

# 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの細菌を用いる復帰突然変異試験

## Reverse Mutation Test of 2,2,6,6-Tetramethyl-4-hydroxypiperidine on Bacteria

### 要約

OECD既存化学物質安全点検に係わる毒性調査事業の一環として、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法により実施した。

予備試験における抗菌性の結果をもとに、本試験では S9 mix 非共存下および共存下の各菌株について 5000 ~ 156  $\mu\text{g}$ /プレート (公比2) の6濃度を設定した。

本試験を2回実施した結果、被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mix の有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mix 非共存下の TA1535, WP2 *uvrA* では 5000  $\mu\text{g}$ /プレート、TA100, TA98, TA1537 では 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上で、共存下の TA100, TA1537 では 2500  $\mu\text{g}$ /プレート以上、TA100, TA98, TA1537 では 5000  $\mu\text{g}$ /プレートでそれぞれ抗菌性が認められた。従って2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの変異原性は陰性と結論した。

### 方法

#### 〔使用菌株〕

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537<sup>1)</sup> および東京大学医科学研究所 松島教授より 1985 年 10 月 14 日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup> 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ものを使用した。

試験に際して、各凍結菌株を融解後、その 20  $\mu\text{L}$  をニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath 社) 25 g を 1 L の精製水に溶解して作製した液体完全培地 10 mL に接種し、37℃ で 8 時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は菌濃度を測定した後、試験に使用した。

#### 〔被験物質〕

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジン (ロット番号: 6509051, 三井石油化学工業(株)提供) は、分子式  $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}$ , 分子量 157.26, 純度 99.8% (不純物として、トリアセトンアミン 0.1% 以下, 2,2,6,6-テトラメチル-4-アミノピペリジン 0.02%, 2,2,6,6-テトラメチルテトラヒ

ドロピラン-4-オール 0.04% を含む) の白色顆粒であり、通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し、確認した。

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンは注射用水 (DW, (株)大塚製薬工場) を用いて最高濃度 (50 mg/mL) の溶液を調製した後、同溶媒で所定濃度に段階希釈したものをを用いた。

#### 〔陽性対照物質〕

陽性対照物質として下記のものを用いた。

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))

$\text{NaN}_3$  : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))

ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (Sigma Chemical Co.)

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

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

$\text{NaN}_3$  は DW に、その他はジメチルスルホキシド (関東化学(株)) に溶解したものを使用した。

#### 〔培地および S9 mix の組成〕

##### 1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いて D-ビオチン、L-ヒスチジンおよび L-トリプトファン の 0.5 mM 混合水溶液を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水 100 mL に対して、粉末寒天 (Bacto-Agar, Difco 社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え、オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し、約 45℃ に保温した。

##### 2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地 (オリエンタル酵母工業(株)) を購入し、使用した。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無水塩	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
ブドウ糖	20 g
寒天 (OXOID Agar No.1)	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

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム六水塩	8 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
D-グルコース6-リン酸	5 $\mu$ mol
$\beta$ -NADPH	4 $\mu$ mol
$\beta$ -NADH	4 $\mu$ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu$ mol
滅菌精製水	残量

\*:購入したS9(キッコーマン(株))を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボン併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 $\times$ g遠心上清分画である。

## 〔試験方法〕

試験はプレインキュベーション法で実施した。

試験管に被験物質溶液0.1 mLを分注し、S9 mix 0.5 mLと菌懸濁液0.1 mLを加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間振盪し、プレインキュベーションを行った。S9 mixを共存させない場合には、S9 mixの代わりに0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mLを加えた。プレインキュベーション後、トップアガー2 mLを上記の試験管に加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養し、復帰変異コロニー数を計測した。同時に実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた。予備試験では各濃度につき1枚のプレートを使用し、本試験では各濃度につき3枚のプレートを使用した。本試験は2回実施し、結果の再現性を確認した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

## 〔試験結果の判定基準〕

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)が陰性対照値の2倍以上を示し、明確な用量相関性および再現性が認められる場合に陽性と判定した。

## 結果および考察

## 〔予備試験〕

5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22  $\mu$ g/プレートの濃度で実施した結果、S9 mix非共存下および共存下のすべての菌株の5000  $\mu$ g/プレートで抗菌性が認められた。従って、本試験ではS9 mix非共存下および共存下の各菌株について5000, 2500, 1250, 625, 313, 156  $\mu$ g/プレートの6濃度を設定した。

