

## 既存化学物質の人健康影響に関する情報

(平成21年12月18日開催)

官報公示 整理番号	CAS No.	物質名称	試験名				頁
			Ames	染色体	28日間	Reprotax	
4-96	42240-73-3	2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン	○	○	○		1
2-140	75-50-3	トリメチルアミン	○	○		○	77
2-186	75-59-2	テトラメチルアンモニウムヒドロキシド	○	○	○		103
2-1065	79-39-0	メタクリルアミド	○	○	○		122
2-608	88-09-5	2-エチル酪酸	○	○		○	144
3-1183	90-02-8	2-ヒドロキシベンズアルデヒド	○	○		○	167
5-56	97-99-4	テトラメチルフルフリルアルコール	○	○	○		188
3-2259	101-83-7	ジシクロヘキシルアミン	○	○	○		209
2-235	110-63-4	1,4-ブタンジオール	○	○		○	231
3-959	118-79-6	2,4,6-トリブロモフェノール	○	○		○	255
3-500	123-07-9	4-エチルフェノール	○	○	○		282
2-1541	126-98-7	メタクリロニトリル	○	○		○	303
2-1291 2-2709	683-10-3	N,N-ジメチル-N-ドデシルグリシン (N-カルボキシメチル-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウム)	○	○		○	325
2-1044	868-77-9	メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステル	○	○		○	351
2-2583	2439-35-2	アクリル酸2-(ジメチルアミノ)エチルエステル	○	○		○	374
2-1047	2867-47-2	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート	○	○		○	396

要 約

当該試験条件下において、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンには遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判定した。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの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 株, TA98 株, TA1535 株および TA1537 株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株を用いた復帰突然変異試験を行った。

その結果、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、0.610 ~ 5000  $\mu\text{g}$ /プレート of いずれの用量においても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、陰性対照の 2 倍を超える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

陽性対照物質は、各試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。

また、用量設定試験、本試験および本試験 (追加試験) により、試験結果の再現性が確認された。

#### 13.11. 結果の解析

平均復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に、陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は、実施しなかった。

#### 14. 試験結果

##### 14.1. 用量設定試験

結果を Figure 1~5 および Table 1, 2 に示す。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、-S9 処理ならびに +S9 処理のいずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、-S9 処理の全菌株の低用量あるいは中用量以上の用量において、+S9 処理の TA100 株および TA1537 株の高用量において、試験菌株に対する生育阻害作用が認められた。

陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

##### 14.2. 被験物質の析出等 (用量設定試験)

処理開始時に、-S9 処理および+S9 処理ともに 128  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で反応液に白濁および白色粉末状の析出物が観察された。プレインキュベーション後、-S9 処理では 128~320  $\mu\text{g}$ /プレートの用量、+S9 処理では 128  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量において、処理開始時に認められた白濁が消失していた。さらに、+S9 処理の 20.5  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、2000  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色塊状の析出物が認められた。

コロニー数計測時では、-S9 および+S9 処理ともに 128  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物がみられ、さらに、+S9 処理の 5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で白色塊状の析出物が観察された。

析出物の影響により、-S9 処理の 2000  $\mu\text{g}$ /プレート以上および+S9 処理の 320  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量では、コロニーアナライザーの使用が不相当と判断し、目視によりコロニー数を計数した。

##### 14.3. 本試験

結果を Figure 6~10 および Table 3, 4 に示す。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、-S9 処理の TA100 株および TA1537 株では 19.5  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で、TA1535 株および TA98 株では 39.1  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で、WP2uvrA 株では 625  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で、

また、+S9 処理の TA100 株および TA1537 株では 1250  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で認められた。

陽性対照物質は、試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

#### 14.4. 被験物質の析出等 (本試験)

処理開始時に、-S9 処理の 78.1  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で、また、+S9 処理の 156  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で反応液に白濁および白色粉末状の析出物が観察された。プレインキュベーション後、-S9 および+S9 処理の処理開始時に認められた白濁は消失していた。さらに、+S9 処理の 39.1  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物が、1250  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色塊状の析出物が認められた。

コロニー数計測時では、-S9 および+S9 処理ともに 78.1  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色粉末状の析出物がみられ、さらに、+S9 処理の 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量で白色塊状の析出物が観察された。

析出物の影響により、+S9 処理の 156  $\mu\text{g}$ /プレート以上の用量では、コロニーアナライザーの使用が不適当と判断し、目視によりコロニー数を計数した。

#### 14.5. 本試験 (追加試験)

結果を Figure 11~14 および Table 5 に示す。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、いずれの試験菌株においても、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、TA100 株および TA1537 株では 25.0  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で、TA1535 株および TA98 株では 50.0  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で認められた。

陽性対照物質は、各試験菌株に対して復帰突然変異を顕著に誘発した。

#### 14.6. 被験物質の析出等 (本試験-追加試験)

処理開始時およびコロニー数計測時において、被験物質の析出等の特筆すべき変化は、認められなかった。

## 15. 考察および結論

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの遺伝子突然変異誘発性を検討するため、細菌（ネズミチフス菌・大腸菌）を用いたプレインキュベーション法による復帰突然変異試験を実施した。

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/プレートあるいは試験菌株の生育を阻害を示す用量を設定し、試験を行った。その結果、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、-S9 処理および+S9 処理の全ての試験菌株において、陰性対照と比較し、2 倍を超える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

これら両処理法での試験結果は、用量設定試験、本試験および本試験（追加試験）により、再現性が確認された。

陰性対照および陽性対照の平均復帰変異コロニー数は、いずれも当施設の背景データ（Appendix 1）から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の結果から、当該試験条件下において、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンには遺伝子突然変異を誘起する作用がないものと判定した。

なお、これまでに被験物質 2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンについての遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告は得られていない。

類縁体である 4,4'-メチレンビス（2-クロロアニリン）は、人において発がん性を示し<sup>1)~3)</sup>、遺伝子損傷を引き起こす<sup>4)~6)</sup>ことが報告されている。さらに、細菌を用いる復帰変異試験で陽性<sup>7)</sup>との報告があり、ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験で数的異常を誘発する<sup>8)</sup>ことも報告されている。

## 16. 参考文献

- 1) IARC: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 57: p.271-303. International Agency for Research on Cancer, Lyon. Also, 1993, Suppl.7: 246-247.
- 2) Ward E, Smith AB, Haiperin W.: 4,4'-Methylenebis (2-chloroaniline): an unregulated carcinogen. Am J Ind Med. 1987, 12(5): 537-549.
- 3) Ward E, Haiperin W, Thun M, Grossman HB, Fink B, Koss L, Osorio AM, Schulte P.: Bladder tumors in two young males occupationally exposed to MBOCA. Am J Ind Med. 1988, 14(3): 267-272.
- 4) McQueen CA, Williams GM.: Review of the genotoxicity and carcinogenicity of 4,4'-methylene-dianiline and 4,4'-methylene-bis -2-chloroaniline. Mutat. Res. 1990, 239(2): 133-142.

Table 1. Summary data on dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
[Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	90	104	117	12	10	8	18	19	16	12	18	15	11	7	13
		[ 104	$\pm$	14 ]	[ 10	$\pm$	2 ]	[ 18	$\pm$	2 ]	[ 15	$\pm$	3 ]	[ 10	$\pm$	3 ]
2,2',3,3'- tetrachloro-	8.19	89	98	97	8	12	14	14	10	13	16	20	18	10	7	8
		[ 95	$\pm$	5 ]	[ 11	$\pm$	3 ]	[ 12	$\pm$	2 ]	[ 18	$\pm$	2 ]	[ 8	$\pm$	2 ]
4,4'-diamino diphenylmethane	20.5	81*	70*	73*	9	12	12	13	9	12	23	22	21	6*	6*	6*
		[ 75	$\pm$	6 ]	[ 11	$\pm$	2 ]	[ 11	$\pm$	2 ]	[ 22	$\pm$	1 ]	[ 6	$\pm$	0 ]
	51.2	75*	73*	70*	12*	8*	9*	14	16	13	23*	17*	21*	7*	4*	5*
		[ 73	$\pm$	3 ]	[ 10	$\pm$	2 ]	[ 14	$\pm$	2 ]	[ 20	$\pm$	3 ]	[ 5	$\pm$	2 ]
	128 +	87*	82*	87*	8*	12*	7*	15	15	12	16*	20*	18*	11*	6*	6*
		[ 85	$\pm$	3 ]	[ 9	$\pm$	3 ]	[ 14	$\pm$	2 ]	[ 18	$\pm$	2 ]	[ 8	$\pm$	3 ]
	320 +	84*	73*	78*	10*	14*	11*	11*	13*	16*	24*	20*	23*	8*	5*	9*
		[ 78	$\pm$	6 ]	[ 12	$\pm$	2 ]	[ 13	$\pm$	3 ]	[ 22	$\pm$	2 ]	[ 7	$\pm$	2 ]
	800 +	86*	98*	90*	11*	11*	11*	12*	11*	19*	20*	19*	14*	6*	12*	6*
		[ 91	$\pm$	6 ]	[ 11	$\pm$	0 ]	[ 14	$\pm$	4 ]	[ 18	$\pm$	3 ]	[ 8	$\pm$	3 ]
	2000 +	91*	99*	80*	10*	8*	8*	16*	12*	17*	16*	11*	14*	6*	6*	4*
		[ 90	$\pm$	10 ]	[ 9	$\pm$	1 ]	[ 15	$\pm$	3 ]	[ 14	$\pm$	3 ]	[ 5	$\pm$	1 ]
	5000 +	86#	93#	86#	6#	6#	10#	12#	12#	19#	10#	11#	9#	5#	5#	4#
		[ 88	$\pm$	4 ]	[ 7	$\pm$	2 ]	[ 14	$\pm$	4 ]	[ 10	$\pm$	1 ]	[ 5	$\pm$	1 ]
Positive control compound		AF-2			NaN <sub>3</sub>			AF-2			AF-2			9-AA		
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Revertant colonies		743	710	697	654	559	583	99	110	121	671	638	641	282	361	391
per plate		[ 717	$\pm$	24 ]	[ 599	$\pm$	49 ]	[ 110	$\pm$	11 ]	[ 650	$\pm$	18 ]	[ 345	$\pm$	56 ]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide      NaN<sub>3</sub>: Sodium azide      9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

# : The growth of background lawn of bacteria can't be observed by visible precipitation.

Table 2. Summary data on dose-finding study of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
[Activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	113 [ 105	103 $\pm$	100 7 ]	7 8	8 $\pm$	10 2 ]	17 21	23 $\pm$	23 3 ]	22 22	20 $\pm$	24 2 ]	11 10	10 $\pm$	8 2 ]
2,2',3,3'- tetrachloro-	8.19	149 [ 140	137 $\pm$	133 8 ]	8 10	11 $\pm$	11 2 ]	23 20	20 $\pm$	16 4 ]	27 28	27 $\pm$	31 2 ]	15 14	12 $\pm$	16 2 ]
4,4'-diamino diphenylmethane	20.5	156 [ 146	143 $\pm$	140 9 ]	9 10	12 $\pm$	9 2 ]	12 16	14 $\pm$	21 5 ]	26 30	32 $\pm$	33 4 ]	8 12	17 $\pm$	12 5 ]
	51.2	155 [ 148	149 $\pm$	141 7 ]	12 11	8 $\pm$	14 3 ]	24 20	18 $\pm$	17 4 ]	34 33	32 $\pm$	33 1 ]	11 10	6 $\pm$	14 4 ]
	128 +	145 [ 140	137 $\pm$	137 5 ]	13 12	9 $\pm$	15 3 ]	31 28	25 $\pm$	29 3 ]	32 30	30 $\pm$	29 2 ]	6 10	10 $\pm$	13 4 ]
	320 +	130 [ 127	121 $\pm$	131 6 ]	11 12	13 $\pm$	12 1 ]	22 20	21 $\pm$	16 3 ]	30 26	25 $\pm$	23 4 ]	8 10	10 $\pm$	12 2 ]
	800 +	127* [ 129	134* $\pm$	127* 4 ]	9 11	10 $\pm$	13 2 ]	18 20	21 $\pm$	20 2 ]	24 27	31 $\pm$	26 4 ]	7 9	11 $\pm$	9 2 ]
	2000 +	131* [ 125	121* $\pm$	124* 5 ]	10 9	7 $\pm$	11 2 ]	19 20	19 $\pm$	21 1 ]	26 28	28 $\pm$	30 2 ]	5* 4	5* $\pm$	3* 1 ]
	5000 +	127* [ 132	135* $\pm$	134* 4 ]	13 15	15 $\pm$	16 2 ]	14 16	19 $\pm$	14 3 ]	27 26	26 $\pm$	24 2 ]	6* 6	7* $\pm$	6* 1 ]
Positive control compound		2-AA			2-AA			2-AA			2-AA			2-AA		
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		1			2			10			0.5			2		
Revertant colonies per plate		1253 [ 1225	1177 $\pm$	1246 42 ]	394 389	406 $\pm$	367 20 ]	730 762	795 $\pm$	760 33 ]	332 342	371 $\pm$	324 25 ]	210 205	192 $\pm$	213 11 ]

2-AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	113 [ 114	119 $\pm$	109 5 ]	14 [ 16	18 $\pm$	17 2 ]	31 [ 28	31 $\pm$	22 5 ]	19 [ 21	26 $\pm$	19 4 ]	7 [ 8	7 $\pm$	9 1 ]
2,2',3,3'- tetrachloro-	0.610	121 [ 122	121 $\pm$	123 1 ]										6 [ 6	5 $\pm$	6 1 ]
4,4'-diamino diphenylmethane	1.22	107 [ 105	99 $\pm$	109 5 ]										13 [ 9	8 $\pm$	7 3 ]
	2.44	112 [ 111	113 $\pm$	108 3 ]	13 [ 12	13 $\pm$	11 1 ]				24 [ 20	18 $\pm$	19 3 ]	9 [ 11	9 $\pm$	14 3 ]
	4.88	109 [ 103	97 $\pm$	104 6 ]	12 [ 14	16 $\pm$	13 2 ]				30 [ 22	16 $\pm$	20 7 ]	6 [ 8	6 $\pm$	11 3 ]
	9.77	84 [ 92	93 $\pm$	99 8 ]	8 [ 8	7 $\pm$	8 1 ]				18 [ 20	25 $\pm$	18 4 ]	8 [ 10	12 $\pm$	9 2 ]
	19.5	106* [ 91	80* $\pm$	87* 13 ]	10 [ 12	14 $\pm$	11 2 ]	22 [ 25	27 $\pm$	27 3 ]	22 [ 21	22 $\pm$	19 2 ]	5* [ 5	6* $\pm$	5* 1 ]
	39.1	70* [ 71	68* $\pm$	75* 4 ]	9* [ 8	9* $\pm$	5* 2 ]	34 [ 26	23 $\pm$	21 7 ]	18* [ 18	19* $\pm$	17* 1 ]	7* [ 5	4* $\pm$	3* 2 ]
	78.1 +				14* [ 14	17* $\pm$	10* 4 ]	26 [ 24	23 $\pm$	23 2 ]	20* [ 21	20* $\pm$	24* 2 ]			
	156 +							20 [ 20	23 $\pm$	18 3 ]						
	313 +							20 [ 21	25 $\pm$	18 4 ]						
	625 +							36* [ 31	30* $\pm$	26* 5 ]						

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.



Table 3. Continued

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]																		
		TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537										
Positive control compound	AF-2	AF-2		NaN <sub>3</sub>		AF-2		AF-2		9-AA										
Dose( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.01		0.5		0.01		0.1		80										
Revertant colonies per plate [	639	731	644	663	605	564	127	148	126	697	596	695	295	305	295					
	671	$\pm$	52	]]	611	$\pm$	50	]]	134	$\pm$	12	]]	663	$\pm$	58	]]	298	$\pm$	6	]
AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide		NaN <sub>3</sub> : Sodium azide				9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride														

Table 4. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane [Non-activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]																
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537				
DMSO a)	0	114	122	119	15	11	12	26	43	36	18	32	25	19	17	16		
		[ 118	$\pm$	4 ]	[ 13	$\pm$	2 ]	[ 35	$\pm$	9 ]	[ 25	$\pm$	7 ]	[ 17	$\pm$	2 ]		
2,2',3,3'- tetrachloro-	39.1	152	177	154														
		[ 161	$\pm$	14 ]														
4,4'-diamino diphenylmethane	78.1 +	139	168	168										20	17	14		
		[ 158	$\pm$	17 ]										[ 17	$\pm$	3 ]		
	156 +	120	136	138	15	16	11	33	31	36	36	30	36	10	12	18		
		[ 131	$\pm$	10 ]	[ 14	$\pm$	3 ]	[ 33	$\pm$	3 ]	[ 34	$\pm$	3 ]	[ 13	$\pm$	4 ]		
	313 +	149	140	148	9	9	7	21	29	30	36	33	38	10	12	13		
		[ 146	$\pm$	5 ]	[ 8	$\pm$	1 ]	[ 27	$\pm$	5 ]	[ 36	$\pm$	3 ]	[ 12	$\pm$	2 ]		
	625 +	145	147	129	11	13	14	26	27	29	25	27	31	10	13	15		
		[ 140	$\pm$	10 ]	[ 13	$\pm$	2 ]	[ 27	$\pm$	2 ]	[ 28	$\pm$	3 ]	[ 13	$\pm$	3 ]		
	1250 +	132*	136*	139*	11	14	16	20	22	30	17	23	23	8*	8*	9*		
		[ 136	$\pm$	4 ]	[ 14	$\pm$	3 ]	[ 24	$\pm$	5 ]	[ 21	$\pm$	3 ]	[ 8	$\pm$	1 ]		
	2500 +				18	18	17	20	23	32	21	22	30	5*	5*	7*		
					[ 18	$\pm$	1 ]	[ 25	$\pm$	6 ]	[ 24	$\pm$	5 ]	[ 6	$\pm$	1 ]		
	5000 +				20	16	18	27	26	32	24	30	23					
					[ 18	$\pm$	2 ]	[ 28	$\pm$	3 ]	[ 26	$\pm$	4 ]					
Positive control compound	2-AA	2-AA			2-AA			2-AA			2-AA			2-AA				
Dose( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2			10			0.5			2							
Revertant colonies	1490	1290	1320	468	504	469	833	876	909	499	438	514	236	194	187			
per plate	[ 1367	$\pm$	108 ]	[ 480	$\pm$	21 ]	[ 873	$\pm$	38 ]	[ 484	$\pm$	40 ]	[ 206	$\pm$	27 ]			

2-AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )

\* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 5. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Non-activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]											
		TA100			TA1535			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	99 [ 102	111 $\pm$	96 8 ]	17 [ 17	15 $\pm$	20 3 ]	19 [ 19	20 $\pm$	19 1 ]	13 [ 13	10 $\pm$	16 3 ]
2,2',3,3'- tetrachloro-	0.781	82 [ 89	90 $\pm$	96 7 ]							7 [ 9	10 $\pm$	10 2 ]
4,4'-diamino diphenylmethane	1.56	113 [ 105	92 $\pm$	111 12 ]	13 [ 13	14 $\pm$	11 2 ]	28 [ 25	26 $\pm$	20 4 ]	16 [ 14	15 $\pm$	12 2 ]
	3.13	101 [ 104	98 $\pm$	112 7 ]	11 [ 10	8 $\pm$	10 2 ]	22 [ 20	23 $\pm$	16 4 ]	11 [ 12	10 $\pm$	15 3 ]
	6.25	88 [ 99	93 $\pm$	117 16 ]	12 [ 14	16 $\pm$	15 2 ]	22 [ 20	20 $\pm$	18 2 ]	11 [ 10	12 $\pm$	8 2 ]
	12.5	83 [ 85	76 $\pm$	96 10 ]	9 [ 7	6 $\pm$	7 2 ]	20 [ 19	20 $\pm$	16 2 ]	10 [ 7	6 $\pm$	5 3 ]
	25.0	82* [ 82	84* $\pm$	79* 3 ]	9 [ 9	12 $\pm$	5 4 ]	14 [ 15	18 $\pm$	14 2 ]	9* [ 7	5* $\pm$	7* 2 ]
	50.0				8* [ 8	9* $\pm$	6* 2 ]	15* [ 18	22* $\pm$	16* 4 ]			
Positive control compound		AF-2			NaN <sub>3</sub>			AF-2			9-AA		
Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		0.01			0.5			0.1			80		
Revertant colonies		549	553	511	610	636	674	647	614	606	428	452	423
per plate		[ 538	$\pm$	23 ]	[ 640	$\pm$	32 ]	[ 622	$\pm$	22 ]	[ 434	$\pm$	16 ]

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide      NaN<sub>3</sub>: Sodium azide      9-AA: 9-Aminoacridine hydrochloride  
a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100  $\mu\text{L}/\text{plate}$ )  
\* : Growth inhibition was observed.

要 約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンは、染色体異常を誘起しないものと判定された

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果に基づいて染色体異常試験 (本試験) の濃度を設定したが、いずれの処理法においても、相対細胞増殖率が 50%未満の処理濃度では、重度の細胞増殖抑制あるいは分裂細胞の減少により、顕微鏡観察が不可能であった。したがって、本結果に基づいて、染色体異常試験 (追加試験) を実施した。短時間処理法-S9 処理では 68.6, 98.0 および 140  $\mu\text{g/mL}$ 、同+S9 処理では 63.7, 91.0 および 130  $\mu\text{g/mL}$  のそれぞれ3濃度について顕微鏡観察を実施した。その結果、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても、明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

以上の結果より、連続処理法 24 時間処理群では 31.2, 44.6, 63.7 および 91.0  $\mu\text{g/mL}$  の4濃度について顕微鏡観察を実施したが、当条件下においても2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理による染色体異常の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の陽性対照物質マイトマイシン C (MMC) ならびに短時間処理法+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) では、いずれも染色体構造異常を陰性対照と比較して高頻度に誘発した。

14. 試験結果

14.1. 細胞増殖抑制試験

14.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示す。

短時間処理法-S9 処理および+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理の全てにおいて、濃度依存的に細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、それぞれ 123, 459 および 61.2 µg/mL と算出された。

14.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時、短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の 420~1680 µg/mL の濃度において白濁、420 µg/mL 以上の濃度において白色粉末状、さらに、1680 µg/mL 以上の濃度において白色塊状の析出物が認められた。また、短時間処理法+S9 処理では、840~1680 µg/mL の濃度において白濁、840 µg/mL 以上の濃度において白色粉末状、さらに、1680 µg/mL 以上の濃度において白色塊状の析出物が認められた。

被験物質処理終了時、短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の 105 µg/mL 以上の濃度においては白色粉末状、さらに、210 µg/mL 以上の濃度において白色塊状の析出物が認められた。また、短時間処理法+S9 処理では、210~1680 µg/mL の濃度において白色膜状、210 µg/mL 以上の濃度において白色粉末状、さらに、420 µg/mL 以上の濃度において白色塊状の析出物が認められた。

14.2. 染色体異常試験 (本試験)

各処理法の相対細胞増殖率を下記に示す。相対細胞増殖率が 50%未満を示した処理濃度において、短時間処理法では重度の細胞増殖抑制のために、連続処理法 24 時間処理では重度の分裂細胞の減少のために染色体観察ができなかった。したがって、染色体異常試験 (追加試験) を実施することとし、本試験の標本は観察しなかった。

-S9 処理		+S9 処理		24 時間処理	
処理濃度 (µg/mL)	相対細胞増殖率 (%)	処理濃度 (µg/mL)	相対細胞増殖率 (%)	処理濃度 (µg/mL)	相対細胞増殖率 (%)
15.6	94.5	31.3	90.8	7.81	98.1
31.3	78.3	62.5	89.4	15.6	105.6
62.5	81.7	125	54.0	31.3	102.5
125	53.0	250	1.2	62.5	66.5
250	2.6	500	0.1	125	19.1

14.2.1. 析出等の観察

被験物質処理開始時、短時間処理法+S9 処理の 500 µg/mL の濃度において白濁が認められた。

被験物質処理終了時、短時間処理法の 125 µg/mL 以上および連続処理法 24 時間処理の 62.5 µg/mL 以上の濃度において白色粉末状、さらに、短時間処理法-S9 処理の 250 µg/mL 以上および短時間処理法+S9 処理の 500 µg/mL 濃度において白色塊状の析出物が認められた。また、短時間処理法+S9 処理の 250 µg/mL 以上の濃度において白色膜状の析出物が認められた。

#### 14.3. 染色体異常試験 (追加試験)

##### 14.3.1. 短時間処理法-S9 処理

結果を Table 3 および Appendix 1 に示す。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群での染色体構造異常出現頻度は、68.6, 98.0 および 140 µg/mL でそれぞれ 1.0, 1.0 および 2.0% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、68.6, 98.0 および 140 µg/mL でそれぞれ 0.5, 2.0 および 1.0% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。また、濃度に依存した細胞増殖率の低下が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 140 µg/mL での細胞増殖率は 46.4% であった。

陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 56.0% であった。

##### 14.3.2. 短時間処理法+S9 処理

結果を Table 4 および Appendix 2 に示す。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群での染色体構造異常出現頻度は、63.7, 91.0 および 130 µg/mL でそれぞれ 0.0, 0.0 および 1.5% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、63.7, 91.0 および 130 µg/mL でそれぞれ 1.5, 0.5 および 0.5% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。また、濃度に依存した細胞増殖率の低下が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 130 µg/mL での細胞増殖率は 40.7% であった。

陽性対照物質 CP で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 29.5% であった。

##### 14.3.3. 連続処理法 24 時間処理

結果を Table 5 および Appendix 3 に示す。

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群での染色体構造異常出現頻度は、31.2, 44.6, 63.7 および 91.0 µg/mL でそれぞれ 1.5, 1.0, 1.0 および 0.0% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現

頻度は、31.2, 44.6, 63.7 および 91.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  でそれぞれ 0.5, 0.5, 1.5 および 2.0% であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。また、濃度に依存した細胞増殖率の低下が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 91.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で細胞増殖率は 48.5% であった。

陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 47.5% であった。

#### 14.3.4. 析出等の観察

被験物質処理開始時、いずれの処理法においても、析出等の特筆すべき変化は認められなかった。

被験物質処理終了時、短時間処理法-S9 処理の 98.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上、短時間処理法+S9 処理の 91.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上および連続処理法 24 時間処理の 63.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度において白色粉末状の析出物が認められた。

## 15. 考察および結論

2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU 細胞)を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理では, 細胞の増殖を 50%以上抑制する濃度まで検討した。

その結果, 2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン処理群では, 短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理のいずれにおいても, 染色体異常の誘発頻度は, 陰性対照群と同等の値を示し, 明確な染色体異常(構造異常ならびに数的異常)の誘発は認められなかった。

短時間処理法において陰性と判定されたことから, 連続処理法 24 時間処理の染色体の観察を実施した。その結果, いずれの濃度においても明確な染色体異常の誘発は認められなかった。

陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度は, いずれも背景データ (Appendix 4) から求めた基準値内であり, 試験成立条件を満たしたことから, 当該試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から, 当該試験条件下において, 2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定された。

なお, これまでに被験物質 2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンについての遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告は得られていない。

類縁体である 4,4'-メチレンビス (2-クロロアニリン) は, 人において発がん性を示し<sup>1)~3)</sup>, 遺伝子損傷を引き起こす<sup>4)~6)</sup>ことが報告されている。さらに, 細菌を用いる復帰変異試験で陽性<sup>7)</sup>との報告があり, ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験で数的異常を誘発する<sup>8)</sup>ことも報告されている。

## 16. 参考文献

- 1) IARC: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 57: p.271-303. International Agency for Research on Cancer, Lyon. Also, 1993, Suppl.7: 246-247.
- 2) Ward E, Smith AB, Haiperin W.: 4,4'-Methylenebis (2-chloroaniline): an unregulated carcinogen. Am J Ind Med. 1987, 12(5): 537-549.
- 3) Ward E, Haiperin W, Thun M, Grossman HB, Fink B, Koss L, Osorio AM, Schulte P.: Bladder tumors in two young males occupationally exposed to MBOCA. Am J Ind Med. 1988, 14(3): 267-272.



Table 1. Results of growth inhibition test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
[Short-term treatment]

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Conc. (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[ Mean ]	Compound	Conc. (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[ Mean ]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	26.3	78.0	[ 82.7 ]	2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	26.3	79.0	[ 82.9 ]
		87.3				86.7	
	52.5	104.5	[ 98.1 ]		52.5	91.4	[ 88.5 ]
		91.6				85.5	
	105 d)	70.3 72.7	[ 71.5 ]		105	78.7 91.0	[ 84.9 ]
	210 d)	2.0 7.2	[ 4.6 ]		210 d)	48.2 42.8	[ 45.5 ]
	420 d)	20.1 5.1	[ 12.6 ]		420 d)	46.9 53.8	[ 50.4 ]
	840 d)	15.7 0.7	[ 8.2 ]		840 d)	41.0 45.3	[ 43.2 ]
	1680 d)	12.5 7.4	[ 10.0 ]		1680 d)	25.8 33.4	[ 29.6 ]
	3360 d)	9.2 13.6	[ 11.4 ]		3360 d)	44.5 39.2	[ 41.9 ]

Fifty % growth inhibition concentration was as follows:

[Short-term treatment : -S9] --- 123 µg/mL

[Short-term treatment : +S9] --- 459 µg/mL

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 2. Results of growth inhibition test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
[Continuous treatment]

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Conc. (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[ Mean ]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	26.3	86.2 59.1	[ 72.7 ]
	52.5	58.5 55.5	[ 57.0 ]
	105 d)	43.0 36.3	[ 39.7 ]
	210 d)	3.8 16.7	[ 10.3 ]
	420 d)	0.0 0.0	[ 0.0 ]
	840 d)	1.1 0.0	[ 0.6 ]
	1680 d)	11.2 15.4	[ 13.3 ]
	3360 d)	18.6 3.5	[ 11.1 ]

Fifty % growth inhibition concentration was as follows:  
[Continuous treatment : 24 h] --- 61.2 µg/mL

a) : Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

d) : Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Short-term treatment : -S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	6	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 ( 0.5)	200	1 ( 0.5)
2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	68.6	6	78.8	200	1	0	2	0	0	0	2 ( 1.0)	200	1 ( 0.5)
	98.0 d)	6	61.1	200	1	0	2	0	0	0	2 ( 1.0)	200	4 ( 2.0)
	140 d)	6	46.4	200	1	1	3	0	0	0	4 ( 2.0)	200	2 ( 1.0)
MMC b)	0.1	6	85.9	200	12	48	100	1	0	0	112 ( 56.0)	200	2 ( 1.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Mitomycin C

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	6	100.0	200	0	0	1	0	0	0	1 ( 0.5)	200	1 ( 0.5)
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	63.7	6	84.2	200	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	200	3 ( 1.5)
	91.0 d)	6	76.4	200	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	200	1 ( 0.5)
	130 d)	6	40.7	200	0	0	3	0	0	0	3 ( 1.5)	200	1 ( 0.5)
CP b)	12.5	6	122.7	200	3	15	48	0	1	0	59 ( 29.5)	200	0 ( 0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ )

b): Positive control: Cyclophosphamide

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane (Additional study) [Continuous treatment : 24 h]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
DMSO a)	0	24	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 ( 0.5)	200	1 ( 0.5)
2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane	31.2	24	85.1	200	1	2	1	0	0	0	3 ( 1.5)	200	1 ( 0.5)
	44.6	24	83.2	200	0	1	1	0	0	0	2 ( 1.0)	200	1 ( 0.5)
	63.7 d)	24	55.4	200	2	1	1	0	0	0	2 ( 1.0)	200	3 ( 1.5)
	91.0 d)	24	48.5	200	1	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	200	4 ( 2.0)
MMC b)	0.05	24	71.6	200	6	31	81	0	0	0	95 ( 47.5)	200	0 ( 0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others -gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Mitomycin C

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Appendix 1. Chromosome aberration test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
(Additional study) [Short-term treatment : -S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	6	100.0	100	0	1	0	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
		6	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	1.0
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	68.6	6	68.4	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0
		6	89.2	100	1	0	2	0	0	0	1.0	2.0	100	1.0
	98.0 d)	6	62.7	100	1	0	1	0	0	0	1.0	1.0	100	4.0
		6	59.5	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
	140 d)	6	47.6	100	1	1	2	0	0	0	1.0	3.0	100	1.0
		6	45.2	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	1.0
MMC b)	0.1	6	78.8	100	7	25	53	0	0	0	0.0	58.0	100	1.0
		6	92.9	100	5	23	47	1	0	0	1.0	54.0	100	1.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Mitomycin C

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Appendix 2. Chromosome aberration test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
(Additional study) [Short-term treatment : +S9]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	6	100.0	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	0.0
		6	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	63.7	6	82.6	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	3.0
		6	85.7	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0
	91.0 d)	6	74.8	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	0.0
		6	78.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
	130 d)	6	42.7	100	0	0	2	0	0	0	0.0	2.0	100	0.0
		6	38.7	100	0	0	1	0	0	0	0.0	1.0	100	1.0
CP b)	12.5	6	125.0	100	2	7	18	0	0	0	1.0	24.0	100	0.0
		6	120.3	100	1	8	30	0	1	0	1.0	35.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
-gap: total number of cells with aberrations except gap

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

b): Positive control: Cyclophosphamide

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Appendix 3. Chromosome aberration test of 2,2',3,3'-tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane  
(Additional study) [Continuous treatment : 24 h]

Compound	Conc. (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Only gap (%)	Total (-gap) (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	24	100.0	100	1	1	0	0	0	0	1.0	1.0	100	0.0
		24	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
2,2',3,3'- Tetrachloro- 4,4'-diamino diphenylmethane	31.2	24	81.3	100	1	0	1	0	0	0	1.0	1.0	100	0.0
		24	88.9	100	0	2	0	0	0	0	0.0	2.0	100	1.0
	44.6	24	80.4	100	0	1	1	0	0	0	0.0	2.0	100	0.0
		24	86.0	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	1.0
	63.7 d)	24	54.5	100	1	1	1	0	0	0	1.0	2.0	100	3.0
		24	56.2	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	0.0
91.0 d)	24	50.4	100	1	0	0	0	0	0	1.0	0.0	100	2.0	
	24	46.5	100	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	100	2.0	
MMC b)	0.05	24	77.0	100	3	17	44	0	0	0	0.0	53.0	100	0.0
		24	66.1	100	3	14	37	0	0	0	1.0	42.0	100	0.0

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others  
-gap: total number of cells with aberrations except gap  
a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)  
b): Positive control: Mitomycin C  
d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.



