

# メタクリルアミドの細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of Methacrylamide on Bacteria

### 要約

メタクリルアミドについて、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, TA1535, TA98, TA1537<sup>1)</sup>および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup>の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験はS9 mix無添加および添加試験のいずれも313~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。

その結果、2回の本試験とも用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、メタクリルアミドは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

### 方法

#### 1. 検定菌

*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

*S. typhimurium*の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与された。

*E. coli* WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与された。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したのを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)およびアンピシリン耐性因子pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

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

分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

#### 2. 被験物質

メタクリルアミドは、白色結晶である。用いた被験物質は、ロット番号710130、純度99.5%以上(不純物:メタアクリル酸)であり、三井化学(株)(千葉)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保管した。

本被験物質は試験期間中安定であったことが確認された。

メタクリルアミドは、局方注射用水(ロット番号:K6I94, (株)大塚製薬工場)に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

#### 3. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

SA: アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA: 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)

2AA: 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを-20℃で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

#### 4. 培地およびS9 mixの組成

##### 1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混合した。

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

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

##### 2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地1 Lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
大洋寒天(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

## 3) S9 mix

1 mL 中下記の成分を含む。

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

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

## 5. 試験方法

プレインキュベーション法<sup>3)</sup>により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 mL)、検定菌液0.1 mLを混合し、37°Cで20分間プレインキュベーションしたのち、約45°Cに保温したトッパアガー2 mLを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。同時に実施した試験については、溶媒および陽性対照群を共通とした。培養は37°Cで48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を目視またはコロニーアナライザーを用いて算定した。抗菌性の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、溶媒および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。

## 6. 判定基準

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定することとした。

## 結果および考察

50.0~5000  $\mu$ g/plateの範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した。その結果、すべての検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix無

添加試験および添加試験とも5000  $\mu$ g/plateとした。

313~5000  $\mu$ g/plateの範囲で公比を2として2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、すべての検定菌において、2回の試験とも溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、陰性であった。

以上の結果に基づき、メタクリルアミドは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

なお、本被験物質はチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験でも陰性であった<sup>4)</sup>。本被験物質の類縁化合物については、簡単な情報検索を行ったが、変異原性に関する情報は得られなかった。

## 文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F. J. de Serres, J. Ashby, Elsevier, North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 62.

## 連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
 試験担当者：原 巧, 川上久美子  
 (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: Tohru Shibuya (Study Director)  
 Takumi Hara, Kumiko Kawakami,  
 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 Mutagenicity of methacrylamide on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)										
		Base-pair substitution type						Frameshift type				
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98	
S9 mix (-)	0	153 149 152 ( 151 $\pm$ 2.1)	21 10 12 ( 14 $\pm$ 5.9)	32 30 23 ( 28 $\pm$ 4.7)	18 20 20 ( 19 $\pm$ 1.2)	10 5 8 ( 8 $\pm$ 2.5)						
	313	159 162 151 ( 157 $\pm$ 5.7)	15 13 10 ( 13 $\pm$ 2.5)	18 29 32 ( 26 $\pm$ 7.4)	23 21 24 ( 23 $\pm$ 1.5)	14 6 5 ( 8 $\pm$ 4.9)						
	625	149 128 146 ( 141 $\pm$ 11.4)	14 18 8 ( 13 $\pm$ 5.0)	23 26 26 ( 25 $\pm$ 1.7)	17 25 23 ( 22 $\pm$ 4.2)	3 9 5 ( 6 $\pm$ 3.1)						
	1250	138 133 141 ( 137 $\pm$ 4.0)	12 10 14 ( 12 $\pm$ 2.0)	27 27 32 ( 29 $\pm$ 2.9)	23 26 17 ( 22 $\pm$ 4.6)	9 5 10 ( 8 $\pm$ 2.6)						
	2500	141 134 165 ( 147 $\pm$ 16.3)	12 12 16 ( 13 $\pm$ 2.3)	24 27 17 ( 23 $\pm$ 5.1)	20 22 20 ( 21 $\pm$ 1.2)	11 8 3 ( 7 $\pm$ 4.0)						
	5000	138 152 162 ( 151 $\pm$ 12.1)	13 17 12 ( 14 $\pm$ 2.6)	26 30 25 ( 27 $\pm$ 2.6)	21 14 32 ( 22 $\pm$ 9.1)	9 7 5 ( 7 $\pm$ 2.0)						
S9 mix (+)	0	146 139 125 ( 137 $\pm$ 10.7)	13 8 7 ( 9 $\pm$ 3.2)	26 23 30 ( 26 $\pm$ 3.5)	37 26 24 ( 29 $\pm$ 7.0)	9 11 10 ( 10 $\pm$ 1.0)						
	313	182 177 166 ( 175 $\pm$ 8.2)	5 12 7 ( 8 $\pm$ 3.6)	24 26 36 ( 29 $\pm$ 6.4)	27 33 35 ( 32 $\pm$ 4.2)	10 7 8 ( 8 $\pm$ 1.5)						
	625	152 194 179 ( 175 $\pm$ 21.3)	14 9 6 ( 10 $\pm$ 4.0)	46 29 22 ( 32 $\pm$ 12.3)	25 34 23 ( 27 $\pm$ 5.9)	16 15 11 ( 14 $\pm$ 2.6)						
	1250	174 169 167 ( 170 $\pm$ 3.6)	12 14 13 ( 13 $\pm$ 1.0)	27 45 43 ( 38 $\pm$ 9.9)	27 22 28 ( 26 $\pm$ 3.2)	11 12 9 ( 11 $\pm$ 1.5)						
	2500	164 184 164 ( 171 $\pm$ 11.5)	13 8 16 ( 12 $\pm$ 4.0)	25 28 33 ( 29 $\pm$ 4.0)	30 27 21 ( 26 $\pm$ 4.6)	6 7 8 ( 7 $\pm$ 1.0)						
	5000	168 147 165 ( 160 $\pm$ 11.4)	15 17 14 ( 15 $\pm$ 1.5)	39 43 42 ( 41 $\pm$ 2.1)	40 42 41 ( 41 $\pm$ 1.0)	5 7 5 ( 6 $\pm$ 1.2)						
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA						
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80						
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA						
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2						
Positive control S9 mix (+)	Number of colonies/plate	507 506 477 ( 497 $\pm$ 17.0)	573 557 587 ( 572 $\pm$ 15.0)	196 190 201 ( 196 $\pm$ 5.5)	506 545 521 ( 524 $\pm$ 19.7)	423 361 312 ( 365 $\pm$ 55.6)						
	Number of colonies/plate	1025 1018 998 (1014 $\pm$ 14.0)	377 384 371 ( 377 $\pm$ 6.5)	824 846 836 ( 835 $\pm$ 11.0)	449 479 437 ( 455 $\pm$ 21.6)	379 356 358 ( 364 $\pm$ 12.7)						

Purity was above 99.5 %, and methacrylic acid was contained as impurity.

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

Table 2 Mutagenicity of methacrylamide on bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate, mean $\pm$ S.D.)												
		Base-pair substitution type						Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537
S9 mix (-)	0	166 169 146 (160 $\pm$ 12.5)	9 11 8 (9 $\pm$ 1.5)	21 19 28 (23 $\pm$ 4.7)	21 24 25 (23 $\pm$ 2.1)	8 17 12 (12 $\pm$ 4.5)								
	313	148 143 147 (146 $\pm$ 2.6)	16 13 6 (12 $\pm$ 5.1)	22 21 14 (19 $\pm$ 4.4)	14 21 32 (22 $\pm$ 9.1)	3 5 6 (5 $\pm$ 1.5)								
	625	150 138 142 (143 $\pm$ 6.1)	16 11 10 (12 $\pm$ 3.2)	28 24 25 (26 $\pm$ 2.1)	24 15 17 (19 $\pm$ 4.7)	8 10 5 (8 $\pm$ 2.5)								
	1250	122 147 143 (137 $\pm$ 13.4)	14 8 12 (11 $\pm$ 3.1)	26 20 21 (22 $\pm$ 3.2)	21 24 23 (23 $\pm$ 1.5)	10 8 7 (8 $\pm$ 1.5)								
	2500	154 128 136 (139 $\pm$ 13.3)	13 14 14 (14 $\pm$ 0.6)	26 13 16 (18 $\pm$ 6.8)	16 23 16 (18 $\pm$ 4.0)	9 7 9 (8 $\pm$ 1.2)								
	5000	144 161 149 (151 $\pm$ 8.7)	14 17 12 (14 $\pm$ 2.5)	20 14 20 (18 $\pm$ 3.5)	22 27 8 (19 $\pm$ 9.8)	8 12 10 (10 $\pm$ 2.0)								
S9 mix (+)	0	155 198 195 (183 $\pm$ 24.0)	12 18 15 (15 $\pm$ 3.0)	25 30 23 (26 $\pm$ 3.6)	25 29 42 (32 $\pm$ 8.9)	15 21 14 (17 $\pm$ 3.8)								
	313	180 191 171 (181 $\pm$ 10.0)	13 8 13 (11 $\pm$ 2.9)	30 22 21 (24 $\pm$ 4.9)	33 39 30 (34 $\pm$ 4.6)	12 10 12 (11 $\pm$ 1.2)								
	625	192 159 172 (174 $\pm$ 16.6)	15 25 8 (16 $\pm$ 8.5)	31 25 14 (23 $\pm$ 8.6)	21 24 47 (31 $\pm$ 14.2)	20 14 10 (15 $\pm$ 5.0)								
	1250	171 168 190 (176 $\pm$ 11.9)	15 14 13 (14 $\pm$ 1.0)	29 30 31 (30 $\pm$ 1.0)	27 27 29 (28 $\pm$ 1.2)	15 21 14 (17 $\pm$ 3.8)								
	2500	182 193 170 (182 $\pm$ 11.5)	14 17 23 (18 $\pm$ 4.6)	24 37 38 (33 $\pm$ 7.8)	39 20 39 (33 $\pm$ 11.0)	17 15 15 (16 $\pm$ 1.2)								
	5000	201 189 185 (192 $\pm$ 8.3)	12 20 18 (17 $\pm$ 4.2)	29 32 36 (32 $\pm$ 3.5)	40 34 35 (36 $\pm$ 3.2)	11 11 11 (11 $\pm$ 0.0)								
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA								
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80								
	Number of colonies/plate	538 507 545 (530 $\pm$ 20.2)	569 587 546 (567 $\pm$ 20.6)	200 188 195 (194 $\pm$ 6.0)	604 556 570 (577 $\pm$ 24.7)	316 303 325 (315 $\pm$ 11.1)								
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA								
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2								
	Number of colonies/plate	1072 1021 1073 (1055 $\pm$ 29.7)	450 430 475 (452 $\pm$ 22.5)	715 781 737 (744 $\pm$ 33.6)	540 504 488 (511 $\pm$ 26.6)	350 367 406 (374 $\pm$ 28.7)								

Purity was above 99.5 %, and methacrylic acid was contained as impurity.

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

*In Vitro* Chromosomal Aberration Test of Methacrylamide  
on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

メタクリルアミドの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。

連続処理(24時間)、短時間処理(6時間)ともに0.90 mg/mL(10 mM)の濃度においても50%を越える細胞増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において0.90 mg/mLを最高処理濃度とし、公比2で3濃度を設定した。連続処理では、24時間および48時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix非存在下および存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。S9 mix非存在下では、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下では、中濃度群(0.45 mg/mL)において、倍数性細胞の出現頻度は1.00%で有意差が認められたが、その頻度が低いことと傾向性検定( $p < 0.01$ )において有意差が認められなかったことから、陰性と判定した。

以上の結果より、メタクリルアミドは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在21代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、仔牛血清(CS:Cansera International)を10 vol%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

$2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュー

ベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. S9

S9(キッコーマン(株))は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

メタクリルアミド(ロット番号:710130, 三井化学(株), 千葉)は、白色結晶で、水、DMSOおよびアセトンに対して50 mg/mL以上で溶解し、水溶性であり、融点112-114°C、沸点215°Cで、純度99.5%以上(不純物としてメタアクリル酸および水分を含む)の物質であった。被験物質原体は、過酸化剤、酸化剤、酸、還元剤との接触により重合する。

6. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用蒸留水(ロット番号:K7G78, (株)大塚製薬工場)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10 vol%になるように加えた。

7. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を越える細胞増殖抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理ともに0.90 mg/mL(10 mM)とし、連続処理、S9 mixの非存在

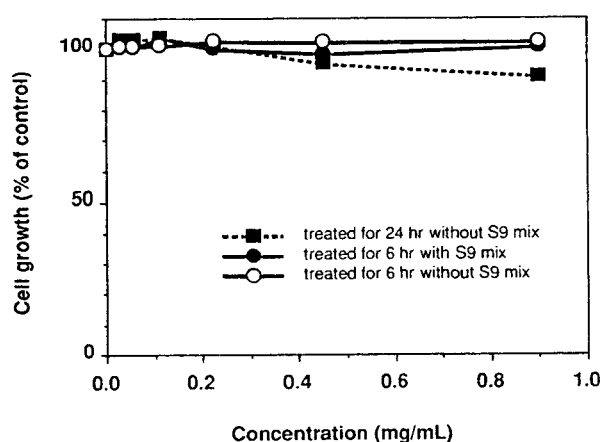


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with methacrylamide

下および存在下での短時間処理では公比2で3濃度を設定した。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC (MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド (CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用蒸留水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

### 9. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3 vol%ギムザ溶液で染色した。

### 10. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会(MMS)<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

### 11. 記録と判定

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

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法<sup>2)</sup>により、有意差検定を実施した

( $p < 0.01$ )。また、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定<sup>3)</sup>( $p < 0.01$ )を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

### 結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。メタクリルアミドを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。メタクリルアミドを加えてS9 mix非存在下および存在下で短時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常誘発作用は認められなかった。また、S9 mix非存在下では、いずれの処理群においても、倍数性細胞の有意な増加は認められなかったが、S9 mix存在下では中濃度(0.45 mg/mL)においてのみ、有意な増加( $p < 0.01$ )が認められたものの、出現頻度は1.00%と低く、濃度依存性もないことから生物学的には陰性と判定した。

従って、メタクリルアミドは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

また、本物質は細菌を用いる復帰突然変異試験において、変異原活性は認められなかった<sup>4)</sup>。

### 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 16-37.
- 2) 吉村 功編, “毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ,” サイエントリスト社, 東京, 1987, pp. 76-78.
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編, “毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析,” 地人書館, 東京, 1992, pp. 218-223.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, “化学物質毒性試験報告,” Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 58.

連絡先

試験責任者：田中憲穂

試験担当者：日下部博一，佐々木澄志，  
高橋俊孝，橋本恵子

(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: Noriho Tanaka (Study director)

Hirokazu Kusakabe, Kiyoshi Sasaki,

Toshitaka Takahashi, Keiko Hashimoto

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety  
Center

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

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

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with methacrylamide (MA)\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		Concurrent cytotoxicity <sup>6)</sup> (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Non-treatment			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.00			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.00			100.0
MA	0.23	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.13			94.5
MA	0.45	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.38	-	-	87.5
MA	0.90	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.0)	0.00			87.0
MC	0.00005	24	200	5	41	89	0	1	10	146	0	97*(48.5)	94*(47.0)	0.00			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.13			100.0
MA	0.23	48	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.00			93.5
MA	0.45	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.00	-	-	87.5
MA	0.90	48	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	1 ( 0.5)	0.00			74.0
MC	0.00005	48	200	3	52	222	8	4	30	319	5	142*(71.0)	140*(70.0)	0.38			-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, ctb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C.

1) Distilled water was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran-Armitage's trend test was done at  $p < 0.01$ . 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. \*: Significantly different from solvent control at  $p < 0.01$  by Fisher's exact probability test. \*\*: Purity was more than 99.5 %

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with methacrylamide (MA)\*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		Concurrent cytotoxicity <sup>6)</sup> (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Non-treatment				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0.00			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.00			100.0
MA	0.23	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	0.00			96.5
MA	0.45	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.25	-	-	96.5
MA	0.90	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.00			90.5
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	0.13			-
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.00			100.0
MA	0.23	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0.13			96.5
MA	0.45	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1.00	-	-	89.5
MA	0.90	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0.00			90.0
CPA	0.005	+	6-(18)	200	3	8	40	1	0	0	52	0	44*(22.0)	41*(20.5)	0.00			-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, ctb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C.

1) Distilled water was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran-Armitage's trend test was done at  $p < 0.01$ . 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. \*: Significantly different from solvent control at  $p < 0.01$  by Fisher's exact probability test. \*\*: Purity was more than 99.5 %



# メタクリルアミ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 Methacrylamide in Rats

### 要約

繊維加工剤、接着剤、紙加工剤、凝集剤等の幅広い用途で使用されているメタクリルアミドの0(精製水)、30、100および300 mg/kg/dayを1群雌雄各7あるいは14匹のCrlj:CD(SD)IGSラットに28日間反復経口投与して毒性を検討し、さらに0および300 mg/kg群の雌雄各7匹を用いて14日間の回復性も併せて検討した。その結果、以下の成績を得た。

一般状態では、雌雄の300 mg/kg群でよろめき歩行ならびに後肢の反転を伴う例が認められ、この症状は回復期間の14日間を通して認められた。行動機能観察では300 mg/kg群に投与21あるいは28日に雌雄で筋緊張の低下、歩行失調、雄で前肢の握力の低下がみられ、100および300 mg/kg群の雌雄ならびに30 mg/kg群の雌で自発運動量の低下が認められた。回復期間にも、300 mg/kg群の雌雄で筋緊張の低下、歩行失調、後肢の握力および自発運動量の低下がみられ、雄では後肢の着地開脚幅の低下も認められた。この変化は、投与期間および回復終了時の病理組織学検査において、300 mg/kg群の雌雄の全例で坐骨神経に神経線維の変性、また小脳に小脳脚における軸索膨化(1~2例)がみられたことから、メタクリルアミドによる神経毒性に起因するものであった。この神経毒性に関連して、投与終了時の剖検時に300 mg/kg群の雌雄の1~3例に膀胱の内腔拡張も認められた。

一方、回復終了時の病理組織学検査で1例のみの変化ではあるが、雄の300 mg/kg群にステージIX、Xにおけるステップ19精子細胞のretentionがみられ、軽度な精巢毒性も認められた。この変化との関連は明らかでなかったが、回復終了時に300 mg/kg群の雄の精巢の器官重量および器官体重量比の増加も認められた。

その他にも、体重では、300 mg/kg群の雌雄で投与2日から体重増加抑制が認められ、投与7日以降にも低く推移し、この体重増加抑制は回復期間中にも認められた。また、投与28日には100 mg/kg群の雌でも認められた。摂餌量では、300 mg/kg群の雌雄で摂餌量の低下が投与2日以降に散見されたが、この摂餌量の低下は回復期間の後半には回復した。また投与4週に300 mg/kg群の雌雄で飲水量の低下がみられ、雌では回復2週にも認められた。血液学検査では、300 mg/kg群の雌雄および100 mg/kg群の雄で貧血傾向が認められたが、回復終了時には雄で血小板数の増加が、雌で血小板数の増加およびプロトンビン時間の延長が認められたのみであった。

血液生化学検査では、300 mg/kg群の雌雄でアルブミンの増加、 $\alpha_1$ -グロブリンおよびアルカリホスファターゼの低下がみられ、雄で $\alpha_2$ -グロブリンの低下、雌でトリグリセリドの増加、尿素窒素およびクレアチニンの低下が認められた。回復終了時では、300 mg/kg群の雄でA/G比、アルブミン、カリウムおよび無機リンの増加、総蛋白、グルコースおよびトリグリセリドの低下、雌でアルカリホスファターゼ、カリウム、クロールおよび無機リンの増加、総蛋白およびグルコースの低下が認められた。これらの変化はメタクリルアミドの直接の毒性あるいはメタクリルアミドによる神経毒性に関連した変化と考えられた。

以上のことから、本試験条件下での無影響量(NOEL)は雄で30 mg/kg/day、雌で30 mg/kg/day未満と考えられた。

### 方法

#### 1. 被験物質および投与液の調製

メタクリルアミド(純度:99.5%, Lot No. 710130, 三井化学(株), 東京)は、白色の結晶で、融点が112~114°Cで、30°Cで水100 gに40.9 g溶解する。入手後の被験物質は遮光気密容器に入れ、室温で保存し、残余被験物質を製造業者が分析し、投与期間中の被験物質の安定性を確認した。溶媒は日本薬局方精製水(ヤクハン製薬(株))を用い、これに被験物質を所定の濃度となるように溶解させた。調製液は、冷蔵庫内遮光下で7日間安定であることから、調製後直ちに遮光できる褐色瓶に入れて冷蔵庫内(3~7°C)に保存し、調製後7日以内に使用した。また、これらの調製液について濃度を確認し、設定値の±5%以内であることを確認した。

#### 2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた4週齢のSprague-Dawley系ラット(Crlj:CD(SD)IGS)の雌雄を8日間の検疫・馴化を行った後、雌雄各42匹を選択して5週齢で試験に供した。投与日の体重範囲は雄が152~183 g、雌が128~154 gであった。動物は、温度22~24°C、湿度50~63%、換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(午前8時から午後8時まで点灯)に制御されたバリアシステムの飼育室で、ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は5匹以内、群分け後は個別で飼育した。飼料は、 $\gamma$ 線照射固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて、飲料水は札

幌市水道水を自動給水装置を用いてそれぞれ自由に摂取させた。

### 3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では雌雄のラットに150, 300および600 mg/kgの3用量を1群5匹に14日間投与し, 600 mg/kgで雄に3例, 雌に1例の死亡あるいは切迫屠殺例が認められ, 300 mg/kg以上の投与群で一般状態, 体重, 摂餌量, 血液および血液生化学検査, 剖検, 器官重量等に雌雄いずれもメタクリルアミドの毒性が認められた。150 mg/kg群でも雌雄に体重増加抑制傾向, 雄に尿素窒素の低下および脳重量の低下, 雌に無機リンの増加が認められた。これらのことから, 300 mg/kgを本試験の高用量に設定し, 150 mg/kgでも弱い毒性がみられていることから, 公比約3で除し, 100および30 mg/kgとし, これに日本薬局方精製水を投与する対照群を含めた計4群を設定した。1群の動物数は雌雄とも7匹とし, 投与前々日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行った。

動物は, 投与日に一番近い測定日の体重に基づいて5 mL/kgの容量でラット用胃ゾンデを用いて1日1回, 28日間の計28回, 強制的に胃内に投与した。

### 4. 検査項目

#### 1) 一般状態観察

投与期間および回復期間中, 全例について1日1回以上の頻度で観察した。

#### 2) 行動機能観察(FOB)

投与開始前, 投与7, 14, 21および28日ならびに回復7および14日に雌雄の各群7例のうち4例を用いて, ケージ外から動物のケージ内状態を姿勢, 眼瞼閉鎖, 呼吸, 振戦・痙攣, 常同行動(回転, 旋回)および異常行動(自傷)について, ケージから取り出す時に取り出し易さ, 扱い易さ, 筋緊張, 立毛, 被毛の状態, 皮膚, 眼球, 瞳孔径, 可視粘膜, 流涙, 流涎および体温について, またオープンフィールド装置内で痙攣, 歩行, 覚醒状態, 排尿, 排便, 呼吸, 常同行動(毛繕いおよび匂嗅ぎ)および異常行動(後方突進および発声)について, 検査台上で視覚(棒を接近させた時の反応), 触覚(筆を接触させた時の反応), 聴覚(ガルトン笛に対する反応), 痛覚(尾根部を挟んだ時の反応), 固有受容反応(強制姿勢からの復帰反応)および空中正向反射(30 cm上方から落下させた時の反応)について, それぞれのスコアリング表に従って観察し, スコア付けた。また, 投与4週および回復2週に前肢および後肢の握力(CPUゲージ, アイコーエンジニアリング(株)), 後肢の着地開脚幅, 10分毎60分間の自発運動量(Actomonitor II, メディカル・エイジェント社)を測定した。

#### 3) 体重および摂餌量測定

体重は全例について, 投与1日(投与前), 投与2, 7, 14, 21および28日(投与終了日), 回復1, 7および14日

ならびに剖検日に測定し, 投与1日から28日の体重増加量および体重増加率を算出した。また, 摂餌量は剖検日を除いて体重と同じ日に測定した。

#### 4) 尿検査

投与期間および回復期間の最終週に全例を代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行い, 同時に採尿中の飲水量(重量)も測定した。約3時間の蓄尿についてpH, 蛋白, 糖, ケトン体, ウロビリノーゲン, ビリルビン, 潜血反応(以上, マルティスティックス, バイエル・三共)および色調(肉眼観察)ならびに沈渣(鏡検)を検査し, 21時間蓄尿について尿量(容量)および比重(屈折計, アタゴ)を測定した。

#### 5) 血液学検査

全例について16~21時間絶食させた後, 剖検時にエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し, EDTA・2Kで処理した血液を用いて赤血球数, 平均赤血球容積, 血小板数, 白血球数(以上, 電気抵抗法), ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法), (以上, コールターカウンターT660型, コールター), ヘマトクリット値(赤血球数, 平均赤血球容積より算出), 平均赤血球ヘモグロビン量(赤血球数, ヘモグロビン量より算出), 平均赤血球ヘモグロビン濃度(ヘマトクリット値, ヘモグロビン量より算出)および白血球型別百分率(May-Grünwald-Giemsa染色)を測定した。また, 3.8%クエン酸ナトリウムで処理した後, 3000 rpmで10分間遠心分離して得られた血漿を用いて, プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上, 血液凝固自動測定装置アメルングKC-10A, バクスター)を測定した。

#### 6) 血液生化学検査

血液学検査と同時に, 全例について腹部大動脈より採血し, ヘパリン処理した後, 3000 rpmで10分間の遠心分離で得られた血漿を用いてGOT(IFCC法), 乳酸脱水素酵素(Wróblewski & La Due法)およびグルコース(ヘキソキナーゼ法)を測定し, また, 無処理血液を3000 rpmで10分間の遠心分離で得られた血清を用いてGPT(IFCC法), アルカリホスファターゼ(Bessey-Lowry法),  $\gamma$ -GTP(包接L- $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法), 総コレステロール(酵素法), トリグリセリド(遊離グリセロール消去法), 総ビリルビン(アゾビリルビン法), 尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法), クレアチニン(Jaffé法), カルシウム(OCPC法), 無機リン(Fiske-SubbaRow法), 総蛋白(ビウレット法)(以上, 自動分析装置7150形, 日立製作所), ナトリウム, カリウム(以上, 炎光光度法, コーニング480型炎光光度計), クロール(電量滴定法, クロライドカウンターCL-6M, 平沼産業), 蛋白分画およびA/G比(以上, セルロースアセテート膜電気泳動法, 全自動電気泳動装置CTE-150, 常光)を測定した。

## 7) 剖検および器官重量測定

投与期間および回復期間終了の翌日に全例について、体外表を観察し、エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。また、脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、下垂体、胸腺、甲状腺(上皮小体含む)、精巣、精巣上体および卵巣の重量を測定するとともに、器官重量を剖検当日の体重で除し100を乗じて器官体重重量比を算出した。

## 8) 病理組織学検査

全例について肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳、下垂体、副腎、甲状腺、上皮小体、胸腺、腸間膜リンパ節、膵臓、舌、下顎リンパ節、顎下腺、舌下腺、耳下腺、乳腺、皮膚、胸骨および大腿骨(骨髄を含む)、脊髄(頸部)、骨格筋(腓腹筋)、胸部大動脈、喉頭、気管、気管支、食道、胃(前胃、腺胃、幽門部)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、膀胱、精囊(凝固腺を含む)、前立腺、卵巣、子宮、膣、および坐骨神経を10%中性緩衝ホルマリン液で、眼球およびハーダー腺をデビッドソン液で固定・保存し、精巣および精巣上体をブアン液で固定後70%エタノールで保存した。これらの器官・組織を常法に従ってパラフィン包埋後、薄切してヘマトキシリン・エオジン染色あるいは特殊染色(ボディアン染色、K・B染色、ニューロフィラメント免疫染色)標本を作製し、鏡検した。

## 5. 統計解析

前肢および後肢の握力、後肢の着地開脚幅、自発運動量、体重、摂餌量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および器官体重重量比の成績について、Bartlettの検定法によって等分散性を解析し、等分散を示した場合は、一元配置分散分析法によって解析し、有意な場合には、Dunnettの検定法により対照群と他群との比較を行った。不等分散を示した場合は、Kruskal-Wallis法で解析し、有意な場合には、Mann-WhitneyのU検定法を用いて対照群との比較を行った。行動機能観察のスコアおよび尿検査の定量的項目の成績については、Kruskal-Wallisの検定法で解析し、有意差がみられた場合はMann-WhitneyのU検定法を用いて対照群との比較を行った。なお、対照群との検定については、危険率5%以下を統計学的に有意とした。

## 結果

## 1. 一般状態

雌雄の300 mg/kg群で投与20あるいは21日からよろめき歩行がみられ、後肢の反転を伴う例も認められた。この症状は回復期間の14日間を通して認められた。

## 2. 行動機能観察(Table 1)

投与期間中は、300 mg/kg群で、投与21日に雌で歩行失調がみられ、そのスコアに対照群と比較して有意差が認められた。また投与28日には雌雄に筋緊張の低下お

よび歩行失調がみられ、そのスコアに有意差が認められた。投与4週に雄で前肢に有意な握力の低下がみられ、また自発運動量では、雄で測定開始後の10~20および20~30分ならびに60分間のカウント数、雌で0~10および10~20分のカウント数に有意な低下が認められた。また100 mg/kg群でも、雄で10~20分、雌で0~10分のカウント数に有意な低下が認められ、30 mg/kg群では、雌のみで0~10分のカウント数に有意な低下が認められた。

回復期間中は、300 mg/kg群で、雌雄とも回復7および14日に筋緊張の低下および歩行失調がみられ、そのスコアに有意差が認められた。また、回復2週に雌雄とも後肢に有意な握力の低下がみられ、また自発運動量では、雄で0~10、10~20、20~30および30~40分ならびに60分間のカウント数、雌で0~10および50~60分のカウント数ならびに60分間のカウント数に有意な低下が認められた。雄ではさらに後肢に有意な着地開脚幅の低下も認められた。

