

Table 7 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose (mg/kg)	0	10	50	250
Male	Final body weight (g)	501.7 ± 30.7 (13)	509.6 ± 32.1 (13)	498.9 ± 28.3 (13)	496.0 ± 56.1 (13)
	Liver (g)	14.47 ± 1.32 ^{a)} (13) 2.88 ± 0.17 ^{b)}	14.48 ± 1.57 (13) 2.84 ± 0.18	14.67 ± 1.36 (13) 2.94 ± 0.16	16.86 ± 2.85 (13) 3.38 ± 0.22**
	Kidneys (g)	3.00 ± 0.19 (13) 0.60 ± 0.05	2.92 ± 0.19 (13) 0.57 ± 0.03	3.07 ± 0.24 (13) 0.62 ± 0.04	3.28 ± 0.35* (13) 0.67 ± 0.09
	Thymus (mg)	314.1 ± 68.8 (13) 62.9 ± 15.2	311.3 ± 101.4 (13) 60.8 ± 18.6	280.4 ± 64.0 (13) 56.6 ± 14.7	319.7 ± 93.4 (13) 65.6 ± 21.6
	Adrenal glands (mg)	52.0 ± 8.6 (13) 10.4 ± 1.8	45.3 ± 9.2 (13) 8.9 ± 1.8	45.5 ± 7.2 (13) 9.1 ± 1.5	47.4 ± 7.8 (13) 9.7 ± 1.9
	Testes (g)	3.21 ± 0.26 (13) 0.64 ± 0.08	3.27 ± 0.21 (13) 0.64 ± 0.05	3.23 ± 0.33 (13) 0.65 ± 0.06	3.34 ± 0.25 (13) 0.68 ± 0.09
	Epididymides (g)	1.17 ± 0.08 (13) 0.24 ± 0.03	1.16 ± 0.08 (13) 0.23 ± 0.02	1.16 ± 0.08 (13) 0.23 ± 0.01	1.20 ± 0.12 (13) 0.24 ± 0.03
Female	Final body weight (g)	313.7 ± 24.9 (13)	307.2 ± 22.2 (13)	291.0 ± 16.8* (12)	296.7 ± 17.4 (11)
	Liver (g)	13.16 ± 1.19 (13) 4.20 ± 0.28	13.48 ± 1.23 (13) 4.40 ± 0.37	13.50 ± 1.30 (12) 4.63 ± 0.29**	14.34 ± 1.08 (11) 4.83 ± 0.19**
	Kidneys (g)	1.80 ± 0.21 (13) 0.57 ± 0.04	1.87 ± 0.20 (13) 0.61 ± 0.04	1.75 ± 0.12 (12) 0.60 ± 0.05	1.85 ± 0.15 (11) 0.62 ± 0.05
	Thymus (mg)	162.5 ± 55.4 (13) 51.7 ± 15.8	140.3 ± 70.2 (13) 45.1 ± 21.8	128.2 ± 66.5 (12) 43.7 ± 22.1	137.0 ± 44.6 (11) 46.1 ± 15.1
	Adrenal glands (mg)	68.4 ± 9.2 (13) 21.9 ± 2.8	69.9 ± 8.0 (13) 22.8 ± 2.4	66.6 ± 10.5 (12) 22.9 ± 3.5	64.0 ± 7.6 (11) 21.6 ± 2.5

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)

