

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドのラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Benzyltrimethylanmonium chloride in Rats

要約

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドは、有機合成反応の触媒として使用されている化合物である。本化合物の毒性については、ほとんど報告がないため、今回、既存化学物質の安全点検に関わる毒性調査事業の一環として、SD系ラットを用いる強制経口投与による28日間反復投与毒性試験を実施した。

ラットは1群雌雄各5匹で4試験群、対照群および高用量群には雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドは、超純水に溶解し、0, 30, 60および120 mg/kgを毎日1回、4週間連続経口投与し、一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、血液学検査、血液凝固能検査、血液生化学検査、尿検査、器官重量測定および病理学的検査を行った。なお、回復期間は2週間とし、投与終了時と同様な検査を実施した。

その結果は、次のとおりである。

雌の120 mg/kg群で1例が投与4週に死亡した。病理学検査の結果には死因に結びつく変化は認められなかった。

一般状態の観察では、雄の60 mg/kg群で流涎、雌雄の120 mg/kg群で流涎、流涙および被毛の汚れが、さらに雌の120 mg/kg群で立毛が認められた。雌雄の120 mg/kg群で観察された症状は回復試験では観察されず回復を示した。

体重は雄の120 mg/kg群で増加が抑制され、投与3週以降有意であった。摂餌量は、雄の120 mg/kg群で投与期間を通して減少が認められた。飼料効率は雄の120 mg/kg群で投与4週のみ低値であった。回復期間中は、体重変化を除き回復が認められた。

血液学検査の結果、雄の120 mg/kg群で、ヘモグロビン量、MCVおよびMCHの高値が認められた。回復期間終了時には、被験物質の投与と関連づけられる変化は認められなかった。

血液生化学検査の結果、雌雄とも被験物質投与と関連づけられる変化は認められなかった。

尿検査の結果、雌雄とも被験物質投与と関連づけられる変化は認められなかった。

器官重量測定の結果、雌雄とも被験物質投与と関連づけられる変化は認められなかった。

病理学的検査の結果、計画屠殺動物において剖検所見および組織所見では被験物質の影響が示唆される所見は

認められなかった。投与期間中に、120 mg/kg群の雌で1例死亡動物が観察され、組織学的検査の結果、肝細胞腫脹と好酸性小体の出現が認められた。

以上の結果、無影響量は雄で30 mg/kg/day、雌で60 mg/kg/dayと判断された。

材料および方法

1. 被験物質

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド(CAS No.56-93-9, 和光純薬工業(株)提供)は白色の固体(常温)で、水溶性、分子式 $C_{10}H_{16}ClN$ 、分子量185.70の化合物である。本試験に用いたロットRSL9083の純度は98%であった。

2. 供試動物

供試したラット [Crj:CD(SD)系, SPF] は日本チャールス・リバー(株)(神奈川県)から4週齢で購入した。動物を検収後、試験環境に9日間馴化させた後、6週齢で投与を開始した。動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした。動物の識別は、個別飼育ケージに動物標識番号(Animal ID-No.)を付すことにより行った。投与開始時の体重は雄で137~156 g、雌で117~131 gであった。

3. 飼育条件

動物はバリアシステムの飼育室で飼育し、環境調節の目標値は温度 $23 \pm 2^{\circ}C$ 、相対湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数20回/時、照明150~300 lux、12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)とした。(株)東京技研サービスの水洗式飼育機を使用し、金属製前面・床網目飼育ケージに動物を1匹ずつ収容し、オリエンタル酵母工業(株)製造の放射線滅菌改良NIH公開ラット・マウス飼料および水道水を自由に摂取させた。飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回取り換えた。

なお、動物の馴化期間を含め、投与および回復期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

4. 試験群の構成

試験群は0, 30, 60および120 mg/kgの4群とし、1群雌雄各5匹を用い、0および120 mg/kg群に雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

〔用量設定理由〕

本試験に先立ち、投与量設定のための2週間投与試験を0, 10, 30, 90および180 mg/kgの5用量で実施した。その結果、雌雄とも180 mg/kg群で死亡が認められ、死亡率は雄で60%, 雌で80%であった。90 mg/kg群では、雌雄とも器官重量に軽微な変化が認められたのみであった。従って、28日間反復投与毒性試験の最高用量は120 mg/kgとし、以下公比2で除した中用量を60 mg/kg, 低用量を30 mg/kgに設定した。

5. 投与方法

被験物質の投与経路は経口とした。被験物質は超純水に溶解し、胃ゾンデを用いて経口投与した。投与容量は体重100 g当り0.5 mlとした。対照群には溶媒のみ投与した。

6. 投与液の調製、分析

被験物質は、各用量(30, 60および120 mg/kg)ごとに所定量を精秤し、超純水(NANO pure システム, 米国SYBRON社)に溶解した。投与液は調製後、冷蔵庫保存で1週間安定であることが確認されているので、本試験においては毎週1回調製を行い、1日分毎に小分けをし使用時まで冷蔵庫に保管した。投与液の濃度分析をすべての群に関し投与1および4週の調製液について実施した結果、設定濃度の104~107%の範囲であり、適切に調製されていた。

7. 投与期間

投与期間は28日間とし、投与終了後0および120 mg/kg群について2週間の回復試験を実施した。

8. 観察、測定および検査

1) 一般状態の観察

全動物を毎日午前、午後の2回観察し、中毒症状の有無、行動異常、死期の迫った動物および死亡動物の有無等を記録した。

2) 体重

投与開始から回復試験終了時まで、毎週1回測定した。

3) 摂餌量

毎週1回給餌した残量を測定し、飼料摂取量(g/week)を算出した。

4) 臨床検査

投与終了時および回復期間終了時の計2回実施した。

採血するに当り、動物は約16時間絶食させた。動物をエーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。

a. 血液学検査

EDTA-3Kを添加した初血を用い、白血球数(WBC: 暗視野板法)、赤血球数(RBC: 暗視野板法)、ヘモグロビン量(HGB: シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトク

リット値(HCT: RBC, MCVより算出)、平均赤血球容積(MCV: 暗視野板法)、平均赤血球血色素量(MCH: HGB, RBCより算出)、平均赤血球血色素濃度(MCHC: HGB, HCTより算出)、血小板数(PLT: 暗視野板法)および白血球百分率(フローサイトケミストリー法)を血液自動分析装置THMS H・1E(米国マイルス社)を用いて測定した。

網赤血球(RC)率算定用に、全血をキャピロット(テルモ株式会社)で染色後、血液塗抹標本を作製し鏡検した。

また、クエン酸ソーダ添加血液の血漿について、プロトロンビン時間(Quick 1段法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(クロット法)およびフィブリノーゲン量(トロンビン時間法)を血液凝固自動測定装置KC-40(独国Amelung社)を用いて測定した。

b. 血液生化学検査

血清を用いて、総蛋白(ビューレット法)、アルブミン(B.C.G.法)、A/G比(計算値)、血糖(グルコースオキシダーゼ法)、中性脂肪(酵素法)、総コレステロール(酵素法)、尿素窒素(BUN: ウレアーゼ改良法)、総ビリルビン(ジアゾ色素法)、カルシウム(アルセナゾIII色素法)、無機リン(モリブデン酸ブルー法)、ナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)および塩素(電極法)をEKTACHEM 700N(米国コダック社)で、クレアチニン(アルカリ性ピクリン酸比色法)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT: Karmen改良法)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT: Karmen改良法)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ -GTP: Szasz改良法)およびアルカリホスファターゼ(ALP: Bessey-Lowry-Brock改良法)をCentrifiChem ENCORE II(米国ペーカー社)で測定した。

c. 尿検査

血液学検査に先立ち、採尿器を用いて24時間(午前10時から翌日午前10時まで)尿を採取し、尿量、色調および濁度を検査後、尿比重計UR-S(株アタゴ)を用いて尿比重を測定した。また、尿を遠心分離後Sternheimer変法により沈渣を染色し、鏡検した。pH、潜血、ケトン体、糖、蛋白、ビリルビンおよびウロビリノーゲンについて、N-マルティスティックスSG試験紙(マイルス・三共(株))およびCLINITEK 200(米国マイルス社)を用いて測定した。