## 3. 体重(Fig. 1)

投与期間中は、雌雄の300 mg/kg群で有意な体重増加抑制が認められ、投与28日には雄の300 mg/kg群で体重減少が、雌の100 mg/kg群でも有意な体重増加抑制が認められた。

回復期間中も、雌雄の300 mg/kg群で体重が低く推移したが、体重増加量および体重増加率は対照群を上回り回復傾向が認められた。

## 4. 摂餌量(Fig. 2)

投与期間中は、雌雄の300 mg/kg群で投与2日以降に摂餌量の低下あるいは低下傾向が認められた。

回復期間中は、雌雄の300 mg/kg群で回復1あるいは7日まで有意な低下がみられたが、回復14日には有意差はみられなかった。

## 5. 尿検査および飲水量

尿検査では、投与4週に雌雄の各投与群に変化は認められなかった。回復2週には雌の300 mg/kg群で尿比重に対照群と比較して有意な低下が認められたが、正常範囲内の変動であった。

飲水量では、投与4週に雌雄の300 mg/kg群で対照群と比較して有意な低下あるいは低下傾向が認められ、回復2週にも雌で有意な低下が認められた。

## 6. 血液学検査(Table 2, 3)

投与終了時に、雌雄の300 mg/kg群でヘマトクリット値およびヘモグロビン量に対照群と比較して有意な低下あるいは低下傾向が認められ、雄の100 mg/kg群でも低下傾向が認められた。また、雄の100および300 mg/kg群では平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン量にも低下が認められた。一方、雄の30 mg/kg群には平均赤血球容積のみに低下が認められ、その他の項目には変化がみられなかった。

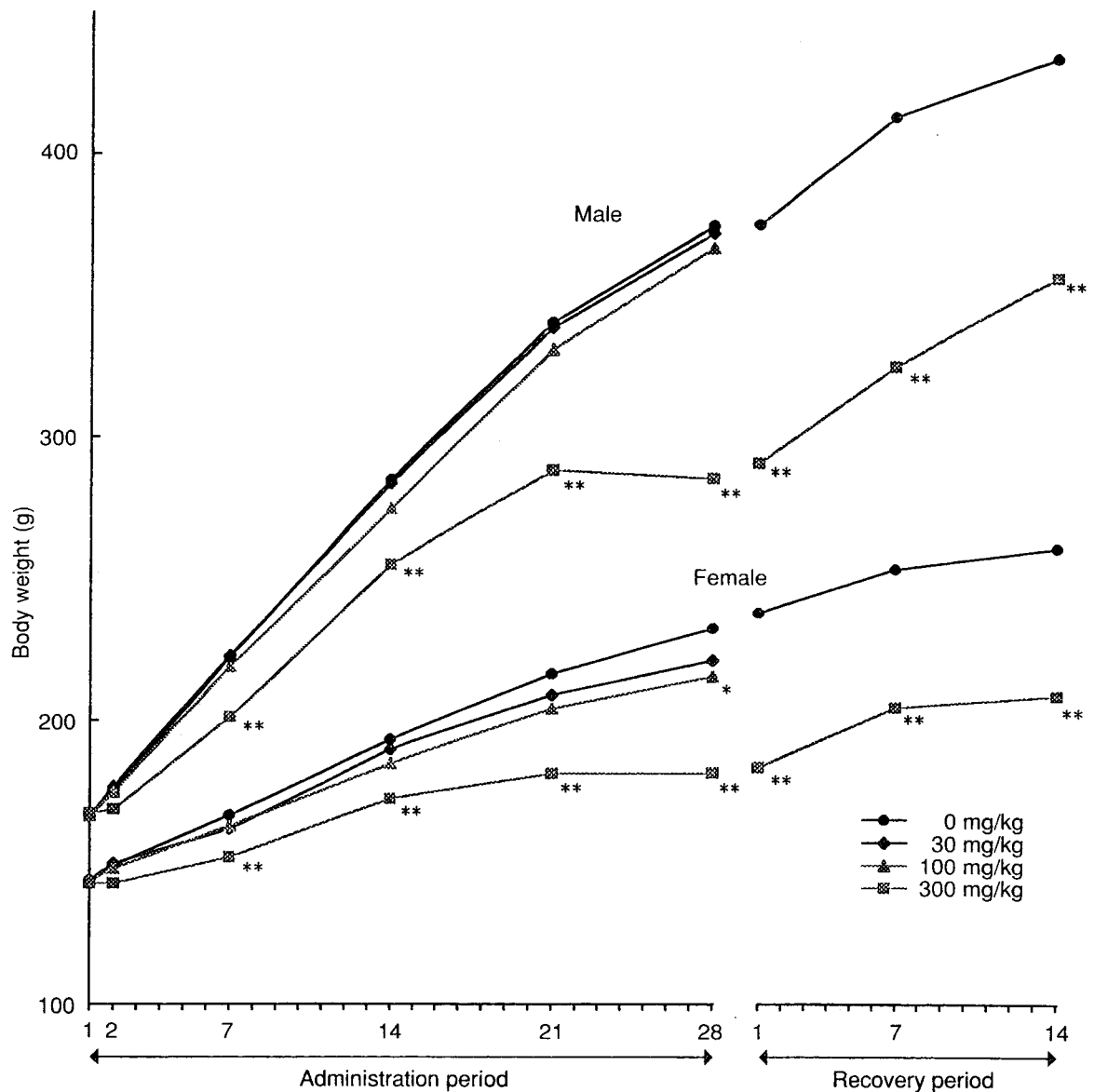


Fig. 1 Body weight change of rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test  
Significantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$

回復終了時に、雌雄の300 mg/kg群で血小板数に有意な増加がみられ、雌でプロトロンビン時間に有意な延長が認められた。また、雄で単球に有意な増加がみられたが、正常範囲内の数値であった。

#### 7. 血液生化学検査 (Table 4, 5)

投与終了時に、300 mg/kg群の雄でアルブミンに有意な増加、 $\alpha_2$ -グロブリンおよびアルカリホスファターゼに有意な低下がみられ、 $\alpha_1$ -グロブリンには低下傾向が認められた。また、雌ではトリグリセリドに有意な増加、尿素窒素およびクレアチニンに有意な低下がみられ、アルブミンの増加傾向、アルカリホスファターゼおよび $\alpha_1$ -グロブリンの低下傾向が認められた。100 mg/kg群では、雄に総蛋白の有意な低下が認められたが、用量依存性は認められなかった。

回復終了時に、300 mg/kg群の雄でA/G比、アルブミ

ン、カリウムおよび無機リンの有意な増加、総蛋白、グルコースおよびトリグリセリドの有意な低下が認められた。また、雌ではアルカリホスファターゼ、カリウム、クロールおよび無機リンの有意な増加、総蛋白およびグルコースの有意な低下が認められた。一方、雄でクレアチニンに有意な低下が認められたが、対照群の変動範囲内の値であった。

#### 8. 剖検

投与終了時に、300 mg/kg群の雄で3例に膀胱の内腔拡張が認められ、1例に肺の右前葉に暗赤色化、左肺に暗赤色斑が認められ、また雌では1例に膀胱の内腔拡張が認められた。なお、対照群の1例に左肺の暗赤色斑が認められた。

回復終了時に、300 mg/kg群の雄の1例で肺の右中間葉および左肺に白色斑が認められ、また雌の1例で右腎

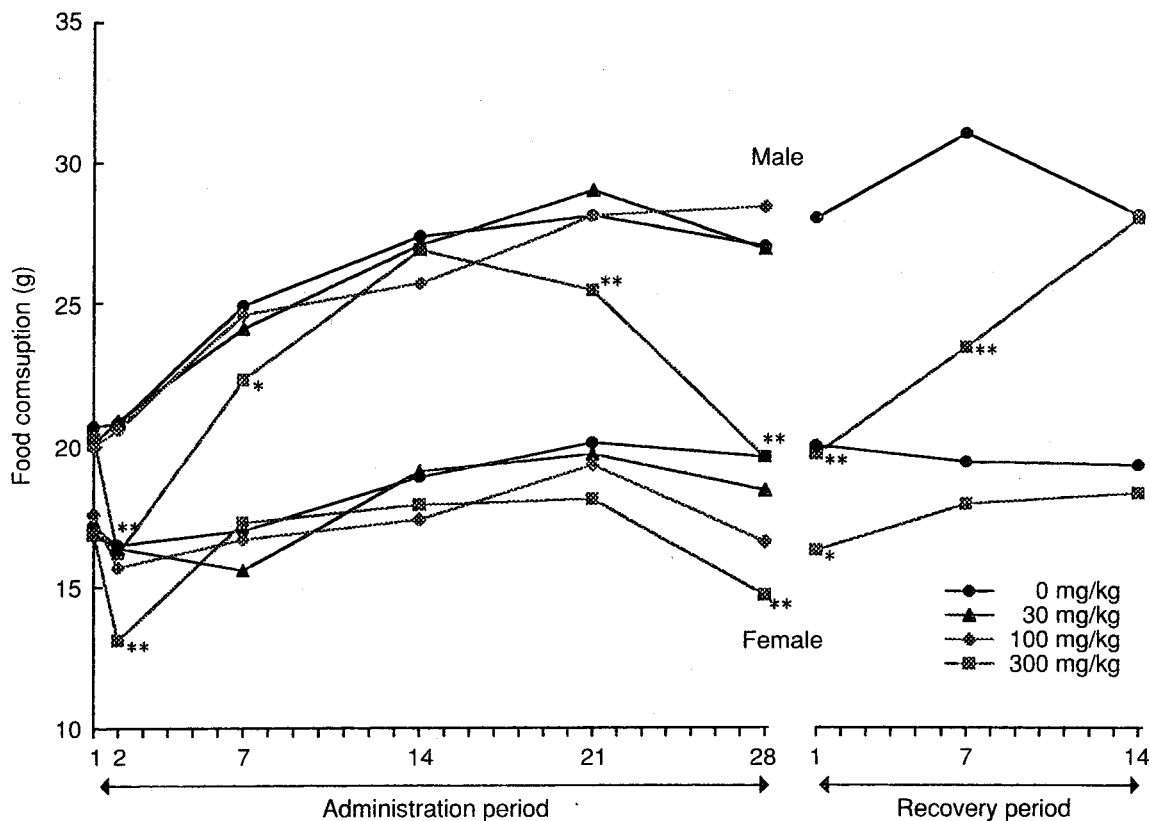


Fig. 2 Food consumption of rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test. Significantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$

臓に腎盂拡張および子宮に嚢胞が認められた。

9. 器官重量および器官体重量比 (Table 6, 7)

投与終了時および回復終了時のいずれにも、300 mg/kg 群の雌雄ともに脳、肺、心臓および肝臓等多くの器官の器官重量が低下し、また器官体重量比が増加した。しかし、回復終了時に雄の精巣は、器官重量および器官体重量比のいずれもが増加を示した。

10. 病理組織学検査 (Table 8, 9)

投与終了時に、300 mg/kg 群の雌雄ともに1~2例で小脳脚における軸索膨化が軽度認められ、また全例で坐骨神経に軽度な神経線維の変性が認められた。

回復終了時には、300 mg/kg 群の雌雄ともに3~5例で小脳脚における軸索膨化が軽度認められ、また全例で坐骨神経に軽度~中等度な神経線維の変性が認められた。さらに、雄の1例で精巣にステージIX, Xにおけるステップ19精子細胞の軽度なretentionが認められた。

対照群および300 mg/kg 群で投与終了時および回復終了時にみられたその他の変化にはメタクリルアミド投与との関連性は認められなかった。

考察

メタクリルアミドは、長期投与により神経毒性の発現が知られているアクリルアミドの類縁物質<sup>1)</sup>であり、メ

タクリルアミドの急性経口投与毒性試験<sup>2)</sup>において中枢神経の変性・壊死等が認められたことから、アクリルアミドと同様に神経毒性の発現が予測された。

一般状態では、300 mg/kg 群で投与3~4週から雌雄いずれにもよろめき歩行がみられ、後肢の反転を伴う例も認められ、これらの神経症状は回復期間中にも継続して観察された。よろめき歩行および後肢の反転はアクリルアミドにおいて報告されている後肢の麻痺<sup>3)</sup>と類似した症状と考えられ、メタクリルアミドではマウスに神経毒性が報告<sup>4)</sup>されていることから、これらの歩行異常はメタクリルアミドの末梢神経に対する毒性により、後肢が麻痺した結果と推察された。

行動機能観察では、投与期間中に300 mg/kg 群の雌雄で筋緊張の低下、歩行失調、握力の低下、雄で自発運動量の低下が認められた。この変化はいずれも末梢神経に対する神経毒性を示唆する前述の一般状態の変化とともに認められた。後肢の着地開脚幅の低下については回復期間に認められており、自発運動量の低下についても雌雄とも回復期間中の方がより高頻度に認められた。このことは末梢神経に対する神経毒性が、投与期間終了後にも進行したものと推察された。握力の低下については、アクリルアミドの30 mg/kg を5週間投与した試験<sup>4)</sup>でも報告されていることから、この変化はメタクリルアミドの影響と考えられた。後肢の握力の低下に関連する病変として病理組織学所見で坐骨神経に神経線維の変性が確認された。前肢の握力の低下については、病理組織学検

査で認められた小脳の小脳脚における軸索膨化との関連が考えられた。雌の30および300 mg/kg群、雌雄の100 mg/kg群では、自発運動量の測定開始後0～10あるいは10～20分に有意な低下が認められた。対照群の動物では測定開始後の自発運動量が時間の経過とともに減少していく傾向がみられており、これは周囲の状況に馴れるに従って運動量が低下していくものと推察された。したがって、60分間の自発運動量に変化がみられないこと、各投与群の自発運動量の低下がいずれも測定開始後の初期にみられたことから、対照群と比較して周囲の状況の変化に対して鈍感であった可能性、あるいは運動活性が低下していた可能性が考えられた。このことは、60分間の自発運動量に有意差がみられている300 mg/kg群でも、測定開始後の初期に対照群と比較して有意差がみられることが多いことから、測定開始後の初期に認められた自発運動量の低下は、メタクリルアミドの影響によるものと推察された。なお、雌雄の30および100 mg/kg群では、一般状態、病理組織学検査において変化はみられなかった。

剖検では、300 mg/kg群で雌雄とも1～3例と少数例ではあるが膀胱に内腔拡張が認められた。この変化は、600 mg/kgを10～13日間投与した予備試験における死亡例にも認められ、メタクリルアミドとの関連が示唆された。また、この変化は、前述の後肢の麻痺に関連して、末梢神経の障害に起因した排尿困難による可能性も考えられた。

病理組織学検査では、300 mg/kg群の雌雄の全例で、坐骨神経に軽度な神経線維の変性が認められ、メタクリルアミドの神経毒性と考えられた。この変化は回復終了時ではその程度を増強し、前述と同様に末梢神経に対する神経毒性が、回復期間にも進行した可能性が推察された。アクリルアミドの50 mg/kgの週3回投与を4週間行った試験では、投与終了後40日には後肢の麻痺が回復し、末梢神経線維の再生像も認められている<sup>3)</sup>ことから、本試験において認められた神経線維の変性は、14日間の回復期間では回復するまでには至らなかったものと考えられた。また、300 mg/kg群の雌雄の小脳に散見された小脳脚における軸索膨化については、アクリルアミドの50 mg/kgの10日間投与においても認められている<sup>5)</sup>。なお、30および100 mg/kg群では、これらの神経毒性を示唆する変化は認められなかった。

一方、300 mg/kg群の1例の精巣で回復終了時に認められたステージIX, Xにおけるステップ19精子細胞のretentionについては、セルトリ細胞の障害に起因するものと考えられている<sup>6)</sup>。メタクリルアミドの急性経口投与毒性試験<sup>2)</sup>においても精巣毒性が示唆され、精母細胞および精子細胞に変化が認められたが、本試験で認められた所見とは異なり、またセルトリ細胞に障害がみられないことから、神経毒性の発現により体重および摂餌量の低下が継続したことに起因して、前述の精子細胞のretentionが起きた可能性も考えられた。しかし、精子細胞のretentionについては、特定のステージにのみ認められていることから精巣毒性の可能性を否定すること

はできなかった。

体重では、300 mg/kg群で雌雄とも投与初期から体重増加抑制が認められ、投与7日以降、回復終了時まで体重が低く推移した。また100 mg/kg群の雌でも投与28日に有意な体重増加抑制が認められた。回復期間には体重増加が認められたが、対照群と同等までの回復には至らなかった。

摂餌量では、300 mg/kgで雌雄とも摂餌量の低下が、投与初期から回復期間の前半まで継続したが、回復期間終了の時点では対照群とほぼ同等まで回復した。

血液学検査では、雌雄の300 mg/kg群でヘマトクリット値およびヘモグロビン量の低下あるいは低下傾向が認められ、雄の100 mg/kg群でもヘマトクリット値およびヘモグロビン量に低下傾向が認められた。また、雄の100および300 mg/kg群では平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン量にも低下が認められた。この貧血傾向は、雌雄の300 mg/kg群において神経症状が継続して認められたこと、体重の低下が投与7日以降継続して認められ、投与28日には減少あるいは停滞したこと、ならびに摂餌量の低下が継続的に認められたことに関連した二次的な変化と考えられた。しかし、骨髄あるいは脾臓に毒性を示唆する変化は認められず、回復期間には、これら貧血傾向を示唆する変化は認められなかった。また、雌雄の300 mg/kg群に血小板数の増加、雌のプロトロンビン時間の延長が認められ、この変化も、神経症状ならびに体重と摂餌量の低下が継続した影響によるものと考えられた。

血液生化学検査では、投与終了時に雌雄の300 mg/kg群で $\alpha_1$ -グロブリンに低下傾向およびアルカリホスファターゼに低下あるいは低下傾向がみられ、雄では $\alpha_2$ -グロブリンに低下、雌ではトリグリセリドに増加もみられた。この変化も血液学検査の場合と同様に、神経症状ならびに体重および摂餌量の低下が継続したことに起因するものと推察された。雌雄の300 mg/kg群でアルブミンに増加あるいは増加傾向が認められ、回復終了時に雄ではA/G比に増加も認められた。雌の300 mg/kg群では、尿素窒素およびクレアチニンに低下が認められたが、腎臓に病理組織学的な異常は認められなかった。

回復期間に雌雄いずれも総蛋白、グルコースに低下およびカリウム、無機リン等の電解質に増加が認められたが、この変化は、神経症状ならびに体重と摂餌量の低下が継続した影響が回復していないことに起因するか、あるいは神経毒性が進行したことから神経組織からの逸脱に起因する等の可能性が考えられた。

器官重量および器官体重重量比では、回復終了時の300 mg/kg群で精巣の器官重量および器官体重重量比に増加が認められたが、精子細胞のretentionが認められたのは1例のみであり、その原因について病理組織学所見から明らかにすることは出来なかった。

以上、メタクリルアミドをラットに28日間反復経口投与した場合、雌雄いずれも300 mg/kg投与で神経症状および体重増加抑制が認められ、病理組織学的には神経毒性が認められた。14日間の回復終了後に、この神経

毒性には回復性が認められなかった。また、100 mg/kg 投与でも、雌雄いずれにも自発運動量の低下、さらに雄で貧血傾向および腎臓の器官体重重量比の増加が、雌で体重増加抑制が認められた。30 mg/kg 投与では、雌で自発運動量の低下が認められた。

これらのことから、本試験条件下での無毒性量 (NOEL) は雄で30 mg/kg/day、雌で30 mg/kg/day未満と考えられた。

#### 文献

- 1) K. Hashimoto, J. Sakamoto, and H. Tanii, *Arch. Toxicol.*, **47**, 179(1981).
- 2) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, “化学物質毒性試験報告,” Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 41.
- 3) B. Veronesi, K. Jones, S. Gupta, J. Pringle and C. Mezei, *Neurotoxicology*, **12**, 715(1991).
- 4) G. E. Schulze and B. G. Boysen, *Fund. Appl. Toxicol.*, **16**, 602(1991).
- 5) D. J. O'Shaughnessy and G. J. Losos, *Toxicol. Pathol.*, **14**, 389(1986).
- 6) D. M. Creasy, *Toxicol. Pathol.*, **25**, 119(1997).

#### 連絡先

試験責任者：須永昌男  
試験担当者：吉田文子, 皆川英俊, 平田真理子,  
古川正敏, 山本美代子  
(株)化合物安全性研究所  
〒004-0839 札幌市清田区真栄363番24  
Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

#### Correspondence

Authors: Masao Sunaga (Study director)  
Ayako Yoshida, Hidetoshi Minagawa,  
Mariko Hirata, Masatoshi Hurukawa,  
Miyoko Yamamoto  
Safety Research Institute for Chemical  
Compounds Co., Ltd.  
363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,  
004-0839, Japan  
Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

Table 1 Results of grip strength, foot splay, and locomotor activity counts in rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
Male						
Grip strength(g)						
Forelimb	867.5 ± 129.4	761.8 ± 150.7	912.5 ± 196.8	359.0 ± 86.8**	933.0 ± 88.5	777.5 ± 198.2
Hindlimb	369.5 ± 85.9	343.5 ± 111.3	394.3 ± 115.8	192.3 ± 61.4	271.8 ± 69.7	83.3 ± 54.8**
Splay(cm)						
Hindlimb	8.48 ± 1.33	8.15 ± 1.14	9.58 ± 1.52	8.73 ± 2.85	9.70 ± 1.65	5.73 ± 2.54*
Locomotor activity counts						
0'-10'	743.5 ± 143.9	611.3 ± 69.4	612.0 ± 129.1	421.0 ± 265.3	704.3 ± 28.9	240.3 ± 114.2**
10'-20'	519.8 ± 95.0	468.5 ± 26.8	345.3 ± 13.8*	188.8 ± 104.8*	432.5 ± 61.2	186.8 ± 66.5**
20'-30'	407.0 ± 74.1	364.0 ± 141.6	298.8 ± 114.1	123.0 ± 84.3**	290.8 ± 28.7	141.5 ± 27.1**
30'-40'	249.3 ± 43.3	196.3 ± 130.9	261.8 ± 106.2	70.0 ± 93.6	248.0 ± 113.0	57.3 ± 57.4*
40'-50'	254.0 ± 110.9	206.0 ± 151.2	203.3 ± 146.9	65.0 ± 90.0	37.0 ± 20.7	55.8 ± 54.7
50'-60'	224.0 ± 99.3	148.5 ± 121.7	168.3 ± 104.4	88.0 ± 68.1	14.5 ± 12.5	52.8 ± 45.2
Total(0'-60')	2397.5 ± 92.1	1994.5 ± 435.5	1889.3 ± 498.6	955.8 ± 613.9**	1727.0 ± 86.4	734.3 ± 220.6**
Female						
Grip strength(g)						
Forelimb	725.8 ± 152.3	712.5 ± 152.2	772.0 ± 281.3	419.8 ± 207.1	670.8 ± 68.7	549.0 ± 142.9
Hindlimb	316.3 ± 105.8	227.8 ± 52.5	227.0 ± 65.7	185.0 ± 63.9	130.5 ± 27.5	49.3 ± 22.0**
Splay(cm)						
Hindlimb	7.03 ± 2.52	7.15 ± 1.74	9.35 ± 1.29	8.58 ± 2.57	6.08 ± 2.35	6.83 ± 1.80
Locomotor activity counts						
0'-10'	646.0 ± 39.6	465.0 ± 87.7*	453.0 ± 118.8*	286.8 ± 76.2**	573.3 ± 99.4	322.8 ± 119.6*
10'-20'	442.5 ± 78.8	297.5 ± 153.2	269.0 ± 112.6	154.0 ± 105.6*	325.0 ± 61.7	151.0 ± 131.7
20'-30'	354.0 ± 144.6	203.3 ± 139.6	179.3 ± 151.6	116.0 ± 95.5	195.8 ± 76.9	114.8 ± 141.5
30'-40'	228.8 ± 173.1	230.3 ± 162.6	138.0 ± 126.0	136.5 ± 128.9	198.0 ± 45.7	118.0 ± 90.4
40'-50'	103.5 ± 116.1	217.8 ± 170.6	79.3 ± 88.5	149.0 ± 126.8	61.5 ± 36.5	39.3 ± 28.2
50'-60'	163.5 ± 215.8	170.0 ± 128.7	71.5 ± 83.1	54.0 ± 49.2	152.3 ± 77.5	43.5 ± 24.7*
Total(0'-60')	1938.3 ± 569.7	1583.8 ± 792.3	1190.0 ± 638.2	896.3 ± 514.3	1505.8 ± 290.3	789.3 ± 489.8*

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:p≤0.05, \*\*:p≤0.01



Table 2 Hematological findings in male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	100 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.061 $\pm$ 0.433	8.386 $\pm$ 0.341	8.174 $\pm$ 0.316	8.293 $\pm$ 0.355	8.491 $\pm$ 0.400	8.271 $\pm$ 0.349
Hematocrit (%)	51.10 $\pm$ 1.59	51.10 $\pm$ 1.02	49.44 $\pm$ 1.34	49.10 $\pm$ 1.09*	50.74 $\pm$ 2.71	48.93 $\pm$ 1.21
Hemoglobin (g/dL)	16.44 $\pm$ 0.59	16.59 $\pm$ 0.42	15.99 $\pm$ 0.57	15.86 $\pm$ 0.53	16.61 $\pm$ 0.90	15.87 $\pm$ 0.40
MCV (fL)	63.43 $\pm$ 1.75	60.97 $\pm$ 2.13*	60.49 $\pm$ 1.46*	59.23 $\pm$ 1.53**	59.76 $\pm$ 1.72	59.19 $\pm$ 1.64
MCH (pg)	20.41 $\pm$ 0.64	19.77 $\pm$ 0.63	19.56 $\pm$ 0.56*	19.16 $\pm$ 0.58**	19.56 $\pm$ 0.51	19.21 $\pm$ 0.73
MCHC (%)	32.19 $\pm$ 0.55	32.47 $\pm$ 0.34	32.33 $\pm$ 0.60	32.29 $\pm$ 0.61	32.74 $\pm$ 0.22	32.44 $\pm$ 0.71
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	13.59 $\pm$ 3.22	15.27 $\pm$ 3.76	13.06 $\pm$ 3.25	15.69 $\pm$ 4.99	14.81 $\pm$ 2.16	12.07 $\pm$ 3.33
Platelet ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1105.1 $\pm$ 68.0	1126.6 $\pm$ 138.3	1100.0 $\pm$ 115.3	1162.0 $\pm$ 107.4	954.0 $\pm$ 147.1	1183.0 $\pm$ 71.7**
PT (sec)	15.43 $\pm$ 1.99	15.74 $\pm$ 1.58	15.79 $\pm$ 1.96	16.47 $\pm$ 2.57	16.30 $\pm$ 2.15	15.16 $\pm$ 0.97
APTT (sec)	23.40 $\pm$ 2.66	23.20 $\pm$ 2.29	21.77 $\pm$ 2.79	23.93 $\pm$ 2.67	29.50 $\pm$ 2.83	29.74 $\pm$ 2.35
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophils						
Stab form	0.7 $\pm$ 0.8	0.7 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.8	0.7 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.7
Segmented	7.7 $\pm$ 3.9	10.1 $\pm$ 6.2	8.1 $\pm$ 2.2	9.9 $\pm$ 10.2	6.9 $\pm$ 3.3	7.6 $\pm$ 4.0
Eosinophils	0.7 $\pm$ 1.0	0.7 $\pm$ 1.0	0.9 $\pm$ 1.1	1.4 $\pm$ 1.4	0.3 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 1.1
Basophils	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocytes	0.7 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 1.0	0.6 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.5**
Lymphocytes	90.1 $\pm$ 3.3	87.4 $\pm$ 5.7	89.9 $\pm$ 2.8	87.4 $\pm$ 10.8	91.7 $\pm$ 2.9	88.9 $\pm$ 4.1

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.Significantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ 

Table 3 Hematological findings in female male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.010 $\pm$ 0.457	8.186 $\pm$ 0.296	7.927 $\pm$ 0.292	7.759 $\pm$ 0.296	8.141 $\pm$ 0.263	8.007 $\pm$ 0.230
Hematocrit (%)	48.53 $\pm$ 2.94	49.20 $\pm$ 1.23	47.93 $\pm$ 2.09	45.64 $\pm$ 2.01*	48.19 $\pm$ 1.56	47.97 $\pm$ 2.25
Hemoglobin (g/dL)	16.10 $\pm$ 0.93	16.44 $\pm$ 0.39	16.03 $\pm$ 0.67	15.29 $\pm$ 0.69	15.83 $\pm$ 0.43	15.74 $\pm$ 0.76
MCV (fL)	60.59 $\pm$ 2.00	60.13 $\pm$ 1.76	60.44 $\pm$ 0.97	58.80 $\pm$ 1.18	59.20 $\pm$ 1.64	59.91 $\pm$ 1.59
MCH (pg)	20.11 $\pm$ 0.70	20.11 $\pm$ 0.61	20.21 $\pm$ 0.41	19.70 $\pm$ 0.51	19.46 $\pm$ 0.65	19.64 $\pm$ 0.65
MCHC (%)	33.19 $\pm$ 0.64	33.43 $\pm$ 0.52	33.44 $\pm$ 0.52	33.51 $\pm$ 0.58	32.84 $\pm$ 0.50	32.81 $\pm$ 0.85
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	8.16 $\pm$ 1.27	8.70 $\pm$ 3.16	10.36 $\pm$ 2.47	9.56 $\pm$ 3.20	10.41 $\pm$ 2.24	8.81 $\pm$ 3.00
Platelet ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1104.7 $\pm$ 297.0	1124.9 $\pm$ 112.0	1183.6 $\pm$ 93.8	1206.7 $\pm$ 115.9	1116.6 $\pm$ 104.2	1275.9 $\pm$ 99.2*
PT (sec)	13.41 $\pm$ 0.93	13.47 $\pm$ 0.79	13.13 $\pm$ 0.98	13.06 $\pm$ 1.16	14.36 $\pm$ 0.37	14.87 $\pm$ 0.35*
APTT (sec)	20.30 $\pm$ 5.00	17.60 $\pm$ 1.21	17.57 $\pm$ 1.23	17.50 $\pm$ 1.02	19.33 $\pm$ 1.51	19.80 $\pm$ 2.02
Differential leukocyte counts (%)						
Neutrophils						
Stab form	0.9 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.6	0.3 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.5
Segmented	8.1 $\pm$ 3.1	7.7 $\pm$ 3.6	9.4 $\pm$ 2.7	8.6 $\pm$ 2.8	6.9 $\pm$ 3.7	5.0 $\pm$ 2.4
Eosinophils	0.7 $\pm$ 1.1	1.4 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 1.6	1.4 $\pm$ 1.1	0.6 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.5
Basophils	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocytes	0.6 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.8
Lymphocytes	89.7 $\pm$ 2.1	89.7 $\pm$ 4.2	87.6 $\pm$ 3.3	88.9 $\pm$ 3.3	91.1 $\pm$ 4.9	93.4 $\pm$ 2.2

