

2,6-ジクロロトルエンのチャイニーズ・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 2,6-Dichlorotoluene in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

2,6-ジクロロトルエ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(48時間)においては、50%を明らかに越える増殖抑制濃度、すなわち0.069 mg/mLの濃度を最高処理濃度とした。また、短時間処理(6時間)のS9 mix非存在下およびS9 mix存在下における短時間処理では、それぞれ50%を明らかに越える増殖抑制濃度である0.033 mg/mLおよび0.096 mg/mLを最高処理濃度とした。すべての処理系列において最高処理濃度の1/2および1/4を中濃度および低濃度として設定した。連続処理では、24時間および48時間処理後、短時間処理ではS9 mix非存在下および存在下で6時間処理し、新鮮培地で更に18時間培養後、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。

すべての処理系列において、処理した最高濃度は細胞毒性のために観察できなかったため、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0.035 mg/mL、S9 mix非存在下および存在下での短時間処理では0.017 mg/mLおよび0.048 mg/mLで、これらの濃度を高濃度群として2濃度群を観察対象とした。

CHL/IU細胞を24時間連続処理した群では、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。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。

以上の結果より、本試験条件下で2,6-ジクロロトルエンは、染色体異常を誘発しない(陰性)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, JRH BIOSCIENCES)を10 vol%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

2×10^4 個のCHL/IU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°C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日目に新鮮培地に交換後、被験物質を加え、24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非存在下および存在下で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. S9

S9(キッコーマン(株))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雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入した。添加量は培地に対して5 vol%とした。

5. 被験物質

2,6-ジクロロトルエン(ロット番号:50820, (株)日本化学工業協会(東京))は、透明液体で、水に対しては不溶、アセトンおよびDMSOに可溶で、融点-1.9°C、沸点75.6°C、蒸気圧53.32 Pa以下の物質で、純度99.6%(不純物として、2,5-ジクロロトルエン(0.13%), 2,4-ジクロロトルエン(0.07%), 2,3-ジクロロトルエン(0.05%), 3,4-ジクロロトルエン(0.01%), 3,5-ジクロロトルエン(0.01%)等を含む)で、常温常圧において1年間安定の物質で、室温で遮光保存した。

6. 被験物質の調製

被験物質は用時調製して試験に用いた。溶媒はDMSO(ロット番号:APH4165, 和光純薬工業(株))およびロット番号:12H0658, Sigma Chemical Co.)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0.5 vol%になるように加えた。

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。被験物質のCHL/IU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、連続処理における50%の増殖抑制濃度を

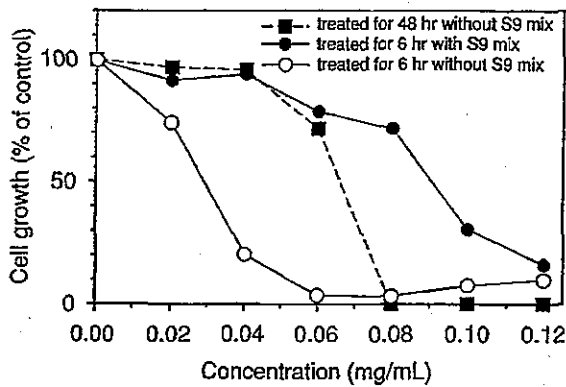


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2,6-dichlorotoluene

明らかに超える濃度(約60%の増殖抑制濃度)を、60%増殖抑制濃度をはさむ2濃度より算出したところ、0.069 mg/mLであった。また、短時間処理のS9 mix非存在下および存在下では、それぞれ0.033 mg/mLおよび0.096 mg/mLであった(Fig. 1)。

8. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理では0.069 mg/mL、短時間処理のS9 mix非存在下および存在下では、それぞれ0.033 mg/mLおよび0.096 mg/mL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、局方注射用水(特大大塚製薬工場)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。

9. 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。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3 vol%ギムザ溶液で染色した。

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、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・哺乳動物試験研究会(MMS)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、溶媒対照群と被験物質処理群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、有意差検定を実施した($p < 0.01$)。被験物質の染色体異常誘発についての最終判定は、石館ら³⁾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。ただし、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

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。2,6-ジクロロトルエンを加えて24時間および48時間連続処理した群の最高濃度群は、どちらの系でも細胞毒性のために十分な細胞数が観察できなかったが、観察可能であっ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。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。2,6-ジクロロトルエンを加え、S9 mix非存在下または存在下で6時間処理した群の最高濃度群は、どちらの系でも細胞毒性のために十分な細胞数が観察できなかったが、S9 mix非存在下または存在下それぞれで0.017 mg/mLおよび0.048 mg/mLからの各2群ではいずれも、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。

