八

2,2,4,4,6,8,8-
ヘプタメチルノナン
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
材料および方法	3
1．使用した細胞	3
2．培養液の調製	3
3．培養条件	3
4．被験物質	3
5．被験物質の調製	4
6．細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定	4
6.1 試験条件	4
6.2 標本作製法	5
6.3 増殖抑制の指標とその結果	5
7．実験群の設定	6
7.1 直接法	6
7.2 代謝活性化法	7
8．染色体標本作製法	7
9．染色体分析	8
10．記録と判定	9
結果と考察	10
結　論	11
文　献	11

Tables 1～4, Figure 1

要　約

2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンの染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL）を用いて検討した。結果は、以下のように要約される。

1）細胞増殖抑制試験

直接法および代謝活性化法のいずれの処理濃度群（0.02～2.00 mg/mℓ）においても、50%をこえる増殖抑制作用は観察されなかった。

従って、染色体異常試験において、直接法、代謝活性化法ともに 10 mM に相当する 2.26 mg/mℓ の処理濃度を高濃度とし、その½の濃度を中濃度、¼の濃度を低濃度として用いた。

2）染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間および48時間処理した結果、いずれの濃度においても染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。但し、48時間処理の高濃度群では分裂抑制のため染色体分析が不可能であった。また、代謝活性化法においても、S9mix 存在下および非存在下のいずれの処理条件においても、染色体異常の誘発作用は認められなかった。

3）結　論

2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンは、今回実施した試験条件下で、試験管内の CHL細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

緒　　言

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、日本が独自に選定した既存化学物質の１つである、2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL）を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

この試験は、「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ガイドライン：473に準拠し、化学物質 GLP（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ものである。

材料および方法

1．使用した細胞

リサーチ・リソースバンク（JCRB）から入手（1988年２月、入手時：継代４代）したチャイニーズ・ハムスター由来の CHL細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

この CHL細胞株は、染色体異常試験の検出感度にすぐれているため常用されている。

2．培養液の調製

培養には、牛胎児血清（FCS; J.R.Scientific、ロット番号 C019407）を10%添加したイーグル MEM培養液を用いた。MEM培養液は、イーグル MEM培地「ニッスイ」①粉末（日水製薬㈱）9.4ｇを１ℓの蒸留水に溶解し、121℃で15分間、高圧蒸気滅菌したのち、L-グルタミン（滅菌済み、日水製薬㈱）300 mg と10 % $NaHCO_3$ 溶液 12.5 mℓ を加えて調製した。２倍濃度の MEM培養液は、上記の培地 9.4ｇを 500 mℓ の蒸留水に溶解し、以下 MEM培養液と同様に調製した。

3．培養条件

2×10^4個の CHL細胞を、培養液５mℓを入れたシャーレ（径６cm、Corning）に播き、37℃の CO_2インキュベーター（５% CO_2）内で培養した。

4．被験物質

2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナン（CAS No.：4390-04-9，略号：HMN，ロット番号：　　）は無色透明の液体で、アセトンに約 500 mg/mℓ まで可溶で、水には溶けない。分子式 $C_{16}H_{34}$、分

子量 226.45、沸点 240℃、比重 0.78 の物質で、純度は 99.9%である（

）。本実験では被験物質がアセトンに可溶であることから、溶媒としてアセトンを用いた。原体の安定性に関しては情報は得られなかったが、秦野研究所分析化学研究室で実施したエームス試験（試験計画番号：M-91-182）における溶媒中での安定性試験では、3～460 mg/mℓ の濃度範囲で3時間は安定であった。

5．被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。原体をアセトン（和光純薬工業㈱、ロット番号：DCK1899）に溶解して原液（400 または 452 mg/mℓ）を調製し、ついで原液をアセトンで順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、全ての試験において培養液の 0.5%(v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内（平均含量が添加量の85%以上）の値であった（Appendix 1）。

6．細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

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。

6.1　試験条件

直接法では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、シャーレに培養液 5.0 mℓ と各濃度の被験物質調製液 25 μℓ を加え、48時間処理した。代謝活性化法においては、細胞を4日間培養したのち培養液を捨て、シャーレに、MEM培養液 2.0 mℓ、S9mix（組成を以下に示す）0.5 mℓ と2倍濃度の MEM培養液 0.5 mℓ を加え、

更に 15 μℓ の被験物質調製液を加えて6時間処理した。処理後、新鮮な培養液に交換し、更に18時間培養した。処理濃度は、HMNのアセトン中での溶解性と処理液中での性状（白濁して浮遊する）を考慮し、増殖抑制試験では直接法、代謝活性化法ともに培養液中での最終濃度が 0.02～2.00 mg/mℓ の範囲で試験を行った。

