

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 1-Methylethenylbenzene \*\*on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean $\pm$ S.D.)																			
		Base - pair substitution type									Frameshift type										
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvr</i> A			TA98			TA1537							
S9 Mix (-)	0	106	119	110	11	19	11	9	21	21	27	16	17	9	7	5	( 112 $\pm$ 6.7 )	( 14 $\pm$ 4.6 )	( 17 $\pm$ 6.9 )	( 20 $\pm$ 6.1 )	( 7 $\pm$ 2.0 )
	12.5	125	111	111	13	16	18	20	15	20	26	20	21	6	8	10	( 116 $\pm$ 8.1 )	( 16 $\pm$ 2.5 )	( 18 $\pm$ 2.9 )	( 22 $\pm$ 3.2 )	( 8 $\pm$ 2.0 )
	25	98	98	96	11	18	15	18	14	12	16	15	14	9	9	5	( 97 $\pm$ 1.2 )	( 15 $\pm$ 3.5 )	( 15 $\pm$ 3.1 )	( 15 $\pm$ 1.0 )	( 8 $\pm$ 2.3 )
	50	111	129	97	11	9	6	19	25	30	17	19	23	11	13	12	( 112 $\pm$ 16.0 )	( 9 $\pm$ 2.5 )	( 25 $\pm$ 5.5 )	( 20 $\pm$ 3.1 )	( 12 $\pm$ 1.0 )
	100	106	112	101	12	11	9	27	16	15	21	22	23	8	5	3	( 106 $\pm$ 5.5 )	( 11 $\pm$ 1.5 )	( 19 $\pm$ 6.7 )	( 22 $\pm$ 1.0 )	( 5 $\pm$ 2.5 )
	200	101 *	82 *	100 *	9 *	7 *	9 *	10 *	18 *	18 *	22 *	12 *	18 *	6 *	6 *	7 *	( 94 $\pm$ 10.7 )	( 8 $\pm$ 1.2 )	( 15 $\pm$ 4.6 )	( 17 $\pm$ 5.0 )	( 6 $\pm$ 0.6 )
	400	17 *	119 *	93 *	8 *	0 *	3 *	11 *	12 *	5 *	13 *	12 *	14 *	4 *	4 *	3 *	( 76 $\pm$ 53.0 )	( 4 $\pm$ 4.0 )	( 9 $\pm$ 3.8 )	( 13 $\pm$ 1.0 )	( 4 $\pm$ 0.6 )
S9 Mix (+)	0	134	132	130	15	8	20	17	12	19	25	27	44	12	11	8	( 132 $\pm$ 2.0 )	( 14 $\pm$ 6.0 )	( 16 $\pm$ 3.6 )	( 32 $\pm$ 10.4 )	( 10 $\pm$ 2.1 )
	12.5	97	107	90	17	13	13	16	32	17	26	32	34	19	20	10	( 98 $\pm$ 8.5 )	( 14 $\pm$ 2.3 )	( 22 $\pm$ 9.0 )	( 31 $\pm$ 4.2 )	( 16 $\pm$ 5.5 )
	25	108	124	119	8	14	12	28	20	22	31	33	27	15	14	16	( 117 $\pm$ 8.2 )	( 11 $\pm$ 3.1 )	( 23 $\pm$ 4.2 )	( 30 $\pm$ 3.1 )	( 15 $\pm$ 1.0 )
	50	110	112	117	15	18	15	28	25	23	28	40	33	11	15	16	( 113 $\pm$ 3.6 )	( 16 $\pm$ 1.7 )	( 25 $\pm$ 2.5 )	( 34 $\pm$ 6.0 )	( 14 $\pm$ 2.6 )
	100	114	113	103	12	10	6	22	26	22	34	23	29	6	14	10	( 110 $\pm$ 6.1 )	( 9 $\pm$ 3.1 )	( 23 $\pm$ 2.3 )	( 29 $\pm$ 5.5 )	( 10 $\pm$ 4.0 )
	200	94 *	103 *	104 *	9	11	13	16	17	25	31 *	28 *	23 *	14 *	10 *	14 *	( 100 $\pm$ 5.5 )	( 11 $\pm$ 2.0 )	( 19 $\pm$ 4.9 )	( 27 $\pm$ 4.0 )	( 13 $\pm$ 2.3 )
	400	83 *	103 *	114 *	7 *	14 *	8 *	22 *	19 *	20 *	19 *	17 *	22 *	7 *	5 *	6 *	( 100 $\pm$ 15.7 )	( 10 $\pm$ 3.8 )	( 20 $\pm$ 1.5 )	( 19 $\pm$ 2.5 )	( 6 $\pm$ 1.0 )
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	512	549	521	260	282	248	174	176	160	764	810	844	1610	1762	1800	( 527 $\pm$ 19.3 )	( 263 $\pm$ 17.2 )	( 170 $\pm$ 8.7 )	( 806 $\pm$ 40.1 )	( 1724 $\pm$ 100.5 )
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	1			2			10			0.5			2							
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	923	916	763	281	218	240	1464	1433	1412	466	422	373	241	223	278	( 867 $\pm$ 90.4 )	( 246 $\pm$ 32.0 )	( 1436 $\pm$ 26.2 )	( 420 $\pm$ 46.5 )	( 247 $\pm$ 28.0 )

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

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

\*\*: Purity was 99.6 %.

