

した。

6. 試験用量の設定

濃度設定試験は、最高用量を5000 µg/plateとして注射用水により以下公比4で7段階希釈した計8用量を設定した。本試験では、濃度設定試験において菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、菌の増殖抑制が認められなかったため、原液の最高用量を5000 µg/plateとして以下公比2で5段階希釈した計6用量を設定した。

7. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した5種類の化学物質を使用した。

2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

(AF-2, 和光純薬工業)

Sodium azide

(SAZ, 和光純薬工業)

2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-amino-propylamino]acridine·2HCl (ICR-191, Polysciences)

2-aminoanthracene (2AA, ナカライテスク)

Benzo[a]pyrene (B[a]P, ナカライテスク)

AF-2, ICR-191, 2AA, B[a]Pはジメチルスルホキシド(試薬特級, 和光純薬工業)を用いて溶解し, SAZは, 注射用水(日本薬局方, 大塚製薬工場)により溶解し, 目的濃度に調製した。

8. 試験方法

Amesらの原法の改良法^{1,2)}であるプレインキュベーション法に準じて、非代謝活性化群及び代謝活性化群それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験液あるいは陽性対照物質溶液を100 µL、次いで非代謝活性化群の場合、0.1mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)を500 µL、代謝活性化群の場合、S9 mixを500 µL添加した。さらに、試験菌液を100 µL加え、37°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、あらかじめ45°Cに保温したトップアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。37°Cで48時間培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害及び沈殿/結晶の析出の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。次いで、復帰変異により生じたコロニーを計数した。計数に際しては白色の結晶物が析出したため、肉眼により手動で計数した。各濃度につき3枚のプレートをを使用した。

9. 結果判定

復帰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、判定に際しては統計学的処理は行わなかった。

結果及び考察

濃度設定試験の結果をTable 1に、本試験の結果をTable 2に示した。

濃度設定試験の結果、菌株の種類に関わらず、代謝活性化系存在下で最高用量5000 µg/plateで白色結晶物の析出が認められた。同様に、本試験においても、菌株の種類に関わらず、代謝活性化系存在下で2500 µg/plate以上の被験物質処理群で白色結晶物の析出が認められた。なお、非代謝活性化系存在下では濃度設定試験及び本試験ともに、菌株の種類に関わらず、全被験物質処理群で、沈殿及び結晶物の析出は認められなかった。そして、菌株に対しての増殖抑制は濃度設定試験及び本試験の全被験物質処理群において、菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、認められなかった。また、溶媒対照と比較して2倍以上かつ用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は濃度設定試験及び本試験の全被験物質処理群において認められなかった。

一方、陽性対照群では各菌株の溶媒対照群に比較して2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。更に、各菌株の代謝活性化及び非代謝活性化における溶媒対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は当該試験実施施設における背景データと比較し異常と考えられる数値が認められず、試験は適切に実施されたものと考えられた。

なお、化学構造的に本被験物質と類似物質である *tert*-butyl hydroperoxide (CAS Registry No. 75-91-2) は、染色体異常試験³⁾で陽性の結果が、isopropyl alcohol (CAS Registry No. 67-63-0) は細菌を用いる復帰変異試験⁴⁾及び姉妹染色分体交換試験⁵⁾で陰性の結果が、acetone cyanohydrin (CAS Registry No. 75-86-5) は細菌を用いる復帰変異試験⁶⁾で陰性の結果がそれぞれ報告されている。

以上の試験結果より、本試験条件下において2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは細菌に対して遺伝子変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。

文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*, 113:173-215(1983).
- 2) Matsushima T, Sugimura T, Nagao M et al.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. In "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens", eds. Norpoth KH, Garner RC (eds.), Springer, Berlin (1980) pp.273-285.
- 3) Ochi T: Effects of iron chelators and glutathione depletion on the induction and repair of chromosomal aberrations by *tert*-butyl hydroperoxide in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res*, 213:243-248(1989).
- 4) Shimizu H, Suzuki Y, Takemura N, Goto S, Matsushita H: Results of microbial mutation test for forty-three industrial chemicals. *Sangyo Igaku*, 27:400-419(1985).

- 5) Von der Hude W, Scheutwinkel M, Gramlich U et al.: Genotoxicity of three-carbon compounds evaluated in the SCE test *in vitro*. Environ Mutagen, 9:401-410(1987).
- 6) Zeiger E, Anderson B, Haworth S et al.: Salmonella mutagenicity tests: IV: results from the testing of 300 chemicals. Environ Mol Mutagen, 11 (Suppl 12):1-157(1988).

