

4-エチルビフェニルの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 4-Ethylbiphenyl on Bacteria

要約

4-エチルビフェニルについて *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用いる復帰変異試験をプレインキュベーション法により実施した。

予備試験における抗菌性の結果をもとに、本試験では S9 mix 非共存下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 は 19.5 ~ 0.610 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の6濃度, WP2 *uvrA* は 39.1 ~ 0.610 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の7濃度を, 共存下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 は 78.1 ~ 2.44 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の6濃度, WP2 *uvrA* は 313 ~ 9.77 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (公比2) の6濃度をそれぞれ設定した。

本試験を2回実施した結果, 被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は, S9 mix の有無によらず, いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また, S9 mix 非共存下ではすべての菌株の 9.77 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で, 共存下では TA100, TA1535, TA98, TA1537 の 78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$, WP2 *uvrA* の 156 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で抗菌性が認められた。従って4-エチルビフェニルは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と結論した。

方法

【使用菌株】

カリフォルニア大学 B. N. Ames 教授より 1983 年 5 月 27 日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および 東京大学医科学研究所 松島教授より 1985 年 10 月 14 日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の 5 菌株を用いた。各菌株は超低温槽で -80℃ 以下に凍結保存したものを使用した。

試験に際して, 各凍結菌株を融解後, その 20 μL をニュートリエントブロス (Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath 社) 25 g を 1 L の精製水に溶解して作製した液体完全培地 10 mL に接種し, 37℃ で 8 時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は, 濁度計を用いて菌濃度を測定し, 各菌株共に生菌数が $1 \times 10^9/\text{mL}$ 以上であることを確認した。

【被験物質】

4-エチルビフェニル(ロット番号:1-GOH, 新日鐵化学(株), 東京)は, 純度 97.998 % (不純物として, 9-メチルフルオレン 0.64 % を含有) の白色固体である。被験物質は

使用時まで冷暗所に保存した。なお, 本ロットの安定性は, 実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し, 確認した。

4-エチルビフェニルはジメチルスルホキシド(DMSO, 関東化学(株))を用いて最高濃度(50 mg/mL)の溶液を調製した後, 同溶媒で所定濃度に段階希釈したものをを用いた。

【陽性対照物質】

陽性対照物質として下記のものを用いた。

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(和光純薬工業(株))

NaN₃ : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

ENNG : N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(Sigma Chemical Co.)

9-AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chemical Co.)

2-AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

NaN₃ は注射用水(株)大塚製薬工場)に, その他は DMSO に溶解したものを使用した。

【培地および S9 mix の組成】

1) トップアガー

アミノ酸水溶液として, 精製水を用いて 0.5 mM D-ピオチン, L-ヒスチジン混合水溶液(サルモネラ用)または 0.5 mM L-トリプトファン水溶液(大腸菌用)を調製し, これをろ過滅菌後, 冷蔵庫に保管した。精製水 100 mL に対して, 粉末寒天(Bacto-Agar, Difco 社) 0.6 g, 塩化ナトリウム 0.5 g の割合で加え, オートクレーブで滅菌し完全に溶解させた後, 上記のアミノ酸水溶液を 1/10 量加えて混和し, 約 45℃ に保温した。

2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディア AM-N 培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し, 使用した。なお, 培地 1 L あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・七水塩	0.2 g
クエン酸・一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めてある。

3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で調製し、使用時まで氷中に保存した。

S9*	0.1 mL
塩化マグネシウム六水塩	8 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
D-グルコース6-リン酸	5 μ mol
β -NADPH	4 μ mol
β -NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol
滅菌精製水	残量

*: 購入したS9(キッコマン株)を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを用いて併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 \times g遠心上清分画である。

[試験方法]