5) 病理学検査

病理解剖は投与終了時および回復期間終了時に動物をエーテル麻酔し、放血致死させ実施した。肉眼的異常を病理解剖所見記録シートに記録した。また、脳、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胸腺、精巣および卵巣について重量を測定し、器官重量・体重比を算出した。上記重量測定器官と下垂体、眼球、唾液腺、甲状腺(上皮小体を含む)、心臓、肺、胃、膀胱、骨髄(大腿骨)および肉眼所見で変化が認められた器官・組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

病理組織学検査は固定した器官・組織のうち、対照群

と高用量群の唾液腺、肝臓、心臓、脾臓、腎臓、副腎および骨髄(大腿骨)について実施した。常法に従って薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色し鏡検した。

6) データの記録および統計分析

各試験群の体重、摂餌量、血液学検査値、血液生化学検査値、尿検査値(尿量および尿比重のみ)、器官重量および器官重量・体重比は、下記に示した自動判別方式に従い、最初に Bartlett の等分散検定を実施した。等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、分散が有意で各群の標本数が同数の場合は Dunnett の多重比較検定、各群の標本数が異なる場合は Duncan の多重範囲検定で対照群と各投薬群間の有意差を検定した。Bartlett の等分散検定で不等分散の場合は Kruskal-Wallis の順位検定を実施し、有意の場合はノンパラメトリックの Dunnett の多重比較検定で対照群と各投薬群間の有意差を検定した。また、病理学的検査結果については、Fisher の直接確率検定を実施した。

有意水準は5および1%の片側検定で実施した。

試験結果

1. 死亡率

投与4週に、雌の120 mg/kg群で1例(動物番号2309)が死亡した。これを除き投与期間中、雌雄とも死亡例は認められなかった。

回復期間中には、雌雄とも対照群および120 mg/kg群で死亡例は認められなかった。

2. 一般状態の観察

雄では、120 mg/kg群で投与2週から流涎が観察され始め、投与2週は6例に、投与3週以降は9例に観察された。流涎は投与後1時間から発現し、3時間程度継続した後消失する繰り返しであり、程度は下顎がかなり濡れる程度であった。また、流涎は60 mg/kg群でも投与4週5~7日に2例に発現したが、120 mg/kg群と比較し症状の程度は軽度で下顎が濡れる程度であった。その他の変化として、120 mg/kg群では、投与4週に5例に流涙が、また2例に被毛の汚れが認められた。これらはいずれも回復期間に入ると認められなかった。また、被毛の汚れについては、観察された2例がいずれも投与4週の計画屠殺動物であったため、回復性は明らかでなかった。

雌では、120 mg/kg群で投与2週から流涎が全例に、また、流涙および被毛の汚れが8例に、立毛が3例に観察され、投与4週には流涙および被毛の汚れが10例に、立毛が4例に増加し、このうち1例が投与4週に死亡したが、死亡例では流涎、流涙および被毛の汚れが投与2週から観察された以外、特記すべき変化は認められなかった。いずれの症状も回復期間に入ると認められなかった。なお、流涎の程度や発現時間は雄とほぼ同じであった。流涙についても発現時間は流涎と同様であったが、

程度は軽度で眼瞼が濡れる程度であった。

3. 体重(Figure 1)

雄では、120 mg/kg群で投与1週から増加抑制傾向が認められ、投与3および4週で対照群と比較して低値を示した。投与終了時の対照群と120 mg/kg群の体重差は、回復期間終了時でも大差がなかった。

雌では、投与期間中は120 mg/kg群で僅かに体重増加抑制傾向にあったもののいずれの被験物質投与群も対照群と有意な差は認められなかった。回復1週では、対照群と比較して120 mg/kg群で僅かに低値であったが、2週には有意な差は認められなかった。

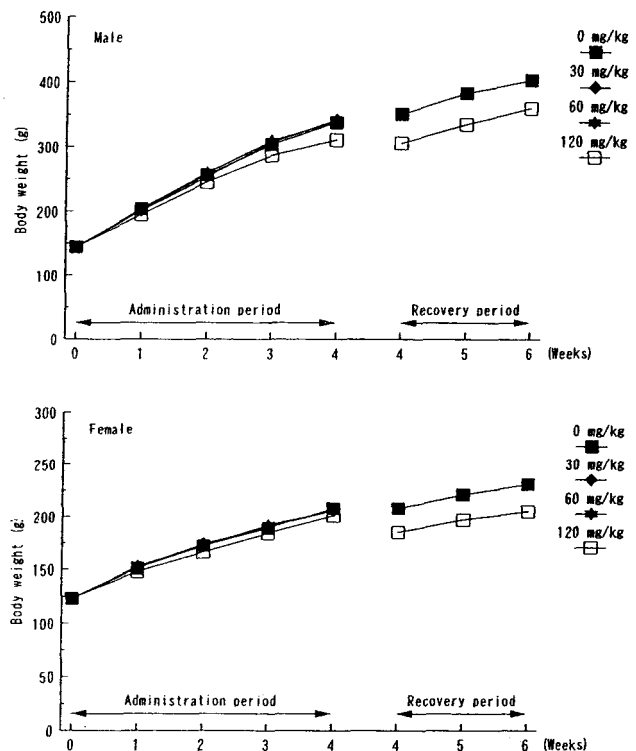


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with benzyltrimethylammonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

4. 摂餌量

雄では、対照群と比較して120 mg/kg群で投与期間を通じて減少が認められた。回復期間に入ると対照群と120 mg/kg群で明確な差は認められなかった。

雌では、投与期間および回復期間を通じて、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

5. 血液学検査(Table 1)

[投与終了時の検査結果]

雄では、対照群と比較して120 mg/kg群でヘモグロビン量、MCVおよびMCHの高値が認められた。また、MCVおよびMCHは、30および60 mg/kg群でも高値が認められたが、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量および赤血球数は対照群と差がなく、意義のある変化ではなかった。

