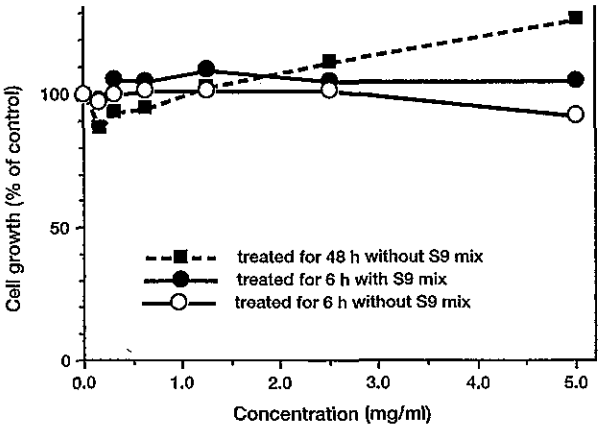


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate

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 Co.)は，注射用水(㈱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，陰性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クラン・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．1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルを加えて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．1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルを加えて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，1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルは，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しないと結論した．

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with tris (2- ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate (TEBTC) * without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Trend test[5]	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	1	3	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.13		
Solvent[1]	0	24	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50		
TEBTC	1.3	24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.63		
TEBTC	2.5	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	NT	NT
TEBTC	5.0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38		
MC	0.00005	24	200	4	43	84	0	1	0	132	1	92 (46.0)	92 (46.0)	0.13		
Solvent[1]	0	48	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25		
TEBTC	1.3	48	200	0	0	0	2	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
TEBTC	2.5	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	NT	NT
TEBTC	5.0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	2	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		
MC	0.00005	48	200	1	29	63	1	8	0	102	4	65 (32.5)	64 (32.0)	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.), 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, NT: not tested. 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) Cochran・Armitage's trend test was done at $p<0.05$ when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at $p<0.05$ by Fisher's exact test. *: Purity was more than 99.0%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with tris (2- ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate (TEBTC) ** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Trend test[5]	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	3	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.38		
Solvent[1]	0	-	6-(18)	200	0	0	1	2	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38		
TEBTC	1.3	-	6-(18)	200	1	2	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.13		
TEBTC	2.5	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50	NT	NT
TEBTC	5.0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.25		
Solvent[1]	0	+	6-(18)	200	0	2	5	0	0	0	7	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.25		
TEBTC	1.3	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25		
TEBTC	2.5	+	6-(18)	200	2	1	1	0	0	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.50	NT	NT
TEBTC	5.0	+	6-(18)	200	2	2	1	0	0	0	5	0	5 (2.5)	3 (1.5)	0.25		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	5	34	112	1	0	0	152	8	89 (44.5)	86 (43.0)	0.25		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), 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, NT: not tested. 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) Cochran・Armitage's trend test was done at $p<0.05$ when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at $p<0.05$ by Fisher's exact test. **: Purity was more than 99.0%.

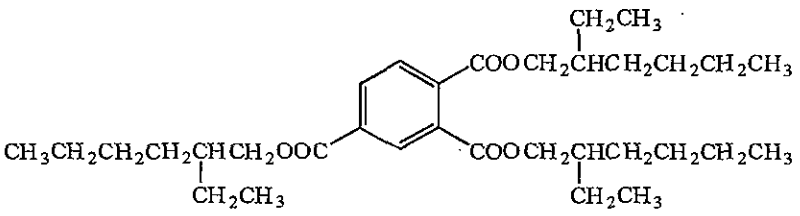
文献

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，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：田中憲穂
試験担当者：山影康次，若栗　忍，日下部博一，橋本恵子，長尾哲二
(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, Tetsuji Nagao
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

SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE

CAS No.	3319-31-1
Chemical Name	Tris(2-ethylhexyl)benzene-1,2,4-tricarboxylate
Structural Formula	

RECOMMENDATIONS

The chemical is currently of low priority for further work.

SUMMARY CONCLUSIONS OF THE SIAR

Human Health

In a single dose study of rats, 75 % of the orally administered chemical at 100 mg/kg bw was excreted in an unchanged form in the feces, 16 % as metabolites in the urine and 1.9 % was expired as CO_2.

