

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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-(Dimethylamino)ethyl acrylate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理(24時間)では0.06 mg/ml、短時間処理(6時間)のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下ではそれぞれ0.04 mg/mlおよび0.2 mg/mlであった。各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5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時間および48時間連続処理では0.060 mg/mlの濃度であったことから、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。短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下ではそれぞれ0.010 mg/mlおよび0.050 mg/mlが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、この濃度を含む2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(0.060 mg/ml)で染色体の構造異常(gapを含む)および倍数性細胞が誘発され、その頻度は23.5%および10.75%であった。48時間連続処理した高濃度群(0.060 mg/ml)で染色体の構造異常(gapを含む)が誘発された(8.5%)。また、すべての処理群において細胞毒性のために倍数性細胞については規定の細胞数が観察できなかったが、高濃度群(0.060 mg/ml)で倍数性細胞が誘発された(6.21%)。短時間処理では、S9 mix非存在下において、0.020 mg/ml以上の処理群では細胞毒性のため分析できなかったが、0.010 mg/mlでは、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発された(16.0%)。また、0.0050 mg/mlおよび0.01 mg/mlにおいて倍数性細胞が認められ、その頻度は1.25%および10.88%であった。S9 mix存在下では、0.10 mg/ml以上の処理群では細胞毒性のため分析できなかったが、0.050 mg/mlでは、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発された(12.5%)。また、0.025 mg/mlおよび0.050 mg/mlにおいて倍数性細胞の誘発作用が認められ、その誘発頻度は1.25%お

び5.25%であった。

以上の結果より、本試験条件下でアクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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を入れたディッシュ(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

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステル(略号:DMAEA, CAS No.:2439-35-2, ロット番号:5P07, (株)日本触媒)は、無色-黄色透明液体で、水に対しては54.3 mg/ml, DMSOでは50 mg/ml, アセトンでは50 mg/mlで溶解し、融点-75°C, 沸点170°Cで、分子式C₇H₁₃NO₂, 分子量143.21, 純度99.9 wt%(不純物としてジメチルアミノエタノール0.01%, アクリル酸0.01%, メトキノン(重合防止剤)2000 ppmを含む)の物質である。

被験物質原体は、熱、光、過酸化剤などによって重合が起こることがあり、経時により黄褐色に着色する。

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

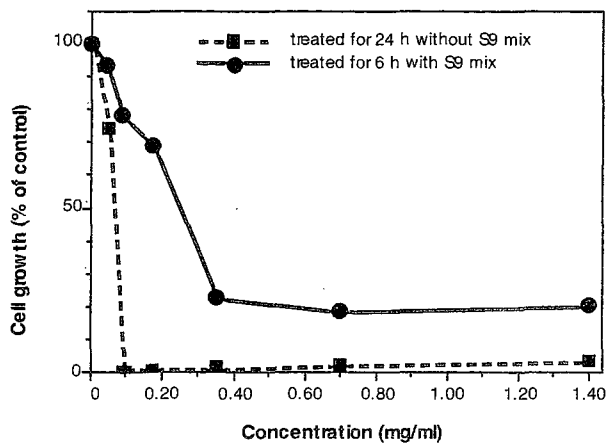


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate

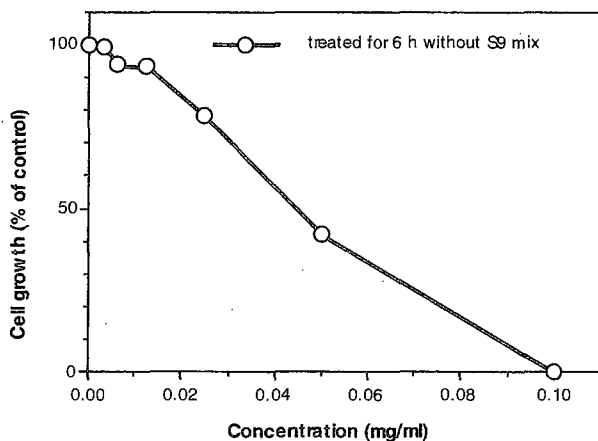


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate

定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、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™, オリンパス光学工業 (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、連続処理における 50% の増殖抑制濃度は、0.06 mg/ml、短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では、それぞれ 0.04 mg/ml および 0.2 mg/ml であった (Fig. 1, 2)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、

50% 増殖抑制濃度の 2 倍濃度を最高処理濃度とし、公比 2 で 5 濃度を設定した (24 時間および 48 時間連続処理: 0.0075, 0.015, 0.030, 0.060, 0.12 mg/ml, 短時間処理の S9 mix 非存在下: 0.0050, 0.010, 0.020, 0.040, 0.080 mg/ml, 短時間処理の S9 mix 存在下: 0.025, 0.050, 0.10, 0.20, 0.40 mg/ml)。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 μg/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ュにつき 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)、連続処理では 0.060 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。短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では、それぞれ 0.010 mg/ml および 0.050 mg/ml が染色体分析の可能な最高濃度であり、それ以上の濃度では分裂中期細胞が得られなかったことから、これらの濃度を含む 2 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²⁾ ($p < 0.05$)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。アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルを加えて 24 時間連続処理した高濃度群 (0.060 mg/ml) で染色体の構造異常 (gap を含む) および倍数性細胞が誘発され、その頻度は 23.5% および 10.75% であった。

48 時間連続処理した高濃度群 (0.060 mg/ml) で染色体の構造異常 (gap を含む) が誘発され、その頻度は 8.5% であった。また、すべての処理群において細胞毒性のために倍数性細胞については規定の細胞数が観察できなかったが、高濃度群 (0.060 mg/ml) で倍数性細胞が誘発され、その頻度は 6.21% であった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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、0.020 mg/ml 以上の処理群では細胞毒性のため分析できなかったが、0.010 mg/ml では、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 16.0% であった。また、0.0050 mg/ml および 0.01 mg/ml において倍数性細胞の誘発作用が認められ、その誘発頻度は 1.25% および 10.88% であった。S9 mix 存在下では、0.10 mg/ml 以上の処理群では細胞毒性のため分析できなかったが、0.050 mg/ml では、染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その発生頻度は 12.5% であった。また、0.025 mg/ml および 0.050 mg/ml において倍数性細胞の誘発作用が認められ、その頻度は 1.25% および 5.25% であった。

従って、アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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, 佐々木澄志, 若栗 忍,
 日下部博一, 中川ゆづき,
 水谷正寛, 古畑紀久子, 橋本恵子
 (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, Kiyoshi Sasaki,
 Shinobu Wakuri, Hirokazu Kusakabe,
 Yuzuki Nakagawa, Masahiro Mizutani,
 Kikuko Furuhashi, Keiko Hashimoto
 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-(dimethylamino)ethyl acrylate (DMAEA)** 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		TAG (%)	TA (%)	Polyploid ⁴⁾ (%)	SA	NA	
Control			200	0	2	2	0	0	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.50			-
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38			100.0
DMAEA	0.015	24	200	0	0	0	2	1	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.50			82.5
DMAEA	0.030	24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	+	+	72.0
DMAEA	0.060	24	200	8	23	44	1	1	0	77	0	47* (23.5)	42 (21.0)	10.75*			65.0
DMAEA	0.12 ***	24	-											-			13.0
MC	0.00005	24	200	6	32	109	1	0	0	148	0	94 (47.0)	91 (45.5)	0.13			-
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.63			100.0
DMAEA	0.015	48	200	3	4	0	2	0	0	9	1	7 (3.5)	5 (2.5)	0.26 ⁷⁾			58.5
DMAEA	0.030	48	180	3	3	0	9	1	0	16	1	8 (4.4)	6 (3.3)	0.36 ⁸⁾	+	+	56.5
DMAEA	0.060	48	200	0	4	10	11	2	10	37	4	17* (8.5)	17 (8.5)	6.21 ⁹⁾ *			103.5
DMAEA	0.12 ***	48	-											-			8.0
MC	0.00005	48	200	6	35	127	12	7	20	207	1	98 (49.0)	96 (48.0)	0.25			-

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.

