0.05	0.53 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.47 ± 0.05	0.47 ± 0.02
Thymus (%)	143 ± 19	162 ± 26	134 ± 19	123 ± 20	99 ± 19	107 ± 29	108 ± 11
Heart (%)	0.34 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.35 ± 0.05	0.30 ± 0.01	0.32 ± 0.01*	0.32 ± 0.01*
Lung (%)	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.01
Liver (%)	3.10 ± 0.14	3.15 ± 0.13	3.14 ± 0.22	3.64 ± 0.33**	3.07 ± 0.16	3.02 ± 0.31	3.23 ± 0.15
Spleen (%)	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02
Kidneys (%)	0.77 ± 0.03	0.74 ± 0.05	0.73 ± 0.03	0.79 ± 0.07	0.69 ± 0.04	0.69 ± 0.06	0.72 ± 0.04
Adrenals (%)	16 ± 2	17 ± 3	15 ± 2	16 ± 2	14 ± 2	15 ± 2	14 ± 3
Testes (%)	0.84 ± 0.05	0.84 ± 0.06	0.80 ± 0.13	0.87 ± 0.09	0.71 ± 0.08	0.78 ± 0.14	0.71 ± 0.05
<b>Female</b>							
No. of animals	6	6	6	6	6	6	6
Body weight (g)	228 ± 12	243 ± 15	227 ± 8	220 ± 12	249 ± 29	264 ± 29	238 ± 17
<b>Absolute organ weight</b>							
Brain (g)	1.84 ± 0.06	1.86 ± 0.05	1.84 ± 0.07	1.86 ± 0.06	1.86 ± 0.04	1.99 ± 0.15*	1.88 ± 0.08
Thymus (mg)	420 ± 108	447 ± 68	434 ± 87	460 ± 97	341 ± 50	384 ± 57	339 ± 85
Heart (g)	0.85 ± 0.08	0.84 ± 0.05	0.83 ± 0.04	0.78 ± 0.04	0.86 ± 0.09	0.94 ± 0.11	0.84 ± 0.04
Lung (g)	1.09 ± 0.05	1.07 ± 0.10	1.06 ± 0.08	1.04 ± 0.07	1.08 ± 0.08	1.11 ± 0.09	1.05 ± 0.10
Liver (g)	6.75 ± 0.76	6.86 ± 0.34	6.87 ± 0.58	7.65 ± 0.86	6.84 ± 0.93	7.49 ± 1.08	7.00 ± 0.65
Spleen (g)	0.51 ± 0.06	0.49 ± 0.03	0.47 ± 0.04	0.50 ± 0.05	0.51 ± 0.07	0.52 ± 0.08	0.50 ± 0.04
Kidneys (g)	1.72 ± 0.21	1.86 ± 0.11	1.84 ± 0.13	1.74 ± 0.14	1.81 ± 0.14	1.87 ± 0.22	1.74 ± 0.16
Adrenals (mg)	72 ± 8	75 ± 8	76 ± 10	74 ± 5	70 ± 6	76 ± 5	78 ± 10
Ovaries (mg)	81.3 ± 9.8	96.6 ± 14.9	98.0 ± 15.5	97.4 ± 10.2	88.3 ± 13.0	92.4 ± 9.9	96.0 ± 12.5
<b>Relative organ weight</b>							
Brain (%)	0.81 ± 0.04	0.77 ± 0.04	0.81 ± 0.04	0.85 ± 0.04	0.75 ± 0.08	0.76 ± 0.09	0.80 ± 0.07
Thymus (%)	184 ± 42	185 ± 33	192 ± 41	210 ± 49	138 ± 18	147 ± 22	142 ± 34
Heart (%)	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.01
Lung (%)	0.48 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.47 ± 0.04	0.47 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.44 ± 0.02
Liver (%)	2.96 ± 0.26	2.83 ± 0.12	3.02 ± 0.19	3.46 ± 0.20**	2.75 ± 0.13	2.83 ± 0.13	2.94 ± 0.12
Spleen (%)	0.23 ± 0.04	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.23 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.01
Kidneys (%)	0.76 ± 0.07	0.77 ± 0.05	0.81 ± 0.04	0.79 ± 0.05	0.73 ± 0.05	0.71 ± 0.01	0.74 ± 0.06
Adrenals (%)	32 ± 3	31 ± 4	33 ± 5	34 ± 3	28 ± 3	29 ± 3	33 ± 5
Ovaries (%)	35.7 ± 4.3	40.0 ± 6.2	43.3 ± 7.6	44.3 ± 4.7	36.0 ± 6.8	35.1 ± 1.4	40.4 ± 4.6

