

最終報告書

p-ニトロフェノールナトリウムのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号: 98-111)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

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	4
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	7
1) 被験物質および陽性対照物質の用量	7
2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製	7
3) 細胞の処理	7
4) 試験群の構成および使用シャーレ数	8
5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定	9
6) 染色体の観察	9
7) 染色体異常の分類および集計	9
8) 試験結果の判定	10

結果	10
1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）	10
2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）	11
3. D_{20} 値	11
結論および参考事項	12
参考文献	12

表

表 1	p-ニトロフェノールナトリウムの染色体異常試験結果 （短時間処理法：S9 mix 非存在下）	14
表 2	p-ニトロフェノールナトリウムの染色体異常試験結 （短時間処理法：S9 mix 存在下）	15
図		
図 1	構造異常を有する細胞の出現頻度	16
図 2	数的異常を有する細胞の出現頻度	17

要 約

p-ニトロフェノールナトリウム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線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いて *in vitro* における短時間処理法による染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、S9 mix 非存在下では 25~1600 $\mu\text{g/mL}$ 、S9 mix 存在下では 400~1600 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、S9 mix 非存在下では 1600 $\mu\text{g/mL}$ 、また、S9 mix 存在下では 1200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。

したがって、染色体異常試験における用量は、S9 mix 非存在下では 100, 200, 400, 800, 1200 および 1600 $\mu\text{g/mL}$ 、S9 mix 存在下では 600, 800, 1000, 1200, 1400 および 1600 $\mu\text{g/mL}$ とした。

試験の結果、S9 mix 非存在下では、用量依存的な染色体異常細胞の増加が認められ、800 および 1200 $\mu\text{g/mL}$ での増加は統計学的に有意なものであった。1600 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。また、S9 mix 存在下においても用量依存的な染色体構造異常細胞の増加が認められ、600 $\mu\text{g/mL}$ 以上での増加は統計学的に有意なものであった。1400 および 1600 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞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、p-ニトロフェノールナトリウムの CHL/IU 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、S9 mix 非存在下では 1.08 mg/mL、S9 mix 存在下では 0.65 mg/mL であった。

試 験 目 的

この試験は、*p*-ニトロフェノールナトリウム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) : *p*-ニトロフェノールナトリウム (PNPS)

別名 *p*-Nitrophenol sodium salt ; *p*-ニトロフェノールソーダ塩

なお、*p*-ニトロフェノールナトリウムは不安定な物質で、通常は二水和物 (*p*-Nitrophenol sodium salt \cdot 2H₂O) として製品化され流通している。従って、試験には *p*-Nitrophenol sodium salt \cdot 2H₂O を用いた。

CAS番号 : 824-78-2 (*p*-Nitrophenol sodium salt \cdot 2H₂O : 42083-62-5)

ロット番号 :

純 度 : 79.4% (平成10年10月21日分析) [不純物 : 水 19.4%, 不明 1.2%]

p-Nitrophenol sodium salt \cdot 2H₂O としての純度は 97.2% (平成10年10月21日分析) [不純物 : 水 1.6%, 不明 1.2%] である。

入手先(製造元) :

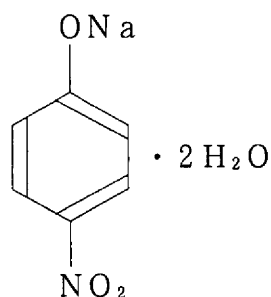
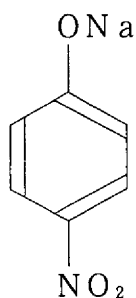
入 手 日 : 平成10年10月26日

入 手 量 : 250 g

物理化学的性状 :

化学名 *p*-Nitrophenol sodium salt (二水和物 : *p*-Nitrophenol sodium salt \cdot 2H₂O)

構造式



(二水和物)

分子式 $\text{NaOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ (二水和物： $\text{NaOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
分子量 161.09 (二水和物：197.12)
性状(常温) 黄色結晶
融点 300°C 以上
沸点 測定不可 (分解)
溶解性 水：5.97 g/100 mL, エタノール：可溶 (以上, 二水和物の溶解性)
安定性： 安定 [実験終了後, 残余被験物質を において分析 (平成11年7月12日) した結果, 純度は79.5%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°C), 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生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場, ロット番号 K8H89, 局方) 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

