

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of 3a,4,7,7a-Tetrahydro-1H-indene on Bacteria

要約

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537¹⁾および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*^{2,3)}の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加試験のいずれも、用量設定試験で抗菌性が認められたことから、本試験はS9 mix 無添加試験および添加試験ともに、78.1~250 μg /プレートの範囲(TA1535 および TA1537 ではS9 mix 無添加試験は3.91~125 μg /プレート、添加試験は7.81~250 μg /プレート)で実施した。その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても、溶媒対照値の2倍以上となる再現性のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。以上の結果から、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

[検定菌]

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB.N. Ames 博士から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものをを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異(*rfa*)とアンピシリン耐性因子 pKM101(プラスミド)の有無について調べ、特性が維持されていることを確認した。試験に際して、ニュートリエントブロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に凍結した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

[被験物質]

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン(CAS No. 3048-65-5)は、分子量 120.21 の無色透明液体である。用いた

被験物質は、日本石油化学(株)製造、ロット番号 DIG02、純度 99.0 wt%(不純物:0.8 wt% ブタジエン-イソプレン-ピペリレン, 0.1 wt% ジシクロペンタジエン, 0.1 wt% 未知成分)であり、日本石油化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで室温で保管した。

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:ESK4546, 和光純薬工業(株))に溶解して最高濃度の調製液を調製した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

[陽性対照物質]

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(上野製薬(株))

SA : アジ化ナトリウム(和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン(Sigma Chem.Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン(和光純薬工業(株))

AF2 および 2AA は DMSO に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

[培地および S9 mix の組成]

1) トップアガー(TA菌株用)

下記の水溶液(A)および(B)を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ピオチン	0.5 mM

*:WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、極東製薬工業(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、培地1lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
バクトアガー(Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 mix

1 ml 中下記の成分を含む

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール (PB) および 5, 6-ベンゾフラボン (BF) の併用投与で酵素誘導して作製した S9 を用いた。

〔試験方法〕

プレインキュベーション法¹⁾により, S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中に, 被験物質調製液 0.1 ml, リン酸緩衝液 0.5 ml (S9 mix 添加試験においては S9 mix 0.5 ml), 検定菌液 0.1 ml を混合し, 37°C で 20 分間往復振とう培養したのち, トップアガー 2 ml を加えて混和し, 合成培地平板上に流して固めた。また, 対照群として被験物質調製液の代わりに使用溶媒, または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各 Table 中に示した。溶媒および陽性対照群は, 同時に実施した他の試験と共通とした。培養は 37°C で 48 時間行い, 生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については, 肉眼的あるいは実体顕微鏡下で, 寒天表面の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては, 溶媒および陽性対照群では 3 枚ずつ, 各用量については 1 枚ずつとした。また, 本試験においては, 両対照群および各用量につき, 3 枚ずつを用い, それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は 1 回, 本試験は同一用量について 2 回実施し, 結果の再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

用いた 5 種の検定菌のうち, 1 種以上の検定菌の S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において, 被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が, 溶媒対照のそれに比べて 2 倍以上に増加し, かつ, その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に, 当該被験物質は本試験系において変異原性を有する (陽性) と判定することとした。ただし, 2 回の本試験の一方でのみ変異コロニー数の平均値が溶媒対照値の 2 倍以上となる用量が認められた場合において, その溶媒対照値が 10 以下であり, 変異コロニー数の増加に用量依存性が認められない場合は陰性とする事とした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンについて 50 ~ 5000 μg/プレート の範囲で公比を約 3 として, 試験を実施した。その結果, S9 mix 無添加試験では 150 μg/プレート以上で, S9 mix 添加試験では TA1535 と TA1537 において 150 μg/プレート以上で, その他の検定菌においては 500 μg/プレート以上で抗菌性が認められた。

