チオフェンの
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
材料および方法	3
1. 使用した細胞	3
2. 培養液の調製	3
3. 培養条件	3
4. 被験物質および陽性対照物質	3
5. 被験物質の調製	4
6. 試験条件	5
7. 細胞増殖抑制試験	5
7.1 処理条件	5
7.2 標本作製法	6
7.3 増殖抑制の指標とその結果	6
8. 本試験の群構成	6
8.1 連続処理（S9 mix 非存在下）	7
8.2 短時間処理（S9 mix 存在下および非存在下）	7
9. 染色体標本作製法	8
10. 染色体分析	8
11. 記録と判定	9
結　果	10
結　論	10
特記事項	10
文　献	11

Tables 1～5

Figures 1～3

[要　　約]

チオフェンの*in vitro* 染色体異常誘発性を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU) を用いて検討し、陰性の結果を得た。

チオフェンの CHL/IU 細胞に対する連続処理（48時間）および S9 mix 存在下、非存在下の短時間処理（6時間）ともに、0.84 mg/ mℓ（10 mM）の濃度においても50%を越える増殖抑制作用は認められなかった。そこで、本試験の最高処理濃度として、連続処理および短時間処理ともに、0.84 mg/ mℓ（10 mM ）の濃度を設定した。最高処理濃度の 1/2 および 1/4の濃度を、それぞれ中濃度および低濃度として設定した。連続処理群では、S9 mix 非存在下で24時間および48時間処理後標本を作製し、染色体分析を行なった。短時間処理群では S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理後、新鮮な培養液でさらに18時間培養して標本を作製し、染色体分析を行った。

CHL/IU細胞をチオフェンで処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

[緒　　言]

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、チオフェンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL/IU）を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

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。

[材料および方法]

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク（JCRB）から入手（1988年2月、入手時：継代 4代、現在12代）したチャイニーズ・ハムスター由来の CHL/IU細胞を、解凍後継代 10代以内で試験に用いた。

この CHL/IU 細胞株は、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、常用されている。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清（FCS：Biocell、ロット番号：4001776）を10%添加したイーグル MEM 培養液を用いた。MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」① 粉末（日水製薬(株)）9.4 g を 1 ℓ の蒸留水に溶解し、121 ℃ で 15分間、高圧蒸気滅菌したのち、L-グルタミン（滅菌済み、日水製薬(株)）300 mg と10% $NaHCO_3$ 溶液、約 12.5 mℓ を加えて調製した。2倍濃度の MEM 培養液は、上記の培地 9.4 g を 500 mℓ の蒸留水に溶解し、以下 MEM 培養液と同様に調製した。

3. 培養条件

チオフェンは揮発しやすいことから、培養にはフラスコ (T25 、Corning)を用いた。2×10^4 個の CHL/IU 細胞を、培養液 5 mℓ を入れたフラスコに播き、37 ℃ の CO_2 インキュベーター (5% CO_2) 内で培養した。

4. 被験物質および陽性対照物質

［被験物質］

チオフェン（以下 TP と略す、CAS No. 110-02-1 ）は、分子量 84.14 の無色透明液体の物質である。物理化学的性状等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は、ロット番号　　純度 98%（不純物：不明）であり、　　から購入(カタログNo：T-0223）した。被験物質は、使用時まで冷蔵保管した。

TPのジメチルスルホキシド（DMSO）中での安定性試験を秦野研究所において実施した。

低濃度 (0.781 mg/ mℓ) 溶液は当研究所で実施した復帰突然変異試験（M-94-078）で調製したものについて、また高濃度 (168 mg/ mℓ) 溶液は当該試験で調製したものについて、室温遮光条件下で、調製後4時間までの安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値（0時間）の平均値に対して、100および101％であった。これらは当研究所で規定している基準（平均含量が初期値の90.0％以上）を満たしていた（Appendix 2、3）。

