

厚生省生活衛生局 殿

最終報告書

N,N'-(1,2-エタンジール)ビスオクタンアミドのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号：8L672)

2000年7月6日

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	9
3. 培地	9
4. S9 mix	10
5. 試験方法	10
結果	15
考察および結論	15
参考文献	15
別表	16
図	18

要 約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い、*N,N'*-(1,2-エタンジール)ビスオクタデカンアミドの *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

短時間処理法の細胞増殖抑制試験の結果、いずれの用量においても 50 % 以上の細胞増殖抑制は認められなかった。従って、染色体異常試験はいずれの処理条件においても 500 $\mu\text{g/ml}$ を最高用量とし、その 1/2, 1/4 の用量を設定した。その結果、S9 mix 非共存下および共存下のいずれの用量においても、染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5 % 未満であった。

連続処理法の 24 時間処理の細胞増殖抑制試験の結果、いずれの用量においても 50 % 以上の細胞増殖抑制は認められなかった。従って、染色体異常試験は 500 $\mu\text{g/ml}$ を最高用量とし、その 1/2, 1/4 の用量を設定した。その結果、いずれの用量においても、染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5 % 未満であった。

以上の結果より、本試験条件下における *N,N'*-(1,2-エタンジール)ビスオクタデカンアミドの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と結論した。

材料および方法

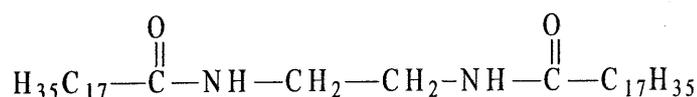
1. 試験物質

1.1 被験物質

1) 被験物質

から提供された *N,N'*-(1,2-エタンジール)ビスオクタデカアミド (CAS 番号 110-30-5, ロット番号 純度 99.7%) は、使用時まで室温に保存した。被験物質は下記の構造式および分子量を有する、水、アセトンに溶解しない白色または淡褐色固体である。窒素雰囲気中で 250 °C 以上で分解を開始する。

構造式：



分子量：593.03

不純物：未反応脂肪酸 0.1 %

未反応アミン分 0.1 %

揮発分(水分) 0.1 %

2) 被験物質懸濁液の調製

溶媒検討の結果、本被験物質は生理食塩液（以下生食）には 50 mg/ml、アセトンには 250 mg/ml でそれぞれ不溶であった。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、ジメチルスルホキシド(以下 DMSO) には 100 mg/ml でほぼ均一に懸濁し、これ以上の濃度では調製容器壁に被験物質が多量に付着した。これらの結果から、本被験物質の溶媒には DMSO を用いた。ただし、被験物質懸濁液の最高調製濃度は 100 mg/ml (培地中での最終用量：500 μg/ml) とした。

被験物質を DMSO で所定用量に用時懸濁した。これを同じ溶媒で希釈し、所定用量の被験物質懸濁液を調製した。

1.2 陰性対照物質

DMSO (関東化学株, ロット番号：912S1784, 純度：99.7%)

1.3 陽性対照物質

1) 陽性対照物質

マイトマイシン C

(以下 MMC, 協和発酵工業株, ロット番号: 226AHE, 含量 108%)

ベンゾ [a] ピレン

(以下 BP, 東京化成工業株, ロット番号: GG01, 含量 95.6%)

2) 陽性対照物質の調製

MMC は, 生食 (株) 大塚製薬工場, ロット番号: K8G96 [短時間処理法], K8I73 [連続処理法] に用時溶解した (短時間処理法: $1 \mu\text{g/ml}$, 連続処理法: $0.3 \mu\text{g/ml}$)。BP は, DMSO (関東化学株, ロット番号: 912S1784) に 4 mg/ml で溶解し, 使用時まで凍結保存した。

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。細胞は大日本製薬株より 1996 年 11 月 6 日に購入し, 細胞懸濁液に対し最終 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, プラスチックプレート (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 (炭酸ガス 5%, 温度 37°C , 加湿, NAPCO 社, 7300 型) で培養した。

3. 培地

3.1 MEM

イーグル MEM 培地「ニッスイ」① (日本製薬株) 約 8.3 g を精製水 880 ml に溶解し, オートクレーブ滅菌 (121°C , 15 分間) 後, 別に滅菌処理した 2.92% L-グルタミン水溶液と 10% 炭酸水素ナトリウム水溶液をそれぞれ 8.8 ml , 11.2 ml 添加した。この溶液を以下 MEM とする。

