

1,4-ブタンジオールの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 1,4-Butanediol on Bacteria

要約

1,4-ブタンジオールについて、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, TA1537¹⁾および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*^{2,3)}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、本試験では S9 mix 無添加および添加試験を 313 ~ 5000 μg /プレートの範囲で実施した。また、TA1537 の S9 mix 無添加試験では、本試験と同一の用量で再現性試験を実施した。

その結果、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倍以上となる再現性のあ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、1,4-ブタンジオールは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

[検定菌]

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

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

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

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものをを用い、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、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子 pKM101(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)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]

1,4-ブタンジオール(CAS No. 110-63-4)は、分子量90.14の無色透明液体である。用いた被験物質は、三菱化学(株)製造、ロット番号 B5I04、純度99.8 wt%(不純

物:0.06 wt% 1,4-アセトキシヒドロキシブテン-2, 0.07 wt% 2-(4-ヒドロキシブチルオキシ)テトラヒドロフラン)であり、三菱化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで乾燥窒素でシールし、室温で遮光保管した。

1,4-ブタンジオールは、局方注射用水(ロット番号:K5A80, (株)大塚製薬工場)に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、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。

[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 および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO)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(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
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 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μ mol

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

〔試験方法〕

プレインキュベーション法⁴⁾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 分間往復振とう培養したのち、トップアガー 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。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は、同時に実施した他の試験と共通とした。培養は 37°C で 48 時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。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、本試験および再現性試験においては、両対照群および各用量につき、3 枚ずつを用い、それぞれそ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。また、TA1537 の S9 mix 無添加試験については、本試験 I と本試験 II の結果が異なるため、再現性試験を行った。

〔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。ただし、2 回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の 2 倍以上となる用量が認められた場合において、その溶媒対照値が 10 以下であり、変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

1,4-ブタンジオールについて 50 ~ 5000 μ g/プレート の範囲で公比を約 3 として、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 μ g/プレートとした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で、ともに 313 ~ 5000 μ g/プレートの範囲で公比を 2 として 2 回の本試験を実施した (Table 1, 2)。その結果、TA1537 の S9 mix 無添加試験においては、本試験 I の 625 μ g/プレートで、溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数を示したが、本試験 II では溶媒対照値の 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。また、TA1537 の S9 mix 添加試験と、その他の検定菌においては、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。

〔再現性試験〕

TA1537 の S9 mix 無添加試験では、本試験 I と本試験 II の結果が異なるため、本試験と同一の用量で再現性試験を行った (Table 3)。その結果、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、1,4-ブタンジオールは、用いた試験系において変異原性を有しない (陰性) と判定した。

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) 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.
- 4) 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.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 堀谷尚古,
川上久美子
(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)
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,
Naoko Horiya, Kumiko Kawakami
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan
Tel +81-463-82-4751 FAX +81-463-82-9627

Table 1. Mutagenicity of 1,4-butanediol 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	
S9 mix (-)	0	177 161 156 (165 \pm 11.0)	9 9 12 (10 \pm 1.7)	25 27 23 (25 \pm 2.0)	25 20 24 (23 \pm 2.6)	14 16 15 (15 \pm 1.0)	
	313	159 167 160 (162 \pm 4.4)	14 13 21 (16 \pm 4.4)	20 29 24 (24 \pm 4.5)	31 40 27 (33 \pm 6.7)	15 14 28 (19 \pm 7.8)	
	625	156 151 144 (150 \pm 6.0)	22 14 22 (19 \pm 4.6)	29 29 30 (29 \pm 0.6)	25 23 36 (28 \pm 7.0)	27 40 27 (31 \pm 7.5)	
	1250	178 186 162 (175 \pm 12.2)	21 11 11 (14 \pm 5.8)	29 30 26 (28 \pm 2.1)	29 39 29 (32 \pm 5.8)	24 20 29 (24 \pm 4.5)	
	2500	148 139 145 (144 \pm 4.6)	8 13 9 (10 \pm 2.6)	29 20 21 (23 \pm 4.9)	37 27 22 (29 \pm 7.6)	20 28 15 (21 \pm 6.6)	
	5000	114 159 156 (143 \pm 25.2)	5 11 10 (9 \pm 3.2)	30 29 18 (26 \pm 6.7)	29 38 37 (35 \pm 4.9)	24 27 27 (26 \pm 1.7)	
S9 mix (+)	0	176 165 163 (168 \pm 7.0)	13 14 20 (16 \pm 3.8)	38 22 21 (27 \pm 9.5)	34 34 32 (33 \pm 1.2)	29 18 20 (22 \pm 5.9)	
	313	157 166 173 (165 \pm 8.0)	14 17 12 (14 \pm 2.5)	35 29 33 (32 \pm 3.1)	25 39 46 (37 \pm 10.7)	17 21 14 (17 \pm 3.5)	
	625	177 158 173 (169 \pm 10.0)	11 5 8 (8 \pm 3.0)	29 33 21 (28 \pm 6.1)	26 21 31 (26 \pm 5.0)	31 31 27 (30 \pm 2.3)	
	1250	169 149 178 (165 \pm 14.8)	20 12 10 (14 \pm 5.3)	35 23 33 (30 \pm 6.4)	26 29 40 (32 \pm 7.4)	21 29 12 (21 \pm 8.5)	
	2500	158 155 166 (160 \pm 5.7)	14 10 8 (11 \pm 3.1)	31 20 19 (23 \pm 6.7)	30 34 37 (34 \pm 3.5)	11 11 14 (12 \pm 1.7)	
	5000	150 186 173 (170 \pm 18.2)	10 12 20 (14 \pm 5.3)	18 23 33 (25 \pm 7.6)	32 29 19 (27 \pm 6.8)	18 23 20 (20 \pm 2.5)	
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	624 657 656 (646 \pm 18.8)	294 292 291 (292 \pm 1.5)	258 279 307 (281 \pm 24.6)	565 503 552 (540 \pm 32.7)	1259 1270 880 (1136 \pm 222.1)	
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	719 785 817 (774 \pm 50.0)	305 293 259 (286 \pm 23.9)	459 662 617 (579 \pm 106.6)	396 367 373 (379 \pm 15.3)	304 332 364 (333 \pm 30.0)	

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy)tetrahydrofuran were contained as impurities.

Table 2. Mutagenicity of 1,4-butanediol in reverse mutation test (II) 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	
S9 mix (-)	0	156 161 158 (158 \pm 2.5)	5 14 14 (11 \pm 5.2)	28 27 30 (28 \pm 1.5)	32 39 39 (37 \pm 4.0)	27 21 14 (21 \pm 6.5)						
	313	158 172 136 (155 \pm 18.1)	12 24 15 (17 \pm 6.2)	31 24 27 (27 \pm 3.5)	41 33 31 (35 \pm 5.3)	21 26 29 (25 \pm 4.0)						
	625	169 162 185 (172 \pm 11.8)	11 8 20 (13 \pm 6.2)	27 21 33 (27 \pm 6.0)	30 39 52 (40 \pm 11.1)	33 35 33 (34 \pm 1.2)						
	1250	136 163 163 (154 \pm 15.6)	15 7 14 (12 \pm 4.4)	20 16 19 (18 \pm 2.1)	55 51 51 (52 \pm 2.3)	19 24 30 (24 \pm 5.5)						
	2500	172 173 161 (169 \pm 6.7)	19 17 14 (17 \pm 2.5)	22 28 20 (23 \pm 4.2)	57 64 36 (52 \pm 14.6)	19 31 18 (23 \pm 7.2)						
	5000	156 171 155 (161 \pm 9.0)	9 9 13 (10 \pm 2.3)	23 28 20 (24 \pm 4.0)	43 59 43 (48 \pm 9.2)	24 29 26 (26 \pm 2.5)						
S9 mix (+)	0	183 176 178 (179 \pm 3.6)	20 10 19 (16 \pm 5.5)	27 37 33 (32 \pm 5.0)	43 42 38 (41 \pm 2.6)	7 19 23 (16 \pm 8.3)						
	313	168 163 181 (171 \pm 9.3)	15 13 17 (15 \pm 2.0)	27 37 44 (36 \pm 8.5)	31 31 26 (29 \pm 2.9)	22 25 13 (20 \pm 6.2)						
	625	177 147 166 (163 \pm 15.2)	11 15 23 (16 \pm 6.1)	29 17 37 (28 \pm 10.1)	29 44 39 (37 \pm 7.6)	18 23 21 (21 \pm 2.5)						
	1250	140 204 180 (175 \pm 32.3)	19 21 20 (20 \pm 1.0)	41 27 21 (30 \pm 10.3)	24 33 30 (29 \pm 4.6)	35 25 16 (25 \pm 9.5)						
	2500	163 150 166 (160 \pm 8.5)	19 20 23 (21 \pm 2.1)	22 26 29 (26 \pm 3.5)	28 40 34 (34 \pm 6.0)	15 18 17 (17 \pm 1.5)						
	5000	166 181 181 (176 \pm 8.7)	20 12 11 (14 \pm 4.9)	32 20 34 (29 \pm 7.6)	30 39 34 (34 \pm 4.5)	26 22 9 (19 \pm 8.9)						
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	492 666 699 (619 \pm 111.2)	140 125 102 (122 \pm 19.1)	402 392 361 (385 \pm 21.4)	691 637 688 (672 \pm 30.3)	623 753 427 (601 \pm 164.1)						
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	826 842 883 (850 \pm 29.4)	254 240 271 (255 \pm 15.5)	694 707 753 (718 \pm 31.0)	436 429 442 (436 \pm 6.5)	277 296 341 (305 \pm 32.9)						