したがって, 本試験における最高用量は, S9 mix 無添加試験および添加試験とも 250 μg/プレート (TA100, TA98 および WP2 *uvrA* の S9 mix 添加試験は 500 μg/プレート) とした。しかし, TA1535 と TA1537 の S9 mix 無添加試験においては, 本試験 I で抗菌性のない用量が 4 用量に達しなかったため, 本試験の最高用量を 125 μg/プレートに下げるとともに, 試験をやり直し, その結果を本試験 I の結果とした。

〔本試験〕

S9 mix 無添加試験および添加試験で, とともに上記の最高用量に基づいて公比 2 で 6 用量を設定して 2 回の本試験を実施した (Table 1, 2)。その結果, いずれの検定菌においても, 溶媒対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。以上の結果に基づき, 3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは, 用いた試験系において変異原性を有しない (陰性) と判定した。

文献

- 1) D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Res.*, 113, 173 (1983).
- 2) S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens," eds. by F.J. de Serres, J. Ashby, Elsevier/North-Holland, New York, 1981, pp. 351-360.
- 3) M.H.L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp.161-187.
- 4) T. Matsushima, T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai, M. Sawamura, "Short-Term Test Systems for Detecting Carcinogens," eds. by K.H. Norpoth, R.C. Garner, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, pp. 273-285.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257 秦野市落合 729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,
Kumiko Kawakami
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan
Tel +81-463-82-4751 FAX +81-463-82-9627

Table 1. Mutagenicity of 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in reverse mutation test (I) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	110 107 95 (104 \pm 7.9)	17 5 9 (10 \pm 6.1)	15 20 18 (18 \pm 2.5)	18 13 19 (17 \pm 3.2)	13 8 9 (10 \pm 2.6)	
	3.91	ND	11 12 9 (11 \pm 1.5)	ND	ND	6 7 6 (6 \pm 0.6)	
	7.81	93 83 83 (86 \pm 5.8)	7 16 12 (12 \pm 4.5)	23 20 19 (21 \pm 2.1)	9 14 20 (14 \pm 5.5)	10 14 6 (10 \pm 4.0)	
	15.6	129 110 125 (121 \pm 10.0)	8 7 10 (8 \pm 1.5)	24 22 27 (24 \pm 2.5)	22 16 15 (18 \pm 3.8)	7 6 7 (7 \pm 0.6)	
	31.3	113 127 114 (118 \pm 7.8)	10 12 4 (9 \pm 4.2)	24 15 15 (18 \pm 5.2)	14 19 15 (16 \pm 2.6)	9 7 9 (8 \pm 1.2)	
	62.5	114 117 103 (111 \pm 7.4)	10* 7* 12* (10 \pm 2.5)	28 15 17 (20 \pm 7.0)	8 16 11 (12 \pm 4.0)	10* 12* 10* (11 \pm 1.2)	
	125	82* 84* 92* (86 \pm 5.3)	3* 6* 0* (3 \pm 3.0)	7* 22* 12* (14 \pm 7.6)	6* 7* 13* (9 \pm 3.8)	3* 5* 2* (3 \pm 1.5)	
	250	2* 7* 4* (4 \pm 2.5)		11* 7* 7* (8 \pm 2.3)	4* 0* 3* (2 \pm 2.1)		
S9 mix (+)	0	145 121 138 (135 \pm 12.3)	9 7 18 (11 \pm 5.9)	27 9 21 (19 \pm 9.2)	26 26 19 (24 \pm 4.0)	11 9 10 (10 \pm 1.0)	
	7.81	ND	11 10 13 (11 \pm 1.5)	ND	ND	6 11 4 (7 \pm 3.6)	
	15.6	110 116 119 (115 \pm 4.6)	9 12 12 (11 \pm 1.7)	34 25 30 (30 \pm 4.5)	21 24 21 (22 \pm 1.7)	7 7 6 (7 \pm 0.6)	
	31.3	123 126 97 (115 \pm 15.9)	11 15 12 (13 \pm 2.1)	23 32 15 (23 \pm 8.5)	26 14 20 (20 \pm 6.0)	5 6 10 (7 \pm 2.6)	
	62.5	99 119 118 (112 \pm 11.3)	12 15 5 (11 \pm 5.1)	20 20 21 (20 \pm 0.6)	27 29 14 (23 \pm 8.1)	10 15 10 (12 \pm 2.9)	
	125	120 124 99 (114 \pm 13.4)	14* 7* 12* (11 \pm 3.6)	19 27 24 (23 \pm 4.0)	22 19 21 (21 \pm 1.5)	10 5 7 (7 \pm 2.5)	
	250	93* 96* 110* (100 \pm 9.1)	10* 4* 6* (7 \pm 3.1)	22* 13* 25* (20 \pm 6.2)	15* 13* 10* (13 \pm 2.5)	8* 9* 3* (7 \pm 3.2)	
	500	22* 19* 14* (18 \pm 4.0)		18* 13* 9* (13 \pm 4.5)	0* 3* 5* (3 \pm 2.5)		
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	775 794 860 (810 \pm 44.6)	235 321 352 (303 \pm 60.6)	314 275 290 (293 \pm 19.7)	724 638 737 (700 \pm 53.8)	884 976 1205 (1022 \pm 165.3)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	632 740 739 (704 \pm 62.1)	301 300 326 (309 \pm 14.7)	680 665 634 (660 \pm 23.5)	282 318 334 (311 \pm 26.6)	315 338 356 (336 \pm 20.6)	