要 約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン0 (媒体の0.5 w/v%メチルセルロース溶液のみ投与, 対照群), 100, 300 および1,000 mg/kg/day を Cri: CD(SD) 系ラットの雌雄各5匹に28日間反復経口投与した。また, 対照群および1,000 mg/kg には, 雌雄各5匹の回復群を設け, 28日間の反復投与終了後, 14日間の休薬による毒性の回復性についても検討した。

試験期間を通じて一般状態の観察, 機能観察総合検査 (FOB), 体重および摂餌量の測定を行い, 投与期間および回復期間終了時に臨床検査 (血液学検査, 血液凝固能検査, 血液生化学検査, 血清蛋白電気泳動検査および尿検査) および病理学検査 (器官重量測定, 肉眼観察および病理組織学検査) を実施した。

その結果は, 次の通りである。

雄の対照群で Day 41 (回復期間13日目) に1例の死亡が認められ, 病理所見から死因は持続性の腸閉塞およびこれに伴った全身状態の悪化によるものと考えられた。

一般状態, 体重および摂餌量に被験物質投与の影響は認められず, 詳細な症状観察, 反応性検査, 握力および自発運動量にも変化は認められなかった。

血液学検査では, 被験物質投与の影響は認められなかった。

血液凝固能検査では, 毒性学的に意義のある変化は認められなかった。

血液生化学検査では, 雄の300 および1,000 mg/kg 群で総蛋白が低下し, 雌の1,000 mg/kg 群で中性脂肪が上昇した。

血清蛋白電気泳動検査では, 雄の300 および1,000 mg/kg 群で $\alpha_1$ グロブリン分画が低下した。

尿検査では, 被験物質投与の影響は認められなかった。

病理学検査では, 雌の1,000 mg/kg 群で肝臓相対重量の増加が認められ, 対応する所見として, 病理組織学的に肝臓の小葉中心帯肝細胞肥大が雌雄の300 および1,000 mg/kg 群で認められた。

以上, 当該試験条件下において, 2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの反復経口投与に起因する毒性変化が, 雌雄ともに300 mg/kg/day 以上の投与で認められたことから, 無毒性量は, 雌雄とも100 mg/kg/day と判断された。また, 被験物質投与群で認められた変化は, いずれも14日間の休薬により回復性が認められた。

および腹部膨満を示して回復期間 13 日に死亡したが、この動物は対照群の動物であり、被験物質投与とは関係がない偶発的な異常と判断された。したがって、この動物の投与 25 日以降のデータを対照群のデータとして適切ではないと判断し、統計解析あるいは評価の対象から除外した。

## 15. 試験結果

### 15.1. 死亡および一般状態 (Table 1, Appendix 1)

雄の対照群で Day 41 (回復期間 13 日目) に 1 例 (動物番号 1010) の死亡が認められた。死亡した動物には、Day 28 から消瘦、Day 36 から腹部膨満が観察されていた。その他の動物では、投与および回復期間を通じて死亡および一般状態の変化は認められなかった。

### 15.2. 体重 (Figure 1~2, Table 2, Appendix 2)

雄では投与および回復期間を通じて、対照群と被験物質投与各群との間の体重に有意差は認められなかった。

雌の 1,000 mg/kg 群で投与 42 日に体重の有意な低下が認められたが、投与期間中に変動は認められず、むしろ回復試験用の対照群の体重が一時的に高かったことによるものと考えられた。

### 15.3. 摂餌量 (Figure 3~4, Table 3, Appendix 3)

雌雄ともに投与および回復期間を通じて、対照群と被験物質投与各群との間の摂餌量に有意差は認められなかった。

### 15.4. 機能観察総合検査 (FOB)

#### 15.4.1. 詳細な症状観察 (Table 4, 5, 6, Appendix 4, 5, 6)

投与期間中および回復期間中の観察において、雌雄ともに被験物質投与に起因する変化は認められなかった。また、排糞数および排尿数にも、対照群と被験物質投与各群との間に有意差は認められなかった。なお、回復期間中に死亡した対照群の 1 例に筋緊張の低下が投与 4 週目および回復 1 週目に、被毛粗剛が回復 1 週目に観察された。

#### 15.4.2. 反応性検査 (Table 4, Appendix 4)

投与 4 週目および回復 2 週目に実施した反応性検査において、雌雄ともに被験物質投与に起因する異常反応は認められなかった。

投与 4 週目の反応性検査では、触覚反応検査で「鳴いたり、活発に反応」が 100 mg/kg 群の雄で 1 例に、痛覚反応検査で「刺激から逃げようと前方に歩く」が 300 mg/kg 群の雄で 1 例に認められたが、これらは、対照群でもみられている反応であり、同用量の雌には認められていない反応であることから、被験物質とは関連性のない偶発的な変化と

考えられた。

回復2週目の反応性検査では、痛覚反応検査で「身を固くする」が1,000 mg/kg 群の雄で1例に認められたが、投与4週目に同じ反応は認められておらず、同用量の雌には認められない反応であることから、被験物質とは関連性のない偶発的な変化と考えられた。

15.4.3. 握力（前後肢）（Table 7, Appendix 7）

雌雄とも、投与4週目および回復2週目のいずれの検査においても、対照群と被験物質投与各群との間で前肢および後肢の握力に差は認められなかった。

15.4.4. 自発運動量（Table 8, Appendix 8）

雄では、投与4週目および回復2週目のいずれの検査においても、対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかった。

雌では、投与4週目の検査において、100, 300 および 1,000 mg/kg 群で測定開始後10～20分の自発運動量が、100 mg/kg 群ではさらに測定開始後40～50分の自発運動量がそれぞれ有意な高値を示したが、いずれも一過性の変化であり、1時間の総運動量には、群による差は認められなかった。回復2週目の検査では、対照群と1,000 mg/kg 群との間で差は認められなかった。

15.5. 臨床検査

15.5.1. 血液学検査

15.5.1.1. 投与期間終了時（Table 9-1, Appendix 9-1）

雄では、いずれの検査項目においても対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で白血球数が有意に増加したが、1例（動物番号2304）が異常高値を示したことによる変化であった。また、100 mg/kg 群でMCVが有意に低下したが、雄では認められず、用量依存性のない変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

15.5.1.2. 回復期間終了時（Table 9-2, Appendix 9-2）

雄では、1,000 mg/kg 群で好中球数の有意な低下が認められた。

雌では、1,000 mg/kg 群で網赤血球率の有意な増加が認められた。

15.5.2. 血液凝固能検査

15.5.2.1. 投与期間終了時（Table 10-1, Appendix 10-1）

雌雄ともにいずれの検査項目においても対照群と被験物質投与各群との間に有意な差は認められなかった。

15.5.2.2. 回復期間終了時 (Table 10-2, Appendix 10-2)

雄では、いずれの検査項目においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に有意な差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で PT が有意に短縮した。

15.5.2.3. 血液生化学検査

15.5.2.4. 投与期間終了時 (Table 11-1, Appendix 11-1)

雄では、300 および 1,000 mg/kg 群で総蛋白の有意な減少、1,000 mg/kg 群でカリウムの有意な増加が認められた。また、100 mg/kg 群でナトリウム、カリウムおよび塩素が有意に増加したが、用量依存性のない変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で中性脂肪が有意に上昇した。

15.5.2.5. 回復期間終了時 (Table 11-2, Appendix 11-2)

雌雄ともにいずれの検査項目においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に有意な差は認められなかった。

15.5.3. 血清蛋白電気泳動検査

15.5.3.1. 投与期間終了時 (Table 12-1, Appendix 12-1)

雄では、300 および 1,000 mg/kg 群で  $\alpha_1$  グロブリン分画比率および濃度が有意に低下した。

雌では、300 mg/kg 群で  $\alpha_2$  グロブリン分画比率および濃度が有意に増加したが、用量依存性のない変化であり被験物質投与の影響とは判断しなかった。

15.5.3.2. 回復期間終了時 (Table 12-2, Appendix 12-2)

雄では、いずれの検査項目においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に有意な差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で  $\alpha_2$  グロブリン分画濃度が有意に増加したが、軽微な変化であり、毒性学的意義は低いと判断した。

15.5.4. 尿検査

15.5.4.1. 投与期間終了時 (Table 13-1, Appendix 13-1)

雄では、いずれの検査項目においても対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかった。

雌では、100 mg/kg 群でナトリウム、カリウムおよび塩素総排泄量の有意な減少、300 mg/kg 群でナトリウム総排泄量の有意な減少、1,000 mg/kg 群でカリウムおよび塩素総排泄量の有意な減少が認められた。

15.5.4.2. 回復期間終了時 (Table 13-2, Appendix 13-2)

雄では、1,000 mg/kg 群で浸透圧が有意に低下したが、同群の有意ではない尿量の増加に伴った変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。また、ナトリウム、カリウムおよび塩素濃度が有意に減少したが、総排泄量に変化は認められないことから、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

雌では、いずれの検査項目においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に差は認められなかった。

15.6. 病理学検査

15.6.1. 器官重量

15.6.1.1. 投与期間終了時 (Table 14-1, 15-1, Appendix 14-1, 15-1)

雄では、いずれの測定器官においても対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で肝臓の相対重量の有意な増加および絶対重量の増加傾向が認められた。また、100 および 300 mg/kg 群で脾臓の絶対および相対重量の有意な低下が、100 mg/kg 群で卵巣の絶対重量の有意な低下が認められたが、用量依存性のない変化であり、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

15.6.1.2. 回復期間終了時 (Table 14-2, 15-2, Appendix 14-2, 15-2)

雄では、いずれの測定器官においても対照群と 1,000 mg/kg 群との間に差は認められなかった。

雌では、1,000 mg/kg 群で心臓および卵巣の相対重量の有意な増加が認められたが、同群での偶発的な低体重に起因した変化と考えられ、被験物質投与の影響とは判断しなかった。

15.6.2. 剖検所見

15.6.2.1. 投与期間終了時 (Table 16-1, Appendix 16)

被験物質投与群において、対照群に比し発生数が明らかに増減した所見は認められなかった。被験物質投与群で認められた所見は、いずれも単発性あるいは散発性の発生であり、また、ラットにしばしば自然発生する所見であることから、被験物質投与による変化とは考えられなかった。

15.6.2.2. 回復期間終了時 (Table 16-2, Appendix 16)

対照群および 1,000 mg/kg 群で観察された所見は、いずれも単発性の発生であり、自然発生性の変化と考えられた。

15.6.2.3. 死亡動物 (Appendix 16)

回復期間中に死亡した対照群の 1 例 (動物番号 1010) では、回腸の閉塞、空腸および回腸の内腔拡張、膀胱の赤色斑、脾臓の小型化、胸腺の萎縮、精囊の萎縮および全身の削瘦が認められた。

15.6.3. 組織所見

15.6.3.1. 投与期間終了時 (Table 17-1, Appendix 17)

被験物質投与の関与が疑われた変化が肝臓に認められた。

肝臓では、小葉中心帯肝細胞肥大 (Photo. 1, 2) が雌雄の 300 および 1,000 mg/kg 群に認められ、雌雄ともに 1,000 mg/kg 群で発生数が有意に増加した。肝細胞肥大は、細胞質の好酸性化を伴っていた。なお、肝細胞巣状壊死が、雄の 1,000 mg/kg 群に 1 例発生した。

その他、散発的に軽度の変化が対照群を含めた各群に観察されたが、用量に関連した発生数の増減も認められず、いずれも自然発生病変と考えられた。

15.6.3.2. 回復期間終了時 (Table 17-2, Appendix 17)

投与期間終了時に、雌雄の 300 および 1,000 mg/kg 群に認められた肝細胞の肥大および巣状壊死は観察されなかった。

その他、散発的に軽度の変化が対照群および 1,000 mg/kg 群に観察されたが、その種類および発生数からいずれも自然発生病変と考えられた。

15.6.3.3. 死亡動物 (Appendix 17)

回復期間中に死亡した対照群の 1 例 (動物番号 1010) では、空腸および回腸の内腔拡張、漿膜のうっ血、水腫および単核細胞浸潤、筋層の肥大、回腸の閉塞、潰瘍、漿膜の線維化および出血がみられ、死亡の主因と考えられた。その他、骨髄のうっ血および重度の造血低下、脾臓および胸腺における重度の萎縮、リンパ節の赤血球貪食像および洞組織球症、肺の泡沫細胞集簇、肝臓の肝細胞巣状壊死、腎臓の尿細管好塩基化、膀胱の出血、前立腺および精囊の萎縮、皮膚の浮腫が観察され、二次的な一般状態の悪化と栄養障害が推察された。死因は持続性の腸閉塞であると判断した。

## 16. 考察および結論

被験物質投与に関連した変化が、毒性試験群の肝臓に認められた。1,000 mg/kg 群の雌で肝臓重量の増加が認められ、対応する所見として、病理組織学的に小葉中心帯の好酸性化を伴った肝細胞の肥大が 300 mg/kg 以上の群の雌雄で認められた。薬物や化学物質の投与により、滑面小胞体の増加やチトクローム P-450 の活性上昇をきたし、組織学的に小葉中心帯の好酸性化を伴った肝細胞の肥大を起こすことが知られていることから<sup>1), 2), 3)</sup>、小葉中心帯肝細胞肥大は、同様の機序で発生した可能性が考えられた。肝細胞肥大は、被験物質投与群のみに発生がみられることから、被験物質投与に関連した変化であると考えられた。肝細胞の巣状壊死が、1,000 mg/kg 群の雄 1 例に認められた。巣状壊死は、肝臓の一箇所のみに限局した所見であり、同様の形態学的特徴を持つ肝細胞の巣状壊死は、自然発生病変としてまれに観察されることから、本所見は偶発的な所見で、被験物質投与とは関係のない変化であると考えられた。

血液生化学検査において、毒性試験群の 300 および 1,000 mg/kg 群の雄で総蛋白が低下した。血清蛋白電気泳動検査結果では、同群の雄に  $\alpha_1$  グロブリン分画の低下が認められており、総蛋白の低下は  $\alpha_1$  グロブリン分画の低下に起因した変化であると考えられた。しかし、 $\alpha_1$  グロブリン分画の低下の機序は不明であった。また、毒性試験群の 1,000 mg/kg 群の雌で中性脂肪が上昇した。中性脂肪の上昇は、総コレステロールの変化を伴わない単独の変化であり、雌の高用量群のみに認められた変化である。したがって、これらの変化の毒性学的意義は不明であるが、被験物質の蛋白・脂質代謝系に対する影響が示唆された。

対照群の雄 1 例が回復期間中に死亡した。この動物は、投与 25 日以降体重および摂餌量が減少し、一般状態および FOB において、全身状態の悪化に関連した症状が観察された。病理組織学検査では、持続性の腸閉塞が認められ、これが死因と考えられた。腸閉塞は、ラットにおいてその発生は珍しいが、対照群に発生したことから、自然発生病変であると考えられた。

一般状態、体重および摂餌量に被験物質投与の影響は認められず、詳細な症状観察、反応性検査、握力および自発運動量にも神経毒性を示唆する変化は認められなかった。

その他、毒性試験群において、血液学検査では、1,000 mg/kg 群の雌 1 例（動物番号 2304）の白血球数が高値を示した。しかし、この動物を含めた同群の病理組織学検査で炎症性の変化は認められず、被験物質投与とは関連のない変化と判断した。また、血液生化学検査では、1,000 mg/kg 群の雄でカリウムが上昇し、尿検査では 100, 300 または 1,000 mg/kg 群の雌で尿中電解質が低下したが、変化の程度が用量に伴っておらず、腎機能に関連する生化学検査項目およびその他の尿検査項目にも異常はなく、病理学検査においても腎の異常は認められないことから、被験物質投与とは関連のない変化と考え

られた。回復試験群において、1,000 mg/kg 群の雄で好中球数が減少し、1,000 mg/kg 群の雌で網赤血球率が増加し、PT が短縮した。これらの変化は、投与期間終了時には認められておらず、いずれも軽微な変化であるため、毒性学的意義は低いと考えられた。

以上、当該試験条件下において、2,2',3,3'-テトラクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタンの反復投与に起因する毒性変化が、雌雄ともに 300 mg/kg/day 以上の投与で認められたことから、無毒性量は、雌雄ともに 100 mg/kg/day と判断された。また、毒性試験群で認められた変化は、いずれも 14 日間の休薬により回復性が認められた。

#### 17. 参考文献

- 1) 伊東信之編著，最新毒性病理学，中山書店：158 (1994).
- 2) 日本毒性病理学会編，毒性病理組織学，アイペック：182 (2000).
- 3) Haschek MW, Rousseaux GC, Fundamentals of toxicologic pathology, Academic press: 139 (1998).

#### 18. 試験関係資料の保存

当該試験の下記資料は、安評センター資料保存施設にて最終報告書作成後 10 年間保存される。その後の保存については、試験委託者と安評センターで協議の上、別途定める。また、病理組織標本作製関係資料については、株式会社 組織科学研究所にて 10 年間保存される。その後の保存については、試験委託者と安評センターならびに株式会社 組織科学研究所で協議の上、別途定める。

- 試験計画書（正本）
- 被験物質（各ロット，2g）
- 被験物質に関する資料（使用および調製記録，その他）
- 動物および施設に関する記録
- 生データ（一般状態観察記録，体重測定記録，摂餌量測定記録，臨床検査記録，器官重量測定記録，病理学検査所見記録，その他）
- 各種標本類（ブロック標本，病理組織標本，湿臓器，血液塗抹標本，その他）
- 病理組織標本作製関係資料（病理組織標本作製計画書の写し，病理組織標本作製報告書の写し，標本作製過程管理書の写し，その他）
- 最終報告書（正本），化学物質審査規制法届出様式（写し）



Table 1. Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		1----->			2----->			3----->			4----->			5----->			6----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Emaciation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		7----->			8----->			9----->			10----->			11----->			12----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Emaciation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
03 TCDAM 300	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																			
		13----->			14----->			15----->			16----->			17----->			18----->				
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Emaciation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Emaciation	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Emaciation	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Emaciation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																				
		19----->			20----->			21----->			22----->			23----->			24----->					
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Emaciation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Emaciation	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Emaciation	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Emaciation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment														
		25----->			26----->			27----->			28----->			29		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	5
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	5
	Emaciation	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	5
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																	
		1----->			2----->			3----->			4----->			5----->			6----->		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		7----->			8----->			9----->			10----->			11----->			12----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																		
		13----->			14----->			15----->			16----->			17----->			18----->			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																				
		19----->			20----->			21----->			22----->			23----->			24----->					
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

-37-

Table 1. -continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment																					
		25----->			26----->			27----->			28----->			29									
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3							
01 control 0	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5
02 TCDAM 100	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
03 TCDAM 300	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
04 TCDAM 1000	normal	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
		Total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	

1: Before dosing 2: 30 to 60 minutes after dosing 3: 3 to 4 hours after dosing  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

-38-

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment															
		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	
01 control 0	normal	-	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		Total	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Emaciation	-	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		+	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
		Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4
	Abdominal distention	-	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4
	+	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	
04 TCDAM 1000	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 1.

-continued Clinical observation

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg	Finding Part	Day of experiment														
		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
01 control 0	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
04 TCDAM 1000	normal	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 2. Body weight

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment									Gain 1-28	Unit:g
		1	4	8	11	15	18	22	25	28		
01 control 0	N	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	
	Mean	151	173	200	220	243	263	285	304	319	168	
	S.D.	6	10	14	18	23	26	30	31	33	29	
02 TCDAM 100	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Mean	150	172	199	219	246	264	283	300	318	168	
	S.D.	6	10	13	15	21	24	29	33	42	40	
03 TCDAM 300	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Mean	149	171	198	223	248	272	296	313	333	183	
	S.D.	6	8	14	16	17	18	20	22	22	18	
04 TCDAM 1000	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	151	172	197	219	240	257	277	292	308	158	
	S.D.	6	9	13	17	20	22	24	24	27	23	

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 2. -continued Body weight

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment									Gain 1-28	Unit:g
		1	4	8	11	15	18	22	25	28		
01 control 0	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	117	131	146	160	169	179	191	197	207	90	
	S.D.	5	6	6	9	10	9	11	10	10	10	
02 TCDAM 100	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Mean	117	132	144	157	164	172	181	187	198	82	
	S.D.	5	7	9	11	12	12	12	15	15	11	
03 TCDAM 300	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	Mean	117	129	141	154	162	169	178	187	194	77	
	S.D.	5	7	10	13	16	21	23	25	26	24	
04 TCDAM 1000	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	Mean	117	131	143	155	163	173	185	190	196	80	
	S.D.	5	6	7	7	7	9	9	8	11	10	

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 2. -continued Body weight

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose	mg/kg	N	Day of experiment					Gain 29-42	Unit:g
			29	32	36	39	42		
01 control 0		4	4	4	4	4	4	4	
		Mean	339	355	375	390	404	65	
		S.D.	25	24	27	27	29	5	
04 TCDAM 1000		5	5	5	5	5	5	5	
		Mean	318	332	346	363	372	54	
		S.D.	25	26	23	20	19	10	

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

-43-

Table 2. -continued Body weight

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose	mg/kg	N	Day of experiment					Gain 29-42	Unit:g
			29	32	36	39	42		
01 control 0		5	5	5	5	5	5	5	
		Mean	210	219	227	234	240	30	
		S.D.	9	12	12	11	9	4	
04 TCDAM 1000		5	5	5	5	5	5	5	
		Mean	196	202	209	218	222*	26	
		S.D.	13	16	19	16	15	5	

Significantly different from 01 group \*  $P \leq 0.05$  (Dunnett)  
TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

-44-



Table 3.

## Food consumption

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment						Unit:g/animal/day
		1 => 8	8 => 15	15 => 22	22 => 28	28 => 36	36 => 42	
01 control 0	N	10	10	10	9	4	4	
	Mean	23	24	25	25	28	29	
	S.D.	2	3	3	2	1	2	
02 TCDAM 100	N	5	5	5	5			
	Mean	23	25	25	25			
	S.D.	2	3	4	5			
03 TCDAM 300	N	5	5	5	5			
	Mean	23	25	27	27			
	S.D.	1	2	2	2			
04 TCDAM 1000	N	10	10	10	10	5	5	
	Mean	22	24	24	24	26	26	
	S.D.	2	3	3	3	2	2	

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 3.

## -continued Food consumption

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Group No. Dose mg/kg		Day of experiment						Unit:g/animal/day
		1 => 8	8 => 15	15 => 22	22 => 28	28 => 36	36 => 42	
01 control 0	N	10	10	10	10	5	5	
	Mean	17	18	18	18	20	19	
	S.D.	1	1	1	1	2	1	
02 TCDAM 100	N	5	5	5	5			
	Mean	18	18	18	17			
	S.D.	1	2	2	2			
03 TCDAM 300	N	5	5	5	5			
	Mean	17	18	18	18			
	S.D.	1	2	3	3			
04 TCDAM 1000	N	10	10	10	10	5	5	
	Mean	17	18	19	18	20	19	
	S.D.	2	2	2	2	2	2	

TCDAM: 2,2',3,3'-Tetrachloro-4,4'-diamino diphenylmethane

Table 4. Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)			
			1	2	3	4	1	2		
No. of animals	0	10	10	10	10	10	5	4		
	100	5	5	5	5	5	-	-		
	300	5	5	5	5	5	-	-		
	1000	10	10	10	10	10	5	5		
REMOVAL FROM CAGE Ease of removal	Very easy	0	10	10	10	10	5	4		
		100	5	4	5	5	2	-	-	
		300	5	5	5	5	4	-	-	
		1000	10	7	10	9	9	5	5	
	Easy	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0	1	0	0	3	-	-	
		300	0	0	0	0	1	-	-	
		1000	0	3	0	1	1	0	0	
	Vocalization	None	0	10	10	10	10	5	4	
			100	5	5	5	5	5	-	-
			300	5	5	5	5	5	-	-
			1000	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

-47-

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)			
			1	2	3	4	1	2		
HANDLING OBSERVATIONS Muscle tone	Normal	0	10	10	10	10	9	4	4	
		100	5	5	5	5	5	-	-	
		300	5	5	5	5	5	-	-	
		1000	10	10	10	10	10	5	5	
	Decrease or limp	0	0	0	0	0	1	1	0	
		100	0	0	0	0	0	-	-	
		300	0	0	0	0	0	-	-	
		1000	0	0	0	0	0	0	0	
	Subnormal temperature	Absent	0	10	10	10	10	10	5	4
			100	5	5	5	5	5	-	-
			300	5	5	5	5	5	-	-
			1000	10	10	10	10	10	5	5
Piloerection	Absent	0	10	10	10	10	10	5	4	
		100	5	5	5	5	5	-	-	
		300	5	5	5	5	5	-	-	
		1000	10	10	10	10	10	5	5	
Staining hair	Absent	0	10	10	10	10	10	5	4	
		100	5	5	5	5	5	-	-	
		300	5	5	5	5	5	-	-	
		1000	10	10	10	10	10	5	5	
Unkempt hair	Absent	0	10	10	10	10	10	4	4	
		100	5	5	5	5	5	-	-	
		300	5	5	5	5	5	-	-	
		1000	10	10	10	10	10	5	5	
Rough fur	Absent	0	0	0	0	0	0	1	0	
		100	0	0	0	0	0	-	-	
		300	0	0	0	0	0	-	-	
		1000	0	0	0	0	0	0	0	

B. G. : Before grouping

-48-

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2
Skin color	Normal	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5
Lacrimation	Absent	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5
Exophthalmos	Absent	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5
Pupillary size	Normal	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5
Salivation	Absent	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2
<b>OBSERVATIONS IN ARENA</b>								
Posture	Normal	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5
Motor activity	Normal	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5
Respiration	Normal	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5
Lid closure	Wide open	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5
Gait	Normal	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5
Tremor	None	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2
Twitch	None	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5
Convulsion	None	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5
Stereotypic behavior	None	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5
Abnormal behavior	None	0	10	10	10	10	5	4
		100	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

- 51 -

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)	
		B. G.	1	2	3	4	1
<b>SENSORIMOTOR FUNCTION</b>							
Approach contact	Normal a)	0				9	4
		100				5	-
		300				5	-
		1000				10	5
Freezing		0				1	0
		100				0	-
		300				0	-
		1000				0	0
Touch response	Moderate reaction	0				9	4
		100				4	-
		300				5	-
		1000				10	5
Vocalization, energetically reaction		0				0	0
		100				1	-
		300				0	-
		1000				0	0
Freezing		0				1	0
		100				0	-
		300				0	-
		1000				0	0
Pinna response	Normal	0				10	4
		100				5	-
		300				5	-
		1000				10	5

B. G. : Before grouping

a) Rat slowly approaches and sniffs at object or turns away

- 52 -

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Male

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
		B. G.	1	2	3	4	1	2
Pain response(Tail pinch)	Slowly turns	0				1	0	
		100				0	-	
		300				0	-	
		1000				0	0	
	Walk away from stimulus	0				2	0	
		100				0	-	
		300				1	-	
		1000				0	0	
	Freezing	0				0	0	
		100				0	-	
		300				0	-	
		1000				0	1	
Normal	0				7	4		
	100				5	-		
	300				4	-		
	1000				10	4		
Pupillary reflex	Normal	0				10	4	
		100				5	-	
		300				5	-	
		1000				10	5	
Air righting reflex	Normal	0				10	4	
		100				5	-	
		300				5	-	
		1000				10	5	

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)	Administration period (Week)				Recovery period (Week)				
		B. G.	1	2	3	4	1	2		
No. of animals	0	10	10	10	10	10	5	5		
	100	5	5	5	5	5	-	-		
	300	5	5	5	5	5	-	-		
	1000	10	10	10	10	10	5	5		
REMOVAL FROM CAGE Ease of removal	Very easy	0	6	7	9	9	7	5	5	
		100	3	5	5	5	3	-	-	
		300	3	5	5	5	5	-	-	
		1000	6	10	10	10	9	5	4	
	Easy	0	4	3	1	1	3	0	0	
		100	2	0	0	0	2	-	-	
		300	2	0	0	0	0	-	-	
		1000	4	0	0	0	1	0	1	
	Vocalization	None	0	10	10	10	10	10	5	5
			100	5	5	5	5	5	-	-
			300	5	5	5	5	5	-	-
			1000	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
			1	2	3	4	1	2	
<b>HANDLING OBSERVATIONS</b>									
Muscle tone	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Subnormal temperature	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Piloerection	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Staining hair	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Unkempt hair	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Skin color	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
			1	2	3	4	1	2	
Lacrimation	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Exophthalmos	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Pupillary size	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Salivation	Absent	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
			1	2	3	4	1	2	
OBSERVATIONS IN ARENA									
Posture	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Motor activity	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Respiration	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Lid closure	Wide open	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Gait	Normal	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Tremor	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

-57-

Table 4. -continued Detailed clinical observation and sensory reactivity to stimuli of different types

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)	B. G.	Administration period (Week)				Recovery period (Week)		
			1	2	3	4	1	2	
Twitch	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Convulsion	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Stereotypic behavior	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5
Abnormal behavior	None	0	10	10	10	10	10	5	5
		100	5	5	5	5	5	-	-
		300	5	5	5	5	5	-	-
		1000	10	10	10	10	10	5	5

B. G. : Before grouping

-58-

Sex: Female

Signs	Dose level (mg/kg)		Administration period (Week)				Recovery period (Week)	
			B. G.	1	2	3	4	1
<b>SENSORIMOTOR FUNCTION</b>								
Approach contact	Normal a)	0					10	5
		100					5	-
		300					5	-
		1000					10	5
Touch response	Moderate reaction	0					10	5
		100					5	-
		300					5	-
		1000					10	5
Pinna response	Normal	0					10	5
		100					5	-
		300					5	-
		1000					10	5
Pain response(Tail pinch)	Normal	0					10	5
		100					5	-
		300					5	-
		1000					10	5
Pupillary reflex	Normal	0					10	5
		100					5	-
		300					5	-
		1000					10	5
Air righting reflex	Normal	0					10	5
		100					5	-
		300					5	-
		1000					10	5

B. G. : Before grouping

a) Rat slowly approaches and sniffs at object or turns away

Table 5. Summary of number of defecation

Exp. No. 9934(115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	B. G.	Administration period (week)				Recovery period (week)	
				1	2	3	4	1	2
	0	10	0.0 ± 0.0 a)	0.3 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.6	0.3 ± 1.0 (9)	0.0 ± 0.0 (4)	0.0 ± 0.0 (4)
Male	100	5	0.4 ± 0.9	1.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
	300	5	0.4 ± 0.9	0.4 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.6 ± 1.3		
	1,000	10	0.6 ± 1.1	0.8 ± 1.1	0.2 ± 0.6	0.3 ± 0.9	0.1 ± 0.3	0.4 ± 0.9 (5)	0.0 ± 0.0 (5)
	0	10	0.2 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 (5)	0.0 ± 0.0 (5)
Female	100	5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
	300	5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0		
	1,000	10	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 (5)	0.0 ± 0.0 (5)
	0	10	0.2 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0 (5)	0.0 ± 0.0 (5)

B. G. : Before grouping

a) Mean ± S.D.

Values in parentheses are expressed no. of animals examined



Table 6. Summary of number of pools of urine

Exp. No. 9934(115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	B.G.	Administration period (week)				Recovery period (week)		
				1	2	3	4	1	2	
Male	0	10	0.6 ± 0.8 a)	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.6	0.4 ± 0.8	0.2 ± 0.4	(9)	0.0 ± 0.0 (4)	0.5 ± 0.6 (4)
	100	5	0.6 ± 0.9	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0			
	300	5	0.2 ± 0.4	0.8 ± 1.3	0.4 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0			
	1,000	10	1.0 ± 1.1	0.7 ± 0.8	0.2 ± 0.4	0.8 ± 0.9	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	(5)	0.2 ± 0.4 (5)
Female	0	10	0.3 ± 0.7	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	(5)	0.0 ± 0.0 (5)
	100	5	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.5			
	300	5	0.4 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0			
	1,000	10	0.2 ± 0.6	0.5 ± 1.0	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	(5)	0.0 ± 0.0 (5)

B.G. : Before grouping

a) Mean ± S.D.

Values in parentheses are expressed no. of animals examined

Table 7. Summary of grip strength

Exp. No. 9934(115-213)

4 week of administration					Unit : g
Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Forelimb	Hindlimb	
Male	0	9	1338 ± 147 a)	703 ± 139	
	100	5	1457 ± 206	822 ± 228	
	300	5	1370 ± 211	721 ± 129	
	1,000	10	1281 ± 170	739 ± 205	
Female	0	10	620 ± 171	321 ± 77	
	100	5	741 ± 99	289 ± 42	
	300	5	551 ± 99	307 ± 34	
	1,000	10	605 ± 126	301 ± 74	

a) Mean ± S.D.

Table 7. -continued Summary of grip strength

Exp. No. 9934(115-213)

2 week of recovery					Unit : g
Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Forelimb		Hindlimb
Male	0	4	1381 ± 408 a)		707 ± 284
	1,000	5	1604 ± 241		1027 ± 155
Female	0	5	1080 ± 291		574 ± 190
	1,000	5	889 ± 249		510 ± 269

a) Mean ± S.D.

Table 8. Summary of motor activity

Exp. No. 9934 (115-213)

4 week of administration									
Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Motor activity (counts)						Total (0-60)
			0-10 a)	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
Male	0	9	194 ± 27 b)	169 ± 25	151 ± 40	129 ± 33	102 ± 40	102 ± 59	847 ± 139
	100	5	195 ± 35	178 ± 15	147 ± 30	127 ± 29	111 ± 57	132 ± 21	890 ± 132
	300	5	216 ± 22	159 ± 27	145 ± 25	111 ± 30	96 ± 58	102 ± 52	829 ± 153
	1,000	10	204 ± 17	169 ± 26	157 ± 25	130 ± 35	105 ± 64	74 ± 57	838 ± 146
Female	0	10	127 ± 28	68 ± 28	72 ± 20	77 ± 33	44 ± 25	58 ± 20	445 ± 114
	100	5	133 ± 22	113 ± 31**	91 ± 35	69 ± 37	87 ± 27*	62 ± 32	554 ± 117
	300	5	105 ± 23	102 ± 21*	69 ± 41	74 ± 25	51 ± 15	53 ± 30	455 ± 125
	1,000	10	126 ± 30	101 ± 17*	72 ± 23	74 ± 33	59 ± 32	46 ± 22	478 ± 103

a) interval time (minutes)

b) Mean ± S.D.

Significantly different from control group \* p ≤ 0.05 \*\* p ≤ 0.01 (Dunnett)

2 week of recovery

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Motor activity (counts)						Total (0-60)
			0-10 a)	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	
Male	0	4	181 ± 38 b)	150 ± 34	128 ± 7	52 ± 45	24 ± 29	11 ± 18	546 ± 89
	1,000	5	183 ± 32	132 ± 68	110 ± 57	115 ± 52	68 ± 49	46 ± 52	653 ± 262
Female	0	5	137 ± 11	126 ± 35	94 ± 27	105 ± 58	108 ± 113	65 ± 68	636 ± 247
	1,000	5	161 ± 58	128 ± 55	106 ± 65	99 ± 70	104 ± 72	55 ± 57	652 ± 355

a) interval time (minutes)

b) Mean ± S.D.

