

既存化学物質の人健康影響に関する情報

(平成22年12月17日開催)

官報公示 整理番号	CAS No.	物質名称	試験名				頁
			Ames	染色体	28日間	Reprotox	
3-36	103-64-0	β -プロモステレン	○	○	○		1
3-78 3-91	102-47-6	3, 4-ジクロロベンジルクロライド (別名称): 1, 2-ジクロロ-4-(クロロメチル)ベンゼン	○	○	○		53
4-644	208-96-8	アセナフチレン	○	○	○		83
5-2275	91-96-3	アゾイックCC-5	○	○	○		126
5-2111	3618-60-8	モルダントブラック-7	○	○	○		176
7-1340	32492-61-8	ビスフェノールA-EO付加物	○	○		○	220
7-1340	37353-75-6	ビスフェノールA-PO付加物	○	○		○	264

要 約

β -プロモスチレンの遺伝子突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略した) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略した) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド (以下、DMSO と略す) を用いた。

試験は、1.22~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲の被験物質処理用量で予備試験を実施した。その結果より本試験は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 については 2.44~78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲の 6 用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* については、9.77~313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の範囲の 6 用量で実施した。

1. 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

2. 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 39.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 78.1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 156 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で認められた。

3. 復帰変異コロニー数

本試験 1 回目の代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められたが、本試験 2 回目では 2 倍以上には増加しなかった。このため、同一用量で追加確認試験を実施した。その結果、陰性対照値の 2 倍以上には増加せず、用量反応性も認められなかった。これらの結果は、陰性対照値が低値のために数個の変動により発生したものと考えられ、被験物質による増加ではないと判断した。なお、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100 において、陰性対照値の 2 倍には達しないものの、用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。その他の菌株においては、2 回の本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず、本被験物質による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

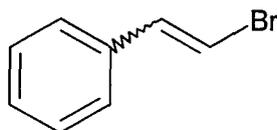
以上の試験結果より、本試験条件下において、 β -プロモスチレンは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能をさない (陰性) と判定した。

被験物質及び被験液の調製

1. 被験物質及び溶媒

(1) 被験物質

名 称	β -ブロモスチレン
CAS 番号	103-64-0
ロット番号	TEYUC
構造式	



純 度	99.6%
分 子 量	183.05
常温における性状	黄色透明液体 (比重: 1.4246)
安 定 性	通常の取扱い条件においては安定。酸化剤との接触に注意する。
保存方法	冷暗所・密栓
保存温度	保存期間(2008.1.28~2008.4.1)中の実測温度: -1.6~9.8°C
保存場所	東京研究所 被験物質調製保存室
廃棄方法	試験終了後の残量は株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で焼却後、廃棄した。

(2) 溶媒

名 称	DMSO
製 造 元	和光純薬工業株式会社
ロット番号	WKF6984 (予備試験、本試験 1 回目、2 回目) PEQ4800 (追加確認試験)
規 格	JIS 規格 試薬特級 99.0%以上
保存方法	室温保存
保存場所	東京研究所 被験物質調製保存室

(3) 溶媒の選択理由

溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水に 50mg/mL で溶解せず、DMSO に 50mg/mL、アセトンに 100mg/mL で溶解し、いずれも発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、菌株への毒性を考慮して DMSO を溶媒として試験を実施した。

2. 被験液の調製方法

(1) 予備試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質 0.150 mL を分取して電子天秤 (GR-120、株式会社エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 214.8 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、この溶媒量から分取した際の液量 0.150 mL を差し引いた 4.146 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、50 mg/mL の被験液を公比 4 で順次 6 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781、0.195、0.0488 及び 0.0122 mg/mL の計 7 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発

生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

(2) 本試験 1 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質 0.020 mL を分取して電子天秤 (GR-120、株式会社 エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 32.2 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、この溶媒量から分取した際の液量 0.020 mL を差し引いた 2.556 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、12.5 mg/mL 溶液を 4 倍希釈して 3.13 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 7 段階希釈し、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488 及び 0.0244 mg/mL の計 8 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

(3) 本試験 2 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質 0.020 mL を分取して電子天秤 (GR-120、株式会社 エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 29.7 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、この溶媒量から分取した際の液量 0.020 mL を差し引いた 2.356 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、12.5 mg/mL 溶液を 4 倍希釈して 3.13 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 7 段階希釈し、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488 及び 0.0244 mg/mL の計 8 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

(4) 追加確認試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質 0.020 mL を分取して電子天秤 (GR-120、株式会社 エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 31.0 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、この溶媒量から分取した際の液量 0.020 mL を差し引いた 2.460 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、12.5 mg/mL 溶液を公比 4 で 2 段階希釈して 0.781 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 5 段階希釈し、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488 及び 0.0244 mg/mL の計 6 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

(5) 被験液の保存条件

被験液は用時調製とし、保存はしなかった。

試験材料及び試験方法

1. 試験菌株

(1) 菌株の種類

次の 5 種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

S. typhimurium TA100

S. typhimurium TA1535

E. coli WP2 *uvrA*

表 3 菌株の換算生菌数一覧

菌 株	菌 数(cells/mL)			
	予備試験	本試験 1回目	本試験 2回目	追加確認 試験
<i>S. typhimurium</i> TA100	5.51×10^9	5.23×10^9	4.46×10^9	
<i>S. typhimurium</i> TA1535	5.04×10^9	5.02×10^9	4.89×10^9	4.97×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	8.18×10^9	8.09×10^9	7.94×10^9	
<i>S. typhimurium</i> TA98	6.21×10^9	5.91×10^9	5.09×10^9	
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.07×10^9	3.09×10^9	3.11×10^9	

(3) 本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mLの被験液を公比4で6段階希釈した計7用量(1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 µg/plate)を用い、予備試験を実施した。なお、予備試験の結果を別表1に示した。

予備試験の結果、本被験物質処理による生育阻害は、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537株及び代謝活性化した場合の*S. typhimurium* TA1535、TA1537の78.1 µg/plate以上、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA*及び代謝活性化した場合の*S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA*の313 µg/plate以上で認められた。また、本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

このため本試験の試験用量は、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537及び代謝活性化する場合の*S. typhimurium* TA1535、TA1537については78.1 µg/plate、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA*及び代謝活性化する場合の*S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA*については313 µg/plateをそれぞれ最高用量として、以下公比2で5段階希釈した計6用量を設定した。

(4) プレート数

被験物質処理群、陰性対照及び陽性対照処理群について、予備試験ではそれぞれ2枚、2回の本試験及び追加確認試験ではそれぞれ3枚のプレートを用いた。

(5) 試験操作 (プレインキュベーション法)

- 滅菌した小試験管に調製した被験液、溶媒又は陽性対照溶液を0.1 mL入れ、これに代謝活性化しない場合は0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 7.4) 0.5 mLを、代謝活性化する場合はS9 Mix 0.5 mLを加えた後、それぞれの小試験管に各菌株の培養液0.1 mLを加えた。
- 小試験管を攪拌後すぐに37°Cで20分間振盪しながらプレインキュベーションし、これに45°Cに保温されているトップアガーを2.0 mL加え攪拌後、最少グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 無菌試験として、調製した最高用量の被験液0.1 mL及び調製したS9 Mix 0.5 mLをそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを2.0 mL加えた後に最少グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら1)~3)の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

- 4) 最少グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認し、最少グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°Cで予備試験では49.5時間、本試験1回目では49.5時間、本試験2回目では48.5時間、追加確認試験では48.5時間培養した。
- 5) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色を確認した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかったため、自動コロニーカウンタ（コロニーアナライザーCA-11D systems、システムサイエンス株式会社）を用いて計数（面積補正、補正值：1.21）した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

5. 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数（陰性対照値）に対して2倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の2倍以上となる増加を示し、2回の本試験で再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

試験結果及び考察

1. 試験結果

試験の結果を別表1～6及び図1～10に示した。なお、図は別表2、3より作成した。

(1) 培養終了後の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿及び着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。なお、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 39.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 156 µg/plate 以上で菌の生育阻害が認められた。

(2) 復帰変異コロニー数

本試験1回目の代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められたが、本試験2回目及び追加確認試験では2倍以上には増加しなかった。その他の菌株においては、代謝活性化の有無にかかわらず、本被験物質による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

(3) 試験系の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理限界（平均値±3SD：別添）内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。

2. 考察

本試験 1 回目の代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められたが、本試験 2 回目では 2 倍以上には増加しなかった。このため、同一用量で追加確認試験を実施した。その結果、陰性対照値の 2 倍以上には増加せず、用量反応性も認められなかった。これらの結果は、陰性対照値が低値のために数個の変動により発生したものと考えられ、被験物質による増加ではないと判断した。なお、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100 において、陰性対照値の 2 倍には達しないものの、用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められた。その他の菌株においては、2 回の本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず、本被験物質による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

以上の試験結果より、本試験条件下において、 β -プロモスチレンは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

参考文献

- (1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- (2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- (3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp⁺ Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- (4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- (5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- (6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶 (編): 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- (7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編: 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- (8) 石館 基 (監修): 微生物を用いる変異原性試験データ集 (能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.

(別表1)

試験結果表 (予備試験)

被験物質の名称: β -プロモステレン

No. T-0142

試験実施期間		2008年2月25日 より 2008年2月28日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	105 91 (98)	12 10 (11)	16 19 (18)	31 22 (27)	4 16 (10)	
	1.22	122 103 (113)	10 12 (11)	18 15 (17)	36 27 (32)	9 5 (7)	
	4.88	129 108 (119)	11 11 (11)	15 14 (15)	27 24 (26)	5 8 (7)	
	19.5	108 116 (112)	5 5 (5)	15 15 (15)	20 30 (25)	7 5 (6)	
	78.1	114 * 103 * (109)	6 * 7 * (7)	15 14 (15)	22 23 (23)	11 * 5 * (8)	
	313	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	
	1250	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	165 166 (166)	10 22 (16)	25 16 (21)	54 51 (53)	9 14 (12)
1.22		186 204 (195)	15 13 (14)	15 24 (20)	45 60 (53)	7 7 (7)	
4.88		200 188 (194)	13 20 (17)	23 16 (20)	51 47 (49)	8 7 (8)	
19.5		220 237 (229)	12 8 (10)	17 25 (21)	43 55 (49)	7 3 (5)	
78.1		297 307 (302)	13 * 14 * (14)	32 22 (27)	61 61 (61)	5 * 13 * (9)	
313		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	
1250		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	
5000		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	
陽性対照		S9Mixを必要としないもの	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)		0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	S9Mixを必要とするもの	コロニー数/プレート	558 511 (535)	324 338 (331)	78 83 (81)	437 434 (436)	1686 1413 (1550)
		名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
		用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		コロニー数/プレート	855 814 (835)	305 293 (299)	1131 1175 (1153)	292 292 (292)	113 123 (118)

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ : アジ化ナトリウム
ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

試験結果表(本試験 1回目:-S9Mix)

被験物質の名称: β -プロモスチレン

No. T-0142

試験実施期間		2008年3月10日 より 2008年3月13日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg /プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)	145 117 114 (125 \pm 17.1)	17 10 14 (14 \pm 3.5)	29 27 28 (28 \pm 1.0)	12 19 17 (16 \pm 3.6)	8 10 5 (8 \pm 2.5)	
	2.44	114 136 106 (119 \pm 15.5)	12 5 5 (7 \pm 4.0)	NT	NT	7 6 8 (7 \pm 1.0)	
	4.88	116 125 119 (120 \pm 4.6)	13 8 11 (11 \pm 2.5)	NT	NT	10 8 5 (8 \pm 2.5)	
	9.77	124 128 124 (125 \pm 2.3)	11 4 14 (10 \pm 5.1)	28 18 31 (26 \pm 6.8)	16 21 16 (18 \pm 2.9)	5 7 4 (5 \pm 1.5)	
	19.5	125 110 117 (117 \pm 7.5)	10 11 4 (8 \pm 3.8)	31 24 24 (26 \pm 4.0)	10 16 33 (20 \pm 11.9)	7 7 3 (6 \pm 2.3)	
	39.1	123 122 119 (121 \pm 2.1)	11 * 18 * 8 * (12 \pm 5.1)	31 19 24 (25 \pm 6.0)	13 16 21 (17 \pm 4.0)	5 * 5 * 6 * (5 \pm 0.6)	
	78.1	118 * 118 * 100 * (112 \pm 10.4)	7 * 7 * 6 * (7 \pm 0.6)	19 29 13 (20 \pm 8.1)	15 12 17 (15 \pm 2.5)	6 * 4 * 8 * (6 \pm 2.0)	
	156	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 \pm 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 \pm 0.0)	NT	
	313	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 \pm 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 \pm 0.0)	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名称 用量(μg /プレート)	AF-2 0.01	SAZ 0.5	AF-2 0.01	AF-2 0.1
		540 609 563 (571 \pm 35.1)	209 208 225 (214 \pm 9.5)	71 64 79 (71 \pm 7.5)	479 454 422 (452 \pm 28.6)	1996 2010 1880 (1962 \pm 71.4)	

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
 SAZ : アジ化ナトリウム
 ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]ピロリジン・2HCl

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
 NT: 試験せず。
 ()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表3)

試験結果表 (本試験 1回目:+S9Mix)

被験物質の名称: β -プロモステレン

No. T-0142

試験実施期間		2008年3月10日 より 2008年3月13日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg /プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	152 144 134 (143 \pm 9.0)	8 11 6 (8 \pm 2.5)	33 19 24 (25 \pm 7.1)	38 58 57 (51 \pm 11.3)	13 8 13 (11 \pm 2.9)	
	2.44	NT	15 12 11 (13 \pm 2.1)	NT	NT	17 14 11 (14 \pm 3.0)	
	4.88	NT	5 11 7 (8 \pm 3.1)	NT	NT	7 13 7 (9 \pm 3.5)	
	9.77	149 157 147 (151 \pm 5.3)	16 17 12 (15 \pm 2.6)	30 14 40 (28 \pm 13.1)	59 48 64 (57 \pm 8.2)	7 13 8 (9 \pm 3.2)	
	19.5	162 162 175 (166 \pm 7.5)	8 10 9 (9 \pm 1.0)	28 31 25 (28 \pm 3.0)	39 52 41 (44 \pm 7.0)	10 11 8 (10 \pm 1.5)	
	39.1	193 197 173 (188 \pm 12.9)	19 21 13 (18 \pm 4.2)	25 30 34 (30 \pm 4.5)	53 45 42 (47 \pm 5.7)	21 16 13 (17 \pm 4.0)	
	78.1	269 211 231 (237 \pm 29.5)	10 * 16 * 11 * (12 \pm 3.2)	18 29 27 (25 \pm 5.9)	59 60 41 (53 \pm 10.7)	7 * 12 * 13 * (11 \pm 3.2)	
	156	137 * 116 * 128 * (127 \pm 10.5)	NT	34 * 31 * 22 * (29 \pm 6.2)	33 * 33 * 28 * (31 \pm 2.9)	NT	
	313	0 * 0 * 0 * (0 \pm 0.0)	NT	0 * 0 * 0 * (0 \pm 0.0)	0 * 0 * 0 * (0 \pm 0.0)	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名称 用量 (μg /プレート)	B[a]P 5.0	2AA 2.0	2AA 10.0	B[a]P 5.0
		824 817 837 (826 \pm 10.1)	307 262 316 (295 \pm 28.9)	1205 1225 1249 (1226 \pm 22.0)	322 322 333 (326 \pm 6.4)	111 113 109 (111 \pm 2.0)	

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT: 試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表4)

試験結果表 (本試験 2回目: -S9Mix)

被験物質の名称: β -プロモスチレン

No. T-0142

試験実施期間		2008年3月24日 より 2008年3月27日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	90	11	13	30	9
		126	18	10	16	10
		106 (107 \pm 18.0)	12 (14 \pm 3.8)	13 (12 \pm 1.7)	12 (19 \pm 9.5)	9 (9 \pm 0.6)
	2.44	127	15			7
		120	13			4
		117 (121 \pm 5.1)	16 (15 \pm 1.5)	NT	NT	6 (6 \pm 1.5)
	4.88	113	5			4
		115	12			4
		126 (118 \pm 7.0)	10 (9 \pm 3.6)	NT	NT	4 (4 \pm 0.0)
	9.77	114	11	17	18	5
		116	7	17	21	7
		132 (121 \pm 9.9)	11 (10 \pm 2.3)	8 (14 \pm 5.2)	18 (19 \pm 1.7)	2 (5 \pm 2.5)
19.5	118	8	16	23	6	
	137	6	16	17	10	
	114 (123 \pm 12.3)	8 (7 \pm 1.2)	13 (15 \pm 1.7)	18 (19 \pm 3.2)	10 (9 \pm 2.3)	
39.1	125	12 *	18	19	5 *	
	98	7 *	27	23	6 *	
	113 (112 \pm 13.5)	5 * (8 \pm 3.6)	17 (21 \pm 5.5)	16 (19 \pm 3.5)	4 * (5 \pm 1.0)	
78.1	97 *	7 *	12	23	8 *	
	90 *	6 *	21	23	4 *	
	94 * (94 \pm 3.5)	8 * (7 \pm 1.0)	16 (16 \pm 4.5)	14 (20 \pm 5.2)	10 * (7 \pm 3.1)	
156			15 *	0 *		
	NT	NT	15 *	0 *	NT	
			7 * (12 \pm 4.6)	0 * (0 \pm 0.0)		
313			0 *	0 *		
	NT	NT	0 *	0 *	NT	
			0 * (0 \pm 0.0)	0 * (0 \pm 0.0)		
陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	506	286	66	477	2203
	510	252	82	460	2306	
	469 (495 \pm 22.6)	247 (262 \pm 21.2)	69 (72 \pm 8.5)	419 (452 \pm 29.8)	2223 (2244 \pm 54.6)	

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
 SAZ : アジ化ナトリウム
 ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]ピロピルアミノ]アクリジン・2HCl

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
 NT: 試験せず。
 ()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表5)

試験結果表 (本試験 2回目: +S9Mix)

被験物質の名称: β -プロモステレン

No. T-0142

試験実施期間		2008年3月24日 より 2008年3月27日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	122	13	18	53	13
		140	7	13	47	8
		110 (124 \pm 15.1)	8 (9 \pm 3.2)	25 (19 \pm 6.0)	38 (46 \pm 7.5)	12 (11 \pm 2.6)
	2.44	NT	9 7 11 (9 \pm 2.0)	NT	NT	12 5 9 (9 \pm 3.5)
		4.88	NT	7 8 10 (8 \pm 1.5)	NT	NT
	9.77		129 151 145 (142 \pm 11.4)	8 10 8 (9 \pm 1.2)	14 15 16 (15 \pm 1.0)	38 42 36 (39 \pm 3.1)
		19.5	159 159 136 (151 \pm 13.3)	10 4 11 (8 \pm 3.8)	19 16 13 (16 \pm 3.0)	47 45 33 (42 \pm 7.6)
	39.1		188 197 172 (186 \pm 12.7)	21 15 11 (16 \pm 5.0)	21 12 14 (16 \pm 4.7)	32 53 56 (47 \pm 13.1)
		78.1	219 221 197 (212 \pm 13.3)	7 * 11 * 15 * (11 \pm 4.0)	14 19 15 (16 \pm 2.6)	45 41 47 (44 \pm 3.1)
	156		90 * 123 * 132 * (115 \pm 22.1)	NT	16 * 15 * 21 * (17 \pm 3.2)	22 * 31 * 28 * (27 \pm 4.6)
313		0 * 0 * 0 * (0 \pm 0.0)	NT	0 * 0 * 0 * (0 \pm 0.0)	4 * 8 * 6 * (6 \pm 2.0)	NT
	陽性対照	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P
用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)		5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
コロニー数/プレート		808 720 721 (750 \pm 50.5)	338 282 339 (320 \pm 32.6)	1039 962 1044 (1015 \pm 46.0)	288 295 306 (296 \pm 9.1)	93 94 113 (100 \pm 11.3)

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT: 試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表6)

試験結果表 (追加確認試験)

試験実施期間		2008年3月31日 より 2008年4月3日	
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)	
		塩基対置換型	
		TA1535	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	8	
		11	
		13	(11 ± 2.5)
	2.44	13	
		4	
		7	(8 ± 4.6)
	4.88	5	
		8	
		10	(8 ± 2.5)
	9.77	8	
9			
14		(10 ± 3.2)	
19.5	6		
	16		
	11	(11 ± 5.0)	
39.1	8		
	5		
	11	(8 ± 3.0)	
78.1	10 *		
	11 *		
	12 *	(11 ± 1.0)	
陽性対照	名称	2AA	
	用量(μg/プレート)	2.0	
	コロニー数/プレート	353	
		333	
		310	(332 ± 21.5)

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
 ()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

4. 要約

β -ブロモスチレンの染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 1850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 116 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、50%を超える細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（IC50、概略値）は、短時間処理法の非代謝活性化では 67.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 66.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48 時間処理では 72.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。一方、短時間処理法の代謝活性化では、最低用量の 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。しかしながら、細胞増殖抑制率測定用標本を目視で観察した結果、14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では染色体観察用標本の作製並びに染色体観察が可能と推測される量の細胞が認められた。これらの結果より、ガイドラインに定められた「細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、染色体異常試験における各処理法の最高用量を短時間処理法の代謝活性化では 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 116 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

なお、染色体異常試験の短時間処理法・代謝活性化では、最高用量の 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても、細胞増殖抑制率がガイドラインに定められた 50%を下回らなかったため、28.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、再試験を実施した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、いずれの処理法においても陰性の判定基準である 5%未満であった。また、倍数性細胞の出現頻度も、いずれの処理法においても陰性の判定基準である 5%未満であった。

なお、全ての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内であった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

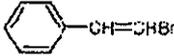
以上の結果から、 β -ブロモスチレンは本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数的異常は誘発しないと結論した。

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

被験物質の純度等の特性は、東京化成工業株式会社における非 GLP 下での分析に基づくものである (Attached Data 1)。

製造者	:	東京化成工業株式会社
名称	:	β -ブロモスチレン
英名称	:	beta-Bromostyrene
ロット番号	:	TEYUC
CAS 番号	:	103-64-0
化学構造式	:	
分子量	:	183.05
密度	:	1.4246
純度	:	99.6 %
性状	:	淡黄色液体
入手量	:	25 g
安定性	:	実験終了後、試験受託者にて特性分析 (試験番号 : A-2153) を実施し、確認した (Attached Data 2)。
保存方法	:	冷蔵 (保存期間中実測温度 : 3~11°C)、遮光、防湿
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室 冷蔵庫
取扱い上の注意	:	特になし
残余物の取り扱い	:	実験終了後、被験物質の残余物は全て実験期間中の安定性を確認するため、すべて β -ブロモスチレン (Lot No.TEYUC) の安定性試験 (試験番号 ; A-2153) へ移管した。

6.1.2 溶媒

名称	:	ジメチルスルホキシド (DMSO)
ロット番号	:	LTF0010
規格	:	試薬特級
製造元	:	和光純薬工業株式会社
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室
溶媒の選択理由	:	試験開始前に被験物質の溶媒に対する溶解性の検討を実施した結果、注射用水には 18.5 mg/mL で不溶、

DMSOには185 mg/mLで溶解することが確認されたため、DMSOを溶媒として使用することとした。

6.2 被験液の調製

6.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.3700g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 185 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1850 µg/mL）を調製した。次いで、185 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、92.5、46.3、23.1、11.6、5.78、2.89 及び 1.45 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

2) 染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.3700g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 185 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1850 µg/mL）を調製した。次いで、185 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 11 段階希釈し、92.5、46.3、23.1、11.6、5.78、2.89、1.45、0.723、0.361、0.181 及び 0.090 mg/mL の 12 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では、1.45 から 0.090 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では、11.6 から 0.723 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を用いた。

連続処理法では、被験物質 0.3700g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 185 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1850 µg/mL）を調製した。次いで、185 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、92.5、46.3、23.1、11.6、5.78、2.89 及び 1.45 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理及び 48 時間処理ともに 11.6 から 1.45 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を用いた。

3) 再試験（短時間処理法 代謝活性化）

被験物質 0.3700g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 185 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1850 µg/mL）を調製した。次いで、185 mg/mL 溶液を公比 4（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 3 mL）で順次 3 段階希釈し、46.3、11.6 及び 2.89 mg/mL の 3 濃度段階の被験液を調製した。さらに、2.89 mg/mL の溶液を公比 1.5（各濃度の被験液 2 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、1.93、1.28、0.856、0.571、0.381、0.254 及び 0.169 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。試験には 2.89 から 0.169 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を供した。