The acute toxicity of the chemical is low because it showed no toxic signs at 2,000 mg/kg bw by oral route in rats [OECD TG 401] and at 2 mL/kg by dermal route in rabbits. During exposure by inhalation at 2600 mg/m^3, no death occurred in rats, but reddening patches in the lungs were observed after 14 days post exposure.. In an irritation-test for animals, the chemical was slightly irritating to the skin and the eyes. A sensitization test on guinea pigs showed no sensitization [OECD TG 406].

A feeding study with rats for 28 days showed a decrease of hemoglobin and an increases of leucocyte counts and serum cholesterol as well as an increased liver weight in the mid and high dose groups (0.67 and 2.0 %). Liver biochemistry revealed increases in palmitoyl CoA oxidation (increased in both sexes at 2.0% and males at all dose levels) and catalase activity (increased in males at 2.0%), suggesting the induction of peroxisome proliferation. Further analysis by an electron microscope indicated slight increased number of peroxisomes in hepatocytes at the high dose. It is generally accepted that the induction of peroxisome proliferation occurs specifically in rodents but much less in other species including humans. There were no dose-related histopathological changes in any treated groups. The NOAEL in this study was considered to be 0.2 % (184 mg/kg bw/day).

The OECD reproductive/developmental toxicity screening test [TG 421] for at least 46 days at doses of 100, 300 and 1,000 mg/kg/day demonstrated a decrease of spermatocytes and spermatids in testis in the 300 and 1000 mg/kg groups but not in the 100 mg/kg group.

Based on the testicular toxicity, the NOAEL for repeated dose toxicity is considered to be 100 mg/kg bw/day.

As for reproductive/developmental toxicity, the chemical showed no adverse effects on copulation, fertility, delivery and nursing of females nor on the viability, body weight and morphology of offspring in the above screening test [OECD TG 421]. However, the NOAEL for reproductive toxicity in males was considered to be 100 mg/kg bw/day

because of the testicular toxicity described above. Both NOAELs for reproductive toxicity in females and developmental toxicity of offspring were considered to be 1,000 mg/kg bw/day.

The genotoxicity of this chemical was evaluated in many *in vitro* assay systems. It was neither mutagenic in bacteria [OECD TG 471 & 472] nor clastogenic in mammalian cells [Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Japan)].

Environment

The Mackay level III fugacity Model was employed to estimate the environmental distribution of this chemical in air, water, soil and sediment. If released to air, this chemical will exist solely in the particulate phase in the ambient atmosphere. If released to soil, this chemical is not expected to be distributed to other compartments.

This chemical has to be considered as weakly toxic against aquatic organisms and is not biodegradable. This chemical has a high logPow value (5.94), the measured BCF is reported as less than 1 to 2.7 in carp for 6 weeks, but some uncertainty still remains regarding the bioaccumulation potential of this chemical. This result indicates that the bioavailability of this chemical is low. The toxicity results to aquatic plants (algae; *Selenastrum capricornutum*) were >100 mg/L for EC_{50} (72hr). The acute toxicity data in fish (medaka; *Oryzias latipes*) were >100 mg/L (96h, LC_{50}) and >75 mg/L (14d, LC_{50}). In *Daphnia magna*, the acute toxicity was >180mg/L (48hr: EC_{50}) and the chronic toxicity was >55.6 mg/L (21d, reproduction). All these data were obtained in supersaturated solution with the aid of solubilizer (HCO-40). The test solution was considered to be homogeneous. Another chronic toxicity data in *Daphnia magna* (NOEC >0.082mg/L) was reported (Procedure of ASTM and USEPA). Though this value is lower than the saturation point, the measured concentration data were less reliable.

Based on the description of the test results above, it can be concluded that Tris(2-ethylhexyl)benzene-1,2,4-tricarboxylate does not show any toxic effects at the limit of solubility towards those aquatic organisms, which were tested in the laboratory. Though it is difficult to determine a PNEC, this substance is not toxic at its water solubility (OECD TG105; 0.13 mg/L 25 C).

Exposure

This chemical is manufactured as a plasticizer for PVC.