Table 9-1. Hematology  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	HCT (%)	HGB (g/dL)	RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	5	41.8 ± 1.3	15.5 ± 0.4	7.72 ± 0.13	54.2 ± 1.0	20.1 ± 0.2	37.1 ± 0.6
	100	5	42.0 ± 1.5	15.5 ± 0.6	7.71 ± 0.27	54.5 ± 1.2	20.1 ± 0.5	36.9 ± 0.2
	300	5	40.5 ± 1.6	14.9 ± 0.5	7.31 ± 0.32	55.4 ± 2.4	20.4 ± 0.7	36.7 ± 0.4
	1,000	5	41.3 ± 2.0	15.2 ± 0.8	7.52 ± 0.29	54.9 ± 0.9	20.3 ± 0.4	36.9 ± 0.2
Female	0	5	39.5 ± 1.2	14.8 ± 0.4	7.22 ± 0.24	54.8 ± 0.4	20.5 ± 0.4	37.4 ± 0.5
	100	5	40.7 ± 1.8	15.3 ± 0.7	7.66 ± 0.38	53.2 ± 0.6#	20.0 ± 0.2	37.6 ± 0.4
	300	5	39.5 ± 1.4	14.9 ± 0.3	7.38 ± 0.38	53.6 ± 1.6	20.3 ± 0.8	37.7 ± 0.6
	1,000	5	39.4 ± 1.3	14.5 ± 0.5	7.24 ± 0.28	54.4 ± 1.9	20.0 ± 0.6	36.8 ± 0.3

Mean ± S.D.

Significantly different from control group; #: P ≤ 0.05 (Steel)

Table 9-1. -continued Hematology  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	WBC (x10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )	Differential leukocyte counts (%)						
				NEUT	LYMPH	MONO	EOSN	BASO	LUC	
Male	0	5	9.26 ± 2.60	15.3 ± 1.8	81.5 ± 1.6	1.8 ± 0.5	0.7 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1	
	100	5	8.46 ± 2.65	14.4 ± 3.4	82.4 ± 3.8	1.5 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.3	
	300	5	8.11 ± 1.02	18.3 ± 2.5	79.0 ± 2.9	1.5 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.3	
	1,000	5	9.62 ± 2.25	18.2 ± 3.5	78.5 ± 3.5	1.7 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.8 ± 0.4	
Female	0	5	5.21 ± 2.63	14.0 ± 4.2	83.1 ± 4.5	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.7 ± 0.2	
	100	5	5.12 ± 0.82	14.3 ± 2.9	82.6 ± 3.4	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.6	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.1	
	300	5	4.94 ± 1.19	16.9 ± 8.1	80.3 ± 7.9	1.3 ± 0.4	0.8 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.6 ± 0.3	
	1,000	5	8.71 ± 2.92*	14.4 ± 4.3	82.1 ± 4.9	1.3 ± 0.7	1.1 ± 0.4	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.4	

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells  
 Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group; \* : P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 67 -

Table 9-1. -continued Hematology  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	NEUT (x10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )		LYMPH (x10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )		MONO (x10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )		EOSN (x10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )		BASO (x10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )		LUC (x10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )	
			Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Male	0	5	1.41 ± 0.40	0.40	7.56 ± 2.14	2.14	0.17 ± 0.09	0.09	0.06 ± 0.03	0.03	0.01 ± 0.01	0.01	0.06 ± 0.02	0.02
	100	5	1.21 ± 0.41	0.41	6.98 ± 2.25	2.25	0.13 ± 0.03	0.03	0.07 ± 0.05	0.05	0.01 ± 0.01	0.01	0.06 ± 0.03	0.03
	300	5	1.48 ± 0.28	0.28	6.40 ± 0.82	0.82	0.12 ± 0.03	0.03	0.05 ± 0.03	0.03	0.01 ± 0.01	0.01	0.05 ± 0.02	0.02
	1,000	5	1.75 ± 0.57	0.57	7.55 ± 1.79	1.79	0.16 ± 0.04	0.04	0.07 ± 0.04	0.04	0.01 ± 0.01	0.01	0.08 ± 0.05	0.05
Female	0	5	0.68 ± 0.20	0.20	4.38 ± 2.41	2.41	0.06 ± 0.02	0.02	0.04 ± 0.01	0.01	0.01 ± 0.01	0.01	0.04 ± 0.03	0.03
	100	5	0.72 ± 0.12	0.12	4.24 ± 0.80	0.80	0.06 ± 0.02	0.02	0.06 ± 0.03	0.03	0.00 ± 0.00	0.00	0.03 ± 0.00	0.00
	300	5	0.82 ± 0.38	0.38	3.98 ± 1.18	1.18	0.06 ± 0.01	0.01	0.04 ± 0.01	0.01	0.00 ± 0.01	0.01	0.03 ± 0.01	0.01
	1,000	5	1.29 ± 0.70	0.70	7.10 ± 2.11	2.11	0.13 ± 0.12	0.12	0.09 ± 0.04	0.04	0.01 ± 0.01	0.01	0.09 ± 0.07	0.07

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells  
 Mean ± S.D.

- 68 -

Table 9-1. -continued Hematology  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PLT (x10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )	Reticulocyte (%)
Male	0	5	1153 ± 164	2.7 ± 0.5
	100	5	1135 ± 178	2.7 ± 0.5
	300	5	1218 ± 58	3.0 ± 0.1
	1,000	5	1169 ± 178	3.0 ± 0.4
Female	0	5	1382 ± 185	2.6 ± 0.8
	100	5	1284 ± 136	2.2 ± 0.3
	300	5	1226 ± 152	2.4 ± 0.3
	1,000	5	1264 ± 190	3.2 ± 0.7

Mean ± S.D.

- 69 -

Table 9-2. Hematology  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	HCT (%)	HGB (g/dL)	RBC (x10 <sup>12</sup> /mm <sup>3</sup> )	MCV (μm <sup>3</sup> )	MCH (pg)	MCHC (%)
Male	0	4	42.7 ± 2.0	15.6 ± 0.6	8.06 ± 0.19	52.9 ± 1.5	19.4 ± 0.4	36.5 ± 0.3
	1,000	5	42.2 ± 1.6	15.3 ± 0.7	8.03 ± 0.54	52.6 ± 2.2	19.1 ± 0.7	36.3 ± 0.5
Female	0	5	41.9 ± 2.6	15.7 ± 1.0	7.91 ± 0.42	53.0 ± 1.4	19.9 ± 0.3	37.5 ± 0.8
	1,000	5	40.3 ± 2.4	15.0 ± 0.8	7.62 ± 0.58	52.9 ± 1.7	19.7 ± 0.7	37.3 ± 0.4

Mean ± S.D.

- 70 -

Table 9-2. -continued Hematology  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	WBC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Differential leukocyte counts (%)					
				NEUT	LYMPH	MONO	EOSN	BASO	LUC
Male	0	4	10.00 $\pm$ 2.46	16.7 $\pm$ 3.6	79.8 $\pm$ 3.7	1.8 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.1
	1,000	5	10.20 $\pm$ 2.74	11.9 $\pm$ 4.7	84.4 $\pm$ 5.2	1.9 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
Female	0	5	6.69 $\pm$ 2.02	19.4 $\pm$ 7.4	77.4 $\pm$ 6.9	1.7 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.2
	1,000	5	5.81 $\pm$ 2.87	16.3 $\pm$ 5.8	79.7 $\pm$ 6.2	1.8 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.7	0.0 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells  
 Mean  $\pm$  S.D.

- 71 -

Table 9-2. -continued Hematology  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	NEUT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	LYMPH ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	MONO ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	EOSN ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	BASO ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	LUC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )
Male	0	4	1.62 $\pm$ 0.28	8.03 $\pm$ 2.17	0.18 $\pm$ 0.06	0.10 $\pm$ 0.06	0.01 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.02
	1,000	5	1.15 $\pm$ 0.25*	8.69 $\pm$ 2.66	0.18 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.06	0.02 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.02
Female	0	5	1.33 $\pm$ 0.83	5.14 $\pm$ 1.38	0.11 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.03	0.00 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.02
	1,000	5	0.92 $\pm$ 0.45	4.66 $\pm$ 2.53	0.10 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.03	0.00 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.04

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells  
 Mean  $\pm$  S.D.  
 Significantly different from control group; \*:  $P \leq 0.05$  (Dunnett)

- 72 -

Table 9-2. --continued Hematology  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PLT (x10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )	Reticulocyte (%)
Male	0	4	1169 ± 192	2.4 ± 0.2
	1,000	5	1047 ± 74	2.6 ± 0.5
Female	0	5	1276 ± 142	2.0 ± 0.5
	1,000	5	1173 ± 112	2.9 ± 0.5*

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

-73-

Table 10-1. Coagulation  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)
Male	0	5	19.1 ± 0.6	23.9 ± 1.7
	100	5	20.7 ± 3.5	24.9 ± 2.0
	300	5	19.9 ± 1.5	24.0 ± 2.1
	1,000	5	20.4 ± 1.0	25.2 ± 3.7
Female	0	5	17.3 ± 0.9	17.8 ± 2.6
	100	5	17.3 ± 0.8	18.4 ± 0.6
	300	5	17.6 ± 0.9	19.1 ± 1.8
	1,000	5	16.6 ± 0.4	18.7 ± 1.3

Mean ± S.D.

-74-

Table 10-2. Coagulation  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)
Male	0	4	19.4 ± 1.5	24.1 ± 1.7
	1,000	5	21.5 ± 1.4	25.1 ± 2.4
Female	0	5	17.9 ± 0.5	17.9 ± 1.0
	1,000	5	16.9 ± 0.4**	18.6 ± 0.7

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)

- 75 -

Table 11-1. Blood chemistry  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	T.protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	T.cholesterol (mg/dL)
Male	0	5	5.77 ± 0.16	145 ± 16	28.5 ± 16.7	61 ± 10
	100	5	5.62 ± 0.13	163 ± 19	51.0 ± 29.9	61 ± 12
	300	5	5.46 ± 0.15*	148 ± 24	43.5 ± 13.6	57 ± 6
	1,000	5	5.50 ± 0.21*	161 ± 26	51.4 ± 20.7	59 ± 8
Female	0	5	5.93 ± 0.31	115 ± 21	8.5 ± 5.1	63 ± 14
	100	5	5.84 ± 0.20	125 ± 19	17.2 ± 5.5	75 ± 7
	300	5	5.96 ± 0.13	118 ± 13	13.0 ± 6.5	66 ± 6
	1,000	5	5.89 ± 0.26	141 ± 25	20.1 ± 7.3*	71 ± 11

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 76 -



Table 11-1. -continued Blood chemistry  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	T.bilirubin (mg/dL)	Total bile acid ( $\mu$ mol/L)
Male	0	5	12.5 $\pm$ 0.7	0.21 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01	42.3 $\pm$ 23.9
	100	5	12.1 $\pm$ 1.2	0.22 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01	13.4 $\pm$ 5.0
	300	5	11.6 $\pm$ 1.2	0.22 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01	10.8 $\pm$ 4.6
	1,000	5	13.2 $\pm$ 2.4	0.21 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.01	19.4 $\pm$ 15.8
Female	0	5	15.5 $\pm$ 1.7	0.27 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01	16.8 $\pm$ 4.1
	100	5	13.3 $\pm$ 1.1	0.23 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01	11.8 $\pm$ 7.8
	300	5	15.7 $\pm$ 2.0	0.25 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	13.2 $\pm$ 5.8
	1,000	5	14.5 $\pm$ 1.6	0.24 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01	8.8 $\pm$ 1.6

Mean  $\pm$  S.D.

- 77 -

Table 11-1. -continued Blood chemistry  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Gamma-GTP (U/L)
Male	0	5	82 $\pm$ 3	29 $\pm$ 6	860 $\pm$ 126	0.4 $\pm$ 0.1
	100	5	83 $\pm$ 7	31 $\pm$ 5	818 $\pm$ 84	0.3 $\pm$ 0.1
	300	5	78 $\pm$ 9	29 $\pm$ 3	762 $\pm$ 131	0.3 $\pm$ 0.1
	1,000	5	85 $\pm$ 10	31 $\pm$ 5	804 $\pm$ 172	0.4 $\pm$ 0.1
Female	0	5	84 $\pm$ 13	24 $\pm$ 7	409 $\pm$ 75	0.7 $\pm$ 0.1
	100	5	95 $\pm$ 15	22 $\pm$ 3	384 $\pm$ 40	0.8 $\pm$ 0.4
	300	5	88 $\pm$ 12	23 $\pm$ 6	397 $\pm$ 50	0.8 $\pm$ 0.1
	1,000	5	71 $\pm$ 10	21 $\pm$ 3	427 $\pm$ 108	0.8 $\pm$ 0.2

Mean  $\pm$  S.D.

- 78 -

Table 11-1. -continued Blood chemistry  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Calcium (mg/dL)	I.phosphorus (mg/dL)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	5	9.84 ± 0.14	8.27 ± 0.60	143.4 ± 0.5	4.48 ± 0.17	106.6 ± 0.7
	100	5	9.92 ± 0.21	8.75 ± 0.38	144.2 ± 0.3#	4.89 ± 0.17*	108.5 ± 0.2#
	300	5	9.78 ± 0.40	8.69 ± 0.43	143.9 ± 1.5	4.46 ± 0.17	107.2 ± 1.3
	1,000	5	9.65 ± 0.33	9.03 ± 0.68	142.5 ± 0.8	5.04 ± 0.28**	107.2 ± 1.4
Female	0	5	9.78 ± 0.36	7.84 ± 0.64	144.0 ± 1.3	4.46 ± 0.12	109.3 ± 1.3
	100	5	9.66 ± 0.20	7.86 ± 0.48	142.7 ± 1.0	4.36 ± 0.27	108.4 ± 1.8
	300	5	9.75 ± 0.34	7.95 ± 0.61	143.6 ± 0.3	4.26 ± 0.22	108.9 ± 1.8
	1,000	5	9.95 ± 0.12	8.34 ± 0.87	143.7 ± 1.1	4.28 ± 0.29	107.9 ± 1.5

Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05    \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)  
 Significantly different from control group; #: P ≤ 0.05 (Steel)

- 79 -

Table 11-2. Blood chemistry  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	T.protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	T.cholesterol (mg/dL)
Male	0	4	5.55 ± 0.28	149 ± 19	39.3 ± 7.6	55 ± 16
	1,000	5	5.53 ± 0.11	156 ± 18	50.3 ± 21.8	58 ± 11
Female	0	5	5.85 ± 0.15	115 ± 10	11.4 ± 3.0	61 ± 14
	1,000	5	5.95 ± 0.26	129 ± 22	12.4 ± 4.7	65 ± 9

Mean ± S.D.

- 80 -

Table 11-2. --continued Blood chemistry  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	T.bilirubin (mg/dL)	Total bile acid ( $\mu$ mol/L)
Male	0	4	11.5 $\pm$ 1.1	0.27 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.02	23.2 $\pm$ 21.4
	1,000	5	11.6 $\pm$ 1.4	0.26 $\pm$ 0.04	0.03 $\pm$ 0.01	20.9 $\pm$ 14.3
Female	0	5	15.6 $\pm$ 1.2	0.30 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.01	18.7 $\pm$ 20.2
	1,000	5	15.6 $\pm$ 2.6	0.27 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.01	16.4 $\pm$ 6.3

Mean  $\pm$  S.D.

- 81 -

Table 11-2. --continued Blood chemistry  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Gamma-GTP (U/L)
Male	0	4	96 $\pm$ 15	31 $\pm$ 3	486 $\pm$ 70	0.4 $\pm$ 0.1
	1,000	5	84 $\pm$ 6	30 $\pm$ 4	565 $\pm$ 76	0.4 $\pm$ 0.1
Female	0	5	86 $\pm$ 20	25 $\pm$ 3	358 $\pm$ 79	0.9 $\pm$ 0.4
	1,000	5	78 $\pm$ 10	25 $\pm$ 2	375 $\pm$ 31	0.9 $\pm$ 0.2

Mean  $\pm$  S.D.

- 82 -

Table 11-2. --continued Blood chemistry  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Calcium (mg/dL)	I. phosphorus (mg/dL)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	4	9.67 ± 0.32	7.58 ± 0.26	142.6 ± 1.3	4.73 ± 0.22	106.2 ± 1.0
	1,000	5	9.86 ± 0.25	7.71 ± 0.45	143.3 ± 0.6	4.60 ± 0.52	106.1 ± 0.9
Female	0	5	9.74 ± 0.24	7.52 ± 1.02	142.1 ± 1.2	4.55 ± 0.30	107.4 ± 1.6
	1,000	5	9.80 ± 0.30	6.84 ± 0.78	142.8 ± 1.9	4.33 ± 0.25	107.8 ± 1.5

Mean ± S.D.

- 83 -

Table 12-1. Electrophoresis  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (%)	Alpha-1 (%)	Alpha-2 (%)	Beta (%)	Gamma (%)	A/G
Male	0	5	50.6 ± 1.7	22.7 ± 1.4	7.9 ± 0.6	14.8 ± 0.7	4.1 ± 0.5	1.02 ± 0.07
	100	5	51.4 ± 3.2	21.0 ± 0.8	8.4 ± 0.9	15.5 ± 1.4	3.7 ± 0.7	1.07 ± 0.15
	300	5	52.6 ± 2.3	19.4 ± 2.5*	7.9 ± 0.6	15.5 ± 0.5	4.6 ± 0.2	1.12 ± 0.10
	1,000	5	52.9 ± 1.4	18.4 ± 2.0**	8.4 ± 0.6	15.5 ± 1.6	4.8 ± 0.7	1.12 ± 0.07
Female	0	5	52.7 ± 1.6	19.6 ± 2.2	7.5 ± 0.7	15.1 ± 0.5	5.2 ± 1.0	1.12 ± 0.07
	100	5	54.7 ± 3.4	18.4 ± 1.5	7.9 ± 0.3	14.9 ± 1.3	4.0 ± 1.1	1.22 ± 0.18
	300	5	54.1 ± 0.8	17.0 ± 0.8	8.8 ± 0.7**	15.3 ± 1.1	4.8 ± 0.9	1.18 ± 0.04
	1,000	5	55.0 ± 2.3	17.3 ± 1.6	8.1 ± 0.6	15.1 ± 1.3	4.5 ± 1.4	1.23 ± 0.12

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 \*\* : P ≤ 0.01 (Dunnett)

- 84 -

Table 12-1. --continued Electrophoresis  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (g/dL)	Alpha-1 (g/dL)	Alpha-2 (g/dL)	Beta (g/dL)	Gamma (g/dL)
Male	0	5	2.92 ± 0.17	1.31 ± 0.06	0.46 ± 0.04	0.85 ± 0.04	0.23 ± 0.03
	100	5	2.89 ± 0.18	1.18 ± 0.06	0.47 ± 0.05	0.87 ± 0.09	0.21 ± 0.03
	300	5	2.87 ± 0.08	1.06 ± 0.16*	0.43 ± 0.03	0.84 ± 0.03	0.25 ± 0.02
	1,000	5	2.91 ± 0.08	1.02 ± 0.15**	0.46 ± 0.04	0.85 ± 0.06	0.26 ± 0.04
Female	0	5	3.12 ± 0.12	1.17 ± 0.20	0.44 ± 0.04	0.89 ± 0.02	0.30 ± 0.06
	100	5	3.20 ± 0.26	1.07 ± 0.09	0.46 ± 0.01	0.87 ± 0.07	0.23 ± 0.07
	300	5	3.22 ± 0.10	1.01 ± 0.03	0.52 ± 0.03**	0.91 ± 0.08	0.29 ± 0.06
	1,000	5	3.24 ± 0.23	1.02 ± 0.13	0.48 ± 0.04	0.89 ± 0.05	0.26 ± 0.07

Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)

Table 12-2. Electrophoresis  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (%)	Alpha-1 (%)	Alpha-2 (%)	Beta (%)	Gamma (%)	A/G
Male	0	4	48.7 ± 2.9	22.7 ± 3.6	8.0 ± 0.9	16.3 ± 0.9	4.3 ± 0.7	0.95 ± 0.11
	1,000	5	49.7 ± 2.7	21.9 ± 2.1	8.4 ± 1.0	15.9 ± 0.9	4.2 ± 1.3	0.99 ± 0.11
Female	0	5	51.3 ± 1.7	19.8 ± 1.0	7.6 ± 0.3	15.0 ± 0.6	6.3 ± 1.1	1.06 ± 0.07
	1,000	5	51.3 ± 2.4	19.0 ± 1.4	8.3 ± 0.7	15.9 ± 1.0	5.6 ± 1.3	1.05 ± 0.10

Mean ± S.D.

Table 12-2. --continued Electrophoresis  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Albumin (g/dL)	Alpha-1 (g/dL)	Alpha-2 (g/dL)	Beta (g/dL)	Gamma (g/dL)
Male	0	4	2.70 ± 0.14	1.27 ± 0.24	0.45 ± 0.03	0.91 ± 0.04	0.24 ± 0.05
	1,000	5	2.75 ± 0.12	1.21 ± 0.12	0.46 ± 0.06	0.88 ± 0.07	0.23 ± 0.08
Female	0	5	3.00 ± 0.06	1.16 ± 0.09	0.45 ± 0.02	0.88 ± 0.04	0.37 ± 0.07
	1,000	5	3.05 ± 0.18	1.13 ± 0.13	0.49 ± 0.02**	0.95 ± 0.06	0.33 ± 0.08

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*\* : P ≤ 0.01 (Dunnett)

- 87 -

Table 13-1. Urinalysis  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (mL)	Osmotic pressure (mOsm/kg)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	10	12.1 ± 4.1	1550 ± 532	122 ± 49	254.8 ± 94.5	170.0 ± 68.7
	100	5	16.8 ± 13.1	1469 ± 477	120 ± 40	233.2 ± 75.5	161.5 ± 57.2
	300	5	17.1 ± 7.5	1321 ± 425	116 ± 40	216.1 ± 70.1	142.1 ± 50.8
	1,000	10	11.1 ± 2.1	1571 ± 355	128 ± 26	252.2 ± 58.0	170.6 ± 41.4
Female	0	10	15.8 ± 7.1	1205 ± 385	99 ± 33	187.5 ± 61.5	127.7 ± 43.3
	100	5	10.9 ± 4.2	1378 ± 515	109 ± 47	214.2 ± 78.4	145.0 ± 59.3
	300	5	10.3 ± 3.9	1692 ± 516	119 ± 41	251.8 ± 67.6	168.6 ± 57.7
	1,000	10	11.2 ± 3.3	1388 ± 347	115 ± 26	212.3 ± 59.0	145.6 ± 35.8

Mean ± S.D.

- 88 -



Table 13-1. --continued Urinalysis  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Ketone bodies					Glucose (g/dL)					Protein (mg/dL)						
			-	+/-	1+	2+	3+	-	0.1	0.25	0.5	≥1.0	-	+/-	30	100	≥300		
Male	0	10	7	2	1						9	1				2	4	3	1
	100	5	4		1					5							4		1
	300	5	4	1						5						1	2	2	
	1,000	10	8	1	1					10						1	8		1
Female	0	10	10							10						8	2		
	100	5	5							5						3	2		
	300	5	3	2						4	1					1	2	1	1
	1,000	10	10							10						6	3	1	

Ketone bodies : -(negative), +/- (5 mg/dL), 1+ (15 mg/dL), 2+ (40 mg/dL), 3+ (≥80 mg/dL)

- 91 -

Table 13-1. --continued Urinalysis  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Bilirubin			Urobilinogen (E. U./dL)										
			-	1+	2+	3+	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	≥12				
Male	0	10	9	1							9	1				
	100	5	5								5					
	300	5	5								5					
	1,000	10	10								10					
Female	0	10	10								10					
	100	5	5								5					
	300	5	4	1							4	1				
	1,000	10	10								10					

Bilirubin : -(negative), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked)

- 92 -



Table 13-1. --continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes			Leukocytes			Epithelial cells			Casts		Fat globules		Mucous threads		Crystals		
			-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+	-	+	-	+	-	+
Male	0	10		10			10			10			10			10			10	
	100	5		5			5			5			5			5			5	
	300	5		5			5			5			5			4	1		5	
	1,000	10		10			10			10			10			10			4	6
Female	0	10		10			10			10			10			10			2	8
	100	5		5			5			4	1		5			5			5	
	300	5		5			5			5			5			5			5	
	1,000	10		10			10			10			10			10			10	

Erythrocytes, Leukocytes and Epithelial cells (cells/ $\mu$ L) : -(0-4), 1+(5-14), 2+(15-29), 3+(30 or more)  
 Casts, Fat globules, Mucous threads and Crystals : -(not observed), +(observed)

Table 13-2. Urinalysis  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Volume (mL)	Osmotic pressure (mOsm/kg)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	4	10.1 $\pm$ 1.7	2102 $\pm$ 146	179 $\pm$ 5	316.1 $\pm$ 25.0	232.4 $\pm$ 17.4
	1,000	5	13.3 $\pm$ 3.6	1611 $\pm$ 374*	128 $\pm$ 24#	243.1 $\pm$ 48.9*	164.1 $\pm$ 31.0**
Female	0	5	13.8 $\pm$ 5.0	1552 $\pm$ 480	122 $\pm$ 46	221.6 $\pm$ 66.1	151.4 $\pm$ 52.2
	1,000	5	14.2 $\pm$ 6.9	1536 $\pm$ 611	119 $\pm$ 51	223.6 $\pm$ 88.5	155.6 $\pm$ 66.3

Mean  $\pm$  S.D.  
 Significantly different from control group; \*: P  $\leq$  0.05 \*\*; P  $\leq$  0.01 (Dunnett)  
 Significantly different from control group; #: P  $\leq$  0.05 (Steel)

Table 13-2. --continued Urinalysis  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Sodium (mmol/day)	Potassium (mmol/day)	Chloride (mmol/day)
Male	0	4	1.81 ± 0.29	3.18 ± 0.43	2.34 ± 0.29
	1,000	5	1.63 ± 0.20	3.11 ± 0.43	2.10 ± 0.29
Female	0	5	1.51 ± 0.05	2.81 ± 0.25	1.89 ± 0.13
	1,000	5	1.43 ± 0.19	2.73 ± 0.43	1.87 ± 0.22

Mean ± S.D.

- 95 -

Table 13-2. --continued Urinalysis  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Color											pH											Occult blood				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	≥9	-	+/-	1+	2+	3+		
Male	0	4	4																						4				
	1,000	5	5																						5				
Female	0	5	5																						2 3 5				
	1,000	5	5																						1 4 4 1				

Color : 1= Colorless, 2= Slight yellow, 3= Yellow-brown, 4= Red, 5= Red-brown, 6= Dark red, 7= Dark brown, 8= Brown-black, 9= Milky white, 10= Fluorescent green, 11= Blue  
 Occult blood : - (negative), +/- (trace), 1+ (slight), 2+ (moderate), 3+ (marked)

- 96 -

Table 13-2. --continued Urinalysis  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Ketone bodies					Glucose(g/dL)					Protein(mg/dL)				
			-	+/-	1+	2+	3+	-	0.1	0.25	0.5	≥1.0	-	+/-	30	100	≥300
Male	0	4	1		3				3	1				1		1	2
	1,000	5	1	2	2				5						1	2	2
Female	0	5	1		4				4	1					1	2	2
	1,000	5	1		4				5						1	2	2

Ketone bodies : -(negative), +/- (5 mg/dL), 1+(15 mg/dL), 2+(40 mg/dL), 3+(≥ 80 mg/dL)

- 67 -

Table 13-2. --continued Urinalysis  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Bilirubin				Urobilinogen(E.U./dl)							
			-	1+	2+	3+	0.1	1.0	2.0	4.0	8.0	≥12		
Male	0	4	4						3	1				
	1,000	5	4	1					3	2				
Female	0	5	5						2	3				
	1,000	5	5						1	4				

Bilirubin : -(negative), 1+(slight), 2+(moderate), 3+(marked)

- 68 -

Table 13-2. -continued Urinalysis : Microscopic examination of sediment  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Erythrocytes			Leukocytes			Epithelial cells			Casts		Fat globules		Mucous threads		Crystals	
			-	1+	2+ 3+	-	1+	2+ 3+	-	1+	2+ 3+	-	+	-	+	-	+	-	+
Male	0	4		4			4			4			4			4			4
	1,000	5		5			5			5			5			5			5
Female	0	5		5			5			5			5			5			5
	1,000	5		5			5			5			5			5			5

Erythrocytes, Leukocytes and Epithelial cells (cells/ $\mu$ L) : - (0-4), 1+(5-14), 2+(15-29), 3+(30 or more)  
 Casts, Fat globules, Mucous threads and Crystals : - (not observed), + (observed)

- 66 -

Table 14-1. Organ weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidneys (g)
Male	0	5	283 $\pm$ 30	2.12 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.10	8.56 $\pm$ 1.05	2.34 $\pm$ 0.15
	100	5	293 $\pm$ 35	2.08 $\pm$ 0.08	1.07 $\pm$ 0.11	9.48 $\pm$ 1.97	2.40 $\pm$ 0.23
	300	5	306 $\pm$ 23	2.12 $\pm$ 0.08	1.10 $\pm$ 0.07	9.76 $\pm$ 0.80	2.59 $\pm$ 0.11
	1,000	5	272 $\pm$ 22	2.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.11	8.64 $\pm$ 1.30	2.35 $\pm$ 0.32
Female	0	5	189 $\pm$ 8	1.96 $\pm$ 0.06	0.72 $\pm$ 0.04	5.85 $\pm$ 0.29	1.62 $\pm$ 0.15
	100	5	182 $\pm$ 14	1.88 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.06	5.63 $\pm$ 0.64	1.46 $\pm$ 0.17
	300	5	181 $\pm$ 24	1.90 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.07	5.75 $\pm$ 0.52	1.58 $\pm$ 0.16
	1,000	5	186 $\pm$ 6	1.88 $\pm$ 0.10	0.73 $\pm$ 0.07	6.42 $\pm$ 0.63	1.57 $\pm$ 0.06

Mean  $\pm$  S.D.

- 100 -

Table 14-1. --continued Organ weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (g)	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)	Thyroid (mg)
Male	0	5	0.53 ± 0.09	47 ± 6	2.79 ± 0.26		20 ± 3
	100	5	0.55 ± 0.10	45 ± 6	3.03 ± 0.19		17 ± 2
	300	5	0.60 ± 0.12	54 ± 7	2.98 ± 0.15		22 ± 5
	1,000	5	0.53 ± 0.09	48 ± 5	2.82 ± 0.20		20 ± 6
Female	0	5	0.46 ± 0.07	60 ± 8		80 ± 4	15 ± 4
	100	5	0.35 ± 0.04*	62 ± 8		64 ± 10**	15 ± 2
	300	5	0.36 ± 0.05*	64 ± 7		79 ± 5	14 ± 2
	1,000	5	0.43 ± 0.06	64 ± 10		73 ± 7	15 ± 4

Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)

-101-

Table 14-1. --continued Organ weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Pituitary (mg)	Thymus (mg)	Epididymides (mg)	Mandibular gland (mg)
Male	0	5	8 ± 2	513 ± 101	625 ± 80	516 ± 68
	100	5	8 ± 1	484 ± 69	658 ± 39	532 ± 107
	300	5	10 ± 1	540 ± 81	654 ± 35	525 ± 34
	1,000	5	8 ± 3	483 ± 122	603 ± 62	500 ± 29
Female	0	5	12 ± 2	452 ± 85		369 ± 27
	100	5	10 ± 1	463 ± 35		353 ± 39
	300	5	9 ± 2	432 ± 101		370 ± 18
	1,000	5	10 ± 4	406 ± 63		377 ± 43

Mean ± S.D.

-102-

Table 14-2. Organ weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (g)	Heart (g)	Liver (g)	Kidneys (g)
Male	0	4	379 ± 30	2.16 ± 0.09	1.28 ± 0.07	11.09 ± 0.86	2.79 ± 0.15
	1,000	5	346 ± 20	2.11 ± 0.08	1.21 ± 0.11	10.02 ± 0.97	2.64 ± 0.18
Female	0	5	225 ± 9	1.99 ± 0.08	0.81 ± 0.04	6.31 ± 0.47	1.71 ± 0.04
	1,000	5	206 ± 14*	1.97 ± 0.10	0.81 ± 0.07	6.26 ± 0.96	1.70 ± 0.27

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*; P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 103 -

Table 14-2. -continued Organ weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (g)	Adrenals (mg)	Testes (g)	Ovaries (mg)	Thyroid (mg)
Male	0	4	0.66 ± 0.11	56 ± 2	3.37 ± 0.42		19 ± 4
	1,000	5	0.65 ± 0.15	51 ± 8	3.17 ± 0.11		20 ± 4
Female	0	5	0.50 ± 0.07	65 ± 4		75 ± 12	14 ± 1
	1,000	5	0.47 ± 0.14	66 ± 9		86 ± 13	14 ± 1

Mean ± S.D.

- 104 -

Table 14-2. --continued Organ weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Pituitary (mg)	Thymus (mg)	Epididymides (mg)	Mandibular gland (mg)
Male	0	4	11 ± 2	397 ± 11	964 ± 54	619 ± 38
	1,000	5	9 ± 2	484 ± 134	944 ± 35	589 ± 37
Female	0	5	13 ± 2	436 ± 66		448 ± 50
	1,000	5	13 ± 4	447 ± 90		409 ± 46

Mean ± S.D.

- 105 -

Table 15-1. Organ weight per body weight  
---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Heart (%)	Liver (%)	Kidneys (%)
Male	0	5	283 ± 30	0.754 ± 0.073	0.366 ± 0.010	3.025 ± 0.108	0.831 ± 0.048
	100	5	293 ± 35	0.721 ± 0.112	0.366 ± 0.025	3.215 ± 0.323	0.824 ± 0.071
	300	5	306 ± 23	0.695 ± 0.053	0.360 ± 0.011	3.186 ± 0.079	0.849 ± 0.039
	1,000	5	272 ± 22	0.737 ± 0.040	0.365 ± 0.017	3.161 ± 0.244	0.861 ± 0.073
Female	0	5	189 ± 8	1.037 ± 0.059	0.381 ± 0.018	3.097 ± 0.093	0.855 ± 0.058
	100	5	182 ± 14	1.037 ± 0.087	0.378 ± 0.011	3.081 ± 0.139	0.798 ± 0.054
	300	5	181 ± 24	1.061 ± 0.149	0.389 ± 0.023	3.194 ± 0.265	0.878 ± 0.102
	1,000	5	186 ± 6	1.010 ± 0.064	0.395 ± 0.032	3.446 ± 0.252*	0.843 ± 0.022

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 106 -

Table 15-1. -continued Organ weight per body weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (%)	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)	Thyroid (%)
Male	0	5	0.188 ± 0.024	0.017 ± 0.001	0.998 ± 0.155		0.007 ± 0.001
	100	5	0.187 ± 0.015	0.016 ± 0.002	1.046 ± 0.118		0.006 ± 0.000
	300	5	0.195 ± 0.029	0.018 ± 0.001	0.977 ± 0.065		0.007 ± 0.002
	1,000	5	0.194 ± 0.027	0.018 ± 0.002	1.038 ± 0.073		0.007 ± 0.002
Female	0	5	0.240 ± 0.029	0.032 ± 0.004		0.042 ± 0.002	0.008 ± 0.002
	100	5	0.192 ± 0.007**	0.034 ± 0.004		0.035 ± 0.007	0.008 ± 0.001
	300	5	0.202 ± 0.024*	0.036 ± 0.006		0.044 ± 0.009	0.008 ± 0.002
	1,000	5	0.229 ± 0.023	0.034 ± 0.005		0.039 ± 0.003	0.008 ± 0.002

Mean ± S.D.  
 Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 \*\*: P ≤ 0.01 (Dunnett)

- 107 -

Table 15-1. -continued Organ weight per body weight  
 ---Administration period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Pituitary (%)	Thymus (%)	Epididymides (%)	Mandibular gland (%)
Male	0	5	0.003 ± 0.001	0.180 ± 0.021	0.224 ± 0.040	0.182 ± 0.011
	100	5	0.003 ± 0.000	0.165 ± 0.014	0.227 ± 0.024	0.181 ± 0.020
	300	5	0.003 ± 0.000	0.177 ± 0.026	0.214 ± 0.014	0.172 ± 0.009
	1,000	5	0.003 ± 0.001	0.177 ± 0.038	0.222 ± 0.021	0.184 ± 0.014
Female	0	5	0.006 ± 0.001	0.239 ± 0.041		0.195 ± 0.011
	100	5	0.006 ± 0.001	0.255 ± 0.030		0.193 ± 0.009
	300	5	0.005 ± 0.001	0.237 ± 0.038		0.206 ± 0.023
	1,000	5	0.006 ± 0.002	0.219 ± 0.039		0.202 ± 0.019

Mean ± S.D.