Table 1 Hematology of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
HCT (%)	43.4 ± 1.7	43.2 ± 2.0	43.5 ± 1.4	45.8 ± 1.4	44.2 ± 0.4	43.1 ± 1.0
HGB (g/dl)	14.9 ± 0.3	15.1 ± 0.5	15.0 ± 0.5	16.1 ± 0.3**	15.2 ± 0.3	15.1 ± 0.4
RBC (×10 ⁶ /mm ³)	7.52 ± 0.22	7.28 ± 0.38	7.27 ± 0.30	7.66 ± 0.23	7.85 ± 0.10	7.47 ± 0.07**
MCV (μm ³)	57.7 ± 1.1	59.4 ± 1.1*	59.8 ± 0.8**	59.8 ± 0.9**	56.2 ± 0.7	57.7 ± 1.6
MCH (pg)	19.8 ± 0.3	20.7 ± 0.8*	20.7 ± 0.3*	21.0 ± 0.6**	19.4 ± 0.4	20.2 ± 0.5*
MCHC (%)	34.2 ± 0.7	34.8 ± 1.5	34.5 ± 0.5	35.1 ± 0.8	34.4 ± 0.4	35.0 ± 1.0
PLT (×10 ³ /mm ³)	1074 ± 66	1161 ± 132	1082 ± 98	1101 ± 156	1014 ± 96	1000 ± 121
WBC (×10 ³ /mm ³)	9.9 ± 1.8	13.9 ± 2.2	12.6 ± 1.7	10.5 ± 3.6	11.5 ± 1.5	15.0 ± 4.4
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	12 ± 3	9 ± 3	9 ± 3	11 ± 3	10 ± 1N	9 ± 4
LYMPH	85 ± 3	87 ± 4	89 ± 3	86 ± 2	85 ± 1N	88 ± 4
MONO	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 0	2 ± 1	1 ± 1
EOSN	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1
LUC	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0
Reticulocyte (%)	30 ± 2	29 ± 8	31 ± 5	30 ± 6	21 ± 7	29 ± 4
PT (sec.)	13.8 ± 0.4	13.5 ± 0.3	13.6 ± 0.2	13.7 ± 0.3	13.6 ± 0.4	13.4 ± 0.3
APTT (sec.)	25.1 ± 1.5	25.4 ± 1.1	25.1 ± 1.5	25.9 ± 1.9	25.9 ± 1.3	23.8 ± 2.1
Fibrinogen (mg/dl)	255 ± 20	258 ± 5	266 ± 21	244 ± 10	277 ± 21	254 ± 15
Female						
No. of animals	4	5	5	5	5	4
HCT (%)	43.0 ± 1.3	42.2 ± 1.5	42.6 ± 1.3	42.9 ± 1.3	40.7 ± 1.1	41.3 ± 1.9
HGB (g/dl)	15.3 ± 0.5	15.2 ± 0.4	15.1 ± 0.3	15.3 ± 0.3	14.6 ± 0.1N	14.9 ± 0.8
RBC (×10 ⁶ /mm ³)	7.49 ± 0.33	7.46 ± 0.36	7.36 ± 0.17	7.44 ± 0.19	7.32 ± 0.18	7.49 ± 0.22
MCV (μm ³)	57.4 ± 1.1	56.7 ± 1.0	57.9 ± 1.0	57.7 ± 0.9	55.6 ± 0.9	55.2 ± 1.6
MCH (pg)	20.4 ± 0.2	20.4 ± 0.7	20.5 ± 0.5	20.6 ± 0.4	19.9 ± 0.5	19.9 ± 0.8
MCHC (%)	35.6 ± 0.5	36.0 ± 0.7	35.4 ± 0.7	35.7 ± 0.9	35.8 ± 0.9	36.0 ± 0.8
PLT (×10 ³ /mm ³)	1114 ± 43	1139 ± 57	1069 ± 90	1065 ± 112	994 ± 79	1187 ± 107*
WBC (×10 ³ /mm ³)	6.5 ± 2.8	5.9 ± 2.2	6.3 ± 2.8	7.3 ± 2.5	5.5 ± 1.9	6.4 ± 1.1
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	12 ± 2	13 ± 4	11 ± 2	13 ± 5	18 ± 5	13 ± 2
LYMPH	84 ± 2	83 ± 4	84 ± 4	82 ± 6	79 ± 5	83 ± 3
MONO	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 0	2 ± 1
EOSN	2 ± 1	2 ± 0	2 ± 2	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 1
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Reticulocyte (%)	21 ± 7	18 ± 6	20 ± 3	19 ± 6	20 ± 5	23 ± 8
PT (sec.)	13.9 ± 0.5	13.9 ± 0.6	13.8 ± 0.2	14.0 ± 0.4	13.8 ± 0.5	14.1 ± 0.5
APTT (sec.)	21.0 ± 0.4	21.2 ± 1.2	21.8 ± 1.4	21.1 ± 1.6	19.8 ± 0.6	19.7 ± 0.8
Fibrinogen (mg/dl)	233 ± 26	214 ± 27	207 ± 23	213 ± 18	195 ± 9	204 ± 19

NEUT:Neutrophil LYMPH:Lymphocyte MONO:Monocyte EOSN:Eosinophil ASO:Basophil LUC:Large unstained cells

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

N:Non parametric analysis

雌では、いずれの検査項目も対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

〔回復期間終了時の検査結果〕

雄では、対照群に比較して120 mg/kg群で赤血球数の低値、MCHの高値が認められた。

雌では、対照群に比較して120 mg/kg群で血小板数が高値を示したが、背景値の範囲内の変化であった(背景値 $1103 \pm 124 \times 10^3 / \text{mm}^3$, $n=50$)。

6. 血液凝固検査 (Table 1)

投与終了時および回復試験終了時のいずれにおいても、雌雄ともに対照群と被験物質投与群とで検査を行った3項目に差は認められなかった。

7. 血液生化学検査 (Table 2)

〔投与終了時の検査結果〕

雄では、対照群に比較して30および120 mg/kg群でGOTが高値を示したが、背景値の正常範囲内の値であった。

雌では、すべての検査項目について、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

〔回復期間終了時の検査結果〕

雄では、すべての検査項目について、対照群と120 mg/kg群とで差が認められなかった。

雌では、対照群に比較して120 mg/kg群で総蛋白の低値が認められたが、対照群が僅かに高値傾向にあり、120 mg/kg群の値は正常範囲(背景値: 5.66 ± 0.20 g/dl, $n=50$)内の値であった。

8. 尿検査 (Table 3)

投与終了時および回復試験終了時のいずれにおいても、雌雄ともに対照群と被験物質投与群とですべての検査項目について明らかな差は認められなかった。

9. 器官重量 (Table 4)

〔投与終了時の結果〕

雄では、対照群に比較して30および60 mg/kg群で脳、腎臓および脾臓重量が高値、さらに60 mg/kg群で胸腺重量が高値を示した。

雌では、重量測定を行ったすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差は認められなかった。

〔回復期間終了時の結果〕

雌雄とも重量測定を行ったすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差は認められなかった。

10. 器官重量・体重比(相対重量) (Table 4)

〔投与終了時の結果〕

雄では、対照群に比較して60 mg/kg群で胸腺相対重量の高値が認められた。

雌では、重量測定を実施したすべての器官について、

対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

〔回復期間終了時の結果〕

雄では、対照群に比較して120 mg/kg群で脳相対重量の高値が認められた。

雌では、重量測定を実施したすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

11. 病理学検査

a) 剖検所見 (Table 5)

雌の120 mg/kg群の死亡例については、肉眼的には特筆すべき所見は観察されなかった。

投与終了時の計画屠殺された動物の剖検所見で被験物質による影響と考えられる所見は雌雄いずれの投与群にも認められなかった。

対照群を含め観察された所見としては、肺の赤色斑/区域と有色斑/区域が、それぞれ雌雄で少数例、胸腺の赤色斑/区域は雌で少数例認められた。その他観察された所見はごく僅かか、単発性の発生に止まった。

回復期間終了時の所見は、いずれも単発性の発生に止まり、被験物質による影響と考えられる所見は認められなかった。

b) 組織所見 (Table 6)

雌の120 mg/kg群の死亡例については、肝臓において、好酸性小体の出現と肝細胞腫脹が認められ、また、副腎皮質の増生が認められた。その他、肝臓の肉芽巣、骨髄の血管拡張や自己融解が観察された。

投与終了時の組織学的検査の結果、被験物質による影響と考えられる所見は認められなかった。対照群を含め観察された所見として、肝臓の周辺性脂肪化あるいは脂肪化、肉芽巣、腎臓の尿細管の好塩基化、繊維化や管腔拡張などの変化が認められた。

考察および結論

雌の120 mg/kg群で死亡が1例認められ、この動物では、同群の他の動物でも観察された流涎、流涙および被毛の汚れが死亡の3週間前から観察された。病理学的検査の結果、肝臓に肝細胞腫脹と好酸性小体の出現等が認められたが、死因に結びつけられる変化ではなかった。しかしながら、予備試験での死亡例の状況等から、被験物質投与により死亡したものと考えられた。

一般状態の観察では、雌雄の120 mg/kg群で流涎、流涙および被毛の汚れが、さらに雌の120 mg/kg群で立毛が認められ、これらの症状のうち、流涎については雄の60 mg/kg群の1部の例でも観察された。投与中止により消失が認められいずれも被験物質投与による変化と考えられた。

体重、摂餌量および飼料効率、雄の120 mg/kg群のみ低値または減少が認められ、摂餌量および飼料効率は投与の中止により回復した。体重については投与終了時の差が縮まらず、回復は認められなかった。