連絡先

試験責任者: 望月 肇
 試験担当者: 中村香織, 高部道仁
 (株)ボゾリサーチセンター
 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284
 Tel & Fax 0550-82-9922

Correspondance

Authors: Hajime Mochizuki (Study Director)
 Kaori Nakamura, Michihito Takabe
 Bozo Research Center Inc., 1284 Kamado,
 Gotemba-shi, Shizuoka, 412-0039, Japan
 Tel & Fax +81-550-82-9922

Table 1 Results of the dose-range finding test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol without or with metabolic activation in the bacterial reverse mutation test

S9 mix	Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies/plate (Mean $\pm$ Standard Deviation)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
(-)	0 ^{a)}	99 89 87 (92 $\pm$ 6.4)	9 14 11 (11 $\pm$ 2.5)	19 28 28 (25 $\pm$ 5.2)	24 25 22 (24 $\pm$ 1.5)	7 5 8 (7 $\pm$ 1.5)
	0.305	99 89 102 (97 $\pm$ 6.8)	9 9 8 (9 $\pm$ 0.6)	22 26 23 (24 $\pm$ 2.1)	22 17 23 (21 $\pm$ 3.2)	8 10 10 (9 $\pm$ 1.2)
	1.22	106 91 95 (97 $\pm$ 7.8)	7 9 8 (8 $\pm$ 1.0)	23 28 28 (26 $\pm$ 2.9)	14 19 19 (17 $\pm$ 2.9)	8 9 9 (9 $\pm$ 0.6)
	4.88	86 106 108 (100 $\pm$ 12.2)	8 11 15 (11 $\pm$ 3.5)	26 28 31 (28 $\pm$ 2.5)	18 20 17 (18 $\pm$ 1.5)	12 7 11 (10 $\pm$ 2.6)
	19.5	99 108 93 (100 $\pm$ 7.5)	10 10 10 (10 $\pm$ 0.0)	21 19 21 (20 $\pm$ 1.2)	18 15 14 (16 $\pm$ 2.1)	10 11 11 (11 $\pm$ 0.6)
	78.1	106 104 106 (105 $\pm$ 1.2)	9 12 11 (11 $\pm$ 1.5)	21 27 22 (23 $\pm$ 3.2)	12 17 22 (17 $\pm$ 5.0)	10 12 10 (11 $\pm$ 1.2)
	313	97 78 81 (85 $\pm$ 10.2)	9 10 10 (10 $\pm$ 0.6)	28 25 24 (26 $\pm$ 2.1)	15 16 16 (16 $\pm$ 0.6)	10 7 7 (8 $\pm$ 1.7)
	1250	104 96 110 (103 $\pm$ 7.0)	13 11 10 (11 $\pm$ 1.5)	31 32 24 (29 $\pm$ 4.4)	17 20 15 (17 $\pm$ 2.5)	10 7 8 (8 $\pm$ 1.5)
	5000	103 91 101 (98 $\pm$ 6.4)	13 9 10 (11 $\pm$ 2.1)	18 18 20 (19 $\pm$ 1.2)	19 15 21 (18 $\pm$ 3.1)	7 8 7 (7 $\pm$ 0.6)
(+))	0 ^{a)}	102 109 112 (108 $\pm$ 5.1)	10 12 17 (13 $\pm$ 3.6)	29 28 31 (29 $\pm$ 1.5)	23 24 29 (25 $\pm$ 3.2)	15 14 10 (13 $\pm$ 2.6)
	0.305	116 120 106 (114 $\pm$ 7.2)	9 10 12 (10 $\pm$ 1.5)	30 31 31 (31 $\pm$ 0.6)	21 26 23 (23 $\pm$ 2.5)	10 11 9 (10 $\pm$ 1.0)
	1.22	107 111 113 (110 $\pm$ 3.1)	13 17 10 (13 $\pm$ 3.5)	22 30 25 (26 $\pm$ 4.0)	19 18 18 (18 $\pm$ 0.6)	12 9 18 (13 $\pm$ 4.6)
	4.88	105 97 107 (103 $\pm$ 5.3)	8 12 10 (10 $\pm$ 2.0)	29 26 23 (26 $\pm$ 3.0)	21 23 19 (21 $\pm$ 2.0)	10 13 14 (12 $\pm$ 2.1)
	19.5	125 112 103 (113 $\pm$ 11.1)	11 10 9 (10 $\pm$ 1.0)	27 23 22 (24 $\pm$ 2.6)	20 27 20 (22 $\pm$ 4.0)	9 12 14 (12 $\pm$ 2.5)
	78.1	119 103 94 (105 $\pm$ 12.7)	12 11 9 (11 $\pm$ 1.5)	31 31 28 (30 $\pm$ 1.7)	23 33 24 (27 $\pm$ 5.5)	12 14 11 (12 $\pm$ 1.5)
	313	105 104 107 (105 $\pm$ 1.5)	10 8 10 (9 $\pm$ 1.2)	24 31 24 (26 $\pm$ 4.0)	18 22 28 (23 $\pm$ 5.0)	14 13 16 (14 $\pm$ 1.5)
	1250	89 99 107 (98 $\pm$ 9.0)	13 9 13 (12 $\pm$ 2.3)	20 19 26 (22 $\pm$ 3.8)	19 15 18 (17 $\pm$ 2.1)	12 10 12 (11 $\pm$ 1.2)
	5000	106 [†] 101 [†] 104 [†] (104 $\pm$ 2.5)	11 [†] 10 [†] 11 [†] (11 $\pm$ 0.6)	21 [†] 29 [†] 29 [†] (26 $\pm$ 4.6)	21 [†] 19 [†] 25 [†] (22 $\pm$ 3.1)	11 [†] 9 [†] 9 [†] (10 $\pm$ 1.2)
(-)	Positive control	AF-2 ^{b)}	SAZ ^{c)}	AF-2 ^{b)}	AF-2 ^{b)}	ICR-191 ^{d)}
	Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of revertant colonies/plate	423 439 481 (448 $\pm$ 30.0)	320 323 347 (330 $\pm$ 14.8)	344 333 356 (344 $\pm$ 11.5)	378 401 400 (393 $\pm$ 13.0)	1431 1389 1490 (1437 $\pm$ 50.7)
(+))	Positive control	B[a]P ^{e)}	2AA ^{f)}	2AA ^{f)}	B[a]P ^{e)}	B[a]P ^{e)}
	Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of revertant colonies/plate	490 468 480 (479 $\pm$ 11.0)	117 109 112 (113 $\pm$ 4.0)	443 450 459 (451 $\pm$ 8.0)	347 355 341 (348 $\pm$ 7.0)	124 109 113 (115 $\pm$ 7.8)