被験物質は水に可溶であるため, 溶媒には生理食塩液を用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[*a*]P の溶媒についても, DMSO [和光純薬工業株式会社, ロット番号 ACH7185, 純度 99.9%] を用いた。

4. 試験細胞株

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日に分与を受けたチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) 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2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 1019178) を常法に従い調製し, これに非働化 (56°C, 30分間加熱処理) 仔牛血清 (Gibco Laboratories, ロット番号 1013320, 1015812) を10%の割合で添加したものをを用いた。

6. 培養条件

供試細胞は, CO₂インキュベーター (Napco 社) 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-394, 平成10年12月4日製造, 平成10年12月18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: 200~239 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) 投与方法 (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 μ mol/0.1 mL
KCl	33 μ mol/0.1 mL
G-6-P	5 μ mol/0.1 mL
NADP	4 μ mol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4 μ mol/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用量を検討するため、短時間処理法の場合は、S9 mix 非存在下では 25, 50, 100, 200, 400, 800 および 1600 μ g/mL, S9 mix 存在下では 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 および 1600 μ g/mL, 連続処理法の場合は 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 および 200 μ g/mL の用量を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行なった。試験には各用量について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生理食塩液に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで、原液の一部を生理食塩液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 10 vol%とした。なお、被験物質供試液を調製する際は、純度換算を行った。

2) 細胞の処理

短時間処理法の場合、直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に 4×10^3 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え、培養開始 3 日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、生理食塩液（陰性対照）または被験物質の供試液各 0.3 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とも 2.5 mL を残して培養液を取り除き、S9 mix 0.5 mL を加えた後、生理食塩液または被験物質の供試液各 0.3 mL をシャーレに加えた。培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加えて18時間培養した。一方、連続処理法の場合は、短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し、培養開始 3 日後に生理食塩液または被験物質の供試液各 0.5 mL を加えて24時間および48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 w/v%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。

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 (モノセレータ II, オリンパス光学工業株式会社) を用いて測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果は、下表に示したとおり、短時間処理法においては、S9 mix 非存在下では 1600 $\mu\text{g/mL}$ で、また、S9 mix 存在下では 1200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量はそれぞれ 800~1600 $\mu\text{g/mL}$ 間および 1200 $\mu\text{g/mL}$ の近くにあるものと判断された。連続処理法においては、24時間処理では 200 $\mu\text{g/mL}$ 以上、また、48時間処理では 100 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量はそれぞれ 100~200 $\mu\text{g/mL}$ 間および 50~100 $\mu\text{g/mL}$ 間にあるものと判断された。

〔短時間処理法〕			〔短時間処理法〕		
用 量	細胞増殖率 (%)		用 量	細胞増殖率 (%)	
($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix 非存在下		($\mu\text{g/mL}$)	S9 mix 存在下	
0 (溶媒)	100	100 [100.0]	0 (溶媒)	100	100 [100.0]
25	105	101 [103.0]	400	96	110 [103.0]
50	102	94 [98.0]	600	98	113 [105.5]
100	91	92 [91.5]	800	98	116 [107.0]
200	82	77 [79.5]	1000	70	77 [73.5]
400	80	77 [78.5]	1200	47	49 [48.0]
800	68	65 [66.5]	1400	42	33 [37.5]
1600	3	17 [10.0]	1600	24	24 [24.0]

[] : 平均値

〔連続処理法〕

用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	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]
3.125	98	97	[97.5]	89	94	[91.5]
6.25	86	102	[94.0]	87	86	[86.5]
12.5	93	94	[93.5]	84	85	[84.5]
25	89	91	[90.0]	75	75	[75.0]
50	75	79	[77.0]	54	55	[54.5]
100	55	61	[58.0]	25	25	[25.0]
200	42	45	[43.5]	20	20	[20.0]

[] : 平均値

9. 染色体異常試験 (短時間処理法)