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

*:Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.0 wt% and 0.8 wt% butadiene-isoprene-piperylene and 0.1 wt% dicyclopentadiene were contained as impurities.

ND:Not done

Table 2. Mutagenicity of 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene in reverse mutation test (II) on bacteria

With(+) or without(-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, mean \pm S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	117 108 101 (109 \pm 8.0)	11 10 14 (12 \pm 2.1)	28 19 24 (24 \pm 4.5)	19 21 14 (18 \pm 3.6)	11 16 13 (13 \pm 2.5)	
	3.91	ND	12 11 11 (11 \pm 0.6)	ND	ND	13 13 11 (12 \pm 1.2)	
	7.81	97 106 106 (103 \pm 5.2)	10 5 11 (9 \pm 3.2)	25 21 33 (26 \pm 6.1)	16 14 22 (17 \pm 4.2)	6 18 21 (15 \pm 7.9)	
	15.6	99 108 106 (104 \pm 4.7)	18 11 14 (14 \pm 3.5)	17 17 16 (17 \pm 0.6)	19 16 17 (17 \pm 1.5)	13 5 10 (9 \pm 4.0)	
	31.3	107 97 96 (100 \pm 6.1)	6 11 10 (9 \pm 2.6)	21 26 22 (23 \pm 2.6)	11 20 14 (15 \pm 4.6)	12 14 6 (11 \pm 4.2)	
	62.5	105 108 93 (102 \pm 7.9)	8 10 6 (8 \pm 2.0)	10 20 28 (19 \pm 9.0)	13 18 25 (19 \pm 6.0)	8 10 12 (10 \pm 2.0)	
	125	89* 66* 89* (81 \pm 13.3)	4* 3* 4* (4 \pm 0.6)	24* 16* 20 (20 \pm 4.0)	9* 9* 8* (9 \pm 0.6)	11* 7* 2* (7 \pm 4.5)	
	250	1* 22* 60* (28 \pm 29.9)		17* 13* 28* (19 \pm 7.8)	6* 10* 1* (6 \pm 4.5)		
S9 mix (+)	0	112 106 107 (108 \pm 3.2)	12 6 8 (9 \pm 3.1)	25 23 40 (29 \pm 9.3)	30 31 22 (28 \pm 4.9)	22 8 6 (12 \pm 8.7)	
	7.81	ND	8 11 9 (9 \pm 1.5)	ND	ND	9 14 4 (9 \pm 5.0)	
	15.6	93 114 103 (103 \pm 10.5)	7 17 10 (11 \pm 5.1)	25 23 17 (22 \pm 4.2)	16 21 19 (19 \pm 2.5)	6 13 9 (9 \pm 3.5)	
	31.3	107 122 112 (114 \pm 7.6)	11 16 15 (14 \pm 2.6)	22 25 26 (24 \pm 2.1)	22 25 32 (26 \pm 5.1)	16 6 8 (10 \pm 5.3)	
	62.5	114 122 128 (121 \pm 7.0)	7 10 10 (9 \pm 1.7)	32 23 19 (25 \pm 6.7)	26 27 27 (27 \pm 0.6)	11 12 10 (11 \pm 1.0)	
	125	99 105 111 (105 \pm 6.0)	7 10 13 (10 \pm 3.0)	32 32 20 (28 \pm 6.9)	31 12 22 (22 \pm 9.5)	13 6 5 (8 \pm 4.4)	
	250	81* 58* 86* (75 \pm 14.9)	1* 2* 4* (2 \pm 1.5)	17* 25* 20* (21 \pm 4.0)	9* 11* 12* (11 \pm 1.5)	2* 2* 7* (4 \pm 2.9)	
	500	38* 8* 10* (19 \pm 16.8)		16* 19* 12* (16 \pm 3.5)	2* 2* 2* (2 \pm 0.0)		
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix(-)	Number of colonies/plate	563 575 567 (568 \pm 6.1)	380 384 351 (372 \pm 18.0)	303 312 331 (315 \pm 14.3)	531 522 545 (533 \pm 11.6)	1349 1188 1356 (1298 \pm 95.0)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix(+)	Number of colonies/plate	512 607 650 (590 \pm 7.6)	274 271 345 (297 \pm 41.9)	485 499 470 (485 \pm 14.5)	308 348 287 (314 \pm 31.0)	227 292 311 (277 \pm 44.0)	