The production volume in Japan is approximately 20,000 tonnes/year and there are 5 manufacturers in Japan. Estimated global production is 40,000-100,000 tonnes/year. This chemical is mainly used as a plasticizer for PVC electrical cable and wire.

Occupational exposure may occur through dermal contact and inhalation of mist. This chemical is produced in closed system and workers wear protective gloves and goggles during the operation, so actual exposure in the work place is considered to be low.

Since this chemical is difficult to extract from the polymeric matrix, consumer and environmental exposure are considered to be low.

NATURE OF FURTHER WORK RECOMMENDED

There is no recommendation for further work. The hazards of this chemical towards the environment and human health are considered to be low. Both occupational and consumer exposure are considered to be low.

これまで合計21種の化合物について検索を行ったが，1,2-dichloroethane のみが TA100 において S9 mix 共存下で陽性の結果を示し，他はすべて陰性であった．これらの検体については哺乳動物培養細胞に対する染色体異常誘発性をも検討しており，その結果を本誌に併せて発表してあるので参照されたい．

文 献

1) 佐谷戸安好：トキシコロジーフォーラム，7，443 (1984)
2) 矢部禎明：水，1，86 (1983)
3) Ames, B. N. *et al.*: *Mutation Res.*, **31**, 347 (1975)
4) Galli, A. *et al.*: *Boll.-Soc. Ital. Biol. Sper.*, **58**, 860 (1982)
5) Shahin, M. and R. C. von Borstel: *Mutation Res.*, **48**, 173 (1977)
6) Abe, S. and M. Sasaki: *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**, 1635 (1977)
7) Guengerich, F. P. *et al.*: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 303 (1980)
8) Ozawa, N. and F. P. Guengerich: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5266 (1983)

水道水汚染有機化合物およびその関連物質の変異原性に関する研究
II．哺乳動物培養細胞による染色体異常試験

祖父尼俊雄・林　真・松岡厚子・沢田　稔
畑中みどり・石館　基

Mutagenicity Tests on Organic Chemical Contaminants in City Water and Related Compounds
II. Chromosome Aberration Tests in Cultured Mammalian Cells

Toshio Sofuni, Makoto Hayashi, Atsuko Matsuoka, Minoru Sawada,
Midori Hatanaka and Motoi Ishidate, Jr.

The clastogenic potential of organic chemical contaminants in city water and related compounds was examined using Chinese hamster cells (CHL) in culture. Out of 25 chemicals tested without a metabolic activation system, two chemicals, acrylonitrile and acrylamide, significantly induced chromosome aberrations. By the metabolic activation system, 27 chemicals were tested, and 5 of them, anthracene, pyrene, acetophenone, biphenyl and 1,2-dichloroethane, were positive only in the presence of S9 mix. Two chemicals, acrylonitrile and acrylamide, were also positive both with and without S9 mix. One chemical, benzaldehyde, was positive only in the absence of S9 mix. Other chemicals showed no significant increase in the incidence of chromosome aberrations when used with and without S9 mix. In summary, out of 32 chemicals examined with or without the metabolic activation system, 8 chemicals were positive in the presence and/or absence of S9 mix.

(Received May 31, 1985)

水道水中の微量有機化合物について，微生物による遺伝子突然変異試験に加えて，哺乳動物培養細胞による染色体異常試験を行ったので，その結果について報告する．

試 験 方 法

チャイニーズ・ハムスター肺由来の細胞株 (CHL) を用い，代謝活性化を行わない直接法[1]，あるいは S9 を用いる代謝活性化法[2] による染色体異常試験を行った．

直接法では 2×10^4 個の細胞をガラス培養瓶に播き，3日目に検体を加え，24時間および48時間後に染色体標本を作製した．検体濃度は，予備試験によって細胞増殖が約50%抑制される濃度を求めて，それを指標として3段階濃度（原則として公比2）を選択した．

代謝活性化法では，ガラス培養瓶に細胞を播種し，3日目に検体と S9 mix とで6時間処理した．その後，新しい培養液と交換し，さらに18時間培養し，染色体標本を作製した．S9 は Ames 試験に用いたものと同じく，PCB (KC 400) 処理したラットまたはマウスの肝から調製した．