1) 被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の用量は、50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ3用量以上のデータが得られる事を考慮して、S9 mix 非存在下では 100, 200, 400, 800, 1200 および 1600 $\mu\text{g/mL}$ の6用量, S9 mix 存在下では 600, 800, 1000, 1200, 1400 および 1600 $\mu\text{g/mL}$ の6用量とした。陽性対照物質の MNNG は 2.5 $\mu\text{g/mL}$, B[a]P は 10 $\mu\text{g/mL}$ の用量を用いた。

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生理食塩液に溶解して最高用量の供試液 (原液) を調製した。次いで、原液の一部を生理食塩液で順次希釈し、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。なお、被験物質供試液を調製する際は、純度換算を行った。

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用量当たり4枚のシャーレを用い、そのうち2枚は染色体標本作製用に、残りの2枚は細胞増殖率

測定用に使用した。但し、陽性対照群については細胞増殖率の測定は行わず、用いるシャーレは染色体標本作製の2枚とした。

S9 mix 非存在下の場合は、各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、生理食塩液および被験物質供試液は 0.3 mL, MNNG の供試液は 0.015 mL を各シャーレに添加して培養した。また、S9 mix 存在下の場合は、各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除いた後、S9 mix 0.5 mL を加え、続いて生理食塩液および被験物質供試液は 0.3 mL, B[a]P の供試液は 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、新しい培養液 5 mL を加え、さらに18時間培養した。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

[S9 mix 非存在下]

用量 ($\mu\text{g/mL}$)	使用シャーレ数
0 (陰性対照) ^a	4
100	4
200	4
400	4
800	4
1200	4
1600	4
2.5 (陽性対照) ^b	2

a : 生理食塩液, b : MNNG, 使用シャーレ総数 : 30

[S9 mix 存在下]

用量 ($\mu\text{g/mL}$)	使用シャーレ数
0 (陰性対照) ^a	4
600	4
800	4
1000	4
1200	4
1400	4
1600	4
10 (陽性対照) ^b	2

a : 生理食塩液, b : B[a]P, 使用シャーレ総数 : 30

5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

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 1010169) を最終濃度として $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 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剝離し、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、S ϕ rensen 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 $1.4 \text{ vol}\%$ 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。

細胞増殖率の測定は、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、 $0.1 \text{ w/v}\%$ クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色し、水洗後乾燥した。単層培養細胞密度計 (モノセレーター II, オリパス光学工業株式会社) を用いて陰性 (溶媒) 対照群の細胞増殖率を 100% とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

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。各用量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用量当たり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、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 (倍数体) のみを記録した。

ギャップ (染色分体型および染色体型) については、異常として記録したが、構造異常には含めなかった。ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

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表示した。

8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、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用量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、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻度が2用量以上で有意に増加し、かつ用量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

1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

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1.5%であったが、被験物質群では100, 200, 400, 800 および 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ2.0, 2.0, 2.5, 7.5 および 28.0%と用量依存的な増加が認められ、800 および 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での増加は陰性対照群と比較して統計学的に有意なものであった。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96.5%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体は、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0~1.5%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。

1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においては、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像が認められなかった。

なお、本被験物質は黄色を呈しており、その供試液を培養液中に添加すると培養液は直ちに黄色化した。この変化がpH値の低下を伴うものかを確認するため、400~1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用量に関し、添加直後と添加培養6時間後に培養液のpHを測定したところ、pHは7.0~7.2の中性域を保持していた。

2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

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0.5%であったのに対し、被験物質群では、600, 800, 1000 および 1200 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 11.5, 19.0, 33.5 および 48.0%と用量依存的な増加が認められ、600 $\mu\text{g/mL}$ 以上での増加は統計学的に有意なものであった。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 45.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群では 1.0%の低い出現頻度で認められた。被験物質群においても 0~1.5%の範囲の低い出現頻度であった。陽性対照群では倍数体は認められなかった。

1400 および 1600 $\mu\text{g/mL}$ においては、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像が認められなかった。