a) Vehicle control (=Water for injection)

b) AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, c) SAZ: Sodium azide, d) ICR-191: 2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine $\cdot$ 2HCl, e) B[a]P: Benzo[a]pyrene, f) 2AA: 2-Aminoanthracene

† Deposition of crystals was observed.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 2 Results of the main test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol without or with metabolic activation in the bacterial reverse mutation test

S9 mix	Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies/plate (Mean $\pm$ Standard Deviation)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
(-)	0 ^{a)}	106 96 137 (113 $\pm$ 21.4)	11 10 9 (10 $\pm$ 1.0)	31 25 31 (29 $\pm$ 3.5)	14 16 20 (17 $\pm$ 3.1)	13 12 10 (12 $\pm$ 1.5)
	156	96 118 117 (110 $\pm$ 12.4)	9 7 9 (8 $\pm$ 1.2)	30 25 29 (28 $\pm$ 2.6)	14 13 10 (12 $\pm$ 2.1)	10 10 8 (9 $\pm$ 1.2)
	313	93 112 118 (108 $\pm$ 13.1)	7 11 7 (8 $\pm$ 2.3)	28 22 29 (26 $\pm$ 3.8)	11 11 18 (13 $\pm$ 4.0)	13 11 15 (13 $\pm$ 2.0)
	625	109 111 102 (107 $\pm$ 4.7)	7 6 8 (7 $\pm$ 1.0)	28 27 27 (27 $\pm$ 0.6)	15 18 15 (16 $\pm$ 1.7)	11 9 10 (10 $\pm$ 1.0)
	1250	115 106 120 (114 $\pm$ 7.1)	8 5 9 (7 $\pm$ 2.1)	31 28 22 (27 $\pm$ 4.6)	10 12 16 (13 $\pm$ 3.1)	8 9 12 (10 $\pm$ 2.1)
	2500	116 116 112 (115 $\pm$ 2.3)	6 8 14 (9 $\pm$ 4.2)	31 23 30 (28 $\pm$ 4.4)	12 15 18 (15 $\pm$ 3.0)	8 10 12 (10 $\pm$ 2.0)
	5000	120 117 106 (114 $\pm$ 7.4)	6 6 9 (7 $\pm$ 1.7)	20 22 16 (19 $\pm$ 3.1)	15 10 12 (12 $\pm$ 2.5)	11 11 8 (10 $\pm$ 1.7)
(+))	0 ^{a)}	130 128 119 (126 $\pm$ 5.9)	13 13 12 (13 $\pm$ 0.6)	27 32 27 (29 $\pm$ 2.9)	18 22 20 (20 $\pm$ 2.0)	11 15 10 (12 $\pm$ 2.6)
	156	120 125 123 (123 $\pm$ 2.5)	8 7 8 (8 $\pm$ 0.6)	24 27 29 (27 $\pm$ 2.5)	20 19 19 (19 $\pm$ 0.6)	15 15 12 (14 $\pm$ 1.7)
	313	130 138 114 (127 $\pm$ 2.2)	8 7 8 (8 $\pm$ 0.6)	28 21 29 (26 $\pm$ 4.4)	20 19 22 (20 $\pm$ 1.5)	11 15 13 (13 $\pm$ 2.0)
	625	107 112 100 (106 $\pm$ 6.0)	10 9 7 (9 $\pm$ 1.5)	25 22 27 (25 $\pm$ 2.5)	17 18 21 (19 $\pm$ 2.1)	10 10 12 (11 $\pm$ 1.2)
	1250	129 132 113 (125 $\pm$ 10.2)	12 8 9 (10 $\pm$ 2.1)	25 21 19 (22 $\pm$ 3.1)	25 22 21 (23 $\pm$ 2.1)	11 12 14 (12 $\pm$ 1.5)
	2500	124 [†] 125 [†] 130 [†] (126 $\pm$ 3.2)	10 [†] 6 [†] 9 [†] (8 $\pm$ 2.1)	18 [†] 17 [†] 21 [†] (19 $\pm$ 2.1)	20 [†] 18 [†] 15 [†] (18 $\pm$ 2.5)	15 [†] 12 [†] 9 [†] (12 $\pm$ 3.0)
	5000	134 [†] 126 [†] 144 [†] (135 $\pm$ 9.0)	6 [†] 5 [†] 9 [†] (7 $\pm$ 2.1)	25 [†] 19 [†] 18 [†] (21 $\pm$ 3.8)	17 [†] 12 [†] 12 [†] (14 $\pm$ 2.9)	9 [†] 13 [†] 9 [†] (10 $\pm$ 2.3)
(-)	Positive control	AF-2 ^{b)}	SAZ ^{c)}	AF-2 ^{b)}	AF-2 ^{b)}	ICR-191 ^{d)}
	Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of revertant colonies/plate	467 452 488 (469 $\pm$ 18.1)	144 213 172 (176 $\pm$ 34.7)	265 206 234 (235 $\pm$ 29.5)	360 355 374 (363 $\pm$ 9.8)	1338 1063 1181 (1194 $\pm$ 138.0)
(+))	Positive control	B[a]P ^{e)}	2AA ^{f)}	2AA ^{f)}	B[a]P ^{e)}	B[a]P ^{e)}
	Dosage ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of revertant colonies/plate	612 648 603 (621 $\pm$ 23.8)	122 130 98 (117 $\pm$ 16.7)	421 403 398 (407 $\pm$ 12.1)	247 242 253 (247 $\pm$ 5.5)	113 117 104 (111 $\pm$ 6.7)

