

## *N*-メチルフェニル-*N'*-メチルフェニル-*p*-フェニレンジアミン (MMPD) のラットを用いた経口投与による催奇形性試験

酒見和枝\*, 宇佐見 誠, 紅林秀雄, 大野泰雄

### Teratogenicity study of *N*-methylphenyl-*N'*-methylphenyl-*p*-phenylenediamine (MMPD) in rats by oral administration

Kazue Sakemi\*, Makoto Usami, Hideo Kurebayashi and Yasuo Ohno

Teratogenicity of *N*-methylphenyl-*N'*-methylphenyl-*p*-phenylenediamine (MMPD), a rubber antioxidant, was examined in Wistar rats. MMPD was given to pregnant rats by gavage once a day from day 6 through day 15 of pregnancy at doses of 0, 2, 4 and 8 mg/kg/day. The pregnant rats were sacrificed on day 20 of pregnancy and their fetuses were examined. MMPD was not maternal toxicity at any dose. MMPD did not affect growth or morphological development of fetuses. MMPD caused early embryonic death at 8 mg/kg. It was concluded from these results that the no-observed-adverse-effect level was 2 mg/kg/day for rat fetuses, and 8 mg/kg/day or higher for pregnant rats. The teratogenicity of MMPD was inconclusive due to its embryo-fetal lethality.

Keywords: *N*-methylphenyl-*N'*-methylphenyl-*p*-phenylenediamine, rubber antioxidant, Wistar rat, teratogenicity, developmental toxicity

#### 緒 言

*N*-メチルフェニル-*N'*-メチルフェニル-*p*-フェニレンジアミン (MMPD) は、ゴムの老化防止に使用されている抗酸化剤である。アミンタイプの抗酸化剤は、ラジカル源と容易に一電子酸化反応を起こし抗酸化作用を示す。MMPDの有害性に対する報告はないが、含有成分である *N,N'*-Di-(*o*-Tolyl)-*p*-phenylenediamine の  $LDL_0$  値は 300mg/kg (マウス, 腹腔内) である。同じアミンタイプの抗酸化剤の発生毒性に関しては、*N*-フェニル-*p*-フェニレンジアミン (PPD) と *N*-イソプロピル-*N'*-フェニル-*p*-フェニレンジアミン (IPPD) についての報告がある。PPD を妊娠 6 ~ 15 日のラットに 50, 100, 200 mg/kg 経口投与した実験では、母体および胎児の体重, 性比, 胎児の内部器官および骨格に異常はなく, 胚・胎児致死作用も認められないことが報告されている<sup>1)</sup>。また, 孵卵 3 日のニワトリ卵に IPPD を注入した実験では 0.041  $\mu$ mol/egg 以上で羽の欠損, 体腔開口, 眼瞼および角膜の欠損等の奇形が観察され,  $ED_{50}$  値は 0.11  $\mu$ mol/egg であることが報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら, MMPD の発生毒性に関しては報告が見当たらない。そこで本試験では, 妊娠ラットへの経口投与により MMPD の催奇形性について検討した。

#### 材料および方法

##### 1. 被験物質

MMPD は精工化学株式会社より入手した。性状は黒褐色粒状で, 添付資料による純度は 75% 以上であった。融点は 80 °C 以上で, アセトンおよびベンゼンに容易に溶解し, 水には不溶である。CAS No. は, 3081-14-9 である。

##### 2. 動物及び飼育条件

ウイスター系ラット (日本チャールスリバー) の雌 (10 週齢) および雄 (11 週齢) を用いた。未経産の雌を雄と終夜同居させ, 翌朝腔垢中に精子が認められたものを試験に供した。妊娠日の起算は精子確認日を妊娠 0 日とした。

妊娠動物は, 試験期間をとおしてアルミ製ケージで個別飼育し, 固形飼料 (オリエンタル酵母, MF) および水道水を自由に摂取させた。動物飼育室内の環境は, 温度  $25 \pm 2$  °C, 相対湿度  $55 \pm 5$  %, 換気回数 15 回/時間, 明暗交代 12 時間 (明期 5:00 ~ 17:00) とした。