Values are expressed as Mean  $\pm$  S.D.Significantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$

Table 4 Blood chemical findings in male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
	7	7	7	7	7	7
No. of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	5.77 ± 0.21	5.80 ± 0.13	5.49 ± 0.18*	5.79 ± 0.25	5.77 ± 0.15	5.49 ± 0.23*
A/G	1.190 ± 0.090	1.219 ± 0.069	1.273 ± 0.103	1.317 ± 0.115	1.109 ± 0.108	1.269 ± 0.105*
Protein fraction (%)						
Albumin	54.37 ± 1.76	55.00 ± 1.41	56.04 ± 1.90	56.83 ± 2.12*	52.59 ± 2.37	55.93 ± 1.93*
α <sub>1</sub> -globulin	23.04 ± 1.83	22.60 ± 2.97	21.47 ± 1.62	20.94 ± 1.30	23.79 ± 2.32	21.39 ± 2.21
α <sub>2</sub> -globulin	10.50 ± 0.81	10.10 ± 0.99	10.21 ± 0.87	9.17 ± 0.88*	8.61 ± 0.23	8.41 ± 0.92
β-globulin	11.06 ± 0.65	11.47 ± 0.97	11.54 ± 0.52	12.24 ± 1.46	13.63 ± 0.71	13.01 ± 0.73
γ-globulin	1.03 ± 0.46	0.83 ± 0.40	0.73 ± 0.19	0.81 ± 0.23	1.39 ± 0.35	1.26 ± 0.80
GOT (IU/L)	65.0 ± 9.6	65.7 ± 10.8	60.3 ± 4.3	58.0 ± 8.2	68.7 ± 10.3	74.0 ± 12.3
GPT (IU/L)	25.1 ± 2.3	27.0 ± 6.2	25.1 ± 3.0	20.9 ± 3.0	33.0 ± 8.7	31.6 ± 3.9
ALP (IU/L)	495.6 ± 97.4	482.4 ± 110.5	447.1 ± 101.3	337.6 ± 57.5*	355.4 ± 123.6	358.6 ± 76.9
LDH (IU/L)	324.1 ± 86.5	304.6 ± 126.7	267.3 ± 56.4	295.6 ± 76.6	227.4 ± 39.2	260.7 ± 45.6
γ-GTP (IU/L)	0.56 ± 0.28	0.51 ± 0.30	0.61 ± 0.29	0.66 ± 0.28	0.54 ± 0.21	0.60 ± 0.24
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose (mg/dL)	156.0 ± 17.9	155.0 ± 21.9	148.7 ± 14.0	160.0 ± 15.9	171.3 ± 12.1	126.9 ± 18.8**
Total cholesterol (mg/dL)	64.4 ± 10.1	57.6 ± 16.3	52.4 ± 11.2	58.6 ± 15.9	65.3 ± 9.8	67.9 ± 9.1
Triglyceride (mg/dL)	34.4 ± 12.1	44.1 ± 16.8	39.9 ± 18.3	32.3 ± 13.6	53.4 ± 25.0	30.0 ± 11.2*
Urea nitrogen (mg/dL)	15.39 ± 1.58	15.90 ± 0.77	15.10 ± 1.50	15.74 ± 1.31	17.23 ± 1.64	16.69 ± 2.13
Creatinine (mg/dL)	0.44 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.43 ± 0.05	0.41 ± 0.04	0.49 ± 0.04	0.40 ± 0.00**
Sodium (mEq/L)	142.29 ± 0.95	142.86 ± 0.69	142.50 ± 1.50	141.29 ± 0.57	143.43 ± 1.10	143.21 ± 1.04
Potassium (mEq/L)	4.781 ± 0.220	4.383 ± 0.416	4.557 ± 0.280	4.777 ± 0.454	4.436 ± 0.356	4.887 ± 0.299*
Chlorine (mEq/L)	105.4 ± 1.9	105.6 ± 1.0	104.7 ± 0.8	106.6 ± 1.0	105.7 ± 1.6	106.9 ± 1.6
Calcium (mg/dL)	9.70 ± 0.22	9.63 ± 0.26	9.47 ± 0.20	9.47 ± 0.24	9.40 ± 0.12	9.20 ± 0.26
Inorganic phosphorous (mg/dL)	8.47 ± 0.33	8.64 ± 0.79	8.61 ± 0.76	7.83 ± 0.33	7.26 ± 0.51	7.94 ± 0.65*

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*: p ≤ 0.05, \*\*: p ≤ 0.01

28日間反復投与毒性試験

Table 5 Blood chemical findings in male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
Total protein (g/dL)	5.73 ± 0.26	5.83 ± 0.36	5.80 ± 0.18	5.61 ± 0.16	6.20 ± 0.19	5.60 ± 0.08**
A/G	1.426 ± 0.105	1.423 ± 0.148	1.459 ± 0.162	1.576 ± 0.044	1.486 ± 0.109	1.560 ± 0.127
Protein fraction (%)						
Albumin	58.76 ± 1.75	58.69 ± 2.43	59.31 ± 2.55	61.24 ± 0.64	59.77 ± 1.87	60.94 ± 1.99
α-globulin	19.63 ± 1.50	19.99 ± 2.44	19.40 ± 2.13	17.63 ± 0.87	18.94 ± 1.39	17.94 ± 1.05
α-globulin	7.61 ± 1.01	7.64 ± 1.10	7.87 ± 0.99	7.43 ± 0.86	6.60 ± 0.55	6.60 ± 0.66
β-globulin	12.27 ± 0.95	12.10 ± 0.68	12.09 ± 0.77	12.39 ± 0.65	12.71 ± 1.34	12.33 ± 0.71
γ-globulin	1.73 ± 0.70	1.59 ± 0.73	1.33 ± 0.23	1.31 ± 0.16	1.97 ± 0.65	2.19 ± 1.04
GOT (IU/L)	65.3 ± 9.1	62.1 ± 4.3	62.1 ± 8.9	64.7 ± 4.3	61.9 ± 6.7	68.0 ± 7.5
GPT (IU/L)	23.7 ± 5.2	24.3 ± 4.9	20.9 ± 5.6	18.4 ± 2.2	22.0 ± 4.5	25.7 ± 4.3
ALP (IU/L)	271.3 ± 62.1	282.0 ± 67.3	282.6 ± 79.2	225.6 ± 50.7	182.1 ± 15.1	244.4 ± 87.6*
LDH (IU/L)	318.9 ± 90.9	277.0 ± 50.5	278.1 ± 88.6	328.4 ± 75.8	261.1 ± 49.0	250.7 ± 30.3
γ-GTP (IU/L)	1.64 ± 2.10	1.01 ± 0.55	0.91 ± 0.44	0.90 ± 0.23	1.40 ± 0.45	1.10 ± 0.54
Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
Glucose (mg/dL)	118.7 ± 17.2	120.1 ± 5.7	120.7 ± 7.4	131.1 ± 14.3	150.4 ± 13.1	126.1 ± 9.9**
Total cholesterol (mg/dL)	64.4 ± 13.9	67.0 ± 13.5	59.9 ± 12.0	60.1 ± 10.0	71.1 ± 12.7	66.4 ± 16.2
Triglyceride (mg/dL)	9.3 ± 3.1	10.9 ± 3.1	13.4 ± 6.3	17.1 ± 6.4*	14.0 ± 6.5	11.6 ± 4.8
Urea nitrogen (mg/dL)	17.99 ± 1.53	19.04 ± 1.68	16.96 ± 1.81	15.43 ± 1.37*	18.10 ± 2.88	17.67 ± 1.78
Creatinine (mg/dL)	0.53 ± 0.08	0.50 ± 0.06	0.46 ± 0.05	0.43 ± 0.05*	0.54 ± 0.08	0.47 ± 0.05
Sodium (mEq/L)	141.07 ± 1.72	139.93 ± 0.98	140.86 ± 1.28	140.21 ± 1.44	142.79 ± 0.81	142.79 ± 1.07
Potassium (mEq/L)	4.553 ± 0.151	4.484 ± 0.343	4.551 ± 0.350	4.851 ± 0.422	4.090 ± 0.216	4.736 ± 0.350**
Chlorine (mEq/L)	108.1 ± 2.1	107.4 ± 1.5	107.1 ± 1.7	108.1 ± 0.9	107.1 ± 1.1	108.6 ± 1.0*
Calcium (mg/dL)	9.20 ± 0.14	9.09 ± 0.22	9.31 ± 0.23	9.06 ± 0.19	9.27 ± 0.34	8.99 ± 0.31
Inorganic phosphorous (mg/dL)	7.37 ± 0.85	7.14 ± 0.64	7.24 ± 0.91	7.26 ± 0.59	5.60 ± 0.60	6.93 ± 0.52**

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*: p≤0.05, \*\*: p≤0.01

Table 6 Absolute and relative organ weights in male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
Body weight (g)	347.7 ± 13.9	338.7 ± 26.2	332.7 ± 20.0	255.3 ± 34.3**	402.3 ± 47.9	318.9 ± 36.2**
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.050 ± 0.041	2.026 ± 0.082	2.080 ± 0.077	1.916 ± 0.114*	2.156 ± 0.165	2.030 ± 0.051
Lungs (g)	1.314 ± 0.084	1.266 ± 0.112	1.277 ± 0.064	1.160 ± 0.118*	1.350 ± 0.163	1.306 ± 0.096
Heart (g)	1.186 ± 0.053	1.246 ± 0.075	1.199 ± 0.085	1.059 ± 0.097*	1.371 ± 0.147	1.160 ± 0.147*
Liver (g)	10.257 ± 0.994	10.380 ± 1.422	10.241 ± 1.121	8.519 ± 1.434*	11.811 ± 1.929	9.384 ± 1.192*
Kidneys (g)	2.493 ± 0.181	2.566 ± 0.171	2.746 ± 0.332	2.460 ± 0.318	2.867 ± 0.434	2.646 ± 0.288
Spleen (g)	0.647 ± 0.094	0.651 ± 0.098	0.660 ± 0.087	0.473 ± 0.042**	0.721 ± 0.103	0.667 ± 0.095
Adrenals (mg)	62.286 ± 6.157	62.143 ± 9.582	62.571 ± 9.572	50.571 ± 7.850*	55.571 ± 8.264	52.286 ± 3.302
Pituitary gland (mg)	12.34 ± 1.03	11.54 ± 1.30	12.44 ± 1.71	9.61 ± 1.31**	12.31 ± 1.44	10.84 ± 0.49
Thymus (mg)	606.7 ± 114.6	573.0 ± 118.5	598.6 ± 80.5	482.9 ± 77.1	547.0 ± 135.7	534.4 ± 171.4
Thyroids (mg)	20.471 ± 2.369	21.900 ± 2.681	19.157 ± 3.153	19.143 ± 1.491	22.386 ± 5.167	20.314 ± 4.321
Testes (g)	3.006 ± 0.278	3.044 ± 0.517	3.134 ± 0.241	2.913 ± 0.265	3.193 ± 0.181	3.471 ± 0.240*
Epididymides (g)	0.756 ± 0.062	0.761 ± 0.069	0.770 ± 0.050	0.689 ± 0.061	1.031 ± 0.053	0.976 ± 0.028*
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.591 ± 0.029	0.601 ± 0.038	0.626 ± 0.046	0.759 ± 0.083**	0.539 ± 0.045	0.641 ± 0.062**
Lungs (g%)	0.379 ± 0.011	0.373 ± 0.016	0.387 ± 0.027	0.463 ± 0.092**	0.339 ± 0.027	0.413 ± 0.050**
Heart (g%)	0.341 ± 0.013	0.370 ± 0.028	0.359 ± 0.020	0.417 ± 0.042**	0.341 ± 0.020	0.361 ± 0.017
Liver (g%)	2.946 ± 0.197	3.056 ± 0.231	3.071 ± 0.182	3.327 ± 0.170**	2.924 ± 0.190	2.946 ± 0.198
Kidneys (g%)	0.717 ± 0.039	0.757 ± 0.011	0.823 ± 0.054**	0.966 ± 0.059**	0.713 ± 0.059	0.830 ± 0.039**
Spleen (g%)	0.187 ± 0.023	0.193 ± 0.035	0.196 ± 0.017	0.187 ± 0.014	0.179 ± 0.016	0.209 ± 0.029*
Adrenals (mg%)	17.940 ± 1.872	18.323 ± 2.137	18.774 ± 2.314	19.887 ± 2.162	13.841 ± 1.443	16.594 ± 2.375*
Pituitary gland (mg%)	3.559 ± 0.365	3.414 ± 0.380	3.736 ± 0.388	3.781 ± 0.364	3.076 ± 0.310	3.436 ± 0.392
Thymus (mg%)	174.296 ± 30.878	168.806 ± 30.054	179.911 ± 22.000	190.203 ± 27.392	134.384 ± 21.873	166.871 ± 43.446
Thyroids (mg%)	5.884 ± 0.634	6.474 ± 0.716	5.754 ± 0.880	7.621 ± 1.193**	5.617 ± 1.438	6.337 ± 0.862
Testes (g%)	0.863 ± 0.052	0.900 ± 0.122	0.944 ± 0.087	1.151 ± 0.125**	0.801 ± 0.076	1.097 ± 0.103**
Epididymides (g%)	0.219 ± 0.013	0.226 ± 0.020	0.230 ± 0.012	0.271 ± 0.035**	0.259 ± 0.033	0.310 ± 0.033*

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$

Table 7 Absolute and relative organ weights in female rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Administration period				Recovery period	
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals	7	7	7	7	7	7
Body weight (g)	214.7 ± 15.1	206.3 ± 12.3	199.3 ± 12.4	163.6 ± 8.7**	244.7 ± 25.7	192.1 ± 6.6**
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.977 ± 0.096	1.980 ± 0.076	1.909 ± 0.050	1.803 ± 0.048**	2.023 ± 0.089	1.890 ± 0.043**
Lungs (g)	0.986 ± 0.069	1.003 ± 0.045	0.957 ± 0.064	0.859 ± 0.052**	1.013 ± 0.080	0.947 ± 0.024
Heart (g)	0.791 ± 0.080	0.809 ± 0.091	0.770 ± 0.033	0.691 ± 0.037*	0.830 ± 0.093	0.743 ± 0.062
Liver (g)	6.044 ± 0.679	6.137 ± 0.498	5.936 ± 0.482	5.121 ± 0.380**	6.644 ± 0.769	5.344 ± 0.236**
Kidneys (g)	1.696 ± 0.176	1.743 ± 0.145	1.650 ± 0.089	1.604 ± 0.082	1.744 ± 0.169	1.624 ± 0.079
Spleen (g)	0.467 ± 0.048	0.430 ± 0.067	0.439 ± 0.042	0.369 ± 0.027**	0.481 ± 0.068	0.461 ± 0.056
Adrenals (mg)	66.571 ± 17.008	68.286 ± 9.050	69.571 ± 7.743	56.714 ± 6.824	63.429 ± 5.682	61.571 ± 5.912
Pituitary gland (mg)	14.56 ± 1.46	14.41 ± 0.85	12.71 ± 1.33	10.83 ± 2.15**	15.69 ± 1.70	12.47 ± 0.70**
Thymus (mg)	526.9 ± 117.8	493.7 ± 68.5	472.1 ± 67.3	371.0 ± 54.0**	400.3 ± 64.6	392.1 ± 56.6
Thyroids (mg)	15.671 ± 2.299	15.171 ± 2.835	15.843 ± 2.615	14.729 ± 3.000	15.729 ± 3.461	13.586 ± 1.504
Ovaries (mg)	85.571 ± 12.985	91.714 ± 19.559	88.286 ± 10.889	69.714 ± 8.077	94.571 ± 9.144	77.286 ± 7.931**
Relative organ weight						
Brain (g%)	0.924 ± 0.083	0.963 ± 0.060	0.961 ± 0.071	1.106 ± 0.072**	0.834 ± 0.086	0.984 ± 0.029**
Lungs (g%)	0.459 ± 0.009	0.487 ± 0.029	0.481 ± 0.022	0.526 ± 0.026**	0.416 ± 0.022	0.494 ± 0.015**
Heart (g%)	0.369 ± 0.025	0.391 ± 0.034	0.387 ± 0.024	0.424 ± 0.024**	0.339 ± 0.018	0.386 ± 0.032**
Liver (g%)	2.810 ± 0.185	2.971 ± 0.116	2.979 ± 0.138	3.136 ± 0.236**	2.717 ± 0.173	2.781 ± 0.102
Kidneys (g%)	0.790 ± 0.059	0.846 ± 0.056	0.829 ± 0.023	0.979 ± 0.032**	0.713 ± 0.021	0.847 ± 0.041**
Spleen (g%)	0.217 ± 0.018	0.207 ± 0.034	0.223 ± 0.030	0.227 ± 0.024	0.197 ± 0.024	0.240 ± 0.024**
Adrenals (mg%)	30.830 ± 6.257	33.103 ± 3.935	34.921 ± 3.557	34.716 ± 4.207	26.080 ± 2.875	32.037 ± 2.730**
Pituitary gland (mg%)	6.790 ± 0.675	7.011 ± 0.627	6.401 ± 0.770	6.604 ± 1.150	6.481 ± 1.113	6.500 ± 0.500
Thymus (mg%)	244.801 ± 49.342	239.991 ± 35.204	236.181 ± 23.055	228.024 ± 40.930	164.626 ± 29.299	203.676 ± 24.812*
Thyroids (mg%)	7.289 ± 0.792	7.376 ± 1.458	7.949 ± 1.210	8.991 ± 1.726	6.406 ± 1.035	7.069 ± 0.718
Ovaries (mg%)	39.687 ± 3.517	44.269 ± 7.908	44.456 ± 6.264	42.651 ± 4.748	38.801 ± 3.181	40.317 ± 4.887

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; \*: p ≤ 0.05, \*\*: p ≤ 0.01

Table 8 Histopathological findings in male rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Grade	End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals examined		7	7	7	7	7	7
Organ: Findings	Grade						
Lung: Cellular infiltration, neutrophil	++	0	-	-	2	0	0
Granuloma	Total	0	-	-	1	0	2
	+	0	-	-	0	0	1
	++	0	-	-	1	0	1
Accumulation, foam cell	+	0	-	-	0	2	2
Trachea: Cellular infiltration, neutrophil, lamina propria							
	+	0	-	-	1	0	0
Liver: Granuloma	+	1	-	-	0	0	0
Kidney: Cellular infiltration, lymphocyte	+	0	-	-	0	1	0
Cast, hyaline	+	0	-	-	0	1	1
Cyst	<+>	0	-	-	0	0	1
Hyperplasia, tubular epithelium	+	0	-	-	0	1	1
Testis: Retention, step 19 spermatid, stage IX, X	+	0	-	-	0	0	1
Prostate: Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium							
	+	1	-	-	2	1	1
Cerebellum: Swelling, axonal, cerebellar peduncle	+	0	0	0	1	0	3
Sciatic nerve: Degeneration, nerve fiber	Total	0	0	0	7	0	7
	+	0	0	0	7	0	4
	++	0	0	0	0	0	3
Pituitary gland: Hyperplasia, tubular, pars nervosa	+	0	-	-	1	0	0

Values are no. of animals with findings.

Grade: +=slight, ++=moderate change and <+>=detected.

-=blank value.

Table 9 Histopathological findings in female rats treated orally with methacrylamide in twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Grade	End of administration period				End of recovery period	
		0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	0 mg/kg	300 mg/kg
No. of animals examined		7	7	7	7	7	7
Organ: Findings	Grade						
Lung: Cellular infiltration, neutrophil	+	1	-	-	0	0	0
Granuloma	+	1	-	-	0	0	0
Accumulation, foam cell	+	0	-	-	0	1	1
Esophagus: Granulation, muscular layer	+	0	-	-	1	0	0
Kidney: Cellular infiltration, lymphocyte	+	2	-	-	1	0	0
Dilatation, renal pelvis	+	0	-	-	0	0	1
Uterus: Cyst	<+>	0	-	-	0	0	1
Cerebellum: Swelling, axonal, cerebellar peduncle	+	0	0	0	2	0	5
Sciatic nerve: Degeneration, nerve fiber	Total	0	0	0	7	0	7
	+	0	0	0	7	0	5
	++	0	0	0	0	0	2
Pituitary gland: Cyst	<+>	1	-	-	0	0	1
Hyperplasia, tubular, pars nervosa	+	1	-	-	0	0	0

Values are no. of animals with findings.

Grade: +=slight, ++=moderate change and <+>=detected.

-=blank value.

## 2-エチル酪酸の細菌を用いる復帰変異試験

### Reverse Mutation Test of 2-Ethylbutyric acid in Bacteria

#### 要約

2-エチル酪酸について *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰変異試験を実施した。

予備試験の結果をもとに本試験では, S9 mix 非共存下のすべての菌株は 5000~313  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の5用量を, 共存下の TA100, TA1535, TA98 および TA1537 は 5000~156  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の6用量, WP2 *uvrA* は 5000~313  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (公比2) の5用量をそれぞれ設定した。

2回の本試験の結果, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から, 2-エチル酪酸は本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

#### 材料および方法

##### 1. テスト菌株

カリフォルニア大学 B. N. Ames 教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1)</sup> および 東京大学医科学研究所 松島教授より 1985 年 10 月 14 日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> の 5 菌株を用いた。テスト菌株は菌懸濁液にジメチルスルホキシド(DMSO: 関東化学(株))を加え, 0.2 mL ずつ小分けしてドライアイス・アセトン中で急速凍結した後, 超低温槽で  $-80^{\circ}\text{C}$  以下に凍結保存したものを使用した。これら菌株はアミノ酸要求性, 紫外線感受性, 膜変異, 薬剤耐性などの遺伝的特徴を事前に調べ, 特性を備えていることを確認した。

##### 2. テスト菌株の前培養

L 字型試験管に 2.5% ニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath 社) 溶液を 10 mL 分注し, これに凍結保存した菌懸濁液を解凍して 20  $\mu\text{L}$  を接種した。37  $^{\circ}\text{C}$  で 8 時間振盪培養した後, 濁度計を用いて菌濃度を測定し, 生菌数が  $1 \times 10^9/\text{mL}$  以上であることを確認した。

##### 3. 被験物質

2-エチル酪酸(ロット番号: 01-91101, チッソ(株)(東京)提供)は, 純度 99.2% (不純物として, 水分 0.03% を含む) の無色液体である。被験物質は使用時まで冷蔵, 暗

所に保存した。

被験物質原体は, 通常の取り扱い条件で安定である。酸化剤と激しく反応する。

##### 4. 被験物質溶液の調製

DMSO を用いて最高用量の溶液を調製した後, 同溶媒で所定用量に段階希釈し, 速やかに試験に使用した。

##### 5. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを用いた。陽性対照物質溶液は, あらかじめ所定の濃度に調製し,  $-80^{\circ}\text{C}$  以下に凍結保存したものを使用した。

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

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン(Sigma Chemical Co.)

9-AA : 9-アミノアクリジン塩酸塩(Sigma Chemical Co.)

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

NaN<sub>3</sub> は注射用水(株大塚製薬工場)に, その他は DMSO に溶解したものを使用した。

##### 6. 培地および S9 mix の組成

###### 1) トップアガー

アミノ酸水溶液として, 精製水を用いて 0.5 mM D-ピオチン, L-ヒスチジン混合水溶液(サルモネラ用)または 0.5 mM L-トリプトファン水溶液(大腸菌用)を調製し, これをろ過滅菌後, 冷蔵庫に保管した。精製水 100 mL に対して, 粉末寒天(Bacto-Agar, Difco 社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え, オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後, 上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し, 約 45  $^{\circ}\text{C}$  に保温した。

###### 2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し, 使用した。なお, 培地 1 L あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g

寒天(OXOID Agar No.1) 15 g  
 径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めてある。

### 3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで氷中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム六水塩	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
D-グルコース6-リン酸	5 $\mu$ mol
$\beta$ -NADPH	4 $\mu$ mol
$\beta$ -NADH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu$ mol
滅菌精製水	残量

\*: 購入したS9(キッコマン株)を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを用いて併用投与して作製した肝ホモジネートの9000  $\times$  g遠心上清分画である。

## 7. 試験方法

試験はブレインキューベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を0.1 mL、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)を0.5 mLおよび菌懸濁液を0.1 mL加え、37  $^{\circ}$ Cで20分間振盪培養した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 mL添加した。ブレインキューベーション後、トップアガー2 mLを上記の混合液に加え混和し、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37  $^{\circ}$ Cで48時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各用量につき1枚のプレートを使用した。本試験は各用量につき3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

## 8. 試験結果の判定基準

いずれかの試験菌株で、S9 mixの有無によらず、被験物質用量の増加にともなって復帰変異コロニー数(平均値)が陰性(溶媒)対照値の2倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は変異原性を有する(陽性)と判定した。なお、試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

## 結果および考察

### 1. 予備試験

予備試験を *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535,

TA98, TA1537および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いて、5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88および1.22  $\mu$ g/plateの7用量で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの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 mix共存下ではTA100, TA1535, TA98およびTA1537の5000  $\mu$ g/plateで抗菌性が認められた。従って本試験では、S9 mix非共存下のすべての菌株は5000, 2500, 1250, 625, 313  $\mu$ g/plateの5用量を、共存下のTA100, TA1535, TA98, TA1537は5000, 2500, 1250, 625, 313, 156  $\mu$ g/plateの6用量、WP2 *uvrA*は5000, 2500, 1250, 625, 313  $\mu$ g/plateの5用量をそれぞれ設定した。

## 2. 本試験

試験の結果をTable 1, 2に示した。本試験を2回実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、S9 mix共存下ではTA100, TA1535, TA98およびTA1537の5000  $\mu$ g/plateで抗菌性が認められた。

なお、S9 mix非共存下および共存下において陽性対照が各菌株に誘発した復帰変異コロニー数は、各菌株の陰性対照の復帰変異コロニー数と比較して、明らかに2倍を超えて増加し、陽性の結果を示した。

以上の結果から、2-エチル酪酸は本試験系において変異原性を有さない(陰性)と判定した。

なお、類似化合物である酢酸ブチル<sup>3)</sup>、酪酸<sup>3)</sup>、イソ吉草酸エチル<sup>3)</sup>およびギ酸イソアミル<sup>3)</sup>は、いずれも細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が報告されている。

## 参考文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173(1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3(1976).
- 3) 石館基監修, "微生物を用いる変異原性試験データ集," エル・アイ・シー, 東京, 1991, pp.70-71, pp.84-85, pp.234-235, pp.324-325.



連絡先

試験責任者：榎本佳明

試験担当者：榎本佳明, 清水優子

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Yoshiaki Enomoto (Study director)

Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,

Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,

Ibaraki, 314-0255 Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Mutagenicity of 2-ethylbutyric acid in reverse mutation test (I) in bacteria

With (+) or Without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	116 124 ( 126) 138 ( $\pm$ 11)	13 18 ( 14) 10 ( $\pm$ 4)	24 35 ( 29) 27 ( $\pm$ 6)	15 18 ( 16) 15 ( $\pm$ 2)	10 9 ( 10) 10 ( $\pm$ 1)
	313	106 118 ( 116) 125 ( $\pm$ 10)	8 12 ( 9) 8 ( $\pm$ 2)	37 39 ( 39) 41 ( $\pm$ 2)	15 18 ( 16) 15 ( $\pm$ 2)	15 13 ( 14) 13 ( $\pm$ 1)
	625	129 129 ( 129) 128 ( $\pm$ 1)	12 7 ( 9) 9 ( $\pm$ 3)	34 25 ( 34) 42 ( $\pm$ 9)	15 18 ( 16) 16 ( $\pm$ 2)	14 15 ( 13) 11 ( $\pm$ 2)
	1250	107 141 ( 120) 112 ( $\pm$ 18)	11 11 ( 10) 8 ( $\pm$ 2)	29 47 ( 37) 34 ( $\pm$ 9)	14 13 ( 14) 16 ( $\pm$ 2)	17 13 ( 16) 17 ( $\pm$ 2)
	2500	116 100 ( 114) 125 ( $\pm$ 13)	9 11 ( 10) 9 ( $\pm$ 1)	36 33 ( 35) 36 ( $\pm$ 2)	18 18 ( 17) 16 ( $\pm$ 1)	13 19 ( 16) 15 ( $\pm$ 3)
	5000	101 94 ( 94) 87 ( $\pm$ 7)	7 5 ( 7) 8 ( $\pm$ 2)	28 38 ( 35) 38 ( $\pm$ 6)	13 12 ( 14) 18 ( $\pm$ 3)	11 13 ( 12) 12 ( $\pm$ 1)
S9 mix (+)	0	111 118 ( 112) 108 ( $\pm$ 5)	10 10 ( 11) 12 ( $\pm$ 1)	36 29 ( 33) 35 ( $\pm$ 4)	29 22 ( 23) 18 ( $\pm$ 6)	19 19 ( 19) 19 ( $\pm$ 0)
	156	123 124 ( 122) 120 ( $\pm$ 2)	8 13 ( 10) 9 ( $\pm$ 3)	/	27 29 ( 25) 20 ( $\pm$ 5)	18 21 ( 20) 22 ( $\pm$ 2)
	313	118 124 ( 116) 106 ( $\pm$ 9)	15 10 ( 13) 14 ( $\pm$ 3)	41 29 ( 37) 42 ( $\pm$ 7)	31 26 ( 26) 21 ( $\pm$ 5)	22 27 ( 24) 24 ( $\pm$ 3)
	625	103 118 ( 114) 122 ( $\pm$ 10)	13 12 ( 12) 10 ( $\pm$ 2)	39 35 ( 35) 31 ( $\pm$ 4)	23 23 ( 25) 28 ( $\pm$ 3)	23 26 ( 25) 26 ( $\pm$ 2)
	1250	113 103 ( 111) 116 ( $\pm$ 7)	8 11 ( 10) 10 ( $\pm$ 2)	46 41 ( 38) 28 ( $\pm$ 9)	33 26 ( 29) 27 ( $\pm$ 4)	17 17 ( 17) 18 ( $\pm$ 1)
	2500	102 126 ( 116) 120 ( $\pm$ 12)	11 9 ( 10) 9 ( $\pm$ 1)	32 26 ( 30) 32 ( $\pm$ 3)	30 23 ( 24) 20 ( $\pm$ 5)	18 26 ( 21) 18 ( $\pm$ 5)
	5000	100* 108* ( 105) 108* ( $\pm$ 5)	8* 6* ( 7) 6* ( $\pm$ 1)	28 38 ( 30) 23 ( $\pm$ 8)	21* 26* ( 23) 21* ( $\pm$ 3)	18* 22* ( 17) 12* ( $\pm$ 5)
Positive control	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 mix (-)	Number of revertants	618 603 ( 608) 603 ( $\pm$ 9)	446 518 ( 486) 495 ( $\pm$ 37)	973 954 ( 964) 966 ( $\pm$ 10)	697 666 ( 682) 682 ( $\pm$ 16)	443 278 ( 329) 267 ( $\pm$ 99)
Positive control	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
S9 mix (+)	Number of revertants	1600 1562 ( 1512) 1374 ( $\pm$ 121)	313 241 ( 264) 239 ( $\pm$ 42)	1080 1140 ( 1173) 1299 ( $\pm$ 113)	459 582 ( 488) 422 ( $\pm$ 84)	205 187 ( 203) 217 ( $\pm$ 15)

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, NaN<sub>3</sub>:sodium azideENNG: *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine hydrochloride

2-AA:2-aminoanthracene

(Mean)

( $\pm$ S.D.)