なお、600~1200 $\mu\text{g/mL}$ 用量に関し、培養液の pH を添加直後と添加培養 6 時間後に測定したところ、pH は 7.0~7.2 の中性域を保持していた。

3. D_{20} 値⁴⁾

短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下において、陽性値を示す染色体異常細胞の増加が認められたため、 D_{20} 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の推定用量 (mg/mL)〕を算出した。

その結果は次表に示したとおりであり、S9 mix 非存在および存在下の構造異常に関する D_{20} 値は、いずれも S 値が小さい方の 1.08 mg/mL および 0.65 mg/mL を採用した。

短時間処理法	回帰曲線	D_{20} 値 ($\mu\text{g/mL}$)	S 値 $\left(S = \frac{D_{20}}{r} \times \frac{1}{n^2} \right)$
〔構造異常〕			
S9 mix 非存在下	$y=0.0201163x-1.80232(r=0.896402)$	1083.82	33.5854
	$y=14.4447x-27.9363(r=0.725551)$	2082.57	79.7311
S9 mix 存在下	$y=0.0379717x-4.83961(r=0.938393)$	654.161	27.8843
	$y=112.6x-302.648(r=0.981813)$	733.568	29.8863

S 値：対象となった D_{20} 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

結論および参考事項

p-ニトロフェノールナトリウムの変異原性に関する報告は見当たらないものの、その類縁化合物について、p-ニトロフェノールは、*Salmonella typhimurium* を用いた復帰突然変異試験で陰性⁵⁾、*Proteus mirabilis* を用いた DNA 修復試験で陽性⁶⁾、初代ラット肝細胞を用いた不定期 DNA 合成試験で陰性⁷⁾、o-ニトロフェノールは、*S. typhimurium* を用いた復帰突然変異試験で陰性⁵⁾と報告されている。また、3-メチル-4-ニトロフェノールは、*S. typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験で陰性⁸⁾、CHL/IU 細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁹⁾と報告されている。

そこで、今回 p-ニトロフェノールナトリウムの染色体異常誘発性の有無を調べるため、CHL/IU 細胞を用いた *in vitro* における染色体異常試験を実施した。その結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下ともに染色体構造異常細胞の用量依存的、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、p-ニトロフェノールナトリウムの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。短時間処理法において陽性結果が得られたため、連続処理法による試験は行わなかった。本被験物質の D₂₀値は、S9 mix 非存在下では 1.08 mg/mL、S9 mix 存在下では 0.65 mg/mL であった。本試験結果は、CHL/IU 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断基準¹⁰⁾からみても明らかな陽性と判断されるものであった。

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 改定版”
化学工業日報社, 東京, 1992, pp.51-52.
 - 5) Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W. and Zeiger, E. (1983).
Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environmental Mutagenesis*,
5, 3-142.
 - 6) Adler, B., Braun, R., Schoneich, J. and Bohme, H. (1976). Repair-defective
mutants of *proteus mirabilis* as a prescreening system for the detection of
potential carcinogens. *Biologisches Zentralblatt*, **95**, 463-469.
 - 7) Probst, G.S., McMahon, R.E., Holl, L.E., Thompson, C.Z., Epp, J.K. and Neal, S.B.
(1981). Chemically-induced DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures : A
comparison with bacterial mutagenicity using 218 compounds. *Environmental
Mutagenesis*, **3**, 11-32.
 - 8) 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.2”
化学物質点検推進委員会, 東京, 1995, pp.163-166.
 - 9) 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.2”
化学物質点検推進委員会, 東京, 1995, pp.167-170.
 - 10) 石館 基 監修, “改定増補 染色体異常試験データ集” エル・アイ・シー, 東京, 1987,
p.19.

