

## 2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの細菌を用いる復帰変異試験

### Reverse Mutation Test of 2-Amino-2-ethyl-1,3-propanediol in Bacteria

#### 要約

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの遺伝子変異誘発性の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100, TA98, TA1535, TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* の5菌株を用いて復帰変異誘発試験を実施した。

試験は濃度設定試験及び本試験を実施し、非代謝活性化系及び代謝活性化系存在下の条件で、ブレインキューベーション法で実施した。被験物質の溶媒には注射用水を用いた。なお、被験液の処理用量は濃度設定試験で0.305~5000 µg/plateの範囲で8用量、本試験で156~5000 µg/plateの範囲で6用量を設定した。

濃度設定試験において、菌株の種類に関わらず、代謝活性化系存在下で最高用量5000 µg/plateで白色結晶物の析出が認められた。同様に、本試験においても、菌株の種類に関わらず、代謝活性化系存在下で2500 µg/plate以上の被験物質処理群で白色結晶物の析出が認められた。なお、非代謝活性化系存在下においては濃度設定試験及び本試験ともに、菌株の種類に関わらず、全被験物質処理群で沈殿及び結晶物の析出は認められなかった。また、菌株に対しての増殖抑制は濃度設定試験及び本試験の全被験物質処理群において、菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、認められなかった。一方、溶媒対照と比較して2倍以上かつ用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は濃度設定試験及び本試験の全被験物質処理群において、菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず、認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下において2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは細菌に対して復帰変異誘発性を示さない(陰性)と判定した。

#### 方法

##### 1. 試験菌株

試験菌株としてヒスチジン要求性の *S. typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537) 並びにトリプトファン要求性の *E. coli* WP2 *uvrA* の5種類を選択した。

これらの菌株はいずれも1997年10月9日に国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部から入手した。試験菌株は-80°C設定の超低温フリーザーで保存したものをを用いた。各菌株は、アミノ酸要求性、紫外線(UV)感受性、膜変異(*rfa*)及び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、解凍した菌液をニュートリエントプロスNo.2(UNIPATH LTD.)を入れた培養用三角フラスコに一定量を接種し、37°Cで約8時間振盪培養したものを検定菌液とした。なお、分光光度計を用いて660 nmの吸光度を測定し、試験菌液の増殖を確認した。

##### 2. 培地の調製

###### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

最少グルコース寒天平板培地はオリエンタル酵母工業から購入し、試験に用いた。本プレート組成は、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(最終濃度: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、0.06%水酸化ナトリウム)に2%グルコース(和光純薬工業)及び1.5%の寒天(伊那食品工業)を加え、径90 mmの滅菌シャーレ当たり30 mLを分注して固めたものである。

###### 2) アミノ酸添加軟寒天培地(トップアガー)

0.6 w/v%寒天粉末(Difco)及び0.6 w/v%塩化ナトリウム(和光純薬工業)の組成の軟寒天を調製し、これに、*S. typhimurium*用には0.5 mmol/L D-ビオチン(和光純薬工業)及び0.5 mmol/L L-ヒスチジン(和光純薬工業)水溶液、*E. coli*用には0.5 mmol/L L-トリプトファン(ナカライテスク)水溶液を1/10容量加え、トップアガーとした。

##### 3. S9 mix

フェノバルビタール及び5,6-ベンゾフラボン(7週齢投与したSprague-Dawley系雄ラットに腹腔内投与した肝臓から調製されたS9並びに補酵素をオリエンタル酵母工業から購入し、S9 mixを調製した。

##### 4. 被験物質

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオール(ロット番号:HDE01, 製造元:東京化成工業, 東京)は純度99.4 wt%, 微黄色透明の粘性の液体で、冷暗所に保存した。

##### 5. 被験液の調製

溶媒は、注射用水(日本薬局方, 大塚製薬工場)を用いた。被験物質を溶媒で希釈して原液(50.0 mg/mL)を調製し、次いで順次溶媒で希釈して各濃度の被験液を調製

した。

#### 6. 試験用量の設定

濃度設定試験は、最高用量を5000 µg/plateとして注射用水により以下公比4で7段階希釈した計8用量を設定した。本試験では、濃度設定試験において菌株及び代謝活性化の有無にかかわらず、菌の増殖抑制が認められなかったため、原液の最高用量を5000 µg/plateとして以下公比2で5段階希釈した計6用量を設定した。

#### 7. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した5種類の化学物質を使用した。

2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

(AF-2, 和光純薬工業)

Sodium azide

(SAZ, 和光純薬工業)

