

3) 新生児に及ぼす影響

(1) 新生児の観察 (Table 7)

300 mg/kg群で出産児数の低値を示し、それに伴い出生率も低値傾向を示した。なお、性比に変化は認められなかった。

一般状態および外表異常の観察では、被験物質に起因する変化は認められなかった。

(2) 体重 (Table 7)

雌雄の体重および体重増加量とも被験物質投与群に変化は認められなかった。

(3) 剖検

哺育4日の生存児の剖検および死亡児の剖検では、被験物質に起因する異常所見は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性

死亡が300 mg/kgの妊娠20日に雌1例、妊娠23日の分娩途中で雌1例で認められた。投与後の症状として、流涎が300 mg/kg群の雌雄全例に認められた。被験物質はウサギの眼粘膜に対し強い刺激性を有することから知られている³⁾こと、被験物質投与による神経症状が認められていないことから、流涎は被験物質の刺激性に起因する変化と考えられる。

病理学検査の結果、被験物質に起因する変化が胃、腎臓および膀胱に認められた。剖検において前胃粘膜の肥厚、黄色化および隆起巣が300 mg/kg群の雌雄でみられ、組織学的には扁平上皮過形成、角化亢進、錯角化、び慢性炎症性細胞浸潤、びらんおよび粘膜下織の水腫が同群の雌雄で認められた。その他、腎臓の尿細管上皮の壊死および腎盂上皮の過形成、膀胱の粘膜上皮過形成が60および300 mg/kg群の雌雄で認められた。

前胃の扁平上皮過形成は、種々の刺激性化学物質の経口投与によって誘発され、角化亢進や炎症性細胞浸潤、水腫を伴うこともあり、投与を中止することにより回復することが報告されている⁴⁾。胃の変化は、上述のように流涎が300 mg/kg群の全例で認められていることから、被験物質の刺激性に起因する変化と考えられる。腎臓の尿細管上皮の壊死は多くの薬物によって誘発され、その機序は様々である⁴⁾。壊死は近位尿細管に見られることが多く⁵⁾、本試験での発現部位はそれに一致していた。膀胱の粘膜上皮過形成は、種々の原因による移行上皮の損傷部における再生像として認められる⁶⁾。被験物質は消毒剤に用いられ殺菌力が強力であることが知られている⁷⁾こと、両性界面活性剤のうち市販殺菌消毒剤の代謝についての実験では、高用量投与における排泄は主として腎臓より行われる⁷⁾ことから、腎臓および膀胱の変化は被験物質により誘発されたものと考えられる。

血液生化学検査では、尿素窒素の増加が300 mg/kg群の雌雄で認められた。血清尿素は腎機能の指標として用いられており⁸⁾、前述のように腎臓への影響が組織学的にみられていることから、それに伴う増加と考えられる。

これら投与期間で認められた変化は、2週間の回復期間により消失するか、変化がみられても病変程度が明らかに軽減し、回復傾向を示しているものと考えられる。

分娩途中で死亡した300 mg/kg群の1例では、交配前に一過性の変化として鼻周囲および下腹部の汚れ、性周期検査で発情休止期の継続、剖検では前胃粘膜の肥厚、組織学的には、被験物質に起因する前述の変化の他、肺の静脈および肝臓の中心静脈に血栓が認められた。周産期に死亡した動物を組織検査すると、静脈に血栓がみられ、播種性血管内凝固症候群(DIC)を呈することがしばしば認められる。本動物も同様の変化を示していることから、死因として播種性血管内凝固症候群(DIC)の可能性が示唆された。他の死亡動物では、被験物質に起因する前述の変化の他、病理組織学検査では気管に重度の粘膜上皮の壊死と中等度の固有層の炎症性細胞浸潤、肺に中等度のうっ血と軽度の水腫が認められた。また、本死亡動物は死亡前日に流涎が観察されていたことから、流涎の発症と気管・肺の組織学的変化から誤嚥した可能性が考えられ、死亡したものと推察された。

雄の生殖器系への変化として、精巣および精巣上体の小型および精細管萎縮などが認められたが、本系統の動物でしばしば観察される自然発生性の変化と考えられ、さらに用量に関係なくみられていることから、被験物質に起因するものではないと判断した。その他、体重、摂餌量、血液学検査、尿検査(雄)および器官重量では、被験物質に起因する影響は認められなかった。また、詳細な症状観察、機能検査および自発運動量測定でも被験物質の影響はなく、神経症状を示唆する変化は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

全出産児死亡が300 mg/kg群の雌1例の哺育0日に認められた。本動物は分娩完了までに2日間(妊娠22日~24日)を要し難産を示し、分娩完了の観察時には全出産児が死亡していた。分娩途中の観察においても、授乳、胎盤摂取あるいは児動物を回集するなどの哺育行動が認められなかった。また、妊娠期間の延長および出産児数の減少が300 mg/kg群で認められた。300 mg/kg群の雌では妊娠末期の死亡、分娩途中の死亡、全出産児死亡がみられ、いずれも周産期に集中して認められていることから、妊娠期間の延長や出産児数の減少を招いたものと考えられる。この他、性周期、交尾率、受胎率、分娩率、黄体数、着床数、着床率および出産率では被験物質に起因する変化は認められなかった。

新生児の検査において、出産児数が300 mg/kg群で減少し、それに伴い出生率も低値傾向を示した。生後4日の生存率、性比、外表、一般状態、体重および剖検では被験物質に起因する変化は認められなかった。したがって、出産児数の減少がみられたが、次世代の発育へ影響を及ぼすものではないと考えられる。

以上のように、N-(カルボキシメチル)-N,N-ジメチル-1-ドデカナミニウムを反復経口投与した結果、一般毒性

学的な主な変化として300 mg/kg群で周産期における雌の死亡、雌雄全例に流産がみられ、前胃粘膜の肥厚と組織学的には扁平上皮過形成が認められた。60および300 mg/kg群の雌雄では腎臓の尿細管上皮の壊死および膀胱の粘膜上皮過形成が認められ、加えて血清尿素窒素の高値が300 mg/kg群の雌雄で認められた。これら投与期間で認められた変化は2週間の回復期間により消失するか、変化がみられても病変程度が軽減し、回復傾向を示しているものと判断された。生殖発生毒性に及ぼす影響として、300 mg/kg群で全出産児死亡、妊娠期間の延長、出産児数の減少が認められた。したがって、本試験条件下における反復投与毒性に関する無毒性量は雌雄とも10 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無毒性量は雄親動物で300 mg/kg/day、雌親動物ならびに児動物では60 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 「13901の化学商品」化学工業日報社、東京(2001) pp.1262-1264.
- 2) 星野信人ら：*N*-(カルボキシメチル)-*N,N*-ジメチル-1-ドデカナミニウムノラットを用いる単回経口投与毒性試験。化学物質毒性試験報告，13: 85-86 (2006)。
- 3) アンヒトール24B。製品安全性データシート，花王(2003)。
- 4) Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ: The alimentary system and pancreas. Stomach. In "Atlas of experimental toxicological pathology", Gopinath C, Prentice DE, Lewis DJ (ed), MTP Press, Lancaster (1987) pp.64-65.
- 5) 渡辺満利，西川秋佳:腎臓。非腫瘍性病変。尿細管上皮細胞の壊死。In「毒性病理組織学」前川昭彦(責任編集)，日本毒性病理学会，名古屋(2000) p.254.
- 6) 福島昭治:膀胱/尿管/尿道。増殖性および腫瘍性病変。膀胱。過形成。In「毒性病理組織学」前川昭彦(責任編集)，日本毒性病理学会，名古屋(2000) p.272.
- 7) 界面活性剤の安全性および生分解性に関するデータシート集(第4集)，日本界面活性剤工業界，東京(1988) pp.168-170.
- 8) 河合忠，屋形稔，伊藤喜久:「異常値の出るメカニズム」医学書院，東京(2001) p.119.

