

最 終 報 告 書

ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの哺乳動物培養細胞を用いた染色体異常試験

(試験番号: 97-089)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

Study No. 97-089

目 次

要約	1 頁
試験目的	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	5
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	6
9. 染色体異常試験	8
1) 被験物質および陽性対照物質の濃度	8
2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製	8
3) 細胞の処理	8
(1) 連続処理法	8
(2) 短時間処理法	9
4) 試験群の構成および使用シャーレ数	9
5) 染色体標本の作製	10
6) 染色体の観察	10
7) 染色体異常の分類および集計	11
8) 試験結果の判定	11

結果および考察	11
1. 染色体異常試験（連続処理法）	11
2. 染色体異常試験（短時間処理法）	12
3. D_{20} 値	13
結論および参考事項	13

表

表1	ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの染色体異常試験結果（連続処理法）	15
表2	ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの染色体異常試験結果（短時間処理法）	17

図

図1	構造異常を有する細胞の出現頻度	19
図2	倍数性細胞の出現頻度	20

要 約

ビス(1-メチルエチル)ナフタレ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繊維芽細胞株 (CHL) を用いて *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる濃度を決定するため、連続処理法においては24時間および48時間処理ともに 12.5~800 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法においては、S9 mix 非存在下では 12.5~200 $\mu\text{g/mL}$ 、S9 mix 存在下では 12.5~4500 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、連続処理法において24時間処理では 100 $\mu\text{g/mL}$ 以上、48時間処理では 50 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められた。短時間処理法においては、S9 mix 非存在下で 50 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められたが、S9 mix 存在下では 50% を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。

したがって、染色体異常試験における濃度は、連続処理法の場合、24時間処理では 6.25, 12.5, 25, 50, 75 および 100 $\mu\text{g/mL}$ 、48時間処理では 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50 および 100 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50 および 75 $\mu\text{g/mL}$ 、S9 mix 存在下では 140.63, 281.25, 562.5, 1125, 2250 および 4500 $\mu\text{g/mL}$ とした。

試験の結果、連続処理法においては、24時間および48時間処理ともに染色体異常を有する細胞の増加は認められなかった。なお、24時間処理の 75 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度および48時間処理における 100 $\mu\text{g/mL}$ 濃度では、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。短時間処理法においては、S9 mix 非存在下では、染色体異常を有する細胞の増加は認められなかった。S9 mix 存在下では、140.63~562.5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で濃度依存的な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 非存在下における 75 $\mu\text{g/mL}$ 濃度では、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。

以上の成績から、本実験条件下では、ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの CHL 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。計算された D_{20} 値は、短時間処理法において 0.88 mg/mL であった。

試 験 目 的

この試験は、ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの哺乳動物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^{1, 2)}

1. 被験物質

名称(略号): ビス(1-メチルエチル)ナフタレン (BMEN)

別名 ジイソプロピルナフタレン ; Naphthalene, bis(1-methylethyl)-

CAS番号: 38640-62-9

ロット番号:

純 度: 98.44% (平成9年11月25日分析)

[不純物 ビス(1-メチルエチル)テトラリン: 1.10%;

トリス(1-メチルエチル)ナフタレン: 0.43%]

入手先(製造元):

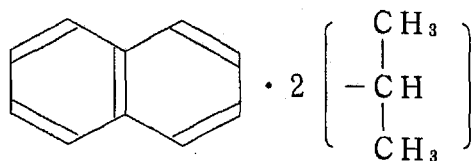
入 手 日:

入 手 量: 25 g

物理化学的性状:

化 学 名 Bis(1-methylethyl)naphthalene

構 造 式



分 子 式 $C_{10}H_8(CH(CH_3)_2)_2$

分 子 量 212.34

性状(常温) 殆ど無臭の低粘度の無色透明な液体

沸 点 300°C

溶 解 性 水, DMSO: 不溶; アセトン: 可溶

安定性：安定〔実験終了後、残余被験物質を試験委託者において分析（平成10年4月13日）した結果、純度は98.30%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（4℃）、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アセトン（和光純薬工業株式会社、ロット番号 ESE3934、純度 99.5%）を用いた。陽性対照物質は、連続処理法では 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG, Aldrich Chemical Company, ロット番号 00613PN, 純度 97%) を、短時間処理法では 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

被験物質は水および DMSO に不溶、アセトンに可溶であるため、溶媒にはアセトンを用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[a]P の溶媒については、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 TPK7807, 純度 99.9%) を用いた。

4. 試験細胞株

チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL) (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日入手) を使用した。供試細胞は、浮遊細胞液に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4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 1003745) を常法に従い調製し、これに非働化 (56℃, 30分間加熱処理) 仔牛血清 (Gibco Laboratories, ロット番号 1004615) を10%の割合で添加したものを用いた。

6. 培養条件

供試細胞は、CO₂インキュベーター (Napco 社, 6200型) を用い、CO₂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画分 (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-375, 平成10年1月9日製造, 平成10年1月30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 当たりの組成は、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: 183~245 g

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 (9,000×g) し、その上清を採取。

[S9 mix 1 mL あたりの組成]

S9	0.3 mL
MgCl ₂	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濃度を検討するため、連続処理法では、12.5, 25, 50, 100, 200, 400 および 800 $\mu\text{g/mL}$ 濃度を、短時間処理法においては、S9 mix 非存在下では 12.5, 25, 50, 75, 100 および 200 $\mu\text{g/mL}$, S9 mix 存在下では 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 および 4500 $\mu\text{g/mL}$ 濃度を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行なった。試験には各濃度について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アセトンに溶解して最高濃度の供試液（原液）を調製した。すなわち、原液の濃度は、連続処理法では 160.1 mg/mL, 短時間処理法では 160.1 mg/mL（1回目）、400.1 mg/mL（2回目）および 900.0 mg/mL（3回目）とした。次いで、原液の一部をアセトンで順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。被験物質の供試液の添加量は、各シャーレの培養液量の 0.5%（v/v）とした。なお、4500 $\mu\text{g/mL}$ は、被験物質供試液の作製可能な上限濃度であった。

