

ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of Bis(1-methylethyl)naphthalene on Bacteria

要約

ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

試験は、指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、S9 mix 非存在(直接法)および存在(代謝活性化法)下でプレインキュベーション法により行った。

20~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で行った濃度設定試験では、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても生育阻害は認められなかった。したがって、本試験は、312.5~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲の濃度(公比2)を用いて行った。

試験を2回実施した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての菌株において復帰変異コロニー数の明らかな増加は認められず、また、菌の生育阻害も認められなかった。

以上の成績から、ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの細菌に対する遺伝子突然変異誘発は陰性と判定した。

方法

1. 指標菌株

国立公衆衛生院地域環境衛生学部から1994年12月19日に分与を受けた *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を解凍後、その30 μL をニュートリエントブロス(Bacto nutrient broth dehydrated, Difco Laboratories)液体培地15 mLに接種し、37℃で12時間振盪培養した。培養後の懸濁菌液は、濁度を測定し、濁度と生菌数の換算式より1 mLあたり 1×10^9 以上の生菌数が得られていることを確認し、試験菌液とした。

各菌株の遺伝的特性検査は、凍結保存菌の調製時並びに各実験ごとに行い、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。

2. 被験物質

ビス(1-メチルエチル)ナフタレン(ロット番号7Y251, 呉羽化学工業(株), 東京)は、無色透明の液体で、水およ

びジメチルスルホキシド(DMSO)に不溶、アセトンに可溶であり、純度98.44%(不純物としてビス(1-メチルエチル)テトラリン1.10%およびトリス(1-メチルエチル)ナフタレン0.43%を含む)の物質である。

実験終了後、被験物質提供元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。

3. 被験物質供試液の調製

溶媒にアセトン(和光純薬工業(株))を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製した。

4. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記のものを使用した。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

2-AA: 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

NaN₃: アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9-AA: 9-アミノアクリジン(Aldrich Chemical Co.)

AF-2 および 2-AA は DMSO(和光純薬工業(株))に、NaN₃ および 9-AA は 蒸留水(株)大塚製薬工場)に溶解した。

5. 培地

1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

テスメディアAN培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。培地1 Lあたりの組成は下記のとおりであり、径90 mmのシャーレ1枚あたりに30 mLを分注したものである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	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
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

2) アミノ酸添加軟寒天培地(トップアガー)

0.6 w/v% 寒天粉末(Difco Laboratories)および0.5 w/v% 塩化ナトリウムの組成の軟寒天を調製し、これに、*S. typhimurium*用には0.5 mM D-ピオチンおよび0.5 mM L-ヒスチジン水溶液、*E. coli*用には0.5 mM L-トリプトファン水溶液を1/10容加え、トップアガーとした。

6. S9 mix

製造後6ヶ月以内のエームテスト用凍結S9 mix(キッコーマン(株))を購入し、使用した。S9は、誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンと投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。

7. 試験方法

試験は、プレインキュベーション法で行った。

試験管に使用溶媒0.05 mL、被験物質供試液0.05 mLあるいは陽性対照物質溶液0.1 mLを入れ、次いで直接法では0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を0.5 mL、代謝活性化法ではS9 mixを0.5 mL加え、続いて試験菌液0.1 mLを分注し、37℃で20分間振盪培養した。培養終了後、45℃に保温したトップアガー2 mLを加えた混合液をプレート上に重層した。37℃で48時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。プレートは、濃度設定試験では各濃度とも1枚、本試験では3枚を使用した。本試験は、同一濃度を用いて2回行った。

8. 結果の判定

結果の判定は、各濃度におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、以下の3基準を満たす場合を陽性とした。

- 1) 被験物質処理群において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
- 2) 被験物質濃度の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する(濃度依存性)。
- 3) 2回にわたる本試験の結果から、復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

結果および考察

20~5000 µg/plateの範囲で行った濃度設定試験では、直接法および代謝活性化法ともに、いずれの指標菌株においても生育阻害は認められなかった。したがって、本試験における被験物質の処理濃度は、最高濃度を5000 µg/plateとし、以下公比2で2500, 1250, 625および312.5 µg/plateとした。

