

カルシウム＝ジホルマーのラットを用いた強制経口投与による肝中期発がん性試験

日本バイオアッセイ研究センター

## 1 被験物質

### 1.1 名称等

名称	: カルシウム＝ジホルマー (別名 ギ酸カルシウム)
製造元	: Sigma
CAS No.	: 544-17-2
ロット番号	: BCBT9796
含量	: 99.9%
分子量	: 130.1

### 1.2 物理化学的性状等

外観及び性状	: 白色粉末
融点	: >300°C
溶解性	: 172g/L 水

### 1.3 製造・輸入量及び用途

製造・輸入量	: 9,000 - 10,000t (2015 年)
用途	: 皮革用中和剤, 農薬 (植物成長調整剤)

### 1.4 有害性情報

急性毒性	: LD <sub>50</sub> (ラット経口) 2,650 mg/kg
刺激性	: 眼: あり、皮膚: なし
遺伝毒性	: エームス試験陰性、形質転換試験陽性
発がん性	: 情報なし
特定標的臓器毒性	: なし

## 2 目的

F344/DuCrIcrlj ラットを用いた肝中期発がん性試験(伊東法)を用いて、カルシウム＝ジホルマーの肝臓に対するプロモーション作用の有無を検索した。

## 3 方法

試験は、被験物質投与群 3 群、媒体対照群及び陽性対照群の計 5 群の構成で、各群 22 匹の F344 ラット(雄 6 週齢)を用いて行った。起始物質として *N*-ニトロソジエチルアミン (DEN) 200 mg/kg を腹腔内へ投与した後、第 3 週目より 6 週間、注射用水に溶解した被験物質を 0 (媒体対照群)、250、500 及び 1000 mg/kg/day の用量で、また、陽性対照群にはフェノバルビタールナトリウムを 25 mg/kg/day の用量で、毎日 1 回、強制経口投与した。DEN 処置後、第 3 週目の終わりには肝臓

の 2/3 を切除する手術を行った。動物は投与終了日の翌日に安楽死させ、肝臓の前腫瘍性病変である胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巣 (直径 0.2 mm 以上) の数及び面積を計測し、肝臓単位面積当たりの陽性細胞巣の数及び面積を算出することでプロモーション作用の有無を評価した。

#### 4 投与量設定の理由

被験物質の投与量は、用量設定試験の結果を基に決定した。被験物質投与量を 0 (媒体対照群、注射用水)、300、600、1000 及び 1200 mg/kg に設定し、1 用量当たり 5 匹の F344 ラット (雄 6 週齢) に DEN 200 mg/kg を腹腔内投与した後、8 週齢から毎日、4 週間、被験物質を強制経口投与した。その結果、死亡や一般状態の異常は観察されなかったが、1000 mg/kg 以上の投与群で体重増加の軽微な抑制が認められた。投与 4 週間後の体重は媒体対照を 100% とすると、1000 mg/kg 及び 1200 mg/kg とともに 96% であった。また、600 mg/kg 以上の投与群で肝臓の絶対重量に軽微な低下が認められた。病理組織学検査の結果、投与に関連する病変は観察されなかった。

この結果を基に、本試験の高用量を最終決定する目的で、被験物質投与量を 0 (媒体対照群、注射用水)、300、1000 及び 1200 mg/kg に設定し、部分肝切除した 1 用量当たり 6 匹の F344 ラット (雄 9 週齢) に、部分肝切除翌日から毎日、14 日間、被験物質を強制経口投与した。その結果、1200 mg/kg を投与した 6 匹中の 3 匹が投与 1 回で死亡した。1200 mg/kg 群では体重増加の軽微な抑制がみられ、2 週間投与終了後の体重は媒体対照を 100% とすると 95% であった。また、1000 mg/kg 以上の投与で肝臓の絶対重量低下が認められた。

以上の用量設定試験の結果から、本試験に用いる高用量は、動物に最小限の毒性兆候がみられるが、動物が部分肝切除及び 6 週間の投与に耐え得る用量として、1000 mg/kg が適切であると判断した。したがって、本試験では、高用量を 1000 mg/kg に設定し、公比 2 で除して中用量を 500 mg/kg、低用量を 250 mg/kg とした。