2) 細胞の処理

連続処理法の場合、直径 3.5 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に 6×10^3 個/mL の細胞を含む培養液 2 mL を加え、培養開始3日後にアセトン（陰性対照）または被験物質の供試液各 0.01 mL を加えて24時間および48時間培養した。一方、短時間処理法の場合は、連続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 S9 mix 非存在下の場合は培養液を取り替えず、アセトンまたは被験物質の供試液各 0.01 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の培養液を取り除き、S9 mix 希釈液（S9 mix を培養液で6倍に希釈したもの）を 2 mL 加えた後、アセトンまたは被験物質の供試液各 0.01 mL をシャーレに加えた。そして、培養6時間後に培養液を取り除き、新鮮培養液で細胞表面を3回洗浄し、新しい培養液 2 mL を加えて18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、10%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、0.1%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、100 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度の被験物質供試液は、培養液内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た。この油滴様物は、100~400 $\mu\text{g/mL}$ 濃度においては微細なもので、シャーレの底、

培養液内および培養液の表面に分散していた。しかしながら、800 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では大きなひと固まりの油滴様物として培養液表面に浮遊し、培養液内への分散は認められなかった。培養終了時にも 200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で添加時と同様の油滴様物の残存が認められた。

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（オリンパス光学工業株式会社、モノセレータ）によって測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各濃度群の細胞増殖率を求めた。

その結果は、次表に示したとおり、連続処理法においては、24時間処理で 100 $\mu\text{g/mL}$ 以上、48時間処理で 50 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度でいずれも 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、それぞれ 50~100 $\mu\text{g/mL}$ 間および 25~50 $\mu\text{g/mL}$ 間にあるものと判断された。

短時間処理法においては、S9 mix 非存在下では 50 $\mu\text{g/mL}$ 濃度ではほぼ 50%細胞増殖抑制を示し、75 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。S9 mix 存在下では、12.5~4500 $\mu\text{g/mL}$ のいずれの濃度においても 50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。すなわち 100~400 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で概ね濃度に依存した細胞増殖の抑制傾向が認められたが抑制率は 50%に到らず、実験を 3 回繰り返して最高 4500 $\mu\text{g/mL}$ までの細胞増殖率を測定したが、高濃度ではむしろ抑制率が低下する傾向にあった。

〔連続処理法〕

濃 度 ($\mu\text{g/mL}$)	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]
12.5	114	110	[112.0]	102	101	[101.5]
25	106	99	[102.5]	96	87	[91.5]
50	72	64	[68.0]	28	33	[30.5]
100	16	16	[16.0]	5	8	[6.5]
200	14	16	[15.0]	7	7	[7.0]
400	22	16	[19.0]	13	12	[12.5]
800	16	26	[21.0]	15	11	[13.0]

[] : 平均値

[短時間処理法 : S9 mix 非存在下]

濃 度 (μ g/mL)	細胞増殖率 (%)		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]
12.5	109	93	[101.0]
25	101	94	[97.5]
50	40	56	[48.0]
75	11	10	[10.5]
100	12	24	[18.0]
200	12	17	[14.5]

[] : 平均値

[短時間処理法 : S9 mix 存在下]

濃 度 (μ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	実施1回目		実施2回目		実施3回目	
0 (溶媒)	100	100 [100.0]	100	100 [100.0]	100	100 [100.0]
12.5	104	94 [99.0]	--	-- [--]	--	-- [--]
25	90	86 [88.0]	--	-- [--]	--	-- [--]
50	95	94 [94.5]	--	-- [--]	--	-- [--]
100	66	73 [69.5]	54	72 [63.0]	--	-- [--]
200	55	58 [56.5]	--	-- [--]	--	-- [--]
400	60	58 [59.0]	70	85 [77.5]	--	-- [--]
800	80	77 [78.5]	75	78 [76.5]	--	-- [--]
1200	--	-- [--]	82	72 [77.0]	--	-- [--]
1600	--	-- [--]	84	89 [86.5]	--	-- [--]
2000	--	-- [--]	82	90 [86.0]	88	91 [89.5]
2500	--	-- [--]	--	-- [--]	84	82 [83.0]
3000	--	-- [--]	--	-- [--]	81	84 [82.5]
3500	--	-- [--]	--	-- [--]	87	82 [84.5]
4000	--	-- [--]	--	-- [--]	97	87 [92.0]
4500	--	-- [--]	--	-- [--]	97	98 [97.5]

