

Table 8 Histopathological findings of rats treated orally with 1,1,1-tris(hydroxymethyl) ethane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ [Number of animals examined]		Sex:		male				female			
Findings, grade and number of animals		Dose (mg/kg):		0	100	300	1000	0	100	300	1000
Brain				[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Congenital defect,	total			1			0	0			0
cerebral cortex, unilateral	+			1			0				
Liver				[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Degeneration, fatty,	total			13			13	9			10
hepatocyte, periportal	±			2			4	7			8
	+			11			9	2			2
Microgranuloma	total			13			12	10			12
	±			11			11	10			12
	+			2			1	0			0
Necrosis, focal	total			1			1	0			0
	+			1			1				
Hemorrhage, focal	total			1			1	0			0
	±			1			0				
	+			0			1				
Fibrosis, capsule, foccal	total			0			1	0			0
	±			0			1				
Kidney				[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Eosinophilic body	total			7			6	0			0
	±			3			4				
	+			3			2				
	++			1			0				
Basophilic tubule	total			7			4	4			6
	±			6			4	4			6
	+			1			0	0			0
Cast, hyalin,	total			1			0	0			0
cortico-medullary junction	±			0			0				
	+			1			0				
Dilatation, pelvis	total			1			0	0			0
	+			1			0				
Spleen				[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Hematopoiesis, extramedullary	total			13			13	13			13
	±			12			12	3			5
	+			1			1	8			6
	++			0			0	2			2
Deposit, pigment, brown	total			13			13	13			13
	±			5			7	1			3
	+			8			6	7			9
	++			0			0	5			1
Thymus				[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Atrophy	total			0			0	7			4
	±							5			4
	+							1			0
	++							1			0
Heart				[13]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[13]
Myocardial degeneration, focal	total			1			0	0			0
	±			1			0				
Myocardial fibrosis, focal	total			0			1	0			0
	±			0			1				
Testis				[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Atrophy, seminiferous, tubule,	total			0			1				
focal	±			0			1				
Epididymis				[13]	[0]	[0]	[13]	[0]	[0]	[0]	[0]
Cell debris, tubular lumen	total			0			1				
	±			0			1				
Ovary				[0]	[0]	[0]	[0]	[1]	[1]	[3]	[1]
Abnormality	total							0	0	0	0

±: very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

Table 9 Summary of reproductive performance in parental rats treated orally with 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	100	300	1000
Number of mated pairs	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	13
Copulation index	100	100	100	100
Number of pregnant animals	12	12	10	12
Fertility index	92.3	92.3	76.9	92.3
Pairing days until copulation (Mean $\pm$ S.D.)	2.6 $\pm$ 0.9	2.8 $\pm$ 2.0	2.5 $\pm$ 1.1	2.1 $\pm$ 0.6
Frequency of vaginal estrus (Mean $\pm$ S.D.)	1.0 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0

Copulation index = (Number of copulated pairs/Number of mated pairs) $\times$ 100; %Fertility index = (Number of pregnant animals/Number of copulated pairs) $\times$ 100; %

