



メタクリル酸 2-(ジエチルアミノ)エチル
のマウスを用いる小核試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

目次

要約	1
試験目的	1
材料と方法	2
1. 被験物質	2
2. 陽性対照物質	2
3. 実験動物および飼育条件	3
4. 投与検体の調製および投与方法	3
5. 試験操作、観察および解析	5
1) 毒性予備試験	5
2) 小核本試験	6
結果と考察	9
1. 毒性予備試験	9
2. 小核本試験	9
参考文献	10
Table	12

要約

メタクリル酸 2-(ジエチルアミノ)エチルの生体内における染色体異常誘発性を評価するために、ICR系マウスを用いて強制経口投与による小核試験を実施した。まず、小核本試験の投与量を決定するために毒性予備試験を行って最大耐量を求め、その結果に基づいて小核本試験を実施し、陰性の結果を得た。

毒性予備試験では、雌雄マウスを用いて、メタクリル酸 2-(ジエチルアミノ)エチルを 250、500、1000 および 2000 mg/kg/day の用量で、24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。その結果、2000 mg/kg/day の用量において、雄の 2 例で死亡が認められ、雌においては、いずれの用量においても一般状態の変化および死亡は認められなかった。以上の結果から、雄の方が被験物質の毒性に対して感受性が高いと考えられ、最大耐量は、雄では 1000 mg/kg/day、雌では 2000 mg/kg/day 以上であった。

毒性予備試験の結果に基づき、小核本試験は、雄マウスを用いてメタクリル酸 2-(ジエチルアミノ)エチルを 250、500 および 1000 mg/kg/day の用量で、24 時間間隔で 2 回強制経口投与し、最終投与の 24 時間後に骨髄の塗抹標本作製し、小核の観察を行った。その結果、メタクリル酸 2-(ジエチルアミノ)エチルの投与による小核出現頻度に、統計学的に有意な増加は認められなかった。一方、cyclophosphamide monohydrate を 50 mg/kg 投与した陽性対照群では、小核出現頻度が 1%水準で有意に増加し、本試験系が生体内における染色体異常検出系として技術的に問題ないものであることが確認された。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、陰性対照群とそれ以外の群との間に統計学的に有意な差は認められず、被験物質の投与による骨髄細胞の増殖抑制作用は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、メタクリル酸 2-(ジエチルアミノ)エチルは、マウス骨髄細胞において染色体異常誘発作用を示さないものと結論する。

試験目的

メタクリル酸 2-(ジエチルアミノ)エチルの生体内における染色体異常誘発性を検討するために、マウス骨髄細胞を用いる小核試験を実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質であるメタクリル酸 2-(ジエチルアミノ)エチル[別名:2-(ジエチルアミノ)エチルメタクリレート、略称:DEM、英名: methacrylic acid, 2-(diethylamino)ethyl ester、CAS No.:105-16-8、分子量:185.27、分子式: $C_{10}H_{19}NO_2$ 、ロット番号: 含量:99.7%(毛管カラム GC、安定剤としてヒドロキノンモノメチルエーテルを約0.1%含有)、製造:]は、無色澄明の液体(特異臭)である。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。被験物質は から入手し、使用時まで密閉容器に入れ、室温で保管した。

被験物質原体の安定性については、被験物質提供者において、実験終了後に返却した被験物質の含量を分析した結果、被験物質は実験期間中安定であったことが確認された(Appendix 2、GLP 基準外)。なお、被験物質原体の安定性については GLP 基準下での確認はされていないが、化学的根拠に基づいた資料であることから、実験期間中安定であり、当該試験の信頼性に影響しないと判断した。

2. 陽性対照物質

陽性対照物質は、cyclophosphamide monohydrate(略称:CP、CAS No.: 6055-19-2、ロット番号:113K1406、純度:99.8%、製造者:Sigma Chemical)を用いた。陽性対照物質は2005年1月18日に購入し、使用時まで冷蔵した。

3. 実験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー (CRJ) 厚木飼育センターから 8 週齢で購入した ICR 系マウス [Crj:CD1(ICR)、SPF]を、入荷日を含む 7 日間、検疫と馴化を兼ねて飼育し、外観および一般状態に異常の認められない動物を 9 週齢で試験に使用した。検疫期間中は、動物には、油性フェルトペンにより尾に入荷動物番号を記し、飼育ケージには、試験番号、性別、入荷動物番号および入荷日を記載した動物カードを付けて個体識別を行った。各試験に用いた動物の入荷日、匹数および入荷時体重範囲を以下に示す。余剰動物は、各試験の最終観察終了後に炭酸ガスにより安楽死させた。