## 〔本試験〕

結果をTable 1, 2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施した結果、2回の本試験ともに、被験物質の各濃度

において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mix非共存下のTA1535, WP2uvrAでは5000  $\mu$ g/プレート、TA100, TA98, TA1537では2500  $\mu$ g/プレート以上で、共存下のTA100, TA1537では2500  $\mu$ g/プレート以上、TA100, TA98, TA1537では5000  $\mu$ g/プレートでそれぞれ抗菌性が認められた。

以上の結果から、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの変異原性は陰性と結論した。

## 文献

- 1) D.M. Maron and B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173(1983).
- 2) M.H.L. Green and W.J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3(1976).

## 連絡先

試験責任者：宮川 誠  
 試験担当者：榎本佳明, 清水優子  
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
 314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

## Correspondence

Authors: Makoto Miyagawa (Study director)  
 Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu  
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
 Kashima Laboratory  
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
 Ibaraki, 314-0255, Japan  
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine on bacteria

With (+) or Without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	150 139 (148) 154 ( $\pm 8$ )	14 16 (15) 16 ( $\pm 1$ )	49 36 (45) 51 ( $\pm 8$ )	24 17 (21) 22 ( $\pm 4$ )	9 17 (13) 14 ( $\pm 4$ )
	156	166 164 (165) 164 ( $\pm 1$ )	12 17 (16) 20 ( $\pm 4$ )	48 38 (41) 36 ( $\pm 6$ )	17 26 (22) 24 ( $\pm 5$ )	10 5 (8) 9 ( $\pm 3$ )
	313	163 149 (157) 158 ( $\pm 7$ )	11 10 (11) 12 ( $\pm 1$ )	44 46 (48) 53 ( $\pm 5$ )	19 15 (16) 15 ( $\pm 2$ )	9 11 (12) 16 ( $\pm 4$ )
	625	141 140 (141) 143 ( $\pm 2$ )	11 15 (13) 13 ( $\pm 2$ )	38 57 (48) 49 ( $\pm 10$ )	18 20 (19) 20 ( $\pm 1$ )	11 9 (10) 9 ( $\pm 1$ )
	1250	144 136 (139) 138 ( $\pm 4$ )	8 17 (13) 15 ( $\pm 5$ )	38 44 (42) 44 ( $\pm 3$ )	11 22 (18) 21 ( $\pm 6$ )	6 6 (8) 12 ( $\pm 3$ )
	2500	116* 113* (114) 113* ( $\pm 2$ )	10 6 (8) 7 ( $\pm 2$ )	29 35 (33) 34 ( $\pm 3$ )	24* 22* (22) 20* ( $\pm 2$ )	3* 8* (5) 4* ( $\pm 3$ )
	5000	107* 93* (101) 102* ( $\pm 7$ )	12* 12* (9) 3* ( $\pm 5$ )	22* 13* (18) 18* ( $\pm 5$ )	10* 12* (11) 12* ( $\pm 1$ )	3* 2* (3) 3* ( $\pm 1$ )
S9 mix (+)	0	160 172 (167) 170 ( $\pm 6$ )	12 18 (16) 19 ( $\pm 4$ )	50 36 (44) 47 ( $\pm 7$ )	28 25 (26) 25 ( $\pm 2$ )	11 9 (10) 11 ( $\pm 1$ )
	156	130 160 (161) 192 ( $\pm 31$ )	13 12 (14) 16 ( $\pm 2$ )	54 51 (54) 56 ( $\pm 3$ )	27 17 (22) 21 ( $\pm 5$ )	8 10 (11) 14 ( $\pm 3$ )
	313	146 168 (169) 192 ( $\pm 23$ )	15 17 (14) 10 ( $\pm 4$ )	42 47 (44) 44 ( $\pm 3$ )	32 23 (27) 27 ( $\pm 5$ )	16 10 (11) 6 ( $\pm 5$ )
	625	147 169 (161) 166 ( $\pm 12$ )	18 13 (16) 16 ( $\pm 3$ )	42 42 (42) 43 ( $\pm 1$ )	20 27 (23) 22 ( $\pm 4$ )	12 11 (11) 9 ( $\pm 2$ )
	1250	161 175 (162) 151 ( $\pm 12$ )	8 11 (15) 25 ( $\pm 9$ )	46 59 (49) 43 ( $\pm 9$ )	30 33 (29) 23 ( $\pm 5$ )	9 13 (10) 9 ( $\pm 2$ )
	2500	146* 152* (146) 140* ( $\pm 6$ )	12 12 (14) 18 ( $\pm 3$ )	58 57 (56) 52 ( $\pm 3$ )	23 32 (26) 24 ( $\pm 5$ )	11* 9* (10) 10* ( $\pm 1$ )
	5000	98* 105* (108) 122* ( $\pm 12$ )	6* 14* (9) 8* ( $\pm 4$ )	38* 25* (30) 28* ( $\pm 7$ )	18* 23* (19) 15* ( $\pm 4$ )	6* 4* (7) 10* ( $\pm 3$ )
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN <sub>3</sub>	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	1076 1190 (1112) 1070 ( $\pm 68$ )	420 401 (419) 437 ( $\pm 18$ )	1812 1825 (1807) 1785 ( $\pm 20$ )	476 425 (422) 366 ( $\pm 55$ )	180 136 (166) 182 ( $\pm 26$ )

