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

材料および方法 ---------- 3

1．使用した細胞 ---------- 3

2．培養液の調製 ---------- 3

3．培養条件 ---------- 3

4．被験物質および陽性対照物質 ---------- 3

5．被験物質の調製 ---------- 4

6．試験条件 ---------- 5

7．細胞増殖抑制試験 ---------- 5

7.1 処理条件 ---------- 5

7.2 標本作製法 ---------- 6

7.3 増殖抑制の指標とその結果 ---------- 6

8．本試験の群構成 ---------- 6

8.1 直接法 ---------- 6

8.2 代謝活性化法 ---------- 7

9．染色体標本作製法 ---------- 7

10．染色体分析 ---------- 8

11．記録と判定 ---------- 8

結果および考察 ---------- 10

結　論 ---------- 10

特記事項 ---------- 10

文　献 ---------- 11

Tables 1～5， Figures 1～3

【要　　約】

リン酸トリメチルの *in vitro* 染色体異常誘発性を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて検討し、陰性の結果を得た。

直接法、代謝活性化法ともに、1.4 mg/mℓ（10 mM）の濃度においても明確な増殖抑制作用が認められなかったことより、1.4 mg/mℓ（10 mM）の濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の 1/2 および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。直接法として、S9 mix 非存在下における24時間および48時間連続処理、代謝活性化法としてS9 mix 存在下および非存在下で6時間（18時間の回復時間）処理後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

直接法により、CHL/IU 細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。代謝活性化法では、S9mix 存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

【緒　　言】

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、リン酸トリメチルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL/IU）を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

上記の試験は、「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。

【材料および方法】

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク（JCRB）から入手（1988年2月、入手時：継代 4代、現在12代）したチャイニーズ・ハムスター由来の CHL/IU（以下CHLと略す）細胞を、解凍後継代 10代以内で試験に用いた。

この CHL 細胞株は、一般的に化学物質に対して検出感度が高いため常用されている。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清（FCS：JRH BIOSCIENCES、ロット番号：1C2073）を 10% 添加したイーグル MEM 培養液を用いた。MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末（日水製薬(株)）9.4 g を 1 ℓ の蒸留水に溶解し、121 ℃ で 15分間、高圧蒸気滅菌したのち、L-グルタミン（滅菌済み、日水製薬(株)）300 mg と 10% $NaHCO_3$ 溶液、約 12.5 mℓ を加えて調製した。2倍濃度の MEM 培養液は、上記の培地 9.4 g を 500 mℓ の蒸留水に溶解し、以下 MEM 培養液と同様に調製した。

3. 培養条件

2×10^4 個の CHL 細胞を、培養液 5 mℓ を入れたディッシュ (径 6 cm、Corning) に播き、37 ℃ の CO_2 インキュベーター (5% CO_2) 内で培養した。

4. 被験物質および陽性対照物質

［被験物質］（　　本試験データより）

（名　　称）　リン酸トリメチル

（略　　号）　TMP

（CAS　　No.）　512-56-1

（ロット番号）

（分子式）　$C_3H_9PO_4$

（分子量）　140

（純　　度）　99.9%

（性　　状）　無色透明液体で、水、アセトンおよびジメチルスルホキシド

（DMSO）に可溶、融点が－70℃、沸点が180～195℃、比重が1.217（20/20℃）の物質である。

（提　　供　　者）

（保　存　条　件）　冷暗所・遮光密栓保存

（安　　定　　性）　通常の取扱では安定

（溶媒中での安定性）　秦野研究所分析化学研究室で実施した溶媒中（アセトン）での安定性試験では、70.0～280 mg/mℓ の濃度範囲で4時間は安定であった（Appendix 1）。

［陽性対照物質］

1）直接法の試験に用いる物質

（化　　学　　名）　マイトマイシン C

（略　　号）　MC

（ロ　ッ　ト　番　号）　926ACE

（製　　造　　者）　協和醗酵工業(株)

（保　存　条　件）　冷暗所保存

2）代謝活性化法の試験に用いる物質

（化　　学　　名）　シクロホスファミド

（略　　号）　CPA

（ロ　ッ　ト　番　号）　70H0948

（製　　造　　者）　Sigma Chemical Co.