# 1-メチルエチルベンゼンの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

## In Vitro Chromosomal Aberration Test of 1-Methylethylbenzene on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

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、1-メチルエチルベンゼンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(24および48時間)、短時間処理(6時間)のS9 mix非存在下においては、50%を越える増殖抑制濃度、すなわち0.17 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。また、短時間処理のS9 mix存在下では、50%を越える増殖抑制濃度、すなわち0.23 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4を、それぞれ中濃度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、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した高濃度群(0.17 mg/ml)では、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群においては、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。また、短時間処理では、S9 mix非存在下および存在下で6時間処理した高濃度群(それぞれ0.17および0.23 mg/ml)において、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群においては、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、1-メチルエチルベンゼンは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

### 方法

#### 1. 使用した細胞

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

#### 2. 培養液の調製

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

#### 3. 培養条件

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

#### 4. 被験物質

1-メチルエチルベンゼン(略号: MEB, CAS No.: 98-83-9, ロット番号: 33041, 三井石油化学工業(株)製造、(社)日本化学工業協会提供)は、無色透明液体で、水に不溶、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびアセトンに可溶、融点-23.3°C、沸点165.5°C、蒸気圧2.43 mmHg(25°C)、分子式C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>、分子量118.19、純度99.6%の物質である。被験物質原体の安定性に関する情報は得られなかったが、引火性物質で引火点54°C、発火点574°Cの物質である。溶媒中(DMSO)では、0.125~46.0 mg/mlの濃度範囲で4時間は安定であった。

#### 5. 被験物質の調製

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

#### 6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

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

その結果、連続処理における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度(約60%の増殖抑制濃度)は、60%の増殖抑制を示す濃度をはさむ2濃度の値より算出したところ

ろ、0.17 mg/mlであった。また、短時間処理のS9mix存在下および非存在下における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度は、それぞれ0.23 mg/mlおよび0.14 mg/mlであった(Fig. 1)。

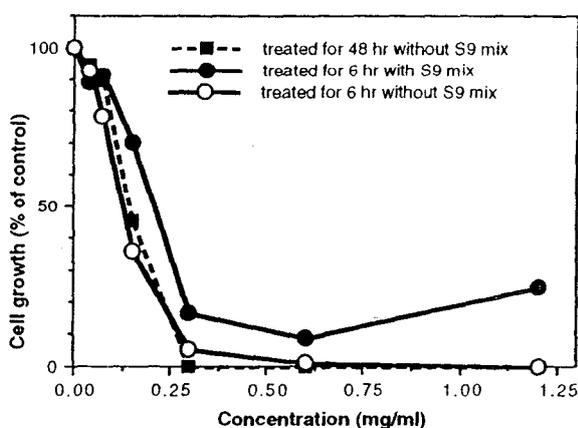


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1-methylethylbenzene

### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理および短時間処理のS9 mix非存在下では0.17 mg/ml、短時間処理のS9 mix存在下では0.23 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水((株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

### 8. 染色体標本作製法

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

### 9. 染色体分析

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

### 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(p<0.05)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<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

### 結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。

1-メチルエチルベンゼンを加えて24時間および48時間連続処理した高濃度群(0.17 mg/ml)では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。

1-メチルエチルベンゼンを加えてS9 mix非存在下および存在下で6時間処理した高濃度群(それぞれ0.17 mg/mlおよび0.23 mg/ml)では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかった。その他の処理群では、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。

従って、1-メチルエチルベンゼンは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

### 文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 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.

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

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control <sup>1)</sup>			200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )	0.63		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0.25		
MEB	0.04	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.38	-	-
MEB	0.09	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.50	-	-
MEB	0.17	24	13	1	2	10	1	0	4	0	18	1	9*( 69.2 )	9*( 69.2 )	0.00 <sup>6)</sup>	Tox	Tox
MC	0.00005	24	200	15	57	115	2	1	4	10	204	0	104*( 52.0 )	98*( 49.0 )	0.38	+	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0.38		
MEB	0.04	48	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0 )	1 ( 0.5 )	0.25	-	-
MEB	0.09	48	200	1	1	0	0	0	2	0	4	0	3 ( 1.5 )	2 ( 1.0 )	0.63	-	-
MEB	0.17	48	9	0	4	4	0	0	0	10	18	1	4*( 44.4 )	4*( 44.4 )	0.00 <sup>7)</sup>	Tox	Tox
MC	0.00005	48	200	21	43	124	4	3	3	60	258	1	108*( 54.0 )	101*( 50.5 )	0.38	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C, Tox : toxic. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Thirteen cells were analysed. 7) Ten cells were analysed. \* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 99.6% .