染色体の観察は，培養瓶当たり 100 個のよく広がっ

Table 2. Chromosome aberration tests in cultured Chinese hamster cells (Direct method) (1982)

Compound	Solvent	Dose (mg/ml)	Treatment time (h)	Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells$ ctg	ctb	cte	csb	cse	Total	Judge
1,2,3-Trichloro-benzene	DMSO	0	24	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	
		0.0157	24	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	3.0	−
		0.0313	24	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		0.0625	24	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	1.0	−
		0	48	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	
		0.0157	48	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		0.0313	48	2.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	−
		0.0625	48	3.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	3.0	−
1,2,4-Trichloro-benzene	DMSO	0	24	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		0.0313	24	3.0	0.0	2.0	1.0	0.0	0.0	2.0	−
		0.0625	24	3.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	−
		0.125	24	TOX	- - - - - TOX - - - - - -						
		0	48	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	
		0.0313	48	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		0.0625	48	1.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	1.0	−
		0.125	48	TOX	- - - - - TOX - - - - - -						
1,3,5-Trichloro-benzene	DMSO	0	24	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	
		0.0157	24	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		0.0313	24	4.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	−
		0.0625	24	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		0	48	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	
		0.0157	48	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		0.0313	48	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	−
		0.0625	48	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	−
Biphenyl	DMSO	0	24	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	
		0.075	24	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		0.1	24	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		0.125	24	1.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	4.0	−
		0	48	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	
		0.075	48	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		0.1	48	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	−
		0.125	48	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	−
l-Menthol	DMSO	0	24	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	
		0.0313	24	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		0.0625	24	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	3.0	−
		0.125	24	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.0	−
		0	48	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		0.0313	48	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		0.0625	48	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		0.125	48	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
dl-Menthol	EtOH	0	24	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	
		0.1	24	2.0	3.0	1.0	1.0	0.0	0.0	5.0	±
		0.15	24	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		0.2	24	0.0	3.5	2.5	0.5	0.0	0.0	6.0	±
		0	48	1.0	2.0	1.0	0.0	0.0	1.0	3.0	
		0.1	48	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	2.0	−
		0.15	48	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		0.2	48	0.0	2.0	1.0	2.0	0.0	1.0	4.0	−

$,TOX: See the foot-notes in Table 1.

Table 3. (continued)

Compound	Solvent	Dose (mg/ml)	Treatment time (h)	Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells‡ ctg	ctb	cte	csb	cse	total	Judge
Di(2-ethylhexyl)-phthalate	DMSO	0	24	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	
		0.0625	24	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		0.125	24	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		0.25	24	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		0	48	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	
		0.0625	48	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		0.125	48	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		0.25	48	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−

‡,TOX,MM: See the foot-notes in Table 1.

た分裂中期像について行い，染色分体ギャップ (ctg)，染色分体切断 (ctb)，染色分体交換 (cte)，染色体切断 (csb)，染色体交換 (cse) などの構造異常をもつ細胞の出現頻度を記録した．さらに，いずれかの構造異常を1個以上もつ異常細胞の出現頻度を求めると共に，倍数性細胞の出現頻度も記録した．判定は異常細胞の出現頻度が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．結果が疑陽性になった場合には，検体濃度を調節して，再度実験を繰り返した．

結　　果

1. 直接法

代謝活性化を行わない直接法の結果を Table 1～3 に示す．1981年度の11種類の検体（2種の chlordane の異性体を含む）のうち，acrylonitrile は 0.02 mg/ml で，acrylamide は 0.15 mg/ml 以上で陽性と判定されたが，他の9検体はいずれも陰性であった (Table 1)．1982年度は6種類の検体（3種の trichlorobenzene の異性体，2種の menthol の異性体を含む）について直接法で検討したが，いずれも陰性の結果に終わっており (Table 2)，直接染色体異常を誘発する性質をもたないものと判断された．1983年度の8種類の検体（2種の dichloroethane の異性体を含む）も直接法ではいずれも染色体異常誘発性を示さなかった(Table 3)．

