Study No. 970930

４－メチルピリジンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

最 終 報 告 書

作成日: 2011年3月29日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

全 37 頁

1. 目 次

表 紙 1
1. 目 次 2

15. 要 約 11
16. 緒 言 12
17. 方 法 12
17.1. 被験物質，媒体，陽性対照物質及び陰性対照物質 12
17.1.1. 被験物質 12
17.1.2. 媒体 12
17.1.3. 陽性対照物質 12
17.1.4. 陰性対照物質 13
17.2. 検体液 13
17.2.1. 被験物質 13
17.2.2. 陽性対照物質 13
17.2.3. 残余検体液の取り扱い 14
17.3. 試験系 14
17.3.1. 細胞 14
18. S9 mix 15
19. 培養液 15
20. 細胞数の調整及び細胞播種 16

21. 試験方法 16
21.1. 細胞増殖抑制試験 16
21.1.1. 短時間処理法 16
21.1.2. 連続処理法 16
21.1.3. 試験濃度 17
21.1.4. 使用シャーレ数 17
21.1.5. 細胞数の計測 17
21.1.6. 細胞増殖抑制試験結果 17
21.2. 染色体異常試験 17
21.2.1. 短時間処理法 18
21.2.2. 連続処理法 18
21.2.3. 試験濃度 18
21.2.4. 使用シャーレ数 18
21.2.5. 細胞数の計測 18
21.2.6. 標本の作製 19
21.3. 識　別 19
22. 染色体異常の観察 19
22.1. 顕微鏡の倍率 19
22.2. 細胞の観察数 19
22.3. 染色体異常の分類 19
23. 試験の成立条件 20
24. 統計学的方法 20
25. 判定基準 20
26. 試験結果 21
26.1. 短時間処理法 21
26.1.1. S9 mix添加 21
26.1.2. S9 mix無添加 21
26.2. 連続処理法 21
27. 考　察 22
28. 文　献 22

Tables

Table 1. Cell growth inhibition test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells
-The short treatment method: +S9 mix- 23
Table 2. Cell growth inhibition test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells
-The short treatment method: –S9 mix- 24

Table 3. Cell growth inhibition test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells
-The continuous treatment method: 24 hr- 25
Table 4. Chromosomal aberration test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells
-The short treatment method: +S9 mix- 26
Table 5. Chromosomal aberration test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells
-The short treatment method: –S9 mix- 27
Table 6. Chromosomal aberration test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells
-The continuous treatment method: 24 hr- 28

Figures

Figure 1. Chemical structure of 4–methylpyridine. 29
Figure 2,3. Cell growth inhibition test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells. 30

15. 要　約

4－メチルピリジンの染色体異常誘発性の有無を，ほ乳類培養細胞 (CHL/IU 細胞) を用い，短時間処理法 (6 時間処理の S9 mix 添加及び S9 mix 無添加) と連続処理法 (24 時間処理) で検討した.

4－メチルピリジンの試験濃度は，細胞増殖抑制試験の結果，短時間処理法及び連続処理法とも，細胞毒性が認められなかったことから，細胞増殖抑制試験と同様に 1000 μg/mL (10 mmol/L 相当) を最高濃度とし，以下公比 2 により 500 及び 250 μg/mL の 3 段階を設定した.

試験の結果，短時間処理法及び連続処理法とも，数的及び構造異常細胞の出現率は 5%未満であった.

各試験系列で用いた陽性対照物質は，明らかな陽性結果を示し，陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は，試験の成立条件を満たすものであった.

以上の結果，当試験の条件下において，4－メチルピリジンに染色体異常誘発性はないと判定する.

16. 緒　言

4–メチルピリジンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を行い，その染色体異常誘発性の有無について検討した.

17. 方　法

17.1. 被験物質，媒体，陽性対照物質及び陰性対照物質

17.1.1. 被験物質

被験物質 4-メチルピリジン[別名: γ–ピコリン，英語名称: 4–methylpyridine，CAS No.: 108-89-4，官報公示整理番号 (化審法): 5-711] は，化学式: C_6H_7N (化学構造式は Figure 1.参照)，分子量: 93.13，物性・性状: ごくうすい黄色澄明の液体であり，やや甘い不快臭を有する．水，エタノール及びアセトンに極めて溶けやすい．引火点: 55℃，密度 (20℃): 0.954 g/mL である．当試験には，

入手したものを用いた [

純度 (キャピラリーカラム GC): 99.0%]．入手後は，試験施設の被験物質保管室の室温保管庫 [設定温度: 23℃ (実測値: 22.0 – 25.0℃)，設定湿度: 55% (実測値: 40.8 – 67.0%)] 内に，室温・遮光・気密 (アルゴンガス充填) の条件下で保管した.

「4-メチルピリジンのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験」(試験番号: 100530) の投与期間終了後に試験施設で保管した被験物質 (Lot No.: STN0098) を製造元で再分析し，使用期間中の安定性を確認した.