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

*:Inhibition was observed against growth of the bacteria.

Purity was 99.0 wt% and 0.8 wt% butadiene-isoprene-piperylene and 0.1 wt% dicyclopentadiene were contained as impurities.

ND:Not done

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの 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

In Vitro Chromosomal Aberration Test of 3a,4,7,7a-Tetrahydro-1H-indene on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

連続処理(24時間)および短時間処理(6時間)において、0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度(MI max)は、連続処理(24時間)では0.050 mg/ml、短時間処理(6時間)のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下ではそれぞれ0.050 mg/mlおよび0.10 mg/mlであった。各系列での処理濃度は、MI maxの2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度設定した。なお、48時間連続処理の濃度は、24時間連続処理と同じ濃度に設定した。連続処理では、S9 mix非存在下で24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)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。染色体分析が可能な最高濃度は、24時間および48時間連続処理では0.050 mg/ml、短時間処理のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下ではそれぞれ0.050 mg/mlおよび0.10 mg/mlの濃度であったことから、これらの濃度を高濃度群として3濃度群を観察対象とした。

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濃度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。短時間処理では、S9 mix非存在下において、いずれの処理群においても染色体異常は誘発されなかった。倍数性細胞については、高濃度群(0.050 mg/ml)で、細胞毒性のため規定の細胞数を観察できなかったが、いずれの処理群でも誘発されなかった。S9 mix存在下では、高濃度(0.10 mg/ml)において、染色体の構造異常(gapを含む)が有意に誘発された(14.5%)。また、高濃度(0.10 mg/ml)において、細胞毒性のため規定の細胞数を観察できなかったが、いずれの処理群でも倍数性細胞の誘発は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下で3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

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細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: Cansera International)を10%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、揮発しやすいこと、またプラスチック底面を溶解することから、培養にはガラス製培養フラスコ(25 cm², 池本理化)を用いた。2×10⁴個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたフラスコに播き、37℃のCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 被験物質