血液学検査の結果、雄の120 mg/kg群で認められたへ

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
BUN (mg/dl)	11.8 ± 3.2	11.1 ± 0.7	11.7 ± 1.9	14.4 ± 2.4	10.8 ± 1.6	12.7 ± 2.5
Creatinine (mg/dl)	0.57 ± 0.09	0.56 ± 0.07	0.57 ± 0.09	0.63 ± 0.02	0.65 ± 0.10	0.63 ± 0.08
T.cholesterol (mg/dl)	47 ± 10	38 ± 11	46 ± 13	33 ± 12	33 ± 11	35 ± 13
T.protein (g/dl)	5.29 ± 0.26N	5.32 ± 0.16	5.20 ± 0.04	5.36 ± 0.18	5.43 ± 0.21	5.44 ± 0.27
Albumin (g/dl)	3.04 ± 0.15	3.04 ± 0.13	2.96 ± 0.07	3.15 ± 0.11	3.05 ± 0.12	3.12 ± 0.13
A/G	1.35 ± 0.03N	1.33 ± 0.08	1.32 ± 0.09	1.43 ± 0.02	1.29 ± 0.04	1.35 ± 0.07
Glucose (mg/dl)	128 ± 9	132 ± 15	125 ± 10	115 ± 10	146 ± 22	139 ± 25
Triglyceride (mg/dl)	42.1 ± 9.6	55.9 ± 21.4	44.4 ± 11.2	40.7 ± 8.8	62.5 ± 19.2N	52.1 ± 4.3
GOT (U/l)	48 ± 1N	55 ± 4*	52 ± 8	56 ± 3*	40 ± 4	45 ± 7
GPT (U/l)	13 ± 2	14 ± 2	12 ± 2	14 ± 2	14 ± 3	14 ± 2
ALP (U/l)	163 ± 29	166 ± 48	138 ± 21	166 ± 19	136 ± 30	138 ± 17
γ-GTP (U/l)	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.4	0.6 ± 0.5	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.2
T.bilirubin (mg/dl)	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.02
Sodium (mmol/l)	144.1 ± 1.0	143.5 ± 0.7	144.7 ± 1.4	143.1 ± 1.4	142.5 ± 0.7	141.5 ± 1.1
Potassium (mmol/l)	4.50 ± 0.31	4.61 ± 0.25	4.48 ± 0.24	4.74 ± 0.21	4.01 ± 0.13	4.22 ± 0.27
Chloride (mmol/l)	107.2 ± 0.7	107.0 ± 1.6	107.9 ± 1.5	106.3 ± 0.7	108.2 ± 1.3	107.1 ± 0.6
Calcium (mg/dl)	9.79 ± 0.35	9.82 ± 0.27	9.64 ± 0.28	9.63 ± 0.15	9.70 ± 0.26	9.77 ± 0.31
I.phosphate (mg/dl)	7.81 ± 0.28	7.80 ± 0.65	7.61 ± 0.25	8.12 ± 0.52	7.36 ± 0.51	7.80 ± 0.50
Female						
No. of animals	4	5	5	5	5	4
BUN (mg/dl)	13.7 ± 3.2	14.3 ± 2.5	14.9 ± 2.3	13.8 ± 1.3	13.6 ± 2.9	15.1 ± 2.4
Creatinine (mg/dl)	0.67 ± 0.06	0.58 ± 0.06	0.59 ± 0.06	0.55 ± 0.07	0.65 ± 0.03	0.63 ± 0.10
T.cholesterol (mg/dl)	45 ± 6	41 ± 6	46 ± 8	46 ± 12	42 ± 18	45 ± 17
T.protein (g/dl)	5.46 ± 0.06	5.34 ± 0.18	5.40 ± 0.33	5.29 ± 0.22	5.83 ± 0.28	5.44 ± 0.15*
Albumin (g/dl)	3.26 ± 0.10	3.23 ± 0.16	3.27 ± 0.27	3.19 ± 0.18	3.40 ± 0.24	3.16 ± 0.18
A/G	1.48 ± 0.08	1.54 ± 0.10	1.53 ± 0.08	1.52 ± 0.08	1.39 ± 0.08	1.39 ± 0.12
Glucose (mg/dl)	105 ± 6	106 ± 12	105 ± 13	103 ± 15	114 ± 15	103 ± 16
Triglyceride (mg/dl)	33.3 ± 5.8	30.5 ± 4.9	33.7 ± 8.2	28.2 ± 2.7	49.8 ± 20.2	38.3 ± 8.8
GOT (U/l)	57 ± 8	59 ± 11	53 ± 8	56 ± 10	46 ± 10	47 ± 5
GPT (U/l)	15 ± 2	16 ± 2	15 ± 2	16 ± 4	13 ± 1	13 ± 3
ALP (U/l)	132 ± 38	105 ± 34	109 ± 23	83 ± 22	73 ± 27	89 ± 24
γ-GTP (U/l)	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.6	1.0 ± 0.4
T.bilirubin (mg/dl)	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.05	0.14 ± 0.03	0.16 ± 0.05	0.15 ± 0.05
Sodium (mmol/l)	143.6 ± 0.7	142.2 ± 1.6	142.5 ± 1.4	141.4 ± 1.1	141.3 ± 1.3	140.9 ± 1.1
Potassium (mmol/l)	4.32 ± 0.25N	4.50 ± 0.28	4.91 ± 1.22	4.57 ± 0.37	4.00 ± 0.53	4.29 ± 0.25
Chloride (mmol/l)	111.2 ± 1.4	109.0 ± 0.7	109.2 ± 1.9	108.9 ± 1.8	107.9 ± 2.7	110.4 ± 1.7
Calcium (mg/dl)	9.74 ± 0.12N	9.64 ± 0.34	10.02 ± 0.49	9.77 ± 0.13	9.94 ± 0.40	9.60 ± 0.31
I.phosphate (mg/dl)	6.75 ± 0.55	6.28 ± 0.48	7.34 ± 0.83	6.96 ± 0.59	6.15 ± 0.80	5.94 ± 0.91

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05

N: Non parametric analysis

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Volume (ml)	21 ± 10N	16 ± 3	19 ± 8	18 ± 3	16 ± 4	18 ± 6
Specific gravity	1.042 ± 0.016	1.055 ± 0.011	1.040 ± 0.017	1.043 ± 0.006	1.037 ± 0.011	1.037 ± 0.021
Color	Slight yellow	5	5	5	5	5
Turbidity	Clear muddy	5	5	5	5	5
pH	7	0	2	1	0	1
	7.5	2	1	0	0	1
	8	0	0	0	0	0
	8.5	2	1	1	2	0
	≥9	1	1	3	3	3
Occult blood	-	5	5	5	3	5
	+/-	0	0	0	0	1
	2+	0	0	0	0	1
Ketones	-	2	1	2	5	1
	+/-	1	1	1	0	0
	1+	2	3	2	0	4
Glucose (g/dl)	-	5	5	5	5	5
	Protein +/-	0	0	0	1	0
	(mg/dl) 30	2	1	4	4	3
	100	1	3	0	0	2
	≥300	2	1	1	0	0
Bilirubin	-	5	5	5	5	5
Urobilinogen (E.U./dl)	0.1	2	1	2	5	4
	1.0	3	4	3	0	1
Erythrocytes	-	5	5	5	5	5
Leukocytes	-	5	5	5	5	5
Epith. cells	-	5	5	5	5	5
Casts	-	5	4	5	5	5
	+	0	1	0	0	0
Fat glob.	-	5	5	5	5	5
M. threads	-	5	5	5	5	4
	+	0	0	0	0	1
others	-	1	0	1	0	2
	+	4	5	4	5	3

Fat glob.: Fat globule, M. threads: Mucous threads, others: Crystals

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

N: Non parametric analysis

Table 3 (continued)

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)		
	0	30	60	120	0	120	
Female							
No. of animals	4	5	5	5	5	4	
Volume (ml)	15 ± 9N	9 ± 2	11 ± 6	20 ± 12	16 ± 3	17 ± 10	
Specific gravity	1.056 ± 0.022	1.063 ± 0.007	1.070 ± 0.019	1.044 ± 0.027	1.049 ± 0.014	1.041 ± 0.016	
Color	Slight yellow	4	5	5	5	4	
Turbidity	Clear muddy	4	5	5	5	4	
pH	7	1	0	0	2	1	
	7.5	1	0	2	1	2	
	8	0	0	1	1	1	
	8.5	2	1	0	0	0	
	≥9	0	2	0	0	0	
Occult blood	-	4	5	5	4	5	
	1+	0	0	0	1	0	
Ketones	-	1	2	1	5	0	
	+/-	2	3	4	0	4	
	1+	1	0	0	0	1	
Glucose (g/dl)	-	4	5	5	5	4	
	Protein	-	1	0	0	1	0
	(mg/dl)	30	0	4	1	3	3
	100	3	1	3	1	2	
	≥300	0	0	1	0	0	
Bilirubin	-	4	5	4	5	5	
	1+	0	0	1	0	0	
Urobilinogen (E.U./dl)	0.1	1	0	0	3	0	
	1.0	3	5	5	2	5	
Erythrocytes	-	4	3	5	5	5	
	+	0	2	0	0	0	
Leukocytes	-	4	5	5	5	5	
Epith. cells	-	4	4	5	4	5	
	+	0	1	0	1	0	
Casts	-	4	4	5	5	5	
	+	0	1	0	0	0	
Fat glob.	-	4	5	5	5	5	
M. threads	-	4	5	5	5	5	
others	-	1	0	0	0	0	
	+	3	5	5	5	5	

