

2) 回復期間終了時

甲状腺：40 mg/kg群の雌雄全例で濾胞細胞の増生および肥大がみられたが、その程度は投与期間終了時に比して弱くなり、ごく軽度であった。

副腎：皮質細胞の空胞化が、雄の対照群の3例および40 mg/kg群の4例にみられた。変化の程度は対照群の1例が軽度であった以外は、ごく軽度であった。

考察

一般状態では、投与期間の後半に40 mg/kg群の雌の少数例で被毛光沢不良がみられたが、これらの例では同群内でも体重が比較的軽く、摂餌量も少ないところから、体重増加抑制、摂餌量の低値に関連した変化と思われる。同群では投与期間中に1例が死亡したが、一般状態、体重推移、摂餌量推移、摂水量推移などに異常はみられず、また剖検および病理組織学的検査によっても死亡原因は明らかではなかった。

体重は12 mg/kg群の雄と40 mg/kg群の雌雄で低値であ

り、摂餌量の低値に起因した変動と思われた。回復期間中の40 mg/kg群の体重増加量は対照群よりも大きく、摂餌量は投与期間の後半よりも増加傾向を示したが、体重および摂餌量ともに有意な低値が継続して認められた。したがって、体重および摂餌量は休薬により回復傾向はうかがえるものの、回復期間が2週間では不十分であったと考えられた。

尿検査では、12 mg/kg以上の群の雄で尿比重の低値、40 mg/kg群の雄で尿量の高値が認められた。血液化学検査で12 mg/kg群の雄と40 mg/kg群の雌雄で尿素窒素およびクレアチニンの高値が認められていること、電解質にも変動がみられることから、これらの変動は腎機能の低下に関連した変化と推測された。しかしながら、腎臓の病理組織学的検査では40 mg/kg群の雌雄に特異的な組織変化はみられず、回復期間終了時には尿量およびクレアチニンは逆に低値を示していることから、尿比重、尿量、尿素窒素、クレアチニンの変動は休薬によって回復する可逆的な変化と考えられた。

血液学検査では、12 mg/kg以上の群の雄、雌または雌

Table 5 Absolute and relative organ weights of male rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2-mercaptobenzimidazole

Test period	Termination of administration period						Termination of recovery period	
	Control		2-mercaptobenzimidazole				Control	2-mercaptobenzimidazole
	0	1.2	4	12	40	0	40	
Group								
Dose(mg/kg)								
Number of males	10	10	10	10	10	5	5	
Body weight (g)	331.6 ± 24.5	347.4 ± 30.3	337.9 ± 18.1	262.8 ± 16.9**	227.8 ± 14.0**	409.6 ± 29.4	278.8 ± 8.0**	
Brain (g)	1.966 ± 0.081	1.998 ± 0.074	1.969 ± 0.088	1.889 ± 0.051	1.829 ± 0.069**	2.056 ± 0.118	1.954 ± 0.067	
Thyroids (mg)	0.596 ± 0.049	0.578 ± 0.043	0.584 ± 0.025	0.722 ± 0.055**	0.805 ± 0.049**	0.506 ± 0.045	0.704 ± 0.043**	
Liver (g)	22.58 ± 3.57	26.18 ± 4.25	48.76 ± 7.94**	59.30 ± 15.94**	99.01 ± 23.11**	20.78 ± 4.04	39.44 ± 9.46**	
Kidneys (g)	6.89 ± 1.53	7.59 ± 1.38	14.43 ± 2.14*	22.43 ± 5.30**	43.37 ± 9.03**	5.10 ± 1.07	14.20 ± 3.65**	
Adrenals (mg)	10.348 ± 1.119	11.262 ± 1.732	11.054 ± 1.111	8.930 ± 0.579*	9.735 ± 0.601	11.994 ± 1.339	8.600 ± 0.863**	
Testes (g)	3.117 ± 0.175	3.227 ± 0.237	3.265 ± 0.208	3.398 ± 0.106**	4.278 ± 0.214**	2.926 ± 0.202	3.084 ± 0.267	
Uterus (g)	2.488 ± 0.248	2.564 ± 0.200	2.749 ± 0.171**	1.933 ± 0.155**	1.805 ± 0.118**	2.868 ± 0.156	2.084 ± 0.172**	
Prostate (g)	0.751 ± 0.051	0.740 ± 0.059	0.813 ± 0.034*	0.737 ± 0.046	0.792 ± 0.055	0.702 ± 0.051	0.750 ± 0.056	
Seminal vesicles (mg)	55.35 ± 8.94	49.40 ± 4.82	53.78 ± 7.42	39.12 ± 5.01**	39.45 ± 3.34**	57.22 ± 7.45	41.32 ± 5.63**	
Bladder (mg)	16.69 ± 2.34	14.32 ± 1.89*	15.93 ± 2.08	14.90 ± 1.68	17.35 ± 1.32	14.10 ± 2.44	14.84 ± 2.23	
Rectum (g)	2.929 ± 0.245	2.988 ± 0.218	3.002 ± 0.129	2.976 ± 0.247	2.902 ± 0.137	3.044 ± 0.107	3.048 ± 0.232	
Small intestine (g)	0.888 ± 0.076	0.863 ± 0.065	0.890 ± 0.035	1.137 ± 0.140**	1.278 ± 0.094**	0.748 ± 0.065	1.092 ± 0.070**	

