

m-ニトロ安息香酸の
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

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

目次

要約	1
試験目的	1
試験ガイドラインと GLP	2
材料と方法	2
1. 被験物質	2
2. 陽性対照物質	2
3. 細胞と培養条件	2
4. S9 反応液の調製	3
5. 被験物質調製液の調製	3
6. 細胞増殖抑制試験	3
7. 染色体異常試験	4
8. 染色体分析	5
試験成績と考察	6
参考文献	8
Figure	9
Tables	10

要約

m-ニトロ安息香酸のチャイニーズ・ハムスター雌肺由来細胞 (CHL/IU 細胞)を用いる染色体異常試験を実施し、その染色体異常誘発性を検討した。

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理における最高処理濃度を S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下ともに 10 mmol/L (1.7 mg/mL) とし、公比 2 で計 4 段階の濃度群を設定した。また、0.85 mg/mL 以上の濃度群では処理開始時に処理液が橙ないし黄色化したことから、pH 調整群 (0.85、1.7 mg/mL) も設定し、染色体異常試験を実施した。

細胞増殖率および分裂指数の結果をもとに以下の観察対象群を決定し、染色体分析を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理 (pH 非調整群) : 0.43、0.85、1.7 mg/mL

S9 mix 非存在下の短時間処理 (pH 調整群) : 0.85、1.7 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理 (pH 非調整群) : 0.43、0.85、1.7 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理 (pH 調整群) : 0.85、1.7 mg/mL

その結果、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理したいずれの濃度群においても構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった。倍数性細胞については、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した高濃度群 (1.7 mg/mL) でのみ統計学的に有意な増加 (出現率: それぞれ 0.9% および 1.5%) が認められたが、同じ濃度の pH 調整群では統計学的有意差は認められなかった。

短時間処理した場合、構造異常の誘発が認められなかったことから、24 時間連続処理による染色体異常試験を行った。なお、短時間処理と同様に最高処理濃度を 10 mmol/L (1.7 mg/mL) とし、公比 2 で計 5 段階の濃度群を設定するとともに、pH 調整群 (0.85、1.7 mg/mL) も設定した。

細胞増殖率および分裂指数の結果をもとに以下の観察対象群を決定し、染色体分析を行った。

24 時間連続処理 (pH 非調整群) : 0.43、0.85、1.7 mg/mL

24 時間連続処理 (pH 調整群) : 0.85、1.7 mg/mL

その結果、24 時間連続処理した中濃度群および pH 調整した高濃度群において染色体の構造異常を有する細胞が統計学的に有意に増加 (出現率: 9.0% および 12.0%) し、pH 調整の有無にかかわらず染色体の構造異常が誘発された。倍数性細胞については、いずれの処理群においても統計学的有意差は認められなかった。

以上の結果より、*m*-ニトロ安息香酸は、本試験条件において CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

試験目的

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、*m*-ニトロ安息香酸の染色体異常誘発作用を評価するため、CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

試験ガイドラインと GLP

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、一部改正 平成 17 年 4 月 1 日) および「OECD 化学物質試験法ガイドライン 473/ほ乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験」(1997 年 7 月 21 日採択)に準拠し、「化学物質 GLP」(平成 15 年 11 月 21 日、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、最終改正 平成 17 年 4 月 1 日)を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である *m*-ニトロ安息香酸[別名:3-ニトロ安息香酸、英名:3-nitrobenzoic acid、略称:NBA、分子式: $C_7H_5NO_4$ 、ロット番号: 含量:99.4%、製造:]は、わずかにうすい黄色結晶性粉末である。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。被験物質は和光純薬工業株式会社から購入し、使用時まで密閉容器に入れ、遮光条件下で室温保管した。

被験物質原体の安定性については、被験物質購入先において、実験終了後に返却した被験物質の含量を分析した結果、被験物質は実験期間中安定であったことが確認された (Appendix 2、GLP 基準外)。なお、被験物質原体の安定性については GLP 下での確認はされていないが、化学的根拠に基づいた資料であることから、実験期間中安定であり、本試験の信頼性に影響しないと判断した。

