厚生省生活衛生局　殿

最 終 報 告 書

1, 3-ジフェニルグアニジンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

（試験番号：8L671）

2000 年 7 月 6 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

目　次

要約 ---------- 7

材料および方法 ---------- 8

1. 試験物質 ---------- 8

2. 細胞 ---------- 9

3. 培地 ---------- 9

4. S9 mix ---------- 10

5. 試験方法 ---------- 10

結果 ---------- 15

考察および結論 ---------- 15

参考文献 ---------- 15

別表 ---------- 16

図 ---------- 18

要　約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い，1, 3-ジフェニルグアニジンの *in vitro* における染色体異常試験を実施した．

短時間処理法の細胞増殖抑制試験の結果，50 %細胞増殖抑制用量は，S9 mix 非共存下，共存下で 232，192 μg/ml であった．従って，染色体異常試験はいずれの処理条件においても 400 μg/ml を最高用量とし，その 1/2，1/4，1/8 の用量を設定した．その結果，S9 mix 非共存下および共存下のいずれの用量においても，染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5 %未満であった．

連続処理法の 24 時間処理の細胞増殖抑制試験の結果，50 %細胞増殖抑制用量は 189 μg/ml であった．従って，染色体異常試験は 400 μg/ml を最高用量とし，その 1/2，1/4，1/8 の用量を設定した．その結果，いずれの用量においても，染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5 %未満であった．

以上の結果より，本試験条件下における 1, 3-ジフェニルグアニジンの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と結論した．

材料および方法

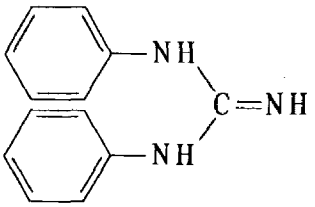
1. 試験物質

1.1 被験物質

1) 被験物質

から提供された 1,3-ジフェニルグアニジン(CAS 番号 102-06-7，ロット番号 純度 99.9 %)は，使用時まで冷蔵，暗所に密栓して保存した．被験物質は下記の構造式および分子量を有する水に 0.1 g/100 ml(27 ℃)，アセトンに 24.7 g/100 ml (29 ℃)，トルエンには 1.1 g/100 ml(19 ℃)溶解する白色粉末である．

構造式：



分子量：211.27

不純物：なし

2) 被験物質懸濁液の調製

溶媒検討の結果，本被験物質は生理食塩液（以下生食）には 50 mg/ml，アセトンには 500 mg/ml でそれぞれで不溶であった．ジメチルスルホキシド（以下 DMSO）には 500 mg/ml で可溶であった．一方，1 %カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液（以下 1 % CMC-Na 水溶液）には 50 mg/ml でほぼ均一に懸濁した．これらの結果から，本被験物質の溶媒には，細胞処理が 5000 μg/ml から可能な 1 % CMC-Na 水溶液を用いた．

被験物質を 1 % CMC-Na 水溶液で所定用量に用時懸濁した．これを同じ溶媒で希釈し，所定用量の被験物質懸濁液を調製した．

1.2 陰性対照物質

CMC-Na（ナカライテスク㈱，ロット番号：M5F8130）

1.3 陽性対照物質

1)陽性対照物質

マイトマイシンC

（以下MMC，協和発酵工業㈱，ロット番号：226AHE，含量 108 %）

ベンゾ〔a〕ピレン

（以下BP，東京化成工業㈱，ロット番号：GG01，含量 95.6 %）

2)陽性対照物質の調製

MMCは，生食（㈱大塚製薬工場，ロット番号：K8G96[短時間処理法]，K8I73[連続処理法]）に用時溶解した（短時間処理法：1 μg/ml，連続処理法：0.3 μg/ml）．BPは，DMSO（関東化学㈱，ロット番号：912S1784）に4 mg/mlで溶解し，使用時まで凍結保存した．

2. 細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株CHL/IUを使用した．細胞は大日本製薬㈱より1996年11月6日に購入し，細胞懸濁液に対し最終10 %の割合でDMSOを添加したものを1 mlに小分けして，液体窒素中で凍結保存した．試験には，これを融解して培養し，その後の継代数が5代以内のものを使用した．細胞の培養には，プラスチックプレート（直径6 cmまたは10 cm； Becton Dickinson and Company）を用い，炭酸ガス細胞培養装置内（炭酸ガス5 %，温度37 ℃，加湿，NAPCO社，7300型）で培養した．

3. 培地

3.1 MEM

イーグルMEM培地「ニッスイ」①（日水製薬㈱）約8.3 gを精製水880mlに溶解し，オートクレーブ滅菌（121 ℃，15分間）後，別に滅菌処理した2.92 % L-グルタミン水溶液と10 %炭酸水素ナトリウム水溶液をそれぞれ8.8 ml，11.2 ml添加した．この溶液を以下MEMとする．