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1-methylethylbenzene(MEB)\*\* with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control <sup>1)</sup>				200	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.38		
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.38		
MEB	0.04	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.50	-	-
MEB	0.09	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0.38	-	-
MEB	0.17	-	6-(18)	48	2	0	0	0	0	0	10	12	0	3*( 6.3 )	1 ( 2.1 )	1.54 <sup>6)</sup>	Tox	Tox
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.25	-	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0.25		
MEB	0.06	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.50	-	-
MEB	0.12	+	6-(18)	200	3	1	1	0	0	0	0	5	0	5 ( 2.5 )	2 ( 1.0 )	0.13	-	-
MEB	0.23	+	6-(18)	0													Tox	Tox
CPA	0.005	+	6-(18)	200	36	94	175	3	2	24	110	444	0	151*( 75.5 )	141*( 70.5 )	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 : acentric fragment (chromatid type), 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, Tox : toxic. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Sixty-five cells were analysed. \* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was 99.6% .

## 連絡先

試験責任者 : 田中憲穂  
 試験担当者 : 山影康次, 日下部博一, 橋本恵子,  
 澁谷 徹, 原 巧, 加藤基恵,  
 堀谷尚古  
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所  
 〒257 神奈川県秦野市落合729-5  
 Tel. 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

## Correspondence

Authors : Noriho Tanaka ( Study director )  
 Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,  
 Keiko Hashimoto, Toru Shibuya, Takumi Hara,  
 Motoe Katoh, Naoko Horiya  
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center  
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan  
 Tel. +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

# ペンタエリスリトールのラットを用いる単回経口投与毒性試験

## Single Dose Oral Toxicity Test of Pentaerythritol in Rats

### 要約

ペンタエリスリトールの500, 1000および2000 mg/kgを5週齢のCrj:CD (SD)系雌雄ラットに経口単回投与し、その毒性を試験した。

死亡は雌雄のいずれの群においても認められず、LD<sub>50</sub>値は2000 mg/kg以上と推定された。一般状態では下痢便や軟便が1000 mg/kg以上の群の雌雄で投与日あるいは投与後1日に認められた。体重推移、剖検および病理組織学的検査では、雌雄ともにペンタエリスリトール投与による影響は認められなかった。

### 材料および方法

#### 1. 被験物質

ペンタエリスリトールは、一般に合成樹脂、塗料あるいは油墨に用いられる物質であり、水溶性(水溶解度7.23 g/100 g)の白色顆粒である。本試験では三菱ガス化学(株)より提供されたロット番号50825(純度92.7%)のものを使用した。被験物質は7カ月間安定であり、本ロットは試験期間中安定であることを確認した。投与には、被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液(日本薬局方CMC-Na, 丸石製薬(株); 日本薬局方精製水, ヤクハン製薬(株))で用時に懸濁調製したものを使用した。

#### 2. 試験動物および飼育条件

生後4週齢のCrj:CD (SD)系のSPFラット雌雄を日本チャールス・リバー(株)より受け入れ、9日間の馴化飼育を行い、順調な発育を示した動物を試験に用いた。動物は、温度23±3°C、湿度55±10%、換気回数10~15回/時および照明12時間/日に設定されたバリアシステムの飼育室において、ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は5匹以内、群分け後は3匹以内収容した。飼料は固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))、飲料水は水道水(札幌市水道水)を自由に摂取させた。飼料の混入物質および飲料水の水質を検査し、異常がないことを確認した。

#### 3. 試験群の設定

本試験の投与量設定のために実施した試験では、500, 1000および2000 mg/kg群、0.5% CMC-Na溶液投与群(対照群)の計4群を設定し、1群当たり雌雄各5匹のラットに投与した。投与後5日間の観察において1000および2000 mg/kg

群で投与日あるいは投与後1日に下痢便あるいは軟便が認められたのみで、死亡は認められなかったため、観察期間を投与後14日まで延長し、本試験の成績とした。群分けは投与前日に体重別層化無作為抽出法により行った。

#### 4. 投与方法

投与は、動物を約17~18時間絶食させた後、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与容量は、体重1 kg当り10 mlとして投与日に測定した体重に基づいて算出した。投与時の週齢は雌雄ともに5週齢で、その平均体重(体重範囲)は雄で132.5 g (125~138 g)、雌で114.0 g (108~123 g)であった。

#### 5. 観察、測定および検査項目

全例について、一般状態を投与日は投与後6時間までは頻繁に、投与後1日以降は1日1回以上の頻度で投与後14日まで観察した。また、体重を投与日、投与後1, 3, 5, 7, 10および14日に測定した。全例について投与後14日に体外表を観察した後、エーテル麻酔下で放血致死させ、剖検した。このうち、対照群およびペンタエリスリトール投与各群の雌雄各2例の肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳(大脳・小脳)、胃(前胃・腺胃)、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸および直腸を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色あるいは特殊染色(PAS染色)標本作製し、病理組織学的検査を行った。

