

厚生省生活衛生局 殿

試験報告書

トリメチルシラノールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号: 6L683)

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. 細胞	8
3. 培地	9
4. S9 mix	9
5. 試験物質調製液	10
6. 細胞増殖抑制試験	10
7. 染色体異常試験	11
結果	14
考察および結論	14
参考文献	14
表	15
図	19

要約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/TU を用い、トリメチルシラノールの *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果、いずれの条件においても、被験物質は細胞増殖を 50 % 以上抑制しなかった。従って、染色体異常試験は、約 10mM (900 μ g/ml) を最高濃度とし、その 1/2 および 1/4 の 3 濃度で実施した。その結果、染色体構造異常細胞あるいは数的異常細胞の誘発は観察されなかった。

以上の結果より、本試験条件下におけるトリメチルシラノールの CHL/TU 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

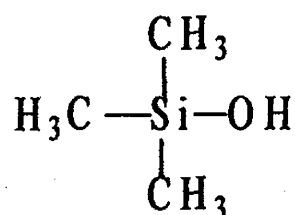
1. 試験物質

1.1 被験物質

から送付されたトリメチルシラノール

(CAS 番号 : 1066-40-6, ロット番号: 純度 99.8 %)は, 使用時まで冷暗所に保存した。被験物質は下記の構造式, 分子量を有する無色透明の液体である。試験に使用したロットの安定性は, 実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し, 確認した。

構造式 :



分子量 : 90.19

不純物 : ヘキサメチルシロキサン 0.2 %

1.2 対照物質

1) 陰性対照物質

ジメチルスルホキシド (DMSO と略す。関東化学㈱, ロット番号 : 804S1844,
純度 99.7 %以上)

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 : 119AFG,
含量 100 %)

(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. 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㈱より 1996 年 11 月 6 日に購入し, 細胞懸濁液に対し 10 %の割合で DMSO を添加した

ものを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、炭酸ガス細胞培養装置内（NAPCO社、7300型、炭酸ガス5%；温度37℃、加湿）で培養した。

3. 培地

3.1 イーグル最少培地

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㈱）を添付の処方に従い調製し、オートクレーブ滅菌（121℃、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℃、30分間加熱処理）した仔牛血清（GIBCO BRL、ロット番号：35K7844）を100 ml添加した。

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール（1日目30 mg/kg、2日目以降60 mg/kgを3日間1日1回腹腔内投与）と5,6-ベンゾフラボン（3日目に80 mg/kgを1回腹腔内投与）で酵素誘導したSD系雄ラット肝由来S9（キッコーマン㈱、ロット番号：RAA-355、1996年11月22日製造）を購入し、使用した。使用時まで-80℃以下で保存した。

4.2 S9 mix

S9 mix 10 ml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。

D-グルコース 6-リン酸	14.1 mg
β -NADP ⁺	33.5 mg
(以上、用時秤量)	
20 mM HEPES (pH 7.2)	2 ml
50 mM 塩化マグネシウム六水和物	1 ml
330 mM 塩化カリウム	1 ml
精製水	3 ml
(以上、予め滅菌調製した溶液を添加)	
S9	3 ml

5. 試験物質調製液

5.1 被験物質溶液

溶媒検討の結果、本被験物質は、局方生理食塩液には 50 mg/ml で不溶、1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液には 50 mg/ml で均一に懸濁しなかった。一方、DMSO には約 700 mg/ml で溶解した。これらの結果から、本被験物質の溶媒は DMSO を用いた。

被験物質を所定濃度で DMSO に溶解し、この溶液をさらに同じ溶媒で希釈し各処理濃度の 200 倍の被験物質溶液を用時調製した。

5.2 陽性対照溶液

MMC は、局方生理食塩液（㈱大塚製薬工場、ロット番号：K6K83）で 3 μ g/ml に用時調製した。BP は、DMSO（関東化学㈱、ロット番号：610E1229）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

