

考察

死亡は、雄で500, 1000, 1414および2000 mg/kg群に、雌で1414および2000 mg/kg群に認められ、LD₅₀値は雌雄ともに約2000 mg/kgと推定された。なお、死亡時期は投与後2~4日であり、遅延死する傾向が認められた。一般状態観察で認められた間代性痙攣、自発運動の減少などの所見は1,4-ジシアノベンゼン投与による影響と考えられた。また、1,4-ジシアノベンゼン投与群で認められた体重の低値あるいは体重減少は約1週間継続し、その程度は生存例よりも死亡例で重度であった。

前胃において認められた粘膜層の肥厚などの病理学的所見は、1,4-ジシアノベンゼンの刺激による反応性変化と考えられた。死亡例における小葉中心性の肝細胞の空胞化は、通常酸素欠乏時に認められる変性変化であることから、本試験では死亡までの経過が長いことに伴った変化と考えられた。

上記を考慮すると、1,4-ジシアノベンゼンの前胃に対する障害が継続したことにより一般状態が悪化し、死亡に至ったものと推察された。

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

1,4-ジシアノベンゼンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 1,4-dicyanobenzene in Rats

要約

1,4-ジシアノベンゼンの1.25, 5, 20および80 mg/kg/dayをSD系雌雄ラットに28日間経口反復投与し, その毒性および投与後14日間休業した際の回復性を検討した。

体重の増加抑制および摂餌量の減少が80 mg/kg群の雌雄で認められた。肝臓に対する影響として, 体重重量比の増加が80 mg/kg群の雌雄で, 小葉中心性の肝細胞肥大および小葉中心帯に滑面小胞体の増加が80 mg/kg群の雄で認められた。また, 血中のトリグリセリド, リン脂質あるいは総コレステロールの増加が20 mg/kg以上の群の雌雄で, γ -GTPの増加傾向が80 mg/kg群の雄で認められた。甲状腺に対する影響として, 体重重量比の増加が80 mg/kg群の雌雄で, ろ胞の不整形化が80 mg/kg群の雄で, コロイドの減少が20 mg/kg以上の群の雄で認められた。腎臓に対する影響として, 褪色が5 mg/kg以上の群の雄で認められ, 組織学的に近位尿細管を主とする尿細管上皮の硝子滴沈着が対照群よりも多数例に認められ, その程度は用量相関的に重くなる傾向が認められた。また, 尿比重の低下および尿中電解質の減少が80 mg/kg群の雌雄で, 血中のクロールの減少が20 mg/kg以上の群の雄および80 mg/kg群の雌で, 血中のカルシウムの増加および無機リンの減少が80 mg/kg群の雌雄で認められた。

これらの変化はその多くが14日間の休業により消失し, 回復傾向はあるものと考えられた。

以上のことから, 本試験条件下における1,4-ジシアノベンゼン投与による無影響量(NOEL)は雄で1.25 mg/kg/day, 雌で5 mg/kg/dayであると考えられた。

材料および方法

1. 被験物質

1,4-ジシアノベンゼンは燻蒸剤として使用される殺菌・殺虫用化学物質であり, 油溶性(水溶解度: 0.03 g/100 g)の白色結晶である。本試験では昭和電工(株)より提供されたロット番号930825(純度99%以上)のものを使用した。被験物質は試験期間中安定であることを確認した。投与液の調製は用時とし, 0.05, 0.2および0.8 w/v%の濃度は被験物質を1%メチルセルロース溶液(MC: 品名メトロース, SM-15, 信越化学工業(株); 日本薬局方精製水: ヤクハン製薬(株))で懸濁して調製した。0.0125%は0.05%調製液を1%メチルセルロース溶液で希釈して調製した。

2. 試験動物および飼育条件

生後4週齢の雌雄のCj:CD(SD)系SPFラットを日本チャールス・リバー(株)より受け入れ, 1週間の馴化飼育を行い, 異常がなく順調な発育を示した動物を試験に用いた。

動物は, 温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55\pm 10\%$, 換気回数10~15回/時および照明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5匹以内, 群分け後は1匹を収容した。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, 本試験に先立って実施した1,4-ジシアノベンゼンの14日間反復投与経口毒性試験の成績を参考に設定した。すなわち, 500 mg/kg群では雌3例の死亡が認められ, 100 mg/kg群では体重増加抑制, 摂餌量の減少, 血中トリグリセリドの増加, 肝細胞の腫大, 肝細胞内好酸性封入体, 脳のグリア細胞の増殖などが認められ, 死亡する可能性も考えられた。また, 20 mg/kg群では血中トリグリセリドの増加, 肝細胞内好酸性封入体などが認められた。これらのことから, 20 mg/kg/dayを中間用量とし, 高用量を100 mg/kg/dayよりも小さくかつ確実に影響の現れる量と考えられる80 mg/kg/day, 低用量を公比4で5 mg/kg/day, また, 20 mg/kg群でみられた変化が5 mg/kg/day投与で出現する可能性も勘案し, 最低用量を無影響量と推測される1.25 mg/kg/dayとし, さらに1%メチルセルロース溶液を投与する対照を加えて計5群とした。動物数は対照群で雌雄各14匹, 1.25, 5および20 mg/kg群で雌雄各7匹, 80 mg/kg群で雌雄各14匹とし, このうち回復性試験のために対照群および80 mg/kg群の雌雄各7匹をあてた。群分けは馴化期間の最終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, 1日1回連続28回行った。回復性試験の日数は14日間とした。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。投与は5週齢から開始し, 投与開始時の平均体重(体重範囲)は雄で139.8 g(130~151 g), 雌で129.0 g(117~142 g)であった。

