

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 2-Hydroxyethyl methacrylate on Bacteria

要約

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルについて、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, TA1535, TA98, TA1537¹⁾ および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*^{2,3)} の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験では S9 mix 無添加試験および添加試験を 313~5000 µg/プレート の範囲で実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものをを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステル(CAS No. 868-77-9)は、分子量 130.16 の無色透明液体である。用いた被験物質は、(株)日本触媒製造、ロット番号 5P05LA、純度 97.6 wt% [不純物:0.2-0.3% エチレングリコールジ

メタクリレート、2.0-2.5% ジエチレングリコールモノメタクリレート、50 ppm メトキノン(重合防止剤)] であり、(株)日本触媒から供与された。被験物質は、使用時まで冷蔵した。なお、試験終了後に(株)日本触媒において、被験物質の化学分析を行った結果、純度は 97.3 wt% であった。メタクリル酸2-ヒドロキシエチルエステルは、局方注射用水(ロット番号:K5A80、(株)大塚製薬工場)に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(上野製薬(株))
SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))
9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem. Co.)
2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2 および 2AA はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 mix の組成〕

1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ビオチン	0.5 mM

*: WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
バクトアガー(Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 mix

1 ml 中下記の成分を含む

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB) および 5, 6-ベンゾフラボン(BF) の併用投与で酵素誘導して作製した S9 を用いた。

〔試験方法〕

プレインキュベーション法⁴⁾により, S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に, 被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml), 検定菌液 0.1 ml を混合し, 37℃で20分間往復振とう培養したのち, トップアガー 2 ml を加えて混和し, 合成培地平板上に流して固めた。また, 対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は, 同時に実施した他の試験と共通とした。培養は 37℃で 48 時間行い, 生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については, 肉眼的あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては, 溶媒および陽性対照群では 3 枚ずつ, 各用量については 1 枚ずつとした。また, 本試験においては, 両対照群および各用量につき, 3 枚ずつを用い, それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は 1 回, 本試験は同一用量について 2 回実施し, 結果の再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

用いた 5 種の検定菌のうち, 1 種以上の検定菌の S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において, 被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が, 溶媒対照のそれに比べて 2 倍以上に増加し, かつ, その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に, 当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。ただし, 2 回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の 2 倍以上となる用量が認められた場合において, その溶媒対照値が 10 以下であり, 変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルについて 50~5000 μ g/プレート の範囲で公比を約 3 として, 用量設定試験を実施した。その結果, すべての検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。

したがって, 本試験における最高用量は, S9 mix 無添加試験および添加試験とも 5000 μ g/プレートとした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で, ともに 313~5000 μ g/プレート の範囲で公比を 2 として 2 回の本試験を実施した (Table 1, 2)。その結果, いずれの検定菌においても, 溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは, 用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 4) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K.H. Norpoth, R.C. Garner, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 秦野市落合 729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,
Kumiko Kawakami
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. Mutagenicity of 2-hydroxyethyl methacrylate in reverse mutation test (I) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)																			
		Base-pair substitution type						Frameshift type													
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
S9 mix (-)	0	154	171	159	13	7	12	28	26	29	25	33	27	11	15	10	(161 \pm 8.7)	(11 \pm 3.2)	(28 \pm 1.5)	(28 \pm 4.2)	(12 \pm 2.6)
	313	141	158	160	13	9	10	31	33	30	23	28	19	11	8	10	(153 \pm 10.4)	(11 \pm 2.1)	(31 \pm 1.5)	(23 \pm 4.5)	(10 \pm 1.5)
	625	141	147	139	12	14	12	30	34	31	27	20	20	9	12	8	(142 \pm 4.2)	(13 \pm 1.2)	(32 \pm 2.1)	(22 \pm 4.0)	(10 \pm 2.1)
	1250	151	133	149	9	17	9	31	37	22	12	19	18	14	8	9	(144 \pm 9.9)	(12 \pm 4.6)	(30 \pm 7.5)	(16 \pm 3.8)	(10 \pm 3.2)
	2500	137	137	157	12	15	13	30	26	20	28	20	18	12	9	12	(144 \pm 11.5)	(13 \pm 1.5)	(25 \pm 5.0)	(22 \pm 5.3)	(11 \pm 1.7)
	5000	154	141	160	12	10	19	29	26	23	25	33	23	15	12	15	(152 \pm 9.7)	(14 \pm 4.7)	(26 \pm 3.0)	(27 \pm 5.3)	(14 \pm 1.7)
S9 mix (+)	0	156	193	150	11	10	9	40	39	40	44	26	36	11	20	9	(166 \pm 23.3)	(10 \pm 1.0)	(40 \pm 0.6)	(35 \pm 9.0)	(13 \pm 5.9)
	313	129	162	154	11	15	13	27	27	35	20	29	33	15	13	8	(148 \pm 17.2)	(13 \pm 2.0)	(30 \pm 4.6)	(27 \pm 6.7)	(12 \pm 3.6)
	625	157	183	181	14	13	8	48	36	31	25	35	37	12	15	7	(174 \pm 14.5)	(12 \pm 3.2)	(38 \pm 8.7)	(32 \pm 6.4)	(11 \pm 4.0)
	1250	177	180	182	14	9	11	36	28	41	34	30	27	8	11	10	(180 \pm 2.5)	(11 \pm 2.5)	(35 \pm 6.6)	(30 \pm 3.5)	(10 \pm 1.5)
	2500	172	177	172	13	10	12	33	40	29	22	30	36	6	10	8	(174 \pm 2.9)	(12 \pm 1.5)	(34 \pm 5.6)	(29 \pm 7.0)	(8 \pm 2.0)
	5000	162	175	160	15	11	15	37	30	33	30	30	34	9	11	12	(166 \pm 8.1)	(14 \pm 2.3)	(33 \pm 3.5)	(31 \pm 2.3)	(11 \pm 1.5)
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	689	685	779	262	272	295	337	289	301	688	663	721	1291	1123	1369	(718 \pm 53.2)	(276 \pm 16.9)	(309 \pm 25.0)	(691 \pm 29.1)	(1261 \pm 125.7)
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2							
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	755	927	1012	300	298	262	582	746	652	298	332	304	367	346	313	(898 \pm 130.9)	(287 \pm 21.4)	(660 \pm 82.3)	(311 \pm 18.1)	(342 \pm 27.2)

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
 Purity was 97.6 wt% and 0.2-0.3 % ethylene glycol dimethacrylate, 2.0-2.5 % diethylene glycol monomethacrylate and 50 ppm methoquinone were contained as impurities.

Table 2. Mutagenicity of 2-hydroxyethyl methacrylate in reverse mutation test (II) on bacteria

With(+)or without(-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)															
		Base-pair substitution type						Frameshift type									
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537			
S9 mix (-)	0	140	125	147	11	18	13	25	27	23	20	31	20	12	14	11	
		(137 \pm 11.2)			(14 \pm 3.6)			(25 \pm 2.0)			(24 \pm 6.4)			(12 \pm 1.5)			
	313	124	122	145	13	10	19	26	22	28	31	19	33	4	8	9	
		(130 \pm 12.7)			(14 \pm 4.6)			(25 \pm 3.1)			(28 \pm 7.6)			(7 \pm 2.6)			
	625	116	104	169	8	8	10	26	26	25	26	26	19	14	6	6	
		(130 \pm 34.6)			(9 \pm 1.2)			(26 \pm 0.6)			(24 \pm 4.0)			(9 \pm 4.6)			
	1250	108	118	116	14	10	13	23	20	26	30	22	14	7	5	11	
		(114 \pm 5.3)			(12 \pm 2.1)			(23 \pm 3.0)			(22 \pm 8.0)			(8 \pm 3.1)			
2500	151	141	139	19	10	8	17	20	26	22	15	25	5	7	12		
	(144 \pm 6.4)			(12 \pm 5.9)			(21 \pm 4.6)			(21 \pm 5.1)			(8 \pm 3.6)				
5000	149	134	151	10	9	10	20	27	31	20	27	30	8	12	9		
	(145 \pm 9.3)			(10 \pm 0.6)			(26 \pm 5.6)			(26 \pm 5.1)			(10 \pm 2.1)				
S9 mix (+)	0	141	115	140	9	14	11	37	26	28	34	22	31	9	5	8	
		(132 \pm 14.7)			(11 \pm 2.5)			(30 \pm 5.9)			(29 \pm 6.2)			(7 \pm 2.1)			
	313	141	138	137	6	11	7	37	23	29	38	30	21	6	8	6	
		(139 \pm 2.1)			(8 \pm 2.6)			(30 \pm 7.0)			(30 \pm 8.5)			(7 \pm 1.2)			
	625	128	147	131	10	18	17	22	30	29	26	27	28	12	3	5	
		(135 \pm 10.2)			(15 \pm 4.4)			(27 \pm 4.4)			(27 \pm 1.0)			(7 \pm 4.7)			
	1250	140	170	143	10	20	13	35	31	21	24	24	21	5	8	15	
		(151 \pm 16.5)			(14 \pm 5.1)			(29 \pm 7.2)			(23 \pm 1.7)			(9 \pm 5.1)			
2500	159	151	146	10	12	17	30	35	29	24	28	29	12	10	8		
	(152 \pm 6.6)			(13 \pm 3.6)			(31 \pm 3.2)			(27 \pm 2.6)			(10 \pm 2.0)				
5000	146	173	170	5	10	15	26	38	33	28	27	32	8	8	8		
	(163 \pm 14.8)			(10 \pm 5.0)			(32 \pm 6.0)			(29 \pm 2.6)			(8 \pm 0.0)				
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	644	728	760	347	386	359	483	487	475	672	665	608	1320	1043	1130	
		(711 \pm 59.9)			(364 \pm 20.0)			(482 \pm 6.1)			(648 \pm 35.1)			(1164 \pm 141.7)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	658	680	770	310	335	315	473	407	420	281	255	313	269	274	260	
		(703 \pm 59.3)			(320 \pm 13.2)			(433 \pm 35.0)			(283 \pm 29.1)			(268 \pm 7.1)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene
Purity was 97.6 wt% and 0.2-0.3 % ethylene glycol dimethacrylate, 2.0-2.5 % diethylene glycol monomethacrylate and
50 ppm methoquinone were contained as impurities.

