

最終報告書

ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験（プロモーション試験）

厚生労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質対策課 委託

試験施設

一般財団法人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 番地の 5

TEL 0463-82-4751

目次

要約	5
試験目的.....	5
採用する試験方法と GLP 対応	5
材料と方法	5
1. 被験物質	5
2. 陽性対照物質	6
3. 細胞と培養条件	6
4. 被験物質の調製液及び処理	6
5. 用量設定試験	6
6. 形質転換試験における群構成.....	7
7. 形質転換試験	8
8. 形質転換巢の判定	8
9. 結果の判定.....	8
予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わな かったこと	9
結果と考察	9
1. 用量設定試験	9
2. 形質転換試験	10
結論	10
参考文献.....	10
図 1 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における用量設定試験の結果	11
図 2 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における形質転換試験の結果	11
表 1 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における用量設定試験の結果(1 回目、クリスタルパイ オレット法).....	12
表 2 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における用量設定試験の結果(2 回目、クリスタルパイ オレット法).....	12
表 3 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における用量設定試験の結果(3 回目、血球計算盤法)	13
表 4 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における形質転換試験の細胞増殖試験の結果(血球 計算盤法)	14
表 5 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における形質転換試験の結果	15

(最終ページ:15 ページ)

信頼性保証陳述書

要約

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験を実施することにより、ヘキサメチレンジアミンについて *in vitro* での発がんプロモーション作用の有無を検討した。

クリスタルバイオレット法による用量設定試験において、Bhas 42 細胞を 0.31、0.63、1.3、2.5、5.0、10 mM の濃度で処理したところ、10 mM において強い細胞毒性作用が認められた。そこで濃度を 1.0、2.0、4.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10 mM に設定し、2 回目の用量設定試験を行った。その結果、10 mM において殆どの細胞が死滅したにもかかわらず、9.0 mM では増殖促進している可能性が示唆された。通常、細胞増殖は用量に依存して阻害されるため、何らかの理由により細胞が濃く染色され、見かけ上細胞が増殖したように測定された可能性が考えられた。そこで 2 回目のクリスタルバイオレット法と同じ濃度で、血球計算盤を用いて 3 回目の用量設定試験を実施した。

血球計算盤法においてもクリスタルバイオレット法と同様の結果が得られたため、1.0、2.0、4.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10 mM を用いて形質転換試験を行った。その結果、いずれの濃度においても形質転換巢の有意な増加は認められなかった。なお、8.0、9.0、10 mM では細胞毒性作用が強すぎ、培養の途中で全細胞が剥がれてしまったことから培養を中止し、評価対象外とした。

以上の結果から、ヘキサメチレンジアミンは *in vitro* での発がんプロモーション作用を有しないことが示唆された。

試験目的

ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験を実施し、*in vitro* での発がんプロモーション作用を評価した。

採用する試験方法と GLP 対応

本試験は、「Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験による調査の基準」(平成 26 年 7 月 4 日、厚生労働省第 3 回遺伝毒性評価ワーキンググループ合意事項)及び「労働安全衛生規則第 34 条の 3 第 2 項の規定に基づき試験施設等が具備すべき基準を定める告示」(昭和 63 年 9 月 1 日労働省告示第 76 号、最終改正平成 12 年 12 月 25 日労働省告示第 120 号)¹⁾に準拠して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

ヘキサメチレンジアミン(英名: hexamethylenediamine、略称: HMDA、CAS No.: 124-09-4、性状: 固体、アミン臭、融点: 38-42、沸点: 204-205、純度: 95.0%以上、分子量: 116.21、分子式: C₆H₁₆N₂、ロット

番号:KPP5758)は和光純薬工業株式会社より購入した。また使用時まで遮光、25℃以下(実測温度:3~5℃)にて保管した。

2. 陽性対照物質

陽性対照物質として用いた 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate(略称:TPA、純度:99%、ロット番号:MKBQ9406V、Sigma-Aldrich)はジメチルスルホキシド(略称:DMSO、ロット番号:AWH6230、和光純薬工業)に溶解し、50 µg/mLとしたものを小分け後、-15℃以下で凍結保存し、調製後1年以内に用時解凍して用いた(最終濃度:50 ng/mL)。

