

復帰変異試験

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	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 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。

小試験管中にトップアガー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無添加試験では, TA100, TA98およびTA1537は150 μ g/プレート以上, TA1535およびWP2 *uvrA*は500 μ g/プレート以上の用量で抗菌性が認められた。また, S9 mix添加試験ではTA100, TA1535, WP2 *uvrA*およびTA1537は500 μ g/プレート以上, TA98は1500 μ g/プレート以上の用量で抗菌性が認められた。

〔本試験〕

結果をそれぞれTable 1, 2に示した。1,2,4-トリメチルベンゼンの用量は, TA1535のS9 mix無添加試験とTA1537のS9 mix添加試験では, 本試験Iにおいて抗菌性のない用量が4用量に達しなかったため, 本試験における最高用量をともに250 μ g/プレートに下げることとした。したがって, 本試験での用量は, S9 mix無添加試験ではTA100, TA1535, TA98およびTA1537は7.81~250 μ g/プレート, WP2 *uvrA*は15.6~500 μ g/プレートの範囲で, S9 mix添加試験ではTA1537は7.81~250 μ g/プレート, TA100, TA1535およびWP2 *uvrA*は15.6~500 μ g/プレート, TA98は31.3~1000 μ g/プレートの範囲で公比を2として試験を実施した。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, 1,2,4-トリメチルベンゼンは, 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。

Table 1. Mutagenicity of 1,2,4-trimethylbenzene** 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	136	138	152	5	14	14	19	32	26	18	34	24	5	5	9
		(142 \pm 8.7)			(11 \pm 5.2)			(26 \pm 6.5)			(25 \pm 8.1)		(6 \pm 2.3)			
	7.81	133	121	127	6	12	12	ND			15	26	29	7	11	4
		(127 \pm 6.0)			(10 \pm 3.5)						(23 \pm 7.4)		(7 \pm 3.5)			
	15.6	132	126	123	12	7	8	12	30	15	23	27	19	13	6	3
		(127 \pm 4.6)			(9 \pm 2.6)			(19 \pm 9.6)			(23 \pm 4.0)		(7 \pm 5.1)			
	31.3	131	142	134	20	15	9	21	16	16	25	25	31	6	3	6
		(136 \pm 5.7)			(15 \pm 5.5)			(18 \pm 2.9)			(27 \pm 3.5)		(5 \pm 1.7)			
62.5	121	97	115	9	14	8	19	18	22	25	23	24	16	5	9	
	(111 \pm 12.5)			(10 \pm 3.2)			(20 \pm 2.1)			(24 \pm 1.0)		(10 \pm 5.6)				
125	102*	91*	106*	7*	9*	18*	23	17	24	22*	20*	17*	5*	6*	12*	
	(100 \pm 7.8)			(11 \pm 5.9)			(21 \pm 3.8)			(20 \pm 2.5)		(8 \pm 3.8)				
250	86*	86*	79*	12*	6*	14*	14*	20*	24*	30*	20*	11*	6*	6*	5*	
	(84 \pm 4.0)			(11 \pm 4.2)			(19 \pm 5.0)			(20 \pm 9.5)		(6 \pm 0.6)				
500							24*	20*	15*							
							(20 \pm 4.5)									
S9mix (+)	0	117	130	139	14	14	16	25	21	26	36	29	41	19	18	32
		(129 \pm 11.1)			(15 \pm 1.2)			(24 \pm 2.6)			(35 \pm 6.0)		(23 \pm 7.8)			
	7.81	ND			ND			ND			ND		14	21	17	
													(17 \pm 3.5)			
	15.6	136	155	147	19	23	22	15	26	33	ND			22	18	14
		(146 \pm 9.5)			(21 \pm 2.1)			(25 \pm 9.1)						(18 \pm 4.0)		
	31.3	136	154	145	15	12	9	25	23	26	45	43	40	17	15	13
		(145 \pm 9.0)			(12 \pm 3.0)			(25 \pm 1.5)			(43 \pm 2.5)		(15 \pm 2.0)			
62.5	130	146	168	12	18	20	23	24	23	39	23	43	15	20	18	
	(148 \pm 19.1)			(17 \pm 4.2)			(23 \pm 0.6)			(35 \pm 10.6)		(18 \pm 2.5)				
125	141	112	109	10	13	9	25	29	25	33	26	37	14*	10*	17*	
	(121 \pm 17.7)			(11 \pm 2.1)			(26 \pm 2.3)			(32 \pm 5.6)		(14 \pm 3.5)				
250	91*	116*	121*	13*	11*	11*	24	26	19	42	24	31	12*	11*	9*	
	(109 \pm 16.1)			(12 \pm 1.2)			(23 \pm 3.6)			(32 \pm 9.1)		(11 \pm 1.5)				
500	105*	91*	104*	9*	7*	9*	25*	15*	12*	25*	33*	20*				
	(100 \pm 7.8)			(8 \pm 1.2)			(17 \pm 6.8)			(26 \pm 6.6)						
1000										20*	19*	15*				
										(18 \pm 2.6)						
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	770	678	696	142	171	162	135	112	123	756	803	831	742	764	624
		(715 \pm 48.8)			(158 \pm 14.8)			(123 \pm 11.5)			(797 \pm 37.9)			(710 \pm 75.3)		
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	1417	1332	1306	333	332	325	1435	1465	1409	389	369	355	222	198	195
		(1352 \pm 58.1)			(330 \pm 4.4)			(1436 \pm 28.0)			(371 \pm 17.1)			(205 \pm 14.8)		

