

培養終了後、14.8.6.に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行い、さらに24時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

14.8.6. 処理量一覧

	溶媒および被験物質			陽性対照		
	培養液	S9 mix	処理液	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.03 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

14.8.7. 析出等の観察

各処理法において、処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.8.8. 標本の作製

染色体標本作製のおよそ2時間前に、最終濃度 0.2 µg/mL となるようコルセミド溶液 (Lot No. 1305832, Invitrogen) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25%トリプシン溶液 (Lot No. 1300409, Invitrogen) を用いてプレートより細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で5分間遠心分離して培養液を除いた後、37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液 5 mL を加え、37°C の条件下で16分間の低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。固定液を2回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とした。細胞密度を適切な濃度に調整し、細胞濃度確認のため染色体標本を1枚作製した。染色体メタフェーズ展開装置 (HANABI) を用いて、スライドガラス上に細胞浮遊液を1滴滴下し、染色体標本を2枚作製した。スライド標本は十分に乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8, Lot No. TP794874, Merck) を用いて1.2 v/v% に希釈したギムザ液 (Lot No. OB408561, Merck) で12分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

14.8.9. 相対細胞増殖率の測定

染色体標本作製時に陰性対照、各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて、ATP フォトメーター (ルミテスターC-100LU, キッコーマン) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理を開始した細胞液 50 µL を添加し、攪拌した。測定用チューブにこの混合液 100 µL を分注した。細胞液添加から約20分経過後、測定用チューブにATP測定用試薬キット(ルシフェール250, キッコーマン)の発光試薬液 100 µL を添加し、相対発光量(Relative Light Unit : RLU) を測定した。陰性対照群における RLU に対する比(相対細胞増殖率)

を各濃度群について求めた。

14.8.10. 評価対象

短時間処理法では、14.8.9.における相対細胞増殖率が陰性対照群の50%未満になる最も低い濃度を最高濃度とした3濃度を評価対象（観察濃度）とした。連続処理法24時間処理では、相対細胞増殖率が陰性対照群の50%未満になる濃度（120 µg/mL）では観察可能な分裂像が減少していたため、120 µg/mLを最高濃度とし、連続する4濃度を評価対象（観察濃度）とした。

14.8.11. 染色体の観察

短時間処理法および連続処理法のそれぞれの標本を分けてコード化した。短時間処理法について染色体の観察を実施し、その結果、陰性結果が得られたため、引き続き連続処理法の標本についても観察を行った。

各プレート当たり100個、すなわち、1濃度当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下（×600）で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ（gap）、染色分体切断（ctb）、染色分体切断（csb）、染色分体交換（cte）、染色体交換（cse）およびその他（oth）の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合は、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ、本来の軸からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として、1濃度当たり200個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

14.9. 試験成立条件

- a. 陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は、背景データから求めた基準値内であり、かつ、いずれも5%未満であること
- b. 陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は、上記の基準値内であり、かつ、10%以上であること

上記の条件を満たした場合に、試験は成立したと判断した。

14.10. 結果の解析

異常細胞の出現頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満、かつ、再現性が認められた場合に疑陽性、10%以上、かつ、再現性あるいは被験物質の濃度に依存性が認められた場合は、陽性と判定した。なお、ギャップのみ保有する細胞については、異常細胞数から除外して判定した。

統計学的手法を用いた検定は、実施しなかった。

15. 試験結果

15.1. 細胞増殖抑制試験

15.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示す.

短時間処理法-S9 処理および+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理の全てにおいて、濃度依存性を伴った細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、それぞれ 99.1, 33.2 および 106 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された.

15.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時、全ての処理の 62.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において白色粉末状の析出物が認められた. さらに、短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理では、125 および 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において白色膜状の析出物、501 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で白色油滴状の析出物も認められた. 短時間処理法+S9 処理では、125~501 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において白色膜状の析出物、1002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で白色油滴状の析出物が認められた.

