

厚生省生活衛生局 殿

試 験 報 告 書

フタル酸ジブチルエステルのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号：4 L 4 3 4)

株式会社三菱化学安全科学研究所

目 次

	頁
要 約	7
材料及び方法	
1. 試験物質	8
2. 指標細胞	8
3. 培地	9
4. S9 Mix	9
5. 試験物質の調製	9
6. 細胞増殖抑制試験	10
7. 染色体異常試験	11
結 果	
1. 細胞増殖抑制試験	14
2. 染色体異常試験	14
結論	15
参考文献	15
補足資料	15
表	16
図	19

要約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い、フタル酸ジヘキシルエステルの *in vitro*における染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験に先立ち、代謝活性化法によらない場合と代謝活性化法による場合について、50, 500, 5000 $\mu\text{g/ml}$ で予備試験を実施したところ、いずれの処理条件においても処理群と陰性対照との差は認められなかった。

予備試験の結果を基に、細胞増殖抑制試験を実施した（細胞増殖抑制試験1）ところ、代謝活性化法による場合では、被験物質は 5000 $\mu\text{g/ml}$ においても、細胞増殖を50%以上抑制しなかった。しかし、代謝活性化法によらない場合は、24時間処理では 156 $\mu\text{g/ml}$, 48時間処理では 156, 313 $\mu\text{g/ml}$ で細胞増殖が50%以上抑制されたが、これより高い濃度では、50%を超える細胞増殖抑制は認められず、染色体異常試験に用いる適切な濃度を設定することが出来なかった。従って、24時間及び48時間処理では 156 $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、追加試験を実施したところ（細胞増殖抑制試験2）、50%細胞増殖抑制濃度（TCID₅₀）はそれぞれ 81, 55 $\mu\text{g/ml}$ であった。

染色体異常試験は、細胞増殖抑制試験の結果を基に、TCID₅₀を超える濃度を最高濃度とし、公比2で3濃度で実施した。その結果、染色体構造異常あるいは数的異常細胞の出現率は、全ての処理条件において5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下におけるフタル酸ジヘキシルエステルの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と結論した。

材料及び方法

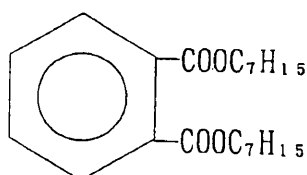
1. 試験物質

1.1 被験物質

より提供された 7α-ヒドロキシステロイド (Lot No.

純度 99.56%以上) を使用した。被験物質は、融点 -55°C 、沸点 $235\sim 245^{\circ}\text{C}$ /10mmHgの無色透明液体であり、水、熱、光等に安定である。水にほとんど溶けず、ジメチルスルホキシド、アセトン、芳香族炭化水素に易溶である。なお、本ロットについては実験開始前及び実験開始後に被験物質製造者が分析したデータを入力し、安定であることの確認を行った。

化学名：7α-ヒドロキシステロイド
化学式： $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$
構造式：



分子量：362.48
CAS No.：3648-21-3

1.2 対照物質

(1) 陰性対照物質

アセトン (和光純薬工業株式会社, ロット番号：APF4541, KCF1401, 純度 99.5%)

(2) 陽性対照物質

(a) 代謝活性化法によらない場合

マイトマイシンC (MMCと略す, 協和醸酵工業株式会社, ロット番号：967ADD, 純度 約 100%)

(b) 代謝活性化法による場合

ベンゾ[a]ピレン (BPと略す, 東京化成工業株式会社, ロット番号：AX01, 純度 99.5%)

2. 指標細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/1U を使用した。細胞は、大日本製薬株式会社より1994年8月30日に購入し、細胞懸濁液に対して10%の割合でジメチルスルホキシド (DMSOと略す) を添加したものを1mlずつ小分けして、液体窒素中で凍結保存した。試験には、これを融解して培養し、その後の継代数が5代以内のものを使用

した。細胞の培養には、プラスチックシャーレ（直径6 cm又は10cm；Becton Dickinson and Company）を用い、炭酸ガス5%，空気95%，温度37℃，加湿条件下に自動制御された炭酸ガス細胞培養装置（NAPCO社，7300型）内で培養した。

3. 培地

3.1 MEM

イーグル最少培地（イーグル MEM培地「ニッスイ」①；日水製薬株式会社）を添付の処方に従って精製水に溶解し、オートクレーブ滅菌（121℃，15分間，以下同じ）を行った。この1ℓに、別に滅菌した10%炭酸水素ナトリウム水溶液12.5mlと0.292% L-グルタミン水溶液10mlを添加した。

3.2 培養液

MEMに非働化（56℃，30分間加熱処理）した子牛血清（GIBCO BRL，ロット番号：43N1140）を10%の割合で添加した。

4. S9 Mix

4.1 S9

市販品（キッコーマン株式会社，ロット番号：RAA-318，1994年11月11日製造）を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラット（体重192～229g）にフェノバルビタールを30mg/kgで1回，60mg/kgで3回，24時間間隔で腹腔内投与し，5,6-ベンゾフラボン80mg/kgをフェノバルビタールの第3回目の投与時に1回併用投与して作製した肝ホモジネートの9,000g上清分画である。使用時まで-80℃以下で保存した。

