

よるポジションペーパーも同様の内容となっている。また、最近EUのCPMPからは医薬品の遺伝毒性不純物のリスク評価に関するドラフトが出されている。しかしながら、我が国ではこのような検討がなされていないのが現状である。このように、近年海外で、リスク評価に係る戦略を検討する機運が高くなってきていることを考え合わせると、我が国においても、化学物質の遺伝毒性の検出、評価、解釈に関する基本的な考えを確立することは重要なことであると考え。そこで、専門家集団である日本環境変異原学会の中に臨時委員会を設け、この問題について検討を開始することとした。本臨時委員会では、検討した戦略を日本環境変異原学会の統一見解としてまとめ、国際的なコンセンサスを得た論文として公表する予定である。まず、すべての人の生活に係る食品関連物質を取り上げた、食品関連モデル化合物としてコウジ酸について検証を重ねてきた。食品関連物質の遺伝毒性の考え方が確立されれば、医薬品、農薬、工業化学物質等への適用は可能と考える。

なお、本臨時委員会の活動は、厚生労働科学研究費補助金食品安全性確保研究事業「既存添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究」の研究班と合同で進めているものである。本臨時委員会の活動は現在も継続中であり、ここでは、活動中間報告としてその活動目的を述べ、初期約1年間の検討会(第1回~第13回)の議事要旨を本臨時委員会の活動報告として提示する。

2. 遺伝毒性の戦略

本臨時委員会が描く「遺伝毒性の評価・解釈のための戦略」とは、遺伝毒性のリスク評価における定量的評価の導入である。遺伝毒性を有する発がん物質は閾値ならびにADIが設定されず、食品添加物等においては使用禁止の措置がとられる。例えば、食品添加物では、動物に対し低用量で高頻度でがんを誘発する物と、高用量でも低頻度でしかがんを誘発しない物では、そのリスクの違いは考慮されていいにも関わらず、最終的に同じ扱いがなされる。すなわち、ゼロリスクの考えである。しかし、リスクとは確率であり、0.01%のリスクも50%のリスクも、それが0%ではないということのみで同等のリスクととらえることは、リスク評価においても、続くリスクマネジメントにおいても、もはや現実的ではないと考える。本臨時委員会は、遺伝毒性のリスク評価に定量的評価を導入し、より現実的な遺伝毒性のリスク評価法を構築したいと考えている。この考えは、発がんとの関連だけでなく、次世代への遺伝的影響の評価においても同様である。定量的評価には、動物の発がんにおける遺伝毒性の関与(メカニズム)、ヒトにおける当該メカニズムの発現、閾値の設定、ヒトの曝露量などの検討が不可欠である。また、アフラトキシンは、遺伝毒性発がん物質

であるにもかかわらず、避けることのできない汚染物質ということでTDI(耐容一日摂取量)が設定されている。この例からも理解されるように、遺伝毒性発がん物質であってもなんらかの「実務的閾値」を設定することは可能と思われる。そのための、理論的構築やデータベースによる検証(例えば、各種遺伝毒性試験における反応の強さとヒトにおける発がん性の有無の相関など)が必要となろう。

なお、遺伝毒性の「検出・評価・解釈」という用語は、「リスク評価」と同義に用いている。「検出」ではどのような試験の組合せが遺伝毒性に係るハザードの確認に有効なのか、「評価」では各種試験の重み付けやin vivo 遺伝毒性試験の有用性や限界、またその用量や反応の程度はどうなのか、「解釈」ではどのような遺伝毒性のメカニズムによりハザードが生じているのか、そのハザードはヒトにおいても影響(発がん性、生殖細胞突然変異など)を与えるのか、閾値は設定できるのか、既知物質と比較しての影響はどうなのか、ということの意味している。

3. コウジ酸の検討結果

化学物質の遺伝毒性の検出、評価、解釈(すなわちリスク評価)に関する基本的な考えを確立するためのモデル化合物として、最初にコウジ酸を選択した。コウジ酸は、麹菌に由来する天然成分であり、抗菌、抗酸化、抗変色作用を有する添加物として食品に用いられてきた。また、メラニン色素形成を抑制する作用があることから、化粧品や医薬部外品にも用いられてきた。しかしながら、既存添加物の安全性確認作業の一環として実施されてきた安全性試験によって、マウス及びラットにおいて肝臓に対する発がん性が示唆され、その遺伝毒性も検出されたことから、食品添加物としての使用は禁止されることとなった化合物である。

コウジ酸の遺伝毒性試験ならびに発がん性試験については、これまでにいくつかの既発表および未発表のデータがある。さらに、本臨時委員会においても厚生労働科学研究費研究班とともに、追加検討を行った。それら一連の試験の結果については、すでに長尾委員による報告があるので参照されたい(環境変異原研究, 26, 193-198, 2004)。結論として、コウジ酸は多くのin vitro 遺伝毒性試験およびいくつかのin vivo 遺伝毒性試験において陽性を示したことから、遺伝毒性物質であることは明らかであるが、試験用量を考慮するとその程度は弱いものと考えられる。一方、肝臓においてはわずかな8-OH-dG量の増加が見られたが、突然変異の増加は観察されず、初期1年間の検討で得られたデータからは、肝臓で示唆されている腫瘍誘発性を遺伝毒性によって合理的に説明することはできていない。

4. 検討会議事要旨

以下は、日本環境変異原学会臨時委員会：「食品および食品添加物等に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」および厚生労働科学研究費研究班：「食品添加物等の遺伝毒性検出の戦略に関する研究」による合同検討会の議事要旨である。

4.1. 第1回検討会(2003年1月27日)

林委員長より、以下のように本委員会設置の主旨について説明があった。化学物質の遺伝毒性に関する情報は安全性評価の一環として広く用いられているが、hazard identificationを目的とする場合が主で、risk assessmentを行うための戦略が確立されていない。その理由の一つとして、「遺伝毒性には閾値がない」とする思想が根底にあり、hazard identificationがそのままrisk assessmentとして用いられてきたことにある。近年海外で、この戦略を検討する機運が高くなってきていることも考え合わせると、この時期に専門家集団である日本環境変異原学会の中に臨時委員会を設け、化学物質の遺伝毒性の検出、評価、解釈に関する基本的な考えを確立することは重要なことであると考え。まず、全ての人の生活に関係する食品関連の遺伝毒性について検討する。最も安全性が要求される食品関連物質についての考え方が確立されれば、医薬品、農薬、工業化学物質等への適用は大きな問題にはならないと考える。

本委員会の目的として、我々の生活環境中に存在する化学物質の遺伝毒性の検出、評価、解釈に関する戦略を日本環境変異原学会の統一見解としてまとめ、学会に報告するとともに論文として公表する。さらに、国際的なコンセンサスを得るため、海外の専門家にコンサルテーションをお願いする。なお、本臨時委員会としては、食品および食品添加物に焦点を絞り、それらの安全性に関する考え方をまとめることを、本臨時委員会の目的とする。

本委員会を取り巻く現状として、遺伝毒性の試験法に関してはICH, OECD, IWGT等により国際的な調和がなされてきたが、試験結果の評価、解釈に関しては国単位で検討が開始されている。特に、英国のDepartment of Healthの諮問会議であるCOMによるガイダンスが影響力を発揮しており、米国EPAによるポジションペーパーも同様の内容となっている。また、最近EUのCPMPから医薬品の不純物に関するドラフトが出され、コメントが求められている。しかし、我が国ではこのような検討がなされていないのが現状である。

今後の計画として、8名の委員をコアとし、会合を重ねて問題点の抽出、整理、議論、とりまとめを行う。それぞれの会合においてさらに専門家の必要な場合には個別に招聘することとし、議論の質と正確さを高める配慮

をする。具体的には、文献、ドキュメントの収集とそれらの整理、解析を行う。手始めとして、前述のCOMガイダンス、USEPAのポジションペーパー、EUCPMPのドラフト、食品添加物として議論された赤色2号およびコウジ酸の遺伝毒性に関する文書等を用いる。

本臨時委員会の特色としては、具体的なデータを基に議論を進めることを基本とし、具体的な議論の積み重ねの上に概念的な考察を加える。特に、閾値の問題に関しては十分な議論の上に、学会としての統一見解を示したい。その過程において、個々の試験法の限界ならびに結果の解釈についても議論を深める。検討内容に関しては随時日本環境変異原学会のHP上に公開し、学会員が自由に発言できる体制を考える。また、本年11月に開催される日本環境変異原学会第32回大会において検討結果(少なくとも中間的なまとめ)を発表する。さらに、この議論を国際的に認知されるよう、海外の専門家にコンサルテーションを年度内に開催するとともに、速やかに論文として公表することを目指す。

長尾副委員長より、具体的進め方につき提案があった。COMガイドラインの項目ごとに討議し、他の資料ともつき合わせて矛盾点・補足すべき点等を議論する。遺伝毒性試験ごとの結果と発がん性、次世代毒性との一致性をクリアにして考えていきたい。その後、赤色2号等の現実のデータを当てはめてみることで、本委員会の特徴付けをしたい。この提案を受けて、以下のような質疑応答、意見交換がなされた。

- 食品添加物だけでなく食品そのものも対象とするのか？：その方向で考えている。
- 遺伝毒性の閾値をどう取り扱うか？：行政サイドからの要望もあり、practicalな閾値の設定が可能かどうかを議論したい。そのためには遺伝毒性のメカニズム解析が必要だろう。
- 遺伝毒性の総合的評価法を議論するのか、個々の化学物質の評価を議論するのか？：最終的には前者を考えたい。
- 基本的なstrategyはCOMガイダンスで大筋良いと思えるので、COMの問題点は何か、データが足りないなら何が足りないのかを明らかにできれば良いのではないか？：遺伝毒性の問題の有無を我々のstrategyできちんと評価することが主目的。COMが良いという結論ならばそれでも良い。その評価法を用いて、例えばコウジ酸(遺伝毒性、発がん性の陽性・陰性データが種々あり、現状では評価が困難)をきちんと評価できれば良い。
- Genotoxic non-carcinogenをどう考えるかも一つの方法論ではないか？：遺伝毒性をもつこと自体の危険性をアピールできれば、遺伝毒性試験の実施意義もアピールできる。