被験物質処理終了時、短時間処理法の 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度および連続処理法 24 時間処理の 501 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において白色油滴状の析出物が認められた.

15.2. 染色体異常試験

15.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Table 3 および Appendix 1 に示す.

2-ナフチルイソブチルエーテル処理群での染色体構造異常出現頻度は、76.8, 96.0 および 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 0.0, 1.5 および 2.5%であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった. 倍数性細胞の出現頻度は、76.8, 96.0 および 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 0.0, 0.0 および 0.5%であり、陰性対照群 (0.0%) と同等であった. また、濃度に依存した細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での細胞増殖率は 24.1%であった.

陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 44.0%であった.

15.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Table 4 および Appendix 2 に示す.

2-ナフチルイソブチルエーテル処理群での染色体構造異常出現頻度は、16.1, 20.1 および 25.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 0.0, 0.0 および 1.5%であり、陰性対照群 (0.0%) と比較し明確な増加は認められなかった. 倍数性細胞の出現頻度は、16.1, 20.1 および 25.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 0.5, 0.0 および 1.0%であり、陰性対照群 (0.5%) と同等であった. また、

濃度に依存した細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 25.2 µg/mL での細胞増殖率は 40.2%であった。

陽性対照物質 CP で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 17.0%であった。

15.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Table 5 および Appendix 3 に示す。

2-ナフチルイソブチルエーテル処理群での染色体構造異常出現頻度は 61.4, 76.8, 96.0 および 120 µg/mL でそれぞれ 1.0, 0.5, 1.0 および 2.2%であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、61.4, 76.8, 96.0 および 120 µg/mL でそれぞれ 0.0, 0.0, 0.0 および 0.0%であり、陰性対照群 (0.5%) と同等であった。また、濃度に依存した細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 120 µg/mL での細胞増殖率は 40.3%であった。最高濃度の 120 µg/mL では強い分裂阻害がみられ、分析可能な分離中期像は 182 細胞であった。

陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 42.0%であった。

15.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始時、全ての処理法の 39.3µg/mL 以上の濃度において白色粉末状の析出物が認められた。さらに、短時間処理法-S9-処理および連続処理法 24 時間処理では、120 µg/mL 以上の濃度において白色膜状の析出物も認められた。

被験物質処理終了時、全ての処理法とも、析出は認められなかった。

16. 考察および結論

2-ナフチルイソプチルエーテルの染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理では, 細胞の増殖を 50%以上抑制する濃度まで検討した。

その結果, 2-ナフチルイソプチルエーテル処理群では, 短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理のいずれにおいても, 染色体異常の誘発頻度は, 陰性対照群と同等の値を示し, 明確な染色体構造異常の誘発は認められなかった。

短時間処理法において陰性と判定されたことから, 連続処理法 24 時間処理の染色体の観察を実施した。その結果, いずれの濃度においても明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも背景データ (Appendix 4) から求めた基準値内であり, 試験成立条件を満たしたことから, 当該試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から, 当該試験条件下において, 2-ナフチルイソプチルエーテルのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定された。

なお, これまでに2-ナフチルイソプチルエーテルの遺伝毒性および発がん性に関する報告はない。類縁体であるnaphthaleneは, 細菌およびヒト細胞株での遺伝子突然変異試験で陰性, CHO細胞, リンパ球および着床前のマウス胚を用いた染色体異常試験で陽性との報告がある¹⁾。さらに, マウス骨髄での染色体異常誘発は認められないが, ショウジョウバエの翅毛スポット試験で陽性反応が認められている¹⁾。1-Methylnaphthaleneおよび2-methylnaphthaleneは, ヒトリンパ球において姉妹染色分体交換を誘発し, さらに, 1-methylnaphthaleneは, 弱いながらも染色体異常も誘発すると報告されている²⁾。2-Naphthylamineは, マウス骨髄小核試験で明確な陽性反応がみられている³⁾。Glycidyl 1-naphthyl etherは, 細菌を用いた復帰変異試験で陽性⁴⁾, マウスリンパ球での染色体異常試験で陽性, マウス骨髄での染色体異常試験で陽性との報告もある⁵⁾