- 108 -



Table 15-2. Organ weight per body weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Body weight (g)	Brain (%)	Heart (%)	Liver (%)	Kidneys (%)
Male	0	4	379 ± 30	0.571 ± 0.035	0.338 ± 0.013	2.930 ± 0.111	0.739 ± 0.052
	1,000	5	346 ± 20	0.611 ± 0.029	0.352 ± 0.041	2.898 ± 0.193	0.766 ± 0.073
Female	0	5	225 ± 9	0.889 ± 0.074	0.359 ± 0.018	2.809 ± 0.167	0.761 ± 0.045
	1,000	5	206 ± 14*	0.958 ± 0.057	0.393 ± 0.024*	3.018 ± 0.280	0.823 ± 0.101

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 109 -

Table 15-2. --continued Organ weight per body weight  
---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Spleen (%)	Adrenals (%)	Testes (%)	Ovaries (%)	Thyroid (%)
Male	0	4	0.174 ± 0.026	0.015 ± 0.001	0.888 ± 0.063		0.005 ± 0.001
	1,000	5	0.189 ± 0.038	0.015 ± 0.002	0.921 ± 0.078		0.006 ± 0.001
Female	0	5	0.225 ± 0.036	0.029 ± 0.001		0.034 ± 0.004	0.006 ± 0.000
	1,000	5	0.225 ± 0.054	0.032 ± 0.004		0.042 ± 0.005*	0.007 ± 0.000

Mean ± S.D.  
Significantly different from control group; \*: P ≤ 0.05 (Dunnett)

- 110 -

Table 15-2. --continued Organ weight per body weight  
 ---Recovery period---

Exp. No. 9934 (115-213)

Sex	Dose level (mg/kg)	No. of animals	Pituitary (%)	Thymus (%)	Epididymides (%)	Mandibular gland (%)
Male	0	4	0.003 ± 0.001	0.105 ± 0.008	0.255 ± 0.012	0.164 ± 0.009
	1,000	5	0.003 ± 0.000	0.140 ± 0.041	0.274 ± 0.024	0.171 ± 0.015
Female	0	5	0.006 ± 0.001	0.194 ± 0.030		0.200 ± 0.023
	1,000	5	0.006 ± 0.002	0.215 ± 0.031		0.198 ± 0.014

Mean ± S.D.

- 111 -

Table 16-1. Summary of gross findings with statistical analysis  
 ( sacrificed, administration period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level (mg/kg)	No. of animals	Male animals				Female animals				
		0	100	300	1,000	0	100	300	1,000	
Organ	Findings	5	5	5	5	5	5	5	5	
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>										
lung	brown patch/zone	1	0	0	0	0	0	0	0	
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>										
stomach	white patch/zone	0	1	0	0	0	0	0	0	
liver	hepatodiaphragmatic nodule	0	0	0	0	0	0	1	0	
	white patch/zone	0	0	0	1	0	0	0	0	
<b>URINARY SYSTEM</b>										
kidney	cyst	0	0	1	0	0	1	0	0	
	scarred	1	1	0	0	1	2	1	1	
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>										
uterus	cyst	-	-	-	-	0	1	0	0	
	dilated lumen	-	-	-	-	2	2	0	2	
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>										
thyroid gland	nodule	0	0	0	0	0	1	0	0	

- 112 -

Table 16-2.

Summary of gross findings with statistical analysis  
( sacrificed, recovery period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals		Female animals	
		0	1,000	0	1,000
Organ	Findings	4	5	5	5
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>					
liver	adhesion with kidney	0	0	1	0
<b>URINARY SYSTEM</b>					
kidney	cyst	0	1	0	1
	scarred	1	0	0	0
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>					
uterus	dilated lumen	-	-	0	1

-113-

Table 17-1.

Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed, administration period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals				Female animals				
		5	100	300	1,000	5	100	300	1,000	
Organ	Findings	5	5	5	5	5	5	5	5	
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>										
lung	accumulation of foamy cells	3	-	-	2	3	-	-	2	
	bronchopneumonia	1	-	-	0	0	-	-	0	
	osseous metaplasia	1	-	-	0	0	-	-	0	
trachea	dilatation, gland	1	-	-	0	0	-	-	1	
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>										
glandular stomach	dilatation, gland	0	0	-	0	1	-	-	0	
	epidermal cyst	0	1	-	0	0	-	-	0	
exocrine pancreas	degeneration, acinar cell	1	-	-	0	0	-	-	0	
liver	fatty change, hepatocyte	1	1	0	0	3	2	2	2	
	necrosis, hepatocyte, focal	0	0	0	1	0	0	0	0	
	microgranuloma	5	4	5	4	5	4	4	4	
	hepatodiaphragmatic nodule	0	0	0	0	0	0	1	0	
	hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	0	0	3	5**	0	0	1	5**	
<b>URINARY SYSTEM</b>										
kidney	basophilic tubule	3	1	0	1	1	0	0	1	
	cyst	0	0	0	1	1	1	0	1	
	hyaline droplet	1	0	0	1	0	0	0	0	
	mineralization	1	0	0	1	1	0	0	2	
	fibrosis, focal	1	1	1	0	0	0	0	0	
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>										
epididymis	cellular infiltration, lymphocyte	1	-	-	1	-	-	-	-	
prostate	cell debris, lumen	1	-	-	0	-	-	-	-	
	cellular infiltration, lymphocyte	5	-	-	2	-	-	-	-	
uterus	cyst	-	-	-	-	0	1	-	0	

Significantly different from control group; \*\* :  $P \leq 0.01$  (Fisher)

-114-

Table 17-1. --continued Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed, administration period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals				Female animals			
		0	100	300	1,000	0	100	300	1,000
Organ	Findings	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>									
uterus	dilatation, lumen	-	-	-	-	2	1	-	2
vagina	epidermal cyst	-	-	-	-	1	-	-	0
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>									
thyroid gland	ectopic thymus	1	-	-	0	0	0	-	0
	ultimobranchial remnant	2	-	-	0	1	0	-	3

- 115 -

Table 17-2. Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed, recovery period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals		Female animals	
		0	1,000	0	1,000
Organ	Findings	4	5	5	5
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>					
lung	accumulation of foamy cells	3	2	1	2
trachea	dilatation, gland	1	1	0	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>					
exocrine pancreas	degeneration, acinar cell	0	1	1	0
	cellular infiltration, mononuclear	0	0	1	0
	focus, hypertrophic, basophilic	0	0	1	0
cecum	cellular infiltration, mononuclear	1	0	0	0
liver	adhesion with kidney	0	0	1	0
	fatty change, hepatocyte	1	0	3	2
	microgranuloma	4	4	5	5
<b>URINARY SYSTEM</b>					
kidney	basophilic tubule	2	2	1	0
	cyst	0	1	1	1
	hyaline droplet	1	1	0	0
	mineralization	3	1	2	0
	fibrosis, focal	1	2	1	0
	hyperplasia, renal tubule	0	0	1	0
urinary bladder	cellular infiltration, lymphocyte	0	0	1	0
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>					
prostate	cellular infiltration, lymphocyte	3	2	-	-

- 116 -

Table 17-2. -continued Summary of histological findings with statistical analysis  
( sacrificed, recovery period )

Exp. No. 9934 (115-213)

Dose level ( mg/kg )	No. of animals necropsied	Male animals		Female animals	
		4	5	5	5
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>					
uterus					
	dilatation, lumen	-	-	0	1
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>					
pituitary gland					
	cyst	0	1	0	0
thyroid gland	ultimobranchial remnant	1	4	3	2
adrenal gland	mineralization	0	0	1	0
<b>SPECIAL SENSE SYSTEM</b>					
eye					
	dysplasia, retina	0	0	1	0
<b>INTEGUMENTARY SYSTEM</b>					
skin					
	cellular infiltration, mononuclear	1	0	1	0

- 117 -

# トリメチルアミンの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Trimethylamine on Bacteria

### 要約

トリメチルアミンについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537) および *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) の5菌株を用いた。試験は2回繰り返して実施し、S9 mix無添加群の各試験菌株およびS9 mix添加群のTA100, TA1535ならびにTA1537で39.1~1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の6用量、S9 mix添加群のWP2 *uvrA* で156~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の6用量、同群のTA98で78.1~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  の7用量で試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加群および添加群のいずれにおいても、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なかった。

以上の結果より、本試験条件下ではトリメチルアミンは、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

### 方法

#### 1. 試験菌株

細菌を用いる復帰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 TA1537<sup>1)</sup> ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> 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(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成11年3月31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 KGaA)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 $-80^{\circ}\text{C}$ 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)

オリエンタル酵母工業(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%リン酸二カルcium・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:No.1)を加え、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

##### 2) トップアガー(軟寒天)

塩化ナトリウム0.5%を含む0.6% Bacto-agar(Difco)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 mmol/L L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mmol/L 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 mmol/L 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のバツフル付三角フラスコに2.5%ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No. 2: OXOID)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50  $\mu\text{L}$ 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、 $37^{\circ}\text{C}$ で8時間振盪(往復振盪: 100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

##### 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の組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADPH	4 $\mu\text{mol}$
NADH	4 $\mu\text{mol}$
Na-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$
精製水	残量

##### 5. 被験物質

トリメチルアミン(ロット番号:MT381012)は純度30.8%(不純物としてジメチルアミン10 ppm以下を含む)の水溶液である。本剤は水に易溶で、水溶液中で安定である。三菱ガス化学(株)(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷暗所で保管した。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. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質を日本薬局方注射用水(株)大塚製薬工場)を用いて希釈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、速やかに処理を行った。なお、本被験物質情報から揮発性が疑われたため、調製に際しては蓋付きの試験管を用いた。また、原液中での被験物質濃度が30.8%であることを考慮して調製した。

## 7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量を用いて予備的な試験を実施した。S9 mix無添加群の各試験菌株ならびにS9 mix添加群のTA100, TA1535およびTA1537で1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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S9 mix無添加群の各試験菌株ならびにS9 mix添加群のTA100, TA1535およびTA1537で1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , S9 mix添加群のWP2 *uvrA*ならびにTA98で5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とし、それぞれ6~7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°C)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( $\text{NaN}_3$ :和光純薬工業(株))
- 9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA: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<sup>1)</sup>の改良法であるブレインキューベーション法に準じて、S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。蓋付き試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100  $\mu\text{L}$ 、次いでS9 mix無添加群の場合、0.1 mol/Lナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500  $\mu\text{L}$ 、S9 mix添加群の場合、S9 mixを500  $\mu\text{L}$ 添加し、さらに試験菌液100  $\mu\text{L}$ を加え、37°Cで20分間振盪培養(ブレインキューベーション)した。培養終了後、あらかじめ45°Cに保温したトッパアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。各プレートをビニールテープで密封して、37°C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( $\times 60$ )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。なお、本試験1回目においては、S9 mix添加群のWP2 *uvrA*で5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ において強い

生育阻害作用の影響により、背景菌が目視できるほどのコロニーを形成していたため、コロニーアナライザーの使用は不適切と判断し、目視でコロニー数を計数した。各濃度につき3枚のプレートを使用した。また、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

1回目の試験結果をTable 1~2に、2回目の試験結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群ならびに添加群ともすべての試験菌株の高用量群において、トリメチルアミン処理による生育阻害作用が観察された。しかしながら、復帰突然変異コロニー数については、S9 mix無添加群、S9 mix添加群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試験菌株において、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、コロニー計数時、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、トリメチルアミン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。

なお、本被験物質の変異原性に関する報告はなかったが、類縁体であるdimethylamineについてはAmes試験で疑陽性<sup>3)</sup>、dimethylamine hydrochlorideでは染色体異常試験で陰性<sup>4)</sup>、methylamineではマウスリンフォーマ試験で陽性<sup>5)</sup>との報告があった。

## 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).
- 3) N. R. Green and J. R. Savage, *Mutat. Res.*, **57**, 115 (1978).
- 4) M. Ishidate Jr. and S. Odashima, *Mutat. Res.*, **48**, 337(1977).
- 5) W. J. Caspary and B. Myhr, *Mutat. Res.*, **174**(4), 285 (1986).

連絡先

試験責任者：中嶋 圓  
試験担当者：益森勝志，北澤倫世，板倉真由実  
(財)食品農医薬品安全性評価センター  
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2  
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)  
Shoji Masumori, Michiyo Kitazawa,  
Mayumi Itakura  
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)  
582-2 Shioshinden, Fukude-cho, Iwata-gun,  
Shizuoka, 437-1213, Japan  
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393



Table 1 Results of the bacterial reversion test of trimethylamine (1st trial)  
[direct method: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	122	134	119	9	10	11	21	20	22	20	22	22	7	8	5
		[125 $\pm$ 8]	[10 $\pm$ 1]	[21 $\pm$ 1]	[21 $\pm$ 1]	[7 $\pm$ 2]										
	39.1	121	111	120	10	11	15	24	24	26	20	20	21	4	4	4
		[117 $\pm$ 6]	[12 $\pm$ 3]	[25 $\pm$ 1]	[20 $\pm$ 1]	[4 $\pm$ 0]										
	78.1	113	117	112	14	10	13	24	23	24	29	31	29	9	7	7
		[114 $\pm$ 3]	[12 $\pm$ 2]	[24 $\pm$ 1]	[30 $\pm$ 1]	[8 $\pm$ 1]										
	156	121	120	124	12	11	10	20	24	20	25	21	26	6	4	4
	[122 $\pm$ 2]	[11 $\pm$ 1]	[21 $\pm$ 2]	[24 $\pm$ 3]	[5 $\pm$ 1]											
313	109	114	106	9	10	12	23	21	21	19	22	20	5	6	5	
	[110 $\pm$ 4]	[10 $\pm$ 2]	[22 $\pm$ 1]	[20 $\pm$ 2]	[5 $\pm$ 1]											
625	116	112	113	10	10	12	28	22	26	24	27	23	5	3	9	
	[114 $\pm$ 2]	[11 $\pm$ 1]	[25 $\pm$ 3]	[25 $\pm$ 2]	[6 $\pm$ 3]											
1250	68*	64*	67*	7*	10*	6*	18*	16*	16*	14*	15*	19*	7*	6*	5*	
	[66 $\pm$ 2]	[8 $\pm$ 2]	[17 $\pm$ 1]	[16 $\pm$ 3]	[6 $\pm$ 1]											
Positive control		530	506	522*	404	413	416*	120	128	123*	696	661	657*	426	413	434*
		[519 $\pm$ 12]	[411 $\pm$ 6]	[124 $\pm$ 4]	[671 $\pm$ 21]	[424 $\pm$ 11]										

a) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b)  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 

\*: Growth inhibition was observed

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

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	128	127	124	12	11	15	27	25	30	30	32	30	11	13	10
		[126 $\pm$ 2]	[13 $\pm$ 2]	[27 $\pm$ 3]	[31 $\pm$ 1]	[11 $\pm$ 2]										
	39.1	121	116	123	11	12	13							9	13	11
		[120 $\pm$ 4]	[12 $\pm$ 1]											[11 $\pm$ 2]		
	78.1	114	120	119	10	11	11				26	32	27	10	12	11
		[118 $\pm$ 3]	[11 $\pm$ 1]					[28 $\pm$ 3]	[11 $\pm$ 1]					[11 $\pm$ 1]		
	156	118	122	120	11	9	12	28	25	26	29	26	28	10	10	11
	[120 $\pm$ 2]	[11 $\pm$ 2]	[26 $\pm$ 2]	[28 $\pm$ 2]	[10 $\pm$ 1]											
313	119	120	119	11	14	10	22	24	22	25	29	27	10	13	9	
	[119 $\pm$ 1]	[12 $\pm$ 2]	[23 $\pm$ 1]	[27 $\pm$ 2]	[11 $\pm$ 2]								[11 $\pm$ 2]			
625	107	105	106	12*	9*	12*	23	24	25	31	26	24	9*	7*	11*	
	[106 $\pm$ 1]	[11 $\pm$ 2]	[24 $\pm$ 1]	[27 $\pm$ 4]	[9 $\pm$ 2]								[9 $\pm$ 2]			
1250	110	104*	97*	8*	9*	8*	33	33	37	31*	31*	29*	14*	18*	10*	
	[104 $\pm$ 7]	[8 $\pm$ 1]	[34 $\pm$ 2]	[30 $\pm$ 1]	[14 $\pm$ 4]											
2500							19*	18*	22*	6*	10*	9*				
							[20 $\pm$ 2]	[8 $\pm$ 2]								
5000							5*	9*	11*	0*	0*	0*				
							[8 $\pm$ 3]	[0 $\pm$ 0]								
Positive control		758	753	761*	286	302	300*	808	772	798*	270	298	284*	158	162	172*
		[757 $\pm$ 4]	[296 $\pm$ 9]	[793 $\pm$ 19]	[284 $\pm$ 14]	[164 $\pm$ 7]										

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  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 

\*: Growth inhibition was observed

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

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	125	117	109	12	13	15	25	25	20	20	20	19	5	7	5
		[117 $\pm$ 8]			[13 $\pm$ 2]			[23 $\pm$ 3]			[20 $\pm$ 1]			[6 $\pm$ 1]		
	39.1	123	120	117	13	14	15	22	26	29	19	18	21	11	8	8
		[120 $\pm$ 3]			[14 $\pm$ 1]			[26 $\pm$ 4]			[19 $\pm$ 2]			[9 $\pm$ 2]		
	78.1	122	126	125	13	12	14	26	21	22	18	20	19	8	6	6
		[124 $\pm$ 2]			[13 $\pm$ 1]			[23 $\pm$ 3]			[19 $\pm$ 1]			[7 $\pm$ 1]		
	156	127	112	118	17	14	14	25	25	24	24	17	17	6	5	4
		[119 $\pm$ 8]			[15 $\pm$ 2]			[25 $\pm$ 1]			[19 $\pm$ 4]			[5 $\pm$ 1]		
313	125	129	135	10	12	10	25	27	26	23	20	22	7	4	6	
	[130 $\pm$ 5]			[11 $\pm$ 1]			[26 $\pm$ 1]			[22 $\pm$ 2]			[6 $\pm$ 2]			
625	130	145	137	11	12	10	28	26	20	21	21	18	6	5	7	
	[137 $\pm$ 8]			[11 $\pm$ 1]			[25 $\pm$ 4]			[20 $\pm$ 2]			[6 $\pm$ 1]			
1250	75*	75*	71*	6*	8*	8*	18*	19*	20*	16*	16*	12*	7*	4*	5*	
	[74 $\pm$ 2]			[7 $\pm$ 1]			[19 $\pm$ 1]			[15 $\pm$ 2]			[5 $\pm$ 2]			
Positive control		525	508	480*	409	402	427*	160	155	159*	523	552	553*	411	419	419*
		[504 $\pm$ 23]			[413 $\pm$ 13]			[158 $\pm$ 3]			[543 $\pm$ 17]			[416 $\pm$ 5]		

a) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b)  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
c) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\*: Growth inhibition was observed

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

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 uvrA			TA98			TA1537		
Test substance	0	118	125	122	16	15	16	27	29	30	25	30	24	10	15	10
		[122 $\pm$ 4]			[16 $\pm$ 1]			[29 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 3]		
	39.1	120	121	123	11	12	14							8	11	13
		[121 $\pm$ 2]			[12 $\pm$ 2]									[11 $\pm$ 3]		
	78.1	124	121	107	17	12	12				30	25	26	11	14	13
		[117 $\pm$ 9]			[14 $\pm$ 3]						[27 $\pm$ 3]			[13 $\pm$ 2]		
	156	117	129	129	13	10	13	23	26	28	31	28	28	14	10	13
		[125 $\pm$ 7]			[12 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 3]			[29 $\pm$ 2]			[12 $\pm$ 2]		
	313	125	120	126	13	10	13	29	30	31	26	28	27	13	14	12
		[124 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 2]			[30 $\pm$ 1]			[27 $\pm$ 1]			[13 $\pm$ 1]		
625	123	109	111	15*	12*	13*	22	24	25	32	28	28	11*	13*	10*	
	[114 $\pm$ 8]			[13 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 2]			[29 $\pm$ 2]			[11 $\pm$ 2]			
1250	112*	114*	114*	9*	7*	8*	30	25	30	17*	22*	18*	12*	9*	12*	
	[113 $\pm$ 1]			[8 $\pm$ 1]			[28 $\pm$ 3]			[19 $\pm$ 3]			[11 $\pm$ 2]			
2500							19*	20*	21*	0*	0*	0*				
							[20 $\pm$ 1]			[0 $\pm$ 0]						
5000							0*	0*	0*	0*	0*	0*				
							[0 $\pm$ 0]			[0 $\pm$ 0]						
Positive control		759	776	742*	286	290	252*	602	609	623*	362	368	383*	140	148	150*
		[759 $\pm$ 17]			[276 $\pm$ 21]			[611 $\pm$ 11]			[371 $\pm$ 11]			[146 $\pm$ 5]		

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  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\*: Growth inhibition was observed

# トリメチルアミンのチャイニーズハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of Trimethylamine on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

トリメチルアミンが培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、短時間処理法-S9ならびに+S9処理とも591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (10 mM相当)を最高処理濃度とし、73.9~591  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4用量を設定した。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。-S9ならびに+S9処理とも148~591  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、S9 mix非存在下で染色体構造異常の出現頻度が疑陽性(±)となり、S9 mix存在下では高用量においてのみ陽性反応(+)が認められた。従って、再現性あるいは用量依存性をみるため、-S9ならびに+S9処理とも303~591  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4用量を用いて確認試験を実施した。いずれの試験系とも378~591  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量について染色体異常の観察を行った結果、S9 mix非存在下ならびに存在下とも試験用量に依存した染色体構造異常の増加が観察された。

本被験物質処理により培養液のpHがアルカリ性を示していたが、森田らの報告ならびに染色体構造異常の誘発頻度の程度を考慮すると陽性であると考えられた。すなわち、-S9処理ではpHの影響が無い用量で試験用量に依存した構造異常の誘発が認められていること、+S9処理ではpHの影響により構造異常の出現頻度が数%上昇したとしても処理群での構造異常出現頻度が40%以上であることから本被験物質による構造異常誘発は陽性であると判断した。

以上の結果より、本試験条件下ではトリメチルアミンは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

### 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/IU)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK KGaA)を10 vol%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞を

融解し3~5日ごとに継代したものを使用した。なお、細胞増殖抑制試験では継代数12、染色体異常試験では同14、確認試験では同21の細胞を用いた。

#### 2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(旭テクノグラス(株))に、メンブランフィルター(0.45  $\mu\text{m}$ :Featuring Corning and Costar Products)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(GIBCO Life Technologies, Inc)を最終濃度で10 vol%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液を冷暗所(4  $^{\circ}\text{C}$ )に保存した。

#### 3. 培養条件

CO<sub>2</sub>インキュベーター(Formaおよび三洋電機メダイカシステム(株))を用い、CO<sub>2</sub>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。また、S9 mixの組成は松岡らの方法<sup>1)</sup>に従った。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.3 mL
MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADP	4 $\mu\text{mol}$
HEPES緩衝液(pH 7.2)	4 $\mu\text{mol}$
精製水	残量

#### 5. 被験物質

トリメチルアミン(ロット番号:MT381012)は純度30.8%(不純物としてジメチルアミン10 ppm以下を含む)の水溶液である。本剤は水に易溶で、水溶液中で安定である。三菱ガス化学(株)(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで冷暗所で保管した。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. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質を日本薬局方生理食塩液(株)大

塚製薬工場)を用いて希釈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、速やかに処理を行った。なお、本被験物質情報から揮発性が疑われたため、調製には蓋付きの試験管を用いた。ただし、原液中での被験物質濃度が30.8%であることを考慮して調製した。

7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

細胞培養用フラスコに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。S9 mix非存在下(-S9 mix)あるいは存在下(+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 vol%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 w/v%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 vol%エタノール, 1 vol%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、最高用量の591 μg/mLにおいても短時間処理法S9 mix非存在下で60%以上、S9 mix存在下で80%以上の細胞が生存していた(Fig. 1-2)。

なお、被験物質暴露終了時、290 μg/mL以上において培養液のpHがアルカリ性を示していた。

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もとに、染色体異常試験では短時間処理法-S9処理ならびに+S9処理とも591 μg/mL(10 mM相当)を最高処理濃度とし、以下公比2で減じた計4用量ならびに溶媒対照群を設定した。

-S9処理において染色体構造異常の出現に関し疑陽性、+S9処理において1用量のみ陽性と判定されたことから、いずれの試験系とも591 μg/mLを最高処理濃度とした確認試験を実施し、公比1.25で減じた計4用量を設定した。

なお、陽性対照として、-S9処理でマイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業(株))を0.1 μg/mL、+S9処理でシクロホスファミド(CP:塩野義製薬(株))を12.5 μg/mLの用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

培養面積25 cm<sup>2</sup>の細胞培養用フラスコを用い、細胞増殖抑制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 μg/mLとなるようコロセミド(GIBCO Life Technologies, Inc)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 mmol/L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 vol%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各フラスコあたり100個、すなわち用量当たり200個

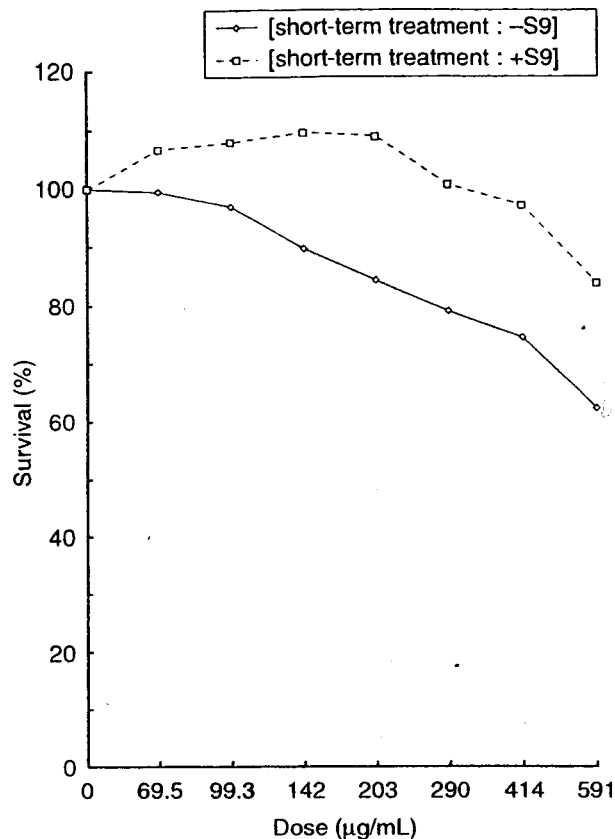


Fig. 1 Dose-survival curves of trimethylamine [short-term treatment: 6 hr]

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による分類法<sup>2)</sup>に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。

11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めない場合(-gap)につい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<sup>3)</sup>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、統計的手法を用いた検定は実施しなかった。また、分裂中期像の20%にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であるD<sub>20</sub>値を最小二乗法により算出し、一定濃度(mg/mL)あたりの交換型異常(cte)出現数を示す比較値であるTR値を、染色分体交換の出現頻度(%)を被験物質濃度(mg/mL換算)で割ることにより算出した。

## 結果および考察

短時間処理法での試験結果を Table 1~2 に示した。トリメチルアミン処理群の場合、S9 mix 非存在下においては染色体異常の僅かな誘発が認められ(出現頻度は 296  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 5.0%, 591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 7.0%), S9 mix 存在下においては高用量の 591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  においてのみ染色体構造異常の明確な誘発が観察された(出現頻度は 18.5%)。また、試験用量に依存した細胞増殖抑制作用がいずれの処理法においても観察された。なお、染色体異常の誘発は、疑陽性との判定あるいは 1 用量のみでの陽性反応であることから、再現性あるいは用量依存性をみるために確認試験を実施した。その結果、被験物質処理群の場合、S9 mix 非存在下ならびに存在下のいずれにおいても染色体構造異常の出現に明確な用量依存性が認められた (Table 3~4)。一方、S9 mix 非存在下における陽性対照物質 MMC で処理した細胞、および S9 mix 存在下における陽性対照物質 CP で処理した細胞では本試験、確認試験とも染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

本被験物質処理直後、培養液の pH は 591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  でおよそ 8.9~9.0 を示したが、暴露終了時では 8.2~8.6 であった。森田らの報告<sup>4,5)</sup>によると、今回の pH の変動では -S9 処理においては試験系に影響をおよぼさないこと、+S9 処理では極僅かに染色体構造異常を誘発することが示されている。-S9 処理では pH の影響が無い用量で試験用量に依存した構造異常の誘発が認められていること、+S9 処理では pH の影響により構造異常の出現頻度が数%上昇したとしても処理群での構造異常出現頻度が 40% 以上であることから本被験物質による構造異常誘発は陽性であると判断した。

変異原性の強さに関する相対的比較値である  $D_{20}$  値は 0.474 (mg/mL)、TR 値は 67.7 と算出され、既知変異原性物質に比較してトリメチルアミンの変異原性は弱いことを示していた。

以上の試験結果から、本試験条件下においてトリメチルアミンのチャイニーズハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陽性と判定した。

なお、本被験物質の変異原性に関する報告はなかったが、類縁体である dimethylamine については Ames 試験で疑陽性<sup>6)</sup>、dimethylamine hydrochloride では染色体異常試験で陰性<sup>7)</sup>、methylamine ではマウスリンフォーム試験で陽性<sup>8)</sup>との報告があった。

## 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, 東京, 1987, pp.19-24.

- 4) T. Morita, Y. Watanabe, K. Takeda and K. Okumura, *Mutat. Res.*, **225**, 55 (1989).
- 5) T. Morita, T. Nagaki, I. Fukuda and K. Okumura, *Mutat. Res.*, **262**, 159 (1991).
- 6) N. R. Green and J. R. Savage, *Mutat. Res.*, **57**, 115 (1978).
- 7) I. Motoi Jr. and O. Shigeyoshi, *Mutat. Res.*, **48**, 337 (1977).
- 8) J. C. William and M. Briaan, *Mutat. Res.*, **174** (4), 285 (1986).

