

2.4.4 細胞の性状検査

細胞の性状は、モード数が 25 本、倍加時間が 18.7 時間(継代数 3 の時点)であり、細胞形態には問題のないことを確認した。また、細胞はマイコプラズマ陰性であることを確認した。

2.5 S9 mix 及び培養液の調製

2.5.1 S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社より S9 を購入し、自家調製を行ったコファクターと用時に混合して S9 mix を調製した。本試験に用いた S9 の製品分析書に示された情報、保存条件、使用期限、コファクターの保存条件、使用期限及び S9 mix の組成は以下の通りである。

1) S9

名称	: S9
ロット番号	: 07061503
製造日	: 2007 年 6 月 15 日
種・系統	: ラット・SD 系
性	: 雄
週齢	: 7 週齢
誘導物質	: フェノバルビタール (PB) 及び 5, 6-ベンゾフラボン (BF)
投与経路	: 腹腔内
投与期間及び投与量	: PB 4 日間 30+60+60+60 mg/kg body weight BF 1 日 80 mg/kg body weight
保存条件	: 冷凍 (超低温フリーザー)
使用期限	: 2007 年 12 月 14 日 (製造後 6 箇月)

2) 補酵素

名称	: コファクター
ロット番号	: 070929
調製日	: 2007 年 9 月 29 日
保存方法	: 冷凍 (超低温フリーザー)
使用期限	: 2008 年 3 月 28 日 (調製後 6 箇月)

3) S9 mix の組成

S9	2 mL	
補酵素	4.7 mL	
	20 mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
	50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
	330 mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
	50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
	40 mmol/L 酸化型ニコチンアミドアデニン	

ジヌクレオチドリリン酸(NADP)水溶液 0.67 mL

精製水 0.67 mL

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と同様になるように各成分の必要量を秤取し、精製水に溶解、pH 調整、濾過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

2.5.2 細胞培養液

培養液は、非働化(56°C, 30 分)した牛血清を 10 vol% 添加した Eagle's Essential Medium (GIBCO™, Cat.No. 11095-072、11095-080、Invitrogen Co.)を用いた。調製後の培養液(BS-MEM)は冷蔵保存した。

1) 牛血清 (BS)

ロット番号 : 571834
製造元 : Invitrogen Corporation
保存条件 : 冷凍 (−80°C の冷凍庫)

2) MEM (Minimum Essential Medium, 1×Liquid)

ロット番号 : 281601、300142
製造元 : Invitrogen Corporation
保存条件 : 冷蔵

2.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。確認試験及び追加試験は実施しなかった。

1) 細胞増殖抑制試験

- (1) 短時間処理法：代謝活性化及び非代謝活性化
- (2) 連続処理法：24 時間処理及び 48 時間処理

2) 染色体異常試験

- (1) 短時間処理法：代謝活性化及び非代謝活性化
- (2) 連続処理法：24 時間処理及び 48 時間処理

2.6.1 識別方法

個々の培養は、試験番号及びコード化した処理番号を明記したラベルで識別した。個々の染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した番号及びスライド枝番号を明記したラベルで識別した。

2.6.2 用量の設定

2.6.2.1 細胞増殖抑制試験

最高用量を 2100 µg/mL とし、以下公比 2 で希釈した 1050、525、263、131、65.6、32.8 及び 16.4 µg/mL の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2.6.2.2 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 131 $\mu\text{g/mL}$ で、非代謝活性化では 525 $\mu\text{g/mL}$ で、連続処理法の 24 時間処理では 131 $\mu\text{g/mL}$ で、48 時間処理では 65.6 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 468.9 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 128.5 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 53.8 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 1050 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 263 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 131 $\mu\text{g/mL}$ 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。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

2.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として実施した。

2.6.3.1 短時間処理法

- 1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- 3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- 4) 培養終了後、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

2.6.3.2 連続処理法

- 1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。

- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- 3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

2.6.4 染色体異常試験

2.6.4.1 短時間処理法

- 1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- 3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- 4) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.100 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- 5) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリス

タルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2.6.4.2 連続処理法

- 1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL（最終濃度：0.050 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- 3) 各群 2 枚のプレートについて、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所水滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- 4) 残る各群 2 枚のプレートは、培養の終了時に肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