##### 3. 用量および群構成

用量の設定にあたって, 10, 20 および 40 mg/kg/day の 3 用量を用いて, 1 群 2 ~ 4 匹のラットを用いて予備試験を実施した。その結果, 妊娠動物には毒性兆候は認められなかったが, 10 mg/kg/day で 64% の胚・胎児が死亡し 20 mg/kg/day 以上ではすべての胚・胎児が死亡した。これらの結果を考慮して, 本試験における群構成は, MMPD 投与群として 2, 4 および 8 mg/kg/day の 3 用量を設定し, 対照群を加えて計 4 群

\* To whom correspondence should be addressed: Kazue Sakemi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3707-6950; E-mail: sakemi@nihs.go.jp

とした。1群の妊娠動物数は22～26匹とした。

#### 4. 投与方法

ゴマ油に溶解した被験物質を、妊娠6日の体重に基づいて妊娠6～15日の10日間、毎日1回、胃ゾンデを用いて妊娠動物に強制経口投与した。投与量はいずれの用量においても5ml/kgとなるように調製した。対照群にはゴマ油5ml/kgを同様に経口投与した。

#### 5. 観察方法

妊娠動物の体重および餌重量を妊娠0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 17および20日に測定した。また、一般状態を毎日観察した。妊娠20日に妊娠動物を屠殺し、妊娠子宮重量、黄体数、着床数および胚・胎児死亡を調べた。生存胎児については、外表の異常および性別を調べ、体重を測定した。各腹の約2分の1の生存胎児についてAlizarin red S染色骨格標本作製し骨格を観察した<sup>3)</sup>。残り約2分の1の生存胎児については内部器官を観察した。内部器官の観察には、頭部および腹部については粗大切片法<sup>4)</sup>を、胸部については顕微解剖法<sup>5)</sup>を用いた。

#### 6. 統計学的方法

妊娠動物または一腹を標本の単位として、対照群とMMPD投与群との有意差の検定をおこなった。度数データについてはFisherの直接確立法を用いた。計量データについては、Bartlettの等分散検定により群間で分散に差がないことを調べた後、分散分析およびScheffé法を用いた。計数データおよび群間で分散に差が認められた計量データについては、Kruskal-WallisのH検定およびScheffé法を用いた。

## 結 果

### 1. 妊娠動物に及ぼす影響

#### 1.1. 一般状態

いずれの群においても、一般状態の変化並びに死亡は認められなかったが、すべての胚・胎児が死亡していた動物数が8mg/kg/day投与群で対照群に比べて有意に多かった(Table 1)。

#### 1.2. 体重および摂餌量

体重には、対照群とMMPD投与群との間に有意差は認められなかった(Fig. 1)。対照群と比較して8mg/kg/day投与群において体重増加の抑制傾向が認められたが、妊娠子宮重量を除いた妊娠20日の補正体重には、対照群とMMPD投与群との間に有意差は認められなかった(Table 1)。

