

Fig. 3 Food consumption change of male rats treated orally with 1-methylethenylbenzene in the combined reপর dose and reproductive/developmental toxicity screening test

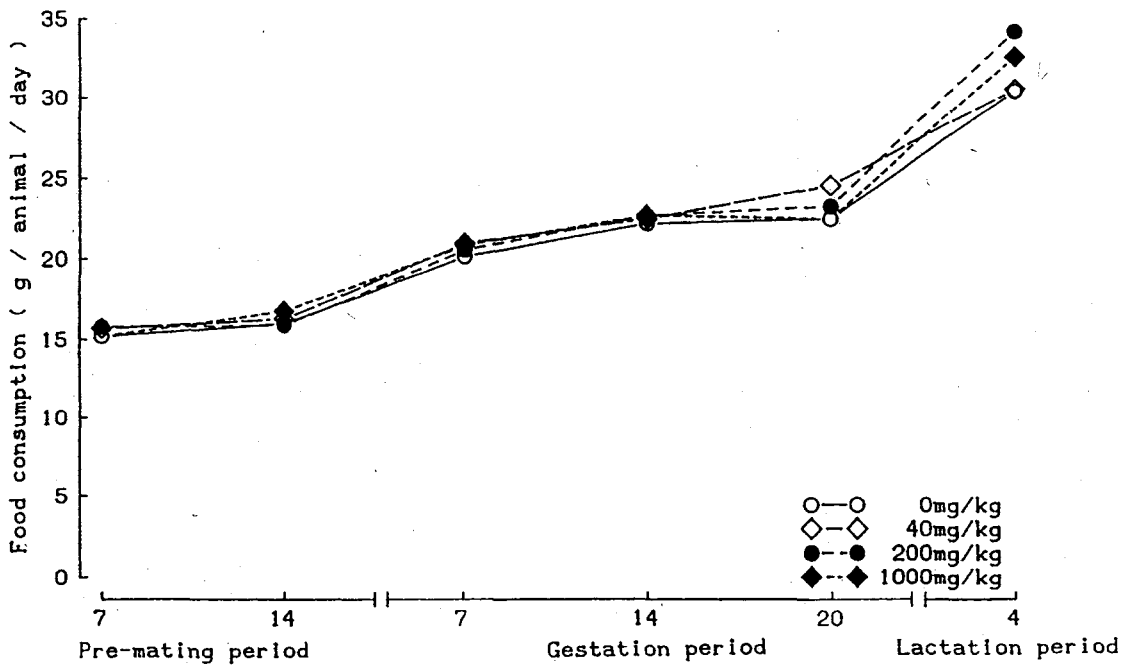


Fig. 4 Food consumption change of female rats treated orally with 1-methylethenylbenzene in the combined reপর dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Table 1 Hematological examination in male rats treated orally with 1-methylethenylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	40	200	1000
Number of animals	10	10	10	9
RBC (10 ⁴ /μl)	848 ± 37.7	885 ± 28.6	848 ± 40.0	865 ± 24.8
Ht(PCV) (%)	46.2 ± 2.10	47.4 ± 1.79	46.0 ± 2.07	45.9 ± 1.41
Hb (g/dl)	15.7 ± 0.65	16.1 ± 0.62	15.6 ± 0.72	15.6 ± 0.45
Reticulo (%)	25 ± 3.9	24 ± 2.7	27 ± 2.5	24 ± 2.0
MCV (μm ³)	54.5 ± 1.33	53.6 ± 1.37	54.2 ± 1.01	53.1 ± 1.67
MCH (pg)	18.5 ± 0.49	18.2 ± 0.56	18.4 ± 0.35	18.0 ± 0.59
MCHC (%)	33.9 ± 0.35	33.9 ± 0.28	33.8 ± 0.30	34.0 ± 0.38
Plt (10 ⁴ /μl)	94.8 ± 23.64	97.2 ± 13.91	96.8 ± 14.15	105.2 ± 7.77
WBC (10 ² /μl)	117 ± 30.0	93 ± 17.0	112 ± 26.5	109 ± 32.7
Differential leukocyte counts (%)				
Lymphocytes	83 ± 5.7	80 ± 4.8	81 ± 6.4	79 ± 8.9
Neutrophils				
segmented	13 ± 5.4	12 ± 5.5	10 ± 1.9	13 ± 7.0
band	1 ± 0.7	1 ± 1.1	0 ± 0.4	0 ± 0.7
Eosinophils	0 ± 0.7	1 ± 1.3	1 ± 0.8	1 ± 1.1
Basophils	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
Monocytes	3 ± 2.5	6 ± 2.5	8 ± 6.6	7 ± 4.7