4.2 S9 Mix

S9 Mix 1ml当り，以下の組成で用時調製し，使用時まで水中に保存した。

S9	0.3ml
塩化マグネシウム（6水和物）	5μmol
塩化カリウム	33μmol
グルコース 6-リン酸	5μmol
β-NADP ⁺	4μmol
HEPES (pH 7.2)	4μmol
滅菌精製水	残量

5. 試験物質の調製

5.1 被験物質溶液

被験物質をアセトンに用時溶解させて最高濃度の100倍の被験物質溶液を調製し

た。これをさらに溶媒を用いて希釈し、各濃度の100倍の被験物質溶液を調製した。

5.2 被験物質溶液の濃度確認

染色体異常試験に用いた最高及び最低濃度の被験物質溶液について濃度分析を実施し、いずれも所定濃度の $100 \pm 5\%$ 以内であることを確認した（15頁，補足資料参照）。

5.3 陽性対照物質溶液

MMCは局方生理食塩液に $3 \mu\text{g/ml}$ の濃度で用時溶解し、ろ過滅菌した。

BPはDMSOに 4 mg/ml の濃度で溶解し、凍結保存したものを室温で融解して使用した。

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における適切な濃度を決定するために、細胞増殖抑制試験を実施した。

6.1 被験物質濃度

細胞増殖抑制試験に先立ち、代謝活性化法によらない場合の24時間処理と代謝活性化法による場合のS9 Mix共存下について、 $50, 500, 5000 \mu\text{g/ml}$ の3濃度で予備試験を実施した。この試験では1濃度あたり1枚のシャーレを用い処理24時間後に目視で観察した。その結果、いずれの処理条件においても、陰性対照との差は認められなかった。

予備試験の結果を基に、代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合のS9 Mix 共存下について、 $156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 \mu\text{g/ml}$ の6濃度で細胞増殖抑制試験を実施した（細胞増殖抑制試験1）。その結果、代謝活性化法による場合は、いずれの濃度においても細胞増殖を50%以上抑制しなかった。しかし、代謝活性化法によらない場合は、24時間処理では $156 \mu\text{g/ml}$ 、48時間処理では $156, 313 \mu\text{g/ml}$ でそれぞれ細胞増殖が50%以上抑制されたが、これより高い濃度では、50%を超える細胞増殖抑制は認められず、染色体異常試験に用いる適切な濃度を設定することができなかった。このため代謝活性化法によらない場合の24時間処理では $4.9, 9.8, 19.5, 39, 78, 156 \mu\text{g/ml}$ の6濃度、48時間処理では $2.4, 4.9, 9.8, 19.5, 39, 78, 156 \mu\text{g/ml}$ の7濃度で追加試験を実施した（細胞増殖抑制試験2）。

6.2 細胞処理

4×10^3 個/mlの細胞懸濁液を6 cmシャーレに5 ml播き、3日間培養した。

各シャーレから培養液を除去した後、代謝活性化法によらない場合は、細胞を $50 \mu\text{l}$ の被験物質溶液と5 mlの培養液で24時間及び48時間処理した。

代謝活性化法による場合は、細胞を $30 \mu\text{l}$ の被験物質溶液と0.5 mlのS9 Mix

及び 2.5mlの培養液にて6時間処理し、MEM で3回洗浄後新しい培養液 5 mlで更に18時間培養した。

陰性対照も同様に処理した。各濃度あたり2枚のシャーレを用いた。

6.3 細胞数の計測

代謝活性化法による場合は、処理終了後、細胞表面をダルベッコのリン酸緩衝液（ダルベッコ PBS「ニッスイ」；日水製薬株式会社、PBS(-)と略す）で洗浄後、メタノールで10分間固定、3%ギムザ液で10分間染色後、軽く水洗し乾燥した。染色した各シャーレについて単層培養細胞密度計（モノセレーター；オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞増殖の程度を測定した。

代謝活性化法によらない場合は、細胞増殖抑制試験1でモノセレーターを使用したか、24時間及び48時間処理のいずれにおいても標本作製時に細胞内に被験物質が認められ、これがモノセレーターによる計測を妨げる恐れがあったため、細胞増殖抑制試験2の細胞数の計測には血球計算盤を用いた。すなわち処理終了後、細胞表面をPBS(-)で1回洗浄後、0.25%トリプシン溶液（溶媒：PBS(-)）処理後、培養液を加えピペッティングすることにより細胞を剥離し、血球計算盤で細胞数を数えた。

6.4 50%細胞増殖抑制濃度の算出

代謝活性化法によらない場合並びに代謝活性化法による場合のそれぞれについて、陰性対照値を100%として生存曲線を作成した。細胞毒性が認められた場合は、被験物質による50%細胞増殖抑制濃度（TCID₅₀）を求めた。

