

1,2,3-トリメチルベンゼンのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験(追加試験)

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 1,2,3-Trimethylbenzene in Rats (Additional test)

要約

先に実施した1,2,3-トリメチルベンゼンのSD系ラットを用いる強制経口投与による28日間反復投与毒性試験において最低用量の100 mg/kg群でも雌雄で活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT), さらに雄の100 mg/kg群でプロトロンビン時間(PT)の延長傾向が認められたため、無影響量を見出すための追加試験を実施した。

ラットは1群雌雄各5匹で4試験群, 計40匹を使用した。

1,2,3-トリメチルベンゼンは、コーン油に溶解し、0, 3, 10および30 mg/kgを毎日1回、4週間連続経口投与し、一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、血液凝固能検査、血液生化学検査(GOTおよび塩素のみ)および病理学的検査(剖検)を行った。

その結果は、次のとおりであった。

一般状態の観察では、雌雄とも投与期間を通じて異常動物は認められなかった。

体重、摂餌量および飼料効率、雌雄とも群間で差が認められなかった。

血液凝固能検査では、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、プロトロンビン時間(PT)およびフィブリノーゲン量のいずれも、雌雄ともに被験物質投与群と対照群とで差が認められなかった。

血液生化学検査の結果、雌雄のすべての被験物質投与群ともGOTおよび塩素の2項目について、対照群と差が認められなかった。

病理学的検査の結果、被験物質の影響が示唆される肉眼所見は雌雄いずれの群にも認められなかった。

以上のことから、無影響量は雌雄とも30 mg/kg/dayと判断された。

材料および方法

1. 被験物質

1,2,3-トリメチルベンゼン(CAS No.526-73-8, 東京化成工業(株)提供)は無色透明の液体で、非水溶性、分子式 C_9H_{12} 、分子量120.20の化合物である。本試験に用いたロットFJA01の純度は99.8%であった。

2. 供試動物

供試したラット [Crj:CD(SD)系, SPF] は日本チャールス・リバー(株)(神奈川県)から4週齢で購入した。動

物を検収後、試験環境に8日間馴化させた後、6週齢で投与を開始した。動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした。動物の識別は、個別飼育ケージに動物標識番号(Animal ID-No.)を付すことにより行った。投与開始時の体重は雄で130~144 g、雌で104~121 gであった。

3. 飼育条件

動物はバリアシステムの飼育室で飼育し、環境調節の目標値は温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数20回/時、照明150~300 lux、12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)とした。(株)東京技研サービスの水洗式飼育機を使用し、金属製前面・床網目飼育ケージに動物を1匹ずつ収容し、オリエンタル酵母工業(株)製造の放射線滅菌改良NIH公開ラット・マウス飼料および水道水を自由に摂取させた。飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回取り換えた。

なお、動物の馴化期間を含め、投与および回復期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

4. 試験群の構成

試験群は0, 3, 10および30 mg/kgの4群とし、1群雌雄各5匹、計40匹を使用した。

[用量設定理由]

28日間反復投与毒性試験を0, 100, 300および1000 mg/kgで実施した結果、雌雄とも100 mg/kgにおいてもPT, APTTの延長のみが影響として認められた。無影響量を把握するため、さらに公比約3で30, 10および3 mg/kgを設定した。

5. 投与方法

被験物質の投与経路は経口とした。被験物質はコーン油に溶解し、胃ゾンデを用いて経口投与した。投与容量は体重100 g当り0.5 mlとした。対照群には溶媒のみ投与した。

6. 投与液の調製、分析

被験物質は、各用量(3, 10および30 mg/kg)ごとに所定量を精秤し、コーン油(ナカライテスク(株))に溶解した。投与液は調製後、冷蔵庫保存で1週間安定であることが確認されているので、本試験においては毎週1回調製を行い、1日分毎に小分けをし使用時まで冷蔵庫に保

管した。投与液の濃度分析をすべての群に関し投与1および4週の調製液について実施した結果、設定濃度の89.5～99.3%の範囲であり、適切に調製されていた。

7. 投与期間

投与期間は28日間とした。

8. 観察、測定および検査

1) 一般状態の観察

全動物を毎日午前、午後の2回観察し、中毒症状の有無、行動異常、死期の迫った動物および死亡動物の有無等を記録した。

2) 体重

投与開始から投与終了時まで、毎週1回測定した。

3) 摂餌量

毎週1回給餌した残量を測定し、飼料摂取量(g/week)を算出した。

4) 臨床検査

投与終了時に実施した。

採血するに当り、動物は約16時間絶食させた。動物をエーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。

a. 血液凝固能検査

クエン酸ソーダ添加血液の血漿について、プロトロンビン時間(Quick 1段法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(クロット法)およびフィブリノーゲン量(トロンビン時間法)を血液凝固自動測定装置KC-40(独国Amelung社)を用いて測定した。

b. 血液生化学検査

血清を用いて、塩素(電極法)をEKTACHEM 700N(米国コダック社)で、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT; Karmen改良法)をCentrifiChem ENCORE II(米国ペーカー社)で測定した。

