

6-tert-ブチル-2,4-キシレノールの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 6-tert-Butyl-2,4-xyleneol on Bacteria

要約

OBCD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾ および *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ を用い、S9 Mix 無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験では、50~5000 µg/プレートで実施したところ、抗菌性が認められたので、本試験では S9 Mix 無添加試験が 6.25~200 µg/プレート、S9 Mix 添加試験については、TA1537 は 6.25~200 µg/プレート、他の4検定菌では 12.5~400 µg/プレートの用量で試験を実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加が認められなかったことから、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

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 博士から分与を受けた。*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を受けた。検定菌は、-80°C以下で凍結保存した。各検定菌は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子(*pKM101*)の有無についての特性確認を行った。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字型試験管に種菌を接種し、37°C、約10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

6-tert-ブチル-2,4-キシレノール(CAS No.1879-09-0)は、分

子量178.30の液体である。純度98.5%のもの(ロット番号:FGC01, 不純物不明, 東京化成工業(株)製造)を(社)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで冷暗所で保管した。

6-tert-ブチル-2,4-キシレノールは、ジメチルスルホキシド(以下DMSOと略, 和光純薬工業(株))に50, 40あるいは4 mg/mlになるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし約3で希釈したものを、速やかに試験に用いた。

6-tert-ブチル-2,4-キシレノールのDMSO溶液中での安定性試験を、本試験での低濃度(0.0625 mg/ml)および同時に実施した染色体異常試験での高濃度(11.2 mg/ml)の2濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後4時間における各3サンプルの平均含量は、それぞれ初期値(0時間)の平均に対して、102および101%であった。また、本試験IIに用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、0.0625 mg/ml溶液の含量は既定濃度に対し、108~112%、4 mg/ml溶液は、100~103%であった。

以上の結果から、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールはDMSO溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔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 : フリルフラマイド (上野製薬(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, 2AAはDMSO(和光純薬工業(株))に溶解したものを-20°Cで凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは蒸留水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地およびS9Mix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)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B) *L-ヒスチジン	0.5 mM
ビオチン	0.5 mM

* : WP2 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、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1リットル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
水酸化ナトリウム	0.66 g
クエン酸・1水和物	2 g
グルコース	20 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
バクトアガー (Difco)	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 (1 ml中下記の成分を含む)

**S9	0.1 ml
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 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(株))を用いた。

〔試験方法〕

プレート法を用いて、S9 Mix無添加および添加条件下で試験を行った。

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およびトップアガー2 mlを混和したのち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DMSO, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量はTable1~2に示した。培養は37 °Cで48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。

〔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無添加あるいは添加試験において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照値のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは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(陽性)と判定することとした。

結果および考察

〔用螢設定試験〕

6-tert-ブチル-2,4-キシレノールについて、50~5000 μg/プレート(範囲で公比を約3とし、試験を実施したとこ

ろ、すべての検定菌において S9 Mix 無添加試験および添加試験ともに150~500 μg/プレート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を、すべての検定菌において、S9 Mix 無添加試験では200 μg/プレート、S9 Mix 添加試験では400 μg/プレート (TA1537については200 μg/プレート)とすることとした。

〔本試験〕

結果を Table 1, 2に示した。6-tert-ブチル-2,4-キシレノールについて、すべての検定菌について、S9 Mix 無添加試験では6.25~200 μg/プレート、S9 Mix 添加試験では12.5~400 μg/プレート (TA1537についてのみ6.25~200 μg/プレート)の範囲で、公比を2とし、試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の S9 Mix 添加および無添加試験のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。また、すべての検定菌において、高用量の1~2群において、抗菌性が認められた。

以上の結果に基づき、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールは、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。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215 (1983).
- 2) M.H.L. Green, in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
 試験担当者：坂本京子, 堀谷尚古, 川上久美子,
 松木容彦, 飯田さやか, 中込まどか
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒 257 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)
 Kyoko Sakamoto, Naoko Horiya,
 Kumiko Kawakami, Yasuhiko Matsuki,
 Sayaka Iida and Madoka Nakagomi
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257 Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of 6-tert -Butyl-2,4-xylcnol** on bacteria

