

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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-(Dimethylamino)ethyl acrylate on Bacteria

要約

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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たことから、本試験は S9 mix 無添加試験および添加試験ともに、156~5000 μg /プレートの範囲(S9 無添加試験の TA98 と TA1537 は 78.1~2500 μg /プレート、添加試験の WP2 *uvrA* は 313~5000 μg /プレート)で実施した。また、TA98 の S9 mix 添加試験では、1000~5000 μg /プレートの用量範囲で再現性試験を実施した。

その結果、TA98 の S9 mix 添加試験において、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加が認められ、用量依存性もみられた。

以上の結果から、アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルは、用いた試験系において変異原性を有する(陽性)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〕

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステル(CAS No. 2439-35-2)は、分子量 143.21 の無色-黄色透明液体(受領時:無色透明液体)である。(株)日本触媒製造、用いた被験物質は、ロット番号 5P07、純度 99.9 wt% [不純物:0.01% 2-ジメチルアミノエタノール、0.01% アクリル酸、2000 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 99.8 wt%であった。アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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)

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¹⁾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, 本試験および再現性試験においては, 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。また, TA98 の S9 mix 添加試験については, 本試験 I と本試験 II の結果が異なるため, 再現性試験を行った。また, 陽性結果が得られた TA98 の S9 mix 添加試験については, 本試験および再現性試験で変異コロニー数が溶媒対照値の 2 倍以上となった用量について, 変異コロニー数の平均値から溶媒対照値を差し引いた値を, 用量で除して比変異活性値(誘発復帰変異コロニー数/mg)を求めた。

〔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〕

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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, S9 mix 無添加試験では, TA98 と TA1537 において 1500 μ g/プレート 以上で, その他の検定菌においては 5000 μ g/プレート で抗菌性が認められた。また, S9 mix 添加試験では, WP2 *uvrA* 以外の検定菌において 5000 μ g/プレート で抗菌性が認められた。

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 (TA98 と TA1537 の S9 mix 無添加試験は 2500 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, ともに上記の最高用量に基づいて公比 2 で 5~6 用量を設定して 2 回の本試験を実施した (Table 1, 2)。その結果, TA98 の S9 mix 添加試験においては, 本試験 I ではいずれの用量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が, 本試験 II の最高用量の 5000 μ g/プレート で, 溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数を示した。また, TA98 の S9 mix 無添加試験と, その他の検定菌においては, 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。

〔再現性試験〕

TA98 の S9 mix 添加試験では, 本試験 II の最高用量の 5000 μ g/プレート でのみ溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加が認められたため, 再現性と用量依存性を確認するために, 最高用量を 5000 μ g/プレート とし, 等差 800 μ g/プレート で 6 用量を設定して再現性試験を実施した (Table 3)。その結果, 用量依存的な変異コロニー数の増加が認められ, 3400 μ g/プレート 以上では溶媒対照値の 2 倍以上となった。TA98 の S9 mix 添加試験での, 当被験物質の最大比変異活性値は, 10.6 誘発復帰変異コロニー/mg (再現性試験, 3400 μ g/プレート) で, 同一条件下における陽性対照物質 2-アミノアントラセンの値 (508000 誘発復帰変異コロニー/mg) の約 50000 分の 1 であった。

以上の結果に基づき, アクリル酸 2-(ジメチルアミ

ノ)エチルエステルは、用いた試験系において変異原性を有する(陽性)と判定した。

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

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.

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-(dimethylamino)ethyl acrylate 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	178 143 115 (145 \pm 31.6)	21 18 7 (15 \pm 7.4)	22 30 22 (25 \pm 4.6)	27 29 22 (26 \pm 3.6)	8 10 8 (9 \pm 1.2)	
	78.1	ND	ND	ND	34 18 29 (27 \pm 8.2)	17 15 12 (15 \pm 2.5)	
	156	166 127 136 (143 \pm 20.4)	14 9 10 (11 \pm 2.6)	21 22 23 (22 \pm 1.0)	31 30 31 (31 \pm 0.6)	11 16 18 (15 \pm 3.6)	
	313	139 114 118 (124 \pm 13.4)	11 6 11 (9 \pm 2.9)	30 30 24 (28 \pm 3.5)	22 33 34 (30 \pm 6.7)	11 9 15 (12 \pm 3.1)	
	625	147 116 153 (139 \pm 19.9)	12 7 6 (8 \pm 3.2)	23 27 25 (25 \pm 2.0)	31 37 31 (33 \pm 3.5)	12 20 16 (16 \pm 4.0)	
	1250	136 129 156 (140 \pm 14.0)	7 9 7 (8 \pm 1.2)	28 19 20 (22 \pm 4.9)	59 45 33* (46 \pm 13.0)	4 9 10* (8 \pm 3.2)	
	2500	169 193 180 (181 \pm 12.0)	11 8 13 (11 \pm 2.5)	36 34 27 (32 \pm 4.7)	8* 16* 12* (12 \pm 4.0)	7* 2* 4* (4 \pm 2.5)	
	5000	61* 23* 54* (46 \pm 20.2)	0* 0* 5* (2 \pm 2.9)	15* 9* 15* (13 \pm 3.5)			
S9 mix (+)	0	164 149 138 (150 \pm 13.1)	17 17 16 (17 \pm 0.6)	40 44 37 (40 \pm 3.5)	35 31 31 (32 \pm 2.3)	21 25 23 (23 \pm 2.0)	
	156	126 124 126 (125 \pm 1.2)	15 13 7 (12 \pm 4.2)	ND	31 21 26 (26 \pm 5.0)	9 8 13 (10 \pm 2.6)	
	313	129 132 114 (125 \pm 9.6)	8 7 9 (8 \pm 1.0)	37 29 25 (30 \pm 6.1)	13 22 22 (19 \pm 5.2)	5 10 9 (8 \pm 2.6)	
	625	158 127 153 (146 \pm 16.6)	15 8 10 (11 \pm 3.6)	29 28 29 (29 \pm 0.6)	21 16 20 (19 \pm 2.6)	8 12 9 (10 \pm 2.1)	
	1250	133 115 86 (111 \pm 23.7)	16 11 10 (12 \pm 3.2)	31 17 27 (25 \pm 7.2)	17 24 23 (21 \pm 3.8)	5 11 7 (8 \pm 3.1)	
	2500	138 123 102 (121 \pm 18.1)	8 20* 20* (16 \pm 6.9)	28 27 26 (27 \pm 1.0)	28 26 23 (26 \pm 2.5)	5 5 8 (6 \pm 1.7)	
	5000	149 139 152 (147 \pm 6.8)	8* 7* 9* (8 \pm 1.0)	21 28 42 (30 \pm 10.7)	43 34 45 (41 \pm 5.9)	16 8 16* (13 \pm 4.6)	
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	641 680 673 (665 \pm 20.8)	425 412 454 (430 \pm 21.5)	415 414 402 (410 \pm 7.2)	683 668 718 (690 \pm 25.7)	1924 1724 1891 (1846 \pm 107.2)	
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	659 676 721 (685 \pm 32.0)	295 304 321 (307 \pm 13.2)	677 613 546 (612 \pm 65.5)	312 322 324 (319 \pm 6.4)	327 333 257 (306 \pm 42.3)	

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

*:Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinone were contained as impurities.