\*:Microbial toxicity was observed.

Table 2 Mutagenicity of 2-ethylbutyric acid in reverse mutation test (II) in bacteria

With (+) or Without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	97 106 ( 101) 100 ( $\pm$ 5)	11 13 ( 13) 15 ( $\pm$ 2)	40 37 ( 37) 34 ( $\pm$ 3)	18 19 ( 18) 17 ( $\pm$ 1)	9 12 ( 10) 9 ( $\pm$ 2)
	313	97 94 ( 102) 114 ( $\pm$ 11)	16 15 ( 14) 11 ( $\pm$ 3)	34 40 ( 39) 43 ( $\pm$ 5)	20 19 ( 20) 21 ( $\pm$ 1)	12 7 ( 10) 11 ( $\pm$ 3)
	625	103 112 ( 107) 107 ( $\pm$ 5)	15 11 ( 11) 8 ( $\pm$ 4)	38 39 ( 41) 45 ( $\pm$ 4)	19 20 ( 19) 17 ( $\pm$ 2)	10 10 ( 10) 10 ( $\pm$ 0)
	1250	114 104 ( 104) 95 ( $\pm$ 10)	10 14 ( 14) 17 ( $\pm$ 4)	44 39 ( 43) 45 ( $\pm$ 3)	19 19 ( 20) 22 ( $\pm$ 2)	9 10 ( 10) 12 ( $\pm$ 2)
	2500	103 102 ( 114) 137 ( $\pm$ 20)	12 16 ( 13) 12 ( $\pm$ 2)	41 33 ( 35) 30 ( $\pm$ 6)	18 21 ( 19) 17 ( $\pm$ 2)	9 10 ( 10) 11 ( $\pm$ 1)
	5000	100 95 ( 101) 108 ( $\pm$ 7)	14 11 ( 13) 15 ( $\pm$ 2)	41 28 ( 33) 30 ( $\pm$ 7)	18 18 ( 20) 23 ( $\pm$ 3)	8 11 ( 10) 11 ( $\pm$ 2)
S9 mix (+)	0	111 97 ( 104) 104 ( $\pm$ 7)	12 8 ( 11) 14 ( $\pm$ 3)	42 45 ( 44) 45 ( $\pm$ 2)	27 22 ( 24) 23 ( $\pm$ 3)	15 19 ( 17) 17 ( $\pm$ 2)
	156	98 112 ( 107) 110 ( $\pm$ 8)	16 12 ( 14) 15 ( $\pm$ 2)	/	26 31 ( 28) 28 ( $\pm$ 3)	20 20 ( 19) 17 ( $\pm$ 2)
	313	97 115 ( 106) 106 ( $\pm$ 9)	16 13 ( 13) 11 ( $\pm$ 3)	36 36 ( 39) 46 ( $\pm$ 6)	29 30 ( 30) 32 ( $\pm$ 2)	16 16 ( 16) 17 ( $\pm$ 1)
	625	100 105 ( 102) 102 ( $\pm$ 3)	12 16 ( 14) 15 ( $\pm$ 2)	45 44 ( 43) 39 ( $\pm$ 3)	32 26 ( 29) 29 ( $\pm$ 3)	14 14 ( 16) 20 ( $\pm$ 3)
	1250	106 112 ( 107) 104 ( $\pm$ 4)	14 15 ( 15) 17 ( $\pm$ 2)	38 42 ( 41) 42 ( $\pm$ 2)	32 22 ( 28) 30 ( $\pm$ 5)	13 12 ( 14) 16 ( $\pm$ 2)
	2500	107 97 ( 104) 109 ( $\pm$ 6)	11 14 ( 12) 11 ( $\pm$ 2)	37 37 ( 39) 43 ( $\pm$ 3)	26 31 ( 27) 25 ( $\pm$ 3)	12 12 ( 14) 18 ( $\pm$ 3)
	5000	113* 93* ( 104) 106* ( $\pm$ 10)	9* 6* ( 7) 6* ( $\pm$ 2)	41 40 ( 42) 46 ( $\pm$ 3)	22* 28* ( 26) 27* ( $\pm$ 3)	13* 13* ( 14) 15* ( $\pm$ 1)
Positive control	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 mix (-)	Number of revertants	585 545 ( 554) 533 ( $\pm$ 27)	488 493 ( 503) 527 ( $\pm$ 21)	892 880 ( 916) 975 ( $\pm$ 52)	537 480 ( 494) 465 ( $\pm$ 38)	309 312 ( 319) 336 ( $\pm$ 15)
Positive control	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
S9 mix (+)	Number of revertants	1362 1242 ( 1276) 1223 ( $\pm$ 75)	267 274 ( 256) 228 ( $\pm$ 25)	1230 1217 ( 1224) 1225 ( $\pm$ 7)	432 440 ( 425) 403 ( $\pm$ 19)	197 186 ( 182) 163 ( $\pm$ 17)

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, NaN<sub>3</sub>: sodium azide  
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride  
 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)  
( $\pm$ S.D.)

\*: Microbial toxicity was observed.

## 2-エチル酪酸のチャイニーズ・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 2-Ethylbutyric acid in Cultured Chinese Hamster Cells

#### 要約

2-エチル酪酸の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。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法のS9 mix存在下、非存在下で1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公比2で4濃度を設定した。連続処理法の24時間処理では、1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公差400で4濃度を設定した。

短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下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出現頻度は5%未満であった。また連続処理法の24時間処理の1200, 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、染色体の構造異常細胞の出現頻度はそれぞれ17.0, 74.0%であった。連続処理法24時間処理において、倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下では2-エチル酪酸は、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

#### 材料および方法

##### 1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1999年8月, 入手時:継代14代, 凍結時:17代)したチャイニーズ・ハムスター肺由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代5代以内で試験に用いた。

##### 2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(GIBCO BRL, ロット番号:1019033)を10 vol%添加したイーグルMEM(日水製薬(株)培養液を用いた。

##### 3. 培養条件

$2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。

短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。また連続処理法では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間処理した。

##### 4. 被験物質

2-エチル酪酸(ロット番号:01-91101, チッソ(株)(東京)

提供)は、純度99.2%(不純物として、水分0.03%を含む)の無色液体である。被験物質は使用時まで冷蔵、暗所に保存した。

被験物質原体は、通常の取り扱い条件で安定である。酸化剤と激しく反応する。

##### 5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒はジメチルスルホキシド(関東化学(株), ロット番号:010G1456, 104G1307, 108G2036)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5 vol%になるように加えた。

##### 6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、血球計算盤を用いて各群の細胞を計数し、陰性対照群に対する割合をもって指標とした。

その結果、2-エチル酪酸の約50%の増殖抑制を示す濃度を、生存曲線において細胞増殖率が50%前後を示す2点を結ぶ直線式より算出したところ、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下でいずれも1002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また連続処理法の24時間処理における約50%の増殖抑制を示す濃度は1272  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった(Fig. 1)。

##### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、短時間処理法のS9 mix存在下、非存在下で1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公比2で4濃度を設定した。連続処理法の24時間処理では、1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として、公差400で4濃度を設定した。

陽性対照として、短時間処理法のS9 mix存在下では、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業(株), ロット番号:GG01)の濃度を20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , S9 mix非存在下では、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:283AIG)の濃度を0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 連続処理法では、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:286AIH)の濃度を0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。

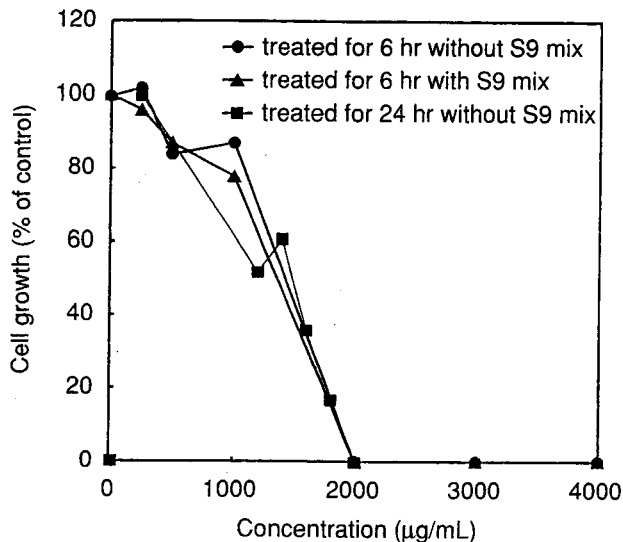


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-ethylbutyric acid

### 8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 µg/mLになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき2枚作製した。作製した標本を、3 vol%ギムザ溶液で20分間染色した。

### 9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のディッシュから得られたスライドを処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(MMS)<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型の切断、交換などの構造異常およびギャップの有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。ギャップは構造異常には含めなかった。また、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。ただし、連続処理法24時間処理の1600 µg/mLでは、細胞毒性のため、一方のプレートの標本については50個以上の分裂中期細胞が得られず、集計から除外した。

### 10. 記録と測定

溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が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。

### 11. 細胞増殖率の測定

染色体標本作製と同一のサンプルにおける細胞増殖率を測定した。標本作製時に剥離した細胞の一部を採取し、血球計算盤で細胞を計数した。

### 結果および考察

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。2-エチル酪酸を加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

連続処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。2-エチル酪酸を加えて24時間連続処理した結果、1200, 1600 µg/mLで染色体の構造異常細胞の出現頻度はそれぞれ17.0, 74.0%であった。倍数性細胞の出現頻度は全ての処理条件で5%未満であった。

なお、処理開始時および処理終了時の細胞処理液のpHを測定したところ、連続処理法24時間処理の1200, 1600 µg/mLにおける細胞処理液のpHは6.6~7.1であった。よって、染色体構造異常誘発は、細胞処理液のpH低下に起因するものではなく、被験物質の染色体異常誘発性に起因するものであると考えられた。

以上の結果から、2-エチル酪酸は本試験条件下において、染色体異常を誘発すると結論した。

なお、類似化合物である氷酢酸、酪酸ならびに乳酸は、いずれも連続処理法で陰性の結果が報告されている<sup>2)</sup>。

### 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス”, 朝倉書店, 東京, 1988, pp.16-37.
- 2) 祖父尼俊雄監修, “染色体異常試験データ集(改訂1998年版)”, エル・アイ・シー, 東京, 1999.

### 連絡先

試験責任者: 中川宗洋  
 試験担当者: 太田絵律奈, 石毛裕子, 成見香瑞範  
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
 〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

### Correspondence

Authors: Munehiro Nakagawa (Study director)  
 Erina Ohta, Yuko Ishige,  
 Kazunori Narumi  
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
 Kashima Laboratory  
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
 Ibaraki, 314-0255 Japan  
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-ethylbutyric acid with and without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9 mix	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid <sup>b)</sup> (%)	Judgement <sup>c)</sup>	
						ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Solvent <sup>a)</sup>	0	-	6-18	100	200	3	0	0	0	0	3	3( 1.5)	0	0.0	-	-
Test Substance	200	-	6-18	125	200	0	1	1	0	0	2	2( 1.0)	0	0.0	-	-
	400	-	6-18	117	200	1	0	1	0	0	2	2( 1.0)	0	0.0	-	-
	800	-	6-18	91	200	1	0	1	0	0	2	2( 1.0)	0	0.0	-	-
	1600 A	-	6-18	54	200	2	1	0	0	0	3	2( 1.0)	0	0.5	-	-
MMC	0.1	-	6-18	62	200	51	33	0	0	0	84	66(33.0)	0	0.5	+	-
Solvent	0	+	6-18	100	200	0	0	2	0	0	2	2( 1.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	200	+	6-18	84	200	0	0	0	0	0	0	0( 0.0)	0	0.0	-	-
	400	+	6-18	93	200	0	0	1	0	0	1	1( 0.5)	0	0.0	-	-
	800	+	6-18	86	200	0	0	1	0	0	1	1( 0.5)	0	1.0	-	-
	1600 A	+	6-18	0	TOXIC											
BP	20	+	6-18	68	200	25	105	1	0	0	131	116(58.0)	0	0.0	+	-

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C(positive control), BP:benzo [a] pyrene(positive control)

a) Dimethyl sulfoxide was used as solvent.

b) Two hundred cells were analyzed in each group except 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with S9 mix.

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

A: The color of the medium was changed yellow and it indicated that pH of the medium became low.

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-ethylbutyric acid without S9 mix

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell growth index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Number of cells with aberrations (%)	Number of gaps	polyploid <sup>b)</sup> (%)	Judgement <sup>c)</sup>	
					ctb	cte	csb	cse	frg	total				SA	NA
Solvent <sup>a)</sup>	0	24	100	200	1	0	1	0	0	2	2( 1.0)	0	0.0	-	-
Test Substance	400	24	94	200	11	0	0	0	0	11	11( 5.5)	2	0.0	±	-
	800	24	83	200	10	0	1	0	0	11	10( 5.0)	2	1.0	±	-
	1200	24	62	200	33	0	2	0	0	35	34(17.0)	1	0.5	+	-
	1600 A	24	2	100	72	2	0	0	0	74	74(74.0)	4	0.0	+	-
MMC	0.03	24	79	200	37	19	5	0	0	61	59(29.5)	2	0.0	+	-

Abbreviations; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), frg:fragment, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MMC:mitomycin C(positive control)

a) Dimethyl sulfoxide was used as solvent.

b) Two hundred cells were analyzed in each group except 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

c) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

A: The color of the medium was changed yellow and it indicated that pH of the medium became low.

## 2-エチル酪酸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 2-Ethylbutyric acid by Oral Administration in Rats

#### 要約

2-エチル酪酸は、抗痙攣薬のバルプロ酸の類縁化学物質として知られている有機酸である。本物質の安全性評価の資料を得るために、2-エチル酪酸0(媒体対照、コーン油)、10、50および250 mg/kgを10週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット(各13匹/群)に、交配前2週間から2週間の交配期間を経て、雄は42日間、交尾した雌は妊娠期間を経て分娩後4日まで、交尾したが分娩しなかった雌は妊娠25日相当日まで、それぞれ連日投与して翌日剖検し、雌雄動物に対する反復投与毒性および生殖発生毒性を検討した。また、出生児は哺育4日まで観察して剖検し、出生児に対する影響も検討した。結果は以下のように要約される。

#### 1. 反復投与毒性

雌雄ともに被験物質投与に起因する、死亡および瀕死動物は認められなかった。

雌雄ともに250 mg/kg投与群において、投与後一過性の流涎が1例ずつに認められた他に、被験物質投与に起因した一般状態の異常は認められなかった。また、体重増加および摂餌量にも投与の影響は認められなかった。

雌雄ともに250 mg/kg投与群において腎臓重量がやや増加したが、病理組織学検査では被験物質投与に起因すると考えられる異常は認められなかった。その他の器官の重量および病理組織学検査所見にも被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学検査では、50 mg/kg以上の投与群の雄において白血球数が軽度減少し、250 mg/kg投与群において血小板数が減少したが、雌では被験物質投与の影響は認められなかった。血液生化学検査成績については、雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

#### 2. 生殖発生毒性

性周期に被験物質投与の影響は認められず、全例が交尾した。また、受胎率にも投与の影響は認められなかった。

被験物質各投与群の妊娠期間は対照群と同様であり、出産率にも被験物質投与の影響は認められなかった。また、妊娠黄体数、着床数、着床率、産児数および分娩率といった出生までの胚および胎児の生存性にも投与の影響は認められなかった。しかし、50 mg/kg以上の投与群において、少数例に産児を集める行動や胎盤を処理する行動の欠如、あるいは分娩の遅延といった分娩異常が

認められた。さらに、250 mg/kg投与群では出生産児数が減少し、生児出産率および出生率が減少し、このために、哺育4日における生存産児数も減少した。哺育0日および4日における性比ならびに新生児の4日の生存率には投与の影響は認められず、出生児の体重にも投与の影響は認められなかった。形態異常を示す出生児も認められなかった。

以上の試験成績から、本試験条件下における2-エチル酪酸の無作用量は、反復投与毒性に関しては、雄では10 mg/kg/dayであり、雌では50 mg/kg/dayと推定された。生殖発生毒性に関しては、雄では250 mg/kg/dayであり、雌では10 mg/kg/dayと推定され、出生児では50 mg/kg/dayであると推定された。

#### 方法

##### 1. 被験物質

本試験に使用した2-エチル酪酸(ロット番号:01-91101, 純度:99.2%, 不純物として水分0.03%を含有する無色透明の液体)は、チッソ株式会社(熊本)から提供を受けたもので、入手後は室温保管した。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された。

投与検体は、被験物質を秤量してコーン油(英名:corn oil, ナカライテスク(株)Lot, No. V9F1299)に溶解し、いずれの用量においても1回の投与液量が2 mL/kg体重になるように含量を調製した。投与検体の安定性については、冷蔵、遮光条件下における8日間の安定性を確認しているため、1週間に1回以上の頻度で調製し、調製後7日以内に使用した。投与検体中に含まれる被験物質の含量は秦野研究所において確認した。

##### 2. 使用動物および飼育方法

試験には、日本チャールス・リバー(株)厚木飼育センター生産のSprague-Dawley系(Crj:CD(SD)IGS, SPF)ラットを使用した。雌雄動物は7週齢で購入し、入荷後6日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間毎日一般状態を観察して異常が認められなかった動物を、さらに2週間予備飼育した。この間、雄は一般状態を観察し、雌は一般状態を観察するとともに性周期を観察した。雌雄とも投与開始前日に体重を測定し、体重別層化無作為抽出法により群分けした。雌動物については、入荷後7日から群分け日まで性周期を毎日観察し、定期的に発情を回帰している動物を選択して群分けに用いた。

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/時間、照明12時間(7~19時点灯)にそれぞれ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))および飲料水(水道水、秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。妊娠18日(腔栓あるいは精子発見日=妊娠0日)以後の母動物は、ラット用プラスチック製繁殖ケージに収容し、哺育5日(哺育0日=分娩日)まで紙パルプ製チップ(ALPHA-dri、加商(株))を床敷として供給して飼育した。

### 3. 投与量の設定および投与方法

本試験における投与量は、本試験に先立ち実施した予備試験の結果に基づいて決定した。すなわち、本試験と同系統のラット各群雌雄各5匹に、2-エチル酪酸をコーン油に溶解して、0、250、500あるいは1000 mg/kgを2週間反復経口投与し、その間、一般状態を観察して体重推移、摂餌量、尿の性状を調べた後、最終投与後に絶食してその翌日に剖検し、器官重量を測定した。その結果、1000 mg/kg投与により投与初期に自発運動が減少し、体重増加および摂餌量が抑制された。その後は流産が認められるようになり、呼吸異常を示した雄の1例は瀕死状態に至った。さらに、2週間の反復投与後には前胃粘膜の肥厚が認められ、雌雄の肝臓重量が増加し、雄の脾臓が腫大して雌の腎臓重量が増加した。これらの結果ならびに、本試験では投与期間がさらに延長し、雌には妊娠、分娩および哺育といった生理的負荷が加えられることを考慮すると、1000 mg/kgは、耐量を超える量であると推測された。一方、250 mg/kgおよび500 mg/kg投与群は、瀕死状態に至らなかったものの呼吸異常も認められ、肝臓および腎臓重量の増加傾向が認められた。また、呼吸異常を認めなかった雄には脾臓重量の増加傾向が認められた。さらに、器官形成期の妊娠ラットに2-エチル酪酸を150 mg/kg反復投与すると、母動物の一部が呼吸異常を示して瀕死あるいは死に至ることが報告されていることから<sup>1)</sup>、本試験における高用量には、予備試験において2週間の生存が確認された250 mg/kgを設定し、以下公比5で除して、中用量には50 mg/kgを、低用量には10 mg/kgを設定することとした。

### 4. 観察および検査

#### 1) 一般状態観察

雌雄とも、全例について毎日、投与前後に一般状態を観察し、症状が発現した場合は、速やかな回復が期待されない所見を除き、症状の発現している間、断続的に可能な限り観察を継続した。死亡例については発見後体重を測定して剖検した。

#### 2) 体重

雌雄の全例について体重を測定した。測定は、雄では投与1(投与開始日)、7、14、21、28、35、42日および解剖日に行い、雌では、交尾を確認するまでは投与1、7、14、21日に、交尾確認後は、妊娠0、7、14、20日に、

分娩後は哺育0、4日および解剖日に行った。分娩しなかった例は、妊娠26日相当日の剖検日に測定した。これらのうち、投与21日の雌については、交尾が確認されていない動物についてのみ測定したので評価の対象から除外した。

#### 3) 摂餌量

雌雄の全例について投与1~2、7~8および14~15日に摂餌量を測定した。これらの他に、雄では投与14~15、29~30、35~36および41~42日に、雌では妊娠0~1、7~8、14~15および20~21日ならびに分娩後の哺育3~4日にも測定した。

#### 4) 性周期

雌の全例について群分け日までの観察に引き続き、交尾確認日まで性周期を観察した。腔スミア標本の細胞像から性周期を判定し、発情期の回帰間隔を基に性周期のタイプを、4日周期、4および5日周期ならびに不正性周期に分類し、投与開始後性周期が変化した動物の頻度を群毎に算出した。また、群ごとに平均発情回帰日数(個体毎の発情期から次回発情期までの日数の平均)を求めた。

#### 5) 交配

雌雄ともに2週間投与後(投与15日)の12週齢から交尾を確認するまで、2週間を限度として同群内の雌雄1:1で連日同居させた。交配期間中は、毎朝、腔スミア中の精子、あるいは腔栓の有無を確認した。これらのうちのいずれかが確認された雌動物は、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。交配結果から、各群について交尾率 $[(\text{交尾動物数}/\text{交配動物数}) \times 100, \text{\%}]$ を求め、剖検時に子宮に着床痕の確認された雌動物を受胎動物として受胎率 $[(\text{受胎動物数}/\text{交尾動物数}) \times 100, \text{\%}]$ を算出した。また、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数も求めた。

#### 6) 分娩・哺育観察

各群とも、交尾した雌は、全例を自然分娩させて哺育させた。分娩の確認は、妊娠21日から分娩が確認されるまで、妊娠25日を限度として毎日行い、11時までには分娩が完了した例についてその日を哺育0日とした。分娩状態を直接観察できた例については、異常の有無を断続的に観察し、直接観察ができなかった例については、分娩前後の一般状態および産児の状態から異常の有無を判断した。妊娠25日相当日までに分娩が確認されない動物は翌日剖検し、子宮に着床痕の認められなかった例を不妊と判定した。

分娩を確認した全例について妊娠期間(妊娠0日~分娩日の日数)を算定し、出産率 $[(\text{生児出産雌数}/\text{受胎動物数}) \times 100, \text{\%}]$ を各群について求めた。また、哺育1日から毎日、哺育状態を観察し、哺育5日の剖検において数えられた着床数および妊娠黄体数から着床率 $[(\text{着$



床数/妊娠黄体数)×100, %) を算出した。

出生児は、哺育0日に、雌雄別に産児数(生存児+死亡児)を調べ、分娩率 [(産児数/着床痕数)×100, %], 生児出生率 [(出生生児数/着床痕数)×100, %] および出生率 [(出生生児数/産児数)×100, %] を算出した。生存児については外表奇形の有無を観察した。翌日(哺育1日)から哺育4日まで毎日一般状態を観察し、生児数と死亡児数を雌雄別に数えて新生児の4日の生存率 [(哺育4日の生児数/哺育0日の生児数)×100, %] を算出した。生存児については、哺育0および4日に個別の体重を測定し、各腹ごとに雌雄別の平均値を算出するとともに哺育0および4日における性比 [(哺育0あるいは4日雄生児数/哺育0あるいは4日雌生児数)×100] を算出した。

## 7) 剖検

### (1) 雄

投与42日に絶食を開始し、その18~24時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部後大静脈から抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを用いて血液を採取し、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測定に用いた。次いで、腹部後大静脈から抗凝固剤としてEDTA-3Kを用いて採血し、その他の血液学検査に用いた。さらに、腹部後大静脈から抗凝固剤としてヘパリンを用いて採血し、血液生化学検査に用いた。動物は、採血終了後に放血致死させ解剖し、器官・組織の肉眼観察を行った。また、全例について、脳、下垂体、脊髄、上部気道を含む上顎、甲状腺、心臓、肺、気管、気管支、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、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿骨髄、精巣、精巣上体、前立腺腺葉、凝固腺を含む精囊、病変部を採取し、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体の重量を測定して相対重量を算出した。採取した器官および組織のうち、精巣ならびに精巣上体はブアン液(長期保存は0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液を使用)に固定し、その他は0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定して保存した。肺は、摘出前に0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液を注入してから固定・保存した。

### (2) 雌

死亡例は発見後直ちに剖検した。交尾したが分娩しなかった例については妊娠25日相当日に、また、分娩した例は哺育4日に絶食を開始し、いずれも絶食開始18~24時間後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で雄と同様に採血後、放血致死させ解剖し、器官・組織の肉眼観察を行った。また、全例について脳、下垂体、脊髄、上部気道を含む上顎、甲状腺、心臓、肺、気管、気管支、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、膀胱、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、坐骨神経、大腿骨髄、卵巣、子宮、膈および病変部を採取し、脳、心臓、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓および副腎の重量を測定して相対重量を算出した。子宮に

ついては着床数を数え、分娩した雌の卵巣については実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数えた後、いずれも0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定して保存した。肺は雄と同様に0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液による注入固定を行った。

### (3) 出生児

死亡児は発見後速やかに剖検し、0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定して保存した。生存児は全例を哺育4日にエーテル吸入により致死させ剖検し、異常の認められた器官を0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定し保存した。

## 8) 血液学検査

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は全自動血液凝固測定装置CA-1000(東亜医用電子)を用いて光散乱法によって測定した。また、血液自動分析装置CELL-DYN3500SL(ダイナボット)を用いて赤血球数(RBC)、平均赤血球容積(MCV)ならびに血小板数を電気抵抗法で、白血球数および白血球分類をフローサイトメトリー・レーザー光散乱法で測定し、血色素量を吸光度法により測定した。さらに、RBC、MCVあるいは血色素量からヘマトクリット値、平均赤血球血色素濃度(MCHC)あるいは平均赤血球血色素量(MCH)を算出した。

## 9) 血液生化学検査

遠心方式生化学自動分析装置COBAS-FARA(ロシュ)を用い、総蛋白濃度はビウレット法で、アルブミン濃度はBCG法で、尿素窒素濃度(BUN)は、ウレアーゼGl.DH法で、クレアチニン濃度はJaffé法で、ブドウ糖濃度はグルコキナーゼG6PDH法で、総コレステロール濃度はCOD・DAOS法で、トリグリセライド濃度はGPO・DAOS法で、アルカリフォスファターゼ活性(ALP)はGSCC法で、GPTおよびGOT活性はIFCC法で、γ-GTP活性はγ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法で、総ビリルビン濃度はJendrassik/Grof法で、無機リン濃度はモリブデン酸直接法で、カルシウム濃度はOCPC法で測定し、A/G比は算出した。また、全自動電解質分析装置EA05(A&T)を用い、イオン電極法によって、ナトリウム、カリウムおよび塩素の各濃度を測定した。

## 10) 病理組織学検査

雄から得られた固定保存器官のうち、精巣および精巣上体は全例について、その他は対照群5例および250 mg/kg投与群6例について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標本作製し、病理組織学検査を実施した。

雌では採取した器官および組織のうち、卵巣は全例について、その他は不妊例を除く対照群7例および250 mg/kg投与群5例について雄と同様に病理組織標本作製し、病理組織学検査を実施した。

病変部については雌雄ともに脱毛を除き病理組織学検

査を行った。

## 5. 統計解析

性周期の変化した動物の頻度、交尾率、受胎率ならびに出生児の形態異常の出現頻度についてはFisherの直接確率検定を行った。病理組織学検査所見では、グレード分けをしたデータはMann-WhitneyのU検定により、陽性グレードの合計値はFisherの直接確率片側検定により対照群と2-エチル酪酸各投与群との間の有意差検定を行った。その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいはlitterごとの平均値を1標本として先ずBartlett法により各群の分散の一樣性について検定を行った。分散が一樣である場合には一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められる場合はDunnett法により多重比較を行った。一方、いずれかの群で分散が0となる場合および分散が一樣でない場合には、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、群間に有意性が認められる場合には、Dunnett型の検定法により多重比較を行った。有意水準はいずれも5%とした。

