

Table 4 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	30	60	120	0	120
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	324 ± 11	342 ± 19	340 ± 16	316 ± 16	403 ± 17	360 ± 33*
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.03 ± 0.06	2.12 ± 0.05*	2.13 ± 0.07*	2.02 ± 0.05	2.10 ± 0.07	2.05 ± 0.15
Liver (g)	9.26 ± 0.73	10.37 ± 1.24	10.04 ± 0.97	8.55 ± 0.53	11.42 ± 1.12	9.94 ± 1.42
Kidneys (g)	2.48 ± 0.17	2.84 ± 0.27*	2.81 ± 0.19*	2.47 ± 0.08	2.89 ± 0.37	2.62 ± 0.27
Spleen (g)	0.51 ± 0.06	0.67 ± 0.07*	0.66 ± 0.13*	0.44 ± 0.10	0.64 ± 0.08	0.61 ± 0.09
Adrenals (mg)	46 ± 7	53 ± 9	48 ± 4	53 ± 5	60 ± 14	54 ± 5
Testes (g)	2.91 ± 0.12	2.83 ± 0.17	2.88 ± 0.15	2.82 ± 0.19	3.08 ± 0.25	2.79 ± 0.19
Thymus (mg)	567 ± 133N	675 ± 19	740 ± 80*	564 ± 47	444 ± 104	511 ± 76
Relative organ weight						
Brain (%)	0.629 ± 0.035	0.621 ± 0.029	0.627 ± 0.030	0.639 ± 0.029	0.522 ± 0.015	0.570 ± 0.028**
Liver (%)	2.857 ± 0.157N	3.032 ± 0.290	2.955 ± 0.239	2.706 ± 0.046	2.828 ± 0.182	2.754 ± 0.218
Kidneys (%)	0.767 ± 0.049	0.833 ± 0.078	0.826 ± 0.050	0.783 ± 0.036	0.719 ± 0.105	0.730 ± 0.062
Spleen (%)	0.157 ± 0.014	0.197 ± 0.028	0.194 ± 0.038	0.139 ± 0.027	0.157 ± 0.015	0.170 ± 0.017
Adrenals (%)	0.014 ± 0.002N	0.016 ± 0.003	0.014 ± 0.001	0.017 ± 0.001	0.015 ± 0.003	0.015 ± 0.001
Testes (%)	0.899 ± 0.039	0.831 ± 0.082	0.849 ± 0.066	0.896 ± 0.090	0.764 ± 0.049	0.779 ± 0.060
Thymus (%)	0.175 ± 0.042N	0.198 ± 0.008	0.218 ± 0.020*	0.179 ± 0.015	0.111 ± 0.029	0.142 ± 0.016
Female						
No. of animals	4	5	5	5	5	4
Body weight (g)	207 ± 13	206 ± 12	206 ± 9	213 ± 19	231 ± 21	205 ± 19
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.90 ± 0.07	1.89 ± 0.02	1.88 ± 0.05	1.89 ± 0.07	1.97 ± 0.06	1.94 ± 0.05
Liver (g)	5.93 ± 0.30	5.84 ± 0.35	5.91 ± 0.66	6.22 ± 0.39	6.14 ± 0.67	5.35 ± 0.46
Kidneys (g)	1.62 ± 0.11	1.71 ± 0.05	1.59 ± 0.08	1.74 ± 0.15	1.70 ± 0.06	1.56 ± 0.14
Spleen (g)	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.09	0.37 ± 0.05	0.44 ± 0.07	0.38 ± 0.05
Adrenals (mg)	58 ± 5	61 ± 6	58 ± 10	60 ± 6	64 ± 5	67 ± 6
Ovaries (mg)	74 ± 9	81 ± 8	80 ± 13	81 ± 8	78 ± 4	71 ± 9
Thymus (mg)	403 ± 93	430 ± 56	458 ± 53	381 ± 93	408 ± 90	326 ± 51
Relative organ weight						
Brain (%)	0.920 ± 0.045	0.922 ± 0.061	0.915 ± 0.058	0.887 ± 0.056	0.859 ± 0.102	0.952 ± 0.079
Liver (%)	2.896 ± 0.103	2.842 ± 0.197	2.870 ± 0.206	2.927 ± 0.270	2.661 ± 0.201	2.615 ± 0.150
Kidneys (%)	0.791 ± 0.083	0.834 ± 0.075	0.771 ± 0.018	0.822 ± 0.100	0.742 ± 0.066	0.764 ± 0.035
Spleen (%)	0.191 ± 0.019	0.186 ± 0.014	0.189 ± 0.035	0.171 ± 0.017	0.191 ± 0.023	0.186 ± 0.018
Adrenals (%)	0.028 ± 0.002	0.030 ± 0.005	0.028 ± 0.004	0.028 ± 0.003	0.028 ± 0.003	0.033 ± 0.006
Ovaries (%)	0.036 ± 0.004	0.040 ± 0.003	0.039 ± 0.005	0.038 ± 0.006	0.034 ± 0.002	0.035 ± 0.004
Thymus (%)	0.195 ± 0.043	0.210 ± 0.031	0.223 ± 0.022	0.179 ± 0.045	0.176 ± 0.030	0.160 ± 0.026