摂餌量には、対照群とMMPD投与群との間に有意差は認められなかった(Fig. 2)。

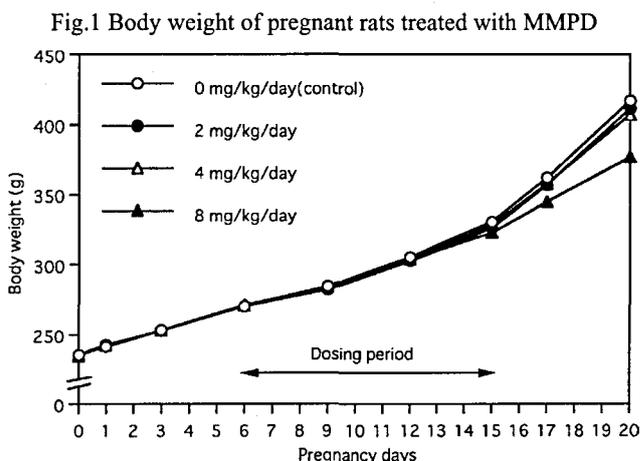
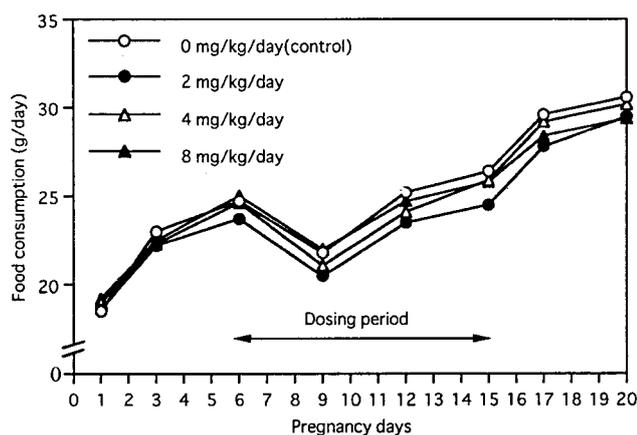


Table 1. Clinical signs in pregnant rats treated with MMPD

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	2	4	8
No. of pregnant rats	22	22	23	26
No. of dead pregnant rats	0	0	0	0
No. of pregnant rats with live fetuses	22	22	22	18
No. of pregnant rats with death of all the embryo / fetuses (%) <sup>a</sup>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.3%)	8 (30.8%)**
Initial body weight (g) <sup>b</sup>	235.0 ± 10.4	235.0 ± 10.6	235.2 ± 10.2	234.2 ± 11.6
Final body weight (g) <sup>b</sup>	416.8 ± 20.2	411.2 ± 27.8	407.0 ± 38.4	376.7 ± 52.4
Body weight gain (g) <sup>bc</sup>	181.8 ± 17.7	176.2 ± 22.7	171.9 ± 33.6	142.6 ± 47.3
Corrected body weight (g) <sup>bd</sup>	329.9 ± 18.3	325.8 ± 20.4	332.3 ± 20.9	334.8 ± 22.1

a: Incidence, b: Mean ± S.D., c: Body weight gain from day 1 to day 20 of pregnancy, d: Body weight minus uterine weight at day 20 of pregnancy, \*\*: Significantly different from the control group at p<0.01

Fig.2 Food consumption of pregnant rats treated with MMPD



## 2. 胎児に及ぼす影響

## 2.1. 生存胎児数, 性比, 胎児体重および胚胎児死亡

用量依存的な胚・胎児死亡が観察され, 8mg/kg/day投与群においては生存胎児数の有意な減少および初期胚の死亡による着床後胚・胎児死亡率の有意な増加が認められた (Table 2). 黄体数, 着床数, 着床率, 性比および胎児体重には, 対照群とMMPD投与群との間に有意差は認められなかった.

## 2.2. 胎児外表

4 mg/kg/day以下の各群において1~4匹の胎児に外表

奇形が認められたが, 対照群とMMPD投与群との間には発生率に有意差は認められなかった (Table 3).

## 2.3. 胎児骨格

骨格奇形は, 胸椎または腰椎または尾椎の欠損, 腰椎体の癒合, 肋骨の欠損, 肋骨と胸椎弓の癒合等が, 対照群および2 mg/kg/dayにおいてそれぞれ1および2匹の胎児に認められたが, 発生率には対照群とMMPD投与群との間に有意差は認められなかった (Table 4).

骨格変異の発生率には, 対照群とMMPD投与群との間に有意差は認められなかった. また, 骨化の進行度の指標として調べた仙尾椎骨, 中手骨および中足骨の骨化核数にも有意差は認められなかった.

## 2.4. 胎児内部器官

各群において4~9匹の胎児に内部器官の奇形が認められたが, 発生率には対照群とMMPD投与群との間に有意差は認められなかった (Table 5).

