

5-エチリデン-2-ノルボルネンの細菌を用いる復帰変異試験

Reverse Mutation Test of 5-Ethylidene-2-norbornene on Bacteria

要約

5-エチリデン-2-ノルボルネンについて、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537⁺および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*⁻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無添加試験では、TA1535およびTA1537は3.91～125 μg/プレート、TA100, TA98およびWP2 *uvrA*は7.81～250 μg/プレート、S9 mix添加試験ではTA100, TA1535およびTA98は7.81～250 μg/プレート、TA1537およびWP2 *uvrA*は15.6～500 μg/プレートの範囲で実施した。

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、5-エチリデン-2-ノルボルネンは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

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pKM 101(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字型試験管に解凍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】

5-エチリデン-2-ノルボルネンは、分子量120.20の無色透明液体である。用いた被験物質は、ロット番号6J01、純度99.4 wt%〔不純物として軽質分:0.5% (このうちビニルシクロヘプテンを0.3 wt%含み、未知成分は0.2 wt%)、重質分:0.1 wt%〕であり、日本石油化学(株)から供与された。被験物質は、使用時まで酸化劣化を防止するため窒素シールを行い、室温で保管した。

5-エチリデン-2-ノルボルネンは、ジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:DLR7825およびDLF7632, 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、同溶媒で所定の濃度に希釈して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は超純水に溶解し、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)製の最少グルコース寒天培地を用いた。なお、培地1 L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-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
バクテアガー(清水食品)	15 g

結果および考察

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mLを流して固めたものである。

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 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol
NADH	4 μ mol
NADPH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol

** :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されたS9(キッコーマン(株))を用いた。

〔試験方法〕

ブレインキューベーション法³⁾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分間ブレインキューベーションしたのち、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。各検定菌ごとに用いた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、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。

〔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 無添加試験あるいはS9 mix 添加試験において、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、溶媒対照値の2倍以上に増加し、その増加に再現性および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もの(陽性)と判定することとした。

〔用量設定試験〕

5-エチリデン-2-ノルボルネンについて50.0~5000 μ g/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 無添加試験においては、すべての検定菌で150 μ g/プレート以上で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験ではTA1535とTA98では150 μ g/プレート以上で、その他の検定菌では500 μ g/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 無添加試験については250 μ g/プレートとし、S9 mix 添加試験についてはTA1535とTA98は250 μ g/プレート、その他の検定菌は500 μ g/プレートとした。

〔本試験〕

上記の最高用量に基づいて、それぞれ公比2で6用量を設定して2回の本試験を実施した(Table 1, 2)。ただし、TA1535とTA1537のS9 mix 無添加試験、およびTA100のS9 mix 添加試験では、本試験Iにおいて抗菌性のない用量が4用量に満たなかったため、最高用量をそれぞれ250 μ g/プレートから125 μ g/プレートに、500 μ g/プレートから250 μ g/プレートに下げ、本試験Iをやり直すとともに、本試験IIを実施した。その結果、すべての検定菌において、2回の本試験とも溶媒対照値の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、5-エチリデン-2-ノルボルネンは、用いた試験系において変異原性を有しないもの(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) 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.

Table 1. Mutagenicity of 5-ethylidene-2-norbornene on bacteria (I)