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 2 Blood chemical examination in male rats treated orally with 1-methylethenylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	40	200	1000
Number of animals	10	10	10	9
GOT(AsT) (IU/l)	85 ± 22.1	87 ± 18.3	113 ± 49.9	99 ± 29.3
GPT(AIT) (IU/l)	22 ± 4.2	24 ± 4.6	43 ± 31.8 *	48 ± 24.4 **
γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.7
ALP (IU/l)	239 ± 37.5	279 ± 53.3	291 ± 75.9	269 ± 55.8
Total bilirbin (mg/dl)	0.1 ± 0.06	0.2 ± 0.05	0.1 ± 0.08	0.1 ± 0.08
Urea nitrogen (mg/dl)	14.0 ± 1.41	15.3 ± 1.83	14.2 ± 1.45	18.9 ± 3.63 **
Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.03	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.03
Glucose (mg/dl)	144 ± 13.4	136 ± 7.7	141 ± 8.9	130 ± 8.3 *
Total Chol. (mg/dl)	71 ± 12.6	73 ± 21.5	95 ± 15.4 *	83 ± 15.9
Triglyceride (mg/dl)	85 ± 39.2	68 ± 26.6	56 ± 17.1	36 ± 11.2 **
Total protein (g/dl)	6.56 ± 0.330	6.57 ± 0.267	6.68 ± 0.142	6.79 ± 0.282
Albumin (g/dl)	3.74 ± 0.104	3.77 ± 0.125	3.76 ± 0.078	3.87 ± 0.217
A/G ratio	1.34 ± 0.092	1.35 ± 0.098	1.29 ± 0.047	1.33 ± 0.081
Inorganic phos. (mg/dl)	7.5 ± 0.43	7.8 ± 0.23	7.6 ± 0.60	7.8 ± 0.46
Ca (mg/dl)	9.4 ± 0.23	9.5 ± 0.20	9.6 ± 0.24	9.5 ± 0.19
Na (mEq/l)	144 ± 0.8	144 ± 0.9	144 ± 1.2	144 ± 0.5
K (mEq/l)	4.4 ± 0.20	4.4 ± 0.18	4.5 ± 0.13	4.8 ± 0.14 **
Cl (mEq/l)	101 ± 0.8	102 ± 1.1	100 ± 1.2	100 ± 1.4 *

Values are expressed as Mean ± S.D.

*, Significantly different from the control group value at P<0.05

**, Significantly different from the control group value at P<0.01

Table 3 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 1-methylethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	40	200	1000
Male				
Number of animals	10	10	10	9
Body weight (g)	485 ± 27.3	482 ± 28.2	479 ± 24.3	435 ± 30.7 **
Absolute organ weight				
Thymus (mg)	338 ± 72.5	342 ± 78.3	359 ± 80.5	378 ± 90.4
Liver (g)	13.28 ± 1.756	13.10 ± 1.708	14.34 ± 1.286	15.87 ± 1.109 **
Kidneys (g)	2.80 ± 0.189	2.89 ± 0.289	3.05 ± 0.157	3.10 ± 0.158 *
Testes (g)	3.15 ± 0.246	3.29 ± 0.184	3.40 ± 0.211	3.34 ± 0.359
Epididymides (g)	1.18 ± 0.110	1.16 ± 0.094	1.13 ± 0.085	1.13 ± 0.147
Relative organ weight				
Thymus (mg%)	69 ± 12.0	71 ± 14.6	75 ± 17.5	86 ± 17.2
Liver (g%)	2.73 ± 0.221	2.71 ± 0.215	2.99 ± 0.172	3.66 ± 0.292 **
Kidneys (g%)	0.58 ± 0.051	0.60 ± 0.056	0.64 ± 0.036	0.72 ± 0.040 **
Testes (g%)	0.65 ± 0.073	0.68 ± 0.055	0.71 ± 0.063	0.77 ± 0.075 **
Epididymides (g%)	0.24 ± 0.027	0.24 ± 0.029	0.24 ± 0.022	0.26 ± 0.033
Female				
Number of animals	9	9	8	8
Body weight (g)	308 ± 14.1	314 ± 24.1	311 ± 18.8	291 ± 38.0
Absolute organ weight				
Thymus (mg)	221 ± 67.0	239 ± 45.7	181 ± 36.1	139 ± 48.2 *
Liver (g)	13.02 ± 1.071	13.61 ± 1.192	15.24 ± 1.017 *	16.16 ± 2.069 **
Kidneys (g)	1.84 ± 0.131	2.15 ± 0.474	2.17 ± 0.219	2.45 ± 0.191 **
Relative organ weight				
Thymus (mg%)	72 ± 21.0	76 ± 11.5	59 ± 11.6	47 ± 14.2 *
Liver (g%)	4.22 ± 0.248	4.34 ± 0.258	4.91 ± 0.283 **	5.55 ± 0.214 **
Kidneys (g%)	0.60 ± 0.038	0.69 ± 0.157	0.70 ± 0.060 *	0.86 ± 0.168 **

Values are expressed as Mean ± S.D.

