

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate on Bacteria

要約

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

試験は、指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、S9 mix 非存在(直接法)および存在(代謝活性化法)下でプレインキュベーション法により行った。

156~5000 μg /プレートの範囲で濃度を設定して行った濃度設定試験では、直接法における TA98 および TA1537 の 5000 μg /プレートでのみ菌の生育阻害が認められ、2500 μg /プレートでは、両菌株とも復帰変異コロニー数の増加が認められた。したがって、本試験は、いずれの菌株においても 5000 μg /プレートを最高濃度とし、以下公比2で計6濃度を設定して行った。

試験を2回行った結果、直接法の TA1537 においてのみ 2500 μg /プレートで復帰変異コロニー数の増加が認められた。しかし、濃度依存性については明らかではなかった。また、直接法の TA98 において、2500 μg /プレート以上の濃度で復帰変異コロニー数の増加傾向が認められた。

そこで、この2菌株について、1000~5000 μg /プレートの範囲で濃度を設定(公差500)し、直接法における確認試験を行った。その結果、両菌株とも 3500 μg /プレート以上の濃度で生育阻害が認められた。TA1537 では 2500 および 3000 μg /プレートで復帰変異コロニー数の増加が認められ、濃度依存性傾向も認められた。TA98 では、復帰変異コロニー数の増加傾向は認められたものの、溶媒対照値の2倍を越えるものではなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートは、細菌に対し遺伝子突然変異を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹ および *E. coli* WP2 *uvrA*² の5菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で-80℃以下に凍結保存し

た。

試験に際して、各凍結菌株を解凍後、その30 μL をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の菌懸濁液は、濁度を測定し、濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり 1×10^9 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

2. 被験物質

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート(ロット番号K609415, 三洋化成工業(株)提供)は、無色透明の液体で、水、ジメチルスルホキシド(DMSO)およびアセトンに可溶であり、分子式 $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_2$ 、分子量157.24、純度99.9% [不純物として、ハイドロキノンモノメチルエーテル2000ppm(重合防止剤として添加)、ジメチルアミノエタノール0.1%以下、メチルメタクリレート0.02%以下を含む]の物質である。

実験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

3. 被験物質供試液の調製

溶媒に蒸留水(株大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製した。

4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

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

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9-AA : 9-アミノアクリジン(Aldrich Chemical Co.)

AF-2 および 2-AA は DMSO(株同仁化学研究所)に、SA および 9-AA は蒸留水(株大塚製薬工場)に溶解した。

5. 培地

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディア AN 培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。培地1 Lあたりの組成は下記のとおりであり、径90 mmのシャーレ1枚あたりに30 mLを分注

したものである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	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
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

2) アミノ酸添加軟寒天培地(トップアガー)

0.6%寒天粉末(Difco Laboratories)および0.5%塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、*S. typhimurium*用には0.5 mM D-ビオチンおよび0.5 mM L-ヒスチジン水溶液、*E. coli*用には0.5 mM L-トリプトファン水溶液を1/10容加え、トップアガーとした。

6. S9 mix

製造後6ヶ月以内のエームテスト用凍結S9 mix(キッコーマン(株))を購入し、使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

7. 試験方法

試験は、プレインキュベーション法で行った。

試験管に使用溶媒、被験物質供試液あるいは陽性対照物質溶液を0.1 mL入れ、次いで直接法では0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を0.5 mL、代謝活性化法ではS9 mixを0.5 mL加え、続いて試験菌液0.1 mLを分注し、37°Cで20分間振盪培養した。培養終了後、45°Cに保温したトップアガー2 mLを加えた混合液をプレート上に重層した。37°Cで48時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。プレートは、濃度設定試験では各濃度とも2枚、本試験では3枚を使用した。本試験は、同一濃度を用いて2回行った。

8. 結果の判定

結果の判定は、各濃度におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、以下の3基準を全て満たす場合を陽性とした。

- 1) 被験物質処理群において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
- 2) 被験物質濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する(濃度依存性)。
- 3) 2回にわたる本試験の結果から、復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

結果および考察

156~5000 μg /プレートの範囲で濃度を設定して行った濃度設定試験では、直接法におけるTA98およびTA1537の5000 μg /プレートでのみ菌の生育阻害が認め

られ、また、2500 μg /プレートでは両菌株とも溶媒対照と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められた。したがって、本試験における被験物質の処理濃度は、最高濃度を5000 μg /プレートとし、以下公比2で2500, 1250, 625, 313および156 μg /プレートとした。

本試験の結果(Tables 1~4)、直接法のTA1537株においてのみ2500 μg /プレートで溶媒対照値の2倍を越える復帰変異コロニー数の増加が認められたが、濃度依存性については明らかではなかった。また、直接法におけるTA98の2500 μg /プレート以上の濃度で復帰変異コロニー数の増加傾向が認められた。菌の生育阻害は、濃度設定試験と同様、TA98およびTA1537の5000 μg /プレートでのみ認められた。

そこで、この2菌株について2500 μg /プレートから菌の生育阻害が認められた5000 μg /プレート間に濃度依存性の復帰変異コロニー数の増加が認められるか否かを調べる目的で1000~5000 μg /プレートの範囲で濃度を設定(公差500)し、直接法による確認試験を行った。その結果(Table 5)、両菌株とも3500 μg /プレート以上の濃度で生育阻害が認められた。TA1537では、2500および3000 μg /プレートで溶媒対照値と比較して2倍以上の復帰変異コロニー数の増加が認められ、濃度依存性傾向も認められた。TA98においては、2000~3500 μg /プレートで復帰変異コロニー数の増加傾向が認められたものの、溶媒対照値の2倍を越えるものではなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定した。陽性結果が得られたので、変異原性の強さに関する相対的比較値である比変異活性値³⁾(誘発復帰変異コロニー数/mg)を算出したところ、本被験物質の比変異活性値は3.6/mgであった。

なお、類縁化合物である(ジメチルアミノ)エチルアクリラートの変異原性についても、*S. typhimurium*および*E. coli*を用いた復帰突然変異試験並びにCHL細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁴⁾と報告されており、エチルメタクリラートについては、*S. typhimurium*を用いた復帰突然変異試験で陰性⁵⁾、L5178Yマウスリンホーマ細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁶⁾、CHO細胞を用いた染色体異常試験では陰性⁷⁾および姉妹染色分体交換試験で陽性⁷⁾と報告されている。また、2-(ジメチルアミノ)エチル塩化物については、麦酒酵母菌を用いた復帰突然変異試験で陽性⁸⁾と報告されている。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173(1983).
- 2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," 1, Vol.3, eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.
- 3) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化審法毒性試験法の解説 改訂版," 化学工業日報社, 東京, 1992, p. 42.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化学物質毒性試験報告 Vol. 5" 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1997, pp. 595-604.
- 5) E. Zeiger, B. Anderson, S. Haworth, T. Lowlor, K. Mortelmans, W. Speck, *Environ. Mutagen.*, **9(suppl. 9)**, 1(1987).
- 6) M.M. Moore, A. Amtower, C.L. Doerr, K.H. Brock, K.L. Dearfield, *Environ. Mol. Mutagen.*, **11**, 49(1988).
- 7) "The Dictionary of Substances and their Effects," Vol.4, eds. by M.L. Richardson, S. Gangolli, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994, pp. 430-432.
- 8) F.K. Zimmermann, R.C. Borstel, E.S. Halle, J.M. Parry, D. Siebert, G. Zetterberg, R. Barale, N. Loprieno, *Mutat. Res.*, **133**, 199(1984).

連絡先

試験責任者：野田 篤
 試験担当者：野田 篤, 昆 尚美
 (財)畜産生物科学安全研究所
 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11
 Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)
 Naomi Kon
 Research Institute for Animal Science in
 Biochemistry and Toxicology
 3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi,
 kanagawa, 229-1132, Japan
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Results of reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate on bacteria (1st trial)
[direct method:-S9]

Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate															[Mean \pm S.D.]				
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
0	143	147	163	11	12	7	13	14	20	17	18	24	7	7	6	[151 \pm 11]	[10 \pm 3]	[16 \pm 4]	[20 \pm 4]	[7 \pm 1]
156	169	191	169	8	10	10	17	16	15	18	20	30	6	10	3	[176 \pm 13]	[9 \pm 1]	[16 \pm 1]	[23 \pm 6]	[6 \pm 4]
313	142	148	171	9	8	9	10	16	14	16	24	17	6	6	4	[154 \pm 15]	[9 \pm 1]	[13 \pm 3]	[19 \pm 4]	[5 \pm 1]
625	136	157	150	11	10	12	10	10	12	26	27	18	6	5	7	[148 \pm 11]	[11 \pm 1]	[11 \pm 1]	[24 \pm 5]	[6 \pm 1]
1250	172	181	178	8	10	8	12	17	19	19	17	24	7	6	8	[177 \pm 5]	[9 \pm 1]	[16 \pm 4]	[20 \pm 4]	[7 \pm 1]
2500	164	162	148	14	6	9	11	20	14	30	44	30	11	15	18	[158 \pm 9]	[10 \pm 4]	[15 \pm 5]	[35 \pm 8]	[15 \pm 4]
5000	170	171	165	8	8	8	17	19	18	19*	46*	37*	4*	3*	6*	[169 \pm 3]	[8 \pm 0]	[18 \pm 1]	[34 \pm 14]	[4 \pm 2]
Positive control	830	888	888**	361	315	320 ^b	895	933	941**	382	384	402 ^d	1014	794	1030**	[869 \pm 33]	[332 \pm 25]	[923 \pm 25]	[389 \pm 11]	[946 \pm 132]

*: Toxic effect was observed.

