

最 終 報 告 書

6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾールの哺乳動物培養細胞を用いた染色体異常試験

(試験番号: 97-087)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

Study No. 97-087

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	5
9. 染色体異常試験	7
1) 被験物質および陽性対照物質の濃度	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
(1) 連続処理法	7
(2) 短時間処理法	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	8
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	9

結果	10
1. 染色体異常試験（連続処理法）	10
2. 染色体異常試験（短時間処理法）	10
3. 染色体異常試験（短時間処理法：確認試験）	11
4. D_{20} 値	12
結論および参考事項	12
参考文献	13

表

表1 6-tert-ブチル-m-クレゾールの染色体異常試験結果（連続処理法）	14
表2 6-tert-ブチル-m-クレゾールの染色体異常試験結果（短時間処理法）	16
表3 6-tert-ブチル-m-クレゾールの染色体異常試験結果（短時間処理法：確認試験） ...	18

図

図1 構造異常を有する細胞の出現頻度	20
図2 倍数性細胞の出現頻度	21
図3 構造異常を有する細胞の出現頻度（短時間処理法：確認試験）	22
図4 倍数性細胞の出現頻度（短時間処理法：確認試験）	22

要 約

6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール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、連続処理法では24時間および48時間処理ともに 0.625~80 $\mu\text{g/mL}$, 短時間処理法においては, S9 mix 非存在および存在下ともに 7.5~120 $\mu\text{g/mL}$ 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は24時間および48時間処理ともに 80 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で, また, 短時間処理法においては S9 mix 非存在および存在下ともに 120 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で, いずれも 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濃度は, 連続処理法の場合, 10, 20, 40, 60 および 80 $\mu\text{g/mL}$, 短時間処理法の場合, 7.5, 15, 30, 60, 90 および 120 $\mu\text{g/mL}$ とした。

試験の結果, 連続処理法においては, 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時間および48時間処理における 80 $\mu\text{g/mL}$ 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, 60 $\mu\text{g/mL}$ 濃度を除く 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上のいずれの濃度においても染色体構造異常細胞の有意な増加が認められたが, 濃度依存的な増加ではなかった。また, S9 mix 非存在および存在下ともに 120 $\mu\text{g/mL}$ 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。そこで, 短時間処理法において, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 および 30 $\mu\text{g/mL}$ 濃度を設定し, 確認試験を行った。その結果, S9 mix 非存在下では, 染色体異常細胞の増加は認められなかった。一方, S9 mix 存在下では, 濃度依存的な染色体構造異常細胞の増加が認められ, 15 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度での増加は, 統計学的に有意なものであった。

以上の成績から, 本実験条件下では, 6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾールの 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 0.038 mg/mL であった。

試 験 目 的

この試験は、6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール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): 6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール (6TBMC)

別名 3-Methyl-6-*tert*-butylphenol; 2-*tert*-Butyl-5-methylphenol;
m-Cresol, 6-*tert*-butyl-

CAS番号: 88-60-8

ロット番号:

純 度: 99.23% (平成9年10月23日分析)

[不純物 4-Methyl-2-*tert*-butylphenol: 0.57%]

入手先(製造元):

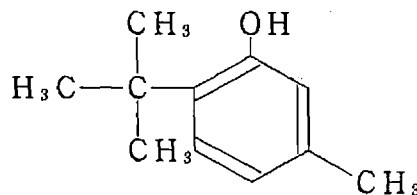
入 手 日:

入 手 量: 25 g

物理化学的性状

化 学 名 6-*tert*-Butyl-*m*-cresol

構 造 式



分 子 式 $C_{11}H_{16}O$

分 子 量 164.24

性状(常温) 微黄色透明液体

沸 点 $244^{\circ}\text{C}/101.3 \text{ KPa}$

融 点 21.3°C

蒸気圧 1.80 KPa (120℃)

溶解性 水：ほとんど溶けない；DMSO, 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14日）した結果，純度は99.30％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（窒素充填）

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。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

被験物質は水に難溶，DMSO に可溶であるため，溶媒には DMSO 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 TPK7807，TPR7212，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7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了。

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℃、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（細胞増殖抑制試験および染色体異常試験：ロット番号 CAM-370・平成9年10月3日製造・平成9年11月18日購入、確認試験：ロット番号 CAM-377・平成10年2月6日製造・平成10年2月20日購入）し、-80℃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： 178～231 g (CAM-370), 187～221 g (CAM-377),

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、0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 および 80 $\mu\text{g/mL}$ 濃度を、短時間処理法においては、7.5, 15, 30, 60, 90 および 120 $\mu\text{g/mL}$ 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 DMSO 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 16.0 mg/mL, 短時間処理法では 24.0 mg/mL とした。次いで、原液の一部を DMSO 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。

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 DMSO (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、DMSO 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、DMSO 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、連続処理法および短時間処理法ともに被験物質供試液のシャーレ内添加時および培養終了時には、培養液の変化や被験物質の析出などは認められなかった。

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、下表に示したとおり、連続処理法においては、24時間および48時間処理ともに 80 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で 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、24時間および48時間処理ともに 40~80 $\mu\text{g/mL}$ 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 非存在および存在下ともに 120 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、S9 mix 非存在下では 90 $\mu\text{g/mL}$ 濃度ではほぼ 50%細胞増殖抑制を示し、S9 mix 存在下では 90~120 $\mu\text{g/mL}$ 間に 50%細胞増殖抑制濃度があるものと判断された。