2. 陽性対照物質

S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理用の陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC、ロット番号:466AEE、協和醗酵工業)を用いた。また、S9 mix 存在下の短時間処理用の陽性対照物質としてシクロホスファミド (CP、ロット番号:091K1176、Sigma Chemical)を用いた。これらの陽性対照物質を日局注射用水(ロット番号:K6A81 および K6F74、大塚製薬工場)に溶かし、原液 (MMC:20 $\mu\text{g/mL}$ 、CP:1 mg/mL)を用時調製して試験に用いた。

3. 細胞と培養条件

CHL/IU 細胞は、染色体数のモードが 25 本で、我が国において染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手(1988 年 2 月 10 日入手、入手時の継代数 4)し、継代後、液体窒素(気相)中に凍結保存(現在の継代数 23)した。その細胞(倍加時間約 15 時間、マイコプラズマの汚染なし)を、解凍後、継代 8 代(細胞増殖抑制試験)、5 代および 8 代(染色体異常試験)で試験に用いた。

培養には、仔牛血清 (CS、ロット番号:28019903、Cansera International および 4J0214、JRH Biosciences)を 10 vol%添加したイーグル MEM 培養液(10%CS/MEM)を用い、CO₂ インキュベーター

(5%CO₂, 37°C、加湿条件下)内で培養した。イーグル MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末(日水製薬)9.4 g に対して精製水を 1 L の割合で加えて溶解し、高压蒸気滅菌(121°C、15 分)したものに、L-グルタミン(日水製薬)を約 0.3 g、10 w/v%NaHCO₃ 水溶液を約 20 mL の割合となるように無菌的に混合して調製したものを用いた。

4. S9 反応液の調製

S9(ロット番号:RAA-541、2006 年 4 月 7 日製造および RAA-542、2006 年 4 月 21 日製造、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 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットの肝臓から調製したものを購入し、使用時まで超低温槽(-80°C)に保管した。グルコース-6-リン酸(G-6-P、Sigma Chemical)、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸(β-NADP⁺、オリエンタル酵母工業)および KCl を超純水に溶かし、混合液として超低温槽(-80°C)に保管し、使用時はこれに S9、MgCl₂および HEPES(pH 7.2)を加え、S9 mix とした。試験には、10%CS/MEM:S9 mix を 25:5 の割合で混和した S9 反応液(3 mL/ディッシュ)を加えて処理を行った(各成分の最終濃度:5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-NADP⁺、0.83 mmol/L MgCl₂、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度で水に不溶であったが、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したことから、溶媒として DMSO(ロット番号:KLG8126、和光純薬工業)を用いた。被験物質を必要量秤量し、溶媒を加えて溶解させ、原液(細胞増殖抑制試験および染色体異常試験ともに 170 mg/mL)を用時調製し、それを溶媒で段階希釈して種々の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を 1 vol%添加して処理を行った。

染色体異常試験については処理液の酸性化の影響を調べるために、pH を調整した処理液も調製して試験に用いた。S9 mix 非存在下用の処理液は、10%CS/MEM に被験物質調製原液(170 mg/mL、最終添加容量は 1 vol%)を加え、処理液の色が 10%CS/MEM と同程度になるまで 1 mol/L NaOH を加えたのち、さらに 10%CS/MEM を加えて所定の容量とし、処理原液(1.7 mg/mL)を調製した。また、その原液を DMSO を 1 vol%添加した 10%CS/MEM で 2 倍希釈した処理液(0.85 mg/mL)も調製した。S9 mix 存在下用の処理液は、10%CS/MEM(20 mL)に被験物質調製原液(170 mg/mL)を 300 μL 加え、処理液の色が 10%CS/MEM と同程度になるまで 1 mol/L NaOH を加えたのち、さらに S9 mix(5 mL)と 10%CS/MEM を加えて処理原液(1.7 mg/mL)を調製し、さらにそれを DMSO を 1 vol%含む S9 反応液で 2 倍希釈した処理液(0.85 mg/mL)も調製した。