5. 観察、測定および検査項目

1) 一般状態観察

投与期間および回復期間中、全例について1日1回以上の頻度で観察した。

2) 体重、摂餌量および飲水量測定

全例について、体重を投与1日(投与前)、投与2, 7, 14, 21および28日(投与終了日)、回復1, 2, 7および14日、剖検日に測定した。摂餌量および飲水量測定は剖検日を除いて体重測定と同じ日に測定した。また、投与1から28日および回復1から14日の体重増加量および体重増加率を算出した。

3) 尿検査

投与期間の最終週(投与23~24日)および回復期間の最終週(回復12~13日)に全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, 試験紙マルチスティック; 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。

4) 血液学的検査

剖検時に全例について約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(シアン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)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 バクスター-KK)を測定した。

5) 血液生化学検査

剖検時に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), γ -GTP(包接L- γ -グルタミル-p-ニトロアニリド基質法), アルカリフォスファターゼ(ベッセイ・ローリー法), 乳酸脱水素酵素(ロブレスキー・ラ・デュー法), 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) 剖検および器官重量測定

投与期間および回復期間終了の翌日に全例について, 体外表を観察し, エーテル麻酔下で採血後放血致死させ剖検した。また, 脳, 下垂体, 甲状腺, 肺, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎, 胸腺, 精巣および卵巣の重量を測定し, 器官体重重量比を算出した。

7) 病理組織学的検査

全例について肝臓, 腎臓, 脾臓, 心臓, 肺, 脳(大脳・小脳), 下垂体, 副腎, 甲状腺, 上皮小体, 胸腺, 腸間膜リンパ節, 膵臓, 舌, 下顎リンパ節, 顎下腺, 舌下腺, 耳下腺, 乳腺, 皮膚, 胸骨および大腿骨(骨髄を含む), 脊髄(頸部), 骨格筋(外側広筋), 胸部大動脈, 喉頭, 気管支, 食道, 胃(前胃・腺胃), 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 膀胱, 精巣, 精巣上体, 精囊(凝固腺を含む), 前立腺, 卵巣, 子宮, 膣および坐骨神経を10%中性緩衝ホルマリン液, 眼球およびハーダー膜をデビッドソン液で固定し, 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(GFAP免疫染色, ルクソール・ファースト青・オディアン重染色および鉄(ペルリン青)染色)標本作製し, 病理組織学的検査を行った。

8) 電子顕微鏡検査

投与期間終了時解剖例および回復期間終了時解剖例のうち対照群および80 mg/kg群の雌雄各2例について肝臓の一部を採取し, グルタルアルデヒドとオスミウム酸で二重固定し, 常法に従い超薄切片を作製し, 酢酸ウリニルとクエン酸鉛の二重染色を行い, 電子顕微鏡(JEM T8; 日本電子(株))を用いて観察した。

6. 統計処理

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, Dunnettの検定法あるいはMann-WhitneyのU-検定法により対照群と1,4-ジシアノベンゼン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. 一般状態観察

頸部に外傷, 痂皮あるいは脱毛が5および80 mg/kg群の雄各1例で投与9~28日あるいは15~28日に認められた。回復期間では, 雌雄ともに異常は認められなかった。

2. 体重推移 (Table 1, 2)

投与期間では、雌雄ともに80 mg/kg群で投与7あるいは2日以降に体重の減少が、投与期間中の体重増加量および増加率の減少が認められた。

回復期間では、雌雄ともに80 mg/kg群で回復1あるいは2日に体重の減少が、回復期間中の体重増加量および増加率の増加が認められた。

3. 摂餌量

投与期間では、80 mg/kg群の雄で投与2~28日に、同群の雌で投与2および7日に摂餌量の減少が認められた。

回復期間では、80 mg/kg群の雄で回復1日に摂餌量の減少が、同群の雌で回復2日に摂餌量の増加が認められた。

4. 飲水量

投与期間では、雌雄ともに対照群と比較して有意な差は認められなかった。

回復期間では、雌の80 mg/kg群で回復2日に飲水量の増加が認められた。

5. 尿検査 (Table 3, 4)

投与期間最終週には、80 mg/kg群の雄で尿比重の低下、カリウムおよびクロールの減少が認められ、また、統計学的に有意な差ではないもののナトリウムの減少傾向が認められた。同群の雌では尿比重の低下、ナトリウム、カリウムおよびクロールの減少が認められた。

回復期間最終週には、雌雄ともに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

投与期間終了時には、80 mg/kg群の雄で分節好中球率の上昇が、同群の雌で網状赤血球数の上昇が認められた。

回復期間終了時には、80 mg/kg群の雄で分節好中球率の上昇およびリンパ球率の低下が、同群の雌で網状赤血球数および分節好中球率の上昇、リンパ球率の低下が認められた。

7. 血液生化学検査 (Table 5, 6)