染色体異常試験の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, 48 時間処理および短時間処理法の S9 mix 共存下で、900, 90, 9 μ g/ml (10, 1, 0.1 mM) 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 時間後に位相差倒立顕微鏡で細胞の状態を観察した。

その結果、いずれの処理条件および処理濃度においても、細胞の状態は陰性対照と差が認められなかった。

以上の結果から、細胞増殖抑制試験は、連続処理法および短時間処理法のいずれにおいても 900, 450, 225, 113, 56.3 μ g/ml の 5 濃度を設定した。

6.2 細胞処理

4 \times 10³ 個/ml の細胞懸濁液を 6 cm シャーレに 5 ml 播き、3 日間培養した。

シャーレから培養液を除去した後、連続処理法では、細胞を被験物質溶液 25 μ l、培養液 5 ml で 24 または 48 時間処理した。

短時間処理法では、S9 mix 共存下は、細胞を被験物質溶液 15 μ l、S9 mix 0.5 ml、培養液 2.5 ml で、また、S9 mix 非共存下は、被験物質溶液 15 μ l、培養液 3 ml で 6 時間処理後、MEM で 3 回洗浄し新しい培養液 5 ml でさらに 18 時間培養した。

陰性対照として、被験物質溶液に使用した溶媒も各条件で同様に処理した。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) で洗浄し, メタノールで10分間固定, 3%ギムザ液 (1/150 M リン酸緩衝液, pH 6.8, で希釈) 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を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)) を用いて細胞増殖率を測定した。

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、被験物質の50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) を算出した。なお、IC₅₀ は、プロビット法により算出した。

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は図1～2に示すごとく、10mM (900 μg/ml) まで細胞の増殖を抑制しなかった。

この結果から、連続処理法および短時間処理法のいずれの処理条件においても10mMを最高用量とし、その1/2および1/4の3濃度 (900, 450, 225 μg/ml) で染色体異常試験を実施した。

陽性対照である MMC, BP の濃度はそれぞれ、染色体異常誘発性が知られている 0.03, 20 μg/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、細胞を培養液 5 ml, MMC 溶液 50 μl で、短時間処理法の S9 mix 共存下では培養液 2.5 ml, S9 mix 0.5 ml, BP 溶液 15 μl で、S9 mix 非共存下では培養液 3 ml, BP 溶液 15 μl 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 μg/ml となるようにシャーレに加え、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、0.25%トリプシン（溶媒：PBS(-)）処理により細胞を剥離し、遠心分離（1000 rpm, 5分間；以下同じ）により細胞を集めた。上清を除去し、これに0.075 M塩化カリウム溶液4 mlを加えて低張処理（37℃, 15分）を行った。更に、冷却したメタノール・酢酸(3:1)混合液4 mlを加え細胞を固定し、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を懸濁し、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（箇所）に滴下し、乾燥して染色体標本とした。これを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2枚の標本を作製した。

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、シャーレ1枚につき1000個、1濃度2000個の細胞中の分裂中期細胞を数え、分裂指数を求めた。またこれから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

陰性対照、陽性対照および被験物質処理群について、構造異常および数的異常を盲検法で観察した。

(1) 構造異常

シャーレ1枚につき100個、1濃度200個の細胞を調べた。

染色体がよく拡がった分裂中期細胞を観察し、構造異常細胞を数えた。ただし、構造異常がなく、染色体数が 25 ± 2 本でない細胞は除外した。異常の分類は以下のとおりとした¹⁾。

ギャップ	(染色分体型および染色体型を含む；gapと略す)
染色分体型切断	(ctbと略す)
染色分体型交換	(ctc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。

(2) 数的異常

シャーレ1枚につき100個、1濃度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を数えた。

7.5 試験結果の判定基準

構造異常を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 (-gap) と含めた場合 (+gap) で集計した。

被験物質の染色体異常誘発性の判定は、+gapの構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に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。

7.6 結果のまとめ

染色体構造異常をもつ細胞および倍数体の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度(%)を表示するとともに、用量依存性について図示した。

結果

結果を表1～4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頻度は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頻度は著しく増加した。

