

被験物質は、水にほとんど溶けず、溶解性の検討により DMSO に易溶であることから、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (SeccoSolv[®]; 分析用, 純度 \geq 99.5%, Lot No. K36323231, Merck) に溶解させた。

細胞増殖抑制試験では、使用直前に被験物質 991.0 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 3 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。次いで、DMSO を加えて 5 mL に定容し、198.2 mg/mL 調製原液を準備した。DMSO 1 mL に、この 198.2 mg/mL 調製原液 1 mL を加えることにより、99.1 mg/mL 液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、49.6, 24.8, 12.4, 6.19, 3.10, 1.55, 0.774 および 0.387 mg/mL 液を調製した。この被験物質液は、用時調製された。

染色体異常試験において、使用直前に被験物質 75.0 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 2 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。次いで、DMSO を加えて 3 mL に定容し、25.0 mg/mL 調製原液を準備した。DMSO 1.5 mL に、この 25.0 mg/mL 調製原液 1.5 mL を加えることにより、12.5 mg/mL 液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、6.25, 3.13, 1.56 および 0.781 mg/mL 液を調製した。この被験物質液は、用時調製された。

なお、被験物質液に発熱、発泡、発煙等の変化は認められなかった。

6.6. 対照群

6.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質液調製に用いる溶媒である DMSO を使用した。

6.6.2. 陽性対照 (短時間処理法- S9 処理および連続処理法 24 時間処理)

注射用水 (日本薬局方注射用水; 大塚蒸留水, 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC; マイトマイシン注用 2 mg, 協和発酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液; 大塚生食注, 大塚製薬工場) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、6 ヶ月以内の凍結保存したものを試験に用いた。

処理濃度は、短時間処理法で 0.1 μ g/mL, 連続処理法で 0.05 μ g/mL とした。

6.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

生理食塩液 5 mL に溶解したシクロホスファミド (CP; 注射用エンドキサン[®] 100 mg 10V, 塩野義製薬) を生理食塩液を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、6 ヶ月以内の凍結保存したものを試験に用いた。

処理濃度は 12.5 μ g/mL とした。

6.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

6.7.1. 処理濃度

細胞増殖抑制試験（予備試験）における被験物質の処理濃度として、ガイドライン上定められた 10 mM 相当の 1982 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高濃度とし、以下 991, 496, 248, 124, 61.9, 31.0, 15.5, 7.74 および 3.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 10 濃度を設定した。

6.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 濃度当たり 2 ウェルを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

6.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F, 住友ベークライト）の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、12.7.6.に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各ウェルの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液（Sigma-Aldrich）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 1 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた。

6.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、12.7.6.に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った。

その後の操作は、12.7.3.に記載した方法に準じた。

6.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、12.7.6.に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた。

6.7.6. 処理量一覧

	溶媒あるいは被験物質		
	培養液	S9 mix	処理液
- S9 処理	600 μL	-	6 μL
+S9 処理	500 μL	100 μL	6 μL
24 時間処理	600 μL	-	6 μL

6.7.7. 析出等の観察

各処理法において、処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。+S9 処理の処理終了時において 15.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で培養液の色調が橙色を呈していたため、その時点で pH メーター（twin pH B-212, 堀場製作所）を用いて培養液の pH を測定した。

6.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウエルから培養液を除き、10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用，和光純薬工業）を加えて約 10 分間細胞を固定した。次いで，クリスタル・バイオレット（Merck）の 0.1%水溶液で 10 分間細胞を染色した。各プレートを水洗した後，乾燥させた。各ウエルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を 3 mL 加え，5 分放置した。各ウエルの溶出液を 96 ウエルのプレート（アッセイプレート，IWAKI）に各々 300 μ L 分注し，マイクロプレートリーダー（モデル 680，Bio-Rad Laboratories）を用いて，570 nm での吸光度を測定した。陰性対照群における吸光度に対する比を各濃度群について求め，相対細胞増殖率とした。細胞増殖抑制が認められたため，いずれの処理法もプロビット法を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した。

6.8. 染色体異常試験

6.8.1. 処理濃度

細胞増殖抑制試験の結果，短時間処理法-S9 処理，+S9 処理および連続処理法 24 時間処理のいずれにおいても細胞毒性が認められ，50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ 119，62.7 および 125 μ g/mL であった。したがって，染色体異常試験は，細胞の増殖を 50%以上抑制すると推定される濃度，すなわち，短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理では 250 μ g/mL，短時間処理法+S9 処理では，125 μ g/mL をそれぞれ最高濃度とし，次表に示す 5 濃度を設定した。

処理法	処理濃度 (μ g/mL)					
短時間処理法-S9 処理	-	15.6	<u>31.3</u>	<u>62.5</u>	<u>125</u>	250
短時間処理法+S9 処理	<u>7.81</u>	<u>15.6</u>	<u>31.3</u>	62.5	125	-
連続処理法 24 時間処理	-	15.6	31.3	62.5	125	250

