

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細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（オリンパス）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、直接法における50%増殖抑制濃度は約2.0 mg/ml程度であった。代謝活性化法においては、処理した濃度範囲（0.08～2.50 mg/ml）において50%をこえる増殖抑制は観察されなかった（Fig.1）。

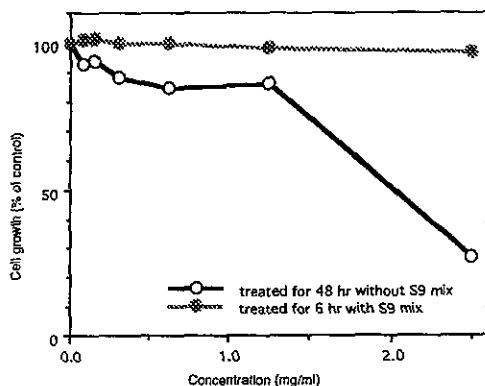


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid in CHL cells

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、直接法（24および48時間連続処理）では2.0 mg/ml、代謝活性化法（6時間処理後18時間培養）では10 mMにあたる2.2 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。

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。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製し、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。ギムザ染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのシャーレから得られた異なる標本を、複数の観察者がそれぞれブラインドの状態で行った。

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¹⁾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、フィッシャーの“Exact probability test”法により溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定を行った。

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら²⁾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。

結果および考察

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸を加えて24時間および48時間処理した低・中濃度群においては、いずれも染色体の構造異常の出現頻度に有意な増加は認められなかったが、高濃度群の24時間処理では観察した細胞の9%（gapを含む、 $p=5.62 \times 10^{-4}$ ）、48時間処理では11.5%（gapを含む、 $p=1.86 \times 10^{-3}$ ）に染色体の構造異常が誘発され陽性と判定された。倍数性細胞については、いずれの群においても有意な増加はみられなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した。

2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼンスルホン酸を加えてS9 mix非存在下で6時間処理した高濃度群において、染色体の構造異常の有意な増加（ $p=0.0337$ ）が認められたが、その頻度は3.5%と低く陰性であった。一方、S9 mix存在下の高濃度群では、観察細胞の約50%に構造異常が誘発され陽性となった。倍数性細胞については、いずれの群においても有意な増加はみられなかった。

被験物質処理において、pHの低下が観察されたので、後日、培養液のpHを測定したところ、溶媒対照群ではpH7.11～8.07の範囲であったが、直接法の高濃度群では、処理直後はpH6.37～6.59であった。また、代謝活性化法のS9 mix存在下の高濃度群では、処理直後でpH5.46～5.81まで低下した。

Moritaらは^{3,4)}、pHの著しい変化は染色体異常を誘発することを報告している。従って、この試験の最終判定は陽性となったが、pHが著しく低下したため、染色体異常が誘発された可能性も考えられる。本実験の結果からは、誘発された染色体異常が検体そのものの染色体切断作用に基づくものか、それとも検体によるpHの低下に起因する二次的な影響によるものかは明確でない。染色体異常誘発の要因を見極めるためには、更に詳細な実験を行う必要があると思われる。

陽性対照として用いた直接法でのMC処理群、およびS9 mix存在下でのCPA処理群では染色体体交換（cte）や染色体体切断（ctb）などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

なお、本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

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, 1988.
- 2) 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, 1987.
- 3) T. Morita, et al., *Mutation Res.*, 225, 55 (1989)
- 4) T. Morita, et al., *Mutation Res.*, 240, 195(1990)

連絡先: 試験責任者 田中憲穂

(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: Tanaka, Norihiro

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

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

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

Table 1 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid** by direct method