*, Significantly different from the control group value at P<0.05

**, Significantly different from the control group value at P<0.01

Table 4 Summary of gross findings in rats treated orally with 1-methylethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ Findings	Sex	Male				Female			
	Dose (mg/kg/day)	0	40	200	1000	0	40	200	1000
Number of animals		10	10	10	9	10	10	10	10
Liver									
Dark reddish change		0	0	3	9	0	0	0	0
Enlargement		0	0	0	1	0	0	0	1
Kidneys									
Discoloration of the cortico-medullary junction		0	0	0	0	0	0	4	9
Enlargement		0	0	0	3	0	1	0	7
Urinary bladder									
Urinary calculus		0	0	0	3	0	0	0	0
Adrenals									
Enlargement		0	0	0	0	0	0	0	1
Grayish change		0	0	0	0	0	0	0	1
Testes									
Atrophy		1	0	0	0				
Thymus									
Atrophy		0	0	0	0	0	0	0	1
Spleen									
Atrophy		0	0	0	0	0	0	0	1
Skin									
Crust		0	0	0	1	0	0	0	0

膀胱では黄色の微細砂粒状の結石が1000 mg/kg群の雄のみに認められた。

副腎では腫大および灰白色化、胸腺では萎縮がそれぞれ1000 mg/kg群の雌に認められた。胸腺の萎縮が認められた1例では、脾臓の萎縮を伴っていた。

その他、片側精巣の萎縮が対照群の雄1例、皮膚の痂皮形成が1000 mg/kg群の雄1例に認められたが、その発現状況から偶発病変と判断した。

死亡した1000 mg/kg群の雄の1例では、膀胱が血様尿を大量に貯留して膨満し、直径1~2 mm大の膀胱結石が7~8個認められた。腎臓は腫大し、腎盂腔、尿管、膀胱ならびに膀胱に接している精囊および前立腺に顕著な出血が認められ、尿閉を起こしていたと思われた。その他肺水腫、脾臓の萎縮が認められた。

9)組織所見(Table 5)

計画解剖動物では、被験物質に起因する変化が雌雄の肝臓、腎臓および副腎、雄の膀胱、雌の胸腺に認められた。

肝臓では肝細胞の好酸性変化が200 mg/kg以上の群の雌雄に認められた。雄では微細顆粒状を呈した好酸性細胞が小葉全体にび漫性に認められ、それに伴って通常みられる脂肪滴が消失していた。一方、雌では小葉中心部に顕著にみられ、肝細胞はやや肥大していた。

腎臓では尿管上皮の硝子滴の増加が200 mg/kg以上の群の雄に認められ、そのほとんどの例が尿管上皮の好塩基性変化を伴っていた。また、尿管上皮の空胞化が200 mg/kg以上の群の雌に認められ、その周囲にリンパ球の浸潤がみられる例が数例あった。この空胞はオイルレッドO染色の結果、赤褐色に染まる脂肪滴であった。なお、剖検で腫大が認められた40 mg/kg群の雌1例の腎臓には本変化は認められなかった。

副腎では束状帯の微細あるいは粗大な脂肪滴の増加が1000 mg/kg群の雌雄に認められた。

膀胱では粘膜上皮の増生が1000 mg/kg群の雄に認められ、粘膜上皮層は正常な例の2~3倍に肥厚し、びらんと粘膜下織への炎症性細胞の浸潤を伴う例もあった。

胸腺では萎縮が200 mg/kg以上の群の雌に認められ、皮質と髄質の境界が不明瞭になっていた。

その他に認められた変化については、いずれも少数例であり、その発現状況から非特異的な偶発病変と考えられた。なお、非妊娠雌の卵巣には組織学的な変化は認められなかった。

死亡例では腎臓、尿管、膀胱、精囊および前立腺に出血がみられ、腎臓ではさらに尿管の拡張および腎乳頭の壊死が認められた。その他肺水腫および脾臓の萎縮も認められた。

2.生殖発生毒性

1)生殖機能(Table 6)