2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-amino-propylamino]acridine·2HCl

(ICR-191, Polysciences)

2-aminoanthracene

(2AA, ナカライテスク)

Benzo[a]pyrene

(B[a]P, ナカライテスク)

AF-2, ICR-191, 2AA, B[a]Pはジメチルスルホキシド(試薬特級, 和光純薬工業)を用いて溶解し, SAZは, 注射用水(日本薬局方, 大塚製薬工場)により溶解し, 目的濃度に調製した。

#### 8. 試験方法

Amesらの原法の改良法<sup>1,2)</sup>であるプレインキュベーション法に準じて, 非代謝活性化群及び代謝活性化群それぞれについて試験を実施した。試験管に, 使用溶媒, 被験液あるいは陽性対照物質溶液を100 µL, 次いで非代謝活性化群の場合, 0.1mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液(pH7.4)を500 µL, 代謝活性化群の場合, S9 mixを500 µL添加した。さらに, 試験菌液を100 µL加え, 37°C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°Cに保温したトップアガーを2 mL添加し, 混合液をプレート上に重層した。37°Cで48時間培養した後, 被験物質の試験菌株に対する生育阻害及び沈殿/結晶の析出の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。次いで, 復帰変異により生じたコロニーを計数した。計数に際しては白色の結晶物が析出したため, 肉眼により手で計数した。各濃度につき3枚のプレートを使用した。

#### 9. 結果判定

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, 判定に際しては統計学的処理は行わなかった。

#### 結果及び考察

濃度設定試験の結果をTable 1に, 本試験の結果をTable 2に示した。

濃度設定試験の結果, 菌株の種類に関わらず, 代謝活性化系存在下で最高用量5000 µg/plateで白色結晶物の析出が認められた。同様に, 本試験においても, 菌株の種類に関わらず, 代謝活性化系存在下で2500 µg/plate以上の被験物質処理群で白色結晶物の析出が認められた。なお, 非代謝活性化系存在下では濃度設定試験及び本試験ともに, 菌株の種類に関わらず, 全被験物質処理群で, 沈殿及び結晶物の析出は認められなかった。そして, 菌株に対しての増殖抑制は濃度設定試験及び本試験の全被験物質処理群において, 菌株の種類及び代謝活性化の有無に関わらず, 認められなかった。また, 溶媒対照と比較して2倍以上かつ用量依存的な復帰変異コロニー数の増加は濃度設定試験及び本試験の全被験物質処理群において認められなかった。

一方, 陽性対照群では各菌株の溶媒対照群に比較して2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。更に, 各菌株の代謝活性化及び非代謝活性化における溶媒対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数は当試験実施施設における背景データと比較し異常と考えられる数値が認められず, 試験は適切に実施されたものと考えられた。

なお, 化学構造的に本被験物質と類似物質である *tert*-butyl hydroperoxide (CAS Registry No. 75-91-2) は, 染色体異常試験<sup>3)</sup>で陽性の結果が, isopropyl alcohol (CAS Registry No. 67-63-0) は細菌を用いる復帰変異試験<sup>4)</sup>及び姉妹染色分体交換試験<sup>5)</sup>で陰性の結果が, acetone cyanohydrin (CAS Registry No. 75-86-5) は細菌を用いる復帰変異試験<sup>6)</sup>で陰性の結果がそれぞれ報告されている。

以上の試験結果より, 本試験条件下において2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは細菌に対して遺伝子変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。

#### 文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res*, 113:173-215(1983).
- 2) Matsushima T, Sugimura T, Nagao M et al.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. In "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens", eds. Norpoth KH, Garner RC (eds.), Springer, Berlin (1980) pp.273-285.
- 3) Ochi T: Effects of iron chelators and glutathione depletion on the induction and repair of chromosomal aberrations by *tert*-butyl hydroperoxide in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res*, 213:243-248(1989).
- 4) Shimizu H, Suzuki Y, Takemura N, Goto S, Matsushita H: Results of microbial mutation test for forty-three industrial chemicals. *Sangyo Igaku*, 27:400-419(1985).

- 5) Von der Hude W, Scheutwinkel M, Gramlich U et al.: Genotoxicity of three-carbon compounds evaluated in the SCE test *in vitro*. *Environ Mutagen*, 9:401-410(1987).
- 6) Zeiger E, Anderson B, Haworth S et al.: Salmonella mutagenicity tests: IV: results from the testing of 300 chemicals. *Environ Mol Mutagen*, 11 (Suppl 12):1-157(1988).

