

4,4'-ビフェニルジオール細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 4,4'-Biphenyldiol in Bacteria

要約

4,4'-ビフェニルジオ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菌株を用いた。WP2 *uvrA*以外の検定菌では用量設定試験で生育阻害が認められたことから、本試験はTA100については78.1~2500 µg/plate, それ以外の検定菌については156~5000 µg/plateの範囲で実施した。

その結果、用いた5種の検定菌の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4,4'-ビフェニルジオールは、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

4,4'-ビフェニルジオールは、白色結晶である。用いた被験物質は、ロット番号:020411, 純度:99.96%, 製造:本州化学工業(和歌山)であり、本州化学工業から供与された。被験物質は、使用時まで密閉、遮光して室温で保管した。本ロットは、実験期間中安定であったことが被験物質提供者により確認されている。

4,4'-ビフェニルジオールは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:WAJ4459, 和光純薬工業)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。調製時に、発熱、発泡および変色は認められなかった。

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)

アジ化ナトリウム (SA, 和光純薬工業)

9-アミノアクリジン (9AA, Sigma Chem.)

2-アミノアントラセン(2AA, 和光純薬工業)

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

試験には、*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*)、アンピシリン耐性因子pKM101(プラスミド)の有無および陰性対照と陽性対照の復帰変異コロニー数について調べ、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)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・七水和物	0.2 g
クエン酸・一水和物	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)	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

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 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したS9 (キッコーマン) 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無添加条件およびS9 mix添加条件で試験を行った。

小試験管中に, 被験物質調製液0.1 mL, S9 mix無添加条件では0.1 mol/Lナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL, S9 mix添加条件では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に保温したトップアガー-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, 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てそれぞれ陰性対照および陽性対照とした。同時に実施した他試験については, 陰性および陽性対照の結果を共通とした。

培養は37°Cで48時間行い, 発生し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澱の有無は, 肉眼により確認した。また, 生育阻害の有無については, 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。陰性および陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値を, それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

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, 結果の再現性の確認をした。

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無添加条件あるいはS9 mix添加条件において, 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。

結果及び考察

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, TA100のS9 mix無添加および添加条件では1500 μg/plate以上の用量で, TA1535, TA98およびTA1537のS9 mix無添加および添加条件では5000 μg/plateの用量で生育阻害が認められた。WP2 *uvrA*については生育阻害は認められなかった。また, 被験物質に由来する沈澱は, S9 mix無添加条件では1500 μg/plate以上の用量で, S9 mix添加条件では5000 μg/plateの用量で認められた。

したがって, 最高用量を, TA100では2500 μg/plate, それ以外の検定菌では5000 μg/plateとして, 公比2で6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, TA100のS9 mix無添加および添加条件では1250 μg/plate以上の用量で, TA1535, TA98およびTA1537のS9 mix無添加および添加条件では2500 μg/plate以上の用量で生育阻害が認められた。WP2 *uvrA*については生育阻害は認められなかった。復帰変異コロニー数は, いずれの検定菌においても, 陰性対照値の2倍以上となる増加は認められなかった。

以上の結果に基づき, 4,4'-ビフェニルジオールは, 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4,4'-ビフェニルジオールは, 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構造異常および倍數性ともに陽性の結果が得られている⁹⁾。また, 関連物質である4,4'-diaminodiphenylについては, 復帰変異試験で陽性の結果が報告されている⁹⁾。Biphenylについては復帰変異試験では陰性, 染色体異常試験ではマウスS9を用いた代謝活性化法において陽性の結果が報告されている⁶⁻⁸⁾。o-Phenylphenolについては復帰変異試験, 染色体異常試験ともに陰性の結果が報告されている⁹⁾。2,5-Dihydroxybiphenylについては染色体異常試験で陰性の結果が報告されている¹⁰⁾。Phenolについては復帰変異試験では陰性, *Allium cepa*を用いた染色体異常試験では陰性の結果が報告されている^{11,12)}。

文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res*, 113:173-215(1983).
- 2) Green MHL: Mutagen testing using Trp⁺ reversion in *Escherichia coli*. In "Handbook of Mutagenicity Test Procedures", Kilbey BJ, Legator M, Nichols W et al. (eds.), Elsevier, Amsterdam (1984) pp.161-187.

