

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの
ラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of
2-Hydroxyethyl methacrylate by Oral Administration in Rats

要約

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する反復投与による一般毒性学的な影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検討した。投与量は、1000 mg/kg を最高用量とし、以下 300, 100 および 30 mg/kg とした。対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。

1. 反復投与毒性

雄においては、一般状態では 1000 mg/kg 群で流産がみられ、1/12 例が死亡した。体重は、1000 mg/kg 群で増加抑制がみられた。摂餌量は、1000 mg/kg 群で減少がみられた。血液学検査では、各投与群とも各検査項目に投与による変動はみられなかった。血液生化学検査では、30 mg/kg 以上の群で尿素窒素の高値あるいはその傾向、1000 mg/kg 群で K, Cl および無機リンの高値およびトリグリセライドの低値がみられた。剖検では、各投与群とも、投与による影響はみられなかった。死亡例では、胸腺および肺の暗赤色化、副腎の肥大がみられた。器官重量では、100 mg/kg 以上の群で腎臓の相対重量の高値、1000 mg/kg 群で肝臓の相対重量の高値がみられた。病理組織学検査では、1000 mg/kg 群で腎臓に尿細管拡張および集合管拡張がみられた。しかし、死亡例においては投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

雌においては、一般状態では 1000 mg/kg 群で流産、自発運動の低下、腹臥、流涙、被毛の汚れ、表皮温下降および呼吸緩徐がみられ、6/12 例が死亡した。体重は、1000 mg/kg 群で交配前投与期間に増加抑制がみられた。摂餌量は、1000 mg/kg 群で交配前投与期間に減少がみられた。剖検所見では、1000 mg/kg 群で胸腺の萎縮および副腎の肥大がみられた。死亡例では、胸腺の萎縮、肺の暗赤色化、脾臓の萎縮、副腎の肥大、腺胃粘膜の暗赤色化および小腸の暗赤色化がみられた。器官重量では、100 mg/kg 以上の群で腎臓の絶対重量の高値あるいはその傾向、1000 mg/kg 群で腎臓の絶対・相対重量の高値がみられた。病理組織学検査では、1000 mg/kg 群で腎臓に髄質および乳頭部への好中球浸潤、脳に延髄の広範な軟化がみられた。死亡例においては、脾臓の萎縮、副腎の束状帯の過形成など死戦期のストレスに起因すると思われる変化がみられた。

2. 生殖発生毒性

発情回数、交尾率、交尾日数、受胎雌数、妊娠期間および受胎率では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。また、分娩状態にも異常はみられなかった。黄体数、着床痕数、着床率および出産率では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。

総出産児数、分娩率、哺育0日の新生児数、児の産出率、死産児数、出生率、性比、哺育4日の新生児数、哺育4日の生存率では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。外表観察では、いずれの群においても異常はみられなかった。体重では、各投与群の雌雄とも哺育0日および哺育4日とも対照群との間に差はみられなかった。一般状態では、対照群および各投与群とも異常症状はみられなかった。また、剖検では、いずれの群においても異常はみられなかった。

以上のことから、当該試験条件下におけるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの一般毒性学的無影響量は、雄では 30 mg/kg 投与により尿素窒素の高値が認められたことから 30 mg/kg/day 未満、雌では 100 mg/kg 投与により腎臓の相対重量の高値が認められたことから 30 mg/kg/day と考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、いずれの項目にも影響が認められなかったことから雌雄の生殖および児動物の発生とも 1000 mg/kg/day と推察される。

方法

1. 被験物質、媒体および投与検体

被験物質のメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは、分子量:130.16、融点:-10℃以下、沸点:87℃の無色透明の液体であり、水およびアセトンにきわめて溶けやすい(Lot No. 5P05LA、製造元:(株)日本触媒、純度:97.6%、ただし、不純物としてエチレングリコールジメタクリレート を 0.2~0.3%、ジエチレングリコールモノメタクリレートを 2.0~2.5%含有)。入手後は、冷蔵・遮光・気密条件下で保管した。なお、投与期間終了後に被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、使用期間中の安定性が確認された。

被験物質は、注射用水に溶解して調製した。なお、2, 20 および 200 mg/ml の調製液は、調製後冷蔵・遮光条件下で7日間、さらに室温・遮光条件下で4時間保存しても安定性に問題のないことが確認されていたため、各濃度の調製液は調製後、冷蔵・遮光条件下で保管し、調製後7日以内に使用した。被験物質は純度による換算を

行って調製した。

2. 使用動物および飼育条件

8週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット [Crj:CD(SD), (SPF)] を日本チャールス・リバー(株)から購入した。入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後7日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物を群分けして試験に用いた。群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与開始日に行った。1群の動物数は、雌雄各12匹とした。

動物は、室温20～24℃、湿度40～70%、明暗各12時間(照明:午前6時～午後6時)、換気回数12回/時に設定した飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージを用いて1ケージあたり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージを用いて個別飼育した。ただし、交配はステンレス製懸垂式ケージ内で行った。また、母動物は、妊娠18日にオートクレーブ処理した床敷(サンフレック、日本チャールス・リバー(株))を入れたプラスチック製ケージに個別に移し、自然分娩および哺育をさせた。飼料は固型飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業(株))を、飲料水は水道水をいずれも自由に摂取させた。なお、剖検前日の午後4時から絶食とした。

3. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

投与経路は経口投与を選択した。投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたプラスチック製ディスプレイ注射筒を用いて、強制経口投与した。投与量は、雄では投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を、妊娠期間中は妊娠0、7、14および21日の体重を、授乳期間中は哺育0日の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。投与回数は1日1回とした。投与開始日の週齢は雌雄とも10週齢であり、体重範囲は雄が341～380 g、雌が232～256 gであった。

投与量は、先に実施した雄ラットを用いた2週間経口投与による予備試験(投与段階:0, 30, 100, 300 および1000 mg/kg、各群5例)の結果により決定した。すなわち、1000 mg/kg群で投与直後に流涎がみられたのみで、各群とも死亡発現はなく、体重推移および剖検でも異常は認められなかった。そこで、当試験の投与量は、1000 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3で300, 100 および30 mg/kgとした。また、対照として被験物質と同一容量の媒体(注射用水)を投与する群を設けた。

4. 観察および検査項目

1) 雄

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回観察した。なお、死亡例は、発見後速やかに剖検し、異

常の認められた器官・組織を10%中性緩衝ホルマリン液に固定後、H-E染色組織標本を作製し、病理組織学的に検査した。

(2) 体重測定

体重は、1週間に2回測定した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間および交配期間終了後から毎週2回測定した。

(4) 血液学検査

投与期間終了の翌日に、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から血液を採取し、以下の検査を実施した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数および白血球数(WBC)は、EDTA-2KコーティングしたSysmexサンプルカップに採取した血液について、多項目自動血球計数装置(Sysmex E-2000、東亜医用電子(株))を用いて測定した。さらに、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)および平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

網状赤血球数(RET)は、EDTA-2K処理した血液をBrecher法により超生体染色してスライドガラスに塗抹後、Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で赤血球1000個中の数を計数した。

白血球百分率は、EDTA-2K処理した血液をスライドガラスに塗抹し、May-Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で白血球100個を分類計数した。

プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)およびフィブリノーゲン濃度は、3.13%クエン酸ナトリウムで処理した血漿について、散乱光検出方式により血液凝固分析装置(コアグマスターII、三共(株))を用いて測定した。

(5) 血液生化学検査

血液学的検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液を遠心分離し、得られた血清について、以下の検査を実施した。

GOTおよびGPTはHenry変法、ALPはp-NPP基質法、γ-GTPはγ-G-P-NA基質法、総蛋白はBiuret法、総ビリルビンはAzobilirubin法、尿素窒素(BUN)はUrease-GIDH法、クレアチニンはJaffé法、ブドウ糖はGlucose dehydrogenase法、総コレステロールはCOD-DAOS法、トリグリセライドはGPO-DAOS法、Caはo-CPC法、無機リンはMolybdenum blue法により、自動分析装置(AU 500、オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

NaおよびKはイオン選択電極法により、Clは電量滴定法により、いずれも全自動電解質分析装置(EA04、(株)A&T)を用いて測定した。

蛋白分画は、電気泳動法により自動電気泳動装置(AES 600、オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

アルブミン量は総蛋白量および蛋白分画値から、A/G比は蛋白分画値から算出した。

(6) 剖検

上記の(4)および(5)の項で採血した動物をさらに放血致死させた後に器官・組織の肉眼的観察を行った。胸

腺、肝臓、腎臓、精巣および精巣上体は摘出後に重量を測定し、副腎、脳、心臓および脾臓とともに10%中性緩衝ホルマリン液(ただし、精巣および精巣上体はブアン液)に固定した。