Fat glob.: Fat globule, M. threads: Mucous threads, others: Crystals

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

N: Non parametric analysis

Table 4 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	324 ± 11	342 ± 19	340 ± 16	316 ± 16	403 ± 17	360 ± 33*
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.03 ± 0.06	2.12 ± 0.05*	2.13 ± 0.07*	2.02 ± 0.05	2.10 ± 0.07	2.05 ± 0.15
Liver (g)	9.26 ± 0.73	10.37 ± 1.24	10.04 ± 0.97	8.55 ± 0.53	11.42 ± 1.12	9.94 ± 1.42
Kidneys (g)	2.48 ± 0.17	2.84 ± 0.27*	2.81 ± 0.19*	2.47 ± 0.08	2.89 ± 0.37	2.62 ± 0.27
Spleen (g)	0.51 ± 0.06	0.67 ± 0.07*	0.66 ± 0.13*	0.44 ± 0.10	0.64 ± 0.08	0.61 ± 0.09
Adrenals (mg)	46 ± 7	53 ± 9	48 ± 4	53 ± 5	60 ± 14	54 ± 5
Testes (g)	2.91 ± 0.12	2.83 ± 0.17	2.88 ± 0.15	2.82 ± 0.19	3.08 ± 0.25	2.79 ± 0.19
Thymus (mg)	567 ± 133N	675 ± 19	740 ± 80*	564 ± 47	444 ± 104	511 ± 76
Relative organ weight						
Brain (%)	0.629 ± 0.035	0.621 ± 0.029	0.627 ± 0.030	0.639 ± 0.029	0.522 ± 0.015	0.570 ± 0.028**
Liver (%)	2.857 ± 0.157N	3.032 ± 0.290	2.955 ± 0.239	2.706 ± 0.046	2.828 ± 0.182	2.754 ± 0.218
Kidneys (%)	0.767 ± 0.049	0.833 ± 0.078	0.826 ± 0.050	0.783 ± 0.036	0.719 ± 0.105	0.730 ± 0.062
Spleen (%)	0.157 ± 0.014	0.197 ± 0.028	0.194 ± 0.038	0.139 ± 0.027	0.157 ± 0.015	0.170 ± 0.017
Adrenals (%)	0.014 ± 0.002N	0.016 ± 0.003	0.014 ± 0.001	0.017 ± 0.001	0.015 ± 0.003	0.015 ± 0.001
Testes (%)	0.899 ± 0.039	0.831 ± 0.082	0.849 ± 0.066	0.896 ± 0.090	0.764 ± 0.049	0.779 ± 0.060
Thymus (%)	0.175 ± 0.042N	0.198 ± 0.008	0.218 ± 0.020*	0.179 ± 0.015	0.111 ± 0.029	0.142 ± 0.016
Female						
No. of animals	4	5	5	5	5	4
Body weight (g)	207 ± 13	206 ± 12	206 ± 9	213 ± 19	231 ± 21	205 ± 19
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.90 ± 0.07	1.89 ± 0.02	1.88 ± 0.05	1.89 ± 0.07	1.97 ± 0.06	1.94 ± 0.05
Liver (g)	5.93 ± 0.30	5.84 ± 0.35	5.91 ± 0.66	6.22 ± 0.39	6.14 ± 0.67	5.35 ± 0.46
Kidneys (g)	1.62 ± 0.11	1.71 ± 0.05	1.59 ± 0.08	1.74 ± 0.15	1.70 ± 0.06	1.56 ± 0.14
Spleen (g)	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.09	0.37 ± 0.05	0.44 ± 0.07	0.38 ± 0.05
Adrenals (mg)	58 ± 5	61 ± 6	58 ± 10	60 ± 6	64 ± 5	67 ± 6
Ovaries (mg)	74 ± 9	81 ± 8	80 ± 13	81 ± 8	78 ± 4	71 ± 9
Thymus (mg)	403 ± 93	430 ± 56	458 ± 53	381 ± 93	408 ± 90	326 ± 51
Relative organ weight						
Brain (%)	0.920 ± 0.045	0.922 ± 0.061	0.915 ± 0.058	0.887 ± 0.056	0.859 ± 0.102	0.952 ± 0.079
Liver (%)	2.896 ± 0.103	2.842 ± 0.197	2.870 ± 0.206	2.927 ± 0.270	2.661 ± 0.201	2.615 ± 0.150
Kidneys (%)	0.791 ± 0.083	0.834 ± 0.075	0.771 ± 0.018	0.822 ± 0.100	0.742 ± 0.066	0.764 ± 0.035
Spleen (%)	0.191 ± 0.019	0.186 ± 0.014	0.189 ± 0.035	0.171 ± 0.017	0.191 ± 0.023	0.186 ± 0.018
Adrenals (%)	0.028 ± 0.002	0.030 ± 0.005	0.028 ± 0.004	0.028 ± 0.003	0.028 ± 0.003	0.033 ± 0.006
Ovaries (%)	0.036 ± 0.004	0.040 ± 0.003	0.039 ± 0.005	0.038 ± 0.006	0.034 ± 0.002	0.035 ± 0.004
Thymus (%)	0.195 ± 0.043	0.210 ± 0.031	0.223 ± 0.022	0.179 ± 0.045	0.176 ± 0.030	0.160 ± 0.026

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

N: Non parametric analysis

Table 5 Summary of gross findings in rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
		0	30	60	120	0	120
Male							
	No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
CARDIOVASCULAR SYSTEM							
heart	white patch/zone	0	0	1	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM							
spleen	deformed	0	0	0	0	0	1
RESPIRATORY SYSTEM							
lung	black patch/zone	0	0	1	0	0	0
	colored patch/zone	1	0	0	1	0	0
	red patch/zone	1	1	1	2	0	0
DIGESTIVE SYSTEM							
liver	colored patch/zone	0	0	1	0	0	0
	diaphragmatic hernia	0	0	0	1	0	0
	white patch/zone	0	0	0	1	0	0
URINARY SYSTEM							
kidney	white patch/zone	0	0	0	0	1	0
ENDOCRINE SYSTEM							
pituitary gland	cyst	0	1	0	0	0	0
adrenal gland	enlarged	0	0	0	0	1	0
Female							
	No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
CARDIOVASCULAR SYSTEM							
heart	black patch/zone	0	1	0	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM							
spleen	enlarged	1	0	0	0	0	0
lymph node	enlarged	1	0	0	0	0	0
thymus	red patch/zone	2	1	0	0	0	0
RESPIRATORY SYSTEM							
lung	black patch/zone	1	0	0	0	0	0
	colored patch/zone	1	0	0	0	0	1
	red patch/zone	0	0	0	2	0	0
DIGESTIVE SYSTEM							
liver	enlarged	1	0	0	0	0	0
	granular	1	0	0	0	0	0
	pale	1	0	0	0	0	0
choledochus	dilated lumen	1	0	0	0	0	0
URINARY SYSTEM							
kidney	cyst	1	0	0	0	0	0
	dilated pelvis	0	0	0	1	0	0
	enlarged	1	0	0	0	0	0
	pale	1	0	0	0	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM							
ovary	cyst	0	0	2	0	0	0
uterus	dilated lumen	1	0	0	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM							
pituitary gland	cyst	1	0	0	0	0	0

