

で1.5%と疑陽性の判定基準である5%以上10%未満から、陰性の判定基準である5%未満を示した。なお、連続処理法の24時間処理の156 µg/mL及び78.1 µg/mLでは、観察細胞数が規定数に満たなかったためTOXと判定したが、TAはそれぞれ27.3及び14.0%を示し、それ以下の濃度を含めて用量依存的な出現率の増加が認められた。

各処理法ともに陰性及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性及び陽性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 5)と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

### 3) 数的異常

染色体数的異常(倍数体)の出現率は、短時間処理法の代謝活性化では625 µg/mLでTOX、313 µg/mLで1.5%、156 µg/mLで3.5%、78.1 µg/mLで4.0%及び39.1 µg/mLで1.5%と陰性の判定基準である5%未満であった。また、非代謝活性化においては、313 µg/mLでTOX、156 µg/mLで1.0%、78.1 µg/mLで0.5%、39.1 µg/mLで3.5%及び19.5 µg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満であった。さらに、連続処理法の24時間処理では313 µg/mL、156 µg/mL及び78.1 µg/mLでTOX、39.1 µg/mLで0%及び19.5 µg/mLで1.0%と陰性の判定基準である5%未満であった。また、48時間処理では、39.1 µg/mLで0.5%、19.5 µg/mLで0.5%、9.77 µg/mLで1.0%、4.88 µg/mLで0.5%及び2.44 µg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満であった。

各処理法ともに陰性対照群における染色体数的異常(倍数体)の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 5)と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

## 3. 確認試験

結果をFig. 2-5、2-6、Table 2-5、2-6、3-5、3-6に示した。

### 1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化においては205 µg/mL及び256 µg/mLでは微少に、320 µg/mL、400 µg/mL及び500 µg/mLでは半数に細胞の不連続性が認められた。非代謝活性化においては14.8 µg/mL及び22.2 µg/mLでは微少に、33.3 µg/mL及び50 µg/mLでは半数に細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化においては全用量で、非代謝活性化においては33.3 µg/mL以上の用量で色調変化が認められた。肉眼による被験物質の析出の観察では、析出は認められなかった。

## 2) 構造異常

構造異常の出現率(TA)は、代謝活性化では500 µg/mLではTOX、400 µg/mLで5.0%、320 µg/mLで5.5%、256 µg/mLで2.5%及び205 µg/mLで3.5%と疑陽性の判定基準である5%以上10%未満から、陰性の判定基準である5%未満を示した。また、非代謝活性化においては、50 µg/mLで6.0%、33.3 µg/mLで10.5%、22.2 µg/mLで12.5%、14.8 µg/mLで7.5%、9.88 µg/mLで1.0%及び6.58 µg/mLで1.5%と、陽性の判定基準である10%以上から、陰性の判定基準である5%未満を示した。

各処理法ともに陰性及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性及び陽性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 5)と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

## 3) 数的異常

数的異常(倍数体)の出現率は、代謝活性化では500 µg/mLでTOX、400 µg/mLで1.0%、320 µg/mLで2.0%、256 µg/mLで2.0%及び205 µg/mLで0.5%と陰性の判定基準である5%未満であった。また、非代謝活性化においては、50 µg/mLで1.0%、33.3 µg/mLで0.5%、22.2 µg/mLで0.5%、14.8 µg/mLで0%、9.88 µg/mLで0%及び6.58 µg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満であった。

各処理法ともに陰性対照群における染色体数的異常(倍数体)の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 5)と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

## 考 察

被験物質は、染色体異常試験の短時間処理法・非代謝活性化において、19.5 µg/mLで構造異常を有する細胞の出現率 (TA) が陽性を示したが、連続処理法の24時間処理及び48時間処理の同一用量においては、TAはそれぞれ疑陽性及び陰性を示し、被験物質に対する暴露時間の経過とともに構造異常の出現率が増加する傾向は認められなかった。また、短時間処理法及び連続処理法ともに、19.5 µg/mL以外の用量において明確な用量依存性は認められないもののTAの増加が認められ、疑陽性を示した。これらの結果から総合的に判断すると、本被験物質の染色体構造異常誘発性は疑陽性であり、弱い構造異常の誘発能を有するものと判定された。一方、染色体数的異常 (倍数体) の出現頻度の増加はいずれの処理法においても認められなかった。

