

Table 8 (continued)

Organ [Number of animals examined]	Sex:	Male					Female					
		Dose(mg/kg):	0	30	100	300	1000	0	30	100	300	1000
Testis			[13]	[13]	[13]	[13]	[13]					
Atrophy, seminiferous tubule,	total		0	0	1	2	4*					
focal	±		0	0	1	1	1					
	+		0	0	0	1	2					
	++		0	0	0	0	1					
Epididymis			[13]	[0]	[0]	[0]	[13]					
Cell debris, tubular lumen	total		0				3					
	±		0				2					
	+		0				1					
Cellular infiltration, lymphocyte,	total		1				1					
interstitium	±		1				0					
	+		0				1					
Spermatoc granuloma	total		1				1					
	+		1				1					
Spleen			[13]	[0]	[0]	[0]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]	[13]
Hematopoiesis, extramedullary	total		13				13	13	13	13	13	13
	±		2				3	5	3	2	5	5
	+		11				9	6	8	5	6	1
	++		0				1	2	1	4	1	5
	+++		0				0	0	1	2	1	2
Deposit, pigment, brown	total		13				13	13	13	13	13	13
	±		6				0	3	4	1	1	0
	+		7				13	7	6	8	8	6
	++		0				0	3	3	4	4	7
Heart			[13]	[0]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[0]	[13]
Degeneration, myocardium,	total		1				1	0				0
focal	±		1				0	0				0
	+		0				1	0				0
Hemorrhage	total		0				1	0				0
	±		0				1	0				0
Thymus			[13]	[0]	[0]	[0]	[13]	[13]	[0]	[0]	[0]	[13]
Atrophy	total		0				0	1	4	1	5	5
	±		0				0	1	3	0	2	1
	+		0				0	0	0	1	0	2
	++		0				0	0	1	0	1	2
	+++		0				0	0	0	0	2	0
Hemorrhage	total		1				2	4	3	0*	0*	5
	±		1				2	4	2	0	0	5
	+		0				0	0	1	0	0	0
Hyperplasia, endothelial cell,	total						0	1	0	0	0	0
focal	+						0	1	0	0	0	0
Adrenal gland								[12]	[0]	[0]	[0]	[13]
Necrosis, zona fasciculata, focal	total							1				0
	±							1				0
Ovary								[2]	[0]	[0]	[4]	[2]
Atretic follicle, increased	total							0			1	0
	+							0			1	0

±:very slight, +:slight, #:moderate, ##:severe

*:significant difference from control, $p < 0.05$ (by Fischer exact test)

*:significant difference from control, $p < 0.05$ (by Mann-Whitney U test)

** :significant difference from control, $p < 0.01$ (by Mann-Whitney U test)

Table 9 Summary of reproductive performance in parental rats treated orally with 2,6-dichlorotoluene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of mated pairs	13	13	13	13	13
Number of copulated pairs	13	13	13	13	13
Copulation index A)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of pregnant animals	11	13	13	9	11
Fertility index B)	84.6	100.0	100.0	69.2	84.6
Pairing days until copulation (Mean \pm S.D.)	2.8 \pm 3.4	3.7 \pm 4.3	2.9 \pm 1.1	2.6 \pm 1.6	3.2 \pm 2.7
Frequency of vaginal estrus (Mean \pm S.D.)	1.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.3	1.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.3	1.2 \pm 0.6

A) Copulation index = (Number of copulated pairs/Number of mated pairs) \times 100, %B) Fertility index = (Number of pregnant animals/Number of copulated pairs) \times 100, %