シャーレは1濃度について2枚用いた。

S9mix の組成

S9*	3
20 mM HEPES (pH 7.2)	2
50 mM $MgCl_2$	1
330 mM KCl	1
50 mM G-6-P	1
40 mM NADP	1
蒸留水	1
Total	10 mℓ

* S9 : 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調製したキッコーマン㈱製の S9（ロット番号:RAA-254, 1991年5月製造および RAA-260, 1991年9月製造）を購入し、使用時まで－80℃の超低温槽内に保存した。製造後6か月以内に使用した。

6.2　標本作製法

培養終了後、培養液を捨てたのち、リン酸緩衝液（Ca^{++}, Mg^{++}を含む）で洗い、細胞がシャーレに付着した状態で10%中性ホルマリン溶液を加えて固定した。固定後、0.1%クリスタルバイオレットで染色した。

6.3　増殖抑制の指標とその結果

被験物質の CHL細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（オリンパス）を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞

増殖の比をもって指標とした。

その結果、直接法、代謝活性化法ともに、処理した濃度範囲（0.02～2.00 mg/mℓ）において50%をこえる増殖抑制は観察されなかったが、直接法の 2.00 mg/mℓ 処理群では約44%の増殖抑制がみられた（Tables 1、2 および Fig. 1）。

7．実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果と化審法ガイドラインに定める最高濃度である 10 mM（2.26 mg/mℓ）の値を考慮し、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、直接法、代謝活性化法ともに 2.26 mg/mℓ とし、それぞれ高濃度群の½の濃度を中濃度、¼の濃度を低濃度とした。

7.1 直接法

直接法での試験条件は、細胞増殖抑制試験と同様にした。3段階の処理濃度群に対照群を含め下記の11群を設け、各群2枚のシャーレを用いた。

群	濃度（mg/mℓ）	処理時間(hours)
1）無処理対照	—	—
2）溶媒対照*	0	24
3）HMN	0.57	24
4）HMN	1.13	24
5）HMN	2.26	24
6）陽性対照(MC)**	0.00005	24
7）溶媒対照*	0	48
8）HMN	0.57	48
9）HMN	1.13	48
10）HMN	2.26	48
11）陽性対照(MC)**	0.00005	48

* 溶媒はアセトンを用い、培養液に 0.5%（v/v）量添加した。

** MC：Mitomycin C（協和醗酵工業㈱、ロット番号 664-AIK）は注射用蒸留水（㈱大塚製薬工場、ロット番号 K1D79）に溶解して調製した。この処理濃度で染色体異常を誘発することが知られている。

7.2 代謝活性化法

代謝活性化法での試験条件は、細胞増殖抑制試験と同様にした。対照群として S9mix を加えない群を含め、下記の11群を設け、各群2枚のシャーレを用いた。

群	濃度 (mg/mℓ)	S9mix の有無	処理時間(hours)
1) 無処理対照	—	—	—
2) 溶媒対照*	0	−	6-(18)
3) HMN	0.57	−	6-(18)
4) HMN	1.13	−	6-(18)
5) HMN	2.26	−	6-(18)
6) 陽性対照(CPA)**	0.005	−	6-(18)
7) 溶媒対照*	0	+	6-(18)
8) HMN	0.57	+	6-(18)
9) HMN	1.13	+	6-(18)
10) HMN	2.26	+	6-(18)
11) 陽性対照(CPA)**	0.005	+	6-(18)

* 溶媒はアセトンを用い、培養液に 0.5% (v/v) 量添加した。
** CPA : Cyclophosphamide (Sigma, ロット番号 67F- 0155) は注射用蒸留水 (㈱大塚製薬工場、ロット番号 K1D79) に溶解して調製した。この処理濃度で染色体異常を誘発することが知られている。

8. 染色体標本作製法

1) 培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約 0.1 μg/mℓ になるように培養液に加え、培養終了後各群の細胞をリン酸緩衝液 (Ca^{++}, Mg^{++}を含まない) で洗い、0.25%トリプシン溶液を用いてはがし、10 mℓ の遠沈管に集めた。

2) 1,000～1,200 rpm で5分間遠沈し、上清を捨てたのち沈澱した細胞に3 mℓの 0.075M KCl 溶液を加えることにより約30分間低張処理を行った。

3) 低張処理後、低張液の上層にカルノア液 (酢酸：メタノール＝1：3 v/v)

約6 mlを加え、下方から静かにピペッティングして混和させて固定し、その後 1,000～1,200 rpm で5分間遠沈した。

4）遠沈後上清を除き、再び新鮮なカルノア液を加えて細胞をピペッティングにより再浮遊させ 1,000～1,200 rpm で5分間遠沈した。この操作を数回繰り返した。