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)Concurrent cytotoxicity, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7)Seven hundred and sixty four cells were analysed. 8)Five hundred and fifty seven cells were analysed. 9)Seven hundred and eighty nine cells were analysed. *:Significantly different from historical solvent control data at p<0.05 by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **:Purity was 99.9 wt%. 2-Dimethylamino ethanol (0.01 %), acrylate (0.01 %) and methoquinone (2000 ppm) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate (DMAEA)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 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		TAG (%)	TA (%)	Polyploid ⁴⁾ (%)	SA	NA	
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.00			-	
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	1	0	1	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			100.0	
DMAEA	0.0050	-	6-(18)	200	2	0	1	1	0	0	4	4 (2.0)	2 (1.0)	1.25*			97.5	
DMAEA	0.010	-	6-(18)	200	4	12	39	1	0	0	56	32* (16.0)	30 (15.0)	10.88*	+	+	99.0	
DMAEA	0.020 ***	-	6-(18)	-										-			17.0	
DMAEA	0.040 ***	-	6-(18)	-										-			15.5	
DMAEA	0.080 ***	-	6-(18)	-										-			17.0	
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25			-	
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	2	0	5	0	0	7	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00			100.0	
DMAEA	0.025	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	1.25*			85.0	
DMAEA	0.050	+	6-(18)	200	6	7	15	0	0	0	28	25* (12.5)	19 (9.5)	5.25*	+	+	80.0	
DMAEA	0.10 ***	+	6-(18)	-										-			39.0	
DMAEA	0.20 ***	+	6-(18)	-										-			36.0	
DMAEA	0.40 ***	+	6-(18)	-										-			37.5	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	8	86	387	11	3	120	615	0	185 (92.5)	184 (92.0)	0.13			-

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.

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 was 99.9 wt%. 2-Dimethylamino ethanol (0.01 %), acrylate (0.01 %) and methoquinone (2000 ppm) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because there were small number of metaphases due to severe cytotoxicity.

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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-(Dimethylamino)ethyl acrylate by Oral Administration in Rats

要約

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルは、カチオン系凝集剤、エマルジョン改善剤、繊維処理剤、粘着剤、接着剤などの製造に使用されている。毒性に関する情報としては、眼、皮膚、粘膜に対して刺激性を有し、ラットの経口投与によるLD₅₀値は455 mg/kgとの報告がある¹⁾。今回、OECDによる既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、SDラット(1群雌雄各12匹)に4, 20および100 mg/kgの用量を交配前14日から交配を経て雄は計43日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育3日まで経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

1. 反復投与毒性

100 mg/kg群において、雄で一過性の体重増加抑制および摂餌量減少、雌で死亡が2例認められた。剖検では雌雄で前胃壁の肥厚および十二指腸リンパ節の腫大が観察され、病理組織学検査では前胃粘膜に潰瘍、炎症性細胞の浸潤および粘膜上皮の過形成、十二指腸リンパ節に形質細胞の増生が認められた。さらに雌では胸腺の重量減少と萎縮が認められた。また、雄の血液学検査で網状赤血球、血小板および分葉核球数の増加、血液生化学検査でアルブミンの減少が認められた。20 mg/kg群においても雄の前胃に同様な組織変化が認められた。

2. 生殖発生毒性

親動物の交尾率、受胎率、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率、妊娠期間、分娩および哺育行動には被験物質に起因する変化は認められなかった。また、出産児数、出産生児数、性比、出生率、新生児の4日生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにおいても被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果より、アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルの反復投与毒性に関する無影響量は雄が4 mg/kg/day、雌が20 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、親動物および児動物ともに100 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステル(株)日本触媒工業、Lot No. 5P07、純度99.9%)は、融点-75℃、

沸点170℃、水およびアセトンに溶けやすい無色～黄色透明の液体である。被験物質は冷蔵・遮光下で保管した。また、試験期間中安定であったことが確認された。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より入手した雌雄のSDラット(Crj:CD)を6日間検疫・馴化後、試験に供した。投与開始前日に体重別層化無作為抽出法により、1群につき雌雄各12匹を振り分けた。投与開始時の週齢は雌雄とも9週齢、体重範囲は雄が324～369 g、雌が212～244 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中、温度20～25℃、湿度40～70%、換気約12回/時、照明12時間/日(7:00～19:00)に自動調節された飼育室を使用した。動物は実験動物用床敷(ペータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに、群分け後は1匹、交配期間は雌雄各1匹、哺育期間は1腹で収容し、飼育した。

動物には、オートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1:オリエンタル酵母工業(株))および5 μmのフィルターで濾過後、紫外線照射した水道水をそれぞれ自由摂取させた。

3. 投与量および投与方法

SDラットの雌雄を用いて、被験物質を50, 100および200 mg/kgの用量で7日間経口投与した結果、雌雄とも200 mg/kg群で体重減少あるいは増加抑制、摂餌量減少、削瘦が認められた。また剖検では、200 mg/kg群で前胃粘膜の肥厚、白色化、出血、潰瘍、胃の穿孔と周囲組織との癒着、十二指腸粘膜の白色化などの消化管の変化が認められ、100 mg/kg群でも前胃に同様な変化が認められた。以上の結果から、本試験では高用量を100 mg/kgとし、以下公比5で中用量を20 mg/kg、低用量を4 mg/kgとした。また、媒体(コーン油)のみを投与する対照群を設けた。

投与期間は、雌雄とも交配前14日間、交配期間、および雄は剖検前日までの計43日間、雌は交尾成立後、妊娠、分娩を経て哺育3日までとし、コーン油に溶解させた被験物質を胃ゾンデを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与液量は5 ml/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。

投与液の調製はイエローランプ照明下で行い、投与液は褐色瓶に入れ、投与に供するまで冷蔵・遮光下で保存した。なお、投与開始前に投与液中の被験物質の安定性

および濃度を確認した。

4. 反復投与毒性に関する観察・検査

1) 一般状態

全例について生死、外観、行動等を投与前および投与後に毎日観察した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。

2) 体重および摂餌量

体重は、雌雄とも投与開始日、投与開始後3, 7, 14日、およびその後週1回、交尾した雌は妊娠0, 7, 14, 20日および哺育0, 4日に測定した(交尾確認日を妊娠0日、分娩確認日を哺育0日とする)。また、体重増加量を交配前は投与開始日、妊娠期間は妊娠0日、哺育期間は哺育0日の体重を基準に算出した。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定した。

3) 雄の血液学検査

雄の全生存動物について、解剖日の前日より約21時間絶食させ、チオペンタールナトリウム(ラボナル：田辺製薬(株))の腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採取した血液の一部をEDTA-2Kにより凝固阻止し、赤血球数(シースフローDCインピーダンス検出法)、白血球数(RF/DCインピーダンス検出法)、血小板数(シースフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度(SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500: 東亜医用電子(株))、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A: 立石電機(株))、網状赤血球数(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網赤血球測定装置(R-2000: 東亜医用電子(株))により測定した。また、検査結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。

4) 雄の血液生化学検査

雄の全生存動物について、解剖日に採取した血液を室温で約30分間放置した後、3000 r.p.m.で10分間遠心分離し、得られた血清について、GOT(SSCC改良法)、GPT(SSCC改良法)、ALP(GSCC改良法)、 γ -GTP(SSCC改良法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、グルコース(GK-G6PDH法)、総コレステロール(CES-CO-POD法)、トリグリセライド(LPL-GK-G3PO-POD法)、クレアチニン(Jaffé法)、総ビリルビン(Jendrassik改良法)、総蛋白(Biuret法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出)、カルシウム(O-CPC法)、無機リン(UV法)、ナトリウム、カリウム、クロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(日立736-10形: (株)日立製作所)により測定した。

5) 病理検査

雌雄とも最終投与日の翌日に、全生存動物についてチオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹

大動脈の切断・放血により安楽死させて剖検し、胸腺、肝臓、腎臓、副腎、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、解剖日の体重を基に相対重量(対体重比)を算出した。さらに、これらの器官に加えて、脳、下垂体、眼球およびハーダー腺、甲状腺および上皮小体、心臓、肺、脾臓、胃、腸管(十二指腸～直腸)、膀胱、卵巣、骨髄(大腿骨)、坐骨神経および脊髄を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後保存した。ただし、死亡例以外の眼球およびハーダー腺はダビッドソン液、精巣および精巣上体はブアン液で固定した。

病理組織検査は雌雄の対照および100 mg/kg群の脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、胃、十二指腸、副腎、精巣、精巣上体、非妊娠雌の卵巣、全新生児死亡および哺育異常を示した母動物の乳腺、ならびにその他の肉眼的異常部位について、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検した。また、器官重量測定で減少がみられた雌の胸腺、さらに、雄の血液学検査で網状赤血球および血小板数の増加がみられたことから、雌雄の大腿骨骨髄についても対照および100 mg/kg群を検査した。その結果、雌雄の胃および雌の胸腺に被験物質に起因する変化が認められたので、4および20 mg/kg群のこれらの器官についても検査した。なお、肉眼的に変化がみられた脾十二指腸リンパ節を検査した結果、被験物質に起因する変化が認められたが、胃の変化に伴った二次的变化と判断し、4および20 mg/kg群については検査しなかった。