[] : 平均値

-- : 試験せず

9. 染色体異常試験

1) 被験物質および陽性対照物質の濃度

被験物質の濃度は、細胞増殖抑制試験の結果から、50%細胞増殖抑制濃度の前後が含まれ、かつ3濃度以上のデータが得られる事を考慮して設定した。すなわち、連続処理法の場合は、24時間および48時間処理ともに 6.25, 12.5, 25, 50 および 100 $\mu\text{g/mL}$ (公比2) の5濃度、並びに24時間処理では 50 $\mu\text{g/mL}$ と 100 $\mu\text{g/mL}$ 間で、48時間処理では 25 $\mu\text{g/mL}$ と 50 $\mu\text{g/mL}$ 間でいずれも細胞増殖率の急激な変化が認められたことを考慮して、24時間処理では 75 $\mu\text{g/mL}$, 48時間処理では 37.5 $\mu\text{g/mL}$ も設定し、それぞれ6濃度とした。短時間処理法の場合は、S9 mix 非存在下では、6.25, 12.5, 25, 50 および 75 $\mu\text{g/mL}$ の5濃度、並びに 25 $\mu\text{g/mL}$ と 50 $\mu\text{g/mL}$ 間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことを考慮して、37.5 $\mu\text{g/mL}$ も設定し、計6濃度とした。S9 mix 存在下においては、100~400 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で細胞増殖の抑制傾向が認められたものの、4500 $\mu\text{g/mL}$ においても50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかったことから、染色体異常試験の濃度は、100 $\mu\text{g/mL}$ あたりまでが含まれる広い範囲の設定を考え、4500 $\mu\text{g/mL}$ (供試液作製可能な上限量) を最高濃度とし、以下公比2で 2250, 1125, 562.5, 281.25 および 140.63 $\mu\text{g/mL}$ の計6濃度とした。陽性対照物質の MNNG は 2.5 $\mu\text{g/mL}$, B[a]P は 10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で試験した。

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アセトンに溶解して最高濃度の供試液 (原液) を調製した。すなわち、原液の濃度は連続処理法では 20.0 mg/mL, 短時間処理法では S9 mix 非存在下で 15.0 mg/mL, S9 mix 存在下では 899.7 mg/mL とした。次いで、上述の 8-1) に記載した方法と同様の操作で原液の一部をアセトンで順次希釈し、所定濃度の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は 0.5 mg/mL, B[a]P は 2.0 mg/mL の供試液を調製した。

3) 細胞の処理

4×10^3 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濃度当たり2枚のシャーレを使用した。

(1) 連続処理法

アセトン（陰性対照），被験物質および MNNG の各供試液は，それぞれ 0.025 mL を各シャーレに添加し，24時間および48時間培養した。なお，被験物質供試液のシャーレ内添加時，100 $\mu\text{g/mL}$ 濃度でのみ細かな油滴様の被験物質が認めれたが，培養終了時には認められなかった。

(2) 短時間処理法

S9 mix 非存在下の場合，各シャーレから培養液 2 mL を抜き取り，アセトン，被験物質および B[a]P の各供試液のそれぞれ 0.015 mL を各シャーレに添加して培養した。また，S9 mix 存在下の場合，各シャーレから培養液 2.5 mL を抜き取った後，各シャーレに S9 mix を 0.5 mL ずつ添加し，さらに，アセトン，被験物質および B[a]P の各供試液のそれぞれ 0.015 mL を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，新鮮培養液で細胞表面を3回洗浄し，新しい培養液 5 mL を加え，さらに18時間培養した。なお，S9 mix 存在下の 140.63 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で，被験物質供試液をシャーレ内に添加した直後に，細胞増殖抑制試験におけると同様の被験物質の析出による油滴様物が認められ，140.63～562.5 $\mu\text{g/mL}$ 濃度では微細なものが培養液中に分散して存在したが，1125 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では大きなひと固まりの油滴様物として培養液表面に浮遊した。培養終了時には 281.25 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で同様の油滴様物の残存が認められた。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

〔連続処理法〕

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	使用シャーレ数	
	24時間処理	48時間処理
0 (陰性対照) ^a	2	2
6.25	2	2
12.5	2	2
25	2	2
37.5	--	2
50	2	2
75	2	--
100	2	2
2.5 (陽性対照) ^b	2	2

a : アセトン, b : MNNG, 使用シャーレ総数 : 32

〔短時間処理法〕

濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	使用シャーレ数	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0 (陰性対照) ^a	2	2
6.25	2	--
12.5	2	--
25	2	--
37.5	2	--
50	2	--
75	2	--
140.63	--	2
281.25	--	2
562.5	--	2
1125	--	2
2250	--	2
4500	--	2
10 (陽性対照) ^b	2	2

a : アセトン, b : B[a]P, 使用シャーレ総数 : 32

5) 染色体標本の作製

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 1001347) 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%トリプシン水溶液 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、1000 rpm, 5分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の 75 mM 塩化カリウム水溶液 4 mL を加えて懸濁し、37°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) 1 mL を添加して固定した。1000 rpm 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か所に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 (pH 6.8, 株式会社ヤトロン, ロット番号 1478) を用いて希釈した 1.4%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。

6) 染色体の観察

染色体は、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。各濃度とも染色体が明瞭に識別でき、染色体の数が

25±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 濃度当たり 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³⁾

染色体異常の分類は、構造異常については、ギャップ（染色分体型および染色体型）、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、倍数性細胞のみを記録した。

ギャップは、染色分体の染色性が全く認められない部位を対象とし、その部位が染色分体幅以上のもので、しかも染色分体の縦軸線上にあるものとした。ただし、非染色部位が染色分体の縦軸線上にあっても著しく離れている場合には、切断とした。

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ギャップのみを有する細胞を含めた場合と、含めない場合とに区別して表示した。

8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、ギャップを含めた構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料 χ^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濃度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、被験物質による染色体異常細胞の出現頻度が 2 濃度以上で有意に増加し、かつ濃度依存性あるいは再現性が認められた場合、陽性と判定した。

結果および考察

1. 染色体異常試験（連続処理法）

結果は表 1 に示した。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 24 時間処理で 1.0 %、48 時間処理で 1.5 % であった。被験物質群では、24 時間処理で 0～1.0 %、48 時間処理では 0～0.5 % の範囲の出現頻度で、陰性対照群との間に有意差はなかった。