なお、陰性対照群における染色体の構造異常を有する細胞及び染色体数的異常 (倍数体) の出現頻度は、いずれの処理法においても5%未満であった。また、陽性対照物質のCPあるいはMMCを処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。更に、2枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

染色体異常試験において、短時間処理法の代謝活性化では疑陽性の、非代謝活性化では陽性の結果が得られたが、いずれの場合も構造異常を有する細胞の出現率 (TA) に用量依存的な増加が認められなかったため確認試験を実施した。

その結果、確認試験の代謝活性化においては、2用量で疑陽性を示したがTA値の用量依存的な増加は認められず、染色体異常試験の代謝活性化と同様な結果が得られ再現性が確認された。一方、確認試験の非代謝活性化においては、染色体異常試験で陽性を示した近傍の用量で試験を実施したが、低用量ではTA値の用量依存的な増加が認められたが、高用量では用量依存的な増加は認められず、D20値は求められなかった。以上の結果から判断すると、本被験物質の染色体構造異常誘発性は陽性であり、染色体構造異常の誘発能を有するものと判定された。一方、染色体数的異常 (倍数体) の出現頻度の増加はいずれの処理法においても認められなかった。確認試験における陽性対照群では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。また、陰性対照群における染色体の構造異常を有する細胞及び染色体数的異常 (倍数体) の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、さらに試験施設の背景値と同様であった。従って試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、2、3、4、4'-テトラヒドロキシベンゾフェノン は、本試験条件下において

染色体数的異常（倍数体）の誘発能は有さないものの、弱い染色体構造異常の誘発能を有するものと判定した。

Table 1-1 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone  
[short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>
+	6-18	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	—	—	—
			100		—	—	—
		19.5	83	83	—	—	—
			83		—	—	—
		39.1	83	83	—	—	—
			83		—	—	—
		78.1	100	92	—	—	—
			83		—	—	—
		156	66	75	+	Light-yellow	—
			83		+	Light-yellow	—
		313	66	66	+	Orange	—
			66		+	Orange	—
		625	33	33	++	Light-brown	—
			33		++	Light-brown	—
		1250	33	33	g)	Brown	—
			33		g)	Brown	—
2500	133	125 <sup>h)</sup>	g)	Brown	+		
	116		g)	Brown	+		
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					464.273	µg/mL	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
- b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
- c) Observation of plate at the end of treatment
- d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.  
+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.  
++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
- e) — : No changes of color
- f) — : Absence of precipitates/crystals  
+ : Presence of precipitates
- g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.
- h) These values are unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

Table 1-2 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment:-S9 mix]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>
-	6-18	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-
			83		-	-	-
		19.5	66	72	-	-	-
			66		-	-	-
		39.1	66	72	+	-	-
			66		+	-	-
		78.1	66	72	++	Light-yellow	-
			66		++	Light-yellow	-
		156	50	55	++	Orange	-
			50		++	Orange	-
		313	33	27	+++	Orange	-
			16		+++	Orange	-
		625	16	17	+++	Light-brown	-
			16		+++	Light-brown	-
		1250	16	17	+++	Brown	-
			16		+++	Brown	-
		2500	50	55 <sup>g)</sup>	+++	Brown	+
			50		+++	Brown	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					184.036	$\mu\text{g/mL}$	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.  
 b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.  
 c) Observation of plate at the end of treatment  
 d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.  
 + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.  
 ++ : There was discontinuity among appproximately half of the surviving cells.  
 +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.  
 e) - : No changes of color  
 f) - : Absence of precipitates/crystals  
 + : Presence of precipitates  
 g) These values are unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