- 3) Matsushima T, Sugimura T, Nagao M et al.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. In "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens", Norpoth KH, Garner RC (eds.), Springer, Berlin (1980) pp.273-285.
- 4) 田中憲穂ら:4,4'-ビフェニルジオールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験. 化学物質毒性試験報告, 12:144-148(2005).
- 5) 賀田恒夫, 石館基(監修):「環境変異原性データ集 1」サイエンティスト社, 東京(1980)p.60.
- 6) 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 日本化学物質安全・情報センター, 東京(1986)p.229.
- 7) 祖父尼俊雄(監修):「染色体異常試験データ集」1998年版, エル・アイ・シー, 東京(1999)p.77.
- 8) 賀田恒夫, 石館基(監修):「環境変異原性データ集 1」サイエンティスト社, 東京(1980)p.68.
- 9) 祖父尼俊雄(監修):「染色体異常試験データ集」1998年版, エル・アイ・シー, 東京(1999)p.392.
- 10) 祖父尼俊雄(監修):「染色体異常試験データ集」1998年版, エル・アイ・シー, 東京(1999)p.186.
- 11) 賀田恒夫, 石館基(監修):「環境変異原性データ集 1」サイエンティスト社, 東京(1980)p.329.
- 12) 労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集, 日本化学物質安全・情報センター, 東京(1986)p.196.

連絡先

試験責任者: 原 巧
 試験担当者: 須井 哉, 大山徳子,
 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: Takumi Hara (Study Director)
 Hajime Sui, Noriko Ohyama,
 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 I Mutagenicity of 4,4'-biphenyldiol in 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	153	139	133	10	10	8	18	22	24	22	28	26	7	5	8
		(142 \pm 10)			(9 \pm 1)			(21 \pm 3)			(25 \pm 3)			(7 \pm 2)		
	78.1	152	176	137	NT			NT			NT			NT		
		(155 \pm 20)														
	156	137	144	142	11	7	9	24	21	26	24	22	24	9	10	6
		(141 \pm 4)			(9 \pm 2)			(24 \pm 3)			(23 \pm 1)			(8 \pm 2)		
	313	142	136	124	3	8	8	21	22	16	24	27	28	9	8	8
		(134 \pm 9)			(6 \pm 3)			(20 \pm 3)			(26 \pm 2)			(8 \pm 1)		
625	123	121	132	7	6	6	29	18	21	22	24	27	4	4	6	
	(125 \pm 6)			(6 \pm 1)			(23 \pm 6)			(24 \pm 3)			(5 \pm 1)			
1250	72*	76*	101*	3	6	7	19	16	18	26	17	22	7	6	8	
	(83 \pm 16)			(5 \pm 2)			(18 \pm 2)			(22 \pm 5)			(7 \pm 1)			
2500 †	0*	0*	0*	0*	0*	0*	7	9	14	0*	0*	0*	2*	3*	3*	
	(0 \pm 0)			(0 \pm 0)			(10 \pm 4)			(0 \pm 0)			(3 \pm 1)			
5000 †	NT			0*	0*	0*	9	5	12	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
				(0 \pm 0)			(9 \pm 4)			(0 \pm 0)			(0 \pm 0)			
S9 mix (+)	0	171	161	147	6	14	10	35	30	36	42	41	36	12	16	15
		(160 \pm 12)			(10 \pm 4)			(34 \pm 3)			(40 \pm 3)			(14 \pm 2)		
	78.1	148	171	161	NT			NT			NT			NT		
		(160 \pm 12)														
	156	181	185	191	8	9	11	32	30	23	57	35	39	12	7	16
		(186 \pm 5)			(9 \pm 2)			(28 \pm 5)			(44 \pm 12)			(12 \pm 5)		
	313	159	166	162	8	4	7	27	28	23	40	42	40	10	7	11
		(162 \pm 4)			(6 \pm 2)			(26 \pm 3)			(41 \pm 1)			(9 \pm 2)		
625	133	126	127	10	7	6	20	15	22	46	44	42	11	8	8	
	(129 \pm 4)			(8 \pm 2)			(19 \pm 4)			(44 \pm 2)			(9 \pm 2)			
1250	123*	117*	129*	4	3	4	13	25	13	29	35	29	9	9	7	
	(123 \pm 6)			(4 \pm 1)			(17 \pm 7)			(31 \pm 3)			(8 \pm 1)			
2500 †	10*	6*	22*	2*	2*	3*	6	8	11	2*	3*	7*	5*	1*	1*	
	(13 \pm 8)			(2 \pm 1)			(8 \pm 3)			(4 \pm 3)			(2 \pm 2)			
5000 †	NT			0*	0*	0*	9	8	2	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
				(0 \pm 0)			(6 \pm 4)			(0 \pm 0)			(0 \pm 0)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2 ^a			SA ^b			AF2			AF2			9AA ^c		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	574	619	613	646	625	610	165	186	184	336	374	431	224	224	231
	(602 \pm 24)			(627 \pm 18)			(178 \pm 12)			(380 \pm 48)			(226 \pm 4)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA ^d			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	817	802	845	357	311	346	866	763	760	485	443	394	261	266	276
	(821 \pm 22)			(338 \pm 24)			(796 \pm 60)			(441 \pm 46)			(268 \pm 8)			

