

# 最終報告書

$\alpha$ ,4-ジクロロトルエンの哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号：04-250-3)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

## 目 次

要 約 .....	1 頁
目 的 .....	2
材料および方法 .....	2
1. 被験物質 .....	2
2. 対照物質 .....	3
3. 溶媒 .....	3
4. 試験細胞株 .....	3
5. 培養液 .....	3
6. 培養条件 .....	4
7. S9 mix .....	4
8. 細胞増殖抑制試験 .....	4
1) 被験物質の供試液の調製 .....	5
2) 細胞の処理 .....	5
3) 細胞増殖率の測定 .....	5
9. 染色体異常試験 .....	7
1) 被験物質および陽性対照物質の用量 .....	7
2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製 .....	7
3) 細胞の処理 .....	7
4) 試験群の構成および使用シャーレ数 .....	8
5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定 .....	8
6) 染色体の観察 .....	9
7) 染色体異常の分類および集計 .....	9
8) 試験結果の判定 .....	9
結 果 .....	10
1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下） .....	10
2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下） .....	10
3. D <sub>20</sub> 値 .....	11
結 論 .....	11
文 献 .....	12

表：

表 1-1	$\alpha$ ,4-ジクロロトルエンの染色体異常試験結果 (短時間処理法：S9 mix 非存在下) .....	13
表 1-2	$\alpha$ ,4-ジクロロトルエンの染色体異常試験結果 (短時間処理法：S9 mix 存在下) .....	14

図：

図 1	構造異常を有する細胞の出現頻度 .....	15
図 2	数的異常を有する細胞の出現頻度 .....	16

## 要 約

$\alpha,4$ -ジクロロトルエン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、25~1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、S9 mix 非存在下では 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上、S9 mix 存在下では 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 6.25, 12.5, 25, 37.5 および 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix 存在下では 25, 50, 100, 150 および 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とした。

試験の結果、S9 mix 非存在下の 12.5 および 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix 存在下の 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。なお、S9 mix 非存在下の 37.5 および 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、S9 mix 存在下の 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では、細胞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、本実験条件下では、 $\alpha,4$ -ジクロロトルエンの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。本被験物質の  $D_{20}$  値は、S9 mix 非存在下では 0.015 mg/mL、S9 mix 存在下では 0.13 mg/mL であった。

## 目 的

この試験は、 $\alpha,4$ -ジクロロトルエンのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするために実施した。

## 材料および方法<sup>1, 2)</sup>

### 1. 被験物質

名 称 :  $\alpha,4$ -ジクロロトルエン  
別 名 : パラクロロベンジルクロライド, 4-クロロベンジルクロライド  
CAS 番号 : 104-83-6  
ロット番号 :  
純 度 : 99.10%〔平成 16 年 1 月 29 日,  
において分析 (GC 法)〕

入 手 先 :

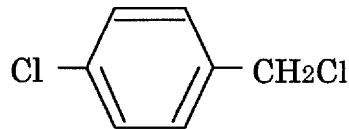
入 手 日 : 平成 17 年 3 月 7 日

入 手 量 : 25 g

物 性 等 :

化学名  $\alpha,4$ -ジクロロトルエン  
(alpha,4-dichlorotoluene)

構造式



分子式  $C_7H_6Cl_2$

分子量 161.03

性状 刺激臭を有する無色～淡黄色の固体

溶解性 水に難溶, アルコール, エーテル, ベンゼンおよびアセトンに可  
溶

沸点  $213\sim 214^{\circ}C$  (760mmHg)

融点  $28\sim 30^{\circ}C$

比重 1.260 ( $30^{\circ}C$ )

安定性 : 安定 [実験終了後, (財)畜産生物科学安全研究所において保管した  
残余被験物質を を通じ,  
において分析 (平成 18 年 4 月 6 日, GC 法) し  
た結果, 純度は 99.08% で, 実験期間中被験物質は安定であったこ  
とを確認した。]

保管条件 : 冷暗所 (2~6°C), 密栓

## 2. 対照物質

陰性対照物質は、被験物質の溶媒として使用したジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業株式会社, ロット番号 TCE7729, 100%) を用いた。陽性対照物質は、短時間処理法 S9 mix 非存在下では 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG, Aldrich Chemical Company, ロット番号 00613PN, 純度 97%) を, S9 mix 存在下では 3,4-Benzo[a]pyrene (B[a]P, Sigma Chemical Company, ロット番号 57F-3434, 純度 98%) を用いた。