- 本委員会の最終結論をどのようにまとめるのか、そのイメージは(例えば、危険度につき何らかの call を発信する等)？：化学物質の単なる classification ではなく、risk 評価まで踏み込みたい(できるか否かは別として)。
- 知りたいことは、何を具体的にどうすればものが言えるのかという点。また、COM 等では in vivo の結果を重視しているが、in vitro 陽性の結果が何を意味するのかも検討すべき。
- Epigenetic なものをどう扱うか？：本委員会の趣意とは異なるように思えるので、必要があれば考慮する。
- 各遺伝毒性試験の既知データを解析するにあたり、定量的概念(どの用量から陽性になっているか、1 g オーダーか 1000 g オーダーかでは意味が違うのではないか)も考慮してはどうか。
- 代謝の種差も考慮すべき。ヒトに対する遺伝毒性の有無を最終的には評価すべきではないか。
- 先ずは、COM の各 stage の試験法の整理(発がん性等との一致率の評価等：分担者を決め、review paper を中心に調査)から始めてはどうか？：定量的評価も考慮するなら、膨大な作業量になるため困難か。分担は決めず、各人が可能な範囲で調査してみる。Discrepancy のあるものを中心に調査する手もある。
- 総論からまとめていくのは大変な作業になりそうなので、各論から始めてはどうか？ 先ずはコウジ酸の評価を行う。評価のために何が足りないかを議論すれば、自ずと COM に何が足りないかや遺伝毒性総合評価の strategy が見えてくるのではないか？：この方向性で検討を開始することになった。コウジ酸に関する資料を配付し、各委員ごとにその risk を考察して、次回の委員会で討論することになった。

4.2. 第2回検討会(2003年3月18日)

林委員長より、厚生労働科学研究費申請に関する説明があった。概要としては、戦略に関する理論を構築するために必要なデータを得るための実験も行うこととする。運営に関しては、研究班と JEMS 臨時委員会は協力して事業を推進するものであり、今後は合同の会合を持つこととする。

国際ワークショップに関しては、本年度中に開催する必要がある。3日程度の会合を計画し、最初の2日間はクローズドな会議とし、3日目に公開のワークショップかシンポジウムを開催する。クローズドな会議では、その時点までにまとめた我々の考えについてコンサルテーションを受ける。公開ワークショップでは、我々の考え、コンサルテーションのまとめ、ならびに海外からの参加者にそれぞれの立場から講演をしてもらう。

4.3. 第3回検討会(2003年5月26日)

長尾委員より、本委員会の課題につき説明があった。遺伝毒性評価のための strategy として UK COM のガイダンスを参考にしたとき、そこに含まれる3つの課題(1. in vivo 遺伝毒性の検出法と評価基準の確立、2. 発がん性に繋がる事象か否かの判定、特に aneugenicity を含めるべきかどうか、3. 遺伝毒性発がん性物質と遺伝毒性物質の閾値)を中心に議論したいとのことであった。Heritable な影響、特に遺伝毒性非発がん性物質の germ cell への影響についても議論すべきとの意見が出され、第4の課題として加えることになった。委員会の具体的な取り進め方法に関して討議し、先ずは各ガイダンス(COM, ICH, CPMP, EPA, Health Canada など)の比較表を森田委員が中心となって作成し、相違点を明らかにしつつ問題点の議論を行うことになった。議論の中で試験系に関する疑問点が出てきた場合、その試験系に精通している委員または専門家によるレビューをその都度行うことになった。

研究班におけるコウジ酸とタール系色素の研究内容につき確認が行われた。コウジ酸に関しては食添用、部外品用、試薬を代表する3種のロットを選び、先ずは in vitro Comet assay (佐々木委員)と TA98, TA100 を用いる細菌を用いる復帰突然変異試験(ブラックライトの同時照射実験を含む：太田委員)を行う。その結果を見て他の試験系でも3種ロットでの評価が必要かを考える。³²P ポストラベル法による DNA 付加体形成試験(長尾委員)を実施する前に各ロットの不純物分析とその遺伝毒性確認を行い、その後に DNA 付加体形成試験を行うかどうかを考える。光遺伝毒性(プラスミド DNA 鎖切断試験, Ames 試験, 染色体異常試験, Comet assay 等：田中委員)は先ずプラスミド DNA 鎖切断試験を行い、その後他の試験系の必要性を考える。新たに、コウジ酸とタール系色素に関して遺伝毒性との構造活性相関を調べることにする(林委員)。

4.4. 第4回検討会(2003年6月30日)

コウジ酸の試験進捗状況について、担当者から途中経過について説明がなされた。TA100, WP2uvrA/pKM101, +/-S9 mix において陽性となり、ロット間で大きな差はなかった(太田委員)。TA100, -S9 mix で3ロットとも同様に陽性、分析も開始した(長尾委員)。Comet 試験, WTK1, -S9 mix, 4, 8 h 処理した結果全て陽性で、ロット間に大きな差は認められなかった(佐々木委員)。

森田委員からリスクアセスメントの基礎的事項の概説の後、ICH-Q3C, CPMP の genotoxic impurities に関する position paper, Dearfield らによる US EPA の position paper, UKDH の COM ガイダンス, Health Canada の工業化学物質に関する文書の詳しい紹介があった。さらに、それらの間の比較表が提示され、説明がなされた。

今回の検討会は、コウジ酸の既存データに基づく評価を分担して行うこととした。分担は、in vitro non mammalian (能美委員)、in vitro mammalian (祖父尼委員)、in vivo 試験 (中嶋委員、林委員)、Comet (佐々木委員)、carcinogenicity (宇野委員) とした。

4.5. 第5回検討会(2003年7月22日)

コウジ酸の既存データに基づく評価のまとめが報告され、多くの議論がなされた。

1) In vitro mammalian test systems (祖父尼委員)

遺伝子突然変異試験、染色体異常試験、SCE および小核試験のデータが報告された。染色体損傷性について 1000 g/mL 以上の濃度で陽性となるケースが認められたが、コウジ酸の分子量が 142 であることから、10 mM (1420 g/mL) を上回る濃度での陽性結果の生物学的妥当性に疑問が呈された。1000 g/mL 以上の濃度での細胞毒性、pH のデータの必要性が指摘され、pH について中嶋委員が確認することとなった。そのデータに基づき、必要に応じ、田中委員が染色体異常試験 (細胞毒性評価を含む) を実施することとなった。追加情報として、佐々木委員により、WTK-1 細胞を用いた染色体異常試験の結果 (約 10 mM 以上で陽性) が紹介された。会議後、長尾委員より、CHL 細胞において 72 時間処理でみられる小核が aneuploidy によるものかどうかを検討してはどうかとの提案がなされた。また、祖父尼委員より、WTK-1 細胞での染色体異常誘発性に関連し、TK6 細胞での検討 (トリパンブルー法による細胞数計測も含む) の必要性が提案された。佐々木委員により、これら試験の実施の可否について検討中。

本間委員より、TK6 と WTK-1 細胞を用いたコウジ酸の tk 座位遺伝子突然変異試験の結果速報が提示され、両細胞で濃度依存的な突然変異頻度増加がみられた。これを受け能美委員より、トランスジェニックラットを使って長期発がん試験と遺伝子突然変異試験を並行して行い、発がん標的臓器 (甲状腺と肝臓) での突然変異誘発性を調べることの必要性が提案された。

2) Comet assay (佐々木委員)

In vitro Comet では、2500 g/mL 以上の濃度で、用いた 2 種類の細胞で陽性となったこと、in vivo Comet では、マウスを用いた 2 つの機関の結果の相違 (機関 A は陰性、機関 B は胃と肝で陽性)、ならびにマウスとラットの陽性臓器の相違 (マウス：胃と肝、ラット：胃と肝に加え肺と骨髄) が報告された。前者の相違の要因としてマウスの系統差、被験物質の相違、検体調製の微妙な相違などが考えられるが、実際のところ何に起因するかを確認する必要性が指摘された。A 社のサンプルを分析にかけることが提案され、実施することとなった (長尾委員)。なお、機関 B における in vivo Comet の陽性反応は弱いものであったが、BaP のような多環芳香族炭化水素が示

す Comet 像と類似していた。ただし、in vivo Comet では、BaP のような多環芳香族炭化水素は弱い陽性しか示さない。

3) In vivo mammalian test systems (中嶋委員)

優性致死 (陰性)、マウス (陰性) & ラット (陽性) 骨髄/末梢血小核試験、マウス (陽性) & ラット (陰性) 肝臓小核試験、ラット肝 UDS 試験 (陰性)、マウス TG 試験 (陰性；肝臓) および DNA 付加体試験 (ラット甲状腺、陰性) の結果が報告された。総合すると、コウジ酸の in vivo 遺伝毒性 (小核誘発性として) はマウス肝およびラット骨髄にみられ、動物種および標的臓器に相違が認められることから、実際の曝露評価や代謝の検討が必要かもしれない。また、いずれの陽性反応も致死用量付近 (1000 mg/kg 以上) であることも重要なポイントとなる可能性がある。マウス TG 試験では 1600 mg/kg を 28 日間投与されているが、なぜ、そのような高用量の投与が可能であったのかに疑問が呈された。

4) Carcinogenicity (宇野委員)

コウジ酸による甲状腺腫瘍および肝腫瘍を検討した試験 (マウスがん原性試験、p53-KO & 野生型マウス反復投与試験、ラット肝二段階発がん試験、ラット伊東モデル試験、甲状腺腫瘍検討試験) から、マウスおよびラットの甲状腺腫瘍はプロモーション作用によること、肝腫瘍については、プロモーション作用に加え、イニシエーション作用も否定できないことが報告された。甲状腺については、DNA 付加体や 8-OH-dG の検討がなされ陰性結果を示したが、肝臓の当該データがなく、その必要性が指摘された。8-OH-dG については葛西委員による検討結果が待たれる。また、宇野委員からショウジョウバエ試験、RDS 試験等の実施を計画していることが紹介された。会議後、7 月中旬に開催されたトキシコロジー学会で、コウジ酸による肝 RDS の陽性結果が報告された (2% 混餌投与で投与開始約 3 日目と 2 週間目の解析で陽性、4 週間後では陰性) ことから、宇野委員による RDS の検索は、混餌と強制経口での比較を加えてみる予定とのこと。

5) In vitro non mammalian (太田委員)