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy)tetrahydrofuran were contained
as impurities.

Table 3. Mutagenicity of 1,4-butanediol in confirmation test of reverse mutation test 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.)					
						Frameshift type	
						TA1537	
S9 mix (-)	0					12 12 10 (11 \pm 1.2)	
	313					7 10 11 (9 \pm 2.1)	
	625					11 11 18 (13 \pm 4.0)	
	1250					9 10 11 (10 \pm 1.0)	
	2500					5 13 11 (10 \pm 4.2)	
	5000					7 13 14 (11 \pm 3.8)	
Positive control	Chemical					9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)					80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate					622 621 787 (677 \pm 95.6)	

9AA: 9-Aminoacridine
 Purity was 99.8 wt% and 0.06 wt% 1,4-acetoxyhydroxybutene-2 and 0.07 wt% 2-(4-hydroxybutyloxy) tetrahydrofuran were contained as impurities.

1,4-ブタンジオールの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 1,4-Butanediol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

1,4-ブタンジオール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%を明らかに越える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 非存在下で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 存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、1,4-ブタンジオールは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

方法

1. 使用した細胞

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

2. 培養液の調製

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

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたデイッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)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

1,4-ブタンジオール(略号:BD, CAS No.:110-63-4, ロット番号:B5I04, 三菱化学(株))は、無色透明液体で、水に対しては50.8 mg/ml以上、DMSOでは2 M以上、アセトンでは50 mg/ml以上で溶解し、融点20.1°C、沸点228°C、蒸気圧0.1 mmHg(25°C)で、分子式C₄H₁₀O₂、分子量90.14、純度99.8%(不純物として1,4-アセトキシヒドロキシブテン-2 0.06 wt%、2-(4-ヒドロキシブチルオキシ)テトラヒドロフラン 0.07 wt%を含む、他は不明)の物質である。

被験物質原体は、吸湿性があり、酸の存在下でテトラヒドロフラン化する。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用水(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%(v/v)になるように加えた。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、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を明らかに越える増殖抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。

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、短時間処理ともに0.90 mg/ml(10 mM)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

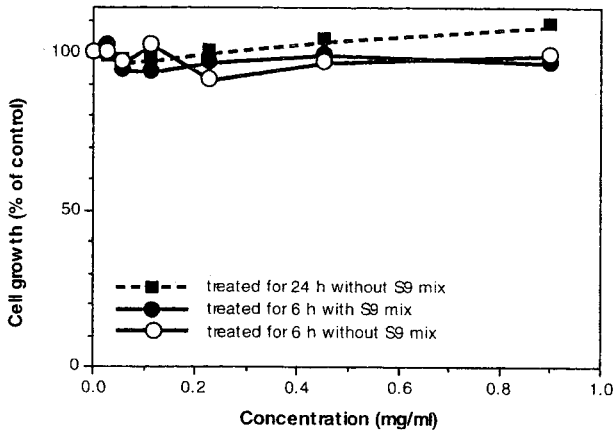


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,4-butanediol

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枚ディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本を作製し、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。

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)研究会¹⁾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、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²⁾(多重性を考慮して familywise の有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³⁾($p < 0.05$)を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

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。1,4-ブタンジオールを加えて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。1,4-ブタンジオールを加えて S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、1,4-ブタンジオールは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

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) 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," サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 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.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
 試験担当者: 山影康次, 日下部博一,
 渡辺千津子, 橋本恵子, 水谷正寛,
 澁谷 徹
 (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, Hirokazu Kusakabe,
 Chizuko Watanabe, Keiko Hashimoto,
 Masahiro Mizutani, Tohru Shibuya
 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

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 1, 4- butanediol (BD)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								No. of cells			Concurrent ⁶⁾			
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total	Others ³⁾	with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		cytotoxicity (%)	
												TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Control			200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	1.00			-
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	5	0	0	5	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25			100.0	
BD	0.23	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38			100.5	
BD	0.45	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50	NT	NT	103.0	
BD	0.90	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.50			103.0	
MC	0.00005	24	200	4	41	109	0	1	0	155	0	88 (44.0)	88 (44.0)	0.63			-	
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			100.0	
BD	0.23	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13			99.0	
BD	0.45	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	NT	NT	100.0	
BD	0.90	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			100.5	
MC	0.00005	48	200	5	38	103	7	4	10	167	1	90 (45.0)	86 (43.0)	0.50			-	

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), 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)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<0.05 when the incidence of TAG and polyploid was significantly different from historical solvent control at p<0.05 by Fisher's exact test. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with MonocellaterTM. **:Purity of test substance was 99.8 wt%. 1,4-Acetoxyhydroxybutene-2(0.06 wt%)and 2-(4-hydroxybutyloxy)tetrahydrofuran(0.07 wt%)were contained as impurities.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU)treated with 1, 4- butanediol (BD)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								No. of cells			Concurrent ⁶⁾		
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total	Others ³⁾	with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		cytotoxicity (%)
													TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Control				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38			-
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.00			100.0
BD	0.23	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.75			100.5
BD	0.45	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.75	NT	NT	97.5
BD	0.90	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.50			98.0
CPA	0.005	-	6-(18)	200	3	1	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	1 (0.5)	0.75			-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.63			100.0
BD	0.23	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.75			100.0
BD	0.45	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.88	NT	NT	98.0
BD	0.90	+	6-(18)	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.50			95.0
CPA	0.005	+	6-(18)	200	14	139	298	3	1	100	555	0	160 (80.0)	159 (79.5)	0.63			-

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: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, CPA:cyclophosphamide, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at p<0.05 when the incidence of TAG and polyploid was significantly different from historical solvent control at p<0.05 by Fisher's exact test. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with MonocellaterTM. **:Purity of test substance was 99.8 wt%. 1,4-Acetoxyhydroxybutene-2(0.06 wt%)and 2-(4-hydroxybutyloxy)tetrahydrofuran(0.07 wt%)were contained as impurities.