下線を付した濃度について染色体異常の観察を実施した。

6.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 濃度当たり 2 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて，試験番号，処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

6.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート（細胞培養用シャーレ，住友ベークライト）に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し，3 日間培養した。培養終了後，12.8.6. に記載する割合で，溶媒，被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後，各プレートの培養液を除去し，ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液（Sigma-Aldrich）

を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

6.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、12.8.6. に記載する割合で、溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。その後の操作は、12.8.3. に記載した方法に準じた。

6.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、12.8.6. に記載する割合で、溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

6.8.6. 処理量一覧

	溶媒あるいは被験物質			陽性対照物質		
	培養液	S9 mix	処理液	培養液	S9 mix	処理液
- S9 処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.03 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

6.8.7. 析出等の観察

各処理法において、処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。+S9 処理の処理終了時において 7.81 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で培養液の色調が橙色を呈していたため、その時点で pH メーター (twin pH B-212) を用いて培養液の pH を測定した。

6.8.8. 標本の作製

染色体標本作製のおよそ 2 時間前に、最終濃度 0.2 $\mu\text{g/mL}$ となるようにコルセミド溶液 (Invitrogen) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25% トリプシン溶液 (Invitrogen) を用いてプレートより細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液約 5 mL を加え、37°C の条件で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) で細胞を固定した。固定液を 2 回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とした。細胞密度を適切な濃度に調整し、細胞濃度確認のため染色体標本を 1 枚作製した。染色体メタフェーズ展開装置 (HANABI) を用いて、スライドガラス上に細胞浮遊液を 1 滴滴下し、染色体標本を 2 枚作製した。スライド標本は十分に乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8, Merck) を用いて 1.2 v/v% に希釈したギムザ液 (Merck) で 12 分間程度染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

6.8.9. 相対細胞増殖率の測定

染色体標本作製時に陰性対照、各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて、A TP フォトメーター（ルミテスターC-100LU, キッコーマン）を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理を開始した細胞液 50 μ L を添加し、攪拌した。測定用チューブにこの混合液 100 μ L を分注した。細胞液添加から約 20 分経過後、測定用チューブに ATP 測定用試薬キット（ルシフェール 250, キッコーマン）の発光試薬液 100 μ L を添加し、相対発光量（Relative Light Unit : RLU）を測定した。陰性対照群における RLU に対する比を各濃度群について求め、相対細胞増殖率とした。

6.8.10. 評価対象

12.8.9.の相対細胞増殖率が 50%未満になる最も低い濃度を最高濃度とした連続する 3 濃度を評価対象（観察濃度）とした。

6.8.11. 染色体の観察

短時間処理法と連続処理法のそれぞれの標本を分けて無作為にコード化し、マスキング法で観察した。短時間処理法について染色体の観察を実施し、その結果、陽性結果が得られたため、連続処理法の標本については観察を実施しなかった。

各プレート当たり 100 個、すなわち、1 濃度当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下（ $\times 600$ ）で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ（gap）、染色分体切断（ctb）、染色体切断（csb）、染色分体交換（cte）、染色体交換（cse）およびその他（oth）の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合は、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ、本来の軸からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として、1 濃度当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

6.9. 試験成立条件

- a. 陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は、背景データから求めた基準値内であり、かつ、いずれも 5%未満であること
- b. 陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は、上記の基準値内であり、かつ、10%以上であること

上記の条件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

6.10. 結果の解析

異常細胞の出現頻度が 5%未満を陰性、5%以上 10%未満、かつ、再現性が認められた場合に疑陽性、10%以上、かつ、再現性あるいは被験物質の濃度に依存性が認められた場合は陽

性と判定した。なお、ギャップのみ保有する細胞については、異常細胞数から除外して判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

6.11. D₂₀ 値ならびに TR 値の算出法

D₂₀ 値は分裂中期像の 20% にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であり、最小二乗法により算出した。TR 値は一定濃度 (mg/mL) 当たりの交換型異常 (cte) 出現数を示す比較値であり、染色分体交換の出現頻度 (%) を被験物質濃度 (mg/mL 換算) で割ることにより算出した。

7. 試験結果

7.1. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

7.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示す。

短時間処理法- S9 処理, 同法+S9 処理および連続処理法 24 時間のいずれにおいても濃度に依存した細胞増殖率の低下が認められ, 50%細胞増殖抑制濃度は, 短時間処理法- S9 処理, 同法+S9 処理および連続処理法 24 時間でそれぞれ 119, 62.7 および 125 $\mu\text{g/mL}$ であった。

7.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時, いずれの処理法の 248 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で白色粉末状の析出物が認められ, さらに 911 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では橙色の油適状析出物が認められた。処理終了時, 短時間処理法- S9 処理の 248 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では透明の油適状析出物, 連続処理法 24 時間の 248 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では透明および橙色の油適状析出物が認められた。また短時間処理法+S9 処理では, 248 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で透明あるいは透明と橙色の油適状析出物が認められ, 15.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では培養液の色調が橙色を呈していた。したがって, 陰性対照および 15.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度について培養液の pH を測定した (下表参照)。なお pH の低下は認められなかったため, 代謝物の色であると考えられた。

