

厚生省生活衛生局 殿

試 験 報 告 書

3-ジブチルピリジンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号: 5L551)

株式会社三菱化学安全科学研究所

目次

要約	7
材料および方法	8
1. 試験物質	8
2. 指標細胞	9
3. 培地	9
4. S9 mix	9
5. 試験物質溶液	10
6. 細胞増殖抑制試験	10
7. 染色体異常試験	11
結果	15
1. 細胞増殖抑制試験	15
2. 染色体異常試験	15
考察および結論	15
参考文献	15
表	16
図	20

要約

チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/U を用い、3-アピリンの *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、予備試験を実施したところ、5000 $\mu\text{g/ml}$ における細胞増殖度は、連続処理法の 24 時間処理では陰性対照の 10 % 程度、48 時間処理では生存細胞が認められず、短時間処理法では 80 % 程度であった。

細胞増殖抑制試験の結果、50 % 細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) は、連続処理法の 24, 48 時間処理、短時間処理法の S9 mix 非共存下で 1836, 1917, 1749 $\mu\text{g/ml}$ であった。また、短時間処理法の S9 mix 共存下では、被験物質は細胞増殖を 50 % 以上抑制しなかった。

染色体異常試験は、連続処理法および短時間処理法の S9 Mix 非共存下は、 IC_{50} を超える濃度を最高濃度とする、公比 2 の 4 濃度で実施した。また、短時間処理法の S9 mix 共存下は 5000 $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、公比 2 の 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 3-アピリンの CHL/U 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と結論した。

材料および方法

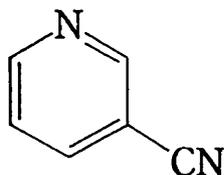
1. 試験物質

1.1 被験物質

から送付された 3-シアニルピリジン (CAS No.100-54-9, ロット番号: 純度 99.9%) を冷暗所で保存し, 使用した. 被験物質は下記の化学名, 構造式および分子量を有する水に可溶の白色固体である. 試験に使用したロットの安定性は, 被験物質供給元が実験開始前および実験終了後に分析し, 確認した.

化学名: ニコチンニトリル

構造式:



分子量: 104.11

1.2 対照物質

1) 陰性対照物質

局方生理食塩液 (生食と略す, ㈱大塚製薬工場, ロット番号: K5B97)

2) 陽性対照物質

(1) 連続処理法

マイトマイシン C (MMC と略す, 協和醗酵工業㈱, ロット番号: 051AEG, 含量 109%)

(2) 短時間処理法

ベンゾ [a] ピレン (BP と略す, 東京化成工業㈱, ロット番号: AX01, 含量 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/IU を使用した。細胞は大日本製薬(株)より 1994 年 8 月 30 日に購入し、細胞懸濁液に対し 10 %の割合でジメチルスルホキシド (DMSOと略す) を添加したものを各々 1 ml に小分けして、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 または 10 cm; Becton Dickinson and Company) を用い、炭酸ガス 5 %, 温度 37 °C, 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 (MEM と略す, イーグル MEM 培地「ニッスイ」①; 日水製薬(株)) を添付の処方に従い調製し、オートクレーブ滅菌 (121 °C, 15 分間) を行った。この 1 l に、別に滅菌処理した 2.92 % L-グルタミン水溶液 10 ml と 10 % 炭酸水素ナトリウム水溶液 12.7 ml を添加した。

3.2 培養液

上記の MEM 900 ml に対して、非働化 (56 °C, 30 分間加熱処理) した仔牛血清 (GIBCO BRL, ロット番号: 43N1140) を 100 ml 添加した。

4. S9 mix

4.1 S9

購入した S9 (キッコーマン(株), ロット番号: RAA-337, 1995 年 11 月 17 日製造) を使用した。この S9 は、7 週齢の SD 系ラット (体重 199 ~ 234 g) にフェノバルビタールを 30 mg/kg で 1 回, 60 mg/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 80 mg/kg をフェノバルビタールの 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 9000 × g 上清分画である。使用時まで -80 °C 以下で保存した。