1,4-ブタンジオール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 1,4-Butanediol in Rats

要約

1,4-ブタンジオールの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験(以下、併合試験)を行い、同化合物の雌雄動物に及ぼす反復投与毒性ならびに生殖発生毒性について検討した。すなわち、0(媒体対照)、200、400および800 mg/kgの1,4-ブタンジオールを、Sprague-Dawley系(Crj:CD)ラットの雌雄(各13匹/群)に、交配前2週間および交配期間2週間経口投与した。さらに、雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで投与を継続して、剖検した。

1. 反復投与毒性

いずれの被験物質投与群においても、投与後一過性に症状が発現し、投与量に依存してその重篤度は増加した。200 mg/kg投与群においては活動性が亢進した。400 mg/kg投与群においては活動性の亢進もみられたが、主として活動性は抑制され、800 mg/kg投与群においては昏睡状態に陥る動物もみられたが、5時間後には回復していた。

体重は400および800 mg/kg投与群において投与初期にその増加が抑制され、その後の増加率に変化はみられなかったが、初期の体重増加量の差が試験終了時まで継続した。また、これに付随して摂餌量も減少していた。

雄動物の血液学検査においては、何ら有意な変化は認められなかったが、血液生化学検査において、軽度で正常範囲内の変化であり、被験物質投与との関係は疑問視されるが、血糖値の統計的に有意な減少が観察された。

肉眼的解剖所見としては特筆すべき変化はみられなかったが、400 mg/kg以上の投与量群の膀胱の病理組織学観察により、移行上皮のびまん性過形成および粘膜固有層に線維化が認められた。

2. 生殖発生毒性

産児の形態および生存率については異常はみられなかったが、800 mg/kg投与群において軽度ではあったが有意な体重減少がみられた。

3. 無影響量

以上の試験成績から、本試験条件下では、1,4-ブタンジオールの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに200 mg/kg/dayを下回る量、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄ともに800 mg/kg/day、産児に対しては400 mg/kg/dayであると判断される。

方法

1. 被験物質

本試験に使用した1,4-ブタンジオール(ロット番号:KCM2119、純度:98.0%)は、和光純薬工業(株)(東京)より提供を受けたもので、入手後は室温、遮光条件下で保管した。

被験物質は、局方注射用水(三重製薬(株)、製造番号:DH004)に溶解し、いずれの用量においても1回の投与液量が5 mL/kg体重になるように含量を調整し、調製検体は、室温で密封保管して使用した。投与検体中に含まれる被験物質の含量については、当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、雌雄ともに7週齢で購入した日本チャールス・リバー(株)厚木飼育センター生産のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD, SPF)を使用した。購入した動物は、入荷後1週間、馴化と検疫を兼ねて予備飼育し、雌雄とも投与開始日(投与1日)の体重をもとに体重別層化無作為抽出法に準じて群分けした。

各動物は、基準温湿度各 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、および50-60%、換気回数約15回/時間、照明12時間(午前7時-午後7時)に制御された飼育室で、金属製ケージに個別に収容して飼育し、固型飼料(CA-1、日本クレア(株))および飲料水(水道水、秦野市水道局給水)を自由に摂取させた。妊娠18日(精子確認日=妊娠0日)以後の母動物は、飼育ケージの床にステンレス製床板を敷き、床敷として木製チップ(ホワイトフレック、日本チャールス・リバー(株))を適宜供給した。

3. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験の投与量は、本試験と同系統のラット各群雌雄5匹に、1,4-ブタンジオールの200、400、600、800、1000 mg/kgを1週間強制的に連続経口投与した予備試験(以下予備試験と略記)の結果に基づき、体重増加の抑制傾向、活動性低下(投与4日まで)、活動性亢進(投与5日から)、血尿などの変化が認められた800 mg/kgを本試験の高用量に設定し、以下、公比2で減じて中用量には400 mg/kgを、低用量には200 mg/kgを設定した。

各用量の投与検体は、雌雄13匹から成る各群の動物に対して剖検日前日まで、毎日1回、ラット用胃管を用いて経口投与した。すなわち、雄に対しては交配期間14日間および交配期間終了後14日間までの連続42日間、

また、雌に対しては、交配前14日間と最長14日間の交配期間中(交尾まで)、ならびに交尾雌では妊娠期間を通して剖検前日までの哺育3日(分娩日=哺育0日)まで、交尾後、分娩の認められなかった動物に対しては妊娠24日相当日まで、それぞれ投与した。毎日の投与は、午前9時から12時の間に行い、各動物の投与液量(5 mL/kg)は、雄ならびに交配前および交配期間中の雌については週1回の測定体重を基に、また、交尾後の雌については妊娠0日(交尾確認日)の体重を基にそれぞれ算出した。

4. 観察方法

1) 親動物

A. 一般状態の観察

雌雄とも、全例について飼育期間中毎日1回以上観察した。

B. 体重測定

雌雄とも、全例について体重を試験期間中週1回(雄:投与1, 8, 15, 22, 29, 36, 42日, 雌:投与1, 8, 15日)および剖検日に測定した。雄動物と同居中の雌は、投与22日にも体重を測定した。また、交尾した雌では、妊娠0, 7, 14, 20日に、さらに、分娩した雌では、哺育0および4日の体重を測定した。

C. 摂餌量測定

雌雄とも、全例について体重測定日と同日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を算出した。2週間の交配期間中は摂餌量を測定しなかった。交尾した雌では、妊娠0-7, 7-14, 14-20日の、さらに、分娩した雌では、哺育0-4日の摂餌量を測定した。

D. 尿検査

検査日は投与1, 8, および15日とし、全例について投与後約4時間目の尿を強制排泄させて、尿中の血色素について試験紙法(マルティスティックス/クリニテック200, マイルス三共)により尿検査を実施した。採尿が困難な場合には、極度の刺激を避けるため採尿を中止した。

E. 交配

交配は、投与15日の夕方から最長14日間、同群内の雌雄を1対1で同居させて行った。交尾成立の確認は、毎朝、膣栓および膣垢標本中の精子の存在を調べることにより行い、交尾が確認された雌は、その日を妊娠0日と起算して雄から分離し、個別に飼育した。交配結果から、各群について交尾率 [(交尾動物数/交配動物数) × 100]、受胎率 [(受胎動物数/交尾動物数) × 100]、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を求めた。

F. 分娩・哺育状態の観察

各群とも交尾した雌は、全例を自然分娩させた。分娩

状態の観察は分娩を直接観察できたものについてのみ行った。また、直接観察できなかった例においても分娩後の徴候から分娩状態の良否が判定できるものについては、それを記録した。分娩後は哺育状態を観察し、異常の有無を記録した。

G. 分娩日の規定

分娩の確認は、午前9~11時に限定し、この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物について、その日を分娩日と規定した。午前11時を過ぎて分娩を終了した動物については、翌日を分娩日とした。

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

H. 最終検査

(1) 雄動物

全例について、最終投与日に絶食を開始し、その翌日(絶食開始18~24時間後)に以下の検査を行った。

イ. 血液学検査

ペントバルビタール麻酔下で腹部後大静脈よりEDTAを抗凝固剤として採血し、Coulter Counter Model S-PLUS IV(コールターエレクトロニクス)を用いた電気抵抗法により; 赤血球数(RBC), 白血球数(WBC), 平均赤血球容積(MCV), 血小板数を自動測定し、また、吸光度法により血色素量(Hb)を自動測定してそれらの値から平均赤血球血色素量(MCH=Hb × 1000/RBC), ヘマトクリット値(Ht=RBC × MCV × 0.001), 平均赤血球血色素濃度(MCHC=Hb × 100/Ht)を算出した。白血球分類は、Wright-Giemsa染色した静脈血塗抹標本を光学顕微鏡下で観察することにより視算した。

ロ. 血液生化学検査

全例について、血液学検査のための採血に引き続き、ヘパリンを抗凝固剤として採血し、血漿を分離して、遠心方式生化学自動分析装置COBAS-FARA(ロシュ)を用いて総蛋白濃度(ピウレット法), アルブミン濃度(BCG法), 総コレステロール濃度(COD・DAOS法), ブドウ糖濃度(グルコキナーゼG6PDH法), 尿素窒素濃度(BUN;ウレアーゼGl.DH法), クレアチニン濃度(Jaffe法), アルカリフォスファターゼ活性(パラニトロフェニルリン酸基質法), GOTおよびGPT活性(SSCC法), 総ビリルビン濃度(ビリルビン「ロシュ」キットSシリーズ), カルシウム濃度(OCPC法), 無機リン濃度(Inorg. phos.;モリブデン酸直接法), γ -GTP活性(γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法)を測定し、全自動電解質分析装置EA05(A&T)を用いてイオン電極法により、塩素, ナトリウムおよびカリウムの各濃度を測定した。また、A/G比は上記の測定結果に基づいて算出した。

ハ. 病理学検査

全例について剖検し、器官・組織の肉眼的観察を実施した。その際、胸腺, 肝臓, 腎臓, 精巣および精巣上体の重量を測定し、併せて比体重値(相対重量)を算出した。

精巣および精巣上体を除くこれらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱ならびに右側ハーダー腺は10 w/v%ホルマリン液に、精巣および精巣上体はブアン液に固定して保存した。固定器官のうち、膀胱はすべての投与群について、また、その他の器官は対照群および高用量群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学検査を行った。

