



2- (ジエチルアミノ) エチル=メタクリレートの
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

厚生省生活衛生局 委託

財団法人 食品薬品安全センター
秦野研究所

【目 次】

	頁
要約 -----	1
緒言 -----	2
材料と方法 -----	3
1 細胞 -----	3
2 被験物質および陽性対照物質 -----	3
3 S9 反応液 -----	3
4 細胞増殖抑制試験 -----	4
5 染色体異常試験 -----	4
6 染色体分析 -----	5
結果 -----	7
特記事項 -----	7
参考文献 -----	8

Fig. 1

Tables 1 and 2

[要 約]

2- (ジエチルアミノ) エチル=メタクリレート (DAEMA) は、CHL/IU 細胞 (チャイニーズ・ハムスター、肺) に染色体異常を誘発した。

DAEMA の CHL/IU 細胞に対する 50% 増殖抑制濃度は、連続処理 (新鮮培地中で 24 時間処理) では 0.17 mg/ml であった。また、短時間処理の S9 mix 存在下 (S9 反応液中で 6 時間処理後 18 時間の回復時間) では 0.33 mg/ml、および S9 mix 非存在下 (S9 反応液の代わりに MEM 培地を使用) では 0.12 mg/ml であった。

このことから染色体異常試験では、連続処理 (24 時間および 48 時間処理)、短時間処理の S9 mix 非存在下において、50% 増殖抑制濃度の約 2 倍濃度である 0.30 mg/ml を最高処理濃度とし、公比 2 でそれぞれ 5 濃度を設定した。短時間処理の S9 mix 存在下においても同様に 0.60 mg/ml を最高処理濃度とし、以下公比 2 で 5 濃度を設定した。染色体分析が可能な最高濃度は、連続処理および短時間処理の S9 mix 非存在下においては、ともに 0.30 mg/ml の濃度であり、短時間処理の S9 mix 存在下においては 0.60 mg/ml であったことから、これらの濃度を含む 3 濃度群を観察対象とした。

DAEMA は、S9 mix 存在下で短時間処理した場合においてのみ、染色体の構造異常を誘発した (異常出現頻度は 0.30 mg/ml および 0.60 mg/ml でそれぞれ 6.0% および 24.5%)。一方、連続処理 (24 時間および 48 時間) および S9 mix 非存在下で短時間処理した場合においては、倍数性細胞を誘発した (24 時間連続処理: 0.15 および 0.30 mg/ml の濃度でそれぞれ 1.75% および 7.25%、48 時間連続処理: 0.30 mg/ml の濃度で 5.13%、S9 mix 非存在下で短時間処理: 0.30 mg/ml の濃度で 7.13%)。

【緒 言】

化学物質の遺伝毒性を評価するための短期検索法の一つとして、哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験がある。化学物質によって誘発される染色体異常には、大別して構造異常（ギャップ、切断、交換）と数的異常（倍数性細胞、異数性細胞）があり、前者はDNA 傷害、後者は細胞の分裂機構の異常などを反映している。本試験で用いた CHL/IU 細胞は、染色体数が少なく、一般的に化学物質に対して染色体異常の検出感度が高いため、染色体異常試験によく用いられる。

OECD 既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、DAEMA の細胞遺伝学的影響を評価するため、CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験を実施した。なお本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和 62 年 3 月 31 日、環保業第 237 号、薬発第 306 号、62 基局第 303 号）および「OECD 毒性試験ガイドライン：473」に準拠し、「化学物質 GLP 基準」（昭和 59 年 3 月 31 日、環保業第 39 号、薬発第 229 号、59 基局第 85 号、改訂昭和 63 年 11 月 18 日、環企研第 233 号、衛生第 38 号、63 基局第 823 号）に基づいて実施した。

[材料と方法]

1 細胞

CHL/IU 細胞 (JCRB 細胞バンクより入手) は、牛胎児血清 (Filtron、ロット番号: 55301) を 10% 含むイーグル MEM 培地 (日水製薬) を用い、CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37℃) 内で培養した。また、解凍後継代 10 代以内で試験に用いた (継代数は、1988 年 2 月に入手した時点で 4 代、現在は 12 代)。

