

Table 4 - 2 Necropsy - Incidence of macroscopic lesions in female rats

Site and lesion	Dose (mg/kg)			
	2000		1000	
Fate	fd	tk	fd	tk
No. of animals examined	0	5	0	5
No abnormalities detected	-	0	-	0
Spleen: Enlargement	-	5	-	0
Back skin (patched area): Erosion/ulcer	-	5	-	5

Fate: fd, found dead; tk, terminal kill.

厚生労働省化学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究

平成 18 年度分担研究報告書

3. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）の
ヒト皮膚 3 次元モデルにおける皮膚腐食性試験

分担研究者 小坂忠司 (財)残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室長
協力研究者 林 宏一 (財)残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室

研究要旨

ヒト皮膚三次元モデルを用いてアルキルアンモニウム化合物系防腐剤（AAC）の皮膚腐食性を検索した。前培養した皮膚モデルに AAC を 3 分間および 60 分間暴露し、MTT 法により生存率を計算した。AAC の皮膚腐食性は 3 分間暴露で陽性であり、60 分暴露で擬陽性であった。

従って、本実験条件下において、AAC は腐食性陽性ないし強度刺激性の区分に相当すると判定された。

A. 研究目的

ヒト皮膚三次元モデルを用いて、木材防腐剤であるアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）の皮膚腐食性を検索した。

B. 研究方法

試験方法は 2004 年 4 月 13 日付け経済協力開発機構の毒性指針「OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 431: *In Vitro* Skin Corrosion - Human Skin Model Test」¹⁾に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

本試験の被験物質として、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤のジデシルジ

メチルアンモニウムクロリド（Didecyl dimethylammonium chloride、和光純薬工業株式会社）である。含量は、マクロケルダール法による窒素量から算出した場合 82.2 %、硝酸銀滴定法による塩素イオン量から算出した場合 87.2 %であり、水分量は 1.3%であった。受領した被験物質は冷蔵庫（許容範囲 1~10℃）で保管した。

陽性対照物質は、皮膚腐食性が確認されている 10%水酸化カリウム溶液（KOH、関東化学株式会社）を用いた。

2. 試験皮膚モデル

ヒト皮膚三次元モデル（EpiDerm™ human skin model system、倉敷紡績株式会社）を用いた。ヒト皮膚三次元モデルは搬入後、使用時まで冷蔵庫にて保管した。

本ヒト皮膚三次元モデルの EpiDerm™ は米国の代替法検証組織の ICCVAM でインビトロの皮膚腐食性試験として検証されたモデル²⁾である。

3. 被験物質投与液の調製

50%濃度の AAC 懸濁液を投与前に調製した。調製は、所定量の被験物質を秤量し、注射用水（大塚製薬株式会社）を加え定容、溶解させた。陽性対照物質の水酸化カリウムは注射用水に溶解させ、10%濃度の水溶液を調製した。

4. 試験方法

試験実施に先立って、培養液にてヒト皮膚三次元モデル（以後、モデルと記載）を約1時間37℃で5%CO₂条件下にて前培養した。モデルの反応性を確認するため、陰性対照群処置区と陽性対照群処置区を設けた。陰性対照物質には注射用水を、陽性対照物質には10%水酸化カリウム溶液を用いた。

50%に調製したAACを100 μLずつ3個のモデルに処置した。各処置物質の暴露時間は、3分間および60分間とした。暴露後、リン酸緩衝液（PBS、インビトロジェン株式会社）で洗浄した後、生細胞の定量化のため培養液に溶解させた0.5 mg/mL濃度のMTT（3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide、Sigma社）を0.3 mL加えて、37℃で3時間培養した。以上の37℃での培養は5% CO₂インキュベーター（三洋電機（株））を用いた。培養後、PBSで洗浄し、イソプロパノール（和光純薬株式会社）を2 mL加えてモデルを浸漬させ、冷暗所（4℃の冷蔵庫）で1

晩（約15時間）静置し、MTTホルマザンを抽出した。抽出液をよく攪拌し、マイクロプレートリーダー（ナルジェヌンク株式会社）を用いて540 nmで吸光度を測定した。測定値より、以下の計算式を用いてモデル細胞の生存率を計算した。

生存率(%)= (処理モデルの吸光度・補正值吸光度)/(陰性対照群の吸光度・補正值吸光度)×100

判定；各測定値の生存率から、皮膚腐食性を判定した。判定はOECDの試験ガイドライン431に示された基準³⁾に従った。すなわち、生存率が3分暴露で50%未満、もしくは60分暴露で15%未満の場合には皮膚腐食性陽性と判定した。