Each value shows mean ± S.D.

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

Table 6 Absolute and relative organ weights of female rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2-mercaptobenzimidazole

Test period	Termination of administration period						Termination of recovery period	
	Control		2-mercaptobenzimidazole				Control	2-mercaptobenzimidazole
	0	1.2	4	12	40	0	40	
Group								
Dose(mg/kg)								
Number of males	10	10	10	10	9	5	5	
Body weight (g)	206.5 ± 17.2	204.8 ± 11.9	201.0 ± 11.6	204.8 ± 16.9	158.3 ± 8.9**	226.4 ± 16.6	184.2 ± 5.4**	
Brain (g)	1.837 ± 0.060	1.779 ± 0.059	1.816 ± 0.037	1.812 ± 0.053	1.716 ± 0.082**	1.826 ± 0.093	1.768 ± 0.054	
Thyroids (mg)	0.897 ± 0.074	0.872 ± 0.066	0.906 ± 0.052	0.891 ± 0.075	1.086 ± 0.061**	0.810 ± 0.066	0.958 ± 0.032**	
Liver (g)	18.29 ± 3.18	17.93 ± 2.30	28.13 ± 8.49	57.90 ± 20.14**	82.26 ± 17.82**	12.64 ± 3.83	27.04 ± 3.74**	
Kidneys (g)	8.91 ± 1.64	8.81 ± 1.31	14.00 ± 4.06	28.58 ± 10.52**	51.77 ± 9.78**	5.62 ± 1.69	14.68 ± 1.99**	
Adrenals (mg)	6.143 ± 0.703	5.948 ± 0.331	6.185 ± 0.580	6.795 ± 0.731	6.483 ± 0.565	6.370 ± 0.776	5.480 ± 0.333*	
Uterus (g)	2.970 ± 0.147	2.905 ± 0.071	3.076 ± 0.188	3.313 ± 0.153**	4.097 ± 0.173**	2.808 ± 0.189	2.976 ± 0.152	
Prostate (g)	1.658 ± 0.139	1.582 ± 0.074	1.684 ± 0.109	1.703 ± 0.220	1.370 ± 0.060**	1.704 ± 0.111	1.464 ± 0.114**	
Seminal vesicles (mg)	0.804 ± 0.051	0.775 ± 0.056	0.839 ± 0.063	0.830 ± 0.067	0.869 ± 0.063	0.752 ± 0.039	0.794 ± 0.057	
Bladder (mg)	65.09 ± 7.90	55.03 ± 4.97*	59.98 ± 5.16	55.06 ± 7.79*	44.60 ± 6.90**	67.22 ± 8.10	46.04 ± 8.58**	
Rectum (mg)	31.65 ± 4.14	26.85 ± 1.57	29.92 ± 2.98	26.94 ± 3.56	28.21 ± 4.34	29.84 ± 4.35	24.96 ± 4.18	
Small intestine (mg)	94.23 ± 9.53	86.62 ± 13.25	89.81 ± 10.71	92.76 ± 21.46	58.37 ± 10.59**	77.48 ± 6.31	70.16 ± 9.53	
Large intestine (mg)	45.80 ± 5.06	42.33 ± 6.42	44.83 ± 6.10	45.37 ± 9.71	36.94 ± 6.92	34.28 ± 2.85	38.04 ± 4.58	

Each value shows mean ± S.D.

