

最 終 報 告 書

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート
の哺乳動物培養細胞を用いた染色体異常試験

(試験番号: 96-067)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

Study No. 96-067

目 次

要約	1 頁
試験目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 対照物質	3
3. 溶媒	3
4. 試験細胞株	3
5. 培地	3
6. 培養条件	4
7. S9 mix	4
8. 細胞増殖抑制試験	4
1) 被験物質の供試液の調製	5
2) 細胞の処理	5
3) 細胞増殖率の測定	5
9. 染色体異常試験	7
1) 被験物質および陽性対照物質の濃度	7
2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製	7
3) 細胞の処理	7
(1) 連続処理法	7
(2) 短時間処理法	7
4) 試験群の構成および使用シャーレ数	8
5) 染色体標本の作製	8
6) 染色体の観察	9
7) 染色体異常の分類および集計	9
8) 試験結果の判定	9

結果	10
1. 染色体異常試験（連続処理法）	10
2. 染色体異常試験（短時間処理法）	10
3. D_{20} 値	11
結論および参考事項	11
参考文献	12

表

表1	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの染色体異常試験結果 (連続処理法)	14
表2	2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの染色体異常試験結果 (短時間処理法)	16

図

図1	構造異常を有する細胞の出現頻度	18
図2	倍数性細胞の出現頻度	19

要 約

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

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、連続処理法では 78~5000 $\mu\text{g/ml}$ 濃度を、また、短時間処理法では 600~1800 $\mu\text{g/ml}$ 濃度を用いて細胞増殖抑制試験を行った。その結果、連続処理法では24時間および48時間処理でそれぞれ 625 および 313 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で、また、短時間処理法では S9 mix 非存在および存在下でそれぞれ 800 および 1600 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。

したがって、染色体異常試験における濃度は、連続処理法の場合 20, 39, 78, 156, 313 および 625 $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法の場合 200, 400, 600, 800, 1400 および 1600 $\mu\text{g/ml}$ とした。

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

従って、本実験条件下では、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの CHL 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。計算された D_{20} 値は、短時間処理法において 0.19 mg/ml であった。

試 験 目 的

この試験は、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート(DMMA)の哺乳動物培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするため実施した。

材料および方法^{1), 2)}

1. 被験物質

名称(略号): 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート (DMMA)

別名 メタクリル酸ジメチルアミノエチル

CAS番号: 2867-47-2

ロット番号:

純 度: 99.9 % (平成8年9月17日分析)

[不純物 ハイドロキノンモノメチルエーテル: 2000 ppm (重合防止剤として添加); ジメチルアミノエタノール: 0.1%以下; メチルメタクリレート: 0.02%以下]

供 給 者:

入 手 日:

入 手 量: 25g

物理化学的性状:

化 学 名 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート
[2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate]

示 性 式 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$

分 子 式 $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}$

分 子 量 157.22

性状(常温) 無色透明の液体

沸 点 182~192 °C

融 点 約-30°C

蒸 気 圧 1.07×10^{-5} mPa

溶解性 水, アセトン, DMSOに可溶

安定性: 安定 (実験終了後, 残余被験物質を試験委託者において分析した結果, 純度は 99.9 % (1997年4月9日分析) で, 実験期間中被験物質は安定であったことを確認した。)

保管条件: 冷暗所 (4℃), 密栓

2. 対照物質

陰性対照物質は, 被験物質の溶媒として使用した蒸留水〔㈱大塚製薬工場, ロット番号 K6G94〕を用いた。陽性対照物質は, 直接法では *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, Sigma chemical 社, ロット番号 109C-0469) を, 代謝活性化法では 3,4-Benzo [a]pyrene (B[a]P, Sigma chemical 社, ロット番号 57F-3434)を用いた。

3. 溶媒

被験物質は水に易溶な液体であるため, 溶媒には蒸留水を用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[a]P の溶媒には, ジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業株式会社, ロット番号 WDG4420) を用いた。

4. 試験細胞株

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

5. 培地

Eagle-MEM 粉末培地 (Gibco Laboratories, ロット番号 73K2362) を常法に従い調製し, これに非働化 (56℃, 30分間加熱処理) 仔牛血清 (Gibco Laboratories, ロット番号 36N2761, 34K2063) を10%の割合で添加したものを用いた。

6. 培養条件

供試細胞は CO₂ インキュベーター (Napco 社, 6200型) を用い, CO₂ 濃度 5 %, 空気 95 %, 温度 37°C, 加湿条件下で培養した。

7. S9 mix

S9 mixは, ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素画分 (S9) にコファクターを加えて凍結された市販品を, キッコーマン株式会社から購入 (ロット番号 CAM-351, 平成8年9月6日製造, 平成8年11月20日購入) し, -80°C以下で保存したものを使用時に冷水中で解凍して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 ml 当たりの組成は, 次のとおりである。

[S9 製造法]

A. 使用動物

- a) 種・系統: Sprague-Dawley 系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- b) 性・週齢: 雄・7 週齢
- c) 体 重: 198~243 g

B. 誘導法

- a) 誘導物質: Phenobarbital (PB), 5,6-Benzoflavone (BF)
- b) 投与経路: 腹腔内投与
- c) 投与法 (投与開始日起算):
 - 1 日目 - PB 30 mg/kg, 2, 3, 4 日目 - PB 60 mg/kg
 - 3 日目 - BF 80 mg/kg