考察および結論

トリメチルシラノール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、連続処理法および短時間処理法の900 $\mu\text{g/ml}$ (10mM) まで染色体構造異常細胞および数的異常細胞の誘発は観察されなかった。

一方、陰性対照および陽性対照では染色体構造異常を有する細胞出現頻度は期待通りの値を示し、本試験が技術的に成立していることが示された。

従って、トリメチルシラノールのCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と結論した。

なお、同物質あるいは類似化合物における染色体異常誘発性に関する他の情報は得られなかった。

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1 染色体異常試験結果 (連続処理法)

被験物質名: トリメチルシラノール

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	倍數体數		染色体構造異常細胞1) の出現數と出現頻度 (%)						判定					
				(%)	判定	ギャップ	ctb	cte	csb	cse	frg		-gap	igap			
溶媒 [DMSO]	24	0	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0			
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)		
			100	0		1	0	0	0	0	0	0	0	2	2		
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)		
被験物質	24	225	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0			
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
			100	0		0	1	0	0	0	0	0	0	1	1		
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)		
被験物質	48	225	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0			
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)		
陽性対照 [MMC]	48	0.03	100	1		1	1	0	1	0	0	0	1	2			
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	1 (0.5)		1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	3 (1.5)			
			100	1		12	9	0	0	0	0	0	20	21			
			100	0		11	6	1	0	0	0	0	17	19			
			200	1 (0.5)		23 (11.5)	15 (7.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (18.5)	40 (20.0)			
陽性対照 [MMC]	48	0.03	100	1		9	26	2	2	0	0	34	35				
			100	0		17	16	2	0	0	0	32	32				
			200	1 (0.5)		26 (13.0)	42 (21.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	66 (33.0)	67 (33.5)				

1) gap: 染色体型切斷, ctb: 染色体型切斷, cte: 染色体型切斷, csb: 染色体型切斷, cse: 染色体型切斷, frg: 断片化
 2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現率が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。
 DMSO: ジメチルスルホキシド MMC: マイトマイシンC

表2 染色体異常試験結果(短時間処理法)

被験物質名: トリメチルシラノール

処理	S9 mixの有無	処理濃度(μg/ml)	観察細胞数	倍率体数		染色体構造異常細胞(1)の出現数と出現頻度(%)				判定			
				(%)	判(2)	ギャップ	染色体分体型	染色体型	frg		合計		
				ctb	cte	csb	cse	-gap	+gap				
溶媒	-	0	100	0		0	0	0	0	0	0		
			100	0	1	1	0	0	2	2	2		
			200	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	2(1.0)		
			100	2	0	0	0	0	0	0	0		
[DMSO]	+	0	100	0		0	0	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
被験物質	-	225	100	0		0	0	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	0	1	0	1	0	2	2	2		
被験物質	-	450	100	0		0	0	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	2(1.0)		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		
被験物質	-	900	100	0		0	0	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	0	1	0	1	0	1	1	1		
被験物質	+	225	100	0		0	0	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		
被験物質	+	450	100	0		0	0	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		
被験物質	+	800	100	0		0	0	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		
陽性対照	-	20	100	0		0	0	0	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
			100	0	21	0	75	0	78	78	78		
陽性対照	+	20	100	0		0	0	0	0	0	0		
			100	0	17	0	75	0	75	75	75		
			200	0(0.0)	38(19.0)	150(75.0)	0(0.0)	0(0.0)	153(76.5)	153(76.5)	153(76.5)		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		

1) gap: 染色体分体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色体分体型切断, cte: 染色体分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, frg: 断片化
 2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現率が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。
 S9の用量(5%), 被験物質処理時間(6h), 被験物質処理後の細胞回復時間(18h)
 DMSO: ジメチルスルホキシド BP: ペンゾ[α]ピレン

表 3 分裂指数 (連続処理法)