試験を2回行った結果(Tables 1~4)、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、供試した全ての菌株において復帰変異コロニー数は、溶媒対照値の2倍を越えることはなく、また、菌の生育阻害も認められなかった。代謝活性化法における312.5 µg/plate以上の供試混合液は、プレインキュベーション終了時に白濁していた。また、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの濃度においてもトップアガーを加えた供試混合液をプレート上に広げた際、被験物質と思われる油膜および油滴様物が認められた。この油膜および油滴様物は培養終了時には625 µg/plate以上で認められ、312.5 µg/plateでは明らかでなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、ビス(1-メチル

エチル)ナフタレンの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの化学構造における母核のナフタレンについても、*S. typhimurium*を用いた復帰変異試験³⁾および*E. coli*を用いたDNA修復試験⁴⁾でいずれも陰性と報告されており、これらの試験結果も考え合わせるとビス(1-メチルエチル)ナフタレンの*in vitro*における遺伝子突然変異誘発性は低いものと判断される。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," 1, Vol.3, eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.
- 3) 賀田恒夫, 石館基監修 "環境変異原データ集1," サイエンティスト社, 東京, 1980, p. 288.
- 4) S. W. Mamber, V. Bryson, E. K. Stanley, *Mutat. Res.*, 119, 135(1983).

連絡先

試験責任者: 野田 篤

試験担当者: 野田 篤, 昆 尚美

(財)畜産生物科学安全研究所

〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11

Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)

Naomi Kon

Research Institute for Animal Science in
Biochemistry and Toxicology

3-7-11 Hashimotodai, Sagami-hara-shi, kanagawa,
229-1132, Japan

Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

復帰変異試験

Table 1 Results of reverse mutation test of bis(1-methylethyl)naphthalene on bacteria (1st trial)
[direct method:-S9 mix]

Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	139	116	114	8	6	13	14	15	17	19	28	21	12	13	13
	[123 ± 14]			[9 ± 4]			[15 ± 2]			[23 ± 5]			[13 ± 1]		
312.5	125	122	109	9	9	9	13	22	21	21	19	33	18	10	12
	[119 ± 9]			[9 ± 0]			[19 ± 5]			[24 ± 8]			[13 ± 4]		
625#	114	136	126	6	6	4	13	17	18	24	28	12	9	17	7
	[125 ± 11]			[5 ± 1]			[16 ± 3]			[21 ± 8]			[11 ± 5]		
1250#	130	127	141	10	10	5	23	22	18	20	12	25	7	12	12
	[133 ± 7]			[8 ± 3]			[21 ± 3]			[19 ± 7]			[10 ± 3]		
2500#	128	126	122	11	11	10	20	16	11	15	22	17	15	8	5
	[125 ± 3]			[11 ± 1]			[16 ± 5]			[18 ± 4]			[9 ± 5]		
5000#	135	127	116	9	7	12	11	16	11	25	13	13	10	8	14
	[126 ± 10]			[9 ± 3]			[13 ± 3]			[17 ± 7]			[11 ± 3]		
Positive control	853	943	830 ^a	256	300	279 ^a	932	892	895 ^d	350	435	358 ^d	516	520	596 ^d
	[875 ± 60]			[278 ± 22]			[906 ± 22]			[381 ± 47]			[544 ± 45]		

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.
a): AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 μg/plate
b): NaN₃: Sodium azide, 0.5 μg/plate
c): AF-2, 0.04 μg/plate
d): AF-2, 0.1 μg/plate
e): 9-AA: 9-Aminoacridine, 80 μg/plate

Table 2 Results of reverse mutation test of bis(1-methylethyl)naphthalene on bacteria (1st trial)
[activation method: +S9 mix]

Test substance concentration (μg/plate)	Number of revertant colonies per plate [Mean ± S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	123	133	146	8	11	10	15	25	24	37	40	41	18	18	12
	[134 ± 12]			[10 ± 2]			[21 ± 6]			[39 ± 2]			[16 ± 3]		
312.5	113	116	116	6	10	8	20	20	30	24	35	25	13	11	15
	[115 ± 2]			[8 ± 2]			[23 ± 6]			[28 ± 6]			[13 ± 2]		
625#	110	126	107	7	8	7	23	19	16	25	22	36	10	13	10
	[114 ± 10]			[7 ± 1]			[19 ± 4]			[28 ± 7]			[11 ± 2]		
1250#	112	125	109	9	6	6	21	20	23	23	34	30	17	14	14
	[115 ± 9]			[7 ± 2]			[21 ± 2]			[29 ± 6]			[15 ± 2]		
2500#	120	122	123	5	15	8	22	20	12	29	15	19	13	16	14
	[122 ± 2]			[9 ± 5]			[18 ± 5]			[21 ± 7]			[14 ± 2]		
5000#	100	121	130	7	8	9	17	18	25	24	22	29	7	17	8
	[117 ± 15]			[8 ± 1]			[20 ± 4]			[25 ± 4]			[11 ± 6]		
Positive control	589	605	593 ^a	192	195	201 ^a	1275	1302	1308 ^d	342	352	370 ^d	174	172	196 ^d
	[596 ± 8]			[196 ± 5]			[1295 ± 18]			[355 ± 14]			[181 ± 13]		