体重についてBartlettの等分散検定の後、一元配置分散分析法あるいはKruskal-Wallis法により解析し、有意な場合、Dunnnettの検定法あるいはMann-WhitneyのU-検定法により対照群とペンタエリスリトール投与各群との比較を行った。なお、対照群との検定については、危険率5%以下を統計学的に有意とした。

### 成績

#### 1. 死亡状況およびLD<sub>50</sub>値 (Table 1)

雌雄ともに、いずれの群においても死亡は認められず、LD<sub>50</sub>値は2000 mg/kg以上と推定された。

#### 2. 一般状態

投与日に、下痢便が1000 mg/kg群の雌、2000 mg/kg群

Table 1 Mortality and LD<sub>50</sub> values of rats treated orally with pentaerythritol in the single dose toxicity test

Sex	Pentaerythritol (mg/kg)	Distribution of dead animals			Mortality <sup>b)</sup>	LD <sub>50</sub> value (mg/kg)
		0	1	2-14 <sup>a)</sup>		
Male	0	0	0	0	0/5	>2000
	500	0	0	0	0/5	
	1000	0	0	0	0/5	
	2000	0	0	0	0/5	
Female	0	0	0	0	0/5	>2000
	500	0	0	0	0/5	
	1000	0	0	0	0/5	
	2000	0	0	0	0/5	

a: Day after administration.

b: No. of dead animals / No. of animals treated.

の雌雄の全受皿上で確認された。なお、同症状は投与後約2時間以降に認められ、1000 mg/kg群よりも2000 mg/kg群で頻回認められた。投与後1日に下痢便および軟便が1000 mg/kg群の雌雄の約半数の受皿上で、2000 mg/kg群の雌雄の全受皿上で確認された。投与後2日以降に前述の症状を含め異常は認められなかった。

### 3. 体重

ペンタエリスリトール投与のいずれかの群においても対照群とほぼ同じ推移を示した。

### 4. 剖検および病理組織学的検査

ペンタエリスリトール投与による異常は認められなかった。

### 考察

死亡は雌雄のいずれの群においても認められず、LD<sub>50</sub>値は2000 mg/kg以上と推定された。下痢便や軟便が1000 mg/kg以上の群の雌雄で投与日あるいは投与後1日に認められた。しかし、これらの症状は投与後2日以降は認められず、体重など全身に悪影響を及ぼすものではなかった。

### 連絡先

試験責任者：八幡 昭子  
 試験担当者：山田 高士, 小林 裕幸,  
 運営管理者：井本 精一  
 (株)化合物安全性研究所  
 〒004 北海道札幌市豊平区真栄363番24号  
 Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

### Correspondence

Authors: Akiko Yahata (Study director)  
 Takashi Yamada, Hiroyuki Kobayashi,  
 Seiichi Imoto (Management)  
 Safety Research Institute for Chemical Compounds  
 Co., Ltd.  
 363-24 Shin-ei, Toyohira-ku, Sapporo, Hokkaido,  
 004, Japan  
 Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313

## Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of Pentaerythritol by Oral Administration

### 要約

ペンタエリスリトールの100, 300および1000 mg/kg/dayを雄ラットの交配前および交配期間を含む46日間、雌ラットの交配前、交配及び妊娠期間、ならびに哺育3日までの期間に経口反復投与し、雌雄動物への反復投与による影響、雌雄動物の生殖および次世代の発生に及ぼす影響について試験した。

雌雄動物への反復投与により、軟便が300 mg/kg以上の群の雌雄で、下痢便が300 mg/kg以上の群の雄および1000 mg/kg群の雌で認められた。飲水量の増加傾向が1000 mg/kg群の雄で認められた。その他に、ペンタエリスリトール投与による影響は認められなかった。従って、ペンタエリスリトール反復投与による無影響量 (NOEL) は雌雄ともに100 mg/kg/dayであることが示された。

雌雄動物の生殖および次世代の発生に対して、ペンタエリスリトール投与による影響は認められなかった。従って、ペンタエリスリトールの雌雄動物の生殖および次世代の発生に対する無影響量は1000 mg/kg/dayであることが示された。

### 材料および方法

#### 1. 被験物質

ペンタエリスリトールは、一般に合成樹脂、塗料あるいは釉薬に用いられる物質であり、水溶性(水溶解度7.23 g/100 g)の白色顆粒である。本試験では三菱ガス化学(株)より提供されたロット番号50825(純度92.7%)のものを使用した。被験物質は7カ月間安定であり、本ロットは試験期間中安定であることを確認した。投与には、被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液(日本薬局方CMC-Na, 丸石製薬(株); 日本薬局方精製水, ヤクハン製薬(株))で用時あるいは5日に1回の頻度で懸濁調製したものを使用した。なお、ペンタエリスリトールの低・高濃度の調製液が5日間安定であることを確認した。

#### 2. 試験動物および飼育条件

生後8週齢のCrj: CD (SD) 系のSPFラット雌雄を日本チャールス・リバー(株)より受け入れ、15日間馴化飼育した後、順調な発育を示し、かつ雌では性周期に異常の認められない動物を試験に用いた。

