

p-ニトロフェノールナトリウムの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of p-Nitrophenol sodium salt on Bacteria

要約

p-ニトロフェノールナトリウム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。

用量は、用量設定試験の結果、直接法および代謝活性化法ともに、全ての菌株において 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で生育阻害が認められたため、156~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲(公比2)で設定した。

試験を2回行った結果、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増加は認められなかった。菌の生育阻害については、直接法の場合、TA1535, TA98 および TA1537 では 2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で、TA100 および WP2 *uvrA* では 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で認められ、代謝活性化法の場合は全ての菌株とも 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で認められた。

以上の成績から、p-ニトロフェノールナトリウムの細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

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 *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 および *E. coli* WP2 *uvrA* の 5 菌株を用いた。各菌株は、超低温槽で -80 °C 以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を解冻後、その 25 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 °C 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

p-ニトロフェノールナトリウムは不安定な物質であるため、安定な二水和物として流通している。試験には二水和物(ロット番号 8J-001, 純度 79.4 %, 水 19.4 % を含む、三井化学(株)(東京)提供)を用いた。二水和物は、黄色結晶で、水に 59.7 mg/mL 可溶およびエタノールに可溶である。被験物質は、冷暗所(4 °C)で密栓保管した。

実験終了後、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

溶媒に蒸留水(株大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高用量の供試液(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用量の供試液を調製した。供試液は、用時調製し、調製の際には純度換算を行った。

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(トッパアガー)

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-ビオチンおよび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

エームステスト用凍結S9 mix(キッコーマン(株))を購入し、製造後6ヶ月以内に使用した。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。

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、被験物質供試液あるいは陽性対照物質溶液を0.1 mL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°Cで20分間振盪培養した。培養終了後、45°C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°C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、用量設定試験では各用量とも1枚、本試験では3枚を使用した。本試験は、同一用量を用いて2回行った。

8. 結果の判定

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が溶媒対照値の2倍以上を示し、用量依存性および結果の再現性が認められる場合を陽性とした。

但し、明確な用量依存性が認められない場合においても、陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定することとした。

結果および考察

100~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で行った用量設定試験においては、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株とも5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で菌の生育阻害が認められた。したがって、本試験における被験物質の用量は、最高用量を5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、以下公比2で、2500, 1250, 625, 313および156 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 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かった。菌の生育阻害については、直接法の場合、TA1535, TA98およびTA1537では2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で、また、TA100およびWP2 *uvrA*では5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で認められ、代謝活性化法の場合は全ての菌株とも5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、p-ニトロフェノールナトリウムの遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

なおp-ニトロフェノールナトリウムの類縁化合物であるp-ニトロフェノール³⁾およびo-ニトロフェノール³⁾は*S. typhimurium*を、また、3-メチル-4-ニトロフェノール⁴⁾は*S. typhimurium*および*E. coli*を用いた復帰変異試験でいずれも陰性と報告され、p-ニトロフェノールについては、*Proteus mirabilis*を用いたDNA修復試験で陽性⁵⁾、初代ラット肝細胞を用いた不定期DNA合成試験で陰性⁶⁾と報告されている。

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) S. Haworth, T. Lawlor, K. Mortelmans, W. Speck, E. Zeiger, *Environ. Mutagen.*, **5**, 3(1983).
- 4) 高島浩介, 鈴木文子, 亀地礼子, 川上久美子, 松木容彦, 北嶋美似子, 化学物質毒性試験報告, **2**, 163 (1995).
- 5) B. Adler, R. Braun, J. Schoneich, H. Bohme, *Biol. Zbl.*, **95**, 463(1976).
- 6) G. S. Probst, R. E. McMahon, L. E. Holl, C. Z. Thompson, J. K. Epp, S. B. Neal, *Environ. Mutagen*, **3**, 11(1981).

