メチルアセトアセテート
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 ---------- 8

参考文献 ---------- 8

Fig. 1

Tables 1, 2 and 3

[要　　約]

メチルアセトアセテート（MAA）は、CHL/IU細胞（チャイニーズ・ハムスター、肺）に対し、染色体異常を誘発しなかった。

CHL/IU細胞をMAAで1.2 mg/mlを含む各濃度で連続処理（新鮮培地中で24時間処理）した場合、MAAはCHL/IU細胞の増殖を抑制しなかった。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）においては、50％増殖抑制濃度が1.2 mg/ml（10 mM）となり、S9 mix非存在下（S9反応液の代わりにMEM培地を使用）では増殖抑制は認められなかった。

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）および短時間処理のS9 mix非存在下において、1.2 mg/ml（10 mM）を最高処理濃度とし、公比2で以下3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1.2 mg/mlを最高処理濃度とし、以下公比2で4濃度を設定した。染色体分析が可能な最高濃度は、全処理系列において1.2 mg/ml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。

染色体分析の結果、S9 mix存在下で短時間処理した最高処理濃度（1.2 mg/ml）においてのみ、染色体の構造異常および倍数性細胞が有意に増加した（$p<0.01$、構造異常出現頻度：11.0％、倍数性細胞出現頻度：2.75％）。上記処理群は、培地の黄色化が処理直後および処理終了時に観察されたため、誘発された構造異常は、培地の酸性化による場合と、MAAの直接的なDNA傷害に起因する場合の2つの可能性が考えられた。このため、上記処理群について、被験物質添加直後に培地のpHを中性域（7.0）に調整し、確認試験を実施したところ、染色体異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。従って、MAA処理によって誘発された染色体異常は、培養液の酸性化による非生理的条件に起因して生じることが示され、染色体異常誘発性を陰性と判定した

[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、MAA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）および子牛血清（Cansera International、ロット番号：2608311）を10%含むイーグルMEM培地（日水製薬）を用い、CO_2インキュベーター（5% CO_2、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（親株の継代数は、1988年2月に入手した時点で4代、当該試験には12代および21代のものを使用した）。

2　被験物質および陽性対照物質

被験物質であるメチルアセトアセテート（MAA、CAS No. 105-45-3）の物理化学的性状等はAppendix 1に示した。MAAは　　から提供された後、室温保管し、使用のつど注射用蒸留水（大塚製薬工場、ロット番号：K6G92およびK7G78）に溶解して希釈した。

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およびK7G78）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およびRAA-381、1996年11月製造および1998年4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℃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（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℃に保管し、使用時はこれにS9、$MgCl_2$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と被験物質調製液の添加量の合計と等量）およびMEM培地（血清不含）を混和したS9反応液をディッシュに加えた（S9反応液：5% S9、0.83 mM G-6-P、0.67 mM β-$NADP^+$、0.83 mM $MgCl_2$、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培地に2倍濃度MEM培地（被験物質調製液の添加量と等量）を混合したものを使用した。

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単離した後、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、Corning）に播種して3日間培養した。

連続処理では、新鮮培地4.5 mlと培地交換した後、被験物質調製液を0.5 ml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2.7 mlに培地交換した後、被験物質調製液を0.3 ml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。

連続および短時間処理ともに、0.038 ～ 1.2 mg/ml（10 mM）の濃度範囲で処理した。培養終了後、10%ホルムアルデヒド溶液で固定し、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

MAAは細胞増殖抑制試験の連続処理およびS9 mix非存在下の短時間処理において、CHL/IU細胞の増殖を抑制しなかったが、短時間処理のS9 mix存在下においては、0.60 mg/mlおよび1.2 mg/ml（10 mM）の濃度において、CHL/IU細胞の増殖を抑制し（Fig. 1）、50%増殖抑制濃度は1.2 mg/ml（10 mM）となった。

このことから染色体異常試験において、すべての処理系列で、1.2 mg/ml（10 mM）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：0.30、0.60、1.2 mg/ml、S9 mix存在下の短時間処理：0.15、0.30、0.60、1.2 mg/ml）。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、連続処理では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。短時間処理ではS9反応液およびMEM培地（2倍濃度MEM培地を含む）2.7 mlに注射用蒸留水を0.3 ml加え（全量：3 ml）、CPAを最終濃度が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（和光純薬工業）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（Ca^{2+}およびMg^{2+}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）を約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枚のスライド標本を作製した。

