

Table 6. Summary data on bacterial reverse mutation test of 2-naphthylisobutyl ether
[Activation method : +S9]

Compound	Dose (µg/plate)	Revertant colonies per plate [Mean±S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
DMSO a)	0	99	112	96	16	12	13	15	22	18	28	23	32	21	22	19
		[102	±	9]	14	±	2]	18	±	4]	28	±	5]	21	±	2]
2-naphthylisobutyl ether	4.88	136	128	131	7	15	13							22	18	19
	[132	±	4]	12	±	4]								[20	±	2]
	9.77	118	116	112	16	13	16							25	22	23
	[115	±	3]	15	±	2]								[23	±	2]
	19.5	93	108	110	13	13	15				22	28	26	21	15	18
	[104	±	9]	14	±	1]				[25	±	3]	18	±	3]	
	39.1	105	118	104	9	7	16				25	18	25	16	14	11
	[109	±	8]	11	±	5]				[23	±	4]	14	±	3]	
	78.1	81*	86*	86*	8	10	12				23	25	23	22	12	21
	[84	±	3]	10	±	2]				[24	±	1]	18	±	6]	
	156	70*	67*	87*	6*	11*	8*	22	25	23	20	22	28	12*	13*	13*
	[75	±	11]	8	±	3]	23	±	2]	23	±	4]	13	±	1]	
	313	54*	58*	53*	14*	13*	9*	23	20	20	19	21	24	16*	13*	12*
	[55	±	3]	12	±	3]	21	±	2]	21	±	3]	14	±	2]	
	625							22	16	14	23	26	32			
								[17	±	4]	27	±	5]			
	1250							21	25	22	27*	19*	22*			
								[23	±	2]	23	±	4]			
	2500 +							17	10	20						
								[16	±	5]						
	5000 +							17	19	20						
								[19	±	2]						
Positive control compound		2-AA			2-AA			2-AA			2-AA			2-AA		
Dose(µg/plate)		1			2			10			0.5			2		
Revertant colonies		934	924	980	361	387	372	507	530	509	398	408	349	162	149	175
per plate [946	±	30]	373	±	13]	515	±	13]	385	±	32]	162	±	13]

2-AA: 2-Aminoanthracene

a): Negative control (Dimethyl sulfoxide, 100 µL/plate)

* : Growth inhibition was observed.

+ : Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

要 約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、2-ナフチルイソブチルエーテルは、染色体異常を誘起しないものと判定された

2-ナフチルイソブチルエーテルの染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/TU 細胞) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果に基づいて、濃度設定を行った。染色体異常試験では、短時間処理法-S9 処理で 76.8, 96.0 および 120 µg/mL ならびに同+S9 処理で 16.1, 20.1 および 25.2 µg/mL のそれぞれ 3 濃度について顕微鏡観察を実施した。その結果、2-ナフチルイソブチルエーテル処理群では、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても、明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

以上の結果より、連続処理法 24 時間処理群について 61.4, 76.8, 96.0 および 120 µg/mL の 4 濃度について顕微鏡観察を実施したが、同試験法においても、2-ナフチルイソブチルエーテル処理による染色体異常の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の陽性対照物質マイトマイシン C (MMC) ならびに短時間処理法+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) では、いずれも染色体構造異常を陰性対照と比較して高頻度に誘発した。

1. 表題

2-ナフチルイソブチルエーテルのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2. 試験目的

被験物質の染色体異常誘発性をほ乳類培養細胞を用いて検討する。

3. 遵守した GLP および準拠したガイドライン

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17 ガイドライン
- 新規化学物質等に係る試験の方法について (平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 473 (21st July 1997: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test)

4. 試験番号

9890 (115-209)

5. 試験施設

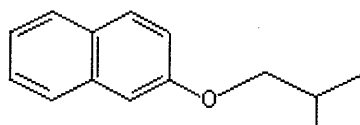
〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1393

13. 被験物質
- 13.1. 被験物質名
2-ナフチルイソブチルエーテル
- 13.2. ロット番号
GI01
- 13.3. 純度
99.1%
- 13.4. 製造元
東京化成工業株式会社
- 13.5. 購入年月日
平成 18 年 4 月 24 日
- 13.6. 購入量
500 g
- 13.7. 保存条件
冷蔵・遮光・除湿
- 13.8. 保存場所
安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫
- 7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch. 72
保存期間：2006年4月24日～同年7月10日
実測値：3.0～7.4°C
 - 6号館2階被験物質調製室内バイオマルチクーラー ch. 41
保存期間：2006年7月10日～同年8月3日（最終使用日）
実測値：5.0～6.6°C
- 13.9. 一般名
2-イソブトキシナフトレン
- 13.10. 化学名
2-Naphthylisobutyl ether
- 13.11. CAS No.
2173-57-1