Table 6 Summary of histopathological findings in rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item		28 days dosing groups (mg/kg)											
		0			30			60			120		
Organ	Findings	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Male													
No. of animals necropsied		5			5			5			5		
DIGESTIVE SYSTEM													
liver		(5)			(0)			(0)			(5)		
	fatty change, peripheral granulation	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	infiltration/cellular	4	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
	hepatodiaphragmatic nodule	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
URINARY SYSTEM													
kidney		(5)			(0)			(0)			(5)		
	basophilic change	3	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
	deposit of calcium	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	eosinophilic body	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	infiltration/cellular	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
MUSCULOSKELETAL SYSTEM													
bone		(5)			(0)			(0)			(5)		
	osteosclerosis	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
Female													
No. of animals necropsied		5			5			5			5		
HEMATOPOIETIC SYSTEM													
bone marrow		(5)			(0)			(0)			(5)		
	granulopoiesis, increased	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
spleen		(5)			(0)			(0)			(5)		
	capsulitis	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	hematopoiesis, increased	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM													
liver		(5)			(0)			(0)			(5)		
	bile duct dilatation	0	0	1	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	cytological alteration	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	fatty change	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	fatty change, peripheral	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	necrosis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	swelling of liver cells	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	cholangitis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	granulation	2	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
	bile duct hyperplasia	0	0	1	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	extramedullary hematopoiesis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
URINARY SYSTEM													
kidney		(5)			(0)			(0)			(5)		
	edema	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	basophilic change	2	0	0	-	-	-	-	-	-	3	0	0
	cyst	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	hydronephrosis	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	tubular dilatation	0	1	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	lymphocytic infiltration	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	fibrosis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
ENDOCRINE SYSTEM													
adrenal gland		(5)			(0)			(0)			(5)		
	vacuolic change	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0

1:slight 2:moderate 3:marked

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

モグロビン量、MCVおよびMCHの高値のみが被験物質投与と関連づけられる変化であったが、変化の程度は僅かであり、被験物質の血液に対する影響は弱いものと考えられた。回復試験終了時に雌雄の120 mg/kg群で認められた変化も、軽微または投与終了時に認められなかった変化であり、被験物質投与との関連は示唆されない。血液凝固能検査に関しては、雌雄とも変化が認められなかった。

血液生化学検査および尿検査の結果、被験物質投与によると考えられる変化は、雌雄いずれの群にも認められなかった。

器官重量測定の結果、明確に被験物質投与の影響を示唆する変化では認められなかった。雄の30および60 mg/kg群で認められた脳、腎臓および脾臓の実重量の変化は、相対重量に有意な差が認められず、この両群の体重が高値傾向にあることから、体重による影響と考えられた。また、雄の60 mg/kg群で認められた胸腺の実重量および相対重量の高値についても、投与用量との関連性がなく、被験物質投与による変化とは考えられなかった。回復試験終了時に認められた雄の120 mg/kgの脳相対重量の高値も、この群の体重が低いことによるものと推察された。

病理学的検査の結果、剖検所見では計画屠殺動物、死亡動物ともに特筆すべき所見は観察されなかった。

組織所見では、計画屠殺動物においては、被験物質の影響を示唆する所見は観察されなかったが、死亡した1例の動物では肝細胞腫脹と好酸性小体の出現が観察された。しかし、いずれも軽度の変化であり、死に至らしめるほどの肝細胞腫脹、好酸性小体の出現とは考えがたく死因は不明であった。なお、予備試験において、計画屠殺動物の180 mg/kg群では肝臓の肥大は観察されなかつ

たが、投与期間中に死亡した180 mg/kg群の雌雄の大部分の例で肝臓の肥大が肉眼的に観察されている。本試験の死亡動物の肝臓では肥大が認められなかったが、組織学的に観察された肝細胞腫脹と好酸性小体の出現は被験物質投与による影響が考えられた。

以上のことから、本試験では雌雄で認められた一般状態の変化および雄の120 mg/kg群で認められた血液学検査値の変化が被験物質投与と関連づけられるものであり、無影響量は一般状態に変化が認められなかった、雄で30 mg/kg/day、雌で60 mg/kg/dayと判断された。

連絡先

試験責任者：井上博之

試験担当者：各務 進、庄子明德、渡 修明、
小林和雄、高木留美子

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜 582-2
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Hiroyuki Inoue (Study director),
Susumu Kakamu, Akinori Shoji,
Nobuaki Watari, Kazuo Kobayashi,
Rumiko Takagi

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan
Tel 81-538-58-1266 Fax 81-538-58-1393

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Benzyltrimethylammonium chloride on Bacteria

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの変異原性について遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535およびTA1537株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA株を用いる復帰突然変異試験を行った。予備的な試験の結果を基に、試験用量を設定した。すなわち、直接法 (-S9 mix) ならびに代謝活性化法 (+S9 mix) の各菌株についてそれぞれ、156~5000 μg /プレートの6用量を設定し試験した。その結果、直接法および代謝活性化法のいずれにおいても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められず、再現性も確認された。一方、各系での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。従って、本試験条件下において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドは微生物に対し遺伝子突然変異を誘起しないものと判断した。

材料および方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537¹⁾ ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2uvrA²⁾ の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所から分与を受けた。平成6年11月25日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド (DMSO: MERCK社) を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mlずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

日清製粉(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエ

ン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム [いずれも最終濃度]) に2%のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID社:No.1)を加え、30 mlをシャーレに分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

Bacto-agar(DIFCO社)0.6%を含む0.5%塩化ナトリウム水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mM D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mlの円筒容器(ストレージボトル: Corning Costar社)に2.5%ニュートリエントプロス(OXOID社)溶液を25ml分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μl 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック(株))を用い、37℃で8時間振盪(往復振盪:120回/分)培養し、試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1ml中の量
S9	0.1 ml
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
リン酸緩衝Na-液(pH 7.4)	100 μmol

5. 被験物質

被験物質のベンジルトリメチルアンモニウムクロリド(ロット番号:RSL9083, CAS No.:56-93-9)は分子式C₁₀H₁₆ClN, 分子量185.70, 純度99.0%以上の白色粉末である。和光純薬工業(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質溶液の調製

注射用蒸留水(大塚蒸留水:株大塚製薬工場)に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 試験用量の設定

8.00, 40.0, 200, 1000および5000 µg/プレートの用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、直接法のTA100およびTA1535で5000 µg/プレートにおいて試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。従って、本試験においては直接法ならびに代謝活性化法の各菌株について5000 µg/プレートを最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20℃)した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
(AF-2:和光純薬工業株)

アジ化ナトリウム(NaN₃:和光純薬工業株)

9-アミノアクリジン(ACR:ALDRICH社)

2-アミノアントラセン(2-AA:和光純薬工業株)

9. 試験方法

Amesらの原法の改良法であるプレインキュベーション法²⁾に準じて、直接法および代謝活性化法それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を100 µl、次いで直接法の場合、0.1 Mナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 µl、代謝活性化法の場合、S9 mixを500 µlおよび試験菌液100 µlを加え、37℃で20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、トップアガーを2 ml添加し、混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡(×60)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス株)を用いた。独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

試験結果をTable 1~4に示した。直接法(-S9 mix)のTA100およびTA1535の5000 µg/プレートにおいて、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理による生育阻害作用が観察された。直接法のTA98, TA1537およびWP2^{uvrA}ならびに代謝活性化法(+S9 mix)では、5000 µg/プレートにおいても同作用は観察されなかった。また、復帰突然変異コロニー数については、直接法、代謝活性化法とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、試験中析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から、本試験条件下においてベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron, and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, **38**, 3 (1976)

連絡先

試験責任者:中嶋 圓

試験担当者:北沢倫世, 熊平智司, 勝俣 勇

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors:Madoka Nakajima(Study director)

Michiyo Kitazawa, Satoshi Kumadaira

Isami Katsumata

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides(An-pyo Center)

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,

Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride (1st trial)
[direct method: -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
D.W.#	0	97	91	85	13	8	12	23	24	21	22	27	25	9	6	7
		[91 \pm 6]			[11 \pm 3]			[23 \pm 2]			[25 \pm 3]			[7 \pm 2]		
Test sub.	156	103	93	88	17	7	8	19	22	24	27	30	21	10	5	9
		[95 \pm 8]			[11 \pm 6]			[22 \pm 3]			[26 \pm 5]			[8 \pm 3]		
	313	91	95	94	16	10	10	18	22	18	23	21	23	11	5	10
		[93 \pm 2]			[12 \pm 3]			[19 \pm 2]			[22 \pm 1]			[9 \pm 3]		
	625	95	83	101	9	9	15	19	21	24	29	28	27	11	5	9
		[93 \pm 9]			[11 \pm 3]			[21 \pm 3]			[28 \pm 1]			[8 \pm 3]		
	1250	90	96	102	11	10	14	23	24	20	20	35	27	10	11	9
		[96 \pm 6]			[12 \pm 2]			[22 \pm 2]			[27 \pm 8]			[10 \pm 1]		
	2500	87	100	89	17	7	6	25	26	21	25	24	23	7	6	8
		[92 \pm 7]			[10 \pm 6]			[24 \pm 3]			[24 \pm 1]			[7 \pm 1]		
	5000	97*	84*	96*	7*	13*	8*	23	21	22	22	30	23	10	9	8
		[92 \pm 7]			[9 \pm 3]			[22 \pm 1]			[25 \pm 4]			[9 \pm 1]		
Positive control		555	518	487 ^{a)}	464	409	411 ^{b)}	119	126	124 ^{a)}	631	595	660 ^{c)}	546	496	519 ^{d)}
		[520 \pm 34]			[428 \pm 31]			[123 \pm 4]			[629 \pm 33]			[520 \pm 25]		