C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離 (9,000×g) し, その上清を採取。

[S9 mix 1 ml あたりの組成]

S9	0.3 ml
MgCl ₂	5 μmol/0.1 ml
KCl	33 μmol/0.1 ml
G-6-P	5 μmol/0.1 ml
NADP	4 μmol/0.1 ml
HEPES 緩衝液	4 μmol/0.2 ml
蒸留水	0.1 ml

8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な濃度を検討するため, 連続処理法の24時間および

48時間処理の場合 78, 156, 313, 625, 1250, 2500 および 5000 $\mu\text{g/ml}$ 濃度で, また, 短時間処理法の S9 mix 非存在および存在下の場合, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 および 1800 $\mu\text{g/ml}$ 濃度で, 次に記載する細胞増殖抑制試験を行なった。試験には各濃度について 2 枚のシャーレを使用した。

1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は, 使用時に被験物質を蒸留水に溶解して最高濃度の供試液 (原液) を調製した。すなわち, 原液の濃度は, 連続処理法では 55.0 mg/ml, 短時間処理法では 19.8 mg/ml とした。次いで原液の一部を蒸留水で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。被験物質の供試液の添加量は, 各シャーレの培地量の 10% (v/v) とした。

2) 細胞の処理

連続処理法の場合, 直径 3.5 cm の円形プラスチック製シャーレ (Becton Dickinson 社) に 6×10^3 個/ml の細胞を含む培地 2 ml を加え, 培養開始 3 日後に蒸留水 (陰性対照) または被験物質の供試液各 0.2 ml を加えて 24 時間および 48 時間培養した。一方, 短時間処理法の場合は, 連続処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し, 培養開始 3 日後に S9 mix 非存在下の場合は培地を取り替えず, 蒸留水または被験物質の供試液各 0.2 ml をシャーレに加えた。また, S9 mix 存在下の場合は各シャーレの培地を取り除き, S9 mix 希釈液 (S9 mix を培地で 6 倍に希釈したもの) を 2 ml 加えた後, 蒸留水または被験物質の供試液各 0.2 ml をシャーレに加えた。そして, 培養 6 時間後に培地を取り除き, 新鮮培地で細胞表面を 3 回洗浄し, 新しい培地 2 ml を加えて 18 時間培養した。培養終了後, 培地を取り除き, 生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し, 10%ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後, 水洗し, 0.1%クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後, 室温で一晩自然乾燥した。

3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は, 染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計 (オリンパス光学工業株式会社, モノセレータ) によって測定し, 陰性対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各濃度群の細胞増殖率を求めた。

その結果は, 下表に示したとおり, 連続処理法においては 24 時間処理で 625 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ, 50%細胞増殖抑制濃度は 313~625 $\mu\text{g/ml}$ 間にあるものと判断された。48 時間処理では 156 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で 50%を上回る

細胞増殖抑制が認められ、156 $\mu\text{g/ml}$ が50%細胞増殖抑制濃度を示した。

短時間処理法においては S9 mix 非存在および存在下でそれぞれ 800 および 1600 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ 600 ~800 $\mu\text{g/ml}$ 間および 1400~1600 $\mu\text{g/ml}$ 間にあるものと判断された。

〔連続処理法〕

濃 度 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[100.0] ^a	100	100	[100.0]
78	71	61	[66.0]	63	62	[62.5]
156	66	57	[61.5]	48	52	[50.0]
313	60	56	[58.0]	38	40	[39.0]
625	25	28	[26.5]	20	21	[20.5]
1250	14	10	[12.0]	1	6	[3.5]
2500	13	7	[10.0]	2	4	[3.0]
5000	10	6	[8.0]	1	4	[2.5]

a : 平均値

〔短時間処理法〕

濃 度 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[100.0] ^a	100	100	[100.0]
600	54	59	[56.5]	74	88	[81.0]
800	38	45	[41.5]	64	77	[70.5]
1000	24	32	[28.0]	70	71	[70.5]
1200	16	20	[18.0]	64	77	[70.5]
1400	13	20	[16.5]	54	61	[57.5]
1600	12	11	[11.5]	41	46	[43.5]
1800	22	13	[17.5]	30	36	[33.0]

a : 平均値

9. 染色体異常試験

1) 被験物質および陽性対照物質の濃度

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の前後が含まれ、かつ3濃度以上のデータが得られることを考慮して、連続処理法では 625 $\mu\text{g/ml}$ を最

高濃度とし、以下公比2で 313, 156, 78, 39 および $20\mu\text{g/ml}$ の計6濃度を設定した。短時間処理法においては、 $1600\mu\text{g/ml}$ (約 10 mM 相当) を最高濃度とし、以下公比2で 800, 400 および $200\mu\text{g/ml}$ を設定し、さらに S9 mix 非存在および存在下で50%をやや上回る細胞増殖率を示した 600 および $1400\mu\text{g/ml}$ を追加し、計6濃度を設定した。

陽性対照物質の MNNG は $2.5\mu\text{g/ml}$, B[a]P は $10\mu\text{g/ml}$ の濃度で試験した。

2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を蒸留水に溶解して最高濃度の供試液（原液）を調製した。すなわち、原液の濃度は、連続処理法では 6.88 mg/ml , 短時間処理法では 17.6 mg/ml とした。次いで、上述の 8-1) に記載した方法と同様の操作で原液の一部を蒸留水で順次希釈し、所定濃度の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は 0.5 mg/ml , B[a]P は 2.0 mg/ml の供試液を調製した。