Table 10 Summary of development up of pups from dams treated orally with 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	100	300	1000
Number of pregnant females	12	12	10	12
Number of pregnant females with pups alive	12	12	10	12
Gestation index	100.0	100.0	100.0	100.0
Gestation length in days	22.3 $\pm$ 0.5 (12)	22.4 $\pm$ 0.5 (12)	22.4 $\pm$ 0.5 (10)	22.6 $\pm$ 0.5 (12)
Number of corpora lutea	17.5 $\pm$ 1.7 (12)	18.2 $\pm$ 2.4 (12)	16.0 $\pm$ 1.2 (10)	16.3 $\pm$ 1.2 (12)
Number of implantation sites	16.5 $\pm$ 1.6 (12)	16.0 $\pm$ 3.6 (12)	14.5 $\pm$ 2.6 (10)	15.0 $\pm$ 2.3 (12)
Implantation index	94.5 $\pm$ 6.0 (12)	87.9 $\pm$ 17.0 (12)	90.5 $\pm$ 14.9 (10)	91.5 $\pm$ 10.0 (12)
Day 0 of lactation				
Number of pups born	15.2 $\pm$ 1.9 (12)	14.3 $\pm$ 3.6 (12)	13.4 $\pm$ 2.8 (10)	13.1 $\pm$ 3.1 (12)
Delivery index	91.9 $\pm$ 6.6 (12)	89.9 $\pm$ 12.2 (12)	92.1 $\pm$ 6.8 (10)	85.8 $\pm$ 14.0 (12)
Number of pups alive	15.0 $\pm$ 2.0 (12)	14.2 $\pm$ 3.6 (12)	13.4 $\pm$ 2.8 (10)	13.1 $\pm$ 3.1 (12)
Birth index	90.9 $\pm$ 7.3 (12)	88.9 $\pm$ 13.2 (12)	92.1 $\pm$ 6.8 (10)	85.8 $\pm$ 14.0 (12)
Live birth index	98.8 $\pm$ 2.7 (12)	98.8 $\pm$ 3.0 (12)	100.0 $\pm$ 0.0 (10)	100.0 $\pm$ 0.0 (12)
Pup weight in grams				
Male	6.1 $\pm$ 0.4 (12)	6.6 $\pm$ 0.8 (12)	6.6 $\pm$ 0.8 (10)	6.6 $\pm$ 0.6 (11)
Female	5.9 $\pm$ 0.6 (12)	6.2 $\pm$ 0.8 (12)	6.2 $\pm$ 0.7 (10)	6.3 $\pm$ 0.5 (12)
Sex ratio (male/female)	0.76 (78/102)	0.85 (78/92)	0.97 (66/68)	0.62 (60/97)
Day 4 of lactation				
Number of pups alive	14.8 $\pm$ 2.1 (12)	14.1 $\pm$ 3.7 (12)	13.3 $\pm$ 2.7 (10)	13.1 $\pm$ 3.1 (12)
Viability index	98.2 $\pm$ 3.2 (12)	99.2 $\pm$ 2.9 (12)	99.4 $\pm$ 2.0 (10)	100.0 $\pm$ 0.0 (12)
Pup weight in grams				
Male	9.3 $\pm$ 0.8 (12)	10.4 $\pm$ 2.3 (12)	10.9 $\pm$ 2.0 (10)	10.5 $\pm$ 0.9* (11)
Female	9.1 $\pm$ 1.1 (12)	10.1 $\pm$ 2.1 (12)	10.6 $\pm$ 1.6 (10)	10.3 $\pm$ 1.0 (12)

Values are expressed as mean $\pm$ S.D.

Parenthesis indicates the number of litters evaluated.

*: significant difference from control, $p < 0.05$ Gestation index = (Number of pregnant females with pups alive/Number of pregnant females) $\times$ 100; %Implantation index = (Number of implantation sites/Number of corpora lutea) $\times$ 100; %Delivery index = (Number of pups born/Number of implantation sites) $\times$ 100; %Birth index = (Number of pups alive on day 0/Number of implantation sites) $\times$ 100; %Live birth index = (Number of pups alive on day 0/Number of pups born) $\times$ 100; %Viability index = (Number of pups alive on day 4/Number of pups alive on day 0) $\times$ 100; %

1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタンの 細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 1,1,1-Tris(hydroxymethyl)ethane on Bacteria

要約

1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタンについて、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, TA98, TA1535, TA1537) および *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) の5菌株を用い、用量設定試験の結果をもとに、本試験ではS9 mix無添加群および添加群の各試験菌株についていずれも156~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量で試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加群および添加群のいずれにおいても、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下では1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタンは、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535 および TA1537¹⁾ ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB.N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受けた。平成8年11月13日に菌株の特性検査を実施し、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。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK社)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム〔いずれも最終濃度〕)に2%のグルコース