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **; P ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

Table 5 Summary of gross findings in rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
			0	30	60	120	0	120
Male								
		No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
CARDIOVASCULAR SYSTEM								
	heart	white patch/zone	0	0	1	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
	spleen	deformed	0	0	0	0	0	1
RESPIRATORY SYSTEM								
	lung	black patch/zone	0	0	1	0	0	0
		colored patch/zone	1	0	0	1	0	0
		red patch/zone	1	1	1	2	0	0
DIGESTIVE SYSTEM								
	liver	colored patch/zone	0	0	1	0	0	0
		diaphragmatic hernia	0	0	0	1	0	0
		white patch/zone	0	0	0	1	0	0
URINARY SYSTEM								
	kidney	white patch/zone	0	0	0	0	1	0
ENDOCRINE SYSTEM								
	pituitary gland	cyst	0	1	0	0	0	0
	adrenal gland	enlarged	0	0	0	0	1	0
Female								
		No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
CARDIOVASCULAR SYSTEM								
	heart	black patch/zone	0	1	0	0	0	0
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
	spleen	enlarged	1	0	0	0	0	0
	lymph node	enlarged	1	0	0	0	0	0
	thymus	red patch/zone	2	1	0	0	0	0
RESPIRATORY SYSTEM								
	lung	black patch/zone	1	0	0	0	0	0
		colored patch/zone	1	0	0	0	0	1
		red patch/zone	0	0	0	2	0	0
DIGESTIVE SYSTEM								
	liver	enlarged	1	0	0	0	0	0
		granular	1	0	0	0	0	0
		pale	1	0	0	0	0	0
	choledochus	dilated lumen	1	0	0	0	0	0
URINARY SYSTEM								
	kidney	cyst	1	0	0	0	0	0
		dilated pelvis	0	0	0	1	0	0
		enlarged	1	0	0	0	0	0
		pale	1	0	0	0	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM								
	ovary	cyst	0	0	2	0	0	0
	uterus	dilated lumen	1	0	0	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM								
	pituitary gland	cyst	1	0	0	0	0	0