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μ 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 (DMSO)	24	0	2000	116	5.8	100
トリメチルシラノール	24	225	2000	86	4.3	74
	24	450	2000	114	5.7	98
	24	900	2000	97	4.9	84
陽性対照 (MMC)	24	0.03	2000	103	5.2	89
陰性対照 (DMSO)	48	0	2000	110	5.5	100
トリメチルシラノール	48	225	2000	98	4.9	89
	48	450	2000	97	4.9	88
	48	900	2000	100	5.0	91
陽性対照 (MMC)	48	0.03	2000	77	3.9	70

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC

表 4 分裂指数 (短時間処理法)

処理	S9 mix 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 (DMSO)	—	0	2000	136	6.8	100
トリメチルシラノール	—	225	2000	111	5.6	82
	—	450	2000	159	8.0	117
	—	900	2000	138	6.9	101
陽性対照 (BP)	—	20	2000	139	7.0	102
陰性対照 (DMSO)	+	0	2000	190	9.5	100
トリメチルシラノール	+	225	2000	199	10.0	105
	+	450	2000	176	8.8	93
	+	900	2000	189	9.5	99
陽性対照 (BP)	+	20	2000	48	2.4	25

DMSO : ジメチルスルホキシド

BP : ベンゾ[a]ピレン

図1 トリメチルシラノールの細胞毒性
(連続処理法)

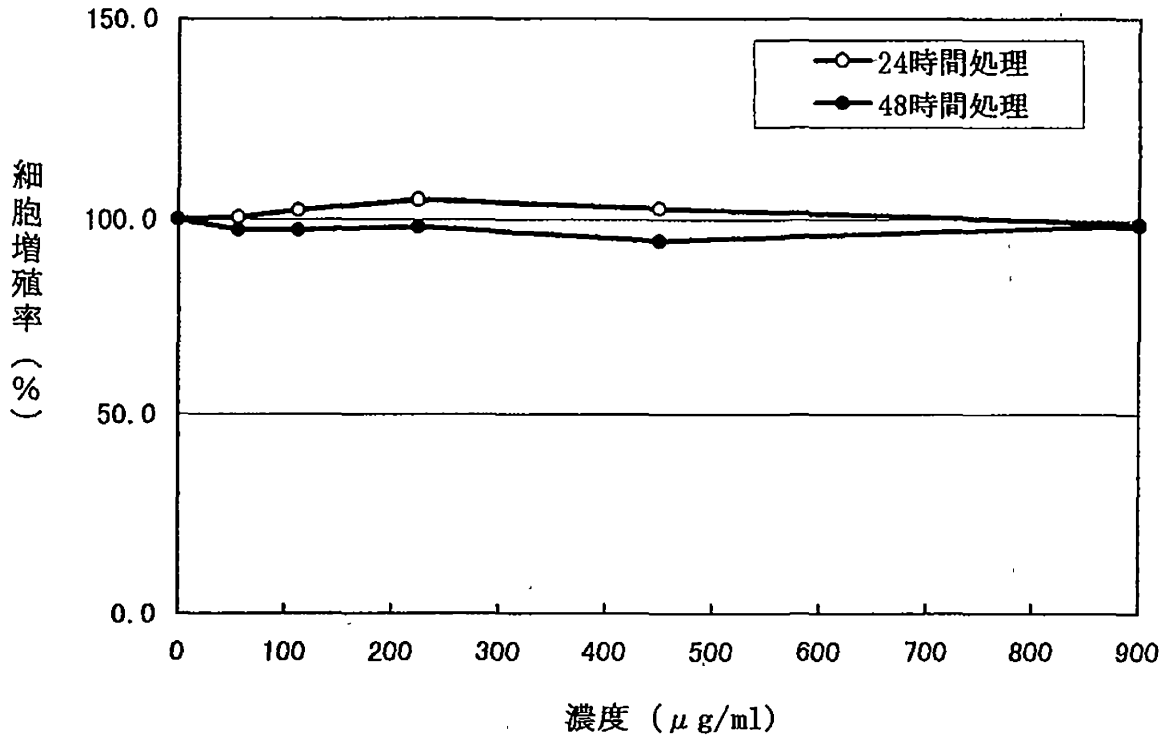


図2 トリメチルシラノールの細胞毒性
(短時間処理法) (6時間処理, 18時間回復)