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; \*:P &lt; 0.05 \*\*:P &lt; 0.01

Table 5 Summary of gross findings of rats treated orally with 4,4'-thiobis(6-*tert*-butyl-*m*-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)				
	Organ	Findings	0	15	60	250	0	60	250
Male									
	No. of animals necropsied		6	6	6	6	6	6	6
Small intestine									
	Thickening of wall		0	0	0	4	0	0	0
Large intestine									
	Dilatation of cecum		0	0	0	5	0	0	0
Testes									
	Enlargement (unilateral)		0	0	0	0	0	1	0
Epididymis									
	Yellow nodule (unilateral)		0	0	0	0	0	0	1
Female									
	No. of animals necropsied		6	6	6	6	6	6	6
Thyroid									
	Enlargement (bilateral)		0	1	0	0	0	0	0
Small intestine									
	Thickening of wall		0	0	0	4	0	0	0
Large intestine									
	Dilatation of cecum		0	0	0	4	0	0	0

リンの増加がみられたことから、尿蛋白の増加は本被験物質の腎臓に対する影響と考えられるが、腎臓では組織学的変化は認められなかった。また、250 mg/kg群の雌の血糖値は低下していたことから、尿中ケトン体の増加は、血糖値の低下に伴い、エネルギー源としての脂質要求が増大したためと推察される。

血液学検査では、血小板数の増加、リンパ球比率の減少と分葉核好中球比率の増加が250 mg/kg群の主として雌にみられた。250 mg/kg群の雌におけるリンパ球および分葉核好中球の実数を、白血球数とその分画比率から求めると、リンパ球数は対照群平均値の約20%増、分葉核好中球数は対照群平均値の約160%増であったことから、本試験における白血球分画比率の変化は、分葉核好中球の実質的な増加に起因し、大腸粘膜での細胞浸潤との関連性が示唆される。

血液生化学検査では、既に述べた血糖、尿素窒素および無機リンの変動のほか、総コレステロールとリン脂質の増加が250 mg/kg群にみられ、脂質代謝への影響も示唆された。

病理学検査では、小腸、大腸、腸間膜リンパ節および肝臓に変化がみられた。小腸では、肉眼的な壁の肥厚が250 mg/kg群にみられ、組織学的には、回腸で腸絨毛の過形成がみられた。既に述べた如く、60 mg/kg以上の投与群では食餌効率の低下が示唆されたが、小腸における形態学的変化は、消化・吸収能の低下に対する適応的な生体反応と考えられる。また、大腸では、肉眼的な盲腸の拡張が250 mg/kg群にみられ、組織学的には盲腸および結腸で吸収上皮細胞の空胞化および粘膜の細胞浸潤

が60 mg/kg以上の投与群にみられ、大腸に対する障害性が示唆された。ただし、吸収上皮細胞の変化を示す個体と細胞浸潤を示す個体とは必ずしも一致せず、両者の関連性は明らかでなかった。腸間膜リンパ節では、傍皮質領域における“tingible body macrophage”が250 mg/kg群にやや多くみられた。この変化は、頸部リンパ節や胸腺、脾臓など他のリンパ器官では認められなかったことから、腸管障害と関連した所見であり、リンパ系器官に対する直接的な作用ではないと考えられる。なお、投与終了時剖検例のうち、250 mg/kg群の雌雄各1例に、直腸粘膜の細胞浸潤がみられたが発現例数が少なく、また、この種の動物では背景的に観察されることから、被験物質投与との関連性はないと判断された。

肝臓では、250 mg/kg群で重量が増加し、組織学的には小葉中心帯肝細胞の肥大が認められた。血液生化学検査では、GOTやGPTの上昇など肝機能障害を示す所見はみられなかったことから、肝臓の組織所見は、薬物代謝酵素の誘導を示唆するもの<sup>2)</sup>と推察される。

回復群においては、被験物質投与に関連すると考えられる変化のうち、250 mg/kg群の尿pHの低下、尿蛋白の増加、血小板数の増加および回腸における腸絨毛の過形成を除く所見は認められず、概ね可逆性の変化と考えられた。

以上の如く、4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール)をラットに28日間反復投与した結果、主な変化が60 mg/kg以上の投与群の大腸に、さらに250 mg/kg群では小腸および肝臓にみられ、本被験物質の主な標的器官は