Table 6 Summary of histopathological findings in rats treated orally with benzyltrimethylanmonium chloride in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)											
			0			30			60			120		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Male														
No. of animals necropsied			5			5			5			5		
DIGESTIVE SYSTEM														
liver			(5)			(0)			(0)			(5)		
		fatty change, peripheral granulation	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		infiltration/cellular	4	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
		hepatodiaphragmatic nodule	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
			0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
URINARY SYSTEM														
kidney			(5)			(0)			(0)			(5)		
		basophilic change	3	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
		deposit of calcium	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		eosinophilic body	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		infiltration/cellular	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
MUSCULOSKELETAL SYSTEM														
bone			(5)			(0)			(0)			(5)		
		osteosclerosis	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
Female														
No. of animals necropsied			5			5			5			5		
HEMATOPOIETIC SYSTEM														
bone marrow			(5)			(0)			(0)			(5)		
		granulopoiesis, increased	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
spleen			(5)			(0)			(0)			(5)		
		capsulitis	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		hematopoiesis, increased	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM														
liver			(5)			(0)			(0)			(5)		
		bile duct dilatation	0	0	1	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		cytological alteration	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		fatty change	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		fatty change, peripheral	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		necrosis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		swelling of liver cells	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		cholangitis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		granulation	2	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0
		bile duct hyperplasia	0	0	1	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		extramedullary hematopoiesis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
URINARY SYSTEM														
kidney			(5)			(0)			(0)			(5)		
		edema	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		basophilic change	2	0	0	-	-	-	-	-	-	3	0	0
		cyst	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
		hydronephrosis	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		tubular dilatation	0	1	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		lymphocytic infiltration	0	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
		fibrosis	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0
ENDOCRINE SYSTEM														
adrenal gland			(5)			(0)			(0)			(5)		
		vacuolic change	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0

1:slight 2:moderate 3:marked

Numbers in parenthesis indicate No. of animals examined microscopically at this site.

ヘモグロビン量、MCVおよびMCHの高値のみが被験物質投与に関連づけられる変化であったが、変化の程度は僅かであり、被験物質の血液に対する影響は弱いものと考えられた。回復試験終了時に雌雄の120 mg/kg群で認められた変化も、軽微または投与終了時に認められなかった変化であり、被験物質投与との関連は示唆されない。血液凝固能検査に関しては、雌雄とも変化が認められなかった。

血液生化学検査および尿検査の結果、被験物質投与によると考えられる変化は、雌雄いずれの群にも認められなかった。

器官重量測定の結果、明確に被験物質投与の影響を示唆する変化では認められなかった。雄の30および60 mg/kg群で認められた脳、腎臓および脾臓の実重量の変化は、相対重量に有意な差が認められず、この両群の体重が高値傾向にあることから、体重による影響と考えられた。また、雄の60 mg/kg群で認められた胸腺の実重量および相対重量の高値についても、投与用量との関連性がなく、被験物質投与による変化とは考えられなかった。回復試験終了時に認められた雄の120 mg/kgの脳相対重量の高値も、この群の体重が低いことによるものと推察された。

病理学的検査の結果、剖検所見では計画屠殺動物、死亡動物ともに特筆すべき所見は観察されなかった。

組織所見では、計画屠殺動物においては、被験物質の影響を示唆する所見は観察されなかったが、死亡した1例の動物では肝細胞腫脹と好酸性小体の出現が観察された。しかし、いずれも軽度の変化であり、死に至らしめるほどの肝細胞腫脹、好酸性小体の出現とは考えがたく死因は不明であった。なお、予備試験において、計画屠殺動物の180 mg/kg群では肝臓の肥大は観察されなかつ

たが、投与期間中に死亡した180 mg/kg群の雌雄の大部分の例で肝臓の肥大が肉眼的に観察されている。本試験の死亡動物の肝臓では肥大が認められなかったが、組織学的に観察された肝細胞腫脹と好酸性小体の出現は被験物質投与による影響が考えられた。

以上のことから、本試験では雌雄で認められた一般状態の変化および雄の120 mg/kg群で認められた血液学検査値の変化が被験物質投与に関連づけられるものであり、無影響量は一般状態に変化が認められなかった、雄で30 mg/kg/day、雌で60 mg/kg/dayと判断された。

連絡先

試験責任者：井上博之

試験担当者：各務 進、庄子明徳、渡 修明、

小林和雄、高木留美子

(財)食品農薬薬品安全性評価センター

〒437-12 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: Hiroyuki Inoue (Study director),

Susumu Kakamu, Akinori Shoji,

Nobuaki Watari, Kazuo Kobayashi,

Rumiko Takagi

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

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho, Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan

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

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Benzyltrimethylammonium chloride on Bacteria