5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

1) 生殖機能

交配前の投与期間終了後、各群内で雄1雌1の交配対を設け、最長14日間昼夜同居させ、毎日午前中に雌の膣垢を採取し、ギムザ染色して鏡検した。膣栓形成あるいは膣垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。交尾した対は雌雄を分離し、以後の検査に供した。これらの結果から、交尾所要日数(交配後、交尾成立までに要した日数)、交尾成立までに逸した発情期の回数、交尾率($[\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}] \times 100$)、受胎率($[\text{受胎動物数} / \text{交尾動物数}] \times 100$)を算出した。

2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が終了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。その後、新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ、一般状態、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。

哺育4日の解剖時に卵巣、子宮を摘出して黄体数および着床数を検査した。交尾確認後25日を経ても分娩しない雌は剖検し、肉眼的に着床が認められない動物の子宮は2% KOH水溶液に浸漬し、着床の有無を確認した。また、全ての出産児が死亡した母動物はその時点で剖検し、乳腺を保存した。これらの結果から、妊娠期間(妊娠0日から出産が確認された日までの期間)、出産率

(〔生児出産雌数/受胎雌数〕×100), 着床率(〔着床数/黄体数〕×100), 分娩率(〔総出産児数/着床数〕×100)を算出した。

3) 新生児の観察・検査

(1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数, 出産生児数, 死産児数, 性別および外表異常の有無を検査した。その後, 一般状態, 死亡の有無を毎日観察した。死亡動物は食殺等で検査に耐えないものを除き, 10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬・固定後, 実体顕微鏡下で剖検した。哺育0および4日の生存児数から出生率(〔出産生児数/総出産児数〕×100), 新生児の4日生存率(〔哺育4日生児数/出産生児数〕×100)を算出した。

(2) 体重

哺育0および4日に1腹毎に雌雄単位で測定し, それぞれの平均値を算出した。また, 哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。

(3) 剖検

全ての生存児について哺育4日に口腔を含む外表を検査した後, チオペン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を切断・放血し, 安楽死させて剖検した。

6. 統計解析

計量データについて, パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い, 分散が一様の場合は一元配置分散分析を行った。分散が一様でない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合で各群の例数が一定ならばDunnnett法またはDunnnett型, 不定ならばScheffé法またはScheffé型により多重比較を行った。計数データについては, 組織所見をArmitageの χ^2 検定, その他の項目をFisherの直接確率法により検定した。新生児に関するデータは各母動物毎に算出した平均値を統計単位とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡動物

100 mg/kg群の雌2例が投与開始後1日および16日に死亡した。後者は投与開始後13日に自発運動の低下, うずくまり, ラッセル音, 赤色鼻汁および軟便を示したが, 翌日にはこれらの症状が消失し, 以後死亡するまで投与後の流涎が観察された以外に変化は認められなかった。前者には死亡に関連する一般状態の変化は認められなかった。病理検査では, 共通する所見として肺のうっ血および出血が認められた他, 前者には赤色胸水, 食道の出血巣と潰瘍, 前胃粘膜の出血巣, 片側腎臓のう胞が認められ, 後者には肺の水腫, 前胃粘膜の潰瘍, 炎症性細胞の浸潤および粘膜の過形成, 腺胃粘膜の出血巣, 胸腺の萎縮および片側副腎皮質の壊死が認められた。

2) 一般状態

投与直後の流涎が100 mg/kg群の雄では投与開始後4日から, 雌では8日から観察され, 投与終了時までには断続的に発現する例を含めてほぼ全例で認められた。これらの一部には投与直前から反射的に流涎する例も観察された。その他, 哺育異常を示した母動物で自発運動の低下, 肛門周囲の汚れ, 体温低下または紅涙が対照群の1例で哺育1日に, 20 mg/kg群の1例で哺育3日以降に認められた。

3) 体重(Fig.1,2)

雄では, 100 mg/kg群で投与開始後3日の体重増加量が有意な低値を示したが, 以後は有意な変化は認められなかった。雌では, 全期間を通して対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

4) 摂餌量

雄では, 100 mg/kg群で投与開始後3日の摂餌量が有意な低値を示したが, 以後は有意な変化は認められなかった。その他, 4 mg/kg群で投与開始後42日の摂餌量が有意な高値を示したが, 20および100 mg/kg群では有意差が認められなかったことから, 偶発的な変化と判断した。雌では, 全期間を通して対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

5) 雄の血液学検査(Table 1)

網状赤血球および血小板数の有意な増加が100 mg/kg群で認められた。また, 同群では, リンパ球比が有意な低値を, 分葉核球比が有意な高値を示し, 実数換算値では分葉核球数の有意な増加が認められた。

6) 雄の血液生化学検査(Table 2)

アルブミンの有意な減少が100 mg/kg群で認められた。その他, 4 mg/kg群の総ビリルビンが有意な高値を示したが, 20および100 mg/kg群では有意な変化が認められなかったことから, 偶発的なものと判断した。また, 100 mg/kg群のクロールが有意な高値を示したが, 生理的変動範囲内の値であった。

7) 器官重量(Table 3)

胸腺の絶対重量および相対重量の有意な減少が100 mg/kg群の雌で認められた。その他, 4 mg/kg群の雌で副腎の絶対重量が有意な低値を示したが, 20および100 mg/kg群では有意な変化が認められなかったことから, 偶発的な変化と判断した。雄では, いずれの器官においても, 絶対重量および相対重量とも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

8) 剖検所見(Table 4)

投与終了後解剖動物では, 前胃壁の肥厚が20 mg/kg群の雄2例, 100 mg/kg群の雌雄全例に認められた。肥厚した前胃粘膜の表面は白色化し, 粗造を呈していた。少数例では前胃漿膜面の一部と周囲の腹膜, 横隔膜や肝

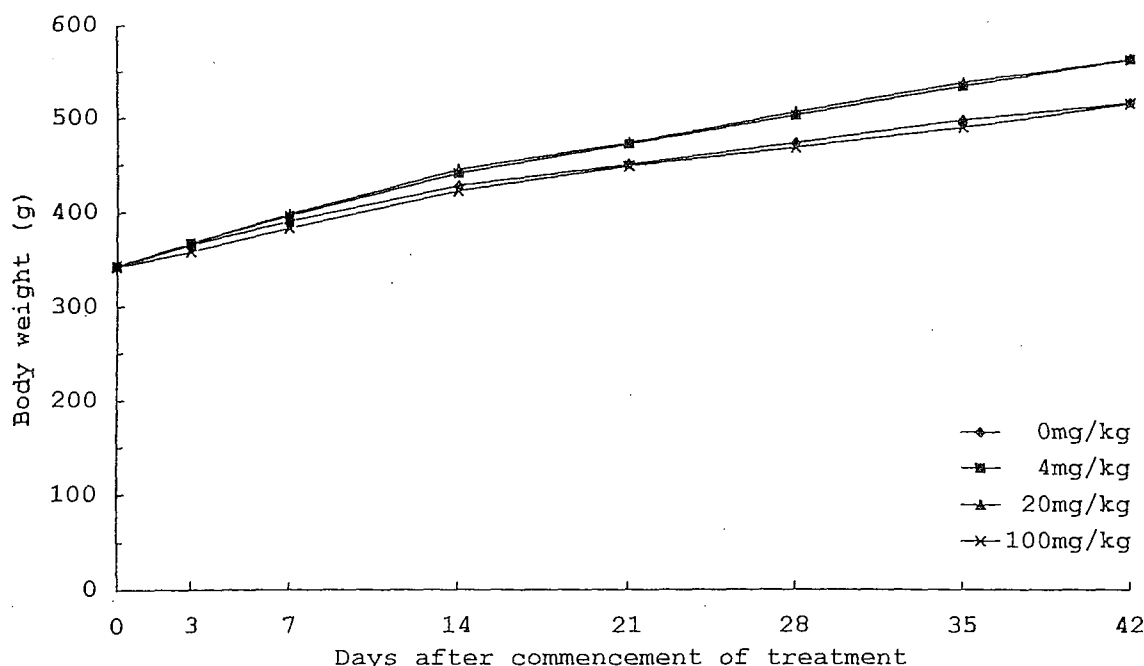


Fig.1 Body weight changes of male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