## 結果

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 死亡および一般状態

雄動物に死亡はなかった。雄では250 mg/kg投与群の1例に投与後一過性の流涎が認められた他に、被験物質投与に起因すると考えられる異常は観察されなかった。

雌では対照群の1例が投与38日の分娩中に死亡した。死亡するまで異常は全く観察されなかったが、病理組織学検査において肺および腎臓系球体の毛細血管内にフィブリン血栓が認められたことから、フィブリン血栓に関連した原因により死亡したものと推測される。この他に死亡および瀕死例はなかった。雌の一般状態については、250 mg/kg投与群の1例に投与後一過性の流涎が認められた他に被験物質投与に起因すると考えられる異常は観察されなかった。

#### 2) 体重(Figs. 1, 2)

雌雄ともにいずれの時期の体重も対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められず、体重増加に被験物質投与の影響は認められなかった。

#### 3) 摂餌量(Figs. 3, 4)

雌雄ともにいずれの時期の摂餌量も対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められず、被験物質投与の影響は認められなかった。

#### 4) 器官重量(Table 1)

雌雄ともに250 mg/kg投与群において腎臓重量が増加し、雄では相対重量のみが、また、雌では重量および相対重量のいずれもが対照群と比較して有意に増加した。その他の器官については雌雄ともに対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

### 5) 血液学検査所見(Table 2)

雄では赤血球系の各測定値には対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。白血球系については、50 mg/kg以上の投与群において白血球数が対照群と比較して有意( $p<0.05$ )に減少した。また、白血球百分比については対照群との間に有意差は認められなかったが、リンパ球以外の白血球比率はむしろ対照群より高い値を示していた。凝固系については、250 mg/kg投与群において血小板数が有意( $p<0.01$ )に減少していたが、血液凝固時間には対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

雌ではいずれの検査項目についても対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

### 6) 血液生化学検査所見(Table 3)

雄ではいずれの検査項目についても対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

雌では、50 mg/kg以上の投与群において $\gamma$ -GTP活性が対照群と比較して軽度ながら有意( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ )に上昇した。また、対照群と比較すると、50 mg/kg投与群において総ビリルビン濃度の有意( $p<0.01$ )な減少およびカルシウム濃度の有意( $p<0.01$ )な増加が認められたが、その他の投与群については対照群との間に有意差は認められなかった。上記以外の項目については、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

### 7) 剖検所見

雄では、50 mg/kgおよび250 mg/kg投与群の各2例に肝臓および腎臓の腫大が認められ、そのうちの250 mg/kg投与群の1例には右側腎臓の皮質に淡色域が認められた。これらの他に250 mg/kg投与群では胸腺の腫大が1例に、小型化が2例に観察された。生殖器の変化としては、対照群および250 mg/kg投与群の2および1例の精巣上体に黄色あるいは乳白色の結節が片側性に観察された。

雌では、妊娠26日相当日に剖検した不妊例2例については、対照群の1例に所見は認められなかったが、50 mg/kg投与群の1例の胸腺に小型化が認められた。哺育5日の定期解剖では胸腺の小型化が対照群を含む各投与群に1例ずつ認められた。また、対照群の2例および10 mg/kg投与群の1例の腺胃粘膜に赤色点が認められ、10 mg/kg投与群の別の1例において前胃粘膜の肥厚が観察された。50 mg/kg投与群では1例の左側子宮角に赤色域が観察された。この他、対照群では1例に左側子宮角の限局性拡張が認められ、一般状態の観察において右腋窩皮下に結節の認められた例にはその部位に腫瘍が認められた。

### 8) 病理組織学検査所見(Table 4)

雄では精巣、精巣上体、肝臓、腎臓、脾臓、肺および気管、心臓、および甲状腺に所見が認められたが、いずれも被験物質投与に起因した変化ではなかった。

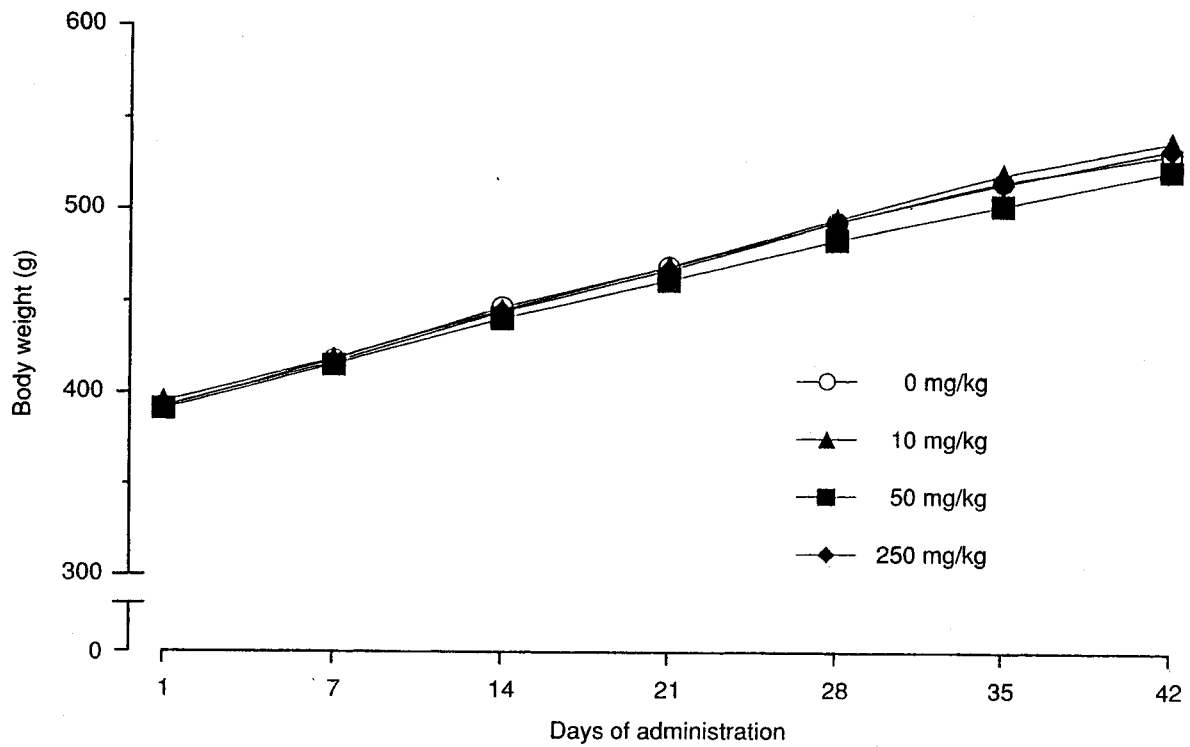


Fig. 1 Body weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

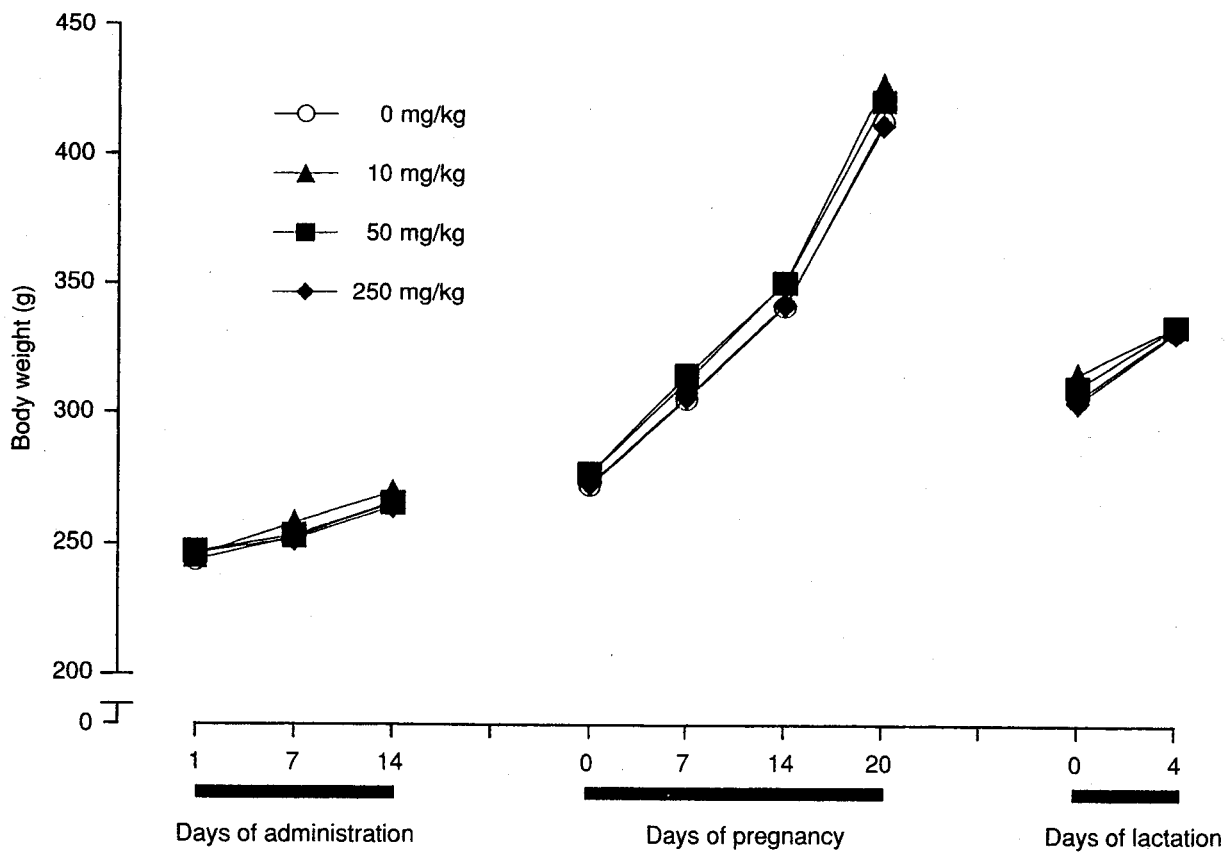


Fig. 2 Body weight of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

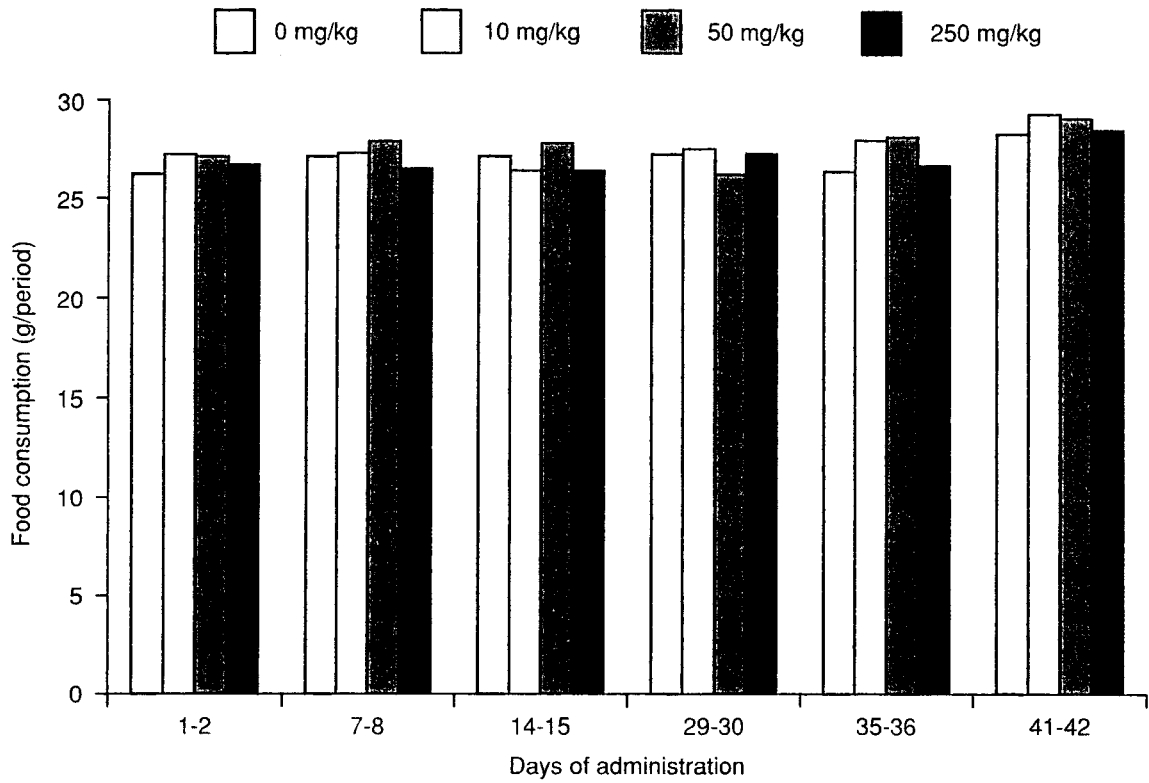


Fig. 3 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

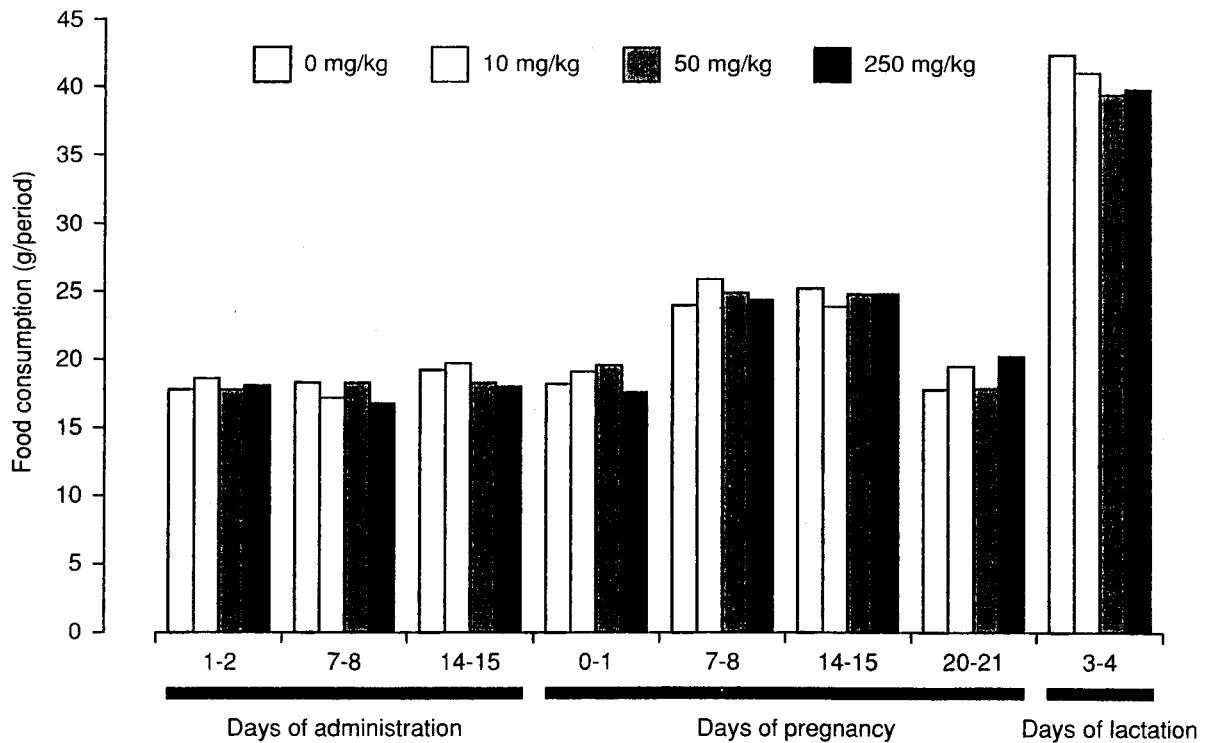


Fig. 4 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

雌でも子宮、肝臓、腎臓、脾臓、肺および気管、胸腺、膀胱、甲状腺に所見が認められたが、いずれも被験物質投与に起因した変化ではなかった。また、対照群の1例において右腋窩皮下に腫瘤が認められた例には、腋窩部の乳腺にリンパ球およびマクロファージの浸潤が認められ、乳管内には細胞残屑が認められた。

## 2. 生殖発生毒性

### 1) 性周期所見 (Table 5)

投与開始後に性周期の変化した動物の頻度および平均発情回帰日数には、対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

### 2) 交配成績 (Table 5)

全例が交尾し、対照群および50 mg/kg投与群の各1例を除き受胎した。また、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にも対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

### 3) 分娩および哺育所見

対照群において分娩を直接観察した6例中1例は、妊娠22日の分娩中に死亡したが、分娩状態に異常は認められなかった。しかし、娩出された産児の中には皮下出血が認められたことから、これら2例の娩出時には分娩困難があったものと推測された。被験物質投与群では、10 mg/kg投与群の9例、50 mg/kg投与群の5例、および250 mg/kg投与群の9例の分娩を直接観察した。これらのうち、50 mg/kg投与群の2例には産児を集める行動が認められず、出生児が多数死亡した例が認められた。また、妊娠22日に分娩を開始したが、分娩が遅延して4時間が経過しても3匹しか分娩せず、翌日に死亡児1匹を含む18匹の分娩が確認された例も認められた。250 mg/kg投与群の1例には妊娠23日の分娩時に胎盤処理および産児を集める行動が認められず出生児の多数が死亡した例が認められ、この例の分娩状態は不良であったと判断された。しかし、10 mg/kg投与群の動物に分娩状態の異常は観察されず、妊娠期間および出産率については対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった (Table 6)。

哺育状態の異常はいずれの投与群の動物にも認められなかった。

### 4) 黄体数および着床数 (Table 6)

対照群と被験物質投与群の間に有意差は認められず、排卵および着床には被験物質投与の影響は認められなかった。

### 5) 出生児所見 (Table 6)

いずれの投与群の動物も行動を含む一般状態に異常は認められなかった。

出生児の生存性を対照群と比較すると、250 mg/kg投与群において出産児数、生児出産率および出生率が有意 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) に低下した。産児数および分娩率

もやや低下したが、有意差は認められなかった。哺育0日における性比については対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。哺育期間中にはいずれの投与群においても死亡児が増加することはなく、新生児の4日の生存率は対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。しかし、250 mg/kg投与群では哺育0日において低下していた生児数がそのまま維持されたため、対照群と比較すると、哺育4日における生児数に有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。哺育4日における性比については対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

体重については雌雄ともにいずれの時期も対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかった。

生存産児の形態観察 (表には示さず) では、分娩途中で母動物が死亡した対照群の1腹の雌産児2例に、胸部および両前肢皮下に血液の貯留、皮膚の乾燥、ならびに左側後肢末端の皮下血腫および尾の小血腫あるいは吻部および両後肢の皮下血腫が認められたが、内臓に異常は観察されなかった。死亡児の形態に異常は観察されなかった。哺育4日における剖検では50 mg/kg投与群の1腹の雌2例に曲尾が観察された他に、いずれの投与群にも異常は観察されなかった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

雌雄ともに250 mg/kg投与群において流涎が観察されたが、各1例に投与後一過性に認められた軽微な変化であった。

予備試験では1000 mg/kgの反復投与を受けた雄が呼吸異常を示して瀕死状態に至ったが、本試験では瀕死あるいは死亡動物は認められなかった。Narotskyら<sup>1)</sup>は、器官形成期にあたる妊娠時期に2-エチル酪酸を150あるいは250 mg/kg経口投与すると母動物が誤嚥により呼吸異常を示して死亡することを報告し、これは被験物質の消化管に対する刺激作用によるものであると推定している。予備試験において瀕死状態に至った動物に誤嚥は認められなかったが、呼吸異常の成因を知るために本試験では病理組織学検査に上部気道を加えた。また、予備試験のそれより最高用量を減らし、胃管の外壁に被験物質が全く付着しないように投与したところ、死亡および瀕死のみならず呼吸異常も観察されなかった。病理学検査においても上部気道から肺に至るまで呼吸器に異常は観察されなかったため、予備試験でみられた呼吸異常の成因を知ることはできなかった。

体重増加および摂餌量には被験物質投与の影響は認められなかった。

雌雄ともに、250 mg/kg投与群において腎臓重量あるいはその相対重量が増加した。高用量群に認められた変化であり、予備試験においても腎臓重量の増加が雌雄に認められていたことから被験物質投与による影響であると考えられる。しかし、血液生化学検査では腎機能を示す各指標に被験物質投与の影響は認められず、病理組織

学検査においても異常は観察されなかったことからその成因は不明である。その他の器官の重量には雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学検査では、50 mg/kg以上の投与群の雄において白血球数が軽度減少し、250 mg/kg投与群では血小板数も減少した。いずれも軽微な変化であるが、用量に依存して変動していることから被験物質投与に起因した変化であると考えられる。白血球数の減少については、リンパ球以外の白血球比率はむしろ対照群より高い値を示していたことから、リンパ球数の減少に由来するものと推測される。雌動物の血液学検査には投与の影響は認められなかった。

雌の血液生化学検査において50 mg/kg以上の投与群のγ-GTP活性がやや上昇した。しかしその程度はごく軽微であり、50 mg/kgおよび250 mg/kg両群間で被験物質の用量に関連した変化が認められなかった。また、その他の肝機能を表す指標に投与の影響は認められず、肝臓重量および肝臓の病理組織学検査においても投与に起因する異常は観察されなかったことから、50 mg/kg以上の投与群において認められたγ-GTP活性の僅かな上昇は偶発的な変化であると判断された。その他の変化はいずれも被験物質の投与量とは無関係に認められた変化であることから被験物質投与による影響ではないものと考えられる。雄の血液生化学検査成績には投与の影響は認められなかった。

病理学検査ではいずれの器官にも被験物質投与の影響は認められなかった。

## 2. 生殖発生毒性

雌動物について観察した性周期には被験物質投与の影響は認められなかった。また、交配成績にも被験物質投与の影響は認められなかったことから、250 mg/kgまでの2-エチル酪酸は親動物の生殖能力に影響を及ぼさないものと考えられる。

対照群の1例が分娩中にフィブリン血栓に関連した原因により死亡した。分娩状態の異常は50 mg/kg以上の投与群にも少数例ずつ認められたが、いずれも分娩翌日以降の哺育状態には異常が認められなかったことから、対照群の死亡例とは異なる原因により分娩状態に異常をきたしたものと推測される。

250 mg/kg投与群において出産生児数が減少した。着床数には投与の影響は認められず、産児数は軽度な減少に留まっていたことから、出生時の死亡が増加したことによるものと考えられる。250 mg/kg投与では、1例ではあるが、分娩状態の異常が認められ、その例では生児出産率および出生率も著しい低値(いずれも38.5%)を示した。その他の動物の分娩状態に異常は認められなかったが、250 mg/kg投与では生児出産率および出生率が有意に低下していたことから、250 mg/kgの2-エチル酪酸投与は分娩に影響を及ぼし、産児の生存性を低下させるものと考えられる。50 mg/kg投与群においても2例に分娩の異常が観察された。2例のうち1例は生児出産率および出生率がやや低かった(いずれも68.8%)。また、50

mg/kg投与群の生児出産率および出生率は対照群との間に有意差は認められなかったが、やや低い値を示していたことから50 mg/kg投与も分娩に影響を及ぼす可能性があるものと推測される。10 mg/kg投与群では分娩および出生児の生存性のいずれにも投与の影響は認められなかった。出生児の性比および発育ならびに分娩翌日以降の生存性についてはいずれの投与群においても被験物質投与の影響は認められなかった。

2-エチル酪酸は、催奇形物質であるバルプロ酸と類似した化学構造を有する化学物質である。本試験では50 mg/kg投与群の同腹の2例に曲尾が認められた。曲尾は本系統のラットでしばしば観察される奇形であり、用量とは無関係に1腹のみに観察されたことから、本例は自然発生によるものと判断された。従って、250 mg/kgまでの投与量の2-エチル酪酸に催奇形性はないものと判断された。

## 3. 無作用量

以上の試験成績から、本試験条件下における2-エチル酪酸の無作用量は、雄に対する反復投与毒性に関しては、白血球数が軽度減少したことから10 mg/kg/dayと推定された。雌に対する反復投与毒性に関しては、投与後一過性の流涎が認められ、腎臓重量およびその相対重量が増加したことから50 mg/kg/dayと推定された。生殖発生毒性に関しては雄では250 mg/kg/dayと推定された。雌では50 mg/kg/day以上の投与群の少数例に分娩異常が認められたことから10 mg/kg/dayであると推定された。出生児では、250 mg/kg/day投与群において出生日における生存性が低下したことから50 mg/kg/dayであると推定された。

## 文献

- 1) M. G. Narotsky, E. Z. Francis, R. J. Kavlock, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **22**, 251(1994).

## 連絡先

試験責任者：代田真理子

試験担当者：佐藤昌子、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: Mariko Shirota (Study director)

Masako Sato, 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 Organ weights of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
<b>Male</b>				
Number of animals	13	13	13	13
Final body weight (g)	502.1 ± 47.6	509.8 ± 52.2	492.1 ± 52.0	501.7 ± 45.2
Brain (g)	2.02 ± 0.07	2.02 ± 0.08	2.01 ± 0.08	1.99 ± 0.10
(g%)	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.05	0.40 ± 0.04
Heart (g)	1.36 ± 0.13	1.38 ± 0.21	1.35 ± 0.13	1.36 ± 0.10
(g%)	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02
Thymus (mg)	270.5 ± 75.2	270.4 ± 78.9	290.1 ± 129.6	259.6 ± 98.2
(mg%)	53.3 ± 11.4	52.7 ± 12.8	58.1 ± 21.9	51.5 ± 18.5
Liver (g)	13.75 ± 2.19	13.80 ± 2.41	13.64 ± 2.58	13.89 ± 2.05
(g%)	2.73 ± 0.21	2.69 ± 0.23	2.76 ± 0.30	2.76 ± 0.20
Kidneys (g)	3.05 ± 0.42	3.13 ± 0.37	3.09 ± 0.26	3.36 ± 0.29
(g%)	0.61 ± 0.06	0.61 ± 0.03	0.63 ± 0.06	0.67 ± 0.05*
Spleen (g)	0.82 ± 0.15	0.83 ± 0.13	0.83 ± 0.14	0.77 ± 0.09
(g%)	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.02
Adrenal glands (mg)	57.1 ± 6.1	53.5 ± 10.9	58.6 ± 9.2	54.0 ± 6.3
(mg%)	11.5 ± 1.5	10.5 ± 1.6	12.0 ± 2.1	10.8 ± 1.3
Testes (g)	3.25 ± 0.33	3.26 ± 0.27	3.36 ± 0.32	3.08 ± 0.24
(g%)	0.65 ± 0.07	0.64 ± 0.07	0.69 ± 0.11	0.62 ± 0.07
Epididymides (g)	1.21 ± 0.10	1.24 ± 0.13	1.25 ± 0.10	1.18 ± 0.11
(g%)	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.24 ± 0.03
<b>Female</b>				
Number of animals	11	13	12	13
Final body weight (g)	307.8 ± 27.0	309.5 ± 29.4	306.6 ± 17.3	306.1 ± 20.4
Brain (g)	1.89 ± 0.10	1.91 ± 0.05	1.91 ± 0.08	1.92 ± 0.06
(g%)	0.62 ± 0.05	0.62 ± 0.06	0.62 ± 0.03	0.63 ± 0.04
Heart (g)	0.93 ± 0.09	0.90 ± 0.06	0.92 ± 0.09	0.93 ± 0.08
(g%)	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Thymus (mg)	169.7 ± 59.3	172.7 ± 70.8	197.4 ± 78.6	185.4 ± 81.2
(mg%)	54.8 ± 17.7	55.2 ± 19.9	64.3 ± 24.5	60.2 ± 26.0
Liver (g)	10.24 ± 1.29	9.85 ± 0.66	10.19 ± 0.78	10.25 ± 0.94
(g%)	3.32 ± 0.22	3.19 ± 0.22	3.32 ± 0.12	3.35 ± 0.24
Kidneys (g)	1.89 ± 0.16	1.94 ± 0.16	2.01 ± 0.21	2.12 ± 0.24*
(g%)	0.62 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.65 ± 0.05	0.70 ± 0.08*
Spleen (g)	0.71 ± 0.09	0.67 ± 0.08	0.69 ± 0.07	0.68 ± 0.13
(g%)	0.23 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.04
Adrenal glands (mg)	69.3 ± 8.4	72.5 ± 10.4	67.9 ± 10.3	67.7 ± 7.9
(mg%)	22.5 ± 1.8	23.6 ± 3.8	22.2 ± 3.4	22.2 ± 2.6

Values represent mean ± S.D.