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN<sub>3</sub>: sodium azide (Mean)  
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene ( $\pm$ S.D.)

\*: Microbial toxicity was observed.

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine on bacteria

With (+) or Without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	134 134 (134) 133 ( $\pm 1$ )	17 18 (18) 18 ( $\pm 1$ )	37 43 (42) 45 ( $\pm 4$ )	20 19 (20) 22 ( $\pm 2$ )	7 6 (6) 6 ( $\pm 1$ )
	156	150 147 (139) 119 ( $\pm 17$ )	20 20 (20) 19 ( $\pm 1$ )	51 31 (39) 36 ( $\pm 10$ )	17 19 (16) 12 ( $\pm 4$ )	8 7 (6) 4 ( $\pm 2$ )
	313	117 137 (134) 149 ( $\pm 16$ )	15 25 (20) 20 ( $\pm 5$ )	31 35 (34) 36 ( $\pm 3$ )	23 20 (20) 17 ( $\pm 3$ )	6 4 (6) 9 ( $\pm 3$ )
	625	111 155 (136) 142 ( $\pm 23$ )	22 20 (22) 23 ( $\pm 2$ )	37 38 (38) 38 ( $\pm 1$ )	18 18 (18) 19 ( $\pm 1$ )	4 4 (4) 3 ( $\pm 1$ )
	1250	161 125 (140) 135 ( $\pm 19$ )	20 18 (20) 23 ( $\pm 3$ )	29 32 (33) 37 ( $\pm 4$ )	18 16 (17) 18 ( $\pm 1$ )	5 11 (8) 8 ( $\pm 3$ )
	2500	121* 120* (111) 91* ( $\pm 17$ )	12 13 (13) 13 ( $\pm 1$ )	35 29 (29) 24 ( $\pm 6$ )	23* 18* (19) 16* ( $\pm 4$ )	10* 5* (7) 5* ( $\pm 3$ )
	5000	104* 98* (99) 96* ( $\pm 4$ )	9* 8* (9) 10* ( $\pm 1$ )	13* 12* (14) 16* ( $\pm 2$ )	11* 10* (10) 10* ( $\pm 1$ )	5* 6* (5) 5* ( $\pm 1$ )
S9 mix (+)	0	158 158 (159) 161 ( $\pm 2$ )	24 18 (21) 22 ( $\pm 3$ )	40 36 (38) 37 ( $\pm 2$ )	27 23 (24) 22 ( $\pm 3$ )	9 9 (9) 10 ( $\pm 1$ )
	156	178 155 (158) 141 ( $\pm 19$ )	20 25 (23) 25 ( $\pm 3$ )	48 35 (44) 48 ( $\pm 8$ )	30 33 (27) 19 ( $\pm 7$ )	4 11 (7) 6 ( $\pm 4$ )
	313	162 145 (158) 167 ( $\pm 12$ )	17 18 (21) 28 ( $\pm 6$ )	48 43 (41) 33 ( $\pm 8$ )	25 30 (32) 42 ( $\pm 9$ )	11 5 (9) 11 ( $\pm 3$ )
	625	139 146 (141) 138 ( $\pm 4$ )	25 23 (23) 20 ( $\pm 3$ )	28 36 (34) 37 ( $\pm 5$ )	21 33 (28) 30 ( $\pm 6$ )	13 9 (9) 6 ( $\pm 4$ )
	1250	163 149 (159) 165 ( $\pm 9$ )	25 16 (20) 18 ( $\pm 5$ )	45 35 (41) 43 ( $\pm 5$ )	28 33 (28) 23 ( $\pm 5$ )	6 6 (7) 9 ( $\pm 2$ )
	2500	112* 136* (133) 150* ( $\pm 19$ )	17 28 (21) 18 ( $\pm 6$ )	27 39 (36) 42 ( $\pm 8$ )	30 41 (33) 28 ( $\pm 7$ )	8* 11* (9) 9* ( $\pm 2$ )
	5000	103* 105* (110) 123* ( $\pm 11$ )	10* 5* (8) 10* ( $\pm 3$ )	30* 48* (39) 38* ( $\pm 9$ )	16* 17* (17) 17* ( $\pm 1$ )	12* 5* (8) 8* ( $\pm 4$ )
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	$\text{NaN}_3$	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	2	0.1	80
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
S9 mix (+)	Number of revertants	685 633 (669) 690 ( $\pm 32$ )	406 371 (367) 325 ( $\pm 41$ )	493 432 (435) 381 ( $\pm 56$ )	655 653 (645) 626 ( $\pm 16$ )	336 493 (377) 303 ( $\pm 102$ )
	Number of revertants	1052 1017 (1026) 1009 ( $\pm 23$ )	378 312 (356) 379 ( $\pm 38$ )	1703 1824 (1802) 1879 ( $\pm 90$ )	395 387 (397) 410 ( $\pm 12$ )	183 187 (184) 183 ( $\pm 2$ )

