

厚生省生活衛生局 殿

## 最終報告書

2,4,6-トリニトロ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：8L677)

2000年7月6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	10
5. 試験方法	10
結果	14
考察および結論	14
参考文献	15
別表	16
図	19

## 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, 4, 6-トリニトロフェノールの *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

短時間処理法の S9 mix 非共存下、共存下について、5000  $\mu\text{g/ml}$  を最高用量とし、4000, 3000, 2000, 1000, 500  $\mu\text{g/ml}$  で細胞増殖抑制試験を実施した。この結果、50%細胞増殖抑制用量は、S9 mix 非共存下、共存下で 1076, 756  $\mu\text{g/ml}$  であった。従って、染色体異常試験はいずれの処理条件においても 1600  $\mu\text{g/ml}$  を最高用量とし、その 1/2, 1/4, 1/8 の用量を設定した。その結果、S9 mix 非共存下の 1600  $\mu\text{g/ml}$  において、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 7.5% であった。この結果より、S9 mix 非共存下について 1400, 1600, 1800  $\mu\text{g/ml}$  で確認試験を実施した。その結果、1600, 1800  $\mu\text{g/ml}$  における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度はそれぞれ 19.0, 21.0% であり、染色体構造異常誘発の再現性が確認された。一方、S9 mix 共存下では、いずれの用量においても染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 5% 未満であった。また、染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理群においても 5% 未満であった。

以上の結果より、本試験条件下における 2, 4, 6-トリニトロフェノールの 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

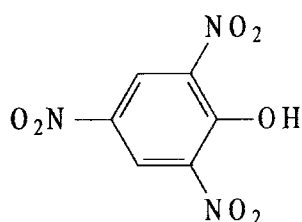
### 1. 試験物質

#### 1.1 被験物質

##### 1) 被験物質

から提供された 2, 4, 6-トリニトロフェノール(CAS 番号 88-89-1, ロット番号 純度 81.4 %)は, 使用時まで換気(通風)が可能な冷所に遮光して保存した. 被験物質は下記の構造式および分子量を有する冷水に 1/100, 沸騰水に 7/100 溶解する黄色結晶である.

構造式:



分子量: 229.05

不純物: 水 18.5 %

不明物 0.1 %

##### 2) 被験物質溶液の調製

溶媒検討の結果, 本被験物質は生理食塩液 (以下生食) には 25 mg/ml で不溶であった. 1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液には 50 mg/ml で均一に懸濁しなかった. ジメチルスルホキシド (以下 DMSO) には 500mg/ml で溶解した (添加時最終用量: 2500  $\mu$ g/ml). アセトンには 500 mg/ml で溶解した (添加時最終用量: 5000  $\mu$ g/ml). これらの結果から, 本被験物質の溶媒には, より高用量での処理が可能なアセトンを用いた.

被験物質をアセトンで所定用量に用時溶解した. これを同じ溶媒で希釈し, 所定用量の被験物質溶液を調製した. なお, 被験物質秤量の際に, 純度換算 (81.4 %) を実施した.

#### 1.2 陰性対照物質

アセトン (和光純薬工業(株), ロット番号: TPF1104, 純度 99.5 %以上)

### 1.3 陽性対照物質

#### 1) 陽性対照物質

マイトマイシン C

(以下 MMC, 協和発酵工業(株), ロット番号: 226AHE, 含量 108%)

ベンゾ [a] ピレン

(以下 BP, 東京化成工業(株), ロット番号: GG01, 含量 95.6%)

#### 2) 陽性対照物質の調製

MMC は, 生食 (株)大塚製薬工場, ロット番号: K8G96[本試験], K8I73[確認試験]) に 1  $\mu\text{g/ml}$  で用時溶解した. BP は, DMSO (関東化学(株), ロット番号: 912S1784) に 4  $\text{mg/ml}$  で溶解し, 使用時まで凍結保存した.

## 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(株)より 1996 年 11 月 6 日に購入し, 細胞懸濁液に対し最終 10% の割合で DMSO 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, プラスチックプレート (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 (炭酸ガス 5%, 温度 37°C, 加湿, NAPCO, 7300 型) で培養した.