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

雄で赤血球数, ヘマトクリット値, 血小板数, 網状赤血球数, 白血球数の低値, ならびにプロトロンビン時間と活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が認められた。平均赤血球容積の低値, 平均赤血球血色素濃度の高値も認められ, これらは主としてヘマトクリット値の低値に起因した変動と思われた。休薬により, 前記の変化の中で平均赤血球容積, プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の有意差は消失し, 逆に血小板数および網状赤血球数は高値を, 平均赤血球血色素濃度は低値を示した。一方, 赤血球数, ヘモグロビン量およびヘマトリット値の低値が40 mg/kg群の雌雄で, 白血球数の低値が40 mg/kg群の雄で認められたことから, これらの検査値の回復には長期間が必要とされることが推測された。病理組織学的検査では, 被験物質投与群にヘモジデリン沈着などの組織変化がみられておらず, 血液学検査の変動は軽度の造血機能抑制の影響と考えられた。

血液生化学検査では, 4 mg/kg以上の群の雄, 雌または雌雄でγ-GTP, 総蛋白, アルブミン量, 蛋白分画値, 総

ビリルビン, 総コレステロール, ブドウ糖, トリグリセライドなどの主として肝機能, あるいは尿素窒素, クレアチニン, Na, Cl, Ca, 無機リンなどの主として腎機能に関する検査値の変動が認められたが, ほとんどは休薬により回復あるいは回復傾向がみられた。なお, Ca値は甲状腺機能との関連性が知られており, 甲状腺の重量および組織検査に異常がみられた雌ではCa値に変動が認められなかったものの, 雄では変動が4 mg/kg群から認められていることから, Ca値の変動は甲状腺機能あるいは組織変化に伴ったものと推測された。さらに, 肝機能および腎機能に関する検査値の変動の多くも, 甲状腺機能あるいは組織変化に伴った変化の可能性が考えられた。

器官重量では, 甲状腺重量の高値が認められた。病理組織学的検査では濾胞細胞の過形成および肥大が低用量の1.2 mg/kg群からみられ, この組織変化が重量増加の原因と考えられた。なお, 当組織変化の程度はやや弱くなるものの回復期間終了時にも同様の組織像がみられており, 可逆性の変化ではあるが2週間の回復期間では不十分であったと思われる。また, 副腎にみられた皮質細胞の

Table 7 Histopathological examination of male rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2-mercaptobenzimidazole

Test period	Termination of administration period										Termination of recovery period																													
	Control		2-mercaptobenzimidazole				2-mercaptobenzimidazole				Control																													
Group	0		1.2				4				12		40																											
Dose(mg/kg)	0		1.2				4				12		40																											
Number of males	10		10				10				10		5																											
Finding	Grade		-				±				+		2+		3+																									
Heart																																								
Cell infiltration in interstitium	10	0	0	0	0	0	/	/	/	/	9	1	0	0	0	0	/	/																						
Liver																																								
Granuloma	8	2	0	0	0	0	/	/	/	/	7	3	0	0	0	0	/	/																						
Spleen																																								
Extramedullary hematopoiesis	4	6	0	0	0	0	/	/	/	/	8	2	0	0	0	0	/	/																						
Adrenal																																								
Vacuolization of cortical cells	7	3	0	0	0	0	6	4	0	0	0	5	5	0	0	0	4	6	0	0	0	0	0	1	9	0	0	0	2	2	1	0	0	0	1	4	0	0	0	0
Thyroid																																								
Hyperplasia/hypertrophy of follicular cells	10	0	0	0	0	0	5	4	1	0	0	0	3	5	2	0	0	0	0	8	2	0	0	0	0	0	10	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0		

No remarkable changes were recognized following organs; Kidney and Parathyroid on termination of administration period, Parathyroid on termination of recovery period.
Grade of histopathological finding: -; No abnormal detect, ±; Slight, +; Mild, 2+; Moderate, 3+; Marked
/: Not examined.

