

5) 剖検所見

死亡した150 mg/kg群の雄1例, 450 mg/kg群の雄3例および雌1例では, 所見として胃の前胃潰瘍が450 mg/kg群の雄で3例, 胃の前胃粘膜肥厚が450 mg/kg群の雌雄で各1例, 胃の腺胃赤色化が450 mg/kg群の雄で1例, 胃の腺胃赤色斑点が450 mg/kg群の雌で1例, 胃の内腔拡張が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌雄で各1例, 小腸の内腔拡張が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌雄で各1例, 大腸の内腔拡張が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌雄でそれぞれ1, 1および3例, 胸腺の萎縮が150および450 mg/kg群の雄で各1例, 胸腺の赤色化が450 mg/kg群の雄で2例, 鼻腔の粘液性内容物が150 mg/kg群の雄で1例, 全身の削瘦が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌で各1例, 脾臓の萎縮が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌で各1例, 肺の赤色化が450 mg/kg群の雄で1例, 肝臓の白色斑点が450 mg/kg群の雌で1例, 精囊の萎縮が150 mg/kg群の雄で1例および子宮の小型化が450 mg/kg群の雌で1例に観察された。

雄では, 死亡動物を除く対照群, 50, 150および450 mg/kg群の12, 12, 11および9例について剖検を行った。その結果, 450 mg/kg群で胃の前胃潰瘍が9例に認められ, 対照群に比べ有意に発生数が増加した。なお, 前胃潰瘍の9例中6例では, 周囲組織との癒着も認められた。その他, 自然発生と考えられる肺の褐色斑点, 副腎の褐色斑点, 被毛の菲薄化および腎臓の嚢胞が対照群および450 mg/kg群で少数例に認められた。

自然分娩した雌では, 対照群, 50, 150および450 mg/kg群の11, 12, 12および11例について剖検を行った。その結果, 450 mg/kg群で胃の前胃潰瘍が9例, 胸腺の萎縮が6例に認められ, いずれの所見も対照群に比べ有意に発生数が増加した。なお, 前胃潰瘍は9例中3例で周囲組織との癒着も認められた。また, 同群で胃の前胃粘膜肥厚が3例, 脾臓の肥大が1例に認められた。その他, 自然発生と考えられる肺の褐色斑点, 腎臓の癒痕, 被毛の菲薄化, 肝臓の白色斑点および卵巣の嚢胞が対照群, 150および450 mg/kg群で少数例に散見された。

妊娠25日までに分娩が認められなかった対照群の1例では, 所見として子宮の黒色斑点および内腔拡張が観察された。なお, この動物の子宮内に死亡胎児が1例認められた。

6) 病理組織学検査 (Table 2, 3)

途中死亡した150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌雄では, 異常病変部組織, 胸腺, 胃, 副腎, 精巣, 精巣上体, 卵巣, 子宮および陰について病理組織学検査を行った。その結果, 前胃潰瘍および角化亢進を伴った胃の前胃扁平上皮増生がそれぞれ450 mg/kg群の雄で3例, 胃の腺胃潰瘍および腺胃粘膜下織線維化が450 mg/kg群の雌で1例, 胃の腺胃粘膜下織出血および浮腫が450 mg/kg群の雄で1例, 胃の粘膜鬱血が450 mg/kg群の雌で1例に認められた。また, 副腎皮質の瀰漫性増生が150および450 mg/kg群の雄で1および3例, 副腎皮

質の空胞変性が450 mg/kg群の雄で1例, 脾臓の萎縮が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌で各1例, 胸腺皮質の萎縮が150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌雄で各1例, 胸腺の鬱血が450 mg/kg群の雄で2例, 胸腺の出血が450 mg/kg群の雄で1例, 肺の鬱血が450 mg/kg群の雄で1例および肝臓の巣状壊死が450 mg/kg群の雌で1例に認められた。

雄では, 対照群および450 mg/kg群の精巣および精巣上体, 被験物質投与の影響が疑われた器官組織である胸腺, 胃および副腎, さらに, 肉眼所見で認められた異常病変部組織全てについて病理組織学検査を行った。その結果, 450 mg/kg群で胃の前胃潰瘍および角化亢進を伴った前胃扁平上皮増生が全例(9例), 副腎皮質の瀰漫性増生が7例に認められ, いずれの所見も対照群に比べて有意に発生率が増加した。観察された胃の前胃潰瘍を程度分けして評価したところ, 軽度1例, 中等度2例および高度6例で対照群に比べ高度の所見が有意に増加した。また, 副腎皮質の空胞変性が対照群, 50, 150および450 mg/kg群でそれぞれ6, 6, 2および1例, 過剰分泌化を伴った肺の細気管支上皮杯細胞化生が450 mg/kg群で1例, 肺の局所的気管支肺炎が対照群および450 mg/kg群で各1例および腎臓の嚢胞が対照群で2例に認められた。

自然分娩した雌では, 対照群および450 mg/kg群の卵巣, 被験物質投与の影響が疑われた器官組織である胸腺, 胃および副腎, さらに, 肉眼所見で認められた異常病変部組織全てについて病理組織学検査を行った。その結果, 450 mg/kg群で胃の前胃潰瘍が9例, 角化亢進を伴った前胃扁平上皮増生が10例および副腎皮質の瀰漫性増生が8例に認められ, いずれの所見も対照群に比べて統計学的に有意に発生率が増加した。雄同様, 胃の前胃潰瘍を程度分けして評価したところ, 中等度4例および高度5例で対照群に比べ高度の所見が有意に増加した。また, 胃の前胃粘膜下織線維化が450 mg/kg群で2例, 胃の前胃粘膜下織浮腫が450 mg/kg群で1例, 脾臓の白脾髄増生が450 mg/kg群で1例, 胸腺皮質の萎縮が対照群, 50および450 mg/kg群でそれぞれ2, 1および6例, 肺の局所的気管支肺炎および局所的泡沫細胞集簇が450 mg/kg群で各1例, マクロファージ集簇を伴った肝臓の局所的皮膜肥厚が対照群で1例, 卵巣の嚢胞が対照群で2例に認められた。

妊娠25日剖検の雌(自然分娩の認められなかった雌)では, 子宮について病理学的検査を行った。その結果, 子宮内腔内に局所的出血が認められた。

2. 生殖発生毒性

1) 交尾および受胎能 (Table 4)

交尾および受胎は, すべての群で全例成立した。なお, 450 mg/kg群で妊娠2日に死亡した動物は受胎の集計に含めなかった。

性周期観察では, 平均性周期に対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。異常性周期を示す動物が対照群, 150および450 mg/kg群でそれぞれ2例,

50 mg/kg群で1例認められたが、異常性周期発現率に対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

## 2) 分娩および哺育 (Table 5)

分娩状態に異常は観察されなかった。各群の妊娠期間、黄体数、着床痕数、出産児数および出產生児数はほぼ同様な値を示し、出産率、着床率、出生率、性比および新生児の4日の生存率に対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

## 3) 新生児の形態、体重および剖検所見

新生児の外表検査では、450 mg/kg群で矮小児が1例認められたのみであり、被験物質投与の影響は認められなかった。

哺育0および4日の体重では、雌雄ともに対照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。

哺育期間中の死亡児の剖検では、被験物質投与の影響と考えられる所見は認められず、胸腺頸部残留が対照群の雄1例および450 mg/kg群の雌1例に観察されたのみであった。

哺育4日の剖検では、被験物質投与の影響と考えられる所見は認められず、胸腺頸部残留が雄の対照群、50、450 mg/kg群および雌の50 mg/kg群でそれぞれ5、3、2および1例に観察された。その他、肝臓の白色斑点、黒色斑点、横隔膜との癒着、黄色化および奇形結節、腎臓の腎盂拡大、腎臓位置異常、眼球の赤色化および皮膚の外傷が各群で散発的に認められた。

## 考察

### 1. 反復投与毒性

被験物質投与による影響と考えられる死亡が、150 mg/kg群の雄および450 mg/kg群の雌雄で認められた。また、死亡動物を含め一般状態の変化として流涎、鼻音、不整呼吸、腹部膨満および鼻分泌物が認められ、被験物質投与の影響が疑われた。鼻音、不整呼吸および鼻分泌物については、対応する明確な剖検あるいは組織所見は観察されていないが、150 mg/kg群の雄の死亡例に剖検所見で鼻腔の粘性内容物貯留が、また、450 mg/kg群の雄の計画解剖例に組織学検査で過剰分泌化を伴った気管支上皮の杯細胞化生が、それぞれ単発性ながら観察されており、被験物質投与による呼吸器系への粘液分泌亢進の誘発が疑われた。腹部膨満については、剖検の結果から消化管の内腔拡張によるものと確認された。この消化管の内腔拡張は、死亡動物の剖検で全例に認められており、被験物質投与に起因する呼吸器系変化(鼻音等)と関連した何らかの呼吸障害のために、開口呼吸による空気の誤嚥を招いたもので、死因にも関与した変化と考えられた。流涎は発現時期、匹数および継続時間から被験物質の用量に関連して増強すると判断した。なお、150 mg/kg群の雌で認められた流涎は1例であり、しかも妊娠2日の投与直後にのみ一過性に発現していることから偶発的な変化と判断し、被験物質投与の影響とは考えな

かった。

体重では、450 mg/kg群の雌雄で投与開始以降低値を示し、被験物質投与による体重増加抑制が認められた。また、摂餌量でも、450 mg/kg群の雄で投与開始以降、雌で投与期間の前半に低値を示し、被験物質投与の影響が認められた。

一般状態、体重および摂餌量の変化から、被験物質の作用には雌雄差があり、雌に比べ雄に強く影響が発現していると考えられた。

病理学検査では、生殖器系に対して被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。なお、450 mg/kg群の雄で認められた精巣の相対重量の高値は、実重量、剖検および組織所見で異常は認められないことから、低体重に起因した変化と判断した。450 mg/kg群の雌雄に認められた前胃の潰瘍、角化亢進を伴った扁平上皮増生、粘膜下織の線維化等の諸所見は、被験物質が強い刺激性の性状を有することから、前胃粘膜への直接的刺激作用による腐食性ならびに反応性変化と考えられ、中でも粘膜の刺激が強く認められた例では、前胃の潰瘍による炎症反応が漿膜にまで拡大した結果、周囲組織との癒着が生じたものと思われた。450 mg/kg群の雌の1例に観察された脾臓白脾髄の増生は、前胃の炎症に対する反応と考えられ、被験物質投与による二次的な影響と判断された。また、同群の雌雄で胸腺重量が低値、副腎重量が高値を示し、これらの重量変化に対応すると考えられる組織所見として、胸腺については皮質の萎縮が主に雌に、副腎については皮質の瀰漫性増生が雌雄に認められたが、被験物質投与の直接作用による影響であるかは明確でなかった。しかしながら、胸腺あるいは副腎に所見の認められた動物には共通して胃にも病変が認められることから、胃の病変に起因した生体負荷による変化とも考えられた。

以上のことから、本試験条件下における1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンの親動物に対する無影響量は、雄では50 mg/kg/day、雌では150 mg/kg/dayと判断された。

### 2. 生殖発生毒性

平均性周期、異常性周期発現率、交尾率、受胎率、妊娠期間、妊娠黄体数、着床痕数、出産児数、出產生児数、性比、哺育4日生児数、出産率、着床率、出生率および新生児の4日の生存率に被験物質投与の影響は認められなかった。また、新生児の外表検査でも被験物質投与の影響は認められず、体重にも群間差は認められなかった。死亡児および哺育4日の剖検では、被験物質投与によると考えられる異常所見は観察されなかった。

以上のことから、1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンの生殖能および次世代児に対する影響はともに450 mg/kg/day投与によっても認められず、無影響量は450 mg/kg/dayと判断された。

文献

- 1) 伊藤義彦, 化学物質毒性試験報告, **3**, 387(1996).
- 2) S. Gad and C. S. Weil, "Statistics and Experimental Design For Toxicologists," Telford Press, New Jersey, 1986, pp.43-45.
- 3) 佐野正樹, 医薬安全性研究会会報, **32**, 21(1990).
- 4) M. Yoshida, *J. Japanese Soc. Comp. Statist.*, **1**, 111 (1988).
- 5) 佐久間昭, "薬効評価 I -計画と解析-", 東京大学出版会, 東京, 1977, pp.109-117.
- 6) 石居進, "生物統計学入門," 培風館, 東京, 1975, pp.78-107.

連絡先

試験責任者: 伊藤圭一  
試験担当者: 森山知通, 伊賀達也, 木原 亨  
(財)食品農医薬品安全性評価センター  
〒437-1213 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜  
582-2  
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Keiichi Ito (Study director)  
Tomomichi Moriyama, Tatsuya Iga,  
Tohru Kihara  
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)  
582-2 Shioshinden Arahama, Fukude-cho, Iwata-  
gun, Shizuoka, 437-1213, Japan  
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 1,3-bis(aminomethyl)benzene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level		0 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg	450 mg/kg
<b>Male</b>					
No. of animals examined		12	12	11	9
Body weight	(g)	509 ± 31	510 ± 28	510 ± 45	440 ± 19**
Absolute organ weight					
Thymus	(mg)	277 ± 73	325 ± 71	300 ± 72	199 ± 60*
Adrenals	(mg)	63 ± 9	64 ± 9	63 ± 11	90 ± 14**
Testes	(g)	3.39 ± 0.22	3.53 ± 0.38	3.48 ± 0.20	3.26 ± 0.14
Epididymides	(mg)	1262 ± 84	1350 ± 104	1245 ± 110	1197 ± 112
Relative organ weight					
Thymus	(mg%)	54.23 ± 13.22	63.88 ± 14.15	58.74 ± 12.93	45.09 ± 13.43
Adrenals	(mg%)	12.38 ± 1.93	12.44 ± 1.64	12.32 ± 1.74	20.53 ± 3.26**
Testes	(g%)	0.67 ± 0.05	0.69 ± 0.09	0.69 ± 0.08	0.74 ± 0.03**
Epididymides	(mg%)	248.40 ± 20.66	265.02 ± 22.62	245.94 ± 30.64	271.65 ± 22.20
<b>Female</b>					
No. of animals examined		11	12	12	11
Body weight	(g)	316 ± 28	313 ± 18	306 ± 25	296 ± 17
Absolute organ weight					
Thymus	(mg)	130 ± 56	144 ± 55	116 ± 44	81 ± 23*
Adrenals	(mg)	83 ± 8	80 ± 12	79 ± 10	93 ± 10
Relative organ weight					
Thymus	(mg%)	40.25 ± 14.43	45.52 ± 16.26	37.52 ± 13.51	27.56 ± 8.16
Adrenals	(mg%)	26.37 ± 3.62	25.70 ± 3.85	25.99 ± 3.87	31.45 ± 3.52**

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$

Table 2 Summary of histological findings with statistical analysis treated orally with 1, 3-bis(aminomethyl)benzene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Organ	Dose level (mg/kg)	Male animals				Female animals			
		0	50	150	450	0	50	150	450
Findings	No. of animals necropsied	12	12	11	9	11	12	12	11
<b>HEMATOPOIETIC SYSTEM</b>									
spleen									
hyperplasia		-	-	-	-	-	-	-	1
thymus									
atrophy		0	0	0	0	2	1	0	6
<b>RESPIRATORY SYSTEM</b>									
lung									
accumulation of foamy cells		0	-	-	0	-	-	-	1
bronchopneumonia		1	-	-	1	-	-	-	1
goblet cell metaplasia		0	-	-	1	-	-	-	0
<b>DIGESTIVE SYSTEM</b>									
stomach									
edema		0	0	0	0	0	0	0	1
ulcer, forestomach		0	0	0	9**	0	0	0	9**
fibrosis		0	0	0	0	0	0	0	2
squamous hyperplasia		0	0	0	9**	0	0	0	10**
liver									
capsular thickening		-	-	-	-	1	-	-	-
<b>URINARY SYSTEM</b>									
kidney									
cyst		2	-	-	-	-	-	0	-
<b>REPRODUCTIVE SYSTEM</b>									
ovary									
cyst, brusa		-	-	-	-	2	-	-	0
<b>ENDOCRINE SYSTEM</b>									
adrenal gland									
degeneration, vacuolar		6	6	2	1	0	0	0	0
hyperplasia, cortex		0	0	0	7**	0	0	0	8**

( ): No. of animals examined microscopically at this site. -: Not applicable.  
Significant difference from control group; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$



Table 4 Summary of reproductive performance in rats treated orally with 1,3-bis(aminomethyl)benzene in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg	450 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs copulated	12	12	12	12
No. of pregnant females	12	12	12	11 <sup>c</sup>
Copulation index (%) <sup>a</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0
Fertility index (%) <sup>b</sup>	100.0	100.0	100.0	100.0(11/11) <sup>c</sup>
Estrus cycle				
No. of animals examined	12	12	12	12
Mean estrus cycle(days, Mean ± S.D.)	4.5 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.6(11)	4.2 ± 0.3(11)
Irregular cycle <sup>c</sup> (%) <sup>d</sup>	2(16.7)	1( 8.3)	2(16.7)	2(16.7)

a) (No. of animals with successful copulation/no. of animals mated)×100

b) (No. of pregnant animals/no. of animals with successful copulation)×100

c) No. of animals having irregular estrus cycles

d) (No. of animals having irregular estrus cycles/no. of animals examined)×100

e) Excludes the dead female from the calculation, because the pregnancy or non-pregnancy status could not be determined at Day 2 of gestation

Values in parentheses are expressed no. of animals observed

Significant difference from control group; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$

Table 5 Findings of delivery in dams treated orally with 1,3-bis(aminomethyl)benzene and observations on their pups (F<sub>1</sub>) in the preliminary reproduction toxicity screening test