(7) 病理組織学検査

摘出した器官・組織について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。対照群および1000 mg/kg群の心臓、肝臓、脾臓、胸腺、腎臓、精巣、精巣上体、副腎および脳についてH-E染色組織標本を作製し、病理組織学的に検査した。1000 mg/kg群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた腎臓は30、100および300 mg/kg群についても同様に検査した。

2) 雌

(1) 一般状態および死亡の有無

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回観察した。なお、死亡例は、発見後速やかに剖検し、卵巣、子宮および異常の認められた器官・組織を10%中性緩衝ホルマリン液に固定後、H-E染色組織標本を作製し、病理組織学的に検査した。

(2) 性周期

性周期は、投与開始日から交尾確認日まで毎日1回観察した。なお、発情期が連続2日間にわたって観察された場合は1回と計数した。

(3) 体重測定

体重は、交配開始前14日間および交配期間中には毎週2回、妊娠期間中には妊娠0、7、14および21日に、哺育期間には哺育0および4日にそれぞれ測定した。

(4) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間までは毎週2回測定した。また、妊娠期間中は妊娠2、9、16および21日に、哺育期間中は哺育4日に測定した。

(5) 交尾不成立雌の剖検

交尾不成立雌は、交配期間終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床の有無により妊娠の成否を確認した。

(6) 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ、分娩状態の異常の有無、分娩終了の確認を妊娠21日から妊娠25日の午前10時まで毎日行った。午前10時に分娩が終了していた場合、その日を哺育0日とした。

(7) 妊娠25日までに分娩しなかった雌の剖検

妊娠25日までに分娩しなかった雌は、エーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床の有無により妊娠の成否を確認した。

(8) 哺育状態の観察および剖検

母動物は、哺育状態を哺育4日まで毎日観察し、哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床痕数および黄体数を数えた。肝臓、腎臓、胸腺および卵巣は摘出後に重量を測定し、副腎、脳、心臓および脾臓とともに10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

(9) 病理組織学検査

摘出した器官・組織について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。対照群および1000 mg/kg群の心臓、肝臓、脾臓、胸腺、腎臓、卵巣、副腎および脳についてH-E染色組織標本を作製し、病理組織学的に検査した。1000 mg/kg群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた脳ならびに1000 mg/kg群の死亡例で変化のみられた副腎は30、100および300 mg/kg群についても同様に検査した。

3) 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

14日間にわたって投与された雌雄は、同一群内で1対1に組み合わせて同居交配した。交配期間は14日を限度として、交尾を確認するまでの連続同居交配とした。

交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い、膣垢内に精子または陰栓を確認した雌を交尾成立動物として、その日を妊娠0日として起算した。

4) 新生児

(1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。

(2) 新生児の観察

新生児は、一般状態および死亡の有無を生存期間中毎日1回観察した。

(3) 体重測定

体重は、哺育0日(出生日)および4日に測定した。

(4) 剖検

新生児は、哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

5. 統計解析

測定値の統計解析は下記の検定法を用い、有意差検定は対照群と各投与群との間で行った。いずれの検定においても、危険率5%未満を有意とした。新生児は一腹の平均を一単位として検定した。

体重(親動物、新生児)、摂餌量、発情回数、交尾日数、妊娠期間[分娩日(哺育0日)-交尾確認日]、着床痕数、総出産児数(新生児数+死産児数)、新生児数、死産児数、分娩率 $[(\text{総出産児数}/\text{着床痕数}) \times 100]$ 、児の産出率 $[(\text{哺育0日の新生児数}/\text{着床痕数}) \times 100]$ 、黄体数、着床率 $[(\text{着床痕数}/\text{黄体数}) \times 100]$ 、出生率 $[(\text{哺育0日の新生児数}/\text{総出産児数}) \times 100]$ 、哺育4日の新生児数、哺育4日の生存率 $[(\text{哺育4日の新生児数}/\text{哺育0日の新生児数}) \times 100]$ 、外表異常出現率 $[(\text{外表異常児数}/\text{新生児数}) \times 100]$ 、性比(雄/雌)、器官重量(相対重量を含む)、血液学検査成績、血液生化学検査成績については、各群で平均値および標準偏差を算出した。有意差検定は、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散ならば一元配置法による分散分析²⁾を行い、有意ならばDunnnett法²⁾を用いて行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定³⁾)を行い、有意ならば順

位を利用したDunnett型の検定法を用いて行った。

交尾率 [(交尾成立動物数/同居動物数)×100]、受胎率 [(受胎雌数/交尾成立動物数)×100]、出産率 [(新生児出産雌数/受胎雌数)×100] は、 χ^2 検定を用いた。

なお、病理組織学検査において、1000 mg/kg群で毒性学的影響が示唆され他の用量群についても検査を実施した器官・組織の所見については、上記の順位を利用したDunnett型の検定法を用いて行った。そこで有意差が認められた所見については、Cochran・Armitageの傾向検定を用いて用量反応性の検定を実施した。

結果

1. 反復投与毒性

1) 雄に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡は、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では認められなかった。1000 mg/kg群では、投与20日に1例が死亡したが、前日まで流涎の他には異常はみられなかった。

生存例の一般状態観察において、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では観察期間を通していずれの動物とも異常はみられなかった。1000 mg/kg群では、流涎が投与3日から投与後約1分～約30分の間みられた。

(2) 体重推移 (Fig.1)

30、100 および 300 mg/kg群の体重は、対照群とほぼ同様の推移であり、いずれの測定日にも有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与18～25 および 32～50日に体重の有意な低値がみられた。

(3) 摂餌量 (Fig.2)

30 および 300 mg/kg群の摂餌量は、対照群とほぼ同程度であり、いずれの測定日にも有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて投与31日に摂餌量の有意な低値がみられたが、投与量に依存したものでなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与13、31、38～45日に摂餌量の有意な低値がみられた。

(4) 血液学検査 (Table 1)

各投与群とも、対照群と比べていずれの測定項目にも有意差はみられなかった。

(5) 血液生化学検査 (Table 2)

30 および 300 mg/kg群では、対照群と比べて尿素窒素の有意な高値がみられた。100 mg/kg群では、対照群と比べて有意差はないが尿素窒素の高値傾向がみられた。1000 mg/kg群では、対照群と比べて尿素窒素、K、Cl および無機リンの有意な高値、トリグリセライドの有意な低値がみられた。

(6) 剖検

生存例の剖検において、対照群では片側性の精巣上体の尾部に黄白色結節が1例にみられた。30 および 100 mg/kg群では、いずれにも異常はみられなかった。300 mg/kg群では、片側性の腎臓に白色斑が1例、両側性の

精巣の萎縮と軟化が1例にみられた。1000 mg/kg群では、胸腺の暗赤色化が1例、両側性の腎臓の肥大が1例にみられた。しかし、これらの変化は、いずれも少数例であり、投与によるものではないと判断した。

1000 mg/kg投与群の死亡例の剖検において、肺・胸腺の暗赤色化および両側性の副腎の肥大がみられた。

(7) 器官重量 (Table 3)

30 mg/kg群では、対照群と比べていずれの器官重量にも有意差はみられなかった。100 および 300 mg/kg群では、対照群と比べて腎臓の相対重量の有意な高値がみられた。

1000 mg/kg投与群では、対照群と比べて肝臓および腎臓の相対重量の有意な高値がみられた。

(8) 病理組織学検査 (Table 4)

生存例では、腎臓において尿細管拡張が1000 mg/kg群で3例、集合管拡張が1000 mg/kg群で2例にみられたが、それらの程度はいずれもごく軽度であった。なお、尿細管拡張は1000 mg/kg群で対照群と比べて用量相関性はないものの有意差が認められ、集合管拡張は有意差はないものの増加傾向にあった。

その他には、胸腺の出血、心臓の小肉芽腫、肝臓の小肉芽腫および小葉中心性の肝細胞空胞変性、腎臓の尿細管好塩基性化、近位尿細管内の好酸性小体、嚢胞、びまん性鉍質沈着および好中球浸潤がみられたが、対照群でも同程度にみられているか、あるいは少数例であることから、偶発的变化と判断した。なお、脾臓、副腎、精巣および脳では対照群および1000 mg/kg群とも異常はみられなかった。

1000 mg/kg群の死亡例では、胸腺の出血、肺の浮腫、胸腺・肺・副腎の自己融解がみられたが、それらの程度はいずれもごく軽度～軽度であった。なお、剖検で異常の認められた副腎には肥大を示唆する変化はみられなかった。