2.6.5 染色体標本の観察

顕微鏡下で各濃度当たり 200 個（プレート当たり 100 個）のよく広がった分裂中期像について構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の数も記録した。なお、客観的に観察するため染色体標本はすべて盲検法により観察した。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とした。

2.6.6 染色体異常の分類

染色体異常の種類は以下のように分類した。

2.6.6.1 構造異常

ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体または染色分体の同軸上に断片があるもの（非染色部分が染色分体の同軸上にある）であって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるものとした。

- 染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸上からはずれているもの、及び非染色部位が染色分体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものとした。
- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものとした。
- 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化 (frg) 他。

2.6.6.2 数的異常

倍数性 : polyploidy (endoreduplicationを含む)。

2.6.7 判定基準

判定は石館らの基準¹⁾に従い、染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率(%)によって被験物質の染色体異常誘発性を次のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5%未満	陰 性 (－)
5%以上 10%未満	疑陽性 (±)
10%以上	陽 性 (+)

構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合 (TAG) と含まない場合 (TA) とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を、被験物質の染色体異常誘発性陽性と判定した。

なお、判定に際しては統計学的手法を用いなかった。

3. 試験結果

3.1 細胞増殖抑制試験

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、代謝活性化では 131 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 127.7 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、非代謝活性化では 525 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 468.9 $\mu\text{g/mL}$ であった。

(2) 被験液添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに色調変化は認められなかった。代謝活性化では、被験物質添加に伴う析出は 1050 $\mu\text{g/mL}$ 以上で認められた。また、非代謝活性化では、被験物質添加に伴う析出は 1050 $\mu\text{g/mL}$ 以上で認められた。

(3) 培養液交換前の培養状態の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともに、析出は 2100 $\mu\text{g/mL}$ で認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では全ての濃度で、非代謝活性化では 131 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

2) 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 1-3 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4 及び Table 1-4 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理では 131 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 128.5 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、48 時間処理では 65.6 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 53.8 $\mu\text{g/mL}$ であった。

(2) 被験液添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに色調変化は認められなかった。24 時間処理及び 48 時間処理ともに、被験物質添加に伴う析出は 1050 $\mu\text{g/mL}$ 以上で認められた。

(3) 標本作製前の培養状態の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともに、析出は 2100 $\mu\text{g/mL}$ で認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理では、1050 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の剥離・死滅が認められたため TOX と判定し、65.6 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の浮遊、形態変化が認められ、48 時間処理では 32.8 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3.2 染色体異常試験—短時間処理法

代謝活性化の結果を Fig. 2-1、Table 2-1 及び Table 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 2-2、

Table 2-2 及び Table 3-2 に示した。

1) 被験液添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに色調変化は認められなかった。代謝活性化では、被験物質の添加に伴う析出は認められなかったが、非代謝活性化では被験物質の添加に伴う析出 1050 µg/mL 以上で認められた。

2) 培養液交換前の培養状態の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともに、析出は認められなかった。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 65.6 µg/mL 以上の濃度で、非代謝活性化では 263 µg/mL 以上の濃度で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では 263 µg/mL では 2.0%、131 µg/mL では 0.5%、65.6 µg/mL では 0.5% 及び 32.8 µg/mL では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。また、非代謝活性化においては、1050 µg/mL では規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定し、525 µg/mL では 1.5%、263 µg/mL では 0.5% 及び 131 µg/mL では 1.0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、代謝活性化では 263 µg/mL では 0%、131 µg/mL では 0%、65.6 µg/mL では 0% 及び 32.8 µg/mL では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。また、非代謝活性化においては、1050 µg/mL では規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定し、525 µg/mL では 0%、263 µg/mL では 0.5% 及び 131 µg/mL では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

3.3 染色体異常試験—連続処理法

24 時間処理の結果を Fig. 2-3、Table 2-3 及び Table 3-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 2-4、Table 2-4 及び Table 3-4 に示した。

1) 被験液添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに色調変化は認められなかった。また、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、被験物質添加に伴う析出は認められなかった。

2) 標本作製前の培養状態の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともに、析出は認められなかった。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理では 263 µg/mL の

