

II-453 染色体異常試験における変異原性の定量に関する研究

京都大学 学生員 上西琴子
京都大学 正 員 小野芳朗
京都大学 正 員 宗宮 功

1. はじめに 微生物試験を補う変異原性試験として、哺乳動物細胞を用いた染色体異常試験が着目されている。本研究では染色体異常試験法の技法の検討を行い、技法の確立と習得を試みた。さらにこの染色体異常試験を用いて水の塩素処理生成物であり変異原であるとされる化合物を選んで変異原性を定量し、確立した染色体異常試験の有用性を検討した。

2. 実験方法 図-1に本実験で行った染色体異常試験の概略を示す。作製した染色体標本は石館の方法¹⁾にしたがって異常を検索し、主に中期分裂像にみられる染色体の数的あるいは構造的異常を記録した。本研究では培養細胞として新生ハインズ・ムスターの雌の肺の繊維芽細胞（CHL/IU）を用いた。培養はEagleのMEMで37℃、5%CO₂下で行なった。

ここでは本試験中特に染色体標本作製法の技法の検討を行った。図-2に染色体標本作製法の概略を示す。以下に検討するにあたって着目した項目を述べる。

（1）コルヒチン処理：より効率的な分裂中期像の集積と、染色体の凝縮による染色分体の分離と動原体の位置の明確化 （2）トリプシン処理：培養細胞を痛めずに剝離できること （3）低張処理：細胞を十分に膨潤させていること （4）固定処理：細胞質を壊れやすくするため細胞の脱水を充分に行っていること （5）プレパラート作製：①細胞浮遊液滴下；細胞懸濁液がスライドガラス上に薄く広くひろげられること ②乾燥；適度に広がった染色体、染色分体像が得られること （6）染色、封入：染色の濃さ、染色体の広がり、検鏡しやすい状態であること

以上の項目に基づいて検討し、得られた染色体標本作製法は以下の通りであった。

〔I〕検体投与後3日目の培養細胞にコルヒチンをフラスコ内最終濃度にして0.3~0.4μg/ml投入する。

〔II〕コルヒチン投入から2時間後、フラスコから旧培養液を取り出し、トリプシン溶液をフラスコに1ml投入し、室温で1分間作用させたのち、旧培養液を入れてトリプシンの作用を止める。この後、ピペッティングにより細胞を剝離し遠心管に集める。

〔III〕0.075MKClを3ml加えピペッティング攪拌し、15分間、37℃で低張処理を行う。この後遠沈（800rpm、1分間）し、上澄みを捨て、同じ操作を再び行う。

〔IV〕カルノア固定液（メタノール：氷酢酸=3:1(v/v)）を3ml強加え、ピペッティング攪拌の後、室温で15分間放置する。遠沈（1000rpm、5分間）をはさんで合計3回この操作を行う。