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>avr</i> A			TA98			TA1537							
S9 Mix (-)	0	136	114	125	10	10	12	17	20	13	25	27	20	5	6	9	(125 \pm 11.0)	(11 \pm 1.2)	(17 \pm 3.5)	(24 \pm 3.6)	(7 \pm 2.1)
	6.25	127	114	114	17	14	16	14	27	11	24	25	29	8	9	6	(118 \pm 7.5)	(16 \pm 1.5)	(17 \pm 8.5)	(26 \pm 2.6)	(8 \pm 1.5)
	12.5	130	95	122	8	11	11	17	19	22	18	24	32	5	6	5	(116 \pm 18.3)	(10 \pm 1.7)	(19 \pm 2.5)	(25 \pm 7.0)	(5 \pm 0.6)
	25	107	107	92	13	14	5	17	18	22	26	18	11	7	7	9	(102 \pm 8.7)	(11 \pm 4.9)	(19 \pm 2.6)	(18 \pm 7.5)	(8 \pm 1.2)
	50	112	122	124	16	9	13	20	20	20	16	21	22	3	5	0	(119 \pm 6.4)	(13 \pm 3.5)	(20 \pm 0.0)	(20 \pm 3.2)	(3 \pm 2.5)
	100	101*	82*	90*	10	12	8	18	18	13	28	22	24	8*	1*	9*	(91 \pm 9.5)	(10 \pm 2.0)	(16 \pm 2.9)	(25 \pm 3.1)	(6 \pm 4.4)
	200	0*	0*	0*	0*	0*	0*	19*	18*	23*	0*	24*	29*	0*	0*	0*	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)	(20 \pm 2.6)	(18 \pm 15.5)	(0 \pm 0.0)
S9 Mix (+)	0	116	138	126	12	9	7	14	24	22	40	45	31	8	12	8	(127 \pm 11.0)	(9 \pm 2.5)	(20 \pm 5.3)	(39 \pm 7.1)	(9 \pm 2.3)
	6.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16	19	12					(16 \pm 3.5)
	12.5	144	120	143	11	13	18	26	26	20	31	36	52	11	11	11	(136 \pm 13.6)	(14 \pm 3.6)	(24 \pm 3.5)	(40 \pm 11.0)	(11 \pm 0.0)
	25	144	146	133	14	15	12	20	23	21	38	33	30	12	20	19	(141 \pm 7.0)	(14 \pm 1.5)	(21 \pm 1.5)	(34 \pm 4.0)	(17 \pm 4.4)
	50	171	140	125	15	6	7	30	31	21	39	34	37	15	12	11	(145 \pm 23.5)	(9 \pm 4.9)	(27 \pm 5.5)	(37 \pm 2.5)	(13 \pm 2.1)
	100	136	143	123	12	17	7	32	30	29	35	31	25	12	7	7	(134 \pm 10.1)	(12 \pm 5.0)	(30 \pm 1.5)	(30 \pm 5.0)	(9 \pm 2.9)
	200	123*	120*	100*	4*	10*	6*	27	25	24	24*	25*	33*	6*	9*	10*	(114 \pm 12.5)	(7 \pm 3.1)	(25 \pm 1.5)	(27 \pm 4.9)	(8 \pm 2.1)
	400	0*	3*	10*	0*	0*	0*	13*	15*	9*	0*	0*	0*				(4 \pm 5.1)	(0 \pm 0.0)	(12 \pm 3.1)	(0 \pm 0.0)	(0 \pm 0.0)
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA							
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80							
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	558	503	581	272	290	257	151	147	141	818	784	809	1996	1973	2086	(547 \pm 40.1)	(273 \pm 16.5)	(146 \pm 5.0)	(804 \pm 17.6)	(2018 \pm 59.7)
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA							
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2							
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	1050	1112	1125	178	210	144	1211	1295	1303	323	286	295	267	265	171	(1096 \pm 40.1)	(177 \pm 33.0)	(1270 \pm 51.0)	(301 \pm 19.3)	(234 \pm 54.9)

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. ND: Not Done

**: Purity was 98.5 %.

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of 6-tert-Butyl-2,4-xyleneI** on bacteria