(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID社: No.1)を加え、30 mLをシャーレに分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

Bacto-agar(DIFCO社)0.6%を含む0.5%塩化ナトリウム水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mM D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mLのバッフル付三角フラスコに2.5%ニュートリエントブロス(OXOID社)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μL 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10: タイテック(株))を用い、37℃で6時間振盪(往復振盪: 120回/分)培養し、試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中の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。S9 mixの組成を以下に示す。

成 分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
リン酸緩衝Na-液(pH 7.4)	100 μmol
精製水	残 量

5. 被験物質

被験物質の1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタン(ロット番号: 80913)は分子式C₃H₁₂O₃、分子量120.15、純度99.0%の固体である。三菱瓦斯化学(株)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、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。

6. 被験物質液の調製

注射用水(株)大塚製薬工場)に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果, S9 mix無添加群ならびに添加群のいずれの処理群においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。

従って, 本試験においてはS9 mix無添加群ならびに添加群の各試験菌株について5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とし, それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は, DMSOを用いて溶解し, 少量ずつ分注した後凍結保存(-20℃)した。

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

アジ化ナトリウム(NaN_3 :和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン塩酸塩(ACR:ALDRICH社)

2-アミノアントラセン(2-AA:和光純薬工業(株))

9. 試験方法

Amesらの原法の改良法であるブレインキュベーション法¹⁾に準じて, S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に, 使用溶媒, 被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 μL , 次いでS9 mix無添加群の場合, 0.1 M ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μL , S9 mix添加群の場合, S9 mixを500 μL 添加し, さらに試験菌液100 μL を加え, 37℃で20分間振盪培養(ブレインキュベーション)した。培養終了後, トップアガーを2 mL添加し, 混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後, 被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため, 実体顕微鏡($\times 60$)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで, 復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス(株))を用いた。独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し, かつ, 再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に, 陽性と判定した。

なお, 統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

1回目の試験結果をTable 1~2に, 2回目の試験結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群ならびに添加群のいずれにおいても, 1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタン処理による生育阻害作用は観察されなかった。

また, 復帰突然変異コロニー数については, S9 mix無添加群, S9 mix添加群とも溶媒対照と同等の値であり, 明確な増加傾向は認められなかった。一方, 陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において, 溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお, 試験中析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から, 本試験条件下において, 1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタンの微生物に対する遺伝子突然変異に関し, 陰性と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron and B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) M.H.L. Green and W.J. Muriel, *Mutat. Res.*, 38, 3(1976).

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 北澤倫世, 菊池正憲

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜
582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)

Michiyo Kitazawa, Masanori Kikuchi

Biosafety Research Center, Foods, Drugs
and Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1. Results of the bacterial reversion test of 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane(1st trial)
[direct method:-S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test sub.	0	102 116 108 [109 $\pm$ 7]			10 10 10 [10 $\pm$ 0]			21 22 21 [21 $\pm$ 1]			27 23 28 [26 $\pm$ 3]			8 8 7 [8 $\pm$ 1]		
	156	126 111 110 [116 $\pm$ 9]			17 10 10 [12 $\pm$ 4]			21 22 25 [23 $\pm$ 2]			27 25 23 [25 $\pm$ 2]			9 6 8 [8 $\pm$ 2]		
	313	104 103 107 [105 $\pm$ 2]			11 10 9 [10 $\pm$ 1]			23 19 24 [22 $\pm$ 3]			20 25 23 [23 $\pm$ 3]			11 14 9 [11 $\pm$ 3]		
	625	106 105 100 [104 $\pm$ 3]			7 11 10 [9 $\pm$ 2]			22 20 23 [22 $\pm$ 2]			21 22 23 [22 $\pm$ 1]			6 9 5 [7 $\pm$ 2]		
	1250	96 109 110 [105 $\pm$ 8]			10 8 15 [11 $\pm$ 4]			22 24 23 [23 $\pm$ 1]			20 25 19 [21 $\pm$ 3]			13 7 10 [10 $\pm$ 3]		
	2500	102 101 100 [101 $\pm$ 1]			8 9 5 [7 $\pm$ 2]			18 24 15 [19 $\pm$ 5]			24 19 18 [20 $\pm$ 3]			6 10 6 [7 $\pm$ 2]		
	5000	93 98 98 [96 $\pm$ 3]			5 9 5 [6 $\pm$ 2]			17 20 24 [20 $\pm$ 4]			16 15 17 [16 $\pm$ 1]			9 9 4 [7 $\pm$ 3]		
Positive control		766 786 763 ^{a)} [772 $\pm$ 13]			405 402 380 ^{b)} [396 $\pm$ 14]			183 186 167 ^{a)} [179 $\pm$ 10]			455 456 483 ^{c)} [465 $\pm$ 16]			457 440 431 ^{d)} [443 $\pm$ 13]		