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの変異原性について遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535およびTA1537株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA株を用いる復帰突然変異試験を行った。予備的な試験の結果を基に、試験用量を設定した。すなわち、直接法 (-S9 mix) ならびに代謝活性化法 (+S9 mix) の各菌株についてそれぞれ、156~5000 µg/プレート の6用量を設定し試験した。その結果、直接法および代謝活性化法のいずれにおいても、ラット肝ミクロソーム (S9) 添加の有無にかかわらず、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ず、再現性も確認された。一方、各系での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。従って、本試験条件下において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドは微生物に対し遺伝子突然変異を誘起しないものと判断した。

材料および方法

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* WP2uvrA²⁾の5種類の菌株を選抜した。

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日に国立衛生試験所から分与を受けた。平成6年11月25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)

日清製粉(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-ピオチン(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の円筒容器(ストレージボトル: Corning Costar社)に2.5%ニュートリエントブロス(OXOID社)溶液を25ml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8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-ベンゾフラボンと投与した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 1ml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

5. 被験物質

被験物質のベンジルトリメチルアンモニウムクロリド(ロット番号:RSL9083, CAS No.:56-93-9)は分子式C₁₀H₁₆ClN, 分子量185.70, 純度99.0%以上の白色粉末である。和光純薬工業(株)から提供された被験物質を使用した。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. 被験物質溶液の調製

注射用蒸留水(大塚蒸留水: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

8.00, 40.0, 200, 1000および5000 μg /プレートの用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、直接法のTA100およびTA1535で5000 μg /プレートにおいて試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。従って、本試験においては直接法ならびに代謝活性化法の各菌株について5000 μg /プレートを最高用量とし、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 $^{\circ}\text{C}$)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(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プレインキュベーション法¹⁾に準じて、直接法および代謝活性化法それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を100 μl 、次いで直接法の場合、0.1 Mナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μl 、代謝活性化法の場合、S9 mixを500 μl および試験菌液100 μl を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で20分間振盪培養(プ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 $^{\circ}\text{C}$ 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

試験結果をTable 1~4に示した。直接法(-S9 mix)のTA100およびTA1535の5000 μg /プレートにおいて、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理による生育阻害作用が観察された。直接法のTA98, TA1537およびWP2uvrAならびに代謝活性化法(+S9 mix)では、5000 μg /プレートにおいても同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、直接法、代謝活性化法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ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド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: 北沢倫世, 熊平智司, 勝俣 勇
 (財)食品農医薬品安全性評価センター
 〒437-12 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, Satoshi Kumadaira
 Isami Katsumata
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
 Pesticides (An-pyo Center)
 582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride(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			
D.W.#	0	97	91	85	13	8	12	23	24	21	22	27	25	9	6	7	
		[91 \pm 6]	[11 \pm 3]	[23 \pm 2]	[25 \pm 3]	[7 \pm 2]											
Test sub.	156	103	93	88	17	7	8	19	22	24	27	30	21	10	5	9	
		[95 \pm 8]	[11 \pm 6]	[22 \pm 3]	[26 \pm 5]	[8 \pm 3]											
	313	91	95	94	16	10	10	18	22	18	23	21	23	11	5	10	
		[93 \pm 2]	[12 \pm 3]	[19 \pm 2]	[22 \pm 1]	[9 \pm 3]											
	625	95	83	101	9	9	15	19	21	24	29	28	27	11	5	9	
		[93 \pm 9]	[11 \pm 3]	[21 \pm 3]	[28 \pm 1]	[8 \pm 3]											
5000	1250	90	96	102	11	10	14	23	24	20	20	35	27	10	11	9	
		[96 \pm 6]	[12 \pm 2]	[22 \pm 2]	[27 \pm 8]	[10 \pm 1]											
	2500	87	100	89	17	7	6	25	26	21	25	24	23	7	6	8	
		[92 \pm 7]	[10 \pm 6]	[24 \pm 3]	[24 \pm 1]	[7 \pm 1]											
5000	97*	84*	96*	7*	13*	8*	23	21	22	22	30	23	10	9	8		
	[92 \pm 7]	[9 \pm 3]	[22 \pm 1]	[25 \pm 4]	[9 \pm 1]												
Positive control		555	518	487 ^{a)}	464	409	411 ^{b)}	119	126	124 ^{c)}	631	595	660 ^{d)}	546	496	519 ^{d)}	
		[520 \pm 34]	[428 \pm 31]	[123 \pm 4]	[629 \pm 33]	[520 \pm 25]											