〔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]
0.625	94	96	[95.0]	96	106	[101.0]
1.25	103	98	[100.5]	94	102	[98.0]
2.5	99	103	[101.0]	96	103	[99.5]
5	103	94	[98.5]	84	91	[87.5]
10	89	92	[90.5]	83	81	[82.0]
20	89	90	[89.5]	83	84	[83.5]
40	63	70	[66.5]	72	75	[73.5]
80	23	23	[23.0]	10	12	[11.0]

[] : 平均値

〔短時間処理法〕

濃 度 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
7.5	107	114	[110.5]	90	94	[92.0]
15	99	109	[104.0]	82	90	[86.0]
30	103	95	[99.0]	71	86	[78.5]
60	82	78	[80.0]	69	67	[68.0]
90	53	48	[50.5]	57	59	[58.0]
120	15	7	[11.0]	9	7	[8.0]

[] : 平均値

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

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の濃度は、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、連続処理法の場合は、24時間および48時間処理ともに10, 20, 40 および 80 $\mu\text{g/mL}$ の4濃度、並びに40 $\mu\text{g/mL}$ と 80 $\mu\text{g/mL}$ 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、60 $\mu\text{g/mL}$ も設定し、計5濃度とした。短時間処理法の場合は、細胞増殖抑制試験と同様、S9 mix 非存在下および存在下ともに7.5, 15, 30, 60, 90 および 120 $\mu\text{g/mL}$ の6濃度を設定した。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DMSO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16.0 mg/mL, 短時間処理法では24.0 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DMSO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

DMSO（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および培養終了時には、培養液の変化や被験物質の析出など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、DMSO、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、DMSO、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、被験物質供試液のシャーレ内添加時および6時間培養終了時には、培養液の変化や被験物質の析出などは認められなかった。

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
10	2	2
20	2	2
40	2	2
60	2	2
80	2	2
2.5 (陽性対照) ^b	2	2

a : DMSO, b : MNNG, 使用シャーレ総数 : 28

〔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
7.5	2	2
15	2	2
30	2	2
60	2	2
90	2	2
120	2	2
10 (陽性対照) ^b	2	2

a : DMSO, 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, 株式会社ヤマトロン, 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。数値異常については、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の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

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0~1.5%、48時間処理では0~1.0%の範囲の出現頻度であり、陰性対照群と比較して統計学的有意差は認められなかった。

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96.5%、48時間処理で92.0%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、陰性対照群では認められなかった。被験物質群においては、48時間処理でのみ0~1.0%の範囲の低い出現頻度で認められた。また、陽性対照群においても、48時間処理でのみ1.0%の低い出現頻度であった。

なお、被験物質の細胞に対する毒性のため、24時間および48時間処理ともに80 $\mu\text{g/mL}$ 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1.0%、S9 mix 存在下で0.5%であった。被験物質群では、S9 mix 非存在下においては0~1.5%の範囲の出現頻度で認められ、陰性対照群との間に有意差はなかった。S9 mix 存在下では、7.5、15、30、60 および 90 $\mu\text{g/mL}$ 濃度でそれぞれ8.5、7.0、5.0、4.0 および 5.5%の出現頻度で認められ、60 $\mu\text{g/mL}$ 濃度を除く全ての濃度の出現頻度は、陰性対照群と比べて有意に高かった。この出現頻度の増加は、濃度の増加とともに若干小さくなる傾向にあり、濃度依存的な増加ではなかった。

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 2.0%，S9 mix 存在下で 60.5%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 S9 mix 非存在下でのみ 0.5%，被験物質群では S9 mix 存在下でのみ 0～1.0%の範囲のいずれも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 非存在および存在下ともに 120 $\mu\text{g/mL}$ 濃度では観察可能な分裂中期像は認められなかった。

3. 染色体異常試験（短時間処理法：確認試験）

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有意な増加が認められたが、濃度依存的な結果ではなかった。そこで、濃度依存性の有無を明らかにするため、短時間処理法における確認試験を行った。

細胞は、新たに凍結保存細胞を再培養し、増殖させたものを用いた。被験物質の濃度は、染色体異常試験において、染色体構造異常細胞の出現頻度が 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で最も高かったことから、この前後の濃度を含み、また、30～90 $\mu\text{g/mL}$ 濃度間の構造異常細胞の出現頻度には大差がなかったことから、30 $\mu\text{g/mL}$ を最高濃度とし、以下 15, 10, 7.5, 5 および 2.5 $\mu\text{g/mL}$ の計 6 濃度を設定した。

試験の結果は、表 3 に示した。染色体の構造異常細胞の出現頻度は、陰性対照群では、S9 mix 非存在下で 2.5%，S9 mix 存在下で 1.5%であった。被験物質群では、S9 mix 非存在下においては 0～3.0%の範囲の出現頻度で認められ、陰性対照群との間に有意差はなかった。S9 mix 存在下では、2.5, 5, 7.5, 10, 15 および 30 $\mu\text{g/mL}$ 濃度でそれぞれ 2.5, 2.5, 5.5, 6.5, 8.5 および 16.0%と濃度依存的な出現頻度の増加が認められ、15 および 30 $\mu\text{g/mL}$ 濃度の増加は、陰性対照群と比較して有意なものであった。