3.2 培養液

MEM 900 mlに，非働化（56 ℃, 30分間加熱処理）した仔牛血清(GIBCO BRL, ロット番号：1009120）を100 ml添加した．

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール（1 日目 30 mg/kg，2 日目以降 60 mg/kg を 1 日 1 回 3 日間腹腔内投与）と 5, 6- ベンゾフラボン（3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与）で酵素誘導した SD 系雄ラット肝由来 S9（キッコーマン㈱，［細胞増殖抑制試験］ロット番号：RAA-390，1998 年 9 月 11 日製造，［染色体異常試験］ロット番号：RAA-395，1998 年 12 月 11 日製造）を購入した．購入した S9 は使用時まで -80 ℃ 以下で保存した．

4.2 S9 mix

S9 mix 1 ml あたり以下の組成で用時調製し，使用時まで氷中に保存した．

S9	0.3 ml
D- グルコース -6- リン酸	5 μ mol
β -NADP $^{+}$	4 μ mol
HEPES（pH 7.2）	4 μ mol
塩化マグネシウム六水和物	5 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
精製水	残量

5. 試験方法

5.1 短時間処理法

1) 細胞増殖抑制試験

(1) 試験物質用量

細胞増殖抑制試験に先立ち，S9 mix 非共存下（以下－ S9 mix）および共存下（以下＋ S9 mix）で，50，500，5000 μg/ml の 3 用量で予備試験を実施した．この試験では，1 用量あたり 1 枚のプレートを用い，細胞の状態を位相差倒立顕微鏡を用いて観察した．

その結果，陰性対照と比較した細胞生存率は下記の通りであった．

処理群 ＼ 用量（μg/ml）	50	500	5000
－ S9 mix	100 %	50 %	0 %
＋ S9 mix	100 %	100 %	0 %

以上の結果から，細胞増殖抑制試験は，下記の用量を設定した．

－ S9 mix : 31.3，62.5，125，250，500，1000，2000，5000 μg/ml

＋ S9 mix : 250，500，1000，2000，3000，4000，5000 μg/ml

(2) 細胞処理

4×10^3個/ml に調製した細胞懸濁液を 6 cm プレートに 5 ml ずつ播き，3 日間培養した．

培養液を除去した後，下記の組成の細胞処理液を 1 用量あたり 2 枚のプレートに加え 6 時間細胞を処理した．6 時間後，MEM で細胞表面を 1 回洗浄し，新しい培養液 5 ml でさらに 18 時間処理した．

	被験物質懸濁液または陰性対照	S9 mix	培養液
− S9 mix	0.3 ml	―――	2.7 ml
＋ S9 mix	0.3 ml	0.5 ml	2.2 ml

(3) 細胞増殖率の測定

細胞表面を Ca^{2+}，Mg^{2+}フリーのリン酸緩衝液（以下 PBS(-)，ダルベッコ PBS「ニッスイ」，日水製薬㈱）で洗浄し，メタノールで 10 分間固定後，3 %ギムザ液で 10 分間染色し，乾燥させた． 染色した各プレートについて単層培養細胞密度計(モノセレーター，オリンパス光学工業㈱）を用いて細胞増殖率を測定した．

(4) 50 %細胞増殖抑制用量の算出

各処理条件について，陰性対照値を 100 %として生存曲線を作成し，被験物質の 50 %細胞増殖抑制用量(IC_{50})を算出した．なお IC_{50} は，細胞増殖率が 50 %を示す用量を挟む 2 点を結ぶ直線式より算出した．

2) 染色体異常試験

(1) 試験物質用量

細胞増殖抑制試験の結果は図 1，2 に示すごとく，IC_{50} は短時間処理法の− S9 mix，＋ S9 mix で 232，192 μg/ml あった．

この結果より，− S9 mix，＋ S9 mix で 400 μg/ml を最高用量とし，その 1/2，1/4，1/8 の用量を設定した．

陽性対照である MMC，BP の用量はそれぞれ，染色体異常誘発性が知られている 0.1，20 μg/ml とした．

(2) 細胞処理

5.1，1)，(2) 項と同様に処理した．

陽性対照については，下記の組成の細胞処理液で同様に細胞を処理した．

	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	培養液
− S9 mix	0.3 ml	―――	―――	2.7 ml
＋ S9 mix	―――	0.015 ml	0.5 ml	2.5 ml

いずれの処理条件も，各用量あたり 4 枚のプレートを用い，2 枚を標本作製に，2 枚を細胞増殖率の測定に使用した．

(3) 標本作製

標本作製用プレートに処理終了の 2 時間前に最終用量が 0.1 μg/ml となるようにコルセミドを加え，分裂中期細胞を蓄積した．処理終了後，細胞表面を PBS(-) で洗浄し，0.25 % トリプシン処理にて細胞を剥離した後，遠心管に回収し，遠心分離（1000 rpm, 5 分間；以下同様）により細胞を集めた．上清を除去し，各遠心管に 0.075 M 塩化カリウム溶液 4 ml を加えて低張処理（37 ℃，15 分）を行った．次に，冷却したメタノール・酢酸（3:1）混合液 0.5 ml を加え細胞を半固定した後，遠心分離し，上清を除去した．さらに，同固定液 4 ml を加え，同様の操作を 2 ～ 3 回繰り返した．その後，少量の固定液で細胞を懸濁させ，濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスに 2 箇所滴下して乾燥した．これを 3 % ギムザ溶液で 20 分間染色し，水洗，乾燥後，封入して観察標本とした．なお，標本は，各プレートにつき 2 枚作製した．

