ジアセトンアルコールの
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 ---------- 6

特記事項 ---------- 6

参考文献 ---------- 7

Fig. 1

Tables 1 and 2

[要　　約]

ジアセトンアルコール（DAA）は、CHL/IU 細胞（チャイニーズ・ハムスター、肺）に染色体異常を誘発しなかった。

DAA は CHL/IU 細胞に対して、連続処理（新鮮培地中で24時間処理）および短時間処理の S9 mix 存在下および非存在下（それぞれ S9 反応液および MEM 培地中で 6時間処理後 18時間の回復時間）で、最高処理濃度である 1.2 mg/ml（10 mM）においても 50％を越える増殖抑制を示さなかった。

このことから染色体異常試験において、連続処理（24時間および 48時間処理）および短時間処理（S9 mix 存在下および非存在下）ともに 1.2 mg/ml（10 mM）を最高処理濃度とし、公比 2 で各処理濃度を設定した。染色体分析は、すべての系列で 1.2 mg/ml（10 mM）の濃度含む 3濃度群を観察対象とした。

その結果、DAA はいずれの処理条件下においても、染色体の構造異常および倍数性細胞を誘発しなかった。

[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、DAA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（Cansera International、ロット番号：2605420）を10%含むイーグルMEM培地（日水製薬）を用い、CO_2インキュベーター（5% CO_2、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12代）。

2　被験物質および陽性対照物質

被験物質であるDAA（CAS No. 123-42-2）の物理化学的性状等はAppendix 1に示した。DAAは　　から提供された後、密封、遮光条件下で冷蔵し、使用のつど注射用蒸留水（大塚製薬工場、ロット番号：K5H71）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：051AEG）は、注射用蒸留水（大塚製薬工場、ロット番号：K5H71）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-333、1995年9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℃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℃に保管し、使用時はこれにS9、$MgCl_2$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と被験物質調製液の添加量の合計と等量）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 $MgCl_2$、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培地に2倍濃度MEM培地（被験物質調製液の添加量と等量）を混合したものを使用した。

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単離した後、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 4.5 ml と培地交換した後、被験物質調製液を 0.5 ml 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 2.7 ml に培地交換した後、被験物質調製液を 0.3 ml 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。

連続および短時間処理ともに、0.038 ～ 1.2 mg/ml（10 mM）の濃度範囲で処理した。培養終了後、10％ホルマリン溶液で固定し、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

細胞増殖抑制試験の連続および短時間処理において、最高処理濃度の 1.2 mg/ml（10 mM）においても50％の増殖抑制は示さなかった（Fig. 1）。

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 1.2 mg/ml（10 mM）を最高処理濃度とし、公比 2 で 3濃度を設定した（0.30、0.60、1.2 mg/ml）。

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、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に溶媒対照群と陽性対照群および無処理対照群（新鮮培地と交換）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、またS9 反応液および MEM 培地 2.7 ml に注射用蒸留水を 0.3 ml 加え（全量：3 ml）、CPA を最終濃度が 5 μg/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（Ca^{2+} および Mg^{2+} 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）を約 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枚のスライド標本を作製した。

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、細胞増殖率測定の結果と分裂指数により、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、観察対象の 3濃度群を決定した。

6　染色体分析

細胞増殖率の測定結果（Table 1、2）より、すべての処理系列で 1.2 mg/ml（10 mM）の濃度においても増殖抑制が認められず、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（MMS）研究会[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。また、異常を有する細胞は、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で表し、記録用紙に記録した。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。

溶媒の背景データ（Appendix 2）と被験物質処理群間で、フィッシャーの直接確率法[2)]

により、familywiseの有意水準を5%として有意差検定を実施した。直接確率法で有意差がある場合、用量依存性の有無をコクラン・アーミテッジの傾向性検定[3]（$p < 0.05$）で確認した。最終的な判定は、統計学的および生物学的な評価に基づいて行った。

[結　　果]

DAAは連続処理において、処理限界濃度の1.2 mg/ml（10 mM）を含むいずれの処理濃度でも、染色体の構造異常および倍数性細胞を誘発しなかった（Table 1）。短時間処理において、DAAは染色体の構造異常を誘発しなかった。一方、短時間処理のS9 mix存在下における中濃度群（0.60 mg/ml）およびS9 mix非存在下における高濃度群（1.2 mg/ml）においてのみ倍数性細胞の有意な増加（それぞれ1.25%および1.00%）が認められたが、濃度依存性は認められず、本試験において用いた統計学的判定基準では疑陽性の判定となった。しかしながら、本実験における溶媒対照の倍数性細胞の出現頻度（S9 mix存在下および非存在下でそれぞれ0.63%および1.13%、Table 2）と比較すると、処理群の倍数性細胞出現頻度は明らかにコントロールレベルであり、生物学的には陰性と判定した（Table 2）。

一方、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存在下においてのみ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:「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)