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 98.75% and impurity was unknown.

ND:Not done

復帰変異試験

Table 2. Mutagenicity of 1,2,4-trimethylbenzene** 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	115 106 120 (114 \pm 7.1)	16 15 12 (14 \pm 2.1)	25 26 36 (29 \pm 6.1)	32 23 21 (25 \pm 5.9)	7 8 6 (7 \pm 1.0)	
	7.81	105 128 105 (113 \pm 13.3)	13 8 11 (11 \pm 2.5)	ND	22 25 21 (23 \pm 2.1)	5 6 7 (6 \pm 1.0)	
	15.6	93 113 117 (108 \pm 12.9)	13 14 11 (13 \pm 1.5)	25 17 17 (20 \pm 4.6)	19 23 29 (24 \pm 5.0)	9 3 13 (8 \pm 5.0)	
	31.3	101 107 97 (102 \pm 5.0)	16 22 15 (18 \pm 3.8)	26 27 27 (27 \pm 0.6)	22 23 26 (24 \pm 2.1)	3 9 7 (6 \pm 3.1)	
	62.5	125 106 109 (113 \pm 10.2)	12 10 12 (11 \pm 1.2)	20 14 20 (18 \pm 3.5)	26 26 22 (25 \pm 2.3)	7 7 6 (7 \pm 0.6)	
	125	95* 108* 84* (96 \pm 12.0)	5* 13* 12* (10 \pm 4.4)	17 22 25 (21 \pm 4.0)	16* 16* 16* (16 \pm 0.0)	5* 4* 6* (5 \pm 1.0)	
	250	55* 82* 62* (66 \pm 14.0)	6* 6* 8* (7 \pm 1.2)	17* 16* 19* (17 \pm 1.5)	17* 7* 14* (13 \pm 5.1)	0* 6* 3* (3 \pm 3.0)	
	500			13* 14* 14* (14 \pm 0.6)			
S9mix (+)	0	129 117 119 (122 \pm 6.4)	16 11 10 (12 \pm 3.2)	39 26 27 (31 \pm 7.2)	37 31 35 (34 \pm 3.1)	15 7 15 (12 \pm 4.6)	
	7.81	ND	ND	ND	ND	18 20 18 (19 \pm 1.2)	
	15.6	111 89 111 (104 \pm 12.7)	10 7 11 (9 \pm 2.1)	31 30 29 (30 \pm 1.0)	ND	18 19 19 (19 \pm 0.6)	
	31.3	109 118 105 (111 \pm 6.7)	6 9 11 (9 \pm 2.5)	32 25 54 (37 \pm 15.1)	23 34 31 (29 \pm 5.7)	16 15 18 (16 \pm 1.5)	
	62.5	102 106 120 (109 \pm 9.5)	13 10 16 (13 \pm 3.0)	23 30 30 (28 \pm 4.0)	27 25 29 (27 \pm 2.0)	21 14 18 (18 \pm 3.5)	
	125	117 96 107 (107 \pm 10.5)	8 14 10 (11 \pm 3.1)	22 30 21 (24 \pm 4.9)	35 31 25 (30 \pm 5.0)	9 20 24 (18 \pm 7.8)	
	250	88* 103* 81* (91 \pm 11.2)	10 10 16 (12 \pm 3.5)	23 26 18 (22 \pm 4.0)	32 33 25 (30 \pm 4.4)	13* 21* 21* (18 \pm 4.6)	
	500	95* 108* 89* (97 \pm 9.7)	12* 15* 16* (14 \pm 2.1)	22* 19* 22* (21 \pm 1.7)	21* 18* 32* (24 \pm 7.4)		
	1000				20* 20* 14* (18 \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	754 769 582 (702 \pm 103.9)	158 173 156 (162 \pm 9.3)	188 185 105 (159 \pm 47.1)	825 866 908 (866 \pm 41.5)	1052 1228 1133 (1138 \pm 88.1)	
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	1100 1146 1128 (1125 \pm 23.2)	315 292 311 (306 \pm 12.3)	1364 1438 1356 (1386 \pm 45.2)	298 300 295 (298 \pm 2.5)	299 266 221 (262 \pm 39.2)	