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 2.0%であったのに対し、S9 mix 存在下では 69.5%と B[a]P の代謝活性化による顕著な染色体異常誘発性が確認された。

倍数性細胞については、陰性対照群では、S9 mix 非存在および存在下ともに 0.5%の低い出現頻度で認められた。被験物質群では、S9 mix 非存在および存在下ともに 0～1.0%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。

4. 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。但し、染色体異常試験においては、明確な濃度依存性が認められず、妥当なD₂₀値を求めることができなかったため、明らかな濃度依存性が認められた確認試験の結果に基づいてD₂₀値を求めた。

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 0.038 mg/mL であった。

	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=0.493878x+1.20408	38.0578	0.781767
S9 mix 存在下	(r=0.993507)		
	y=10.2974x-2.39994	149.731	3.34237
	(r=0.91424)		

結論および参考事項

6-tert-ブチル-m-クレゾール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有意な増加が認められ、確認試験においても濃度依存的な染色体異常細胞の有意な増加が確認された。

したがって、本実験条件下では、6-tert-ブチル-m-クレゾールの 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0.038 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5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とする生物学的判断基準⁵⁾ からみても陽性と判断されるものであった。

なお、本被験物質の類縁化合物に関する変異原性について、4,4'-チオビス(6-tert-ブチル-m-クレゾール)⁶⁾ および 2'-2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-p-クレゾール)⁷⁾

は、いずれも *Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験並びに CHL 細胞を用いた染色体異常試験で陰性と報告されている。

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 改定版” 化学工業日報社, 東京, 1992, pp.51-52.
- 5) 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.
- 6) 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.4” 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1996, pp.239-250.
- 7) 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.4” 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1996, pp.423-430.

表1-1 6-tert-ブチル-m-クレゾール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 (DMSO)	--	100	0	--	0	1	1	0	0	0	2	2	--
		100	0		0	0	0	0	0	0			
		200	0(0)		0(0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	2(1.0)	
被験物質	10	100	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	—
		100	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)	
	20	100	0	—	1	0	0	0	0	0	1	0	—
		100	0		1	0	1	0	0	2	1		
		200	0(0)		2(1.0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)	1(0.5)	
	40	100	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	—
		100	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)	
	60	100	0	—	1	0	1	0	0	0	2	1	—
		100	0		0	1	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)	
	80 [#]	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
		--	--		--	--	--	--	--	--	--		
		--	--		--	--	--	--	--	--	--		
陽性対照 (MNNG)	2.5	100	0	—	4	46	97	1	0	0	99	99	+
		100	0		2	36	91	2	0	0	94	94	
		200	0(0)		6(3.0)	82(41.0)	188(94.0)	3(1.5)	0(0)	0(0)	193(96.5)**	193(96.5)	

+g：ギャップのみを有する細胞を含む場合.

-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.

DMSO：dimethyl sulfoxide.

MNNG：1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**：p<0.01.

表 1-2 6-tert-ブチル-m-クレゾール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 (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 (DMSO)	--	100	0		1	0	0	0	0	0	1	0	
		100	0		1	1	0	0	1	0	2	1	
		200	0(0)	--	2(1.0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	3(1.5)	1(0.5)	--
被験物質	10	100	0		0	1	0	0	0	0	1	1	
		100	0		0	0	1	0	0	0	1	1	
		200	0(0)	—	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	2(1.0)	—
	20	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)	—
	40	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)	—
	60	100	0		0	0	1	0	0	0	1	1	
		100	2		1	0	0	0	0	0	1	0	
		200	2(1.0)	—	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	1(0.5)	—
	80 [#]	--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
陽性対照 (MNNG)	2.5	100	1		3	48	89	5	5	0	93	93	
		100	1		10	41	86	7	2	0	91	91	
		200	2(1.0)	—	13(6.5)	89(44.5)	175(87.5)	12(6.0)	7(3.5)	0(0)	184(92.0)**	184(92.0)	+

+ g : ギャップのみを有する細胞を含む場合.

- 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.

DMSO : dimethyl sulfoxide.

MNNG : 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

** : $p < 0.01$.

表2-1 6-tert-ブチル-m-クレゾール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 (μg/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 (DMSO)	--	100	0	--	0	1	0	0	0	0	1	1	--	
		100	1		0	1	0	0	0	1	1			
		200	1(0.5)		0(0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	2(1.0)			
被験物質	7.5	100	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	—	
		100	0		0	0	0	1	0	1	1			
		200	0(0)		0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)			
	15	100	0	—	1	0	0	0	0	0	1	0	—	
		100	0		0	1	0	0	1	1				
		200	0(0)		1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	2(1.0)	1(0.5)			
	30	100	0	--	0	0	0	0	0	0	0	0	—	
		100	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)			
	60	100	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	—	
		100	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)			
	90	100	0	—	0	0	2	0	0	0	2	2	—	
		100	0		1	1	0	0	1	1				
		200	0(0)		1(0.5)	3(1.5)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)	3(1.5)			
	120 [#]	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--		--	--	--	--	--	--	--			
		--	--		--	--	--	--	--	--	--			
	陽性対照 (B[a]P)	10	100	1	—	0	2	0	0	0	0	2	2	—
			100	0		1	0	0	1	0	2	1		
			200	1(0.5)		1(0.5)	2(1.0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	4(2.0)	3(1.5)	

+g: ギャップのみを有する細胞を含む場合.