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.
a): 2-AA: 2-Aminoanthracene, 1 μg/plate
b): 2-AA, 2 μg/plate
c): 2-AA, 10 μg/plate

Table 3 Results of reverse mutation test of bis(1-methylethyl)naphthalene on bacteria (2nd trial)
[direct method: -S9 mix]

Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	123	125	133	8	8	7	14	10	14	17	17	23	6	10	7
	[127 \pm 5]			[8 \pm 1]			[13 \pm 2]			[19 \pm 3]			[8 \pm 2]		
312.5	116	129	118	6	12	12	15	18	17	16	15	26	5	4	7
	[121 \pm 7]			[8 \pm 1]			[17 \pm 2]			[19 \pm 6]			[5 \pm 2]		
625#	122	128	128	12	5	12	18	15	13	22	22	14	6	3	2
	[126 \pm 3]			[10 \pm 4]			[15 \pm 3]			[19 \pm 5]			[4 \pm 2]		
1250#	122	129	129	4	6	11	15	22	17	16	20	18	5	6	3
	[127 \pm 4]			[7 \pm 4]			[18 \pm 4]			[18 \pm 2]			[5 \pm 2]		
2500#	104	134	125	8	8	6	16	18	14	11	24	21	6	3	8
	[121 \pm 15]			[7 \pm 1]			[16 \pm 2]			[19 \pm 7]			[6 \pm 3]		
5000#	103	114	106	6	3	6	17	11	16	18	17	14	5	4	9
	[108 \pm 6]			[5 \pm 2]			[15 \pm 3]			[16 \pm 2]			[6 \pm 3]		
Positive control	767	766	791 ^a	253	256	292 ^a	936	934	881 ^a	370	381	335 ^a	509	549	638 ^a
	[775 \pm 14]			[267 \pm 22]			[917 \pm 31]			[362 \pm 24]			[565 \pm 66]		

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

a): AF-2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$

b): NaN₃: Sodium azide, 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$

c): AF-2, 0.04 $\mu\text{g}/\text{plate}$

d): AF-2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$

e): 9-AA:9-Aminoacridine, 80 $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 4 Results of reverse mutation test of bis(1-methylethyl)naphthalene on bacteria (2nd trial)
[activation method: +S9 mix]

Test substance concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	113	133	133	8	10	7	21	13	20	37	37	45	13	10	11
	[126 \pm 12]			[8 \pm 2]			[18 \pm 4]			[40 \pm 4]			[11 \pm 2]		
312.5	120	116	118	7	7	9	12	17	23	32	38	31	8	9	8
	[118 \pm 2]			[8 \pm 1]			[17 \pm 6]			[34 \pm 4]			[8 \pm 1]		
625#	137	114	109	12	5	12	16	28	16	33	32	32	8	11	11
	[120 \pm 15]			[10 \pm 4]			[20 \pm 7]			[32 \pm 1]			[10 \pm 2]		
1250#	128	113	110	6	9	5	18	16	19	27	27	22	8	4	13
	[117 \pm 10]			[7 \pm 2]			[18 \pm 2]			[25 \pm 3]			[8 \pm 5]		
2500#	100	126	94	9	14	6	19	14	24	52	23	26	9	3	10
	[107 \pm 17]			[10 \pm 4]			[19 \pm 5]			[34 \pm 16]			[7 \pm 4]		
5000#	133	103	114	5	15	6	11	28	12	27	29	24	4	4	6
	[117 \pm 15]			[9 \pm 6]			[17 \pm 10]			[27 \pm 3]			[5 \pm 1]		
Positive control	591	602	504 ^a	198	178	166 ^a	1257	1181	1042 ^a	388	375	350 ^a	139	141	135 ^a
	[566 \pm 54]			[181 \pm 16]			[1160 \pm 109]			[371 \pm 19]			[138 \pm 3]		