2 被験物質および陽性対照物質

被験物質である DAEMA (CAS No. 105-16-8) の物理化学的性状等は Appendix 1 に示した。DAEMA は から提供された後、室温遮光保存し、ジメチルスルホキシド (和光純薬工業、ロット番号: ESJ4625) に溶解して希釈した。また、DAEMA は、1996 年 9 月 7 日～1998 年 7 月 29 日の間、純度に大きな変化は認められず、規格値である 98.5% 以上であった (日本ユピカ (株) 湘南工場提供資料より) ことから、実験期間中 (1997 年 1 月 20 日～1997 年 2 月 6 日) は安定であったことが確認された。

陽性対照物質として用いたシクロホスファミド (CPA、Sigma Chemical、ロット番号: 73H0846) およびマイトマイシン C (MC、協和醗酵工業、ロット番号: 118AFG) は、注射用蒸留水 (大塚製薬工場、ロット番号: K6G92) に溶かし、用時調製して用いた。

3 S9 反応液

S9 (キッコーマン、ロット番号: RAA-355、1996 年 11 月製造) は、7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットにフェノバルビタールと 5, 6-ベンゾフラボンを投与して肝臓から調製したものを購入し、使用時まで -80℃ で保管した。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 (酸化型、β-NADP⁺、オリエンタル酵母) および KCl を蒸留水に溶かし、混合液として -80℃ で保管し、使用時はこれに S9、MgCl₂ および HEPES を加え、S9 mix とした。S9 mix 存在下で短時間処理する場合、S9 mix、2 倍濃度 MEM 培地 (血清不含で S9 mix の添加量と等量) および MEM 培地 (血清不含) を混和して S9 反応液とした (5% S9、0.83 mM G-6-P、0.67 mM β-NADP⁺、0.83 mM MgCl₂、5.5 mM KCl、0.67 mM HEPES)。一方、S9 mix 非存在下で短時間処理する場合は、S9 反応液の代わりに MEM 培地を使用した。

4 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。CHL/IU 細胞を 0.25%トリプシンを用いてはがした後、 4×10^3 個/ml の細胞懸濁液とし、その 5 ml (2×10^4 個) をプラスチックディッシュ (直径 6 cm、Coming) に播種して 3 日間培養した。

連続処理では、新鮮培地 5 ml と培地交換した後、被験物質調製液を 25 μ l ずつ添加し 24 時間処理した。

S9 mix 存在下における短時間処理では、S9 反応液 3 ml に培地交換した後、被験物質調製液を 15 μ l ずつ添加し 6 時間処理した。リン酸緩衝塩類溶液 (Ca^{2+} および Mg^{2+} を含む) で洗浄後、新鮮培地 5 ml に交換し、さらに 18 時間培養した。一方、S9 mix 非存在下の処理群においては、S9 反応液の代わりに MEM 培地 (2 倍濃度 MEM 培地を含む) を用いた以外の操作は、S9 mix 存在下の処理群と同様に行った。

連続処理および短時間処理において、0.059 ~ 1.9 mg/ml の濃度範囲で処理した。培養終了後、10%ホルマリン溶液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計 (Monocellater™、オリンパス光学工業) を用い、溶媒対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測した。1 濃度あたり 2 枚のディッシュを用いた。

5 染色体異常試験

DAEMA は細胞増殖抑制試験の連続および短時間処理において、処理濃度に依存して CHL/IU 細胞の増殖を抑制した (Fig. 1)。また、50%増殖抑制濃度は、連続処理では 0.17 mg/ml、短時間処理の S9 mix 存在下および非存在下においては、それぞれ 0.33 mg/ml および 0.12 mg/ml であった。

