

3-アミノフェノールの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 3-Aminophenol on Bacteria

要約

3-アミノフェノールについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められなかったことから、本試験はS9 mix無添加試験および添加試験ともに313~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。

その結果、TA98のS9 mix添加試験において、2回の本試験とも最高用量の5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で復帰変異コロニー数に増加が認められたが、陰性対照値の2倍以上にはならなかった。また、TA98のS9 mix無添加試験およびその他の検定菌においては、いずれの用量においても陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から3-アミノフェノールは、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。

方法

1. 被験物質

3-アミノフェノールは、淡灰色結晶性粉末である。用いた被験物質は、ロット番号720208、純度99.70%、製造三井化学(株)(山口)であり、三井化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。本ロットについては、試験期間中安定であることが確認された。

3-アミノフェノールは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:ACQ2095, 和光純薬工業(株))に溶解して最高用量の調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌ごとに用いた陽性対照物質は、当研究所で十分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれTable中に示した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド	(AF2, 和光純薬工業(株))
アジ化ナトリウム	(SA, 和光純薬工業(株))
9-アミノアクリジン	(9AA, Sigma Chem. Co.)
2-アミノアントラセン	(2AA, 和光純薬工業(株))

AF2, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを -20°C で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

3. 検定菌

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

*S. typhimurium*の4菌株は1997年8月7日に、*E. coli* WP2 *uvrA*株は1997年4月9日に日本バイオアッセイ研究センターの松島泰次郎博士から分与された。

検定菌は -80°C で凍結保存したものを、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)およびアンピシリン耐性因子pKM 101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントプロスNo. 2(Oxoid Ltd.)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°C で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

4. 培地およびS9 mixの組成

1) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少グルコース寒天培地を用いた。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
大洋寒天(清水食品)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

2) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)または(C)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco Lab.)	0.6 w/v %
塩化ナトリウム	0.5 w/v %
(B) <i>Salmonella typhimurium</i> 用	
L-ヒスチジン	0.5 mmol/L

D-ビオチン	0.5 mmol/L
(C) <i>Escherichia coli</i> 用	
L-トリプトファン	0.5 mmol/L

結果および考察

3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたりの組成は下記のとおりである。

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(キッコーマン株)を用いた。

5. 試験方法

ブレインキューベーション法³⁾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、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、37°Cで20分間ブレインキューベーションしたのち、約45°Cに保温したトッパアガー2 mLを加えて混和し、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使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとに用いた陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。同時に実施した試験については、陰性および陽性対照群を共通とした。

培養は37°Cで48時間行い、生じた復帰変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈殿の有無は、肉眼により確認した。また、抗菌性の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢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、陰性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、結果の再現性を確認した。

6. 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無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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もの(陽性)と判定することとした。

50.0~5000 μ g/plateの範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した。その結果、すべての検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験のいずれにおいても抗菌性は認められなかった。また、被験物質に由来する沈殿もすべての用量で認められなかった。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix無添加試験および添加試験とも5000 μ g/plateとした。

最高用量を5000 μ g/plateとして公比2で5用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、TA98のS9 mix添加試験において、2回の試験とも最高用量の5000 μ g/plateで復帰変異コロニー数に増加が認められたが、陰性対照値の2倍以上には達しなかった。また、TA98のS9 mix無添加試験およびその他の検定菌においては、2回の試験とも陰性対照値の2倍以上となる復帰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、3-アミノフェノールは、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。

なお3-アミノフェノールは、当研究所で本試験と並行して実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では染色体の構造異常が誘発され、陽性であった⁴⁾。また、関連物質である4-アミノフェノールについては、復帰変異試験で陰性、染色体異常試験で陽性の結果が得られている^{5,6)}。

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.
- 3) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K. H. Norpoth, R. C. Garner, Springer, Berlin, 1980, pp.273-285.
- 4) 山影康次, 化学物質毒性試験報告, **8**, 709(2000).
- 5) 澁谷徹, 化学物質毒性試験報告, **5**, 463(1997).
- 6) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **5**, 471(1997).