非妊娠動物が200 mg/kg群で1例、1000 mg/kg群で2例認められたが、交尾率および受胎率ともに対照群と被験物

質投与群との間に有意な差は認められなかった。また、各群ともほとんどの雌が交配開始後4日以内に発情期を示して交尾し、交尾所要日数および交尾成立までに逸した発情期の回数ともに有意な差は認められなかった。なお、対照群の雌1例は膣垢検査では交尾が確認されなかったが、剖検で受胎が判明した。

2)分娩・哺育状態(Table 7)

非分娩動物が40および200 mg/kg群で各1例認められたが、その他の母動物はいずれも正常な分娩を示した。妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率および分娩率には、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。なお、非分娩動物には、剖検で子宮内に着床痕のみが観察された。

哺育期間の観察において、1000 mg/kg群の2例で哺育1日に全新生児の死亡が観察された。これらの母動物のうち1例では新生児への授乳量が少なく、翌日には全新生児を食殺していた。また他の1例では、分娩日の哺育行動には異常はなく、授乳も観察されたが、全新生児が死亡した哺育1日に膣からの出血がみられ、翌日以降は膣と肛門周囲の汚れと哺育4日には自発運動の減少、削瘦、立毛が認められた。なお、この2例のうち1例は妊娠後期の体重増加抑制が顕著であり、他の1例も分娩後に著しい体重減少を示した。その他の母動物には異常は認められなかった。

3)新生児に及ぼす影響

(1)生存率(Table 7)

1000 mg/kg群では2腹の全新生児が死亡したため、有意差は認められなかったものの、4日生存率が若干低値を示した。しかし、他の腹では生後の死亡は認められなかった。出産児数、出生児数、性比および出生率には、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

(2)出生児の観察

いずれの群でも外表異常を示す新生児は認められなかった。生後の一般状態では200 mg/kg群の1例で哺育1日に体色の白色化と喘ぎ呼吸が観察されたのみで、その他の新生児には異常は認められなかった。

(3)体重(Table 7)

1000 mg/kg群において、哺育0日および4日の体重が、有意差は認められなかったものの、雌雄とも若干低値を示した。生後の体重増加量については、各被験物質投与群とも対照群とほぼ同様な値を示した。

(4)剖検

生存動物では、脳の出血点40 mg/kg群の1例、腎盂拡張が1000 mg/kg群の1腹の2例、尿管の拡張が200 mg/kg群の1例、1000 mg/kg群の1腹の7例に認められた。また、死亡動物では、全新生児が死亡した1000 mg/kg群の2腹で腎盂拡張が18例中7例に観察された。

Table 5 Summary of histopathological findings in rats treated orally with 1-methylethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ Findings	Sex Dose (mg/kg/day)	Male				Female			
		0	40	200	1000	0	40	200	1000
Number of animals		10	10	10	9	10	10	10	10
Heart									
Focal myocardial degeneration		3	*	*	2	0	*	*	0
Liver									
Acidophilic change of the hepatocytes		0	0	7	9	0	0	1	9
Microgranuloma		1	0	0	0	0	0	0	0
Kidneys									
Increase of hyaline droplets in the tubular epithelium		0	0	3	8	0	0	0	0
Basophilic change of the tubular epithelium		0	0	2	7	0	0	0	0
Vacuolation of the tubular epithelium		0	0	0	0	0	0	4	10
Infiltration of lymphocytes		0	0	0	0	0	0	0	3
Cystic dilatation of renal tubules		0	1	0	1	0	2	0	0
Focal scar		0	1	0	0	0	0	0	0
Nephroblastoma		0	0	0	0	0	1	0	0
Pyelectasis		0	0	0	0	0	1	0	0
Urinary bladder									
Hyperplasia of the mucosal epithelium		0	0	0	8	0	*	*	0
Focal erosion		0	0	0	2	0	*	*	0
Infiltration of inflammatory cells in submucosa		0	0	0	2	0	*	*	0
Adrenals									
Increase of fatty droplets in the fascicular zone		0	0	0	6	0	0	0	3
Testes									
Atrophy of seminiferous tubules		2	*	*	2				
Thymus									
Atrophy		*	*	*	*	0	0	1	5
Spleen									
Atrophy		0	*	*	0	0	*	*	1
Extramedullary hemopoiesis		0	*	*	0	2	*	*	1
Hemosiderosis		0	*	*	0	0	*	*	1
Skin									
Focal dermatitis		*	*	*	1/1#	*	*	*	*

#, Number of animals showing lesion / number of animals examined.