2) 雌に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡は、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では認められなかった。1000 mg/kg群では、投与6日に3例、投与9日に1例、投与12日に1例と投与17日に1例の計6例が死亡した。死亡例では、流涎が投与3日から投与後約1分～約30分の間みられ、自発運動の低下、呼吸緩徐、腹臥、被毛の汚れ、表皮温下降、流涎あるいは削瘦が死亡する1～9日前から多くの例で認められた。

生存例の一般状態観察において、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では観察期間を通していずれの動物とも異常はみられなかった。1000 mg/kg群では、流涎が投与3日から投与後約1分～約30分の間みられ、また、1例では自発運動の低下、腹臥、被毛の汚れ、表皮温下降、削瘦も認められた。

(2) 体重推移 (Fig.3)

交配開始前では、30、100 および 300 mg/kg群の体重は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与4および

8日に体重の有意な低値がみられた。なお、1000 mg/kg群の死亡例では、死亡前に急激な体重減少がみられた。

妊娠期間中では、30, 300 および 1000 mg/kg群の体重は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠 21 日に体重の有意な高値がみられたが、投与量に依存したものでなかった。

哺育期間中では、30 および 100 mg/kg群の体重は対照群と比べて哺育4日に体重の有意な高値がみられたが、投与量に依存したものでなかった。300 および 1000 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

(3) 摂餌量 (Fig.4)

交配開始前では、30, 100 および 300 mg/kg群の摂餌量は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与3, 6 および 13 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

妊娠期間中では、30 および 300 mg/kg群の摂餌量は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。なお、100 および 1000 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠 16 日に摂餌量の有意な高値がみられたが、一過性の変化であり、投与によるものではないと判断した。

哺育期間中では、各投与群とも対照群と比べて摂餌量に有意差はみられなかった。

(4) 剖検

生存例の剖検において、対照群, 30, 100 および 300 mg/kg群では異常はみられなかった。1000 mg/kg群では、胸腺の萎縮と両側性の副腎の肥大が1例にみられた。

1000 mg/kg群の死亡例の剖検において、胸腺の萎縮が1例、肺の暗赤色化が1例、脾臓の萎縮が6例、両側性の副腎の肥大が6例、腺胃粘膜の暗赤色化が3例、小腸の暗赤色化が2例にみられた。

(5) 器官重量 (Table 5)

30 mg/kg群では、対照群と比べていずれの器官重量にも有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて腎臓の絶対重量の有意な高値がみられた。300 mg/kg群では、対照群と比べて有意差はないが、腎臓の絶対重量の高値傾向がみられた。1000 mg/kg群では、対照群と比べて腎臓の絶対・相対重量の有意な高値がみられた。

(6) 病理組織学検査 (Table 6)

生存例では、腎臓において髄質および乳頭部への好中球浸潤(片側性)が1000 mg/kg群で1例にみられたが、その程度は軽度であった。脳において、延髄の広範軟化が1000 mg/kg群で1例にみられたが、その程度は軽度であった。

その他、胸腺の萎縮および出血、脾臓の髄外造血亢進、副腎の束状帯広範壊死、束状帯巣状類洞拡張、束状帯巣状空胞変性および束状帯肥大がみられたが、いずれも少数例であることから、偶発的变化と判断した。

なお、心臓、肝臓および卵巣では対照群および 1000

mg/kg群とも異常はみられなかった。また、剖検で異常の認められた 1000 mg/kg群の1例の副腎の肥大と脾臓の萎縮を示唆する変化はみられなかった。

1000 mg/kg投与群の死亡例6例において、肺に浮腫が1例、胸腺に萎縮が1例、脾臓に萎縮が5例と白脾髄の萎縮が1例、副腎に束状帯の過形成が3例と自己融解が1例、腺胃粘膜のびらんが1例と自己融解が1例、小腸粘膜にびらんが1例にみられた。なお、それらの程度は、胸腺の萎縮および白脾髄の萎縮が中等度であったが、その他の所見はいずれもごく軽度～軽度であった。また、剖検で異常の認められた 1000 mg/kg群の2例の副腎の肥大、2例の腺胃粘膜の暗赤色化、1例の小腸の暗赤色化を示唆する変化はみられなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物の生殖発生に及ぼす影響

(1) 発情回数、交尾率および受胎率 (Table 7)

交配前の投与期間(14日間)の発情回数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

対照群と 1000 mg/kg投与群の各1組を除いた全例で交尾が確認された。また、1000 mg/kg群の1組で雌が交配期間中に死亡した。交尾日数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。また、交尾率にも、各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。不受胎雌は、30 および 300 mg/kg投与群で各1例みられたが、受胎率には各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。なお、受胎雌の全例が新生児を分娩した。

(2) 妊娠期間、分娩状態、黄体数、着床率および出産率 (Table 8)

妊娠期間は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。また、いずれの動物とも分娩状態に異常はみられなかった。

黄体数、着床痕数および着床率は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

出産率は、対照群、各投与群とも 100 %であった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 分娩率、出生率および生存率 (Table 8)

総出産児数および分娩率は、各投与群とも対照群の間に有意差はみられなかった。

哺育0日の新生児数、死産児数、出生率、児の産出率および性比は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

新生児の一般状態では、いずれの群とも異常症状は観察されなかった。

哺育4日の新生児数および哺育4日の生存率は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

新生児の外表異常の観察では、いずれの群とも異常はみられなかった。

(2) 新生児の体重 (Table 8)

各投与群の体重は、哺育0日および4日とも雌雄とも対照群との間に有意差はみられなかった。

(3) 新生児の剖検

対照群, 各投与群とも, いずれにも異常はみられなかった。

考察

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。投与量は, 1000 mg/kg を最高用量とし, 以下 300, 100 および 30 mg/kg とした。なお, 対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。

雄動物に対して, 1000 mg/kg 群で 1 例が死亡した。死亡例の剖検, 異常の観察された器官・組織の病理組織学検査において, 死後変化に基づくと考えられる所見の他には, 特筆すべき変化は認められず, 死因は明らかにできなかった。一般状態観察において, 1000 mg/kg 群では投与期間の初期から投与直後に流涎がみられたが, 持続時間は約 30 分間であり, 投与を継続しても持続時間の延長は認められなかった。この流涎は, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの刺激性に基づく変化と考えられる。また, 1000 mg/kg 群では, 摂餌量の減少と関連した体重の増加抑制がみられた。30 mg/kg 以上の群の尿素窒素の増加, 100 mg/kg 以上の群の腎臓の相対重量の増加, 1000 mg/kg 群の K, Cl, 無機リンの増加, 腎臓の病理組織学検査における尿細管拡張, 集合管拡張などは腎機能の低下を示唆する変化と考えられる。しかし, 尿素窒素, K, Cl, 無機リンの増加は軽度であり, 腎臓の組織学的所見も発生頻度が低く, 程度も軽微であった。1000 mg/kg 群では, 肝臓の相対重量の有意な高値, 血液生化学検査においてトリグリセライドの低値が認められたが, 肝臓の絶対重量には差がみられないこと, 肝臓の病理組織学検査でも異常がみられないことから, 肝臓の相対重量の高値とトリグリセライドの低値は摂餌量の減少に伴う変化と考えられ, 毒性学的に重篤なものではないと判断した。なお, 血液学検査においては, 1000 mg/kg 群でも各検査項目に異常は認められなかった。

雌動物に対して, 1000 mg/kg 群で 6 例が死亡した。死亡例では, 急激な体重減少, 摂餌量の減少がみられ, 剖検において肺の暗赤色化, 胸腺の萎縮, 脾臓の萎縮, 副腎の肥大, 腺胃粘膜および小腸の暗赤色化が認められた。死亡例で異常の観察された器官・組織の病理組織学検査において肺の浮腫, 胸腺の萎縮, 脾臓の萎縮, 副腎束状帯の過形成, 腺胃粘膜および小腸粘膜のびらんがみられたが, これらの変化は死戦期のストレスに起因するものと考えられる。一般状態観察においては, 雄の場合と同様に 1000 mg/kg 群で流涎がみられた。その他には自発運動の低下, 腹臥, 流涎, 被毛の汚れ, 表皮温下降, 呼吸緩徐が死亡例の多くにみられた。1000 mg/kg 群では, 雄と同様に摂餌量の減少と関連した体重の増加抑制が交配前投与期間にみられた。器官重量では, 100 mg/kg 以上の群で腎臓の絶対重量の高値あるいは高値傾向, 1000 mg/kg 群で腎臓の相対重量の高値がみられた。また,