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	2	3	0	0	0	0	0	5	1	5 (2.5)	3 (1.5)	0.50		
Solvent ¹⁾	0	24	200	2	1	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.00		
ACMBS	0.5	24	200	1	2	0	1	0	0	0	4	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.38	—	—
ACMBS	1.0	24	200	0	2	0	1	1	0	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.00	—	—
ACMBS	2.0	24	200	5	8	8	1	0	1	0	23	0	18* (9.0)	15* (7.5)	0.25	±	—
MC	0.00005	24	200	6	18	44	0	0	6	0	74	0	54* (27.0)	51* (25.5)	0.25	+	—
Solvent ¹⁾	0	48	200	3	1	1	2	0	0	0	7	0	7 (3.5)	4 (2.0)	0.38		
ACMBS	0.5	48	200	2	2	0	0	0	0	0	4	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.25	—	—
ACMBS	1.0	48	200	3	1	0	0	3	0	0	7	0	7 (3.5)	4 (2.0)	0.25	—	—
ACMBS	2.0	48	200	2	10	14	0	0	1	0	27	0	23* (11.5)	21* (10.5)	0.00	+	—
MC	0.00005	48	200	5	42	76	5	5	8	0	141	2	91* (45.5)	87* (43.5)	0.00	+	—

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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 : mytomicin C. 1) 0.5 % carboxymethyl cellulose sodium 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 99.5%.

Table 2 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid** by metabolic activation method

Group	Concentration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		
Solvent ¹⁾	0	—	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00		
ACMBS	0.55	—	6-(18)	200	1	1	2	1	0	0	0	5	0	5 (2.5)	4 (2.0)	0.38	—	—
ACMBS	1.1	—	6-(18)	200	3	2	1	0	0	0	0	6	0	6 (3.0)	3 (1.5)	0.13	—	—
ACMBS	2.2	—	6-(18)	200	1	4	4	1	0	2	0	12	0	7* (3.5)	6* (3.0)	0.63	—	—
CPA	0.005	—	6-(18)	200	2	0	0	2	0	0	0	4	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.25	—	—
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	2	0	0	0	1	0	0	3	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.13		
ACMBS	0.55	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	—	—
ACMBS	1.1	+	6-(18)	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	0 (0.0)	0.00	—	—
ACMBS	2.2	+	6-(18)	200	12	94	148	0	0	4	230	488	0	104* (52.0)	100* (50.0)	0.50	+	—
CPA	0.005	+	6-(18)	200	18	108	265	9	3	10	160	573	0	168* (84.0)	166* (83.0)	0.00	+	—

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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) 0.5 % carboxymethyl cellulose sodium 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 99.5%.

Single Dose Toxicity Test of 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonane in Rats

要約

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンの急性経口投与毒性試験を雌雄のSprague-Dawley系 (Crj:CD) ラット計20匹を用いて実施した。なお、投与量は、雌雄とも0 (溶媒対照群) および2000 mg/kgとした。

その結果、雌雄とも、溶媒対照群および2000 mg/kg投与群に死亡例はみられず、また、投与後の一般状態の変化も、溶媒として用いたコーンオイルの大量投与に起因すると思われる一過性の下痢便あるいは軟便の排泄がみられた以外には、異常は認められなかった。投与後の体重は、溶媒対照群、2000 mg/kg投与群ともに順調に増加し、15日目に行った剖検においても各器官・組織に異常所見は認められなかった。

以上の結果から、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける経口投与によるLD₅₀値は、雌雄とも2000 mg/kgを上回る量と推定された。

緒言

既存化学物質の安全性評価の一環として、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける急性経口投与毒性試験を実施した。

方法

1. 被験物質および投与検体

本試験の被験物質として、(社)日本化学工業協会から提供された2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナン [CAS No.: 4390-04-9、ロット番号: AU02 (東京化成工業(株)製)、無色透明の液体、比重: 0.78、純度: 99.9%] を用いた。

投与に際して、比重を考慮し、被験物質を25.6% (v/v) の濃度になるようコーンオイルに混和し、投与検体とした。

なお、この方法に従って調製された2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンの安定性試験では、コーンオイルに混和して調製した2.56および25.6% (v/v) 溶液中の被験物質は、室温遮光の条件下で7日間は安定であることが確認された。また、今回の試験で使用した溶液中の平均被験物質含量は、所定濃度の97.9%であった。