一方、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、24 時間処理で 97.5 %、

48時処理で 89.5%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性細胞は、陰性対照群では、24時間処理でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。被験物質群においても、24時間処理でのみ 0~0.5%の範囲の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では、倍数性細胞は認められなかった。

なお、被験物質の細胞に対する毒性のため、24時間処理の 75 $\mu\text{g/mL}$ 以上および48時間処理の 100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度では観察可能な分裂中期像が認められなかった。

2. 染色体異常試験（短時間処理法）

結果は表 2 に示した。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、S9 mix 非存在下で 0.5%，S9 mix 存在下で 1.0%であった。被験物質群では S9 mix 非存在下においては 0.5~1.5%の範囲の出現頻度で認められたが、陰性対照群との間に有意差はなかった。S9 mix 存在下では、140.63, 281.25 および 562.5 $\mu\text{g/mL}$ 濃度の出現頻度はそれぞれ 7.5, 10.5 および 12.5%で濃度依存的、かつ、いずれの濃度も陰性対照群と比べ有意な増加が認められた。しかしながら、1125, 2250 および 4500 $\mu\text{g/mL}$ 濃度ではそれぞれ 5.0, 2.5 および 2.0%の出現頻度で、有意差は認められなかった。

高濃度で染色体構造異常細胞の出現率の増加が認められなかったことについては、試験物質が析出して大きなひと固まりとなるため培養液中に分散せず、細胞が被験物質により十分暴露されなかったことによるものと推察される。また、細胞増殖抑制試験において短時間処理法 S9 mix 存在下での高濃度処理群では細胞増殖抑制が認められなかったことも、同様の原因によるものと考えられる。

一方、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、S9 mix 非存在下で 1.5%，S9 mix 存在下で 48.0%を示し、B[a]P は代謝活性化されて顕著な染色体異常を誘発することが確認された。

倍数性細胞については、陰性対照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、S9 mix 非存在下で 0~0.5%，S9 mix 存在下で 0~1.5%の範囲の低い出現頻度で認められた。

なお、被験物質の細胞に対する毒性のため、S9 mix 非存在下の 75 $\mu\text{g/mL}$ 濃度では観察可能な分裂中期像が認められなかった。

3. D₂₀値⁴⁾

短時間処理法 S9 mix 存在下において、陽性値を示す染色体異常細胞の増加が認められたため、D₂₀値（分裂中期像20％に異常を誘発させるために必要な被験物質の濃度、mg/mL）を算出した。

その結果は下表に示したとおりであり、D₂₀値は、S値（対象となったD₂₀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）が最小となった0.88 mg/mLであった。なお、D₂₀値の算出は、染色体異常細胞出現頻度が直線的な増加傾向（濃度依存性）を示す140.63～562.5 μg/mL濃度の値を用いて行った。

	回帰曲線	D ₂₀ 値 (μg/mL)	S値 $\left(S = \frac{D_{20}}{r} \times \frac{1}{n^2} \right)$
短時間処理法	y=0.0189969x+3.199962	884.357	60.8515
S9 mix 存在下	(r=0.908314)		
	y=12.4576x-20.7599	1870.19	121.272
	(r=0.963839)		

結論および参考事項

ビス(1-メチルエチル)ナフタレンのチャイニーズハムスター肺由来の繊維芽細胞株（CHL）を用いた *in vitro* における染色体異常試験を実施した結果、短時間処理法 S9 mix 存在下において、染色体構造異常細胞の濃度依存的、かつ有意な増加が認められた。

したがって、本実験条件下では、ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの CHL 細胞に対する染色体異常誘発性は、陽性と判定した。また、本被験物質のD₂₀値は、短時間処理法において0.88 mg/mLであった。本試験結果は、CHL 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定基準⁵⁾からみても明らかな陽性を示すものであった。

なお、ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの変異原性については、枯草菌を用いた DNA 修復試験、*Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験並びに *S. typhimurium* および宿主としてマウスを用いた宿主経由試験でいずれも陰性との報告がある（堀田鉄也、呉羽科学工業株式会社社内資料、1977）。本被験物質の化学構造における母

核のナフタレンについては, *S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験⁶⁾, シリアンハムスター由来の BHK21cl13 細胞およびラット胚由来細胞を用いたトランスフォーメーション試験⁶⁾ および *E. coli* を用いた DNA 修復試験⁷⁾ でいずれも陰性, CHL 細胞を用いた染色体異常試験においては陽性⁸⁾ と報告されている。

参考文献

- 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 test 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, “改訂増補 染色体異常試験データ集” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p.19.
- 6) 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, 1980, p.288.
- 7) Mamber, S.W., Bryson, V. and Stanley, E.K. (1983). The *Escherichia coli* WP2/WP100 rec assay for detection of potential chemical carcinogens. *Mutation Research*, 119, 135-144.
- 8) 石館 基 監修, “改訂増補 染色体異常試験データ集” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p.290.