濃度で、48時間処理では131 µg/mLの濃度で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、24時間処理では263 µg/mLでは1.0%、131 µg/mLでは0%、65.6 µg/mLでは0.5%及び32.8 µg/mLでは0%と陰性の判定基準である5%未満であった。また、48時間処理では131 µg/mLでは0%、65.6 µg/mLでは1.0%、32.8 µg/mLでは0%及び16.4 µg/mLでは0%と陰性の判定基準である5%未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、24時間処理では263 µg/mLでは0%、131 µg/mLでは0%、65.6 µg/mLでは0.5%及び32.8 µg/mLでは0%と陰性の判定基準である5%未満であった。また、48時間処理では131 µg/mLでは0%、65.6 µg/mLでは0%、32.8 µg/mLでは0%及び16.4 µg/mLでは0%と陰性の判定基準である5%未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4. 考察及び結論

Chlorthiamid の染色体異常試験において、短時間処理法及び連続処理法ともに、染色体構造異常を有する細胞の出現率及び倍数体の出現頻度は 5%未満であったことから陰性と判定した。

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。さらに、いずれの群においても同一用量における 2 枚のプレート間に染色体異常細胞の出現頻度の著しい差は認められなかったことから、試験は適切に実施されたと判断した。

以上の結果から、Chlorthiamid 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。

5. 参考文献

- 1) 石館基監修 (1987) : <改訂> 染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー、東京
- 2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, **48**, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutation Res.*, **66**, 277-290
- 4) 石館 基 (1982) : 哺乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), 日本香粧品科学会誌, **6**, 31-43
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271

N-allyl aniline : ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号 IET 07-0087)

最終報告書

1. 要約

チャイニーズハムスター肺由来の CHL/IU 細胞株を用いて、ラット薬物代謝活性化系 (S9 mix) 存在下および非存在下で N-allyl aniline のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を検索した。

N-allyl aniline はジメチルスルホキシドに溶解させて用いた。短時間処理法による染色体異常試験では、S9 mix 存在下および非存在下で被験物質を 6 時間処理し、処理 18 時間後に染色体標本を作製した。N-allyl aniline の用量は細胞増殖抑制試験の結果より、S9 mix 非存在下では 347, 417, 500, 600 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量を設定し、S9 mix 存在下では 14.5, 17.4, 20.8, 25, 30 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量を設定した。染色体観察の結果、S9 mix 非存在下の最高用量 (600 $\mu\text{g/mL}$) 群において、構造的染色体異常を有する分裂細胞の出現頻度は 20.0% (ギャップを除く) であり、溶媒対照群と比べて有意な増加であった。また、S9 mix 存在下では、染色体観察可能な 14.5, 17.4, 20.8, 25 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量について染色体異常の分析を行ったところ、20.8 $\mu\text{g/mL}$ および 25 $\mu\text{g/mL}$ 群において構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度が 6.5% および 10.0% (ギャップを除く) を示し、溶媒対照群と比べて有意な増加が認められた。一方、倍数体の出現頻度に関しては、両処理法とも有意な増加は認められなかった。

連続処理法では、S9 mix 非存在下で N-allyl aniline を 24 時間連続処理した後、染色体標本を作製した。細胞増殖抑制試験の結果より、289, 347, 417, 500, 600 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量を設定した。染色体観察可能な 289, 347, 417, 500 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量について染色体異常の分析を行ったところ、いずれの用量においても異常細胞の有意な増加は認められなかった。また、倍数体の出現頻度も有意な増加は認められなかった。

溶媒対照群における異常細胞の出現頻度は 5% 以下であった。また、マイトマイシン C またはベンツ(a)ピレンを処理した陽性対照群における異常細胞の出現頻度は、溶媒対照群に比べて有意に高かった。よって、試験の有効性が確認された。

以上の結果から、チャイニーズハムスター CHL/IU 細胞株を用いた本実験条件下において、N-allyl aniline は代謝活性化系の有無にかかわらず構造的染色体異常を誘発するものと結論した。

2. 試験目的

N-allyl aniline のチャイニーズハムスター培養細胞における染色体異常誘発性の有無を検索した。

3. 被験物質

名称：	N-allyl aniline
化学式：	C ₉ H ₁₁ N
CAS No.：	589-09-3
ロット番号：	040520AE
分子量：	133.19
純度：	95% (非GLP値)
性状：	透明液体
密度：	0.982 g/cm ³
引火点：	89°C
保存条件：	冷蔵暗所