処理法	処理時間	処理濃度 ($\mu\text{g/mL}$)								
		0	15.5	31.0	61.9	124	248	496	991	1982
短時間処理法+S9 処理	6 h	7.7	8.1	8.1	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2	8.3

7.2. 染色体異常試験

7.2.1. 短時間処理法- S9 処理

試験結果を Table 3 および Appendix 1 に示す。

Azoxybenzene 処理群の染色体構造異常出現頻度は、31.3, 62.5 よび 125 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 2.0, 0.5 および 0.5%であり、陰性対照群 (1.0%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、31.3, 62.5 および 125 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 0.5, 1.0 および 2.5%であり、陰性対照群 (0.0%) と比較し明確な増加は認められなかった。また、濃度に依存した相対細胞増殖率の低下が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 125 $\mu\text{g/mL}$ での相対細胞生存率は 39.0%であった。

陽性対照の MMC 処理による染色体構造異常出現頻度は 57.0%であった。

7.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Table 4 および Appendix 2 に示す。

Azoxybenzene 処理群の染色体構造異常出現頻度は、7.81, 15.6 および 31.3 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 0.0, 16.0 および 52.0%であり、陰性対照群 (1.0%) と比較し 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度において濃度依存性のある明確な増加が認められた。倍数性細胞の出現頻度は、7.81, 15.6 および 31.3 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 0.0, 0.5 および 0.0%であり、陰性対照群 (0.0%) と比較し明確な増加は認められなかった。

また、濃度に依存した相対細胞増殖率の低下が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 31.3 $\mu\text{g/mL}$ での相対細胞生存率は 46.0%であった。

陽性対照の CP 処理による染色体構造異常出現頻度は 43.0%であった。

7.2.3. 析出等の観察

被験物質処理開始時、短時間処理法- S9 処理および連続処理法 24 時間の 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で白色粉末状および白色膜状の析出物が認められた。また、短時間処理法+S9 処理の 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で白色粉末状、125 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で白色膜状の析出物が認められた。処理終了時、短時間処理法- S9 処理および連続処理法 24 時間の 250 $\mu\text{g/mL}$ の濃度では透明の油滴状析出物が認められた。また短時間処理法+S9 処理では、7.81 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で培養液の色調が橙色を呈していた。したがって、陰性対照および 7.81 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度について培養液の pH を測定した (下表参照)。なお pH の低下は認められなかったため、代謝物の色であると考えられた。

処理法	処理時間	処理濃度 ($\mu\text{g/mL}$)					
		0	7.81	15.6	31.3	62.5	125
短時間処理法 +S9 処理	6 h	7.7	7.7	7.8	7.9	8.0	8.1
		7.6	7.8	7.9	8.0	8.1	8.1

7.3. D_{20} 値ならびに TR 値算出結果

染色体異常試験結果から算出した D_{20} 値 (mg/mL) ならびに TR 値は次の通りであった。

処理法	異常の種類	D_{20} 値	TR 値
短時間処理法+S9 処理	構造異常	0.0129	1086

8. 考察および結論

Azoxybenzene の染色体異常誘発性の有無を検討するため、培養細胞 (CHL/TU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果を基に、短時間処理法- S9 処理、同+S9 処理において、細胞の増殖を 50%以上抑制すると予想される濃度まで検討した。

Azoxybenzene 処理の場合は、短時間処理法- S9 処理では染色体異常の誘発はみられなかったが、同法の+S9 処理において、染色体構造異常の誘発が認められた。変異原性の強さに関する相対的比較値である D_{20} 値の最小値は 0.0129 (mg/mL) , TR 値の最大値は 1086 と算出され、「監視化学物質への該当性の判定等に係る試験方法及び判定基準：最終改正 平成 18 年 7 月 21 日」によると本被験物質の変異原性は、強い陽性であることを示していた。

陰性対照あるいは陽性対照の染色体異常出現頻度はいずれも当施設での背景データから求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件で実施されたものと判断された。

以上の結果から、当該試験条件下において、Azoxybenzene の培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定された。

9. 参考文献

- Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - A screening for chemical carcinogens. *Mutat Res* 1977; 48: 337-54.
- Ishidate M. Chromosome aberration test *in vitro* for chemical mutagens in our environment. *The Tissue Culture* 1979; 5: 115-22.
- Evans HJ. In: Hollaender A editor. Cytological methods of detecting chemical mutagens. *Chemical Mutagens*. New York Plenum press 1976; 4: 1-25.
- Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Jr. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutat Res* 1979; 66: 277-90.
- Ishidate M. Chromosomal aberration test *in vitro*. Tokyo: REALIZE INC. 1987.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research [editorial]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 22: 269-75.