Table 8 Histopathological findings of rats treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ [Number of animals examined]		Sex:		male				female			
Findings, grade and number of animals		Dose (mg/kg):		0	10	50	250	0	10	50	250
Heart				[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Myocardial degeneration	total			3			2	0			0
	±			3			2				
Liver				[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	total			0	0	3	11***	0	0	4*	13***
	±			0	0	3	6	0	0	4	9
	+			0	0	0	5	0	0	0	4
Fatty change, periportal	total			13	13	13	10**	0	0	0	0
	±			2	0	1	7				
	+			3	4	5	3				
	++			8	9	7	0				
Increase, catalase positive granule, centrilobular	total			0	0	0	2**	0			0
	±			0	0	0	2				
Elongation, catalase positive granule	total			0	0	0	2**	0			0
	±			0	0	0	2				
Necrosis, focal	total			0	0	0	0	0	1	0	1
	±							0	1	0	1
Spleen				[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Deposit, pigment, brown	total			13			13	13			13
	±			0			0	0			0
	+			13			13	13			13
Hematopoiesis, extramedullary	total			13			13	13			13
	±			7			7	0			2
	+			6			6	11			8
	++			0			0	2			3
Thymus				[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Atrophy	total			0			0	5	8	8	8
	±							3	4	5	6
	+							2	4	2	1
	++							0	0	1	1
Hemorrhage	total			0			0	0	1	0	0
	±							0	1	0	0
Kidney				[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Eosinophilic body	total			3	2	5	9*	0	0	0	0
	±			0	1	3	2				
	+			1	1	1	4				
	++			2	0	1	2				
	+++			0	0	0	1				
Basophilic tubule, cortex	total			12	9	10	8	6	5	1*	5
	±			12	9	10	7	6	5	1	4
	+			0	0	0	0	0	0	0	1
	++			0	0	0	1	0	0	0	0
Cast, granular cortico-medullary junction	total			0	0	0	1	0			0
	±			0	0	0	1				
Mineralization, medulla	total			1	0	0	1	0			0
	±			1	0	0	1				
Dilatation, renal pelvis	total			1	0	0	0	0			0
	±			1	0	0	0				
Cyst	total			0	1	1	0	0			0
	±			0	1	1	0				
Hyperplasia, pelvic epithelium	total			0	0	0	0	0	0	0	1
	±							0	0	0	1
	+							0	0	0	1
Cellular infiltration, lymphocyte, pelvic mucosa	total			0	0	0	0	0	0	0	1
	±							0	0	0	1
Cast, proteinous	total			0	0	0	0	0	0	0	1
	±							0	0	0	1
Urinary bladder				[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Hyperplasia, transitional cell	total			0			0	0	0	0	2
	±							0	0	0	2
Adrenal gland				[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Lipid droplet, increased, zona fasciculata	total			0			0	0	0	0	1
	±							0	0	0	1
Necrosis, cortex	total			0	0	0	0	0	1	0	0
	±							0	1	0	0
Epididymis				[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Granuloma spermatic	total			1			1				
	±			1			0				
	++			0			1				

±: very slight; +, slight; ++, moderate;

#: significant difference from control, $p < 0.05$ (by Fisher exact test)##: significant difference from control, $p < 0.01$ (by Fisher exact test)**: significant difference from control, $p < 0.01$ (by Mann-Whitney U test)

Table 9 Summary of reproductive performance in parental rats treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	10	50	250
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	13
Copulation index ^{A)}	100	100	100	100
Number of pregnant animals	13	13	12	12
Fertility index ^{B)}	100	100	92.3	92.3
Pairing days until copulation (Mean $\pm$ S.D.)	3.1 $\pm$ 2.2	2.7 $\pm$ 0.9	2.3 $\pm$ 1.9	2.8 $\pm$ 1.3
Frequency of vaginal estrus (Mean $\pm$ S.D.)	1.2 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.0

A): copulation index = (number of copulated pairs/number of mated pairs) $\times$ 100 ; %B): fertility index = (number of pregnant animals/number of copulated pairs) $\times$ 100 ; %