1000 mg/kg 群において, 腎臓に髄質および乳頭部への好中球浸潤, 脳に延髄の広範軟化巣が認められ, 1 例のみの変化であるが, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの投与により生じた可能性を否定できない。

したがって, 当試験条件下におけるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの一般毒性学的無影響量は, 雄で 30 mg/kg/day 未満, 雌で 30 mg/kg/day と考えられる。

親動物の生殖発生に対しては, 発情回数, 交尾率, 交尾日数, 受胎率および受胎雌数には, 各投与群とも影響はみられなかった。また, 各投与群とも妊娠期間, 分娩状態, 黄体数, 着床痕数, 着床率および出産率にも影響はみられなかった。

新生児に対しては, 各投与群で総出産児数, 分娩率, 死産児数, 哺育 0 日の新生児数, 出生率, 児の産出率, 性比には影響はみられなかった。外表観察では, いずれの群とも異常はみられなかった。また, 一般状態, 哺育 4 日の新生児数, 生存率, 体重, 剖検にも影響はみられなかった。

したがって, 当試験条件下におけるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの生殖発生毒性学的な無影響量は, 雌雄の生殖および児動物の発生に関していずれも 1000 mg/kg/day と推察される。

以上のように, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの一般毒性学的無影響量は, 雄では 30 mg/kg 投与により尿素窒素の高値が認められたことから 30 mg/kg/day 未満, 雌では 100 mg/kg 投与により腎臓の相対重量の高値が認められたことから 30 mg/kg/day と考えられる。また, 生殖発生毒性学的な無影響量は, いずれの項目にも影響が認められなかったことから雌雄の生殖および児動物の発生とも 1000 mg/kg/day と推察される。なお, 筆者らは類似物質であるメタクリル酸(2-ヒドロキシプロピル)エステルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を先に実施したが, その一般毒性学的無影響量は雌雄とも 300 mg/kg/day であり, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの方が毒性は強いと考えられる。

文献

- 1) 佐久間昭, “薬効評価-計画と解析 I, II,” 東大出版会, 東京, 1977, 1981.
- 2) C.W. Dunnett, *Biometrics*, 20, 482(1964).
- 3) W.H. Kruskal, W.A. Wallis, *J. Amer. Statist. Assoc.*, 47, 583(1952).
- 4) 古橋忠和ほか, 化学物質毒性試験報告, 4, 569(1996).

連絡先

試験責任者：古橋忠和
試験担当者：長瀬孝彦，藤村高志，内藤一嘉，
牧野浩平，渡邊ゆかり，木村均
(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
〒501-62 岐阜県羽島市福寿町間島6-104
Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors: Tadakazu Furuhashi (Study director)
Takahiko Nagase, Takashi Fujimura,
Kazuyoshi Naitou, Kohei Makino,
Yukari Watanabe and Hitoshi Kimura
Nihon Bioresearch Inc. Hashima Laboratory
6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu,
501-62, Japan
Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284

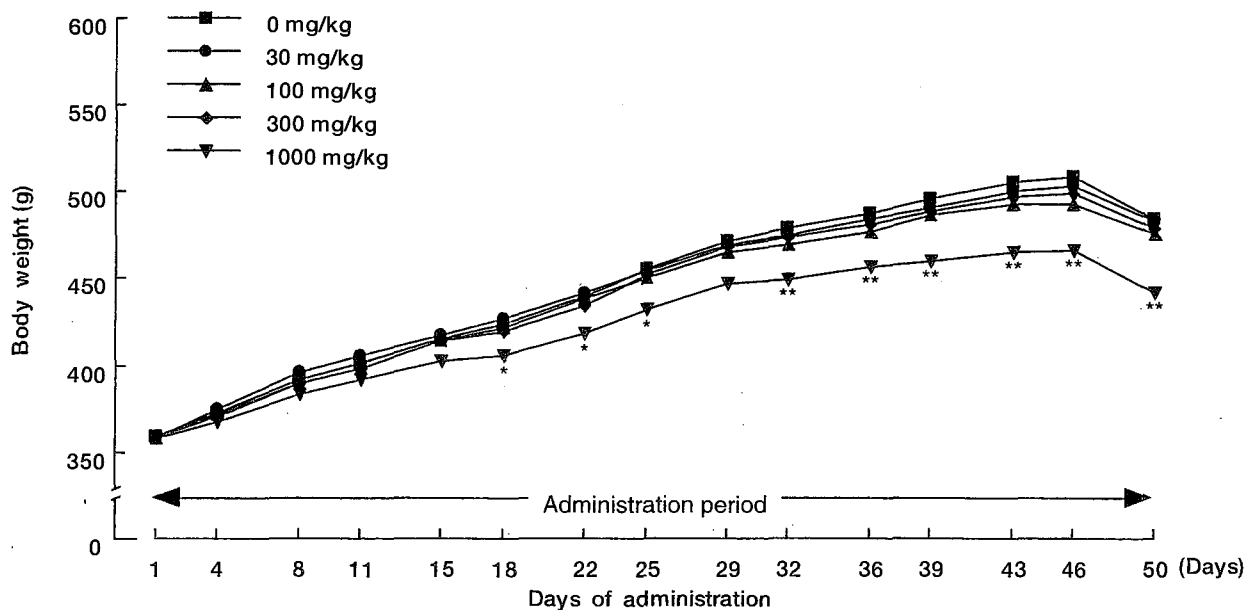


Fig. 1 Body weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration
Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

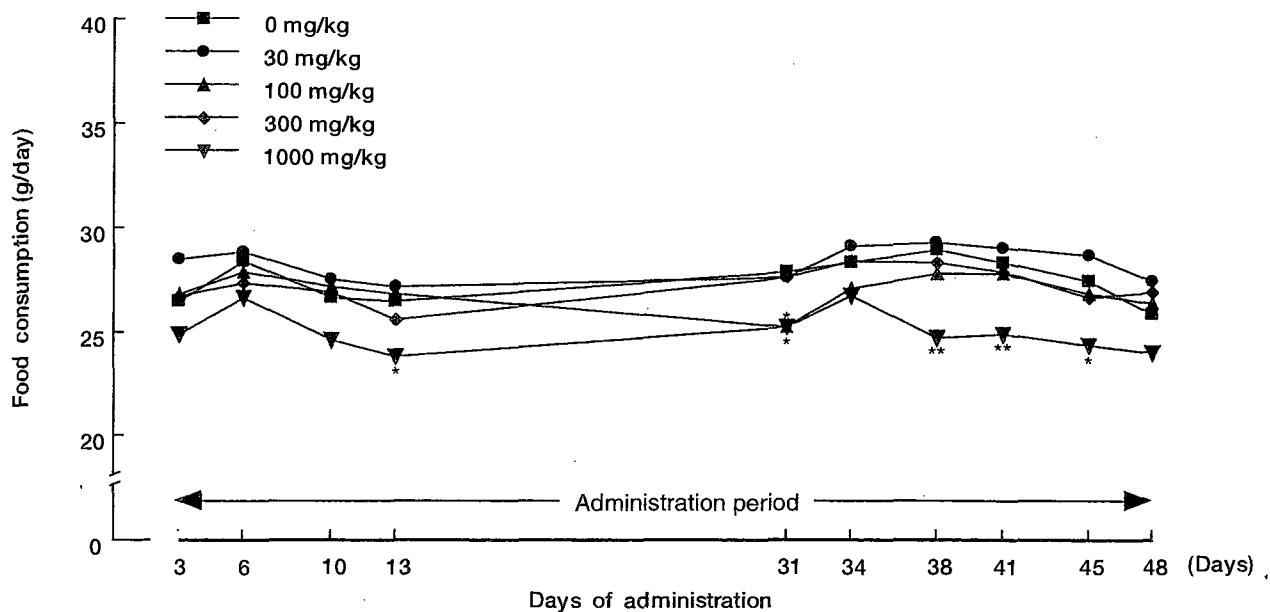


Fig. 2 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration
Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