Table 10 Summary of development of pups from dams treated orally with 2,6-dichlorotoluene in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	30	100	300	1000
Number of pregnant females	11	13	12	9	11
Number of pregnant females with pups alive	11	13	12	9	10
Gestation index A)	100	100	100	100	90.9
Gestation length in days	22.1±0.3	22.2±0.4	22.5±0.5	22.6±0.5	22.5±0.7
Number of corpora lutea	17.9±2.7	18.2±2.9	18.8±2.8	17.6±3.3	16.5±2.0
Number of implantation sites	16.3±2.9	15.9±3.1	17.3±2.6	15.8±3.7	13.7±5.8
Implantation index B)	90.7±11.8	87.9±13.4	91.9±10.4	90.0±17.4	81.2±31.9
Day 0 of lactation					
Number of pups born	15.6±2.8	14.8±3.1	15.8±3.1	14.4±4.1	13.1±6.2
Delivery index C)	96.3±4.7	92.7±6.6	91.4±7.5	90.9±10.0	87.1±23.0
Number of pups alive	15.5±2.7	14.6±3.0	15.6±3.1	14.2±4.1	12.9±6.3
Birth index D)	95.8±5.1	91.8±6.8	90.0±8.4	89.5±9.4	83.6±31.2
Live birth index E)	99.5±1.7	99.0±2.4	98.5±5.1	98.6±4.2	90.5±30.0
Pup weight in grams					
Male	6.3±0.5	6.3±0.7	6.6±0.9	6.4±0.9	6.0±0.6
Female	6.0±0.5	6.0±0.9	6.3±0.8	5.9±0.8	5.8±0.8
Sex ratio F)	1.17±0.43	1.72±2.85	0.97±0.49	1.76±0.99	1.13±0.64
Day 4 of lactation					
Number of pups alive	15.5±2.8	14.5±3.0	15.2±2.8	12.1±5.8	12.2±5.3
Viability index G)	99.4±2.1	99.5±1.6	97.7±3.6	85.9±32.8	79.7±36.3
Pup weight in grams					
Male	10.2±0.9	10.1±1.9	10.4±2.0	10.1±2.2	8.8±1.4
Female	9.8±1.0	9.8±2.0	10.1±1.9	9.5±2.1	8.4±1.3

Values are expressed as Mean ± S.D.

Parenthesis indicates number of litters evaluated.

A) Gestation index = (Number of pregnant females with pups alive / Number of pregnant females) × 100, %

B) Implantation index = (Number of implantation sites / Number of corpora lutea) × 100, %

C) Delivery index = (Number of pups born / Number of implantation sites) × 100, %

D) Birth index = (Number of pups alive on day 0 / Number of implantation sites) × 100, %

E) Live birth index = (Number of pups alive on day 0 / Number of pups born) × 100, %

F) Sex ratio = (Number of male pups alive on day 0 / Number of female pups alive on day 0) × 100, %

G) Viability index = (Number of pups alive on day 4 / Number of pups alive on day 0) × 100, %

2,6-ジクロロトルエンの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 2,6-Dichlorotoluene in Bacteria

要約

2,6-ジクロロトルエンについて細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で生育障害が認められたことから、本試験はS9 mix無添加試験では4.69~150 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (TA1535は2.34~150 $\mu\text{g}/\text{plate}$)、S9 mix添加試験では18.8~600 $\mu\text{g}/\text{plate}$ (TA1535は9.38~600 $\mu\text{g}/\text{plate}$)の範囲で実施した。

その結果、用いた5種の検定菌のいずれにおいても、用量依存性のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から2,6-ジクロロトルエンは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

方法

1. 被験物質

2,6-ジクロロトルエンは、透明な液体である。用いた被験物質は、ロット番号50820、純度99.6%、製造 東レ(株)(東京)であり、(株)日本化学工業協会から供与された。被験物質は、使用時まで室温で遮光保管した。

2,6-ジクロロトルエンは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:APJ3434, 和光純薬工業(株))に溶解して最高用量または6 mg/mLの調製液を調製した後、同溶媒で所定の濃度に希釈して速やかに試験に用いた。

秦野研究所において、2,6-ジクロロトルエンのDMSO溶液中での安定性試験を実施した。その結果、2,6-ジクロロトルエンの23.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および20 mg/mL溶液は室温遮光条件下で調製後4時間安定であることが確認された。また、1回目の本試験に用いた調製検体について含量測定試験を行った結果、6 mg/mL溶液は当研究所の基準(平均含量が調製指示値の90~110%)の範囲内であった。23.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液の含量は113~115%で、この範囲よりやや高かったが、試験結果には影響しないものと判断した。

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

各検定菌ごとに用いた陽性対照物質は、当研究所で十

分な蓄積データが得られている物質および用量とし、それぞれTable中に示した。

2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
(AF2, 上野製薬(株))

アジ化ナトリウム (SA, 和光純薬工業(株))

9-アミノアクリジン (9AA, Sigma-Chem. Co.)

