

2,3-ジブロモコハク酸のラットを用いた単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of 2,3-Dibromosuccinic acid in Rats

要約

2,3-ジブロモコハク酸をSD系ラットの雌雄に単回経口投与した時の毒性について検討した。投与量は、雌雄ともにOECDガイドラインにより限界用量とされている2000mg/kgとした。

雌雄とも死亡例は認められず、一般状態、体重および剖検結果においても異常は認められなかった。

以上の結果から、最小致死量 (LD₅₀値) は雌雄ともに2000mg/kg以上と推定された。

方法

1. 被験物質

2,3-ジブロモコハク酸 (東京化成工業(株), ロット番号: DW01, 純度: 99.8%) は、分子量275.88, 水, メタノール, エタノール, アセトンに可溶の白色粉末である。本ロットについては試験期間中安定であることが確認された。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より入手したSD系ラット (Crj:CD, SPF) の雌雄各5匹を9日間検疫・馴化し、試験に使用した。投与時の週齢は雌雄とも5週齢, 体重範囲は雄が152~160g, 雌が118~130gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中, 温度20~25℃, 湿度40~70%R.H., 換気約12回/時, 照明12時間 (7:00~19:00) に自動調節された飼育室を使用した。動物は, 実験動物用床敷 (ペータチップ: 日本チャールス・リバー(株)) を敷いたポリカーボネート製ケージに1ケージ当り5匹で収容し飼育した。

動物には, 実験動物用固型飼料 (MF: オリエンタル酵母工業(株)) および5μmのフィルター濾過後紫外線照射した水道水を, それぞれ自由摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与量は予備試験の結果に基づき, 雌雄ともOECDガイドラインにより限界用量とされている2000mg/kgとした。被験物質は投与直前に0.5%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液に懸濁させ, 投与前日の夕方から絶食させたラットに胃ゾンデを用いて1回強制経口投与した。投与液量は10ml/kgとし, 投与後約3時間は飼料を与えなかった。

4. 観察および検査方法

一般状態は, 投与当日は投与後15分, 30分, 1, 3および6時間, その後は1日1回, 14日間にわたって観察した。体重は, 投与直前, 投与後3, 7および14日に測定した。また, すべての動物を観察終了後 (投与後14日)

にチオペンタールナトリウムによる麻酔下で腹大動脈を切断し, 放血致死させ剖検した。

結果

1. 死亡率および致死量

14日間の観察期間を通して雌雄ともに死亡は認められず, 最小致死量 (LD₅₀値) は雌雄ともに2000mg/kg以上と推定された。

2. 一般状態, 体重および剖検

雌雄とも一般状態に異常は認められず, 体重は順調に増加した。また, 剖検においても, 雌雄ともに異常は認められなかった。

連絡先

試験責任者: 松浦郁夫
試験担当者: 大保真由美
(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Ikuo Matsuura (Study director)
Mayumi Ohbo
Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Kashima
Laboratory
14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-02 Japan
Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

2,3-ジブロモコはく酸のラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 2,3-Dibromosuccinic acid in Rats

要約

2,3-ジブロモコはく酸の20, 140および1000mg/kgをSD系ラットの雌雄に28日間反復投与し、その毒性について検討した。対照群および1000mg/kg群については14日間の回復期間を設けた。

体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査および病理学的検査において、雌雄とも被験物質投与に起因する変化は認められなかった。1000mg/kg群で雌雄ともに軽度の流涎が認められたが、その頻度も投与期間中1~2回のみであり、毒性学的意義はないと考えられた。

以上の結果より、本試験条件下における2,3-ジブロモコはく酸の無影響量は、雌雄ともに1000mg/kgと考えられる。

方法

1. 被験物質

2,3-ジブロモコはく酸 (東京化成工業(株), ロット番号: DW01, 純度: 99.8%) は、分子量275.88, 水, メタノール, エタノール, アセトンに可溶の白色粉末である。本ロットについては試験期間中安定であることが確認された。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より入手したSD系ラット (Crl:CD, SPF) の雌雄を9日間検疫・馴化し、試験に使用した。投与開始前に動物を体重別層化無作為抽出法により群分けした。1群の動物数は雌雄各6匹とし、対照および高用量群についてはこの他に雌雄各6匹の回復群を設けた。投与開始時の週齢は雌雄とも5週齢、体重範囲は雄が171~199g, 雌が136~169gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中、温度20~25℃, 湿度40~70%R.H., 換気約12回/時, 照明12時間(7:00~19:00)に自動調節された飼育室を使用した。動物は、実験動物用床敷 (ベータチップ: 日本チャールス・リバー(株)) を敷いたポリカーボネート製ケージに1ケージ当り2匹で収容し飼育した。

動物には、実験動物用固型飼料 (MF: オリエンタル酵母工業(株)) および5 μ mのフィルター濾過後紫外線照射した水道水を、それぞれ自由摂取させた。

3. 投与量および投与方法

被験物質を100, 300および1000mg/kgの各用量でSD系ラットに7日間反復経口投与した結果、いずれの用量においても明瞭な毒性兆候は認められなかった。従って、

本試験では高用量を1000mg/kgとし、以下公比約7で中用量を140mg/kg, 低用量を20mg/kgとした。さらに、溶媒のみを投与する対照群を設定した。

投与期間は、剖検前日までの28日間とし、対照および1000mg/kg群については14日間の回復期間を設けた。被験物質を0.5%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液に懸濁させ、毎日1回、午前中に胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与量は10ml/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。

4. 観察および検査方法

1) 一般状態、体重および摂餌量

全例について一般状態を毎日観察した。体重は投与開始日およびその後毎週1回測定した。また、摂餌量については、投与開始日およびその後毎週1回、ケージ単位で風袋込み重量を測定し、各期間毎の1匹当りの1日の平均摂餌量を算出した。

2) 血液学的検査

各計画殺時の全動物について、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採血し、赤血球数 (シースフローDCインピーダンス検出法) 白血球数 (RF/DCインピーダンス検出法)、血小板数 (シースフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度 (SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値 (赤血球パルス波高値検出法) を多項目自動血球分析装置 (NE-4500: 東亜医用電子(株)), 白血球百分率 (Wright染色塗抹標本) を血液細胞自動分析装置 (MICROX HEG-70A: (株)立石電機)、網状赤血球数 (アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法) を自動網状赤血球測定装置 (R-2000: 東亜医用電子(株)), プロトロンビン時間 (PT; Quick一段法)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT; 活性化セファロプラスチン法) を血液凝固自動測定装置 (KC-10A: アメルング社) により測定した。また、検査の結果から平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球色素量 (MCH)、平均赤血球色素濃度 (MCHC) を算出した。凝固阻止剤として、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測定には3.13%クエン酸ナトリウム水溶液を、それ以外の項目の測定にはEDTA-2Kを用いた。

