食薬セ研第 10-1660 号

2000年12月27日

（ヒドロキシフェニル）メチルフェノールの
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 ---------- 8

Fig. 1、2

Table 1、2

[要　　約]

（ヒドロキシフェニル）メチルフェノール（HPMP）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。

HPMP 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 0.0094 mg/mL および 0.091 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 0.057mg/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 0.0090 mg/mL および 0.090 mg/mL の濃度となり、24時間連続処理においては 0.060 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、HPMP は S9 mix 存在下および非存在下で短時間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、HPMP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HPMP（CAS No. 1333-16-0）の物理化学的性状等はAppendix 1に示した。HPMPは　　から提供された後、暗所で冷蔵保管した。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）を加え、超音波処理して溶解し、希釈した。

陽性対照物質として用いたシクロフォスファミド（CPA、Sigma Chemical、ロット番号：73H0846）およびマイトマイシンC（MC、協和発酵工業、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-396、1999年1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、3 mL のS9 反応液と培地交換した後、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。

最初の細胞増殖抑制試験において、0.063 ～ 2.0 mg/mL（10 mM）の濃度範囲で処理を実施したところ、S9 mix 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には強い増殖抑制作用が認められたことから、0.0031 ～ 0.10 mg/mL の濃度範囲で処理した。また、S9 mix 非存在下で短時間処理する場合は、0.063～ 2.0 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、HPMP は S9 mix 存在下で短時間処理および S9 mix 非存在下で 24時間連続処理した場合（Fig. 1）、および S9 mix 非存在下で 短時間処理した場合（Fig. 2）、CHL/IU 細胞の増殖を抑制した。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 0.0094 mg/mL および 0.091 mg/mL となり、連続処理した場合は 0.057 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（ただし、無処理対照群および陽性対照群では 2枚）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、単層培養細胞密度計による細胞増殖率の測定は行わなかった。

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 0.0090 mg/mL および 0.090 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 0.060 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]

HPMP は、S9 mix 存在下および非存在下で短時間処理した場合、観察最高濃度（それぞれ 0.0090 および 0.090 mg/mL）において、染色体構造異常（ギャップを除く）を有する細胞の出現頻度がそれぞれ 19.5%および 14.0%と増加し、陽性の結果となった（Table 1）。また、S9 mix 非存在下で 24時間連続処理した場合では、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。また、S9 mix 存在下で短時間処理した場合、観察最高濃度（0.0090 mg/mL）においてのみ、倍数性細胞の有意な増加（$p < 0.01$）が認められたが、出現頻度は 1.50%と低く、陰性と判定した。

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 存在下および非存在下の短時間処理群では、それぞれ 0.010 mg/mL および 0.15 mg/mL となった。

本試験結果では、短時間処理系列の観察最高濃度を除いた低濃度および中濃度においては、染色体構造異常を有する細胞の出現頻度および細胞増殖率は溶媒対照と同程度となった（Table 1）。また、短時間処理系列の観察最高濃度のみで、処理終了後ほとんどの細胞

が球形化していたが、連続処理の観察最高濃度では細胞の球形化は認められなかった。一方、連続処理の場合、観察最高濃度（0.060 mg/mL）において50%を越える細胞毒性が認められている（47.0%）が、染色体異常が誘発されなかった。このことは、長時間（24時間）の暴露により染色体異常をもつ細胞が淘汰されたためと考えられる。また、24時間連続処理では、S9 mix非存在下の短時間処理系列で染色体異常が認められた濃度（0.090 mg/mL）よりも低い濃度が観察最高濃度（0.060 mg/mL）となっており、その濃度を越える場合は強い細胞毒性作用により染色体分析が不可能となったことから、染色体異常の検出ができなかったとも考えられる。

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。

HPMPの関連物質としては、様々なビスフェノール類が挙げられる。ビスフェノールAについては、復帰突然変異試験で陰性の結果が報告されている[5]が、分裂装置である紡錘糸の形成を阻害し、異数性細胞（染色体の数的異常）を誘発することが、CREST染色法（キネトコア抗体を用いる動原体の蛍光抗体染色法）を用いた小核の分析結果から示唆されている[6]。しかしながら、本試験で使用した被験物質中には、異性体としてbis(*p*-hydroxyphenyl)methane（異性体の混合比率：30.2%、Appendix 1）を含んでおり、この物質については異数性細胞を誘発しないことが報告されている[6]。本試験では異数性細胞誘発の指標となる倍数性細胞の誘発は認められず、構造異常が増加したことから、残りの2種の異性体（Appendix 1）によって構造異常が誘発された可能性がある。加えて、本被験物質には微量であるものの不純物としてホルムアルデヒドが含まれており（1 wt%未満、Appendix 1）、37%ホルムアルデヒド溶液(ホルマリン)はCHL/IU細胞に0.015 mg/mL以上の濃度で染色体異常を誘発することが知られている[4]。しかしながら、本試験におけるホルムアルデヒドの濃度は、被験物質処理濃度の100分の1以下と推定できる。従って、本試験結果の解釈には、ホルムアルデヒド以外の他の要因を考慮する必要があると考えられる。

[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」, (株)エル・アイ・シー, 東京, (1987)

5) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課　監修:「労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集」, 社団法人日本化学物質安全・情報センター編集・発行, 東京 (1996)

6) Pfeiffer, E. et. al., Interference with microtubules and induction of micronuclei in vitro by various bisphenols, Mutation Res., 390, 21-31 (1997)