#: Precipitate was observed on the surface of agar plates.

a): 2-AA:2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$

b): 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$

c): 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$

ビス(1-メチルエチル)ナフタレンのチャイニーズ・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 Bis(1-methylethyl)naphthalene on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を用いて *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、細胞増殖抑制試験を行った結果、連続処理法の場合は、24時間および48時間処理でそれぞれ100および50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。短時間処理法の場合は、S9 mix非存在下では50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で50%を上回る細胞増殖抑制が認められたが、S9 mix存在下では、50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。したがって、染色体異常試験における濃度は、連続処理法の場合、24時間処理では6.25, 12.5, 25, 50, 75および100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48時間処理では6.25, 12.5, 25, 37.5, 50および75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法の場合、S9 mix非存在下では6.25, 12.5, 25, 37.5, 50および75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix存在下では140.63, 281.25, 562.5, 1125, 2250および4500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

試験の結果、連続処理法においては、染色体異常を有する細胞の増加は認められなかった。24時間処理の75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上および48時間処理の100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、細胞に対する毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。短時間処理法においては、S9 mix非存在下では染色体異常を有する細胞の増加は認められなかったが、S9 mix存在下では140.63, 281.25および562.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で濃度依存的な染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度7.5, 10.5および11.5%)が認められた。S9 mix非存在下の75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では細胞に対する毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

以上の成績から、ビス(1-メチルエチル)ナフタレンは、CHL/IU細胞に対し染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部(元:国立衛生試験所変異原性部)から昭和60年1月13日に分与を受けたチャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を使用した。供試細胞は、浮遊細胞液に10 vol%の割合でジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業株)を添加し、液体窒素条件下で保存したものを培

養液に戻し、解凍後の継代数が6回までのものを使用した。

2. 培養液

Eagle-MEM粉末培地(Gibco Laboratories)を常法に従い調製し、これに非働化仔牛血清(Gibco Laboratories)を10 vol%の割合で添加したものをを用いた。

3. 培養条件

4×10^3 個/mLの細胞を含む培養液5 mLをディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson Co.)に加え、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。

連続処理法では、培養開始3日後に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理法では、培養開始3日後にS9 mix非存在および存在下で6時間処理し、処理終了後、新鮮培養液でさらに18時間培養した。

4. S9 mix

製造後6ヶ月以内の染色体異常試験用凍結S9 mix(キッコマン株)を購入し、使用した。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。

5. 被験物質

ビス(1-メチルエチル)ナフタレン(ロット番号7Y251, 呉羽化学工業株, 東京)は、無色透明の液体で、水およびDMSOに不溶、アセトンに可溶であり、純度98.44%(不純物としてビス(1-メチルエチル)テトラリン1.10%およびトリス(1-メチルエチル)ナフタレン0.43%を含む)の物質である。

実験終了後、被験物質提供元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. 被験物質供試液の調製

溶媒にアセトン(和光純薬工業株)を用い、被験物質を溶解して最高濃度の供試液(原液)を調製した。この原液の一部を溶媒で順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。供試液は、用時調製し、そのディッシュ内への添加量は培養液量の0.5 vol%とした。

7. 細胞増殖抑制試験

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。

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の供試液は、培養液内に添加すると直ちに油滴様の被験物質の析出が認められた。この油滴様物は100~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においては微細なもので、ディッシュの底、培養液内および培養液の表面に分散したが、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では大きなひと固まりの油滴様物として培養液表面に浮遊し、培養液内への分散は認められなかった。培養終了時にも200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で添加時と同様の油滴様物の残存が認められた。培養終了後、0.1 w/v% クリスタルバイオレット水溶液で染色した細胞の密度を単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業(株))を用いて測定し、溶媒対照群の細胞増殖率を100%とした時の各濃度群の細胞増殖率を求めた。

その結果(Fig. 1~5)、連続処理法の場合は、24時間処理で100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、48時間処理では50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で、50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、それぞれ50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間および25~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間にあるものと判断された。短時間処理法の場合は、S9 mix非存在下では50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。S9 mix存在下では、12.5~4500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のいずれの濃度においても50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。すなわち、100~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で概ね濃度に依存した細胞増殖の抑制傾向が認められたが、抑制率は50%に到らず、実験を3回繰り返して最高4500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (供試液作製可能な最高濃度)まで細胞増殖率を測定したが、高濃度はむしろ抑制率が低下する傾向にあった。