*, Not examined.

Table 6 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with 1-methylethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	40	200	1000
Number of pairs examined	10	10	10	10
Number of pairs with successful mating	10	10	10	10
Mating index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	10	10	9	8
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	100.0	90.0	80.0
Pairing days until mating	2.6 ± 1.13 ^{c)}	3.3 ± 1.25	2.9 ± 0.88	2.7 ± 1.34
Number of estrous stages without mating	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00

a) mating index (%) = (Number of pairs with successful mating / Number of pairs examined) × 100

b) fertility index (%) = (Number of pregnant animals / Number of pairs with successful mating) × 100

c) Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 7 Delivery and litter data in rats treated orally with 1-methylethylbenzene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	40	200	1000
Number of females examined	9	10	9	8
Number of females with live pups	9	9	8	8
Gestation index (%) ^{a)}	100.0	90.0	88.9	100.0
Gestation length (days)	22.1 ± 0.60 ^{f)}	22.3 ± 0.50	22.8 ± 0.46	22.1 ± 0.35
Number of corpora lutea	17.3 ± 2.55	16.0 ± 1.41	18.0 ± 3.12	17.1 ± 1.73
Number of implantation sites	15.9 ± 2.32	13.9 ± 4.65	15.1 ± 5.53	15.6 ± 1.30
Implantation index (%) ^{b)}	92.0	85.4	80.8	91.7
Delivery index (%) ^{c)}	90.4	84.6	83.3	86.5
Number of pups delivered	14.4 ± 2.92	13.0 ± 4.85	14.1 ± 5.73	13.6 ± 2.92
Number of live pups on day 0	14.4 ± 2.92	14.4 ± 1.74	15.9 ± 2.36	13.4 ± 3.07
Live birth index (%) ^{c)}	100.0	100.0	100.0	97.7
Sex ratio (male/female)	0.73(55/75)	0.60(49/81)	1.27(71/56)	0.79(48/59)
Number of live pups on day 4	14.3 ± 2.87	14.1 ± 1.27	15.3 ± 2.19	10.5 ± 6.65
Viability index on day 4 (%) ^{e)}	99.3	98.0	96.4	75.0
Body weight of pups (g)				
on day 0				
male	6.5 ± 0.57	6.7 ± 0.60	6.6 ± 0.65	5.7 ± 1.04
female	6.1 ± 0.48	6.2 ± 0.43	6.1 ± 0.63	5.4 ± 0.95
on day 4				
male	10.6 ± 1.33	10.7 ± 0.95	10.1 ± 1.68	9.6 ± 1.53
female	10.1 ± 1.12	9.9 ± 0.83	9.4 ± 1.48	9.1 ± 1.54
Body weight gain of pups (g)				
day 0 to 4				
male	3.9 ± 0.78	4.0 ± 0.78	3.8 ± 0.90	3.5 ± 0.75
female	3.7 ± 0.51	3.7 ± 0.69	3.6 ± 0.80	3.4 ± 0.85

a) Gestation index (%) = (Number of females with live pups / Number of pregnant females) × 100

b) Implantation index (%) = (Number of implantation sites / Number of corpora lutea) × 100

c) Delivery index (%) = (Number of pups delivered / Number of implantation sites) × 100

d) Live birth index (%) = (Number of live pups on day 0 / Number of pups delivered) × 100

e) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4 / Number of live pups on day 0) × 100

f) Values are expressed as Mean ± S.D.

考察

1. 反復投与毒性

被験物質の反復投与による影響として、1000 mg/kg群の雄では体重増加抑制、摂餌量減少および膀胱結石が認められ、1例が死亡した。死亡例には貧血および血尿とともに、膀胱に多量の結石と血様尿による膨満が認められたことから、膀胱結石により尿閉を引き起こし死亡したものと推察された。さらに生存動物の剖検でも雄には膀胱に結石が認められていることから、1000 mg/kg群の雄では被験物質により尿組成に変化を来し、結石を形成¹⁾したものと考えられる。雌でも妊娠後期に体重増加抑制の傾向が認められたが、死亡および膀胱結石は認められなかった。