3) 血液生化学的検査

採取した血液を室温で約30分間放置した後、3000r.p.m., 10分間遠心分離し、得られた血清を用いて総蛋白 (Biuret法)、アルブミン (BCG法)、A/G比 (総蛋白およびアルブミンより算出)、グルコース (GK-G6PDH法)、トリグリセライド (LPL-GK-G3PO-POD法)、

総コレステロール (CES-CO-POD法), 尿素窒素 (Urease-GLDH法), クレアチニン (Jaffe法), カルシウム (O-CPC法), 無機リン (UV法), GOT (SSCC改良法), GPT (SSCC改良法), γ -GTP (SSCC改良法), ALP (GSCC改良法), ナトリウム, カリウム (イオン選択電極法) を自動分析装置 (日立736-10形: (株)日立製作所) により測定した。

なお, クロライドについては2,3-ジプロモこはく酸に含まれるBrが選択電極法によるClイオンの測定値に影響を与えることが考えられたため, 影響を受ける可能性の少ない電量滴定法 (クロライドメーター, Model 925: コーニングメディカル(株)) により測定した。

4) 尿検査

投与終了時の解剖の2日前に全生存動物の新鮮尿を採取し, pH, 潜血, 蛋白, 糖, ケトン体, ビリルビン, ウロビリノーゲン (試験紙法, N-マルチステックスSG: マイルス・三共(株)) を尿分析器 (クリニテック10: マイルス・三共(株)) により測定した。

5) 病理学的検査

各計画殺時, 全動物について採血後に腹大動脈を切断して放血致死させ解剖し, 脳, 肝臓, 腎臓, 副腎, 精巣および卵巣の重量を測定した。また, これらの器官に加え, 下垂体, 眼球 (付属腺を含む), 肺, 胃, 甲状腺 (上皮小体を含む), 心臓, 脾臓, 膀胱, 骨髄 (大腿骨) を採取し, 10%中性リン酸緩衝ホルマリン液 (眼球およびハーダー腺はDavidson液) にて固定後保存した。

投与終了時解剖動物の対照および1000mg/kg群の雌雄の心臓, 肝臓, 腎臓, 副腎および脾臓を対象に, 常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し鏡検した。

6. 統計学的解析

計量データについては, Bartlett法による等分散の検定を行い, 分散が一樣の場合には一元配置分散分析を行った後, Dunnett法またはScheffe法により平均値の比較を行った。分散が一樣でない場合にはKruskal-Wallisの検定を行い, Dunnett型またはScheffe型の順位和検定を行った。尿の定性検査で得られたデータについては, Armitageの χ^2 検定を用いた。有意水準は5%以下とした。

結果

1. 一般状態, 体重および摂餌量 (Fig. 1, 2)

1000mg/kg群で雌雄とも軽度の流涎が認められたが, 投与期間後半に1~2回観察されたのみであった。体重は雌雄ともに対照群と同様な推移を示したが, 摂餌量において, 1000mg/kg群の雌で投与開始後14日および21日に増加, 回復期間終了時に減少が認められた。

2. 血液学的検査 (Table 1)

投与終了時の検査において, 1000mg/kg群の雄でリンパ球の増加, 雌でヘモグロビン濃度の増加, リンパ球の減少および単球の増加が認められたが, いずれも軽微な変化であるため, 生理的変動範囲内の変化と判断した。また, 回復終了時の検査において, 1000mg/kg群の雄で平均赤血球容積の増加, 雌でAPTTの短縮が認め

られたが, いずれも軽微な変化であり, 投与終了時の検査では変化は認められていないことから, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

3. 血液生化学的検査 (Table 2)

投与終了時の検査では, 20mg/kg群の雌で尿素窒素の増加, A/G比の減少, 1000mg/kg群の雌でクロライドの減少, また, 回復終了時の検査では, 1000mg/kg群の雌でクロライドの増加が認められたが, これらはいずれも用量依存性がないか, あるいは軽微な変化であるため, 生理的変動範囲内の偶発的な変化と判断した。

4. 尿検査

20mg/kg群の雄で蛋白およびケトン体の減少, 糖の増加が認められたが, 用量依存性のない軽微な変化であるため, 被験物質投与とは関連のない変化と判断した。

5. 器官重量 (Table 3)

投与終了時の検査において, 1000mg/kg群の雌で肝臓の対体重比の増加が認められたが, 実重量では差は認められなかった。

6. 病理解剖検査 (Table 4)

被験物質投与に起因する変化は認められなかった。偶発性変化として脾臓表層の偽膜形成, 甲状腺の片側性の欠損と肥大および腹腔内結節が認められた。

7. 病理組織学的検査 (Table 5)

被験物質投与に起因する変化は認められなかった。偶発性変化として, 肝臓の巣状壊死, 小肉芽腫, 単核細胞の浸潤, 腎臓の尿管上皮の好塩基性変化および脾臓の被膜表層部における結合組織の増生が認められた。

考察

2,3-ジプロモこはく酸の20, 140および1000mg/kgをSD系ラットの雌雄に28日間反復経口投与し, その毒性について検討した。

1000mg/kg群において, 雌雄ともに軽度の流涎が観察されたが, 投与期間後半に1~2回散見された程度の極低頻度のもので, 経時的な一定の傾向もなかったことから, 同群の投与液がpH1~2の強酸性であることに起因した毒性学的意義に乏しい変化と考えられる。また, 雌の摂餌量に軽微な変化が認められたが, 他の検査ではこれに関連する変化は認められなかったことから, 毒性学的意義はないと考えられる。さらに, 雌の肝臓の対体重比の増加についても, 実重量では有意な差がなく, 病理学組織学的検査においても肝臓に異常は認められなかったことから, 偶発的な変化と考えられる。

その他, 体重, 血液学的検査, 血液生化学的検査, 尿検査および病理学的検査のいずれにおいても, 被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から, 本試験条件下における2,3-ジプロモこはく酸の無影響量は雌雄ともに1000mg/kgと考えられる。

