

Table 7 Incidence of histopathological findings of female rats treated with *o*-acetoacetoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose level (mg/kg/day)			0			8			25		80			250		
Organ	Findings	No. of animals	TK	NP	(T)	TK	NP	(T)	TK	(T)	TK	NP	(T)	TK	NP	(T)
			9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
Heart	Myocardial degeneration/fibrosis	-	9	1	(10)	-	0	(0)	-		-	1	(1)	9	1	(10)
		+	0	0	(0)	-	1	(1)	-		-	0	(0)	0	0	(0)
	Cellular infiltration, lymphocyte, focal	-	9	0	(9)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	9	1	(10)
		+	0	1	(1)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	0	0	(0)
Lung	Mineralization, artery	-	7	0	(7)	-	0	(0)	-		-	1	(1)	9	1	(10)
		+	2	1	(3)	-	1	(1)	-		-	0	(0)	0	0	(0)
	Accumulation, foam cell	-	9	1	(10)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	7	1	(8)
		+	0	0	(0)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	2	0	(2)
Liver	Hemorrhage/proliferation, macrophage, focal	-	9	1	(10)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	8	1	(9)
		+	0	0	(0)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	0	0	(1)
	Necrosis, focal	-	9	1	(10)	8	1	(9)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
		+	0	0	(0)	1	0	(1)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)
Kidney	Deposit, hemosiderin, Kupffer cell	-	9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	5	1	(6)	0	0	(0)
		+	0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	4	0	(4)*	9	1	(10)**
	Cyst, solitary	-	8	1	(9)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	8	1	(9)
		+	1	0	(1)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	1	0	(1)
Urinary	Mineralization, corticomedullary junction	-	9	0	(9)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	9	1	(10)
		+	0	1	(1)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	0	0	(0)
	Cellular infiltration, lymphocyte, bladder submucosa	-	8	1	(9)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	9	1	(10)
		+	1	0	(1)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	0	0	(0)
Uterus	Dilatation, lumen	-	-	0	(0)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	-	1	(1)
		+	-	1	(1)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	-	0	(0)
	Hemorrhage	-	8	1	(9)	-	1	(1)	-		-	1	(1)	9	1	(10)
		+	1	0	(1)	-	0	(0)	-		-	0	(0)	0	0	(0)
Spleen	Hematopoiesis, extramedullary	-,+	8	1	(9)	7	1	(8)	9	(9)	5	1	(6)	0	0	(0)
		++,+++	1	0	(1)	2	0	(2)	1	(1)	4	0	(4)	9	1	(10)**
	Deposit, hemosiderin	-,+	8	1	(9)	8	1	(9)	8	(8)	2	0	(2)	0	0	(0)
		++,+++	1	0	(1)	1	0	(1)	2	(2)	7	1	(8)**	9	1	(10)**
Congestion	Congestion	-,+	9	1	(10)	9	1	(10)	10	(10)	6	0	(6)	0	0	(0)
		++,+++	0	0	(0)	0	0	(0)	0	(0)	3	1	(4)*	9	1	(10)**
	Adhesive inflammation	-	8	1	(9)	9	1	(10)	10	(10)	9	1	(10)	9	1	(10)
		++	1	0	(1)	0	0	(0)	0	(0)	0	0	(0)	0	0	(0)

-:Negative, +:Slight, ++:Moderate, +++:Severe

TK:Terminal kill, NP:Non-pregnant, T:Total, -:Not examined

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

Table 8 Reproduction results of treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0	8	25	80	250
No. of pairs with mated	10	10	10	10	10
No. of pairs with successful copulation	10	10	10	10	10
Copulation index(%)	100	100	100	100	100
Pairing days until copulation(day, Mean±S.D.)	2.3 ± 1.16	2.4 ± 1.26	2.9 ± 0.88	2.3 ± 0.82	2.3 ± 1.06
No. of pregnant females	9	9	10	9	9
Fertility index(%)	90	90	100	90	90
No. of corpora lutea (Mean±S.D.)	21.8 ± 2.0	21.7 ± 2.1	20.9 ± 2.2	20.7 ± 1.2	21.2 ± 2.5
No. of implantation sites (Mean±S.D.)	17.2 ± 1.9	15.9 ± 2.1	16.0 ± 3.2	16.1 ± 0.9	18.0 ± 0.9
Implantation index(%, Mean±S.D.)	79.5 ± 9.5	73.7 ± 9.2	77.1 ± 16.2	78.4 ± 8.3	85.7 ± 8.8
No. of pregnant females with parturition	9	9	10	9	9
Gestation length(day, Mean±S.D.)	22.7 ± 0.5	23.0 ± 0	22.7 ± 0.5	22.7 ± 0.5	22.4 ± 0.5
No. of pregnant females with live pups	9	9	10	9	9
Gestation index(%)	100	100	100	100	100
No. of pregnant females with live pups on day 4	9	9	10	9	9