4.2 S9 mix

S9 mix 1ml あたり以下の組成で用時調製し、使用時まで氷中に保存した。

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

5. 試験物質溶液

5.1 被験物質溶液

溶媒検討の結果、生食に 50 mg/ml で溶解した。従って、本被験物質の溶媒には生食を使用した。

被験物質を生食に溶解させて最高濃度の 10 倍の被験物質溶液を用時調製した。これを溶媒を用いて希釈し、各濃度の 10 倍の被験物質溶液を調製した。

5.2 陽性対照溶液

MMC は、局方生理食塩液で 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に用時調製した。BP は、DMSO で 4 mg/ml に溶解し、凍結保存したものを室温で融解し使用した。

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における適切な処理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、連続処理法の 24 および 48 時間処理と短時間処理法の S9 mix 共存下について、5000, 500, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 または 48 時間後に位相差顕微鏡で細胞の状態を観察した。

その結果、連続処理法の 24 時間処理の 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では陰性対照の 10% 程度、500 および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では陰性対照と差が認められなかった。48 時間処理では、5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では生存細胞が認められず、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では陰性対照の 90% 程度、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では陰性対照と差が認められなかった。短時間処理法によるの S9 mix 共存下では、5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では陰性対照の 80% 程度、500 および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では陰性対照と差が認

められなかった。

この結果より、いずれの処理条件においても、5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 500, 250 $\mu\text{g/ml}$ の各々 7 濃度で細胞増殖抑制試験を実施した。

なお、短時間処理法の S9 mix 共存下で、予備試験と異なる結果が得られたため、上記濃度による試験は不成立とし、5000, 4500, 4000, 3500, 3000, 2000, 1000 $\mu\text{g/ml}$ の 7 濃度で再試験を実施した。

6.2 細胞処理

4×10^3 個/ml の細胞を 6 cm シャーレあたり 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、連続処理法は、細胞を 0.5 ml の被験物質溶液と 4.5 ml の培養液にて 24 および 48 時間処理した。

短時間処理法の S9 mix 共存下は、細胞を 0.3 ml の被験物質溶液と 0.5 ml の S9 mix および 2.2 ml 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。S9 mix 非共存下は、細胞を 0.3 ml の被験物質溶液と 2.7 ml の培養液にて S9 mix 共存下と同様に処理した。

陰性対照として、被験物質溶液に使用する溶媒も同様に処理した。各濃度あたり 2 枚のシャーレを用いた。

6.3 細胞増殖率の測定

細胞表面を Ca^{2+} , Mg^{2+} フリーのダルベッコのリン酸緩衝液 (PBS(-) と略す, ダルベッコ PBS 「ニッスイ」; 日水製薬(株)) 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)) を用いて細胞増殖の程度を測定した。

6.4 50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) の算出

連続処理法および短時間処理法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、被験物質による IC₅₀ を算出した。IC₅₀ は、50%細胞増殖抑制濃度を挟む 2 点間で直線式を求め、この式より算出した。

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を図 1,2 に示す。

この結果より、連続処理法の 24, 48 時間処理では 3000, 1500, 750, 375 $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法の S9 mix 非共存下では 5000, 2500, 1250, 625 $\mu\text{g/ml}$ の各 4 濃度、短時間処理法の S9 mix 共存下では 5000, 2500, 1250 $\mu\text{g/ml}$ の 3 濃度で染色体異常試験を実施した。

陽性対照である MMC および BP はそれぞれ、染色体異常誘発性が知られている 0.03 および 20 $\mu\text{g/ml}$ とした。

7.2 細胞処理

細胞を 6.2 と同様に処理した。陽性対照については、連続処理法では、細胞を 5 ml の培養液と 50 μl の MMC 溶液からなる液で、また、短時間処理法の S9 mix 共存下では 2.5 ml の培養液と 0.5 ml の S9 mix および 15 μl の BP 溶液、S9 mix 非共存下では 3 ml の培養液と 15 μl の BP 溶液からなる液で同様に処理した。