Ames 試験データについて報告され、公表文献のいくつかはデータの信頼性に疑問のあることが述べられ、最終的な評価材料としないことが提案され、了解された。さらに、太田委員によって検討された TA100、TA98、TA102 および WP2 *uvrA*/pKM101 を用いた Ames 試験のデータが紹介された (コウジ酸のいずれのロットも代謝活性化の有無にかかわらず陽性)。さらに、UVA 照射の影響は受けなかったこと、変異のタイプに他の化合物ではあまりみられない A·T → C·G、G·C → C·G がみられたことが報告された。会議後、能美委員より、コウジ酸の化学構造からどのような DNA 損傷作用が考えられるのか、化学の立場から検討することの必要性が、また、

長尾委員より、topoisomerase阻害活性の有無を検討することの必要性も提案された。

4.6. 第6回検討会(2003年8月20日)

コウジ酸の遺伝毒性について新しいデータが紹介された。光切断(田中委員)について、コウジ酸を用いた光プラスミド切断性試験と、それに対するラジカルスカベンジャーの影響に関する試験が実施された。コウジ酸は光照射によるDNA切断を誘発し、これにはスーパーオキシドおよび過酸化水素の発生が関与していることが示唆された。TK6/WTK-1細胞によるTK-遺伝子突然変異試験(本間委員)について、TK6, WTK-1細胞とも用量依存的に突然変異を誘発することが示された。細胞毒性の結果と両細胞の反応性から、コウジ酸は主として、点突然変異を誘発すること、細胞周期停止作用があることが指摘された。

特別講演として、大阪市立大学福島昭治先生より「Genotoxic carcinogenの閾値に関する研究」について講演が行われた。

4.7. 第7回検討会(2003年9月22日)

コウジ酸溶液pHに関して中嶋委員より紹介された。前回のデータよりさらに高濃度での検討が提案され、それに回答するものである。DMSO, 生理食塩液ともに最高用量で6.9および6.7と軽度な低下が観察されたが、染色体異常誘発性が認められる低pHは6程度であるので、pHの変化が染色体異常誘発性の原因とは考えがたいことが確認された。

E. coli WP2 *uvrA*/pKM101および*E. coli* WP2/pKM101を用いた結果が太田委員より報告された。S9 mixの存否に関わらず用量依存的に復帰変異コロニーが増加したが、WP2 *uvrA*/pKM101でより強い誘発が観察され、酸化的傷害のみでなく、bulky adductを形成している可能性が示唆された。

BMD(Bench-mark dose)およびVSD(Virtual Safe Dose)算出法が宇野委員によって紹介された。コウジ酸の雌マウスにおける甲状腺発がんのデータを用いてBMDの計算のデモが行われ、数学モデル(Gamma, Multistage, Logistic, Provit, Quantal-linear, Quantal-quadratic, Weibull model)の違いによりBMDの値に多少違いが出るが、その差は小さいことが示された。また、遺伝毒性試験、例えばin vivo小核試験データへの適用に関しても議論がなされ、陰性対照の値を10%上昇させる用量を指標にしてはどうかとの提案もなされた。今後、本委員会の提案の一つとして検討する必要がある。

William G. Thilly: Have environmental mutagens caused oncomutations in people? Nature Genetics, 34, 255-259 (2003)が本間委員より紹介された。ポイントは、人ががんを引き起こす突然変異のほとんどは内的要因に

よるものであり、環境変異原が突然変異を誘発することにより人のがんを引き起こすという証拠は特別の場合を除きほとんどない(紫外線照射, がんの化学療法や、放射線療法)。環境要因は突然変異を誘発するというよりもむしろ、突然変異を持つ細胞を選択すると考えた方が、人での環境発がんの事実をうまく説明できるように思われる。以上の発表に関して多くの議論がなされ、本委員会のポジションペーパーを作り上げる場合にも参考になるが、遺伝毒性に関する考え方を単純化しすぎることなく、いろいろな角度から考察を加える必要があるとされた。

日本環境変異原学会発表の要旨について長尾委員から説明があり、ヒトに対するコウジ酸の曝露量を、天然に存在する可能性のある「みそ、醤油」から試算してみるとの説明があった。

長尾委員から、これまでに得られた新しいデータのまとめおよび今後の検討の方向性に関する以下の提案がなされた。コウジ酸の変異原性についての整理では、コウジ酸のHPLC分離により、コウジ酸の分画が±S9で変異原性を示した。コウジ酸以外の分画に変異原性があるか否か現在検討中である。大腸菌変異スペクトル解析により、G→Aが35%、その他は9~15%、AT塩基対の変異が37%と高いのが特徴である。In vitroヒトリンパ芽球細胞でTK変異, MN, Cometの誘発がみられ、MNについてはaneuploidyであるか否か検討する必要があると思われる。TK変異については塩基置換, LOH, aneuploidyによる可能性があるが、このメカニズムについては特に検討せず、トランスジェニックラットの結果を持つ方針である。In vitro染色体異常について、ヒト細胞TK6およびWTK-1細胞を用いて検討する(佐々木委員)。In vivo genotoxicityの検出法のrecommendationを作る場合に重要となる問題として以下の事項があげられた:

- In vitroにおけるMNはin vivo情報のために重要か。In vivoと動物種を統一する必要は無いか。
- ヒトの細胞を使うことは良いが、MNについてはWTK-1, TK6細胞の結果は陽性であり、Human keratinocyte および Hep G2の結果と異なる。後二者の再現性を検討した上で、理由を検討する必要があると思われる。
- コウジ酸はdirect mutagenであるが、S9の存在下でも活性は低下しないので下記に関する問題は無いが、S9で不活性化されるものは、胃に対する作用を調べる必要がある。変異原性試験において胃で使えるシステムとしてCometのvalidationが重要である。

以上の提案について議論がなされた。In vitroでの小核誘発性に関し、数的異常によるものか否かを、本間委員がFISHで検討することとした。また、トランスジェ

ニックのデータが非常に重要であることが確認され、中嶋委員が担当することとなった。雌 MutaMouse を用い、3 および 1.5% の混餌で 4 週間の投与とし、肝臓における変異を調べる。他の臓器も凍結保存しておき、必要に応じて解析する。また、DNA シークエンスの解析が必要な場合には衛研が協力することとした。その他、雌雄を用いるべき、BMD が求められるように多くの用量段階について検討すべき、Comet、肝小核等を組みあわせて行つては、等の意見が出されたが、さらに検討することとした。

4.8. 第8回検討会(2003年10月22日)

コウジ酸の SVK14 および HepG2 を用いた *in vitro* 小核試験の結果に関する祖父尼委員のレビューが紹介された。

コウジ酸のラット肝 RDS 試験およびショウジョウバエ試験の中間結果が宇野委員より報告された。RDS 試験は強制経口投与と混餌投与で行い、投与3日後に両条件とも最高用量で RDS が誘発された。肝の重量変化および病理組織変化はなかった。体重当たり投与量は混餌投与の方で多かったが、体重増加量は強制経口投与で強く抑制された。甲状腺重量は強制経口投与より混餌投与で著しく増加した。ショウジョウバエの DNA 修復および翅毛スポット試験は陰性であった。

コウジ酸の MutaMouse を用いた遺伝子突然試験の計画概要が中嶋委員によって紹介され、内容が協議された。投与用量は 1、2 および 3% とすること、摘出器官に甲状腺を加えることになった。

Kerry L. Dearfield et al.: Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Res.*, 521, 121-135 (2002) の JETOC による日本語の解説記事が森田委員より紹介された。

4.9. 第9回検討会(2003年11月20日)

コウジ酸の遺伝毒性について、長尾委員より新しいデータが紹介された。3 ロットのコウジ酸の各 HPLC 分画について復帰突然変異誘発能を検討したところ、ロット間に相違は認められず、また NMR 分析により活性物質はコウジ酸であることが確認された。このことから、既報告の相反する *in vitro* 試験結果は、各ロットに含まれている可能性のある不純物によるものではないことが明らかとなった。

日本環境変異原学会発表スライドの改訂版が長尾委員より提示された。スライドは若干の変更がかけられた後、最終版とされる予定である。今後、リスク評価に関し必要とされるであろう議論内容について、以下の項目が上げられた：

- 閾値以下のものであれば、いくら加えても問題はないのか？

- 化学物質の使用をやめた場合のリスクは？
- 何に使うかによって許容できるレベルは異なるのでは？
- 発癌性のリスクには閾値があっても、遺伝毒性のリスクとしてはどうか？

4.10. 第10回検討会(2003年12月25日)

中嶋委員から、コウジ酸の TG 試験 (1, 2, 3% 混餌) の進捗状況について説明がなされた。12月19日に解剖が終わり、必要な組織(肝臓、胃、結腸、骨髄、甲状腺)を凍結した。肝臓の一部を DNA の酸化的障害 (8-OH-dG) を検討するため葛西委員に送付した。マクロでは全処理群で甲状腺の肥大、および最高用量群で子宮の肥大 (5 倍程度) が観察された。また、最高投与群において軽度な体重増加抑制が認められたが、その他特記すべき事項はない。また、最終日には末梢血の AO 超生体染色による小核試験のための標本作製したので、順次解析予定である。さらに、肝臓の一部を用いて Comet 試験を実施するための準備を進めている。

森田委員から、Commission of the European Communities の Regulation of the European Parliament and of the Council, concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restrictions of Chemicals (REACH) に関する紹介がなされた。一般化学物質が対象で、CMR effects (carcinogenicity, mutagenicity and toxicity for reproduction) を中心に考慮し、危険物を規制しようとするものである。生産量により要求される試験項目が変わる点、陰性の場合 *in vitro* の試験がなくても受け入れ可能な *in vivo* 試験結果があれば、それでの評価も行う点等が新しい点であろう。

4.11. 第11回検討会(2004年1月16日)

葛西委員からコウジ酸を投与した TG マウス肝における 8-OH-dG の測定結果の説明があった。以前の実験では、2% コウジ酸を 2 週間投与したラットの甲状腺で明らかな減少がみられたが、MutaMouse の肝では 3% 混餌投与群で有意に増加した。葛西委員の発表について質疑がなされた。主なものとしては、コウジ酸は抗酸化物質なのに今回 8-OH-dG が上がった理由に関し、アスコルビン酸でも高用量だと上がることが判っており、コウジ酸の構造から考えて、ラジカルができている可能性が指摘された。その他、ラットでは甲状腺での 8-OH-dG の低下がマウスでも再現可能かとの疑問が提示されたが、マウスの甲状腺は非常に小さく、技術的に困難であることが指摘された。また、データのばらつきに関する質問等が出された。また、反応の強さ、再現性に関しての質疑、応答があった。