Table 10 Summary of development up of pups from dams treated orally with ditridecyl phthalate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	40-10	200-50	1000-250
Number of pregnant females	13	13	12	12
Number of pregnant females with pups alive	13	13	12	11
Gestation index ^{A)}	100	100	100	91.7
Gestation length in days	22.5 $\pm$ 0.5 (13)	22.6 $\pm$ 0.5 (13)	22.3 $\pm$ 0.5 (12)	22.5 $\pm$ 0.7 (12)
Number of corpora lutea	16.5 $\pm$ 2.3 (13)	17.8 $\pm$ 2.0 (13)	17.4 $\pm$ 2.6 (12)	17.5 $\pm$ 3.4 (12)
Number of implantation sites	15.5 $\pm$ 1.7 (13)	16.5 $\pm$ 2.2 (13)	15.9 $\pm$ 3.0 (12)	15.3 $\pm$ 4.3 (12)
Implantation index ^{B)}	93.9 $\pm$ 5.2 (13)	92.6 $\pm$ 6.8 (13)	91.9 $\pm$ 13.3 (12)	86.1 $\pm$ 22.6 (12)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	14.4 $\pm$ 1.9 (13)	14.7 $\pm$ 3.4 (13)	15.0 $\pm$ 2.9 (12)	13.9 $\pm$ 4.0 (12)
Delivery index ^{C)}	93.0 $\pm$ 7.2 (13)	88.2 $\pm$ 16.0 (13)	94.4 $\pm$ 5.9 (12)	91.5 $\pm$ 8.0 (12)
Number of pups alive	14.3 $\pm$ 1.8 (13)	14.7 $\pm$ 3.4 (13)	14.9 $\pm$ 2.8 (12)	13.2 $\pm$ 4.5 (12)
Birth index ^{D)}	92.6 $\pm$ 7.2 (13)	88.2 $\pm$ 16.0 (13)	93.9 $\pm$ 6.0 (12)	79.7 $\pm$ 27.2 (12)
Live birth index ^{E)}	99.6 $\pm$ 1.6 (13)	100.0 $\pm$ 0.0 (13)	99.5 $\pm$ 1.6 (12)	87.7 $\pm$ 28.4* (12)
Pup weight in grams				
Male	6.6 $\pm$ 0.7 (13)	6.4 $\pm$ 0.5 (13)	6.2 $\pm$ 0.6 (12)	6.3 $\pm$ 0.4 (11)
Female	6.3 $\pm$ 0.8 (13)	6.1 $\pm$ 0.6 (13)	5.9 $\pm$ 0.6 (12)	6.0 $\pm$ 0.4 (11)
Sex ratio ^{F)}	1.11 $\pm$ 0.6 (13)	1.34 $\pm$ 1.0 (13)	1.09 $\pm$ 0.6 (12)	0.99 $\pm$ 0.5 (11)
Day 4 of lactation				
Number of pups alive	13.8 $\pm$ 2.0 (13)	14.5 $\pm$ 3.3 (13)	14.4 $\pm$ 2.7 (12)	13.1 $\pm$ 3.8 (11)
Viability index ^{G)}	96.8 $\pm$ 11.4 (13)	98.6 $\pm$ 3.7 (13)	96.8 $\pm$ 5.7 (12)	89.9 $\pm$ 21.1 (11)
Pup weight in grams				
Male	10.3 $\pm$ 1.6 (13)	9.5 $\pm$ 2.0 (13)	9.1 $\pm$ 1.8 (12)	9.5 $\pm$ 0.5 (10)
Female	10.0 $\pm$ 1.7 (13)	9.2 $\pm$ 2.1 (13)	8.7 $\pm$ 1.9 (12)	9.3 $\pm$ 0.4 (11)

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

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

A): Gestation index = (number of pregnant females with pups alive/number of pregnant females) $\times$ 100 ; %B): Implantation index = (number of implantation sites/number of corpora lutea) $\times$ 100 ; %C): Delivery index = (number of pups born/number of implantation sites) $\times$ 100 ; %D): Birth index = (number of pups alive on day 0/number of implantation sites) $\times$ 100 ; %E): Live birth index = (number of pups alive on day 0/number of pups born) $\times$ 100 ; %F): Sex ratio = (number of male pups alive on day 0/number of female pups alive on day 0) $\times$ 100 ; %G): Viability index = (number of pups alive on day 4/number of pups alive on day 0) $\times$ 100 ; %

ジトリデシルフタラートの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Ditridecyl phthalate on Bacteria

要約

ジトリデシルフタラートについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537) および *Escherichia coli* (WP2 uvrA) の5菌株を用い、用量設定試験の結果をもとに、本試験ではS9 mix無添加群および添加群の各試験菌株についてそれぞれ156～5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量で試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加群および添加群のいずれにおいても、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではジトリデシルフタラートは、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535 および TA1537¹⁾ ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 uvrA²⁾ の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB.N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受けた。平成9年2月12日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK社)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム〔いずれも最終濃度〕)に2%のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID社: No.1)を加

え、30 mLをシャーレに分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

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

3. 前培養条件

内容量200 mLのバッフル付三角フラスコに2.5%ニュートリエントブロス(OXOID社)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μL 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック(株))を用い、37℃で6時間振盪(往復振盪:120回/分)培養し、試験に使用した。

4. S9 mix

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

成 分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
リン酸緩衝Na-液(pH 7.4)	100 μmol
精製水	残 量