ND:Not done

Table 2. Mutagenicity of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate 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	13	9	9	25	36	28	24	13	21	8	6	7	
		(137 \pm 11.2)			(10 \pm 2.3)			(30 \pm 5.7)			(19 \pm 5.7)			(7 \pm 1.0)			
	78.1	ND			ND			ND			28	22	24	8	8	11	
											(25 \pm 3.1)			(9 \pm 1.7)			
	156	115	114	123	8	10	12	28	27	23	26	19	23	13	11	8	
		(117 \pm 4.9)			(10 \pm 2.0)			(26 \pm 2.6)			(23 \pm 3.5)			(11 \pm 2.5)			
	313	111	117	135	12	10	17	27	30	32	22	25	28	16	11	11	
		(121 \pm 12.5)			(13 \pm 3.6)			(30 \pm 2.5)			(25 \pm 3.0)			(13 \pm 2.9)			
625	127	133	135	6	10	8	27	28	24	29	34	38	9	11	11		
	(132 \pm 4.2)			(8 \pm 2.0)			(26 \pm 2.1)			(34 \pm 4.5)			(10 \pm 1.2)				
1250	121	104	118	12	8	7	32	28	26	43	27	39	2*	5*	6*		
	(114 \pm 9.1)			(9 \pm 2.6)			(29 \pm 3.1)			(36 \pm 8.3)			(4 \pm 2.1)				
2500	160	161	169	10*	10*	12*	41	42	33	10*	9*	5*	2*	3*	2*		
	(163 \pm 4.9)			(11 \pm 1.2)			(39 \pm 4.9)			(8 \pm 2.6)			(2 \pm 0.6)				
5000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	2*	8*	24								
	(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(11 \pm 11.4)										
S9 mix (+)	0	104	113	111	13	15	10	34	31	30	27	23	23	9	8	7	
		(109 \pm 4.7)			(13 \pm 2.5)			(32 \pm 2.1)			(24 \pm 2.3)			(8 \pm 1.0)			
	156	104	115	133	15	17	12	ND			23	39	25	8	10	14	
		(117 \pm 14.6)			(15 \pm 2.5)						(29 \pm 8.7)			(11 \pm 3.1)			
	313	137	108	110	11	12	12	28	30	38	30	30	35	3	8	6	
		(118 \pm 16.2)			(12 \pm 0.6)			(32 \pm 5.3)			(32 \pm 2.9)			(6 \pm 2.5)			
	625	107	104	103	7	13	12	39	30	42	24	19	12	3	6	4	
		(105 \pm 2.1)			(11 \pm 3.2)			(37 \pm 6.2)			(18 \pm 6.0)			(4 \pm 1.5)			
1250	106	94	100	9	8	8	36	28	29	23	20	27	5	12	5		
	(100 \pm 6.0)			(8 \pm 0.6)			(31 \pm 4.4)			(23 \pm 3.5)			(7 \pm 4.0)				
2500	102	95	101	13	9	11	30	35	36	29	28	27	9	2	6		
	(99 \pm 3.8)			(11 \pm 2.0)			(34 \pm 3.2)			(28 \pm 1.0)			(6 \pm 3.5)				
5000	107	114	96	13*	8*	14*	44	39	34	66	45	55	14	9*	11*		
	(106 \pm 9.1)			(12 \pm 3.2)			(39 \pm 5.0)			(55 \pm 10.5)			(11 \pm 2.5)				
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	644	728	760	370	359	383	244	282	281	495	608	544	557	484	444	
		(711 \pm 59.9)			(371 \pm 12.0)			(269 \pm 21.7)			(549 \pm 56.7)			(495 \pm 57.3)			
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	440	456	431	333	342	317	523	499	534	321	355	296	255	311	324	
		(442 \pm 12.7)			(331 \pm 12.7)			(519 \pm 17.9)			(324 \pm 29.6)			(297 \pm 36.7)			

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

*:Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinone were contained as impurities.

ND:Not done

Table 3. Mutagenicity of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in confirmation test of reverse mutation test 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.)					
					Frameshift type		
					TA98		
S9 mix (+)	0				34	22	31 (29 \pm 6.2)
	1000				23	20	27 (23 \pm 3.5)
	1800				48	32	27 (36 \pm 11.0)
	2600				63	54	52 (56 \pm 5.9)
	3400				72	52	70 (65 \pm 11.0)
	4200				79	74	57 (70 \pm 11.5)
	5000				63	76	70 (70 \pm 6.5)
Positive control S9 mix (+)	Chemical				2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)				0.5		
	Number of colonies/plate				281	255	313 (283 \pm 29.1)

2AA:2-Aminoanthracene

Purity was 99.9 wt% and 0.01% 2-dimethylamino ethanol, 0.01% acrylate and 2000 ppm methoquinon were contained as impurities.

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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-(Dimethylamino)ethyl acrylate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理(24時間)では0.06 mg/ml、短時間処理(6時間)のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下ではそれぞれ0.04 mg/mlおよび0.2 mg/mlであった。各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5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時間および48時間連続処理では0.060 mg/mlの濃度であったことから、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。短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下ではそれぞれ0.010 mg/mlおよび0.050 mg/mlが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、この濃度を含む2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(0.060 mg/ml)で染色体の構造異常(gapを含む)および倍数性細胞が誘発され、その頻度は23.5%および10.75%であった。48時間連続処理した高濃度群(0.060 mg/ml)で染色体の構造異常(gapを含む)が誘発された(8.5%)。また、すべての処理群において細胞毒性のために倍数性細胞については規定の細胞数が観察できなかったが、高濃度群(0.060 mg/ml)で倍数性細胞が誘発された(6.21%)。短時間処理では、S9 mix非存在下において、0.020 mg/ml以上の処理群では細胞毒性のため分析できなかったが、0.010 mg/mlでは、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発された(16.0%)。また、0.0050 mg/mlおよび0.01 mg/mlにおいて倍数性細胞が認められ、その頻度は1.25%および10.88%であった。S9 mix存在下では、0.10 mg/ml以上の処理群では細胞毒性のため分析できなかったが、0.050 mg/mlでは、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発された(12.5%)。また、0.025 mg/mlおよび0.050 mg/mlにおいて倍数性細胞の誘発作用が認められ、その誘発頻度は1.25%お

び5.25%であった。

以上の結果より、本試験条件下でアクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステル(略号:DMAEA, CAS No.:2439-35-2, ロット番号:5P07, (株)日本触媒)は、無色-黄色透明液体で、水に対しては54.3 mg/ml, DMSOでは50 mg/ml, アセトンでは50 mg/mlで溶解し、融点-75°C, 沸点170°Cで、分子式C₇H₁₃NO₂, 分子量143.21, 純度99.9 wt%(不純物としてジメチルアミノエタノール0.01%, アクリル酸0.01%, メトキノン(重合防止剤)2000 ppmを含む)の物質である。

被験物質原体は、熱、光、過酸化物質などによって重合が起こることがあり、経時により黄褐色に着色する。

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

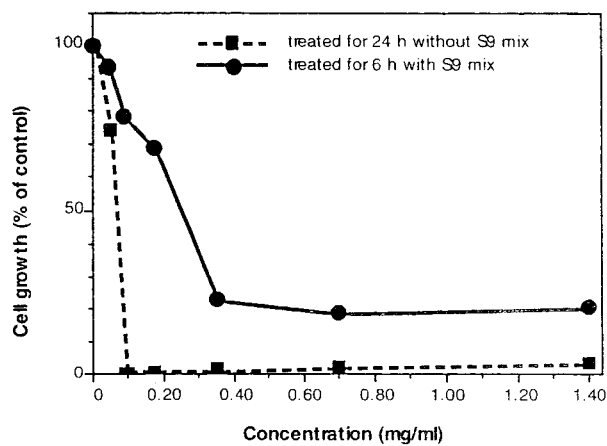


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate

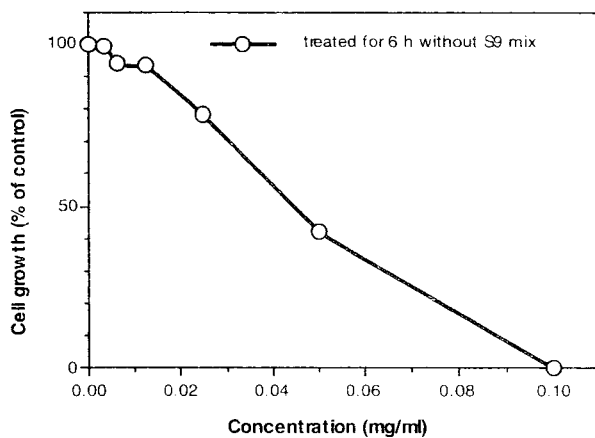


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate

定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、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™, オリジナル光学工業 (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、連続処理における 50% の増殖抑制濃度は、0.06 mg/ml、短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では、それぞれ 0.04 mg/ml および 0.2 mg/ml であった (Fig. 1, 2)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、