#: Solvent control *: The background lawn was thin
a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$
d): ACR; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride (1st trial)
[activation method: +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
D.W.#	0	106	109	100	15	10	13	31	20	25	27	32	28	12	11	10
		[105 \pm 5]			[13 \pm 3]			[25 \pm 6]			[29 \pm 3]			[11 \pm 1]		
Test sub.	156	109	93	102	14	9	12	24	21	19	31	25	32	9	7	7
		[101 \pm 8]			[12 \pm 3]			[21 \pm 3]			[29 \pm 4]			[8 \pm 1]		
	313	99	96	94	14	10	13	26	20	26	31	43	35	15	11	11
		[96 \pm 3]			[12 \pm 2]			[24 \pm 3]			[36 \pm 6]			[12 \pm 2]		
	625	90	93	89	17	13	16	22	19	17	33	33	43	11	10	9
		[91 \pm 2]			[15 \pm 2]			[19 \pm 3]			[36 \pm 6]			[10 \pm 1]		
	1250	96	94	98	15	15	13	23	23	26	34	47	34	14	6	9
		[96 \pm 2]			[14 \pm 1]			[24 \pm 2]			[38 \pm 8]			[10 \pm 4]		
	2500	103	116	112	8	13	8	31	26	21	31	29	32	6	10	8
		[110 \pm 7]			[10 \pm 3]			[26 \pm 5]			[31 \pm 2]			[8 \pm 2]		
	5000	95	86	93	18	14	7	23	21	23	47	35	30	12	5	11
		[91 \pm 5]			[13 \pm 6]			[22 \pm 1]			[37 \pm 9]			[9 \pm 4]		
Positive control		668	655	682 ^{a)}	319	333	376 ^{b)}	792	700	762 ^{c)}	391	335	316 ^{d)}	152	133	171 ^{b)}
		[668 \pm 14]			[343 \pm 30]			[751 \pm 47]			[347 \pm 39]			[152 \pm 19]		

#: Solvent control
a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride (2nd trial)
[direct method: -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
D.W.#	0	116 97 93 [102 \pm 12]	17 16 15 [16 \pm 1]	29 33 29 [30 \pm 2]	32 29 26 [29 \pm 3]	7 11 8 [9 \pm 2]
Test sub.	156	105 105 111 [107 \pm 3]	14 15 10 [13 \pm 3]	37 35 25 [32 \pm 6]	27 32 21 [27 \pm 6]	10 12 9 [10 \pm 2]
	313	115 103 99 [106 \pm 8]	17 9 8 [11 \pm 5]	24 21 24 [23 \pm 2]	30 20 30 [27 \pm 6]	9 8 8 [8 \pm 1]
	625	110 99 124 [111 \pm 13]	14 14 9 [12 \pm 3]	25 22 27 [25 \pm 3]	30 23 31 [28 \pm 4]	12 11 9 [11 \pm 2]
	1250	110 99 102 [104 \pm 6]	18 12 14 [15 \pm 3]	23 24 21 [23 \pm 2]	35 27 25 [29 \pm 5]	4 9 7 [7 \pm 3]
	2500	94 109 98 [100 \pm 8]	13 13 11 [12 \pm 1]	26 25 30 [27 \pm 3]	25 26 28 [26 \pm 2]	12 10 9 [10 \pm 2]
	5000	91* 110* 104* [102 \pm 10]	12* 13* 13* [13 \pm 1]	29 26 28 [28 \pm 2]	25 27 32 [28 \pm 4]	11 11 10 [11 \pm 1]
Positive control		441 437 458 ^{a)} [445 \pm 11]	507 436 439 ^{b)} [461 \pm 40]	122 111 121 ^{a)} [118 \pm 6]	501 570 543 ^{c)} [538 \pm 35]	450 482 448 ^{d)} [460 \pm 19]

#: Solvent control * : The background lawn was thin
 a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) : AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$
 d) : ACR; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride (2nd trial)
[activation method: +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]				
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
D.W.#	0	111 114 92 [106 \pm 12]	12 15 15 [14 \pm 2]	28 21 26 [25 \pm 4]	30 34 25 [30 \pm 5]	15 9 11 [12 \pm 3]
Test sub.	156	84 101 98 [94 \pm 9]	9 9 16 [11 \pm 4]	24 19 22 [22 \pm 3]	34 26 28 [29 \pm 4]	10 10 9 [10 \pm 1]
	313	82 101 120 [101 \pm 19]	13 16 16 [15 \pm 2]	23 22 19 [21 \pm 2]	27 18 24 [23 \pm 5]	5 6 8 [6 \pm 2]
	625	116 84 85 [95 \pm 18]	15 10 16 [14 \pm 3]	20 14 24 [19 \pm 5]	21 30 28 [26 \pm 5]	7 7 10 [8 \pm 2]
	1250	114 109 96 [106 \pm 9]	14 11 10 [12 \pm 2]	20 20 24 [21 \pm 2]	28 26 19 [24 \pm 5]	8 11 13 [11 \pm 3]
	2500	115 103 102 [107 \pm 7]	10 16 15 [14 \pm 3]	25 19 26 [23 \pm 4]	39 25 29 [31 \pm 7]	9 9 6 [8 \pm 2]
	5000	104 118 110 [111 \pm 7]	16 13 10 [13 \pm 3]	27 22 20 [23 \pm 4]	25 26 26 [26 \pm 1]	10 13 7 [10 \pm 3]
Positive control		614 625 618 ^{a)} [619 \pm 6]	415 382 384 ^{b)} [394 \pm 19]	795 730 745 ^{c)} [757 \pm 34]	308 311 346 ^{d)} [322 \pm 21]	103 113 135 ^{b)} [117 \pm 16]

#: Solvent control
 a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) : 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) : 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの 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 Benzyltrimethylammonium chloride on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株(CHL)を用いる *in vitro* 染色体異常試験を行った。細胞増殖抑制試験において細胞が死滅するほどの毒性が観察されなかったため、OECDのガイドラインに従って10 mM相当の濃度を最高用量とした。すなわち、連続処理法(24時間処理および48時間処理)ならびに短時間処理法(6時間処理の+S9 mixおよび-S9 mix)のいずれにおいても使用溶媒での10 mM相当を最高用量とした475, 950および1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の3用量(公比2)について染色体標本を作製した後、顕微鏡観察を実施した。短時間+S9 mix処理法の1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において、僅かではあるが染色体構造異常の誘発傾向が観察された。同処理法において1000, 1300, 1600および1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の4用量を用いた確認試験を2回繰り返して実施した結果、構造異常誘発頻度は1回目で各用量群2.5~3.5%であったが、2回目は4.0~6.5%の細胞に構造異常の誘発が認められた。一方、連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンC(MMC)および短時間+S9 mix処理の陽性対照物質シクロホスファミド(CP)は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。従って、本試験条件下の *in vitro* 試験系において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの染色体異常誘起性について疑陽性と判断した。

材料および方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK社)を10%添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3~5日ごとに継代した。なお、本染色体異常試験では解凍後継代数9の細胞を、確認試験においては同8および45の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM培地(LIFE TECHNOLOGIES社)を1000 mlの精製水で溶解した後、2.2 gの炭酸水素ナトリウム

(関東化学株)を加えた。1N塩酸を用いてpHを7.2に調整した後、メンブランフィルター(0.2 μm :Gelman Sciences社)を用いて加圧濾過除菌した。非働化(56 $^{\circ}\text{C}$, 30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終濃度で10%になるよう加えた後、試験に使用した。