## 3. 培地

### 3.1 MEM

イーグル MEM 培地「ニッスイ」① (日水製薬(株)) 約 8.3 g を精製水 880ml に溶解し, オートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分間) 後, 別に滅菌処理した 2.92% L-グルタミン酸水溶液と 10% 炭酸水素ナトリウム水溶液をそれぞれ 8.8 ml, 11.2 ml 添加した. この溶液を以下 MEM とする.

### 3.2 培養液

MEM 900 ml に, 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: 1009120) 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1日1回3日間腹腔内投与）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-395, 1998年12月11日製造）を購入した。購入したS9は使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ 以下で保存した。

## 4.2 S9 mix

S9 mix 1 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。

S9	0.3 ml
D-グルコース-6-リン酸	5 $\mu\text{mol}$
$\beta$ -NADP <sup>+</sup>	4 $\mu\text{mol}$
HEPES (pH 7.2)	4 $\mu\text{mol}$
塩化マグネシウム六水和物	5 $\mu\text{mol}$
塩化カリウム	33 $\mu\text{mol}$
精製水	残量

## 5. 試験方法

## 5.1 短時間処理法

## 1) 細胞増殖抑制試験

## (1) 試験物質用量

細胞増殖抑制試験に先立ち、S9 mix 非共存下（以下- S9 mix）および共存下（以下+ S9 mix）で、50, 500, 5000  $\mu\text{g/ml}$ の3用量で予備試験を実施した。この試験では、1用量あたり1枚のプレートを用い、細胞の状態を位相差倒立顕微鏡を用いて観察した。

その結果、陰性対照と比較した細胞生存率は下記の通りであった。

処理群 \ 用量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	50	500	5000
- S9 mix	100 %	100 %	60 %
+ S9 mix	100 %	100 %	60 %

以上の結果から、細胞増殖抑制試験は、下記の用量を設定した。

- S9 mix : 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000  $\mu\text{g/ml}$

+ S9 mix : 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000  $\mu\text{g/ml}$

## (2) 細胞処理

$4 \times 10^3$  個/ml に調製した細胞懸濁液を 6 cm プレートに 5 ml ずつ播き、3 日間培養した。

培養液を除去した後、下記の組成の細胞処理液を 1 用量あたり 2 枚のプレートに加え 6 時間細胞を処理した。6 時間後、MEM で細胞表面を 1 回洗浄し、新しい培養液 5 ml でさらに 18 時間処理した。

	被験物質溶液 または陰性対照	S9 mix	培養液
- S9 mix	0.03 ml	———	3.0 ml
+ S9 mix	0.03 ml	0.5 ml	2.5 ml

処理開始時および 6 時間処理終了時に、陰性対照と全処理用量について、細胞処理液を微量採取し、pH を pH メーター (twin pH B-212, 榊堀場製作所, または pH-81, 横河電機株) で測定した。

## (3) 細胞増殖率の測定

細胞表面を  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  フリーのリン酸緩衝液 (以下 PBS (-), ダルベッコ PBS 「ニッスイ」, 日水製薬株) で洗浄し、0.25 % トリプシン処理後、培養液を加えて細胞を剥離し、血球計算盤で細胞を計数した。

## (4) 50 % 細胞増殖抑制用量の算出

各処理条件について、陰性対照値を 100 % として生存曲線を作成し、被験物質の 50 % 細胞増殖抑制用量 ( $\text{IC}_{50}$ ) を算出した。なお  $\text{IC}_{50}$  は、細胞増殖率が 50 % を示す用量を挟む 2 点を結ぶ直線式より算出した。

## 2) 染色体異常試験 (本試験)

## (1) 試験物質用量

細胞増殖抑制試験の結果は図 1, 2 に示すごとく、 $\text{IC}_{50}$  は短時間処理法の - S9 mix, + S9 mix で 1076, 756  $\mu\text{g/ml}$  あった。

この結果より、- S9 mix, + S9 mix で 1600  $\mu\text{g/ml}$  を最高用量とし、その 1/2, 1/4, 1/8 の用量を設定した。