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide,  $\text{NaN}_3$ : sodium azide  
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)  
( $\pm$ S.D.)

\*: Microbial toxicity was observed.

# 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの 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 2,2,6,6-Tetramethyl-4-hydroxypiperidine on Cultured Chinese Hamster Cells

### 要約

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジ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。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても800 µg/mLを最高濃度とし、それぞれ公比2で4用量を設定した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した結果、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。

また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下の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。しかしながら、短時間処理法のS9 mix非存在下の最高濃度(800 µg/mL)の分裂指数が6.6であることから、さらに高濃度において分裂中期細胞の観察が可能と推測されたため、1200 µg/mLを最高濃度とし、1000, 800 µg/mLの3用量で追加試験1を実施した。その結果、いずれの濃度においても、染色体構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められず、また、1200 µg/mLの分裂指数が6.3であったことから、さらに同条件下において2000, 1500, 1000 µg/mLの3用量で追加試験2を実施した。その結果、2000 µg/mLで染色体構造異常および数的異常細胞の出現頻度はそれぞれ6.0, 7.0%となった。そこで、さらに再現性確認のため追加試験2と同条件で追加試験3を実施したところ、2000 µg/mLで染色体構造異常細胞の出現頻度は17.5%となり、再現性が認められた。なお、追加試験2および3における2000 µg/mLの分裂指数はそれぞれ1.6, 3.3であった。

以上の結果より、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンは、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

大日本製薬(株)から入手(1996年11月, 入手時:継代14代, 凍結時:17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5代以内で試験に用いた。

#### 2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(CS:GIBCO BRL, ロット番号:35K7844, 39K0464)を10%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<sup>4</sup>個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6 cm, Becton Dickinson and Company)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。

連続処理法では、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、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mixの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

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジン(ロット番号:6509051, 三井石油化学工業(株)一現三井化学(株)一提供)は、分子式C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>NO, 分子量157.26, 純度99.8%(不純物として、トリアセトンアミン0.1%以下, 2,2,6,6-テトラメチル-4-アミノピペリジン0.02%, 2,2,6,6-テトラメチルテトラヒドロピラン-4-オール0.04%を含む)の白色顆粒である。通常取り扱い条件では安定である。なお、本ロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し、確認した。

#### 5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒は局方生理食塩液(生食, (株)大塚製薬工場, ロット番号:K6F82, K7F75, K8B74)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(v/v)%になるように加えた。なお、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(Fig.1, 2)。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(Monocellator™, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を測定し、被験物質処理群の陰性対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。なお、連続処理法は、500~1000 µg/mLで