(4) 細胞増殖率の測定

標本作製と同時期における細胞増殖率の測定を実施した．細胞増殖率用のプレートを用いて，細胞増殖抑制試験と同様に実施した．

(5) 観　察

①予備鏡検

標本作製後，試験の適否確認のため予備鏡検を行った．その結果，全てのプレートにおいて 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため，全てのプレートの標本を観察の対象とした．また，陰性対照および陽性対照については，構造異常細胞の有無が適切であることを確認した．

②構造異常および数的異常

標本はすべてをコード化し，プレート 1 枚につき 100 個，1 用量 200 個の分裂中期細胞を盲検法で観察した．分裂中期細胞は，染色体がよく拡がった細胞を観察した．

構造異常は，以下の分類[1]に従って観察した．ただし，構造異常がなく，染色体数が 25 ± 2 本でない細胞は除外した．

- 染色分体型切断　(ctb と略す)
- 染色分体型交換　(cte と略す)
- 染色体型切断　(csb と略す)
- 染色体型交換　(二動原体, 環状染色体など；cse と略す)
- 断片化　(frg と略す)

ギャップは，染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした．他の異常と区別して記録し，構造異常には含めなかった．

数的異常は，核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた．

(6) 試験結果の判定基準

構造異常を 1 個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし，ギャップのみをもつ細胞を除いて集計した．

被験物質の染色体異常誘発性の判定は，各処理条件において，構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に 5 %未満を陰性（－），いずれか一方または両方が 5 %以上 10 %未満を疑陽性（±），いずれか一方または両方が 10 %以上を陽性（＋）とした．

5.2 結果のまとめ

染色体構造異常および数的異常をもつ細胞の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度（%）を表示した．染色体構造異常は種類別に細胞数を表示した．また，細胞増殖抑制試験および染色体異常試験における用量依存性について図示した．

5.3 連続処理法

短時間処理法の結果，染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は，いずれの処理条件においても 5 %未満であった．このため，連続処理法による試験を実施した．

原則として，短時間処理法に準じて行った．連続処理法に適用された操作については以下に記載する．

(1) 試験物質用量

連続処理法の細胞増殖抑制試験に先立ち，24 時間処理で予備試験を実施した．

その結果，陰性対照と比較した細胞生存率は下記の通りであった．

処理群 ＼ 用量（μg/ml）	50	500	5000
24 時間処理	100 %	10 %	0 %

以上の結果から，細胞増殖抑制試験は，下記の用量を設定した．

24 時間処理：50，100，200，300，400，500 μg/ml

細胞増殖抑制試験の結果は図 3 に示すごとく，IC_{50}は 189 μg/ml であった．この結果より，染色体異常試験は 400 μg/ml を最高用量とし，その 1/2，1/4，1/8 の用量を設定した．

染色体異常試験の陽性対照 MMC の濃度は，染色体異常誘発性が知られている 0.03 μg/ml とした．

(2) 細胞処理

4×10^3個/ml に調製した細胞懸濁液を 6 cm プレートに 5 ml ずつ播き，3 日間培養した．

培養液を除去した後，下記の組成の細胞処理液をプレートに加え，細胞を 24 時間連続処理した．

	被験物質懸濁液または陰性対照	培養液
24 時間処理	0.5 ml	4.5 ml

染色体異常試験の陽性対照については，下記の組成の細胞処理液で同様に細胞を処理した．

	MMC 溶液	培養液
24 時間処理	0.5 ml	4.5 ml

結　果

結果を別表 1，2 および図 1 ～ 7 に示す.

短時間処理法および連続処理法のいずれの処理条件においても，染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は 5 %未満であった.

短時間処理法の S9 mix 非共存下および共存下において，染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度に，用量依存的な増加傾向が認められたが，いずれの用量においても 5 %未満であった.

連続処理法においては，染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5 %未満であった.

考 察 お よ び 結 論

1, 3-ジフェニルグアニジンの染色体異常誘発性を検討するため，ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した.

その結果，短時間処理法および連続処理法のいずれの処理条件においても，染色体異常を持つ細胞の出現頻度は 5 %未満であった.

一方，陰性対照および陽性対照では染色体構造異常を有する細胞の出現頻度は期待通りの値を示し，本試験が技術的に成立していることが示された.

従って，1, 3-ジフェニルグアニジンの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と結論した.

なお，類似化合物の染色体異常誘発性に関する情報は添付資料 1 にまとめた.