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN₃; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): AF-2, 0.04 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e): 9-AA; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 2 Results of reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate on bacteria (1st trial)
[activation method:+S9]

Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate															[Mean \pm S.D.]				
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537							
0	149	150	163	20	15	10	19	14	15	25	41	40	9	16	10	[154 \pm 8]	[15 \pm 5]	[16 \pm 3]	[35 \pm 9]	[12 \pm 4]
156	184	174	186	10	6	9	17	14	14	28	38	37	12	8	9	[181 \pm 6]	[8 \pm 2]	[15 \pm 2]	[34 \pm 6]	[10 \pm 2]
313	207	187	192	16	7	10	22	17	15	32	29	41	8	7	18	[195 \pm 10]	[11 \pm 5]	[18 \pm 4]	[34 \pm 6]	[11 \pm 6]
625	220	223	193	9	18	7	14	15	21	39	35	33	13	15	13	[212 \pm 17]	[11 \pm 6]	[17 \pm 4]	[36 \pm 3]	[14 \pm 1]
1250	216	221	223	15	14	11	16	14	14	35	42	48	14	17	13	[220 \pm 4]	[13 \pm 2]	[15 \pm 1]	[42 \pm 7]	[15 \pm 2]
2500	222	205	191	9	9	12	20	15	17	37	32	41	18	20	15	[206 \pm 16]	[10 \pm 2]	[17 \pm 3]	[37 \pm 5]	[18 \pm 3]
5000	242	214	216	13	9	9	20	17	25	52	54	37	20	17	14	[224 \pm 16]	[10 \pm 2]	[21 \pm 4]	[48 \pm 9]	[17 \pm 3]
Positive control	566	631	510*	205	201	180 ^b	958	982	988 ^c	301	258	265 ^c	85	80	103 ^b	[569 \pm 61]	[195 \pm 13]	[976 \pm 16]	[275 \pm 23]	[89 \pm 12]

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

Table 3 Results of reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate on bacteria (2nd trial)
[direct method: -S9]

Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	109	135	141	13	10	8	18	16	17	21	32	26	6	7	5
	[128 \pm 17]			[10 \pm 3]			[17 \pm 1]			[26 \pm 6]			[6 \pm 1]		
156	107	119	103	13	7	8	25	16	15	26	19	11	6	9	6
	[110 \pm 8]			[9 \pm 3]			[19 \pm 6]			[19 \pm 8]			[7 \pm 2]		
313	120	112	151	7	14	7	22	13	20	29	18	20	6	6	10
	[128 \pm 21]			[9 \pm 4]			[18 \pm 5]			[22 \pm 6]			[7 \pm 2]		
625	132	133	130	16	10	7	19	14	18	27	16	31	6	9	6
	[132 \pm 2]			[11 \pm 5]			[17 \pm 3]			[25 \pm 8]			[7 \pm 2]		
1250	128	110	130	6	11	6	21	11	14	26	15	27	7	5	11
	[123 \pm 11]			[8 \pm 3]			[15 \pm 5]			[23 \pm 7]			[8 \pm 3]		
2500	121	110	110	10	6	11	17	12	12	38	38	42	18	14	13
	[114 \pm 6]			[9 \pm 3]			[14 \pm 3]			[39 \pm 2]			[15 \pm 3]		
5000	139	128	147	7	13	4	17	22	19	33*	54*	27*	1*	4*	2*
	[138 \pm 10]			[8 \pm 5]			[19 \pm 3]			[38 \pm 14]			[2 \pm 2]		
Positive control	872	857	845 ^a	354	340	317 ^b	976	913	993 ^c	413	432	372 ^d	946	982	964 ^e
	[858 \pm 14]			[337 \pm 19]			[961 \pm 42]			[406 \pm 31]			[964 \pm 18]		

*: Toxic effect was observed.

a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$
c) : AF-2, 0.04 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) : AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ e) : 9-AA; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 4 Results of reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate on bacteria (2nd trial)
[activation method: +S9]

Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	111	119	136	11	8	13	16	17	17	30	44	36	19	21	18
	[122 \pm 13]			[11 \pm 3]			[17 \pm 1]			[37 \pm 7]			[19 \pm 2]		
156	143	140	139	14	7	14	23	19	13	29	34	41	20	18	16
	[141 \pm 2]			[12 \pm 4]			[18 \pm 5]			[35 \pm 6]			[18 \pm 2]		
313	132	120	139	11	14	6	18	14	17	48	43	30	20	11	22
	[130 \pm 10]			[10 \pm 4]			[16 \pm 2]			[40 \pm 9]			[18 \pm 6]		
625	147	123	142	16	11	13	13	25	14	39	29	37	14	24	20
	[137 \pm 13]			[13 \pm 3]			[17 \pm 7]			[35 \pm 5]			[19 \pm 5]		
1250	139	160	147	12	8	9	22	20	19	25	44	34	18	16	14
	[149 \pm 11]			[10 \pm 2]			[20 \pm 2]			[34 \pm 10]			[16 \pm 2]		
2500	133	117	151	9	9	11	17	20	17	34	46	40	16	16	19
	[134 \pm 17]			[10 \pm 1]			[18 \pm 2]			[40 \pm 6]			[17 \pm 2]		
5000	153	175	149	9	9	14	23	20	21	38	58	32	24	27	29
	[159 \pm 14]			[11 \pm 3]			[21 \pm 2]			[43 \pm 14]			[27 \pm 3]		
Positive control	513	555	637 ^a	197	175	161 ^b	920	981	971 ^c	351	375	390 ^d	100	88	82 ^e
	[568 \pm 63]			[178 \pm 18]			[957 \pm 33]			[372 \pm 20]			[90 \pm 9]		

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

Table 5 Results of reverse mutation test of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate on bacteria (Confirmative test) [direct method: -S9]

Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertant colonies per plate			[Mean±S.D.]					
	TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98			TA1537		
0	-	-	-	26	23	25	5 4 5		
				[25 ± 2]			[5 ± 1]		
1000	-	-	-	25	23	22	8 8 5		
				[23 ± 2]			[7 ± 2]		
1500	-	-	-	22	23	33	9 11 7		
				[26 ± 6]			[9 ± 2]		
2000	-	-	-	33	36	30	8 7 9		
				[33 ± 3]			[8 ± 1]		
2500	-	-	-	52	42	39	12 11 16		
				[44 ± 7]			[13 ± 3]		
3000	-	-	-	36	47	42	13 11 21		
				[42 ± 6]			[15 ± 5]		
3500	-	-	-	28*	29*	46*	7* 9* 6*		
				[34 ± 10]			[7 ± 2]		
4000	-	-	-	17*	22*	16*	5* 4* 3*		
				[18 ± 3]			[4 ± 1]		
4500	-	-	-	15*	7*	10*	3* 3* 4*		
				[11 ± 4]			[3 ± 1]		
5000	-	-	-	10*	15*	17*	3* 8* 4*		
				[14 ± 4]			[5 ± 3]		
Positive control	-	-	-	343	393	358 ^{a)}	933 962 905 ^{b)}		
				[365 ± 26]			[933 ± 29]		

*: Toxic effect was observed. -: Not tested.

a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 0.1 μg/plate

b) : 9-AA; 9-Aminoacridine, 80 μg/plate

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの 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-(Dimethylamino)ethyl methacrylate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートの染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL)を用いて *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、細胞増殖抑制試験を行った結果、連続処理法の場合は、24時間および48時間処理でそれぞれ625および313 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、短時間処理法の場合は、S9 mix非存在および存在下でそれぞれ800および1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で、50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。したがって、染色体異常試験における濃度は、連続処理法の場合20, 39, 78, 156, 313および625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法の場合200, 400, 600, 800, 1400および1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

試験の結果、連続処理法では、24時間および48時間処理ともに最高濃度の625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (出現頻度88.5および76.5%)で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。短時間処理法においては、S9 mix非存在下で細胞に対する毒性のため観察可能な分裂中期像が認められなかった高濃度を除く200~600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (出現頻度6.5, 49.5, 87.5%)で、また、S9 mix存在下では、800~1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (出現頻度13.5, 99.5, 100%)で濃度依存的な染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。

以上の成績から、本実験条件下において、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートは、CHL細胞に対し染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL)〔国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部(元: 国立衛生試験所 変異原性部)から昭和60年1月13日入手〕を使用した。供試細胞は、浮遊細胞液に10%の割合でジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業(株))を添加し、液体窒素条件下で保存しておいたものを培養液に戻し、解凍後の継代数が6回までのものを使用した。

2. 培養液

Eagle-MEM粉末培地(Gibco Laboratories)を常法に従い調製し、これに非働化仔牛血清(Gibco Laboratories)を10%の割合で添加したものをを用いた。

3. 培養条件

4×10^3 個/mLの細胞を含む培養液5 mLをシャーレ(径6 cm, Becton Dickinson Co.)に加え、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。

連続処理法では、培養開始3日後に被験物質供試液を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理法では、培養開始3日後にS9 mix非存在および存在下で6時間処理し、処理終了後、新鮮培養液でさらに18時間培養した。

4. S9 mix

製造後6ヶ月以内の染色体異常試験用凍結S9 mix(キッコーマン(株))を購入し、使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンと投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

5. 被験物質

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート(ロット番号K609415, 三洋化成工業(株)提供)は、無色透明の液体で、水、DMSOおよびアセトンに可溶であり、分子式C₈H₁₅NO₂、分子量157.24、純度99.9%〔不純物として、ハイドロキノンモノメチルエーテル2000 ppm(重合防止剤として添加)、ジメチルアミノエタノール0.1%以下、メチルメタクリレート0.02%以下を含む〕の物質である。

実験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質供試液の調製

溶媒に蒸留水(株)大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製し、そのシャーレ内への添加量は培養液量の10%(v/v)とした。

7. 細胞増殖抑制試験

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。0.1%クリスタルバイオレット水溶液で染色した細胞の密度を単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリジナル光学工業(株))を用いて測定し、溶媒対照群の細胞増殖率を100%とした時の各濃度群の細胞増殖率を求めた。

その結果(Appendix 1, 2), 連続処理法の場合は、24

時間処理では625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は313~625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間にあるものと判断された。48時間処理では156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で50%細胞増殖抑制が認められ、313 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。短時間処理法の場合は、S9 mix非存在および存在下でそれぞれ800および1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、それぞれ600~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間および1400~1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間にあるものと判断された。

Appendix 1 Cell growth inhibition test of CHL cells continuously treated with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate without S9 mix

Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Average cell growth rate (%)	
	24-hour treatment	48-hour treatment
0(Solvent)	100	100
78	66.0	62.5
156	61.5	50.0
313	58.0	39.0
625	26.5	20.5
1250	12.0	3.5
2500	10.0	3.0
5000	8.0	2.5

