食薬セ研第 10-1652 号

2000年11月24日

2-メチル-2-プロペンニトリルのチャイニーズ・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　被験物質および陽性対照物質 ---------- 2

2　細胞 ---------- 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

結果および考察 ---------- 6

参考文献 ---------- 7

Fig. 1

Table 1、2

[要　　約]

2-メチル-2-プロペンニトリル (MPN) 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。

MPN の CHL/IU 細胞に対する 50%増殖抑制濃度は、 S9 mix 存在下で短時間処理した場合 (S9 反応液中で 6時間処理後 18時間の回復時間) 、 0.27 mg/mL であった。一方、 S9 mix 非存在下で短時間処理 (S9 反応液の代わりに MEM 培地を使用) した場合 および連続処理 (新鮮培地中で 24時間処理) した場合は、0.67 mg/mL (10 mM) の濃度においても50%を越える細胞増殖抑制作用は認められなかった。

このことから染色体異常試験では、S9 mix 非存在下での短時間処理および連続処理 (24時間処理) においては、0.67 mg/mL の濃度を最高処理濃度とし、公比 2 で計 3濃度を設定した。S9 mix 存在下での短時間処理においては、50%増殖抑制濃度の 2倍濃度である 0.54 mg/mL の濃度を最高処理濃度とし、公比 2 で計 5濃度を設定した。染色体分析が可能な最高濃度は、 S9 mix 存在下および非存在下で短時間処理した場合、それぞれ 0.27 mg/mL および 0.67 mg/mL 、24時間連続処理においては 0.67 mg/mL となったため、これら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、MPN は S9 mix 存在下での短時間処理条件下において、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の標的 (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現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。

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、MPN 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、「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成 9年 10月 31日、環保安第 287号、衛生第 127号、平成09・10・31 基局第 2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　被験物質および陽性対照物質

被験物質である MPN (CAS No. 126-98-7) の物理化学的性状等は Appendix 1 に示した。MPN は　　から提供された後、冷蔵遮光保管した。本ロットについては、

実験期間中安定であることが確認された。

試験に際しては、使用のつど局方注射用水(大塚製薬工場、ロット番号：K8H73)に溶解し、希釈した。なお、予備検討の結果、被験物質溶液は、プラスチックディッシュを溶解することや揮発性があることから、ガラスフラスコ(25 cm^2)を使用した。

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：204AGL)は用時調製とし、局方注射用水(大塚製薬工場、ロット番号：K8H73)に溶解して用いた。

2　細胞

CHL/IU細胞（JCRB細胞バンクより入手）は、仔牛血清(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、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21代)。

3　S9反応液

S9(キッコーマン、ロット番号：RAA-389、1998年8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℃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-$NADP^+$、オリエンタル酵母工業)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（被験物質調製液を10 vol%で添加したときの各成分の最終濃度：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）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、その 5 mL (2×10^4個) をガラスフラスコに播種して 3日間培養した。

S9 mix 存在下で短時間処理する場合、S9 反応液 2.7 mL と培地交換した後、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 5 mL に交換し、さらに 18時間培養した。一方、S9 mix 非存在下で短時間処理する場合、S9 反応液の代わりに MEM 培地を用いた以外の操作は、S9 mix 存在下の処理と同様に行った。また、連続処理においては、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。なお、被験物質は揮発性物質であることから、密栓して処理を行った。

全ての処理系列において、0.021 ～ 0.67 mg/mL (10mM) の濃度範囲で処理した。培養終了後、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) をフラスコ当り 5 mL 加えて細胞をはがした。その細胞懸濁液 0.5 mL を等張性血球計算用希釈液 (アイソトン®II、Coulter) 9 mL に加え、コールターカウンター (Model D、Coulter Electronics) を用いてフラスコ当りの細胞数を計測した (1フラスコ当り 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当りの細胞数の比を求め、被験物質による細胞増殖抑制作用の指標とした。1濃度あたり 2個のフラスコを用いた。