表1-1 ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)

試験群	濃 度 (μ g/mL)	観察 細胞数	倍数性細胞		構 造 異 常 を 有 す る 細 胞 数 と 出 現 頻 度 (%)								判定
			細胞数 (%)	判定	ギャップ g	染色分体型		染色体型		その他	合 計		
						切断	交換	切断	交換		+ g	- g	
陰性対照 (アセトン)	--	100	0		0	2	0	0	0	0	2	2	
		100	1		0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	1(0.5)	--	0(0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	2(1.0)	--
被験物質	6.25	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	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)	—
	12.5	100	1		0	1	0	0	0	0	1	1	
		100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	1(0.5)	—	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	—
	25	100	0		0	1	1	0	1	0	2	2	
		100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	0(0)	—	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	2(1.0)	2(1.0)	—
	50	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0		0	0	1	0	0	0	1	1	
		200	0(0)	—	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	—
	75 [#]	--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	100 [#]	--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
陽性対照 (MNNG)	2.5	100	0		6	23	97	0	0	0	97	97	
		100	0		8	32	98	0	0	0	98	98	
		200	0(0)	—	14(7.0)	55(27.5)	195(97.5)	0(0)	0(0)	0(0)	195(97.5)**	195(97.5)	+

+ g : ギャップのみを有する細胞を含む場合.
MNNG : 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

- g : ギャップのみを有する細胞を除く場合.
** : $p < 0.01$.

: 細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像なし.

表 1-2 ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの染色体異常試験結果 (連続処理法: 48時間処理)

試験群	濃 度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	倍数性細胞		構 造 異 常 を 有 す る 細 胞 数 と 出 現 頻 度 (%)								判定
			細胞数 (%)	判定	ギャップ g	染色分体型		染色体型		その他	合 計		
						切断	交換	切断	交換		+ g	- g	
陰性対照 (アセトン)	--	100	0		0	1	1	0	0	0	1	1	
		100	0		0	0	2	0	0	0	2	2	
		200	0(0)	--	0(0)	1(0.5)	3(1.5)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)	3(1.5)	--
被験物質	6.25	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0		1	0	0	0	0	0	1	0	
		200	0(0)	—	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	—
	12.5	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	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)	—
	25	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0		0	0	0	0	1	0	1	1	
		200	0(0)	—	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	—
	37.5	100	0		0	0	0	0	1	0	1	1	
		100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	0(0)	—	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	—
	50	100	0		0	1	1	0	0	0	1	1	
		100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	0(0)	—	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	—
	100*	--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
陽性対照 (MNNG)	2.5	100	0		3	31	91	4	1	0	92	92	
		100	0		2	30	82	3	1	0	87	87	
		200	0(0)	—	5(2.5)	61(30.5)	173(86.5)	7(3.5)	2(1.0)	0(0)	179(89.5)**	179(89.5)	+

+ g : ギャップのみを有する細胞を含む場合.
MNNG : 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

- g : ギャップのみを有する細胞を除く場合.
** : $p < 0.01$.

: 細胞毒性のため, 観察可能な分裂中期像なし.

表 2 - 1 ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの染色体異常試験結果 (短時間処理法 : S9mix 非存在下)

試験群	濃 度 (μ g/mL)	観察 細胞数	倍数性細胞		構 造 異 常 を 有 す る 細 胞 数 と 出 現 頻 度 (%)								判定	
			細胞数 (%)	判定	ギャップ g	染色分体型		染色体型		その他	合 計			
						切断	交換	切断	交換		+ g	- g		
陰性対照 (アセトン)	--	100	0		0	0	1	0	0	0	1	1		
		100	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)	1(0.5)	1(0.5)	--	
被験物質	6.25	100	1		0	0	1	0	0	0	1	1		
		100	0		0	0	1	0	0	0	1	1		
		200	1(0.5)	-	0(0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	2(1.0)	-	
	12.5	100	0		0	1	2	0	1	0	3	3		
		100	1		0	0	0	0	0	0	0	0		
		200	1(0.5)	-	0(0)	1(0.5)	2(1.0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	3(1.5)	3(1.5)	-	
	25	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0		
		100	0		0	0	1	0	0	0	1	1		
		200	0(0)	-	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	-	
	37.5	100	1		1	0	0	0	0	0	1	0		
		100	0		0	0	0	0	0	0	0	0		
		200	1(0.5)	-	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	-	
	50	100	0		0	0	1	0	1	0	2	2		
		100	0		0	0	0	0	0	0	0	0		
		200	0(0)	-	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	2(1.0)	2(1.0)	-	
	75 [#]	--	--		--	--	--	--	--	--	--	--		
		--	--		--	--	--	--	--	--	--	--		
		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
	陽性対照 (B[a]P)	10	100	0		1	1	0	0	0	0	2	1	
			100	0		0	0	1	0	0	0	1	1	
			200	0(0)	-	1(0.5)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)	2(1.0)	-

+ g : ギャップのみを有する細胞を含む場合。
B[a]P : 3, 4-benzo[a]pyrene.

- g : ギャップのみを有する細胞を除く場合.

: 細胞毒性のため, 観察可能な分裂中期像なし.

表 2-2 ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの染色体異常試験結果 (短時間処理法: S9mix 存在下)