Appendix 2 Cell growth inhibition test of CHL cells treated with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate with and without S9 mix

Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Average cell growth rate (%)	
	without S9 mix	with S9 mix
0(Solvent)	100	100
600	56.5	81.0
800	41.5	70.5
1000	28.0	70.5
1200	18.0	70.5
1400	16.5	57.5
1600	11.5	43.5
1800	17.5	33.0

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果から、染色体異常試験における被験物質の濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の前後が含まれ、かつ3濃度以上のデータが得られることを考慮して、連続処理法では625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度とし、以下公比2で計6濃度を設定した。短時間処理法においては1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (約10 mM)を最高濃度とし、以下公比2で4濃度、並びにS9 mix非存在および存在下で50%をやや

上回る細胞増殖率を示した600および1400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ も設定し、計6濃度とした。対照として、溶媒対照群と陽性対照群を設けた。

陽性対照として、連続処理法ではN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG, Sigma Chemical Co.)を2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法では3,4-benzo [a] pyrene(B [a] P, Sigma Chemical Co.)を10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で用いた。陽性対照物質の溶媒には、いずれもDMSO(和光純薬工業(株))を使用した。

9. 染色体標本の作製

培養終了2時間前にコルセミド(Gibco Laboratories)を最終濃度として0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。トリプシン処理で細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.4%ギムザ液で約15分間染色した。スライド標本は、各シャーレにつき3枚作製した。

10. 染色体の観察

各シャーレ当たり100個、すなわち、1濃度当たり2シャーレ、200個の分裂中期像を、総合倍率600倍の顕微鏡下で観察した。標本は全てコード化し、盲検法で観察を行った。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(MMS)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と倍数性細胞(Polyploid)の有無について観察した。

11. 記録と判定

観察した細胞数、構造異常の種類と数および倍数性細胞の数について集計し、構造異常を有する細胞については、ギャップのみを有する細胞を含めた場合(+g)と含めない場合(-g)とに区別して記録した。

ギャップを含めた染色体構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度について、多試料 χ^2 検定を行い有意差(有意水準5%以下)が認められた場合は、フィッシャーの直接確率法を用いて溶媒対照群と各濃度群との間の有意差検定(有意水準は多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた)を行った。

その結果、溶媒対照群と比較して、被験物質による染色体異常細胞の出現頻度が2濃度以上で有意に増加し、かつ濃度依存性あるいは再現性が認められた場合、陽性と判定した。

結果および考察

連続処理法による結果をTable 1に示した。24時間および48時間処理ともに、最高濃度の625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でのみ染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度88.5および76.5%)が認められた。倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理法による結果をTable 2に示した。S9 mix非存在下では、200~600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で濃度依存的かつ有意な染色体構造異常細胞の増加(出現頻度6.5, 49.5, 87.5%)が認められた。S9 mix存在下では、800~1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で濃度依存的な染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度13.5, 99.5, 100%)が認められた。S9 mix非存在および存在下ともに、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。なお、短時間処理法S9 mix非存在下の800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では、被験物質の細胞に対する毒性のため、観察可能な分裂中期像が認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートのCHL細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。本試験結果は、CHL細胞において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が10%以上を陽性とする生物学的判定基準²⁾からみても明らかに陽性を示すものであった。陽性結果が得られたため、 D_{20} 値³⁾(分裂中期像の20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の濃度)を算出したところ、連続処理法では妥当と考えられる D_{20} 値は得られず、短時間処理法において算出された0.19 mg/mLを本被験物質の D_{20} 値とした。

なお、類縁化合物である(ジメチルアミノ)エチルアクリラートの変異原性についてもCHL細胞を用いた染色体異常試験並びに*Salmonella typhimurium*および*Escherichia coli*を用いた復帰突然変異試験で陽性⁴⁾と報告されており、エチルメタクリラートについては、*S.typhimurium*を用いた復帰突然変異試験で陰性⁵⁾、L5178Yマウスリンホーマ細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁶⁾、CHO細胞を用いた染色体異常試験では陰性⁷⁾および姉妹染色分体交換試験で陽性⁸⁾と報告されている。また、2-(ジメチルアミノ)エチル塩化物については、麦酒酵母菌を用いた復帰突然変異試験で陽性⁹⁾と報告されている。

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, pp.16-37.
- 2) 石館基監修, “改定増補 染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p.19.
- 3) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, “化審法毒性試験法の解説 改訂版,” 化学工業日報社, 東京, 1992, pp.51-52.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, “化学物質毒性試験報告 Vol. 5,” 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1997, pp.595-604.
- 5) E. Zeiger, B. Anderson, S. Haworth, T. Lowlor, K. Mortelmans, W. Speck, *Environ. Mutagen.*, **9**(suppl. 9), 1(1987).
- 6) M.M. Moore, A. Amtower, C.L. Doerr, K.H. Brock, K.L. Dearfield, *Environ. Mol. Mutagen.*, **11**, 49(1988).

- 7) “The Dictionary of Substances and their Effects,” Vol.4, eds. by M.L. Richardson, S. Gangolli, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994, pp.430-432.
- 8) F.K. Zimmermann, R.C. Borstel, E.S. Halle, J.M. Parry, D. Siebert, G. Zetterberg, R. Barale, N. Loprieno, *Mutat. Res.*, **133**, 199(1984).

連絡先

試験責任者: 野田 篤
 試験担当者: 野田 篤, 昆 尚美
 (財)畜産生物科学安全研究所
 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11
 Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)
 Naomi Kon
 Research Institute for Animal Science in
 Biochemistry and Toxicology
 3-7-11 Hashimoto-dai, Sagami-hara-shi,
 Kanagawa, 229-1132, Japan
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate without S9 mix

Group	Concentration (μg/mL)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0	--	--
DAEM	20	24	200	3	0	0	0	0	0	3	0 (0)	3 (1.5)	0.5	-	-
	39	24	200	0	0	1	0	1	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0	-	-
	78	24	200	0	1	1	0	0	0	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0	-	-
	156	24	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.5	-	-
	313	24	200	0	1	0	1	2	0	4	4 (2.0)	4 (2.0)	0	-	-
	625	24	200	22	119	131	42	0	0	314	173 (86.5)	177 (88.5)**	0	+	-
MNNG	2.5	24	200	11	32	185	7	0	0	235	188 (94.0)	189 (94.5)**	0	+	-
Solvent	0	48	200	1	0	1	0	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0	--	--
DAEM	20	48	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0	-	-
	39	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0 (0)	1 (0.5)	0	-	-
	78	48	200	2	0	0	1	1	0	4	2 (1.0)	4 (2.0)	0	-	-
	156	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0	-	-
	313	48	200	1	0	0	0	2	0	3	2 (1.0)	3 (1.5)	0	-	-
	625	48	200	21	61	123	46	0	0	251	148 (74.0)	153 (76.5)**	0	+	-
MNNG	2.5	48	200	11	39	136	25	17	0	228	159 (79.5)	159 (79.5)**	1.0	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, DAEM: 2-(Dimethylamino) ethyl methacrylate, MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 1) Distilled water was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample χ^2 test was done at $p < 0.05$, and then Fisher's exact test was done at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.
 **: Significantly different from solvent group data at $p < 0.01$ by Fisher's exact test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate with and without S9 mix

Group	Concentration (μg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0	--	--
DAEM	200	-	6-(18)	200	1	1	6	0	6	0	14	13 (6.5)	13 (6.5)**	1.0	+	-
	400	-	6-(18)	200	18	23	86	6	0	0	133	92 (46.0)	99 (49.5)**	0.5	+	-
	600	-	6-(18)	200	28	115	141	21	0	0	305	172 (86.0)	175 (87.5)**	0.5	+	-
	800	-	6-(18)	Toxic												
	1400	-	6-(18)	Toxic												
	1600	-	6-(18)	Toxic												
BP	10	-	6-(18)	200	1	1	2	0	0	0	4	3 (1.5)	4 (2.0)	0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	1.0	--	--
DAEM	200	+	6-(18)	200	0	0	0	0	2	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0	-	-
	400	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0 (0)	0	-	-
	600	+	6-(18)	200	1	1	3	0	2	0	7	6 (3.0)	7 (3.5)	0.5	-	-
	800	+	6-(18)	200	2	2	24	0	2	0	30	26 (13.0)	27 (13.5)**	1.5	+	-
	1400	+	6-(18)	200	13	146	194	45	0	0	398	199 (99.5)	199 (99.5)**	0	+	-
	1600	+	6-(18)	84	6	60	81	21	0	0	168	84 (100)	84 (100)**	0	+	-
BP	10	+	6-(18)	200	9	11	112	4	2	0	138	116 (58.0)	117 (58.5)**	0	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, DAEM: 2-(Dimethylamino) ethyl methacrylate, BP: benzo[a]pyrene
 1) Distilled water was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample χ^2 test was done at $p < 0.05$, and then Fisher's exact test was done at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.
 **: Significantly different from solvent group data at $p < 0.01$ by Fisher's exact test.