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

Table 2 Hematological examination of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
<b>Male</b>				
Number of animals	13	13	13	13
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	850 $\pm$ 48	825 $\pm$ 42	850 $\pm$ 60	828 $\pm$ 31
Hemoglobin (g/dL)	15.2 $\pm$ 0.7	15.0 $\pm$ 0.5	15.1 $\pm$ 0.9	15.0 $\pm$ 0.6
Hematocrit (%)	44.6 $\pm$ 1.9	44.2 $\pm$ 1.6	44.5 $\pm$ 2.9	44.5 $\pm$ 1.6
MCV (fL)	52.5 $\pm$ 1.4	53.6 $\pm$ 1.2	52.4 $\pm$ 1.8	53.7 $\pm$ 1.4
MCH (pg)	17.9 $\pm$ 0.5	18.3 $\pm$ 0.5	17.8 $\pm$ 0.6	18.1 $\pm$ 0.5
MCHC (g/dL)	34.1 $\pm$ 0.3	34.0 $\pm$ 0.4	34.0 $\pm$ 0.4	33.8 $\pm$ 0.4
Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	111.4 $\pm$ 20.3	103.8 $\pm$ 13.2	103.6 $\pm$ 10.2	93.8 $\pm$ 7.4**
PT (sec)	16.2 $\pm$ 3.4	14.7 $\pm$ 1.3	15.9 $\pm$ 3.0	15.9 $\pm$ 2.6
APTT (sec)	22.1 $\pm$ 2.6	21.1 $\pm$ 2.4	21.9 $\pm$ 2.3	21.5 $\pm$ 1.9
WBC ( $\times 100/\text{mm}^3$ )	87.8 $\pm$ 20.2	75.1 $\pm$ 23.5	65.0 $\pm$ 20.1*	64.7 $\pm$ 16.0*
Differential leukocyte counts (%)				
Neutrophil (%)	13 $\pm$ 4	14 $\pm$ 3	15 $\pm$ 5	16 $\pm$ 5
Eosinophil (%)	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1
Basophil (%)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte (%)	3 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2
Lymphocyte (%)	82 $\pm$ 4	79 $\pm$ 5	79 $\pm$ 6	78 $\pm$ 7
<b>Female</b>				
Number of animals	11	13	12	13
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	646 $\pm$ 32	633 $\pm$ 48	650 $\pm$ 46	657 $\pm$ 40
Hemoglobin (g/dL)	12.7 $\pm$ 0.7	12.5 $\pm$ 0.7	12.7 $\pm$ 0.7	12.9 $\pm$ 0.6
Hematocrit (%)	37.5 $\pm$ 2.2	36.9 $\pm$ 2.1	37.4 $\pm$ 2.2	38.1 $\pm$ 1.9
MCV (fL)	58.1 $\pm$ 1.5	58.4 $\pm$ 2.0	57.6 $\pm$ 1.8	58.1 $\pm$ 3.1
MCH (pg)	19.7 $\pm$ 0.6	19.8 $\pm$ 0.7	19.5 $\pm$ 0.7	19.7 $\pm$ 1.0
MCHC (g/dL)	33.9 $\pm$ 0.5	33.9 $\pm$ 0.3	33.9 $\pm$ 0.4	34.0 $\pm$ 0.3
Platelet ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	111.7 $\pm$ 15.9	119.1 $\pm$ 11.5	110.2 $\pm$ 15.0	102.8 $\pm$ 10.8
PT (sec)	13.2 $\pm$ 0.7	13.2 $\pm$ 0.7	12.9 $\pm$ 0.5	13.2 $\pm$ 0.6
APTT (sec)	17.7 $\pm$ 2.4	16.6 $\pm$ 1.0	16.9 $\pm$ 0.8	16.7 $\pm$ 0.8
WBC ( $\times 100/\text{mm}^3$ )	97.4 $\pm$ 24.5	91.2 $\pm$ 22.8	96.4 $\pm$ 25.8	90.0 $\pm$ 18.8
Differential leukocyte counts (%)				
Neutrophil (%)	19 $\pm$ 5	24 $\pm$ 9	21 $\pm$ 5	20 $\pm$ 6
Eosinophil (%)	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0
Basophil (%)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Monocyte (%)	8 $\pm$ 5	5 $\pm$ 3	5 $\pm$ 2	6 $\pm$ 3
Lymphocyte (%)	72 $\pm$ 9	70 $\pm$ 10	72 $\pm$ 6	73 $\pm$ 5

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 in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
<b>Male</b>				
Number of animals	13	13	13	13
Total protein (g/dL)	5.5 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.4 ± 0.3	5.4 ± 0.3
Albumin (g/dL)	3.2 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.2
A/G	1.36 ± 0.13	1.26 ± 0.11	1.28 ± 0.15	1.34 ± 0.09
BUN (mg/dL)	16 ± 3	17 ± 3	17 ± 3	16 ± 2
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	152 ± 21	144 ± 24	140 ± 15	148 ± 17
Total cholesterol (mg/dL)	44 ± 7	44 ± 7	40 ± 10	41 ± 9
Triglyceride (mg/dL)	47 ± 18	41 ± 13	35 ± 14	39 ± 18
ALP (U/L)	193 ± 42	214 ± 39	233 ± 53	225 ± 44
GPT (U/L)	30 ± 3	32 ± 4	31 ± 5	39 ± 29
GOT (U/L)	67 ± 10	66 ± 6	69 ± 10	79 ± 35
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 0	0 ± 1
Total bilirubin (mg/dL)	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02
Inorganic phosphate (mg/dL)	5.7 ± 0.7	5.8 ± 0.8	5.8 ± 0.8	6.1 ± 0.7
Ca (mg/dL)	8.9 ± 0.2	8.8 ± 0.3	8.8 ± 0.3	8.9 ± 0.2
Na (mEq/L)	145.5 ± 1.3	145.5 ± 1.1	146.3 ± 1.2	145.4 ± 1.5
K (mEq/L)	4.00 ± 0.35	3.91 ± 0.31	3.96 ± 0.25	4.10 ± 0.22
Cl (mEq/L)	109.0 ± 1.8	109.4 ± 1.5	110.0 ± 0.8	108.3 ± 1.7
<b>Female</b>				
Number of animals	11	13	12	13
Total protein (g/dL)	5.4 ± 0.4	5.4 ± 0.2	5.7 ± 0.4	5.4 ± 0.4
Albumin (g/dL)	3.1 ± 0.2	3.1 ± 0.1	3.3 ± 0.3	3.2 ± 0.2
A/G	1.34 ± 0.12	1.33 ± 0.12	1.38 ± 0.13	1.46 ± 0.18
BUN (mg/dL)	17 ± 3	15 ± 3	17 ± 3	18 ± 3
Creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	124 ± 12	128 ± 9	135 ± 13	136 ± 15
Total cholesterol (mg/dL)	49 ± 11	48 ± 14	49 ± 11	47 ± 10
Triglyceride (mg/dL)	63 ± 20	64 ± 22	76 ± 28	53 ± 18
ALP (U/L)	103 ± 25	129 ± 51	128 ± 53	138 ± 57
GPT (U/L)	40 ± 6	40 ± 5	38 ± 7	41 ± 9
GOT (U/L)	62 ± 7	65 ± 10	59 ± 8	64 ± 13
γ-GTP (U/L)	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0*	1 ± 1**
Total bilirubin (mg/dL)	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.03**	0.10 ± 0.03
Inorganic phosphate (mg/dL)	6.8 ± 0.7	6.3 ± 0.5	6.6 ± 0.9	6.6 ± 1.0
Ca (mg/dL)	9.0 ± 0.5	9.2 ± 0.3	9.7 ± 0.2**	9.4 ± 0.5
Na (mEq/L)	143.2 ± 1.0	143.7 ± 1.0	142.9 ± 1.0	143.4 ± 1.0
K (mEq/L)	4.31 ± 0.55	3.98 ± 0.27	4.04 ± 0.29	3.95 ± 0.25
Cl (mEq/L)	107.6 ± 1.7	108.4 ± 1.2	107.5 ± 1.4	107.9 ± 1.6

Values represent mean ± S.D.

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

Table 4 Histopathological findings of rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Organ [Number of animals examined]	Sex:	Male				Female			
		Dose(mg/kg)	0	10	50	250	0	10	50
Testis		[13]	[13]	[13]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Atrophy, seminiferous tubule	-	10	13	13	12				
	±	3	0	0	0				
	+	0	0	0	1				
	total	3	0	0	1				
Epididymis		[13]	[13]	[13]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Cell debris, lumen	-	11	13	13	12				
	±	2	0	0	0				
	+	0	0	0	1				
	total	2	0	0	1				
Spermatid granuloma	-	11	13	11	11				
	±	0	0	2	2				
	+	1	0	0	0				
	++	1	0	0	0				
	total	2	0	2	2				
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitium	-	10	13	11	11				
	±	3	0	2	2				
	total	3	0	2	2				
Prostate: ventral lobe		[5]	[0]	[0]	[6]	[0]	[0]	[0]	[0]
Cellular infiltration, lymphocyte & plasma cell, interstitium/epithelium	-	2			2				
	±	2			1				
	+	0			1				
	++	1			2				
	total	3			4				
Uterus		[0]	[0]	[0]	[0]	[7]	[0]	[1]	[5]
Dilatation, cystic, lumen, focal	-					6		1	5
	++					1		0	0
	total					1		0	0
Cellular infiltration, macrophage, with brown pigment, muscular layer	-					7		0	5
	++					0		1	0
	total					0		1	0
Liver		[5]	[0]	[2]	[7]	[7]	[0]	[0]	[5]
Fatty change, periportal	-	0		0	0	1			0
	±	4		0	5	6			5
	+	1		1	2	0			0
	++	0		1	0	0			0
	total	5		2	7	6			5
Microgranuloma	-	1		1	5	7			4
	±	4		1	0	0			1
	+	0		0	2	0			0
	total	4		1	2	0			1
Hematopoiesis, extramedullary	-	5		2	7	7			4
	±	0		0	0	0			1
	total	0		0	0	0			1
Kidney		[5]	[0]	[2]	[7]	[7]	[0]	[0]	[5]
Ectopic tissue, epididymis-like duct, cortex, right side	-	5		2	6	7			5
	++	0		0	1	0			0
	total	0		0	1	0			0
Eosinophilic body	-	3		1	5	7			5
	±	0		0	2	0			0
	+	1		1	0	0			0
	++	1		0	0	0			0
	total	2		1	2	0			0

-: Negative, ±: Very slight, +: Slight, ++: Moderate, +++: Severe, total: Total of positive grade  
[ ]: Number of animals examined

Table 4 (continued)

Organ [Number of animals examined]	Sex:	Dose(mg/kg)	Male				Female			
			0	10	50	250	0	10	50	250
Kidney			[5]	[0]	[2]	[7]	[7]	[0]	[0]	[5]
Basophilic tubule, cortex	-		2		0	4	3			3
	±		3		2	2	4			2
	+		0		0	1	0			0
	total		3		2	3	4			2
Cast, hyalin, medulla	-		5		2	6	7			5
	+		0		0	1	0			0
	total		0		0	1	0			0
Cast, hyalin, cortex	-		5		2	6	7			5
	±		0		0	1	0			0
	total		0		0	1	0			0
Cyst, cortico-medullary junction	-		4		2	7	7			5
	±		1		0	0	0			0
	total		1		0	0	0			0
Mineralization	-		4		1	7	4			3
	±		1		1	0	3			1
	+		0		0	0	0			1
	total		1		1	0	3			2
Spleen			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Hematopoiesis, extramedullary	±		1			1	0			0
	+		4			5	1			0
	++		0			0	6			5
	total		5			6	7			5
Deposit, pigment, brown	±		5			6	7			5
	total		5			6	7			5
Lung & Bronchus			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Accumulation, foam cell	-		4			4	2			3
	±		1			2	5			1
	+		0			0	0			1
	total		1			2	5			2
Heart			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Degeneration/fibrosis, myocardium	-		4			5	7			5
	±		1			1	0			0
	total		1			1	0			0
Thymus			[5]	[0]	[0]	[8]	[8]	[1]	[1]	[5]
Atrophy	-		5			8	8	1	0	4
	±		0			0	0	0	0	1
	++		0			0	0	0	1	0
	total		0			0	0	0	1	1
Urinary bladder			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Cellular infiltration, lymphocyte, lamina propria	-		5			6	7			4
	±		0			0	0			1
	total		0			0	0			1
Thyroid gland			[5]	[0]	[0]	[6]	[7]	[0]	[0]	[5]
Cellular infiltration, plasma cell & lymphocyte, interstitium	-		5			6	6			5
	±		0			0	1			0
	total		0			0	1			0
Ectopic thymus	-		5			5	7			5
	±		0			1	0			0
	total		0			1	0			0
Subcutaneous tissue of axilla			[0]	[0]	[0]	[0]	[1]	[0]	[0]	[0]
Cellular infiltration, lymphocyte & macrophage, mammary gland	±						1			
	total						1			
Cell debris, lactiferous duct, mammary gland	+						1			
	total						1			

-: Negative, ±: Very slight, +: Slight, ++: Moderate, +++: Severe, total: Total of positive grade  
 [ ]: Number of animals examined

Table 5 Estrous cycle and reproductive performance of rats in combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose(mg/kg)	0	10	50	250
Estrous cycle				
Number of females examined	13	13	13	13
Pre-treatment period				
Number of females showing 4-day cycle	13	13	13	13
Treatment period				
Number of animals showing:				
4-day cycle	12	13	13	12
4- and 5- day cycle	0	0	0	1
Irregular cycle	1	0	0	0
Mean length of estrous cycle in days				
Mean $\pm$ S.D.	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.1
Number of vaginal estrus during mating period				
Mean $\pm$ S.D.	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0
Reproductive performance				
Number of pairs examined (A)	13	13	13	13
Number of pairs copulated (B)	13	13	13	13
Copulation index [(B/A) $\times$ 100,%]	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of fertile pairs (C)	12	13	12	13
Fertility index [(C/B) $\times$ 100, %]	92.3	100.0	92.3	100.0
Pairing days until copulation				
Mean $\pm$ S.D.	2.6 $\pm$ 1.7	2.0 $\pm$ 1.1	2.8 $\pm$ 1.2	2.3 $\pm$ 1.3

Table 6 Development of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-ethylbutyric acid by oral administration

Dose (mg/kg)	0		10		50		250	
Number of pregnant females	12		13		12		13	
Number of pregnant females with live newborns	11		13		12		13	
Gestation index	91.7		100.0		100.0		100.0	
Gestation length in days	22.5 ± 0.5	(11)	22.3 ± 0.5	(13)	22.4 ± 0.5	(12)	22.6 ± 0.5	(13)
Number of corpora lutea	16.1 ± 1.4	(12)	16.0 ± 1.9	(13)	16.2 ± 2.4	(12)	15.8 ± 1.8	(13)
Number of implantations	15.2 ± 1.9	(12)	15.4 ± 1.5	(13)	15.2 ± 2.5	(12)	15.1 ± 1.6	(13)
Implantation index	94.4 ± 9.2	(12)	96.4 ± 4.6	(13)	93.7 ± 6.7	(12)	95.8 ± 4.4	(13)
Day 0 of lactation								
Number of newborns	14.4 ± 2.2	(11)	14.5 ± 1.8	(13)	14.3 ± 3.2	(12)	13.5 ± 2.0	(13)
Delivery index	95.0 ± 6.2	(11)	94.4 ± 5.3	(13)	93.1 ± 9.8	(12)	89.3 ± 9.7	(13)
Number of live newborns	14.4 ± 2.2	(11)	14.4 ± 1.6	(13)	13.4 ± 3.1	(12)	11.5 ± 3.1*	(13)
Birth index	95.0 ± 6.2	(11)	93.5 ± 4.7	(13)	87.9 ± 11.2	(12)	76.0 ± 16.8**	(13)
Live birth index	100.0 ± 0.0	(11)	99.1 ± 2.3	(13)	94.8 ± 10.1	(12)	86.4 ± 21.1**	(13)
Sex ratio on day 0	1.49 ± 1.08	(11)	0.95 ± 0.56	(13)	1.27 ± 0.55	(12)	1.18 ± 1.05	(13)
Day 4 of lactation								
Number of live pups	14.1 ± 2.0	(11)	14.3 ± 1.7	(13)	13.4 ± 3.1	(12)	11.5 ± 3.0*	(13)
Viability index	98.3 ± 4.0	(11)	99.5 ± 2.0	(13)	100.0 ± 0.0	(12)	99.4 ± 2.1	(13)
Sex ratio on day 4	1.45 ± 1.07	(11)	0.96 ± 0.56	(13)	1.27 ± 0.55	(12)	1.18 ± 1.05	(13)
Body weights of pups (g)								
Day 0								
Male	6.8 ± 0.7	(11)	6.8 ± 0.4	(13)	6.8 ± 1.0	(12)	7.0 ± 0.9	(13)
Female	6.4 ± 0.6	(11)	6.5 ± 0.4	(13)	6.4 ± 0.8	(12)	6.6 ± 0.8	(13)
Day 4								
Male	10.6 ± 1.2	(11)	10.6 ± 0.9	(13)	11.4 ± 2.5	(12)	11.8 ± 2.0	(13)
Female	10.1 ± 1.2	(11)	10.2 ± 0.9	(13)	10.9 ± 1.9	(12)	11.2 ± 2.1	(13)

Values represent mean ± S.D.

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

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

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

Gestation index = (number of pregnant females with live newborns / number of pregnant females) × 100, %

Implantation index = (number of implantations / number of corpora lutea) × 100, %

Delivery index = (number of newborns / number of implantations) × 100, %

Birth index = (number of live newborns / number of implantations) × 100, %

Live birth index = (number of live newborns / number of newborns) × 100, %

Sex ratio on day 0 = number of male live newborns / number of female live newborns

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

Sex ratio on day 4 = number of male live pups on day 4 of lactation / number of female live pups on day 4 of lactation

## 2-ヒドロキシベンズアルデヒドの細菌を用いる復帰突然変異試験

### Reverse Mutation Test of 2-Hydroxybenzaldehyde on Bacteria

#### 要約

OECD既存化学物質安全性調査事業の一環として、2-ヒドロキシベンズアルデヒドについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加の条件でプレート法により、用量設定試験を50～5000  $\mu\text{g}$ /プレートの用量で行ったところ、すべての検定菌において、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験で抗菌性が認められた。したがって、本試験はS9 mix無添加試験を31.3～1000  $\mu\text{g}$ /プレート(TA100は15.6～500  $\mu\text{g}$ /プレート、WP2 *uvrA*は125～4000  $\mu\text{g}$ /プレート)、S9 mix添加試験を62.5～2000  $\mu\text{g}$ /プレート(TA100は15.6～500  $\mu\text{g}$ /プレート、WP2 *uvrA*は125～4000  $\mu\text{g}$ /プレート)の範囲で用量を設定し、試験を実施した。

その結果、抗菌性は、S9 mix無添加試験では、500  $\mu\text{g}$ /プレート(TA100 およびTA1537)、1000  $\mu\text{g}$ /プレート(TA98 およびTA1535) および4000  $\mu\text{g}$ /プレート(WP2)で、S9 mix添加試験では、500  $\mu\text{g}$ /プレート(TA100)、2000  $\mu\text{g}$ /プレート(TA1535, TA98 およびTA1537) および4000  $\mu\text{g}$ /プレート(WP2)で認められた。復帰突然変異コロニー数は、2回の本試験とも、用いたすべての検定菌で、いずれの用量においても増加は認められなかったことから、2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

#### 方法

##### 〔検定菌〕

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

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

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

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを、ニ

ュートリエントプロスNo.2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

##### 〔被験物質〕

2-ヒドロキシベンズアルデヒド(CAS No. 90-02-8)は、分子量 122.12 の淡黄色液体である。試験には、セイミケミカル(株)製〔ロット番号：082316、純度 95%以上(不純物：不明)〕のものを、(社)日本化学工業協会から供与されたもの、使用時までガラス製容器に入れ、窒素ガスで空気と置換密栓して室温で遮光保管し用いた。

2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解性がよいことから、DMSOに20～50 mg/mlの範囲で溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、2-ヒドロキシベンズアルデヒドのDMSO溶液中での安定性試験および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、低濃度(156  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )溶液は本試験Ⅱで調製したものについて、また高濃度(40.0 mg/ml)溶液は染色体異常試験で調製したものについて、室温遮光条件下で、安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均値に対して、99.6および98.4%であった。また、本試験Ⅱで調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、調製後の濃度はそれぞれ低濃度は102%、高濃度は101%であった。

##### 〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

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

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

##### 〔培地およびS9 mixの組成〕

1) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混合した。

- (A) バクトアガー (Difco) 0.6%  
 塩化ナトリウム 0.5%  
 (B)\* L-ヒスチジン 0.5 mM  
 D-ビオチン 0.5 mM  
 \*: WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
バクトアガー (Difco)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mlを流して固めてある。

3) S9 mix

1 ml中下記の成分を含む

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

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

(試験方法)

プレート法により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中にトッパアガー2ml、被験物質調製液0.1 ml、リン酸緩衝液0.5 ml (S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 ml)、検定菌液0.1 mlを混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりにDMSO、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。

用いた平板は用量設定試験においては、溶媒および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、結果の再現性の確認を行った。

(判定基準)

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

結果および考察

(用量設定試験)

50~5000 μg/プレートの範囲で公比を約3として、試験を実施したところ、S9 mix無添加試験ではWP2 *uvrA* 5000 μg/プレートで、TA100が500 μg/プレート以上で、その他は1500 μg/プレート以上で抗菌性が認められた。また、S9 mix添加試験ではTA100が500 μg/プレート以上で、その他は1500 μg/プレート以上の用量で抗菌性が認められた。

(本試験)

結果をそれぞれTable 1, 2に示した。2-ヒドロキシベンズアルデヒドの用量を、S9 mix無添加試験は31.3~1000 μg/プレート (TA100は15.6~500 μg/プレート、WP2 *uvrA*は125~4000 μg/プレート)、S9 mix添加試験は62.5~2000 μg/プレート (TA100およびWP2 *uvrA*はS9 mix添加試験と同一用量)の範囲で公比を2として設定し試験を実施した。その結果、2回の試験のいずれも、用いた5種類の検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験において、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

Table 1. Mutagenicity of 2-hydroxybenzaldehyde\*\* in reverse mutation test (I) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	115 127 83 (108 $\pm$ 22.7)	11 9 13 (11 $\pm$ 2.0)	21 23 26 (23 $\pm$ 2.5)	21 18 22 (20 $\pm$ 2.1)	8 7 7 (7 $\pm$ 0.6)	
	15.6	97 81 93 (90 $\pm$ 8.3)	ND	ND	ND	ND	
	31.3	84 83 79 (82 $\pm$ 2.6)	17 8 21 (15 $\pm$ 6.7)	ND	20 22 28 (23 $\pm$ 4.2)	7 6 8 (7 $\pm$ 1.0)	
	62.5	82 79 80 (80 $\pm$ 1.5)	8 7 27 (14 $\pm$ 11.3)	ND	16 28 22 (22 $\pm$ 6.0)	2 11 7 (7 $\pm$ 4.5)	
	125	87 83 85 (85 $\pm$ 2.0)	11 12 15 (13 $\pm$ 2.1)	20 12 19 (17 $\pm$ 4.4)	13 18 19 (17 $\pm$ 3.2)	10 6 1 (6 $\pm$ 4.5)	
	250	58 38 55 (50 $\pm$ 10.8)	18 8 12 (13 $\pm$ 5.0)	22 19 26 (22 $\pm$ 3.5)	22 23 18 (21 $\pm$ 2.6)	8 7 7 (7 $\pm$ 0.6)	
	500	40* 41* 51* (44 $\pm$ 6.1)	19 3 7 (10 $\pm$ 8.3)	14 18 24 (19 $\pm$ 5.0)	19 18 20 (19 $\pm$ 1.0)	5* 8* 3* (5 $\pm$ 2.5)	
	1000		1* 0* 0* (0 $\pm$ 0.6)	23 21 15 (20 $\pm$ 4.2)	14* 11* 17* (14 $\pm$ 3.0)	1* 1* 7* (3 $\pm$ 3.5)	
	2000			2 4 6 (4 $\pm$ 2.0)			
	4000			0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)			
S9mix (+)	0	123 144 155 (141 $\pm$ 16.3)	7 12 10 (10 $\pm$ 2.5)	30 18 23 (24 $\pm$ 6.0)	37 41 32 (37 $\pm$ 4.5)	12 14 15 (14 $\pm$ 1.5)	
	15.6	103 114 121 (113 $\pm$ 9.1)	ND	ND	ND	ND	
	31.3	81 117 111 (103 $\pm$ 19.3)	ND	ND	ND	ND	
	62.5	93 95 105 (98 $\pm$ 6.4)	9 14 13 (12 $\pm$ 2.6)	ND	26 35 22 (28 $\pm$ 6.7)	7 16 12 (12 $\pm$ 4.5)	
	125	96 98 93 (96 $\pm$ 2.5)	17 10 8 (12 $\pm$ 4.7)	29 21 18 (23 $\pm$ 5.7)	26 22 25 (24 $\pm$ 2.1)	7 6 14 (9 $\pm$ 4.4)	
	250	56 71 83 (70 $\pm$ 13.5)	10 10 7 (9 $\pm$ 1.7)	32 26 22 (27 $\pm$ 5.0)	21 27 28 (25 $\pm$ 3.8)	9 10 15 (11 $\pm$ 3.2)	
	500	45* 57* 68* (57 $\pm$ 11.5)	7 4 7 (6 $\pm$ 1.7)	26 12 19 (19 $\pm$ 7.0)	25 18 22 (22 $\pm$ 3.5)	10 8 4 (8 $\pm$ 3.1)	
	1000		4 1 3 (3 $\pm$ 1.5)	20 23 29 (24 $\pm$ 4.6)	20 14 23 (19 $\pm$ 4.6)	5 8 7 (7 $\pm$ 1.5)	
	2000		0* 0* 1* (0 $\pm$ 0.6)	15 12 6 (11 $\pm$ 4.6)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	
	4000			0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)			
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	591 481 463 (512 $\pm$ 69.3)	263 262 225 (250 $\pm$ 21.7)	108 121 101 (110 $\pm$ 10.1)	785 800 745 (777 $\pm$ 28.4)	1064 1104 971 (1046 $\pm$ 68.2)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	2008 1637 1544 (1730 $\pm$ 245.5)	212 229 230 (224 $\pm$ 10.1)	1166 1335 1277 (1259 $\pm$ 85.9)	573 498 438 (503 $\pm$ 67.6)	262 217 221 (233 $\pm$ 24.9)	

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

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

\*\*: Purity was above 95% and impurity was unknown.

ND: Not done



Table 2. Mutagenicity of 2-hydroxybenzaldehyde\*\* in reverse mutation test (II) on bacteria

With(+)/or without(-) S9 mix	Test substance dose ( $\mu$ g/plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	102 98 89 (96 $\pm$ 6.7)	16 13 12 (14 $\pm$ 2.1)	23 22 21 (22 $\pm$ 1.0)	27 19 27 (24 $\pm$ 4.6)	5 11 10 (9 $\pm$ 3.2)	
	15.6	82 74 82 (79 $\pm$ 4.6)	ND	ND	ND	ND	
	31.3	88 92 99 (93 $\pm$ 5.6)	10 8 10 (9 $\pm$ 1.2)	ND	21 28 28 (26 $\pm$ 4.0)	12 7 10 (10 $\pm$ 2.5)	
	62.5	75 74 82 (77 $\pm$ 4.4)	15 10 11 (12 $\pm$ 2.6)	ND	31 30 35 (32 $\pm$ 2.6)	4 11 8 (8 $\pm$ 3.5)	
	125	96 64 78 (79 $\pm$ 16.0)	11 10 13 (11 $\pm$ 1.5)	31 31 23 (28 $\pm$ 4.6)	27 23 31 (27 $\pm$ 4.0)	10 4 7 (7 $\pm$ 3.0)	
	250	66 50 59 (58 $\pm$ 8.0)	6 6 5 (6 $\pm$ 0.6)	31 24 38 (31 $\pm$ 7.0)	22 23 11 (19 $\pm$ 6.7)	7 3 2 (4 $\pm$ 2.6)	
	500	34* 50* 44* (43 $\pm$ 8.1)	5 7 3 (5 $\pm$ 2.0)	20 12 28 (20 $\pm$ 8.0)	21 23 23 (22 $\pm$ 1.2)	4 12 8 (8 $\pm$ 4.0)	
	1000		3* 0* 2* (2 $\pm$ 1.5)	23 21 25 (23 $\pm$ 2.0)	11* 19* 17* (16 $\pm$ 4.2)	6* 5* 7* (6 $\pm$ 1.0)	
	2000			8 9 8 (8 $\pm$ 0.6)			
	4000			0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)			
S9mix (+)	0	100 112 109 (107 $\pm$ 6.2)	14 10 8 (11 $\pm$ 3.1)	30 25 29 (28 $\pm$ 2.6)	40 31 37 (36 $\pm$ 4.6)	5 18 12 (12 $\pm$ 6.5)	
	15.6	89 120 104 (104 $\pm$ 15.5)	ND	ND	ND	ND	
	31.3	115 116 105 (112 $\pm$ 6.1)	ND	ND	ND	ND	
	62.5	103 76 96 (92 $\pm$ 14.0)	10 10 11 (10 $\pm$ 0.6)	ND	29 40 29 (33 $\pm$ 6.4)	9 5 11 (8 $\pm$ 3.1)	
	125	94 98 88 (93 $\pm$ 5.0)	7 19 13 (13 $\pm$ 6.0)	37 29 37 (34 $\pm$ 4.6)	28 38 24 (30 $\pm$ 7.2)	7 13 11 (10 $\pm$ 3.1)	
	250	63 49 72 (61 $\pm$ 11.6)	20 7 3 (10 $\pm$ 8.9)	47 42 34 (41 $\pm$ 6.6)	28 23 27 (26 $\pm$ 2.6)	11 13 8 (11 $\pm$ 2.5)	
	500	41* 49* 52* (47 $\pm$ 5.7)	8 5 5 (6 $\pm$ 1.7)	33 24 31 (29 $\pm$ 4.7)	27 29 20 (25 $\pm$ 4.7)	7 7 3 (6 $\pm$ 2.3)	
	1000		1* 0* 1* (1 $\pm$ 0.6)	27 29 21 (26 $\pm$ 4.2)	30 19 20 (23 $\pm$ 6.1)	8 8 4 (7 $\pm$ 2.3)	
	2000		0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	17 8 14 (13 $\pm$ 4.6)	17* 13* 9* (13 $\pm$ 4.0)	0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)	
	4000			0* 0* 0* (0 $\pm$ 0.0)			
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ( $\mu$ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies /plate	535 591 587 (571 $\pm$ 31.2)	267 284 275 (275 $\pm$ 8.5)	152 146 140 (146 $\pm$ 6.0)	761 734 764 (753 $\pm$ 16.5)	1132 929 1397 (1153 $\pm$ 234.7)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ( $\mu$ g/plate)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	1464 1444 1498 (1469 $\pm$ 27.3)	291 304 309 (301 $\pm$ 9.3)	1422 1450 1427 (1433 $\pm$ 14.9)	342 363 371 (359 $\pm$ 15.0)	263 294 277 (278 $\pm$ 15.5)	

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

\*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

\*\* : Purity was above 95% and impurity was unknown.

ND : Not done

## 文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." eds, by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.