2-アミノアントラセン (2AA, 和光純薬工業(株))

AF2, 9AAおよび2AAはDMSOに、SAは超純水に溶解したものを-20°Cで凍結保存し、解凍後、速やかに試験に用いた。

3. 検定菌

試験には、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*を用いた。

*S. typhimurium*の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から、*E. coli* WP2 *uvrA*株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与された。

検定菌は-80°Cで凍結保存したものをを用い、各菌株の特性確認は凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、膜変異(*rfa*)およびアムピシリン耐性因子pKM101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。

試験に際して、ニュートリエントプロスNo.2(Oxoid Ltd.)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37°Cで10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

分光光度計により660 nmの吸光度を測定し、検定菌液の増殖を確認した。

4. 培地およびS9 mixの組成

1) 合成培地

培地は、日清製粉(株)製の最少グルコース寒天培地を用いた。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・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	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
バクタアガー (Difco Lab.)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めた

ものである。

2) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)または(C)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco Lab.) 0.6 w/v%
塩化ナトリウム 0.5 w/v%

(B) *Salmonella typhimurium*用
L-ヒスチジン 0.5 mmol/L
D-ビオチン 0.5 mmol/L

(C) *Escherichia coli*用
L-トリプトファン 0.5 mmol/L

3) S9 mix

S9 mix 1 mLあたりの組成は下記のとおりである。

S9* 0.1 mL
塩化マグネシウム 8 μmol
塩化カリウム 33 μmol
グルコース-6-リン酸 5 μmol
NADH 4 μmol
NADPH 4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4) 100 μmol

*:7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製したS9(キッコーマン株)を用いた。

5. 試験方法

プレート法により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 mL、リン酸緩衝液0.5 mL(S9 mix添加試験においてはS9 mix 0.5 mL)、検定菌液0.1 mLを混合したのち、約45°Cに保温したトップアガー2 mLを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。同時に実施した他試験については、陰性および陽性対照群を共通とした。

培養は37°Cで48時間行い、発生した復帰変異コロニー数をコロニーアナライザーまたは目視によって算定した。被験物質に由来する沈澱の有無は、肉眼により確認した。また、生育阻害の有無については、肉眼あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては、両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。

用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、結果の再現性の確認をした。

6. 判定基準

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9

mix無添加試験あるいはS9 mix添加試験において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有するもの(陽性)と判定することとした。

結果および考察

50.0~5000 μg/plateの範囲で公比を約3として、用量設定試験を実施した。その結果、S9 mix無添加試験ではTA1535の50.0 μg/plate、その他においては150 μg/plate以上、また、S9 mix添加試験ではTA1535の150 μg/plate、その他においては500 μg/plate以上の用量で強い生育阻害が認められた。

したがって、S9 mix無添加試験では4.69~150 μg/plate(TA1535のみ2.34~150 μg/plate)、S9 mix添加試験では18.8~600 μg/plate(TA1535のみ9.38~600 μg/plate)の範囲に公比2で6~7用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。その結果、2回の試験とも用量依存性のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、2,6-ジクロロトルエンは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

なお関連物質である2,4-ジクロロトルエンについては、細菌を用いる復帰突然変異試験³⁾およびチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験⁴⁾でも陰性の結果が得られている。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 3) 澁谷徹, 化学物質毒性試験報告, **1**, 133(1994).
- 4) 田中憲穂, 化学物質毒性試験報告, **1**, 137(1994).

連絡先

試験責任者：澁谷 徹

試験担当者：加藤基恵, 坂本京子, 堀谷尚古,
川上久美子, 原 巧, 松本容彦,
飯田さやか, 中込まどか

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257-8523 秦野市落合729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)

Motoe Katoh, Kyoko Sakamoto,

Naoko Horiya, Kumiko Kawakami,

Takumi Hara, Yasuhiko Matsuki,

Sayaka Iida, Madoka Nakagomi

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center

729-5 Ochiai Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,

Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Mutagenicity of 2,6-dichlorotoluene in bacteria (I)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)														
		Base-pair substitution type									Frameshift type					
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	108	94	118	10	10	9	24	16	23	20	23	19	5	8	8
		(107 \pm 12.1)			(10 \pm 0.6)			(21 \pm 4.4)			(21 \pm 2.1)			(7 \pm 1.7)		
	2.34	NT			16	10	7	NT			NT			NT		
					(11 \pm 4.6)											
	4.69	84	92	99	9	20	7	21	34	26	18	18	25	10	5	7
		(92 \pm 7.5)			(12 \pm 7.0)			(27 \pm 6.6)			(20 \pm 4.0)			(7 \pm 2.5)		
	9.38	117	92	101	10	9	13	15	27	21	19	20	16	7	7	9
		(103 \pm 12.7)			(11 \pm 2.1)			(21 \pm 6.0)			(18 \pm 2.1)			(8 \pm 1.2)		
18.8	97	108	107	11	8	8	26	24	30	21	25	24	4	5	10	
	(104 \pm 6.1)			(9 \pm 1.7)			(27 \pm 3.1)			(23 \pm 2.1)			(6 \pm 3.2)			
37.5	115	104	110	15	4	4*	26	12	20	15	16	25	6	8	7	
	(110 \pm 5.5)			(8 \pm 6.4)			(19 \pm 7.0)			(19 \pm 5.5)			(7 \pm 1.0)			
75.0	66*	61*	87*	1*	5*	6*	19*	18*	6*	11*	8*	8*	7*	3*	3*	
	(71 \pm 13.8)			(4 \pm 2.6)			(14 \pm 7.2)			(9 \pm 1.7)			(4 \pm 2.3)			
150	31*	29*	47*	0*	0*	0*	5*	8*	7*	1*	2*	9*	4*	4*	4*	
	(36 \pm 9.9)			(0 \pm 0.0)			(7 \pm 1.5)			(4 \pm 4.4)			(4 \pm 0.0)			
S9 mix (+)	0	96	101	101	7	14	4	26	14	18	31	37	31	12	8	8
		(99 \pm 2.9)			(8 \pm 5.1)			(19 \pm 6.1)			(33 \pm 3.5)			(9 \pm 2.3)		
	9.38	NT			14	18	17	NT			NT			NT		
					(16 \pm 2.1)											
	18.8	82	98	84	13	8	12	31	24	24	34	28	31	13	17	8
		(88 \pm 8.7)			(11 \pm 2.6)			(26 \pm 4.0)			(31 \pm 3.0)			(13 \pm 4.5)		
	37.5	106	109	90	15	17	12	24	30	21	26	28	23	10	11	17
		(102 \pm 10.2)			(15 \pm 2.5)			(25 \pm 4.6)			(26 \pm 2.5)			(13 \pm 3.8)		
75.0	90	114	90	14	7	18	28	21	24	35	26	31	10	14	11	
	(98 \pm 13.9)			(13 \pm 5.6)			(24 \pm 3.5)			(31 \pm 4.5)			(12 \pm 2.1)			
150	91	112	81	9	15	9	24	28	26	23	23	32	16	12	10	
	(95 \pm 15.8)			(11 \pm 3.5)			(26 \pm 2.0)			(26 \pm 5.2)			(13 \pm 3.1)			
300	90*	89*	98*	10*	11*	15*	19	18	20	17	21	19	15	12	15	
	(92 \pm 4.9)			(12 \pm 2.6)			(19 \pm 1.0)			(19 \pm 2.0)			(14 \pm 1.7)			
600	68*	84*	90*	7*	6*	10*	19*	18*	15*	18*	16*	25*	7*	8*	5*	
	(81 \pm 11.4)			(8 \pm 2.1)			(17 \pm 2.1)			(20 \pm 4.7)			(7 \pm 1.5)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	304	371	371	390	384	389	190	187	173	799	769	736	2043	1821	1752
	(349 \pm 38.7)			(388 \pm 3.2)			(183 \pm 9.1)			(768 \pm 31.5)			(1872 \pm 152.1)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	795	824	896	279	300	319	1359	1201	1324	467	504	447	301	243	257
	(838 \pm 52.0)			(299 \pm 20.0)			(1295 \pm 83.0)			(473 \pm 28.9)			(267 \pm 30.3)			

The purity of the test substance was 99.6%. This substance contained 0.13% 2,5-dichlorotoluene, 0.07% 2,4-dichlorotoluene, 0.05% 2,3-dichlorotoluene, 0.01% 3,4-dichlorotoluene and 0.01% 3,5-dichlorotoluene as impurities.