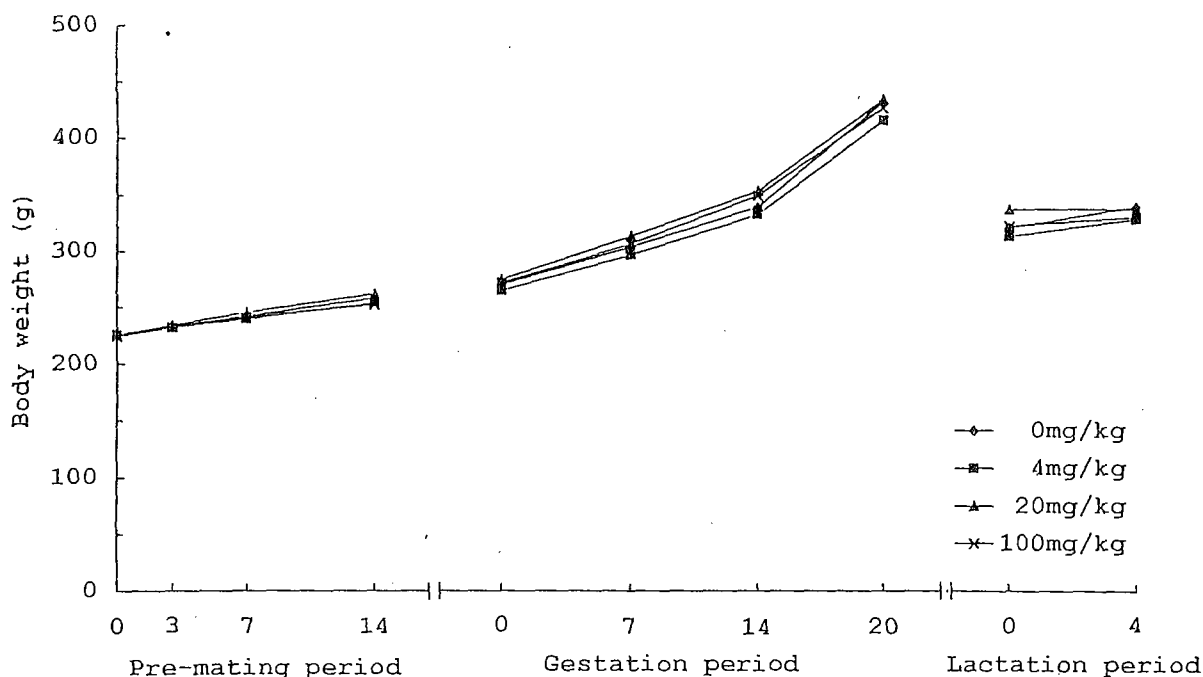


Fig.1 Body weight changes of female rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

臓、横隔膜と肺の癒着が観察された。また、脾十二指腸リンパ節の腫大が100 mg/kg群の雌雄各7例で認められた。

全新生児が死亡した対照群の雌の1例では、胸腺および脾臓の小型化、胃の膨満、両側副腎の腫大、膣の膿貯留、両側ハーダー腺の褐色化が認められた。また、哺育3日以降に授乳行動を示さなかった20 mg/kg群の雌の1例では、胸腺の小型化、腺胃粘膜の出血巣、両側副腎の腫大が認められた。その他に、被験物質投与群で種々の

変化が認められたが、発現状況から偶発病変と判断した。

9) 組織所見 (Table 5)

投与終了後解剖動物では、被験物質に起因する変化が雌雄の前胃、脾十二指腸リンパ節および雌の胸腺に認められた。すなわち、前胃粘膜の潰瘍とそれに伴い生じた炎症性細胞の浸潤および粘膜上皮の過形成が20 mg/kg群で雄2例、100 mg/kg群の雌雄全例に認められ、100

mg/kg群では発現頻度に有意差が認められた。潰瘍が漿膜面にまで及び、周囲の組織と癒着する例が認められる一方、粘膜の過形成あるいは炎症性細胞の浸潤のみがみられる例もあった。肉眼的に腫大していた脾十二指腸リンパ節では、髄索における形質細胞の増生が認められた。雌の胸腺では、軽度あるいは中等度の萎縮が対照、20および100 mg/kg群のそれぞれ1, 1, 3例で認められ、100 mg/kg群でわずかに増加する傾向がみられた。

非妊娠雌の卵巣、全新生児死亡および哺育異常を示した母動物の乳房ならびに雌雄の大腿骨骨髓には、特記すべき異常所見は認められなかった。

その他に、被験物質投与群で種々の変化が認められたが、いずれも自然発生的に観察される変化であり、発現状況に一定の傾向がないことから偶発病変と判断した。

2. 生殖発生毒性

1) 生殖機能 (Table 6)

ほとんどの雌が交配開始後5日以内に発情期を示して交尾し、交尾率、交尾所要日数および交尾成立までに逸した発情期の回数ともに有意な差は認められなかった。100 mg/kg群の雌2例は交配開始日から発情休止期が継続したが、これらのうち1例は交配開始後14日に発情期を示して交尾し、他の1例も陰垢検査では交尾確認できなかったものの、後の観察で受胎していたことが判明した。また、非妊娠動物は各群とも1例のみであり、受胎率にも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

2) 分娩・哺育状態 (Table 7)

各群とも母動物全例が正常な分娩を示した。また、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率および分娩率には、対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

哺育期間の観察において、哺育異常が対照および100 mg/kg群の母動物各1例で観察され、哺育2日までに全新生児が死亡した。いずれも分娩日から新生児の回集、授乳などの哺育行動を示さず、さらに100 mg/kg群の1例は全新生児を食殺した。また、20 mg/kg群の母動物1例は哺育3日以降、新生児の回集および授乳行動を示さなかった。しかし、これらの哺育異常については、各群1例のみの発現であったことから、偶発的な変化と判断した。

3) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存率 (Table 7)

同腹内全新生児死亡が対照および100 mg/kg群の各1腹で認められた他は、死亡児は4, 20および100 mg/kg群でそれぞれ1, 3, 1腹で1~2例観察されただけであり、出産児数、出生児数、性比、出生率および新生児の4日生存率ともに対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

(2) 出生児の観察

各群いずれの新生児にも外表異常は認められなかつ

た。また、出生日に未受乳の新生児が各群で観察されたが、母動物が授乳行動を示さなかった腹以外のほとんどは翌日に受乳し、一般状態にも異常は認められなかった。

(3) 体重 (Table 7)

各被験物質投与群の雌雄ともに対照群とほぼ同様な体重および体重増加量を示し、有意差は認められなかった。

(4) 剖検

腎盂拡張が、生存動物では20 mg/kg群の1腹で1例および100 mg/kg群の1腹で6例、死亡動物では対照群の1腹で10例に観察された。その他には、生存動物および死亡動物ともに異常は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性

反復投与による影響として、100 mg/kg群の雄で投与初期の一過性の体重増加抑制と摂餌量減少、雌で死亡が2例認められた。死亡例には共通する所見として肺のうっ血、出血、水腫が認められた。被験物質が属するアクリル酸エステル類により急性中毒死した動物の特徴的所見は、肺の充血および出血であることが知られていることから²⁾、同様な原因により死亡した可能性が考えられる。

病理検査において、前胃の肥厚が雄では20 mg/kg以上の群、雌では100 mg/kg群で認められ、組織学的には前胃の潰瘍およびそれに伴う炎症性細胞の浸潤と粘膜上皮の過形成が観察された。被験物質と類似の化合物であるアクリル酸エチルエステルは、ラットの前胃に対し刺激性を有し、潰瘍や炎症性変化および上皮の過形成を起こすことが報告されている²⁻⁵⁾。したがって、被験物質もこのアクリル酸エステルと同様に前胃に対して刺激性を有するものと考えられる。

脾十二指腸リンパ節における形質細胞の増生が100 mg/kg群の雌雄で肉眼的な腫大を伴って認められた。本変化はリンパ節近辺にある炎症性変化に対する生理的反応として生じるものであり⁶⁾、前胃の潰瘍による炎症性変化に反応した二次的な変化と考えられる。また、胸腺の重量減少と萎縮の増加傾向が100 mg/kg群の雌で認められたが、本変化はストレス状態の動物で観察されるものであり⁷⁾、被験物質に特異的な変化というよりも、妊娠、分娩および哺育の負荷に被験物質の影響が加わったことにより生じた非特異的な変化と考えられる。