## 連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 益森勝志, 北澤倫世, 菊池正憲,

植田ゆみ子, 熊平智司, 鈴木ゆみ子,

加藤木かな江, 梶原玲子

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2

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

## Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)

Shoji Masumori, Michiyo Kitazawa,

Masanori Kikuchi, Yumiko Ueta,

Satoshi Kumadaira, Yumiko Suzuki,

Kanae Katogi, Reiko Kajihara

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

582-2 Shiohinden, Fukude-cho, Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan

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

染色体異常試験

Table 1 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with trimethylamine [short-term treatment: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline *	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0) -	1(0.5) -	-
Test substance	148	6	103.1	200	0	0	1	0	0	0	1(0.5) -	6(3.0) -	-
	296	6	83.2	200	3	5	6	0	0	0	10(5.0) $\pm$	4(2.0) -	$\pm$
	591	6	61.1	200	3	4	11	0	0	0	14(7.0) $\pm$	3(1.5) -	$\pm$
MMC <sup>b</sup>	0.1	6	79.6	200	13	34	90	0	1	0	103(51.5)+	0(0.0) -	+

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth: others, -gap:total number of cells with aberrations except gap  
a) Negative control  
b) Positive control (mitomycin C)

Table 2 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with trimethylamine [short-term treatment: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline *	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0) -	0(0.0) -	-
Test substance	148	6	72.6	200	1	0	1	0	0	0	1(0.5) -	3(1.5) -	-
	296	6	66.5	200	3	1	2	0	0	0	2(1.0) -	3(1.5) -	-
	591	6	37.8	200	7	10	30	0	0	0	37(18.5)+	3(1.5) -	+
CP <sup>a</sup>	12.5	6	61.8	200	3	44	142	0	1	0	146(73.0)+	2(1.0) -	+

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth: others, -gap:total number of cells with aberrations except gap  
a) Negative control  
b) Positive control (cyclophosphamide)

Table 3 Results of the confirmative examination of trimethylamine [short-term treatment: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline <sup>a</sup>	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0) -	1(0.5) -	-
Test substance	378	6	42.2	200	3	7	17	0	0	0	18(9.0)±	5(2.5) -	±
	473	6	23.0	200	5	15	41	0	0	0	45(22.5)+	7(3.5) -	+
	591	6	6.4	200	4	14	35	0	0	0	45(22.5)+	8(4.0) -	+
MMC <sup>b</sup>	0.1	6	58.9	200	6	35	69	0	0	0	80(40.0)+	3(1.5) -	+

Abbreviations; ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others, -gap: total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (mitomycin C)

Table 4 Results of the confirmative examination of trimethylamine [short-term treatment: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline <sup>a</sup>	0	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0(0.0) -	3(1.5) -	-
Test substance	378	6	52.4	200	1	1	4	0	0	0	4(2.0) -	4(2.0) -	-
	473	6	42.1	200	0	2	9	0	0	0	11(5.5)±	8(4.0) -	±
	591	6	16.7	200	7	29	80	0	1	0	90(45.0)+	3(1.5) -	+
CP <sup>b</sup>	12.5	6	53.9	200	11	34	121	0	0	0	126(63.0)+	2(1.0) -	+

Abbreviations; ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others, -gap: total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (cyclophosphamide)

# トリメチルアミンのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

## Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of Trimethylamine by Oral Administration in Rats

### 要約

トリメチルアミンは、砂糖大根から砂糖、ベタインを抽出した残余中から主として抽出される化合物である<sup>1)</sup>。その複合体は植物、動物、特に魚の組織中に大量に存在し、ヒトおよび動物では腸内酵素によって生成され、通常、肝臓において代謝を受け、ジメチルアミンあるいはトリメチルアミンオキシドになって尿中に排出される<sup>2)</sup>。ヒトでは、この代謝酵素(トリメチルアミンオキシダーゼ)の先天性欠損症が知られており、その特徴的な臭気から魚臭病と呼ばれている<sup>3)</sup>。

1984年、インドのボパールで起きた殺虫剤製造工場での事故によって、大気中に大量のメチルイソシアニドが放出されたために、多数の死者が発生し、その後もこの地方で不妊、流産、死産、早産の発現率が増加した事例は、近年における最大の環境汚染事故として有名である<sup>4)</sup>。後年行われた動物実験の結果から、メチルイソシアニドには発癌性および生殖毒性があることが報告されている<sup>5)</sup>。本試験の被験物質であるトリメチルアミンはメチルイソシアニドの主要代謝物であるが<sup>6)</sup>、妊娠マウスにトリメチルアミンを投与すると胎児期および出生後の発育抑制が特に雄で強く認められたとする報告もある<sup>7)</sup>。しかし、トリメチルアミンの反復投与毒性および生殖発生毒性についての報告はない。今回、トリメチルアミンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。すなわち、Sprague-Dawley系(Crj:CD(SD)IGS)ラットの雌雄(各13匹/群)に、トリメチルアミンの0(媒体)、8、40および200 mg/kgを交配前2週間ならびに交配期間2週間を通して経口投与し、さらに雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育4日まで投与を継続した。試験結果は以下のように要約される。

### 1. 反復投与毒性

200 mg/kg投与群において雄に2例、雌に1例の死亡が認められた。雌雄ともに200 mg/kg投与群では異常呼吸音および投与直後の流涎、胃腸管に潰瘍および炎症性変化、粘膜上皮の過形成や粘膜下織の水腫がみられた。また、同群の雄では体重の増加抑制傾向、摂餌量の減少ならびに総蛋白濃度およびアルブミン濃度の減少が認められた。

雌の体重および摂餌量、雌雄の器官重量、尿検査結果および血液学検査結果にはトリメチルアミン投与の影響

はなかった。

### 2. 生殖発生毒性

性周期、雌雄動物の交尾率、受胎率には、トリメチルアミン投与の影響は認められなかった。また、分娩および哺育状態の異常は観察されず、産児数、分娩率、妊娠期間、妊娠黄体数、着床数ならびに着床率にはトリメチルアミン投与の影響はなかった。

生児出生率、出産生児数、哺育4日の生児数、新生児の4日の生存率、性比、生児の体重および形態にもトリメチルアミン投与の影響は認められなかった。

### 3. 無作用量

以上の試験成績から、本試験条件下ではトリメチルアミンの反復投与毒性に関する無作用量は雌雄とも40 mg/kg/day、生殖発生毒性の無作用量は雌雄共に200 mg/kg/day、また、産児に対する無作用量も200 mg/kg/dayであると判断される。

## 方法

### 1. 被験物質

本試験には、三菱ガス化学(株)(新潟)より提供されたトリメチルアミンの水溶液(ロット番号:M381012、含有量:30.8%)を用いた。トリメチルアミンの水溶液は無色透明で、不純物として10 ppm以下のジメチルアミンを含有していた。受領したトリメチルアミンは、入手後、使用時まで冷蔵保管した。被験物質の試験期間中の安定性は、残余被験物質を提供元で再分析することにより確認した。

投与にあたっては、供給された30.8%水溶液を日局注射用水(光製薬(株)、製造番号:9707SA)にて希釈し、いずれの用量においても1回の投与量が10 mL/kg体重になるように濃度を調整した。試験中に調製した投与検体(0.08, 0.40, 2.00 w/v%)には所定濃度のトリメチルアミンが含有されていたことを確認した。なお、調製検体中の被験物質の安定性について確認した結果、0.08~10 w/v%の濃度では、冷蔵、遮光の条件下で少なくとも8日間安定であった。

### 2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも7週齢にて購入した日本チャールス・リバー(株)筑波飼育センター生産のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS, SPF)を使用した。購入した



動物は、入荷後2週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、雄は検疫終了日の体重を基に、雌は定期的に4日あるいは5日で性周期を回帰している動物を選択し、さらに検疫終了日の体重を考慮して、体重別層化無作為抽出法により群分けして、各群とも雌雄各13匹を配した。

各動物は基準温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、基準湿度50~65%、換気回数約15回/時ならびに照明12時間(午前7時~午後7時)に制御された飼育室で、金属製金網床ケージに個別に収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア(株))および水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させた。妊娠14日(交尾確認日=妊娠0日)以後の雌動物については、プラスチック製ラット用繁殖ケージに収容し、床敷として紙パルプ製チップ(ALPHA-dri、加商(株))を適宜供給した。

### 3. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は、投与量設定のために実施した予備試験の結果を参考に設定し、予備試験の投与量は、急性経口投与毒性予備試験の結果をもとに設定した。急性経口投与毒性予備試験では、250、500ならびに1000 mg/kgのトリメチルアミンを各群雌雄各3匹のラットに投与した結果、500 mg/kg投与群では雄で1例、雌で2例、1000 mg/kg投与群では雄で2例、雌で3例の死亡が認められた。250 mg/kg以上の投与群の生存例においても体重の増加抑制がみられた。また、一般状態の変化として、500 mg/kg以上の投与群で異常姿勢、体温の低下、鎮静等の所見が認められた。死亡例の剖検所見においては腹水、胃粘膜の肥厚および赤色化、腸管の赤色化ならびに腎臓の皮質の淡色化等がみられた。トリメチルアミンの水溶液は強アルカリ性で皮膚への腐食性を有することから、急性経口投与毒性予備試験において認められた消化管の変化や腹水は、トリメチルアミン水溶液の物性による影響と考えられた。250 mg/kgの単回投与では体重の増加抑制のみが観察され、一般状態の変化、消化管への影響は明確ではなかったが、反復投与することにより、一般状態の著しい変化、消化管の毒性が重篤になる可能性が予想されたことから、反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合予備試験の高用量を急性経口投与毒性予備試験の低用量の約2分の1量である100 mg/kgと設定した。中用量以下は公比を2としてそれぞれ50ならびに25 mg/kgに設定して、14日間反復強制経口投与し、溶媒を同容量投与した対照群の動物と比較した。その結果、雌雄とも死亡例はなく、一般状態の変化、体重および摂餌量の推移、血液学検査および血液生化学検査結果のいずれにも明らかなトリメチルアミン投与の影響はなかった。これらのことから、トリメチルアミンの100 mg/kgの14日間の反復投与では、雌雄とも明確な毒性を見出すことができず、42日間の反復投与毒性試験の高用量としては低すぎる用量であると判断した。一方、トリメチルアミンの250 mg/kgの投与量は単回投与における死亡発現量の半分量であり、42日間の反復投与によって投与期間中に動物が死亡する可能性が示唆された。以上の結果から、本試験の高用量を200 mg/kgと設定し、以下公比5で除して40および8 mg/kgを中および低用量

と設定した。

なお、対照群には注射用水をトリメチルアミン投与群と同一条件にて投与した。

各用量の投与検体は、雄に対しては交配前2週間と2週間の交配期間および交配期間終了後、剖検日前日まで2週間の連続42日間、また、雌に対しては交配前2週間と交尾が認められるまで最長2週間の交配期間、ならびに交尾した雌では妊娠期間を通して分娩の後、哺育4日(分娩日=哺育0日)まで、交尾はしたが分娩しなかった雌は妊娠24日相当日まで、交尾しなかった雌は連続54日間、毎日1回、ラット用胃管を用いて経口投与した。毎日の投与は午前11時から午後3時の間に行い、各動物に投与する液量(体重1 kg当たり10 mL)は最新時の体重を基に算出した。

### 4. 観察および検査

#### 1) 親動物

##### A. 一般状態の観察

雌雄とも全例について、飼育期間中毎日1回以上、投与期間中は投与前後の毎日2回以上観察した。

##### B. 体重測定

雄は全例について、投与1(投与初日)、7、14、21、28、35、42日および解剖日に、雌は全例について、投与1、7および14日に測定し、交配までに期間を要した雌では投与21および28日に、交尾が確認されなかった雌ではさらに投与35ならびに42日にも体重を測定した。また、交尾した雌では妊娠0、7、14および20日に、分娩した雌では哺育0、4日および解剖日に体重を測定した。交尾は確認されたが分娩しなかった雌は、妊娠25日相当日(解剖日)に体重を測定した。

##### C. 摂餌量測定

雄では、投与1、7、13、29、35および41日に、雌では、投与1、7および13日にそれぞれ摂餌量を測定し、翌日までの摂餌量を測定した。2週間の交配期間中の摂餌量は測定しなかった。交尾が確認されなかった雌では投与29、35および41日にも摂餌量を測定した。さらに交尾した雌では、妊娠0、7、14および20日に、分娩した雌では、哺育0および3日にそれぞれ翌日までの摂餌量を測定した。

##### D. 性周期

全例の雌について、交尾が確認されるまで膣垢塗抹標本を作製した。膣垢像より性周期を観察し、発情期の間の平均日数を算出した。

##### E. 交配

交配は投与15日の夕方から最長2週間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。200 mg/kg投与群の1組では、交配期間中の交尾確認前に雄が死亡したため(交配10日目に死亡)、同群内の既に交尾した雄動物と引き続き交配させた。

交尾の確認は毎朝、膣栓および膣垢標本中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配の結果から、各群について交尾率((交尾動物数

/同居動物数)×100), 受胎率((受胎動物数/交尾動物数)×100), 同居開始から交尾までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

#### F. 分娩および哺育状態の観察

交尾を確認した雌は全例を自然分娩させた。分娩状態が直接観察できた動物についてはその状態を観察し、直接観察できなかった動物についても、分娩後の徴候から分娩困難や遅延などの分娩障害の有無を判断して記録した。分娩後は哺育状態を毎日観察した。

分娩の確認は午前9時~11時に実施し、この時間帯に分娩が終了していることを確認した動物については、その日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎてから分娩を終了した動物については、翌日を分娩日とした。

分娩を確認した全例について妊娠期間(妊娠0日から分娩日までの日数)を算定し、出産率((生児出産雌数/受胎動物数)×100)を各群について求めた。

#### G. 尿検査

各投与群の雌雄各5例について、投与6週に動物を代謝ケージに収容し約4時間尿あるいは新鮮尿を採取して、pH, 潜血, 蛋白, 糖, ウロビリノーゲン, ケトン体, ビリルビンを試験紙法(クリニテック200+, バイエル・三共(株))により、色調ならびに混濁度を視診により、それぞれ検査した。

#### H. 血液学検査

雄全例は投与42日の翌日に、分娩した雌は哺育4日の翌日に、交尾をしたが分娩しなかった雌は妊娠25日相当日に、交尾しなかった雌は投与54日の翌日に、それぞれ前日より18から24時間絶食させた後、剖検に先立ちペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈より採血し、以下の測定を行った。先ずクエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血し血漿を分離して、プロトロンビン時間、活性部分トロンボプラスチン時間(光散乱検出法, CA-1000, 東亜医用電子(株))を測定した。続いて、EDTA-2Kを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コールターエレクトロニクス(株))により、赤血球数、白血球数、平均赤血球容積、血小板数(以上、電気抵抗法)および血色素量(吸光度法)を測定し、これらを基に平均赤血球血色素量、ヘマトクリット値および平均赤血球血色素濃度を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)を視算した。なお、対照群ならびに高用量群については、網状赤血球比率を測定した。

#### I. 血液生化学検査

血液学検査用の採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロシュ・ダイアグノスティクス(株))を用いて総蛋白濃度(ビウレット法), アルブミン濃度(BCG法), 総コレステロール濃度(COD・DAOS法), トリグリセライド濃度(GPO・DAOS法), ブドウ糖濃度(グルコキナーゼG6PDH法), 尿素窒素濃度(ウレアーゼGLDH法), クレアチニン濃度(Jaffé法), アルカリフォスファターゼ活性(GSCC法), GOTおよびGPT活性(IFCC法), 総ビリルビン濃度(Jendrassik/Grof法), カ

ルシウム濃度(OCPC法), 無機リン濃度(モリブデン酸直接法),  $\gamma$ -GTP活性( $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)を測定し、A/G比を算出した。また、全自動電解質分析装置(EA05, (株)A&T)により、塩素、ナトリウムおよびカリウムの各濃度(イオン電極法)を測定した。

#### J. 病理学検査

採血後、全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を行った。その際、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓および副腎、雄ではさらに精巣および精巣上体の重量を測定し、併せて比体重値(相対重量)を算出した。雌では卵巣および子宮を摘出し、卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を、子宮は着床数をそれぞれ数え、着床率((着床数/妊娠黄体数)×100)を算出した。全例の脳、下垂体、脊髄、消化管、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、心臓、胸腺、甲状腺、気管、肺、膀胱、腸間膜リンパ節、下顎リンパ節、坐骨神経、大腿骨髄および全ての雄動物の精囊ならびに前立腺腺葉、全ての雌動物の腔、卵巣ならびに子宮は0.1 Mリン酸緩衝10 vol%ホルマリン液(pH 7.2)に固定した。肺は注入固定を行った。全ての雄動物の精巣および精巣上体はブアン液に固定して保存し、その後、長期保存のために0.1 Mリン酸緩衝10 vol%ホルマリン液に置換した。対照群および高用量群の雌雄各5例の固定した器官は、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って、病理組織学検査を実施した。なお、精巣および精巣上体、卵巣ならびに病理学検査の結果、異常が認められた胃については、全例の動物について病理組織学検査を実施した。

#### 2) 出生児

##### A. 産児数の算定

哺育0日に産児数(生児+死亡児)を調べ、分娩率((産児数/着床痕数)×100)および生児出産率((出産生児数/着床痕数)×100)を求めた。産児については、外表奇形の有無および性別を調べ、性比((雄の生児数/雌の生児数)×100)を算出した。

##### B. 死亡児数の算定

死亡児数を毎日調べ、出生率((出産生児数/産児数)×100)および新生児の4日の生存率((哺育4日の生児数/哺育0日の生児数)×100)を求めた。死亡児は剖検し、異常の有無および内部器官の肉眼的観察を行った。

##### C. 体重測定

哺育0日および4日に個別に体重を測定した。

##### D. 剖検

哺育4日に全例をエーテル吸入により致死させて剖検し、外表および内部器官の肉眼的観察を実施した。

#### 5. 統計解析

交尾率ならびに受胎率についてはFisherの直接確率検定を行った。病理組織学検査所見のうち、グレード分けしたデータはMann-WhitneyのU検定により、陽性グレードの合計値はFisherの直接確率の片側検定により対照群との間で有意差検定を行った。その他の体重、摂

餌量ならびに定期解剖例の血液学、血液生化学検査の値および器官重量は、個体ごとに得られた値あるいはliterごとの平均値を1標本として、Dunnett法による多重比較検定を行った。有意水準はいずれも5%とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 一般状態

200 mg/kg投与群においては、雄で投与25日ならびに投与42日に各1例、雌で妊娠22日(投与38日)に1例の死亡が認められた。

投与25日に死亡した雄は、投与19日から流涎、削瘦、異常呼吸音、呼吸困難を示し、死亡前日から外陰部周囲の被毛の汚染、軟便が認められた。投与42日に死亡した雄は、投与10日から非連続的ではあったが、流涎、削瘦、異常呼吸音、呼吸困難、体温の低下、耳介蒼白、ふらつき歩行および鼻周囲褐色汚染が認められた。雌の死亡例では投与11日から、非連続的に流涎、異常呼吸音が観察された。

生存動物では、200 mg/kg投与群の雄において、投与9日以降流涎が10例に、異常呼吸音が3例に、接触反応の減弱が1例に、それぞれ観察され、同群の雌においても投与9日以降、流涎が10例に、異常呼吸音が3例に、削瘦が1例に、それぞれ観察された。40 mg/kg以下の投与群では、雌雄ともに一般状態の異常は観察されなかった。

#### 2) 体重 (Table 1, 2)

雄では、200 mg/kg投与群において体重には有意差は認められなかったが、累積体重増加量は対照群に比較して小さく体重の増加抑制傾向が認められた。40 mg/kg以下の投与群の体重は、対照群と同様に推移した。

雌では、体重推移に対照群とトリメチルアミン各投与群との間で有意差は認められなかった。

#### 3) 摂餌量 (Table 3, 4)

200 mg/kg投与群の雄の摂餌量は、投与13および41日に有意に減少した。一方、雌の摂餌量には、対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 4) 尿検査

尿検査の結果、雌雄ともいずれの検査項目についても、トリメチルアミンの投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

#### 5) 血液学検査 (Table 5, 6)

雄では40 mg/kg以上の投与群において、平均赤血球色素濃度の有意な増加がみられたが、他の赤血球関連の測定項目には差が認められず、病理組織学検査においても骨髓、脾臓等に血液学検査にみられた変化に関連すると考えられる変化は認められなかったことから、偶発

的な有意差であると判断した。さらに、40 mg/kg投与群では血小板数の有意な減少がみられたが、200 mg/kg投与群には認められないことから偶発的な有意差であると判断した。雌では、いずれの検査項目についてもトリメチルアミン投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

#### 6) 血液生化学検査 (Table 7, 8)

雄の200 mg/kg投与群においては総蛋白濃度およびアルブミン濃度の有意な減少ならびに尿素窒素濃度およびクレアチニン濃度の有意な増加が認められた。

雌では、40 mg/kg以上の投与群において尿素窒素濃度の有意な増加が認められた。

#### 7) 病理学検査

##### A. 雄

##### イ. 肉眼所見

200 mg/kg投与群の7例の前胃粘膜に肥厚がみられ、そのうち3例には陥凹部、1例には硬化部も認められた。さらに、投与期間中に死亡した2例を含む3例の腺胃粘膜に赤色あるいは暗赤色の領域がみられ、死亡した動物の1例には前胃粘膜にも赤色域が認められた。また、死亡した2例の胃および腸管にはガスが貯留しており、十二指腸および空腸粘膜の赤色化あるいは空腸および回腸に赤色調の内容物が観察された。

精巣および精巣上体では200 mg/kg投与群で死亡したうちの1例、40 mg/kg投与群の1例に小型化が認められ、このうち200 mg/kg投与群の1例には前立腺および精囊の小型化もみられた。また、死亡した2例では胸腺および脾臓も小型化を呈していたほか、そのうちの1例は脾臓の淡色化、腸間膜リンパ節の小型化ならびに副腎の暗色化および腫大が認められ、他の1例では肺の暗色化がみられた。その他、対照群の精巣上体に結節、下顎リンパ節に暗赤色化がみられた。

##### ロ. 器官重量 (Table 9)

雄の器官重量には、対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。

#### ハ. 病理組織学検査 (Table 10)

精巣では200 mg/kg投与群の投与期間終了時に屠殺した1例の精細管で伸長した精子細胞の変性が、投与期間中に死亡した2例のうち1例の精細管で精母細胞および円形の精子細胞の変性が認められた。これらの例の精巣上体では管腔内に細胞残屑がみられたほか、精子細胞の変性がみられた例では変性した精子が、精母細胞に変化がみられた例では精子数の減少がそれぞれ観察された。また、トリメチルアミン各投与群では萎縮した精細管がみられ、他の例と比較して程度の強い例では精細管内に多核巨細胞ならびに精巣上体に細胞残屑が観察されたが、対照群とトリメチルアミン各投与群の間で発現頻度および程度には明らかな差は認められなかった。その他、精巣上体では対照群で精子肉芽腫、40 mg/kg投与群の間質でリンパ球の浸潤がそれぞれみられた。

前立腺および精囊では、200 mg/kg投与群で投与期間

中に死亡した例のうち精巢に変化がみられた1例で萎縮が認められた。また、200 mg/kg投与群および対照群の間質にリンパ球浸潤がみられ、他の例と比較して程度の強い例では上皮に好中球およびリンパ球の浸潤も観察されたが、両群間で発現頻度および程度に明らかな差は認められなかった。

胃では200 mg/kg投与群の全例の前胃に扁平上皮の過形成が認められ、粘膜では炎症細胞の浸潤、粘膜下織では水腫および肉芽を伴っていた。また、5例の粘膜に糜爛がみられそのうちの2例では潰瘍、1例では出血が認められたほか、漿膜に肉芽がみられる例もあった。さらに、前胃の糜爛および潰瘍の程度が他の例に比べ比較的強かった1例の腺胃では、粘膜に糜爛、出血および炎症細胞の浸潤が、粘膜下織に水腫が認められた。投与期間中に死亡した2例では前胃に扁平上皮の過形成が観察されたほか、1例の十二指腸および空腸の粘膜上皮にうっ血、盲腸の粘膜下織に好中球の浸潤を伴う水腫がみられたが、他の異常所見は認められなかった。

肝臓では、200 mg/kg投与群で投与期間中に死亡した例のうち、1例に限局性の壊死が観察された。また、200 mg/kg投与群および対照群に門脈周囲性の脂肪化がみられたが、両群間の発現頻度および程度に差は認められなかった。

脾臓では200 mg/kg投与群で投与期間中に死亡した例のうち、1例に萎縮が観察された。また、200 mg/kg投与群および対照群のほとんどの例に髄外造血および褐色色素の沈着がみられたが、両群間の発現頻度および程度に差は認められなかった。

また、200 mg/kg投与群および対照群では腎臓の皮質に好塩基性尿細管、髄質に鉍質沈着が、心臓の心筋に変性/線維化が、肺に泡沫細胞の集簇がみられたが、両群間の発現頻度および程度に差は認められなかった。

その他、対照群の甲状腺で異所性の胸腺組織、死亡した例の肺で限局性の出血がみられたが、他の観察器官に異常は認められなかった。

## B. 雌

### イ. 肉眼所見

200 mg/kg投与群の7例の前胃粘膜に肥厚がみられ、そのうち5例は陥凹部、4例は水腫を伴っていた。また、40および8 mg/kg投与群の各1例の腺胃粘膜に暗色あるいは黒色の点がみられた。投与期間中死亡した1例の胃および腸管ではガスが貯留していたほか、胸腺の小型化および肺の暗色化が認められた。その他、200、40 mg/kg投与群および対照群の胸腺にも小型化が認められたほか、200 mg/kg投与群には腎臓の淡色域が、対照群では肝臓に白色点あるいは子宮内腔の拡張がみられた。

### ロ. 器官重量 (Table 9)

雌の器官重量には、対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。

### ハ. 病理組織学検査 (Table 10)

子宮では200 mg/kg投与群および対照群の不妊動物各1例に内腔の拡張がみられ、そのうち対照群の例は200

mg/kg投与群の例と比較して程度が強く、腔上皮に好中球の浸潤を伴っており、腔には角化上皮が観察された。一方、200 mg/kg投与群の不妊例の腔には粘液分泌上皮および角化上皮がみられた。その他、妊娠中に死亡した例の腔には粘液分泌上皮が観察された。卵巣には異常は認められなかった。

胃では200 mg/kg投与群の11例の前胃に扁平上皮の過形成がみられ、そのうち妊娠中に死亡した例を含む8例の粘膜に糜爛あるいは潰瘍、炎症細胞の浸潤が認められたほか、7例の粘膜下織に水腫や肉芽がみられた。また、潰瘍の程度が他の例と比較して強い3例の粘膜では出血がみられ、そのうち2例では漿膜にも肉芽が認められた。対照群の2例の前胃粘膜でも、潰瘍あるいは糜爛、炎症細胞の浸潤を伴う扁平上皮の過形成が観察され、そのうち1例の粘膜下織には水腫および肉芽もみられた。一方、妊娠中に死亡した例では、腺胃粘膜に糜爛、潰瘍ならびに出血が認められた。その他、対照群の1例の腺胃粘膜にも糜爛がみられたほか、200 mg/kg投与群の盲腸の漿膜に肉芽が、対照群の直腸の粘膜下織に水腫がみられた。

肝臓では200 mg/kg投与群で妊娠中に死亡した1例に限局性の壊死が認められた。また、200 mg/kg投与群および対照群に門脈周囲性の脂肪化がみられたが、両群間の発現頻度および程度に明らかな差は認められなかった。

脾臓では、200 mg/kg投与群で妊娠中に死亡した1例に萎縮が認められたほか、200 mg/kg投与群および対照群のほとんどの例で髄外造血や褐色色素の沈着がみられたが、両群間の発現頻度および程度に差は認められなかった。

その他、腎臓では皮質に好塩基性尿細管、近位尿細管の空胞変性、間質にリンパ球浸潤がみられ、心臓では心筋の変性/線維化が、肺では血管に鉍質沈着が、甲状腺では異所性の胸腺組織が認められた。他の観察器官に異常は認められなかった。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 親動物

#### A. 性周期 (Table 11)

性周期の観察結果にトリメチルアミン投与の影響は認められなかった。

#### B. 交配成績 (Table 11)

対照群ならびに40 mg/kg投与群の各1組では、2週間の交配期間中に交尾しなかった。また、交尾はしたが不妊であった動物が、対照群に1組、200 mg/kg投与群に1組認められた。しかし、交尾率、受胎率、同居から交尾までに要した日数およびその間に回帰した発情期の回数には、対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。

#### C. 分娩および哺育状態

40 mg/kg投与群の1例では分娩日に産児の回集が認められず、産児の体表温も低下していたが、翌日には回復していた。その他の動物には、分娩および哺育状態の異

常は観察されなかった。200 mg/kg投与群の哺育状態は全て良好であったことから、40 mg/kg投与群の1例にみられた哺育状態の不良はトリメチルアミン投与の影響ではないと考えられた。

#### D. 出産率および妊娠期間 (Table 12)

40 mg/kg投与群の1例が妊娠25日に出産したが、他の動物は妊娠22～23日に出産した。妊娠期間が24日を超える例は、まれではあるものの今回の試験に使用した系統においても自然発生的に認められる所見であること、ならびに高用量群では全例が妊娠22～23日に出産したことから、この1例の変化はトリメチルアミン投与の影響ではない可能性が高いと判断した。出産率および妊娠期間には対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。

#### E. 妊娠黄体数、着床数および着床率 (Table 12)

200 /kg投与群で妊娠22日に死亡した1例を含め、妊娠黄体数、着床数および着床率には、対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。

### 2) 出生児

#### A. 生存性 (Table 12)

分娩率、生児出産率、出生率、新生児の4日の生存率、出生生児数、哺育4日の生児数および性比には、対照群とトリメチルアミン各投与群との間に有意差は認められなかった。死亡児は、対照群で5例、40 mg/kg投与群で7例、200 mg/kg投与群で3例みられたが、死亡時期および死亡児数に特定の傾向は認められなかった。

#### B. 体重 (Table 12)

いずれの投与群も雌雄ともに、対照群と同様な体重推移を示した。

#### C. 形態

いずれの出生児にも外表奇形は認められず、哺育4日の剖検においても内部器官に異常は認められなかった。また、死亡児の剖検でも異常は観察されなかった。

## 考察

200 mg/kg投与群の雄で2例、雌で1例の死亡がみられた。これらの動物の生前の一般状態の変化として投与後の流涎、異常呼吸音がみられ、さらに雄では、削瘦、呼吸困難、肛門周囲の汚れ、軟便等といった一般状態の悪化を伴った。また剖検の結果、雌雄いずれも胃および腸管にはガスが貯留し、胃粘膜上皮の過形成および炎症像がみられた。トリメチルアミンの単回経口投与毒性試験でも200 mg/kg以上の投与群で、同様な一般状態の変化および剖検所見を伴った死亡が認められている。これらの動物の死因は明らかではないが、次の様な要因が働いた可能性が考えられる。まず、トリメチルアミンが腐食性をもつ強塩基性刺激物質であることから、経口投与により胃粘膜および腸管粘膜を強度に障害し全身状態が悪化していた可能性は高い。本試験の剖検の結果、200 mg/kg投与群の雌雄に前胃粘膜の暗色化および肥厚等の病変が観察され、病理組織学検査の結果、前胃および

腺胃の潰瘍、糜爛、炎症、肉芽が観察された。また、同様の変化は、胃と比較して頻度、程度ともに軽度であったが盲腸にもみられている。一方、トリメチルアミンはニコチン性アセチルコリン受容体のアゴニストであることが明らかになっていることから<sup>9)</sup>、呼吸循環器に対しニコチン類似の交感神経興奮作用を呈し、さらに興奮が進行して神経筋接合部の脱分極性遮断作用が死因となった可能性も考えられる。

生存動物においては200 mg/kg投与群で、投与後の一過性の流涎ならびに異常呼吸音が観察され、同群の雄では体重増加の抑制傾向がみられた。トリメチルアミンの単回経口投与毒性試験では200 mg/kgの投与により体重の増加抑制が認められ、125 mg/kg投与群では異常呼吸音が、350 mg/kg投与群では流涎がみられていることから、本試験で認められた雄の体重増加抑制傾向および異常呼吸音等の一般状態の変化はトリメチルアミン投与の影響によるものと考えられた。

本試験では病理組織学検査の結果、胃の潰瘍、炎症、肉芽組織の増殖を伴った前胃粘膜上皮の過形成が観察された。トリメチルアミンの水溶液には局所刺激性があることが知られており、前胃粘膜が刺激性物質により増殖性変化を起こすことから<sup>9)</sup>、消化管にみられた増殖性病変はトリメチルアミン水溶液の刺激に基づく変化と考えられる。

トリメチルアミンは主に肝臓で代謝を受け、ジメチルアミンやトリメチルアミンオキシドとして腎臓から排出される<sup>2)</sup>。腎臓障害時には、トリメチルアミンを含む脂肪族化合物の血中濃度が増加するとの報告がみられ<sup>2)</sup>、トリメチルアミンの代謝、排泄経路である肝臓や腎臓においては影響が発現する可能性が考えられる。本試験においては、尿素窒素濃度の増加が雌では40 mg/kg以上の投与群、雄では200 mg/kg投与群で認められ、200 mg/kg投与群の雄ではクレアチニン濃度の増加がみられた。しかし、これらの測定値は当研究所の背景データから逸脱する値ではない事から、今回の試験で認められた有意差は偶発的なものである可能性が高いと判断した。また、尿検査、器官重量ならびに病理組織学検査結果のいずれにも、腎臓の異常ならびに腎臓以外に血中尿素窒素濃度を变化させる可能性が考えられる広範囲の組織崩壊あるいは肝臓における合成過剰等を示唆する所見は認められなかったことから、トリメチルアミンの投与に基づく腎障害は確認されないものと判断した。

以上の結果から、200 mg/kgのトリメチルアミンの反復投与により動物が死亡したこと、雄では体重の増加抑制傾向および摂餌量の減少がみられ、雌雄ともに胃腸管粘膜の著しい病理学変化が認められたことから、雌雄動物の一般毒性学的な無作用量は40 mg/kg/dayと推定された。

病理学検査の結果、生殖関連器官にトリメチルアミン投与によると考えられる異常は認められず、性周期観察の結果にも影響はみられなかった。また、雌雄動物の交尾率、受胎率、母動物の出産率、妊娠期間、哺育状態、妊娠黄体数、着床数および着床率ならびに産児の生存性、

性比, 体重および形態にトリメチルアミン投与の影響は認められなかった。以上のことから, 生殖発生毒性的な無作用量は雌雄ともに200 mg/kg/day, 産児に対する無作用量も200 mg/kg/dayと考えられた。前述の通り, トリメチルアミンはメチルイソシアニドの主要代謝物であり, メチルイソシアニドは生殖毒性を有することが明らかとなっているが, トリメチルアミンにはその作用は認められなかった。

以上の結果から, 本試験条件下ではトリメチルアミンの一般毒性的変化に関する無作用量は40 mg/kg/day, また, 生殖発生毒性的な変化は認められなかった事から無作用量は雌雄ともに200 mg/kg/day, 産児に対する無作用量も200 mg/kg/dayであると推察される。

#### 文献

- 1) "The Merck Index," 12th. edition., eds. by S. Budavari, et al., Merck & Co. Inc., Rahway, 1996, p.1527.
- 2) S. Lewis, M. A. Eastwood and W. G. Brydon, *British Journal of Nutrition*, **54**, 43(1985).
- 3) J. R. Humbert, K. B. Hammond and W. E. Hathaway, *Lancet*, **2**, 770(1970).
- 4) D. R. Varma, *J. Environ. Sci. Health*, **A26**, 1437(1991).
- 5) D. R. Varma, *J. Environ. Sci. Health*, **27**, 265(1987).
- 6) D. R. Varma, I. Guest and S. Smith, *J. Environ. Sci. Health*, **30**, 1(1990).
- 7) I. Guest and D. R. Varma, *Can. J. Physiol. Pharmacol*, **71**, 185(1992).
- 8) M. Alkodon, E. F. R. Pereira, W. S. Cortes, A. Maelicke and E. X. Albuquerque, *European Journal of Neuroscience*, **9**, 2734(1997).
- 9) J. R. Glaister, "毒性病理学の基礎," ソフトサイエンス社, 東京, 1992, p.87.