陽性対照である MMC, BP の用量はそれぞれ、染色体異常誘発性が知られている 0.1, 20  $\mu\text{g/ml}$  とした。

## (2) 細胞処理

5.1, 1), (2)項と同様に処理した。

陽性対照については、下記の組成の細胞処理液で同様に細胞を処理した。

	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	培養液
- S9 mix	0.3 ml	——	——	2.7 ml
+ S9 mix	——	0.015 ml	0.5 ml	2.5 ml

## (3) 標本作製

処理終了の2時間前に最終用量が  $0.1 \mu\text{g/ml}$  となるようにコルセミドを各プレートに加え、分裂中期細胞を蓄積した。処理終了後、細胞表面を PBS(-) で洗浄し、0.25% トリプシン処理にて細胞を剥離した後、遠心管に回収し、遠心分離 (1000 rpm, 5 分間; 以下同様) により細胞を集めた。上清を除去し、各遠心管に 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 0.5 ml を加え細胞を半固定した後、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。その後、少量の固定液で細胞を懸濁させ、濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスに 2 箇所滴下して乾燥した。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。なお、標本は、各プレートにつき 2 枚作製した。

## (4) 細胞増殖率の測定

標本作製と同時期における細胞増殖率の測定を実施した。標本作製時にトリプシン処理にて剥離した細胞の一部を採取し、血球計算盤で細胞を計数した。

## (5) 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、+ S9 mix の  $1600 \mu\text{g/ml}$  において、プレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られなかったため、この標本を観察の対象から除外した。また、陰性対照および陽性対照については、構造異常細胞の有無が適切であることを確認した。

## ② 構造異常および数的異常

標本はすべてをコード化し、プレート 1 枚につき 100 個、1 用量 200 個の分裂中期細胞を盲検法で観察した。分裂中期細胞は、染色体がよく拡がった細胞を観察した。

構造異常は、以下の分類<sup>1)</sup>に従って観察した。ただし、構造異常がなく、染色体数が  $25 \pm 2$  本でない細胞は除外した。

{	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	(fig と略す)

ギャップは、染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした。他の異常と区別して記録し、構造異常には含めなかった。

数的異常は、核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた。

### (6) 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、ギャップのみをもつ細胞を除いて集計した。

被験物質の染色体異常誘発性の判定は、各処理条件において、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。

結果が疑陽性の場合または用量依存性が認められない場合は、確認試験を実施した。確認試験の結果、再現性が認められた場合は陽性と判定し、再現性が認められない場合あるいは用量依存性が認められない場合は陰性と判定した。

### 3) 染色体異常試験 (確認試験)

染色体異常試験の結果、- S9 mix の 1600  $\mu\text{g/ml}$  において、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 7.5% であり、判定は疑陽性であった。このため、- S9 mix について確認試験を実施した。試験物質の用量は 1400, 1600, 1800  $\mu\text{g/ml}$  とした。

細胞処理、標本作製および観察は、5.1, 2) 項と同様に実施した。

予備鏡検の結果、全てのプレートにおいて 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため、全てのプレートの標本を観察の対象とした。また、陰性対照および陽性対照については、構造異常細胞の有無が適切であることを確認した。

### 5.2 結果のまとめ

染色体構造異常および数的異常をもつ細胞の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度 (%) を表示した。染色体構造異常は種類別に細胞数を表示した。なお、観察可能な分裂中期細胞数がプレートあたり 50 個未満の標本の欄は“TOX”と記載した。

また、細胞増殖抑制試験および染色体異常試験における用量依存性について図示した。陽性となった試験条件について、D<sub>20</sub>値（分裂中期細胞の20%に異常を誘発させるために必要な用量，mg/ml）を算出した。また、その代表的な染色体異常像の写真を添付した。

## 結 果

結果を別表1～3および図1～4に示す。

本試験の短時間処理法の一S9 mixの1600 μg/mlにおいて、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は、7.5%であった。この結果より、1400, 1600, 1800 μg/mlで確認試験を実施した。その結果、1600, 1800 μg/mlにおける染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度はそれぞれ19.0, 21.0%であった。

染色体異常誘発を示したいずれの処理群においても、被験物質処理開始時および終了時の細胞処理液のpHは6.3以上であった。

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。

また、いずれの処理条件においても、染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は5%未満であった。