7. 染色体異常試験

7.1 試験物質濃度

細胞増殖抑制試験の結果、代謝活性化法による場合では、被験物質は 5000 μ g/ml においても、細胞増殖を50%以上抑制しなかった。

代謝活性化法によらない場合では、細胞増殖の抑制が見られ、24時間処理及び48時間処理のTCID₅₀は、81, 55 μ g/mlであった。

これらの結果より、代謝活性化法によらない場合の24時間処理では 25, 50, 100 μ g/ml, 48時間処理では 15, 30, 60 μ g/ml, 代謝活性化法による場合では 1250, 2500, 5000 μ g/mlのそれぞれ3濃度で染色体異常試験を実施した。

陽性対照であるMMC及びBPの濃度は、それぞれ広く使用されている 0.03, 20 μ g/mlと

した。

7.2 細胞処理

代謝活性化法によらない場合は、6.2と同様に処理した。陽性対照(MMC)については、細胞を5mlの培養液と50 μ lのMMC溶液からなる液で同様に処理した。

代謝活性化法による場合のS9 Mix共存下は、6.2と同様に処理した。S9 Mix非共存下の場合、細胞を30 μ lの被験物質溶液と3mlの培養液で処理した。陽性対照(BP)については、S9 Mix共存下の場合、0.5mlのS9 Mixと2.5mlの培養液の混液、またS9 Mix非共存下の場合、3mlの培養液に15 μ lのBP溶液を加えた液を同様に処理した。

陰性対照についても同様に処理した。

7.3 標本作製

標本作製の2時間前に、コルセミドを最終濃度が0.1 μ g/mlとなるように各シャーレに加え、分裂中期の細胞を蓄積させた。細胞表面をPBS(-)で1回洗浄後、トリプシン処理により細胞を剥離し、1000 rpm(最大遠心加速度、170~180g)、5分間遠心分離(以下同様)することにより細胞を集めた。上清を除去し、これに4mlの0.075 M塩化カリウム溶液を加えて低張処理(37 $^{\circ}$ C、15分)を行った。更に、4mlの冷却したメタノール・酢酸(3:1)混合液(カルノア固定液)を加え細胞を固定した。遠心分離後固定液を捨て、新しい固定液を4ml加えた。この操作を3~4回繰り返した。固定終了後、少量の固定細胞懸濁液を調製し、濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスの2箇所(2箇所)に滴下し、乾燥してスライド標本とした。各濃度あたり2枚作製した。これを、1/150 Mリン酸緩衝液(pH 6.8)で希釈した3%ギムザ溶液で20分間染色し、水洗、乾燥後、封入剤で封入して観察標本とした。

7.4 観 察

構造異常及び数的異常について盲検法で観察を行った。

(1) 構造異常

染色体がよく拡がり25 \pm 2本の染色体数をもつ分裂中期像を選び、構造異常の有無を調べた。異常の分類は以下の通りとした¹⁾。

{ 染色体型切断 染色体型交換 染色体型切断 染色体型交換 その他	ギャップ	(染色分体型及び染色体型を含む；gと略す)
	染色体型切断	(ctbと略す)
	染色体型交換	(cteと略す)
	染色体型切断	(csbと略す)
	染色体型交換	(二動原体，環状染色体など；cseと略す)
	その他	(断片化)

ギャップは，染色分体に見られる非染色部分が染色分体の縦軸上にあり，その幅が染色分体の幅以上で著しく離れておらず，非染色部分の形状が明確なものとし，切断とは区別した．1枚のシャーレあたり100個，すなわち各濃度あたり200個の細胞を調べた．

(2) 数的異常

1枚のシャーレあたり100個，すなわち各濃度あたり200個の分裂中期像を調べ核内倍加細胞を含む倍数体細胞数を計数した．

(3) 有糸分裂指数

シャーレあたり1000個，すなわち各濃度あたり2000個の細胞について有糸分裂細胞数を数え，有糸分裂指数を求めた．

7.5 試験結果の判定基準

構造異常については，異常を1個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし，ギャップのみの異常をもつ細胞を除いた場合(-g)と含めた場合(+g)の2通りの方法で集計した．+gの集計値について，陰性対照との間で χ^2 検定を行った．数的異常についても同様に検定を実施した．

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は，ギャップのみを示す細胞を含めた場合の構造異常あるいは数的異常細胞の出現率が5%未満を陰性(-)，5%以上10%未満を疑陽性(±)，10%以上を陽性(+)とした．また，染色体異常の出現頻度を図示した．

結果

1. 細胞増殖抑制試験

結果を図1～3に示す。

代謝活性化法による場合では、被験物質は 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においても細胞増殖を50%以上抑制しなかった。なお、細胞処理時、全処理濃度で培養液中に被験物質が分離した。