なお、被験物質調製液の調製時に、発熱、発泡および変色などの変化の無いことを目視により確認した。

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。CHL/IU 細胞に 0.25%トリプシンを作用させ、 4×10^3 個/mL の単一細胞浮遊懸濁液を調製し、その 5 mL (2×10^4 個) をプラスチックディッシュ (直径 6 cm) に播種した。培養開始 3 日目に、以下の手順で短時間処理および連続処理を行った。すべての処理条件において、試験法ガイドラインに従い 10 mmol/L (1.7 mg/mL) の濃度を最高処理濃度とし、0.053~1.7 mg/mL の濃度範囲 (公比 2) で処理を行った。各群 2 枚のディッシュを用いた。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理する場合、各ディッシュの培養液をそれぞれ 10%CS/MEM および S9 反応液と交換 (3 mL/ディッシュ) した後、溶媒 (陰性対照) または各濃度の被験物質調製液 (30 μ L) を各ディッシュに添加し 6 時間処理した。処理後、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS, Ca^{2+} および Mg^{2+} を含む) で細胞を洗浄し、10%CS/MEM (5 mL/ディッシュ) でさらに 18 時間培養した。また、連続処理する場合には、各ディッシュの培養液を 10%CS/MEM と交換 (5 mL/ディッシュ) した後、溶媒 (陰性対照) または各濃度の被験物質調製液 (50 μ L) を各ディッシュに添加し 24 時間処理した。また、培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた結果、いずれの処理群においても沈殿は認められなかった。また、被験物質調製液を添加した際に、培養液の色が 0.85 mg/mL では橙色に、1.7 mg/mL では黄色に変化した。処理液の pH は測定しなかった。なお、処理終了時には培養液の黄色化は認められなかった。

培養終了後、10 vol%ホルマリン溶液で固定し、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™, オリンパス販売) を用い、陰性 (溶媒) 対照群と比較した各被験物質処理群の相対増殖率を測定した。

7. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、*m*-ニトロ安息香酸はすべての処理条件において CHL/IU 細胞の増殖を濃度依存的に抑制したが、短時間処理では 1.7 mg/mL 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。24 時間連続処理した場合には 50%を超える増殖抑制作用が認められたことから、増殖率 50%を挟む 2 点の回帰直線式から 50%の増殖抑制濃度を算出した結果、その濃度は 1.4 mg/mL と推定された (Figure 1)。

このことから S9 mix 非存在下および存在下での短時間処理ともに試験法ガイドラインに従い 10 mmol/L (1.7 mg/mL) の濃度を最高処理濃度とし、公比 2 で計 4 濃度設定して染色体異常試験を実施した。なお、細胞増殖抑制試験で被験物質調製液を添加した際に培養液の黄色化が認められたことから、0.85 mg/mL および 1.7 mg/mL の濃度群については、pH 測定用の処理液を別途調製 ($n=1$) し、pH メータ (PH81、横河電機) を用いて処理時の処理液 pH を測定したほか、処理液の pH を調整した pH 調整群も設定した。

試験操作は、細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。被験物質処理群、陰性 (溶媒) 対照群と陽性対照群を設けた。pH 調整群については、各ディッシュの培養液を pH 調整した処理液と交換して処理を行った。1 濃度あたり 4 枚のディッシュ (ただし、陽性対照群では 2 枚) を用い、そのうちの 2 枚は染色体標本作製し、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率を測定した。陽性対照群については、S9 mix 非存在下の短時間処理では、MMC (20 μ g/mL) を最終濃度が 0.1 μ g/mL となるように

添加した。また、S9 mix 存在下の短時間処理では、CP (1 mg/mL) を最終濃度が 10 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加した。なお、MMC および CP は上記の濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。また、処理開始時および終了時に処理液が黄色化した群については、処理液の pH を測定した。