（保　存　条　件）　冷暗所保存

5．被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はアセトン（和光純薬工業(株)、ロット番号：DCK1899およびTWF2156）を用いた。原体を溶媒に溶解して原液（増殖抑制試験、染色体異常試験ともに 280 mg/mℓ）を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の 0.5 % (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研

究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内（溶媒中での平均含量が添加量の 90.0～110％）の値であった（Appendix 2）。

6. 試験条件

直接法では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、ディッシュに培養液5 mℓと各濃度の被験物質調製液25 μℓを加え、24時間および48時間連続処理した。

代謝活性化法では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、MEM培養液、2倍濃度のMEM培養液およびS9 mixをそれぞれ4：1：1の割合で混合した溶液3 mℓをディッシュに加えた。また、S9 mix非存在下の処理群においては、MEM培養液 3 mℓをディッシュに加え、さらに15 μℓの被験物質調製液を加えて6時間処理した。処理終了後、新鮮な培養液に交換し、さらに18時間培養した。S9 mixの調製は下記の組成で行った。

S9*	3
20 mM HEPES (pH 7.2)	2
50 mM $MgCl_2$	1
330 mM KCl	1
50 mM G-6-P	1
40 mM NADP	1
蒸留水	1
合計	10 mℓ

* S9 ： 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調製したキッコーマン(株)の S9（ロット番号：RAA-297, 1993年8月製造）を購入し、使用時まで－80℃の超低温槽内に保存した。

7. 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。

7.1 処理条件

直接法では48時間処理群について、また、代謝活性化法ではS9mix存在下および非存在下の処理群について細胞増殖抑制試験を実施した。処理濃度は、直接法および代謝活性化法とも0.04 ～1.40 mg/mℓ（10 mM）の範囲の濃度を用いた。ディッシュは1濃度について2枚用いた。

7.2　標本作製法

培養終了後、培養液を捨てたのち、10% ホルマリン溶液を加え、細胞がディッシュに付着した状態で 固定した。固定後、0.1% クリスタルバイオレット液で染色した。

7.3　増殖抑制の指標とその結果

被験物質の CHL 細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（Monocellater™、オリンパス光学工業(株)）を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、直接法、代謝活性化法ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を越える増殖抑制は認められなかった（Table 1、2、3 および Fig.1）。

8. 本試験の群構成

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、直接法、代謝活性化法とも 1.4 mg/mℓ（10 mM相当）とし、それぞれ高濃度群の 1/2 の濃度を中濃度、1/4 の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたMC および CPA は、注射用水（大塚製薬工場(株)、ロット番号：K1H75）に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8.1　直接法

直接法では、3段階の被験物質処理濃度群に、対照群を含め下記の 11群を設け、各群 2 枚のディッシュを用いた。

群		濃度 (mg/mℓ)	処理時間 (hours)
1)	無処理対照	−	−
2)	溶媒対照	0	24
3)	TMP	0.4	24
4)	TMP	0.7	24
5)	TMP	1.4	24
6)	陽性対照 (MC)	0.00005	24

（次頁に続く）

	群	濃度 (mg/mℓ)	処理時間 (hours)
7)	溶媒対照	0	48
8)	TMP	0.4	48
9)	TMP	0.7	48
10)	TMP	1.4	48
11)	陽性対照 (MC)	0.00005	48

8.2 代謝活性化法

代謝活性化法では、3段階の被験物質処理濃度群に、対照群として S9mix を加えない群を含め、下記の 11群を設け、各群 2枚のディッシュを用いた。

	群	濃度 (mg/mℓ)	S9mixの有無	処理時間 (hours)
1)	無処理対照	—	—	—
2)	溶媒対照	0	−	6-(18)
3)	TMP	0.4	−	6-(18)
4)	TMP	0.7	−	6-(18)
5)	TMP	1.4	−	6-(18)
6)	陽性対照 (CPA)	0.005	−	6-(18)
7)	溶媒対照	0	+	6-(18)
8)	TMP	0.4	+	6-(18)
9)	TMP	0.7	+	6-(18)
10)	TMP	1.4	+	6-(18)
11)	陽性対照 (CPA)	0.005	+	6-(18)

9. 染色体標本作製法

1) 培養終了の 2時間前に、コルセミドを最終濃度が約 0.1 μg/mℓ になるように培養液に加え、培養終了後、各群の細胞をリン酸緩衝液（Ca^{++}、Mg^{++}を含まない）で洗い、ピペッティングにより細胞をはがし、10 mℓ の遠沈管に集めた。

2) 1,000～1,200 rpm で 5分間遠沈し、上清を捨てたのち、沈殿した細胞に 3 mℓ の0.075 M KCl 水溶液を加えることにより約 30分間低張処理を行った。