2. 代謝活性化法

代謝活性化法による結果を Table 4～6 に示す．検体処理時の S9 の最終濃度は5％とし，S9 mix の添加，不添加にかかわらず処理時間は6時間とした．1981年度の検体のうち，α- および γ-chlordane は検体量が少なかったため実験はできなかった，Acrylonitrile および acrylamide は直接法と同様 −S9 で共に陽性の結果を示したが，直接法に比べて約2倍の濃度が必要であった．また，両検体は +S9 でも陽性の結果で示したが，−S9 の時とほぼ同じ濃度範囲であった (Table 4)．一方，anthracene および pyrene は +S9 の時にのみ陽性の結果を示し，しかも，細胞致死効果も強まる傾向にあった．ただし，異常の出現頻度には明確な濃度依存性はみられていない．尚，他の5検体は代謝活性化法によっても染色体異常誘発性は認められなかった (Table 4)．

代謝活性化法での S9 の最終濃度は5％にしてあるが，これを徐々に20％まで増加させると，1,1-dichloroethylene が染色体異常を誘発することが判明した．Acrylonitrile でも異常の増強効果が認められたが，trichloroethylene, tetrachloroethylene, 1,1,1-trichloroethane, carbon tetrachloride では S9 の割合を増加しても染色体異常の誘発は認められなかった．1,1-dichloroethylene の染色体異常誘発性の詳細については他の報告[3]を参照されたい．

1982年度の10種類の検体の結果を Table 5 に示す．Benzaldehyde は −S9 の時に陽性の結果を示し，+S9 では疑陽性の範囲にとどまり，しかも細胞致死効果も幾分低下の傾向を示した．一方，acetophenone および biphenyl は +S9 の時にのみ陽性の結果を示し，染色体異常誘発効果は後者の方が著しかった．なお，benzyl cyanide および naphthalene は +S9 の時に最高濃度で疑陽性となったにとどまった．他の5検体はいずれも染色体異常誘発性は認められなかった．

Table 6 に1983年度の結果を示す．8検体（2種の dichloroethane の異性体を含む）のうち 1,2-dichloroethane のみが +S9 の時に明らかな染色体異常誘発性を示し，しかも，濃度に依存して異常頻度が増加した．−S9 の時は最高濃度でのみ幾分異常細胞が増加したが，疑陽性の範囲にとどまった．1,2-dichloroethane の異性体である 1,1-dichloroethane は染色体異常を誘発せず，細胞毒性も 1,2- 体より弱かった．他の6検体はいずれも陰性の結果を示した．

Table 4. (continued)

Compound	Solvent	S9	Dose (mg/ml)	Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells$ ctg	ctb	cte	csb	cse	total	Judge
Acrylamide	Saline	−	0	3.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0	3.0	
		−	0.13	0.0	1.0	4.0	0.0	0.0	0.0	4.0	−
		−	0.25	1.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	3.0	−
		−	0.5	1.0	13.0	18.0	9.0	0.0	0.0	28.0	+
		−	1.0	0.0	47.0	70.0	46.0	0.0	1.0	95.0	+
		+	0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	
		+	0.13	1.0	2.0	0.0	1.0	0.0	0.0	3.0	−
		+	0.25	4.0	3.0	0.0	1.0	0.0	0.0	4.0	−
		+	0.5	0.0	8.0	10.0	8.0	0.0	0.0	20.0	+
		+	1.0	0.0	38.0	70.0	47.0	0.0	0.0	100.0	+
Anthracene	DMSO	−	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		−	0.01	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		−	0.015	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	−
		−	0.02	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		−	0.025	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		+	0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		+	0.01	1.0	0.0	1.0	3.0	0.0	0.0	4.0	−
		+	0.015	1.0	1.0	2.0	8.0	0.0	0.0	9.0	±
		+	0.02	1.0	4.0	7.0	9.0	0.0	0.0	14.0	+
Pyrene	DMSO	−	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		−	0.005	2.0	2.0	2.0	1.0	0.0	0.0	4.0	−
		−	0.01	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	−
		−	0.015	1.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	−
		−	0.02	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		+	0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		+	0.005	1.0	1.0	2.0	1.0	0.0	0.0	3.0	−
		+	0.01	3.0	15.0	13.0	10.0	0.0	0.0	24.0	+

$ See the foot-notes in Table 1.