3) 細胞の処理

4×10^3 個/ml の細胞を含む培地 5 ml を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ (Becton Dickinson 社) に加え、3日間培養後、下記の方法で処理した。培養には1濃度当たり2枚のシャーレを使用した。

(1) 連続処理法

蒸留水および被験物質の各供試液は 0.5 ml, MNNG の供試液は 0.025 ml を各シャーレに添加し、24時間および48時間培養した。

(2) 短時間処理法

S9 mix 非存在下の場合、各シャーレから培地 2 ml を抜き取り、蒸留水および被験物質の各供試液は 0.3 ml, B[a]P の供試液は 0.015 ml を各シャーレに添加して培養した。また、S9 mix 存在下の場合、各シャーレから培地 2.5 ml を抜き取った後、各シャーレに S9 mix を 0.5 ml ずつ添加し、さらに、蒸留水および被験物質の各供試液は 0.3 ml, B[a]P の供試液は 0.015 ml を各シャーレに添加して培養した。S9 mix 非存在および存在下のいずれの場合も、培養6時間後に培地を取り除き、新鮮培地で細胞表面を3回洗浄し、新しい培地 5 ml を加え、さらに 18 時間培養した。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

〔連続処理法〕

濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	使用シャーレ数	
	24時間処理	48時間処理
0 (陰性対照) ^a	2	2
20	2	2
39	2	2
78	2	2
156	2	2
313	2	2
625	2	2
2.5 (陽性対照) ^b	2	2

a : 蒸留水, b : MNNG, 使用シャーレ総数 : 32

〔短時間処理法〕

濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	使用シャーレ数	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0 (陰性対照) ^a	2	2
200	2	2
400	2	2
600	2	2
800	2	2
1400	2	2
1600	2	2
10 (陽性対照) ^b	2	2

a : 蒸留水, b : B[a]P, 使用シャーレ総数 : 32

5) 染色体標本の作製

標本作製の2時間前に、培養中の各シャーレにコルセミドを最終濃度として $0.2\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。培養終了後、培地を取り除き、0.2%トリプシン水溶液2mlで処理して細胞をシャーレから剥離し、新鮮培地5mlを入れた遠沈管に移し、1000 rpm、5分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の75 mM 塩化カリウム水溶液4mlを加えて懸濁し、37℃で15分間低張処理した。低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液(v/v)1mlを添加して固定した。1000 rpmで5分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液4mlで懸濁・固定した。この操作を3回繰り返したのち、少量の固定液で適切な密度の細胞を懸濁し、スライドガラスの2か所に1滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、Sørensen 緩衝液(pH 6.8)を用いて希釈した1.4%ギムザ液で約15分間染色した。水洗後、室温で乾燥して染色体標本作製した。標本は、シャーレ当たり3枚作製した。

6) 染色体の観察

染色体は、60倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率 600倍で検鏡した。標本はすべてコード化し、盲検法でおこなった。各供試濃度とも染色体が明瞭に識別できる染色体の数が 25 ± 2 本の分裂中期像について、1 シャーレ当たり100個、すなわち、1 濃度当たり 2 枚のシャーレの200個について観察した。

7) 染色体異常の分類および集計³⁾

染色体異常の分類は、構造異常については、ギャップ（染色分体型および染色体型）、染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換（二動原体、環状染色体など）およびその他（断片化）とした。数的異常については、倍数性細胞のみを記録した。

ギャップは、染色体の染色性が全く認められない部位を対象とし、その部位が染色分体幅以上のもので、しかも染色分体の縦軸線上にあるものとした。ただし、非染色部位が染色分体の縦軸線上にあっても著しく離れている場合には、切断とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計をおこなった。構造異常の総数は、観察した細胞 200個中に認められた異常細胞数をギャップのみを有する細胞を含めた場合と、含めない場合とに区別して表示した。

8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、ギャップを含めた構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料 χ^2 検定をおこなって有意差（有意水準 5 % 以下）が認められた場合は、Fisher の直接確率法を用いて陰性対照群と各濃度群との間の有意差検定（有意水準は多重性を考慮して、5 % または 1 % を処理群の数で割ったものを用いた。）をおこなった。その結果、陰性対照群に比較して、被験物質による染色体異常細胞の出現頻度が 2 濃度以上で有意に増加し、かつ濃度依存性あるいは再現性が認められた場合、陽性と判定した。

結 果

1. 染色体異常試験（連続処理法）

結果は表 1 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では24時間および48時間処理でそれぞれ 0.5 および 1.0%であった。これに対し、被験物質群では、20, 39, 78, 156, 313 および 625 $\mu\text{g/ml}$ において24時間処理では 1.5, 1.0, 0.5, 0.5, 2.0 および 88.5%の出現頻度で、また、48時間処理では 0.5, 0.5, 2.0, 0, 1.5 および 76.5%の出現頻度で認められ、いずれの処理においても 625 $\mu\text{g/ml}$ における出現頻度の増加が、陰性対照群と比較して明らかに有意なものであった。しかしながら、濃度依存性については24時間および48時間処理ともに明らかではなかった。一方、陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は、24時間および48時間処理でそれぞれ 94.5%および 79.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数性細胞は、陰性対照群では認められなかった。被験物質群では24時間処理でのみ 0～0.5%の範囲の低い出現頻度で認められた。また、陽性対照群では、48時間処理でのみ 1.0%の出現頻度で認められた。