5. 被験物質

被験物質のジトリデシルフタラート(ロット番号: 2700)は分子式C₃₄H₅₈O₄、分子量530.83、純度99.82%の液体である。協和油化(株)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

DMSOに被験物質を溶解して調製原液とした。調製

原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、S9 mix無添加群ならびに添加群のいずれの処理群においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。

従って、本試験においてはS9 mix無添加群ならびに添加群の各試験菌株について5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

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

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

アジ化ナトリウム(NaN_3 :和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン塩酸塩(ACR:ALDRICH社)

2-アミノアントラセン(2-AA:和光純薬工業(株))

9. 試験方法

Amesらの原法の改良法であるブレインキューベーション法¹⁾に準じて、S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 μL 、次いでS9 mix無添加群の場合、0.1 Mナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μL 、S9 mix添加群の場合、S9 mixを500 μL 添加し、さらに試験菌液100 μL を加え、37℃で20分間振盪培養(ブレインキューベーション)した。培養終了後、トップアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡($\times 60$)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス(株))を用いた。独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

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

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

1回目の試験結果をTable 1~2に、2回目の試験結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群のTA1537株の5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ においてのみ、ジトリデシルフタレート処理による生育阻害作用が観察された。また、復帰突然変異コロニー数については、S9 mix無添加群、S9 mix

添加群とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、コロニー数計測時、S9 mix無添加群、添加群のいずれも1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上の用量において、油滴状の析出物が観察された。以上の試験結果から、本試験条件下において、ジトリデシルフタレートの微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

なお、類縁化合物であるフタル酸ジヘプチルエステルの変異原性については、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた復帰突然変異試験で陰性²⁾と報告されている。

文献

- 1) D.M. Maron and B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) M.H.L. Green and W.J. Muriel, *Mutat. Res.*, 38, 3(1976).
- 3) 西富 保, 化学物質毒性試験報告, 4, 741(1996).

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 菊池正憲, 板倉真由実

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜

582-2

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

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)

Masanori Kikuchi, Mayumi Itakura

Biosafety Research Center, Foods, Drugs

and Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,

Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan

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

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

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]								
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>		
Test sub.	0	120 101 116 [112 $\pm$ 10]	12 17 13 [14 $\pm$ 3]	22 21 20 [21 $\pm$ 1]	21 27 23 [24 $\pm$ 3]	8 9 9 [9 $\pm$ 1]				
	156	99 115 103 [106 $\pm$ 8]	18 14 12 [15 $\pm$ 3]	16 18 20 [18 $\pm$ 2]	17 21 22 [20 $\pm$ 3]	13 12 7 [11 $\pm$ 3]				
	313	121 101 101 [108 $\pm$ 12]	13 17 12 [14 $\pm$ 3]	20 22 26 [23 $\pm$ 3]	24 25 19 [23 $\pm$ 3]	11 14 10 [12 $\pm$ 2]				
	625	100 101 127 [109 $\pm$ 15]	18 16 12 [15 $\pm$ 3]	21 23 21 [22 $\pm$ 1]	22 15 24 [20 $\pm$ 5]	12 11 10 [11 $\pm$ 1]				
	1250 +	101 85 112 [99 $\pm$ 14]	14 11 14 [13 $\pm$ 2]	26 27 18 [24 $\pm$ 5]	28 20 21 [23 $\pm$ 4]	9 11 9 [10 $\pm$ 1]				
	2500 +	101 81 102 [95 $\pm$ 12]	12 16 19 [16 $\pm$ 4]	23 20 22 [22 $\pm$ 2]	21 21 24 [22 $\pm$ 2]	9 8 11 [9 $\pm$ 2]				
	5000 +	97 94 100 [97 $\pm$ 3]	15 17 16 [16 $\pm$ 1]	25 27 27 [26 $\pm$ 1]	21 23 25 [23 $\pm$ 2]	11* 10* 10* [10 $\pm$ 1]				
Positive control		699 681 694** [691 $\pm$ 9]	417 429 398** [415 $\pm$ 16]	183 190 161** [178 $\pm$ 15]	561 602 618** [594 $\pm$ 29]	460 505 483** [483 $\pm$ 23]				

