



グリセリン三酢酸エステルの
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 -----	3
1 細胞 -----	3
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 -----	4
5 染色体異常試験 -----	4
6 染色体分析 -----	5
結果 -----	7
特記事項 -----	8
参考文献 -----	8

Fig. 1

Tables 1 and 2

[要 約]

グリセリン三酢酸エステル (TA) の、CHL/IU 細胞 (チャイニーズ・ハムスター、肺) に対する染色体異常誘発性は、TA による培養液の酸性化による可能性が強く、疑陽性と判定した。

TA は CHL/IU 細胞を連続処理 (新鮮培地中で 24 時間処理) した場合、CHL/IU 細胞の増殖を抑制しなかった。また、短時間処理の S9 mix 存在下 (S9 反応液中で 6 時間処理後 18 時間の回復時間) においては、50% 増殖抑制濃度が 1.8 mg/ml となり、一方、S9 mix 非存在下 (S9 反応液の代わりに MEM 培地を使用) では増殖抑制は認められなかった。

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)、短時間処理の S9 mix 非存在下において、2.2 mg/ml (10 mM) を最高処理濃度とし、公比 2 で以下 3 濃度を設定した。短時間処理の S9 mix 存在下においても同様に 2.2 mg/ml を最高処理濃度とし、以下公比 2 で 4 濃度を設定した。染色体分析が可能な最高濃度は、全処理系列において 2.2 mg/ml であったことから、この濃度を含む 3 濃度群を観察対象とした。

染色体分析の結果、倍数性細胞については、全処理系列において有意な増加 ($p < 0.01$) は認められなかった。一方、S9 mix 存在下で短時間処理した最高処理濃度 (2.2 mg/ml) においてのみ、染色体の構造異常が有意に増加した ($p < 0.01$ 、異常出現頻度は 43.5%)。上記処理群では、培地が徐々に黄色化 (培地の酸性化) することから、本物質で誘発された染色体異常に関しては、DNA に対する直接的な傷害作用というよりはむしろ培養液の酸性化によって誘発された可能性が強く、疑陽性と判定した。

[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。

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、TA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、牛胎児血清 (Filtron、ロット番号: 55301) および子牛血清 (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、CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37°C) 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、当該試験には 12 代および 21 代のものを使用した)。

2 被験物質および陽性対照物質

被験物質である TA (CAS No. 102-76-1) の物理化学的性状等は Appendix 1 に示した。TA は から提供された後、室温で保存し、ジメチルスルホキシド (和光純薬工業、ロット番号: ESJ4625) に溶解して希釈した。また、当該試験の実験期間 (1997 年 1 月 20 日 ~ 1998 年 6 月 26 日) 以前と以後の TA の純度に変化は認められなかった (からの提供資料より) ことから、TA は実験期間中は安定であったことが確認された。

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: 118AFG) は、注射用蒸留水 (大塚製薬工場、ロット番号: K6G92 および 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-355 および RAA-381、1996 年 11 月製造および 1998 年 4 月製造) は、7 週齢の雄 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肝臓から調製したものを購入し、使用時まで -80°C で保管した。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 を蒸留水に溶かし、混合液として -80°C で保管し、使用時はこれに S9、MgCl₂ 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 の添加量と等量) および MEM 培地 (血清不含) を混和して S9 反応液とした (5% S9、0.83 mM G-6-P、0.67 mM β-NADP⁺、0.83 mM MgCl₂、5.5 mM KCl、0.67 mM HEPES)。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及ぼす影響を調べた。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 5 ml と培地交換した後、被験物質調製液を 25 μ 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 に培地交換した後、被験物質調製液を 15 μ l 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 (2 倍濃度 MEM 培地を含む) 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。

連続処理および短時間処理において、0.069 ~ 2.2 mg/ml (10 mM) の濃度範囲で処理した。培養終了後、10%ホルムアルデヒド溶液で固定し、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