試験	入荷日	入荷動物数	体重範囲
毒性予備試験	2006 年 8 月 2 日	雄 15 匹	28.8~32.5 g
		雌 15 匹	25.7~28.1 g
小核本試験	2006 年 8 月 23 日	雄 30 匹	27.0~32.3 g

動物は、全飼育期間を通じて、許容温度:21.0~25.0℃、許容湿度:40.0~75.0%、換気回数:約 15 回/時間、照明 12 時間(7 時~19 時)に設定された飼育室内で、床敷としてペパークリーン(日本エスエルシー)を入れた TPX 樹脂製ケージ(143W×293D×148H mm、CRJ)に 1 匹ずつ收容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温度および湿度の実測値はそれぞれ 22.0~24.5℃および 46.0~69.0%であり、いずれも許容範囲内にあった。また、供給した飼料、水および床敷の分析結果では、試験に支障をきたす可能性のある混入物はなかった。

動物の群分けは、検疫終了時の測定体重が、平均値の±20%以内の範囲にある動物の中から雌雄各 12 匹(毒性予備試験)および雄 25 匹(小核本試験)を選択し、体重別層化無作為抽出法により行った。群分け後の動物には、油性フェルトペンにより尾に動物番号を記し、ケージには、群ごとに色の異なる動物カードに、試験番号、性、群(投与量)および動物番号を記入して飼育ケージに付けて個体識別を行った。

4. 投与検体の調製および投与方法

被験物質は、水に不溶で日局オリーブ油に溶解することから、被験物質の媒体(陰性対照物質)として日局オリーブ油を用いた。

被験物質を秤量し、日局オリーブ油(製造番号:KK-10、小堺製薬)を加えて溶解して最高濃度

の被験物質投与検体を調製し、以下同媒体で段階希釈してそれ以下の濃度の被験物質投与検体を調製した。被験物質投与検体は、毒性予備試験においては用時調製し、小核本試験においては調製後、冷蔵(実測値:2~5℃)、遮光条件下で保管し、調製後 48 時間以内に使用した。被験物質投与検体の調製濃度を以下に示す。

毒性予備試験:25.0、50.0、100 および 200 mg/mL

小核本試験:25.0、50.0 および 100 mg/mL

被験物質投与検体の調製時に、発熱、発泡および変色は認められなかった。

10.0 および 200 mg/mL の濃度の被験物質投与検体について、下記のガスクロマトグラフ(GC)法を用い、冷蔵、遮光条件下における 72 時間の安定性を確認した。その結果、10.0 および 200 mg/mL 調製液中のメタクリル酸 2-(ジエチルアミノ)エチルの残存率は、それぞれ 102 および 98.8% であり、いずれも、試験計画書に記載した許容基準(調製直後の濃度に対する保管後の濃度の残存率:90.0%以上)を満たした(Appendix 3)。

小核本試験に用いた全ての被験物質投与検体について、秦野研究所で、下記の GC 法を用いて含量測定を行った。その結果、25.0、50.0 および 100 mg/mL 調製液中のメタクリル酸 2-(ジエチルアミノ)エチルの平均含量は、それぞれ 102、103 および 103% であり、いずれも、試験計画書に記載した許容基準(平均含量:90.0~110%)を満たした(Appendix 4)。

分析法

被験物質投与検体の 1 mL を採取し、アセトンで一定量とした後、アセトンで希釈し、一定量の内標準(IS)溶液を加えて試料溶液を調製した。別に、被験物質約 50 mg をひょう取し、アセトン 50 mL に溶解した。この溶液(1、1 および 2 mL)に一定量の IS 溶液を加えた後、アセトンで 20、10 および 10 mL として、標準溶液(DEM 約 50、100 あるいは、200 µg/mL)を、それぞれ調製した。試料溶液および標準溶液を以下の GC 法で測定し、標準溶液から作成する検量線を用いて試料溶液中の被験物質濃度を求めた。IS 溶液は、ピフェニル(和光特級、和光純薬工業)約 10 mg をアセトンに溶解し、50 mL として調製した。

GC 条件

装置

GC システム-3(島津製作所)

構成:GC-14B(ガスクロマトグラフ)、AOC-20i(オートインジェクタ)、

C-R4A(データ処理装置)

