二酸化チオ尿素の
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　細胞 ---------- 2

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 ---------- 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

特記事項 ---------- 7

参考文献 ---------- 7

Fig. 1

Table 1、2

[要　　約]

二酸化チオ尿素（TUD）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。

TUD 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 0.29 mg/mL であった。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時間の回復時間）、1.1 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。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）、50%増殖抑制濃度は 0.83 mg/mL であった。

このことから、染色体異常試験では、連続処理（24時間および 48時間処理）においては、50%増殖抑制濃度の約 2倍濃度である 0.60 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 2 で計 5濃度を設定した。S9 mix 存在下で短時間処理する場合は、1.1 mg/mL（10 mM） を最高処理濃度とし、公比 2 で計 4濃度を設定した。また、S9 mix 非存在下で短時間処理する場合は、1.1 mg/mL（10 mM）を最高処理濃度とし、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、24時間および 48時間連続処理においてそれぞれ 0.60 mg/mL および 0.15 mg/mL、短時間処理のS9 mix 存在下および非存在下においてそれぞれ 0.55 mg/mL および 1.1 mg/mL（10 mM）の濃度となったため、これらの濃度を含めて以下計 3濃度を観察対象とした。

染色体分析の結果、TUD は 48時間連続処理を除く全ての処理系列の最高濃度において、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、連続処理およびS9 mix非存在下での短時間処理があり、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、TUD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）。

2　被験物質および陽性対照物質

被験物質であるTUD（CAS No. 4189-44-0）の物理化学的性状等はAppendix 1に示した。TUDは　　から提供された後、防湿で室温遮光保管し、使用のつど局方注射用水（大塚製薬工場、ロット番号：K7G78）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：147AFK）は用時調製とし、局方注射用水（大塚製薬工場、ロット番号：K7G78）に溶解して用いた。

3　S9反応液

S9（キッコーマン、ロット番号：RAA-367、1997年8月製造およびロット番号：RAA-376、1998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8および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）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と被験物質調製液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（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培地に2倍濃度MEM培地（被験物質調製液の添加量と等量）を混合したものを使用した。

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。

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 5 mL 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 培地を用いた以外の操作は、S9 mix 存在下の処理群と同様に行った。

全ての処理系列において、0.034 ～ 1.1 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

TUD は細胞増殖抑制試験の連続処理および S9 mix 非存在下の短時間処理において、CHL/IU 細胞の増殖を抑制した（Fig. 1）。また、50%増殖抑制濃度は、連続処理では 0.29 mg/mL、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合は 0.83 mg/mL であった。一方、S9 mix 存在下で短時間処理した場合は、最高処理濃度である 1.1 mg/mL（10 mM）においても50%を越える増殖抑制は認められなかった（Fig. 1）。

このことから染色体異常試験において、連続処理では、50%増殖抑制濃度の 2倍濃度付近を最高処理濃度とし、短時間処理では 1.1 mg/mL（10 mM）を最高処理濃度として以下公比 2 で各濃度を設定した（連続処理：0.038、0.075、0.15、0.30、0.60 mg/mL、S9 mix 存在下の短時間処理：0.14、0.28、0.55、1.1 mg/mL、S9 mix 非存在下の短時間処理：0.069、0.14、0.28、0.55、1.1 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。また、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。連続処理では 24時間と 48時間の被験物質処理群を設け、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。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を設けた。

陽性対照群については、MC を新鮮培地 5 mL に最終濃度が 0.05 μg/mL となるように添加した。また、CPA を S9 反応液および MEM 培地 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）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 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、細胞増殖率の測定結果と分裂指数により、観察対象とする 3濃度群を決定した。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た。

6　染色体分析

細胞増殖率の測定結果と分裂指数（Tables 1 and 2）により、24時間および 48時間連続処理においてはそれぞれ 0.60 mg/mL および 0.15 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。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 0.55 mg/mL および 1.1 mg/mL（10 mM）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。染色体分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会（MMS）[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。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、有意水準を 1%として有意差検定を実施した。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、生物学的な観点からの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]

24時間連続処理および S9 mix 存在下および非存在下で短時間処理した場合、観察対象とした最高濃度において、TUD は染色体の構造異常を誘発した（Tables 1 and 2）。一方、48時間処理については染色体の構造異常の増加は認められなかった（Table 1）。このことについては、TUD で長時間（48時間）の連続処理を実施した場合、24時間連続処理よりも強い細胞毒性または細胞分裂抑制作用が認められたことから、傷害を有する細胞は淘汰されたためと考えられる。

倍数性細胞については、短時間処理の S9 mix 存在下においてのみ傾向性検定で有意（$p< 0.01$、Table 2）となったが、最高濃度（0.55 mg/mL）における出現頻度は 1.00%と低く、フィッシャーの直接確率法においては有意（$p<0.01$、Table 2）ではないことから、陰性と判定した。なお、本試験と並行して実施された細菌を用いる復帰突然変異試験において、TA1535 を用いた場合、S9 mix 存在下および非存在下で変異原活性が認められている（食薬セ研第 9-1936 号）。

また、TUD の関連物質である尿素（urea）については、染色体の構造異常を誘発することが報告されている[4]。通常化学物質によって誘発される構造異常は染色分体交換が主であるが、TUD は尿素と同様に交換型異常よりも染色分体切断を高率に誘発した。

一方、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:「改訂増補　染色体異常試験データ集」, 株式会社エル・アイ・シー, 東京 (1987)