5　染色体異常試験

細胞増殖抑制試験において、MPN はS9 mix 存在下で短時間処理した場合、処理濃度に依存してCHL/IU 細胞の増殖を抑制し (Fig.1) 、50%増殖抑制濃度は、0.27 mg/mLであった。一方、S9 mix 非存在下で短時間処理および連続処理した場合には、最高濃度の0.67 mg/mL (10 mM) においても50%を越える増殖抑制作用は認められなかった (Fig.1) 。

このことから染色体異常試験の S9 mix 存在下の短時間処理では、50%増殖抑制濃度の 2 倍濃度付近を最高処理濃度とし、以下公比 2 で 5濃度を設定した 。S9 mix 存在下の短時間処理および連続処理では、 0.67 mg/mL (10 mM) を最高処理濃度とし、以下公比 2 で 3濃度を設定した 。染色体異常試験においては 1濃度あたり 2個のフラスコを用い、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。短時間処理では、S9 mix 存在下と非存在下で 6時間処理した。連続処理では 24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。また、無処理対照群および陽性対照群についてはコールターカウンターによる細胞増殖率測定は行わなかった。

陽性対照群については、S9 mix 非存在下で短時間処理する場合、MEM培地 2.7 mL に 0.3 mL の局方注射用水を加え、MC を最終濃度が 0.1 μg/mL となるように添加した。連続処理する場合は培地 4.5 mL に 0.5 mL の局方注射用水を加え、MC を最終濃度が 0.05 μg/mL となるように添加した。また、S9 mix 存在下で短時間処理する場合、S9 反応液 2.7 mL に 0.3 mL の局方注射用水を加え、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）をフラスコ当り 5 mL 加えて細胞をはがし、15 mL の遠沈管に集めた。被験物質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 、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染色体標本を作製せず、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。

分裂指数 (Table 1、 2) により、 S9 mix 存在下の短時間処理では 0.27 mg/mL が染色体分析が可能な最高濃度であったことから、この濃度を含めて以下 3 濃度を観察対象とした。S9 mix 非存在下の短時間処理および連続処理ではともに 0.67 mg/mL が染色体分析が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 3 濃度を観察対象とした。また、染色体分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会 (JEMS・MMS) [1] による分類法に基づいて行った。ただし、ギャップについては、ガイドラインに従い、染色体分体幅よりも狭い非染色性部位と定義し、構造異常誘発性の判定には含めないこととした。染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を観察し、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、倍数性細胞は可能な限り 1群 800個の分裂中期細胞を分析した。

溶媒対照群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。

[結果および考察]

MPN は、S9 mix 存在下で短時間処理した場合においてのみ、観察対象とした 3濃度において染色体の構造異常が濃度依存的に増加し、構造異常（ギャップを除く）を有する細胞の出現頻度は7.5%～62.0%となった（Table 1）。それ以外の処理系列では、染色体の構造異常を有する細胞の頻度は溶媒対照のレベルであった（Table 1、2）。構造異常の誘発が認められたS9 mix 存在下での短時間処理群について、D_{20}値[4] を求めたところ、 0.090 mg/mL となった。また、S9 mix 存在下で短時間処理した場合の低濃度（0.068 mg/mL）および中濃度（0.14 mg/mL）において、倍数性細胞の有意な増加（$p< 0.01$）が認められ、その出現頻度はそれぞれ 3.13%および 1.88%となり、濃度依存性はみられなかった（Table 1）。観察対象とした最高濃度では、分裂指数が低下していることや規定の細胞数

を分析できなかったことから、分裂遅延により倍数性細胞の頻度が濃度依存的に減少した可能性が考えられる。それ以外の処理系列では、倍数性細胞の頻度は溶媒対照のレベルであった（Table 1、2）。倍数性細胞の誘発に関しては、濃度依存性が認められないことから D_{20} 値は求めなかった。

一方、陽性対照物質として用いたMCは、短時間処理のS9 mix存在下および連続処理において染色体の構造異常を誘発し（Table 1、2）、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 1）。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。

以上の結果より、MPNは代謝活性化されてはじめて染色体異常を誘発する物質であることが示唆された。

MPNのメチル基が水素に置換しているアクリロニトリルは、代謝活性化の有無とは無関係に染色体の構造異常を誘発するが、倍数性細胞を誘発しないという報告がある[4]。また、MPNのニトリル基が他のものに置換しているメチルメタクリレートについては、染色体の構造異常を誘発するが、その作用は弱いことが知られている[5]。これらのことから、化学構造的に類似したこれらの3物質は、ともに染色体の構造異常を誘発するが、その作用機序は異なる可能性が示唆された。