50% 増殖抑制濃度の 2 倍濃度を最高処理濃度とし、公比 2 で 5 濃度を設定した (24 時間および 48 時間連続処理: 0.0075, 0.015, 0.030, 0.060, 0.12 mg/ml, 短時間処理の S9 mix 非存在下: 0.0050, 0.010, 0.020, 0.040, 0.080 mg/ml, 短時間処理の S9 mix 存在下: 0.025, 0.050, 0.10, 0.20, 0.40 mg/ml)。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 μg/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ュにつき 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), 連続処理では 0.060 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。短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では、それぞれ 0.010 mg/ml および 0.050 mg/ml が染色体分析の可能な最高濃度であり、それ以上の濃度では分裂中期細胞が得られなかったことから、これらの濃度を含む 2 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¹⁾ による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、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クラン・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。アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルを加えて24時間連続処理した高濃度群(0.060 mg/ml)で染色体の構造異常(gapを含む)および倍数性細胞が誘発され、その頻度は23.5%および10.75%であった。

48時間連続処理した高濃度群(0.060 mg/ml)で染色体の構造異常(gapを含む)が誘発され、その頻度は8.5%であった。また、すべての処理群において細胞毒性のために倍数性細胞については規定の細胞数が観察できなかったが、高濃度群(0.060 mg/ml)で倍数性細胞が誘発され、その頻度は6.21%であった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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、0.020 mg/ml 以上の処理群では細胞毒性のため分析できなかったが、0.010 mg/ml では、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16.0%であった。また、0.0050 mg/ml および0.01 mg/ml において倍数性細胞の誘発作用が認められ、その誘発頻度は1.25%および10.88%であった。S9 mix 存在下では、0.10 mg/ml 以上の処理群では細胞毒性のため分析できなかったが、0.050 mg/ml では、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発され、その発生頻度は12.5%であった。また、0.025 mg/ml および0.050 mg/ml において倍数性細胞の誘発作用が認められ、その頻度は1.25%および5.25%であった。

従って、アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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, 佐々木澄志, 若栗 忍,
 日下部博一, 中川ゆづき,
 水谷正寛, 古畑紀久子, 橋本恵子
 (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, Kiyoshi Sasaki,
 Shinobu Wakuri, Hirokazu Kusakabe,
 Yuzuki Nakagawa, Masahiro Mizutani,
 Kikuko Furuhashi, Keiko Hashimoto
 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-(dimethylamino)ethyl acrylate(DMAEA)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		with aberrations TAG (%)	Polyloid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾ SA NA		
Control			200	0	2	2	0	0	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.50		-
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38		100.0	
DMAEA	0.015	24	200	0	0	0	2	1	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.50		82.5
DMAEA	0.030	24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	+	72.0
DMAEA	0.060	24	200	8	23	44	1	1	0	77	0	47*(23.5)	42 (21.0)	10.75*	+	65.0
DMAEA	0.12 ***	24	-													13.0
MC	0.00005	24	200	6	32	109	1	0	0	148	0	94 (47.0)	91 (45.5)	0.13		-
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.63		100.0
DMAEA	0.015	48	200	3	4	0	2	0	0	9	1	7 (3.5)	5 (2.5)	0.26 ⁷⁾		58.5
DMAEA	0.030	48	180	3	3	0	9	1	0	16	1	8 (4.4)	6 (3.3)	0.36 ⁸⁾	+	56.5
DMAEA	0.060	48	200	0	4	10	11	2	10	37	4	17*(8.5)	17 (8.5)	6.21 ⁹⁾ *	+	103.5
DMAEA	0.12 ***	48	-													8.0
MC	0.00005	48	200	6	35	127	12	7	20	207	1	98 (49.0)	96 (48.0)	0.25		-

Abbreviations, gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte: chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange(dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no.of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C.

1)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)Concurrent cytotoxicity, representing cytotoxicity, was measured with MonocellaterTM. 7)Seven hundred and sixty four cells were analysed. 8)Five hundred and fifty seven cells were analysed. 9)Seven hundred and eighty nine cells were analysed. *:Significantly different from historical solvent control data at p<0.05 by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **:Purity was 99.9 wt%. 2-Dimethylamino ethanol(0.01%), acrylate(0.01%) and methoquinone(2000 ppm) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL/IU) treated with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate(DMAEA)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells			Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		with aberrations TAG (%)	Polyloid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾ SA NA		
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.00		-	
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	1	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		100.0
DMAEA	0.0050	-	6-(18)	200	2	0	1	1	0	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	1.25*		97.5
DMAEA	0.010	-	6-(18)	200	4	12	39	1	0	0	56	0	32*(16.0)	30 (15.0)	10.88*	+	99.0
DMAEA	0.020 ***	-	6-(18)	-												17.0	
DMAEA	0.040 ***	-	6-(18)	-												15.5	
DMAEA	0.080 ***	-	6-(18)	-												17.0	
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	2	0	5	0	0	7	2	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00		100.0
DMAEA	0.025	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	1.25*		85.0
DMAEA	0.050	+	6-(18)	200	6	7	15	0	0	0	28	0	25*(12.5)	19 (9.5)	5.25*	+	80.0
DMAEA	0.10 ***	+	6-(18)	-												39.0	
DMAEA	0.20 ***	+	6-(18)	-												36.0	
DMAEA	0.40 ***	+	6-(18)	-												37.5	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	8	86	387	11	3	120	615	0	185 (92.5)	184 (92.0)	0.13		-

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.

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 MonocellaterTM. *:Significantly different from historical solvent control data at p<0.05 by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **:Purity was 99.9 wt%. 2-Dimethylamino ethanol(0.01%), acrylate(0.01%) and methoquinone(2000 ppm) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because there were small number of metaphases due to severe cytotoxicity.

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)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-(Dimethylamino)ethyl acrylate by Oral Administration in Rats

要約

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルは、カチオン系凝集剤、エマルジョン改善剤、繊維処理剤、粘着剤、接着剤などの製造に使用されている。毒性に関する情報としては、眼、皮膚、粘膜に対して刺激性を有し、ラットの経口投与によるLD₅₀値は455 mg/kgとの報告がある¹⁾。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4, 20および100 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

100 mg/kg群において、雄で一過性の体重増加抑制および摂餌量減少、雌で死亡が2例認められた。剖検では雌雄で前胃壁の肥厚および膵十二指腸リンパ節の腫大が観察され、病理組織学検査では前胃粘膜に潰瘍、炎症性細胞の浸潤および粘膜上皮の過形成、膵十二指腸リンパ節に形質細胞の増生が認められた。さらに雌では胸腺の重量減少と萎縮が認められた。また、雄の血液学検査で網状赤血球、血小板および分葉核球数の増加、血液生化学検査でアルブミンの減少が認められた。20 mg/kg群においても雄の前胃に同様な組織変化が認められた。

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、出産率、分娩率、妊娠期間、分娩および哺育行動には被験物質に起因する変化は認められなかった。また、出産児数、出生産児数、性比、出生率、新生児の4日生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにおいても被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果より、アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステルの反復投与毒性に関する無影響量は雄が4 mg/kg/day、雌が20 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は、親動物および児動物ともに100 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質

アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステル(株)日本触媒工業、Lot No. 5P07、純度99.9%)は、融点-75℃、