試験はブレインキューベーション法で実施した。

滅菌した試験管に被験物質溶液を0.1 mL、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mLおよび菌懸濁液を0.1 mL加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間振盪培養した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 mL添加した。ブレインキューベーション後、トップアガー2 mLを上記の混合液に加え混和し、最少グルコース寒天平板培地上に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。

実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、目視により被験物質の沈殿の有無を確認した。プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各用量につき1枚のプレートを使用した。本試験は各用量につき3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

[試験結果の判定基準]

被験物質処理プレートにおける復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照値の2倍以上を示し、明確な用量相関性および再現性が認められる場合に陽性と判定した。

結果および考察

[予備試験]

5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 μ g/plateの濃度で実施した結果、S9 mix非共存下ではすべての菌株の19.5 μ g/plate以上で、共存下ではTA100, TA1535, TA98, TA1537の78.1 μ g/plate以上、WP2 *uvrA*の313 μ g/plate以上で抗菌性が認められた。従って、本試験ではS9 mix非共存下のTA100, TA1535, TA98, TA1537は19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610 μ g/plateの6濃度、WP2 *uvrA*は39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44, 1.22, 0.610 μ g/plateの7濃度を、共存下のTA100, TA1535, TA98,

TA1537は78.1, 39.1, 19.5, 9.77, 4.88, 2.44 μ g/plateの6濃度、WP2 *uvrA*は313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.77 μ g/plateの6濃度をそれぞれ設定した。

[本試験]

結果をTable 1, 2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施した結果、2回の本試験ともに、被験物質の各濃度において誘発された復帰変異コロニー数は、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示さなかった。また、S9 mix非共存下ではすべての菌株の9.77 μ g/plate以上で、共存下ではTA100, TA1535, TA98, TA1537の78.1 μ g/plate, WP2 *uvrA*の156 μ g/plate以上で抗菌性が認められた。

以上の結果から、4-エチルピフェニルは本試験系において変異原性を有さない(陰性)と結論した。

なお、類似化合物である1,1'-ピフェニルおよび σ -フェニルフェノールは、いずれも細菌を用いる復帰変異試験で陰性の結果が報告されている³⁾。

参考文献

- 1) D. M. Maron and B. N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173(1983).
- 2) M. H. L. Green and W. J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3(1976).
- 3) 石館 基 監修, 微生物を用いる変異原性試験データ集, エル・アイ・シー社, 東京, 1991.

連絡先

試験責任者: 宮川 誠

試験担当者: 榎本佳明, 清水優子, 大久保智子

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Makoto Miyagawa (Study director)