3) 低張処理後、低張液の上層にカルノア液（氷酢酸：メタノール = 1：3 v/v） 約 6 mℓを加え、下方から静かにピペッティングしながら混和して固定し、その後 1,000～1,200

rpm で 5分間遠沈した。

4) 遠沈後上清を除き、再び新鮮なカルノア液を加えて細胞をピペッティングにより再浮遊させ、1,000～1,200 rpm で 5分間遠沈した。この操作を数回繰り返した。

5) 遠沈して得た白色の細胞塊に、0.2～0.5 mℓ のカルノア液を加え、十分に懸濁させた。

6) 細胞浮遊液の少量を、あらかじめ洗浄しておいたスライドグラス上に滴下し、そのまま風乾した。

7) スライド標本は各ディッシュにつき 6枚作製した。

8) スライドグラスのフロスト部分に鉛筆で、試験系識別番号、コード番号およびスライド番号を記入した。

9) 乾燥したスライドは、ギムザ原液（Merck）4.5 mℓ を M/15 リン酸緩衝液（pH 6.8）150 mℓ に希釈した染色液で約 8分間染色後、蒸留水で軽くすすいで風乾した。

10) 染色したスライド標本は、コード番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

10. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、複数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た状態で分析した。よく広がり、かつ染色体が散逸していない分裂中期像を探し、異常を有する細胞については、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で記録用紙に記録した。

染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験（MMS）分科会[1] による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞（polyploid）の有無について観察した。また構造異常については 1群 200個、倍数性細胞については 1群 800個の分裂中期細胞を分析することとした。

11. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの Exact probability test 法により、溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群間の有意差検定を行っ

た。

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら[2]の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が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。但し、疑陽性の結果が得られた場合には、染色体異常試験もしくは小核試験により、再現性、用量依存性等を検討し最終判定を行うこととした。

【結果および考察】

直接法による染色体分析の結果を Table 4 および Fig. 2 に示した。

TMPを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。

代謝活性化法による染色体分析の結果を Table 5 および Fig. 3 に示した。

TMPを加えて S9mix 存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

陽性対照として用いた直接法での MC 処理群、および S9mix 存在下での CPA 処理群では染色分体交換 (cte) や染色分体切断 (ctb) などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

【結　　論】

リン酸トリメチルは、直接法により、24時間および48時間連続処理した10 mM の濃度を含むいずれの処理群（0.4～1.4 mg/mℓ）においても染色体の構造異常や倍数性細胞を誘発しなかった。

代謝活性化法においても、S9mix 存在下および非存在下で6時間処理した10 mM の濃度を含むいずれの処理群（0.4～1.4 mg/mℓ）においても染色体の構造異常や倍数性細胞を誘発しなかった。

従って、リン酸トリメチルは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

【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及び試験計画書からの逸脱はなかった。

【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、1988

2) 石館　基　監修：〈改訂〉染色体異常試験データ集、エル・アイ・シー社、1987

Table 1 Growth inhibition of CHL cells continuously treated with trimethylphosphate (TMP) for 48 hours without S9 mix

Concentration of TMP (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0	100 ,	100	100.0
0.04	97 ,	99	98.0
0.09	98 ,	100	99.0
0.18	98 ,	97	97.5
0.35	97 ,	94	95.5
0.70	94 ,	92	93.0
1.40	86 ,	81	83.5

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 2 Growth inhibition of CHL cells treated with trimethylphosphate (TMP) for 6 hours with S9 mix

Concentration of TMP (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0	100 ,	100	100.0
0.04	105 ,	95	100.0
0.09	112 ,	100	106.0
0.18	112 ,	109	110.5
0.35	116 ,	93	104.5
0.70	98 ,	96	97.0
1.40	105 ,	100	102.5

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 3 Growth inhibition of CHL cells treated with trimethylphosphate (TMP) for 6 hours without S9 mix

Concentration of TMP (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0	100 ,	100	100.0
0.04	100 ,	109	104.5
0.09	96 ,	106	101.0
0.18	99 ,	109	104.0
0.35	94 ,	101	97.5
0.70	100 ,	111	105.5
1.40	100 ,	100	100.0

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 4 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with trimethylphosphate (TMP)** without S9 mix