3. 細胞と培養条件

Bhas 42 細胞(マウス全胎児由来 BALB/c 3T3 A31-1-1 に v-Ha-ras 遺伝子を導入した細胞)²⁾は JCRB 細胞バンクより 1988 年 4 月 19 日に入手した。入手した時点で 7 代のものを 17 代まで継代して凍結保存した(マイコプラズマ陰性)。これを解凍後 2、4、8 代で用量設定試験に、また 2 代で形質転換試験に用いた³⁻⁶⁾。培養はウシ胎児血清(FBS、ロット番号:S11605S1780、Biowest)を 5 vol%含む Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12(DMEM/F12)を用い、CO₂インキュベーター(5% CO₂、37℃)内で培養した。

FBS を 5 vol%含む DMEM/F12 は以下のように調製した。まず、DMEM/F12 粉末(1 L 分/袋、Life Technologies)1 袋に滅菌した超純水 100 mL を加え溶解させ、フィルター滅菌(ポアサイズ:0.22 µm)し 10 倍濃度培養液を作製した。次に、滅菌した超純水 450 mL に 10 倍濃度培養液 50 mL、10% NaHCO₃ 水溶液 6 mL、10000 U/mL ペニシリン-10000 µg/mL ストレプトマイシン溶液 5 mL および FBS 26.8 mL を加えて作製した。

4. 被験物質の調製液及び処理

被験物質の 5 mg/mL(43.0 mM)と 10 mM(1.2 mg/mL)では、10 mM の方が低い用量であるため、10 mM を最高用量とした。そこで溶解性試験では、超純水及び DMSO を用いて 10 mM の 200 倍濃度液を調製し観察した。その結果、同様に懸濁したことから、TPA の溶媒である DMSO を被験物質の溶媒として使用した。

被験物質及び TPA 調製液は、黄色灯下にて最終濃度の 200 倍溶液を用時調製し、溶媒濃度が 0.5 vol%となるように培養液に添加して処理した。

安定性試験は用時調製のため実施しなかった。また含量測定も実施しなかった。

5. 用量設定試験

調製液は、原液を溶媒との混合により公比 2 で段階希釈して作製した。

形質転換試験で用いる処理濃度を決定するため、用量設定試験としてクリスタルバイオレット法による細胞増殖試験を行った。細胞を 0.25%トリプシンを用いて剥離した後、細胞濃度 0.7×10^4 個/mL の懸濁

液とした。この細胞懸濁液 2 mL (1.4×10^4 個) を 6 ウェルプレートに分注し (3 ウェル/群)、4 日間培養した。被験物質の処理は、播種 4 日後に培養液を処理液と交換 (1 ウェルあたり 2 mL) することで実施した。播種 7 日後に培養液を捨て (3 日間処理)、メタノールで固定後、0.1% クリスタルバイオレット液で染色した。

ウェル内に色素抽出液 (0.02 mol/L 塩酸、50% エタノール) を 2 mL ずつ注入し、色素抽出した。各抽出液を 100 μ L 取り、96 ウェルプレートに移し、マイクロプレートリーダー (SUNRISE CLASSIC、Tecan) を用いて吸光度 (540 nm) を測定した。各濃度群での相対細胞増殖率 (%) は次の式によって求めた。

$$X (\%) = (T - B) / (S - B) \times 100$$

X: 被験物質群の相対細胞増殖率 (%)

S: 溶媒対照群の吸光度

T: 被験物質群の吸光度

B: ブランクの吸光度 (培地のみを入れたウェル)

血球計算盤法による細胞増殖試験も行った。培養終了まではクリスタルバイオレット法と同様に実施した。0.25% トリプシン 0.5 mL を用いて剥離後、培地を 4.5 mL 加え懸濁し、ウェル当たりの細胞数を測定した。各濃度群での相対細胞増殖率 (%) 及び細胞数は次の式によって求めた。

$$X (\%) = (T/S) \times 100$$

X: 被験物質群の相対細胞増殖率 (%)

S: 溶媒対照群の細胞数

T: 被験物質群の細胞数

細胞数 ($\times 10^4$ 個): (血球計算盤上部の細胞数 + 血球計算盤下部の細胞数) / 18 \times 5

なお 18 は血球計算盤の区画の数、5 は細胞懸濁液量 (mL)。

6. 形質転換試験における群構成

形質転換試験の濃度は用量設定試験の結果から以下の基準をもとに決定した。

- 1) 細胞増殖の促進が見られた場合、細胞毒性が認められない濃度 (相対細胞増殖率が 80-120%) に 1 濃度、細胞増殖の促進が認められる濃度に 3 濃度、弱い増殖阻害が認められる濃度に 1 濃度を設定する。
- 2) 細胞増殖の阻害が見られた場合、細胞毒性が認められない濃度に 2 濃度、細胞毒性が認められない濃度から増殖が 50% 阻害される濃度 (IC50) 間に 2 濃度、IC50 から増殖が 90% 阻害される濃度 (IC90) 間に 1 濃度を設定する。
- 3) 最終的な決定は、生物学的な観点からの判断を加味して総合的に設定する。

