

既存化学物質毒性試験：

変異原性に関する研究

国立衛生試験所

安全性生物試験研究センター

変異原性部

目的

当試験所，安全性生物試験研究センターで行われている既存化学物質毒性試験の一環として，下記の検体について微生物を用いる遺伝子突然変異試験，ならびに哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を分担する。

被験物質

Pentaerythritol

Cyclohexyl chloride

Diheptyl phthalate

Pigment blue-15

上記検体は，当所，安全性生物試験研究センター・毒性部および病理部で試験に供したものである。

試験方法

1. 微生物を用いる遺伝子突然変異試験

サルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*)
TA100(塩基置換型変異原検出用), TA98, TA97
(フレームシフト型変異原検出用), および
TA102 (架橋型, 酸化型変異原検出用)の4菌株を用い, 代謝活性化法を併用してAmes試験を行った^{1, 2)}. 代謝活性化法に必要なS9はFischerラット雄(5週令, 80-100g)にKC-400を500mg/kg投与した(i.p.)後, 常法に従って調製した. S9mix (0.5ml)中には, S9(50 μ l), G6P(2.5 μ mol), NADPH(2 μ mol), NADH(2 μ mol), MgCl₂(4 μ mol), KCl(16.5 μ mol), リン酸ナトリウム(pH7.4, 40 μ mol)が含まれている. 菌体を被験物質及びS9mixと共に, 37℃で20分間ブレインキュベートした後, 寒天平板上に重層し, さらに2日間培養後, 復帰突然変異コロニー(His⁺)数を計測した.

被験物質は dimethylsulfoxide(DMSO)に溶解または懸濁し, 指標菌株に殺菌効果を示す

濃度まで、あるいは、殺菌効果を示さない場合には、5mg/プレートまで濃度を上げて試験を行った。濃度段階は原則として8段階とし、濃度に依存して誘発復帰変異コロニー数が上昇し、しかもその数が自然復帰コロニー数の2倍を越えた場合を陽性とする。陽性対照としては、-S9mixの条件下ではTA100, TA98にAF-2, TA102にマイトマイシンC (MMC), TA97にICR-191を、+S9mixの条件下では、いずれの株に対しても2-アミノアントラセン (2AA) を用いた。

2. 哺乳類培養細胞による染色体異常試験

チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL) を用い、直接法および代謝活性化法による染色体異常試験を行った^{3, 4)}。

直接法においては、細胞 2×10^4 個を6cmのプラスチックシャーレに播き、3日目に検体を加え、24時間および48時間後に染色体標本作製した。検体濃度は予備試験によって、細

胞増殖が約 50%抑制される濃度を求め、それを指標として3濃度（原則として公比2）を設定した。予備試験で毒性が観察されない場合には、10mM程度を最高濃度とした。

代謝活性化法においては、細胞播種後3日目に被験物質をS9mixと共に6時間処理し、さらに18時間培養した後、染色体標本を作製した。S9はAmes試験で用いたものと同様、KC-400処理したFischerラットの肝から調製したものである。

Cyclohexyl chlorideについては、培養液に加えて超音波で乳濁させた後、その液をプレート中の培養液の20%と交換して処理を行った。またpigment blue-15は、最初にDMSOにほゞ溶かしてから培養液を加えて超音波で乳濁させ、プレート中の培養液10%と交換した。他の2被験物質については、salineあるいはDMSOに懸濁させた後、直接プレート中の培養液に添加して処理を行った。

染色体異常の観察は、各濃度当り100個の

分裂中期像について行い、染色分体型あるいは染色体型の構造異常（ギャップ、切断、交換など）をもつ細胞の出現頻度を記録した。さらに、倍数体（染色体数が倍化した細胞）についても併せて記録した。結果の判定は、未処理及び溶媒処理の対照群では通常4%以上の異常はみられないため、5%未満を陰性（-）、5%以上10%未満を疑陽性（±）、10%以上を陽性（+）とする。

試験結果および考察

微生物による遺伝子突然変異試験では、今回供試された被験物質 pentaerythritol, cyclohexyl chloride, diheptyl phthalate, および pigment blue-15は、いずれの菌株においてもS9mixの有無にかかわらず、有意な復帰変異コロニー数の増加は観察されなかった（表1）。

チャイニーズ・ハムスター培養細胞による染色体異常試験の結果を表2、表3に示す。

Pentaerythritol及びdiheptyl phthalateについては，10mM(1.4及び3.6mg/ml)を越える2.0及び4.0mg/mlにおいても顕著な毒性作用が観察されなかったので，それらを最高濃度とした．Pigment blue-15は，予備試験の結果3.0mg/mlの濃度で細胞の増殖を約50%阻害する毒性効果が認められ，しかもそれ以上の濃度ではDMSOに溶解しないため，3.0mg/mlを最高濃度とした．Cyclohexyl chlorideでは，0.5mg/ml以上の濃度で著しい致死作用が観察された．しかし4被験物質はいずれも，直接法および代謝活性化法共に，染色体の構造的異常の誘発は認められなかった．また，倍数体についても有意な増加は認められなかった．