考　　察

1981年度の11種類の検体のうちacrylonitrileとacrylamideは直接法で陽性の結果が得られた．一方，サルモネラ菌によるAmes試験ではacrylonitrileは代謝活性化を行った時（+S9）にのみ陽性の結果が報告されている[4]．本研究の培養細胞による染色体異常試験でも+S9で陽性となったが，その異常誘発効果は−S9の時と同程度であった．これらの結果は微生物での突然変異誘発と哺乳動物細胞での染色体異常誘発とではその発現機構に若干の差異があることが考えられる．なお，哺乳動物細胞による姉妹染色分体交換試験，体細胞突然変異試験においても本研究の染色体異常試験と同様に陽性結果が報告されている[5]．

Anthraceneとpyreneは+S9の時にのみ陽性の結果が得られた．Anthraceneの微生物による変異原性試験では一般に陰性の結果が報告されているが，なかには陽性の結果もみられ，逆にpyreneでは比較的陽性の結果が報告されている[6]．ただし，一般的には代謝活性化の有無にかかわらず変異原性はないとの判断がなされている[7]．しかし，両検体については発癌性を示唆する報告もあり[8]，今後慎重に検討する必要がある．

1,1-dichloroethyleneは本研究の通常の代謝活性化法（5% S9）では陰性であったが，S9の濃度を上げることによって染色体異常が誘発された[3]．本検体は微生物による変異原性試験でも代謝活性化法によって陽性の結果が報告されており[9]，さらに，哺乳動物培養細胞での姉妹染色分体交換試験でも+S9の時に陽性と判定されている[3]．ただし，マウスによる小核試験では陰性の結果となっており[3]，生体内での作用機序についてはさらに詳細に検討すべきである．

1982年度の検体の一つであるbiphenylは微生物による突然変異試験および哺乳動物培養細胞による染色体異常試験（直接法）で共に陰性の結果が得られた．チャイニーズ・ハムスター培養細胞（Don）による染色体異常および姉妹染色分体交換（SCE）試験でも陰性の結果が報告されており[10]，また，シリアン・ハムスター（BHK21）による細胞形質転換試験でも陰性の結果であった[11]．一方，本研究での代謝活性化法によ

Table 5. Chromosome aberration tests in cultured Chinese hamster cells (Metabolic activation method) (1982)

Compound	Solvent	S 9	Dose (mg/ml)	Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells* ctg	ctb	cte	csb	cse	total	Judge
Benzaldehyde	DMSO	−	0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	
		−	0.8	11.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	2.0	−
		−	1.0	3.0	1.0	13.0	18.0	0.0	0.0	24.0	+
		+	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		+	0.8	11.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	−
		+	1.0	5.0	3.0	3.0	4.0	0.0	0.0	9.0	±
		+	1.2	0.0	0.0	5.0	4.0	0.0	0.0	9.0	±
Acetophenone	DMSO	−	0	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	2.0	
		−	0.8	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		−	1.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	2.0	−
		−	1.2	0.0	1.0	1.0	3.0	0.0	0.0	4.0	−
		+	0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	2.0	
		+	0.6	2.0	0.0	3.0	5.0	0.0	0.0	7.0	±
		+	0.8	2.0	1.0	7.0	12.0	0.0	0.0	17.0	+
		+	1.0	1.0	1.0	9.0	12.0	0.0	0.0	16.0	+
Benzyl cyanide	DMSO	−	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		−	0.25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		−	0.5	3.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		−	1.0	4.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	2.0	−
		+	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		+	0.25	2.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	−
		+	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		+	1.0	1.0	0.0	3.0	5.0	0.0	0.0	7.0	±
p-Dichlorobenzene	DMSO	−	0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		−	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		−	0.1	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		−	0.2	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		+	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		+	0.05	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		+	0.1	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	−
		+	0.2	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	−
1,2,3-Trichloro-benzene	DMSO	−	0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	
		−	0.1	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		−	0.125	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		+	0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	
		+	0.1	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		+	0.125	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
1,3,5-Trimethyl-benzene	DMSO	−	0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		−	0.025	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		−	0.05	2.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		−	0.1	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		+	0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	
		+	0.05	2.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	−
		+	0.1	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		+	0.2	1.0	1.0	2.0	0.0	0.0	0.0	3.0	−
Naphthalene	DMSO	−	0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		−	0.01	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	−
		−	0.02	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		−	0.04	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		+	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		+	0.01	1.0	1.0	0.0	2.0	0.0	0.0	3.0	−
		+	0.02	2.4	2.4	2.4	1.2	0.0	0.0	4.9	−
		+	0.04	1.0	2.0	3.0	7.0	0.0	0.0	8.0	±

