

考察

以上の試験成績から、雄では、100 mg/kg以上の投与群において、肝細胞は小葉中心性に肥大し、マクロファージの浸潤が惹起され、さらに、400 mg/kg投与により小葉中心部の肝細胞細胞質が均質化および小空胞化し、小葉中心性に肝細胞が壊死した。また、血液生化学検査においても、GOTおよびGPT活性が上昇した。雌においても、100 mg/kg以上の投与群において、肝細胞は小葉中心性に肥大し、小葉中心性の肝細胞壊死、小葉中心部の肝細胞細胞質の均質化および小空胞化、ならびにマクロファージの浸潤が観察された。これらの肝臓の毒性変化を反映して、雄では100 mg/kg以上の投与群において、また、雌では400 mg/kg投与群において肝臓重量比体重値が増加した。これらの変化は、投与8日に瀕死屠殺した雌にもすでに観察されていたことから、少なくとも雌では、比較的早期から肝臓は障害を受けていたものと考えられる。

チオフェンによる肝臓障害は、チオフェンの代謝過程で生成された活性中間体による毒性であることが明らかにされている¹⁰⁾。チオフェンは、肝臓のP450 monooxygenasesにより、S-oxidationを受け、その結果、反応性の非常に高いthiophene-S-oxidesに転換されることが*in vitro*²⁰⁾でも、また、*in vivo*²¹⁾でも証明されている。チオフェンの主要な尿中代謝物は、メルカプト尿酸であることから、thiophene-S-oxidesの代謝には、グルタチオン付加が関与しているものと考えられている²²⁾。一方、thiophene-S-oxidesは好電子性であるため、グルタチオンのない条件では、ミクロゾーム蛋白と非可逆的に結合する²³⁾。従って、チオフェンによる肝臓障害には、thiophene-S-oxidesの生成量と、グルタチオン付加などの第2相の代謝活性が関与しているものと考えられる。本試験では雌雄ともに肝臓に同質の病理組織所見が観察されているが、雌では、所見の有無に個体差はあるものの、雄と比較すると、より低い投与量から所見が認められ、その程度も雄と比較して増強されており、チオフェンによる肝臓障害には性差があるものと考えられる。一般に、肝臓の薬物代謝酵素活性は雄の方が高いので、thiophene-S-oxidesは雄においてより多く生成されると考えられるが、雄における肝臓障害の程度がむしろ弱かったのは、第2相の代謝活性や、細胞内の求核性分子の種類あるいは濃度などに相違があったためと推測される。

雌における肝細胞壊死の個体差の成因については、本試験結果からは明らかではないが、肝細胞壊死が非妊娠動物にも分娩後の動物にも観察されていることから、動物の生理状態よりも活性中間体の第2相の代謝活性などの個体差によるものと推測される。

雌では、400 mg/kg投与により、投与初期から一部の動物が運動失調を呈した。また、病理組織検査では、小脳の顆粒細胞壊死があり、これに伴って小脳核神経細胞の変性が観察された。また、100 mg/kg投与によっても軽度な変化が1例に観察された。雄では、運動失調を呈する動物は無く、また、病理組織検査においても400

mg/kg投与群の1例に軽度な所見が観察されたのみで、小脳の変化にも性差が認められた。チオフェンの毒性変化として小脳の顆粒細胞壊死および小脳核神経細胞の変性も、すでに報告されているが¹¹⁻¹³⁾、小脳に著しい変化の観察された動物には、肝細胞壊死も顕著に観察され、小脳の顆粒細胞壊死および小脳核神経細胞の変性の成因と肝細胞壊死の成因は同一であると推測される。脳においても薬物代謝酵素が合成されていることが証明されており²⁴⁾、小脳には、P4501A1/2や、P4502E1などの活性のあることが明らかにされている²⁵⁾。小脳病変の原因が、肝臓で生成されたチオフェンの活性中間体が脳血管閥門を越えて小脳に流入したことにより惹起されたものか、あるいは、チオフェンが脳血管閥門を越えて小脳に入り、小脳の薬物代謝酵素で代謝された結果生成された活性中間体により惹起されたものかは、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。小脳における変性には部位特異性があり、II～IVおよびIX葉の顆粒細胞に顕著に観察された。これは、既報¹²⁾ともほぼ一致する所見であるが、これらの葉は下小脳動脈の支配領域にあること²⁶⁾、また、小脳核神経細胞の分泌機能あるいは細胞間の情報伝達物質系は、小脳核神経細胞の細胞種ごとに異なること²⁶⁾等から、小脳におけるチオフェンの毒性発現には、障害を受ける細胞の解剖学的および生化学的性質が関係しているものと推測される。