投与期間終了時には、雄では20および80 mg/kg群でトリグリセリドおよびリン脂質の増加ならびにクロールの減少が、さらに80 mg/kg群でアルカリフォスファターゼおよび無機リンの減少が認められた。また、統計学的に有意な差ではないものの、80 mg/kg群で γ -GTPおよびカルシウムの増加傾向が認められた。雌では、5 mg/kg以上の群で尿素窒素の減少が、20および80 mg/kg群にトリグリセリドの増加が、さらに80 mg/kg群で β -グロブリン分画の上昇、総コレステロールおよびリン脂質の増加、クレアチニンの減少、カルシウムの増加および無機リンの減少が認められた。また、統計学的に有意な差ではないものの、80 mg/kg群でクロールの減少傾向が認められた。

回復期間終了時には、80 mg/kg群の雄で γ -GTPの増加およびクレアチニンの減少が、同群の雌でクロールの減少が認められた。

その他、1,4-ジシアノベンゼン投与による異常は認められなかった。

8. 器官重量 (Table 7, 8)

投与期間終了時には、雄では20および80 mg/kg群で腎臓の重量および体重重量比の増加が、80 mg/kg群で甲状腺の体重重量比の増加、胸腺重量の減少、肝臓の体重重量比の増加、脾臓重量の減少および副腎の体重重量比の増加が認められた。雌では、80 mg/kg群で腎臓の体重重量比の増加、甲状腺の重量および体重重量比の増加、肝臓の体重重量比の増加および脾臓重量の減少が認められた。

回復期間終了時には、雄では80 mg/kg群で腎臓の体重重量比の増加、脾臓の重量および体重重量比の減少が認められた。雌では、80 mg/kg群で甲状腺の重量および体重重量比の増加ならびに肝臓の体重重量比の増加が認められた。

9. 剖検

投与期間終了時には、腎臓の褪色が5 mg/kg以上の群の雄に認められた。また、5および80 mg/kg群の雄各1例に下顎リンパ節の腫大が認められた。両例は、一般状態で頸部に外傷や脱毛などがみられた例であった。

回復期間終了時には、雌雄ともに異常は認められなかった。

10. 病理組織学的検査 (Table 9, 10)

投与期間終了時には、肝臓では小葉中心性の肝細胞肥大が80 mg/kg群の雄に認められた。腎臓では近位尿細管を主とする尿細管上皮の硝子滴沈着が対照群および5 mg/kg以上の群の雄で認められ、その出現例数は1,4-ジシアノベンゼン投与群で多く、程度は用量相関的に重くなる傾向が認められた。この硝子滴は自然発生でみられるものと同様であるものの、20 mg/kg以上の群ではほぼ全ての近位尿細管上皮にみられ、80 mg/kg群では滴が大型化し、滴の癒合も認められた。さらに、硝子滴沈着が認められた例のうち80 mg/kg群の雄2例では遠位を主とする尿細管の拡張および尿細管上皮の萎縮が伴って認められた。脾臓では軽度のリンパ球の萎縮が80 mg/kg群の雄に認められた。甲状腺では軽度のろ胞の不整形化が80 mg/kg群の雄、軽度のコロイドの減少が20および80 mg/kg群の雄に認められた。なお、頸部に外傷などが認められた5および80 mg/kg群の雄各1例では、下顎リンパ節における髄索内形質細胞の増加、頸部皮膚における膿瘍、細胞浸潤、潰瘍、痂皮および水腫などが軽度あるいは中等度に認められ、さらに80 mg/kg群の雄1例では、胸骨および大腿骨における軽度の顆粒球系細胞の増加が認められた。

Table 1 Body weight changes in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test
- Administration period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Day of administration						Body weight gain	
			1	2	7	14	21	28	Day 1-28	% ^{a)}
Male	0	14	140.4 ^{b)} ±4.9	147.2 ±5.9	188.4 ±10.1	247.7 ±17.9	304.2 ±24.7	347.8 ±29.8	207.357 ±26.398	147.431 ±15.901
	1.25	7	139.0 ±7.2	147.4 ±7.2	187.9 ±11.9	242.3 ±18.7	297.4 ±26.3	341.7 ±26.8	202.714 ±23.606	145.914 ±16.479
	5	7	140.3 ±4.6	147.9 ±5.1	188.7 ±5.7	248.1 ±11.7	304.7 ±18.1	348.9 ±20.0	208.571 ±18.876	148.767 ±13.746
	20	7	140.6 ±5.7	146.0 ±7.0	184.9 ±12.1	244.1 ±18.4	300.3 ±16.2	346.6 ±20.2	206.000 ±15.362	146.444 ±7.168
	80	14	139.1 ±5.5	141.5 ±6.4	162.9** ±8.0	215.4** ±11.4	258.4** ±16.6	287.3** ±22.1	148.214** ±19.116	106.512** ±12.541
Female	0	14	128.7 ±5.3	132.7 ±5.7	155.9 ±8.2	178.8 ±7.8	200.3 ±8.3	219.2 ±10.7	90.500 ±8.609	70.387 ±6.917
	1.25	7	128.9 ±3.9	132.7 ±5.3	154.3 ±7.6	176.7 ±11.3	199.6 ±15.5	220.9 ±19.5	92.000 ±16.482	71.216 ±11.250
	5	7	128.7 ±6.2	131.4 ±6.2	156.9 ±5.8	178.6 ±8.1	201.4 ±11.6	225.3 ±16.2	96.571 ±12.869	75.026 ±9.456
	20	7	129.6 ±6.5	128.9 ±4.7	149.9 ±9.1	172.0 ±13.2	194.0 ±12.8	215.0 ±18.1	85.429 ±15.988	65.994 ±12.344
	80	14	129.1 ±6.4	126.5* ±6.9	134.8** ±8.2	160.0** ±9.9	180.6** ±12.5	196.6** ±15.5	67.571** ±10.624	52.232** ±7.069

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

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

* : Differs from control, p<0.05.