3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデン(略号:THI, CAS No.:3048-65-5, ロット番号:D1G02, 日本石油化学(株))は、無色透明液体で、水に対しては50.0 mg/ml未満、DMSOでは1 M以上1.5 M未満、アセトンでは50 mg/ml以下で溶解し、融点-80℃、沸点160.3℃、蒸気圧4 mmHgで、分子式C₉H₁₂、分子量120.21、純度99.0 wt%(不純物としてブタジエン-イソプレン-ピペリレン0.8 wt%, ジシクロペンタジエン0.1 wt%, 未知成分0.1 wt%を含む)の物質である。

被験物質原体は、通常の取り扱い条件においては安定である。

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DMSO(和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、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1%(v/v)になるように加えた。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定す

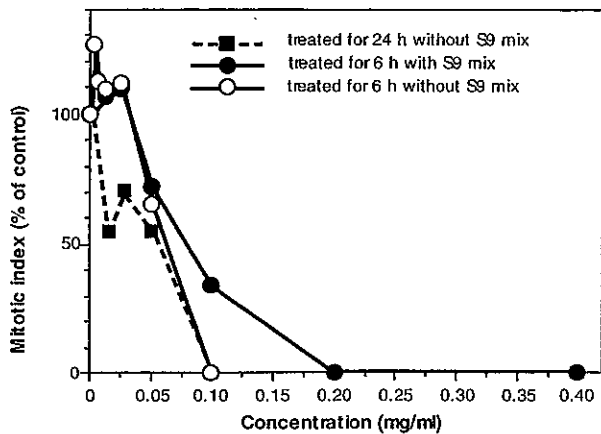


Fig. 1 Mitotic inhibition of CHL/IU cells treated with 3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-indene

るため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質の CHL/IU 細胞に対する増殖抑制作用は、フラスコあたりの観察細胞(1000細胞)における分裂中期細胞の頻度(分裂指数:Mitotic index)を調べ、2つのフラスコともに 0.5% 以上の分裂指数を示した最も高い濃度(MI max)を指標とした。

その結果、連続処理における MI max は、0.050 mg/ml、短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では、それぞれ 0.050 mg/ml および 0.10 mg/ml であった(Fig. 1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験において、連続処理および短時間処理のすべての処理群で、MI max の2倍濃度を最高処理濃度とし、公比2で5濃度を設定した(24時間および48時間連続処理および短時間処理の S9 mix 非存在下:0.0063, 0.013, 0.025, 0.050, 0.10 mg/ml, 短時間処理の S9 mix 存在下:0.013, 0.025, 0.05, 0.10, 0.20 mg/ml)。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株)大塚製薬工場)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。

染色体異常試験においては1濃度あたり2枚フラスコを用い、染色体標本作製と同時に分裂指数を測定した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約 0.1 μ g/ml になるように培養液に加えた。染色体標本作製は常法に従って行った。スライド標本は各フラスコにつき6枚作製した。作製した標本を 3% ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

分裂指数の測定結果から、MI max 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。その結果(Table 1, 2), 連続処理では 0.050 mg/ml が、短時間処理の S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下では、それぞれ 0.050 mg/ml および 0.10 mg/ml が MI max を示したことから、これらの濃度を含む3濃度群を観察対象とした。

作製したスライド標本のうち、1つのフラスコから得られた異なるスライドを、4名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。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)研究会²⁾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した。

10. 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、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法³⁾(多重性を考慮して familywise の有意水準を 5% とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコクラン・アーミテッジの傾向性検定³⁾($p < 0.05$)を行った。最終的な判定は、統計学および生物学的な評価に基づいて行った。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果を Table 1 に示した。3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンを加えて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、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 2 に示した。3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンを加えて S9 mix 非存在下における短時間処理では、いずれの処理群においても、染色体の構造異常は認められなかった。高濃度群(0.050 mg/ml)では細胞毒性のため、規定の細胞数が観察できなかったが、いずれの処理群においても、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。S9 mix 存在下では、高濃度群(0.10 mg/ml)において染色体の構造異常(gap を含む)が有意に誘発され、その頻度は 14.5% であった。また、高濃度群(0.10 mg/ml)では細胞毒性のため、規定の細胞数が観察できなかったが、いずれの処理群においても、倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、3a,4,7,7a-テトラヒドロ-1H-インデンは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