13.12. 化学構造



13.13. 分子式

C₁₄H₁₆O

13.14. 分子量

200.28

13.15. 物質の状態

白色結晶塊

13.16. 融点

32.4°C (凝固点)

13.17. 引火点

68°C

13.18. 溶解性

水：不溶

DMSO：可溶 (50 mg/mL 以上)

13.19. 安定性

通常の取り扱い条件においては安定。

13.20. 取り扱い上の注意

酸化剤との接触に注意する。引火性が強く、燃焼しやすい液体。

取扱いは換気の良い場所で行い、粉塵が飛散しないように注意する。

適切な保護具を着用し、吸い込んだり、目、皮膚および衣類に触れないようにする。

13.21. 安定性分析

13.21.1. 安定性の確認方法

実験終了後に純度分析を実施した結果、純度が99.6% (判定基準：98%以上) であったことから、被験物質の実験期間中の安定性が確認された。

純度分析の詳細を Reference data 1 に示す。

13.21.2. 安定性分析用被験物質の保存場所

安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫

- 7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch. 72

保存期間：2006年4月24日～同年9月13日（最終使用日）

実測値：3.0～7.7°C

13.22. 残余被験物質の処理

実験終了後、1.0 g の被験物質を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りは専用の容器に廃棄された。

14. 試験材料および方法

14.1. 試験細胞株

遺伝毒性ガイドラインは乳類培養細胞を用いる染色体試験法で指定されている、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を使用した。CHL/IU 細胞は、1984年11月15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、ジメチルスルホキシド（DMSO, GC 用, 純度 99.9%, Lot No. K31758278, Merck）を容量比で 10% 添加された後、液体窒素中に保存された。試験には、凍結した細胞を融解した後、3～5 日ごとに継代し、細胞増殖抑制試験では継代数 21 の細胞を、染色体異常試験では継代数 27 の細胞を用いた。

なお、凍結ロット毎にマイコプラズマ汚染検査を独立行政法人 医薬基盤研究所で実施した結果、汚染は認められなかった（細胞 Lot No. CLC-004, 2005 年 6 月 27 日, 試験結果報告書 NB-0001）。さらに、当該試験に使用した細胞は、2005 年 5 月 30 日～同年 6 月 1 日および 2005 年 6 月 6～8 日に細胞の特性検査が実施され、倍加時間（15.2 時間）、染色体数（25 本保有細胞 84%）等に異常は認められていない。

14.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（IWAKI, Lot No. 501095, 旭テクノグラス）に非働化（56°C, 30 分）済みの仔牛血清（Lot No. 542384, Invitrogen）を最終濃度で 10% になるよう添加した。調製後の培養液は、使用時まで冷暗所（15°C 以下）に保存された。

14.3. 培養条件

CO₂ インキュベーター（三洋電機）を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37°C の条件で細胞を培養した。

14.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix（Lot No. CAM-540, キッコーマン）を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー（設定値：-80°C, 基準値：-60°C 以下）に保存した。

14.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法を下表に示す。

ロット番号	RAA-540
製造年月日	2006年3月17日 (誘導物質投与開始後5日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7週齢
体重	191~240 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB)および5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および 投与回数	PB: 30 mg/kg 1回 (1日目) 60 mg/kg 3回 (2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回 (3日目)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	26.46 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す。

S9	0.3	mL
MgCl ₂	5	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADP	4	μmol
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4	μmol

14.5. 被験物質液の調製

被験物質は、水に不溶で、DMSOには可溶であることから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったDMSO (SeccoSolv[®], 純度≥99.5%, Lot No. K32997731 【細胞増殖抑制試験】, 純度≥99.5%, Lot No. K35364331 【染色体異常試験】, Merck) に溶解させた。

細胞増殖抑制試験では、使用直前に被験物質 1001.4 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液 (200.3 mg/mL 溶液) を準備した。この 200.3 mg/mL 調製原液 1 mL を DMSO 1 mL に加えることにより、100.2 mg/mL 溶液を調製した。以下、同様に希釈を行い、50.1, 25.0, 12.5, 6.26, 3.13 および 1.56 mg/mL 液を調製した。