連絡先

試験責任者: 星野信人
 試験担当者: 佐藤ゆかり, 藤代真弓, 小山 隆
 爰島洋子, 豊田直人
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
 〒314-0255 茨城県神栖市砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Nobuhito Hoshino (Study director)
 Yukari Sato, Mayumi Fujishiro,
 Takashi Koyama, Hiroko Kokoshima,
 Naoto Toyota
 Kashima Laboratory Mitsubishi Chemical Safety
 Institute Ltd.,
 14 Sunayama, Kamisu-shi, Ibaraki, 314-0255,
 Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax+81-479-46-2874

Table 1 Hematological examination in rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	10	60	300	0	300
Male							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.650 \pm 0.323	8.322 \pm 0.243	8.426 \pm 0.397	8.520 \pm 0.267	8.420 \pm 0.319	8.598 \pm 0.299
	Hemoglobin (g/dL)	15.50 \pm 0.51	15.14 \pm 0.19	15.36 \pm 0.71	15.30 \pm 0.41	15.02 \pm 0.47	15.08 \pm 0.47
	Hematocrit (%)	46.98 \pm 1.60	45.56 \pm 0.95	46.10 \pm 2.17	46.46 \pm 1.55	45.72 \pm 1.54	46.14 \pm 1.24
	Reticulocyte (%)	2.06 \pm 0.30	2.28 \pm 0.30	2.80 \pm 0.35	2.34 \pm 0.86	2.44 \pm 0.67	2.50 \pm 0.44
	MCV (fL)	54.38 \pm 2.08	54.68 \pm 1.15	54.74 \pm 2.29	54.56 \pm 1.81	54.36 \pm 1.96	53.72 \pm 1.59
	MCH (pg)	17.94 \pm 0.76	18.14 \pm 0.35	18.24 \pm 1.05	17.94 \pm 0.38	17.84 \pm 0.44	17.56 \pm 0.52
	MCHC (%)	33.02 \pm 0.43	33.16 \pm 0.54	33.32 \pm 0.85	32.92 \pm 1.02	32.86 \pm 0.43	32.70 \pm 0.22
	Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	981.6 \pm 34.6	1101.8 \pm 153.2	995.6 \pm 140.4	1137.4 \pm 44.0	1064.2 \pm 217.9	1055.6 \pm 124.9
	PT (sec)	22.50 \pm 3.29	17.94 \pm 1.68*	19.50 \pm 2.57	17.86 \pm 2.40*	18.30 \pm 2.00	20.68 \pm 2.83
	APTT (sec)	21.26 \pm 1.18	20.24 \pm 1.00	21.84 \pm 1.67	19.96 \pm 1.75	20.26 \pm 1.15	20.76 \pm 1.17
	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10.352 \pm 3.403	8.772 \pm 1.252	9.260 \pm 2.759	9.792 \pm 1.142	10.000 \pm 3.524	8.914 \pm 3.208
	Differential leukocyte counts (%)						
	Lymphocyte	82.60 \pm 8.26	83.72 \pm 3.38	79.16 \pm 15.79	78.84 \pm 4.84	84.36 \pm 5.27	86.74 \pm 4.38
	Neutrophilie Segmented	15.20 \pm 7.60	14.26 \pm 3.88	18.84 \pm 14.14	18.76 \pm 5.50	11.84 \pm 4.31	10.64 \pm 4.12
	Neutrophilie Band	0.20 \pm 0.45	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.40 \pm 0.55	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
	Eosinophil	0.80 \pm 0.84	0.60 \pm 0.89	0.80 \pm 0.84	1.00 \pm 0.71	1.40 \pm 0.89	1.20 \pm 0.84
	Basophil	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
	Monocyte	1.20 \pm 1.10	1.42 \pm 0.94	1.20 \pm 1.10	1.00 \pm 1.00	2.40 \pm 1.14	1.42 \pm 1.18
Female							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6.872 \pm 0.343	6.964 \pm 0.577	6.890 \pm 0.390	6.600 \pm 0.314	7.936 \pm 0.191	7.764 \pm 0.355
	Hemoglobin (g/dL)	13.10 \pm 0.62	13.36 \pm 0.95	13.30 \pm 0.70	12.88 \pm 0.40	14.88 \pm 0.55	14.62 \pm 0.13
	Hematocrit (%)	39.42 \pm 1.90	40.42 \pm 2.91	39.78 \pm 1.95	38.58 \pm 1.13	43.68 \pm 1.39	43.28 \pm 1.57
	Reticulocyte (%)	5.78 \pm 0.97	6.68 \pm 1.71	6.14 \pm 1.31	5.96 \pm 1.44	2.50 \pm 0.52	2.46 \pm 0.27
	MCV (fL)	57.38 \pm 0.44	58.12 \pm 2.49	57.78 \pm 1.11	58.50 \pm 1.69	55.04 \pm 2.06	55.76 \pm 1.48
	MCH (pg)	19.04 \pm 0.11	19.22 \pm 0.72	19.28 \pm 0.42	19.50 \pm 0.44	18.76 \pm 0.67	18.84 \pm 0.72
	MCHC (%)	33.20 \pm 0.12	33.04 \pm 0.32	33.38 \pm 0.23	33.38 \pm 0.31	34.06 \pm 0.47	33.78 \pm 1.16
	Platelet ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1193.4 \pm 75.7	1252.2 \pm 343.9	1213.0 \pm 67.5	1262.4 \pm 238.0	1142.2 \pm 125.4	1014.6 \pm 77.8
	PT (sec)	17.46 \pm 0.97	17.36 \pm 0.76	17.24 \pm 0.32	17.24 \pm 0.67	15.76 \pm 0.54	15.68 \pm 0.30
	APTT (sec)	16.44 \pm 1.48	14.48 \pm 2.16	15.72 \pm 2.37	14.96 \pm 1.61	16.56 \pm 0.91	16.86 \pm 1.40
	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10.658 \pm 2.458	10.866 \pm 2.816	11.242 \pm 2.694	10.522 \pm 3.663	6.080 \pm 1.416	6.224 \pm 2.337
	Differential leukocyte counts (%)						
	Lymphocyte	75.10 \pm 11.00	66.86 \pm 7.61	75.00 \pm 12.14	63.14 \pm 11.29	84.50 \pm 5.86	85.38 \pm 2.69
	Neutrophilie Segmented	21.90 \pm 10.91	28.74 \pm 7.61	22.00 \pm 11.38	31.40 \pm 9.52	12.08 \pm 4.80	13.22 \pm 2.77
	Neutrophilie Band	0.60 \pm 0.55	0.20 \pm 0.45	0.40 \pm 0.89	1.02 \pm 2.28	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
	Eosinophil	0.80 \pm 0.84	1.80 \pm 0.84	1.40 \pm 0.89	0.80 \pm 0.45	1.60 \pm 1.14	0.20 \pm 0.45*
	Basophil	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
	Monocyte	1.60 \pm 1.14	2.40 \pm 2.07	1.20 \pm 0.84	3.64 \pm 1.99	1.82 \pm 1.33	1.20 \pm 0.84

Values are expressed as Mean \pm S.D.
Significantly different from 0 mg/kg group; * p <0.05, ** p <0.01

