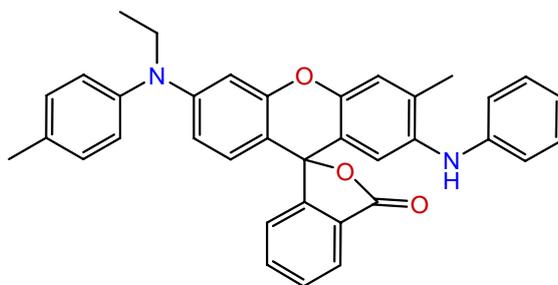


2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl) amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1 (3H), 9'-[9H] xanthen]-3-one

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサントン]-3-オン

[CAS No. 59129-79-2]

Molecular formula: $C_{36}H_{30}N_2O_3$ Molecular weight: 539



ABSTRACT

In vitro chromosomal aberration tests using cultured Chinese hamster cells (CHL/IU) were conducted to assess the potential of 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one to induce chromosomal aberrations.

2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one did not induce chromosomal aberrations in cultured cells under the conditions of this study.

Chromosomal aberration test

Purity : 99.0%

Type of cell used : Chinese hamster lung (CHL/IU) cells

Test method : Guidelines for screening mutagenicity Testing of Chemicals
Chemical Substances Control Law of Japan and OECD Test
Guideline 473

Solvent : Culture medium only

Positive controls: -S9mix ; Mytomycin C
+S9mix ; Benzo[a]pyrene

S9 : Rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone

Plate/test : 2

Dosage : -S9mix (short-term treatment) ; 0,1.4,2.7,4.1,5.4mg/mL
+S9mix (short-term treatment) ; 0,1.4,2.7,4.1,5.4mg/mL
+S9mix (short-term confirmation test) ; 0,2.7,4.1,5.4mg/mL
-S9mix (continuous treatment,24h) ; 0,0.34,0.68,1.4,2.7,5.4 mg/mL
-S9mix (continuous treatment,48h) ; 0,0.17,0.34,0.68,1.4,2.7 mg/mL

GLP : Yes

Test results :

No increase in chromosomal aberrations was observed with either the short-term treatment (-S9 mix , +S9 mix and +S9 mix confirmation test) or the continuous treatment (24hours and 48 hours).

Genetic effects:

	clastogenicity			polyploidy		
	+	?	-	+	?	-
Without metabolic activations	[]	[]	[*]	[]	[]	[*]
With metabolic activation	[]	[]	[*]	[]	[]	[*]

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサテン]-3-オンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

Chromosomal aberration test of 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methyl spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H] xanthen]-3-one with cultured mammalian cells

要約

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサテン]-3-オンのチャイニーズ・ハムスター肺由来細胞 (CHL/IU 細胞) を用いる染色体異常試験を実施した。

短時間処理法において、-S9 処理および+S9 処理ともに、1.4, 2.7, 4.1, 5.4mg/mL の4段階の用量で実施した。試験の結果、-S9 処理において、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、いずれの用量においても5%未満であった。+S9 処理においても、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、いずれの用量においても5%未満であった。

連続処理法において、24時間処理は、0.34, 0.68, 1.4, 2.7, 5.4mg/mL の5段階、48時間処理は、0.17, 0.34, 0.68, 1.4, 2.7mg/mL の5段階の用量で実施した。試験の結果、24時間処理において、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、いずれの用量においても5%未満であった。48時間処理においても、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、いずれの用量においても5%未満であった。

短時間処理法による試験および連続処理法による試験で陰性と判断したため、短時間処理法での確認試験を実施した。確認試験は、2.7, 4.1, 5.4mg/mL の3段階の用量で実施した。試験の結果、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、いずれの用量においても5%未満であった。

以上の結果より、本被験物質の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は、陰性と判定した。

方法

1. 被験物質

被験物質の 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサテン]-3-オンは [REDACTED] 提供を受けたもの (ロット番号: 0924) で、純度 99.0% の微着色粉末である。被験物質は、入手後、使用時まで室温、遮光にて保管した。被験物質の同一性については、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) を用いて測定し、文献値と比較することにより確認した。また、被験物質の安定性は、試験実施前および試験実施後に赤外分光光度計を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