代謝活性化法によらない場合は、24時間処理では 156 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、48時間処理では 156, 313 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でそれぞれ細胞増殖が50%以上抑制されたが、これより高い濃度では50%を超える細胞増殖抑制は認められず、染色体異常試験に用いる適切な濃度を設定することができなかった（細胞増殖抑制試験1）。このため、更に濃度を下げて（24時間処理：4.9, 9.8, 19.5, 39, 78, 156 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、48時間処理：2.4, 4.9, 9.8, 19.5, 39, 78, 156 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）追加試験を実施した（細胞増殖抑制試験2）。追加試験の結果、代謝活性化法によらない場合の24時間及び48時間処理は、いずれも細胞増殖の抑制が見られ、 TCID_{50} はそれぞれ 81, 55 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。なお、24時間及び48時間処理のいずれについても、処理終了後の観察において 78～625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で細胞内に被験物質が認められた。

2. 染色体異常試験

結果を表1～3及び図4～7に示す。

代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合のいずれの処理条件においても、被験物質による染色体構造異常あるいは数的異常をもつ細胞の出現率は、5%未満であった。

なお、代謝活性化法によらない場合の48時間処理の 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において、 χ^2 検定の結果、構造異常細胞の出現頻度は陰性対照と比較して有意差が認められた（ $p < 0.05$, 表1）。しかし、出現率が5%未満であるため、染色体異常誘発性は陰性とした。

全処理群の全濃度で、被験物質溶液を培養液に添加した際に培養液表面に油滴状の被験物質の分離が認められた。

なお陽性対照における染色体異常細胞出現頻度の著明な増加は、本試験の試験条件が適切であったことを示すものと考えられる。

結 論

以上の結果より、本試験条件下における フタル酸ジブチルエステル の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と結論した。

参考文献

- 1) 日本環境変異学会・哺乳動物試験分科会 ; “化学物質による染色体異常アトラス”
朝倉書店, 東京, 1988

補足資料

被験物質処理時に、調製した被験物質溶液の濃度確認を実施した。その結果を下表に示す。

単位 : mg/ml		
設定濃度	1.50	500
分析結果	1.46	509
	1.53	497
MEAN	1.50(100)	503(101)

かっこ内は設定濃度に対する割合 (%) を示す。

表 2 染色体異常試験結果 (代謝活性化法による場合)

被験物質名 : フタル酸ジヘブチルエステル

処理	S9 Mixの有無	処理濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	観察細胞数	倍數体數		染色体構造異常細胞(1)の出現數と出現頻度(%)										判(3)
				(%)	檢(2)定	g	ctb	cte	csb	cse	その他	合計	檢(2)定			
				g	ctb	cte	csb	cse	その他	-g	+g	檢(2)定				
陰性対照 (アセトン)	-	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0	2	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	3(1.5)	0	0	
			100	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
			100	0	1	1	1	0	0	0	0	3	3	0	0	
			200	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	4(2.0)	0	0	
被験物質	-	# 1250	100	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0	0		
			100	0	1	2	1	0	0	0	3	4	0	0		
			200	0(0.0)	4(2.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(2.5)	6(3.0)	0	0		
			100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0		
			100	0	1	0	1	0	0	0	2	2	0	0		
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	3(1.5)	0	0		
	# 5000	-	# 1250	100	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	0	0	
				100	1	0	0	1	1	0	0	2	2	0	0	
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
				200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	0	0	
# 2500	+	# 5000	100	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0	0		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	0	0		
			100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0		
			100	0	1	0	1	1	0	0	3	3	0	0		
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	4(2.0)	0	0		
陽性対照 (BP)	-	20	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0		
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1		
			100	0	0	51	70	0	0	0	77	77	0	0		
			100	0	0	34	72	4	1	0	81	81	0	0		
			200	0(0.0)	85(42.5)	142(71.0)	4(2.0)	1(0.5)	0(0.0)	158(79.0)	158(79.0)	0	0	0		

1) ctb: 染色体分型切断, cte: 染色体分型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, その他: 断片化
 2) x2検定を有して有意差を有するものは+gのみ検定; *** (p<0.001), ** (p<0.01), * (p<0.05)
 3) 判定基準 (+gの集計値) 5%未満: 一陰性, 5%以上10%未満: 土疑陽性, 10%以上: +陽性
 S9濃度 (5%), 被験物質処理時間 (6h) 被験物質処理後の細胞回復時間 (18h)
 BP: ベンゾ[a]ピレン
 #: 細胞処理時, 培養液表面に油滴状の被験物質が認められた.

表3 有糸分裂指数

(1)代謝活性化法によらない場合

処 理	処 理 時 間 (h)	処 理 濃 度 ($\mu\text{g/ml}$)	観 察 細 胞 数	有 糸 分 裂 指 数 (%)
陰 性 対 照 (アセトン)	24	0	2000	3.9
フタル酸 ジヘチルエステル	24	25	2000	5.2
	24	50	2000	2.8
	24	100	2000	2.0
陽 性 対 照 (MMC)	24	0.03	2000	4.0
陰 性 対 照 (アセトン)	48	0	2000	6.8
フタル酸 ジヘチルエステル	48	15	2000	7.3
	48	30	2000	6.8
	48	60	2000	5.0
陽 性 対 照 (MMC)	48	0.03	2000	5.4