［陽性対照物質］

1）連続処理の試験に用いる物質

（化　学　名）　マイトマイシン C
（略　　号）　MC
（ロット番号）　928ACF
（製　造　者）　協和醗酵工業(株)
（保管条件）　冷蔵保管

2）短時間処理の試験に用いる物質

（化　学　名）　シクロホスファミド
（略　　号）　CPA
（ロット番号）　70H0948
（製　造　者）　Sigma Chemical Co.
（保管条件）　冷蔵保管

5．被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はDMSO(和光純薬工業（株)、ロット番号：APH4165およびKCN1642）を用いた。原体を溶媒に溶解してメスアップにより原液（増殖抑制試験、染色体異常試験ともに 168 mg/ mℓ）を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の 0.5% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、連続処理および短時間処理に用いた高濃度群と低濃度群の被験物質調製液について、含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、いずれも当研究所の規定し

ている基準（溶媒中での平均含量が添加量の90.0～110%）の範囲内であった(Appendix 4)。

6. 試験条件

連続処理では、細胞を 3日間培養したのち培養液を捨て、フラスコに培養液 5 mℓ と各濃度の被験物質調製液 0.025 mℓ を加え、24時間および48時間処理した。

短時間処理では、細胞を 3日間培養したのち培養液を捨て、MEM 培養液、2倍濃度の MEM 培養液および S9 mix をそれぞれ 4：1：1 の割合で混合した溶液 3 mℓ をフラスコに加えた。また、S9 mix 非存在下の処理群においては、MEM 培養液 3 mℓ をフラスコに加え、さらに 0.015 mℓ の被験物質調製液を加えて 6時間処理した。処理終了後、新鮮な培養液に交換し、さらに 18時間培養した。S9 mix の調製は下記の組成で行った。

S9*	3
20 mM HEPES (pH 7.2)	2
50 mM $MgCl_2$	1
330 mM KCl	1
50 mM G-6-P	1
40 mM NADP	1
蒸留水	1
合計	10 mℓ

* S9 ： 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調製したキッコーマン(株)の S9（ロット番号：RAA-314, 1994 年8月製造）を購入し、使用時まで－80℃の超低温槽内に保存した。

7. 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。

7.1 処理条件

連続処理では48時間処理群について、また、短時間処理では S9 mix 存在下および非存在下の6時間処理群について細胞増殖抑制試験を実施した。連続処理および短時間処理ともに、0.026～0.84 mg/ mℓ（10 mM）の範囲の濃度を試験に用いた。フラスコは 1濃度について 2本用いた。

7.2　標本作製法

後述の染色体標本作製法と同様の手順で染色体標本を作製した。

7.3　増殖抑制の指標とその結果

被験物質の CHL/IU 細胞に対する増殖抑制作用は、フラスコあたりの観察細胞（400 細胞）における分裂中期細胞の頻度（分裂指数 ： Mitotic index）を調べ、被験物質処理群の溶媒対照群に対する分裂指数の比をもって指標とした。

その結果、連続処理および短時間処理ともに、0.84 mg/ mℓ（10 mM ）の濃度においても50%を明らかに越える増殖抑制作用（約60%）は認められなかった（Table 1 、2 、3 および Fig.1 ）。

8. 本試験の群構成

細胞増殖抑制試験の結果より、連続処理および短時間処理ともに、0.84 mg/ mℓ（10 mM）の濃度を最高処理濃度とし、その 1/2 および 1/4 の濃度をそれぞれ中濃度および低濃度として設定した。陽性対照物質として用いたMC および CPA は、注射用水（(株) 大塚製薬工場、ロット番号：K4D76）に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発する濃度を適用した。

8.1　連続処理（S9 mix 非存在下）

連続処理では、24時間と48時間処理の3段階の被験物質処理濃度群に、対照群を含め下記の 11群を設けた。各群 2本のフラスコを用いた。

	群	濃度 (mg/mℓ)	処理時間 (h)
1)	無処理対照	—	—
2)	溶媒対照	0	24
3)	TP	0.21	24
4)	TP	0.42	24
5)	TP	0.84	24
6)	陽性対照 (MC)	0.00005	24
7)	溶媒対照	0	48
8)	TP	0.21	48
9)	TP	0.42	48
10)	TP	0.84	48
11)	陽性対照 (MC)	0.00005	48