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)に関する研究
チオベンズアミド、*N*-フェニルチオベンズアミド、アリルベンゼン
染色体異常試験実施報告書

研究要旨

膨大な数の化学物質のリスク評価を迅速かつ低コストで実施するために、化学物質の構造との関連性からその毒性を予測するシステムの重要性が高まってきている。

本研究では、(Q)SAR [(定量的)構造活性相関: (Quantitative) Structure-Activity Relationship] 予測結果を実際の遺伝毒性試験結果と比較し、その有効性を確認するために、試験結果が不足している3化合物(チオベンズアミド、*N*-フェニルチオベンズアミド、アリルベンゼン)について、チャニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

その結果、チオベンズアミドは、倍数性細胞を誘発しなかったが、濃度依存的に染色体の構造異常を誘発した。一方、チオベンズアミドのアミノ基にベンゼン環が結合した*N*-フェニルチオベンズアミドは構造異常を誘発せず、分析した最高濃度でのみ倍数性細胞を誘発した。しかしながら、*N*-フェニルチオベンズアミドは、培養液中で針状の沈殿を形成したことから、物理的な細胞分裂阻害により倍数性細胞が誘発された可能性があると考えられた。また、アリルベンゼンは構造異常および倍数性細胞ともに誘発しなかった。

A. 研究目的

我々を取りまく環境中には多数の化学物質が存在しているが、新規化学物質があらたに開発され、その数は益々増加している。これらの化学物質を安全に取り扱うためには、様々な視点から試験を実施し、それらのヒトや環境中へのリスクを評価する必要がある。しかしながら、膨大な数の化学物質の試験データを得るためには、莫大な時間とコストが必要であり、この問題を解決するための対応策が必要とされている。

これまでも、蓄積された試験データをもとに化学構造と毒性の関連性が調べられ、発がん性や変異原性に関与する官能基が示唆されている^{1)~3)}。しかしながら、毒性の示唆された官能基を持つ化学物質が予測された毒性を示さない結果に直面することも珍しくはなく、構造式からその毒性を予測することは容易ではない。

近年、(Q)SAR システムによる化学物質の毒性予測が高い一致率を示すことが報告⁴⁾されており、これまでに蓄積された試験データとこの(Q)SAR システムを利用することにより、膨大な数の化学物質の精度の高い毒性予測が期待される。

今回、遺伝毒性データが不足している化学物質の試験データを得るために、チャニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

B. 研究方法

(1) 被験物質

被験物質として、チオベンズアミド (英名: thiobenzamide, CAS No. : 2227-79-4、分子式: C_7H_7NS 、分子量: 137.20、ロット番号: DPE0354、純度: 97%以上、性状: 白色～淡黄色の粉末、販売元: 和光純薬工業)、*N*-フェニルチオベンズアミド (英名: *N*-phenylthiobenzamide, CAS No. : 636-04-4、分子式: $C_{13}H_{11}NS$ 、分子量: 213.30、ロット番号: NISGD、純度: 98%以上、性状: 黄色粉末、販売元: 東京化成工業)、アリルベンゼン (英名: allylbenzene, CAS No. : 300-57-2、分子式: C_9H_{10} 、分子量: 118.18、ロット番号: WKQ4154、純度: 98%以上、性状: 無色液体、販売元: 和光純薬工業) を国立医薬品食品衛生研究所より提供された。

(2) 陽性対照物質

S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理用の陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC、ロット番号: 485AFC、協和醗酵工業) を用いた。また、S9 mix 存在下の短時間処理用の陽性対照物質としてシクロホスファミド (CP、ロット番号: 091K1176、Sigma Chemical) を用いた。これらの陽性対照物質を日局注射用水 (ロット番号: K7A00、大塚製薬工場) に溶かし、原液 (MMC: 20 $\mu\text{g/mL}$ 、CP: 1 mg/mL) を用時調製して試験に用いた。

(3) 細胞と培養条件

CHL/IU 細胞は、染色体数のモードが 25 本で、我が国において染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手 (1988 年 2 月 10 日入手、入手時の継代数 4) し、継代後、液体窒素 (気相) 中に凍結保存 (現在の継代数 23) した。その細胞 (倍加時間約 15 時間、マイコプラズマの汚染なし) を、解凍後、継代 10 代以内で試験に用いた。

培養には、仔牛血清 (CS、ロット番号: 4J0214、JRH Biosciences) を 10 vol% 添加したイーグル MEM 培養液 (10%CS/MEM) を用い、 CO_2 インキュベーター (5% CO_2 、37°C、加湿条件下) 内で培養した。イーグル MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末 (日水製薬) 4.7 g に対して精製水を 500 mL 加えて溶解し、高圧蒸気滅菌 (121 °C、15 分) したものに、L-グルタミン (日水製薬) を約 0.15 g、10 w/v% NaHCO_3 水溶液を約 10 mL 無菌的に混合して調製したものを用いた。