Group	Concent-ration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Judgement[5]	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		
Solvent[1]	0	24	200	0	0	1	2	0	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00		
TMP	0.4	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00	−	−
TMP	0.7	24	200	0	2	2	1	0	0	0	5	0	5 (2.5)	5 (2.5)	0.00	−	−
TMP	1.4	24	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00	−	−
MC	0.00005	24	200	5	34	80	4	1	2	0	126	0	81 *(40.5)	79 *(39.5)	0.13	+	−
Solvent[1]	0	48	200	0	0	1	2	0	1	0	4	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13		
TMP	0.4	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	−	−
TMP	0.7	48	200	3	1	0	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	1 (0.5)	0.00	−	−
TMP	1.4	48	200	0	2	2	2	0	0	0	6	1	4 (2.0)	4 (2.0)	0.13	−	−
MC	0.00005	48	200	8	39	76	11	6	4	10	154	17	83 *(41.5)	81 *(40.5)	0.25	+	−

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), 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) Acetone was used as solvent. 2) More than ten 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) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).
* : Significantly different from solvent control at $p<0.05$. ** : Purity was 99.9%.

Table 5 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with trimethylphosphate (TMP)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S 9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Judgement[5]	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
Solvent[1]	0	−	6 - (18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13		
TMP	0.4	−	6 - (18)	200	0	0	1	0	0	0	0	1	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13	−	−
TMP	0.7	−	6 - (18)	200	0	0	0	2	0	0	0	2	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	−	−
TMP	1.4	−	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13	−	−
CPA	0.005	−	6 - (18)	200	1	2	0	0	0	1	0	4	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.00	−	−
Solvent[1]	0	+	6 - (18)	200	0	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	1.88		
TMP	0.4	+	6 - (18)	200	2	0	1	2	1	1	0	7	0	6 (3.0)	4 (2.0)	1.00	−	−
TMP	0.7	+	6 - (18)	200	1	3	0	0	0	1	0	5	0	5 (2.5)	4 (2.0)	0.88	−	−
TMP	1.4	+	6 - (18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	3	1 (0.5)	0 (0.0)	1.38	−	−
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	18	102	234	10	5	2	60	431	0	139 *(69.5)	138 *(69.0)	0.00	+	−

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), 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) Acetone was used as solvent. 2) More than ten 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) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).
* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$. ** : Purity was 99.9%.