2. 染色体異常試験（短時間処理法）

結果は表 2 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では、S9 mix 非存在および存在下でともに 0.5%であった。これに対し、被験物質群では S9 mix 非存在下の 200, 400 および 600 $\mu\text{g/ml}$ でそれぞれ 6.5, 49.5 および 87.5%の出現頻度で認められ、いずれも陰性対照群と比べ統計学的有意差のある高い出現頻度を示し、さらに濃度依存性も認められた。また、S9 mix 存在下では 200, 400, 600, 800, 1400 および 1600 $\mu\text{g/ml}$ でそれぞれ 1.0, 0, 3.5, 13.5, 99.5 および 100%の出現頻度で認められ、800 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度における出現頻度の増加は、陰性対照群と比べて統計学的に有意なものであり、さらに濃度依存性も認められた。一方、陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は、S9 mix 非存在下で 2.0%, S9 mix 存在下で 58.8%を示し B[a]P は代謝活性化されて顕著な染色体異常を誘発することが確認された。

倍数性細胞については、陰性対照群では、S9 mix 存在下でのみ 1.0%の低い出現頻度で認められた。被験物質群においては、S9 mix 非存在および存在下でそれぞれ 0.5～1.0%およ

び0～1.5%の範囲の出現頻度で認められたが、陰性対照群との間に有意差はなかった。陽性対照群では、S9 mix 非存在および存在下ともに倍数性細胞は認められなかった。

なお、S9 mix 非存在下の 800, 1400 および 1600 $\mu\text{g/ml}$ においては、被験物質の細胞に対する毒性のため観察可能な分裂中期像が認められなかった。また、S9 mix 存在下の 1600 $\mu\text{g/ml}$ では、細胞毒性のため分裂中期像は 84 個しか観察することができなかった。

3. D_{20} 値⁴⁾

連続処理法および短時間処理法ともに陽性値を示す染色体異常細胞の増加が認められたため、 D_{20} 値（分裂中期像 20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の濃度, mg/ml ）を算出した。

その結果、連続処理法および短時間処理法 S9 mix 存在下では、計算値と試験結果から判断される推定値とに大きな隔たりがあり、妥当と考えられる D_{20} 値は得られなかった。短時間処理法 S9 mix 非存在下においては、下表に示した D_{20} 値が得られ、S 値（対照となった D_{20} 値のうち、相関係数 r が大きく、陰性対照群を含む群数 n が多いものほどより妥当性が高いとする考えに基づく指標）が小さい方の値 0.19 mg/ml を本被験物質の D_{20} 値とした。

		D_{20} 値 (mg/ml)	S 値
短時間処理法	S9 mix 非存在下	0.19	12.62
		0.20	13.19

結論および参考事項

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートのチャイニーズハムスター肺由来の繊維芽細胞株 (CHL)を用いた *in vitro* における染色体異常試験を実施した結果、連続処理法24時間および48時間処理並びに短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下のすべてにおいて、染色体構造異常細胞の有意な増加が認められ、短時間処理法においては S9 mix 非存在および存在下ともに、明らかな濃度依存性も認められた。

したがって、本実験条件下では、2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの CHL 細胞に対する染色体異常誘発性は、陽性と判定した。また、本被験物質の D_{20} 値は、短時間処理法

において 0.19 mg/ml であった。本試験結果は、CHL 細胞において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が10%以上を陽性とする生物学的判定基準⁵⁾ からみても明らかに陽性と判断されるものであった。

なお、類縁化合物である(ジメチルアミノ)エチルアクリレートの変異原性についても CHL 細胞を用いた染色体異常試験並びに *Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験で陽性⁶⁾ と報告されており、エチルメタクリレートについては、*S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験で陰性⁷⁾、L5178Y マウスリンホーマ細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁸⁾、CHO 細胞を用いた染色体異常試験では陰性⁹⁾ および姉妹染色分体交換試験で陽性⁹⁾ と報告されている。また、2-(ジメチルアミノ)エチル塩化物については、麦酒酵母菌を用いた復帰突然変異試験で陽性¹⁰⁾ と報告されている。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, **48**, 337-354.
- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal aberration test on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, **66**, 277-290.
- 3) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988, pp.16-37.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, “化審法毒性試験法の解説 改訂版,” 化学工業日報社, 東京, 1992, pp.51-52.
- 5) 石舘 基 監修, “改訂増補 染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 19.
- 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.5,” 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1997, pp.595-604.

- 7) Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., and Speck, W. (1987). *Salmonella* mutagenicity test : III. Results from the testing of 255 chemicals, *Environmental Mutagenesis*, **9**(supplement 9), 1-109.
- 8) Moore, M.M., Amtower, A., Doerr, C.L., Brock, K.H. and Dearfield, K.L. (1988). Genotoxicity of acrylic acid, methyl acrylate, ethyl acrylate, methyl methacrylate, and ethyl methacrylate in L5178Y mouse lymphoma cells, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **11**, 49-63.
- 9) "The Dictionary of Substances and their Effects," Vol.4, eds. by M.L. Richardson, S. Gangolli, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1994, pp.430-432.
- 10) Zimmermann, F.K., Borstel, R.C., Halle, E.S., Parry, J.M., Siebert, D., Zetterberg, G., Barale, R. and Loprieno, N. (1984). Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae* : a report of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research*, **133**, 199-244.