MutaMouse を用いる試験の進捗状況について中嶋委員から報告がなされた。現時点で、DNA 抽出まで終了

しており、これから解析にかかる。また、同じ動物での Comet assay (28日投与の3日後の測定)と末梢血MNは陰性であった。

4.12. 第12回拡大検討会(クローズド会議:2004年2月12~13日, 国際シンポジウム:2004年2月14日)

本検討会は、海外コンサルタント(M.J. Aardema, D. Benford, D.H. Blakey, S.M. Galloway, D. Kirkland, Y.J. Surh, V. Thybaud, D. Tweats, L. Müller)を招き、拡大検討会として2回に分けて開催した。

1) クローズド会議

第12回拡大検討会議を海外の識者を招いてのコンサルテーション会議として開催するにあたり、本検討会の背景および目的が林委員長より説明された。最終目標は、3年間(2003年4月~2006年3月)の研究期間の最後まで残り2年で、食品関連物質の遺伝毒性に関するリスク評価の戦略を構築し、提言をまとめることにある。

長尾委員より、食品添加物としてのコウジ酸の遺伝毒性リスク評価について説明がなされた。すなわち、日本における食品添加物の規制の歴史、今回のコウジ酸規制の理由、薬事食品審議委員会で検討されたコウジ酸の発癌性ならびに遺伝毒性データの要約、それらを基にしたHERP法やBMD法による発癌リスクの計算結果などが報告され、極めて弱い反応しか示さない化合物の評価をどう扱うかについて問題提起を行った。

宇野委員より、コウジ酸の遺伝毒性に関する新規データについて説明がなされた。本検討会がこの1年間で実施した下記11種の試験/検討の結果を、データをふまえて報告した。

- 培養液のpH: 影響なし
- Ames試験における不純物の影響: コウジ酸に起因
- Ames試験(再確認など): 陽性
- 光プラスミド試験: 陽性
- TK6/WTK-1細胞による突然変異および小核試験: 陽性
- TK6/WTK-1細胞による Comet試験: 陽性
- TK6細胞による光遺伝毒性試験: 陽性
- ショウジョウバエ翅毛スポット試験: 陰性
- 雌MutaMouseによる肝臓遺伝子変異: 陰性
- 雌MutaMouseによる肝臓の8-OH-dG形成: 陽性
- ラット肝臓RDS試験: 陽性

海外コンサルタントを中心として、コウジ酸の発癌性および遺伝毒性データが検証された。一連の議論は「コウジ酸はヒトにも該当する遺伝毒性発癌物質かどうか?」という点に集約された。その結果、結論を導くには現時点ではデータ間のギャップが多く、そのギャップを埋める必要があるとされた。相反する結果が得られた

場合には、一般的にはなんらかのクライテリアでその重み付けをすることがあり、その中ではGLP試験か非GLP試験なのか、発表された論文の掲載誌は何か、試験のデザインは適切か、著者の評判はどうなのか、といった点も考慮されることがあるとされた。コウジ酸については、肝発癌性が遺伝毒性メカニズムに起因するものか否かを評価するには、いくつかの不明点、疑問点あるいは問題点すなわちギャップが存在することが指摘された。例えば、発癌性データに関しては、肝腫瘍の質(良性か悪性か)や用いたコウジ酸の質(かび毒の含有率など)が明らかでないこと、ノックアウトマウスを用いた検討では群あたりの匹数が少ないことなど、また遺伝毒性データに関しては、肝臓小核ではマウス陽性/ラット陰性、骨髄/末梢血小核ではラット陽性/マウス陰性のように明確に一致していない点のあること、Comet試験ではtail momentの測定が必要とされたことなどである。これらの事項を解決するには、スライド標本の再評価やADMEデータ収集を含む追加確認試験の実施などが必要と提言された。

2) 国際シンポジウム

第12回拡大検討会議「その2」を、「食品関連物質等のリスクアセスメント戦略」と題した国際シンポジウムとして開催するにあたり、まず、その趣旨が長尾委員より説明された。以下、海外シンポジスト7名および国内シンポジスト2名による発表ならびに総合討論が行われた。その演題の中で、クローズド会議をふまえ、海外コンサルタントの提言が報告された。本シンポジウムの開催により、遺伝毒性を中心とした食品関連化学物質の安全性に関心のある多くの参加者に、遺伝毒性発癌物質であっても閾値を設定できる可能性のあることが認識されたものと思われる。今後は、どのようなケースに閾値の設定が可能なのか、また、その設定はどのように行うのが適切で人々に受け入れられるものなのかを明らかにする必要がある。

4.13. 第13回検討会(2004年3月15日)

2004年2月の録音、東京会議について、今回の会議の成果については、Dr. Tweatsより提出される報告書の内容が重要であり、報告書を検討した上で今後の方向性を検討する。会議ではコウジ酸の発がん性、特に肝臓に対する発がん性に疑問が集中した。コウジ酸に遺伝毒性であったとしても胆状腺がんとの直接作用の関係はないであろう。また、肝がんを引き起こすとしても、それが遺伝毒性によるものがはっきりしない。従って、肝臓に対する遺伝毒性の有無を明らかに必要があるのではないかと。肝臓での小核試験を実施する際の問題点(ラットorマウス、加齢による影響、肝部分切除の影響)が話し合われた。

次年度コウジ酸に関する試験としては以下の試験を追

加試験として行うことが提案された：肝小核，肝臓でのDNAアダクトの検出，光毒性を考慮したMLA，ラット肝UDS，TK試験．試験データの信頼性を向上させるため，GLPでの試験，もしくは試験プロトコール等の精査の必要性である．今年度でコウジ酸に関する試験を終了させ，試験結果については来年度中に論文にまとめることを目指す．

次回のモデル化合物としてはアマランス，もしくは他のアゾ化合物を候補とする．化合物が決まり次第，手分けしてこれまでの試験データをレビューする．具体的な進め方に関しては，Dr. Tweatsの報告書を精査した上で，

もう一度話し合う．

5. おわりに

「食品および食品添加物に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈」に関する臨時委員会の目指しているところを軸に，活動中間報告をまとめた．コウジ酸1つを取り上げても，そのリスク評価は容易なものではなく，検討すべき事項は山積している．検討を重ね，残りの1年半で，JEMSの会員からも理解の得られる遺伝毒性の「検出・評価・解釈」についての戦略を構築したい．



Protective effects of progesterone on implantation failure induced by dibutyltin dichloride in rats

Makoto Ema*, Akira Harazono, Akihiko Hirose, Eiichi Kamata

Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Received 30 December 2002; received in revised form 27 February 2003; accepted 28 February 2003

Abstract

We previously showed that dibutyltin dichloride (DBTCl) at 7.6 mg/kg and higher on days 0–3 of pregnancy caused implantation failure and a decline in serum progesterone levels in rats and hypothesized that the decline is responsible for the implantation failure. This study was conducted to determine the protective effects of progesterone on the DBTCl-induced implantation failure in rats. Rats were given oral DBTCl at 0, 7.6, or 15.2 mg/kg on days 0–3 of pregnancy and/or subcutaneous progesterone at 2 mg/rat on days 0–8 of pregnancy. The reproductive outcome was determined on day 9 of pregnancy. No effects of administration of progesterone alone on the pregnancy rate and number of implantations were found. The pregnancy rate and number of implantations were significantly decreased after administration of DBTCl alone. The pregnancy rate and number of implantations were higher in the groups given DBTCl and progesterone than the groups given DBTCl alone. The present data indicate that progesterone protects, at least in part, against the DBTCl-induced implantation failure and support our hypothesis that the decline in progesterone levels is a primary mechanism for the implantation failure due to DBTCl.

© 2003 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Dibutyltin chloride; Organotin; Implantation failure; Early embryonic loss; Progesterone

1. Introduction

Organotin compounds are chemicals widely used in agriculture and industry. Disubstituted organotin compounds are commercially the most important derivatives, being used as heat and light stabilizers for polyvinyl chloride (PVC) plastics to prevent degradation of the polymer during melting

and forming of the resin into its final products as catalysts in the production of polyurethane foams, and as vulcanizing agents for silicone rubbers (Piver, 1973; WHO, 1980). The amounts of organotin released into the environment have increased with its widespread use. The most important non-pesticidal route of entry of organotin compounds into the environment is through leaching of organotin-stabilized PVC by water (Quevauviller et al., 1991), and use in antifouling agents resulting in the entry of organotin into the aquatic environment (Maguire, 1991).

* Corresponding author. Tel.: +81-3-3700-9878; fax: +81-3-3707-6950.

E-mail address: ema@nihs.go.jp (M. Ema).

Data are available regarding the identification of dibutyltin (DBT) and tributyltin (TBT) in aquatic marine organisms (Sasaki et al., 1988; Lau, 1991) and marine products (Suzuki et al., 1992). In the environment, TBT is degraded spontaneously and biochemically via a debutylation pathway to DBT (Seligman et al., 1988; Stewart and de Mora, 1990). Organotin compounds are introduced into foods by the use of pesticides and antifoulants and via migration of tin from PVC materials (WHO, 1980). The dietary exposure of Japanese consumers to organotin compounds was estimated and reported that daily intake was 1.7 $\mu\text{g}/\text{person}$ for TBT, 0.45 $\mu\text{g}/\text{person}$ for DBT, 0.09 $\mu\text{g}/\text{person}$ for triphenyltin, and 0 $\mu\text{g}/\text{person}$ for diphenyltin (Toyoda et al., 2000).

Although the toxicity of organotins has been extensively reviewed, the developmental and reproductive toxicity of these compounds is much less well understood (Boyer, 1980; WHO, 1980; Snoeij et al., 1987). We previously reported that oral administration of dibutyltin dichloride (DBTCl) at 5 mg/kg throughout the period of organogenesis resulted in a significant increase in the incidence of fetuses with malformations (Ema et al., 1991). Rat embryos were highly susceptible to the teratogenic effects of DBTCl when administered on days 7 and 8 of pregnancy (Ema et al., 1992). We also reported that DBTCl had dysmorphic effects in rat embryos in a whole embryo culture system (Ema et al., 1995, 1996).