Copulation index=(No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated)×100

Fertility index=(No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation)×100

Gestation index=(No. of females with live pups/No. of pregnant females)×100

Table 9 Litter results of female rats treated orally with *o*-acetoacetotoluidide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg)	0	8	25	80	250
No. of pups born	16.2 ± 1.7	15.2 ± 1.3	15.3 ± 3.4	15.2 ± 1.9	16.7 ± 1.7
Delivery index(%)	94.5 ± 7.4	96.2 ± 5.0	95.6 ± 6.6	94.2 ± 8.5	92.5 ± 7.2
No. of pups alive on day 0 of lactation					
Total	15.8 ± 1.5	14.9 ± 1.2	15.0 ± 3.3	14.7 ± 2.1	16.2 ± 1.7
Male	7.7 ± 2.1	8.6 ± 1.7	7.6 ± 3.3	6.8 ± 1.6	9.0 ± 1.7
Female	8.1 ± 2.1	6.3 ± 1.5	7.4 ± 2.2	7.9 ± 2.7	9.0 ± 1.4
Live birth index(%)	97.5 ± 5.5	97.6 ± 3.2	98.2 ± 4.2	96.2 ± 4.8	97.4 ± 4.4
Sex ratio (Male/Female)	0.92	1.36	0.99	0.88	1.24
No. of pups alive on day 4 of lactation					
Total	15.6 ± 1.6	14.9 ± 1.2	14.9 ± 3.2	14.6 ± 2.1	15.8 ± 1.6
Male	7.4 ± 1.8	8.6 ± 1.7	7.6 ± 3.3	6.8 ± 1.6	8.9 ± 1.5
Female	8.1 ± 2.1	6.3 ± 1.5	7.3 ± 2.3	7.9 ± 2.7	6.9 ± 1.9
Viability index(%)	98.6 ± 2.8	100 ± 0	99.5 ± 1.6	99.3 ± 2.1	97.4 ± 3.1
Body weight of live pups(g)					
on day 0					
Male	7.4 ± 0.7	7.8 ± 0.4	7.7 ± 0.9	7.5 ± 0.5	7.0 ± 0.4
Female	6.9 ± 0.7	7.4 ± 0.3	7.1 ± 0.9	7.2 ± 0.6	6.6 ± 0.4
on day 4					
Male	12.0 ± 1.1	13.0 ± 0.9	12.6 ± 2.3	12.4 ± 1.3	11.1 ± 0.5
Female	11.3 ± 1.2	12.5 ± 0.7	11.7 ± 2.0	12.1 ± 1.5	10.6 ± 0.5

Delivery index=(No. of pups born/No. of implantation sites)×100

Live birth index=(No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100

Sex ratio= Total No. of male pups/Total No. of female pups

Viability index=(No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0)×100

Each value is expressed as Mean±S.D., except sex ratio

o-アセトアセトトルイジドの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of o-Acetoacetotoluidide on Bacteria

要約

o-アセトアセトトルイジドについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537) および *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*) の5菌株を用い、用量設定試験の結果をもとに、本試験ではS9 mix無添加群および添加群の各試験菌株についてそれぞれ156~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量で試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加群および添加群のいずれにおいても、溶媒対照に比べ復帰変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではo-アセトアセトトルイジドは、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535 および TA1537¹⁾ ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成10年1月21日に菌株の特性検査を実施し、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。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK社)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02 %硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2 %クエン酸・1水塩, 1 %リン酸二カリウム・無水塩, 0.192 %リン酸一アンモニウム, 0.066 %水酸化ナトリウム [いずれも最終濃度])に2 %のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5 %の寒天(OXOID社:No. 1)を加

え、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

0.5 %塩化ナトリウムを含む0.6 % Bacto-agar(DIFCO社)水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5mM L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5mM D-ピオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5mM L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mLのバッフル付三角フラスコに2.5 %ニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No. 2:OXOID社)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μL 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック(株))を用い、37℃で8時間振盪(往復振盪:100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中の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。S9 mixの組成を以下に示す。

成 分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
リン酸緩衝Na-液(pH 7.4)	100 μmol
精製水	残 量