## 考 察 お よ び 結 論

2, 4, 6-トリニトロ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、短時間処理法の一S9 mixの1600 μg/mlにおいて、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は7.5%であった。確認試験の結果、1600, 1800 μg/mlにおける染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度はそれぞれ19.0, 21.0%であり、染色体構造異常誘発の再現性が確認された。

染色体異常誘発を示したいずれの用量においても、被験物質処理開始時および終了時の細胞処理液のpHは6.3以上であった。この結果より、この染色体異常誘発は細

胞処理液の pH 低下に起因するものではないと考えられた。

また、いずれの処理条件においても、染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5 % 未満であった。

— S9 mix の確認試験結果より算出した D<sub>20</sub> 値は、1.7 mg/ml 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, 4, 6-トリニトロフェノールの 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、類似化合物の染色体異常誘発性に関する情報は添付資料 1 にまとめた。

## 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

別表 1 染色体異常試験の結果(短時間処理法)[本試験]

被験物質の名称 2,4,6-トリニトロフェノール

処理時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 ( $\mu$ g/ml)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)				
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)	
6-18	-	陰性対照 (アセトン)	100	0	0	0	0	0	0	0	102	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	98	100	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	100	200	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)
6-18	-	200	100	0	0	0	0	0	0	1	107	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	2	100	100	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)	3	104	200	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)
6-18	-	400	100	1	0	0	0	0	1	2	75	100	0	0	0	
			100	0	1	1	0	0	2	0	90	100	0	0	0	
			200	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	3 ( 1.5)	2	83	200	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
6-18	-	800	100	2	1	0	0	0	3	1	68	100	0	0	0	
			100	2	1	0	0	0	3	0	83	100	0	0	0	
			200	4 ( 2.0)	2 ( 1.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	6 ( 3.0)	1	75	200	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
6-18	-	1600	100	11	10	1	0	0	15	1	17	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	63	100	0	0	0	
			200	11 ( 5.5)	10 ( 5.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	15 ( 7.5)	1	40	200	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	37	40	0	0	0	59	0	76	100	0	0	0	
			100	38	44	1	0	0	63	0	83	100	0	0	0	
			200	75 ( 37.5)	84 ( 42.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	122 ( 61.0)	0	79	200	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
6-18	+	陰性対照 (アセトン)	100	0	0	1	0	0	1	0	97	100	0	0	0	
			100	1	1	1	0	0	2	1	103	100	0	0	0	
			200	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	2 ( 1.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	3 ( 1.5)	1	100	200	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
6-18	+	200	100	0	0	0	0	0	0	0	97	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	97	100	0	0	0	
			200	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0	97	200	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
6-18	+	400	100	0	0	0	0	0	0	0	121	100	2	0	2	
			100	1	0	1	0	0	2	1	94	100	0	0	0	
			200	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	2 ( 1.0)	1	108	200	2 ( 1.0)	0 ( 0.0)	2 ( 1.0)	
6-18	+	800	100	0	0	1	0	0	1	1	74	100	1	0	1	
			100	0	0	2	0	0	2	1	72	100	0	0	0	
			200	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	3 ( 1.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	3 ( 1.5)	2	73	200	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	
6-18	+	1600	TOX							2	TOX					
			TOX							0	TOX					
			TOX							1	TOX					
6-18	+	陽性対照 (BP 20)	100	38	77	0	0	0	79	0	67	100	0	0	0	
			100	18	73	1	0	0	75	0	71	100	0	0	0	
			200	56 ( 28.0)	150 ( 75.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	154 ( 77.0)	0	69	200	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	

TOX: 観察可能な分裂中期細胞がプレートあたり50個未満であった。

MMC: マイトマイシンC BP: ベンゾ[a]ピレン

別表 2 染色体異常試験の結果(短時間処理法)[確認試験]