連絡先

試験責任者: 望月 肇  
試験担当者: 中村香織, 高部道仁  
(株)ポリサーチセンター  
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284  
Tel & Fax 0550-82-9922

Correspondance

Authors: Hajime Mochizuki (Study Director)  
Kaori Nakamura, Michihito Takabe  
Bozo Research Center Inc., 1284 Kamado,  
Gotemba-shi, Shizuoka, 412-0039, Japan  
Tel & Fax +81-550-82-9922

Table 1 Results of the dose-range finding test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol without or with metabolic activation in the bacterial reverse mutation test

S9 mix	Dosage (μg/plate)	Number of revertant colonies/plate (Mean ± Standard Deviation)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
(-)	0 <sup>a</sup>	99 89 87 (92 ± 6.4)	9 14 11 (11 ± 2.5)	19 28 28 (25 ± 5.2)	24 25 22 (24 ± 1.5)	7 5 8 (7 ± 1.5)
	0.305	99 89 102 (97 ± 6.8)	9 9 8 (9 ± 0.6)	22 26 23 (24 ± 2.1)	22 17 23 (21 ± 3.2)	8 10 10 (9 ± 1.2)
	1.22	106 91 95 (97 ± 7.8)	7 9 8 (8 ± 1.0)	23 28 28 (26 ± 2.9)	14 19 19 (17 ± 2.9)	8 9 9 (9 ± 0.6)
	4.88	86 106 108 (100 ± 12.2)	8 11 15 (11 ± 3.5)	26 28 31 (28 ± 2.5)	18 20 17 (18 ± 1.5)	12 7 11 (10 ± 2.6)
	19.5	99 108 93 (100 ± 7.5)	10 10 10 (10 ± 0.0)	21 19 21 (20 ± 1.2)	18 15 14 (16 ± 2.1)	10 11 11 (11 ± 0.6)
	78.1	106 104 106 (105 ± 1.2)	9 12 11 (11 ± 1.5)	21 27 22 (23 ± 3.2)	12 17 22 (17 ± 5.0)	10 12 10 (11 ± 1.2)
	313	97 78 81 (85 ± 10.2)	9 10 10 (10 ± 0.6)	28 25 24 (26 ± 2.1)	15 16 16 (16 ± 0.6)	10 7 7 (8 ± 1.7)
	1250	104 96 110 (103 ± 7.0)	13 11 10 (11 ± 1.5)	31 32 24 (29 ± 4.4)	17 20 15 (17 ± 2.5)	10 7 8 (8 ± 1.5)
	5000	103 91 101 (98 ± 6.4)	13 9 10 (11 ± 2.1)	18 18 20 (19 ± 1.2)	19 15 21 (18 ± 3.1)	7 8 7 (7 ± 0.6)
	(+) )	0 <sup>a</sup>	102 109 112 (108 ± 5.1)	10 12 17 (13 ± 3.6)	29 28 31 (29 ± 1.5)	23 24 29 (25 ± 3.2)
0.305		116 120 106 (114 ± 7.2)	9 10 12 (10 ± 1.5)	30 31 31 (31 ± 0.6)	21 26 23 (23 ± 2.5)	10 11 9 (10 ± 1.0)
1.22		107 111 113 (110 ± 3.1)	13 17 10 (13 ± 3.5)	22 30 25 (26 ± 4.0)	19 18 18 (18 ± 0.6)	12 9 18 (13 ± 4.6)
4.88		105 97 107 (103 ± 5.3)	8 12 10 (10 ± 2.0)	29 26 23 (26 ± 3.0)	21 23 19 (21 ± 2.0)	10 13 14 (12 ± 2.1)
19.5		125 112 103 (113 ± 11.1)	11 10 9 (10 ± 1.0)	27 23 22 (24 ± 2.6)	20 27 20 (22 ± 4.0)	9 12 14 (12 ± 2.5)
78.1		119 103 94 (105 ± 12.7)	12 11 9 (11 ± 1.5)	31 31 28 (30 ± 1.7)	23 33 24 (27 ± 5.5)	12 14 11 (12 ± 1.5)
313		105 104 107 (105 ± 1.5)	10 8 10 (9 ± 1.2)	24 31 24 (26 ± 4.0)	18 22 28 (23 ± 5.0)	14 13 16 (14 ± 1.5)
1250		89 99 107 (98 ± 9.0)	13 9 13 (12 ± 2.3)	20 19 26 (22 ± 3.8)	19 15 18 (17 ± 2.1)	12 10 12 (11 ± 1.2)
5000		106† 101† 104† (104 ± 2.5)	11† 10† 11† (11 ± 0.6)	21† 29† 29† (26 ± 4.6)	21† 19† 25† (22 ± 3.1)	11† 9† 9† (10 ± 1.2)
(-)		Positive control	AF-2 <sup>b)</sup>	SAZ <sup>c)</sup>	AF-2 <sup>b)</sup>	AF-2 <sup>b)</sup>
	Dosage (μg/plate)	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of revertant colonies/plate	423 439 481 (448 ± 30.0)	320 323 347 (330 ± 14.8)	344 333 356 (344 ± 11.5)	378 401 400 (393 ± 13.0)	1431 1389 1490 (1437 ± 50.7)
(+) )	Positive control	B[a]P <sup>e)</sup>	2AA <sup>f)</sup>	2AA <sup>f)</sup>	B[a]P <sup>e)</sup>	B[a]P <sup>e)</sup>
	Dosage (μg/plate)	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of revertant colonies/plate	490 468 480 (479 ± 11.0)	117 109 112 (113 ± 4.0)	443 450 459 (451 ± 8.0)	347 355 341 (348 ± 7.0)	124 109 113 (115 ± 7.8)