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの
チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of
2-Hydroxyethyl methacrylate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)ともに 1.3 mg/ml(10 mM)においても 50% を超える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において 1.3 mg/ml の濃度を最高処理濃度として、連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では、公比2で4濃度、短時間処理の S9 mix 非存在下では、公比2で3濃度設定した。なお、48時間連続処理の濃度は、24時間連続処理と同じ濃度に設定した。連続処理では、S9 mix 非存在下で24時間および48時間連続処理後、短時間処理では S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間連続処理と短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では 1.3 mg/ml(10 mM)、48時間連続処理では 0.65 mg/ml であったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU 細胞を24時間連続処理した高濃度群(1.3 mg/ml)では、細胞毒性のため染色体の構造異常および倍数性細胞について規定の細胞数が観察できなかったが、中濃度群(0.65 mg/ml)および高濃度群(1.3 mg/ml)において染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発され、その頻度は 10.0% および 70.6% であった。一方、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。48時間連続処理したすべての処理群において、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発され、その頻度は 6.0~84.0% であった。また、高濃度群(0.65 mg/ml)において、観察した細胞の 3.25% に倍数性細胞が認められた。短時間処理では、S9 mix 非存在下において、いずれの処理群でも染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。一方、低濃度群(0.33 mg/ml)および高濃度群(1.3 mg/ml)において観察した細胞の 0.88% および 6.13% に倍数性細胞が誘発された。S9 mix 存在下では、高濃度群(1.3 mg/ml)において観察した細胞の 13.0% に染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発された。また、中濃度群(0.65 mg/ml)において観察した細胞の 1.25% に倍数性細胞の誘発作用が認められたが、傾向性検定では有意差は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下でメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来の CHL/IU 細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS:Cansera International)を 10% 添加したイーグル MEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個の CHL/IU 細胞を、培養液 5 ml を入れたディッシュ(径 6 cm, Corning)に播き、37°C の CO₂ インキュベーター(5% CO₂) 内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目に S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステル(略号: HEMA, CAS No.:868-77-9, ロット番号:5P05LA, (株)日本触媒)は、無色透明液体で、水に対しては 54.5 mg/ml, DMSOでは 50 mg/ml, アセトンでは 50 mg/ml で溶解し、融点-10°C以下、沸点87°C(5 mmHg)で、分子式 C₆H₁₀O₃, 分子量 130.16, 純度 97.6 wt%(不純物としてエチレングリコールジメタクリレート 0.2-0.3%, ジエチレングリコールモノメタクリレート 2.0-2.5%, メトキノン(重合防止剤)50 ppmを含む)の物質である。

被験物質原体は、熱、光、過酸化物などによって重合が起こることがある。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒は注射用蒸留水(株)大塚製薬工場)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液

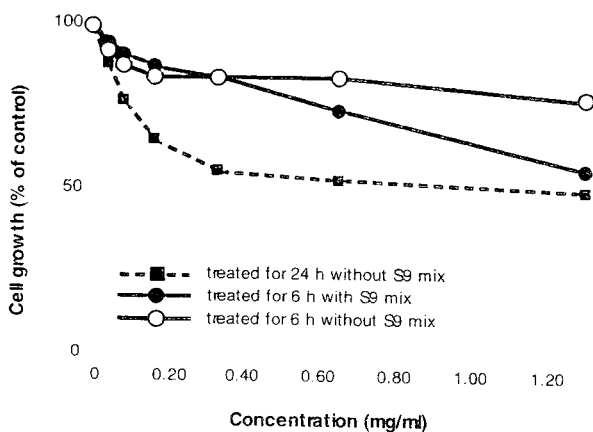


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-hydroxyethyl methacrylate

は、すべての試験において培養液の 10%(v/v) になるように加えた。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質の CHL/IU 細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計 (Monocellater™, オリパス光学工業 (株)) を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で 50% を明らかに越える増殖抑制作用は認められなかった (Fig. 1)。

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、連続処理、短時間処理ともに 1.3 mg/ml (10 mM) とし、連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では、公比 2 で 4 濃度を設定 (0.16, 0.33, 0.65, 1.3 mg/ml) し、短時間処理の S9 mix 非存在下では、公比 2 で 3 濃度設定した (0.33, 0.65, 1.3 mg/ml)。なお、連続処理の 48 時間処理群の濃度は、24 時間処理群と同じ濃度に設定した。陽性対照物質として用いたマイトマイシン C (MC, 協和醗酵工業 (株)) およびシクロホスファミド (CPA, Sigma Chemical Co.) は、注射用水 (株 大塚製薬工場) に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

染色体異常試験においては 1 濃度あたり 4 枚ディッシュを用い、そのうちの 2 枚は染色体標本作製し、別の 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が約 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッ

シユにつき 6 枚作製した。作製した標本を 3% ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20% 以上の相対増殖率で、かつ 2 ディッシュともに 0.5% 以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の 3 濃度群を決定した。その結果 (Table 1, 2), 24 時間連続処理および短時間処理の S9 mix 存在下では 1.3 mg/ml (10 mM) が、48 時間連続処理においては 0.65 mg/ml が染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む 3 濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1 つのディッシュから得られた異なるスライドを、4 名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験 (MMS) 研究会²⁾ 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、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法²⁾ (多重性を考慮して familywise の有意水準を 5% とした) により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³⁾ ($p < 0.05$) を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果を Table 1 に示した。メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルを加えて 24 時間連続処理した高濃度群 (1.3 mg/ml) では、細胞毒性のため染色体の構造異常および倍数性細胞について規定の細胞数が観察できなかったが、中濃度群 (0.65 mg/ml) および高濃度群 (1.3 mg/ml) において染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その頻度は 10.0% および 70.6% であった。一方、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。48 時間連続処理したすべての処理群において、染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発され、その頻度は 6.0 ~ 84.0% であった。また、高濃度群 (0.65 mg/ml) において、観察した細胞の 3.25% に倍数性細胞が認められ、傾向性検定の結果、有意差が認められた。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルを加えて S9 mix 非存在下における短時間処理では、いずれの処理群でも染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。一方、低濃度群 (0.33 mg/ml) および高濃度群 (1.3 mg/ml) において観察した細胞の 0.88% および 6.13% に倍数性細胞が誘発され、傾向性検定の結果、有意差が認められた。

S9 mix 存在下では、高濃度群 (1.3 mg/ml) において観察した細胞の 13.0% に染色体の構造異常 (gap を含む) が有意に誘発された。また、中濃度群 (0.65 mg/ml) において観察した細胞の 1.25% に倍数性細胞の誘発作用が認められたが、傾向性検定では有意差は認められなかった。

従って、メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 吉村 功編, "毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ," サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編, "毒性試験講座 14, 毒性試験データの統計解析," 地人書館, 東京, 1992, pp.218-223.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
 試験担当者: 山影康次, 日下部博一, 水谷正寛,
 澁谷 徹, 橋本恵子, 出石由紀
 (財) 食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 神奈川県秦野市落合729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
 Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,
 Masahiro Mizutani, Tohru Shibuya,
 Keiko Hashimoto, Yuki Izushi
 Hatano Research Institute, Food and Drug
 Safety Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells				Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)			
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total	Others ³⁾	with aberrations TAG (%)	Polyploid ⁴⁾ TA (%)	Trend test ⁵⁾ (%)				
													SA	NA				
Control			200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.50			-
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.75			100.0
HEMA	0.33	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			70.0
HEMA	0.65	24	200	14	8	1	0	0	0	23	0	20*(10.0)	8 (4.0)	0.63	+	NT	64.5	
HEMA	1.3	24	177	40	228	34	1	0	110	413	2	125*(70.6)	112 (63.3)	0.28 ⁷⁾			46.5	
MC	0.00005	24	200	8	70	145	2	1	0	226	0	113 (56.5)	112 (56.0)	0.38			-	
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			100.0	
HEMA	0.16	48	200	6	4	0	2	0	0	12	0	12*(6.0)	6 (3.0)	0.50			59.5	
HEMA	0.33	48	200	15	5	1	2	0	0	23	0	20*(10.0)	7 (3.5)	0.63	+	+	69.5	
HEMA	0.65	48	200	102	329	51	6	1	120	609	1	168*(84.0)	153 (76.5)	3.25*			79.0	
HEMA	1.3***	48	-														0.0	
MC	0.00005	48	200	5	51	118	10	4	30	218	0	93 (46.5)	92 (46.0)	1.38			-	

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no.of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at p<0.05. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7)Seven hundred and two cells were analysed. *:Significantly different from historical solvent control data (p<0.05) by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **:Purity of test substance was 97.6 wt%. Ethylene glycol dimethacrylate (0.2 - 0.3%), diethylene glycol monomethacrylate (2.0 - 2.5%) and methoquinone (50 ppm) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells				Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)		
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total	Others ³⁾	with aberrations TAG (%)	Polyploid ⁴⁾ TA (%)	Trend test ⁵⁾ (%)			
													SA	NA				
Control				200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38			-
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			100.0
HEMA	0.33	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.88*			84.0
HEMA	0.65	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50	NT	+	83.5
HEMA	1.3	-	6-(18)	200	1	0	2	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	6.13*			86.5
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.50			-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			100.0
HEMA	0.33	+	6-(18)	200	0	2	1	2	0	0	5	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.88			80.0
HEMA	0.65	+	6-(18)	200	1	2	5	0	0	0	8	0	6 (3.0)	5 (2.5)	1.25*	+	-	70.0
HEMA	1.3	+	6-(18)	200	4	11	16	0	0	0	31	0	26*(13.0)	22 (11.0)	0.88			58.0
CPA	0.005	+	6-(18)	200	13	43	90	1	1	0	148	0	83 (41.5)	77 (38.5)	0.50			-

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no.of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide, NT:not tested.