Table 2 Blood chemical examination in rats treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	10	60	300	0	300
Male							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	GOT (U/L)	96.0 ± 19.9	105.4 ± 20.8	99.0 ± 11.3	92.4 ± 10.9	125.6 ± 29.5	148.0 ± 42.1
	GPT (U/L)	32.0 ± 7.9	30.0 ± 6.0	30.0 ± 4.0	28.2 ± 2.0	34.0 ± 9.2	50.2 ± 46.3
	γGT (U/L)	1.2 ± 0.4	2.0 ± 0.0*	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.0	2.2 ± 1.1	1.6 ± 0.5
	ALP (U/L)	377.6 ± 58.0	395.4 ± 91.1	383.6 ± 51.3	304.8 ± 39.7	379.0 ± 67.3	381.2 ± 75.2
	Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
	Urea nitrogen (mg/dL)	12.48 ± 0.93	13.08 ± 0.56	13.34 ± 1.37	16.76 ± 2.06**	14.68 ± 2.07	14.04 ± 1.42
	Creatinine (mg/dL)	0.22 ± 0.04	0.30 ± 0.00*	0.24 ± 0.05	0.28 ± 0.04	0.30 ± 0.00	0.26 ± 0.05
	Glucose (mg/dL)	125.8 ± 10.1	118.0 ± 13.7	121.6 ± 10.1	112.2 ± 13.7	125.2 ± 15.4	117.2 ± 4.2
	Total chol. (mg/dL)	62.0 ± 12.8	66.2 ± 13.8	63.8 ± 13.1	61.2 ± 7.9	67.2 ± 30.3	61.2 ± 12.0
	Triglyceride (mg/dL)	23.0 ± 8.1	20.2 ± 3.3	28.2 ± 12.2	24.4 ± 11.9	26.6 ± 9.9	44.0 ± 30.5
	Total protein (g/dL)	6.64 ± 0.19	6.94 ± 0.13	6.92 ± 0.42	6.70 ± 0.28	6.92 ± 0.37	7.00 ± 0.43
	Albumin (g/dL)	3.06 ± 0.15	3.08 ± 0.13	3.18 ± 0.20	3.08 ± 0.19	3.20 ± 0.10	3.28 ± 0.13
	A/G ratio	0.868 ± 0.098	0.790 ± 0.045	0.856 ± 0.095	0.854 ± 0.048	0.862 ± 0.095	0.878 ± 0.054
	Calcium (mg/dL)	9.98 ± 0.33	10.10 ± 0.21	10.22 ± 0.41	10.04 ± 0.37	10.02 ± 0.22	10.06 ± 0.31
	Inorganic phos. (mg/dL)	7.58 ± 0.32	7.54 ± 0.17	7.90 ± 0.17	7.82 ± 0.42	7.60 ± 0.42	7.78 ± 0.36
	Na (mmol/L)	146.8 ± 0.8	147.0 ± 1.0	147.4 ± 1.5	147.0 ± 1.0	147.0 ± 1.0	146.8 ± 1.3
	K (mmol/L)	4.52 ± 0.28	4.64 ± 0.15	4.58 ± 0.38	4.62 ± 0.20	4.40 ± 0.21	4.52 ± 0.27
	Cl (mmol/L)	105.0 ± 0.7	105.2 ± 0.8	105.6 ± 1.5	103.2 ± 2.4	103.4 ± 1.8	104.6 ± 1.1
Female							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	GOT (U/L)	137.4 ± 22.2	117.8 ± 19.8	123.2 ± 19.0	132.0 ± 23.2	163.4 ± 77.1	127.8 ± 32.1
	GPT (U/L)	54.4 ± 16.6	47.6 ± 12.9	49.8 ± 7.2	79.8 ± 25.3	44.4 ± 30.0	30.0 ± 12.3
	γGT (U/L)	1.6 ± 0.9	1.8 ± 0.8	1.4 ± 0.5	2.0 ± 0.0	1.8 ± 0.4	1.8 ± 0.4
	ALP (U/L)	298.0 ± 45.7	259.6 ± 59.0	313.8 ± 196.4	401.0 ± 86.7	164.2 ± 60.1	138.4 ± 35.4
	Total bilirubin (mg/dL)	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.08 ± 0.04	0.14 ± 0.05	0.10 ± 0.00
	Urea nitrogen (mg/dL)	19.16 ± 1.69	20.56 ± 3.70	18.34 ± 2.02	26.66 ± 2.55**	14.98 ± 2.70	18.68 ± 3.07
	Creatinine (mg/dL)	0.32 ± 0.04	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.36 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	Glucose (mg/dL)	121.8 ± 6.3	125.8 ± 6.2	122.0 ± 6.1	111.2 ± 10.1	135.4 ± 9.4	130.8 ± 14.7
	Total chol. (mg/dL)	77.8 ± 13.9	80.4 ± 14.3	64.8 ± 8.6	79.8 ± 14.4	79.4 ± 18.4	77.8 ± 23.8
	Triglyceride (mg/dL)	76.0 ± 68.8	70.6 ± 13.6	53.0 ± 24.8	62.0 ± 21.8	23.2 ± 6.8	20.6 ± 14.0
	Total protein (g/dL)	6.74 ± 0.33	6.94 ± 0.05	7.10 ± 0.19	6.92 ± 0.26	7.34 ± 0.39	7.48 ± 0.66
	Albumin (g/dL)	3.14 ± 0.18	3.30 ± 0.10	3.34 ± 0.21	3.16 ± 0.28	3.62 ± 0.27	3.64 ± 0.42
	A/G ratio	0.862 ± 0.038	0.906 ± 0.050	0.876 ± 0.076	0.850 ± 0.088	0.972 ± 0.067	0.950 ± 0.068
	Calcium (mg/dL)	10.70 ± 0.31	10.80 ± 0.33	11.02 ± 0.29	13.46 ± 4.45*	10.22 ± 0.29	10.20 ± 0.47
	Inorganic phos. (mg/dL)	9.26 ± 0.31	9.16 ± 0.51	9.64 ± 1.17	9.96 ± 0.38	6.46 ± 0.68	6.44 ± 0.34
	Na (mmol/L)	145.0 ± 1.9	146.2 ± 1.8	146.4 ± 0.9	146.2 ± 1.3	146.0 ± 0.7	145.6 ± 1.5
	K (mmol/L)	4.46 ± 0.21	4.36 ± 0.17	4.32 ± 0.33	4.50 ± 0.25	3.94 ± 0.22	4.02 ± 0.26
	Cl (mmol/L)	101.8 ± 3.4	103.6 ± 2.1	104.4 ± 1.3	104.2 ± 1.8	106.2 ± 2.4	107.8 ± 1.5

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; **p*<0.05, ***p*<0.01

Table 3 Urinalysis of male rats treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period			
		0	10	60	300
Male					
Number of animals		5	5	5	5
pH	5.0	0	0	0	0
	5.5	0	0	0	0
	6.0	0	0	0	0
	6.5	0	0	0	0
	7.0	0	0	0	0
	7.5	0	0	0	0
	8.0	0	0	0	1
	8.5	5	4	2	3
>=9	0	1	3	1	
Protein	-	0	0	0	0
	+/-	0	0	0	0
	1+	3	2	2	4
	2+	2	3	3	1
	3+	0	0	0	0
Glucose	-	5	5	5	5
	+/-	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0
Ketones	-	0	1	0	0
	+/-	0	0	2	2
	1+	4	3	3	3
	2+	1	1	0	0
	3+	0	0	0	0
Bilirubin	-	4	3	3	4
	1+	1	2	2	1
	2+	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0
Occult blood	-	5	5	5	5
	+/-	0	0	0	0
	1+	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0
	3+	0	0	0	0
Urobilinogen (EU/dL)	0.1	0	2	0	2
	1.0	5	3	5	3
	2.0	0	0	0	0
	4.0	0	0	0	0
	>=8	0	0	0	0

