

連絡先：試験責任者 澁谷徹

(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 : Shibuya, Tohru

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan

Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of bacterial reverse mutation assay (I) with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt*

Group	Dose (μ g/plate)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)											
			Base-pair substitution type						Frameshift type					
			TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537			
Solvent control		-	145 (131 $\pm$)	127 (13.5)	22 (18 $\pm$)	17 (3.6)	9 (13 $\pm$)	13 (3.5)	27 (22 $\pm$)	18 (4.6)	10 (9 $\pm$)	10 (2.3)	6 (2.3)	
Test substance	312.5	-	168 (160 $\pm$)	176 (21.7)	26 (17 $\pm$)	8 (9.0)	12 (15 $\pm$)	18 (3.1)	26 (22 $\pm$)	21 (3.2)	4 (5 $\pm$)	6 (1.2)	6 (1.2)	
	625	-	144 (139 $\pm$)	140 (5.0)	13 (15 $\pm$)	14 (2.6)	12 (11 $\pm$)	10 (1.2)	20 (20 $\pm$)	22 (2.5)	8 (9 $\pm$)	9 (0.6)	9 (0.6)	
	1250	-	129 (117 $\pm$)	115 (10.7)	16 (12 $\pm$)	8 (4.0)	13 (13 $\pm$)	15 (2.0)	11 (14 $\pm$)	13 (3.1)	7 (7 $\pm$)	8 (1.5)	5 (1.5)	
	2500	-	136 (138 $\pm$)	138 (2.0)	18 (16 $\pm$)	18 (2.9)	8 (12 $\pm$)	17 (4.7)	17 (19 $\pm$)	17 (2.9)	6 (8 $\pm$)	8 (1.5)	9 (1.5)	
	5000	-	133 (140 $\pm$)	148 (7.5)	16 (15 $\pm$)	12 (2.3)	15 (14 $\pm$)	10 (3.2)	21 (18 $\pm$)	12 (4.9)	2 (4 $\pm$)	5 (2.1)	6 (2.1)	
Solvent control		+	163 (137 $\pm$)	125 (22.2)	15 (12 $\pm$)	13 (3.1)	9 (17 $\pm$)	19 (2.9)	45 (42 $\pm$)	45 (4.6)	10 (10 $\pm$)	9 (1.0)	11 (1.0)	
Test substance	312.5	+	156 (155 $\pm$)	158 (3.6)	12 (14 $\pm$)	15 (2.1)	19 (15 $\pm$)	15 (4.0)	46 (39 $\pm$)	27 (10.4)	4 (7 $\pm$)	6 (3.1)	10 (3.1)	
	625	+	149 (133 $\pm$)	132 (15.0)	8 (10 $\pm$)	10 (1.5)	20 (15 $\pm$)	13 (4.7)	37 (30 $\pm$)	25 (6.4)	8 (6 $\pm$)	4 (2.1)	7 (2.1)	
	1250	+	109 (129 $\pm$)	156 (24.3)	7 (11 $\pm$)	12 (3.2)	13 (11 $\pm$)	9 (2.1)	27 (26 $\pm$)	27 (1.2)	6 (7 $\pm$)	10 (2.3)	6 (2.3)	
	2500	+	163 (129 $\pm$)	109 (29.4)	15 (12 $\pm$)	9 (3.0)	12 (14 $\pm$)	13 (2.1)	21 (26 $\pm$)	31 (5.0)	7 (5 $\pm$)	5 (2.5)	2 (2.5)	
	5000	+	141 (140 $\pm$)	145 (5.6)	18 (12 $\pm$)	16 (4.0)	12 (12 $\pm$)	12 (0.6)	28 (29 $\pm$)	30 (1.0)	3 (6 $\pm$)	10 (3.5)	6 (3.5)	
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		694 (654 $\pm$)	612 (41.1)	657 (41.1)	166 (184 $\pm$)	194 (15.4)	191 (15.4)	122 (119 $\pm$)	127 (10.4)	107 (10.4)	796 (780 $\pm$)	748 (28.0)	737 (3113 $\pm$)
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		991 (1046 $\pm$)	1051 (52.7)	1096 (52.7)	231 (203 $\pm$)	196 (24.8)	183 (24.8)	899 (866 $\pm$)	897 (54.9)	803 (54.9)	463 (372 $\pm$)	345 (81.3)	307 (205 $\pm$)