沸点170℃、水およびアセトンに溶けやすい無色～黄色透明の液体である。被験物質は冷蔵・遮光下で保管した。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)より入手した雌雄のSDラット(Crj:CD)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324～369 g、雌が212～244 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中、温度20～25℃、湿度40～70%、換気約12回/時、照明12時間/日(7:00～19:00)に自動調節され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50, 100および200 mg/kgの用量で7日間経口投与した結果、雌雄とも200 mg/kg群で体重減少あるいは増加抑制、摂餌量減少、削瘦が認められた。また剖検では、200 mg/kg群で前胃粘膜の肥厚、白色化、出血、潰瘍、胃の穿孔と周囲組織との癒着、十二指腸粘膜の白色化などの消化管の変化が認められ、100 mg/kg群でも前胃に同様な変化が認められた。以上の結果から、本試験では高用量を100 mg/kgとし、以下公比5で中用量を20 mg/kg、低用量を4 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日までとし、コーン油に溶解させた被験物質を胃ゾンデを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与液量は5 ml/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。

投与液の調製はイエローランプ照明下で行い、投与液は褐色瓶に入れ、投与に供するまで冷蔵・遮光下で保存した。なお、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、体重増加量を交配前は投与開始日、妊娠期間は妊娠0日、哺育期間は哺育0日の体重を基準に算出した。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定した。

3) 雄の血液学検査

雄の全生存動物について、解剖日の前日より約21時間絶食させ、チオペンタールナトリウム(ラボナル：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：立石電機株)、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)を自動網状赤血球測定装置(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)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。

4) 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分間放置した後、3000 r.p.m.で10分間遠心分離し、得られた血清について、GOT(SSCC改良法)、GPT(SSCC改良法)、ALP(GSCC改良法)、 γ -GTP(SSCC改良法)、尿素窒素(Urease-GLDH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)、クレアチニン(Jaffé法)、総ビリルビン(Jendrassik改良法)、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(O-CPC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。

5) 病理検査

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、胸腺、肝臓、腎臓、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、脳、下垂体、眼球およびハーダー腺、甲状腺および上皮小体、心臓、肺、脾臓、胃、腸管(十二指腸～直腸)、膀胱、卵巣、骨髄(大腿骨)、坐骨神経および脊髄を採取し、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ッドソン液、精巣および精巣上体はブアン液で固定した。

病理組織検査は雌雄の対照および100 mg/kg群の脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、胃、十二指腸、副腎、精巣、精巣上体、非妊娠雌の卵巣、全新生児死亡および哺育異常を示した母動物の乳腺、ならびにその他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。また、器官重量測定で減少がみられた雌の胸腺、さらに、雄の血液学検査で網状赤血球および血小板数の増加がみられたことから、雌雄の大腿骨骨髄についても対照および100 mg/kg群を検査した。その結果、雌雄の胃および雌の胸腺に被験物質に起因する変化が認められたので、4および20 mg/kg群のこれらの器官についても検査した。なお、肉眼的に変化がみられた膵十二指腸リンパ節を検査した結果、被験物質に起因する変化が認められたが、胃の変化に伴った二次的变化と判断し、4および20 mg/kg群については検査しなかった。

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。膣栓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時の時点で分娩が終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、一般状態、授乳、営巣、食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。

哺育4日の解剖時に卵巣、子宮を摘出して黄体数および着床数を検査した。交尾確認後25日を経ても分娩しない雌は剖検し、肉眼的に着床が認められない動物の子宮は2% KOH水溶液に浸漬し、着床の有無を確認した。また、全ての出産児が死亡した母動物はその時点で剖検し、乳腺を保存した。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, 出生産児数, 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, 死亡の有無を毎日観察した。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。哺育0および4日の生存児数から出生率(〔出生産児数/総出産児数〕×100), 新生児の4日生存率(〔哺育4日生存児数/出生産児数〕×100)を算出した。

(2) 体重

哺育0および4日に1腹毎に雌雄単位で測定し, それぞれの平均値を算出した。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

全ての生存児について哺育4日に口腔を含む外表を検査した後, 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を切断・放血し, 安楽死させて剖検した。

6. 統計解析

計量データについて, 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で各群の例数が一定ならばDunnett法またはDunnett型, 不定ならばScheffé法またはScheffé型により多重比較を行った。計数データについては, 組織所見をArmitageの χ^2 検定, その他の項目をFisherの直接確率法により検定した。新生児に関するデータは各母動物毎に算出した平均値を統計単位とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡動物

100 mg/kg群の雌2例が投与開始後1日および16日に死亡した。後者は投与開始後13日に自発運動の低下, うずくまり, ラッセル音, 赤色鼻汁および軟便を示したが, 翌日にはこれらの症状が消失し, 以後死亡するまで投与後の流涎が観察された以外に変化は認められなかった。前者には死亡に関連する一般状態の変化は認められなかった。病理検査では, 共通する所見として肺のうっ血および出血が認められた他, 前者には赤色胸水, 食道の出血巣と潰瘍, 前胃粘膜の出血巣, 片側腎臓のう胞が認められ, 後者には肺の水腫, 前胃粘膜の潰瘍, 炎症性細胞の浸潤および粘膜の過形成, 腺胃粘膜の出血巣, 胸腺の萎縮および片側副腎皮質の壊死が認められた。

2) 一般状態

投与直後の流涎が100 mg/kg群の雄では投与開始後4日から, 雌では8日から観察され, 投与終了時までには断続的に発現する例を含めてほぼ全例で認められた。これらの一部には投与直前から反射的に流涎する例も観察された。その他, 哺育異常を示した母動物で自発運動の低下, 肛門周囲の汚れ, 体温低下または紅涙が対照群の1例で哺育1日に, 20 mg/kg群の1例で哺育3日以降に認められた。

3) 体重(Fig.1,2)

雄では, 100 mg/kg群で投与開始後3日の体重増加量が有意な低値を示したが, 以後は有意な変化は認められなかった。雌では, 全期間を通して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。

4) 摂餌量

雄では, 100 mg/kg群で投与開始後3日の摂餌量が有意な低値を示したが, 以後は有意な変化は認められなかった。その他, 4 mg/kg群で投与開始後42日の摂餌量が有意な高値を示したが, 20および100 mg/kg群では有意差が認められなかったことから, 偶発的な変化と判断した。雌では, 全期間を通して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。

5) 雄の血液学検査(Table 1)

網状赤血球および血小板数の有意な増加が100 mg/kg群で認められた。また, 同群では, リンパ球比が有意な低値を, 分葉核球比が有意な高値を示し, 実数換算値では分葉核球数の有意な増加が認められた。

6) 雄の血液生化学検査(Table 2)

アルブミンの有意な減少が100 mg/kg群で認められた。その他, 4 mg/kg群の総ビリルビンが有意な高値を示したが, 20および100 mg/kg群では有意な変化が認められなかったことから, 偶発的なものと判断した。また, 100 mg/kg群のクロールが有意な高値を示したが, 生理的変動範囲内の値であった。

7) 器官重量(Table 3)

胸腺の絶対重量および相対重量の有意な減少が100 mg/kg群の雌で認められた。その他, 4 mg/kg群の雌で副腎の絶対重量が有意な低値を示したが, 20および100 mg/kg群では有意な変化が認められなかったことから, 偶発的な変化と判断した。雄では, いずれの器官においても, 絶対重量および相対重量とも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。

8) 剖検所見(Table 4)

投与終了後解剖動物では, 前胃壁の肥厚が20 mg/kg群の雄2例, 100 mg/kg群の雌雄全例に認められた。肥厚した前胃粘膜の表面は白色化し, 粗造を呈していた。少数例では前胃漿膜面の一部と周囲の腹膜, 横隔膜や肝