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, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): ACR; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2. Results of the bacterial reversion test of 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane(1st trial)
[activation method:+S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test sub.	0	100 108 116 [108 $\pm$ 8]			13 13 10 [12 $\pm$ 2]			21 26 24 [24 $\pm$ 3]			22 26 30 [26 $\pm$ 4]			10 10 11 [10 $\pm$ 1]		
	156	120 103 105 [109 $\pm$ 9]			15 11 10 [12 $\pm$ 3]			22 26 27 [25 $\pm$ 3]			31 25 27 [28 $\pm$ 3]			8 9 11 [9 $\pm$ 2]		
	313	114 106 111 [110 $\pm$ 4]			13 17 16 [15 $\pm$ 2]			24 22 25 [24 $\pm$ 2]			33 34 30 [32 $\pm$ 2]			9 11 14 [11 $\pm$ 3]		
	625	114 99 112 [108 $\pm$ 8]			11 11 16 [13 $\pm$ 3]			23 26 26 [25 $\pm$ 2]			24 29 24 [26 $\pm$ 3]			16 11 14 [14 $\pm$ 3]		
	1250	98 104 102 [101 $\pm$ 3]			13 17 10 [13 $\pm$ 4]			22 27 22 [24 $\pm$ 3]			28 29 28 [28 $\pm$ 1]			13 9 11 [11 $\pm$ 2]		
	2500	103 94 101 [99 $\pm$ 5]			10 12 8 [10 $\pm$ 2]			20 29 23 [24 $\pm$ 5]			29 24 22 [25 $\pm$ 4]			8 11 11 [10 $\pm$ 2]		
	5000	96 91 87 [91 $\pm$ 5]			8 8 9 [8 $\pm$ 1]			19 23 18 [20 $\pm$ 3]			25 29 20 [25 $\pm$ 5]			14 9 14 [12 $\pm$ 3]		
Positive control		405 407 420 ^{a)} [411 $\pm$ 8]			283 329 306 ^{b)} [306 $\pm$ 23]			513 525 499 ^{c)} [512 $\pm$ 13]			240 224 266 ^{d)} [243 $\pm$ 21]			143 188 164 ^{b)} [165 $\pm$ 23]		