The purity of the test substance was 99.96 wt%.

Negative control; Dimethyl sulfoxide

a) 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, b) Sodium azide, c) 9-Aminoacridine, d) 2-Aminoanthracene

†; Precipitate was observed on the surface of agar plates.

*; Growth inhibition was observed.

NT; Not tested

Table 2 Mutagenicity of 4,4'-biphenyldiol in 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	121 104 128 (118 \pm 12)	6 8 11 (8 \pm 3)	39 37 46 (41 \pm 5)	19 29 21 (23 \pm 5)	15 10 11 (12 \pm 3)	78.1	120 110 105 (112 \pm 8)	NT	NT	NT	NT	156	103 127 113 (114 \pm 12)	10 10 8 (9 \pm 1)	38 46 48 (44 \pm 5)	25 26 29 (27 \pm 2)	8 8 6 (7 \pm 1)	313	104 100 108 (104 \pm 4)	9 12 7 (9 \pm 3)	36 36 46 (39 \pm 6)	29 24 20 (24 \pm 5)	8 5 10 (8 \pm 3)	625	63 74 98 (78 \pm 18)	10 2 6 (6 \pm 4)	43 41 46 (43 \pm 3)	18 28 16 (21 \pm 6)	7 11 10 (9 \pm 2)	1250	37* 37* 62* (45 \pm 14)	3 2 8 (4 \pm 3)	32 38 32 (34 \pm 3)	22 24 25 (24 \pm 2)	5 6 7 (6 \pm 1)	2500 †	0* 0* 0* (0 \pm 0)	0* 0* 0* (0 \pm 0)	34 34 30 (33 \pm 2)	3* 2* 2* (2 \pm 1)	1* 2* 1* (1 \pm 1)	5000 †	NT	0* 0* 0* (0 \pm 0)	30 23 33 (29 \pm 5)	0* 0* 0* (0 \pm 0)	0* 0* 0* (0 \pm 0)	S9 mix (+)	0	134 120 130 (128 \pm 7)	5 11 8 (8 \pm 3)	50 45 43 (46 \pm 4)	36 43 40 (40 \pm 4)	13 13 14 (13 \pm 1)	78.1	168 162 164 (165 \pm 3)	NT	NT	NT	NT	156	154 179 147 (160 \pm 17)	14 10 10 (11 \pm 2)	43 41 43 (42 \pm 1)	50 43 48 (47 \pm 4)	16 12 8 (12 \pm 4)	313	149 164 140 (151 \pm 12)	13 8 9 (10 \pm 3)	44 43 45 (44 \pm 1)	43 35 34 (37 \pm 5)	13 9 13 (12 \pm 2)	625	104 123 130 (119 \pm 13)	10 4 13 (9 \pm 5)	32 37 39 (36 \pm 4)	34 42 30 (35 \pm 6)	10 13 10 (11 \pm 2)	1250	83* 99* 110* (97 \pm 14)	6 6 5 (6 \pm 1)	35 33 31 (33 \pm 2)	27 28 40 (32 \pm 7)	6 11 7 (11 \pm 6)	2500 †	3* 3* 1* (2 \pm 1)	2* 2* 1* (2 \pm 1)	36 29 22 (29 \pm 7)	7* 9* 9* (8 \pm 1)	2* 1* 3* (2 \pm 1)	5000 †	NT	0* 0* 0* (0 \pm 0)	31 30 27 (29 \pm 2)	0* 0* 0* (0 \pm 0)	0* 0* 0* (0 \pm 0)	Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2 ^{a)}	SA ^{b)}	AF2	AF2	9AA ^{c)}	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	Number of colonies/plate	485 406 403 (431 \pm 47)	602 600 601 (601 \pm 1)	159 170 200 (176 \pm 21)	403 397 466 (422 \pm 38)	224 298 416 (313 \pm 97)	Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA ^{d)}	2AA	2AA	2AA	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	Number of colonies/plate	755 755 801 (770 \pm 27)	367 319 348 (345 \pm 24)	822 712 796 (777 \pm 57)	441 444 418 (434 \pm 14)	251 234 273 (253 \pm 20)