(2) 雌動物

分娩した動物は哺育4日に、交尾は確認されたが分娩しなかった動物は妊娠25日相当日に、それぞれペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血・致死させて剖検した。妊・不妊のいずれの例においても卵巣および子宮を摘出し、子宮については着床数を数え、着床の認められた動物を妊娠例とした。卵巣は実体顕微鏡下で妊娠黄体数を数え、ブアン液に固定して保存した。不妊動物の子宮についてはSalewski法¹⁾により不妊を確認し、卵巣については病理組織学検査を行った。また、肝臓、腎臓および胸腺重量を測定した。これらの器官および脳、心臓、脾臓、副腎、膀胱および右側ハーダー腺は、10 w/v%ホルマリン液に固定して保存した。これらの固定器官は対照群および高用量群について雄と同様に病理組織学検査を行った。なお、膀胱、胸腺および脾臓に関しては、対照群と高用量群の所見の間に差異が認められたため、これらの器官に関しては、低および中用量群の雌動物についても病理組織学観察を行った。

2) 出生児

A. 産児数の算定

哺育0日に産児数(生存児+死亡児)を調べ、分娩率 $[(産児数/着床痕数) \times 100]$ および生児出生率 $[(出生生児数/着床痕数) \times 100]$ を求めた。また、産児の外表面奇形の有無および性別を調べ、生存児の性比 $[(雄の生児数/雌の生児数) \times 100]$ を算出した。

B. 死亡児数の算定

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

C. 体重測定

哺育0日および4日に一腹単位で雌雄別に体重(litter重量)を測定し、 $(litter重量/測定児数)$ を各腹について求めた。

D. 剖検

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

5. 統計解析

交尾率および受胎率については χ^2 検定を行った。その

他のすべてのデータは、個体毎に得られた値あるいは各腹児の平均値を1標本として、まず、Bartlett法により各群の分散の均一性について検定した。その結果、分散が均一であると判定された場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合にはDunnett法²⁾あるいはScheffé法³⁾により対照群と各被験物質投与群との間で平均値の差の検定を行った。分散が均一でなかった場合は、Kruskal-Wallisの順位検定⁴⁾を行い、群間に有意性が認められた場合に対照群と各被験物質投与群との差についてDunnett型あるいはScheffé型の検定を行った。病理組織学検査所見中、対照群および被験物質投与群の両方に共通してみられ、被験物質投与群で頻度および程度が増加している所見についてはWilcoxonの順位和検定法により対照群と被験物質投与群の差について有意差検定を行った。有意水準は、5%および1%とした。

結果

1. 反復投与毒性(親動物所見)

1) 一般状態

いずれの投与群の雌雄動物にも死亡は認められなかった。

200 mg/kg 投与群の雌雄動物において、3回目投与後より、活動性の増加を示す動物がみられた。こうした動物の数は投与1週間まで次第に増加し、雌雄動物それぞれ10および11匹に認められたが、その後は次第に減少し、投与23日以後はみられなくなった。この症状は投与後約20分頃より始まり、その後約30分程で消失した。400 mg/kg 投与群においては、全ての動物において、初回投与後より活動性の変化が観察され、投与回数増加と共に症状の現われ方に変化が認められた。すなわち投与初期には、投与約20分後より活動性の減少が現われ、約30分後には回復したが、投与3日頃より先ず活動性の増加が現し、その後に減少する動物も観察されるようになった。また、活動性の増加あるいは減少の後、腹臥位を呈する動物も少数みられた。雄動物においては、この症状は投与期間を通して観察されたが、雌動物においては、妊娠期間中は軽度となる傾向が認められた。800 mg/kg 投与群においても、投与20分後頃より全ての動物に毒性症状が認められたが、症状はさらに重篤で、活動性の減少から腹臥位を呈した。また、投与初期には昏睡に陥る動物も雌雄にそれぞれ数匹認められた。しかし、こうした症状も投与5時間後には消失していた。この投与群においても、投与開始後1週間を経過すると投与回数増加と共に、特に雌動物においては妊娠期間中の症状の程度および発現動物数は減少した。しかし、この投与群においては、投与期間の後半期に、雌動物においては妊娠後半期に、軽度の眼球突出を示す動物が雌雄にそれぞれ7および6匹認められた。哺育期間中は、妊娠期間中に比較して、活動性の減少および昏睡状態を呈する動物数は増加し、またこうした症状を示す時間も延長する傾向にあった。

2) 体重

A. 雄動物 (Table 1)

200 mg/kg 投与群においては、投与期間中の平均体重は対照群と比較して有意差は認められなかったが、400 mg/kg および 800 mg/kg 投与群においては、投与初期の体重増加抑制による平均体重の差が、実験終了時まで用量依存的に継続して認められた。すなわち、400 mg/kg 投与群では、投与期間中の平均体重は、対照群に比較して統計的に有意ではないが低値であった。また、800 mg/kg 投与群においては、投与期間を通じて、平均体重は有意 ($p < 0.01$) に減少した。

B. 雌動物 (Table 2)

(1) 交配前

200 mg/kg 投与群の平均体重は、対照群と殆ど同等であった。400 mg/kg 投与群では投与開始後の平均体重は、対照群と比較した場合、低値であったが、有意な変化ではなかった。800 mg/kg 投与群においては、投与開始後 1 週間および 2 週間後の平均体重は有意 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) に減少した。

(2) 妊娠期間

被験物質投与群の妊娠期間中の平均体重は、特に妊娠後半期において、投与量依存的な減少が認められた。200 mg/kg 投与群においては、対照群に比較して統計的に有意な減少ではなかったが、400 mg/kg 投与群においては、妊娠 14 日の平均体重は有意 ($p < 0.05$) に減少し、妊娠 20 日の平均体重も有意差は認められなかったが、低値のまま推移した。800 mg/kg 投与群の平均体重は、妊娠期間を通じて有意 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) に減少した。

(3) 哺育期間

哺育期間の体重は、妊娠末期の平均体重の差が継続的に示されていると考えられ、分娩日および哺育 4 日の平均体重は、400 mg/kg 投与群および 800 mg/kg 投与群で、対照群に比較して有意 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) に減少した。

3) 摂餌量

A. 雄動物 (Table 3)

200 mg/kg 投与群の摂餌量については、対照群に比較して殆ど差がみられなかった。400 mg/kg 投与群においては、投与開始後 2 週間の摂餌量が軽度 (7.6 % ~ 9.8 %) ではあったが有意 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) に減少していた。800 mg/kg 投与群においては、測定した全ての期間にわたって有意 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) に減少しており、減少の程度は約 7 % ~ 20 % であった。

B. 雌動物 (Table 4)

(1) 交配前

200 mg/kg 投与群の摂餌量は対照群と同等であった。400 mg/kg 投与群の摂餌量はいずれの週においても、対

照群に比較して減少 (6.3 % ~ 7.5 %) しており、投与開始後の 1 週間においてはこの減少は統計的に有意 ($p < 0.05$) であった。800 mg/kg 投与群においても統計的に有意 ($p < 0.01$) な減少が認められ、対照群に比較した減少の程度は約 10 % ~ 15 % であった。

(2) 妊娠期間

200 mg/kg 投与群の摂餌量は、いずれの測定時においても対照群より減少 (2.3 % ~ 4.7 %) していたが、統計的に有意なものではなかった。400 mg/kg 投与群においても摂餌量はすべての測定時に減少 (5.6 % ~ 10.2 %) しており、妊娠前半期の減少は統計的に有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) であった。800 mg/kg 投与群の摂餌量は、いずれの測定時においても有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) に減少しており、その減少は対照群に比較して約 9 % ~ 11 % であった。

(3) 哺育期間

被験物質各投与群の摂餌量はいずれの投与量群においても対照群に比較して減少 (8.8 % ~ 15.0 %) しており、減少の程度は投与量に依存していた。しかし、摂餌量の個体差が比較的大きかったため、統計的有意差はみられなかった。

4) 尿検査

いずれの被験物質各投与群およびいずれの検査日においても、尿中に血色素が認められた動物の頻度に有意差はみられなかった。しかし、800 mg/kg 投与群の投与初日の検査において、著しい量の血色素を排泄した動物が雌雄にそれぞれ 3 および 2 匹認められた。