(2)代謝活性化法による場合

処 理	S9 Mixの 有 無	処 理 濃 度 ($\mu\text{g/ml}$)	観 察 細 胞 数	有 糸 分 裂 指 数 (%)
陰 性 対 照 (アセトン)	+	0	2000	9.4
フタル酸 ジヘチルエステル	+	1250	2000	8.6
	+	2500	2000	8.7
	+	5000	2000	10.4
陽 性 対 照 (BP)	+	20	2000	3.4
陰 性 対 照 (アセトン)	-	0	2000	5.5
フタル酸 ジヘチルエステル	-	1250	2000	4.3
	-	2500	2000	6.5
	-	5000	2000	6.1
陽 性 対 照 (BP)	-	20	2000	7.0

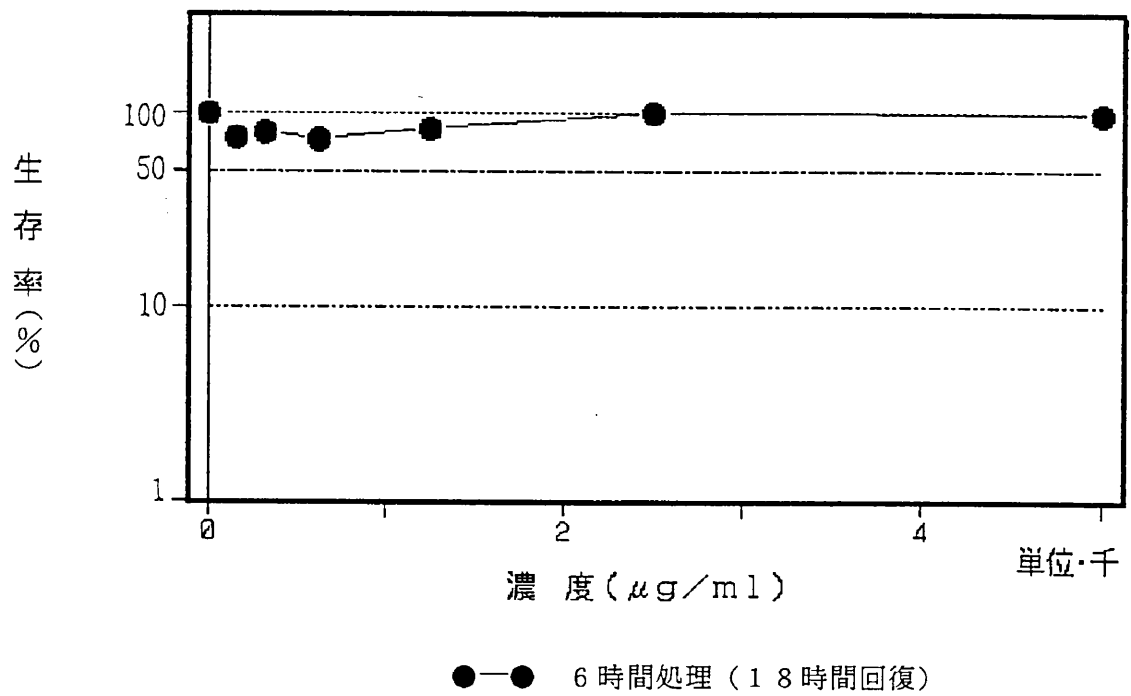


図 1 7-actylphthalic anhydride の細胞毒性 (細胞増殖抑制試験 1)
 (代謝活性化法による場合・モノメーカ-を用いた場合)