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：川上久美子, 原 巧, 須井 哉,
山本明子, 三枝克彦, 加藤初美
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257-8523 秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Kumiko Kawakami, Takumi Hara,
Hajime Sui, Akiko Yamamoto,
Katsuhiko Saegusa, Hatsumi Kato
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,
Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Mutagenicity of 3-aminophenol on bacteria (I)

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	128	134	123	12	7	12	39	29	30	25	34	29	6	12	7
		(128 \pm 5.5)			(10 \pm 2.9)			(33 \pm 5.5)			(29 \pm 4.5)			(8 \pm 3.2)		
	313	147	128	114	6	15	7	24	26	30	21	28	18	9	9	5
		(130 \pm 16.6)			(9 \pm 4.9)			(27 \pm 3.1)			(22 \pm 5.1)			(8 \pm 2.3)		
	625	123	114	126	10	13	8	38	23	27	20	19	32	6	13	7
		(121 \pm 6.2)			(10 \pm 2.5)			(29 \pm 7.8)			(24 \pm 7.2)			(9 \pm 3.8)		
	1250	117	104	131	6	8	12	29	20	28	23	19	14	6	11	8
		(117 \pm 13.5)			(9 \pm 3.1)			(26 \pm 4.9)			(19 \pm 4.5)			(8 \pm 2.5)		
2500	110	108	113	5	8	7	23	28	15	22	22	20	13	7	11	
	(110 \pm 2.5)			(7 \pm 1.5)			(22 \pm 6.6)			(21 \pm 1.2)			(10 \pm 3.1)			
5000	114	130	127	7	6	2	19	28	24	18	28	25	8	15	13	
	(124 \pm 8.5)			(5 \pm 2.6)			(24 \pm 4.5)			(21 \pm 5.1)			(12 \pm 3.6)			
S9 mix (+)	0	140	137	150	10	9	12	28	37	34	39	38	40	10	17	18
		(142 \pm 6.8)			(10 \pm 1.5)			(33 \pm 4.6)			(39 \pm 1.0)			(15 \pm 4.4)		
	313	166	168	168	15	16	6	36	42	36	44	40	32	13	22	9
		(167 \pm 1.2)			(12 \pm 5.5)			(38 \pm 3.5)			(39 \pm 6.1)			(15 \pm 6.7)		
	625	179	181	190	7	12	8	30	28	31	56	36	43	13	13	12
		(183 \pm 5.9)			(9 \pm 2.6)			(30 \pm 1.5)			(45 \pm 10.1)			(13 \pm 0.6)		
	1250	175	190	148	15	3	11	44	29	31	40	44	38	14	19	15
		(171 \pm 21.3)			(10 \pm 6.1)			(35 \pm 8.1)			(41 \pm 3.1)			(16 \pm 2.6)		
2500	172	150	161	10	13	3	34	31	38	50	42	56	10	15	8	
	(161 \pm 11.0)			(9 \pm 5.1)			(34 \pm 3.5)			(49 \pm 7.0)			(11 \pm 3.6)			
5000	153	150	166	13	6	10	41	32	22	68	61	73	17	16	16	
	(156 \pm 8.5)			(10 \pm 3.5)			(32 \pm 9.5)			(67 \pm 6.0)			(16 \pm 0.6)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	559	542	535	697	666	701	258	235	241	623	645	603	368	397	519
	(545 \pm 12.3)			(688 \pm 19.2)			(245 \pm 11.9)			(624 \pm 21.0)			(428 \pm 80.1)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	966	944	929	378	362	366	1041	1085	969	430	472	517	337	301	326
	(946 \pm 18.6)			(369 \pm 8.3)			(1032 \pm 58.6)			(473 \pm 43.5)			(321 \pm 18.4)			

The purity of the test substance was 99.70 %.

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

Table 2 Mutagenicity of 3-aminophenol on bacteria (II)