職業的にチオフェンを使用している労働者に腎障害が起こることが報告されているが、本試験では、腎臓重量比体重値は雌雄ともに増加した。病理組織検査では、100 mg/kg以上の投与群の雌において尿管上皮の空胞変性が有意に増加したが、その程度と、肝臓や小脳の病理組織変化の程度や、動物の一般状態、あるいは哺育状態との間に相関性は認められないことから、尿管上皮の空胞変性は、チオフェン投与による変化であると考えられるが、その成因は、肝臓あるいは小脳病変の成因とは異なるものと推測される。雄の病理組織検査では、400 mg/kg投与群においてeosinophilic bodyの数の軽度な増加が認められたのみであった。血液生化学検査においても、血液尿素窒素濃度が増加したが、クレアチニン濃度には異常は認められなかったことから、少なくとも雌に腎臓機能障害はなかったものと考えられる。

チオフェンを経口投与すると、尿中にはメルカプト尿酸として排泄されることが報告されている¹⁰⁾。投与末期に行った尿検査では、pHがアルカリを示すものが、用量依存的に増加した。予備試験では、投与2および9日に尿検査を実施したが、pHは弱酸性から弱アルカリ性を呈していたことから、投与を反復することにより、pHが上昇したものと推測される。メルカプト尿酸は、酸性であることから、尿のpHの上昇は、少なくとも尿中に排泄されたメルカプト尿酸に起因するものではないと考えられるが、その原因については、本試験成績からは明らかにならなかった。

脾臓重量が400 mg/kg投与群の雄で低下した。また、重量測定は行わなかったが、100 mg/kg投与群の雌で脾臓の萎縮が観察された。しかし、雌雄ともに病理組織の

変化は伴っていなかった。SHR系ラットを用いた実験¹³⁾でも、脾臓重量の低下が報告されているが、組織学的には濾胞の萎縮を伴っており、今回の結果とは異なる。このほか雌の脾臓の病理組織検査では、チオフェン各投与群において、赤脾髄の血液量の減少が観察されたが、用量に伴う変化ではなく、雄には認められなかった。

雄の血液学検査において、100 mg/kg以上の投与群で血色素量が軽度低下したが、肝臓機能の指標となる酵素活性や器官重量との間に相関性は認められず、また、生理的変動の範囲内であることから、毒性変化であるとは判断されない。

血液生化学検査を実施した雄の100 mg/kg以上の投与群において、ブドウ糖濃度の減少、無機リン濃度の増加ならびにアルカリフォスファターゼ活性の低下が認められたが、いずれも軽微な変化であった。

交配成績および生殖器の病理組織検査から、チオフェンの雌雄動物の生殖能力に対する影響は認められなかった。チオフェンは、精子形成に影響を及ぼす化学物質のひとつに挙げられている¹⁴⁾が、今回の試験結果からは、形態学的にも、機能の面からもチオフェンの影響は認められなかった。

チオフェンの投与量に伴う着床前死亡、胚・胎児死亡および形態異常などの増加は認められないことから、400 mg/kgまでの投与量のチオフェンには発生毒性はないものと考えられる。