表 1-1 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート of 染色体異常試験結果 (連続処理法: 24時間処理)

試験群	濃 度 (μg/ml)	観察 細胞数	倍数性細胞		構 造 異 常 を 有 す る 細 胞 数 と 出 現 頻 度 (%)								判定
			細胞数 (%)	判定	ギャップ g	染色分体型		染色体型		その他	合 計		
						切断	交換	切断	交換		+ g	- g	
陰性対照 (蒸留水)	--	100	0	--	0	0	0	0	1	0	1	1	--
		100	0		0	0	0	0	0	0			
		200	0(0)		0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)		
被験物質	20	100	1	—	2	0	0	0	0	0	2	0	—
		100	0		1	0	0	0	0	0	0		
		200	1(0.5)		3(1.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)	0(0)	
	39	100	0	—	0	0	0	0	1	0	1	1	—
		100	0		0	1	0	0	0	1	1		
		200	0(0)		0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	2(1.0)	2(1.0)	
	78	100	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	—
		100	0		0	1	0	0	0	1	1		
		200	0(0)		0(0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	
	156	100	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	—
		100	1		0	0	0	0	1	0	1		
		200	1(0.5)		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	
	313	100	0	—	0	1	0	1	0	0	2	2	—
		100	0		0	0	0	0	2	0	2		
		200	0(0)		0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	2(1.0)	0(0)	4(2.0)	4(2.0)	
	625	100	0	—	11	60	72	22	0	0	91	89	+
		100	0		11	59	59	20	0	0	86	84	
		200	0(0)		22(11.0)	119(59.5)	131(65.5)	42(21.0)	0(0)	0(0)	177(88.5)**	173(86.5)	
陽性対照 (MNNG)	2.5	100	0	—	5	17	93	4	0	0	95	94	+
		100	0		6	15	92	3	0	0	94	94	
		200	0(0)		11(5.5)	32(16.0)	185(92.5)	7(3.5)	0(0)	0(0)	189(94.5)**	188(94.0)	

+ g : ギャップのみを有する細胞を含む場合

- g : ギャップのみを有する細胞を除く場合

MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

** : $P < 0.01$

表1-2 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート染色体異常試験結果(連続処理法:48時間処理)

試験群	濃 度 (μ g/ml)	観察 細胞数	倍数性細胞		構 造 異 常 を 有 す る 細 胞 数 と 出 現 頻 度 (%)								判定
			細胞数 (%)	判定	ギャップ g	染色分体型		染色体型		その他	合 計		
						切断	交換	切断	交換		+ g	- g	
陰性対照 (蒸留水)	--	100	0	--	1	0	0	0	0	0	1	0	--
		100	0		0	1	0	0	1	1			
		200	0(0)		1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	1(0.5)	
被験物質	20	100	0	--	0	0	0	0	1	0	1	1	-
		100	0		0	0	0	0	0	0			
		200	0(0)		0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)		
	39	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
		100	0		1	0	0	0	0	1	0		
		200	0(0)		1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)		
	78	100	0	-	1	0	0	0	0	0	1	0	-
		100	0		1	0	0	1	1	0	3	2	
		200	0(0)		2(1.0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	4(2.0)	2(1.0)	
	156	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
		100	0		0	0	0	0	0	0	0		
		200	0(0)		0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)		
	313	100	0	-	1	0	0	0	1	0	2	1	-
		100	0		0	0	0	1	0	1	1		
		200	0(0)		1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	3(1.5)	2(1.0)	
	625	100	0	--	11	28	64	27	0	0	77	74	+
		100	0		10	33	59	19	0	0	76	74	
		200	0(0)		21(10.5)	61(30.5)	123(61.5)	46(23.0)	0(0)	0(0)	153(76.5)**	148(74.0)	
陽性対照 (MNNG)	2.5	100	0	-	5	16	69	6	9	0	80	80	+
		100	2		6	23	67	19	8	0	79	79	
		200	2(1.0)		11(5.5)	39(19.5)	136(68.0)	25(12.5)	17(8.5)	0(0)	159(79.5)**	159(79.5)	

+g: ギャップのみを有する細胞を含む場合

-g: ギャップのみを有する細胞を除く場合

MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

** : $P < 0.01$

表2-1 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix 非存在下)

試験群	濃 度 (μ g/ml)	観察 細胞数	倍数性細胞		構 造 異 常 を 有 す る 細 胞 数 と 出 現 頻 度 (%)								判定
			細胞数 (%)	判定	ギャップ g	染色分体型		染色体型		その他	合 計		
						切断	交換	切断	交換		+ g	- g	
陰性対照 (蒸留水)	--	100	0	--	0	0	0	0	0	0	0	0	--
		100	0		0	0	0	1	0	1	1		
		200	0(0)		0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)		
被験物質	200	100	0	-	1	1	1	0	3	0	5	5	+
		100	2		0	5	0	3	0	8	8		
		200	2(1.0)		1(0.5)	1(0.5)	6(3.0)	0(0)	6(3.0)	0(0)	13(6.5)**	13(6.5)	
	400	100	1	-	9	17	39	4	0	0	48	44	+
		100	0		9	6	47	2	0	0	51	48	
		200	1(0.5)		18(9.0)	23(11.5)	86(43.0)	6(3.0)	0(0)	0(0)	99(49.5)**	92(46.0)	
	600	100	0	-	15	57	73	10	0	0	86	85	+
		100	1		13	58	68	11	0	0	89	87	
		200	1(0.5)		28(14.0)	115(57.5)	141(70.5)	21(10.5)	0(0)	0(0)	175(87.5)**	172(86.0)	
	800 [#]	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
		--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
	1400 [#]	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
		--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
	1600 [#]	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
		--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
陽性対照 (B[a]P)	10	100	0	-	0	1	1	0	0	0	2	2	-
		100	0		1	0	1	0	0	0	2	1	
		200	0(0)		1(0.5)	1(0.5)	2(1.0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(2.0)	3(1.5)	