短時間処理の結果、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ともに、構造異常を有する細胞の誘発が認められなかったことから、24 時間連続処理による染色体異常試験を実施した。なお、24 時間連続処理群においても、培養液の酸性化の影響を確認するために、処理液の pH を調整した群 (pH 調整群) も設定した。

試験操作は、細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。pH 調整群については、各ディッシュの培養液を pH 調整した処理液と交換して処理を行った。被験物質処理群、陰性 (溶媒) 対照群と陽性対照群を設けた。各群 4 枚のディッシュ (ただし、陽性対照群では 2 枚) を用い、そのうちの 2 枚は染色体標本を作製し、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率を測定した。陽性対照群については、MMC (20 $\mu\text{g/mL}$) を最終濃度が 0.05 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加した、なお、MMC はこの濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。また、処理開始時および終了時に処理液が黄色化した群については、処理液の pH を測定した。

培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加した。培養終了後、培養液を捨て、0.02 w/v% EDTA 含有 PBS (Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含) をディッシュあたり 5 mL 加えてピペettingにより細胞をはがし、細胞を遠沈管に移した。遠沈 (1000~1500 rpm、約 5 分) し、上清を捨てた後、3 mL の 0.075 mol/L KCl 水溶液を加え、約 30 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 (メタノール:氷酢酸 = 3:1 (v/v)) を約 6 mL 加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作を数回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス (あらかじめフロスト部分に試験番号、コード番号およびスライド番号を記入) 上に滴下し、そのまま風乾した。1 ディッシュあたり 4~6 枚のスライド標本を作製した。

作製したスライド標本を 3 vol% ギムザ液 (pH 6.8 の 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈調製) で染色後、水道水ですすいで風乾した。

8. 染色体分析

染色体分析に先立ち、1 枚のディッシュから得られた 1 枚の標本を用いて、濃度の高い方から分裂指数 (500 細胞/標本) を分析した。0.5% 未満の分裂指数を示した場合は染色体分析不能と判断し、また、標本あたりの分析可能な分裂中期細胞が少ない場合にはその数を考慮して、分析可能な最高濃度群を決定することとした。

ディッシュ 1 枚から得られたスライド標本 4 枚を、4 人の観察者がそれぞれ処理条件の分からない状態で分析した。染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を探し、1 群あたり 200 個 (100 細胞/ディッシュ、25 細胞/観察者) の分裂中期細胞 (染色体数: 23~27 本) について構造異常の種類と数を、1 群あたり 800 個 (400 細胞/ディッシュ、100 細胞/観察者) の分裂中期細胞について倍数性細胞 (染色体数が 38 本以上) の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を

求めた。

ギャップおよび切断を除く染色体異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会¹⁾による分類法に基づいて行った。ギャップおよび切断については、染色分体幅より狭い非染色性部位をギャップ、それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

染色体の構造異常(ギャップを除く)を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性対照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法²⁾($p < 0.01$ 、片側)により有意差検定を実施した。また、有意差の認められた処理条件についてはその用量依存性についてコクラン・アーミテッジの傾向性検定³⁾($p < 0.01$ 、片側)を実施することとした。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総合的に行った。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

試験計画書では、処理開始時および処理終了時に培養液の色調が陰性対照群と比較して明らかに黄変した処理群に関しては、処理液の pH を測定すると記載されていたが、細胞増殖抑制試験において培養液(処理液)が黄変したにもかかわらず、pH を測定しなかった。しかしながら、細胞増殖抑制試験は用量設定のための試験であることから、試験結果には影響しないと判断した。

上記の事態以外は本試験期間中に「予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと」はなかった。

試験成績と考察

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果をもとに、公比 2 で以下の濃度群設定し、短時間処理による染色体異常試験を実施した。また、被験物質調製液を添加した時に培養液の色が変化した 0.85 mg/mL と 1.7 mg/mL については処理液の pH を調整した pH 調整群も設定して試験を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理(pH 非調整群): 0.21、0.43、0.85、1.7 mg/mL