染色体異常試験では、使用直前に被験物質 75.0 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液 (15.0 mg/mL 溶液) を準備した。この 15.0 mg/mL 調製原液 4 mL を DMSO 1 mL に加えることにより、12.0 mg/mL 溶液を調製した。以下、同様な希釈を行い、9.60, 7.68, 6.14, 4.92, 3.93, 3.15, 2.52, 2.01, 1.61, 1.29 および 1.03 mg/mL 液を調製した。

いずれの試験においても調製後、被験物質液を速やかに使用した。なお、被験物質液 (調製後 3.5 時間) に発熱、発泡、発煙等の変化は認められなかった。

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質液調製に用いる溶媒である DMSO を使用した。

14.6.2. 陽性対照 (短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理)

注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. K5F73, 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC, 2 mg 力価/バイアル, Lot No. 459AEA, 協和発酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液, Lot No. 4C87N, 大塚製薬工場) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

処理濃度は、短時間処理法で 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法で 0.05 $\mu\text{g/mL}$ とした。

14.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

注射用水 (Lot No. K5F73) 5 mL に溶解したシクロホスファミド (CP, 100 mg/バイアル, Lot No. 4066, 塩野義製薬) を生理食塩液 (Lot No. 4C87N) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

処理濃度は、12.5 $\mu\text{g/mL}$ とした。

14.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

14.7.1. 処理濃度

細胞増殖抑制試験における被験物質の濃度として、ガイドラインで定められた 2003 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) を最高濃度とし、以下、1002, 501, 250, 125, 62.6, 31.3 および 15.6 $\mu\text{g/mL}$ を設定した。

14.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 濃度当たり 2 ウェルを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

14.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F, 住友ベークライト）の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った. 6 時間培養を続けた後, 各ウェルの培養液を除去し, ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 115K2343, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した. 新鮮な培養液 500 μ L を加え, さらに 18 時間培養を続けた.

14.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った.

その後の操作は, 14.7.3. に記載した方法に準じた.

14.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行い, さらに 24 時間培養を続けた.

14.7.6. 処理量一覧

	溶媒あるいは被験物質		
	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	600 μ L	-	6 μ L
+S9 処理	500 μ L	100 μ L	6 μ L
24 時間処理	600 μ L	-	6 μ L

14.7.7. 析出等の観察

各処理法において, 処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した.

14.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウェルから培養液を除き, 10%中性緩衝ホルマリン液 (組織固定用, Lot No. DPR8664, 和光純薬工業) を加えて 10 分間細胞を固定した. 次に, クリスタル・バイオレット (Lot No. K31134240, Merck) の 0.1% 水溶液で 10 分間細胞を染色した. 各プレートを水洗した後, 乾燥させた. 各ウェルに色素溶出液 (30% エタノール, 1% 酢酸水溶液) 3 mL を加え, 5 分間放置した. 各ウェルの溶出液を 96 ウェルのプレート (アッセイプレート, IWAKI) に各々 300 μ L 分注し, マイクロプレートリーダー (モデル 450, BIO・RAD) を用いて 570 nm での吸光度を測定した. 陰性対照群での吸光度に対する比 (相対細胞増殖率) を各濃度群について求めた.

細胞増殖抑制が認められたため、50%細胞増殖抑制濃度を算出した。

14.8. 染色体異常試験

14.8.1. 処理濃度

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法-S9 処理、短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理で細胞毒性が認められ、50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ 99.1, 33.2 および 106 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。したがって、染色体異常試験では、細胞の増殖を 50% 以上抑制すると推定される濃度、すなわち、-S9 処理および 24 時間処理では 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+S9 処理では 49.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ をそれぞれ最高濃度とし、下表に示す 7 または 8 濃度を設定した。

処理法	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)							
-S9 処理	—	39.3	49.2	61.4	<u>76.8</u>	<u>96.0</u>	<u>120</u>	150
+S9 処理	10.3	12.9	<u>16.1</u>	<u>20.1</u>	<u>25.2</u>	31.5	39.3	49.2
24 時間処理	—	39.3	49.2	<u>61.4</u>	<u>76.8</u>	<u>96.0</u>	<u>120</u>	150

下線を付した濃度について染色体異常の観察を実施した。

14.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 濃度当たり 2 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

14.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート（細胞培養用シャーレ、住友ベークライト）に 8×10^3 細胞/ mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Lot No. 016K2433, Sigma-Aldrich）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

14.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/ mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。

その後の操作は、14.8.3. に記載した方法に準じた。

14.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/ mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。