7.3 標本作製

処理終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 $\mu\text{g/ml}$ となるように各シャーレに加え、分裂中期の細胞を蓄積させた。処理終了後、細胞表面を PBS(-) で 1 回洗浄した後、0.25 % トリプシン (溶媒：PBS(-)) 処理により細胞を剥離し、1000 rpm (最大遠心加速度、170 ~ 180 $\times g$)、5 分間遠心分離 (以下同じ) により細胞を集めた。上清を除去し、これに 4 ml の 0.075 M 塩化カリウム溶液を加えて低張処理 (37°C, 15 分) を行った。更に、4 ml の冷却したメタノール・酢酸 (3:1) 混合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 4 ml 加えた。この操作を 3 ~ 4 回繰り返した。固定終了後、少量の固定液で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上の 2 箇所に滴下し、乾燥してスライド標本とした。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。各シャーレあたり 2 枚を作製した。

7.4 観 察

1) 予備鏡検

標本作製後、試験の適否確認のため予備鏡検を行った。

その結果、いずれの標本においても1枚のシャーレあたり50個以上の分裂中期細胞が得られたため、全ての標本を観察対象とした。

陰性対照および陽性対照については、各々構造異常細胞の出現状態が適切であることを確認した。

2) 分裂指数/分裂活性

予備鏡検時に、1枚のシャーレあたり1000個、各濃度あたり2000個の細胞について分裂中期細胞の数を数え、分裂指数を求めた。またこれを基に陰性対照と各処理群の分裂指数の比(分裂活性)を算出した。

3) 構造異常および数的異常

構造異常および数的異常について盲検法で観察を行った。

(1) 構造異常

染色体がよく拡がった分裂中期細胞を選び、構造異常の有無を調べた。原則として、正常細胞の観察は、 25 ± 2 本の染色体数をもつもののみを対象とした。異常の分類は以下の通りとした。

ギャップ	(染色分体型および染色体型を含む；gと略す)
染色分体型切断	(ctbと略す)
染色分体型交換	(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)
断片化	(frgと略す)

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、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、各濃度あたり200個の分裂中期細胞を調べ、核内倍加細胞を含む倍数体細胞数を計測した。

7.5 試験結果の判定基準

構造異常をもつ細胞数は、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。

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、+gの構造異常および数的異常細胞の出現率が共に5%未満を陰性(-)、両方またはいずれかが5%以上10%未満を疑陽性(±)、いずれか一方または両方が10%以上を陽性(+)とした。なお、染色体異常の用量相関性を図示した。

結果

結果を表1～3および図3～6に示す。

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および数的異常細胞の出現率は5%未満であった。

一方、陽性対照による染色体構造異常細胞の出現率は著しく増加した。

考察および結論

3-ジヒドロリゾンの染色体異常誘発性を検討するため、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。その結果、染色体構造異常および数的異常細胞の出現率は、連続処理法の24および48時間処理では3000 μ g/ml、短時間処理法のS9 mix非共存下および共存下では5000 μ g/mlにおいて5%未満であった。

一方、陽性対照では染色体構造異常を有する細胞出現率の著しい増加が観察され、本試験が陽性対照に対して正常に反応していることが示された。

従って、3-ジヒドロリゾンの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

表 3 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	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (生食)	24	0	2000	146	7.3	100
3-シアノ ピリジン	24	375	2000	117	5.9	80
	24	750	2000	124	6.2	85
	24	1500	2000	115	5.8	79
	24	3000	2000	84	4.2	58
陽性対照 (MMC)	24	0.03	2000	100	5.0	68
陰性対照 (生食)	48	0	2000	103	5.2	100
3-シアノ ピリジン	48	375	2000	94	4.7	91
	48	750	2000	92	4.6	89
	48	1500	2000	48	2.4	47
	48	3000	2000	45	2.3	44
陽性対照 (MMC)	48	0.03	2000	103	5.2	100