動物は、温度23±3°C、湿度55±10%、換気回数10~15

回/時、照明12時間/日に設定したバリアシステムの飼育室において、ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は3匹以内、群分け後は1匹、交配中は雌雄各1匹、妊娠期間中は1母動物、哺育期間中は1腹を収容した。ただし、妊娠17日以降は金属網床のかわりに実験動物用床敷(ホワイトフレック、日本チャールス・リバー(株))を敷いたステンレス製受皿を使用した。飼料は固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))、飲料水は水道水(札幌市水道水)をそれぞれ自由に摂取させた。飼料の混入物質および飲料水の水質を検査し、異常がないことを確認した。

#### 3. 試験群の設定

試験群は、本試験の用量設定試験(14日間反復投与試験)の結果を参考に設定した。すなわち、ペンタエリスリトールの100, 300および1000 mg/kg/dayを設定した試験では、1000 mg/kg群で雌雄ともに軟便、下痢便が認められたが、100および300 mg/kg群で異常は認められなかった。これらのことから、本試験の高用量を1000 mg/kg/day、以下、公比約3で300および100 mg/kg/dayとし、さらに0.5%CMC Na溶液を投与する対照群を設け、計4群とした。動物数は1群当たり雌雄各12匹とした。群分けは投与開始前日に体重別層化無作為抽出法により行った。

#### 4. 投与方法

投与は胃ゾンデを用いた強制経口投与とし、投与容量は体重1 kg当たり10 mlとして、投与日に最も近い日に測定した体重に基づいて算出した。雄には交配前14日間および交配期間を含む46日間、雌には交配前14日間および交尾成立までの交配期間、さらに交尾成立例は妊娠期間および哺育3日までの期間投与した。投与は10週齢から開始し、投与開始時の平均体重(体重範囲)は雄で398.6 g (369~432 g)、雌で232.1 g (207~254 g)であった。

#### 5. 観察、測定および検査項目

- 1) 一般状態観察、体重、摂餌量および飲水量測定  
一般状態を試験期間中1日1回以上の頻度で観察した。体重は、投与1日(投与前)、投与2, 5, 7, 10および14日、その後は雄については7日毎(投与終了日を含む)および剖検日に、雌については妊娠0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 17および20日、哺育0, 1および4日に測定した。また、雄は投与1から46日の、雌は投与1から14日、妊娠0から20日および哺育0から4日の体重増加量および体重増加率を算出した。摂

餌量は、雄については交配期間および剖検日を、雌については妊娠0日および哺育0日を除き体重測定日と同じ日(投与終了日を含む)に測定した。飲水量は、雄についてのみ、摂餌量測定日と同じ日に測定した。なお、妊娠日数は交尾成立日を妊娠0日、哺育日数は分娩終了日を哺育0日として起算した。

## 2) 尿検査

投与期間の最終週(投与43~44日)に雄の各群6例を代謝ケージに収容して非絶食下で採尿を行った。約3時間の蓄尿についてpH、蛋白、糖、ケトン体、潜血反応(以上、試験紙マルティスティックス;マイルス・三共)および沈渣(鏡検)を検査し、21時間蓄尿について尿量、比重(アタゴ製屈折計ユリコン)、ナトリウム、カリウム(以上、炎光法:コーニング480型炎光光度計)およびクロール(電量滴定法:平沼CL-6M型クロライドカウンター)を測定した。

## 3) 剖検および器官重量測定

雄は投与46日の翌日にエーテル麻酔下で採血後放血致死させ、剖検した。雌は全哺育児死亡例は発見後直ちに、交尾成立例については哺育4日に、交尾不成立例については交配期間終了の翌日に、妊娠25日まで分娩の認められない例(不妊例)は妊娠26日にエーテル麻酔下で放血致死させ、剖検した。また、子宮の着床痕および卵巣の妊娠黄体を計数した。さらに、肝臓、腎臓、胸腺、副腎、精巣、精巣上体および卵巣の重量を測定し、器官体重重量比を算出した。

## 4) 血液学的検査

剖検時に雄の全例について約16時間絶食させた後、エーテル麻酔下で大腿静脈より採血し、EDTA・2Kで処理した血液を用いて赤血球数、平均赤血球容積、血小板数、白血球数、(以上、電気抵抗法)、血色素量(シアメトヘモグロビン法)(以上、コールターカウンターT660型)、ヘマトクリット値(RBC, MCV値より算出)、平均赤血球ヘモグロビン量(RBC, Hb値より算出)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(Ht, Hb値より算出)、網状赤血球数(Brecher法)および白血球型別百分率(鏡検)を測定した。また、無処理血液を用いて、凝固時間(流体粘度変化による空気圧測定法:グライナー社製マイクロコアグロメーター)を測定した。さらに、腹部大動脈より採血しクエン酸ナトリウムで処理した後、3000 rpmで10分間遠心分離して得られた血漿を用いて、プロトロンビン時間(トロンボプラスチン法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラジン酸法)(以上、AMELUNG KC-10A パクスターKK)を測定した。