表1 p-ニトロフェノールナトリウムの染色体異常試験結果（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

被験物質 の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数 (%)							ギャップ の出現数 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (%)				細胞 増殖率 (%)
	観察 細胞数	染色分 体切断	染色分 体交換	染色体 切断	染色体 交換	その他	総異常 細胞数		観察 細胞数	倍数体	その他 (核内倍加)	総異常 細胞数	
陰性対照 (生理食塩液) 0	100	1	0	0	1	0	2	1	100	0	0	0	100.0
	100	1	0	0	0	0	1	0	100	0	0	0	
	200	2(1.0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	3(1.5)	1(0.5)	200	0(0)	0(0)	0(0)	
100	100	0	1	0	1	0	2	1	100	1	1	2	82.0
	100	2	0	0	0	0	2	1	100	1	0	1	
	200	2(1.0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	4(2.0)	2(1.0)	200	2(1.0)	1(0.5)	3(1.5)	
200	100	1	1	0	0	0	2	0	100	0	2	2	82.5
	100	0	2	0	0	0	2	0	100	0	1	1	
	200	1(0.5)	3(1.5)	0(0)	0(0)	0(0)	4(2.0)	0(0)	200	0(0)	3(1.5)	3(1.5)	
400	100	1	2	0	0	0	3	0	100	0	0	0	80.5
	100	1	2	1	0	0	2	0	100	0	0	0	
	200	2(1.0)	4(2.0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	5(2.5)	0(0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	
800	100	3	6	0	1	0	8	0	100	1	0	1	66.0
	100	1	6	0	0	0	7	0	100	0	0	0	
	200	4(2.0)	12(6.0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	15(7.5)*	0(0)	200	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	
1200	100	9	25	1	0	0	25	2	100	0	0	0	36.5
	100	17	26	0	0	0	31	3	100	0	0	0	
	200	26(13.0)	51(25.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	56(28.0)**	5(2.5)	200	0(0)	0(0)	0(0)	
1600*	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	11.0
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
陽性対照 (MNNG) 2.5	100	23	96	0	0	0	96	2	100	0	0	0	--
	100	22	96	0	1	0	97	2	100	0	0	0	
	200	45(22.5)	192(96.0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	193(96.5)**	4(2.0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	

: 細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像なし。
MNNG : 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

* : $p < 0.05$.

** : $p < 0.01$.

表2 p-ニトロフェノールナトリウムの染色体異常試験結果 (短時間処理法: S9 mix 存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数 (%)							ギャップ の出現数 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (%)				細胞 増殖率 (%)
	観察 細胞数	染色分 体切断	染色分 体交換	染色体 切断	染色体 交換	その他	総異常 細胞数		観察 細胞数	倍数体	その他 (核内倍加)	総異常 細胞数	
陰性対照 (生理食塩液) 0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	1	0	1	100.0
	100	0	1	0	0	0	1	0	100	1	0	1	
	200	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	200	2(1.0)	0(0)	2(1.0)	
600	100	2	12	0	0	0	12	1	100	1	0	1	89.0
	100	0	11	0	0	0	11	0	100	0	2	2	
	200	2(1.0)	23(11.5)	0(0)	0(0)	0(0)	23(11.5)**	1(0.5)	200	1(0.5)	2(1.0)	3(1.5)	
800	100	2	13	0	0	0	14	0	100	0	0	0	79.5
	100	8	19	0	1	0	24	0	100	0	0	0	
	200	10(5.0)	32(16.0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	38(19.0)**	0(0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	
1000	100	13	30	0	0	0	33	1	100	0	0	0	61.0
	100	7	30	0	2	0	34	1	100	0	1	1	
	200	20(10.0)	60(30.0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	67(33.5)**	2(1.0)	200	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	
1200	100	29	43	0	0	0	47	1	100	0	0	0	42.0
	100	19	46	0	0	0	49	1	100	0	0	0	
	200	48(24.0)	89(44.5)	0(0)	0(0)	0(0)	96(48.0)**	2(1.0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	
1400#	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	25.0
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
1600#	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	14.5
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
陽性対照 (B[a]P) 10	100	2	46	2	0	0	46	2	100	0	0	0	--
	100	7	40	0	0	0	45	1	100	0	0	0	
	200	9(4.5)	86(43.0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	91(45.5)**	3(1.5)	200	0(0)	0(0)	0(0)	

: 細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像なし。
B[a]P : 3,4-Benzo[a]pyrene. **: p<0.01.

