



アクリル酸2-(ジメチルアミノ)エチルエステルの
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 -----	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 -----	6
特記事項 -----	7
参考文献 -----	7

Fig. 1 and 2

Tables 1 and 2

[要 約]

アクリル酸 2- (ジメチルアミノ) エチルエステル (DMAEA) 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。

DMAEA 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 0.06 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 0.2 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 0.04 mg/ml であった。

染色体分析が可能な最高濃度は、連続処理で 0.060 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。また、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 0.050 mg/ml および 0.010 mg/ml が染色体分析可能な最高濃度であったことから、これらの濃度を含む 2濃度群を観察対象とした。

DMAEA 処理により、全ての実験系列において染色体の構造異常が有意に増加し (24時間連続処理: 0.060 mg/ml、48時間連続処理: 0.060 mg/ml、S9 mix 存在下における短時間処理: 0.050 mg/ml、S9 mix 非存在下における短時間処理: 0.010 mg/ml、 $p < 0.05$)、濃度依存性も認められた。また、全ての実験系列において倍数性細胞が有意に増加し (24時間連続処理: 0.060 mg/ml、48時間連続処理: 0.060 mg/ml、S9 mix 存在下における短時間処理: 0.025 および 0.050 mg/ml、S9 mix 非存在下における短時間処理: 0.0050 および 0.010 mg/ml、 $p < 0.05$)、濃度依存性も認められた。

[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、DMAEA 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（Cansera International、ロット番号：2605420）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（親株の継代数は、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DMAEA（CAS No. 2439-35-2）の物理化学的性状等は Appendix 1 に示した。DMAEAは から提供された後、冷蔵し、使用のつど注射用蒸留水（大塚製薬工場、ロット番号：K5H71）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：051AEG）は、注射用蒸留水（大塚製薬工場、ロット番号：K5H71）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-333、1995年9月製造およびロット番号：RAA-338、1995年12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 と被験物質の添加量の合計と等量）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培地および2倍濃度MEM培地（被験物質の添加量と等量）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)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と培地交換した後、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培地を用いた以外、S9 mix存在下の処理群と同様に行った。

連続およびS9 mix存在下における短時間処理では、0.044 ~ 1.4 mg/ml (10 mM)の濃度範囲で処理した。一方、S9 mix非存在下における短時間処理では、0.0031 ~ 0.10 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

細胞増殖抑制試験の結果、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。また、50%増殖抑制濃度は、連続処理では0.06 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0.2および0.04 mg/mlであった(Fig. 1、2)。

このことから染色体異常試験において、すべての実験系列で50%増殖抑制濃度の2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で各5濃度を設定した(連続処理:0.0075、0.015、0.030、0.060、0.12 mg/ml、S9 mix存在下の短時間処理:0.025、0.050、0.10、0.20、0.40 mg/ml、S9 mix非存在下の短時間処理:0.0050、0.010、0.020、0.040、0.080 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。

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、無処理対照群（新鮮培地と交換）、陽性対照群および48時間処理（連続処理）群を設けたことや、コルセミドを添加（細胞増殖率測定用ディッシュには非添加）したことを除いて、細胞増殖抑制試験と同様に実施した。

陽性対照群について、連続処理ではMCを新鮮培地5 mlに最終濃度が0.05 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、短時間処理ではS9反応液およびMEM培地2.7 mlに水を0.3 ml加え（全量：3 ml）、CPAを最終濃度が5 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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（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、蒸留水ですすいで風乾した。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、細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、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、観察対象の濃度群を決定した。

6 染色体分析

細胞増殖率（Table 1、2）と分裂指数により、連続処理では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、この濃度を含む3濃度群を観察対象とした。一方、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0.050 および0.010 mg/mlが染色体分析可能な最高濃度で、それ以上の濃度では分裂中期細胞が得られなかったこと

から、それぞれ分析可能な2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 (MMS) 研究会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。また、異常を有する細胞は、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で表し、記録用紙に記録した。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。

溶媒の背景データ (Appendix 2) と被験物質処理群間で、フィッシャーの直接確率法²⁾ により、familywise の有意水準を5%として有意差検定を実施した。直接確率法で有意差がある場合、用量依存性の有無をコクラン・アーミテッジの傾向性検定³⁾ ($p < 0.05$) により判定した。両検定でともに有意差が認められた場合を陽性とし、直接確率法でのみ有意差が認められた場合は疑陽性とした。

[結 果]

染色体分析の結果 (Table 1、2)、DMAEAにより全ての実験系列において染色体の構造異常が有意に増加し (24時間連続処理: 0.060 mg/ml、48時間連続処理: 0.060 mg/ml、S9 mix 存在下における短時間処理: 0.050 mg/ml、S9 mix 非存在下における短時間処理: 0.010 mg/ml、 $p < 0.05$)、濃度依存性も認められた。また、全ての実験系列において倍数性細胞が有意に増加し (24時間連続処理: 0.060 mg/ml、48時間連続処理: 0.060 mg/ml、S9 mix 存在下における短時間処理: 0.025 および 0.050 mg/ml、S9 mix 非存在下における短時間処理: 0.0050 および 0.010 mg/ml、 $p < 0.05$)、濃度依存性も認められた。なお48時間連続処理群では、細胞毒性により、分析した分裂中期細胞が規定数 (構造異常: 200細胞、倍数性細胞: 800細胞) に満たなかった (構造異常では0.030 mg/ml の濃度において、倍数性細胞については3濃度すべてにおいて規定の細胞数の分析ができなかった)。