Table 6 Summary of histopathological findings of rats treated orally with 4,4'-thiobis (6-tert-butyl-m-cresol) in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)											
	0			15			60			250						
	1	2	3	P	1	2	3	P	1	2	3	P	1	2	3	P
Male																
No. of animals necropsied	6			6			6			6			6			
Ileum	(6)			(6)			(6)			(6)			(6)			
hyperplasia/villus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Cecum	(6)			(6)			(6)			(6)			(6)			
vacuolization/cytoplasmic/ absorptive epithelial cell	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	4	1	0	0
cellular infiltration/mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	2	1	0	0
Colon	(6)			(6)			(6)			(6)			(0)			
vacuolization/cytoplasmic/ absorptive epithelial cell	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Rectum	(6)			(6)			(6)			(6)			(6)			
cellular infiltration/mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Liver	(6)			(6)			(6)			(6)			(0)			
hypertrophy/hepatocyte/ centrilobular	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
altered hepatocellular foci	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
microgranuloma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Mesenteric lymph node	(6)			(6)			(6)			(6)			(0)			
tingible body macrophage/ paracortical/increased	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
Kidney	(6)			(0)			(0)			(6)			(0)			
basophilic change/proximal tubule/ focal	0	0	0	0	-----	-----	-----	-----	1	0	0	0	-----	-----	-----	-----
Prostate	(6)			(0)			(0)			(6)			(0)			
inflammation	1	0	0	0	-----	-----	-----	-----	0	0	0	0	-----	-----	-----	-----
Female																
No. of animals necropsied	6			6			6			6			6			
Ileum	(6)			(6)			(6)			(6)			(6)			
hyperplasia/villus	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
Cecum	(6)			(6)			(6)			(6)			(6)			
vacuolization/cytoplasmic/ absorptive epithelial cell	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	2	0	0
cellular infiltration/mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0
Colon	(6)			(6)			(6)			(6)			(0)			
vacuolization/cytoplasmic/ absorptive epithelial cell	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0
cellular infiltration/mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0
Rectum	(6)			(6)			(6)			(6)			(6)			
cellular infiltration/mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Liver	(6)			(6)			(6)			(6)			(0)			
hypertrophy/hepatocyte/ centrilobular	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
microgranuloma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Thyroid (Parathyroid)	(6)			(1)			(0)			(6)			(0)			
hyperplasia/follicle cell/diffuse	0	0	0	0	0	1	0	0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Mesenteric lymph node	(6)			(6)			(6)			(6)			(0)			
tingible body macrophage/ paracortical/increased	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	4	1	0	0

1:Slight 2:Mild 3:Moderate P:Present (grading of severity was not done, such as case in the neoplastic lesion)

Numbers in parenthesis indicate No. of animals examined microscopically at this site.

腸管と肝臓と考えられた。一方、15 mg/kg群では変化は認められなかった。これらの結果から、本試験条件下における4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール)の無影響量は雌雄とも15 mg/kg/dayと考えられた。

#### 文献

- 1) S. C. Gad and C. S. Weil, "Principles and Methods of Toxicology," 2, ed. by A. Wallace Hayes, Raven Press, Ltd., New York, 1989, pp. 435-483.
- 2) J. R. Glaister. "毒性病理学の基礎," 高橋道人監訳, ソフトサイエンス社, 東京, 1992, pp.85-98.

#### 連絡先

試験責任者：岡崎修三  
試験担当者：榎並倫宣, 中村英明, 畠山和久,  
田村一利, 沼田弘明, 勝亦俱慶  
(株)ボゾリサーチセンター 御殿場研究所  
〒412 静岡県御殿場市かまど1284  
Tel. 0550-82-2000 Fax. 0550-82-2379

#### Correspondence

Authors: Shuzo Okazaki (Study director)  
Tomonori Enami, Hideaki Nakamura,  
Kazuhisa Hatayama, Kazutoshi Tamura,  
Hiroaki Numata, Tomoyoshi Katsumata  
Gotemba Laboratory, Bozo Research Center Inc.  
1284, Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka, 412, Japan  
Tel.+81-550-82-2000 Fax.+81-550-82-2379

## 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の細菌を用いる復帰突然変異試験

### Reverse Mutation Test of 4,4-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) on Bacteria

#### 要約

既存化学物質安全性調査事業の一環として、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)について、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加の条件でプレート法により、用量設定試験を50~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で行ったところ、S9 mix無添加試験および添加試験のいずれにおいても*Salmonella*の4検定菌において強い抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA*では抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験ではS9 mix無添加試験をTA100, TA1535およびTA1537は0.781~50  $\mu\text{g}$ /プレート、TA98は3.13~200  $\mu\text{g}$ /プレート、WP2 *uvrA*は313~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲で、S9 mix添加試験を*S. typhimurium*の4菌株は12.5~800  $\mu\text{g}$ /プレート、WP2 *uvrA*は313~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲で用量を設定して実施した