-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.

DMSO: dimethyl sulfoxide.

B[a]P: 3,4-benzo[a]pyrene.

表 2-2 6-tert-ブチル-m-クレゾール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 (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 (DMSO)	--	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)	--
被験物質	7.5	100	1		2	2	10	0	0	0	11	11	
		100	0		0	3	5	0	0	0	6	6	
		200	1(0.5)	—	2(1.0)	5(2.5)	15(7.5)	0(0)	0(0)	0(0)	17(8.5)**	17(8.5)	+
	15	100	2		0	5	6	0	0	0	8	8	
		100	0		2	3	4	0	0	0	6	5	
		200	2(1.0)	—	2(1.0)	8(4.0)	10(5.0)	0(0)	0(0)	0(0)	14(7.0)**	13(6.5)	+
	30	100	1		0	2	5	0	0	0	6	6	
		100	0		0	1	3	0	1	0	4	4	
		200	1(0.5)	—	0(0)	3(1.5)	8(4.0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	10(5.0)*	10(5.0)	+
	60	100	0		0	1	2	0	0	0	2	2	
		100	0		1	0	5	1	0	0	6	5	
		200	0(0)	—	1(0.5)	1(0.5)	7(3.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	8(4.0)	7(3.5)	—
	90	100	0		1	0	6	0	0	0	7	6	
		100	0		0	1	4	0	0	0	4	4	
		200	0(0)	—	1(0.5)	1(0.5)	10(5.0)	0(0)	0(0)	0(0)	11(5.5)*	10(5.0)	+
	120*	--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--		--	--	--	--	--	--	--	--	
		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
陽性対照 (B[a]P)	10	100	0		0	10	60	1	0	0	61	61	
		100	0		2	15	60	1	0	0	60	60	
		200	0(0)	—	2(1.0)	25(12.5)	120(60.0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	121(60.5)**	121(60.5)	+

+ g : ギャップのみを有する細胞を含む場合.

- 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.

DMSO : dimethyl sulfoxide.

B[a]P : 3,4-benzo[a]pyrene.

* : $p < 0.05$.

** : $p < 0.01$.

表 3-1 6-tert-ブチル-m-クレゾールの染色体異常試験結果 (短時間処理法: S9mix 非存在下-確認試験)

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 (DMSO)	--	100	1		0	2	1	0	0	0	3	3	
		100	0		1	1	0	0	0	0	2	1	
		200	1(0.5)	--	1(0.5)	3(1.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	5(2.5)	4(2.0)	--
被験物質	2.5	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)	—
	5	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)	—
	7.5	100	1		2	0	0	0	1	0	3	1	
		100	1		1	1	0	0	1	0	3	2	
		200	2(1.0)	—	3(1.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	6(3.0)	3(1.5)	—
	10	100	0		2	1	0	0	0	0	3	1	
		100	0		1	0	0	0	1	0	2	1	
		200	0(0)	—	3(1.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	5(2.5)	2(1.0)	—
	15	100	0		0	0	1	0	0	0	1	1	
		100	0		2	0	0	0	0	0	2	0	
		200	0(0)	—	2(1.0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)	1(0.5)	—
	30	100	0		2	2	0	0	0	0	3	2	
		100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	0(0)	—	2(1.0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)	2(1.0)	—
陽性対照 (B[a]P)	10	100	0		0	1	1	0	0	0	2	2	
		100	0		2	0	0	0	0	0	2	0	
		200	0(0)	—	2(1.0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	4(2.0)	2(1.0)	—

+ g : ギャップのみを有する細胞を含む場合.

- g : ギャップのみを有する細胞を除く場合.

DMSO : dimethyl sulfoxide.

B[a]P : 3,4-benzo[a]pyrene.

表 3-2 6-tert-ブチル-m-クレゾールの染色体異常試験結果 (短時間処理法: S9mix 存在下-確認試験)

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 (DMSO)	--	100	1		2	0	1	0	0	0	3	1	
		100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	1(0.5)	--	2(1.0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)	1(0.5)	--
被験物質	2.5	100	0		1	0	1	0	0	0	2	1	
		100	0		0	0	3	0	0	0	3	3	
		200	0(0)	—	1(0.5)	0(0)	4(2.0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(2.5)	4(2.0)	—
	5	100	0		0	0	2	0	0	0	2	2	
		100	1		0	1	1	0	1	0	3	3	
		200	1(0.5)	—	0(0)	1(0.5)	3(1.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	5(2.5)	5(2.5)	—
	7.5	100	1		0	4	4	0	0	0	6	6	
		100	1		0	3	3	0	0	0	5	5	
		200	2(1.0)	—	0(0)	7(3.5)	7(3.5)	0(0)	0(0)	0(0)	11(5.5)	11(5.5)	—
	10	100	1		2	2	6	0	0	0	7	7	
		100	0		0	2	5	0	1	0	6	6	
		200	1(0.5)	—	2(1.0)	4(2.0)	11(5.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	13(6.5)	13(6.5)	—
	15	100	1		2	2	6	0	1	0	8	7	
		100	0		1	4	6	0	0	0	9	9	
		200	1(0.5)	—	3(1.5)	6(3.0)	12(6.0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	17(8.5)**	16(8.0)	+
	30	100	0		3	6	11	0	0	0	16	15	
		100	1		1	5	14	0	0	0	16	16	
		200	1(0.5)	—	4(2.0)	11(5.5)	25(12.5)	0(0)	0(0)	0(0)	32(16.0)**	31(15.5)	+
陽性対照 (B[a]P)	10	100	0		4	14	65	0	0	0	69	68	
		100	0		2	19	67	1	0	0	70	70	
		200	0(0)	—	6(3.0)	33(16.5)	132(66.0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	139(69.5)**	138(69.0)	+