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	93 110 91 (93 \pm 10.4)	10 11 16 (12 \pm 3.2)	20 19 23 (21 \pm 2.1)	25 9 24 (19 \pm 9.0)	11 5 9 (8 \pm 3.1)	
	3.91	ND	14 8 9 (10 \pm 3.2)	ND	ND	2 7 4 (4 \pm 2.5)	
	7.81	84 79 92 (85 \pm 6.6)	14 7 8 (10 \pm 3.8)	26 25 13 (21 \pm 7.2)	14 16 14 (15 \pm 1.2)	6 7 7 (7 \pm 0.6)	
	15.6	89 84 82 (85 \pm 3.6)	9 14 18 (14 \pm 4.5)	19 22 22 (21 \pm 1.7)	18 22 12 (17 \pm 5.0)	3 1 6 (3 \pm 2.5)	
	31.3	101 98 80 (93 \pm 11.4)	10 11 14 (12 \pm 2.1)	21 20 18 (20 \pm 1.5)	12 19 13 (15 \pm 3.8)	4 7 7 (6 \pm 1.7)	
	62.5	69 73 75 (72 \pm 3.1)	9* 7* 13* (10 \pm 3.1)	23 21 17 (20 \pm 3.1)	15 14 10 (13 \pm 2.6)	5* 4* 3* (4 \pm 1.0)	
	125	36* 83* 77* (65 \pm 25.6)	1* 6* 4* (4 \pm 2.5)	14* 11* 20* (15 \pm 4.6)	7* 14* 13* (11 \pm 3.8)	3* 1* 2* (2 \pm 1.0)	
	250	56* 0* 9* (22 \pm 30.1)	ND	26* 17* 18* (20 \pm 4.9)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	ND	
S9 mix (+)	0	72 88 84 (81 \pm 8.3)	22 11 17 (17 \pm 5.5)	31 32 40 (34 \pm 4.9)	32 32 39 (34 \pm 4.0)	11 8 12 (10 \pm 2.1)	
	7.81	64 81 69 (71 \pm 8.7)	21 10 13 (15 \pm 5.7)	ND	28 32 22 (27 \pm 5.0)	ND	
	15.6	75 68 63 (69 \pm 6.0)	20 14 17 (17 \pm 3.0)	25 28 19 (24 \pm 4.6)	31 26 26 (28 \pm 2.9)	7 10 7 (8 \pm 1.7)	
	31.3	72 85 69 (75 \pm 8.5)	9 10 16 (12 \pm 3.8)	23 29 30 (27 \pm 3.8)	24 40 30 (31 \pm 8.1)	6 8 9 (8 \pm 1.5)	
	62.5	64 91 83 (79 \pm 13.9)	9 15 12 (12 \pm 3.0)	33 21 21 (25 \pm 6.9)	38 30 28 (32 \pm 5.3)	13 8 9 (10 \pm 2.6)	
	125	61* 62* 39* (54 \pm 13.0)	11* 4* 8* (8 \pm 3.5)	30 22 23 (25 \pm 4.4)	37 27 21 (28 \pm 8.1)	5 5 8 (6 \pm 1.7)	
	250	33* 44* 38* (38 \pm 5.5)	6* 10* 6* (7 \pm 2.3)	27 24 26 (26 \pm 1.5)	23* 18* 20* (20 \pm 2.5)	2* 8* 5* (5 \pm 3.0)	
	500	ND	ND	28* 37* 22* (29 \pm 7.5)	ND	5* 0* 5* (3 \pm 2.9)	
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	456 465 416 (446 \pm 26.1)	377 409 401 (396 \pm 16.7)	127 128 150 (135 \pm 13.0)	639 636 634 (636 \pm 2.5)	1641 1498 1585 (1575 \pm 72.1)	
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	290 279 280 (283 \pm 6.1)	182 201 210 (198 \pm 14.3)	442 484 533 (486 \pm 45.5)	434 389 405 (409 \pm 22.8)	185 167 153 (168 \pm 16.0)	

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 99.4 wt% and 0.3 wt% vinylbicycloheptene and 0.3 wt% unidentified compounds were contained as impurities.

ND:Not done

Table 2. Mutagenicity of 5-ethylidene-2-norbornene on bacteria (II)

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose (μ g/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	92 83 72 (82 \pm 10.0)	16 14 11 (14 \pm 2.5)	22 20 15 (19 \pm 3.6)	24 17 15 (19 \pm 4.7)	8 8 5 (7 \pm 1.7)	
	3.91	ND	14 10 15 (13 \pm 2.6)	ND	ND	2 5 11 (6 \pm 4.6)	
	7.81	82 89 109 (93 \pm 14.0)	16 13 8 (12 \pm 4.0)	23 21 17 (20 \pm 3.1)	25 23 19 (22 \pm 3.1)	6 5 9 (7 \pm 2.1)	
	15.6	92 85 91 (89 \pm 3.8)	18 9 13 (13 \pm 4.5)	13 17 19 (16 \pm 3.1)	28 13 16 (19 \pm 7.9)	7 4 3 (5 \pm 2.1)	
	31.3	82 72 75 (76 \pm 5.1)	8 14 11 (11 \pm 3.0)	31 16 21 (23 \pm 7.6)	11 27 21 (20 \pm 8.1)	5 3 8 (5 \pm 2.5)	
	62.5	70 72 86 (76 \pm 8.7)	6* 5* 1* (4 \pm 2.6)	14 15 20 (16 \pm 3.2)	15 20 25 (20 \pm 5.0)	0* 3* 4* (2 \pm 2.1)	
	125	41* 38* 56* (45 \pm 9.6)	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	21* 21* 31* (24 \pm 5.8)	2* 2* 1* (2 \pm 0.6)	0* 3* 0* (1 \pm 1.7)	
	250	0* 0* 0* (0 \pm 0.0)	ND	12* 9* 13* (11 \pm 2.1)	0* 2* 3* (2 \pm 1.5)	ND	
S9 mix (+)	0	98 82 88 (89 \pm 8.1)	17 15 13 (15 \pm 2.0)	31 21 25 (26 \pm 5.0)	39 38 28 (35 \pm 6.1)	11 10 22 (14 \pm 6.7)	
	7.81	74 100 101 (92 \pm 15.3)	5 15 11 (10 \pm 5.0)	ND	33 29 28 (30 \pm 2.6)	ND	
	15.6	88 96 92 (92 \pm 4.0)	5 6 9 (7 \pm 2.1)	28 20 25 (24 \pm 4.0)	24 30 19 (24 \pm 5.5)	4 7 10 (7 \pm 3.0)	
	31.3	79 120 87 (95 \pm 21.7)	11 17 14 (14 \pm 3.0)	21 27 25 (24 \pm 3.1)	25 34 30 (30 \pm 4.5)	11 11 4 (9 \pm 4.0)	
	62.5	100 91 82 (91 \pm 9.0)	14 14 16 (15 \pm 1.2)	19 27 15 (20 \pm 6.1)	30 26 29 (28 \pm 2.1)	10 5 10 (8 \pm 2.9)	
	125	48* 67* 82* (66 \pm 17.0)	9* 13* 5* (9 \pm 4.0)	23 17 24 (21 \pm 3.8)	21 30 26 (26 \pm 4.5)	12 11 14 (12 \pm 1.5)	
	250	35* 38* 59* (44 \pm 13.1)	9* 8* 11* (9 \pm 1.5)	29 23 26 (26 \pm 3.0)	33* 17* 31* (27 \pm 8.7)	6* 7* 4* (6 \pm 1.5)	
	500	ND	ND	25* 19* 25* (23 \pm 3.5)	ND	0* 0* 1* (0 \pm 0.6)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix(-)	Number of colonies/plate	453 477 416 (449 \pm 30.7)	499 491 505 (498 \pm 7.0)	67 75 72 (71 \pm 4.0)	555 542 494 (530 \pm 32.1)	825 843 749 (806 \pm 49.9)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μ g/plate)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix(+)	Number of colonies/plate	517 415 396 (443 \pm 65.1)	259 210 200 (223 \pm 31.6)	293 275 260 (276 \pm 16.5)	330 332 502 (388 \pm 98.7)	209 190 159 (186 \pm 25.2)	