分析カラム	Zebtron ZB-1(100% Methyl polysiloxane)、Phenomenex®、 内径 0.53 mm、長さ 30 m、膜厚 1.50 μm
キャリアガス	ヘリウム(100 kPa)
カラム温度	100°C、1 min、20°C/min、200°C、30°C/min、290°C、2 min
注入口温度	200°C
検出器温度	250°C
検出器	水素炎イオン化検出器(FID)、水素圧 60 kPa、空気圧 50 kPa
試料注入量	1 μL(スプリットレス注入法、サンプリング時間 1 min)

陽性対照物質の CP については、日局生理食塩液(製造番号:K6A78、大塚製薬工場)に溶解して、5 mg/mL 溶液を調製し、速やかに投与に用いた。

陰性対照物質および被験物質は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に基づいて強制経口投与とし、注射筒およびマウス用胃管を用いて 24 時間間隔で 2 回投与した。陽性対照物質は、注射筒およびマウス用胃管を用いて 1 回強制経口投与した。毒性予備試験の投与は 2006 年 8 月 9 および 10 日に、小核本試験の投与は 2006 年 8 月 30 および 31 日(陽性対照群は 2006 年 8 月 31 日のみ)に行った。投与時刻は、いずれも午前 10 時～11 時の間であった。投与容量は 10 mL/kg/day とし、初回投与の直前に測定した体重に基づいて個体ごとに算出した。初回投与時の体重範囲は、毒性予備試験では雄:32.9～38.0 g、雌:28.5～31.6 g、小核本試験では雄:31.0～34.7 g であった。

5. 試験操作、観察および解析

1) 毒性予備試験

① 実験群の設定

毒性予備試験においては、雌雄のマウスを用いて以下の被験物質投与群を設け、各群の動物数を雌雄各 3 匹とした。

各群の投与容量、投与回数および動物番号を以下に示す。

群	投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号	
			雄	雌
DEM 250 mg/kg/day 投与群	10	2	T1~T3	T13~T15
DEM 500 mg/kg/day 投与群	10	2	T4~T6	T16~T18
DEM 1000 mg/kg/day 投与群	10	2	T7~T9	T19~T21
DEM 2000 mg/kg/day 投与群	10	2	T10~T12	T22~T24

②一般状態の観察

各投与の直後、約 6 時間後および 22~24 時間後に生死および一般状態を観察した。

2) 小核本試験

①実験群の設定

毒性予備試験の結果に基づいて、雄マウスを用いて 250、500 および 1000 mg/kg/day の被験物質投与群と、陰性対照群(媒体:10 mL/kg/day)および陽性対照群(CP:50 mg/kg)を加えた 5 群構成とし、各群 5 匹の動物に投与を行った。なお、陽性対照の CP については、ICR 系雄マウスに 50 mg/kg の用量を単回強制経口投与した場合、投与後 24 時間に小核を有する幼若赤血球の出現頻度が有意に増加することが、秦野研究所において確認されている。

各群の投与容量、投与回数および動物番号を以下に示す。

群	投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号
陰性対照群(日局オリブ油)	10	2	1~5
DEM 250 mg/kg/day 投与群	10	2	6~10
DEM 500 mg/kg/day 投与群	10	2	11~15
DEM 1000 mg/kg/day 投与群	10	2	16~20
陽性対照群(CP 50 mg/kg)	10	1	21~25

②一般状態の観察

各投与の直後、約 6 時間後および 22~24 時間後に生死および一般状態を観察した。

③骨髄塗抹標本の作製

小核の観察のための骨髄塗抹標本は、Hayashi らの論文¹⁾に従って最終投与約 24 時間後に作製した。頸椎脱臼法によりマウスを安楽死させ、両側の大腿骨を摘出した後、その両端を切断して 0.6 mL のウシ胎仔血清 (Lot No.: 1248874、Life Technologies) で骨髄細胞を遠心管に洗い出し、 $200\times g$ で 5 分間遠心分離して上清を除いた。沈渣をピペティングした後、骨髄細胞浮遊液から各個体につき 3 枚の骨髄塗抹標本を作製した。骨髄塗抹標本には、試験番号と動物番号およびスライド番号を記入した。骨髄塗抹標本は、自然乾燥後、メタノールで 5 分間固定した。骨髄塗抹標本には、コード番号表に従って、試験番号とコード番号およびスライド番号を記載したラベルを貼付してコード化し、標本観察時まで室温で保管した。