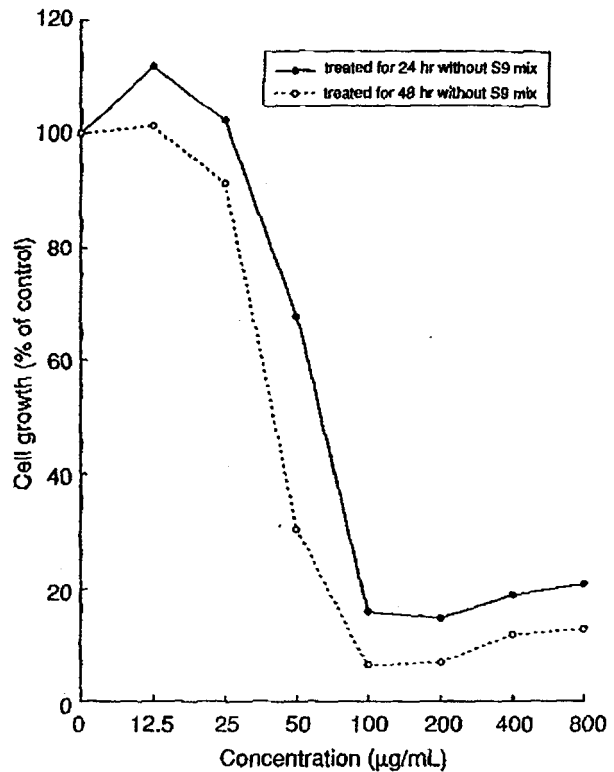


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with bis(1-methylethyl)naphthalene

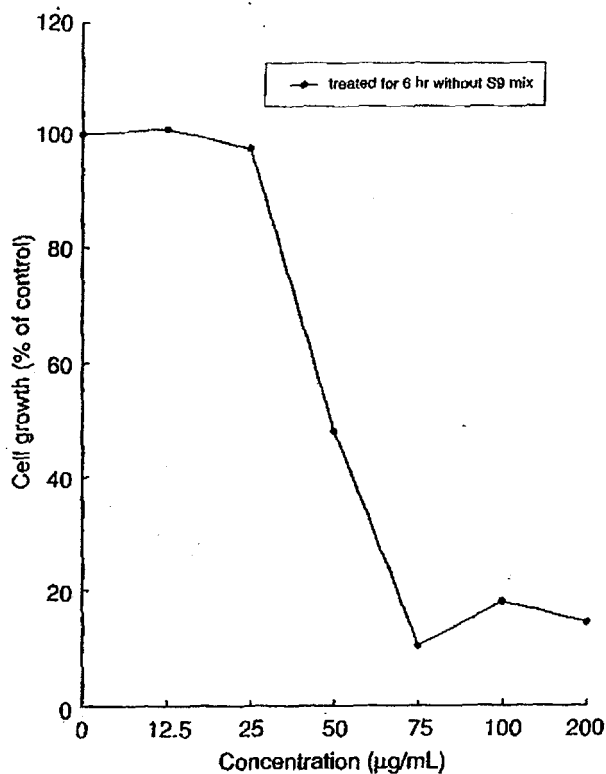


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with bis(1-methylethyl)naphthalene

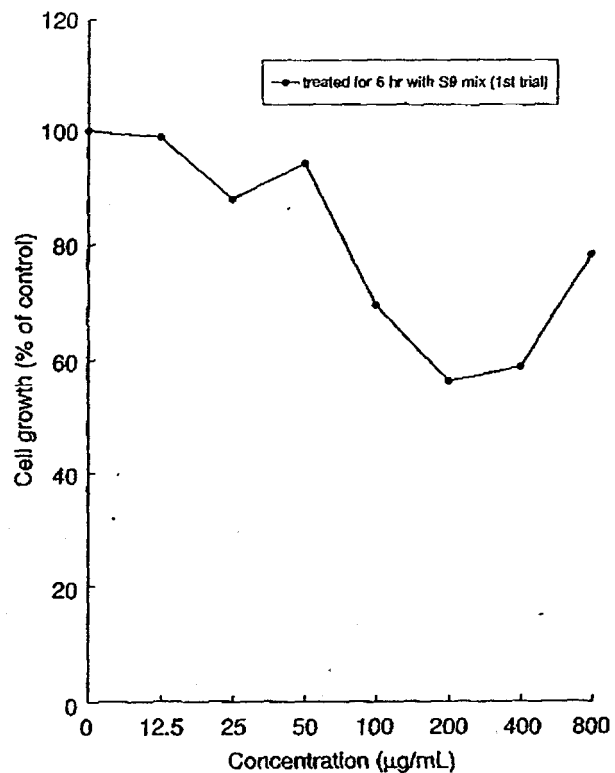


Fig. 3 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with bis(1-methylethyl)naphthalene