2. 動物および飼育方法

生後4週で購入した雌雄のSprague-Dawley系ラット (Crj:CD; SPF、日本チャールス・リバー(株)、厚木飼育センター生産) を7日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各10匹を試験に供した。投与時体重は、雌が98.2~109.5 g、雄が107.7~120.1 gであった。全飼育期間を通じて、動物を金属製金網床ケージ (220 W×270 D×190 H mm、日本ケージ(株)製) に1匹ずつ収容し、温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数約15回/時間、照明12時間 (7~19時点灯) に設定された飼育室内 (バリアーシステム) で飼育した。動物には、投与前約18時間と投与後約3時間の絶食期間を除く全飼育期間を通じて固型飼料 (CE-2、日本クレア(株)) を自由に摂取させ、また、飲料水としては、全飼育期間を通じて水道水を自由に摂取させて維持管理した。

3. 群分けおよび投与方法

群分けは、無作為選択により行い、投与は以下の要領で行った。即ち、雌雄ともあらかじめ約18時間の絶食を行った後、1群5匹からなる2群に分け、体重100 g当たり1 mlの割合でラット用胃管を用いて強制経口投与した。本試験に先立って実施した1群3匹の雄ラットを用いた予備試験の結果、500、1000および2000 mg/kg投与群では、いずれも死亡例は認められなかったため、本試験では、雌雄とも被験物質の投与用量を2000 mg/kgとし、他の1群 (対照群) には溶媒 (コーンオイル) のみを投与した。

4. 観察および病理学的検査

投与日 (1日目) においては、投与直後から約2時間まで継続して、また、それ以降6時間までは、1ないし2時間に1回の頻度で各動物の一般状態と死亡例の有無を観察した。2日目から15日目には、毎日1回動物の状態を観察した。また、投与直前、2、4、8、11および15日目に体重の測定を行い、各群ごとに平均値と標準偏差を求めた。15日目には各動物をペントバルビタール・ナトリウム麻酔下で放血屠殺した後、病理解剖を行い、雌雄とも2000 mg/kg投与群の各1例の主要な器官・組織を10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定し保存した。

試験結果および考察

1. 死亡率およびLD₅₀値

雌雄とも、いずれの投与群にも14日間の観察期間中に死亡例は認められなかった。従って、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける経口投与によるLD₅₀値は、雌雄とも2000 mg/kgを上回る量と推定された。

2. 一般状態の変化

投与後約30分から4時間の間に一過性の下痢便あるいは軟便の排泄が、溶媒対照群の雌雄の全例、2000 mg/kg投与群の雌の5例中3例および雄の5例中4例に認められた。しかし、いずれも、それ以降は正常便となり、観察終了時まで一般状態に異常はみられなかった。

3. 体重の変化 (Table 1)

雌雄とも、いずれの投与群においても体重の増加抑制はみられず、観察期間中の体重増加は順調であった。

4. 病理学的検査所見

15日目に屠殺剖検を行った結果、雌雄とも溶媒対照群および2000 mg/kg投与群のいずれの動物にも、肉眼的変化は認められなかった。

なお、肉眼的観察において、病理組織学的検査を要すると思われる変化がみられなかったため、病理組織学的検査は行わなかった。

以上のように、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける急性経口投与毒性試験を行った結果、雌雄とも溶媒対照群および2000 mg/kg投与群のいずれにも死亡例はみられず、投与後の一般状態の変化として、いずれの投与群にも、一過性の下痢便あるいは軟便の排泄がみられた以外に異常は認められなかった。一般状態においてみられた一過性の下痢便あるいは軟便の排泄については、一般に大量の植物油を経口投与すると、一過性の下痢便の排泄がみられることが知られており、溶媒として用いたコーンオイル¹⁾に起因するものと考えられる。

以上の結果から、2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける経口投与によるLD₅₀値は、雌雄とも2000 mg/kgを上回る量と推定される。

文献

- 1) 白須泰彦、吐山豊秋編 "新毒性試験法—方法と評価—," リアライズ社, 東京, 1985, p.46.