参 考 文 献

1) 日本環境変異学会・哺乳動物試験分科会：“化学物質による染色体異常アトラス”
朝倉書店，東京，1988

別表 1　染色体異常試験の結果(短時間処理法)

被験物質の名称　1,3-ジフェニルグアニジン

処理時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 (μg/ml)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)	ギャップの出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6 − 18	−	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	104	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	1	96	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	50	100	0	0	0	0	0	0	2	121	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	113	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2	117	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	100	100	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	95	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	−	200	100	0	0	0	0	0	0	1	85	100	2	0	2
			100	0	0	0	0	0	0	1	86	100	2	0	2
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2	85	200	4 (2.0)	0 (0.0)	4 (2.0)
6 − 18	−	400	100	0	1	0	0	0	1	0	21	100	4	0	4
			100	0	0	0	0	0	0	1	14	100	4	0	4
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	18	200	8 (4.0)	0 (0.0)	8 (4.0)
6 − 18	−	陽性対照 (MMC 0.1)	100	33	32	0	0	0	51	4	108	100	0	0	0
			100	28	29	0	0	0	46	1	100	100	0	0	0
			200	61 (30.5)	61 (30.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	97 (48.5)	5	104	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	1	0	0	1	0	99	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	1	101	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6 − 18	+	50	100	0	0	0	0	0	0	1	78	100	0	0	0
			100	1	0	1	0	0	2	0	71	100	2	0	2
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1	75	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6 − 18	+	100	100	1	0	0	0	0	1	0	53	100	3	0	3
			100	0	0	0	0	0	0	0	71	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	62	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6 − 18	+	200	100	2	0	0	0	0	2	0	62	100	2	0	2
			100	0	0	0	0	0	0	0	48	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	55	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6 − 18	+	400	100	0	0	0	0	0	0	0	48	100	4	0	4
			100	0	0	0	0	0	0	1	41	100	2	0	2
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	45	200	6 (3.0)	0 (0.0)	6 (3.0)
6 − 18	+	陽性対照 (BP 20)	100	35	67	0	0	0	71	1	108	100	0	0	0
			100	27	67	0	0	0	72	2	129	100	0	0	0
			200	62 (31.0)	134 (67.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	143 (71.5)	3	118	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC　BP:ベンゾ[a]ピレン　　CMC-Na：1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

別表 2　染色体異常試験の結果(連続処理法)

被験物質の名称　1,3-ジフェニルグアニジン

処理時間(h)	被験物質の用量 (μg/ml)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)	ギャップの出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%) 観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24 − 0	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	110	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	50	100	0	0	0	0	0	0	0	111	100	0	0	0
		100	0	0	0	1	0	1	0	102	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	107	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	100	100	0	0	0	1	0	1	0	77	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	81	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	79	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24 − 0	200	100	1	1	0	0	0	1	0	46	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	57	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	51	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	400	59	0	0	0	0	0	0	0	12	59	0	0	0
		69	0	0	0	0	0	0	0	12	69	0	0	0
		128	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	12	128	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 − 0	陽性対照 (MMC 0.03)	100	9	18	0	0	0	25	1	119	100	1	0	1
		100	10	16	0	0	0	25	0	132	100	0	0	0
		200	19 (9.5)	34 (17.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	50 (25.0)	1	125	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)

MMC:マイトマイシンC　　CMC-Na：1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

図１　1，3-ジフェニルグアニジンの細胞毒性
(短時間処理法・－S9 mix)