** : Differs from control, p<0.01.

Table 2 Body weight changes in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test
- Recovery period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Day of recovery				Body weight gain	
			1	2	7	14	Day 1-14	% ^{a)}
Male	0	7	356.3 ^{b)} ±36.1	360.7 ±37.2	387.7 ±43.7	418.7 ±45.7	62.429 ±9.981	17.447 ±1.288
	80	7	297.1** ±10.6	307.4** ±10.3	347.4 ±13.5	383.7 ±21.6	86.571** ±13.402	29.086** ±3.978
Female	0	7	217.3 ±12.3	220.1 ±13.3	233.0 ±13.1	240.9 ±14.0	23.571 ±4.721	10.860 ±2.202
	80	7	197.0* ±14.6	206.1 ±15.0	228.3 ±16.1	236.6 ±16.6	39.571** ±10.814	20.233** ±5.675

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

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

* : Differs from control, p<0.05.

** : Differs from control, p<0.01.

Table 3 Urinary findings in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test
- Final week of the administration period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	pH					Pro		Glu	Ket	Occult blood
			6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	-	-	-
Male	0	14	1 ^{a)}	0	0	4	9	0	14	14	14	14
	1.25	7	0	0	1	0	6	0	7	7	7	7
	5	7	0	0	1	4	2	0	7	7	7	7
	20	7	0	1	1	3	2	0	7	7	7	7
	80	14	0	0	0	7	7	0	14	14	14	14
Female	0	14	0	5	0	4	5	8	6	14	14	14
	1.25	7	0	0	0	3	4	4	3	7	7	7
	5	7	0	1	1	2	3	5	2	7	7	7
	20	7	0	0	1	3	3	5	2	7	7	7
	80	14	1	0	2	6	5	11	3	14	14	14

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Urinary sediments							Specific gravity				
			Epithelial cell											
			RBC	WBC	Squamous	Small Round	Small round	Others	1.011- 1.020	1.021- 1.030	1.031- 1.040	1.041- 1.050	1.050<	
Male	0	14	14	14	14	0	14	14	14	0	2	5	7	0
	1.25	7	7	7	7	0	7	7	7	0	2	3	0	2
	5	7	7	7	7	0	7	7	7	0	0	2	4	1
	20	7	7	7	7	0	7	7	7	1	1	2	3	0
	80	14	14	14	13	1	14	14	14	[2	5	4	3	0]*
Female	0	14	14	14	14	0	14	14	14	0	0	7	6	1
	1.25	7	7	7	6	1	7	7	7	0	1	3	3	0
	5	7	7	7	7	0	7	7	7	1	1	2	2	1
	20	7	7	7	7	0	7	7	7	0	1	4	1	1
	80	14	14	14	14	0	14	14	14	[3	5	3	3	0]**

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	U-Vol ml/21hr	U-Na mEq/21hr	U-K mEq/21hr	U-Cl mEq/21hr
Male	0	14	14.00 ^{b)} ±2.06	0.7954 ±0.3104	3.1624 ±0.7701	1.3554 ±0.4395
	1.25	7	14.64 ±4.18	0.8726 ±0.3501	3.0851 ±0.9639	1.3770 ±0.5276
	5	7	13.50 ±3.59	1.0271 ±0.3915	3.3967 ±0.8889	1.4986 ±0.5134
	20	7	16.64 ±3.38	0.7624 ±0.2789	3.0264 ±0.6835	1.2681 ±0.3587
	80	14	15.32 ±6.08	0.5191 ±0.2406	2.1291 ^{**} ±0.6942	0.8690 [*] ±0.3848
Female	0	14	11.36 ±3.31	0.6843 ±0.1427	2.5085 ±0.4289	1.2399 ±0.2164
	1.25	7	11.71 ±3.01	0.7236 ±0.3339	2.4126 ±0.7615	1.1926 ±0.4719
	5	7	15.64 ±5.26	0.7809 ±0.3538	2.6590 ±0.7050	1.2451 ±0.4595
	20	7	13.07 ±4.06	0.5224 ±0.2490	2.3371 ±0.3835	1.0509 ±0.1981
	80	14	13.39 ±5.72	0.3611 ^{**} ±0.2005	1.4764 ^{**} ±0.5620	0.6138 ^{**} ±0.2872

a: Values are no. of animals with findings.

b: Values are means ± S.D.

*: Differs from control, p<0.05.