7. 形質転換試験

形質転換試験を実施するにあたり、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を評価するため、並行して血球計算盤法による細胞増殖試験を実施した。

細胞を0.25%トリプシンを用いて剥離した後、細胞濃度 0.7×10^4 個/mLの懸濁液とした。この細胞懸濁液2 mL (1.4×10^4 個)をプレートに分注し(形質転換試験用:6ウェル/群、細胞増殖試験用:3ウェル/群)、4日間培養した。被験物質の処理は播種4日後、播種7日後、播種11日後に培養液を交換(1ウェルあたり2 mL)することで実施した。播種14日後に新鮮培地と交換し(10日間処理)、さらに7日間培養した。形質転換試験用のプレートについては、細胞播種21日後にメタノールで固定後、5 vol%ギムザ液で染色し、ウェルあたりの形質転換巣を数えた。細胞増殖試験では、「5. 用量設定試験」と同じ血球計算盤法により相対細胞増殖率を測定した。

8. 形質転換巣の判定

実体顕微鏡を用いて細胞を観察し、次の基準により形質転換巣であると判定したのものについて、その数を数えた。なお、プレートをコード化し、処理条件が判らない状況で観察した。

- 1) 形質転換巣を構成する細胞数が100個以上。
- 2) 紡錘形をしている(spindle-shaped)。
- 3) 細胞質が塩基性(濃い紫色)に強く染まっている(basophilic)。
- 4) ランダムな配列で互いに交差している(criss-cross)。
- 5) 積み重なりあっている(piling-up)。
- 6) 周辺部の単層の細胞へ浸潤している(invasive)。
- 7) 2-6)の所見が全部揃わなくても、一部著しければ形質転換巣と判定する。

9. 結果の判定

1) 統計処理対象群

以下に示す基準を満たした群について統計処理を行った。

- (1) 細胞増殖試験用のプレートでは2ウェル以上が測定可能である。
- (2) 形質転換本試験用のプレートでは5ウェル以上が計数可能である。

2) 統計処理

統計解析ソフトウェア SAS[®]を用い、各被験物質濃度群と溶媒対照群間において Dunnett 検定を行った(有意水準 $\alpha=0.05$ 、片側)。また TPA 処理群と DMSO 処理群間においては Student の t 検定を行った(有意水準 $\alpha=0.05$ 、片側)。

3) 試験成立の判定

以下の基準が全て満たされた場合、結果を評価できる試験が成立したと考えた。

- (1) 溶媒対照群の形質転換率が12個/ウェルを越えていない。
- (2) 陽性対照群の形質転換巣数が有意に高い。

- (3) 被験物質群において以下の条件を含む統計処理対象群が 4 濃度以上ある。ただし、大きくこの条件から外れない限り、濃度は適正と考える。
- (4) 細胞増殖の促進が見られた場合、少なくとも、細胞毒性が認められない濃度に 1 濃度、細胞増殖の促進が認められる濃度に 2 濃度ある。
- (5) 細胞増殖の阻害が見られた場合、少なくとも、細胞毒性が認められない濃度に 2 濃度、細胞毒性が認められない濃度から IC50 の間に 2 濃度ある。

4) 試験結果の判定

「3) 試験成立の判定」により試験が成立した場合、被験物質群の統計処理を実施した群において、以下の基準によって結果を判定した。

- (1) 陰性:形質転換巢の統計学的に有意な増加が、全ての群で認められない。
- (2) 陽性:形質転換巢の統計学的に有意な増加が、連続した 2 濃度以上で認められる。
- (3) 疑陽性:形質転換巢の統計学的に有意な増加が、1 濃度または不連続な 2 濃度以上で認められる。

不確かな結果が得られた場合は、必要に応じて確認試験を行う。

最終的な判定は、統計学的検定、背景データ、形質転換巢の誘発率を考慮し、生物学的な観点からの判断を加味して総合的に評価する。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

試験期間中に、「予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと」はなかった。

結果と考察

1. 用量設定試験

形質転換試験に用いる被験物質の適正な処理濃度を求めるため、クリスタルバイオレット法による用量設定試験を行った。Bhas 42 細胞を被験物質で処理したところ (0.31、0.63、1.3、2.5、5.0、10 mM)、10 mM において強い細胞毒性作用が認められた (図 1 左、表 1)。そこで濃度を 1.0、2.0、4.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10 mM に設定し、2 回目の用量設定試験を行った。その結果、10 mM において殆どの細胞が死滅したにもかかわらず、直前の 9.0 mM では相対細胞増殖率が 120.1%となり、増殖促進している可能性が示唆された (図 1 中、表 2)。通常、細胞増殖が阻害される場合、用量に依存して阻害されるため、実際は細胞は増えておらず、何らかの理由により細胞が濃く染色され、見かけ上細胞が増殖したように測定された可能性が考えられた。そこで、細胞を剥がし、細胞数を直接測定する血球計算盤法を用いて 3 回目の用量設定試験を実施した。2 回目のクリスタルバイオレット法と同じ濃度において相対細胞増殖率を求めたところ、血球計算盤法においてもクリスタルバイオレット法と同

様に、10 mM では強い細胞毒性作用を示したにもかかわらず、9.0 mM 近くの 7.0 及び 8.0 mM では増殖促進の傾向が見られた(図 1 右、表 3)。これらの結果をもとに、形質転換試験における濃度を、1.0、2.0、4.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10 mM に設定した。

2. 形質転換試験

用量設定試験で決定した被験物質処理濃度を用いて形質転換試験を実施し、試験が成立しているかどうか確認した結果、TPA 群の形質転換率は DMSO 群と比較して有意に増加しており、また DMSO 群の形質転換率は 12 個/ウェルを越えていなかった。さらに、被験物質群の統計処理対象群は 4 濃度以上あった(図 2、表 4 及び 5)。このように試験成立の基準が全て満たされたため、被験物質の *in vitro* での発がんプロモーション作用は適切に評価されたと判定した。

被験物質処理群では、いずれの濃度においても形質転換率の有意な増加は認められなかったため、陰性と判定した(図 2、表 4 及び 5)。なお、8.0、9.0、10 mM では細胞毒性作用が強すぎ、培養の途中で全細胞が剥がれてしまったことから培養を中止し(8.0 mM: 処理 10 日目、9.0 及び 10 mM: 処理 7 日目)、評価対象外とした。また 6.0 mM 以上では、培地の色が薄い赤から濃い赤に変色したため pH が高くなったことが示された。

結論

ヘキサメチレンジアミンは *in vitro* での発がんプロモーション作用を有しないことが示唆された。

参考文献

- 1) 労働省化学物質調査課編: 「安衛法における変異原性試験」, 中央労働災害防止協会, 東京 (1991)
- 2) Sasaki, K. et al.: Isolation and characterization of *ras*-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 921-930 (1988)
- 3) Ohmori, K. et al.: An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells. *Mutat. Res.* 557: 191-202 (2004)
- 4) Ohmori, K. et al.: Inter-laboratory collaborative study of cell transformation assay for tumor promoters using Bhas 42 cells by non-genotoxic carcinogen study group in Japan. *Altern. Lab. Anim.* 33: 619-639 (2005)
- 5) Sakai, A. et al.: A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat. Res.* 702: 100-122 (2010)
- 6) Sakai, A. et al.: An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat. Res.* 725: 57-77 (2011)