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:「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)

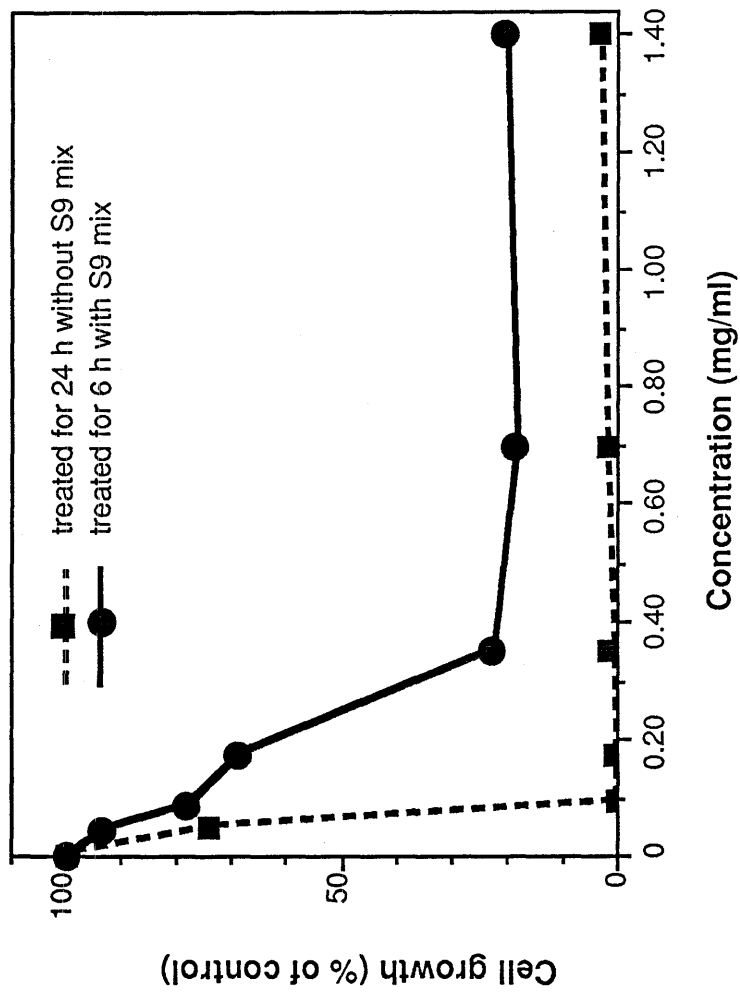


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-(dimethylamino) ethyl acrylate

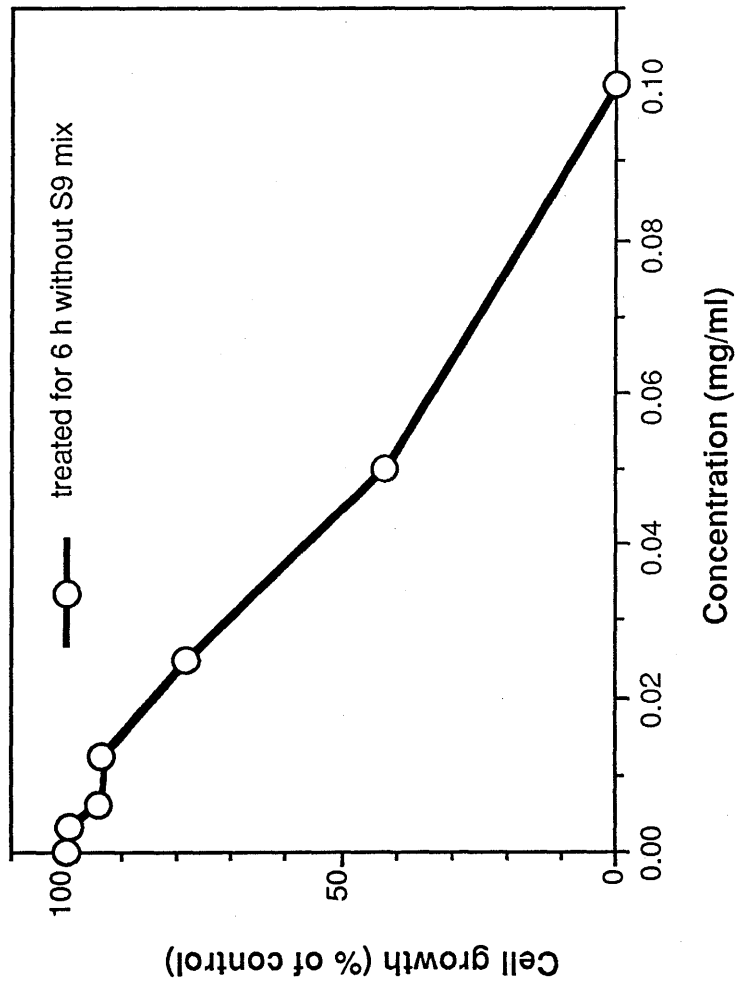


Fig. 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-(dimethylamino) ethyl acrylate