S9 mix 非存在下の短時間処理(pH 調整群): 0.85、1.7 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理(pH 非調整群): 0.21、0.43、0.85、1.7 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理(pH 調整群): 0.85、1.7 mg/mL

なお、沈殿の有無を肉眼で観察した結果、いずれの処理群においても培養液中に沈殿は認められなかった。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析結果をもとに、観察対象群を以下のように決定し、染色体分析を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理(pH 非調整群): 0.43、0.85、1.7 mg/mL

S9 mix 非存在下の短時間処理 (pH 調整群) : 0.85、1.7 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理 (pH 非調整群) : 0.43、0.85、1.7 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理 (pH 調整群) : 0.85、1.7 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合、pH 調整していない高濃度群 (1.7 mg/mL) においてのみ倍数性細胞の統計学的に有意な増加 (出現率: 0.9%、核内倍加した細胞を含む) が認められたが、それ以外は、構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的有意差は認められなかった (Table 1)。なお、処理液の pH は、pH 調整しなかった 0.85 mg/mL および 1.7 mg/mL の調製時ではそれぞれ 6.16 および 5.98 であったが、処理終了時には培養液の色の変化は認められなかった。また、pH 調整した 1.7 mg/mL の処理液の調製時の pH は 7.54 であった。

S9 mix 存在下で短時間処理した場合も同様に、pH 調整していない高濃度群 (1.7 mg/mL) においてのみ倍数性細胞の統計学的に有意な増加 (出現率: 1.5%) が認められ、それ以外はいずれも統計学的有意差は認められなかった (Table 2)。なお、処理液の pH は、pH 調整しなかった 0.85 mg/mL および 1.7 mg/mL の調製時ではそれぞれ 6.21 および 5.81 であったが、処理終了時には 1.7 mg/mL の濃度でのみ培養液の色の変化が認められ、その処理液 (2 ディッシュ) の pH は 6.75 および 6.57 であった。また、pH 調整した 1.7 mg/mL の処理液の調製時の pH は 7.38 であった。

以上のように、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合、構造異常の誘発が認められなかったことから、増殖抑制試験の結果をもとに以下の濃度群 (公比 2) を設定し 24 時間連続処理による染色体異常試験を実施した。

24 時間連続処理 (pH 非調整群) : 0.11、0.21、0.43、0.85、1.7 mg/mL

24 時間連続処理 (pH 調整群) : 0.85、1.7 mg/mL

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析結果をもとに、観察対象群を以下のように決定し、染色体分析を行った。

24 時間連続処理 (pH 非調整) : 0.43、0.85、1.7 mg/mL

24 時間連続処理 (pH 調整) : 0.85、1.7 mg/mL

その結果、pH を調整しなかった中濃度群 (0.85 mg/mL) で構造異常を有する細胞が統計学的に有意な増加 (出現率: 9.0%) したが、高濃度群 (1.7 mg/mL) ではやや高めの出現率 (5.0%) であったものの統計学的有意差は認められなかった (Table 3)。また、pH を調整した場合には、1.7 mg/mL の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 (出現率: 12.0%) が認められた。それ以外は、構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった (Table 3)。なお、処理液の pH は、pH 調整しなかった 0.43 mg/mL、0.85 mg/mL および 1.7 mg/mL の調製時ではそれぞれ 6.69、6.36 および 5.98 であったが、処理終了時には培養液の色の変化は認められなかった。また、pH 調整した 1.7 mg/mL の処理液の調製時の pH は 7.42 であった。

以上のように、構造異常については、pH 調整の有無にかかわらず、24 時間連続処理した場合に異常を有する細胞が有意に増加したことから、被験物質そのものによって構造異常が誘発されたと考えられる。また、倍数性細胞については、pH 調整しない場合にのみ、弱い出現率 (0.9% および 1.5%) で有意