Yoshiaki Enomoto, Yuko Shimizu,

Tomoko Okubo

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,

Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,

Ibaraki, 314-0255, Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Results of reverse mutation test of 4-ethylbiphenyl on bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	129 146 (± 146) 164 (± 18)	11 12 (± 12) 14 (± 2)	30 31 (± 31) 32 (± 1)	26 18 (± 22) 23 (± 4)	7 4 (± 6) 6 (± 2)
	0.610	125 149 (± 143) 155 (± 16)	11 12 (± 12) 12 (± 1)	26 27 (± 26) 26 (± 1)	20 27 (± 22) 20 (± 4)	4 6 (± 5) 4 (± 1)
	1.22	149 120 (± 139) 147 (± 16)	8 12 (± 10) 11 (± 2)	24 35 (± 27) 23 (± 7)	16 16 (± 16) 16 (± 0)	5 6 (± 5) 5 (± 1)
	2.44	148 136 (± 140) 136 (± 7)	12 13 (± 12) 11 (± 1)	27 28 (± 27) 26 (± 1)	18 30 (± 22) 18 (± 7)	9 4 (± 5) 3 (± 3)
	4.88	131 111 (± 124) 131 (± 12)	16 6 (± 12) 14 (± 5)	23 21 (± 25) 30 (± 5)	22 26 (± 24) 23 (± 2)	4 7 (± 6) 7 (± 2)
	9.77	116* 110* (± 111) 108* (± 4)	10* 3* (± 8) 10* (± 4)	18* 16* (± 20) 27* (± 6)	6* 11* (± 11) 15* (± 5)	6* 5* (± 4) 2* (± 2)
	19.5	0* 0* (± 0) 0* (± 0)	0* 0* (± 0) 0* (± 0)	15* 18* (± 17) 18* (± 2)	0* 0* (± 0) 0* (± 0)	0* 0* (± 0) 0* (± 0)
	39.1			17* 21* (± 18) 17* (± 2)		
S9 mix (+)	0	145 164 (± 156) 160 (± 10)	13 11 (± 12) 12 (± 1)	30 37 (± 34) 36 (± 4)	36 34 (± 34) 31 (± 3)	11 9 (± 10) 9 (± 1)
	2.44	148 147 (± 152) 162 (± 8)	9 11 (± 12) 17 (± 4)		39 28 (± 32) 28 (± 6)	5 11 (± 8) 9 (± 3)
	4.88	165 160 (± 164) 167 (± 4)	16 17 (± 17) 17 (± 1)		35 40 (± 35) 30 (± 5)	6 11 (± 10) 12 (± 3)
	9.77	151 160 (± 160) 170 (± 10)	16 12 (± 14) 13 (± 2)	27 38 (± 33) 34 (± 6)	40 28 (± 35) 38 (± 6)	6 11 (± 11) 16 (± 5)
	19.5	160 133 (± 162) 194 (± 31)	9 12 (± 14) 21 (± 6)	38 44 (± 37) 29 (± 8)	49 34 (± 36) 26 (± 12)	10 8 (± 11) 16 (± 4)
	39.1	131 152 (± 147) 157 (± 14)	12 10 (± 11) 10 (± 1)	46 47 (± 42) 34 (± 7)	34 36 (± 37) 40 (± 3)	9 10 (± 12) 16 (± 4)
	78.1	139* 123* (± 130) 128* (± 8)	4* 5* (± 7) 11* (± 4)	37 43 (± 37) 30 (± 7)	21* 27* (± 26) 30* (± 5)	7* 5* (± 6) 5* (± 1)
	156			22* 17* (± 19) 19* (± 3)		
313			29* 15* (± 22) 23* (± 7)			
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
	Number of revertants	487 481 (± 471) 445 (± 23)	501 456 (± 474) 465 (± 24)	452 400 (± 413) 387 (± 34)	358 364 (± 369) 384 (± 14)	346 228 (± 265) 222 (± 70)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	1047 1108 (± 1074) 1066 (± 31)	366 346 (± 360) 369 (± 13)	1393 1414 (± 1384) 1345 (± 35)	360 416 (± 381) 368 (± 30)	123 166 (± 143) 139 (± 22)

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)
(±S.D.)

*Microbial toxicity was observed.