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3. Results of the bacterial reversion test of 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethan (2nd trial)
[direct method: -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test sub.	0	99 110 109 [106 $\pm$ 6]	15 15 14 [15 $\pm$ 1]		22 25 20 [22 $\pm$ 3]			24 22 25 [24 $\pm$ 2]			9 8 11 [9 $\pm$ 2]					
	156	111 115 100 [109 $\pm$ 8]	15 10 13 [13 $\pm$ 3]		24 24 25 [24 $\pm$ 1]			24 27 21 [24 $\pm$ 3]			8 14 13 [12 $\pm$ 3]					
	313	92 107 105 [101 $\pm$ 8]	18 10 12 [13 $\pm$ 4]		24 20 19 [21 $\pm$ 3]			26 23 24 [24 $\pm$ 2]			9 14 11 [11 $\pm$ 3]					
	625	101 109 104 [105 $\pm$ 4]	14 18 14 [15 $\pm$ 2]		21 23 23 [22 $\pm$ 1]			23 21 22 [22 $\pm$ 1]			16 13 13 [14 $\pm$ 2]					
	1250	107 101 117 [108 $\pm$ 8]	11 10 11 [11 $\pm$ 1]		23 18 23 [21 $\pm$ 3]			24 27 22 [24 $\pm$ 3]			11 10 5 [9 $\pm$ 3]					
	2500	98 100 102 [100 $\pm$ 2]	10 16 13 [13 $\pm$ 3]		29 23 20 [24 $\pm$ 5]			20 22 23 [22 $\pm$ 2]			10 14 9 [11 $\pm$ 3]					
	5000	96 88 91 [92 $\pm$ 4]	17 14 15 [15 $\pm$ 2]		22 22 17 [20 $\pm$ 3]			24 26 22 [24 $\pm$ 2]			10 15 10 [12 $\pm$ 3]					
Positive control		729 702 722 ^{a)} [718 $\pm$ 14]	310 318 330 ^{b)} [319 $\pm$ 10]		164 195 188 ^{a)} [182 $\pm$ 16]			432 406 402 ^{c)} [413 $\pm$ 16]			441 421 410 ^{d)} [424 $\pm$ 16]					

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, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): ACR; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethan (2nd trial)
[activation method: +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test sub.	0	119 103 116 [113 $\pm$ 9]	14 14 10 [13 $\pm$ 2]		26 20 23 [23 $\pm$ 3]			33 27 30 [30 $\pm$ 3]			9 10 13 [11 $\pm$ 2]					
	156	109 103 116 [109 $\pm$ 7]	14 17 16 [16 $\pm$ 2]		26 22 24 [24 $\pm$ 2]			28 23 23 [25 $\pm$ 3]			10 11 9 [10 $\pm$ 1]					
	313	128 125 102 [118 $\pm$ 14]	16 10 13 [13 $\pm$ 3]		21 23 28 [24 $\pm$ 4]			27 31 26 [28 $\pm$ 3]			10 13 13 [12 $\pm$ 2]					
	625	117 127 120 [121 $\pm$ 5]	13 13 13 [13 $\pm$ 0]		25 22 21 [23 $\pm$ 2]			24 27 32 [28 $\pm$ 4]			16 11 11 [13 $\pm$ 3]					
	1250	105 122 122 [116 $\pm$ 10]	18 13 18 [16 $\pm$ 3]		23 22 25 [23 $\pm$ 2]			28 34 29 [30 $\pm$ 3]			10 11 13 [11 $\pm$ 2]					
	2500	132 113 109 [118 $\pm$ 12]	10 13 16 [13 $\pm$ 3]		25 24 20 [23 $\pm$ 3]			25 26 34 [28 $\pm$ 5]			11 15 17 [14 $\pm$ 3]					
	5000	105 100 106 [104 $\pm$ 3]	10 10 6 [9 $\pm$ 2]		24 20 26 [23 $\pm$ 3]			22 28 30 [27 $\pm$ 4]			11 13 8 [11 $\pm$ 3]					
Positive control		366 380 380 ^{a)} [375 $\pm$ 8]	310 310 313 ^{b)} [311 $\pm$ 2]		460 447 451 ^{c)} [453 $\pm$ 7]			255 295 250 ^{d)} [267 $\pm$ 25]			187 169 170 ^{b)} [175 $\pm$ 10]					

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタンの 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 1,1,1-Tris(hydroxymethyl)ethane on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタンが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)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、連続処理法ならびに短時間処理法で1200 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM相当)を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度および低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix非存在下における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。