差が認められ、pH 調整した場合には有意差は認められなかった。したがって、この結果については、出現率が低く、再現性が得られないことから、生物学的には陰性であると判断した。

陽性の結果が得られた 24 時間連続処理に関して D20 値⁴⁾を求めたところ、3.1 mg/mL となった。なお、pH 非調整群については酸性下での試験であったことから、pH 調整群の D20 値を採用した。

m-ニトロ安息香酸 (3-nitrobenzoic acid) 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 (試験番号: M-05-131) で陽性の結果が得られている。また、2-nitrobenzoic acid に関しては TA98 で陽性の結果が報告されているが、nitrobenzene に関しては TA98 および TA100 で陰性の結果が報告されている⁵⁾。Benzoic acid、isophthalic acid および terephthalic acid に関しては復帰突然変異試験では陰性^{6)~9)}の結果が報告されている。3-methylbenzoic acid に関しては復帰突然変異試験で陰性¹⁰⁾の結果が報告されている。

染色体異常に関しては、benzoic acid および terephthalic acid で構造異常陽性^{8)、9)}、3-methylbenzoic acid で構造異常陽性¹⁰⁾の結果が報告されている。

陽性対照物質として用いた MMC は、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理において染色体の構造異常を誘発し (Tables 1、3)、CP は短時間処理の S9 mix 存在下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。

以上の結果より、*m*-ニトロ安息香酸は本試験条件において CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

参考文献

- 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) 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)
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫 編集:「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)
- 4) 石館 基 監修:「〈改訂〉染色体異常試験データ集」, エル・アイ・シー, 東京 (1987)
- 5) 賀田恒夫, 石館基 監修:環境変異原データ集 1, サイエンティスト社, 東京, p.298 (1980)
- 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データ集, 社団法人日本化学物質安全・情報センター, 東京, p.84 (1996)
- 7) 石館基 監修, 微生物を用いる変異原性データ集, Life-Science Information Center, 東京, p.52-53 (1991)
- 8) 祖父尼俊雄 監修, 染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー, 東京, p.70 (1999)
- 9) 祖父尼俊雄 監修, 染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー, 東京, p.481 (1999)
- 10) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修:化学物質毒性試験報告 Vol.7, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p.297-322 (1999)