被験物質の名称 2, 4, 6-トリニトロフェノール

処理時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 ( $\mu$ g/ml)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)				
			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	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)	
6-18	-	陰性対照 (アセトン)	100	0	0	0	0	0	0	0	1	101	100	1	0	1
			100	0	0	1	0	0	1	0	99	100	0	0	0	
			200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	1	100	200	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )
6-18	-	1400	100	1	3	0	0	0	4	0	44	100	3	0	3	
			100	1	2	0	0	0	3	0	46	100	0	0	0	
			200	2 ( 1.0 )	5 ( 2.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	7 ( 3.5 )	0	45	200	3 ( 1.5 )	0 ( 0.0 )	3 ( 1.5 )	
6-18	-	1600	100	9	17	0	0	0	20	3	20	100	0	0	0	
			100	11	15	0	0	0	18	0	28	100	0	0	0	
			200	20 ( 10.0 )	32 ( 16.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	38 ( 19.0 )	3	24	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	
6-18	-	1800	100	22	31	0	0	2	40	5	6	100	0	0	0	
			100	2	1	0	0	0	2	1	41	100	0	0	0	
			200	24 ( 12.0 )	32 ( 16.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	2 ( 1.0 )	42 ( 21.0 )	6	24	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	20	25	0	0	0	40	3	20	100	0	0	0	
			100	16	20	0	0	0	33	2	52	100	1	0	1	
			200	36 ( 18.0 )	45 ( 22.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	73 ( 36.5 )	5	36	200	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	

MMC:マイトマイシンC

別表 3 細胞處理液 pH測定結果

## 1. 細胞增殖抑制試驗

用量 ( $\mu\text{g/ml}$ )		陰性对照	500	1000	2000	3000	4000	5000
-S9 mix	處理開始時	7.7	7.5	7.4	7.0	6.6	5.9	5.6
	培地更新時	6.9	7.1	7.1	6.9	6.8	6.1	5.0
+S9 mix	處理開始時	7.8	7.5	7.3	6.7	5.8	5.2	4.6
	培地更新時	6.7	6.8	6.8	6.6	6.2	5.3	4.5

## 2. 染色体異常試驗(本試驗)

用量 ( $\mu\text{g/ml}$ )		陰性对照	200	400	800	1600
-S9 mix	處理開始時	7.5	7.4	7.3	7.0	6.8
	培地更新時	7.4	7.3	7.3	7.2	7.1
+S9 mix	處理開始時	7.0	7.0	6.9	6.6	6.3
	培地更新時	6.9	6.8	6.8	6.7	6.4

## 3. 染色体異常試驗(確認試驗)

用量 ( $\mu\text{g/ml}$ )		陰性对照	1400	1600	1800
-S9 mix	處理開始時	7.6	6.7	6.7	6.5
	培地更新時	7.0	7.1	7.1	7.1

図1 2,4,6-トリニトロフェノールの細胞毒性  
(短時間処理法・-S9 mix)