生食：局方生理食塩液

MMC：マイトマイシン C

(2) 代謝活性化法による場合

処理	S9Mixの有無	処理濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (生食)	—	0	2000	134	6.7	100
3-シアノ ピリジン	—	625	2000	157	7.9	117
	—	1250	2000	131	6.6	98
	—	2500	2000	123	6.2	92
	—	5000	2000	101	5.1	75
陽性対照 (BP)	—	20	2000	128	6.4	96
陰性対照 (生食)	+	0	2000	208	10.4	100
3-シアノ ピリジン	+	1250	2000	191	9.6	92
	+	2500	2000	161	8.1	77
	+	5000	2000	121	6.1	58
陽性対照 (BP)	+	20	2000	35	1.8	17

生食：局方生理食塩液

BP：ベンゾ[a]ピレン

図1 3-シアピリジンの細胞毒性
(連続処理法)

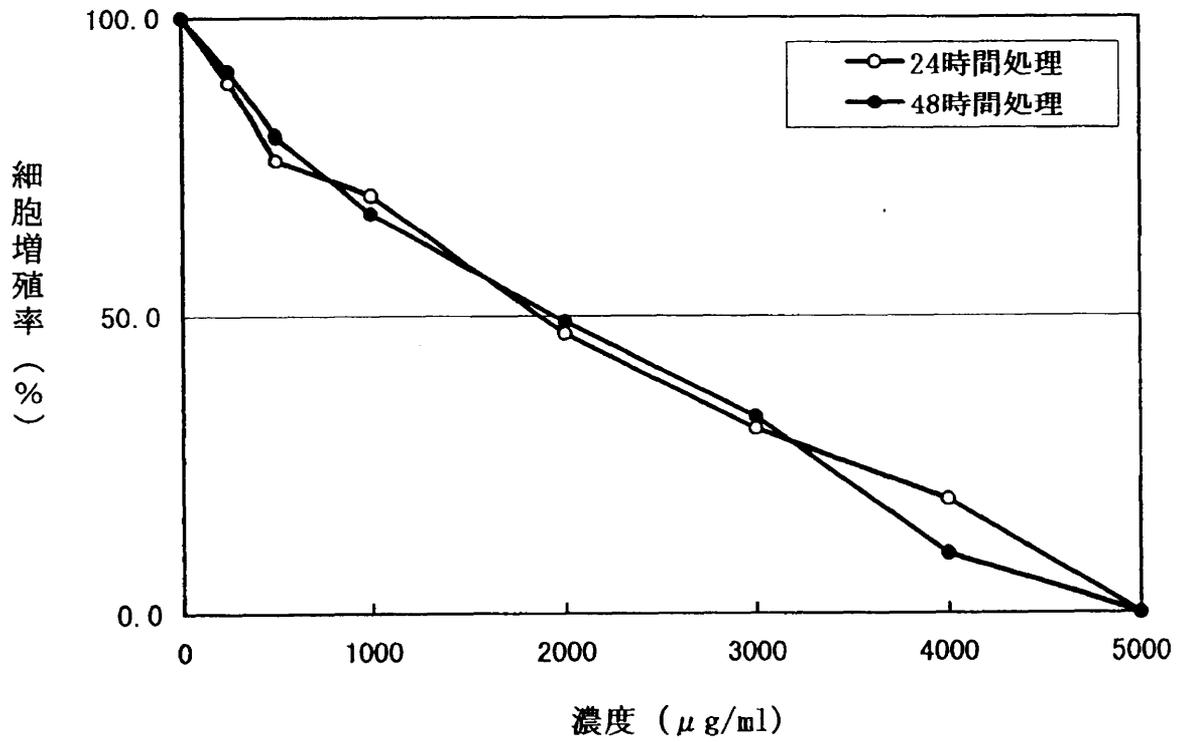


図2 3-シアピリジンの細胞毒性
(短時間処理法)
(6時間処理, 18時間回復)