a) Vehicle control (=Water for injection)

b) AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, c) SAZ: Sodium azide, d) ICR-191:2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine $\cdot$ 2HCl, e) B[a]P: Benzo[a]pyrene, f) 2AA: 2-Aminoanthracene

† Deposition of crystals was observed.

No growth inhibition of tester strains was observed.

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

Chromosomal Aberration Test of 2-Amino-2-ethyl-1,3-propanediol in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの染色体異常誘発能の有無を検討するために、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU細胞)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験を行った結果、短時間処理法及び連続処理法の24時間処理では50%細胞増殖抑制濃度は200 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM相当)以上、連続処理法の48時間処理では1075 $\mu\text{g/mL}$ であった。このことから染色体異常試験における2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの濃度は短時間処理法及び連続処理法ともに公比2で5~1200 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲に設定した。短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化について被験物質を6時間処理した18時間後、連続処理法では被験物質を24時間及び48時間連続処理後、それぞれ染色体標本を作製して検鏡し、染色体異常誘発性を検討した。

試験の結果、短時間処理法及び連続処理法のいずれの処理方法によっても、染色体の構造異常及び倍数性細胞の誘発は認められなかった。

以上の結果から、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは本試験条件下において染色体異常誘発能を有さない(陰性)と結論した。

材料及び方法

1. 使用細胞株

ヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手(2001年12月26日)したチャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞株(CHL/IU細胞)を用いた。なお、試験には細胞増殖抑制試験で16継代目、染色体異常試験で20及び28継代目の細胞を使用した。

2. 培養液の調製

培養には、非働化(56°C, 30分)した仔牛血清(Invitrogen)を10 vol%添加したEagle's MEM (Life Technologies)を用いた。調製後の培養液の保存は冷蔵とした。

3. 培養条件

細胞は、炭酸ガス培養装置を用い、CO₂濃度5%、温度37°Cの高湿度条件下で培養した。継代培養は3~4日ごとに行った。試験に際しては2×10⁴個の細胞を、培養液5 mLを入れた直径6 cmのプラスチックプレートに播

種し、3日目に被験物質を処理した。

4. S9 mix

フェノバルビタール及び5,6-ベンゾフラボン(7週齢のSprague Dawley系雄ラットに腹腔内投与した肝臓から調製されたS9並びに補酵素をオリエンタル酵母工業から購入し、S9 mixを調製した。S9 mixの組成は松岡らの方法¹⁾に従いS9の培地への添加量を5 vol%とした。