④骨髄塗抹標本のアクリジンオレンジ(AO)蛍光染色および小核の観察

ゼーレンゼンの 1/15 mol/L リン酸緩衝液に溶解した 40 $\mu\text{g/mL}$ の AO 溶液を標本観察の直前に骨髄塗抹標本に数滴滴下し、カバーガラスをかけて 510 nm の吸収フィルターが装着されたブルー励起の蛍光顕微鏡下で、100 倍の対物レンズと 10 倍の接眼レンズを用いて観察した。骨髄塗抹標本は、各個体について 2 名の観察者により観察した。1 匹あたり 2000 個 (1 名あたり 1000 個) の幼若赤血球を観察し、そのうち小核を有する幼若赤血球の数を記録した。また、骨髄細胞の増殖抑制の指標として、1 匹あたり 1000 個 (1 名あたり 500 個) の赤血球 (幼若赤血球および成熟赤血球) を観察して、幼若赤血球の数を記録した。

⑤統計解析

(小核出現頻度)

陰性対照群と陽性対照群の小核出現頻度 (平均値) が、秦野研究所の背景データのばらつきの範囲 (平均値 $\pm 3\times$ 標準偏差) 内にあるか否かを調べた。

小核出現頻度については、陰性対照群と各被験物質投与群および陽性対照群の間で、Fisher の正確確率検定法 (片側検定) を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して Bonferroni の補正²⁾を行った。また、小核出現頻度の用量 (対数值) 依存性について、Cochran-Armitage の傾向検定³⁾ (片側検定) を行った。いずれの検定についても、有意水準は 5% および 1% とした。

(赤血球中に占める幼若赤血球の比率)

骨髄細胞の増殖抑制の指標としての幼若赤血球の比率について、まず Bartlett 検定⁴⁾により陽性対照群を除く各群の分散の一様性の検定を行った。その結果、不等分散であったことから、Dunnett 検定⁵⁾(両側検定)を用いて陰性対照群と各被験物質投与群との平均順位の差の検定を行った。陰性対照群と陽性対照群との比較については、F 検定⁴⁾により2群間の分散の一様性の検定を行い、等分散であったことから Student の *t* 検定⁴⁾(両側検定)を行った。Bartlett 検定および F 検定の有意水準は 5%とした。Dunnett 検定および Student の *t* 検定の有意水準は 5%および 1%とした。

幼若赤血球の比率に関する統計解析の結果をもとに、用量反応性および陰性対照群の背景データ等を参考にして、被験物質の骨髄細胞の増殖への影響を調べた。

⑥判定

被験物質が骨髄細胞において、染色体異常誘発作用を示すか否かの判定は、統計解析の結果をもとに、用量反応性および陰性対照群の背景データ、骨髄細胞の増殖への影響等を参考にして総合的に行った。

結果と考察

1. 毒性予備試験

雌雄マウスを用いて 250、500、1000 および 2000 mg/kg/day の被験物質投与群を設け、24 時間間隔で 2 回強制経口投与による毒性予備試験を実施した。その結果、雄においては、2000 mg/kg/day の用量において、2 回目の投与後 6 時間以降に自発運動低下、腹臥位姿勢および立毛が認められ、2 例が死亡した。1000 mg/kg/day 以下の用量においては、一般状態の変化および死亡は認められなかった (Appendix 5)。雌においては、いずれの用量においても一般状態の変化および死亡は認められなかった (Appendix 5)。

上記の結果から、雄の方が被験物質の毒性に対して感受性が高いと考えられ、最大耐量は、雄では 1000 mg/kg/day、雌では 2000 mg/kg/day 以上であった。従って、小核本試験は雄のみを用いて、高用量を 1000 mg/kg/day として行うこととした。

2. 小核本試験

いずれの投与群においても、一般状態の変化および死亡は認められなかった (Appendix 6)。

小核出現頻度および赤血球中に占める幼若赤血球の比率を Table 1 に示す。陰性対照群および陽性対照群の小核出現頻度 (平均値) は、いずれも秦野研究所の背景データ (Appendix 7) のばらつきの範囲 (平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差) 内であった。

被験物質投与群の小核出現頻度は、いずれの用量においても陰性対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、用量に依存して有意に増加する傾向もみられなかった。一方、CP を投与した陽性対照群では、小核出現頻度が 1% 水準で有意に増加し、本試験系が生体内における染色体異常検出系として技術的に問題ないものであることが確認された。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、陰性対照群とそれ以外の群との間に統計学的に有意な差は認められず、被験物質の投与による骨髓細胞の増殖抑制作用は認められなかった。しかし、この試験は生体における最大耐量の 1000 mg/kg/day を最高用量としていることから、試験結果は、小核誘発性を評価する上で十分信頼性の高いものと考えられる。