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Growth inhibition was observed. NT: Not tested

Table 2 Mutagenicity of 2,6-dichlorotoluene in bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)														
		Base-pair substitution type						Frameshift type								
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
S9 mix (-)	0	125	137	125	12	10	17	16	19	23	14	16	16	10	11	6
		(129 \pm 6.9)			(13 \pm 3.6)			(19 \pm 3.5)			(15 \pm 1.2)			(9 \pm 2.6)		
	2.34	NT			16	16	13	NT			NT			NT		
					(15 \pm 1.7)											
	4.69	142	126	111	10	15	12	23	19	16	21	26	21	9	4	6
		(126 \pm 15.5)			(12 \pm 2.5)			(19 \pm 3.5)			(23 \pm 2.9)			(6 \pm 2.5)		
	9.38	115	129	123	6	13	10	15	18	18	22	22	20	4	4	9
		(122 \pm 7.0)			(10 \pm 3.5)			(17 \pm 1.7)			(21 \pm 1.2)			(6 \pm 2.9)		
	18.8	120	125	126	15	11	12	20	17	20	10	17	13	8	3	6
	(124 \pm 3.2)			(13 \pm 2.1)			(19 \pm 1.7)			(13 \pm 3.5)			(6 \pm 2.5)			
37.5	137	119	109	14	12	11	15	20	14	12	17	12	7	4	5	
	(122 \pm 14.2)			(12 \pm 1.5)			(16 \pm 3.2)			(14 \pm 2.9)			(5 \pm 1.5)			
75.0	119	139	92	6	10	18	11	20	12	24	23	18	8*	4*	8*	
	(117 \pm 23.6)			(11 \pm 6.1)			(14 \pm 4.9)			(22 \pm 3.2)			(7 \pm 2.3)			
150	119*	121*	117*	8*	11*	11*	18*	9*	12*	19*	12*	19*	3*	4*	4*	
	(119 \pm 2.0)			(10 \pm 1.7)			(13 \pm 4.6)			(17 \pm 4.0)			(4 \pm 0.6)			
S9 mix (+)	0	127	129	125	20	12	13	30	26	26	37	31	33	17	12	18
		(127 \pm 2.0)			(15 \pm 4.4)			(27 \pm 2.3)			(34 \pm 3.1)			(16 \pm 3.2)		
	9.38	NT			12	22	9	NT			NT			NT		
					(14 \pm 6.8)											
	18.8	139	138	136	15	11	9	22	25	20	32	38	36	13	13	19
		(138 \pm 1.5)			(12 \pm 3.1)			(22 \pm 2.5)			(35 \pm 3.1)			(15 \pm 3.5)		
	37.5	122	122	122	12	17	13	19	36	30	21	29	31	18	14	16
		(122 \pm 0.0)			(14 \pm 2.6)			(28 \pm 8.6)			(27 \pm 5.3)			(16 \pm 2.0)		
	75.0	121	137	131	7	13	10	29	13	21	28	33	25	19	15	14
	(130 \pm 8.1)			(10 \pm 3.0)			(21 \pm 8.0)			(29 \pm 4.0)			(16 \pm 2.6)			
150	129	132	125	16	7	18	27	21	16	35	25	23	11	11	16	
	(129 \pm 3.5)			(14 \pm 5.9)			(21 \pm 5.5)			(28 \pm 6.4)			(13 \pm 2.9)			
300	138	115	140	10*	6*	11*	15*	13*	11*	23*	18*	24*	19*	8*	19*	
	(131 \pm 13.9)			(9 \pm 2.6)			(13 \pm 2.0)			(22 \pm 3.2)			(15 \pm 6.4)			
600	121*	110*	100*	6*	0*	0*	12*	21*	16*	20*	18*	26*	5*	0*	0*	
	(110 \pm 10.5)			(2 \pm 3.5)			(16 \pm 4.5)			(21 \pm 4.2)			(2 \pm 2.9)			
Positive control S9 mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies/plate	549	573	569	321	293	300	166	160	163	854	888	805	1711	1713	1769
	(564 \pm 12.9)			(305 \pm 14.6)			(163 \pm 3.0)			(849 \pm 41.7)			(1731 \pm 32.9)			
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies/plate	1211	1017	1138	254	316	323	1612	1784	1893	531	422	444	279	259	233
	(1122 \pm 98.0)			(298 \pm 38.0)			(1763 \pm 141.7)			(466 \pm 57.6)			(257 \pm 23.1)			

The purity of the test substance was 99.6%. This substance contained 0.13% 2,5-dichlorotoluene, 0.07% 2,4-dichlorotoluene, 0.05% 2,3-dichlorotoluene, 0.01% 3,4-dichlorotoluene and 0.01% 3,5-dichlorotoluene as impurities.