5) 病理学検査

病理解剖は投与終了時に動物をエーテル麻酔し、放血致死させ実施した。肉眼的異常を病理解剖所見記録シートに記録した。また、肝臓、腎臓、脾臓および骨髄(大腿骨)について10%中性緩衝ホルマリン液で固定し保存した。

6) データの記録および統計分析

各試験群の体重、摂餌量、血液凝固能検査値および血液生化学検査値は、下記に示した自動判別方式に従い、最初にBartlettの等分散検定を実施した。等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、分散が有意で各群の標本数が同数の場合はDunnettの多重比較検定、各群の標本数が異なる場合はDuncanの多重範囲検定で対照群と各投薬群間の有意差を検定した。Bartlettの等分散検定で不等分散の場合はKruskal-Wallisの順位検定を実施し、

有意の場合はノンパラメトリックのDunnettの多重比較検定で対照群と各投薬群間の有意差を検定した。また、病理学的検査結果についてはFisherの直接確率検定を実施した。

有意水準は5および1%の片側検定で実施した。

試験結果

1. 死亡率

投与期間中、雌雄ともいずれの群にも死亡例は認められなかった。

2. 一般状態の観察

雌雄いずれの群にも異常動物は認められなかった。

3. 体重

雌雄とも全投与期間を通じて、対照群と被験物質投与群とで有意差が認められなかった。

4. 摂餌量

雌雄とも、投与期間を通じて群間で差が認められなかった。

5. 血液凝固能検査(Table 1)

雌雄ともPT, APTTおよびフィブリノーゲン量の3検査項目について群間で差は認められなかった。

6. 血液生化学検査(Table 2)

雌雄ともGOTおよび塩素は被験物質投与群と対照群とで差が認められなかった。

7. 病理学検査

a) 剖検所見

被験物質投与群で多く観察された所見はなく、観察された所見は、いずれも単発性の発生であった。

考察および結論

雌雄とも投与期間を通じて死亡例はなく、一般状態に異常のある動物は観察されなかった。

体重、摂餌量および飼料効率、雌雄とも被験物質投与群で差が認められなかった。

血液凝固能検査については、前試験(投与量0, 100, 300および1000 mg/kg)で認められたPTおよびAPTTの延長傾向が、雌雄の30 mg/kg群では認められなかった。

血液生化学的検査の結果、GOTおよび塩素は、雌雄とも対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

剖検所見にも被験物質投与と関連づけられる異常は認められなかった。

以上のことから、無影響量は雌雄とも30 mg/kg/dayと判断された。

Table 1 Coagulation of rats treated orally with 1,2,3-trimethylbenzene in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups(mg/kg)			
	0	3	10	30
Male				
No. of animals	5	5	5	5
PT (sec.)	13.6 ± 0.3	13.5 ± 0.3	13.5 ± 0.6	13.8 ± 0.4
APTT (sec.)	23.0 ± 0.6	23.5 ± 0.7	22.8 ± 1.2	23.2 ± 1.1
Fibrinogen (mg/dl)	284 ± 19	273 ± 17	283 ± 17	266 ± 9
Female				
No. of animals	5	5	5	5
PT (sec.)	13.8 ± 0.2	14.1 ± 0.5	14.0 ± 0.4	13.8 ± 0.4
APTT (sec.)	20.5 ± 1.7	20.7 ± 1.4	20.1 ± 0.9	20.8 ± 1.3
Fibrinogen (mg/dl)	231 ± 22	221 ± 31	229 ± 11	219 ± 16

Values are expressed as Mean ± S.D.

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with 1,2,3-trimethylbenzene in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups(mg/kg)			
	0	3	10	30
Male				
No. of animals	5	5	5	5
GOT (U/l)	48 ± 10	46 ± 9	38 ± 3	49 ± 5
Chloride (mmol/l)	110.6 ± 0.9	110.3 ± 0.4	109.6 ± 1.0	110.9 ± 0.9
Female				
No. of animals	5	5	5	5
GOT (U/l)	52 ± 11	59 ± 7	51 ± 8	57 ± 10
Chloride (mmol/l)	112.3 ± 1.3	112.1 ± 1.2	111.7 ± 1.0	113.8 ± 0.8

Values are expressed as Mean±S.D.