2. 被験物質溶液の調製

被験物質は水に対して不溶であり、DMSO に対しては 33.8mg/mL で溶解した (1/100 量添加で最終濃度約 0.338mg/mL)。しかしこの濃度で培養液に添加すると、大きな粒子の析出が生じた。一方、被験物質を直接、培養液に添加すると 5.4mg/mL (約 10mM) の濃度で均一に懸濁した。従って、培養液に直接懸濁する方法を選択した。被験物質を秤量し、培養液を加えて超音波処理をした懸濁液を最高調製懸濁液とした。これを培養液で段階希釈して各被験物質懸濁液を調製した。なお、被験物質を培養液に懸濁させた際、発熱、発泡、変色などの変化は観察されなかった。被験物質懸濁液は、その都度調製して用いた。

3. 細胞

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) を選択した。1985年11月14日に国立衛生試験所 (現:国立医薬品食品衛生研究所) から分与を受け (入手時: 継代数 16代)、当センターで培養後、液体窒素中に保存した (現在 19代)。試験に際しては、凍結細胞を融解し 3~5日ごとに継代し、解凍後継代数 17代以内で試験に用いた。培養液は、仔牛血清 (CS, SAFC Biosciences社, Lot No.8B0525) を 10vol% 添加したイーグル MEM (日本製薬(株)) を用い、CO₂ インキュベーター (37°C, 5%CO₂) 内で培養した。

4. 代謝活性化

代謝活性化には、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 S9 を用い、これに補酵素を添加した「染色体異常試験用凍結 S-9MIX」(キッコーマン(株)) を購入して使用した。各成分の最終濃度; S9 5vol%, グルコース 6-リン酸 (G-6-P) 0.83mmol/L, β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (β-NADP) 0.67mmol/L, MgCl₂ 0.83mmol/L, KCl 5.5mmol/L, HEPES (pH 7.2) 0.67mmol/L。

5. 陽性対照物質

陽性対照物質については、+S9 処理の短時間処理法では、ベンゾ[a]ピレン (BP, 和光純薬工業(株)) をジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業(株)) で調製し、最終濃度が 10 μg/mL となるように添加した。-S9 処理

の短時間処理法および連続処理法では、マイトマイシン C (MMC, 和光純薬工業株) を超純水で調製し、最終濃度がそれぞれ $0.1 \mu\text{g/mL}$ および $0.04 \mu\text{g/mL}$ となるように添加した。

6. 培養条件

4×10^3 個/mLのCHL/IU細胞を 60mmのポリエチレンシャーレに 5mL添加し、 CO_2 インキュベーターで3日間培養した。その後、短時間処理では、-S9処理および+S9処理で被験物質を6時間処理し、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS) で洗浄後、新鮮な培養液でさらに20時間培養した。連続処理では、被験物質を24時間および48時間処理した。

7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

染色体異常試験における被験物質の処理用量を設定するため、被験物質の細胞増殖におよぼす影響を調べた。短時間処理法 (-S9処理, +S9処理), 連続処理法 (24時間処理, 48時間処理) とも最高用量を 5.4mg/mL (約 10mM) として、公比2で7段階以上の用量で実施した。試験は、被験物質処理後シャーレを PBS で洗浄し、エタノールで固定 (5分) 後、0.1%クリスタルバイオレットで染色 (10分) し、水で洗浄後に乾燥した。相対細胞増殖率は、細胞密度計 (オリンパス・モノセレーター) を用いて測定した。陰性 (溶媒) 対照をコントロール (100%), 細胞の生育していないシャーレをブランク (0%) として算出した。

試験の結果、短時間処理法 (-S9処理) および+S9処理では、顕著な細胞増殖率の低下は認められなかった。連続処理法の24時間処理では、0.68, 1.4, 2.7, 5.4mg/mL の用量でそれぞれ、68, 52, 42, 39%の細胞増殖率を示した。48時間処理では、0.68, 1.4, 2.7mg/mL の用量でそれぞれ、63, 44, 28%の細胞増殖率を示した。24時間処理, 48時間処理ともに、細胞増殖率は被験物質の用量に依存して減少しており、被験物質による増殖抑制作用が認められた (Fig. 1)。