Grade; -:negative, +/-:trace, 1+:slight, 2+:moderate, 3+:severe
Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 4 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with *N*-(carboxymethyl)-*N,N*-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
		0	10	60	300	0	300
Male							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	Final body weight (g)	466.0 ± 61.0(7) ^{a)}	465.8 ± 36.3(12)	463.7 ± 39.4(12)	440.3 ± 32.8(7)	490.0 ± 19.8	484.2 ± 28.5
	Absolute organ weight						
	Brain (g)	2.134 ± 0.098	2.150 ± 0.094	2.122 ± 0.025	2.066 ± 0.096	2.158 ± 0.100	2.090 ± 0.086
	Thymus (mg)	327.8 ± 25.9	339.2 ± 75.5	361.6 ± 163.6	232.8 ± 52.3	313.4 ± 53.3	301.2 ± 103.2
	Heart (g)	1.456 ± 0.094	1.512 ± 0.153	1.510 ± 0.170	1.474 ± 0.127	1.626 ± 0.163	1.584 ± 0.169
	Liver (g)	10.962 ± 1.354	11.216 ± 1.198	12.462 ± 2.432	11.244 ± 0.820	12.388 ± 1.914	12.982 ± 1.690
	Spleen (g)	0.700 ± 0.097	0.790 ± 0.039	0.882 ± 0.185	0.718 ± 0.088	0.808 ± 0.149	0.798 ± 0.094
	Kidneys (g)	2.976 ± 0.357	3.130 ± 0.199	2.996 ± 0.170	3.144 ± 0.276	3.246 ± 0.167	3.278 ± 0.179
	Adrenals (mg)	65.00 ± 16.68	68.68 ± 12.79	63.22 ± 5.53	68.56 ± 3.49	59.20 ± 11.37	57.62 ± 9.79
	Testes (g)	3.347 ± 0.316(7)	3.339 ± 0.358(12)	3.484 ± 0.262(12)	3.290 ± 0.740(7)	3.600 ± 0.349	3.628 ± 0.165
	Epididymides (g)	1.304 ± 0.108(7)	1.276 ± 0.116(12)	1.335 ± 0.056(12)	1.259 ± 0.254(7)	1.398 ± 0.112	1.442 ± 0.079
	Relative organ weight						
	Brain (g%)	0.488 ± 0.047	0.458 ± 0.026	0.450 ± 0.054	0.474 ± 0.035	0.442 ± 0.029	0.432 ± 0.019
	Thymus (mg%)	74.96 ± 6.12	72.34 ± 16.33	74.70 ± 26.78	53.00 ± 9.59	63.98 ± 10.91	61.56 ± 17.86
	Heart (g%)	0.334 ± 0.039	0.322 ± 0.018	0.316 ± 0.009	0.338 ± 0.040	0.332 ± 0.031	0.326 ± 0.026
	Liver (g%)	2.492 ± 0.089	2.384 ± 0.118	2.600 ± 0.241	2.578 ± 0.176	2.524 ± 0.342	2.676 ± 0.241
	Spleen (g%)	0.160 ± 0.012	0.168 ± 0.015	0.186 ± 0.042	0.166 ± 0.023	0.164 ± 0.026	0.162 ± 0.019
	Kidneys (g%)	0.678 ± 0.034	0.668 ± 0.045	0.632 ± 0.044	0.720 ± 0.055	0.664 ± 0.021	0.676 ± 0.021
	Adrenals (mg%)	14.66 ± 2.63	14.58 ± 1.99	13.38 ± 1.75	15.72 ± 0.93	12.10 ± 2.36	11.96 ± 2.24
	Testes (g%)	0.727 ± 0.109(7)	0.718 ± 0.071(12)	0.754 ± 0.069(12)	0.746 ± 0.169(7)	0.736 ± 0.077	0.750 ± 0.041
	Epididymides (g%)	0.286 ± 0.046(7)	0.274 ± 0.022(12)	0.290 ± 0.022(12)	0.287 ± 0.054(7)	0.284 ± 0.018	0.298 ± 0.013
Female							
	Number of animals	5	5	5	5	5	5
	Final body weight (g)	306.8 ± 13.3(12) ^{a)}	323.1 ± 25.5(12)	312.5 ± 23.9(12)	319.8 ± 21.1(8)	299.4 ± 20.8	299.0 ± 39.4
	Absolute organ weight						
	Brain (g)	2.072 ± 0.109	1.990 ± 0.065	1.942 ± 0.099	1.952 ± 0.105	1.992 ± 0.041	1.970 ± 0.066
	Thymus (mg)	287.8 ± 108.9	205.2 ± 69.5	239.6 ± 63.5	246.2 ± 72.6	340.2 ± 71.5	272.2 ± 38.2
	Heart (g)	1.000 ± 0.083	1.022 ± 0.108	0.976 ± 0.076	0.996 ± 0.062	0.976 ± 0.050	0.990 ± 0.063
	Liver (g)	10.546 ± 1.329	10.790 ± 0.726	10.022 ± 0.877	11.366 ± 0.619	7.810 ± 0.843	7.986 ± 1.318
	Spleen (g)	0.714 ± 0.074	0.704 ± 0.018	0.714 ± 0.102	0.714 ± 0.119	0.566 ± 0.050	0.560 ± 0.099
	Kidneys (g)	2.054 ± 0.145	2.026 ± 0.101	2.000 ± 0.173	2.084 ± 0.176	1.944 ± 0.178	1.980 ± 0.210
	Adrenals (mg)	76.98 ± 8.12	71.20 ± 3.87	72.18 ± 10.22	74.38 ± 12.55	77.40 ± 6.75	74.02 ± 10.55
	Relative organ weight						
	Brain (g%)	0.686 ± 0.063	0.632 ± 0.067	0.664 ± 0.067	0.626 ± 0.036	0.666 ± 0.054	0.672 ± 0.114
	Thymus (mg%)	95.12 ± 35.19	64.56 ± 22.26	81.28 ± 20.30	78.82 ± 22.68	114.46 ± 27.53	91.24 ± 8.05
	Heart (g%)	0.332 ± 0.011	0.322 ± 0.013	0.336 ± 0.043	0.318 ± 0.023	0.326 ± 0.018	0.334 ± 0.038
	Liver (g%)	3.478 ± 0.288	3.408 ± 0.225	3.416 ± 0.283	3.642 ± 0.180	2.608 ± 0.186	2.660 ± 0.128
	Spleen (g%)	0.234 ± 0.015	0.222 ± 0.022	0.242 ± 0.024	0.230 ± 0.037	0.190 ± 0.028	0.188 ± 0.016
	Kidneys (g%)	0.678 ± 0.023	0.640 ± 0.041	0.682 ± 0.045	0.668 ± 0.058	0.652 ± 0.079	0.664 ± 0.052
	Adrenals (mg%)	25.48 ± 2.84	22.58 ± 2.53	24.72 ± 4.32	23.86 ± 3.98	25.94 ± 2.58	25.02 ± 4.18

a) Number of animals examined.

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group; **p*<0.05, ***p*<0.01

Table 5 Histopathological findings in rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
			0	10	60	300	0	300
	Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5
Male		(Grade)						
	Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Degeneration, myocardium, focal	1+	1			1		
	Lymph node, mandibular		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Lymph node, mesenteric		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Thymus		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Cyst	1+	1			0		
	Spleen		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Bone marrow, femur		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Trachea		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Lung (and bronchus)		<6>	<4>	<0>	<5>	<1>	<0>
	Hemorrhage, focal	1+	0	2		1	1	
	Metaplasia, osseous	1+	1	0		1	0	
	Stomach		<5>	<5>	<5>	<7>	<5>	<5>
	Cell infiltration, inflammatory, forestomach, diffuse	1+	0	0	0	5	0	0
		2+	0	0	0	1	0	0
	Edema, forestomach	1+	0	0	0	5	0	0
		2+	0	0	0	1	0	0
	Erosion, forestomach	1+	0	0	0	3	0	0
	Hyperkeratosis, forestomach	1+	0	0	0	3	0	0
		2+	0	0	0	3	0	0
	Hyperplasia, squamous, forestomach	1+	0	0	0	3	0	1
		2+	0	0	0	3	0	0
		3+	0	0	0	1	0	0
	Parakeratosis, forestomach	1+	0	0	0	4	0	0
	Small intestine, duodenum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Small intestine, jejunum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Small intestine, ileum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Large intestine, cecum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Large intestine, colon		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Large intestine, rectum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Liver		<5>	<0>	<1>	<5>	<0>	<0>
	Cell infiltration, inflammatory, focal	1+	3		1	2		
	Kidney		<5>	<5>	<6>	<5>	<5>	<5>
	Basophilic tubule, proximal tubule	1+	5	2	4	2	2	1
	Cast, hyaline	1+	1	0	0	0	0	0
	Cyst	1+	1	0	1	0	0	0
	Hyaline droplet, proximal tubule	1+	0	0	0	1	0	1
	Hyperplasia, pelvic epithelium	1+	0	0	4*	3	0	0
	Mineralization, cortex	1+	1	0	0	0	1	0
	Mineralization, papilla	1+	2	1	1	0	0	1