連絡先

試験責任者：井上博之
 試験担当者：各務 進，庄子明德，渡 修明，
 小林和雄，松木由加
 (財)食品農医薬品安全性評価センター
 〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜 582-2
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Hiroyuki Inoue (Study director),
 Susumu Kakamu, Akinori Shoji,
 Nobuaki Watari, Kazuo Kobayashi,
 Yuka Matuki
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
 Pesticides (An-pyo Center)
 582-2 Shiohinden Aza Arahama, Fukude-cho,
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan
 Tel 81-538-58-1266 Fax 81-538-58-1393

1,2,3-トリメチルベンゼンの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 1,2,3-Trimethylbenzene on Bacteria

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、1,2,3-トリメチルベンゼンの変異原性について遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA100, TA98, TA1535およびTA1537株ならびに大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA株を用いる復帰突然変異試験を行った。予備的な試験の結果を基に、試験用量を設定した。すなわち、直接法(-S9 mix)の各菌株ならびに代謝活性化法(+S9 mix)のTA100, TA1535およびTA1537でそれぞれ、1.42~45.4 μg /プレート、代謝活性化法のWP2uvrAおよびTA98で5.68~182 μg /プレートの6用量を設定し試験した。その結果、直接法および代謝活性化法のいずれにおいても、ラット肝ミクロソーム(S9)添加の有無にかかわらず、溶媒対照に比べ復帰突然変異コロニー数の明確な増加は認められず、再現性も確認された。一方、各系での陽性対照物質は、それぞれの試験菌株に対し明確な突然変異誘発作用を示した。従って、本試験条件下において、1,2,3-トリメチルベンゼンは微生物に対し遺伝子突然変異を誘起しないものと判断した。

材料および方法

1. 試験菌株

細菌を用いる復帰突然変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537¹⁾ならびにトリプトファン要求性の *Escherichia coli* WP2uvrA²⁾の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のB. N. Ames教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所から分与を受けた。平成6年9月5日に菌株の特性検査を実施し、本試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO: MERCK社)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mlずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80℃で保存した。

2. 培地の調製

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

日清製粉(株)製のテスメディアAN培地を購入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを

含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム [いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業(株))と1.5%の寒天(OXOID社:No.1)を加え、30 mlをシャーレに分注したものである。

2) トップアガー(軟寒天)

Bacto-agar(DIFCO社)0.6%を含む0.5%塩化ナトリウム水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-ヒスチジン(関東化学(株))-0.5 mM D-ビオチン(関東化学(株))水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mM L-トリプトファン(関東化学(株))水溶液を同じく1容量加え用いた。

3. 前培養条件

内容量200 mlの円筒容器(ストレージボトル: Corning Costar社)に2.5%ニュートリエントブロス(OXOID社)溶液を25 ml分注し、これに融解した菌懸濁液を50 μl 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10:タイテック(株))を用い、37℃で8時間振盪(往復振盪:120回/分)培養し、試験に使用した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1ml中の量
S9	0.1 ml
MgCl ₂	8 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADPH	4 μmol
NADH	4 μmol
リン酸緩衝Na-液(pH 7.4)	100 μmol

5. 被験物質

被験物質の1,2,3-トリメチルベンゼン(ロット番号:FJA01, CAS No.:526-73-8)は分子式C₉H₁₂, 分子量120.20, 純度90.8%の液体である。東京化成工業(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、当センターにおいて残余被験物質を分析した結果、安定性に問題

はなかった。

6. 被験物質溶液の調製

DMSOに被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

7. 試験用量の設定

7.26, 36.3, 182, 908および4540 μg /プレート(50 mg/ml溶液を本被験物質の純度90.8%で補正した)の用量を用いて予備的な試験を実施した。その結果、直接法の全菌株ならびに代謝活性化法のTA100, TA1535およびTA1537で36.3 μg /プレート以上、代謝活性化法のWP2uvrAおよびTA98で182 μg /プレート以上において試験菌株に対する生育阻害作用が観察された。従って、本試験においては直接法の各菌株ならびに代謝活性化法のTA100, TA1535およびTA1537で45.4 μg /プレート、代謝活性化法のWP2uvrAおよびTA98で182 μg /プレートを最高用量とし、それぞれ6用量(公比2)を設定した。