	S9 mix (+)	0	134 120 130 (128 \pm 7)	5 11 8 (8 \pm 3)	50 45 43 (46 \pm 4)	36 43 40 (40 \pm 4)	13 13 14 (13 \pm 1)	78.1	168 162 164 (165 \pm 3)	NT	NT	NT	NT	156	154 179 147 (160 \pm 17)	14 10 10 (11 \pm 2)	43 41 43 (42 \pm 1)	50 43 48 (47 \pm 4)	16 12 8 (12 \pm 4)	313	149 164 140 (151 \pm 12)	13 8 9 (10 \pm 3)	44 43 45 (44 \pm 1)	43 35 34 (37 \pm 5)	13 9 13 (12 \pm 2)	625	104 123 130 (119 \pm 13)	10 4 13 (9 \pm 5)	32 37 39 (36 \pm 4)	34 42 30 (35 \pm 6)	10 13 10 (11 \pm 2)	1250	83* 99* 110* (97 \pm 14)	6 6 5 (6 \pm 1)	35 33 31 (33 \pm 2)	27 28 40 (32 \pm 7)	6 11 7 (11 \pm 6)	2500 †	3* 3* 1* (2 \pm 1)	2* 2* 1* (2 \pm 1)	36 29 22 (29 \pm 7)	7* 9* 9* (8 \pm 1)	2* 1* 3* (2 \pm 1)	5000 †	NT	0* 0* 0* (0 \pm 0)	31 30 27 (29 \pm 2)	0* 0* 0* (0 \pm 0)		0* 0* 0* (0 \pm 0)	Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2 ^{a)}	SA ^{b)}	AF2	AF2	9AA ^{c)}	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	Number of colonies/plate	485 406 403 (431 \pm 47)	602 600 601 (601 \pm 1)	159 170 200 (176 \pm 21)	403 397 466 (422 \pm 38)	224 298 416 (313 \pm 97)	Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA ^{d)}	2AA	2AA	2AA	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	Number of colonies/plate	755 755 801 (770 \pm 27)	367 319 348 (345 \pm 24)	822 712 796 (777 \pm 57)	441 444 418 (434 \pm 14)	251 234 273 (253 \pm 20)																																															
		Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2 ^{a)}	SA ^{b)}	AF2	AF2	9AA ^{c)}	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	Number of colonies/plate	485 406 403 (431 \pm 47)	602 600 601 (601 \pm 1)	159 170 200 (176 \pm 21)	403 397 466 (422 \pm 38)	224 298 416 (313 \pm 97)	Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA ^{d)}	2AA	2AA	2AA	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	Number of colonies/plate	755 755 801 (770 \pm 27)	367 319 348 (345 \pm 24)	822 712 796 (777 \pm 57)	441 444 418 (434 \pm 14)	251 234 273 (253 \pm 20)																																																																																																
			Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA ^{d)}	2AA	2AA	2AA	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2		Number of colonies/plate	755 755 801 (770 \pm 27)	367 319 348 (345 \pm 24)	822 712 796 (777 \pm 57)	441 444 418 (434 \pm 14)	251 234 273 (253 \pm 20)																																																																																																																	

The purity of the test substance was 99.96 wt%.