C. 研究結果

1. 皮膚腐食性成績

皮膚腐食性成績を表1に示す。

AAC 処置によるヒト皮膚三次元モデル細胞生存率は、3分暴露で25.4%、60分暴露で19.0%であった。この生存率の皮膚腐食性を判定した結果、3分暴露では陽性、60分暴露では疑陽性（15%以上20%未満）であった。

D. 考察

ヒト皮膚三次元モデルを用いて、皮膚刺激性を検索した。その結果、3分暴露では皮膚腐食性と判定された。一方、60分暴露では、疑陽性（15%以上20%未満）であった。この反応は、Sodium lauryl sulfate（SLS）と同程度の反応性であり³⁾、強度の刺激性が示唆された。本試験条件下において、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤のAACは腐食性陽性あるいは強度

の刺激性物質の区分に相当すると判定された。

E. 結論

ヒト皮膚三次元モデルを用いて AAC の皮膚腐食性を検索した。本実験条件下において、AAC の皮膚腐食性ないし強度刺激性の区分に相当すると判定された。

F. 引用文献

- 1) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 431: *In Vitro* Skin Corrosion - Human Skin Model Test. Adapted: April 13, 2004.
- 2) ICCVAM Evaluation of EPISKIN, Epiderm (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: In vitro Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. Research Triangle Park, NC, National Institute of Environmental Health Sciences. June 2002.
- 3) Prediction of Human Skin Irritancy Using a Cultured Human Skin Model: Comparison of Chemical Application Procedures and Development of a Novel Chemical Application Procedure Using the Vitorlife-skin model. Noriyuki M, Katsuyasu M, Shin-ichiro M, Hajime K, Satoru N, and Hiroaki K. *Altern. Animal Test Experiment. Prediction of Human Skin Irritancy*. 9(1), 1-10 2002

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 皮膚腐食性試験

	3分暴露		60分暴露		判定1	判定2
	吸光度	生存率 (%)	吸光度	生存率 (%)		
陰性対照	1.128	-	1.152	-		
陽性対照	0.255	22.6	0.150	13.0	+	+
AAC	0.287	25.4	0.219	19.0	+	-

判定1;+陽性(3分暴露時 生存率<50%)

判定2;+陽性(60分暴露時 生存率<15%)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究

平成 18 年度分担研究報告書

4. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）の皮膚感作性試験

分担研究者 小坂忠司 (財)残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室長
協力研究者 福山朋季 (財)残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室研究員
上田英夫 (財)残留農薬研究所 毒性部免疫・急性毒性研究室主任

研究要旨

アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）の皮膚感作性試験を、8 週齢の CBA 系 SPF マウスの雌性動物を用いて、OECD の毒性試験指針 429：Skin sensitization・Local Lymph Node Assay（LLNA 法）に従って実施した。投与群として、0、0.01、0.03、0.1、0.3、1%の 6 濃度の AAC を設定し、1 群 5 例のマウスを用いた。各濃度の投与液を 3 日間両耳後方に経皮投与し、3 日後に ^3H -methyl-Thymidine (20 μCi /animal) 溶液を尾静脈内投与した。5 時間後に両耳下リンパ節を摘出し、リンパ節重量、リンパ球細胞生存性（ATP 活性）及びリンパ球細胞増殖活性（ ^3H -methyl-Thymidine 取り込み量）の測定を行った。その結果、リンパ節重量、リンパ球細胞生存性及びリンパ球細胞増殖活性は、0.3 及び 1%投与群において有意な増加が認められた。また、リンパ球細胞増殖活性において、溶媒対照群との比で算出される Simulation Index では、0.1、0.3、及び 1%投与群において 3 以上を示した。これらの結果から、AAC の皮膚感作性は、陽性であると結論された。

A. 研究目的

代表的な木材防腐剤であるアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）について、マウスの Local Lymph Node Assay 法（LLNA 法）により皮膚感作性を検索し、リスク評価に必要な基礎的毒性情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

試験方法は 2002 年 4 月 24 日付け経済協力開発機構の毒性試験指針「OECD Guideline for the testing of chemicals.