+g: ギャップのみを有する細胞を含む場合

-g: ギャップのみを有する細胞を除く場合

B[a]P: 3,4-benzo[a]pyrene

** : $P < 0.01$

: 細胞毒性のため, 観察可能な分裂中期像なし

表2-2 2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレートの染色体異常試験結果(短時間処理法: S9mix 存在下)

試験群	濃 度 (μ g/ml)	観察 細胞数	倍数性細胞		構 造 異 常 を 有 す る 細 胞 数 と 出 現 頻 度 (%)								判定
			細胞数 (%)	判定	ギャップ g	染色分体型		染色体型		その他	合 計		
						切断	交換	切断	交換		+ g	- g	
陰性対照 (蒸留水)	--	100	1		0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	1		0	0	1	0	0	0	1	1	
		200	2(1.0)	--	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	--
被験物質	200	100	0		0	0	0	0	1	0	1	1	
		100	0		0	0	0	0	1	0	1	1	
		200	0(0)	—	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	2(1.0)	2(1.0)	—
	400	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	0(0)	—	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	—
	600	100	0		1	1	1	0	2	0	5	4	
		100	1		0	0	2	0	0	0	2	2	
		200	1(0.5)	—	1(0.5)	1(0.5)	3(1.5)	0(0)	2(1.0)	0(0)	7(3.5)	6(3.0)	—
	800	100	3		1	0	12	0	1	0	13	13	
		100	0		1	2	12	0	1	0	14	13	
		200	3(1.5)	—	2(1.0)	2(1.0)	24(12.0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	27(13.5)**	26(13.0)	+
	1400	100	0		11	66	98	25	0	0	99	99	
		100	0		2	80	96	20	0	0	100	100	
		200	0(0)	—	13(6.5)	146(73.0)	194(97.0)	45(22.5)	0(0)	0(0)	199(99.5)**	199(99.5)	+
	1600 [#]	29	0		3	23	28	5	0	0	29	29	
		55	0		3	37	53	16	0	0	55	55	
		84	0(0)	—	6(7.1)	60(71.4)	81(96.4)	21(25.0)	0(0)	0(0)	84(100)**	84(100)	+
陽性対照 (B[a]P)	10	100	0		9	8	63	3	0	0	64	63	
		100	0		0	3	49	1	2	0	53	53	
		200	0(0)	—	9(4.5)	11(5.5)	112(56.0)	4(2.0)	2(1.0)	0(0)	117(58.5)**	116(58.0)	+