* :Growth inhibition was observed

+ :Visible precipitation was occurred at the end of exposure period

a) :AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) :NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) :AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) :ACR; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 2. Results of the bacterial reversion test of ditiidecyl phthalate (1st trial)
[activation method:+S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]								
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>		
Test sub.	0	111 109 111 [110 $\pm$ 1]	13 18 19 [17 $\pm$ 3]	21 26 27 [25 $\pm$ 3]	30 25 29 [28 $\pm$ 3]	13 12 16 [14 $\pm$ 2]				
	156	127 123 102 [117 $\pm$ 13]	20 13 13 [15 $\pm$ 4]	20 20 25 [22 $\pm$ 3]	25 27 28 [27 $\pm$ 2]	11 14 10 [12 $\pm$ 2]				
	313	109 113 107 [110 $\pm$ 3]	17 14 10 [14 $\pm$ 4]	20 25 21 [22 $\pm$ 3]	24 23 27 [25 $\pm$ 2]	11 9 11 [10 $\pm$ 1]				
	625	117 114 113 [115 $\pm$ 2]	12 15 15 [14 $\pm$ 2]	21 24 26 [24 $\pm$ 3]	37 32 35 [35 $\pm$ 3]	16 16 17 [16 $\pm$ 1]				
	1250 +	99 127 113 [113 $\pm$ 14]	15 15 18 [16 $\pm$ 2]	26 23 27 [25 $\pm$ 2]	35 32 34 [34 $\pm$ 2]	12 14 15 [14 $\pm$ 2]				
	2500 +	108 105 125 [113 $\pm$ 11]	14 16 17 [16 $\pm$ 2]	27 20 26 [24 $\pm$ 4]	38 30 37 [35 $\pm$ 4]	12 10 17 [13 $\pm$ 4]				
	5000 +	121 155 128 [135 $\pm$ 18]	18 14 13 [15 $\pm$ 3]	26 29 23 [26 $\pm$ 3]	34 38 29 [34 $\pm$ 5]	18 12 13 [14 $\pm$ 3]				
Positive control		703 639 698** [680 $\pm$ 36]	320 314 401** [345 $\pm$ 49]	404 431 414** [416 $\pm$ 14]	347 349 360** [352 $\pm$ 7]	152 171 173** [165 $\pm$ 12]				

+ :Visible precipitation was occurred at the end of exposure period

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

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

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test sub.	0	120	111	120	16	15	18	24	25	23	24	24	23	8	5	5
		[117 $\pm$ 5]			[16 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 1]			[24 $\pm$ 1]			[6 $\pm$ 2]		
	156	114	127	131	19	20	16	26	23	22	33	29	22	6	8	6
		[124 $\pm$ 9]			[18 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 2]			[28 $\pm$ 6]			[7 $\pm$ 1]		
	313	124	133	111	15	12	16	21	25	22	28	27	30	5	5	7
		[123 $\pm$ 11]			[14 $\pm$ 2]			[23 $\pm$ 2]			[28 $\pm$ 2]			[6 $\pm$ 1]		
	625	133	128	126	19	18	17	22	23	19	22	28	28	5	4	5
		[129 $\pm$ 4]			[18 $\pm$ 1]			[21 $\pm$ 2]			[26 $\pm$ 3]			[5 $\pm$ 1]		
	1250 +	116	115	132	14	14	18	25	19	22	25	22	18	5	3	3
		[121 $\pm$ 10]			[15 $\pm$ 2]			[22 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 4]			[4 $\pm$ 1]		
	2500 +	121	105	112	21	15	16	18	26	21	21	33	32	4	5	4
		[113 $\pm$ 8]			[17 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 4]			[29 $\pm$ 7]			[4 $\pm$ 1]		
	5000 +	124	126	137	18	20	18	19	27	27	27	33	36	7*	9*	5*
		[129 $\pm$ 7]			[19 $\pm$ 1]			[24 $\pm$ 5]			[32 $\pm$ 5]			[7 $\pm$ 2]		
Positive control		648	677	638**	477	514	502**	172	183	170**	548	505	551**	493	553	535**
		[654 $\pm$ 20]			[498 $\pm$ 19]			[175 $\pm$ 7]			[535 $\pm$ 26]			[527 $\pm$ 31]		