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 99.4 wt% and 0.3 wt% vinylbicycloheptene and 0.3 wt% unidentified compounds were contained as impurities.

ND:Not done

連絡先

試験責任者：澁谷 徹
試験担当者：原 巧, 川上久美子,
堀谷尚古
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
〒257-8523 秦野市落合 729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)
Takumi Hara, Kumiko Kawakami,
Naoko Horiya
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, 257-8523,
Japan
Tel +81-463-82-4751 FAX +81-463-82-9627

5-エチリデン-2-ノルボルネンの 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 5-Ethylidene-2-norbornene on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

5-エチリデン-2-ノルボルネ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)における50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理では0.07 mg/mL、S9 mix存在下およびS9 mix非存在下での短時間処理では0.1 mg/mLおよび0.06 mg/mLであった。各系列での処理濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の約2倍濃度を最高処理濃度とし、それぞれ公比2で5濃度設定した。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存在下および非存在下で6時間処理し、新鮮培地で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。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存在下および非存在下では0.10 mg/mL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、5-エチリデン-2-ノルボルネンは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

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:Filtron)を10 vol%添加したイーグルMEM(日本製薬㈱)培養液を用いた。

3. 培養条件

5-エチリデン-2-ノルボルネンはプラスチック底面を溶解することから、培養にはガラスフラスコ(T25 cm², 池本理化工業㈱)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

5-エチリデン-2-ノルボルネン(ロット番号:6J01, 日本石油化学㈱)は、無色透明液体で、水に対しては100 mmol/L未満、DMSOでは50 mg/mL以上、1 mol/L未満、アセトンでは2 mol/L以上で溶解し、油性で、分子量120.20、凝固点-80℃以下、沸点147℃、純度99.4 wt%(不純物として軽質分0.5%(うちビニルピシクロヘプテンが0.3 wt%、未知成分が0.2 wt%)、重質分0.1 wt%)の物質である。被験物質原体は、水との反応性はなく、320℃以上で異常発熱する。光によって着色する。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はアセトン(ロット番号:KCJ7945, 和光純薬工業㈱)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。

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、コールターカウンター(Coulter Electronics Ltd.)を用いて各群の細胞数を計測し、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%細胞増殖抑制濃度は、0.07 mg/mLであった。また、S9 mix存在下およびS9 mix非存在下における短時間処理では、それぞれ0.1 mg/mLおよび0.06 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、50%増殖抑制濃度の約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(連続処理およびS9 mix存在下での