a) Vehicle control (=Water for injection)

b) AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, c) SAZ: Sodium azide, d) ICR-191:2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino] acridine · 2HCl, e) B[a]P: Benzo[a]pyrene, f) 2AA: 2-Aminoanthracene

† Deposition of crystals was observed.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 2 Results of the main test on 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol without or with metabolic activation in the bacterial reverse mutation test

S9 mix	Dosage ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate (Mean $\pm$ Standard Deviation)				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		<i>S.typhimurium</i> TA100	<i>S.typhimurium</i> TA1535	<i>E.coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>S.typhimurium</i> TA98	<i>S.typhimurium</i> TA1537
(-)	0 <sup>a</sup>	106 96 137 (113 $\pm$ 21.4)	11 10 9 (10 $\pm$ 1.0)	31 25 31 (29 $\pm$ 3.5)	14 16 20 (17 $\pm$ 3.1)	13 12 10 (12 $\pm$ 1.5)
	156	96 118 117 (110 $\pm$ 12.4)	9 7 9 (8 $\pm$ 1.2)	30 25 29 (28 $\pm$ 2.6)	14 13 10 (12 $\pm$ 2.1)	10 10 8 (9 $\pm$ 1.2)
	313	93 112 118 (108 $\pm$ 13.1)	7 11 7 (8 $\pm$ 2.3)	28 22 29 (26 $\pm$ 3.8)	11 11 18 (13 $\pm$ 4.0)	13 11 15 (13 $\pm$ 2.0)
	625	109 111 102 (107 $\pm$ 4.7)	7 6 8 (7 $\pm$ 1.0)	28 27 27 (27 $\pm$ 0.6)	15 18 15 (16 $\pm$ 1.7)	11 9 10 (10 $\pm$ 1.0)
	1250	115 106 120 (114 $\pm$ 7.1)	8 5 9 (7 $\pm$ 2.1)	31 28 22 (27 $\pm$ 4.6)	10 12 16 (13 $\pm$ 3.1)	8 9 12 (10 $\pm$ 2.1)
	2500	116 116 112 (115 $\pm$ 2.3)	6 8 14 (9 $\pm$ 4.2)	31 23 30 (28 $\pm$ 4.4)	12 15 18 (15 $\pm$ 3.0)	8 10 12 (10 $\pm$ 2.0)
	5000	120 117 106 (114 $\pm$ 7.4)	6 6 9 (7 $\pm$ 1.7)	20 22 16 (19 $\pm$ 3.1)	15 10 12 (12 $\pm$ 2.5)	11 11 8 (10 $\pm$ 1.7)
(+) )	0 <sup>a</sup>	130 128 119 (126 $\pm$ 5.9)	13 13 12 (13 $\pm$ 0.6)	27 32 27 (29 $\pm$ 2.9)	18 22 20 (20 $\pm$ 2.0)	11 15 10 (12 $\pm$ 2.6)
	156	120 125 123 (123 $\pm$ 2.5)	8 7 8 (8 $\pm$ 0.6)	24 27 29 (27 $\pm$ 2.5)	20 19 19 (19 $\pm$ 0.6)	15 15 12 (14 $\pm$ 1.7)
	313	130 133 114 (127 $\pm$ 2.2)	8 7 8 (8 $\pm$ 0.6)	28 21 29 (26 $\pm$ 4.4)	20 19 22 (20 $\pm$ 1.5)	11 15 13 (13 $\pm$ 2.0)
	625	107 112 100 (106 $\pm$ 6.0)	10 9 7 (9 $\pm$ 1.5)	25 22 27 (25 $\pm$ 2.5)	17 18 21 (19 $\pm$ 2.1)	10 10 12 (11 $\pm$ 1.2)
	1250	129 132 113 (125 $\pm$ 10.2)	12 8 9 (10 $\pm$ 2.1)	25 21 19 (22 $\pm$ 3.1)	25 22 21 (23 $\pm$ 2.1)	11 12 14 (12 $\pm$ 1.5)