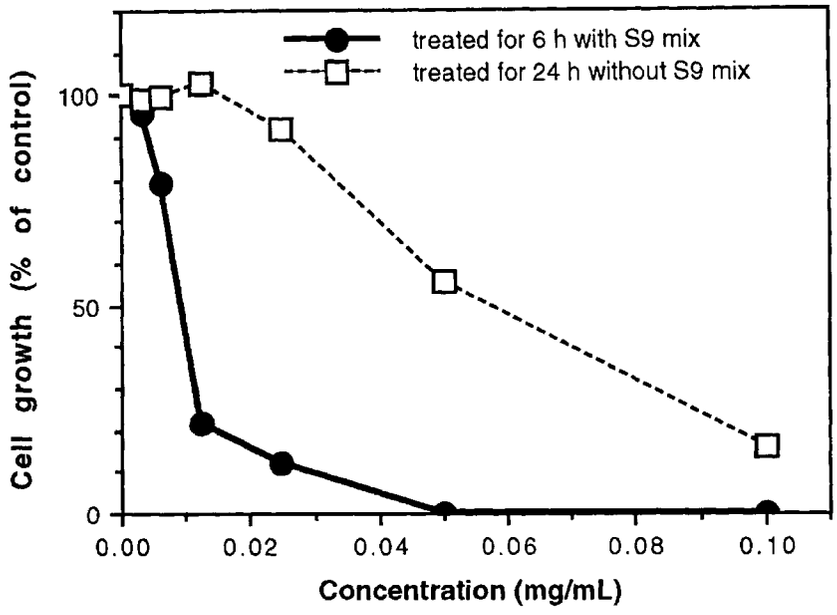

Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with (hydroxyphenyl)methylphenol

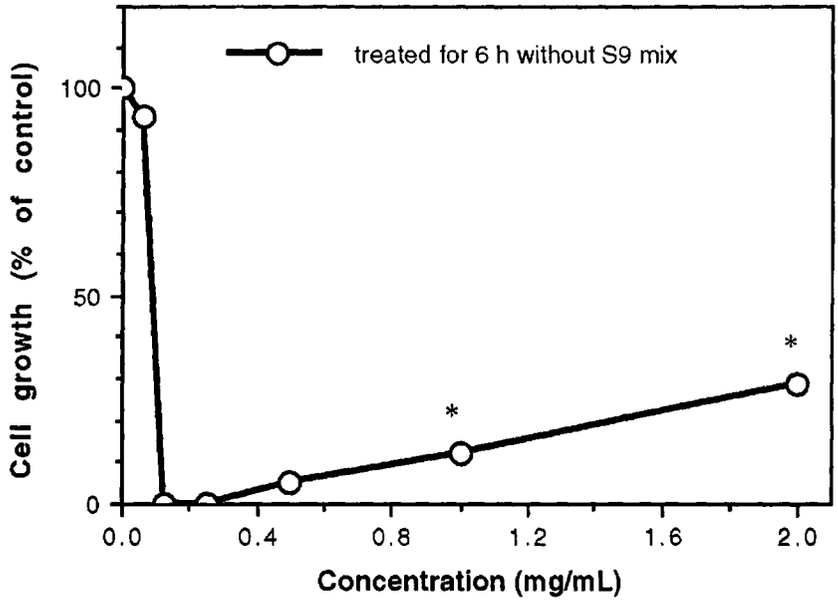

Fig.2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with (hydroxyphenyl)methylphenol

* The increased percent represents adhesion of test article onto culture dishes.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with (hydroxyphenyl) methylphenol (HPMP)** 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	1	1	4	0	0	6	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			—	—
Solvent[1]	0	−	6 - (18)	200	0	1	0	0	0	10	11	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
HPMP	0.023	−	6 - (18)	200	2	1	0	2	0	0	5	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.25			112.0	—
HPMP	0.045	−	6 - (18)	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38	+	−	112.5	—
HPMP	0.090	−	6 - (18)	200	3	15	35	1	0	0	54	0	31 *(15.5)	28 *(14.0)	0.38			72.0	11.6, 11.6
HPMP	0.18 ***	−	6 - (18)	—											—			0.0	—
MC	0.1 μg/ml	−	6 - (18)	200	10	69	150	3	8	20	260	1	121 *(60.5)	119 *(59.5)	0.13			—	—
Solvent[1]	0	+	6 - (18)	200	0	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
HPMP	0.0023	+	6 - (18)	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			94.5	—
HPMP	0.0045	+	6 - (18)	200	0	3	5	0	0	0	8	0	6 (3.0)	6 (3.0)	0.63	+	+	99.5	—
HPMP	0.0090	+	6 - (18)	200	4	35	55	1	1	20	116	0	39 *(19.5)	39 *(19.5)	1.50*			35.5	3.8, 3.4
HPMP	0.018 ****	+	6 - (18)	—											—			28.5	Tox, Tox
CPA	5 μg/ml	+	6 - (18)	200	3	17	64	2	3	0	89	0	60 *(30.0)	60 *(30.0)	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, 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 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) 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 99.0wt%. Phenol, formaldehyde and acids (oxalic acid and formic acid) were contained as impurities.

*** : Chromosome specimens were not made because 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 (hydroxyphenyl) methylphenol (HPMP)** 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	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Solvent[1]	0	24	200	3	1	5	1	0	0	10	0	10 (5.0)	7 (3.5)	0.13			100.0	—
HPMP	0.015	24	200	0	0	0	2	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			103.5	—
HPMP	0.030	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	–	–	87.5	—
HPMP	0.060	24	200	0	5	1	0	0	0	6	3	5 (2.5)	5 (2.5)	0.00			47.0	3.6, 6.6
HPMP	0.12 ***	24	—											—			11.5	—
MC	0.05 μg/ml	24	200	4	44	111	5	4	0	168	0	95 *(47.5)	93 *(46.5)	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.

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 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 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 99.0wt%. Phenol, formaldehyde and acids (oxalic acid and formic acid) were contained as impurities.

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