5) 解剖時検査

A. 雄

(1) 血液学検査 (Table 5)

赤血球系の変化として 400 mg/kg 投与群の Hb (15.0 g/dL) および 800 mg/kg 投与群の Hb (14.9 g/dL) ならびに Ht (42.7 %) が統計的に有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) に減少していたが、その程度は極めて軽度のものであった。当研究所の 14 週齢雄ラットにおける過去 5 試験の Hb および Ht は、それぞれ 14.5 ~ 15.6 g/dL および 40.1 ~ 44.3 % であり、上記変化はすべてこれらの範囲内に含まれることから、毒性学的に無意味なものと考えられる。

(2) 血液生化学検査 (Table 6)

被験物質各投与群において、血糖値の軽度ではあるが有意 ($p < 0.01$) な減少が認められた。対照群における血糖値の変動幅は、129 ~ 150 mg/dL であったが、200、400 および 800 mg/kg 投与群ではそれぞれ 105 ~ 138、115 ~ 141 および 98 ~ 131 mg/dL であった。また、200 および 800 mg/kg 投与群においてカリウムの軽度ではあるが統計的に有意 ($p < 0.01$) な減少、および、これら投与群におけるリンの軽度ではあるが統計的に有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$) な増加が認められた。これら

カリウムおよびリンの変化はいずれも正常範囲内の変化であり、毒性学的には無意味なものと考えられる。

(3) 器官重量 (Table 7)

400および800 mg/kg投与群の肝臓実重量が有意 ($p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$)に減少していたが、体重比重量には有意差は認められなかった。この変化は体重減少を反映したものと考えられる。また、800 mg/kg投与群においては、腎臓実重量の有意 ($p < 0.05$)な減少および精巣の比重量の有意 ($p < 0.05$)な増加が認められたが、いずれも体重減少に関連して生じた変化であり、毒性学的に意味のある変化ではなかった。

(4) 剖検

被験物質投与に起因したと考えられる異常所見は認められなかった。

(5) 病理組織学検査 (Table 8)

膀胱、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、精巣、精巣上体およびハーダー腺に以下の所見が認められた。その他の組織に異常は観察されなかった。

(膀胱)

400 mg/kg投与群の5匹および800 mg/kg投与群の7匹に粘膜上皮のびまん性過形成がみられ、400 mg/kg投与群の4匹および800 mg/kg投与群の12匹の粘膜固有層に線維化が認められた。その他、対照群の3匹、400 mg/kg投与群の2匹および800 mg/kg投与群の1匹の粘膜固有層にリンパ球の浸潤が認められた。

(肝臓)

対照群および800 mg/kg投与群に小葉周辺性の肝細胞の脂肪化、小肉芽腫、髓外造血、巣状壊死および壊死巣への好中球の浸潤がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

(腎臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、萎縮あるいは再生尿細管、eosinophilic body、尿細管の限局性拡張、腎盂の拡張がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、対照群の1匹にリンパ球の浸潤が認められた。

(心臓)

対照群の1匹に心筋の線維化がみられ、対照群および800 mg/kg投与群の各1匹に巣状壊死が認められた。

(脾臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、髓外造血巣および色素沈着がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。その他、対照群の1匹および800 mg/kg投与群の3匹に、極めて軽度の鬱血が認められた。

(精巣)

800 mg/kg投与群の1匹の精細管内に、多核巨細胞が認められた。

(精巣上体)

対照群および800 mg/kg投与群に、リンパ球の浸潤、

精子肉芽腫がみられたが、両群間に頻度および程度の差は認められなかった。

(ハーダー腺)

対照群の4匹および800 mg/kg投与群の1匹にリンパ球の浸潤がみられた以外に変化は認められなかった。

B. 雌動物

(1) 器官重量 (Table 7)

400 mg/kg投与群においては、肝臓の実重量が有意 ($p < 0.05$)に減少し、腎臓の比重量が有意 ($p < 0.05$)に増加していた。800 mg/kg投与群においては、肝臓の実重量および比重量が有意 ($p < 0.01$)に減少し、また、腎臓の実重量も有意 ($p < 0.05$)に減少していた。これらの変化はいずれも体重減少に伴って生じた変化であり、毒性学的に意味のある変化ではなかった。

(2) 剖検

被験物質投与に起因すると思われる異常所見はなかった。

(3) 病理組織学検査 (Table 8)

膀胱、胸腺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓およびハーダー腺に以下の所見が認められた。その他の組織に異常は観察されなかった。

各器官における観察所見の概要は以下の通りである。

(膀胱)

400 mg/kg投与群の1匹および800 mg/kg投与群の3匹に上皮のびまん性過形成がみられ、400 mg/kg投与群の2匹および800 mg/kg投与群の12匹の粘膜固有層に線維化が認められた。その他、200 mg/kg投与群の1匹の粘膜固有層にリンパ球の浸潤が認められた。

(胸腺)

対照群を含む各投与群に萎縮がみられたが、400および800 mg/kg投与群では、その頻度は対照群よりも高かった。その他、400および800 mg/kg投与群の各1匹に、出血が認められた。

(肝臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、小葉周辺性の脂肪化、小肉芽腫および髓外造血がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。

(腎臓)

対照群および800 mg/kg投与群に、萎縮あるいは再生尿細管がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。その他、800 mg/kg投与群の1匹に、皮髄境界部の石灰沈着が認められた。

(心臓)

対照群の1匹に巣状壊死がみられた。

(脾臓)

対照群を含む各群に髓外造血巣がみられたが、800 mg/kg投与群では造血細胞の減少が認められる例が多かった。その他、対照群を含む各群に色素沈着がみられたが、各群間に頻度および程度の差はなかった。その他、400 mg/kg投与群の2匹および800 mg/kg投与群の3匹

に鬱血が見られ、対照群の1匹に線維化が認められた。
(ハーダー腺)

対照群および800 mg/kg投与群の各1匹に色素沈着の亢進がみられた。

2. 生殖発生毒性

1) 生殖関連所見

A. 交配成績 (Table 9)

交尾率はいずれの投与群においても100%であった。不妊動物が、対照群、200および800 mg/kg投与群にそれぞれ1, 1および2匹認められたが、被験物質投与と関連する有意な変化ではなかった。

B. 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態に関しても異常所見はなかった。

C. 妊娠黄体数、着床数および着床率 (Table 10)

これら観察項目に関しても異常所見はなかった。

D. 出産率および妊娠期間 (Table 10)

対照群を含むいずれの投与群においても、全ての妊娠動物が分娩し、妊娠期間に関しても異常はみられなかった。

2) 出生児所見

A. 一般状態および生存性 (Table 10)

生存性に関しては、対照群を含むいずれの投与群においても異常所見はなかった。

B. 体重 (Table 10)

対照群に比較した雌雄産児の生後4日の体重が、800 mg/kg投与群において僅か(10.2%および8.8%)ではあるが有意($p < 0.05$)に減少した。

C. 形態

産児の形態に関しては、対照群を含むいずれの投与群においても異常所見はなかった。

考察

主要な変化として、行動あるいは一般状態に対する影響、血糖値の軽度の低下および膀胱における病理組織学変化が認められた。

1,4-ブタンジオール投与による毒性試験はいくつか報告されており⁵⁻⁸⁾、その中で共通して観察されている一般状態の変化としては、表現上の差異はあるものの、活動性の減少および睡眠であった。本試験においても、こうした変化は400 mg/kg以上の投与量において観察された。200 mg/kg投与群においては活動性はむしろ亢進したが、これは1,4-ブタンジオールの生物学的活性^{9), 10)}に起因する変化と考え、毒性変化とはみなさなかった。400 mg/kg投与群においては、投与の進行に伴って活動性の現われ方はやや変化し、亢進を示す動物も発現した。

また、こうした投与の進行に伴う変化は、1,4-ブタンジオールの代謝速度の変化を示唆していると思われる。妊娠期間中に症状が軽減する傾向がみられた理由としては、この期間中動物の体重が急速に増加し、妊娠末期までに約50%~60%増加していたのに対し、1,4-ブタンジオールの妊娠期間中の投与量が妊娠0日の体重に基づいていたことによるものと思われる。