3.2 培養液

MEM 900 ml に, 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: 1009120) 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1日1回3日間腹腔内投与) 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 (キッコーマン株, ロット番号: RAA-395, 1998年12月11日製造) を購入した。購入した S9 は使用時まで -80°C 以下で保存した。

4.2 S9 mix

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

S9	0.3 ml
D- グルコース -6- リン酸	5 μmol
β -NADP ⁺	4 μmol
HEPES (pH 7.2)	4 μmol
塩化マグネシウム六水和物	5 μmol
塩化カリウム	33 μmol
精製水	残量

5. 試験方法

5.1 短時間処理法

1) 細胞増殖抑制試験

(1) 試験物質用量

細胞増殖抑制試験に先立ち、S9 mix 非共存下 (以下 - S9 mix) および共存下 (以下 + S9 mix) で、5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ の3用量で予備試験を実施した。この試験では、1用量あたり1枚のプレートを用い、細胞の状態を位相差倒立顕微鏡を用いて観察した。

その結果、陰性対照と比較した細胞生存率は下記の通りであった。

処理群 \ 用量 ($\mu\text{g/ml}$)	5	50	500
- S9 mix	100 %	100 %	100 %
+ S9 mix	100 %	100 %	100 %

以上の結果から、細胞増殖抑制試験は、下記の用量を設定した。

- S9 mix : 31.3, 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$

+ S9 mix : 31.3, 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$

(2) 細胞処理

4×10^3 個/ml に調製した細胞懸濁液を 6 cm プレートに 5 ml ずつ播き、3 日間培養した。

培養液を除去した後、下記の組成の細胞処理液を 1 用量あたり 2 枚のプレートに加え 6 時間細胞を処理した。6 時間後、MEM で細胞表面を 1 回洗浄し、新しい培養液 5 ml でさらに 18 時間処理した。

	被験物質懸濁液 または陰性対照	S9 mix	培養液
- S9 mix	0.015 ml	———	3.0 ml
+ S9 mix	0.015 ml	0.5 ml	2.5 ml

(3) 細胞増殖率の測定

細胞表面を Ca^{2+} , Mg^{2+} フリーのリン酸緩衝液 (以下 PBS (-), 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 分間固定後、3 % ギムザ液で 10 分間染色し、乾燥させた。染色した各プレート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) を用いて細胞増殖率を測定した。

(4) 50 % 細胞増殖抑制用量の算出

各処理条件について、陰性対照値を 100 % として生存曲線を作成した。

2) 染色体異常試験

(1) 試験物質用量

細胞増殖抑制試験の結果は図 1, 2 に示すごとく、いずれの用量においても 50 % 以上の細胞増殖抑制は認められなかった。

この結果より、- S9 mix, + S9 mix で 500 $\mu\text{g/ml}$ を最高用量とし、その 1/2, 1/4 の用量を設定した。

陽性対照である MMC, BP の用量はそれぞれ、染色体異常誘発性が知られている 0.1, 20 $\mu\text{g/ml}$ とした。

(2) 細胞処理

5.1, 1), (2) 項と同様に処理した。

陽性対照については、下記の組成の細胞処理液で同様に細胞を処理した。

	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	培養液
- S9 mix	0.3 ml	——	——	2.7 ml
+ S9 mix	——	0.015 ml	0.5 ml	2.5 ml

いずれの処理条件も、各用量あたり 4 枚のプレートを用い、2 枚を標本作製に、2 枚を細胞増殖率の測定に使用した。

(3) 標本作製

標本作製用プレートに処理終了の 2 時間前に最終用量が 0.1 $\mu\text{g/ml}$ となるようにコルセミドを加え、分裂中期細胞を蓄積した。処理終了後、細胞表面を PBS(-) で洗浄し、0.25 % トリプシン処理にて細胞を剥離した後、遠心管に回収し、遠心分離 (1000 rpm, 5 分間; 以下同様) により細胞を集めた。上清を除去し、各遠心管に 0.075 M 塩化カリウム溶液 4 ml を加えて低張処理 (37 $^{\circ}\text{C}$, 15 分) を行った。次に、冷却したメタノール・酢酸 (3:1) 混合液 0.5 ml を加え細胞を半固定した後、遠心分離し、上清を除去した。さらに、同固定液 4 ml を加え、同様の操作を 2~3 回繰り返した。その後、少量の固定液で細胞を懸濁させ、濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスに 2 箇所滴下して乾燥した。これを 3 % ギムザ溶液で 20 分間染色し、水洗、乾燥後、封入して観察標本とした。なお、標本は、各プレートにつき 2 枚作製した。