17. 参考文献

- 1) Schreiner CA.: Genetic toxicity of naphthalene: a review. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2003, 6(2): 161-183.
- 2) Kulka U, Schmid E, Huber R, Bauchinger M.; Analysis of the cytogenetic effect in human lymphocytes induced by metabolically activated 1- and 2-methylnaphthalene. Mutat. Res. 1988, 208(3-4): 155-158.
- 3) Mirkova E, Ashby J.: Activity of the human carcinogens benzidine and 2-naphthylamine in male mouse bone marrow micronucleus assays. Mutagenesis 1988 Sep, 3(5): 437-439.
- 4) Einisto P, Hooberman BH, Sinsheimer JE.: Base-pair mutations caused by six aliphatic epoxides in Salmonella typhimurium TA100, TA104, TA4001, and TA4006. Environ Mol Mutagen. 1993, 21(3): 253-257.
- 5) Das L, Das SK, Chu EH, Sinsheimer JE.: Chromosomal aberrations in mouse lymphocytes exposed in vivo and in vitro to aliphatic epoxides. Mutat. Res. 1993, 299(1): 19-24.

18. 参考とした資料

- Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - A screening for chemical carcinogens. Mutat Res 1977; 48: 337-354.
- Ishidate M. Chromosome aberration test *in vitro* for chemical mutagens in our environment. The Tissue Culture 1979; 5: 115-122.
- Evans HJ. In: Hollaender A editor. Cytological methods of detecting chemical mutagens. Chemical Mutagens. New York Plenum press 1976; 4: 1-25.
- Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Jr. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. Mutat Res 1979; 66: 277-290.
- Ishidate M. Chromosomal aberration test *in vitro*. Tokyo: REALIZE INC. 1987.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research [editorial]. Toxicol Appl Pharmacol 1972; 22: 269-275.