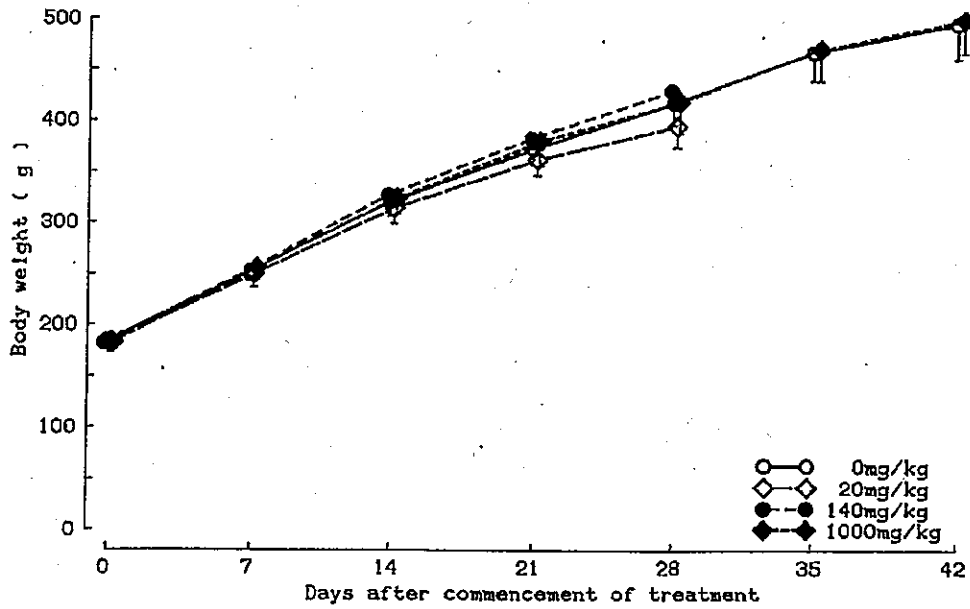


Fig.1 Body weight of male rats treated orally with 2,3-dibromosuccinic acid in 28-day repeat dose toxicity test

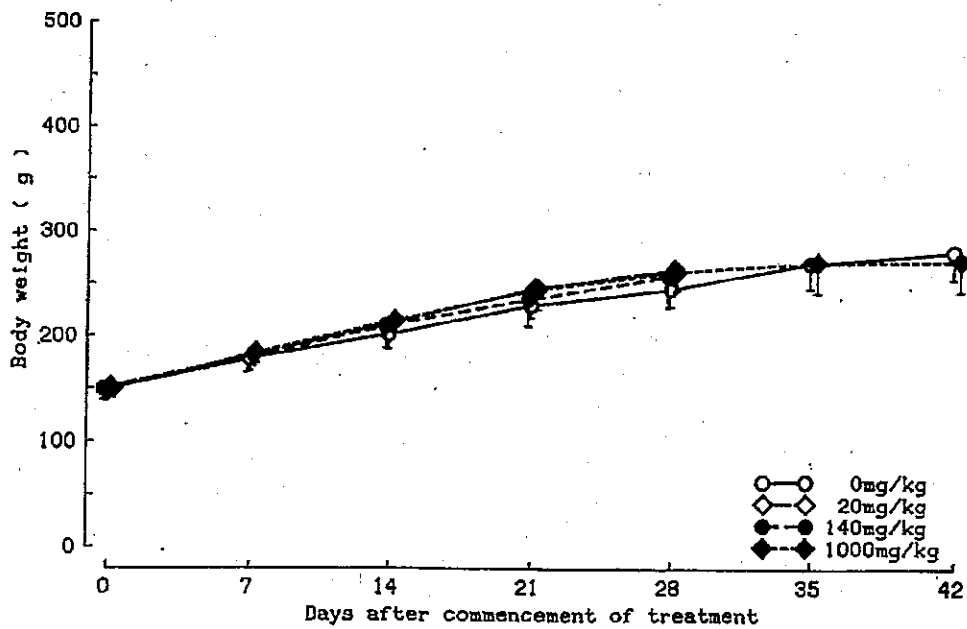


Fig.2 Body weight of female rats treated orally with 2,3-dibromosuccinic acid in 28-day repeat dose toxicity test