## 5) 血液生化学検査

剖検時に雄の全例について腹部大動脈より採血し、3000 rpmで10分間遠心分離して得られた血清を用いてGOT, GPT(以上, IFCC法),  $\gamma$ -GPT(包接L- $\gamma$ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法), コリンエステラーゼ(ヨウ化

ブチリルチオコリン基質法), 血糖(ヘキソキナーゼ法), 総コレステロール, リン脂質(以上, 酵素法), トリグリセリド(遊離グリセロール消去法), 総ビリルビン(アゾビリルビン法), 尿素窒素(ウレアーゼ・インドフェノール法), クレアチニン(ヤッフエ法), カルシウム(OCPC法), 無機リン(フィスケ・サバロー法), 総蛋白(ビウレット法), アルブミン(BCG法), クレアチンフォスフォキナーゼ(GSCC法)(以上, 日立7150形自動分析装置), ナトリウム, カリウム(以上, 炎光法:コーニング480型炎光光度計), クロール(電量滴定法:平沼 CL-6M型クロライドカウンター), A/G比(TP, Alb値より算出)および蛋白分画(セルロースアセテート膜電気泳動法)を測定した。

## 6) 病理組織学的検査

全例の肝臓, 腎臓, 脾臓, 心臓, 肺, 脳(大脳・小脳), 下垂体, 胸腺, 副腎, 甲状腺, 胃(前胃・腺胃), 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 精巣, 精巣上体, 前立腺, 卵巣について, 全哺育児死亡例はさらに乳腺および子宮(頸部含む)について, 常法に従いバラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色および特殊染色[oil red O染色, および鍍銀(渡辺変法)染色, エラスチカ・ワンギーソン染色]標本を作製し, 病理組織学的検査を行った。

## 7) 生殖能検査

雌全例について, 投与前10日から交尾成立までの連日に腔垢塗抹標本を作製し, 性周期の異常の有無を検査した。投与14日の雌雄について, 同試験群内で夕方より1対1で最長14日間同居させた。交尾成立は雌の腔垢中に精子が確認された場合とし, 妊娠成立は雌の子宮に着床痕が確認された場合とした。また, 交尾率[(交尾動物数/同居動物数)×100]および受胎率[(受胎動物数/交尾動物数)×100]を算出した。

## 8) 分娩および母性行動観察

交尾した雌全例について, 分娩状態, 母性行動, 総出産児数, 生児数および死亡児数, 出産児の性別および外表を観察した。また, 着床率[(着床痕数/妊娠黄体数)×100], 出産率[(生児出産雌数/妊娠雌数)×100], 分娩率[(総出産児数/着床痕数)×100], 出生率[(出生生児数/総出産児数)×100], 哺育4日時哺育率[(哺育児確認雌数/正常分娩雌数)×100], 性比[雄生児数/雌生児数]および妊娠期間[分娩終了日までの妊娠日数]を算出した。

## 9) 新生児の生存性, 一般状態観察, 体重測定および剖検

分娩終了日から哺育4日まで1日1回, 生死を確認し, 新生児生存率[(哺育4日生児数/出生生児数)×100]を算出した。また, 一般状態および外表について観察し, 体重を哺育0, 1および4日に測定し, 哺育0から4日の体重増加量および体重増加率を算出した。死亡例は発見後直ちに, その他の例については哺育4日に二酸化炭素吸入法に

より安楽致死させ、剖検した。

## 6. 統計処理

性周期、交尾率、受胎率、出産率および哺育率については、Fisherの正確確率検定法により対照群とペンタエリスリトール投与各群との比較を行った。その他の検査項目については、Bartlettの等分散検定の後、一元配置分散分析法あるいはKruskal-Wallis法により解析し、有意な場合、Dunnnettの検定法あるいはMann-WhitneyのU検定法により対照群とペンタエリスリトール投与各群との比較を行った。なお、分娩および母性行動観察結果、新生児の生存率および体重については1腹を単位として検定を行い、対照群との検定については危険率5%以下を統計学的に有意とした。

## 成績

### 1. 反復投与毒性

#### 1) 一般状態

雄では、投与期間中に300 mg/kg群で軟便が4例に、下痢便が1例に、1000 mg/kg群で軟便および下痢便が全例に認められた。雌では、妊娠前投与期間に300 mg/kg群で軟便が2例に、1000 mg/kg群で軟便および下痢便が全例に認められた。妊娠期間では、1000 mg/kg群で軟便が全例に、下痢便が11例に認められた。哺育期間では、1000 mg/kg群で軟便が全例に、下痢便が9例に認められた。なお、軟便および下痢便は、雌雄ともに300 mg/kg群で散発的に、1000 mg/kg群で断続的に認められた。