5. 被験物質

被験物質のo-アセトアセトトルイジド(ロット番号:7434)は純度99.93 % (不純物として、アセト酢酸アニライド0.06 %, アセト酢酸*m*-トルイダイド0.003 %を含む)の固体である。三星化学工業(株)(福井)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、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. 被験物質液の調製

DMSO(MERCK社)に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 試験用量の設定

19.5, 78.1, 313および1250 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果, S9 mix無添加群ならびに添加群のいずれの処理群においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。

従って, 本試験においてはS9 mix無添加群ならびに添加群の各試験菌株について5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とし, それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は, DMSOを用いて溶解し, 少量ずつ分注した後凍結保存(-20℃)した。

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

アジ化ナトリウム(NaN_3 :和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA:ALDRICH社)

2-アミノアントラセン(2-AA:和光純薬工業(株))

9. 試験方法

Amesらの原法¹⁾の改良法であるプレインキュベーション法に準じて, S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に, 使用溶媒, 被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100 μL , 次いでS9 mix無添加群の場合, 0.1Mナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μL , S9 mix添加群の場合, S9 mixを500 μL 添加し, さらに試験菌液100 μL を加え, 37℃で20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後, あらかじめ45℃に保温したトッパガーを2 mL添加し, 混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後, 被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため, 実体顕微鏡($\times 60$)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで, 復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11:システムサイエンス(株))を用いた。各濃度につき3枚のプレートを使用した。また, 独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し, かつ, 再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に, 陽性と判定した。

なお, 統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

群のいずれにおいても, o-アセトアセトトリイジド処理による生育阻害作用は観察されなかった。また, 復帰変異コロニー数については, S9 mix無添加群, S9 mix添加群とも溶媒対照と同等の値であり, 明確な増加傾向は認められなかった。一方, 陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において, 溶媒対照群の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。なお, コロニー数計測時に析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から, 本試験条件下において, o-アセトアセトトリイジドの微生物に対する遺伝子突然変異に関し, 陰性と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, 38, 3(1976).

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓

試験担当者: 嶋田佐和子, 植田ゆみ子

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜 582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)

Sawako Shimada, Yumiko Ueta

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho, Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan.

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

結果および考察

1回目の試験結果をTable 1~2に, 2回目の試験結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群ならびに添加

Table 1 Results of the bacterial reversion test of *o*-acetoacetotoluidide (1st trial) [direct method: -S9 mix]

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
0	100	103	95	9	8	10	19	21	17	27	27	28	7	8	9
	[99 $\pm$ 4]			[9 $\pm$ 1]			[19 $\pm$ 2]			[27 $\pm$ 1]			[8 $\pm$ 1]		
156	108	96	103	7	7	8	18	23	18	25	26	23	13	14	10
	[102 $\pm$ 6]			[7 $\pm$ 1]			[20 $\pm$ 3]			[25 $\pm$ 2]			[12 $\pm$ 2]		
313	89	94	92	6	7	5	16	18	18	35	29	35	8	9	8
	[92 $\pm$ 3]			[6 $\pm$ 1]			[17 $\pm$ 1]			[33 $\pm$ 3]			[8 $\pm$ 1]		
625	85	86	86	8	7	7	26	25	29	22	28	26	9	9	10
	[86 $\pm$ 1]			[7 $\pm$ 1]			[27 $\pm$ 2]			[25 $\pm$ 3]			[9 $\pm$ 1]		
1250	68	72	75	3	6	4	20	14	17	27	27	24	9	12	7
	[72 $\pm$ 4]			[4 $\pm$ 2]			[17 $\pm$ 3]			[26 $\pm$ 2]			[9 $\pm$ 3]		
2500	58	61	51	4	4	4	23	20	22	19	20	19	10	11	10
	[57 $\pm$ 5]			[4 $\pm$ 0]			[22 $\pm$ 2]			[19 $\pm$ 1]			[10 $\pm$ 1]		
5000	5	6	2	5	6	4	16	18	17	16	12	9	5	3	5
	[4 $\pm$ 2]			[5 $\pm$ 1]			[17 $\pm$ 1]			[12 $\pm$ 4]			[4 $\pm$ 1]		
Positive control	459	470	456 ^{a)}	437	395	415 ^{b)}	147	136	131 ^{a)}	611	625	623 ^{d)}	381	352	368 ^{d)}
	[462 $\pm$ 7]			[416 $\pm$ 21]			[138 $\pm$ 8]			[620 $\pm$ 8]			[367 $\pm$ 15]		

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, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 2 Results of the bacterial reversion test of *o*-acetoacetotoluidide (1st trial) [activation method: +S9 mix]