## 3. 溶媒

被験物質は水に難溶であり, 予備的検討の結果, DMSO に可溶であったことから, 溶媒には DMSO を用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[a]P については, DMSO (和光純薬工業株式会社, ロット番号 TCE7729, 100%) を用いた。

## 4. 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, 細胞懸濁液に 10% の割合で DMSO を添加し, 液体窒素条件下で保存しておいたものを培養液に戻し, 解凍後の継代数が 3 回までのものを使用した。

## 5. 培養液

Eagle-MEM 粉末培地 (Gibco Laboratories, ロット番号 1214390) を常法に従

い調製し、これに非動化 (56°C, 30 分間加熱処理) 仔牛血清 (Gibco Laboratories, ロット番号 1199389, 1249957) を 10% の割合で添加したものを用了。

## 6. 培養条件

供試細胞は、CO<sub>2</sub> インキュベーター (Napco 社) を用い、CO<sub>2</sub> 濃度 5%, 空気 95%, 温度 37°C, 加湿条件下で培養した。

## 7. S9 mix

S9 mix は、ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素分画 (S9) にコファクターを加えて凍結されたものをキッコーマン株式会社から購入 (ロット番号: CAM-527, 2005 年 8 月 12 日製造, 2005 年 10 月 28 日購入) し、-80°C 以下で保存したものを、使用時に冷水中で解凍して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 mL あたりの組成は、次のとおりである。

### [S9 製造法]

#### A. 使用動物

- a) 種・系統: Sprague-Dawley 系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- b) 性・週齢: 雄・7 週齢
- c) 体 重: 190~248g

#### B. 誘導法

- a) 誘導物質: phenobarbital (PB), 5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路: 腹腔内投与
- c) 投与法 (投与開始日起算)
  - 1 日目 - PB 30 mg/kg, 2, 3, 4 日目 - PB 60 mg/kg
  - 3 日目 - BF 80 mg/kg

#### C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離 (9000 × g) し、その上清を採取

#### S9 mix 1 mL 当たりの組成

S9	0.3 mL
MgCl <sub>2</sub>	5 μmol/0.1 mL
KCl	33 μmol/0.1 mL
G-6-P	5 μmol/0.1 mL
NADP	4 μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4 μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1 mL

## 8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な用量を検討するため、短時間処理法お

および連続処理法ともに 25, 50, 100, 200, 400, 800 および 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (10 mM 相当), また, 連続処理法再試験では 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 および 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量を用いて, 次に記載する細胞増殖抑制試験を行った。試験には各用量について 2 枚のシャーレを使用した。

#### 1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は, 使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液 (原液) を調製し, 次いで, 原液の一部を DMSO で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。被験物質の添加量は, 各シャーレの培養液量の 0.5 vol% とした。

#### 2) 細胞の処理

短時間処理法の場合, 直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ (Becton Dickinson 社) に  $4 \times 10^5$  個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え, 培養開始 3 日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き, DMSO (陰性対照) または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。また, S9 mix 存在下の場合は各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除き, S9 mix 0.5 mL を加えた後, DMSO または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。培養 6 時間後に培養液を取り除き, 新しい培養液 5 mL を加えて 18 時間培養した。一方, 連続処理法の場合は短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し, 培養開始 3 日後に DMSO または被験物質の供試液各 0.025 mL をシャーレに加えて 24 時間および 48 時間培養した。培養終了後, 培養液を取り除き, 生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し, 10vol%ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後, 水洗し, 0.1w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後, 室温で一晩自然乾燥した。

なお, 短時間処理法および連続処理法ともに 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量では, 被験物質の供試液を培養液中に添加すると直ちに油滴様の被験物質の析出が認められ, 所定の培養時間終了時においては, シャーレの底に油滴様の被験物質が貼り付いて残存した。

#### 3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は, 染色の濃淡から細胞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式会社) を用いて



測定し、陰性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。

その結果は下表に示したとおり、短時間処理法の場合は、S9 mix 非存在下では 50 $\mu$ g/mL 以上、S9 mix 存在下では 200 $\mu$ g/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それぞれ 25~500 $\mu$ g/mL および 100~200 $\mu$ g/mL の用量域にあると判断された。連続処理法の場合は、24 時間および 48 時間処理ともに 25 $\mu$ g/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 12.5~25 $\mu$ g/mL 用量域にあるものと判断された。