分娩に対するチオフェン投与の影響は認められなかったが、100 mg/kg以上の投与群の少数の母動物に、児を集めたり保温したりするといった哺育行動に低下が認められた。また、400 mg/kg投与群では、母動物の哺育行動にこのような異常は認められないにもかかわらず、新生児の腹部に乳汁の貯留が認められないことから、泌乳の低下が疑われる動物が認められた。これらの動物には100 mg/kg投与群の1例を除いていずれも、小脳核神経細胞の変性が観察されており、哺育行動の低下、あるいは泌乳状態の不良は、チオフェン投与による二次的変化であると推測される。

有意差は認められなかったものの、400 mg/kg投与群では新生児生存率が著しく低値を示した。新生児の4日の生存率の低下は、母動物の哺育行動あるいは泌乳の低下に起因すると考えられるが、本試験結果からは、活性中間体が乳汁を介して、母動物から新生児へと移行し、それが新生児に毒性を発現した可能性も否定できなかった。

これらのことから本試験条件下では、チオフェンの無影響量は、反復投与毒性に関しては、雌雄いずれに対しても25 mg/kg/dayであり、生殖発生毒性に関しては、雄に対しては400 mg/kg/day、雌に対しては、25 mg/kg/day、新生児に対しては、100 mg/kg/dayであると推察される。

文献

- 1) The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. S. Budavari, M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman, eds., Eleventh edn., Merck & CO., Inc., Rahway, N.J., U.S.A. (1989).
- 2) National Toxicology Program: Health and safety program for thiophene. Research Triangle Park, N.C., U.S.A.:NTP, (1986).
- 3) National Toxicology Program: Prechronic design for thiophene. Part of Toxicology Design Committee package. Research Triangle Park, N.C., U.S.A.: NTP (1985).
- 4) И. Б. Михайлец, Г. А. Михайлец, Д. Г. Лелъц, А. В. Валихметов, *Gigiena Trúda i Professional nye Zabolevaniia*, 10, 57 (1966).
- 5) National Technical Information Service:AD277-689, Springfield, V.A., U.S.A.
- 6) J. Marhold, "Preheld Prumyslove Toxikologie," *Organicke Latky, Avicenum, Praha, Czechoslovakia*, 1986, p.1089.
- 7) A.A. Nomeir, P.M. Markham, M. Chadwick, *J. Toxicol. Environ. Health*, 39, 223 (1993).
- 8) H.G. Bray, F.M.B. Carpanini, B.D. Waters, *Xenobiotica*, 1, 157 (1971).
- 9) P.M. Dansette, C. Amar, C. Smith, C. Pons, D. Mansuy, *Biochem. Pharmacol.*, 339, 911 (1990).
- 10) R.J. McMurtry, J.R. Mitchell, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 42, 285 (1977).
- 11) R.M. Herdon, *Exp. Brain Res.*, 6, 49 (1968).
- 12) F. Mori, G. Koya, Y. Yoshida, K. Tamayama, T. Nishioka, *J. Toxicol. Pathol.*, 5, 21 (1992).
- 13) F. Mori, G. Koya, Y. Yoshida, *J. Toxicol. Pathol.*, 6, 223 (1993).
- 14) E. Nieschlag, Th. Schurmeyer, *Arch. Toxicol.*, Suppl., 7, 146 (1984).
- 15) E. Salewski, *Pharmacol.*, 247, 367 (1964).
- 16) 西村秀雄, "胎児科学," 雄鶏社, 東京, 1976, pp.115~177.
- 17) 佐久間昭, "薬効評価一計画と解析," 東大出版会, 東京, 1977.
- 18) C. W. Dunnett, *Biometrics.*, 20, 482 (1964).
- 19) H. Scheffé, *Biometrika.*, 40, 87 (1953).
- 20) W. H. Kruskal and W. A. Wallis, *J. amer. Statist. Assoc.*, 47, 583 (1952).
- 21) 丹後俊郎, "医学への統計学(古川俊之 監修)," 朝倉書店, 東京, 1985.
- 22) A.V. Hodgson, T.B. White, J.W. White, H.W. Strobel, *Mol. Cell. Biochem.*, 120, 171 (1993).
- 23) H. K. Anandatheerthavarada, J.F. Williams, L. Wecker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194, 312 (1993).
- 24) 遠山正彌, "医学のあゆみ," 170, 576 (1994).