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
0	128	126	133	13	16	13	17	16	21	37	33	35	18	16	14
	[129 $\pm$ 4]			[14 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 3]			[35 $\pm$ 2]			[16 $\pm$ 2]		
156	129	120	118	11	16	14	22	21	20	38	30	34	13	17	12
	[122 $\pm$ 6]			[14 $\pm$ 3]			[21 $\pm$ 1]			[34 $\pm$ 4]			[14 $\pm$ 3]		
313	128	133	124	12	9	8	28	30	24	30	34	29	12	12	15
	[128 $\pm$ 5]			[10 $\pm$ 2]			[27 $\pm$ 3]			[31 $\pm$ 3]			[13 $\pm$ 2]		
625	115	112	110	15	12	15	19	22	23	33	35	37	14	9	11
	[112 $\pm$ 3]			[14 $\pm$ 2]			[21 $\pm$ 2]			[35 $\pm$ 2]			[11 $\pm$ 3]		
1250	115	108	109	8	12	13	26	29	26	31	25	28	16	14	14
	[111 $\pm$ 4]			[11 $\pm$ 3]			[27 $\pm$ 2]			[28 $\pm$ 3]			[15 $\pm$ 1]		
2500	96	93	85	12	9	10	23	24	25	29	35	31	12	9	14
	[91 $\pm$ 6]			[10 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 1]			[32 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 3]		
5000	82	75	71	8	9	9	28	28	28	32	32	28	9	11	11
	[76 $\pm$ 6]			[8 $\pm$ 2]			[28 $\pm$ 0]			[31 $\pm$ 2]			[10 $\pm$ 1]		
Positive control	648	657	674 ^{a)}	390	399	378 ^{b)}	680	668	675 ^{d)}	236	241	221 ^{d)}	180	166	162 ^{b)}
	[660 $\pm$ 13]			[389 $\pm$ 11]			[674 $\pm$ 6]			[233 $\pm$ 10]			[169 $\pm$ 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 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3 Results of the bacterial reversion test of o-acetoacetotoluidide (2nd trial) [direct method: -S9 mix]

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
0	104	114	111	9	15	11	17	16	16	19	23	22	7	6	7
	[110 $\pm$ 5]			[12 $\pm$ 3]			[16 $\pm$ 1]			[21 $\pm$ 2]			[7 $\pm$ 1]		
156	96	100	107	12	8	8	22	19	18	21	17	16	6	7	5
	[101 $\pm$ 6]			[9 $\pm$ 2]			[20 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 3]			[6 $\pm$ 1]		
313	93	94	91	8	7	8	18	15	13	20	22	24	6	4	4
	[93 $\pm$ 2]			[8 $\pm$ 1]			[15 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 2]			[5 $\pm$ 1]		
625	92	87	92	6	10	8	17	12	14	18	19	23	5	4	4
	[90 $\pm$ 3]			[8 $\pm$ 2]			[14 $\pm$ 3]			[20 $\pm$ 3]			[4 $\pm$ 1]		
1250	70	66	64	9	7	10	17	21	15	17	16	12	5	5	6
	[67 $\pm$ 3]			[9 $\pm$ 2]			[18 $\pm$ 3]			[15 $\pm$ 3]			[5 $\pm$ 1]		
2500	60	61	63	6	4	6	12	17	17	14	17	15	5	3	3
	[61 $\pm$ 2]			[5 $\pm$ 1]			[15 $\pm$ 3]			[15 $\pm$ 2]			[4 $\pm$ 1]		
5000	33	21	24	3	0	1	16	10	13	9	12	11	0	4	3
	[26 $\pm$ 6]			[1 $\pm$ 2]			[13 $\pm$ 3]			[11 $\pm$ 2]			[2 $\pm$ 2]		
Positive control	435	423	438 ^{a)}	399	466	438 ^{b)}	119	123	123 ^{c)}	633	621	587 ^{d)}	587	648	647 ^{d)}
	[432 $\pm$ 8]			[434 $\pm$ 34]			[122 $\pm$ 2]			[614 $\pm$ 24]			[627 $\pm$ 35]		

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, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4 Results of the bacterial reversion test of o-acetoacetotoluidide (2nd trial) [activation method: +S9 mix]