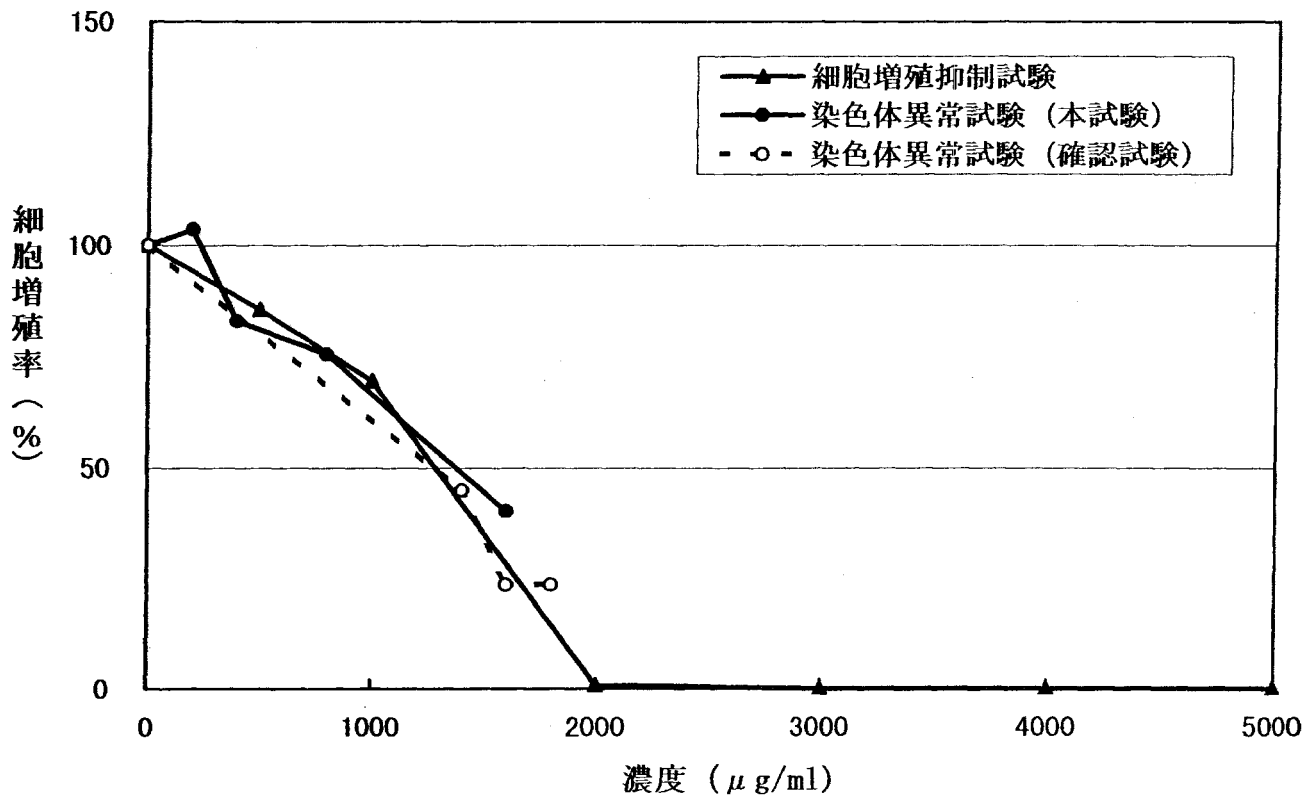


図2 2,4,6-トリニトロフェノールの細胞毒性  
(短時間処理法・+S9 mix)