6.2.2 調製頻度

用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

6.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液が安定であることを確認した。

6.3 対照物質

6.3.1 陰性対照

溶媒として用いたジメチルスルホキシド (DMSO) を陰性対照とした。

6.3.2 陽性対照

- 1) 陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化ではマイトマイシン C を用いた。

名称	:	シクロフォスファミド (以下 CP と略記する)
ロット番号	:	SDP4062
製造元	:	和光純薬工業株式会社
純度	:	生化学用 (97.0%以上)
保存方法	:	冷蔵、遮光
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 発癌性物質冷蔵保存庫

名称	:	マイトマイシン C (以下 MMC と略記する)
ロット番号	:	500AFJ
製造元	:	協和醗酵工業株式会社
力価	:	2mg (力価) /瓶
保存方法	:	室温、遮光
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 発癌性物質室温保存庫

2) 調製方法

染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化では、CP 0.0140 g をプラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: K7I92) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度: 14 µg/mL) を調製した。短時間処理法の非代謝活性化では MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: K7I92) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 µg/mL)。

染色体異常試験の連続処理法では、MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: K7I92) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.900 mL

に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 µg/mL)。

染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化(再試験)では、CP 0.0140 g をプラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号: K8C00) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度: 14 µg/mL) を調製した。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

3) 陽性対照物質の選択理由

前記の毒性試験法ガイドラインに使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

6.4 使用細胞株

6.4.1 細胞株

チャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞 (CHL/IU) を用いた。細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手 (2004 年 11 月 2 日) し、入手後、液体窒素中で保存した細胞 (培地にジメチルスルホキシドを 10vol% 添加した) の一部を融解後、継代培養し、後述 (6.4.4) する細胞の性状検査を実施し、性状などが適正であることを定期的に確認した後に試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 21 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 6 継代、染色体異常試験の連続処理法では 10 継代、染色体異常試験の短時間処理法 (再試験) では 19 継代であった。

6.4.2 細胞の選択理由

自然発生染色体異常の発現率が低いこと、さらに種々の化学物質の染色体異常誘発性に対して感受性が高く、バックグラウンドデータが豊富であること等の理由から本細胞を選択した。

6.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下で培養した。継代は 1~4 日ごとに行った。

6.4.4 細胞の性状検査

細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験に使用した細胞は、凍結保存から解凍し、染色体のモード数、倍加時間及びマイコプラズマ汚染の有無等について 2007 年 12 月 22 日から 2007 年 12 月 28 日に定期検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。染色体異常試験 (再試験) に使用した細胞は、凍結保存から解凍し、染色体のモード数、倍加時間及びマイコプラズマ汚染の有無等について 2008 年 5 月 9 日から 2008 年 5 月 15 日に定期検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。いずれの場合も、細胞は、30 継代を越えない範囲で試験に供した。

6.6.1 識別方法

1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「-」とし、連続処理法では24時間処理を「24-」、48時間処理を「48-」とした。更にこれに続けて陰性対照 (Negative Control) の場合は「NC」を、被験物質用量群の場合は濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。ただし、陽性対照 (Positive Control) は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」~「99」までの2桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。なお、短時間処理法・代謝活性化 (再試験) の識別方法は、染色体異常試験に準じて行った。

6.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を1850 µg/mL (10 mM相当) とし、以下公比2で希釈した925、463、231、116、57.8、28.9及び14.5 µg/mLの計8用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では116 µg/mLで、50%を超える細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (IC50、概略値) は、短時間処理法の非代謝活性化では67.3 µg/mL、連続処理法の24時間処理では66.7 µg/mL、48時間処理では72.9 µg/mLであった。一方、短時間処理法の代謝活性化では、最低用量の14.5 µg/mLにおいても50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。しかしながら、細胞増殖抑制率測定用標本を目視で観察した結果、14.5 µg/mLでは染色体観察用標本の作製並びに染色体観察が可能と推測される量の細胞が認められた。これらの結果より、ガイドラインに定められた「細胞増殖が明らかに50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、染色体異常試験における各処理法の最高用量を短時間処理法の代謝活性化では14.5 µg/mL、非代謝活性化、連続処理法の24時間処理及び48時間処理では116 µg/mLとした。さらに、染色体異常試験の短時間処理法・代謝活性化では、最高用量の14.5 µg/mLにおいても、細胞増殖抑制率がガイドラインに定めた50%を下回らなかったことから、短時間処理法の代謝活性化 (再試験) を実施することとし、28.9 µg/mLを最高用量とし、以下、公比1.5で希釈した計8用量を設定した。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

6.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するために予備試験として実施した。

1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 培養終了後、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100% として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

2) 連続処理法

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と

同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24時間及び48時間処理における被験物質の50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

6.6.4 染色体異常試験

1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径60mm）を用いた。プレートは各群4枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液5.0mL）を播種した。培養3日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液0.883mLを取り除き、S9 mix 0.833mLに続き溶媒0.050mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.883mLを取り除き、S9 mix 0.833mLに続き各濃度の被験液0.050mLを加えた。陽性対照群については培養液0.933mLを除き、S9 mix 0.833mLに続きCP 0.100mL（最終濃度：14 μ g/mL）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液0.050mLを取り除き、溶媒0.050mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.050mLを取り除き、各濃度の被験液0.050mLを加えた。陽性対照群については培養液0.150mLを除き、MMC 0.150mL（最終濃度：0.075 μ g/mL）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6時間培養した。
- (3) 培養6時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液5.0mLを加え、更に18時間培養を続けた。
- (4) 各群2枚のプレート（枝番号-1及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約2時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 μ g/mL、和光純薬工業株式会社）を0.100mL加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を0.075M塩化カリウム溶液で約15分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1液で固定した。固定した細胞をスライドガラス1枚につき2箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり2枚作製した。細胞滴下後、約1日空気乾燥し、2%ギムザ液で約15分間染色して染色体標本作製した。
- (5) 残る各群2枚のプレート（枝番号-3及び-4）は、培養6時間後と同様の方法で18時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

- (1) 24時間処理と48時間処理のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対

照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。

- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL（最終濃度：0.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25% トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日以上空気乾燥し、2% ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- (4) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養の終了時に肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

3) 短時間処理法 代謝活性化（再試験）

6.6.4 染色体異常試験 1) 短時間処理法における試験方法に準じて実施した。

6.6.5 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。また、染色体異常試験の短時間処理法・代謝活性化（再試験）では、設定した濃度のうち、3.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の濃度では細胞増殖抑制作用が認められず、染色体異常誘発の可能性が低いと判断されたため、標本の作製及び観察を実施しないこととした。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とする。

6.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常はさらに以下のように定義・分類した。

1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

- ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体又は染色分体の同軸上に断片がある（非染色部分が染色分体の同軸上にある）ものであって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるものと定義した。
- 染色分体型切断(ctb) : 切断とは断片が染色分体の同軸上からはずれているもの及び非染色部位が染色分体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものと定義した。
- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものを染色体型切断と定義した。
- 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化(frg)他。

2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数（二倍体）と異なり倍化した場合を数的異常と定義した。

- 倍数体 : polyploidy（核内倍加体：endoreduplicationを含む）

6.6.7 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準¹⁾に従い染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率(%)によって以下のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5% 未満	陰 性 (－)
5% 以上 10% 未満	疑陽性 (±)
10%以上	陽 性 (+)

染色体構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合（TAG）と含まない場合（TA）とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

7. 試験結果

7.1 細胞増殖抑制試験

7.1.1 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化では、全ての用量で50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は算出できなかった。一方、非代謝活性化では、116 µg/mL以上の用量で50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は67.3 µg/mLだった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに全ての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに463 µg/mL以上の用量で析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともに231 µg/mL以上の用量で析出が認められた。被験物質用量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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに463 µg/mL以上の用量では、被験物質と思われる物質が多量に存在していたため観察不能であった。また、代謝活性化及び非代謝活性化ともに14.5 µg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.1.2 連続処理法

連続処理法における24時間処理の結果を Fig. 1-3 及び Table 1-3 に、48時間処理の結果を Fig. 1-4 及び Table 1-4 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

24時間処理法及び48時間処理法ともに116 µg/mL以上の用量で50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）はそれぞれ66.7 µg/mL及び72.9 µg/mLだった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、24時間処理及び48時間処理ともに全ての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24時間処理及び48時間処理ともに463 µg/mL以上の用量で析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24時間処理及び48時間処理ともに、231 µg/mL以上の用量で析出が認められた。被験物質用量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、

24 時間処理及び 48 時間処理ともに 463 µg/mL 以上の用量では被験物質と思われる物質が多量に存在していたため、観察不能であった。また、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 231 µg/mL では細胞の剥離、死滅が認められたため TOX と判定し、116 から 14.5 µg/mL の用量では細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.2 染色体異常試験

7.2.1 短時間処理法

代謝活性化の結果を Fig. 2-1、Table 2-1 及び Table 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 2-2、Table 2-2 及び Table 3-2 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに全ての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、全ての用量で析出は認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともに全ての用量で析出は認められなかった。被験物質用量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、代謝活性化では 14.5 µg/mL で細胞の浮遊、形態変化が認められた。一方、非代謝活性化では 14.5 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化では 14.5 µg/mL では 0%、7.23 µg/mL では 0%、3.61 µg/mL では 1.0%、1.81 µg/mL では 0%及び 0.90 µg/mL では 1.0%と陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。また、非代謝活性化においては、116 µg/mL では 0.5%、57.8 µg/mL では 0%、28.9 µg/mL では 0%、14.5 µg/mL では 0%及び 7.23 µg/mL では 0.5%と陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、代謝活性化では 14.5 µg/mL では 0.5%、7.23 µg/mL では 0%、3.61 µg/mL では 0%、1.81 µg/mL では 0%及び 0.90 µg/mL では 0%と陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。また、非代謝活性化においては、116 µg/mL では 1.0%、57.8 µg/mL では 0.5%、28.9 µg/mL では 0%、14.5 µg/mL では 0.5%及び 7.23 µg/mL では 0%と陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、

又試験施設の背景値 (Attached Data 3) 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。

7.2.2 連続処理法

24 時間処理の結果を Fig. 2-3、Table 2-3 及び Table 3-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 2-4、Table 2-4 及び Table 3-4 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で析出は認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で析出は認められなかった。被験物質用量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、24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現率 (TA) は、24 時間処理では 116 µg/mL では 0.5%、57.8 µg/mL では 0.5%、28.9 µg/mL では 0%及び 14.5 µg/mL では 0%と陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。また、48 時間処理においては、116 µg/mL では 0.5%、57.8 µg/mL では 0%、28.9 µg/mL では 0.5%及び 14.5 µg/mL では 0%と陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、24 時間処理では 116 µg/mL では 0.5%、57.8 µg/mL では 0%、28.9 µg/mL では 0.5%及び 14.5 µg/mL では 0%と陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。また、48 時間処理においては、116 µg/mL では 0%、57.8 µg/mL では 0%、28.9 µg/mL では 0%及び 14.5 µg/mL では 0.5%と陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) 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。

7.2.3 短時間処理法（再試験）

代謝活性化の結果を Fig. 2-5、Table 2-5 及び Table 3-5 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、全ての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、全ての用量で析出は認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

全ての用量で析出は認められなかった。被験物質用量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、5.71 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現率 (TA) は、28.9 µg/mL では 1.5%、19.3 µg/mL では 0%、12.8 µg/mL では 0%、8.56 µg/mL では 1.5% 及び 5.71 µg/mL では 1.0% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、28.9 µg/mL では 0%、19.3 µg/mL では 0.5%、12.8 µg/mL では 0%、8.56 µg/mL では 0.5% 及び 5.71 µg/mL では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) 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。

8. 考察

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、いずれの処理法においても陰性の判定基準である 5%未満であった。また、倍数性細胞の出現頻度も、いずれの処理法においても陰性の判定基準である 5%未満であった。

全ての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内であった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。なお、染色体異常試験の連続処理法において、陽性対照群の染色体構造異常頻度が、試験施設の背景値に比べてやや高い値を示したことから、細胞の陽性対照物質への感受性が多少 hypersensitive な状態にあったと推測される。しかしながら、陰性対照群及び被験物質処理群では染色体構造異常頻度は陰性の範囲内であったこと及び感受性が hypersensitive の状態においては、被験物質処理群の染色体構造異常が underestimation されることはないと考えられることから、被験物質の染色体構造異常誘発性の評価には問題はなく、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、 β -プロモスチレンは本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数的異常は誘発しないと結論した。

Table 1-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
+	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			87		-	-	-	-	
		Test article	14.5	49	46	++	-	-	-
				37		++	-	-	-
			28.9	24	33	++	-	-	-
				37		++	-	-	-
			57.8	12	13	+++	-	-	-
				12		+++	-	-	-
			116	0	6	+++	-	-	-
				12		+++	-	-	-
231	0	0	+++	-	-	-	+		
	0		+++	-	-	-	+		
463	0	6	g)	-	+	+			
	12		g)	-	+	+			
925	0	6	g)	-	+	+			
	12		g)	-	+	+			
1850	12	13	g)	-	+	+			
	12		g)	-	+	+			
Concentration of 50% cell-growth inhibition : below					14.5	$\mu\text{g/mL}$			

NC: Negative Control(DMSO)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾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 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) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 1-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Short-term treatment: -S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			100		-	-	-	-	
		14.5	71	71	+	-	-	-	-
			71		+	-	-	-	
		28.9	57	57	++	-	-	-	-
			57		++	-	-	-	
		57.8	71	57	++	-	-	-	-
			42		++	-	-	-	
		116	14	14	++	-	-	-	-
			14		++	-	-	-	
		231	14	7	+++	-	-	-	+
			0		+++	-	-	-	+
		463	0	0	g)	-	+	+	+
			0		g)	-	+	+	
925	0	0	g)	-	+	+	+		
	0		g)	-	+	+			
1850	0	0	g)	-	+	+	+		
	0		g)	-	+	+			
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					67.3	$\mu\text{g/mL}$			

NC: Negative Control(DMSO)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test solutions and ²⁾ 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) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 1-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Continuous treatment : 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	24-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			100		-	-	-	-	
		14.5	59	59	+	-	-	-	-
			59		+	-	-	-	
		28.9	59	59	+	-	-	-	-
			59		+	-	-	-	
		57.8	59	59	+	-	-	-	-
			59		+	-	-	-	
		116	0	0	+++	-	-	-	-
			0		+++	-	-	-	
		231	0	0	TOX	-	-	-	+
			0		TOX	-	-	-	+
		463	0	0	g)	-	+	+	+
			0		g)	-	+	+	
925	0	0	g)	-	+	+	+		
	0		g)	-	+	+			
1850	0	0	g)	-	+	+	+		
	0		g)	-	+	+			
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					66.7	$\mu\text{g/mL}$			

NC: Negative Control(DMSO)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test solutions and ²⁾ 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 most of the surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no 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.

Table 1-4

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
 [Continuous treatment : 48hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{e)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	48-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		Test article	14.5	84	80	++	-	-	-
				76		++	-	-	-
			28.9	69	65	++	-	-	-
				61		++	-	-	-
			57.8	69	65	++	-	-	-
				61		++	-	-	-
			116	7	7	+++	-	-	-
				7		+++	-	-	-
231	0	0	TOX	-	-	-	+		
	0		TOX	-	-	-	+		
463	0	0	g)	-	-	+	+		
	0		g)	-	-	+	+		
925	0	0	g)	-	-	+	+		
	0		g)	-	-	+	+		
1850	0	0	g)	-	-	+	+		
	0		g)	-	-	+	+		
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					72.9	µg/mL			

NC: Negative Control(DMSO)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾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 approximately half of the surviving cells.

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

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no 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.

Table 2-1

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
 [Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{e)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
+	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			100		-	-	-	-	
		Test article	0.90	100	93	-	-	-	-
				85		-	-	-	-
			1.81	100	100	-	-	-	-
				100		-	-	-	-
			3.61	100	93	-	-	-	-
		85		-		-	-	-	
		7.23	85	85	-	-	-	-	
			85		-	-	-	-	
14.5	71	78	+	-	-	-			
	85		+	-	-	-			
PC	100	100	-	-	-	-			
	100		-	-	-	-			

NC: Negative Control(DMSO)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test solutions and ²⁾ 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.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-2

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
 [Short-term treatment: -S9 mix]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			88		-	-	-	-	
		Test article	7.23	66	76	-	-	-	-
				77		-	-	-	-
			14.5	77	82	+	-	-	-
				77		+	-	-	-
			28.9	66	76	+	-	-	-
				77		+	-	-	-
		57.8	66	70	+	-	-	-	
			66		+	-	-	-	
		116	55	59	++	-	-	-	
			55		++	-	-	-	
PC		88	94	-	-	-	-		
		88		-	-	-	-		

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 $\mu\text{g/mL}$)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test solutions and ²⁾ 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

Table 2-3

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Continuous treatment: 24hr]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
		0 (NC)	$\frac{100}{85}$ ^{a)}	100	-	-	-	-	
		Test article	14.5	77	+	-	-	-	
					+	-	-	-	
			28.9	62	+	-	-	-	
					+	-	-	-	
			57.8	69	+	-	-	-	
					+	-	-	-	
			116	30	++	-	-	-	
					++	-	-	-	
			PC	$\frac{85}{85}$	92	-	-	-	-
						-	-	-	-

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 $\mu\text{g/mL}$)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test solutions and ²⁾ 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

Table 2-4

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
 [Continuous treatment: 48hr]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	48-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			118		-	-	-	-	
		Test article	14.5	90	83	+	-	-	-
				90		+	-	-	-
			28.9	90	78	+	-	-	-
				81		+	-	-	-
		57.8	81	78	+	-	-	-	
			90		+	-	-	-	
		116	18	21	++	-	-	-	
			27		++	-	-	-	
		PC	99	91	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 µg/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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾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

Table 2-5

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
[retest : +S9 mix]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
+	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		Test article	1.69	99	99	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
			2.54	99	99	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
			3.81	133	134	-	-	-	-
				133		-	-	-	-
			5.71	133	134	+	-	-	-
				133		+	-	-	-
			8.56	99	99	+	-	-	-
99	+	-		-		-			
12.8	66	83	+	-	-	-			
	99		+	-	-	-			
19.3	66	66	++	-	-	-			
	66		++	-	-	-			
28.9	33	33	++	-	-	-			
	33		++	-	-	-			
PC	133	134	-	-	-	-			
	133		-	-	-	-			

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 µg/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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test solutions and ²⁾ 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

4. 要約

Sprague-Dawley系 SPF ラット〔CrI:CD(SD)〕を用いて、 β -プロモスチレンの反復投与による毒性並びにその可逆性を検討した。投与量は 0（コーン油：対照群）、30、125 及び 500 mg/kg/day とし、28 日間反復強制経口投与した。1 群の動物数は対照群及び 500 mg/kg 投与群で雌雄各 12 匹、30 及び 125 mg/kg 投与群で雌雄各 6 匹とした。このうち、対照群の雌雄各 6 例及び 500 mg/kg 投与群の雄 6 例と雌 5 例については、28 日間投与後 2 週間休薬させた。

500 mg/kg 投与群の雌 1 例が投与 3 日に死亡した。病理学検査における主な変化として肉眼的に血性腹水及び胸水と肝臓の大型化など、組織学的に肝臓の小葉中心性壊死とうっ血などが認められたが、死因は明らかではなかった。

一般状態では、投与開始日に 500 mg/kg 投与群の雌雄全例で自発運動の減少が認められた。

詳細な一般状態では、投与 3 及び 4 週に 500 mg/kg 投与群の雌雄で流涎が散見された。この変化は休薬により消失した。

体重では、投与初期に 500 mg/kg 投与群の雌雄で低値傾向が認められた。

摂餌量では、投与初期に 500 mg/kg 投与群の雌雄で低値が認められた。

尿検査では、125 mg/kg 以上の投与群の雄で尿量の高値と浸透圧の低値が、500 mg/kg 投与群の雌で尿量の高値が、また、沈渣において 500 mg/kg 投与群の雄で小円形上皮細胞の陽性例の発現頻度の増加が認められた。これらの変化はいずれも休薬により消失した。

血液化学検査では、125 mg/kg 以上の投与群の雌で総コレステロールとリン脂質の高値が、500 mg/kg 投与群の雌雄で総たん白質の高値が、雄でアルブミンと無機リンの高値が、雌でトリグリセライドと塩素の高値が認められた。これらの変化は休薬によりほぼ消失した。

病理学検査では、肝臓において、125 mg/kg 以上の投与群の雌雄で絶対あるいは相対重量の高値が、500 mg/kg 投与群の雌雄で肉眼的に大型化と組織学的に小葉中心性肝細胞肥大が認められた。腎臓において、500 mg/kg 投与群の雌雄で絶対あるいは相対重量の高値が、組織学的に 125 mg/kg 以上の投与群の雄で尿細管上皮細胞の好酸性小体が、500 mg/kg 投与群の雄で尿細管変性が認められた。甲状腺において、組織学的に 125 mg/kg 以上の投与群の雌と 500 mg/kg 投与群の雄で濾胞上皮細胞の肥大が認められた。これらの変化はいずれも休薬により消失あるいは軽減した。

以上の結果から、 β -プロモスチレンの本試験条件下における無影響量は雌雄とも 30 mg/kg/day であると推定された。また、みられた変化はいずれも可逆性が認められた。

B-6354

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

被験物質は東京化成工業株式会社より購入した。当試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、試験成績を添付資料 1 に示した。

名称	:	β-ブロモスチレン
英名	:	β-Bromostyrene
CAS 番号	:	103-64-0
示性式	:	C ₆ H ₅ CH:CHBr
ロット番号	:	TEYUC
分子量	:	183.05
純度	:	99.6% (GC 法、cis-,trans-混合物)
入手量	:	500 g (25 g を 20 本)
性状	:	黄色透明液体
比重	:	1.42
引火点	:	120°C
安定性	:	動物試験終了後、被験物質の分析を試験受託者で HPLC 法により実施し、安定であることを確認した。 (添付資料 2)
保存方法	:	冷蔵 (実測値 : 3~9°C) 、遮光、防湿
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	マスク、手袋を着用する。 取扱い場所及び周囲の火気を厳禁し、高温物及び強酸化剤との接触を避ける。
返却 ^(注)	:	被験物質約 1 g を保存試料として保存した。また、投与期間中の安定性を確認するため、投与後の残量は全てβ-ブロモスチレン (Lot No. TEYUC) の安定性試験 (試験番号 ; A-2153) へ移管した。

注) : 試験計画書では分析用に小分けするとしていたが、実際には小分けをしなかった。

6.1.2 媒体

名称	:	コーン油
ロット番号	:	WKJ3948
製造者	:	和光純薬工業株式会社
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所 第 1 研究棟被験物質調製室

B-6354

6.2 投与液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に採取し、コーン油で希釈して 6 mg/mL 液（低用量群液）、25 mg/mL 液（中用量群液）及び 100 mg/mL 液（高用量群液）を調製した。被験液は週 1 回以上の頻度で調製し、調製後 8 日以内に使用した。

6.2.1 投与液の保存方法

投与液は 1 日の必要分ずつ遮光瓶に分注し、使用時まで冷所（冷蔵庫内、実測値：4~6°C）に保存した。

6.2.2 媒体中での安定性

本被験物質の 0.5 及び 200 mg/mL 希釈液（媒体：コーン油）は、冷所（冷蔵庫内、1~10°C）で 8 日間、その後室温で 24 時間安定であることを株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で確認した（試験番号：A-2109、添付資料 3）。

6.2.3 調製物の濃度確認

投与 1 週と 4 週の投与に用いる各濃度の被験液について、その濃度を株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所で HPLC 法を用いて確認した。その結果、表示値に対する濃度の割合は 97.8~104.0%（許容範囲：100±10%）であり、いずれも許容範囲内であった（添付資料 4 及び 5）。分析法の概略を次に示す。

1 濃度当たりの採取本数及び採取量

： 1 本（10 mL）
測定対象物質 : β-プロモスチレン

測定対象標準物質

名称 : β-プロモスチレン
ロット番号 : TEYUC
保存方法 : 冷蔵（冷蔵庫内、実測値：3~7°C）、遮光、防湿で保存

測定条件

HPLC 条件

カラム : L-column ODS（4.6 mm I.D.×150 mm、5 µm、財団法人 化学物質評価研究機構）

カラム恒温槽設定温度

: 40°C

HPLC 移動相 :

試薬名	混合比*
Milli-Q 水	50%
アセトニトリル	50%

* : HPLC システムで混合。

流速 : 1.0 mL/min
 オートサンプラー設定温度 : 4°C
 注入量 : 20 µL
 検出 : UV (測定波長 257 nm)
 注入順序 :

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液 (システム適合性用)
2	3	標準溶液 (定量用)
3	1	測定試料 (6 mg/mL)
4	1	測定試料 (25 mg/mL)
5	1	測定試料 (100 mg/mL)