## 考 察

MMPDの妊娠ラットへの経口投与により, 妊娠ラットに毒性徴候の認められない用量において胚・胎児死亡の増加が認められることから, MMPDは胚・胎児致死作用を有すると考えられる. これら観察された胚・胎児死亡のほとんどは, 着床および胎盤遺残であり, 着床後の早い時期に胚・胎児が

Table 2. Fetal growth in pregnant rats treated with MMPD

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	2	4	8
No. of litters	22	22	23	26
No. of corpora lutea	368	369	378	424
Mean ± S.D.	16.7 ± 1.9	16.8 ± 1.4	16.4 ± 1.9	16.3 ± 1.7
No. of implants	347	349	359	413
Mean ± S.D.	15.8 ± 2.4	15.9 ± 1.6	15.6 ± 2.2	15.9 ± 1.8
Implantation rate (%)	94.1	94.7	95.2	97.4
No. of live fetuses	332	320	291	181
Mean ± S.D.	15.1 ± 2.0	14.5 ± 2.6	12.7 ± 4.9	7.0 ± 7.2**
Sex ratio (male/female)	0.98	1.40	0.84	0.68
Fetal weight (g) <sup>a</sup>				
Male	3.91 ± 0.17	3.96 ± 0.22	3.96 ± 0.19	3.81 ± 0.29
Female	3.80 ± 0.17	3.76 ± 0.28	3.81 ± 0.18	3.63 ± 0.44
No. of dead implants	15	29	68	232
Early death <sup>b</sup>	15	28	66	232
Late death <sup>c</sup>	0	1	2	0
Mortality (%)	3.9	8.0	19.2	57.1**

a: Mean ± S.D., b: implantation sites and placental remnants, c: macerated fetuses and dead fetuses,

\*\* : Significantly different from the control group at  $p < 0.01$ .

Table 3. Gross malformations in the fetuses from pregnant rats treated with MMPD

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	2	4	8
No. of litters	22	22	22	18
No. of litters with malformed fetus	4 (18.2%)	3 (13.6%)	1 (4.55%)	0 (0.00%)
No. of examined fetuses	332	320	291	181
No. of fetus with malformations <sup>a</sup>	4 (1.25%)	3 (1.14%)	1 (2.27%)	0 (0.00%)
General edema	1 (0.35%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Exencephaly	0 (0.00%)	1 (0.57%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Rudimentary tail	1 (0.28%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Shornted tail	0 (0.00%)	1 (0.57%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Dwarf	2 (0.62%)	2 (0.57%)	1 (2.27%)	0 (0.00%)

a : Total number and mean incidence are shown.

Table 4. Skeletal variations in the fetuses from pregnant rats treated with MMPD

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	2	4	8
No. of litters	22	22	22	18
No. of fetuses examined	170	165	150	92
No. of fetuses with malformations <sup>a</sup>	1 (0.57%)	2 (1.70%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Malformed vertebrae	1 (0.57%)	2 (1.70%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Malformed rib	1 (0.57%)	1 (1.14%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
No. of fetuses with variations <sup>a</sup>	44 (25.77%)	58 (35.12%)	62 (44.44%)	31 (48.77%)
Hypoplastic supraoccipital	12 (7.00%)	25 (14.67%)	25 (18.32%)	15 (29.86%)
Cervical rib	4 (2.18%)	3 (1.70%)	2 (1.14%)	1 (0.62%)
Hypoplastic cervical vertebral arch	6 (3.51%)	11 (6.76%)	8 (5.29%)	8 (10.88%)
Deformed sternbrae	6 (3.49%)	5 (2.86%)	5 (7.18%)	4 (9.95%)
Deformed thoracic vertebral body	8 (4.95%)	5 (3.43%)	6 (3.99%)	4 (5.32%)
Wavy rib	1 (0.65%)	3 (1.79%)	2 (1.82%)	2 (3.40%)
Lumbar rib	18 (10.51%)	24 (15.17%)	29 (17.29%)	14 (22.54%)
Extra	3 (1.70%)	4 (2.29%)	3 (1.79%)	3 (9.44%)
Rudimentary	20 (11.64%)	23 (14.66%)	28 (16.73%)	13 (19.76%)
Others	4 (2.35%)	1 (0.65%)	1 (0.91%)	1 (1.11%)
No. of sacro-caudal vertebrae <sup>b</sup>	8.19 ± 0.58	8.15 ± 0.57	8.31 ± 0.35	8.24 ± 0.64
No. of metacarpus <sup>b</sup>	7.80 ± 0.32	7.90 ± 0.48	7.84 ± 0.29	7.65 ± 0.59
No. of metatarsus <sup>b</sup>	8.15 ± 0.31	8.00 ± 0.08	8.06 ± 0.19	8.04 ± 0.18

a: Total number and mean incidence are shown.. b: Mean ± S.D.