* : Growth inhibition was observed

+ : Visible precipitation was occurred at the end of exposure period

a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) : AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) : ACR; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 4. Results of the bacterial reversion test of dinitridecyl phthalate (2nd trial)
[activation method: +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test sub.	0	119	114	133	13	14	17	30	30	24	30	32	32	10	13	9
		[122 $\pm$ 10]			[15 $\pm$ 2]			[28 $\pm$ 3]			[31 $\pm$ 1]			[11 $\pm$ 2]		
	156	124	115	107	13	18	11	24	20	28	33	26	25	9	14	13
		[115 $\pm$ 9]			[14 $\pm$ 4]			[24 $\pm$ 4]			[28 $\pm$ 4]			[12 $\pm$ 3]		
	313	115	118	131	20	18	17	24	34	24	33	26	34	10	12	12
		[121 $\pm$ 9]			[18 $\pm$ 2]			[27 $\pm$ 6]			[31 $\pm$ 4]			[11 $\pm$ 1]		
	625	109	129	127	20	18	13	25	22	28	23	26	32	10	7	11
		[122 $\pm$ 11]			[17 $\pm$ 4]			[25 $\pm$ 3]			[27 $\pm$ 5]			[9 $\pm$ 2]		
	1250 +	133	121	131	16	17	17	26	28	26	23	30	35	12	9	16
		[128 $\pm$ 6]			[17 $\pm$ 1]			[27 $\pm$ 1]			[29 $\pm$ 6]			[12 $\pm$ 4]		
	2500 +	130	128	121	15	18	17	31	26	23	41	29	33	13	13	11
		[126 $\pm$ 5]			[17 $\pm$ 2]			[27 $\pm$ 4]			[34 $\pm$ 6]			[12 $\pm$ 1]		
	5000 +	125	122	120	21	17	19	33	38	32	38	39	42	17	13	12
		[122 $\pm$ 3]			[19 $\pm$ 2]			[34 $\pm$ 3]			[40 $\pm$ 2]			[14 $\pm$ 3]		
Positive control		551	492	565**	336	364	418**	401	417	411**	348	333	368**	151	153	141**
		[536 $\pm$ 39]			[373 $\pm$ 42]			[410 $\pm$ 8]			[350 $\pm$ 18]			[148 $\pm$ 6]		

* : Visible precipitation was occurred at the end of exposure period

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

ジトリデシルフタラートの 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 Ditridecyl phthalate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

ジトリデシルフタレートが培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、連続処理法ならびに短時間処理法で $4750 \mu\text{g/mL}$ を最高処理濃度とした。最高処理濃度の $1/2$ および $1/4$ をそれぞれ中濃度および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、標本作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

その結果、連続処理ならびに短時間処理のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍數性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではジトリデシルフタレートは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL)を選択した。昭和59年11月15日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK社)を10%添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3~5日ごとに継代した。なお、本染色体異常試験では解凍後継代数50の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(LIFE TECHNOLOGIES社)に、メンブランフィルター($0.45 \mu\text{m}$: CORNING社)を用いて加圧濾過除菌した非働化(56℃, 30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終濃度で10%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液を冷暗所(4℃)に保存した。

3. 培養条件

CO_2 インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機機械)を用い、 CO_2 濃度5%, 37℃の条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

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

5. 被験物質

被験物質のジトリデシルフタレート(ロット番号: 2700)は分子式 $\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{O}_4$ 、分子量530.83、純度99.82%の液体である。協和油化(株)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

被験物質をDMSOを用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。ただし、最高処理濃度($4750 \mu\text{g/mL}$)については原液を用いた。

7. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

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

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

その結果、いずれの処理法においても明確な細胞増殖抑制は観察されなかった(Fig. 1)。

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに、染色体異常試験では連続処理法ならびに短時間処理法のいずれにおいても $4750 \mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公比2で減じた計3用量ならびに溶媒対照群を設定した。