5. 被験物質

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオール(ロット番号:HDE01, 東京化成工業, 東京)は、純度99.4%, 微黄色透明、粘性の液体で、冷暗所に保存した。

6. 被験液の調製

溶媒は、生理食塩液(日本薬局方, 大塚製薬工場)を用いた。被験物質を溶媒で希釈して原液(120 mg/mL)を調製し、ついで順次溶媒で希釈して各濃度の被験液を調製した。被験液は、培養液の1 vol%になるように添加した。

7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

染色体異常試験における被験物質の処理濃度を設定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質の細胞増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(モノセレータ, オリパス光学工業)を用いて細胞密度を測定し、被験物質処理群の陰性(媒体)対照群に対する細胞密度の比をもって指標とした。

その結果、50%細胞増殖抑制濃度は短時間処理法及び連続処理法の24時間処理では1200 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM相当)以上、連続処理法の48時間処理では1075 $\mu\text{g/mL}$ であった(Fig. 1, 2)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験で得られた50%細胞増殖抑制濃度をもとに、染色体異常試験では短時間処理法及び連続処理法のいずれにおいても1200 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM相当)を最高濃度とし、以下公比2で希釈した計5濃度並びに陰性(媒体)対照群を設定した。なお、陽性対照として+S9 mix処理ではシクロフォスファミド(CP, 和光純薬工業, 15 $\mu\text{g/mL}$)、-S9 mix処理ではマイトマイシンC(MMC, 協和醗酵工業, 0.05 $\mu\text{g/mL}$)を用いた。

濃度当たり4枚のプレートに処理し、2枚を染色体標本作製用、2枚を細胞増殖率測定用とした。

9. 染色体標本の作製

培養終了の2時間前に、最終濃度が0.2 $\mu\text{g/mL}$ となるようコルセミドを加えた。以下、染色体標本は空気乾燥法によって作製した。スライド標本は各プレートにつき2枚作製し、2 vol%ギムザ液で15分間染色した。

10. 染色体の観察

各用量当たり200個(プレート当たり100個)の分裂中期像についてギャップ(gap)、染色分体型切断(ctb)、染色分体型交換(cte)、染色体型切断(csb)、染色体型交換(cse)及びその他の異常など構造異常の種類並びに異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数性細胞の数も記録した。

客観的な観察を行うため、スライド標本をコード化した状態で分析した。

11. 結果の判定

染色体構造異常を有する細胞の出現率は、ギャップを含む場合と含まない場合について集計し、ギャップを含まない場合で判定した。

判定は石館らの基準²⁾に従い、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。最終的には異常細胞の出現に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

結果及び考察

短時間処理法の結果をTable 1及び2に、連続処理法の結果をTable 3及び4に示した。いずれの処理方法においても、被験物質処理群には染色体構造異常の出現頻度に5%を越える増加は認められなかった。また、倍数性細胞の出現頻度にも増加は認められなかった。一方、陽性対照物質を処理した群においては顕著な染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加が認められた。

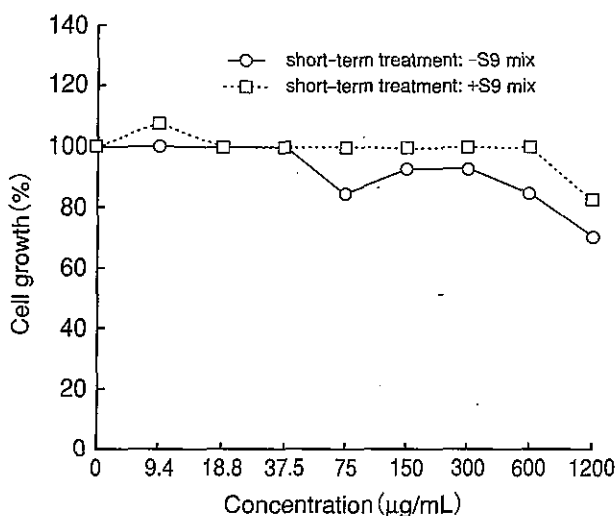


Fig. 1 Cell growth inhibition treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [short-term treatment: 6 hr]

なお、化学構造的に本被験物質と類似物質である *tert*-butyl hydroperoxide (CAS Registry No. 75-91-2) は、染色体異常試験³⁾で陽性の結果が、isopropyl alcohol (CAS Registry No. 67-63-0) は細菌を用いる復帰突然変異試験⁴⁾及び姉妹染色分体交換試験⁵⁾で陰性の結果が、acetone cyanohydrin (CAS Registry No. 75-86-5) は細菌を用いる復帰突然変異試験⁶⁾で陰性の結果がそれぞれ報告されている。

以上の結果から、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは本試験条件下において染色体異常誘発能を有さない(陰性)と判定した。