その結果、連続処理ならびに短時間処理のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下では1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタンは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL)を選択した。昭和59年11月15日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK社)を10%添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3~5日ごとに継代した。なお、本染色体異常試験では解凍後継代数47の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(LIFE TECHNOLOGIES社)に、メンブランフィルター(0.45 μm : CORNING社)を用いて加圧濾過除菌した非働化(56°C, 30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終濃度で10%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液を冷暗所(4°C)に保存した。

3. 培養条件

CO₂インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機特機(株))を用い、CO₂濃度5%, 37°Cの条件で細胞を培

養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中の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。S9 mixの組成は松岡らの方法に従った¹⁾。

5. 被験物質

被験物質の1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタン(ロット番号: 80913)は分子式C₅H₁₂O₃、分子量120.15、純度99.0%の固体である。三菱瓦斯化学(株)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、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。

6. 被験物質液の調製

生理食塩液(株)大塚製薬工場)に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。連続処理の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理ではS9 mix非存在下(-S9 mix)あるいは存在下(+S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

細胞を10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業(株))で固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット(関東化学(株))水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30%エタノール, 1%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、すなわち細胞生存率を算出した。

その結果、いずれの処理法においても明確な細胞増殖抑制は観察されなかった(Fig. 1)。

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに、染色体異常試験では連続処理法ならびに短時間処理法のいずれにおいても1200 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM相当)を最高処理濃度とし、以下公比2で減じた計3用量ならびに溶媒対照群を設定した。

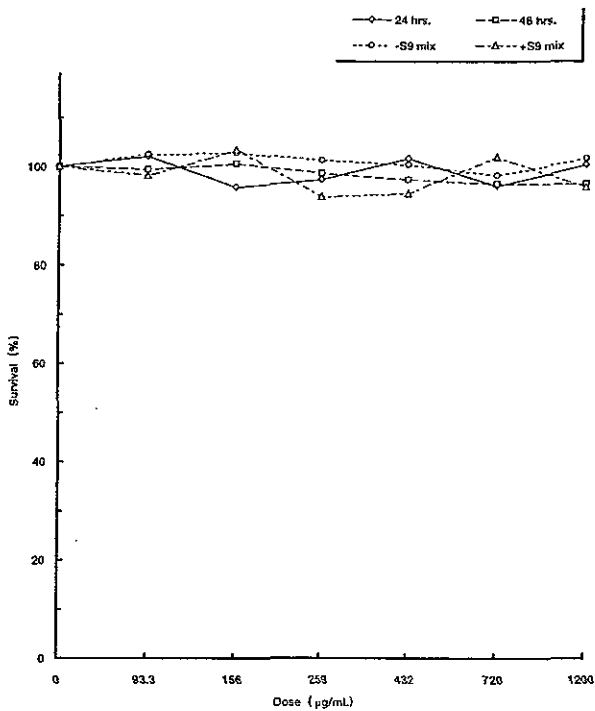


Fig. 1 Dose-survival curves of 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane

陽性対照として、連続処理の場合、マイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業(株))を、24時間処理で0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48時間処理で0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で、短時間処理の場合、シクロホスファミド(CP:塩野義製薬(株))を、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、予備試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃度で0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようコルセミド(LIFE TECHNOLOGIES社)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本作製した後、1.2%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)、染色体切断(csb)、染色分体交換(cte)、染色体交換(cse)およびその他(oth)の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会²⁾による分類法に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、観察した。

11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めた場合(+gap)と、含めない場合(-gap)とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、石館ら³⁾の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とした。最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

連続処理群での試験結果をTable 1に示した。1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタン処理群の場合、いずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。短時間処理群での試験結果をTable 2に示した。被験物質処理群の場合、S9 mix非存在下および存在下のいずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。なお、試験期間中析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から、本試験条件下において1,1,1-トリス(ヒドロキシメチル)エタンのチャイニーズハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陰性と判定した。

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat. Res.*, **66**, 277(1979).
- 2) 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, pp. 31-35.
- 3) 石館基 監修, “<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 東京, 1987, pp. 19-24.