(4) S9 反応液の調製

S9 (ロット番号: RAA-560、2007 年 5 月 11 日製造および RAA-563、2007 年 7 月 27 日製造、キッコーマン) 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 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットの肝臓から調製したものを購入し、使用時まで超低温槽 (-80°C) に保管した。グルコース-6-リン酸 (G-6-P, Sigma Chemical)、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (β -NADP⁺、オリエンタル酵母工業) および KCl を精製水に溶かし、混合液として超低温槽 (-80°C) に保管し、使用時はこれに S9、 MgCl_2 および HEPES (pH 7.2) を加え、S9 mix とした。試験には、10%CS/MEM : S9 mix を 25 : 5 の割合で混和した S9 反応液 (3 mL/ディッシュ) を加えて処理を行った (各成分の最終濃度: 5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β -NADP⁺、0.83 mmol/L MgCl_2 、5.5 mmol/L

KCl, 0.67 mmol/L HEPES)。

(5) 被験物質調製液の調製

3 被験物質ともに試験に必要な濃度で水に不溶であったが、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解したことから、溶媒として DMSO (ロット番号: DPK9955、KLG8126 および EWG8265、和光純薬工業) を用いた。

被験物質を必要量秤量し、溶媒を加えて溶解させ、原液 (チオベンズアミド: 140 mg/mL、*N*-フェニルチオベンズアミド: 210 mg/mL および 30 mg/mL、アリルベンゼン: 120 mg/mL および 35 mg/mL) を用時調製し、それを溶媒で段階希釈して種々の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を 1 vol% 添加して処理を行った。

(6) 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およぼす影響を調べた。CHL/IU 細胞に 0.25% トリプシンを作用させ、 4×10^3 個/mL の単一細胞浮遊懸濁液を調製し、その 5 mL (2×10^4 個) をプラスチックディッシュ (直径 6 cm) に播種した。培養開始 3 日目に、以下の手順で短時間処理および連続処理を行った。すべての処理条件において、試験法ガイドラインに従い 10 mmol/L (チオベンズアミド: 1.4 mg/mL、*N*-フェニルチオベンズアミド: 2.1 mg/mL、アリルベンゼン: 1.2 mg/mL) の濃度を最高処理濃度とし、公比 2 で計 8 段階の濃度群を設定し処理を行った。各群 2 枚のディッシュを用いた。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理する場合、各ディッシュの培養液をそれぞれ 10%CS/MEM および S9 反応液と交換 (3 mL/ディッシュ) した後、溶媒 (陰性対照) または各濃度の被験物質調製液 (30 μ L) を各ディッシュに添加し 6 時間処理した。処理後、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を含む) で細胞を洗浄し、10%CS/MEM (5 mL/ディッシュ) でさらに 18 時間培養した。また、連続処理する場合には、各ディッシュの培養液を 10%CS/MEM と交換 (5 mL/ディッシュ) したのち、溶媒 (陰性対照) または各濃度の被験物質調製液 (50 μ L) を各ディッシュに添加し 24 時間処理した。また、処理開始時および処理終了時に培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

培養終了後、10 vol%ホルマリン水溶液で固定し、0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で染色した。単層培養細胞密度計 (Monocellater™、オリンパス販売) を用い、陰性 (溶媒) 対照群と比較した各被験物質処理群の細胞密度を測定し、増殖抑制の指標とした。

(7) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験とほぼ同じ条件で染色体異常試験を行った。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに被験物質の処理濃度を設定した他、溶媒 (陰性) 対照群および陽性対照群を設けた。1 濃度あたり 4 枚のディッシュ (ただし、陽性対照群では 2 枚) を用い、そのうちの 2 枚は染色体標本を作製し、別の 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を

測定した。

陽性対照群については各ディッシュの培養液を 10%CS/MEM または S9 反応液と交換し、MMC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を、S9 mix 非存在下の短時間処理では 15 $\mu\text{L}/\text{ディッシュ}$ (最終濃度: 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、連続処理では 12.5 $\mu\text{L}/\text{ディッシュ}$ (最終濃度: 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加した。S9 mix 存在下の短時間処理では、CP (1 mg/mL) を 30 $\mu\text{L}/\text{ディッシュ}$ (最終濃度: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加した。なお、MMC および CP は上記の濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。また、陰性対照群および被験物質処理群については、処理開始時および処理終了時に培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

染色体標本用のディッシュについては、培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加した。培養終了後、培養液を捨て 0.02 w/v EDTA 含有 PBS (Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含) をディッシュあたり 5 mL 加えてピペッティングにより細胞をはがし、細胞を遠沈管に移した。遠沈 (約 1400 rpm、約 5 分) し、上清を捨てた後、3 mL の低張液 (0.075 mol/L KCl 水溶液) を加え、約 30 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 (メタノール: 氷酢酸=3:1 (v/v)) を約 6 mL 加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作を数回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス上に滴下し、そのまま風乾した。1 ディッシュあたり 4~6 枚のスライド標本を作製した。作製したスライド標本を 70 vol%メタノールに軽く浸漬したのち 3 vol%ギムザ液 (pH 6.8 の 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈調製) で約 8 分染色後、水道水ですすいで風乾した。