+ g : ギャップのみを有する細胞を含む場合.

- g : ギャップのみを有する細胞を除く場合.

DMSO : dimethyl sulfoxide.

B[a]P : 3,4-benzo[a]pyrene.

** : $p < 0.01$.

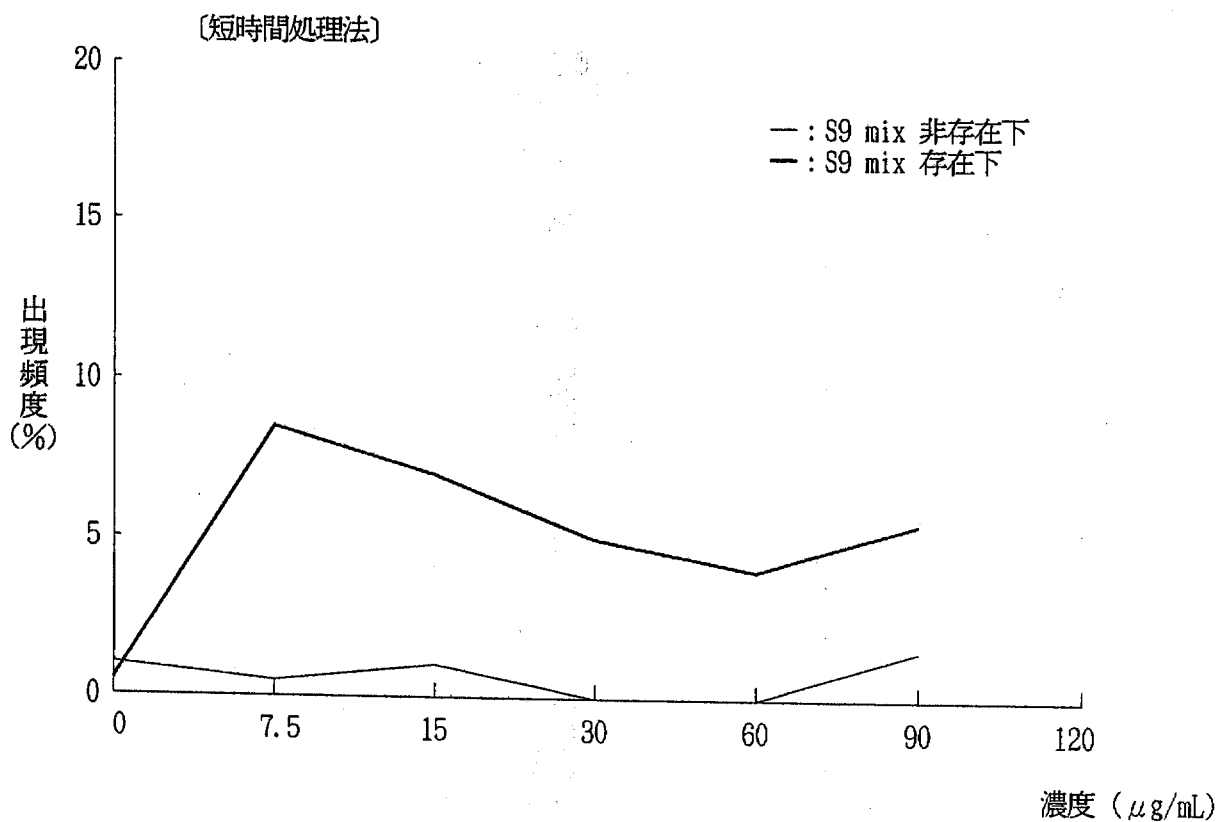
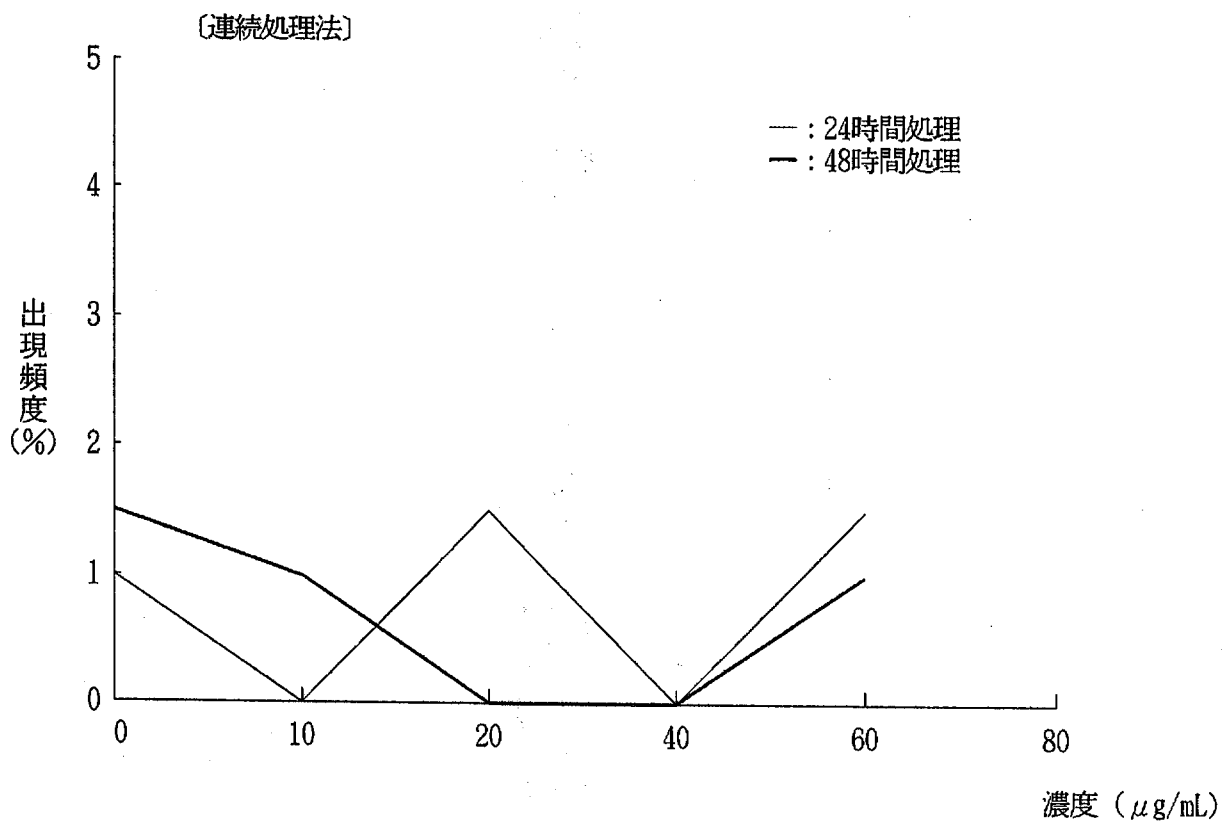