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

Table 1 Results of reverse mutation test of *p*-nitrophenol sodium salt on bacteria (1st trial)
[direct method: -S9 mix]

Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	121	141	115	8	13	5	23	12	15	18	21	17	8	7	14
	[126 \pm 14]			[9 \pm 4]			[17 \pm 6]			[19 \pm 2]			[10 \pm 4]		
156	132	112	104	7	7	10	14	15	28	27	41	26	9	8	11
	[116 \pm 14]			[8 \pm 2]			[19 \pm 8]			[31 \pm 8]			[9 \pm 2]		
313	100	97	102	8	14	10	23	10	20	28	17	23	11	9	13
	[100 \pm 3]			[11 \pm 3]			[18 \pm 7]			[23 \pm 6]			[11 \pm 2]		
625	132	120	104	10	7	11	18	18	19	25	18	33	9	10	10
	[119 \pm 14]			[9 \pm 2]			[18 \pm 1]			[25 \pm 8]			[10 \pm 1]		
1250	97	101	85	3	9	6	14	14	12	15	15	20	11	14	10
	[94 \pm 8]			[6 \pm 3]			[13 \pm 1]			[17 \pm 3]			[12 \pm 2]		
2500	15	11	27	0*	0*	2*	4	2	0	3*	0*	0*	0*	0*	0*
	[18 \pm 8]			[1 \pm 1]			[2 \pm 2]			[1 \pm 2]			[0 \pm 0]		
5000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	1*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[0 \pm 2]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]		
Positive control	1066	1056	1054*	379	445	424*	808	854	871*	397	347	396*	551	555	578*
	[1059 \pm 6]			[416 \pm 34]			[844 \pm 33]			[380 \pm 29]			[561 \pm 15]		

*:Growth inhibition was observed.

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 2 Results of reverse mutation test of *p*-nitrophenol sodium salt on bacteria (1st trial)
[activation method: +S9 mix]

Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	108	129	99	10	11	10	21	20	16	26	34	30	15	9	13
	[112 \pm 15]			[10 \pm 1]			[19 \pm 3]			[30 \pm 4]			[12 \pm 3]		
156	125	116	111	6	11	14	17	14	24	44	31	30	7	15	9
	[117 \pm 7]			[10 \pm 4]			[18 \pm 5]			[35 \pm 8]			[10 \pm 4]		
313	107	110	95	13	10	7	20	23	22	42	36	37	12	8	8
	[104 \pm 8]			[10 \pm 3]			[22 \pm 2]			[38 \pm 3]			[9 \pm 2]		
625	120	111	97	12	10	7	12	19	20	22	33	32	8	7	12
	[109 \pm 12]			[10 \pm 3]			[17 \pm 4]			[29 \pm 6]			[9 \pm 3]		
1250	100	89	87	10	7	4	10	19	14	26	20	22	3	5	5
	[92 \pm 7]			[7 \pm 3]			[14 \pm 5]			[23 \pm 3]			[4 \pm 1]		
2500	0	9	12	0	0	0	5	4	2	0	0	0	0	0	1
	[7 \pm 6]			[0 \pm 0]			[4 \pm 2]			[0 \pm 0]			[0 \pm 1]		
5000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]		
Positive control	643	586	634*	144	153	151*	736	790	847*	381	354	348*	80	109	86*
	[621 \pm 31]			[149 \pm 5]			[791 \pm 56]			[361 \pm 18]			[92 \pm 15]		

*:Growth inhibition was observed.

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

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

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

Table 3 Results of reverse mutation test of p-nitrophenol sodium salt on bacteria (2nd trial)
[direct method: -S9 mix]

Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	117	113	111	8	11	10	14	27	18	28	29	23	10	8	8
	[114 \pm 3]			[10 \pm 2]			[20 \pm 7]			[27 \pm 3]			[9 \pm 1]		
156	119	103	120	14	12	11	15	27	13	28	28	28	9	14	10
	[114 \pm 10]			[12 \pm 2]			[18 \pm 8]			[28 \pm 0]			[11 \pm 3]		
313	111	105	106	8	15	8	18	16	21	21	25	21	7	13	11
	[107 \pm 3]			[10 \pm 4]			[18 \pm 3]			[22 \pm 2]			[10 \pm 3]		
625	118	97	100	7	9	8	20	18	26	19	24	24	13	11	11
	[105 \pm 11]			[8 \pm 1]			[21 \pm 4]			[22 \pm 3]			[12 \pm 1]		
1250	86	98	86	6	6	5	15	14	13	33	18	25	13	6	9
	[90 \pm 7]			[6 \pm 1]			[14 \pm 1]			[25 \pm 8]			[9 \pm 4]		
2500	17	10	36	0*	0*	0*	5	2	7	6*	0*	3*	0*	0*	1*
	[21 \pm 13]			[0 \pm 0]			[5 \pm 3]			[3 \pm 3]			[0 \pm 1]		
5000	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]		
Positive control	805	823	787*	403	400	391 ^b	679	727	771 ^c	395	378	366 ^d	598	634	422 ^e
	[805 \pm 18]			[398 \pm 6]			[726 \pm 46]			[380 \pm 15]			[551 \pm 113]		