	2500	124 <sup>†</sup> 125 <sup>†</sup> 130 <sup>†</sup> (126 $\pm$ 3.2)	10 <sup>†</sup> 6 <sup>†</sup> 9 <sup>†</sup> (8 $\pm$ 2.1)	18 <sup>†</sup> 17 <sup>†</sup> 21 <sup>†</sup> (19 $\pm$ 2.1)	20 <sup>†</sup> 18 <sup>†</sup> 15 <sup>†</sup> (18 $\pm$ 2.5)	15 <sup>†</sup> 12 <sup>†</sup> 9 <sup>†</sup> (12 $\pm$ 3.0)
	5000	134 <sup>†</sup> 126 <sup>†</sup> 144 <sup>†</sup> (135 $\pm$ 9.0)	6 <sup>†</sup> 5 <sup>†</sup> 9 <sup>†</sup> (7 $\pm$ 2.1)	25 <sup>†</sup> 19 <sup>†</sup> 18 <sup>†</sup> (21 $\pm$ 3.8)	17 <sup>†</sup> 12 <sup>†</sup> 12 <sup>†</sup> (14 $\pm$ 2.9)	9 <sup>†</sup> 13 <sup>†</sup> 9 <sup>†</sup> (10 $\pm$ 2.3)
(-)	Positive control	AF-2 <sup>b</sup>	SAZ <sup>c</sup>	AF-2 <sup>b</sup>	AF-2 <sup>b</sup>	ICR-191 <sup>d</sup>
	Dosage ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.50	0.01	0.10	1.00
	Number of revertant colonies/plate	467 452 488 (469 $\pm$ 18.1)	144 213 172 (176 $\pm$ 34.7)	265 206 234 (235 $\pm$ 29.5)	360 355 374 (363 $\pm$ 9.8)	1338 1063 1181 (1194 $\pm$ 138.0)
(+) )	Positive control	B[a]P <sup>e</sup>	2AA <sup>f</sup>	2AA <sup>f</sup>	B[a]P <sup>e</sup>	B[a]P <sup>e</sup>
	Dosage ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	5.00	2.00	10.0	5.00	5.00
	Number of revertant colonies/plate	612 648 603 (621 $\pm$ 23.8)	122 130 98 (117 $\pm$ 16.7)	421 403 398 (407 $\pm$ 12.1)	247 242 253 (247 $\pm$ 5.5)	113 117 104 (111 $\pm$ 6.7)

a) Vehicle control (=Water for injection)

b) AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, c)SAZ: Sodium azide, d)ICR-191:2-Methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)-aminopropylamino]acridine · 2HCl, e) B[a]P: Benzo[a]pyrene, f) 2AA: 2-Aminoanthracene

† Deposition of crystals was observed.

No growth inhibition of tester strains was observed.

## 2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

### Chromosomal Aberration Test of 2-Amino-2-ethyl-1,3-propanediol in Cultured Chinese Hamster Cells

#### 要約

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの染色体異常誘発能の有無を検討するために、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU細胞)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験を行った結果、短時間処理法及び連続処理法の24時間処理では50%細胞増殖抑制濃度は200 µg/mL(10 mM相当)以上、連続処理法の48時間処理では1075 µg/mLであった。このことから染色体異常試験における2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールの濃度は短時間処理法及び連続処理法ともに公比2で5~1200 µg/mLの濃度範囲に設定した。短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化について被験物質を6時間処理した18時間後、連続処理法では被験物質を24時間及び48時間連続処理後、それぞれ染色体標本作製して検鏡し、染色体異常誘発性を検討した。

試験の結果、短時間処理法及び連続処理法のいずれの処理方法によっても、染色体の構造異常及び倍数性細胞の誘発は認められなかった。

以上の結果から、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは本試験条件下において染色体異常誘発能を有さない(陰性)と結論した。