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
*:Purity was 87.4%

Table 2 Results of bacterial reverse mutation assay (II) with 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid monosodium salt*

Group	Dose (μ g/plate)	S9 Mix	Number of revertants (number of colonies, Mean $\pm$ S.D.)														
			Base-pair substitution type									Frameshift type					
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
Solvent control	-	-	159 (154 $\pm$ 6.2)	156	147	21 (16 $\pm$ 4.2)	15	13	18 (21 $\pm$ 6.1)	17	28	22 (29 $\pm$ 7.0)	28	36	16 (13 $\pm$ 3.6)	14	9
	312.5	-	127 (135 $\pm$ 9.3)	145	132	14 (13 $\pm$ 2.3)	14	10	16 (15 $\pm$ 1.0)	15	14	20 (25 $\pm$ 5.7)	31	23	13 (9 $\pm$ 3.2)	7	8
	625	-	150 (137 $\pm$ 11.9)	127	133	25 (19 $\pm$ 6.0)	19	13	16 (12 $\pm$ 4.0)	13	8	23 (24 $\pm$ 4.2)	29	21	5 (6 $\pm$ 1.2)	7	5
	1250	-	127 (131 $\pm$ 3.5)	133	133	15 (17 $\pm$ 2.1)	18	19	10 (12 $\pm$ 2.9)	10	15	14 (17 $\pm$ 3.1)	20	16	7 (6 $\pm$ 1.7)	4	7
	2500	-	139 (140 $\pm$ 6.6)	134	147	10 (13 $\pm$ 4.4)	11	18	20 (16 $\pm$ 3.8)	14	13	17 (21 $\pm$ 3.8)	23	24	8 (9 $\pm$ 2.6)	7	12
	5000	-	138 (138 $\pm$ 12.5)	125	150	19 (16 $\pm$ 3.0)	13	16	11 (15 $\pm$ 4.0)	19	16	22 (21 $\pm$ 1.2)	20	22	6 (7 $\pm$ 1.7)	9	6
Solvent control	+	+	155 (154 $\pm$ 16.0)	138	170	15 (16 $\pm$ 8.5)	8	25	16 (14 $\pm$ 2.0)	14	12	33 (32 $\pm$ 6.0)	26	38	14 (13 $\pm$ 0.6)	13	13
	312.5	+	136 (131 $\pm$ 14.7)	142	114	16 (14 $\pm$ 2.5)	14	11	18 (17 $\pm$ 1.5)	17	15	41 (38 $\pm$ 8.5)	44	28	8 (14 $\pm$ 5.5)	18	17
	625	+	137 (130 $\pm$ 6.7)	124	128	22 (18 $\pm$ 3.5)	18	15	21 (17 $\pm$ 3.2)	15	16	26 (23 $\pm$ 5.2)	26	17	10 (11 $\pm$ 1.7)	10	13
	1250	+	137 (133 $\pm$ 8.4)	138	123	17 (15 $\pm$ 2.5)	12	15	24 (16 $\pm$ 7.1)	15	10	25 (27 $\pm$ 5.3)	33	23	7 (8 $\pm$ 2.3)	7	11
	2500	+	126 (126 $\pm$ 9.0)	135	117	11 (12 $\pm$ 1.0)	13	12	15 (16 $\pm$ 3.6)	20	13	27 (28 $\pm$ 1.5)	28	30	9 (11 $\pm$ 2.6)	14	10
	5000	+	115 (120 $\pm$ 7.2)	128	116	20 (14 $\pm$ 5.1)	10	13	19 (17 $\pm$ 4.0)	12	19	26 (24 $\pm$ 4.4)	27	19	14 (14 $\pm$ 1.5)	12	15
Positive control	Chemical		AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
S9 Mix (-)	Number of colonies /plate		653 (670 $\pm$ 15.5)	675	683	184 (159 $\pm$ 22.5)	154	140	106 (106 $\pm$ 0.6)	105	106	779 (804 $\pm$ 41.0)	781	851	2693 (2696 $\pm$ 60.1)	2638	2758
Positive control	Chemical		2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
S9 Mix (+)	Number of colonies /plate		1001 (972 $\pm$ 39.3)	927	987	187 (172 $\pm$ 13.7)	160	169	748 (766 $\pm$ 31.5)	747	802	201 (205 $\pm$ 6.7)	202	213	157 (182 $\pm$ 25.5)	180	208