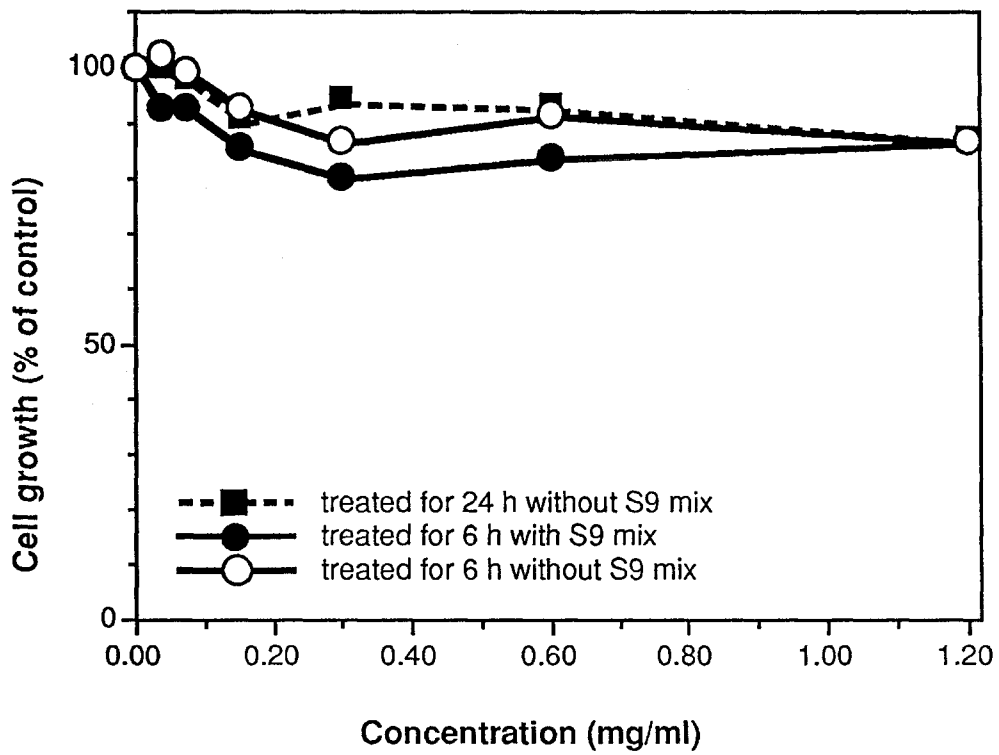

Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with diacetone alcohol

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with diacetone alcohol (DAA)* without S9 mix

Group	Concen-tration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Trend test[5]		Concurrent[6] cytotoxicity (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Control[1]			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			——
Solvent[1]	0	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.75			100.0
DAA	0.30	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.63			93.5
DAA	0.60	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	NT	NT	93.5
DAA	1.2	24	200	0	0	0	2	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.63			88.5
MC	0.00005	24	200	6	69	121	2	3	0	201	2	115 (57.5)	113 (56.5)	0.50			——
Solvent[1]	0	48	200	0	1	0	3	0	0	4	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			100.0
DAA	0.30	48	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			99.5
DAA	0.60	48	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25	NT	NT	100.5
DAA	1.2	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			98.5
MC	0.00005	48	200	2	65	171	14	9	50	311	6	120 (60.0)	120 (60.0)	0.50			——

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, NT: not tested.
1) Distilled water 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 ($p<0.05$) when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control ($p<0.05$) by Fisher's exact test. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. * : Purity of test substance was 99.8 wt%. Acetone (0.1 %) and mesityl oxide (0.05 %) were contained as impurities.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with diacetone alcohol (DAA)*** with and without S9 mix

Group	Concen-tration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations gap	ctb	cte	csb	cse	mul	total	Others[3]	No. of cells with aberrations TAG (%)	TA (%)	Polyploid[4] (%)	Trend test[5] SA	NA	Concurrent[6] cytotoxicity (%)
Control[1]				200	3	1	2	1	0	10	17	0	7 (3.5)	5 (2.5)	0.63			——
Solvent	0	−	6 - (18)	200	1	0	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	1.13			100.0
DAA	0.30	−	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.63			94.5
DAA	0.60	−	6 - (18)	200	0	5	1	0	0	0	6	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	NT	−	102.5
DAA	1.2	−	6 - (18)	200	1	1	0	3	0	0	5	0	2 (1.0)	1 (0.5)	1.00*			92.5
CPA	0.005	−	6 - (18)	200	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.50			——
Solvent[1]	0	+	6 - (18)	200	5	1	1	0	0	0	7	0	7 (3.5)	2 (1.0)	0.63			100.0
DAA	0.30	+	6 - (18)	200	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.75			101.5
DAA	0.60	+	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	1.25*	NT	−	99.5
DAA	1.2	+	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1.00			101.5
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	11	196	299	4	5	140	655	1	176 (88.0)	175 (87.5)	0.63			——

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, NT: not tested.
1) Distilledwater 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 $p<0.05$. 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. * : Significantly different from historical solvent control data with respect to TAG and polyploid at $p<0.05$ by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. ** : Purity of test substance was 99.8 wt%. Acetone (0.1 %) and mesityl oxide (0.05 %) were contained as impurities.