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 98.75% 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：原 巧, 坂本京子, 川上久美子,
清水ゆり, 松木容彦, 中込まどか,
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)
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,
Kumiko Kawakami, Yuri Shimizu,
Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi
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

1,2,4-トリメチルベンゼンの
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
1,2,4-Trimethylbenzene on Cultured Chinese Hamster Cells

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、1,2,4-トリメチルベンゼ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)においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.08 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。また、短時間処理の(6時間)S9 mix存在下および非存在下においてはそれぞれ50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.1 mg/mlおよび0.3 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。連続処理および短時間処理のS9 mix存在下では、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。短時間処理のS9 mix非存在下では、増殖抑制試験でのデータのバラツキが大きかったことから、最高処理濃度とその1/2、1/4および1/8の4処理群を設定した。最高処理濃度の1/2濃度ですでに強い細胞毒性が認められたことから、染色体分析では、最高処理濃度の1/2(0.15 mg/ml)、1/4および1/8の3処理濃度を観察対照とした。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。一方、48時間連続処理した高濃度群(0.08 mg/ml)では、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、染色体の構造異常や倍数性細胞は誘発されなかった。短時間処理では、非存在下で6時間処理した高濃度群(0.15 mg/ml)において、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、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。また、S9 mix存在下では、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、1,2,4-トリメチルベンゼンは、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(日本製薬㈱)培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10⁴個のCHL/IU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時間および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

1,2,4-トリメチルベンゼン(略号: TMB, CAS No.: 95-63-6, ロット番号: H5-CH-11, 東洋合成工業㈱製造, (株)日本化学工業協会提供)は、無色透明液体で、水に対して難溶、融点-43.9℃、沸点169.4℃、蒸気圧0.5 KPa(20℃)、分子式C₉H₁₂、分子量120.20、純度98.75%(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、78.1 μg/ml~60.0 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。

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、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業㈱)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、連続処理における50%の増殖抑制濃度を明らかに越える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%増殖抑制濃度ををさむ2濃度より算出したところ、0.08 mg/mlであった。一方、短時間処理のS9 mix存在下および非存在下では、それぞれ0.1 mg/mlおよび0.3 mg/mlであった(Fig. 1)。