#: Solvent control *: The background lawn was thin
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, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride(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			
D.W.#	0	106	109	100	15	10	13	31	20	25	27	32	28	12	11	10	
		[105 \pm 5]	[13 \pm 3]	[25 \pm 6]	[29 \pm 3]	[11 \pm 1]											
Test sub.	156	109	93	102	14	9	12	24	21	19	31	25	32	9	7	7	
		[101 \pm 8]	[12 \pm 3]	[21 \pm 3]	[29 \pm 4]	[8 \pm 1]											
	313	99	96	94	14	10	13	26	20	26	31	43	35	15	11	11	
		[96 \pm 3]	[12 \pm 2]	[24 \pm 3]	[36 \pm 6]	[12 \pm 2]											
	625	90	93	89	17	13	16	22	19	17	33	33	43	11	10	9	
		[91 \pm 2]	[15 \pm 2]	[19 \pm 3]	[36 \pm 6]	[10 \pm 1]											
5000	1250	96	94	98	15	15	13	23	23	26	34	47	34	14	6	9	
		[96 \pm 2]	[14 \pm 1]	[24 \pm 2]	[38 \pm 8]	[10 \pm 4]											
	2500	103	116	112	8	13	8	31	26	21	31	29	32	6	10	8	
		[110 \pm 7]	[10 \pm 3]	[26 \pm 5]	[31 \pm 2]	[8 \pm 2]											
5000	95	86	93	18	14	7	23	21	23	47	35	30	12	5	11		
	[91 \pm 5]	[13 \pm 6]	[22 \pm 1]	[37 \pm 9]	[9 \pm 4]												
Positive control		668	655	682 ^{a)}	319	333	376 ^{b)}	792	700	762 ^{c)}	391	335	316 ^{d)}	152	133	171 ^{b)}	
		[668 \pm 14]	[343 \pm 30]	[751 \pm 47]	[347 \pm 39]	[152 \pm 19]											

#: Solvent control
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 benzyltrimethylammonium chloride (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		
D.W.#	0	116	97	93	17	16	15	29	33	29	32	29	26	7	11	8
		[102 \pm 12]			[16 \pm 1]			[30 \pm 2]			[29 \pm 3]			[9 \pm 2]		
Test sub.	156	105	105	111	14	15	10	37	35	25	27	32	21	10	12	9
		[107 \pm 3]			[13 \pm 3]			[32 \pm 6]			[27 \pm 6]			[10 \pm 2]		
	313	115	103	99	17	9	8	24	21	24	30	20	30	9	8	8
		[106 \pm 8]			[11 \pm 5]			[23 \pm 2]			[27 \pm 6]			[8 \pm 1]		
	625	110	99	124	14	14	9	25	22	27	30	23	31	12	11	9
		[111 \pm 13]			[12 \pm 3]			[25 \pm 3]			[28 \pm 4]			[11 \pm 2]		
	1250	110	99	102	18	12	14	23	24	21	35	27	25	4	9	7
		[104 \pm 6]			[15 \pm 3]			[23 \pm 2]			[29 \pm 5]			[7 \pm 3]		
	2500	94	109	98	13	13	11	26	25	30	25	26	28	12	10	9
		[100 \pm 8]			[12 \pm 1]			[27 \pm 3]			[26 \pm 2]			[10 \pm 2]		
	5000	91*	110*	104*	12*	13*	13*	29	26	28	25	27	32	11	11	10
		[102 \pm 10]			[13 \pm 1]			[28 \pm 2]			[28 \pm 4]			[11 \pm 1]		
Positive control		441	437	458 ^d	507	436	439 ^b	122	111	121 ^a	501	570	543 ^c	450	482	448 ^d
		[445 \pm 11]			[461 \pm 40]			[118 \pm 6]			[538 \pm 35]			[460 \pm 19]		

