



1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンの  
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、2

Table 1、2

## [要 約]

1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼン (CCMB) 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。

CCMB 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 0.011 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)、50%増殖抑制濃度はそれぞれ 0.12 mg/mL および 0.011 mg/mL であった。

上記の細胞増殖抑制試験の結果から、染色体異常試験における連続処理 (24時間および 48時間処理) および S9 mix 非存在下の短時間処理では、50%増殖抑制濃度の約 2倍濃度である 0.020 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においても、50%増殖抑制濃度の約 2倍濃度である 0.20 mg/mL 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、連続処理および S9 mix 非存在下の短時間処理において、0.010 mg/mL の濃度となり、S9 mix 存在下で短時間処理した場合は 0.10 mg/mL 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、CCMB は S9 mix 存在下の短時間処理において、染色体の構造異常および倍数性細胞を誘発した。また、24時間連続処理した場合も倍数性細胞の誘発が認められた。

## [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。

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、CCMB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<sub>2</sub>インキュベーター

(5% CO<sub>2</sub>、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 CCMB (CASNo. 611-19-8) の物理化学的性状等は Appendix 1 に示した。CCMB は から提供された後、室温保管し、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：DLF7049、TPG6738) 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、局方注射用水 (大塚製薬工場、ロット番号：K7G78) 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-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<sup>+</sup>、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<sub>2</sub> 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<sup>+</sup>、0.83 mM MgCl<sub>2</sub>、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/TU 細胞を 0.25% トリプシンを用いてはがした後、4×10<sup>3</sup> 個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL (2×10<sup>4</sup> 個) をガラスディッシュ (直径 6 cm、池本理化) に播種して 3 日間培養した。なお、被験物質調製液はプラスチックディッシュを溶解す

るため、本試験においてはガラスディッシュを使用した。

連続処理では、新鮮培地 5 mL と培地交換した後、被験物質調製液を 25  $\mu$ L 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 3 mL と培地交換した後、被験物質調製液を 15  $\mu$ L ずつ添加し 6 時間処理した。リン酸緩衝塩類溶液 ( $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  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。

24 時間連続処理および 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。また、S9 mix 存在下における短時間処理では、0.050 ~ 1.6 mg/mL (10 mM) の濃度範囲で処理した。培養終了後、0.02% EDTA 含有リン酸緩衝塩類溶液 ( $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  を含まない) により細胞をはがした。その細胞懸濁液 1 mL を等張性血球計算用希釈液 (アイソトン<sup>®</sup>II、コールター) 9 mL に加え、コールターカウンター (Model D、Coulter Electronics Ltd.) を用いてディッシュあたりの細胞数を計測した (1 ディッシュあたり 2 回計測し、それらの平均値を細胞数とした)。そして処理群の溶媒対照群に対するディッシュあたりの細胞数の比を求め、CCMB による細胞増殖抑制作用の指標とした。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

CCMB は細胞増殖抑制試験の全ての処理系列において、CHL/IU 細胞の増殖を抑制した (Fig. 1、2)。また、50% 増殖抑制濃度は、24 時間連続処理および S9 mix 非存在下で短時間処理した場合はともに 0.011 mg/mL となった。また、S9 mix 存在下で短時間処理した場合は 0.12 mg/mL であった。

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、以下公比 2 で各濃度を設定した (連続処理および S9 mix 非存在下の短時間処理: 0.0013、0.0025、0.0050、0.010、0.020 mg/mL、S9 mix 存在下の短時間処理: 0.013、0.025、0.050、0.10、0.20 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 2 枚のディッシュを用い、コールターカウンターによる細胞増殖率測定と染色体標本

作製を行った。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（新鮮培地と交換）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。

培養終了の2時間前に、コルセミド（和光純薬工業）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、Dulbeccoのリン酸緩衝塩類溶液（0.02% EDTA含有、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>不含）をディッシュあたり5 mL加えて細胞をはがし、15 mLの遠沈管に集めた。処理群と溶媒対照群については、その細胞懸濁液0.5 mLを等張性血球計算用希釈液9 mLに加え、コールターカウンターを用いて細胞増殖率の測定を行った。残りの細胞懸濁液は、染色体標本作製のために遠沈した（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観察対象外とし、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。

細胞増殖率の測定結果と分裂指数（Table 1、2）により、連続処理およびS9 mix非存在

下における短時間処理においては 0.010 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、S9 mix 存在下における短時間処理では、0.10 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。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)<sup>1)</sup> 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<sup>2)</sup> により、有意水準を 1% として有意差検定を実施した。また、コ克蘭・アーミテッジの傾向性検定<sup>3)</sup> ( $p < 0.01$ ) 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]

S9 mix 存在下で短時間処理した場合、CCMB は 0.10 mg/mL の濃度 (観察対象とした最高濃度) において、染色体の構造異常 (gap を含む出現頻度: 13.0%) および倍数性細胞 (出現頻度: 2.88%) を誘発した (Table 2)。加えて、24 時間連続処理の 0.010 mg/mL の濃度 (観察対象とした最高濃度) においても倍数性細胞は増加した (出現頻度: 3.38%、Table 1)。その他の処理系列において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。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は、TA100 を用いた場合、S9 mix 非存在下で疑陽性の結果が得られている (食薬セ研第 9-1935 号)。