5）遠沈して得た白色の細胞沈澱物に、0.2～0.5 ml のカルノア液を加え十分に懸濁させた。

6）細胞浮遊液の少量を、あらかじめ洗浄しておいたスライドグラス上に滴下し、そのまま風乾した。

7）スライド標本は各シャーレにつき6枚作製した。

8）スライドグラスのフロスト部分に鉛筆で、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。

9）乾燥したスライドは、ギムザ原液（Merck）4.5 ml を M/15 リン酸緩衝液（pH 6.8）150 ml に溶かした染色液で約8分間染色後、蒸留水で軽くすすいで風乾した。

10）染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

9．染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのシャーレから得られた異なる標本を、複数の観察者がそれぞれブラインドの状態で分析した。すなわち、染色体が重ならず適度に広がった分裂中期像を探し、異常を有する細胞については、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で記録用紙に記録した。

染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験（MMS）分科会[1]による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換など

の構造異常の有無と倍数性細胞（polyploid）の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの"Exact probability test"法により溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定を行った。

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら[2)]の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が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。

結果と考察

直接法による染色体分析の結果を Table 3 に示した。

ＨＭＮを加えて24時間および48時間処理した各群において、48時間処理の高濃度群を除き、いずれも染色体の構造異常の出現頻度に有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。また、倍数性細胞についても同様に有意な増加はみられなかった。48時間処理の高濃度群では、分裂抑制のため観察可能な分裂中期細胞が得られなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果を Table 4 に示した。

ＨＭＮを加えて S9mix 存在下および非存在下で６時間処理した各濃度群において、いずれも染色体の構造異常および倍数性細胞の有意な増加は認められず、全ての処理群で陰性であった。

陽性対照として用いた直接法での MC 処理群、および S9mix 存在下での CPA 処理群では染色分体交換（cte）や染色分体切断（ctb）などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

なお、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及び試験計画書からの逸脱はなかった。

結　　論

2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンは、直接法の24時間および48時間処理によるいずれの試験においても、CHL細胞に染色体の構造異常と倍数性細胞を誘発しなかった。また、代謝活性化法の6時間処理による各処理群においても、同様に染色体異常誘発作用は認められなかった。

従って、2,2,4,4,6,8,8-ヘプタメチルノナンは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

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 1988

2) 石館　基　監修：＜改訂＞染色体異常試験データ集，エル・アイ・シー社，1987

Table 1 Inhibition of cell growth treated with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (HMN) for 48 hours by direct method in CHL cells

Concentration of HMN (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0.00	100,	100	100.0
0.02	89,	95	92.0
0.03	97,	97	97.0
0.06	101,	83	92.0
0.13	90,	83	86.5
0.25	93,	81	87.0
0.50	87,	91	89.0
1.00	105,	83	94.0
2.00	53,	59	56.0

Cell growth was counted by Monocellater ™ (OLYMPUS)

Table 2 Inhibition of cell growth treated with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (HMN) for 6 hours by metabolic activation method in CHL cells

Concentration of HMN (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0.00	100,	100	100.0
0.02	104,	101	102.5
0.03	104,	94	99.0
0.63	104,	99	101.5
0.13	112,	91	101.5
0.25	106,	93	99.5
0.50	101,	101	101.0
1.00	107,	94	100.5
2.00	103,	107	105.0

Cell growth was counted by Monocellater TM (OLYMPUS)

Table 3 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (HMN) by direct method

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Judgement[5]	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00		
Solvent[1]	0	24	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
HMN	0.57	24	200	0	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25	−	−
HMN	1.13	24	200	2	1	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.13	−	−
HMN	2.26	24	200	3	0	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	0 (0.0)	0.25	−	−
MC	0.00005	24	200	15	114	158	5	1	9	20	322	1	139 *(69.5)	137 *(68.5)	0.25	+	−
Solvent[1]	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		
HMN	0.57	48	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	−	−
HMN	1.13	48	200	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	−	−
HMN	2.26	48	0													tox	tox
MC	0.00005	48	200	15	102	237	6	8	12	120	500	4	152 *(76.0)	151 *(75.5)	0.38	+	−

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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. tox: toxicity was observed. 1) Acetone was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. were scored as 10. 4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). * : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$

Table 4 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (HMN) by metabolic activation method