(4) 細胞増殖率の測定

標本作製と同時期における細胞増殖率の測定を実施した。細胞増殖率用のプレートを用いて、細胞増殖抑制試験と同様に実施した。

(5) 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、全てのプレートにおいて 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため、全てのプレートの標本を観察の対象とした。また、陰性対照および陽性対照については、構造異常細胞の有無が適切であることを確認した。

② 構造異常および数的異常

標本はすべてをコード化し、プレート 1 枚につき 100 個、1 用量 200 個の分裂中期細胞を盲検法で観察した。分裂中期細胞は、染色体がよく拡がった細胞を観察した。

構造異常は、以下の分類¹⁾に従って観察した。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。

{	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の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした。他の異常と区別して記録し、構造異常には含めなかった。

数的異常は、核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた。

(6) 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、ギャップのみをもつ細胞を除いて集計した。

被験物質の染色体異常誘発性の判定は、各処理条件において、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 (-), いずれか一方または両方が 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。

5.2 結果のまとめ

染色体構造異常および数的異常をもつ細胞の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度 (%) を表示した。染色体構造異常は種類別に細胞数を表示した。また、細胞増殖抑制試験および染色体異常試験における用量依存性について図示した。

5.3 連続処理法

短時間処理法の結果、染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件においても 5% 未満であった。このため、連続処理法による試験を実施した。

原則として、短時間処理法に準じて行った。連続処理法に適用された操作については以下に記載する。

(1) 試験物質用量

連続処理法の細胞増殖抑制試験に先立ち、24 時間処理で予備試験を実施した。

その結果、陰性対照と比較した細胞生存率は下記の通りであった。

処理群 \ 用量 ($\mu\text{g/ml}$)	5	50	500
24 時間処理	100 %	100 %	100 %

以上の結果から、細胞増殖抑制試験は、下記の用量を設定した。

24 時間処理 : 31.3, 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$

細胞増殖抑制試験の結果は図 3 に示すごとく、いずれの用量においても 50 % 以上の細胞増殖抑制は認められなかった。この結果より、染色体異常試験は 500 $\mu\text{g/ml}$ を最高用量とし、その 1/2, 1/4 の用量を設定した。

染色体異常試験の陽性対照 MMC の濃度は、染色体異常誘発性が知られている 0.03 $\mu\text{g/ml}$ とした。

(2) 細胞処理

4×10^3 個/ml に調製した細胞懸濁液を 6 cm プレートに 5 ml ずつ播き、3 日間培養した。

培養液を除去した後、下記の組成の細胞処理液をプレートに加え、細胞を 24 時間連続処理した。

	被験物質懸濁液 または陰性対照	培養液
24 時間処理	0.025 ml	5.0 ml

染色体異常試験の陽性対照については、下記の組成の細胞処理液で同様に細胞を処理した。

	MMC 溶液	培養液
24 時間処理	0.5 ml	4.5 ml

結 果

結果を別表 1, 2 および図 1 ~ 7 に示す.

短時間処理法および連続処理法のいずれの処理条件においても, 染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5 % 未満であった.

考 察 お よ び 結 論

N,N' -(1,2-エタンジール)ビスオクタンアミド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, 短時間処理法および連続処理法のいずれの処理条件においても, 染色体異常を持つ細胞の出現頻度は 5 % 未満であった.

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の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, N,N' -(1,2-エタンジール)ビスオクタンアミドの 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, 類似化合物の染色体異常誘発性に関する情報は添付資料 1 にまとめた.

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

別表 1 染色体異常試験の結果(短時間処理法)