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, 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, pp.218-223.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
試験担当者: 山影康次, 日下部博一,
中川ゆづき, 水谷正寛, 渡辺美香,
出石由紀, 橋本恵子
(財)食品薬品安全センター秦野研究所
〒257 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
Kohji Yamakage, Hirokazu Kusakabe,
Yuzuki Nakagawa, Masahiro Mizutani,
Mika Watanabe, Yuki Izushi,
Keiko Hashimoto
Hatano Research Institute, Food and Drug
Safety Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL/IU) continuously treated with 3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-1H-indene(THI)* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								No. of cells				Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total	Others ³⁾	with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		
												TAG (%)	TA (%)		SA		NA
Control			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			-
Solvent ¹⁾	0	24	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.25			100.0
THI	0.013	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			155.7
THI	0.025	24	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38	NT	NT	116.4
THI	0.050	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25			96.7
THI	0.10 **	24	-											-			-
MC	0.00005	24	200	10	42	109	3	0	0	164	0	96 (48.0)	93 (46.5)	0.25			-
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38			100.0
THI	0.013	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			146.9
THI	0.025	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	NT	NT	124.5
THI	0.050	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			167.3
THI	0.10 **	48	-											-			-
MC	0.00005	48	200	2	25	87	1	1	0	116	3	69 (34.5)	67 (33.5)	0.38			-

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)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(p<0.05)when the incidence of TAG or polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control data(p<0.05)by Fisher's exact test. 6)Relative metaphase frequency to the solvent control, representing cytotoxicity, was calculated. *:Purity of test substance was 99.0 wt%. Butadiene-isoprene-piperylene(0.8 wt%) and dicyclopentadiene(0.1 wt%)were contained as impurities. **:Chromosome analysis was not performed because there were small number of metaphases due to cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL/IU) treated with 3a, 4, 7, 7a-tetrahydro-1H-indene(THI)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								No. of cells				Concurrent ⁶⁾ cytotoxicity (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total	Others ³⁾	with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		
													TAG (%)	TA (%)		SA		NA
Control				200	0	0	1	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25			-
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	2	1	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.25			100.0
THI	0.013	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			74.7
THI	0.025	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.25	NT	NT	101.9
THI	0.050	-	6-(18)	156	0	0	2	2	0	0	4	0	3 (1.9)	3 (1.9)	0.43 ⁷⁾			42.6
THI	0.10 ***	-	6-(18)	-											-			-
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13			-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	2	0	1	2	0	0	5	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.13			100.0
THI	0.025	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			91.3
THI	0.050	+	6-(18)	200	0	1	1	0	1	0	3	1	3 (1.5)	3 (1.5)	0.38	+	NT	57.7
THI	0.10	+	6-(18)	200	4	17	24	0	1	0	46	0	29*(14.5)	27 (13.5)	0.22 ⁸⁾			38.5
THI	0.20 ***	+	6-(18)	-											-			-
CPA	0.005	+	6-(18)	200	3	28	43	2	0	10	86	1	46 (23.0)	46 (23.0)	0.25			-

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)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(p<0.05). 6)Relative metaphase frequency to the solvent control, representing cytotoxicity, was calculated. 7)Four hundred and sixty eight cells were analysed, 8)Four hundred and fifty nine cells were analysed. *:Significantly different from historical solvent control(p<0.05)by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. **:Purity of test substance was 99.0 wt%. Butadiene-isoprene-piperylene(0.8 wt%)and dicyclopentadiene(0.1 wt%)were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because there were small number of metaphases due to cytotoxicity.