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe, total: total of positive grade

Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 5 (Continued)

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period	
			0	10	60	300	0	300
	Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5
Male		(Grade)						
	Urinary bladder		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
	Hyperplasia, mucosal epithelium	1+	0	0	5]**	0]**	0	5]**
		2+	0	0	0	5	0	0
	Testis		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Atrophy, seminiferous tubule, diffuse	2+	0			1		
	Atrophy, seminiferous tubule, focal	2+	1			0		
	Epididymis		<5>	<0>	<1>	<5>	<0>	<0>
	Cell debris, duct	1+	1		0	1		
	Decrease, sperm, duct	1+	1		0	0		
		2+	0		0	1		
	Granuloma, spermatic	1+	1		1	0		
	Seminal vesicle		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Prostate		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Cell infiltration, lymphocyte, interstitium	1+	2			1		
		2+	1			0		
	Pituitary		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Thyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Ultimobrancheal remnant	1+	3			1		
	Parathyroid		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Adrenal		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Accessory adrenocortical tissue	1+	1			0		
	Hypertrophy, cortical cell, glomerular zone, focal	1+	1			0		
	Brain		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Spinal cord		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Sciatic nerve		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>
	Skin		<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>

< >: Number of animals examined.
 Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe, total: total of positive grade
 Significantly different from 0 mg/kg group; *p<0.05, **p<0.01

Table 5 (Continued)

Sex	Organ	Dose level (mg/kg)	Administration period				Recovery period		Death	Total litter loss
			0	10	60	300	0	300	300	300
	Finding	Number of animals	7	12	12	7	5	5	2	1
Female		(Grade)								
	Heart		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Lymph node, mandibular		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Lymph node, mesenteric		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Thymus		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<2>	<1>
	Atrophy	1+	0	0	0	0	0	0	1	1
	Hemorrhage	1+	0	0	0	0	0	0	1	0
	Spleen		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Extramedullary hematopoiesis	1+	4			5			0	0
	Atrophy, white pulp	1+	0			0			1	0
	Bone marrow, femur		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Trachea		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Cell infiltration, inflammatory, lamina propria	2+	0			0			1	0
	Necrosis, mucosal epithelium	3+	0			0			1	0
	Lung (and bronchus)		<6>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Cell infiltration, inflammatory, focal	1+	1			0			0	0
	Hemorrhage, focal	1+	1			0			0	0
	Congestion	2+	0			0			1	0
	Edema	1+	0			0			1	0
	Thrombus	1+	0			0			1	0
	Stomach		<5>	<5>	<5>	<8>	<5>	<5>	<2>	<1>
	Cell infiltration, inflammatory, forestomach, diffuse	1+	0	0	0	6	0	0	0	0
		2+	0	0	0	1	0	0	0	1
	Edema, forestomach	1+	0	0	0	5*	0	0	0	0
	Erosion, forestomach	1+	0	0	0	3	0	0	1	1
	Hyperkeratosis, forestomach	1+	0	0	0	7	0	0	0	0
		2+	0	0	0	0	0	0	2	1
	Hyperplasia, squamous, forestomach	1+	0	0	0	1	0	0	2	1
		2+	0	0	0	6	0	0	0	0
	Mineralization, glandular stomach	1+	0	0	0	1	0	0	0	0
	Parakeratosis, forestomach	1+	0	0	0	2	0	0	1	0
		2+	0	0	0	0	0	0	0	1
	Atrophy, mucosa, glandular stomach	1+	0	0	0	0	0	0	0	1
	Small intestine, duodenum		<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<2>	<1>
	Hyperplasia, mucosal epithelium	1+	0	0	0	0	0	0	0	1
	Small intestine, jejunum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<0>	<1>
	Small intestine, ileum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<0>	<1>
	Large intestine, cecum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<1>	<1>
	Large intestine, colon		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
	Large intestine, rectum		<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe, total: total of positive grade

Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 5 (Continued)

Sex			Administration period				Recovery period		Death	Total litter loss
			0	10	60	300	0	300	300	300
Organ	Dose level (mg/kg)									
Finding	Number of animals									
			7	12	12	7	5	5	2	1
Female	(Grade)									
Liver			<5>	<1>	<0>	<5>	<1>	<0>	<2>	<1>
Cell infiltration, inflammatory, focal	1+		0	0	0	1	0	0	0	0
Hemorrhage, focal	1+		0	0	0	0	1	0	0	0
Thrombus, central vein	2+		0	0	0	0	0	0	1	0
Vacuolation, hepatocyte, diffuse	2+		0	0	0	0	0	0	0	1
Kidney			<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<1>	<5>
Basophilic tubule, proximal tubule	1+		0	2	1	3	2	2	0	1
	2+		0	0	0	1	0	0	0	0
Degeneration/necrosis, tubular epithelium	1+		0	0	4*	4*	0	0	0	1
Hyperplasia, pelvic epithelium	1+		0	0	1	3	0	1	0	1
Mineralization, papilla	1+		0	0	1	1	2	0	0	0
Vacuolation, proximal tubule	1+		0	0	0	0	0	0	0	1
Urinary bladder			<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>	<1>	<1>
Hyperplasia, mucosal epithelium	1+		0	0	5**	0**	0	5**	1	1
	2+		0	0	0	5	0	0	0	0
Ovary			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Uterus			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Hemorrhage	1+		0			0			1	0
Vagina			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Pituitary			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Cystic dilatation, Rathke's pouch	1+		0			1			0	0
Thyroid			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<0>	<1>
Ectopic thymic tissue	1+		1			0				0
Ultimobrancheal remnant	1+		3			1				1
Parathyroid			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Adrenal			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Necrosis, focal	1+		0			0			1	0
Hypertrophy, fascicular zone	1+		0			0			0	1
Brain			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Spinal cord			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Sciatic nerve			<5>	<0>	<0>	<5>	<0>	<0>	<2>	<1>
Skin			<0>	<1>	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>	<0>
Atrophy, hair follicle	1+			1						

<>: Number of animals examined.