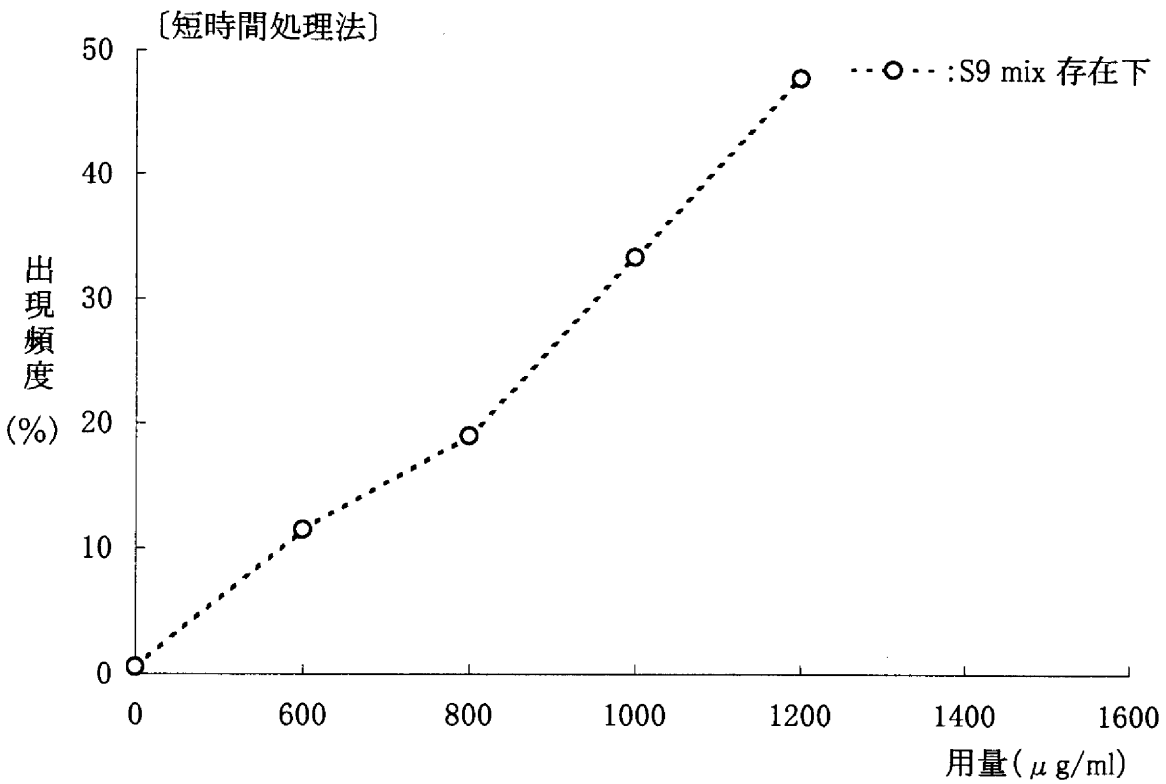
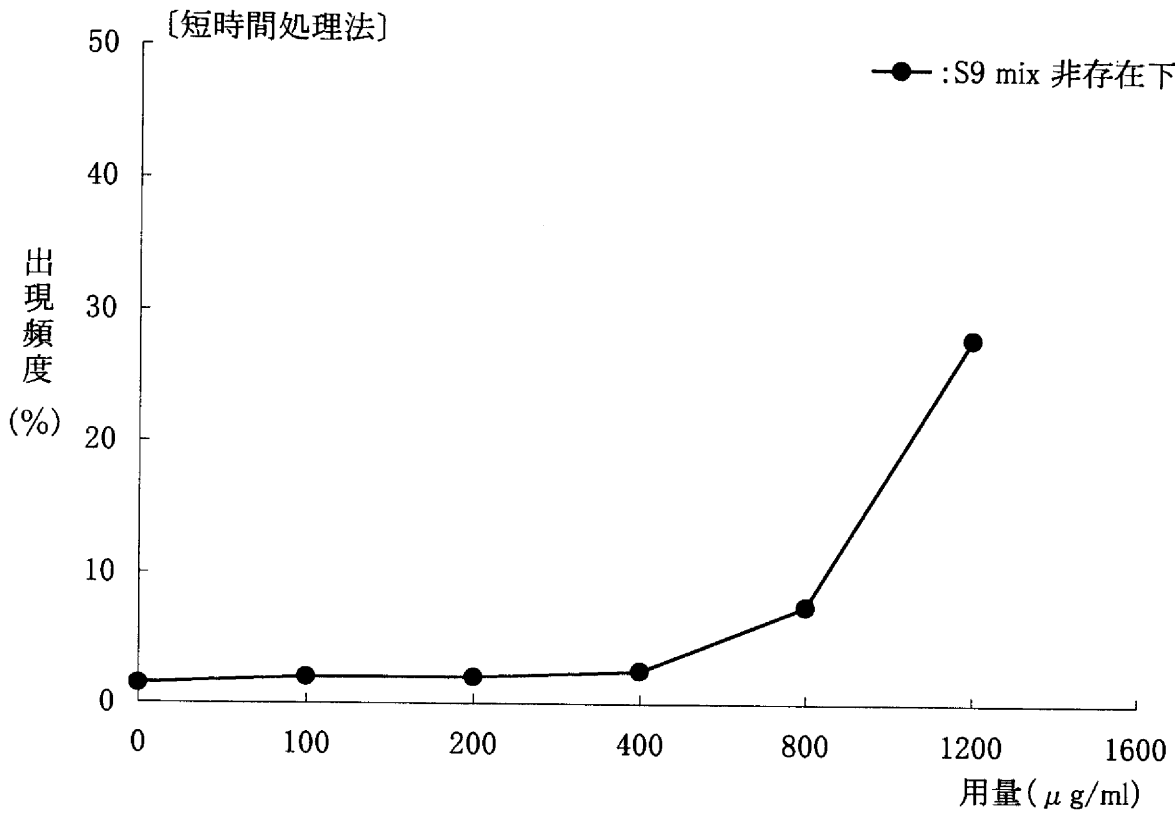