Table 8 Histopathological examination of female rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2-mercaptobenzimidazole

Test period	Termination of administration period										Termination of recovery period																											
	Control		2-mercaptobenzimidazole				2-mercaptobenzimidazole				Control																											
Group	0		1.2				4				12		40																									
Dose(mg/kg)	0		1.2				4				12		40																									
Number of females	10		10				10				10		9																									
Finding	Grade		-				±				+		2+		3+																							
Liver																																						
Granuloma	5	5	0	0	0	0	/	/	/	/	6	3	0	0	0	0	/	/																				
Spleen																																						
Extramedullary hematopoiesis	8	2	0	0	0	0	/	/	/	/	8	1	0	0	0	0	/	/																				
Kidney																																						
Dilatation of urinary tubules	10	0	0	0	0	0	/	/	/	/	8	1	0	0	0	0	/	/																				
Basophilic change of urinary tubules	10	0	0	0	0	0	/	/	/	/	8	1	0	0	0	0	/	/																				
Adrenal																																						
Vacuolization of cortical cells	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	4	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0				
Thyroid																																						
Hyperplasia/hypertrophy of follicular cells	10	0	0	0	0	0	6	4	0	0	0	1	7	1	1	0	0	2	1	4	3	0	0	0	0	9	5	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0

No remarkable changes were recognized following organs; Heart and Parathyroid on termination of administration period, Parathyroid on termination of recovery period.
Grade of histopathological finding: -; No abnormal detect, ±; Slight, +; Mild, 2+; Moderate, 3+; Marked
/: Not examined.

空胞化も、2週間の休業により回復傾向を示す可逆性変化であった。甲状腺の組織変化は、2-メルカプトベンツイミダゾールの反復投与により甲状腺ホルモンの合成が抑制される結果、血中の甲状腺ホルモン濃度が減少し、これがTSHの遊離を刺激して甲状腺の肥大を惹起すると考えられている¹⁾。

本物質の毒性については、Gaworskiら²⁾はラットの反復吸入毒性試験を行い、肝臓重量増加、胸腺重量減少、白血球数減少、貧血症状、遊離脂肪酸減少、コレステロール値増加、GPTおよび尿素窒素増加を観察している。また、川崎ら³⁾はラットでの反復経口投与毒性試験により体重増加抑制、摂餌量減少、白血球数減少、貧血傾向(回復群)、尿素窒素・コレステロール・ γ -GTP増加、胸腺重量減少を観察している。今回の著者らの成績は、これらの報告とほぼ一致するものと思われた。

以上のように、2-メルカプトベンツイミダゾールは造血機能、甲状腺、肝機能および腎機能などに影響を及ぼすことが推測された。当試験条件下における28日間反復経口投与による毒性学的無影響量は、雌雄とも1.2 mg/kg未満と考えられた。

文献

- 1) F.W. Janssen, et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 59, 355-363(1981).
- 2) C.L. Gaworski, et al. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 16, 161-171(1991).
- 3) 川崎 靖ほか, 第21回日本毒科学会, 札幌, (1994).

連絡先

試験責任者：和田 浩
試験担当者：藤村高志, 小池恒雄, 木村 均,
長瀬孝彦, 牧野浩平
(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
〒501-62 岐阜県羽島市福寿町間島 6-104
Tel 058-392-6222 Fax 058-391-3171

Correspondence

Authors: Hiroshi Wada (Study director)
Takashi Fujimura, Tsuneo Koike,
Hitoshi Kimura,
Takahiko Nagase and Kohei Makino
6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu, 501-62,
Japan
Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-391-3171

2-メルカプトベンツイミダゾールの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 2-Mercaptobenzimidazole on Bacteria

要約

2-メルカプトベンツイミダゾールについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾ および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ を用い、S9 Mix 無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験では、50~5000 µg/プレートで実施したところ、抗菌性が認められなかったため、本試験ではS9 Mix 無添加および添加試験ともに312.5~5000 µg/プレートの用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも溶媒対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められなかったことから、2-メルカプトベンツイミダゾールは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

*S.typhimurium*の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。*E. Coli* WP2 *uvrA* 株は1979年5月5日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。検定菌は、-80°C以下で凍結保存した。各検定菌は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子(pKM101)の有無についての特性確認を行った。試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に種菌を接種し、37°C、約10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

2-メルカプトベンツイミダゾール(CAS No 583-39-1)は、分子量150.21の淡黄色白色粉末である。純度98.5%のもの(ロット番号:30807、不純物としてNa₂SO₄など