試験群	濃 度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	倍数性細胞		構 造 異 常 を 有 す る 細 胞 数 と 出 現 頻 度 (%)								判定
			細胞数 (%)	判定	ギャップ g	染色分体型		染色体型		その他	合 計		
						切断	交換	切断	交換		+ g	- g	
陰性対照 (アセトン)	-- 0	100	0		0	1	1	0	0	0	1	1	
		100	0		0	0	0	0	1	0	1	1	
		200	0(0)	--	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	2(1.0)	2(1.0)	--
被験物質	140.63	100	3		1	1	5	0	0	0	6	6	
		100	0		1	4	6	1	1	0	9	9	
		200	3(1.5)	-	2(1.0)	5(2.5)	11(5.5)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	15(7.5)**	15(7.5)	+
	281.25	100	0		1	3	11	0	0	0	13	13	
		100	2		0	1	6	0	1	0	8	8	
		200	2(1.0)	-	1(0.5)	4(2.0)	17(8.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	21(10.5)**	21(10.5)	+
	562.5	100	2		1	3	8	0	0	0	10	9	
		100	1		3	5	11	0	0	0	15	14	
		200	3(1.5)	-	4(2.0)	8(4.0)	19(9.5)	0(0)	0(0)	0(0)	25(12.5)**	23(11.5)	+