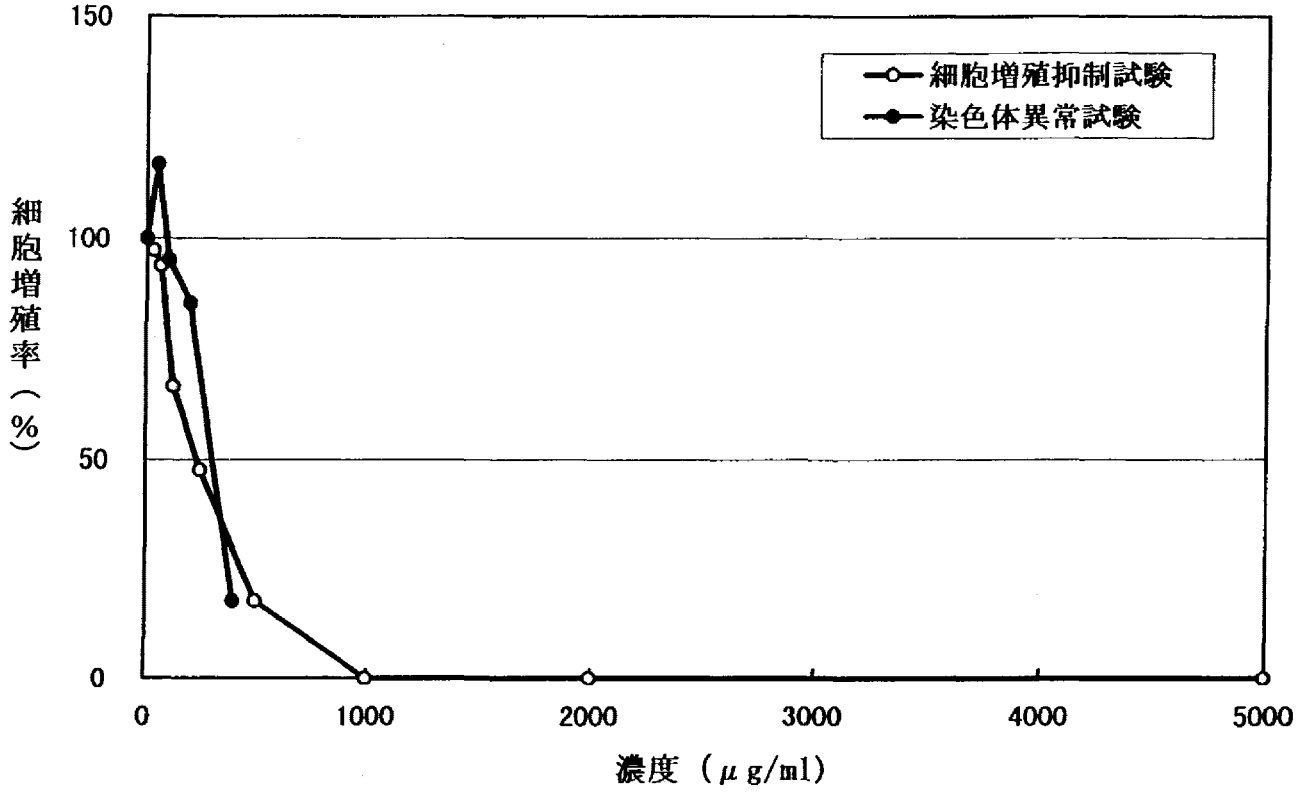


図２　1，3-ジフェニルグアニジンの細胞毒性
(短時間処理法・＋S9 mix)