被験物質の名称 N,N'-(1,2-エタンジール)ビスオクタデカンジド

処理時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 (μ g/ml)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)				
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)	
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	1	0	0	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	125 F	100	0	0	1	0	0	1	1	105	100	0	0	0	
			100	1	0	0	0	0	1	0	105	100	0	0	0	
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1	105	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	-	250 F, S, P	100	0	0	1	0	0	1	0	109	100	0	0	0	
			100	1	0	0	0	0	1	0	105	100	0	0	0	
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	107	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	-	500 F, S, P	100	0	1	1	0	0	1	0	109	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	102	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	106	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	17	29	0	0	0	39	0	109	100	0	0	0	
			100	31	23	1	0	0	45	0	106	100	1	0	1	
			200	48 (24.0)	52 (26.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	84 (42.0)	0	108	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	104	100	0	0	0	
			100	0	0	1	0	0	1	0	96	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	+	125 F	100	0	1	0	0	0	1	0	111	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	101	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	106	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	+	250 F, S, P	100	0	0	0	0	0	0	0	104	100	1	0	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	111	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	108	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	
6-18	+	500 F, S, P	100	0	1	0	0	0	1	0	103	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	126	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	114	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	+	陽性対照 (BP 20)	100	29	65	0	0	0	68	0	89	100	0	0	0	
			100	23	65	0	0	0	68	0	104	100	0	0	0	
			200	52 (26.0)	130 (65.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	136 (68.0)	0	97	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

MMC:マイトマイシンC BP:ペンゾ[a]ピレン DMSO:ジメチルスルホキシド

F:被験物質処理(6時間処理)終了時,培養液表面に膜状で浮遊した被験物質が認められた.

S:被験物質処理(6時間処理)終了時,培養液中に浮遊した被験物質が認められた.

P:被験物質処理(6時間処理)終了時,培養液中に沈殿した被験物質が認められた.

別表 2 染色体異常試験の結果(連続処理法)

被験物質の名称 N, N'-(1, 2-エタンジール)ビスオクタデカンアミド

処理時間(h)	被験物質の用量 (μ g/ml)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	1	0	0	1	0	104	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	1	96	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	125 F	100	0	0	0	0	0	0	0	106	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	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	103	200	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	250 S, P, F	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		100	0	0	1	0	0	1	1	106	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	103	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	500 S, P, F	100	0	0	0	0	0	0	0	96	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	1	109	100	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)	1	102	200	1 (0.5)	0 (0.0)
24-0	陽性対照 (MMC 0.03)	100	14	2	1	0	0	17	1	102	100	0	0	0
		100	10	11	0	0	0	21	0	119	100	0	0	0
		200	24 (12.0)	13 (6.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	38 (19.0)	1	111	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC: マイトマイシンC DMSO: ジメチルスルホキシド

F: 被験物質処理終了時、培養液表面に膜状で浮遊した被験物質が認められた。

S: 被験物質処理終了時、培養液中に浮遊した被験物質が認められた。

P: 被験物質処理終了時、培養液中に沈殿した被験物質が認められた。

図1 N, N' -(1,2-エタンジイル)ビスオクタデカンアミドの細胞毒性
(短時間処理法・S9 mix非共存下)