1)Distilled water was used as solvent. 2)More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3)Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4)Eight hundred cells were analysed in each group. 5)Cochran · Armitage's trend test was done at p<0.05. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. *:Significantly different from historical solvent control data at p<0.05 by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **:Purity of test substance was 97.6 wt%. Ethylene glycol dimethacrylate (0.2 - 0.3%), diethylene glycol monomethacrylate (2.0 - 2.5%) and methoquinone (50 ppm) were contained as impurities.

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの
ラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of
2-Hydroxyethyl methacrylate by Oral Administration in Rats

要約

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を行い、雌雄動物に対する反復投与による一般毒性学的な影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖発生に及ぼす影響について検討した。投与量は、1000 mg/kgを最高用量とし、以下 300, 100 および 30 mg/kgとした。対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。

1. 反復投与毒性

雄においては、一般状態では 1000 mg/kg群で流涎がみられ、1/12 例が死亡した。体重は、1000 mg/kg群で増加抑制がみられた。摂餌量は、1000 mg/kg群で減少がみられた。血液学検査では、各投与群とも各検査項目に投与による変動はみられなかった。血液生化学検査では、30 mg/kg以上の群で尿素窒素の高値あるいはその傾向、1000 mg/kg群でK、Clおよび無機リンの高値およびトリグリセライドの低値がみられた。剖検では、各投与群とも、投与による影響はみられなかった。死亡例では、胸腺および肺の暗赤色化、副腎の肥大がみられた。器官重量では、100 mg/kg以上の群で腎臓の相対重量の高値、1000 mg/kg群で肝臓の相対重量の高値がみられた。病理組織学検査では、1000 mg/kg群で腎臓に尿細管拡張および集合管拡張がみられた。しかし、死亡例においては投与に起因すると思われる変化はみられなかった。

雌においては、一般状態では 1000 mg/kg群で流涎、自発運動の低下、腹臥、流涙、被毛の汚れ、表皮温下降および呼吸緩徐がみられ、6/12 例が死亡した。体重は、1000 mg/kg群で交配前投与期間に増加抑制がみられた。摂餌量は、1000 mg/kg群で交配前投与期間に減少がみられた。剖検所見では、1000 mg/kg群で胸腺の萎縮および副腎の肥大がみられた。死亡例では、胸腺の萎縮、肺の暗赤色化、脾臓の萎縮、副腎の肥大、腺胃粘膜の暗赤色化および小腸の暗赤色化がみられた。器官重量では、100 mg/kg以上の群で腎臓の絶対重量の高値あるいはその傾向、1000 mg/kg群で腎臓の絶対・相対重量の高値がみられた。病理組織学検査では、1000 mg/kg群で腎臓に髄質および乳頭部への好中球浸潤、脳に延髄の広範な軟化がみられた。死亡例においては、脾臓の萎縮、副腎の束状帯の過形成など死戦期のストレスに起因すると思われる変化がみられた。

2. 生殖発生毒性

発情回数、交尾率、交尾日数、受胎雌数、妊娠期間および受胎率では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。また、分娩状態にも異常はみられなかった。黄体数、着床痕数、着床率および出産率では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。

総出産児数、分娩率、哺育0日の新生児数、児の産出率、死産児数、出生率、性比、哺育4日の新生児数、哺育4日の生存率では、各投与群とも対照群との間に差はみられなかった。外表観察では、いずれの群においても異常はみられなかった。体重では、各投与群の雌雄とも哺育0日および哺育4日ともに対照群との間に差はみられなかった。一般状態では、対照群および各投与群とも異常症状はみられなかった。また、剖検では、いずれの群においても異常はみられなかった。

以上のことから、当試験条件下におけるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの一般毒性学的無影響量は、雄では 30 mg/kg投与により尿素窒素の高値が認められたことから 30 mg/kg/day未満、雌では 100 mg/kg投与により腎臓の相対重量の高値が認められたことから 30 mg/kg/dayと考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、いずれの項目にも影響が認められなかったことから雌雄の生殖および児動物の発生とも 1000 mg/kg/dayと推察される。

方法

1. 被験物質、媒体および投与検体

被験物質のメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルは、分子量:130.16、融点:-10℃以下、沸点:87℃の無色透明の液体であり、水およびアセトンにきわめて溶けやすい(Lot No. 5P05LA、製造元:(株)日本触媒、純度:97.6%、ただし、不純物としてエチレングリコールジメタクリレートを 0.2~0.3%、ジエチレングリコールモノメタクリレートを 2.0~2.5%含有)。入手後は、冷蔵・遮光・気密条件下で保管した。なお、投与期間終了後に被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、使用期間中の安定性が確認された。

被験物質は、注射用水に溶解して調製した。なお、2, 20 および 200 mg/mlの調製液は、調製後冷蔵・遮光条件下で7日間、さらに室温・遮光条件下で4時間保存しても安定性に問題のないことが確認されていたため、各濃度の調製液は調製後、冷蔵・遮光条件下で保管し、調製後7日以内に使用した。被験物質は純度による換算を

行って調製した。

2. 使用動物および飼育条件

8週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット [Crj:CD(SD), (SPF)] を日本チャールス・リバー(株)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7日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物を群分けして試験に用いた。群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与開始日に行った。1群の動物数は、雌雄各12匹とした。

動物は、室温20~24℃、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/時に設定した飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージを用いて1ケージあたり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージを用いて個別飼育した。ただし、交配はステンレス製懸垂式ケージ内で行った。また、母動物は、妊娠18日にオートクレーブ処理した床敷(サンフレーク、日本チャールス・リバー(株))を入れたプラスチック製ケージに個別に移し、自然分娩および哺育をさせた。飼料は固型飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業(株))を、飲料水は水道水をいずれも自由に摂取させた。なお、剖検前日の午後4時から絶食とした。

3. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

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プラスチック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、雄では投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14 および21日の体重を、授乳期間中は哺育0日の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。投与回数は1日1回とした。投与開始日の週齢は雌雄とも10週齢であり、体重範囲は雄が341~380 g、雌が232~256 gであった。

投与量は、先に実施した雄ラットを用いた2週間経口投与による予備試験(投与段階:0, 30, 100, 300 および1000 mg/kg、各群5例)の結果により決定した。すなわち、1000 mg/kg群で投与直後に流涎がみられたのみで、各群とも死亡発現はなく、体重推移および剖検でも異常は認められなかった。そこで、当試験の投与量は、1000 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3で300, 100 および30 mg/kgとした。また、対照として被験物質と同一容量の媒体(注射用水)を投与する群を設けた。

4. 観察および検査項目

1) 雄

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回観察した。なお、死亡例は、発見後速やかに剖検し、異

常の認められた器官・組織を10%中性緩衝ホルマリン液に固定後、H-E染色組織標本を作製し、病理組織学的に検査した。

(2) 体重測定

体重は、1週間に2回測定した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間および交配期間終了後から毎週2回測定した。

(4) 血液学検査

投与期間終了の翌日に、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から血液を採取し、以下の検査を実施した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数および白血球数(WBC)は、EDTA-2KコーティングしたSysmexサンプルカップに採取した血液について、多項目自動血球計数装置(Sysmex E-2000、東亜医用電子(株))を用いて測定した。さらに、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)および平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

網状赤血球数(RET)は、EDTA-2K処理した血液をBrecher法により超生体染色してスライドグラスに塗抹後、Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で赤血球1000個中の数を計数した。

白血球百分率は、EDTA-2K処理した血液をスライドグラスに塗抹し、May-Giemsa染色した標本を作製して顕微鏡下で白血球100個を分類計数した。

プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)およびフィブリノーゲン濃度は、3.13%クエン酸ナトリウムで処理した血漿について、散乱光検出方式により血液凝固分析装置(コアグマスターII、三共(株))を用いて測定した。

(5) 血液生化学検査

血液学的検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液を遠心分離し、得られた血清について、以下の検査を実施した。

GOTおよびGPTはHenry変法、ALPはp-NPP基質法、γ-GTPはγ-G-P-NA基質法、総蛋白はBiuret法、総ビリルビンはAzobilirubin法、尿素窒素(BUN)はUrease-GIDH法、クレアチニンはJaffe法、ブドウ糖はGlucose dehydrogenase法、総コレステロールはCOD-DAOS法、トリグリセライドはGPO-DAOS法、Caはo-CPC法、無機リンはMolybdenum blue法により、自動分析装置(AU 500、オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

NaおよびKはイオン選択電極法により、Clは電量滴定法により、いずれも全自動電解質分析装置(EA04、株A&T)を用いて測定した。

蛋白分画は、電気泳動法により自動電気泳動装置(AES 600、オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

アルブミン量は総蛋白量および蛋白分画値から、A/G比は蛋白分画値から算出した。

(6) 剖検

上記の(4)および(5)の項で採血した動物をさらに放血致死させた後に器官・組織の肉眼的観察を行った。胸

腺, 肝臓, 腎臓, 精巣および精巣上体は摘出後に重量を測定し, 副腎, 脳, 心臓および脾臓とともに 10 % 中性緩衝ホルマリン液(ただし, 精巣および精巣上体はブアン液)に固定した。

(7) 病理組織学検査

摘出した器官・組織について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。対照群および 1000 mg/kg 群の心臓, 肝臓, 脾臓, 胸腺, 腎臓, 精巣, 精巣上体, 副腎および脳について H-E 染色組織標本を作製し, 病理組織学的に検査した。1000 mg/kg 群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた腎臓は 30, 100 および 300 mg/kg 群についても同様に検査した。