+g: ギャップのみを有する細胞を含む場合

-g: ギャップのみを有する細胞を除く場合

B[a]P: 3,4-benzo[a]pyrene

**: P < 0.01

#: 細胞毒性のため、規定数の分裂中期像を観察することができなかった。

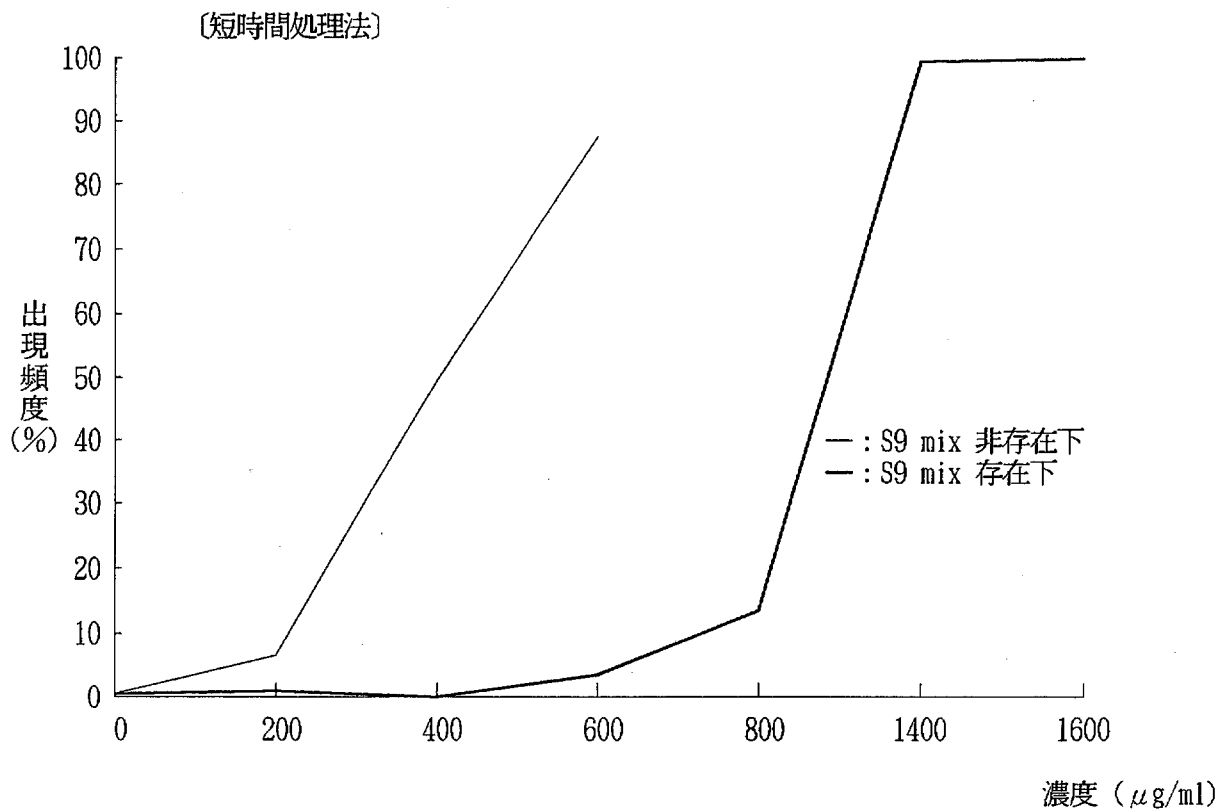
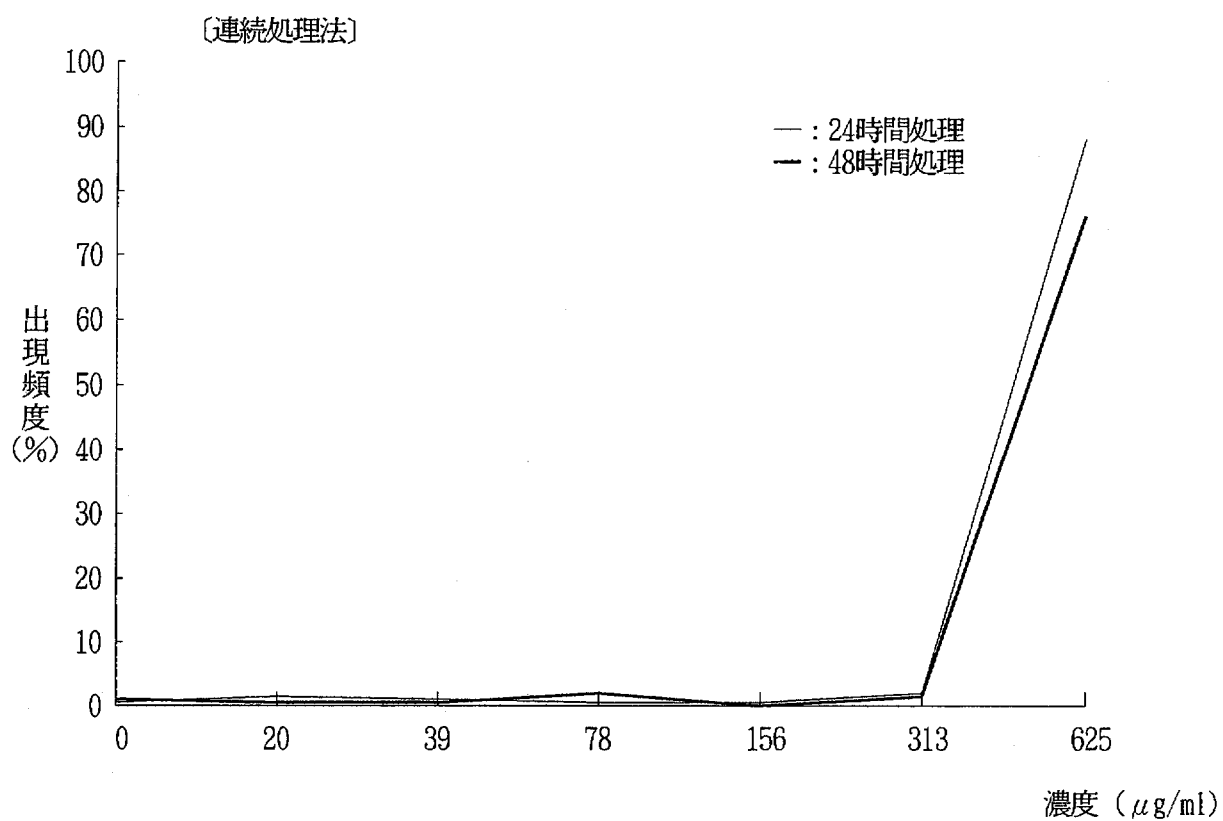