〔V〕遠沈の後、細胞沈渣に新鮮なカルノア固定液を1×10⁶cellsに対し約1ml程度加え、懸濁する。エタノ

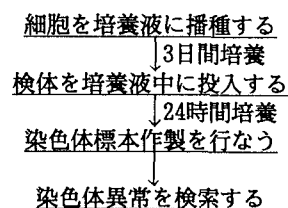


図-1 染色体異常試験法の概略

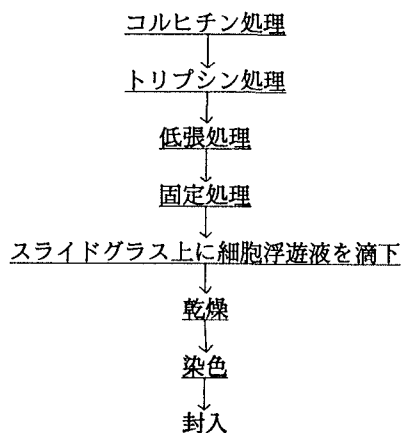


図-2 染色体標本作製法

ールに貯えておいたスライドガラスをよく拭い、濡らしたキムワイブ上におく。このスライドガラス上に細胞懸濁液を2滴滴下する。

〔VI〕スライドガラスを37℃孵卵器に一昼夜以上入れ乾燥する。

〔VII〕5%ギムザ染色液（蒸留水で希釈）で15分間染色し、水洗後、自然乾燥させる。

〔VIII〕封入剤（ダイヤテックス）を2滴たらし、カバーガラスをかけて約1kgのおもしをおき、一昼夜放置する。

〔IX〕顕微鏡で染色体を観察、分裂中期細胞約100個分の染色体をビデオ録画し、その後異常判定を行う。

3. 試験例 本実験の対象化学物質としてクロロホルム（林純薬工業、大阪）、*m*-ジクロロベンゼン（半井化学薬品）、1,2,4-トリクロロベンゼン（和光純薬工業、大阪）を選んだ。これらの化学物質は塩素処理により生成されることが示されており、Amesテスト、*umu*テスト等の細菌を用いた変異原性試験において変異原性が見いだされている。検体とする各化学物質は、エタノールを溶媒とし、各々10,000mg/lに調整する。これを100%エタノールで希釈し、濃度列をつくった。

このようにして調整した各化学物質の濃度列を用いて、試験細胞に対し検体を投与し、dose-responseを得た。その結果を図-3～5に示す。図より各物質で10%以上の異常率、すなわち陽性を示した投与濃度は、クロロホルムで3mg/l、*m*-ジクロロベンゼンで10mg/l、1,2,4-トリクロロベンゼンで30mg/lであった。

4. おわりに 設定した染色体異常試験を適用して、3種の化学物質（クロロホルム、*m*-ジクロロベンゼン、1,2,4-トリクロロベンゼン）についてすべてほぼ有意な

dose-responseを得ることが出来た。これらの化学物質は、既にその変異原性が他の細菌細胞を用いた変異原性のスクリーニング試験等で検出されており、本実験でその変異原性を検出し得たことは、本試験法の有用性を示すものと考えられる。また、哺乳動物細胞を用いた本試験法でこれら3種の化学物質の変異原性が見いだされたということで、人間の健康への有害性について警鐘を鳴らすものとなるともいえるだろう。

参考文献 1) 石館：染色体異常試験データ集（1983）、リライズ社

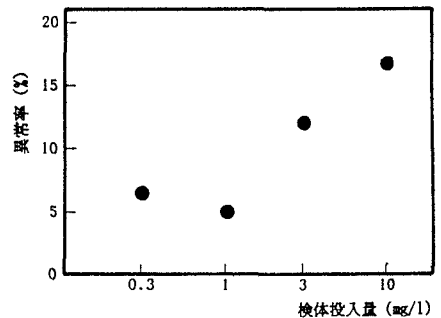


図-3 クロロホルムの染色体異常試験結果

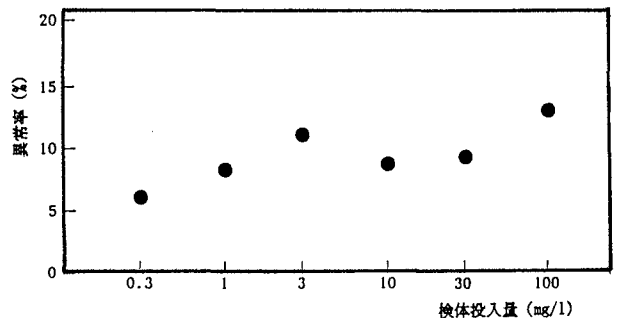


図-4 *m*-ジクロロベンゼンの染色体異常試験結果

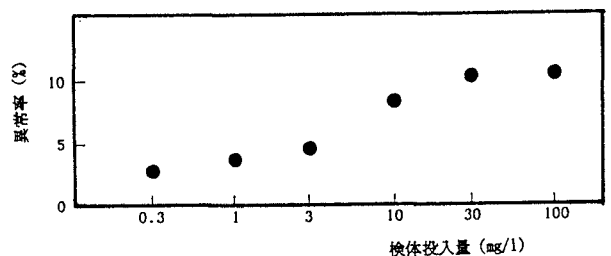


図-5 1,2,4-トリクロロベンゼンの染色体異常試験結果