Diheptyl phthalate, pigment blue-15(別名 copper phthalocyanine blue)及びpentaerythritolについては，今回の我々の実験結果と同様，Ames試験で陰性の結果が報告されている^{5,6,7,8,9}．さらに，diheptyl phthalateについては枯草菌を用いる repair

test で陰性⁵⁾, pigment blue-15 については,
ラット肝初代培養細胞を用いる UDS (不定期
DNA合成) 試験, マウスリンパ腫細胞を用いる
遺伝子突然変異試験, マウス C3H/10T1/2 細
胞を用いる cell transformation assay で陰
性⁶⁾と報告されている.

文 献

- 1) Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki: Mutat. Res., 31, 347 (1975)
- 2) Maron, D. M. and B. N. Ames: Mutat. Res., 113, 173 (1983)
- 3) Ishidate, M., Jr. and S. Odashima: Mutat. Res., 48, 337 (1977)
- 4) 祖父尼俊雄、松岡厚子: 環境変異原研究 5, 4 (1984)
- 5) Omori, Y.: Environ. Health Perspect., 17, 203 (1976)
- 6) Manandhar, M., P. Bahr, L. Dulak, J. C. Eastman and M. J. Iatropoulos: Environ. Mutagen., 4, 393 (1982)

- 7) Milvy, P. and K. Kay: J. Toxicol.
Environ. Health, 4, 31 (1978)
- 8) Shimizu, H., Y. Suzuki, N. Takemura,
S. Goto and H. Matsushita: Jpn. J.
Ind. Health, 27, 400 (1985)
- 9) Cosmetic Ingredient Review Expert
Panel: J. Am. Coll. Toxicol., 2, 35
(1983)
- 10) Shibuya, T., N. Tanaka, M. Katoh, Y.
T. Matsuda and K. Morita: J. Toxicol.
Sci., 10, 135 (1985)
- 11) Buttar, H. S., S.H.H. Swierenga and
T. I. Matula: Toxicol. Lett., 31, 65
(1986)
- 12) Long, S. D., A. J. Warren and J. B.
Little: Carcinogenesis, 3, 553 (1982)
- 13) Cordero, J. F. and P. M. Layde: Am.
J. Hum. Genet., 33, 74A (1981)

表 1 微生物を用いる遺伝子突然変異試験

検体	溶媒	濃度 (μ g/plate)	TA100		TA98		TA102		TA97		判定
			-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
Pentaerythritol	DMSO	0	147	183	13	20	289	349	246	299	—
		25	211	177	19	18	410	550	282	339	
		50	229	190	13	15	419	587	257	332	
		100	217	175	12	17	407	559	253	306	
		250	161	169	11	12	366	525	240	285	
		500	191	171	13	13	304	513	238	362	
		1000	168	151	17	13	370	512	249	325	
		2500	217	155	13	18	413	559	241	273	
		5000	138	173	11	24	366	528	240	351	
Cyclohexyl chloride	DMSO	0	147	183	13	20	310	349	246	299	—
		25	186	175	8	12	426	486	251	278	
		50	176	186	14	18	357	482	257	300	
		100	173	180	14	12	396	498	229	306	
		250	180	205	8	10	176	463	174	279	
		500	152	181	4	20	84	456	147	170	
		1000	44	128	LE	LE	LE	374	27	82	
		2500	LE	LE	LE	LE	LE	81	LE	LE	
		5000	LE	LE	LE	LE	LE	LE	LE	LE	
Diheptyl phthalate	DMSO	0	147	183	13	20	310	349	246	299	—
		25	184	180	15	26	397	466	284	309	
		50	199	148	10	22	428	449	219	366	
		100	187	177	11	20	413	492	261	287	
		250	181	191	8	23	395	432	257	280	
		500	187	198	9	28	329	529	247	338	
		1000	200	170	9	34	312	455	268	362	
		2500	188	170	5	28	285	447	218	313	
		5000	236	155	7	20	311	449	218	299	
Pigment blue-15	DMSO	0	175	147	16	33	335	477	198	294	—
		25	133	154	20	33	360	559	286	313	
		50	160	161	30	28	376	532	221	325	
		100	226	151	17	35	385	574	189	302	
		250	174	171	24	26	382	627	192	258	
		500	177	153	24	25	426	456	215	267	
		1000	156	124	21	30	361	383	195	239	
		2500	114	123	29	32	350	375	201	274	
		5000	153	133	19	27	321	410	177	257	
陽性対照											
AF-2	DMSO	0.02	1010								
		0.05			207						
MMC	D.W.	0.01					1386				
ICR-191	DMSO	0.1							840		
2AA	DMSO	2	2982		2698						1400
		10					2504				