17.1.2. 媒体

媒体には，注射用水 (規格: 局方品，Lot No.: K0A81，使用期限: 2013 年 1 月，株式会社大塚製薬工場) を用いた．注射用水は，使用時まで試験施設の被験物質保管室 [設定温度: 23℃ (実測値: 22.0 – 24.8℃)，設定湿度: 55% (実測値: 40.8 – 56.0%)] 内に，室温の条件下で保管した.

17.1.3. 陽性対照物質

陽性対照物質として，マイトマイシン C (以下 MMC) とジメチルニトロサミン (以下 DMN) を用いた.

MMC [商品名: マイトマイシン注用 2 mg，Lot No.: 542AIA，組成: 1 バイアル中に，日局マイトマイシン C 2 mg (力価) と日局塩化ナトリウムを含有，性状: 青紫色の結晶又は結晶性の粉末で，*N,N*-ジメチルアセトアミドに溶けやすく，水又はメタノールに溶けにくく，エタノールに極めて溶けにくい．安定性: 結晶の状態では常温で安定である．水溶液の状態では pH による影響を受けやすく，pH 8.0 では安定であるが，pH 7.0 以下では pH 値が低くなるにつれて，その安定性は低下する．使用期限: 2013 年 1 月，協和発酵キリン株式会社] と，DMN [Lot No.: ALH4727，性状: 黄

色澄明の液体，安定性: 染色体異常誘発頻度が過去の成績から大きく逸脱していない場合に，生物学的に充分な活性を有していたと判断する．含量: 99.6%，使用期限: 2011 年 3 月 1 日 (自社規定)] は，いずれも市販品を購入した．購入後は，いずれも使用時まで試験施設の被験物質保管室の保管庫 [設定温度: 4℃ (実測値: 5.7 – 6.6℃) ，冷蔵庫: BMS-500F3，日本フリーザー株式会社] 内に，冷蔵の条件下で保管した．

17.1.4. 陰性対照物質

被験物質の媒体である注射用水を用いた．

17.2. 検体液

17.2.1. 被験物質

17.2.1.1. 調製方法

細胞増殖抑制試験では，被験物質 100 mg (実秤量値: 100.0 mg) を秤量 (電子天秤: AT261，メトラー・トレド株式会社)し，注射用水に溶解して最高濃度 (10 mg/mL) を 10 mL 調製した．最高濃度液以下の濃度液は, 10 mg/mL 液の一部を注射用水で段階希釈して被験物質調製液 (5.0, 2.5, 1.25, 0.625，0.313，0.156 及び 0.0781 mg/mL) を調製した．

染色体異常試験では，被験物質 100 mg (実秤量値: 100.0 mg) を秤量 (電子天秤: AT261，メトラー・トレド株式会社) し，注射用水に溶解して最高濃度 (10 mg/mL) を 10 mL 調製した．最高濃度液以下の濃度液は，10 mg/mL 液の一部を注射用水で段階希釈して被験物質調製液 (5.0 及び 2.5 mg/mL) を調製した．

なお，細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験とも調製はクリーンベンチ内で行った．

17.2.1.2. 被験物質調製液の安定性及び調製頻度

媒体として注射用水を用いた被験物質調製液の安定性については，0.05 及び 200 mg/mLの濃度で調製後，冷蔵 [設定温度: 4℃ (実測値: 4.9 – 6.3℃) ，冷蔵庫: BMS-500F3，日本フリーザー株式会社]・遮光・気密 7 日間とその後，室温 [設定温度: 23℃ (実測値: 23.0 – 23.3℃)]・遮光・気密で 6 時間まで問題がないことが確認されている[1)]．

なお，調製は用時に行い，速やかに使用した．

17.2.2. 陽性対照物質

17.2.2.1. 調製方法

MMC 及び DMN [必要量を電子天秤 (AT261，メトラー・トレド株式会社) にて秤量] とも，生理食塩液 (局方品，Lot No.: M9D97，株式会社大塚製薬工場) に溶解して必要濃度 (表示濃度の 10 倍) を調製した．調製は用時にクリーンベンチ内で行った．

以下に試験系列に対する陽性対照物質名，調製濃度及び試験濃度を示した.

		物質名	調製濃度（μg/mL）	試験濃度（μg/mL）
短時間処理法	S9 mix 添加	DMN	5000	500
	S9 mix 無添加	MMC	1.0	0.1
連続処理法		MMC	0.5	0.05

用量の設定理由: 当試験施設のバックグラウンドデータから，いずれも陽性結果を示す濃度であるため.

17.2.2.2. 媒体中での安定性及び濃度

媒体中での安定性及び濃度については，対照物質としての反応が，試験施設のバックグラウンドデータをよく反映していることをもって確認されたものとする.

17.2.3. 残余検体液の取り扱い

残余検体液は，使用後に廃棄した.