陽性対照として、連続処理の場合、マイトマイシンC(MMC: 協和醗酵工業(株))を、24時間処理で $0.05 \mu\text{g/mL}$ 、

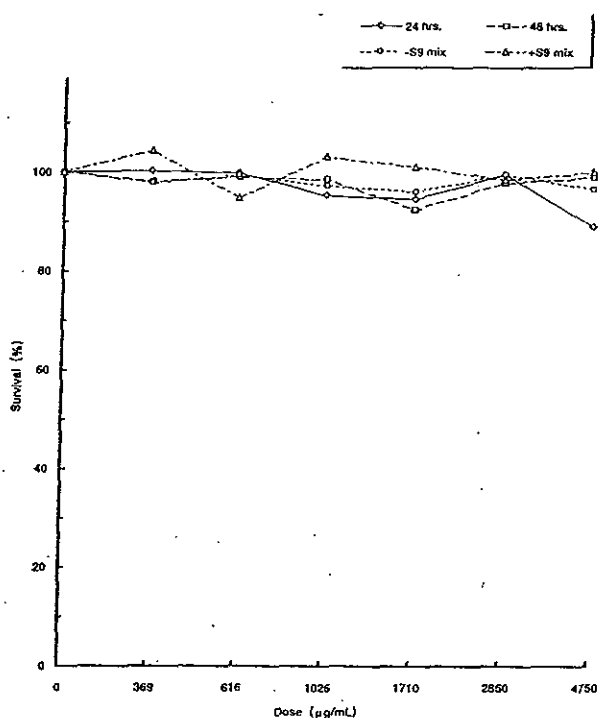


Fig. 1 Dose-survival curves of ditridecyl phthalate

48時間処理で0.025 $\mu\text{g/mL}$ の用量で、短時間処理の場合、シクロホスファミド(CP:塩野義製薬株)を、12.5 $\mu\text{g/mL}$ の用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、予備試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃度で0.2 $\mu\text{g/mL}$ となるようコルセミド(LIFE TECHNOLOGIES社)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本作製した後、1.2%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

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

すべての標本をコード化した後、観察した。

11. 結果の解析

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

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、石館ら³⁾の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とした。最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

連続処理群での試験結果をTable 1に示した。ジトリデシルフタレート処理群の場合、いずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。短時間処理群での試験結果をTable 2に示した。被験物質処理群の場合、S9 mix非存在下および存在下のいずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。なお、連続処理および短時間処理の各試験系において、全ての試験用量で油滴状の被験物質の析出が認められた。以上の試験結果から、本試験条件下においてジトリデシルフタレートのチャイニーズハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陰性と判定した。

なお、類縁化合物であるフタル酸ジヘプチルエステルの変異原性については、CHL細胞を用いた染色体異常試験で陰性⁴⁾と報告されている。

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat. Res.*, 66, 277(1979).
- 2) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 31-35.
- 3) 石館基監修, “<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 東京, 1987, pp. 19-24.
- 4) 西富 保, 化学物質毒性試験報告, 4, 745(1996).

Table 1 Chromosomal aberration test on CHL cells treated with ditiidecyl phthalate [continuous exposure]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement	
				gap	ctb	csb	cte	cse	oth				SA	Pol
Test sub.	0	24	200	1	1	0	1	0	0	1.0	0.5	0.0	-	-
	1188	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	1.5	-	-
	2375	24	200	1	1	0	3	0	0	2.0	2.0	1.0	-	-
	4750	24	200	1	1	1	3	0	0	2.5	2.0	0.0	-	-
MMC*	0.05	24	200	22	51	0	94	1	0	61.5	57.0	0.5	+	-
Test sub.	0	48	200	2	0	0	0	0	0	1.0	0.0	0.5	-	-
	1188	48	200	0	1	0	2	0	0	1.5	1.5	2.0	-	-
	2375	48	200	3	1	0	2	0	0	2.5	1.5	0.5	-	-
	4750	48	200	2	2	1	0	0	0	2.0	1.0	0.0	-	-
MMC*	0.025	48	200	31	63	2	97	2	1	64.0	61.5	1.0	+	-

*: Positive control (mitomycin C)

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

SA: structural aberration Pol: polyploid cell

Table 2 Chromosomal aberration test on CHL cells treated with ditiidecyl phthalate [short-term exposure]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				SA	Pol
Test sub.	0	-	6	200	1	0	0	1	0	0	1.0	0.5	0.0	-	-
	1188	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	1.0	-	-
	2375	-	6	200	0	0	0	2	0	0	1.0	1.0	1.0	-	-
	4750	-	6	200	5	1	0	0	0	0	3.0	0.5	0.5	-	-
CP*	12.5	-	6	200	2	1	0	0	0	0	1.5	0.5	0.5	-	-
Test sub.	0	+	6	200	1	0	0	1	0	0	1.0	0.5	0.5	-	-
	1188	+	6	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	1.0	-	-
	2375	+	6	200	0	2	0	4	0	0	2.0	2.0	1.5	-	-
	4750	+	6	200	0	0	0	3	0	0	1.5	1.5	0.5	-	-
CP*	12.5	+	6	200	17	56	0	155	2	1	84.5	83.5	0.0	+	-