このことから染色体異常試験においては、50%を越える細胞増殖抑制を確実に得るために、すべての処理系列でそれぞれ 50%増殖抑制濃度の 2 倍濃度付近を最高処理濃度とし、公比 2 で各濃度を設定した (連続処理および S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.019、0.038、0.075、0.15、0.30 mg/ml、S9 mix 存在下の短時間処理: 0.038、0.075、0.15、0.30、0.60 mg/ml)。なお、連続処理の 48 時間処理群の濃度は、24 時間処理群と同じ濃度に設定した。また、染色体異常試験においては 1 濃度あたり 4 枚のディッシュを用い、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。試験操作は、固定、標本作製の部分を除いて細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。連続処理では24時間と48時間の被験物質処理群を設け、短時間処理では、被験物質をS9 mix存在下と非存在下で6時間処理した。なお、被験物質処理群の他、溶媒対照群、陽性対照群および無処理対照群（新鮮培地と交換）を設けた。

陽性対照群については、MCを新鮮培地5 mlに最終濃度が0.05 µg/mlとなるように添加した。また、CPAをS9反応液およびMEM培地3 mlに最終濃度が5 µg/mlとなるように添加した。

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が0.1 µg/mlとなるように添加した。培養終了後、培地を除き、0.02% EDTA含有リン酸緩衝塩類溶液（Ca²⁺ および Mg²⁺ を含まない）により細胞をはがし、10 mlの遠沈管に集め遠沈した（1000～1200 rpm、5分）。上清を捨てた後、沈殿した細胞に0.075 M KCl水溶液3 mlを加え、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6 ml加え遠沈した後、上清を除き、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。固定液の交換を数回行った後、少量の固定液で細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス（あらかじめフロスト部分に試験系識別番号、コード番号およびスライド番号を記入）上に滴下し、そのまま風乾した。1ディッシュあたり6枚のスライド標本作製した。

3%ギムザ液（pH 6.8の1/15 Mリン酸緩衝液で希釈調製）でスライド標本を染色後、水ですすいで風乾した。試験計画番号および標本作製の日付を明示したスライドケースに、スライド標本をコード番号順に入れて保存した。

染色体分析に先立って、細胞増殖率の測定結果と分裂指数により、観察対象とする3濃度群を決定した。20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度を、観察対象の最高濃度群とした。

6 染色体分析

細胞増殖率の測定結果と分裂指数（Tables 1 および 2）により、連続処理および短時間処理のS9 mix非存在下においては、ともに0.30 mg/mlが、染色体分析の可能な最高濃度であったことから、この濃度を含む3濃度群を観察対象とした。また、短時間処理のS9 mix存在下においては、0.60 mg/mlが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、この濃度を含む3濃度群を観察対象とした。染色体分析は、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った。よく広がり、かつ染色体が散逸していない分裂中期像を観察した。各群ごとに、観察細胞数、染色体型および染色分体型の構造異常の種類と数、倍数性細胞の数を記録用紙に記入した。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。構造異常は 1群 200個、倍数性細胞は 1群 800個の分裂中期細胞を分析した。

溶媒対照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²⁾により、有意水準を 1%として有意差検定を実施した。また、コクラン・アーミテッジの傾向性検定³⁾ ($p < 0.01$) により、用量依存性の有無を検討した。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行った。

[結 果]

DAEMAでCHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した場合、染色体の構造異常の誘発は認められなかった（Table 1）。S9 mix存在下で短時間処理した場合（Table 2）において、染色体の構造異常を有する細胞が濃度依存的（傾向性検定、 $p < 0.01$ ）に増加した（異常出現頻度は0.30 mg/ml および 0.60 mg/ml でそれぞれ 6.0% および 24.5%）。一方、S9 mix非存在下で短時間処理した最高濃度（0.30 mg/ml）において、構造異常の出現頻度（4.0%、Table 2）に統計学的な有意差（フィッシャーの直接確率法、 $p < 0.01$ ）がみられたものの、24時間連続処理の最高濃度（0.30 mg/ml）においては同頻度で有意差がみられなかった（4.0%、Table 1）ことから、陰性と判定した。また、連続処理（24時間および48時間）およびS9 mix非存在下で短時間処理した場合において、倍数性細胞の数が有意に増加し、24時間連続処理の0.15 および 0.30 mg/ml で、それぞれ 1.75% および 7.25%、48時間連続処理の0.30 mg/ml で 5.13%、S9 mix非存在下で短時間処理の0.30 mg/ml で 7.13%（フィッシャーの直接確率法、 $p < 0.01$ ）を示し、加えて、濃度依存性も認められた（傾向性検定、 $p < 0.01$ ）。以上の結果から、DAEMAはCHL/IU細胞に染色体の構造異常および倍数性細胞を誘発すると結論した。なお、染色体標本作製時に細胞増殖率の測定を行った結果、48時間の連続処理および短時間処理では、50%を越える増殖抑制は認められなかったが、観察対象とした最高処理濃度ではいずれも40～50%の増殖抑制を示した。