Grade; 1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe, total: total of positive grade

Significantly different from 0 mg/kg group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 6 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Administration period			
	0	10	60	300
Number of pairs examined	12	12	12	12
Estrous cycle	4.00 ± 0.00	4.08 ± 0.29	4.00 ± 0.00	4.05 ± 0.15
Irregular estrous cycle	0/12	0/12	0/12	1/12
Number of pairs with successful mating	12	12	12	12
Mating index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	12	12	12	11
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	91.7
Pairing days until mating	2.4 ± 1.1	2.3 ± 1.1	2.9 ± 1.2	3.1 ± 1.0
Number of estrous stages without mating	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

a) Mating index (%) = (Number of pairs with successful mating/number of pairs examined) × 100
 b) Fertility index (%) = (Number of pregnant animals/number of pairs with successful mating) × 100
 Values are expressed as Mean ± S.D.
 Significantly different from 0 mg/kg group; **p*<0.05, ***p*<0.01

Table 7 Delivery and litter data in rats treated orally with N-(carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg)	Administration period					
	0	10	60	300		
Number of females examined	12	12	12	11		
Number of females with live pups	12	12	12	9		
Gestation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	81.8		
Gestation length (days)	22.4 ± 0.5	22.8 ± 0.5	22.6 ± 0.5	23.1 ± 0.3**		
Number of corpora lutea	16.8 ± 1.9	15.8 ± 1.6	14.4 ± 2.9	15.7 ± 1.1		
Number of implantation sites	16.3 ± 2.0	15.6 ± 1.6	14.1 ± 3.0	15.3 ± 1.2		
Implantation index (%) ^{b)}	96.51 ± 4.21	98.46 ± 2.80	97.40 ± 4.95	97.15 ± 4.43		
Delivery index (%) ^{c)}	94.88 ± 4.83	84.43 ± 17.73	89.79 ± 12.20	86.40 ± 7.86		
Number of pups delivered	15.4 ± 2.0	13.3 ± 3.3	12.8 ± 3.6	13.1 ± 1.3*		
Number of live pups on day 0	15.0 ± 2.1	13.3 ± 3.3	12.8 ± 3.6	10.8 ± 4.6		
Live birth index (%) ^{d)}	97.22 ± 5.56	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	83.01 ± 34.61		
Sex ratio (male/female)	0.89(87/98)	0.89(75/84)	0.83(70/84)	0.95(55/58)		
Number of live pups on day 4	14.9 ± 2.1	13.3 ± 3.3	12.8 ± 3.6	12.0 ± 2.7		
Viability index on day 4 (%) ^{e)}	99.51 ± 1.70	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	98.21 ± 5.06		
Body weight of pups (g)	on day 0	male	6.5 ± 0.6	7.0 ± 1.1	6.9 ± 0.8	7.4 ± 0.4
		female	6.0 ± 0.5	6.6 ± 1.1	6.5 ± 0.7	6.8 ± 0.7
	on day 4	male	10.4 ± 0.9	11.6 ± 2.0	11.4 ± 1.8	11.9 ± 1.0
		female	9.8 ± 0.8	11.1 ± 2.0	10.8 ± 1.7	11.1 ± 1.1
Body weight gain of pups (g)	day 0 to 4	male	3.9 ± 0.5	4.5 ± 1.0	4.5 ± 1.1	4.5 ± 0.9
		female	3.7 ± 0.5	4.5 ± 1.0	4.3 ± 1.2	4.3 ± 0.8

a) Gestation index (%) = (Number of females with live pups/number of pregnant females) × 100
 b) Implantation index (%) = (Number of implantation sites/number of corpora lutea) × 100
 c) Delivery index (%) = (Number of pups delivered/number of implantation sites) × 100
 d) Live birth index (%) = (Number of live pups on day 0/number of pups delivered) × 100
 e) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4/number of live pups on day 0) × 100
 Values are expressed as Mean ± S.D.
 Significantly different from 0 mg/kg group; **p*<0.05, ***p*<0.01

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 2-Hydroxyethyl methacrylate on Bacteria

要約

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*^{2,3)}の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験ではS9 mix 無添加試験および添加試験を313~5000 µg/プレートの範囲で実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。試験に際して、ニュートリエントブロス No. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステル(CAS No. 868-77-9)は、分子量 130.16 の無色透明液体である。用いた被験物質は、(株)日本触媒製造、ロット番号 5P05LA、純度 97.6 wt% [不純物:0.2-0.3% エチレングリコールジ

メタクリレート, 2.0-2.5% ジエチレングリコールモノメタクリレート, 50 ppm メトキノン(重合防止剤)] であり、(株)日本触媒から供与された。被験物質は、使用時まで冷蔵した。なお、試験終了後に(株)日本触媒において、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 97.3 wt% であった。メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルは、局方注射用水(ロット番号:K5A80, (株)大塚製薬工場)に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(上野製薬(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2 および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 mix の組成〕

1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco) 0.6%

塩化ナトリウム 0.5%

(B)* L-ヒスチジン 0.5 mM

D-ビオチン 0.5 mM

*:WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物 0.2 g

クエン酸・1水和物 2 g

リン酸水素二カリウム 10 g

リン酸一アンモニウム 1.92 g

水酸化ナトリウム 0.66 g

グルコース 20 g

バクトアガー(Difco) 15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 mix

1 ml 中下記の成分を含む

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB) および 5, 6-ベンゾフラボン(BF) の併用投与で酵素誘導して作製した S9 を用いた。

〔試験方法〕

プレインキュベーション法⁹⁾により, S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に, 被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml), 検定菌液 0.1 ml を混合し, 37°C で 20 分間往復振とう培養したのち, トップアガー 2 ml を加えて混和し, 合成培地平板上に流して固めた。また, 対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は, 同時に実施した他の試験と共通とした。培養は 37°C で 48 時間行い, 生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については, 肉眼的あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては, 溶媒および陽性対照群では 3 枚ずつ, 各用量については 1 枚ずつとした。また, 本試験においては, 両対照群および各用量につき, 3 枚ずつを用い, それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は 1 回, 本試験は同一用量について 2 回実施し, 結果の再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

用いた 5 種の検定菌のうち, 1 種以上の検定菌の S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において, 被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が, 溶媒対照のそれに比べて 2 倍以上に増加し, かつ, その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に, 当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。ただし, 2 回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の 2 倍以上となる用量が認められた場合において, その溶媒対照値が 10 以下であり, 変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルについて 50~5000 μ g/プレート の範囲で公比を約 3 として, 用量設定試験を実施した。その結果, すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

したがって, 本試験における最高用量は, S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 μ g/プレートとした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で, とともに 313~5000 μ g/プレート の範囲で公比を 2 として 2 回の本試験を実施した (Table 1, 2)。その結果, いずれの検定菌においても, 溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは, 用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 4) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K.H. Norpoth, R.C. Garner, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 秦野市落合 729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,
Kumiko Kawakami
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan
Tel +81-463-82-4751 FAX +81-463-82-9627

Table 1. Mutagenicity of 2-hydroxyethyl methacrylate in reverse mutation test (I) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	154 171 159 (161 \pm 8.7)	13 7 12 (11 \pm 3.2)	28 26 29 (28 \pm 1.5)	25 33 27 (28 \pm 4.2)	11 15 10 (12 \pm 2.6)	
	313	141 158 160 (153 \pm 10.4)	13 9 10 (11 \pm 2.1)	31 33 30 (31 \pm 1.5)	23 28 19 (23 \pm 4.5)	11 8 10 (10 \pm 1.5)	
	625	141 147 139 (142 \pm 4.2)	12 14 12 (13 \pm 1.2)	30 34 31 (32 \pm 2.1)	27 20 20 (22 \pm 4.0)	9 12 8 (10 \pm 2.1)	
	1250	151 133 149 (144 \pm 9.9)	9 17 9 (12 \pm 4.6)	31 37 22 (30 \pm 7.5)	12 19 18 (16 \pm 3.8)	14 8 9 (10 \pm 3.2)	
	2500	137 137 157 (144 \pm 11.5)	12 15 13 (13 \pm 1.5)	30 26 20 (25 \pm 5.0)	28 20 18 (22 \pm 5.3)	12 9 12 (11 \pm 1.7)	
	5000	154 141 160 (152 \pm 9.7)	12 10 19 (14 \pm 4.7)	29 26 23 (26 \pm 3.0)	25 33 23 (27 \pm 5.3)	15 12 15 (14 \pm 1.7)	
S9 mix (+)	0	156 193 150 (166 \pm 23.3)	11 10 9 (10 \pm 1.0)	40 39 40 (40 \pm 0.6)	44 26 36 (35 \pm 9.0)	11 20 9 (13 \pm 5.9)	
	313	129 162 154 (148 \pm 17.2)	11 15 13 (13 \pm 2.0)	27 27 35 (30 \pm 4.6)	20 29 33 (27 \pm 6.7)	15 13 8 (12 \pm 3.6)	
	625	157 183 181 (174 \pm 14.5)	14 13 8 (12 \pm 3.2)	48 36 31 (38 \pm 8.7)	25 35 37 (32 \pm 6.4)	12 15 7 (11 \pm 4.0)	
	1250	177 180 182 (180 \pm 2.5)	14 9 11 (11 \pm 2.5)	36 28 41 (35 \pm 6.6)	34 30 27 (30 \pm 3.5)	8 11 10 (10 \pm 1.5)	
	2500	172 177 172 (174 \pm 2.9)	13 10 12 (12 \pm 1.5)	33 40 29 (34 \pm 5.6)	22 30 36 (29 \pm 7.0)	6 10 8 (8 \pm 2.0)	
	5000	162 175 160 (166 \pm 8.1)	15 11 15 (14 \pm 2.3)	37 30 33 (33 \pm 3.5)	30 30 34 (31 \pm 2.3)	9 11 12 (11 \pm 1.5)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	689 685 779 (718 \pm 53.2)	262 272 295 (276 \pm 16.9)	337 289 301 (309 \pm 25.0)	688 663 721 (691 \pm 29.1)	1291 1123 1369 (1261 \pm 125.7)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	755 927 1012 (898 \pm 130.9)	300 298 262 (287 \pm 21.4)	582 746 652 (660 \pm 82.3)	298 332 304 (311 \pm 18.1)	367 346 313 (342 \pm 27.2)	