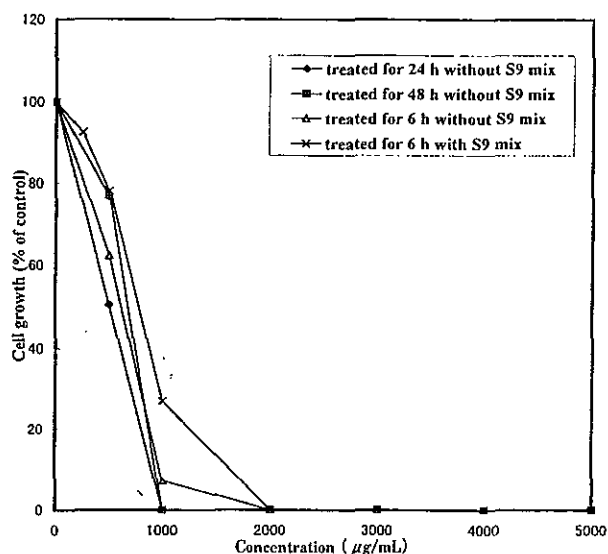


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine

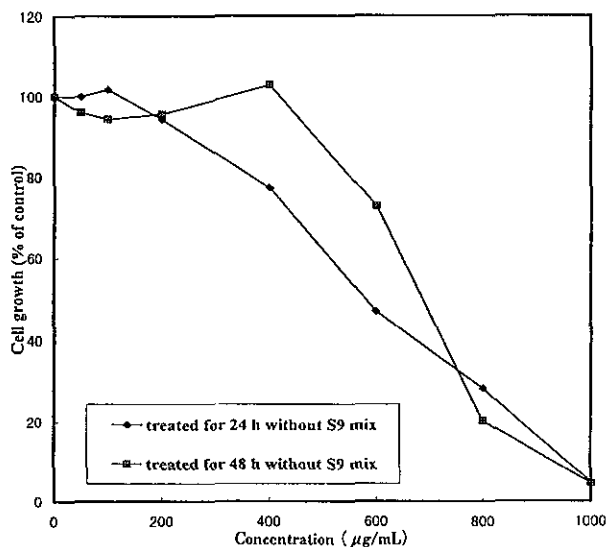


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine

細胞生存率に急激な変化が認められたため、1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度として追加試験を実施した(Fig.2).

その結果、約50%の増殖抑制を示す濃度を、プロビット法により算出したところ、連続処理法の24時間および48時間処理ではそれぞれ572, 683  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ726, 565  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった(Fig.1, 2).

#### 7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果を基に、染色体異常試験は連続処理法および短時間処理法のいずれの処理条件においても800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度とし、それぞれ公比2で4用量を設定した。

追加試験は、分裂指数を基に追加試験1では1200, 1000, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定し、追加試験2, 3では2000, 1500, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定した。

陽性対照として、連続処理法は、マイトマイシンC(MMC, 協和発酵工業株, ロット番号:119AFG)を0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 短時間処理法は、ベンゾ[a]ピレン(BP, 東京化成工業株, ロット番号:AX01)を20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 設定した。

#### 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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2枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で20分間染色した。

#### 9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のディッシュから得られたスライドを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・哺乳動物試験分科会(MMS)<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、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

#### 10. 記録と測定

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。構造異常は、ギャップを持つ細胞を含めた場合(+gap)と含めない場合(-gap)とに区別して集計した。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら<sup>2)</sup>の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性(-), 5%以上10%未満を疑陽性(±), 10%以上を陽性(+)とした。

#### 結果および考察

連続処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンを加えて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出現頻度は5%未満であった。一方、陽性対照物質のMMCで処理した細胞は、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 2-5に示した。細胞増殖抑制試験の結果を基に、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した結果、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出現頻度は5%未満であった。しかしながら、S9 mix非存

在下の800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の分裂指数が6.6であり、さらに高濃度においても分裂中期細胞の観察が可能と判断して1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度とし、1000, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量で追加試験1を実施した。その結果、いずれの濃度においても、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。また、この時の1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の分裂指数が6.3であったことから、さらに同条件下において2000, 1500, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量で追加試験2を実施した。その結果、2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の染色体構造異常および数的異常細胞の出現頻度はそれぞれ6.0, 7.0%となった。そこで、さらに再現性確認のため同条件、同濃度で追加試験3を実施したところ、2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で染色体構造異常細胞の出現頻度は17.5%となり、再現性が認められた。

なお、追加試験2および3の2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の分裂指数はそれぞれ1.6および3.3であった。

一方、陽性対照物質のBPで処理した細胞は、S9 mix存在下でのみ染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

従って、上記の試験条件下で、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンは、染色体異常を誘発すると結論した。

なお、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンおよび類似化合物における染色体異常に関する他の情報は得られなかった。

## 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, 1988.
- 2) 石館 基 監修, “〈改訂〉染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 1987.