3%ギムザ液（Merck、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、流水ですすいで風乾した。試験計画番号、試験系識別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 and 2）により、すべての処理系列で1.2 mg/ml（10 mM）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、有意差検定（$p < 0.01$）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]

MAAは、S9 mix 存在下で短時間処理した場合の 1.2 mg/ml（10 mM）においてのみ、染色体の構造異常を有する細胞および倍数性細胞の数が有意（フィッシャーの直接確率法、$p<0.01$）に増加した（構造異常出現頻度：11.0%、倍数性細胞出現頻度：2.75%、Table 2）。また、傾向性検定でも有意差が認められた（$p < 0.01$）ものの、低および中濃度（それぞれ 0.30 mg/ml および 0.60 mg/ml）における誘発頻度は、構造異常および倍数性細胞ともに溶媒対照のレベルであった（Table 2）。短時間処理の系列において、細胞増殖抑制試験でみられた50%を越える細胞増殖抑制作用（Fig. 1、細胞増殖率：48.0%）は、染色体異常試験においてはみられなかった。しかしながら、細胞増殖抑制試験および染色体異常試験を通して、S9 mix 存在下で短時間処理した 1.2 mg/ml（10 mM）の濃度では、被験物質処理直後および処理終了時（6時間処理後）の培養液の色が黄色を呈し、酸性化している事を認めた。このことから、観察された染色体異常は、培地の酸性化により二次的に生じた可能性もあり、MAAの直接的な DNA 傷害作用を反映していないことも示唆された[4]。そこで、当処理群についてのみ、確認試験を実施した。確認試験では、培地（S9 反応液）に被験物質調製液を1.2 mg/ml（10 mM）の濃度となるように加え、これに 1 N NaOH 溶液を少量添加して pH を7.0 とし、ディッシュに加えて短時間処理を行った。処理終了後の培地の pH は 6.8 であり、ほぼ中性域であった。また染色体分析の結果、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった（Table 3）。確認試験の結果から、初回の試験でみられた染色体異常は、MAA 自身の DNA 傷害作用に基づくものではなく、培地の酸性化による非生理的な条件に起因して生じたことが判明した。このことから、MAA の染色体異常誘発性を陰性と判定した。

一方、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 存在下においてのみ染色体の構造異常を誘発した（Table 2、3）。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」, サイエンティスト社, 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)

4) Morita, T. *et al.*: Mutation Res. 268: 297-305 (1992)