Table 2 Results of reverse mutation test of 4-ethylbiphenyl on bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	0	149 161 (± 157) 162 (± 7)	10 15 (± 11) 7 (± 4)	29 32 (± 27) 19 (± 7)	12 14 (± 14) 17 (± 3)	8 6 (± 6) 5 (± 2)
	0.610	139 145 (± 153) 176 (± 20)	6 11 (± 7) 5 (± 3)	25 19 (± 21) 18 (± 4)	22 16 (± 21) 26 (± 5)	7 6 (± 6) 4 (± 2)
	1.22	176 158 (± 171) 180 (± 12)	9 12 (± 10) 8 (± 2)	31 25 (± 26) 21 (± 5)	28 26 (± 24) 19 (± 5)	5 8 (± 6) 6 (± 2)
	2.44	169 149 (± 154) 145 (± 13)	9 5 (± 9) 14 (± 5)	20 26 (± 22) 20 (± 3)	23 15 (± 16) 10 (± 7)	8 5 (± 6) 5 (± 2)
	4.88	166 168 (± 158) 141 (± 15)	11 10 (± 10) 9 (± 1)	30 28 (± 26) 20 (± 5)	26 16 (± 21) 20 (± 5)	10 6 (± 8) 9 (± 2)
	9.77	85* 130* (± 115) 130* (± 26)	11* 4* (± 8) 8* (± 4)	19* 27* (± 20) 15* (± 6)	19* 11* (± 15) 14* (± 4)	5* 5* (± 4) 3* (± 1)
	19.5	0* 0* (± 0) 0* (± 0)	0* 0* (± 0) 0* (± 0)	8* 19* (± 15) 17* (± 6)	0* 0* (± 0) 0* (± 0)	0* 0* (± 0) 0* (± 0)
	39.1			10* 12* (± 12) 15* (± 3)		
S9 mix (+)	0	173 164 (± 170) 172 (± 5)	9 11 (± 10) 9 (± 1)	35 22 (± 29) 31 (± 7)	29 24 (± 29) 33 (± 5)	8 13 (± 9) 6 (± 4)
	2.44	166 193 (± 180) 180 (± 14)	17 18 (± 17) 15 (± 2)		28 28 (± 28) 28 (± 0)	10 12 (± 9) 6 (± 3)
	4.88	158 181 (± 168) 165 (± 12)	10 17 (± 13) 11 (± 4)		28 21 (± 27) 31 (± 5)	8 6 (± 7) 8 (± 1)
	9.77	192 157 (± 161) 133 (± 30)	8 10 (± 9) 9 (± 1)	26 34 (± 32) 37 (± 6)	36 36 (± 33) 28 (± 5)	9 10 (± 9) 8 (± 1)
	19.5	173 179 (± 178) 183 (± 5)	18 15 (± 15) 12 (± 3)	27 38 (± 33) 34 (± 6)	23 20 (± 22) 24 (± 2)	13 17 (± 12) 7 (± 5)
	39.1	141 143 (± 146) 155 (± 8)	9 9 (± 8) 7 (± 1)	32 26 (± 27) 23 (± 5)	22 30 (± 24) 21 (± 5)	12 9 (± 11) 11 (± 2)
	78.1	143* 136* (± 137) 133* (± 5)	7* 6* (± 8) 12* (± 3)	26 23 (± 23) 21 (± 3)	19* 25* (± 21) 19* (± 3)	7* 4* (± 6) 8* (± 2)
	156			17* 30* (± 22) 19* (± 7)		
313			18* 18* (± 19) 21* (± 2)			
Positive control S9 mix (-)	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
	Number of revertants	558 538 (± 537) 515 (± 22)	447 418 (± 446) 474 (± 28)	719 678 (± 717) 755 (± 39)	421 394 (± 425) 460 (± 33)	237 195 (± 253) 328 (± 68)
Positive control S9 mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	1250 1131 (± 1136) 1027 (± 112)	244 283 (± 256) 242 (± 23)	1155 1170 (± 1227) 1357 (± 113)	390 459 (± 414) 392 (± 39)	136 173 (± 149) 137 (± 21)

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide
 ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)
(±S.D.)

*Microbial toxicity was observed.

4-エチルビフェニルのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 4-Ethylbiphenyl on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

4-エチルビフェニルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、連続処理法の24時間処理および短時間処理法のS9 mix存在下、非存在下では18.8, 37.5, 75, 150, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を、連続処理法48時間処理では9.38, 18.8, 37.5, 75, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下のいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の出現頻度は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下では4-エチルビフェニルは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

材料および方法

1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1996年11月, 入手時:継代14代, 凍結時:17代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代5代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(GIBCO BRL, ロット番号:39K0464)を10 vol%添加したイーグルMEM(日本製薬(株)培養液)を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mLを入れたディッシュ(径6cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。

連続処理法では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mixの存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