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μ g /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)														
		Base - pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvr</i> A			TA98			TA1537		
S9Mix (-)	0	113	107	102	9	14	13	31	27	13	15	21	17	6	11	4
		(107 \pm 5.5)			(12 \pm 2.6)			(24 \pm 9.5)			(18 \pm 3.1)			(7 \pm 3.6)		
	6.25	111	118	108	11	14	14	24	20	23	18	21	28	8	8	9
		(112 \pm 5.1)			(13 \pm 1.7)			(22 \pm 2.1)			(22 \pm 5.1)			(8 \pm 0.6)		
	12.5	119	123	106	10	11	6	18	15	18	29	25	18	7	8	6
		(116 \pm 8.9)			(9 \pm 2.6)			(17 \pm 1.7)			(24 \pm 5.6)			(7 \pm 1.0)		
	25	117	113	126	14	10	9	26	26	19	16	19	26	13	11	8
		(119 \pm 6.7)			(11 \pm 2.6)			(24 \pm 4.0)			(20 \pm 5.1)			(11 \pm 2.5)		
50	124	136	120	9	15	11	23	21	26	19	22	23	5	5	3	
	(127 \pm 8.3)			(12 \pm 3.1)			(23 \pm 2.5)			(21 \pm 2.1)			(4 \pm 1.2)			
100	81*	106*	111*	6*	7*	6*	15	23	20	19	14	22	7*	7*	3*	
	(99 \pm 16.1)			(6 \pm 0.6)			(19 \pm 4.0)			(18 \pm 4.0)			(6 \pm 2.3)			
200	0*	0*	0*	0*	0*	0*	13*	10*	16*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	
	(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			(13 \pm 3.0)			(0 \pm 0.0)			(0 \pm 0.0)			
S9Mix (+)	0	134	125	147	14	12	12	15	14	28	33	45	28	8	9	9
		(135 \pm 11.1)			(13 \pm 1.2)			(19 \pm 7.8)			(35 \pm 8.7)			(9 \pm 0.6)		
	6.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	16	12	15
														(14 \pm 2.1)		
	12.5	142	128	115	16	9	10	21	25	30	34	32	37	10	12	21
		(128 \pm 13.5)			(12 \pm 3.8)			(25 \pm 4.5)			(34 \pm 2.5)			(14 \pm 5.9)		
	25	155	167	137	9	15	12	33	21	27	31	23	35	11	17	8
		(153 \pm 15.1)			(12 \pm 3.0)			(27 \pm 6.0)			(30 \pm 6.1)			(12 \pm 4.6)		
50	163	157	189	13	16	20	24	41	21	40	47	40	10	13	11	
	(170 \pm 17.0)			(16 \pm 3.5)			(29 \pm 10.8)			(42 \pm 4.0)			(11 \pm 1.5)			
100	161	172	156	7	11	11	34	32	39	38	24	28	14	12	11	
	(163 \pm 8.2)			(10 \pm 2.3)			(35 \pm 3.6)			(30 \pm 7.2)			(12 \pm 1.5)			
200	147*	130*	126*	4	9	8	19	31	34	23	30	34	17*	9*	6*	
	(134 \pm 11.2)			(7 \pm 2.6)			(28 \pm 7.9)			(29 \pm 5.6)			(11 \pm 5.7)			
400	0*	0*	0*	1*	1*	1*	19*	21*	12*	0*	0*	0*				
	(0 \pm 0.0)			(1 \pm 0.0)			(17 \pm 4.7)			(0 \pm 0.0)						
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μ g /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	535	542	542	250	243	265	167	158	156	846	883	800	2140	1903	1984
		(540 \pm 4.0)			(253 \pm 11.2)			(160 \pm 5.9)			(843 \pm 41.6)			(2009 \pm 120.5)		
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μ g /plate)	1			2			10			0.5			2		
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	1136	1139	1122	292	256	254	1614	1683	1751	552	551	509	307	302	274
		(1132 \pm 9.1)			(267 \pm 21.4)			(1683 \pm 68.5)			(537 \pm 24.5)			(294 \pm 17.8)		

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

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. ND: Not Done

**Purity was 98.5 %.

6-tert-ブチル-2,4-キシレノールの
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

In Vitro Chromosomal Aberration Test of
6-tert-Butyl-2,4-xyleneol on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(24および48時間)、短時間処理(6時間)のS9 mix非存在下においては、50%を越える増殖抑制濃度、すなわち0.033 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。短時間処理のS9 mix存在下においては、50%を越える増殖抑制濃度、すなわち0.056 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理として、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理、短時間処理としてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍數性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix存在下および非存在下で6時間処理した高濃度群(それぞれ0.056および0.033 mg/ml)では、細胞毒性により十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群においては、染色体の構造異常や倍數性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールは、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12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、牛胎児血清(FCS: JRH BIOSCIENCES)を10%添加したイーグル MEM 培養液(日水製薬(株))を用いた。

3. 培養条件

2×10⁴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

6-tert-ブチル-2,4-キシレノール(略号: TBX, CAS No.: 1879-09-0, ロット番号: FGC01, 東京化成工業(株)製造, (社)日本化学工業協会提供)は、透明液体で、水に不溶、ジメチルスルホキシド(DMSO)に可溶、凝固点21.5°C, 屈折率1.5186, 比重0.9612, 分子式C₁₂H₁₈O, 分子量178.30, 純度98.5%の物質である。被験物質原体は、納入後6か月は安定であり、溶媒中(DMSO)では、0.0625~11.2 mg/mlの濃度範囲で4時間は安定であった。

5. 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 (Sigma Chemical Co.)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% (v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお、濃度の記載について、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。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、連続処理における50%を明らかに越える増殖抑制濃度(約60%の増殖抑制濃度)は、60%の増殖抑制濃度をはさむ2点の値より算出したところ、0.033 mg/mlであった。また、短時間処理のS9 mix存在下および非存在下における50%を越える増殖抑制濃度は、それぞれ