図 1 構造異常を有する細胞の出現頻度

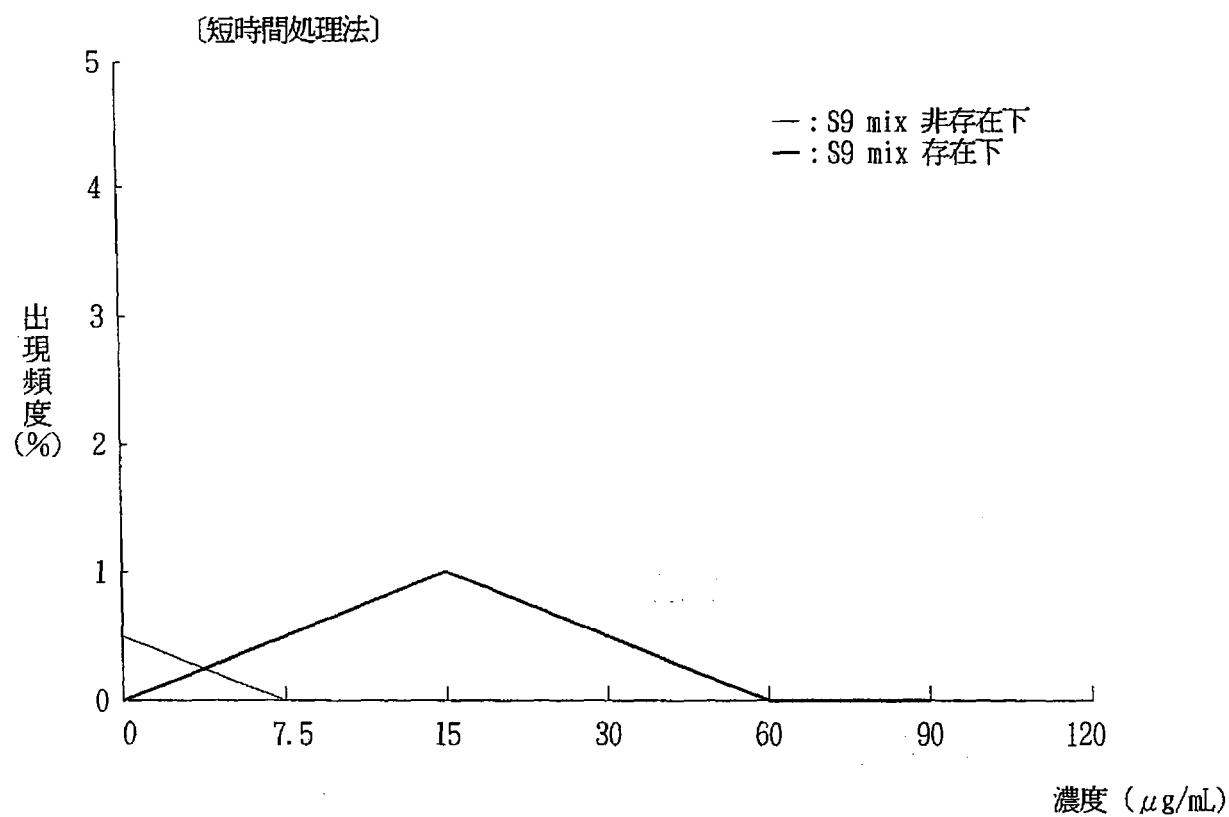
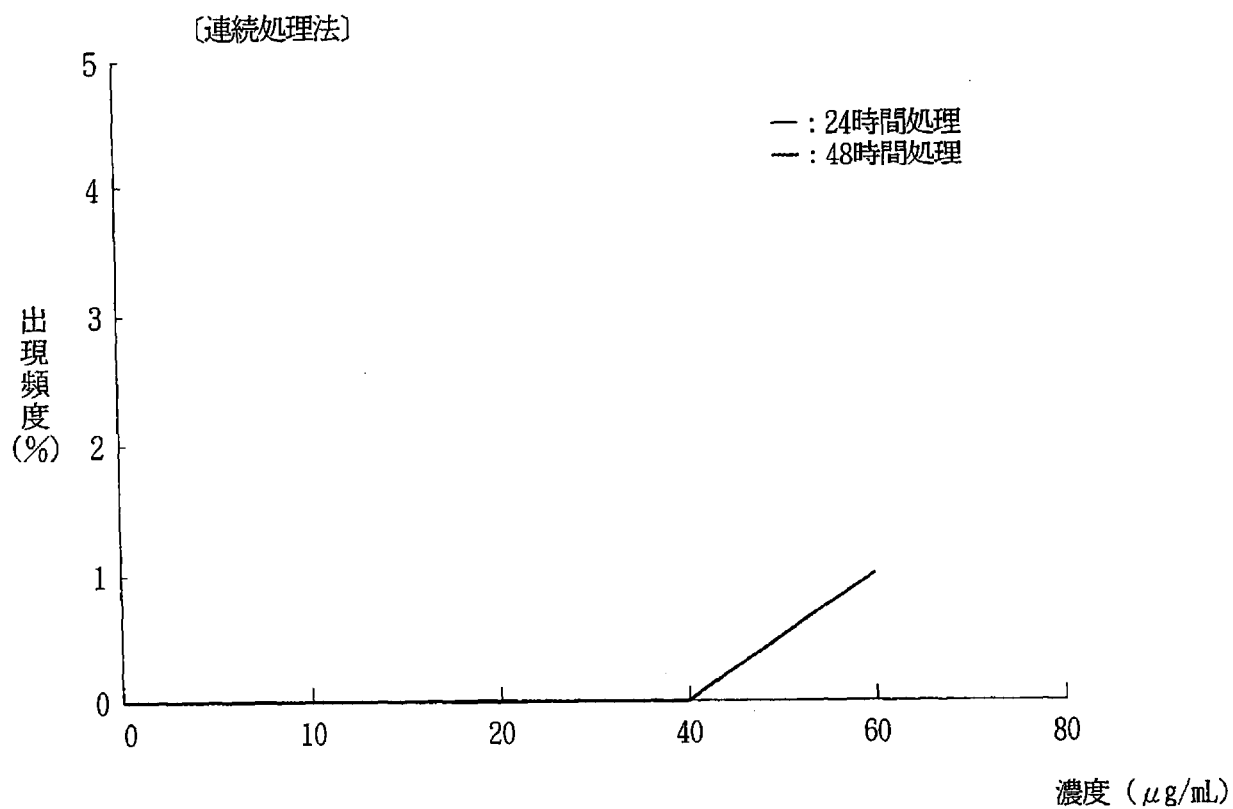