8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した物質を使用した。これらの陽性対照物質は、DMSOを用いて溶解し、少量ずつ分注した後凍結保存(-20℃)した。

- 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
(AF-2: 和光純薬工業(株))
- アジ化ナトリウム(NaN_3 ; 和光純薬工業(株))
- 9-アミノアクリジン(ACR:ALDRICH社)
- 2-アミノアントラセン(2-AA: 和光純薬工業(株))

9. 試験方法

Amesらの原法の改良法であるプレインキュベーション法¹⁾に準じて、直接法および代謝活性化法それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液を100 μl 、次いで直接法の場合、0.1 Mナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500 μl 、代謝活性化法の場合、S9 mixを500 μl および試験菌液100 μl を加え、37℃で20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、トップアガーを2 ml添加し、混合液をプレート上に重層した。37℃の条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡($\times 60$)を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰突然変異により生じたコロニーを計数した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11: システムサイエンス(株))を用いた。独立して試験を2回実施した。

10. 結果の解析

復帰突然変異コロニー数が溶媒対照のほぼ2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

試験結果をTable 1~4に示した。直接法(-S9 mix)ならびに代謝活性化法(+S9 mix)のいずれとも高用量群において、1,2,3-トリメチルベンゼン処理による生育阻害作用が観察された。また、復帰突然変異コロニー数については、直接法、代謝活性化法とも溶媒対照と同等の値であり、明確な増加傾向は認められなかった。一方、陽性対照物質はそれぞれの菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰突然変異コロニーを誘発した。なお、S9 mix添加時182 μg /プレートの用量において、試験管内の反応液が僅かに白濁したが、コロニー計数時には析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。以上の試験結果から、本試験条件下において1,2,3-トリメチルベンゼンの微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutat. Res.*, **38**, 3(1976).

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓
 試験担当者: 北沢倫世, 板倉真由実, 勝俣 勇
 (財)食品農医薬品安全性評価センター
 〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)
 Michiyo Kitazawa, Mayumi Itakura
 Isami Katsumata
 Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
 Pesticides (An-pyo Center)
 582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1. Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-trimethylbenzene (1st trial)
[direct method: -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	97	104	103	10	12	14	15	21	18	18	24	25	4	6	10
		[101 \pm 4]			[12 \pm 2]			[18 \pm 3]			[22 \pm 4]			[7 \pm 3]		
Test sub.	1.42	87	101	85	7	14	16	22	23	13	18	19	29	8	9	8
		[91 \pm 9]			[12 \pm 5]			[19 \pm 6]			[22 \pm 6]			[8 \pm 1]		
	2.84	97	91	82	12	8	9	18	19	24	22	19	26	7	9	10
		[90 \pm 8]			[10 \pm 2]			[20 \pm 3]			[22 \pm 4]			[9 \pm 2]		
	5.68	74	94	94	4	11	5	13	19	22	20	22	27	5	9	4
		[87 \pm 12]			[7 \pm 4]			[18 \pm 5]			[23 \pm 4]			[6 \pm 3]		
	11.4	80	83	69	5	13	12	17	21	16	25	21	22	7	10	8
		[77 \pm 7]			[10 \pm 4]			[18 \pm 3]			[23 \pm 2]			[8 \pm 2]		
	22.7	83	88	95	7	8	7	31	18	21	26	20	15	6	7	7
		[89 \pm 6]			[7 \pm 1]			[23 \pm 7]			[20 \pm 6]			[7 \pm 1]		
	45.4	77*	66*	88*	8*	6*	11*	25*	14*	26*	19*	26*	22*	5*	9*	5*
		[77 \pm 11]			[8 \pm 3]			[22 \pm 7]			[22 \pm 4]			[6 \pm 2]		
Positive control		558	579	517 ^{a)}	402	345	345 ^{b)}	107	140	106 ^{a)}	528	588	565 ^{c)}	620	580	585 ^{d)}
		[551 \pm 32]			[364 \pm 33]			[118 \pm 19]			[560 \pm 30]			[595 \pm 22]		