17.3. 試験系

17.3.1. 細胞

試験には，細胞分裂が早く，染色体数も少ないため染色体の観察に適しており，また当細胞を用いた染色体異常データが多数発表され，バックグラウンドデータが多いチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いた．細胞は，2009 年 7 月 22 日に DS ファーマバイオメディカル株式会社 ラボラトリープロダクツ部から入手した．細胞は，液体窒素中で維持・管理され，試験に際し，凍結してある細胞 (継代数: 15 回，染色体モード数: 25 本，細胞倍化時間: 16.8 時間，マイコプラズマ検査: 陰性) を融解し，増殖させて使用した．細胞の継代は，培養ビン (Nunc 製) を用いて 3～4 日ごとに行った．以下に各試験における再培養からの継代数を示した.

細胞増殖抑制試験 ..... 3 回

染色体異常試験 ..... 7 回

なお，実験操作は空調設備を備えた染色体異常試験室 (G 棟) で行った.

18. S9 mix

S9 (Lot No.: 10081305，オリエンタル酵母工業株式会社) は，フェノバルビタール及び 5,6 - ベンゾフラボンを投与した 7 週齢の雄ラット[Crl:CD (SD)] 37 匹 (体重: 210.1 ± 10.2 g) の肝臓から製造[製造日: 2010 年 8 月 13 日，有効期限: 2011 年 2 月 12 日 (当試験施設の基準: 製造後 6 ヵ月)]されたものを使用した. S9 は, 2010 年 9 月 2 日に購入し, -80°C 設定の超低温フリーザー (ULT-1386-5A, Kendro Laboratory Products) 内に凍結保管した.

S9 mix は，S9 以外の各物質を調製混合して溶液とし，これをメンブランフィルター (φ0.2 μm, NALGENE®) で濾過した後，使用直前に S9 を加えて調製した．S9 mix の組成を以下に示した.

成　分	S9 mix 1 mL 中の量	成　分	S9 mix 1 mL 中の量
S9	0.3 mL	Glucose-6-phosphate	5 μmol
$MgCl_2$	5 μmol	NADP	4 μmol
KCl	33 μmol	HEPES buffer (pH 7.2)	4 μmol

19. 培養液

Eagle の最少必須培養液 (Eagle's minimum essential medium) は，Eagle's MEM 液体培地 (Lot No.: 822962，GIBCO，リスト No. 11095-080) に，非働化 (56°C，30 分) した仔牛血清 (Lot No.: 8108787，GIBCO) を最終調製量の 10 %となるように加えて調製した．なお，調製した培養液は用時に 37°C に加温して使用した．Eagle's MEM 液体培地の組成を以下に示した.

	(mg/L)		(mg/L)
$CaCl_2$ (anhyd.)	200	L - Methionine	15
KCl	400	L - Phenylalanine	32
$MgSO_4$ (anhyd.)	98	L - Threonine	48
NaCl	6800	L - Tryptophan	10
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	140	L - Tyrosine (disodium salt)	52
D - Glucose	1000	L - Valine	46
Phenol red	10	D - Ca pantothenate	1
L - Arginine・HCl	126	Choline chloride	1
L - Cystine・2HCl	31	Folic acid	1
L - Glutamine	292	Iso - Inositol	2
L - Histidine HCl・H_2O	42	Niacinamide	1
L - Isoleucine	52	Pyridoxal・HCl	1
L - Leucine	52	Riboflavin	0.1
L - Lysine・HCl	73	Thiamine・HCl	1

20. 細胞数の調整及び細胞播種

培養ビンに 0.25%トリプシン溶液を加えて細胞を剥離し，遠心分離 [1000 rpm (181 × g), 4°C, 5 分間，小形冷却遠心機 (CF 5RX，日立工機株式会社)，以下同様] により細胞を回収した後，新鮮な培養液を加えて細胞浮遊液を作製した. この細胞浮遊液中の細胞数を血球計算盤を用いて計測し，細胞数が 2×10^4 個/5 mL になるように新鮮な培養液を加えて調整した．調整した細胞浮遊液を 5 mL ずつ，直径 60 mm の滅菌シャーレ (CORNING) に播種し，温度を 37°C，CO_2 濃度を 5%に設定した炭酸ガス培養器 (BNA-121D，エスペック株式会社，以下 CO_2 インキュベーター) 内で 3 日間培養したものを試験に用いた.

21. 試験方法

21.1. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における 4 –メチルピリジンの試験濃度を設定するために, 細胞増殖抑制試験を行った. 試験は, 短時間処理法の S9 mix 添加及び S9 mix 無添加と連続処理法 (24 時間処理) の 3 系列で実施した.

21.1.1. 短時間処理法

細胞播種から 3 日間培養した後に，シャーレから培養液を取り除き，S9 mix 無添加では被験物質調製液あるいは陰性対照物質 0.5 mL に対して培養液 4.5 mL の割合で加え，S9 mix 添加では被験物質調製液あるいは陰性対照物質 0.5 mL に対して培養液と S9 mix を混合したもの (培養液 : S9 mix = 5 : 1，v/v) 4.5 mL の割合で加え，タッチミキサーで充分に混合したものを添加した．いずれのシャーレも 6 時間培養した後に，新鮮な培養液で処理液を洗浄し，洗浄に用いた培養液を取り除いた後，新鮮な培養液 5.0 mL を加え，さらに 18 時間培養した後に細胞数を計測した．なお，検体液添加時と処理終了時に被験物質の析出の有無を肉眼により観察した.