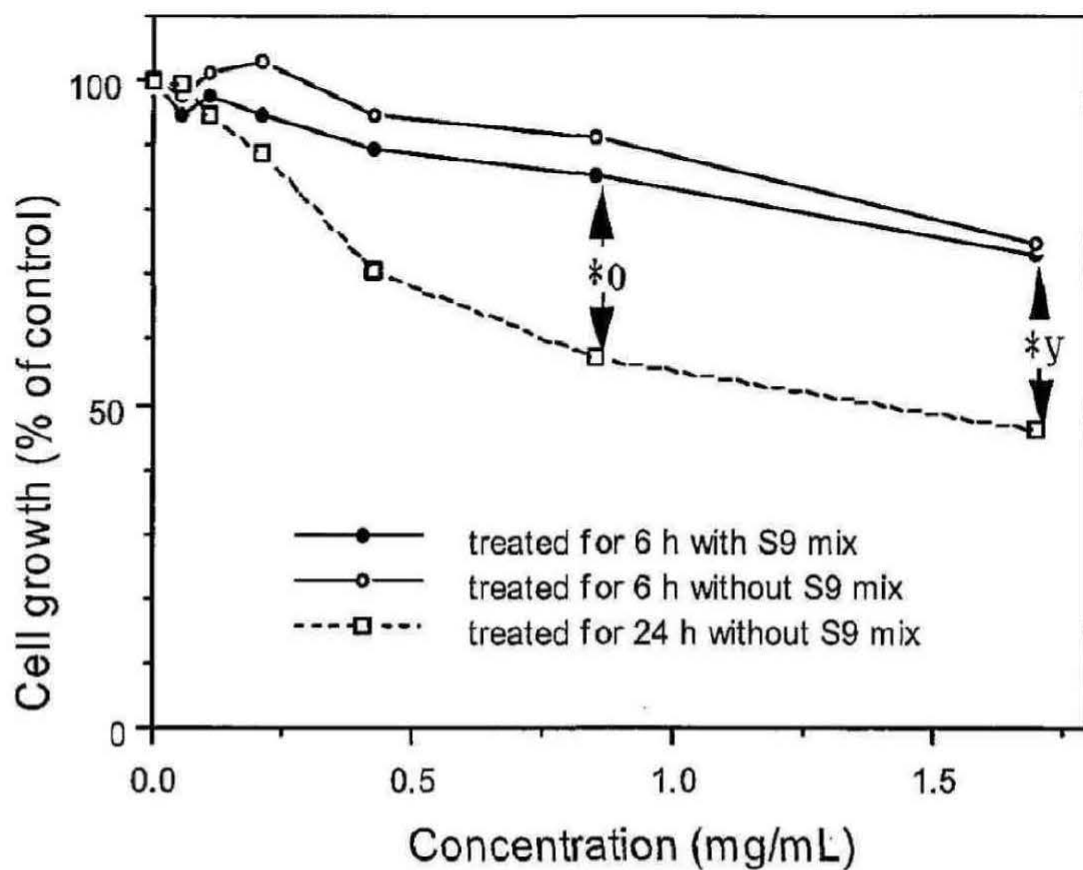


Figure 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 3-nitrobenzoic acid

At 0.85 mg/mL (*o) and 1.7 mg/mL (*y), medium color changed to orange and yellow, respectively, only at the beginning of the treatment.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 3-nitrobenzoic acid (NBA) for 6 h without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾		
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL	
Negative ¹⁾	0	—	6 - (18)	100	NA	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)			
						100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)			
						200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)			
NBA	0.21	—	6 - (18)	100	NA	not observed														
NBA	0.43	—	6 - (18)	99	NA	100	0	1	2	1	0	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	0 (0.0)			
						100	1	0	0	0	1	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	1 (0.3)			
						200	1	1	2	1	1	0	6	0	6 (3.0)	5 (2.5)	1 (0.1)			
NBA	0.85	—	6 - (18)	90	NA	100	0	0	1	3	1	0	5	0	2 (2.0)	2 (2.0)	2 (0.5)	NA	+	
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)			
						200	0	1	1	3	1	0	6	0	3 (1.5)	3 (1.5)	2 (0.3)			
NBA	1.7	—	6 - (18)	72	5.2, 7.2	100	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	5 (1.3)	#		
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)			
						200	0	2	0	1	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	7 *(0.9)			
NBA ^{pH-adjust}	0.85	—	6 - (18)	100	NA	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	NA	NA	
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)			
						200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	2 (0.3)			
NBA ^{pH-adjust}	1.7	—	6 - (18)	88	6.2, 5.6	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)			
						100	1	1	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	0 (0.0)			
						200	1	2	1	0	0	0	4	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0 (0.0)			
MMC	0.1 µg/mL	—	6 - (18)	NA	NA	100	2	12	47	2	0	0	63	1	40 (40.0)	39 (39.0)	0 (0.0)			
						100	1	26	61	0	0	0	88	3	50 (50.0)	49 (49.0)	0 (0.0)			
						200	3	38	108	2	0	0	151	4	90 (45.0)	88 *(44.0)	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); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM.

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.