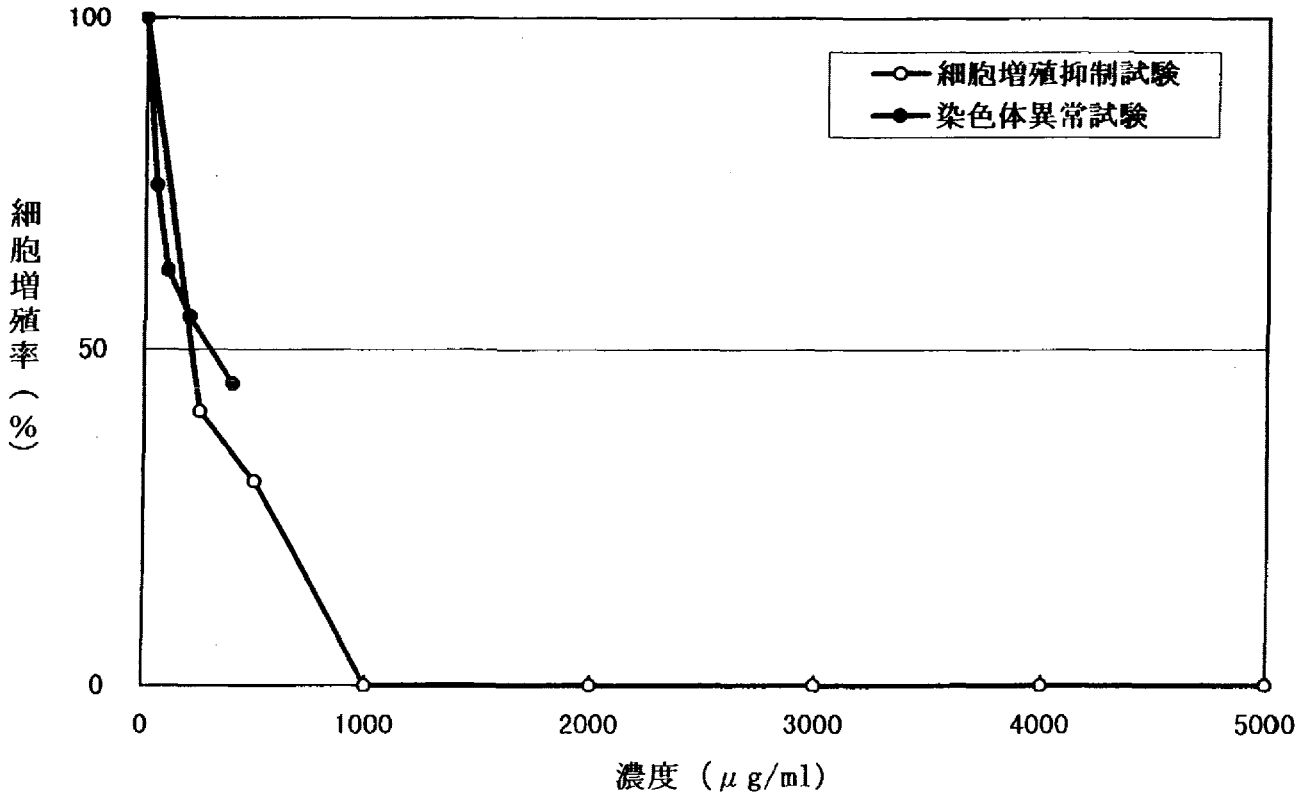


図３　1,3-ジフェニルグアニジンの細胞毒性
（連続処理法・24時間処理）

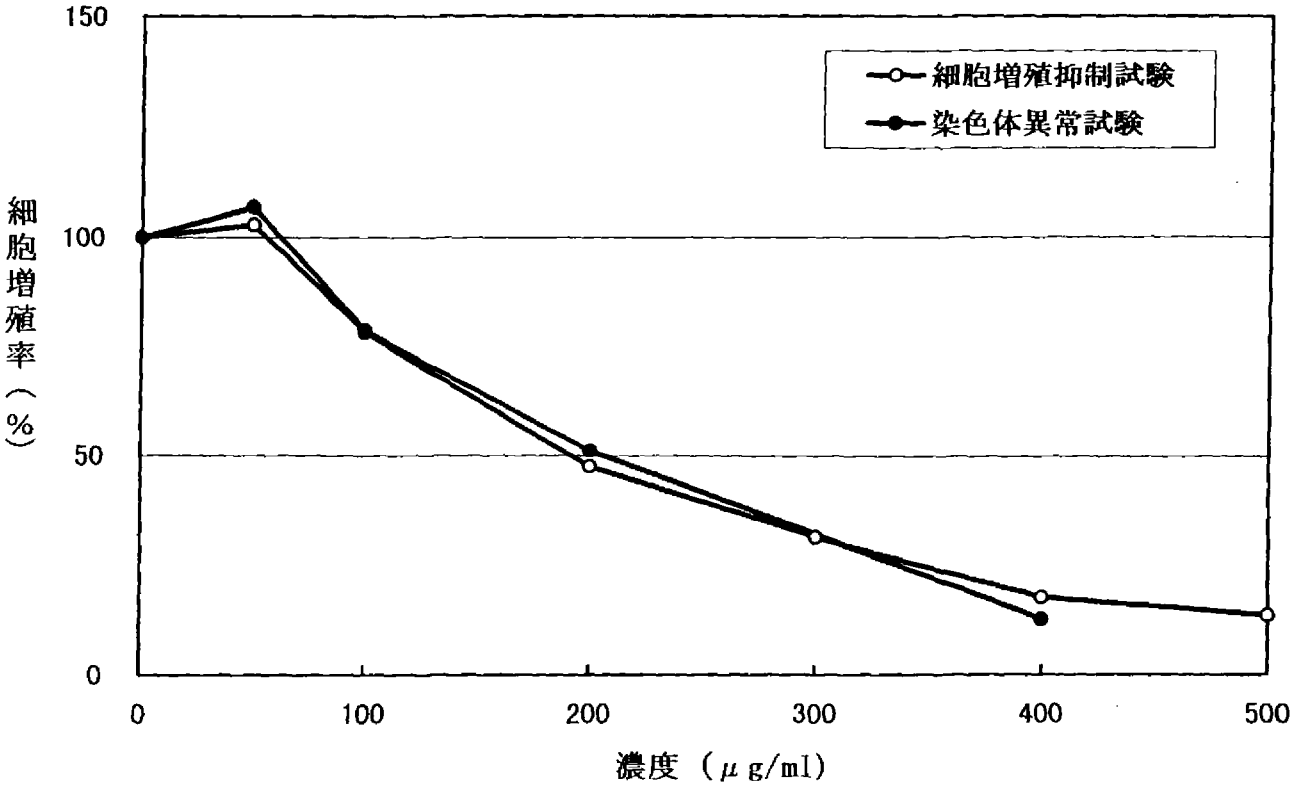


図４　1，3-ジフェニルグアニジンの構造異常細胞出現頻度
(短時間処理法)