#: Solvent control *: The background lawn was thin

a): AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): ACR; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 2. Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-trimethylbenzene (1st trial)
[activation method: +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	109	100	97	8	11	14	26	23	27	28	25	33	14	11	15
		[102 \pm 6]			[11 \pm 3]			[25 \pm 2]			[29 \pm 4]			[13 \pm 2]		
Test sub.	1.42	97	94	96	9	7	15	-	-	-	-	-	23	23	16	
		[96 \pm 2]			[10 \pm 4]									[21 \pm 4]		
	2.84	94	102	90	13	15	12	-	-	-	-	-	17	20	23	
		[95 \pm 6]			[13 \pm 2]									[20 \pm 3]		
	5.68	89	110	107	13	20	11	21	26	21	32	30	40	20	17	22
		[102 \pm 11]			[15 \pm 5]			[23 \pm 3]			[34 \pm 5]			[20 \pm 3]		
	11.4	114	99	106	18	9	9	29	26	17	40	37	41	24	23	27
		[106 \pm 8]			[12 \pm 5]			[24 \pm 6]			[39 \pm 2]			[25 \pm 2]		
22.7	108	121	105	6	10	14	24	26	24	33	37	43	25	17	22	
	[111 \pm 9]			[10 \pm 4]			[25 \pm 1]			[38 \pm 5]			[21 \pm 4]			
45.4	110*	121*	118*	8*	10*	11*	25	24	30	33	37	24	14*	24*	15*	
	[116 \pm 6]			[10 \pm 2]			[26 \pm 3]			[31 \pm 7]			[18 \pm 6]			
90.8	-	-	-	-	-	-	14	25	22	38	33	30	-	-	-	
								[20 \pm 6]			[34 \pm 4]					
182	-	-	-	-	-	-	28*	28*	26*	26*	21*	24*	-	-	-	
								[27 \pm 1]			[24 \pm 3]					
Positive control		620	580	583 ^{a)}	272	367	321 ^{b)}	577	554	646 ^{c)}	314	287	288 ^{d)}	130	120	97 ^{b)}
		[594 \pm 22]			[320 \pm 48]			[592 \pm 48]			[296 \pm 15]			[116 \pm 17]		

#: Solvent control *: The background lawn was thin -: Not tested

a): 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d): 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3. Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-trimethylbenzene (2nd trial)
[direct method:-S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	94	103	106	16	15	14	20	21	27	21	20	24	7	8	7
		[101 \pm 6]			[15 \pm 1]			[23 \pm 4]			[22 \pm 2]			[7 \pm 1]		
Test sub.	1.42	101	98	100	14	16	15	27	21	22	21	20	22	5	5	8
		[100 \pm 2]			[15 \pm 1]			[23 \pm 3]			[21 \pm 1]			[6 \pm 2]		
	2.84	94	105	99	16	14	13	23	24	25	24	20	22	8	8	7
		[99 \pm 6]			[14 \pm 2]			[24 \pm 1]			[22 \pm 2]			[8 \pm 1]		
	5.68	97	98	92	15	17	17	22	25	25	22	23	24	8	6	7
	[96 \pm 3]			[16 \pm 1]			[24 \pm 2]			[23 \pm 1]			[7 \pm 1]			
	11.4	102	103	104	16	11	12	26	21	20	26	26	25	6	8	4
	[103 \pm 1]			[13 \pm 3]			[22 \pm 3]			[26 \pm 1]			[6 \pm 2]			
	22.7	103	93	100	15	15	15	24	26	23	27	23	24	7	6	10
	[99 \pm 5]			[15 \pm 0]			[24 \pm 2]			[25 \pm 2]			[8 \pm 2]			
	45.4	107*	94*	97*	10*	10*	9*	22*	22*	20*	23*	20*	21*	9*	6*	9*
	[99 \pm 7]			[10 \pm 1]			[21 \pm 1]			[21 \pm 2]			[8 \pm 2]			
Positive control		428	394	437 ^{a)}	375	442	502 ^{b)}	109	107	110 ^{c)}	631	645	659 ^{c)}	586	597	450 ^{d)}
		[420 \pm 23]			[440 \pm 64]			[109 \pm 2]			[645 \pm 14]			[544 \pm 82]		