4. 試験材料および方法

4.1. 供試細胞

チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU¹⁾ (1984 年 1 月 12 日, 国立医薬品食品衛生研究所より 11 代目で入手, 染色体モード 25 本, 倍加時間は約 15 時間) を用いた。細胞株 CHL/IU は染色体異常試験で汎用されているほ乳類培養細胞で, 当研究所でも豊富な背景データを蓄積しているため本細胞を選定した。細胞は性状変化防止のために, 液体窒素中 (−196°C) で保存されており, マイコプラズマに汚染されていないことが確認された継代数 14 の細胞を解凍して試験に用いた。

4.2. 細胞培養条件

供試細胞は, 37°C, 5%二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガス恒温培養装置中で組織培養用 60 または 100 mm プレート (FALCON[®], Becton Dickinson Labware, NJ., U.S.A.) を用いて無菌的に培養した。培地は, 10%の割合で非働化した新生仔牛血清 (Lot No. ASC29136, HyClone Laboratories, Inc., UT, U.S.A.) を含む MEM 培地 (Gibco[®], Invitrogen Corp., CA, U.S.A.) に, ペニシリン・ストレプトマイシン (100 IU/mL・100 µg/mL, Gibco[®]) および L-グルタミン (2 mM, Gibco[®]) を添加したものをを用い, 継代時には 0.25%トリプシン溶液 (Gibco[®]) を用いて細胞をプレートより剥離した。

4.3. 被験物質溶液の調製

被験物質は水に不溶であるため, ジメチルスルホキシド (DMSO, 特級, >99.0%, Lot No. FGN01,

東京化成工業株式会社，東京都）を溶媒として用いた。試験の直前に最高濃度を調製し，それより低濃度の溶液は段階希釈法により調製した。溶解後，色，臭い，および発熱等の変化は認められなかった。なお，純度補正は行わなかった。また，被験物質溶液添加後の培地中における DMSO の最終濃度は 1% とした。

4.4. 陽性対照

非代謝活性化系における陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC, マイトマイシン注用 2 mg, 2 mg 力価/アンプル, Lot No. 480AEL, 協和醗酵工業株式会社, 東京都) を用い，生理食塩液（大塚生食注，株式会社大塚製薬工場，徳島県）に 10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で溶解させた。代謝活性化系における陽性対照物質としてベンツ(a)ピレン (B(a)P, 特級, 99.8%, Lot No. ELE2013, 和光純薬工業株式会社) を用い，DMSO に 4 mg/mL の濃度で溶解させた。調製した陽性対照物質溶液は小分けして冷凍保存 (-80°C) し，処理直前に解凍して使用した。

4.5. S9 mix の調製

代謝活性化系として S9 mix を用いた。代謝酵素誘導物質であるフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンを投与されたラットの肝臓ホモジネート 9000 $\times$ g 上清分画 (S9) をキッコーマン株式会社（千葉県）より購入した。購入後， -80°C 超低温槽 (CL-422, 日本フリーザー株式会社, 東京都) に保存した。製造後 6 カ月以内の S9 分画 (Lot No. RAA-559) を試験直前に解凍し，直ちにコファクター (Lot No. 999701, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京都) を加えて，以下の組成となるように S9 mix を調製した。

塩化マグネシウム	8 mM
塩化カリウム	33 mM
グルコース-6-リン酸	5 mM
NADH	4 mM
NADPH	4 mM
ナトリウムーリン酸緩衝液 pH 7.4	100 mM
S9 分画	30%

4.6. 染色体異常試験の種類

短時間処理法と連続処理法による染色体異常試験を行った。短時間処理法では，代謝活性化系 (S9 mix) 存在下および非存在下で 6 時間処理した。連続処理法では代謝活性化系非存在下で 24 時間処理した。試験に用いる用量は，本試験に先立って各処理法による細胞増殖抑制試験を行って決定した。

4.7. 細胞増殖抑制試験

溶解性検査を行ったところ、被験物質は DMSO に易溶であった。したがって、細胞増殖抑制試験の最高用量は $1330 \mu\text{g/mL}$ (10 mM)²⁾ とし、公比 2 で 9 用量 (5.2, 10.4, 20.8, 41.6, 83.1, 166, 333, 665, $1330 \mu\text{g/mL}$) を設定した。さらに被験物質処理群と同じ容量の DMSO を添加した溶媒対照群を設定した。試験は各用量あたり 2 枚のプレートを用いた。

