

厚生省生活衛生局 殿

試 験 報 告 書

2,3,6-トリメチルフェノールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号: 7L641)

1998年12月10日

株式会社三菱化学安全科学研究所

目次

要約	7
材料および方法	8
1. 試験物質	8
2. 細胞	9
3. 培地	9
4. S9 mix	9
5. 試験物質調製液	10
6. 細胞増殖抑制試験	10
7. 染色体異常試験	11
8. 確認試験	14
結果	15
考察および結論	15
参考文献	16
表	17
図	23
写真	27

要 約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い、2,3,6-トリメチルフェノールの *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果、50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理法の24, 48時間処理で124, 71 $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法のS9 mix 共存下、非共存下で108, 119 $\mu\text{g/ml}$ であった。従って、染色体異常試験は、連続処理法および短時間処理法ともに200 $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、その1/2, 1/4 および 1/8 の4濃度で実施した。

その結果、染色体構造異常細胞の出現頻度は短時間処理法のS9 mix 共存下の200 $\mu\text{g/ml}$ で11.0%、非共存下の200 $\mu\text{g/ml}$ で11.5%であった。

連続処理法では、構造異常細胞の出現頻度は24時間の100 $\mu\text{g/ml}$ で5.0%を、48時間では25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ でそれぞれ2.0, 11.5, 38.0, 18.1%を示した。このため再現性および用量依存性を確認するために、連続処理法の24時間, 48時間ともに200, 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ の5濃度で確認試験を実施した。その結果、構造異常細胞の出現頻度は48時間処理の50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ においてそれぞれ9.5, 13.5, 8.5%であった。

また、数的異常細胞の誘発は全ての処理条件で観察されなかった。

以上の結果から、本試験条件下における2,3,6-トリメチルフェノールのCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と結論した。

材料および方法

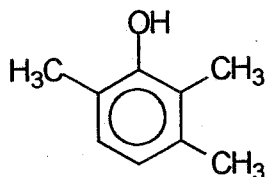
1. 試験物質

1.1 被験物質

本州化学工業株式会社から送付された2,3,6-トリメチルフェノール(CAS番号：2416-94-6, ロット番号：971209, 純度：99.67%)は, 使用時まで室温暗所に保存した。被験物質は下記の構造式および分子量を有する水に微溶, ジメチルスルホキシド, アセトン, アルコールに易溶の淡黄色固体である。

被験物質の安定性は, 被験物質供給者より安定性を保証する資料を入手し, 確認した。

構造式：



分子量：136.19

不純物：2,4,6-トリメチルフェノール 0.08%

2,5-キシレノール 0.05%

1.2 対照物質

1) 陰性対照物質

アセトン (国産化学株, ロット番号：A605G1)

2) 陽性対照物質

(1) 連続処理法

マイトマイシンC (MMC と略す, 協和醗酵工業株, ロット番号：149AFL, 含量 107%)

(2) 短時間処理法

ベンゾ[a]ピレン (BP と略す, 東京化成工業株, ロット番号：AX01, 含量 99.5%)

2. 細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を使用した。細胞は大日本製薬㈱より 1996 年 11 月 6 日に購入し、細胞懸濁液に対し 10 % の割合でジメチルスルホキシド (DMSO と略す) を添加したものを 1 ml に小分けして、液体窒素中で凍結保存した。試験には、これを融解して培養し、その後の継代数が 5 代以内のものを使用した。細胞の培養には、プラスチックシャーレ (直径 6 cm または 10 cm ; Becton Dickinson and Company) を用い、炭酸ガス細胞培養装置内 (NAPCO 社, 7300 型, 炭酸ガス 5 %, 温度 37 °C, 加湿) で培養した。

3. 培地

3.1 イーグル最少培地

イーグル最少培地 (MEM と略す。イーグル MEM 培地「ニッスイ」①, 日本製薬㈱) を添付の処方に従い調製し、オートクレーブ滅菌 (121 °C, 15 分間) を行った。この 1 l に、別に滅菌処理した 2.92 % L-グルタミン水溶液 10 ml と 10 % 炭酸水素ナトリウム水溶液 12.7 ml を添加した。

3.2 培養液

上記の MEM 900 ml に対して、非働化 (56 °C, 30 分間加熱処理) した仔牛血清 (GIBCO BRL, ロット番号 : 39K0464) を 100 ml 添加した。

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール (1 日目 30 mg/kg, 2 日目以降 60 mg/kg を 3 日間 1 日 1 回腹腔内投与) と 5, 6-ベンゾフラボン (3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与) で酵素誘導した SD 系雄ラット肝由来 S9 (キッコーマン㈱, ロット番号 : RAA-374, 1997 年 12 月 4 日製造) を購入し、使用した。使用時まで -80 °C 以下で保存した。

4.2 S9 mix

S9 mix 10 ml あたり以下の組成で用時調製し、使用時まで氷中に保存した。

D- グルコース 6- リン酸	14.1 mg
β -NADP ⁺	33.5 mg
(以上, 用時秤量)	
20 mM HEPES (pH 7.2)	2 ml
50 mM 塩化マグネシウム六水和物	1 ml
330 mM 塩化カリウム	1 ml
精製水	3 ml
(以上, 予め滅菌調製した溶液を添加)	
S9	3 ml

5. 試験物質調製液

5.1 被験物質溶液

溶媒検討の結果、本被験物質は、局方生理食塩液には 50 mg/ml で不溶であった。DMSO には約 666 mg/ml が調製限界であった。アセトンには 500 mg/ml で溶解した。これらの結果から、本被験物質の溶媒はアセトンを用いた。

被験物質をアセトンで所定濃度に用時溶解した。これを同じ溶媒を用いて希釈し、所定濃度の被験物質溶液を調製した。

5.2 陽性対照溶液

MMC は、局方生理食塩液（株大塚製薬工場，ロット番号：K7F75）で 3 μ g/ml に用時調製した。BP は、DMSO（関東化学株，ロット番号：810S1814）で 4 mg/ml に溶解し、凍結保存したものを室温で融解し使用した。

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の処理濃度を決定するために、細胞増殖抑制試験を実施した。