** : Differs from control, p<0.01.

28日間反復投与毒性試験

Table 4 Urinary findings in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test
- Final week of the recovery period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	pH					Pro		Glu	Ket	Occult blood	
			6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	-	-	-	±
Male	0	7	0 ^{a)}	0	0	1	6	0	7	7	7	7	0
	80	7	0	0	1	0	6	0	7	7	7	7	0
Female	0	7	2	0	0	1	4	2	5	7	7	6	1
	80	7	1	2	0	1	3	3	4	7	7	7	0

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Urinary sediments							Specific gravity				
			Epithelial cell						Small round	Others	1.021- 1.030	1.031- 1.040	1.041- 1.050	1.050<
			RBC	WBC	Squamous	Round	±	-						
Male	0	7	7	7	6	1	7	7	7	7	0	0	4	3
	80	7	7	7	7	0	7	7	7	7	2	2	2	1
Female	0	7	7	7	5	2	7	7	7	7	1	2	3	1
	80	7	7	7	6	1	7	7	7	7	2	2	3	0

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	U-Vol ml/21hr	U-Na mEq/21hr	U-K mEq/21hr	U-Cl mEq/21hr
Male	0	7	12.21 ^{b)} ±3.17	0.9409 ±0.3147	3.7447 ±0.4127	1.6420 ±0.2945
	80	7	15.36 ±6.23	0.6751 ±0.3275	2.9729 ±1.0286	1.1026 ±0.5919
Female	0	7	13.57 ±6.62	0.8234 ±0.1266	2.6381 ±0.2945	1.2816 ±0.1300
	80	7	12.21 ±5.67	0.6741 ±0.3690	1.9617 ±0.8687	0.9317 ±0.4617

a: Values are no. of animals with findings.

b: Values are means ± S.D.

Table 5 Biochemical findings in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test
-End of the administration period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Protein fractions (%)											GOT IU/l	GPT IU/l	ALP IU/l	LDH IU/l	γ-GTP IU/l
			TP g/dl	Alb g/dl	A/G	Alb				Globulin								
						α ₁	α ₂	β	γ									
Male	0	7	5.56 ^a ±0.11	2.34 ±0.10	0.726 ±0.054	52.56 ±1.82	20.26 ±1.62	7.34 ±0.52	15.39 ±1.20	4.46 ±0.80	132.7 ±22.0	27.4 ±2.1	510.9 ±125.6	2850.9 ±750.8	1.39 ±0.40			
	1.25	7	5.60 ±0.22	2.31 ±0.07	0.700 ±0.041	52.01 ±2.15	20.37 ±1.49	6.91 ±0.73	15.70 ±0.94	5.00 ±1.04	136.6 ±21.5	29.7 ±3.4	515.7 ±55.3	2942.0 ±735.0	1.07 ±0.43			
	5	7	5.61 ±0.11	2.26 ±0.08	0.666 ±0.035	49.71 ±2.58	21.74 ±1.45	6.90 ±0.95	16.27 ±2.30	5.37 ±1.03	135.0 ±3.5	25.4 ±5.7	499.4 ±162.1	3080.3 ±433.6	1.23 ±0.35			
	20	7	5.61 ±0.09	2.33 ±0.08	0.704 ±0.047	51.77 ±1.51	19.93 ±1.51	7.43 ±0.63	16.11 ±0.96	4.76 ±1.26	145.1 ±20.0	27.0 ±2.2	437.3 ±58.0	3493.3 ±732.2	1.36 ±0.42			
	80	7	5.60 ±0.19	2.23 ±0.22	0.659 ±0.092	49.44 ±5.26	20.13 ±1.51	8.06 ±1.38	17.40 ±2.42	4.97 ±1.03	142.3 ±26.1	30.9 ±5.3	345.6** ±69.0	3385.6 ±1052.1	1.87 ±0.39			
Female	0	7	5.80 ±0.24	2.47 ±0.14	0.739 ±0.060	54.61 ±1.52	19.31 ±0.77	6.47 ±0.72	15.14 ±0.80	4.46 ±1.02	128.6 ±23.4	27.6 ±4.1	239.4 ±68.8	2863.1 ±887.2	2.71 ±0.43			
	1.25	7	5.89 ±0.24	2.54 ±0.10	0.760 ±0.064	55.49 ±1.31	17.64 ±2.02	6.50 ±0.80	15.47 ±1.27	4.90 ±1.26	133.0 ±29.5	23.4 ±4.4	229.6 ±50.6	2941.9 ±1029.4	2.60 ±0.42			
	5	6	5.68 ±0.10	2.43 ±0.08	0.743 ±0.037	54.10 ±2.22	18.98 ±1.28	6.08 ±0.69	16.10 ±0.42	4.73 ±0.87	134.0 ±8.2	20.5* ±2.4	252.3 ±17.7	2933.8 ±398.5	2.97 ±0.45			
	20	7	5.86 ±0.26	2.51 ±0.11	0.749 ±0.025	54.40 ±2.38	19.79 ±0.89	5.84 ±0.78	15.59 ±0.72	4.39 ±1.45	137.0 ±37.4	23.6 ±3.4	215.1 ±61.5	3013.1 ±1171.3	2.27 ±0.35			
	80	7	5.67 ±0.18	2.41 ±0.07	0.739 ±0.012	55.00 ±1.40	18.39 ±0.86	6.31 ±0.74	16.80** ±0.96	3.50 ±1.34	154.0 ±50.6	22.9 ±4.8	181.6 ±71.0	4293.0 ±1980.4	2.74 ±0.32			