AF2:2-(2-Puryl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
*:Purity was 87.4%

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの 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 Monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて検討した。

1) 細胞増殖抑制試験

直接法における約50%の増殖抑制濃度は2.20 mg/mlであった。代謝活性化法では、いずれの処理濃度群 (0.11 ~ 3.40 mg/ml) においても、50%をこえる増殖抑制作用は観察されなかった。

従って、染色体異常試験において、直接法では2.20 mg/ml、代謝活性化法では3.40 mg/ml (10 mM相当) の処理濃度をそれぞれ高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

2) 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、いずれの濃度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。また、代謝活性化法のS9 mix存在下および非存在下のいずれの処理条件においても、染色体異常の誘発作用は認められなかった。

3) 結論

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムは、今回実施した試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

緒言

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである、4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムの、培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

この試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号) およびOECDガイドライン: 473に準拠し、化学物質GLP (昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号) に基づいて実施したものである。

材料および方法

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) したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL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: Bocknek、ロット番号SF70521) を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10⁴個のCHL細胞を、培養液 5mlを入れたシャーレ (径6cm、Corning) に播き、37℃のCO₂インキュベーター (5% CO₂) 内で培養した。

4. 被験物質

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウム (CAS No. 5460-09-3、ロット番号: AZ01、東京化成工業 (株) 製造、(社) 日本化学工業協会提供) は淡褐色の粉末で、アセトンおよび水には溶けず、DMSO (ジメチルスルホキシド) に5%まで溶解する。分子式C₁₀H₇NO₂S₂Na₂、分子量341.3の物質で、純度は87.4%である (東京化成工業 (株) 資料)。本実験では被験物質が水に溶けないことから、溶媒として0.5% CMC Na (カルボキシメチルセルロースナトリウム) 液を用いた。原体の安定性に関しては情報は得られなかったが、秦野研究所分析化学研究室で実施した溶媒中での安定性試験では、5.50 ~ 34.0 mg/mlの濃度範囲で3時間は安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。原体を0.5% CMC Na溶液 (ナカライテスク (株)、ロット番号: M9G8053) に懸濁して原液 (34.0または22.0 mg/ml) を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、全ての試験において培養液の10% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85%以上) の値であった。

染色体異常試験

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細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（オリンパス）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、直接法における約50%の増殖抑制濃度は2.20 mg/mlであった。一方、代謝活性化法では、処理した濃度範囲（0.11～3.40 mg/ml）において50%をこえる増殖抑制は観察されなかった（Fig.1）。

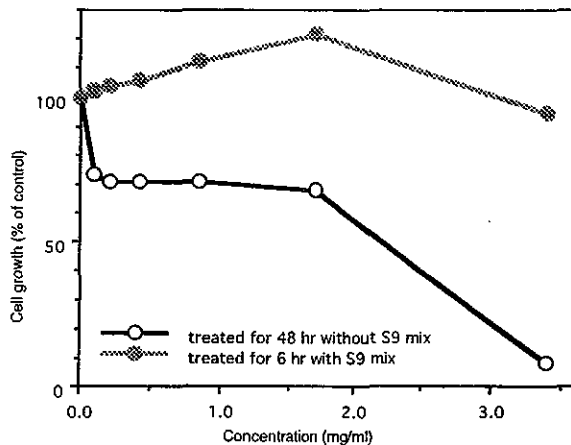


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate in CHL cells

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、直接法（24および48時間連続処理）では2.20 mg/ml、代謝活性化法（6時間処理後18時間培養）では3.40 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。

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。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製し、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。ギムザ染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのシャーレから得られた異なる標本を、複数の観察者がそれぞれブラインドの状態で行った。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験（MMS）分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞（polyploid）の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの“Exact probability test”法により溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が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。

結果および考察

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムを加えて24時間および48時間処理した各群において、いずれも染色体の構造異常の出現頻度に有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。また、倍数性細胞についても同様に有意な増加はみられなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した。

4-アミノ-5-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸モノナトリウムを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した各濃度群において、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。

陽性対照として用いた直接法でのMC処理群、およびS9 mix存在下でのCPA処理群では染色分体交換（cte）や染色分体切断（ctb）などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