を含む、住友化学工業(株)製造)を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保管した。

2-メルカプトベンツイミダゾールは、ジメチルスルホキシド(以下DMSOと略、和光純薬工業(株))に50 mg/mlになるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし約3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

2-メルカプトベンツイミダゾールのDMSO溶液中での安定性試験を、本試験での低濃度(3.125 mg/ml)および当研究所で同時に実施した染色体異常試験での高濃度(300 mg/ml)の2濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後4時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均に対して、99.7および108%であった。また、本試験Iに用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、3.125 mg/ml溶液の含量は既定濃度に対し、96.2~97.1%、50 mg/ml溶液は、95.4~96.2%であった。

以上の結果から、2-メルカプトベンツイミダゾールはDMSO溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : フリルフラマイド (上野製薬(株))
SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))
9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)
2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF2, 2AAはDMSO(和光純薬工業(株))に溶解したものを-20°Cで凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは蒸留水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地およびS9 Mixの組成〕

1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー (Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B) *L-ヒスチジン	0.5 mM
ビオチン	0.5 mM

* : WP2用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1リットルあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g
グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
バクトアガー (Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 Mix (1 ml中下記の成分を含む)

**S9	0.1 ml
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9 (キッコマン(株))を用いた。

〔試験方法〕

プレート法を用いて、S9 Mix 無添加および添加条件下で試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 Mix 添加試験においては S9 Mix 0.5 ml), 検定菌液 0.1 ml およびトップアガー 2 ml を混和したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに DMSO または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は Table 1~2 に示した。培養は 37 °C で 48 時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の S9 Mix 無添加あるいは添加試験において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

2-メルカプトベンツイミダゾールについて、50~5000 μg/プレートの範囲で公比を約3とし、試験を実施したところ、すべての検定菌において S9 Mix 無添加あるいは添加試験ともに抗菌性は認められなかった。

したがって、本試験における最高用量を、すべての検定菌において、S9 Mix 無添加あるいは添加試験ともに 5000 μg/プレートとすることとした。

〔本試験〕

結果を Table 1, 2 に示した。2-メルカプトベンツイミダゾールについて、すべての検定菌について、S9 Mix 無添加あるいは添加試験ともに 312.5~5000 μg/プレートの範囲で、公比を2とし、試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の S9 Mix 無添加あるいは添加試験のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。TA100 の S9 Mix 無添加および添加試験において、最高用量の 5000 μg/プレートにおいて抗菌性が認められた。

以上の結果に基づき、2-メルカプトベンツイミダゾールは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983).
- 2) M.H.L. Green, in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.