その結果、S9 mix無添加試験では、TA100およびTA1537は、12.5  $\mu\text{g}$ /プレート、TA1535は25  $\mu\text{g}$ /プレート、TA98は100  $\mu\text{g}$ /プレートで抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA*では認められなかった。またS9 mix添加試験ではTA100, TA1535, およびTA1537は400  $\mu\text{g}$ /プレート、TA98は800  $\mu\text{g}$ /プレートで抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA*では認められなかった。復帰変異コロニー数は、2回の本試験とも、用いた検定菌について、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)は、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

#### 方法

##### 〔検定菌〕

*Salmonella typhimurium* TA100  
*Salmonella typhimurium* TA1535  
*Escherichia coli* WP2 *uvrA*  
*Salmonella typhimurium* TA98  
*Salmonella typhimurium* TA1537

*S. typhimurium*の4菌株<sup>1)</sup>は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames博士から分

与を受けた。

*E. coli* WP2 *uvrA* 株<sup>2)</sup>は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

##### 〔被験物質〕

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)(CAS No. 96-69-5)は、分子量358.54の白色結晶性粉末である。試験には、住友化学工業(株)製〔ロット番号:40701、純度98%以上(不純物:不明)〕のものを、(株)日本化学工業協会から供与され、使用時まで室温保管し、用いた。

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)は、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解性がよいことから、DMSOに50 mg/mlになるように溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)のDMSO溶液中での安定性試験および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、本試験Ⅱで調製した低濃度(7.81  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )溶液および高濃度(50.0 mg/ml)溶液について、室温遮光条件下で、安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均値に対して、100および98.6%であった。

また、含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、高濃度は94.7%、低濃度は98.3%であった。

##### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

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

AF2, 2AAはDMSO(和光純薬工業(株))に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

##### 〔培地およびS9 mixの組成〕

###### 1) トップアガー

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toaアガー (Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ビオチン	0.5 mM

\*: WP2 *uvrA* 用には, 0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

## 2) 合成培地

培地は, 日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。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
グルコース	20 g
バクtoaアガー (Difco)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mlを流して固めてある。

## 3) S9 mix

1 ml中下記の成分を含む

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol
NADH	4 $\mu$ mol
NADPH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ 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したS9を用いた。

## 〔試験方法〕

プレート法により, 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およびトッアガー2 mlを混合したのち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DMSO, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。培養は37℃で48時間行い, 生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については, 肉眼的あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌膜の状態から判断した。

用いた平板は用量設定試験においては, 溶媒および陽性対照群では3枚ずつ, 各用量については1枚ずつとした。また, 本試験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, 本試験は同一用量について2回実施し, 結果の再現性の確認を行った

## 〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち, 1種以上の検定菌のS9 mix無添加あるいはS9 mix 添加条件において, 被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が, 溶媒対照のそれに比べて2倍以上に増加し, かつ, その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に, 当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。

## 結果および考察

### 〔用量設定試験〕

4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール)について50~5000  $\mu$ g/プレートの範囲で公比を約3として, 試験を実施したところ, S9 mix 無添加試験では, TA100, TA1535およびTA1537はすべての用量で, TA98は150  $\mu$ g/プレート以上の用量で抗菌性が認められたが, WP2 *uvrA*では抗菌性は認められなかった。また, S9 mix 添加試験では*S. typhimurium*の4菌株はすべて500  $\mu$ g/プレート以上の用量で抗菌性が認められたが, WP2 *uvrA*では抗菌性は認められなかった。

### 〔本試験〕

結果をそれぞれTable 1, 2に示した。4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール)の用量を, S9 mix 無添加試験ではTA100, TA1535およびTA1537は0.781~50  $\mu$ g/プレート, TA98は3.13~200  $\mu$ g/プレート, WP2 *uvrA*は313~5000  $\mu$ g/プレートの範囲で, S9 mix 添加試験では*S. typhimurium*の4菌株は12.5~800  $\mu$ g/プレート, WP2 *uvrA*は313~5000  $\mu$ g/プレートの範囲で公比を2として試験を実施した。その結果, 2回の試験のいずれも, 用いた5種類の検定菌のS9 mix 無添加試験および添加試験において, 溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき, 4,4'-チオビス(6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール)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。

Table 1-1. Mutagenicity of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)\*\* in reverse mutation test (I) on bacteria