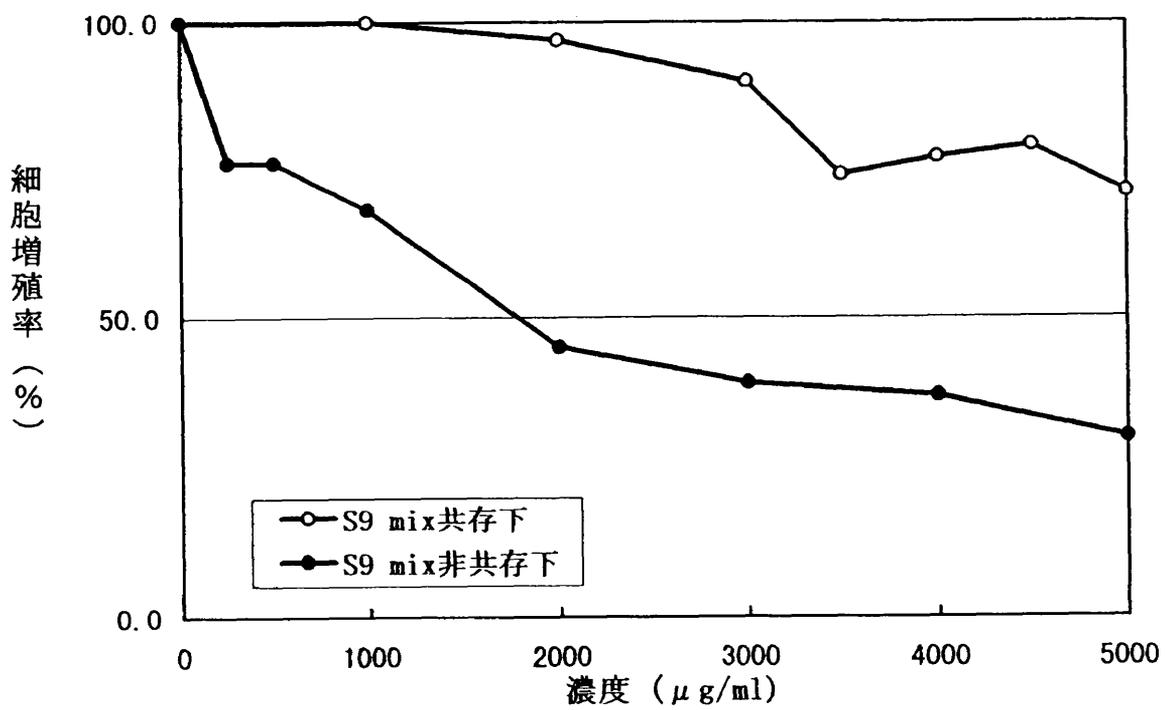


図3 3-シアロピリジンの構造異常細胞出現頻度
(連続処理法)