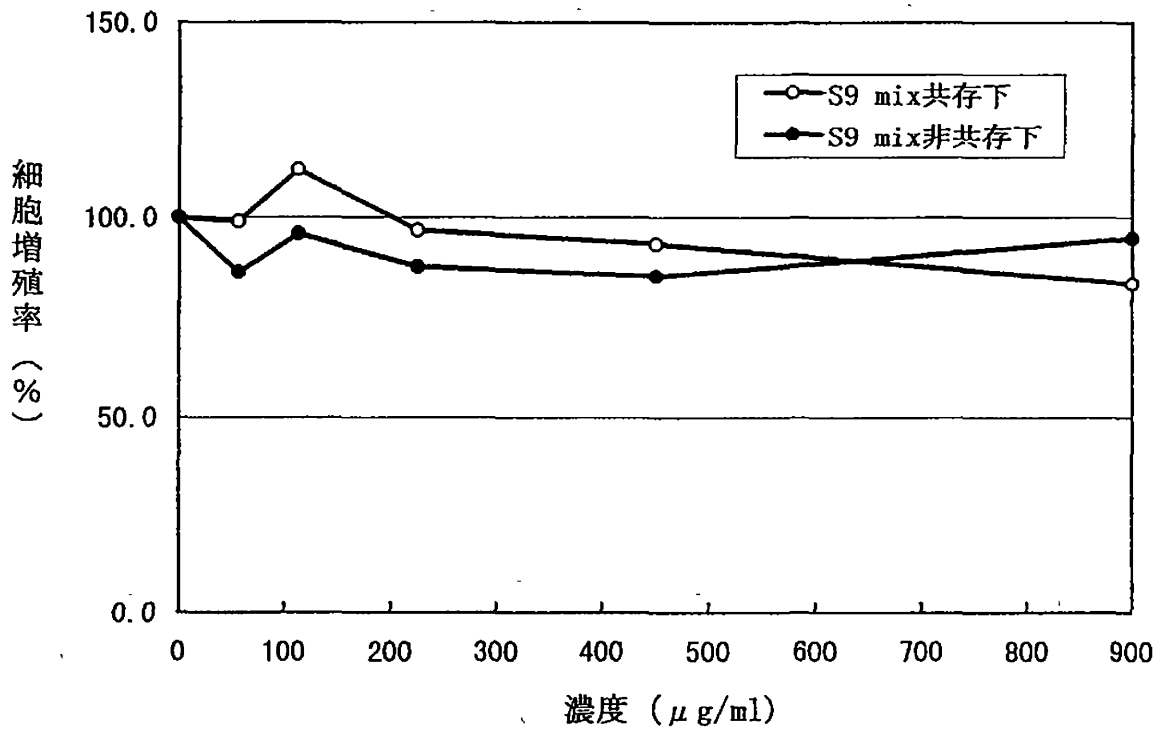


図3 トリメチルシラノールの構造異常細胞出現頻度
(連続処理法)