また、アクリロニトリルについては、復帰突然変異試験で陽性の結果が得られているが[4]、MPNやメチルメタクリレートについては、復帰突然変異試験およびショウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験ともに陰性の結果が報告されている[6)~9)]。

この様に、本試験で陽性の結果を示したMPNの類縁化合物においても染色体異常を生じることが示されている。

[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) 石館　基　監修：「<改定>染色体異常試験データ集」, エル・アイ・シー, 東京

(1987)

5) Doerr, C. L., *et al.*, Micronucleus, chromosome aberration, and small-colony TK mutant analysis to quantitate chromosomal damage in L5178Y mouse lymphoma cells , Mutation Res., 222, pp 191-203, (1989)

6) Zeiger, E., *et al.*, *Salmonella* mutagenicity tests : III. Results from the testing of 255 chemicals, Environmental Mutagenesis, 9, Suppl. 9, pp. 1-110 (1987)

7) Zimmering S., *et al.*, Chemical mutagenesis testing in *Drosophila.* VII. Results of 22 coded compounds tested in larval feeding experiments, Environmental and Molecular Mutagenesis, 14, pp. 245-251 (1989)

8) Waegemaekers T. H. J. M. and Bensink M. P. M., Non-mutagenicity of 27 aliphatic acrylate esters in the Salmonella-microsome test, Mutation Res., 137, pp. 95-102 (1984)

9) Schweikl H., *et al.*, The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells, Mutation Res., 415, pp. 119-130 (1998)

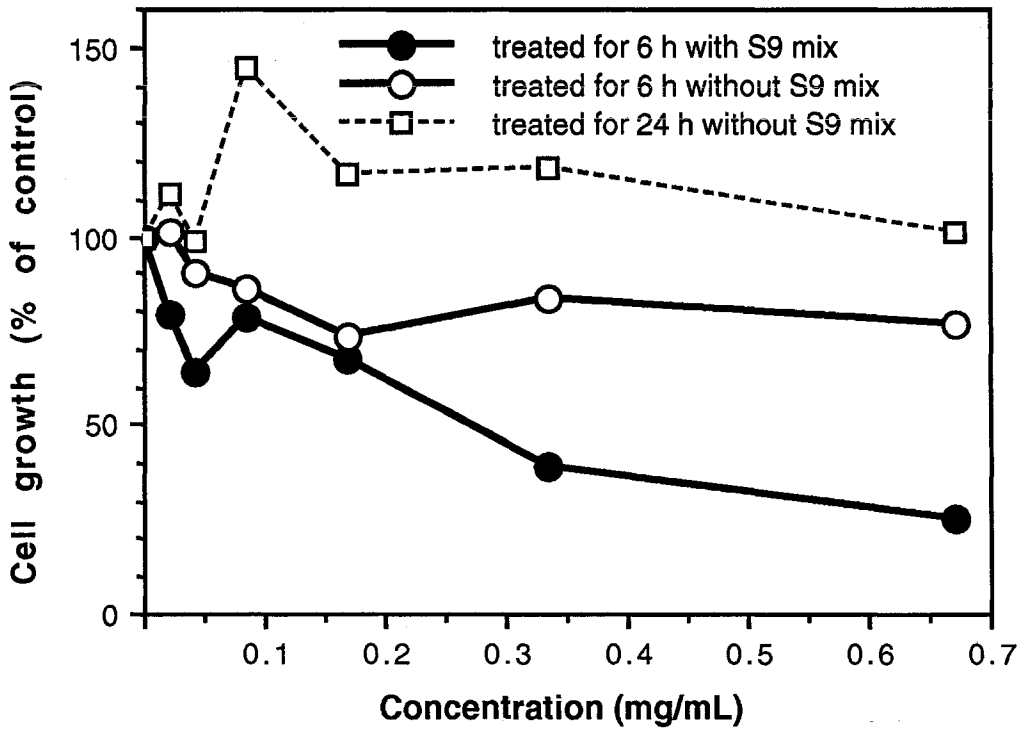

Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-methyl-2-propenenitrile

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-methyl-2-propenenitrile (MPN)** with and without S9 mix