8.2　短時間処理（S9 mix 存在下および非存在下）

短時間処理では、S9 mix 存在下および非存在下の3段階の被験物質処理濃度群に、対照群を含め下記の 11群を設けた。各群 2本のフラスコを用いた。

	群	濃度 (mg/mℓ)	S9 mix の有無	処理時間(h)
1)	無処理対照	—	—	—
2)	溶媒対照	0	−	6-(18)
3)	TP	0.21	−	6-(18)
4)	TP	0.42	−	6-(18)
5)	TP	0.84	−	6-(18)
6)	陽性対照 (CPA)	0.005	−	6-(18)
7)	溶媒対照	0	+	6-(18)
8)	TP	0.21	+	6-(18)
9)	TP	0.42	+	6-(18)
10)	TP	0.84	+	6-(18)
11)	陽性対照 (CPA)	0.005	+	6-(18)

9. 染色体標本作製法

1) 培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 μg/mℓになるように培養液に加え、培養終了後、各群の細胞をリン酸緩衝生理食塩液（Ca^{++}、Mg^{++}を含まない）で洗い、ピペッティングにより細胞をはがし、10 mℓの遠沈管に集めた。

2) 1000～1200 rpm で 5分間遠沈し、上清を捨てたのち、沈殿した細胞に 3 mℓ の0.075 M KCl 水溶液を加えることにより約30分間低張処理を行った。

3) 低張処理後、低張液の上層に固定液（氷酢酸：メタノール＝1：3 v/v） 約 6 mℓ を加え、下方から静かにピペッティングしながら混和して固定し、その後、1000～1200 rpm で 5分間遠沈した。

4) 遠沈後上清を除き、再び新鮮な固定液を加えて細胞をピペッティングにより再浮遊させ、1000～1200 rpm で 5分間遠沈した。この操作を数回繰り返した。

5) 遠沈して得た白色の細胞塊に、0.2～0.5 mℓ の固定液を加え、十分に懸濁させた。

6) 細胞浮遊液の少量を、あらかじめ洗浄しておいたスライドグラス上に滴下し、そのまま風乾した。

7) スライド標本は各フラスコにつき 6枚作製した。

8) スライドグラスのフロスト部分に鉛筆で、試験系識別番号、コード番号およびスライド番号を記入した。

9) 乾燥したスライドは、ギムザ原液（Merck）4.5 mℓ を M/15 リン酸緩衝液（pH 6.8）150 mℓ に希釈した染色液で約 8分間染色後、蒸留水で軽くすすいで風乾した。

10) 染色したスライド標本は、コード番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

10. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのフラスコから得られた異なるスライドを、複数の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。よく広がり、かつ染色体が散逸していない分裂中期像を探し、異常を有する細胞については、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で記録用紙に記録した。

染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験（MMS）分科会[1]による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常と倍数性細胞（polyploid）の有無について観察した。また原則として、構造異常については

1群 200個、倍数性細胞については 1群 800個の分裂中期細胞を分析することとした。

11. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群のそれぞれについて、観察細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数などの分析結果を集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を持つ細胞の出現頻度については、林[2] の方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法[3] により、多重性を考慮し、familywiseの有意水準を5%として検定を実施した。フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコクラン・アーミテッジの傾向性検定[4] ($p<0.05$) を行った。以上2回の検定でともに有意差が認められた場合を陽性とした。傾向性検定で有意差が認められない場合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

なお、DMSOを0.5% (v/v) 添加した場合の、gapを含む構造異常 (TAG) と数的異常に関する秦野研究所における背景データ (1989～1994年) は以下の通りである。