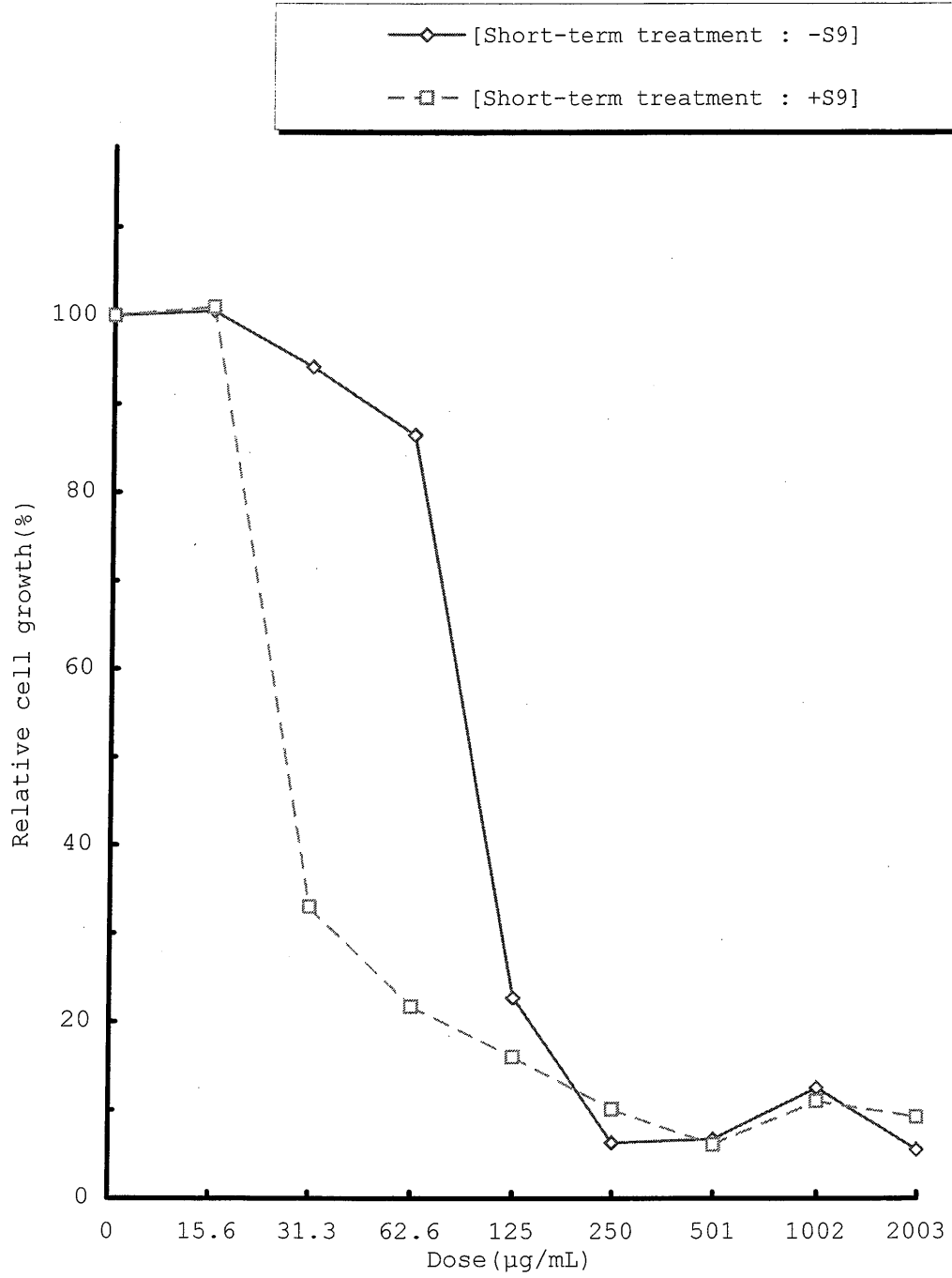


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with 2-naphthylisobutyl ether [Short-term treatment]