6.1 被験物質濃度

細胞増殖抑制試験に先立ち、連続処理法の 24, 48 時間処理および短時間処理法の S9 mix 共存下で、5000, 500, 50 μ g/ml の 3 濃度で予備試験を実施した。この試験では、1 濃度あたり 1 枚のシャーレを用い、処理 24 または 48 時間後に位相差倒立顕微鏡で細胞の状態を肉眼的に観察した。

その結果、陰性対照群を 100 % としたときの細胞生存率は、連続処理法の 24, 48 時間では 5000 および 500 μ g/ml で 0 %, 50 μ g/ml で 90 %, 短時間処理法の S9 mix

共存下では 5000 および 500 $\mu\text{g/ml}$ で 0 %， 50 $\mu\text{g/ml}$ で 60 % であった。

以上の結果から，細胞増殖抑制試験は，連続処理法および短時間処理法の S9 mix 非共存下については 500, 400, 300, 200, 100, 50 および 25 $\mu\text{g/ml}$ の 7 濃度，短時間処理法の S9 mix 共存下については 500, 400, 300, 200, 100, 50, 25, 12.5 および 6.25 $\mu\text{g/ml}$ の 9 濃度を設定した。

6.2 細胞処理

4×10^3 個/ml の細胞懸濁液を 6 cm シャーレに 5 ml 播き，3 日間培養した。

シャーレから培養液を除去した後，連続処理法では，被験物質溶液 0.05 ml，培養液 5 ml で 24 または 48 時間細胞を処理した。

短時間処理法では，S9 mix 共存下は，被験物質溶液 0.03 ml，S9 mix 0.5 ml，培養液 2.5 ml で，また，S9 mix 非共存下は，被験物質溶液 0.03 ml，培養液 3 ml で 6 時間細胞を処理した後，MEM で 3 回洗浄し，新しい培養液 5 ml でさらに 18 時間処理した。

陰性対照として，溶媒も各条件で同様に処理した。

各濃度あたり 2 枚のシャーレを用いた。

6.3 細胞増殖率の測定

細胞表面を Ca^{2+} , Mg^{2+} フリーのリン酸緩衝液 (PBS (-) と略す。ダルベッコ PBS 「ニッスイ」，日水製薬㈱) で洗浄し，メタノールで 10 分間固定し，3 % ギムザ液 (1/15M リン酸緩衝液，pH 6.8，で希釈) で 10 分間染色後，軽く水洗し，乾燥した。染色した各シャーレについて，単層培養細胞密度計 (モノセレーター，オリンパス光学工業㈱) を用いて細胞増殖率を測定した。

6.4 50 % 細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) の算出

連続処理法および短時間処理法のそれぞれについて，陰性対照値を 100 % として生存曲線を作成し，被験物質の 50 % 細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) を算出した。なお， IC_{50} は，プロビット法により算出した。

7. 染色体異常試験

7.1 試験物質濃度

細胞増殖抑制試験の結果は図 1 ~ 2 に示すごとく， IC_{50} は連続処理法の 24, 48 時間処理で 124, 71 $\mu\text{g/ml}$ ，短時間処理法の S9 mix 共存下，非共存下で 108, 119 $\mu\text{g/ml}$ で

あった。

この結果より、連続処理法および短時間処理法ともに 200 $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、その 1/2, 1/4 および 1/8 の 4 濃度で染色体異常試験を実施した。

陽性対照である MMC, BP の濃度はそれぞれ、染色体異常誘発性が知られている 0.03, 20 $\mu\text{g/ml}$ とした。

7.2 細胞処理

細胞を 6.2 と同様に処理した。

陽性対照については、連続処理法では、培養液 5 ml, MMC 溶液 0.05 ml で、短時間処理法の S9 mix 共存下では培養液 2.5 ml, S9 mix 0.5ml, BP 溶液 0.015 ml で、S9 mix 非共存下では培養液 3 ml, BP 溶液 0.015 ml で同様に細胞を処理した。

7.3 標本作製

処理終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 $\mu\text{g/ml}$ となるように各シャーレに加え、分裂中期の細胞を蓄積させた。処理終了後、細胞表面を PBS (-) で 1 回洗浄し、0.25 % トリプシン処理により細胞を剥離した後、遠心分離 (1000 rpm, 5 分間; 以下同じ) により細胞を集めた。上清を除去し、これに 0.075 M 塩化カリウム溶液 4 ml を加えて低張処理 (37 °C, 15 分) を行った。次に、冷却したメタノール・酢酸 (3:1) 混合液 4 ml を加え細胞を固定した後、遠心分離し、上清を除去した。さらに同固定液 4 ml を加え、同様の操作を 2 ~ 3 回繰り返した。固定終了後、少量の固定液で細胞を懸濁し、濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラス上の 2 箇所水滴下し、乾燥した。これを 3 % ギムザ溶液で 20 分間染色し、水洗、乾燥後、封入して観察標本とした。各シャーレにつき 2 枚の標本作製した。

7.4 観 察

1) 予備鏡検

標本作製後、試験の適否確認のため予備鏡検を行った。

その結果、1 枚のシャーレあたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られなかった標本は観察の対象から除外し、結果表に“TOX”と記載した。

陰性対照および陽性対照については、各々構造異常細胞の出現状態が適切であることを確認した。

2) 分裂指数/分裂活性

予備鏡検時に、シャーレ 1 枚につき 1000 個、1 濃度 2000 個の細胞中の分裂中期細

胞を数え、分裂指数を求めた。またこれから陰性対照群と各処理群の分裂指数の比（分裂活性）を算出した。

3) 構造異常および数的異常

陰性対照群、陽性対照群および被験物質処理群について、構造異常および数的異常を盲検法で観察した。

(1) 構造異常

シャーレ1枚につき100個、1濃度200個の細胞を調べた。

染色体がよく拡がった分裂中期細胞を観察し、構造異常細胞を数えた。ただし、構造異常がなく、染色体数が 25 ± 2 本でない細胞は除外した。異常の分類は以下のとおりとした¹⁾。