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
Purity was 97.6 wt% and 0.2-0.3 % ethylene glycol dimethacrylate, 2.0-2.5 % diethylene glycol monomethacrylate and
50 ppm methoquinone were contained as impurities.

Table 2. Mutagenicity of 2-hydroxyethyl methacrylate in reverse mutation test (II) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)														
		Base-pair substitution type						Frameshift type								
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98		TA1537			
S9 mix (-)	0	140	125	147	11	18	13	25	27	23	20	31	20	12	14	11
		(137 \pm 11.2)			(14 \pm 3.6)			(25 \pm 2.0)			(24 \pm 6.4)		(12 \pm 1.5)			
	313	124	122	145	13	10	19	26	22	28	31	19	33	4	8	9
		(130 \pm 12.7)			(14 \pm 4.6)			(25 \pm 3.1)			(28 \pm 7.6)		(7 \pm 2.6)			
	625	116	104	169	8	8	10	26	26	25	26	26	19	14	6	6
		(130 \pm 34.6)			(9 \pm 1.2)			(26 \pm 0.6)			(24 \pm 4.0)		(9 \pm 4.6)			
	1250	108	118	116	14	10	13	23	20	26	30	22	14	7	5	11
	(114 \pm 5.3)			(12 \pm 2.1)			(23 \pm 3.0)			(22 \pm 8.0)		(8 \pm 3.1)				
S9 mix (+)	2500	151	141	139	19	10	8	17	20	26	22	15	25	5	7	12
		(144 \pm 6.4)			(12 \pm 5.9)			(21 \pm 4.6)			(21 \pm 5.1)		(8 \pm 3.6)			
	5000	149	134	151	10	9	10	20	27	31	20	27	30	8	12	9
		(145 \pm 9.3)			(10 \pm 0.6)			(26 \pm 5.6)			(26 \pm 5.1)		(10 \pm 2.1)			
S9 mix (+)	0	141	115	140	9	14	11	37	26	28	34	22	31	9	5	8
		(132 \pm 14.7)			(11 \pm 2.5)			(30 \pm 5.9)			(29 \pm 6.2)		(7 \pm 2.1)			
	313	141	138	137	6	11	7	37	23	29	38	30	21	6	8	6
		(139 \pm 2.1)			(8 \pm 2.6)			(30 \pm 7.0)			(30 \pm 8.5)		(7 \pm 1.2)			
	625	128	147	131	10	18	17	22	30	29	26	27	28	12	3	5
		(135 \pm 10.2)			(15 \pm 4.4)			(27 \pm 4.4)			(27 \pm 1.0)		(7 \pm 4.7)			
	1250	140	170	143	10	20	13	35	31	21	24	24	21	5	8	15
	(151 \pm 16.5)			(14 \pm 5.1)			(29 \pm 7.2)			(23 \pm 1.7)		(9 \pm 5.1)				
S9 mix (+)	2500	159	151	146	10	12	17	30	35	29	24	28	29	12	10	8
		(152 \pm 6.6)			(13 \pm 3.6)			(31 \pm 3.2)			(27 \pm 2.6)		(10 \pm 2.0)			
	5000	146	173	170	5	10	15	26	38	33	28	27	32	8	8	8
		(163 \pm 14.8)			(10 \pm 5.0)			(32 \pm 6.0)			(29 \pm 2.6)		(8 \pm 0.0)			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2		9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1		80			
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	644	728	760	347	386	359	483	487	475	672	665	608	1320	1043	1130
		(711 \pm 59.9)			(364 \pm 20.0)			(482 \pm 6.1)			(648 \pm 35.1)		(1164 \pm 141.7)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA		2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5		2			
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	658	680	770	310	335	315	473	407	420	281	255	313	269	274	260
		(703 \pm 59.3)			(320 \pm 13.2)			(433 \pm 35.0)			(283 \pm 29.1)		(268 \pm 7.1)			

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
Purity was 97.6 wt% and 0.2-0.3 % ethylene glycol dimethacrylate, 2.0-2.5 % diethylene glycol monomethacrylate and 50 ppm methoquinone were contained as impurities.

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの
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
2-Hydroxyethyl methacrylate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU) を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理 (24 時間) および短時間処理 (6 時間) ともに 1.3 mg/ml (10 mM) においても 50% を超える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において 1.3 mg/ml の濃度を最高処理濃度として、連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では、公比 2 で 4 濃度、短時間処理の S9 mix 非存在下では、公比 2 で 3 濃度設定した。なお、48 時間連続処理の濃度は、24 時間連続処理と同じ濃度に設定した。連続処理では、S9 mix 非存在下で 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。染色体分析が可能な最高濃度は、24 時間連続処理と短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では 1.3 mg/ml (10 mM)、48 時間連続処理では 0.65 mg/ml であったことから、これらの濃度を高濃度群として 3 濃度群を観察対象とした。

CHL/IU 細胞を 24 時間連続処理した高濃度群 (1.3 mg/ml) では、細胞毒性のため染色体の構造異常および倍数性細胞について規定の細胞数が観察できなかったが、中濃度群 (0.65 mg/ml) および高濃度群 (1.3 mg/ml) において染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その頻度は 10.0% および 70.6% であった。一方、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。48 時間連続処理したすべての処理群において、染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その頻度は 6.0~84.0% であった。また、高濃度群 (0.65 mg/ml) において、観察した細胞の 3.25% に倍数性細胞が認められた。短時間処理では、S9 mix 非存在下において、いずれの処理群でも染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。一方、低濃度群 (0.33 mg/ml) および高濃度群 (1.3 mg/ml) において観察した細胞の 0.88% および 6.13% に倍数性細胞が誘発された。S9 mix 存在下では、高濃度群 (1.3 mg/ml) において観察した細胞の 13.0% に染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発された。また、中濃度群 (0.65 mg/ml) において観察した細胞の 1.25% に倍数性細胞の誘発作用が認められたが、傾向性検定では有意差は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下でメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは、染色体異常を誘発する (陽性) 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: Cansera International) 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

2×10^4 個の CHL/IU 細胞を、培養液 5 ml を入れたデッシュ (径 6 cm, Corning) に播き、37°C の CO₂ インキュベーター (5% CO₂) 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