(8) 染色体分析

染色体分析に先立って、1 ディッシュから得られた 1 枚の標本を用いて濃度の高い方から分裂指数の分析 (500 細胞/標本) を行った。0.5%未満の分裂指数を示した場合は染色体分析不能と判断し、分析可能な最高濃度群を決定した。なお、標本あたりの分析可能な分裂中期細胞数が少ない場合には、その数を考慮して観察対象群を決定した。

ディッシュ 1 枚から得られたスライド標本 4 枚を、4 人の観察者がそれぞれ処理条件が分からない状態で分析した。染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を探し、1 群あたり 200 個 (100 細胞/ディッシュ、25 細胞/観察者) の分裂中期細胞 (染色体数: 23~27 本) について構造異常の種類と数を、1 群あたり 800 個 (400 細胞/ディッシュ、100 細胞/観察者) の分裂中期細胞について倍数性細胞 (染色体数が 38 本以上) の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。

ギャップおよび切断を除く構造異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会⁵⁾ による分類法に基づいて行った。ギャップおよび切断については染色分体幅よりも狭い非染色性部位をギャップ、それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

(9) 判定

染色体の構造異常 (ギャップを除く) を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性対

照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法 ($p < 0.01$ 、片側) により有意差検定を実施した。また、有意差の認められた処理条件についてはその用量依存性についてコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定 ($p < 0.01$ 、片側) を実施した。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を総合的に行った。

C. 研究結果

(1) チオベンズアミド

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 1.4 mg/mL (10 mmol/L) の濃度において急激に増殖率が低下し、50%の増殖抑制濃度はそれぞれ 0.98 mg/mL および 1.2 mg/mL と推定された。24 時間連続処理した場合には、濃度に依存して増殖率が低下し、50%の増殖抑制濃度は 0.53 mg/mL と推測された (Figure 1)。なお、肉眼観察の結果、すべての処理条件において 1.4 mg/mL の濃度で処理開始時に培養液中に沈殿が認められた。

以上の結果をもとに、短時間処理では 1.4 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 1.5 で計 5 ないし 6 濃度群を設定した。また、24 時間連続処理では 50%の増殖抑制濃度の約 2 倍の濃度である 1.1 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 2 で計 6 濃度群を設定した。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の結果、観察可能な最高濃度は S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ 0.62 mg/mL および 0.93 mg/mL、24 時間連続処理では 0.28 mg/mL となったことから、それらの濃度を含む 3 濃度群について染色体分析を行った。

その結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合、染色分体型切断(ctb)が濃度に依存して誘発された (Table 1)。また、S9 mix 存在下で短時間処理した場合、高濃度群で低頻度 (6.0%) ではあるが染色体の構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加が認められた (Table 2)。24 時間連続処理した場合には、いずれの処理条件においても構造異常を有する細胞の有意な増加は認められなかった (Table 3)。倍数性細胞については、いずれの処理条件においても統計学的有意差は認められなかったが、S9 mix 存在下で短時間処理した中濃度群でのみ核内倍加した細胞が認められた。なお、肉眼観察の結果、0.93 mg/mL 以上の濃度では、処理開始時に培養液中に沈殿が認められた。

(2) *N*-フェニルチオベンズアミド

細胞増殖抑制試験の結果、すべての処理条件において濃度に依存して増殖率が低下し、50%の増殖抑制濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ 0.13 mg/mL および 0.19 mg/mL、24 時間連続処理では 0.095 mg/mL と推測された (Figure 2)。なお、肉眼観察の結果、すべての処理条件において 0.26 mg/mL 以上の濃度で処理開始および処理終了時に培養液中に沈殿が認められた。また、処理終了時に顕微鏡観察したところ、0.26 mg/mL および 0.53 mg/mL の濃度では針状の結晶が観察された。

以上の結果をもとに、すべての処理条件について 50%の増殖抑制濃度の約 1.5 倍の濃度を最高処理濃度とし、公比 1.5 で計 6 濃度群を設定して染色体異常試験を実施したが、S9 mix 非存在下で短

時間処理した場合、0.20 mg/mL で50%を越える増殖抑制が得られなかったことから、0.30 mg/mL を最高処理濃度として試験を実施した。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の結果、観察可能な最高濃度はS9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ0.089 mg/mL および0.20 mg/mL、24時間連続処理では0.10 mg/mL となったことから、それらの濃度を含む3濃度群について染色体分析を行った。

染色体分析の結果、いずれの処理条件においても構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった (Tables 4~6)。倍数性細胞については、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した高濃度群 (それぞれ0.089 mg/mL および0.20 mg/mL) でのみ統計学的に有意に増加した以外は、いずれも倍数性細胞の誘発は認められなかった。なお、肉眼観察の結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合、処理開始時では0.089 mg/mL 以上の濃度で沈殿が認められ、処理終了時では0.20 mg/mL 以上の濃度で針状結晶が認められた。また、S9 mix 存在下で短時間処理した場合には、処理開始時では0.20 mg/mL 以上の濃度で沈殿が認められ、処理終了時では0.30 mg/mL の濃度で針状結晶が認められた。