陽性対照物質として用いたMCは、連続処理において染色体の構造異常を誘発し（Table 1）、CPAは短時間処理のS9 mix存在下において染色体の構造異常を誘発した（Table 2）。これらの陽性対照物質の結果より、本実験系の成立が確認された。

[特記事項]

本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態および試験計画書からの逸脱は無かった。

[参考文献]

- 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)
- 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」, サイエンス社, 東京 (1987)
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫編集:「毒性試験講座 14、毒性試験データの統計解析」, 地人書館, 東京 (1992)

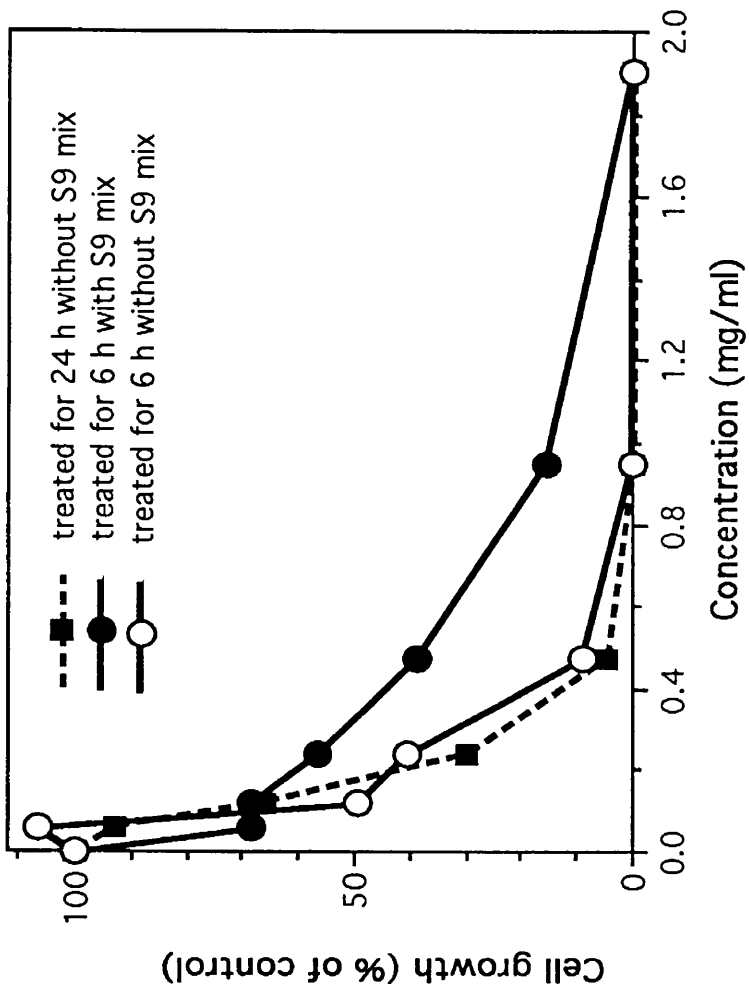


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-(diethylamino)ethyl methacrylate