#### 2) 体重 (Table 1, 2)

対照群と比較して有意な差は認められなかった。

#### 3) 摂餌量

ペンタエリスリトール投与による異常は認められなかった。

#### 4) 飲水量 (Table 3)

雄の飲水量では、統計学的に有意な差はみられなかったものの、1000 mg/kg群で投与10日以降に増加傾向が認められた。

#### 5) 尿検査 (Table 4)

対照群と比較して有意な差は認められなかった。

#### 6) 血液学的検査 (Table 5) および血液生化学検査 (Table 6)

ペンタエリスリトール投与による異常は認められなかった。

#### 7) 器官重量

対照群と比較して有意な差は認められなかった。

#### 8) 剖検

ペンタエリスリトール投与による異常は認められなかった。

### 9) 病理組織学的検査 (Table 7)

ペンタエリスリトール投与による異常は認められなかった。また、交尾不成立例および不妊例においてもその原因を示唆する所見は認められなかった。

## 2. 生殖発生毒性 (Table 8)

### 1) 生殖能検査

ペンタエリスリトール投与による異常は認められなかった。なお、交尾不成立例は300 mg/kg群で1組、不妊例は対照群、100および1000 mg/kg群で各2組に認められた。

### 2) 分娩および母性行動観察

哺育異常として、哺育1日までに全哺育児を死亡させた例が1000 mg/kg群の1例に認められた。本例の出産児は18匹(生存5匹、死亡13匹)であり、いずれも喰殺を受け体の一部が欠損しているか、外傷が認められ、新生児は哺育1日に全例不明となった。母動物には、分娩中、児舐めや巣作り行動が認められたが、分娩終了後は哺育行動は認められなかった。また、分娩中より児の捕喰が認められた。剖検では、子宮に胎盤が着床痕から遊離して認められた以外に異常はなく、病理組織学的検査でも乳腺を含め検査した器官・組織に異常は認められなかった。

分娩終了時の死亡児の剖検では、前述の哺育異常例の死亡児を含め、外傷以外に異常は認められなかった。

### 3) 新生児の生存性、一般状態、体重および剖検

ペンタエリスリトール投与による異常は認められなかった。

## 考察

軟便が300 mg/kg以上の群の雌雄で、下痢便が300 mg/kg以上の群の雄および1000 mg/kg群の雌で認められ、ペンタエリスリトール投与による影響と考えられた。これらの症状と関連するものとして飲水量の増加傾向が1000 mg/kg群の雄で認められたが、全身や生体の恒常性への影響を示唆する変化は認められなかった。その他に、体重推移、摂餌量、尿検査、血液学的検査、血液生化学検査、器官重量、剖検および病理組織学的検査ではペンタエリスリトール投与による影響は認められなかった。

以上より、300 mg/kg以上の群の雌雄で軟便あるいは下痢便が認められたことから、本スクリーニング試験におけるペンタエリスリトール反復投与による無影響量(NOEL)は雌雄ともに100 mg/kg/dayであることが示された。

生殖能検査ではペンタエリスリトール投与による影響は認められず、生殖器の病理学的検査においてもペンタエリスリトール投与による影響は認められなかった。なお、交尾不成立例および不妊例の生殖器にその原因を示唆する病理組織学的所見は認められなかった。全哺育児を死亡させた母動物が1000 mg/kg群の1例に認められた。本例では、哺育行動が認められず、出産児の喰殺などが

Table 1 Body weight changes of male rats treated orally with pentaerythritol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Pentaerythritol (mg/kg)	No. of animals	Day of administration											Body weight gain	
		1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	46	Day 1-46	% <sup>a)</sup>
0	12	398.4 <sup>b)</sup> ±16.7	407.4 ±17.8	423.5 ±22.8	430.1 ±24.3	447.0 ±29.0	461.3 ±33.3	482.7 ±37.0	510.9 ±41.8	533.2 ±46.1	554.2 ±48.4	560.8 ±48.2	162.333 ±33.013	40.543 ±6.668
100	12	398.9 ±15.4	405.8 ±17.0	421.7 ±18.2	430.3 ±18.9	446.2 ±21.7	459.6 ±22.9	477.0 ±25.0	503.8 ±25.6	526.8 ±25.2	546.3 ±26.2	552.4 ±27.6	153.500 ±17.676	38.468 ±4.134
300	12	398.8 ±15.2	404.4 ±17.9	421.8 ±21.7	431.7 ±23.7	448.8 ±26.5	466.4 ±30.5	488.0 ±29.2	512.8 ±34.3	536.0 ±39.2	556.8 ±43.9	569.5 ±44.7	170.750 ±30.684	42.638 ±6.274
1000	12	398.2 ±16.6	404.4 ±15.6	421.4 ±18.5	430.8 ±20.7	446.6 ±23.1	462.4 ±26.5	480.9 ±31.0	504.3 ±35.4	523.9 ±39.6	544.3 ±40.8	552.4 ±41.8	154.250 ±27.605	38.597 ±5.709

a: (Body weight gain / body weight on day 1) × 100.

b: Values are means ± S.D. and expressed in gram.