Recently we reported that a significant increase in implantation failure, preimplantation embryonic loss, was caused following oral administration of DBTCl on days 0–3 of pregnancy at 7.6 mg/kg and higher in rats (Ema and Harazono, 2000a,b). We also showed that DBTCl caused the suppression of uterine decidualization and a decrease in serum progesterone levels in pseudopregnant rats at doses which induced implantation failure (Harazono and Ema, 2001). These findings suggest that a decline in progesterone levels causes the suppression of uterine decidualization and impairment of uterine function, and these effects are responsible for the DBTCl-induced implantation failure. This study was designed to determine whether the administration of progesterone protects against the DBTCl-induced implantation failure in rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Wistar rats (Jcl: Wistar, CLEA Japan, Tokyo, Japan) were used in this study. The animals were maintained in an air-conditioned room at 23–25 °C, with a relative humidity of 50–60%, under a controlled 12/12 light/dark cycle. The rats were reared on a basal diet (F-1; Funabashi Farm Co., Funabashi, Japan) and tap water ad libitum. Daily vaginal smears were monitored from virgin female rats, about 13 weeks of age. On the evening of proestrus, female rats were caged overnight for 15 h with untreated, proven-fertile male rats and checked the following morning for signs of successful mating by examining vaginal smears. The day when sperm were detected in the vaginal smear was considered to be day 0 of pregnancy.

2.2. Administration of dibutyltin dichloride (DBTCl) and/or progesterone

The rats were dosed once daily by gastric intubation with DBTCl (98% pure, Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) at 0, 7.6, or 15.2 mg/kg on days 0–3 after mating. The dosage levels were determined based on the results of our previous study in which DBTCl at 7.6 and 15.2 mg/kg caused significant increases in implantation failure and preimplantation embryonic loss in rats (Ema and Harazono, 2000a,b). The DBTCl was dissolved in olive oil (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan). Successfully mated females were distributed on a random basis into six groups of 14–15 rats each and housed individually. Three groups were subcutaneously injected with progesterone at 2 mg/rat on days 0–8 after mating. The remaining three groups received no progesterone. The volume of each dose of DBTCl was adjusted to 5 ml/kg of body weight based on the daily body weight. The control rats received olive oil only.

2.3. Observations

The female rats were sacrificed by ether overdose on day 9 after mating and the reproductive

outcome was determined. The numbers of corpora lutea and implantations were counted under a dissecting microscope. The uteri were placed in 2% sodium hydroxide for confirmation of the pregnancy status.

2.4. Data analysis

The initial body weight, body weight gain and food consumption of the female rats, and number of implantations were evaluated by analysis of variance, followed by a Dunnett's multiple comparison test if differences were found. Statistical comparisons of the pregnant females and non-pregnant females were made using Fisher's exact test. The 0.05 level of probability was used as the criterion for significance.

3. Results

Table 1 shows the body weight gain and food consumption in female rats given DBTCl and/or progesterone. The body weight gain and food consumption on days 0–4 and 4–9 of pregnancy in the groups given DBTCl with or without progesterone were significantly lower than those in the control group and the group given progesterone alone. No significant differences in body weight gain and food consumption were found between the control group and the group given progesterone alone, or between the groups given

DBTCl alone and the groups given DBTCl and progesterone.

Reproductive findings in female rats given DBTCl and/or progesterone are presented in Table 2. There were no significant differences in the reproductive parameters between the control group and the group given progesterone alone. The pregnancy rate and number of implantations per female in the groups given DBTCl alone at 7.6 or 15.2 mg/kg were significantly lower than those in the control group and in the group given progesterone alone. The pregnancy rate and number of implantations per female were higher in the groups given DBTCl and progesterone than in the groups given DBTCl alone, and significantly higher values were found in the group given DBTCl at 7.6 mg/kg and progesterone. The incidence of preimplantation embryonic loss was significantly higher in the groups given DBTCl with or without progesterone than in the control group and in the group given progesterone alone. The incidence of preimplantation loss was lower in the groups given DBTCl and progesterone than in the groups given DBTCl alone, and significantly lower values were found in the group given DBTCl at 7.6 mg/kg and progesterone.

4. Discussion

We previously showed that DBTCl caused implantation failure (Ema and Harazono,

Table 1
Body weight gain and food consumption in female rats given DBTCl with or without progesterone

DBTCl (mg/kg)	0 (control)	0	7.6	7.6	15.2	15.2
Progesterone (mg/rat)	0	2	0	2	0	2
Number of females successfully mated	14	14	15	14	15	14
Initial body weight (g) ^a	236 ± 12	237 ± 9	232 ± 14	237 ± 12	234 ± 14	235 ± 14
<i>Body weight gain (g)^a</i>						
Days 0–4	8 ± 4	7 ± 6	–24 ± 12*†	–24 ± 11*†	–31 ± 4*†	–28 ± 5*†
Days 4–9	12 ± 4	14 ± 4	–11 ± 22*†	–22 ± 17*†	–35 ± 5*†	–31 ± 9*†
<i>Food consumption (g)^a</i>						
Days 0–4	48 ± 8	46 ± 9	10 ± 11*†	9 ± 10*†	4 ± 1*†	3 ± 2*†
Days 4–9	80 ± 8	78 ± 8	25 ± 30*†	15 ± 27*†	2 ± 1*†	4 ± 4*†

*, Significantly different from the control group; $P < 0.05$. †, Significantly different from the group given progesterone alone, $P < 0.05$.

^a Values are given as the mean ± S.D.

Table 2
Reproductive findings in female rats given DBTCl with or without progesterone

DBTCl (mg/kg)	0 (control)	0	7.6	7.6	15.2	15.2
Progesterone (mg/rat)	0	2	0	2	0	2
Number of females successfully mated	14	14	15	14	15	14
Number of pregnant females (%)	14 (100)	14 (100)	7 (46.7)*†	13 (92.9)#	5 (33.3)*†	9 (64.3)*†
Number of non-pregnant females (%)	0 (0)	0 (0)	8 (53.3)*†	1 (7.1)#	10 (66.7)*†	5 (35.7)*†
Number of corpora lutea ^a	16.3±1.3	17.0±1.9	15.1±1.3†	15.6±1.7	15.3±1.5†	15.3±1.1†
Number of implantations ^a	14.9±2.1	15.1±1.3	5.6±6.6*†	11.6±5.2†#	2.9±5.1*†	6.1±6.3*†
Preimplantation loss (%)	8.6	10.5	62.8*†	25.9*†#	81.3*†	60.0*†

*, Significantly different from the control group, $P < 0.05$. †, Significantly different from the group given progesterone alone, $P < 0.05$. #, Significantly different from the group given DBTCl alone, $P < 0.05$.

^a Values are given as the mean ± S.D.

2000a,b) and the suppression of uterine decidualization correlated with the reduction in serum progesterone levels in rats, and hypothesized that this decline in progesterone levels may be responsible for the DBTCl-induced reproductive failure (Harazono and Ema, 2001). In this study, we determined the effects of progesterone on reproductive parameters in pregnant rats, and showed that progesterone protects against the DBTCl-induced implantation failure.

Normal reproductive function in females involves the interaction of the central nervous system, ovary, and uterus, and toxic effects at these sites can affect embryonic survival. The function of the uterine endometrium is one of the principle factors for the initiation and maintenance of pregnancy. Adequate levels of progesterone are required for normal uterine decidualization and a normal decidualization is required for normal implantation of the embryos (Yochim and De Feo, 1962; Hashimoto and Wiest, 1969). We showed here that lowered reproductive parameters in the groups given DBTCl were recovered by the administration of progesterone, and the values in the groups given DBTCl at 7.6 mg/kg in combination with progesterone were comparable to those in the control group and group given progesterone alone. These findings indicate that progesterone protects against the DBTCl-induced reproductive failure, and support our previous hypothesis that the decline in progesterone levels is the primary factor responsible for the DBTCl-induced implan-

tation failure. However, the number and percent of implantations were less in the groups given DBTCl and progesterone compared with the control group and group given progesterone alone, and these values in the group given DBTCl at 15.2 mg/kg in combination with progesterone were different from the control values. Thus, incompletely protective effects of progesterone against the DBTCl-induced implantation failure were noted, especially at higher dose of DBTCl. It is likely that other mechanisms act in the induction of implantation failure.

In this study, no significant difference in maternal body weight gain or food consumption was found between the females given DBTCl and progesterone and females given progesterone alone. These results indicate that the progesterone did not protect against the maternal toxicity induced by DBTCl, and that the progesterone protects, at least in part, against the implantation failure without the recovery of overt maternal damage. In other words, the implantation failure after the administration of DBTCl during early pregnancy may be due to the direct effect of DBTCl, not to any secondary effects of maternal toxicity. However, DBTCl at high dose was severely maternal toxic and progesterone incompletely protected the DBTCl-induced implantation failure.

In our previous study, significant increases in the incidences of preimplantation embryonic loss were observed after administration of TBTCI, the

parent compound of TBTCI, at 16.3 mg/kg and higher on days 0–3 of pregnancy (Harazono et al., 1998a,b). TBTCI at 16.3 mg/kg is equivalent to 50 $\mu\text{mol/kg}$. We also showed that DBTCI on days 0–3 of pregnancy induced a significant increase in the incidence of preimplantation embryonic loss at 7.6 mg/kg (Ema and Harazono, 2000a,b). DBTCI at 7.6 mg/kg is equivalent to 25 $\mu\text{mol/kg}$. More precisely, the doses of DBTCI that caused early embryonic loss were lower than those of TBTCI. The DBT compound was identified as the main metabolite of the tributyltin compound in rats (Iwai et al., 1981). If on a mole equivalent basis a metabolite is as effective or more effective than the parent compound, this is consistent with the view that the metabolite is the proximate toxicant or at least an intermediate to the proximate toxicant. It is apparent that DBTCI participates in the induction of early embryonic loss due to TBTCI. Furthermore, TBTCI (Harazono and Ema, 2000; Ema and Harazono, 2000b) and DBTCI (Harazono and Ema, 2001) also caused the suppression of uterine decidualization correlated with decreased levels of serum progesterone in pseudopregnant rats at doses that induced implantation failure. These findings suggest the same mechanisms act in the induction of implantation failure due to TBTCI and DBTCI. Consideration of these findings together suggests that the TBTCI-induced implantation failure is mediated by the decline in the maternal serum progesterone levels due to DBT.