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリラートのラットを用いる 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-(Dimethylamino)ethyl methacrylate by Oral Administration in Rats

要約

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートは、共重合による合成樹脂の接着性、染色性などの改善に用いられる他、凝集材、制電剤イオン交換樹脂、塗料用樹脂などのカチオン性モノマー、潤滑油および燃料油添加剤の原料として使用されている。毒性に関する情報としては、ラットの経口投与による最小致死量は2000 mg/kg以上で、前胃に刺激性を示唆する病理変化を起こすことが報告されている。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、SDラット(1群雌雄各12匹)に40、200および1000 mg/kgの用量を交配前14日から交配を経て雄は計43日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育3日まで経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

1. 反復投与毒性

1000 mg/kg群において、雄で投与開始後36日以降、雌で31日以降に攣縮、挙尾、間代性痙攣が散見された。また、雌雄で体重増加抑制、雌で3例の死亡および授乳期間の摂餌量減少が認められた。病理学検査では、雌雄で脳および脊髄の神経線維の変性、前胃壁の肥厚、粘膜上皮の増生、水腫および炎症性細胞浸潤、雌で胸腺の萎縮が認められた。この他、雌雄の腎臓および雄の肝臓、雌の副腎の重量が増加を示したが、組織変化は認められなかった。また、雄の血液生化学検査では、尿素窒素の上昇、血液学検査では赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の減少、網状赤血球比の増加などの貧血性変化、白血球数および分葉核球数の増加が認められた。

200 mg/kg群においても雄でヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の減少が認められた。

2. 生殖発生毒性

親動物の交尾率、受胎率、黄体数、着床数、着床率、分娩率、出産率、妊娠期間および分娩には被験物質に起因する変化は認められなかった。哺育期間の観察では、1000 mg/kg群の母動物3例で全新生児死亡が認められた。新生児の検査では、1000 mg/kg群で低体重および4日生存率の低下が認められた。出産児数、出生率、性比、出生率、外表、一般状態および剖検では被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリ

ラートの反復投与毒性に関する無影響量は雄が40 mg/kg/day、雌が200 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、親動物に対して雄が1000 mg/kg/day、雌が200 mg/kg/day、児動物に対しては200 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート(三洋化成工業株, Lot No. K609415, 純度99.9%)は、融点-30℃、沸点182~192℃、比重0.936、水、アセトンおよびDMSOに溶けやすい、アミン臭のある無色透明の液体である。被験物質は室温・暗所・密閉で保管した。また、試験期間中安定であったことが確認された。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)から入手した雌雄のSDラット[Crj:CD(SD)IGS]を6日間検疫・馴化後、試験に供した。投与開始前日に体重別層化無作為抽出法により、1群につき雌雄各12匹を振り分けた。投与開始時の週齢は雌雄とも9週齢、体重範囲は雄が325~360 g、雌が191~242 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中、温度22±2℃、湿度55±15%、換気約12回/時、照明12時間/日(7:00~19:00)に設定した飼育室を使用した。動物は実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに、群分け後は1匹、交配期間は雌雄各1匹、哺育期間は1腹で収容し、飼育した。

動物には、オートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1:オリエンタル酵母工業(株))および5 μmのフィルターで濾過後、紫外線照射した水道水をそれぞれ自由摂取させた。

3. 投与量および投与方法

SDラットの雌雄を用いて、被験物質を30、100、300および1000 mg/kgの用量で14日間経口投与した結果、1000 mg/kg群の雄で体重減少、雌で体重増加抑制、雌雄で前胃粘膜の肥厚が認められた。以上の結果から、本試験では高用量を1000 mg/kgとし、以下公比5で中用量を200 mg/kg、低用量を40 mg/kgとした。また、媒体(コーン油)のみを投与する対照群を設けた。

投与期間は、雌雄とも交配前14日間、交配期間、お

よび雄は剖検前日までの計43日間、雌は交尾成立後、妊娠、分娩を経て哺育3日まで(41~52日間)とし、プラスチック製胃ゾンデを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与量は5 mL/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。

被験物質はコーン油に溶解させ、投与に供するまで冷蔵保存し、調製後8日以内に使用した。投与開始前に投与液中の被験物質の安定性および濃度を確認した。

4. 反復投与毒性に関する観察・検査

1) 一般状態

全例について生死、外観、行動等を投与前および投与後に毎日観察した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。

2) 体重および摂餌量

体重は、雌雄とも投与開始日、投与開始後3, 7, 14日、およびその後週1回、交尾した雌は妊娠0, 7, 14, 20日および哺育0, 4日に測定した(交尾確認日を妊娠0日、分娩確認日を哺育0日とする)。また、雄では投与開始日の体重を基準に、雌では交配前期間、妊娠期間、哺育期間をそれぞれ投与開始日、妊娠0日、哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定した。

3) 雄の尿検査

解剖日の2日前に各群6匹の新鮮尿を採取し、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲン(試験紙法、マルティステックス:マイルス・三共(株))を尿分析器(クリニテック100:マイルス・三共(株))により測定し、尿沈渣(Sternheimer-Malbin染色標本)を検査した。また、約21時間蓄尿について、尿量を計量し、比重(屈折法)を尿比重計(ユリコン-S:株アタゴ)により測定した。

4) 雄の血液学検査

雄の全生存動物について、解剖日の前日から約21時間絶食させ、チオペンタールナトリウム(ラボナール:田辺製薬(株))の腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採取した血液の一部をEDTA-2Kにより凝固阻止し、赤血球数(シースフローDCインピーダンス検出法)、白血球数(RF/DCインピーダンス検出法)、血小板数(シースフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度(SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500:東亜医用電子(株))、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A:オムロン(株))、網状赤血球数(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網赤血球測定装置(R-2000:東亜医用電子(株))により測定した。また、検査結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

5) 雄の血液生化学検査

雄の全生存動物について、解剖日に採取した血液を室温で約30分間静置後遠心分離し、得られた血清についてGOT(SSCC改良法)、GPT(SSCC改良法)、 γ -GTP(SSCC改良法)、ALP(GSCC改良法)、総ビリルビン(Jendrassik改良法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、グルコース(GK-G6PDH法)、総コレステロール(CES-CO-POD法)、トリグリセライド(LPL-GK-G3PO-POD法)、総蛋白(Biuret法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(UV法)、ナトリウム、カリウム、クロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(日立736-10形:株日立製作所)により測定した。また、採取した血液の一部をヘパリン(リチウム塩)処理後遠心分離し、得られた血漿についてLDH(SSCC改良法)を自動分析装置(COBAS FARA II:F. Hoffmann La Roche & Co.)により測定した。

6) 病理学検査

雌雄とも最終投与日の翌日に、全生存動物についてチオペン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の切断・放血により安楽死させて剖検し、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体の重量を測定した。また、解剖日の体重を基に相対重量(対体重比)を算出した。さらに、これらの器官に加えて、眼球およびハーダー腺、唾液腺(下顎・舌下)、リンパ節(下顎・腸間膜)、上皮小体、気管、肺、食道、胃、腸管(十二指腸~直腸)、膵臓、膀胱、前立腺腹葉、精のう、卵巣、子宮、膣、骨髄(胸骨・大腿骨)、坐骨神経、脊髄、乳腺および肉眼的異常部位を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定後保存した。ただし、死亡例以外の眼球およびハーダー腺はダビドソン液、精巣および精巣上体はブアン液で固定した。

病理組織学検査は雌雄の対照群および1000 mg/kg群の脳、下垂体、甲状腺、胸腺、気管、肺、胃、腸管、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、膵臓、膀胱、骨(胸骨・大腿骨)、骨髄(胸骨・大腿骨)、リンパ節(下顎・腸間膜)、坐骨神経、脊髄、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、精のう、卵巣、子宮、膣、雌の乳腺ならびに全動物の肉眼的異常部位について、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検した。その結果、雌雄とも脳、脊髄、胃および胸腺で被験物質に起因する変化が認められたので、40および200 mg/kg群のこれらの器官についても検査した。なお、この他に雄の40および200 mg/kg群の前立腺および精のうも検査した。

5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

1) 生殖機能

交配前の投与期間終了後、各群内で雄1雌1の交配対を設け、最長14日間昼夜同居させ、毎日午前中に雌の膣垢を採取し、ギムザ染色して鏡検した。膣垢形成あるいは膣垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立と

し、その日を妊娠0日とした。交尾した対は雌雄を分離し、以後の検査に供した。これらの結果から、交尾所要日数(交配開始後、交尾成立までに要した日数)、交尾成立までに逸した発情期の回数、交尾率〔(交尾動物数/同居動物数)×100〕、受胎率〔(受胎動物数/交尾動物数)×100〕を算出した。

2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ、分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が完了している動物を当該日分娩とし、その日を哺育0日とした。その後、新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。

母動物は、哺育4日の剖検時に卵巣、子宮を摘出し、黄体数および着床数を検査した。分娩しない雌は交尾確認後26日に剖検し、肉眼的に着床が認められない動物の子宮は10%硫化アンモニウム水溶液に浸漬して着床の有無を確認した。また、全新生児が死亡した母動物はその時点で剖検した。これらの結果から、妊娠期間(妊娠0日から出産が確認された日までの期間)、出産率〔(生児出産雌数/受胎雌数)×100〕、着床率〔(着床数/黄体数)×100〕、分娩率〔(総出産児数/着床数)×100〕を算出した。

3) 新生児の観察・検査

(1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数(出産生児数、死産児数)、性別および外表異常の有無を検査した。その後、一般状態、死亡の有無を哺育4日まで毎日観察した。哺育0および4日の生存児数から出生率〔(出産生児数/総出産児数)×100〕、新生児の4日生存率〔(哺育4日生児数/出産生児数)×100〕を算出した。

(2) 体重

哺育0および4日に全生存児を個体ごとに測定した。また、哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。

(3) 剖検

哺育4日に全生存児の口腔を含む外表を検査した後、親動物と同様にして安楽死させ、剖検した。死亡動物は食殺等で検査に耐えないものを除き、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬・固定後、実体顕微鏡下で剖検した。

6. 統計解析

計量データについては、パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い、分散が一樣の場合は一元配置分散分析を行った。分散が一樣でない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意な差が認められた場合はDunnnett法またはDunnnett型の多重比較を行った。計数データのうち、尿検査の定性所見および病理組織所見は $a \times b$ の χ^2 検定を行い、有意差が認められた場合はArmitageの χ^2 検定により対照群と各被験物質投与群間

の比較を行った。その他の計数データはFisherの直接確率法により検定した。有意水準は5%とし、新生児に関するデータは各母動物ごとに算出した平均値を標本単位とした。なお、1000 mg/kg群の雄1例は投与開始後25日に上切歯を破損し、体重増加不良を示したため、生殖機能検査以外の以後のデータを集計から除外した。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡動物

1000 mg/kg群の雌で、投与開始後2、6および38日(妊娠23日)にそれぞれ1例が死亡した。投与初期の死亡例には、死亡1~2日前にラッセル音、自発運動低下、呼吸困難あるいは不整呼吸などが認められた。また、妊娠後期の死亡例には投与開始後31日(妊娠16日)から攣縮および挙尾が死亡前日まで観察された。