*:Growth inhibition was observed.
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 p-nitrophenol sodium salt on bacteria (2nd trial)
[activation method: +S9 mix]

Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate [Mean \pm S.D.]														
	TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
0	99	102	108	9	8	7	22	24	15	29	41	27	15	10	11
	[103 \pm 5]			[8 \pm 1]			[20 \pm 5]			[32 \pm 8]			[12 \pm 3]		
156	119	112	87	12	12	11	24	17	26	48	23	32	10	15	12
	[106 \pm 17]			[12 \pm 1]			[22 \pm 5]			[34 \pm 13]			[12 \pm 3]		
313	109	88	126	10	11	7	17	19	21	48	37	29	14	11	18
	[108 \pm 19]			[9 \pm 2]			[19 \pm 2]			[38 \pm 10]			[14 \pm 4]		
625	113	98	94	11	10	6	25	19	25	34	24	30	6	9	14
	[102 \pm 10]			[9 \pm 3]			[23 \pm 3]			[29 \pm 5]			[10 \pm 4]		
1250	104	110	112	11	5	6	16	13	17	25	20	21	8	3	2
	[109 \pm 4]			[7 \pm 3]			[15 \pm 2]			[22 \pm 3]			[4 \pm 3]		
2500	22	18	25	0	0	1	5	1	5	4	0	0	0	0	0
	[22 \pm 4]			[0 \pm 1]			[4 \pm 2]			[1 \pm 2]			[0 \pm 0]		
5000	3*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	[1 \pm 2]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]			[0 \pm 0]		
Positive control	629	569	520*	162	155	144 ^b	778	771	802 ^c	345	331	344*	123	99	80 ^b
	[573 \pm 55]			[154 \pm 9]			[784 \pm 16]			[340 \pm 8]			[101 \pm 22]		

*:Growth inhibition was observed.
a) 2-AA:2-Aminoanthracene, 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$
b) 2-AA, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$
c) 2-AA, 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$

p-ニトロフェノールナトリウムのチャイニーズ・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 *p*-Nitrophenol sodium salt on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

p-ニトロフェノールナトリウム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*における短時間処理法による染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、細胞増殖抑制試験を行った結果、S9 mix非存在下では1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix存在下では1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。したがって、染色体異常試験における用量は、S9 mix非存在下では100, 200, 400, 800, 1200および1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix存在下では600, 800, 1000, 1200, 1400および1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

試験の結果、S9 mix非存在下では、用量依存的な染色体構造異常細胞の増加が認められ、800および1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での増加(出現頻度7.5および28.0%)は統計学的に有意なものであった。S9 mix存在下においても用量依存的な染色体構造異常細胞の増加が認められ、600, 800, 1000および1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での増加(出現頻度11.5, 19.0, 33.5および48.0%)は統計学的に有意なものであった。S9 mix非存在下の1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 並びにS9 mix存在下の1400および1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、*p*-ニトロフェノールナトリウムは、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2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。

培養開始3日後にS9 mix非存在および存在下で被験物質を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

染色体異常試験用凍結S9 mix(キッコーマン(株))を購入し、製造後6ヶ月以内に使用した。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

p-ニトロフェノールナトリウムは不安定な物質であるため、安定な二水和物として流通している。試験には二水和物(ロット番号8J-001, 純度79.4%, 水19.4%を含む, 三井化学(株)(東京)提供)を用いた。二水和物は、黄色結晶で、水に59.7 mg/mL可溶およびエタノールに可溶である。被験物質は、冷暗所(4°C)で密栓保管した。

実験終了後、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

溶媒に生理食塩水(株)大塚製薬工場)を用い、被験物質を溶解して最高用量の供試液(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用量の供試液を調製した。供試液は、用時調製し、調製の際には純度換算を行った。供試液のディッシュ内への添加量は培養液量の10 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用量を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。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(モノセレーター II, MI-60, 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%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果(Fig. 1), S9 mix非存在下では1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix存在下では1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量は、

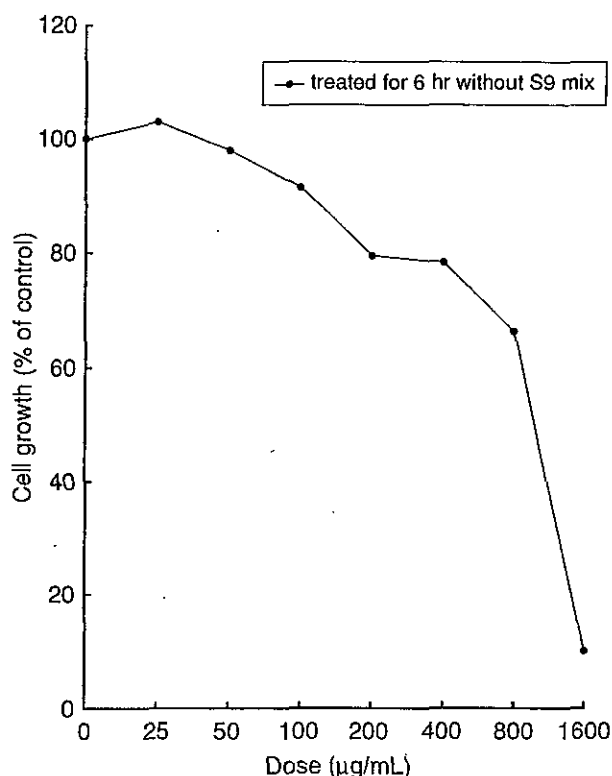


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with p-nitrophenol sodium salt

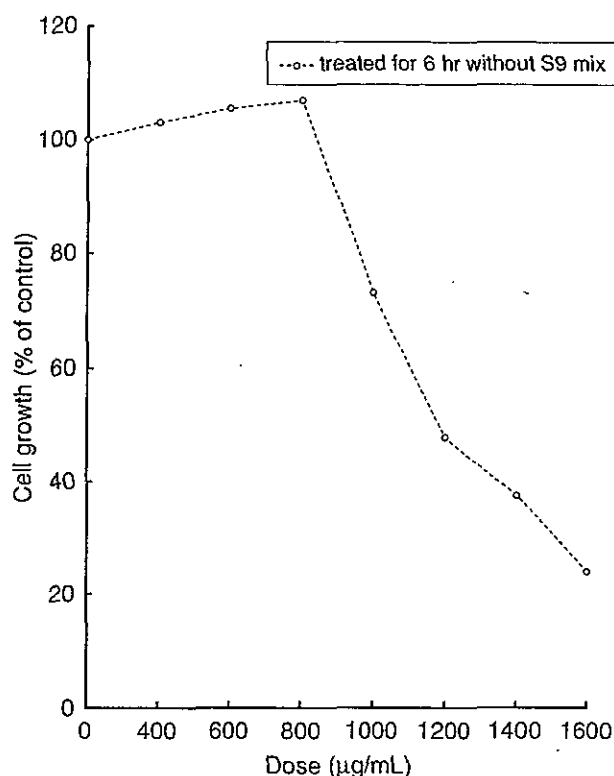


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with p-nitrophenol sodium salt

それぞれ800~1600 µg/mLの用量域および1200 µg/mLの近くにあるものと判断された。

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用量は、50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ3用量以上のデータが得られることを考慮して、S9 mix非存在下では100, 200, 400, 800, 1200 および1600 µg/mL, S9 mix存在下では600, 800, 1000, 1200, 1400 および1600 µg/mLの各6用量を設定した。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、短時間処理法S9 mix存在下では3,4-benzo[a]pyrene (B[a]P, Sigma Chemical Co.)を10 µg/mL, S9 mix非存在下では1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG, Aldrich Chemical Co.)を2.5 µg/mLの用量で用いた。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。

10. 染色体の観察

各ディッシュあたり100個、すなわち、1用量当たり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、記録した。

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用量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用量以上で有意に増加し、かつ用量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