Table 1 Hematology of rats treated orally with 2,3-dibromosuccinic acid in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level	28Days				Recovery	
		0mg/kg	20mg/kg	140mg/kg	1000mg/kg	0mg/kg	1000mg/kg
Male							
	No. of animals	6	6	6	6	6	6
	RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	705 \pm 16.0	717 \pm 45.1	711 \pm 44.0	731 \pm 15.3	745 \pm 61.6	738 \pm 19.3
	Hematocrit (%)	42.4 \pm 1.18	43.7 \pm 1.80	42.8 \pm 1.06	43.9 \pm 0.98	41.9 \pm 3.18	43.0 \pm 1.12
	Hemoglobin (g/dl)	14.9 \pm 0.31	15.3 \pm 0.59	15.0 \pm 0.31	15.3 \pm 0.43	15.0 \pm 1.36	15.4 \pm 0.42
	Reticulocyte (%)	33 \pm 2.2	33 \pm 1.9	33 \pm 5.1	31 \pm 3.6	36 \pm 18.9	27 \pm 2.9
	MCV (μm^3)	60.2 \pm 0.97	61.1 \pm 2.55	60.3 \pm 3.11	60.1 \pm 2.03	56.2 \pm 1.25	58.3 \pm 1.41*
	MCH (pg)	21.1 \pm 0.41	21.3 \pm 0.96	21.2 \pm 1.28	21.0 \pm 0.65	20.1 \pm 0.61	20.8 \pm 0.59
	MCHC (%)	35.0 \pm 0.38	34.9 \pm 0.18	35.1 \pm 0.40	34.9 \pm 0.54	35.7 \pm 0.66	35.7 \pm 0.25
	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	102.1 \pm 12.53	105.7 \pm 8.55	97.4 \pm 9.56	96.3 \pm 10.54	100.2 \pm 10.50	94.8 \pm 8.72
	PT (sec)	12.8 \pm 0.22	12.7 \pm 0.26	12.7 \pm 0.12	12.9 \pm 0.23	12.9 \pm 0.44	12.6 \pm 0.33
	APTT (sec)	16.6 \pm 1.36	15.9 \pm 1.14	16.8 \pm 0.74	15.8 \pm 1.39	15.3 \pm 2.75	14.6 \pm 2.33
	WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	100 \pm 24.5	128 \pm 31.7	130 \pm 32.1	125 \pm 26.9	126 \pm 14.1	139 \pm 44.7
	Differential leukocyte counts (%)						
	Lymphocytes	85 \pm 5.3	89 \pm 2.3	90 \pm 3.4	92 \pm 5.0*	89 \pm 4.4	91 \pm 2.6
	Neutrophils						
	segmented	12 \pm 6.4	8 \pm 1.6	7 \pm 2.7	7 \pm 4.9	7 \pm 2.8	5 \pm 1.7
	band	0 \pm 0.4	0 \pm 0.4	1 \pm 1.2	1 \pm 0.5	0 \pm 0.5	0 \pm 0.4
	Eosinophils	1 \pm 1.0	1 \pm 1.2	0 \pm 0.4	0 \pm 0.4	1 \pm 1.2	0 \pm 0.8
	Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
	Monocytes	2 \pm 1.3	2 \pm 1.2	2 \pm 1.0	1 \pm 1.0	3 \pm 2.5	4 \pm 1.6
Female							
	No. of animals	6	6	6	6	6	6
	RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	723 \pm 23.9	699 \pm 26.9	697 \pm 25.9	733 \pm 30.3	738 \pm 49.3	750 \pm 43.7
	Hematocrit (%)	41.3 \pm 0.90	41.5 \pm 1.59	40.9 \pm 1.32	43.4 \pm 1.77	41.3 \pm 1.50	42.3 \pm 1.86
	Hemoglobin (g/dl)	14.8 \pm 0.39	14.8 \pm 0.56	14.6 \pm 0.48	15.6 \pm 0.51*	14.8 \pm 0.63	15.3 \pm 0.64
	Reticulocyte (%)	25 \pm 5.2	30 \pm 3.6	27 \pm 5.5	23 \pm 1.8	29 \pm 5.6	24 \pm 3.3
	MCV (μm^3)	57.2 \pm 1.64	59.4 \pm 1.54	58.7 \pm 1.05	59.3 \pm 2.19	56.0 \pm 2.25	56.5 \pm 1.76
	MCH (pg)	20.6 \pm 0.63	21.1 \pm 0.40	20.9 \pm 0.27	21.3 \pm 0.66	20.1 \pm 0.82	20.4 \pm 0.58
	MCHC (%)	35.9 \pm 0.17	35.5 \pm 0.27	35.7 \pm 0.22	35.8 \pm 0.32	35.9 \pm 0.35	36.2 \pm 0.29
	Platelet ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	89.3 \pm 10.06	86.9 \pm 12.37	87.8 \pm 6.72	93.0 \pm 4.13	83.4 \pm 12.77	83.6 \pm 12.11
	PT (sec)	12.8 \pm 0.12	13.0 \pm 0.25	13.2 \pm 0.33	13.0 \pm 0.34	13.3 \pm 0.44	13.3 \pm 0.51
	APTT (sec)	15.5 \pm 1.74	15.6 \pm 0.51	14.8 \pm 1.78	15.7 \pm 0.79	15.3 \pm 0.54	12.7 \pm 2.27*
	WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	105 \pm 29.2	104 \pm 12.1	104 \pm 19.7	110 \pm 22.6	91 \pm 34.5	95 \pm 30.8
	Differential leukocyte counts (%)						
	Lymphocytes	94 \pm 2.2	91 \pm 2.1	91 \pm 2.8	88 \pm 5.4*	88 \pm 3.9	90 \pm 4.4
	Neutrophils						
	segmented	4 \pm 1.6	5 \pm 2.0	6 \pm 1.5	7 \pm 3.3	7 \pm 4.6	6 \pm 3.5
	band	0 \pm 0.4	0 \pm 0.0	0 \pm 0.5	1 \pm 0.5	0 \pm 0.0	0 \pm 0.8
	Eosinophils	1 \pm 0.5	1 \pm 1.5	1 \pm 1.2	0 \pm 0.5	1 \pm 0.8	1 \pm 1.1
	Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
	Monocytes	2 \pm 0.8	2 \pm 1.7	3 \pm 0.8	4 \pm 1.8*	4 \pm 1.8	3 \pm 1.0

Values are expressed as Mean \pm S.D.Significantly different from control group; * : $P < 0.05$.

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with 2,3-dibromosuccinic acid in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose leve	28Days				Recovery	
		0mg/kg	20mg/kg	140mg/kg	1000mg/kg	0mg/kg	1000mg/kg
Male							
	No. of animals	6	6	6	6	6	6
	GOT (IU/l)	98 ± 19.7	87 ± 8.7	83 ± 12.3	81 ± 10.1	86 ± 11.5	85 ± 14.3
	GPT (IU/l)	31 ± 6.0	31 ± 4.6	31 ± 3.8	27 ± 5.2	31 ± 3.3	27 ± 2.4
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.0	0 ± 0.4	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	ALP (IU/l)	565 ± 114.7	528 ± 86.3	491 ± 67.0	471 ± 59.0	454 ± 110.5	358 ± 34.4
	Urea nitrogen (mg/dl)	17.9 ± 2.71	17.8 ± 1.56	18.2 ± 1.21	15.4 ± 1.75	18.1 ± 3.56	16.3 ± 1.12
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.00	0.5 ± 0.08	0.4 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.04
	Glucose (mg/dl)	164 ± 11.7	155 ± 7.1	167 ± 6.5	152 ± 10.8	158 ± 18.4	173 ± 9.7
	Total chol. (mg/dl)	62 ± 9.0	57 ± 10.9	67 ± 9.4	56 ± 5.8	67 ± 8.0	66 ± 12.0
	Triglyceride (mg/dl)	157 ± 51.8	111 ± 37.5	200 ± 66.1	166 ± 42.2	189 ± 55.4	137 ± 48.8
	Total protein (g/dl)	6.47 ± 0.326	6.33 ± 0.225	6.49 ± 0.231	6.52 ± 0.165	6.61 ± 0.500	6.74 ± 0.256
	Albumin (g/dl)	3.77 ± 0.133	3.72 ± 0.095	3.84 ± 0.096	3.81 ± 0.118	3.80 ± 0.197	3.83 ± 0.081
	A/G ratio	1.40 ± 0.065	1.43 ± 0.070	1.45 ± 0.096	1.40 ± 0.092	1.37 ± 0.164	1.32 ± 0.058
	Calcium (mg/dl)	9.9 ± 0.28	9.7 ± 0.23	9.9 ± 0.37	9.9 ± 0.06	9.8 ± 0.33	9.7 ± 0.51
	Inorganic phos. (mg/dl)	8.9 ± 0.78	9.2 ± 0.46	9.2 ± 0.60	8.6 ± 0.49	8.4 ± 0.45	8.2 ± 0.32
	Na (meq/l)	143 ± 1.2	143 ± 0.8	143 ± 1.2	144 ± 1.8	142 ± 0.6	143 ± 0.5
	K (meq/l)	4.5 ± 0.20	4.5 ± 0.19	4.5 ± 0.15	4.3 ± 0.23	4.6 ± 0.29	4.5 ± 0.16
	Cl (meq/l)	103 ± 2.1	104 ± 1.0	103 ± 1.0	103 ± 2.7	103 ± 1.4	103 ± 0.8
Female							
	No. of animals	6	6	6	6	6	6
	GOT (IU/l)	83 ± 13.6	83 ± 13.6	72 ± 10.9	70 ± 9.3	80 ± 10.9	74 ± 10.7
	GPT (IU/l)	26 ± 3.1	24 ± 4.1	26 ± 7.7	25 ± 4.7	30 ± 4.6	25 ± 7.7
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.4	0 ± 0.5	1 ± 0.5	1 ± 0.5	0 ± 0.0	0 ± 0.4
	ALP (IU/l)	297 ± 54.9	388 ± 110.4	328 ± 71.1	323 ± 96.1	277 ± 51.9	220 ± 53.4
	Urea nitrogen (mg/dl)	16.3 ± 2.15	20.6 ± 3.02*	17.7 ± 1.94	17.5 ± 2.06	19.7 ± 1.82	17.2 ± 2.51
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.00	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.06	0.6 ± 0.05	0.6 ± 0.08
	Glucose (mg/dl)	148 ± 9.8	154 ± 7.1	145 ± 5.2	149 ± 11.4	166 ± 23.1	164 ± 13.1
	Total chol. (mg/dl)	60 ± 8.9	64 ± 10.9	62 ± 12.1	59 ± 8.2	70 ± 15.9	67 ± 11.1
	Triglyceride (mg/dl)	68 ± 34.7	48 ± 26.2	52 ± 15.1	76 ± 41.2	63 ± 22.5	52 ± 27.8
	Total protein (g/dl)	6.23 ± 0.245	6.47 ± 0.366	6.29 ± 0.271	6.63 ± 0.290	6.57 ± 0.341	6.60 ± 0.340
	Albumin (g/dl)	3.87 ± 0.165	3.87 ± 0.160	3.86 ± 0.128	4.06 ± 0.200	3.94 ± 0.224	3.90 ± 0.160
	A/G ratio	1.64 ± 0.049	1.49 ± 0.093*	1.60 ± 0.091	1.58 ± 0.090	1.50 ± 0.092	1.45 ± 0.074
	Calcium (mg/dl)	9.5 ± 0.19	9.7 ± 0.26	9.6 ± 0.27	9.7 ± 0.20	9.6 ± 0.12	9.3 ± 0.42
	Inorganic phos. (mg/dl)	8.1 ± 0.65	8.4 ± 0.87	8.1 ± 0.41	8.5 ± 0.31	8.0 ± 0.32	7.1 ± 1.08
	Na (meq/l)	143 ± 0.8	143 ± 1.4	143 ± 1.6	142 ± 1.5	142 ± 1.0	143 ± 0.9
	K (meq/l)	4.3 ± 0.22	4.1 ± 0.17	4.2 ± 0.35	4.0 ± 0.08	4.1 ± 0.41	4.4 ± 0.93
	Cl (meq/l)	107 ± 1.5	105 ± 2.4	106 ± 2.2	103 ± 1.7*	105 ± 0.8	107 ± 1.2**