{	ギャップ	(染色分体型および染色体型を含む; gap と略す)
	染色分体型切断	(ctb と略す)
	染色分体型交換	(cte と略す)
	染色体型切断	(csb と略す)
	染色体型交換	(二動原体, 環状染色体など; cse と略す)
	断片化	(frg と略す)

ギャップは、染色分体に見られる非染色部分が染色分体の軸上にあり、その幅が染色分体の幅以上で著しく離れておらず、非染色部分の形状が明確なものとし、切断とは区別した。

(2) 数的異常

シャーレ1枚につき100個、1濃度200個の分裂中期細胞を調べ、核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた。

7.5 試験結果の判定基準

構造異常を1個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし、ギャップのみの異常をもつ細胞を除いた場合 (-gap) と含めた場合 (+gap) で集計した。なお、観察可能な分裂中期細胞が50個未満の場合は集計から除外し、結果表には“TOX”と記載した。

被験物質の染色体異常誘発性の判定は、+gapの構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に5%未満を陰性(-)、いずれか一方または両方が5%以上10%未満を疑陽性(±)、いずれか一方または両方が10%以上を陽性(+)とした。

7.6 結果のまとめ

染色体構造異常をもつ細胞および数的異常細胞の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度(%)を表示するとともに、用量依存性について図示した。また、結果が陽性の場合にはD₂₀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

質濃度, mg/ml) を算出し, 代表的な染色体異常像の写真を添付した。

8. 確認試験

染色体異常試験の結果, 連続処理法の 24 時間処理では判定は疑陽性であり, 48 時間処理では用量依存性が認められなかったことから, 再現性および用量依存性を確認するために, 連続処理法の 24 時間, 48 時間ともに 200, 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ の 5 濃度で確認試験を実施した。

処理方法等については, 7 項に準じた。

結 果

結果を表 1～6 および図 3～8 に示す。

短時間処理法において構造異常細胞の出現頻度は S9 mix 共存下の 200 $\mu\text{g/ml}$ で 11.5 %，非共存下の 200 $\mu\text{g/ml}$ で 11.0 %であった。連続処理法において構造異常細胞の出現頻度が 24 時間の 100 $\mu\text{g/ml}$ では 5.0 %，48 時間の 25，50，100，200 $\mu\text{g/ml}$ でそれぞれ 2.0，11.5，38.0，18.1 %であった。このため，再現性および用量依存性の確認のために，連続処理法の 24 時間，48 時間ともに 200，100，50，25，12.5 $\mu\text{g/ml}$ の 5 濃度で確認試験を実施した。その結果，48 時間処理の 50，100，200 $\mu\text{g/ml}$ おいて構造異常細胞の出現頻度はそれぞれ 9.5，13.5，8.5 %であった。その他の処理条件では 5 %未満であった。また，いずれの処理条件においても被験物質による数的異常細胞の出現頻度は 5 %未満であった。

D_{20} 値は，連続処理法の 48 時間処理では 0.053 mg/ml (本試験)，0.15 mg/ml (確認試験)，短時間処理法では S9 mix 非共存下 0.39 mg/ml，共存下 0.41 mg/ml であった。

なお，陽性対照による染色体構造異常細胞の出現頻度は著しく増加した。

考 察 お よ び 結 論

2,3,6-トリメチルフェノールの染色体異常誘発性を検討するため，ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。その結果，染色体構造異常の出現頻度は短時間処理法において S9 mix 共存下の 200 $\mu\text{g/ml}$ で 11.5 %，非共存下の 200 $\mu\text{g/ml}$ で 11.0 %，連続処理法において 24 時間の 100 $\mu\text{g/ml}$ では 5.0 %，48 時間では，25，50，100，200 $\mu\text{g/ml}$ でそれぞれ 2.0，11.5，38.0，18.1 %を示した。再現性および用量依存性を確認するために，連続処理法の 24 時間，48 時間ともに 200，100，50，25，12.5 $\mu\text{g/ml}$ の 5 濃度で確認試験を実施した。その結果，48 時間処理の 50，100，200 $\mu\text{g/ml}$ おいて染色体構造異常細胞の出現頻度はそれぞれ 9.5，13.5，8.5 %であった。

その他の処理条件では 5 %未満であった。数的異常細胞の出現頻度は，連続処理法および短時間処理法のいずれも 5 %未満であった。

一方、陰性対照および陽性対照では染色体構造異常を有する細胞の出現頻度は期待通りの値を示し、本試験が技術的に成立していることが示された。

従って、2,3,6-トリメチルフェノールの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と結論した。

なお、同物質あるいは類似化合物における染色体異常誘発性に関する他の情報は得られなかった。

参 考 文 献

- 1) 日本環境変異学会・哺乳動物試験分科会：“化学物質による染色体異常アトラス”
朝倉書店，東京，1988

表1 染色体異常試験結果(連続処理法) [本試験]

被験物質名: 2, 3, 6-トリメチルフェニール

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	数的異常細胞の出現頻度 (%)	判別(%)	染色体構造異常細胞(1)の出現数と出現頻度 (%)										計	判別(%)
						ギャップ		染色体分体型		染色体型		cse	frg	合			
						gap	ctb	cte	csb	ctb	cte			-gap	+gap		
溶媒 [アセトン]	24	0	100	0	-	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	-	
			100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	-	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
被験	24	25	100	0	-	2	1	3	0	0	0	0	0	3	3	-	
			100	0	-	0	3	0	0	0	0	0	0	3	3	-	
			200	0 (0.0)	2 (1.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	6 (3.0)	-	
			100	0	2	1	3	0	0	0	0	0	0	6	7	-	
			100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	-	
			200	0 (0.0)	3 (1.5)	1 (0.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (3.5)	9 (4.5)	-	
試験	24	100	100	TOX	-	4	2	0	0	0	0	0	5	5	±		
			100	1	-	4 (4.0)	2 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (5.0)	5 (5.0)	-		
			100	1 (1.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			200	TOX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			200	0 (0.0)	3 (1.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	4 (2.0)	-	
物質	48	25	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0	-	3	2	0	0	1	0	0	0	4	4	-	
			200	0 (0.0)	3 (1.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	4 (2.0)	-	
			100	0	4	6	0	0	0	0	0	0	9	9	+		
			100	0	4	9	1	0	0	0	0	0	13	14	+		
			200	0 (0.0)	8 (4.0)	15 (7.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	22 (11.0)	23 (11.5)	+		
			100	0	11	32	0	0	0	0	0	0	36	37	+		
			100	0	13	28	0	0	0	0	0	0	36	37	+		
			200	0 (0.0)	24 (12.0)	60 (30.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	74 (37.0)	76 (38.0)	+		
			71	0	3	4	0	0	0	0	0	0	7	7	+		
			100	0	6	16	0	0	0	0	0	0	21	24	+		
			200	0 (0.0)	9 (5.3)	20 (11.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	28 (16.4)	31 (18.1)	+		
陽性対照 [MMC]	24	0.03	100	0	-	13	15	0	0	0	0	0	27	27	+		
			100	0	-	6	12	0	0	0	0	17	20	+			
			200	0 (0.0)	19 (9.5)	27 (13.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	44 (22.0)	47 (23.5)	+			
			100	0	12	40	3	1	0	0	0	50	50	+			
			100	0	15	30	0	0	0	0	0	41	44	+			
			200	0 (0.0)	27 (13.5)	70 (35.0)	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	91 (45.5)	94 (47.0)	+				