また、CCMB の関連物質である 1,4-dichloro-2-nitrobenzene および 2-chloro-4-nitroaniline 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<sup>4)</sup>。特に前者は、本試験結果と同様に、S9 mix 存在下で短時間処理した場合についてのみ、染色体の構造異常が誘発されている<sup>4)</sup>。加えて、1, 4-dichloro-2-nitrobenzene における染色体の構造異常出現頻度の最高値は 17.0% と報告されており<sup>4)</sup>、本試験結果 (最高出現頻度: 13.0%) と同程度であることから、1, 4-dichloro-2-nitrobenzene と CCMB の両物質は、CHL/IU 細胞に対する作用



様式が類似していることが示唆された。

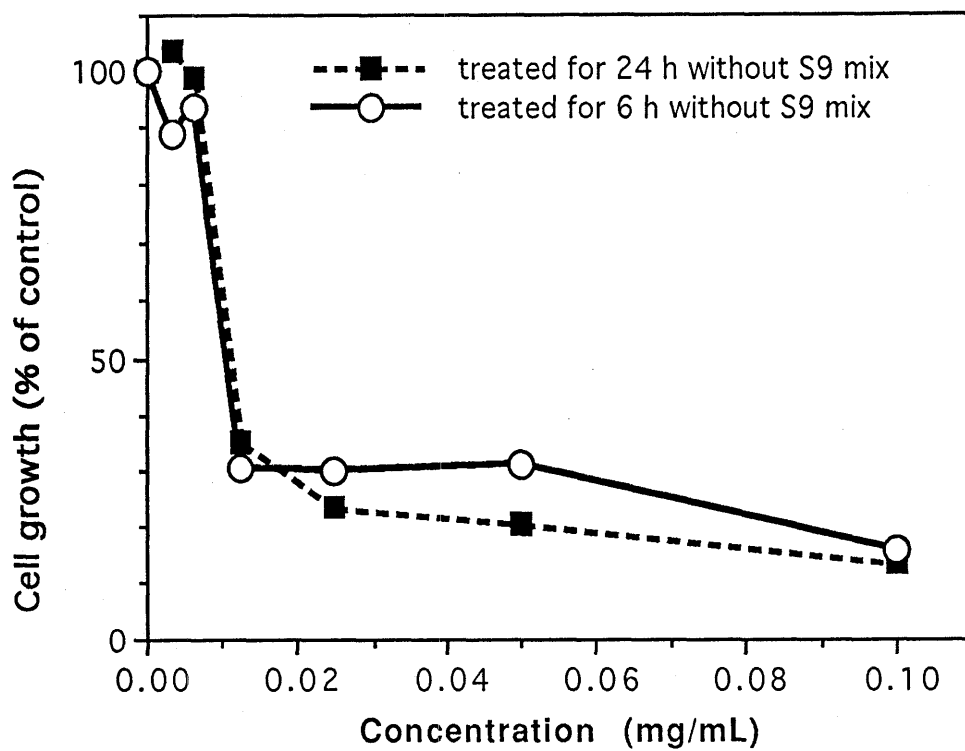
一方、陽性対照物質として用いた MC は、連続処理において染色体の構造異常を誘発し (Table 1) 、 CPA は短時間処理の S9 mix 存在下において染色体の構造異常を誘発した (Table 2) 。これらの陽性対照物質の結果より、本実験系の成立が確認された。

#### [特記事項]

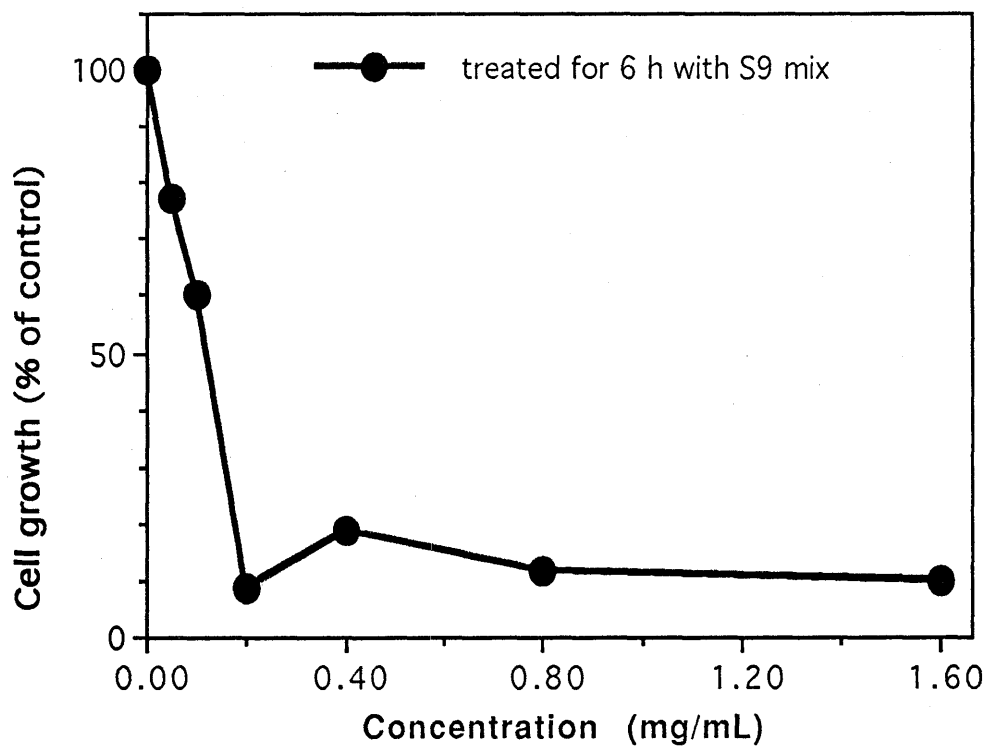
本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態および試験計画書からの逸脱は無かった。