なお、本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

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，1988。
- 2) 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，1987。

連絡先：試験責任者 田中憲穂

（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: Tanaka, Norihiro

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257, Japan

Tel 81-463-82-4751 Fax 81-463-82-9627

Table 1 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate** by direct method

Group	Concent-ration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ¹⁾	No. of cells with aberrations			Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG	(%)	TA		SA	NA
Control			200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	(1.0)	0 (0.0)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	24	200	2	1	0	0	0	0	0	3	0	3	(1.5)	1 (0.5)	0.50		
AHNS	0.55	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	0 (0.0)	0.25	—	—
AHNS	1.10	24	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	(1.0)	0 (0.0)	0.50	—	—
AHNS	2.20	24	200	6	0	0	0	0	0	0	6	0	6	(3.0)	0 (0.0)	0.38	—	—
MC	0.00005	24	200	18	44	57	1	0	3	0	123	0	77*	(38.5)	68* (34.0)	0.25	+	—
Solvent ¹⁾	0	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	0 (0.0)	0.13		
AHNS	0.55	48	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	(1.0)	0 (0.0)	0.25	—	—
AHNS	1.10	48	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	1 (0.5)	0.00	—	—
AHNS	2.20	48	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	4	(2.0)	0 (0.0)	0.25	—	—
MC	0.00005	48	200	17	24	60	1	1	0	20	123	0	73*	(36.5)	62* (31.0)	0.25	+	—

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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) 0.5% Carboxymethyl-cellulose sodium was used as solvent. 2) More than ten 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 87.4%.

Table 2 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate** by metabolic activation method

Group	Concent-ration (mg/ml)	S-9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ¹⁾	No. of cells with aberrations			Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG	(%)	TA		SA	NA
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0 (0.0)	0.25		
Solvent ¹⁾	0	—	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0 (0.0)	0.75		
AHNS	0.85	—	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	0 (0.0)	0.50	—	—
AHNS	1.70	—	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	0 (0.0)	0.38	—	—
AHNS	3.40	—	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0 (0.0)	0.25	—	—
CPA	0.005	—	6 - (18)	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	(1.0)	0 (0.0)	0.88	—	—
Solvent ¹⁾	0	+	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0 (0.0)	0.38		
AHNS	0.85	+	6 - (18)	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	(1.0)	0 (0.0)	0.25	—	—
AHNS	1.70	+	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0 (0.0)	0.50	—	—
AHNS	3.40	+	6 - (18)	200	2	1	0	0	0	0	0	3	0	3	(1.5)	1 (0.5)	0.50	—	—
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	24	80	130	1	1	2	30	268	0	113*	(56.5)	109* (54.5)	0.13	+	—

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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) 0.5% Carboxymethyl-cellulose sodium was used as solvent. 2) More than ten 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 87.4%.

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールのラットを用いた 反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2,2-Dimethyl-1,3-propanediol in Rats

要約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオール（ネオペンチルグリコール）の0（溶媒対照群）、100、300および1,000 mg/kg/dayをSprague-Dawley系（Slc:SD）ラットに交配前2週間および交配期間2週間を通じて経口投与し、さらに雄では交配期間終了後17日間、雌では妊娠期間を通じて分娩後哺育3日まで連続投与し、親動物に対する反復投与毒性および生殖能ならびに児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

1. 反復投与毒性

一般状態には被験物質投与の影響は認められず、死亡例も観察されなかった。

体重および摂餌量は雌雄ともに群間で差はなく被験物質投与の影響は認められなかった。

雄の血液学的検査では、被験物質投与の影響と考えられる変化はなかった。また、血液化学的検査では、300および1,000 mg/kg群でアルブミンの増加に伴う総蛋白の増加と総ビリルビンの増加が認められ、さらに1,000 mg/kg群では血糖値の減少が認められた。

器官重量は雄の300および1,000 mg/kg群で肝臓重量が増加した。さらに1,000 mg/kg群では腎臓重量が増加し、300 mg/kg群でも統計学的有意差はないものの増加傾向が認められた。

雄の剖検所見では、1,000 mg/kg群の12例中2例に肝臓の肥大が観察された。病理組織学検査では、肝臓の肥大を裏付ける明確な形態的变化は認められなかった。腎臓の所見として、雄の1,000 mg/kg群で蛋白円柱や硝子滴変性が増加し、尿管上皮の中程度好塩基性化が11例中4例に観察された。