雄の血液学検査において、100 mg/kg群で認められた網状赤血球および血小板数の増加については、前胃の病変部からの出血に対する代償性の造血機能亢進像であり、分葉核球数の増加についても前胃の炎症に伴った変化と推察される。また、血液生化学検査におけるアルブミンの減少は、その他に肝臓あるいは腎臓への影響を示唆する変化が認められなかったことから、前胃の病変に伴った喪失性の二次的な変化である可能性が考えられる。

投与直後の流涎が100 mg/kg群の雌雄で観察された

が、一部には投与直前から反射的に発現する例もみられたことから、被験物質の局所刺激性に起因したもので、反復投与毒性を示す変化ではないと判断した。

2. 生殖発生毒性

親動物の検査において、交尾率、受胎率、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率、妊娠期間、分娩および哺育行動ともに被験物質の影響を示唆する変化は認められなかった。また、出産児数、出生生児数、性比、出生率、新生児の生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにおいても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、被験物質による親動物の生殖機能、分娩・哺育機能および次世代の発育への影響はないと考えられる。

以上のように、本試験では反復投与による一般毒性学的影響として、親動物には前胃の潰瘍、粘膜上皮の増生など、主に被験物質の刺激性に起因する変化が雄では20 mg/kg以上の群、雌では100 mg/kg群で認められ、2例が死亡した。しかし、親動物の生殖機能および分娩・哺育機能ならびに次世代の発育への影響は認められなかった。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影響量は雄が4 mg/kg/day、雌が20 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は親動物および児動物ともに100 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) EPA/OTS, Doc #89-910000064, 1991.
- 2) 後藤 稔, 池田正之, 原 一郎編, "産業中毒便覧(増補版)," 医歯薬出版株式会社, 東京, 1984, pp.893-993.
- 3) B. I. Ghanayem et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 323(1985).
- 4) B. I. Ghanayem et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 336(1985).
- 5) B. I. Ghanayem et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **83**, 576(1986).
- 6) J. M. Ward, "Monographs on Pathology of Laboratory Animals:Hemopoietic System," eds. by T. C. Jones, J. M. Ward, U. Mohr and R. D. Hunt, Springer-Verlag, Berlin, 1990, pp.155-161.
- 7) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies," Elsevier, Amsterdam, 1990, pp.112-114.

連絡先

試験責任者：松浦郁夫
試験担当者：田谷ゆかり, 土谷 稔, 涌生ゆみ,
豊田直人, 高野克代
(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所
〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Ikuo Matsuura (Study director)
Yukari Taya, Minoru Tsuchitani,
Yumi Wako, Naoto Toyota,
Katsuyo Takano
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
Kashima Laboratory
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-02, Japan
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Hematological examination in male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Number of animals	12	12	12	12
RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	851 \pm 24.9	842 \pm 40.9	840 \pm 38.8	830 \pm 34.9
Ht (PCV) (%)	45.5 \pm 1.08	44.9 \pm 1.32	45.8 \pm 1.79	44.1 \pm 1.52
Hb (g/dl)	15.8 \pm 0.46	15.7 \pm 0.54	15.9 \pm 0.52	15.4 \pm 0.35
Reticulo (%)	25 \pm 2.2	27 \pm 3.3	26 \pm 3.4	30 \pm 3.3**
MCV (μm^3)	53.5 \pm 1.32	53.4 \pm 2.32	54.6 \pm 1.68	53.1 \pm 1.87
MCH (pg)	18.6 \pm 0.52	18.7 \pm 0.95	19.0 \pm 0.60	18.6 \pm 0.69
MCHC (%)	34.7 \pm 0.36	35.0 \pm 0.83	34.8 \pm 0.61	34.9 \pm 0.60
Plt ($10^4/\mu\text{l}$)	103.0 \pm 9.03	102.5 \pm 12.28	104.6 \pm 7.78	115.3 \pm 13.27*
WBC ($10^2/\mu\text{l}$)	120 \pm 15.7	120 \pm 24.9	122 \pm 32.5	159 \pm 43.4
Differential leukocyte counts (%)				
Lymphocytes	81 \pm 4.4	84 \pm 5.0	82 \pm 4.5	68 \pm 7.9**
Neutrophils				
segmented	13 \pm 4.7	10 \pm 4.5	12 \pm 4.2	25 \pm 8.1**
band	0 \pm 0.5	1 \pm 0.9	0 \pm 0.7	1 \pm 0.5
Eosinophils	1 \pm 0.8	1 \pm 0.8	2 \pm 1.4	1 \pm 1.2
Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
Monocytes	4 \pm 2.7	5 \pm 2.4	5 \pm 3.0	5 \pm 2.7
Differential leukocyte counts ($\times 10^2/\mu\text{l}$)				
Lymphocytes	98 \pm 13.9	100 \pm 21.4	99 \pm 26.0	109 \pm 34.3
Neutrophils				
segmented	16 \pm 6.0	12 \pm 4.8	15 \pm 7.3	39 \pm 16.0**
band	0 \pm 0.5	1 \pm 1.2	0 \pm 0.7	1 \pm 0.8
Eosinophils	1 \pm 1.0	1 \pm 1.1	2 \pm 2.1	2 \pm 2.5
Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
Monocytes	5 \pm 3.7	7 \pm 3.8	6 \pm 3.6	8 \pm 5.3

Values are expressed as Mean \pm S.D.

Significantly different from control: *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 2 Blood chemical examination in male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Number of animals	12	12	12	12
GOT (IU/l)	83 \pm 17.5	87 \pm 15.3	85 \pm 21.3	82 \pm 18.3
GPT (IU/l)	24 \pm 4.0	25 \pm 5.4	20 \pm 4.8	24 \pm 3.6
γ -GTP (IU/l)	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
ALP (IU/l)	268 \pm 60.3	256 \pm 48.6	251 \pm 71.9	243 \pm 37.4
Total bilirbin (mg/dl)	0.1 \pm 0.06	0.2 \pm 0.03*	0.2 \pm 0.07	0.2 \pm 0.06
Urea nitrogen (mg/dl)	13.4 \pm 1.93	13.3 \pm 2.02	12.9 \pm 1.41	13.2 \pm 2.12
Creatinine (mg/dl)	0.5 \pm 0.07	0.5 \pm 0.05	0.5 \pm 0.04	0.5 \pm 0.03
Glucose (mg/dl)	133 \pm 15.5	129 \pm 7.6	139 \pm 7.6	130 \pm 12.1
Total Chol. (mg/dl)	89 \pm 15.8	83 \pm 13.8	84 \pm 15.2	93 \pm 15.8
Triglyceride (mg/dl)	70 \pm 25.7	87 \pm 53.6	85 \pm 27.7	92 \pm 32.3
Total protein (g/dl)	6.99 \pm 0.269	7.02 \pm 0.193	7.02 \pm 0.366	6.86 \pm 0.248
Albumin (g/dl)	3.73 \pm 0.132	3.80 \pm 0.060	3.74 \pm 0.129	3.61 \pm 0.126*
A/G ratio	1.14 \pm 0.050	1.19 \pm 0.059	1.15 \pm 0.069	1.12 \pm 0.092
Inorganic phos. (mg/dl)	7.3 \pm 0.33	7.5 \pm 0.43	7.6 \pm 0.44	7.4 \pm 0.33
Ca (mg/dl)	9.6 \pm 0.33	9.6 \pm 0.33	9.7 \pm 0.34	9.7 \pm 0.33
Na (mEq/l)	143 \pm 1.1	144 \pm 0.8	144 \pm 0.7	144 \pm 0.8
K (mEq/l)	4.6 \pm 0.23	4.4 \pm 0.19	4.6 \pm 0.15	4.5 \pm 0.26
Cl (mEq/l)	100 \pm 1.2	100 \pm 1.2	101 \pm 1.2	101 \pm 0.7*

Values are expressed as Mean \pm S.D.

Significantly different from control: *, P<0.05.