Guideline 429: Skin sensitization・Local Lymph Node Assay」¹⁾に従い、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

本試験の被験物質として、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤のジデシルジメチルアンモニウムクロリド（Didecyl dimethylammonium chloride、和光純薬工業株式会社）である。含量は、マクロケルダール法による窒素量から算出した場合 82.2 %、硝酸銀滴定法による塩素イオン量

から算出した場合 87.2 %であり、水分量は 1.3%であった。受領した被験物質は冷蔵庫（許容範囲 1~10℃）で保管した。

2. 試験動物

日本チャールスリバー株式会社厚木飼育センターで生産された近交系 SPF マウス（CBA/JnCrIj）の雌性動物を用いた。CBA/Jn マウスは接触性過敏症研究によく用いられ²⁾ Guideline により使用が定められている動物種である。試験動物は 7 週齢にて購入し、8 日間試験環境に馴化した後、8 週齢にて試験に供試した。馴化期間中毎日一般状態を観察した。動物は温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、換気回数 10 回以上/時間（オールフレッシュエアー方式）、照明時間 12 時間/日（午前 7 時点灯、午後 7 時消灯）に設定された動物飼育室で個別飼育した。投与開始日に全ての動物の体重を測定し、体重値に基づいた層別無作為抽出法により群分けを実施した。基礎飼料には保証飼料である固型飼料 MF（オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、ステンレス鋼製給餌器に入れて動物に自由に摂取させた。飲料水は、市上水（常総市）をプラスチック製給水びんに入れて動物に自由に摂取させた。なお、動物の取り扱いに関しては残留農薬研究所に定める倫理規定に従い実施した。

3. 試験群

本試験に先駆けて実施されたアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）のラットにおける急性経口³⁾、急性経皮⁴⁾及び培養皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験⁵⁾の結果に基づいて、経皮及び経口経路にて毒性の起こらない濃度及び腐食性が認めら

れない濃度と想定される AAC の 1%濃度を最高用量として選択した。

そこで、試験では 1%濃度から公比 3 にて 0、0.01、0.03、0.1、0.3 および 1%の 6 濃度の AAC を設定した。

4. 被験物質投与液の調製

各濃度（0、0.01、0.03、0.1、0.3、1%）の被験物質投与液を投与前に 1 回調製した。投与液の調製に際し、純度換算を実施せずに、所定量の被験物質を秤量し、アセトン/オリーブオイル（アセトン（和光純薬工業株式会社、大阪府）：オリーブオイル（和光純薬工業株式会社、大阪府）=4：1）を加え定容し、スターラーにて攪拌して懸濁させた。対照群の投与液はアセトン/オリーブオイルとした。各濃度の投与液は各投与日に小分け、冷蔵・遮光（5℃）条件下にて保存した。投与液は投与直前に室温に戻して使用した。

5. 被験物質の投与

各被験物質の被験物質投与液を両耳後方に 3 日間経皮投与した。被験物質投与液をスターラー等で攪拌して均質な状態に保ち、ピペットを用いて左右の耳介後方に 25 μL ずつ経皮投与を行った。

6. 体重

全動物について、初回被験物質投与直前及び最終解剖日に体重を測定した。

7. 剖検及び組織採取

最終解剖予定時刻の 5 時間前に動物の尾静脈内に ^3H -methyl-Thymidine (^3H -TdR、GE Healthcare Bioscience Ltd、東京都)

を投与した。 $^3\text{H}\text{-TdR}$ の投与量はマウス 1 匹あたり 20 μCi とした。 $^3\text{H}\text{-TdR}$ 投与の 5 時間後、全生存動物についてエーテルの麻酔下で放血屠殺し、剖検を実施した。各動物より両側の耳下リンパ節を採取し、その重量を測定した。重量測定後、リンパ球細胞の細胞懸濁液とした。

8. 細胞懸濁液の調製

リン酸緩衝液 (PBS) に浸水したリンパ節をナイロンメッシュ (75 μm メッシュ) 上で揺りつぶし、単細胞懸濁液を得た。次に細胞懸濁液を遠心分離 (1300rpm; 5min) により洗浄し、PBS にて 5mL の細胞懸濁液とした。

9. リンパ球細胞生存性

細胞懸濁液の一部試料 (100 μL) について、細胞内 ATP 活性を測定することにより、リンパ球細胞の生存性を評価した。細胞内 ATP 活性の測定には、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (プロメガ、東京都) を用いた。細胞懸濁液の一部試料 (100 μL) と CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (100 μL) を白色マイクロプレート (Nulge Nunc International K.K., 東京都) に添加し、10 分間室温で培養した。その後、マイクロプレートルミノメーター (TR717、Berthold Japan, co. ltd., 東京都) にて発光量を測定した。

10. リンパ球細胞増殖活性

細胞懸濁液を遠心分離 (1300rpm; 5min) により洗浄し、5%トリクロロ酢酸溶液 (TCA、和光純薬工業株式会社、大阪府)