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control group; *, P<0.05, **, P<0.01.

Table 3 Absolute and relative organ weight of rats treated orally with 2,3-dibromosuccinic acid in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level	28Days				Recovery	
		0mg/kg	20mg/kg	140mg/kg	1000mg/kg	0mg/kg	1000mg/kg
Male							
No. of animals		6	6	6	6	6	6
Body weight (g)		411 ± 19.7	395 ± 19.9	430 ± 16.4	407 ± 33.5	496 ± 33.9	499 ± 32.6
Absolute organ weight							
Brain (g)		2.06 ± 0.041	2.02 ± 0.078	2.07 ± 0.079	2.04 ± 0.110	2.11 ± 0.079	2.11 ± 0.099
Liver (g)		17.03 ± 1.445	16.20 ± 1.569	18.71 ± 2.038	17.92 ± 1.795	19.85 ± 1.705	20.15 ± 3.121
Kidneys (g)		3.06 ± 0.225	3.03 ± 0.205	3.38 ± 0.148*	3.14 ± 0.177	3.47 ± 0.274	3.61 ± 0.241
Adrenals (mg)		63.5 ± 11.14	59.2 ± 5.26	66.0 ± 8.30	64.4 ± 7.09	61.7 ± 5.21	67.2 ± 12.73
Testes (g)		3.09 ± 0.257	3.09 ± 0.089	3.24 ± 0.053	3.05 ± 0.216	3.42 ± 0.130	3.20 ± 0.231
Relative organ weight							
Brain (g%)		0.50 ± 0.015	0.51 ± 0.017	0.48 ± 0.026	0.50 ± 0.026	0.42 ± 0.037	0.42 ± 0.035
Liver (g%)		4.13 ± 0.163	4.09 ± 0.248	4.35 ± 0.331	4.40 ± 0.189	4.00 ± 0.286	4.02 ± 0.405
Kidneys (g%)		0.75 ± 0.030	0.77 ± 0.045	0.79 ± 0.037	0.78 ± 0.056	0.70 ± 0.041	0.73 ± 0.027
Adrenals (mg%)		15.4 ± 2.00	15.0 ± 1.87	15.3 ± 1.74	15.9 ± 1.76	12.4 ± 0.66	13.4 ± 1.97
Testes (g%)		0.75 ± 0.055	0.78 ± 0.038	0.76 ± 0.034	0.75 ± 0.087	0.69 ± 0.052	0.65 ± 0.072
Female							
No. of animals		6	6	6	6	6	6
Body weight (g)		246 ± 18.5	263 ± 14.7	257 ± 30.4	267 ± 15.7	281 ± 26.6	272 ± 29.7
Absolute organ weight							
Brain (g)		1.90 ± 0.064	1.89 ± 0.045	1.86 ± 0.069	1.89 ± 0.062	1.88 ± 0.061	1.89 ± 0.050
Liver (g)		9.11 ± 1.064	10.46 ± 0.892	9.63 ± 1.849	10.88 ± 1.012	9.98 ± 1.397	9.22 ± 1.056
Kidneys (g)		1.94 ± 0.214	2.05 ± 0.181	2.02 ± 0.250	2.18 ± 0.177	2.10 ± 0.215	2.02 ± 0.202
Adrenals (mg)		70.7 ± 7.82	74.4 ± 7.75	71.5 ± 10.32	75.4 ± 6.98	77.1 ± 13.63	74.0 ± 4.39
Ovaries (mg)		96.2 ± 11.36	109.1 ± 8.24	107.1 ± 19.38	107.0 ± 19.82	97.7 ± 9.42	107.8 ± 17.44
Relative organ weight							
Brain (g%)		0.78 ± 0.057	0.72 ± 0.047	0.73 ± 0.082	0.71 ± 0.055	0.68 ± 0.048	0.70 ± 0.073
Liver (g%)		3.69 ± 0.223	3.97 ± 0.202	3.72 ± 0.334	4.06 ± 0.176*	3.55 ± 0.273	3.39 ± 0.167
Kidneys (g%)		0.79 ± 0.062	0.78 ± 0.069	0.79 ± 0.051	0.82 ± 0.061	0.75 ± 0.065	0.75 ± 0.104
Adrenals (mg%)		28.7 ± 3.04	28.5 ± 4.38	27.9 ± 3.43	28.3 ± 2.79	27.5 ± 3.75	27.6 ± 4.35
Ovaries (mg%)		39.0 ± 2.97	41.7 ± 5.12	41.7 ± 5.83	40.2 ± 8.02	35.0 ± 3.47	40.2 ± 9.42

Values are expressed as Mean ± S.D.
Significantly different from control group; *: P<0.05.