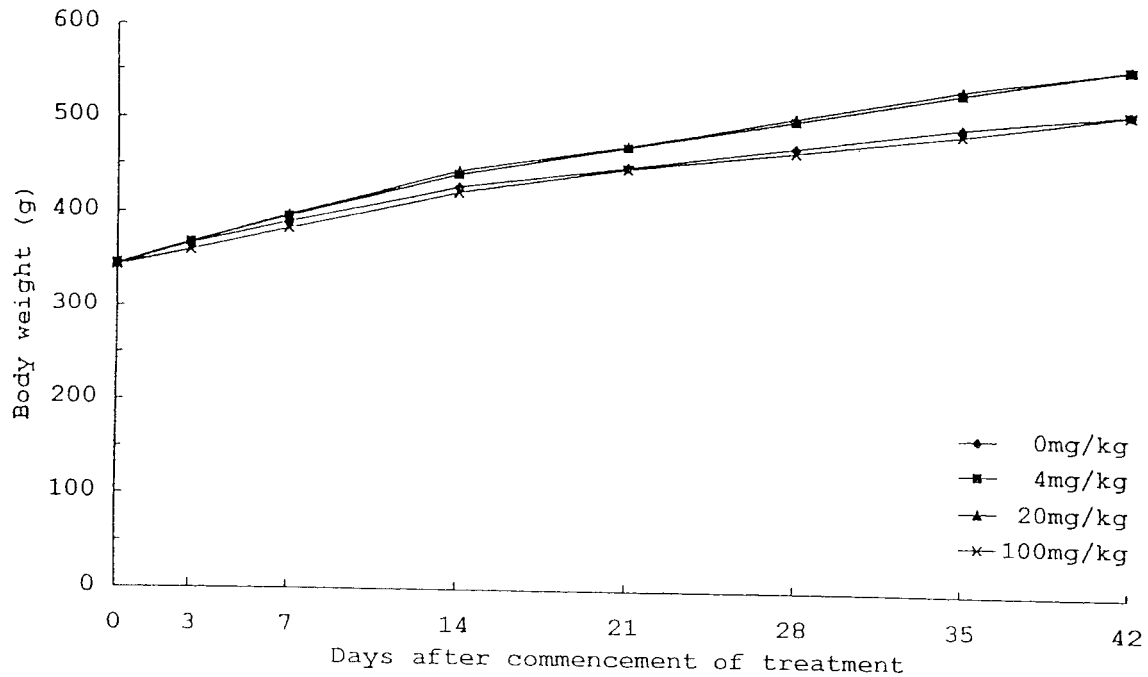


Fig.1 Body weight changes of male rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

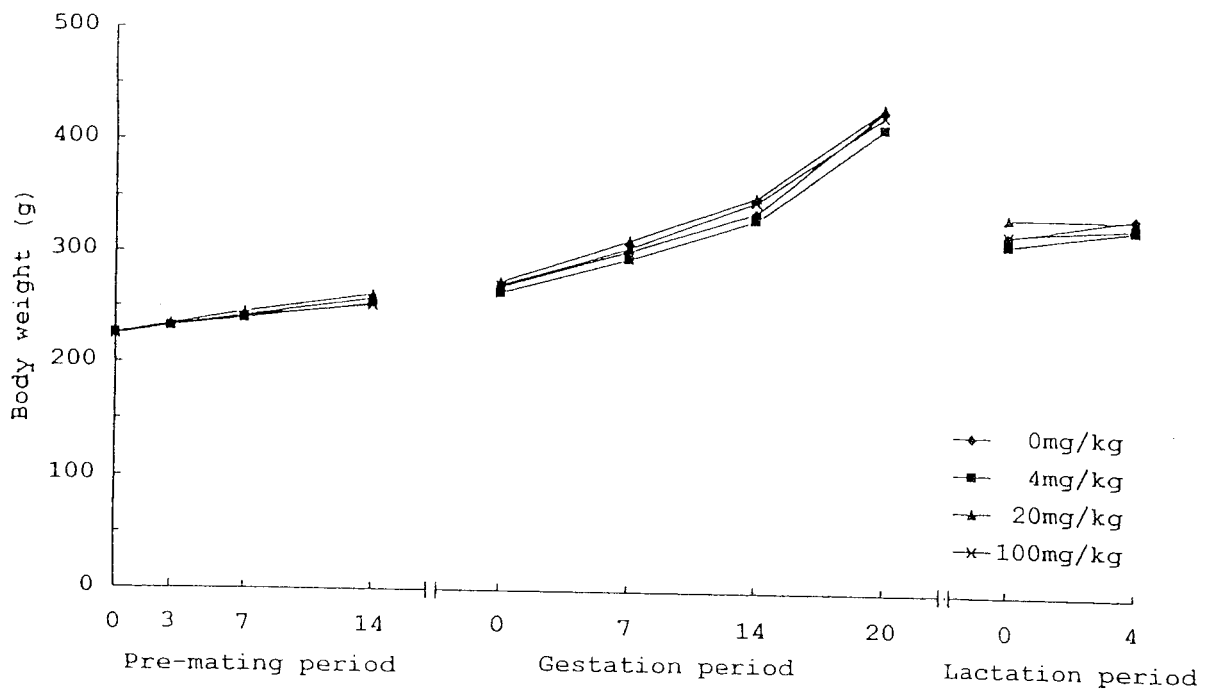


Fig.1 Body weight changes of female rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

臓、横隔膜と肺の癒着が観察された。また、脾十二指腸リンパ節の腫大が100 mg/kg群の雌雄各7例で認められた。

全新生児が死亡した対照群の雌の1例では、胸腺および脾臓の小型化、胃の膨満、両側副腎の腫大、膈の濃貯留、両側ハーダー腺の褐色化が認められた。また、哺育3日以降に授乳行動を示さなかった20 mg/kg群の雌の1例では、胸腺の小型化、腺胃粘膜の出血巣、両側副腎の腫大が認められた。その他に、被験物質投与群で種々の

変化が認められたが、発現状況から偶発病変と判断した。

9) 組織所見 (Table 5)

投与終了後解剖動物では、被験物質に起因する変化が雌雄の前胃、脾十二指腸リンパ節および雌の胸腺に認められた。すなわち、前胃粘膜の潰瘍とそれに伴い生じた炎症性細胞の浸潤および粘膜上皮の過形成が20 mg/kg群で雄2例、100 mg/kg群の雌雄全例に認められ、100

mg/kg群では発現頻度に有意差が認められた。潰瘍が漿膜面にまで及び、周囲の組織と癒着する例が認められる一方、粘膜の過形成あるいは炎症性細胞の浸潤のみがみられる例もあった。肉眼的に腫大していた膵十二指腸リンパ節では、髄索における形質細胞の増生が認められた。雌の胸腺では、軽度あるいは中等度の萎縮が対照、20および100 mg/kg群のそれぞれ1, 1, 3例で認められ、100 mg/kg群でわずかに増加する傾向がみられた。

非妊娠雌の卵巣、全新生児死亡および哺育異常を示した母動物の乳腺ならびに雌雄の大腿骨髄には、特記すべき異常所見は認められなかった。

その他に、被験物質投与群で種々の変化が認められたが、いずれも自然発生的に観察される変化であり、発現状況に一定の傾向がないことから偶発病変と判断した。

2. 生殖発生毒性

1) 生殖機能 (Table 6)

ほとんどの雌が交配開始後5日以内に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有意な差は認められなかった。100 mg/kg群の雌2例は交配開始日から発情休止期が継続したが、これらのうち1例は交配開始後14日に発情期を示して交尾し、他の1例も膣垢検査では交尾確認できなかったものの、後の観察で受胎していたことが判明した。また、非妊娠動物は各群とも1例のみであり、受胎率にも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。

2) 分娩・哺育状態 (Table 7)

各群とも母動物全例が正常な分娩を示した。また、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率および分娩率には、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。

哺育期間の観察において、哺育異常が対照および100 mg/kg群の母動物各1例で観察され、哺育2日までに全新生児が死亡した。いずれも分娩日から新生児の回集、授乳などの哺育行動を示さず、さらに100 mg/kg群の1例は全新生児を食殺した。また、20 mg/kg群の母動物1例は哺育3日以降、新生児の回集および授乳行動を示さなかった。しかし、これらの哺育異常については、各群1例のみの発現であったことから、偶発的な変化と判断した。

3) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存率 (Table 7)

同腹内全新生児死亡が対照および100 mg/kg群の各1腹で認められた他は、死亡児は4, 20および100 mg/kg群でそれぞれ1, 3, 1腹で1~2例観察されただけであり、出産児数、出生児数、性比、出生率および新生児の4日生存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。