TA 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なかったが、短時間処理の S9 mix 存在下においては、2.2 mg/ml (10 mM) の濃度においてのみ CHL/IU 細胞の増殖を抑制し (Fig. 1)、50%増殖抑制濃度は 1.8 mg/ml となった。

このことから染色体異常試験において、すべての処理系列で、処理限界濃度である 2.2 mg/ml (10 mM) を最高処理濃度とし、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: 0.55、1.1、2.2 mg/ml、S9 mix 存在下の短時間処理: 0.28、0.55、1.1、2.2 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、固定、標本作製の部分を除いて細胞増殖抑制試験とはほぼ同様に行った。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、被験物質処理群の他、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。

染色体標本作製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（Ca²⁺ および Mg²⁺ 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。

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 および 2）により、全処理系列において2.2 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、この濃度を含む3濃度群を観察対象とした。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状態で分析した。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、有意差検定 ($p < 0.01$) 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]

TA は、すべての処理系列において、倍数性細胞を誘発しなかった (Tables 1 and 2) 。一方、S9 mix 存在下で短時間処理した場合の 2.2 mg/ml (10 mM) においてのみ、染色体の構造異常を有する細胞が有意 (フィッシャーの直接確率法、 $p < 0.01$) に増加した (異常出現頻度は 43.5%、Table 2) 。また、傾向性検定でも有意差が認められた ($p < 0.01$) が、低および中濃度 (それぞれ 0.55 mg/ml および 1.1 mg/ml) における誘発頻度は溶媒対照のレベルであった (出現頻度はそれぞれ 0% および 0.5%、Table 2) 。細胞増殖抑制試験および染色体異常試験を通して、S9 mix 存在下で短時間処理した 2.2 mg/ml (10 mM) の濃度においてのみ、被験物質処理終了時 (6時間処理後) の培養液の色が黄色を呈しているのを認めた (1.1 mg/ml の濃度では培地は橙色を呈していた) 。また、細胞毒性作用は当処理群においてのみ現れた (Table 2、細胞増殖率: 25.5%) 。そこで確認試験として、当処理群の培地の pH を 1 N の NaOH 溶液を添加することにより中性域 (6.9) に調整し、処理を行ったが、処理終了時には培地の色は黄色に変化し、pH 4.9 に低下していた。すなわち、被験物質を S9 mix 存在下で培地に添加した直後に培地の pH を中性域に調整しても、処理時間の経過と共に培地が徐々に酸性化することがわかった。以上の事象から、観察された染色体構造異常は、培地の酸性化により二次的に生じた可能性⁴⁾ もあり、TA の直接的な DNA 傷害作用を反映していないことも示唆された。しかしながら、誘発された構造異常の細胞出現頻度は 43.5% と高く、TA の直接的な DNA 傷害作用に起因する可能性も否定できないことから、TA の染色体異常誘発性を疑陽性と判定した。

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) Morita, T. *et al.*: Mutation Res. 268: 297-305 (1992)