腎臓および膀胱への影響として、腎臓では重量増加と組織変化が200 mg/kg以上の群の雌雄で、膀胱では粘膜上皮の増生が1000 mg/kg群の雄で認められた。腎臓の尿細管上皮に認められた硝子滴の増加は雄ラットに特異的な変化であり、炭水素化合物の投与により生じることが知られている^{2,3)}。また、硝子滴が過剰に沈着すると上皮は変性・壊死・脱落を生じ、その反応として好塩基性の再生性上皮が出現する^{2,3)}。本試験においてもこれと同様な一連の変化が認められたことから、他の炭水素化合物と同様な現象が生じたものと考えられる。また、雄の膀胱において認められた粘膜上皮の増生は、剖検時に観察された結石に起因する上皮の損傷に対する修復像と考えられる⁴⁾。雄の血液生化学検査で認められた尿素窒素およびカリウムの上昇については、膀胱結石による尿路障害、あるいは腎臓の組織変化に伴った機能障害に起因した変化である可能性が考えられる。

肝臓への影響として、雌雄で肝臓重量の増加および組織変化が、また雄でGPTの上昇が、200 mg/kg以上の群で認められた。一般に、本試験で認められた肝細胞の肥大および好酸性変化は、薬物投与によって薬物代謝酵素の誘導が惹起された際に認められることが知られており、生体の適応現象と考えられている^{5,6)}。しかし、雄では肝臓の脂肪滴の消失および血液生化学検査でトリグリセライドの低下が認められていることから、肝臓での適応範囲を超えて脂質代謝に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、雌で腎臓の尿細管上皮の脂肪化および雌雄で副腎束状帯の脂肪滴の増加も認められており、これらも脂質代謝への影響に関連した変化^{7,8)}と考えられる。

その他、胸腺の萎縮が200 mg/kg以上の群の雌で認められた。本変化についてはストレスにより認められる変化でもあり⁹⁾。本試験の雌では妊娠後期の体重増加抑制に加えて、分娩を経過することにより、動物が過剰なストレス状態にあった可能性が考えられる。

投与直後の流涎が、全被験物質投与群の雄および200 mg/kg以上の群の雌で認められたが、一部には投与直前から反射的に発現する例も観察されたことから、被験物質が有する刺激性¹⁰⁾あるいは物理的性状に起因したもので、毒性学的意義に乏しい変化と判断した。

2. 生殖発生毒性

親動物の検査において、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率には、被験物質に起因する変化は認められなかった。また、分娩にも異常は認められなかった。よって、被験物質による親動物の生殖機能および分娩への影響はないと考えられる。一方、哺育期間の観察において、1000 mg/kg群の母動物2例で全新生児死亡が認められた。これらの母動物には妊娠後期に顕著な体重増加抑制あるいは分娩後に全身状態の悪化がみられ、1例では新生児への授乳量の減少と食殺が認められた。このことから、この2例では顕著な母体毒性により、哺育機能に何らかの障害を来した可能性が考えられる。

新生児の検査において、出産児数、出產生児数、性比および出生率には被験物質の影響は認められなかったが、1000 mg/kg群で低体重および4日生存率低下の傾向が認められた。4日生存率の低下については、顕著な母体毒性を示した母動物2例の全新生児が死亡したことによるもので、それ以外の新生児には死亡は認められなかった。また、生存し得た新生児の体重はほぼ順調に増加したことから、新生児の死亡は、被験物質の新生児への直接的な影響よりも、母体毒性による二次的な影響である可能性が高いと考えられる。剖検において、1000 mg/kg群で腎盂拡張および尿管拡張が観察されたが、腎盂拡張は自然発生的にも認められる所見であり、また尿管拡張は1腹のみの発現であったことから、被験物質との関連は明らかでなかった。外表および一般状態では被験物質に起因する異常は認められなかった。

以上のように、本試験では反復投与による影響として、200 mg/kg以上の群で雌雄の腎臓、肝臓および雌の胸腺の組織変化が、また、1000 mg/kg群では雌雄の体重増加抑制、雄の死亡、雄の膀胱および雌雄の副腎の組織変化が認められた。生殖・発生に及ぼす影響として、親動物の生殖機能および分娩には異常は認められなかったが、1000 mg/kg群で母動物の哺育機能および新生児の発育への影響を示唆する変化が認められた。従って、本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雌雄とも40 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は親動物に対して雄が⁵1000 mg/kg/day、雌が⁵200 mg/kg/day、児動物に対しては200 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) C. Gopinath et al., "Atlas of experimental toxicological pathology," MTP Press Limited, Lancaster, 1987, pp. 87-90.
- 2) P. Greaves, "Histology of preclinical toxicity studies," Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 532-538.
- 3) 渡辺満利, "毒性病理学(前川昭彦, 林裕造編)," 地人書館, 東京, 1991, pp. 267-293.
- 4) E. Kunze, "Urinary system(Jones, T.C. ed.)," Springer-Verlag, Berlin, 1986, pp. 291-310.
- 5) P. Greaves, "Histology of preclinical toxicity studies," Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 393-441.