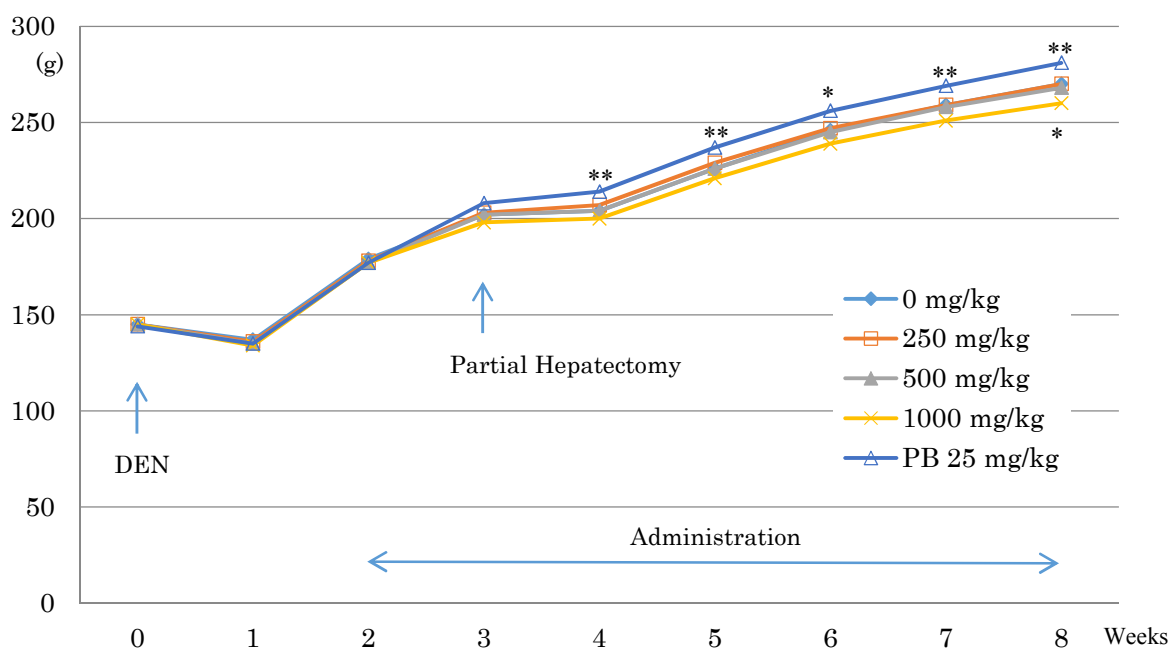
#### 5 結果

被験物質投与に起因する一般状態所見は観察されず、1000 mg/kg 群に体重増加の軽微な抑制が認められた。また、250 mg/kg 以上の群に腎臓の相対重量の増加がみられた。病理組織学的検査で被験物質投与に関連した病変は観察されなかった。肝臓の GST-P 陽性細胞巣には、単位面積当たりの数、面積ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

陽性対照群では、媒体対照群に比較して体重、摂餌量、肝臓重量 (絶対重量・相対重量) 及び腎臓重量 (絶対重量) が増加した。また、肝臓の GST-P 陽性細胞巣については単位面積当たりの数、面積が増加し、肝臓に対する発がんプロモーション作用は陽性であることを確認した。

#### 6 結論

カルシウム=ジホルマートは、本試験条件下では肝臓に対する発がんプロモーション作用を示さないと結論した。



\*, \*\* : Significantly different from control group at  $p < 0.05$ ,  $0.01$ , respectively.

図1 カルシウム=ジホルマートの肝中期発がん性試験における体重推移

表1 カルシウム=ジホルマートの肝中期発がん性試験における肝臓重量結果

投与量 (mg/kg/day)	有効 動物数	剖検時体重 <sup>a</sup> (g)	肝臓絶対重量 (g)	肝臓相対重量 (%)
0	19	248 ± 11	6.099 ± 0.383	2.464 ± 0.136
250	21	248 ± 9	6.035 ± 0.368	2.429 ± 0.096
500	21	246 ± 13	5.951 ± 0.356	2.419 ± 0.127
1000	20	236 ± 13**	5.807 ± 0.455	2.457 ± 0.130
PB 25	21	259 ± 11**	8.285 ± 0.523**	3.197 ± 0.101**

<sup>a</sup> : The value presented were obtained after the animals were fasted overnight.

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

表2 カルシウム=ジホルマートの肝中期発がん性試験における免疫組織化学的検査結果

投与量 (mg/kg/day)	有効 動物数	GST-P 陽性細胞巢	
		陽性細胞巢数 (no./cm <sup>2</sup> )	陽性細胞巢面積 (mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )
0	19	5.712 ± 2.373	0.493 ± 0.224
250	21	6.980 ± 1.437	0.579 ± 0.217
500	21	6.249 ± 2.269	0.558 ± 0.261
1000	20	6.284 ± 2.558	0.628 ± 0.296
PB 25	21	11.775 ± 2.892**	1.262 ± 0.503**

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