## 連絡先

試験責任者：澁谷 徹  
試験担当者：坂本京子, 川上久美子, 原 巧,  
堀谷尚古, 松木容彦, 中込まどか,  
中尾美津男, 北嶋美以子  
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
〒257 秦野市落合 729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

## Correspondence

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

2-ヒドロキシベンズアルデヒドの  
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  
2-Hydroxybenzaldehyde on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、2-ヒドロキシベンズアルデヒドの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.02 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。また、短時間処理(6時間)のS9 mix存在下および非存在下においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.2 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間処理した高濃度群(0.02 mg/ml)では、観察した細胞の5.5%に染色体の構造異常が認められた。また、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、48時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常は認められなかったが、高濃度群(0.02 mg/ml)においては倍数性細胞が誘発され、その頻度は18.12%であった。

短時間処理では、S9 mix非存在下で6時間処理した中濃度群(0.1 mg/ml)および高濃度群(0.2 mg/ml)では、観察した細胞のそれぞれ4.0%と25.1%に染色体の構造異常が認められた。また、低濃度群(0.05 mg/ml)では、有意な倍数性細胞の増加が認められたが疑陽性であった。

いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下では、中濃度群(0.1 mg/ml)および高濃度群(0.2 mg/ml)において、観察した細胞のそれぞれ5.0%と16.5%に染色体の構造異常が認められた。また、すべての処理群において倍数性細胞が誘発され、その頻度は1.63~6.25%であった。

以上の結果より、2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、染色体異常を誘発すると結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2

月、入手時：継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

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

3. 培養条件

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

4. 被験物質

2-ヒドロキシベンズアルデヒド(略号:HBA, CAS No.:90-02-8, ロット番号:082316, セイメケミカル(株)製造, (株)日本化学工業協会提供)は、無色~淡黄色透明液体で、水に対して1.4 g/100 ml(20°C)で溶解し、アルコール、エーテル等に可溶であり、融点-7°C, 沸点196~197°C, 蒸気圧1 hPa(30°C), 分子式C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, 分子量122.12, 純度95.0%以上(不純物は不明)の物質である。

被験物質原体の安定性に関する情報は得られなかったが、溶媒中(DMSO)では、156 μg/ml~40.0 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被

験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%増殖抑制濃度をはさむ2濃度より算出したところ、0.02 mg/mlであった。短時間処理のS9 mix存在下および非存在下における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度は、ともに0.2 mg/mlであった(Fig. 1)。

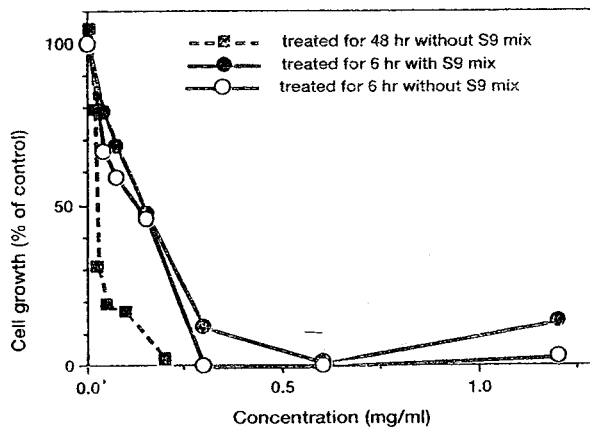


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-hydroxybenzaldehyde

## 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理では、0.02 mg/ml、短時間処理のS9 mix存在下および非存在下では、0.2 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

## 8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 μg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

## 9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの

構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

## 10. 記録と判定

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

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

## 結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。2-ヒドロキシベンズアルデヒドを加えて24時間処理した高濃度群(0.02 mg/ml)では、観察した細胞の5.5%(gapを含む)に染色体の構造異常が認められた。また、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、48時間処理したいずれの処理群でも染色体の構造異常は認められなかったが、高濃度群(0.02 mg/ml)において、倍数性細胞の誘発作用が認められ、その頻度は18.12%であった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。2-ヒドロキシベンズアルデヒドを加えてS9 mix非存在下で6時間処理した中濃度群(0.1 mg/ml)および高濃度群(0.2 mg/ml)では、観察した細胞のそれぞれ4.0%と25.1%に染色体の構造異常が認められ、傾向性検定の結果、濃度依存性が認められた。また、低濃度群(0.05 mg/ml)において、有意な倍数性細胞の増加が認められ、その頻度は対照群が0.13%であるのに対して0.88%であったが、その他の処理群においては増加が認められず、傾向性検定の結果、濃度依存性は認められなかったため、疑陽性と判定した。一方、S9 mix存在下では、中濃度群(0.1 mg/ml)および高濃度群(0.2 mg/ml)では、観察した細胞のそれぞれ5.0%と16.5%に染色体の構造異常が誘発され、傾向性検定の結果、濃度依存性が認められた。また、すべての処理群において倍数性細胞が誘発され、その頻度は1.63~6.25%で、傾向性検定の結果、濃度依存性が認められた。

従って、2-ヒドロキシベンズアルデヒドは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-hydroxybenzaldehyde (HBA)\*\* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells			Trend test <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		with aberrations	Polyploid <sup>4)</sup>	TAG (%)		
Control			200	0	3	1	1	0	0	5	2	5 (2.5)	5 (2.5)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38		
HBA	0.0050	24	200	1	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
HBA	0.010	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	+	NT
HBA	0.020	24	200	3	8	2	0	0	0	13	0	11* (5.5)	8 (4.0)	0.50		
MC	0.00005	24	200	4	35	93	2	1	0	135	2	85 (42.5)	82 (41.0)	0.00		
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
HBA	0.0050	48	200	0	1	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
HBA	0.010	48	200	0	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25	NT	+
HBA	0.020	48	200	1	3	1	0	0	0	5	1	4 (2.0)	4 (2.0)	18.12*		
MC	0.00005	48	200	6	38	81	7	2	10	144	7	81 (40.5)	77 (38.5)	0.50		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C, NT: not tested. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$ . \*: Significantly different from historical solvent control data with respect to TAG and polyploid at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\*: Purity was more than 95%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-hydroxybenzaldehyde (HBA)\*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells			Trend test <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		with aberrations	Polyploid <sup>4)</sup>	TAG (%)		
Control				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50		
HBA	0.050	-	6-(18)	200	1	0	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.88*		
HBA	0.10	-	6-(18)	200	0	8	6	5	0	0	19	2	8* (4.0)	8 (4.0)	0.38	+	-
HBA	0.20	-	6-(18)	179	11	36	40	5	0	0	92	0	45* (25.1)	42 (23.5)	0.66 <sup>6)</sup>		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	0	2	0	1	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	1.00		
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
HBA	0.050	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.63*		
HBA	0.10	+	6-(18)	200	4	7	14	0	0	10	35	0	10* (5.0)	10 (5.0)	4.13*	+	+
HBA	0.20	+	6-(18)	200	6	12	51	1	2	10	82	0	33* (16.5)	31 (15.5)	6.25*		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	6	25	25	1	0	0	57	2	43 (21.5)	40 (20.0)	0.50		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, CPA: cyclophosphamide. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$ . 6) Four hundred and fifty-eight cells were analysed. \*: Significantly different from historical solvent control data with respect to TAG and polyploid at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\*: Purity was more than 95%.

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 林 真, 変異原性試験, 1, 255 (1992).
- 3) 吉村 功 編著, “毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ,” サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 4) 吉村 功, 大橋靖夫 編, “毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析,” 地人書館, 東京, 1992.

連絡先

試験責任者: 田中憲徳  
試験担当者: 山影康次, 中川ゆづき, 日下部博一,  
橋本恵子, 水谷正寛, 古畑紀久子  
(財)食品薬品安全センター秦野研究所  
〒257 神奈川県秦野市落合729-5  
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

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

## 2-ヒドロキシベンズアルデヒドのラットを用いる 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 2-Hydroxybenzaldehyde by Oral Administration in Rats

#### 要約

2-ヒドロキシベンズアルデヒドはバラ科シモツケソウ類の花、タバコの葉等に含まれ、トマト、グレープ、シナモン、コーヒー、お茶等の匂いの成分としても存在する化学物質<sup>1)</sup>であり、構造的にはサリチル酸に非常に類似している<sup>2)</sup>。また、本化学物質は石鹸、洗剤、香水等に0.005~0.2%の濃度で含有されている<sup>1)</sup>。本化学物質の毒性データでは、ラットのLD<sub>50</sub>値は経口投与で520 mg/kg、皮下投与で900 mg/kg、経皮投与で600 mg/kg、腹腔内投与で231 mg/kgであること、ラットに13日間反復混餌投与した場合、2%投与群では肝細胞の好塩基小体の著しい減少、脾臓細胞からのチモーゲン顆粒の枯渇、1%投与群では肝および腎のマイクロボディの数および大きさの増加、肝細胞の脂肪滴等の変化が起こること、さらに、乳頭腫または癌を誘発しないことが報告されている<sup>1)</sup>。本化学物質はラット、マウスに100 mg/kgを単回皮下投与することによって低カルシウム血症が起こること、妊娠11日のラットに400 mg/kgを単回皮下投与することによりサリチル酸あるいはアスピリンの場合と同様に胎生期死亡の増加、口唇裂および多指等の外表奇形の出現が増加することが報告されている<sup>2)</sup>。このサリチル酸類における胎児毒性の主たる要因の一つは低カルシウム血症であることも報告されている<sup>2)</sup>。サリチル酸類の生殖発生毒性については多くの動物種で報告され、ヒトにおいてもプロスタグランジン合成の抑制により遷延分娩、子宮からの出血等について報告されている<sup>3-6)</sup>。本試験はOECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として2-ヒドロキシベンズアルデヒドを雌雄ラットに1日1回、雄には交配2週間前から交配期間を通して剖検前日までの49日間、雌には交配2週間前から交配期間、妊娠期間を通して哺育3日までの41~46日間経口投与し、反復投与による一般毒性学的な影響を検索するとともに、雌雄動物の性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検索した。

#### 1. 反復投与毒性

雄では、死亡例はなく、一般状態、体重、摂餌量、血液学検査値、血液生化学検査値、剖検所見および器官重量に被験物質投与の影響は認められなかった。病理組織学検査の結果、40 mg/kg以上の被験物質投与群において肝臓の少葉周辺性脂肪化の程度およびその出現頻度が対照群に比べて減少した。

雌では、40 mg/kg群の1母体が妊娠22日の分娩途中で、また、160 mg/kg群の1母体が妊娠22日に死亡した以外に死亡例はなく、一般状態の変化は観察されなかった。器官重量では160 mg/kg群において肝臓重量が高値を、卵巣重量が低値を示した。しかし、体重、摂餌量および剖検所見には被験物質投与の影響は認められなかった。病理組織学検査の結果、40 mg/kg以上の被験物質投与群において肝細胞内のグリコーゲン量の軽微な増加が観察された。

#### 2. 生殖発生毒性

親動物に関して、雌の性周期および発情回数、雌雄の交尾および受胎、雌動物の妊娠期間および分娩に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。哺育の異常は、40 mg/kg以下の被験物質投与群には認められなかった。160 mg/kg群では哺育4日までに全児死亡の母動物が2例認められた。生児出産雌数、出産率、黄体数、着床痕数および着床率には被験物質投与の影響は認められなかった。

新生児では、哺育0日の生存児数、死産児数、性比、分娩率および出生率には被験物質投与の影響は認められず、新生児および死産児に被験物質投与に起因すると考えられる外表異常は認められなかった。哺育期間中の児の死亡は、160 mg/kg群において多い傾向が見られ、同群の哺育4日の新生児生存率は低い傾向にあった。また、哺育0日および4日の体重は160 mg/kg群においてわずかに低値を示す傾向にあった。

以上の成績から、本試験条件下における一般毒性学的な無影響量は雌雄ともに10 mg/kg/dayであると考えられた。また、生殖発生毒性的な無影響量は、雄に関しては160 mg/kg/day、雌に関しては40 mg/kg/day、新生児に関しては40 mg/kg/dayであると考えられた。

#### 方法

##### 1. 被験物質

2-ヒドロキシベンズアルデヒド [CAS No. 90-02-8, セイメケミカル(株), Lot No. 082316, 純度99.3%, 分子量122.12, 比重1.167, 融点-7℃, 沸点196~197℃] は、無色~淡黄色透明油状液体であり、窒素置換し、密閉・室温・暗所条件下で保存した。なお、動物試験終了後に残余の被験物質を分析した結果、純度は99.3%であり、被験物質は安定であったことが確認された。

被験物質は、オリーブ油(丸石製薬(株))に溶解し0.05, 0.2, 0.8および3.2%(w/v)濃度に調製した。なお、調製は1週間に2回の頻度で行った。調製後の被験液は、1日分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、窒素置換した上で室温・暗所保存した。本被験物質の0.05～3.2%(w/v)液は、窒素置換・室温・暗所保存条件下で8日間安定であることが確認されている。

被験液の濃度確認は雌雄の投与開始前および雄の投与最終週の2回、各濃度液について実施した。その結果、いずれの被験液も設定濃度の96.9～104.0%の範囲であり、ほぼ設定濃度の2-ヒドロキシベンズアルデヒドが含有されていたことを確認した。

## 2. 使用動物および飼育条件

試験には、雌雄とも日本チャールス・リバー(株)より7週齢で購入したSprague-Dawley(Crj:CD)系SPFラットを使用した。動物は、購入後7日間検疫・馴化飼育した後、一般状態に異常がなく、体重増加が良好な動物を8週齢で群分けして試験に使用した。群分け時の体重範囲は雄で294～319g、雌で195～223gであった。

動物は、温度 $22.5 \pm 3.5^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数1時間10～15回、照明1日12時間(午前7時～午後7時)の飼育室で飼育した。動物は、交配期間および妊娠17日から哺育4日までの期間を除き、金属製網ケージ[リードエンジニアリング(株)または理工電機(株)]に個別に収容し、飼育した。妊娠17日以降の母動物は、哺育4日まで床敷として木製チップ[ホワイティフレック、日本チャールス・リバー(株)]を入れたプラスチック製エコンケージ[日本クレア(株)]に飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)のNMF固型飼料を使用し、飼料および飲料水は、飼育期間中自由に摂取させた。

## 3. 群分け

群分けは、投与開始日に行った。動物は、雌雄とも群分け当日の体重、検疫・馴化期間中の増体重あるいは性周期の観察結果などにより選択した後、当日の体重で層別化し、コンピュータを用いたブロック配置法により各群に振り分けた。1群の動物数は、雌雄各12匹とした。

## 4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

2-ヒドロキシベンズアルデヒドの投与量は、先に実施した予備試験の結果を参考にして2.5, 10, 40および160 mg/kgとした。

投与経路は、OECDガイドラインに準じて強制経口投与とした。投与容量は、体重100g当たり0.5mlとし、個体毎の投与液量は、雄は各測定日の体重を、雌は交配前および交配期間中については各測定日の体重、妊娠期間中については妊娠0日、7日、14日および21日の体重、授乳期間中については哺育0日の体重を基準に算出した。

投与は、金属製胃ゾンデを用いて1日1回強制経口投与した。対照群にはオリーブ油のみを同様に投与した。

雄の投与期間は、交配前14日間およびその後35日間の計49日間、雌の投与期間は、交配前14日間、交配期間、妊娠期間および哺育3日までの41～46日間とした。

## 5. 投与量の設定

2-ヒドロキシベンズアルデヒドの0, 50, 100, 200および400 mg/kgを8週齢のSprague-Dawley(Crj:CD)系ラット雌雄各5匹に1日1回、14日間にわたって反復経口投与し、雌雄ラットに及ぼす影響について検討した。

その結果、400 mg/kg群では雄の全例、雌の5例中4例が、200 mg/kg群では雄の5例中1例、雌の5例中2例が投与7日までに死亡した。しかし、100 mg/kg以下の投与群では一般状態、体重、摂餌量、血液学検査値、血液生化学検査値等に明らかな被験物質投与の影響は認められなかった。したがって、最高用量は、死亡例の認められた200 mg/kgと被験物質投与の影響が認められなかった100 mg/kgのほぼ中間量に相当する160 mg/kg/dayとし、以下、公比4で減じて高用量を40 mg/kg/day、中用量を10 mg/kg/day、低用量を2.5 mg/kg/dayに設定した。

## 6. 反復投与毒性に関する観察、測定および検査

### 1) 一般状態

一般状態の観察は、雌雄とも試験期間を通じて毎日行なった。

### 2) 体重

雄の体重は、投与1日、4日、8日、11日、15日、22日、29日、36日、43日および50日に測定した。雌の体重は、投与1日、4日、8日、11日および15日、交配期間中は週1回、妊娠期間中は妊娠0日、7日、14日および21日、哺育期間中は哺育0日および4日に測定した。

### 3) 摂餌量

摂餌量は、雄では投与開始日および剖検日を除く体重測定と同じ日に、雌では交配前は投与開始日を除く体重測定と同じ日、妊娠期間中は妊娠1日、7日、14日および21日、哺育期間中は哺育1日および4日に前日からの残量を測定し、給餌量との差から1日摂取量を算出した。なお、交配期間中の摂餌量は測定しなかった。

### 4) 雄の血液学検査

雄の全動物について、剖検日の前日より約16時間絶食させ、エーテル麻酔下で腹大動脈より採取した血液の一部に抗凝固剤、EDTA-2K処理した血液を用いて赤血球数(電気抵抗変化検出法)、ヘモグロビン量(シアメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(平均赤血球容積 $\times$ 赤血球数/ $10^3$ )、血小板数(電気抵抗変化検出法)、白血球数(電気抵抗変化検出法)をコールター全自動8項目血球アナライザーT890〔(株)日科機〕を用いて測定した。また、採取した血液の一部を3.8%クエン酸ナトリウム処理した血漿を用いてプロトロンビン時間(クロット法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(クロッ



ト法), フィブリノーゲン量(トロンボプラスチン法)を血液凝固測定装置ACL100(Instrumentation Laboratory)を用いて測定した。検査結果から, 平均赤血球容積(MCV), 平均赤血球色素量(MCH), 平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

白血球百分率はMay-Giemsa染色塗抹標本, 網赤血球率はBrecher法による超生体染色標本の鏡検により算出した。

#### 5) 雄の血液生化学検査

雄の全動物について, 血液学検査のための採血と同時に腹大動脈から採取して得られた血液を遠心分離(3000 rpm, 10分間)し, 得られたヘパリン加血漿を用いてGOT, GPT, LDH(UV-rate法)を, また, 血清を用いてAlP(Bessey-Lowry法), 総コレステロール(CEH-COD-POD法), トリグリセライド(GK-GPO-POD法), リン脂質(PLD-ChoD-POD法), 総ビリルビン(アゾビリルビン法), 血糖(Hexokinase-G6PD法), 尿素窒素(Urease-GLDH法), クレアチニン(Jaffe法), ナトリウム(イオン選択電極法), カリウム(イオン選択電極法), 塩素(イオン選択電極法), カルシウム(OCPC法), 無機リン(モリブデン酸法), 総蛋白質(Biuret法)を全自動分析装置(Monarch:Instrumentation Laboratory)を用いて測定した。また, 全自動電気泳動装置 CLINISCAN2(株式会社ヘレナ研究所)を用いて蛋白質分画(セルロースアセテート膜による電気泳動法)を測定し, 蛋白質分画比率からA/G比を算出した。

#### 6) 病理検査

雄は, 全動物を最終投与の翌日に, 雌は全生存動物について哺育4日にエーテル麻酔下で放血致死させて剖検し, 心臓, 胸腺, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 精巣および精巣上体あるいは卵巣の重量を測定した。これらの器官に加えて, 脳, 下垂体, 甲状腺(上皮小体を含む), 肺(気管支を含む), 副腎, 子宮, 陰および剖検で異常が認められた器官を採取し, リン酸緩衝10%ホルマリン液(精巣および精巣上体はブアン液)に固定した。なお, 妊娠期間中に死亡した40および160 mg/kg群の母動物各1例, 新生児が全て死亡した160 mg/kg群の母動物2例についても同様に処置した。

雌雄とも対照群および160 mg/kg群の脳, 心臓, 肝臓, 腎臓, 副腎, 脾臓, 精巣および精巣上体あるいは卵巣について常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検した。その結果, 雌雄の肝臓に被験物質投与の影響が疑われたため, 2.5, 10および40 mg/kg群についても検査を行った。さらに, 雄では肝臓の小葉周辺帯肝細胞の細胞質内に微細~小型の空胞が観察されたため, その性状を詳細に検討するため対照群, 40および160 mg/kg群の各3例についてオイルレッドO染色を実施した。また, 雌の160 mg/kg群の肝臓においてヘマトキシリン・エオジン染色標本で肝臓の細胞質が腫大淡明化し明るくぬけて観察されたことから, その性状を詳細に検討するため160 mg/kg群の2例についてPAS反応および

唾液消化後PAS反応を実施した。なお, 40および160 mg/kg群の雌では剖検時に異常が観察された胸腺, 肺, 皮下結節についても鏡検した。

#### 7. 生殖発生毒性に関する観察, 測定および検査

##### 1) 性周期観察および交配

交配前14日間の性周期の観察を行った雌を同一群内の雄のケージに入れ1対1の組み合わせで終夜同居させた。同居期間は最長14日間として, 交尾が確認されるまでとした。なお, 交尾の確認は毎朝, 陰栓形成あるいは陰垢中の精子の有無により行い, これらが確認された日を妊娠0日とした。交配結果から, 各群について交尾率 $[(交尾確認動物数/交配動物数) \times 100]$ , 受胎率 $[(受胎動物数/交尾確認動物数) \times 100]$ および交尾までの同居日数を求めた。性周期観察は, 投与開始日から交尾が確認されるまで毎日行い, 発情期像発現回数および発情期から次の発情期までの日数を性周期とし, 平均性周期を算出した。

##### 2) 分娩および哺育状態

交尾が確認された雌については全例を自然分娩させ, 分娩状態を観察した。午前10時の時点で分娩が終了していた動物を当該日分娩とし, その日を哺育0日とした。午前10時を過ぎて分娩した場合は翌日を哺育0日とした。交尾確認後25日を経ても分娩が確認されなかった例については剖検し, 妊娠の成否を確認した。

分娩終了が確認された母動物については出生児を哺育させ, 哺育4日まで毎日, 哺育状態の観察を行った。これらの結果から, 妊娠期間[哺育0日(分娩確認日)-妊娠0日], 出産率 $[(生児出産雌数/受胎動物数) \times 100]$ , 着床率 $[(着床痕数/黄体数) \times 100]$ , 分娩率 $[(総出産児数/着床痕数) \times 100]$ を算出した。

#### 8. 新生児の観察, 測定および検査

##### 1) 新生児の観察

哺育0日に生存児数, 死産児数を数え, 性別および外表異常の有無を検査した。生存児は全例を母動物に哺育させ, 死亡の有無の観察を毎日1回行った。また, 死亡児は死後変化の著しいものを除いてリン酸緩衝10%ホルマリン液に固定し, 保存した。これらの結果から, 性比[雄/雌], 出生率 $[(哺育0日の生存児数/総出産児数) \times 100]$ , 新生児生存率 $[(哺育4日の生存児数/哺育0日の生児数) \times 100]$ を算出した。

##### 2) 体重

体重は, 哺育0日および4日に測定し, 1腹毎に雌雄の平均値を算出した。

##### 3) 剖検

全例の新生児を哺育4日にエーテル麻酔下で放血致死させ, 剖検した。

## 9. 統計解析

体重、摂餌量、発情期像発現回数、性周期、同居日数、妊娠期間、血液学および血液生化学検査値、器官重量、黄体数、着床痕数、出生児数、着床率、性比、分娩率、出生率および新生児生存率については、まずBartlett法により各群の分散の均一性の検定を行い、分散が均一の場合には一元配置分散分析を行い、分散が有意で各群の例数が等しいときにはDunnett法、各群の例数が異なるときにはScheffé法の多重比較検定で対照群と各被験物質投与群の有意差を検定した。分散が均一でない場合は、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、有意であれば対照群と各被験物質投与群との平均順位の違いについて、各群の例数が等しいときはDunnett型、各群の例数が異なるときはScheffé型の検定を行った。交尾率、受胎率、出産率については $\chi^2$ 検定を行った。なお、新生児に関するデータは1腹の平均を1標本とした。また、有意水準は5および1%とした。

## 結果

## 1. 反復投与毒性

## 1) 死亡動物および一般状態

40 mg/kg群の1例が妊娠22日の分娩途中で、また、160 mg/kg群の1例が妊娠22日に死亡した。その他、雌雄とも死亡例は認められず、一般状態の変化は、いずれの例においても観察されなかった。

## 2) 体重および摂餌量 (Fig. 1~4)

各被験物質投与群の体重および摂餌量は、雌雄とも対照群とほぼ同様の推移を示し、被験物質投与による影響は認められなかった。

## 3) 雄の血液および血液生化学検査 (Table 1, 2)

40 mg/kg以下の被験物質投与群では血液および血液生化学検査のいずれの検査項目においても対照群との間に有意な差は認められなかった。160 mg/kg群では血液検査値において平均赤血球容積の高値、平均赤血球色素濃度の低値、プロトロンビン時間の延長が、また、血液生化学検査では塩素の低値、A/G比およびアルブミン比率の高値、 $\gamma$ -グロブリン比率の低値に対照群との間に有意な差が認められた。しかし、これらのいくつかの項目はいずれも生理的変動の範囲内の値であり、血液凝固系の異常、総蛋白質の上昇、血液濃縮を疑わせる他の関連項目に変化が認められない単一項目における変化であったことから、被験物質投与の影響とは考えられなかった。

## 4) 器官重量 (Table 3, 4)

雄では絶対重量および相対重量ともに対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。雌では160 mg/kg群において絶対重量および相対重量ともに肝臓が有意な高値を、右側卵巣が有意な低値を示した。

## 5) 剖検所見

計画解剖動物では、対照群および被験物質投与群の雌雄いずれの例においても異常所見は認められなかった。雌の死亡例の剖検では40 mg/kg群の例において胸腺の萎縮、肝臓の一部退色および副腎の肥大が、160 mg/kg群の例では左側頸部に皮下結節、胸腺に暗赤色点散在および肺の暗赤色変化が観察された。また、全児死亡のため剖検した160 mg/kg群の例では外部所見として乳頭の未発達を観察された。

## 6) 病理組織学検査 (Table 5, 6)

雌雄とも被験物質投与に起因すると考えられる変化は肝臓で観察された。すなわち、雄では小葉周辺性脂肪化の程度および出現頻度は、2.5および10 mg/kg群では対照群と同様であったのに反して、40 mg/kg群では減少傾向、160 mg/kg群では減少を示した。なお、小葉周辺帯肝細胞の細胞質内に空胞が認められたため対照群、40および160 mg/kg群の代表例についてオイルレッドO染色を実施し検索した結果、肝細胞細胞質内の空胞化はその程度に応じてオイルレッドO染色陽性を示したため、これらは脂肪であると判断した。雌では40および160 mg/kg群において肝細胞内に蓄積しているグリコーゲン量の軽微な増加が認められ、その頻度は40 mg/kg群では2例、160 mg/kg群では7例であった。また、40および160 mg/kg群の肝臓においてヘマトキシリン・エオジン染色標本で肝臓の細胞質が腫大淡明化し明るくぬけて観察されたことから、その性状を詳細に検討するため160 mg/kg群の代表例についてPAS反応および唾液消化後PAS反応を実施した結果、PAS反応陽性、唾液消化後PAS反応陰性であった。

その他、被験物質投与に関連した変化は雌雄ともに認められなかった。

死亡例および全児死亡のため安楽死させた雌の所見として、40 mg/kg群の死亡例では肝臓に中等度の小葉中心性壊死、副腎に軽度な束状帯肥大および胸腺に軽度な萎縮が、160 mg/kg群の死亡例では心臓に中等度の心筋変性、腎臓に軽度な尿細管上皮細胞壊死、胸腺に軽微な出血および肺に軽微なうっ血、乳癌が認められた。また、160 mg/kg群の安楽死させた2例においては肝臓に軽度なグリコーゲン量の増加が認められた。

## 2. 生殖発生毒性

## 1) 生殖機能 (Table 7)

被験物質投与群における発情期から次の発情期までの日数(性周期)は対照群とほぼ同様で有意な差は認められなかった。交尾は対照群および被験物質投与群のいずれにおいても同居開始後5日以内に成立し、各群の交尾率は100%であった。また、交尾までに要した平均日数には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。非妊娠動物は対照群および被験物質投与群のいずれにも認められず、各群の受胎率は100%であった。