21.1.2. 連続処理法

細胞播種から 3 日間培養した後に，シャーレから培養液を取り除き，被験物質調製液あるいは陰性対照物質 0.5 mL に対して培養液 4.5 mL の割合で加え，タッチミキサーで充分に混合したものを添加し，24 時間培養した後に細胞数を計測した．なお，検体液添加時と処理終了時に析出の有無を肉眼により観察した.

21.1.3. 試験濃度

短時間処理法及び連続処理法とも同一の試験濃度 (最終濃度) で実施した.

「新規化学物質等に係る試験の方法について」に基づき，10 mmol/L 相当の 1000 μg/mL を最高濃度とし，以下公比 2 で 500，250，125，62.5，31.3，15.6 及び 7.81 μg/mL の計 8 濃度とし，その他に陰性対照を設けた.

21.1.4. 使用シャーレ数

1 濃度当たり 1 枚のシャーレを用いた.

21.1.5. 細胞数の計測

細胞数は血球計算盤を用いて計測し，陰性対照の値を基準に各濃度における細胞の生存率を算出した．計測は，1 枚のシャーレ当たり 3 回行い，その平均値を用いて生存率を求めた.

21.1.6. 細胞増殖抑制試験結果

21.1.6.1. 短時間処理法 (Table 1，2 及び Figure 2)

S9 mix 添加及び S9 mix 無添加における細胞の生存率は, すべての濃度において 90%以上を示し, 細胞毒性は認められなかった.

細胞毒性が認められなかったことから Probit 法による 50%細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) の算出はしなかった.

なお, 検体液添加及び処理終了時の析出物は，S9 mix 添加及び S9 mix 無添加ともすべての濃度において認められなかった.

21.1.6.2. 連続処理法 (Table 3 及び Figure 3)

細胞の生存率は，すべての濃度において 90%以上を示し，細胞毒性は認められなかった.

細胞毒性が認められなかったことから Probit 法による IC_{50} の算出はしなかった.

なお，検体液添加及び処理終了時の析出物は，すべての濃度において認められなかった.

21.2. 染色体異常試験

試験は，短時間処理法の S9 mix 添加及び S9 mix 無添加と連続処理法 (24 時間処理) の 3 系列で実施した.

21.2.1. 短時間処理法

21.1.1. で示した方法により被験物質調製液及び陰性対照物質の処理を実施した.

陽性対照物質については下記の組成で実施した.

処理条件	陽性対照物質溶液	S9 mix	MEM 培養液
S9 mix 無添加	0.5 mL	—	4.5 mL
S9 mix 添加	0.5 mL	0.75 mL	3.75 mL

21.2.2. 連続処理法

21.1.2. で示した方法により被験物質調製液及び陰性対照物質の処理を実施した.

陽性対照物質については下記の組成で実施した.

処理条件	陽性対照物質溶液	S9 mix	MEM 培養液
24 時間処理	0.5 mL	—	4.5 mL

21.2.3. 試験濃度

細胞増殖抑制試験の結果，短時間処理法及び連続処理法とも，細胞毒性が認められなかったことから，細胞増殖抑制試験と同様に 1000 μg/mL を最高濃度とし，以下公比 2 により 500 及び 250 μg/mL の 3 段階を設定した.

処理群は，試験系列ごとに被験物質，陰性対照及び陽性対照群を設けた．陽性対照として短時間処理法の S9 mix 添加には DMN (500 μg/mL)，S9 mix 無添加には MMC (0.1 μg/mL) を，連続処理法には MMC (0.05 μg/mL) を用いた.

21.2.4. 使用シャーレ数

1 濃度当たり 3 枚のシャーレを用意し, 細胞数の計測用に 1 枚, 染色体標本作製用に 2 枚用いた.

21.2.5. 細胞数の計測

細胞に対する毒性を確認するため，被験物質，陰性対照及び陽性対照について細胞数の計測を行った．細胞数の計測は，21.1.5.で示した方法により実施した.

21.2.6. 標本の作製

短時間処理法及び連続処理法のいずれにおいても，培養終了約 2 時間前に 10 μg/mL 濃度のコルセミド液を各シャーレに 0.1 mL 添加して，分裂中期細胞を得た．培養終了後，各シャーレに 0.25% トリプシン溶液を約 3 mL 加えて細胞を剥離し，遠心分離により細胞を回収した後，75 mmol/L 塩化カリウム水溶液で低張処理 (37℃, 15 分間) をした．低張処理が終了した後，再び遠心分離し，メタノールと酢酸を 3:1 の割合で混合して氷冷した固定液で脱水固定を行い，同固定液で細胞浮遊液を調製した．この細胞浮遊液をスライドグラス上の 2 ヵ所に一滴ずつ滴下して細胞を広げ，乾燥後，2%の Giemsa 染色液で 15 分間染色した．