(2) 出生児の観察

各群いずれの新生児にも外表異常は認められなかつ

た。また、出生日に未受乳の新生児が各群で観察されたが、母動物が授乳行動を示さなかった腹以外のほとんどは翌日に受乳し、一般状態にも異常は認められなかった。

(3) 体重 (Table 7)

各被験物質投与群の雌雄ともに対照群とほぼ同様な体重および体重増加量を示し、有意差は認められなかった。

(4) 剖検

腎盂拡張が、生存動物では20 mg/kg群の1腹で1例および100 mg/kg群の1腹で6例、死亡動物では対照群の1腹で10例に観察された。その他には、生存動物および死亡動物ともに異常は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性

反復投与による影響として、100 mg/kg群の雄で投与初期の一過性の体重増加抑制と摂餌量減少、雌で死亡が2例認められた。死亡例には共通する所見として肺のうっ血、出血、水腫が認められた。被験物質が属するアクリル酸エステル類により急性中毒死した動物の特徴的所見は、肺の充血および出血であることが知られていることから²⁾、同様な原因により死亡した可能性が考えられる。

病理検査において、前胃の肥厚が雄では20 mg/kg以上の群、雌では100 mg/kg群で認められ、組織学的には前胃の潰瘍およびそれに伴う炎症性細胞の浸潤と粘膜上皮の過形成が観察された。被験物質と類似の化合物であるアクリル酸エチルエステルは、ラットの前胃に対し刺激性を有し、潰瘍や炎症性変化および上皮の過形成を起こすことが報告されている²⁻⁵⁾。したがって、被験物質もこのアクリル酸エステルと同様に前胃に対して刺激性を有するものと考えられる。

膵十二指腸リンパ節における形質細胞の増生が100 mg/kg群の雌雄で肉眼的な腫大を伴って認められた。本変化はリンパ節近辺にある炎症性変化に対する生理的反応として生じるものであり⁶⁾、前胃の潰瘍による炎症性変化に反応した二次的な変化と考えられる。また、胸腺の重量減少と萎縮の増加傾向が100 mg/kg群の雌で認められたが、本変化はストレス状態の動物で観察されるものであり⁷⁾、被験物質に特異的な変化というよりも、妊娠、分娩および哺育の負荷に被験物質の影響が加わったことにより生じた非特異的な変化と考えられる。

雄の血液学検査において、100 mg/kg群で認められた網状赤血球および血小板数の増加については、前胃の病変部からの出血に対する代償性の造血機能亢進像であり、分葉核球数の増加についても前胃の炎症に伴った変化と推察される。また、血液生化学検査におけるアルブミンの減少は、その他に肝臓あるいは腎臓への影響を示唆する変化が認められなかったことから、前胃の病変に伴った喪失性の二次的な変化である可能性が考えられる。

投与直後の流涎が100 mg/kg群の雌雄で観察された

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、反復投与毒性を示す変化ではないと判断した。

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、出産率、分娩率、妊娠期間、分娩および哺育行動ともに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、出産児数、出産生児数、性比、出生率、新生児の生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにおいても被験物質に起因する変化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、分娩・哺育機能および次世代の発育への影響はないと考えられる。

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響として、親動物には前胃の潰瘍、粘膜上皮の増生など、主に被験物質の刺激性に起因する変化が雄では20 mg/kg以上の群、雌では100 mg/kg群で認められ、2例が死亡した。しかし、親動物の生殖機能および分娩・哺育機能ならびに次世代の発育への影響は認められなかった。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4 mg/kg/day、雌が20 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は親動物および児動物ともに100 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) EPA/OTS, Doc #89-910000064, 1991.
- 2) 後藤 稠, 池田正之, 原 一郎編, "産業中毒便覧(増補版)," 医歯薬出版株式会社, 東京, 1984, pp.893-993.
- 3) B. I. Ghanayem et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 323(1985).
- 4) B. I. Ghanayem et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **80**, 336(1985).
- 5) B. I. Ghanayem et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **83**, 576(1986).
- 6) J. M. Ward, "Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Hemopoietic System," eds. by T. C. Jones, J. M. Ward, U. Mohr and R. D. Hunt, Springer-Verlag, Berlin, 1990, pp.155-161.
- 7) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies," Elsevier, Amsterdam, 1990, pp.112-114.

連絡先

試験責任者: 松浦郁夫

試験担当者: 田谷ゆかり, 土谷 稔, 涌生ゆみ,
豊田直人, 高野克代

(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所
〒314-02 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)

Yukari Taya, Minoru Tsuchitani,

Yumi Wako, Naoto Toyota,

Katsuyo Takano

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-02, Japan

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

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

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Number of animals	12	12	12	12
RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	851 \pm 24.9	842 \pm 40.9	840 \pm 38.8	830 \pm 34.9
Ht (PCV) (%)	45.5 \pm 1.08	44.9 \pm 1.32	45.8 \pm 1.79	44.1 \pm 1.52
Hb (g/dl)	15.8 \pm 0.46	15.7 \pm 0.54	15.9 \pm 0.52	15.4 \pm 0.35
Reticulo (%)	25 \pm 2.2	27 \pm 3.3	26 \pm 3.4	30 \pm 3.3**
MCV (μm^3)	53.5 \pm 1.32	53.4 \pm 2.32	54.6 \pm 1.68	53.1 \pm 1.87
MCH (pg)	18.6 \pm 0.52	18.7 \pm 0.95	19.0 \pm 0.60	18.6 \pm 0.69
MCHC (%)	34.7 \pm 0.36	35.0 \pm 0.83	34.8 \pm 0.61	34.9 \pm 0.60
Plt ($10^4/\mu\text{l}$)	103.0 \pm 9.03	102.5 \pm 12.28	104.6 \pm 7.78	115.3 \pm 13.27*
WBC ($10^2/\mu\text{l}$)	120 \pm 15.7	120 \pm 24.9	122 \pm 32.5	159 \pm 43.4
Differential leukocyte counts (%)				
Lymphocytes	81 \pm 4.4	84 \pm 5.0	82 \pm 4.5	68 \pm 7.9**
Neutrophils				
segmented	13 \pm 4.7	10 \pm 4.5	12 \pm 4.2	25 \pm 8.1**
band	0 \pm 0.5	1 \pm 0.9	0 \pm 0.7	1 \pm 0.5
Eosinophils	1 \pm 0.8	1 \pm 0.8	2 \pm 1.4	1 \pm 1.2
Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
Monocytes	4 \pm 2.7	5 \pm 2.4	5 \pm 3.0	5 \pm 2.7
Differential leukocyte counts ($\times 10^2/\mu\text{l}$)				
Lymphocytes	98 \pm 13.9	100 \pm 21.4	99 \pm 26.0	109 \pm 34.3
Neutrophils				
segmented	16 \pm 6.0	12 \pm 4.8	15 \pm 7.3	39 \pm 16.0**
band	0 \pm 0.5	1 \pm 1.2	0 \pm 0.7	1 \pm 0.8
Eosinophils	1 \pm 1.0	1 \pm 1.1	2 \pm 2.1	2 \pm 2.5
Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
Monocytes	5 \pm 3.7	7 \pm 3.8	6 \pm 3.6	8 \pm 5.3