連絡先: 試験責任者 今井清

(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 : Imai, Kiyoshi

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 Body weight changes in rats after single oral administration of 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane

Sex	Group	Number of treated rats	Number of dead rats	Body weight (g)					
				Initial	2	4	8	11	Final
Female	Control	5	0	103.1 ±4.2	122.6 ±4.1	136.7 ±3.8	151.9 ±5.6	163.6 ±7.1	176.7 ±8.5
	2000 mg/kg	5	0	102.0 ±3.5	120.8 ±8.1	135.3 ±5.2	149.5 ±5.3	159.8 ±4.1	174.7 ±3.7
Male	Control	5	0	115.2 ±3.5	139.5 ±5.8	164.8 ±7.2	202.9 ±13.2	231.0 ±14.9	269.9 ±19.8
	2000 mg/kg	5	0	112.4 ±5.0	136.1 ±7.1	159.7 ±8.4	198.0 ±11.7	224.3 ±12.6	262.5 ±13.1

Body weight: Mean ± S.D.

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける 28日間反復経口投与毒性試験（回復14日間）

Twenty-eight Day Repeat Dose Toxicity Test of 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonane in Rats

要約

2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンの28日間反復経口投与毒性試験（回復14日間）を雌雄のSprague-Dawley系（Crj:CD）ラットを用いて実施した。投与量は、0（溶媒対照群）、100、300および1000 mg/kgとした。雌雄とも溶媒対照群および1000 mg/kg投与群では1群10匹、100および300 mg/kg投与群では1群5匹を使用し、このうち溶媒対照群および1000 mg/kg投与群の各群5匹については、14日間の回復試験を行った。

その結果、いずれの投与群においても死亡例は認められなかった。300 mg/kg以上の投与群では、肝臓の絶対重量あるいは相対重量が増加し、300 mg/kg投与群の雄および1000 mg/kg投与群の雌雄では、小葉中心部肝細胞の腫脹がみられる例があった。また、300 mg/kg以上の投与群の雄において、トリグリセライド濃度の減少がみられたほか、1000 mg/kg投与群の雄において、プロトンビン時間および活性部分トロポプラスチン時間の延長が認められた。その他、300 mg/kg以上の投与群の多くの例では、投与第2週以降に投与直後の流涎が認められた。100 mg/kg投与群では、投与第2週以降に投与直後の流涎が少数例に認められたが、その他には被験物質投与に起因すると思われる変化は認められなかった。

1000 mg/kg投与群について行った14日間の回復試験では、投与期間終了時にみられた小葉中心部肝細胞の腫脹は認められなかった。また、雄においては、肝臓の相対重量の増加、プロトンビン時間および活性部分トロポプラスチン時間の延長が引き続き認められたが、いずれも投与期間終了時と比較して、その程度は軽減する傾向にあった。

これらの結果から、本試験条件下における2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンの無影響量は、雌雄とも100 mg/kg以下と推察された。

緒言

「OECD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, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける28日間反復投与毒性試験（回復14日間）を実施した。

方法

1. 被験物質および投与検体の調製

本試験の被験物質として、(社)日本化学工業協会から提供された2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナン〔CAS No.: 4390-04-09、ロット番号: AU02（東京化成工業(株)製）、無色透明の液体、比重: 0.78、純度: 99.9%〕を用いた。

被験物質を25.6% (v/v) の濃度になるようコーンオイルに混和し、さらに、この25.6%溶液を7.68および2.56% (v/v) となるよう段階希釈して投与検体を調製し、投与時まで室温遮光の条件下で保管した。投与検体の調製は、1週間に1回の頻度で行った。

なお、被験物質の安定性試験の結果、2.56および25.6% (v/v) コーンオイル溶液中の被験物質は、室温遮光の条件下で7日間は安定であることが確認された。また、今回の試験で利用した投与検体について、含量試験を実施した結果、各投与検体中の被験物質の平均含量は、所定濃度の96.8～98.0%であった。

2. 動物および飼育方法

生後4週で購入した雌雄のSprague-Dawley系ラット（Crj:CD;SPF、日本チャールス・リバー(株)、厚木飼育センター生産）を8日間にわたり予備飼育した後、一般状態に異常の認められなかった雌雄各30匹を試験に供した。投与開始時体重は、雌が115.9～131.6 g、雄が143.1～160.0 gであった。全飼育期間を通じて、動物を金属製金網床ケージ（220 W×270 D×190 H mm、日本ケージ(株)製）に1匹ずつ収容し、温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数約15回/時間、照明12時間（7～19時点灯）に設定された飼育室内（バリアーシステム）で飼育した。動物には、剖検前約18～24時間の絶食期間を除き、固型飼料（CE-2、日本クレア(株)）を自由に摂取させ、また、飲料水として、全飼育期間を通じて水道水を自由に摂取させて維持管理した。