1) gap: 染色体分体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色体分体型切断, cte: 染色体分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, frg: 断片化
 2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が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。
 MMC: マイトマイシンC

表2 染色体異常試験結果(短時間処理法) [本試験]

被験物質名: 2,3,6-トリメチルアミン

処理	S9 mixの有無	処理濃度(μg/ml)	観察細胞数	親細胞の出現頻度と出現頻度(%)	判(2)定	染色体異常細胞の出現数				染色体異常細胞(1)の出現数と出現頻度(%)				判(2)定	
						ギャップ	ctb	ctf	cse	ctb	ctf	cse	frg		-gap
溶媒	-	0	100	0	-	0	1	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	0	-	0	1	0	0	0	0	0	0	2	-
			200	0<0.0	-	2<1.0	1<0.5	0<0.0	0<0.0	0<0.0	0<0.0	0<0.0	0<0.0	3<1.5	3<1.5
[アセトン]	+	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0	-	0	0	0	1	1	0	0	2	2	-
			200	0<0.0	-	0<0.0	0<0.0	1<0.5	1<0.5	1<0.5	0<0.0	0<0.0	2<1.0	2<1.0	2<1.0
被験物	-	25	100	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	1<0.5	-	0<0.0	1<0.5	0<0.0	1<0.5	0<0.0	0<0.0	2<1.0	2<1.0	2<1.0	-
			100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	3	3	-
被験物	-	50	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0<0.0	-	1<0.5	0<0.0	2<1.0	0<0.0	0<0.0	0<0.0	0<0.0	3<1.5	3<1.5	-
			100	0	-	4	4	2	1	0	0	7	7	-	
被験物	-	100	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	0<0.0	-	4<2.0	4<2.0	2<1.0	1<0.5	0<0.0	8<4.0	8<4.0	-		
			100	0	-	1	12	0	0	0	14	14	-		
被験物	-	200	100	0	-	0	3	8	0	0	0	0	8	8	+
			100	0<0.0	-	4<2.0	20<10.0	2<1.0	0<0.0	0<0.0	22<11.0	22<11.0	-		
			100	0	-	0	2	0	0	0	2	2	-		
被験物	-	25	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	0<0.0	-	0<0.0	2<1.0	1<0.5	0<0.0	0<0.0	3<1.5	3<1.5	-		
			100	0	-	0	2	0	0	0	5	5	-		
被験物	-	50	100	0	-	1	1	0	0	0	0	0	1	2	-
			100	0<0.0	-	1<0.5	2<1.0	0<0.0	0<0.0	0<0.0	6<3.0	7<3.5	-		
			100	0	-	0	2	0	0	0	2	2	-		
被験物	+	100	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0<0.0	-	0<0.0	2<1.0	0<0.0	0<0.0	0<0.0	2<1.0	2<1.0	-		
			100	0	-	4	10	0	0	0	11	11	-		
被験物	-	200	100	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	11	+
			100	1<0.5	-	4<2.0	21<10.5	0<0.0	1<0.5	0<0.0	23<11.5	23<11.5	-		
			100	0	-	0	0	1	0	0	1	1	-		
陽性対照	-	20	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	0	-	0<0.0	1<0.5	1<0.5	0<0.0	0<0.0	2<1.0	2<1.0	-		
			100	0	-	7	84	0	0	0	84	84	-		
陽性対照	+	20	100	0	-	1	9	81	2	1	0	0	88	88	+
			100	0<0.0	-	16<8.0	165<82.5	2<1.0	1<0.5	167<83.5	167<83.5	-			
			200	0<0.0	-	0	0	0	0	0	0	0	-		

1) gap: 染色体型または染色体型切欠, ctb: 染色体型切欠, cte: 染色体型切欠, cse: 染色体型交換, frg: 断片化
 2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が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。
 S9の用量(5%), 被験物質処理時間(6h), 被験物質処理後の細胞回復時間(18h)
 BP: ベンゾ[a]ピレン

表3 染色体異常試験結果(連続処理法) [確認試験]