連絡先

試験責任者: 澁谷 徹
 試験担当者: 堀谷尚古, 坂本京子, 原 巧,
 川上久美子, 松本容彦, 飯田さやか,
 中込まどか

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒 257 神奈川県秦野市落合 729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors :Tohru Shibuya (Study Director)
 Naoko Horiya, Kyoko Sakamoto,
 Takumi Hara, Kumiko Kawakami,
 Yasuhiko Matsuki,
 Sayaka Iida and Madoka Nakagomi
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of 2-Mercaptobenzimidazole** on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg / plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type						Frameshift type								
		TA100		TA1535		WP2 <i>uvr</i> A		TA98		TA1537						
S9 Mix (-)	0	104	89	106	12	26	11	20	18	19	20	16	23	8	8	7
		(100 \pm 9.3)		(16 \pm 8.4)		(19 \pm 1.0)		(20 \pm 3.5)		(8 \pm 0.6)						
	312.5	88	95	118	13	10	10	27	21	16	14	23	17	5	4	5
		(100 \pm 15.7)		(11 \pm 1.7)		(21 \pm 5.5)		(18 \pm 4.6)		(5 \pm 0.6)						
	625	75	84	80	10	11	9	16	13	27	18	15	17	3	3	5
		(80 \pm 4.5)		(10 \pm 1.0)		(19 \pm 7.4)		(17 \pm 1.5)		(4 \pm 1.2)						
	1250	80	91	92	6	4	6	16	22	17	14	12	17	5	2	9
		(88 \pm 6.7)		(5 \pm 1.2)		(18 \pm 3.2)		(14 \pm 2.5)		(5 \pm 3.5)						
	2500	97	81	104	5	9	9	12	14	13	16	24	14	6	4	7
		(94 \pm 11.8)		(8 \pm 2.3)		(13 \pm 1.0)		(18 \pm 5.3)		(6 \pm 1.5)						
5000	93 *	58 *	43 *	11	9	6	13	7	14	8	11	11	5	5	6	
	(65 \pm 25.7)		(9 \pm 2.5)		(11 \pm 3.8)		(10 \pm 1.7)		(5 \pm 0.6)							
S9 Mix (+)	0	124	122	155	8	14	17	27	31	20	35	39	22	6	20	11
		(134 \pm 18.5)		(13 \pm 4.6)		(26 \pm 5.6)		(32 \pm 8.9)		(12 \pm 7.1)						
	312.5	118	102	96	17	12	7	22	18	27	28	20	22	15	18	11
		(105 \pm 11.4)		(12 \pm 5.0)		(22 \pm 4.5)		(23 \pm 4.2)		(15 \pm 3.5)						
	625	105	99	90	10	13	8	24	20	23	21	17	16	13	12	18
		(98 \pm 7.5)		(10 \pm 2.5)		(22 \pm 2.1)		(18 \pm 2.6)		(14 \pm 3.2)						
	1250	90	78	78	10	10	11	23	15	14	25	27	18	9	8	17
	(82 \pm 6.9)		(10 \pm 0.6)		(17 \pm 4.9)		(23 \pm 4.7)		(11 \pm 4.9)							
2500	71	86	84	2	7	11	14	18	13	18	23	24	11	7	10	
	(80 \pm 8.1)		(7 \pm 4.5)		(15 \pm 2.6)		(22 \pm 3.2)		(9 \pm 2.1)							
5000	60	44	42	7	6	8	17	12	11	18	10	19	7	7	10	
	(49 \pm 9.9)		(7 \pm 1.0)		(13 \pm 3.2)		(16 \pm 4.9)		(8 \pm 1.7)							
Positive control	Chemical	AF2		SA		AF2		AF2		9AA						
	Dose (μg / plate)	0.01		0.5		0.01		0.1		80						
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	635	556	616	242	233	248	212	203	207	898	968	992	2016	1736	2227
		(602 \pm 41.2)		(241 \pm 7.5)		(207 \pm 4.5)		(953 \pm 48.8)		(1993 \pm 246.3)						
Positive control	Chemical	2AA		2AA		2AA		2AA		2AA						
	Dose (μg / plate)	1		2		10		0.5		2						
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	1293	1371	1277	396	338	343	1697	1689	1874	572	540	563	518	397	392
		(1314 \pm 50.3)		(359 \pm 32.1)		(1753 \pm 104.6)		(558 \pm 16.5)		(436 \pm 71.3)						

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoadridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

**: Purity was 98.5 %.

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 2-Mercaptobenzimidazole** on bacteria