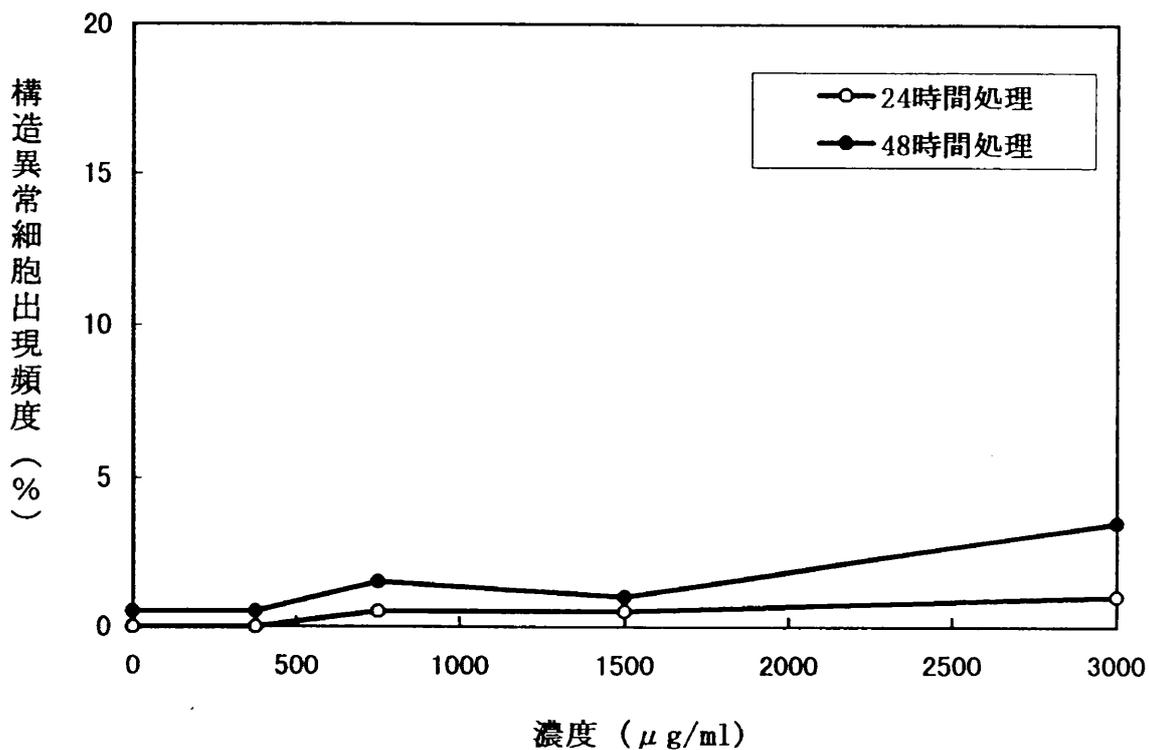


図4 3-シアロピリジンの構造異常細胞出現頻度
(短時間処理法)