#### 材料及び方法

##### 1. 使用細胞株

ヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手(2001年12月26日)したチャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞株(CHL/IU細胞)を用いた。なお、試験には細胞増殖抑制試験で16継代目、染色体異常試験で20及び28継代目の細胞を使用した。

##### 2. 培養液の調製

培養には、非働化(56°C, 30分)した仔牛血清(Invitrogen)を10 vol%添加したEagle's MEM(Life Technologies)を用いた。調製後の培養液の保存は冷蔵とした。

##### 3. 培養条件

細胞は、炭酸ガス培養装置を用い、CO<sub>2</sub>濃度5%、温度37°Cの高湿度条件下で培養した。継代培養は3~4日ごとに行った。試験に際しては2×10<sup>4</sup>個の細胞を、培養液5 mLを入れた直径6 cmのプラスチックプレートに播

種し、3日目に被験物質を処理した。

##### 4. S9 mix

フェノバルビタール及び5,6-ベンゾフラボン7週齢のSprague Dawley系雄ラットに腹腔内投与した肝臓から調製されたS9並びに補酵素をオリエンタル酵母工業から購入し、S9 mixを調製した。S9 mixの組成は松岡らの方法<sup>1)</sup>に従いS9の培地への添加量を5 vol%とした。

##### 5. 被験物質

2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオール(ロット番号:HDE01, 東京化成工業, 東京)は、純度99.4%、微黄色透明、粘性の液体で、冷暗所に保存した。

##### 6. 被験液の調製

溶媒は、生理食塩液(日本薬局方, 大塚製薬工場)を用いた。被験物質を溶媒で希釈して原液(120 mg/mL)を調製し、ついで順次溶媒で希釈して各濃度の被験液を調製した。被験液は、培養液の1 vol%になるように添加した。

##### 7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

染色体異常試験における被験物質の処理濃度を設定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質の細胞増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(モノセレータ, オリパス光学工業)を用いて細胞密度を測定し、被験物質処理群の陰性(媒体)対照群に対する細胞密度の比をもって指標とした。

その結果、50%細胞増殖抑制濃度は短時間処理法及び連続処理法の24時間処理では1200 µg/mL(10 mM相当)以上、連続処理法の48時間処理では1075 µg/mLであった(Fig. 1, 2)。

##### 8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験で得られた50%細胞増殖抑制濃度をもとに、染色体異常試験では短時間処理法及び連続処理法のいずれにおいても1200 µg/mL(10 mM相当)を最高濃度とし、以下公比2で希釈した計5濃度並びに陰性(媒体)対照群を設定した。なお、陽性対照として+S9 mix処理ではシクロフォスファミド(CP, 和光純薬工業, 15 µg/mL)、-S9 mix処理ではマイトマイシンC(MMC, 協和醗酵工業, 0.05 µg/mL)を用いた。

濃度当たり4枚のプレートに処理し、2枚を染色体標本作製用、2枚を細胞増殖率測定用とした。

## 9. 染色体標本の作製

培養終了の2時間前に、最終濃度が0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようコルセミドを加えた。以下、染色体標本は空気乾燥法によって作製した。スライド標本は各プレートにつき2枚作製し、2 vol% ギムザ液で15分間染色した。

## 10. 染色体の観察

各用量当たり200個(プレート当たり100個)の分裂中期像についてギャップ(gap)、染色体型切断(ctb)、染色体型交換(cte)、染色体型切断(csb)、染色体型交換(cse)及びその他の異常など構造異常の種類並びに異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数性細胞の数も記録した。

客観的な観察を行うため、スライド標本をコード化した状態で分析した。

## 11. 結果の判定

染色体構造異常を有する細胞の出現率は、ギャップを含む場合と含まない場合について集計し、ギャップを含まない場合で判定した。

判定は石館らの基準<sup>2)</sup>に従い、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(±)、10%以上を陽性(+)とした。最終的には異常細胞の出現に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

## 結果及び考察

短時間処理法の結果をTable 1及び2に、連続処理法の結果をTable 3及び4に示した。いずれの処理方法においても、被験物質処理群には染色体構造異常の出現頻度に5%を越える増加は認められなかった。また、倍数性細胞の出現頻度にも増加は認められなかった。一方、陽性対照物質を処理した群においては顕著な染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加が認められた。