With (+) or without (-)	Test substance dose (µg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)														
		Base - pair substitution type*									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvr</i> A			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	0	103	125	121	10	19	13	21	16	19	14	35	24	4	7	11
		(116± 11.7)			(14± 4.6)			(19± 2.5)			(24± 10.5)			(7± 3.5)		
	312.5	99	122	105	8	16	11	19	29	19	30	27	18	6	2	7
		(109± 11.9)			(12± 4.0)			(22± 5.8)			(25± 6.2)			(5± 2.6)		
	625	105	130	96	10	12	9	20	19	21	24	18	19	9	11	3
		(104± 7.1)			(10± 1.5)			(20± 1.0)			(20± 3.2)			(8± 4.2)		
	1250	78	109	101	6	9	10	19	8	16	25	27	21	7	6	6
	(96± 16.1)			(8± 2.1)			(14± 5.7)			(24± 3.1)			(6± 0.6)			
S9 Mix (+)	2500	73	97	70	11	4	8	10	9	8	18	19	11	5	2	5
		(80± 14.8)			(8± 3.5)			(9± 1.0)			(16± 4.4)			(4± 1.7)		
	5000	59 *	56 *	52 *	8	8	16	12	8	6	11	14	16	4	4	9
	(56± 3.5)			(11± 4.6)			(9± 3.1)			(14± 2.5)			(6± 2.9)			
S9 Mix (+)	0	116	126	125	12	11	9	18	23	26	43	27	31	18	22	15
		(122± 5.5)			(11± 1.5)			(22± 4.0)			(34± 8.3)			(18± 3.5)		
	312.5	119	109	92	15	15	5	19	24	22	29	43	41	4	9	12
		(107± 13.7)			(12± 5.8)			(22± 2.5)			(38± 7.6)			(8± 4.0)		
	625	101	90	91	8	2	13	24	19	25	29	30	30	12	11	4
		(94± 6.1)			(8± 5.5)			(23± 3.2)			(30± 0.6)			(9± 4.4)		
	1250	92	81	76	8	11	9	11	20	12	39	26	15	9	7	13
	(83± 8.2)			(9± 1.5)			(14± 4.9)			(27± 12.0)			(10± 3.1)			
S9 Mix (+)	2500	60	83	84	7	6	5	17	13	15	31	24	27	8	6	7
		(76± 13.6)			(6± 1.0)			(15± 2.0)			(27± 3.5)			(7± 1.0)		
	5000	90 *	71 *	49 *	2	7	4	17	11	14	15	20	22	1	8	9
	(70± 20.5)			(4± 2.5)			(14± 3.0)			(19± 3.6)			(6± 4.4)			
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (µg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (µg /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	611	620	600	264	301	317	251	261	214	1021	1080	1071	2140	1781	2191
		(610± 10.0)			(294± 27.2)			(242± 24.8)			(1057± 31.8)			(2037± 223.5)		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	947	722	500	362	334	304	1439	1543	1591	353	765	307	343	366	411
		(723± 223.5)			(333± 29.0)			(1524± 77.7)			(475± 252.2)			(373± 34.6)		

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria.

** : Purity was 98.5 %.

2-メルカプトベンツイミダゾールの 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

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 2-Mercaptobenzimidazole on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検に係る毒性試験調査事業の一環として、2-メルカプトベンツイミダゾールの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(24および48時間)においては、50%を越える増殖抑制濃度、すなわち0.39 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。一方、短時間処理(6時間)のS9 mix 存在下および非存在下では、50%を越える増殖抑制が認められなかったことより、1.5 mg/ml(10 mM)の濃度を最高処理濃度とした。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。

CHL/IU 細胞を24時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、48時間連続処理した高濃度群(0.39 mg/ml)において、観察した細胞の7.0%(gapを含む)に染色体の構造異常が観察され、疑陽性の結果が得られた。その他の処理群では、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理では、S9 mix 非存在下で6時間処理したすべての処理群において、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix 存在下のすべての処理群で染色体の構造異常の有意な増加が認められ、その出現頻度は4.0~12.5%で、陽性の結果が得られた。また、S9 mix 存在下のすべての処理群で倍数性細胞の有意な増加が認められたが、その出現頻度は4.00~4.75%であった。

以上の結果より、2-メルカプトベンツイミダゾールは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: JRH BIOSCIENCES)を10%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix 存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

2-メルカプトベンツイミダゾール(略号: MBI, CAS No.: 583-39-1, ロット番号: 30807, 住友化学工業(株)製造, (社)日本化学工業協会提供)は、白色粉末(または淡黄色白色粉末)で、水およびアセトンに不溶、ジメチルスルホキシド(DMSO)に可溶(66.7 wt%以上)、融点約304°C、分子式C₇H₆N₂S、分子量150.21、純度98.5%(不純物としてNa₂SO₄等を含む)の物質である。被験物質原体は安定であり、溶媒中(DMSO)では、3.125~300 mg/mlの濃度範囲で4時間は安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(Sigma Chemical Co., および和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の0.5% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお、濃度記載について、純度換算は行なわなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(MonocellaterTM, オリジナル光学工

業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度(約60%の増殖抑制濃度)は、60%の増殖抑制濃度ををさむ2濃度の値より算出したところ、0.39 mg/mlであった。一方、短時間処理のS9 mix存在下および非存在下では、処理したすべての濃度範囲で50%を明らかに越える増殖抑制は認められなかった(Fig. 1)。