文献

- 1) Matsuoka A et al.: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Res*, **66**:277-290(1979).
- 2) 石館基(監修):「染色体異常試験データ集」エル・アイ・シー、東京(1987)pp.19-24
- 3) Ochi T: Effects of iron chelators and glutathione depletion on the induction and repair of chromosomal aberrations by *tert*-butyl hydroperoxide in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res*, **213**:243-248(1989).
- 4) Shimizu H et al.: Results of microbial mutation test for forty-three industrial chemicals. *Sangyo Igaku*, **27**:400-419(1985).
- 5) von der Hude W: Genotoxicity of three-carbon compounds evaluated in the SCE test *in vitro*. *Environ Mutagen*, **9**:401-410(1987).
- 6) Zeiger E et al.: Salmonella mutagenicity tests: IV: results from the testing of 300 chemicals. *Environ Mol Mutagen*, **11**:1-157(1988).

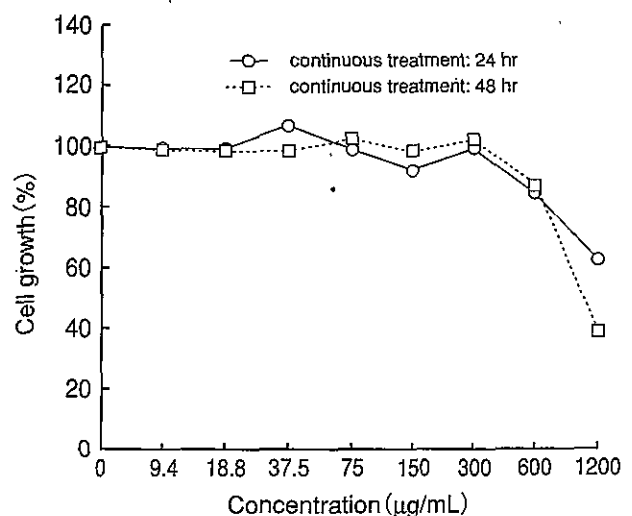


Fig. 2 Cell growth inhibition treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [continuous treatment]

連絡先

試験責任者: 園 明
試験担当者: 樋川奈穂美, 高部道仁, 石井孝広,
勝亦俱慶
(株)ボゾリサーチセンター
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284
Tel & Fax 0550-82-9922

Correspondence

Authors: Akira Sono (Study Director)
Naomi Hikawa, Michihito Takabe,
Takahiro Ishii, Tomoyoshi Katsumata
Bozo Research Center Inc.
1284 Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka, 412-0039,
Japan
Tel & Fax +81-550-82-9922

Table 1 Chromosome aberration test in CHL/IU cells treated for 6 hr with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [short-term treatment: +S9 mix]

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell growth (%)	No. of cells observed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations (with gaps) (%)	No. of cells with aberrations (without gaps) (%)	No. of polyploid cells ^{b)} (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	other				
Physiologica Saline ^{a)}	0	6-18	100	200	2	0	0	0	0	0	1.0	0.0	1.0	
Test substance	75.0	6-18	107	200	0	0	2	0	1	0	1.5	1.5	0.0	-
	150	6-18	93	200	1	0	1	0	0	0	1.0	0.5	0.5	-
	300	6-18	100	200	2	0	2	0	0	0	2.0	1.0	0.0	-
	600	6-18	93	200	2	0	2	0	0	0	2.0	1.0	0.5	-
	1200	6-18	85	200	2	1	2	0	0	0	2.5	1.5	1.5	-
CP	15	6-18	93	200	6	32	148	2	1	0	79.0	79.0	0.0	+

Abbreviation; CP: cyclophosphamide (positive control), ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange

a) Negative control

b) 200 metaphases were observed for polyploid cells.

Table 2 Chromosome aberration test in CHL/IU cells treated for 6 hr with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [short-term treatment: -S9 mix]

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell growth (%)	No. of cells observed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations (with gaps) (%)	No. of cells with aberrations (without gaps) (%)	No. of polyploid cells ^{b)} (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	other				
Physiologica Saline ^{a)}	0	6-18	100	200	3	1	0	0	1	0	2.5	1.0	0.5	
Test substance	75.0	6-18	93	200	3	1	1	0	0	0	2.5	1.0	0.0	-
	150	6-18	93	200	3	3	0	0	0	0	3.0	1.5	0.0	-
	300	6-18	86	200	4	1	0	0	0	0	2.5	0.5	0.5	-
	600	6-18	86	200	2	1	0	0	1	0	2.0	1.0	0.5	-
	1200	6-18	79	200	1	3	0	0	0	0	2.0	1.5	0.5	-
MMC	0.05	6-18	79	200	4	20	31	0	1	0	25.0	24.0	1.5	+

Abbreviation; MMC: mitomycin C (positive control), ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange

a) Negative control

b) 200 metaphases were observed for polyploid cells.