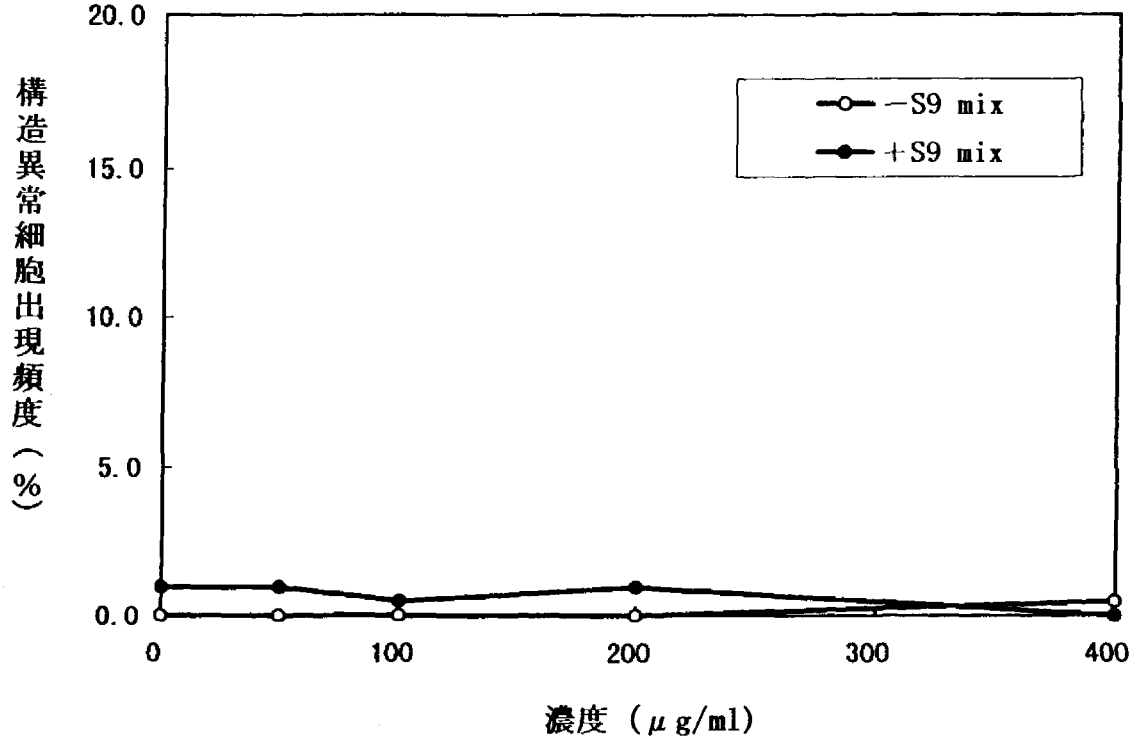


図５　1，3-ジフェニルグアニジンの数的異常細胞出現頻度
(短時間処理法)