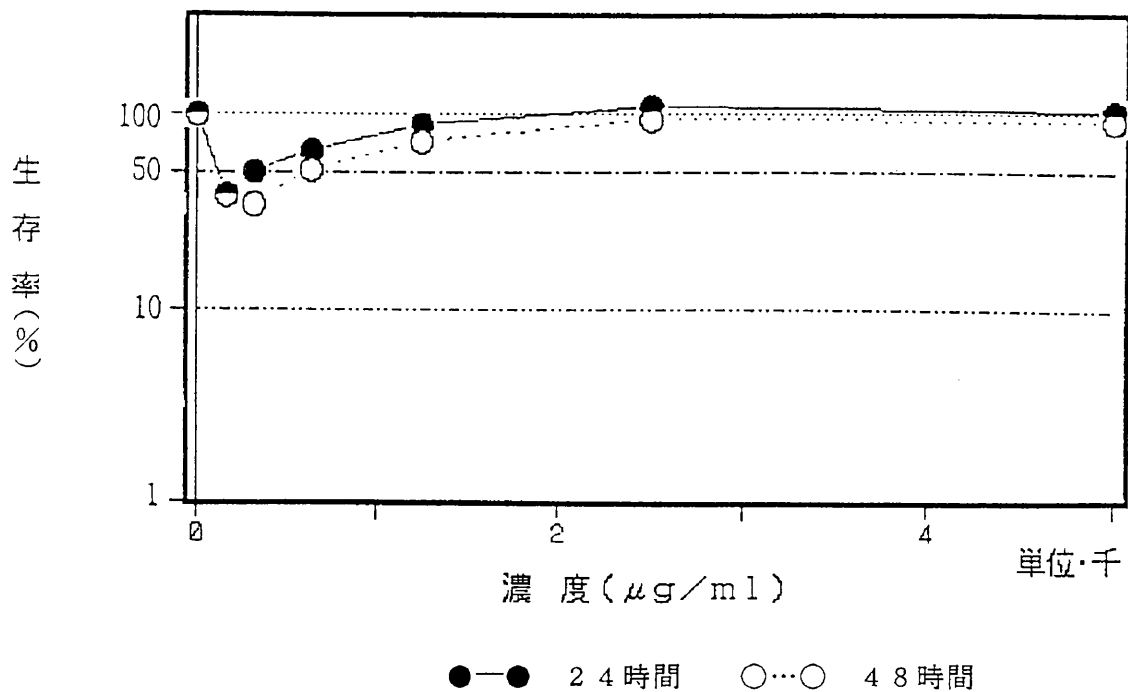


図 2 フタル酸ジエチルエステルの細胞毒性 (細胞増殖抑制試験1)
(代謝活性化法によらない場合・モネレーターを用いた場合)

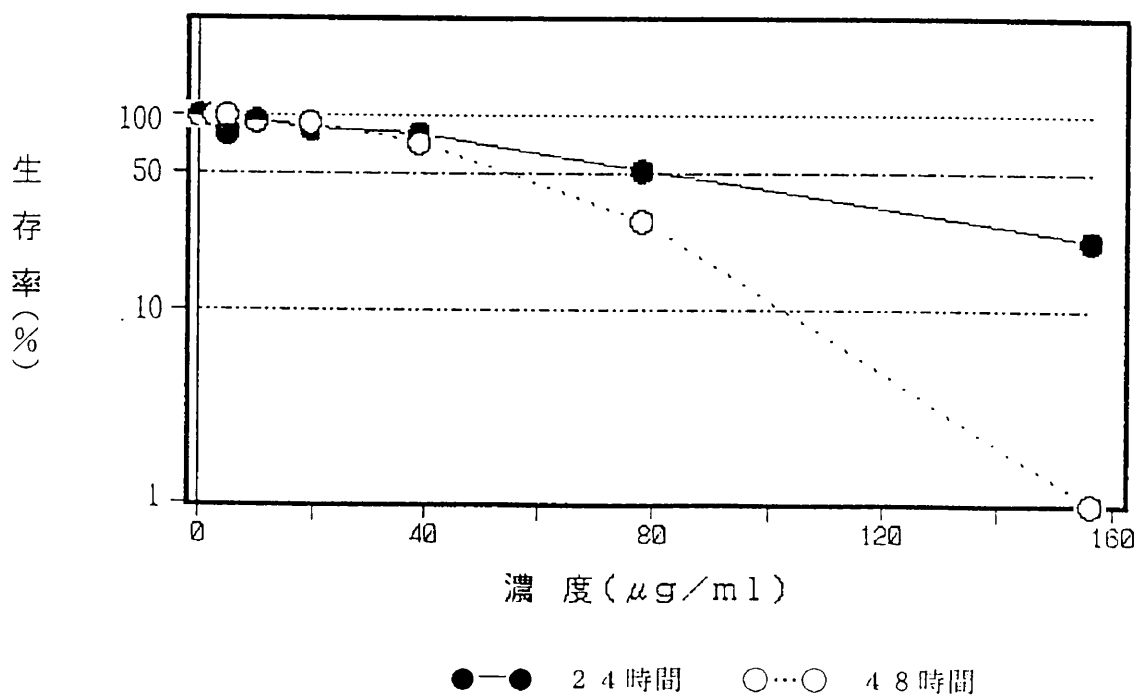


図 3 フタル酸ジエチルエステルの細胞毒性 (細胞増殖抑制試験2)
(代謝活性化法によらない場合・血球計算盤を用いた場合)