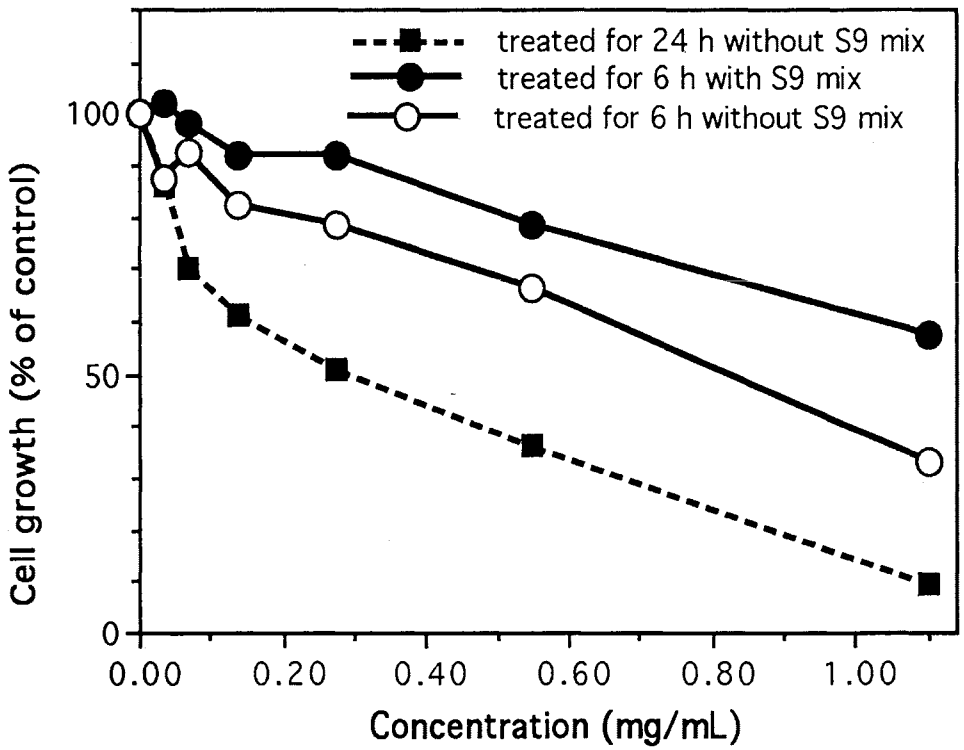

Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with thiourea dioxide

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with thiourea dioxide (TUD)** without S9 mix

Group	Concen-tration (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]		Concurrent[6] cytotoxicity (%)	Mitotic[7] index (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Non-treatment			200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00			——	——
Solvent[1]	0	24	200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			100.0	——
TUD	0.15	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			65.5	——
TUD	0.30	24	200	0	3	4	0	0	0	7	0	5 (2.5)	5 (2.5)	0.25	+	−	55.0	4.9
TUD	0.60	24	200	5	73	54	5	0	0	137	0	78 *(39.0)	77 *(38.5)	0.00			32.0	2.8
MC	0.00005	24	200	8	33	133	2	0	0	176	0	113 *(56.5)	110 *(55.0)	0.00			——	——
Solvent[1]	0	48	200	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25			100.0	——
TUD	0.038	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			81.5	——
TUD	0.075	48	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	−	−	70.5	——
TUD	0.15	48	200	0	2	1	1	0	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.13			59.0	2.3
TUD	0.30 ***	48	——											——			44.5	0.5
TUD	0.60 ***	48	——											——			19.0	——
MC	0.00005	48	200	2	68	228	7	9	10	324	5	135 *(67.5)	133 *(66.5)	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, 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 $p<0.01$. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7) Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. * : Significantly different from solvent control at $p<0.01$ by Fisher's exact probability test. ** : Purity was 99.7 wt%. *** : 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) treated with thiourea dioxide (TUD)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations: gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total	Others[3]	No. of cells with aberrations: TAG (%)	TA (%)	Polyploid[4] (%)	Trend test[5]: SA	NA	Concurrent[6] cytotoxicity (%)	Mitotic[7] index (%)
Non-treatment				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			——	——
Solvent[1]	0	−	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13			100.0	——
TUD	0.28	−	6 - (18)	200	0	1	3	2	0	0	6	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.13			83.5	——
TUD	0.55	−	6 - (18)	200	0	1	3	0	0	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.38	+	−	72.0	10.2
TUD	1.1	−	6 - (18)	200	12	135	76	0	0	10	233	0	104 *(52.0)	100 *(50.0)	0.13			35.5	1.5
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	3	0	4	0	0	7	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.25			100.0	——
TUD	0.14	+	6 - (18)	200	0	1	3	0	0	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00			94.0	——
TUD	0.28	+	6 - (18)	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	+	+	90.0	——
TUD	0.55	+	6 - (18)	200	0	12	12	0	0	0	24	0	15 *(7.5)	15 *(7.5)	1.00			82.5	7.1
TUD	1.1 ***	+	6 - (18)	——											——			52.5	0.6
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	5	20	36	0	1	0	62	0	53 *(26.5)	50 *(25.0)	0.25			——	——

Abbreviations, gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring), 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 $p<0.01$. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7) Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. * : Significantly different from solvent control at $p<0.01$ by Fisher's exact test. ** : Purity was 99.7 wt%.
*** : Chromosome analysis was not performed because there was small number of metaphase due to cytotoxicity.