従って、2,6-ジクロロトルエンは、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しないと結論した。

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, pp.16-37.
- 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, pp.76-78.
- 3) 石館基監修, "改訂増補 染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー, 東京, 1987

連絡先

試験責任者：田中憲徳
試験担当者：山影康次，若栗 忍，日下部博一，
中川ゆづき，橋本恵子，三枝克彦，
加藤初美
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257-8523 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, Shinobu Wakuri,
Hirokazu Kusakabe, Yuzuki Nakagawa,
Keiko Hashimoto, Katsuhiko Saegusa,
Hatsumi Kato
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257-8523, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2,6-dichlorotoluene (DCT)** without S9 mix

| Group | Concentration (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 ⁶⁾ | total | TAG (%) | TA (%) | | SA | NA | | | |
| Non-treatment | | | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.63 | | | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | 24 | 200 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 2 (1.0) | 0.75 | | | |
| DCT | 0.017 | 24 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.38 | - | - | |
| DCT | 0.035 | 24 | 200 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 (0.5) | 0 (0.0) | 0.63 | - | - | |
| DCT | 0.069 | 24 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.00 ⁴⁾ | Tox | Tox | |
| MC | 0.00005 | 24 | 200 | 5 | 44 | 111 | 2 | 1 | 6 | 0 | 169 | 1 | 103*(51.5) | 101*(50.5) | 0.38 | + | - | | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 2 (1.0) | 0.63 | | | | |
| DCT | 0.017 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.38 | - | - | | |
| DCT | 0.035 | 48 | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.75 | - | - | | |
| DCT | 0.069 | 48 | 0 | | | | | | | | | | | | | | Tox | Tox | |
| MC | 0.00005 | 48 | 200 | 6 | 46 | 129 | 10 | 5 | 6 | 0 | 202 | 12 | 104*(52.0) | 103*(51.5) | 0.63 | + | - | | |

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), 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, Tox: toxic.

1) Dimethyl sulfoxide 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) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate *et al.* (1987). 6) One cell was analysed.

*: Significantly different from the solvent control at $p < 0.05$. **: Purity was 99.6%, 2,5-dichlorotoluene (0.13%), 2,4-dichlorotoluene (0.07%), 2,3-dichlorotoluene (0.05%), 3,4-dichlorotoluene (0.01%) and 3,5-dichlorotoluene (0.01%) were contained as impurities.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,6-dichlorotoluene (DCT)** with and without S9 mix

| Group | Concentration (mg/ml) | S9 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 ⁶⁾ | total | TAG (%) | TA (%) | | SA | NA | | | |
| Non-treatment | | | | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 0 | 1 (0.5) | 1 (0.5) | 0.63 | | | | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 3 (1.5) | 3 (1.5) | 0.13 | | | | |
| DCT | 0.008 | - | 6-(18) | 200 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 1 (0.5) | 0.13 | - | - | | |
| DCT | 0.017 | - | 6-(18) | 200 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 7 | 0 | 7 (3.5) | 5 (2.5) | 0.63 | - | - | | |
| DCT | 0.033 | - | 6-(18) | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0.00 | Tox | Tox | | |
| CPA | 0.005 | - | 6-(18) | 200 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 1 | 3 (1.5) | 3 (1.5) | 0.63 | - | - | | |
| Solvent ¹⁾ | 0 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 10 | 11 | 1 | 2 (1.0) | 2 (1.0) | 0.38 | | | | |
| DCT | 0.024 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 4 (2.0) | 4 (2.0) | 0.13 | - | - | | |
| DCT | 0.048 | + | 6-(18) | 200 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 (1.0) | 2 (1.0) | 0.38 | - | - | | |
| DCT | 0.096 | + | 6-(18) | 1 | 2 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 1 (100.0) | 1 (100.0) | 0.00 | Tox | Tox | | |
| CPA | 0.005 | + | 6-(18) | 200 | 5 | 44 | 115 | 1 | 2 | 2 | 0 | 169 | 0 | 96*(48.0) | 94*(47.0) | 0.13 | + | - | | |

Abbreviations; gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring), 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, Tox: toxic.

1) Dimethyl sulfoxide 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) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate *et al.* (1987). 6) Two cells were analysed. 7) One cell was analysed.

*: Significantly different from the solvent control at $p < 0.05$. **: Purity was 99.6%, 2,5-dichlorotoluene (0.13%), 2,4-dichlorotoluene (0.07%), 2,3-dichlorotoluene (0.05%), 3,4-dichlorotoluene (0.01%) and 3,5-dichlorotoluene (0.01%) were contained as impurities.