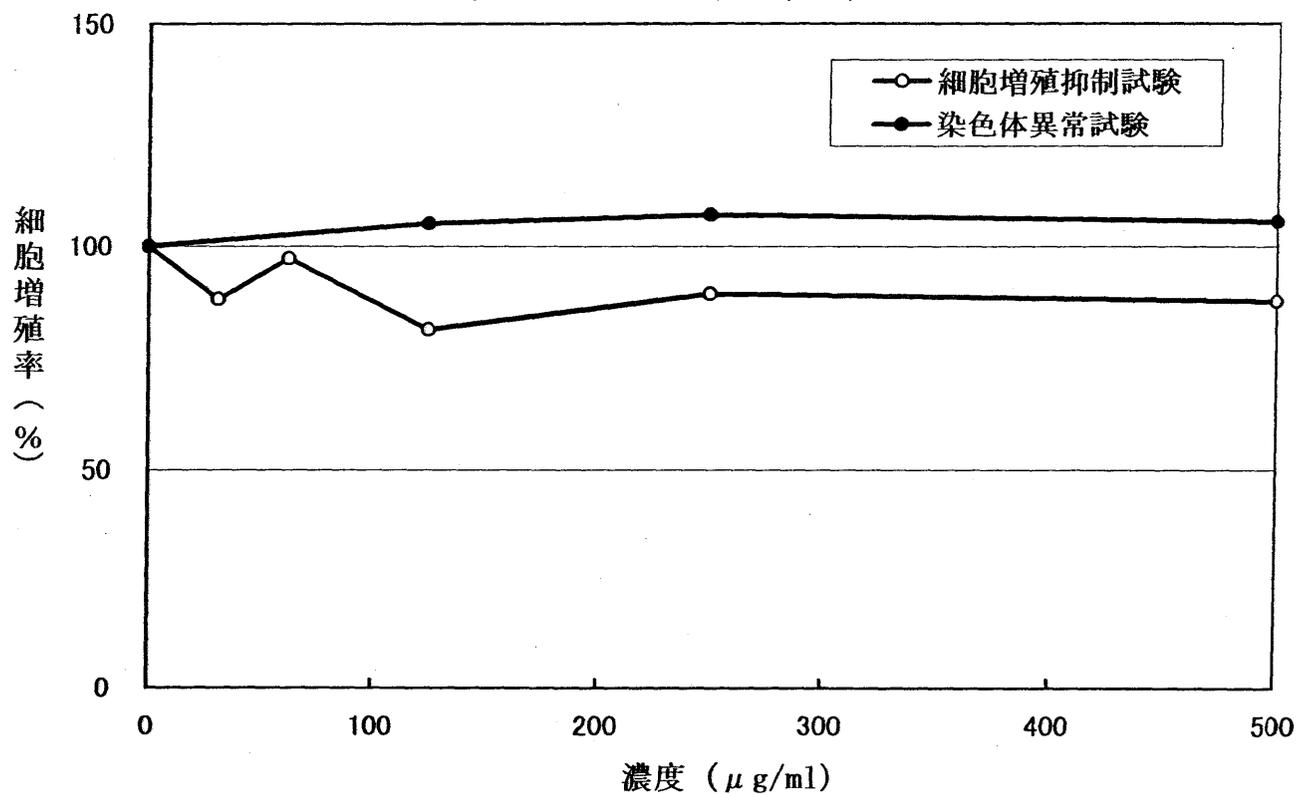


図2 N, N' -(1,2-エタンジイル)ビスオクタデカンアミドの細胞毒性
(短時間処理法・S9 mix共存下)