Table 4 Summary of gross findings in rats treated orally with 2,3-dibromosuccinic acid in 28-day repeat dose toxicity test

Organ	Fate:	28 Days								Recovery					
		Sex:	Male				Female				Male		Female		
			Dose level (mg/kg):	0	20	140	1000	0	20	140	1000	0	1000	0	1000
		No. of animals:	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Spleen															
Pseudomembrane on surface			1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thyroid glands															
Defect			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Enlargement			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Abdominal cavity															
Nodule			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

No abnormalities were observed in the other organs.

Table 5 Summary of histopathological findings in rats treated orally with 2,3-dibromosuccinic acid in 28-day repeat dose toxicity test

Organ	Sex:	Male				Female				
		Dose level (mg/kg):	0	20	140	1000	0	20	140	1000
Findings	No. of animals:	6	6	6	6	6	6	6	6	
Liver										
Small granuloma		1	\$	\$	2	3	\$	\$	2	
Focal necrosis		0	\$	\$	1	0	\$	\$	0	
Infiltration of mononuclear cell		1	\$	\$	1	0	\$	\$	0	
Kidneys										
Basophilic change of tubular epithelium		3	\$	\$	4	2	\$	\$	2	
Spleen										
Proliferation of connective tissue on capsule		1	\$	\$	0	0	\$	\$	0	
Heart										
		ND	\$	\$	ND	ND	\$	\$	ND	
Adrenals										
		ND	\$	\$	ND	ND	\$	\$	ND	

S: Not examined.

ND: No abnormalities were detected.

連絡先

試験責任者：松浦郁夫
 試験担当者：大保真由美，土谷 稔，武知雅人
 豊田直人
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
 〒314-03 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Ikuo Matsuura (Study director)
 Mayumi Ohbo, Minoru Tsuchitani,
 Masato Takechi, Naoto Toyota
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd., Kashima
 Laboratory
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
 Ibaraki, 314-02 Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

2,3-ジブロモコハク酸の細菌を用いる 復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 2,3-Dibromosuccinic acid on Bacteria

要約

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、難分解性化学物質の1つである、2,3-ジブロモコハク酸について、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, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 uvr A を用い、用量設定試験は直接法および代謝活性化法のいずれも、50~5000 μg /プレート、本試験では、直接法は 156.3~5000 μg /プレート、代謝活性化法では 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、いずれの用量でも復帰突然変異コロニー数の増加が認められなかったことから、2,3-ジブロモコハク酸は、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 uvr A
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9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。

試験に際して、ニュートリエントプロスNo. 2 (Oxoid) を入れたL字型試験管に種菌を接種し、 37°C 、約10~12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〕

2,3-ジブロモコハク酸 (CAS No 526-78-3) は、分子量 275.88 の白色の粉末である。純度 98% 以上のもの (ロット番号: 20831, マナック(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、使用時まで室温に保管した。

2,3-ジブロモサクシネートは、アセトン (ロット番号: DSR3251 および DSM4173, 和光純薬工業(株)) を用いて 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3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。なお、調製にあたって、純度換算は行わなかった。

秦野研究所において2,3-ジブロモコハク酸のアセトン溶液中での安定性試験を行った。本試験およびチャイ

ニーズ・ハムスターの培養細胞を用いる染色体異常試験における最高濃度 (233.5 mg/ml) および最低濃度 (0.7812 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、99.4% および 98.4% であった。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml 溶液の含量は既定濃度に対し、101~105%、1.563 mg/ml 溶液は、96.0~104% であった。

以上の結果から、2,3-ジブロモコハク酸はアセトン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。

AF-2 : 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))
9-AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem.Co.)
2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF-2, 9-AA, 2-AA 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。9-AA 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 混液の組成〕

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
	ピチオン	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1l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
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸水素アンモニウムナトリウム ・4水和物	3.5 g

グルコース	20 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 混液 (1 ml 中下記の成分を含む)

S9**	0.1 ml
NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol
NADPH	4 μmol
塩化カリウム	33 μmol
0.2M リン酸緩衝液(pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 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 (キッコーマン(株)) を用いた。

[試験方法]

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトッブアガー2ml, 被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml (代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 ml), 検定菌液 0.1 ml を混合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アセトン, 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 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、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。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況から判断した。

[判定基準]

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性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]

2,3-ジプロモコはく酸について、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、すべての検定菌の直接法において、最高用量の 5000 μg/プレートでのみ抗菌性が認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量を直接法、代謝活性化法ともに、すべての検定菌において、5000 μg/プレートとし、公比2で、直接法は6用量、代謝活性化法は5用量を設定することとした。

[本試験]

結果を Table 1, 2 に示した。2,3-ジプロモコはく酸について直接法では 156.3~5000 μg/プレート、代謝活性化法では 312.5~5000 μg/プレートの用量範囲で試験を実施した。

2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、陰性対照の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

なお、直接法において、すべての検定菌で最高用量の 5000 μg/プレートにおいてのみ抗菌性が認められた。

以上の結果に基づき、2,3-ジプロモコはく酸は、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, and B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983).
- (2) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," (B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, 161-187.