4-エチルビフェニル(ロット番号:1-GOH, 新日鐵化学

(株), 東京)は、純度:97.998%(不純物として、9-メチルフルオレン0.64%含有)の白色固体である。被験物質は使用時まで冷暗所に保存した。なお、本ロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質提供者が分析し、確認した。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒はアセトン(国産化学(株), ロット番号:A605G1)を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の1.0 vol%になるように加えた。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、血球計算盤を用いて各群の細胞を計数し、陰性対照群に対する割合をもって指標とした。

その結果、4-エチルビフェニルの約50%の増殖抑制を示す濃度を、プロビット法により算出したところ、連続処理法の24時間および48時間処理ではそれぞれ78, 66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ97, 91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。しかし、すべての処理条件で高濃度側(5000, 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)においても、生存細胞が認められた(Fig.1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験は、全ての処理条件において5000, 2500, 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を設定した。さらに、50%の増殖抑制を示す濃度の値から、連続処理法24時間処理および短時間処理法S9 mix存在下、非存在下では150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法48時間処理では75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度とし、公比2で4用量を設定した。

陽性対照として、連続処理法は、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:139AFK)を0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法は、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業(株), ロット番号:AX01)を20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に設定した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約

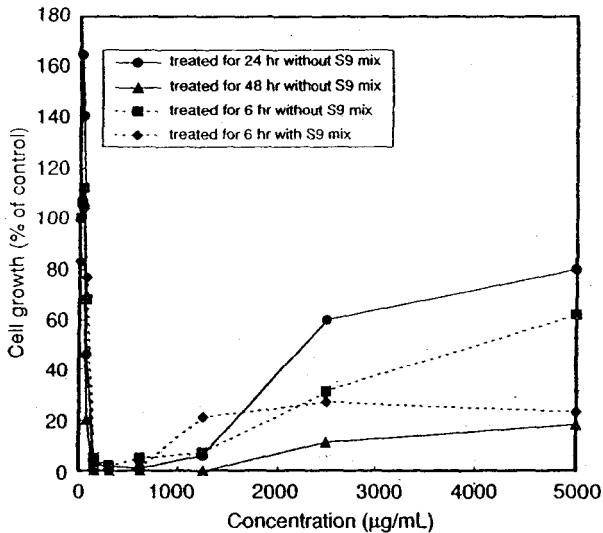


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4-ethylbiphenyl

0.1 µg/mLになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき2枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で20分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のディッシュから得られたスライドを処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(MMS)¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞 (polyploid)の有無について観察した。

構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と測定

溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が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。

結果および考察

連続処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。4-エチルビフェニルを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および数的異常の誘発作用は認められなかった。

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。4-エチルビフェニルを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常および数的異常の誘発作用は

認められなかった。

以上の結果から、4-エチルビフェニルは本試験条件下において、染色体異常誘発性を有しないと結論した。

なお、類似化合物である diphenyl, o-phenylphenol, 2,5-dihydroxybiphenylは、染色体異常試験の連続処理法において陰性の結果が報告されている。なお、また、diphenylは短時間処理法S9 mix存在下で陽性の結果が報告されている²⁾。

文献

- 1) 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.
- 2) 石館基監修, “(改訂)染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 東京, 1987.

連絡先

試験責任者: 太田絵律奈

試験担当者: 中川宗洋, 石毛裕子, 穴澤由美子, 玉川 恵

(株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Erina Ohta (Study director)

Munehiro Nakagawa, Yuko Ishige,

Yumiko Anazawa, Megumi Tamagawa

Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
Kashima Laboratory

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
Ibaraki, 314-0255, Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 4-ethylbiphenyl without S9 mix