#: Solvent control *: The background lawn was thin
 a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$
 d): ACR; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of benzyltrimethylammonium chloride (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		
D.W.#	0	111	114	92	12	15	15	28	21	26	30	34	25	15	9	11
		[106 \pm 12]			[14 \pm 2]			[25 \pm 4]			[30 \pm 5]			[12 \pm 3]		
Test sub.	156	84	101	98	9	9	16	24	19	22	34	26	28	10	10	9
		[94 \pm 9]			[11 \pm 4]			[22 \pm 3]			[29 \pm 4]			[10 \pm 1]		
	313	82	101	120	13	16	16	23	22	19	27	18	24	5	6	8
		[101 \pm 19]			[15 \pm 2]			[21 \pm 2]			[23 \pm 5]			[6 \pm 2]		
	625	116	84	85	15	10	16	20	14	24	21	30	28	7	7	10
		[95 \pm 18]			[14 \pm 3]			[19 \pm 5]			[26 \pm 5]			[8 \pm 2]		
	1250	114	109	96	14	11	10	20	20	24	28	26	19	8	11	13
		[106 \pm 9]			[12 \pm 2]			[21 \pm 2]			[24 \pm 5]			[11 \pm 3]		
	2500	115	103	102	10	16	15	25	19	26	39	25	29	9	9	6
		[107 \pm 7]			[14 \pm 3]			[23 \pm 4]			[31 \pm 7]			[8 \pm 2]		
	5000	104	118	110	16	13	10	27	22	20	25	26	26	10	13	7
		[111 \pm 7]			[13 \pm 3]			[23 \pm 4]			[26 \pm 1]			[10 \pm 3]		
Positive control		614	625	618 ^a	415	382	384 ^b	795	730	745 ^c	308	311	346 ^d	103	113	135 ^b
		[619 \pm 6]			[394 \pm 19]			[757 \pm 34]			[322 \pm 21]			[117 \pm 16]		

#: Solvent control
 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 $\mu\text{g}/\text{plate}$

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの
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 Benzyltrimethylammonium chloride
on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株(CHL)を用いる *in vitro* 染色体異常試験を行った。細胞増殖抑制試験において細胞が死滅するほどの毒性が観察されなかったため、OECDのガイドラインに従って10 mM相当の濃度を最高用量とした。すなわち、連続処理法(24時間処理および48時間処理)ならびに短時間処理法(6時間処理の+S9 mixおよび-S9 mix)のいずれにおいても使用溶媒での10 mM相当を最高用量とした475, 950および1900 $\mu\text{g/ml}$ の3用量(公比2)について染色体標本を作製した後、顕微鏡観察を実施した。短時間+S9 mix処理法の1900 $\mu\text{g/ml}$ において、僅かではあるが染色体構造異常の誘発傾向が観察された。同処理法において1000, 1300, 1600および1900 $\mu\text{g/ml}$ の4用量を用いた確認試験を2回繰り返して実施した結果、構造異常誘発頻度は1回目で各用量群2.5~3.5%であったが、2回目は4.0~6.5%の細胞に構造異常の誘発が認められた。一方、連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンC(MMC)および短時間+S9 mix処理の陽性対照物質シクロホスファミド(CP)は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。従って、本試験条件下の *in vitro* 試験系において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの染色体異常誘起性について疑陽性と判断した。

材料および方法

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日に国立衛生試験所から分与を受け、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9の細胞を、確認試験においては同8および45の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM培地(LIFE TECHNOLOGIES社)を1000 mlの精製水で溶解した後、2.2 gの炭酸水素ナトリウム

(関東化学㈱)を加えた。1N塩酸を用いてpHを7.2に調整した後、メンブランフィルター(0.2 μm :Gelman Sciences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。