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
0	128	120	117	17	14	11	26	19	19	32	35	32	11	14	11
	[122 $\pm$ 6]			[14 $\pm$ 3]			[21 $\pm$ 4]			[33 $\pm$ 2]			[12 $\pm$ 2]		
156	119	111	122	17	16	12	25	22	30	34	26	29	10	7	9
	[117 $\pm$ 6]			[15 $\pm$ 3]			[26 $\pm$ 4]			[30 $\pm$ 4]			[9 $\pm$ 2]		
313	123	117	117	14	16	16	22	25	24	29	26	31	9	7	7
	[119 $\pm$ 3]			[15 $\pm$ 1]			[24 $\pm$ 2]			[29 $\pm$ 3]			[8 $\pm$ 1]		
625	99	107	112	9	8	6	30	31	31	25	20	23	6	5	7
	[106 $\pm$ 7]			[8 $\pm$ 2]			[31 $\pm$ 1]			[23 $\pm$ 3]			[6 $\pm$ 1]		
1250	85	93	104	6	9	6	26	31	30	30	28	26	7	3	5
	[94 $\pm$ 10]			[7 $\pm$ 2]			[29 $\pm$ 3]			[28 $\pm$ 2]			[5 $\pm$ 2]		
2500	79	7	86	6	9	11	23	21	27	29	19	22	3	6	5
	[81 $\pm$ 5]			[9 $\pm$ 3]			[24 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 5]			[5 $\pm$ 2]		
5000	74	62	70	6	7	9	11	22	14	17	19	23	5	6	9
	[69 $\pm$ 6]			[7 $\pm$ 2]			[16 $\pm$ 6]			[20 $\pm$ 3]			[7 $\pm$ 2]		
Positive control	614	612	596 ^{a)}	316	344	338 ^{b)}	522	617	598 ^{c)}	222	254	226 ^{d)}	140	119	147 ^{b)}
	[607 $\pm$ 10]			[333 $\pm$ 15]			[579 $\pm$ 50]			[234 $\pm$ 17]			[135 $\pm$ 15]		

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

In Vitro Chromosomal Aberration Test of o-Acetoacetotoluidide on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

o-アセトアセトトルイジドが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。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、連続処理法の24時間処理で5000 $\mu\text{g/mL}$ 、48時間処理で3600 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法では5000 $\mu\text{g/mL}$ を最高処理濃度とした。連続処理法は、最高処理濃度の1/2、1/4および1/8をそれぞれ高濃度、中濃度および低濃度とした。また、短時間処理法ではS9処理で最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度および低濃度として設定した。連続処理法では、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理法では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。

その結果、いずれの処理法においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかったが、染色体構造異常の僅かな誘発傾向が観察され、連続処理法の24時間処理では陽性判定基準と同じ10%を示した。

しかしながら明確な用量依存性が認められなかったことから、連続処理法の24時間処理において確認試験を実施した。確認試験では、最高処理濃度を3500 $\mu\text{g/mL}$ とし、公差500で減じた5用量を設定した。

その結果、僅かながらも染色体構造異常の用量依存的な誘発作用が認められた。

以上の結果より、本試験条件下ではo-アセトアセトトルイジドは、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

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK社)を10 vol%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞液を融解し数回継代した後使用した。なお、本染色体異常試験では継代数32、確認試験では同48、追加試験では同29の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(LIFE TECHNOLOGIES社)に、メンブランフィルター(0.45 μm :CORNING社)を用いて加圧濾過除菌した非働化(56℃, 30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終濃度で10 vol%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液を冷蔵所(4℃)に保存した。

3. 培養条件

CO₂インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機特機㈱)を用い、CO₂濃度5%, 37℃の条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中の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。また、S9 mixの組成は松岡らの方法¹⁾に従って調製された。

5. 被験物質

被験物質のo-アセトアセトトルイジド(ロット番号:7434)は純度99.93%(不純物として、アセト酢酸アニライド0.06%, アセト酢酸m-トルイダイド0.003%を含む)の固体である。三星化学工業(株)(福井)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、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. 被験物質液の調製

DMSO(MERCK社)に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

12ウエルの細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。連続処理法の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理法ではS9 mix非存在下(-S9 mix)あるいは存在下(+S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

細胞を10 vol%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業(株))で固定した後、0.1 w/v%クリスタル・バイオレット(関東化学(株))水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30

