食薬セ研第10-1656号

2000年12月27日

4-エチルフェノールの
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 ---------- 2

1　被験物質および陽性対照物質 ---------- 2

2　細胞 ---------- 3

3　S9 反応液 ---------- 3

4　細胞増殖抑制試験 ---------- 3

5　染色体異常試験 ---------- 4

6　染色体分析 ---------- 5

結果および考察 ---------- 6

参考文献 ---------- 7

Fig. 1

Table 1、2

[要　　約]

4-エチルフェノール（4EP）は、CHL/IU 細胞（チャイニーズ・ハムスター、肺由来）に染色体異常を誘発した。

4EP の CHL/IU 細胞に対する 50％増殖抑制濃度は、S9 mix 存在下で短時間処理した場合（S9 反応液中で 6時間処理後 18時間の回復培養）および S9 mix 非存在下で短時間処理した場合（S9 反応液の代わりに MEM 培地を使用）、それぞれ 0.15 mg/mL および 0.41 mg/mL であった。また、連続処理（新鮮培地中で 24時間処理）の場合は 0.15 mg/mL となった。

このことから染色体異常試験では、全ての処理系列において、50％増殖抑制濃度の約 2倍濃度を最高処理濃度とし、以下公比 2 で計 5濃度を設定した。染色体分析が可能な最高濃度は、S9 mix 存在下および非存在下で短時間処理した場合、それぞれ 0.075 mg/mL および 0.20 mg/mL の濃度となり、24時間連続処理においては 0.075 mg/mL となったため、これらの濃度を含めて以下 3濃度を観察対象とした。

染色体分析の結果、4EP は S9 mix 存在下で短時間処理した場合および S9 mix 非存在下で 24時間連続処理した場合において、染色体の構造異常を誘発した。

[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。

変異原物質の細胞内の標的（DNAまたは紡錘糸など）に対する作用は、直接作用する場合と、代謝活性化されて変異原活性が現れる場合に大別される。しかしながら、試験管内の変異原性試験に用いる微生物や培養細胞では、代謝活性化能が無いかあるいはあっても活性が低いことから、一般的にはラットの肝臓から調製した肝ホモジネート9000×g上清（S9）を化学物質の代謝活性化を検出するために用いる。染色体異常試験においては、直接作用を検出するための処理系列として、S9 mix非存在下での連続処理および短時間処理があり、加えて代謝活性化作用をみるための処理系列としてS9 mix存在下での短時間処理がある。

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、4EP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、「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成9年10月31日、環保安第287号、衛生第127号、平成09・10・31基局第2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　被験物質および陽性対照物質

被験物質である4EP（CAS No. 123-07-9）の物理化学的性状等はAppendix 1に示した。4EPは　　から提供された後、室温で保管した。本ロットについては、

実験期間中安定であることが確認された。

試験に際しては、被験物質を使用のつどジメチルスルホキシド（和光純薬工業、ロット番号：ACL5008）に溶解し、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：204AGL）は、用時調製とし、局方注射用水（大塚製薬工場、ロット番号：K8H73）に溶解して用いた。

2　細胞

CHL/IU細胞（JCRB細胞バンクより入手）は、仔牛血清（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、現在は21代）。

3　S9反応液

S9（キッコーマン、ロット番号：RAA-389、1998年8月製造）は、フェノバルビタールと5, 6-ベンゾフラボンを投与した7週齢の雄Sprague- Dawley系ラットの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-$NADP^+$、オリエンタル酵母工業）およびKClを蒸留水に溶解し、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と等量）およびMEM培地（血清不含）を混和して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）とした。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およぼす影響を調べた。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、

Corning）に播種して3日間培養した。

S9 mix 存在下で短時間処理する場合、S9 反応液 3 mL と培地交換した後、被験物質調製液を 15 μL 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 非存在下で短時間処理する場合、S9 反応液の代わりに MEM 培地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。また、連続処理においては、新鮮培地 5 mL と培地交換した後、被験物質調製液を 25 μL ずつ添加し 24時間処理した。

全ての処理系列において、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

細胞増殖抑制試験において、4EP は S9 mix 存在下および非存在下で短時間処理した場合、および24時間連続処理した場合、CHL/IU 細胞の増殖を抑制した（Fig. 1）。50％増殖抑制濃度は、S9 mix 存在下および非存在下で短時間処理した場合、それぞれ 0.15 mg/mL および 0.41 mg/mL となり、連続処理した場合は 0.15 mg/mL となった。

このことから染色体異常試験の全ての処理系列において、50％増殖抑制濃度の 2倍濃度付近を最高処理濃度とし、以下公比 2 で計 5濃度を設定し、試験を実施した。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、細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。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。連続処理では 24時間処理した。なお、処理群の他、溶媒対照群、陽性対照群および無処理対照群（培地交換のみ）を設けた。また、無処理対照群および陽性対照群については、2枚のディッシュのみを用いて染色体標本を作製した。