Values are expressed as Mean \pm 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 acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Number of animals	12	12	12	12
GOT (IU/l)	83 \pm 17.5	87 \pm 15.3	85 \pm 21.3	82 \pm 18.3
GPT (IU/l)	24 \pm 4.0	25 \pm 5.4	20 \pm 4.8	24 \pm 3.6
γ -GTP (IU/l)	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
AlP (IU/l)	268 \pm 60.3	256 \pm 48.6	251 \pm 71.9	243 \pm 37.4
Total bilirbin (mg/dl)	0.1 \pm 0.06	0.2 \pm 0.03*	0.2 \pm 0.07	0.2 \pm 0.06
Urea nitrogen (mg/dl)	13.4 \pm 1.93	13.3 \pm 2.02	12.9 \pm 1.41	13.2 \pm 2.12
Creatinine (mg/dl)	0.5 \pm 0.07	0.5 \pm 0.05	0.5 \pm 0.04	0.5 \pm 0.03
Glucose (mg/dl)	133 \pm 15.5	129 \pm 7.6	139 \pm 7.6	130 \pm 12.1
Total Chol. (mg/dl)	89 \pm 15.8	83 \pm 13.8	84 \pm 15.2	93 \pm 15.8
Triglyceride (mg/dl)	70 \pm 25.7	87 \pm 53.6	85 \pm 27.7	92 \pm 32.3
Total protein (g/dl)	6.99 \pm 0.269	7.02 \pm 0.193	7.02 \pm 0.366	6.86 \pm 0.248
Albumin (g/dl)	3.73 \pm 0.132	3.80 \pm 0.060	3.74 \pm 0.129	3.61 \pm 0.126*
A/G ratio	1.14 \pm 0.050	1.19 \pm 0.059	1.15 \pm 0.069	1.12 \pm 0.092
Inorganic phos. (mg/dl)	7.3 \pm 0.33	7.5 \pm 0.43	7.6 \pm 0.44	7.4 \pm 0.33
Ca (mg/dl)	9.6 \pm 0.33	9.6 \pm 0.33	9.7 \pm 0.34	9.7 \pm 0.33
Na (mEq/l)	143 \pm 1.1	144 \pm 0.8	144 \pm 0.7	144 \pm 0.8
K (mEq/l)	4.6 \pm 0.23	4.4 \pm 0.19	4.6 \pm 0.15	4.5 \pm 0.26
Cl (mEq/l)	100 \pm 1.2	100 \pm 1.2	101 \pm 1.2	101 \pm 0.7*

Values are expressed as Mean \pm S.D.

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

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

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Male				
Number of animals	12	12	12	12
Body weight (g)	494 ± 37.3	539 ± 45.6	540 ± 69.5	491 ± 50.0
Absolute organ weight				
Thymus (mg)	346 ± 45.3	438 ± 101.0	380 ± 101.3	314 ± 70.2
Liver (g)	13.61 ± 1.527	15.05 ± 2.531	14.70 ± 2.865	14.13 ± 1.948
Kidney (g)	3.02 ± 0.248	3.33 ± 0.302	3.23 ± 0.451	3.09 ± 0.416
Adrenal (mg)	57.2 ± 11.63	60.7 ± 13.43	66.1 ± 10.81	64.9 ± 8.61
Testis (g)	3.35 ± 0.212	3.48 ± 0.232	3.34 ± 0.292	3.38 ± 0.294
Epididymis (g)	1.27 ± 0.054	1.32 ± 0.107	1.27 ± 0.194	1.33 ± 0.125
Relative organ weight				
Thymus (mg%)	71 ± 11.8	82 ± 19.7	71 ± 19.5	64 ± 12.3
Liver (g%)	2.75 ± 0.203	2.78 ± 0.242	2.70 ± 0.188	2.87 ± 0.188
Kidney (g%)	0.61 ± 0.054	0.62 ± 0.046	0.60 ± 0.043	0.63 ± 0.049
Adrenal (mg%)	11.6 ± 2.47	11.3 ± 2.33	12.3 ± 1.71	13.3 ± 1.42
Testis (g%)	0.68 ± 0.034	0.65 ± 0.061	0.62 ± 0.078	0.69 ± 0.058
Epididymis (g%)	0.26 ± 0.026	0.24 ± 0.025	0.24 ± 0.050	0.27 ± 0.028
Female				
Number of animals	10	11	11	7
Body weight (g)	340 ± 22.9	329 ± 17.4	338 ± 51.7	331 ± 38.2
Absolute organ weight				
Thymus (mg)	256 ± 80.8	203 ± 43.3	220 ± 76.1	162 ± 27.3*
Liver (g)	14.29 ± 0.977	14.04 ± 1.219	13.66 ± 2.302	15.45 ± 2.915
Kidney (g)	2.02 ± 0.117	1.95 ± 0.100	2.03 ± 0.122	2.05 ± 0.216
Adrenal (mg)	75.0 ± 5.04	67.7 ± 4.55*	74.9 ± 12.56	78.0 ± 7.40
Relative organ weight				
Thymus (mg%)	75 ± 22.4	62 ± 12.0	64 ± 20.2	49 ± 4.0**
Liver (g%)	4.21 ± 0.168	4.27 ± 0.229	4.05 ± 0.296	4.62 ± 0.478
Kidney (g%)	0.59 ± 0.043	0.60 ± 0.028	0.62 ± 0.151	0.62 ± 0.023
Adrenal (mg%)	22.2 ± 1.94	20.6 ± 1.57	23.5 ± 10.08	23.8 ± 2.92

Values are expressed as Mean ± S.D.

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

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

Organ	Sex	Male				Female				Dead
	Fate	Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice				
	Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100	0	4	20	100	
Number of animals		12	12	12	12	12	12	12	10	2 ^{&}
Lymph node										
Enlargement, pancreatico-duodenal		0	0	0	7	0	0	0	7	0
Thymus										
Small		0	0	0	0	1	0	1	0	1
Spleen										
Small		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Lung										
Congestion		0	0	0	0	0	0	0	0	2
Edema		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage, focal		1	0	0	0	0	0	0	0	0
Esophagus										
Hemorrhage, focal		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Stomach										
Distention		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Hemorrhage, focal, forestomach		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage, focal, glandular stomach		0	0	0	0	0	0	1	0	1
Thickening of wall, forestomach		0	0	2	12	0	0	0	10	0
Kidney										
Dilatation, pelvis		0	0	0	0	0	1	0	1	0
Nodule, one		1	0	0	0	0	0	0	0	0
Testis										
Small		0	0	1	0					
Epididymis										
Small		0	0	1	0					
Vagina										
Pus within lumen						1	0	0	0	0
Adrenal										
Enlargement		0	0	0	0	1	0	1	0	0
Harderian gland										
Brownish		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Thoracic cavity										
Pleural fluid, red		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Abdominal cavity										
Adhesion, stomach and diaphragm and liver		0	0	0	0	0	0	0	1	0
Adhesion, stomach and diaphragm and lung		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Adhesion, stomach and peritoneum		0	0	0	1	0	0	0	1	0

&, One animal died at 1 day, the other died at 16 days after commencement of administration.

Table 5 Summary of histopathological findings in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ	Sex	Fate	Male				Female				Dead
			Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice				
			0	4	20	100	0	4	20	100	
Findings		Dose (mg/kg/day)									100
Number of animals			12	12	12	12	12	12	12	10	2 ^{&}
Heart											
Inflammatory cell infiltration, focal		Total	1	#	#	0	0	#	#	0	0
		+	1	#	#	0	0	#	#	0	0
Lymph node (pancreatico-duodenal)											
Hyperplasia, plasma cell		Total	#	#	#	7/7 [§]	#	#	#	7/7	#
		+	#	#	#	7/7	#	#	#	7/7	#
Thymus											
Atrophy		Total	#	#	#	#	1	0	1	3	1
		+	#	#	#	#	0	0	1	2	0
		++	#	#	#	#	1	0	0	1	1
Hyperplasia, thymic epithelium		Total	#	#	#	#	1	1	0	0	0
		+	#	#	#	#	1	1	0	0	0
Spleen											
Increase in extramedullary hematopoiesis		Total	0	#	#	0	6	#	#	4	0
		+	0	#	#	0	6	#	#	4	0
Atrophy		Total	0	#	#	0	1	#	#	0	0
		+	0	#	#	0	0	#	#	0	0
		++	0	#	#	0	1	#	#	0	0
Bone marrow (femur)			ND	#	#	ND	ND	#	#	ND	ND
Lung											
Congestion		Total	0/1	#	#	#	#	#	#	#	2
		+	0/1	#	#	#	#	#	#	#	0
		++	0/1	#	#	#	#	#	#	#	2
Edema		Total	0/1	#	#	#	#	#	#	#	1
		+	0/1	#	#	#	#	#	#	#	1
Hemorrhage		Total	0/1	#	#	#	#	#	#	#	2
		+	0/1	#	#	#	#	#	#	#	0
		++	0/1	#	#	#	#	#	#	#	2
Inflammatory cell infiltration, focal											
		Total	1/1	#	#	#	#	#	#	#	0
		+	1/1	#	#	#	#	#	#	#	0
Esophagus											
Ulcer		Total	#	#	#	#	#	#	#	#	1/1
		+	#	#	#	#	#	#	#	#	0/1
		++	#	#	#	#	#	#	#	#	1/1
Stomach											
Atrophy, mucosa, glandular stomach		Total	0	0	0	0	1	0	0	0	0
		+	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Hemorrhage, focal, forestomach		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage, focal, glandular stomach		Total	0	0	0	0	0	0	1	0	1
		+	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Hyperplasia, mucosa, forestomach		Total	0	0	2	12 ^{**}	0	0	0	10 ^{**}	1
		+	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		++	0	0	1	12	0	0	0	10	1
Inflammatory cell infiltration, forestomach		Total	0	0	2	11 ^{**}	0	0	0	10 ^{**}	1
		+	0	0	1	0	0	0	0	0	0
		++	0	0	1	11	0	0	0	10	1
Ulcer, forestomach		Total	0	0	1	11 ^{**}	0	0	0	9 ^{**}	1
		+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		++	0	0	1	11	0	0	0	9	1
Duodenum			ND	#	#	ND	ND	#	#	ND	ND