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	CPK IU/l	T-Bil mg/dl	Glu mg/dl	T-Cho mg/dl	TG mg/dl	PL mg/dl	BUN mg/dl	Crea mg/dl	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mEq/l	Ca mg/dl	P mg/dl
	1.25	7	750.9 ±225.3	0.10 ±0.00	132.9 ±23.1	59.4 ±7.3	61.3 ±19.4	106.9 ±10.4	14.93 ±1.12	0.44 ±0.05	143.71 ±0.86	4.770 ±0.303	105.0 ±1.5	9.74 ±0.17	9.59 ±0.43
	5	7	886.0 ±158.3	0.10 ±0.00	127.3 ±23.6	67.1 ±12.7	78.7 ±36.0	118.3 ±20.1	13.93 ±1.63	0.43 ±0.05	143.36* ±0.48	4.701 ±0.445	104.4 ±1.0	9.54 ±0.30	9.31 ±0.38
	20	7	899.7 ±184.1	0.10 ±0.00	132.1 ±18.8	76.9 ±8.1	112.4** ±12.3	138.7* ±12.5	13.53 ±1.56	0.44 ±0.05	143.00** ±0.96	4.623 ±0.211	102.7** ±1.3	9.67 ±0.19	8.76 ±0.64
	80	7	982.7 ±278.0	0.10 ±0.00	136.0 ±18.1	73.9 ±11.7	104.1* ±57.9	149.1** ±23.3	15.11 ±1.32	0.43 ±0.05	143.79 ±0.91	4.526 ±0.310	102.9** ±1.6	9.81 ±0.27	8.07 ±0.54
Female	0	7	787.1 ±312.4	0.10 ±0.00	112.7 ±18.7	64.3 ±9.0	16.3 ±4.2	129.0 ±16.6	18.37 ±1.64	0.56 ±0.05	142.86 ±1.46	4.507 ±0.263	107.4 ±2.0	9.70 ±0.28	8.39** ±0.73
	1.25	7	831.3 ±363.6	0.10 ±0.00	110.3 ±19.7	68.1 ±12.0	25.6 ±20.5	139.3 ±22.1	16.94 ±0.87	0.53 ±0.08	143.07 ±1.27	4.397 ±0.210	107.4 ±2.0	9.54 ±0.25	8.30 ±0.74
	5	6	824.7 ±137.7	0.10 ±0.00	126.7 ±19.4	73.3 ±8.1	27.7 ±17.3	150.8 ±13.2	15.82* ±2.36	0.53 ±0.10	142.83 ±0.93	4.565 ±0.498	106.8 ±2.5	9.60 ±0.21	8.50 ±0.52
	20	7	960.0 ±408.7	0.10 ±0.00	103.1 ±11.9	67.3 ±11.0	31.7* ±16.2	140.1 ±22.4	15.31** ±2.05	0.53 ±0.10	142.79 ±1.22	4.303 ±0.309	106.6 ±2.6	9.64 ±0.25	8.03 ±0.42
	80	7	1322.4 ±641.4	0.10 ±0.00	125.6 ±15.6	87.1** ±9.0	65.1** ±37.2	179.4** ±17.1	15.47* ±1.21	0.41** ±0.07	142.86 ±1.28	4.593 ±0.239	105.1 ±1.3	10.13** ±0.23	7.06** ±0.82

a : Values are means ± S.D.

* : Differs from control, p<0.05.

** : Differs from control, p<0.01.

28日間反復投与毒性試験

Table 6 Biochemical findings in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test - End of the recovery period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	TP g/dl	Alb g/dl	A/G	Protein fractions (%)				GOT IU/l	GPT IU/l	ALP IU/l	LDH γ -GTP			
						Alb	Globulin						IU/l	IU/l	IU/l	IU/l
							α_1	α_2	β							
Male	0	7	5.79 ^{a)} ± 0.16	2.31 ± 0.07	0.660 ± 0.034	49.94 ± 1.39	21.37 ± 1.68	7.37 ± 0.20	16.63 ± 1.00	4.69 ± 0.72	126.7 ± 19.2	24.3 ± 3.5	318.0 ± 53.4	3027.3 ± 670.3	1.43 ± 0.29	
	80	7	5.70 ± 0.15	2.24 ± 0.10	0.641 ± 0.031	49.87 ± 1.20	21.90 ± 1.60	6.66** ± 0.30	16.63 ± 0.78	4.94 ± 0.76	132.3 ± 28.2	30.0 ± 8.2	309.0 ± 56.5	3080.6 ± 1066.0	2.26** ± 0.46	
Female	0	7	6.17 ± 0.27	2.57 ± 0.08	0.711 ± 0.059	52.70 ± 2.04	20.74 ± 1.99	6.34 ± 0.57	15.30 ± 0.77	4.91 ± 0.95	102.4 ± 22.5	27.7 ± 5.7	173.9 ± 22.9	1789.6 ± 810.2	2.36 ± 0.49	
	80	7	6.11 ± 0.28	2.60 ± 0.14	0.737 ± 0.055	52.99 ± 2.96	19.73 ± 1.49	6.01 ± 0.52	16.03 ± 1.64	5.24 ± 1.16	140.0 ± 53.4	29.0 ± 11.0	173.1 ± 24.5	3431.0 ± 2292.6	2.40 ± 0.43	