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Growth inhibition was observed. NT: Not tested

2,6-ジクロロトルエンのチャイニーズ・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 2,6-Dichlorotoluene in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2,6-ジクロロトルエンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、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。

連続処理(48時間)においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.069 mg/mLの濃度を最高処理濃度とした。また、短時間処理(6時間)のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下における短時間処理では、それぞれ50%を明らかに越える増殖抑制濃度である0.033 mg/mLおよび0.096 mg/mLを最高処理濃度とした。すべての処理系列において最高処理濃度の1/2および1/4を中濃度および低濃度として設定した。連続処理では、24時間および48時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、標本作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

すべての処理系列において、処理した最高濃度は細胞毒性のために観察できなかったため、染色体分析が可能な最高濃度は、24時間および48時間連続処理では0.035 mg/mL、S9 mix非存在下および存在下での短時間処理では0.017 mg/mLおよび0.048 mg/mLで、これらの濃度を高濃度群として2濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理した群では、いずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix存在下および非存在下で6時間処理した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誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下で2,6-ジクロロトルエンは、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時:継代4代、現在12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10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS, JRH BIOSCIENCES)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6 cm, Corning)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に新鮮培地に交換後、被験物質を加え、24および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix非存在下および存在下で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. S9

S9(キッコマン(株))は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

2,6-ジクロロトルエン(ロット番号:50820, (株)日本化学工業協会(東京))は、透明液体で、水に対しては不溶、アセトンおよびDMSOに可溶で、融点-1.9°C、沸点75.6°C、蒸気圧53.32 Pa以下の物質で、純度99.6%(不純物として、2,5-ジクロロトルエン(0.13%), 2,4-ジクロロトルエン(0.07%), 2,3-ジクロロトルエン(0.05%), 3,4-ジクロロトルエン(0.01%), 3,5-ジクロロトルエン(0.01%)等を含む)で、常温常圧において1年間安定の物質で、室温で遮光保存した。

6. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に用いた。溶媒はDMSO(ロット番号:APH4165, 和光純薬工業(株))およびロット番号:12H0658, Sigma Chemical Co.)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0.5 vol%になるように加えた。

7. 細胞増殖抑制試験

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、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%の増殖抑制濃度を

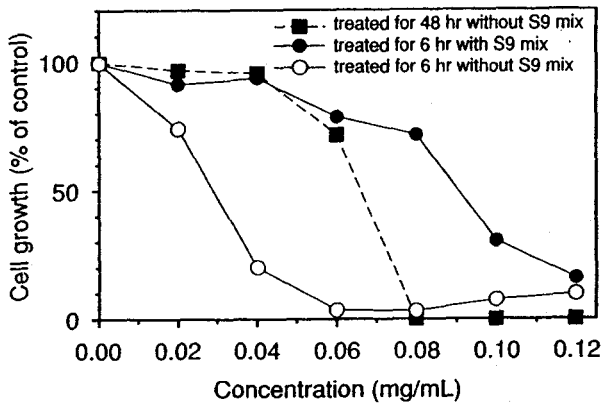


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2,6-dichlorotoluene

明らかに超える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%増殖抑制濃度をはさむ2濃度より算出したところ、0.069 mg/mLであった。また、短時間処理のS9 mix非存在下および存在下では、それぞれ0.033 mg/mLおよび0.096 mg/mLであった(Fig. 1)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理では0.069 mg/mL、短時間処理のS9 mix非存在下および存在下では、それぞれ0.033 mg/mLおよび0.096 mg/mLとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、局方注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

9. 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0.1 μg/mLになるように培養液に加えた。染色体標本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6枚作製した。作製した標本を3 vol% ギムザ溶液で染色した。

10. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ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・哺乳動物試験研究会(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。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