#: Solvent control * : The background lawn was thin

a) : AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : NaN_3 ; Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) : AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d) : ACR; 9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4. Results of the bacterial reversion test of 1,2,3-trimethylbenzene (2nd trial)
[activation method:+S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
DMSO#	0	101	99	102	10	16	15	27	23	28	28	32	34	14	14	13
		[101 \pm 2]			[14 \pm 3]			[26 \pm 3]			[31 \pm 3]			[14 \pm 1]		
Test sub.	1.42	96	109	91	13	16	10	-	-	-	-	-	-	14	13	12
		[99 \pm 9]			[13 \pm 3]			-			-			[13 \pm 1]		
	2.84	98	94	102	12	18	14	-	-	-	-	-	-	9	9	14
		[98 \pm 4]			[15 \pm 3]			-			-			[11 \pm 3]		
	5.68	99	96	105	13	17	16	26	21	27	35	36	34	14	10	15
		[100 \pm 5]			[15 \pm 2]			[25 \pm 3]			[35 \pm 1]			[13 \pm 3]		
	11.4	102	107	106	15	15	13	27	27	21	34	39	32	14	14	14
		[105 \pm 3]			[14 \pm 1]			[25 \pm 3]			[35 \pm 4]			[14 \pm 0]		
22.7	90	105	103	15	18	13	27	26	27	33	37	38	10	13	14	
	[99 \pm 8]			[15 \pm 3]			[27 \pm 1]			[36 \pm 3]			[12 \pm 2]			
45.4	106*	98*	90*	9*	12*	12*	24	25	21	34	31	39	15*	15*	13*	
	[98 \pm 8]			[11 \pm 2]			[23 \pm 2]			[35 \pm 4]			[14 \pm 1]			
90.8	-	-	-	-	-	-	21*	23*	23*	35*	30*	32*	-	-	-	
	-			-			[22 \pm 1]			[32 \pm 3]			-			
182	-	-	-	-	-	-	24*	20*	27*	33*	30*	25*	-	-	-	
	-			-			[24 \pm 4]			[29 \pm 4]			-			
Positive control		658	716	764 ^{a)}	299	321	294 ^{b)}	528	504	607 ^{c)}	406	324	322 ^{d)}	104	105	111 ^{b)}
		[713 \pm 53]			[305 \pm 14]			[546 \pm 54]			[351 \pm 48]			[107 \pm 4]		

#: Solvent control * : The background lawn was thin - : Not tested

a) : 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ b) : 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ c) : 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) : 2-AA, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

1,2,3-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 1,2,3-Trimethylbenzene on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検作業の一環として、1,2,3-トリメチルベンゼンの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株(CHL)を用いる *in vitro* 染色体異常試験を行った。細胞増殖抑制試験結果を基に、細胞毒性が観察される濃度を最高用量として設定した。すなわち、連続24時間処理法で90.0, 180および360 $\mu\text{g/ml}$ 、同48時間処理法で60.0, 120および240 $\mu\text{g/ml}$ 、短時間+S9 mix処理法で120, 240, 480および960 $\mu\text{g/ml}$ 、同-S9 mix処理法で120, 240および480 $\mu\text{g/ml}$ の3~4用量(公比2)について染色体標本作製した後、顕微鏡観察を実施した。短時間+S9 mix処理法の240および480 $\mu\text{g/ml}$ において、僅かではあるが染色体構造異常の誘発傾向が観察された。同処理法において350, 500, 650および800 $\mu\text{g/ml}$ の4用量を用いた確認試験を実施した結果、800 $\mu\text{g/ml}$ において5.5%の構造異常細胞が出現した。一方、連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンC(MMC)および短時間+S9 mix処理の陽性対照物質シクロホスファミド(CP)は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。従って、本試験条件下の *in vitro* 試験系において、1,2,3-トリメチルベンゼンの染色体異常誘起性について疑陽性と判断した。

材料および方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド(DMSO:MERCK社)を10%添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3~5日ごとに継代した。なお、本染色体異常試験では解凍後継代数7の細胞を、確認試験においては同14の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM培地(LIFE TECHNOLOGIES社)を1000mlの精製水で溶解した後、2.2gの炭酸水素ナトリウム(関東化学株)を加えた。1N塩酸を用いてpHを7.2に調整した後、メンブランフィルター(0.2 μm :Gelman Sciences社)を用いて加圧濾過除菌した。非働化(56℃、

30分)済み仔牛血清(LIFE TECHNOLOGIES社)を最終濃度で10%になるよう加えた後、試験に使用した。

3. 培養条件

CO₂インキュベーター(FORMA社あるいは三洋電機特機株)を用い、CO₂濃度5%、37℃の条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン(株)製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成は松岡らの方法に従った¹⁾。

5. 被験物質

被験物質の1,2,3-トリメチルベンゼン(ロット番号:FJA01, CAS No.:526-73-8)は分子式C₉H₁₂、分子量120.20、純度90.8%の液体である。東京化成工業(株)から提供された被験物質を使用した。試験終了後、当センターにおいて残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質溶液の調製

DMSOに被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った(用時調製)。

なお、本被験物質の純度は95%未満であるため、秤量に際して換算した。

7. 予備試験(細胞増殖抑制試験)