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	178	137	144	8	9	15	31	26	31	22	19	24	10	11	10
		(153 \pm 21.9)			(11 \pm 3.8)			(29 \pm 2.9)			(22 \pm 2.5)			(10 \pm 0.6)		
	313	142	143	145	16	12	7	27	25	27	19	18	21	12	12	10
		(143 \pm 1.5)			(12 \pm 4.5)			(26 \pm 1.2)			(19 \pm 1.5)			(11 \pm 1.2)		
	625	154	129	149	11	7	8	27	33	17	17	16	25	11	13	3
		(144 \pm 13.2)			(9 \pm 2.1)			(26 \pm 8.1)			(19 \pm 4.9)			(9 \pm 5.3)		
	1250	150	129	131	11	9	7	18	20	28	18	22	17	6	17	5
		(137 \pm 11.6)			(9 \pm 2.0)			(22 \pm 5.3)			(19 \pm 2.6)			(9 \pm 6.7)		
2500	144	144	134	12	16	9	21	28	22	21	23	28	7	8	13	
	(141 \pm 5.8)			(12 \pm 3.5)			(24 \pm 3.8)			(24 \pm 3.6)			(9 \pm 3.2)			
5000	124	152	139	13	9	5	26	21	26	23	22	21	13	6	12	
	(138 \pm 14.0)			(9 \pm 4.0)			(24 \pm 2.9)			(22 \pm 1.0)			(10 \pm 3.8)			
S9 mix (+)	0	160	134	157	13	12	12	32	34	36	39	38	42	11	17	18
		(150 \pm 14.2)			(12 \pm 0.6)			(34 \pm 2.0)			(40 \pm 2.1)			(15 \pm 3.8)		
	313	180	175	164	5	6	11	28	25	27	38	35	34	8	19	14
		(173 \pm 8.2)			(7 \pm 3.2)			(27 \pm 1.5)			(36 \pm 2.1)			(14 \pm 5.5)		
	625	186	176	181	9	4	8	33	25	27	39	39	39	16	16	13
		(181 \pm 5.0)			(7 \pm 2.6)			(28 \pm 4.2)			(39 \pm 0.0)			(15 \pm 1.7)		
	1250	186	189	162	16	10	14	26	26	27	25	44	41	9	12	20
		(179 \pm 14.8)			(13 \pm 3.1)			(26 \pm 0.6)			(37 \pm 10.2)			(14 \pm 5.7)		
2500	171	167	184	17	12	12	21	26	31	51	55	49	17	11	9	
	(174 \pm 8.9)			(14 \pm 2.9)			(26 \pm 5.0)			(52 \pm 3.1)			(12 \pm 4.2)			
5000	199	172	188	6	8	6	31	34	22	72	66	62	9	12	12	
	(186 \pm 13.6)			(7 \pm 1.2)			(29 \pm 6.2)			(67 \pm 5.0)			(11 \pm 1.7)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	582	544	532	711	680	708	244	223	226	614	655	598	601	655	706
	(553 \pm 26.1)			(700 \pm 17.1)			(231 \pm 11.4)			(622 \pm 29.4)			(654 \pm 52.5)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	1010	944	1013	407	385	392	1013	995	1058	417	471	468	301	313	278
	(989 \pm 39.0)			(395 \pm 11.2)			(1022 \pm 32.4)			(452 \pm 30.3)			(297 \pm 17.8)			

The purity of the test substance was 99.70 %.

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 3-Aminophenol
on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

3-アミノフェノールの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)およびS9 mix非存在下の短時間処理(6時間)では、1.1 mg/mL(10 mM)においても50%を超える増殖抑制を示さなかった。S9 mix存在下の短時間処理における50%細胞増殖抑制濃度は、0.062 mg/mLであった。従って、連続処理およびS9 mix非存在下における短時間処理では1.1 mg/mL(10 mM)を最高処理濃度とし、公比2で3濃度を設定した。S9 mix存在下における短時間処理では、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した。連続処理では、24時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、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。24時間連続処理では全処理濃度で強い細胞分裂阻害のために染色体分析が不可能であったため、濃度を設定し直し(1.1 mg/mL(10 mM)を最高処理濃度として、公比2で10濃度)再度試験を行った。その結果、染色体分析が可能な最高濃度は、0.14 mg/mLであったことから、これを高濃度群として3濃度群を観察対象とした。また、S9 mix非存在下および存在下での短時間処理では1.1 mg/mL(10 mM)および0.060 mg/mLの濃度が分析可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理したすべての処理群(0.034-0.14 mg/mL)において、染色体の構造異常が誘発され、その頻度は8.0-21.0%(gapを除く)であった。倍数性細胞については、高濃度群(0.14 mg/mL)で観察細胞数が規定の細胞数に満たなかった(764細胞)が、誘発作用は認められなかった。S9 mix非存在下での短時間処理では、いずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix存在下での短時間処理では、染色体の構造異常について、傾向性検定($p < 0.01$)において有意差が認められたが、フィッシャーの直接確率法においてはいずれの濃度群でも溶媒対照群との間で有意差($p < 0.01$)が認められなかったことから、陰性と判定した。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、本試験条件下で3-アミノフェノールは、染色体異常を誘発する(陽性)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21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、仔牛血清(CS, Cansera International)を10 vol%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

2×10^4 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°C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時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix非存在下および存在下で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. S9