3. 群および群分け

先に秦野研究所で実施した本被験物質2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-ヘプタメチルノナンのラットにおける急性経口投与毒性試験¹⁾で雌雄のSprague-Dawley系ラットに本被験物質を2000 mg/kg投与した結果、死亡例はみられず、また、被験物質投与に起因すると思われる一般状態および剖検特に異常所見は認められなかった。従って、本試験における投与量は、化審法ガイドライン「ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験」を参考にして、雌雄とも最高投与用量を1000 mg/kgとし、以下公比約3で除して300およ

28日間反復投与毒性試験

び100 mg/kgの各投与用量を設定した。なお、1群は、溶媒対照群としてコーンオイル投与群を設けた。

群分けは、投与開始前日の体重に基づいて、体重別層化無作為抽出法により行った。各群の匹数および動物番号を以下に示す。

群 (投与液の濃度)	匹数 (動物番号)	
	雌	雄
溶媒対照群 (コーンオイル)	10 (1~10)	10 (31~40)
被験物質 100 mg/kg投与群 (2.56% v/v)	5 (11~15)	5 (41~45)
被験物質 300 mg/kg投与群 (7.68% v/v)	5 (16~20)	5 (46~50)
被験物質1000 mg/kg投与群 (25.6% v/v)	10 (21~30)	10 (51~60)

4. 投与方法

本試験の投与経路は、化審法ガイドライン「ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験」に従い経口投与とした。

投与は、1日1回、28日間、ラット用胃管を用いて強制的に行い、投与液量は、雌雄とも5 ml/kgとして、各投与時に最も近い体重値を基準にして算出した。なお、雌雄とも溶媒対照群および最高投与用量群の各5匹については、投与期間終了後、14日間の回復試験期間を設けた。

5. 検査項目

1) 一般状態の観察

投与期間および回復試験期間を通じて、死亡例の有無を調べたほか、全例について、一般状態を毎日1回 (投与期間中は投与後) 観察した。

2) 体重および摂餌量の測定

全例について、投与開始週では、投与開始直前と投与第4日、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は、1週に2回の頻度で体重を測定し、投与期間あるいは回復試験期間終了日および剖検日にも体重の測定を行った。また、全例について、投与開始週では投与開始日に、第2週以降の投与期間および回復試験期間中は、1週に1回の頻度で1日当たりの摂餌量の測定を行った。

3) 尿検査

各群とも動物番号の若い方から5匹を選択し、投与期間終了週 (投与第23日~24日) および回復試験期間終了週 (回復第9日~10日) に、動物を約24時間代謝ケージに収容して採尿し、以下の項目について検査した。なお、pH、潜血、総蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲンおよび沈渣の検査には、代謝ケージに収容して約4時間以内に採取された新鮮尿を用いた。

項目	測定法および使用器具・製品	
尿量	計量	天秤 (尿重量を比重で除す)
色調、混濁	視診	
比重	糖度計	N-1 (アタゴ)
pH、潜血、総蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン	試験紙法	マルティスティックスSG/エームス・クリニテックシステム (マイルス三共)
沈渣	光学顕微鏡	

4) 血液学的検査

投与期間終了時および回復試験期間終了時の剖検に先立ち、全例について、約18ないし24時間絶食させたのち、ベ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、以下の項目について検査した。なお、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の測定には、上記の採血とは別に、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血した血液を用いた。