	1125	100	1		0	1	2	0	3	0	6	6	
		100	0		0	1	4	0	0	0	4	4	
		200	1(0.5)	-	0(0)	2(1.0)	6(3.0)	0(0)	3(1.5)	0(0)	10(5.0)	10(5.0)	-
	2250	100	1		0	0	3	0	0	0	3	3	
		100	1		0	0	2	0	0	0	2	2	
		200	2(1.0)	-	0(0)	0(0)	5(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)	5(2.5)	5(2.5)	-
	4500	100	0		0	0	1	0	0	0	1	1	
		100	0		0	1	1	0	1	0	3	3	
		200	0(0)	-	0(0)	1(0.5)	2(1.0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	4(2.0)	4(2.0)	-
陽性対照 (B[a]P)	10	100	0		2	8	48	1	0	0	53	51	
		100	0		4	9	38	1	0	0	43	42	
		200	0(0)	-	6(3.0)	17(8.5)	86(43.0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	96(48.0)**	93(46.5)	+

+ g : ギャップのみを有する細胞を含む場合.
B[a]P : 3, 4-benzo[a]pyrene. **: $p < 0.01$.

- g : ギャップのみを有する細胞を除く場合.

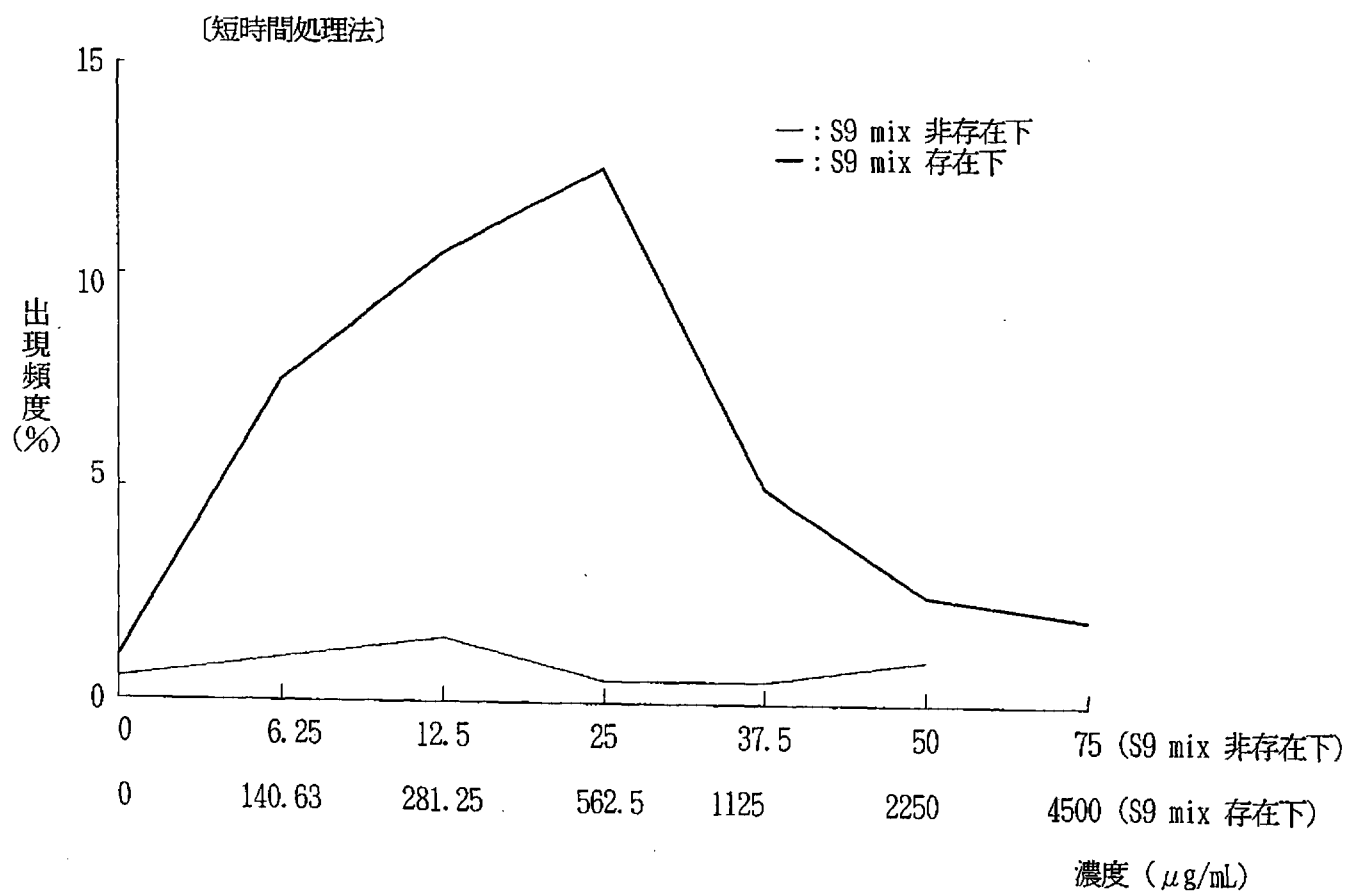
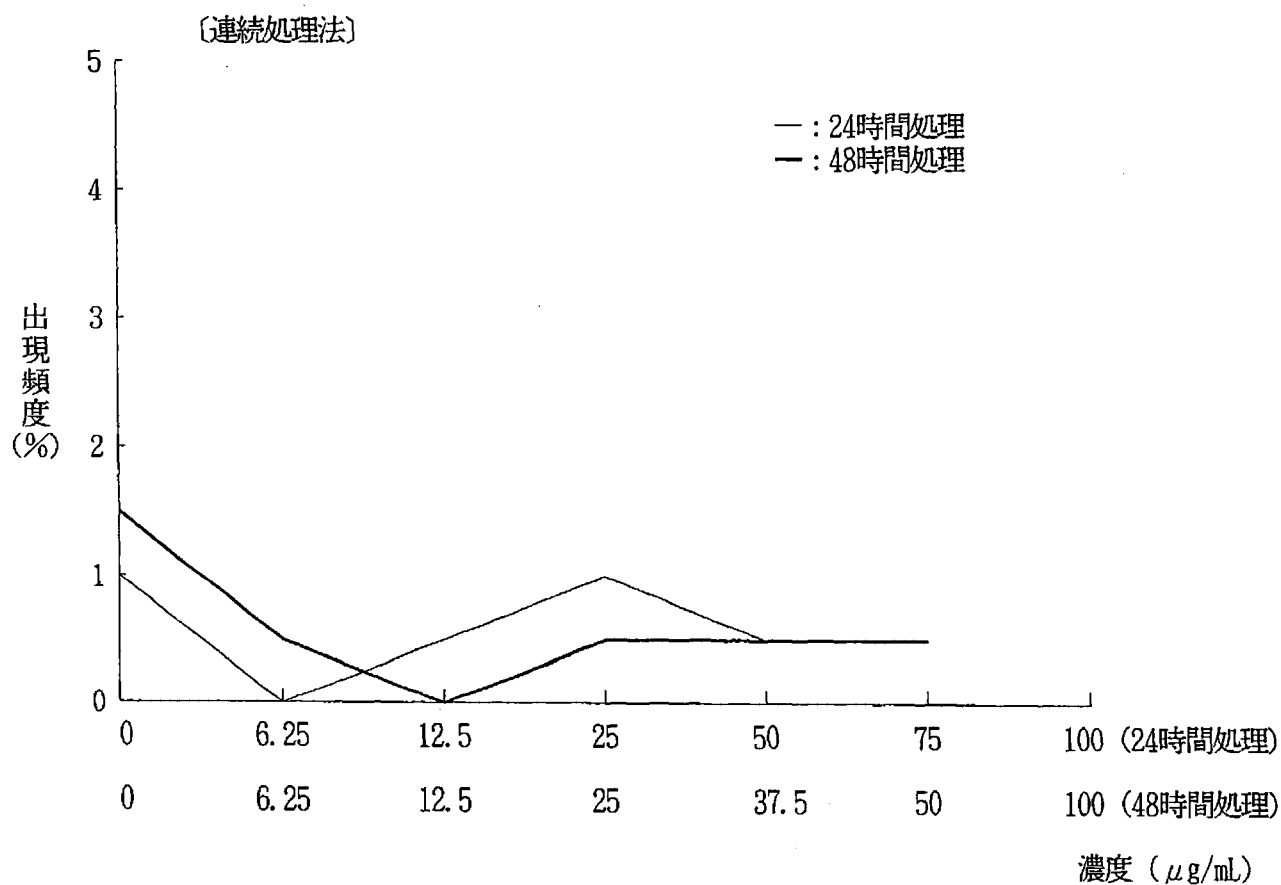