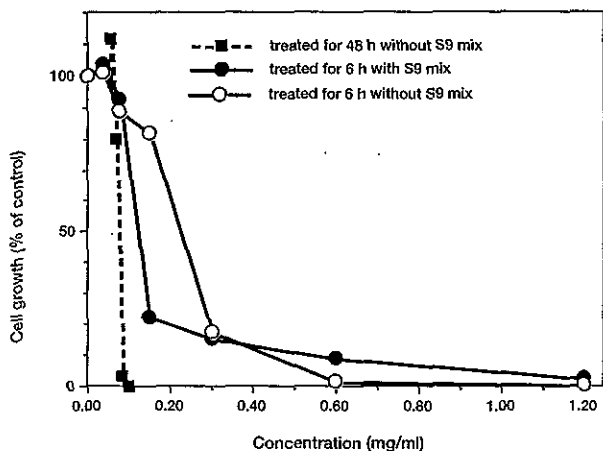


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,2,4-trimethylbenzene

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、連続処理では0.08 mg/ml、短時間処理S9 mix存在下および非存在下では、それぞれ0.1 mg/mlおよび0.3 mg/mlとした。連続処理および短時間処理のS9 mix存在下では、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。短時間処理のS9 mix非存在下では、増殖抑制試験でのデータのバラツキが大きかったことから、最高処理濃度とその1/2、1/4および1/8の4処理群を設定した。最高処理濃度の1/2濃度で、すでに強い細胞毒性が認められたことから、染色体分析では、最高処理濃度の1/2(0.15 mg/ml)、1/4および1/8の3処理濃度を観察対照とした。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、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。1,2,4-トリメチルベンゼンを加えて24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。一方、48時間連続処理した高濃度群(0.08 mg/ml)では、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、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。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。1,2,4-トリメチルベンゼンを加えてS9 mix非存在下で6時間処理した高濃度群(0.15 mg/ml)においては、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群では、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。また、S9 mix存在下では、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。

従って、1,2,4-トリメチルベンゼンは、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。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 1,2,4-trimethylbenzene (TMB)* without S9 mix^a

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	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		
Solvent ¹⁾	0	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.50		
TMB	0.020	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13		
TMB	0.040	24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	NT	NT
TMB	0.080	24	187	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.1)	2 (1.1)	0.00 ⁶⁾		
MC	0.00005	24	200	6	34	76	6	1	0	123	1	74 (37.0)	71 (35.5)	0.00		
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
TMB	0.020	48	200	5	1	0	0	0	0	6	0	6 (3.0)	1 (0.5)	0.13		
TMB	0.040	48	200	2	1	0	0	0	0	3	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13	NT	NT
TMB	0.080	48	68	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00 ^{7)T}		
MC	0.00005	48	200	7	25	76	1	8	0	117	4	76 (38.0)	72 (36.0)	0.00		

^a 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, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) Dimethyl sulfoxide 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. 6) Seven hundred and eleven cells were analysed. 7) One hundred and twelve cells were analysed. *: Purity was 98.75%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1,2,4-trimethylbenzene (TMB)* 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	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	2	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13		
TMB	0.038	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38		
TMB	0.075	-	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	NT	NT
TMB	0.15	-	6-(18)	58 ^T	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00 ^{6)T}		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	1	0	0	1	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	3	2	0	0	1	0	6	0	6 (3.0)	3 (1.5)	0.00		
TMB	0.025	+	6-(18)	200	3	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	0 (0.0)	0.50		
TMB	0.050	+	6-(18)	200	5	1	1	0	0	0	7	0	6 (3.0)	2 (1.0)	0.13	NT	NT
TMB	0.10	+	6-(18)	196	2	3	0	0	0	0	5	2	4 (2.0)	2 (1.0)	0.38 ⁷⁾		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	9	40	127	7	4	10	197	1	96 (48.0)	91 (45.5)	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, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) Dimethyl sulfoxide 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. 6) Seven hundred and eighty eight cells were analysed. *: Purity was 98.75%.

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, 中川ゆづき, 日下部博一,
橋本恵子, 長尾哲二, 太田 亮

(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,

Tetsuji Nagao, Ryo Ohta

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

4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)のラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol) in Rats

要約

既存化学物質の毒性評価の一環として、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の0(5%アラビアゴム水溶液)、15、60、および250 mg/kgをSD系ラットに28日間強制経口投与し、その毒性を検討した。0、60および250 mg/kg群については、別に14日間の回復群を設けた。

被験物質投与に起因する一般状態の変化はみられず、体重への影響もみられなかった。

摂餌量では、投与開始初期に一時的な減少が250 mg/kg群の雌雄でみられたが、雄ではその後対照群をやや上回って推移した。60 mg/kg群の雄の摂餌量も対照群をやや上回って推移した。尿検査では、pHの低下が60 mg/kg群の雌と250 mg/kg群の雌雄に、尿蛋白およびケトン体の増加が60および250 mg/kg群の雌に、血液学検査では、血小板数の増加が250 mg/kg群の雌雄に、分葉核好中球比率の増加およびリンパ球比率の減少が250 mg/kg群の雌に、血液生化学検査では、無機リンの増加が60 mg/kg以上の投与群の雌に、総コレステロールの増加が250 mg/kg群の雌雄に、リン脂質および尿素窒素の増加と血糖値の低下が250 mg/kg群の雌にみられた。