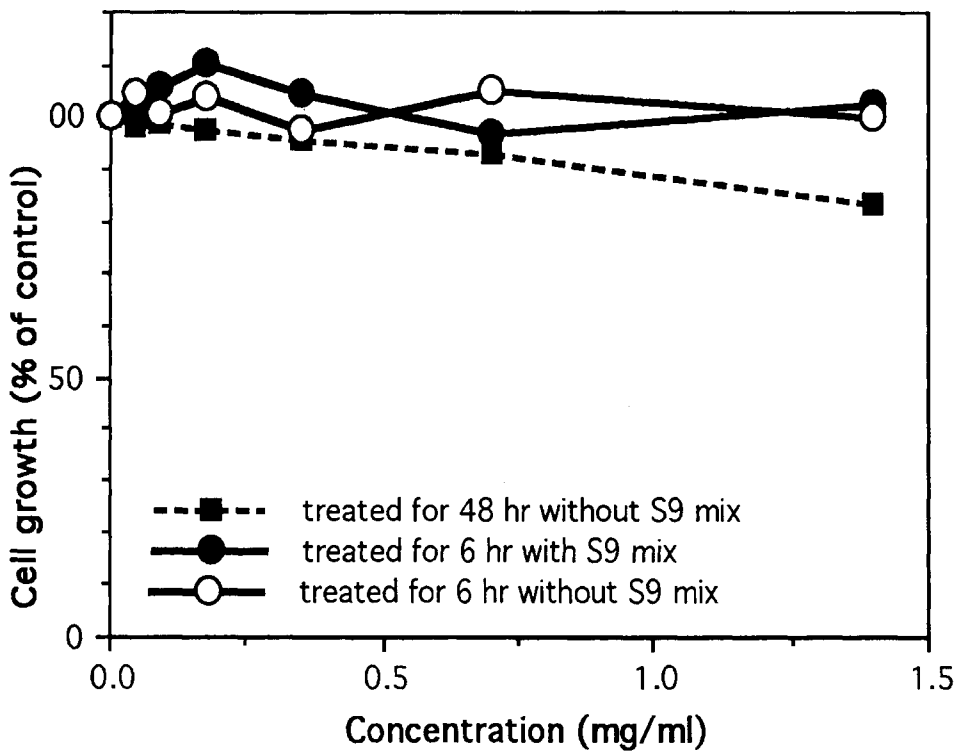

Fig.1 Growth inhibition of CHL cells treated with trimethylphosphate

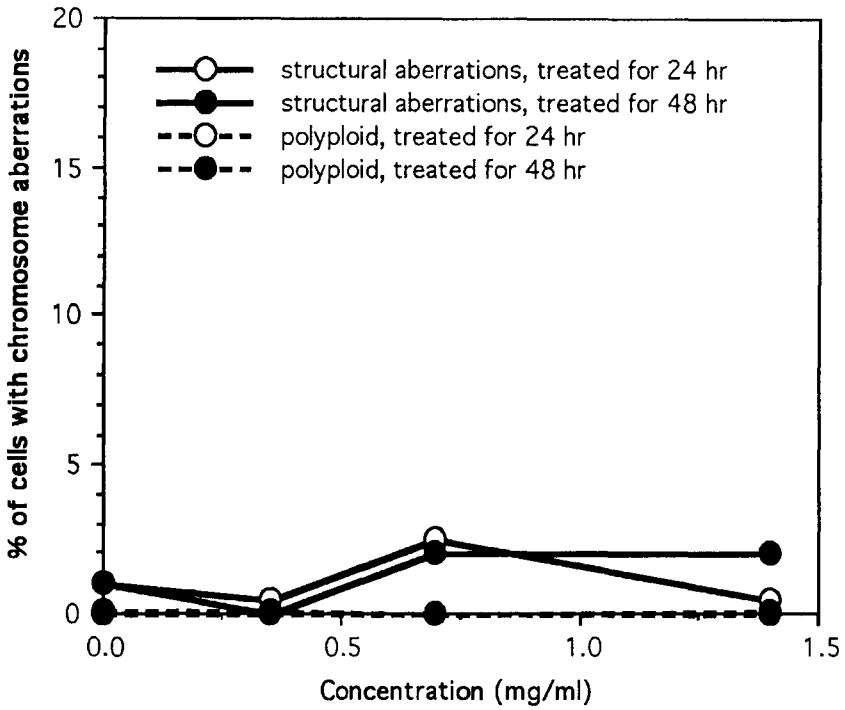

Fig. 2 **Induction of chromosome aberrations in CHL cells continuously treated with trimethylphosphate without S9 mix**

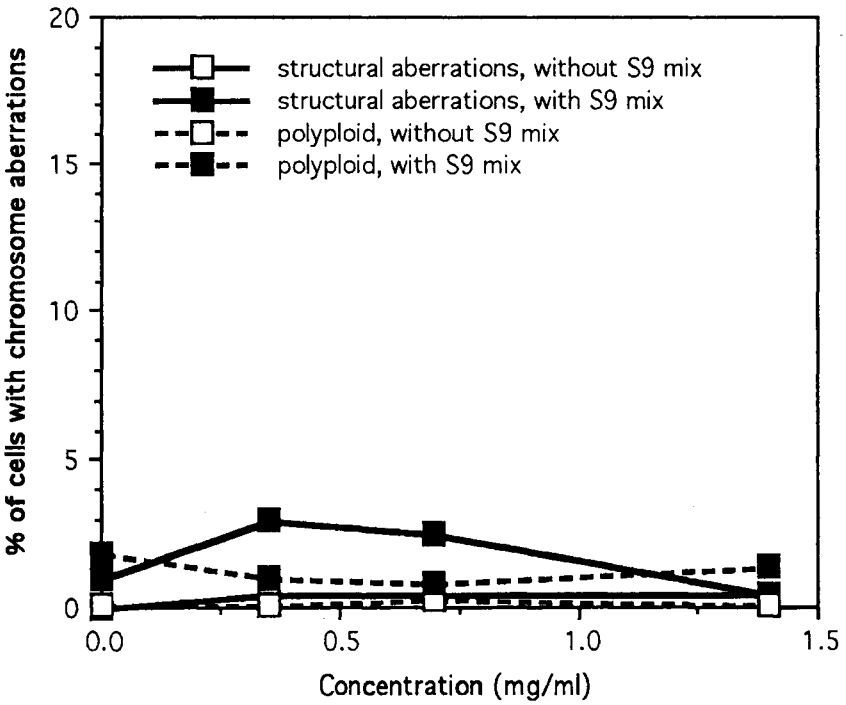

Fig. 3 **Induction of chromosome aberrations in CHL cells treated with trimethylphosphate with and without S9 mix**