Negative control; Dimethyl sulfoxide

a) 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, b) Sodium azide, c) 9-Aminoacridine, d) 2-Aminoanthracene

†; Precipitate was observed on the surface of agar plates.

*; Growth inhibition was observed.

NT; Not tested

4,4'-ビフェニルジオール of 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 4,4'-Biphenyldiol in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

4,4'-ビフェニルジオール of チャイニーズ・ハムスター肺由来細胞(CHL/IU細胞)を用いる染色体異常試験を実施した。

S9 mix非存在下および存在下で短時間処理(6時間処理後18時間の回復時間)した場合、増殖率がやや低下したが、50%を越える増殖抑制作用は認められなかった。24時間連続処理(S9 mix非存在下)では、濃度に依存して増殖率が低下し、50%の増殖抑制濃度は0.046 mg/mLと推定された。

これらの結果に基づき、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理ともに1.9 mg/mL(10 mmol/L)の濃度を最高処理濃度とし、5段階の濃度群(0.12~1.9 mg/mL, 公比2)を設定し、染色体異常試験を実施した。しかしながら、すべての処理系列で分裂指数が低く、分析可能な3濃度群が得られなかったことから、0.48 mg/mLの濃度を最高処理濃度とし、6段階の濃度群(0.015~0.48 mg/mL, 公比2)を再設定し、染色体異常試験を実施した。

細胞増殖率および分裂指数より、S9 mix非存在下および存在下ともに0.030, 0.060, 0.12 mg/mLについて染色体分析を行った。その結果、S9 mix非存在下で短時間処理したすべての処理群において、染色体の構造異常を有する細胞(9.0~15.0%)の統計学的な有意差が認められた。また、中濃度群および高濃度群では倍数性細胞(6.0%および2.3%)の統計学的な有意差が認められた。S9 mix存在下で短時間処理した場合においても、中濃度群および高濃度群で構造異常を有する細胞(11.0%および16.0%)および倍数性細胞(1.4%および1.0%)の統計学的な有意差が認められた。

以上の結果より、4,4'-ビフェニルジオールは、本試験条件下でCHL/IU細胞に染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 細胞

CHL/IU細胞はチャイニーズ・ハムスター、肺由来で、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23代)した。試験には、解凍後継代10代以内で試験に用いた。仔牛血清(CS, Cansera International)を10 vol%添加したイーグルMEM(日水製薬)培養液を用い、CO₂インキュベーター

(37°C, 5% CO₂)内で培養した。

2. S9 mix

S9(キッコーマン)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。S9 mixは使用時に調製し、処理培地に10 vol%添加し、各成分の最終濃度はS9 5 vol%, グルコース-6-リン酸(Sigma Chemical) 0.83 mmol/L, β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(オリエンタル酵母工業)0.67 mmol/L, MgCl₂ 0.83 mmol/L, KCl 5.5 mmol/L, HEPES緩衝液(pH 7.2)0.67 mmol/Lとした。

3. 被験物質

被験物質である4,4'-ビフェニルジオール[ロット番号:020411, 純度:99.96%, 本州化学工業(和歌山)]は白色結晶であり、本州化学工業から提供された後、密閉し、遮光下で室温保管した。また、被験物質は実験期間中安定であったことが、被験物質提供者において確認された。

4. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に用いた。溶媒はジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業)を用いて原液を調製した(細胞増殖抑制試験では190 mg/mL, 染色体異常試験では48 mg/mLおよび190 mg/mL)。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1 vol%になるように加えた。なお、被験物質を溶媒に溶解させた際、発熱、発泡、変色などの変化はなかった。