Table 1-3 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>
—	24	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	—	—	—
			100		—	—	—
		19.5	71	71	—	—	—
			71		—	—	—
		39.1	71	64	+	—	—
			57		+	—	—
		78.1	57	57	++	Light-yellow	—
			57		++	Light-yellow	—
		156	57	57	++	Orange	—
			57		++	Orange	—
		313	42	35	+++	Orange	—
			28		+++	Orange	—
		625	42	42	+++	Light-brown	—
			42		+++	Light-brown	—
		1250	42	50	+++	Brown	—
			57		+++	Brown	—
		2500	150	150 <sup>g)</sup>	+++	Brown	+
			150		+++	Brown	+

Concentration of 50% cell-growth inhibition: 205.955  $\mu\text{g/mL}$

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.  
 b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.  
 c) Observation of plate at the end of treatment  
 d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.  
 + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.  
 ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.  
 +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.  
 e) — : No changes of color  
 f) — : Absence of precipitates/crystals  
 + : Presence of precipitates  
 g) These values are unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

Table 1-4 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>
-	48	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-
			92		-	-	-
		19.5	53	55	+	-	-
			53		+	-	-
		39.1	46	48	+	-	-
			46		+	-	-
		78.1	38	40	+	Light-yellow	-
			38		+	Light-yellow	-
		156	30	31	++	Orange	-
			30		++	Orange	-
		313	23	24	+++	Orange	-
			23		+++	Orange	-
		625	23	24	+++	Light-brown	-
			23		+++	Light-brown	-
		1250	30	31	+++	Brown	-
			30		+++	Brown	-
		2500	99	95 <sup>g)</sup>	+++	Brown	+
			84		+++	Brown	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					33.500	$\mu\text{g/mL}$	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.  
 b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.  
 c) Observation of plate at the end of treatment  
 d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.  
 + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.  
 ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.  
 +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.  
 e) - : No changes of color  
 f) - : Absence of precipitates/crystals  
 + : Presence of precipitates  
 g) These values are unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.



Table 2-1 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment:+S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>	
+	6-18	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	—	—	—	
			99		—	—	—	
		Test article	39.1	83	83	—	—	—
				83		—	—	—
			78.1	83	83	—	—	—
				83		—	—	—
		156	83	83	+	Light-yellow	—	
			83		+	Light-yellow	—	
		313	66	66	++	Orange	—	
			66		++	Orange	—	
		625	33	33	+++	Light-brown	—	
			33		+++	Light-brown	—	
		PC	83	83	—	—	—	
			83		—	—	—	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(cyclophosphamide, 14 $\mu\text{g/mL}$ )

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among appproximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-2 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment:-S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>	
-	6-18	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-	
			100		-	-	-	
		Test article	19.5	80	80	-	-	-
				80		-	-	-
			39.1	80	70	+	-	-
				60		+	-	-
			78.1	60	60	+	Light-yellow	-
				60		+	Light-yellow	-
		156	60	60	++	Orange	-	
			60		++	Orange	-	
		313	20	30	+++	Orange	-	
			40		+++	Orange	-	
		PC	80	80	-	-	-	
			80		-	-	-	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05 $\mu\text{g/mL}$ )

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-3 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 24hr]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>	
-	24	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-	
			100		-	-	-	
		Test article	19.5	79	79	-	-	-
				79		-	-	-
			39.1	59	59	+	-	-
				59		+	-	-
			78.1	59	59	+	Light-brown	-
				59		+	Light-brown	-
		156	59	59	++	Light-brown	-	
			59		++	Light-brown	-	
		313	39	39	+++	Light-brown	-	
			39		+++	Light-brown	-	
		PC	100	100	-	-	-	
			100		-	-	-	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-4 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 48hr]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>	
-	48	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-	
			100		-	-	-	
		Test article	2.44	100	100	-	-	-
				100		-	-	-
			4.88	89	89	-	-	-
				89		-	-	-
			9.77	89	89	-	-	-
				89		-	-	-
		19.5	70	65	+	-	-	
			59		+	-	-	
		39.1	50	55	++	-	-	
			59		++	-	-	
		PC	89	89	-	-	-	
			89		-	-	-	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.  
 b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.  
 c) Observation of plate at the end of treatment  
 d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.  
 + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.  
 ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.  
 e) - : No changes of color  
 f) - : Absence of precipitates/crystals