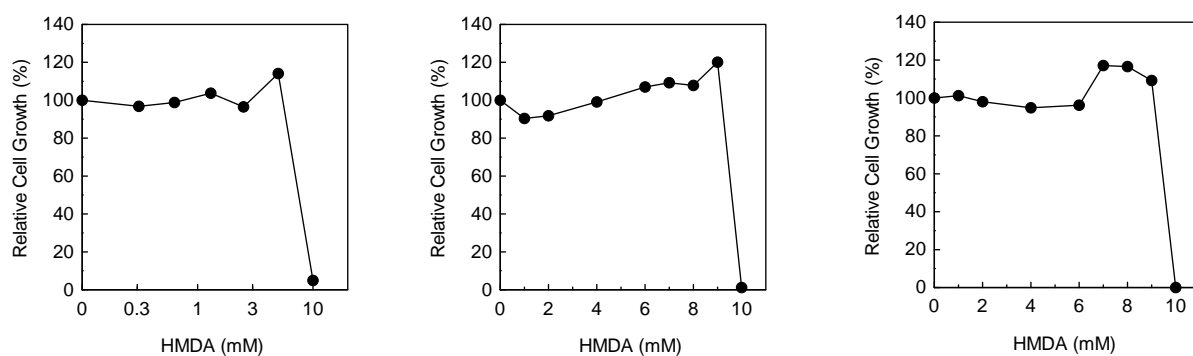


図1 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における用量設定試験の結果

左:1回目(クリスタルバイオレット法)、中:2回目(クリスタルバイオレット法)、右:3回目(血球計算盤法)。

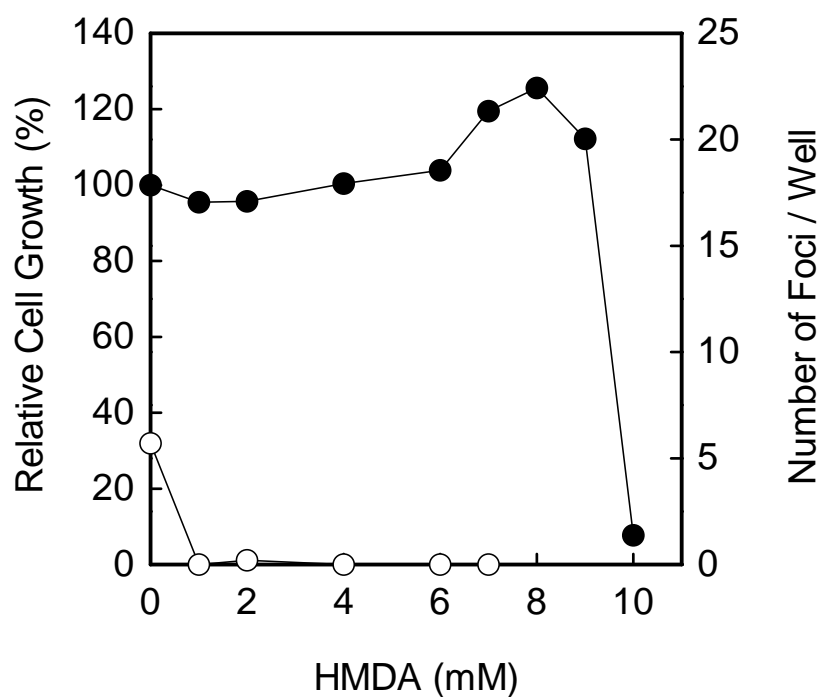


図2 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における形質転換試験の結果

●: 相対細胞増殖率(%), ○: 形質転換巣数/ウェル。

表1 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における用量設定試験の結果
(1回目、クリスタルバイオレット法)

物質名	濃度 (mM)	吸光度/ウェル					相対細胞 増殖率 (%)
		1	2	3	平均	S.D.	
ブランク	-	0.090	0.090	0.080	0.087	0.006	-
DMSO	0.5 vol%	0.653	0.632	0.684	0.656	0.026	100.0
HMDA	0.31	0.623	0.667	0.625	0.638	0.025	96.8
	0.63	0.649	0.641	0.657	0.649	0.008	98.8
	1.3	0.694	0.657	0.680	0.677	0.019	103.7
	2.5	0.669	0.616	0.622	0.636	0.029	96.5
	5.0	0.769	0.716	0.722	0.736	0.029	114.1
	10 ^a	0.119	0.117	0.108	0.115	0.006	4.9

a: 培地の色が薄い赤から濃い赤に変色した。

表2 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における用量設定試験の結果
(2回目、クリスタルバイオレット法)

物質名	濃度 (mM)	吸光度/ウェル					相対細胞 増殖率 (%)
		1	2	3	平均	S.D.	
ブランク	-	0.114	0.106	0.101	0.107	0.007	-
DMSO	0.5 vol%	1.124	1.072	1.134	1.110	0.033	100.0
HMDA	1.0	1.017	0.993	1.033	1.014	0.020	90.4
	2.0	1.032	1.011	1.041	1.028	0.015	91.8
	4.0	1.151	1.126	1.026	1.101	0.066	99.1
	6.0 ^a	1.115	1.178	1.247	1.180	0.066	107.0
	7.0 ^a	1.271	1.162	1.173	1.202	0.060	109.2
	8.0 ^a	1.213	1.165	1.187	1.188	0.024	107.8
	9.0 ^a	1.318	1.281	1.336	1.312	0.028	120.1
	10 ^a	0.125	0.116	0.117	0.119	0.005	1.2

a: 培地の色が薄い赤から濃い赤に変色した。

表3 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における用量設定試験の結果
(3回目、血球計算盤法)