With(+) or without(-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535		TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	109 134 119 (121 $\pm$ 12.6)	20 22 11 ( 18 $\pm$ 5.9)		21 21 30 ( 24 $\pm$ 5.2)	11 6 13 ( 10 $\pm$ 3.6)	
	0.781	104 107 119 (110 $\pm$ 7.9)	16 12 17 ( 15 $\pm$ 2.6)		ND	7 12 12 ( 10 $\pm$ 2.9)	
	1.56	99 115 109 (108 $\pm$ 8.1)	16 11 14 ( 14 $\pm$ 2.5)		ND	8 8 5 ( 7 $\pm$ 1.7)	
	3.13	88 111 99 ( 99 $\pm$ 11.5)	14 10 9 ( 11 $\pm$ 2.6)		22 25 23 ( 23 $\pm$ 1.5)	7 15 12 ( 11 $\pm$ 4.0)	
	6.25	95 85 101 ( 94 $\pm$ 8.1)	9 12 14 ( 12 $\pm$ 2.5)		18 14 25 ( 19 $\pm$ 5.6)	10 7 6 ( 8 $\pm$ 2.1)	
	12.5	95 97 94 ( 95 $\pm$ 1.5)	9 9 8 ( 9 $\pm$ 0.6)		22 22 19 ( 21 $\pm$ 1.7)	5* 5* 5* ( 5 $\pm$ 0.0)	
	25	88* 84* 89* ( 87 $\pm$ 2.6)	11* 5* 13* ( 10 $\pm$ 4.2)		11 25 19 ( 18 $\pm$ 7.0)	7* 8* 2* ( 6 $\pm$ 3.2)	
	50 #	69* 66* 53* ( 63 $\pm$ 8.5)	7* 14* 5* ( 9 $\pm$ 4.7)		13 11 14 ( 13 $\pm$ 1.5)	3* 1* 5* ( 3 $\pm$ 2.0)	
	100 #				5* 5* 9* ( 6 $\pm$ 2.3)		
200 #				0* 2* 8* ( 3 $\pm$ 4.2)			
S9mix (+)	0	156 139 134 (143 $\pm$ 11.5)	13 14 24 ( 17 $\pm$ 6.1)		32 32 31 ( 32 $\pm$ 0.6)	12 15 12 ( 13 $\pm$ 1.7)	
	12.5	146 145 161 (151 $\pm$ 9.0)	19 12 18 ( 16 $\pm$ 3.8)		40 39 40 ( 40 $\pm$ 0.6)	9 15 13 ( 12 $\pm$ 3.1)	
	25	133 141 140 (138 $\pm$ 4.4)	18 17 19 ( 18 $\pm$ 1.0)		30 41 37 ( 36 $\pm$ 5.6)	14 13 6 ( 11 $\pm$ 4.4)	
	50	137 156 128 (140 $\pm$ 14.3)	12 8 22 ( 14 $\pm$ 7.2)		38 32 36 ( 35 $\pm$ 3.1)	17 6 14 ( 12 $\pm$ 5.7)	
	100	134 125 120 (126 $\pm$ 7.1)	11 16 15 ( 14 $\pm$ 2.6)		42 32 33 ( 36 $\pm$ 5.5)	23 14 19 ( 19 $\pm$ 4.5)	
	200	98 99 94 (97 $\pm$ 2.6)	9 20 9 ( 13 $\pm$ 6.4)		25 17 17 ( 20 $\pm$ 4.6)	13 19 13 ( 15 $\pm$ 3.5)	
	400 #	60 83 74 ( 72 $\pm$ 11.6)	10* 10* 9* ( 10 $\pm$ 0.6)		2 5 2 ( 3 $\pm$ 1.7)	11 9 6 ( 9 $\pm$ 2.5)	
	800 #	46* 43* 36* ( 42 $\pm$ 5.1)	5* 9* 8* ( 7 $\pm$ 2.1)		2* 2* 3* ( 2 $\pm$ 0.6)	1* 1* 2* ( 1 $\pm$ 0.6)	
Positive control	Chemical	AF2	SA		AF2	9AA	
	Dose( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5		0.1	80	
S9 mix(-)	Number of colonies/plate	868 803 830 (834 $\pm$ 32.7)	170 165 175 (170 $\pm$ 5.0)		894 873 913 (893 $\pm$ 20.0)	1310 1187 1149 (1215 $\pm$ 84.2)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA		2AA	2AA	
	Dose( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2		0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	1352 1209 1238 (1266 $\pm$ 75.6)	270 316 300 (295 $\pm$ 23.4)		420 373 374 (389 $\pm$ 26.9)	243 212 142 (199 $\pm$ 51.7)	

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

\*:Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

\*\*:Purity was above 98% and impurity was unknown.