被験物質名: 2,3,6-トリチロフェノール

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察的異常細胞の出現頻度 (%)	観察的異常細胞の出現頻度 (%)	染色体構造異常細胞(1)の出現頻度 (%)				出現頻度 (%)		判定			
					ギャップ	ctb	cte	csb	cse	frg		合計		
					gap	ctb	cte	csb	cse	frg	-gap	+gap		
培養	24	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2	
			200	0 (0.0)	0 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[アセトン]	48	0	100	0	0	0	0	0	2	0	0	2	4	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	4 (2.0)	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)
被	12.5	0	100	0	1	1	0	0	0	0	0	2	4	
			200	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	5 (2.5)	
			100	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2	
			200	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	4 (2.0)	
験	25	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
			100	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	2 (1.0)
物	50	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)
			100	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2	3
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	3 (1.5)
質	100	0	100	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	4 (2.0)	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
TOX	200	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
物	12.5	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	3 (1.5)
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
質	25	0	100	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
質	50	0	100	0	2	5	0	0	1	0	0	8	8	
			200	0 (0.0)	5 (2.5)	13 (6.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	18 (9.0)	19 (9.5)			
			100	0	4	13	0	0	0	17	18			
			200	0 (0.0)	4 (2.0)	13 (6.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	16 (8.0)	17 (8.5)			
質	100	0	100	0	2	9	0	0	0	0	0	9	9	
			200	0 (0.0)	6 (3.0)	22 (11.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	26 (13.0)	27 (13.5)			
			100	0	0	6	0	0	0	6	6			
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (5.0)	11 (5.5)			
質	200	0	100	0	1	9	0	0	0	0	0	10	11	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	15 (7.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	16 (8.0)	17 (8.5)			
			100	0	1	6	0	0	0	7	8			
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	15 (7.5)	15 (7.5)			
陽性対照	24	0.03	100	0	3	12	0	0	1	0	0	15	15	
			200	0 (0.0)	4 (2.0)	18 (9.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	22 (11.0)	23 (11.5)			
			100	0	7	31	0	1	0	38	39			
			200	0 (0.0)	7 (3.5)	31 (15.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	40 (20.0)	41 (20.5)			
[MNC]	48	0.03	100	0	10	32	0	0	0	0	0	40	41	
			200	0 (0.0)	17 (8.5)	63 (31.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	78 (39.0)	80 (40.0)			
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

1) gap: 染色体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色体型切断, cte: 染色体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, frg: 断片化
 2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が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。
 MNC: マイトマイシンC

表4 分裂指数 (連続処理法) [本試験]

処理	処理時間 (h)	処理濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (アセトン)	24	0	2000	80	4.0	100
2,3,6-トリメチル フェノール	24	25	2000	43	2.2	54
	24	50	2000	32	1.6	40
	24	100	2000	12	0.6	15
	24	200	2000	9	0.5	11
陽性対照 (MMC)	24	0.03	2000	77	3.9	96
陰性対照 (アセトン)	48	0	2000	138	6.9	100
2,3,6-トリメチル フェノール	48	25	2000	96	4.8	70
	48	50	2000	79	4.0	57
	48	100	2000	27	1.4	20
	48	200	2000	13	0.7	9
陽性対照 (MMC)	48	0.03	2000	126	6.3	91

MMC : マイトマイシンC

表5 分裂指数 (短時間処理法) [本試験]

処理	S9 mix の有無	処理濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (アセトン)	-	0	2000	70	3.5	100
2,3,6-トリメチル フェノール	-	25	2000	68	3.4	97
	-	50	2000	103	5.2	147
	-	100	2000	96	4.8	137
	-	200	2000	131	6.6	187
陽性対照 (BP)	-	20	2000	143	7.2	204
陰性対照 (アセトン)	+	0	2000	109	5.5	100
2,3,6-トリメチル フェノール	+	25	2000	102	5.1	94
	+	50	2000	91	4.6	83
	+	100	2000	119	6.0	109
	+	200	2000	79	4.0	72
陽性対照 (BP)	+	20	2000	39	2.0	36

BP : ベンゾ[a]ピレン

表6 分裂指数 (連続処理法) [確認試験]

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μ g/ml)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (アセトン)	24	0	2000	159	8.0	100
2,3,6-トリメチル フェノール	24	12.5	2000	133	6.7	84
	24	25	2000	66	3.3	42
	24	50	2000	29	1.5	18
	24	100	2000	15	0.8	9
	24	200	2000	3	0.2	2
陽性対照 (MMC)	24	0.03	2000	46	2.3	29
陰性対照 (アセトン)	48	0	2000	50	2.5	100
2,3,6-トリメチル フェノール	48	12.5	2000	94	4.7	188
	48	25	2000	62	3.1	124
	48	50	2000	47	2.4	94
	48	100	2000	23	1.2	46
	48	200	2000	11	0.6	22
陽性対照 (MMC)	48	0.03	2000	82	4.1	164

MMC : マイトマイシンC

図1 2,3,6-トリメチルフェノールの細胞毒性(連続処理法)

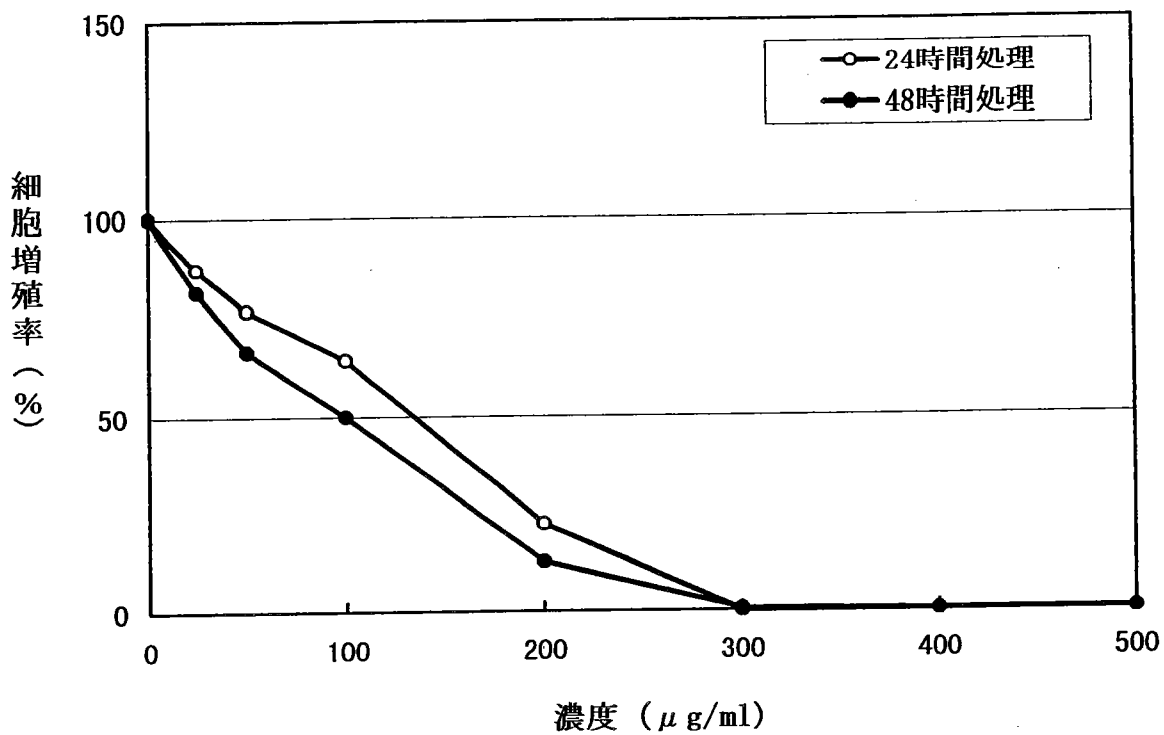


図2 2,3,6-トリメチルフェノールの細胞毒性
(短時間処理法, 6時間処理, 18時間回復)