- 6) H.W. Altmann, "Drug-induced pathology(Grundmann, E. ed.)," Springer-Verlag, Berlin, 1980, pp. 71-76.
- 7) J.E. Fitzgerald et al., *Fund.Appl.Toxicol.*, 6, 520-531 (1986).
- 8) 榎本 眞, 赤崎兼義, "毒性病理学," ソフトサイエンス社, 東京, 1987, pp. 211-224.
- 9) C. Gopinath et al., "Atlas of experimental toxicological pathology," MTP Press Limited, Lancaster, 1987, pp. 122-126.
- 10) M.A. Wolf et al., *Arch.Ind.Health*, 14, 387-398 (1956).

連絡先

試験責任者：松浦郁夫
試験担当者：藤井佳代, 土谷 稔, 涌生ゆみ,
豊田直人, 高野克代
(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所
〒 314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors :Ikuo Matsuura (Study director)
Kayo Fujii, Minoru Tsuchitani, Yumi Wako,
Naoto Toyota, Katsuyo Takano
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Kashima
Laboratory
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun, Ibaraki,
314-02 Japan
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

1-メチルエチニルベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 1-Methylethenylbenzene on Bacteria

要約

既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、1-メチルエチニルベンゼンについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾ および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ を用い、S9 Mix無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験では、50~5000 µg/プレートで実施したところ、抗菌性が認められたので、本試験ではS9 Mix無添加および添加試験ともに12.5~400 µg/プレートの用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも溶媒対照群の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められなかったことから、1-メチルエチニルベンゼンは、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°C以下で凍結保存した。各検定菌は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子(pKM101)の有無についての特性確認を行った。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2 (Oxoid)を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37°C、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〕

1-メチルエチニルベンゼン (CAS No. 98-83-9) は、分子量118.19の無色透明液体である。純度99.6%のもの(ロット番号: 33041, 不純物不明 (0.4%), 三井石油化学工業

(株)製造)を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

1-メチルエチニルベンゼンは、ジメチルスルホキシド(以下DMSOと略、和光純薬工業(株))に50, 40あるいは4 mg/mlになるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし約3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

1-メチルエチニルベンゼンのDMSO溶液中での安定性試験を、本試験での低濃度 (0.125 mg/ml) および当研究所で同時に実施した染色体異常試験での高濃度 (46.0 mg/ml) の2濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後4時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均に対して、99.3および100%であった。

また、本試験IIに用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、0.125 mg/ml溶液の含量は既定濃度に対し、99.4~101%、4mg/ml溶液は、100~102%であった。

以上の結果から、1-メチルエチニルベンゼンはDMSO溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔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 : フリルフラマイド (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°Cで凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは蒸留水に溶解し、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 (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比10:1の割合で混合した。

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

* : WP2 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。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リットル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	0.2g
クエン酸・1水和物	2g
リン酸水素二カリウム	10g
リン酸一アンモニウム	1.92g
水酸化ナトリウム	0.66g
グルコース	20g
バクタアガー (Difco)	15g

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 mmol
塩化カリウム	33 mmol
グルコース-6-リン酸	5 mmol
NADH	4 mmol
NADPH	4 mmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 mmol

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

〔試験方法〕

プレート法を用いて、S9 Mix無添加および添加試験によって試験を行った。

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 0.5ml)、検定菌液0.1 mlおよびトッパアガー2mlを混和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Table1, 2に示した。培養は37°C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。

〔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無添加あるいは添加試験において、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〕

1-メチルエチルベンゼンについて、50~5000 µg/プレートの範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、

すべての検定菌においてS9 Mix無添加および添加試験の500 µg/プレート以上の用量で抗菌性が認められた。そこで、400 µg/プレート以下の用量で再度、用量設定試験を実施したが、200あるいは400 µg/プレートでも抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量を、すべての検定菌において、S9 Mix無添加および添加試験ともに400 µg/プレートとすることとした。

〔本試験〕

結果をTable1, 2に示した。1-メチルエチルベンゼンについて、すべての検定菌について、S9 Mix無添加および添加試験ともに12.5~400 µg/プレートの範囲で、公比を2とし、試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌のS9 Mix無添加および添加試験のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。また、すべての検定菌において、高用量の1~2群において、抗菌性が認められた。