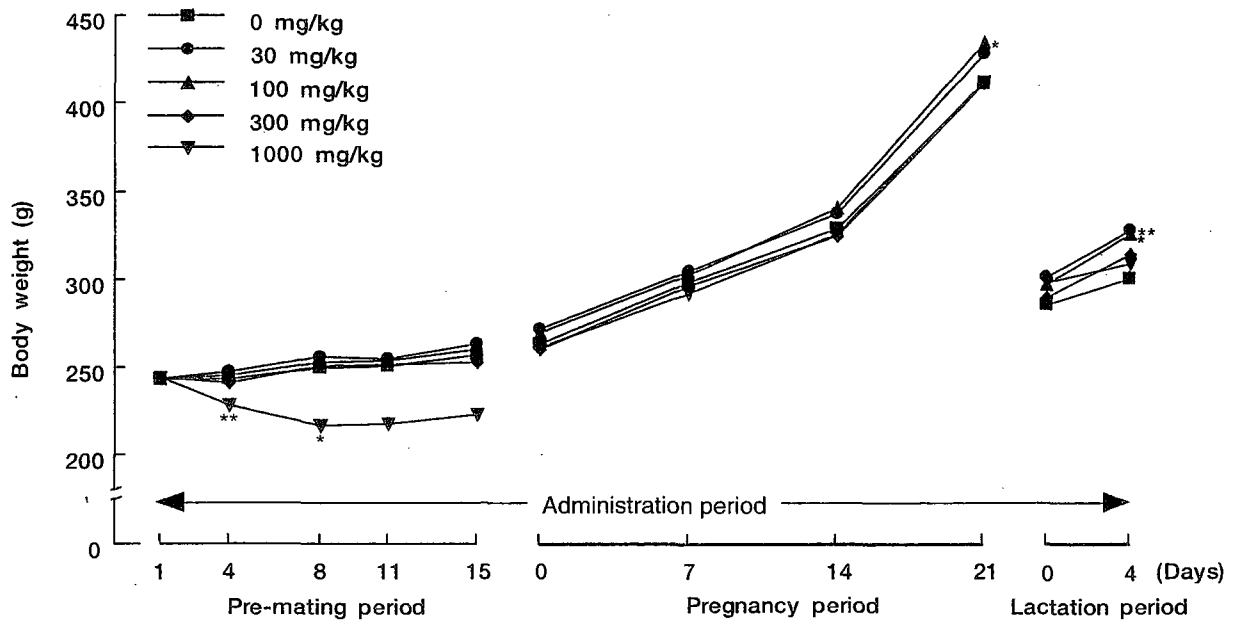


Fig. 3 Body weight of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration
Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

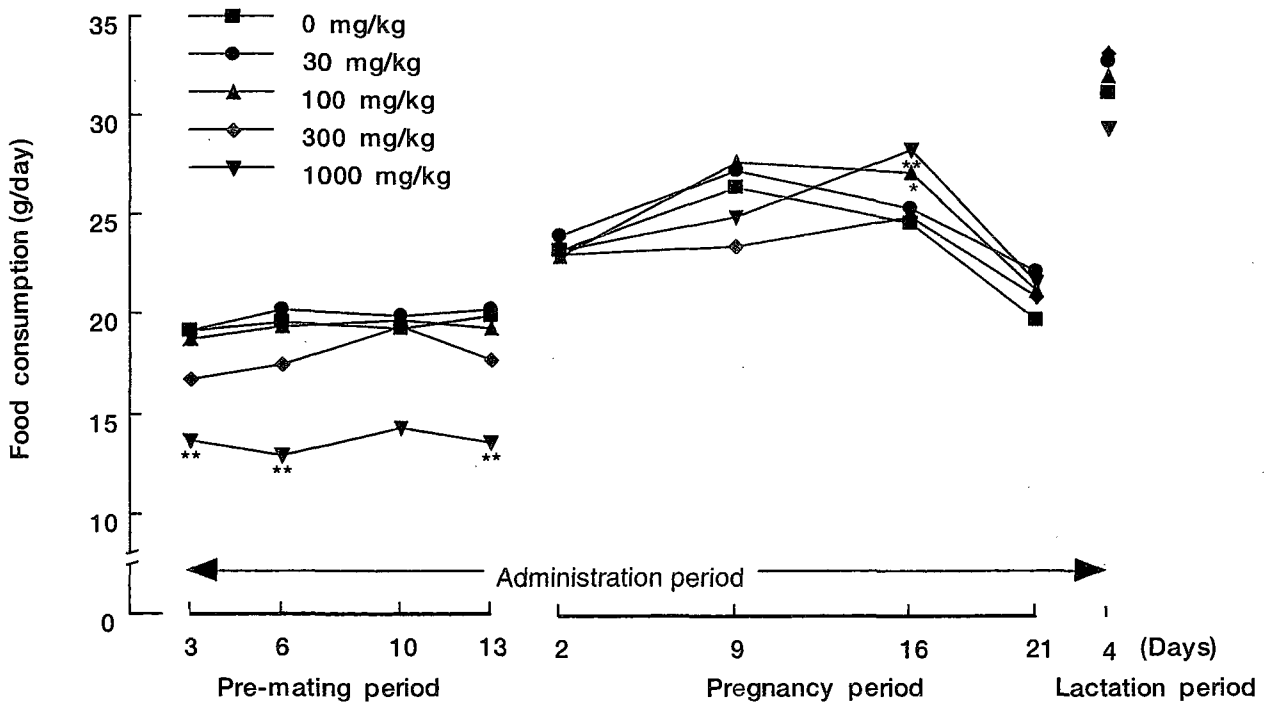


Fig. 4 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration
Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Table 1 Hematological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	11
RBC ($10^4/mm^3$)	859.9 ± 32.2	874.3 ± 32.3	847.8 ± 46.8	851.7 ± 30.3	845.7 ± 62.4
Hemoglobin (g/dl)	15.43 ± 0.84	15.81 ± 0.68	15.63 ± 0.81	15.37 ± 0.67	15.42 ± 1.10
Hematocrit (%)	44.54 ± 1.66	45.52 ± 1.33	44.93 ± 1.44	44.64 ± 1.21	45.01 ± 2.72
MCV (μm^3)	51.80 ± 1.23	52.09 ± 1.89	53.09 ± 2.51	52.44 ± 1.35	53.28 ± 1.51
MCH (pg)	17.95 ± 0.63	18.08 ± 0.90	18.46 ± 1.10	18.06 ± 0.72	18.25 ± 0.56
MCHC (g/dl)	34.60 ± 0.90	34.73 ± 1.09	34.78 ± 1.08	34.42 ± 1.05	34.25 ± 0.90
Platelet ($10^4/mm^3$)	109.02 ± 12.78	115.20 ± 12.08	109.88 ± 12.66	107.55 ± 9.71	109.95 ± 14.15
Reticulocyte (%)	23.8 ± 5.2	24.8 ± 5.2	23.3 ± 6.3	24.2 ± 6.8	22.0 ± 3.5
PT (sec.)	16.91 ± 1.47	16.44 ± 1.24	15.96 ± 0.96	17.78 ± 2.16	16.80 ± 1.80
APTT (sec.)	31.99 ± 2.70	32.98 ± 5.59	30.23 ± 2.24	32.17 ± 2.31	31.03 ± 2.85
Fibrinogen (mg/dl)	253.8 ± 15.5	256.6 ± 20.6	254.9 ± 16.1	241.7 ± 12.3	258.3 ± 29.6
WBC ($10^3/mm^3$)	54.3 ± 10.0	53.1 ± 8.0	58.5 ± 14.6	53.6 ± 11.8	57.3 ± 10.7
Differential leukocyte (%)					
Lymphocyte	84.0 ± 6.9	84.9 ± 7.3	86.8 ± 6.9	84.3 ± 7.4	82.4 ± 11.9
Neutrophil	15.1 ± 6.7	13.8 ± 6.8	12.1 ± 6.3	14.6 ± 7.3	17.0 ± 12.1
Eosinophil	0.5 ± 0.8	0.8 ± 1.0	0.8 ± 0.9	0.8 ± 1.0	0.1 ± 0.3
Basophil	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Monocyte	0.4 ± 0.7	0.6 ± 0.5	0.3 ± 0.6	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.5

Each value shows mean ± S.D.