2) 雌

(1) 一般状態および死亡の有無

一般状態および死亡の有無は, 投与前・後の 1 日 2 回観察した。なお, 死亡例は, 発見後速やかに剖検し, 卵巣, 子宮および異常の認められた器官・組織を 10 % 中性緩衝ホルマリン液に固定後, H-E 染色組織標本を作製し, 病理組織学的に検査した。

(2) 性周期

性周期は, 投与開始日から交尾確認日まで毎日 1 回観察した。なお, 発情期が連続 2 日間にわたって観察された場合は 1 回と計数した。

(3) 体重測定

体重は, 交配開始前 14 日間および交配期間中には毎週 2 回, 妊娠期間中には妊娠 0, 7, 14 および 21 日に, 哺育期間には哺育 0 および 4 日にそれぞれ測定した。

(4) 摂餌量測定

摂餌量は, 交配開始前 14 日間までは毎週 2 回測定した。また, 妊娠期間中は妊娠 2, 9, 16 および 21 日に, 哺育期間中は哺育 4 日に測定した。

(5) 交尾不成立雌の剖検

交尾不成立雌は, 交配期間終了後に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, 着床の有無により妊娠の成否を確認した。

(6) 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ, 分娩状態の異常の有無, 分娩終了の確認を妊娠 21 日から妊娠 25 日の午前 10 時まで毎日行った。午前 10 時に分娩が終了していた場合, その日を哺育 0 日とした。

(7) 妊娠 25 日までに分娩しなかった雌の剖検

妊娠 25 日までに分娩しなかった雌は, 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, 着床の有無により妊娠の成否を確認した。

(8) 哺育状態の観察および剖検

母動物は, 哺育状態を哺育 4 日まで毎日観察し, 哺育 4 日に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, 着床痕数および黄体数を数えた。肝臓, 腎臓, 胸腺および卵巣は摘出後に重量を測定し, 副腎, 脳, 心臓および脾臓とともに 10 % 中性緩衝ホルマリン液に固定した。

(9) 病理組織学検査

摘出した器官・組織について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。対照群および 1000 mg/kg 群の心臓, 肝臓, 脾臓, 胸腺, 腎臓, 卵巣, 副腎および脳について H-E 染色組織標本を作製し, 病理組織学的に検査した。1000 mg/kg 群の検査で対照群と比べて異常を示す動物数に差があると考えられた脳ならびに 1000 mg/kg 群の死亡例で変化のみられた副腎は 30, 100 および 300 mg/kg 群についても同様に検査した。

3) 親動物(P)の生殖発生に及ぼす影響

14 日間にわたって投与された雌雄は, 同一群内で 1 対 1 に組み合わせて同居交配した。交配期間は 14 日を限度として, 交尾を確認するまでの連続同居交配とした。

交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い, 膣垢内に精子または膣栓を確認した雌を交尾成立動物として, その日を妊娠 0 日として起算した。

4) 新生児

(1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性, 死産児数, 新生児数および外表異常の有無を観察した。

(2) 新生児の観察

新生児は, 一般状態および死亡の有無を生存期間中毎日 1 回観察した。

(3) 体重測定

体重は, 哺育 0 日(出生日)および 4 日に測定した。

(4) 剖検

新生児は, 哺育 4 日に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

測定値の統計解析は下記の検定法を用い, 有意差検定は対照群と各投与群との間で行った。いずれの検定においても, 危険率 5% 未満を有意とした。新生児は一腹の平均を一単位として検定した。

体重(親動物, 新生児), 摂餌量, 発情回数, 交尾日数, 妊娠期間 [分娩日(哺育 0 日)-交尾確認日], 着床痕数, 総出産児数(新生児数+死産児数), 新生児数, 死産児数, 分娩率 [(総出産児数/着床痕数)×100], 児の産出率 [(哺育 0 日の新生児数/着床痕数)×100], 黄体数, 着床率 [(着床痕数/黄体数)×100], 出生率 [(哺育 0 日の新生児数/総出産児数)×100], 哺育 4 日の新生児数, 哺育 4 日の生存率 [(哺育 4 日の新生児数/哺育 0 日の新生児数)×100], 外表異常出現率 [(外表異常児数/新生児数)×100], 性比(雄/雌), 器官重量(相対重量を含む), 血液学検査成績, 血液生化学検査成績については, 各群で平均値および標準偏差を算出した。有意差検定は, Bartlett 法による等分散性の検定を行い, 等分散ならば一元配置法による分散分析²⁾を行い, 有意ならば Dunnett 法²⁾を用いて行った。一方, 等分散と認められなかった場合は, 順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallis の検定³⁾)を行い, 有意ならば順

位を利用したDunnett型の検定法を用いて行った。

交尾率 [(交尾成立動物数/同居動物数)×100]、受胎率 [(受胎雌数/交尾成立動物数)×100]、出産率 [(新生児出産雌数/受胎雌数)×100] は、 χ^2 検定を用いた。

なお、病理組織学検査において、1000 mg/kg群で毒性学的影響が示唆され他の用量群についても検査を実施した器官・組織の所見については、上記の順位を利用したDunnett型の検定法を用いて行った。そこで有意差が認められた所見については、Cochran・Armitageの傾向検定を用いて用量反応性の検定を実施した。

結果

1. 反復投与毒性

1) 雄に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡は、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では認められなかった。1000 mg/kg群では、投与20日に1例が死亡したが、前日まで流涎の他には異常はみられなかった。

生存例の一般状態観察において、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では観察期間を通していずれの動物とも異常はみられなかった。1000 mg/kg群では、流涎が投与3日から投与後約1分～約30分の間みられた。

(2) 体重推移 (Fig.1)

30、100 および 300 mg/kg群の体重は、対照群とはほぼ同様の推移であり、いずれの測定日にも有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与18～25 および 32～50日に体重の有意な低値がみられた。

(3) 摂餌量 (Fig.2)

30 および 300 mg/kg群の摂餌量は、対照群とはほぼ同程度であり、いずれの測定日にも有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて投与31日に摂餌量の有意な低値がみられたが、投与量に依存したものではなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与13、31、38～45日に摂餌量の有意な低値がみられた。

(4) 血液学検査 (Table 1)

各投与群とも、対照群と比べていずれの測定項目にも有意差はみられなかった。

(5) 血液生化学検査 (Table 2)

30 および 300 mg/kg群では、対照群と比べて尿素窒素の有意な高値がみられた。100 mg/kg群では、対照群と比べて有意差はないが尿素窒素の高値傾向がみられた。1000 mg/kg群では、対照群と比べて尿素窒素、K、Clおよび無機リンの有意な高値、トリグリセライドの有意な低値がみられた。

(6) 剖検

生存例の剖検において、対照群では片側性の精巣上体の尾部に黄白色結節が1例にみられた。30 および 100 mg/kg群では、いずれにも異常はみられなかった。300 mg/kg群では、片側性の腎臓に白色斑が1例、両側性の

精巣の萎縮と軟化が1例にみられた。1000 mg/kg群では、胸腺の暗赤色化が1例、両側性の腎臓の肥大が1例にみられた。しかし、これらの変化は、いずれも少数例であり、投与によるものではないと判断した。

1000 mg/kg投与群の死亡例の剖検において、肺・胸腺の暗赤色化および両側性の副腎の肥大がみられた。

(7) 器官重量 (Table 3)

30 mg/kg群では、対照群と比べていずれの器官重量にも有意差はみられなかった。100 および 300 mg/kg群では、対照群と比べて腎臓の相対重量の有意な高値がみられた。

1000 mg/kg投与群では、対照群と比べて肝臓および腎臓の相対重量の有意な高値がみられた。

(8) 病理組織学検査 (Table 4)

生存例では、腎臓において尿細管拡張が1000 mg/kg群で3例、集合管拡張が1000 mg/kg群で2例にみられたが、それらの程度はいずれもごく軽度であった。なお、尿細管拡張は1000 mg/kg群で対照群と比べて用量相関性はないものの有意差が認められ、集合管拡張は有意差はないものの増加傾向にあった。

その他には、胸腺の出血、心臓の小肉芽腫、肝臓の小肉芽腫および小葉中心性の肝細胞空胞変性、腎臓の尿細管好塩基性化、近位尿細管内の好酸性小体、嚢胞、びまん性鉍質沈着および好中球浸潤がみられたが、対照群でも同程度にみられているか、あるいは少数例であることから、偶発的变化と判断した。なお、脾臓、副腎、精巣および脳では対照群および1000 mg/kg群とも異常はみられなかった。

1000 mg/kg群の死亡例では、胸腺の出血、肺の浮腫、胸腺・肺・副腎の自己融解がみられたが、それらの程度はいずれもごく軽度～軽度であった。なお、剖検で異常の認められた副腎には肥大を示唆する変化はみられなかった。

2) 雌に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡は、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では認められなかった。1000 mg/kg群では、投与6日に3例、投与9日に1例、投与12日に1例と投与17日に1例の計6例が死亡した。死亡例では、流涎が投与3日から投与後約1分～約30分の間みられ、自発運動の低下、呼吸緩徐、腹臥、被毛の汚れ、表皮温下降、流涎あるいは削瘦が死亡する1～9日前から多くの例で認められた。

生存例の一般状態観察において、対照群、30、100 および 300 mg/kg群では観察期間を通していずれの動物とも異常はみられなかった。1000 mg/kg群では、流涎が投与3日から投与後約1分～約30分の間みられ、また、1例では自発運動の低下、腹臥、被毛の汚れ、表皮温下降、削瘦も認められた。

(2) 体重推移 (Fig.3)

交配開始前では、30、100 および 300 mg/kg群の体重は対照群とはほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与4および

8日に体重の有意な低値がみられた。なお、1000 mg/kg群の死亡例では、死亡前に急激な体重減少がみられた。

妊娠期間中では、30, 300 および 1000 mg/kg群の体重は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠 21 日に体重の有意な高値がみられたが、投与量に依存したものでなかった。