なお、標準溶液及び測定実測試料の測定は 24 時間以内に実施した (バリデーション試験で、オートサンプラー内における 24 時間保存後の安定性が確認されている)。

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験に使用される系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4 試験動物及び群分け

Sprague-Dawley系SPFラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] 雌雄各 47 匹^{注)} を 5 週齢で入手し、当所で 7 日間検疫・馴化飼育し、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (3 回) 及び詳細な一般状態の観察 (1 回) を行い、体重増加量、詳細な一般状態の観察及び一般状態に異常がみられず健康と思われる雌雄各 36 匹 (主群として雌雄各 24 匹、回復群として雌雄各 12 匹) を選び、6 週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で 182~216 g、雌で 145~171 g であった。動物は、検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日 (投与開始の 2 日前) の体重に基づいて層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当て) により行った。また、余剰動物は投与開始日に試験系から除外し、安楽死させた。

注) : 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 45 匹であったが、実際には雌雄各 47 匹が納入された。

6.5 飼育条件

動物は温度 21~23°C、相対湿度 49~66%、換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間 (07:00~19:00) の動物飼育室 (301 号室) で、ブラケット式金属製網ケージ (W 250×D 350×H 200 mm : 日本ケージ株式会社) で個別飼育し、毎日 1 回の飼育室内の清掃を実

施した。固形飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：080305 及び 080509）及び御殿場市営水道水を給水瓶により自由に摂取させた。

6.6 飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用全ロットについて財団法人日本食品分析センターあるいは Eurofins Scientific Analytics で分析を行い、また、飲料水については東芝機械環境センター株式会社で水道法に準拠する水質検査を定期的に（年 4 回）行った。これらの分析成績書を入手し、試験成績に影響がないことを確認した後、写しを保存した。

6.7 動物の識別及びケージへの表示

動物は入荷時に耳標を装着して個体識別した。入荷から群分け前までの間は試験番号、性別及び耳標番号を明記したケージラベルをつけた。群分け後は、性別及び用量ごと（対照群、低、中及び高用量群の順）に 4 桁の番号をつけた。この場合、1000 の位は群、100 の位は性（0 番を雄、1 番を雌）、10 と 1 の位は個体番号とした。各飼育ケージには、群分け前まで使用したケージラベルの裏に用量（群）ごとに色分けしたラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び剖検予定日を明記した。ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定中は、観察者に対して投与の情報を制限するため、ケージラベルを裏返して試験番号、性別及び耳標番号のみを表示した。

6.8 投与経路、投与期間、投与回数及び回復期間とそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口を選択し、投与期間は 28 日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている 1 日 1 回（7 回/週）とした。回復期間は障害の可逆性を検討するのに適当と考えられる 2 週間（14 日間）とし、この間投与を行わなかった。

6.9 投与方法

投与容量は 5 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した（08：00~11：57 の間）。対照群には媒体（コーン油）を同様に投与した。個体ごとの投与液量は最新の体重を基準に算出した。

6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

β -ブロモスチレンの 0（コーン油）、100、300 及び 1000 mg/kg/day を 1 群雌雄各 5 匹のラットに 14 日間反復経口投与した結果¹⁾、主な変化としては、1000 mg/kg 投与群の雌雄全例で死亡が認められた。また、300 mg/kg 投与群では器官重量において雌雄で肝臓の相対重量の高値、雌で腎臓の相対重量の高値が認められた。したがって、本試験における投与量は、500 mg/kg を高用量とし、以下公比約 4 で除して、125 及び 30

mg/kgの3用量を設定した。これに対照群を加え、計4群を設けた。主群では雌雄各6匹、回復群では対照群及び高用量群で雌雄各6匹とした。群構成表を次の表1.に示す。

表 1.群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	30	6	5	雄	6	2001~2006	-	-
				雌	6	2101~2106	-	-
中用量群	125	25	5	雄	6	3001~3006	-	-
				雌	6	3101~3106	-	-
高用量群	500	100	5	雄	6	4001~4006	6	4007~4012
				雌	6	4101~4106	6	4107~4112

6.11 観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りである。

投与1日 (day 1 of administration) : 投与開始日

投与1週 (week 1 of administration) : 投与1から投与7日

回復1日 (day 1 of recovery) : 回復開始日 (投与期間終了の翌日)

回復1週 (week 1 of recovery) : 回復1から回復7日

6.11.1 一般状態の観察

全生存動物について投与期間中は毎日3回、投与前と投与直後及び投与約2時間後 (ただし、土曜及び休日は投与前と投与直後の2回)、回復期間中は毎日1回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。

6.11.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定

詳細な一般状態の観察は、全ての動物について投与開始前に1回、また、全生存動物について投与期間中及び回復期間中は毎週1回実施した。また、機能検査、握力及び自発運動量の測定は、全生存動物について投与4週 (雄を投与25日、雌を投与26日) 及び回復2週 (回復11日) に行った。なお、観察及び検査は投与の情報を制限 (ブラインド化) し、動物をランダムに配置した状態で行った。

投与開始前 (検疫・馴化期間中) の詳細な一般状態の観察において異常は認められなかった。

7. 試験結果

7.1 一般状態

成績を Table 1-1~1-3 及び Appendix 1~10 に示した。

1) 投与期間

30 及び 125 mg/kg 投与群の雌雄では、観察期間を通じて異常は認められなかった。

500 mg/kg 投与群では、雌 1 例（動物番号：4111）が投与 3 日に死亡した。この動物では、投与開始日に自発運動の減少が認められたが、その後は一般状態に異常は観察されなかった。その他、雌雄全例で投与開始日に自発運動の減少が認められたが、その後は全生存動物で異常はみられなかった。

2) 回復期間

いずれの動物においても、回復期間を通じて異常は認められなかった。

7.2 詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量

7.2.1 詳細な一般状態

成績を Table 2-1~2-18 及び Appendix 11~70 に示した。

1) 投与期間

(1) 投与 1 週

オープンフィールド内観察において、30 mg/kg 投与群の雄で立ち上がり回数の有意な高値がみられたが、高用量群に同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。

(2) 投与 2 週

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群の雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

(3) 投与 3 週

手に持つての観察において、500 mg/kg 投与群の雄 4 例と雌 1 例で軽度な流涎が認められた。

(4) 投与 4 週

手に持つての観察において、500 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例で軽度な流涎が認められた。その他にはオープンフィールド内観察において、500 mg/kg 投与群の雌で立ち上がり回数の有意な低値が認められたが、ごく軽度であり、また、投与 1~3 週までの回数とほぼ同様であり、自発運動量などの関連した項目にも変化がないことから、偶発性と判断した。

2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、500 mg/kg 投与群の雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 及び Appendix 71~76 に示した。

1) 投与 4 週

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群の雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復 2 週

500 mg/kg 投与群の雄で着地開脚幅に有意な低値が認められたが、投与 4 週ではみられていないことから偶発性と判断した。

7.2.3 握力

成績を Table 2-21、2-22 及び Appendix 77~82 に示した。

1) 投与 4 週

125 mg/kg 投与群の雌で後肢に有意な高値が認められたが、高用量群に同様な変化はみられていないことから偶発性と判断した。

2) 回復 2 週

500 mg/kg 投与群の雄で前肢に有意な低値が認められたが、投与 4 週にみられていないことから偶発性と判断した。

7.2.4 自発運動量

成績を Fig. 1~4、Table 2-23、2-24 及び Appendix 83~88 に示した。

1) 投与 4 週

各被験物質投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

2) 回復 2 週

500 mg/kg 投与群の雄で測定開始後 40~50 分の測定に有意な低値が認められたが、投与 4 週ではみられていないことから偶発性と判断した。

7.3 体重

成績を Fig. 5、Table 3-1、3-2 及び Appendix 89~94 に示した。

1) 投与期間

500 mg/kg 投与群の雌雄で投与 4 日に低値傾向が認められた。その他には 125 mg/kg 投与群の雌で投与 17、21 及び 24 日と投与期間中の体重増加量に有意な高値が認められたが、高用量群では同様な変化はみられていないことから偶発性と判断した。

2) 回復期間

500 mg/kg 投与群の雌で回復期間中の体重増加量に有意な低値が認められたが、通常みられる程度の変化であることから偶発性と判断した。

7.4 摂餌量

成績を Fig. 6、Table 4-1、4-2 及び Appendix 95~100 に示した。

1) 投与期間

500 mg/kg 投与群の雌雄で投与 4 日に有意な低値が認められた。その他には 125 mg/kg 投与群の雌で投与 7、10、14、17 及び 21 日に、500 mg/kg 投与群の雌で投与 7、14、17、21 及び 28 日に有意な高値が認められたが、いずれも通常みられる程度の変化であることから偶発性と判断した。

2) 回復期間

500 mg/kg 投与群の雌で回復 7 及び 14 日に有意な低値が認められたが、いずれも通常みられる程度の変化であることから偶発性と判断した。

7.5 尿検査（摂水量含む）

成績を Table 5-1~5-8 及び Appendix 101~118 に示した。

1) 投与 4 週

125 mg/kg 以上の投与群の雄で尿量の有意な高値と浸透圧の有意な低値が、更に、500 mg/kg 投与群の雌で尿量の有意な高値が認められた。また、沈渣において 500 mg/kg 投与群の雄 12 例中 5 例、雌 11 例中 1 例で小円形上皮細胞の陽性例が認められ、500 mg/kg 投与群の雄で対照群と比べ発現頻度が増加した。その他には 125 mg/kg 投与群の雌で摂水量の有意な低値が認められたが、高用量群では同様な変化はみられていないことから偶発性と判断した。

2) 回復 2 週

500 mg/kg 投与群の雌雄とも定性的項目で異常は認められず、また、尿量、摂水量及び浸透圧でも対照群との間に有意差は認められなかった。

7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-6 及び Appendix 119~136 に示した。

1) 投与期間終了時

30 mg/kg 投与群の雄で平均赤血球血色素量の有意な低値が、125 mg/kg 投与群の雌で活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な短縮とフィブリノーゲン量の有意な高値が認められたが、高用量群に同様な変化はみられていないことから偶発性と判断した。また、500 mg/kg 投与群の雌雄で平均赤血球血色素濃度の有意な低値が、雄で平均赤血球血色素量の有意な低値が、雌で網赤血球率の有意な高値が認められたが、いずれもごく軽度な変化であり、赤血球数等に明らかな変化はみられていないことから偶発性と判断した。さらに、雄で白血球百分率と白血球数から算出した各分画の実数において単球数の有意な高値が認められたが、ごく軽度な変化であり、白血球数及び白血球百分率等には変化はみられていないことから偶発性と判断した。

2) 回復期間終了時

500 mg/kg 投与群の雄で白血球百分率において好酸球比率の有意な低値が、雌で白

血球百分率において単球数比率の有意な高値が認められたが、いずれも投与期間終了時にみられていないことから偶発性と判断した。

7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 Appendix 137~148 に示した。

1) 投与期間終了時

125 mg/kg 以上の投与群の雌で総コレステロールとリン脂質の有意な高値が、500 mg/kg 投与群の雌雄で総たん白質の有意な高値が、雄で無機リン及びアルブミンの有意な高値が、雌でトリグリセライド及び塩素の有意な高値が認められた。その他には125 mg/kg 投与群の雄で LDH の有意な低値、125mg/kg 以上の投与群の雄で AST の有意な低値と 500 mg/kg 投与群の雄で ALT とクレアチニンの有意な低値が認められたが、いずれも毒性を示唆する高値の変化ではないことから偶発性と判断した。また、125 mg/kg 以上の投与群の雄でカルシウムの有意な高値が認められたが、通常みられる程度の変化であることから偶発性と判断した。

2) 回復期間終了時

500 mg/kg 投与群の雌でトリグリセライドの有意な高値が認められた。

7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 及び Appendix 149~172 に示した。

1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓及び腎臓に認められた。

肝臓 : 500 mg/kg 投与群の雌雄に絶対及び相対重量の有意な高値が、125 mg/kg 投与群の雌に絶対重量の有意な高値が、125 mg/kg 投与群の雄に相対重量の有意な高値が認められた。

腎臓 : 500 mg/kg 投与群の雄に絶対及び相対重量の有意な高値が、500 mg/kg 投与群の雌に相対重量の有意な高値が認められた。

以下に示す変化については、その出現状況からいずれも被験物質投与との関連性のない変化と判断した。

脳 : 125 mg/kg 投与群の雌に相対重量の有意な低値が認められた。

脾臓 : 30 mg/kg 投与群の雄に相対重量の有意な低値が認められた。

精巣 : 500 mg/kg 投与群に絶対重量の有意な低値が認められた。

B-6354

2) 回復期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓に認められた。

肝臓 : 500 mg/kg 投与群の雌に相対重量の有意な高値が認められた。

以下に示す変化については、その出現状況から被験物質投与との関連性のない変化と判断した。

心臓 : 500 mg/kg 投与群の雌に相対重量の有意な高値が認められた。

7.9 剖検所見

成績を Table 9-1~9-3 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 死亡動物

動物番号：4111 で以下の所見が認められた。

腹腔 : 血性腹水貯留が認められた。

胸腔 : 血性胸水貯留が認められた。

肝臓 : 大型化が認められた。

胃 : 腺胃暗赤色巣が認められた。

2) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓に認められた。

肝臓 : 500 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例に大型化が認められた。

以下に示す変化については、その出現状況からいずれも被験物質投与との関連性のない変化と判断した。

肺 (気管支を含む) : 対照群の雌 1 例、125 mg/kg 投与群の雄 1 例に暗赤色巣が認められた。

胃 : 125 及び 500 mg/kg 投与群の雌各 1 例に腺胃暗赤色巣が認められた。

甲状腺 : 30 及び 500 mg/kg 投与群の雌各 1 例に小型化 (片側性) が認められた。

3) 回復期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓に認められた。

肝臓 : 500 mg/kg 投与群の雄 1 例に大型化が認められた。

7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-7 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 死亡動物

回腸（パイエル板含む）

：	軽微なパイエル板の萎縮が認められた。	
腎臓	：	軽微な尿細管の拡張が認められた。
肝臓	：	中等度な小葉中心性壊死と軽度なうっ血が認められた。
肺（気管支を含む）	：	軽微な限局性出血と泡沫細胞の集簇が認められた。
腸間膜リンパ節	：	軽微な萎縮が認められた。
顎下リンパ節	：	軽微な萎縮が認められた。
脾臓	：	軽微な造血の増加と白脾髄の萎縮が認められた。
胃	：	軽度な腺胃のびらんが認められた。
胸腺	：	軽微な萎縮が認められた。
甲状腺	：	鰓後体の遺残が認められた。

2) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が雌雄の肝臓及び甲状腺と雄の腎臓に認められた。

腎臓	：	125 mg/kg 投与群の雄 2 例に軽微な頻度の尿細管上皮細胞の好酸性小体が、500 mg/kg 投与群の雄全例に軽度な頻度の尿細管上皮細胞の好酸性小体が、また、500 mg/kg 投与群の雄 2 例に軽度な尿細管変性が認められた。
肝臓	：	剖検において肝臓の大型化がみられた 500 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例を含め次の所見が認められた。500 mg/kg 投与群の雌雄全例に軽微あるいは軽度な小葉中心性肝細胞肥大が認められた。
甲状腺	：	125 mg/kg 投与群の雌 1 例、500 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 5 例に軽微な濾胞上皮細胞の肥大が認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。なお、剖検時に肺で暗赤色巣が認められた対照群の雌 1 例、125 mg/kg 投与群の雄 1 例と甲状腺で小型化が認められた 30 及び 500 mg/kg 投与群の雌各 1 例については病理組織学検査において剖検所見に関連する異常は認められなかった。

心臓	：	対照群の雄 1 例に軽微な限局性の心筋炎が認められた。
直腸	：	対照群の雄 1 例に軽微な粘膜下の細胞浸潤が認められた。
腎臓	：	対照群の雄 2 例と雌 1 例、30 mg/kg 投与群の雄 3 例、125 mg/kg 投与群の雄 2 例、500 mg/kg 投与群の雄 3 例

と雌 2 例に軽微な再生尿細管が、対照群の雌 1 例、500 mg/kg 投与群の雄 3 例に軽微な硝子円柱が、対照群の雄 1 例と雌 4 例に、30 mg/kg 投与群の雄 5 例、125 mg/kg 投与群の雄 4 例、500 mg/kg 投与群の雄 4 例と雌 2 例に軽微な間質の鉍質沈着が、対照群の雄 2 例と雌 3 例、30 mg/kg 投与群の雄 1 例、125 mg/kg 投与群の雄 1 例、500 mg/kg 投与群の雄 3 例に軽微な間質の細胞浸潤が認められた。

- 肝臓 : 剖検において肝臓の大型化がみられた 500 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例を含め次の所見が認められた。対照群の雄 1 例と雌 4 例、30 mg/kg 投与群の雌 4 例、125 mg/kg 投与群の雌 1 例、500 mg/kg 投与群の雌 2 例に軽微あるいは軽度な辺縁帯の空胞化が、30 mg/kg 投与群の雄 1 例、125 mg/kg 投与群の雄 1 例、500 mg/kg 投与群の雌 1 例に軽微な髓外造血が、500 mg/kg 投与群の雌 1 例に軽度な肉芽腫が、対照群の雄 4 例と雌全例、30 mg/kg 投与群の雄 4 例と雌 5 例、125 mg/kg 投与群の雄 4 例と雌 5 例、500 mg/kg 投与群の雄全例と雌 2 例に軽微あるいは軽度な微小肉芽腫が認められた。
- 前立腺 : 対照群の 4 例、500 mg/kg 投与群の 5 例に軽微あるいは軽度なリンパ球の細胞浸潤が認められた。
- 大腿部骨格筋 : 対照群の雄 1 例に軽微な細胞浸潤が認められた。
- 脾臓 : 対照群及び 500 mg/kg 投与群の雄各 1 例に軽微な造血の増加が認められた。
- 胃 : 剖検において腺胃の暗赤色巣がみられた 125 及び 500 mg/kg 投与群の雌各 1 例には軽微な腺胃のびらんが認められた。
- 甲状腺 : 対照群の雄 2 例に異所性胸腺が、500 mg/kg 投与群の雄 1 例に軽微な間質の細胞浸潤が、対照群の雌雄各 2 例、30 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例、125 mg/kg 投与群の雄 2 例、500 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 3 例に鰓後体の遺残が認められた。
- 膀胱 : 500 mg/kg 投与群の雄 1 例に軽微な粘膜下の細胞浸潤が認められた。

3) 回復期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が雄の腎臓と甲状腺に認められた。

- 腎臓 : 500 mg/kg 投与群の雄 3 例に軽微な頻度の尿細管上皮細胞の好酸性小体が認められた。また、対照群の雄 3

例、500 mg/kg 投与群の雄 4 例に軽微な再生尿細管が、500 mg/kg 投与群の雄 2 例に軽度な再生尿細管がみられ、500 mg/kg 投与群の雄で増強傾向が認められた。

甲状腺 : 500 mg/kg 投与群の雄 1 例に軽微な濾胞上皮細胞の肥大が認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。なお、剖検時に肝臓の大型化が認められた 500 mg/kg 投与群の雄 1 例については、病理組織学検査において剖検所見に関連する異常は認められなかった。

腎臓 : 500 mg/kg 投与群の雄 1 例に軽微な硝子円柱が、対照群の雄 3 例、500 mg/kg 投与群の雄 5 例に軽微な間質の鉍質沈着が認められた。

肝臓 : 対照群の雌雄各 1 例、500 mg/kg 投与群の雌 2 例に軽微な辺縁帯の空胞化が、対照群の雄全例と雌 5 例、500 mg/kg 投与群の雌雄各全例に軽微な微小肉芽腫が認められた。

甲状腺 : 対照群の雄 1 例に異所性胸腺が、対照群の雄 2 例、500 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に鰓後体の遺残が認められた。

8. 考察

Sprague-Dawley系 SPF ラット [CrI:CD(SD)] に β -プロモスチレンを 0 (コーン油 : 対照群)、30、125 及び 500 mg/kg/day の用量で 28 日間反復強制経口投与し、その毒性を検討するとともに、対照群及び 500 mg/kg 投与群はその後 2 週間休薬させ、変化の可逆性について検討した。

死亡動物は 500 mg/kg 投与群の雌 1 例 (動物番号: 4111) で投与 3 日に認められた。この動物では、投与開始日に自発運動の減少が認められたが、その後は一般状態に異常は観察されなかった。病理学検査では、血性の腹水及び胸水の貯留、肝臓の大型化並びに腺胃暗赤色巣が肉眼的に認められた。組織学的には肺の限局性出血と泡沫細胞の集簇、肝臓の小葉中心性壊死とうっ血、腎臓の尿細管の拡張、脾臓の造血の増加と白脾髄の萎縮、腺胃のびらん、甲状腺の鰓後体の遺残、顎下リンパ節、胸腺、腸間膜リンパ節及びパイエル板の萎縮が認められ、被験物質投与の影響と判断されたが、死因は明らかではなかった。

生存動物では、機能検査、握力、自発運動量及び血液学検査に被験物質投与の影響はみられなかったが、以下の検査項目に変化が認められた。

一般状態では、500 mg/kg 投与群の雌雄全例で自発運動の減少が認められたが、投与開始日のみの変化であり、その後は回復期間を含め異常は観察されなかった。

詳細な一般状態では、手に持った観察で投与 3 及び 4 週に 500 mg/kg 投与群の雌雄で流涎 (軽度) が散見された。この変化は休薬により消失し、回復性が認められた。

体重では、500 mg/kg 投与群の雌雄で投与初期 (投与 4 日) に低値傾向が認められた。

摂餌量では、500 mg/kg 投与群の雌雄で投与初期 (投与 4 日) に低値が認められた。

尿検査では、125 mg/kg 以上の投与群の雄で尿量の高値と浸透圧の低値が、500 mg/kg 投与群の雌で尿量の高値が認められたほか、沈渣において 500 mg/kg 投与群の雄で小円形上皮細胞の陽性例の発現頻度が増加し、被験物質投与による腎臓への影響が疑われた。これらの変化は休薬により消失し、回復性が認められた。

血液化学検査では、125 mg/kg 以上の投与群の雌で総コレステロールとリン脂質の高値が、500 mg/kg 投与群の雌雄で総たん白質の高値が、雄でアルブミンの高値が、雌でトリグリセライドの高値が認められ、被験物質投与による肝臓への影響が疑われた。また、500 mg/kg 投与群の雄で無機リンの高値が、雌で塩素の高値が認められた。休薬後の検査において、上述した変化は雌のトリグリセライドの高値を除き、いずれも消失し、回復性が認められた。

病理学検査では、肝臓、腎臓及び甲状腺に被験物質投与の影響が認められた。肝臓において 125 mg/kg 投与群の雄で相対重量の高値が、雌で絶対重量の高値が、500 mg/kg 投与群の雌雄で絶対及び相対重量の高値がみられ、500 mg/kg 投与群の雌雄では肉眼的に大型化が、組織学的に小葉中心性肝細胞肥大が認められた。また、腎臓において

B-6354

500 mg/kg 投与群の雄で絶対及び相対重量の高値が、雌で相対重量の高値が認められ、組織学的に 125 mg/kg 以上の投与群の雄で、尿細管上皮細胞の好酸性小体が、500 mg/kg 投与群の雄で尿細管変性が認められた。更に、甲状腺において濾胞上皮細胞の肥大が 125 mg/kg 以上の投与群の雌と 500 mg/kg 投与群の雄で認められた。これらの変化は休薬後ほぼ消失したが、雄では、肉眼的に肝臓の大型化、組織学的に腎臓の尿細管上皮細胞の好酸性小体及び尿細管の再生の増強と甲状腺の濾胞上皮細胞の肥大が、雌では、肝臓の相対重量の高値が認められた。しかし、いずれも程度あるいは発現例数が軽減し、回復性が認められた。

以上の結果から、 β -プロモスチレンの本試験条件下における無影響量は雌雄とも 30 mg/kg/day であると推定された。また、みられた変化はいずれも可逆性が認められた。

I. 要 約

3,4-ジクロロベンジルクロリドについて、ネズミチフス菌のヒスチジン要求性である TA98、TA100、TA1535、TA1537 株および大腸菌のトリプトファン要求性である WP2uvrA 株にそれぞれ処理し、その変異原性、すなわち遺伝子突然変異誘発性の有無を代謝活性化によらない場合 (-S9mix) および代謝活性化による場合 (+S9mix) で検討した。

本試験は、各試験菌株の最高用量を生育阻害が認められる用量に設定し、以下公比 2 で計 6~7 用量とした。すなわち各試験菌株の-S9mix では 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mix では 200、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で実施した。