スライド標本は 1 シャーレ当たり 3 枚作製し，乱数を用いてコード番号を割り付けた．

21.3. 識　別

シャーレには，試験番号，被験物質名又は対照物質名，濃度，S9 mix の有無 (短時間処理法) 又は培養時間 (連続処理法) を記入した．

スライド標本は，観察終了後に試験番号，被験物質名又は対照物質名，濃度，試験法，S9 mix の有無 (短時間処理法) 又は培養時間 (連続処理法)，標本作製日を記入したラベルを貼り付けた．

22. 染色体異常の観察

22.1. 顕微鏡の倍率

数的異常の観察には 400 倍，構造異常の観察には 1000 倍のノーカバーレンズを使用した．

22.2. 細胞の観察数

良く広がった分裂中期像の細胞を，1 シャーレ当たり 100 個，1 濃度当たり 200 個観察した．標本の観察はコード番号順に行い，観察結果と試験濃度との照合は，全標本を観察した後に行った．

22.3. 染色体異常の分類

染色体異常は，数的異常と構造異常に分類した．数的異常は倍数体 (polyploid) 及び核内倍化 (endoreduplication) を観察対象とし，構造異常はギャップ (gap)，染色分体型切断 (chromatid break，以下 ctb)，染色体型切断 (chromosome break，以下 csb)，染色分体型交換 (chromatid exchange，以下 cte)，染色体型交換 (chromosome exchange，以下 cse)，断片化 (fragmentation，以下 frg) に分類し，これらの染色体異常を有する細胞を陽性細胞 1 個として記録した．なお，ギャップと切断の判別基準は，染色体又は染色分体の断片が軸の同一線上にあるものをギャップとし，同一線上からはずれているものを切断としたが，断片が同一線上にあっても非染色部分が染色分体幅より大

きいものは切断とした．染色体異常の総数は，ギャップを含めた場合と含めない場合とに分けて記録した．

23. 試験の成立条件

陰性対照において，ギャップ以外の構造異常を有する細胞の出現頻度が 5%未満で，陽性対照においてはギャップ以外の構造異常を有する細胞の出現頻度が 10%以上を示し，さらに，試験系に影響した要因がない場合に試験成立とした．なお，試験施設のバックグラウンドデータを Attachment 1 として添付した．

24. 統計学的方法

染色体異常を有する細胞の出現率は，下記の判定基準に従ったため有意差検定は行わなかった．

25. 判定基準

試験の結果は，数的異常又は構造異常を有する細胞の出現率が 5%未満を陰性とし，5%以上 10%未満を疑陽性とした．さらにその出現率が 10%以上を示し，濃度に依存して増加した場合を陽性とした．なお，構造異常の染色体をもつ細胞の出現率は，ギャップを含めた場合と含めない場合で算出し，ギャップを含めない場合の出現率で判定した．

26. 試験結果

26.1. 短時間処理法 (Table 4，5 及び Appendix 1，2)

26.1.1. S9 mix 添加

4－メチルピリジン処理群の数的異常細胞の出現率は, すべての濃度で 1.5%以下と陰性であった.
同様に，構造異常細胞の出現率も，すべての濃度で 2.0%以下と陰性であった.
細胞の生存率は，すべての濃度において 90%以上を示し，細胞毒性は認められなかった.
検体液添加及び処理終了時の析出物は，すべての濃度において認められなかった.
陰性対照の数的異常細胞の出現率は 0.5%，構造異常細胞の出現率は 0%であった．また，陽性対照 (DMN: 500 μg/mL) における数的異常細胞の出現率は 0.5%，構造異常細胞の出現率は 56.0%であった.

26.1.2. S9 mix 無添加

4－メチルピリジン処理群の数的異常細胞の出現率は, すべての濃度で 1.5%以下と陰性であった.
同様に，構造異常細胞の出現率も，すべての濃度で 1.5%以下と陰性であった.
細胞の生存率は，すべての濃度において 90%以上を示し，細胞毒性は認められなかった.
検体液添加及び処理終了時の析出物は，すべての濃度において認められなかった.
陰性対照の数的異常細胞の出現率は 0.5%，構造異常細胞の出現率は 1.0%であった．また，陽性対照 (MMC: 0.1 μg/mL) における数的異常細胞の出現率は 0.5%，構造異常細胞の出現率は 53.0%であった.

26.2. 連続処理法 (Table 6 及び Appendix 3)

4－メチルピリジン処理群の数的異常細胞の出現率は, すべての濃度で 1.0%以下と陰性であった.
同様に，構造異常細胞の出現率も，すべての濃度で 1.5%以下と陰性であった.
細胞の生存率は，すべての濃度において 90%以上を示し，細胞毒性は認められなかった.
検体液添加及び処理終了時の析出物は，すべての濃度において認められなかった.
陰性対照の数的異常細胞の出現率は 1.0%，構造異常細胞の出現率は 0.5%であった．また，陽性対照 (MMC: 0.05 μg/mL) における数的異常細胞の出現率は 0%，構造異常細胞の出現率は 44.0%であった.