(3) アリルベンゼン

アリルベンゼンで処理した場合、増殖率が急激に低下し、50%の増殖抑制濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ0.22 mg/mL および0.24 mg/mL、24時間連続処理では0.12 mg/mL と推測された (Figure 3)。なお、肉眼観察の結果、すべての処理条件において0.15 mg/mL 以上の濃度で処理開始時でのみ培養液中に沈殿が認められた。

以上の結果をもとに、すべての処理条件について50%の増殖抑制濃度の約1.5倍の濃度を最高処理濃度とし、公比1.5で計6濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

分析可能な最高濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではともに0.16 mg/mL、24時間連続処理では0.12 mg/mL となったことから、それらの濃度を含む3濃度群について染色体分析を行った。その結果、いずれの処理群においても染色体異常の誘発は認められなかった (Tables 7~9)。なお、肉眼観察の結果、0.23 mg/mL 以上の濃度では処理開始時に培養液中に沈殿が認められた。

D. 考察

S9 mix非存在下で短時間処理した場合、チオベンズアミドは濃度に依存して染色体の構造異常を誘発し、明らかな陽性結果が得られた。しかしながら、チオベンズアミドのアミノ基にベンゼン環が結合した*N*-フェニルチオベンズアミドは染色体の構造異常を誘発しなかった。この結果のみから推察すると、チオベンズアミドのアミノ基が構造異常の誘発に関与し、ベンゼン環が結合することによりその活性が消失したと考えられる。しかしながら、アミノベンゼンのアミノ基にベンゼン環が結合したジフェニルアミンは、今回の結果の予測通り染色体異常を誘発しないが、ジフェニルアミンにアミノベンゼンが結合した*N,N'*-ジフェニル-*p*-フェニレンジアミンは染色体異常を誘発⁶⁾する。また、今回の結果からアリルベンゼンのアリル基の二重結合は染色体異常誘発に関与し

ないことが予測されるが、同じ二重結合をもつビニルベンゼンは代謝活性化されて染色体異常を誘発する⁶⁾。このように、化学物質の構造と毒性との関連性については、官能基の有無のみで予測できないことから、様々なパラメータを用いてその関連性を予測する(Q)SARシステムは、膨大な数の化学物質の毒性を迅速かつ低コストで予測するための重要なツールであると考えられる。

今回、実験データの無い化学物質の染色体異常試験データが得られたことから、現在開発されている(Q)SARシステム⁴⁾の精度向上が期待されるほか、(Q)SARシステムにチオベンズアミドで認められた特異な構造異常の誘発パターン(ほとんどの染色体異常陽性の化学物質で認められる染色分体型交換を誘発しない)を新たなパラメータとして加えることにより、化学物質の構造と変異原性との関連性に加えて、発がん性等の他の毒性との関連性に関する新たな情報が得られるかもしれない。

E. 結論

チオベンズアミドは、今回の試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体の構造異常を誘発し、アリルベンゼンは染色体異常を誘発しないと結論した。また、*N*-フェニルチオベンズアミドは、今回の試験条件下で分析可能な最高濃度でのみ倍数性細胞を誘発したが、物理的な細胞分裂阻害により倍数性細胞が誘発された可能性あると考えられた。

F. 引用文献

- 1) Sawatari, K., Nakanishi Y., and Matsushima T. Relationships between chemical structures and mutagenicity: a preliminary survey for a database of mutagenicity test results of new work place chemicals. *Industrial Health*, 39, 341-345 (2001)
- 2) Ashby J. , and Tennant R. W. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutation Res.*, 257, 229-308 (1991)
- 3) Tennant R. W., and Ashby J. Classification according chemical structure, mutagenicity to *Salmorella* and level of carcinogenicity of a further 39 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. *Mutation Res.*, 257, 209-228 (1991)
- 4) Hayashi M., Kamata E., Hirose A., Takahashi M., Morita M., Ema M. In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of *Salmonella* microsome assay on 909 chemicals. *Mutation Res.*, 588, 129-135 (2005)
- 5) 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)
- 6) 祖父尼俊雄 監修, 染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー, 東京