陽性対照群については、S9 mix 非存在下で短時間処理する場合、MC を培地 3 mL に最終濃度が 0.1 μg/mL となるように添加し、連続処理する場合は MC を培地 5 mL に最終濃度が 0.05 μg/mL となるように添加した。また、S9 mix 存在下で短時間処理する場合、CPA を S9 反応液 3 mL に最終濃度が 5 μg/mL となるように添加した。

染色体標本作製用のディッシュについては、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（Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない）を加えて細胞をはがし、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枚のスライド標本を作製した。

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、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。

6　染色体分析

染色体分析に先立って、観察対象とする最高濃度を決定した。すなわち、20%未満の細胞増殖率を示した濃度については染色体標本を作製せず、20%以上の細胞増殖率を示した濃度のうち、濃度の高い方からディッシュ毎の分裂中期細胞の出現頻度（分裂指数）を求め、2ディッシュ共に0.5%以上となる最も高い濃度を染色体分析が可能な最高濃度と判断した。

分裂指数（Table 1、2）により、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0.075 mg/mLおよび0.20 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含めて以下公比2で計3濃度を観察対象とした。連続処理においては0.075 mg/mLが染色体分析の可能な最高濃度であったことから、この濃度を含めて以下公比2で計3濃度を観察対象とした。また、染色体分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会（JEMS・MMS）[1)] による分類法に基づいて行った。ただし、ギャップについては、染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義し、構造異常誘発性の判定には含めないこととした。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ようにコード化して分析した。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。

溶媒対照群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、生物学的な観点による判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

[結果および考察]

4EP は、 S9 mix 存在下で短時間処理した場合、観察最高濃度（0.075 mg/mL）において染色体の構造異常を誘発した（ギャップを除いた出現頻度：11.0％、Table 1）。また、S9 mix 非存在下で24時間連続処理した場合においても構造異常を誘発し、出現頻度は 0.075 mg/mL の濃度で 21.0％となった（Table 2）。一方、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合、染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は溶媒対照のレベルであった（Table 1）。倍数性細胞については、S9 mix 存在下で短時間処理した場合の中濃度（0.038 mg/mL）および高濃度（0.075 mg/mL）において、有意な増加（$p< 0.01$）が認められたものの、出現頻度はそれぞれ 1.50％および 1.63％と低く、陰性と判定した。それ以外の処理系列でも倍数性細胞の誘発は認められなかった（Table 1、2）。

染色体の構造異常の誘発が認められた処理系列について、D_{20}値[4]を求めたところ、S9 mix 存在下の短時間処理群では 0.14 mg/mL、24時間の連続処理群では 0.077 mg/mL となった。

フェノール類のうち、側鎖に炭化水素を有している化合物のひとつである 4-（1-メチルプロピル）フェノールについては、染色体異常を誘発しないことが報告されている[5]。一方、*p-tert*-ブチルフェノールについては、染色体の構造異常を誘発することに加え、倍数性細胞の高頻度誘発（最高出現頻度：93.18％）が特徴的である[6]。また、本試験と並行して実施した、*m*-エチルフェノールの染色体異常試験結果についても陽性の結果が得られている[7]が、本物質の結果とは異なり、代謝活性化の処理系列においてのみ構造異常の誘発が認められている。これらのことから、側鎖に炭化水素を有しているフェノール類は、炭

化水素の結合位置および種類が、染色体異常の発現と関わっており、発現する異常のタイプ（構造異常および倍数性細胞）または細胞に対する作用様式を決定している可能性が示唆された。

一方、陽性対照物質として用いたMCは、S9 mix非存在下の短時間処理および連続処理において染色体の構造異常を誘発し（Table 1、2）、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 1）。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。

[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）石館　基　監修：「<改定> 染色体異常試験データ集」, エル・アイ・シー, 東京 (1987)

5）厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室　監修:「化学物質毒性試験報告 Vol. 2 1995」, 化学物質点検推進委員会編集・発行, 東京 (1995)

6）厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室　監修:「化学物質毒性試験報告 Vol. 4 1996」, 化学物質点検推進協議会編集・発行, 東京 (1996)

7）日下部　博一　他:「*m*-エチルフェノールのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験」, 食薬セ研第 10-1659 号