Dose level	0 mg/kg	50 mg/kg	150 mg/kg	450 mg/kg
No. of dams observed	12	12	12	11
No. of dams delivered live pups	11	12	12	11
Duration of gestation (Mean ± S.D.)	22.6 ± 0.5	22.7 ± 0.7	22.6 ± 0.5	22.5 ± 0.5
No. of total corpora lutea (Mean ± S.D.)	225(18.8 ± 1.9)	236(19.7 ± 2.9)	237(19.8 ± 4.1)	199(18.1 ± 4.4)
No. of total implants (Mean ± S.D.)	192(16.0 ± 5.2)	190(15.8 ± 2.5)	199(16.6 ± 1.4)	175(15.9 ± 1.8)
No. of total pups born (Mean ± S.D.)	176(16.0 ± 2.1)	170(14.2 ± 3.0)	179(14.9 ± 2.1)	163(14.8 ± 2.1)
No. of total live pups born (Mean ± S.D.)	173(15.7 ± 2.3)	170(14.2 ± 3.0)	179(14.9 ± 2.1)	161(14.6 ± 1.9)
Male	89( 8.1 ± 2.3)	97( 8.1 ± 2.9)	89( 7.4 ± 2.2)	80( 7.3 ± 1.6) <sup>f</sup>
Female	84( 7.6 ± 2.5) <sup>f</sup>	73( 6.1 ± 1.6)	90( 7.5 ± 1.7)	81( 7.3 ± 2.1) <sup>f</sup>
Sex ratio(Male/Female, Mean ± S.D.)	1.29 ± 0.97	1.45 ± 0.73	1.06 ± 0.46	1.08 ± 0.45
No. of total live pups on day 4 (Mean ± S.D.)				
Male	86( 7.8 ± 2.6)	92( 7.7 ± 2.5)	83( 6.9 ± 2.4)	78( 7.1 ± 1.4)
Female	83( 7.5 ± 2.6)	69( 5.8 ± 1.7)	84( 7.0 ± 2.0)	72( 6.5 ± 1.4)
No. of total dead pups (Mean ± S.D.)	3( 0.3 ± 0.5)	0( 0.0 ± 0.0)	0( 0.0 ± 0.0)	2( 0.2 ± 0.6)
No. of total cannibalism (Mean ± S.D.)	0( 0.0 ± 0.0)	0( 0.0 ± 0.0)	0( 0.0 ± 0.0)	0( 0.0 ± 0.0)
Gestation index (%) <sup>a</sup>	91.7	100.0	100.0	100.0
Implantation index(% , Mean ± S.D.) <sup>b</sup>	84.3 ± 25.8	81.4 ± 14.1	86.4 ± 13.9	90.8 ± 14.3
Delivery index(% , Mean ± S.D.) <sup>c</sup>	92.8 ± 10.9	89.3 ± 10.1	90.0 ± 10.4	92.9 ± 4.7
Live birth index(% , Mean ± S.D.) <sup>d</sup>	98.1 ± 3.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	99.0 ± 3.4
Viability index on day 4(% , Mean ± S.D.) <sup>e</sup>				
Male	95.6 ± 10.0	96.5 ± 9.2	92.2 ± 11.7	97.9 ± 4.8
Female	98.2 ± 6.0	94.4 ± 12.0	92.9 ± 15.4	90.6 ± 11.7

a) (No. of females with live pups/no. of pregnant females)×100

b) (No. of implants/no. of corpora lutea)×100

c) (No. of pups born/no. of implants)×100

d) (No. of live pups born/no. of pups born)×100

e) (No. of live pups on day 4 after birth/no. of live pups born)×100

f) Includes pups found after the day of delivery

Significant difference from control group; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$

# 1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 1,3-Bis(aminomethyl)benzene on Bacteria

### 要約

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンについて、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<sup>1)</sup> および *Escherichia coli* WP2 uvrA<sup>2)</sup> 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、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、1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンは、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。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〕

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼン(CAS No 1477-55-0)は、分子量136.22の無色透明液体である。純度99.8%のもの(ロット番号: 30817, 不純物として水分0.018%を含

む、三菱瓦斯化学(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、使用時まで冷暗所に保管した。

被験物質は、純水に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。

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンの純水中での安定性試験を、当研究所で同時に実施した染色体異常試験での低濃度(0.825 mg/ml)および本試験での高濃度(50.00 mg/ml)の2濃度について、冷蔵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、98.6および96.2%であった。

また、本試験II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104~107%、50 mg/ml溶液は、100~104%であった。以上の結果から、1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンは純水中では安定であり、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 混液 (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 およびトッパアガー 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純水、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℃ 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〕

1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンについて、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、添加試験ともに抗菌性が認められなかった。

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、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。1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンについて、すべての検定菌について、S9 Mix 無添加、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、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。