群	構造異常				数的異常			
	試験数	観察細胞数	異常細胞数	平均値* ±SD	試験数	観察細胞数	倍数性細胞数	平均値** ±SD
(連続処理)								
24時間	30	6000	36	1.2±1.1	30	24000	83	2.8±2.2
48時間	29	5800	52	1.8±1.5	29	23200	70	2.4±1.8
(短時間処理)								
S9 mix 非存在下	19	3800	26	1.4±1.1	19	15200	31	1.6±1.2
S9 mix 存在下	20	4000	42	2.1±2.0	20	16000	38	1.9±1.4

*；200細胞あたりの平均異常細胞数

**；800細胞あたりの平均倍数性細胞数

[結　　果]

連続処理による染色体分析の結果を Table 4 および Fig. 2 に示した。

24時間および48時間連続処理した結果、いずれの処理群においても、染色体の構造異常を有する細胞および倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 5 および Fig. 3 に示した。

S9 mix 非存在下および存在下におけるいずれの処理群においても、染色体の構造異常を有する細胞および倍数性細胞の有意な増加は認められなかった。

陽性対照として用いた連続処理での MC 処理群および S9 mix 存在下での CPA 処理群では染色分体交換 (cte) や染色分体切断 (ctb) などの構造異常をもつ細胞が誘発された。

[結　　論]

チオフェンを、連続処理により24時間および48時間処理した場合、10 mM（0.84 mg/ mℓ）の濃度を含むいずれの処理群（0.21～0.84 mg/ mℓ）においても染色体異常の誘発は認められなかった。

S9 mix 非存在下および存在下で6時間処理した場合、10 mM の濃度を含むいずれの処理群（0.21～0.84 mg/mℓ）においても染色体異常の誘発は認められなかった。

従って、チオフェンは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

[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及び試験計画書からの逸脱はなかった。

[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、（1988）

2) 林　真：染色体異常試験の統計学的処理、変異原性試験、1：255 - 261（1992）

3) 吉村　功　編著：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、（1987）

4) 吉村　功、大橋　靖夫　責任編集：毒性試験講座14、毒性試験データの統計解析、地人書館、（1992）

Table 1 Growth inhibition of CHL/IU cells continuously treated with thiophene (TP) for 48 h without S9 mix

Concentration of TP (mg/ml)	Mitotic index (% of control)		
			Average
0	100.0 ,	100.0	100.0
0.026	84.21 ,	105.2	94.70
0.053	63.15 ,	84.21	73.68
0.11	94.73 ,	89.47	92.10
0.21	110.5 ,	78.94	94.72
0.42	131.5 ,	115.7	123.6
0.84	131.5 ,	136.8	134.1

Table 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with thiophene (TP) for 6 h with S9 mix

Concentration of TP (mg/ml)	Mitotic index (% of control)		
			Average
0	100.0 ,	100.0	100.0
0.026	110.3 ,	63.15	86.72
0.053	96.55 ,	97.36	96.95
0.11	93.10 ,	76.31	84.70
0.21	103.4 ,	47.36	75.38
0.42	68.96 ,	60.52	64.74
0.84	72.41 ,	63.15	67.78

Table 3 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with thiophene (TP) for 6 h without S9 mix

Concentration of TP (mg/ml)	Mitotic index (% of control)		
			Average
0	100.0 ,	100.0	100.0
0.026	89.58 ,	102.0	95.79
0.053	87.50 ,	96.00	91.75
0.11	104.1 ,	100.0	102.0
0.21	85.41 ,	98.00	91.70
0.42	89.58 ,	104.0	96.79
0.84	139.5 ,	80.00	109.7

Table 4 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with thiophene (TP)* without S9 mix

Group	Concent-ration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Trend test[5]	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	0	0	0	3	1	0	4	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		
Solvent[1]	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		
TP	0.21	24	200	1	0	1	0	0	0	2	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25		
TP	0.42	24	200	1	0	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25	NT	NT
TP	0.84	24	200	0	1	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
MC	0.00005	24	200	4	28	22	3	1	0	58	3	40 (20.0)	38 (19.0)	0.00		
Solvent[1]	0	48	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		
TP	0.21	48	200	0	0	0	0	1	10	11	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		
TP	0.42	48	200	1	0	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38	NT	NT
TP	0.84	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00		
MC	0.00005	48	200	3	23	45	15	4	0	90	6	60 (30.0)	58 (29.0)	0.25		

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), 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, NT : not tested.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten 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 $p<0.05$ when the incidence of TAG or polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at $p<0.05$ by Fisher's exact test . * : Purity was 98 %.

