

食薬セ研第12-1904号

2002年 3月22日

1,1,2-トリクロロエタンの
マウスを用いる小核試験

厚生労働省 医薬局審査管理課 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	2
実験材料	3
1. 被験物質	3
2. 実験動物および飼育条件	3
毒性予備試験	5
1. 方 法	5
2. 結 果	6
小核本試験	7
1. 方 法	7
2. 結 果	9
考察および結論	10
参考文献	11
Table 1	13
Table 2	14

【要 約】

1,1,2-トリクロロエタンの生体内における細胞遺伝学的影響を評価するために、CD-1 (ICR) マウスを用いて単回経口投与による小核試験を実施した。

毒性予備試験では、雌雄マウスに 1,1,2-トリクロロエタンの 100、200、400 および 600 mg/kg をそれぞれ単回経口投与した結果、雄では自発運動低下が 400 mg/kg 以上の投与群で認められ、600 mg/kg 投与群の 5 例中 3 例が死亡した。雌ではいずれの投与群においても死亡例は観察されなかったが、600 mg/kg 投与群の全例で自発運動低下が認められたことから、毒性徴候に著しい性差はないと判断し、小核本試験は高用量を 400 mg/kg とし、雄のみを用いた。

小核本試験では、雄マウスに 1,1,2-トリクロロエタンの 100、200 および 400 mg/kg をそれぞれ単回経口投与し、投与後24および48時間に骨髓の塗抹標本を作製した。標本観察の結果、1,1,2-トリクロロエタンの投与により小核出現頻度が増加する傾向は認められなかったが、全赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、400 mg/kg 投与群において低下した。

以上の結果から、本試験条件下では、1,1,2-トリクロロエタンはマウスの骨髓細胞において染色体異常誘発作用あるいは紡錘体形成阻害作用を示さないが、骨髓細胞に対する増殖抑制作用を示した。

【緒 言】

1,1,2-トリクロロエタンは、溶剤、塩化ビニリデンの原料、粘着剤やラッカーなどの生産に用いられている有機塩素化合物である。今回、OECD 既存化学物質安全性点検等に係わる毒性調査の一環として、1,1,2-トリクロロエタンの生体内における細胞遺伝学的影響を調べるために、CD-1(ICR) マウスの骨髓細胞を用いる小核試験を実施した。まず、小核本試験に用いる投与量を決定するために雌雄マウスを用いて毒性予備試験を行い、最大耐量を求め、次に雄マウスを用いて骨髓細胞における小核本試験を行った。

この試験は、生体内における染色体異常誘発および紡錘体形成阻害物質の検出系として最も信頼される方法の一つであり、「OECD 化学物質試験法ガイドライン 474/哺乳動物の赤血球を用いる小核試験」(1997年7月21日採択)および「化学物質 GLP」(昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号、平成12年3月1日一部改正、環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14基局第1号)に準拠して実施した。

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、床敷として木製チップ（ホワイトフレーク、CRJ）を入れた TPX 樹脂製ケージ（143W×293D×148H mm、CRJ）に1匹ずつ収容し、固型飼料（CE-2、日本クレア(株)）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、許容範囲内にあり（注1）、供給した飼料、床敷および水道水の分析結果では、試験に支障をきたす可能性のある混入物はなかったことを確認した。

動物の群分けは、自由群分け法（無作為選択法）により行った。動物の個体識別は、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計画番号、群（投与量および標本作製時期）および動物番号を記載して個体識別の補助とした。

（注1）動物飼育期間中における飼育室の温湿度の実測値
温度：23.0～24.5℃ 相対湿度：50.0～70.0%

【毒性予備試験】

1. 方法

1) 実験群の設定

マウスを用いた経口投与による急性毒性試験において、LD₅₀値が 378 mg/kg であることが報告されていることから、雌雄マウスともに 100、200、400 および 600 mg/kg の被験物質投与群を設け、各群の投与動物数は5匹とした。

2) 検体の調製および投与方法

媒体は、被験物質が水に不溶のため、オリーブ油を選択した。投与検体は、被験物質を秤量し、日局オリーブ油（丸石製薬㈱、製造番号：1110）に溶解して最高濃度液を調製してから、段階希釈により各濃度の投与検体を用時調製した。調製検体中の被験物質の分析法を以下に示す。6 および 0.2%の調製検体について、媒体中における被験物質の安定性を確認した結果、室温、遮光条件下で2日間の安定性が確認された（Appendix 1）。また、各濃度の投与検体については、被験物質の含量を測定した結果、いずれも当研究所の基準（平均含量は調製指示値の90.0～110%）の範囲内にあることが確認された（Appendix 2）。

分析法：各調製検体の 1 mL を採取し、ジクロロメタンで一定量とした後、ジクロロメタンで適宜希釈し、ガスクロマトグラフ（GC）法により測定した。同時に作成した検量線を用いて濃度を求めた。

GC 条件

分析カラム : PoraPLOT Q
(内径 0.53 mm、長さ 10 m、膜厚 20 μm、ジーエルサイエンス㈱)
昇温条件 : 50℃ (1分間) →10℃/min→220℃
キャリアガス: ヘリウム、100 kPa
水素 : 60 kPa
空気 : 50 kPa
注入口温度 : 250℃
検出器温度 : 250℃
試料注入量 : 1 μL

投与経路は、経口投与を選択した。投与回数は1回とし、午前10時～11時の間に注射筒およびマウス用胃管を用いて強制経口投与した。投与液量は、投与の直前に測定した体重をもとに、10 mL/kg となるように個体別に算出した。投与時の体重範囲は、雄 37.3～41.5 g、雌 26.6～32.8 g であった。

3) 症状観察

投与日は投与後約1時間にわたり継続的に生死および一般状態を観察し、その後は投与後約6時間に観察した。翌日からは午前10時前後に観察を行い、投与後3日間にわたって症状観察した。

2. 結果

雌雄マウスにおける投与後の一般状態と死亡率を Table 1 に示した。投与後1時間の観察では、自発運動低下が 400 mg/kg 以上の投与群の雄と 600 mg/kg 投与群の雌で認められ、さらに 600 mg/kg 投与群では雌雄とも全例が腹臥位となった。投与後6時間の観察では上記の症状はいずれも回復していたが、投与翌日には 600 mg/kg 投与群の雄3例が死亡した。投与翌日以降の観察ではこの他に 600 mg/kg 投与群の雄2例および雌1例に立毛が観察された。

以上の結果から、毒性徴候に著しい性差はないと判断し、小核本試験は雄マウスのみを用いて行うこととした。また、TCE の最大耐量は 400 mg/kg であったことから、小核本試験に用いる高用量を 400 mg/kg とした。

【小核本試験】

1. 方法

1) 実験群の設定

毒性予備試験の結果に基づいて、高用量には 400 mg/kg を設定し、雄マウスを用いて小核本試験を実施することとした。すなわち、TCE 投与群は 100、200 および 400 mg/kg の 3 用量群とし、陰性対照群および陽性対照群を加え、標本作製時期を投与後24および48時間として、各群 5 匹からなる以下の 9 群を設けた。なお、陰性対照物質は被験物質の媒体である日局オリブ油を、陽性対照物質はシクロホスファミド（以下 CPA と略す）をそれぞれ選択した。

標本作製時期：24時間

- 1) 陰性対照群（日局オリブ油：10 mL/kg）
- 2) TCE 100 mg/kg 群
- 3) TCE 200 mg/kg 群
- 4) TCE 400 mg/kg 群
- 5) 陽性対照群（CPA：50 mg/kg）*

標本作製時期：48時間

- 6) 陰性対照群（日局オリブ油：10 mL/kg）
 - 7) TCE 100 mg/kg 群
 - 8) TCE 200 mg/kg 群
 - 9) TCE 400 mg/kg 群
-

* 当研究所で、本用量の CPA を強制経口投与することにより、投与後24時間に小核出現頻度が有意に増加することが確認されている。

2) 検体の調製および投与方法

被験物質の調製および投与方法は、毒性予備試験の場合と同様に行った。ただし、安定性試験の結果、調製後 2 日間の安定性が確認されたことから、投与前日に検体を調製し、室温、遮光条件で気密容器に保管したのち、調製日の翌日に投与に用いた。なお、各濃度の投与検体について被験物質の含量を測定した結果、いずれも基準範囲内にあることが確認された（Appendix 3）。

陽性対照物質である CPA（Sigma Chemical Company USA、Lot No.：108H0568）は、日局生理食塩液（㈱大塚製薬工場、製造番号：7H92N）に溶解して所定濃度（5 mg/mL）に調製後、すみやかに強制経口投与（10 mL/kg）した。陰性対照物質の日局オリブ油は、被験物質投与群と同一条件下で投与した。

投与時の動物の個体別体重は Appendix 4 に示した。なお、標本作製時期を投与後24時間に予定した 400 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：19）は、投与直後に死亡したこと

から投与過誤と判断し、予備動物（動物番号：46）と入れ換えて投与を実施した。

3) 症状観察

投与日は投与後約1時間にわたり継続的に生死および一般状態を観察し、その後は投与後約6時間に観察した。投与の翌日以降は、午前10時前後に観察した。

4) 標本の作製

小核の観察のための骨髓塗抹標本は、Schmid の方法^{2, 3)}に従って作製した。すなわち、投与後、所定の標本作製時期に頸椎脱臼法にてマウスを致死させ、両側の大腿骨を摘出した。その後、大腿骨の骨端を切断して、骨髓細胞を 0.6 mL の非働化したウシ胎仔血清 [Gibco BRL Co. (現: Life Technologies Inc.)、Lot No.: 1077012] で洗い出し、約 1200 rpm で5分間遠心分離後、沈渣をピペティングして、細胞浮遊液の一部をスライドガラス上に塗抹（各個体につき3枚）した。それぞれの骨髓塗抹標本には試験計画番号、スライド番号およびコード化した番号を記入し、室温で自然乾燥させた。乾燥した標本は、メタノールで5分間固定後、標本観察時まで室温保存した。

5) 骨髓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

骨髓塗抹標本の AO 蛍光染色は、Hayashi らの方法⁴⁾に従い、標本観察の直前に 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の AO 溶液を骨髓塗抹標本に滴下し、カバーガラスをかけて蛍光顕微鏡下で観察した。骨髓塗抹標本は、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、1匹あたり1000個の赤血球（幼若赤血球および成熟赤血球）を観察して、赤血球中に占める幼若赤血球の比率を調べた。

6) 統計処理法および判定基準

①小核出現頻度

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

小核出現頻度については、陰性対照群と被験物質投与群の間および陰性対照群と陽性対照群の間で、Fisher の正確確率検定法⁵⁾（片側検定）により有意差検定を行った。なお、検定にあたっては、多重性を考慮して Bonferroni の補正⁶⁾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⁷⁾（片側検定）を行った。

②赤血球中に占める幼若赤血球の比率

骨髓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⁵⁾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、いずれも等分散であったことから Dunnett 検定⁶⁾を用いて陰性対照群と各被験物質投与群との平均値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⁵⁾により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⁵⁾を行った。

③判定

被験物質が骨髓細胞において、染色体異常誘発作用または紡錘体形成阻害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の背景データ、骨髓細胞増殖への影響等を参考にして総合的に行った。

2. 結果

いずれの投与群においても、被験物質の投与に起因したと考えられる死亡例は観察されなかった。投与後1時間の一般状態の観察では、自発運動低下が400 mg/kg 投与群の全例で認められたが、投与後6時間の観察では全例とも回復していた。投与翌日以降の観察では、自発運動低下が投与後約24時間に10例中4例、投与後約48時間に5例中2例で観察された。200 mg/kg 以下の TCE 各投与群、陰性対照群および陽性対照群においては、一般状態の変化は観察されなかった。

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 2 に示した。

陰性対照群および陽性対照群の小核出現頻度は、いずれも背景データ (Appendix 5) のばらつきの範囲内であったことから、本試験系の有効性が確認された。

TCE 投与群の小核出現頻度は、いずれの標本作製時期においても陰性対照群との間に有意差は認められず、用量に依存して増加する傾向も認められなかった。一方、CPA を投与した陽性対照群では、0.1%水準で有意な小核出現頻度の増加が確認された。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、いずれの標本作製時期においても400 mg/kg 投与群で低下し、投与後48時間に標本作製した400 mg/kg 投与群では有意差が認められた。200 mg/kg 以下の TCE 投与群および陽性対照群においては、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。