この他、対照群の雌1例が妊娠23日に分娩を開始したが、体温低下および蒼白を示して翌日に死亡した。

2) 一般状態

1000 mg/kg群で、攣縮および挙尾が、雄で投与開始後36日、雌で31日からそれぞれ4および3例で認められ、さらに一部の動物には間代性痙攣あるいは不整呼吸が観察された。これらの症状は、投与時の保定などの刺激により発症し、数分間持続した後消失した。また、投与直後の流涎が雌雄で投与開始後7日から認められた。一部には投与前から発症する動物もみられ、投与終了時までには雌雄ともほぼ全例で観察された。

200 mg/kg群では、雌で同様の流涎が投与開始後14日に4例で観察された。

その他、軟便、紅涙、脱毛が各群で散見されたが、1000 mg/kg群で多発する傾向がみられなかったことから、被験物質との関連はないと判断した。

3) 体重(Fig.1,2)

1000 mg/kg群の雌で、体重増加量が妊娠7および14日に有意な低値を示し、その後も哺育4日まで体重および増加量とも低値で推移した。また、雄でも有意差は認められなかったものの、交配以後の体重は低値傾向を示した。

その他、200 mg/kg群の雄の体重増加量が投与開始後41日に有意な高値を示したが、1000 mg/kg群では増加傾向はなく、偶発変化と判断した。

4) 摂餌量

1000 mg/kg群の雌で、投与開始後7および14日に有意な高値を、哺育4日に有意な低値を示した。

雄では対照群と被験物質投与群との間に有意な変化は認められなかった。

5) 雄の尿検査

1000 mg/kg群で尿量が有意な高値を示したが、生理

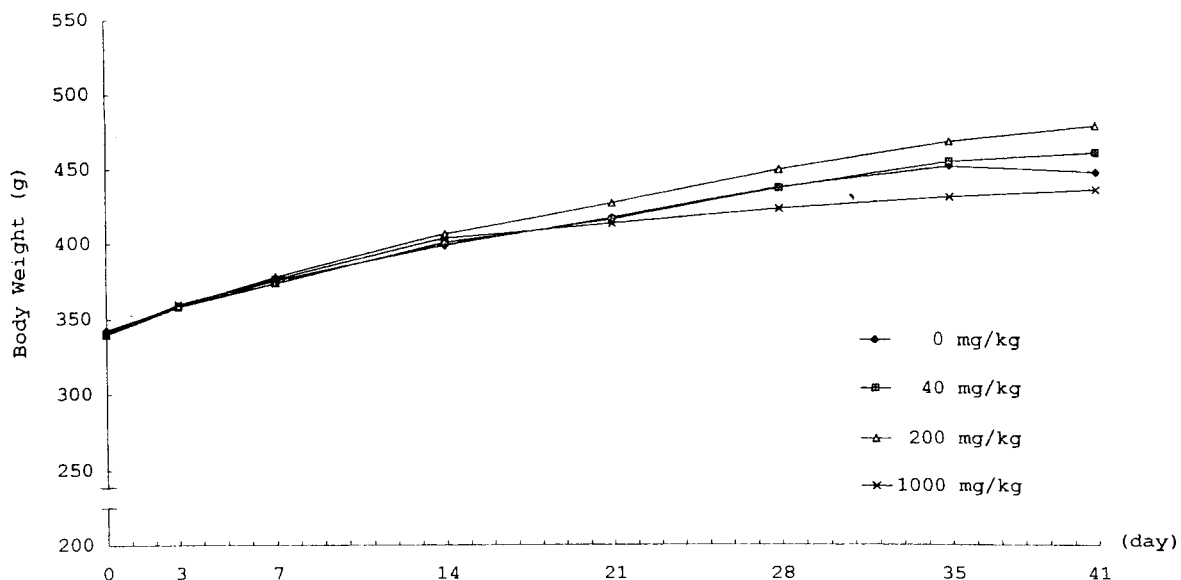


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

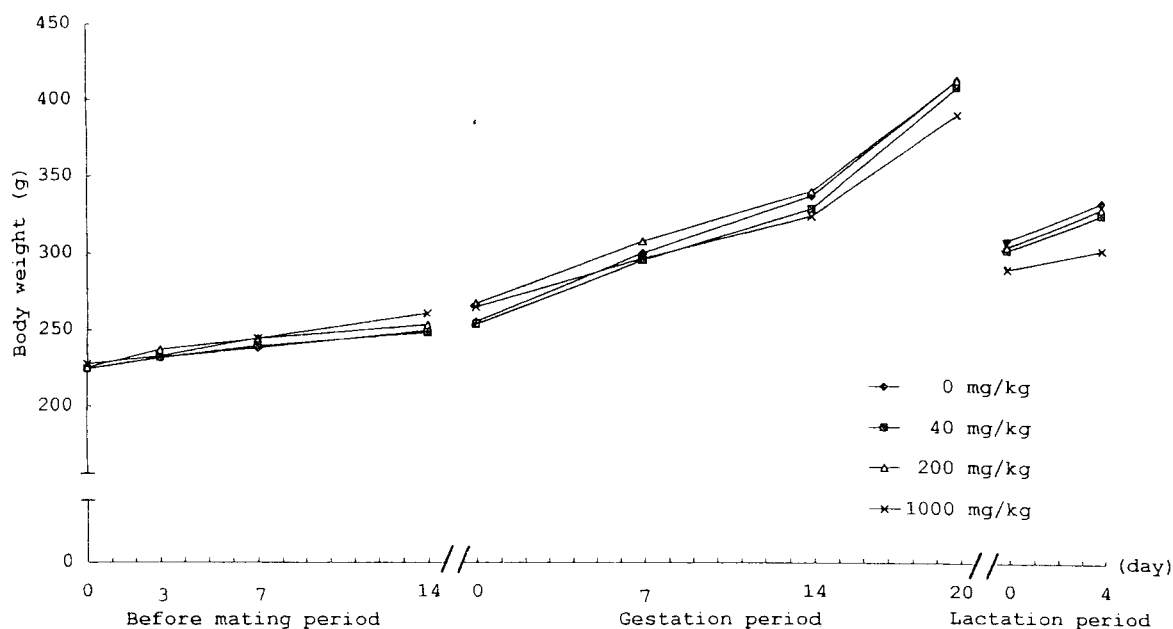


Fig. 2 Body weight changes of female rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

的変動範囲内の値であったことから、偶発的な変化と判断した。その他の検査項目には有意な変化は認められなかった。

6) 雄の血液学検査 (Table 1)

200 mg/kg以上の群でヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値が有意な低値を、網状赤血球比が有意な高値を、1000 mg/kg群で赤血球数、平均赤血球容積および平均赤血球色素量が有意な低値を示した。また、1000 mg/kg群で白血球数が有意な高値を、白血球百分率ではリンパ球が有意な低値を示し、実数換算値で分葉核球数の有意な増加が認められた。なお、同群の単球数も有意な高値を示したが、百分率では有意差は認められず、生理的変動範囲内の値であった。

7) 雄の血液生化学検査 (Table 2)

1000 mg/kg群で尿素窒素が有意な高値を示した。その他、ナトリウムが有意な低値を示したが、生理的変動範囲内の値であったことから、偶発的な変化と判断した。その他の検査項目には有意な変化は認められなかった。

8) 器官重量 (Table 3)

雄では、1000 mg/kg群で肝臓および腎臓の相対重量が有意な高値を示し、絶対重量でも高値の傾向がみられた。また雌では、1000 mg/kg群で副腎の絶対重量および相対重量、腎臓の相対重量が有意な高値を示した。

この他、1000 mg/kg群で雄の脳および精巣上体の絶対重量が有意な低値を、雌の心臓の相対重量が有意な高値を示したが、相対重量あるいは絶対重量では明確な変化はみられなかったことから、体重増加抑制が反映したものと考えられた。また、200 mg/kg群で雄の胸腺の絶対重量が有意な高値を示したが、1000 mg/kg群では同様の変化は認められなかったことから、偶発変化と判断した。

9) 剖検所見

前胃壁の肥厚が1000 mg/kg群の雄の全例、雌では死亡例を含めて10例に認められた。肥厚した前胃粘膜の表面は粗造であった。この他、1000 mg/kg群の雌の死亡例では全例に肺水腫が認められた他、脾臓の小型化、心房拡張、肝臓のうっ血、腺胃の潰瘍、腺胃粘膜の充血、副腎の腫大および胃腸管の鼓張などが観察された。

対照群の雌の死亡例では子宮および胸腺の出血が認められた。また、全新生児が死亡した母動物では、1000 mg/kg群の1例で胸腺の小型化、子宮および膈の出血、200 mg/kg群の1例で腎臓の褪色、脾臓の褐色化および腫大が認められた。

この他、対照群を含む各群で種々の変化が認められたが、いずれも1例のみであったことから偶発所見と判断した。

10) 組織所見 (Table 4)

被験物質に起因する変化が雌雄の脳、脊髄、前胃およ

び雌の胸腺で認められた。脳では、橋の赤核脊髄路領域の神経線維の変性が1000 mg/kg群の雄3例、雌4例で左右対称性に観察された。脊髄でも、背側後脊髄小脳路の神経線維の変性が1000 mg/kg群の雄8例、雌6例で左右対称性に観察され、雌雄とも発現頻度に有意差が認められた。前胃では、粘膜上皮の増生が1000 mg/kg群で死亡例も含めて雌雄全例(死後変化の著しい投与開始後2日の死亡例を除く)で認められた。多くの例ではさらに増生した粘膜の下織に水腫と炎症性細胞浸潤を伴っており、発現頻度に有意差も認められた。雌の胸腺では、萎縮が対照群、40、200および1000 mg/kg群でそれぞれ2、0、2および6例に認められ、有意差は認められなかったものの、1000 mg/kg群で高頻度に発現した。これらのうち、1000 mg/kg群の6例中5例は死亡動物あるいは全新生児が死亡した母動物であった。

1000 mg/kg群の雌の死亡例では、肺の水腫が全例、脾臓の白脾髄の萎縮が2例、下顎および腸間膜リンパ節のリンパ小節の萎縮が1例に認められた。

対照群の死亡例では子宮と胸腺に出血が認められ、子宮の大量出血が原因で衰弱し、死亡したものと考えられた。

この他、対照群を含む各群で種々の変化が認められたが、自然発生性に認められる変化であり、1000 mg/kg群で多発する傾向はみられなかったことから、偶発所見と判断した。