なお、本被験物質については、復帰突然変異試験では陰性、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では陽性の結果が報告されている⁶⁾。関連物質であるメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルについては、復帰突然変異試験では陰性、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では陽性の結果が報告されている⁷⁾。ブチルメタクリレートについては、復帰突然変異試験およびチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験とともに陰性の結果が報告されている⁸⁾。2-エチルヘキシルメタクリレートについては、復帰突然変異試験およびチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験とともに陰性の結果が報告されている⁹⁾。2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートについては、復帰突然変異試験およびチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験とともに陽性の結果が報告されている¹⁰⁾。

以上の結果から、本試験条件下では、マウス骨髄細胞において、メタクリル酸 2-(ジエチルアミノ)エチルは染色体異常誘発作用を示さないものと結論する。

参考文献

- 1) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T.: In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res.* 312: 293-304 (1994)
- 2) Margolin, B. H., Resnick, M. A., Rimpo, J. Y., Archer, P., Galloway, S. M., Bloom, A. D., Zeiger, E.: Statistical analyses for in vitro cytogenetic assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ. Mutagen.* 8: 183-204 (1986)
- 3) Margolin, B. H., Risko, K. J.: in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" Ashby, J. et al. eds., Cambridge Univ. Press (1988), vol.1. pp. 29-42
- 4) Snedecor, G. W., Cochran, W. G.: in "Statistical Methods" 7th ed., Iowa State University Press, Iowa (1980)
- 5) Dunnett, C. W.: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121 (1955)
- 6) 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.6, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.149-175(1998)
- 7) 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, p.525-552(1997)

- 8) 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.6, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.77-100(1998)
- 9) 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.6, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.399-430(1998)
- 10) 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.6, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.539-568(1998)

Table 1. Results of micronucleus test in male CD1 (ICR) mice after double oral administrations of methacrylic acid, 2-(diethylamino)ethyl ester

Group	Animal No.	% of MNPCEs ^a	% of PCEs in ERYs ^b
Negative control Olive oil 10 mL/kg/day	1	0.05	47.3
	2	0.15	56.3
	3	0.05	44.9
	4	0.15	53.4
	5	0.25	62.1
	Total	13 / 10000	2640 / 5000
	Mean ± S.D.	0.13 ± 0.08	52.8 ± 6.9
Min. - Max.	0.05 - 0.25	44.9 - 62.1	
Methacrylic acid, 2-(diethylamino)ethyl ester 250 mg/kg/day	6	0.15	57.6
	7	0.00	51.7
	8	0.15	57.6
	9	0.10	50.0
	10	0.20	33.9
	Total	12 / 10000	2508 / 5000
	Mean ± S.D.	0.12 ± 0.08	50.2 ± 9.7
Min. - Max.	0.00 - 0.20	33.9 - 57.6	
Methacrylic acid, 2-(diethylamino)ethyl ester 500 mg/kg/day	11	0.10	56.1
	12	0.10	55.1
	13	0.10	53.3
	14	0.10	55.5
	15	0.00	52.6
	Total	8 / 10000	2726 / 5000
	Mean ± S.D.	0.08 ± 0.04	54.5 ± 1.5
Min. - Max.	0.00 - 0.10	52.6 - 56.1	
Methacrylic acid, 2-(diethylamino)ethyl ester 1000 mg/kg/day	16	0.00	38.0
	17	0.00	50.5
	18	0.20	63.6
	19	0.10	46.3
	20	0.05	47.1
	Total	7 / 10000	2455 / 5000
	Mean ± S.D.	0.07 ± 0.08	49.1 ± 9.3
Min. - Max.	0.00 - 0.20	38.0 - 63.6	
Positive control CP 50 mg/kg	21	2.25	43.2
	22	1.30	41.0
	23	2.75	47.9
	24	1.95	51.3
	25	2.75	51.4
	Total	220 / 10000 **	2348 / 5000
	Mean ± S.D.	2.20 ± 0.61	47.0 ± 4.7
Min. - Max.	1.30 - 2.75	41.0 - 51.4	

a, % of micronucleated polychromatic erythrocytes in polychromatic erythrocytes observed

b, % of polychromatic erythrocytes in erythrocytes observed

CP, Cyclophosphamide monohydrate (single oral administration)

**, Significantly higher than the negative control at 1% level.