【考察および結論】

TCE 投与群の小核出現頻度には、投与後24および48時間のいずれの標本作製時期においても陰性対照群との間に有意差は認められず、用量に依存して増加する傾向もなかった。

TCE の変異原性については、Ames 試験⁹⁾やマウスの肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験¹⁰⁾において陰性の結果が報告されているが、ヒトのリンパ球を用いた *in vitro* 小核試験およびコメットアッセイ¹¹⁾では、陽性の結果が報告されている。本試験においては、400 mg/kg 投与群において赤血球中に占める幼若赤血球の比率が低下し、被験物質の骨髓細胞に対する増殖抑制作用が示唆されたが、いずれの TCE 投与群においても小核出現頻度に変化はなかった。また、本被験物質の異性体である 1,1,1-トリクロロエタンについては、マウスを用いた小核試験で、陰性の結果¹²⁾が報告されている。

以上の結果から、本試験条件下では、1,1,2-トリクロロエタンはマウスの骨髓細胞において染色体異常誘発作用あるいは紡錘体形成阻害作用を示さないが、400 mg/kg の用量で骨髓細胞に対する増殖抑制作用を示した。

【参 考 文 献】

- 1) White, K. L. et al. : Toxicology of 1,1,2-trichloroethane in the mouse. Drug. Chem. Toxicol. 8 : 333-355 (1985)
- 2) Schmid, W. : The micronucleus test. Mutat. Res. 31 : 9-15 (1975)
- 3) Schmid, W. : The micronucleus test for cytogenetic analysis. in "Chemical Mutagens" Hollaender, A. ed., Plenum Press, N.Y.-London (1976), vol. 4. pp. 76-78
- 4) Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr. : An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. Mutat. Res. 120 : 241-247 (1983)
- 5) Snedecor, G. W., Cochran, W. G. : "Statistical methods", 7th ed. Iowa State University Press (1980)
- 6) 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)
- 7) Margolin, B. H., Risko, K. J. : in "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" Ashby, J. et al. eds., Cambridge Univ. Press (1988) pp. 1.29-1.42
- 8) Dunnet, C. W. : A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J. Am. Statist. Assoc. 50 : 1096-1121 (1955)
- 9) Ashby, J., Tennant, R. W. : Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by

the U. S. NTP. Mutation Res. 257 : 229-306 (1991)

- 10) Mirsalis, J. C. et al. : Measurement of unscheduled DNA synthesis and S-phase synthesis in rodent hepatocytes following in vivo treatment: Testing of 24 compounds. Environ. Mol. Mutagen. 14 : 155-164 (1989)

- 11) Tafazoli, M., Kirsch-Volders, M. : In vitro mutagenicity and genotoxicity study of 1,2-dichloroethylene, 1,1,2-trichloroethane, 1,3-dichloropropane, 1,2,3-trichloropropane and 1,1,3-trichloropropene, using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human lymphocytes. Mutation Res. 371 : 185-202 (1996)

- 12) Gocke, E., King, M.-T. Eckhardt, K., Wild, D. : Mutagenicity of cosmetics ingredients licensed by the European communities. Mutation Res. 90 : 91-109 (1981)

Table 1. Toxic symptoms and mortality of CD-1 (ICR) mice after single oral administration of TCE in the preliminary toxicity test

Sex	Dose (mg/kg)	Number of mice administered	Toxic symptoms	Number of mice that showed toxic symptom				Mortality
				Hours after administration		Days after administration		
				0~1	6	1	2	
Male	100	5	Abnormality	0	0	0	0	0 / 5
	200	5	Abnormality	0	0	0	0	0 / 5
	400	5	Decrease in locomotor activity	5	0	0	0	0 / 5
	600	5	Decrease in locomotor activity	5	0	0	0	3 / 5
	Prone position	5	0	0	0			
	Piloerection	0	0	2	2			
	Death	0	0	3	0			
Female	100	5	Abnormality	0	0	0	0	0 / 5
	200	5	Abnormality	0	0	0	0	0 / 5
	400	5	Abnormality	0	0	0	0	0 / 5
	600	5	Decrease in locomotor activity	5	0	0	0	0 / 5
	Prone position	5	0	0	0			
	Piloerection	0	0	0	1			

