



亜リン酸トリメチルの
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 -----	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 -----	6
参考文献 -----	7

Fig. 1

Tables 1、2

[要 約]

亜リン酸トリメチル (TMP) 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。

TMP 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 非存在下 (MEM 培地中で 6 時間処理後 18 時間の回復時間) についても増殖抑制は認められなかった。一方、短時間処理の S9 mix 存在下 (MEM 培地の代わりに S9 反応液を使用) については、1.2 mg/mL (10 mM) の濃度において約 50% の増殖抑制が認められた。

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、1.2 mg/mL (10 mM) を最高処理濃度とし、公比 2 で以下計 3 濃度を設定し、染色体分析を実施した。また、短時間処理の S9 mix 存在下においては、1.2 mg/mL (10 mM) を最高処理濃度とし、公比 2 で以下計 4 濃度を設定したが、1.2 mg/mL の濃度においても、染色体分析が可能であることからこ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、TMP は S9 mix 存在下においてのみ、弱いながらも染色体の構造異常および倍数性細胞を誘発した。

[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。

変異原物質の細胞内標的（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表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S9 mix非存在下での連続処理および短時間処理があり、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。

本試験では、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、TMP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、CO₂インキュベーター（5% CO₂、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 TMP (CAS No. 121-45-9) の物理化学的性状等は Appendix 1 に示した。

TMP は から提供された後、デシケータ中で冷蔵保管し、使用のつどジメチルスルホキシド (DMSO、和光純薬工業、ロット番号：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-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°C 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ジン酸 (酸化型、 β -NADP⁺、オリエンタル酵母) および KCl を蒸留水に溶解し、混合液として -80°C に保管し、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 (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) 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/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 の細胞懸濁液とした。被験物質調製液は、プラスチックディッシュの底面を溶解させることや、強い特異臭を有するため、5 mL (2×10^4 個) の細胞懸濁液をガラスフラスコ (ハリオ) 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 μL 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 μ L ずつ添加し6時間処理した。処理終了後、リン酸緩衝塩類溶液 (Ca^{2+} および Mg^{2+} を含む) で洗浄、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。全ての処理系列において、0.038 ~ 1.2 mg/mL (10 mM) の濃度範囲で処理した。

培養終了後、5 mL の0.02% EDTA 含有リン酸緩衝塩類溶液 (Ca^{2+} および Mg^{2+} を含まない) を加え、ピペッティングにより細胞をはがし、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®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.) を用いてフラスコあたりの細胞数を計測した (1フラスコあたり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フラスコあたりの細胞数の比を求め、TMP による細胞増殖抑制作用の指標とした。1濃度あたり2枚のフラスコを用いた。

5 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、TMP は連続処理および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 (Fig. 1)。一方、S9 mix 存在下で短時間処理した場合は1.2 mg/mL (10 mM) の濃度群で約50%の増殖抑制が認められた (Fig. 1)。

このことから染色体異常試験において、連続処理および短時間処理ともに 1.2 mg/mL (10 mM) 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: 0.30、0.60、1.2 mg/mL、S9 mix 存在下の短時間処理: 0.15、0.30、0.60、1.2 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を設定した。また、染色体異常試験においては1濃度あたり2枚のフラスコを用い、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 μ g/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 μ g/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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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^{2+} および Mg^{2+} 不含）をフラスコあたり 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フラスコあたり 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、濃度の高い方からフラスコ毎の分裂中期細胞の出現頻度（分裂指数）を求め、2フラスコ共に 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、すべての系列において最高処理濃度の 1.2 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、これら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）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。フラスコ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²⁾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。

[結果および考察]

TMPをS9 mix存在下で短時間処理した場合、染色体の構造異常については濃度依存性および出現頻度ともに統計学的に有意 ($P < 0.01$) となり、最高処理濃度 (1.2 mg/mL、10 mM) における出現頻度が7.5%であることから (Table 2)、TMPは弱いながらも染色体の構造異常を誘発すると結論した。連続処理においては、出現頻度ないし濃度依存性について統計学的に有意 ($P < 0.01$) となる場合も認められたが、染色体異常を持つ細胞の出現頻度が5.0%と低いことから、生物学的観点から陰性と判断した。

倍数性細胞については、短時間処理のS9 mix存在下のすべての濃度群において統計学的に有意な増加 ($P < 0.01$) が認められ、濃度依存性も有意差 ($P < 0.01$) が認められた。また、その出現頻度が2.88%であることから (Table 2)、陽性と判断した。

一方、本試験と併行して実施された細菌を用いる復帰突然変異試験では、変異原活性は認められていない (食薬セ研第9-1870号)。また、TMPの関連物質である dibutyl phosphate および trimethyl phosphate については、染色体の構造異常を誘発しないことが報告されている^{4)、5)}。

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」, サイエンス社, 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) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修:「化学物質毒性試験報告」, 化学物質点検推進委員会 編集・発行, 東京 (1995), Vol.2
- 5) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修:「化学物質毒性試験報告」, 化学物質点検推進委員会 編集・発行, 東京 (1996), Vol.3