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Judgement[5]	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.75		
Solvent[1]	0	−	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.50		
HMN	0.57	−	6 - (18)	200	1	2	0	0	0	0	0	3	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25	−	−
HMN	1.13	−	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38	−	−
HMN	2.26	−	6 - (18)	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.00	−	−
CPA	0.005	−	6 - (18)	200	1	2	0	0	2	0	0	5	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	−	−
Solvent[1]	0	+	6 - (18)	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38		
HMN	0.57	+	6 - (18)	200	0	2	0	0	0	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	−	−
HMN	1.13	+	6 - (18)	200	1	2	0	0	0	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	−	−
HMN	2.26	+	6 - (18)	200	0	2	0	0	0	1	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	−	−
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	16	51	116	2	2	9	0	196	3	116*(58.0)	113*(56.5)	0.38	+	−

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), 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) Acetone was used as solvent. 2) More than ten 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 analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).
* : Significantly different from solvent control at $p<0.05$

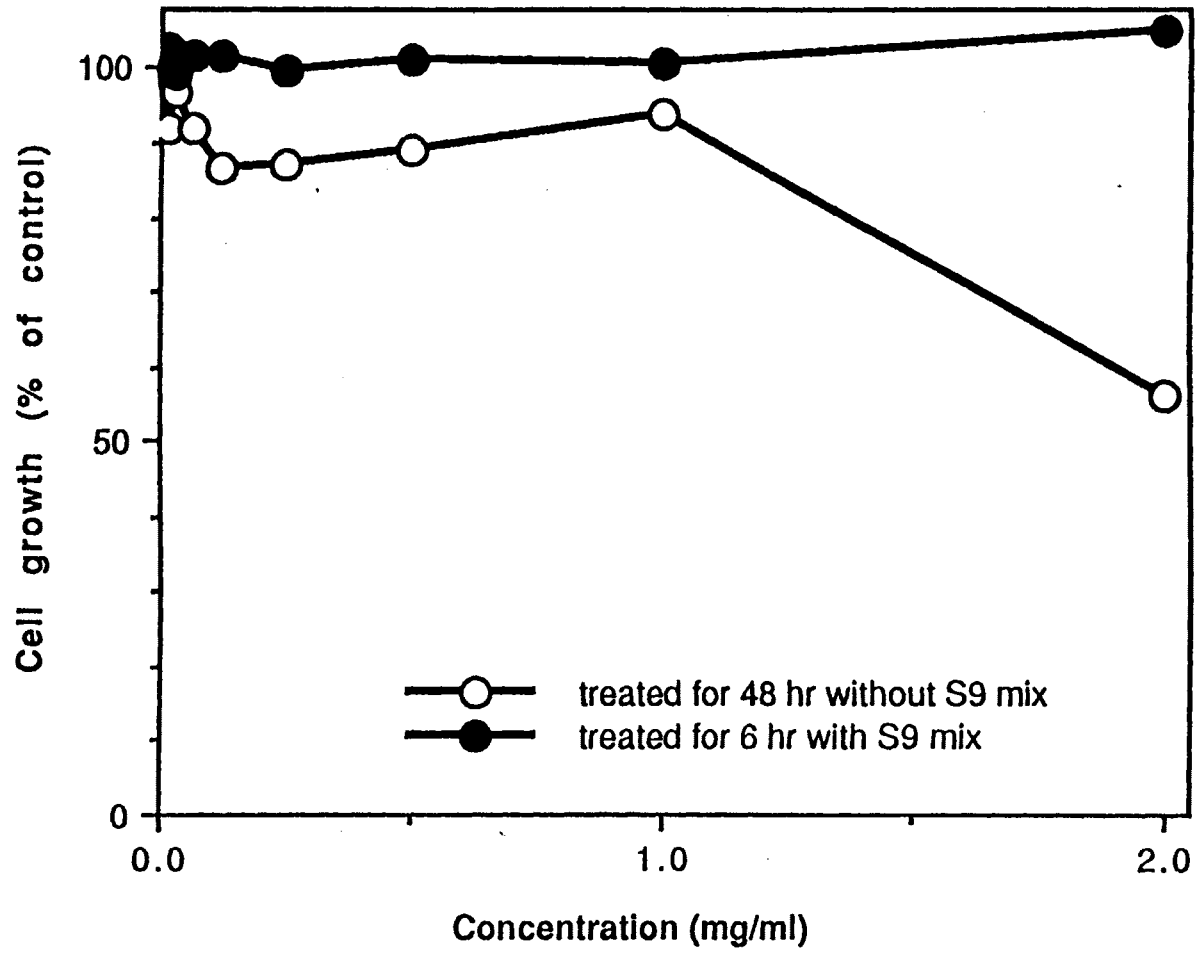

Fig. 1 Inhibition of cell growth treated with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane in CHL cells