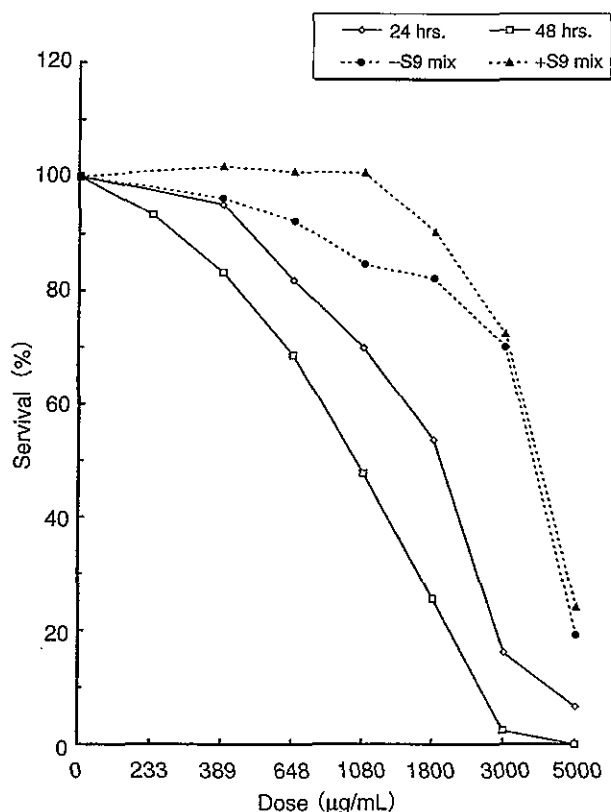


Fig. 1 Dose-survival curves of o-acetoacetotoluidide

vol%エタノール, 1 vol%酢酸水溶液)を適量加え, 5分間程度放置して色素を溶出した後, 580 nmでの吸光度を測定した. 各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比, すなわち細胞生存率を算出した.

その結果, いずれの処理法においても顕著な細胞増殖抑制が観察された (Fig. 1). プロビット法を用いて算出した50%細胞増殖抑制濃度は連続処理法24時間処理で1565 $\mu\text{g/mL}$, 同48時間処理で940 $\mu\text{g/mL}$, 短時間処理法-S9 mix処理で3392 $\mu\text{g/mL}$ および同+S9 mix処理では3699 $\mu\text{g/mL}$ であった.

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに, 染色体異常試験では連続処理法の24時間処理で5000 $\mu\text{g/mL}$, 48時間処理で3600 $\mu\text{g/mL}$, 短時間処理法では5000 $\mu\text{g/mL}$ を最高処理濃度とし, 以下公比2で減じた計3~4用量ならびに溶媒対照群を設定した.

また, 連続処理法の24時間処理において明確な用量依存性は認められないものの染色体構造異常の出現頻度が10%であったことから, 確認試験を実施した. 最高処理濃度を3500 $\mu\text{g/mL}$ とし, 公差500で減じた5用量を設定した.

なお, 陽性対照として, 連続処理法の場合, マイトマイシンC (MMC:協和醗酵工業株)を, 24時間処理で0.05 $\mu\text{g/mL}$, 48時間処理で0.025 $\mu\text{g/mL}$ の用量で, 短時間処理法の場合, シクロホスファミド (CP:塩野義製薬株)を, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ の用量で試験した.

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのディッシュを用い, 予備試験と同様に被験物質等の処理を行った. 培養終了2時間前に, 最終濃度で0.2 $\mu\text{g/mL}$ となるようコルセミド (LIFE TECHNOLOGIES社)を添加した. トリプシン処理で細胞を剥離させ, 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を行った後, 固定液 (メタノール3容:酢酸1容)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, 1.2 vol%ギムザ染色液で12分間染色した.

10. 染色体の観察

各ディッシュあたり100個, すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し, 染色体の形態的变化としてギャップ (gap), 染色分体切断 (ctb), 染色分体切断 (csb), 染色分体交換 (cte), 染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した. 同時に, 倍数性細胞の出現率を記録した. 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による分類法²⁾に従って実施した.

すべての標本をブラインド処理した後, 観察した.

11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めた場合 (+gap) と, 含めない場合 (-gap) とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した.

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を, 石館ら³⁾の基準に従って判定した. 染色体異常を有する細胞の出現頻度が5%未満を陰性 (-), 5%以上10%未満を疑陽性 ($\pm$), 10%以上を陽性 (+) とした. 最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した.

なお, 統計学的手法を用いた検定は実施しなかった.

結果および考察

連続処理法での試験結果をTable 1に示した. o-アセトアセトトルイジド処理群の場合, 24時間処理および48時間処理のいずれにおいても, 僅かに染色体構造異常の誘発傾向が観察された (出現頻度は10.0%および5.0%). 倍数性細胞の誘発はいずれの処理法においても認められなかった. なお, 24時間処理および48時間処理の最高処理濃度では被験物質の影響により分裂中期像は観察されなかったため, 染色体観察を実施しなかった. 一方, 陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた.

短時間処理法での試験結果をTable 2に示した. 被験物質処理群の場合, S9 mix非存在下および存在下のいずれにおいても, 染色体構造異常の僅かな誘発傾向が観察されたが (出現頻度は9.0%および5.0%), 倍数性細胞の誘発は認められなかった. 一方, 陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体構造異常の顕著な誘発が認められた.