Table 2 Body weight changes of female rats treated orally with pentaerythritol in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

— Before the gestation period —											
Pentaerythritol (mg/kg)	No. of animals	Day of administration						Body weight gain			
		1	2	5	7	10	14	Day 1-14	% <sup>a)</sup>		
0	12	233.3 <sup>b)</sup> ±11.5	235.3 ±10.4	242.9 ±12.7	246.0 ±10.7	253.1 ±13.3	259.8 ±13.1	26.583 ±8.512	11.450 ±3.713		
100	12	234.7 ±12.0	238.8 ±10.8	243.6 ±13.5	249.3 ±14.6	252.4 ±16.3	260.5 ±21.4	25.833 ±12.525	10.903 ±5.064		
300	12	229.8 ±8.7	233.4 ±8.7	236.7 ±9.0	243.3 ±10.6	246.5 ±11.0	253.1 ±10.3	23.250 ±6.538	10.141 ±2.971		
1000	12	230.7 ±12.8	233.7 ±11.4	238.8 ±13.2	246.8 ±14.0	250.8 ±15.3	258.5 ±14.8	27.833 ±8.473	12.121 ±3.731		

— During the gestation period —												
Pentaerythritol (mg/kg)	No. of animals	Day of gestation									Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	17	20	Day 0-20	% <sup>c)</sup>
0	10	268.1 ±14.3	276.7 ±13.6	287.9 ±14.2	297.1 ±14.5	309.1 ±15.2	323.2 ±15.7	349.7 ±19.3	380.3 ±22.0	428.5 ±26.1	160.400 ±22.941	59.998 ±9.127
100	10	272.4 ±18.1	281.4 ±19.5	295.4 ±22.2	306.1 ±23.5	316.6 ±23.3	330.3 ±24.9	353.9 ±26.3	386.5 ±28.1	434.6 ±31.5	162.200 ±16.096	59.544 ±4.345
300	11	263.5 ±12.8	270.1 ±14.1	280.9 ±14.9	289.2 ±16.5	295.8 ±16.7	310.5 ±18.2	330.6 ±20.6	359.8 ±24.1	407.8 ±34.7	144.364 ±27.373	54.732 ±9.453
1000	10	266.0 ±17.5	273.6 ±15.6	284.2 ±18.5	294.8 ±22.0	303.1 ±22.7	317.2 ±24.2	337.9 ±24.9	369.3 ±27.4	417.1 ±28.3	151.100 ±16.868	56.892 ±5.859

Table 2 (continued)

— During the lactation period —

Pentaerythritol (mg/kg)	No. of animals	Day of lactation			Body weight gain	
		0	1	4	Day 0-4	% <sup>c)</sup>
0	10	329.0 ±17.6	326.5 ±24.6	341.4 ±19.1	12.400 ±9.582	3.795 ±3.005
100	10	327.8 ±24.1	320.2 ±25.6	337.0 ±23.2	9.200 ±15.922	2.939 ±4.836
300	11	316.3 ±16.5	301.6 ±23.8	323.2 ±21.0	6.909 ±15.984	2.225 ±4.969
1000	10	331.6 ±24.9	319.2 ±23.7	(9) <sup>d)</sup> 332.3 ±16.2	(9) 5.000 ±11.402	(9) 1.683 ±3.674

a: (Body weight gain/ body weight on day 1) × 100.  
 : Values are means ± S.D. and expressed in gram.  
 c: (Body weight gain/ body weight on day 0) × 100.  
 d: Values in parentheses are no. of animals examined.

Table 3 Water consumption of male rats treated orally with pentaerythritol in the combined repeat dose and reproductive/ developmental toxicity screening test

Pentaerythritol (mg/kg)	No. of animals	Day of administration										
		1	2	5	7	10	14	21	28	35	42	46
0	12	41.5 <sup>a)</sup> ±8.6	36.7 ±5.1	39.8 ±6.4	37.1 ±6.4	38.8 ±6.1	41.6 ±8.2	39.1 ±7.7	39.9 ±6.8	44.8 ±13.5	39.2 ±11.3	37.4 ±11.1
100	12	39.2 ±4.9	39.8 ±6.1	39.3 ±5.2	38.3 ±6.7	39.9 ±6.2	40.4 ±6.4	(11) <sup>b)</sup> 39.6 ±7.5	40.9 ±9.2	43.2 ±7.6	39.9 ±8.3	35.9 ±6.1
300	12	42.7 ±8.8	38.4 ±7.7	42.3 ±10.5	38.7 ±8.0	41.0 ±7.0	41.8 ±8.3	(11) 40.0 ±9.6	(11) 42.3 ±11.2	44.1 ±12.5	43.5 ±15.8	38.9 ±6.6
1000	12	39.5 ±6.7	39.1 ±4.9	43.1 ±5.2	39.3 ±3.9	42.5 ±6.2	43.8 ±5.6	41.8 ±4.7	47.4 ±7.1	46.9 ±6.1	46.1 ±9.6	44.2 ±7.8

a: Values are means ± S.D. and expressed in gram/day.  
 b: Values in parentheses are no. of animals examined.