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	CPK IU/l	T-Bil mg/dl	Glu mg/dl	T-Cho mg/dl	TG mg/dl	PL mg/dl	BUN mg/dl	Crea mg/dl	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mEq/l	Ca mg/dl	P mg/dl
80	7	826.3 ± 274.6	0.10 ± 0.00	128.1 ± 21.5	67.0 ± 12.9	66.9 ± 38.6	116.9 ± 24.8	14.30 ± 1.81	0.46* ± 0.05	144.21 ± 0.91	4.811 ± 0.200	106.7 ± 1.1	9.49 ± 0.35	8.04 ± 0.31	
Female	0	7	478.9 ± 173.7	0.10 ± 0.00	120.0 ± 15.3	70.3 ± 8.3	18.0 ± 12.4	137.7 ± 19.7	18.31 ± 2.27	0.57 ± 0.08	143.21 ± 1.07	4.193 ± 0.220	109.1 ± 1.3	9.74 ± 0.22	6.50 ± 0.65
	80	7	977.6 ± 672.4	0.10 ± 0.00	119.4 ± 18.3	71.4 ± 15.0	35.1 ± 22.1	144.6 ± 26.2	16.31 ± 1.87	0.54 ± 0.05	143.14 ± 1.44	4.334 ± 0.300	107.3* ± 1.3	9.76 ± 0.24	6.81 ± 0.52

a : Values are means \pm S.D.

* : Differs from control, $p < 0.05$.

** : Differs from control, $p < 0.01$.

Table 7 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test - Administration period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Body weight g	Kidney				Thyroid				
				Right		Left		Right		Left		
				g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	
Male	0	7	313.9 ^{a)} ±24.1	1.190 ±0.125	0.377 ±0.019	1.163 ±0.088	0.371 ±0.017	9.46 ±1.33	3.041 ±0.617	(6) ^{b)} 8.37 ±1.32	(6) 2.610 ±0.326	
	1.25	7	311.3 ±25.8	1.217 ±0.139	0.389 ±0.025	1.166 ±0.128	0.374 ±0.025	9.33 ±1.34	2.994 ±0.330	8.40 ±1.30	2.714 ±0.472	
	5	7	317.3 ±18.9	1.279 ±0.111	0.403 ±0.026	1.267 ±0.110	0.399 ±0.025	9.34 ±1.30	2.960 ±0.487	9.16 ±1.15	2.881 ±0.266	
	20	7	318.1 ±19.7	1.303 ±0.113	0.410* ±0.022	1.320* ±0.110	0.416* ±0.016	9.46 ±1.99	2.976 ±0.605	9.29 ±1.22	2.914 ±0.293	
	80	7	262.0** ±28.0	1.337 ±0.170	0.511** ±0.061	1.321* ±0.119	0.507** ±0.048	10.19 ±0.77	3.924* ±0.477	9.44 ±1.26	3.634** ±0.602	
Female	0	7	201.7 ±9.9	0.823 ±0.064	0.409 ±0.030	0.811 ±0.071	0.403 ±0.026	6.70 ±1.06	3.327 ±0.554	6.80 ±1.08	3.373 ±0.523	
	1.25	7	205.0 ±14.9	0.836 ±0.061	0.409 ±0.013	0.810 ±0.072	0.396 ±0.016	7.26 ±1.32	3.561 ±0.764	6.64 ±1.57	3.249 ±0.803	
	5	7	206.7 ±14.7	0.853 ±0.088	0.413 ±0.035	0.853 ±0.083	0.413 ±0.028	7.30 ±1.22	3.547 ±0.656	7.44 ±0.68	3.617 ±0.433	
	20	7	198.6 ±16.8	0.877 ±0.080	0.443 ±0.036	0.851 ±0.069	0.431 ±0.038	7.99 ±1.39	4.044 ±0.801	7.64 ±2.22	3.816 ±0.893	
	80	7	180.6* ±15.1	0.869 ±0.090	0.481** ±0.027	0.841 ±0.108	0.464** ±0.032	8.87* ±1.75	4.947** ±1.119	6.77 ±1.26	3.733 ±0.558	
Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Thymus		Liver		Spleen		Adrenal			
			mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%	Right		Left	
									mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Male	0	7	661.1 ±111.1	210.741 ±30.967	9.367 ±1.279	2.979 ±0.229	0.607 ±0.063	0.196 ±0.021	24.4 ±3.9	7.783 ±1.129	27.0 ±4.4	8.586 ±1.163
	1.25	7	641.7 ±122.4	208.451 ±49.502	9.546 ±1.367	3.057 ±0.204	0.580 ±0.097	0.184 ±0.026	21.9 ±4.0	7.019 ±1.115	24.9 ±4.5	7.953 ±1.048
	5	7	658.7 ±120.6	207.680 ±35.478	9.830 ±0.949	3.099 ±0.237	0.677 ±0.109	0.214 ±0.030	27.0 ±4.1	8.544 ±1.405	28.9 ±4.8	9.124 ±1.568
	20	7	643.1 ±60.5	202.129 ±14.746	10.004 ±0.664	3.144 ±0.125	0.543 ±0.060	0.173 ±0.015	26.9 ±2.7	8.469 ±0.967	28.6 ±4.0	9.007 ±1.344
	80	7	466.6** ±63.6	178.419 ±17.922	9.451 ±0.801	3.619** ±0.143	0.434** ±0.086	0.170 ±0.050	26.9 ±3.8	10.234** ±0.687	29.3 ±4.4	11.163** ±0.910
Female	0	7	514.0 ±103.6	256.111 ±56.773	6.084 ±0.414	3.016 ±0.155	0.424 ±0.067	0.210 ±0.037	30.1 ±2.3	14.980 ±1.457	31.3 ±2.4	15.549 ±1.471
	1.25	7	478.4 ±79.0	232.224 ±24.368	6.281 ±0.597	3.061 ±0.134	0.470 ±0.060	0.229 ±0.020	32.9 ±3.8	16.010 ±1.118	35.0 ±2.6	17.087 ±0.743
	5	7	536.0 ±148.2	257.661 ±57.462	6.561 ±0.309	3.184 ±0.185	0.431 ±0.070	0.209 ±0.030	33.4 ±3.5	16.209 ±1.736	35.3 ±3.2	17.090 ±1.298
	20	7	457.3 ±99.3	229.243 ±40.378	6.079 ±0.699	3.056 ±0.136	0.400 ±0.037	0.201 ±0.011	31.7 ±5.2	15.969 ±2.133	34.4 ±6.0	17.274 ±1.952
	80	7	392.1 ±48.2	219.993 ±43.747	6.491 ±0.632	3.596** ±0.138	0.321** ±0.033	0.177 ±0.014	29.7 ±4.5	16.430 ±1.787	30.9 ±4.7	17.096 ±2.177