本試験の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mix では 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、+S9mix の TA98 株では 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の菌株では 100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。

用量設定試験ではいずれの試験菌株においても生育阻害の認められない用量が 4 用量に満たなかった。したがって、再現性を確認するために本試験 2 回目を実施した。用量として、本試験で生育阻害が認められた用量を最高用量に設定し、以下公比 2 で計 5 用量とした。すなわち、各試験菌株の-S9mix では 50、25、12.5、6.25、3.13 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mix の TA98 株では 200、100、50、25、12.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の菌株では 100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で実施した。

本試験 2 回目の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mix では 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mix の TA98 株では 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の菌株では 100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。また、全試験菌株について再現性が確認された。

一方、各試験菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数は、いずれも陰性対照群と比較して顕著な増加が認められた。

以上の結果より、当該試験条件下における 3,4-ジクロロベンジルクロリドの遺伝子突然変異誘発性は、陰性と判断された。

II. 試験目的

3,4-ジクロロベンジルクロリドについて復帰突然変異試験を行い、遺伝子突然変異誘発性の有無をネズミチフス菌および大腸菌を用いて検討する。

III. 試験材料および方法

1. 被験物質^注

- | | |
|------------------|--|
| (1) 名称 | 3,4-ジクロロベンジルクロリド |
| (2) 別名 (商品名) | 3,4-Dichlorobenzyl chloride, 97% |
| (3) CAS No. | 102-47-6 |
| (4) 化学式 | $C_7H_5Cl_3$ |
| (5) 分子量 | 195.47 |
| (6) Lot No. | 10808AH |
| (7) 純度 | 99.9% |
| (8) 外観 | 無色透明液体 |
| (9) 保管条件 | 室温 |
| (10) 同一性 | 提供された情報と送付された被験物質のラベルを目視により比較し、同一であることを確認した。 |
| (11) 安定性 | 試験受託者で保管している同じロット番号の被験物質について、試験受託者にて安定性分析を実施した。その結果、約 16 週間保存後において安定であったため、当該試験の実験期間中においても安定であったと判断した。 |
| (12) 提供者 (試験受託者) | |
| 名称 | 日生研株式会社 |
| 所在地 | 東京都青梅市新町 9-2221-1 |
| (13) 残余被験物質の処分 | 残余被験物質はサンプルとして少量採取した後、速やかに試験受託者に返却する。 |

注：本被験物質は、Sigma-Aldrich 社製造の製品 (3,4-Dichlorobenzyl chloride, 97%) を試験受託者が購入したものである。特性は製造元の情報による。

2.被験物質の調製

(1) 用量

用量設定試験では 6.86、20.6、61.7、185.2、555.6、1667、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした。本試験は、各試験菌株の-S9mix では 1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mix では 6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした。本試験 2 回目は、各試験菌株の-S9mix では 3.13、6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mix の TA98 株では 12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の試験菌株では 6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とした。

(2) 使用した溶媒の名称とその選択理由

DMSO (特級、Lot No. CDQ4624、和光純薬工業株式会社) を用いた。事前に溶媒に対する溶解性の検討を実施した結果、水には不溶であったが DMSO には任意の割合で溶解したことから、DMSO を選択した。

(3) 被験物質液の調製

被験物質を高精度・分析用セミ・マイクロ電子天びん (型式: ER-182A、株式会社エー・アンド・デイ) で、用量設定試験では 250 mg (実秤量値: 251.5 mg) を秤量後、DMSO を加え溶解させ、5 mL にメスアップしたものを最高用量とし、段階希釈して試験に供した。同様に、本試験および本試験 2 回目では 200 mg (実秤量値: 200.1 mg【本試験】、201.3 mg【本試験 2 回目】) を秤量後、DMSO を加え溶解させ、10 mL にメスアップした。これを 10 倍希釈したものを最高用量とし、段階希釈して試験に供した。なお、被験物質液は用時調製した。

3.対照物質

(1) 陰性対照物質

DMSO (特級、Lot No. CDQ4624、和光純薬工業株式会社) を用いた。

(2) 陽性対照物質

①使用した陽性対照物質

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
(Lot No. PKE1831、純度: 99.0%、和光純薬工業株式会社)

SA : Sodium azide
(Lot No. ELJ6565、純度: 99.7%、和光純薬工業株式会社)

9-AA : 9-Aminoacridine
(Lot No. 106F06682、純度: 97%、Sigma-Aldrich Co.)

IV. 試験結果

被験物質の各試験菌株に対する生育阻害および沈殿の有無を確認し、本試験の用量を設定するため、-S9mixおよび+S9mixにより5000、1667、555.6、185.2、61.7、20.6、6.86 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で用量設定試験を行った。

その結果、各試験菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、生育阻害は-S9mixでは61.7 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、+S9mixでは185.2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で各試験菌株に認められた。被験物質の沈殿は認められなかった (Appendix 1)。

これらのことから、本試験では各試験菌株の最高用量を生育阻害が認められる用量に設定し、以下公比2で計6~7用量とした。すなわち、各試験菌株の-S9mixでは100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mixでは200、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で実施した。

本試験の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の2倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mixでは50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、+S9mixのTA98株では200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の試験菌株では100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった (Fig 1、2、Appendix 2)。

用量設定試験ではいずれの試験菌株においても生育阻害の認められない用量が4用量に満たなかった。したがって、再現性を確認するために本試験2回目を実施した。用量として、本試験で生育阻害が認められた用量を最高用量に設定し、以下公比2で計5用量とした。すなわち、各試験菌株の-S9mixでは50、25、12.5、6.25、3.13 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mixのTA98株では200、100、50、25、12.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の菌株では100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で実施した。

本試験2回目の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の2倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mixでは50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mixのTA98株では200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の試験菌株では100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった (Fig 3、4、Appendix 3)。

一方、各試験菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数は、いずれも陰性対照群と比較して顕著な増加が認められた。

V. 考察および結論

3,4-ジクロロベンジルクロリドの遺伝子突然変異誘発性について、ネズミチフス菌 (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) および大腸菌 (WP2uvrA 株) を用いる復帰突然変異試験 (-S9mix および+S9mix) により検討した。

本試験の用量を設定するため 6.86~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で用量設定試験を実施した。その結果、各試験菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mix では 61.7 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、+S9mix では 185.2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で各試験菌株に認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。これらのことから、本試験では各試験菌株の最高用量を-S9mix では 100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mix では 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 設定し、以下公比 2 で計 6~7 用量とした。

本試験の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mix では 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上、+S9mix の TA98 株では 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の試験菌株では 100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 以上で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。

用量設定試験ではいずれの試験菌株においても生育阻害の認められない用量が 4 用量に満たなかった。したがって、再現性を確認するために本試験 2 回目を実施した。用量として、本試験で生育阻害が認められた用量、すなわち各試験菌株の-S9mix では 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mix の TA98 株では 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の試験菌株では 100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量に設定し、以下公比 2 で計 5 用量とした。

本試験 2 回目の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mix では 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mix の TA98 株では 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の菌株では 100 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。

以上のことから、全試験菌株について再現性が確認された。

陰性および陽性対照群のそれぞれの復帰変異コロニー数は、共に背景データ (Attached sheet 1) の Mean \pm 2.5S.D.の範囲内であったことから、当該試験が適正な条件下で実施されたことが確認された。

なお、無菌試験では、雑菌の汚染は認められなかった。

以上の結果より、当該試験条件下における 3,4-ジクロロベンジルクロリドの遺伝子突然変異誘発性は、陰性と判断された。

Appendix 1. Reverse mutation test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in *S.typhimurium* and *E.coli*
(Dose determination test)

With(+) or Without(-) S9 mix	Test substance concentration (μ g/plate)	Number of revertants(number of colonies/plate) ^{a)}				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
S9mix (-)	Solvent control	148 136 (142)	7 4 (6)	29 20 (25)	22 22 (22)	5 6 (6)
	6.86	166 146 (156)	7 9 (8)	24 23 (24)	21 23 (22)	6 3 (5)
	20.6	139 107 (123)	11 5 (8)	29 16 (23)	19 21 (20)	4 4 (4)
	61.7	3 * 1 * (2)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	28 * 4 * (16)	0 * 0 * (0)
	185.2	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	18 * 2 * (10)	0 * 0 * (0)
	555.6	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	1667	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
S9mix (+)	Solvent control	150 146 (148)	9 9 (9)	30 29 (30)	41 45 (43)	7 7 (7)
	6.86	129 141 (135)	9 8 (9)	29 22 (26)	37 34 (36)	7 5 (6)
	20.6	132 124 (128)	7 6 (7)	29 28 (29)	41 42 (42)	11 8 (10)
	61.7	108 127 (118)	8 5 (7)	26 27 (27)	35 40 (38)	8 6 (7)
	185.2	0 * 0 * (0)	0 * 6 * (3)	0 * 0 * (0)	40 * 11 * (26)	0 * 0 * (0)
	555.6	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	5 * 0 * (3)	0 * 0 * (0)
	1667	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (μ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	396 428 (412)	342 327 (335)	186 179 (183)	367 387 (377)	348 351 (350)
Positive control requiring S9 mix	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (μ g/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	1037 1106 (1072)	319 298 (309)	1048 1088 (1068)	430 397 (414)	299 282 (291)

a) : The average number of colonies in each concentration.

* : Inhibition against growth of bacteria.

Solvent : Dimethyl sulfoxide

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA: Sodium azide, 9-AA: 9-Aminoacridine,

2-AA: 2-Aminoanthracene

Study No. H-09002

Appendix 2. Reverse mutation test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in *S.typhimurium* and *E.coli* (Mutagenicity test)

With(+) or Without(-) S9 mix	Test substance concentration (μ g/plate)	Number of revertants(number of colonies/plate) ^{a)}				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
S9mix (-)	Solvent control	115	6	31	28	4
		111 (119)	6 (7)	23 (29)	26 (24)	5 (5)
		131	9	33	18	6
	1.56	121	5	32	14	5
		94 (108)	8 (7)	27 (30)	22 (18)	6 (6)
	3.13	114	5	32	24	8
		125 (120)	10 (8)	37 (35)	20 (22)	5 (7)
	6.25	117	9	30	26	2
112 (115)		8 (9)	27 (29)	18 (22)	3 (3)	
12.5	134	6	37	35	6	
	119 (127)	8 (7)	32 (35)	25 (30)	7 (7)	
25	99	8	21	19	6	
	119 (109)	5 (7)	32 (27)	22 (21)	3 (5)	
50	49 *	0 *	20 *	8 *	0 *	
	70 *(60)	0 *(0)	12 *(16)	7 *(8)	0 *(0)	
100	0 *	0 *	12 *	0 *	0 *	
	0 *(0)	0 *(0)	9 *(11)	0 *(0)	0 *(0)	
S9mix (+)	Solvent control	150	5	31	38	11
		150 (147)	9 (8)	35 (34)	39 (39)	9 (10)
		140	11	36	40	9
	6.25	133	7	36	34	5
		133 (133)	6 (7)	31 (34)	37 (36)	6 (6)
	12.5	147	5	31	43	8
		150 (149)	4 (5)	33 (32)	33 (38)	9 (9)
	25	134	9	36	42	10
159 (147)		8 (9)	37 (37)	45 (44)	6 (8)	
50	148	10	30	37	5	
	121 (135)	8 (9)	27 (29)	31 (34)	10 (8)	
100	97 *	10 *	28 *	33	8 *	
	93 *(95)	8 *(9)	18 *(23)	44 (39)	7 *(8)	
200	0 *	0 *	10 *	0 *	0 *	
	0 *(0)	0 *(0)	10 *(10)	0 *(0)	0 *(0)	
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (μ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	441	245	170	441	437
Positive control requiring S9 mix	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (μ g/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	968	231	1166	490	202
		1064 (1016)	231 (231)	1051 (1109)	426 (458)	220 (211)

a) : The average number of colonies in each concentration.

* : Inhibition against growth of bacteria.

Solvent : Dimethyl sulfoxide

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA: Sodium azide, 9-AA: 9-Aminoacridine,

2-AA: 2-Aminoanthracene

Study No. H-09002

Appendix 3. Reverse mutation test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in *S.typhimurium* and *E.coli* (Mutagenicity test 2)

With(+) or Without(-) S9 mix	Test substance concentration (μ g/plate)	Number of revertants(number of colonies/plate) ^{a)}				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
S9mix (-)	Solvent control	102	7	25	17	6
		91 (96)	6 (6)	23 (25)	17 (19)	5 (5)
		95	5	26	23	5
	3.13	99	10	24	23	7
		93 (96)	5 (8)	15 (20)	25 (24)	3 (5)
	6.25	95	6	28	14	4
		101 (98)	3 (5)	19 (24)	21 (18)	5 (5)
12.5	102	6	28	20	3	
	109 (106)	8 (7)	29 (29)	22 (21)	2 (3)	
25	89	6	23	19	5	
	91 (90)	8 (7)	30 (27)	22 (21)	4 (5)	
50	53 *	2 *	13 *	10 *	0 *	
	69 *(61)	4 *(3)	8 *(11)	14 *(12)	0 *(0)	
S9mix (+)	Solvent control	112	7	27	31	8
		111 (113)	9 (8)	28 (30)	30 (30)	7 (9)
		115	9	36	28	12
	6.25	107	8	25	—	10
		120 (114)	8 (8)	36 (31)	— (—)	7 (9)
	12.5	125	9	35	34	12
		112 (119)	9 (9)	24 (30)	34 (34)	9 (11)
	25	107	13	30	31	8
114 (111)		8 (11)	29 (30)	30 (31)	5 (7)	
50	115	7	23	39	9	
	95 (105)	4 (6)	30 (27)	41 (40)	9 (9)	
100	81 *	4 *	21 *	21	8 *	
	90 *(86)	5 *(5)	25 *(23)	36 (29)	9 *(9)	
200	—	—	—	0 *	—	
	— (—)	— (—)	— (—)	0 *(0)	— (—)	
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration (μ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	387 415 (401)	321 308 (315)	195 211 (203)	552 527 (540)	395 410 (403)
Positive control requiring S9 mix	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration (μ g/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	1010 1118 (1064)	272 255 (264)	1142 1054 (1098)	527 522 (525)	245 222 (234)

a) : The average number of colonies in each concentration.

* : Inhibition against growth of bacteria.

Solvent : Dimethyl sulfoxide

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA: Sodium azide, 9-AA: 9-Aminoacridine,

2-AA: 2-Aminoanthracene

Study No. H-09002

I. 要 約

3,4-ジクロロベンジルクロリドの変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株(CHL/IU 細胞)を用いて、短時間処理法の S9 無添加および S9 添加培養系列、ならびに連続処理法の 24 時間培養系列にて染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験は、S9 無添加培養系列で 0.035、0.03、0.025、0.02 mg/mL、S9 添加培養系列で 0.17、0.12、0.07、0.035 mg/mL、24 時間培養系列で 0.03、0.025、0.02、0.015 mg/mL のそれぞれ 4 用量で実施した。

その結果、被験物質で処理した全ての培養系列において構造異常を有する細胞（構造異常細胞）あるいは数的異常細胞（倍数体）の出現頻度は陰性対照群と同程度であった。なお、被験物質の沈殿は認められなかった。

一方、各培養系列の陽性対照群では、構造異常を有する細胞の出現頻度に顕著な増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下における 3,4-ジクロロベンジルクロリドの染色体異常誘発性は陰性と判断された。

II. 試験目的

3,4-ジクロロベンジルクロリドについては乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無を検討した。

III. 試験材料および方法

1. 被験物質^注

- | | |
|------------------|--|
| (1) 名称 | 3,4-ジクロロベンジルクロリド |
| (2) 別名 (商品名) | 3,4-Dichlorobenzyl chloride, 97% |
| (3) CAS No. | 102-47-6 |
| (4) 化学式 | $C_7H_5Cl_3$ |
| (5) 分子量 | 195.47 |
| (6) Lot No. | 10808AH |
| (7) 純度 | 99.9% |
| (8) 外観 | 無色透明液体 |
| (9) 保管条件 | 室温 |
| (10) 同一性 | 提供された情報と送付された被験物質のラベルを目視により比較し、同一であることを確認した。 |
| (11) 安定性 | 試験受託者で保管している同じロット番号の被験物質について、試験受託者にて安定性分析を実施した。その結果、約 16 週間保存後において安定であったため、当該試験の実験期間中においても安定であったと判断した。 |
| (12) 提供者 (試験受託者) | |
| 名称 | 日生研株式会社 |
| 所在地 | 東京都青梅市新町 9-2221-1 |
| (13) 残余被験物質の処分 | 残余被験物質はサンプルとして少量採取した後、試験受託者に返却する。 |

^注: 本被験物質は、Sigma-Aldrich 社製造の製品 (3,4-Dichlorobenzyl chloride, 97%) を試験受託者が購入したものである。特性は製造元の情報による。

2. 対照物質

(1) 陰性対照物質

Dimethyl Sulfoxide (DMSO、特級、Lot No. CDQ4624、和光純薬工業株式会社) を用いた。

(2) 陽性対照物質

① Mitomycin C (MMC)

MMC (Lot No. KLH1017、和光純薬工業株式会社) は注射用蒸留水 (局方、Lot No. 61008D、扶桑薬品工業株式会社) で溶解し、生理食塩液 (局方、Lot No. 60820D、扶桑薬品工業株式会社) で段階希釈して 10 $\mu\text{g/mL}$ (最終濃度; 0.1 $\mu\text{g/mL}$) となるように調製後、 -20°C 以下 (型式: GR-W22A、冷凍冷蔵庫、株式会社東芝) に保存したものを連続処理法および短時間処理法の S9 無添加培養系列の場合に用時解凍して用いた。

② Benzo[a]pyrene (B[a]P)

B[a]P (Lot No. KLG2702、和光純薬工業株式会社) は 4 mg/mL (最終濃度; 20 $\mu\text{g/mL}$) となるように DMSO (特級、Lot No. PEL2769、和光純薬工業株式会社) に溶解し、 -80°C 以下 (型式: MDF-192AT、超低温フリーザー、三洋電機特機株式会社) に保存したものを短時間処理法の S9 添加培養系列の場合に用時解凍して用いた。

3. 被験物質の用量および調製

(1) 用量

細胞増殖抑制試験では 0.003、0.008、0.025、0.074、0.222、0.667、2 mg/mL (最終濃度)、細胞増殖抑制試験 2 回目の短時間処理法の S9 無添加培養系列では 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07 mg/mL (最終濃度)、連続処理法の 24 時間培養系列では 0.005、0.01、0.015、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL (最終濃度) とした。また、染色体異常試験の短時間処理法の S9 無添加培養系列では 0.02、0.025、0.03、0.035 mg/mL (最終濃度)、S9 添加培養系列では 0.035、0.07、0.12、0.17 mg/mL (最終濃度)、連続処理法の 24 時間培養系列では 0.015、0.02、0.025、0.03 mg/mL (最終濃度) とした。

(2) 使用した溶媒および溶媒選択の理由

DMSO (特級、Lot No. CDQ4624、和光純薬工業株式会社) を用いた。事前に溶媒に対する溶解性の検討を実施した結果、水には不溶であったが DMSO には任意の割合で溶解したことから、DMSO を選択した。

(3) 調製方法

被験物質を高精度・分析用セミ・マイクロ電子天びん（型式：ER-182A、株式会社エー・アンド・デイ）で、細胞増殖抑制試験で 1000 mg（実秤量値：1001.0 mg）、細胞増殖抑制試験 2 回目で 70 mg（実秤量値：70.2 mg）、染色体異常試験では 85 mg（実秤量値：85.2 mg）秤量後、DMSO に溶解させ、それぞれ 5 mL、10 mL および 5 mL にメスアップしたものを最高用量とし、段階希釈して試験に供した。なお、被験物質液は用時調製した。また、被験物質液の状態を調製時に確認した結果、発熱、発泡、着色（変色）はなかった。

4. 使用細胞

本邦で染色体異常試験に汎用されており、検出感度に優れているチャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を使用した。使用株化細胞は 1991 年 10 月 31 日、国立医薬品食品衛生研究所（旧名：国立衛生試験所）より入手した。なお、同株化細胞は入手後培養し、石館の方法¹⁾で、液体窒素容器中で凍結保存した。また、細胞株の保存ロットについてマイコプラズマの汚染がないものを使用した。

5. 培養液

(1) 培養液

Eagle's Minimum Essential Medium (MEM ; Lot No.464676、GIBCO、Invitrogen)

(2) 添加血清

Bovine serum (BS ; Lot No. 687676、GIBCO、Invitrogen)

(3) 調製

NaHCO₃（特級、Lot No. WKF0320、和光純薬工業株式会社）2.2 g を純水 950 mL に溶解させ、さらに MEM 9.6 g を加え溶解させた。これを 0.1 mol/L HCl で pH 7.2 に調整し、シリンジフィルター（0.2 μm、IWAKI GLASS）を用いて濾過滅菌した。その後 900 mL を採取し、非働化した BS を 100 mL 加えたものを使用した。

6. ラット肝ホモジネート（S9）および S9 mix の調製

(1) S9 の種類と購入先および保存法

Phenobarbital および 5,6-Benzoflavone で誘導された Sprague-Dawley 系雄性ラットの S9 (Lot No. RAA-590) をキッコマン株式会社から購入し、-80℃ 以下（型式：MDF-192AT、サンヨー超低温フリーザー、三洋電機メディカシステム株式会社）で保存した、製造後 6 ヶ月以内のものを用時に解凍して使用した。

(2) S9 mix の組成と調製法

1 mL あたりの S9 mix の組成を以下に示す。

成 分	組 成
S9	0.3 mL (30%)
MgCl ₂	5 μmol
KCl	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol

S9 mix は上記組成で必要量を用時調製した。調製方法として、グルコース-6-リン酸 (Lot No. 118803) および NADP (Lot No. 045604、以上、オリエンタル酵母工業株式会社) を純水に溶解し、これに 50 mmol/L MgCl₂、330 mmol/L KCl の混合液、さらに、HEPES 緩衝液を混合させ、シリンジフィルター (0.2 μm、IWAKI GLASS) で濾過滅菌した後、S9 を加えた。

7. 試験操作

試験は石館の方法¹⁾に従って実施した。培養系列として短時間処理法の S9 無添加および S9 添加培養系列、ならびに連続処理法の 24 時間時間培養系列の計 3 系列を設定した。ただし、細胞増殖抑制試験 2 回目は S9 無添加培養系列および 24 時間培養系列のみ実施した。

識別方法はシャーレの側面および蓋に油性インキで試験を識別する符合およびシャーレを識別する番号を記入した。

(1) 前培養

凍結保存された細胞を解凍後、5 mL の培養液を用いて 25 cm² 細胞培養用フラスコ (Becton Dickinson labware) に入れ、CO₂ インキュベーター (型式: 3110 シリーズ、サーモエレクトロン株式会社) で培養した (実測値: CO₂ 濃度 5%、温度 37.0℃、湿度 95%)。培養終了後、トリプシン処理して浮遊させた細胞を 1000rpm で 5 分間遠心分離 (型式: 5800、ユニバーサル冷却遠心機、久保田商事株式会社) して集め新鮮培養液に懸濁した後、血球計算盤を用いて細胞数を計数した。計数結果から、細胞数が 1×10⁴ cells/mL となるように新鮮培養液で希釈調整した。

(2) 細胞増殖抑制試験

継代培養後、 1×10^4 cells/mL に調整した細胞浮遊液を 35 mm 細胞培養用シャーレ (Becton Dickinson labware) に 2 mL ずつ播き (継代数 17) 3 日間培養した後、全シャーレに通し番号を記入し、連続処理法の 24 時間培養系列、短時間処理法の S9 添加および S9 無添加培養系列の計 3 系列に分別した。なお、各培養系列の各用量について 2 枚ずつのシャーレを使用した。連続処理法の場合には各シャーレに陰性対照物質または被験物質液を 0.01 mL/mL ずつ加え、CO₂ 濃度 5%、温度 37.0℃、湿度 95% に設定した CO₂ インキュベーター (型式: MIP-3158 サーモエレクトロン株式会社) で 24 時間培養した。

短時間処理法の S9 添加および S9 無添加培養系列の場合には、S9 添加培養系列のみ S9 の最終濃度が 5% となる量の S9 mix を加え、その後、各シャーレに連続処理法と同様な条件で陰性対照物質または各被験物質液を加えた。両系列とも 6 時間培養後にシャーレ内を生理食塩液で洗浄した後、新鮮培地を加え、さらに CO₂ インキュベーター内で 18 時間培養した。