#### 連絡先

試験責任者: 高島宏昌

試験担当者: 桑形麻樹子, 宮原 敬, 加藤博康,  
関 剛幸, 新藤智子, 丸茂秀樹,  
堀内伸二, 稲田浩子, 三枝克彦,  
安生孝子, 一原佐知子

(財)食品薬品安全センター秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

#### Correspondence

Authors: Hiromasa Takashima (Study director)

Makiko Kuwagata, Takashi Miyahara,

Hiroyasu Katou, Takayuki Seki,

Tomoko Shindou, Hideki Marumo,

Shinji Horiuchi, Hiroko Inada,

Katsuhiko Saegusa, Takako Anjou,

Sachiko Ichihara

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,  
Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Body weight changes of male rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Days of administration				
1 (Init.wt.)	379.0±11.7 (13)	378.0±14.0 (13)	379.5±12.2 (13)	379.2±11.1 (13)
7	398.1±14.6 (13)	400.3±20.0 (13)	405.2±16.1 (13)	393.3±22.9 (13)
14	425.4±16.9 (13)	428.7±25.0 (13)	433.3±21.1 (13)	413.1±30.1 (13)
21	447.7±19.9 (13)	453.1±28.7 (13)	457.1±21.1 (13)	420.2±65.7 (13)
28	473.0±24.0 (13)	478.1±33.6 (13)	481.5±25.4 (13)	448.3±43.2 (12)
35	495.3±26.6 (13)	502.7±35.5 (13)	504.3±29.4 (13)	472.9±35.8 (12)
42	517.3±32.9 (13)	521.6±35.5 (13)	523.1±32.9 (13)	495.5±17.5 (11)
Body weight gain				
1-42	107.2±28.1 (13)	112.5±22.2 (13)	110.5±24.2 (13)	88.8±16.5 (11)

Values represent mean±S.D. in grams, and parentheses indicate number of animals evaluated

Table 2 Body weight changes of female rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Days of administration				
1 (Init.wt.)	237.5±9.4 (13)	239.1±12.5 (13)	240.5±11.3 (13)	239.9±12.5 (13)
7	245.4±14.9 (13)	248.4±13.6 (13)	247.6±15.0 (13)	249.2±13.6 (13)
14	258.0±16.8 (13)	263.8±19.4 (13)	264.3±17.2 (13)	262.9±19.2 (13)
21	271.0±11.8 (3)		316.5 (1)	265.1 (2)
28	289.4 (1)		345.8 (1)	
35	289.7 (1)		346.6 (1)	
42	310.6 (1)		343.8 (1)	
Days of pregnancy				
0	273.4±16.3 (11)	269.5±19.5 (13)	272.3±20.8 (12)	271.0±16.4 (12)
7	311.4±18.1 (11)	308.7±21.9 (13)	312.7±23.0 (12)	307.3±17.2 (12)
14	349.0±20.0 (11)	348.0±26.8 (13)	348.9±25.2 (12)	338.1±20.7 (12)
20	415.4±26.0 (11)	419.4±30.5 (13)	417.7±32.0 (12)	403.5±28.8 (12)
Days of lactation				
0	304.6±28.2 (11)	307.7±25.6 (13)	310.9±28.1 (12)	317.4±17.5 (11)
4	329.0±23.6 (11)	336.4±16.5 (13)	338.2±19.1 (12)	333.2±15.4 (11)

Values represent mean±S.D. in grams, and parentheses indicate number of animals evaluated

Table 3 Food consumption of male rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Days of administration				
1	27.3±2.1 (13)	27.7±3.3 (13)	27.4±2.7 (13)	26.5±4.6 (13)
7	26.9±1.7 (13)	26.9±3.0 (13)	27.1±2.7 (13)	24.9±3.1 (13)
13	26.4±2.0 (13)	25.9±3.1 (13)	26.9±3.8 (13)	23.3±3.4* (13)
29	29.0±3.3 (13)	29.1±3.0 (13)	30.2±2.3 (13)	28.3±3.3 (12)
35	29.7±4.1 (13)	28.4±3.1 (13)	29.0±3.2 (13)	26.7±1.4 (12)
41	29.7±3.4 (13)	28.7±3.4 (13)	29.6±1.8 (13)	24.0±8.0* (12)

Values represent mean±S.D. in grams, and parentheses indicate number of animals evaluated

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

Table 4 Food consumption of female rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Days of administration				
1	16.1±2.6 (13)	16.9±4.2 (13)	17.4±4.3 (13)	17.2±3.5 (13)
7	19.4±2.5 (13)	20.6±2.1 (13)	19.7±3.6 (13)	19.7±2.2 (13)
13	17.7±3.8 (13)	19.2±3.2 (13)	18.7±3.9 (13)	17.8±3.7 (13)
29	21.3 (1)		23.8 (1)	
35	20.3 (1)		79.9 (1)	
41	21.2 (1)		76.8 (1)	
Days of pregnancy				
0	20.0±4.1 (11)	19.7±2.2 (13)	20.5±3.8 (12)	20.9±1.7 (12)
7	25.5±2.9 (11)	27.6±3.9 (13)	26.6±4.4 (12)	25.5±3.0 (12)
14	24.0±12.7 (11)	20.8±2.6 (13)	21.1±2.5 (12)	20.0±2.0 (12)
20	19.6±4.9 (11)	21.4±4.7 (13)	26.4±19.7 (12)	20.8±6.4 (12)
Days of lactation				
0	15.5±6.4 (11)	21.1±4.5 (13)	20.2±9.1 (12)	19.7±3.7 (11)
3	38.9±9.2 (11)	42.6±8.0 (13)	42.7±9.5 (12)	41.9±2.9 (11)

Values represent mean±S.D. in grams, and parentheses indicate number of animals evaluated



Table 5 Hematological examinations of male rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Red blood cells				
Count ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	807 $\pm$ 45 (13)	810 $\pm$ 40 (13)	803 $\pm$ 34 (13)	790 $\pm$ 26 (11)
Hemoglobin (g/dL)	15.2 $\pm$ 0.6 (13)	15.3 $\pm$ 0.4 (13)	15.3 $\pm$ 0.8 (13)	15.1 $\pm$ 0.7 (11)
Hematocrit (%)	44.7 $\pm$ 1.6 (13)	44.4 $\pm$ 1.6 (13)	44.2 $\pm$ 2.3 (13)	42.9 $\pm$ 2.3 (11)
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	55.6 $\pm$ 2.7 (13)	54.9 $\pm$ 1.9 (13)	55.0 $\pm$ 2.0 (13)	54.4 $\pm$ 2.1 (11)
MCH (pg)	18.8 $\pm$ 1.1 (13)	18.9 $\pm$ 0.7 (13)	19.1 $\pm$ 0.7 (13)	19.1 $\pm$ 0.6 (11)
MCHC (%)	33.9 $\pm$ 0.5 (13)	34.5 $\pm$ 0.6 (13)	34.6 $\pm$ 0.7* (13)	35.1 $\pm$ 0.7** (11)
White blood cells				
Count ( $\times 100/\text{mm}^3$ )	63 $\pm$ 19 (13)	65 $\pm$ 16 (13)	66 $\pm$ 21 (13)	63 $\pm$ 20 (11)
Band neutrophil (%)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (11)
Segmented neutrophil (%)	13 $\pm$ 7 (13)	12 $\pm$ 5 (13)	13 $\pm$ 6 (13)	19 $\pm$ 10 (11)
Eosinophil (%)	1 $\pm$ 1 (13)	1 $\pm$ 1 (13)	1 $\pm$ 1 (13)	1 $\pm$ 1 (11)
Basophil (%)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (11)
Monocyte (%)	3 $\pm$ 2 (13)	4 $\pm$ 3 (13)	4 $\pm$ 2 (13)	5 $\pm$ 3 (11)
Lymphocyte (%)	83 $\pm$ 7 (13)	83 $\pm$ 6 (13)	83 $\pm$ 7 (13)	76 $\pm$ 12 (11)
Platelet				
Count ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	94.8 $\pm$ 8.7 (13)	91.4 $\pm$ 4.7 (13)	87.7 $\pm$ 5.3* (13)	95.5 $\pm$ 8.5 (11)
PT (sec)	16.4 $\pm$ 2.0 (13)	16.3 $\pm$ 2.7 (13)	16.9 $\pm$ 2.9 (13)	15.0 $\pm$ 1.4 (11)
APTT (sec)	21.7 $\pm$ 1.3 (13)	21.2 $\pm$ 1.0 (13)	20.9 $\pm$ 1.7 (13)	20.2 $\pm$ 1.9 (11)
Reticulocyte (%)	2.6 $\pm$ 1.1 (13)	N.E.	N.E.	2.4 $\pm$ 0.7 (11)

N.E.: Not examined

Values represent mean  $\pm$  S.D., and parentheses indicate number of animals evaluated\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$ \*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$ 

Table 6 Hematological examinations of female rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Red blood cells				
RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	697 $\pm$ 40 (13)	675 $\pm$ 54 (13)	698 $\pm$ 46 (13)	701 $\pm$ 44 (12)
Hemoglobin (g/dL)	13.7 $\pm$ 0.7 (13)	13.6 $\pm$ 0.6 (13)	13.8 $\pm$ 0.7 (13)	13.9 $\pm$ 0.5 (12)
Hematocrit (%)	40.8 $\pm$ 2.3 (13)	40.1 $\pm$ 2.3 (13)	41.0 $\pm$ 2.8 (13)	41.4 $\pm$ 2.1 (12)
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	58.6 $\pm$ 2.2 (13)	59.6 $\pm$ 3.0 (13)	58.7 $\pm$ 1.8 (13)	59.2 $\pm$ 1.6 (12)
MCH (pg)	19.6 $\pm$ 0.9 (13)	20.2 $\pm$ 1.1 (13)	19.8 $\pm$ 0.7 (13)	19.8 $\pm$ 0.6 (12)
MCHC (%)	33.5 $\pm$ 0.8 (13)	33.8 $\pm$ 0.7 (13)	33.7 $\pm$ 0.7 (13)	33.5 $\pm$ 0.5 (12)
White blood cells				
Count ( $\times 100/\text{mm}^3$ )	70 $\pm$ 23 (13)	71 $\pm$ 20 (13)	66 $\pm$ 20 (13)	65 $\pm$ 15 (12)
Band neutrophil (%)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (12)
Segmented neutrophil (%)	14 $\pm$ 7 (13)	20 $\pm$ 8 (13)	19 $\pm$ 7 (13)	22 $\pm$ 7 (12)
Eosinophil (%)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 1 (13)	0 $\pm$ 1 (13)	0 $\pm$ 0 (12)
Basophil (%)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (13)	0 $\pm$ 0 (12)
Monocyte (%)	4 $\pm$ 2 (13)	5 $\pm$ 2 (13)	6 $\pm$ 5 (13)	5 $\pm$ 3 (12)
Lymphocyte (%)	82 $\pm$ 8 (13)	74 $\pm$ 8 (13)	74 $\pm$ 10 (13)	74 $\pm$ 9 (12)
Platelet				
Count ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	101.6 $\pm$ 6.9 (13)	111.8 $\pm$ 12.7 (13)	99.4 $\pm$ 9.7 (13)	106.5 $\pm$ 13.0 (12)
PT (sec)	12.2 $\pm$ 0.7 (13)	12.2 $\pm$ 0.7 (13)	12.3 $\pm$ 0.7 (13)	12.6 $\pm$ 0.5 (12)
APTT (sec)	17.6 $\pm$ 1.2 (13)	17.2 $\pm$ 1.8 (13)	16.7 $\pm$ 1.6 (13)	17.7 $\pm$ 1.0 (12)
Reticulocyte (%)	6.8 $\pm$ 3.1 (13)	N.E.	N.E.	6.3 $\pm$ 2.7 (12)

N.E.: Not examined

Values represent mean  $\pm$  S.D., and parentheses indicate number of animals evaluated

Table 7 Blood chemical examinations of male rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Total protein (g/dL)	5.4 ± 0.2 (13)	5.3 ± 0.3 (13)	5.3 ± 0.2 (13)	5.1 ± 0.3** (11)
Albumin (g/dL)	3.0 ± 0.2 (13)	2.9 ± 0.2 (13)	2.9 ± 0.1 (13)	2.8 ± 0.2** (11)
A/G	1.26 ± 0.12 (13)	1.21 ± 0.13 (13)	1.21 ± 0.12 (13)	1.24 ± 0.14 (11)
BUN (mg/dL)	16 ± 3 (13)	17 ± 2 (13)	17 ± 1 (13)	19 ± 3** (11)
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.1 (13)	0.6 ± 0.1 (13)	0.5 ± 0.1 (13)	0.6 ± 0.1* (11)
Glucose (mg/dL)	129 ± 10 (13)	129 ± 10 (13)	127 ± 11 (13)	122 ± 8 (11)
Total cholesterol (mg/dL)	37 ± 8 (13)	44 ± 8 (13)	39 ± 7 (13)	42 ± 9 (11)
Triglyceride (mg/dL)	47 ± 20 (13)	42 ± 11 (13)	46 ± 17 (13)	37 ± 8 (11)
ALP (U/L)	231 ± 49 (13)	224 ± 47 (13)	217 ± 35 (13)	218 ± 65 (11)
GPT (U/L)	32 ± 5 (13)	29 ± 5 (13)	31 ± 4 (13)	31 ± 4 (11)
GOT (U/L)	65 ± 8 (13)	64 ± 14 (13)	67 ± 10 (13)	71 ± 11 (11)
γ-GTP (U/L)	0 ± 0 (13)	0 ± 0 (13)	0 ± 0 (13)	0 ± 0 (11)
Total bilirubin (mg/dL)	0.08 ± 0.02 (13)	0.08 ± 0.02 (13)	0.08 ± 0.02 (13)	0.08 ± 0.01 (11)
Inorg. phos. (mg/dL)	5.9 ± 0.6 (13)	5.8 ± 0.5 (13)	5.9 ± 0.4 (13)	6.0 ± 0.6 (11)
Ca (mg/dL)	8.3 ± 0.2 (13)	8.3 ± 0.3 (13)	8.4 ± 0.2 (13)	8.3 ± 0.1 (11)
Na (mEq/L)	145.2 ± 1.2 (13)	144.9 ± 1.2 (13)	145.4 ± 1.0 (13)	145.4 ± 0.8 (11)
K (mEq/L)	3.79 ± 0.25 (13)	3.83 ± 0.20 (13)	3.82 ± 0.19 (13)	3.84 ± 0.15 (11)
Cl (mEq/L)	107.6 ± 1.7 (13)	107.6 ± 1.8 (13)	108.5 ± 1.3 (13)	108.1 ± 1.3 (11)

Values represent mean ± S.D., and parentheses indicate number of animals evaluated

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

\*\* : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Table 8 Blood chemical examinations of female rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Total protein (g/dL)	5.9 ± 0.4 (13)	5.8 ± 0.3 (13)	5.8 ± 0.3 (13)	5.6 ± 0.2 (12)
Albumin (g/dL)	3.4 ± 0.3 (13)	3.3 ± 0.2 (13)	3.2 ± 0.2 (13)	3.2 ± 0.2 (12)
A/G	1.36 ± 0.12 (13)	1.32 ± 0.14 (13)	1.24 ± 0.10 (13)	1.36 ± 0.16 (12)
BUN (mg/dL)	15 ± 3 (13)	18 ± 1 (13)	18 ± 3* (13)	19 ± 3* (12)
Creatinine (mg/dL)	0.6 ± 0.1 (13)	0.6 ± 0.1 (13)	0.6 ± 0.1 (13)	0.6 ± 0.1 (12)
Glucose (mg/dL)	122 ± 14 (13)	119 ± 11 (13)	112 ± 9 (13)	116 ± 12 (12)
Total cholesterol (mg/dL)	52 ± 7 (13)	47 ± 7 (13)	49 ± 7 (13)	48 ± 8 (12)
Triglyceride (mg/dL)	34 ± 7 (13)	41 ± 10 (13)	36 ± 5 (13)	37 ± 11 (12)
ALP (U/L)	99 ± 27 (13)	111 ± 29 (13)	105 ± 34 (13)	101 ± 18 (12)
GPT (U/L)	35 ± 7 (13)	36 ± 7 (13)	38 ± 8 (13)	35 ± 7 (12)
GOT (U/L)	74 ± 10 (13)	73 ± 9 (13)	73 ± 7 (13)	68 ± 8 (12)
γ-GTP (U/L)	0 ± 0 (13)	1 ± 1 (13)	1 ± 1 (13)	0 ± 0 (12)
Total bilirubin (mg/dL)	0.12 ± 0.02 (13)	0.11 ± 0.03 (13)	0.10 ± 0.02 (13)	0.12 ± 0.02 (12)
Inorg. phos. (mg/dL)	6.1 ± 0.7 (13)	6.4 ± 0.5 (13)	6.2 ± 0.4 (13)	6.3 ± 0.7 (12)
Ca (mg/dL)	9.0 ± 0.2 (13)	9.1 ± 0.2 (13)	9.1 ± 0.3 (13)	9.1 ± 0.3 (12)
Na (mEq/L)	143.8 ± 1.4 (13)	143.5 ± 0.8 (13)	143.2 ± 1.3 (13)	144.4 ± 1.6 (12)
K (mEq/L)	3.71 ± 0.23 (13)	3.66 ± 0.18 (13)	3.73 ± 0.22 (13)	3.65 ± 0.20 (12)
Cl (mEq/L)	108.1 ± 1.2 (13)	108.6 ± 1.5 (13)	108.1 ± 1.6 (13)	108.4 ± 1.7 (12)

Values represent mean ± S.D., and parentheses indicate number of animals evaluated

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

\*\* : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Table 9 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose(mg/kg)	0	8	40	200
Male	Final body weight (g)	486.3 ± 30.7 (13)	490.5 ± 32.7 (13)	490.1 ± 31.4 (13)	466.7 ± 15.4 (11)
	Brain(g)	2.06 ± 0.13 <sup>a</sup> (13)	2.04 ± 0.07 (13)	2.07 ± 0.07 (13)	2.06 ± 0.08 (11)
		0.42 ± 0.04 <sup>b</sup> (13)	0.42 ± 0.03 (13)	0.42 ± 0.03 (13)	0.44 ± 0.02 (11)
	Heart(g)	1.42 ± 0.16 (13)	1.42 ± 0.09 (13)	1.44 ± 0.13 (13)	1.34 ± 0.07 (11)
		0.29 ± 0.04 (13)	0.29 ± 0.01 (13)	0.29 ± 0.02 (13)	0.29 ± 0.02 (11)
	Thymus(mg)	348.5 ± 93.4 (13)	355.9 ± 121.1 (13)	366.2 ± 106.4 (13)	317.8 ± 56.7 (11)
		72.0 ± 20.1 (13)	72.0 ± 21.1 (13)	74.1 ± 19.0 (13)	68.1 ± 12.3 (11)
	Liver(g)	12.29 ± 1.42 (13)	12.45 ± 1.25 (13)	12.07 ± 1.24 (13)	11.59 ± 0.68 (11)
		2.53 ± 0.22 (13)	2.54 ± 0.21 (13)	2.46 ± 0.15 (13)	2.48 ± 0.11 (11)
	Kidneys(g)	3.12 ± 0.23 (13)	3.05 ± 0.20 (13)	3.09 ± 0.23 (13)	2.95 ± 0.23 (11)
		0.64 ± 0.05 (13)	0.63 ± 0.05 (13)	0.63 ± 0.04 (13)	0.63 ± 0.04 (11)
	Spleen(g)	0.90 ± 0.08 (13)	0.83 ± 0.10 (13)	0.92 ± 0.17 (13)	0.83 ± 0.10 (11)
		0.19 ± 0.02 (13)	0.17 ± 0.03 (13)	0.19 ± 0.03 (13)	0.18 ± 0.02 (11)
	Adrenal glands(mg)	57.0 ± 8.7 (13)	58.8 ± 10.8 (13)	59.5 ± 8.0 (13)	59.0 ± 10.6 (11)
11.7 ± 1.5 (13)		12.0 ± 2.0 (13)	12.1 ± 1.3 (13)	12.6 ± 2.2 (11)	
Testes(g)	3.39 ± 0.22 (13)	3.36 ± 0.16 (13)	3.37 ± 0.32 (13)	3.34 ± 0.23 (11)	
	0.70 ± 0.05 (13)	0.69 ± 0.05 (13)	0.69 ± 0.08 (13)	0.72 ± 0.04 (11)	
Epididymides(g)	1.25 ± 0.05 (13)	1.28 ± 0.12 (13)	1.21 ± 0.25 (13)	1.24 ± 0.08 (11)	
	0.26 ± 0.02 (13)	0.26 ± 0.03 (13)	0.25 ± 0.05 (13)	0.27 ± 0.02 (11)	
Female	Final body weight (g)	292.5 ± 19.4 (11)	296.7 ± 20.3 (13)	302.3 ± 20.6 (12)	295.2 ± 11.7 (11)
	Brain(g)	1.92 ± 0.06 (11)	1.91 ± 0.06 (13)	1.93 ± 0.08 (12)	1.89 ± 0.10 (11)
		0.66 ± 0.05 (11)	0.65 ± 0.04 (13)	0.64 ± 0.05 (12)	0.64 ± 0.03 (11)
	Heart(g)	0.95 ± 0.09 (11)	0.97 ± 0.10 (13)	0.99 ± 0.10 (12)	0.95 ± 0.08 (11)
		0.32 ± 0.02 (11)	0.33 ± 0.01 (13)	0.33 ± 0.02 (12)	0.32 ± 0.02 (11)
	Thymus(mg)	210.2 ± 108.9 (11)	245.1 ± 66.9 (13)	232.0 ± 103.4 (12)	198.6 ± 56.4 (11)
		70.5 ± 33.1 (11)	82.5 ± 21.3 (13)	75.8 ± 31.0 (12)	67.1 ± 18.1 (11)
	Liver(g)	9.40 ± 0.87 (11)	9.62 ± 1.01 (13)	9.43 ± 0.70 (12)	9.74 ± 0.68 (11)
		3.22 ± 0.24 (11)	3.24 ± 0.24 (13)	3.13 ± 0.23 (12)	3.30 ± 0.26 (11)
	Kidneys(g)	1.91 ± 0.16 (11)	1.94 ± 0.16 (13)	1.90 ± 0.18 (12)	1.92 ± 0.10 (11)
		0.66 ± 0.05 (11)	0.65 ± 0.04 (13)	0.63 ± 0.06 (12)	0.65 ± 0.03 (11)
	Spleen(g)	0.67 ± 0.11 (11)	0.68 ± 0.09 (13)	0.72 ± 0.11 (12)	0.67 ± 0.10 (11)
		0.23 ± 0.04 (11)	0.23 ± 0.03 (13)	0.24 ± 0.04 (12)	0.23 ± 0.03 (11)
	Adrenal glands(mg)	80.4 ± 12.0 (11)	77.8 ± 15.7 (13)	74.6 ± 5.3 (12)	73.9 ± 7.7 (11)
27.6 ± 4.4 (11)		26.2 ± 4.6 (13)	24.8 ± 2.6 (12)	25.1 ± 2.9 (11)	

Values represent mean ± S.D., and parentheses indicate number of animals evaluated

a) Absolute weight

b) Relative weight (g or mg per 100 g body weight)

Table 10 Histopathological findings of rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Sex: Findings, grade and number of animals	Dose(mg/kg):	Male				Female			
			0	8	40	200	0	8	40	200
Stomach			[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Squamous hyperplasia, forestomach	±	0	0	0	0	2	0	0	4	
	+	0	0	0	9	0	0	0	2	
	++	0	0	0	4	0	0	0	5	
	total	0	0	0	13***##	2	0	0	11***##	
Erosion, mucosa, forestomach	±	0	0	0	3	1	0	0	2	
	+	0	0	0	1	0	0	0	2	
	++	0	0	0	1	0	0	0	0	
	total	0	0	0	5#	1	0	0	4	
Ulcer, mucosa, forestomach	±	0	0	0	0	0	0	0	2	
	+	0	0	0	2	1	0	0	2	
	++	0	0	0	0	0	0	0	3	
	total	0	0	0	2	1	0	0	7*#	
Hemorrhage, mucosa, forestomach	±	0	0	0	0	0	0	0	2	
	+	0	0	0	0	0	0	0	1	
	++	0	0	0	1	0	0	0	0	
	total	0	0	0	1	0	0	0	3	
Edema, submucosa, forestomach	±	0	0	0	1	0	0	0	0	
	+	0	0	0	5	1	0	0	1	
	++	0	0	0	4	0	0	0	5	
	+++	0	0	0	1	0	0	0	1	
	total	0	0	0	11***##	1	0	0	7*#	
Cellular infiltration, inflammatory cell, mucosa, forestomach	±	0	0	0	3	2	0	0	3	
	+	0	0	0	5	0	0	0	2	
	++	0	0	0	3	0	0	0	3	
	total	0	0	0	11***##	2	0	0	8*#	
Granulation, submucosa, forestomach	±	0	0	0	3	1	0	0	1	
	+	0	0	0	2	0	0	0	2	
	++	0	0	0	6	0	0	0	3	
	total	0	0	0	11***##	1	0	0	6#	
Granulation, serosa, forestomach	±	0	0	0	0	0	0	0	1	
	+	0	0	0	1	0	0	0	1	
	total	0	0	0	1	0	0	0	2	
Erosion, mucosa, glandular stomach	±	0	0	0	0	1	0	0	0	
	+	0	0	0	0	0	0	0	1	
	++	0	0	0	1	0	0	0	0	
	total	0	0	0	1	1	0	0	1	
Edema, submucosa, glandular stomach	++	0	0	0	1	0	0	0	0	
Cellular infiltration, inflammatory cell, mucosa, glandular stomach	++	0	0	0	1	0	0	0	0	
total	total	0	0	0	1	0	0	0	0	
Ulcer, mucosa, glandular stomach	+	0	0	0	0	0	0	0	1	
total	total	0	0	0	0	0	0	0	1	
Hemorrhage, mucosa, glandular stomach	+	0	0	0	1	0	0	0	0	
++	++	0	0	0	0	0	0	0	1	
total	total	0	0	0	1	0	0	0	1	
Intestine			[5]	[0]	[0]	[5]	[5]	[0]	[0]	[4]
Congestion, epithelium, mucosa, duodenum & jejunum	+++	0			1	0			0	
total	total	0			1	0			0	
Granulation, serosa, cecum	±	0			0	0			1	
total	total	0			0	0			1	
Edema, submucosa, cecum	+	0			1	0			0	
total	total	0			1	0			0	
Edema, submucosa, rectum	+	0			1	1			0	
total	total	0			1	1			0	
Cellular infiltration, neutrophil, submucosa, cecum	+	0			1	0			0	
total	total	0			1	0			0	

[ ]: Number of animals examined

Grade of histopathological findings; ±: very slight, +: slight, ++: moderate, +++: severe

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (by Two-tailed Mann-Whitney U test)

\*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (by Two-tailed Mann-Whitney U test)

#: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (by One-tailed Fisher exact test)

##: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (by One-tailed Fisher exact test)

Table 10 (continued)

Organ	Sex: Findings, grade and number of animals	Male				Female			
		Dose(mg/kg):	0	8	40	200	0	8	40
Liver		[5]	[0]	[0]	[5]	[5]	[0]	[0]	[5]
Necrosis, focal	+	0			1	0			0
	++	0			0	0			1
	total	0			1	0			1
Fatty change, periportal	±	1			2	4			3
	+	4			1	1			0
	total	5			3	5			3
Kidneys		[5]	[0]	[0]	[5]	[5]	[0]	[0]	[5]
Basophilic tubule, cortex	±	3			2	1			0
	total	3			2	1			0
Mineralization, medulla	±	1			2	0			0
	total	1			2	0			0
Cellular infiltration, lymphocyte interstitium	±	0			0	0			1
	+	0			0	0			1
	total	0			0	0			2
Degeneration, vacuolar, proximal tubule	±	0			0	1			0
	total	0			0	1			0
Spleen		[5]	[0]	[0]	[4]	[5]	[0]	[0]	[5]
Atrophy	++	0			1	0			1
	total	0			1	0			1
Hematopoiesis, extramedullary	±	2			4	2			0
	+	3			0	2			4
	++	0			0	1			0
	total	5			4	5			4
Deposit, pigment, brown	±	1			0	0			0
	+	4			3	5			4
	++	0			0	0			1
	total	5			3	5			5
Heart		[5]	[0]	[0]	[5]	[5]	[0]	[0]	[5]
Myocardial degeneration/fibrosis	±	0			2	0			1
	+	2			0	0			0
	total	2			2	0			1
Lung		[5]	[0]	[0]	[5]	[5]	[0]	[0]	[5]
Accumulation, foam cell, focal	±	1			2	0			0
	total	1			2	0			0
Hemorrhage, focal	±	0			1	0			0
	total	0			1	0			0
Mineralization, artery	±	0			0	0			1
	total	0			0	0			1
Thyroid gland		[5]	[0]	[0]	[4]	[5]	[0]	[0]	[5]
Ectopic thymus	±	1			0	0			0
	+	0			0	1			1
	total	1			0	1			1
Testes		[13]	[13]	[13]	[13]				
Atrophy, seminiferous tubule	±	0	1	0	1				
	+	0	1	1	0				
	++	0	0	1	0				
	total	0	2	2	1				
Multinucleated giant cell, seminiferous tubule	+	0	0	1	0				
	total	0	0	1	0				
Degeneration, spermatocyte and round spermatid, seminiferous tubule	+	0	0	0	1				
	total	0	0	0	1				
Degeneration, elongated spermatid, seminiferous tubule	+	0	0	0	1				
	total	0	0	0	1				

[ ]: Number of animals examined

Grade of histopathological findings; ±: very slight, +: slight, ++: moderate, +++: severe

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (by Two-tailed Mann-Whitney U test)\*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (by Two-tailed Mann-Whitney U test)#: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (by One-tailed Fisher exact test)##: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (by One-tailed Fisher exact test)

Table 10 (continued)

Organ	Sex: Dose(mg/kg):	Male				Female			
		0	8	40	200	0	8	40	200
Findings, grade and number of animals									
Epididymides		[13]	[13]	[13]	[13]				
Cell debris, in lumen	±	0	0	1	0				
	+	0	0	0	2				
	total	0	0	1	2				
Degenerated sperm, in lumen	+	0	0	0	1				
	total	0	0	0	1				
Decrease, sperm, in lumen	+	0	0	0	1				
	total	0	0	0	1				
Spermatic granuloma, unilateral	+	1	0	0	0				
	total	1	0	0	0				
Cellular infiltration, lymphocyte interstitium	±	0	0	1	0				
	total	0	0	1	0				
Prostate		[5]	[0]	[0]	[5]				
Atrophy	+	0			1				
	total	0			1				
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	±	2			1				
	+	2			0				
	++	1			2				
	total	5			3				
Cellular infiltration, lymphocyte and neutrophil, epithelium	±	1			1				
	+	1			1				
	total	2			2				
Seminal vesicle		[5]	[0]	[0]	[5]				
Atrophy	+	0			1				
	total	0			1				
Uterus						[5]	[0]	[0]	[5]
Dilatation, lumen	+					0			1
	++					1			0
	total					1			1
Cellular infiltration, neutrophil, luminal epithelium	++					1			0
	total					1			0
Vagina						[5]	[0]	[0]	[5]
Mucification, epithelium	±					0			1
	++					0			1
	total					0			2
Cornification, epithelium	++					1			1
	total					1			1

[ ]: Number of animals examined

Grade of histopathological findings; ±: very slight, +: slight, ++: moderate, +++: severe

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (by Two-tailed Mann-Whitney U test)

\*\* : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (by Two-tailed Mann-Whitney U test)

# : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$  (by One-tailed Fisher exact test)

## : Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$  (by One-tailed Fisher exact test)

Table 11 Reproductive performance of rats treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Mean length of estrous cycle	4.1 ± 0.3	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1
Number of mated pairs	13	3	13	13
Number of copulated pairs	12	13	12	13
Copulation index <sup>a</sup>	92.3	100	92.3	100
Number of pregnant animals	11	13	12	12
Fertility index <sup>b</sup>	91.7	100	100	92.3
Pairing days until copulation (Mean ± S.D.)	4.3 ± 3.9	2.9 ± 1.0	2.8 ± 1.3	3.7 ± 3.0
Frequency of vaginal estrus (Mean ± S.D.)	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.6

a) Copulation index = (Number of copulated pairs/Number of mated pairs) × 100, %

b) Fertility index = (Number of pregnant animals/Number of copulated pairs) × 100, %

Table 12 Summary of development of pups from dams treated orally with trimethylamine in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	8	40	200
Number of pregnant females	11	13	12	12
Number of pregnant females with pups alive	11	13	12	11
Gestation index <sup>a</sup>	100	100	100	91.7
Gestation length in days	22.4 ± 0.5 (11)	22.3 ± 0.5 (13)	22.8 ± 0.9 (12)	22.5 ± 0.5 (11)
Number of corpora lutea	19.0 ± 4.1 (11)	18.1 ± 2.1 (13)	18.3 ± 2.3 (12)	17.9 ± 2.7 (12)
Number of implantation sites	14.8 ± 3.2 (11)	15.8 ± 2.7 (13)	14.6 ± 4.1 (12)	15.0 ± 2.3 (12)
Implantation index <sup>b</sup>	82.2 ± 23.4 (11)	86.8 ± 9.1 (13)	81.4 ± 23.7 (12)	84.2 ± 7.8 (12)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	14.0 ± 3.0 (11)	14.7 ± 2.5 (13)	13.3 ± 3.9 (12)	12.3 ± 4.6 (12)
Delivery index <sup>c</sup>	94.8 ± 4.8 (11)	93.5 ± 6.7 (13)	92.3 ± 9.5 (12)	82.2 ± 26.5 (12)
Number of pups alive	14.0 ± 3.0 (11)	14.7 ± 2.5 (13)	12.8 ± 4.4 (12)	13.2 ± 2.5 (11)
Birth index <sup>d</sup>	94.8 ± 4.8 (11)	93.5 ± 6.7 (13)	89.1 ± 18.1 (12)	88.0 ± 7.0 (11)
Live birth index <sup>e</sup>	100.0 ± 0.0 (11)	100.0 ± 0.0 (13)	95.8 ± 14.4 (12)	98.2 ± 4.3 (11)
Pups weight in grams				
Male	6.8 ± 0.5 (11)	6.8 ± 0.6 (13)	7.1 ± 1.1 (12)	7.2 ± 0.8 (11)
Female	6.3 ± 0.5 (11)	6.5 ± 0.6 (13)	6.5 ± 1.0 (12)	6.9 ± 0.8 (11)
Sex ratio on day 0 <sup>f</sup>	108 ± 74 (11)	108 ± 71 (13)	107 ± 30 (12)	194 ± 277 (11)
Day 4 of lactation				
Number of pups alive	13.5 ± 3.0 (11)	14.7 ± 2.5 (13)	12.8 ± 4.6 (12)	13.2 ± 2.5 (11)
Viability index <sup>g</sup>	97.0 ± 8.1 (11)	100.0 ± 0.0 (13)	95.8 ± 14.4 (12)	100.0 ± 0.0 (11)
Pups weight in grams				
Male	10.4 ± 1.6 (11)	11.0 ± 1.4 (13)	11.3 ± 1.5 (12)	11.5 ± 1.6 (11)
Female	9.8 ± 1.7 (11)	10.7 ± 1.4 (13)	10.8 ± 1.5 (12)	11.2 ± 1.6 (11)
Sex ratio on day 4 <sup>h</sup>	97 ± 52 (11)	108 ± 71 (13)	108 ± 31 (12)	194 ± 277 (11)

Values represent mean ± S.D., and parentheses indicate number of litters evaluated

a) Gestation index = (number of females with alive pups/number of pregnant females) × 100, %

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

c) Delivery index = (number of pups born/number of implantation sites) × 100, %

d) Birth index = (number of live pups on day 0/number of implantation sites) × 100, %

e) Live birth index = (number of live pups on day 0/number of pups born) × 100, %

f) Sex ratio on day 0 = (number of male live pups on day 0/number of female live pups on day 0) × 100, %

g) Viability index = (number of live pups on day 4/number of live pups on day 0) × 100, %

h) Sex ratio on day 4 = (number of male live pups on day 4/number of female live pups on day 4) × 100, %

i) The data of a litter which has not any female live pups was excluded.