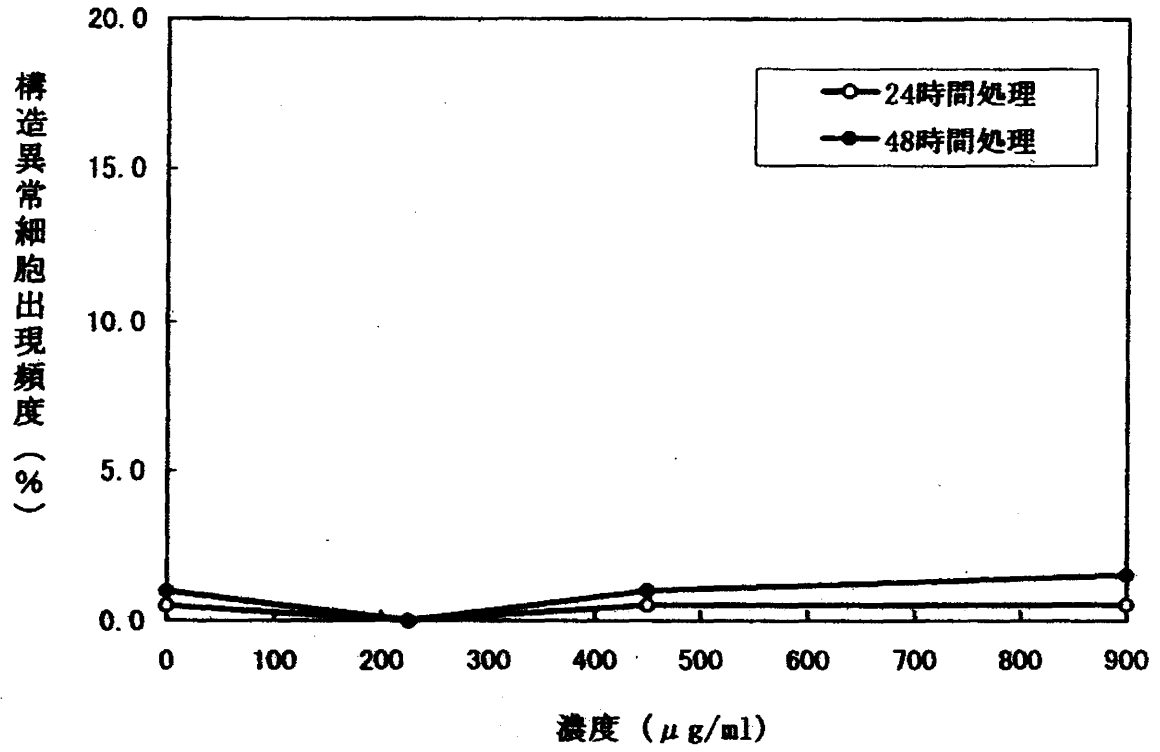


図4 トリメチルシラノールの構造異常細胞出現頻度
(短時間処理法)