5. 培養条件

2×10⁴個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたガラスディッシュ(直径6 cm)に播き、CO₂インキュベーター内で3日間培養した。その後、連続処理では、新鮮培地と交換後、被験物質を加え、24時間処理した。また、短時間処理では、血清入りの培地によりS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、リン酸緩衝塩類溶液で洗浄、新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

6. 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およぼす影響を調べた。

いずれの処理条件においても、1.9 mg/mL (10 mmol/L) を最高処理濃度とし、0.015~1.9 mg/mL の濃度範囲 (公比2, 8濃度) で処理を行った。なお、処理開始時および処理終了時ともに0.24 mg/mL以上の濃度で肉眼観察により沈殿が認められた。

培養終了後、10 vol %ホルマリン溶液で細胞を固定し、0.1 %クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計 (Monocellater™, オリンパス光学工業) を用い、溶媒を添加した溶媒対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測した。細胞増殖抑制試験では、各用量2枚のディッシュを用いた。処理系列は溶媒対照群と被験物質処理群とした。

その結果、S9 mix非存在下および存在下で短時間処理した場合には、1.9 mg/mL (10 mmol/L) においても50 %を超える増殖抑制作用は認められなかった (Fig. 1)。24時間連続処理した場合、50 %の増殖抑制濃度は0.046 mg/mLと推定された (Fig. 1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理群では1.9 mg/mL (10 mmol/L) を最高処理濃度とし、公比2で5濃度 (0.12, 0.24, 0.48, 0.95, 1.9 mg/mL) 設定した。しかしながら、分裂指数が低く、分析可能な3濃度群が得られなかったことから、0.48 mg/mLを最高処理濃度とし、公比2で6濃度 (0.015, 0.030, 0.060, 0.12, 0.24, 0.48 mg/mL) を再設定した。

陽性対照群については、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理では、マイトマイシンC (MMC, 協和醗酵工業) およびシクロホスファミド (CP, Sigma Chemical) 溶液を日局注射用水 (大塚製薬工場) で調製し、最終濃度がそれぞれ0.1 μg/mLおよび10 μg/mLとなるように添加した。

染色体異常試験においては、各用量4枚のディッシュ (陽性対照群では2枚) を用いた。陽性対照群以外では2枚のディッシュを用い染色体標本作製し、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を測定した。処理系列は溶媒対照群、陽性対照群および被験物質処理群とした。

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。作製した標本は3 vol %ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

細胞増殖率と分裂指数を細胞毒性の指標として、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), 観察可能な最高濃度は、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理ともに0.12 mg/mLであったことから、この濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

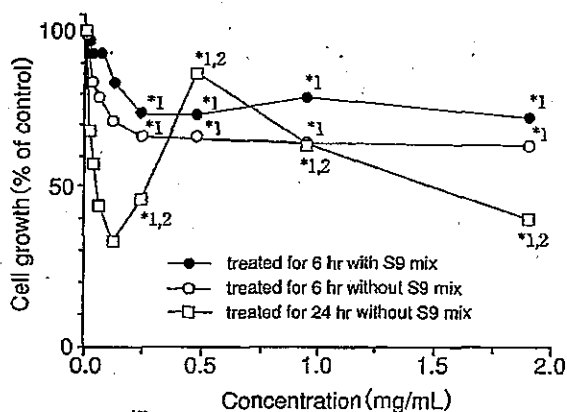
作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会 (MMS)¹⁾ による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞 (染色体数が38本以上) の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 判定

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 ($p < 0.01$, 片側)。また、用量依存性に関してコクラン・アーミテッジの傾向性検定³⁾ ($p < 0.01$, 片側) 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

4,4'-ビフェニルジオールは、S9 mix非存在下で短時間処理した場合、濃度依存性は認められなかったが、すべての処理群において観察した細胞の9.0~15.0 %で染色体の構造異常が認められ、いずれも統計学的に有意であり、陽性の結果が得られた (Table 1)。また、中濃度群および高濃度群においては、倍数性細胞 (6.0 %および2.3 %) が統計学的に有意に増加し、陽性の結果が得られた (Table 1)。S9 mix存在下で短時間処理した場合には、中濃度群および高濃度群で構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加 (11.0 %および16.0 %) が認められ、陽性の結果が得られた (Table 2)。また、倍数性細胞につ



*1: Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment period by naked eye.