物質名	濃度 (mM)	ウェル番号	測定値(個)		細胞数($\times 10^4$ 個)		相対細胞 増殖率 (%)
			血球計算盤上部	血球計算盤下部	ウェルあたり	平均	
DMSO	0.5 vol%	1	104	108	58.9	60.1	100.0
		2	111	104	59.7		
		3	105	117	61.7		
HMDA	1.0	1	106	115	61.4	60.8	101.2
		2	113	109	61.7		
		3	106	108	59.4		
	2.0	1	109	98	57.5	58.9	98.0
		2	96	110	57.2		
		3	111	112	61.9		
	4.0	1	106	103	58.1	57.0	94.8
		2	99	102	55.8		
		3	102	104	57.2		
6.0 ^a	1	104	101	56.9	57.8	96.2	
	2	102	112	59.4			
	3	105	100	56.9			
7.0 ^a	1	132	127	71.9	70.4	117.1	
	2	131	118	69.2			
	3	123	129	70.0			
8.0 ^a	1	122	132	70.6	70.1	116.6	
	2	130	126	71.1			
	3	127	120	68.6			
9.0 ^a	1	121	120	66.9	65.6	109.2	
	2	116	113	63.6			
	3	124	115	66.4			
10 ^a	1	0	0	0.0	0.0	0.0	
	2	0	0	0.0			
	3	0	0	0.0			

a: 培地の色が薄い赤から濃い赤に変色した。

表4 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における形質転換試験の
細胞増殖試験の結果(血球計算盤法)

物質名	濃度 (mM)	ウェル番号	測定値(個)		細胞数($\times 10^4$ 個)		相対細胞 増殖率(%)
			血球計算盤上部	血球計算盤下部	ウェルあたり	平均	
DMSO	0.5 vol%	1	84	90	48.3	49.2	100.0
		2	96	86	50.6		
		3	92	83	48.6		
TPA	50 ng/mL	1	164	148	86.7	87.0	176.8
		2	150	155	84.7		
		3	157	166	89.7		
HMDA	1.0	1	81	88	46.9	47.0	95.5
		2	80	91	47.5		
		3	86	82	46.7		
	2.0	1	78	84	45.0	47.1	95.7
		2	89	85	48.3		
		3	92	81	48.1		
	4.0	1	82	94	48.9	49.4	100.4
		2	90	97	51.9		
		3	83	88	47.5		
6.0 ^a	1	98	91	52.5	51.1	103.9	
	2	93	84	49.2			
	3	90	96	51.7			
7.0 ^a	1	104	100	56.7	58.8	119.5	
	2	95	111	57.2			
	3	118	107	62.5			
8.0 ^a	1	109	115	62.2	61.8	125.6	
	2	107	102	58.1			
	3	113	121	65.0			
9.0 ^a	1	99	105	56.7	55.2	112.2	
	2	98	112	58.3			
	3	90	92	50.6			
10 ^a	1	9	7	4.4	3.8	7.7	
	2	5	6	3.1			
	3	6	8	3.9			

a: 培地の色が薄い赤から濃い赤に変色した。

表5 ヘキサメチレンジアミンの Bhas 42 細胞における形質転換試験の結果

物質名	濃度 (mM)	形質転換巢/ウェル						平均	S.D.
		1	2	3	4	5	6		
DMSO	0.5 vol%	7	6	5	6	5	5	5.7	0.8
TPA	50 ng/mL	20	10	18	14	13	19	15.7 *	3.9
HMDA	1.0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
	2.0	0	1	0	0	0	0	0.2	0.4
	4.0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
	6.0 ^a	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
	7.0 ^a	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0
	8.0 ^a	tox	tox	tox	tox	tox	tox		
	9.0 ^a	tox	tox	tox	tox	tox	tox		
10 ^a	tox	tox	tox	tox	tox	tox			

*: $p < 0.05$, Studentのt検定(片側)による。

a: 培地の色が薄い赤から濃い赤に変色した。

tox: 細胞毒性作用が強すぎ、培養の途中で全細胞が剥がれてしまったことから培養を中止し、評価対象外とした。