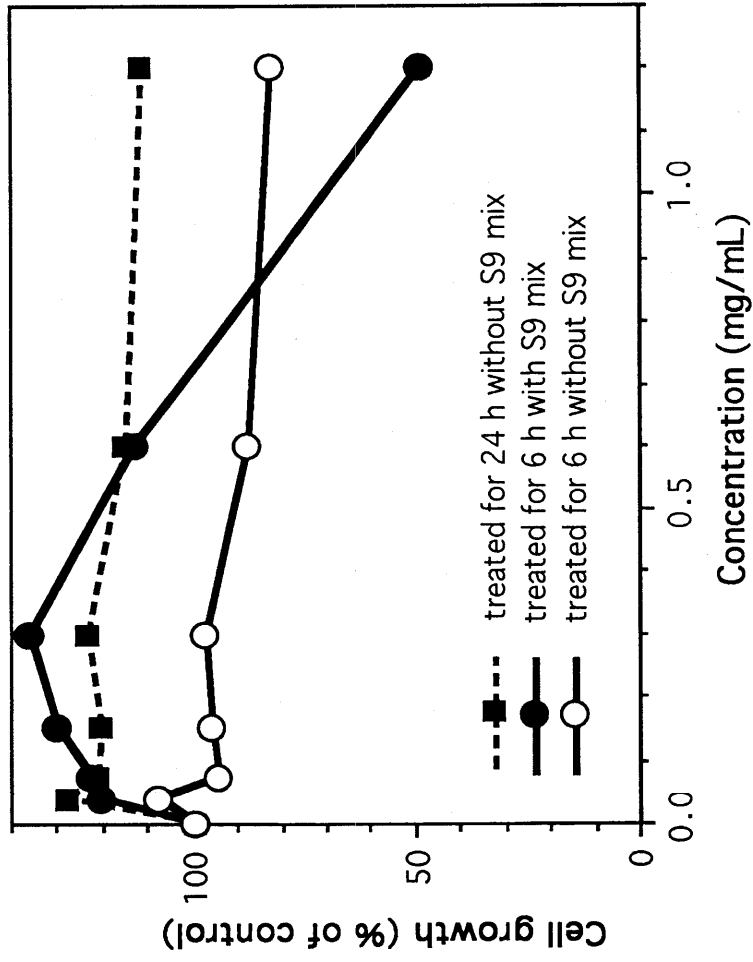


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with trimethyl phosphite

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with trimethyl phosphite (TMP)** without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/mL)	Time of exposure (h)	No. of analysed cells	No. of structural aberrations					Total	3) Others		No. of cells with aberrations		Polyploid (%)	4) Trend test		Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)	Mitotic ⁷⁾ index (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse		mul	TA	TA (%)	TAG (%)		TA (%)	SA		
Non-treatment			200	0	1	1	1	0	10	13	0	4	(2.0)	0.00				
Solvent ¹⁾ 0		24	200	1	0	1	0	0	0	2	0	2	(1.0)	0.00			100.0	
TMP 0.30		24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0.00			99.0	
TMP 0.60		24	200	0	1	0	2	0	0	3	0	3	(1.5)	0.13	+	-	86.5	
TMP 1.2		24	200	1	7	4	1	0	0	13	0	10	(5.0)	0.13			71.6	
MC 0.00005		24	200	2	44	132	0	0	0	178	1	110*	(55.0)	0.00				6.5
Solvent ¹⁾ 0		48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(0.0)	0.00			100.0	
TMP 0.30		48	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1	(0.5)	0.13			122.7	
TMP 0.60		48	200	0	0	2	0	0	0	2	0	2	(1.0)	0.00	+	+	92.7	
TMP 1.2		48	200	2	1	7	1	1	20	32	5	10*	(5.0)	0.63			35.2	
MC 0.00005		48	200	2	61	183	10	2	60	318	19	122*	(61.0)	0.13				7.6

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, MC : mitomycin C. 1) Dimethylsulfoxide 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 coulter counter. 7) Number of metaphase per 500 cells was scored in each flask 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 99.58 wt%. Methanol (0.10%), dimethyl hydrophosphite (0.02%), trimethyl phosphate (0.19%) and unknown substance (0.11%) were contained as impurity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with trimethyl phosphite (TMP)** with and without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	No. of structural aberrations					No. of cells with aberrations		Polyploid (%)	Trend test		Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)	Mitotic ⁷⁾ index (%)		
				analysed	gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾ total		Others	TAG (%)			TA (%)	SA
Non-treatment				200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13				
Solvent ¹⁾ 0		-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			100.0	
TMP 0.30		-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			98.0	
TMP 0.60		-	6-(18)	200	1	1	1	0	0	3	3 (1.5)	2 (1.0)	0.13	-	-	81.9	
TMP 1.2		-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			85.0	12.6
CPA 0.005		-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00				
Solvent ¹⁾ 0		+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			100	
TMP 0.30		+	6-(18)	200	1	1	2	1	0	5	5 (2.5)	4 (2.0)	0.88 *			118.1	
TMP 0.60		+	6-(18)	200	0	0	3	1	0	4	3 (1.5)	3 (1.5)	2.88 *	+	+	118.9	
TMP 1.2		+	6-(18)	200	1	6	9	0	2	18	15* (7.5)	14* (7.0)	2.88 *			115.4	11.4
CPA 0.005		+	6-(18)	200	3	26	76	4	1	110	71* (35.5)	69* (34.5)	0.00				

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) Dimethylsulfoxide 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 coulter counter. 7) Number of metaphase per 500 cells was scored in each flask 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 99.58 wt%. Methanol (0.10%), dimethyl hydrophosphite (0.02%), trimethyl phosphate (0.19%) and unknown substance (0.11%) were contained as impurity.