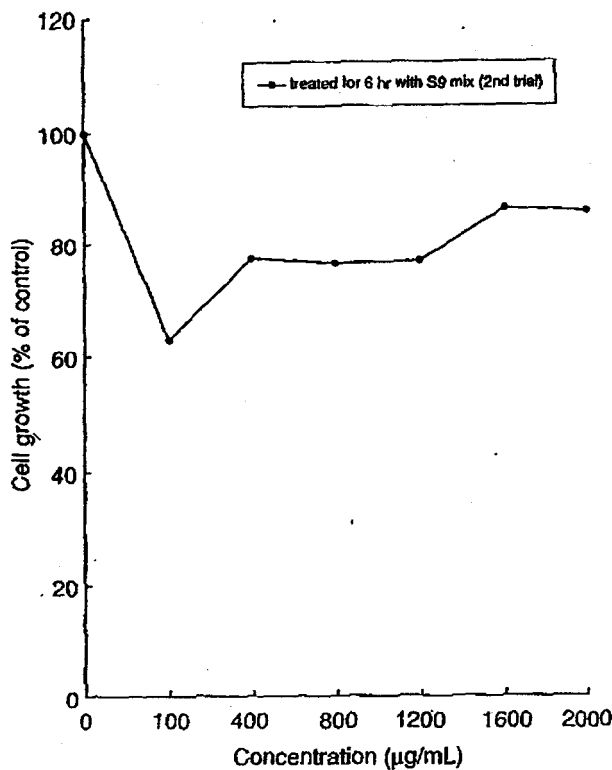


Fig. 4 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with bis(1-methylethyl)naphthalene

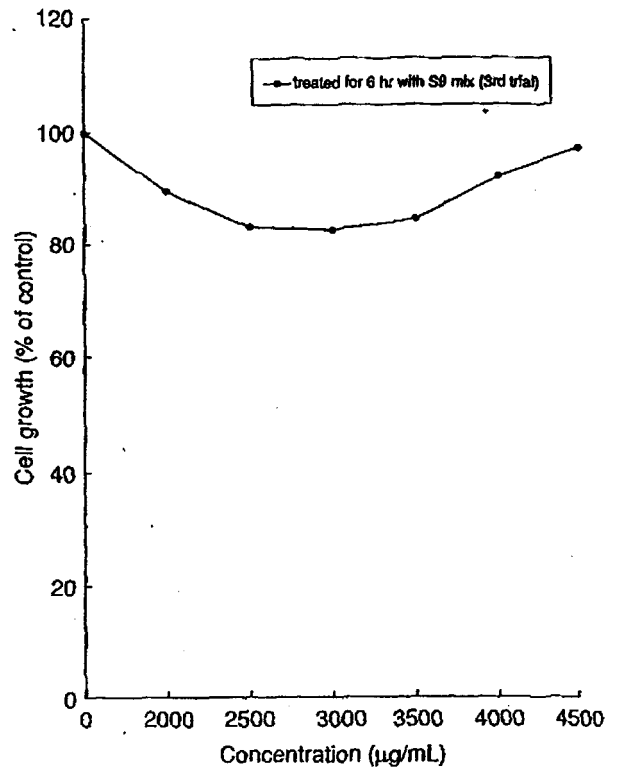


Fig. 5 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with bis(1-methylethyl)naphthalene

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果から、染色体異常試験における被験物質の濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の前後が含まれ、かつ3濃度以上のデータが得られることを考慮して、連続処理法の場合は、6.25, 12.5, 25, 50および100 µg/mL(公比2)の5濃度に、24時間処理では75 µg/mL, 48時間処理では37.5 µg/mLを加えた6濃度を設定した。短時間処理法の場合は、S9 mix非存在下では6.25, 12.5, 25, 50および75 µg/mLに、37.5 µg/mLを加えた6濃度を設定した。S9 mix存在下においては、100~400 µg/mLで細胞増殖の抑制傾向が認められたものの、4500 µg/mLにおいても50%を上回る細胞増殖抑制が認められなかったことから、100 µg/mLあたりまでが含まれる広い範囲の設定を考慮、4500 µg/mLを最高濃度とし、以下公比2で2250, 1125, 562.5, 281.25および140.63 µg/mLの6濃度とした。対照として、溶媒対照群と陽性対照群を設けた。