培養終了後、シャーレ内を生理食塩液で洗浄後、細胞を 10%ホルマリン水溶液で固定した。その後 0.1%クリスタル・バイオレットで 10 分間染色したあと、水洗、乾燥させた。これをモノセレーター(オリンパス光学工業株式会社)を用いてそれぞれのシャーレの染色性から間接的に細胞増殖率を測定した。得られた結果を図示し、概略の 50%細胞増殖抑制濃度を求めた。

(3) 細胞増殖抑制試験 2 回目

短時間処理法の S9 無添加培養系列および連続処理法の 24 時間培養系列について、細胞増殖抑制試験と同様の方法で行った。試験には継代数 20 の細胞を用いた。

(4) 染色体異常試験

継代培養した細胞浮遊液を血球計算板を用いて細胞数を確認した後、 1×10^4 cells/mL に希釈調整し、必要枚数の 60 mm 細胞培養用シャーレ (標本作製用、Becton Dickinson labware) に 5 mL、35 mm 細胞培養用シャーレ (細胞増殖率測定用) に 2 mL ずつ入れた (継代数 22)。3 日間培養した後、連続処理法の 24 時間培養系列、短時間処理法の S9 添加および S9 無添加培養系列の計 3 系列に分別し、各系列について陰性対照群、陽性対照群をおいた。なお、各培養系列、用量につき標本作製用 2 枚、細胞増殖率測定用 1 枚とした。

連続処理法の 24 時間培養系列では、シャーレに陰性対照物質および各濃度の被験物質液を 0.01 mL/mL、陽性対照物質の MMC を 0.01 mL/mL 添加して 24 時間培養した。

短時間処理法の S9 添加および S9 無添加培養系列の場合、S9 添加培養系列のみ

S9 の最終濃度が 5%となる量の S9 mix を加え、さらにシャーレに連続処理法と同様な条件で陰性対照物質または各濃度の被験物質液を加え、陽性対照物質として S9 無添加培養系列の場合は MMC を 0.01 mL/mL、S9 添加培養系列の場合は B[a]P を 0.005 mL/mL 加えた。両系列とも 6 時間培養後にシャーレ内を生理食塩液で洗浄した後、新鮮培地を加え、さらに 18 時間培養した。連続処理法および短時間処理法ともに温度 37.0℃、湿度 95%、CO₂ 濃度 5%に設定した CO₂ インキュベーター内で培養した。

全ての培養系列の全シャーレについて、培養終了 2 時間前にコルセミド溶液 (Lot No.PEL7660、和光純薬工業株式会社) を最終濃度が 0.2 μg/mL となるよう加え、分裂中期細胞を蓄積させた。培養終了後、37℃で温めた 0.25%トリプシン溶液で細胞を剥離し、1000 rpm で 5 分間遠心分離 (テーブルトップ遠心機、型式:8100、久保田商事株式会社) して細胞を集めた後、0.075 mol/L KCl 溶液により 37℃で 15 分間低張処理した。冷却したカルノア液 (メタノール:酢酸の容量比が 3:1 の混合液) を 1 mL 加え、遠心分離をして上清を捨て、さらに 5 mL のカルノア液で細胞を固定した。再び遠心分離し、以下、同様な処理を 2 回繰り返した。その後、濡らしたガーゼ上のスライドガラス 2 ヶ所に、得られた細胞懸濁液を 1~2 滴ずつ滴下した。

乾燥させたスライドガラスを 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8) で 1.5%に調製したギムザ染色液で約 15 分間染色し、水洗、乾燥させてプレート標本とし、作製したプレート標本にランダムイズした番号を割り当てた。

全ての培養系列について、培養終了時に陰性対照群と各用量群の細胞増殖率を細胞増殖抑制試験と同様な方法で測定した。

8. 観 察

よく広がった 1 用量当たり 200 個 (各プレート当たり 100 個) の分裂中期像を、倍率が 750 倍の微分干渉型生物顕微鏡 (BHS-323N、株式会社オリンパス) で観察した。

染色体異常の分類については、数的異常は倍数体、構造異常は染色分体型切断(ctb)、染色分体型交換(cte)、染色体型切断(csb)、染色体型交換(cse)およびその他(o)に分類した。染色分体あるいは染色体型ギャップ(g)については上記分類とは別に記録した。ギャップの判定基準は染色分体幅よりも狭い非染色性部位のものとした。その他とは 1 個の分裂中期像に多数のギャップ、切断などがあった場合に断片化 (Frg.) として記録した。これらの異常を 1 個でも有する細胞を異常細胞 1 個として記録した。

染色体が観察できる細胞がない場合、またはプレート当たり 50 個以下である場合は Toxic (TOX) として記録した。

9.判 定

染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照群と比較して明らかに上昇し、かつ、用量依存性が認められた場合、または、単独な用量で明らかに上昇し、かつ、再現性が認められた場合には陽性と判定し、それ以外は陰性と判定した。

ギャップについては、構造異常に含めない結果で表記し、総合判定でもギャップを含めない結果で評価した。

10.統計学的解析

統計学的手法は用いなかった。

IV. 試験結果

50%細胞増殖抑制濃度を求めるために0.003、0.008、0.025、0.074、0.222、0.667および2 mg/mLの用量で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、いずれの培養系列においても細胞増殖率の顕著な減少が認められ、短時間処理法のS9添加培養系列におけ50%細胞増殖抑制濃度は約0.1 mg/mLと求められた。しかしながら短時間処理法のS9無添加培養系列および連続処理法の24時間培養系列では、急激な細胞増殖抑制作用により適切な50%細胞増殖抑制濃度を求めることできなかった。なお、被験物質の沈殿は0.222 mg/mL以上で認められた (Fig. 1-1、1-2、Table 1)。

細胞増殖抑制試験の結果から、短時間処理法のS9無添加培養系列では、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07 mg/mL、連続処理法の24時間培養系列では、0.005、0.01、0.015、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mLのそれぞれ7用量で細胞増殖抑制試験2回目を実施した。その結果、いずれの培養系列においても細胞増殖率の減少が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法のS9無添加培養系列で約0.028 mg/mL、連続処理法の24時間培養系列で約0.025 mg/mLと求められた。なお、被験物質の沈殿は認められなかった (Fig. 2-1、2-2、Table 2)。

以上の結果から染色体異常試験は、短時間処理法のS9無添加培養系列では0.02、0.025、0.03、0.035 mg/mL、S9添加培養系列では0.035、0.07、0.12、0.17 mg/mL、連続処理法の24時間培養系列では0.015、0.02、0.025、0.03 mg/mLのそれぞれ4用量で実施した。その結果、いずれの培養系列においても陰性対照の構造異常細胞の出現頻度は0.5%、数的異常(倍数体)細胞の出現頻度は0.0%であった。また、被験物質処理群ではいずれも、構造異常細胞の出現頻度は0.5~1.5%、数的異常(倍数体)細胞の出現頻度は0.0%であり、陰性対照群と同程度であった。被験物質の沈殿は認められなかった。一方、各陽性対照群では、それぞれ染色体の構造異常細胞の出現頻度に顕著な増加が認められ、構造異常細胞の出現頻度は、短時間処理法のS9無添加およびS9添加培養系列では25.5および41.0%、連続処理法の24時間培養系列では36.5%であった。また、全ての培養系列での数的異常(倍数体)細胞の出現頻度は0.0%であった。染色体異常試験で測定した細胞増殖率は、短時間処理法のS9無添加培養系列の0.02、0.025、0.03、0.035 mg/mLではそれぞれ86、60、39、32%、S9添加培養系列の0.035、0.07、0.12、0.17 mg/mLではそれぞれ93、77、49、29%、連続処理法の24時間培養系列の0.015、0.02、0.025、0.03 mg/mLでは99、73、48、30%であった (Fig. 3-1、3-2、Appendix 1、2)。

V. 考察および結論

3,4-ジクロロベンジルクロリドの変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を用いて短時間処理法の S9 無添加および S9 添加培養系列、ならびに連続処理法の 24 時間培養系列にて、染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験および同試験 2 回目の結果、いずれの培養系列においても細胞増殖率の減少が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法の S9 無添加培養系列で約 0.028 mg/mL、S9 添加培養系列で約 0.1 mg/mL、連続処理法の 24 時間培養系列で約 0.025 mg/mL と求められた。なお、被験物質の沈殿は細胞増殖抑制試験の 0.222mg/mL 以上で認められた。

これらのことより染色体異常試験の用量は、強い細胞毒性を示す用量から、弱い細胞毒性を示す用量あるいは細胞毒性を示さない用量まで網羅されるように設定した。すなわち短時間処理法の S9 無添加培養系列では 0.02、0.025、0.03、0.035 mg/mL、S9 添加培養系列では 0.035、0.07、0.12、0.17 mg/mL、連続処理法の 24 時間培養系列では 0.015、0.02、0.025、0.03 mg/mL のそれぞれ 4 用量とした。その結果、被験物質で処理した全ての培養系列において、構造異常細胞あるいは数的異常（倍数体）細胞の出現頻度は陰性対照群と同程度であった。被験物質の沈殿は認められなかった。

各陽性対照群では、構造異常を有する細胞の出現頻度が顕著に増加し、陰性および陽性各対照群では、共にバックグランドデータ（添付資料 1）の Mean \pm 2.5S.D. の範囲内であったことから、当該試験が適正な条件下で実施されたことが確認された。

また、染色体異常試験の細胞増殖率より、いずれの培養系列においても強い細胞毒性を示す用量から、弱い細胞毒性を示す用量あるいは細胞毒性を示さない用量まで網羅されている。これらのことから当該試験の用量設定は適切である事が示された。

以上の結果から、当該試験条件下における 3,4-ジクロロベンジルクロリドの染色体異常誘発性は陰性と判定された。

VI. 参考文献

- 1) 石館基：染色体異常による変異原の検出法、変異原と毒性、1 (4)、64-73、1978.

1. 要約

3,4-ジクロロベンジルクロリドの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系ラットを用いて実施した。雌雄とも5群構成とし、1群には媒体である0.5% CMCを、他の4群には被験物質を、それぞれ10、30、100および300 mg/kgの用量で28日間にわたり強制経口投与した。雌雄とも回復試験に用いる動物を含む対照群および300 mg/kg投与群は各12匹、その他の群は各6匹とした。

投与期間中に300 mg/kg群の雌1匹が死亡し、胃粘膜黄色調、腺胃粘膜の暗赤色斑が認められ、組織学的には前胃の糜爛、細胞浸潤が観察された。

一般状態の変化としては、300 mg/kg群の雌雄で投与直後に一過性の流涎あるいは流涙が見られる例があった。

300 mg/kg群の雌雄で腎臓および肝臓重量の増加が認められた。300 mg/kg群の尿検査では、雄の尿量、沈渣中の円柱および雌の沈渣中の上皮細胞の増加が認められた。

病理学的検査では、被験物質に起因する前胃の変化が10 mg/kg以上の群の雌雄で、腎臓の変化が100 mg/kg以上の群の雄および300 mg/kg群の雌で観察された。前胃では粘膜の肥厚があり、組織学的には前胃粘膜の角化亢進、扁平上皮の過形成が観察され、なかには糜爛、細胞浸潤が認められた。腎臓では、組織学的には100 mg/kg以上の群の雄に尿細管上皮の硝子滴沈着が、300 mg/kg群の雌雄に好塩基性尿細管上皮の増加、尿細管の拡張、尿細管上皮の変性が、雌では尿細管の壊死および間質の細胞浸潤が観察された。

14日間の回復期間により、被験物質投与に起因した腎臓の好塩基性尿細管上皮の増加、雄の肝臓および雌雄の腎臓の相対重量の高値等の変化は残存するが、前胃粘膜の扁平上皮の過形成、腎臓の尿細管の拡張および尿細管上皮の硝子滴沈着、間質の細胞浸潤等の変化は程度および発生率において回復あるいは回復傾向を示した。

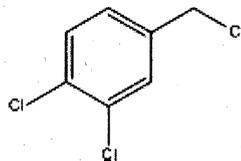
以上の結果、3,4-ジクロロベンジルクロリドの28日間反復経口投与による無影響量は雌雄ともに10 mg/kg/day未満であると判断された。

2. 被験物質および媒体

2.1. 被験物質(Appendix 55)

コード名： 3,4-ジクロロベンジルクロリド 3,4-dichlorobenzyl chloride

構造式：



組成式： $C_7H_5Cl_3$

ロット番号： 10808AH

CAS 番号： 102-47-6

分子量： 195.47

純度： 99.9%
性状： 無色透明液体
安定性： 「3,4-ジクロロベンジルクロリドの開封後室温暗所における密閉保存下での長期安定性試験(試験番号：P-56)」において、保存開始後約 32 週間の安定性が得られ、投与期間における安定性が確認されている。
購入元： Sigma-Aldrich Japan K.K.(東京都品川区)
保管条件： 室温(実測温度範囲：8~28℃)、暗所で密閉して保管した。
保管場所： 被験物質保管ロッカー No. R4
被験物質取り扱い上の注意事項： 取扱い時には保護眼鏡(ゴーグル)、マスクおよび手袋を着用し、ドラフト内で取り扱った。
被験物質サンプルの保管： 同一ロットの被験物質 5.0g を採取し(2009 年 7 月 22 日)、保管用サンプルとして、試験施設内に保管した。
残余被験物質の処分： 当該試験より除外して、当社試薬棚に移管した。

2.2. 媒体

名称： 0.5% Sodium carboxymethyl cellulose(CMC)
CMC
製造元： 国産化学株式会社(東京都中央区)
ロット番号： II15424
注射用水
製造元： 株式会社大塚製薬工場(徳島県鳴門市)
ロット番号： 8C75N
媒体調製方法： 注射用水 100 mL に 0.5 g の割合で CMC を加え溶解した。
保存方法： CMC、注射用水および調製済み媒体は室温(温度実測値：15~25℃)保存した。媒体は調製後 10 日以内に使用した。
保管場所： 被験物質等保管室、分注後は被験物質保管ロッカー No. R10

3. 試験方法

3.1. 使用動物

3.1.1. 動物種(系統)およびその選択理由

動物は日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター(神奈川県厚木市)で生産された Crl:CD(SD)ラット(SPF/VAF)を使用した。ラットは化学物質の反復経口投与毒性試験で頻繁に用いられる動物種であり、本系統については当社のもつ背景データが豊富であるため使用した。

3.1.2. 入荷時の週齢、購入動物数および体重範囲

雌雄ともに 4 週齢の動物を各 47 匹購入した(雌雄とも 2009 年 7 月 23 日)。入荷時の体重範囲は、雄 71~82 g、雌 61~73 g であった。これは試験計画書に記

載した体重範囲(雄 50~110 g、雌 50~110 g)内であった。

3.1.3. 検疫・馴化期間

入荷後、動物は雄 12 日間、雌 13 日間の検疫・馴化期間をおいた。入荷時、触診を含む観察を行った。また、検疫・馴化期間中は毎日一般状態の観察を行った。馴化期間中に異常が観察された動物はいなかった。

3.1.4. 群分け

投与開始前日(試験 -1 日)に全動物の体重を測定した。このとき、馴化期間中に異常が観察された動物および低あるいは高体重の動物を除外対象とし、その他の健康状態の良い動物を対象として体重層別に無作為に各群に配分した。群分け後、除外動物はジエチルエーテル深麻酔下で安楽殺した。

3.2. 動物飼育管理

3.2.1. 飼育環境

バリアーシステム下の飼育室(4 号棟、飼育室 43)で、室温は 20~25℃、湿度は 30~70%、照明時間は 7~19 時の 12 時間、換気(オールフレッシュエアー)回数は 10 回転/時以上に設定した。試験期間中の飼育室の温度(最低 22℃、最高 24℃)および湿度(最低 43%、最高 69%)は設定範囲内であった。

3.2.2. ケージおよび収容数

動物は、検疫・馴化飼育期間および投与期間を通じて幅 21 cm、奥行き 35 cm、高さ 20 cm の単線メッシュ(ステンレス)製ケージに、個別に収容した。

3.2.3. 動物の識別

群分け前は、尾の腹側面に油性インキで仮番号(雄：1~47、雌：51~97)を記入して識別した。群分け後は、尾の背側面に油性インキで個体番号を記入して識別した。

3.2.4. 群およびケージの識別

試験番号、群および個体番号をカードに記入し、カードケースを用いてケージに装着して識別した。

3.2.5. 飼料(Appendix 56)

飼料にはラット用固形飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社、東京都板橋区)を用いた。使用した飼料と同一ロット(ロット番号 090512、090706)の飼料成分および微生物の有無は製造業者で検査し、飼料中の有害物質の濃度は Eurofins Analytics K.K.(東京都板橋区)で測定した。分析結果を入手した結果、いずれも設定した基準値の範囲内であった。

3.2.6. 飲料水(Appendix 57)

水道水(井戸水)を給水瓶(ポリカーボネイト製)で自由に摂取させた。水道水は、試験施設において原水(井戸水)に次亜塩素酸ナトリウムを添加して消毒したものを与えた(動物試験前、期間中および期間後の塩素濃度：0.35～0.50ppm)。動物試験開始前の水道水の混入物および有害物質について株式会社ヤクルト本社中央研究所付属分析センター(東京都国立市)で検査したところ、水道法水質基準値の範囲内であることを確認した。

3.3. 試験の実施

3.3.1. 投与用量および群の構成

試験群の投与用量は 0 mg/kg 体重(対照群)、10 mg/kg 体重(最低用量群)、30 mg/kg 体重(中間用量群)、100 mg/kg 体重(高用量群)および 300 mg/kg 体重(最高用量群)とした。本試験動物として、各群に雌雄各 6 匹を配分し、5 群で雌雄合計 60 匹を用いた。また、回復試験動物として対照群および最高用量群に雌雄各 6 匹を配分し、2 群で雌雄合計 24 匹を用いた。

本試験群

群	投与用量 (mg/kg 体重)	動物数および個体番号			
		雄		雌	
A 対照	0	6	101 ~ 106	6	151 ~ 156
B 最低用量	10	6	201 ~ 206	6	251 ~ 256
C 中間用量	30	6	301 ~ 306	6	351 ~ 356
D 高用量	100	6	401 ~ 406	6	451 ~ 456
E 最高用量	300	6	501 ~ 506	6	551 ~ 556

回復試験群

群	投与用量 (mg/kg 体重)	動物数および個体番号			
		雄		雌	
A 対照	0	6	107 ~ 112	6	157 ~ 162
E 最高用量	300	6	507 ~ 512	6	557 ~ 562

3.3.2. 投与用量の設定理由

先に実施した「3,4-ジクロロベンジルクロリドのラットにおける 14 日間反復経口投与毒性予備試験(試験番号：X-99p)」では、被験物質を 1000 mg/kg、300 mg/kg、100 mg/kg および 30 mg/kg の用量で 14 日間強制経口投与した。その結果、1000 mg/kg、300 mg/kg、100 mg/kg および 30 mg/kg 群の死亡率は雌雄ともそれぞれ 100%、0%、0%および 0%となり、1000 mg/kg の用量は明らかに毒性量であった。300 mg/kg 群の雄ではクレアチニンの増加が用量に関連してみられ、雌において前胃粘膜の赤色斑が観察されたことから、被験物質投与との関連が疑われた。本被験物質と類似の化学構造をもつ 1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンのラットにおける反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験¹⁾では、10

mg/kg 以上の群の雄および 50 mg/kg 群の雌に前胃壁の肥厚、扁平上皮の増生、糜爛および潰瘍が認められている。これらの結果に基づき、最高用量には明らかな毒性発現が期待できる 300 mg/kg とし、公比約 3 で高用量、中間用量および最低用量をそれぞれ 100 mg/kg、30 mg/kg および 10 mg/kg に設定した。対照群には媒体を投与した。

3.4. 投与方法、投与経路および期間の選択理由

3.4.1. 投与方法

投与期間中は毎日午前中に経口投与用胃管を用いて投与した。

3.4.2. 投与経路および投与期間の選択理由

「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、環保企発第 031121002 号、平成 18 年 11 月 20 日最終改正)に従い、投与経路は強制経口投与とし、投与期間は 28 日間とした。

3.5. 被験物質投与液の調製方法、投与液量および投与液中の濃度測定

3.5.1. 被験物質投与液の調製方法

先に実施した「3,4-ジクロロベンジルクロリドの 0.5% (w/v) CMC 溶液中での安定性試験(試験番号：P-57)」において、被験物質の媒体内における 28 日間の安定性が確認されていることから、2 週間分の投与液をそれぞれ投与開始前週(試験-7 日、第 1 回)および試験 2 週(試験 8 日および試験 10 日(最低用量群再調製)、第 2 回)に調製した。

調製は、2 週間分の所定量の被験物質をディスポーザブルシリンジでピーカーに量りとり、媒体である 0.5%CMC で共洗いしつつ所定の容量のメスフラスコ内に移してメスアップした後、震盪・混和して乳化した。これらの操作はドラフト内で行った。なお、被験物質の純度は 100%に近似しているため純度換算は行わなかった。対照群には媒体を投与した。

調製した被験物質投与液および媒体は、分注までの間は被験物質等保管室あるいは被験物質保管ロッカー(No.R13、14)内に、投与日毎に小分け後は投与日まで被験物質保管ロッカー(No.R10、R12~15)内に、遮光下、室温(実測値：15~25℃)で密閉保存した。

3.5.2. 投与液量

投与液量は 10 mL/kg 体重とし、直近の体重に基づいて算出した。

3.6. 投与液中の被験物質濃度測定(Appendix 58)

第 1 回および第 2 回被験物質調製日に調製した被験物質投与液について、各用量群の 3 ヶ所から、対照群については 1 ヶ所から分析用サンプルを採取し、被験物質の濃度および均一性を確認した。

その結果、各用量群の投与液中の被験物質濃度は許容範囲である設定濃度の ±10%以内(設定濃度に対する割合：91.3~104.6%)であった。また、各用量群の

投与液中の 3 ヶ所の測定値の変動係数(CV)も許容範囲である 10%以内(2.2～4.1%)であった。

以下に測定方法を示す。

3.6.1. 試薬

- 1) アセトニトリル(残留農薬試験・PCB 試験用、関東化学株式会社、Lot No. 102U1779)
- 2) 精製水
- 3) 注射用水(株式会社大塚製薬工場、Lot No.8C75N)
- 4) Sodium Carboxymethyl Cellulose (国産化学株式会社)

3.6.2. 標準原液の調製

被験物質である 3,4-ジクロロベンジルククロリド(Lot No. 10808AH)を標準物質として使用した。3,4-ジクロロベンジルククロリド約 100.1 mg (純度による補正值)を正確に量りとり、アセトニトリルを加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした(1000.00 µg/mL)。

3.6.3. 標準溶液の調製

標準原液をアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液で希釈し、次表のように標準溶液を調製した。

標準溶液	採取溶液	分取量(mL)	総量(mL)	標準溶液濃度(µg/mL)
ST5	標準原液	0.2	100	2.00
ST4	ST5	50	100	1.00
ST3	ST4	50	100	0.50
ST2	ST3	40	100	0.20
ST1	ST2	40	100	0.08

3.6.4. 分析試料の調製

1) 0.0 mg/mL 濃度

0.0 mg/mL 濃度の被験物質投与液 5.000 mL をマイクロピペットで 200 mL 容三角フラスコに量りとり、ホールピペットおよびマイクロピペットを用いてアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液 95 mL を加え、20 分間横振り震盪した。上清液からマイクロピペットで 2.000 mL を量りとり、アセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。この溶液を分析試料とした。

2) 1.0 mg/mL 濃度

1.0 mg/mL 濃度の被験物質投与液 5.000 mL をマイクロピペットで 200 mL 容三角フラスコに量りとり、ホールピペットおよびマイクロピペットを用いてアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液 95 mL を加え、20 分間横振り震盪した。上清液からマイクロピペットで 2.000 mL を量りとり、アセトニトリル/精製水

(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。この溶液を分析試料とした。

3) 3.0 mg/mL 濃度

3.0 mg/mL 濃度の被験物質投与液 5.000 mL をマイクロピペットで 200 mL 容三角フラスコに量りとり、ホールピペットおよびマイクロピペットを用いてアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液 95 mL を加え、20 分間横振り震盪した。上清液からマイクロピペットで 2.000 mL を量りとり、アセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。さらに、その溶液からホールピペットで 40 mL を量りとりアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。この溶液を分析試料とした。

4) 10.0 mg/mL 濃度

10.0 mg/mL 濃度の被験物質投与液 5.000 mL をマイクロピペットで 200 mL 容三角フラスコに量りとり、ホールピペットおよびマイクロピペットを用いてアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液 95 mL を加え、20 分間横振り震盪した。上清液からマイクロピペットで 2.000 mL を量りとり、アセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。さらに、その溶液からマイクロピペットで 10 mL を量りとりアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。この溶液を分析試料とした。