Table 2 Blood chemical examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	11
GOT (IU/l)	70.94 ± 12.29	68.81 ± 10.63	70.82 ± 10.88	66.21 ± 10.88	62.32 ± 12.26
GPT (IU/l)	21.38 ± 3.24	22.33 ± 3.15	21.38 ± 4.14	21.48 ± 2.20	21.06 ± 5.94
ALP (IU/l)	75.68 ± 11.70	79.52 ± 15.80	84.17 ± 18.07	71.48 ± 14.95	75.33 ± 28.16
γ -GTP (IU/l)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
T-protein (g/dl)	5.62 ± 0.29	5.88 ± 0.27	5.74 ± 0.20	5.73 ± 0.24	5.54 ± 0.36
Albumin (g/dl)	2.892 ± 0.141	2.991 ± 0.164	2.912 ± 0.144	2.970 ± 0.135	2.873 ± 0.169
Protein fraction (%)					
Albumin	51.49 ± 1.34	50.90 ± 1.92	50.72 ± 1.46	51.81 ± 1.52	51.95 ± 2.40
α_1 -globulin	22.78 ± 2.13	23.61 ± 1.68	23.21 ± 1.74	22.38 ± 2.50	22.44 ± 2.13
α_2 -globulin	4.52 ± 0.97	4.98 ± 0.71	4.83 ± 0.67	4.64 ± 0.70	4.67 ± 0.96
α_3 -globulin	5.60 ± 0.49	5.50 ± 0.22	5.54 ± 0.51	5.33 ± 0.26	5.20 ± 0.53
β -globulin	12.25 ± 1.46	11.50 ± 0.77	11.77 ± 0.69	12.04 ± 0.85	12.11 ± 0.97
γ -globulin	3.37 ± 0.79	3.51 ± 0.55	3.93 ± 1.03	3.81 ± 0.62	3.63 ± 0.76
A/G ratio	1.064 ± 0.057	1.039 ± 0.082	1.032 ± 0.062	1.076 ± 0.066	1.085 ± 0.101
T-bilirubin (mg/dl)	0.072 ± 0.006	0.075 ± 0.007	0.077 ± 0.011	0.076 ± 0.010	0.070 ± 0.012
BUN (mg/dl)	17.36 ± 2.04	19.97 ± 2.57*	19.42 ± 2.11	20.82 ± 2.07**	25.06 ± 4.57**
Creatinine (mg/dl)	0.535 ± 0.025	0.546 ± 0.051	0.538 ± 0.026	0.542 ± 0.056	0.544 ± 0.063
Glucose (mg/dl)	125.26 ± 10.06	125.89 ± 8.99	124.38 ± 8.77	126.18 ± 9.70	142.55 ± 43.06
T-cholesterol (mg/dl)	65.68 ± 13.77	61.31 ± 14.52	63.34 ± 16.35	67.97 ± 9.88	56.11 ± 13.66
Triglyceride (mg/dl)	83.18 ± 47.03	99.67 ± 45.12	54.01 ± 20.45	72.99 ± 29.19	47.85 ± 26.99*
Na (mEq/l)	144.41 ± 1.76	144.08 ± 1.57	144.38 ± 1.72	144.03 ± 1.72	143.38 ± 1.21
K (mEq/l)	4.130 ± 0.184	4.173 ± 0.231	4.293 ± 0.154	4.291 ± 0.220	4.535 ± 0.418**
Cl (mEq/l)	105.71 ± 1.91	105.97 ± 0.99	107.15 ± 2.25	107.09 ± 0.98	107.08 ± 3.36*
Ca (mg/dl)	9.76 ± 0.35	9.86 ± 0.30	9.68 ± 0.18	9.66 ± 0.26	9.61 ± 0.39
I-phosphorus (mg/dl)	6.55 ± 0.70	6.55 ± 0.66	6.96 ± 0.61	6.98 ± 0.74	7.95 ± 0.80**

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

Table 3 Organ weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	11
Body weight (g)	484.5 ± 34.2	483.2 ± 27.9	475.4 ± 26.5	478.8 ± 18.5	442.5 ± 20.9**
Thymus (mg)	310.63 ± 80.69	273.98 ± 72.28	277.63 ± 67.98	289.81 ± 85.98	265.77 ± 64.35
(mg%)	64.41 ± 17.67	56.42 ± 13.56	58.31 ± 13.24	60.68 ± 18.21	60.33 ± 15.66
Liver (g)	12.099 ± 1.758	12.532 ± 1.413	12.263 ± 1.484	12.647 ± 0.840	12.115 ± 0.755
(g%)	2.489 ± 0.216	2.590 ± 0.184	2.572 ± 0.196	2.640 ± 0.124	2.741 ± 0.139**
Kidneys (g)	2.823 ± 0.246	2.921 ± 0.247	3.017 ± 0.250	3.028 ± 0.260	3.200 ± 0.466
(g%)	0.583 ± 0.044	0.605 ± 0.055	0.635 ± 0.046*	0.634 ± 0.060*	0.723 ± 0.110**
Testes (g)	3.283 ± 0.232	3.344 ± 0.178	3.418 ± 0.286	3.158 ± 0.475	3.281 ± 0.213
(g%)	0.682 ± 0.075	0.694 ± 0.063	0.721 ± 0.070	0.662 ± 0.100	0.744 ± 0.054
Epididymides (g)	1.303 ± 0.077	1.298 ± 0.143	1.295 ± 0.093	1.236 ± 0.161	1.305 ± 0.093
(g%)	0.271 ± 0.028	0.270 ± 0.042	0.271 ± 0.019	0.259 ± 0.036	0.296 ± 0.030

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

Table 4 Histopathological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0				30				100				300				1000				
	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	
HThymus	[12]				[0]				[0]				[0]				[11]				
Hemorrhage	12	0															10	1	1	0	0
Heart	[12]				[0]				[0]				[0]				[11]				
Microgranuloma	11	1	1	0	0	0											10	1	1	0	0
Liver	[12]				[0]				[0]				[0]				[11]				
Microgranuloma	10	2	2	0	0	0											9	2	2	0	0
Degeneration, vacuolar, centrilobular	11	1	1	0	0	0											11	0			
Kidney	[12]				[12]				[12]				[12]				[11]				
Basophilic tubules	9	3	3	0	0	0	11	1	1	0	0	0	12	0			7	4	3	1	0
Eosinophilic body, proximal tubule	10	2	2	0	0	0	11	1	1	0	0	0	11	1	1	0	10	1	1	0	0
Hyaline droplet, proximal tubule	12	0			12	0			11	1	1	0	0	0			11	0			
Dilatation, renal tubule	12	0			12	0			12	0			12	0			8	3	3	0	0
Dilatation, collecting tubule	12	0			12	0			12	0			12	0			9	2	2	0	0
Cyst, unilateral	12	0			12	0			12	0			12	0			10	1	1	0	0
Mineralization, diffuse	12	0			12	0			12	0			12	0			10	1	1	0	0
Cellular infiltration, neutrophil	12	0			12	0			12	0			12	0			10	1	1	0	0
Degeneration, renal tubule, focal, unilateral	12	0			12	0			12	0			11	1	1	0	11	0			
Epididymis	[12]				[0]				[0]				[0]				[11]				
Granuloma, spermatic, left tail	11	1	0	1	0	0											11	0			

Grade of histopathological finding; ±:Slight, +:Mild, 2+:Moderate, 3+:Marked.

N:No abnormality detected.

A:Abnormality detected.

[]:Number of males examined.

No remarkable changes were recognized in spleen, adrenal, testis and brain of control and 1000 mg/kg groups.

Significantly different from control (**:p<0.01).

Table 5 Organ weight of dams on day 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of dams	11	11	12	11	5
Body weight (g)	300.7 ± 40.0	328.8 ± 12.7**	326.1 ± 11.5*	315.1 ± 17.4	309.2 ± 19.1
Thymus (mg)	163.16 ± 74.90	176.37 ± 30.67	159.91 ± 54.09	160.71 ± 44.26	174.02 ± 76.33
(mg%)	54.11 ± 22.37	53.74 ± 9.84	48.94 ± 16.16	51.51 ± 15.76	56.30 ± 24.76
Liver (g)	12.775 ± 1.020	13.159 ± 0.833	13.661 ± 1.182	13.021 ± 1.717	13.050 ± 1.537
(g%)	4.342 ± 0.849	4.005 ± 0.264	4.187 ± 0.286	4.118 ± 0.349	4.216 ± 0.333
Kidneys (g)	1.785 ± 0.158	1.848 ± 0.084	1.953 ± 0.151*	1.947 ± 0.162	2.056 ± 0.261**
(g%)	0.605 ± 0.107	0.564 ± 0.037	0.598 ± 0.038	0.618 ± 0.048	0.662 ± 0.049*
Ovaries (mg)	98.96 ± 8.50	100.55 ± 15.13	102.85 ± 11.51	95.71 ± 11.23	97.44 ± 10.80
(mg%)	33.83 ± 8.14	30.57 ± 4.40	31.53 ± 3.28	30.35 ± 2.94	31.52 ± 2.69

Each value shows mean ± S.D.
Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

Table 6 Histopathological examination of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0				30				100				300				1000								
	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	
Thymus	[12]						[0]						[0]						[6]						
Atrophy	11	1	0	1	0	0													5	1	0	0	1	0	
Hemorrhage	11	1	1	0	0	0													6	0					
Spleen	[12]						[0]						[0]						[6]						
Hematopoiesis, extramedullary, increased	11	1	0	1	0	0													6	0					
Kidney	[12]						[0]						[0]						[6]						
Cellular infiltration, papilla and medulla, neutrophil, unilatera	12	0																	5	1	0	1	0	0	
Adrenal	[12]						[12]						[12]						[6]						
Necrosis, zona fasciculata, massive	10	2	0	2	0	0	12	0					12	0					6	0					
Dilatation, sinusoid, zona fasciculata, focal	11	1	1	0	0	0	12	0					12	0					6	0					
Degeneration, vacuolar, zona fasciculata, focal	11	1	1	0	0	0	12	0					12	0					6	0					
Hypertrophy, zona fasciculata	11	1	1	0	0	0	12	0					12	0					6	0					
Brain	[12]						[12]						[12]						[6]						
Malacia, medulla oblongata, massive	12	0					12	0					12	0					5	1	0	1	0	0	

Grade of histopathological finding; ±: Slight, +: Mild, 2+: Moderate, 3+: Marked.
N: No abnormality detected.
A: Abnormality detected.
[]: Number of females examined.
No remarkable changes were recognized in heart, liver and ovary of control and 1000 mg/kg groups.