にて 3mL の細胞懸濁液とした。冷蔵・遮光 (4°C) 条件下にて 18 時間静置し、細胞を裸化させた。18 時間後、遠心分離 (1300rpm; 5min) により洗浄し、再度 TCA にて 1mL の細胞懸濁液とした。得られた細胞懸濁液をシンチレーションバイアルに移し、Atomlight (株式会社パーキンエルマージャパン、東京都) を 9mL 加えてよく攪拌した。この細胞懸濁液について、液体シンチレーションカウンター (LC-5100、アロカ株式会社、東京都) により細胞増殖活性を測定した。

11. 有意差検定

各検査項目について、対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の有無を危険率 5%および 1%レベルで解析した。

体重、リンパ節重量、リンパ球細胞生存性及びリンパ球細胞増殖活性のデータについては、先ず Bartlett の等分散分析を行ったその後、等分散の場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett の多重比較法により対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。一方、等分散ではない場合には、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較法を用いて平均順位の有意差の有無を判定した。

12. Stimulation index (SI) の算出

細胞増殖活性測定データについて、その平均値をもとに、次式により Stimulation index (SI) を求める。

SI = 各投与群の細胞増殖活性平均値 /
溶媒対照群の細胞増殖活性平均値

一般的に、SI が 3 以上で陽性であると判定する。⁶⁾

C. 研究結果

LLNA の試験結果を表 1 に示す。

1. 体重

いずれの投与群においても被験物質投与の影響と考えられるような体重減少は認められなかった。

2. リンパ節重量

AAC の 0.3 及び 1% 投与群で、対照群と比べ有意なリンパ節重量の増加が認められた。

3. リンパ球細胞生存性

AAC の 0.1、0.3 及び 1% 投与群で、対照群と比べ有意な ATP 活性の増加が認められた。

4. リンパ球細胞増殖活性

AAC の 0.3 及び 1% 投与群で、対照群と比べ有意なリンパ球細胞増殖活性の増加が認められた。また、SI 値は AAC 0.1、0.3、及び 1% 投与群において 3 以上を示していた。

D. 考察

木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価を行う事を目的に、CBA/Jn マウス雌を用いた Local Lymph Node Assay 法により、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) の皮膚感作性を検索し

た。

リンパ節重量測定は 0.3 及び 1% 投与群、リンパ球細胞の生存性測定では 0.1、0.3 及び 1% 投与群で有意な増加が認められた。³H-TdR を用いたリンパ球細胞の増殖活性測定では、0.3 及び 1% 投与群で有意な増加が認められ、溶媒対照群との比で算出される Simulation Index は、0.1、0.3、及び 1% 投与群において 3 以上を示していた。

リンパ節重量、リンパ球細胞の生存性およびリンパ球細胞の増殖活性がいずれも AAC 投与群で増加していること、増加が用量相関性であること、SI 値が 3 以上を示していることから、AAC の LLNA 法における皮膚感作性は陽性と判断した。

E. 結論

CBA/Jn マウスを用いた Local Lymph Node Assay 法により、アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) の皮膚感作性を検索した。本実験条件下において、AAC の皮膚感作性は陽性であると結論した。

F. 引用文献

- 1) OECD, 2002. OECD Guideline for the Testing of Chemicals; Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Guideline 429. Paris, adopted 24th April 2002.
- 2) Dean JH, et al. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, Regulatory Toxicology and Pharmacology 34,258-273 2001.

- 3) 小坂忠司:アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) のラットにおける急性経口投与毒性試験、厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究、2007年
- 4) 小坂忠司:アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) のラットにおける急性経皮投与毒性試験、厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究、2007年
- 5) 小坂忠司:アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (AAC) のヒト皮膚三次元モデルにおける皮膚腐食性試験、厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究、2007年
- 6) Gerberick, G. F., Robinson, M. K., Ryan, C. A., Dearman, R. J., Kimber, I., Basketter, D. A., Wright, Z., and Marks, J. G. (2001). Contact allergenic potency: correlation of human and local lymph node assay data. *Am J Contact Dermat* 12, 156-161.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Table 1 LLNA results in female mice

Group no.	Dose	Final BW (g)	Lymph node weight (mg)	ATP activity (RLU)	Cellular proliferation (DPM/mouse)	Stimulation Index
1	0	Mean	3.8	121626	297.9	1.0
		S.D.	0.3	28459	129.3	
2	AAC 0.01 %	Mean	3.4	133973	266.7	0.9
		S.D.	0.3	37185	151.7	
3	AAC 0.03 %	Mean	4.1	109537	282.0	0.9
		S.D.	1.1	32198	77.2	
4	AAC 0.1 %	Mean	4.8	256050 **	1004.2	3.3
		S.D.	0.5	30305	295.2	
5	AAC 0.3 %	Mean	8.2 **	387061 **	3485.7 **	11.7
		S.D.	2.0	94025	1225.0	
6	AAC 1 %	Mean	9.2 **	517162 **	5042.4 **	16.9
		S.D.	1.5	80659	624.2	

S.D.: Standard deviation.