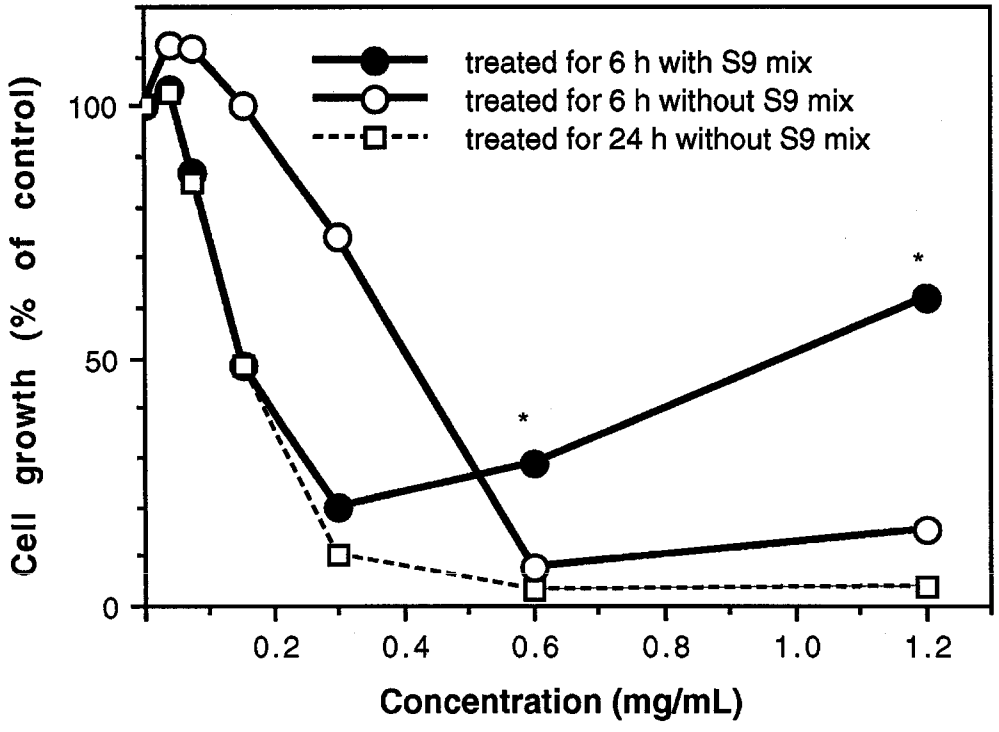

Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 4-ethylphenol

* Died cells remained adhering onto the culture dishes.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 4-ethylphenol (4EP)** with and without S9 mix

Group	Concen-tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of aberrations gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total	Others[3]	No. of cells with aberrations TAG (%)	TA (%)	POL[4] (%)	Trend test[5] TA	POL	Concurrent[6] cytotoxicity (%)	Mitotic[7] index (%)
Non-treatment				200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			—	—
Solvent[1]	0	−	6 - (18)	200	0	2	0	0	1	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
4EP	0.050	−	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			85.0	—
4EP	0.10	−	6 - (18)	200	1	2	2	0	0	0	5	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38	−	−	88.5	—
4EP	0.20	−	6 - (18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38			76.0	12.8, 9.8
4EP	0.40 ***	−	6 - (18)	—											—			2.0	—
4EP	0.80 ***	−	6 - (18)	—											—			19.0	—
MC	0.1 μg/mL	−	6 - (18)	200	1	53	131	7	1	0	193	3	101 *(50.5)	100 *(50.0)	0.00			—	—
Solvent[1]	0	+	6 - (18)	200	0	1	0	2	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			100.0	—
4EP	0.019	+	6 - (18)	200	2	2	1	1	0	0	6	0	5 (2.5)	3 (1.5)	0.00			95.0	—
4EP	0.038	+	6 - (18)	200	2	2	7	5	0	0	16	1	10 (5.0)	8 (4.0)	1.50 *	+	+	83.5	—
4EP	0.075	+	6 - (18)	200	1	13	35	2	0	10	61	0	22 *(11.0)	22 *(11.0)	1.63 *			56.0	4.6, 6.8
4EP	0.15 ****	+	6 - (18)	—											—			38.0	2.0, 0.4
4EP	0.30 ****	+	6 - (18)	—											—			21.0	Tox, Tox
CPA	5 μg/mL	+	6 - (18)	200	11	45	193	3	1	0	253	1	124 *(62.0)	121 *(60.5)	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, POL : polyploid, MC : mitomycin C, CPA : cyclophosphamide, Tox : cytotoxic.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosomecondensation, 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) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish.

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test.

** : Purity was 98.328 wt%.

*** : Chromosome specimens were not madebecause of severe cytotoxicity.

**** : Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 4-ethylphenol (4EP)** without S9 mix

Group	Concen-tration (mg/mL)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others[3]	No. of cells with aberrations		POL[4] (%)	Trend test[5]		Concurrent[6] cytotoxicity (%)	Mitotic[7] index (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Solvent[1]	0	24	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
4EP	0.019	24	200	4	1	5	3	1	0	14	0	11 (5.5)	8 (4.0)	0.00			102.0	—
4EP	0.038	24	200	3	6	7	0	1	0	17	3	16 *(8.0)	13 *(6.5)	0.13	+	−	89.0	—
4EP	0.075	24	200	4	24	18	0	4	0	50	1	45 *(22.5)	42 *(21.0)	0.00[8]			68.5	1.4, 1.2
4EP	0.15 ****	24	—											—			33.0	0.4, 0.0
4EP	0.30 ***	24	—											—			6.5	—
MC	0.05 μg/mL	24	200	2	49	119	2	3	10	185	0	105 *(52.5)	104 *(52.0)	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, POL : polyploid, MC : mitomycin C.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent. 2) More than nine aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosomecondensation, 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) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. 8) Seven hundred and twenty-two cells were analysed.

* : Significantly different from solvent control at $p< 0.01$ by Fisher's exact probability test.

** : Purity was 98.328 wt%.

*** : Chromosome specimens were not made because of severe cytotoxicity.

**** : Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity.