

4-(1-メチルエチル)アニリンの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 4-(1-Methylethyl) aniline on Bacteria

要約

4-(1-メチルエチル)アニリンについて、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たことから、本試験はS9 mix無添加試験では46.9~1500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、S9 mix添加試験では23.4~1500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。ただし、TA100とTA1535のS9 mix添加試験では、本試験Iで188または93.8 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以下の用量で復帰変異コロニー数の用量依存的な増加が認められたため、本試験IIでは5.86~188 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲で実施した。

その結果、2回の本試験とも、TA100とTA1535のS9 mix添加試験において、復帰変異コロニー数が溶媒対照値の2倍以上に増加し、用量依存性が認められた。

以上の結果から、4-(1-メチルエチル)アニリンは、用いた試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定した。

方法

1. 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博士から分与された。

E. coli WP2 *uvrA*株は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された。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したのを用い、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、ニュートリエントブロス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℃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。

2. 被験物質

4-(1-メチルエチル)アニリンは、無色液体である。用いた被験物質は、ロット番号970918、純度99.27%(不純物:0.32% MIPA, 0.10% OIPA)であり、三井石油化学(株)(東京)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光して保管した。

4-(1-メチルエチル)アニリンは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号: TPJ5678, 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。

3. 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(和光純薬工業(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, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを-20℃で凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

4. 培地およびS9 mixの組成

1) トップアガー(TA菌株用)

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 Lab.) 0.6 w/v%

塩化ナトリウム 0.5 w/v%

(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、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。

3) S9 mix

1mL中下記の成分を含む。

S9**	0.1 mL
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μmol

**：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されたS9(キッコーマン(株))を用いた。

5. 試験方法

プレインキュベーション法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℃で20分間プレインキュベーションしたのち、約45℃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、溶媒および陽性対照群を共通とした。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を目視またはコロニーアナライザーを用いて算定した。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、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、溶媒対照値の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。

結果および考察

50.0~5000 μg/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、1500 μg/plate以上の用量で抗菌性が認められた。

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1500 μg/plateとした。

最高用量を1500 μg/plateとして、公比2で6~7用量を設定して本試験Iを実施した(Table 1)。その結果、TA100とTA1535のS9 mix添加試験では、それぞれ46.9~750 μg/plateおよび23.4~375 μg/plateの用量で溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められ、それぞれ188および93.8 μg/plateまで用量依存的に増加した。そこで、これらについては、本試験IIの実施に当たって、最高用量を188 μg/plateに下げ公比2で6用量を設定した(Table 2)。その結果、両検定菌とも用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、46.9 μg/plateで溶媒対照値の2倍に達した。

TA100とTA1535のS9 mix無添加試験およびその他の検定菌については、本試験Iと同一用量で本試験IIを実施した(Table 2)。その結果、2回の試験とも溶媒対照値の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、本被験物質はS9 mix添加条件下でTA100とTA1535に復帰変異を誘発するものと考えられる。当被験物質の最大比活性は、TA100のS9 mix添加試験における3454.2(本試験I, 46.9 μg/plate)で、同一条件下における陽性対照物質2-アミノアントラセンの値(919000)の約270分の1であった。

以上の結果に基づき、4-(1-メチルエチル)アニリンは、用いた試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定した。

なお、本被験物質はチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験では陰性であった⁴⁾。また、本被験物質の類縁化合物のアニリン⁵⁾およびm-トルイジン⁶⁾は、復帰変異試験で陰性の結果が得られている。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173(1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F. J. de Serres, J. Ashby, Elsevier, North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 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, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 350.
- 5) 石館基監修, "微生物を用いる変異原性試験データ集," エル・アイ・シー, 東京, 1991, pp. 27-28.

- 6) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修,
“化学物質毒性試験報告,” Vol. 2, 化学物質点検推
進連絡協議会, 東京, 1995, p. 79.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：原 巧, 川上久美子
財団法人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: Tohru Shibuya (Study Director)
Takumi Hara, Kumiko Kawakami
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 4-(1-methylethyl) aniline 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 $uvrA$			TA98			TA1537							
S9 mix (-)	0	116	131	127	8	11	8	15	30	28	26	20	19	7	7	6	(125 \pm 7.8)	(9 \pm 1.7)	(24 \pm 8.1)	(22 \pm 3.8)	(7 \pm 0.6)
	46.9	110	141	143	15	9	6	26	23	32	25	18	17	5	4	5	(131 \pm 18.5)	(10 \pm 4.6)	(27 \pm 4.6)	(20 \pm 4.4)	(5 \pm 0.6)
	93.8	151	147	149	11	10	8	35	23	19	20	19	24	6	8	4	(149 \pm 2.0)	(10 \pm 1.5)	(26 \pm 8.3)	(21 \pm 2.6)	(6 \pm 2.0)
	188	128	129	128	7	8	9	28	27	28	25	23	29	7	9	10	(128 \pm 0.6)	(8 \pm 1.0)	(28 \pm 0.6)	(26 \pm 3.1)	(9 \pm 1.5)
	375	125	141	141	13	13	7	26	17	21	28	20	20	10	6	10	(136 \pm 9.2)	(11 \pm 3.5)	(21 \pm 4.5)	(23 \pm 4.6)	(9 \pm 2.3)
	750	126*	128	150	8	8	15	26	29	24	17	11	11	11*	9*	4*	(135 \pm 13.3)	(10 \pm 4.0)	(26 \pm 2.5)	(13 \pm 3.5)	(8 \pm 3.6)
	1500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)
S9 mix (+)	0	126	152	147	12	14	6	37	28	33	40	32	26	14	10	15	(142 \pm 13.8)	(11 \pm 4.2)	(33 \pm 4.5)	(33 \pm 7.0)	(13 \pm 2.6)
	23.4	231	272	258	24	25	21	30	38	35	66	47	53	12	12	14	(254 \pm 20.8)	(23 \pm 2.1)	(34 \pm 4.0)	(55 \pm 9.7)	(13 \pm 1.2)
	46.9	298	312	303	32	29	40	38	32	34	56	46	44	16	6	13	(304 \pm 7.1)	(34 \pm 5.7)	(35 \pm 3.1)	(49 \pm 6.4)	(12 \pm 5.1)
	93.8	298	308	348	42	37	46	29	33	28	48	47	47	18	18	17	(318 \pm 26.5)	(42 \pm 4.5)	(30 \pm 2.6)	(47 \pm 0.6)	(18 \pm 0.6)
	188	284	350	404	37	36	36	44	33	38	54	40	49	18	14	11	(346 \pm 60.1)	(36 \pm 0.6)	(38 \pm 5.5)	(48 \pm 7.1)	(14 \pm 3.5)
	375	338	331	360	31	32	29	29	41	44	40	29	48	13	18	15	(343 \pm 15.1)	(31 \pm 1.5)	(38 \pm 7.9)	(39 \pm 9.5)	(15 \pm 2.5)
	750	344	319	339	14	13	21	36	42	33	42	55	39	17	20	16	(334 \pm 13.2)	(16 \pm 4.4)	(37 \pm 4.6)	(45 \pm 8.5)	(18 \pm 2.1)
	1500	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)
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	531	569	548	566	654	355	208	212	195	619	601	605	323	400	342	(549 \pm 19.0)	(525 \pm 153.7)	(205 \pm 8.9)	(608 \pm 9.5)	(355 \pm 40.1)
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	1026	1064	1092	454	467	430	794	762	878	517	535	557	448	418	459	(1061 \pm 33.1)	(450 \pm 18.8)	(811 \pm 59.9)	(536 \pm 20.0)	(442 \pm 21.2)

Purity was 99.27 %, and 0.32 % MIPA and 0.10 % OIPA were contained as impurities.
 AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene
 *:Growth inhibition was observed.

Table 2 Mutagenicity of 4-(1-methylethyl) aniline 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	145 153 140 (146 \pm 6.6)	7 11 11 (10 \pm 2.3)	15 21 30 (22 \pm 7.5)	26 23 28 (26 \pm 2.5)	17 8 6 (10 \pm 5.9)	
	46.9	130 130 143 (134 \pm 7.5)	6 9 9 (8 \pm 1.7)	18 27 20 (22 \pm 4.7)	21 19 16 (19 \pm 2.5)	4 5 4 (4 \pm 0.6)	
	93.8	126 150 152 (143 \pm 14.5)	8 8 8 (8 \pm 0.0)	23 18 21 (21 \pm 2.5)	19 23 22 (21 \pm 2.1)	9 6 14 (10 \pm 4.0)	
	188	157 141 161 (153 \pm 10.6)	10 11 7 (9 \pm 2.1)	25 28 21 (25 \pm 3.5)	24 24 23 (24 \pm 0.6)	11 11 12 (11 \pm 0.6)	
	375	157 162 161 (160 \pm 2.6)	14 11 7 (11 \pm 3.5)	23 28 25 (25 \pm 2.5)	17 13 29 (20 \pm 8.3)	9 6 12 (9 \pm 3.0)	
	750	145* 114* 129* (129 \pm 15.5)	16* 4* 5* (8 \pm 6.7)	17 20 20 (19 \pm 1.7)	4* 15* 9* (9 \pm 5.5)	3* 2* 5* (3 \pm 1.5)	
	1500	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	
S9 mix (+)	0	143 141 130 (138 \pm 7.0)	16 8 17 (14 \pm 4.9)	29 30 21 (27 \pm 4.9)	27 37 34 (33 \pm 5.1)	8 13 14 (12 \pm 3.2)	
	5.86	180 195 233 (203 \pm 27.3)	17 16 15 (16 \pm 1.0)	NT	NT	NT	
	11.7	255 230 235 (240 \pm 13.2)	28 15 24 (22 \pm 6.7)	NT	NT	NT	
	23.4	258 292 254 (268 \pm 20.9)	24 25 32 (27 \pm 4.4)	38 23 34 (32 \pm 7.8)	62 41 33 (45 \pm 15.0)	18 12 17 (16 \pm 3.2)	
	46.9	308 284 297 (296 \pm 12.0)	35 34 28 (32 \pm 3.8)	39 36 36 (37 \pm 1.7)	41 47 56 (48 \pm 7.5)	13 24 15 (17 \pm 5.9)	
	93.8	344 279 303 (309 \pm 32.9)	28 30 34 (31 \pm 3.1)	40 32 41 (38 \pm 4.9)	53 43 58 (51 \pm 7.6)	17 20 15 (17 \pm 2.5)	
	188	319 288 300 (302 \pm 15.6)	38 37 33 (36 \pm 2.6)	40 31 30 (34 \pm 5.5)	48 34 49 (44 \pm 8.4)	12 13 15 (13 \pm 1.5)	
	375	NT	NT	33 39 25 (32 \pm 7.0)	48 43 45 (45 \pm 2.5)	13 14 17 (15 \pm 2.1)	
	750	NT	NT	28 43 30 (34 \pm 8.1)	47 51 43 (47 \pm 4.0)	14 18 12 (15 \pm 3.1)	
	1500	NT	NT	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	
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	
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	518 565 545 (543 \pm 23.6)	574 556 557 (562 \pm 10.1)	196 200 207 (201 \pm 5.6)	592 586 586 (588 \pm 3.5)	483 460 470 (471 \pm 11.5)	
	Number of colonies/plate	1079 999 1015 (1031 \pm 42.3)	438 392 383 (404 \pm 29.5)	727 722 748 (732 \pm 13.8)	459 500 459 (473 \pm 23.7)	317 321 372 (337 \pm 30.7)	

Purity was 99.27%, and 0.32% MIPA and 0.10% OIPA were contained as impurities.

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

*:Growth inhibition was observed.

NT:Not tested

4-(1-メチルエチル)アニリンのチャイニーズ・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 4-(1-Methylethyl) aniline on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

4-(1-メチルエチル)アニリン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)および短時間処理(6時間)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理では0.2 mg/mL, S9 mix非存在下および存在下での短時間処理では、それぞれ0.5 mg/mLおよび0.3 mg/mLであった。各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の2倍濃度を最高処理濃度とし、それぞれ公比2で5濃度設定した。連続処理では、24時間および48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。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間および48時間連続処理では0.20 mg/mL, S9 mix非存在下および存在下での短時間処理では0.25 mg/mLおよび0.30 mg/mL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時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix非存在下および存在下での短時間処理では、いずれの処理群においても、染色体の構造異常は認められなかった。S9 mix非存在下では、いずれの処理群においても倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix存在下では、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。

以上の結果より、4-(1-メチルエチル)アニリンは、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(日水製薬(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

4-(1-メチルエチル)アニリン(ロット番号: 970918, 三井化学(株), 東京)は、無色液体で、水に対しては100 mM未満, DMSOでは2 M以上, アセトン50 mg/mL以上で溶解し、油溶性で、沸点226-227°C/9.9 kPa, 純度99.27% (他に不純物としてMIPA 0.32%, OIPA 0.10%を含む)の物質であった。被験物質原体は、常温、遮光で安定であった。

6. 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(ロット番号: DLF7049, 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 vol%になるように加えた。

7. 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、24時間連続処理における50%細胞増殖抑制濃度は、0.2 mg/mLであった。また、S9 mix非存在下およ

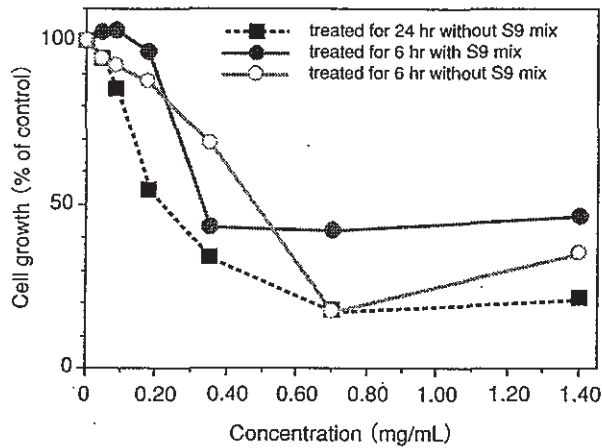


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4-(1-methylethyl) aniline

びS9 mix存在下で短時間処理した場合は、0.5 mg/mLおよび0.3 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、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、50%細胞増殖抑制濃度の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(24時間および48時間連続処理: 0.025, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 mg/mL, S9 mix非存在下での短時間処理: 0.063, 0.13, 0.25, 0.50, 1.0 mg/mL, S9 mix存在下での短時間処理: 0.038, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/mL)。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、注射用蒸留水(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 μ g/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0.20 mg/mL, S9 mix非存在下およびS9 mix存在下での短時間処理では0.25 mg/mLおよび0.30 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)¹⁾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(polyloid)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。4-(1-メチルエチル)アニリンを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの群においても、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。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。4-(1-メチルエチル)アニリンを加えてS9 mix非存在下および存在下で短時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。S9 mix非存在下では、いずれの処理群においても、倍数性細胞は誘発されなかった。S9 mix存在下では、傾向性検定の結果、有意差が認められた($p < 0.01$)が、最高濃度(0.30 mg/mL)における出現頻度は0.63%と低く、フィッシャーの直接確率法においては有意($p < 0.01$)でないことから、陰性と判定した。

従って、4-(1-メチルエチル)アニリンは、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。

4-(1-メチルエチル)アニリンは細菌を用いる復帰突然変異試験においてTA100およびTA1535に対し、S9 mix存在下で変異原活性が認められた⁴⁾。また、関連物質であるアニリンについては、染色体異常試験において、陽性の結果が報告されている⁵⁾。また、*m*-トルイジンについては陰性と報告されている⁶⁾が、*o*-および*p*-トルイジンは代謝活性化されて染色体異常を誘発することが報告されている⁷⁾。これらの化学物質はベンゼン環にアミノ基を有していることに加え、4-(1-メチルエチル)アニリ

ンはイソプロピル基, トルイジンはメチル基を有しており, 基の種類および結合位置の違いが染色体異常の発現に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

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) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999, p. 345.
- 5) 石舘基監修, "改訂増補 染色体異常試験データ集," リアライズ社, 東京, 1983, p. 31.
- 6) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, "化学物質毒性試験報告," Vol. 2, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1995, p. 99.
- 7) 石舘基監修, "改訂増補 染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー社, 東京, 1987, pp. 418-419.

連絡先

試験責任者: 佐々木澄志
試験担当者: 日下部博一, 若栗 忍, 高橋俊孝,
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: Kiyoshi Sasaki (Study director)
Hirokazu Kusakabe, Shinobu Wakuri,
Toshitaka Takahashi, 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 4-(1-methylethyl) aniline (MEA)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		Concurrent cytotoxicity ⁶⁾ (%)	Mitotic index ⁷⁾ (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Non-treatment			200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			—	—
Solvent ¹⁾ 0		24	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25			100.0	—
MEA 0.050		24	200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13			84.0	—
MEA 0.10		24	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			69.0	—
MEA 0.20		24	200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00	-	-	50.5	5.2
MEA 0.40***		24	—											—			35.5	Tox
MC 0.00005		24	200	3	36	110	3	0	0	152	0	100*(50.0)	100*(50.0)	0.00			—	—
Solvent ¹⁾ 0		48	200	0	0	2	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			100.0	—
MEA 0.050		48	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13			99.5	—
MEA 0.10		48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	-	-	81.5	—
MEA 0.20		48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			49.0	6.4
MEA 0.40***		48	—											—			5.5	0.1
MC 0.00005		48	200	0	65	238	8	2	20	333	4	139*(69.5)	139*(69.5)	0.38			—	—

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, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, MC:mitomycin C, Tox:cytotoxic.

1)Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2)More than nine 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 $P < 0.01$. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. 7)Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. *:Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test. **:Purity was 99.27%. MIPA (0.32%) and OIPA (0.10%) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4-(1-methylethyl) aniline (MEA)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hr)	S9 mix	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		Concurrent cytotoxicity ⁶⁾ (%)	Mitotic index ⁷⁾ (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Non-treatment				200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			—	—
Solvent ¹⁾ 0		6-(18)	-	200	0	2	0	0	0	0	2	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
MEA 0.063		6-(18)	-	200	1	2	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.13			88.0	—
MEA 0.13		6-(18)	-	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			82.0	—
MEA 0.25		6-(18)	-	200	0	0	2	0	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	-	-	80.5	15.1
MEA 0.50***		6-(18)	-	—										—			9.0	Tox	
MEA 1.0***		6-(18)	-	—										—			22.5	Tox	
CPA 0.005		6-(18)	-	200	0	1	0	2	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25			—	—
Solvent ¹⁾ 0		6-(18)	+	200	2	1	1	0	0	0	4	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
MEA 0.075		6-(18)	+	200	0	4	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.00			83.5	—
MEA 0.15		6-(18)	+	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	+	78.0	—
MEA 0.30		6-(18)	+	200	0	1	6	0	0	0	7	0	6 (3.0)	6 (3.0)	0.63			59.5	9.9
MEA 0.60***		6-(18)	+	—										—			28.5	Tox	
CPA 0.005		6-(18)	+	200	3	43	144	0	0	0	190	1	104*(52.0)	102*(51.0)	0.13			—	—

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, SA:structural aberration, NA:numerical aberration, CPA:cyclophosphamide, Tox:cytotoxic.

1)Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2)More than nine 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 $P < 0.01$. 6)Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. 7)Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. *:Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test. **:Purity was 99.27%. MIPA (0.32%) and OIPA (0.10%) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity.