5) 30.0 mg/mL 濃度

30.0 mg/mL 濃度の被験物質投与液 5.000 mL をマイクロピペットで 200 mL 容三角フラスコに量りとり、ホールピペットおよびマイクロピペットを用いてアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液 95 mL を加え、20 分間横振り震盪した。上清液からマイクロピペットで 2.000 mL を量りとり、アセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。さらに、その溶液からマイクロピペットで 4.000 mL を量りとりアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。この溶液を分析試料とした。

3.6.5. HPLC 条件

HPLC :	Agilent 1100 series LC/MSD
カラム :	COSMOSIL 5C18-MS- II Packed Column(4.6×250 mm、5 μm、Nacalai Tesque, Inc.、Manf. No. K64295)
ガードカラム :	COSMOSIL 5C18-MS- II Guard Column(4.6×10 mm、5 μm、Nacalai Tesque, Inc.、Lot No. M9A2562)
カラム温度 :	40°Cに設定(実測値 : 40.0°C)
移動相 :	アセトニトリル/精製水=70/30 (v/v)
注入量 :	20 μL
検出波長 :	UV 202 nm
オートサンプラー温度 :	4°Cに設定(実測値 : 3.9~4.1°C)

統計解析ソフトは SAS(SAS Institute Japan 株式会社、東京都港区)および EXSUS(株式会社シーエーシー、東京都中央区)を使用した。

4. 試験成績

4.1. 死亡率(Table 1~4)

300 mg/kg 群において、試験 6 日に雌 1 匹(個体番号 561)が死亡した。300 mg/kg 群の雌の死亡率は 8.3%であった。

投与期間および回復期間を通じて、その他の投与群および対照群に死亡した動物はいなかった。

4.2. 一般状態(Table 5~8, Appendix 1~4)

300 mg/kg 群では、雄では流涎が試験 8 日および 9 日に 2 匹、試験 11 日から 16 日に 1 匹に観察され、流涙が試験 14 日および 15 日に 1 匹に観察された。同群の雌 1 匹には、試験 2 日に流涙および流涎、試験 5 日に自発運動の減少が観察され、試験 6 日に死亡した。

その他の投与群および対照群に異常な所見は投与期間中観察されなかった。

回復期間では、300 mg/kg 群および対照群に異常な所見は観察されなかった。

4.3. 詳細な状態の観察(Table 9~12, Appendix 5~8)

投与期間および回復期間を通じて、各投与群および対照群に異常な所見は観察されなかった。

4.4. 機能検査(Table 13 および 14, Appendix 9 および 10)

投与期間および回復期間を通じて、各投与群の雌雄に有意な変化を示す項目はなかった。

4.5. 体重(Table 15~18, Appendix 11~14)

投与期間および回復期間を通じて、各投与群の雌雄の体重に明らかな変動はみられなかった。

4.6. 摂餌量(Table 19~22, Appendix 15~18)

300 mg/kg 群では、試験 4 週の雄の摂餌量が対照群に比較して有意な高値を示した。また、同群では回復期間における雄の平均摂餌量が対照群に比較して有意な高値を示した。

その他の投与群の投与期間および回復期間中の摂餌量に明らかな変動はみられなかった。

4.7. 尿検査(Table 23 および 24, Appendix 19 および 20)

投与期間終了時では、300 mg/kg 群の雄の尿量、雄の沈渣中の円柱(Casts)および雌の沈渣中の上皮細胞(Epithelial cell)が有意な高値を示し、雄のケトン体(Ketone)および雌の総蛋白(Protein)が有意な低値を示した。また、100 mg/kg、30

mg/kg および 10mg/kg 群の雄における沈渣中の上皮細胞(Epithelial cell)ならびに 10 mg/kg 群の雌の pH が有意な低値を示した。

4.8. 血液学的検査(Table 25~28、Appendix 21~24)

投与期間終了時では、100 mg/kg および 10 mg/kg 群の雄の白血球百分比における好酸球(Eosino)が有意な増加を示した。

回復期間終了時では、300 mg/kg 群の雄の血小板数(PLT)が有意な高値を示した。

4.9. 血液生化学的検査(Table 29~32、Appendix 25~28)

投与期間終了時では、各投与群の雌雄の検査項目に明らかな変動はみられなかった。

回復試験終了時では、300 mg/kg 群の雄の血糖(GLU)および総コレステロール(TCHO)ならびに雌のナトリウム(Na)が有意な高値を示し、雌の総ビリルビン(TB)が有意な低値を示した。

4.10. 器官重量および体重比(Table 33~40、Appendix 29~36)

投与期間終了時では、300 mg/kg 群の雌雄の肝臓および腎臓(右・左・両側)の絶対重量および相対重量ともに有意な高値を示した。30 mg/kg 群の雌の脾臓の絶対重量が有意な高値を、同群の雌の副腎(左・両側)の相対重量が有意な低値を示した。

回復試験終了時では、300 mg/kg 群の雄の胸腺の絶対重量および相対重量、雄の肝臓および雌雄の腎臓(雄：左・両側、雌：右・両側)の相対重量が有意な高値を、雄の副腎(右)の絶対重量が有意な低値を示した。

4.11. 剖検所見(Table 41~45、Appendix 37~44)

投与期間終了時計画殺動物では、前胃粘膜の肥厚が 10 mg/kg 群の雌 1 匹、300 mg/kg 群の雄 4 匹および雌 3 匹に観察され、300 mg/kg 群の雄に有意差が見られた。胃粘膜の黄色調が 300 mg/kg 群の雌雄各 1 匹に観察された。腺胃粘膜の暗赤色斑が 10 mg/kg 群の雄 2 匹、100 mg/kg 群の雄 1 匹、および 300 mg/kg 群の雌雄各 1 匹に観察された。対照群および 30 mg/kg 群の雌雄に異常な肉眼的変化は観察されなかった。

回復期間終了時計画殺動物では、胃粘膜の黄色調が 300 mg/kg 群の雄 1 匹および雌 2 匹に観察された。対照群の雌雄に異常な肉眼的変化は観察されなかった。

300 mg/kg 群の試験 6 日に死亡した回復試験群の雌 1 匹に、胃粘膜の黄色調、腺胃粘膜の暗赤色斑および脾臓の退色が観察された。

4.12. 病理組織学的所見(Table 46~50、Appendix 45~54)

被験物質投与によると考えられる変化が胃および腎臓に観察され、その他の臓器・器官では観察されなかった。胃および腎臓の所見は以下のようであった。

胃の所見：投与期間終了時計画殺動物には、前胃粘膜の角化亢進が 10 mg/kg 群の雄 1 匹(軽度)、30 mg/kg 群の雄 4 匹(中等度 1 匹・軽度 3 匹)、雌 3 匹(中等度

1匹・軽度2匹)、100 mg/kg群の雌雄各6匹(雄：中等度2匹・軽度4匹、雌：中等度4匹・軽度2匹)および300 mg/kg群の雌雄各6匹(雄：高度3匹・中等度3匹、雌：高度1匹・中等度4匹・軽度1匹)に観察され、30 mg/kg以上の群の雄および100 mg/kg以上の群の雌では有意な増加が見られた。前胃粘膜の扁平上皮の過形成が10 mg/kg群の雌1匹(中等度)、30 mg/kg群の雄2匹(軽度)、雌1匹(軽度)、100 mg/kg群の雌雄各6匹(雄：中等度3匹・軽度3匹、雌：中等度4匹・軽度2匹)、および300 mg/kg群の雌雄各6匹(雄：中等度6匹、雌：中等度5匹・軽度1匹)に観察され、100 mg/kg以上の群の雌雄では有意な増加が見られた。前胃粘膜下織の水腫が10 mg/kg群の雄1匹(軽度)、雌2匹(高度1匹・中等度1匹)、30 mg/kg群の雄1匹(中等度)、雌1匹(中等度)、100 mg/kg群の雄1匹(中等度)、雌2匹(中等度1匹・軽度1匹) および300 mg/kg群の雄3匹(中等度)に観察された。前胃粘膜の細胞浸潤が10 mg/kg群の雄2匹(中等度1匹・軽度1匹)、雌4匹(中等度1匹・軽度3匹)、30 mg/kg群の雄3匹(中等度1匹・軽度2匹)、雌4匹(軽度)、100 mg/kg群の雌1匹(軽度)および300 mg/kg群の雌雄各3匹(雄：中等度1匹・軽度2匹、雌：軽度3匹)に観察され、10 mg/kg群および30 mg/kg群の雌では有意な増加が見られた。前胃粘膜の軽度糜爛が300 mg/kg群の雄1匹に観察された。

腺胃粘膜では粘膜下織の軽度水腫が対照群の雌1匹および300 mg/kg群の雌1匹に、軽度うっ血が10 mg/kg群および300 mg/kg群の雄各1匹に、軽度糜爛が100 mg/kg群の雄1匹および300 mg/kg群の雌1匹にそれぞれ観察された。

回復期間終了時計画殺動物には、前胃粘膜の角化亢進が300 mg/kg群の雄1匹(軽度)、雌4匹(軽度)に観察され、雌に有意な増加が見られた。前胃粘膜の扁平上皮の過形成が300 mg/kg群の雌雄各5匹(雄：軽度5匹、雌：中等度2匹・軽度3匹)に観察され、雌雄に有意な増加が見られた。対照群の雌雄に異常な組織学的変化は観察されなかった。試験6日に死亡した300 mg/kg群の雌の前胃には粘膜下織の軽度水腫、中等度の細胞浸潤および中等度の糜爛が観察された。

腎臓の所見：投与期間終了時計画殺動物には、尿細管上皮の変性が300 mg/kg群の雄3匹(軽度)、雌2匹(軽度)に観察された。好塩基性尿細管上皮の増加が対照群の雄2匹(軽度)、雌1匹(軽度)、10 mg/kg群の雄2匹(軽度)、30 mg/kg群の雄2匹(軽度)、100 mg/kg群の雄1匹(軽度)、雌1匹(軽度)、および300 mg/kg群の雄6匹(軽度)、雌5匹(中等度2匹・軽度3匹)に観察され、300 mg/kg群の雌雄に有意な増加が見られた。尿細管上皮の硝子滴沈着が100 mg/kg群の雄2匹(軽度)および300 mg/kg群の雄6匹(高度1匹・中等度5匹)に観察され、300 mg/kg群に有意な増加が見られた。300 mg/kg群の雄に観察された中等度および高度な硝子滴沈着は抗ラット α_{2U} -グロブリン抗体で陽性を示した。乳頭への軽度石灰沈着が対照群の雄1匹および10 mg/kg群の雌1匹に観察された。尿細管の軽度壊死が300 mg/kg群の雌2匹に観察された。尿細管の軽度拡張が300 mg/kg群の雄4匹、雌4匹に観察され、雌雄ともに有意な増加であった。蛋白円柱が30 mg/kg群の雄1匹、100 mg/kg群の雌1匹、および300 mg/kg群の雌1匹に、間質の線維化が300 mg/kg群の雄2匹、雌1匹に、間質の細胞浸潤が300 mg/kg群の雌3匹に観察されたが、いずれの変化も軽度であった。

回復期間終了時計画殺動物には、好塩基性尿細管上皮の軽度な増加が対照群

の雄 2 匹および 300 mg/kg 群の雄 6 匹雌 5 匹に観察され、300 mg/kg 群の雌雄に有意な増加が見られた。300 mg/kg 群では乳頭への石灰沈着が雄 2 匹に、尿細管の拡張が雌雄各 3 匹、間質の線維化が雌 1 匹に、間質の細胞浸潤が雌 2 匹に観察されたが、いずれの変化も軽度であった。

5. 考察

3,4-ジクロロベンジルクロリドを 10 mg/kg、30 mg/kg、100 mg/kg および 300 mg/kg の用量で雌雄の Crl:CD(SD)SPF ラットに 28 日間にわたって強制経口投与し、その後 14 日間の回復試験期間を設けた。

一般状態の観察では、300 mg/kg 群の雌雄で、投与直後に一過性の流涎あるいは流涙が見られる例があった。この症状は雌雄とも回復試験期間中には観察されなかったことから、被験物質の刺激性²⁾に起因する変化と判断された。

試験 6 日に死亡した 300 mg/kg 群の雌の胃には粘膜黄色調、腺胃粘膜の暗赤色斑が認められ、組織学的には前胃の糜爛、細胞浸潤が観察された。「3,4-ジクロロベンジルクロリドのラットにおける 14 日間反復経口投与毒性予備試験(試験番号: X-99p)」で 1000 mg/kg を投与した死亡例でも剖検時に同様の変化が認められており、本被験物質による毒性で死亡したと考えられた。

反復投与による影響として、病理学的検査では、被験物質に起因する前胃の変化が 10 mg/kg 以上の群の雌雄、腎臓の変化が 100 mg/kg 以上の群の雄および 300 mg/kg 群の雌で観察された。前胃では剖検において前胃粘膜の肥厚が認められ、組織学的には前胃粘膜の角化亢進、扁平上皮の過形成が観察され、なかには糜爛、細胞浸潤も認められた。本被験物質と類似の化学構造で、皮膚や粘膜に対し、刺激性を有することが知られている 1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンを SD 系ラットに反復経口投与した試験¹⁾でも前胃壁の肥厚、扁平上皮の増生、糜爛が認められていることより、それらの変化は本被験物質の前胃粘膜に対する直接的刺激作用によって生じたと推察された。

一方、300 mg/kg 群の雌雄ともに、腎臓重量の増加がみられ、組織学的には 100 mg/kg 以上の群の雄のみに尿細管上皮の硝子滴沈着が、300 mg/kg 群の雌雄に好塩基性尿細管上皮の増加、尿細管の拡張、尿細管上皮の変性が、雌のみに尿細管の壊死および間質の細胞浸潤が観察された。雄ラットのみに認められた尿細管上皮の硝子滴は、免疫組織化学的に α_{2u} -globulin であることが証明された。そのため、これらの病変は、各種の薬物やパラジクロルベンゼンなどの化学物質の投与により沈着が著しく亢進することが知られている雄ラットに特異的に発現する α_{2u} グロブリン腎症^{3), 4), 5)}に類似した変化と考えられる。同変化は 1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンを投与した雄ラットにも認められている¹⁾。雌雄で観察された好塩基性尿細管上皮の増加は、障害された尿細管上皮細胞の壊死・脱落后の再生性変化と考えられる。300 mg/kg 群の雄では尿量および沈渣中の円柱、雌では沈渣中の上皮細胞が、それらの病変と関連して増加したと考えられた。

肝臓の絶対重量および相対重量が 300 mg/kg 群の雌雄とも増加し、被験物質投与の影響と考えられた。しかしながら、投与期間終了時の血液、血液生化学的

および病理組織学的検査結果には肝臓機能に関連した項目の変化は認められなかった。

300 mg/kg 群の試験 4 週の雄の摂餌量および回復期間の雄の平均摂餌量が有意な高値を示したが、変化の程度としては僅かであり、雌では変化はなく、毒性学的意義はないと考えられた。

回復期間終了時に、300 mg/kg 群の雄の血小板数、血糖および総コレステロールならびに雌のナトリウムが有意な高値を示し、雌の総ビリルビンが有意な低値を示した。ナトリウムの変動幅は僅かであり、偶発的变化と考えられた。その他の項目は投与期間終了時には変動が認められていないため、毒性学的意義はないと判断した。また、300 mg/kg 群の雄の胸腺の重量が増加したが、その意義はわからなかった。

14 日間の回復期間により、被験物質投与に起因した腎臓の好塩基性尿細管上皮の増加、雄の肝臓および雌雄の腎臓の相対重量の増加等の変化は残存するが、前胃粘膜の扁平上皮の過形成、腎臓の尿細管の拡張および尿細管上皮の硝子滴沈着、間質の細胞浸潤等の変化は程度および発生率において回復あるいは回復傾向を示した。

以上の結果、被験物質による毒性学的影響として 10 mg/kg 以上の雌雄で前胃の組織変化、100 mg/kg 群以上の雄および 300 mg/kg 群の雌で腎臓の組織変化、300 mg/kg 群の雌雄で腎臓および肝臓の重量増加が認められた。従って、3,4-ジクロロベンジルクロリドの 28 日間反復経口投与による無影響量は雌雄ともに 10 mg/kg/day 未満であると考えられる。

6. 文献

- 1) 厚生労働省化学物質安全対策室(旧：厚生省生活化学安全対策室)監修：
1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンのラットにおける反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験、「化学物質毒性試験報告」Vol.7, pp.492-502, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999.
- 2) 製品安全データシート, MSDS No. JW323441, 和光純薬工業株式会社, 大阪 2009.
- 3) Swenberg, J. A., Short, B., Borghoff, S., Strasser, J., and Charbonneau, M. : The Comparative Pathobiology of α 2u-Globulin Nephropathy, Toxicol. Appl. Pharmacol. 97:35-46, 1989.
- 4) 伊藤信行(編著)：「最新毒性病理学」中山書店, pp.193-209, 東京, 1994.
- 5) 厚生労働省化学物質安全対策室(旧：厚生省生活化学安全対策室)監修：
o-ジクロロベンゼンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験, 「化学物質毒性試験報告」Vol.8, pp.316-327, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 2001.

3. 要約

アセナフチレンの復帰突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド(以下、DMSO と略す)を用いた。

試験は、19.5~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 については 0.61~19.5 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537 については 2.44~78.1 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* については 9.77~313 µg/plate の範囲の 6 用量で実施した。

1) 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化しない場合の 5000 µg/plate で認められた。また、被験物質による着色は、代謝活性化した場合の 5000 µg/plate で認められた。

2) 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 9.77 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 39.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* の 156 µg/plate 以上で認められた。

3) 復帰変異コロニー数

2 回の本試験ともに、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても本被験物質による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

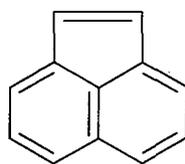
以上の試験結果より、本試験条件下において、アセナフチレンは、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

5. 被験物質及び被験液の調製

5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

製造元	:	新日鐵化学株式会社
名称	:	アセナフチレン
ロット番号	:	7-MOM
CAS番号	:	208-96-8
構造式	:	



純度	:	96.3%
不純物の名称及び濃度	:	ナフタレン ; 0.1%、1-メチルナフタレン ; 0.2%、アセナフテン ; 3.3%、その他 ; 0.2%
分子量	:	152.20
融点	:	88-91°C
沸点	:	280°C
蒸気圧	:	2.67hPa(156°C)
分配係数	:	3.93~4.07
常温における性状	:	黄色固体
安定性	:	紫外線照射で二量体、108°C 加熱で種々のポリマーを生成する。強酸により、重合。還元するとアセナフテン、酸化するとナフタリン酸を生じる。なお、本試験終了後に残余となった被験物質を製造元において分析した結果、純度に大きな変動はなく、安定であることが確認された(別添1)。
溶解性	:	水 ; 不溶 DMSO ; 50mg/mL 以上
保存条件	:	冷蔵・遮光・密閉
保存場所	:	東京研究所 被験物質調製保存室
保存温度	:	保存期間中 2008.10.30~2009.2.20 の実測温度 -0.6~8.2°C
返却	:	試験終了後の残量はすべて製造元へ返却した。

なお、上記溶解性は、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果であり、水については 50mg/mL で溶解しなかったため、不溶とした。

5.1.2 溶媒

名称	:	DMSO
製造元	:	和光純薬工業株式会社
ロット番号	:	PEH6808
規格	:	JIS 規格 試薬特級 99.0%以上
保存方法	:	室温保存
保存場所	:	東京研究所 被験物質調製保存室

5.1.3 溶媒の選択理由

溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水に 50mg/mL で溶解せず、DMSO に 50mg/mL で溶解し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、DMSO を溶媒として試験を実施した。

5.2 被験液の調製方法

5.2.1 用量設定試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤 (GR-120、株式会社エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 272.4 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、5.448 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 4 で順次 4 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781 及び 0.195 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

5.2.2 本試験 1 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤 (GR-120、株式会社エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 40.2 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、3.216 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、これを 4 倍希釈して 3.13 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 9 段階希釈し、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122 及び 0.0061 mg/mL の計 10 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

5.2.3 本試験 2 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤 (GR-120、株式会社エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 33.4 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、2.672 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、これを 4 倍希釈して 3.13 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 9 段階希釈し、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122 及び 0.0061 mg/mL の計 10 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

5.2.4 被験液の保存条件

被験液は用時調製とし、保存はしなかった。

6. 試験材料及び方法

6.1 試験菌株

6.1.1 菌株の種類

次の 5 種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

S. typhimurium TA100

S. typhimurium TA1535

E. coli WP2 *uvrA*

フレームシフト型

S. typhimurium TA98

S. typhimurium TA1537

なお、菌株は国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部より 1997 年 10 月 9 日に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で入手したものから、2005 年 7 月 21 日に分与された。

6.1.2 菌株の選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じて選択した。当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている。

6.1.3 菌株の保存及び解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液 8.0 mL に対して、DMSO (和光純薬工業株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 PEN0496) を 0.7 mL の割合で添加して、滅菌チューブに 300 μ L ずつ分注し、 -70°C 以下の超低温

6.4.3 本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mL の被験液を公比 4 で 4 段階希釈した計 5 用量 (19.5、78.1、313、1250、5000 µg/plate) を用い、用量設定試験を実施した。なお、用量設定試験の結果を別表 1 に示した。

用量設定試験の結果、本被験物質処理による生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 19.5 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* の 313 µg/plate 以上で認められた。また、本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化しない場合の 5000 µg/plate で認められた。また、被験物質による着色は、代謝活性化した場合の 5000 µg/plate で認められた。

このため、本試験の試験用量は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 については 19.5 µg/plate、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537 については 78.1 µg/plate、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* については 313 µg/plate をそれぞれ最高用量として、以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量を設定した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

6.4.4 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群のいずれについても、用量設定試験では 2 枚、2 回の本試験では 3 枚のプレートを用いた。

6.4.5 試験操作（プレインキュベーション法）

- 1) 滅菌した小試験管に調製した被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1 mL 入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、それぞれの小試験管に各菌株の培養液 0.1 mL を加えた。
- 2) 小試験管を攪拌後すぐに 37°C で 20 分間振盪しながらプレインキュベーションし、これに 45°C に保温されているトップアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを 2.0 mL 加えた後に最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら 1)~3) の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 4) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で用量設定試験、本試験 1 回目及び本試験 2 回目ともに 48 時間培養した。

- 5) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色を確認した結果、代謝活性化しない場合の 5000 µg/plate で沈殿、代謝活性化した場合の 5000 µg/plate で着色が認められたものの、機器計測に影響がなかったため、自動コロニーカウンタ(コロニーアナライザーCA-11D systems、システムサイエンス株式会社)を用いて計数(面積補正、補正值:1.21)した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

6.5 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数(陰性対照値)に対して2倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の2倍以上となる増加を示し、2回の本試験で再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

7. 試験結果

試験の結果を別表1~5及び図1~10に示した。なお、図は別表2、3より作成した。

7.1 培養終了後の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化しない場合の 5000 µg/plate で認められた。また、被験物質による着色は、代謝活性化した場合の 5000 µg/plate で認められた。なお、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 9.77 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 39.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* の 156 µg/plate 以上で認められた。

7.2 復帰変異コロニー数

2回の本試験ともに、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても本被験物質による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

7.3 試験系の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理限界(平均値±3SD:別添)内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断し

た。

8. 考察

2 回の本試験ともに、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても本被験物質による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の試験結果より、本試験条件下において、アセナフチレンは、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

9. 参考文献

- 1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp+ Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- 5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- 6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶 (編) : 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編 : 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館基 (監修) : 微生物を用いる変異原性試験データ集 (能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: アセナフチレン

No. T-0306

試験実施期間		2009年1月15日 より 2009年1月19日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	119 151 (135)	16 15 (16)	31 31 (31)	22 25 (24)	11 17 (14)
	19.5	143 126 (135)	13 19 (16)	32 32 (32)	19 17 (18)	13 * 21 * (17)
	78.1	58 * 68 * (63)	13 * 12 * (13)	17 * 22 * (20)	16 * 15 * (16)	17 * 18 * (18)
	313	45 * 43 * (44)	0 * 0 * (0)	11 * 10 * (11)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	1250	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	7 * 6 * (7)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000 #	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	124 130 (127)	15 15 (15)	27 37 (32)	38 39 (39)
19.5		150 125 (138)	19 11 (15)	28 34 (31)	40 37 (39)	19 19 (19)
78.1		146 146 (146)	10 * 11 * (11)	32 34 (33)	52 * 56 * (54)	15 * 14 * (15)
313		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	9 * 8 * (9)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
1250		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	7 * 8 * (8)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
5000		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
陽性対照		S9Mixを必要としないもの	名称 AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	547 581 (564)	328 358 (343)	99 85 (92)	546 503 (525)	2120 2057 (2089)
	S9Mixを必要とするもの	名称 B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1125 1166 (1146)	319 327 (323)	1231 1163 (1197)	420 348 (384)	139 158 (149)