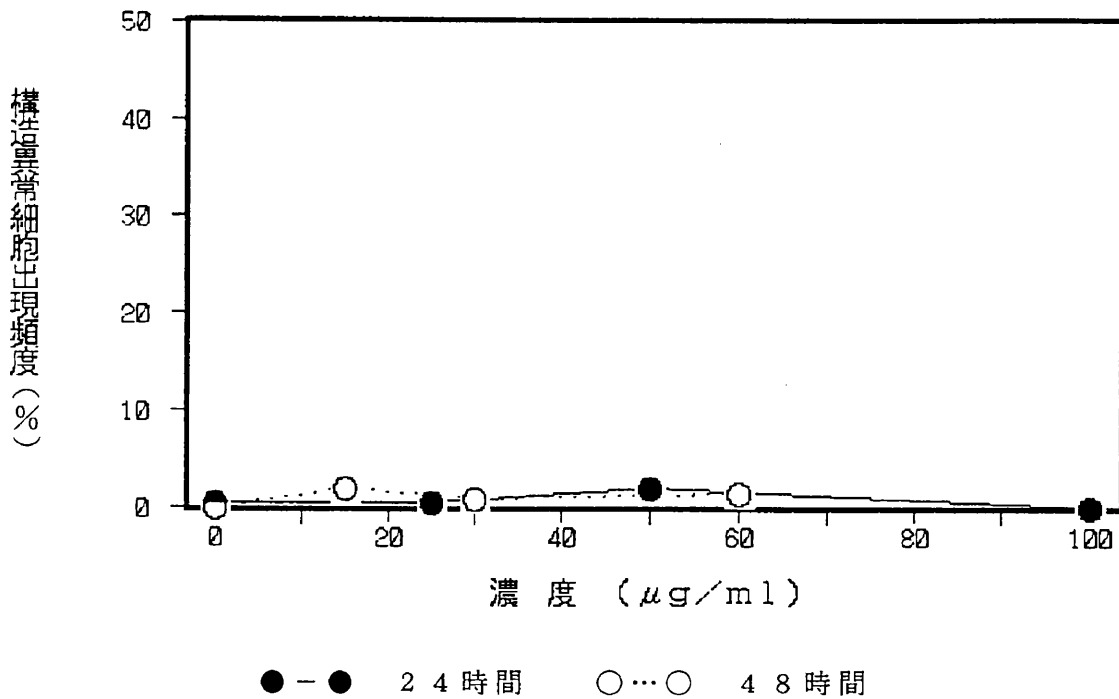


図 4 フタル酸ジ¹⁴C-7-ethyl エステルの構造異常細胞出現頻度 (代謝活性化法によらない場合)

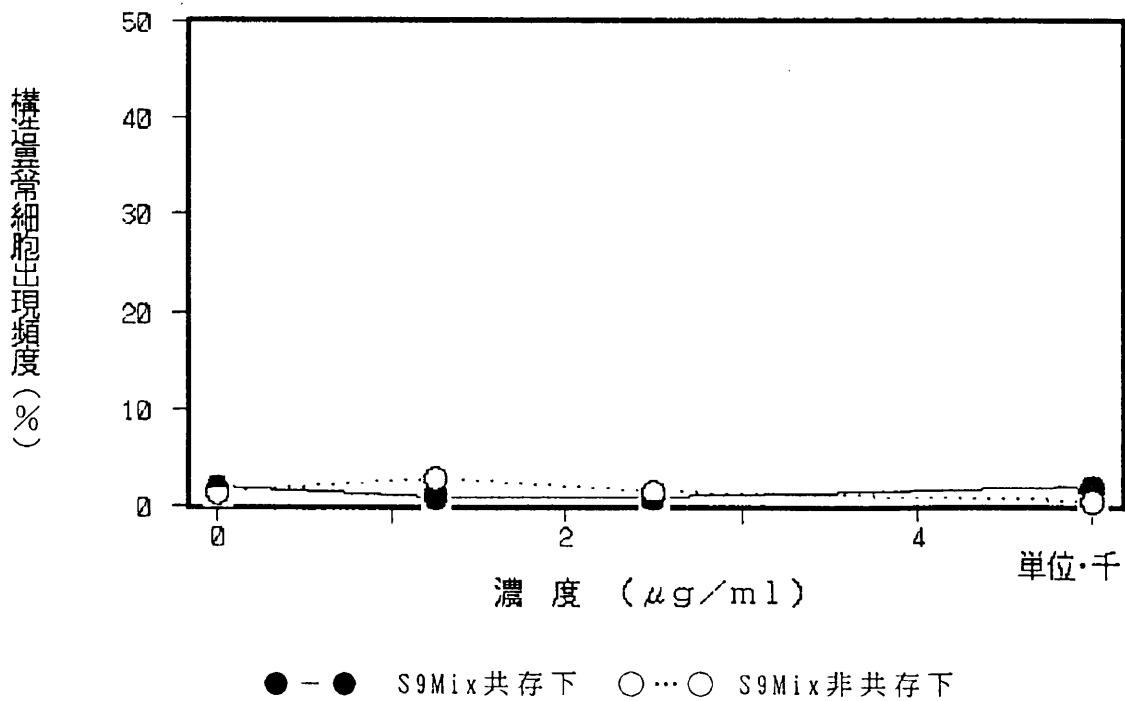


図 5 フタル酸ジ¹⁴C-7-ethyl エステルの構造異常細胞出現頻度 (代謝活性化法による場合)