- 25) D. Mansuy, P. Valadon, I. Erdelmeier, P. Lopez-Garcia, C. Amar, J.-P. Girault, P. M. Dansette, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 7825 (1991).
- 26) P. M. Dansette, D. C. Thang, H. E. Amri, D. Mansuy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**, 1624 (1992).

連絡先

試験責任者：長尾哲二
試験担当者：代田真理子，森村智美，渡辺千朗
(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: Tetsuji Nagao (Study director)
Mariko Shirota, Tomomi Morimura,
Chiaki Watanabe
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

チオフェンの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Thiophene on Bacteria

要約

OECD既存化学物質安全性調査事業の一環として、チオフェンについて、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、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加の条件でプレート法により、用量設定試験を50~5000 μg /プレートの用量で行ったところ、S9 mix無添加試験、添加試験のいずれもWP2 *uvrA*以外の検定菌において、高用量群で抗菌性が認められた。したがって、本試験ではS9 mix無添加試験および添加試験のいずれもTA1537では78.1~2500 μg /プレート、WP2 *uvrA*では313~5000 μg /プレート、その他は156~5000 μg /プレートの範囲で用量を設定して試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加試験および添加試験のいずれも2500~5000 μg /プレートの用量で抗菌性が認められた。復帰変異コロニー数は、2回の本試験とも、用いた検定菌について、いずれの用量においても増加は認められなかったことから、チオフェ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¹⁾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²⁾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℃以下で凍結保存したものを、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で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〕

チオフェン(CAS No. 110-02-1)は、分子量 84.14の無色透明の液体である。試験には、東京化成工業(株)製、

〔ロット番号：FGB01, 純度98%(不純物：不明)]のものを購入し、使用時まで冷蔵保管した。

チオフェンは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解性がよいことから、DMSOに50 mg/mlまたは25 mg/mlの割合で溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、チオフェンのDMSO溶液中での安定性試験および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、低濃度(0.781 mg/ml)溶液は本試験IIで調製したものについて、また高濃度(168 mg/ml)溶液は染色体異常試験で調製したものについて、室温遮光条件下で、安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均値に対して、100および101%であった。また、含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、低濃度は89.7%とやや低い値であったが、高濃度は95.2%であった。

〔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 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (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℃で凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは純水に溶解し、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

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
D-ビオチン	0.5 mM

*: WP2 *uvrA*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 l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
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20g
バクタアガー (Difco)	15g

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

** : 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を用いた。

〔試験方法〕

プレート法により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中にトッパアガー2 ml, 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各Table中に示した。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。用いた平板は用量設定試験においては、溶媒および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、結果の再現性の確認を行った。

〔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S9 mix添加条件において、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〕

50~5000 μ g/プレートの範囲で公比を約3として、試験を実施したところ、S9 mix 無添加試験、添加試験のいずれもTA1537では1500 μ g/プレート以上で、またTA100, TA1535, A98の3菌株では5000 μ g/プレートで抗菌性が認められたが、WP2 *uvrA*のみ最高用量においても抗菌性は認められなかった。

〔本試験〕

結果をそれぞれTable 1, 2に示した。チオフェンの用量を、S9 mix無添加試験、添加試験のいずれもTA1537では78.1~2500 μ g/プレート、WP2 *uvrA*では313~5000 μ g/プレート、その他は156~5000 μ g/プレートの範囲で公比を2として設定し試験を実施した。その結果、2回の試験のいずれも、用いた5種類の検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験において、溶媒対照値の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。