In summary, the administration of progesterone protects, at least in part, against the DBTCI-induced implantation failure. The present data support our hypothesis that the decline in progesterone levels is a primary mechanism for the implantation failure due to DBTCI.

Acknowledgements

This study was supported, in part, by a grant from the Ministry of Health, Welfare, and Labor, Japan.

References

- Boyer, I.J., 1980. Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology* 55, 253–298.
- Ema, M., Harazono, A., 2000a. Adverse effects of dibutyltin dichloride on initiation and maintenance of rat pregnancy. *Reprod. Toxicol.* 14, 451–456.
- Ema, M., Harazono, A., 2000b. Developmental and reproductive toxicity of tributyltin and its metabolite, dibutyltin, in rats. *Cong. Amon.* 40, S108–S120.
- Ema, M., Itami, T., Kawasaki, H., 1991. Teratogenicity of di-*n*-butyltin dichloride in rats. *Toxicol. Lett.* 58, 347–356.
- Ema, M., Itami, T., Kawasaki, H., 1992. Susceptible period for the teratogenicity of di-*n*-butyltin dichloride in rats. *Toxicology* 73, 81–92.
- Ema, M., Iwase, T., Iwase, Y., Ogawa, Y., 1995. Dysmorphic effects of di-*n*-butyltin dichloride in cultured rat embryos. *Toxicol. In Vitro* 5, 703–709.
- Ema, M., Iwase, T., Iwase, Y., Ohyama, N., Ogawa, Y., 1996. Change of embryotoxic susceptibility to di-*n*-butyltin dichloride in cultured rat embryos. *Arch. Toxicol.* 70, 742–748.
- Harazono, A., Ema, M., 2000. Suppression of decidual cell response induced by tributyltin chloride in pseudopregnant rats: a cause of early embryonic loss. *Arch. Toxicol.* 74, 632–637.
- Harazono, A., Ema, M., 2001. Suppression of decidual cell response following administration of dibutyltin dichloride in pseudopregnant rats. *J. Toxicol. Sci.* 26, 264.
- Harazono, A., Ema, M., Ogawa, Y., 1998a. Evaluation of early embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats: phase- and dose-dependent antifertility effects. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 94–99.
- Harazono, A., Ema, M., Kawashima, K., 1998b. Evaluation of malnutrition as a cause of tributyltin-induced pregnancy failure in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 224–230.
- Hashimoto, I., Wiest, W.G., 1969. Correlation of the secretion of ovarian steroids with function of a single generation of corpora lutea in the immature rat. *Endocrinology* 84, 873–885.
- Iwai, H., Wada, O., Arakawa, Y., 1981. Determination of tri-, di-, and monodutyltin and inorganic tin in biological materials and some aspects of their metabolism in rats. *J. Anal. Toxicol.* 5, 300–306.
- Lau, M.M., 1991. Tributyltin antifoulings: a threat to the Hong Kong marine environment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 299–304.
- Maguire, R.J., 1991. Aquatic environmental aspects of non-pesticidal organotin compounds. *Water Poll. Res. J. Canada* 26, 243–360.
- Piver, W.T., 1973. Organotin compounds: industrial applications and biological investigation. *Environ. Health Perspect.* 4, 61–79.

- Quevauviller, P., Bruchet, A., Donard, O.F.X., 1991. Leaching of organotin compounds from poly (vinyl chloride) (PVC) materials. *Appl. Organomet. Chem.* 5, 125–129.
- Sasaki, K., Ishizaka, T., Suzuki, T., Saito, Y., 1988. Determination of tri-*n*-butyltin and di-*n*-butyltin compounds in fish by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71, 360–366.
- Seligman, P.F., Valkirs, A.O., Stang, P.M., Lee, R.F., 1988. Evidence for rapid degradation of tributyltin in a marina. *Mar. Pollut. Bull.* 19, 531–534.
- Snoeij, N.J., Penninks, A.H., Seinen, W., 1987. Biological activity of organotin compounds—an overview. *Environ. Res.* 44, 335–345.
- Stewart, C., de Mora, S.J., 1990. A review of the degradation of tri(*n*-butyl)tin in the marine environment. *Environ. Technol.* 11, 565–570.
- Suzuki, T., Matsuda, R., Saito, Y., 1992. Molecular species of tri-*n*-butyltin compounds in marine products. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1437–1443.
- Toyoda, M., Sakai, H., Kobayashi, Y., Komatsu, M., Hoshino, Y., Horie, M., Saeki, M., Hasegawa, Y., Tsuji, M., Kojima, M., Toyomura, K., Kumano, M., Tanimura, A., 2000. Daily dietary intake of tributyltin, dibutyltin, triphenyltin, and diphenyltin compounds according to a total diet study in Japanese population. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 31, 280–286.
- WHO, 1980. Environmental health criteria 15. In: Tin and Organotin Compounds: A Preliminary Review. World Health Organization, Geneva.
- Yochim, J.M., De Feo, V.J., 1962. Control of decidual growth in the rat by steroid hormones of the ovary. *Endocrinology* 71, 134–142.

HIGHER SUSCEPTIBILITY OF NEWBORN THAN YOUNG RATS TO 3-METHYLPHENOL

Mutsuko KOIZUMI¹, Atsushi NODA², Yoshihiko ITO², Masatoshi FURUKAWA³,
Sakiko FUJII³, Eiichi KAMATA¹, Makoto EMA¹ and Ryuichi HASEGAWA¹

¹National Institute of Health Sciences,

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

²Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology,

3-7-11 Hashimoto-dai, Sagami-hara-shi, Kanagawa 229-1132, Japan

³Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd.,

363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido 004-0839, Japan

(Received October 30, 2002; Accepted February 12, 2003)

ABSTRACT — To determine susceptibility of infants to 3-methylphenol, a repeated dose toxicity study was conducted with oral administration to newborn and young rats. In an 18-day newborn study from postnatal days 4 to 21 at doses of 30, 100 and 300 mg/kg/day, various clinical signs including deep respiration, hypersensitivity on handling and tremors under contact stimulus, and depressed body weight gain were observed at 300 mg/kg. At 100 mg/kg, hypersensitivity and tremors were also noted in a small number of males only on single days during the dosing period. No adverse effects were observed in the 30 mg/kg group. There were no abnormalities of physical development, sexual maturation and reflex ontogeny. The no observed adverse effect level (NOAEL) for newborn rats was considered to be 30 mg/kg/day and the unequivocally toxic level 300 mg/kg/day. In a 28-day study starting at 5 weeks of age, clinical signs and depression of body weight gain, as observed in the newborn rats, appeared in both sexes at 1000 mg/kg but not 300 mg/kg. The NOAEL and the unequivocally toxic level were 300 mg/kg/day and 1,000 mg/kg/day, respectively. From these results, newborn rats were concluded to be 3 to 10 times more susceptible to 3-methylphenol than young rats. However, the realistic no adverse effect dose for the newborn must be slightly lower than 100 mg/kg/day, at which the toxicity incidence was very low, rather than 30 mg/kg/day. Based on this speculation and the equal toxicity at unequivocally toxic levels, the differences in the susceptibility to 3-methylphenol could be concluded to be 3 to 4 times. This is consistent with the results of our previous comparative studies on 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol and 3-aminophenol, which showed 2 to 4 times differences in the susceptibility between newborn and young rats.

KEY WORDS: Toxicity in newborn rats, 3-Methylphenol

INTRODUCTION

It is known that neonates have specific physiological characteristics with regard to water volume per body, weight of liver and brain relative to body size, cardiac output, respiratory rate, and blood flow to brain and kidney, for example. In fact, the toxicokinetic ability of infants seems to differ from that of adults with respect to their metabolism, clearance, protein binding and volume of distribution, based on data obtained with

therapeutic drugs (Besunder *et al.*, 1988; Kearns and Reed, 1989; Morselli, 1989), although there is very little information regarding environmental chemicals. Furthermore, the sensitivity of rapidly developing tissues/systems in neonates may also differ from that in adults (Vesselinovitch *et al.*, 1979; Pope *et al.*, 1991; Faustman *et al.*, 2000). Since infants are always exposed to various chemicals by putting fingers, toys and other objects into their mouths as well as via mother's milk, there is growing concern about effects

Correspondence: Mutsuko KOIZUMI

on infant health. Unfortunately, there is no generally accepted Test Guideline for newborn toxicity studies. Therefore, we established a new protocol (Koizumi *et al.*, 2001) in order to investigate the differences of susceptibility between the newborn and young rats. This protocol includes a detailed examination of physical development and sexual maturation, and a complete toxicity analysis after the 9-week recovery-maintenance period, the age of the young adult. Furthermore, a unique feature is that the same lot number of chemical and the same rat strain from the same supplier are used as in young rat studies.

Using this protocol, we have already tested 14 phenolic derivatives as a part of an existing chemical testing program of Japan in 1999. So far, we have reported three comparative analyses of 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol and 3-aminophenol (Koizumi *et al.*, 2001, 2002a, 2002b; Yamamoto *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2002). In these studies, for more precise / appropriate comparison, we estimated both the no observed effect levels (NOAELs) and unequivocally toxic levels, defined as doses inducing severe toxic signs including death or critical histological damage, based on the results of both the main studies and the dose-finding studies for each case. In consequence, it was concluded that the susceptibility of newborn rats to the toxicity of these chemicals ranged from 2 to 4 times that of young rats.

In the present study, we selected 3-methylphenol, widely known as *m*-cresol and used in synthetic resins, disinfectants and pharmaceutical raw materials (Chemical Products' Handbook, 2002). Several reviews on the toxicity of this chemical or cresols, including three isomers, have been published (ATSDR, 1991; EHC, 1995; IRIS, 1997). For 3-methylphenol, although various clinical signs, growth inhibition and some developmental effects have been reported (TRL, 1986; BRRC, 1988a, 1988b, 1989; MBA, 1988; NTP, 1992), there are no data to our knowledge on its direct effects in newborn animals. In this study, we estimated the NOAELs and unequivocally toxic levels of 3-methylphenol, and compared them between newborn and young rats employing the previously described protocol.