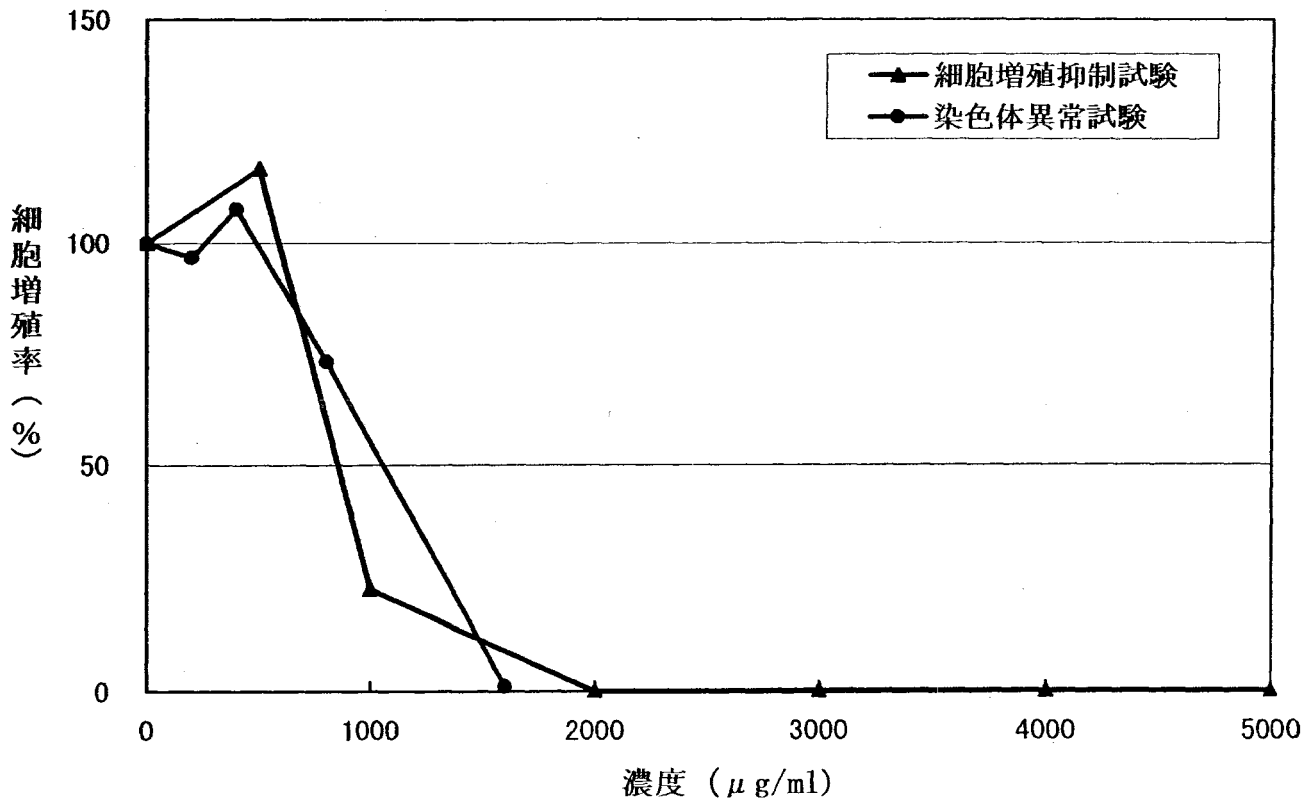


図3 2,4,6-トリニトロフェノールの構造異常細胞出現頻度  
(短時間処理法)

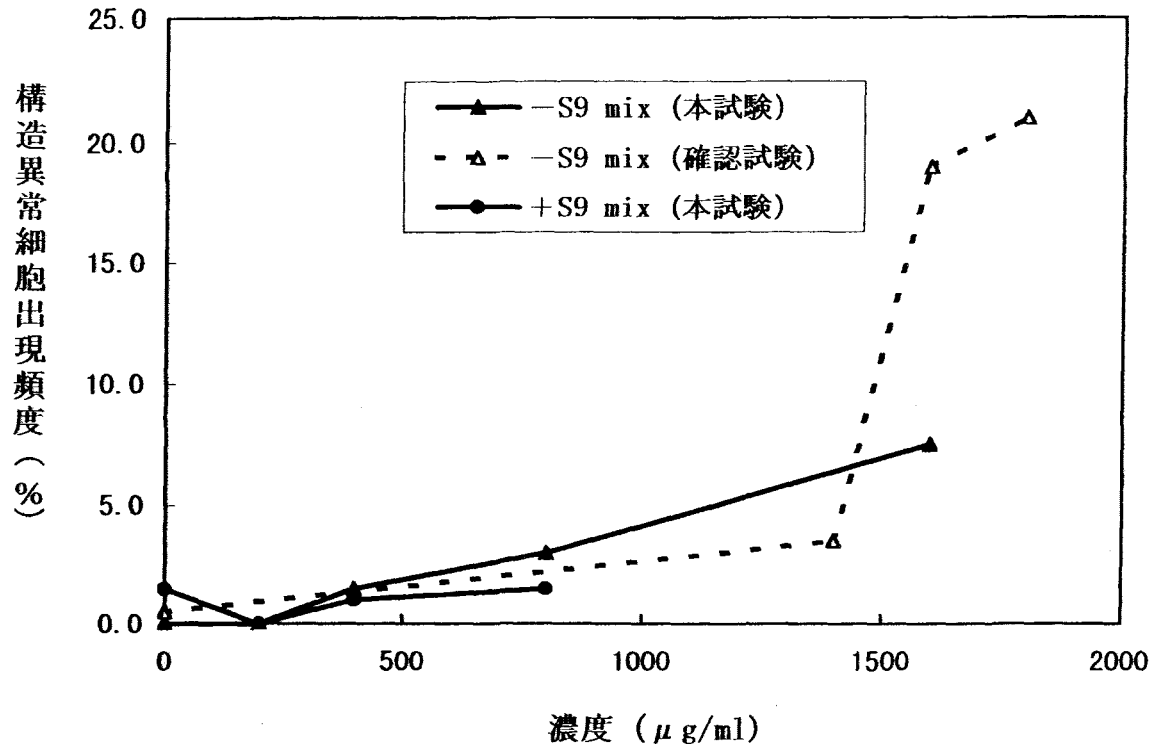


図4 2,4,6-トリニトロフェノールの数的異常細胞出現頻度  
(短時間処理法)