2. 生殖発生毒性

1) 生殖機能 (Table 5)

未交尾動物は200 mg/kg群で1対観察されただけで、ほとんどの交配対は交配開始後5日以内に雌が発情期を示して交尾し、交尾率、交尾所要日数および交尾成立までに逸した発情期の回数ともに対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。また、非妊娠動物は1000 mg/kg群で1例観察されただけであり、受胎率にも有意な差は認められなかった。なお、200 mg/kg群の未交尾動物の雄には、剖検で精巣の小型化、病理組織学検査では精細管のび慢性萎縮などが認められ、交尾不成立の原因と思われた。

2) 分娩・哺育状態 (Table 6)

分娩の観察において、対照群の1例が妊娠23日に分娩を開始したが、新生児1例を娩出したのみで、分娩が完了しないまま翌日に死亡した。また、200 mg/kg群の1例が妊娠24日に分娩し、授乳、児なめ、胎盤摂食、回集行動などの母性行動を示さず、全ての新生児が哺育1日までに死亡した。その他の母動物は各群とも妊娠22または23日に正常な分娩を示し、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、分娩率および出産率ともに対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

哺育期間の観察において、全新生児死亡が、分娩遅延を示した200 mg/kg群の1腹の他に、1000 mg/kg群の3腹で観察された。これらの母動物には母性行動がみられたが、新生児のほとんどは受乳状態が不良で、哺育2日

までに全例が死亡した。また、同群の他の1腹でも分娩日に未受乳の新生児が多数観察され、それらのほとんどは死亡した。その他の母動物の哺育状態には異常は認められなかった。

3) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存率 (Table 6)

1000 mg/kg群で、有意差は認められなかったものの、哺育4日の新生児数および新生児の4日生存率が低値を示した。本変化は母動物が哺育異常を示した4腹で新生児死亡が多発したことに起因しており、同群のその他の腹では新生児死亡はほとんど観察されなかった。出産児数、出生児数、性比および出生率には対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。なお、1000 mg/kg群の出産児数が他の群に比べて低値を示したが、着床数が8および6と少なかった母動物2例の出産児数が反映していた。対照群でも着床数8を示す母動物が1例観察されており、これらを除外した場合の対照群および1000 mg/kg群の出産児数は14.5および14.7とほぼ同様の値であった。さらに、黄体数、着床率、分娩率にも被験物質の影響は認められなかったことから、偶発変化と考えられる。

(2) 外表および一般状態

皮下出血が対照群で出生日に1例観察された。その他には、1000 mg/kg群で未受乳の新生児が多発した以外は一般状態に変化はみられず、外表異常も認められなかった。

(3) 体重 (Table 6)

1000 mg/kg群で雌雄とも哺育0日の体重が有意な低値を示した。200 mg/kg以下の群では雌雄とも対照群と被験物質投与群との間に有意な変化は認められなかった。なお、1000 mg/kg群の体重について、全新生児死亡および死亡児が多発した腹を除いた場合、哺育0日の平均体重は雄7.1 g、雌6.5 g、また平均体重増加量は雄4.0 g、雌3.8 gと対照群とほぼ同様の値であった。

(4) 剖検

生存動物ではいずれの群にも異常は認められなかった。また、死亡動物では胸腺頸部残留が対照群の1腹で1例、1000 mg/kg群の2腹で2例観察されただけであったことから、被験物質に起因する変化ではないと判断した。

考察

1. 反復投与毒性

反復投与による影響として、1000 mg/kg群の雌雄で攣縮、挙尾および間代性痙攣が、投与開始後30日以上経過した後、投与時の保定などの刺激により発現した。また、同群では雌雄で体重増加抑制、雌で授乳期間の摂餌量減少が認められた他、雌では3例が死亡し、病理学検査で肺水腫が認められた。化学構造が類似する物質では、中毒症状として呼吸器刺激による呼吸困難が起り、肺水腫により死亡することが知られており²⁾、同様な原

因により死亡した可能性が考えられる。

病理学検査において、1000 mg/kg群の雌雄で脳、脊髓および前胃、雌で胸腺に被験物質に起因する変化が認められた。すなわち、脳および脊髓では、橋の赤核脊髓路領域と背側後脊髓小脳路で神経線維の変性が左右対称性に認められた。これらは筋の運動あるいは筋緊張の調節に關与する神経連絡路であり、同群で投与後期に観察された攣縮、挙尾などの行動異常と關連する変化と推察される。化学構造が類似するメタクリル酸2-ヒドロエチルエステルおよび2-エチルヘキシルメタクリレートでも反復投与により行動異常の発現および脳の組織変化が起ることが報告されている^{3,4)}。また、メチルメタクリレートは行動異常を誘発することが知られ⁵⁾、脳内アミンあるいは神経伝達に影響を及ぼすことが明らかにされている⁶⁻⁷⁾。発現機序は不明であるが、被験物質も中枢神経系への影響が示唆される。前胃では、剖検で肥厚が観察され、組織学的には粘膜上皮の増生と粘膜下織の水腫および炎症性細胞浸潤が認められた。化学構造が類似するアクリル酸のエステル化合物は、ラットの前胃に対し刺激性を有することが知られており⁸⁻¹⁰⁾、被験物質も同様の刺激性を有するものと考えられる。また、胸腺の萎縮が1000 mg/kg群の雌で高頻度に認められたが、死亡あるいは全新生児死亡を示した母動物がほとんどであり、死亡例の一部では脾臓の白脾髄およびリンパ節のリンパ小節の萎縮も観察された。これらの変化はストレス状態の動物に非特異的にみられる変化でもあることから¹¹⁾、被験物質に直接起因したものではなく、二次的に生じた変化である可能性が考えられる。

器官重量では雌雄の腎臓重量が増加の傾向を示し、雄では血清尿素窒素の上昇が認められたことから、被験物質による腎機能への影響の可能性が示唆される。また、雄の肝臓および雌の副腎にも重量増加が認められ、これらの器官にも影響している可能性が考えられた。しかし、いずれも病理組織学検査では変化は認められなかったことから、影響としては軽度のものとして推察される。

雄の血液学検査では、1000 mg/kg群で赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の減少、網状赤血球比の増加などの貧血性変化と白血球数および分葉核球数の増加が認められた。これらの変化は前胃の病変部の炎症との関連が考えられるが、貧血性変化については、前胃に病変が認められなかった200 mg/kg群でも観察されており、被験物質による造血機能への影響が示唆される。しかし、脾臓および骨髄には組織変化は認められなかったことから、影響としては軽度なものと考えられる。

投与直後の流涎が1000 mg/kg群の雌雄および200 mg/kg群の雌で観察されたが、一部には投与直前から反射的に発現する例もみられたことから、被験物質の局所刺激性に起因したものであり、反復投与毒性を示すものではないと考えられる。

2. 生殖発生毒性

親動物の検査において、交尾率、受胎率、黄体数、着

床数, 着床率, 分娩率, 出産率, 妊娠期間には被験物質の影響を示唆する変化は認められなかった. また, 分娩にも異常は認められなかった. したがって, 被験物質による親動物の生殖機能および分娩への影響はないと考えられる. 一方, 哺育期間の観察では, 全新生児死亡が1000 mg/kg群の母動物3例で観察された他にも, 1例で新生児死亡が多発したことから, 被験物質により哺育機能に何らかの障害を来した可能性が考えられる. なお, 200 mg/kg群でも全新生児死亡が1例観察されたが, 分娩が遅延した母動物であり, 対照群でも難産が1例で観察されていること, 200 mg/kg群では本動物以外に新生児死亡が多発した例がなかったことなどから, 被験物質との関連はない偶発的なものと考えられる.

新生児の検査において, 出産児数, 出产生児数, 性比および出生率に被験物質の影響はみられなかったが, 1000 mg/kg群で低体重および新生児の4日生存率の低下が認められた. 全新生児死亡あるいは死亡が多発した腹以外の新生児の体重および4日生存率は対照群とほぼ同様な値を示していたことから, 低体重および4日生存率の低下は母動物の哺育機能障害に起因したものである可能性が考えられる. 外表検査, 一般状態および剖検では被験物質に起因する変化は認められなかった.

以上のように, 本試験では反復投与による一般毒性学的影响として, 200 mg/kg以上の群の雄で貧血性変化が認められ, 1000 mg/kg群では雌雄で行動異常, 体重増加抑制, 脳, 脊髄および前胃の組織変化, 雌で死亡, 摂餌量減少, 胸腺の萎縮が認められた. 生殖・発生に及ぼす影響として, 親動物の生殖機能および分娩には異常は認められなかったが, 1000 mg/kg群で母動物の哺育機能および新生児の発育への影響を示唆する変化が認められた. したがって, 本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雄が40 mg/kg/day, 雌が200 mg/kg/day, 生殖発生毒性に関する無影響量は親動物に対して雄が1000 mg/kg/day, 雌が200 mg/kg/day, 児動物に対しては200 mg/kg/dayと考えられる.

文献

- 1) 山下弘太郎ら, 化学物質毒性試験報告, 6, 545 (1998).
- 2) 後藤 稠, 池田正之, 原 一郎編, "産業中毒便覧(増補版)," 医歯薬出版(株), 東京, 1984, pp. 889-993.
- 3) 古橋忠和ら, 化学物質毒性試験報告, 5, 583 (1997).
- 4) 古橋忠和ら, 化学物質毒性試験報告, 6, 405 (1998).
- 5) R. Husain, S.P. Srivastava, P.K. Seth, *Arch. Toxicol.*, **58**, 33(1985).
- 6) D.L. Innes, M.F. Tansy, *Neurotoxicology*, **2**, 515 (1981).
- 7) E. Verkkala, R. Rajaniemi, H. Savolainen, *Toxicol. Lett.*, **18**, 111(1983).

- 8) B.I. Ghanayem, R.R. Maronpot, H.B. Matthews, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 323(1985).
- 9) B.I. Ghanayem, R.R. Maronpot, H.B. Matthews, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 336(1985).
- 10) B.I. Ghanayem, R.R. Maronpot, H.B. Matthews, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **83**, 576(1986).
- 11) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies," Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 77-142.