項目	測定法	使用機器
赤血球数 (RBC)	自動 (電気抵抗法)	Coulter Counter Model S-PLUS IV (コールターエレクトロニクス社)
白血球数 (WBC)	〃 (〃)	〃
血色素濃度 (Hb)	〃 (吸光度法)	〃
平均赤血球容積 (MCV)	〃 (電気抵抗法)	〃
ヘマトクリット値 (Ht)	〃 ($0.001 \times \text{RBC} \times \text{MCV}$)	〃
平均赤血球血色素量 (MCH)	〃 ($1000 \times \text{Hb} / \text{RBC}$)	〃
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	〃 ($100 \times \text{Hb} / \text{Ht}$)	〃
血小板数	〃 (電気抵抗法)	〃
白血球分類	視算 (静脈血塗抹標本、 Wright-Giemsa 染色)	光学顕微鏡
網状赤血球比率	Brecher法	〃
プロトロンビン時間 (PT)	自動 (シンプラスチンオート試薬)	CA-3000 (東亜医用電子)
活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	自動 (プラテリンAオート試薬)	〃

5) 血液生化学的検査

全例について、血液学的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、血漿を分離して以下の項目について検査を行った。

項目	測定法	使用機器
総蛋白濃度	ビウレット法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシュ)
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・GLDH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 (ALP)	p-ニトロフェニルリン酸基質法	〃
GOT活性	SSCC法	〃
GPT活性	〃	〃
LDH活性	Wroblewski-La Due法	〃
カルシウム濃度	OCPC法	〃
ナトリウム濃度	イオン電極法	Na-K-Cl アナライザーIT-3型 (常光)
カリウム濃度	〃	〃
塩素濃度	電量滴定法	〃
無機リン濃度	モリブデン酸直接法	遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA (ロシュ)
トリグリセライド濃度	GPO・DAOS法	〃
γ -GTP活性	γ -グルタミル-p-ニトロ アニリド基質法	〃
A/G比	計算	

6) 病理学的検査

全例について、上記の採血に引き続き、必要に応じて腋窩動脈を切断して放血屠殺したのち、器官および組織の肉眼的観察を行った。また、各動物の脳、肝臓、腎臓、副腎、卵巣または精巣の重量測定を行い、各器官重量を剖検日の体重で除して、それぞれの相対重量を算出した。さらに、各動物より摘出した脳、下垂体、眼球、甲状腺、上皮小体、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、

胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、卵巣または精巣、膀胱、大腿骨骨髓および肉眼的変化のみられた器官については、0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン (pH 7.2) で固定し、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および剖検時に肉眼的変化の認められた器官について、パラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。組織学的検査は、雌雄とも投与期間終了時の溶媒対照群および1000 mg/kg投与群の心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副

腎について行い、さらに、被験物質投与に起因したと考えられる病理組織学的変化の認められた肝臓については、100、300 mg/kg投与群および回復試験期間終了時の溶媒対照群および1000 mg/kg投与群についても実施した。その他、投与期間終了時の剖検時に肉眼的変化の認められた一部の例の顎下リンパ節、皮膚、胸腺、肺、胃、子宮および精巣について、また、回復試験期間終了時の剖検時に肉眼的変化の認められた一部の例の胃、肺、腎臓および胸腺について組織学的検査を実施した。

6. 統計処理法

体重、摂餌量、半定量検査を除く尿検査および定期解剖例の血液学的検査、血液生化学的検査ならびに器官重量の値について、各群ごとに平均値および標準偏差を求めた。また、試験群の構成が溶媒対照群を含め3群以上ある場合は、Bartlettの方法による分散の均等性の検定（有意水準：5%）を行い、ついで、分散が均等な場合は、一元配置型の分散分析を行い、有意（有意水準：5%）の時はDunnnettあるいはSchefféの方法で多重比較を行った。一方、分散が均等でない場合はKruskal-Wallisの順位検定を行い、有意（有意水準：5%）ならばDunnnett型あるいはScheffé型の方法で多重比較を行った。また、試験群が溶媒対照群を含め2群となる場合には、溶媒対照群と被験物質投与群の各平均値の差の検定は、等分散であればStudentのt検定、不等分散であればAspin-Welch検定を行った。