Table 5. Visceral malformations in the fetuses from pregnant rats treated with MMPD

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	2	4	8
No. of litters	22	22	22	17
No. of fetuses examined	162	155	141	89
No. of fetuses with malformations <sup>a</sup>	9 (5.23%)	4 (2.61%)	8 (11.5%)	6 (21.98%)
Abnormal lung lobulation	1 (0.57%)	0 (0.00%)	1 (4.55%)	3 (9.48%)
Diaphragmatic hernia	3 (1.87%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
Dilatated renal pelvis	1 (0.57%)	1 (0.57%)	1 (0.65%)	0 (0.00%)
Dilatated ureter	2 (1.07%)	1 (0.57%)	4 (6.98%)	1 (5.88%)
Left-sided umbilical artery	2 (1.22%)	3 (2.05%)	4 (4.48%)	4 (18.4%)
Others	2 (1.08%)	1 (0.57%)	1 (0.65%)	0 (0.00%)

a : Total number and mean incidence are shown.

死亡していることが示唆され、また、母動物には影響が見られないことから、胚・胎児に対する直接作用であると考えられる。

本試験条件下におけるMMPDの妊娠ラットに対する無影響量は8 mg/kg/day以上であると考えられる。これは、高用量である8 mg/kg/dayにおいても妊娠ラットにMMPD投与による毒性徴候が認められないからである。また、ラット胎児に対してはMMPD投与により、胚・胎児死亡数が用量依存的に増加しており、4 mg/kg/day群においては有意差は認められないものの、その発生頻度は今まで我々が行ってきた一連の催奇形性試験におけるコントロールレベルを越えていた。このことから、ラット胎児に対する無影響量は2 mg/kg/dayであると考えられる。これは、胎児に被験物質投与による毒性徴候が認められない最高の用量である。

本試験においては胎児奇形発生率の増加は認められなかったが、高投与量群において胚・胎児致死作用が認められたため、MMPDの催奇形性が検出されなかった可能性がある。MMPDの催奇形性を明らかにするためには、より短期間の投与による催奇形性試験が必要であると考えられる。

## 文 献

- 1) anonymous : *J Am Coll Toxicol.*, **13** (5), 374-394 (1994)
- 2) Korhonen, A., Hemminki, K. and Vainio, H. : *J Appl Toxicol.*, **3** (2), 112-117 (1983)
- 3) Dawson, A. B. : *Stain Technol.*, **1**, 123 (1926)
- 4) Wilson, J. G. : "Teratology principles and techniques" (eds. Wilson, J. G. and Warkany, J.) pp. 262, The University of Chicago Press, Chicago (1965)
- 5) 西村耕一 : 先天異常, **14**, 23(1974)

## 要 旨

N-メチルフェニル-N'-メチルフェニル-p-フェニレンジアミン(MMPD)の催奇形性をラットを用いて調べた。0, 2, 4および8 mg/kg/dayのMMPDを妊娠ラットに妊娠6～15日の10日間毎日1回経口投与した。妊娠20日に動物を屠殺し胎児奇形について調べた。妊娠動物には、いずれの投与量においても毒性徴候は認められなかった。胎児には、発育の抑制および奇形発生率の増加は認められなかったが、8 mg/kg/dayで強い胚・胎児致死作用が認められた。これらの結果から、無影響量は、ラット胎児に対しては2 mg/kg/day、妊娠ラットに対しては8 mg/kg/day以上であると結論された。