S9(キッコーマン(株))は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

3-アミノフェノール(ロット番号:720208, 三井化学(株)(山口))は、淡灰色結晶性粉末で、水に対しては100 mmol/L以上、50 mg/mL未満、DMSOでは2 mol/L以上で溶解し、融点122.7°C, 沸点280°Cで、純度99.70%(不純物は不明)の物質で、室温保存した。被験物質原体は、常温で安定であった。

6. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に用いた。溶媒は局方注射用水(ロット番号:K8D75およびK8H73, (株)大塚製薬工場)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10 vol%になるように加えた。

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。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、連続処理およびS9 mix非存在下における短時間処理では、最高処理濃度の1.1 mg/mL(10 mM)においても50%を越える細胞増殖抑制作用は認められなかった。S9 mix存在下における短時間処理での50%細胞増殖抑制濃度は、0.062 mg/mLであった(Fig. 1)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理およびS9 mix非存在下の短時間処理では、1.1 mg/mL(10 mM)を最高濃度とし、公比2で3濃度を設定した(0.28, 0.55, 1.1 mg/mL)。S9 mix存在下の短時間処理では50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(0.0075, 0.015, 0.030, 0.060, 0.12 mg/mL)。しかし、連続処理においては、染色体分析の可能な濃度が得られなかったため、1.1 mg/mL(10 mM)を最高濃度として、公比2で10濃度(0.0021-1.1)に設定し直し、再度試験を行った。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、局方注射用水(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。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュを用い、そのうちの2枚は染色体標本作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。

9. 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 vol%ギムザ溶液で染色した。

10. 染色体分析

細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度を観察対象の最高濃度群とし、観察対象の3濃度群を決定した。その結果(Table 1, 2)、連続処理では0.14 mg/mLが、S9 mix非存在下およびS9 mix存在下での短時間処理では1.1 mg/mLおよび0.060 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

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

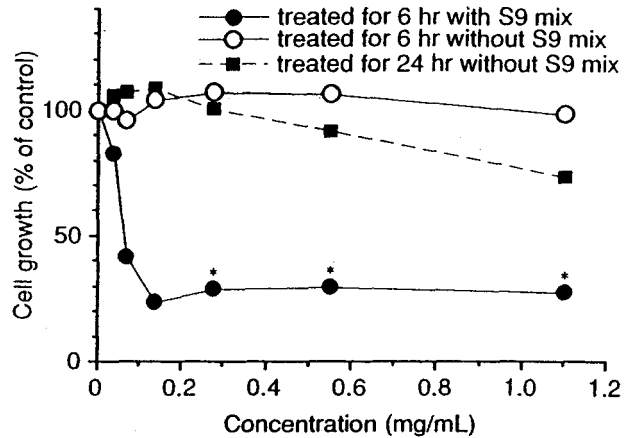


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 3-aminophenol

*:Precipitates or unknown materials remained adhering onto culture dishes

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・哺乳動物試験研究会(MMS)リ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。

11. 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、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法²⁾により、有意差検定を実施した($p < 0.01$)。また、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³⁾($p < 0.01$)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

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。3-アミノフェノールを加えて24時間連続処理したすべての処理群(0.034~0.14 mg/mL)において、染色体の構造異常が誘発され、その頻度は8.0~21.0%(gapを除く)であった。一方、倍数性細胞の誘発作用については、高濃度群(0.14 mg/mL)では毒性のために800細胞の観察できず、観察細胞数は764細胞であったが、すべての処理群において、有意な倍数性細胞の増加は認められなかった。染色体分析ができなかった0.28~1.1 mg/mLの濃度における細胞増殖率は、溶媒対照のレベルであったが、分裂中期細胞が認められなかった(Table 1)ことから、3-アミノフェノールによる強い分裂遅延が生じていたことが示された。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示し

た。3-アミノフェノールを加え、S9 mix非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix存在下で6時間処理した場合は、染色体の構造異常について、傾向性検定 ($p < 0.01$) において有意差が認められたが、フィッシャーの直接確率法においてはいずれの濃度群でも溶媒対照群との間で有意差 ($p < 0.01$) が認められず、高濃度 (0.06 mg/mL) における出現頻度は6.0%と低頻度であったことから、陰性と判定した。また、すべての処理群において、有意な倍数性細胞の増加は認められなかった。

従って、3-アミノフェノールは、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すると結論した。

アミノ基を有するフェノール類のひとつである4-アミノフェノールについても、染色体の構造異常を誘発することが報告されている⁴⁾。4-アミノフェノールは3-アミノフェノールと同様に、24時間処理系列で構造異常を要する細胞の出現頻度が最高 (50%) となっており、構造異常の誘発には両物質ともに24時間程度の長い暴露時間を有すると考えられることからCHL/IU細胞に対する作用の類似性が示唆された。

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) 吉村功編, “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, pp. 76-78.
- 3) 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, pp. 218-223.
- 4) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, 5, 471 (1997).