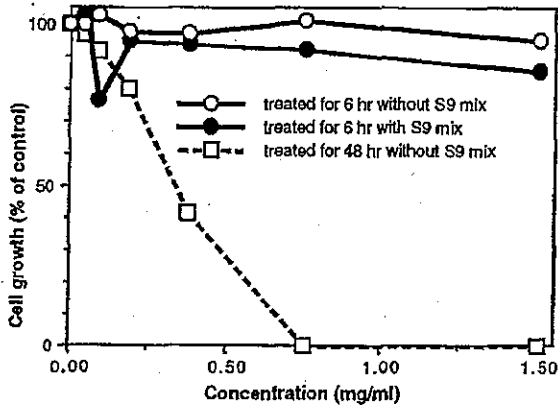


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-mercaptobenzimidazole

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理では0.39 mg/ml、短時間処理では1.5 mg/ml (10 mM)とし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協利醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水((株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 μg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は、各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyplloid)の有無について観察

した。また構造異常については、1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析することとした。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーのexact probability test法により、溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定(p<0.05)を行った。

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が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。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。2-メルカプトベンツイミダゾールを加えて24時間連続処理したすべての群で、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。一方、48時間連続処理した高濃度群(0.39 mg/ml)において、観察した細胞の7.0%(gapを含む)に染色体の構造異常が認められ、疑陽性の結果が得られた。その他の処理群では染色体の構造異常および倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。

2-メルカプトベンツイミダゾールを加えてS9 mix非存在下で6時間処理したすべての処理群で、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下のすべての処理群において染色体の構造異常の有意な増加が認められ、その出現頻度は4.0~12.5%(gapを含む)であり、判定は陽性であった。また、S9 mix存在下のすべての処理群で倍数性細胞の有意な増加が認められたが、その出現頻度は4.00~4.75%であった。

従って、2-メルカプトベンツイミダゾールは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

文献

- 1) 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.
- 2) 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.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-mercaptobenzimidazole (MBI)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control ¹⁾			200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
Solvent	0	24	200	2	1	0	0	0	0	0	3	1	3 (1.5)	1 (0.5)	0.38		
MBI	0.10	24	200	1	0	0	0	0	2	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.00	-	-
MBI	0.20	24	200	1	2	2	0	1	0	0	6	0	5 (2.5)	4 (2.0)	0.13	-	-
MBI	0.39	24	200	0	1	0	0	0	1	10	12	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00	-	-
MC	0.00005	24	200	7	98	138	6	3	4	0	256	3	123* (61.5)	120* (60.0)	0.00	+	-
Solvent ¹⁾	0	48	200	1	1	0	1	0	1	0	4	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.13		
MBI	0.10	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-
MBI	0.20	48	200	0	2	2	0	0	0	0	4	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	-	-
MBI	0.39	48	200	0	20	5	2	0	1	10	38	0	14* (7.0)	14* (7.0)	0.85 ⁶⁾	±	-
MC	0.00005	48	200	4	76	154	6	3	1	70	314	28	119* (59.5)	118* (59.0)	0.38	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Seven hundred and seven cells were analysed. * : Significantly different from solvent control at p<0.05. ** : Purity was 98.5% and Na₂SO₄ was contained as impurity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-mercaptobenzimidazole (MBI)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control ¹⁾				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00			
Solvent	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
MBI	0.4	-	6-(18)	200	0	1	4	0	0	0	10	15	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38	-	-
MBI	0.8	-	6-(18)	200	0	0	1	5	0	1	0	7	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	-	-
MBI	1.5	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25		
MBI	0.4	+	6-(18)	200	2	3	14	1	0	0	0	20	0	8* (4.0)	7* (3.5)	4.25*	-	-
MBI	0.8	+	6-(18)	200	2	11	28	1	0	0	10	52	1	23* (11.5)	22* (11.0)	4.00*	+	-
MBI	1.5	+	6-(18)	200	3	21	24	0	0	0	0	48	0	25* (12.5)	23* (11.5)	4.75*	+	-
CPA	0.005	+	6-(18)	200	5	158	267	12	2	3	200	647	2	159* (79.5)	158* (79.0)	0.13	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). * : Significantly different from solvent control at p<0.05. ** : Purity was 98.5% and Na₂SO₄ was contained as impurity.

連絡先

試験責任者：田中憲穂
 試験担当者：山影康次，若栗 忍，日下部博一，
 橋本恵子
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 神奈川県秦野市落合729-5
 Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors : Noriho Tanaka (Study director)
 Kohji Yamakage, Shinobu Wakuri,
 Hirokazu Kusakabe, Keiko Hashimoto
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627