# テトラメチルアンモニウムヒドロキシドの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Tetramethylammonium hydroxide on Bacteria

### 要約

テトラメチルアンモニウムヒドロキシドについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537) および *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) の5菌株を用いた。試験は2回繰り返して実施し、S9 mix 無添加群の各試験菌株およびS9 mix 添加群のWP2 *uvrA* を除いた試験菌株について39.1~1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、S9 mix 添加群のWP2 *uvrA* について156~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  のそれぞれ6用量で実施した。

その結果、S9 mix 無添加群および添加群のいずれにおいても、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なかった。

以上の結果より、本試験条件下ではテトラメチルアンモニウムヒドロキシドは、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

### 方法

#### 1. 試験菌株

細菌を用いる復帰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 TA1537<sup>1)</sup> ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> 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(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成11年3月31日ならびに平成11年6月29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 KGaA)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 $-80^{\circ}\text{C}$ 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)

オリエンタル酵母工業(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:No. 1)を加え、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

##### 2) トップアガー(軟寒天)

塩化ナトリウム0.5%を含む0.6% Bacto-agar(Difco)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 mmol/L L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mmol/L 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 mmol/L 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のバッフル付三角フラスコに2.5%ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No. 2: OXOID)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50  $\mu\text{L}$ 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、 $37^{\circ}\text{C}$ で8時間振盪(往復振盪: 100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

##### 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 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADPH	4 $\mu\text{mol}$
NADH	4 $\mu\text{mol}$
Na-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$
精製水	残量

##### 5. 被験物質

テトラメチルアンモニウムヒドロキシド(ロット番号: 81021A)は純度20.0%の水溶液であり、水溶液中で安定である。昭和電工(株)(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。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. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質を日本薬局方注射用水(㈱大塚製薬工場)を用いて希釈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、速やかに処理を行った。ただし、原液中での被験物質濃度が20.0%であることを考慮して調製した。

#### 7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量を用いて予備的な試験を実施した。S9 mix無添加群の各試験菌株ならびにS9 mix添加群のWP2 *uvrA*を除いた試験菌株では、1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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S9 mix無添加群の各試験菌株ならびにS9 mix添加群のTA100, TA1535, TA98ならびにTA1537で1250  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , S9 mix添加群のWP *uvrA*で5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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°C)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( $\text{NaN}_3$ :和光純薬工業(株))
- 9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA: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<sup>1)</sup>の改良法であるプレインキュベーション法に準じて、S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質溶液を100  $\mu\text{L}$ 、次いでS9 mix無添加群の場合、0.1 mol/Lナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500  $\mu\text{L}$ 、S9 mix添加群の場合、S9 mixを500  $\mu\text{L}$ 添加した。さらに、試験菌液100  $\mu\text{L}$ を加え、37°C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、あらかじめ45°Cに保温したトップアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。37°C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( $\times 60$ )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。各濃度につき3枚のプレートを使用した。また、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

1回目の試験結果をTable 1~2に、2回目の試験結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群ならびに添加群のすべての試験菌株の高用量群において、テトラメチルアンモニウムヒドロキシド処理による生育阻害作用が観察された。しかしながら、復帰突然変異コロニー数については、S9 mix無添加群、S9 mix添加群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試験菌株において、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、コロニー計数時、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、テトラメチルアンモニウムヒドロキシ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。

なお、本被験物質の類縁体であるtetramethylammonium bromide, tetramethylammonium chloride, tetramethylammonium iodide, tetramethylammonium fluoride tetrahydrate, tetramethylammonium hexafluorophosphate, tetramethylammonium hydroxide pentahydrateおよびtetramethylammonium tetrafluoroborateの変異原性に関する報告はなかった。

#### 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：菊池正憲, 益森勝志  
 (財)食品農医薬品安全性評価センター  
 〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2  
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

#### Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)  
 Masanori Kikuchi, Shoji Masumori  
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
 Pesticides (An-pyo Center)  
 582-2 Shioshinden, Fukude-cho, Iwata-gun,  
 Shizuoka, 437-1213, Japan  
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Results of the bacterial reversion test of tetramethylammonium hydroxide (1st trial)  
[direct method: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	101	107	104	9	14	12	29	27	29	23	23	23	8	10	9
		[104	$\pm$	3]	[12	$\pm$	3]	[28	$\pm$	1]	[23	$\pm$	0]	[9	$\pm$	1]
	39.1	118	104	105	11	11	15	18	25	25	17	20	22	11	10	13
		[109	$\pm$	8]	[12	$\pm$	2]	[23	$\pm$	4]	[20	$\pm$	3]	[11	$\pm$	2]
	78.1	107	106	111	11	8	13	28	21	26	22	25	19	9	10	8
		[108	$\pm$	3]	[11	$\pm$	3]	[25	$\pm$	4]	[22	$\pm$	3]	[9	$\pm$	1]
	156	102	104	100	12	9	12	20	20	22	28	26	20	6	7	6
		[102	$\pm$	2]	[11	$\pm$	2]	[21	$\pm$	1]	[25	$\pm$	4]	[6	$\pm$	1]
313	97	102	108	11	11	13	22	26	29	23	23	21	8	9	10	
	[102	$\pm$	6]	[12	$\pm$	1]	[26	$\pm$	4]	[22	$\pm$	1]	[9	$\pm$	1]	
625	103	109	107	15	10	16	21	23	25	21	22	27	11	11	6	
	[106	$\pm$	3]	[14	$\pm$	3]	[23	$\pm$	2]	[23	$\pm$	3]	[9	$\pm$	3]	
1250	87*	72*	90*	10*	8*	11*	25*	27*	22*	17*	19*	17*	12*	8*	9*	
	[83	$\pm$	10]	[10	$\pm$	2]	[25	$\pm$	3]	[18	$\pm$	1]	[10	$\pm$	2]	
Positive control		384	403	427*	356	379	382*	133	125	129*	589	560	598*	481	514	492*
		[405	$\pm$	22]	[372	$\pm$	14]	[129	$\pm$	4]	[582	$\pm$	20]	[496	$\pm$	17]

a) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b)  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
 c) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
 \*: Growth inhibition was observed

Table 2 Results of the bacterial reversion test of tetramethylammonium hydroxide (1st trial)  
[activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	113	118	113	11	16	8	27	21	29	21	25	21	15	17	12
		[115	$\pm$	3]	[12	$\pm$	4]	[26	$\pm$	4]	[22	$\pm$	2]	[15	$\pm$	3]
	39.1	111	119	107	9	9	9				19	25	23	17	17	15
		[112	$\pm$	6]	[9	$\pm$	0]				[22	$\pm$	3]	[16	$\pm$	1]
	78.1	115	110	108	11	8	9				23	26	25	19	21	18
		[111	$\pm$	4]	[9	$\pm$	2]				[25	$\pm$	2]	[19	$\pm$	2]
	156	107	112	102	8	9	6	22	25	24	22	20	20	17	16	14
		[107	$\pm$	5]	[8	$\pm$	2]	[24	$\pm$	2]	[21	$\pm$	1]	[16	$\pm$	2]
	313	103	115	116	13	10	9	28	24	24	21	28	21	13	15	15
		[111	$\pm$	7]	[11	$\pm$	2]	[25	$\pm$	2]	[23	$\pm$	4]	[14	$\pm$	1]
625	94	96	93	16	9	10	29	27	26	17	21	22	13	16	21	
	[94	$\pm$	2]	[12	$\pm$	4]	[27	$\pm$	2]	[20	$\pm$	3]	[17	$\pm$	4]	
1250	110*	98*	102*	12*	9*	9*	22	27	23	14*	14*	14*	19*	16*	17*	
	[103	$\pm$	6]	[10	$\pm$	2]	[24	$\pm$	3]	[14	$\pm$	0]	[17	$\pm$	2]	
2500							21*	21*	20*							
							[21	$\pm$	1]							
5000							0*	0*	0*							
							[0	$\pm$	0]							
Positive control		831	828	869*	383	318	386*	690	732	733*	367	362	377*	141	154	154*
		[843	$\pm$	23]	[362	$\pm$	38]	[718	$\pm$	25]	[369	$\pm$	8]	[150	$\pm$	8]

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  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
 \*: Growth inhibition was observed

Table 3 Results of the bacterial reversion test of tetramethylammonium hydroxide (2nd trial)  
[direct method: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	118	118	108	11	11	15	31	29	30	21	21	24	8	7	7
		[115 $\pm$ 6]			[12 $\pm$ 2]			[30 $\pm$ 1]			[23 $\pm$ 2]			[7 $\pm$ 1]		
	39.1	106	108	102	13	17	14	27	26	26	21	21	27	6	8	10
		[105 $\pm$ 3]			[15 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 1]			[23 $\pm$ 3]			[8 $\pm$ 2]		
	78.1	110	110	102	9	12	14	27	24	21	21	24	22	8	9	8
		[107 $\pm$ 5]			[12 $\pm$ 3]			[24 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 2]			[8 $\pm$ 1]		
	156	115	97	110	13	11	16	30	31	29	17	16	17	8	10	7
		[107 $\pm$ 9]			[13 $\pm$ 3]			[30 $\pm$ 1]			[17 $\pm$ 1]			[8 $\pm$ 2]		
313	103	104	111	14	11	13	25	26	29	18	18	17	10	12	10	
	[106 $\pm$ 4]			[13 $\pm$ 2]			[27 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 1]			[11 $\pm$ 1]			
625	104	125	125	15	14	16	25	28	30	24	20	25	11	7	9	
	[118 $\pm$ 12]			[15 $\pm$ 1]			[28 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 3]			[9 $\pm$ 2]			
1250	92*	76*	86*	12*	9*	9*	29*	21*	29*	23*	22*	16*	7*	5*	6*	
	[85 $\pm$ 8]			[10 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 5]			[20 $\pm$ 4]			[6 $\pm$ 1]			
Positive control		382	401	379*	337	373	394*	157	159	138*	519	554	559*	398	373	437*
		[387 $\pm$ 12]			[368 $\pm$ 29]			[151 $\pm$ 12]			[544 $\pm$ 22]			[403 $\pm$ 32]		

a) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  b)  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$   
 c) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\*: Growth inhibition was observed

Table 4 Results of the bacterial reversion test of tetramethylammonium hydroxide (2nd trial)  
[activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0	129	112	122	15	12	13	27	25	26	33	29	26	13	11	9
		[121 $\pm$ 9]			[13 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 1]			[29 $\pm$ 4]			[11 $\pm$ 2]		
	39.1	111	112	119	10	13	16				26	23	27	15	13	11
		[114 $\pm$ 4]			[13 $\pm$ 3]						[25 $\pm$ 2]			[13 $\pm$ 2]		
	78.1	130	126	125	16	12	13				31	24	25	9	13	7
		[127 $\pm$ 3]			[14 $\pm$ 2]						[27 $\pm$ 4]			[10 $\pm$ 3]		
	156	131	116	124	9	13	13	25	26	32	27	28	22	12	10	13
		[124 $\pm$ 8]			[12 $\pm$ 2]			[28 $\pm$ 4]			[26 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 2]		
313	135	114	113	17	14	13	23	22	23	30	28	27	10	11	10	
	[121 $\pm$ 12]			[15 $\pm$ 2]			[23 $\pm$ 1]			[28 $\pm$ 2]			[10 $\pm$ 1]			
625	116	124	122	14	10	12	25	25	28	31	25	27	12	12	14	
	[121 $\pm$ 4]			[12 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 2]			[28 $\pm$ 3]			[13 $\pm$ 1]			
1250	100*	97*	106*	10*	10*	11*	24	23	25	24*	19*	21*	12*	10*	7*	
	[101 $\pm$ 5]			[10 $\pm$ 1]			[24 $\pm$ 1]			[21 $\pm$ 3]			[10 $\pm$ 3]			
2500							15*	17*	21*							
							[18 $\pm$ 3]									
5000							0*	0*	0*							
							[0 $\pm$ 0]									
Positive control		681	724	718*	316	359	355*	636	619	647*	391	343	341*	172	164	157*
		[708 $\pm$ 23]			[343 $\pm$ 24]			[634 $\pm$ 14]			[358 $\pm$ 28]			[164 $\pm$ 8]		

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  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\*: Growth inhibition was observed

# テトラメチルアンモニウムヒドロキシドの 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 Tetramethylammonium hydroxide on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

テトラメチルアンモニウムヒドロキシドが培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、短時間処理法ならびに連続処理法とも10 mM相当の濃度を含む228~910  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量を設定した。短時間処理法では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、連続処理法では、S9 mix非存在下における24時間連続処理後、標本作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

その結果、短時間処理ならびに連続処理の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、本試験条件下ではテトラメチルアンモニウムヒドロキシドは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

### 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/IU)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK KGaA)を10 vol%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞を融解し3~5日ごとに継代したものを使用した。なお、細胞増殖抑制試験では継代数8および15の細胞を、染色体異常試験では同13および23の細胞を用いた。

#### 2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(旭テクノグラス(株))に、メンブランフィルター(0.45  $\mu\text{m}$ :Featuring Corning and Costar Products)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(GIBCO Life Technologies, Inc)を最終濃度で10 vol%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液を冷暗所(4  $^{\circ}\text{C}$ )に保存した。

#### 3. 培養条件

CO<sub>2</sub>インキュベーター(Formaおよび三洋電機メディ

カシステム(株))を用い、CO<sub>2</sub>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。また、S9 mixの組成は松岡らの方法<sup>1)</sup>に従った。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.3 mL
MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADP	4 $\mu\text{mol}$
HEPES緩衝液(pH 7.2)	4 $\mu\text{mol}$
精製水	残量

#### 5. 被験物質

テトラメチルアンモニウムヒドロキシド(ロット番号:81021A)は純度20.0%の水溶液であり、水溶液中で安定である。昭和電工(株)(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。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. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質を日本薬局方注射用水(株)大塚製薬工場)を用いて希釈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、速やかに処理を行った。ただし、原液中での被験物質濃度が20.0%であることを考慮して調製した。

#### 7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

12ウエルの細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。短時間処理法ではS9 mix非存在下(-S9 mix)あるいは存在下(+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。連続処理法の場合、24時間連続して処理を実施した。

細胞を10 vol%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 w/v%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

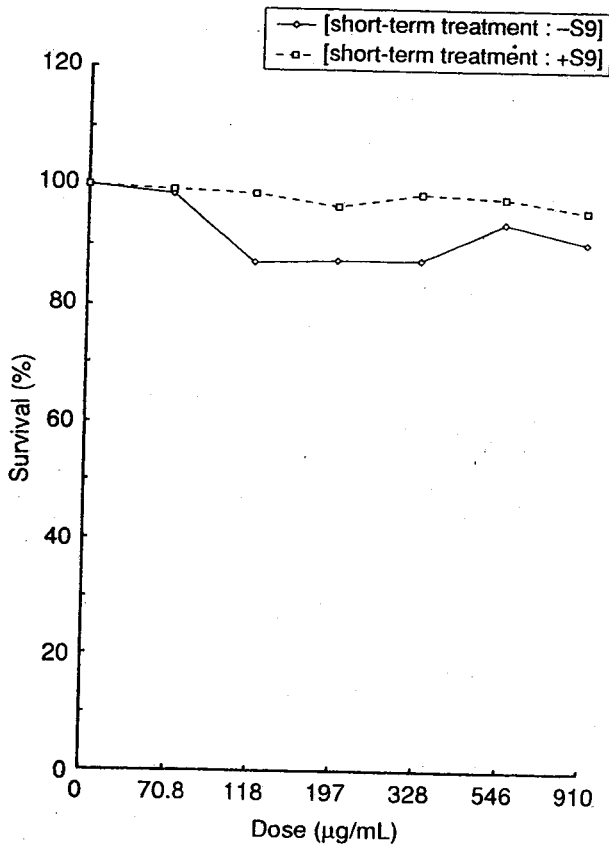


Fig. 1 Dose-survival curves of tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment: 6 hr]

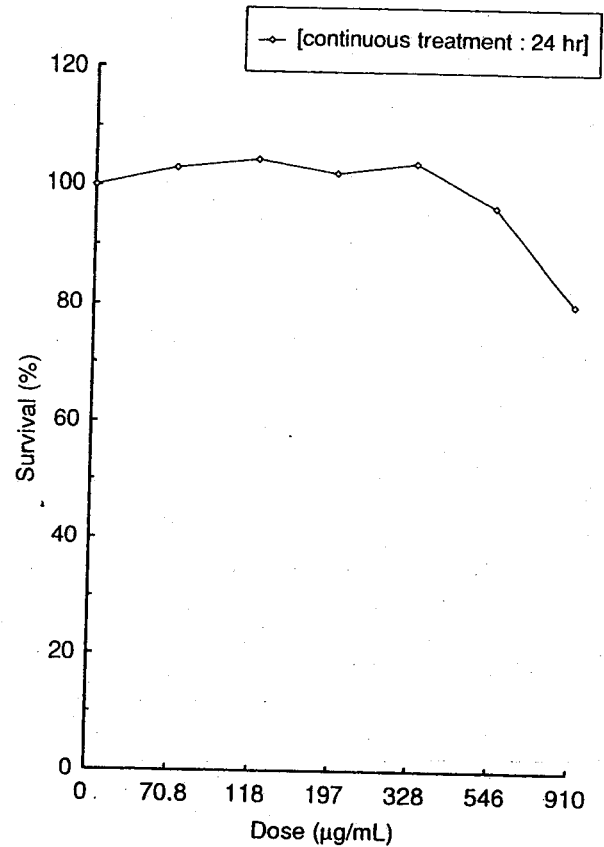


Fig. 2 Dose-survival curve of tetramethylammonium hydroxide [continuous treatment: 24 hr]

vol%エタノール, 1 vol%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, いずれの処理法においても明確な細胞増殖抑制は観察されなかった(Fig. 1~2)。

なお, 被験物質暴露終了時, 短時間処理法では546 µg/mL以上において, 連続処理法では910 µg/mLにおいて培養液のpHが僅かにアルカリ性を示していた。

#### 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もとに, 染色体異常試験では短時間処理法ならびに連続処理法のいずれにおいても910 µg/mL(10 mM相当)を最高処理濃度とし, 以下公比2で減じた計3用量ならびに溶媒対照群を設定した。

なお, 陽性対照として, 短時間処理法の場合, -S9処理でマイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業(株))を0.1 µg/mL, +S9処理でシクロホスファミド(CP:塩野義製薬(株))を12.5 µg/mLの用量で, 連続処理の場合マイトマイシンCを0.05 µg/mLの用量で試験した。

#### 9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い, 細胞増殖抑制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 µg/mLとなるようコルセミド(GIBCO Life Technologies, Inc)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 mmol/L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 vol%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), 染色体体切断(ctb), 染色体切断(csb), 染色体体交換(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による分類法<sup>2)</sup>に従って実施した。

すべての標本をコード化した後, マスキング法で観察した。

#### 11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めない場合(-gap)につい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<sup>3)</sup>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

短時間処理法での試験結果を Table 1~2 に示した。テトラメチルアンモニウムヒドロキシド処理群の場合、S9 mix 非存在下ならびに S9 mix 存在下とも、いずれの用量においても染色体構造異常ならびに倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。S9 mix 非存在下においては、試験用量に依存した細胞生存率のわずかな減少傾向が観察された。また、S9 mix 存在下においては、被験物質処理による強い細胞増殖抑制作用は観察されなかった。一方、S9 mix 非存在下における陽性対照物質 MMC で処理した細胞、および S9 mix 存在下における陽性対照物質 CP で処理した細胞ではいずれにおいても染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

連続処理法での試験結果を Table 3 に示した。被験物質処理群の場合、染色体構造異常ならびに倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。また、被験物質処理による強い細胞増殖抑制作用はいずれの用量においても認められなかった。一方、陽性対照物質の MMC で処理した細胞では染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

なお、本被験物質暴露終了時に短時間処理法ならびに連続処理法で高用量の 910  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において培養液の pH が僅かにアルカリ性を示していたが、染色体異常試験結果ならびに森田らの報告<sup>4,5)</sup>から試験系に影響をおよぼしたとは考えられなかった。

以上の試験結果から、本試験条件下においてテトラメチルアンモニウムヒドロキシドのチャイニーズハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陰性と判定した。

なお、本被験物質の類縁体である tetramethylammonium bromide, tetramethylammonium chloride, tetramethylammonium iodide, tetramethylammonium fluoride tetrahydrate, tetramethylammonium hexafluorophosphate, tetramethylammonium hydroxide pentahydrate および tetramethylammonium tetrafluoroborate の変異原性に関する報告はなかった。

### 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, 東京, 1987, pp.19-24.
- 4) T. Morita, Y. Watanabe, K. Takeda and K. Okumura, *Mutat. Res.*, **225**, 55 (1989).
- 5) T. Morita, T. Nagaki, I. Fukuda and K. Okumura, *Mutat. Res.*, **262**, 159 (1991).

### 連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 菊池正憲, 益森勝志, 梶原玲子,  
永井美穂

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田582-2

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

### Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study Director)

Masanori Kikuchi, Shoji Masumori,

Reiko Kajihara, Miho Nagai

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

582-2 Shioshinden, Fukuda-cho, Iwata-gun,

Shizuoka, 437-1213, Japan

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

Table 1 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
D. W. <sup>a</sup>	0	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0(0.0)-	0(0.0)-	-
Test substance	228	6	110.1	200	3	1	1	0	0	0	2(1.0)-	1(0.5)-	-
	455	6	83.6	200	0	1	1	0	0	0	2(1.0)-	0(0.0)-	-
	910	6	78.5	200	1	1	0	0	0	0	1(0.5)-	2(1.0)-	-
MMC <sup>b</sup>	0.1	6	63.8	200	11	52	122	0	0	0	132(66.0)+	1(0.5)-	+

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth:others, -gap:total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (mitomycin C)

Table 2 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
D. W. <sup>a</sup>	0	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0(0.0)-	2(1.0)-	-
Test substance	228	6	97.2	200	0	0	0	0	0	0	0(0.0)-	1(0.5)-	-
	455	6	106.4	200	1	0	0	0	0	0	0(0.0)-	2(1.0)-	-
	910	6	95.6	200	0	1	1	0	0	0	1(0.5)-	1(0.5)-	-
CP <sup>b</sup>	12.5	6	74.5	200	12	52	140	0	0	1	148(74.0)+	0(0.0)-	+

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth:others, -gap:total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (cyclophosphamide)

Table 3 Chromosome aberration test on CHL/IU cells treated with tetramethylammonium hydroxide [continuous treatment: 24 hr]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell survival (%)	Number of cells analysed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations -gap (%)	No. of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
D. W. <sup>a</sup>	0	24	100.0	200	2	0	0	0	0	0	0(0.0)-	1(0.5)-	-
Test substance	228	24	97.7	200	0	1	1	0	0	0	2(1.0)-	1(0.5)-	-
	455	24	93.8	200	1	1	0	0	0	0	1(0.5)-	2(1.0)-	-
	910	24	89.0	200	0	0	3	0	0	0	3(1.5)-	1(0.5)-	-
MMC <sup>b</sup>	0.05	24	60.1	200	14	21	54	0	0	0	63(31.5)+	1(0.5)-	+

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth:others, -gap:total number of cells with aberrations except gap

a) Negative control

b) Positive control (mitomycin C)

# テトラメチルアンモニウムヒドロキシ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 Tetramethylammonium hydroxide in Rats

### 要約

テトラメチルアンモニウムヒドロキシドの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系ラットを用いて実施した。投与量は雌雄とも0(対照群), 5, 10および20 mg/kgとし, 0および20 mg/kg投与群は回復試験の動物を含む1群10匹, 5および10 mg/kg投与群は1群5匹を使用して試験を行った。

その結果, いずれの投与群においても死亡例は認められなかった。一般状態の変化として, 投与第6日以降, 10 mg/kg以上の投与群で投与直後の流涎が繰り返して観察された。この流涎は, 投与後1時間以内に消失する一過性の症状であったが, 投与第13日以降には, 雄の10 mg/kg以上の投与群および雌の20 mg/kg投与群で投与後1時間以上継続して観察される例があった。10 mg/kg投与群の雄および20 mg/kg投与群の雌雄では, 投与第1週の摂餌量が低値を示した。また, 回復期間中に被験物質投与群の雄の摂餌量は高値を示し, 回復第1週には有意な差が認められた。回復第2週の尿検査では, 被験物質投与群の雄における電解質排泄量に増加がみられたが, 投与第4週の尿検査所見には被験物質投与に起因したと考えられる変化はなかった。血液学検査および血液生化学検査所見には, 被験物質投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。器官重量では, 投与期間終了時の雄の心臓重量が用量に依存して減少した。すなわち, 絶対重量は5 mg/kg以上の投与群で, 相対重量は10 mg/kg以上の投与群で, いずれも有意な減少が認められた。一方, 投与期間終了時の雌および回復期間終了時の雌雄の器官重量には, いずれも有意な差は認められなかった。また, 病理組織学所見には, 被験物質投与に起因したと考えられる変化は観察されなかった。

以上のことから, 本試験条件下におけるテトラメチルアンモニウムヒドロキシドの無影響量は, 雄では5 mg/kg/day未満, 雌では5 mg/kg/dayであると判断された。

### 方法

#### 1. 被験物質

被験物質として, 昭和電工(株)(福島)より提供されたテトラメチルアンモニウムヒドロキシドの20.19%水溶液(ロット番号:81029)を用いた。提供された水溶液は無色透明の液体で, 不純物として炭酸根3 ppm, 塩化物0.17 ppmを含有していた。被験物質は, 使用時まで室温で保

管した。なお, 被験物質の試験期間中の安定性は, 残余被験物質を提供元で再分析することにより確認した。

投与検体は, 被験物質を局方注射用水(製造番号:9707SA, 光製薬(株))で希釈してテトラメチルアンモニウムヒドロキシド濃度として0.2 w/v%溶液を調製し, これを注射用水により各濃度に段階希釈した。なお, 初回に調製した各濃度の投与検体の含量測定を実施した結果, 溶液中の被験物質の平均含量は, 所定濃度の100~101%であった。また, 本被験物質の溶媒中の安定性を確認するための分析法の確立が困難であったため, 安定性試験は実施せず, 投与検体は用時調製とした。

#### 2. 動物および飼育方法

試験には, 生後4週で購入し, 検疫を兼ねて8日間予備飼育した雌雄のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS, 日本チャールス・リバー(株))各30匹を使用した。

群分けは, 検疫期間中に異常がなかった動物を用い, 投与開始前日の体重に基づいて体重別層化無作為抽出法により行った。動物数は, 雌雄とも対照群および高用量群を各10匹とし, 低および中用量群を各5匹とした。

動物は, 温度 $24 \pm 1$  °C, 湿度50~65%, 換気回数約15回/時, 照明12時間(7~19時点灯)に設定した飼育室内で, 金属製金網床ケージに1匹ずつ収容し, 固型飼料(CE-2, 日本クレア(株))および水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。

#### 3. 投与量の設定および投与方法

本試験の投与量は, 投与量設定のための予備試験と急性経口投与毒性予備試験の結果に基づき決定した。すなわち, 20 mg/kgを5日間反復投与することにより雄3例中1例で, 腺胃粘膜の肥厚が観察されたが, 5および10 mg/kgを7日間反復投与しても何ら変化がみられなかった。一方, 急性経口投与毒性予備試験として, 25 mg/kgを単回投与したところ, 半眼および自発運動の減少等が散見され, 雄3例中1例では投与翌日の体重が減少した。これらのことから20 mg/kg投与群は, 被験物質による毒性影響が認められ, かつ28日間の反復投与に耐えうる用量であると判断し, 本試験の用量は, 高用量を20 mg/kgとし, 以下公比2で除して10および5 mg/kgを中用量および低用量とした。また, 雌雄とも媒体である注射用水を投与する対照群を設けた。

投与経路は強制経口投与とし, 1日1回, 28日間, ラット用胃管を用いて投与した。投与容量は10 mL/kgと



し、投与量は雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に算出した。なお、回復期間は14日間とした。

#### 4. 観察および検査

##### 1) 一般検査

毎日(投与期間中は投与前および投与後)全例の一般状態を観察した。また、体重は、投与第1週の第1日の投与直前と5日、投与第2週以降回復期間終了週までは1週に2回の頻度で測定し、その他、投与期間終了日、回復期間終了日および剖検日にも測定した。摂餌量は、投与第1週では、投与第1日から2日にかけて1日あたりの摂餌量を測定し、以後回復期間終了週まで毎週1回の頻度で測定した。

##### 2) 尿検査

各群とも全例について、投与第4週および回復第2週に代謝ケージに収容して蓄尿し、約4および24時間の時点で採尿した。この4時間尿を用いて、pH、潜血、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンを試験紙法(クリニテック200+, バイエル・三共(株))により、また色調および濁度を視診により検査し、24時間尿を用いて、尿量(天秤で重量を計測し、比重で除す)、比重(単位体積あたりの重量を測定)を測定したほか、全自動電解質分析装置(EA05, (株)A&T)により、ナトリウム、カリウムおよび塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

##### 3) 血液学検査

投与期間ないし回復期間終了日から翌日の剖検日にかけて定期解剖例全例を18から24時間絶食させ、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈よりEDTA 2Kを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コールターエレクトロニクス(株))により赤血球数、白血球数、平均赤血球容積、血小板数(以上、電気抵抗法)および血色素量(吸光度法)を測定し、これらを基にヘマトクリット値、平均赤血球血色素量および平均赤血球血色素濃度を算出した。血液の一部は塗抹標本とし、白血球分類(Wright-Giemsa染色)および網状赤血球比率(Brecher法)を求めた。また、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採取した血液をCA-1000(東亜医用電子(株))によりプロトロンビン時間および活性部分トロンボプラスチン時間(光散乱検出法)を測定した。

##### 4) 血液生化学検査

血液学検査用の採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して遠心方式生化学自動分析装置(COBAS-FARA, ロシュ・ダイアグノスティクス(株))により、総蛋白濃度(ピウレット法)、アルブミン濃度(BCG法)、総コレステロール濃度(COD・DAOS法)、ブドウ糖濃度(グルコキナーゼ・G6PDH法)、尿素窒素濃度(ウレアーゼ・Gl.DH法)、クレアチニン濃度(Jaffé法)、アルカリフォスファターゼ活性(GSCC法)、GOT活性(IFCC法)、GPT活性(IFCC法)、 $\gamma$ -GTP活性( $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)、

トリグリセライド濃度(GPO・DAOS法)、無機リン濃度(モリブデン酸直接法)、カルシウム濃度(OCPC法)を測定し、A/G比を算出した。また、全自動電解質分析装置(EA05, (株)A&T)により、ナトリウム濃度、カリウム濃度および塩素濃度(イオン電極法)を測定した。

##### 5) 病理学検査

上記の採血に引き続き、動物を放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣または精巣、精巣上体の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、脳、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺、上皮小体、心臓、気管、気管支、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、前立腺、精囊、卵巣、子宮、陰、乳腺、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、骨格筋(下腿部)、坐骨神経、大腿骨骨髓、脾臓、顎下腺、舌下腺、舌、食道、大動脈、ハーダー腺、皮膚、病変部を0.1 mol/Lリン酸緩衝10 vol%ホルマリン溶液(pH 7.2)に固定し、精巣、精巣上体はブアン液に固定した。心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、胃、精巣、精巣上体、卵巣および病変部はパラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、先ず、対照群および高用量群について病理組織学検査を実施した。次いで、被験物質投与による影響が疑われた雄の腎臓について、全例の病理組織学検査を実施した。その他、肉眼的異常が認められた器官・組織についても病理組織学検査を実施した。

##### 5. 統計解析

体重、摂餌量、尿検査(半定量検査を除く)および定期解剖例の血液学検査、血液生化学検査ならびに器官重量について、群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群が3群以上の場合には、Dunnett法で多重比較を行い、2群の場合には、Studentのt検定ないしAspin-Welchのt検定を行った。さらに、病理組織学検査所見は、グレード分けしたデータについてMann-WhitneyのU検定を、陽性グレードの合計値についてFisher直接確率の片側検定を行った。なお、これら対照群および被験物質投与群との間の有意差検定はいずれの場合も有意水準を5%とした。

## 結果

### 1. 一般状態

投与第6日以降、投与後1時間以内に消失する投与直後の一過性の流涎が、5 mg/kg投与群の雄1例、10 mg/kg投与群の雄4例、雌5例、20 mg/kg投与群の雄8例、雌9例に認められた。また、投与第13日以降には、流涎が投与後1時間以上継続して観察される例もあり、その例数は、10 mg/kg投与群の雄1例、20 mg/kg投与群の雄5例、雌6例であった。これらの流涎は、5 mg/kg投与群を除き、投与により繰り返して観察され

ることが多かった。また、個体によっては投与時の保定の段階で見られることがあった。さらに、20 mg/kg 投与群の雌1例では、投与1時間後から流涎が認められることもあった。その他、10 mg/kg 投与群の雄1例では、投与第12日以降、片側眼球の暗色化が認められた。なお、投与期間および回復期間中に死亡例はなかった。

## 2. 体重 (Fig. 1, 2)

観察期間中、被験物質投与群では、雌雄いずれにおいても対照群との間に体重の有意な差は認められなかった。

## 3. 摂餌量 (Fig. 3)

10 mg/kg 投与群の雄および20 mg/kg 投与群の雌雄では、投与第1週の摂餌量が対照群と比較して有意な低値を示したが、その後の投与期間中には、いずれの被験物質投与群においても有意な差は認められなかった。一方、回復期間中、被験物質投与群の雄の摂餌量は高値を示し、回復第1週には有意な差が認められた。

## 4. 尿検査 (Table 1)

投与第4週の検査では、いずれの検査項目においても、対照群と被験物質投与群の間に著しい差は認められなかった。回復第2週の検査では、被験物質投与群の雄における電解質排泄量に有意な増加が認められた。

## 5. 血液学検査 (Table 2)

投与期間終了時の検査では、20 mg/kg 投与群の雄にプロトロンビン時間の短縮がみられた以外、対照群と被

験物質投与群の間に有意な差は認められなかった。また、回復期間終了時の検査では、被験物質投与群の雌雄に赤血球数の有意な減少がみられたほか、雄では網状赤血球比率、平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の増加と血小板数の減少が、また、雌では血色素量の減少および活性部分トロンボプラスチン時間の短縮が認められた。

## 6. 血液生化学検査 (Table 3)

投与期間終了時の検査では、いずれの検査項目においても、対照群と被験物質投与群の間に有意な差は認められなかった。回復期間終了時の雄では、総蛋白濃度の有意な低下が認められたが、他の検査項目には対照群と被験物質投与群の間に有意な差は認められなかった。