#### [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) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修:「既存化学物質 変異原性試験データ集」, (社) 日本化学物質安全・情報センター 編集・発行, 東京 (1996)



**Fig. 1** Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1-chloro-2-(chloromethyl) benzene



**Fig. 2** Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1-chloro-2-(chloromethyl) benzene

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 1-chloro-2-(chloromethyl) benzene (CCMB)\*\* without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/mL)	Time of exposure (h)	No. of structural aberrations							Total	3) Others	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		Concurrent <sup>6)</sup> cytotoxicity (%)	Mitotic <sup>7)</sup> index (%)
			analysed	gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup>			TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Non-treatment			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.13				
Solvent <sup>1)</sup> 0		24	200	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.00			100.0		
CCMB 0.0025		24	200	1	0	0	1	0	2	0	2 ( 1.0 )	1 ( 0.5 )	0.13			110.4		
CCMB 0.0050		24	200	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.38	-	+	107.5		
CCMB 0.010		24	200	1	3	6	0	0	10	0	7 ( 3.5 )	6 ( 3.0 )	3.38*			77.1	6.9	
CCMB 0.020 ***		24	—													28.3	0.0	
MC 0.00005		24	200	2	40	120	1	0	163	0	109 *( 54.5 )	107 *( 53.5 )	0.00					
Solvent <sup>1)</sup> 0		48	200	0	0	1	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.13			100.0		
CCMB 0.0025		48	200	1	1	1	0	0	3	0	3 ( 1.5 )	2 ( 1.0 )	0.00			75.5		
CCMB 0.0050		48	200	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.00	-	+	86.3		
CCMB 0.010		48	200	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.75			74.4	10.1	
CCMB 0.020 ***		48	—													11.3		
MC 0.00005		48	200	2	56	206	4	4	302	3	129 *( 64.5 )	129 *( 64.5 )	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, 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 number, representing cytotoxicity, was measured with Coulter Counter. 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 99.65 wt%. Benzene, 1-chloro-4-(chloromethyl-) (0.16%) and Benzene, 1-chloro-2-(dichloromethyl-) (0.17%) were contained as impurities. \*\*\* : 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 1-chloro-2-(chloromethyl) benzene (CCMB)\*\* with and without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/mL)	S 9 mix exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others 3)	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		Concurrent 6) cytotoxicity (%)	Mitotic <sup>7)</sup> index (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>2)</sup> total	TAG (%)		TA (%)	SA		NA	Mitotic <sup>7)</sup> index (%)		
Non-treatment			200	0	0	1	1	0	0	2	0	2 ( 1.0 )	2 ( 1.0 )	0.25				
Solvent <sup>1)</sup> 0		6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.00			100.0	
CCMB 0.0025		6-(18)	200	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.25			105.4		
CCMB 0.0050		6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.38		-	99.9		
CCMB 0.010		6-(18)	200	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0.50			87.4	11.0	
CCMB 0.020 ***		6-(18)	—													43.5	Tox	
CPA 0.005		6-(18)	200	0	0	1	3	0	0	4	0	2 ( 1.0 )	2 ( 1.0 )	0.25				
Solvent <sup>1)</sup> 0		6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.13			100.0	
CCMB 0.025		6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0.00			89.2		
CCMB 0.050		6-(18)	200	0	1	1	1	1	0	4	0	4 ( 2.0 )	4 ( 2.0 )	0.50		+	94.2	
CCMB 0.10		6-(18)	200	1	12	21	0	0	0	34	0	26 *( 13.0 )	25 *( 12.5 )	2.88*		+	85.4	5.4
CCMB 0.20 ***		6-(18)	—													4.9		
CPA 0.005		6-(18)	200	0	6	21	1	0	0	28	0	24 *( 12.0 )	24 *( 12.0 )	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, 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 number, representing cytotoxicity, was measured with Coulter Counter. 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 99.65 wt%. Benzene, 1-chloro-4-(chloromethyl-) (0.16%) and Benzene, 1-chloro-2-(dichloromethyl-) (0.17%) were contained as impurities.

\*\*\* : Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.