連絡先

試験責任者: 澁谷 徹
 試験担当者: 原 巧, 坂本京子, 石原尚古,
 川上久美子, 松木容彦, 福原克治
 (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)
 Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,
 Naoko Ishihara,
 Kumiko Kawakami,
 Yasuhiko Matsuki, Katsuharu Fukuhara
 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 2,3-dibromosuccinic acid ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μ g / plate)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9 Mix (-)	0	129	123	120	15	15	12	31	29	23	29	55	46	5	12	6
		(124 \pm 4.6)			(14 \pm 1.7)			(28 \pm 4.2)			(43 \pm 13.2)			(8 \pm 3.8)		
	156.3	114	140	109	18	6	9	21	26	19	48	60	50	9	9	7
		(121 \pm 16.6)			(11 \pm 6.2)			(22 \pm 3.6)			(53 \pm 6.4)			(8 \pm 1.2)		
	312.5	115	131	115	13	10	18	22	24	34	32	34	31	4	12	12
		(120 \pm 9.2)			(14 \pm 4.0)			(27 \pm 6.4)			(32 \pm 1.5)			(9 \pm 4.6)		
	625	120	109	118	15	11	11	18	32	22	34	28	32	8	8	7
	(116 \pm 5.9)			(12 \pm 2.3)			(24 \pm 7.2)			(31 \pm 3.1)			(8 \pm 0.6)			
1250	105	119	121	11	13	9	32	18	24	35	35	33	7	7	7	
	(115 \pm 8.7)			(11 \pm 2.0)			(25 \pm 7.0)			(34 \pm 1.2)			(7 \pm 0.0)			
2500	125	101	116	10	8	14	40	22	30	26	29	30	10	9	5	
	(114 \pm 12.1)			(11 \pm 3.1)			(31 \pm 9.0)			(28 \pm 2.1)			(8 \pm 2.6)			
5000	0*	0*	0*	10*	0*	0*	0*	0*	0*	18*	20*	14*	0*	0*	0*	
	(0 \pm 0.0)			(3 \pm 5.8)			(0 \pm 0.0)			(17 \pm 3.1)			(0 \pm 0.0)			
S9 Mix (+)	0	125	132	129	15	12	16	18	39	25	56	41	38	9	12	12
		(129 \pm 3.5)			(14 \pm 2.1)			(27 \pm 10.7)			(45 \pm 9.6)			(11 \pm 1.7)		
	312.5	149	131	131	23	9	11	18	19	28	40	52	45	11	13	12
		(137 \pm 10.4)			(14 \pm 7.6)			(22 \pm 5.5)			(46 \pm 6.0)			(12 \pm 1.0)		
	625	120	150	130	10	19	17	21	31	34	55	53	55	12	16	12
		(133 \pm 15.3)			(15 \pm 4.7)			(29 \pm 6.8)			(54 \pm 1.2)			(13 \pm 2.3)		
	1250	131	125	109	15	18	23	27	23	40	44	47	47	7	18	9
	(122 \pm 11.4)			(19 \pm 4.0)			(30 \pm 8.9)			(46 \pm 1.7)			(11 \pm 5.9)			
2500	128	129	158	22	20	11	23	16	23	61	49	58	11	7	12	
	(138 \pm 17.0)			(18 \pm 5.9)			(21 \pm 4.0)			(56 \pm 6.2)			(10 \pm 2.6)			
5000	114	120	127	17	22	15	31	38	14	59	36	48	16	7	11	
	(120 \pm 6.5)			(18 \pm 3.6)			(28 \pm 12.3)			(48 \pm 11.5)			(11 \pm 4.5)			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μ g / plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	410	373	394	122	126	106	168	134	154	545	502	555	1818	1698	1982
		(392 \pm 18.6)			(118 \pm 10.6)			(152 \pm 17.1)			(534 \pm 28.2)			(1833 \pm 142.6)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μ g / plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	439	599	620	211	181	192	860	829	726	235	277	222	171	175	155
		(553 \pm 99.0)			(195 \pm 15.2)			(805 \pm 70.1)			(245 \pm 28.7)			(167 \pm 10.6)		

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 above 98%.

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 2,3-dibromosuccinic acid ** on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μ g /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9Mix (-)	0	119	100	110	9	9	14	20	19	22	30	31	28	10	5	9
		(110 \pm 9.5)			(11 \pm 2.9)			(20 \pm 1.5)			(30 \pm 1.5)			(8 \pm 2.6)		
	156.3	90	135	104	12	15	12	27	32	26	20	27	32	6	6	6
		(110 \pm 23.0)			(13 \pm 1.7)			(28 \pm 3.2)			(26 \pm 6.0)			(6 \pm 0.0)		
	312.5	109	131	110	13	9	16	19	19	21	26	28	23	10	9	10
		(117 \pm 12.4)			(13 \pm 3.5)			(20 \pm 1.2)			(26 \pm 2.5)			(10 \pm 0.6)		
	625	124	126	135	23	14	15	21	24	14	23	22	24	8	8	5
	(128 \pm 5.9)			(17 \pm 4.9)			(20 \pm 5.1)			(23 \pm 1.0)			(7 \pm 1.7)			
S9Mix (-)	1250	125	117	134	10	12	12	19	26	20	31	28	40	8	7	2
		(125 \pm 8.5)			(11 \pm 1.2)			(22 \pm 3.8)			(33 \pm 6.2)			(6 \pm 3.2)		
	2500	122	106	124	16	22	13	16	17	27	25	25	26	6	8	4
	(117 \pm 9.9)			(17 \pm 4.6)			(20 \pm 6.1)			(25 \pm 0.6)			(6 \pm 2.0)			
	5000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
		(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)		
S9Mix (+)	0	109	136	131	18	9	12	16	19	25	37	45	39	10	10	11
		(125 \pm 14.4)			(13 \pm 4.6)			(20 \pm 4.6)			(40 \pm 4.2)			(10 \pm 0.6)		
	312.5	130	124	123	14	12	10	21	28	14	31	33	36	17	15	13
		(126 \pm 3.8)			(12 \pm 2.0)			(21 \pm 7.0)			(33 \pm 2.5)			(15 \pm 2.0)		
	625	102	126	143	17	16	10	22	20	13	38	42	31	10	15	12
		(124 \pm 20.6)			(14 \pm 3.8)			(18 \pm 4.7)			(37 \pm 5.6)			(12 \pm 2.5)		
	1250	140	122	120	18	12	21	21	17	24	32	34	30	12	8	17
	(127 \pm 11.0)			(17 \pm 4.6)			(21 \pm 3.5)			(32 \pm 2.0)			(12 \pm 4.5)			
S9Mix (+)	2500	125	128	119	16	11	19	25	31	19	36	37	40	14	13	11
		(124 \pm 4.6)			(15 \pm 4.0)			(25 \pm 6.0)			(38 \pm 2.1)			(13 \pm 1.5)		
	5000	123	113	128	15	14	17	23	18	25	25	48	27	14	14	17
		(121 \pm 7.6)			(15 \pm 1.5)			(22 \pm 3.6)			(33 \pm 12.7)			(15 \pm 1.7)		
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μ g /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	441	413	419	127	147	161	122	128	144	495	500	501	2204	2208	2290
		(424 \pm 14.7)			(145 \pm 17.1)			(131 \pm 11.4)			(499 \pm 3.2)			(2234 \pm 48.5)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μ g /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	724	674	713	217	226	229	864	856	888	286	253	282	149	128	117
		(704 \pm 26.3)			(224 \pm 6.2)			(869 \pm 16.7)			(274 \pm 18.0)			(131 \pm 16.3)		

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 above 98%.