## 連絡先

試験責任者: 太田絵律奈  
 試験担当者: 中川宗洋, 石毛裕子, 穴澤由美子  
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
 〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14  
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

## Correspondence

Authors: Erina Ohta (Study director)  
 Munehiro Nakagawa, Yuko Ishige,  
 Yumiko Anazawa  
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,  
 Kashima Laboratory  
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,  
 Ibaraki, 314-0255, Japan  
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine without S9 mix [main test]

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>		
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap(%)	+gap(%)		SA	NA	
Solvent <sup>1)</sup>	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0		
TH	100	24	200	0	1	0	0	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
	200	24	200	0	1	1	1	0	0	3	3	3(1.5)	3(1.5)	0.0	-	-
	400	24	200	0	0	0	1	0	0	1	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
	800	24	176	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.6	-	-
MMC	0.03	24	200	0	15	41	3	1	0	60	58	58(29.0)	58(29.0)	0.0	+	-
Solvent	0	48	200	0	0	0	2	0	0	2	2	2(1.0)	2(1.0)	0.0		
TH	100	48	200	1	1	0	1	0	0	3	2	2(1.0)	3(1.5)	0.0	-	-
	200	48	200	1	0	0	1	0	0	2	1	1(0.5)	2(1.0)	0.0	-	-
	400	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
	800	48	200	0	0	3	2	0	0	5	4	4(2.0)	4(2.0)	2.0	-	-
MMC	0.03	48	200	2	14	50	6	0	0	72	64	64(32.0)	65(32.5)	0.0	+	-

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f: acentric fragment (chromatid type), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, TH: 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine, MMC: mitomycin C (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine with and without S9 mix [main test]

Group	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap(%)	+gap(%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	1	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.0		
TH	100	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
	200	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.5	-	-
	400	-	6-(18)	200	0	1	0	0	1	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.0	-	-
	800	-	6-(18)	100	0	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.5	-	-
BP	20	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.5		
TH	100	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
	200	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
	400	+	6-(18)	200	0	1	0	1	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.0	-	-
	800	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
BP	20	+	6-(18)	200	2	19	157	1	0	0	179	160(80.0)	160(80.0)	0.0	+	-

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f: acentric fragment (chromatid type), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, TH: 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine, BP: benzo[a]pyrene (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).



Table 3 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine without S9 mix [additional test 1]

Group	Concentration (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap (%)	+gap (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
TH	800	-	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.5	-	-
	1000	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	1.0	-	-
	1200	-	6-(18)	200	0	0	1	0	1	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.5	-	-
BP	20	-	6-(18)	200	0	1	0	1	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	0.0	-	-

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f: acentric fragment (chromatid type), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, TH: 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine, BP: benzo[a]pyrene (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

Table 4 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine without S9 mix [additional test 2]

Group	Concentration (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap (%)	+gap (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
TH	1000	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
	1500	-	6-(18)	200	2	1	0	0	0	0	3	1(0.5)	3(1.5)	4.0	-	-
	2000	-	6-(18)	100	1	0	4	0	1	0	6	5(5.0)	6(6.0)	7.0	±	±
BP	20	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(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 etc.), f: acentric fragment (chromatid type), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, TH: 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine, BP: benzo[a]pyrene (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

Table 5 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine without S9 mix [additional test 3]

Group	Concentration (µg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>2)</sup> (%)	Judgement <sup>3)</sup>	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap (%)	+gap (%)		SA	NA
Solvent <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	1	3	0	0	0	0	4	3(1.5)	4(2.0)	0.0	-	-
TH	1000	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0(0.0)	1(0.5)	0.0	-	-
	1500	-	6-(18)	200	0	1	4	1	0	0	6	6(3.0)	6(3.0)	0.5	-	-
	2000	-	6-(18)	200	1	5	32	0	0	0	38	35(17.5)	35(17.5)	0.0	+	-
BP	20	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(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 etc.), f: acentric fragment (chromatid type), -gap: total no. cells with aberrations except gap, +gap: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, TH: 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine, BP: benzo[a]pyrene (Positive control)

1) JP saline was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).