連続処理法の24時間処理において、染色体構造異常の出現頻度が1用量のみ陽性反応を示したことから確認試験を実施し、結果をTable 3に示した。被験物質処理群の場合、僅かながら染色体構造異常の用量依存的な誘発が認められた。なお、被験物質の影響により、3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においては観察可能な分裂中期像は180細胞のみであり、最高用量である3500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では観察可能な分裂中期像はほとんど観察されなかった。

なお、暴露終了時、連続処理法ならびに短時間処理法+S9 mix処理では最高用量で、短時間処理法-S9 mix処理では2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で、粉末状被験物質が培養液中に散在しているのが観察された。

以上の試験結果から、本試験条件下において α -アセトアセトトリジドのチャイニーズハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陽性と判定した。

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat. Res.*, **66**, 277(1979).
- 2) 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. 31-35.
- 3) 石館基監修, “<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 東京, 1987, pp. 19-24.

連絡先

試験責任者：中嶋 圓

試験担当者：北澤倫世, 益森勝志, 熊平智司

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜
582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)

Michiyo Kitazawa, Shoji Masumori,

Satoshi Kumadaira

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
Iwata-gun, Shizuoka, 437-1213, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-acetoacetotoluidide [continuous treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement	
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth				SA	Pol
Test substance	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.5	-	-
	625	24	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-	-
	1250	24	200	0	3	1	0	0	0	2.0	2.0	0.0	-	-
	2500	24	200	2	6	13	0	0	0	10.0	9.0	0.0	+	-
	5000 #	24	Toxic											
MMC*	0.05	24	200	4	44	81	0	0	0	51.5	51.5	0.5	+	-
Test substance	0	48	200	0	1	0	0	1	0	1.0	1.0	0.5	-	-
	450	48	200	0	3	0	1	0	0	1.5	1.5	0.0	-	-
	900	48	200	0	2	4	1	0	0	3.5	3.5	0.0	-	-
	1800	48	200	0	4	7	0	0	0	5.0	5.0	0.5	±	-
	3600 #	48	Toxic											
MMC*	0.25	48	200	5	44	78	1	1	0	50.0	50.0	1.0	+	-

*:Positive control (Mitomycin C)

ctb:Chromatid break cte:Chromatid exchange csb:Chromosome break cse:Chromosome exchange oth:others

SA:structural aberration Pol:polyploid cell

:Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 2 Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-acetoacetotoluidide [short-term treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth				SA	Pol
Test substance	0	-	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	0.5	-	-
	1250	-	6-(18)	200	0	2	1	0	0	0	1.5	1.5	0.5	-	-
	2500 #	-	6-(18)	200	0	4	4	0	0	0	3.5	3.5	0.5	-	-
	5000 #	-	6-(18)	200	1	10	11	0	0	0	9.0	8.5	0.0	±	-
CP*	12.5	-	6-(18)	200	0	4	1	0	0	0	2.5	2.5	0.5	-	-
Test substance	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	0.5	0.5	0.0	-	-
	1250	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.5	-	-
	2500	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	0.5	-	-
	5000 #	+	6-(18)	200	1	6	8	0	0	0	5.0	5.0	0.5	±	-
CP*	12.5	+	6-(18)	200	11	58	177	0	1	0	89.5	89.5	0.0	+	-

*:Positive control (Cyclophosphamide)

ctb:Chromatid break cte:Chromatid exchange csb:Chromosome break cse:Chromosome exchange oth:others

SA:structural aberration Pol:polyploid cell

:Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 3 Results of the confirmative examination of *o*-acetoacetotoluidide [continuous treatment:24 hrs]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement	
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth				SA	Pol
Test substance	0	24	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.5	-	-
	1500	24	200	1	5	3	0	0	0	4.0	3.5	0.0	-	-
	2000	24	200	1	11	6	0	0	0	8.5	8.0	0.0	$\pm$	-
	2500	24	200	0	2	3	0	0	0	2.5	2.5	0.0	-	-
	3000	24	180	0	3	4	0	0	0	3.9	3.9	0.0	-	-
	3500 #	24	Toxic											
MMC*	0.05	24	200	12	56	85	0	0	0	57.0	56.0	0.5	+	-

*:Positive control (Mitomycin C)

ctb:Chromatid break cte:Chromatid exchange csb:Chromosome break cse:Chromosome exchange oth:others

SA:structural aberration Pol:polyploid cell

:Visible precipitation was shown at the end of exposure period

3-アミノフェノールのラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 3-Aminophenol in Rats

