

# 1,2,4-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 1,2,4-Trimethylbenzene on Bacteria

### 要約

既存化学物質安全性調査事業の一環として、1,2,4-トリメチルベンゼンについて、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  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で行ったところ、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験において、すべての検定菌で強い抗菌性が認められた。また、TA1535のS9 mix無添加試験とTA1537のS9 mix添加試験では、本試験Iで抗菌性のない用量が4用量に達しなかったため、本試験の用量を下げた。したがって、本試験ではS9 mix無添加試験をTA100, TA1535, TA98およびTA1537は7.81~250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、WP2 *uvrA*は15.6~500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で、S9 mix添加試験をTA1537は7.81~250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA100, TA1535およびWP2 *uvrA*は15.6~500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 、TA98は31.3~1000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で用量を設定して実施した。

その結果、S9 mix無添加試験では、TA100, TA1535, TA98およびTA1537では125  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、WP2 *uvrA*では、250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、S9 mix添加試験では、TA1537では125  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、TA100およびTA1535では250  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上、TA98およびWP2 *uvrA*では、500  $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上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、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(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<sup>2)</sup>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<sup>2)</sup>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、試験に際して、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]

1,2,4-トリメチルベンゼン(CAS No. 95-63-6)は、分子量120.20の無色透明液体である。試験には、東洋合成工業(株)製〔ロット番号:H5-CH-11, 純度98.75%(不純物:不明)〕を、(社)日本化学工業協会から供与され、使用時まで室温遮光保管して、使用した。

1,2,4-トリメチルベンゼンは、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, 10または2.5 mg/mlになるように溶解した後、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、1,2,4-トリメチルベンゼンの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(78.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )溶液は、本試験IIで調製したものについて、高濃度(60.0 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、104および99.2%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(78.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )溶液は91.6%、高濃度(10.0 mg/ml溶液)は99.8%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	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 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
グルコース-6-リン酸	5 $\mu$ mol
NADH	4 $\mu$ mol
NADPH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ 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°C 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/プレート 以上, TA1535 および WP2 *uvrA* は 500  $\mu$ 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  $\mu$ g/プレート 以上, TA98 は 1500  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/プレート, WP2 *uvrA* は 15.6 ~ 500  $\mu$ g/プレートの範囲で, S9 mix 添加試験では TA1537 は 7.81 ~ 250  $\mu$ g/プレート, TA100, TA1535 および WP2 *uvrA* は 15.6 ~ 500  $\mu$ g/プレート, TA98 は 31.3 ~ 1000  $\mu$ 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

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	
S9 mix (-)	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)			
S9 mix (+)	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、標本を作製し、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(株))培養液を用いた。

#### 3. 培養条件

$2 \times 10^4$ 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたデッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター(5% CO<sub>2</sub>)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(株)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C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>、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(株))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、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業(株))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%増殖抑制濃度をはさむ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)。

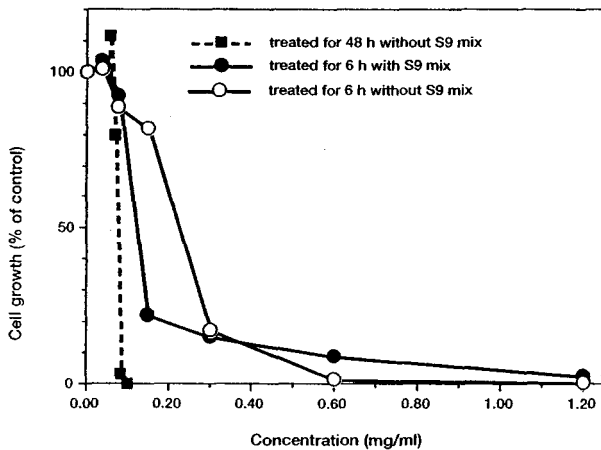


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,2,4-trimethylbenzene

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(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株)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イス

ユにつき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つのデイス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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>(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ラン・アーミテッジの傾向性検定<sup>4)</sup>(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<sup>1)</sup>

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others <sup>3)</sup>	No. of cells			Trend test <sup>5)</sup>	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		with aberrations TAG (%)	Polyloid <sup>4)</sup> (%)	TA (%)	SA	NA
Control			200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		
Solvent <sup>1)</sup>	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 <sup>6)</sup>		
MC	0.00005	24	200	6	34	76	6	1	0	123	1	74 (37.0)	71 (35.5)	0.00		
Solvent <sup>1)</sup>	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 <sup>7)T</sup>		
MC	0.00005	48	200	7	25	76	1	8	0	117	4	76 (38.0)	72 (36.0)	0.00		

<sup>1)</sup> 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 <sup>3)</sup>	No. of cells			Trend test <sup>5)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>	total		with aberrations TAG (%)	Polyloid <sup>4)</sup> (%)	TA (%)	SA	NA
Control				200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
Solvent <sup>1)</sup>	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 <sup>T</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00 <sup>6)T</sup>		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	1	1	0	0	1	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.13		
Solvent <sup>1)</sup>	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 <sup>7)</sup>		
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