〔短時間処理法〕

用 量 ( $\mu$ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[ 100.0 ]	100	100	[ 100.0 ]
25	76	74	[ 75.0 ]	95	96	[ 95.5 ]
50	31	32	[ 31.5 ]	96	96	[ 96.0 ]
100	30	30	[ 30.0 ]	81	82	[ 81.5 ]
200	33	30	[ 31.5 ]	35	37	[ 36.0 ]
400	27	26	[ 26.5 ]	28	40	[ 34.0 ]
800	34	25	[ 29.5 ]	27	30	[ 28.5 ]
1600	37	26	[ 31.5 ]	30	31	[ 30.5 ]

[ ]: 平均値

〔連続処理法〕

用 量 ( $\mu$ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[ 100.0 ]	100	100	[ 100.0 ]
25	37	37	[ 37.0 ]	21	24	[ 22.5 ]
50	31	30	[ 30.5 ]	22	21	[ 21.5 ]
100	29	25	[ 27.0 ]	22	19	[ 20.5 ]
200	29	27	[ 28.0 ]	20	20	[ 20.0 ]
400	24	26	[ 25.0 ]	23	17	[ 20.0 ]
800	29	25	[ 27.0 ]	22	20	[ 21.0 ]
1600	21	27	[ 24.0 ]	22	17	[ 19.5 ]

[ ]: 平均値

## 〔連続処理法：再試験〕

用 量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[ 100.0 ]	100	100	[ 100.0 ]
1.56	97	95	[ 96.0 ]	94	97	[ 95.5 ]
3.13	95	88	[ 91.5 ]	94	96	[ 95.0 ]
6.25	89	87	[ 88.0 ]	86	92	[ 89.0 ]
12.5	78	78	[ 78.0 ]	81	75	[ 78.0 ]
25	44	46	[ 45.0 ]	34	35	[ 34.5 ]

[ ] : 平均値

## 9. 染色体異常試験

## 1) 被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から、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設定した。すなわち、短時間処理法 S9 mix 非存在下では  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  を最高用量とし、以下公比 2 で 25, 12.5 および  $6.25\mu\text{g}/\text{mL}$  の 4 用量、並びに  $25\mu\text{g}/\text{mL}$  と  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  間で細胞増殖率に急激な変化が認められたことを考慮して、その中間量の  $37.5\mu\text{g}/\text{mL}$  を加えた計 5 用量、S9 mix 存在下では  $200\mu\text{g}/\text{mL}$  を最高用量とし、以下公比 2 で 100, 50 および  $25\mu\text{g}/\text{mL}$  の 4 用量、並びに  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  と  $200\mu\text{g}/\text{mL}$  間で細胞増殖率に急激な変化が認められたことを考慮して、その中間量の  $150\mu\text{g}/\text{mL}$  を加えた計 5 用量とした。陽性対照物質の MNNG は  $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、B[a]P は  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  の用量を用いた。

## 2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液を調製した。次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈し、所定用量の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は  $0.5\text{ mg}/\text{mL}$ 、B[a]P は  $2.0\text{ mg}/\text{mL}$  の供試液を調製した。

## 3) 細胞の処理

$4 \times 10^5$  個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ (Becton Dickinson 社) に加え、3 日間培養後、下記の方法で処理した。培養には 1 用量当たり 4 枚のシャーレを用い、そのうち 2 枚は染色体標本作製用に、残りの 2 枚は細胞増殖率測定用に使用した。但し、陽性対照群について

は細胞増殖率の測定は行わず、用いるシャーレは染色体標本作製の2枚とした。

短時間処理法の S9 mix 非存在下の場合は、各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液をそれぞれ 0.015 mL ずつ各シャーレに添加して培養した。また、S9 mix 存在下の場合は、各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除いた後、S9 mix 0.5 mL を加え、続いて、DMSO、被験物質供試液および B[a]P の供試液をそれぞれ 0.015 mL ずつ各シャーレに添加して培養した。S9 mix 非存在および存在下のいずれの場合も、培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。

#### 4) 試験群の構成および使用シャーレ数

〔短時間処理法〕

用量( $\mu\text{g/mL}$ )	使用シャーレ数	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0 (陰性対照) <sup>a</sup>	4	4
6.25	4	4
12.5	4	4
25	4	4
37.5	4	4
50	4	4
2.5 (陽性対照) <sup>b</sup>	2	--
10 (陽性対照) <sup>c</sup>	--	2

a : DMSO, b : MNNG, c : B[a]P, 使用シャーレ数 : 52

#### 5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

標本作製の 2 時間前に、培養中の各シャーレにコルセミド (Gibco Laboratories, ロット番号 1238727) を最終濃度として  $0.2\mu\text{g/mL}$  となるように添加した。培養終了後、培養液を取り除き、 $0.2\text{w/v}\%$  トリブシン水溶液 2 mL で処理して細胞をシャーレから剥離し、新鮮培養液 5 mL を入れた遠沈管に移し、1000rpm、5 分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の 75mM 塩化カリウム水溶液 4mL を加えて懸濁し、 $37^\circ\text{C}$  で 15 分間低張処理した。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 (v/v) 1mL を添加して固定した。1000rpm で 5 分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液 4 mL で懸濁・固定した。この操作を 3 回繰り返した後、少量の固定液で適切な密度に細胞を懸濁し、スライドガラスの 2 ヶ所に 1 滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、