a : Values are means ± S.D.

b : Values in parentheses are no. of animals examined.

* : Differs from control, p<0.05.

** : Differs from control, p<0.01.

Table 8 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 1,4-dicyanobenzene in the 28-day repeated dose toxicity test - Recovery period -

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Body weight g	Kidney				Thyroid			
				Right		Left		Right		Left	
				g	%	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Male	0	7	390.4 ^{a)} ±41.7	1.336 ±0.111	0.344 ±0.022	1.293 ±0.120	0.334 ±0.017	9.56 ±1.55	2.456 ±0.342	9.11 ±1.35	2.327 ±0.142
	80	7	357.7 ±19.5	1.380 ±0.129	0.386* ±0.031	1.324 ±0.118	0.369* ±0.025	9.36 ±1.25	2.613 ±0.298	8.47 ±1.32	2.359 ±0.251
Female	0	7	226.9 ±12.7	0.843 ±0.057	0.370 ±0.031	0.833 ±0.063	0.367 ±0.033	7.21 ±1.20	3.183 ±0.521	6.23 ±1.02	2.746 ±0.425
	80	7	221.4 ±14.4	0.856 ±0.047	0.389 ±0.020	0.841 ±0.052	0.380 ±0.026	7.57 ±0.82	3.417 ±0.268	7.74* ±0.89	3.493** ±0.282

Sex	1,4-dicyano- benzene (mg/kg)	No. of animals	Thymus		Liver		Spleen		Adrenal			
			mg	10 ⁻³ %	g	%	g	%	Right		Left	
									mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Male	0	7	548.7 ±65.6	141.214 ±16.388	11.434 ±1.327	2.930 ±0.112	0.716 ±0.049	0.183 ±0.014	27.1 ±4.7	6.923 ±0.606	29.1 ±5.9	7.419 ±0.874
	80	7	572.7 ±145.9	159.370 ±34.114	10.763 ±1.324	3.000 ±0.210	0.576** ±0.081	0.160* ±0.020	25.4 ±1.9	7.131 ±0.694	28.9 ±2.9	8.100 ±1.037
Female	0	7	385.1 ±60.5	169.129 ±18.244	6.280 ±0.519	2.766 ±0.123	0.449 ±0.043	0.199 ±0.018	30.4 ±3.6	13.437 ±1.715	32.1 ±5.1	14.207 ±2.443
	80	7	426.1 ±90.9	192.156 ±38.731	6.484 ±0.302	2.933* ±0.134	0.431 ±0.081	0.194 ±0.029	32.9 ±5.3	14.887 ±2.546	33.9 ±3.8	15.340 ±1.967

a : Values are means ± S.D.

* : Differs from control, p<0.05.

** : Differs from control, p<0.01.

回復期間終了時には、腎臓に近位尿細管を主とする尿細管上皮の硝子滴沈着および限局性の尿細管上皮の再生が対照群および80 mg/kg群の雄に認められた。

11. 電子顕微鏡検査

投与期間終了時には、肝臓の小葉中心帯における滑面小胞体の増加が80 mg/kg群の雄に認められた。

回復期間終了時には、雌雄ともに異常は認められなかった。

考察

体重の増加抑制および摂餌量の減少が80 mg/kg群の雌雄で認められ、1,4-ジシアノベンゼン投与による影響と考えられた。

肝臓に対する影響として、体重重量比の増加が80 mg/

kg群の雌雄で、小葉中心性の肝細胞肥大および小葉中心帯に滑面小胞体の増加が80 mg/kg群の雄で認められ、1,4-ジシアノベンゼン投与による薬物代謝酵素誘導^{1,2)}が示唆された。また、血中のトリグリセリド、リン脂質あるいは総コレステロールの増加が20 mg/kg以上の群の雌雄で、γ-GTPの増加傾向およびアルカリフォスファターゼの減少が80 mg/kg群の雄で、β-グロブリン分画の上昇が80 mg/kg群の雌で認められ、1,4-ジシアノベンゼンの肝臓・胆道系への影響が示唆された。

甲状腺に対する影響として、体重重量比の増加が80 mg/kg群の雌雄で、ろ胞の不整形化が80 mg/kg群の雄で、コロイドの減少が20 mg/kg以上の群の雄で認められた。外来物質によって引き起こされた酵素誘導は体内の性ホルモンや甲状腺ホルモンなどの分解を促進する場合がありますと報告されており²⁾、本試験でも肝臓の酵素誘導によ