Table 3 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Male				
Number of animals	12	12	12	12
Body weight (g)	494 ± 37.3	539 ± 45.6	540 ± 69.5	491 ± 50.0
Absolute organ weight				
Thymus (mg)	346 ± 45.3	438 ± 101.0	380 ± 101.3	314 ± 70.2
Liver (g)	13.61 ± 1.527	15.05 ± 2.531	14.70 ± 2.865	14.13 ± 1.948
Kidney (g)	3.02 ± 0.248	3.33 ± 0.302	3.23 ± 0.451	3.09 ± 0.416
Adrenal (mg)	57.2 ± 11.63	60.7 ± 13.43	66.1 ± 10.81	64.9 ± 8.61
Testis (g)	3.35 ± 0.212	3.48 ± 0.232	3.34 ± 0.292	3.38 ± 0.294
Epididymis (g)	1.27 ± 0.054	1.32 ± 0.107	1.27 ± 0.194	1.33 ± 0.125
Relative organ weight				
Thymus (mg%)	71 ± 11.8	82 ± 19.7	71 ± 19.5	64 ± 12.3
Liver (g%)	2.75 ± 0.203	2.78 ± 0.242	2.70 ± 0.188	2.87 ± 0.188
Kidney (g%)	0.61 ± 0.054	0.62 ± 0.046	0.60 ± 0.043	0.63 ± 0.049
Adrenal (mg%)	11.6 ± 2.47	11.3 ± 2.33	12.3 ± 1.71	13.3 ± 1.42
Testis (g%)	0.68 ± 0.034	0.65 ± 0.061	0.62 ± 0.078	0.69 ± 0.058
Epididymis (g%)	0.26 ± 0.026	0.24 ± 0.025	0.24 ± 0.050	0.27 ± 0.028
Female				
Number of animals	10	11	11	7
Body weight (g)	340 ± 22.9	329 ± 17.4	338 ± 51.7	331 ± 38.2
Absolute organ weight				
Thymus (mg)	256 ± 80.8	203 ± 43.3	220 ± 76.1	162 ± 27.3*
Liver (g)	14.29 ± 0.977	14.04 ± 1.219	13.66 ± 2.302	15.45 ± 2.915
Kidney (g)	2.02 ± 0.117	1.95 ± 0.100	2.03 ± 0.122	2.05 ± 0.216
Adrenal (mg)	75.0 ± 5.04	67.7 ± 4.55*	74.9 ± 12.56	78.0 ± 7.40
Relative organ weight				
Thymus (mg%)	75 ± 22.4	62 ± 12.0	64 ± 20.2	49 ± 4.0**
Liver (g%)	4.21 ± 0.168	4.27 ± 0.229	4.05 ± 0.296	4.62 ± 0.478
Kidney (g%)	0.59 ± 0.043	0.60 ± 0.028	0.62 ± 0.151	0.62 ± 0.023
Adrenal (mg%)	22.2 ± 1.94	20.6 ± 1.57	23.5 ± 10.08	23.8 ± 2.92

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control:*, P<0.05;** P<0.01.

Table 4 Summary of necropsy findings in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Sex Fate	Male				Female				Dead
		Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice				
Findings	Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100	0	4	20	100	100
Number of animals		12	12	12	12	12	12	12	10	2*
Lymph node										
Enlargement, pancreatico-duodenal		0	0	0	7	0	0	0	7	0
Thymus										
Small		0	0	0	0	1	0	1	0	1
Spleen										
Small		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Lung										
Congestion		0	0	0	0	0	0	0	0	2
Edema		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage, focal		1	0	0	0	0	0	0	0	0
Esophagus										
Hemorrhage, focal		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Stomach										
Distention		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Hemorrhage, focal, forestomach		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage, focal, glandular stomach		0	0	0	0	0	0	1	0	1
Thickening of wall, forestomach		0	0	2	12	0	0	0	10	0
Kidney										
Dilatation, pelvis		0	0	0	0	0	1	0	1	0
Nodule, one		1	0	0	0	0	0	0	0	0
Testis										
Small		0	0	1	0					
Epididymis										
Small		0	0	1	0					
Vagina										
Pus within lumen						1	0	0	0	0
Adrenal										
Enlargement		0	0	0	0	1	0	1	0	0
Harderian gland										
Brownish		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Thoracic cavity										
Pleural fluid, red		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Abdominal cavity										
Adhesion, stomach and diaphragm and liver		0	0	0	0	0	0	0	1	0
Adhesion, stomach and diaphragm and lung		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Adhesion, stomach and peritoneum		0	0	0	1	0	0	0	1	0

&, One animal died at 1 day, the other died at 16 days after commencement of administration.

Table 5 Summary of histopathological findings in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Sex	Fate	Dose (mg/kg/day)	Male				Female				Dead
				Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice				
				0	4	20	100	0	4	20	100	
Number of animals				12	12	12	12	12	12	12	10	2 ^{&}
Heart												
	Inflammatory cell infiltration, focal	Total		1	#	#	0	0	#	#	0	0
		+		1	#	#	0	0	#	#	0	0
Lymph node (pancreatico-duodenal)												
	Hyperplasia, plasma cell	Total		#	#	#	7/7 [§]	#	#	#	7/7	#
		+		#	#	#	7/7	#	#	#	7/7	#
Thymus												
	Atrophy	Total		#	#	#	#	1	0	1	3	1
		+		#	#	#	#	0	0	1	2	0
		++		#	#	#	#	1	0	0	1	1
	Hyperplasia, thymic epithelium	Total		#	#	#	#	1	1	0	0	0
		+		#	#	#	#	1	1	0	0	0
Spleen												
	Increase in extramedullary hematopoiesis	Total		0	#	#	0	6	#	#	4	0
		+		0	#	#	0	6	#	#	4	0
	Atrophy	Total		0	#	#	0	1	#	#	0	0
		+		0	#	#	0	0	#	#	0	0
		++		0	#	#	0	1	#	#	0	0
Bone marrow (femur)				ND	#	#	ND	ND	#	#	ND	ND
Lung												
	Congestion	Total		0/1	#	#	#	#	#	#	#	2
		+		0/1	#	#	#	#	#	#	#	0
		++		0/1	#	#	#	#	#	#	#	2
	Edema	Total		0/1	#	#	#	#	#	#	#	1
		+		0/1	#	#	#	#	#	#	#	1
	Hemorrhage	Total		0/1	#	#	#	#	#	#	#	2
		+		0/1	#	#	#	#	#	#	#	0
		++		0/1	#	#	#	#	#	#	#	2
Inflammatory cell infiltration, focal		Total		1/1	#	#	#	#	#	#	#	0
		+		1/1	#	#	#	#	#	#	#	0
Esophagus												
	Ulcer	Total		#	#	#	#	#	#	#	#	1/1
		+		#	#	#	#	#	#	#	#	0/1
		++		#	#	#	#	#	#	#	#	1/1
Stomach												
	Atrophy, mucosa, glandular stomach	Total		0	0	0	0	1	0	0	0	0
		+		0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Hemorrhage, focal, forestomach	Total		0	0	0	0	0	0	0	0	1
		+		0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Hemorrhage, focal, glandular stomach	Total		0	0	0	0	0	0	1	0	1
		+		0	0	0	0	0	0	1	0	1
	Hyperplasia, mucosa, forestomach	Total		0	0	2	12 ^{**}	0	0	0	10 ^{**}	1
		+		0	0	1	0	0	0	0	0	0
		++		0	0	1	12	0	0	0	10	1
	Inflammatory cell infiltration, forestomach	Total		0	0	2	11 ^{**}	0	0	0	10 ^{**}	1
		+		0	0	1	0	0	0	0	0	0
		++		0	0	1	11	0	0	0	10	1
	Ulcer, forestomach	Total		0	0	1	11 ^{**}	0	0	0	9 ^{**}	1
		+		0	0	0	0	0	0	0	0	0
		++		0	0	1	11	0	0	0	9	1
Duodenum				ND	#	#	ND	ND	#	#	ND	ND

+, Slight; ++, Moderate; #, Not examined; ND, No abnormalities were detected.

§, Number of animals showing lesion/number of animals examined.

&, One animal died at 1 day, the other died at 16 days after commencement of administration.

Significantly different from control: **, P<0.01.