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2- (dimethylamino) ethyl acrylate (DMAEA)** without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of structural aberrations					Total	No. of cells with aberrations		Trend test ⁵⁾ SA NA	Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)					
			analysed	gap	ctb	cte	csb		cse	mul			TAG (%)	TA (%)	Polyloid ⁴⁾ (%)		
Control ¹⁾			200	0	2	2	0	0	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.50			
Solvent	0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38			100.0
DMAEA 0.015		24	200	0	0	0	2	1	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.50			82.5
DMAEA 0.030		24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	+	+	72.0
DMAEA 0.060		24	200	8	23	44	1	1	0	77	0	47*(23.5)	42 (21.0)	10.75*			65.0
DMAEA 0.12 ***		24	200	6	32	109	1	0	0	148	0	94 (47.0)	91 (45.5)	0.13			13.0
MC 0.00005		24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.63			100.0
Solvent ¹⁾	0	48	200	3	4	0	2	0	0	9	1	7 (3.5)	5 (2.5)	0.267)			58.5
DMAEA 0.015		48	200	3	3	0	9	1	0	16	1	8 (4.4)	6 (3.3)	0.368)	+	+	56.5
DMAEA 0.030		48	200	0	4	10	11	2	10	37	4	17*(8.5)	17 (8.5)	6.219)*			103.5
DMAEA 0.060		48	200	6	35	127	12	7	20	207	1	98 (49.0)	96 (48.0)	0.25			8.0
DMAEA 0.12 ***		48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.63			100.0
MC 0.00005		48	200	3	4	0	2	0	0	9	1	7 (3.5)	5 (2.5)	0.267)			58.5
DMAEA 0.015		48	180	3	3	0	9	1	0	16	1	8 (4.4)	6 (3.3)	0.368)	+	+	56.5
DMAEA 0.060		48	200	0	4	10	11	2	10	37	4	17*(8.5)	17 (8.5)	6.219)*			103.5
DMAEA 0.12 ***		48	200	6	35	127	12	7	20	207	1	98 (49.0)	96 (48.0)	0.25			8.0

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<0.05. 6) Concurrent cytotoxicity, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7) Seven hundred and sixty four cells were analysed. 8) Five hundred and fifty seven cells were analysed. 9) Seven hundred and eighty nine cells were analysed. * : Significantly different from historical solvent control data at p<0.05 by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. ** : Purity was 99.9 wt%. 2-Dimethylamino ethanol (0.01 %), acrylate (0.01 %) and methoquinone (2000 ppm) were contained as impurities. *** : Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2- (dimethylamino) ethyl acrylate (DMAEA)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Total	Others	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		Concurrent cytotoxicity (%)							
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul	TAG (%)			TA (%)	SA		NA									
Control ¹⁾	0	—	—	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.00	—	—	—	—	
Solvent	0	—	6-(18)	200	0	0	1	0	1	0	2	0	0	2	2	2	2	2	2	2	0.13	—	—	—	100.0	
DMAEA	0.0050	—	6-(18)	200	2	0	1	1	0	0	4	0	0	4	4	4	4	4	4	4	1.25*	—	—	—	97.5	
DMAEA	0.010	—	6-(18)	200	4	12	39	1	0	0	56	0	0	32*	30	30	30	30	30	30	10.88*	+	+	+	99.0	
DMAEA	0.020 ***	—	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17.0	
DMAEA	0.040 ***	—	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15.5
DMAEA	0.080 ***	—	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17.0
CPA	0.005	—	6-(18)	200	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0.25	—	—	—	—	
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	2	0	5	0	0	7	2	2	3	3	3	3	3	3	3	0.00	—	—	—	—	100.0
DMAEA	0.025	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1.25*	—	—	—	—	85.0
DMAEA	0.050	+	6-(18)	200	6	7	15	0	0	0	28	0	0	25*	19	19	19	19	19	19	5.25*	+	+	+	+	80.0
DMAEA	0.10 ***	+	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	39.0
DMAEA	0.20 ***	+	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	36.0
DMAEA	0.40 ***	+	6-(18)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	37.5
CPA	0.005	+	6-(18)	200	8	86	387	11	3	120	615	0	0	185	184	184	184	184	184	0.13	—	—	—	—	—	

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<0.05. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. * : Significantly different from historical solvent control data at p<0.05 by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. ** : Purity was 99.9 wt%. 2-Dimethylamino ethanol (0.01 %), acrylate (0.01 %) and methoquinone (2000 ppm) were contained as impurities. *** : Chromosome analysis was not performed because there were small number of metaphases due to severe cytotoxicity.