2. 生殖発生毒性

交尾能、受胎能および性周期観察では、被験物質投与の影響は認められなかった。

分娩時観察では、対照群の1例を除き妊娠動物の全例が正常に分娩し哺育期間を通じ被験物質投与の影響は認められなかった。また、新生児の外表検査でも被験物質投与によると考えられる異常はなく、体重も哺育4日まで順調に増加した。死産児および哺育4日までの死亡児ならびに哺育4日の剖検では、被験物質投与によると考えられる異常所見は観察されなかった。

以上の結果から、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールの反復投与毒性は、雄の300 mg/kg/day以上の投与で認められ、雌では1,000 mg/kg/day投与によっても認められなかった。したがって、最大無影響量は、雄では100 mg/kg/day、雌では1,000 mg/kg/dayと判断した。また、雌雄の生殖に及ぼす影響および児動物の発生・発育に及ぼす影響は1,000 mg/kg/day投与によっても認められず、最大無影響量はともに1,000 mg/kg/dayと判断した。

緒言

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオール（2,2-Dimethyl-1,3-propanediol、別名：Neopentyl glycol）は、化学産業の分野においてポリエステル樹脂の主原料として使用されている化合物である。本化合物の毒性については、経口投与によるLD₅₀値がラット6,400～12,800 mg/kg、マウス3,200～6,400 mg/kgであることや1%混餌による36日間投与で体重の増加抑制および摂餌量の減少することが報告されているが、ヒトや実験動物の生殖・発生に及ぼす影響についてはほとんど知られていない。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、2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオールの反復投与毒性・生殖発生毒性について検討した。

方法

1. 被験物質

2,2-ジメチル-1,3-プロパンジオール〔ロット番号1N01（三菱瓦斯化学）、Cas No. 126-30-7、別名Neopentyl glycol（NPG）〕は、分子量104.15、融点127℃、沸点208℃（760mmHg）で水に可溶性の白色結晶状フレークであり、使用時まで室温条件下で密閉保管した。

本被験物質は局方注射用蒸留水〔ロット番号9106AS、9108CS、9108VS（光製薬）〕に溶解し、20（w/v）%溶液を調製した。これを原液とし、注射用蒸留水で順次希釈し各群の投与溶液を調製した。調製後は、使用時まで冷蔵庫に保存した。調製液中の被験物質は0.2, 20（w/v）%溶液の場合、冷蔵条件下ですくなくとも7日間安定であることが確認されているため、調製は1週間に1回実施し、調製後7日以内に使用した。

投与液の濃度分析は、各群の調製液について調製開始時に調製したバッチから無作為にサンプルを抽出し実施した。その結果、97.0～103%の範囲で適切に調製されており問題はなかった。

2. 使用動物および飼育条件

日本エスエルシー株式会社（静岡県浜松市）から購入した9週齢のSprague-Dawley (Slc:SD,SPF) 系雌雄ラットを使用した。購入した動物は8日間検疫・馴化飼育した後、全例を10週齢で群分けして試験に用いた。群分け時の体重は、雄で294~337 g、雌で199~223 gであった。

動物は、温度22~24℃、湿度50~60%、換気回数20回/時間、照度150~300lux、照明時間12時間（午前7時点灯、午後7時消灯）に設定された飼育室（W8×D8×H2.5 m、160m³）で飼育した。株式会社東京技研サービス（東京都府中市）の自動水洗式飼育機（W486×D79×H160 cm）を使用し、床ステンレス網目飼育ケージ（W15.8×D23.8×H16.0 cm、飼育ケージ・スペース6,017 cm³）に動物を1匹ずつ収容し飼育した。但し、交配期間中の雄は、アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ（W36.8×D25.0×H16.0 cm、飼育ケージ・スペース14,720 cm³）に収容し飼育した。母動物は、妊娠18日以降哺育4日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ（W36.8×D25.0×H16.0 cm）に哺育トレーおよび巣作り材料（アルファードライ）を入れて飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母工業株式会社（東京都中央区）製造のNMF固型飼料（放射線滅菌飼料）を使用した。飲水は、水道水を自由に摂取させた。