図 1 構造異常を有する細胞の出現頻度

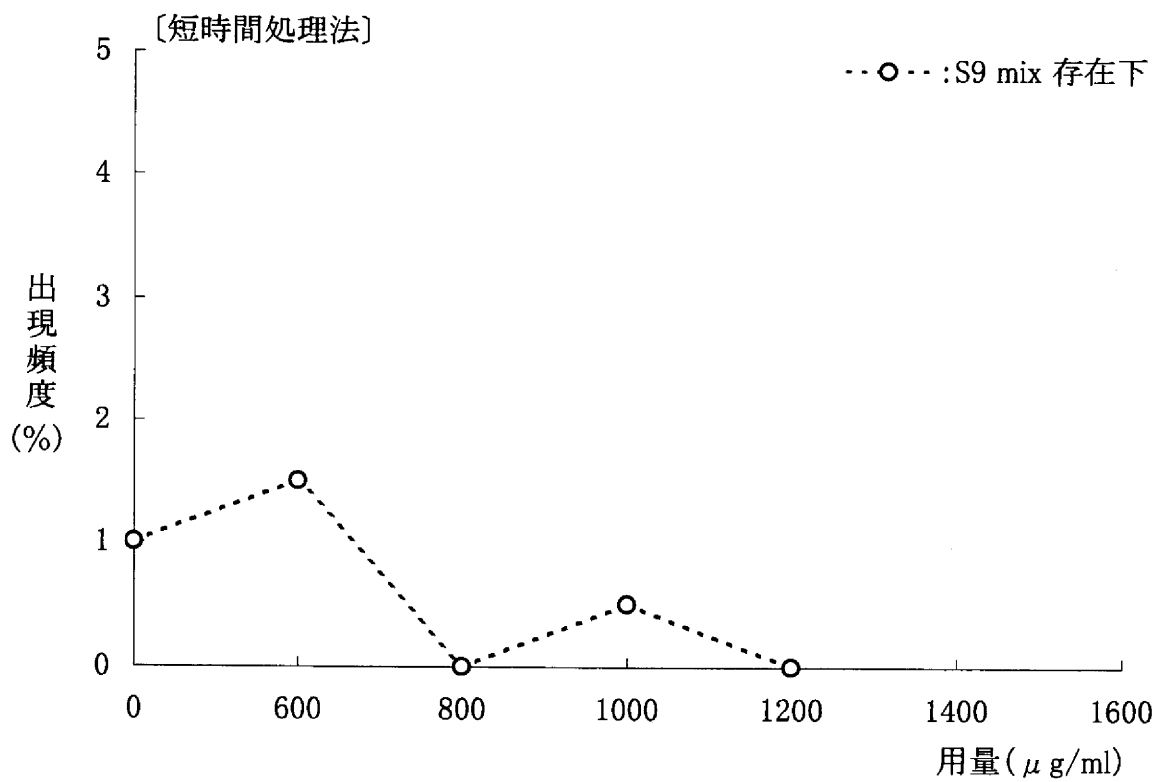