MATERIALS AND METHODS

Materials

3-Methylphenol (CAS No. 108-39-4, purity: 99.13%) was obtained from Honshu Chemical Industry Co., Ltd. (Wakayama, Japan), and dissolved in

olive oil. The test solution was prepared at least once a week and kept cool and in the dark until dosing. The stability was confirmed to be at least 8 days under these conditions. All other reagents used in this study were specific purity grade.

Animals

Sprague-Dawley SPF rats [Crj:CD(SD)IGS] were purchased from Charles River Japan Inc. (Kanagawa, Japan) and maintained in an environmentally controlled room at 20-26°C with a relative humidity of 45-65%, a ventilation rate of more than 10 times per hour, and a 12:12 hr light/dark cycle. In the 18-day main study of newborn rats, 21 pregnant rats (gestation day 15) were purchased and allowed to deliver spontaneously. Among all newborns separated from dams at postnatal day 3 (the date of birth was defined as postnatal day 0), 48 males and 48 females were selected by stratified random sampling based on the body weight and assigned to 4 dose groups, including controls. Twelve foster mothers suckled the 4 males and 4 females assigned to each group up to weaning on postnatal day 21 (termination of dosing). After weaning, the animals of the recovery-maintenance group were individually maintained for 9 weeks. In the 28-day study of young rats, 4-week-old male and female rats were obtained and used at ages of 5 weeks after acclimation. All animals were allowed free access to basal diet (newborn rat study: LABO MR stock, Nihon Nosan Kogyo Inc., Yokohama, Japan; young rat study: CRF-1, Oriental Yeast Co. Ltd., Tokyo, Japan) and tap water.

Study design (Time schedule as reported previously (Koizumi *et al.*, 2001))

1. 18-Day repeated dose study in newborn rats

1) Dose-finding study

Newborn rats (5/sex/dose) were administered the test substance at 0, 100, 300 or 1,000 mg/kg/day in olive oil by gastric intubation daily from postnatal days 4 to 21. They were examined for general behavior and body weights during the dosing period, and sacrificed at postnatal day 22 after overnight starvation, for assessment of hematology, blood biochemistry, macroscopic findings and organ weights.

2) Main study

Newborn rats (12/sex/dose) were administered 3-methylphenol at 0, 30, 100 or 300 mg/kg/day in olive oil by gastric intubation daily from postnatal days 4 to 21, based on results of the dose-finding study, and 6

High susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol.

males and 6 females in each group were sacrificed on postnatal day 22 after overnight starvation. Recovery-maintenance groups (rest of animals in all groups) were maintained for 9 weeks without chemical treatment and fully examined at 12 weeks of age. General behavior was noted at least once a day for newborn rats (separated from each foster mother) and foster mothers. Body weight was measured at postnatal days 4, 7, 10, 13, 16, 19 and 21, and then at 7-day intervals, and food consumption (for 24 hr from the day before) at the same days after weaning. At postnatal day 20 for males and day 21 for females, gait condition, pupillary reflex, auricular reflex, corneal reflex, visual placing reflex, surface and mid-air righting reflexes, and ipsilateral flexor reflex were examined. Furthermore, fur appearance, incisor eruption and eye opening were observed in all animals from postnatal days 7, 9 and 11, respectively, and testes descent and vaginal opening were examined from postnatal days 17 and 29, respectively. Color, pH, occult blood, protein, glucose, ketone bodies, bilirubin, urobilinogen, sediment, specific gravity and volume of the urine were examined only at the end of the recovery-maintenance period. Blood was collected from the abdominal aorta under ether anesthesia at sacrifice after overnight starvation for scheduled-sacrifice and recovery-maintenance groups. One part was treated with EDTA-2K or 3.8% sodium citrate and examined for hematological parameters such as the red blood cell count, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, white blood cell count, platelet count, reticulocyte count, and leukocyte analysis percentage, as well as blood clotting parameters such as prothrombin time and activated thromboplastin time. Serum obtained from another portion of the blood was analyzed for blood biochemistry (total protein, albumin, albumin-globulin ratio, glucose, total cholesterol, triglycerides, phospholipid, total bilirubin, urea nitrogen (BUN), creatinine, glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), alkaline phosphatase, γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP), lactate dehydrogenase, cholinesterase, calcium, inorganic phosphorus, sodium, potassium, chlorine). After gross examination of the body surface, orificial mucosa and internal organs of animals sacrificed by exsanguination following collection of blood, the brain, pituitary gland, thymus, thyroids, heart, lungs, liver, spleen, kidneys, adrenals, testes, epididymides, prostates, seminal vesicle, ovaries and uterus were removed and weighed. Histopathological examination was conducted for the

control and the highest dose groups. The trachea, stomach, intestine, pancreas, lymph glands, urinary bladder, spinal cord, bone marrow and sciatic nerve as well as the above organs were fixed in 10% buffered formalin-phosphate (following Bouin's fixation for testes and epididymides), and paraffin sections were routinely prepared and stained with Hematoxylin-Eosin for microscopic examination. For other groups, the organs with macroscopically abnormal findings or in which dose-related effects were evident on microscopic examination for the highest dose group, were examined.

2. 28-Day repeated dose study in young rats

1) Dose-finding study (14-day study)

Five-week-old rats (5/sex/dose) were administered the test substance at 0, 125, 250, 500 or 1,000 mg/kg/day in olive oil by gastric intubation for 14 days. They were examined for general behavior, body weight and food consumption during dosing and sacrificed after overnight starvation following the last treatment for assessment of hematology, blood biochemistry, macroscopic findings and organ weights.

2) Main study

Five-week-old rats were given the test substance in olive oil by gastric intubation daily for 28 days and sacrificed after overnight starvation following the last treatment. Referring to the results of the dose-finding study, 4 doses, including the control, were established (0, 100, 300, 1,000 mg/kg/day). Recovery groups (0, 1,000 mg/kg) were maintained for 2 weeks without chemical treatment and fully examined at 11 weeks of age. The number of animals for each sex/dose was 7 for both scheduled-sacrifice and recovery cases. Rats were examined for general behavior, body weight, food consumption, urinalysis, hematology and blood biochemistry, necropsy findings, organ weights and histopathological findings in compliance with the Test Guideline of the Japanese Chemical Control Act (Official Name: Law Concerning the Examination and Regulation of Manufacture, etc. of Chemical Substances) under Good Laboratory Practice conditions.

Statistical analysis

Data were statistically analyzed as follows (Sakuma, 1977, 1981; Yamasaki *et al.*, 1981). Continuous data were analyzed by Bartlett's test for distribution. When homogeneity was recognized, one-way analysis of variance was performed. When a significant difference was observed, Dunnett's or Scheffe's tests

were conducted for comparisons between control and 3-methylphenol-treated groups. If not homogenous or in the case of quantitative urinalysis data, analysis was performed using the Kruskal-Wallis test. In consequence, if a significant difference was detected, Dunnett type, Scheffe type or Mann-Whitney's U tests (Mann and Whitney, 1947) were conducted. In the newborn rat study, categorical data for general appearance, reflex ontogeny, necropsy and histopathology were analyzed by Fisher's exact probability test. A probability less than 5% was considered statistically significant.

RESULTS

18-day study in newborn rats (including the dose-finding study)

In a dose-finding study at doses of 100, 300 and 1,000 mg/kg, all animals at 1,000 mg/kg died within two days after the first treatment (Table 1). These rats showed deep respiration, decrease in spontaneous activity and pale skin. At 300 mg/kg, deep respiration

and tremors under contact stimulus were noted during the dosing period in all animals, but no deaths occurred. No clinical signs were observed at 100 mg/kg. Body weight gain was depressed in females at 300 mg/kg. Blood biochemical examination showed a slight increase in total bilirubin in both sexes receiving 300 mg/kg (males; 0.36 mg/dL, compared with 0.32 mg/dL in controls, females; 0.37 mg/dL, 0.32 mg/dL). Organ weights, shown in Table 2, demonstrated a significant increase in relative liver weight in males at 100 and 300 mg/kg, and in females at 300 mg/kg but not absolute liver weights. No dose-related changes in hematology or gross findings were observed. Based on these results, the clearly toxic dose of 300 mg/kg was selected as the top dose in the main study, and 30 and 100 mg/kg were derived by approximately one-third divisions.

In the main study, various toxic signs such as deep respiration, increase in motor activity and tremors under contact stimulus were noted during the dosing period in all animals receiving 300 mg/kg, but no deaths occurred (Table 1). With 100 mg/kg, although

Table 1. Clinical signs and mortality in 18-day studies of 3-methylphenol in newborn rats.

Dose (mg/kg)	Dose-finding study			Main study		
	100	300	1,000	30	100	300
Males						
No. of animals	5	5	5	12	12	12
No. of dead animals	-	-	5 ^{a)}	-	-	-
No. of animals with clinical signs						
Deep respiration	-	5	3	-	-	5
Increase in motor activity	-	-	-	-	-	12
Decrease in spontaneous activity	-	-	5	-	-	1
Hypersensitivity on handling	-	-	-	-	1 ^{b)}	7
Tremors under contact stimulus	-	5	-	-	3 ^{c)}	12
Pale skin	-	-	1	-	-	-
Females						
No. of animals	5	5	5	12	12	12
No. of dead animals	-	-	5 ^{a)}	-	-	-
No. of animals with clinical sign						
Deep respiration	-	5	2	-	-	3
Increase in motor activity	-	-	-	-	-	12
Decrease in spontaneous activity	-	-	5	-	-	1
Hypersensitivity on handling	-	-	-	-	-	10
Tremors under contact stimulus	-	5	-	-	-	12
Pale skin	-	-	2	-	-	-

--: No animals with clinical sign.

^{a)}: All animals died within 2 days after first treatment, ^{b)}: Observed only at dosing day 18, ^{c)}: Observed only at dosing day 4 in one rat and at dosing day 11 in another two.

High susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol.

no clinical signs were observed in the dose-finding study, three males showed tremors under contact stimulus only on single days, dosing days 4, 11 and 11, respectively, and another male showed hypersensitivity on handling on a single day, dosing day 18. No change in general behavior was observed at 30 mg/kg. Body weights of both sexes given 300 mg/kg were lowered during the dosing period, but at 100 and 30 mg/kg were comparable to control values (Fig.1). No definitive changes in developmental parameters, including sexual maturation, as well as reflex ontogeny were detected in any dose group. At the scheduled sacrifice, blood biochemical examination of the 300 mg/kg group showed increases in γ -GTP, total bilirubin and BUN in males (Table 3). Significant increase of relative liver weight but not absolute liver weight was noted in both sexes given this highest dose (Table 2). In addition, there was a decrease in absolute brain weight in both sexes, but this change was not noted in the dose-finding study. On histopathological examination, basophilic tubules in kidneys showed a tendency to increase in 300 mg/kg males (slight and moderate changes in 2/6 and 3/6, respectively, compared with only slight change in 5-6/6 animals in other groups). After the recovery-maintenance period, there were no dose-related changes in body weight, blood biochemistry and histopathology, but low absolute brain weights remained in males (1.90 g, compared with 2.08 g in controls). No dose-related

changes in food consumption, urinalysis, hematology and gross finding were observed throughout this study, including the recovery-maintenance period.

Since the hypersensitivity on handling and tremors under contact stimulus observed in a small number of males of the 100 mg/kg group were considered as dose-related adverse effects, the NOAEL in the main study was concluded to be 30 mg/kg/day. However, these clinical signs at 100 mg/kg were observed only on single days during the dosing period in the main study and not in the dose-finding study. Therefore, as for the unequivocally toxic level, 300 mg/kg/day was concluded to be appropriate because significant toxic effects in the central nervous system were observed at this dose, along with decrease in body weight gain.

28-day study in young rats (including the dose-finding study)

In the dose-finding study for 14 days at doses of 125, 250, 500 and 1,000 mg/kg, no deaths occurred at any dose (Table 4). Salivation, tremors and prone/lateral position were observed during the dosing period in both sexes at 1,000 mg/kg. Body weights and food consumption were lowered in males receiving 1,000 mg/kg. At 500 mg/kg and less, no changes in clinical signs, body weight and food consumption were observed. Blood biochemical examination showed increase in total cholesterol in females at 1,000 mg/kg

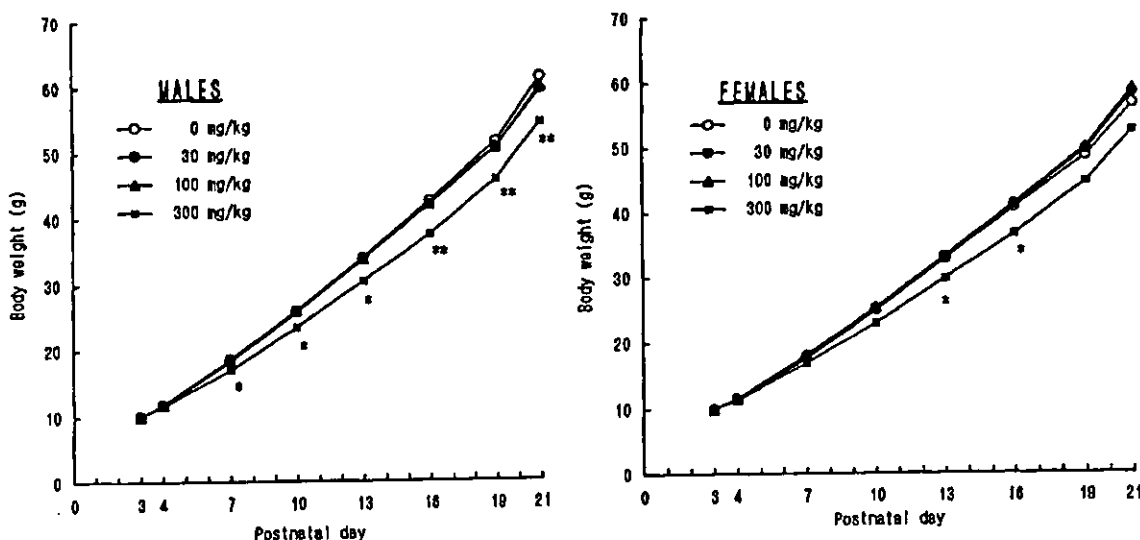


Fig. 1. Body weight change in 18-day study of 3-methylphenol in newborn rats (main study).

*: Significantly different from controls ($p < 0.05$), **: Significantly different from controls ($p < 0.01$).

(76.0 mg/dL, compared with 53.4 mg/dL at controls) and 500 mg/kg (72.2 mg/dL). Increase in relative liver weights in both sexes at 1,000 mg/kg (males: 3.86 g/100 g body weight, compared with 3.32 g/100 g body weight at controls, females: 3.70 g/100 g body weight, 3.34 g/100 g body weight) and 500 mg/kg (males: 3.60 g/100 g body weight, females: 3.68 g/100 g body weight), and in relative kidney weight in males at 1,000 mg/kg (0.47 g/100 g body weight, compared with 0.43 g/100 g body weight) was also observed. There were no dose-related changes evident on hematological and gross examination. Based on the results, the upper limit dose in the Test Guideline of 1,000 mg/kg was selected as the top dose for the main study, and 300 and 100 mg/kg were derived by division.

In the main study, deaths did not occur even at 1,000 mg/kg (Table 4). Salivation and tremors were observed throughout the dosing period at only 1,000

mg/kg in most males and females. At this dose, body weights were significantly lowered (finally 9% lower than controls for males and 11% for females) throughout the dosing period in males and from dosing day 14 in females, and food consumption was transiently lowered during the early dosing period in both sexes. At dosing week 4, increases in water consumption and urine volume were found in males and lowering of urinary pH in both sexes in the 1,000 mg/kg group. At 100 and 300 mg/kg, no changes in clinical signs, body weight, food consumption and urinalysis data were observed. Blood biochemical examination showed only slight increases in total cholesterol and BUN in males with a tendency for increase in total cholesterol in females receiving 1,000 mg/kg (Table 5). No dose-related changes in hematological findings were observed in any 3-methylphenol-treated group. There were significant increases in relative liver weights of

Table 2. Organ weights after 18-day repeat dosing of 3-methylphenol in newborn rats.

Dose (mg/kg)	Dose-finding study ^{a)}			Main study			
	0	100	300	0	30	100	300
Males							
No. of animals	5	5	5	6	6	6	6
Body weight ^{b)} (g)	62 ± 5	62 ± 6	59 ± 7	53.1 ± 3.3	52.7 ± 3.5	51.4 ± 3.5	46.7 ± 4.3*
Brain (g)	1.53 ± 0.05 ^{c)} (2.47 ± 0.19 ^{d)}	1.57 ± 0.06 (2.55 ± 0.18)	1.52 ± 0.06 (2.61 ± 0.23)	1.55 ± 0.04 (2.93 ± 0.18)	1.58 ± 0.06 (3.00 ± 0.11)	1.51 ± 0.06 (2.94 ± 0.13)	1.47 ± 0.02* (3.16 ± 0.28)
Liver (g)	1.81 ± 0.13 (2.90 ± 0.04)	1.91 ± 0.19 (3.08 ± 0.19**)	1.94 ± 0.24 (3.29 ± 0.05**)	1.74 ± 0.15 (3.27 ± 0.12)	1.71 ± 0.13 (3.24 ± 0.14)	1.75 ± 0.24 (3.39 ± 0.25)	1.75 ± 0.20 (3.74 ± 0.13**)
Kidney (g)	0.69 ± 0.06 (1.11 ± 0.03)	0.72 ± 0.07 (1.16 ± 0.03)	0.68 ± 0.05 (1.16 ± 0.07)	0.64 ± 0.04 (1.21 ± 0.05)	0.66 ± 0.06 (1.26 ± 0.05)	0.62 ± 0.04 (1.20 ± 0.06)	0.58 ± 0.02 (1.25 ± 0.10)
Testis (mg)	310 ± 20 (500 ± 20)	310 ± 30 (500 ± 40)	320 ± 40 (540 ± 20)	300 ± 28 (566 ± 43)	293 ± 36 (555 ± 52)	282 ± 14 (549 ± 15)	270 ± 27 (581 ± 51)
Females							
No. of animals	5	5	5	6	6	6	6
Body weight (g)	61 ± 4	59 ± 6	51 ± 6*	49.4 ± 3.8	50.5 ± 4.1	51.6 ± 3.3	45.5 ± 1.4
Brain (g)	1.50 ± 0.05 (2.46 ± 0.18)	1.44 ± 0.03 (2.45 ± 0.24)	1.43 ± 0.10 (2.81 ± 0.16*)	1.52 ± 0.05 (3.09 ± 0.27)	1.48 ± 0.06 (2.94 ± 0.27)	1.48 ± 0.05 (2.88 ± 0.13)	1.42 ± 0.05* (3.13 ± 0.10)
Liver (g)	1.77 ± 0.13 (2.91 ± 0.08)	1.77 ± 0.12 (3.01 ± 0.10)	1.67 ± 0.15 (3.29 ± 0.15**)	1.59 ± 0.18 (3.21 ± 0.13)	1.59 ± 0.13 (3.16 ± 0.04)	1.72 ± 0.08 (3.34 ± 0.11)	1.61 ± 0.05 (3.54 ± 0.12**)
Kidney (g)	0.71 ± 0.05 (1.19 ± 0.07)	0.70 ± 0.04 (1.19 ± 0.10)	0.63 ± 0.06 (1.24 ± 0.09)	0.63 ± 0.04 (1.27 ± 0.03)	0.63 ± 0.04 (1.25 ± 0.04)	0.65 ± 0.04 (1.27 ± 0.09)	0.61 ± 0.04 (1.34 ± 0.07)
Ovary (mg)	14.9 ± 2.8 (24.4 ± 5.1)	14.4 ± 1.1 (24.5 ± 1.5)	15.7 ± 2.4 (30.9 ± 4.8)	15.6 ± 4.0 (31.7 ± 8.9)	15.4 ± 3.0 (30.5 ± 5.5)	13.8 ± 2.1 (26.8 ± 4.7)	12.6 ± 2.3 (27.8 ± 5.1)

Data are mean ± SD values.

^{a)}: In the 1,000 mg/kg group of the dose-finding study, since all animals died by dosing day 2, measurement of organ weights was not conducted. ^{b)}: Body weight after overnight starvation following the last dosing, ^{c)}: Absolute weight, ^{d)}: Relative weight (g or mg/100 g body weight).

*: Significantly different from the control group ($p < 0.05$), **: Significantly different from the control group ($p < 0.01$).