ND:Not done

Table 1-2. Mutagenicity of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)\*\* in reverse mutation test (I) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)					
		Base-pair substitution type					
				WP2 <i>uvrA</i>			
S9mix (-)	0			20 37 22 ( 26 $\pm$ 9.3)			
	313 #			14 13 12 ( 13 $\pm$ 1.0)			
	625 #			16 29 18 ( 21 $\pm$ 7.0)			
	1250 #			16 22 29 ( 22 $\pm$ 6.5)			
	2500 #			25 24 19 ( 23 $\pm$ 3.2)			
	5000 #			22 22 23 ( 22 $\pm$ 0.6)			
S9mix (+)	0			29 22 24 ( 25 $\pm$ 3.6)			
	313 #			29 21 18 ( 23 $\pm$ 5.7)			
	625 #			20 16 16 ( 17 $\pm$ 2.3)			
	1250 #			24 15 18 ( 19 $\pm$ 4.6)			
	2500 #			12 11 11 ( 11 $\pm$ 0.6)			
	5000 #			11 11 9 ( 10 $\pm$ 1.2)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical			AF2			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			0.01			
	Number of colonies/plate			146 162 170 (159 $\pm$ 12.2)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical			2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			10			
	Number of colonies/plate			1214 1213 1269 (1232 $\pm$ 32.0)			

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

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

\*\* : Purity was above 98% and impurity was unknown.



Table 2-1. Mutagenicity of 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)\*\* in reverse mutation test (I) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535		TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	120 130 141 (130 $\pm$ 10.5)	11 12 18 ( 14 $\pm$ 3.8)		29 18 26 ( 24 $\pm$ 5.7)	7 12 5 ( 8 $\pm$ 3.6)	
	0.781	124 135 149 (136 $\pm$ 12.5)	12 10 14 ( 12 $\pm$ 2.0)		ND	8 12 7 ( 9 $\pm$ 2.6)	
	1.56	151 112 105 (123 $\pm$ 24.8)	20 14 12 ( 15 $\pm$ 4.2)		ND	6 9 11 ( 9 $\pm$ 2.5)	
	3.13	129 104 132 (122 $\pm$ 15.4)	8 17 19 ( 15 $\pm$ 5.9)		23 25 29 ( 26 $\pm$ 3.1)	12 7 5 ( 8 $\pm$ 3.6)	
	6.25	114 91 112 (106 $\pm$ 12.7)	15 10 13 ( 13 $\pm$ 2.5)		12 24 24 ( 20 $\pm$ 6.9)	5 5 6 ( 5 $\pm$ 0.6)	
	12.5	107* 106* 84* ( 99 $\pm$ 13.0)	15 15 6 ( 12 $\pm$ 5.2)		25 19 21 ( 22 $\pm$ 3.1)	10* 8* 12* ( 10 $\pm$ 2.0)	
	25	64* 84* 106* ( 85 $\pm$ 21.0)	6* 11* 14* ( 10 $\pm$ 4.0)		17 23 20 ( 20 $\pm$ 3.0)	5* 6* 6* ( 6 $\pm$ 0.6)	
	50 #	53* 63* 48* ( 55 $\pm$ 7.6)	9* 6* 9* ( 8 $\pm$ 1.7)		8 14 17 ( 13 $\pm$ 4.6)	0* 0* 2* ( 1 $\pm$ 1.2)	
	100 #				9* 5* 6* ( 7 $\pm$ 2.1)		
200 #				10* 4* 6* ( 7 $\pm$ 3.1)			
S9mix (+)	0	129 137 129 (132 $\pm$ 4.6)	15 16 20 ( 17 $\pm$ 2.6)		30 36 36 ( 34 $\pm$ 3.5)	14 13 14 ( 14 $\pm$ 0.6)	
	12.5	172 182 166 (173 $\pm$ 8.1)	20 20 30 ( 23 $\pm$ 5.8)		33 46 35 ( 38 $\pm$ 7.0)	8 13 9 ( 10 $\pm$ 2.6)	
	25	160 162 174 (165 $\pm$ 7.6)	33 26 23 ( 27 $\pm$ 5.1)		45 38 39 ( 41 $\pm$ 3.8)	12 22 8 ( 14 $\pm$ 7.2)	
	50	166 168 146 (160 $\pm$ 12.2)	24 15 20 ( 20 $\pm$ 4.5)		42 41 39 ( 41 $\pm$ 1.5)	11 10 9 ( 10 $\pm$ 1.0)	
	100	120 146 118 (128 $\pm$ 15.6)	17 26 12 ( 18 $\pm$ 7.1)		29 30 38 ( 32 $\pm$ 4.9)	14 15 18 ( 16 $\pm$ 2.1)	
	200 #	117 114 122 (118 $\pm$ 4.0)	11 16 11 ( 13 $\pm$ 2.9)		19 14 17 ( 17 $\pm$ 2.5)	8 12 4 ( 8 $\pm$ 4.0)	
	400 #	82* 95* 80* ( 86 $\pm$ 8.1)	15 9 10 ( 11 $\pm$ 3.2)		9 5 7 ( 7 $\pm$ 2.0)	2* 9* 14* ( 8 $\pm$ 6.0)	
	800 #	45* 47* 46* ( 46 $\pm$ 1.0)	9* 8* 5* ( 7 $\pm$ 2.1)		3* 3* 4* ( 3 $\pm$ 0.6)	0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0.0)	
Positive control	Chemical	AF2	SA		AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5		0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	794 787 840 (807 $\pm$ 28.8)	172 181 159 (171 $\pm$ 11.1)		932 901 970 (934 $\pm$ 34.6)	942 913 905 (920 $\pm$ 19.5)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA		2AA	2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2		0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	1418 1526 1543 (1496 $\pm$ 67.8)	299 297 298 (298 $\pm$ 1.0)		321 299 319 (313 $\pm$ 12.2)	256 270 235 (254 $\pm$ 17.6)	