Table 5 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with thiophene (TP)* with and without S9 mix

Group	Concentration (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]	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25		
Solvent[1]	0	−	6 - (18)	200	1	2	1	0	1	0	5	2	5 (2.5)	4 (2.0)	0.25		
TP	0.21	−	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13		
TP	0.42	−	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13	NT	NT
TP	0.84	−	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13		
CPA	0.005	−	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13		
Solvent[1]	0	+	6 - (18)	200	0	2	4	0	0	0	6	2	4 (2.0)	4 (2.0)	0.25		
TP	0.21	+	6 - (18)	200	1	2	2	1	0	0	6	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.00		
TP	0.42	+	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	NT	NT
TP	0.84	+	6 - (18)	200	5	6	5	0	0	0	16	0	7 (3.5)	5 (2.5)	0.25		
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	0	10	10	1	2	0	23	2	20 (10.0)	20 (10.0)	0.13		

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), 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, NT : not tested.
1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than ten 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 $p<0.05$ when the incidence of TAG or polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at $p<0.05$ by Fisher's exact test. * : Purity was 98 %.

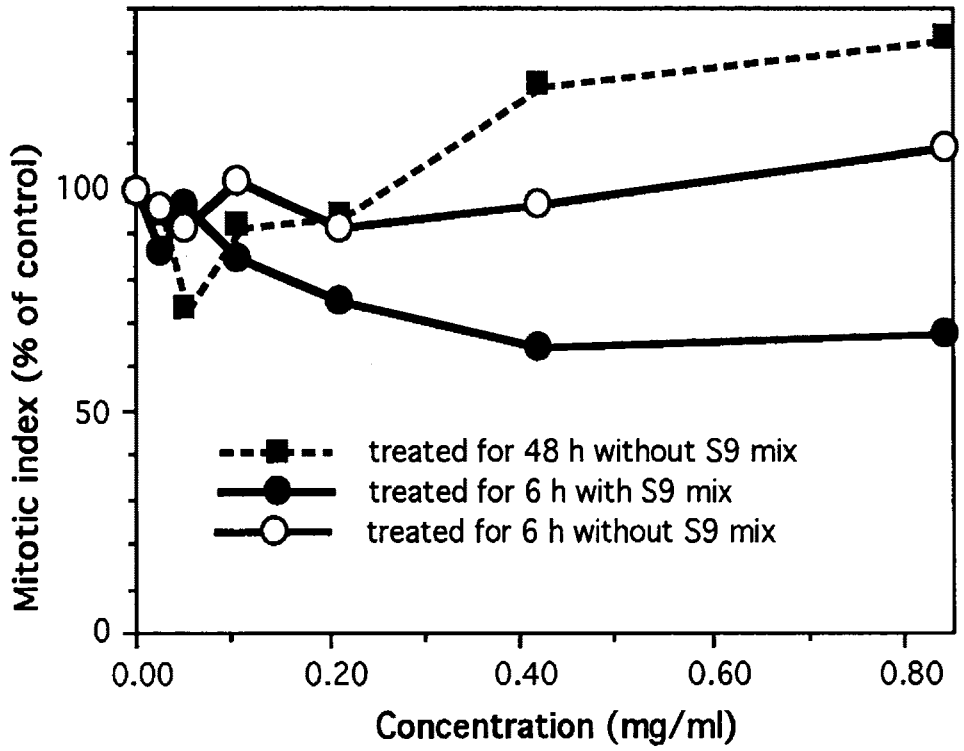

Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with thiophene

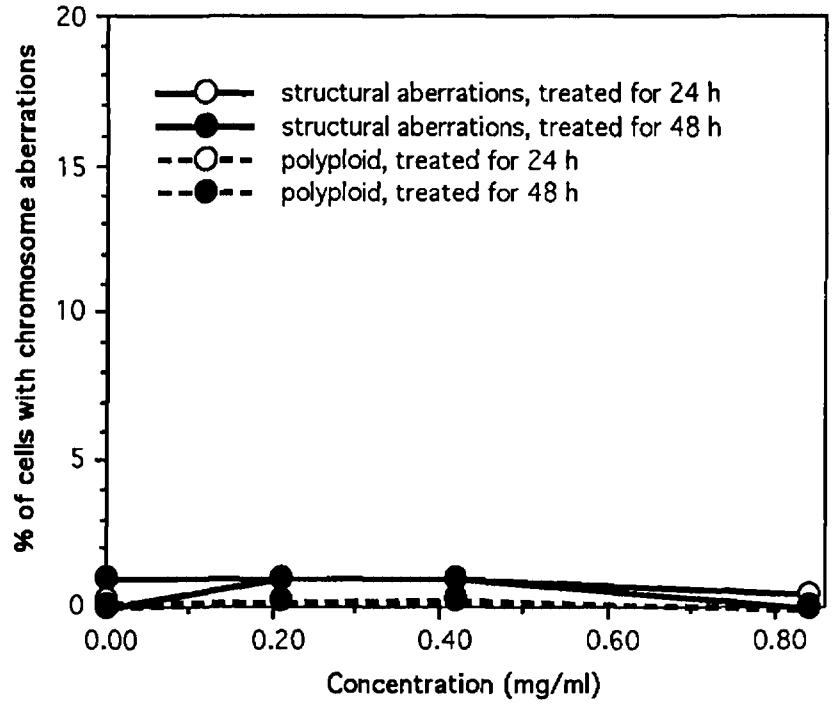

Fig. 2 **Induction of chromosome aberrations in CHL/IU cells continuously treated with thiophene without S9 mix**

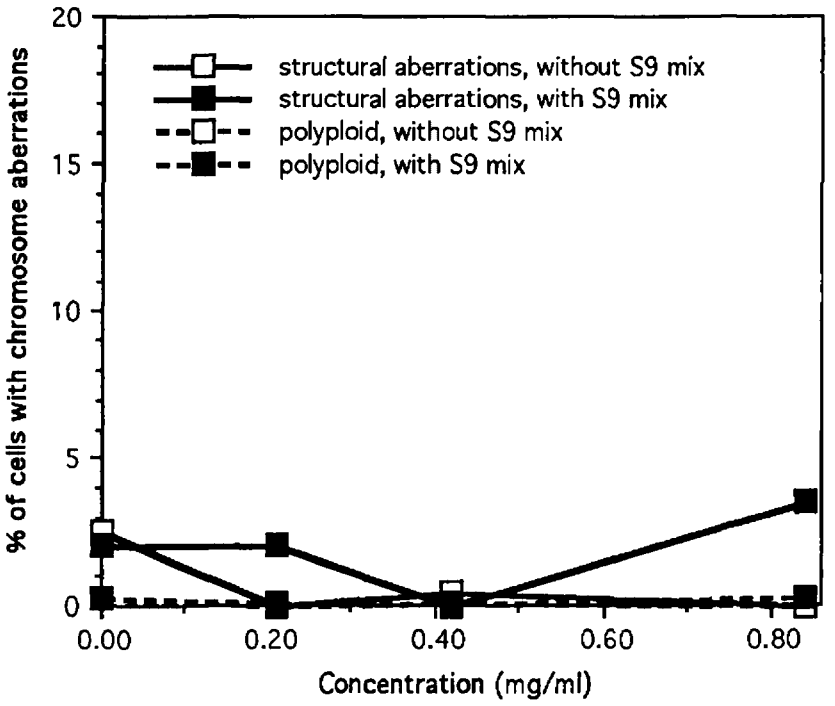

Fig. 3 **Induction of chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with thiophene with and without S9 mix**