27. 考　察

4－メチルピリジンの染色体異常誘発性の有無を，ほ乳類培養細胞 (CHL/IU 細胞) を用い，短時間処理法 (6 時間処理の S9 mix 添加及び S9 mix 無添加) と連続処理法 (24 時間処理) で検討した．

4－メチルピリジン処理群の数的異常細胞及び構造異常細胞の出現率は，いずれの試験系列においても，5%に満たなかったため，4－メチルピリジンは数的異常及び構造異常のいずれも誘発しないものと思われる．

短時間処理法及び連続処理法の各試験系列において，陰性対照及び陽性対照群の異常細胞出現率は，試験の成立条件を満たすものであった．

以上の結果，当試験の条件下において，4－メチルピリジンに染色体異常誘発性はないと判定する．

28. 文　献

1) 4－メチルピリジンの注射用水中での安定性確認試験 (試験番号: 092430)，株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所．

Table 1. Cell growth inhibition test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells -The short treatment method: +S9 mix-

Test substance	Concentration (μg/mL)	Exposure-Recovery (hr)	No. of cells ($\times 10^4$/plate)	Survival ratio[a)] (%)	IC_{50} (μg/mL)
Negative control	-	6-18	69	100	-
4–Methylpyridine	7.81	6-18	65	94	1000<
	15.6	6-18	69	100	
	31.3	6-18	69	100	
	62.5	6-18	69	100	
	125	6-18	65	94	
	250	6-18	65	94	
	500	6-18	65	94	
	1000	6-18	67	97	

Negative control: Distilled water.

a): (4–Methylpyridine treated group / negative control)×100.

No precipitates were noted at any concentration in culture fluid at the initiation and the completion of treatment.

Table 2. Cell growth inhibition test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells -The short treatment method: –S9 mix-

Test substance	Concentration (μg/mL)	Exposure-Recovery (hr)	No. of cells ($\times 10^4$/plate)	Survival ratio[a)] (%)	IC_{50} (μg/mL)
Negative control	-	6-18	61	100	-
4–Methylpyridine	7.81	6-18	59	97	1000<
	15.6	6-18	60	98	
	31.3	6-18	63	103	
	62.5	6-18	60	98	
	125	6-18	59	97	
	250	6-18	57	93	
	500	6-18	58	95	
	1000	6-18	56	92	

Negative control: Distilled water.

a): (4–Methylpyridine treated group / negative control)×100.

No precipitates were noted at any concentration in culture fluid at the initiation and the completion of treatment.

Table 3. Cell growth inhibition test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells -The continuous treatment method: 24 hr-

Test substance	Concentration (μg/mL)	Exposure-Recovery (hr)	No. of cells ($\times 10^4$/plate)	Survival ratio[a)] (%)	IC_{50} (μg/mL)
Negative control	-	24-0	61	100	-
4–Methylpyridine	7.81	24-0	59	97	1000<
	15.6	24-0	55	90	
	31.3	24-0	58	95	
	62.5	24-0	61	100	
	125	24-0	60	98	
	250	24-0	57	93	
	500	24-0	56	92	
	1000	24-0	56	92	

Negative control: Distilled water.

a): (4–Methylpyridine treated group / negative control)×100.

No precipitates were noted at any concentration in culture fluid at the initiation and the completion of treatment.

Table 4. Chromosomal aberration test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells -The short treatment method: +S9 mix-

Test substance	Concentration (μg/mL)	Exposure-Recovery (hr)	No.of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations											Survival ratio [e] (%)
				No.of polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence [a] (%)	Judgement [b]	Types [c] and numbers (cumulative)						No.of cells with chromosome aberration		Incidence [d] (%)		Judgement [b]	
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)		
Negative control	—	6-18	200	1	0	0.5	–	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–	100
4–Methylpyridine	250	6-18	200	0	0	0	–	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–	93
	500	6-18	200	1	0	0.5	–	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	–	94
	1000	6-18	200	3	0	1.5	–	0	3	0	1	0	0	4	4	2.0	2.0	–	93
Dimethylnitrosamine	500	6-18	200	1	0	0.5	—	0	53	2	68	5	0	112	112	56.0	56.0	+	87

Negative control: Distilled water.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

b): Judged on the basis of incidence as; –: negative (less than 5.0%); ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

e): (4–Methylpyridine treated group or positive control / negative control) × 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

No precipitates were noted at any concentration in culture fluid at the initiation and the completion of treatment.

Table 5. Chromosomal aberration test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells -The short treatment method: –S9 mix-

Test substance	Concentration (μg/mL)	Exposure-Recovery (hr)	No.of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations												Survival ratio [e] (%)
				No.of polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence [a] (%)	Judgement [b]	Types [c] and numbers (cumulative)						No.of cells with chromosome aberration		Incidence [d] (%)		Judgement [b]		
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)			
Negative control	–	6-18	200	1	0	0.5	–	0	2	0	0	0	0	2	2	1.0	1.0	–		100
4–Methylpyridine	250	6-18	200	2	0	1.0	–	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–		100
	500	6-18	200	3	0	1.5	–	0	2	0	0	0	0	2	2	1.0	1.0	–		97
	1000	6-18	200	2	0	1.0	–	0	2	0	0	1	0	3	3	1.5	1.5	–		95
Mitomycin C	0.1	6-18	200	1	0	0.5	–	0	68	3	58	2	0	106	106	53.0	53.0	+		87

Negative control: Distilled water.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

b): Judged on the basis of incidence as; –: negative (less than 5.0%); ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

e): (4–Methylpyridine treated group or positive control / negative control) × 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

No precipitates were noted at any concentration in culture fluid at the initiation and the completion of treatment.