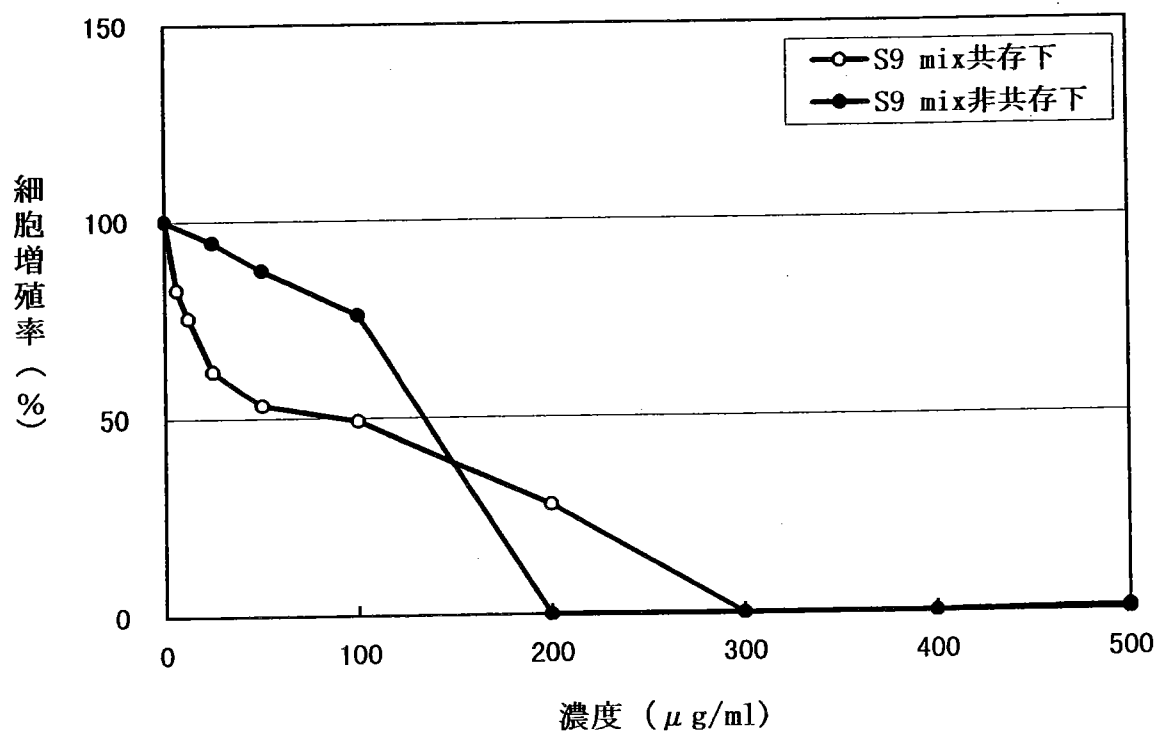


図3 2,3,6-トリメチルフェノールの構造異常細胞出現頻度
(連続処理法) [本試験]

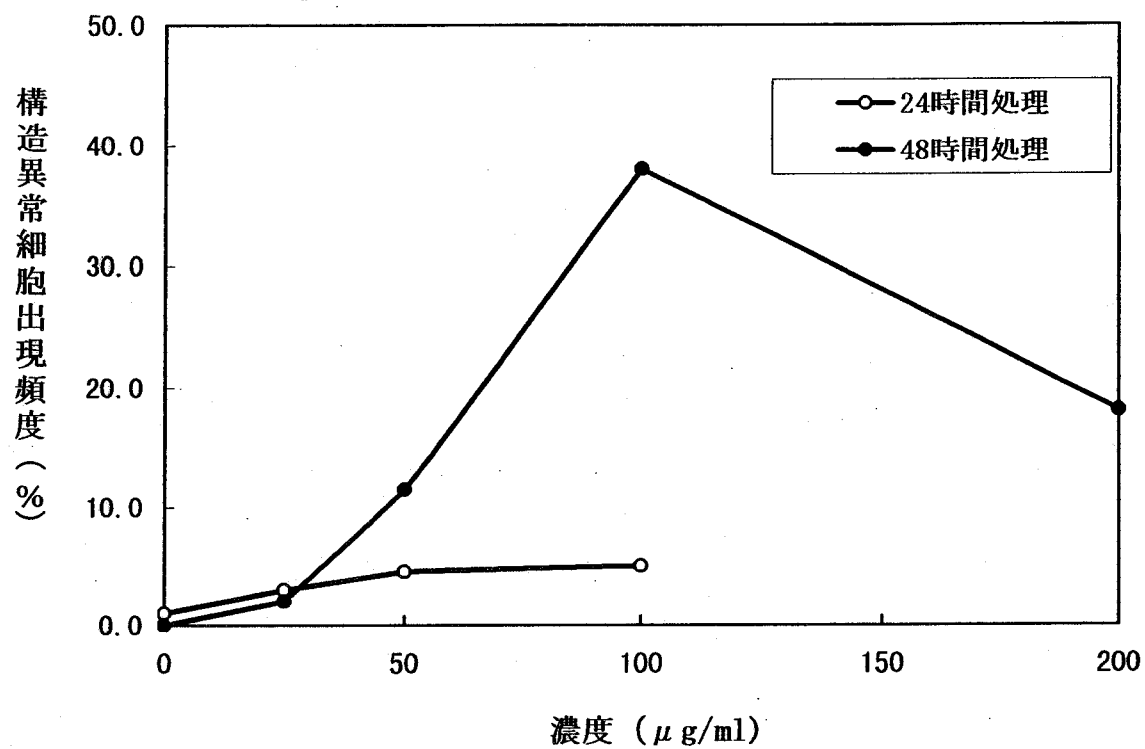


図4 2,3,6-トリメチルフェノールの構造異常細胞出現頻度
(短時間処理法) [本試験]