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

\*:Inhibition was observed against growth of the bacteria. #:Precipitate was observed on the surface of agar plates.

\*\*:Purity was above 98% and impurity was unknown.

ND:Not done.

Table 2-2. Mutagenicity of 4,4'-thiobis (6-tert-butyl-m-cresol)\*\* in reverse mutation test (I) on bacteria

With(+)or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, Mean $\pm$ S.D.)					
		Base-pair substitution type					
				WP2 <i>uvrA</i>			
S9mix (-)	0			27 24 18 ( 23 $\pm$ 4.6)			
	313 #			16 25 17 ( 19 $\pm$ 4.9)			
	625 #			18 22 22 ( 21 $\pm$ 2.3)			
	1250 #			23 24 17 ( 21 $\pm$ 3.8)			
	2500 #			15 22 14 ( 17 $\pm$ 4.4)			
	5000 #			8 5 10 ( 8 $\pm$ 2.5)			
S9mix (+)	0			32 26 39 ( 32 $\pm$ 6.5)			
	313 #			27 33 19 ( 26 $\pm$ 7.0)			
	625 #			26 17 17 ( 20 $\pm$ 5.2)			
	1250 #			22 21 20 ( 21 $\pm$ 1.0)			
	2500 #			13 13 12 ( 13 $\pm$ 0.6)			
	5000 #			12 12 15 ( 13 $\pm$ 1.7)			
Positive control	Chemical			AF2			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			0.01			
S9 mix(-)	Number of colonies/plate			217 195 204 (205 $\pm$ 11.1)			
Positive control	Chemical			2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )			10			
S9 mix(+)	Number of colonies/plate			1569 1540 1512 (1540 $\pm$ 28.5)			

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

#:Precipitate was observed on the surface of agar plates.

\*\*Purity was above 98% and impurity was unknown.

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.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子,  
清水ゆり, 松本容彦, 中込まどか,  
中尾美津男, 飯田さやか  
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257 秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)  
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,  
Kumiko Kawakami, Yuri Shimizu,  
Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi,  
Mitsuo Nakao, Sayaka Iida  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

# 4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)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 4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)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)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.002 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。また、短時間処理の(6時間)S9 mix存在下および非存在下においてはそれぞれ50%を越える増殖抑制濃度、すなわち0.02 mg/mlおよび0.0009 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix 非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。48時間連続処理したいずれの濃度群でも、染色体の構造異常は認められなかった。また、高濃度群(0.002 mg/ml)細胞毒性では、十分な細胞数が分析できなかったが、その他の濃度群においては倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)は、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: Biocell)を10%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

2×10<sup>4</sup>個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたペイッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

#### 4. 被験物質

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)(略号: TBBC, CAS No.:96-69-5, ロット番号: 40701, 住友化学工業(株)製造, (株)日本化学工業協会提供)は、白色結晶性粉末で、水に対しては不溶、アセトンおよびメタノールには可溶であり、融点160~165℃、分子式C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>S、分子量358.54、純度98%(不純物は不明)の物質である。

被験物質原体の安定性に関する情報は得られなかったが、溶媒中(DMSO)では、7.81 μg/ml~50.0 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

#### 5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(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1%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

#### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリパス光学工業(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%の増殖抑制濃度を明らかに超える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%増殖抑制濃度をはさむ2濃度より算出したところ、0.002 mg/mlであった(Fig. 1)。一方、短時間処理のS9 mix存在下および非存在下では、それぞれ0.02 mg/ml(Fig. 2)および0.0009 mg/mlであった(Fig. 1)。