Group	Concen-tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of aberrations gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total	Others[3]	No. of cells with aberrations TAG (%)	TA (%)	POL[4] (%)	Trend test[5] TA	POL	Concurrent[6] cytotoxicity (%)	Mitotic[7] index (%)
Non-treatment				200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			—	—
Solvent[1]	0	−	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			100.0	—
MPN	0.17	−	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			102.9	—
MPN	0.34	−	6 - (18)	200	0	0	1	4	0	0	5	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25	−	−	104.9	—
MPN	0.67	−	6 - (18)	200	1	1	0	0	0	0	2	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25			87.5	12.0, 11.2
MC	0.1 μg/mL	−	6 - (18)	200	10	59	184	1	3	0	257	4	122 *(61.0)	119 *(59.5)	0.00			—	—
Solvent[1]	0	+	6 - (18)	200	2	3	0	1	0	0	6	0	5 (2.5)	4 (2.0)	0.50			100.0	—
MPN	0.068	+	6 - (18)	200	4	10	7	1	0	0	22	0	19 *(9.5)	15 *(7.5)	3.13 *			80.3	—
MPN	0.14	+	6 - (18)	200	3	16	27	1	0	0	47	0	31 *(15.5)	30 *(15.0)	1.88 *	+	−	80.7	—
MPN	0.27	+	6 - (18)	200	20	146	126	4	0	320	616	0	129 *(64.5)	124 *(62.0)	0.14[8]			57.5	0.8, 1.6
MPN	0.54 ***	+	6 - (18)	—											—			20.0	Tox, Tox
CPA	5 μg/mL	+	6 - (18)	200	9	47	169	4	0	0	229	1	127 *(63.5)	124 *(62.0)	0.13			—	—

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, POL : polyploid, MC : mitomycin C, CPA : cyclophosphamide, Tox : cytotoxic.

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 at $p < 0.01$. 6) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 7) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish. 8) Seven hundred and thirty-three cells were analysed.

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.01$ by Fisher's exact probability test.

** : Purity was 99wt%. This substance contained impurities as follows: *p* -methoxyphenol as polymerization inhibitor (51 wt ppm), acetone (19 wt ppm) , acrylonitrile (59 wt ppm), propionitrile (55 wt ppm), methacrolein (72 wt ppm), isobutylonitrile (48 wt ppm), hydrogen cyanide (35 wt ppm), and trace amount of acetonitrile and *cis* -crotonitrile. *** : Chromosome analysis was not performed because there was no metaphase due to cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-methyl-2-propenenitrile (MPN)** without S9 mix

Group	Concen-tration (mg/mL)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of aberrations							Others[3]	No. of cells with aberrations		POL[4] (%)	Trend test[5]		Concurrent[6] cytotoxicity (%)	Mitotic[7] index (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL		
Solvent[1]	0	24	200	1	0	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.00			100.0	—
MPN	0.17	24	200	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			119.6	—
MPN	0.34	24	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.00	–	–	120.7	—
MPN	0.67	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			109.0	10.2, 9.0
MC	0.05 μg/mL	24	200	3	19	87	3	2	0	114	0	81 *(40.5)	80 *(40.0)	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, POL : polyploid, MC : mitomycin C.

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 at $p<0.01$. 6) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 7) Metaphase frequency, mitotic index, was calculated by counting 500 cells in each dish.

* : Significantly different from solvent control at $p< 0.01$ by Fisher's exact probability test.

** : Purity was 99wt%. This substance contained impurities as follows: *p* -methoxyphenol as polymerization inhibitor (51 wt ppm), acetone (19 wt ppm) , acrylonitrile (59 wt ppm), propionitrile (55 wt ppm), methacrolein (72 wt ppm), isobutylonitrile (48 wt ppm), hydrogen cyanide (35 wt ppm), and trace amount of acetonitrile and *cis* -crotonitrile.