Table 1 Chromosomal aberration test on CHL cells treated with 1,1,1-tris(hydroxymethyl) ethane [continuous exposure]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement	
				gap	ctb	csb	cte	cse	oth				SA	Pol
Test sub.	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-	-
	300	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-	-
	600	24	200	1	1	0	0	0	0	1.0	0.5	1.0	-	-
	1200	24	200	0	3	0	1	0	0	2.0	2.0	1.0	-	-
MMC*	0.05	24	200	15	30	1	66	0	0	43.5	41.5	0.5	+	-
Test sub.	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	1.0	-	-
	300	48	200	1	0	0	1	0	0	1.0	0.5	1.0	-	-
	600	48	200	3	0	1	2	0	0	3.0	1.5	0.0	-	-
	1200	48	200	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0	-	-
MMC*	0.025	48	200	15	22	0	73	0	0	44.0	40.5	1.0	+	-

*: Positive control (mitomycin C)

ctb: chromatid break csb: chromosome break cte: chromatid exchange cse: chromosome exchange oth: others

SA: structural aberration Pol: polyploid cell

Table 2 Chromosomal aberration test on CHL cells treated with 1,1,1-tris(hydroxymethyl) ethane [short-term exposure]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				SA	Pol
Test sub.	0	-	6	200	1	1	0	0	1	0	1.5	1.0	1.0	-	-
	300	-	6	200	1	1	0	2	0	0	1.5	1.0	0.5	-	-
	600	-	6	200	1	1	1	1	0	0	1.0	0.5	1.0	-	-
	1200	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	1.5	-	-
CP*	12.5	-	6	200	2	0	0	0	0	0	1.0	0.0	0.5	-	-
Test sub.	0	+	6	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.0	-	-
	300	+	6	200	0	0	0	2	0	0	1.0	1.0	1.0	-	-
	600	+	6	200	1	0	0	2	0	0	1.5	1.0	0.0	-	-
	1200	+	6	200	1	2	0	2	0	0	2.0	2.0	1.0	-	-
CP*	12.5	+	6	200	23	51	2	134	1	0	74.0	73.5	0.5	+	-

*: Positive control (cyclophosphamide)

ctb: chromatid break csb: chromosome break cte: chromatid exchange cse: chromosome exchange oth: others

SA: structural aberration Pol: polyploid cell

連絡先

試験責任者：中嶋 圓
試験担当者：北澤倫世，菊池正憲
財団法人 食品農医薬品安全性評価センター
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜
582-2
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)
Michiyo Kitazawa, Masanori Kikuchi
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)
582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of Ditridecyl phthalate by Oral Administration in Rats

要約

ジトリデシルフタレートは、軟質塩化ビニル(プラスチック)の可塑剤として使用されているフタル酸エステル的一种であり、血液バックや血液回路等の医療機器、食物の保存容器に広く使用されている化学物質である¹⁾。フタル酸エステルの毒性試験は数多く実施されており、フタル酸エステルの中には、ペルオキシゾームを増殖させる作用をもち、肝および腎毒性、さらに精巣毒性を示すものもある²⁻⁶⁾。また、妊娠マウスあるいはラットにフタル酸エステルを投与すると、催奇形性を含む発生毒性を示すことが報告されている⁷⁻⁹⁾。ジトリデシルフタレートについては、ラットでのLD₅₀値が経口投与では64 mL/kg以上であることが知られている¹⁰⁾が、反復投与毒性および生殖発生毒性については、明らかにされていない。そこで今回、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、ジトリデシルフタレートの0(溶媒対照)、10、50および250 mg/kgをSprague-Dawley系(Crj:CD)ラットの雌雄(各13匹/群)に交配前2週間および交配期間2週間経口投与し、さらに雄では交配期間終了後2週間、雌では妊娠期間を通して分娩後哺育3日まで投与を継続して、親動物に対する反復投与毒性および生殖能力ならびに次世代児の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