要約

3-アミノフェノールは染料あるいは医薬品PASの原料として使用されている。1%カルメロースナトリウム水溶液に懸濁した3-アミノフェノールの0, 500, 700, 1000および1400 mg/kgを、1群あたり雌雄各5匹のCrj:CD(SD)IGSラットに単回経口投与してその急性毒性を検討し、以下の成績を得た。死亡は雌雄とも投与後3日までに700 mg/kg以上の投与群で認められた。一般状態では、投与日に500 mg/kg以上の投与群で、振戦、流涎、褐色尿、腹臥、横臥が投与後数分から4時間の間に発現した。その他に、手足・耳介の蒼白、自発運動の減少等も観察された。体重では、雌雄の700 mg/kg投与群で投与後1日に低値が認められ、雄ではその後も増加抑制傾向が継続したが、雌では著明でなかった。剖検では、雌雄の死亡例に腺胃粘膜の菲薄化、腺胃粘膜の暗赤色斑等の障害性変化が認められ、うっ血による脾臓の腫大も認められた。生存例では、雄の700 mg/kg投与群で精巣、精巣上体および精囊の小型が、雌の700および1000 mg/kg投与群で脾臓の暗赤色化、腎臓の暗褐色化、尾の先端部の暗紫色化が認められた。また、雌雄の700 mg/kg投与群で肝臓および脾臓の相対重量の高値がみられ、病理組織学検査では、雌で肝臓のクッパー細胞、腎臓の近位尿細管上皮および脾臓への褐色色素の沈着が認められた。死亡例では、雌雄とも脾臓のうっ血が認められ、雄で肝臓の限局性壊死、肝臓のクッパー細胞および腎臓の近位尿細管上皮への軽度な褐色色素の沈着が認められた。LD₅₀値は、雄で693 mg/kg、雌で856 mg/kgであった。

方法

1. 被験物質および投与液の調製

3-アミノフェノール(純度:99.70%, Lot No. 720208, 三井化学(株), 東京)は、淡灰色の結晶である。入手後の被験物質は遮光気密容器に入れ、4~10℃の冷暗所で保存し、残余被験物質を製造業者が分析し、投与期間中の被験物質の安定性を確認した。媒体はカルメロースナトリウム(丸石製薬(株))を精製水(ヤクハン製薬(株))に溶解して調製した1%水溶液(1% CMC-Na)を用い、これに被験物質を所定の濃度となるように懸濁させた。調製液は、冷暗所、遮光下で8日間安定であることから、調製後直ちに遮光気密容器に入れて冷蔵庫で保存し、室温に戻して使用した。また、これらの調製液について濃度を確認

し、設定値の±10%以内にあることを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より受け入れた4週齢のSprague-Dawley系ラット(Crj:CD(SD)IGS)の雌雄を8日間の検疫・馴化を行った後、雌雄各25匹を選択して5週齢で試験に供した。投与日の体重は雄が132~146 g、雌が103~116 gであった。動物は、温度20~23℃、湿度51~59%、換気回数10~15回/時間および照明時間12時間(8時から20時まで点灯)に制御されたバリアシステムの飼育室で、ブラケット式金属製金網床ケージに群分け前は1ケージあたり4あるいは5匹を収容し、群分け後は個別飼育した。飼料は、γ線照射固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて、飲料水は札幌市水道水を自動給水装置を用いてそれぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与量設定試験では雌雄のラットに500, 700, 1000, 1400および2000 mg/kgの5用量を1群3匹に単回投与し、雌雄とも700, 1000, 1400および2000 mg/kg投与群でそれぞれ1/3, 2/3, 3/3および3/3例が死亡した。このことから、本試験の投与量は雌雄とも最低用量を500 mg/kgとし、公比約1.4で500, 700, 1000および1400 mg/kgを設定し、これに1% CMC-Naを投与する対照群を含めた雌雄各5群を設定した。1群の動物数は雌雄とも5匹とし、投与前日の体重に基づいて層化無作為抽出法により群分けを行った。

動物は、投与前に約17時間絶食させ、投与日の体重に基づいて5 mL/kgの容量でラット用胃ゾンデを用いて強制的に胃内に単回投与した。なお、給餌の再開は投与後4時間に行った。

4. 検査項目

1) 一般状態観察

投与後6時間までは頻繁に、その後は投与後14日の剖検日まで1日1回観察した。

2) 体重測定

投与日の投与前、投与後1, 3, 5, 7, 10および14日に測定した。得られた体重から、体重増加量[(投与後14日体重)-(投与前体重)]および体重増加率[(体重増加量)/(投与前体重)×100]を算出した。