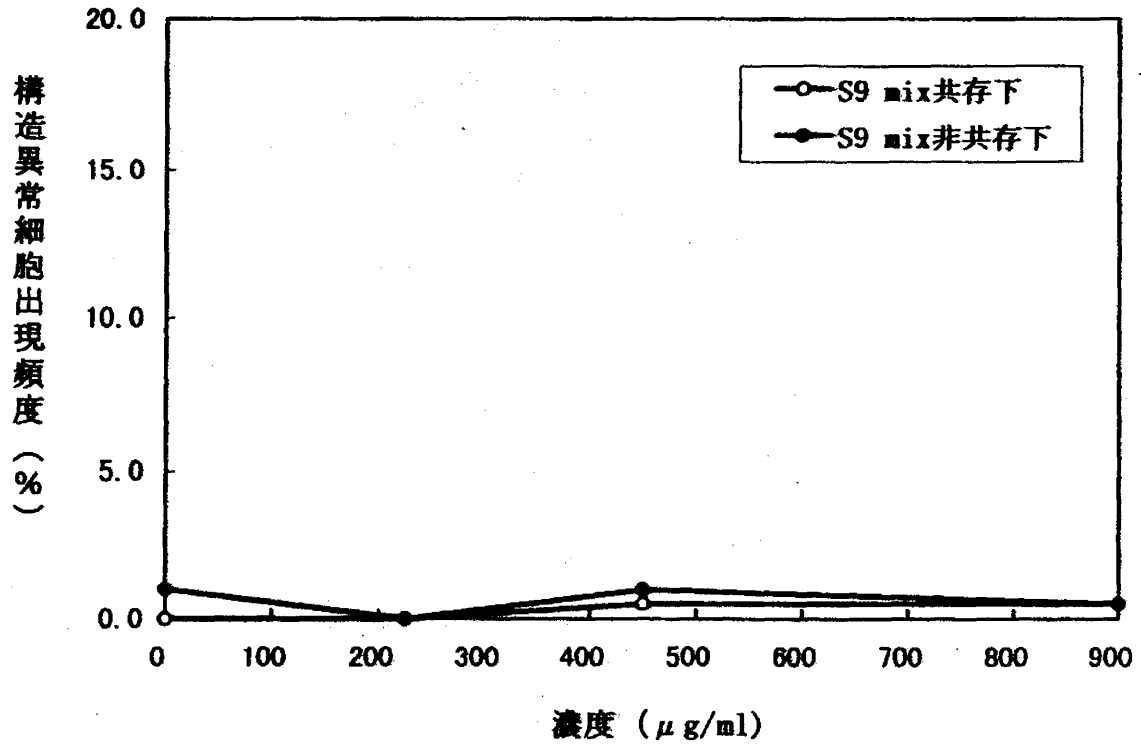


図5 トリメチルシラノールの倍数体細胞出現頻度
(連続処理法)

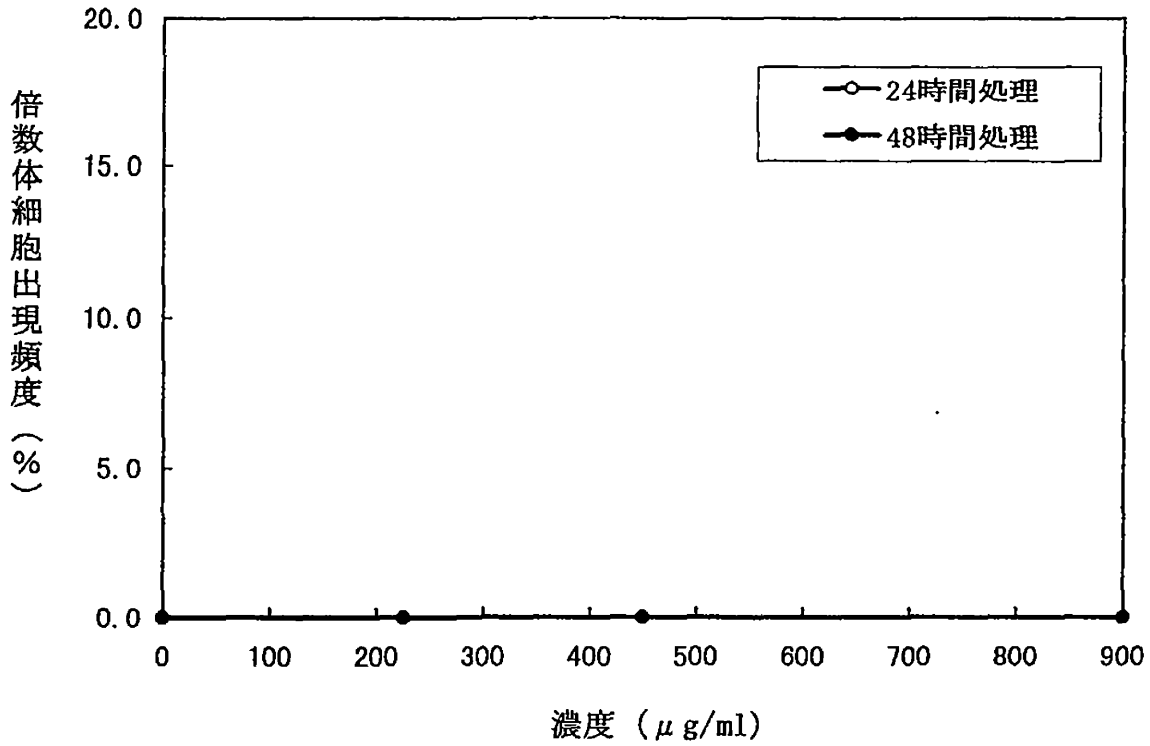


図6 トリメチルシラノールの倍数体細胞出現頻度
(短時間処理法)