Table 2-1. Results of micronucleus test in male CD-1 (ICR) mice after single oral administration of TCE (sampling time: 24 hours)

Group	Animal No.	MNPCE / PCE ^a	PCE / ERY ^b
Negative control Olive oil 10 mL/kg	1	2 / 2000	473 / 1000
	2	2 / 2000	456 / 1000
	3	5 / 2000	663 / 1000
	4	1 / 2000	422 / 1000
	5	3 / 2000	609 / 1000
	Total	13 / 10000	2623 / 5000
	%(Mean±S.D.)	(0.13 ± 0.08)	(52.5 ± 10.5)
TCE 100 mg/kg	6	3 / 2000	563 / 1000
	7	4 / 2000	558 / 1000
	8	5 / 2000	573 / 1000
	9	5 / 2000	307 / 1000
	10	2 / 2000	544 / 1000
	Total	19 / 10000	2545 / 5000
	%(Mean±S.D.)	(0.19 ± 0.07)	(50.9 ± 11.3)
TCE 200 mg/kg	11	5 / 2000	560 / 1000
	12	0 / 2000	507 / 1000
	13	2 / 2000	708 / 1000
	14	1 / 2000	603 / 1000
	15	0 / 2000	514 / 1000
	Total	8 / 10000	2892 / 5000
	%(Mean±S.D.)	(0.08 ± 0.10)	(57.8 ± 8.2)
TCE 400 mg/kg	16	0 / 2000	505 / 1000
	17	1 / 2000	400 / 1000
	18	10 / 2000	181 / 1000
	46	3 / 2000	367 / 1000
	20	4 / 2000	589 / 1000
	Total	18 / 10000	2042 / 5000
	%(Mean±S.D.)	(0.18 ± 0.20)	(40.8 ± 15.4)
Positive control CPA 50 mg/kg	21	30 / 2000	414 / 1000
	22	49 / 2000	431 / 1000
	23	42 / 2000	640 / 1000
	24	13 / 2000	295 / 1000
	25	23 / 2000	572 / 1000
	Total	157 / 10000	2352 / 5000
	%(Mean±S.D.)	(1.57 ± 0.72)***	(47.0 ± 13.7)

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes / number of erythrocytes observed

CPA: Cyclophosphamide

***: Significantly higher than the negative control at 0.1% level.

Table 2-2. Results of micronucleus test in male CD-1 (ICR) mice after single oral administration of TCE (sampling time: 48 hours)

Group	Animal No.	MNPCE / PCE ^a	PCE / ERY ^b
Negative control Olive oil 10 mL/kg	26	2 / 2000	489 / 1000
	27	0 / 2000	495 / 1000
	28	2 / 2000	567 / 1000
	29	2 / 2000	583 / 1000
	30	5 / 2000	545 / 1000
	Total	11 / 10000	2679 / 5000
	%(Mean±S.D.)	(0.11 ± 0.09)	(53.6 ± 4.2)
TCE 100 mg/kg	31	0 / 2000	530 / 1000
	32	2 / 2000	603 / 1000
	33	4 / 2000	481 / 1000
	34	3 / 2000	503 / 1000
	35	5 / 2000	345 / 1000
	Total	14 / 10000	2462 / 5000
	%(Mean±S.D.)	(0.14 ± 0.10)	(49.2 ± 9.4)
TCE 200 mg/kg	36	4 / 2000	569 / 1000
	37	2 / 2000	529 / 1000
	38	3 / 2000	502 / 1000
	39	3 / 2000	499 / 1000
	40	3 / 2000	665 / 1000
	Total	15 / 10000	2764 / 5000
	%(Mean±S.D.)	(0.15 ± 0.04)	(55.3 ± 6.9)
TCE 400 mg/kg	41	5 / 2000	192 / 1000
	42	2 / 2000	438 / 1000
	43	3 / 2000	447 / 1000
	44	2 / 2000	352 / 1000
	45	0 / 2000	410 / 1000
	Total	12 / 10000	1839 / 5000
	%(Mean±S.D.)	(0.12 ± 0.09)	(36.8 ± 10.5)*

a: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / number of polychromatic erythrocytes observed

b: Number of polychromatic erythrocytes / number of erythrocytes observed

*: Significantly lower than the negative control at 5% level.