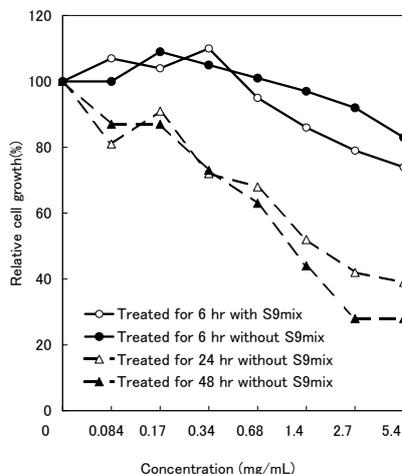


Fig. 1

Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-anilino-6-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3-methyl spiro[isobenzofran-1-(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

8. 実験群の設定 (染色体異常試験)

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理法 (-S9処理, +S9処理) ともに最高用量は、試験ガイドラインの上限である 5.4mg/mL (10mM) として、1.4, 2.7, 4.1, 5.4mg/mL の4段階の用量で実施した。連続処理法の24時間処理は、0.34, 0.68, 1.4, 2.7, 5.4mg/mL の5段階、48時間処理は、0.17, 0.34, 0.68, 1.4, 2.7mg/mL の5段階の用量とした。また、短時間処理法 (+S9処理のみ) の確認試験は、2.7, 4.1, 5.4mg/mL の3段階の用量で実施した。

試験は、用量あたり4枚のシャーレを処理し、2枚を染色体標本作製用、2枚を細胞増殖率測定用とした。また、陰性 (溶媒) 対照群および陽性対照群を設定した。

9. 染色体標本作製

染色体標本の作製2時間前にコルセミドを最終用量 $0.2 \mu\text{g/mL}$ となるように添加した。2時間後培養液を遠沈管に移し、トリプシン溶液を用いて細胞を剥がし、遠沈管に加えた。遠沈管を遠心 (1000rpm , 5分) し、培養液を除去し、 75mM KCl溶液4mLを徐々に添加し、 37°C で20分間低張処理を行った。固定液 (エタノール3:酢酸1) 0.5mL を徐々に添加して遠心した。上清を除去し、固定液4mLを徐々に添加して固定した後、遠心した。この操作を3回繰り返した後、適当な密度の細胞浮遊液を作製した。清浄なスライドグラスに細胞浮遊液を滴下した。これを乾燥後、2.5%ギムザ液 ($\text{pH}6.8$) で12分間染色し、水洗後乾燥させた。

10. 染色体の観察

シャーレあたり100個、用量あたり200個の分裂中期細胞を顕微鏡下で観察した。染色体は、ギャップ (gap), 染色分体切断 (ctb), 染色体切断 (csb), 染色分体交換 (cte), 染色体交換 (cse), およびその他 (others) の構造異常に分類した。同時に、数的異常 (倍数体) の出現率を記録した。染色体の分析は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会による分類法¹⁾に従って実施した。標本はコード化した後、染色体観察を実施した。

11. 結果の評価

祖父尼らの判定基準²⁾および当センターでのバックグラウンドデータより構造異常, 数的異常 (倍数体, 核内倍加を含む) とも、各用量での判定に下記の基準を設けた。染色体異常を有する細胞の出現頻度; 5%未満を陰性 (-), 5%以上10%未満を疑陽性 (\pm), 10%以上を陽性 (+)。溶媒対照群と比較し被験物質処理群において陽性反応が認められ、かつ、再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。なお、構造異常には、ギャップのみを持つ細胞は含めなかった。また、試験結果の統計処理は行わなかった。

結果および考察

短時間処理法による染色体異常試験の結果を Table 1 に示した。短時間処理法の-S9 処理では、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、いずれの用量においても 5%未満であった。+S9 処理でも、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、いずれの用量においても 5%未満であった。また、-S9 処理および+S9 処理ともに、顕著な細胞増率の低下は認められなかった。

連続処理法による染色体異常試験の結果を Table 2 に示した。連続処理法の 24 時間処理では、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、いずれの用量においても 5%未満であった。48 時間処理でも、構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、いずれの用量においても 5%未満であった。また、細胞増殖率は、24 時間処理の 2.7, 5.4mg/ml でそれぞれ、55, 41%, 48 時間処理の 1.4, 2.7mg/ml でそれぞれ、38, 36%を示し細胞増殖抑制作用が観察された。