*: Positive control (cyclophosphamide)

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

SA: structural aberration Pol: polyploid cell

連絡先

試験責任者：中嶋 圓

試験担当者：菊池正憲，板倉真由実

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜

582-2

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

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)

Masanori Kikuchi, Mayumi Itakura

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

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,

Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan

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

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン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-Methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid by Oral Administration in Rats

要約

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸は、蛍光染料中間体として広く使用されている。2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の0(対照群), 175, 350および700 mg/kgの用量を雌雄ラット(SD系ラット; Crj:CD)に1日1回, 雄には交配14日前から交配期間を通して剖検前日までの49あるいは50日間, 雌には交配14日前から交配期間, 妊娠期間中および分娩後の哺育3日までの41~48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

700 mg/kg群雄において, 喘鳴, 一部が黒色を呈する軟便, 腹部膨満, 肛門周囲の汚染および粗毛, 体重増加の抑制, 摂餌量の低値が認められた。また, 平均赤血球容積および平均赤血球血色素量の低値, 総蛋白質および α_1 -グロブリン分画比率の低値が認められた。さらに肉眼的に胃の境界線の肥厚, 腺胃の暗赤色点と糜爛, 組織学的に境界線粘膜の過形成, 噴門部粘膜の萎縮, 腺胃の糜爛と表層性出血がみられた。骨髄像検査, 器官重量および精細管のステージ分類には被験物質投与の影響は認められなかった。同群雌においては, 雄と同様の症状に加え, 耳介の蒼白化, 削瘦, 立毛, 自発運動の減少, 体温低下, 呼吸数の減少を呈した後, 1例が死亡し, 1例が切迫屠殺された。また, 体重増加の抑制傾向, 肉眼的に胃の境界線の肥厚, 腺胃の暗赤色点散在と一部陥凹, 組織学的に境界線粘膜の過形成, 噴門部粘膜の萎縮, 腺胃の糜爛と表層性出血がみられた。摂餌量には被験物質投与の影響は認められなかった。350 mg/kg群においては, 雄で肉眼的に胃の境界線の肥厚, 雌雄で組織学的に境界線粘膜の過形成, 噴門部粘膜の萎縮がみられた。一般状態, 体重, 摂餌量, 血液学検査, 骨髄像検査および血液生化学検査には被験物質投与の影響は認められなかった。175 mg/kg群の雌雄においては, いずれの観察, 測定および検査において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

親動物に関して, 性周期, 交尾率, 受胎率, 妊娠期間, 分娩および哺育状態, さらに黄体数, 着床痕数および着床率, 出産率および分娩率のいずれにも被験物質投与

の影響は認められなかった。

新生児に関して, 700 mg/kg群の雌雄体重の低値傾向と哺育4日における生存率に低値傾向が認められた。しかし, 哺育0日の生存児数, 死産児数, 出生率, 性比に被験物質投与の影響は認められず, 外表異常児もみられなかった。また, 哺育4日における剖検においても異常は認められなかった。

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175 mg/kg/dayと考えられた。また, 生殖発生毒性的な無影響量は雌雄親動物ともに700 mg/kg/day, 新生児で350 mg/kg/dayと考えられた。

方法

1. 被験物質

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸 [日本化薬(株)製造, Lot No. 96001, 純度79.6%, 分子量217.20, 融点133.5℃以下] は, 淡黄色顆粒状であり, 冷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80.2%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, 純度換算した量を採取し, 注射用水(日本薬局方, (株)大塚製薬工場)に溶解し, 3.5, 7および14% (w/v)濃度に調製した。調製は1週間に1回以上の頻度で行った。調製後の被験液は, 1日分ずつ褐色ガラス瓶に分注し, 冷蔵・暗所条件下で保存した。本被験物質の1~20% (w/v)液は, 室温24時間保存後および冷蔵(4℃)8日間保存後更に室温24時間保存後において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98~101%の範囲であり, はほぼ設定濃度の2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸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, 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雌雄ラットを使用した。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309~335 g, 雌で202~232 gであった。なお, 雌については, 検疫・馴化期間中に全動物の膈スミアを採取