以上の結果に基づき、1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼンは、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, 加藤基恵,  
 川上久美子, 松木容彦,  
 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,  
 Motoe Katoh, 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 2 Results of reverse mutation test ( II ) of 1,3-Bis(aminomethyl)benzene\*\* on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ( $\mu\text{g}$ /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	136	127	127	9	14	15	28	18	23	24	22	23	15	6	12	
		( 130 $\pm$ 5.2 )			( 13 $\pm$ 3.2 )			( 23 $\pm$ 5.0 )			( 23 $\pm$ 1.0 )			( 11 $\pm$ 4.6 )			
	312.5	134	136	123	10	8	9	25	22	20	16	16	23	2	9	7	
		( 131 $\pm$ 7.0 )			( 9 $\pm$ 1.0 )			( 22 $\pm$ 2.5 )			( 18 $\pm$ 4.0 )			( 6 $\pm$ 3.6 )			
	625	146	140	145	16	12	17	22	35	20	26	26	20	10	5	5	
		( 144 $\pm$ 3.2 )			( 15 $\pm$ 2.6 )			( 26 $\pm$ 8.1 )			( 24 $\pm$ 3.5 )			( 7 $\pm$ 2.9 )			
	1250	126	139	119	14	15	10	27	21	26	17	30	33	5	9	11	
	( 128 $\pm$ 10.1 )			( 13 $\pm$ 2.6 )			( 25 $\pm$ 3.2 )			( 27 $\pm$ 8.5 )			( 8 $\pm$ 3.1 )				
2500	151	157	161	9	11	7	27	20	34	20	20	16	4	8	11		
	( 156 $\pm$ 5.0 )			( 9 $\pm$ 2.0 )			( 27 $\pm$ 7.0 )			( 19 $\pm$ 2.3 )			( 8 $\pm$ 3.5 )				
5000	155	162	154	11	11	9	36	30	27	35	19	23	5	7	8		
	( 157 $\pm$ 4.4 )			( 10 $\pm$ 1.2 )			( 31 $\pm$ 4.6 )			( 26 $\pm$ 8.3 )			( 7 $\pm$ 1.5 )				
S9 Mix (+)	0	136	149	134	14	11	15	31	26	37	32	35	28	10	11	13	
		( 140 $\pm$ 8.1 )			( 13 $\pm$ 2.1 )			( 31 $\pm$ 5.5 )			( 32 $\pm$ 3.5 )			( 11 $\pm$ 1.5 )			
	312.5	130	130	139	10	7	14	32	36	22	33	29	28	8	16	16	
		( 133 $\pm$ 5.2 )			( 10 $\pm$ 3.5 )			( 30 $\pm$ 7.2 )			( 30 $\pm$ 2.6 )			( 13 $\pm$ 4.6 )			
	625	164	148	149	8	14	19	32	24	30	45	39	27	14	9	11	
		( 154 $\pm$ 9.0 )			( 14 $\pm$ 5.5 )			( 29 $\pm$ 4.2 )			( 37 $\pm$ 9.2 )			( 11 $\pm$ 2.5 )			
	1250	149	135	140	14	12	13	31	28	30	34	38	36	18	14	17	
	( 141 $\pm$ 7.1 )			( 13 $\pm$ 1.0 )			( 30 $\pm$ 1.5 )			( 36 $\pm$ 2.0 )			( 16 $\pm$ 2.1 )				
2500	140	148	175	10	8	9	31	31	29	40	35	29	16	11	14		
	( 154 $\pm$ 18.3 )			( 9 $\pm$ 1.0 )			( 30 $\pm$ 1.2 )			( 35 $\pm$ 5.5 )			( 14 $\pm$ 2.5 )				
5000	173	190	185	11	12	15	32	31	35	31	35	35	18	16	10		
	( 183 $\pm$ 8.7 )			( 13 $\pm$ 2.1 )			( 33 $\pm$ 2.1 )			( 34 $\pm$ 2.3 )			( 15 $\pm$ 4.2 )				
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ( $\mu\text{g}$ /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	628	660	662	185	195	234	221	210	221	758	843	888	1723	1542	1867	
		( 650 $\pm$ 19.1 )			( 205 $\pm$ 25.9 )			( 217 $\pm$ 6.4 )			( 830 $\pm$ 66.0 )			( 1711 $\pm$ 162.9 )			
	Number of colonies / plate	648	620	760	345	296	325	951	1175	1053	406	395	400	279	308	356	
		( 676 $\pm$ 74.1 )			( 322 $\pm$ 24.6 )			( 1060 $\pm$ 112.1 )			( 400 $\pm$ 5.5 )			( 314 $\pm$ 38.9 )			

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

\*\* : Purity was 99.8 % and H O (0.02 %) was contained as impurity.