哺育期間中では、30 および 100 mg/kg群の体重は対照群と比べて哺育4日に体重の有意な高値がみられたが、投与量に依存したものでなかった。300 および 1000 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。

(3) 摂餌量 (Fig.4)

交配開始前では、30, 100 および 300 mg/kg群の摂餌量は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。1000 mg/kg群では、対照群と比べて投与3, 6 および 13 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

妊娠期間中では、30 および 300 mg/kg群の摂餌量は対照群とほぼ同様の推移であり、有意差はみられなかった。なお、100 および 1000 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠 16 日に摂餌量の有意な高値がみられたが、一過性の変化であり、投与によるものではないと判断した。

哺育期間中では、各投与群とも対照群と比べて摂餌量に有意差はみられなかった。

(4) 剖検

生存例の剖検において、対照群、30, 100 および 300 mg/kg群では異常はみられなかった。1000 mg/kg群では、胸腺の萎縮と両側性の副腎の肥大が1例にみられた。

1000 mg/kg群の死亡例の剖検において、胸腺の萎縮が1例、肺の暗赤色化が1例、脾臓の萎縮が6例、両側性の副腎の肥大が6例、腺胃粘膜の暗赤色化が3例、小腸の暗赤色化が2例にみられた。

(5) 器官重量 (Table 5)

30 mg/kg群では、対照群と比べていずれの器官重量にも有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて腎臓の絶対重量の有意な高値がみられた。300 mg/kg群では、対照群と比べて有意差はないが、腎臓の絶対重量の高値傾向がみられた。1000 mg/kg群では、対照群と比べて腎臓の絶対・相対重量の有意な高値がみられた。

(6) 病理組織学検査 (Table 6)

生存例では、腎臓において髓質および乳頭部への好中球浸潤(片側性)が1000 mg/kg群で1例にみられたが、その程度は軽度であった。脳において、延髄の広範軟化が1000 mg/kg群で1例にみられたが、その程度は軽度であった。

その他、胸腺の萎縮および出血、脾臓の髓外造血亢進、副腎の束状帯広範壊死、束状帯巢状類洞拡張、束状帯巢状空胞変性および束状帯肥大がみられたが、いずれも少数例であることから、偶発的变化と判断した。

なお、心臓、肝臓および卵巣では対照群および 1000

mg/kg群とも異常はみられなかった。また、剖検で異常の認められた 1000 mg/kg群の1例の副腎の肥大と脾臓の萎縮を示唆する変化はみられなかった。

1000 mg/kg投与群の死亡例6例において、肺に浮腫が1例、胸腺に萎縮が1例、脾臓に萎縮が5例と白脾髄の萎縮が1例、副腎に束状帯の過形成が3例と自己融解が1例、腺胃粘膜のびらんが1例と自己融解が1例、小腸粘膜にびらんが1例にみられた。なお、それらの程度は、胸腺の萎縮および白脾髄の萎縮が中等度であったが、その他の所見はいずれもごく軽度~軽度であった。また、剖検で異常の認められた 1000 mg/kg群の2例の副腎の肥大、2例の腺胃粘膜の暗赤色化、1例の小腸の暗赤色化を示唆する変化はみられなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物の生殖発生に及ぼす影響

(1) 発情回数、交尾率および受胎率 (Table 7)

交配前の投与期間(14日間)の発情回数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

対照群と 1000 mg/kg投与群の各1組を除いた全例で交尾が確認された。また、1000 mg/kg群の1組で雌が交配期間中に死亡した。交尾日数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。また、交尾率にも、各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。不受胎雌は、30 および 300 mg/kg投与群で各1例みられたが、受胎率には各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。なお、受胎雌の全例が新生児を分娩した。

(2) 妊娠期間、分娩状態、黄体数、着床率および出産率 (Table 8)

妊娠期間は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。また、いずれの動物とも分娩状態に異常はみられなかった。

黄体数、着床痕数および着床率は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

出産率は、対照群、各投与群とも 100%であった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 分娩率、出生率および生存率 (Table 8)

総出産児数および分娩率は、各投与群とも対照群の間に有意差はみられなかった。

哺育0日の新生児数、死産児数、出生率、児の産出率および性比は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

新生児の一般状態では、いずれの群とも異常症状は観察されなかった。

哺育4日の新生児数および哺育4日の生存率は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

新生児の外表面異常の観察では、いずれの群とも異常はみられなかった。

(2) 新生児の体重 (Table 8)

各投与群の体重は、哺育0日および4日とも雌雄とも対照群との間に有意差はみられなかった。

(3) 新生児の剖検

対照群, 各投与群とも, いずれにも異常はみられなかった。

考察

メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。投与量は, 1000 mg/kg を最高用量とし, 以下 300, 100 および 30 mg/kg とした。なお, 対照として媒体(注射用水)投与群を設けた。

雄動物に対して, 1000 mg/kg 群で 1 例が死亡した。死亡例の剖検, 異常の観察された器官・組織の病理組織学検査において, 死後変化に基づくと考えられる所見の他には, 特筆すべき変化は認められず, 死因は明らかにできなかった。一般状態観察において, 1000 mg/kg 群では投与期間の初期から投与直後に流涎がみられたが, 持続時間は約 30 分間であり, 投与を継続しても持続時間の延長は認められなかった。この流涎は, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの刺激性に基づく変化と考えられる。また, 1000 mg/kg 群では, 摂餌量の減少と関連した体重の増加抑制がみられた。30 mg/kg 以上の群の尿素窒素の増加, 100 mg/kg 以上の群の腎臓の相対重量の増加, 1000 mg/kg 群の K, Cl, 無機リンの増加, 腎臓の病理組織学検査における尿細管拡張, 集合管拡張などは腎機能の低下を示唆する変化と考えられる。しかし, 尿素窒素, K, Cl, 無機リンの増加は軽度であり, 腎臓の組織学的所見も発生頻度が低く, 程度も軽微であった。1000 mg/kg 群では, 肝臓の相対重量の有意な高値, 血液生化学検査においてトリグリセライドの低値が認められたが, 肝臓の絶対重量には差がみられないこと, 肝臓の病理組織学検査でも異常がみられないことから, 肝臓の相対重量の高値とトリグリセライドの低値は摂餌量の減少に伴う変化と考えられ, 毒性学的に重篤なものではないと判断した。なお, 血液学検査においては, 1000 mg/kg 群でも各検査項目に異常は認められなかった。

雌動物に対して, 1000 mg/kg 群で 6 例が死亡した。死亡例では, 急激な体重減少, 摂餌量の減少がみられ, 剖検において肺の暗赤色化, 胸腺の萎縮, 脾臓の萎縮, 副腎の肥大, 腺胃粘膜および小腸の暗赤色化が認められた。死亡例で異常の観察された器官・組織の病理組織学検査において肺の浮腫, 胸腺の萎縮, 脾臓の萎縮, 副腎束状帯の過形成, 腺胃粘膜および小腸粘膜のびらんがみられたが, これらの変化は死戦期のストレスに起因するものと考えられる。一般状態観察においては, 雄の場合と同様に 1000 mg/kg 群で流涎がみられた。その他には自発運動の低下, 腹臥, 流涙, 被毛の汚れ, 表皮温下降, 呼吸緩徐が死亡例の多くにみられた。1000 mg/kg 群では, 雄と同様に摂餌量の減少と関連した体重の増加抑制が交配前投与期間にみられた。器官重量では, 100 mg/kg 以上の群で腎臓の絶対重量の高値あるいは高値傾向, 1000 mg/kg 群で腎臓の相対重量の高値がみられた。また,

1000 mg/kg 群において, 腎臓に髄質および乳頭部への好中球浸潤, 脳に延髄の広範軟化巣が認められ, 1 例のみの変化であるが, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの投与により生じた可能性を否定できない。

したがって, 当試験条件下におけるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの一般毒性学的無影響量は, 雄で 30 mg/kg/day 未満, 雌で 30 mg/kg/day と考えられる。

親動物の生殖発生に対しては, 発情回数, 交尾率, 交尾日数, 受胎率および受胎雌数には, 各投与群とも影響はみられなかった。また, 各投与群とも妊娠期間, 分娩状態, 黄体数, 着床痕数, 着床率および出産率にも影響はみられなかった。

新生児に対しては, 各投与群で総出産児数, 分娩率, 死産児数, 哺育 0 日の新生児数, 出生率, 児の産出率, 性比には影響はみられなかった。外表観察では, いずれの群とも異常はみられなかった。また, 一般状態, 哺育 4 日の新生児数, 生存率, 体重, 剖検にも影響はみられなかった。

したがって, 当試験条件下におけるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの生殖発生毒性学的な無影響量は, 雌雄の生殖および児動物の発生に関していずれも 1000 mg/kg/day と推察される。

以上のように, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの一般毒性学的無影響量は, 雄では 30 mg/kg 投与により尿素窒素の高値が認められたことから 30 mg/kg/day 未満, 雌では 100 mg/kg 投与により腎臓の相対重量の高値が認められたことから 30 mg/kg/day と考えられる。また, 生殖発生毒性学的な無影響量は, いずれの項目にも影響が認められなかったことから雌雄の生殖および児動物の発生とも 1000 mg/kg/day と推察される。なお, 筆者らは類似物質であるメタクリル酸(2-ヒドロキシプロピル)エステルのラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験を先に実施したが, その一般毒性学的無影響量は雌雄とも 300 mg/kg/day であり⁴⁾, メタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの方が毒性は強いと考えられる。

文献

- 1) 佐久間昭, “薬効評価-計画と解析 I, II,” 東大出版会, 東京, 1977, 1981.
- 2) C.W. Dunnett, *Biometrics*, **20**, 482(1964).
- 3) W.H. Kruskal, W.A. Wallis, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **47**, 583(1952).
- 4) 古橋忠和ほか, 化学物質毒性試験報告, **4**, 569(1996).