連絡先

試験責任者: 松浦郁夫

試験担当者: 星野信人, 土居卓也, 豊田直人,

高野克代, 鈴木美江

(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所

〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Ikuo Matsuura (Study director)

Nobuhito Hoshino, Takuya Doi,

Naoto Toyota, Katsuyo Takano,

Yoshie Suzuki

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-0255, Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Hematological examination in male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		0	40	200	1000
Number of animals		12	12	12	11
RBC	×10 ¹¹ /μL	881.7 ± 43.6	861.7 ± 24.0	859.8 ± 36.7	821.6 ± 34.1**
Hematocrit	%	46.73 ± 2.45	46.22 ± 1.56	44.84 ± 1.26*	41.72 ± 1.97**
Hemoglobin	g/dL	15.91 ± 0.69	15.78 ± 0.44	15.28 ± 0.40*	14.24 ± 0.74**
Reticulocyte	%	17.81 ± 2.61	19.28 ± 4.58	21.56 ± 3.57*	24.84 ± 3.75**
MCV	fl	53.02 ± 1.73	53.65 ± 1.18	52.23 ± 2.08	50.81 ± 2.30*
MCH	pg	18.07 ± 0.60	18.33 ± 0.44	17.78 ± 0.74	17.33 ± 0.81*
MCHC	%	34.05 ± 0.64	34.16 ± 0.60	34.08 ± 0.77	34.14 ± 0.66
Platelet	×10 ⁴ /μL	97.50 ± 14.74	99.33 ± 10.04	106.43 ± 13.86	108.71 ± 18.39
WBC	×10 ² /μL	73.37 ± 15.08	79.35 ± 21.47	91.29 ± 23.38	96.20 ± 23.80*
Differential leukocyte counts	%				
Lymphocytes		82.2 ± 5.3	82.2 ± 6.5	81.7 ± 6.3	74.5 ± 7.3*
Neutrophils					
segmented		11.8 ± 3.6	11.2 ± 5.0	10.0 ± 3.7	17.0 ± 8.4
band		0.6 ± 0.7	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.5 ± 0.7
Eosinophils		0.5 ± 0.7	0.7 ± 0.9	0.9 ± 1.1	0.5 ± 0.7
Basophils		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Monocytes		4.9 ± 3.0	5.8 ± 2.8	7.3 ± 3.1	7.5 ± 3.3
Differential leukocyte counts	×10 ² /μL				
Lymphocytes		60.0 ± 11.1	65.7 ± 19.6	74.9 ± 21.0	71.5 ± 20.2
Neutrophils					
segmented		8.8 ± 3.9	8.5 ± 2.9	9.1 ± 4.0	16.3 ± 7.8*
band		0.6 ± 0.7	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.5 ± 0.7
Eosinophils		0.5 ± 0.7	0.6 ± 0.7	0.8 ± 0.9	0.5 ± 0.7
Basophils		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Monocytes		3.8 ± 2.7	4.5 ± 2.4	6.3 ± 2.7	7.3 ± 4.0*

Values are expressed as Mean±S.D.
Significantly different from control: *, P<0.05, **, P<0.01.

Table 2 Blood chemical examination in male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)		0	40	200	1000
Number of animals		12	12	12	11
GOT	U/L	95.0 ± 15.4	96.8 ± 14.7	94.3 ± 14.7	96.1 ± 13.5
GPT	U/L	27.6 ± 7.9	21.2 ± 3.4	22.1 ± 4.5	23.5 ± 4.8
LDH	U/L	178.0 ± 61.9	166.7 ± 79.6	142.6 ± 40.1	162.5 ± 33.8
γ-GTP	U/L	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3
ALP	U/L	269.8 ± 43.4	268.2 ± 42.3	271.8 ± 29.2	272.4 ± 52.5
Total bilirubin	mg/dL	0.13 ± 0.07	0.13 ± 0.05	0.11 ± 0.03	0.14 ± 0.05
Urea nitrogen	mg/dL	14.44 ± 2.15	13.89 ± 1.53	14.79 ± 1.66	16.46 ± 1.79*
Creatinine	mg/dL	0.49 ± 0.09	0.50 ± 0.06	0.51 ± 0.05	0.54 ± 0.07
Glucose	mg/dL	128.0 ± 16.0	124.3 ± 13.8	130.5 ± 13.4	135.1 ± 15.6
Total Cholesterol	mg/dL	52.3 ± 12.2	56.0 ± 10.5	51.8 ± 9.6	63.7 ± 13.4
Triglyceride	mg/dL	26.8 ± 13.3	35.3 ± 14.5	33.2 ± 7.4	29.7 ± 9.4
Total protein	g/dL	6.84 ± 0.34	6.90 ± 0.31	6.84 ± 0.27	7.04 ± 0.28
Albumin	g/dL	3.38 ± 0.13	3.37 ± 0.13	3.33 ± 0.11	3.46 ± 0.15
A/G ratio		0.979 ± 0.055	0.955 ± 0.065	0.946 ± 0.030	0.970 ± 0.043
Inorganic phosphate	mg/dL	7.50 ± 0.63	7.60 ± 0.35	7.50 ± 0.50	7.81 ± 0.48
Ca	mg/dL	9.19 ± 0.23	9.23 ± 0.30	9.08 ± 0.26	9.15 ± 0.28
Na	mmol/L	144.8 ± 0.6	144.6 ± 1.1	144.4 ± 1.0	143.1 ± 1.0**
K	mmol/L	4.33 ± 0.20	4.51 ± 0.19	4.45 ± 0.26	4.55 ± 0.20
Cl	mmol/L	99.8 ± 2.3	98.6 ± 1.7	99.8 ± 2.1	98.3 ± 2.5

Values are expressed as Mean±S.D.
Significantly different from control: *, P<0.05, **, P<0.01.

Table 3 Absolute and relative organ weights in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	40	200	1000
Male				
Number of animals	12	12	12	11
Body weight g	432.1 ± 40.2	444.3 ± 41.1	459.8 ± 29.6	410.9 ± 33.4
Absolute organ weight				
Brain g	2.123 ± 0.066	2.123 ± 0.078	2.145 ± 0.049	2.043 ± 0.053**
Pituitary mg	13.17 ± 1.32	13.58 ± 1.61	14.14 ± 2.33	13.87 ± 2.63
Thyroid mg	20.52 ± 3.07	20.74 ± 2.44	21.43 ± 2.75	20.37 ± 1.41
Thymus mg	235.5 ± 36.4	230.4 ± 74.0	291.1 ± 45.8*	206.3 ± 50.3
Heart g	1.367 ± 0.185	1.315 ± 0.125	1.358 ± 0.081	1.325 ± 0.108
Liver g	10.936 ± 1.371	11.490 ± 1.942	11.718 ± 1.154	12.035 ± 1.370
Spleen g	0.651 ± 0.058	0.682 ± 0.109	0.721 ± 0.134	0.712 ± 0.118
Kidney g	2.858 ± 0.254	2.962 ± 0.272	2.969 ± 0.221	3.042 ± 0.316
Adrenal mg	57.34 ± 6.95	58.56 ± 9.53	55.27 ± 6.89	52.77 ± 6.12
Testis g	3.338 ± 0.257	3.188 ± 0.210	3.102 ± 0.732	3.292 ± 0.206
Epididymis g	1.209 ± 0.092	1.203 ± 0.096	1.170 ± 0.222	1.104 ± 0.072*
Relative organ weight				
Brain g%	0.493 ± 0.045	0.482 ± 0.049	0.468 ± 0.032	0.498 ± 0.037
Pituitary mg%	3.07 ± 0.35	3.06 ± 0.38	3.09 ± 0.53	3.39 ± 0.60
Thyroid mg%	4.74 ± 0.52	4.71 ± 0.69	4.66 ± 0.57	4.98 ± 0.39
Thymus mg%	54.74 ± 8.64	51.53 ± 13.69	63.38 ± 9.81	50.29 ± 12.08
Heart g%	0.316 ± 0.028	0.296 ± 0.017	0.297 ± 0.015	0.324 ± 0.022
Liver g%	2.526 ± 0.108	2.572 ± 0.241	2.547 ± 0.150	2.922 ± 0.126**
Spleen g%	0.150 ± 0.007	0.153 ± 0.019	0.158 ± 0.026	0.173 ± 0.021
Kidney g%	0.663 ± 0.046	0.668 ± 0.044	0.648 ± 0.057	0.740 ± 0.053**
Adrenal mg%	13.30 ± 1.35	13.21 ± 2.03	12.04 ± 1.45	12.90 ± 1.64
Testis g%	0.778 ± 0.092	0.724 ± 0.094	0.679 ± 0.166	0.805 ± 0.080
Epididymis g%	0.283 ± 0.036	0.273 ± 0.031	0.256 ± 0.055	0.270 ± 0.029
Female				
Number of animals	11	12	10	5
Body weight g	332.0 ± 10.6	324.6 ± 23.7	329.1 ± 26.0	303.0 ± 16.3
Absolute organ weight				
Brain g	2.016 ± 0.080	1.993 ± 0.065	2.026 ± 0.103	1.934 ± 0.063
Pituitary mg	19.25 ± 2.84	20.43 ± 2.65	20.26 ± 3.19	19.30 ± 3.23
Thyroid mg	17.54 ± 3.07	17.75 ± 3.61	17.61 ± 2.98	16.36 ± 3.19
Thymus mg	189.5 ± 67.4	192.7 ± 47.2	170.0 ± 70.8	201.4 ± 61.4
Heart g	1.011 ± 0.055	0.965 ± 0.072	1.011 ± 0.091	1.052 ± 0.063
Liver g	14.764 ± 1.604	14.538 ± 1.621	14.644 ± 1.759	14.094 ± 1.181
Spleen g	0.562 ± 0.059	0.595 ± 0.109	0.572 ± 0.088	0.692 ± 0.172
Kidney g	2.065 ± 0.147	1.957 ± 0.136	2.146 ± 0.171	2.210 ± 0.248
Adrenal mg	74.46 ± 8.98	70.17 ± 5.86	78.28 ± 6.82	89.80 ± 10.05**
Relative organ weight				
Brain g%	0.608 ± 0.031	0.617 ± 0.046	0.617 ± 0.039	0.640 ± 0.029
Pituitary mg%	5.80 ± 0.87	6.33 ± 0.97	6.17 ± 1.00	6.36 ± 1.03
Thyroid mg%	5.27 ± 0.82	5.49 ± 1.06	5.37 ± 0.93	5.38 ± 0.98
Thymus mg%	57.23 ± 20.74	60.01 ± 17.24	51.39 ± 21.06	66.48 ± 20.45
Heart g%	0.304 ± 0.017	0.298 ± 0.022	0.308 ± 0.015	0.350 ± 0.034**
Liver g%	4.445 ± 0.455	4.474 ± 0.289	4.449 ± 0.415	4.660 ± 0.444
Spleen g%	0.171 ± 0.019	0.183 ± 0.031	0.174 ± 0.020	0.228 ± 0.061
Kidney g%	0.623 ± 0.057	0.605 ± 0.049	0.656 ± 0.057	0.730 ± 0.084**
Adrenal mg%	22.46 ± 2.86	21.68 ± 1.79	23.83 ± 1.67	29.64 ± 2.68**

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control: *, P < 0.05, **, P < 0.01.