11. 記録と判定

無処理対照、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。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、溶媒対照群と被験物質処理群および陽性対照群間でフィッシャーの直接確率法²⁾により、有意差検定を実施した($p < 0.01$)。被験物質の染色体異常誘発についての最終判定は、石館ら³⁾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。ただし、疑陽性の結果が得られた場合には、染色体異常試験もしくは小核試験により、再現性、用量依存性等を検討し最終判定を行うこととした。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。2,6-ジクロロトルエンを加えて24時間および48時間連続処理した群の最高濃度群は、どちらの系でも細胞毒性のために十分な細胞数が観察できなかったが、観察可能であったいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。2,6-ジクロロトルエンを加え、S9 mix非存在下または存在下で6時間処理した群の最高濃度群は、どちらの系でも細胞毒性のために十分な細胞数が観察できなかったが、S9 mix非存在下または存在下それぞれで0.017 mg/mLおよび0.048 mg/mLからの各2群ではいずれも、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、2,6-ジクロロトルエンは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

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) 吉村功編, “毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ,” サイエンティスト社, 東京, 1987, pp.76-78.
- 3) 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

染色体異常試験

連絡先

試験責任者：田中憲穂

試験担当者：山影康次，若栗 忍，日下部博一，
中川ゆづき，橋本恵子，三枝克彦，
加藤初美

(財)食品薬品安全センター秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)

Kohji Yamakage, Shinobu Wakuri,

Hirokazu Kusakabe, Yuzuki Nakagawa,

Keiko Hashimoto, Katsuhiko Saegusa,

Hatsumi Kato

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center

729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2,6-dichlorotoluene (DCT)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ⁶⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Non-treatment			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.63		
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.75		
DCT	0.017	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38	-	-
DCT	0.035	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	0 (0.0)	0.63	-	-
DCT	0.069	24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00 ⁷⁾	Tox	Tox
MC	0.00005	24	200	5	44	111	2	1	6	0	169	1	103*(51.5)	101*(50.5)	0.38	+	-
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.63		
DCT	0.017	48	200	0	0	0	0	1	0	0	1	3	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	-	-
DCT	0.035	48	200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.75	-	-
DCT	0.069	48	0													Tox	Tox
MC	0.00005	48	200	6	46	129	10	5	6	0	202	12	104*(52.0)	103*(51.5)	0.63	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), f: acentric fragment (chromatid type), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C, Tox: toxic.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate *et al.* (1987). 6) One cell was analysed.

*: Significantly different from the solvent control at $p < 0.05$. **: Purity was 99.6%, 2,5-dichlorotoluene (0.13%), 2,4-dichlorotoluene (0.07%), 2,3-dichlorotoluene (0.05%), 3,4-dichlorotoluene (0.01%) and 3,5-dichlorotoluene (0.01%) were contained as impurities.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,6-dichlorotoluene (DCT)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ⁶⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Non-treatment				200	0	0	0	0	0	0	10	10	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.63		
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	1	0	1	1	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.13		
DCT	0.008	-	6-(18)	200	1	0	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13	-	-
DCT	0.017	-	6-(18)	200	2	2	1	1	0	1	0	7	0	7 (3.5)	5 (2.5)	0.63	-	-
DCT	0.033	-	6-(18)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	Tox	Tox
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	0	0	2	0	0	3	1	3 (1.5)	3 (1.5)	0.63	-	-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	1	10	11	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38		
DCT	0.024	+	6-(18)	200	0	1	1	2	0	0	0	4	2	4 (2.0)	4 (2.0)	0.13	-	-
DCT	0.048	+	6-(18)	200	0	0	0	1	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38	-	-
DCT	0.096	+	6-(18)	1	2	3	3	0	0	0	0	8	0	1 (100.0)	1 (100.0)	0.00	Tox	Tox
CPA	0.005	+	6-(18)	200	5	44	115	1	2	2	0	169	0	96*(48.0)	94*(47.0)	0.13	+	-

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), f: acentric fragment (chromatid type), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, CPA: cyclophosphamide, Tox: toxic.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate *et al.* (1987). 6) Two cells were analysed. 7) One cell was analysed.

*: Significantly different from the solvent control at $p < 0.05$. **: Purity was 99.6%, 2,5-dichlorotoluene (0.13%), 2,4-dichlorotoluene (0.07%), 2,3-dichlorotoluene (0.05%), 3,4-dichlorotoluene (0.01%) and 3,5-dichlorotoluene (0.01%) were contained as impurities.