Stimulation Index is the ratio of the mean of actual measurements for each test substance treatment group against that of the vehicle treatment control group. Significantly different from control (Dunnett's test following one-way ANOVA or Dunnett-type test following Kruskal-Wallis test): *, p <= 0.05; **, p <= 0.01.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
木材防腐剤として使用される化学物質のリスク評価に関する研究

平成 18 年度分担研究報告書

5. アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）の培養細胞を用いる
コメットアッセイ

分担研究者 松元 郷六 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室長
協力研究者 和田 邦生 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室
竹澤 祐造 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室
阿部 美咲樹 (財)残留農薬研究所 毒性部遺伝毒性研究室

研究要旨

アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤（AAC）の DNA 損傷誘発性を調査するため、培養細胞を用いるコメットアッセイを行った。用量設定試験により、本試験で用いる用量は 7.3、10.2、14.3、20、28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。その結果、7.3、10.2、14.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では DNA 損傷は認められなかった。20、28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では DNA 損傷細胞の有意な増加が認められた。しかし、これらの用量では細胞毒性が確認されたため、出現した DNA 損傷は被験物質の細胞毒性に起因する二次的な作用と判断した。よって、AAC の培養細胞に対する DNA 損傷誘発性は陰性と判断された。

A. 研究目的

国内で使用される木材防腐剤は主に 3 種類に分けられる。すなわち、クロム・銅・ヒ素化合物系木材防腐剤(CCA)、銅・アルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤 (ACQ)、およびアルキルアンモニウム化合物系木材防腐剤(AAC)である。我々はこれまでに CCA と ACQ の遺伝毒性を明らかにして来た。本年度は AAC に的を絞ってその遺伝毒性を調査することにした。

本研究では、DNA 損傷誘発性の有無を調査するため、培養細胞を用いるコメットアッセイを行った。

B. 研究方法

試験は Hartmann らのガイドライン¹⁾および Sasaki らの方法²⁾を参考にし、以下の条件で実施した。

1. 被験物質

名称： Didecyl dimethyl ammonium chloride (DDAC)
ロット番号： DPJ0013
純度： 82.2~87.2%
CAS Reg No. : 7173-51-5
製造元： 和光純薬工業株式会社
入手日： 2006年 8月 14日

注意事項： 吸湿性、刺激性、感作性あり
保存条件： 冷暗所（許容範囲：1～10℃）
分子量： 362.08
示性式： C₂₂H₄₈ClN

2. 細胞

チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL³ を用いた。供試細胞は、37℃、5% 二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガスインキュベーターで組織培養用ファルコンプレートを用いて培養した。培養液は 10% の割合で非働化新生仔牛血清（HyClone Laboratories, Inc.）を含む MEM 培地（Gibco BRL）に、ペニシリン-ストレプトマイシン（100 IU/mL, 100 µg/mL, Gibco BRL）、L-グルタミン（2 mM, Gibco BRL）を添加したものを、継代時には 0.25% トリプシン溶液（Gibco BRL）を用いて細胞をプレートより剥離した。

3. 被験物質溶液の調製

AAC は生理食塩液（大塚製薬株式会社）に溶かしたところ、均一な懸濁状態となった。よって用量設定試験には生理食塩液を用いた。用量設定試験後、AAC は純水に変化なく溶解したことが判明したため、本試験の溶媒には滅菌した純水を用いた。なお、純度換算は行わなかった。

4. 陰性対照および陽性対照

本試験は陰性対照（溶媒対照）物質として滅菌した純水を用いた。陽性対照物質として 4-ニトロキノリン-1 オキシド（4-NQO、和光純薬工業株式会社）をジメチルスルホ

キシド（和光純薬工業株式会社）に溶解させて用いた。

5. 用量設定試験（細胞増殖抑制試験）

細胞増殖抑制試験では、3621 µg/mL（10 mM）を最高用量とし、公比 2 で 9 用量を設定した。陰性（溶媒）対照群には溶媒のみを 1% 添加した。試験は各用量あたり 2 枚のプレートを用了。