結果

1. 一般状態

投与期間および回復試験期間中に、溶媒対照群を含む各群に死亡例は認められなかった。一般状態の変化としては、溶媒対照群を含む一部の例で、投与直後に一過性の流涎がみられ、その多くは投与第2週以降に認められた。特に雌雄とも1000 mg/kg投与群では、投与を重ねるに従って発生例数が増加する傾向があり、まれに、投与時に保定するだけで観察されることもあった。なお、各群の投与期間中に流涎のみられた例数は、溶媒対照群の雌の2例と雄の1例、100 mg/kg投与群の雌の1例と雄の3例、300 mg/kg投与群の雌雄各3例および1000 mg/kg投与群の雌雄全例であった。その他、呼吸音の異常および頸部周囲皮膚の痂皮、潰瘍あるいは脱毛などが散発的にみられたが、いずれも用量依存性は認められなかった。

2. 体重 (Fig.1)

各群の平均体重は、投与期間および回復試験期間中を通して、溶媒対照群と被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。

3. 摂餌量 (Fig.2)

各群の平均摂餌量は、投与期間および回復試験期間中を通して、溶媒対照群と被験物質投与群の間に有意差は認められなかった。

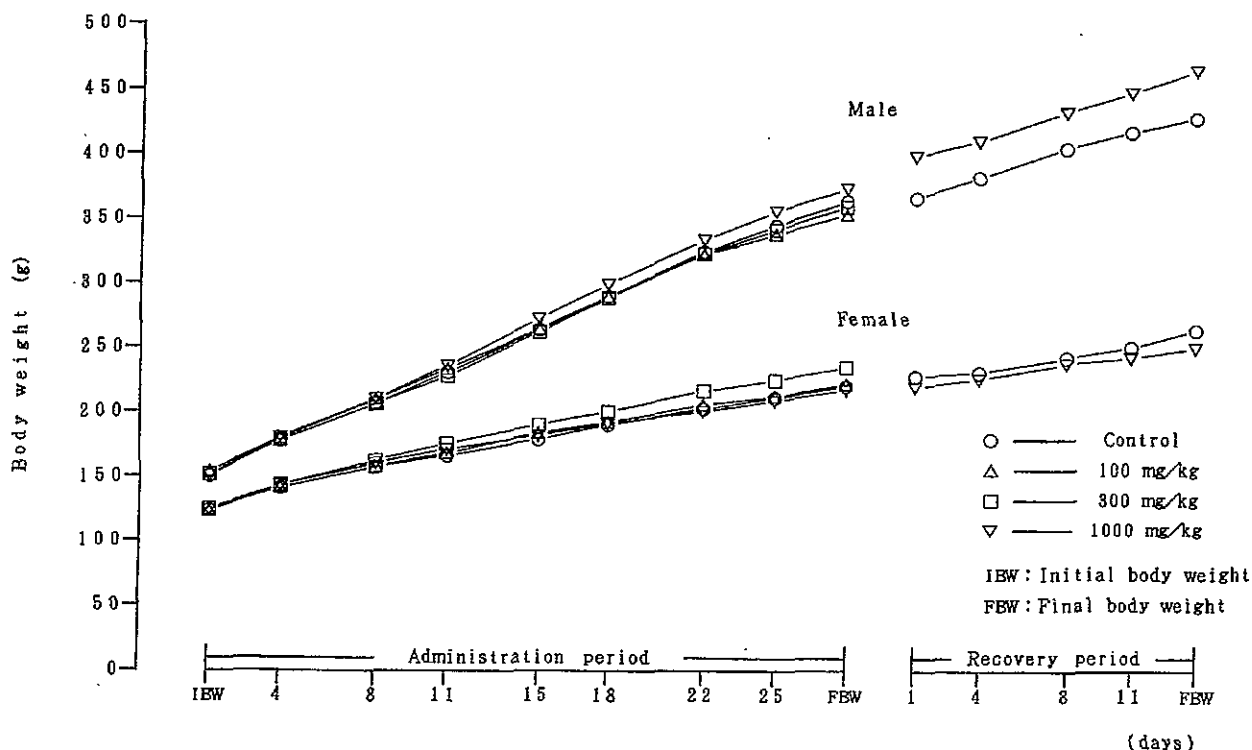


Fig 1 Body weight changes in rats administered with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane for 28 days