連絡先

試験責任者：古橋忠和
試験担当者：長瀬孝彦，藤村高志，内藤一嘉，
牧野浩平，渡邊ゆかり，木村均
(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
〒 501-62 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)
Takahiko Nagase, Takashi Fujimura,
Kazuyoshi Naitou, Kohei Makino,
Yukari Watanabe and Hitoshi Kimura
Nihon Bioresearch Inc. Hashima Laboratory
6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu,
501-62, Japan
Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284

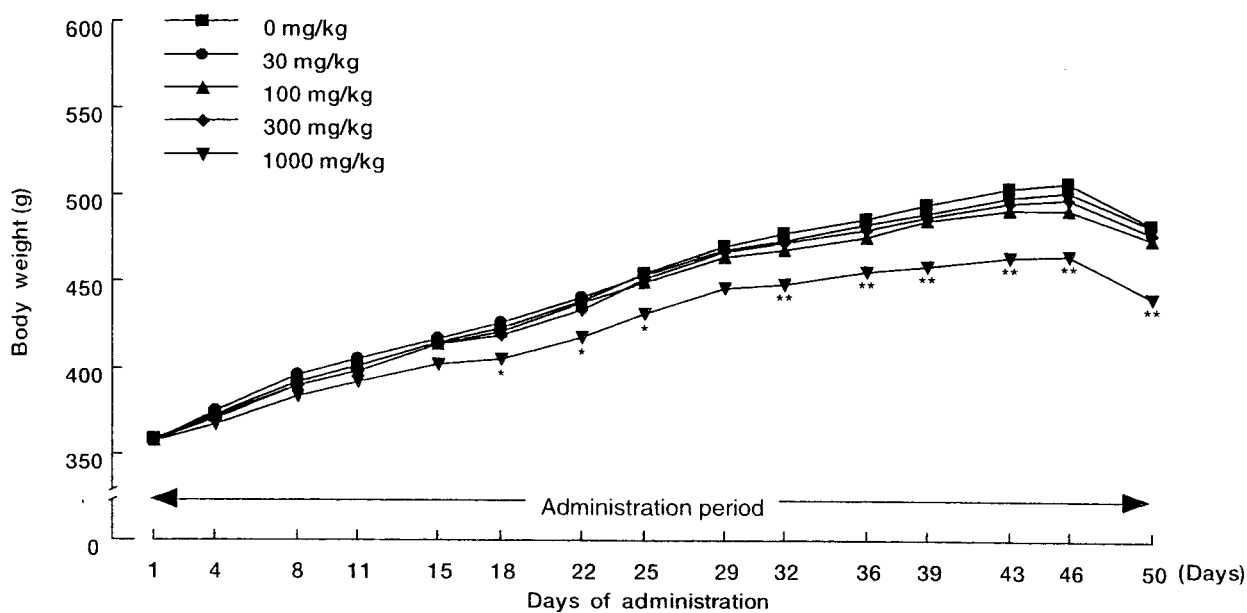


Fig. 1 Body weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration
Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

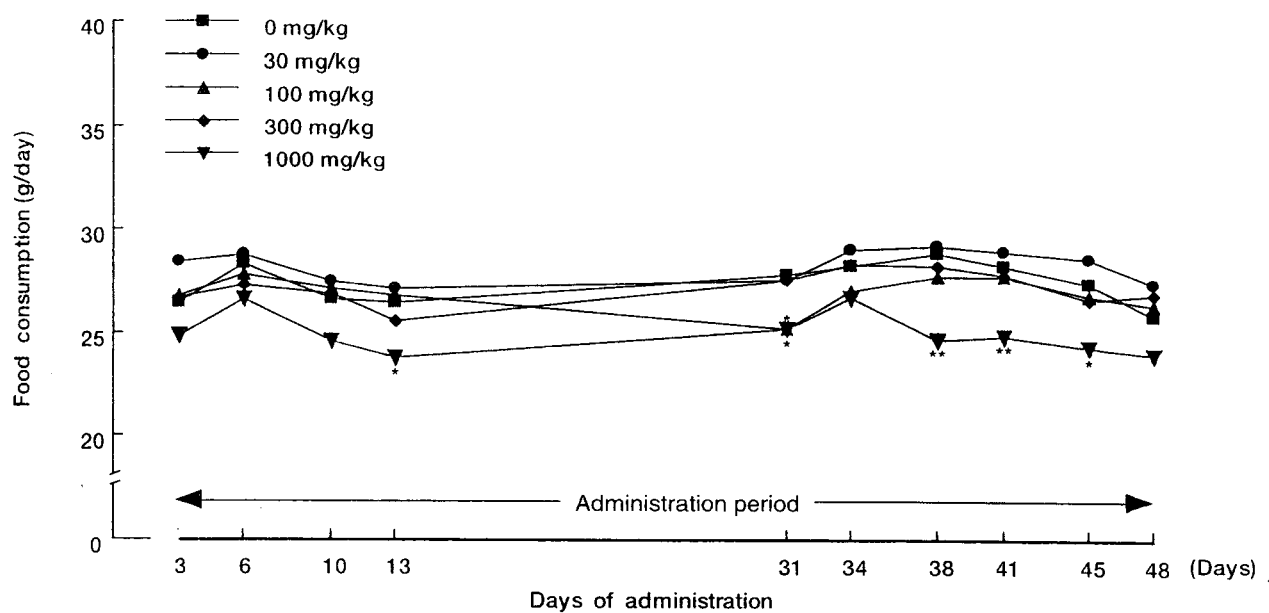


Fig. 2 Food consumption of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration
Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

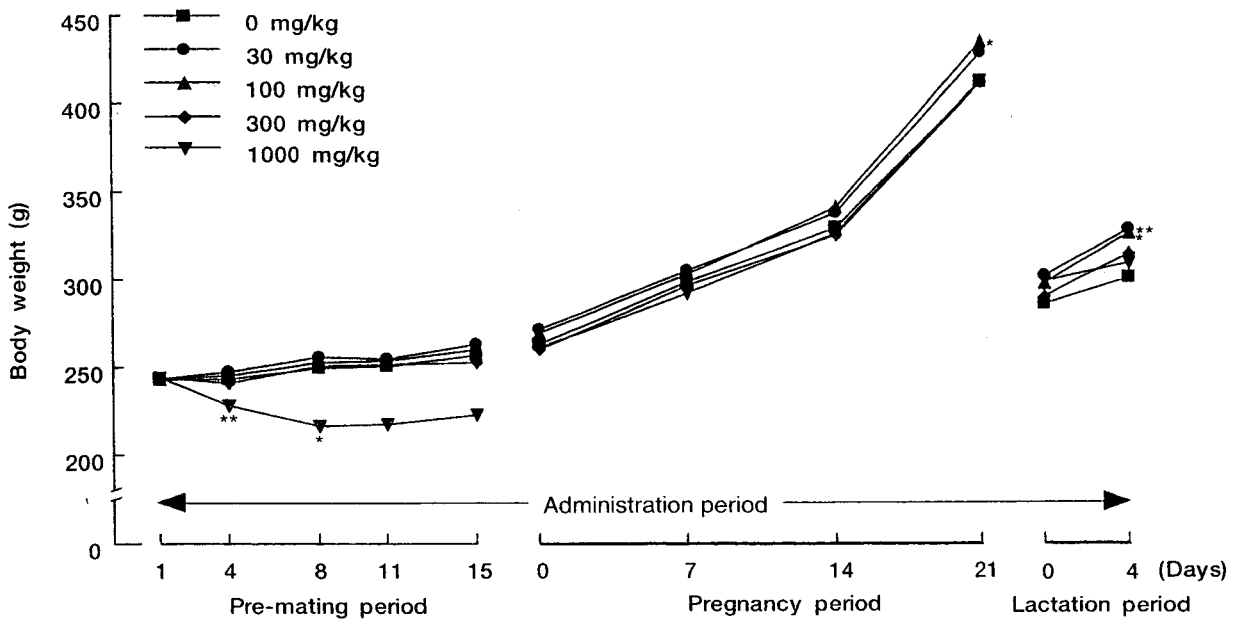


Fig. 3 Body weight of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration
Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