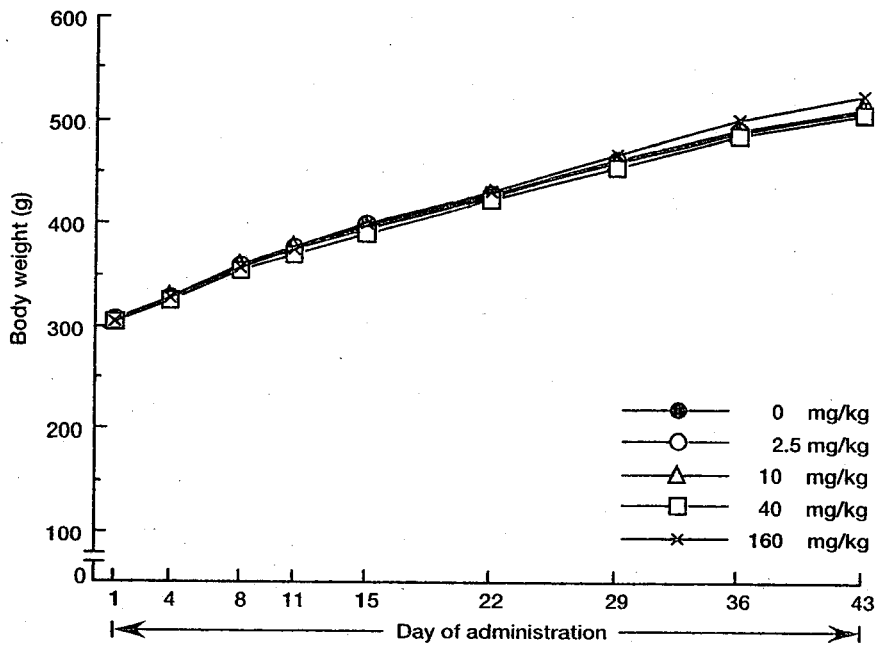


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

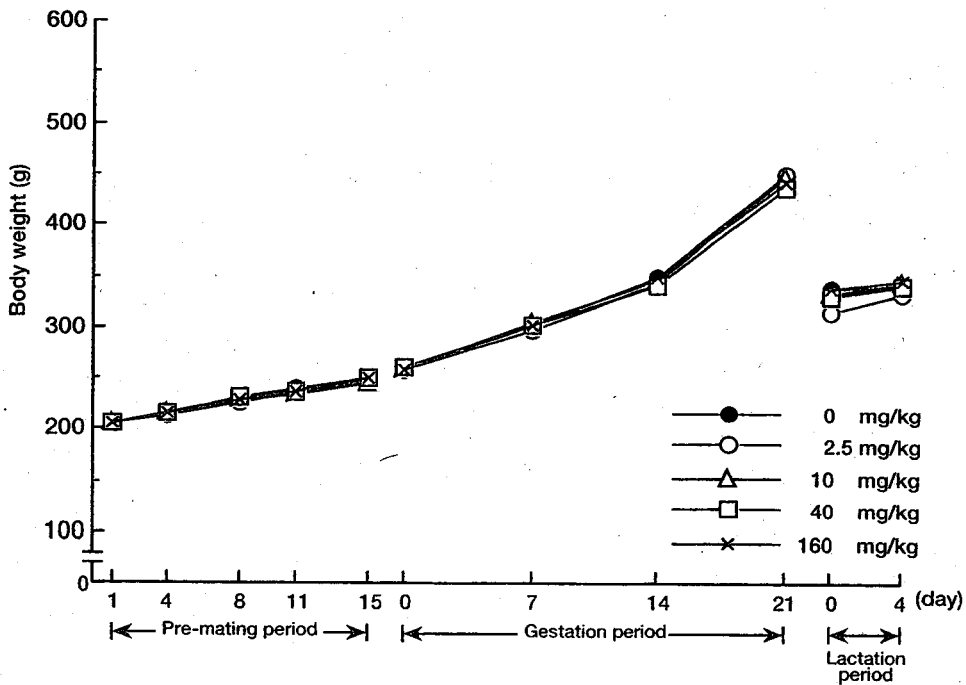


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

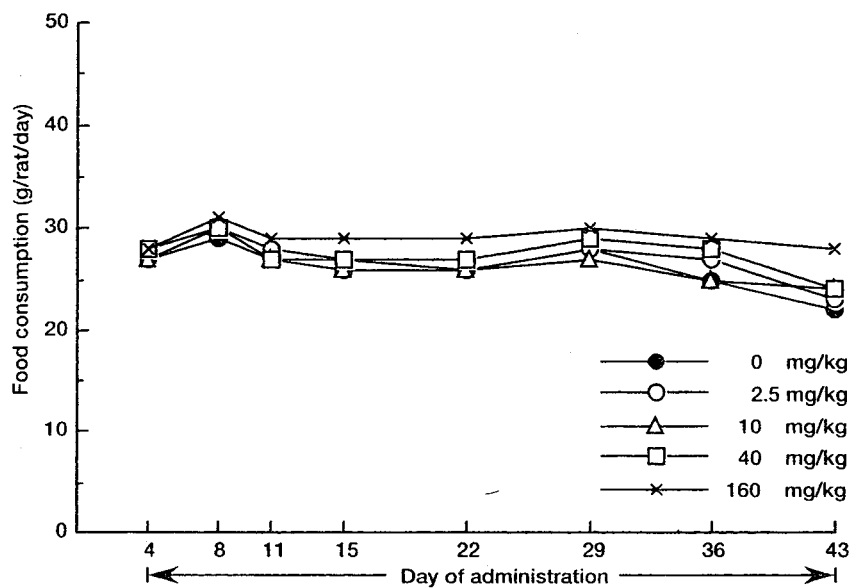


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

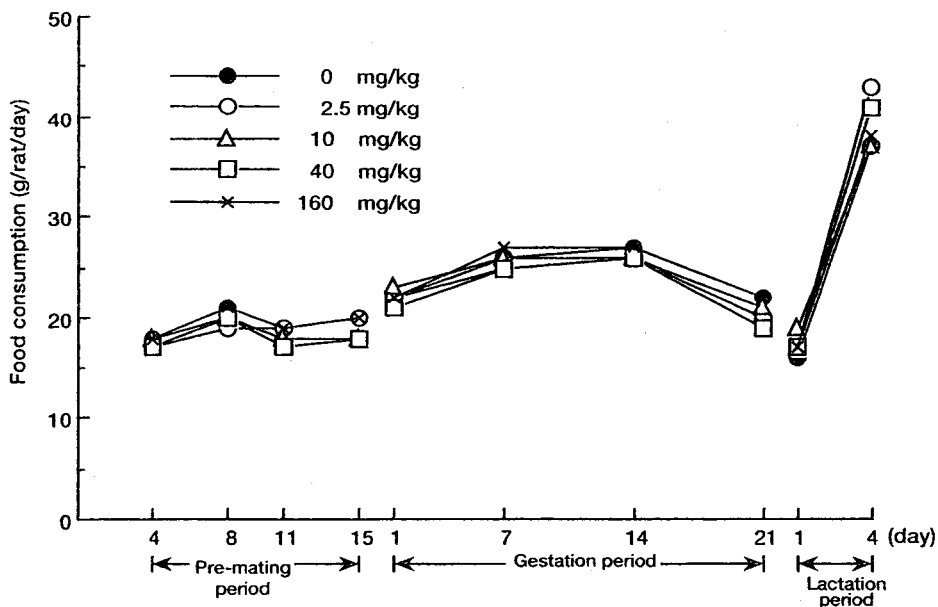


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

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

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
No. of animals	12	12	12	12	12
RBC ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	838 $\pm$ 31	849 $\pm$ 31	832 $\pm$ 29	851 $\pm$ 45	844 $\pm$ 32
Hb (g/dl)	16.3 $\pm$ 0.5	16.1 $\pm$ 0.3	16.2 $\pm$ 0.4	16.1 $\pm$ 0.4	16.5 $\pm$ 0.3
Ht (%)	47 $\pm$ 2	47 $\pm$ 1	46 $\pm$ 2	47 $\pm$ 2	48 $\pm$ 1
MCV ( $\mu^3$ )	55.6 $\pm$ 1.5	54.9 $\pm$ 1.2	55.8 $\pm$ 0.9	55.0 $\pm$ 1.6	57.1 $\pm$ 1.3*
MCH (pg)	19.4 $\pm$ 0.6	19.0 $\pm$ 0.6	19.5 $\pm$ 0.4	19.0 $\pm$ 0.7	19.5 $\pm$ 0.5
MCHC (%)	34.9 $\pm$ 0.4	34.7 $\pm$ 0.7	34.9 $\pm$ 0.6	34.5 $\pm$ 0.5	34.2 $\pm$ 0.4**
Reticulocyte (%)	21 $\pm$ 5	22 $\pm$ 4	22 $\pm$ 4	20 $\pm$ 4	25 $\pm$ 4
Platelet ( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )	118.2 $\pm$ 11.8	113.5 $\pm$ 10.7	117.8 $\pm$ 10.7	117.0 $\pm$ 11.1	108.2 $\pm$ 8.4
PT (sec.)	12.4 $\pm$ 0.9	12.5 $\pm$ 1.2	12.4 $\pm$ 0.6	12.5 $\pm$ 0.7	14.3 $\pm$ 1.7**
APTT (sec.)	19.2 $\pm$ 1.2	18.7 $\pm$ 1.0	18.8 $\pm$ 0.9	19.5 $\pm$ 2.0	20.4 $\pm$ 1.6
Fibrinogen (mg/dl)	241 $\pm$ 27	262 $\pm$ 27	247 $\pm$ 19	250 $\pm$ 16	245 $\pm$ 21
WBC ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	100 $\pm$ 17	109 $\pm$ 29	111 $\pm$ 31	106 $\pm$ 35	112 $\pm$ 24
Differential leucocyte counts (%)					
Lymphocytes	88.0 $\pm$ 4.3	85.2 $\pm$ 5.8	87.5 $\pm$ 4.5	88.5 $\pm$ 4.4	86.8 $\pm$ 8.3
Stab	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Segmented	10.8 $\pm$ 4.1	14.0 $\pm$ 5.4	11.6 $\pm$ 4.4	10.8 $\pm$ 3.8	12.4 $\pm$ 7.8
Eosinophils	0.6 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.7
Basophils	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Monocytes	0.7 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.4
Others	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0

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

Significantly different from the control group; \*:P<0.05. \*\*:P<0.01

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

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
No. of animals	12	12	12	12	12
GOT (IU/l)	60 $\pm$ 7	56 $\pm$ 7	53 $\pm$ 9	59 $\pm$ 9	59 $\pm$ 10
GPT (IU/l)	42 $\pm$ 8	38 $\pm$ 3	39 $\pm$ 5	42 $\pm$ 4	44 $\pm$ 4
LDH (IU/l)	41 $\pm$ 23	42 $\pm$ 25	38 $\pm$ 12	34 $\pm$ 13	38 $\pm$ 13
ALP (IU/l)	209 $\pm$ 48	219 $\pm$ 36	202 $\pm$ 57	214 $\pm$ 51	230 $\pm$ 40
Total chol. (mg/dl)	56 $\pm$ 8	54 $\pm$ 7	58 $\pm$ 11	51 $\pm$ 9	49 $\pm$ 9
TG (mg/dl)	97 $\pm$ 37	91 $\pm$ 40	87 $\pm$ 31	89 $\pm$ 34	96 $\pm$ 43
PL (mg/dl)	105 $\pm$ 13	104 $\pm$ 12	105 $\pm$ 13	99 $\pm$ 14	100 $\pm$ 14
Total bilirubin (mg/dl)	0.13 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.03
Glucose (mg/dl)	114 $\pm$ 8	119 $\pm$ 9	114 $\pm$ 9	115 $\pm$ 12	105 $\pm$ 11
BUN (mg/dl)	15 $\pm$ 2	15 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2	14 $\pm$ 3
Creatinine (mg/dl)	0.65 $\pm$ 0.06	0.66 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.07
Na (mEq/l)	141 $\pm$ 1	142 $\pm$ 1	141 $\pm$ 1	141 $\pm$ 1	141 $\pm$ 1
K (mEq/l)	4.5 $\pm$ 0.1	4.5 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.2
Cl (mEq/l)	113 $\pm$ 1	114 $\pm$ 1	113 $\pm$ 1	113 $\pm$ 1	112 $\pm$ 1*
Ca (mg/dl)	9.3 $\pm$ 0.2	9.2 $\pm$ 0.2	9.1 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.3	9.3 $\pm$ 0.2
P (mg/dl)	7.1 $\pm$ 0.6	7.2 $\pm$ 0.7	7.0 $\pm$ 0.6	7.4 $\pm$ 0.8	7.3 $\pm$ 0.6
TP (g/dl)	6.4 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.3	6.4 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.3	6.1 $\pm$ 0.3
A/G ratio	0.93 $\pm$ 0.06	0.94 $\pm$ 0.05	0.96 $\pm$ 0.10	0.99 $\pm$ 0.07	1.08 $\pm$ 0.11**
Albumin (%)	48.0 $\pm$ 1.6	48.3 $\pm$ 1.4	48.9 $\pm$ 2.6	49.7 $\pm$ 1.8	51.9 $\pm$ 2.5**
Globulin (%)					
$\alpha_1$	22.9 $\pm$ 1.5	22.6 $\pm$ 2.3	22.4 $\pm$ 1.9	21.9 $\pm$ 3.1	22.1 $\pm$ 2.7
$\alpha_2$	4.8 $\pm$ 1.0	5.1 $\pm$ 1.8	4.7 $\pm$ 1.8	4.6 $\pm$ 1.6	4.4 $\pm$ 1.4
$\beta$	18.0 $\pm$ 1.5	17.9 $\pm$ 1.2	17.8 $\pm$ 1.4	18.0 $\pm$ 1.7	16.8 $\pm$ 0.9
$\gamma$	6.0 $\pm$ 1.2	6.1 $\pm$ 0.9	6.3 $\pm$ 1.0	5.7 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 1.4*

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

Significantly different from the control group; \*:P<0.05. \*\*:P<0.01.

Table 3 Absolute and relative organ weights in male rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
No. of animals	12	12	12	12	12
Body weight (g)	502 ± 33	505 ± 35	503 ± 26	498 ± 23	511 ± 11
Absolute organ weight					
Thymus (mg)	333 ± 115	353 ± 103	334 ± 77	369 ± 99	352 ± 52
Heart (g)	1.49 ± 0.16	1.44 ± 0.11	1.43 ± 0.09	1.43 ± 0.12	1.46 ± 0.09
Liver (g)	14.12 ± 1.49	14.13 ± 1.48	14.12 ± 1.64	13.38 ± 1.03	13.77 ± 0.72
Spleen (mg)	769 ± 58	792 ± 94	799 ± 72	793 ± 124	762 ± 82
Kidney					
Right (g)	1.56 ± 0.14	1.57 ± 0.14	1.56 ± 0.09	1.61 ± 0.16	1.58 ± 0.13
Left (g)	1.55 ± 0.13	1.54 ± 0.15	1.54 ± 0.10	1.63 ± 0.17	1.61 ± 0.11
Testis					
Right (g)	1.73 ± 0.14	1.71 ± 0.12	1.73 ± 0.12	1.72 ± 0.12	1.67 ± 0.13
Left (g)	1.70 ± 0.14	1.70 ± 0.11	1.73 ± 0.13	1.80 ± 0.37	1.67 ± 0.11
Epididymis					
Right (mg)	658 ± 60	654 ± 57	659 ± 49	682 ± 59	645 ± 50
Left (mg)	661 ± 63	649 ± 55	672 ± 52	659 ± 62	627 ± 56
Relative organ weight					
Thymus (mg%)	67 ± 23	70 ± 21	66 ± 15	74 ± 21	69 ± 12
Heart (g%)	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Liver (g%)	2.81 ± 0.18	2.79 ± 0.14	2.80 ± 0.22	2.69 ± 0.16	2.70 ± 0.15
Spleen (mg%)	154 ± 12	157 ± 18	159 ± 19	159 ± 24	149 ± 19
Kidney					
Right (g%)	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.03
Left (g%)	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.01	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.03
Testis					
Right (g%)	0.35 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.33 ± 0.03
Left (g%)	0.34 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.07	0.33 ± 0.02
Epididymis					
Right (mg%)	132 ± 14	130 ± 18	131 ± 11	137 ± 12	126 ± 12
Left (mg%)	132 ± 14	129 ± 15	134 ± 10	133 ± 13	123 ± 12

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 4 Absolute and relative organ weights in female rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
No. of animals	12	12	12	10	9
Body weight (g)	340 ± 15	334 ± 13	343 ± 20	340 ± 17	346 ± 9
Absolute organ weight					
Thymus (mg)	241 ± 67	192 ± 60	282 ± 79	240 ± 49	188 ± 49
Heart (g)	1.07 ± 0.15	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.08	0.98 ± 0.05	1.00 ± 0.10
Liver (g)	13.28 ± 0.99	13.21 ± 0.75	12.97 ± 1.26	13.58 ± 1.15	15.36 ± 1.02**
Spleen (mg)	710 ± 75	677 ± 107	659 ± 83	648 ± 70	752 ± 77
Kidney					
Right (g)	1.03 ± 0.07	1.09 ± 0.12	1.03 ± 0.08	1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.05
Left (g)	1.04 ± 0.07	1.07 ± 0.10	1.03 ± 0.08	1.00 ± 0.06	1.09 ± 0.27
Ovary					
Right (mg)	63 ± 9	62 ± 9	57 ± 11	54 ± 7	47 ± 7**
Left (mg)	55 ± 6	55 ± 5	54 ± 6	50 ± 5	47 ± 7
Relative organ weight					
Thymus (mg%)	71 ± 20	58 ± 17	82 ± 23	71 ± 13	54 ± 15
Heart (g%)	0.31 ± 0.05	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.03
Liver (g%)	3.91 ± 0.31	3.96 ± 0.22	3.79 ± 0.33	4.00 ± 0.31	4.43 ± 0.30**
Spleen (mg%)	209 ± 18	203 ± 31	193 ± 26	191 ± 19	217 ± 20
Kidney					
Right (g%)	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Left (g%)	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.08
Ovary					
Right (mg%)	19 ± 3	19 ± 3	17 ± 3	16 ± 2	14 ± 2**
Left (mg%)	16 ± 2	16 ± 2	16 ± 2	15 ± 1	14 ± 2

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from the control group; \*\*:P&lt;0.01

Table 5 Histopathological findings of male rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs	Dose (mg/kg/day)	0				2.5				10				40				160			
		No. of animals				No. of animals				No. of animals				No. of animals				No. of animals			
-findings	Grade	0	1	2	TE	0	1	2	TE	0	1	2	TE	0	1	2	TE	0	1	2	TE
Cerebrum		12			12				0				0				0	12			12
Cerebellum		12			12				0				0				0	12			12
Heart																					
-myocarditis/focal		10	2		12				0				0				0	8	4		12
Liver																					
-lipid droplet/cytoplasmic			8	4	12		7	5	12		8	4	12		1	11	12		6	6	
Adrenal		12			12				0				0				0	12			12
Spleen		12			12				0				0				0	12			12
Kidney																					
-basophilic change/tubular epithelium/focal		11		1	12				0				0				0	12			12
Testis																					
-atrophy/tubular/focal/bilateral		11	1		12				0				0				0	12			12
Epididymis		12			12				0				0				0	12			12

0: No remarkable changes 1: Slight 2: Mild TE: Total Examine

Table 6 Histopathological findings of dams treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organs	Dose (mg/kg/day)	0			2.5			10			40			40			160			160				
		Alive			Alive			Alive			Alive			Dead or Sacrificed			Alive			Dead or Sacrificed				
-findings	Grade	0	1	TE	0	TE	0	TE	0	1	TE	0	2	3	TE	0	1	TE	0	1	2	3	P	TE
Cerebrum		12		12		0		0			0				0	9		9	3					3
Cerebellum		12		12		0		0			0				0	9		9	3					3
Heart																								
-degeneration/myocardial		12		12		0		0			0				0	9		9	2			1		3
Liver																								
-necrosis/centrilobular		12		12	12	12	12	12	10		10	1		1	2	9		9	3					3
-deposit/glycogen		12		12	12	12	12	12	8	2	10	2		2		2	7	9	1			2		3
Adrenal																								
-hypertrophy/zona foveolata		12		12		0		0			0	1		1		9		9	3					3
Spleen																								
-hematopoiesis/extramedullary/increased		8	4	12		0		0			0				0	6	3	9	3					3
Kidney																								
-necrosis/tubular epithelium		12		12		0		0			0				0	9		9	2			1		3
Ovary		12		12		0		0			0				0	9		9	3					3
Other gross lesion																								
-Tymus: atrophy			0			0		0			0		1	1			0	1						1
: hemorrhage			0			0		0			0		1	1			0			1				1
-Lung: congestion			0			0		0			0						0			1				1
-Subcutaneous nodule: adenocarcinoma/ mammary gland			0			0		0			0						0						1	1

0: No remarkable changes 1: Slight 2: Mild 3: Moderate P: Present<sup>a)</sup> TE: Total Examine

a): "Present" is used when grading of severity was not done, such as case in the neoplastic lesion

Table 7 Summary of reproductive performance in rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
Estrus cycle (days, Mean $\pm$ S.D.)	4.4 $\pm$ 0.6	4.4 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.6	4.2 $\pm$ 0.3
No. of pairs mated	12	12	12	12	12
No. of pairs copulated	12	12	12	12	12
No. of pregnant females	12	12	12	12	12
Copulation index (%) <sup>a)</sup>	100	100	100	100	100
Fertility index (%) <sup>b)</sup>	100	100	100	100	100

a) : (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)  $\times$  100

b) : (No. of pregnant animals/No. of pairs with successful copulation)  $\times$  100

## 2) 分娩および哺育状態 (Table 8)

40 mg/kg 群の 1 例が妊娠 22 日の分娩途中で死亡した以外に分娩の異常は対照群および被験物質投与群のいずれにも観察されなかった。しかし、160 mg/kg 群では分娩途中の死亡例は認められないことから、40 mg/kg 群における死亡が分娩異常に起因したものであるとは考えられない。また、40 mg/kg 群の 1 例では妊娠 25 日においても分娩が観察されなかったため、剖検したところ着床痕が観察された。妊娠期間、黄体数、着床痕数、着床率、出産率および分娩率には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

哺育状況では、160 mg/kg 群において乳頭の未発達例が 2 例に観察され、全ての新生児が哺育 2 日あるいは 3 日に死亡した。その他には哺育状況の異常は認められなかった。性比、出生率および新生児生存率には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。なお、哺育期間中の児の死亡は、160 mg/kg 群において多い傾向がみられたため、同群の哺育 4 日の平均生存児数が少なく、新生児生存率も低い傾向にあった。

## 3) 新生児の形態、体重および剖検所見 (Table 9)

生存児および死産児数の外表検査では、短軀および痕跡尾が対照群の死産児に 1 例、痕跡尾が 160 mg/kg 群の生存児に 1 例観察されたのみであった。哺育 0 日および 4 日の体重は、160 mg/kg 群において対照群に比べてわずかに低値を示す傾向にあったが、有意な差は認められなかった。40 mg/kg 以下の投与群における体重は対照群とほぼ同等の値であった。哺育 4 日の剖検では、いずれの例においても異常は認められなかった。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

雄では、死亡例はなく、一般状態、体重、摂餌量、血液学検査値、血液生化学検査値、剖検所見および器官重量には被験物質投与の影響は認められなかった。なお、血液学検査において 160 mg/kg 群にプロトロンビン時間の延長が認められたが、血液凝固系に関連する他の項目に変化が認められない単一項目における変化であった。また、本被験物質はラットおよびマウスにおいて低カルシウム血症を起こすことが報告<sup>2)</sup>されているが、本試験

では血液凝固因子の 1 つであるカルシウムの低下は認められなかった。これらのことから、この変化が被験物質投与による影響とは考えられない。病理組織学検査において被験物質投与に起因すると考えられる変化は肝臓で認められた。すなわち、対照群において観察される小葉周辺性脂肪化の程度およびその出現頻度が 40 mg/kg 以上の被験物質投与群で減少した。しかし、その機序は明らかではなかった。

雌では、40 mg/kg 群の 1 母体が妊娠 22 日の分娩途中で、160 mg/kg 群の 1 母体が妊娠 22 日に死亡した。死亡例の病理組織学検査において、死亡に直接関連すると考えられる共通した所見は両者には認められなかった。その他、一般状態、体重、摂餌量および剖検所見に被験物質投与の影響は認められなかった。器官重量では 160 mg/kg 群において肝臓の高値、卵巣の低値が認められたが、40 mg/kg 以下の被験物質投与群には対照群との間に有意な差は認められなかった。病理組織学検査において被験物質投与に起因すると考えられる変化は雄と同様に肝臓で認められたが、その変化は雄と異なっていた。すなわち、肝細胞内にグリコーゲン量の軽微な増加が 40 mg/kg 群の少数例、160 mg/kg 群の多数例に観察された。なお、40 および 160 mg/kg 群の肝臓においてヘマトキシリン・エオジン染色標本で肝細胞の細胞質が腫大淡明化し明るくぬけていたため、その性状を PAS 反応および唾液消化後 PAS 反応で検索したところ、細胞内に分布するグリコーゲンを反映するものと考えられた。

以上のことから、2-ヒドロキシベンズアルデヒドの反復投与により、160 mg/kg 群において雌の肝臓重量が高値を、卵巣重量が低値を示し、病理組織学検査では雌雄に相違はあるものの 40 mg/kg 以上の投与群において肝臓に変化が認められた。したがって、本試験条件下における 2-ヒドロキシベンズアルデヒドの一般毒性学的な無影響量は、雌雄ともに 10 mg/kg/day であると判断される。

### 2. 生殖発生毒性

雌の性周期、雌雄の交尾および受胎および雌の妊娠期間ならびに分娩に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。哺育状況では、160 mg/kg 群において乳頭の未発達に起因すると考えられる全新生児の死亡例が 2 例認められた。しかし、乳頭の未発達と被験物質投与の影



Table 8 Delivery and litter data in female rats treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
No. of pregnant females	12	12	12	12	12
No. of females with live pups	12	12	12	10	11
Gestation index (%) <sup>a)</sup>	100	100	100	83.8	91.7
Gestation length (days, Mean±S.D.)	22.3 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.5 ± 0.7	22.5 ± 0.5	22.8 ± 0.4
No. of corpora lutea (Mean±S.D.)	248(20.7 ± 4.7)	257(21.4 ± 3.5)	226(18.8 ± 3.6)	198(19.8 ± 2.4)	214(19.5 ± 2.3)
No. of implantations (Mean±S.D.)	207(17.3 ± 3.1)	223(18.6 ± 2.6)	184(15.3 ± 4.8)	172(17.2 ± 1.7)	185(16.8 ± 2.0)
Implantation index (%) <sup>b)</sup>	83.5	86.8	81.4	86.9	86.4
No. of stillborn (Mean±S.D.)	2( 0.2 ± 0.4)	4( 0.3 ± 0.7)	0( 0.0 ± 0.0)	2( 0.2 ± 0.6)	7( 0.6 ± 0.9)
No. of live born (Mean±S.D.)	183(15.3 ± 4.0)	208(17.3 ± 2.2)	165(13.8 ± 4.3)	152(15.2 ± 2.5)	152(13.8 ± 3.1)
Live birth index (%) <sup>c)</sup>	98.9	98.1	100	98.7	95.6
Delivery index (%) <sup>d)</sup>	89.4	95.1	89.7	89.5	85.9
No. of male pups (Mean±S.D.)	97( 8.1 ± 3.2)	105( 8.8 ± 2.4)	83( 6.9 ± 3.1)	78( 7.8 ± 2.7)	82( 7.5 ± 2.2)
No. of female pups (Mean±S.D.)	86( 7.2 ± 3.1)	103( 8.6 ± 2.0)	82( 6.8 ± 2.2)	74( 7.4 ± 2.5)	70( 6.4 ± 2.0)
Sex ratio <sup>e)</sup>	1.13	1.02	1.01	1.05	1.17
No. of pups					
Day 0 of lactation (Mean±S.D.)	183(15.3 ± 4.0)	208(17.3 ± 2.2)	165(13.8 ± 4.3)	152(15.2 ± 2.5)	151(13.7 ± 3.3)
Day 4 of lactation (Mean±S.D.)	179(14.9 ± 3.8)	203(16.9 ± 1.7)	163(13.6 ± 4.3)	151(15.1 ± 2.5)	125(11.4 ± 6.1)
Viability index (%) <sup>f)</sup>	97.8	97.6	98.8	99.3	82.8

a) : (No. of females with live pup/No. of pregnant females)×100

b) : (No. of implantations/No. of corpora lutea)×100

c) : (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100

d) : (No. of pups born/No. of implantations)×100

e) : (No. of males/No. of females)

f) : (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100

Table 9 Body weight of pups from dams treated orally with 2-hydroxybenzaldehyde in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	2.5	10	40	160
Day 0 of lactation					
Male	6.7 ± 0.6	6.4 ± 0.4	7.0 ± 0.6	6.9 ± 0.5	6.0 ± 0.5
Female	6.2 ± 0.5	6.0 ± 0.4	6.8 ± 0.6	6.5 ± 0.7	5.7 ± 0.5
Day 4 of lactation					
Male	10.5 ± 1.8	10.0 ± 1.1	11.2 ± 1.3	10.9 ± 1.2	9.7 ± 1.4
Female	10.0 ± 1.5	9.3 ± 1.0	11.2 ± 1.8	10.5 ± 1.5	9.0 ± 1.7

Values are expressed as Mean ± S.D.

響との関係については明らかではなかった。40 mg/kg以下の被験物質投与群には哺育の異常は認められなかった。新生児出産雌数、出産率、黄体数、着床痕数および着床率には被験物質投与の影響は認められなかった。

新生児に関して、生存児数、死産児数、性比、分娩率および出生率には被験物質投与の影響は認められなかった。また、新生児および死産児に被験物質投与に起因する外表異常は認められなかった。哺育期間中の児の死亡は、対照群との間に有意な差は認められないものの160 mg/kg群において多い傾向がみられ、新生児生存率が低い傾向にあった。また、哺育0日および4日の体重は160 mg/kg群においてわずかに低値を示す傾向にあった。サリチル酸あるいはアスピリンの150 mg/kgを妊娠8日～14日までの7日間にわたって経口投与した試験

では新生児の発育遅延、離乳率の低下が報告<sup>6)</sup>されている。したがって、本被験物質160 mg/kgの投与により新生児の生存および発育に及ぼす影響が示唆された。しかし、40 mg/kg以下の投与群においては新生児の生存および発育に及ぼす被験物質投与の影響は認められなかった。新生児の哺育4日の剖検では、いずれの例においても異常は認められなかった。

以上のことから、生殖発生毒性的には性周期、交尾および受胎、妊娠期間および分娩に及ぼす被験物質投与の影響はいずれの投与群においても認められなかった。しかし、160 mg/kg群では全新生児が死亡した母動物が2例認められ、また、新生児の生存・発育に及ぼす影響が示唆された。したがって、本試験条件下における生殖発生毒性的な無影響量は、雄に関しては160 mg/kg/day、

雌に関しては40 mg/kg/day, 新生児に関しては40 mg/kg/dayであると判断される。

文献

- 1) D. L. J. Opdyke, *Fd Cosmet. Toxicol.*, 17, 903 (1979)
- 2) H. Saito, A. Yokoyama, S. Takeno, T. Sakai, K. Ueno, H. Masumura and H. Kitagawa, *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.*, 38, 209 (1982)
- 3) C. A. Kimmel, J. G. Wilson and H. J. Shumacher, *Teratology*, 4, 15 (1971)
- 4) R. P. Koshakji and A. R. Schulert, *Biochem. Pharmacol.*, 22, 407 (1973)
- 5) K. S. Khera, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 37, 149 (1975)
- 6) S. Tanaka, K. Kawashima, S. Nakaura, S. Nagao, T. Kuwamura, A. Takanaka and Y. Omori, *Cong. Anom.*, 13, 73 (1973)

連絡先

試験責任者：梅村建夫  
試験担当者：杉沢健一, 石倉寿一, 石井孝広,  
田村一利, 茂呂光夫, 勝亦俱慶  
(株)ボゾリサーチセンター 函南研究所  
〒419-01 静岡県田方郡函南町桑原三本松1308  
Tel 0559-78-7851 Fax 0559-78-7898

Correspondence

Authors: Tatsuo Umemura (Study Director)  
Kenichi Sugisawa, Toshikazu Ishikura,  
Takahiro Ishii, Kazutoshi Tamura,  
Mitsuo Moro, Tomoyoshi Katsumata  
Bozo Research Center Inc. Kannami Laboratory  
1308 Kuwahara-Sanbonmatsu, Kannami-cho,  
Tagata-gun, Shizuoka-ken, 419-01, Japan  
Tel +81-559-78-7851 Fax +81-559-78-7898