短時間処理法による試験および連続処理法による試験で陰性と判断したため、短時間処理法の+S9 処理での確認試験を実施した。その結果を Table 3 に示した。構造異常および数的異常を持つ細胞の出現率は、いずれの用量においても 5%未満であった。また、いずれの用量においても顕著な細胞増率の低下は認められなかった。

なお、実施した全ての染色体異常試験の陰性（溶媒）対照および陽性対照の値は、当センターのバックグラウンドデータの範囲内にあり、試験が適切に行われたことを示していた。

以上の試験結果をまとめると、短時間処理法の-S9 処理および+S9 処理において、数的異常および構造異常を持つ細胞の出現率は、陰性の判定基準である 5%未満を示した。また、連続処理法の 24 時間処理および 48 時間処理においても、数的異常および構造異常を持つ細胞の出現率は、陰性の判定基準である 5%未満を示した。短時間処理法の+S9 処理についての確認試験において、数的異常および構造異常を持つ細胞の出現率は、陰性の判定基準である 5%未満を示した。なお、短時間処理法、連続処理法ともに、試験ガイドラインで要求される最高用量（10 mM : 5.4mg/mL）または、細胞毒性の認められる用量まで試験を実施した。

上記結果より、本被験物質の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会編：化学物質による染色体異常アトラス，朝倉書店，東京，1988.
- 2) 祖父尼俊雄監修：染色体異常試験データ集，LIC，東京，1999.

連絡先

試験責任者：

試験担当者：

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター

〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445

Tel 0463-82-3911 Fax 0463-82-3860

Correspondence

Authors:

Japan Bioassay Research Center, Japan
Industrial Safety and Health Association
2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257-0015,
Japan

Tel +81-463-82-3911 Fax +81-463-82-3860

Table 1 Chromosomal aberration test of CHL/IU cells treated with 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one [Short-term treatment with and without S9mix]

Treatment time(h) ^{a)}	S9 mix	Concentration (mg/ml)	Percentages(%) of cells showing structural chromosomal aberrations							gap (%)	Relative cell growth(%)	Percentages(%) of cells showing numerical chromosomal aberrations				Judgement ^{d)}		
			Observed cells	ctb	cte	csb	cse	others	TOTAL			Observed cells	Polyploid	others	TOTAL	SA	NA	
6-20	-	0 ^{b)}	200	0	0.5	0	0	0	0	0.5	0	100	205	2.4	0	2.4	-	-
		1.4	200	0.5	0.5	0	0	0	0	1	0	92	206	2.9	0	2.9	-	-
		2.7	200	0	0	0	0	0	0	0	0	83	206	2.9	0	2.9	-	-
		4.1	200	0	1	0	0	0	0	1	0	78	206	2.9	0	2.9	-	-
		5.4	200	0.5	1	0	0	0	0	1.5	0	69	206	2.9	0	2.9	-	-
		[MMC] ^{c)}	200	6.5	58.5	0	0	0	0	62.5	0	-	201	0.5	0	0.5	+	-
6-20	+	0 ^{b)}	200	0	0.5	0	0	0	0	0.5	0	100	202	1.0	0	1.0	-	-
		1.4	200	0	1	0	0	0	0	1	0	90	203	1.5	0	1.5	-	-
		2.7	200	0	0	0	0	0	0	0	0	77	204	2.0	0	2.0	-	-
		4.1	200	0	1	0	0	0	0	1	0	77	206	2.9	0	2.9	-	-
		5.4	200	0	0	0	0	0	0	0	0	61	204	2.0	0	2.0	-	-
		[B[a]P] ^{c)}	200	1.5	29	0	0	0	0	30	0	-	201	0.5	0	0.5	+	-

Abbreviations: gap:chromatid and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, others(structural):fragmentation etc.(except pulverization), others(numerical):endreduplication etc.

A cell which has many aberrations is calculated as one cell showing aberrations .

a) Treatment time and recovery time were indicated in the column of treatment time.

b) Negative control: normal culture medium only

c) Positive control, MMC: mitomycin C at 0.1µg/mL, BP:benzo[a]pyrene at 10µg/mL.

d) Judgement was done on the basis of criteria of reference 2, SA:structural aberration, NA:numerical aberration.

Table 2 Chromosomal aberration test of CHL/IU cells treated with 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one [Continuous treatment without S9mix]

Treatment time(h) ^{a)}	S9 mix	Concentration (mg/ml)	Percentages(%) of cells showing structural chromosomal aberrations							gap (%)	Relative cell growth(%)	Percentages(%) of cells showing numerical chromosomal aberrations				Judgement ^{d)}	
			Observed cells	ctb	cte	csb	cse	others	TOTAL			Observed cells	Polyploid	others	TOTAL	SA	NA
24-0	-	0 ^{b)}	200	0	0.5	0	0	0	0.5	0	100	202	1.0	0	1.0	-	-
		0.34	200	0	0.5	0	0	0	0.5	0	86	205	2.4	0	2.4	-	-
		0.68	200	0	0.5	0	0	0	0.5	0	75	201	0.5	0	0.5	-	-
		1.4	200	0.5	1	0	0	0	1.5	0	66	201	0.5	0	0.5	-	-
		2.7	200	0.5	0.5	0	0	0	1	0	55	205	2.4	0	2.4	-	-
		5.4	200	0	0.5	0	0	0	0.5	0	41	203	1.5	0	1.5	-	-
		[MMC] ^{c)}	200	13	40	0	0	0	48.5	1	-	201	0.5	0	0.5	+	-
48-0	-	0 ^{b)}	200	0	0	0	0	0	0	0	100	202	1.0	0	1.0	-	-
		0.17	200	0	0	0	0	0	0	0	92	206	2.9	0	2.9	-	-
		0.34	200	0	0	0	0	0	0	0	78	202	1.0	0	1.0	-	-
		0.68	200	0.5	1	0	0	0	1.5	0	58	204	2.0	0	2.0	-	-
		1.4	200	0.5	0.5	0	0	0	1	0	38	202	1.0	0	1.0	-	-
		2.7	155	0	0.6	0	0	0	0.6	0	36	156	0.6	0	0.6	-	-
		[MMC] ^{c)}	200	12	65	0	0	0	71	0	-	200	0	0	0	+	-

Abbreviations: gap:chromatid and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, others(structural):fragmentation etc.(except pulverization), others(numerical):endreduplication etc.

A cell which has many aberrations is calculated as one cell showing aberrations .

a) Treatment time and recovery time were indicated in the column of treatment time.

b) Negative control:normal culture medium only

c) Positive control, MMC:mitomycin C at 0.04µg/mL.

d) Judgement was done on the basis of criteria of reference 2, SA:structural aberration, NA:numerical aberration.

Table 3 Chromosomal aberration test of CHL/IU cells treated with 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H] xanthene]-3-on [Short-term treatment with S9mix, Confirmation test]

Treatment time(h) ^{a)}	S9 mix	Concentration (mg/ml)	Percentages(%) of cells showing structural chromosomal aberrations							gap (%)	Relative cell growth(%)	Percentages(%) of cells showing numerical chromosomal aberrations				Judgement ^{d)}	
			Observed cells	ctb	cte	csb	cse	others	TOTAL			Observed cells	Polyploid	others	TOTAL	SA	NA
6-20	+	0 ^{b)}	200	0	0	0	0	0	0	0	100	201	0.5	0	0.5	-	-
		2.7	200	0	0.5	0	0	0	0.5	0	72	202	1.0	0	1.0	-	-
		4.1	200	0	0.5	0	0	0	0.5	0	66	206	2.9	0	2.9	-	-
		5.4	200	0	0	0	0	0	0	0	66	202	1.0	0	1.0	-	-
		[B[a]P]	200	1.5	65	0	0	0	65.5	0	-	200	0	0	0	+	-

Abbreviations: gap:chromatid and chromosome gap, ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, others(structural):fragmentation etc.(except pulverization), others(numerical):endreduplication etc.

A cell which has many aberrations is calculated as one cell showing aberrations .

a) Treatment time and recovery time were indicated in the column of treatment time.

b) Negative control:normal culture medium only

c) Positive control, BP:benzo[a]pyrene at 10µg/mL.

d) Judgement was done on the basis of criteria of reference 2, SA:structural aberration, NA:numerical aberration.