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ : アジ化ナトリウム
ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

: 被験物質の沈澱が認められたことを示す。

()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

試験結果表 (本試験1回目:-S9Mix)

被験物質の名称:アセナフチレン

No. T-0306

試験実施期間		2009年2月2日 より 2009年2月5日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (µg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	153 125 107 (128 ± 23.2)	18 10 7 (12 ± 5.7)	31 26 30 (29 ± 2.6)	18 7 23 (16 ± 8.2)	10 14 7 (10 ± 3.5)
	0.61	NT	NT	NT	NT	10 8 8 (9 ± 1.2)
	1.22	NT	NT	NT	NT	7 2 5 (5 ± 2.5)
	2.44	118 118 120 (119 ± 1.2)	8 11 13 (11 ± 2.5)	35 24 34 (31 ± 6.1)	21 13 18 (17 ± 4.0)	6 7 7 (7 ± 0.6)
		4.88	128 126 130 (128 ± 2.0)	7 7 10 (8 ± 1.7)	34 32 29 (32 ± 2.5)	26 15 12 (18 ± 7.4)
	9.77	144 126 130 (133 ± 9.5)	17 10 11 (13 ± 3.8)	31 31 35 (32 ± 2.3)	16 27 28 (24 ± 6.7)	7 * 5 * 8 * (7 ± 1.5)
		19.5	119 105 117 (114 ± 7.6)	15 13 13 (14 ± 1.2)	32 31 43 (35 ± 6.7)	21 18 18 (19 ± 1.7)
	39.1	118 105 126 (116 ± 10.6)	13 * 5 * 11 * (10 ± 4.2)	27 32 29 (29 ± 2.5)	21 14 10 (15 ± 5.6)	NT
		78.1	40 * 40 * 47 * (42 ± 4.0)	12 * 7 * 6 * (8 ± 3.2)	19 * 18 * 20 * (19 ± 1.0)	10 * 10 * 16 * (12 ± 3.5)
	陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
用量(µg/プレート)		0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
コロニー数/プレート		615 618 589 (607 ± 15.9)	325 322 292 (313 ± 18.2)	122 88 102 (104 ± 17.1)	469 498 438 (468 ± 30.0)	1870 1668 1775 (1771 ± 101.1)

(備考)

AF-2 :2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ :アジ化ナトリウム

ICR-191 :2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT: 試験せず。

()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表3)

試験結果表 (本試験1回目:+S9Mix)

被験物質の名称:アセナフレン

No. T-0306

試験実施期間		2009年2月2日 より 2009年2月5日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	139 139 130 (136 ± 5.2)	15 16 7 (13 ± 4.9)	41 27 26 (31 ± 8.4)	37 34 42 (38 ± 4.0)	12 10 12 (11 ± 1.2)	
	2.44	NT	19 7 15 (14 ± 6.1)	NT	36 36 37 (36 ± 0.6)	11 13 10 (11 ± 1.5)	
	4.88	NT	10 10 16 (12 ± 3.5)	NT	55 49 36 (47 ± 9.7)	13 10 11 (11 ± 1.5)	
	9.77		133 128 112 (124 ± 11.0)	14 10 8 (11 ± 3.1)	33 27 30 (30 ± 3.0)	38 31 48 (39 ± 8.5)	6 7 11 (8 ± 2.6)
	19.5		121 110 132 (121 ± 11.0)	10 10 13 (11 ± 1.7)	31 29 24 (28 ± 3.6)	42 38 39 (40 ± 2.1)	15 13 11 (13 ± 2.0)
	39.1		142 141 134 (139 ± 4.4)	8 * 14 * 21 * (14 ± 6.5)	27 37 33 (32 ± 5.0)	43 42 36 (40 ± 3.8)	13 * 11 * 7 * (10 ± 3.1)
	78.1		121 123 144 (129 ± 12.7)	11 * 15 * 7 * (11 ± 4.0)	23 28 28 (26 ± 2.9)	31 * 41 * 46 * (39 ± 7.6)	7 * 10 * 21 * (13 ± 7.4)
	156		74 * 40 * 72 * (62 ± 19.1)	NT	7 * 11 * 9 * (9 ± 2.0)	NT	NT
	313		0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	22 * 7 * 7 * (12 ± 8.7)	NT	NT
	陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名称 用量(μg/プレート)	B[a]P 5.0	2AA 2.0	2AA 10.0	B[a]P 5.0
		コロニー数/プレート	1033 1084 1073 (1063 ± 26.8)	228 241 258 (242 ± 15.0)	1076 1184 1165 (1142 ± 57.7)	422 404 339 (388 ± 43.7)	134 138 142 (138 ± 4.0)

(備考)

2AA :2-アミノアントラセン
B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT: 試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表4)

試験結果表 (本試験2回目:-S9Mix)

被験物質の名称:アセナフチレン

No. T-0306

試験実施期間		2009年2月19日 より 2009年2月23日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	144 122 116 (127 ± 14.7)	7 8 17 (11 ± 5.5)	34 32 24 (30 ± 5.3)	18 14 18 (17 ± 2.3)	20 13 18 (17 ± 3.6)
	0.61	NT	NT	NT	NT	23 11 17 (17 ± 6.0)
	1.22	NT	NT	NT	NT	13 24 21 (19 ± 5.7)
	2.44	100 110 98 (103 ± 6.4)	2 5 7 (5 ± 2.5)	26 35 26 (29 ± 5.2)	15 18 19 (17 ± 2.1)	8 18 15 (14 ± 5.1)
	4.88	106 104 92 (101 ± 7.6)	7 9 7 (8 ± 1.2)	27 24 34 (28 ± 5.1)	9 13 8 (10 ± 2.6)	16 17 21 (18 ± 2.6)
	9.77	112 97 97 (102 ± 8.7)	11 12 7 (10 ± 2.6)	26 31 27 (28 ± 2.6)	29 13 18 (20 ± 8.2)	17 * 24 * 14 * (18 ± 5.1)
	19.5	98 118 98 (105 ± 11.5)	11 7 9 (9 ± 2.0)	32 30 36 (33 ± 3.1)	15 20 18 (18 ± 2.5)	17 * 19 * 13 * (16 ± 3.1)
	39.1	110 113 98 (107 ± 7.9)	8 * 6 * 8 * (7 ± 1.2)	39 33 22 (31 ± 8.6)	15 9 19 (14 ± 5.0)	NT
	78.1	53 * 52 * 53 * (53 ± 0.6)	7 * 8 * 7 * (7 ± 0.6)	20 * 14 * 16 * (17 ± 3.1)	5 * 10 * 10 * (8 ± 2.9)	NT
	陽性対照	S9Mixを必要としな いもの	名称 AF-2 用量(μg/プレート) 0.01	名称 SAZ 用量 0.5	名称 AF-2 用量 0.01	名称 AF-2 用量 0.1
		564 573 596 (578 ± 16.5)	221 235 257 (238 ± 18.1)	66 84 95 (82 ± 14.6)	474 560 557 (530 ± 48.8)	1548 1637 1519 (1568 ± 61.5)

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
 SAZ : アジ化ナトリウム
 ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]プロピルアミノ]アクリジン・2HCl

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
 NT: 試験せず。
 ()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表5)

試験結果表 (本試験2回目: +S9Mix)

被験物質の名称: アセナフチレン

No. T-0306

試験実施期間		2009年2月19日 より 2009年2月23日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	156 129 106 (130 ± 25.0)	7 10 5 (7 ± 2.5)	32 29 22 (28 ± 5.1)	33 29 35 (32 ± 3.1)	14 13 15 (14 ± 1.0)	
	2.44	NT	5 10 7 (7 ± 2.5)	NT	41 17 33 (30 ± 12.2)	22 24 11 (19 ± 7.0)	
	4.88	NT	8 6 8 (7 ± 1.2)	NT	38 31 33 (34 ± 3.6)	25 16 25 (22 ± 5.2)	
	9.77	124 104 107 (112 ± 10.8)	8 10 12 (10 ± 2.0)	31 30 30 (30 ± 0.6)	39 36 28 (34 ± 5.7)	12 28 19 (20 ± 8.0)	
	19.5	106 112 101 (106 ± 5.5)	13 8 4 (8 ± 4.5)	31 33 28 (31 ± 2.5)	31 25 26 (27 ± 3.2)	12 16 14 (14 ± 2.0)	
	39.1	105 113 127 (115 ± 11.1)	7 * 4 * 7 * (6 ± 1.7)	26 25 36 (29 ± 6.1)	36 45 36 (39 ± 5.2)	10 * 19 * 18 * (16 ± 4.9)	
	78.1	113 122 96 (110 ± 13.2)	2 * 5 * 8 * (5 ± 3.0)	33 26 24 (28 ± 4.7)	24 * 26 * 33 * (28 ± 4.7)	13 * 11 * 9 * (11 ± 2.0)	
	156	105 * 77 * 58 * (80 ± 23.6)	NT	9 * 14 * 10 * (11 ± 2.6)	NT	NT	
	313	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	NT	8 * 6 * 4 * (6 ± 2.0)	NT	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P
		用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		コロニー数/プレート	990 973 976 (980 ± 9.1)	230 232 231 (231 ± 1.0)	892 894 913 (900 ± 11.6)	412 400 318 (377 ± 51.2)	117 123 133 (124 ± 8.1)

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT: 試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

3. 要約

アセナフチレンの染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 1550 $\mu\text{g/mL}$ として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の代謝活性化では 194 $\mu\text{g/mL}$ において、非代謝活性化では 48.4 $\mu\text{g/mL}$ において、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 96.9 $\mu\text{g/mL}$ において 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では 113.5 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 38.5 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 69.8 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 68.4 $\mu\text{g/mL}$ であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、短時間処理法の代謝活性化では 133 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、非代謝活性化では 88.9 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 100 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を設定した。ただし、染色体異常試験の短時間処理法で、染色体構造異常誘発性が明らかに陽性であることが確定したため、連続処理法の用量については、設定を行ったが、実験は実施しなかった。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の総出現率の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では、最高用量の 133 $\mu\text{g/mL}$ から 39.5 $\mu\text{g/mL}$ で、陽性の判定基準である 10%以上から疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満からを示し、ほぼ用量依存的な増加が認められたため、総合的に陽性と判定した。一方、短時間処理法の非代謝活性化では、全用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、総合的に陰性と判定した。

なお、短時間処理法の代謝活性化における染色体異常誘発の強さの指標値は、観察細胞の 20%に何らかの以上が見られる用量である D20 値は、0.15 mg/mL 、単位用量あたりの染色分体型交換 (cte) を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値は、160 であった。

一方、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても 5%未満であったことから、アセナフチレンの染色体数的異常誘発性は、総合的に陰性と判定した。

すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考

M-1346

えられた。

以上の結果から、アセナフチレンは本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

5. 試験材料及び方法

5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

被験物質の純度等の特性は、新日鐵化学株式会社における非 GLP 下での分析に基づくものである (Attached Data 1)。

製造者	:	新日鐵化学株式会社
名称	:	アセナフチレン
英名称	:	Acenaphthylene
ロット番号	:	7-MOM
CAS 番号	:	208-96-8
化学構造式	:	
分子量	:	152.19
密度	:	0.899
純度	:	96.3%
不純物	:	アセナフテン 3.3%、ナフタレン 0.1%、1-メチルナフタレン 0.2%、その他 0.2%
融点	:	275°C
性状	:	黄色～赤黄色の粉末
入手量	:	10 g
安定性	:	試験終了後に製造者において特性を測定し、その結果を入手して実験期間中の安定性を確認した。(Attached Data 2)
保存方法	:	冷蔵 (冷蔵内、保存期間中の実測温度: 3°C~6°C)
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室 冷蔵庫
取扱い上の注意	:	取り扱いは、適切な保護具を身につけ、粉塵やエアゾールが発生しないように取扱う。また、火気厳禁とする。
返却	:	被験物質の残余物は、実験終了後に製造者に送付し、安定性を確認後、すべて製造者において廃棄した。

5.1.2 溶媒

名称	:	ジメチルスルホキシド (DMSO)
ロット番号	:	LTF0010
規格	:	試薬特級

M-1346

製造元 : 和光純薬工業株式会社
保存方法 : 室温
保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室
溶媒の選択理由 : 被験物質情報によると、水に不溶であると記されていたことから、供試前試験を実施した。その結果、DMSOに155 mg/mLで良好に溶解することが確認されたため、溶媒としてDMSOを用いることとした。

5.2 被験液の調製

5.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.3100 gを2 mLメスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の155 mg/mL溶液（プレートに0.050 mL添加した際の最終濃度：1550 µg/mL）を調製した。次いで、155 mg/mL溶液を公比2（各濃度の被験液1 mL：溶媒1 mL）で順次7段階希釈し、77.5、38.8、19.4、9.69、4.84、2.42及び1.21 mg/mLの8濃度段階の被験液を調製した。

2) 染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.0400gを2 mLメスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の20.0 mg/mL溶液（プレートに0.050 mL添加した際の最終濃度：200 µg/mL）を調製した。次いで、20.0 mg/mL溶液を公比1.5（各濃度の被験液2.0 mL：溶媒1.0 mL）で順次6段階希釈し、13.3、8.89、5.93、3.95、2.63及び1.76 mg/mLの7濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では13.3、8.89、5.93、3.95及び2.63 mg/mLの5濃度段階の被験液を、非代謝活性化では8.89、5.93、3.95、2.63及び1.76 mg/mLの5濃度段階の被験液を用いた。

5.2.2 調製頻度

用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

5.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化がないことを肉眼的及び触知にて観察し、被験液の安定性を確認した。

5.3 対照物質

5.3.1 溶媒対照

溶媒として用いたジメチルスルホキシド（DMSO）を陰性対照物質とした。

5.3.2 陽性対照

1) 陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロfosファミドを、非代謝活性化ではマイトマイシンCを用いた。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化

5.6.1 識別方法

1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「-」とし、連続処理法では 24 時間処理を「24-」、48 時間処理を「48-」とした。更にこれに続けて陰性対照 (Negative Control) の場合は「NC」を、被験物質処理群の場合は濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。又、陽性対照 (Positive Control) は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」~「99」までの 2 桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

5.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 1550 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 775、388、194、96.9、48.4、24.2 及び 12.1 $\mu\text{g/mL}$ の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 194 $\mu\text{g/mL}$ において、非代謝活性化では 48.4 $\mu\text{g/mL}$ において、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 96.9 $\mu\text{g/mL}$ において 50% を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50% 細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、短時間処理法の代謝活性化では 113.5 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 38.5 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 69.8 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 68.4 $\mu\text{g/mL}$ であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50% 以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50% 以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、短時間処理法の代謝活性化では 133 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、非代謝活性化では 88.9 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 100 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を設定することとした。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

5.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するために予備試験として実施した。

1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 培養終了後、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度 99%以上）で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

2) 連続処理法

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と

同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24時間及び48時間処理における被験物質の50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

5.6.4 染色体異常試験

1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径60mm）を用いた。プレートは各群4枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液5.0mL）を播種した。培養3日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液0.883mLを取り除き、S9 mix 0.833mLに続き溶媒0.050mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.883mLを取り除き、S9 mix 0.833mLに続き各濃度の被験液0.050mLを加えた。陽性対照群については培養液0.933mLを除き、S9 mix 0.833mLに続きCP 0.100mL（最終濃度：14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液0.050mLを取り除き、溶媒0.050mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.050mLを取り除き、各濃度の被験液0.050mLを加えた。陽性対照群については培養液0.150mLを除き、MMC 0.150mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6時間培養した。
- (3) 培養6時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液5.0mLを加え、更に18時間培養を続けた。
- (4) 各群2枚のプレート（枝番号-1及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約2時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を0.1mL加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を0.075M塩化カリウム溶液で約15分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1液で固定した。固定した細胞をスライドガラス1枚につき2箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり2枚作製した。細胞滴下後、約1日以上空気乾燥し、2%ギムザ液で約15分間染色して染色体標本作製した。
- (5) 残る各群2枚のプレート（枝番号-3及び-4）は、培養6時間後と同様の方法で18時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

6. 試験結果

6.1 細胞増殖抑制試験

6.1.1 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Appendix 1-1 及び 2-1 に、非代謝活性化の結果を Appendix 1-2 及び 2-2 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化では 194 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 113.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。また、非代謝活性化では 48.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 38.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。

2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、変化は認められなかった。被験物質の添加に伴う析出は、代謝活性化では 96.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で、非代謝活性化では 194 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質の析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、388 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で認められた。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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、24.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

6.1.2 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Appendix 1-3 及び 2-3 に、48 時間処理の結果を Appendix 1-4 及び Table 2-4 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理法では 96.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 69.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。また、48 時間処理法では 96.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 68.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。

2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、変化は認められなかった。被験物質添加に伴う析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、194 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質の析出は、24 時間処理では 388 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で、48 時間処理では 194 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で認められた。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、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、12.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

6.2 染色体異常試験

6.2.1 短時間処理法

代謝活性化の結果を Fig. 1-1、Table 1-1 及び Appendix 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2、Table 1-2 及び Appendix 3-2 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、変化は認められなかった。被験物質の添加に伴う析出は、代謝活性化では 133 µg/mL 以上の用量で認められた。非代謝活性化では認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質の析出は、代謝活性化では 133 µg/mL で認められたが、非代謝活性化では全用量で認められなかった。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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、59.3 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化においては、133 µg/mL では 17.0%、88.9 µg/mL では 11.0%、59.3 µg/mL では 11.0%、39.5 µg/mL では 7.0%、26.3 µg/mL では 0.5%を示し、133~59.3 µg/mL では 10%以上を示したことから陽性と、39.5 µg/mL では 5% 以上 10% 未満を示したことから疑陽性と、その他の用量では 5% 未満であったことから陰性と判定された。染色体異常誘発の強さの指標値は、観察細胞の 20%に何らかの以上が見られる用量である D20 値は 0.15 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換(cte)を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値は 160 であった。

また、短時間処理法の非代謝活性化においては、88.9 µg/mL では 4.0%、59.3 µg/mL では 0.5%、39.5 µg/mL では 0.5%、26.3 µg/mL では 1.0%、17.6 µg/mL では 1.5%を示し、全用量で 5%未満であったことから陰性と判定された。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は試験施設の背景値 (Attached Data 3) の陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、短時間処理法の代謝活性化においては、133 µg/mL では 0.5%、88.9 µg/mL では 1.5%、59.3 µg/mL では 1.0%、39.5 µg/mL では 1.0%、26.3 µg/mL では 0.5%を示し、全ての用量で 5%未満であったことから陰性と判定された。

また、短時間処理法の非代謝活性化においては、88.9 µg/mL では 0.5%、59.3 µg/mL では 0%、39.5 µg/mL では 0%、26.3 µg/mL では 0%、17.6 µg/mL では 0%、を示し、全ての用量で 5%未満であったことから陰性と判定された。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、

M-1346

また試験施設の背景値（Attached Data 3）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。

7. 考察

アセナフチレンは、細胞増殖抑制試験の短時間処理法の代謝活性化では 194 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、非代謝活性化では 48.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 96.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では 113.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非代謝活性化では 38.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 69.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 68.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、短時間処理法の代謝活性化では 133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、非代謝活性化では 88.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を設定した。ただし、染色体異常試験の短時間処理法で、染色体構造異常誘発性が明らかに陽性であることが確定したため、連続処理法の用量については、設定を行ったが、実験は実施しなかった。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の総出現率の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では、最高用量の 133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 39.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、陽性の判定基準である 10%以上から疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満からを示し、ほぼ用量依存的な増加が認められたため、総合的に陽性と判定した。一方、短時間処理法の非代謝活性化では、全用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、総合的に陰性と判定した。

なお、短時間処理法の代謝活性化における染色体異常誘発の強さの指標値は、観察細胞の 20%に何らかの以上が見られる用量である D20 値は、0.15 mg/mL 、単位用量あたりの染色分体型交換 (cte) を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値は、160 であった。

一方、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても 5%未満であったことから、アセナフチレンの染色体数的異常誘発性は、総合的に陰性と判定した。

陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。更に、いずれの群においても同一用量における 2 枚のプレート間に染色体異常細胞の出現頻度の著しい差は認められなかったことから、試験は適切に実施されたと判断した。

アセナフチレンは、細菌を用いる復帰突然変異試験において TA1537 及び TA1538 菌株に対して、代謝活性化及び非代謝活性化の条件下で陰性を示しているが、全ての

M-1346

1,2-環結合型の acenaphene は、TA1537 菌株において間接型の frameshift mutagen であることが報告されている⁶⁾。

以上の結果から、アセナフチレンは本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

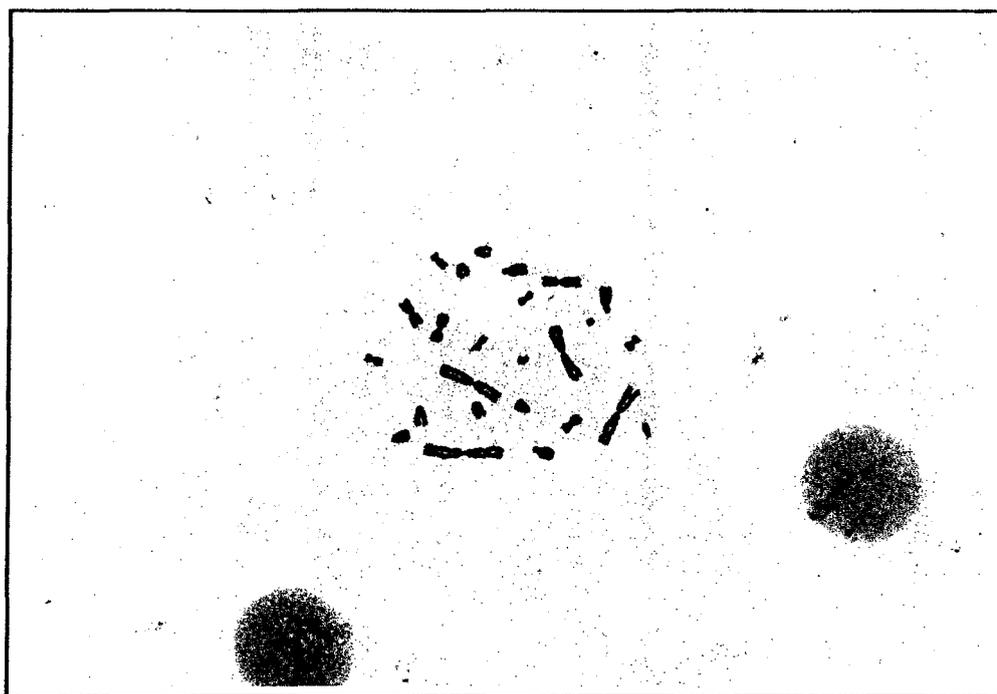


Photo. 1 A metaphase chromosome from the negative control group
[Short-term treatment: +S9 mix]