Table 5 (Continued)

Organ	Sex	Fate	Male				Female				Dead
			Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice				
			0	4	20	100	0	4	20	100	
Findings	Dose (mg/kg/day)										100
Number of animals			12	12	12	12	12	12	10		2*
Liver											
Fatty change, hepatocyte	Total		5	#	#	4	1	#	#	0	0
	+		5	#	#	4	0	#	#	0	0
	++		0	#	#	0	1	#	#	0	0
Microgranuloma	Total		6	#	#	3	0	#	#	1	0
	+		6	#	#	3	0	#	#	1	0
Necrosis, focal	Total		1	#	#	0	0	#	#	0	0
	+		1	#	#	0	0	#	#	0	0
Kidney											
Basophilic tubule	Total		2	#	#	1	0	0/1 [§]	#	0	0
	+		2	#	#	1	0	0/1	#	0	0
Cyst	Total		1	#	#	0	1	0/1	#	0	1
	+		1	#	#	0	1	0/1	#	0	1
Dilatation, pelvis	Total		0	#	#	0	0	1/1	#	1	0
	+		0	#	#	0	0	1/1	#	1	0
Eosinophilic body, tubular epithelium, proximal	Total		0	#	#	1	0	0/1	#	0	0
	+		0	#	#	1	0	0/1	#	0	0
Fatty degeneration, tubular epithelium	Total		0	#	#	0	1	0/1	#	0	0
	+		0	#	#	0	0	0/1	#	0	0
	++		0	#	#	0	1	0/1	#	0	0
Hyaline droplet, tubular epithelium	Total		3	#	#	2	0	0/1	#	0	0
	+		3	#	#	2	0	0/1	#	0	0
Inflammatory cell infiltration, interstitium	Total		1	#	#	0	0	0/1	#	0	0
	+		1	#	#	0	0	0/1	#	0	0
Mineralization	Total		1	#	#	0	0	0/1	#	0	0
	+		1	#	#	0	0	0/1	#	0	0
Testis											
Atrophy	Total		0	#	1/1	0					
Epididymis											
Decrease in sperm	Total		0	#	1/1	0					
	+		0	#	1/1	0					
Inflammatory cell infiltration, focal	Total		0	#	0/1	1					
	+		0	#	0/1	1					
Ovary							ND/1	ND/1	ND/1	ND/1	#
Vagina											
Inflammatory cell infiltration	Total						1/1	#	#	#	#
	+						0/1	#	#	#	#
	++						1/1	#	#	#	#
Mammary gland							ND/1	#	ND/1	ND/1	#
Adrenal											
Hypertrophy, cortical cell, fascicular zone	Total		ND	#	#	ND	1	#	0/1 [§]	0	0
	+		ND	#	#	ND	1	#	0/1	0	0
Increase in lipid droplet, fascicular zone	Total		ND	#	#	ND	1	#	0/1	1	0
	+		ND	#	#	ND	0	#	0/1	1	0
	++		ND	#	#	ND	1	#	0/1	0	0
Mineralization	Total		ND	#	#	ND	1	#	0/1	0	0
	+		ND	#	#	ND	1	#	0/1	0	0
Necrosis, cortex	Total		ND	#	#	ND	0	#	1/1	0	1
	+		ND	#	#	ND	0	#	0/1	0	1
	++		ND	#	#	ND	0	#	1/1	0	0
Harderian gland	Total		#	#	#	#	1/1	#	#	#	#
Hypersecretion	+		#	#	#	#	1/1	#	#	#	#
Brain			ND	#	#	ND	ND	#	#	ND	ND

+, Slight ; ++, Moderate ; #, Not examined ; ND, No abnormalities were detected.

§, Number of animals showing lesion/number of animals examined.

&, One animal died at 1 day, the other died at 16 days after commencement of administration.

Table 6 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Number of pairs examined	12	12	12	11 [#]
Number of pairs with successful mating	12	12	12	10 [§]
Mating index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	11	11	11	9 [§]
Fertility index (%) ^{b)}	91.7	91.7	91.7	90.0
Pairing days until mating	2.0 ± 1.41 ^{c)}	2.1 ± 1.16	2.0 ± 1.04	3.6 ± 4.03
Number of estrous stages without mating	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00

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

c) Values are expressed as Mean ± S.D.

#, One female died at 2 days after pairing.

§, These indices included one female that the pregnancy was noticed later by clinical signs.

Table 7 Delivery and litter data in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Number of females examined	11	11	11	8
Number of females with live pups	11	11	11	8
Gestation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Gestation length (days)	22.4 ± 0.50 ^{b)}	22.5 ± 0.52	22.7 ± 0.47	22.6 ± 0.52
Number of corpora lutea	19.0 ± 2.49	18.3 ± 2.28	17.7 ± 1.27	18.4 ± 2.83
Number of implantation sites	16.9 ± 1.76	16.2 ± 2.04	15.9 ± 3.45	16.3 ± 3.45
Implantation index (%) ^{b)}	89.8	90.4	89.7	89.0
Delivery index (%) ^{c)}	95.5	93.2	85.4	96.5
Number of pups delivered	16.2 ± 2.18	15.4 ± 2.46	13.8 ± 3.09	15.8 ± 3.73
Number of live pups on day 0	15.9 ± 1.81	15.3 ± 2.49	13.6 ± 3.07	14.9 ± 3.60
Live birth index (%) ^{d)}	98.6	99.4	98.7	95.1
Sex ratio (male/female)	0.97 (86/89)	0.91 (80/88)	1.14 (80/70)	0.89 (56/63)
Number of live pups on day 4	14.4 ± 5.08	15.2 ± 2.56	13.5 ± 3.01	13.4 ± 6.39
Viability index on day 4 (%) ^{e)}	90.9	99.4	98.8	87.5
Body weight of pups (g)				
on day 0 male	6.6 ± 0.54	6.9 ± 0.59	7.2 ± 0.91	6.7 ± 0.79
female	6.3 ± 0.56	6.5 ± 0.52	6.8 ± 0.87	6.4 ± 0.89
on day 4 male	10.9 ± 0.83	11.2 ± 1.56	11.4 ± 2.56	10.6 ± 1.38
female	10.6 ± 0.94	10.8 ± 1.51	10.9 ± 2.43	10.2 ± 1.28
Body weight gain of pups (g)				
day 0 to 4 male	4.3 ± 0.39	4.3 ± 1.14	4.2 ± 1.74	3.8 ± 1.04
female	4.2 ± 0.50	4.3 ± 1.06	4.2 ± 1.70	3.7 ± 0.79

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

f) Values are expressed as Mean ± S.D.

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate on Bacteria

要約

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

試験は、指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、S9 mix 非存在(直接法)および存在(代謝活性化法)下でプレインキュベーション法により行った。

156~5000 μg /プレートの範囲で濃度を設定して行った濃度設定試験では、直接法における TA98 および TA1537 の 5000 μg /プレートでのみ菌の生育阻害が認められ、2500 μg /プレートでは、両菌株とも復帰変異コロニー数の増加が認められた。したがって、本試験は、いずれの菌株においても 5000 μg /プレートを最高濃度とし、以下公比2で計6濃度を設定して行った。

試験を2回行った結果、直接法の TA1537 においてのみ 2500 μg /プレートで復帰変異コロニー数の増加が認められた。しかし、濃度依存性については明らかではなかった。また、直接法の TA98 において、2500 μg /プレート以上の濃度で復帰変異コロニー数の増加傾向が認められた。

そこで、この2菌株について、1000~5000 μg /プレートの範囲で濃度を設定(公差500)し、直接法における確認試験を行った。その結果、両菌株とも 3500 μg /プレート以上の濃度で生育阻害が認められた。TA1537 では 2500 および 3000 μg /プレートで復帰変異コロニー数の増加が認められ、濃度依存性傾向も認められた。TA98 では、復帰変異コロニー数の増加傾向は認められたものの、溶媒対照値の2倍を越えるものではなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートは、細菌に対し遺伝子突然変異を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹ および *E. coli* WP2 *uvrA*² の5菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で-80℃以下に凍結保存し

た。

試験に際して、各凍結菌株を解凍後、その30 μL をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の菌懸濁液は、濁度を測定し、濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり 1×10^9 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

2. 被験物質

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート(ロット番号K609415, 三洋化成工業(株)提供)は、無色透明の液体で、水、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびアセトンに可溶であり、分子式 $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_2$ 、分子量157.24、純度99.9%〔不純物として、ハイドロキノンモノメチルエーテル2000ppm(重合防止剤として添加)、ジメチルアミノエタノール0.1%以下、メチルメタクリレート0.02%以下を含む〕の物質である。

実験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

3. 被験物質供試液の調製

溶媒に蒸留水(株大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製した。

4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9-AA : 9-アミノアクリジン(Aldrich Chemical Co.)