細胞を 1.5×10⁵ 個/プレートの割合で組織培養用 6 cm プレートに播種し、48 時間後、被験物質溶液を 1 時間処理した。

各処理法とも培養終了後に培地を捨て、PBS で二回洗浄し、10%ホルマリン液で 10 分間固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液にて 10 分間室温で染色した。染色後、単層培養細胞密度計（オリンパス光学株式会社）を用いて細胞密度を計測し、陰性対照群に対する細胞増殖率を求めた。

6. 本試験（コメットアッセイ）

使用シャーレ、播種細胞数、培地量、処理前の培養時間、被験物質溶液添加量、被験物質処理時間は 5. 用量設定試験と同様に行った。陽性対照は 1% となるよう添加した。被験物質処理後、培養液を捨て、PBS で 2 回洗浄後、スライド標本作製した。

7. スライド標本の作製

トリプシンにより細胞を回収し、遠心した。上清を棄てた後、適量のホモジナイズ液（75mM NaCl, 30mM EDTA2Na）で細胞を再浮遊させた。細胞浮遊液と低融点寒天（PBS に Low melting point agar（ナカライテスク株式会社）を 0.75% で融解したものを 10:75 で混和し、あらかじめ Normal

melting point agar (ナカライテスク株式会社)をコーティングしておいたスライドガラス上に均等に広げた。冷却により寒天を固めた後、冷却した細胞溶解液 (2.5M NaCl、100mM EDTA2Na、10mM Tris base、1% Triton X-100、10% DMSO、pH10)に浸した。1シャーレあたり2枚のスライド標本作製した。細胞溶解液に一時間以上浸した後、電気泳動槽(株式会社マリソル)上で4°Cに冷却した電気泳動液 (300mM NaOH、1mM EDTA2Na、pH >13)によりスライドガラスを20分間浸し、冷蔵暗所でアンワインディングを行った。その後直ちに電気泳動を開始した。泳動条件は25V、270~300mA、4°C、20分、暗所であった。電気泳動が終了後、冷却した中和液(Tris base pH7.5)に5分浸し、過剰なアルカリを中和した。処理が終了したらスライドガラスをエタノールに浸し、脱水し、コード化した後、エチジウムブロマイド (20 µg/mL)で染色し観察した。

8. コメット像の分析

各スライドガラスあたり50個、各濃度あたり200個のコメット像をCCDカメラでPCに画像を取り込み、Komet5.5(Kinetic Imaging Limited)により画像解析を行った。計測したパラメーターは% Tail DNA、Tail length、Olive tail momentであった。

9. コメットアッセイの統計解析

陰性対照群と処理群の間でOne-way Anovaを用いた。被験物質投与群に有意な差が認められた場合はDunnettの多重検定を行った。陰性対照群と陽性対照群はAspin-Welchのt検定を行った。なお、い

ずれの検定法も有意水準を5%以下に設定した。

10. 本試験における細胞毒性試験

コメットアッセイと同時に細胞毒性を評価するためサテライト群を設け、増殖抑制試験を行った。サテライト群の使用シャーレ、播種細胞数、培地量、処理前の培養時間、被験物質溶液添加量、被験物質処理時間、固定・染色方法などは、5. 用量設定試験と同様に行った。

また、ATPを測定し細胞毒性を評価した。使用シャーレ、播種細胞数、培地量、処理前の培養時間、被験物質溶液添加量、被験物質処理時間などは、5. 用量設定試験と同様に行った。ATPを測定した用量は陰性対照群、20 µg/mL群、陽性対照群であった。被験物質処理後、培養液を捨て、PBSで2回洗浄後、トリプシンにより細胞を回収し、冷メタノールによりATPを抽出した。抽出したATPはルミテスター(キッコマン株式会社)を用いて発光量として検出し、陰性対照群と比較した。

11. 倫理面への配慮

本研究は培養細胞を材料とした*in vitro*実験研究であり、人や動物を研究対象として用いていないため、人権擁護や動物愛護などの観点において倫理上の問題はない。

C. 研究結果

1. 用量設定試験(細胞増殖抑制試験)

用量設定試験の結果をTable1に示す。

14.14 µg/mLでは細胞増殖率が79%、28.29 µg/mLの濃度では細胞増殖率が41%となり、それ以上の濃度では細胞は死滅し

ていたと考えられた。なお、細胞死の影響により 56.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度では用量と細胞増殖率との相関性は認められなかった。

以上の結果から、本試験の最高用量は 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

2. 本試験

本試験の結果を Table2 に示し、DNA 損傷を示すパラメーターをグラフ化したものを Figure1 に示す。また、観察した各スライドグラスの結果を Appendix1 に示す。

その結果、28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群では、DNA 損傷の3つのパラメーター (% Tail DNA、Tail length、Olive tail moment) 全てに有意な差が認められた。同時にモノセレーターの計測による細胞増殖率も 66%であり細胞毒性が認められた。