#, An endoreduplicated cell was observed.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 3-nitrobenzoic acid (NBA) for 6 h with S9 mix

Group	Concen- tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾							
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL						
Negative ¹⁾	0	+	6 - (18)	100	NA	100	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)	NA	+						
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)								
						200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0 (0.0)								
NBA	0.21	+	6 - (18)	94	NA	not observed																			
NBA	0.43	+	6 - (18)	92	NA	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	1 (0.3)			NA					
						100	1	3	0	0	0	0	4	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)								
						200	2	4	0	0	0	0	6	0	5 (2.5)	4 (2.0)	1 (0.1)								
NBA	0.85	+	6 - (18)	85	NA	100	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)					NA			
						100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)								
						200	1	3	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0 (0.0)								
NBA	1.7	+	6 - (18)	69	4.8, 6.2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (1.8)							NA	
						100	0	2	0	0	0	0	2	0	1 (1.0)	1 (1.0)	5 (1.3)								
						200	0	2	0	0	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	12 *(1.5)								
NBA ^{pH-adjust}	0.85	+	6 - (18)	87	NA	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)	NA	NA						
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)								
						200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.1)								
NBA ^{pH-adjust}	1.7	+	6 - (18)	83	4.2, 4.4	100	1	1	0	1	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	1 (0.3)			NA					
						100	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)								
						200	1	1	1	1	0	0	4	0	4 (2.0)	3 (1.5)	3 (0.4)								
CP	10 µg/mL	+	6 - (18)	NA	NA	100	3	10	82	0	0	0	95	1	58 (58.0)	57 (57.0)	0 (0.0)					NA			
						100	2	20	72	2	0	0	96	1	62 (62.0)	61 (61.0)	2 (0.5)								
						200	5	30	154	2	0	0	191	2	120 (60.0)	118 *(59.0)	2 (0.3)								

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; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM.

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.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 3-nitrobenzoic acid (NBA) for 24 h without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (h)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾	
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ¹⁾	0	24	100	NA	100	1	2	0	3	0	0	6	0	4 (4.0)	3 (3.0)	1 (0.3)		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
					200	1	2	0	3	0	0	6	0	4 (2.0)	3 (1.5)	1 (0.1)		
NBA	0.11	24	93	NA	not observed													
NBA	0.21	24	89	NA	not observed													
NBA	0.43	24	74	NA	100	1	2	2	0	0	0	5	0	5 (5.0)	4 (4.0)	0 (0.0)		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)		
					200	1	2	2	0	0	0	5	0	5 (2.5)	4 (2.0)	1 (0.1)		
NBA	0.85	24	57	NA	100	0	5	0	1	0	0	6	0	5 (5.0)	5 (5.0)	0 (0.0)		
					100	2	8	4	1	0	0	15	1	14 (14.0)	13 (13.0)	0 (0.0)		
					200	2	13	4	2	0	0	21	1	19 (9.5)	18*(9.0)	0 (0.0)	+	NA
NBA	1.7	24	42	4.6, 3.8	100	3	5	0	1	0	0	9	0	9 (9.0)	6 (6.0)	1 (0.3)		
					100	1	3	0	1	0	0	5	0	5 (5.0)	4 (4.0)	0 (0.0)		
					200	4	8	0	2	0	0	14	0	14 (7.0)	10 (5.0)	1 (0.1)		
NBA ^{pH-adjust}	0.85	24	66	NA	100	0	4	0	1	0	0	5	0	5 (5.0)	5 (5.0)	0 (0.0)		
					100	2	3	2	0	0	0	7	0	6 (6.0)	4 (4.0)	0 (0.0)		
					200	2	7	2	1	0	0	12	0	11 (5.5)	9 (4.5)	0 (0.0)	+	NA
NBA ^{pH-adjust}	1.7	24	52	4.6, 2.8	100	3	12	6	1	1	0	23	0	21 (21.0)	18 (18.0)	0 (0.0)		
					100	3	5	1	0	0	0	9	0	9 (9.0)	6 (6.0)	0 (0.0)		
					200	6	17	7	1	1	0	32	0	30 (15.0)	24*(12.0)	0 (0.0)		
MMC	0.05 µg/mL	24	NA	NA	100	0	43	67	0	0	0	110	0	54 (54.0)	54 (54.0)	0 (0.0)		
					100	1	30	56	1	0	10	98	0	55 (55.0)	54 (54.0)	0 (0.0)		
					200	1	73	123	1	0	10	208	0	109 (54.5)	108*(54.0)	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); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM.

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.