

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細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（オリンパス）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、回帰直線式より算出した直接法における約50%の増殖抑制を示す濃度は16 µg/ml、代謝活性化法では40 µg/mlであった（Fig.1）。

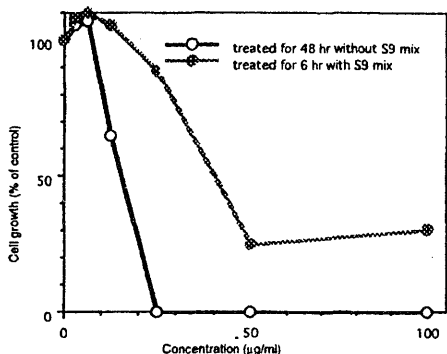


Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with p-tert-octylphenol in CHL cells

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最高処理濃度を、直接法（24および48時間連続処理）では16 µg/ml、代謝活性化法（6時間処理後18時間培養）では40 µg/mlとし、それぞれ最高処理濃度の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。

上記濃度にしたがって試験を実施したところ、S9 mix非存在下の処理群では、低濃度群（10 µg/ml）においても、分裂抑制のため染色体の分析が不可能であった。そこで、S9 mix非存在下の低濃度群の濃度（5.0 µg/ml）を高濃度として、以下の濃度群を設定して追加試験を実施した。

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。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製し、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。ギムザ染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのシャーレから得られた異なる標本を、複数の観察者がそれぞれブラインドの状態で行った。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<sup>11</sup>による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色体型のギャップ、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、フィッシャーの“Exact probability test”法により溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら<sup>21</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が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。

結果および考察

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。

p-tert-オクチルフェノールを加えて24時間および48時間処理した低濃度および中濃度の各群において、いずれも染色体の構造異常と倍数性細胞の出現頻度に有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。一方、高濃度群については、分裂抑制のため、観察可能な分裂中期細胞がみられなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果をTable 2に示した。

p-tert-オクチルフェノールを加えてS9 mix非存在下で6時間処理した各濃度群においては、いずれも分裂抑制のため、観察可能な分裂中期細胞がみられなかった。一方、S9 mix存在下では、中濃度において倍数性細胞が有意（p=0.0192）に増加したが、染色体の構造異常については全ての処理群で有意な増加は認められなかった。分裂抑制のため観察不能であったS9 mix非存在下の群については、さらに低い濃度を設定して追加試験を実施した（Table 3）。その結果、5.0 µg/mlの濃度では、分裂抑制のため、ほとんど分裂中期細胞が得られなかったが、1.3 µg/mlおよび2.5 µg/mlの濃度では、構造異常および倍数性細胞ともに有意な増加はみられなかった。従って、代謝活性化法における最終判定は、全ての処理群で陰性となった。

上記の試験において、直接法（24時間および48時間）における8 µg/mlの処理濃度では染色体分析は可能であったが、代謝活性化法におけるS9 mix非存在下の5 µg/mlの処理濃度では分裂細胞が得られなかった。その理由としては、S9 mix存在下ではp-tert-オクチルフェノールによる細胞毒性が著しく低減されることから、直接法の処理培養液中に含まれている10%の血清が代謝的に作用していることや、5~8 µg/mlの濃度付近が分裂抑制のかかる限界であることなどが考えられる。

陽性対照として用いた直接法でのMC処理群、およびS9 mix存在下でのCPA処理群では染色体体交換（cte）や染色体体切断（ctb）などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

なお、本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

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, 1988.
- 2) 石館基監修：“<改訂>染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 1987.

連絡先：試験責任者 田中憲穂

(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 : Tanaka, Noriho

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 1 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with p-tert-octylphenol \*\* by direct method

Group	Concentration (µg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3 ( 1.5 )	0 ( 0.0 )	0.38		
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	4	0	0	0	0	0	0	4	0	4 ( 2.0 )	0 ( 0.0 )	0.75		
PO	4	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.13	-	-
PO	8	24	200	7	0	0	0	0	0	0	7	0	7 ( 3.5 )	0 ( 0.0 )	0.13	-	-
PO	16	24	0													Tox	Tox
MC	0.05	24	200	30	40	40	0	1	0	10	121	0	69* ( 34.5 )	57* ( 28.5 )	0.38	+	-
Solvent <sup>1)</sup>	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.75		
PO	4	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0.13	-	-
PO	8	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0.25	-	-
PO	16	48	0													Tox	Tox
MC	0.05	48	200	18	24	33	2	2	0	10	89	1	52* ( 26.0 )	39* ( 19.5 )	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.), f : fragment (deletion), 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. Tox : toxicity 1) Dimethylsulfoxide 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

\* : Significantly different from solvent control at p<0.05. \*\* : Purity was more than 97%.

Table 2 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with p-tert-octylphenol \*\* by metabolic activation method

Group	Concentration (µg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0.13			
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.50			
PO	10	-	6-(18)	0												Tox	Tox	
PO	20	-	6-(18)	0												Tox	Tox	
PO	40	-	6-(18)	0												Tox	Tox	
CPA	5	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.00	-	-	
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 ( 1.0 )	1 ( 0.5 )	0.13			
PO	10	+	6-(18)	200	5	0	0	0	0	0	5	0	5 ( 2.5 )	0 ( 0.0 )	0.00	-	-	
PO	20	+	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	1.00*	-	-	
PO	40	+	6-(18)	200	5	8	1	0	0	0	14	0	8 ( 4.0 )	4 ( 2.0 )	0.25	-	-	
CPA	5	+	6-(18)	200	23	11	28	0	0	0	62	0	48* ( 24.0 )	33* ( 16.5 )	0.63	+	-	

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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. Tox : toxicity 1) Dimethylsulfoxide 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

\* : Significantly different from solvent control at p<0.05. \*\* : Purity was more than 97%.

染色体異常試験

Table 3 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with *p*-tert-octylphenol \*\* by metabolic activation method

Group	Concentration (µg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations										No. of cells with aberrations			Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Judgement <sup>5)</sup>		
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul <sup>2)</sup>	total	Others <sup>3)</sup>	TAG	(%)	TA	(%)		SA	NA	
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25		
Solvent <sup>1)</sup>	0	—	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25		
PO	1.3	—	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	0	(0.0)	0.00	—	—	
PO	2.5	—	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0	(0.0)	0.25	—	—	
PO	5.0	—	6-(18)	4	0	2	1	0	0	0	0	3	0	2	(50.0)	2	(50.0)	0.00 <sup>6)</sup>	Tox	Tox	
MC	0.1	—	6-(18)	200	12	21	40	0	1	0	0	74	0	52*	(26.0)	46*	(23.0)	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.), f : fragment (deletion), 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. Tox : toxicity 1) Dimethylsulfoxide 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) Four cells were analyzed.

\* : Significantly different from solvent control at  $p < 0.05$ . \*\* : Purity was more than 97%.