Table 6. Chromosomal aberration test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells -The continuous treatment method: 24 hr-

Test substance	Concentration (μg/mL)	Exposure-Recovery (hr)	No.of metaphase examined	Numerical aberration: No.of polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence[a] (%)	Judgement[b]	Structural aberrations: Types[c] and numbers (cumulative): gap	ctb	csb	cte	cse	frg	No.of cells with chromosome aberration (+g)	(-g)	Incidence[d] (%) (+g)	(-g)	Judgement[b]	Survival ratio[e] (%)
Negative control	–	24-0	200	2	0	1.0	–	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	–	100
4–Methylpyridine	250	24-0	200	0	0	0	–	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–	95
	500	24-0	200	2	0	1.0	–	0	1	0	1	0	0	2	2	1.0	1.0	–	97
	1000	24-0	200	1	0	0.5	–	0	1	0	1	1	0	3	3	1.5	1.5	–	93
Mitomycin C	0.05	24-0	200	0	0	0	–	0	58	2	44	1	0	88	88	44.0	44.0	+	90

Negative control: Distilled water.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

b): Judged on the basis of incidence as; –: negative (less than 5.0%); ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

e): (4–Methylpyridine treated group or positive control / negative control) × 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

No precipitates were noted at any concentration in culture fluid at the initiation and the completion of treatment.

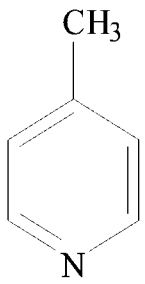

Figure 1. Chemical structure of 4–methylpyridine.