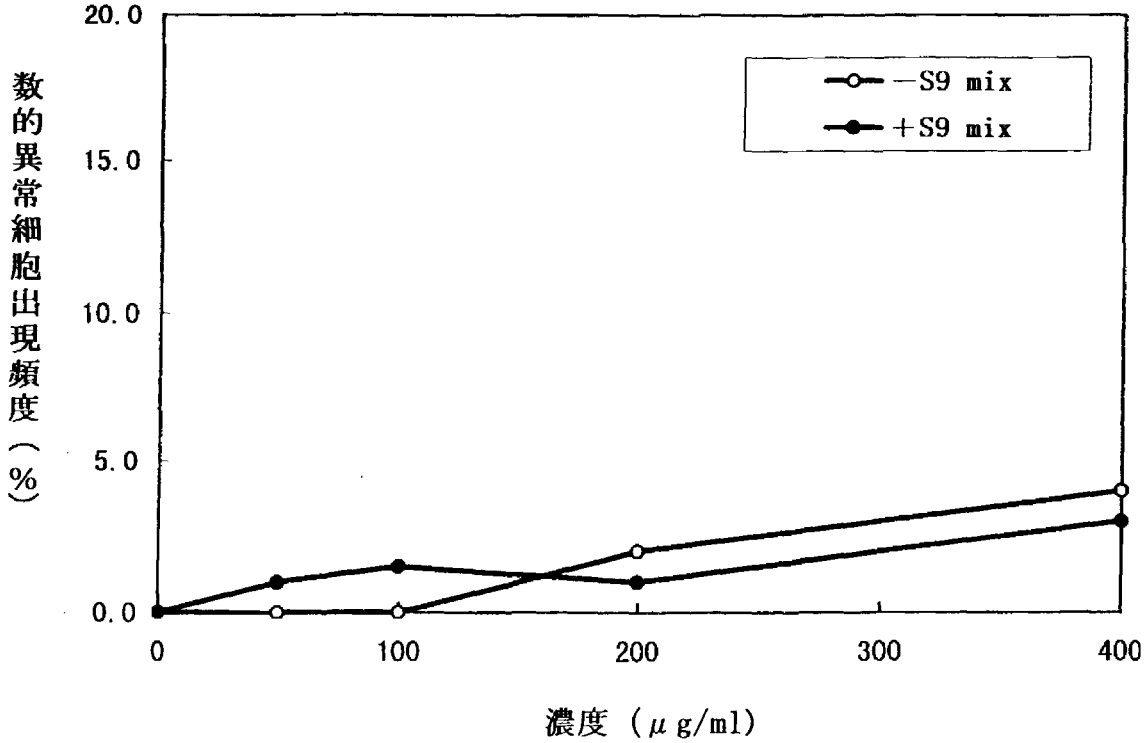


図６　1，3-ジフェニルグアニジンの構造異常細胞出現頻度
（連続処理法）

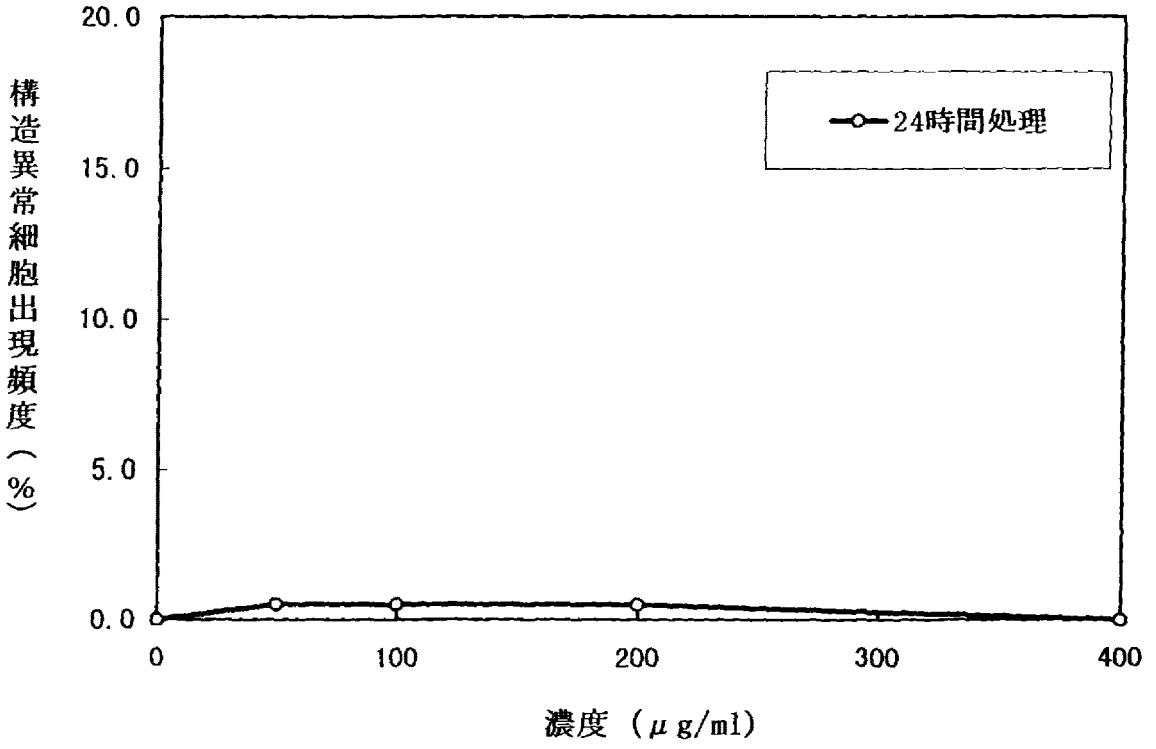
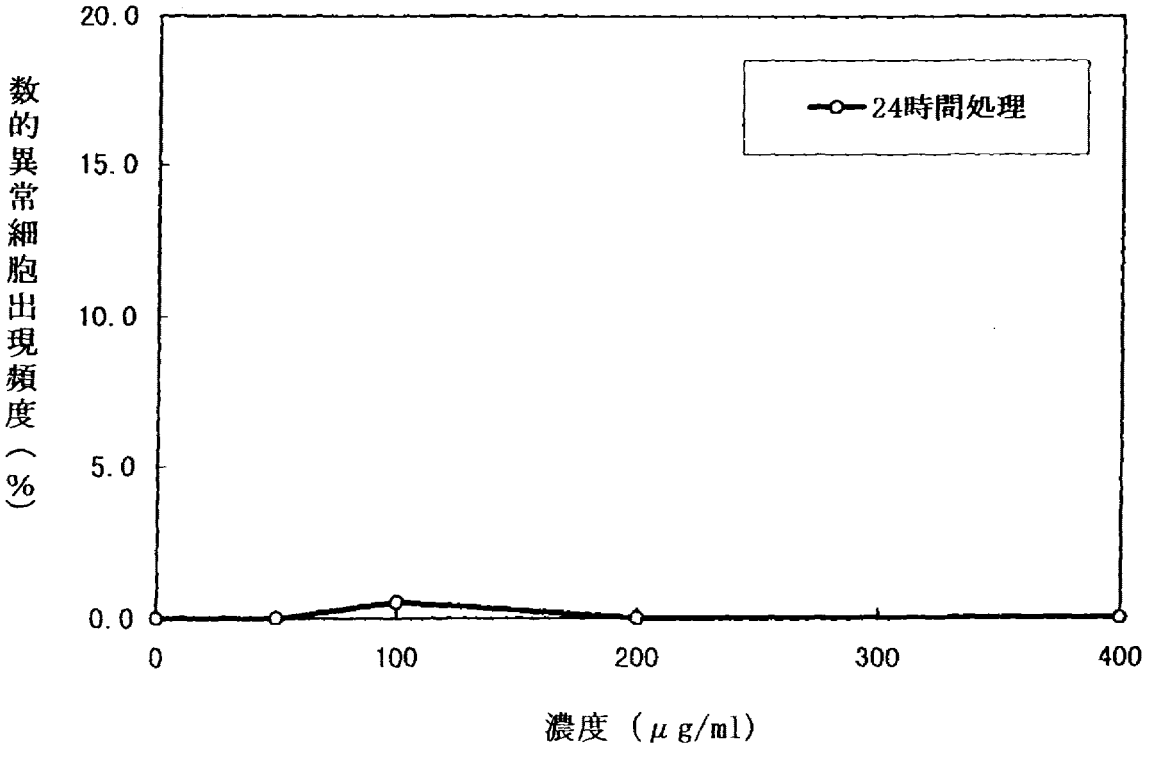



図７　1，3-ジフェニルグアニジンの数的異常細胞出現頻度
（連続処理法）