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステル (略号: HEMA, CAS No.: 868-77-9, ロット番号: 5P05LA, (株) 日本触媒) は、無色透明液体で、水に対しては 54.5 mg/ml, DMSO では 50 mg/ml, アセトンでは 50 mg/ml で溶解し、融点 -10°C 以下, 沸点 87°C (5 mmHg) で、分子式 C₆H₁₀O₃, 分子量 130.16, 純度 97.6 wt% (不純物としてエチレングリコールジメタクリレート 0.2-0.3%, ジエチレングリコールモノメタクリレート 2.0-2.5%, メトキノン (重合防止剤) 50 ppm を含む) の物質である。

被験物質原体は、熱, 光, 過酸化物などによって重合が起こることがある。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用蒸留水 (株) 大塚製薬工場) 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

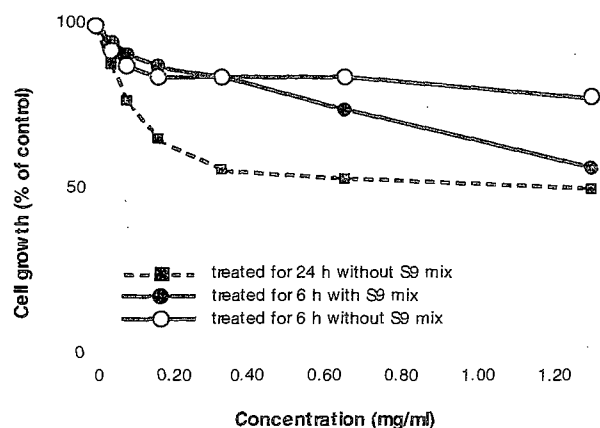


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-hydroxyethyl methacrylate

は、すべての試験において培養液の 10%(v/v) になるように加えた。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

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、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で 50% を明らかに越える増殖抑制作用は認められなかった (Fig. 1)。

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、短時間処理ともに 1.3 mg/ml (10 mM) とし、連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では、公比 2 で 4 濃度を設定 (0.16, 0.33, 0.65, 1.3 mg/ml) し、短時間処理の S9 mix 非存在下では、公比 2 で 3 濃度設定した (0.33, 0.65, 1.3 mg/ml)。なお、連続処理の 48 時間処理群の濃度は、24 時間処理群と同じ濃度に設定した。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。

染色体異常試験においては 1 濃度あたり 4 枚ディッシュを用い、そのうちの 2 枚は染色体標本作製し、別の 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッ

シにつぎ 6 枚作製した。作製した標本を 3% ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20% 以上の相対増殖率で、かつ 2 ディッシュともに 0.5% 以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の 3 濃度群を決定した。その結果 (Table 1, 2), 24 時間連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では 1.3 mg/ml (10 mM) が、48 時間連続処理においては 0.65 mg/ml が染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む 3 濃度群を観察対象とした。

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) 研究会¹⁾ 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 (polyploid) 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、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法²⁾ (多重性を考慮して familywise の有意水準を 5% とした) により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³⁾ ($p < 0.05$) を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

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。メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルを加えて 24 時間連続処理した高濃度群 (1.3 mg/ml) では、細胞毒性のため染色体の構造異常および倍数性細胞について規定の細胞数が観察できなかったが、中濃度群 (0.65 mg/ml) および高濃度群 (1.3 mg/ml) において染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その頻度は 10.0% および 70.6% であった。一方、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。48 時間連続処理したすべての処理群において、染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その頻度は 6.0 ~ 84.0% であった。また、高濃度群 (0.65 mg/ml) において、観察した細胞の 3.25% に倍数性細胞が認められ、傾向性検定の結果、有意差が認められた。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルを加えて S9 mix 非存在下における短時間処理では、いずれの処理群でも染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。一方、低濃度群 (0.33 mg/ml) および高濃度群 (1.3 mg/ml) において観察した細胞の 0.88% および 6.13% に倍数性細胞が誘発され、傾向性検定の結果、有意差が認められた。

S9 mix 存在下では、高濃度群 (1.3 mg/ml) において観察した細胞の 13.0% に染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発された。また、中濃度群 (0.65 mg/ml) において観察した細胞の 1.25% に倍数性細胞の誘発作用が認められたが、傾向性検定では有意差は認められなかった。

従って、メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは、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すると結論した。

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, 東京, 1988.
- 2) 吉村 功編, "毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ," サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編, "毒性試験講座 14, 毒性試験データの統計解析," 地人書館, 東京, 1992, pp.218-223.

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, 水谷正寛,
澁谷 徹, 橋本恵子, 出石由紀
(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,
Masahiro Mizutani, Tohru Shibuya,
Keiko Hashimoto, Yuki Izushi
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

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2- hydroxyethyl methacrylate (HEMA)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Trend test ⁵⁾		Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		with aberrations TAG (%)	Polyploid ⁴⁾ TA (%)	Polyploid ⁴⁾ (%)	SA	NA	
Control			200	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.50			-
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.75			100.0
HEMA	0.33	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			70.0
HEMA	0.65	24	200	14	8	1	0	0	0	23	0	20*(10.0)	8 (4.0)	0.63	+	NT	64.5
HEMA	1.3	24	177	40	228	34	1	0	110	413	2	125*(70.6)	112 (63.3)	0.28 ⁷⁾			46.5
MC	0.00005	24	200	8	70	145	2	1	0	226	0	113 (56.5)	112 (56.0)	0.38			-
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			100.0
HEMA	0.16	48	200	6	4	0	2	0	0	12	0	12*(6.0)	6 (3.0)	0.50			59.5
HEMA	0.33	48	200	15	5	1	2	0	0	23	0	20*(10.0)	7 (3.5)	0.63	+	+	69.5
HEMA	0.65	48	200	102	329	51	6	1	120	609	1	168*(84.0)	153 (76.5)	3.25*			79.0
HEMA	1.3***	48	-											-			0.0
MC	0.00005	48	200	5	51	118	10	4	30	218	0	93 (46.5)	92 (46.0)	1.38			-

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), 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, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than nine 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)Cochran · Armitage's trend test was done at p<0.05. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7)Seven hundred and two cells were analysed. *:Significantly different from historical solvent control data (p<0.05) by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **:Purity of test substance was 97.6 wt%. Ethylene glycol dimethacrylate (0.2 - 0.3%), diethylene glycol monomethacrylate (2.0 - 2.5%) and methoquinone (50 ppm) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2- hydroxyethyl methacrylate (HEMA)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Trend test ⁵⁾		Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		with aberrations TAG (%)	Polyploid ⁴⁾ TA (%)	Polyploid ⁴⁾ (%)	SA	NA	
Control				200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38			-
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			100.0
HEMA	0.33	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.88*			84.0
HEMA	0.65	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50	NT	+	83.5
HEMA	1.3	-	6-(18)	200	1	0	2	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	6.13*			86.5
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.50			-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			100.0
HEMA	0.33	+	6-(18)	200	0	2	1	2	0	0	5	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.88			80.0
HEMA	0.65	+	6-(18)	200	1	2	5	0	0	0	8	0	6 (3.0)	5 (2.5)	1.25*	+	-	70.0
HEMA	1.3	+	6-(18)	200	4	11	16	0	0	0	31	0	26*(13.0)	22 (11.0)	0.88			58.0
CPA	0.005	+	6-(18)	200	13	43	90	1	1	0	148	0	83 (41.5)	77 (38.5)	0.50			-

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), 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, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than nine 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)Cochran · Armitage's trend test was done at p<0.05. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. *:Significantly different from historical solvent control data at p<0.05 by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **:Purity of test substance was 97.6 wt%. Ethylene glycol dimethacrylate (0.2 - 0.3%), diethylene glycol monomethacrylate (2.0 - 2.5%) and methoquinone (50 ppm) were contained as impurities.