供給した飼料、水および巣作り材料には試験に支障を来す可能性の考えられる夾雑物の混在はなかった。

3. 群分け

動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けし、1群当たり各12匹を用意した。

群分け後の動物の識別は個体別に耳に入れ墨をするとともにケージごとに動物標識番号（Animal ID-No.）をつけた。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

本試験の用量は先に実施したラットを用いた反復投与毒性/生殖発生毒性併合予備試験（試験番号1796）の結果を参考にして決定した。すなわち、0、10、100および1,000 mg/kgを雄および雌に2週間連続経口投与した結果、1,000 mg/kg群の雄で肝臓重量が増加した。

以上の結果から、本試験の最高用量は予備試験と同じ1,000 mg/kgを設定し、以下公比約3にて除し、300および100 mg/kgを設定した。

投与経路は、OECDガイドライン「反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験」で指示されている投与経路に準じて強制経口投与を選択した。投与容量は、体重100 g当り0.5 mlとし、個体別に測定した最新体重に基づいて算出を行った。胃ゾンデを用いて毎日1回（7日/週）強制経口投与した。対照群には局方注射用蒸留水のみを投与した。

雄の投与期間は、交配前14日間と交配期間14日間および交配終了後の17日間の連続45日間とした。雌の投与期間は、交配前14日間と交配期間中（交尾成立まで最長14日間）ならびに交尾成立雌の妊娠期間を通じて分娩後の哺育3日まで（40~46日間）とした。なお、交尾不成立の雌は交配期間終了後の解剖前日まで45日間投与した。

5. 観察および検査

1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日観察した。

2) 体重

雄では、投与0（投与開始日）、7、14、21、28、35、42および46日（剖検日）に測定した。雌では、投与0（投与開始日）、7、14および21日に測定し、交尾不成立の雌はそれ以後は投与28、35、42および46日（剖検日）に測定した。交尾成立後の雌は、妊娠0、7、14、21日に、分娩した雌は哺育1および4日に測定した。

3) 摂餌量

雄では、投与0（投与開始日）、7および14日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出した。雌では、投与0、7および14日に餌重量を測定した。また、交尾成立の雌は妊娠0、7、14および21日に、分娩した雌は哺育1および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの間の摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出した。なお、交配期間中および交配期間終了後の摂餌量は測定しなかった。

4) 交配

交配前14日間（交配開始日を含めて15日間）の性周期観察を行った雌と同群内の雄を1対1で最長2週間毎晩同居させた。翌朝、陰垢中の精子確認をもって交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。

性周期観察は交尾成立日まで行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数とし平均性周期を算出した。

交配結果から、各群について交尾率〔（交尾動物数/同居動物数）×100〕を算出した。

5) 自然分娩時および新生児の観察

交尾成立動物は、全例を自然分娩させた。分娩の確認は午前中（午前9時~12時）に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した個体について、その日を哺育1日、その前日を分娩日（哺育0日）と規定した。午前12時を過ぎて分娩した個体については、翌日を哺育1日とした。分娩を確認した全例について妊娠期間（哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数）、受胎率〔（受胎動物数/交尾成立動物数）×100〕、出産率〔（生児出産雌数/妊娠雌数）×100〕、着床率〔（着床痕数/妊娠黄体数）×100〕、分娩率〔（総出産児数/着床痕数）×100〕、出生率〔（出生児数/総出産児数）×100〕を算出した。

新生児は哺育1日に出産児数（生存児+死亡児）を調べ、性別を判定するとともに、外形異常の有無を調べた。また、哺育1および4日に雌雄別の同腹児重量を測定し、雌雄別1匹当りの平均重量を算出した。

哺育4日に新生児全例を屠殺し、主要器官の肉眼観察を行った。哺育期間中の死亡児も同様に主要器官の肉眼観察を行った。また、新生児の4日生存率〔（哺育4日生児数/出産児数）×100〕を算出した。

6) 臨床検査

各群の雄全例について剖検時に実施した。動物を約16時間絶食させた後、エーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。

a) 血液学的検査

血液学検査には初血を用いた。THMS H6000 (米国テクニコン社) を用いて下記の項目を測定した (EDTA-3K添加血液)。

白血球数	(WBC)	暗視野板法
赤血球数	(RBC)	暗視野板法
ヘモグロビン量	(HGB)	シアンメトヘモグロビン法
ヘマトクリット値	(HCT)	全赤血球の容積より補正
平均赤血球容積	(MCV)	RBC, HCTより算出
平均赤血球血色素量	(MCH)	HGB, RBCより算出
平均赤血球血色素濃度	(MCHC)	HGB, HCTより算出
血小板数	(PLT)	暗視野板法
白血球百分率		フローサイトケミストリー法