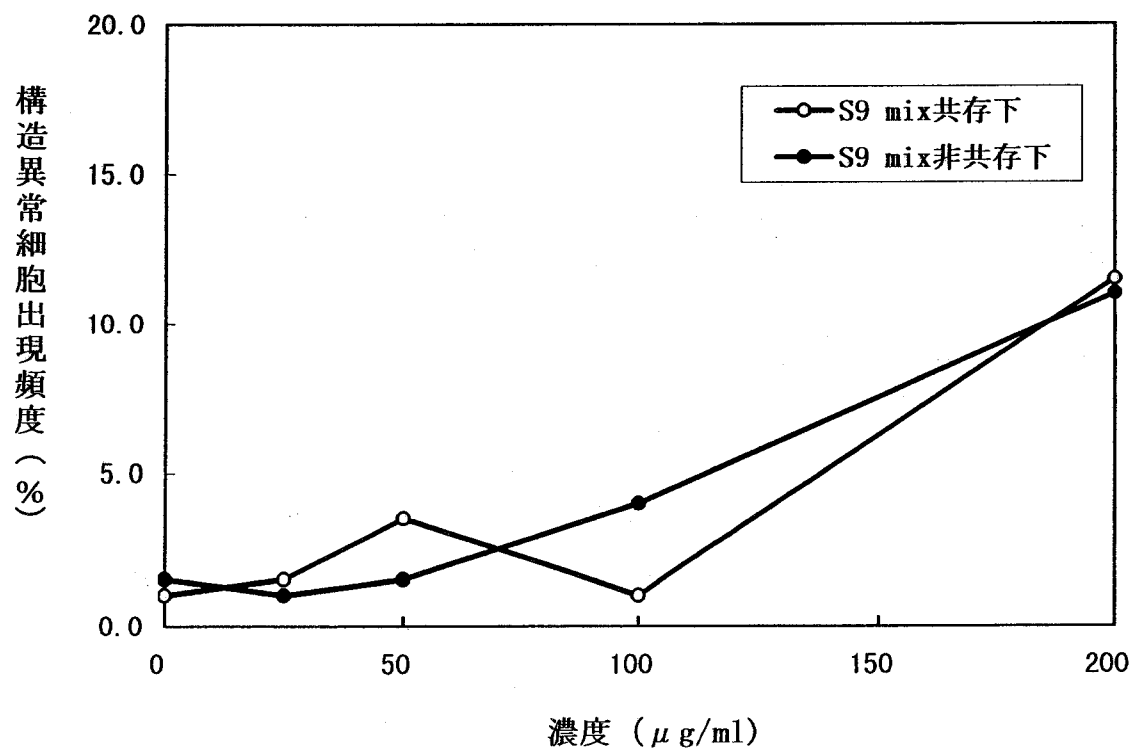


図5 2,3,6-トリメチルフェノールの数的異常細胞出現頻度
(連続処理法) [本試験]

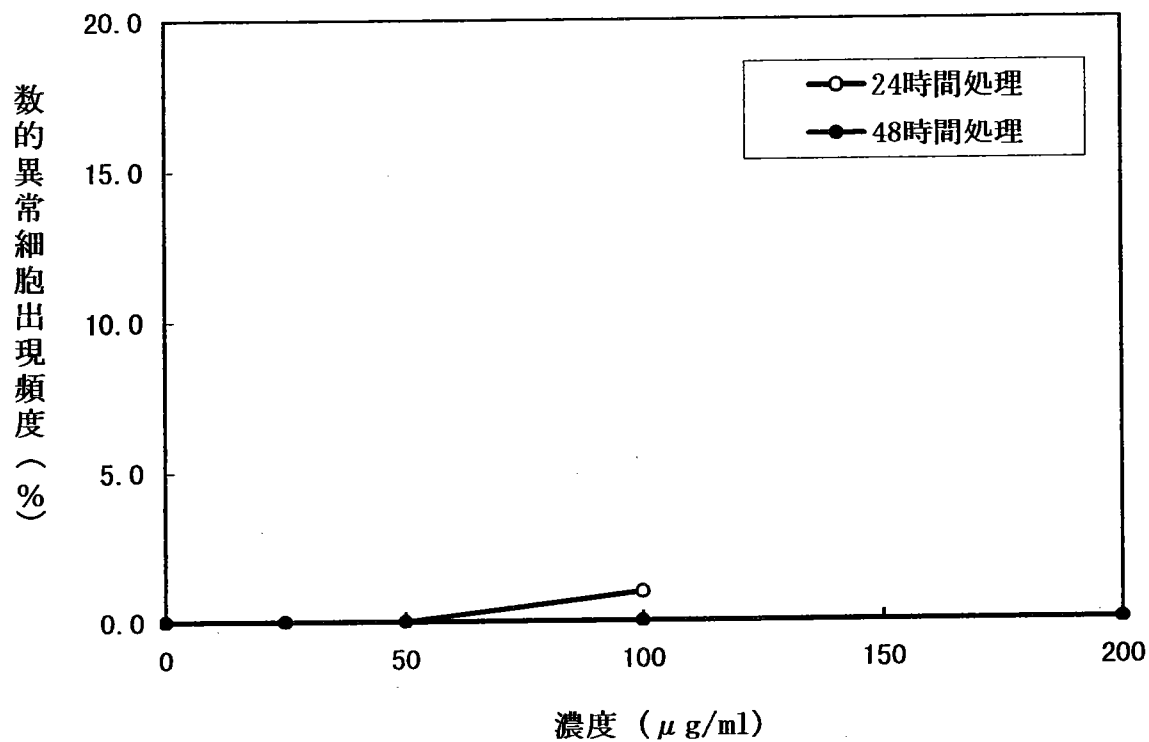


図6 2,3,6-トリメチルフェノールの数的異常細胞出現頻度
(短時間処理法) [本試験]