以上の結果に基づき、1-メチルエチルベンゼンは、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。

文献

- 1) D.M. Maron, and B.N. Ames, *Mutation Research.*, 113, 173 (1983).
- 2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds., 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：坂本京子, 堀谷尚古, 川上久美子,
 松木容彦, 飯田さやか, 中込まどか
 (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 :Tohru Shibuya (Study Director)
 Kyoko Sakamoto, Naoko Horiya,
 Kumiko Kawakami, Yasuhiko Matsuki,
 Sayaka Iida and Madoka Nakagomi
 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

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of 1-Methylethybenzene** 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			WP2 <i>uvr</i> A			TA98			TA1537			
S9 Mix (-)	0	120	106	122	7	12	16	19	15	19	17	19	14	4	6	8	
		(116 \pm 8.7)			(12 \pm 4.5)			(18 \pm 2.3)			(17 \pm 2.5)			(6 \pm 2.0)			
	12.5	113	130	115	8	16	7	13	17	16	23	14	6	6	6	4	
		(119 \pm 9.3)			(10 \pm 4.9)			(15 \pm 2.1)			(14 \pm 8.5)			(5 \pm 1.2)			
	25	133	118	118	9	13	5	20	17	23	23	15	15	5	3	2	
		(123 \pm 8.7)			(9 \pm 4.0)			(20 \pm 3.0)			(18 \pm 4.6)			(3 \pm 1.5)			
	50	125	134	131	15	9	9	17	17	11	16	23	28	6	3	6	
	(130 \pm 4.6)			(11 \pm 3.5)			(15 \pm 3.5)			(22 \pm 6.0)			(5 \pm 1.7)				
100	106	111	105	6	5	9	15	13	12	19	21	8	4	7	3		
	(107 \pm 3.2)			(7 \pm 2.1)			(13 \pm 1.5)			(16 \pm 7.0)			(5 \pm 2.1)				
200	119 *	102 *	119 *	6 *	8 *	9 *	15 *	11 *	12 *	16 *	14 *	14 *	6 *	6 *	1 *		
	(113 \pm 9.8)			(8 \pm 1.5)			(13 \pm 2.1)			(15 \pm 1.2)			(4 \pm 2.9)				
400	126 *	107 *	106 *	5 *	4 *	4 *	7 *	13 *	9 *	8 *	13 *	17 *	3 *	5 *	2 *		
	(113 \pm 11.3)			(4 \pm 0.6)			(10 \pm 3.1)			(13 \pm 4.5)			(3 \pm 1.5)				
S9 Mix (+)	0	117	119	148	13	8	12	21	13	17	21	30	39	7	12	7	
		(128 \pm 17.3)			(11 \pm 2.6)			(17 \pm 4.0)			(30 \pm 9.0)			(9 \pm 2.9)			
	12.5	138	110	123	11	10	17	24	21	17	26	29	28	16	10	11	
		(124 \pm 14.0)			(13 \pm 3.8)			(21 \pm 3.5)			(28 \pm 1.5)			(12 \pm 3.2)			
	25	123	147	132	17	17	9	15	17	24	31	29	23	15	14	8	
		(134 \pm 12.1)			(14 \pm 4.6)			(19 \pm 4.7)			(28 \pm 4.2)			(12 \pm 3.8)			
	50	134	129	138	19	6	10	19	19	19	34	33	28	11	11	6	
	(134 \pm 4.5)			(12 \pm 6.7)			(19 \pm 0.0)			(32 \pm 3.2)			(9 \pm 2.9)				
100	106	141	120	15	10	7	14	15	17	28	26	17	7	9	8		
	(122 \pm 17.6)			(11 \pm 4.0)			(15 \pm 1.5)			(24 \pm 5.9)			(8 \pm 1.0)				
200	117	120	117	12	12	10	16	18	16	22	30	31	4 *	8 *	11 *		
	(118 \pm 1.7)			(11 \pm 1.2)			(17 \pm 1.2)			(28 \pm 4.9)			(8 \pm 3.5)				
400	100 *	101 *	128 *	4 *	5 *	5 *	16 *	27 *	14 *	27 *	26 *	22 *	8 *	8 *	6 *		
	(110 \pm 15.9)			(5 \pm 0.6)			(19 \pm 7.0)			(25 \pm 2.6)			(7 \pm 1.2)				
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
	Number of colonies / plate	1132	1168	1165	262	221	218	636	744	884	345	422	418	198	234	228	
		(1155 \pm 20.0)			(234 \pm 24.6)			(755 \pm 124.3)			(395 \pm 43.3)			(220 \pm 19.3)			

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.

**: Purity was 99.6 %.