網状赤血球数 (RC) についてはキャピロット (テルモ株式会社、東京都渋谷区) で染色後、血液塗抹標本を作製し鏡検した。

b) 血液化学的検査

クリーンシール (株式会社ヤマトロン、東京都千代田区) に血液を採取し、30分間放置後3,000 r.p.m. 7分間遠心分離して得た血清を検査に用いた。生化学自動分析装置 CentrifChem ENCORE II (ペーカー社、米国) および EKTACHEM 700N (コダック社、米国) を用いて下記の項目を測定した。

総蛋白 (TP)	ビュレット法
アルブミン (Alb)	B.C.G.法
A/G	計算値
血糖 (Glu)	ヘキソキナーゼ法
尿素窒素 (BUN)	ウレアーゼ改良法
クレアチニン (Crea)	Jaffe 法
総ビリルビン (T-Bili)	ジアゾ色素法
グルタミン酸オキザロ	
酢酸トランスアミナーゼ (GOT)	Karmen改良法
グルタミン酸ピルビン	
酸トランスアミナーゼ (GPT)	Wroblewski and LaDue改良法
γ -グルタミルトランス	
ペプチダーゼ (γ -GTP)	酵素法
カルシウム (Ca)	アリザリン法
無機リン (IP)	モリブデンブルー法
カリウム (K)	電極法
塩素 (Cl)	電極法

7. 病理学検査

剖検および器官重量測定

a) 雄動物

45日間投与後、約16時間の絶食させ、エーテル麻酔下で放血安楽死させた。主要器官の肉眼的観察を行い、肝臓、腎臓、胸腺、精巣上体および精巣重量を測定し、器官重量・体重比を算出した。また、全動物の重量測定器官に加えて脳、心臓、脾臓、副腎、精囊、前立腺、下垂体および肉眼所見で変化が認められた器官・組織として腹腔内の塊を10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。なお、精巣および精巣上体はブアン氏液に固定した。

b) 自然分娩した雌

哺育4日にエーテル麻酔後放血安楽死させ、主要器官の肉眼的観察を行った後、肝臓、腎臓、胸腺および卵巣重量を測定し、器官重量・体重比を算出した。また、全動物の重量測定器官に加えて脳、心臓、脾臓、副腎、下垂体および肉眼所見で変化が認められた器官・組織として肺を10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。また、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

c) 交尾不成立の雌

45日間投与後、エーテル麻酔後放血安楽死させ、主要器官の肉眼的観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨 (骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃および十二指腸、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、陰、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

d) 自然分娩の認められない雌

妊娠25日にエーテル麻酔後放血安楽死させ、主要器官の肉眼的観察を行った後、皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨 (骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃および十二指腸、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、陰、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄を10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。着床痕が認められない動物は不妊と判定した。

8. 病理組織学検査

1) 交尾の成立した雄

対照群と高用量群全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および病変部組織として腹腔内の塊について実施した。なお、1,000 mg/kg群で腎臓の蛋白円柱や硝子滴変性、尿細管上皮の好塩基性化の発生数の増加が認められたため、100および300 mg/kg群の腎臓についても行った。

2) 自然分娩した雌

対照群と高用量群全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣および病変部組織として肺について実施した。

3) 交尾の成立しなかった雌雄

全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、陰、子宮、卵巣、精巣、精巣上体、精囊、前立腺および下垂体について実施した。

4) 妊娠を成立させなかった雄および妊娠不成立の雌

全例の脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、陰、子宮、卵巣、精巣、精巣上体、精囊、前立腺および下垂体について実施した。

5) 自然分娩の認められない雌

皮膚、乳腺、リンパ節、唾液腺、胸骨、大腿骨 (骨髄を含む)、胸腺、気管、肺および気管支、心臓、甲状腺および上皮小体、舌、食道、胃および十二指腸、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、卵巣、子宮、陰、眼球、ハーダー腺、脳、下垂体および脊髄について実施した。