病理学検査では、250 mg/kg群の雌雄に肝臓重量の増加、肉眼的な小腸壁の肥厚と盲腸の拡張がみられた。組織学的には、肝臓で小葉中心帯肝細胞の肥大と回腸における腸絨毛の過形成が250 mg/kg群の雌雄に、盲腸と結腸で吸収上皮細胞の空胞化が60 mg/kg以上の投与群の雌雄に、また、盲腸粘膜の細胞浸潤が60 mg/kg以上の投与群の雌雄に、結腸粘膜の細胞浸潤が60 mg/kg以上の投与群の雌にみられた。さらに、腸間膜リンパ節では、傍皮質領域における“tingible body macrophage”が250 mg/kg群の雌に多くみられた。回復群においては、回腸以外のほとんどの変化は消失した。

以上の結果から、本試験条件下における4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)の無影響量は雌雄とも15 mg/kg/dayと考えられた。

方法

1. 被験物質および被験液の調製

被験物質4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)は、分子量358.54、融点160~165℃、水に不溶、アセ

トンおよびメタノールに可溶の白色結晶性粉末である。本試験にはロット番号40701(住友化学工業(株)製)、純度98%以上のものを用いた。なお、投与終了後の残余被験物質について分析を行った結果、使用期間中は安定であったことが確認された。

投与容量が5 ml/kg体重となるよう、5%アラビアゴム水溶液に懸濁して0.3、1.2および5%(w/v)懸濁液を調製した。0.1~5%(w/v)懸濁液は、室温で1日間および冷蔵(約4℃)・暗所(褐色ガラス瓶)で8日間まで安定であったことから、最大1週間分を一括して調製し、1日分ずつ褐色ガラス瓶に分注して冷蔵庫(約4℃)に保存した。また、投与開始前および投与終了週の2回、投与に使用する各濃度液について当施設で測定した結果、いずれも濃度は適正でかつ均一であった。

2. 使用動物および飼育条件

5週齢のCrlj:CD(SD)系SPF雌雄ラットを日本チャールス・リバー(株)から購入し、当所で約1週間検疫・馴化飼育した後、体重増加が順調で一般状態に異常を認めなかった雌雄各42匹を選び、6週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で193~222 g(平均値:208.0 g)、雌で148~171 g(平均値:157.4 g)であった。

動物は、群分け当日の体重に基づいて層別化し、各群平均体重がほぼ均等となるよう、コンピュータを用いて各群に割り付けた。

動物は、温度23±3℃、相対湿度50±20%、換気回数1時間当たり11~13回、照明1日12時間の飼育室で、金属製網ケージに1匹ずつ収容し、固型飼料(放射線滅菌CRF-1、オリエンタル酵母工業(株))および飲料水(水道水)を自由に摂取させ飼育した。

3. 投与量および投与方法

2週間投与による予備試験(投与量:0、5、60、250および1000 mg/kg)の結果、1000 mg/kg群で多数例が死亡し、250 mg/kg群ではGOTおよびGPTの上昇、血糖値の低下、盲腸の拡張などがみられた。一方、60 mg/kg以下の投与群では変化はみられなかった。これらの成績から、本試験では250、60および15 mg/kgの3用量を設定し、これに対照群を加えて計4群を使用した。さらに、対照群、60および250 mg/kg群では回復群を設けた。動物数はいずれの群も雌雄各6匹とした。

被験液の投与容量は5 ml/kg体重とし、金属製胃ゾンデを用いて1日1回28日間強制経口投与した。対照群には溶媒(5%アラビアゴム水溶液)を同様に投与した。投

与量は最新の体重を基準に算出した。回復期間は14日間とした。

4. 検査項目

1) 一般状態の観察

投与期間中は毎日2回以上、回復期間中は毎日1回観察した。

2) 体重

投与期間および回復期間を通じ、週2回の頻度で体重を測定した。

3) 摂餌量測定

投与期間および回復期間を通じ、週2回の頻度で摂餌量を測定した。

4) 血液学検査

投与期間および回復期間終了の翌日の剖検時に検査を行った。前日から一夜(約16時間)絶食させた動物をエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から抗凝固剤(EDTA-2K)を加えた採血ビンに血液を採取し、赤血球数(電気抵抗変化検出法)、ヘモグロビン量(シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(平均赤血球容積および赤血球数から算出)、平均赤血球容積(電気抵抗変化検出法)、平均赤血球色素量(ヘモグロビン量および赤血球数から算出)、平均赤血球色素濃度(ヘモグロビン量およびヘマトクリット値から算出)、血小板数(電気抵抗変化検出法)、白血球数(電気抵抗変化検出法)(以上コールター全自動8項目血球アナライザーT890、(株)日科機)、網赤血球率(Brecher法)および白血球百分率(May-Giemsa鏡検法)を測定した。また、3.8%クエン酸ナトリウムを加えた容器に採取した血液を遠心分離(3000 rpm, 10分間)し、得られた血漿を用い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(以上クロット法、血液凝固自動測定装置、ACL-100, Instrumentation Laboratory)を測定した。