*2: There were precipitates on the dishes at growth measurement.

Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4,4'-biphenyldiol

いても、中濃度群および高濃度群(1.4%および1.0%)で統計学的に有意な増加が認められた(Table 2)。倍数生細胞の出現率は低いものの、S9 mix非存在下の短時間処理の結果も考慮して、陽性と判断した。

以上のように、陽性の結果が得られたことから、D₂₀値⁴⁾を求めたところ、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理における構造異常に関するD₂₀値はそれぞれ0.33 mg/mLおよび0.14 mg/mLとなった。倍数性細胞については、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ0.79 mg/mLおよび2.3 mg/mLとなったが、S9 mix存在下の短時間処理については、染色体分析を行った高濃度(0.12 mg/mL)の10倍以上の濃度であることから対象外となった。

陽性対照物質として用いたMMCは、S9 mix非存在下で短時間処理した場合において染色体の構造異常を誘発し(Table 1)、CPはS9 mix存在下で短時間処理した場合において染色体の構造異常を誘発した(Table 2)。これらの陽性対照物質の結果より、本実験系の成立が確認された。

なお、4,4'-ビフェニルジオールについては、当研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性の結果が得られている⁵⁾。4,4'-ビフェニルジオールの2つの水酸基のないbiphenylについては復帰突然変異試験で陰性⁶⁾、染色体異常試験ではマウスS9を用いた場合に陽性⁷⁾の結果が報告されている。また、biphenylに水酸基が1つ結合したo-phenylphenolと水酸基が2つ結合した2,5-dihydroxybiphenylについては染色体異常試験で連続処理条件下では陰性の結果が得られている^{8,9)}。これらのことから、biphenylに結合する水酸基の数や位置によって染色体異常誘発作用が異なると考えられる。

以上の結果より、4,4'-ビフェニルジオールは、本試験条件下でCHL/IU細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

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、大橋増夫(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) 石館基(監修)：「<改定>染色体異常試験データ集」エル・アイ・シー、東京(1987)p.23.
- 5) 原巧ら：4,4'-ビフェニルジオールの細菌を用いる復帰突然変異試験。化学物質毒性試験報告，12:139-143(2005)。

- 6) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課監修：「労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集」日本化学物質安全・情報センター、東京(1996)p.229.
- 7) 祖父尼俊雄(監修)：「染色体異常試験データ集改定1998年版」エル・アイ・シー、東京(1999)p.77.
- 8) 上掲書；p.392.
- 9) 上掲書；p.186.

連絡先

試験責任者：田中憲穂

試験担当者：山影康次，高橋孝孝，若栗 忍，
渡辺美香，中川ゆづき，橋本恵子，
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 神奈川県秦野市落合729-5

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

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)