3. 培養条件

CO₂インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機特機株)を用い、CO₂濃度5%、37 $^{\circ}\text{C}$ の条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン株製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成は松岡らの方法に従った。

5. 被験物質

被験物質のベンジルトリメチルアンモニウムクロリド(ロット番号:RSL9083, CAS No.:56-93-9)は分子式C₁₀H₁₆ClN, 分子量185.70, 純度99.0%以上の白色粉末である。和光純薬工業株から提供された被験物質を使用した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質溶液の調製

生理食塩液(株大塚製薬工場)に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質溶液を処理した。連続処理法の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理法ではS9 mix存在下(+S9 mix)あるいは非存在下(-S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

細胞を10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業株)で固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット(関東化学株)水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30%エタノール, 1%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、す

なわち細胞生存率を算出した。

その結果、連続処理法においては細胞増殖抑制作用が観察されたが、短時間処理法では明確な同作用は認められなかった(Fig. 1)。プロビット法を用いて算出した50%細胞増殖抑制濃度は連続24時間処理で1311 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、同48時間処理で585 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と算出された。また、短時間処理では1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上と考えられた。

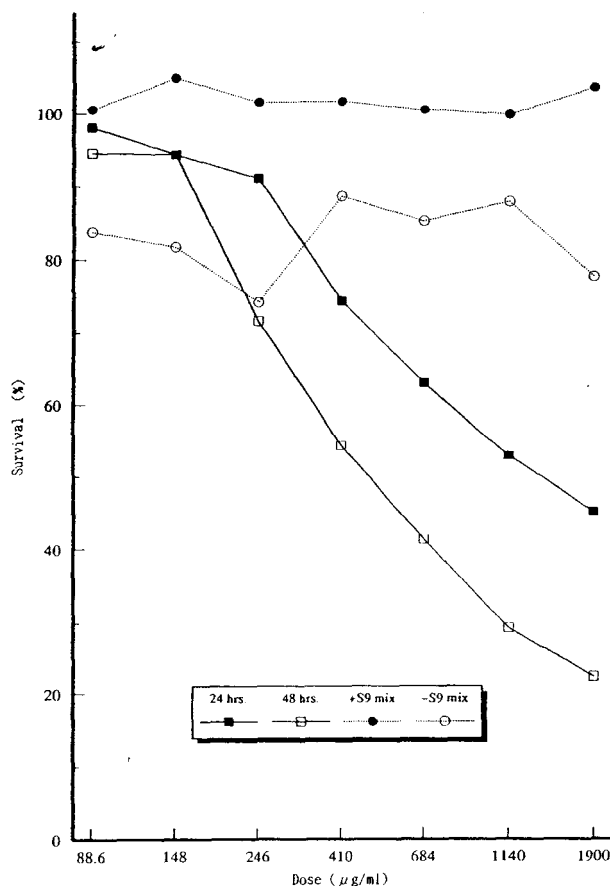


Fig. 1 Dose-survival curves of benzyltrimethylammonium chloride

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果を基に、染色体異常試験では連続処理法、短時間処理法とも10 mM相当の1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を高用量とし、以下公比2で減じた950および475 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の計3用量ならびに溶媒対照群を設定した。

陽性対照として、連続処理法の場合、マイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業(株))を、24時間処理で0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、48時間処理で0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で、短時間処理法の場合、シクロホスファミド(CP:塩野義製薬(株))を、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で試験した。

また、確認試験においては1000, 1300, 1600および1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の4用量(等差数列)を設定した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、予備試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃

度で0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようコルセミド(LIFE TECHNOLOGIES社)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.2%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)、染色体切断(csb)、染色分体交換(cte)、染色体交換(cse)およびその他(oth)の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。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²⁾による分類法に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、観察した。

11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めた場合(+gap)と、含まない場合(-gap)とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、石館ら³⁾の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が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。最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

連続処理群での試験結果をTable 1に示した。ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理群の場合、24時間ならびに48時間処理のいずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。短時間処理群での試験結果をTable 2に示した。被験物質処理群の場合、+S9 mix処理において高用量の1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においてのみ染色体の構造異常の出現頻度が5%を示し、疑陽性と判定された。再現性を調査するため確認試験を実施した結果、1回目の試験では染色体構造異常の誘発頻度が2.5~3.5%であり疑陽性の判定基準である5%を超えることはなかった(Table 3)。2回目の確認試験では被験物質処理群において僅かではあるが染色体の構造異常の増加傾向が観察された(Table 4)。また、陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。以上の試験結果から、本試験条件下においてベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、疑陽性と判定した。

Table 1. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with benzyltrimethylammonium chloride [long-term treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline*	0	24	200	2	1	1	1	0	0	2.5	1.5	2.5	-
Test Sub.	475	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-
	950	24	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-
	1900	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-
MMC**	0.05	24	200	25	76	1	97	1	0	71.0	69.0	1.0	+
Saline*	0	48	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.5	-
Test Sub.	475	48	200	1	1	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-
	950	48	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	1.5	-
	1900	48	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	3.0	-
MMC**	0.025	48	200	15	45	1	66	3	0	50.5	47.5	0.5	+

*: Solvent control **: Positive control (mitomycin C)

ctb: chromatid break csb: chromosome break cte: chromatid exchange cse: chromosome exchange oth: others

Table 2. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with benzyltrimethylammonium chloride [short-term treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline*	0	+	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.5	-
Test Sub.	475	+	6	200	0	0	0	3	0	0	1.5	1.5	0.0	-
	950	+	6	200	1	4	0	5	1	1	4.0	4.0	3.5	-
	1900	+	6	200	3	3	0	9	0	0	5.0	5.0	2.5	±
CP**	12.5	+	6	200	7	36	0	61	2	1	43.5	42.0	0.5	+
Saline*	0	-	6	200	2	0	0	0	1	0	1.5	0.5	0.5	-
Test Sub.	475	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-
	950	-	6	200	3	1	0	0	0	0	2.0	0.5	1.0	-
	1900	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	2.0	-
CP**	12.5	-	6	200	0	1	0	1	0	0	1.0	1.0	0.0	-

*: Solvent control **: Positive control (cyclophosphamide)

ctb: chromatid break csb: chromosome break cte: chromatid exchange cse: chromosome exchange oth: others

Table 3. Results of the confirmative examination using CHL cells of benzyltrimethylammonium chloride [short-term treatment: first trial]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline*	0	+	6	200	1	0	0	1	0	0	1.0	0.5	0.0	-
Test Sub.	1000	+	6	200	0	3	0	4	1	0	3.0	3.0	1.0	-
	1300	+	6	200	1	0	0	4	0	0	2.5	2.0	1.0	-
	1600	+	6	200	2	2	0	5	0	0	3.5	3.0	0.0	-
	1900	+	6	200	1	0	1	2	1	0	2.5	2.0	1.0	-
CP**	12.5	+	6	200	26	43	0	137	3	0	74.0	72.5	1.5	+

*: Solvent control **: Positive control (cyclophosphamide)
 ctb: chromatid break csb: chromosome break cte: chromatid exchange cse: chromosome exchange oth: others

Table 4. Results of the confirmative examination using CHL cells of benzyltrimethylammonium chloride [short-term treatment: second trial]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline*	0	+	6	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.0	-
Test Sub.	1000	+	6	200	1	2	0	8	0	0	4.0	4.0	0.0	-
	1300	+	6	200	2	2	0	9	0	0	5.0	4.5	0.5	±
	1600	+	6	200	1	2	0	10	0	0	5.5	5.5	0.0	±
	1900	+	6	200	0	2	0	12	0	1	6.5	6.5	1.0	±
CP**	12.5	+	6	200	11	37	0	116	0	0	63.0	62.0	1.0	+

*: Solvent control **: Positive control (cyclophosphamide)
 ctb: chromatid break csb: chromosome break cte: chromatid exchange cse: chromosome exchange oth: others

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat Res.*, **66**, 277 (1979).
- 2) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 31-35.
- 3) 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, 東京, 1987, pp. 19-24.

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓
 試験担当者: 北沢倫世, 菊池正憲, 板倉真由実
 (財)食品農医薬品安全性評価センター
 〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)
 Michiyo Kitazawa, Masanori Kikuchi
 Mayumi Itakura
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
 Pesticides (An-pyo Center)
 582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393