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㈱)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(㈱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-ベンゾフラボンと投与した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。

5. 被験物質

被験物質のベンジルトリメチルアンモニウムクロリド(ロット番号:RSL9083, CAS No.:56-93-9)は分子式C₁₀H₁₆ClN, 分子量185.70, 純度99.0%以上の白色粉末である。和光純薬工業㈱から提供された被験物質を使用した。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. 被験物質溶液の調製

生理食塩液(㈱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日後に被験物質溶液を処理した。連続処理法の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理法ではS9 mix存在下(+S9 mix)あるいは非存在下(-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㈱)で固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット(関東化学㈱)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

染色体異常試験

なわち細胞生存率を算出した。

その結果、連続処理法においては細胞増殖抑制作用が観察されたが、短時間処理法では明確な同作用は認められなかった (Fig. 1)。プロビット法を用いて算出した50%細胞増殖抑制濃度は連続24時間処理で1311 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、同48時間処理で585 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と算出された。また、短時間処理では1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上と考えられた。

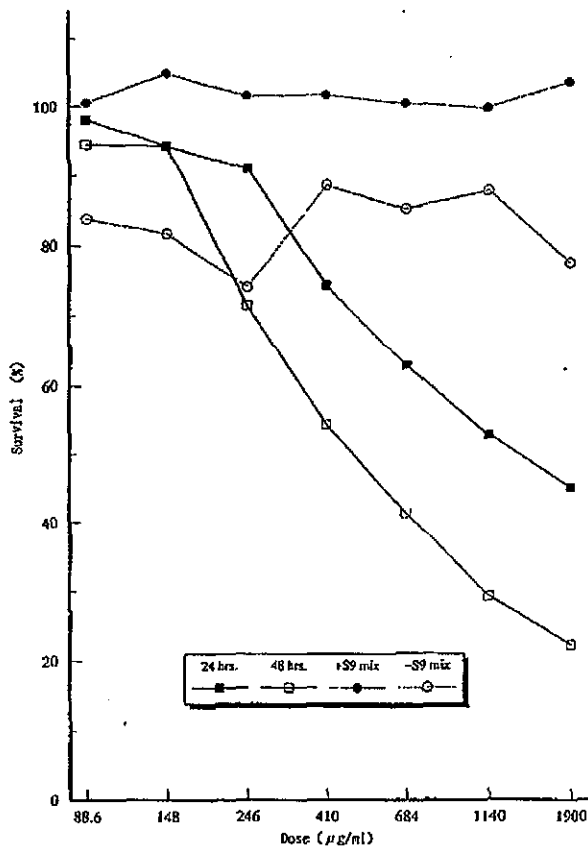


Fig. 1 Dose-survival curves of benzyltrimethylammonium chloride

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基に、染色体異常試験では連続処理法、短時間処理法とも10 mM相当の1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を高用量とし、以下公比2で減じた950および475 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の計3用量ならびに溶媒対照群を設定した。

陽性対照として、連続処理法の場合、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、短時間処理法の場合、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。

また、確認試験においては1000, 1300, 1600および1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の4用量(等差数列)を設定した。

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようコロセミド(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を作製した後、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、含まない場合(-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。ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理群の場合、24時間ならびに48時間処理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処理において高用量の1900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においてのみ染色体の構造異常の出現頻度が5%を示し、疑陽性と判定された。再現性を調査するため確認試験を実施した結果、1回目の試験では染色体構造異常の誘発頻度が2.5~3.5%であり疑陽性の判定基準である5%を超えることはなかった(Table 3)。2回目の確認試験では被験物質処理群において僅かではあるが染色体の構造異常の増加傾向が観察された(Table 4)。また、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の構造異常の顕著な誘発が認められた。以上の試験結果から、本試験条件下においてベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、疑陽性と判定した。

Table 1. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with benzyltrimethylammonium chloride [long-term treatment]