細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質溶液を処理した。連続処理法の場合、24あるいは48時間連続して処理を実施し、短時間処理法ではS9 mix存在下(+S9 mix)あるいは非存在下(-S9 mix)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。

細胞を10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業株)で固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット(関東化学株)水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30%エタノール、1%酢酸水溶液)を適量加え、5分間程度放置して色素を溶出した後、580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比、すなわち細胞生存率を算出した。

その結果、いずれの処理法においても顕著な細胞増殖抑制が観察された(Fig. 1)。プロビット法を用いて算出した50%細胞増殖抑制濃度は連続24時間処理で180 $\mu\text{g/ml}$ 、同48時間処理で130 $\mu\text{g/ml}$ 、短時間+S9 mix処理で218 $\mu\text{g/ml}$ 、同-S9 mix処理で213 $\mu\text{g/ml}$ であった。

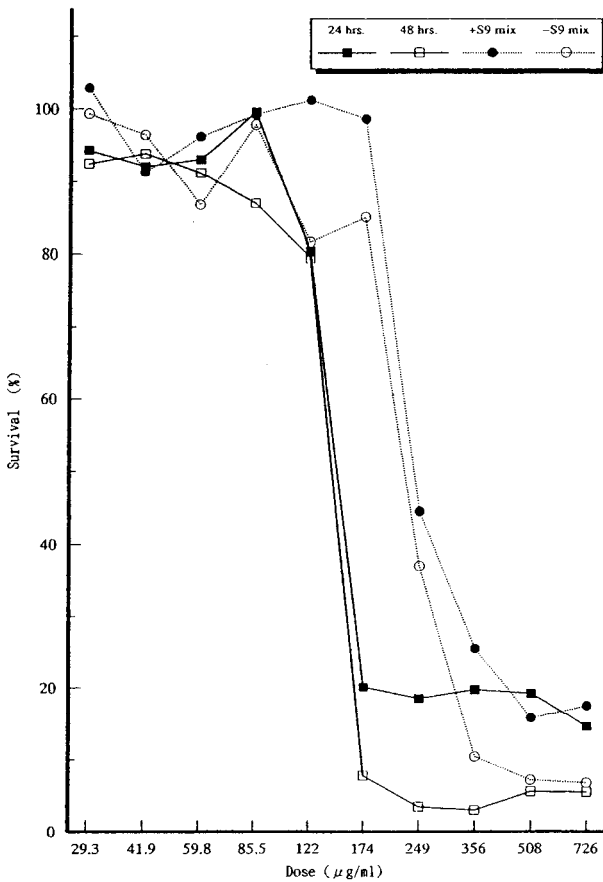


Fig. 1 Dose-survival curves of 1,2,3-trimethylbenzene

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果を基に、染色体異常試験では連続24時間処理で360 $\mu\text{g/ml}$ 、同48時間処理で240 $\mu\text{g/ml}$ 、短時間+S9 mix処理で960 $\mu\text{g/ml}$ 、同-S9 mix処理で480 $\mu\text{g/ml}$ を最高用量とし、以下公比2で減じた計3~4用量ならびに溶媒対照群を設定した。

陽性対照として、連続処理法の場合、マイトマイシンC(MMC:協和醗酵工業(株))を、24時間処理で0.05 $\mu\text{g/ml}$ 、48時間処理で0.025 $\mu\text{g/ml}$ の用量で、短時間処理法の場合、シクロホスファミド(CP:塩野義製薬(株))を、12.5 $\mu\text{g/ml}$ の用量で試験した。

また、確認試験においては350, 500, 650および800 $\mu\text{g/ml}$ の4用量(等差数列)を設定した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、予備試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃度で0.2 $\mu\text{g/ml}$ となるようコロセミド(LIFE TECHNOLOGIES社)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥

離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mM塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.2%ゴムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、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。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会²⁾による分類法に従って実施した。

すべての標本をコード化した後、観察した。

11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞を含めた場合(+gap)と、含めない場合(-gap)とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、石館ら³⁾の基準に従って判定した。染色体異常を有する細胞の出現頻度が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。最終的には再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