Table 3 Chromosome aberration test in CHL/IU cells treated for 24 hr with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [continuous treatment:24hr]

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell growth (%)	No. of cells observed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations (with gaps) (%)	No. of cells with aberrations (without gaps) (%)	No. of polyploid cells ^{b)} (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	other				
Physiologica Saline ^{a)}	0	24	100	200	4	1	2	0	1	0	4.0	2.0	0.0	
Test substance	75.0	24	89	200	5	0	1	0	0	0	3.0	0.5	0.5	-
	150	24	89	200	4	1	0	0	1	0	3.0	1.0	1.0	-
	300	24	111	200	3	0	1	0	1	0	2.5	1.0	0.0	-
	600	24	89	200	4	0	1	0	0	0	2.5	0.5	1.5	-
	1200	24	67	81	1	1	2	0	0	0	4.9	3.7	1.2	TOX
MMC	0.05	24	89	200	7	40	60	1	4	1	43.5	42.0	0.0	+

Abbreviation; MMC:mitomycin C (positive control), ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange.

a) Negative control

b) 200 metaphases were observed for polyploid cells.

Table 4 Chromosome aberration test in CHL/IU cells treated for 48 hr with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [continuous treatment:48hr]

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Cell growth (%)	No. of cells observed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations (with gaps) (%)	No. of cells with aberrations (without gaps) (%)	No. of polyploid cells ^{b)} (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	other				
Physiologica Saline ^{a)}	0	48	100	200	5	0	0	0	1	0	3.0	0.5	1.0	
Test substance	75.0	48	100	200	3	0	0	0	0	0	1.5	0.0	0.0	-
	150	48	106	200	2	0	0	0	1	0	1.5	0.5	0.0	-
	300	48	106	200	5	0	1	0	2	0	4.0	1.5	0.5	-
	600	48	100	200	2	1	0	0	0	0	1.5	0.5	1.5	-
	1200	48	50	84	1	0	0	0	3	0	4.8	3.6	3.6	TOX
MMC	0.05	48	94	200	10	50	108	3	2	0	68.0	66.5	1.0	+

Abbreviation; MMC:mitomycin C (positive control), ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange

a) Negative control

b) 200 metaphases were observed for polyploid cells.

O,O'-ジエチルジチオリン酸のラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of *O,O'*-Diethyl dithiophosphate in Rats

要約

O,O'-ジエチルジチオリン酸を雌ラットに1回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は、第1回試験は2000 mg/kg、第2回試験は300 mg/kg、第3回試験は300 mg/kgとした。媒体には1.0 vol% Tween 80を含む0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を用いた。各群の使用動物数は各3例とした。

死亡例は、2000 mg/kg投与で投与後1日までに3例全例に認められた。

一般状態において、2000 mg/kg投与で流涎、自発運動の低下、腹臥位、チアノーゼおよび緩徐呼吸がみられた。300 mg/kg投与では、投与直後に流涎がみられた。300 mg/kg投与では、体重推移に異常はみられなかった。剖検において、2000 mg/kg投与で胃穿孔、腺胃粘膜暗赤色斑、腺胃粘膜肥厚、前胃粘膜肥厚および腹水貯留がみられた。300 mg/kg投与では、異常はみられなかった。

以上の結果から、*O,O'*-ジエチルジチオリン酸の急性毒性は、GHSのカテゴリ-4に分類される。

方法

1. 被験物質および媒体

O,O'-ジエチルジチオリン酸は、暗青色のメルカプタン臭を有する強酸の液体であり、ほとんどの有機溶剤に可溶、水にもわずかに可溶である[Lot No. ASK5069, 純度:98.9%, 密度:1.180 g/mL(20 °C), 和光純薬工業(大阪)]。入手後は、冷蔵・遮光の条件下で保管した。投与終了後に被験物質を分析し、使用期間中安定であったことを確認した。

O,O'-ジエチルジチオリン酸は、1.0 vol% Tween 80を含む0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液で所定濃度となるように、懸濁して調製した。なお、被験物質の調製に際して、純度による換算を実施した。1および200 mg/mLの調製液は、調製後、冷蔵、遮光および気密の条件下で7日間保管後、さらに室温、遮光および気密の条件下で24時間保管しても安定性に問題のないことが確認されている。投与検体は、用時調製とし、調製後6時間以内に使用した。

投与に使用した投与検体中の被験物質濃度を測定した結果、被験物質濃度に問題はなかった。

2. 使用動物および飼育条件

7週齢のCrj:CD(SD)IGS雌ラット(SPF)を日本チャールス・リバーから購入した。入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後2日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常の認められなかった動物を群分けした。群分けは、第1回試験、第2回試験および第3回試験とも投与日にコンピュータを用いて無作為抽出法により行った。