0.056mg/mlおよび0.029 mg/mlであった(Fig. 1)。なお、S9 mix存在下の0.15 mg/mlでは、増殖率が61%の値を示したが、これは被験物質のディッシュへの付着によるものと判断された。

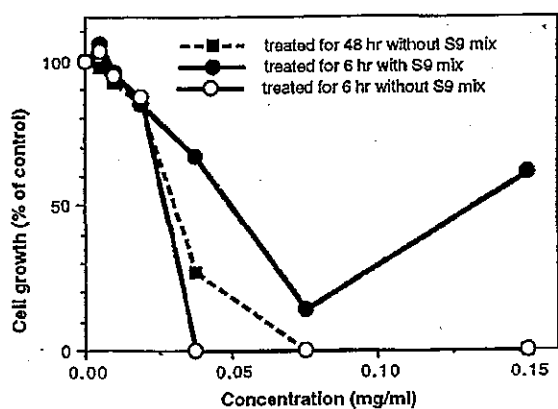


Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 6-tert-butyl-2,4-xylenol

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理および短時間処理のS9 mix 非存在下では0.033 mg/ml、短時間処理のS9 mix 存在下では0.056 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。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、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。

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 μg/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%ギムザ液で染色した。

9. 染色体分析

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(MMS)分科会¹⁾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することとした。

10. 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、フィッシャーのexact probability test法により、溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群の有意差検定(p<0.05)を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら²⁾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

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。

6-tert-ブチル-2,4-キシレノールを加えて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誘発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。

6-tert-ブチル-2,4-キシレノールを加えてS9 mix 存在下および非存在下で6時間処理した、高濃度群(0.033 mg/ml)を除く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。高濃度群では、いずれも細胞毒性のため、評価できる十分な分裂中期細胞が得られなかった。

従って、6-tert-ブチル-2,4-キシレノールは、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しないと結論した。

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.
- 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, 東京, 1987.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 6-tert-butyl-2,4-xyleneol (TBX)** 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⁾	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control ¹⁾	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38		
Solvent	0	24	200	0	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		
TBX	0.008	24	200	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	-	-
TBX	0.017	24	200	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	-	-
TBX	0.033	24	200	2	2	4	1	0	1	0	10	0	7 (3.5)	6 (3.0)	0.00	-	-
MC	0.00005	24	200	4	74	128	4	0	3	10	223	4	106 *(53.0)	105 *(52.5)	0.00	+	-
Solvent ¹⁾	0	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13		
TBX	0.008	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	-	-
TBX	0.017	48	200	0	0	0	2	0	1	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	-	-
TBX	0.033	48	200	0	3	1	0	1	1	0	6	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	-	-
MC	0.00005	48	200	7	49	152	5	8	10	30	261	16	113 *(56.5)	112 *(56.0)	0.50	+	-

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), 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. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten 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) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). *: Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. **: Purity was 98.5%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 6-tert-butyl-2,4-xyleneol (TBX)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid (%) ⁴⁾	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control ¹⁾	0	-	6-(18)	200	1	3	0	0	0	0	0	4	1	3 (1.5)	2 (1.0)	0.13		
Solvent	0	-	6-(18)	200	0	0	0	2	0	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
TBX	0.008	-	6-(18)	200	1	0	0	2	0	0	10	13	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.38	-	-
TBX	0.017	-	6-(18)	200	0	0	1	2	0	1	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13	-	-
TBX	0.033	-	6-(18)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00 ⁶⁾	Tox	Tox
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	0	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.75 *	-	-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	2	3	0	0	0	0	0	5	1	4 (2.0)	2 (1.0)	0.63		
TBX	0.014	+	6-(18)	200	0	1	0	1	0	1	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13	-	-
TBX	0.028	+	6-(18)	200	1	1	1	1	0	1	0	5	1	3 (1.5)	2 (1.0)	0.38	-	-
TBX	0.056	+	6-(18)	10	0	6	13	0	1	1	0	21	0	8 *(80.0)	8 *(80.0)	0.00 ⁷⁾	Tox	Tox
CPA	0.005	+	6-(18)	200	15	126	320	12	3	2	100	578	3	157 *(78.5)	157 *(78.5)	0.25	+	-

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), 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. 1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten 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) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). 6) One cell was analysed. 7) Eleven cells were analysed. *: Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. **: Purity was 98.5%.

連絡先

試験責任者 : 田中憲穂
 試験担当者 : 山影康次, 若栗 忍, 中川ゆづき,
 日下部博一, 橋本恵子
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 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, Shinobu Wakuri,
 Yuzuki Nakagawa,
 Hirokazu Kusakabe, Keiko Hashimoto
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
 Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
 Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627