結果および考察

連続処理群での試験結果をTable 1に示した。1,2,3-トリメチルベンゼン処理群の場合、24時間ならびに48時間処理のいずれの用量においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発傾向は観察されなかった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞では染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。短時間処理群での試験結果をTable 2に示した。被験物質処理群の場合、+S9 mix処理において240および480 $\mu\text{g/ml}$ において染色体の構造異常の出現頻度が5%を超え、疑陽性と判定された。再現性を調査するため確認試験を実施した結果、被験物質処理群において僅かではあるが染色体の構造異常の増加傾向が観察された(Table 3)。また、陽性対照物質のCPで処理した細胞ではS9 mix存在下でのみ染色体の構造異常の顕著な誘発が認められた。以上の試験結果から、本試験条件下において1,2,3-トリメチルベンゼンの哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、疑陽性と判定した。

Table 1. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with 1,2,3-trimethylbenzene [long-term treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO*	0	24	200	2	1	0	1	0	0	1.5	1.0	0.5	-
Test Sub.	90.0	24	200	3	4	0	2	0	0	4.5	3.0	0.5	-
	180	24	200	0	0	0	1	0	0	0.5	0.5	0.0	-
	360	24	200	0	1	0	1	0	0	1.0	1.0	0.0	-
MMC**	0.05	24	200	19	63	0	100	0	1	64.5	63.5	0.0	+
DMSO*	0	48	200	1	2	0	1	0	0	2.0	1.5	0.0	-
Test Sub.	60.0	48	200	1	2	0	4	0	0	3.5	3.0	0.5	-
	120	48	200	1	2	0	1	0	0	2.0	1.5	0.0	-
	240	48	200	0	2	0	3	0	0	2.5	2.5	2.0	-
MMC**	0.025	48	200	14	38	0	76	2	0	46.5	45.0	0.0	+

*:Solvent control **:Positive control (mitomycin C)

ctb:chromatid break csb:chromosome break cte:chromatid exchange cse:chromosome exchange oth:others

Table 2. Chromosomal aberration test on CHL cells treated with 1,2,3-trimethylbenzene [short-term treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO*	0	+	6	200	0	1	0	2	0	0	1.5	1.5	0.0	-
Test Sub.	120	+	6	200	0	5	0	4	0	0	3.5	3.5	2.0	-
	240	+	6	200	3	7	0	12	0	0	6.5	6.0	1.0	±
	480	+	6	200	2	4	0	6	1	0	5.5	4.5	3.0	±
	960	+	6	Toxic										
CP**	12.5	+	6	200	5	40	0	89	1	0	51.5	51.5	0.0	+
DMSO*	0	-	6	200	1	2	0	1	1	0	2.5	2.0	1.0	-
Test Sub.	120	-	6	200	1	4	0	1	0	0	3.0	2.5	1.0	-
	240	-	6	200	1	2	0	0	0	0	1.5	1.0	0.0	-
	480	-	6	200	2	2	0	0	0	0	1.5	1.0	1.0	-
CP**	12.5	-	6	200	1	0	0	2	0	0	1.5	1.0	1.0	-

*:Solvent control **:Positive control (cyclophosphamide)

ctb:chromatid break csb:chromosome break cte:chromatid exchange cse:chromosome exchange oth:others

Table 3. Results of the confirmative examination using CHL cells of 1,2,3-trimethylbenzene [short-term treatment]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Total [+gap] (%)	Total [-gap] (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO*	0	+	6	200	1	0	1	3	0	1	3.0	2.5	0.0	-
Test Sub.	350	+	6	200	1	1	0	3	0	0	1.5	1.5	1.0	-
	500	+	6	200	0	1	0	6	1	0	3.5	3.5	0.5	-
	650	+	6	200	2	2	0	5	1	0	4.5	3.5	0.5	-
	800	+	6	200	2	7	0	7	0	0	5.5	5.0	1.5	±
CP**	12.5	+	6	200	10	34	0	105	0	0	59.0	58.5	0.0	+

*:Solvent control **:Positive control(cyclophosphamide)

ctb:chromatid break csb:chromosome break cte:chromatid exchange cse:chromosome exchange oth:others

文献

- 1) A. Matsuoka, M. Hayashi and M. Ishidate Jr., *Mutat Res.*, **66**, 277(1979).
- 2) 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, pp. 31-35.
- 3) 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, 東京, 1987, pp. 19-24.

連絡先

試験責任者: 中嶋 圓
 試験担当者: 北沢倫世, 菊池正憲, 熊平智司
 (財)食品農医薬品安全性評価センター
 〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2
 Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Madoka Nakajima (Study director)
 Michiyo Kitazawa, Masanori Kikuchi
 Satoshi Kumadaira
 Biosafety Research Center/Foods, Drugs and
 Pesticides (An-pyo Center)
 582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,
 Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan
 Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393