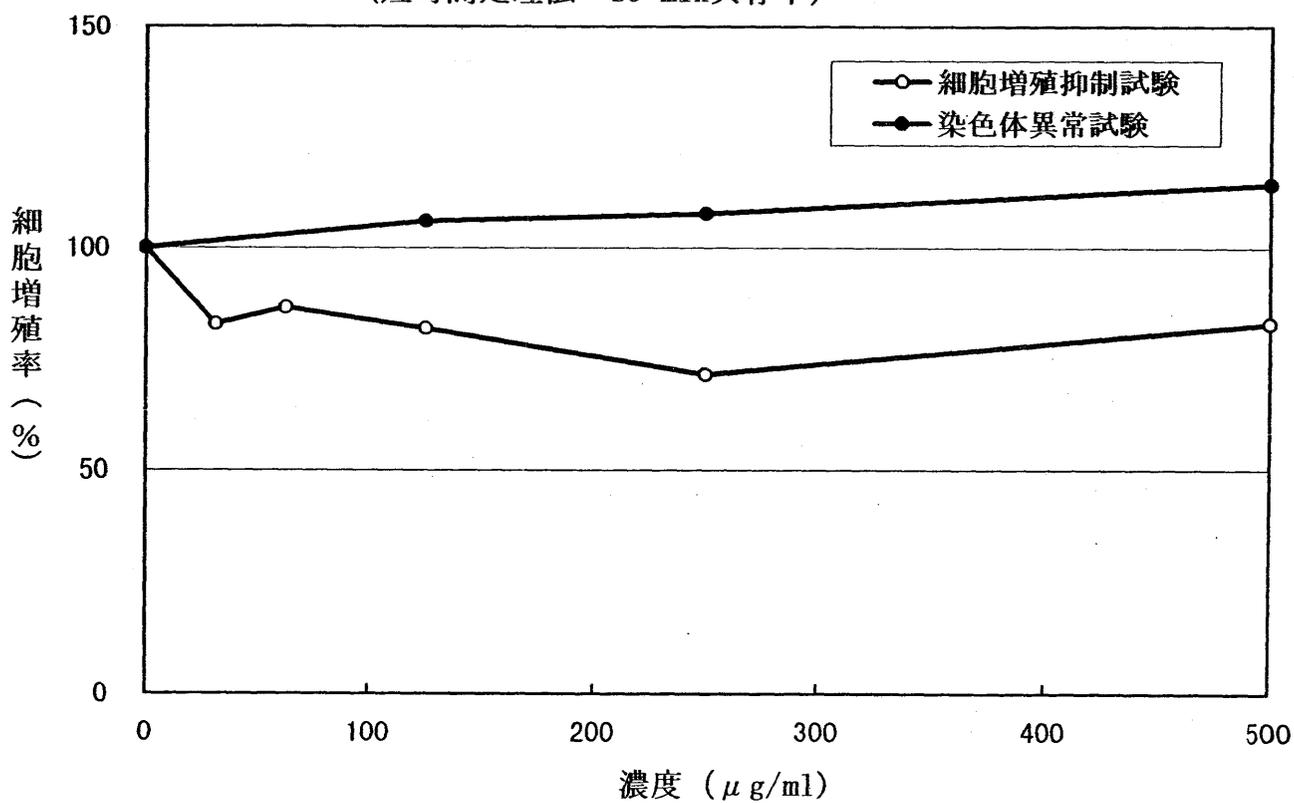


図3 N,N' -(1,2-エタンジイル)ビスオクタデカンアミドの細胞毒性(連続処理法・24時間処理)

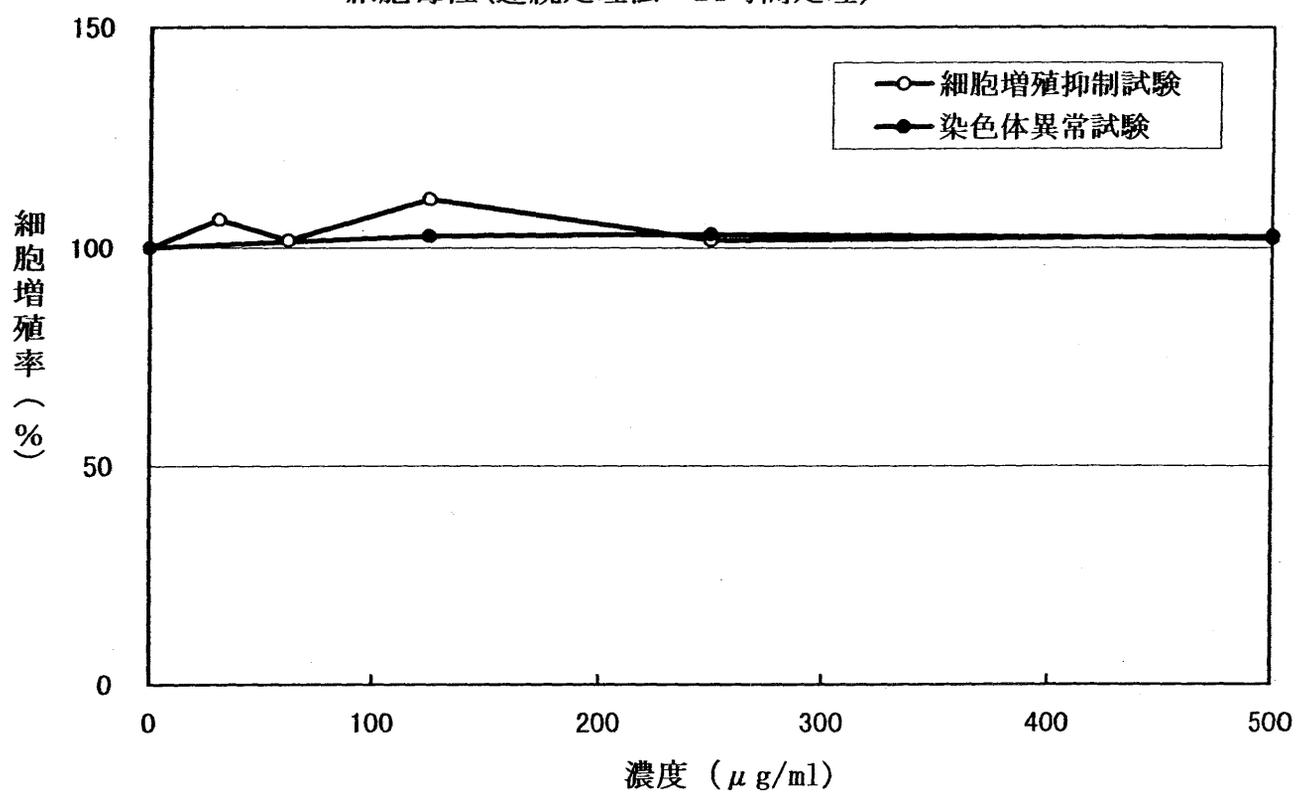


図4 N,N' -(1,2-エタンジイル)ビスオクタデカンアミドの
構造異常細胞出現頻度 (短時間処理法)