20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群では DNA 損傷を示す3つのパラメーター全てに有意な増加が認められた。モノセレーターの計測による細胞増殖率は 96%であり、細胞毒性は認められなかった。この用量では細胞内 ATP を計測した結果、陰性対照群と比べ、11.6%まで ATP が減少していた。その他の用量群では DNA 損傷に有意な差は認められなかった。

一方、陽性対照群(4NQO)では陰性対照群に比べ、細胞増殖率は 86%、ATP は 91.7%であり、細胞毒性を示さなかったが、DNA 損傷を示す3つのパラメーター全てに有意に高い値が得られた。

D. 考察

本試験では、20 および 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では DNA 損傷細胞の有意な増加が認められた。しかし、細胞死と DNA 損傷は関連が

あるため、DNA 損傷が現れた場合、細胞毒性を考慮しなくてはならない。文献上、コントロールと比べ 30%以上細胞生存率が低下する用量での試験結果は一般的に避けられてきた⁴⁾との報告がある。細胞毒性試験において 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の結果は 96%の細胞増殖率であり、細胞毒性は認められなかった。しかし、顕微鏡下の観察では細胞の変形が認められていた。そこで細胞内 ATP を計測した結果、陰性対照群と比べ、11.6%まで ATP が減少していた。したがって細胞は残っているものの、それは死細胞であると判断できた。28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では細胞毒性試験において 66%の細胞増殖率であり、細胞死が示唆された。よって、20 および 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では被験物質の細胞毒性に起因する DNA 損傷がおこっていると判断した。なお、用量設定試験より溶媒を滅菌水に変更したが、本試験は細胞毒性が現れる高用量まで試験が行われたことが、細胞毒性試験により確認された。

以上から AAC の DNA 損傷性は陰性であると判断した。また、AAC の *in vivo* 小核試験でも陰性の結果が得られている(本年度事業において実施)。このことから AAC に明らかな遺伝毒性は無いものと判断できる。本研究結果は今後の AAC のリスク評価を行う上で、貴重な基礎データとなり得るだろう。

E. 結論

本実験条件下において、AAC の培養細胞に対する DNA 損傷誘発性は陰性であると結論した。

F. 引用文献

- 1) Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud V. and Tice R.R. (2003) 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. Mutagenesis. 18(1);45~51.
- 2) Sasaki, YF., Tsuda, S., Izumiyama, F., and Nishidate, E. (1997) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, Mutation Res. 388(1);33~44.
- 3) Koyama, H., Utakoji, T. and Ono, T. (1970) A new cell derived from newborn Chinese hamster lung tissue. Gann, 61: 161-167.
- 4) Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu JC. and Sasaki YF. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen., 35(3), 206-21.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Table 1. Dose range-finding test (Preliminary growth inhibition test)

Test substance : AAC

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative cell growth (%)		Mean (%)
Solvent control (PS 1.0%)	100	100	100
14.14	77	81	79
28.29	42	39	41
56.58	125	130	128
113.2	138	141	140
226.3	159	158	159
452.6	138 ^{b)}	163 ^{b)}	151 ^{b)}
905.3	133 ^{b)}	163 ^{b)}	148 ^{b)}
1811	241 ^{b)}	313 ^{b)}	264 ^{b)}
3621	272 ^{b)}	290 ^{b)}	281 ^{b)}

PS : Physiological saline

a) : CHL cells were treated with the test substance for 1 hour.

b) : Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment.

Table 2. Summary of results

Test substance: AAC

Concentration (µg/mL)	% Tail DNA		Tail length		Olive tail moment		Relative cell growth (%)	Cell viability (ATP)(%)	Judgement
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.			
Solvent control	4.90	0.96	16.68	5.18	0.59	0.16	100	100	Negative
7.3	6.47	1.16	16.76	7.68	0.72	0.28	108	-	Negative
10.2	5.95	0.81	16.53	2.92	0.72	0.17	111	-	Negative
14.3	5.48	1.30	15.95	4.04	0.67	0.20	113	-	Negative
20	12.33	2.81	29.91	2.83	2.14	0.64	96	11.6	Cytotoxicity
28	12.73	1.84	30.69	7.60	2.40	0.69	66	-	Cytotoxicity
4NQO 0.25	13.28	2.29	34.12	9.96	2.57	0.73	86	91.7	Positive

200 cells were scored from each doses.