雄動物の血液生化学検査において、軽度ではあるが、統計的に有意な減少が観察された。Jedrychowskiら⁷⁾は1,4-ブタンジオールの最高500 mg/kgまでの投与量を、Wistar系ラットに28日間経口投与したが、血糖値に関しては、統計的に有意差は認めていないがその平均値は投与量の増加とともにむしろ上昇していた。したがって本試験でみられた血糖値の軽度の減少は、被験物質投与によるものか否か、疑問視される。

膀胱の病理組織学観察において、移行上皮のびまん性過形成および粘膜固有層の線維化が400 mg/kg以上の投与量群において観察されたが、これらの所見は過去の報告には見当たらなかった。しかし1,4-ブタンジオールは各種器官に充血をもたらすことが報告されており¹¹⁾、充血による透過性の亢進が被験物質あるいはその代謝物の組織中への移行を助長し、その結果これら物質が膀胱粘膜を刺激したと考えることができよう。

生殖発生毒性に関しては、親世代の生殖能に関連した観察項目において、被験物質投与との関連を示す変化は認められなかった。産児に関しては、雌雄産児の生後4日の体重が、800 mg/kg投与群において減少した。この減少は母動物の哺育4日の平均体重が低値であったことに起因しているのかもしれないが、毒性学的意義は不明である。

以上の試験成績から、本試験条件下では、1,4-ブタンジオールの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに200 mg/kg/dayを下回る量、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄ともに800 mg/kg/day、産児に対しては400 mg/kg/dayであると判断される。

文献

- 1) E. Salewski, *Naunyn-schmiedebergs arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **247**, 367(1964).
- 2) C. W. Dunnett, *Biometrics.*, **20**, 482(1964).
- 3) H. Scheffé, *Biometrika.*, **40**, 87(1953).
- 4) W. H. Kruskal and W. A. Wallis, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **47**, 583(1952).
- 5) P. V. Taberner, J. T. Rick and G. A. Kerkut, *Life Sciences*, **11**, 335(1972).
- 6) P. V. Taberner and M. J. Pearce, *J. Pharm. Pharmac.*, **26**, 597(1974).
- 7) R. A. Jedrychowski, R. Görny, J. Stetkiewicz and I. Stetkiewicz, *Polish J. Occu. Med.*, **3**, 421(1990).
- 8) National Toxicology Program, *Final Study Report*. (1994).

- 9) F. Poidrugo and O. C. Snead III, *Neuropharmacol.*, **23**, 109(1984).
- 10) H. Sprince, J. A. Josephs Jr. and C. R. Wilpizeski, *Life Sciences*, **5**, 2041(1966).
- 11) S. P. Knyshova, *Hyg. Sanit.*, **33**, 41(1968).

連絡先

試験責任者：藤井孝朗

試験担当者：橋本 豊，佐藤昌子，宮原 敬，
田子和美，関 剛幸，小島幸一，
吉村慎介，畔上二郎，三枝克彦，
稲田浩子，松木容彦，中込まどか

(財)食品薬品安全センター

〒257-8523 神奈川県秦野市落合725-3

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

Correspondence

Authors: Takaaki Fujii (Study director)

Yutaka Hashimoto, Masako Sato,

Takashi Miyahara, Kazumi Tago,

Takayuki Seki, Kohichi Kojima,

Shinsuke Yoshimura, Jiro Azegami,

Katsuhiko Saegusa, Hiroko Inada,

Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center in Reproductive Toxicology

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

Japan

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

Table 1 Body weights of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration								
1 (Init. wt.)	296.6 ± 7.3	(13)	296.7 ± 8.2	(13)	297.0 ± 7.3	(13)	296.6 ± 8.2	(13)
8	335.0 ± 17.1	(13)	335.3 ± 16.3	(13)	323.1 ± 12.8	(13)	304.8 ± 14.6**	(13)
15	371.5 ± 20.6	(13)	372.3 ± 23.0	(13)	357.6 ± 16.6	(13)	335.0 ± 15.5**	(13)
22	395.9 ± 23.8	(13)	398.7 ± 25.4	(13)	381.4 ± 19.1	(13)	358.5 ± 18.7**	(13)
29	424.3 ± 27.7	(13)	428.2 ± 28.3	(13)	405.2 ± 21.1	(13)	381.5 ± 17.3**	(13)
36	446.2 ± 30.1	(13)	454.1 ± 31.7	(13)	425.3 ± 20.9	(13)	402.7 ± 18.9**	(13)
42	463.4 ± 31.1	(13)	470.0 ± 32.7	(13)	441.4 ± 23.2	(13)	416.4 ± 18.9**	(13)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.
 Parenthesis indicates number of animals.
 **:significant difference from control, p<0.01

Table 2 Body weights of female rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration (Pre-mating period)								
1 (Init. wt.)	216.5 ± 6.5	(13)	216.6 ± 7.4	(13)	216.1 ± 6.3	(13)	216.0 ± 6.3	(13)
8	235.1 ± 12.6	(13)	232.2 ± 10.9	(13)	229.2 ± 7.3	(13)	219.7 ± 8.8**	(13)
15	251.8 ± 15.4	(13)	251.8 ± 16.2	(13)	245.4 ± 7.4	(13)	237.9 ± 11.2*	(13)
Days of pregnancy								
0	259.2 ± 14.9	(12)	260.7 ± 16.5	(12)	252.5 ± 7.8	(13)	242.1 ± 13.5*	(11)
7	300.4 ± 20.1	(12)	292.5 ± 19.3	(12)	285.3 ± 10.9	(13)	279.4 ± 18.0*	(11)
14	339.0 ± 22.6	(12)	329.4 ± 22.2	(12)	318.1 ± 11.4*	(13)	312.7 ± 21.0**	(11)
20	412.9 ± 23.3	(12)	401.1 ± 27.1	(12)	391.0 ± 18.5	(13)	382.4 ± 29.4*	(11)
Days of lactation								
0	308.2 ± 32.1	(12)	302.4 ± 20.1	(12)	279.1 ± 12.1*	(13)	276.8 ± 21.7*	(11)
4	355.1 ± 23.4	(12)	321.1 ± 26.0	(12)	305.6 ± 16.9**	(13)	296.5 ± 23.4**	(11)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.
 Parenthesis indicates number of animals.
 * :significant difference from control, p<0.05
 **:significant difference from control, p<0.01

Table 3 Food consumption of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration								
1 ~ 8	198.2 ± 13.9	(13)	199.1 ± 13.8	(13)	183.1 ± 9.8*	(13)	159.5 ± 15.1**	(13)
8 ~ 15	197.6 ± 12.0	(13)	192.8 ± 14.1	(13)	178.3 ± 12.2**	(13)	162.7 ± 15.0**	(13)
29 ~ 36	187.9 ± 11.8	(13)	193.4 ± 15.2	(13)	178.3 ± 8.8	(13)	174.9 ± 11.2*	(13)
36 ~ 42	161.5 ± 9.8	(13)	164.4 ± 11.8	(13)	154.0 ± 7.9	(13)	145.9 ± 9.1**	(13)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.
 Parenthesis indicates number of animals.
 * :significant difference from control, p<0.05
 **:significant difference from control, p<0.01

Table 4 Food consumption of female rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Days of administration (Pre-mating period)								
1~ 8	140.4 ± 13.1	(13)	139.9 ± 8.7	(13)	129.9 ± 9.0*	(13)	118.7 ± 8.9**	(13)
8~15	141.9 ± 11.7	(13)	145.5 ± 11.2	(13)	133.0 ± 7.4	(13)	128.1 ± 9.5**	(13)
Days of pregnancy								
0~ 7	173.2 ± 14.2	(12)	165.1 ± 13.2	(12)	157.8 ± 10.2*	(13)	158.3 ± 16.7*	(11)
7~14	183.6 ± 17.6	(12)	177.3 ± 15.3	(12)	164.8 ± 8.6**	(13)	167.6 ± 13.2*	(11)
14~20	154.1 ± 12.9	(12)	150.6 ± 14.3	(12)	145.5 ± 9.4	(13)	137.7 ± 10.5**	(11)
Days of lactation								
0~ 4	121.9 ± 12.5	(12)	111.2 ± 24.7	(12)	108.6 ± 21.6	(13)	103.6 ± 22.0	(11)