4.7.1. 短時間処理法

CHL/IU 細胞を 1.5×10^5 個/プレートの割合で組織培養用 60 mm プレート (培地量 5 mL) に播種した。約 48 時間培養後、代謝活性化系では、S9 mix を含む培地 (新鮮な培地 : S9 mix = 5 : 1) 3 mL と交換した後、各濃度の被験物質溶液を 30 μL 添加した。一方、非代謝活性化系では、新鮮な培地 3 mL と交換した後、各濃度の被験物質溶液を 30 μL 添加した。6 時間後に培地を取り除き、PBS(-) で細胞を洗浄後、新鮮な培地に交換してさらに 18 時間培養した。いずれの方法においても培養終了後、培地を捨て、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、東京都) を用いて細胞密度を計測し、溶媒対照群に対する細胞増殖率を求めた。

4.7.2. 連続処理法

CHL/IU 細胞を 1.5×10^5 個/プレートの割合で組織培養用 60 mm プレート (培地量 5 mL) に播種した。約 48 時間培養後、各濃度の被験物質溶液を 50 μL 添加し、24 時間連続処理した。処理終了後、短時間処理法と同様に細胞を固定、染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を計測した。

4.8. 染色体異常試験

4.8.1. 短時間処理法

CHL/IU 細胞を 1.5×10^5 個/プレートの割合で組織培養用 60 mm プレート (培地量 5 mL) に播種し、約 48 時間培養した。代謝活性化系では S9 mix を含む培地 (新鮮な培地 : S9 mix = 5 : 1) 3 mL と交換した後、被験物質溶液を添加した。一方、非代謝活性化系では新鮮な培地 3 mL と交換した後、被験物質溶液を添加した。用量は、細胞増殖抑制試験の結果に基づき、347, 417, 500, 600 $\mu\text{g/mL}$ (非代謝活性化系) の 4 用量、または 14.5, 17.4, 20.8, 25, 30 $\mu\text{g/mL}$ (代謝活性化系) の 5 用量を設定した。溶媒対照群には被験物質溶液の調製に用いた DMSO を添加した (最終培地濃度 1%(v/v))。陽性対照群には MMC 溶液 (最終培地濃度 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 非代謝活性化系) または B(a)P 溶液 (最終培地濃度 40 $\mu\text{g/mL}$, 代謝活性化系) を添加した。なお、培地への添加量は被験物質処理群、溶媒対照群、および陽性対照群のすべてのプレートにおいて 30 μL であった。

処理開始から 6 時間後に処理培地を取り除き、PBS(-) で細胞を 2 回洗浄した。新鮮な培地に交換してさらに 18 時間培養した後、染色体標本作製した。試験は各用量あたり 2 枚のプレートを用いて行った。

同時に各用量における細胞毒性を評価するためサテライト群を設けた。サテライト群に用いた

プレート、播種細胞数、培地量および処理方法などは本群と同一であった。固定から細胞増殖率の測定までは細胞増殖抑制試験の場合と同様の手順で行った。サテライト群も各用量あたり2枚のプレートを用いた。

4.8.2. 連続処理法

CHL/IU 細胞を 1.5×10^5 個/プレートの割合で組織培養用 60 mm プレート（培地量 5 mL）に播種し、約 48 時間後に被験物質溶液を添加した。用量は細胞増殖抑制試験の結果に基づき、289, 347, 417, 500, 600 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量を設定した。溶媒対照群には被験物質溶液を調製した DMSO（最終培地濃度 1%(v/v)）を添加した。陽性対照群には MMC 溶液（最終培地濃度 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ）を添加した。なお、培地への添加量は被験物質処理群、溶媒対照群、および陽性対照群のすべてのプレートにおいて 50 μL であった。染色体標本は投与液添加から 24 時間後に作製した。試験は各用量あたり2枚のプレートを用いて行った。

同時に各用量における細胞毒性を評価するためサテライト群を設けた。サテライト群に用いたプレート、播種細胞数、培地量および処理方法などは本群と同一であった。固定から細胞増殖率の測定までは細胞増殖抑制試験の場合と同様の手順で行った。サテライト群も各用量あたり2枚のプレートを用いた。