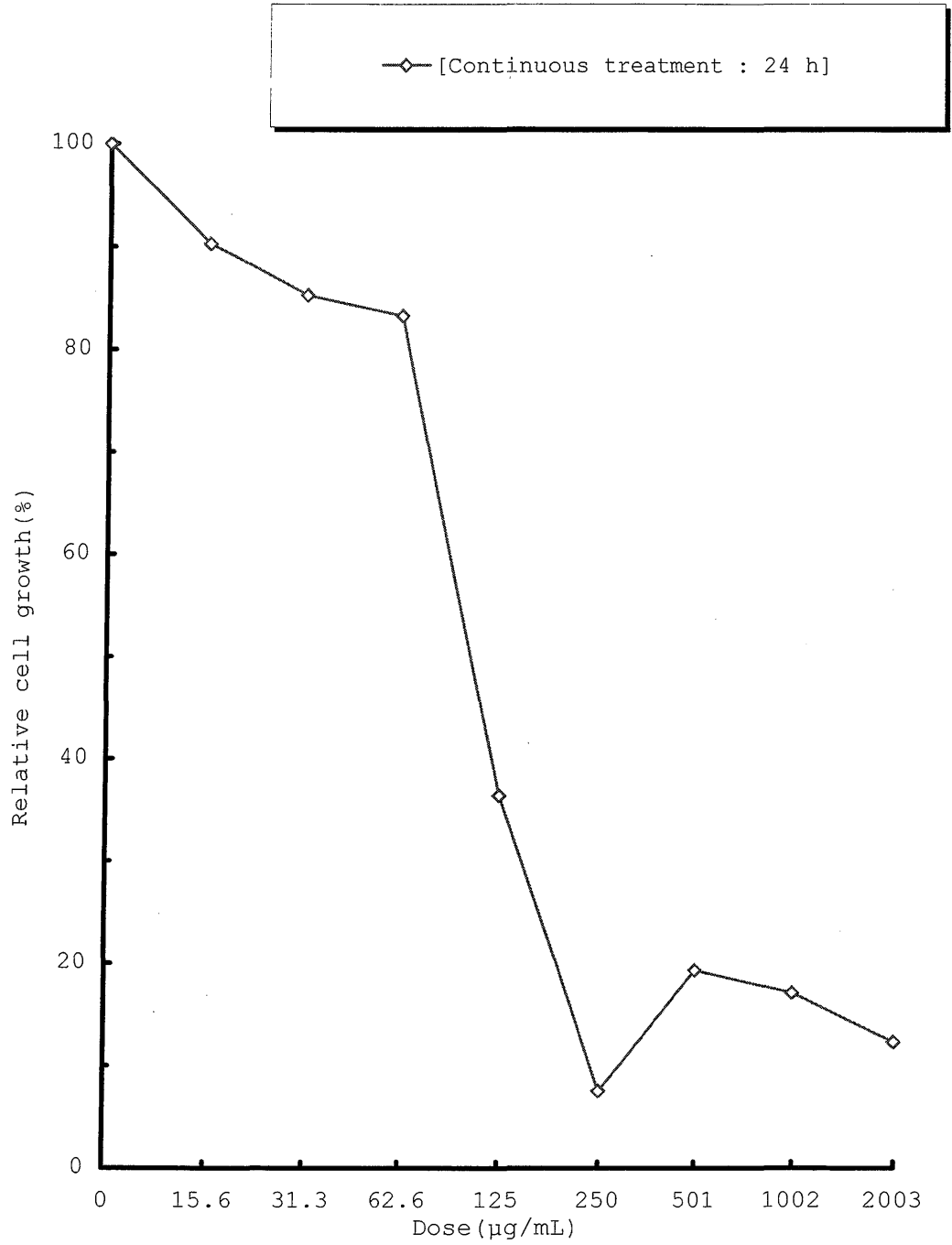


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with 2-naphthylisobutyl ether [Continuous treatment]

Table 1. Results of growth inhibition test of 2-naphthylisobutyl ether [Short-term treatment]

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]	Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
2-Naphthylisobutyl ether	15.6	100.2 100.8	[100.5]	2-Naphthylisobutyl ether	15.6	103.9 98.0	[101.0]
	31.3	91.1 97.2	[94.2]		31.3	31.4 34.6	[33.0]
	62.6	89.7 83.3	[86.5]		62.6	22.9 20.4	[21.7]
	125	28.3 17.1	[22.7]		125	15.9 16.0	[16.0]
	250 d)	7.5 5.1	[6.3]		250 d)	6.6 13.6	[10.1]
	501 d)	6.0 7.3	[6.7]		501 d)	6.1 6.1	[6.1]
	1002 d)	12.9 12.0	[12.5]		1002 d)	11.1 10.8	[11.0]
	2003 d)	6.6 4.4	[5.5]		2003 d)	10.7 7.6	[9.2]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[Short-term treatment : -S9] --- 99.1 µg/mL

[Short-term treatment : +S9] --- 33.2 µg/mL

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)

d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.

Table 2. Results of growth inhibition test of 2-naphthylisobutyl ether [Continuous treatment]

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
2-Naphthylisobutyl ether	15.6	90.9 89.6	[90.3]
	31.3	92.3 78.3	[85.3]
	62.6	87.0 79.6	[83.3]
	125	46.5 26.3	[36.4]
	250	7.2 7.7	[7.5]
	501 d)	15.9 22.6	[19.3]
	1002 d)	12.8 21.4	[17.1]
2003 d)	14.0 10.6	[12.3]	

50% Growth inhibition dose was as follows:
[Continuous treatment : 24 h] --- 106 µg/mL

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 10 µL/mL)
d): Visible precipitation was observed at the end of treatment period.