動物は、室温20~26 °C、湿度40~70 %, 明暗各12時間(照明:午前6時~午後6時)、換気回数12回/時に維持された飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中および群分け後とも、ステンレス製ケージを用いて個別飼育した飼料は、固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業)を自由に摂取させた。ただし、投与前日の夕刻から投与までの約19時間と投与後約6時間まで絶食した。飲料水は、水道水を自由に摂取させた。ただし、群分け時から投与後約6時間までは絶水した。

3. 投与経路、投与方法および投与量

投与経路は、経口投与を選択した。投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスプレイ注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、投与直前に測定した体重を基準として10 mL/kgで算出した。投与回数は1回とした。投与日の週齢は8週齢であり、体重範囲は169~179 gであった。

O,O'-ジエチルジチオリン酸のラット経口投与によるLD₅₀値は4510 mg/kgとの情報がある¹⁾。従って、OECD Test Guideline 423で最高用量とされている2000 mg/kgを第1回試験の投与量とした。第1回試験の2000 mg/kg投与で3例全例が死亡したため、300 mg/kgを第2回試験の投与量とした。第2回試験の300 mg/kg投与で死亡例が認められなかったため、300 mg/kgを第3回試験の投与量とした。各試験の動物数は、3例とした。

4. 観察および検査項目

1) 観察期間

投与後14日間とした。

2) 一般状態

投与日は投与後6時間(投与直後~投与後30分、投与後2, 4および6時間)まで、投与翌日からの観察期間中は1日1回、一般状態および死亡の有無を観察した。

Table 1 Mortality of female rats in single dose oral toxicity test of *O,O'*-diethyl dithiophosphate

Group	Dose (mg/kg)	Number of animals	Number of deaths							Total number of deaths
			Hours after administration				Days after administration			
			0~0.5	2	4	6	1	2	3~14	
Test group 1	2000	3	0	0	0	2	1	-	-	3
Test group 2	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Test group 3	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0

3) 体重測定

投与日(投与直前)ならびに投与後1, 3, 7, 10および14日に測定した。

4) 剖検

死亡動物は、速やかに剖検した。生存動物は、観察期間終了日にジエチルエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

5. 統計解析

LD₅₀値は概略の範囲を推定した。

体重は、各群で平均値および標準偏差を算出した。

結果

1. 死亡状況, LD₅₀ 値および一般状態 (Table 1)

死亡例は、第1回試験の2000 mg/kg投与で投与後6時間に2例と投与後1日に1例の全例に認められた。第2回試験および第3回試験の300 mg/kg投与では、死亡例は認められなかった。*O,O'*-ジエチルジチオリン酸のLD₅₀値は、300 mg/kgと2000 mg/kgの間にあると推定される。

一般状態において、第1回試験の2000 mg/kg投与で投与直後に流涎が2例、投与後約5分に自発運動の低下および腹臥位が各1例、投与後2時間に腹臥位が2例と自発運動の低下が1例、投与後4時間に緩徐呼吸が3例、腹臥位およびチアノーゼが各2例と自発運動の低下が1例、投与後6時間に腹臥位および緩徐呼吸が1例にみられた。第2回試験の300 mg/kg投与では、異常はみられなかった。第3回試験の300 mg/kg投与では、投与直後に流涎が1例にみられたが、投与2時間以降に異常は認められなかった。

2. 体重

第2回試験および第3回試験の300 mg/kg投与では、体重は順調に推移した。

3. 剖検

第1回試験の2000 mg/kg投与による死亡例では、腺胃粘膜肥厚が3例、胃穿孔、腺胃粘膜暗赤色斑および腹水貯留が各2例と前胃粘膜肥厚が1例にみられた。

第2回試験および第3回試験の300 mg/kg投与による

生存例では、異常はみられなかった。

考察

O,O'-ジエチルジチオリン酸の急性毒性は、GHSのカテゴリ-4に分類される。

O,O'-ジエチルジチオリン酸の2000 mg/kg投与により、流涎、自発運動の低下、腹臥、緩徐呼吸およびチアノーゼ、剖検で胃穿孔、腺胃粘膜暗赤色斑、腺胃粘膜肥厚、前胃粘膜肥厚および腹水貯留が認められたことから、*O,O'*-ジエチルジチオリン酸は消化管粘膜に対して直接的な刺激作用を有し、この作用に基づく消化管障害により死に至ったと考えられる。

文献

- 1) 和光純薬工業、未発表。

連絡先

試験責任者：古橋忠和

試験担当者：藤村高志、内藤一嘉、吉島賢一
(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島6-104
Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors: Tadakazu Furuhashi (Study director)
Takashi Fujimura, Kazuyoshi Naito,
Ken-ichi Yoshijima

Nihon Bioresearch Inc.

6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu,
501-6251, Japan

Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284