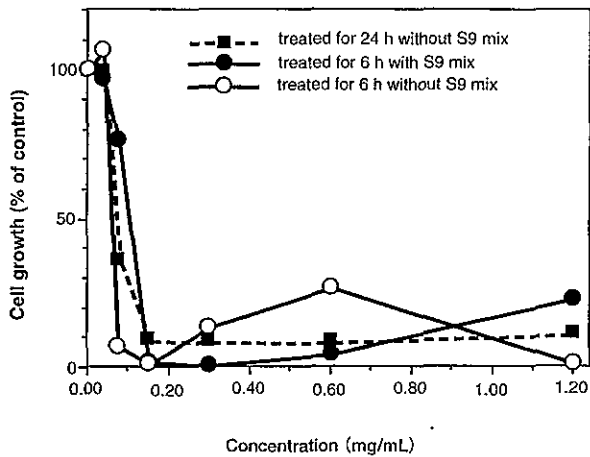


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 5-ethylidene-2-norbornene

短時間処理:0.013, 0.025, 0.050, 0.10, 0.20 mg/mL, S9 mix非存在下での短時間処理:0.0063, 0.013, 0.025, 0.050, 0.10 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, 注射用蒸留水(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, 溶媒対照群と処理群では1濃度あたり2フラスコを用い, 染色体標本の作製およびコールターカウンターによる細胞増殖率測定を行った。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように培養液に加えた。染色体標本の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

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, 短時間処理においてはS9 mix存在下および非存在下ともに0.10 mg/mLが, 染色体分析の可能な最高濃度であったことから, 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(polyplloid)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($p < 0.01$)。また, 用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³⁾($p < 0.01$)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。5-エチリデン-2-ノルボルネンを加えて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。5-エチリデン-2-ノルボルネンを加えて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, 5-エチリデン-2-ノルボルネンは, 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.
- 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.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 5-ethylidene-2-norbornene (ENB)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ¹	No. of cells			Concurrent		Mitotic index ⁷ (%)		
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²	total		with aberrations TAG (%)	Polyploid ¹ TA (%)	Trend test ⁵ SA NA	cytotoxicity ⁶ (%)				
Control			200	1	0	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.50			—	—
Solvent ¹	0	24	200	1	0	1	1	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.38			100.0	—
ENB	0.013	24	200	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			135.0	—
ENB	0.025	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13	-	-	115.3	—	
ENB	0.050	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25			124.1	4.7	
ENB	0.10***	24	—											—			7.2	—	
ENB	0.20***	24	—											—			6.3	—	
MC	0.00005	24	200	0	4	27	1	0	0	0	32	0	24*(12.0)	24*(12.0)	0.13			—	—
Solvent ¹	0	48	200	0	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			100.0	—
ENB	0.013	48	200	0	3	0	0	0	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38			99.8	—
ENB	0.025	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	-	-	105.8	—	
ENB	0.050	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			97.2	1.2	
ENB	0.10***	48	—											—			5.3	—	
ENB	0.20***	48	—											—			8.4	—	
MC	0.00005	48	200	5	17	37	0	4	0	0	63	1	48*(24.0)	46*(23.0)	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.

1)Acetone 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 Coulter Counter. 7)Number of metaphase per 500 cells was scored in each flask in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes.

*:Significantly different from solvent control at p<0.01 by Fisher's exact test. **:Purity was 99.4%. Vinylbicycloheptene (0.3 wt%) and unidentified compounds (0.3 wt%) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 5-ethylidene-2-norbornene (ENB)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ¹	No. of cells			Concurrent		Mitotic index ⁷ (%)	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²	total		with aberrations TAG (%)	Polyploid ¹ TA (%)	Trend test ⁵ SA NA	cytotoxicity ⁶ (%)			
Control				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.13			—	—
Solvent ¹	0	-	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13			100.0	—
ENB	0.025	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			101.6	—	
ENB	0.050	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	-	-	98.4	—
ENB	0.10	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25			48.8	5.1
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.00			—	—
Solvent ¹	0	+	6-(18)	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.50			100.0	—
ENB	0.025	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.00			108.3	—	
ENB	0.050	+	6-(18)	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13	-	-	109.0	—
ENB	0.10	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38			43.3	4.5	
ENB	0.20***	+	6-(18)	—										—			10.7	—	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	8	22	65	0	0	0	95	1	61*(30.5)	58*(29.0)	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, CPA:cyclophosphamide.

1)Acetone 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 Coulter Counter. 7)Number of metaphase per 500 cells was scored in each flask in order to select the highest dose enable to analyse chromosomes.

*:Significantly different from solvent control at p<0.01 by Fisher's exact test. **:Purity was 99.4%. Vinylbicycloheptene (0.3 wt%) and unidentified compounds (0.3 wt%) were contained as impurities. ***:Chromosome analysis was not performed because of severe cytotoxicity.

連絡先

試験責任者：田中憲穂
試験担当者：日下部博一，渡辺美香，
中川ゆづき，井上みゆき，橋本恵子
(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)
Hirokazu Kusakabe, Mika Watanabe,
Yuzuki Nakagawa, Miyuki Inoue,
Keiko Hashimoto
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