Values are expressed as mean±S.D. in grams.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, p<0.05

** : significant difference from control, p<0.01

Table 5 Hematology of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Male								
Red blood cells								
Count (× 10 ⁴ /mm ³)	821 ± 24	(13)	805 ± 34	(13)	803 ± 37	(13)	797 ± 22	(13)
Hemoglobin (g/dl)	15.6 ± 0.6	(13)	15.1 ± 0.4	(13)	15.0 ± 0.6*	(13)	14.9 ± 0.5**	(13)
Hematocrit (%)	44.4 ± 1.5	(13)	43.5 ± 1.3	(13)	42.9 ± 1.8	(13)	42.7 ± 1.5*	(13)
MCV (μm ³)	54.1 ± 1.9	(13)	54.1 ± 2.0	(13)	53.5 ± 1.2	(13)	53.6 ± 2.0	(13)
MCH (pg)	19.0 ± 0.7	(13)	18.8 ± 0.7	(13)	18.6 ± 0.4	(13)	18.7 ± 0.7	(13)
MCHC (%)	35.1 ± 0.6	(13)	34.8 ± 0.3	(13)	34.8 ± 0.3	(13)	34.9 ± 0.3	(13)
White blood cells								
Count (× 10 ³ /mm ³)	71 ± 14	(13)	58 ± 14*	(13)	54 ± 10**	(13)	67 ± 14	(13)
Band neutrophil (%)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Segmented neutrophil (%)	14 ± 7	(13)	15 ± 6	(13)	17 ± 7	(13)	14 ± 7	(13)
Eosinophil (%)	1 ± 1	(13)	1 ± 1	(13)	1 ± 1	(13)	1 ± 2	(13)
Basophil (%)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)
Monocyte (%)	3 ± 2	(13)	4 ± 2	(13)	4 ± 2	(13)	4 ± 3	(13)
Lymphocyte (%)	82 ± 7	(13)	79 ± 8	(13)	78 ± 8	(13)	80 ± 9	(13)
Platelet								
Count (× 10 ⁴ /mm ³)	102.9 ± 12.3	(13)	100.1 ± 11.0	(13)	104.7 ± 10.8	(13)	97.8 ± 8.0	(13)

Values are expressed as mean±S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, p<0.05

** : significant difference from control, p<0.01

Table 6 Blood chemistry of male rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0		200		400		800	
Total protein(g/dL)	5.6 ± 0.2	(13)	5.5 ± 0.1	(13)	5.4 ± 0.2	(13)	5.4 ± 0.2	(13)
Albumin(g/dL)	3.0 ± 0.1	(13)	2.9 ± 0.1	(13)	2.9 ± 0.1	(13)	2.9 ± 0.1	(13)
A/G	1.12 ± 0.08	(13)	1.17 ± 0.12	(13)	1.16 ± 0.13	(13)	1.16 ± 0.14	(13)
BUN(mg/dL)	16 ± 1	(13)	15 ± 2	(13)	15 ± 2	(13)	17 ± 3	(13)
Creatinine(mg/dL)	0.7 ± 0.1	(13)	0.7 ± 0.0	(13)	0.7 ± 0.1	(13)	0.7 ± 0.1	(13)
Glucose(mg/dL)	139 ± 7	(13)	127 ± 10**	(13)	128 ± 9**	(13)	116 ± 9**	(13)
Total cholesterol(mg/dL)	29 ± 3	(13)	27 ± 6	(13)	27 ± 4	(13)	29 ± 4	(13)
Total bilirubin(mg/dL)	0.06 ± 0.02	(13)	0.06 ± 0.04	(13)	0.07 ± 0.02	(13)	0.06 ± 0.03	(13)
Na(mEq/L)	143.9 ± 0.9	(13)	144.5 ± 0.7	(13)	143.2 ± 0.8	(13)	143.6 ± 1.3	(13)
K(mEq/L)	4.17 ± 0.20	(13)	3.92 ± 0.17**	(13)	4.08 ± 0.20	(13)	3.89 ± 0.15**	(13)
Cl(mEq/L)	108.7 ± 1.3	(13)	108.8 ± 1.1	(13)	108.6 ± 1.3	(13)	108.2 ± 1.0	(13)
Ca(mg/dL)	8.5 ± 0.2	(13)	8.6 ± 0.2	(13)	8.6 ± 0.3	(13)	8.7 ± 0.2	(13)
Inorg. phos.(mg/dL)	5.6 ± 0.3	(13)	6.0 ± 0.5*	(13)	5.8 ± 0.3	(13)	6.5 ± 0.5**	(13)
ALP(U/L)	303 ± 44	(13)	280 ± 27	(13)	297 ± 34	(13)	307 ± 48	(13)
GPT(U/L)	31 ± 4	(13)	30 ± 5	(13)	34 ± 6	(13)	29 ± 3	(13)
GOT(U/L)	68 ± 6	(13)	65 ± 10	(13)	66 ± 7	(13)	66 ± 7	(13)
γ-GTP(U/L)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)	0 ± 0	(13)

Values are expressed as mean±S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

* : significant difference from control, p<0.05

** : significant difference from control, p<0.01

Table 7 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Male	Final body weight (g)	434.3 ± 29.3	(13)	443.5 ± 30.7	(13)	415.3 ± 20.4	(13)	390.8 ± 18.0**	(13)
	Liver (g)	12.15 ± 1.36 ^a	(13)	11.70 ± 0.96	(13)	11.09 ± 1.02*	(13)	10.34 ± 0.83**	(13)
		2.79 ± 0.20 ^b		2.64 ± 0.13		2.67 ± 0.17		2.64 ± 0.15	
	Kidneys (g)	2.82 ± 0.20	(13)	2.86 ± 0.22	(13)	2.64 ± 0.18	(13)	2.62 ± 0.16*	(13)
		0.65 ± 0.04		0.65 ± 0.03		0.64 ± 0.03		0.67 ± 0.03	
	Thymus (mg)	348.8 ± 103.5	(13)	343.3 ± 94.8	(13)	317.8 ± 79.6	(13)	286.2 ± 69.8	(13)
		80.9 ± 25.5		77.6 ± 21.6		76.2 ± 17.2		73.3 ± 18.0	
	Testes (g)	3.06 ± 0.20	(13)	3.11 ± 0.37	(13)	3.14 ± 0.21	(13)	3.06 ± 0.17	(13)
		0.71 ± 0.05		0.70 ± 0.08		0.76 ± 0.06		0.78 ± 0.07*	
Epididymides (g)	1.19 ± 0.06	(13)	1.16 ± 0.09	(13)	1.17 ± 0.08	(13)	1.13 ± 0.08	(13)	
	0.28 ± 0.02		0.26 ± 0.02		0.28 ± 0.03		0.29 ± 0.02		
Female	Final body weight (g)	335.1 ± 23.4	(12)	321.1 ± 26.0	(12)	305.6 ± 16.9**	(13)	296.5 ± 23.4**	(11)
	Liver (g)	14.27 ± 0.92	(12)	13.36 ± 1.40	(12)	13.08 ± 1.07*	(13)	11.68 ± 1.15**	(11)
		4.26 ± 0.15		4.17 ± 0.33		4.28 ± 0.26		3.94 ± 0.21**	
	Kidneys (g)	2.07 ± 0.15	(12)	2.07 ± 0.21	(12)	2.09 ± 0.18	(13)	1.88 ± 0.17*	(11)
		0.62 ± 0.06		0.65 ± 0.05		0.69 ± 0.06*		0.63 ± 0.04	
	Thymus (mg)	231.7 ± 88.9	(12)	221.1 ± 66.1	(12)	188.9 ± 62.0	(13)	167.0 ± 57.5	(11)
		68.6 ± 23.5		68.1 ± 16.7		61.3 ± 18.1		55.5 ± 15.9	

Values are expressed as mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of animals.

a: absolute weight

b: relative weight (g or mg per 100 g body weight)