5) 血液生化学検査

血液学検査のための採血と同時に腹大動脈から採血し、遠心分離(3000 rpm, 10分間)により得られた血清を用いてAIP(Bessey-Lowry法)、総コレステロール(CEH-COD-POD法)、トリグリセライド(GK-GPO-POD法)、リン脂質(PLD-ChOD-POD法)、総ビリルビン(アゾビリルビン法)、血糖(Hexokinase-G6PD法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、クレアチニン(Jaffé法)、ナトリウム、カリウムおよび塩素(イオン選択電極法)、カルシウム(OCPC法)、無機リン(モリブデン酸法)、総蛋白質(Biuret法)、アルブミン(BCG法)およびA/G比(総蛋白質およびアルブミンから算出)を測定した。また、ヘパリンを加えた容器に採血し、遠心分離(3000 rpm, 10分間)により得られた血漿を用いてGOT、GPT、LDH(UV-rate法)、 γ -GTP(γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド法)およびChE(DTNB法)(以上いずれ

も自動分析装置Monarch, Instrumentation Laboratory)を測定した。

6) 尿検査

投与終了時剖検動物は投与第4週(検査当日の投与後)に、回復群の動物は回復第2週に検査を行った。検査動物を代謝ケージに個別に収容し、絶食・自由摂水下で4時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の20時間尿を採取した。採取した最初の4時間尿を用いてpH、蛋白質、ケトン体、ブドウ糖、潜血、ビリルビン、ウロビリノーゲン(以上URIFLET7A試験紙、(株)京都第一科学)、色調(肉眼観察)および沈渣(鏡検)を検査した。また、その後得られた20時間尿を用いて比重(屈折法、アタゴ屈折計、(株)アタゴ)を測定し、4時間尿量および20時間尿量から1日の尿量を算出した。さらに、代謝ケージに収容した状態で、前日からの1日の摂水量を給水瓶を用いて測定した。

7) 剖検および器官重量

上記血液学検査および血液生化学検査のための採血後に放血致死させ、外表異常の有無を観察した後、頭部、胸部および腹部を含む全身の器官・組織について肉眼的に異常の有無を観察した。続いて、以下に示す器官を摘出後、器官重量(絶対重量)を測定した。また、絶食後の体重および絶対重量から体重100 g当たりの相対重量を算出した。

脳、胸腺、心臓、肺(気管支を含む)、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、卵巣

8) 病理組織学検査

全動物について以下に示す全器官・組織を採取し、リン酸緩衝10%ホルマリン液(但し、眼球およびハーダー腺は3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン液)で固定した。さらに、*印を施した器官・組織についてパラフィンに包埋した。投与終了時剖検動物では、このうち対照群と高用量群は包埋した全ての器官・組織について、また、中および低用量群は被験物質投与による変化が疑われた小腸(十二指腸～回腸)、大腸(盲腸～直腸)、肝臓および腸間膜リンパ節についてそれぞれ切片とし、ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を施して鏡検した。回復群では、被験物質投与による変化が疑われた上記の腸管、肝臓および腸間膜リンパ節について全動物を検査した。

脳*、脊髄*、坐骨神経*、胸大動脈、心臓*、気管*、肺(気管支を含む)*、舌、食道、胃*、十二指腸*、空腸*、回腸*、盲腸*、結腸*、直腸*、唾液腺(顎下腺・舌下腺)、肝臓*、脾臓*、下垂体*、甲状腺(上皮小体を含む)*、副腎*、胸腺*、脾臓*、腸間膜リンパ節*、頸部リンパ節*、腎臓*、膀胱*、精巣*、精巣上体*、精囊、前立腺*、卵巣*、子宮*、膣*、乳腺、皮膚、眼球*、ハーダー腺、骨及び骨髄(胸骨・大腿骨)*、大腿筋、肉眼的異常部位*