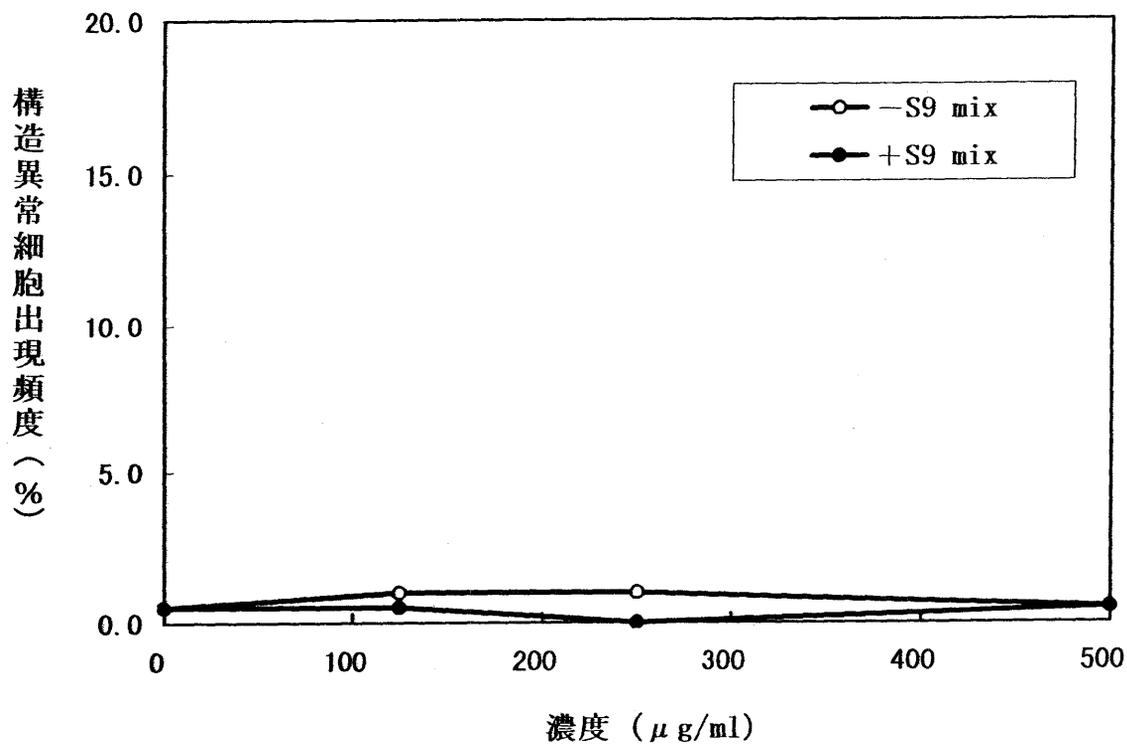


図5 N,N' -(1,2-エタンジイル)ビスオクタデカンアミドの
数的異常細胞出現頻度 (短時間処理法)

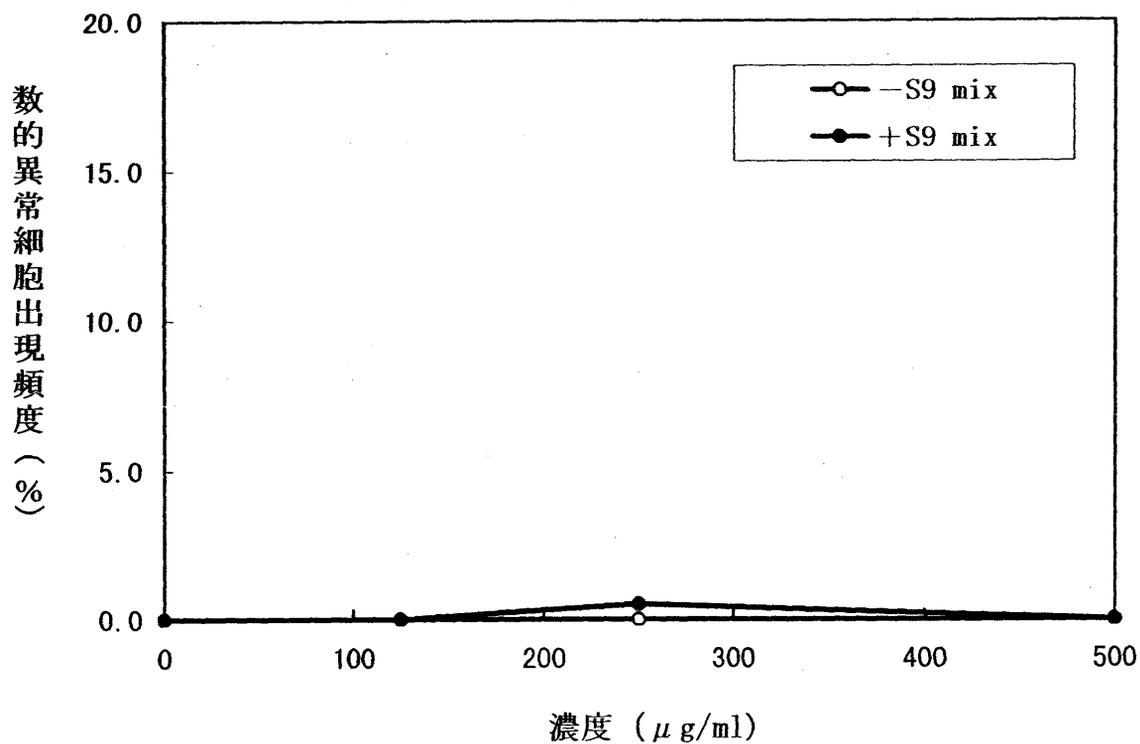


図6 N,N' -(1,2-エタンジイル)ビスオクタデカンアミドの
構造異常細胞出現頻度 (連続処理法)

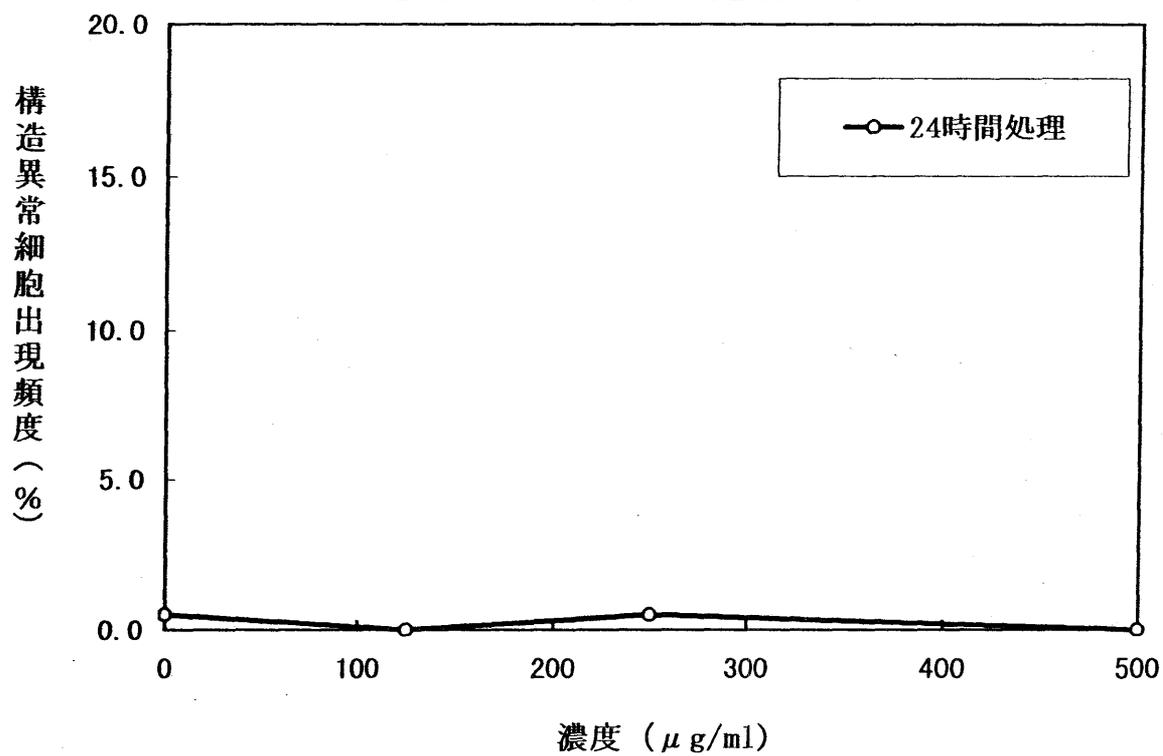


図7 N,N' -(1,2-エタンジイル)ビスオクタデカンアミドの
数的異常細胞出現頻度 (連続処理法)