*: significant difference from control, $p < 0.05$

**: significant difference from control, $p < 0.01$

Table 8 Histopathological findings of rats treated orally with 1,4-butanediol in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ [Number of animals examined]	Sex:	male				female			
		Dose(mg/kg):				Dose(mg/kg):			
Findings, grade and number of animals		0	200	400	800	0	200	400	800
Urinary bladder		[13]	[13]	[12]	[13]	[13]	[12]	[13]	[13]
Diffuse hyperplasia of epithelium	total	0	0	5	7	0	0	1	3
	±	0	0	5	7	0	0	1	3
Fibrosis in lamina propria	total	0	0	4	12	0	0	2	12
	±	0	0	4	12	0	0	2	12
Infiltration of lymphocytes in lamina propria	total	3	0	2	1	0	1	0	0
	±	3	0	2	1	0	1	0	0
Thymus		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Atrophy	total	0			0	1	1	5	7
	±	0			0	0	1	2	2
	+	0			0	1	0	3	5
Hemorrhage	total	0			0	0	0	1	1
	±	0			0	0	0	1	0
	+	0			0	0	0	0	1
Spleen		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Extramedullary hematopoiesis	total	13			13	13	13	13	13
	±	6			4	1	1	0	4
	+	7			9	4	5	5	6
	++	0			0	8	7	8	3
Deposits of pigment	total	13			13	13	13	13	13
	±	2			0	0	1	1	3
	+	11			13	13	12	12	10
Congestion	total	1			3	0	0	2	3
	±	1			3	0	0	0	0
	+	0			0	0	0	2	3
Fibrosis	total	0			0	1	0	0	0
	+	0			0	1	0	0	0
Liver		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Fatty change of hepatocyte in peripheral zone	total	13			13	1			1
	±	0			0	0			1
	+	8			10	1			0
	++	5			3	0			0
Microgranuloma	total	10			11	6			7
	±	9			11	6			7
	+	1			0	0			0
Extramedullary hematopoiesis	total	1			2	4			3
	±	1			2	4			3
Focal necrosis	total	2			1	0			0
	±	1			0	0			0
	+	1			1	0			0
Infiltration neutrophils in necrotic focus	total	2			1	0			0
	±	1			1	0			0
	+	1			0	0			0

±:very slight, +:slight, ++:moderate, +++:severe

Table 8 (continued)

Organ [Number of animals examined]	Sex:	male				female			
		Dose (mg/kg) :							
Findings, grade and number of animals		0	200	400	800	0	200	400	800
Kidney		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Atrophic/regenerated tubule	total	12			11	5			7
	±	10			11	5			7
	+	2			0	0			0
Eosinophilic body	total	8			4	0			0
	±	5			2	0			0
	+	3			2	0			0
Focal dilatation of tubule in medulla	total	1			1	0			0
	+	1			1	0			0
Dilatation of pelvis	total	2			2	0			0
	+	2			2	0			0
Infiltration of lymphocytes	total	1			0	0			0
	+	1			0	0			0
Calcification in cortico-medullary junction	total	0			0	0			1
	+	0			0	0			1
Brain		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Partial defect	total	1			0	0			0
	+	1			0	0			0
Heart		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Myocardial fibrosis	total	1			0	0			0
	±	1			0	0			0
Focal necrosis	total	1			1	1			0
	±	1			1	1			0
Harderian gland		[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Infiltration of lymphocytes	total	4			1	0			0
	±	3			1	0			0
	+	1			0	0			0
Increased pigmentation	total	0			0	1			1
	+	0			0	1			1
Testis		[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Multinucleated giant cells in seminiferous tubules	total	0			1				
	±	0			1				
Epididymis		[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Infiltration of lymphocytes	total	8			8				
	±	5			6				
	+	3			2				
Spermatic granuloma	total	3			2				
	+	3			2				

±: very slight, +: slight, ++: moderate, +++: severe

Table 9 Summary of reproductive performance in parental rats treated orally with 1,4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	200	400	800
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	13
Copulation index ^{A)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant animals	12	12	13	11
Fertility index ^{B)}	92.3	92.3	100.0	84.6
Pairing days until copulation (mean±S.D.)	2.8 ± 1.2	2.8 ± 1.9	3.1 ± 1.2	3.0 ± 3.5
Frequency of vaginal estrus (mean±S.D.)	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3

A) : Copulation index = (Number of copulated pairs/Number of mated pairs) × 100; %

B) : Fertility index = (Number of pregnant animals/Number of copulated pairs) × 100; %

Table 10 Summary of development of pups from dams treated orally with 1, 4-butanediol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0		200		400		800	
Number of pregnant females	12		12		13		11	
Number of pregnant females with pups alive	12		12		13		11	
Gestation index ^{A)}	100.0		100.0		100.0		100.0	
Gestation length in days	22.0 ± 0.0	(12)	22.0 ± 0.0	(12)	22.2 ± 0.4	(13)	22.2 ± 0.4	(11)
Number of corpora lutea	17.6 ± 3.4	(12)	17.9 ± 4.4	(12)	17.0 ± 1.4	(13)	16.8 ± 1.9	(11)
Number of implantation sites	15.1 ± 2.0	(12)	15.8 ± 2.4	(12)	15.4 ± 1.3	(13)	15.9 ± 1.6	(11)
Implantation index ^{B)}	87.5 ± 13.9	(12)	89.6 ± 11.3	(12)	90.8 ± 8.0	(13)	94.9 ± 5.7	(11)
Day 0 of lactation								
Number of pups born	14.8 ± 1.9	(12)	14.6 ± 2.2	(12)	14.6 ± 1.9	(13)	15.0 ± 1.8	(11)
Delivery index ^{C)}	98.4 ± 2.9	(12)	92.9 ± 7.1	(12)	94.8 ± 6.3	(13)	94.2 ± 4.7	(11)
Number of pups alive	14.7 ± 1.9	(12)	14.4 ± 2.1	(12)	13.9 ± 2.1	(13)	14.7 ± 1.8	(11)
Birth index ^{D)}	97.3 ± 3.3	(12)	92.0 ± 8.3	(12)	90.4 ± 10.6	(13)	92.4 ± 4.4	(11)
Live birth index ^{E)}	98.9 ± 2.5	(12)	98.9 ± 2.5	(12)	95.5 ± 9.8	(13)	98.2 ± 3.1	(11)
Pup weight in grams								
Male	6.3 ± 0.3	(12)	6.0 ± 0.3	(12)	6.4 ± 0.3	(13)	6.1 ± 0.5	(11)
Female	6.0 ± 0.3	(12)	5.8 ± 0.3	(12)	6.0 ± 0.3	(13)	5.7 ± 0.6	(11)
Sex ratio ^{F)}	45.6 ± 13.4	(12)	47.8 ± 13.5	(12)	51.6 ± 15.1	(13)	46.2 ± 14.8	(11)
Day 4 of lactation								
Number of pups alive	14.4 ± 1.7	(12)	14.3 ± 2.0	(12)	13.8 ± 2.2	(13)	14.5 ± 1.5	(11)
Viability index ^{G)}	98.5 ± 2.8	(12)	99.5 ± 1.7	(12)	99.3 ± 2.5	(13)	98.4 ± 3.7	(11)
Pup weight in grams								
Male	10.2 ± 0.8	(12)	9.8 ± 0.7	(12)	10.0 ± 0.5	(13)	9.3 ± 0.8*	(11)
Female	9.8 ± 1.0	(12)	9.4 ± 0.8	(12)	9.6 ± 0.5	(13)	8.8 ± 0.8*	(11)
Sex ratio ^{H)}	46.3 ± 13.2	(12)	47.5 ± 13.4	(12)	51.9 ± 14.8	(13)	46.7 ± 15.1	(11)

Values are expressed as mean±S.D.

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

*: significant difference from control, $p < 0.05$

A) : Gestation index = (Number of pregnant females with pups alive/Number of pregnant females) × 100; %

B) : Implantation index = (Number of implantation sites/Number of corpora lutea) × 100; %

C) : Delivery index = (Number of pups born/Number of implantation sites) × 100; %

D) : Birth index = (Number of pups alive on day 0/Number of implantation sites) × 100; %

E) : Live birth index = (Number of pups alive on day 0/Number of pups born) × 100; %

F) : Sex ratio = (Number of male pups alive on day 0/Number of pups alive on day 0) × 100; %

G) : Viability index = (Number of pups alive on day 4/Number of pups alive on day 0) × 100; %

H) : Sex ratio = (Number of male pups alive on day 4/Number of pups alive on day 4) × 100; %