図 1 構造異常を有する細胞の出現頻度

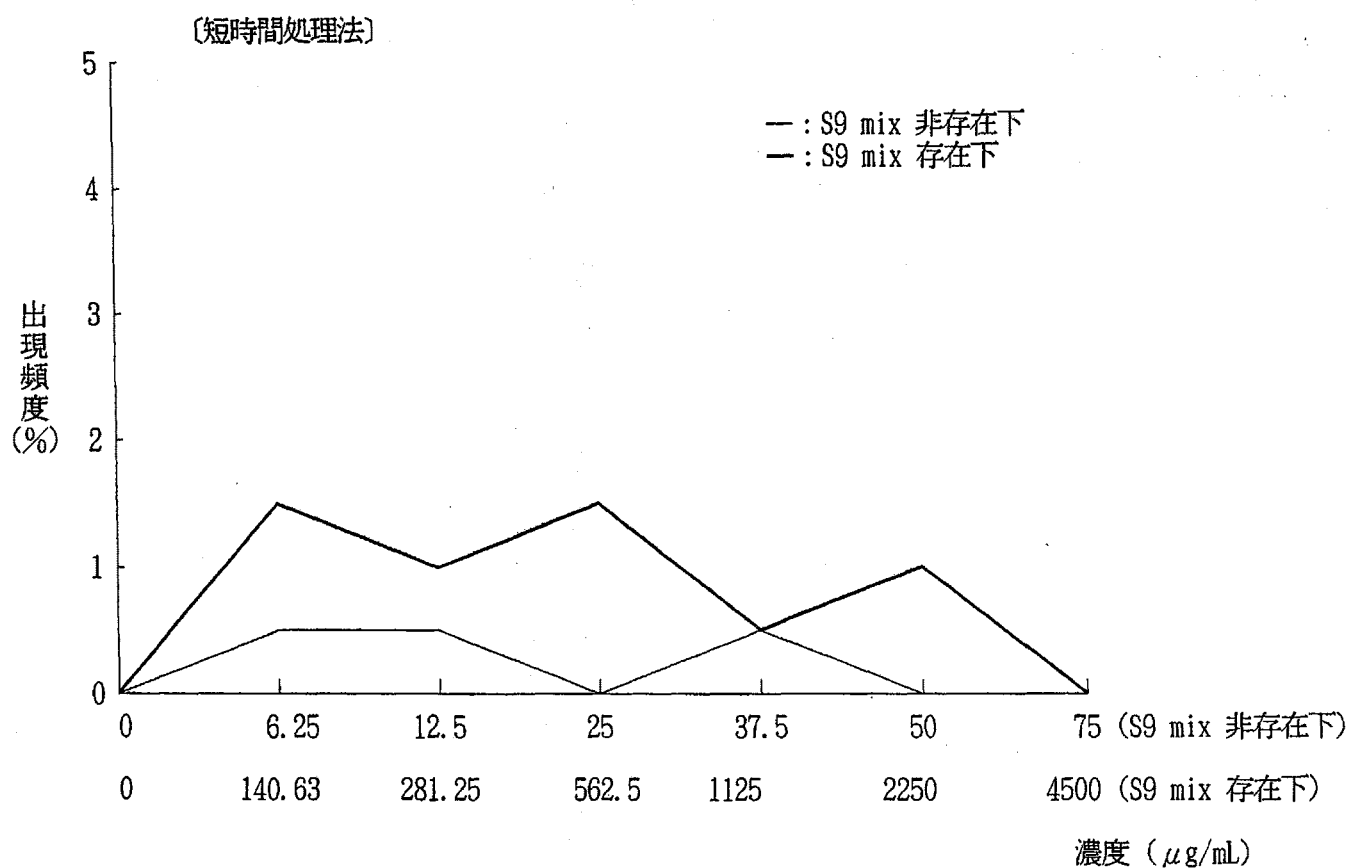
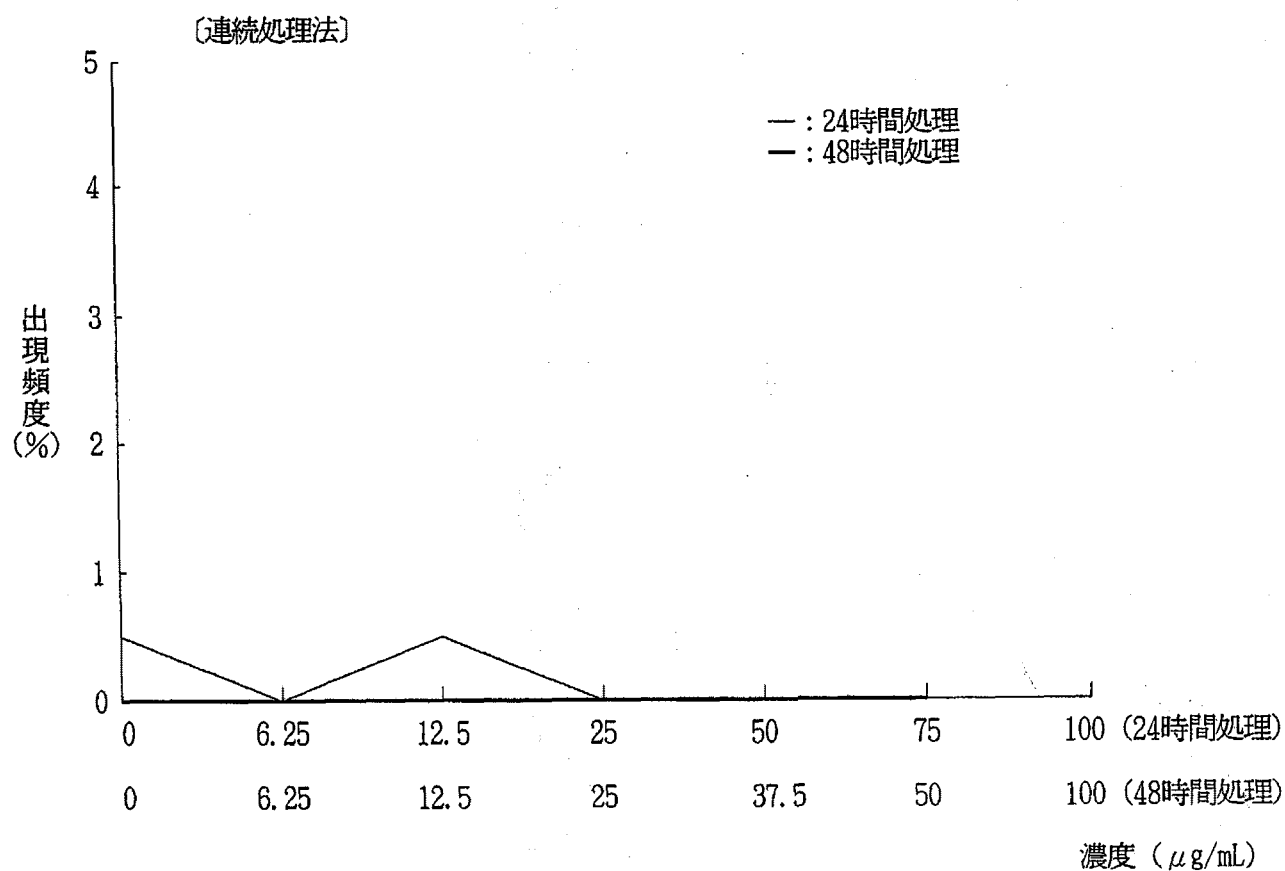


図 2 倍数性細胞の出現頻度