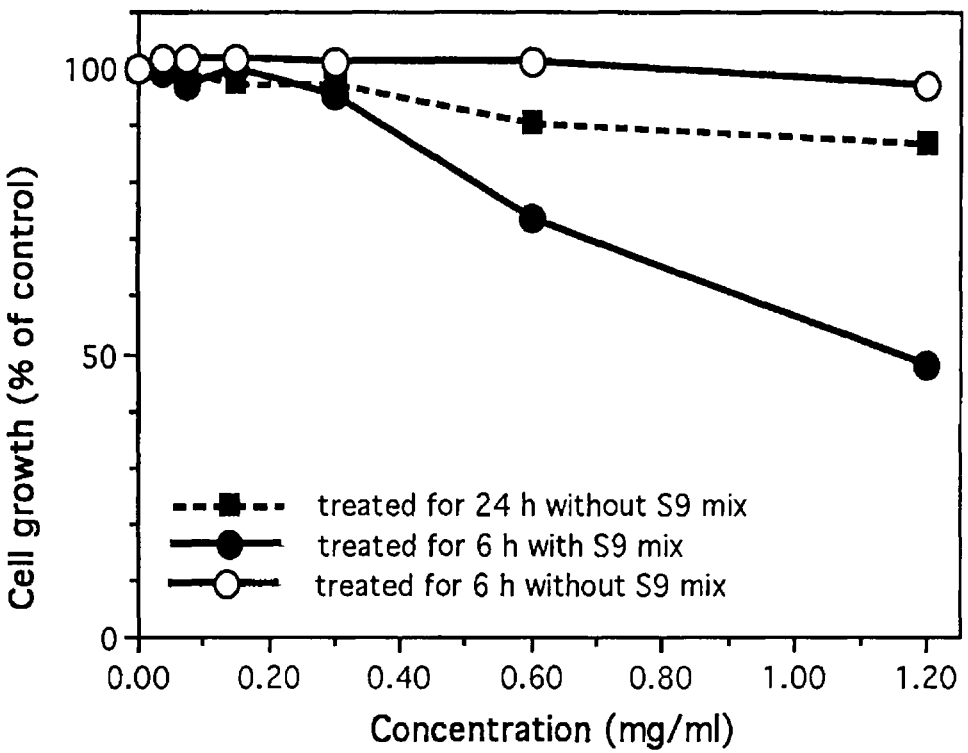

Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with methyl acetoacetate

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with methyl acetoacetate (MAA)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Trend test[5]		Concurrent[6] cytotoxicity (%)	Mitotic[7] index (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Control[1]			200	0	0	0	3	0	0	3	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38			——	——
Solvent[1]	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			100.0	——
MAA	0.30	24	200	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13			101.0	——
MAA	0.60	24	200	0	2	0	2	0	0	4	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.75	–	–	94.0	——
MAA	1.2	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			83.0	9.2
MC	0.00005	24	200	0	8	44	1	0	0	53	1	45 *(22.5)	45 *(22.5)	0.50			——	——
Solvent[1]	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			100.0	——
MAA	0.30	48	200	0	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38			100.0	——
MAA	0.60	48	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.63	–	–	107.0	——
MAA	1.2	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			74.5	2.2
MC	0.00005	48	200	1	18	42	2	0	0	63	8	47 *(23.5)	46 *(23.0)	0.25			——	——

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) Distilled water 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 at $p<0.01$ by Fisher's exact test. ** : Purity was 99.4%. Methanol was supposed as an impurity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with methyl acetoacetate (MAA)** with and without S9 mix

Group	Concen-tration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Trend test[5]		Concurrent[6] cytotoxicity (%)	Mitotic[7] index (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Control				200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			——	——
Solvent[1]	0	−	6 - (18)	200	2	2	0	0	0	0	4	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.50			100.0	——
MAA	0.30	−	6 - (18)	200	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38			93.5	——
MAA	0.60	−	6 - (18)	200	1	0	1	0	1	0	3	1	3 (1.5)	2 (1.0)	0.75	−	+	97.5	——
MAA	1.2	−	6 - (18)	200	0	1	0	4	0	0	5	0	3 (1.5)	3 (1.5)	1.25			95.5	7.2
CPA	0.005	−	6 - (18)	200	0	2	0	1	0	0	3	1	3 (1.5)	3 (1.5)	0.63			——	——
Solvent[1]	0	+	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.75			100.0	——
MAA	0.30	+	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			106.0	——
MAA	0.60	+	6 - (18)	200	0	1	1	3	0	0	5	0	4 (2.0)	4 (2.0)	1.25	+	+	103.0	——
MAA	1.2	+	6 - (18)	200	0	12	23	1	0	0	36	0	22 *(11.0)	22 *(11.0)	2.75 *			88.0	7.0
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	4	29	102	2	1	0	138	0	87 *(43.5)	83 *(41.5)	0.38			——	——

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, CPA : cyclophosphamide.

1) Distilled water 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 at $p<0.01$ by Fisher's exact test. ** : Purity was 99.4%. Methanol was supposed as an impurity.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with methyl acetoacetate (MAA)** with S9 mix

Group	Concen-tration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)	
Solvent[1]	0	+	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25
MAA[5]	1.2	+	6 - (18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	6	100	426	9	0	50	591	1	168 *(84.0)	168 *(84.0)	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, CPA : cyclophosphamide.

1) Distilled water 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) Culture medium containing MAA and S9 mix was adjusted to pH 7.0. * : Significantly different from solvent control at $p<0.01$ by Fisher's exact test. ** : Purity was 99.4%. Methanol was supposed as an impurity.