*:p<0.05 Dunnet test

** :p<0.01 Dunnet test

^a:p<0.05 Aspin-welch t-test

^{aa}:p<0.01 Aspin-welch t-test

-: not done

4NQO:4-nitroquinoline-1-oxide

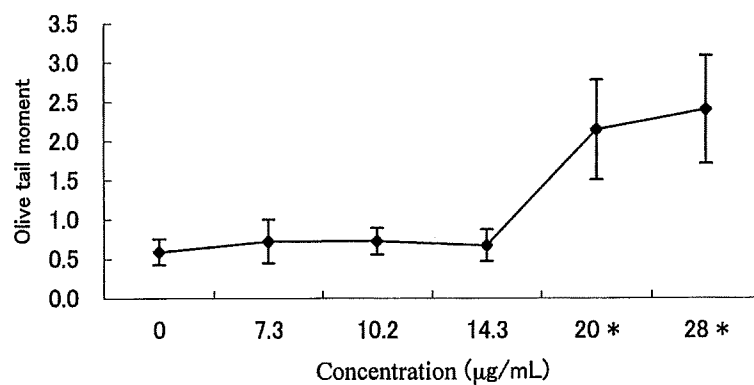
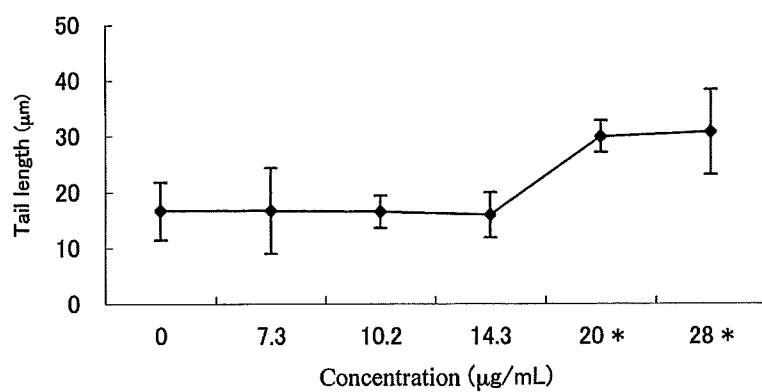
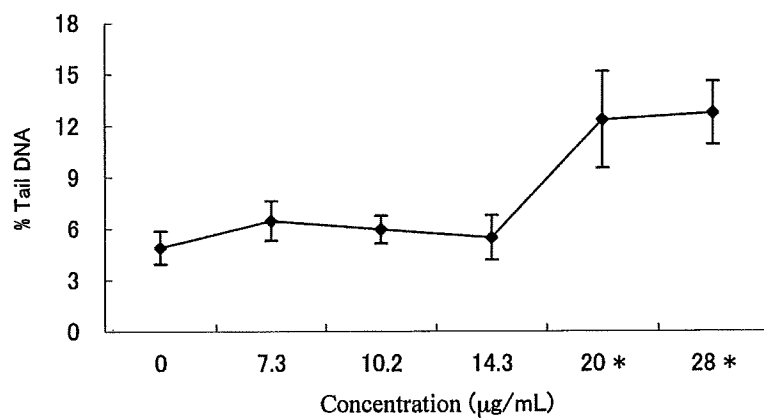


Fig. 1. The effects of AAC on CHL cells in comet assay. The induction of DNA damage at 20 and 28 µg/mL (*) was associated with cell death. Data are means \pm S.D. (n=4).

Appendix 1. Individual values of comet assay

Test substance: AAC

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Code number	% Tail DNA	Tail length	Olive tail moment
Solvent control (Pure water)	35	4.14	12.10	0.42
	25	4.33	12.29	0.52
	61	4.86	21.14	0.62
	28	6.27	21.20	0.80
7.3	48	5.76	9.01	0.42
	41	5.46	11.63	0.57
	38	6.61	21.19	0.85
	4	8.05	25.19	1.05
10.2	8	5.04	13.40	0.50
	23	6.61	17.96	0.82
	5	5.50	14.90	0.70
	51	6.66	19.87	0.88
14.3	42	4.00	12.80	0.39
	33	6.42	13.38	0.75
	60	6.70	21.64	0.86
	56	4.78	15.99	0.67
20	12	15.11	28.98	2.75
	47	14.38	26.61	2.62
	43	9.63	30.76	1.48
	6	10.21	33.31	1.72
28	54	11.13	22.00	1.72
	17	11.66	26.63	1.99
	15	15.27	36.99	3.26
	37	12.84	37.13	2.62
Positive control 4NQO 0.25	10	10.96	27.22	2.02
	32	11.68	25.55	1.99
	55	15.13	36.51	2.73
	53	15.37	47.19	3.54

4NQO:4-nitroquinoline-1-oxide