値はすべて2プレートの平均

表2 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（直接法）

被験物質名	S 9 mix	時間*	溶媒	濃度 (mg/ml)	観察 細胞数	倍数体		染色体構造異常をもつ細胞の出現頻度(%)***								判定
						(%)	判定	ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total		
Pentaerythritol	—	24-0	Saline	0(Solvent)	100	2.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
				0.5	100	6.0	±	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—	
				1.0	100	2.0	—	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	—	
				2.0	100	1.0	—	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	2.0	—	
	—	48-0	Saline	0(Solvent)	100	4.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
				0.5	100	1.0	—	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	—	
				1.0	100	3.0	—	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	—	
				2.0	100	3.0	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—	
Cyclohexyl chloride	—	24-0	Medium**	0(None)	100	1.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
				0.062	100	2.0	—	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	—	
				0.125	100	0.0	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—	
				0.25	100	0.0	—	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	—	
	—	48-0	Medium**	0(None)	100	2.0		0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
				0.062	100	2.0	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—	
				0.125	100	1.0	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—	
				0.25	100	0.0	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—	
Diheptyl phthalate	—	24-0	DMSO	0(Solvent)	100	4.0		1.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	3.0		
				1.0	100	0.0	—	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	—	
				2.0	100	1.0	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	—	
				4.0	100	1.0	—	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	—	
	—	48-0	DMSO	0(Solvent)	100	1.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
				1.0	100	1.0	—	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	—	
				2.0	100	1.0	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—	
				4.0	100	2.0	—	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	—	
Pigment blue-15	—	24-0	DMSO***	0(None)	100	1.0		1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
				0(Solvent)	100	1.0		1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
				0.75	100	1.0	—	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	—	
				1.5	100	3.0	—	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	—	
				3.0	100	2.0	—	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	—	
	—	48-0	DMSO***	0(None)	100	1.0		1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
				0(Solvent)	100	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
				0.75	100	2.0	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—	
				1.5	100	1.0	—	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	—	
				3.0	100	2.0	—	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	—	

* 処理時間—回復時間, ** Mediumに加え超音波で乳濁（本文参照）, *** DMSOに溶解後 mediumに加え超音波で乳濁（本文参照）,
 *** ctg:染色分体ギャップ(染色体ギャップを含める), ctb:染色分体切断, cte:染色分体交換, frg:断片化, csb:染色体切断, cse:染色体交換

表3 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(代謝活性化法)

被験物質名	S 9 mix	時間* (h)	溶媒	濃度 (mg/ml)	観察細胞数	倍数体		染色体構造異常をもつ細胞の出現頻度(%)***								判定
						(%)	判定	ctg	ctb	cte	frg	csb	cse	total		
Pentaerythritol	-	6-18	Saline	0(Solvent)	100	4.0		1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
				0.5	100	1.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
				1.0	100	4.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
				2.0	100	3.0	-	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
	+	6-18	Saline	0(Solvent)	100	1.0		1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
				0.5	100	2.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
				1.0	100	1.0	-	2.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-	
				2.0	100	2.0	-	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
Cyclohexyl chloride	-	6-18	Medium**	0(None)	100	1.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
				0.125	100	1.0	-	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
				0.25	100	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	-	
				0.5	100	2.0	-	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
	+	6-18	Medium**	0(None)	100	0.0		0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
				0.125	100	0.0	-	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
				0.25	100	1.0	-	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	
				0.5	100	3.0	-	1.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	4.0	-	
Diheptyl phthalate	-	6-18	DMSO	0(Solvent)	100	3.0		0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
				1.0	100	6.0	±	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
				2.0	100	1.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
				4.0	100	2.0	-	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	-	
	+	6-18	DMSO	0(Solvent)	100	1.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
				1.0	100	0.0	-	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	
				2.0	100	1.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	2.0	-	
				4.0	100	1.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
Pigment blue-15	-	6-18	DMSO***	0(Solvent)	100	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
				0.75	100	1.0	-	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	
				1.5	100	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
				3.0	100	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
	+	6-18	DMSO***	0(Solvent)	100	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
				0.75	100	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
				1.5	100	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
				3.0	100	2.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	-	

* 処理時間-回復時間, ** Mediumに加え超音波で乳濁(本文参照), *** DMSOに溶解後 mediumに加え超音波で乳濁(本文参照),
 *** ctg:染色分体ギャップ(染色体ギャップを含める), ctb:染色分体切断, cte:染色分体交換, frg:断片化, csb:染色体切断, cse:染色体交換