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				
Saline*	0	24	200	2	1	1	1	0	0	2.5	1.5	2.5	-
Test Sub.	475	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-
	950	24	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-
	1900	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-
MMC**	0.05	24	200	25	76	1	97	1	0	71.0	69.0	1.0	+
Saline*	0	48	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.5	-
Test Sub.	475	48	200	1	1	0	1	0	0	0.5	0.5	0.5	-
	950	48	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	1.5	-
	1900	48	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	3.0	-
MMC**	0.025	48	200	15	45	1	66	3	0	50.5	47.5	0.5	+

*:Solvent control **:Positive control (mitomycin C)

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

Table 2. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with benzyltrimethylammonium chloride [short-term treatment]

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				
Saline*	0	+	6	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.5	-
Test Sub.	475	+	6	200	0	0	0	3	0	0	1.5	1.5	0.0	-
	950	+	6	200	1	4	0	5	1	1	4.0	4.0	3.5	-
	1900	+	6	200	3	3	0	9	0	0	5.0	5.0	2.5	±
CP**	12.5	+	6	200	7	36	0	61	2	1	43.5	42.0	0.5	+
Saline*	0	-	6	200	2	0	0	0	1	0	1.5	0.5	0.5	-
Test Sub.	475	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-
	950	-	6	200	3	1	0	0	0	0	2.0	0.5	1.0	-
	1900	-	6	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	2.0	-
CP**	12.5	-	6	200	0	1	0	1	0	0	1.0	1.0	0.0	-

*: Solvent control **:Positive control (cyclophosphamide)

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

染色体異常試験

Table 3. Results of the confirmative examination using CHL cells of benzyltrimethylammonium chloride [short-term treatment: first trial]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	S9 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				
Saline*	0	+	6	200	1	0	0	1	0	0	1.0	0.5	0.0	-
Test Sub.	1000	+	6	200	0	3	0	4	1	0	3.0	3.0	1.0	-
	1300	+	6	200	1	0	0	4	0	0	2.5	2.0	1.0	-
	1600	+	6	200	2	2	0	5	0	0	3.5	3.0	0.0	-
	1900	+	6	200	1	0	1	2	1	0	2.5	2.0	1.0	-
CP**	12.5	+	6	200	26	43	0	137	3	0	74.0	72.5	1.5	+

*: Solvent control **: Positive control (cyclophosphamide)
 ctb: chromatid break csb: chromosome break cte: chromatid exchange cse: chromosome exchange oth: others

Table 4. Results of the confirmative examination using CHL cells of benzyltrimethylammonium chloride [short-term treatment: second trial]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	S9 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				
Saline*	0	+	6	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.0	-
Test Sub.	1000	+	6	200	1	2	0	8	0	0	4.0	4.0	0.0	-
	1300	+	6	200	2	2	0	9	0	0	5.0	4.5	0.5	±
	1600	+	6	200	1	2	0	10	0	0	5.5	5.5	0.0	±
	1900	+	6	200	0	2	0	12	0	1	6.5	6.5	1.0	±
CP**	12.5	+	6	200	11	37	0	116	0	0	63.0	62.0	1.0	+

*: Solvent control **: Positive control (cyclophosphamide)
 ctb: chromatid break csb: chromosome break cte: chromatid exchange cse: chromosome exchange oth: others

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.

連絡先

試験責任者: 中嶋 園
 試験担当者: 北沢倫世, 菊池正憲, 板倉真由実
 (財)食品農医薬品安全性評価センター
 〒437-12 静岡県磐田郡榑田町塩新田字荒浜582-2
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)
 Michiyo Kitazawa, Masanori Kikuchi
 Mayumi Itakura
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
 Pesticides (An-pyo Center)
 582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

National Toxicology Program
Toxicity Report Series
Number 57

NTP Technical Report
on the Toxicity Studies of
Benzyltrimethylammonium Chloride

(CAS No. 56-93-9)

Administered by Gavage
to F344/N Rats and B6C3F₁ Mice

February 2000
NIH Publication No. 00-4405

U.S. Department of Health and Human Services
Public Health Service
National Institutes of Health