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-(diethylamino)ethyl methacrylate (DAEMA)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾		No. of cells with aberrations		Trend test ⁵⁾ SA NA	Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)	Mitotic ⁷⁾ index (%)		
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total	TA (%)	Polyplloid ⁴⁾ (%)	TAG (%)	TA ()					
Control ¹⁾	0		200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	1	(0.5)	0.75	—	—
Solvent	0	24	200	0	2	0	0	0	0	0	2	0	2	(1.0)	2	(1.0)	0.13	—	—
DAEMA	0.075	24	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	1	(0.5)	1.13	—	—
DAEMA	0.15	24	200	0	1	0	0	1	0	0	2	0	2	(1.0)	2	(1.0)	1.75*	+	+
DAEMA	0.30	24	200	0	5	4	0	0	0	0	9	0	8	(4.0)	8	(4.0)	7.25*	—	—
MC	0.00005	24	200	1	16	47	1	0	0	0	65	0	50*	(25.0)	50*	(25.0)	0.13	—	—
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	2	0	0	0	2	0	1	(0.5)	1	(0.5)	0.38	—	—
DAEMA	0.075	48	200	0	4	1	1	1	0	0	7	0	7	(3.5)	7	(3.5)	0.25	—	—
DAEMA	0.15	48	200	0	1	2	4	0	0	0	7	0	5	(2.5)	5	(2.5)	1.25	—	+
DAEMA	0.30	48	200	0	2	0	0	0	0	0	2	0	2	(1.0)	2	(1.0)	5.13*	—	—
MC	0.00005	48	200	0	15	43	1	2	0	0	61	1	41*	(20.5)	41*	(20.5)	0.00	—	—

Abbreviations, gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring), 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.

1) Dimethylsulfoxide 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) Cochran • Armitage's trend test was done at p<0.01. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 7) Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. * : Significantly different from solvent control data at p<0.01 by Fisher's exact test. ** : Purity was 99.8%. Stabilizer (MEHQ, 470 ppm), water (0.03%), MMA (0.02%) and alcohol (0.11%) were contained as impurities.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-(diethylamino)ethyl methacrylate (DAEMA)** with and without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/ml)	S 9 mix exposure (h)	No. of structural aberrations										No. of cells with aberrations	Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)	Mitotic ⁷⁾ index (%)			
			gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total	Others ³⁾	TAG (%)	TA (%)			SA	NA					
Control ¹⁾	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13			
Solvent	0	6-(18)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.25			100.0
DAEMA 0.075	0.075	6-(18)	0	1	3	0	0	0	0	4	0	0	4	2.0	4	2.0	0.25				84.0
DAEMA 0.15	0.15	6-(18)	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	2	1.0	2	1.0	0.75		+	+	79.5
DAEMA 0.30	0.30	6-(18)	0	3	5	0	0	0	0	8	0	0	8*	4.0	8*	4.0	7.13*				59.0
CPA 0.005	0.005	6-(18)	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0.5	1	0.5	0.00				2.2
Solvent ¹⁾	0	6-(18)	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0.5	1	0.5	0.25				100.0
DAEMA 0.15	0.15	6-(18)	1	5	1	0	0	0	0	7	0	0	7	3.5	6	3.0	0.88				79.0
DAEMA 0.30	0.30	6-(18)	1	5	6	0	0	0	0	12	0	0	12*	6.0	11*	5.5	1.13		+	-	66.0
DAEMA 0.60	0.60	6-(18)	4	27	31	0	2	0	0	64	0	0	49*	24.5	48*	24.0	0.13				50.0
CPA 0.005	0.005	6-(18)	4	46	187	1	1	10	249	0	0	0	139*	69.5	138*	69.0	0.38				2.4

Abbreviations, gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, cse : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring), 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.

1) Dimethylsulfoxide 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) Cochran - Armitage's trend test was done at p<0.01. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 7) Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. * : Significantly different from solvent control data at p<0.01 by Fisher's exact test. ** : Purity was 99.8% . Stabilizer (MEHQ, 470 ppm), water (0.03%), MMA (0.02%) and alcohol (0.11%) were contained as impurities.