Table 5. (continued)

Compound	Solvent	S9	Dose (mg/ml)	Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells* ctg	ctb	cte	csb	cse	total	Judge
Biphenyl	DMSO	−	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		−	0.01	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		−	0.015	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		−	0.02	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		+	0	1.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	
		+	0.01	4.0	2.0	0.0	3.0	0.0	0.0	5.0	±
		+	0.015	1.0	0.0	10.0	31.0	0.0	0.0	35.0	+
		+	0.02	1.0	4.0	35.0	28.0	0.0	0.0	51.0	+
Dibenzofuran	DMSO	−	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		−	0.025	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		−	0.05	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		−	0.1	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	−
		+	0	1.0	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	
		+	0.025	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	−
		+	0.05	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	−
		+	0.1	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	−
l-Menthol	DMSO	−	0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	
		−	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		−	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		+	0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	
		+	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	−
		+	0.2	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	−
		+	0.3	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	−

* See the foot-notes in Table 1.

る染色体異常試験では S9 mix を添加すると明らかな染色体異常誘発性が認められており，biphenyl の代謝産物の中に染色体異常誘発物質が含まれているものと考えられる．

1983年度の8検体についての培養細胞による染色体異常試験の結果は，サルモネラ菌を用いる Ames 試験の結果と同一であった．つまり，1,2-dichloroethane のみが代謝活性化法で陽性の結果を示し，他はすべて陰性であった．

Cis-1,2-dichloroethylene の *Saccharomyces cerevisiae* による変異原性試験（組換試験，遺伝子突然変異試験，遺伝子変換試験）では S9 の共存，非共存下にかかわらず，陰性の結果が報告されている[12]．また，dibutylphthalate の *S. cerevisiae* による変異原性試験[13]，培養細胞による染色体異常試験および姉妹染色分体交換試験[10]の報告でも，陽性の結果は示されていない．これらの報告は本研究結果と一致している．

Di (2-ethyhexyl) phthalate は NTP (National Toxicology Program) の実験で発癌性が実証された[14]が，変異原性試験では，マウスによる優性致死試験[15]で陽性となった以外は S9 を併用しても，*in vitro* の変異原性試験は陰性に終わっている[10]．Di(2-ethylhexyl) phthalate の加水分解物である monoethylhexylphthalate は，姉妹染色分体交換を起こさないが，染色体異常誘発性を示すという報告がある[16]．Di(2-ethylhexyl) phthalate は S9 mix で加水分解されない[17]ため，本研究の染色体異常試験でも陰性に終わったものと考えられる．

これまで直接法あるいは代謝活性化法のいずれかまたは両法で，合計32種の化合物について染色体異常誘発性を検討してきたが，8種の化合物 (acrylonitrile, acrylamide, anthracene, acetophenone, pyrene, biphenyl, 1,2-dichloroethane, benzaldehyde) が S9 mix 共存下あるいは非共存下で陽性となった．1984年度以降も引き続き水道水汚染化学物質とその関連化合物について検索を行っており，それらの結果についても追って報告する予定である．

文　献

1) Ishidate, M., Jr. and S. Odashima: *Mutat. Res.*, **48**, 337 (1977)
2) 祖父尼俊雄，松岡厚子：環境変異原研究，**5**，4 (1984)
3) 沢田　稔，祖父尼俊雄，石館　基：環境変異原研究：**6**，149 (1984)
4) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, **19**, 84