Table 7 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of females	12	12	12	12	7
Number of estrous cases before mating (14 days)					
Mean±S.D.	3.4 ± 0.5	3.3 ± 1.2	3.5 ± 0.5	3.3 ± 0.6	2.9 ± 1.7
Number of pairs	12	12	12	12	7
Number of pairs with successful copulation	11	12	12	12	5
Copulation index (%) ^{a)}	91.7	100.0	100.0	100.0	71.4
Number of conceiving days					
Mean±S.D.	2.7 ± 1.8	3.4 ± 1.6	2.8 ± 1.1	2.8 ± 1.2	2.4 ± 0.9
Number of pregnant females	11	11	12	11	5
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	91.7	100.0	91.7	100.0
Number of pregnant females with live pups	11	11	12	11	5

a) : (Number of pairs with successful copulation/number of pairs)×100.

b) : (Number of pregnant females/number of pairs with successful copulation)×100.

Table 8 Observation of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose(mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of dams	11	11	12	11	5
Length of gestation (days)					
Mean±S.D. per dam	22.64 ± 0.50	22.27 ± 0.47	22.50 ± 0.52	22.18 ± 0.40	22.40 ± 0.55
Number of corpora lutea					
Mean±S.D. per dam	17.6 ± 1.4	18.3 ± 2.0	18.8 ± 2.1	17.1 ± 2.2	16.8 ± 2.8
Number of implantation scars					
Mean±S.D. per dam	16.5 ± 1.4	16.5 ± 0.9	17.2 ± 2.1	15.9 ± 1.8	15.8 ± 2.7
Implantation index ^{a)}					
Mean±S.D. per dam	93.5 ± 6.4	91.1 ± 7.6	91.9 ± 9.2	93.5 ± 7.2	93.8 ± 4.0
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of live pups born					
Mean±S.D. per dam	14.5 ± 1.0	15.1 ± 1.0	15.8 ± 1.8	15.1 ± 2.3	14.0 ± 2.9
Sex ratio at birth ^{c)}					
Mean±S.D. per dam	1.42 ± 1.45	1.31 ± 0.71	1.47 ± 1.37	0.83 ± 0.21	1.44 ± 0.63
Birth index ^{d)}					
Mean±S.D. per dam	88.5 ± 6.1	91.3 ± 6.7	91.9 ± 5.0	94.5 ± 6.6	88.0 ± 6.0
Number of dead pups on day 0 of lactation					
Mean±S.D. per dam	0.8 ± 1.0	0.3 ± 0.5	0.8 ± 1.0	0.1 ± 0.3	0.4 ± 0.5
Number of pups born					
Mean±S.D. per dam	15.4 ± 1.2	15.4 ± 1.1	16.5 ± 2.3	15.2 ± 2.4	14.4 ± 3.2
Delivery index ^{e)}					
Mean±S.D. per dam	93.5 ± 4.8	92.8 ± 6.5	95.9 ± 5.4	95.1 ± 6.8	90.4 ± 8.0
Live birth index ^{f)}					
Mean±S.D. per dam	94.9 ± 5.9	98.3 ± 3.0	95.9 ± 4.9	99.5 ± 1.8	97.6 ± 3.3
Number of live pups on day 4 of lactation					
Mean±S.D. per dam	14.3 ± 0.9	14.8 ± 1.1	15.3 ± 2.0	14.8 ± 2.3	14.0 ± 2.9
Viability index ^{g)}					
Mean±S.D. per dam	98.2 ± 3.1	98.3 ± 4.0	97.3 ± 4.5	98.2 ± 4.4	100.0 ± 0.0
Number of external anomalies					
Mean±S.D. per dam	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Body weight of pups (g)					
Mean±S.D. per dam					
Male Day 0	6.43 ± 0.50	6.39 ± 0.37	6.55 ± 0.56	6.37 ± 0.51	6.82 ± 0.74
Male Day 4	10.19 ± 0.80	10.02 ± 0.77	10.23 ± 1.15	10.13 ± 1.10	10.44 ± 1.62
Female Day 0	6.11 ± 0.45	6.07 ± 0.44	6.02 ± 0.48	6.04 ± 0.49	6.34 ± 0.87
Female Day 4	9.66 ± 0.62	9.73 ± 0.88	9.48 ± 0.93	9.75 ± 1.04	9.90 ± 1.56

a) : (Number of implantation scars/number of corpora lutea)×100.

c) : Number of male pups/number of female pups.

e) : (Number of pups born/number of implantation scars)×100.

g) : (Number of live pups on day 4/number of live pups born)×100.

b) : (Number of dams with live pups/number of pregnant dams)×100.

d) : (Number of live pups born/number of implantation scars)×100.

f) : (Number of live pups born/number of pups born)×100.

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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-(Dimethylamino)ethyl acrylate on Bacteria

要約

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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たことから、本試験は S9 mix 無添加試験および添加試験ともに、156~5000 μg /プレートの範囲(S9 無添加試験の TA98 と TA1537 は 78.1~2500 μg /プレート、添加試験の WP2 *uvrA* は 313~5000 μg /プレート)で実施した。また、TA98 の S9 mix 添加試験では、1000~5000 μg /プレートの用量範囲で再現性試験を実施した。

その結果、TA98 の S9 mix 添加試験において、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加が認められ、用量依存性もみられた。

以上の結果から、アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルは、用いた試験系において変異原性を有する(陽性)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、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〕

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステル(CAS No. 2439-35-2)は、分子量 143.21 の無色-黄色透明液体(受領時:無色透明液体)である。(株)日本触媒製造、用いた被験物質は、ロット番号 5P07, 純度 99.9 wt% [不純物:0.01% 2-ジメチルアミノエタノール, 0.01% アクリル酸, 2000 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 99.8 wt% であった。

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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)

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⁴⁾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℃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℃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、本試験および再現性試験においては、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。また、TA98 の S9 mix 添加試験については、本試験Iと本試験IIの結果が異なるため、再現性試験を行った。また、陽性結果が得られた TA98 の S9 mix 添加試験については、本試験および再現性試験で変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上となった用量について、変異コロニー数の平均値から溶媒対照値を差し引いた値を、用量で除して比変異活性値 (誘発復帰変異コロニー数/mg) を求めた。

〔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〕

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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、S9 mix 無添加試験では、TA98 と TA1537 において 1500 μ g/プレート 以上で、その他の検定菌においては 5000 μ g/プレート で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験では、WP2 *uvrA* 以外の検定菌において 5000 μ g/プレート で抗菌性が認められた。

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 (TA98 と TA1537 の S9 mix 無添加試験は 2500 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、ともに上記の最高用量に基づいて公比2で5~6用量を設定して2回の本試験を実施した (Table 1, 2)。その結果、TA98 の S9 mix 添加試験においては、本試験Iではいずれの用量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が、本試験IIの最高用量の 5000 μ g/プレート で、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数を示した。また、TA98 の S9 mix 無添加試験と、その他の検定菌においては、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。

〔再現性試験〕

TA98 の S9 mix 添加試験では、本試験IIの最高用量の 5000 μ g/プレート でのみ溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められたため、再現性と用量依存性を確認するために、最高用量を 5000 μ g/プレート とし、等差 800 μ g/プレート で6用量を設定して再現性試験を実施した (Table 3)。その結果、用量依存的な変異コロニー数の増加が認められ、3400 μ g/プレート 以上では溶媒対照値の2倍以上となった。TA98 の S9 mix 添加試験での、当被験物質の最大比変異活性値は、10.6 誘発復帰変異コロニー/mg (再現性試験, 3400 μ g/プレート) で、同一条件下における陽性対照物質 2-アミノアントラセンの値 (508000 誘発復帰変異コロニー/mg) の約 50000 分の1であった。