最終報告書

Chlorthiamid のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

N-M180

1. 要 約

Chlorthiamid の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10 mM に相当する 2100 µg/mL として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の代謝活性化では 131 µg/mL で、非代謝活性化では 525 µg/mL で、連続処理法の 24 時間処理では 131 µg/mL で、48 時間処理では 65.6 µg/mL で、それぞれ 50% を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50% 細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、短時間処理法の代謝活性化では 127.7 µg/mL、非代謝活性化では 468.9 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 128.5 µg/mL、48 時間処理では 53.8 µg/mL であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「細胞増殖が明らかに 50% 以上抑制される用量」として、短時間処理法の代謝活性化では 263 µg/mL、非代謝活性化では 1050 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 263 µg/mL、48 時間処理では 131 µg/mL を最高用量として、以下、公比 2 で希釈した計 4 用量を設定した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率 (TA 値) は、全ての処理法で、被験物質処理群における染色体構造異常を有する細胞の出現率は 5% 未満であったことから、Chlorthiamid の染色体構造異常の誘発性は陰性と判定した。さらに、倍数性細胞の出現率はいずれの用量においても 5% 未満であったことから、Chlorthiamid の染色体数的異常誘発性は陰性と判定した。

全ての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5% 未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。

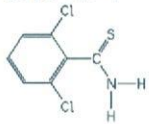
以上の結果から、Chlorthiamid は本試験条件下においては本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数的異常を誘発しないと結論した。

2. 試験材料及び方法

2.1 被験物質及び溶媒

2.1.1 被験物質

被験物質 Chlorthiamid は国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 総合評価研究室より提供された。

製造者	: 株式会社ワコーケミカル
名称	: Chlorthiamid
ロット番号	: KLE0355
CAS番号	: 1918-13-4
構造式又は示性式	: 
分子量	: 206.09
純度	: 97%以上
融点	: 151~152°C
性状	: 白色粉末
入手量	: 5 g
保存方法	: 室温 (実測値: 20~24°C)、遮光、密閉
返却	: 実験終了後、被験物質の残量は全て試験委託者に返却した。

2.1.2 溶媒

名称	: ジメチルスルホキシド (DMSO)
ロット番号	: LTF0010
規格	: 試薬特級
製造元	: 和光純薬工業株式会社
保存方法	: 室温
溶媒の選択理由	: 試験開始前に溶媒に対する溶解性を検討したところ、DMSO に対して 210 mg/mL で溶解したため、DMSO を溶媒として用いた。

2.2 被験液の調製

2.2.1 調製方法

2.2.1.1 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.4200 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 210.0 mg/mL 溶液 (プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度: 2100 µg/mL) を調製した。次いで、210.0 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 1 mL : 溶媒 1 mL) で順次 7 段階希釈し、105、52.5、26.3、13.1、6.56、3.28 及び 1.64 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

2.2.1.2 染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.4200 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 210 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2100 µg/mL）を調製した。次いで、210 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 6 段階希釈し、105、52.5、26.3、13.1、6.56 及び 3.28 mg/mL の 7 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性法では 26.3、13.1、6.56 及び 3.28 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では 105、52.5、26.3 及び 13.1 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を用いた。連続処理法では、被験物質 0.4200 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 210 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2100 µg/mL）を調製した。次いで、210 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、105、52.5、26.3、13.1、6.56、3.28 及び 1.64 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理では 26.3、13.1、6.56 及び 3.28 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を、48 時間処理では 13.1、6.56、3.28 及び 1.64 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を用いた。

2.2.2 調製頻度

使用時に調製した。

2.2.3 被験液の安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液の安定性情報とした。

2.3 対照物質

2.3.1 陰性対照物質

溶媒である DMSO を陰性対照とした。

2.3.2 陽性対照物質

- 1) シクロfosファミドとマイトマイシン C を、S9 による代謝活性化系と非代謝活性化系の陽性対照としてそれぞれ用いた。

- (1) シクロfosファミド（以下 CP と略記する）

ロット番号 : SDP4062
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 純度 : 生化学用 (97.0%以上)
 保存条件 : 冷蔵、遮光

- (2) マイトマイシン C（以下 MMC と略記する）

ロット番号 : 498AFJ、500AFJ
 製造元 : 協和醗酵工業株式会社
 力価 : 2 mg（力価）/瓶
 保存条件 : 室温、遮光

2) 調製方法

染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化では、CP 0.0140 g をプラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K7B93) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度: 14 µg/mL) を調製した。短時間処理法の非代謝活性化では、MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K7B93) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 µg/mL)。

染色体異常試験の連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では、MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K7B93) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 µg/mL)。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

3) 陽性対照物質の選択理由

前述の遺伝毒性試験法ガイドラインに使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的事業であることから CP 及び MMC を選択した。

2.4 使用細胞株

2.4.1 供試哺乳類培養細胞

哺乳類の培養細胞 (チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞、CHL/IU 細胞株) を用いた。2004 年 11 月 2 日にヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。入手後、液体窒素中で保存した細胞の一部を融解後、継代培養し、後述 (5.4.4) する細胞の性状検査を実施し、性状などが適正であることを定期的に確認した後に試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 23 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 5 継代、染色体異常試験の連続処理法では 9 継代であった。

2.4.2 細胞の選択理由

本細胞株は、自然発生の染色体異常出現率が低く、種々の化学物質に対して感受性が高いことから哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験に広く用いられており、背景データも多いことから本試験に用いる細胞株として選択した。

2.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下で培養した。継代は 1~4 日ごとに行った。