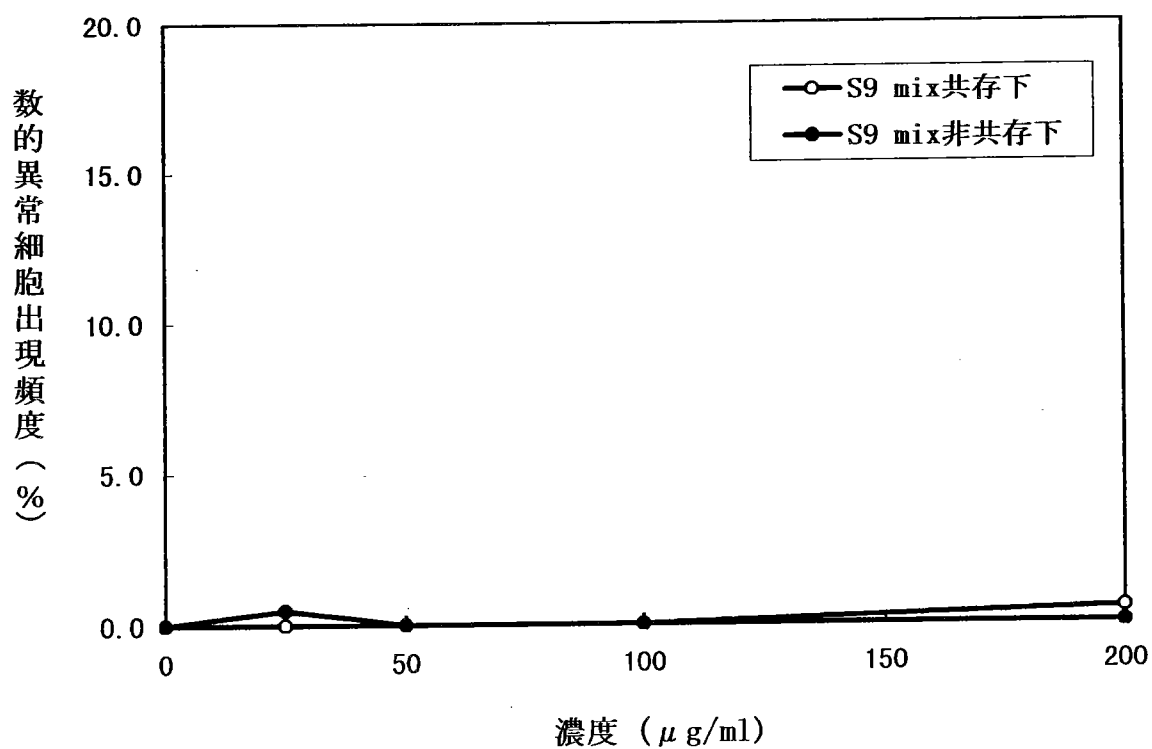


図7 2,3,6-トリメチルフェノールの構造異常細胞出現頻度
(連続処理法) [確認試験]

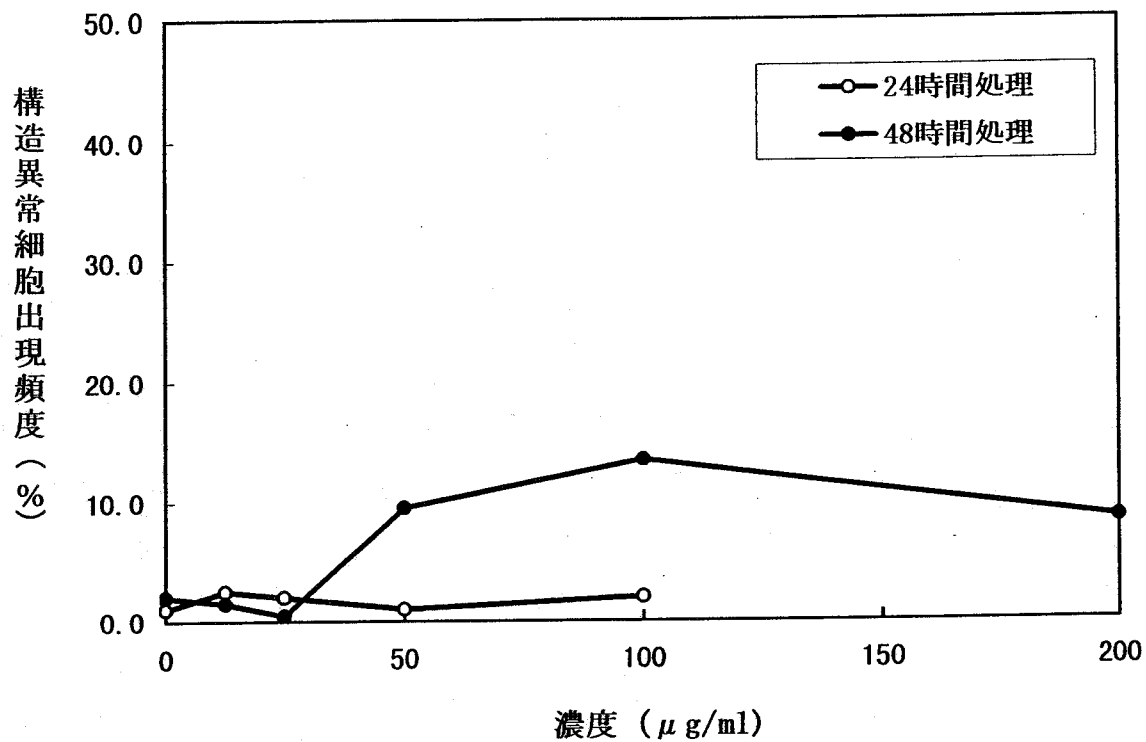


図8 2,3,6-トリメチルフェノールの数的異常細胞出現頻度
(連続処理法) [確認試験]