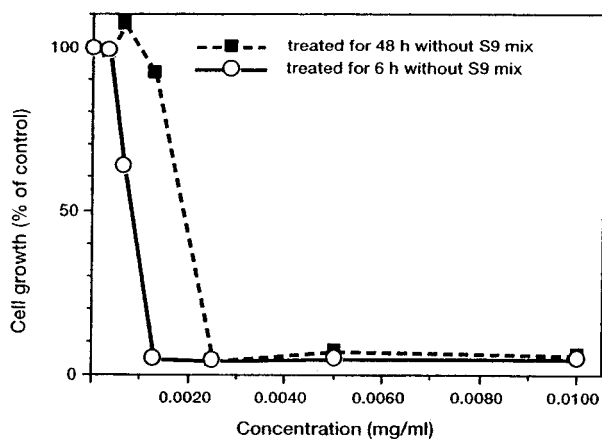


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) without S9 mix

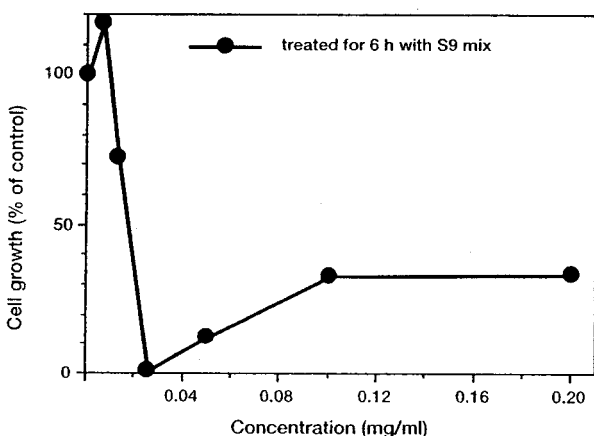


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) with S9 mix

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、連続処理では0.002 mg/ml、短時間処理S9 mix 存在下および非存在下では、それぞれ0.02 mg/mlおよび0.0009 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 μg/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%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会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。

10. 記録と判定

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

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、林<sup>2)</sup>の方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法<sup>3)</sup>(多重性を考慮してfamilywiseの有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定<sup>4)</sup>(p<0.05)を行った。原則として以上2回の検定でもに有意差が認められた場合を陽性とした。傾向性検定で有意差が認められない場合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

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。4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)を加えて24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は認められなかった。また、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は誘発されなかった。倍数性細胞の誘発作用に関して、高濃度群(0.002 mg/ml)では、細胞毒性のため倍数性細胞の誘発に関しては十分な細胞数が分析できなかったが、その他の処理群では倍数性細胞は誘発されなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)を加えてS9 mix 存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)は、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) (TBBC)\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	0	1	0	6	0	0	7	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
TBBC	0.00050	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13		
TBBC	0.0010	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38	NT	NT
TBBC	0.0020	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
MC	0.00005	24	200	0	16	58	0	0	0	74	1	62 (31.0)	62 (31.0)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	0	1	0	1	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50		
TBBC	0.00050	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13		
TBBC	0.0010	48	200	1	1	0	3	0	0	5	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.13	NT	NT
TBBC	0.0020	48	140	0	0	1	2	1	0	4	0	2 (1.4)	2 (1.4)	0.42 <sup>6)†</sup>		
MC	0.00005	48	200	3	31	67	3	6	20	130	5	70 (35.0)	68 (34.0)	0.13		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C, NT: not tested, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran - Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$  when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test. 6) Two hundred and thirty-eight cells were analysed. \*: Purity was more than 98%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) (TBBC)\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
TBBC	0.00023	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		
TBBC	0.00045	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25	NT	NT
TBBC	0.00090	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00		
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
TBBC	0.0050	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		
TBBC	0.010	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	NT	NT
TBBC	0.020	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	1	26	112	0	1	40	180	0	90 (45.0)	89 (44.5)	0.00		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, CPA: cyclophosphamide, NT: not tested. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran - Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$  when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test. \*: Purity was more than 98%.

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 林 真, 変異原性試験, 1, 255 (1992).
- 3) 吉村 功 編著, “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.
- 4) 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.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂  
試験担当者: 山影康次, 若栗 忍, 中川ゆづき,  
日下部博一, 橋本恵子, 長尾哲二,  
太田 亮  
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257 神奈川県秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)  
Kohji Yamakage, Shinobu Wakuri,  
Yuzuki Nakagawa, Hirokazu Kusakabe,  
Keiko Hashimoto, Tetsuji Nagao,  
Ryo Ohta  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627