2,3-ジブロモコハク酸の 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 2,3-Dibromosuccinic acid on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

OECD 既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、2,3-ジブロモコハク酸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/U, 以下CHLと略す) を用いて試験管内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、細胞増殖抑制試験を行ったところ、直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は1.3 mg/mlであった。一方、代謝活性化法のS9mix存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は2.1 mg/mlであった。また、S9mix非存在下では2.8 mg/ml (10 mM) の濃度においても50%を越える増殖抑制は認められなかった。従って、染色体異常試験において、直接法では1.3 mg/ml、代謝活性化法では10 mMに相当する2.8 mg/mlの処理濃度をそれぞれ高濃度とし、その1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として用いた。

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、すべての処理群において染色体の構造異常や倍數性細胞の誘発作用は認められなかった。また、代謝活性化法におけるS9mix存在下の最高処理濃度 (2.8 mg/ml) では細胞毒性のために染色体分析ができなかったが、S9mix存在下のその他の処理群および非存在下においては、染色体の構造異常や倍數性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より2,3-ジブロモコハク酸は、上記の試験条件下で試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

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) したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL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, ロット番号: IC2073) を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10⁴個のCHL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℃のCO₂ インキューベーター (5% CO₂) 内で培養した。

直接法では、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、代謝活性化法では、細胞播種3日目にS9mixの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

2,3-ジブロモコハク酸 (CAS No.: 526-78-3, ロット番号: 20831, マナック(株)製造, (社)日本化学工業協会提供) は白色の粉末で、水、ジメチルスルホキシドおよびアセトンに可溶である。分子式 C₄H₄Br₂O₄, 分子量 275.88, 融点250℃以上の物質で、純度は98%以上である。原体は室温で安定であり、溶媒中 (アセトン) での安定性試験では、0.7812~233.5 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。溶媒はアセトン (和光純薬工業(株), ロット番号: DCK1899) 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、培養液の1% (v/v) になるように加えたが、染色体異常試験における代謝活性化法では1.2% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験の直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群の調製液の濃度は、すべて許容範囲内 (平均含量が添加量の85%以上) の値であった。

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細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計 (Monocellater, オリンパス光学工業(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、2,3-ジブロモコハク酸の約50%の増殖抑制を示す濃度を、50%をはさむ2濃度の値より算出したところ、直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は1.3 mg/mlであった。一方、代謝活性化法のS9mix存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は2.1 mg/mlであった。また、S9mix非存在下では2.8 mg/ml (10 mM) の濃度においても50%を越える増殖抑制は認められなかった (Fig. 1)。

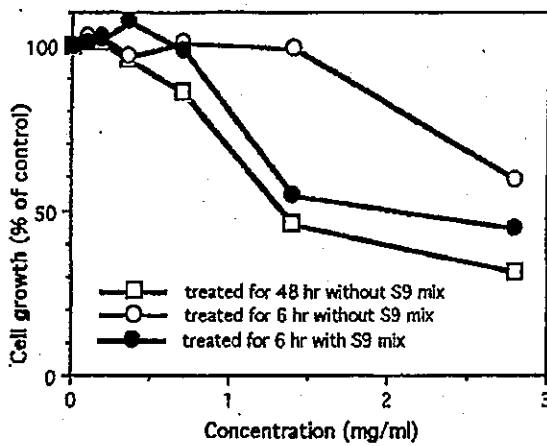


Fig.1 Growth inhibition of CHL cells treated with 2,3-dibromosuccinic acid

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、直接法では1.3 mg/ml、代謝活性化法では10mMに相当する2.8 mg/ml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。

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。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で約10分間染色した。

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、複数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(polyploid)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の有意差検定を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、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

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。2,3-ジプロモコはく酸を加えて24時間および48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出現頻度に有意な増加は認められなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した。S9mix非存在下の最高処理濃度群(2.8 mg/ml)では、倍数性細胞の出現頻度に有意な増加(p=0.0154)がみられたが、その頻度は0.75%であり、背景データとの比較および石館らの判定基準では陰性となった。また、S9mix存在下の最高処理濃度群(2.8 mg/ml)においては、増殖抑制のため染色体分析ができなかったが、その他のS9mix存在下および非存在下の6時間処理群においては、いずれも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。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with 2,3-dibromosuccinic acid** 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	(%)
Control			200	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
Solvent ¹⁾	0	24	200	2	1	0	2	0	0	0	5	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.25		
DBS	0.3	24	200	2	1	0	3	0	0	0	6	2	6 (3.0)	4 (2.0)	0.25	-	-
DBS	0.7	24	200	2	3	1	1	0	0	0	7	0	7 (3.5)	5 (2.5)	0.25	-	-
DBS	1.3	24	200	0	1	0	0	0	1	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.88	-	-
MC	0.00005	24	200	20	72	170	4	2	4	0	272	6	137 *(68.5)	133 *(66.5)	0.25	+	-
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	10	10	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
DBS	0.3	48	200	0	0	0	2	0	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-
DBS	0.7	48	200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	-	-
DBS	1.3	48	200	0	1	0	4	0	0	0	5	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25	-	-
MC	0.00005	48	200	6	65	241	10	5	12	50	389	30	144 *(72.0)	143 *(71.5)	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) Acetone 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 more than 98.0%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2,3-dibromosuccinic acid** 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	(%)
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00			
DBS	0.7	-	6-(18)	200	0	1	2	0	0	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.50	-	-	
DBS	1.4	-	6-(18)	200	2	1	0	0	0	1	0	4	3 (1.5)	1 (0.5)	0.13	-	-	
DBS	2.8	-	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.75 *	-	-	
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	0	0	2	2	1	0	6	5 (2.5)	4 (2.0)	0.50	-	-	
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38			
DBS	0.7	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	-	-	
DBS	1.4	+	6-(18)	200	1	1	1	0	0	1	0	4	4 (2.0)	3 (1.5)	0.88	-	-	
DBS	2.8	+	6-(18)	0												Tox	Tox	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	13	75	157	4	1	2	0	252	4	116 *(58.0)	110 *(55.0)	0.00	+	-

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, Tox : toxicity. 1) Acetone 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 more than 98.0%.

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, 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, 1987.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
試験担当者: 山影康次, 佐々木澄志,
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, Kiyoshi Sasaki,
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