Sørensen 緩衝液 (pH6.8, 株式会社ヤトロン, ロット番号 1478) を用いて希釈した 1.4 vol%ギムザ液で約 15 分間染色した。水洗後, 室温で乾燥して染色体標本とした。標本は, 1 シャーレ当たり 3 枚作製した。

細胞増殖率の測定は, 培養終了後, 培養液を取り除き, 生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し, 10vol%ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後水洗し, 0.1w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色し, 水洗後乾燥した。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式会社) を用いて陰性 (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。

#### 6) 染色体の観察

染色体の観察は 60 倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率 600 倍で検鏡した。観察は標本をすべてコード化し, 盲検法で行った。各用量とも, 染色体が明瞭に識別でき, 染色体の数が  $25 \pm 2$  本の分裂中期像について, 1 シャーレ当たり 100 個, すなわち, 1 用量当たり 2 枚のシャーレの合計 200 個について観察した。

#### 7) 染色体異常の分類および集計<sup>3)</sup>

染色体異常の分類は, 構造異常については, 染色分体型の切断と交換, 染色体型の切断と交換 (二動原体, 環状染色体など) およびその他 (断片化など) とした。数的異常については, 倍数性細胞 (倍数体) のみを記録した。

ギャップ (染色分体型および染色体型) については, 異常として記録したが, 構造異常には含めなかった。ギャップは, 染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については, 上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し, 異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は, 観察した細胞 200 個中に認められた異常細胞数を表示した。

#### 8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり, 構造異常および倍数性細胞の出現頻度は, 多試料  $\chi^2$  検定を行って, 有意差 (有意水準 5%以下) が認められた場合は, Fisher の直接確率法を用いて陰性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、陰性対照群と比較して、被験物質群におけ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、さらに用量依存性が認められた場合、染色体異常誘発性は陽性と判定した。なお、単一用量でのみ有意な増加が認められた場合は、それに近い用量を用いて確認試験を行い、その結果、再現性のある結果が認められた場合には、染色体異常誘発性は陽性とした。

## 結 果

### 1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表 1-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 0.5%と低値であった。被験物質群では 6.25, 12.5 および 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  でそれぞれ 0.5, 13.5 および 32.5%と用量依存的な出現頻度の増加が認められ、12.5 および 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の出現頻度は陰性対照群と比べて有意に高かった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 92.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、37.5 および 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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は認められなかった。

### 2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表 1-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 25, 50, 100 および 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  でそれぞれ 1.0, 1.0, 5.5 および 31.0%の出現頻度で認められ、150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の出現頻度は陰性対照群と比べて有意に増加した。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 55.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群においては、0~2.0%の範囲の低い出現頻度で認められた。

### 3. D<sub>20</sub> 値<sup>4)</sup>

短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下において、陽性値を示す染色体構造異常細胞の増加が認められたため、D<sub>20</sub> 値〔分裂中期像の 20% に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量 (mg/mL)〕を算出した。

その結果は下表に示すとおりであり、S9 mix 非存在および存在下の構造異常に関する D<sub>20</sub> 値は、S 値が小さい 0.015 および 0.13 mg/mL を採用した。

短時間処理法	回帰曲線	D <sub>20</sub> 値 ( $\mu\text{g/mL}$ )	S 値 $\left[ S = \frac{D_{20}}{r} \times \frac{1}{n^2} \right]$
S9 mix 非存在下	$y = 1.376x - 3.3$ ( $r = 0.970741$ )	16.9331	1.09022
	$y = 36.2091x - 22.5181$ ( $r = 0.930063$ )	<u>14.9361</u>	<u>1.0037</u>
S9 mix 存在下	$y = 0.186724x - 4.23706$ ( $r = 0.860852$ )	<u>129.801</u>	<u>6.03131</u>
	$y = 22.511x - 29.9705$ ( $r = 0.732107$ )	165.892	9.06379

S 値：対象となった D<sub>20</sub> 値のうち、相関係数 r が大きく、陰性対照群を含む群数 n が多いものほどより妥当性が高いとする考えに基づく指標。

### 結 論

$\alpha,4$ -ジクロロトルエンについて染色体異常誘発性の有無を調べるため、CHL/IU 細胞を用いた *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。その結果、S9 mix 非存在および存在下ともに染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。

したがって、本実験条件下では、 $\alpha,4$ -ジクロロトルエンの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。本被験物質の染色体の構造異常誘発に関する D<sub>20</sub> 値は、S9 mix 非存在下では 0.015 mg/mL、S9 mix 存在下では 0.13 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% 以上を陽性とする生物学的判断基準<sup>5)</sup>からみても明らかに陽性と判断されるものであった。

$\alpha,4$ -ジクロロトルエンの変異原性については、*Salmonella typhimurium* を用いた復帰突然変異試験において陰性<sup>6)</sup>との報告がある。また、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性との情報（イハラケミカル工業株式会社、製品安全データシート）があり、本試験においてその陽性結果が確認された。

文 献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, **48**, 337-354.
- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). "Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, **66**, 277-290.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Japan Chemical Industry Ecology・Toxicology and Information Center, JAPN; Mutagenicity of test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation of the industrial safety and health law. (1996).

表 1-1  $\alpha,4$ -ジクロロトルエンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)					キヤップの細胞 出現数 (%)	増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)				
		染色分体		染色体		その他			総異常 細胞数	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0
		( 0 ) ( 0.5 ) ( 0 ) ( 0 ) ( 0 ) ( 0.5 ) ( 0 )		( 0 ) ( 0 ) ( 0 )									
6.25	100	0	0	0	0	0	0	0	102.5	100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0
		( 0 ) ( 0.5 ) ( 0 ) ( 0 ) ( 0 ) ( 0.5 ) ( 0 )		( 0 ) ( 0 ) ( 0 )									
12.5	100	12	9	0	0	0	17	1	95.5	100	0	0	0
	100	8	3	0	0	0	10	0		100	0	0	0
	200	20	12	0	0	0	27	1		200	0	0	0
		( 10.0 ) ( 6.0 ) ( 0 ) ( 0 ) ( 0 ) ( 13.5 )** ( 0.5 )		( 0 ) ( 0 ) ( 0 )									
25	100	19	24	0	2	0	34	1	86.0	100	0	0	0
	100	15	25	0	0	0	31	0		100	1	0	1
	200	34	49	0	2	0	65	1		200	1	0	1
		( 17.0 ) ( 24.5 ) ( 0 ) ( 1.0 ) ( 0 ) ( 32.5 )** ( 0.5 )		( 0 ) ( 0 ) ( 0 )									
37.5 #	---	---	---	---	---	---	---	---	52.0	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---		---	---	---	---
		( -- ) ( -- ) ( -- ) ( -- ) ( -- ) ( -- ) ( -- )		( -- ) ( -- ) ( -- )									
50 #	---	---	---	---	---	---	---	---	37.0	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---		---	---	---	---
		( -- ) ( -- ) ( -- ) ( -- ) ( -- ) ( -- ) ( -- )		( -- ) ( -- ) ( -- )									
陽性対照	100	44	83	2	0	0	90	0		100	0	0	0
2.5	100	50	93	1	0	0	95	0	---	100	0	0	0
	200	94	176	3	0	0	185	0		200	0	0	0
		( 47.0 ) ( 88.0 ) ( 1.5 ) ( 0 ) ( 0 ) ( 92.5 )** ( 0 )		( 0 ) ( 0 ) ( 0 )									

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

\*\*: $p < 0.01$ .

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。



表 1-2  $\alpha,4$ -ジクロロトルエンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)					総異常 細胞数	ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)				
		染色分体		染色体		その他		出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0	
0	100	0	1	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0	
	200	0	1	0	1	0	2	0		200	0	0	0	
		( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )
25	100	1	1	0	0	0	1	0	97.5	100	0	0	0	
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	1	0	1	
	200	1	2	0	0	0	2	0		200	1	0	1	
		( 0.5 )	( 1.0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )		( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	
50	100	0	2	0	0	0	2	0	89.0	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
	200	0	2	0	0	0	2	0		200	0	0	0	
		( 0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	
100	100	3	5	0	0	0	5	0	79.0	100	0	0	0	
	100	1	5	0	1	0	6	0		100	4	0	4	
	200	4	10	0	1	0	11	0		200	4	0	4	
		( 2.0 )	( 5.0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 5.5 )	( 0 )		( 2.0 )	( 0 )	( 2.0 )	( 0 )	
150	100	5	29	1	0	0	29	0	64.5	100	0	0	0	
	100	9	33	1	0	0	33	0		100	1	0	1	
	200	14	62	2	0	0	62	0		200	1	0	1	
		( 7.0 )	( 31.0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 0 )	( 31.0 )**	( 0 )		( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	
200 #	---	---	---	---	---	---	---	---	40.0	---	---	---	---	
	---	---	---	---	---	---	---	---		---	---	---	---	---
		( --- )	( --- )	( --- )	( --- )	( --- )	( --- )	( --- )		( --- )		( --- )	( --- )	( --- )
陽性対照	100	19	52	0	0	0	55	0		100	0	0	0	
10	100	17	52	1	1	0	55	0	---	100	0	0	0	
	200	36	104	1	1	0	110	0		200	0	0	0	
		( 18.0 )	( 52.0 )	( 0.5 )	( 0.5 )	( 0 )	( 55.0 )**	( 0 )		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

\*\*: $p < 0.01$ .

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

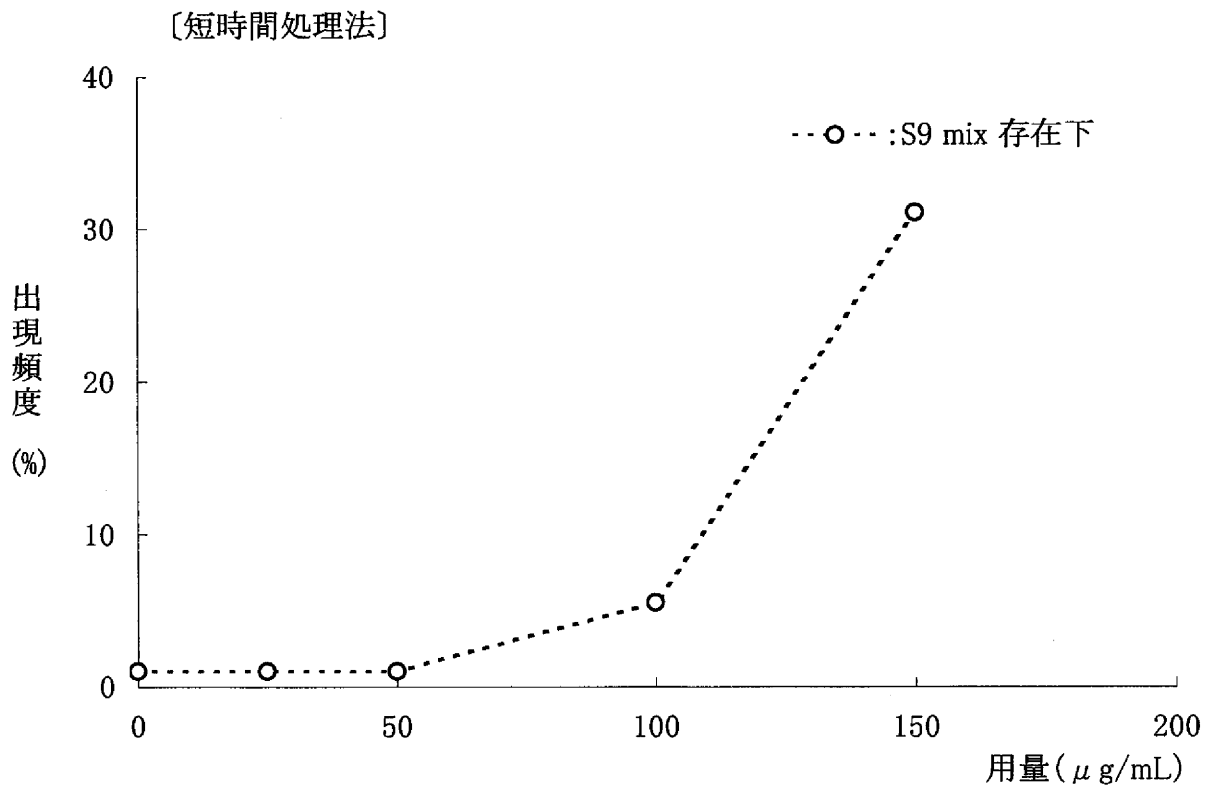
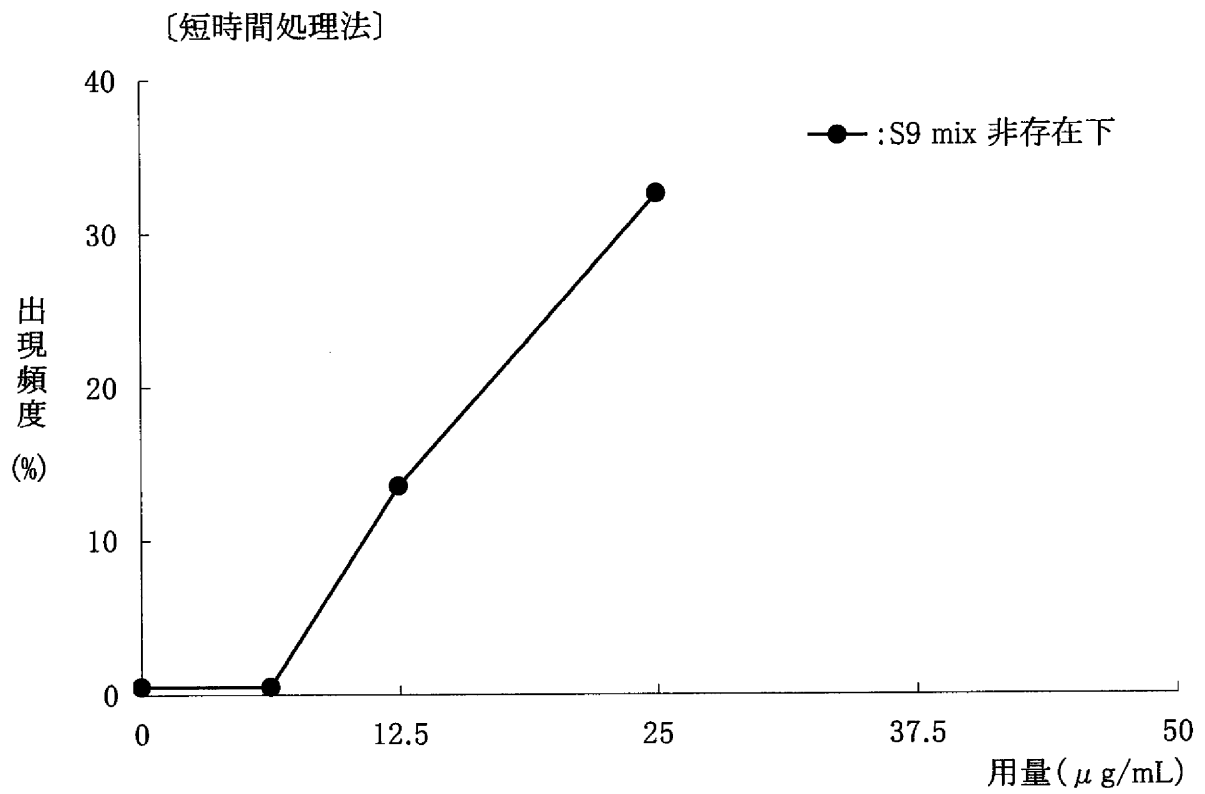


図1 構造異常を有する細胞の出現頻度

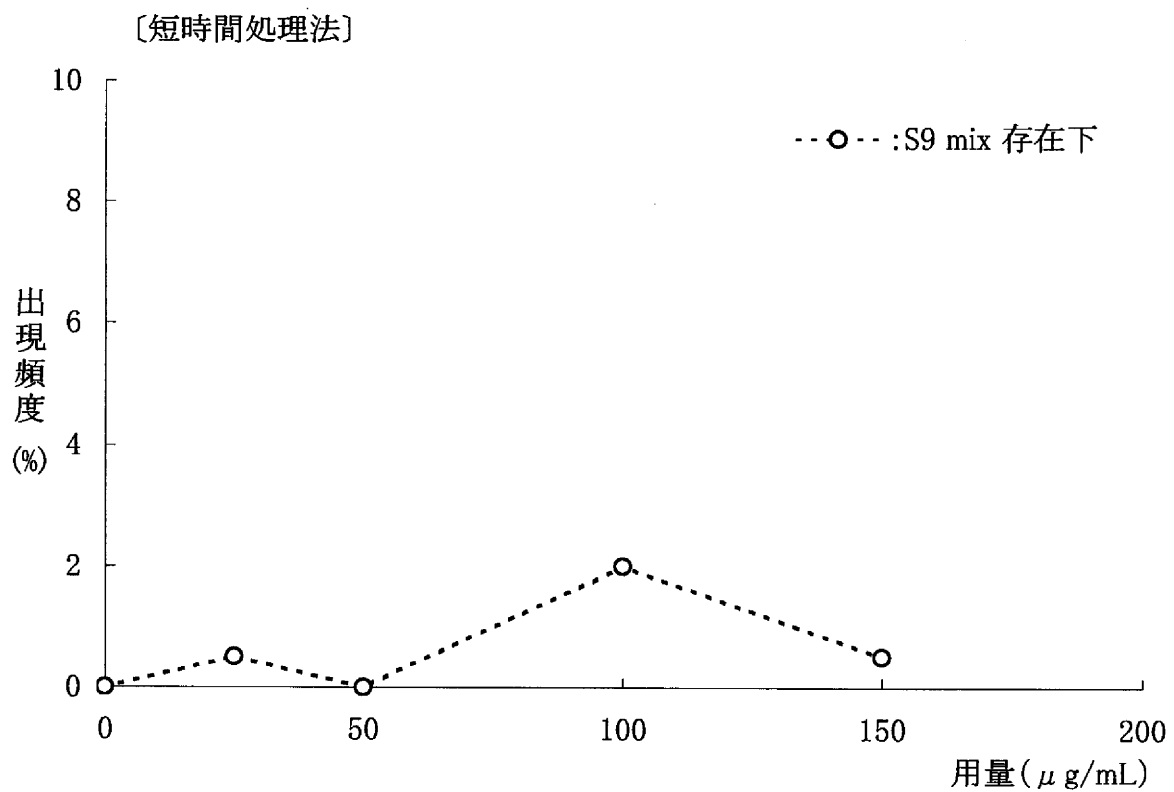
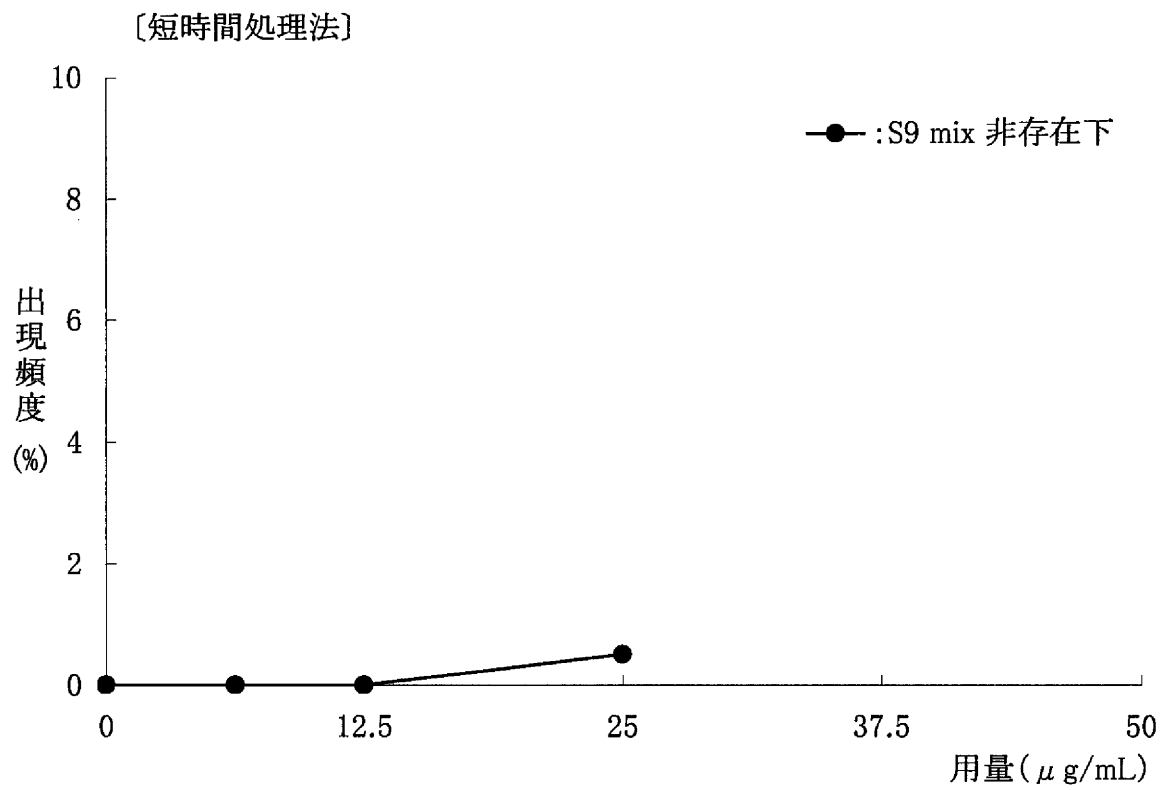


図2 数的異常を有する細胞の出現頻度