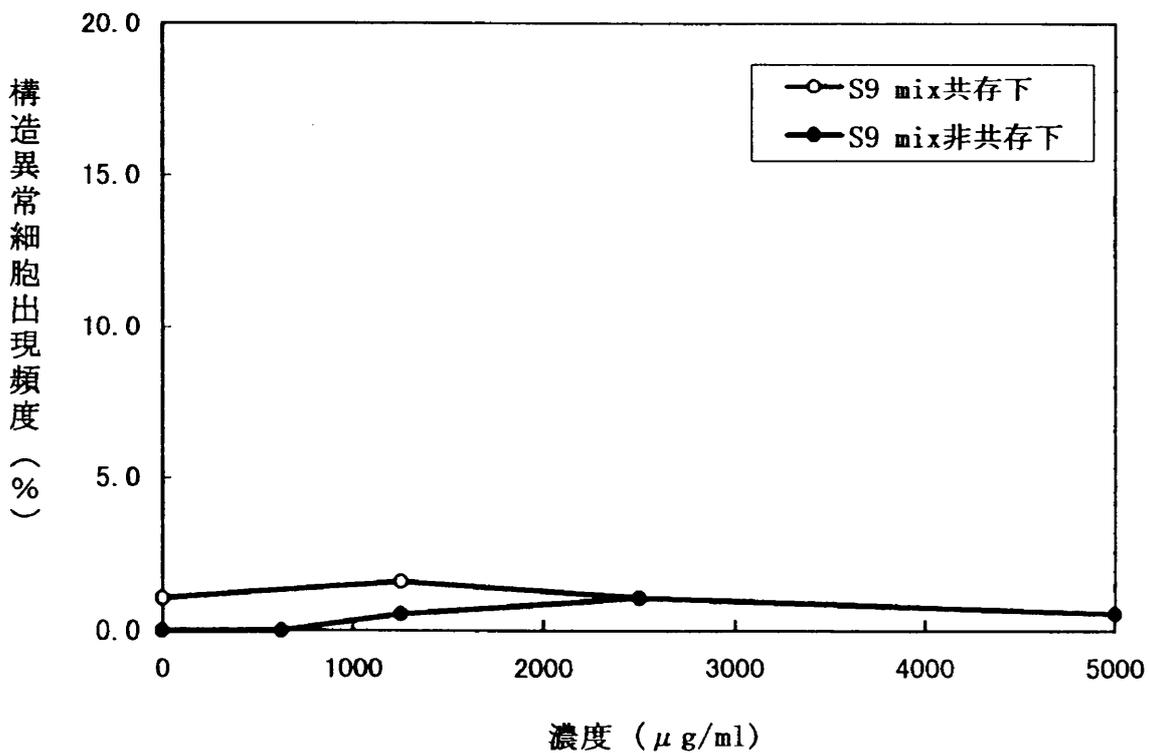


図5 3-シアロリジンの倍数体細胞出現頻度
(連続処理法)

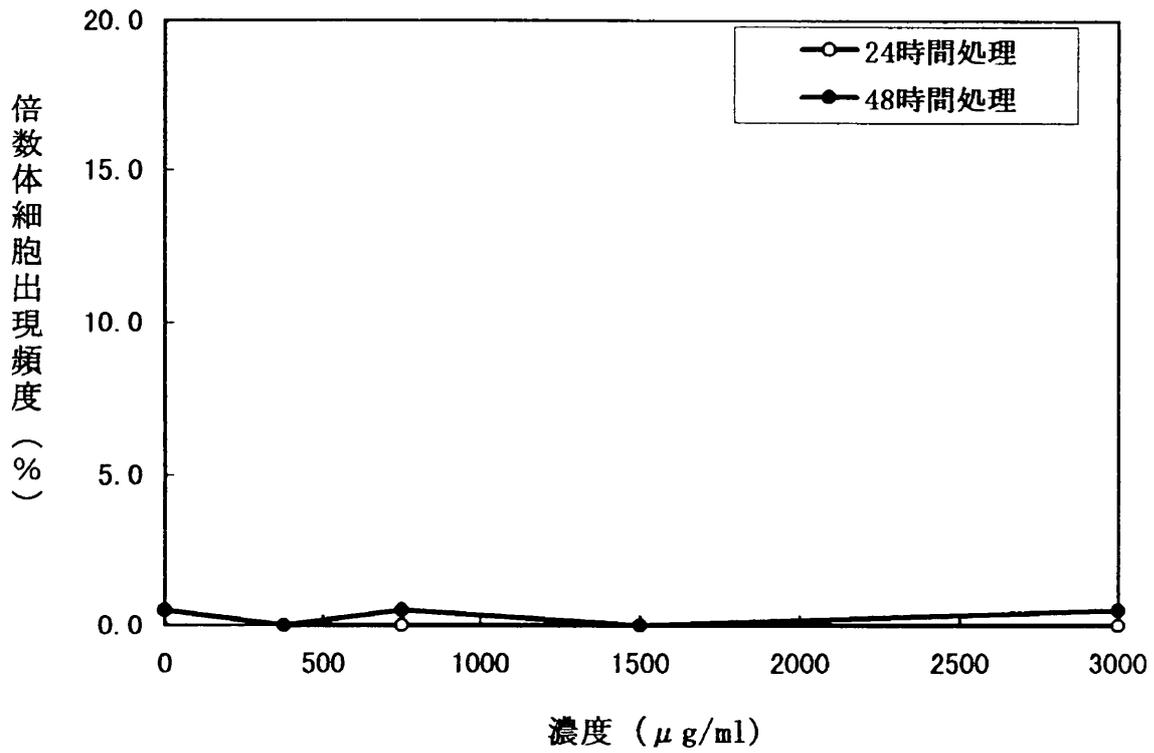


図6 3-シアロリジンの倍数体細胞出現頻度
(短時間処理法)