4.9. 染色体標本の作製および染色

染色体標本の作製は通常の空気乾燥法に従って行った。細胞分裂を中期で止めるため、標本作製の2時間前にコルセミド（和光純薬工業株式会社）を最終濃度 0.2 $\mu\text{g/mL}$ で培地中に添加した。細胞は 0.25%トリプシン溶液で剥がした後、0.075 M 塩化カリウム水溶液で約 15 分間室温で低張処理した。カルノア固定液（メタノール：酢酸 = 3 : 1）を用いて固定した後、各プレートあたり2枚のスライドガラスに滴下し、空気乾燥させた。作製した染色体標本は、暗号化したコード番号を付し、2%ギムザ液（メルク社製ギムザ液を pH 6.8 リン酸緩衝液で希釈）で 15 分間（室温）染色した。

4.10. 染色体異常の分析

染色体構造異常については、各プレートあたり 100 個、各用量あたり 200 個の良く広がった中期分裂像を顕微鏡下 1000 倍で観察した。観察対象細胞としては染色体数が 25 ± 2 本の細胞とした。染色体の数的異常については、各用量あたり 200 個の分裂中期細胞について観察し、倍数体の出現数を記録した。倍数体についてはその染色体数を記録した。

染色体異常は以下の基準に従って分類した。

4.10.1. 構造的染色体異常

① ギャップ (g)

姉妹染色分体上の同一部位または片方の染色分体上の非染色性部分の内、その長さが染色分

体幅より短く、染色分体中軸線がずれていないもの。

② 染色分体型切断 (ctb)

染色分体中軸線がずれた異常，または片方の染色分体上の非染色性部分の長さが染色分体幅より長い異常。染色分体型の断片も含む。

③ 染色分体型交換 (cte)

異なる染色体間で複数の切断点が誤って再結合した異常（染色体間交換），または同一染色体内で複数の切断点が誤って再結合した異常（染色体内交換）。

④ 染色体型切断 (csb)

姉妹染色分体上の同一部位における切断で，染色分体中軸線がずれた異常，または姉妹染色分体上の同一部位における非染色性部分の長さが染色分体幅よりも長い異常。染色体型の断片も含む。

⑤ 染色体型交換 (cse)

多動原体染色体および染色体型環。

⑥ 断片化 (fragmentation)

1 個の中期分裂像に多数の切断やギャップが存在する異常。便宜上，異常数 1 として記録。

⑦ その他 (others)

複合型染色体異常など。

4.10.2. 数的染色体異常

数的染色体異常のうち倍数性についてのみ観察対象とした。CHL/IU 細胞の染色体数のモードは 25 本であるため，その半数性の 3 倍以上の染色体数（37 本以上）を有する中期分裂像を倍数体として記録した。倍数体の一つに核内倍加も含めた。

4.11. 試験の有効性

被験物質の染色体異常誘発性の判定を行う前に，各試験の有効性の確認を行った。試験成績が以下の基準に合致していれば，その試験は有効とした。

- ① 溶媒対照群において，構造的および数的染色体異常を有する細胞の出現頻度が 5%以下である。
- ② 陽性対照群において，構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度が溶媒対照群と比べて有意に高い。

4.12. 統計学的解析

構造的染色体異常を有する細胞の出現数（ギャップを除く）および倍数体の出現数について，

被験物質処理群と溶媒対照群との間でカイ二乗検定を行った。被験物質処理群で有意な増加が認められた場合、用量相関性を解析するために Cochran-Armitage の傾向検定を行った。いずれの検定法も有意水準は 5% 以下に設定した。

4.13. 結果の判定

染色体異常誘発性の判定は構造的染色体異常と数的染色体異常に分けて行った。被験物質のいずれの用量においても、染色体異常を有する細胞の出現頻度（構造的染色体異常の場合はギャップを除く）に有意な増加が認められない場合、陰性と判定した。一方、染色体異常を有する細胞の出現頻度に統計学的に有意な増加と用量相関性が認められた場合、陽性と判定した。最終的な評価は、試験責任者が細胞毒性、異常誘発頻度等を参考に生物学的意義を十分考慮した上で総合的に行った。