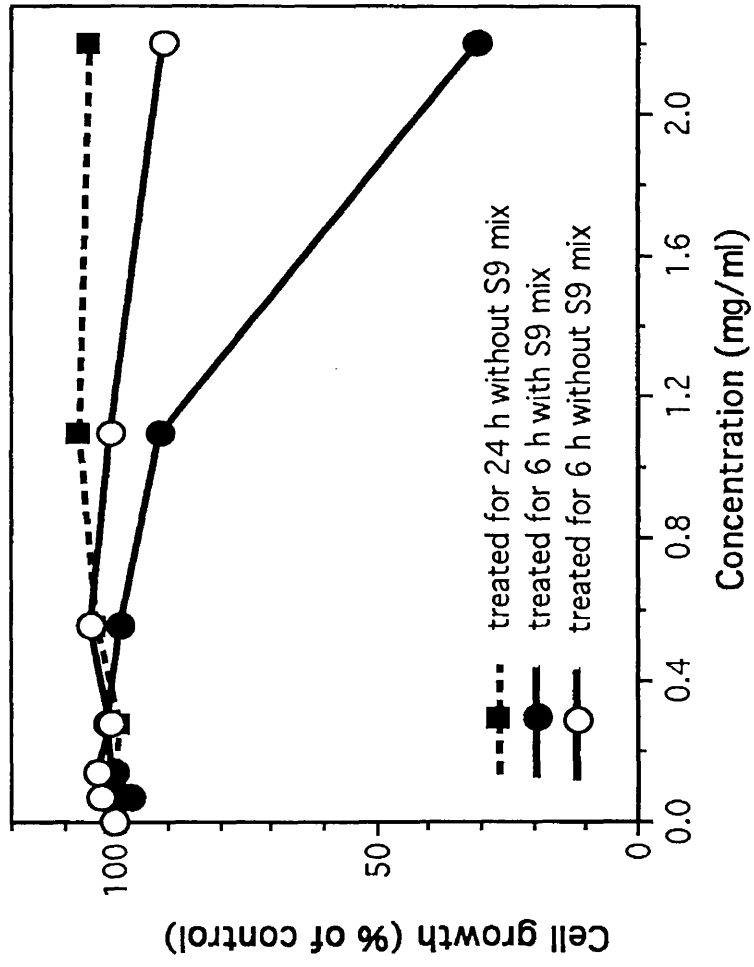


Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with glyceryl triacetate

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with glyceryl triacetate (TA)** without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of analysed cells	No. of structural aberrations							Others	No. of cells with aberrations		Trend test ⁵⁾ SA NA	Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)	Mitotic ⁷⁾ index (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul	total		TAG (%)	TA (%)			
Control			200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	—	—
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	1	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	100.0	—
TA	0.55	24	200	0	0	2	0	0	0	2	1	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00	100.0	—
TA	1.1	24	200	0	1	2	0	0	0	3	1	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	92.5	—
TA	2.2	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00	90.5	8.6
MC	0.00005	24	200	2	8	26	0	0	0	36	0	33 *(16.5)	31 *(15.5)	0.13	—	—
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	100.0	—
TA	0.55	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38	105.0	—
TA	1.1	48	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38	104.0	—
TA	2.2	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	85.0	6.8
MC	0.00005	48	200	6	13	27	0	4	0	50	4	40 *(20.0)	34 *(17.0)	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, 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 confluency, representing cytotoxicity, was measured with a 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 data at $p < 0.01$ by Fisher's exact test. ** : Purity was 98.2 wt%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with glyceryl triacetate (TA)** with and without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations	Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)	Mitotic ⁷⁾ index (%)						
				analysed	gap	ctb	cte	csb	cse	mul			total	Others ³⁾			TAG (%)	TA (%)	SA	NA		
Control ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00					
Solvent	0	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0.13					100.0
TA	0.55	-	6-(18)	200	0	0	0	4	0	0	0	1	0	1	0	0.5	0.63					100.5
TA	1.1	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	0	2	0	2	0	1.0	0.00					99.5
TA	2.2	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.25					90.5
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	2	0	2	0	0	3	1	0	1	0	0.5	0.50					9.2
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.25					100.0
TA	0.55	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.50					109.0
TA	1.1	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0.5	0.25					104.5
TA	2.2	+	6-(18)	200	10	59	103	0	0	70	242	1	87*	84*	42.0	0.26 ⁸⁾						25.5
CPA	0.005	+	6-(18)	200	4	28	113	1	0	0	146	0	91*	90*	45.0	0.13						1.6

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) 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 confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 7) Number of metaphases per 500 cells was scored in each dish in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes. 8) Seven hundred and eighty cells were analysed. * : Significantly different from historical solvent control data at $p < 0.01$ by Fisher's exact test. ** : Purity was 98.2 wt%. Diacetin (0.9%) was contained as an impurity.