連絡先

試験責任者: 山影康次

試験担当者: 田中憲穂, 日下部博一, 高橋俊孝,
若栗 忍, 橋本恵子

(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Kohji Yamakage (Study director)

Noriho Tanaka, Hirokazu Kusakabe,

Toshitaka Takahashi, Shinobu Wakuri,

Keiko Hashimoto

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center

729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 3-aminophenol (3AP)^{a)} without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others ^{d)}	No. of cells with aberrations		POL ^{e)} (%)	Trend test ^{f)}		Concurrent cytotoxicity ^{g)} (%)	Mitotic index ^{h)} (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁱ⁾	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Non-treatment			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			—	—
Solvent ^{b)} 0		24	200	1	1	1	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
3AP 0.034		24	200	0	11	7	1	0	0	19	1	16*(8.0)	16*(8.0)	0.00	+	-	125.0	—
3AP 0.069		24	200	4	18	18	0	1	0	41	0	31*(15.5)	29*(14.5)	0.13			131.5	—
3AP 0.14		24	200	4	27	28	3	4	0	66	0	44*(22.0)	42*(21.0)	0.00 ^{j)}			131.0	1.2, 0.6
3AP 0.28 ^{k)}		24	—														119.5	0.0, 0.0
3AP 0.55 ^{k)}		24	—														109.0	0.0, 0.0
3AP 1.1 ^{k)}		24	—														91.0	0.0, 0.0
MC 0.05 µg/mL		24	200	3	44	86	1	3	0	137	1	90*(45.0)	89*(44.5)	0.00			—	—

Abbreviations; gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no. of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, POL:polyploid, MC:mitomycin C.

a) Purity was 99.70 %. b) Distilled water was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. g) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome analysis was not performed because there was no metaphase due to mitotic inhibition. j) Seven hundred and sixty-four cells were analysed.

*:Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 3-aminophenol (3AP)^{a)} with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others ^{d)}	No. of cells with aberrations		POL ^{e)} (%)	Trend test ^{f)}		Concurrent cytotoxicity ^{g)} (%)	Mitotic index ^{h)} (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁱ⁾	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Non-treatment				200	1	0	0	3	0	0	4	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.00			—	—
Solvent ^{b)} 0		-	6-(18)	200	1	3	2	0	0	0	6	0	5 (2.5)	4 (2.0)	0.13			100.0	—
3AP 0.28		-	6-(18)	200	2	1	5	3	0	0	11	0	5 (2.5)	3 (1.5)	0.00			102.0	—
3AP 0.55		-	6-(18)	200	0	4	21	1	0	0	26	1	9 (4.5)	9 (4.5)	0.00	-	-	99.0	—
3AP 1.1		-	6-(18)	200	2	5	12	7	1	10	37	1	12 (6.0)	10 (5.0)	0.00			93.0	6.4, 9.4
MC 0.1 µg/mL		-	6-(18)	200	8	74	200	1	0	0	283	2	138*(69.0)	135*(67.5)	0.13			—	—
Solvent ^{b)} 0		+	6-(18)	200	0	0	1	4	0	0	5	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13			100.0	—
3AP 0.015		+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			103.5	—
3AP 0.030		+	6-(18)	200	0	1	2	0	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	+	-	89.0	—
3AP 0.060		+	6-(18)	200	7	12	10	0	0	0	29	1	19*(9.5)	12 (6.0)	0.00			50.5	3.2, 4.6
3AP 0.12 ^{k)}		+	6-(18)	—														32.5	Tox, Tox
CPA 5 µg/mL		+	6-(18)	200	5	81	253	5	4	20	368	0	149*(74.5)	148*(74.0)	0.00			—	—

Abbreviations; gap:chromatid gap and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange (dicentric and ring), mul:multiple aberrations, TAG:total no. of cells with aberrations, TA:total no. of cells with aberrations except gap, POL:polyploid, MC:mitomycin C, CPA:cyclophosphamide, Tox:cytotoxic.

a) Purity was 99.70 %. b) Distilled water was used as solvent. c) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. d) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. e) Eight hundred cells were analysed in each group. f) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$. g) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. h) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. i) Chromosome analysis was not performed because there was no metaphase due to cytotoxicity.

*:Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test.