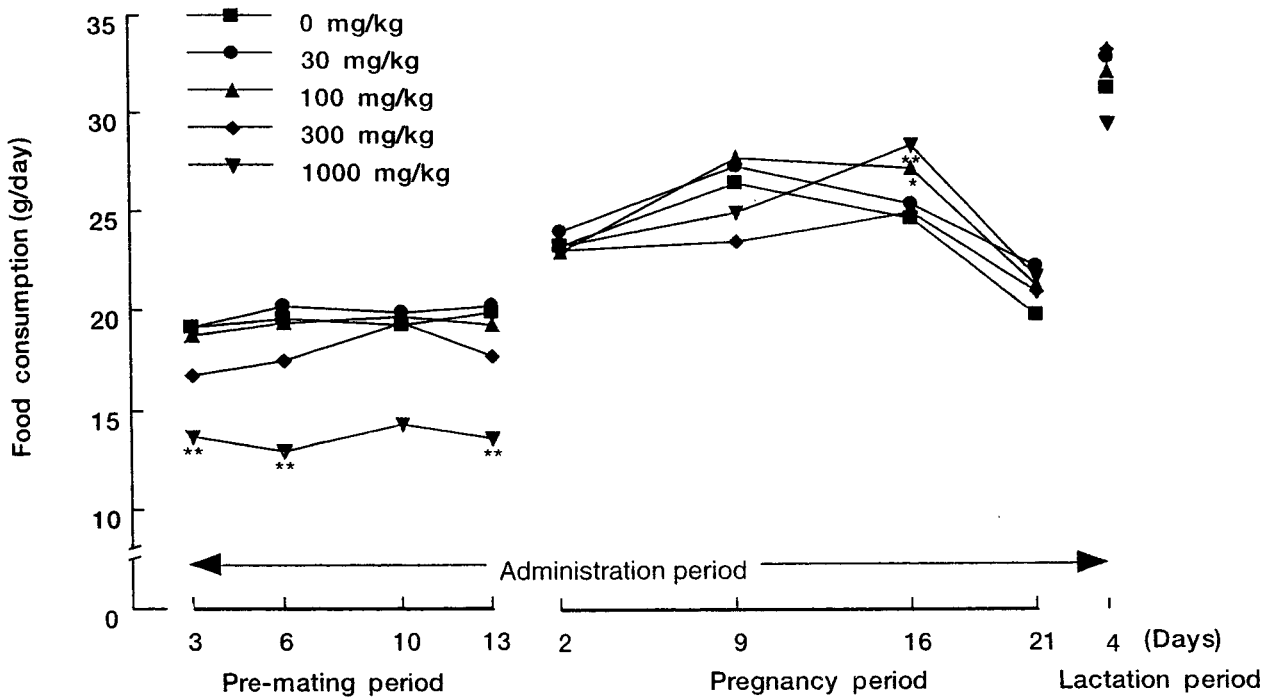


Fig. 4 Food consumption of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration
Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Table 1 Hematological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	11
RBC (10 ⁴ /mm ³)	859.9 ± 32.2	874.3 ± 32.3	847.8 ± 46.8	851.7 ± 30.3	845.7 ± 62.4
Hemoglobin (g/dl)	15.43 ± 0.84	15.81 ± 0.68	15.63 ± 0.81	15.37 ± 0.67	15.42 ± 1.10
Hematocrit (%)	44.54 ± 1.66	45.52 ± 1.33	44.93 ± 1.44	44.64 ± 1.21	45.01 ± 2.72
MCV (μm ³)	51.80 ± 1.23	52.09 ± 1.89	53.09 ± 2.51	52.44 ± 1.35	53.28 ± 1.51
MCH (pg)	17.95 ± 0.63	18.08 ± 0.90	18.46 ± 1.10	18.06 ± 0.72	18.25 ± 0.56
MCHC (g/dl)	34.60 ± 0.90	34.73 ± 1.09	34.78 ± 1.08	34.42 ± 1.05	34.25 ± 0.90
Platelet (10 ⁴ /mm ³)	109.02 ± 12.78	115.20 ± 12.08	109.88 ± 12.66	107.55 ± 9.71	109.95 ± 14.15
Reticulocyte (%)	23.8 ± 5.2	24.8 ± 5.2	23.3 ± 6.3	24.2 ± 6.8	22.0 ± 3.5
PT (sec.)	16.91 ± 1.47	16.44 ± 1.24	15.96 ± 0.96	17.78 ± 2.16	16.80 ± 1.80
APTT (sec.)	31.99 ± 2.70	32.98 ± 5.59	30.23 ± 2.24	32.17 ± 2.31	31.03 ± 2.85
Fibrinogen (mg/dl)	253.8 ± 15.5	256.6 ± 20.6	254.9 ± 16.1	241.7 ± 12.3	258.3 ± 29.6
WBC (10 ³ /mm ³)	54.3 ± 10.0	53.1 ± 8.0	58.5 ± 14.6	53.6 ± 11.8	57.3 ± 10.7
Differential leukocyte (%)					
Lymphocyte	84.0 ± 6.9	84.9 ± 7.3	86.8 ± 6.9	84.3 ± 7.4	82.4 ± 11.9
Neutrophil	15.1 ± 6.7	13.8 ± 6.8	12.1 ± 6.3	14.6 ± 7.3	17.0 ± 12.1
Eosinophil	0.5 ± 0.8	0.8 ± 1.0	0.8 ± 0.9	0.8 ± 1.0	0.1 ± 0.3
Basophil	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Monocyte	0.4 ± 0.7	0.6 ± 0.5	0.3 ± 0.6	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.5

Each value shows mean ± S.D.

Table 2 Blood chemical examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	11
GOT (IU/l)	70.94 ± 12.29	68.81 ± 10.63	70.82 ± 10.88	66.21 ± 10.88	62.32 ± 12.26
GPT (IU/l)	21.38 ± 3.24	22.33 ± 3.15	21.38 ± 4.14	21.48 ± 2.20	21.06 ± 5.94
ALP (IU/l)	75.68 ± 11.70	79.52 ± 15.80	84.17 ± 18.07	71.48 ± 14.95	75.33 ± 28.16
γ-GTP (IU/l)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
T-protein (g/dl)	5.62 ± 0.29	5.88 ± 0.27	5.74 ± 0.20	5.73 ± 0.24	5.54 ± 0.36
Albumin (g/dl)	2.892 ± 0.141	2.991 ± 0.164	2.912 ± 0.144	2.970 ± 0.135	2.873 ± 0.169
Protein fraction (%)					
Albumin	51.49 ± 1.34	50.90 ± 1.92	50.72 ± 1.46	51.81 ± 1.52	51.95 ± 2.40
α ₁ -globulin	22.78 ± 2.13	23.61 ± 1.68	23.21 ± 1.74	22.38 ± 2.50	22.44 ± 2.13
α ₂ -globulin	4.52 ± 0.97	4.98 ± 0.71	4.83 ± 0.67	4.64 ± 0.70	4.67 ± 0.96
α ₃ -globulin	5.60 ± 0.49	5.50 ± 0.22	5.54 ± 0.51	5.33 ± 0.26	5.20 ± 0.53
β-globulin	12.25 ± 1.46	11.50 ± 0.77	11.77 ± 0.69	12.04 ± 0.85	12.11 ± 0.97
γ-globulin	3.37 ± 0.79	3.51 ± 0.55	3.93 ± 1.03	3.81 ± 0.62	3.63 ± 0.76
A/G ratio	1.064 ± 0.057	1.039 ± 0.082	1.032 ± 0.062	1.076 ± 0.066	1.085 ± 0.101
T-bilirubin (mg/dl)	0.072 ± 0.006	0.075 ± 0.007	0.077 ± 0.011	0.076 ± 0.010	0.070 ± 0.012
BUN (mg/dl)	17.36 ± 2.04	19.97 ± 2.57*	19.42 ± 2.11	20.82 ± 2.07**	25.06 ± 4.57**
Creatinine (mg/dl)	0.535 ± 0.025	0.546 ± 0.051	0.538 ± 0.026	0.542 ± 0.056	0.544 ± 0.063
Glucose (mg/dl)	125.26 ± 10.06	125.89 ± 8.99	124.38 ± 8.77	126.18 ± 9.70	142.55 ± 43.06
T-cholesterol (mg/dl)	65.68 ± 13.77	61.31 ± 14.52	63.34 ± 16.35	67.97 ± 9.88	56.11 ± 13.66
Triglyceride (mg/dl)	83.18 ± 47.03	99.67 ± 45.12	54.01 ± 20.45	72.99 ± 29.19	47.85 ± 26.99*
Na (mEq/l)	144.41 ± 1.76	144.08 ± 1.57	144.38 ± 1.72	144.03 ± 1.72	143.38 ± 1.21
K (mEq/l)	4.130 ± 0.184	4.173 ± 0.231	4.293 ± 0.154	4.291 ± 0.220	4.535 ± 0.418**
Cl (mEq/l)	105.71 ± 1.91	105.97 ± 0.99	107.15 ± 2.25	107.09 ± 0.98	107.08 ± 3.36*
Ca (mg/dl)	9.76 ± 0.35	9.86 ± 0.30	9.68 ± 0.18	9.66 ± 0.26	9.61 ± 0.39
I-phosphorus (mg/dl)	6.55 ± 0.70	6.55 ± 0.66	6.96 ± 0.61	6.98 ± 0.74	7.95 ± 0.80**

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control (*: p<0.05, **: p<0.01).

Table 3 Organ weight of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose(mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12	11
Body weight (g)	484.5 ± 34.2	483.2 ± 27.9	475.4 ± 26.5	478.8 ± 18.5	442.5 ± 20.9**
Thymus (mg)	310.63 ± 80.69	273.98 ± 72.28	277.63 ± 67.98	289.81 ± 85.98	265.77 ± 64.35
(mg%)	64.41 ± 17.67	56.42 ± 13.56	58.31 ± 13.24	60.68 ± 18.21	60.33 ± 15.66
Liver (g)	12.099 ± 1.758	12.532 ± 1.413	12.263 ± 1.484	12.647 ± 0.840	12.115 ± 0.755
(g%)	2.489 ± 0.216	2.590 ± 0.184	2.572 ± 0.196	2.640 ± 0.124	2.741 ± 0.139**
Kidneys (g)	2.823 ± 0.246	2.921 ± 0.247	3.017 ± 0.250	3.028 ± 0.260	3.200 ± 0.466
(g%)	0.583 ± 0.044	0.605 ± 0.055	0.635 ± 0.046*	0.634 ± 0.060*	0.723 ± 0.110**
Testes (g)	3.283 ± 0.232	3.344 ± 0.178	3.418 ± 0.286	3.158 ± 0.475	3.281 ± 0.213
(g%)	0.682 ± 0.075	0.694 ± 0.063	0.721 ± 0.070	0.662 ± 0.100	0.744 ± 0.054
Epididymides (g)	1.303 ± 0.077	1.298 ± 0.143	1.295 ± 0.093	1.236 ± 0.161	1.305 ± 0.093
(g%)	0.271 ± 0.028	0.270 ± 0.042	0.271 ± 0.019	0.259 ± 0.036	0.296 ± 0.030

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from control(*:p<0.05, **:p<0.01).