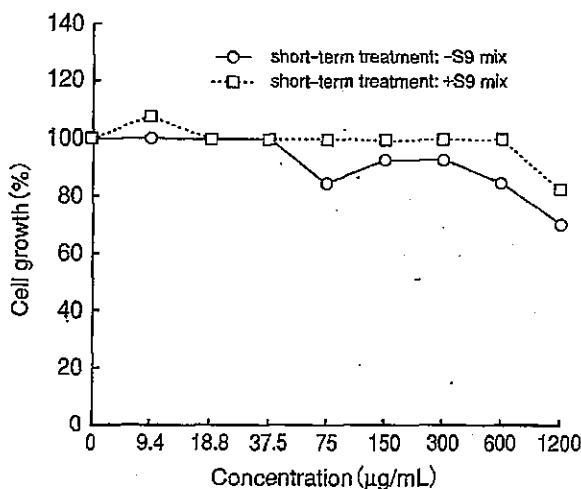


Fig. 1 Cell growth inhibition treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [short-term treatment: 6 hr]

なお、化学構造的に本被験物質と類似物質である *tert*-butyl hydroperoxide (CAS Registry No. 75-91-2) は、染色体異常試験<sup>3)</sup>で陽性の結果が、isopropyl alcohol (CAS Registry No. 67-63-0) は細菌を用いる復帰突然変異試験<sup>4)</sup>及び姉妹染色分体交換試験<sup>5)</sup>で陰性の結果が、acetone cyanohydrin (CAS Registry No. 75-86-5) は細菌を用いる復帰突然変異試験<sup>6)</sup>で陰性の結果がそれぞれ報告されている。

以上の結果から、2-アミノ-2-エチル-1,3-プロパンジオールは本試験条件下において染色体異常誘発能を有さない(陰性)と判定した。

## 文献

- 1) Matsuoka A et al.: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Res*, 66:277-290 (1979).
- 2) 石館基(監修): 「染色体異常試験データ集」エル・アイ・シー、東京(1987) pp.19-24
- 3) Ochi T: Effects of iron chelators and glutathione depletion on the induction and repair of chromosomal aberrations by *tert*-butyl hydroperoxide in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res*, 213:243-248 (1989).
- 4) Shimizu H et al.: Results of microbial mutation test for forty-three industrial chemicals. *Sangyo Igaku*, 27:400-419 (1985).
- 5) von der Hude W: Genotoxicity of three-carbon compounds evaluated in the SCE test *in vitro*. *Environ Mutagen*, 9:401-410 (1987).
- 6) Zeiger E et al.: Salmonella mutagenicity tests: IV: results from the testing of 300 chemicals. *Environ Mol Mutagen*, 11:1-157 (1988).

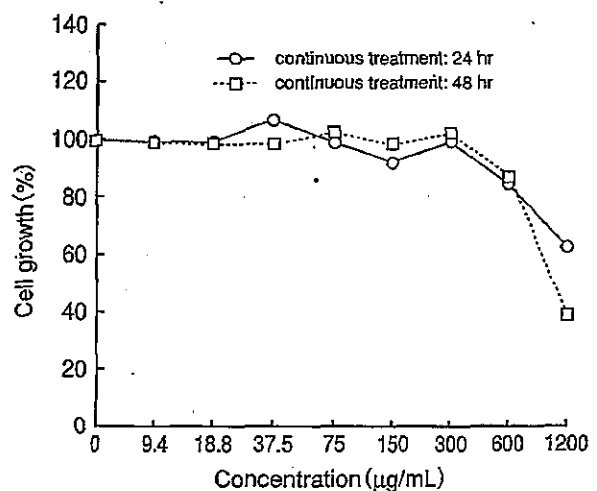


Fig. 2 Cell growth inhibition treated with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [continuous treatment]

## 染色体異常試験

---

### 連絡先

試験責任者: 園 明  
試験担当者: 樋川奈穂美, 高部道仁, 石井孝広,  
勝亦倶慶  
(株)ボゾリサーチセンター  
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284  
Tel & Fax 0550-82-9922

### Correspondence

Authors: Akira Sono (Study Director)  
Naomi Hikawa, Michihito Takabe,  
Takahiro Ishii, Tomoyoshi Katsumata  
Bozo Research Center Inc.  
1284 Kamado, Gotemba-shi, Shizuoka, 412-0039,  
Japan  
Tel & Fax +81-550-82-9922



Table 1 Chromosome aberration test in CHL/IU cells treated for 6 hr with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [short-term treatment: +S9 mix]