陽性対照として、連続処理法では1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine(MNNG, Aldrich Chemical Co.)を2.5 µg/mL, 短時間処理法では3,4-benzo [a] pyrene(B [a] P, Sigma Chemical Co.)を10 µg/mLの濃度で用いた。陽性対照物質の溶媒には、いずれもDMSO(和光純薬工業(株))を使用した。

9. 染色体標本の作製

培養終了2時間前にコルセミド(Gibco Laboratories)を最終濃度として0.2 µg/mLとなるように添加した。トリプシン処理で細胞を剥離し、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後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本を作製した後、1.4 vol%ギムザ液で約15分間染色した。スライド標本は、各ディッシュにつき3枚作製した。

10. 染色体の観察

各ディッシュあたり100個、すなわち、1濃度当たり2ディッシュ、200個の分裂中期像を、総合倍率600倍の顕微鏡下で観察した。標本は全てコード化し、盲検法で観察を行った。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(MMS)による分類法¹⁾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と倍数性細胞(Polyploid)の有無について観察した。

11. 記録と判定

観察した細胞数、構造異常の種類と数および倍数性細胞の数について集計し、構造異常を有する細胞については、ギャップのみを有する細胞を含めた場合(+g)と含めない場合(-g)とに区別して記録した。

ギャップを含めた染色体構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度について、多試料 χ^2 検定を行い有意差(有意水準5%以下)が認められた場合は、フィッシャーの直接確率法を用いて溶媒対照群と各濃度群との間の有意差検定(有意水準は多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた。)を行った。

その結果、溶媒対照群と比較して、被験物質による染

色体異常細胞の出現頻度が2濃度以上で有意に増加し、かつ濃度依存性あるいは再現性が認められた場合、陽性と判定した。

結果および考察

連続処理法による結果をTable 1に示した。ビス(1-メチルエチル)ナフタレンを加えて24時間および48時間処理したいずれの濃度群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。被験物質供試液のディッシュ内添加時、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でのみ被験物質の析出による細かな油滴様物が認められたが、培養終了時には認められなかった。

短時間処理法による結果をTable 2に示した。S9 mix非存在下では、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。S9 mix存在下では、140.63, 281.25および562.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で濃度依存的な染色体構造異常細胞の有意な増加(出現頻度7.5, 10.5および11.5%)が認められたが、1125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では構造異常を有する細胞の有意な増加は認められなかった。S9 mix非存在および存在下ともに、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix存在下の140.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、被験物質供試液をディッシュ内に添加した直後に被験物質の析出による油滴様物が認められ、140.63~562.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では微細なものが培養液中に分散して存在したが、1125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では大きなひと固まりの油滴様物として培養液表面に浮遊した。培養終了時には、281.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で同様の油滴様物の残存が認められた。

連続処理法24時間処理の75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、48時間処理の100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および短時間処理法S9 mix非存在下の75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では、被験物質の細胞に対する毒性のため、観察可能な分裂中期像が認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下ではビス(1-メチルエチル)ナフタレンのCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。短時間処理法S9 mix存在下の高濃度で構造異常細胞の増加が認められなかったことについては、被験物質が析出して大きなひと固まりとなるため培養液中に分散せず、細胞が被験物質により十分暴露されなかったことによるものと推察される。細胞増殖抑制試験において、高濃度処理群では細胞増殖抑制が認められなかったことも同様の原因によるものと考えられる。ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの染色体構造異常の誘発は、その代謝物の作用によることが考えられる一方で、析出した本被験物質の細胞への物理的刺激による影響も考えられた。なお、本被験物質の化学構造における母核のナフタレンは、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験において短時間処理法S9 mix存在下で構造異常細胞の誘発が認められ²⁾、ナフタレンの代謝物による影響が示唆されている。本試験結果は、CHL/IU細胞において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が10%以上を陽性とする石館らの判定基準³⁾からみても明らかに陽性を示すものであった。陽性結果が得られたため D_{20} 値⁴⁾(分裂中期像の20%に異常を誘発させる被験物質の推定

濃度)を算出したところ、本被験物質の D_{20} 値は、短時間処理法において0.88 mg/mL であった。

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, 東京, 1988, pp. 16-37.
- 2) 祖父尼俊雄 監修, “改訂1998版 染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1999, p. 346.
- 3) 石館 基 監修, “改定増補 染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 19.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, “化審法毒性試験法の解説 改訂版,” 化学工業日報社, 東京, 1992, pp. 51-52.

連絡先

試験責任者: 野田 篤
 試験担当者: 野田 篤, 昆 尚美
 (財)畜産生物科学安全研究所
 〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台3-7-11
 Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Authors: Atsushi Noda (Study director)
 Naomi Kon
 Research Institute for Animal Science in
 Biochemistry and Toxicology
 3-7-11 Hashimotodai, Sagamihara-shi, Kanagawa,
 229-1132, Japan.
 Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

染色体異常試験

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with bis(1-methylethyl) naphthalene without S9 mix

Group	Concentration (µg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid ^a (%)	Judgement ^b		
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA	
Solvent ¹	0	24	200	0	2	0	0	0	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.5	-	-
BMEN	6.25	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	0	-	-
	12.5	24	200	0	1	0	0	0	0	1	1	1(0.5)	1(0.5)	0.5	-	-
	25	24	200	0	1	1	0	1	0	3	2	2(1.0)	2(1.0)	0	-	-
	50	24	200	0	0	1	0	0	0	1	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
	75	24	Toxic													
100	24	Toxic														
MNNG	2.5	24	200	14	55	195	0	0	0	264	195(97.5)	195(97.5)**	0	+	-	
Solvent	0	48	200	0	1	3	0	0	0	4	3(1.5)	3(1.5)	0	-	-	
BMEN	6.25	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0(0)	1(0.5)	0	-	-	
	12.5	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0)	0(0)	0	-	-	
	25	48	200	0	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-	
	37.5	48	200	0	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-	
	50	48	200	0	1	1	0	0	0	2	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-	
100	48	Toxic														
MNNG	2.5	48	200	5	61	173	7	2	0	248	179(89.5)	179(89.5)**	0	+	-	

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, BMEN: bis(1-methylethyl) naphthalene, MNNG: 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine
 1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample χ^2 test was done at $p < 0.05$, and then Fisher's exact test was done at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.
 **: Significantly different from solvent group data at $p < 0.01$ by Fisher's exact test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with bis(1-methylethyl) naphthalene with and without S9 mix

Group	Concentration (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid ^a (%)	Judgement ^b	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth	total	-g (%)	+g (%)		SA	NA
Solvent ¹	0	-	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
BMEN	6.25	-	6-(18)	200	0	0	2	0	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.5	-	-
	12.5	-	6-(18)	200	0	1	2	0	1	0	4	3(1.5)	3(1.5)	0.5	-	-
	25	-	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0	-	-
	37.5	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0(0)	1(0.5)	0.5	-	-
	50	-	6-(18)	200	0	0	1	0	1	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0	-	-
	75	-	6-(18)	Toxic												
BP	10	-	6-(18)	200	1	1	1	0	0	0	3	2(1.0)	3(1.5)	0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	1	1	0	1	0	3	2(1.0)	2(1.0)	0	-	-
BMEN	140.63	+	6-(18)	200	2	5	11	1	1	0	20	15(7.5)	15(7.5)**	1.5	+	-
	281.25	+	6-(18)	200	1	4	17	0	1	0	23	21(10.5)	21(10.5)**	1.0	+	-
	562.5	+	6-(18)	200	4	8	19	0	0	0	31	23(11.5)	25(12.5)**	1.5	+	-
	1125	+	6-(18)	200	0	2	6	0	3	0	11	10(5.0)	10(5.0)	0.5	-	-
	2250	+	6-(18)	200	0	0	5	0	0	0	5	5(2.5)	5(2.5)	1.0	-	-
	4500	+	6-(18)	200	0	1	2	0	1	0	4	4(2.0)	4(2.0)	0	-	-
BP	10	+	6-(18)	200	6	17	86	2	0	0	111	93(46.5)	96(48.0)**	0	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), oth: others, -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, BMEN: bis(1-methylethyl) naphthalene, BP: benzo [a] pyrene
 1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Multi-sample χ^2 test was done at $p < 0.05$, and then Fisher's exact test was done at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.
 **: Significantly different from solvent group data at $p < 0.01$ by Fisher's exact test.