5. 試験結果および考察

5.1. 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験の結果を Table 1 に示し、被験物質の用量と細胞増殖率との関係を Figure 1 に示す。

短時間処理法の非代謝活性化系では 665 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で、代謝活性化系では 41.6 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で溶媒対照群に対して 50%を超える細胞増殖抑制を示した。連続処理法では 665 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で 50%以上の細胞増殖抑制を示した。ただし、いずれの処理法においても 333 $\mu\text{g/mL}$ から 665 $\mu\text{g/mL}$ 、または 20.8 $\mu\text{g/mL}$ から 41.6 $\mu\text{g/mL}$ の間で急激に細胞増殖が低下した。よって、本試験ではこれらの用量間で用量間隔を細かく設定する必要があると示唆された。

以上の結果から、各処理による染色体異常試験の用量を次のように設定した。

短時間処理法（非代謝活性化系）： 347, 417, 500, 600 $\mu\text{g/mL}$ （公比 1.2）

短時間処理法（代謝活性化系）： 14.5, 17.4, 20.8, 25, 30 $\mu\text{g/mL}$ （公比 1.2）

連続処理法（24 時間）： 289, 347, 417, 500, 600 $\mu\text{g/mL}$ （公比 1.2）

5.2. 短時間処理法による染色体異常試験

短時間処理法の非代謝活性化系における結果を Table 2 に示し、代謝活性化系における結果を Table 3 に示す。

非代謝活性化系において、500 $\mu\text{g/mL}$ 以下の用量群で構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。しかし、最高用量（600 $\mu\text{g/mL}$ ）群において、構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度は 20.0%（ギャップを除く）を示し、溶媒対照群と比べて有意な増加が認められた。

代謝活性化系では最高用量（30 $\mu\text{g/mL}$ ）群において、細胞毒性により染色体分裂像が観察されなかった。よって、14.5, 17.4, 20.8, 25 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量について染色体異常の分析を行った。その結果、20.8 $\mu\text{g/mL}$ および 25 $\mu\text{g/mL}$ 群において、構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度がそれぞれ 6.5% および 10.0%（ギャップを除く）であり、溶媒対照群と比べて有意な増加が認められた。それらの増加には有意な用量相関性も認められた（ $p < 0.001$, Cochran-Armitage の傾向検定）。一方、倍数体の出現頻度に関しては、両処理法とも有意な増加は認められなかった。

溶媒対照群における構造的および数的染色体異常を有する細胞の出現頻度は 5%以下であった。また、MMC または B(a)P を処理した陽性対照群では、構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度が溶媒対照群と比べて有意に高かった。したがって、短時間処理法による本試験の有効性が確認された。

5.3. 連続処理法による染色体異常試験

連続処理法による結果を Table 4 に示す。

最高用量 (600 $\mu\text{g/mL}$) 群において強い細胞毒性により染色体標本作製することができなかった。よって、289, 347, 417, 500 $\mu\text{g/mL}$ の4用量について染色体異常の分析を行った。その結果、構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度は 0%~3.0% (ギャップを除く) であり、いずれの用量においても溶媒対照群に比べて有意な増加は認められなかった。また、倍数体の出現頻度に関しても、有意な増加は認められなかった。

一方、MMC を処理した陽性対照群では、構造的染色体を有する細胞の出現頻度が溶媒対照群と比べて有意に高かった。また、溶媒対照群における構造的および数的染色体異常を有する細胞の出現頻度は 5% 以下であった。したがって、連続処理法による本試験の有効性が確認された。

6. 結論

以上の結果より、チャイニーズハムスター肺由来の CHL/IU 細胞株を用いた本実験条件下において、N-allyl aniline は代謝活性化系の有無にかかわらず構造的染色体異常を誘発するものと結論した。

7. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかったこと

試験期間を通じ、試験計画書からの逸脱は認められなかった。また、試験の信頼性に悪影響を及ぼした疑いのある諸要因 (環境要因, 予期しえなかった事態等) は認められなかった。

8. 参考文献

- 1) Koyama, H. et al., A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue. Gann, 61 : 161-167 (1970)
- 2) Ishidate, M. Jr., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M. and Matsuoka, A., Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan, Fd. Chem. Toxic., 22: 623-636 (1984)