Group	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Number of cells with aberrations		polyploid ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap(%)	+gap(%)		SA	NA
Solvent ^{b)}	0	24	200	0	0	1	2	0	0	3	3(1.5)	3(1.5)	0.5	-	-
Test Substance	18.8	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.5	-	-
	37.5	24	200	0	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	1.0	-	-
	75	24	100	0	0	1	0	0	0	1	1(1.0)	1(1.0)	1.0	-	-
	150	24		Toxic											
	1250 ※◇	24	100	0	1	0	0	0	0	1	1(1.0)	1(1.0)	0.0	-	-
	2500 ※◇	24		Toxic											
	5000 ※#	24	100	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-
MMC	0.03	24	200	2	20	23	0	0	0	45	43(21.5)	44(22.0)	0.0	+	-
Solvent	0	48	200	0	1	0	0	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-
Test Substance	9.38	48	200	0	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.5	-	-
	18.8	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0(0.0)	1(0.5)	0.0	-	-
	37.5	48	200	1	1	0	1	0	0	3	2(1.0)	3(1.5)	0.5	-	-
	75	48		Toxic											
	1250 ※◇	48		Toxic											
	2500 ※◇	48		Toxic											
	5000 ※#	48		Toxic											
MMC	0.03	48	200	3	33	40	2	0	0	78	66(33.0)	68(34.0)	0.5	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), f: fragment

-gap: total number cells with aberrations except gap, +gap: total number of cells with aberrations

SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MMC: mitomycin C (positive control)

1) Acetone was used as solvent.

2) Two hundred cells were analyzed in each group, except 75, 150, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

※: Some of the test substance precipitated in the medium at the beginning of the treatment.

◇: Some of the test substance suspended in the medium at the beginning of the treatment.

#: Some of the test substance floated as a lump on the surface of the medium at the beginning of the treatment.

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4-ethylbiphenyl with and without S9 mix

Group	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9 mix	Time of exposure (hr)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Number of cells with aberrations		polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾		
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-gap(%)	+gap(%)		SA	NA	
Solvent ¹⁾	0	-	6-18	200	0	1	0	2	0	0	3	3(1.5)	3(1.5)	0.5	-	-	
Test Substance	18.8	-	6-18	200	2	1	0	0	0	0	3	1(0.5)	3(1.5)	0.0	-	-	
	37.5	-	6-18	200	0	3	0	2	0	0	5	5(2.5)	5(2.5)	0.5	-	-	
	75	-	6-18	100	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-	
	150	-	6-18		Toxic												
	1250 ※◇	-	6-18		Toxic												
	2500 ※◇	-	6-18	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.5	-	-
	5000 ※#	-	6-18	200	0	0	0	1	0	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-	
BP	20	-	6-18	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.5	-	-	
Solvent	0	+	6-18	200	0	0	0	0	1	0	1	1(0.5)	1(0.5)	0.0	-	-	
Test Substance	18.8	+	6-18	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-	
	37.5	+	6-18	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	1.5	-	-	
	75	+	6-18	200	0	1	1	0	0	0	2	2(1.0)	2(1.0)	1.5	-	-	
	150	+	6-18		Toxic												
	1250 ※◇	+	6-18	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-	
	2500 ※◇	+	6-18	200	0	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	0.0	-	-	
	5000 ※#	+	6-18	200	0	0	3	0	0	0	3	3(1.5)	3(1.5)	0.0	-	-	
BP	20	+	6-18	200	0	24	157	0	0	0	181	159(79.5)	159(79.5)	0.5	+	-	

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), f: fragment
 -gap: total number cells with aberrations except gap, +gap: total number of cells with aberrations
 SA: structural aberration, NA: numerical aberration, BP: benzo [a] pyrene (positive control)

1) Acetone was used as solvent.

2) Two hundred cells were analyzed in each group, 75, 150 and 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ without S9 mix and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with S9 mix.

3) Judgement was done on the basis of criteria of Ishidate *et al.* (1987).

※: Some of the test substance precipitated in the medium at the beginning of the treatment.

◇: Some of the test substance suspended in the medium at the beginning of the treatment.

#: Some of the test substance floated as a lump on the surface of the medium at the beginning of the treatment.

①