図 2 倍数性細胞の出現頻度

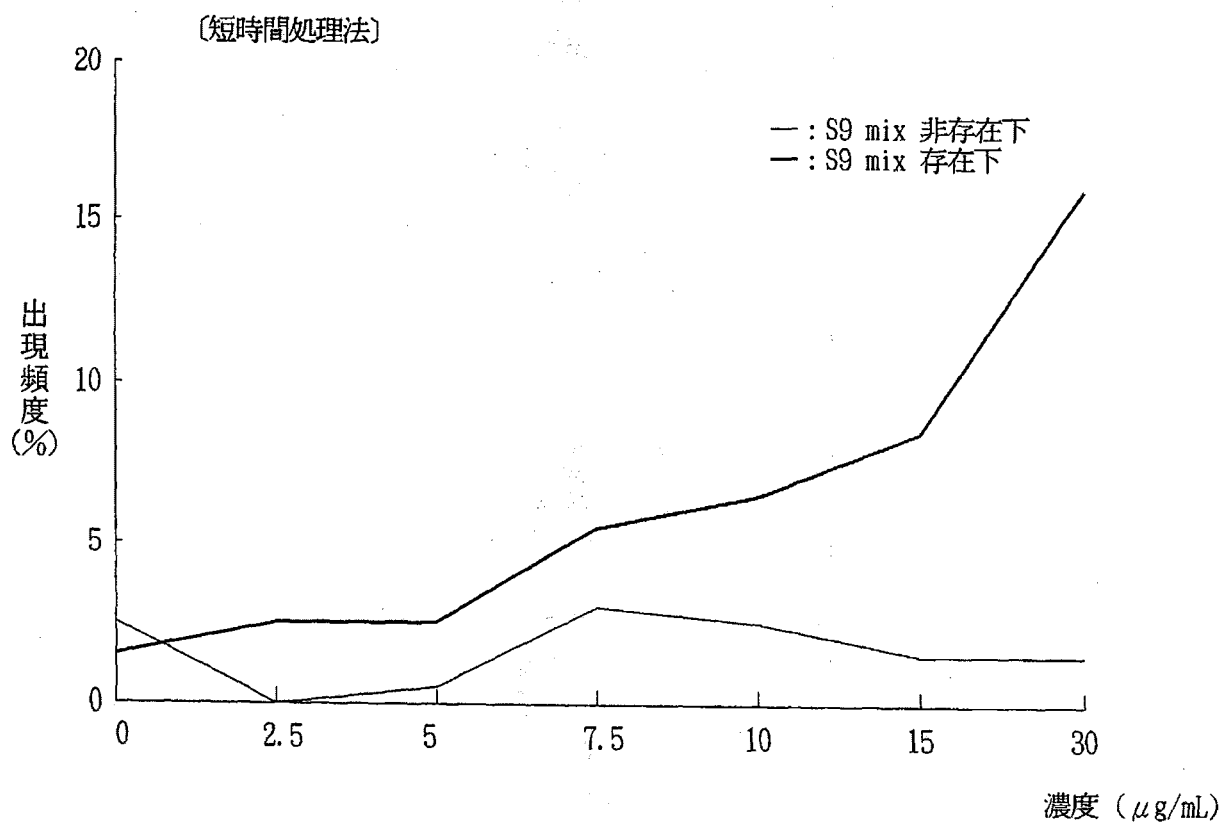


図 3 構造異常を有する細胞の出現頻度 (確認試験)

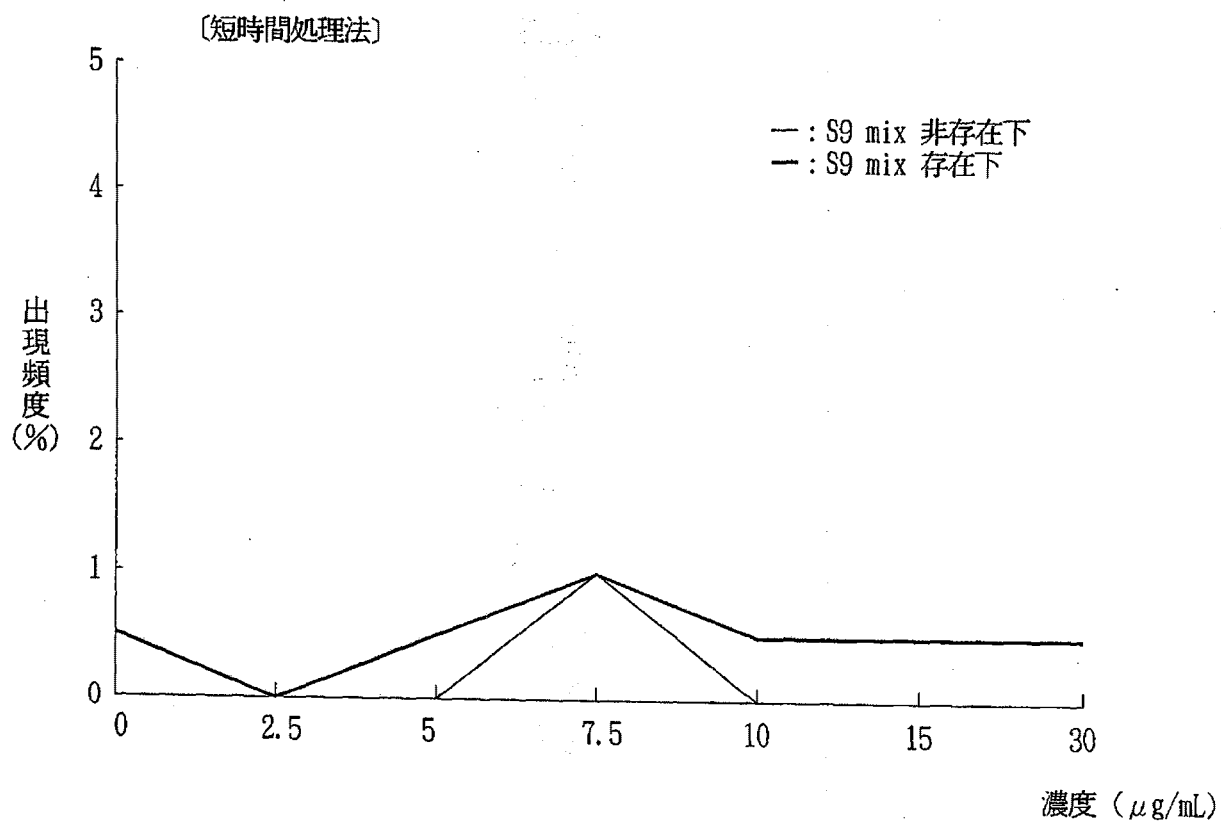


図 4 倍数性細胞の出現頻度 (確認試験)