AF-2 および 2-AA は DMSO(株同仁化学研究所)に、SA および 9-AA は蒸留水(株大塚製薬工場)に溶解した。

5. 培地

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。培地1 Lあたりの組成は下記のとおりであり、径90 mmのシャーレ1枚あたりに30 mLを分注

したものである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	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
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

2) アミノ酸添加軟寒天培地(トッパアガー)

0.6%寒天粉末(Difco Laboratories)および0.5%塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、*S. typhimurium*用には0.5 mM D-ビオチンおよび0.5 mM L-ヒスチジン水溶液、*E. coli*用には0.5 mM L-トリプトファン水溶液を1/10容加え、トッパアガーとした。

6. S9 mix

製造後6ヶ月以内のエームステスト用凍結S9 mix(キッコーマン株)を購入し、使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

7. 試験方法

試験は、プレインキュベーション法で行った。

試験管に使用溶媒、被験物質供試液あるいは陽性対照物質溶液を0.1 mL入れ、次いで直接法では0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を0.5 mL、代謝活性化法ではS9 mixを0.5 mL加え、続いて試験菌液0.1 mLを分注し、37℃で20分間振盪培養した。培養終了後、45℃に保温したトッパアガー2 mLを加えた混合液をプレート上に重層した。37℃で48時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。プレートは、濃度設定試験では各濃度とも2枚、本試験では3枚を使用した。本試験は、同一濃度を用いて2回行った。

8. 結果の判定

結果の判定は、各濃度におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、以下の3基準を全て満たす場合を陽性とした。

- 1) 被験物質処理群において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
- 2) 被験物質濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する(濃度依存性)。
- 3) 2回にわたる本試験の結果から、復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

結果および考察

156~5000 μg /プレートの範囲で濃度を設定して行った濃度設定試験では、直接法におけるTA98およびTA1537の5000 μg /プレートでのみ菌の生育阻害が認め

られ、また、2500 μg /プレートでは両菌株とも溶媒対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。したがって、本試験における被験物質の処理濃度は、最高濃度を5000 μg /プレートとし、以下公比2で2500, 1250, 625, 313および156 μg /プレートとした。

本試験の結果(Tables 1~4)、直接法のTA1537株においてのみ2500 μg /プレートで溶媒対照値の2倍を越える復帰変異コロニー数の増加が認められたが、濃度依存性については明らかではなかった。また、直接法におけるTA98の2500 μg /プレート以上の濃度で復帰変異コロニー数の増加傾向が認められた。菌の生育阻害は、濃度設定試験と同様、TA98およびTA1537の5000 μg /プレートでのみ認められた。

そこで、この2菌株について2500 μg /プレートから菌の生育阻害が認められた5000 μg /プレート間に濃度依存性の復帰変異コロニー数の増加が認められるか否かを調べる目的で1000~5000 μg /プレートの範囲で濃度を設定(公差500)し、直接法による確認試験を行った。その結果(Table 5)、両菌株とも3500 μg /プレート以上の濃度で生育阻害が認められた。TA1537では、2500および3000 μg /プレートで溶媒対照値と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められ、濃度依存性傾向も認められた。TA98においては、2000~3500 μg /プレートで復帰変異コロニー数の増加傾向が認められたものの、溶媒対照値の2倍を越えるものではなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定した。陽性結果が得られたので、変異原性の強さに関する相対的比較値である比変異活性値³⁾(誘発復帰変異コロニー数/mg)を算出したところ、本被験物質の比変異活性値は3.6/mgであった。

なお、類縁化合物である(ジメチルアミノ)エチルアクリラートの変異原性についても、*S. typhimurium*および*E. coli*を用いた復帰突然変異試験並びにCHL細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁴⁾と報告されており、エチルメタクリラートについては、*S. typhimurium*を用いた復帰突然変異試験で陰性⁵⁾、L5178Yマウスリンホーマ細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁶⁾、CHO細胞を用いた染色体異常試験では陰性⁷⁾および姉妹染色分体交換試験で陽性⁷⁾と報告されている。また、2-(ジメチルアミノ)エチル塩化物については、麦酒酵母菌を用いた復帰突然変異試験で陽性⁸⁾と報告されている。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983).
- 2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," 1, Vol.3, eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.
- 3) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化審法毒性試験法の解説 改訂版," 化学工業日報社, 東京, 1992, p. 42.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化学物質毒性試験報告 Vol. 5" 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1997, pp. 595-604.
- 5) E. Zeiger, B. Anderson, S. Haworth, T. Lowlor, K. Mortelmans, W. Speck, *Environ. Mutagen.*, **9(suppl. 9)**, 1(1987).
- 6) M.M. Moore, A. Amtower, C.L. Doerr, K.H. Brock, K.L. Dearfield, *Environ. Mol. Mutagen.*, **11**, 49(1988).
- 7) "The Dictionary of Substances and their Effects," Vol.4, eds. by M.L. Richardson, S. Gangolli, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994, pp. 430-432.
- 8) F.K. Zimmermann, R.C. Borstel, E.S. Halle, J.M. Parry, D. Siebert, G. Zetterberg, R. Barale, N. Loprieno, *Mutat. Res.*, **133**, 199(1984).

連絡先

試験責任者：野田 篤
 試験担当者：野田 篤, 昆 尚美
 (財)畜産生物科学安全研究所
 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11
 Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)
 Naomi Kon
 Research Institute for Animal Science in
 Biochemistry and Toxicology
 3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi,
 kanagawa, 229-1132, Japan
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Results of reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate on bacteria (1st trial)
[direct method:-S9]

Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	143	147	163	11	12	7	13	14	20	17	18	24	7	7	6
	[151 \pm 11]			[10 \pm 3]			[16 \pm 4]			[20 \pm 4]			[7 \pm 1]		
156	169	191	169	8	10	10	17	16	15	18	20	30	6	10	3
	[176 \pm 13]			[9 \pm 1]			[16 \pm 1]			[23 \pm 6]			[6 \pm 4]		
313	142	148	171	9	8	9	10	16	14	16	24	17	6	6	4
	[154 \pm 15]			[9 \pm 1]			[13 \pm 3]			[19 \pm 4]			[5 \pm 1]		
625	136	157	150	11	10	12	10	10	12	26	27	18	6	5	7
	[148 \pm 11]			[11 \pm 1]			[11 \pm 1]			[24 \pm 5]			[6 \pm 1]		
1250	172	181	178	8	10	8	12	17	19	19	17	24	7	6	8
	[177 \pm 5]			[9 \pm 1]			[16 \pm 4]			[20 \pm 4]			[7 \pm 1]		
2500	164	162	148	14	6	9	11	20	14	30	44	30	11	15	18
	[158 \pm 9]			[10 \pm 4]			[15 \pm 5]			[35 \pm 8]			[15 \pm 4]		
5000	170	171	165	8	8	8	17	19	18	19*	46*	37*	4*	3*	6*
	[169 \pm 3]			[8 \pm 0]			[18 \pm 1]			[34 \pm 14]			[4 \pm 2]		
Positive control	830	888	888 ^{a)}	361	315	320 ^{b)}	895	933	941 ^{c)}	382	384	402 ^{d)}	1014	794	1030 ^{e)}
	[869 \pm 33]			[332 \pm 25]			[923 \pm 25]			[389 \pm 11]			[946 \pm 132]		

*: Toxic effect was observed.

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$
 c): AF-2, 0.04 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2 Results of reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate on bacteria (1st trial)
[activation method:+S9]

Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	149	150	163	20	15	10	19	14	15	25	41	40	9	16	10
	[154 \pm 8]			[15 \pm 5]			[16 \pm 3]			[35 \pm 9]			[12 \pm 4]		
156	184	174	186	10	6	9	17	14	14	28	38	37	12	8	9
	[181 \pm 6]			[8 \pm 2]			[15 \pm 2]			[34 \pm 6]			[10 \pm 2]		
313	207	187	192	16	7	10	22	17	15	32	29	41	8	7	18
	[195 \pm 10]			[11 \pm 5]			[18 \pm 4]			[34 \pm 6]			[11 \pm 6]		
625	220	223	193	9	18	7	14	15	21	39	35	33	13	15	13
	[212 \pm 17]			[11 \pm 6]			[17 \pm 4]			[36 \pm 3]			[14 \pm 1]		
1250	216	221	223	15	14	11	16	14	14	35	42	48	14	17	13
	[220 \pm 4]			[13 \pm 2]			[15 \pm 1]			[42 \pm 7]			[15 \pm 2]		
2500	222	205	191	9	9	12	20	15	17	37	32	41	18	20	15
	[206 \pm 16]			[10 \pm 2]			[17 \pm 3]			[37 \pm 5]			[18 \pm 3]		
5000	242	214	216	13	9	9	20	17	25	52	54	37	20	17	14
	[224 \pm 16]			[10 \pm 2]			[21 \pm 4]			[48 \pm 9]			[17 \pm 3]		
Positive control	566	631	510 ^{a)}	205	201	180 ^{b)}	958	982	988 ^{c)}	301	258	265 ^{a)}	85	80	103 ^{b)}
	[569 \pm 61]			[195 \pm 13]			[976 \pm 16]			[275 \pm 23]			[89 \pm 12]		

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$