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

§, Number of animals showing lesion/number of animals examined.

&, One animal died at 1 day, the other died at 16 days after commencement of administration.

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

Table 5 (Continued)

Organ	Sex	Fate	Dose (mg/kg/day)	Male				Female				Dead
				Scheduled sacrifice				Scheduled sacrifice				
				0	4	20	100	0	4	20	100	
Number of animals				12	12	12	12	12	12	12	10	2 ^{&}
Liver												
Fatty change, hepatocyte	Total			5	#	#	4	1	#	#	0	0
	+			5	#	#	4	0	#	#	0	0
	++			0	#	#	0	1	#	#	0	0
Microgranuloma	Total			6	#	#	3	0	#	#	1	0
	+			6	#	#	3	0	#	#	1	0
Necrosis, focal	Total			1	#	#	0	0	#	#	0	0
	+			1	#	#	0	0	#	#	0	0
Kidney												
Basophilic tubule	Total			2	#	#	1	0	0/1 ^{\$}	#	0	0
	+			2	#	#	1	0	0/1	#	0	0
Cyst	Total			1	#	#	0	1	0/1	#	0	1
	+			1	#	#	0	1	0/1	#	0	1
Dilatation, pelvis	Total			0	#	#	0	0	1/1	#	1	0
	+			0	#	#	0	0	1/1	#	1	0
Eosinophilic body, tubular epithelium, proximal	Total			0	#	#	1	0	0/1	#	0	0
	+			0	#	#	1	0	0/1	#	0	0
Fatty degeneration, tubular epithelium	Total			0	#	#	0	1	0/1	#	0	0
	+			0	#	#	0	0	0/1	#	0	0
	++			0	#	#	0	1	0/1	#	0	0
Hyaline droplet, tubular epithelium	Total			3	#	#	2	0	0/1	#	0	0
	+			3	#	#	2	0	0/1	#	0	0
Inflammatory cell infiltration, interstitium	Total			1	#	#	0	0	0/1	#	0	0
	+			1	#	#	0	0	0/1	#	0	0
Mineralization	Total			1	#	#	0	0	0/1	#	0	0
	+			1	#	#	0	0	0/1	#	0	0
Testis												
Atrophy	Total			0	#	1/1	0					
Epididymis												
Decrease in sperm	Total			0	#	1/1	0					
+				0	#	1/1	0					
Inflammatory cell infiltration, focal	Total			0	#	0/1	1					
	+			0	#	0/1	1					
Ovary								ND/1	ND/1	ND/1	ND/1	#
Vagina												
Inflammatory cell infiltration	Total							1/1	#	#	#	#
	+							0/1	#	#	#	#
	++							1/1	#	#	#	#
Mammary gland								ND/1	#	ND/1	ND/1	#
Adrenal												
Hypertrophy, cortical cell, fascicular zone	Total			ND	#	#	ND	1	#	0/1 ^{\$}	0	0
	+			ND	#	#	ND	1	#	0/1	0	0
Increase in lipid droplet, fascicular zone	Total			ND	#	#	ND	1	#	0/1	1	0
	+			ND	#	#	ND	0	#	0/1	1	0
	++			ND	#	#	ND	1	#	0/1	0	0
Mineralization	Total			ND	#	#	ND	1	#	0/1	0	0
	+			ND	#	#	ND	1	#	0/1	0	0
Necrosis, cortex	Total			ND	#	#	ND	0	#	1/1	0	1
	+			ND	#	#	ND	0	#	0/1	0	1
	++			ND	#	#	ND	0	#	1/1	0	0
Harderian gland												
Hyperscretion	Total			#	#	#	#	1/1	#	#	#	#
+				#	#	#	#	1/1	#	#	#	#
Brain								ND	#	#	ND	ND

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

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

&, One animal died at 1 day, the other died at 16 days after commencement of administration.

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

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Number of pairs examined	12	12	12	11 [#]
Number of pairs with successful mating	12	12	12	10 ^{\$}
Mating index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant females	11	11	11	9 ^{\$}
Fertility index (%) ^{b)}	91.7	91.7	91.7	90.0
Pairing days until mating	2.0 ± 1.41 ^{c)}	2.1 ± 1.16	2.0 ± 1.04	3.6 ± 4.03
Number of estrous stages without mating	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00

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.

#, One female died at 2 days after pairing.

\$. These indices included one female that the pregnancy was noticed later by clinical signs.

Table 7 Delivery and litter data in rats treated orally with 2-(dimethylamino)ethyl acrylate in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0	4	20	100
Number of females examined	11	11	11	8
Number of females with live pups	11	11	11	8
Gestation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Gestation length (days)	22.4 ± 0.50 ^{f)}	22.5 ± 0.52	22.7 ± 0.47	22.6 ± 0.52
Number of corpora lutea	19.0 ± 2.49	18.3 ± 2.28	17.7 ± 1.27	18.4 ± 2.83
Number of implantation sites	16.9 ± 1.76	16.2 ± 2.04	15.9 ± 3.45	16.3 ± 3.45
Implantation index (%) ^{b)}	89.8	90.4	89.7	89.0
Delivery index (%) ^{c)}	95.5	93.2	85.4	96.5
Number of pups delivered	16.2 ± 2.18	15.4 ± 2.46	13.8 ± 3.09	15.8 ± 3.73
Number of live pups on day 0	15.9 ± 1.81	15.3 ± 2.49	13.6 ± 3.07	14.9 ± 3.60
Live birth index (%) ^{d)}	98.6	99.4	98.7	95.1
Sex ratio (male/female)	0.97 (86/89)	0.91 (80/88)	1.14 (80/70)	0.89 (56/63)
Number of live pups on day 4	14.4 ± 5.08	15.2 ± 2.56	13.5 ± 3.01	13.4 ± 6.39
Viability index on day 4 (%) ^{e)}	90.9	99.4	98.8	87.5
Body weight of pups (g)				
on day 0 male	6.6 ± 0.54	6.9 ± 0.59	7.2 ± 0.91	6.7 ± 0.79
female	6.3 ± 0.56	6.5 ± 0.52	6.8 ± 0.87	6.4 ± 0.89
on day 4 male	10.9 ± 0.83	11.2 ± 1.56	11.4 ± 2.56	10.6 ± 1.38
female	10.6 ± 0.94	10.8 ± 1.51	10.9 ± 2.43	10.2 ± 1.28
Body weight gain of pups (g)				
day 0 to 4 male	4.3 ± 0.39	4.3 ± 1.14	4.2 ± 1.74	3.8 ± 1.04
female	4.2 ± 0.50	4.3 ± 1.06	4.2 ± 1.70	3.7 ± 0.79

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.