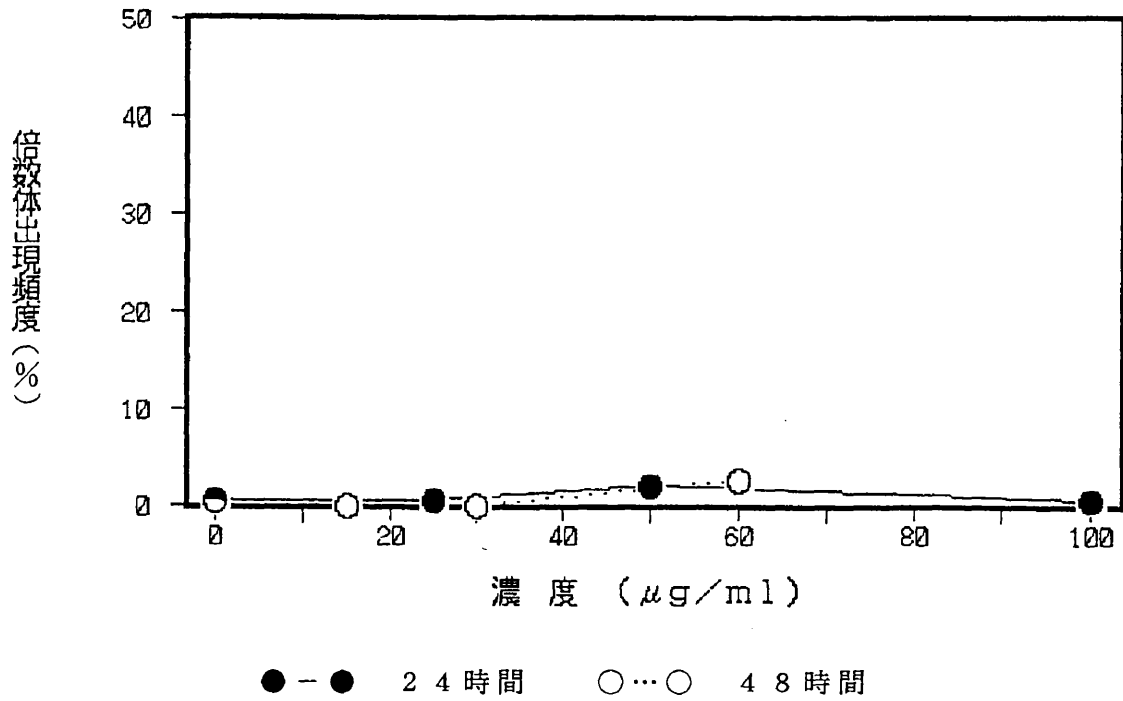


図 6 フタル酸ジ'ハ7'チルエステルの倍数体細胞出現頻度 (代謝活性化法によらない場合)

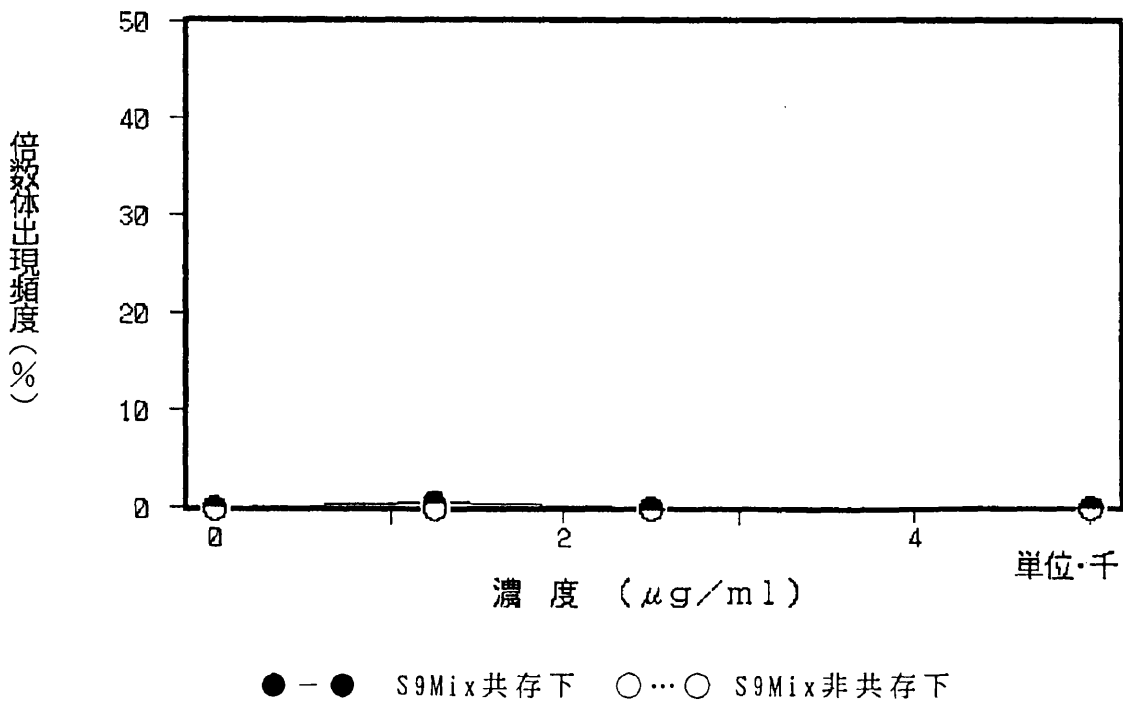


図 7 フタル酸ジ'ハ7'チルエステルの倍数体細胞出現頻度 (代謝活性化法による場合)