以上の結果に基づき、チオフェンは、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。

Table I. Mutagenicity of thiophene** in reverse mutation test (I) on bacteria

With(+)or without(-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type						Frameshift type								
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9mix (-)	0	97	114	127	11	18	9	29	21	23	28	14	21	9	4	5
		(113 \pm 15.0)			(13 \pm 4.7)			(24 \pm 4.2)			(21 \pm 7.0)			(6 \pm 2.6)		
	78.1	ND			ND			ND			ND			4 8 6 (6 \pm 2.0)		
	156	97	113	101	7	7	13	ND			18	21	24	7	5	8
		(104 \pm 8.3)			(9 \pm 3.5)						(21 \pm 3.0)			(7 \pm 1.5)		
	313	107	106	111	12	11	8	13	12	20	23	18	18	6	5	4
		(108 \pm 2.6)			(10 \pm 2.1)			(15 \pm 4.4)			(20 \pm 2.9)			(5 \pm 1.0)		
	625	113	94	86	11	11	14	27	16	18	19	20	23	7	6	9
	(98 \pm 13.9)			(12 \pm 1.7)			(20 \pm 5.9)			(21 \pm 2.1)			(7 \pm 1.5)			
1250	78	96	86	15	14	14	20	20	16	18	29	21	7	6	5	
	(87 \pm 9.0)			(14 \pm 0.6)			(19 \pm 2.3)			(23 \pm 5.7)			(6 \pm 1.0)			
2500	79	99	94	12	13	10	17	16	20	21	19	28	4*	2*	3*	
	(91 \pm 10.4)			(12 \pm 1.5)			(18 \pm 2.1)			(23 \pm 4.7)			(3 \pm 1.0)			
5000	83*	75*	72*	6*	11*	9*	16*	24	13	18*	15*	13*				
	(77 \pm 5.7)			(9 \pm 2.5)			(18 \pm 5.7)			(15 \pm 2.5)						
S9mix (+)	0	124	127	132	15	12	12	28	27	23	27	32	44	18	7	9
		(128 \pm 4.0)			(13 \pm 1.7)			(26 \pm 2.6)			(34 \pm 8.7)			(11 \pm 5.9)		
	78.1	ND			ND			ND			ND			11 14 11 (12 \pm 1.7)		
	156	121	127	124	11	11	19	ND			28	34	22	15	8	8
		(124 \pm 3.0)			(14 \pm 4.6)						(28 \pm 6.0)			(10 \pm 4.0)		
	313	120	107	98	19	12	12	33	13	24	34	16	25	17	25	18
		(108 \pm 11.1)			(14 \pm 4.0)			(23 \pm 10.0)			(25 \pm 9.0)			(20 \pm 4.4)		
	625	119	105	120	13	13	11	19	21	24	23	26	31	18	8	15
	(115 \pm 8.4)			(12 \pm 1.2)			(21 \pm 2.5)			(27 \pm 4.0)			(14 \pm 5.1)			
1250	131	98	119	12	12	10	30	34	25	29	36	33	10	16	8	
	(116 \pm 16.7)			(11 \pm 1.2)			(30 \pm 4.5)			(33 \pm 3.5)			(11 \pm 4.2)			
2500	110	117	116	9	10	16	21	14	10	21	19	26	12*	7*	12*	
	(114 \pm 3.8)			(12 \pm 3.8)			(15 \pm 5.6)			(22 \pm 3.6)			(10 \pm 2.9)			
5000	82*	91*	104*	8*	9*	15*	17	18	25	25*	14*	22*				
	(92 \pm 11.1)			(11 \pm 3.8)			(20 \pm 4.4)			(20 \pm 5.7)						
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 mix(-)	Number of colonies/plate	618	627	632	174	215	208	119	117	113	840	892	847	1965	1673	1991
		(626 \pm 7.1)			(199 \pm 21.9)			(116 \pm 3.1)			(860 \pm 28.2)			(1876 \pm 176.6)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
S9 mix(+)	Number of colonies/plate	1068	1025	1025	270	272	221	1270	1435	1069	450	432	416	328	294	362
		(1039 \pm 24.8)			(254 \pm 28.9)			(1258 \pm 183.3)			(433 \pm 17.0)			(328 \pm 34.0)		

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 % and impurity was unknown.

ND : Not done

Table 2. Mutagenicity of thiophene** in reverse mutation test (II) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type						Frameshift type								
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98		TA1537			
S9mix (-)	0	120	114	135	20	17	14	23	32	30	30	32	20	17	16	23
		(123 \pm 10.8)			(17 \pm 3.0)			(28 \pm 4.7)			(27 \pm 6.4)		(19 \pm 3.8)			
	78.1	ND			ND			ND			ND		14	17	11	
													(14 \pm 3.0)			
	156	131	117	83	7	6	13	ND			18	14	20	24	18	23
		(110 \pm 24.7)			(9 \pm 3.8)						(17 \pm 3.1)		(22 \pm 3.2)			
	313	104	81	120	11	12	13	20	21	21	21	19	17	18	12	31
		(102 \pm 19.6)			(12 \pm 1.0)			(21 \pm 0.6)			(19 \pm 2.0)		(20 \pm 9.7)			
625	105	93	100	16	9	9	29	16	18	19	16	24	17	14	19	
	(99 \pm 6.0)			(11 \pm 4.0)			(21 \pm 7.0)			(20 \pm 4.0)		(17 \pm 2.5)				
1250	88	83	85	10	9	13	23	12	22	17	17	19	26	25	18	
	(85 \pm 2.5)			(11 \pm 2.1)			(19 \pm 6.1)			(18 \pm 1.2)		(23 \pm 4.4)				
2500	76*	84*	78*	9*	6*	8*	23	12	21	18*	18*	21*	6*	12*	11*	
	(79 \pm 4.2)			(8 \pm 1.5)			(19 \pm 5.9)			(19 \pm 1.7)		(10 \pm 3.2)				
5000	78*	70*	91*	6*	5*	9*	13	17	15	17*	10*	11*				
	(80 \pm 10.6)			(7 \pm 2.1)			(15 \pm 2.0)			(13 \pm 3.8)						
S9mix (+)	0	126	129	117	16	13	10	44	24	21	37	34	28	8	17	16
		(124 \pm 6.2)			(13 \pm 3.0)			(30 \pm 12.5)			(33 \pm 4.6)		(14 \pm 4.9)			
	78.1	ND			ND			ND			ND		11	11	9	
													(10 \pm 1.2)			
	156	122	116	134	13	10	11	ND			23	37	29	13	12	6
		(124 \pm 9.2)			(11 \pm 1.5)						(30 \pm 7.0)		(10 \pm 3.8)			
	313	114	96	108	11	11	8	9	21	21	25	29	39	6	11	5
		(106 \pm 9.2)			(10 \pm 1.7)			(17 \pm 6.9)			(31 \pm 7.2)		(7 \pm 3.2)			
625	114	91	97	23	9	11	16	27	24	22	29	27	12	9	9	
	(101 \pm 11.9)			(14 \pm 7.6)			(22 \pm 5.7)			(26 \pm 3.6)		(10 \pm 1.7)				
1250	119	101	96	13	14	14	22	24	20	35	28	25	9	17	3	
	(105 \pm 12.1)			(14 \pm 0.6)			(22 \pm 2.0)			(29 \pm 5.1)		(10 \pm 7.0)				
2500	74*	107*	99*	7*	10*	12*	14	25	24	25*	28*	29*	10*	11*	10*	
	(93 \pm 17.2)			(10 \pm 2.5)			(21 \pm 6.1)			(27 \pm 2.1)		(10 \pm 0.6)				
5000	63*	69*	71*	4*	2*	6*	11*	25*	12*	19*	22*	26*				
	(68 \pm 4.2)			(4 \pm 2.0)			(16 \pm 7.8)			(22 \pm 3.5)						
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2		9AA			
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1		80			
S9 mix(-)	Number of colonies/plate	678	599	627	247	269	266	145	157	153	959	967	925	1963	2099	1748
		(635 \pm 40.1)			(261 \pm 11.9)			(152 \pm 6.1)			(950 \pm 22.3)		(1937 \pm 177.0)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA		2AA			
	Dose($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5		2			
S9 mix(+)	Number of colonies/plate	1056	1405	1231	291	292	293	1477	1388	1534	501	502	487	208	280	208
		(1231 \pm 174.5)			(292 \pm 1.0)			(1466 \pm 73.6)			(497 \pm 8.4)		(232 \pm 41.6)			

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 % and impurity was unknown.

ND : Not done

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, 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：坂本京子, 川上久美子, 原 巧,
清水ゆり, 堀谷尚古, 松本容彦,
中込まどか, 中尾美津男,
飯田さやか
財 食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 秦野市落合 729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Kyoko Sakamoto, Kumiko Kawakami,
Takumi Hara, Yuri Shimizu,
Naoko Horiya, Yasuhiko Matsuki,
Madoka Nakagomi, Mitsuo Nakao and
Sayaka Iida
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

チオフェンの 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 Thiophene 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、チオフェン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(48時間)、短時間処理(6時間)ともに0.84 mg/ml(10 mM)の濃度においても50%を明らかに越える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において0.84 mg/ml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、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時間および48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。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。

以上の結果より、チオフェンは、上記の試験条件下で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、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: Biocell)を10%添加したイーグルMEM(日水製薬㈱)培養液を用いた。

3. 培養条件

チオフェンは揮発しやすいことから、培養にはフラスコ(25 cm², Corning)を用いた。2×10⁴個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたフラスコに播き、37℃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

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

チオフェン(略号: TP, CAS No.: 110-02-1, ロット番号: FGB01, 東京化成工業㈱製造)は、無色透明液体で、水に対しては不溶、DMSOおよびアセトンには混和し、融点-38℃、沸点84℃、分子式C₄H₄S、分子量84.14、純度98%(不純物は不明)の物質である。

被験物質原体の安定性に関する情報は得られなかったが、溶媒中(DMSO)では、0.781 μg/ml~168 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

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(和光純薬工業㈱)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。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

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、フラスコあたりの観察細胞(400細胞)における分裂中期細胞の頻度(分裂指数: Mitotic index)を調べ、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、短時間処理ともに、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作用は認められなかった(Fig. 1)。

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、短時間処理ともに0.84 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, 協和醗酵工業㈱)およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical

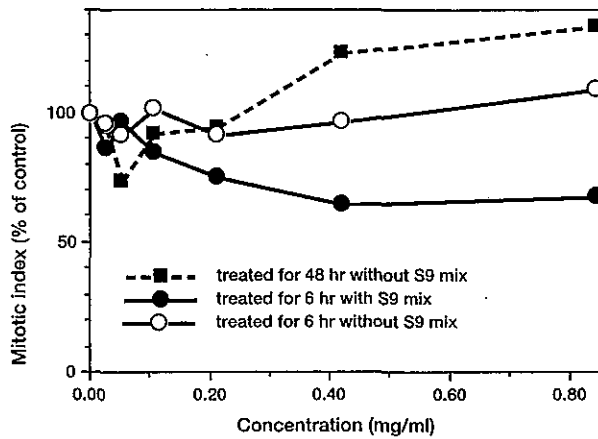


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with thiophene

Co.) は、注射用水(榊大塚製薬工場)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。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各フラスコにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのフラスコ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分体型のギャップ、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、林²⁾の方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法³⁾(多重性を考慮してfamilywiseの有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定⁴⁾($p < 0.05$)を行った。原則として以上2回の検定でともに有意差が認められた場

合を陽性とした。傾向性検定で有意差が認められない場合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

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。チオフェンを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用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。チオフェンを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、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。

従って、チオフェンは、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しないと結論した。

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) 林 真, 変異原性試験, 1, 255(1992).
- 3) 吉村 功 編著, “毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ,” サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 4) 吉村 功, 大橋靖夫 編, “毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析,” 地人書館, 東京, 1992.

連絡先

試験責任者: 田中憲徳

試験担当者: 山影康次, 中川ゆづき, 日下部博一,
橋本恵子, 水谷正寛, 古畑紀久子

(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, Yuzuki Nakagawa,

Hirokazu Kusakabe, Keiko Hashimoto,

Masahiro Mizutani, Kikuko Furuhashi

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