Compound	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell growth (%)	No. of cells observed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations (with gaps) (%)	No. of cells with aberrations (without gaps) (%)	No. of polyploid cells <sup>b)</sup> (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	other				
Physiologica Saline <sup>a)</sup>	0	6-18	100	200	2	0	0	0	0	0	1.0	0.0	1.0	
Test substance	75.0	6-18	107	200	0	0	2	0	1	0	1.5	1.5	0.0	-
	150	6-18	93	200	1	0	1	0	0	0	1.0	0.5	0.5	-
	300	6-18	100	200	2	0	2	0	0	0	2.0	1.0	0.0	-
	600	6-18	93	200	2	0	2	0	0	0	2.0	1.0	0.5	-
	1200	6-18	85	200	2	1	2	0	0	0	2.5	1.5	1.5	-
CP	15	6-18	93	200	6	32	148	2	1	0	79.0	79.0	0.0	+

Abbreviation; CP: cyclophosphamide (positive control), ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange

a) Negative control

b) 200 metaphases were observed for polyploid cells.

Table 2 Chromosome aberration test in CHL/IU cells treated for 6 hr with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [short-term treatment: -S9 mix]

Compound	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Time of exposure (hr)	Cell growth (%)	No. of cells observed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations (with gaps) (%)	No. of cells with aberrations (without gaps) (%)	No. of polyploid cells <sup>b)</sup> (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	other				
Physiologica Saline <sup>a)</sup>	0	6-18	100	200	3	1	0	0	1	0	2.5	1.0	0.5	
Test substance	75.0	6-18	93	200	3	1	1	0	0	0	2.5	1.0	0.0	-
	150	6-18	93	200	3	3	0	0	0	0	3.0	1.5	0.0	-
	300	6-18	86	200	4	1	0	0	0	0	2.5	0.5	0.5	-
	600	6-18	86	200	2	1	0	0	1	0	2.0	1.0	0.5	-
	1200	6-18	79	200	1	3	0	0	0	0	2.0	1.5	0.5	-
MMC	0.05	6-18	79	200	4	20	31	0	1	0	25.0	24.0	1.5	+

Abbreviation; MMC: mitomycin C (positive control), ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange

a) Negative control

b) 200 metaphases were observed for polyploid cells.

染色体異常試験

Table 3 Chromosome aberration test in CHL/IU cells treated for 24 hr with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [continuous treatment:24hr]

Compound	Concentration (μg/mL)	Time of exposure (hr)	Cell growth (%)	No. of cells observed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations (with gaps) (%)	No. of cells with aberrations (without gaps) (%)	No. of polyploid cells <sup>b)</sup> (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	other				
Physiologica Saline <sup>a)</sup>	0	24	100	200	4	1	2	0	1	0	4.0	2.0	0.0	
Test substance	75.0	24	89	200	5	0	1	0	0	0	3.0	0.5	0.5	-
	150	24	89	200	4	1	0	0	1	0	3.0	1.0	1.0	-
	300	24	111	200	3	0	1	0	1	0	2.5	1.0	0.0	-
	600	24	89	200	4	0	1	0	0	0	2.5	0.5	1.5	-
	1200	24	67	81	81	1	1	2	0	0	0	4.9	3.7	1.2
MMC	0.05	24	89	200	7	40	60	1	4	1	43.5	42.0	0.0	+

Abbreviation; MMC:mitomycin C (positive control), ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange.

a) Negative control

b) 200 metaphases were observed for polyploid cells.

Table 4 Chromosome aberration test in CHL/IU cells treated for 48 hr with 2-amino-2-ethyl-1,3-propanediol [continuous treatment:48hr]

Compound	Concentration (μg/mL)	Time of exposure (hr)	Cell growth (%)	No. of cells observed	Number of cells with structural aberrations						No. of cells with aberrations (with gaps) (%)	No. of cells with aberrations (without gaps) (%)	No. of polyploid cells <sup>b)</sup> (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	other				
Physiologica Saline <sup>a)</sup>	0	48	100	200	5	0	0	0	1	0	3.0	0.5	1.0	
Test substance	75.0	48	100	200	3	0	0	0	0	0	1.5	0.0	0.0	-
	150	48	106	200	2	0	0	0	1	0	1.5	0.5	0.0	-
	300	48	106	200	5	0	1	0	2	0	4.0	1.5	0.5	-
	600	48	100	200	2	1	0	0	0	0	1.5	0.5	1.5	-
	1200	48	50	84	84	1	0	0	0	3	0	4.8	3.6	3.6
MMC	0.05	48	94	200	10	50	108	3	2	0	68.0	66.5	1.0	+

Abbreviation; MMC:mitomycin C (positive control), ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange

a) Negative control

b) 200 metaphases were observed for polyploid cells.