その結果、死亡動物は、対照群を含まないいずれの投与群においても認められなかった。雄では、投与後一過性の流涎が、50 mg/kg以上のジトリデシルフタレート投与により投与16日以降、断続的ではあるが投与期間を通して観察された。摂餌量には、雌雄ともにジトリデシルフタレート投与による影響は認められなかったが、雌では体重の増加抑制が、50 mg/kg以上のジトリデシルフタレート投与により認められた。雌の一般状態および雄の体重推移には、ジトリデシルフタレート投与の影響は認められなかった。

肝臓重量の増加が、雄では250 mg/kgのジトリデシルフタレート投与により、雌では50 mg/kg以上のジトリデシルフタレート投与により認められた。病理組織学検査の結果、雌雄ともに、50 mg/kg以上のジトリデシルフタレート投与により小葉中心部の肝細胞が肥大し、雄では、250 mg/kgのジトリデシルフタレート投与により、カタラーゼ染色陽性顆粒が増加した。また、雄の腎臓重量の増加が、250 mg/kgのジトリデシルフタレート投与により認められた。病理組織学検査の結果、雄では、250 mg/kgのジトリデシルフタレート投与により、

eosinophilic bodyの発現頻度が増加し、尿細管上皮が壊死した後の再生像と思われる好塩基性尿細管が観察された。雌の腎臓重量にはジトリデシルフタレート投与の影響は認められなかったが、250 mg/kgのジトリデシルフタレート投与により、腎盂上皮および膀胱移行上皮の過形成が認められた。しかし、尿検査の結果には、雌雄ともにジトリデシルフタレート投与の影響は認められなかった。雄について実施した血液生化学検査では、250 mg/kgのジトリデシルフタレート投与により、アルカリフォスファターゼの上昇が認められたが、血液学的検査にはジトリデシルフタレート投与の影響はなかった。

また、ジトリデシルフタレート投与による精巣毒性も認められなかった。

一方、生殖発生毒性に関しては、雌雄動物の交尾率、受胎率、雌の妊娠維持および分娩に関して、ジトリデシルフタレート投与の影響は認められなかった。250 mg/kgのジトリデシルフタレート投与により、哺育不良が示唆された。250 mg/kgのジトリデシルフタレート投与により認められた母動物の哺育不良に起因して、産児の生存性が低下した。しかし、産児の性比、体重および形態に、ジトリデシルフタレート投与の影響は認められなかった。

これらのことから、本試験条件下では、ジトリデシルフタレートの反復投与毒性に関する無影響量は、雌雄ともに、10 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、雄に対しては、250 mg/kg/day、雌に対しては、50 mg/kg/day、産児に対しては、250 mg/kg/dayであると判断される。

方法

1. 被験物質

ジトリデシルフタレート〔ロット番号:2700(協和油化(株))、純度:93.7-100.0%(エステル価198-212より換算)、分子式:C₃₄H₅₈O₄、分子量:530.83、比重:0.950(20℃/20℃)、融点(凝固点):-21℃、沸点:250℃(2 mmHg)]は、無色透明の液体でフタル酸エステルの一種であり、使用時まで室温保管した。

被験物質は、コーン油〔ナカライテスク(株)、Lot No.:V6N3521〕にて溶解し、いずれの用量においても1回の投与液量が5 mL/kg体重になるように濃度を調整した。調製検体は、冷蔵、遮光、気密の条件下で保管し、調製後7日以内に投与した。なお、0.2および20%(w/v)の濃度の調製液については、冷蔵、遮光条件下で少なく