Kohji Yamakage,

Toshitaka Takahashi,

Shinobu Wakuri, Mika Watanabe,

Yuzuki Nakagawa,

Keiko Hashimoto, 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 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4,4'-biphenyldiol (BPD)** for 6 hr without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Concurrent ^a cell growth (%)	Mitotic ^b index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ^c	Number of cells with aberrations		Number ^d of polyploid cells (%)	Trend test ^e
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ^f	total		+gap (%)	-gap (%)		
Negative ^b	0	-	6-(18)	100	-	100	0	0	0	1	0	0	1	0	1(1.0)	1(1.0)	0(0.0)	
						100	0	0	1	0	0	0	1	0	1(1.0)	1(1.0)	0(0.0)	
						200	0	0	1	1	0	0	2	0	2(1.0)	2(1.0)	0(0.0)	
BPD	0.015	-	6-(18)	100	-		not observed											
BPD	0.030	-	6-(18)	99	-	100	4	8	48	1	1	10	72	0	20(20.0)	19(19.0)	1(0.3)	
						100	1	3	31	3	1	10	49	0	12(12.0)	11(11.0)	1(0.3)	
						200	5	11	79	4	2	20	121	0	32(16.0)	30*(15.0)	2(0.3)	
BPD	0.060	-	6-(18)	89	-	100	1	4	43	0	0	0	48	0	14(14.0)	14(14.0)	28(7.0)	
						100	2	4	18	1	0	0	25	0	12(12.0)	10(10.0)	20(5.0)	
						200	3	8	61	1	0	0	73	0	26(13.0)	24*(12.0)	48*(6.0)	
BPD	0.12	-	6-(18)	78	5.6, 3.0	100	3	2	11	0	0	0	16	0	8(8.0)	6(6.0)	9(2.3)	
						100	2	2	23	2	3	0	32	0	13(13.0)	12(12.0)	9(2.3)	
						200	5	4	34	2	3	0	48	0	21(10.5)	18*(9.0)	18*(2.3)	
BPD	0.24	-	6-(18)	78	0.2, 0.0		not observed due to the small number of metaphases											
BPD	0.48	-	6-(18)	80	0.0, 0.2		not observed due to the small number of metaphases											
MMC	0.1 µg/mL	-	6-(18)	-	-	100	3	16	34	1	1	0	55	0	35(35.0)	34(34.0)	0(0.0)	
						100	13	21	41	3	0	0	78	0	43(43.0)	39(39.0)	0(0.0)	
						200	16	37	75	4	1	0	133	0	78(39.0)	73*(36.5)	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), mul: multiple aberrations, POL: polyploid, MMC: mitomycin C.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent and added at the level of 1 vol% per dish.

2) Cell confluency representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish.

4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.

5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations.

6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$ (one-side).

*: Significantly different from the negative control at $p < 0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

** : Purity was 99.96%.

染色体異常試験

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4,4'-biphenyldiol (BPD)** for 6 hr with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Concurrent ^a cell growth (%)	Mitotic ^a index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ^a	Number of cells with aberrations		Number ^b of polyploid cells (%)	Trend test ^c	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ^d	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ^a	0	+	6-(18)	100	-	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2(2.0)	1(1.0)	0(0.0)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
						200	1	1	0	0	0	2	0	2(1.0)	1(0.5)	0(0.0)			
BPD	0.015	+	6-(18)	102	-		not observed												
BPD	0.030	+	6-(18)	108	-	100	3	3	0	0	0	0	6	0	6(6.0)	3(3.0)	1(0.3)		
						100	0	0	0	0	0	0	1	0(0.0)	0(0.0)	3(0.8)			
						200	3	3	0	0	0	6	1	6(3.0)	3(1.5)	4(0.5)			
BPD	0.060	+	6-(18)	116	-	100	2	7	32	1	0	10	52	0	14(14.0)	13(13.0)	7(1.8)		
						100	0	4	20	3	0	0	27	0	9(9.0)	9(9.0)	4(1.0)		
						200	2	11	52	4	0	10	79	0	23(11.5)	22*(11.0)	11*(1.4)	+	+
BPD	0.12	+	6-(18)	112	6.6, 6.4	100	1	13	22	1	0	0	37	0	15(15.0)	15(15.0)	1(0.3)		
						100	2	10	30	4	1	10	57	2	17(17.0)	17(17.0)	7(1.8)		
						200	3	23	52	5	1	10	94	2	32(16.0)	32*(16.0)	8*(1.0)		
BPD	0.24	+	6-(18)	107	0.4, 0.4	not observed due to the small number of metaphases													
BPD	0.48	+	6-(18)	102	0.4, 0.0	not observed due to the small number of metaphases													
CP	10 µg/mL	+	6-(18)	-	-	100	7	20	29	2	0	0	58	0	43(43.0)	38(38.0)	1(0.3)		
						100	5	16	34	2	0	0	57	0	40(40.0)	35(35.0)	0(0.0)		
						200	12	36	63	4	0	0	115	0	83(41.5)	73*(36.5)	1(0.1)		

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, POL: polyploid, CP: cyclophosphamide.

- 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent and added at the level of 1 vol% per dish.
- 2) Cell confluency representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™.
- 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish.
- 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.
- 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations.
- 6) Eight hundred cells were analyzed in each group.
- 7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$ (one-side).

*: Significantly different from the negative control at $p < 0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

** : Purity was 99.96%.