短時間処理法による結果をTable 1に示す。S9 mix非存在下では、用量依存的な染色体の構造異常を有する細胞の増加が認められ、800および1200 µg/mLでの増加(出現頻度7.5および28.0%)は陰性対照群と比較して統計学的に有意なものであった。S9 mix存在下において

も、用量依存的な染色体の構造異常細胞の増加が認められ、600, 800, 1000および1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での増加(出現頻度11.5, 19.0, 33.5および48.0%)は統計学的に有意なものであった。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非存在下の1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 並びにS9 mix存在下の1400および1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。

なお、本被験物質は黄色を呈しており、その供試液を培養液中に添加すると培養液は直ちに黄色化した。被験物質の溶解に伴う培養液のpHの変化を、400~1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用量の添加直後と添加培養6時間後の培養液について測定したところ、いずれもpHは7.0~7.2の中性域を保ち、変化は認められなかった。

以上の成績から、*p*-ニトロフェノールナトリウムは、染色体構造異常を誘発する作用があると考えられた。したがって、本実験条件下では、*p*-ニトロフェノールナトリウムのCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。陽性結果が得られたため、 D_{20} 値²⁾(分裂中期像の20%に異常を誘発させる被験物質の推定用量)を算出したところ、本被験物質の D_{20} 値は、短時間処理法S9 mix非存在下において1.08 mg/mL、S9 mix存在下では0.65 mg/mLであった。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、明らかに陽性と判断されるものであった。

p-ニトロフェノールナトリウムの類縁化合物である3-メチル-4-ニトロフェノールは、CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁴⁾と報告されている。

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) 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.
- 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) 田中憲穂, 山影康次, 日下部博一, 橋本恵子, 澁谷徹, 原巧, 加藤基恵, 石原尚古, 化学物質毒性試験報告, 2, 167(1995).

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

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with p-nitrophenol sodium salt with and without S9 mix

Group	Dose (μg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of cells with structural aberrations						gap (%)	No. of cells with numerical aberrations			Cell Growth rate(%)	
					ctb	cte	csb	cse	oth	total(%) ²		Polyploid	Polyploid ³	total(%) ²		
Solvent ¹	0	-	6-(18)	200	2	0	0	1	0	3(1.5)	1(0.5)	0	0	0(0)	100.0	
PNPS	100	-	6-(18)	200	2	1	0	1	0	4(2.0)	2(1.0)	2	1	3(1.5)	82.0	
	200	-	6-(18)	200	1	3	0	0	0	4(2.0)	0(0)	0	3	3(1.5)	82.5	
	400	-	6-(18)	200	2	4	1	0	0	5(2.5)	0(0)	0	0	0(0)	80.5	
	800	-	6-(18)	200	4	12	0	1	0	15(7.5)*	0(0)	1	0	1(0.5)	66.0	
	1200	-	6-(18)	200	26	51	1	0	0	56(28.0)**	5(2.5)	0	0	0(0)	36.5	
	1600	-	6-(18)	Toxic	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	11.0
MNNG	2.5	-	6-(18)	200	45	192	0	1	0	193(96.5)**	4(2.0)	0	0	0(0)	—	
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	1(0.5)	0(0)	2	0	2(1.0)	100.0	
PNPS	600	+	6-(18)	200	2	23	0	0	0	23(11.5)**	1(0.5)	1	2	3(1.5)	89.0	
	800	+	6-(18)	200	10	32	0	1	0	38(19.0)**	0(0)	0	0	0(0)	79.5	
	1000	+	6-(18)	200	20	60	0	2	0	67(33.5)**	2(1.0)	0	1	1(0.5)	61.0	
	1200	+	6-(18)	200	48	89	0	0	0	96(48.0)**	2(1.0)	0	0	0(0)	42.0	
	1400	+	6-(18)	Toxic	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25.0
	1600	+	6-(18)	Toxic	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	14.5
BP	10	+	6-(18)	200	9	86	2	0	0	91(45.5)**	3(1.5)	0	0	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, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, PNPS: p-nitrophenol sodium salt, MNNG: 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine, BP: 3,4-benzo[a]pyrene

1) JP saline was used as solvent. 2) Multi-sample χ^2 test was done at $p < 0.05$ and then Fisher's exact test was done at $p < 0.05$ or $p < 0.01$. 3) endoreduplication

*: Significantly different from solvent group data at $p < 0.05$ by Fisher's exact test.

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