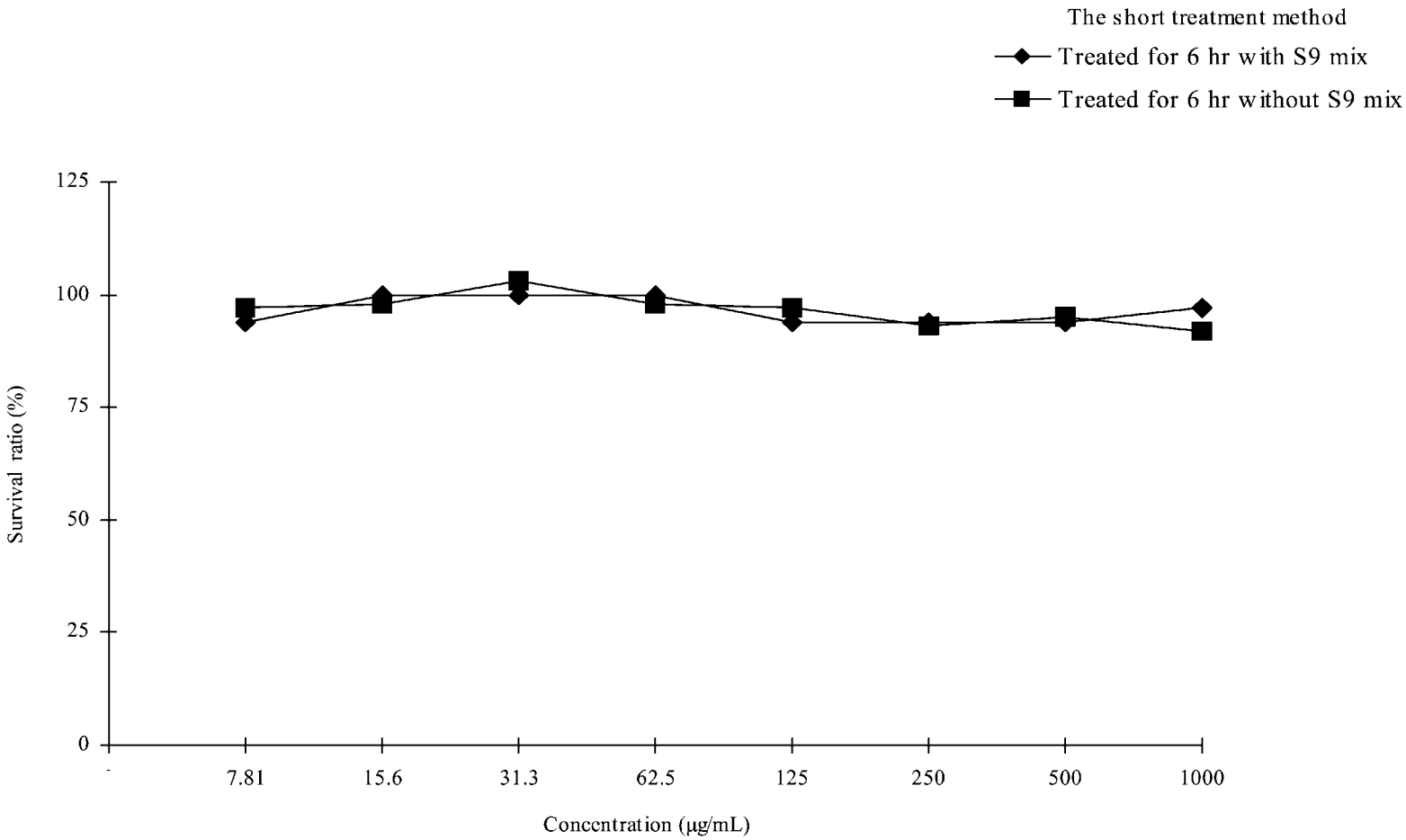

Figure 2. Cell growth inhibition test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells.

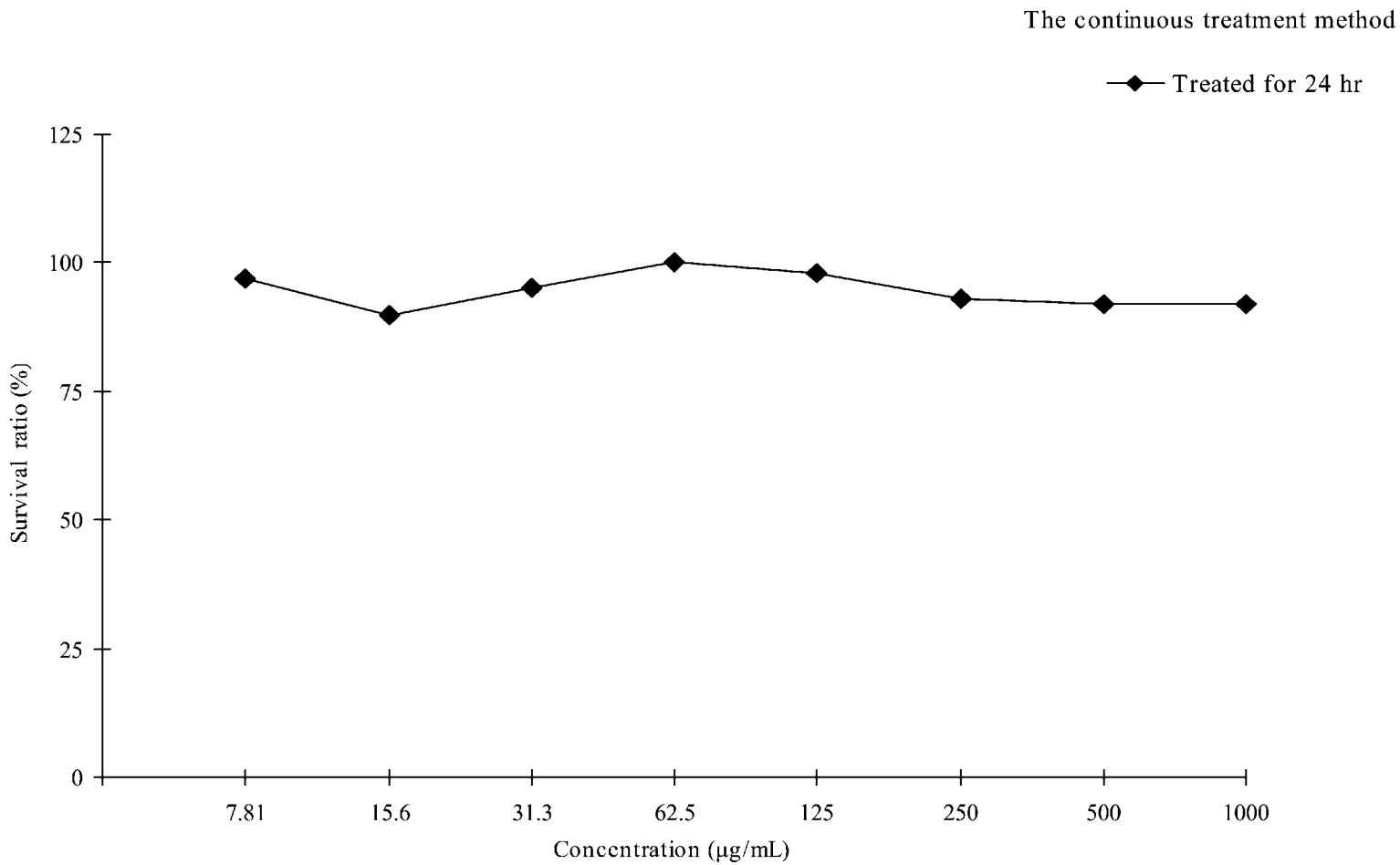

Figure 3. Cell growth inhibition test of 4–methylpyridine with cultured CHL cells.