Table 4 Histopathological findings in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Sex		Male				Female					
	Fate	Dose (mg/kg)	Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice				Dead	
			0	40	200	1000	0	40	200	1000	0	1000
Number of animals			12	12	12	11	11	12	12	9	1 ^a	3 ^b
Heart												
Inflammatory cell infiltration, focal	+		5	#	#	1	0	#	0/1 ^{\$}	0	0	0
Mandibular lymph node												
Blood absorption	+		2	#	#	1	1	#	0/1	0	0	0
Atrophy, lymph follicle	+		0	#	#	0	0	#	0/1	0	0	1
Mesenteric lymph node												
Blood absorption	+		0	#	#	1	0	#	0/1	0	0	0
Atrophy, lymph follicle	+		0	#	#	0	0	#	0/1	0	0	1
Pancreaticoduodenal lymph node			#	#	#	ND/3	#	#	#	ND/1	#	#
Thymus												
Hemorrhage	+		0	0	0	0	0	0	0	0/8	1	0
Atrophy, acute	+		0	0	0	0	2	0	2	3/8	0	3
Spleen												
Atrophy, white pulp	+		0	#	#	0	0	#	0/1	0	0	2
Bone marrow (femur)			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Bone marrow (sternum)			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Trachea												
Dilatation, tracheal gland	+		4	#	#	4	1	#	0/1	4	0	0
Lung												
Edema	+		0	#	#	0	0	#	0/2	0	0	3
Hemorrhage, focal	+		0	#	#	0	0	#	0/2	1	0	0
Inflammatory cell infiltration	+		4	#	#	5	2	#	1/2	4	0	0
Stomach												
Dilatation, gastric gland	+		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0/2
Edema	+		0	0	0	7**	0	0	0	2	0	1/2
Hyperplasia, squamous, forestomach, diffuse	+		0	0	0	11**	0	0	0	9**	0	2/2
Inflammatory cell infiltration, forestomach	+		0	0	0	10**	0	0	0	5**	0	1/2
Ulcer, forestomach	+		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0/2
Ulcer, glandular stomach	+		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/2
Duodenum			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Jejunum			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Ileum			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Cecum			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Colon			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Rectum			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND
Liver												
Fatty change, hepatocyte, focal	+		0	#	1/1	0	0	#	0/1	0	0	0
Microgranuloma	+		1	#	0/1	1	1	#	0/1	0	0	0
Necrosis, focal	+		0	#	0/1	0	0	#	0/1	1	0	0
Pancreas												
Atrophy, acinus, focal	+		0	#	#	1	1	#	0/1	0	1	0
Inflammatory cell infiltration, focal	+		2	#	#	1	0	#	0/1	0	0	0

+, Slight ; #, Not examined ; ND, No abnormalities were detected.

\$. Number of animals showing lesion/number of animals examined

a). One animal died of dystocia at day 23 of gestation.

b). Dead animals were observed at 2,6 and 38 days after commencement of administration.

Significantly different from control:**, P<0.01.

Table 4 (Continued)

Organ	Sex	Fate	Male								Female		
			Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice				Dead		
			0	40	200	1000	0	40	200	1000	0	1000	
Findings		Dose (mg/kg)											
Number of animals			12	12	12	11	11	12	12	9	1 ^{a)}	3 ^{b)}	
Kidney													
Basophilic tubule	+		0	#	#	2	0	#	0/1	0	0	0	
Cyst	+		0	#	#	0	0	#	0/1	0	0	1	
Dilatation, tubule	+		1	#	#	0	0	#	0/1	0	0	0	
Hyaline droplet, tubular epithelium, proximal	+		7	#	#	5	0	#	0/1	0	0	0	
Inflammatory cell infiltration, interstitium, focal	+		1	#	#	0	1	#	0/1	1	0	1	
Urinary bladder			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND	
Testis													
Atrophy, seminiferous tubule, diffuse	+		0	#	1/1	0							
Epididymis													
Decrease in sperm	+		0	#	1/1	0							
Seminal vesicle			ND	ND	ND	ND							
Prostate													
Inflammatory cell infiltration	+		2	3	0	1							
Ovary							ND	#	ND/1	ND	ND	ND	
Uterus													
Hemorrhage	+						0	#	0/1	1	1	0	
Inflammatory cell infiltration	+						0	#	0/1	1	0	0	
Vagina													
Hemorrhage	+						0	#	0/1	1	0	0	
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte	+						0	#	0/1	1	0	0	
Mammary gland							ND	ND/3	ND/3	ND	ND	ND	
Pituitary													
Cystic dilatation, Rathke's Pouch	+		0	#	#	1	0	#	0/1	0	0	0	
Thyroid													
Ultimobranchial remnant	+		3	#	#	2	3	#	0/1	4	1	0	
Adrenal			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND	
Brain													
Degeneration, nerve fiber	+		0	0	0	3	0	0	0	4	0	0	
Spinal cord													
Degeneration, nerve fiber	+		0	0	0	8**	0	0	0	6**	0	0	
Sciatic nerve			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND	
Skin													
Atrophy, hair follicle	+		#	#	#	#	1/1	#	#	#	#	#	
Bone (femur)			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND	
Bone (sternum)			ND	#	#	ND	ND	#	ND/1	ND	ND	ND	

+, Slight ; #, Not examined ; ND, No abnormalities were detected.

\$, Number of animals showing lesion/number of animals examined

a), One animal died of dystocia at 23 of gestation.

b), Dead animals were observed at 2,6 and 38 days after commencement of administration.

Significantly different from control: **, P<0.01.

Table 5 Fertility and pregnancy data in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	40	200	1000
Number of pairs examined	12	12	12	10
Number of pairs with successful mating	12	12	11	10
Mating index % ^{a)}	100.0	100.0	91.7	100.0
Number of pregnant females	12	12	11	9
Fertility index % ^{b)}	100.0	100.0	100.0	90.0
Pairing days until mating	2.5 ± 1.0 ^{c)}	3.1 ± 1.0	3.9 ± 3.0	2.8 ± 1.0
Number of estrous stages without mating	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0

a) Mating index (%) = (Number of pairs with successful mating/number of pairs examined) × 100

b) Fertility index (%) = (Number of pregnant animals/number of pairs with successful mating) × 100

c) Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 6 Delivery and litter data in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	40	200	1000
Number of females examined	12	12	11	8
Number of females with live pups	11	12	11	8
Gestation index % ^{a)}	91.7	100.0	100.0	100.0
Gestation length (days)	22.9 ± 0.3 ^{c)}	22.6 ± 0.5	22.6 ± 0.7	22.8 ± 0.5
Number of corpora lutea ^{b)}	17.3 ± 1.9	17.6 ± 1.6	16.8 ± 1.7	16.9 ± 4.9
Number of implantation sites	15.6 ± 2.9	16.4 ± 1.6	15.6 ± 2.5	14.8 ± 4.9
Implantation index % ^{b)}	89.5 ± 12.3	93.6 ± 8.1	92.6 ± 7.8	86.2 ± 11.6
Delivery index % ^{c)}	89.7 ± 5.9	94.7 ± 4.8	85.4 ± 15.1	88.9 ± 8.2
Number of pups delivered	14.5 ± 1.4	15.5 ± 1.2	13.6 ± 4.1	12.6 ± 4.5
Number of live pups on day 0	14.3 ± 1.6	15.5 ± 1.2	13.1 ± 5.1	11.0 ± 3.7
Live birth index % ^{d)}	98.03 ± 4.52	100.00 ± 0.00	93.18 ± 22.61	89.06 ± 12.64
Sex ratio (male/female)	1.18(85/72)	0.86(86/100)	0.87(67/77)	0.83(40/48)
Number of live pups on day 4	14.0 ± 1.5	15.5 ± 1.2	14.0 ± 3.7	7.8 ± 4.2
Viability index on day 4 % ^{e)}	98.16 ± 3.18	100.00 ± 0.00	89.78 ± 29.88	51.51 ± 50.48
Body weight of pups g				
on day 0 male	7.2 ± 0.4	6.6 ± 0.4	6.9 ± 0.7	6.4 ± 1.1*
on day 0 female	6.8 ± 0.6	6.3 ± 0.5	6.5 ± 0.7	6.0 ± 0.9*
on day 4 male	11.1 ± 1.1	10.4 ± 0.9	10.8 ± 2.0	10.2 ± 2.5
on day 4 female	10.7 ± 1.3	9.8 ± 1.0	10.4 ± 2.0	9.8 ± 1.8
Body weight gain of pups g				
day 0 to 4 male	3.9 ± 0.9	3.7 ± 0.7	4.0 ± 1.5	3.4 ± 1.4
day 0 to 4 female	3.9 ± 0.9	3.6 ± 0.6	3.9 ± 1.5	3.5 ± 0.8

a) Gestation index (%) = (Number of females with live pups/number of pregnant females) × 100

b) Implantation index (%) = (Number of implantation sites/number of corpora lutea) × 100

c) Delivery index (%) = (Number of pups delivered/number of implantation sites) × 100

d) Live birth index (%) = (Number of live pups on day 0/number of pups delivered) × 100

e) Viability index (%) = (Number of live pups on day 4/number of live pups on day 0) × 100

f) Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control: *, P < 0.05.