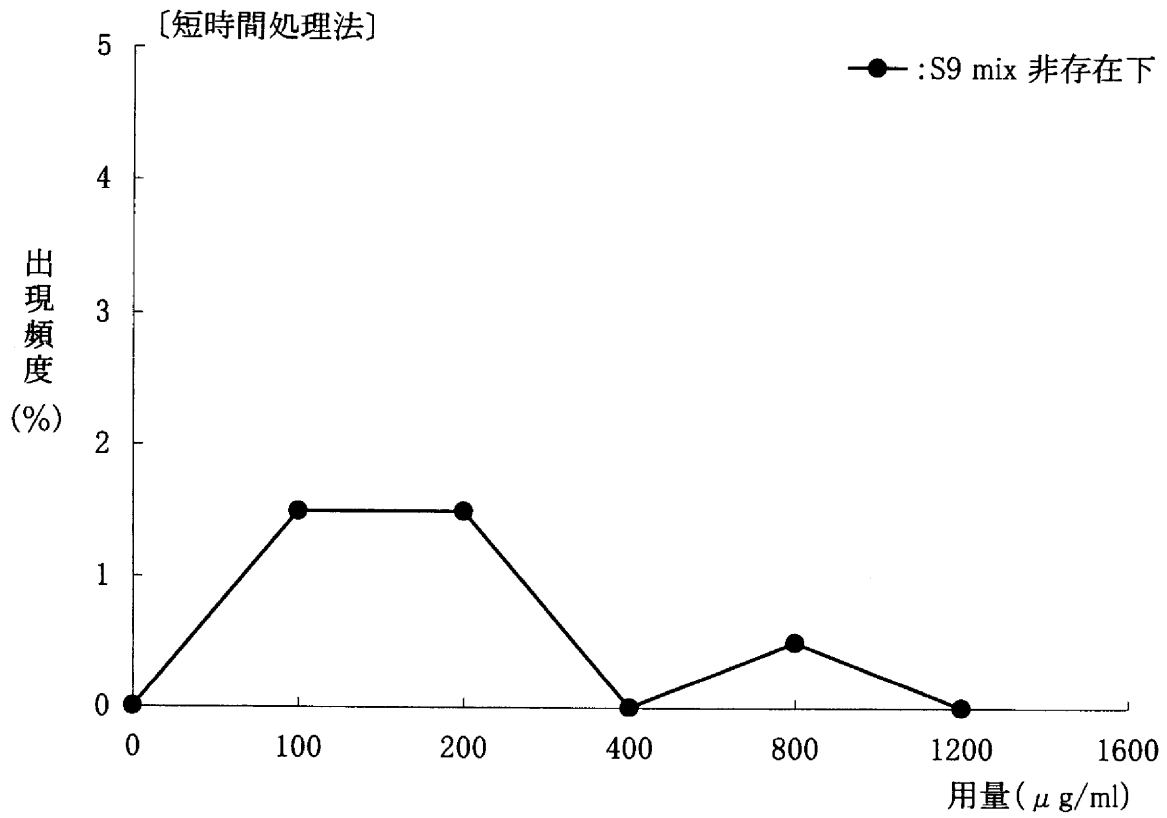


図 2 数的異常を有する細胞の出現頻度