図 1 構造異常を有する細胞の出現頻度

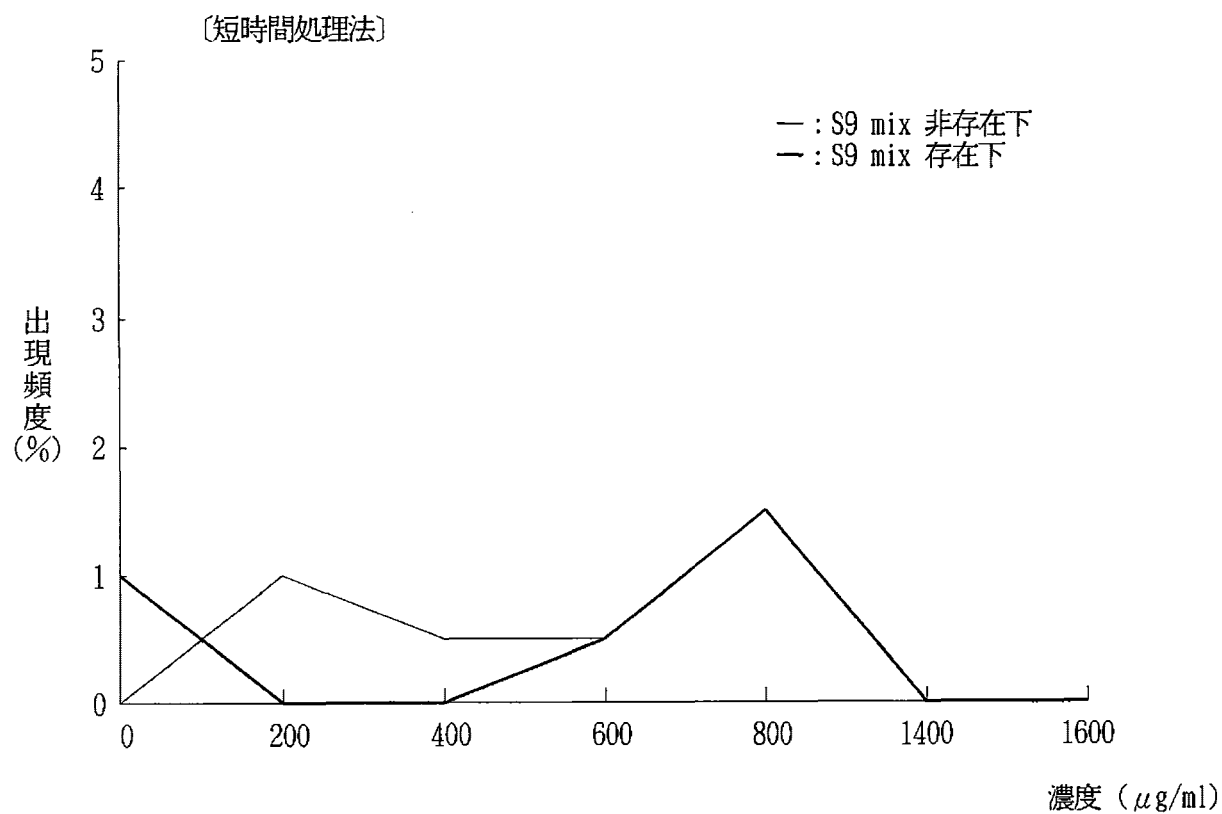
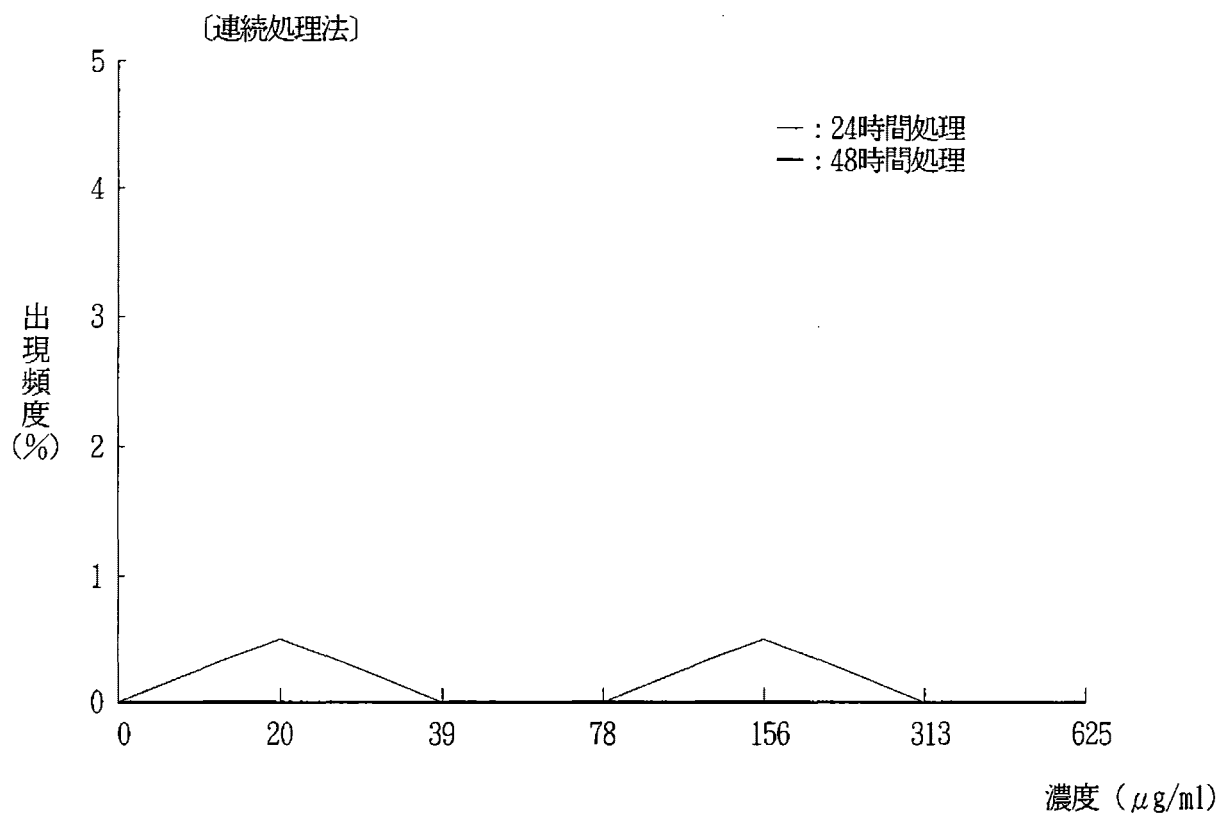


図 2 倍数性細胞の出現頻度