## 7. 病理学検査

### 1) 肉眼所見

#### (1) 投与期間終了時解剖例

片側眼球の暗色部が10 mg/kg 投与群の雄1例に、腎臓の嚢胞が対照群の雌1例に、脾臓の小型化が20 mg/kg 投与群の雌1例に観察された。

#### (2) 回復期間終了時解剖例

腎臓の大型化と皮質の淡色部が20 mg/kg 投与群の雄1例に、片側の精巣および精巣上体の小型化が対照群の1例に観察された。

### 2) 器官重量 (Table 4)

投与期間終了時解剖例の5 mg/kg 以上の投与群の雄では、心臓の絶対重量に有意な減少がみられ、10 mg/kg

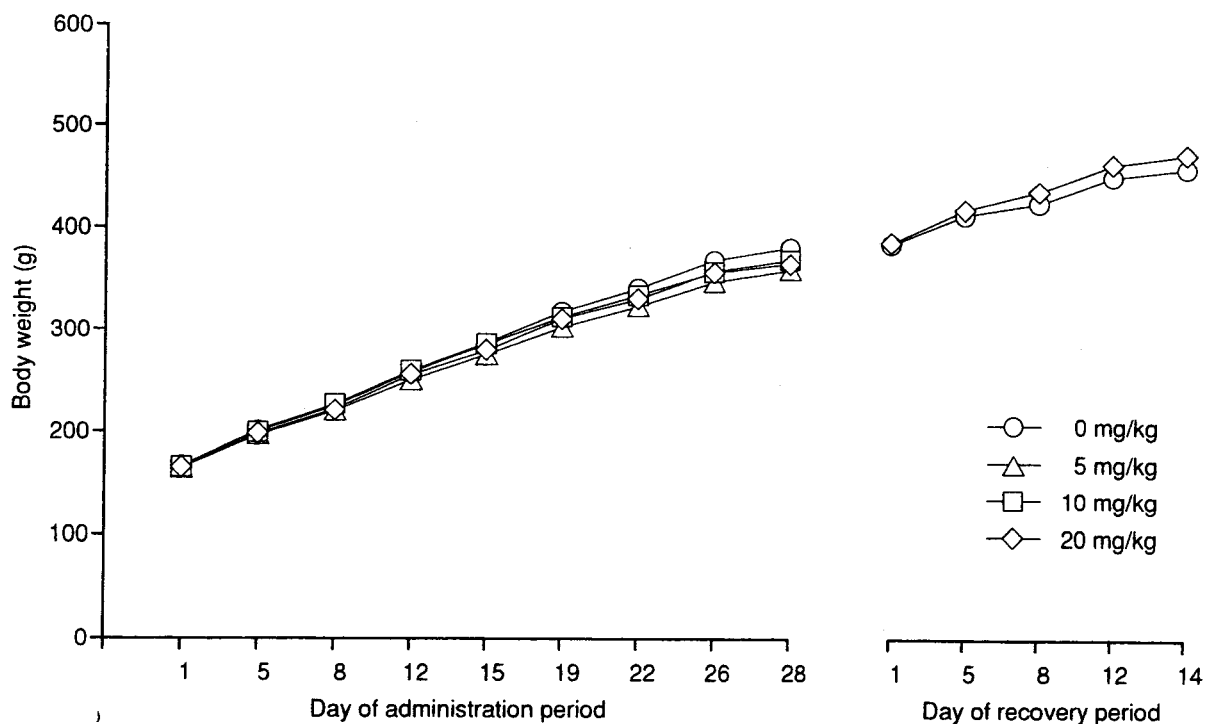


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

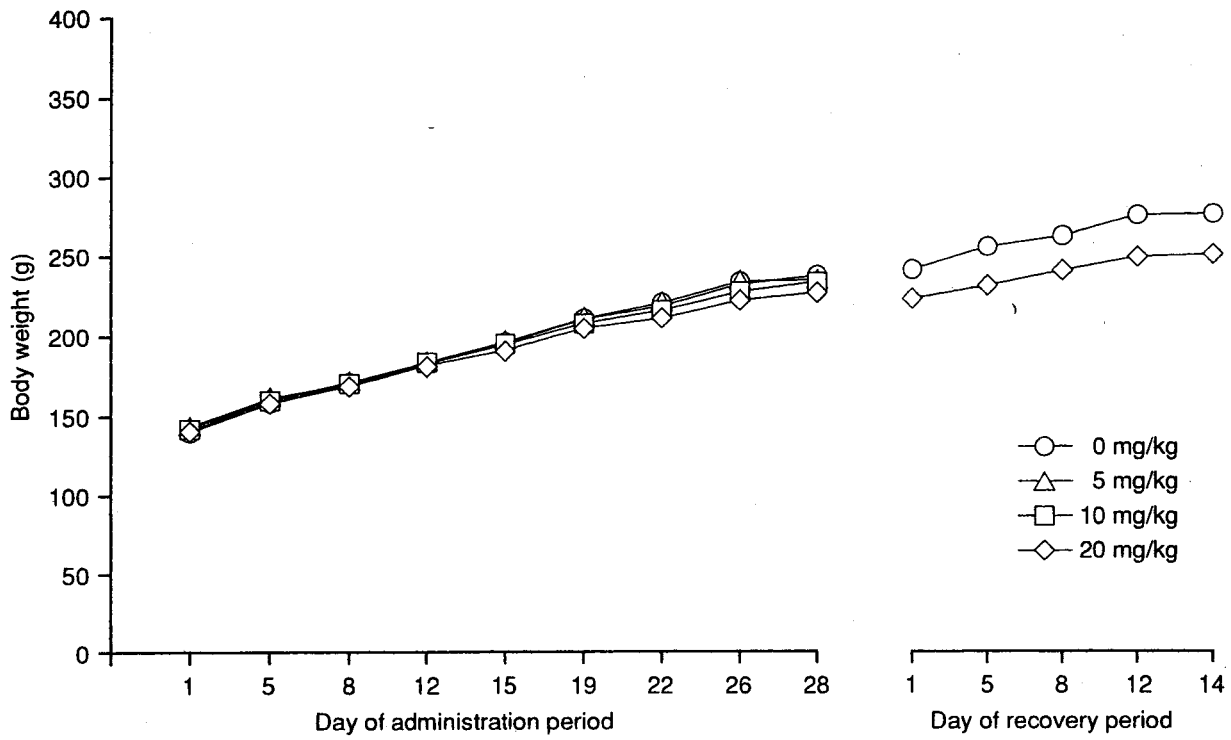


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

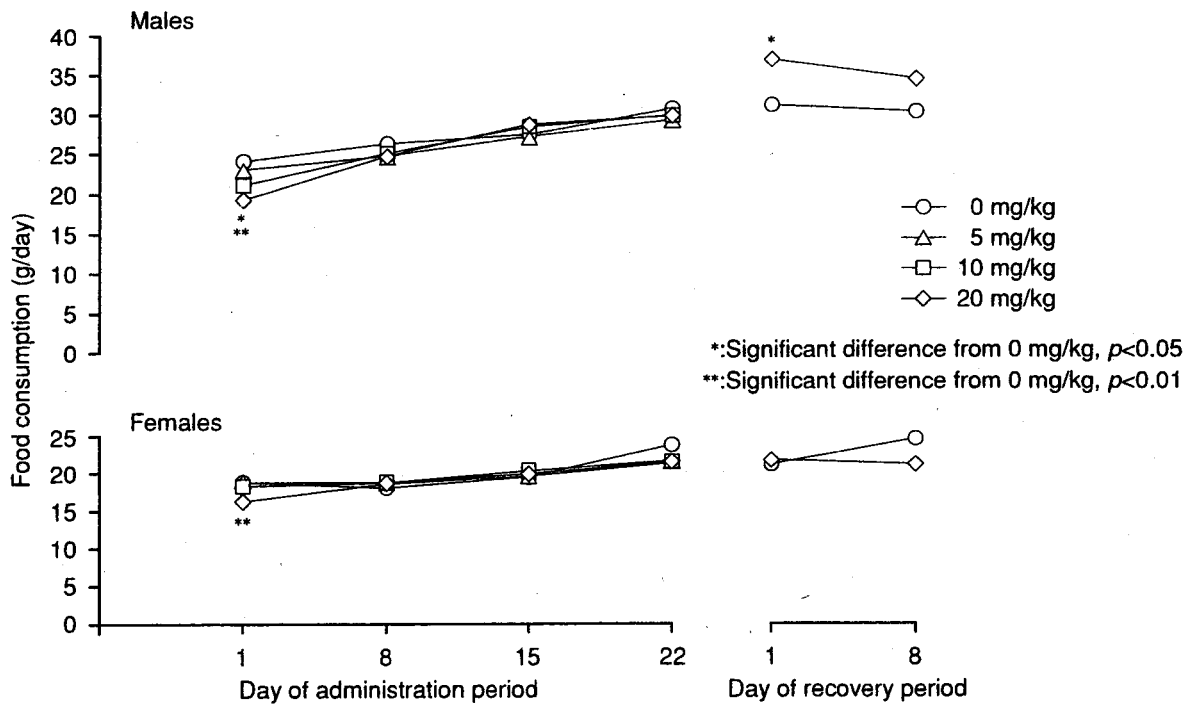


Fig. 3 Food consumption of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

以上の投与群では、相対重量にも有意な減少が認められた。一方、回復期間終了時解剖例の器官重量には、いずれも有意な差は認められなかった。

3) 病理組織学検査 (Table 5)

(1) 投与期間終了時解剖例

腎臓の近位尿細管に軽度な好酸性小体が20 mg/kg投与群の雄2例に観察されたほか、腎臓、脾臓あるいは心臓に所見が観察されたが、いずれの所見も群間でその発

生頻度および程度に差は認められなかった。なお、肉眼的に病変がみられた部位の所見として、片側眼球に暗色部がみられた10 mg/kg投与群の雄1例では硝子体の出血が、腎臓に嚢胞がみられた対照群の雌1例では皮質の嚢胞が、脾臓の小型化がみられた20 mg/kg投与群の雌1例では、髄外造血の消失がそれぞれ認められた。

## (2) 回復期間終了時解剖例

雄の腎臓の近位尿細管に軽微から軽度な好酸性小体が、対照群2例、被験物質投与群3例に観察されたほか、自然発生性の所見が観察されたが、いずれの所見も群間でその発生頻度および程度に差は認められなかった。なお、肉眼的に病変がみられた部位の所見として、片側の精巣および精巣上体の小型化がみられた対照群の1例では、精巣の精細管萎縮および精巣上体の精子減少が観察されたが、腎臓の大型化と皮質の淡色部がみられた20 mg/kg投与群の雄1例では、これに対応すると考えられる変化は認められなかった。

## 考察

テトラメチルアンモニウムヒドロキシドを、5、10および20 mg/kgの用量で雌雄のSprague-Dawley系ラットに28日間にわたって強制経口投与し、その後14日間の回復期間を設けた。

その結果、投与第6日以降、被験物質投与群に投与直後の流涎が認められた。この流涎は、投与後1時間以内に消失する一過性の症状であったが、投与第13日以降には、雄の10 mg/kg以上の投与群および雌の20 mg/kg投与群では、投与後1時間以上継続して観察される例があった。流涎は、テトラメチルアンモニウムヒドロキシドの急性経口投与毒性試験の高用量群(50 mg/kg)でも観察されており、被験物質投与による影響と考えられる。流涎の成因としては、テトラメチルアンモニウムヒドロキシドの0.2 w/v%水溶液のpHは12.5という強アルカリ性であることから、投与検体の刺激性による変化とも考えられるが、低用量の投与検体濃度でもpHはほとんど変わらないことから、その可能性は少ないと考えられる。一方、テトラメチルアンモニウム塩は神経節興奮薬(脱分極性薬物)であり、一部ムスカリン様作用を有する<sup>1)</sup>ことから、被験物質の自律神経系に対する作用によって、唾液の分泌が亢進した可能性がある。なお、流涎以外に、便の性状あるいは瞳孔等には変化は認められなかった。また、5 mg/kg投与群の雄1例に認められた流涎は、1回のみで、投与の保定の段階でみられていることから、被験物質の作用による症状ではなく、投与操作に反応した変化と考えられる。

10 mg/kg投与群の雄および20 mg/kg投与群の雌雄では、投与第1週の摂餌量が低値を示した。この変化は、用量依存的事から被験物質投与によるものと考えられるが、観察期間中の体重には変化はなく、その影響は軽微なものであった。一方、回復期間中の被験物質投与群の雄の摂餌量が高値を示した。その成因については不明であるが、被験物質投与中止による変化と考えら

れる。また、回復第2週の尿検査で、被験物質投与群の雄の電解質排泄量に増加がみられたが、この所見は、前述の回復期間になってからの摂餌量の増加に伴う変化の可能性もある。

回復期間終了時の血液学検査所見として、被験物質投与群の雌雄に赤血球数の減少がみられたほか、雄では網状赤血球比率、平均赤血球容積および平均赤血球色素量の増加と血小板数の減少が、雌では色素量の減少がそれぞれ認められた。これらの変化は、いずれも投与期間終了時には対照群との差はなく、また、生理的変動範囲内の軽微な変化であることから、毒性学的意義は少ないものと考えられる。この他、血液および血液生化学の検査項目のうち、対照群と被験物質投与群との間に有意差の認められた血液凝固時間は、短縮方向の変化であったこと、総蛋白濃度の低下は、回復期間終了時のみの変化であり、他の関連所見もなかったことから、いずれも被験物質投与およびその後続く回復期間に関連がない変化と考えられる。

器官重量では、投与期間終了時に雄の心臓重量が用量に依存して減少したが、高用量群における組織学所見には対照群との差はなかった。前述のように、テトラメチルアンモニウム塩は神経節興奮薬であり、神経節のシナプス後膜を脱分極させることにより、節後ニューロンの興奮を起こし、次いで脱分極性の遮断を起こすことが知られており<sup>1)</sup>、また、ラットの心臓に対してムスカリン様作用を有することが報告されている<sup>2)</sup>。これらのことから、今回の試験でみられた雄の心臓重量の減少は、被験物質投与による降圧、心筋の収縮力低下、心拍数の減少等心臓に対する負荷の軽減によって生じた可能性があるが、その詳細については不明である。

その他、病理学検査所見として、投与期間終了時に、20 mg/kg投与群の雄2例で腎臓の近位尿細管に好酸性小体が観察されたが、この所見は、雄ラットに特徴的な自然発生性病変であり<sup>3)</sup>、回復期間終了時の検査では、対照群でも認められていることから、投与期間終了時に観察された変化は、自然発生性のもので、被験物質投与に起因した変化ではないと考えられる。

以上のように、テトラメチルアンモニウムヒドロキシドを反復投与することにより、10 mg/kg以上の用量では、投与後の流涎がみられ、20 mg/kgの用量では、流涎が1時間以上継続して認められる例が多かった。また、雄では心臓の重量が用量依存的に減少し、5 mg/kg以上の用量で絶対重量に有意な差が認められた。したがって、本試験条件下におけるテトラメチルアンモニウムヒドロキシドの無影響量は、雄では5 mg/kg/day未満、雌では5 mg/kg/dayであると判断された。

## 文献

- 1) 伊藤宏, "薬理学," 三須良実編, 第6版, 栄光堂, 東京, 1986, p.200.

- 2) R. H. Kennedy, R. P. Wyeth, P. Gerner, S. Liu, H. J. Fontenot, E. Seifen, *Am. J. Physiol.*, **268** (*Cell Physiol.* **37**), C1414(1995).  
3) 伊東信行, “最新毒性病理学,” 中山書店, 東京, 1994, p.206.

連絡先

試験責任者: 畔上二郎  
試験担当者: 森村智美, 加藤博康, 関 剛幸,  
新藤智子, 永田伴子, 吉村慎介,  
堀内伸二, 稲田浩子, 三枝克彦,  
安生孝子

(財)食品薬品安全センター秦野研究所  
〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Jiro Azegami (Study Director)  
Tomomi Morimura, Hiroyasu Katoh,  
Takayuki Seki, Tomoko Shindo,  
Tomoko Nagata, Shinsuke Yoshimura,  
Shinji Horiuchi, Hiroko Inada,  
Katsuhiko Saegusa, Takako Anjo  
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center  
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,  
Japan  
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Urinalysis of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	On day 26 of administration period				On day 12 of recovery period	
	0	5	10	20	0	20
<b>Male</b>						
Number of animals	10	5	5	10	5	5
Volume (mL/24 hr) <sup>a</sup>	26.9±10.9	21.9±4.6	27.1±2.8	24.0±5.3	32.9±11.0	26.6±3.7
Specific gravity <sup>a</sup>	1.038±0.011	1.033±0.007	1.030±0.005	1.033±0.007	1.033±0.010	1.040±0.008
Color	light yellow					
Protein <sup>c</sup>	±	2	1	2	0	1
	+	8	4	3	10	3
Ketone <sup>b</sup>	±	5	4	3	6	3
	+	1	0	1	2	1
Occult blood <sup>b</sup>	±	0	0	0	0	0
	+	0	0	1	0	0
Urobilinogen <sup>d</sup>	±	10	5	5	9	4
	+	0	0	0	1	1
Concentration of electrolyte (mEq/L) <sup>a</sup>						
Na	82.2±23.7	71.3±23.9	60.8±13.5	76.2±18.2	75.9±27.9	103.4±21.8
K	176.1±54.2	174.3±38.4	154.2±23.9	173.7±30.5	141.9±47.8	188.7±27.1
Cl	101.5±34.9	91.4±26.9	81.9±15.5	104.4±20.8	82.8±34.2	116.2±19.1
Excretion of electrolyte (mEq/24 hr) <sup>a</sup>						
Na	2.00±0.22	1.75±0.60	1.62±0.27	1.77±0.39	2.27±0.22	2.69±0.24*
K	4.23±0.71	4.26±0.89	4.13±0.33	4.06±0.71	4.28±0.53	4.94±0.23*
Cl	2.41±0.36	2.24±0.68	2.20±0.35	2.44±0.46	2.46±0.42	3.04±0.19*
Na/K	0.48±0.10	0.40±0.07	0.39±0.05	0.44±0.06	0.53±0.03	0.54±0.05
<b>Female</b>						
Number of animals	10	5	5	10	5	5
Volume (mL/24 hr) <sup>a</sup>	14.9±4.8	17.5±4.3	17.7±4.1	19.6±5.7	17.7±1.8	18.3±6.1
Specific gravity <sup>a</sup>	1.036±0.008	1.032±0.012	1.034±0.004	1.031±0.011	1.037±0.004	1.034±0.005
Color	light yellow					
Protein <sup>c</sup>	±	5	0	0	1	1
Ketone <sup>b</sup>	±	1	0	0	1	0
Urobilinogen <sup>d</sup>	±	9	5	5	8	5
	+	1	0	0	2	0
Concentration of electrolyte (mEq/L) <sup>a</sup>						
Na	83.2±23.9	76.3±28.9	76.2±15.2	63.6±21.4	107.6±9.3	101.4±16.7
K	200.2±41.2	172.9±61.7	181.0±17.3	162.9±49.5	187.8±15.3	177.0±23.8
Cl	100.0±28.0	88.8±39.1	98.2±4.9	88.3±30.8	112.0±12.7	104.0±13.9
Excretion of electrolyte (mEq/24 hr) <sup>a</sup>						
Na	1.22±0.43	1.26±0.43	1.38±0.47	1.19±0.41	1.90±0.27	1.79±0.41
K	2.93±0.84	2.83±0.75	3.16±0.60	3.03±0.73	3.31±0.27	3.16±0.85
Cl	1.48±0.55	1.43±0.55	1.74±0.40	1.66±0.57	1.98±0.31	1.88±0.61
Na/K	0.41±0.07	0.44±0.05	0.43±0.09	0.39±0.05	0.57±0.04	0.57±0.03

a) Values represent mean ± S.D. b) ±: trace, +: slight c) ±: trace, +: 30 mg/dL d) ±: 0.1 E.U./dL, +: 1.0 E.U./dL

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$

Table 2 Hematological examination of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	5	10	20	0	20
<b>Male</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	717 $\pm$ 32	700 $\pm$ 28	700 $\pm$ 35	701 $\pm$ 40	777 $\pm$ 26	735 $\pm$ 21*
Hemoglobin (g/dL)	14.7 $\pm$ 0.4	14.8 $\pm$ 0.5	14.7 $\pm$ 0.6	15.0 $\pm$ 0.6	15.2 $\pm$ 0.4	15.1 $\pm$ 0.3
Hematocrit (%)	43.0 $\pm$ 1.5	42.9 $\pm$ 1.6	42.3 $\pm$ 1.9	42.6 $\pm$ 1.8	44.6 $\pm$ 1.8	43.5 $\pm$ 1.1
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	60.0 $\pm$ 1.4	61.4 $\pm$ 1.3	60.5 $\pm$ 0.5	60.8 $\pm$ 1.2	57.4 $\pm$ 0.7	59.2 $\pm$ 0.9**
MCH (pg)	20.6 $\pm$ 0.7	21.2 $\pm$ 0.5	21.0 $\pm$ 0.4	21.4 $\pm$ 0.4	19.6 $\pm$ 0.3	20.6 $\pm$ 0.5**
MCHC (%)	34.3 $\pm$ 0.5	34.6 $\pm$ 0.7	34.7 $\pm$ 0.5	35.2 $\pm$ 0.7	34.1 $\pm$ 0.8	34.7 $\pm$ 0.3
Reticulocyte (%)	3.7 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 1.6	3.3 $\pm$ 0.8	1.7 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.9*
Platelet ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	103.7 $\pm$ 7.0	95.1 $\pm$ 5.3	102.1 $\pm$ 7.5	102.1 $\pm$ 5.3	104.6 $\pm$ 10.2	89.5 $\pm$ 8.3*
PT (sec)	18.7 $\pm$ 2.0	20.2 $\pm$ 3.0	17.3 $\pm$ 2.0	14.2 $\pm$ 1.2*	15.9 $\pm$ 2.6	15.5 $\pm$ 2.5
APTT (sec)	21.1 $\pm$ 1.4	21.0 $\pm$ 2.0	20.4 $\pm$ 0.9	18.4 $\pm$ 2.0	20.6 $\pm$ 2.0	19.3 $\pm$ 1.5
WBC ( $\times 100/\text{mm}^3$ )	75 $\pm$ 23	81 $\pm$ 15	76 $\pm$ 31	77 $\pm$ 20	88 $\pm$ 23	67 $\pm$ 8
Differential leukocyte counts (%)						
Band neutrophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Segmented neutrophil	15 $\pm$ 8	6 $\pm$ 5	7 $\pm$ 4	7 $\pm$ 5	4 $\pm$ 2	9 $\pm$ 6
Eosinophil	1 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Basophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte	3 $\pm$ 4	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2
Lymphocyte	81 $\pm$ 11	90 $\pm$ 5	89 $\pm$ 7	90 $\pm$ 5	94 $\pm$ 1	86 $\pm$ 6
<b>Female</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
RBC ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	714 $\pm$ 23	709 $\pm$ 23	711 $\pm$ 27	714 $\pm$ 43	775 $\pm$ 18	740 $\pm$ 16*
Hemoglobin (g/dL)	14.9 $\pm$ 0.5	14.6 $\pm$ 0.2	14.8 $\pm$ 0.5	14.8 $\pm$ 0.6	15.3 $\pm$ 0.3	14.9 $\pm$ 0.3*
Hematocrit (%)	42.8 $\pm$ 1.4	41.5 $\pm$ 0.9	42.9 $\pm$ 1.7	42.5 $\pm$ 1.8	44.4 $\pm$ 1.1	43.0 $\pm$ 1.1
MCV ( $\mu\text{m}^3$ )	60.0 $\pm$ 0.9	58.6 $\pm$ 1.7	60.4 $\pm$ 1.8	59.6 $\pm$ 2.5	57.3 $\pm$ 0.9	58.1 $\pm$ 1.5
MCH (pg)	20.9 $\pm$ 0.3	20.7 $\pm$ 0.8	20.8 $\pm$ 0.4	20.8 $\pm$ 0.8	19.8 $\pm$ 0.2	20.1 $\pm$ 0.6
MCHC (%)	34.8 $\pm$ 0.4	35.3 $\pm$ 1.0	34.5 $\pm$ 0.5	35.0 $\pm$ 0.7	34.6 $\pm$ 0.5	34.6 $\pm$ 0.5
Reticulocyte (%)	2.4 $\pm$ 1.0	2.1 $\pm$ 0.7	2.2 $\pm$ 0.9	1.9 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.6	2.6 $\pm$ 0.4
Platelet ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	88.3 $\pm$ 6.4	96.8 $\pm$ 9.2	105.7 $\pm$ 7.8	96.8 $\pm$ 14.4	95.3 $\pm$ 10.6	91.0 $\pm$ 6.8
PT (sec)	12.0 $\pm$ 0.6	12.5 $\pm$ 0.8	12.9 $\pm$ 0.2	12.7 $\pm$ 0.5	12.0 $\pm$ 0.5	11.7 $\pm$ 0.5
APTT (sec)	16.9 $\pm$ 1.4	16.3 $\pm$ 0.7	15.0 $\pm$ 1.6	15.7 $\pm$ 1.1	17.5 $\pm$ 1.0	15.9 $\pm$ 0.7*
WBC ( $\times 100/\text{mm}^3$ )	47 $\pm$ 12	49 $\pm$ 18	44 $\pm$ 4	42 $\pm$ 5	45 $\pm$ 7	39 $\pm$ 10
Differential leukocyte counts (%)						
Band neutrophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Segmented neutrophil	8 $\pm$ 3	8 $\pm$ 6	14 $\pm$ 8	8 $\pm$ 5	7 $\pm$ 3	9 $\pm$ 6
Eosinophil	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	0 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1
Basophil	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte	3 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 3
Lymphocyte	89 $\pm$ 4	90 $\pm$ 5	84 $\pm$ 9	91 $\pm$ 6	89 $\pm$ 4	87 $\pm$ 8

Values represent mean  $\pm$  S.D.\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$ \*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Table 3 Blood chemical examination of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	5	10	20	0	20
<b>Male</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.2±0.2	5.1±0.2	5.3±0.2	5.3±0.3	5.5±0.1	5.2±0.1**
Albumin (g/dL)	3.0±0.1	3.0±0.2	3.0±0.2	3.2±0.1	3.2±0.1	3.1±0.1
A/G	1.36±0.13	1.37±0.21	1.30±0.12	1.47±0.10	1.39±0.12	1.50±0.12
Glucose (mg/dL)	133±7	125±3	126±6	130±10	167±40	147±15
Total cholesterol (mg/dL)	40±4	36±6	43±6	44±5	46±11	40±6
Triglyceride (mg/dL)	41±4	42±10	43±18	37±5	48±9	50±11
BUN (mg/dL)	17±3	16±2	16±4	17±2	15±3	14±2
Creatinine (mg/dL)	0.5±0.0	0.5±0.1	0.6±0.1	0.6±0.0	0.7±0.1	0.6±0.1
Inorg. phos. (mg/dL)	7.5±0.4	7.4±0.2	7.5±0.3	7.3±0.6	7.4±0.5	7.1±0.5
Ca (mg/dL)	8.8±0.2	8.9±0.2	8.9±0.2	9.0±0.1	8.9±0.2	9.0±0.2
Na (mEq/L)	145.6±0.7	145.0±0.7	144.8±0.3	145.2±0.6	145.3±1.4	145.1±0.7
K (mEq/L)	3.52±0.15	3.61±0.12	3.73±0.23	3.63±0.2	4.03±0.44	3.61±0.25
Cl (mEq/L)	107.4±1.1	107.2±1.1	107.4±1.3	108.3±1.2	106.5±1.1	106.3±0.5
ALP (U/L)	453±62	425±99	396±66	399±80	319±53	309±49
GPT (U/L)	29±5	29±1	29±3	34±7	30±6	30±2
GOT (U/L)	69±5	66±6	61±6	67±13	70±7	70±6
γ-GTP (U/L)	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Female</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Total protein (g/dL)	5.2±0.2	5.4±0.2	5.1±0.2	4.9±0.3	5.8±0.3	5.6±0.2
Albumin (g/dL)	3.2±0.1	3.3±0.1	3.2±0.2	3.1±0.2	3.6±0.3	3.4±0.2
A/G	1.58±0.11	1.66±0.14	1.66±0.14	1.66±0.12	1.61±0.25	1.61±0.13
Glucose (mg/dL)	125±10	122±10	120±10	118±6	130±14	119±14
Total cholesterol (mg/dL)	50±4	51±6	52±13	56±10	53±10	62±4
Triglyceride (mg/dL)	30±7	30±6	31±7	30±13	41±22	27±10
BUN (mg/dL)	16±2	19±3	16±3	19±4	21±3	20±2
Creatinine (mg/dL)	0.6±0	0.6±0	0.6±0	0.6±0.1	0.7±0.1	0.7±0
Inorg. phos. (mg/dL)	5.8±0.8	6.6±0.6	5.8±1.0	6.3±0.2	6.0±0.7	6.2±0.8
Ca (mg/dL)	8.7±0.2	8.9±0.2	8.6±0.4	8.6±0.2	9.1±0.3	8.9±0.3
Na (mEq/L)	143.6±0.9	143.8±1.3	144.5±0.9	144.7±1.5	144.2±1.2	145.2±1.3
K (mEq/L)	3.26±0.19	3.47±0.29	3.38±0.19	3.31±0.37	4.04±0.31	3.89±0.35
Cl (mEq/L)	108.6±0.8	108.8±1.3	109.5±1.7	109.5±1.2	107.5±2.5	108.9±0.9
ALP (U/L)	259±91	244±83	276±65	293±52	186±16	191±42
GPT (U/L)	20±2	24±3	24±3	25±5	24±3	26±7
GOT (U/L)	62±5	57±4	57±5	58±3	64±8	65±14
γ-GTP (U/L)	0±1	0±0	0±0	0±1	1±0	0±0

Values represent mean±S.D.

\*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p<0.01$



Table 4 Organ weights of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

Dose (mg/kg)	End of administration period				End of recovery period	
	0	5	10	20	0	20
<b>Male</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	348.7±16.9	326.1±23.9	334.0±15.4	325.7±16.8	410.5±19.3	424.3±30.6
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1896.4±64.6	1916.0±82.1	1923.2±55.9	1919.2±123.1	1976.7±62.4	1986.9±11.8
Thymus	621.5±90.5	580.8±111.9	641.3±162.3	540.3±92.1	545.7±131.1	529.6±76.4
Heart	1259.9±78.8	1086.4±77.3*	1077.0±104.8**	1043.6±65.4**	1230.1±52.8	1254.6±117.5
Liver	10540.8±708.4	9927.4±910.4	10202.5±338.4	9943.1±1170.0	11831.7±963.2	12920.9±1257.9
Kidneys	2623.6±147.5	2444.1±187.2	2449.7±168.9	2473.4±191.5	2749.4±274.7	2839.4±196.4
Spleen	723.7±71.2	669.1±111.1	670.0±127.6	653.0±127.0	755.6±68.0	881.0±111.5
Adrenal glands	58.9±12.9	45.6±5.2	49.6±3.4	55.2±7.0	55.7±3.9	54.9±5.8
Testes	3159.3±294.7	2942.5±122.6	3030.4±128.5	2949.1±158.0	3223.9±395.3	3300.5±266.6
Epididymides	722.8±29.5	695.3±11.4	707.6±51.1	696.0±50.0	953.6±168.5	1067.5±58.9
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	5.450±0.360	5.895±0.414	5.765±0.266	5.892±0.200	4.818±0.117	4.705±0.380
Thymus	1.778±0.205	1.786±0.345	1.912±0.439	1.658±0.262	1.331±0.326	1.247±0.144
Heart	3.618±0.257	3.336±0.188	3.223±0.255*	3.207±0.195*	2.998±0.106	2.959±0.219
Liver	30.227±1.290	30.411±0.703	30.572±1.119	30.461±2.355	28.824±1.977	30.421±1.413
Kidneys	7.538±0.568	7.514±0.635	7.337±0.456	7.594±0.430	6.705±0.707	6.693±0.096
Spleen	2.082±0.248	2.047±0.284	2.008±0.393	2.000±0.331	1.846±0.213	2.076±0.209
Adrenal glands	0.170±0.041	0.140±0.014	0.149±0.011	0.169±0.015	0.136±0.009	0.129±0.013
Testes	9.083±0.999	9.074±0.917	9.086±0.527	9.058±0.319	7.844±0.797	7.814±0.878
Epididymides	2.079±0.163	2.140±0.145	2.120±0.140	2.140±0.161	2.317±0.361	2.519±0.091
<b>Female</b>						
Number of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	214.7±10.8	213.6±25.4	213.2±21.0	211.0±18.8	251.7±14.5	226.2±26.3
Absolute organ weights (mg)						
Brain	1805.3±70.2	1727.2±69.2	1755.5±65.6	1742.6±92.8	1855.1±98.4	1839.6±108.9
Thymus	499.0±71.5	503.9±108.3	442.2±92.1	446.8±62.9	392.9±55.3	388.9±88.2
Heart	771.3±59.3	748.4±106.6	724.3±54.3	763.0±100.9	815.5±48.7	799.1±97.5
Liver	6499.5±275.6	6351.2±1132.3	6120.9±881.6	6595.1±803.4	7001.4±563.2	6677.6±1024.8
Kidneys	1713.7±80.4	1649.4±222.2	1550.7±72.2	1602.6±135.1	1752.9±88.7	1657.1±292.5
Spleen	521.8±13.2	610.0±212.5	502.5±95.5	452.4±88.2	506.9±66.7	503.3±139.3
Adrenal glands	61.5±8.7	57.3±12.2	55.0±6.1	60.1±4.3	58.8±8.7	62.7±7.8
Ovaries	87.9±12.3	84.4±17.1	77.1±10.3	85.9±11.4	83.4±17.7	79.8±18.6
Relative organ weights (mg/g)						
Brain	8.416±0.286	8.168±0.915	8.302±0.906	8.299±0.699	7.388±0.554	8.201±0.896
Thymus	2.322±0.290	2.340±0.282	2.097±0.518	2.116±0.222	1.571±0.296	1.704±0.266
Heart	3.594±0.235	3.498±0.154	3.409±0.221	3.616±0.324	3.249±0.285	3.535±0.215
Liver	30.291±0.701	29.593±2.103	28.670±2.220	31.204±1.553	27.812±1.488	29.448±1.890
Kidneys	7.988±0.283	7.714±0.323	7.318±0.643	7.601±0.220	6.994±0.726	7.304±0.695
Spleen	2.438±0.175	2.799±0.710	2.344±0.240	2.133±0.264	2.030±0.386	2.195±0.375
Adrenal glands	0.285±0.028	0.267±0.036	0.258±0.019	0.285±0.014	0.234±0.039	0.277±0.016
Ovaries	0.408±0.043	0.392±0.037	0.364±0.055	0.407±0.042	0.330±0.058	0.352±0.062

Values represent mean ± S.D.

\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.05$ \*\*: Significant difference from 0 mg/kg,  $p < 0.01$

Table 5 Histopathological findings of rats treated orally with tetramethylammonium hydroxide in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Male						Female						
	End of administration period				End of recovery period		End of administration period				End of recovery period		
	0	5	10	20	0	20	0	5	10	20	0	20	
Dose (mg/kg)													
Number of animals examined (Kidney)	5	5	5	5	5	5	5	0	0	5	0	0	
Eosinophilic body, proximal tubule	±	0	0	0	0	0	2			0		0	
	+	0	0	0	2	2	1			0		0	
	Total	0	0	0	2	2	3			0		0	
Basophilic tubule	±	4	3	4	3	4	5			3		2	
	+	0	0	1	0	0	0			0		0	
	Total	4	3	5	3	4	5			3		2	
Cellular infiltration, lymphocyte	±	5	3	5	4	5	5			2		2	
	Total	5	3	5	4	5	5			2		2	
Cyst, cortex	±	0	0	0	0	0	0			0		0	
	+	0	0	0	0	0	0			1		0	
	Total	0	0	0	0	0	0			1		0	
Cast, proteinous	±	2	0	1	0	0	0			0		0	
	+	0	0	0	1	0	0			0		0	
	Total	2	0	1	1	0	0			0		0	
Number of animals examined (Spleen)	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	
Deposit, pigment, brown	±	0		0			0			0		0	
	+	5		5			5			5		5	
	Total	5		5			5			5		5	
Hematopoiesis, extramedullary	±	3		4			5			3		3	
	+	2		0			0			1		1	
	++	0		1			0			0		0	
	Total	5		5			5			4		4	
(Heart)													
Myocardial degeneration/fibrosis	±	1		0			0			0		0	
	+	0		1			0			0		0	
	Total	1		1			0			0		0	
Number of animals examined (Testis)	5	0	0	5	1	0							
Atrophy, seminiferous tubule, unilateral	±	0		0		0							
	+	0		0		0							
	++	0		0		0							
	+++	0		0		1							
	Total	0		0		1							
(Epididymis)													
Decrease, sperm, unilateral	±	0		0		0							
	+	0		0		0							
	++	0		0		0							
	+++	0		0		1							
	Total	0		0		1							
Number of animals examined (Eye)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hemorrhage, vitreous cavity	±		0										
	+		1										
	Total		1										

Grade of histopathological finding; ±:very slight, +:slight, ++:moderate, +++:severe, total:total of positive grade