以上の結果に基づき、アクリル酸 2-(ジメチルアミ

ノ)エチルエステルは、用いた試験系において変異原性を有する(陽性)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-(dimethylamino)ethyl acrylate 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	178 143 115 (145 \pm 31.6)	21 18 7 (15 \pm 7.4)	22 30 22 (25 \pm 4.6)	27 29 22 (26 \pm 3.6)	8 10 8 (9 \pm 1.2)	
	78.1	ND	ND	ND	34 18 29 (27 \pm 8.2)	17 15 12 (15 \pm 2.5)	
	156	166 127 136 (143 \pm 20.4)	14 9 10 (11 \pm 2.6)	21 22 23 (22 \pm 1.0)	31 30 31 (31 \pm 0.6)	11 16 18 (15 \pm 3.6)	
	313	139 114 118 (124 \pm 13.4)	11 6 11 (9 \pm 2.9)	30 30 24 (28 \pm 3.5)	22 33 34 (30 \pm 6.7)	11 9 15 (12 \pm 3.1)	
	625	147 116 153 (139 \pm 19.9)	12 7 6 (8 \pm 3.2)	23 27 25 (25 \pm 2.0)	31 37 31 (33 \pm 3.5)	12 20 16 (16 \pm 4.0)	
	1250	136 129 156 (140 \pm 14.0)	7 9 7 (8 \pm 1.2)	28 19 20 (22 \pm 4.9)	59 45 33* (46 \pm 13.0)	4 9 10* (8 \pm 3.2)	
	2500	169 193 180 (181 \pm 12.0)	11 8 13 (11 \pm 2.5)	36 34 27 (32 \pm 4.7)	8* 16* 12* (12 \pm 4.0)	7* 2* 4* (4 \pm 2.5)	
	5000	61* 23* 54* (46 \pm 20.2)	0* 0* 5* (2 \pm 2.9)	15* 9* 15* (13 \pm 3.5)			
S9 mix (+)	0	164 149 138 (150 \pm 13.1)	17 17 16 (17 \pm 0.6)	40 44 37 (40 \pm 3.5)	35 31 31 (32 \pm 2.3)	21 25 23 (23 \pm 2.0)	
	156	126 124 126 (125 \pm 1.2)	15 13 7 (12 \pm 4.2)	ND	31 21 26 (26 \pm 5.0)	9 8 13 (10 \pm 2.6)	
	313	129 132 114 (125 \pm 9.6)	8 7 9 (8 \pm 1.0)	37 29 25 (30 \pm 6.1)	13 22 22 (19 \pm 5.2)	5 10 9 (8 \pm 2.6)	
	625	158 127 153 (146 \pm 16.6)	15 8 10 (11 \pm 3.6)	29 28 29 (29 \pm 0.6)	21 16 20 (19 \pm 2.6)	8 12 9 (10 \pm 2.1)	
	1250	133 115 86 (111 \pm 23.7)	16 11 10 (12 \pm 3.2)	31 17 27 (25 \pm 7.2)	17 24 23 (21 \pm 3.8)	5 11 7 (8 \pm 3.1)	
	2500	138 123 102 (121 \pm 18.1)	8 20* 20* (16 \pm 6.9)	28 27 26 (27 \pm 1.0)	28 26 23 (26 \pm 2.5)	5 5 8 (6 \pm 1.7)	
	5000	149 139 152 (147 \pm 6.8)	8* 7* 9* (8 \pm 1.0)	21 28 42 (30 \pm 10.7)	43 34 45 (41 \pm 5.9)	16 8 16* (13 \pm 4.6)	
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	641 680 673 (665 \pm 20.8)	425 412 454 (430 \pm 21.5)	415 414 402 (410 \pm 7.2)	683 668 718 (690 \pm 25.7)	1924 1724 1891 (1846 \pm 107.2)	
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	659 676 721 (685 \pm 32.0)	295 304 321 (307 \pm 13.2)	677 613 546 (612 \pm 65.5)	312 322 324 (319 \pm 6.4)	327 333 257 (306 \pm 42.3)	

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 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinone were contained as impurities.

ND:Not done

Table 2. Mutagenicity of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate 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 (137 \pm 11.2)	13 9 9 (10 \pm 2.3)	25 36 28 (30 \pm 5.7)	24 13 21 (19 \pm 5.7)	8 6 7 (7 \pm 1.0)	
	78.1	ND	ND	ND	28 22 24 (25 \pm 3.1)	8 8 11 (9 \pm 1.7)	
	156	115 114 123 (117 \pm 4.9)	8 10 12 (10 \pm 2.0)	28 27 23 (26 \pm 2.6)	26 19 23 (23 \pm 3.5)	13 11 8 (11 \pm 2.5)	
	313	111 117 135 (121 \pm 12.5)	12 10 17 (13 \pm 3.6)	27 30 32 (30 \pm 2.5)	22 25 28 (25 \pm 3.0)	16 11 11 (13 \pm 2.9)	
	625	127 133 135 (132 \pm 4.2)	6 10 8 (8 \pm 2.0)	27 28 24 (26 \pm 2.1)	29 34 38 (34 \pm 4.5)	9 11 11 (10 \pm 1.2)	
	1250	121 104 118 (114 \pm 9.1)	12 8 7 (9 \pm 2.6)	32 28 26 (29 \pm 3.1)	43 27 39 (36 \pm 8.3)	2* 5* 6* (4 \pm 2.1)	
	2500	160 161 169 (163 \pm 4.9)	10* 10* 12* (11 \pm 1.2)	41 42 33 (39 \pm 4.9)	10* 9* 5* (8 \pm 2.6)	2* 3* 2* (2 \pm 0.6)	
	5000	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	2* 8* 24 (11 \pm 11.4)			
S9 mix (+)	0	104 113 111 (109 \pm 4.7)	13 15 10 (13 \pm 2.5)	34 31 30 (32 \pm 2.1)	27 23 23 (24 \pm 2.3)	9 8 7 (8 \pm 1.0)	
	156	104 115 133 (117 \pm 14.6)	15 17 12 (15 \pm 2.5)	ND	23 39 25 (29 \pm 8.7)	8 10 14 (11 \pm 3.1)	
	313	137 108 110 (118 \pm 16.2)	11 12 12 (12 \pm 0.6)	28 30 38 (32 \pm 5.3)	30 30 35 (32 \pm 2.9)	3 8 6 (6 \pm 2.5)	
	625	107 104 103 (105 \pm 2.1)	7 13 12 (11 \pm 3.2)	39 30 42 (37 \pm 6.2)	24 19 12 (18 \pm 6.0)	3 6 4 (4 \pm 1.5)	
	1250	106 94 100 (100 \pm 6.0)	9 8 8 (8 \pm 0.6)	36 28 29 (31 \pm 4.4)	23 20 27 (23 \pm 3.5)	5 12 5 (7 \pm 4.0)	
	2500	102 95 101 (99 \pm 3.8)	13 9 11 (11 \pm 2.0)	30 35 36 (34 \pm 3.2)	29 28 27 (28 \pm 1.0)	9 2 6 (6 \pm 3.5)	
	5000	107 114 96 (106 \pm 9.1)	13* 8* 14* (12 \pm 3.2)	44 39 34 (39 \pm 5.0)	66 45 55 (55 \pm 10.5)	14 9* 11* (11 \pm 2.5)	
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	644 728 760 (711 \pm 59.9)	370 359 383 (371 \pm 12.0)	244 282 281 (269 \pm 21.7)	495 608 544 (549 \pm 56.7)	557 484 444 (495 \pm 57.3)	
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	440 456 431 (442 \pm 12.7)	333 342 317 (331 \pm 12.7)	523 499 534 (519 \pm 17.9)	321 355 296 (324 \pm 29.6)	255 311 324 (297 \pm 36.7)	

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 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinone were contained as impurities.

ND:Not done

Table 3. Mutagenicity of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in confirmation test of reverse mutation test 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.)					
					Frameshift type		
					TA98		
S9 mix (+)	0				34	22	31 (29 \pm 6.2)
	1000				23	20	27 (23 \pm 3.5)
	1800				48	32	27 (36 \pm 11.0)
	2600				63	54	52 (56 \pm 5.9)
	3400				72	52	70 (65 \pm 11.0)
	4200				79	74	57 (70 \pm 11.5)
	5000				63	76	70 (70 \pm 6.5)
Positive control S9 mix(+)	Chemical				2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)				0.5		
	Number of colonies/plate				281	255	313 (283 \pm 29.1)

2AA:2-Aminoanthracene

Purity was 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinon were contained as impurities.