Table 4 Histopathological examination of male rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose(mg/kg)	0				30				100				300				1000								
	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+	
HThymus	[12]						[0]						[0]						[11]						
Hemorrhage	12	0																	10	1	1	0	0	0	0
Heart	[12]						[0]						[0]						[11]						
Microgranuloma	11	1	1	0	0	0													10	1	1	0	0	0	0
Liver	[12]						[0]						[0]						[11]						
Microgranuloma	10	2	2	0	0	0													9	2	2	0	0	0	0
Degeneration, vacuolar, centrilobular	11	1	1	0	0	0													11	0					
Kidney	[12]						[12]						[12]						[11]						
Basophilic tubules	9	3	3	0	0	0	11	1	1	0	0	0	12	0					7	4	3	1	0	0	0
Eosinophilic body, proximal tubule	10	2	2	0	0	0	11	1	1	0	0	0	11	1	1	0	0	0	12	0					
Hyaline droplet, proximal tubule	12	0					12	0					11	1	1	0	0	0	12	0					
Dilatation, renal tubule	12	0					12	0					12	0					8	3	3	0	0	0	0**
Dilatation, collecting tubule	12	0					12	0					12	0					9	2	2	0	0	0	0
Cyst, unilateral	12	0					12	0					12	0					10	1	1	0	0	0	0
Mineralization, diffuse	12	0					12	0					12	0					10	1	1	0	0	0	0
Cellular infiltration, neutrophil	12	0					12	0					12	0					10	1	1	0	0	0	0
Degeneration, renal tubule, focal, unilateral	12	0					12	0					11	1	1	0	0	0	11	0					
Epididymis	[12]						[0]						[0]						[11]						
Granuloma, spermatic, left tail	11	1	0	1	0	0													11	0					

Grade of histopathological finding; ±:Slight, +:Mild, 2+:Moderate, 3+:Marked.

N:No abnormality detected.

A:Abnormality detected.

[]:Number of males examined.

No remarkable changes were recognized in spleen, adrenal, testis and brain of control and 1000 mg/kg groups.

Significantly different from control(**:p<0.01).

Table 5 Organ weight of dams on day 4 of lactation in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of dams	11	11	12	11	5
Body weight (g)	300.7 ± 40.0	328.8 ± 12.7**	326.1 ± 11.5*	315.1 ± 17.4	309.2 ± 19.1
Thymus (mg)	163.16 ± 74.90	176.37 ± 30.67	159.91 ± 54.09	160.71 ± 44.26	174.02 ± 76.33
(mg%)	54.11 ± 22.37	53.74 ± 9.84	48.94 ± 16.16	51.51 ± 15.76	56.30 ± 24.76
Liver (g)	12.775 ± 1.020	13.159 ± 0.833	13.661 ± 1.182	13.021 ± 1.717	13.050 ± 1.537
(g%)	4.342 ± 0.849	4.005 ± 0.264	4.187 ± 0.286	4.118 ± 0.349	4.216 ± 0.333
Kidneys (g)	1.785 ± 0.158	1.848 ± 0.084	1.953 ± 0.151*	1.947 ± 0.162	2.056 ± 0.261**
(g%)	0.605 ± 0.107	0.564 ± 0.037	0.598 ± 0.038	0.618 ± 0.048	0.662 ± 0.049*
Ovaries (mg)	98.96 ± 8.50	100.55 ± 15.13	102.85 ± 11.51	95.71 ± 11.23	97.44 ± 10.80
(mg%)	33.83 ± 8.14	30.57 ± 4.40	31.53 ± 3.28	30.35 ± 2.94	31.52 ± 2.69

Each value shows mean ± S.D.
Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

Table 6 Histopathological examination of female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0				30				100				300				1000				
	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	N	A	±	+ 2+ 3+	
Thymus	[12]				[0]				[0]				[0]				[6]				
Atrophy	11	1	0	1 0 0 0													5	1	0	0 1 0 0	
Hemorrhage	11	1	1	0 0 0 0													6	0			
Spleen	[12]				[0]				[0]				[0]				[6]				
Hematopoiesis, extramedullary, increased	11	1	0	1 0 0 0													6	0			
Kidney	[12]				[0]				[0]				[0]				[6]				
Cellular infiltration, papilla and medulla, neutrophil, unilatera	12	0															5	1	0	1 0 0 0	
Adrenal	[12]				[12]				[12]				[12]				[6]				
Necrosis, zona fasciculata, massive	10	2	0	2 0 0 0	12	0			12	0			12	0			6	0			
Dilatation, sinusoid, zona fasciculata, focal	11	1	1	0 0 0 0	12	0			12	0			12	0			6	0			
Degeneration, vacuolar, zona fasciculata, focal	11	1	1	0 0 0 0	12	0			12	0			12	0			6	0			
Hypertrophy, zona fasciculata	11	1	1	0 0 0 0	12	0			12	0			12	0			6	0			
Brain	[12]				[12]				[12]				[12]				[6]				
Malacia, medulla oblongata, massive	12	0			12	0			12	0			12	0			5	1	0	1 0 0 0	

Grade of histopathological finding; ±: Slight, +: Mild, 2+: Moderate, 3+: Marked.
N: No abnormality detected.
A: Abnormality detected.
[]: Number of females examined.
No remarkable changes were recognized in heart, liver and ovary of control and 1000 mg/kg groups.

Table 7 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of females	12	12	12	12	7
Number of estrous cases before mating (14 days)					
Mean±S.D.	3.4 ± 0.5	3.3 ± 1.2	3.5 ± 0.5	3.3 ± 0.6	2.9 ± 1.7
Number of pairs	12	12	12	12	7
Number of pairs with successful copulation	11	12	12	12	5
Copulation index (%) ^{a)}	91.7	100.0	100.0	100.0	71.4
Number of conceiving days					
Mean±S.D.	2.7 ± 1.8	3.4 ± 1.6	2.8 ± 1.1	2.8 ± 1.2	2.4 ± 0.9
Number of pregnant females	11	11	12	11	5
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	91.7	100.0	91.7	100.0
Number of pregnant females with live pups	11	11	12	11	5

a) : (Number of pairs with successful copulation/number of pairs)×100.

b) : (Number of pregnant females/number of pairs with successful copulation)×100.

Table 8 Observation of pups in combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 2-hydroxyethyl methacrylate by oral administration

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of dams	11	11	12	11	5
Length of gestation (days)					
Mean±S.D. per dam	22.64 ± 0.50	22.27 ± 0.47	22.50 ± 0.52	22.18 ± 0.40	22.40 ± 0.55
Number of corpora lutea					
Mean±S.D. per dam	17.6 ± 1.4	18.3 ± 2.0	18.8 ± 2.1	17.1 ± 2.2	16.8 ± 2.8
Number of implantation scars					
Mean±S.D. per dam	16.5 ± 1.4	16.5 ± 0.9	17.2 ± 2.1	15.9 ± 1.8	15.8 ± 2.7
Implantation index ^{a)}					
Mean%±S.D. per dam	93.5 ± 6.4	91.1 ± 7.6	91.9 ± 9.2	93.5 ± 7.2	93.8 ± 4.0
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of live pups born					
Mean±S.D. per dam	14.5 ± 1.0	15.1 ± 1.0	15.8 ± 1.8	15.1 ± 2.3	14.0 ± 2.9
Sex ratio at birth ^{c)}					
Mean±S.D. per dam	1.42 ± 1.45	1.31 ± 0.71	1.47 ± 1.37	0.83 ± 0.21	1.44 ± 0.63
Birth index ^{d)}					
Mean%±S.D. per dam	88.5 ± 6.1	91.3 ± 6.7	91.9 ± 5.0	94.5 ± 6.6	88.0 ± 6.0
Number of dead pups on day 0 of lactation					
Mean±S.D. per dam	0.8 ± 1.0	0.3 ± 0.5	0.8 ± 1.0	0.1 ± 0.3	0.4 ± 0.5
Number of pups born					
Mean±S.D. per dam	15.4 ± 1.2	15.4 ± 1.1	16.5 ± 2.3	15.2 ± 2.4	14.4 ± 3.2
Delivery index ^{e)}					
Mean%±S.D. per dam	93.5 ± 4.8	92.8 ± 6.5	95.9 ± 5.4	95.1 ± 6.8	90.4 ± 8.0
Live birth index ^{f)}					
Mean%±S.D. per dam	94.9 ± 5.9	98.3 ± 3.0	95.9 ± 4.9	99.5 ± 1.8	97.6 ± 3.3
Number of live pups on day 4 of lactation					
Mean±S.D. per dam	14.3 ± 0.9	14.8 ± 1.1	15.3 ± 2.0	14.8 ± 2.3	14.0 ± 2.9
Viability index ^{g)}					
Mean%±S.D. per dam	98.2 ± 3.1	98.3 ± 4.0	97.3 ± 4.5	98.2 ± 4.4	100.0 ± 0.0
Number of external anomalies					
Mean%±S.D. per dam	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Body weight of pups (g)					
Mean%±S.D. per dam					
Male Day 0	6.43 ± 0.50	6.39 ± 0.37	6.55 ± 0.56	6.37 ± 0.51	6.82 ± 0.74
4	10.19 ± 0.80	10.02 ± 0.77	10.23 ± 1.15	10.13 ± 1.10	10.44 ± 1.62
Female Day 0	6.11 ± 0.45	6.07 ± 0.44	6.02 ± 0.48	6.04 ± 0.49	6.34 ± 0.67
4	9.66 ± 0.62	9.73 ± 0.88	9.48 ± 0.93	9.75 ± 1.04	9.90 ± 1.56

a) : (Number of implantation scars/number of corpora lutea)×100.

b) : (Number of dams with live pups/number of pregnant dams)×100.

c) : Number of male pups/number of female pups.

d) : (Number of live pups born/number of implantation scars)×100.

e) : (Number of pups born/number of implantation scars)×100.

f) : (Number of live pups born/number of pups born)×100.

g) : (Number of live pups on day 4/number of live pups born)×100.