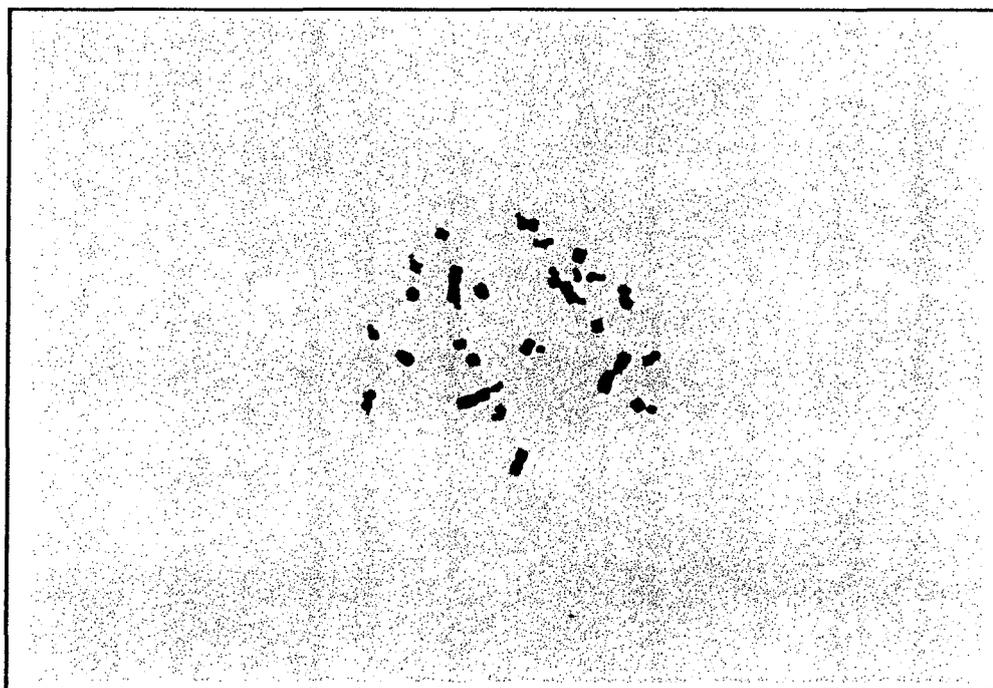


Photo. 2 A metaphase chromosome from the 133 µg/mL group with
chromatid breaks
[Short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Short-term treatment:+S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.		
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)	Judge-ment
6-18	+	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	1	0	1	-	68-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	115	100	0	0	0	-	58-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(100)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		26.3	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	61	100	1	0	1	-	47-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	61	100	0	0	0	-	46-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(57)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		39.5	100	2	4	0	0	0	5	0	5		61	100	1	0	1		18-1
			100	2	8	0	0	0	9	0	9	±	53	100	1	0	1	-	84-1
			200	4(2.0)	12(6.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	14(7.0)	0(0.0)	14(7.0)		(53)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		59.3	100	3	10	0	0	0	12	1	13		38	100	1	0	1		64-1
			100	5	9	0	0	0	10	0	10	+	46	100	1	0	1	-	32-1
			200	8(4.0)	19(9.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	22(11.0)	1(0.5)	23(11.5)		(39)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		88.9	100	4	8	0	0	1	12	0	12		38	100	2	0	2		66-1
			100	3	9	0	0	0	10	0	10	+	30	100	1	0	1	-	73-1
			200	7(3.5)	17(8.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	22(11.0)	0(0.0)	22(11.0)		(32)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)		
		133	61	6	8	0	0	0	11	0	11		22	61	0	0	0		70-1
			39	3	7	0	0	0	8	0	8			39	0	0	0		70-2
			85	8	6	0	0	0	12	0	12	+	0	85	1	0	1	-	89-1
			15	3	0	0	0	0	3	0	3			15	0	0	0		89-2
			200	20(10.0)	21(10.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	34(17.0)	0(0.0)	34(17.0)		(10)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		PC	100	3	54	0	0	0	54	0	54		107	100	0	0	0		91-1
			100	9	51	0	0	0	56	0	56	+	115	100	0	0	0	-	29-1
			200	12(6.0)	105(52.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	110(55.0)	0(0.0)	110(55.0)		(103)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

4. 要約

アセナフチレンの28日間反復経口投与毒性試験を6週齢のSprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD(SD)、1群雌雄各6又は12匹〕を用いて実施した。投与量は0(0.5 w/v%メチルセルロース水溶液：対照群)、4、20及び100 mg/kgとし、また、対照群と100 mg/kg投与群の一部の個体(1群雌雄各6匹)については投与期間終了後2週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

詳細な観察を含む一般状態では、100 mg/kg投与群の雌で流涎が散見されたほか、一部で粗毛及び削瘦も認められた。更に、オープンフィールド内観察に立ち上がり回数¹の低値も認められた。

機能検査、握力及び自発運動量では、100 mg/kg投与群の雄で聴覚に、100 mg/kg投与群の雌で痛覚に弱い反応の動物が散見された。また、100 mg/kg投与群の雌で前肢握力の低値が、100 mg/kg投与群の雌雄で自発運動量の低値がみられた。

体重及び摂餌量では、低値が100 mg/kg投与群の雌雄でみられ、体重増加量も低値を示した。

尿検査(摂水量を含む)では、沈渣において小円形上皮細胞の陽性例の発現頻度の増加傾向が100 mg/kg投与群の雄で、摂水量及び尿量の高値と浸透圧の低値が100 mg/kg投与群の雌雄でみられた。

血液学検査では、網赤血球率の低値及び血小板数の高値が100 mg/kg投与群の雌雄で、ヘモグロビン量及び平均赤血球色素濃度の高値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が100 mg/kg投与群の雌でみられた。

血液化学検査では、総コレステロール及びリン脂質の高値が100 mg/kg投与群の雌雄で、総たん白質及びアルブミンの高値が100 mg/kg投与群の雄でみられた。

病理学検査では、剖検で粗毛、低栄養状態及び子宮の小型化が100 mg/kg投与群の雌でみられ、重量及び組織学検査では20 mg/kg以上の投与群の雌雄で肝臓に、100 mg/kg投与群の雌雄で胸腺、心臓、大腿骨(骨髄を含む)、胸骨(骨髄を含む)、膀胱、腎臓、脾臓及び副腎に、雄で胃に、雌で腸間膜リンパ節、子宮及び卵巣に変化が認められた。

上述した変化のうち、回復期間中あるいは回復期間終了時にも雌雄の握力及び尿検査に、雄の病理学検査の副腎に変化がみられたが、その他の変化は休薬とともに軽減あるいは消失し、回復性を示した。

以上の結果、アセナフチレンの本試験条件下における無影響量は病理学検査における肝臓の変化などから4 mg/kg/dayと推定された。

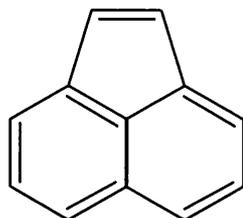
6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

被験物質は新日鐵化学株式会社より提供された。本試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、検査成績書を添付資料1に示した。

名称	:	アセナフチレン
英名	:	Acenaphthylene
CAS 番号	:	208-96-8
官報公示整理番号	:	4-644
分子量	:	152.19
分子式	:	$C_{12}H_8$
構造式	:	



ロット番号	:	7-MOM
純度	:	96.3 %
不純物	:	
アセナフテン	:	3.3 %
入手量	:	775 g
安定性	:	投与終了後、被験物質について提供先で安定性を実施し、安定であることが確認された（添付資料2）。
保存方法	:	冷蔵（許容範囲 1~10°C；実測値 3~7°C）
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	マスク、手袋を着用した。 換気のよい場所で行い粉塵が飛散しないように取り扱った。
返却	:	被験物質 1 g を保存試料として保存した。分析用に小分けした被験物質の残量は廃棄した。また、被験物質の残量は提供先に返却し、安定性を確認後廃棄した。

6.1.2 媒体

名称	:	メチルセルロース 400cP
ロット番号	:	EWM1974
メーカー	:	和光純薬工業株式会社
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所 第1研究棟被験物質調製室

なお、媒体については、本試験に先立って実施した被験液中のアセナフチレンの安定性・均一性試験（試験番号：A-2171）において、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液中での被験物質の安定性及び均一性に良好な結果が得られていることから、0.5w/v%メチルセルロース水溶液を選択した。

6.2 投与液の調製

6.2.1 媒体の調製

調製方法	:	メチルセルロース 400cP を注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号；8K74）に溶解し、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液とした。
保存方法	:	冷所（冷蔵庫内、許容範囲 1~10°C；実測値 4~6°C）に保存し、調製後 8 日以内に被験液の調製に使用した。

6.2.2 被験液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に採取し、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液に懸濁して 0.8 mg/mL 液（低用量群液）、4 mg/mL 液（中用量群液）及び 20 mg/mL 液（高用量群液）を調製した。被験液は 8 日に 1 回以上の頻度で調製し、調製後 8 日以内に使用した。

6.2.3 投与液の保存方法

投与液は 1 日必要分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、使用時まで冷所（冷蔵庫内、許容範囲 1~10°C；実測値 3~6°C）に保存した。

6.2.4 媒体中での安定性

本被験物質の 0.1 及び 200 mg/mL 懸濁液（媒体：0.5 w/v%メチルセルロース水溶液）は、冷所（冷蔵庫内、1~10°C）、遮光で 8 日間、その後室温で 24 時間安定であることが株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で確認されている（試験番号：A-2171、添付資料 3）。

6.2.5 被験液の濃度・均一性確認

投与 1 週と 4 週の投与に用いる各濃度の被験液について、その濃度・均一性を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で HPLC 法を用いて確認した。その結果、表

されている。

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験に使用された系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4 試験動物及び群分け

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] 雌雄各 47 匹^{注)} を 5 週齢で入手し、当所で 8 日間検疫・馴化飼育し、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (3 回) 及び詳細な一般状態の観察 (1 回) を行い、体重増加量、一般状態及び詳細な一般状態の観察に異常がみられず健康と思われる雌雄各 36 匹 (主群として雌雄各 24 匹、回復群として雌雄各 12 匹) を選び、6 週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で 209~234 g、雌で 147~177 g であった。動物は検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日 (投与開始の 2 日前) の体重に基づいて層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた) により行った。また、余剰動物は投与開始日に試験系から除外した。

注) : 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 45 匹であったが、実際には雌雄各 47 匹が納入された。

6.5 飼育条件

動物は温度 21~25°C (許容範囲:23±3°C)、相対湿度 46~61 %、(許容範囲:50±20 %)、換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間 (07:00~19:00) の動物飼育室 (303 号室) で、ブラケット式金属製網ケージ (W 250×D 350×H 200 mm : 日本ケージ株式会社) で個別飼育し、毎日 1 回の飼育室内の清掃を実施した。固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 : 090309、090407) 及び御殿場市営水道水を給水瓶により自由に摂取させた。

6.6 飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用ロットについて Eurofins Scientific Analytics で分析を行い、また、飲料水については東芝機械環境センター株式会社に水道法に準拠する水質検査を定期的に (年 4 回) 依頼した。これらの分析成績書を入手し、試験成績に影響がないことを確認した後、写しを保存した。

6.7 動物の識別及びケージへの表示

動物は入荷時に小動物耳標を装着して個体識別した。入荷から群分け前までの間は試験番号、性別及び耳標番号を明記したケージラベルをつけた。群分け後は、性別及

び用量ごと（対照群、低、中及び高用量群の順）に4桁の番号をつけた。この場合、1000の位は群、100の位は性（0番を雄、1番を雌）、10と1の位は個体番号とした。各飼育ケージには、群分け前まで使用したケージラベルの裏に用量（群）ごとに色分けしたラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び剖検予定日を明記した。ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定中は、観察者に対して投与の情報を制限するため、ケージラベルを裏返して試験番号、性別及び耳標番号のみを表示した。

6.8 投与経路、投与期間、投与回数及び回復期間とそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口投与を選択し、投与期間は28日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回（7回/週）とした。回復期間は障害の可逆性を検討するのに適当と考えられる2週間（14日間）とし、この間投与を行わなかった。

6.9 投与方法

投与容量は5 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した（08:00~11:21の間）。対照群には媒体（0.5 w/v%メチルセルロース水溶液）を同様に投与した。個体ごとの投与液量（表示単位：0.1 mL）は最新の体重を基準に算出した。

6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

アセナフチレンの0（0.5 w/v%メチルセルロース水溶液）、100、300及び1000 mg/kg/dayを1群雌雄各5匹のラットに14日間反復経口投与した結果¹⁾、主な変化として、雌雄で1000 mg/kg投与群で全例が死亡し、100 mg/kg以上の投与群の器官重量に変化がみられことから、本試験における投与量は、100 mg/kg投与群を高用量とし、公比5で除し、20 mg/kgを中用量に、4 mg/kgを低用量に設定し、対照群を加え4群構成とした。1群当たりの動物を主群では雌雄各6匹、回復群では対照群及び高用量群で雌雄各6匹とした。群構成を表1に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	4	0.8	5	雄	6	2001~2006	-	-
				雌	6	2101~2106	-	-
中用量群	20	4	5	雄	6	3001~3006	-	-
				雌	6	3101~3106	-	-
高用量群	100	20	5	雄	6	4001~4006	6	4007~4012
				雌	6	4101~4106	6	4107~4112

7. 試験結果

7.1 一般状態の観察

成績を Table 1-1~1-3 及び Appendix 1~10 に示した。

1) 投与期間

流涎が 100 mg/kg 投与群の雌で投与 16 日以降に散見された。また、粗毛が 100 mg/kg 投与群の雌 2/12 例で、削瘦が 100 mg/kg 投与群の雌 1/12 例でいずれも投与 24 日以降に認められた。

2) 回復期間

いずれの動物においても、回復期間を通じて異常は認められなかった。

7.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量

7.2.1 詳細な一般状態の観察

成績を Table 2-1~2-18 及び Appendix 11~70 に示した。

1) 投与期間

(1) 投与 1 週

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群の雌雄と対照群との間に有意差は認められなかった。

(2) 投与 2 週

手に持っただけの観察において軽度の流涎が 100 mg/kg 投与群の雌 1/12 例でみられ、また、オープンフィールド内観察において立ち上がり回数の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

(3) 投与 3 週

手に持っただけの観察において軽度あるいは中等度の流涎が 100 mg/kg 投与群の雌 3/12 例でみられ、また、オープンフィールド内観察において立ち上がり回数の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

(4) 投与 4 週

手に持っただけの観察において軽度な粗毛が 100 mg/kg 投与群の雌 2/12 例、軽度の流涎が 100 mg/kg 投与群の雌 4/12 例でみられ、また、オープンフィールド内観察において立ち上がり回数の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

2) 回復期間

(1) 回復 1 週

オープンフィールド内観察において立ち上がり回数の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。

(2) 回復 2 週

いずれの検査項目においても異常はなく、100 mg/kg 投与群の雌雄と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 及び Appendix 71~76 に示した。

1) 投与 4 週

聴覚反応において弱い反応を示す動物が 100 mg/kg 投与群の雄 3/12 例で、また、痛覚反応において弱く反応する動物が 100 mg/kg 投与群の雌 1/12 例で認められた。

2) 回復 2 週

いずれの検査項目においても異常はなく、100 mg/kg 投与群の雌雄と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.3 握力

成績を Table 2-21、2-22 及び Appendix 77~82 に示した。

1) 投与 4 週

前肢の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

2) 回復 2 週

前肢及び後肢の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

7.2.4 自発運動量

成績を Fig. 1~4、Table 2-23、2-24 及び Appendix 83~88 に示した。

1) 投与 4 週

測定開始後 20~30 分の測定値において有意な高値が 20 mg/kg 投与群の雌と 100 mg/kg 投与群の雄で有意な低値が、測定開始後 0~10 分及び 10~20 分の測定値において有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられた。更に、100 mg/kg 投与群の雄では測定開始後 0~60 分の測定値にも有意な低値が認められた。

2) 回復 2 週

測定開始後 40~50 分の測定値において有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

7.3 体重

成績を Fig.5、Table 3-1、3-2 及び Appendix 89~94 に示した。

1) 投与期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で投与 4 から 28 日、雌で投与 10 から 28 日に認められた。更に、100 mg/kg 投与群の雌雄では投与期間中の体重増加量でも有意な低値が認められた。

2) 回復期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で回復 1 から 14 日に認められた。

7.4 摂餌量

成績を Fig.6、7、Table 4-1、4-2 及び Appendix 95~100 に示した。

1) 投与期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で投与 7 から 28 日に認められた。

2) 回復期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で回復 7 日に認められた。

7.5 尿検査（摂水量含む）

成績を Table 5-1~5-8 及び Appendix 101~118 に示した。

1) 投与 4 週

沈渣において小円形上皮細胞の陽性例が対照群の雌 1/12 例、20 mg/kg 投与群の雄 1/6 例、100 mg/kg 投与群の雄 4/12 例、雌 2/12 例でみられ、100 mg/kg 投与群の雄で発現頻度の増加傾向が認められた。また、摂水量及び尿量の有意な高値と浸透圧の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

2) 回復 2 週

沈渣において小円形上皮細胞の陽性例が、100 mg/kg 投与群の雌雄各 2/6 例でみられ発現頻度の増加傾向が認められた。また、尿量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で、浸透圧の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-6 及び Appendix 119~136 に示した。

1) 投与期間終了時

赤血球数の有意な低値が 4 mg/kg 投与群の雄と 20 mg/kg 投与群の雌で、ヘモグロビン量と平均赤血球血色素濃度の有意な高値が 100 mg/kg の投与群の雌で、網赤血球率の有意な低値と血小板数の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が 100 mg/kg 投与群の雌で、また、白血球百分率でリンパ球比率の有意な低値が 4 mg/kg 投与群の雌で認められた。

2) 回復期間終了時

網赤血球率の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、血小板数の有意な高値とフィブリノーゲン量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。また、白血球百分率で好塩基球比率と分画実数で好塩基球の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。

7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 及び Appendix 137~148 に示した。

1) 投与期間終了時

AST 及びクレアチニンの有意な低値が 100 mg/kg の投与群の雌で、総コレステロールとリン脂質の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、トリグリセライドの有意な

高値が 4 mg/kg 投与群の雄で、尿素窒素の有意な低値が 20 mg/kg 投与群の雌で、無機リンの有意な低値が 4 mg/kg 投与群の雌で、総たん白質とアルブミンの有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。

2) 回復期間終了時

無機リンの有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、グルコースの有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、総コレステロール及びリン脂質の有意な高値と総たん白質、アルブミン及び A/G 比の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 及び Appendix 149~172 に示した。

1) 投与期間終了時

最終体重の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

脳	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
胸腺	:	絶対及び相対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
心臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、相対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。
肝臓	:	相対重量の有意な高値が 20 mg/kg 以上の投与群の雌雄で認められた。
脾臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。
腎臓	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。
副腎	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。
卵巣	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群で認められた。

2) 回復期間終了時

最終体重の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

脳	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。
胸腺	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
心臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。

		られた。
肝臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
脾臓	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
腎臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。
副腎	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
精巣	:	絶対重量の有意な低値と相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群で認められた。
精巣上体	:	絶対重量の有意な低値と相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群で認められた。

7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 投与期間終了時

外部所見	:	粗毛が 100 mg/kg 投与群の雌 2/6 例で、低栄養状態が 100 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で認められた。
子宮	:	小型化が 100 mg/kg 投与群の 2/6 例で認められた。

2) 回復期間終了時

腎臓	:	腎盂拡張が 100 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で認められた。
甲状腺	:	小型化が 100 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で認められた。

7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-6 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が副腎、大腿骨（骨髄を含む）、胸骨（骨髄を含む）、腎臓、肝臓、腸間膜リンパ節、脾臓、胃、胸腺、膀胱及び子宮で認められた。

副腎	:	軽微な球状帯のび慢性肥大が、20 mg/kg 投与群の雌 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例でみられ、100 mg/kg 投与群の雌雄で発現頻度の増加傾向が認められた。
大腿骨（骨髄を含む）	:	軽微あるいは軽度な骨髄細胞密度の低下が 100 mg/kg

- 投与群の雄 1 例と雌 2 例で認められた。
- 胸骨（骨髄を含む）： 軽微な骨髄細胞密度の低下が 100 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例で認められた。
- 腎臓： 軽微~中等度の尿細管の好塩基性化が 100 mg/kg 投与群の雌雄各全例で、軽微な単細胞壊死が 100 mg/kg 投与群の雌雄各全例で認められた。
- 肝臓： 軽微なクッパー細胞の色素沈着が 100 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例で、軽微な肝細胞の単細胞壊死が 100 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例で、軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が 20 mg/kg 投与群の雄 5 例、100 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌全例で認められた。
- 腸間膜リンパ節： 軽微な萎縮が 100 mg/kg 投与群の雌 3 例で認められた。
- 脾臓： 軽微なリンパ濾胞の萎縮が 100 mg/kg 投与群の雌 2 例で認められた。
- 胃： 軽微な腺胃のびらんが 100 mg/kg 投与群の雄 2 例で認められた。
- 胸腺： 軽微~中等度な萎縮が 100 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 4 例で認められた。
- 膀胱： 軽微な被蓋細胞の肥大が 100 mg/kg 投与群の雄 4 例と雌全例で認められた。
- 子宮： 剖検において小型化が認められた 100 mg/kg 投与群の 2 例に軽度な萎縮が認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

- 腎臓： 軽微な尿細管拡張が 100 mg/kg 投与群の雌 1 例で、軽微な再生尿細管が対照群の雄 3 例と雌 1 例、4 mg/kg 投与群の雄 1 例、20 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例で、軽微な皮髄境界部の鉍質沈着が 4 及び 20 mg/kg 投与群の雄各 1 例に、軽微な間質性の細胞浸潤が 4 mg/kg 投与群の雄 1 例、20 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例、100 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に、腎芽腫が 4 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。
- 肝臓： 軽微あるいは軽度な辺縁帯の肝細胞の空胞化が対照群の雌雄各 2 例、4 mg/kg 投与群の雌雄各 3 例、20 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 5 例、100 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例で、軽微な髓外造血が 100 mg/kg 投与群の雄 1 例で、軽微な限局性の出血が 20 mg/kg 投与群の雄 1 例で、軽

- 微な微小肉芽腫が対照群の雄 4 例と雌全例、4 mg/kg 投与群の雄全例と雌 5 例、20 mg/kg 投与群の雌雄各 5 例、100 mg/kg 投与群の雄 4 例と雌 2 例で認められた。
- 肺（気管支を含む）： 軽微な肺胞マクロファージの出現が 100 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。
- 前立腺： 軽微あるいは軽度な間質性の細胞浸潤が対照群の 3 例、100 mg/kg 投与群の 2 例で認められた。
- 脾臓： 軽微な髄外造血が対照群の雄 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 3 例で認められた。
- 精巣： 軽微な精細管の萎縮が 100 mg/kg 投与群の 1 例で認められた。
- 甲状腺： 軽微な異所性胸腺が対照群の雄 1 例、100 mg/kg 投与群の雌 1 例で、軽微な總後体遺残が対照群の雌雄各 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 3 例で認められた。

2) 回復期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が副腎、腎臓及び肝臓で認められた。

- 副腎： 軽微な球状帯のび慢性肥大が対照群の雄 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 1 例でみられ、100 mg/kg 投与群の雄で発現頻度の増加傾向が認められた。
- 腎臓： 軽微あるいは軽度な尿細管の好塩基性化が 100 mg/kg 投与群の雌雄各全例に（剖検において腎盂拡張がみられた 100 mg/kg 投与群の雌 1 例を含む）認められた。
- 肝臓： 軽微なクッパー細胞の色素沈着が 100 mg/kg 投与群の雄 4 例で、軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が 100 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 1 例で認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

- 腎臓： 剖検において腎盂拡張が認められた 100 mg/kg 投与群の雌 1 例で中等度な腎盂拡張と軽度な再生尿細管が認められた。また、軽微な再生尿細管が対照群の雄 2 例、100 mg/kg 投与群の雄 1 例で、軽微な皮髄境界部の鉍質沈着が対照群の雌 1 例で、軽微な間質性な細胞浸潤が対照群の雄 2 例、100 mg/kg 投与群の雄 3 例で認められた。
- 肝臓： 軽微あるいは軽度な辺縁帯の肝細胞の空胞化が対照群の雌 3 例で、軽微な髄外造血が 100 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例で、軽微な微小肉芽腫が対照群の雄 3 例と雌 5 例、100 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌 4 例で認められた。

B-6582

- 脾臓 : 軽微な髄外造血が対照群及び 100 mg/kg 投与群の雌各 1 例で認められた。
- 甲状腺 : 剖検において小型化が認められた 100 mg/kg 投与群の雌 1 例で軽微な異所性胸腺と鰓後体遺残がみられたが、小型化に相当する所見は認められなかった。

8. 考察

アセナフチレンの 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹] を用いて実施した。投与量は 0 (0.5 w/v% メチルセルロース水溶液：対照群)、4、20 及び 100 mg/kg とし、また、対照群と 100 mg/kg 投与群の一部の個体 (1 群雌雄各 6 匹) については投与期間終了後 2 週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

詳細な観察を含む一般状態では、100 mg/kg 投与群の雌で流涎が散見されたほか、一部で粗毛及び削瘦も認められた。更に、オープンフィールド内観察に立ち上がり回数
の低値も認められた。なお、これらの変化は休薬により消失した。その他、回復期間中に 100 mg/kg 投与群の雄でオープンフィールド内観察に立ち上がり回数の低値がみられたが、投与期間中には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。

機能検査、握力及び自発運動量では、100 mg/kg 投与群の雄で聴覚に、100 mg/kg 投与群の雌で痛覚に弱い反応の動物が散見された。また、100 mg/kg 投与群の雌で前肢握力の低値が、100 mg/kg 投与群の雌雄で自発運動量の低値がみられた。これらの変化は病理学検査では中枢及び末梢神経系に異常はみられていないものの被験物質投与の影響が疑われた。なお、回復 2 週においても 100 mg/kg 投与群の雌雄で前肢及び後肢握力の低値が認められた。その他、自発運動量について 20 mg/kg 投与群の雌で高値が投与 4 週に、100 mg/kg 投与群の雌で高値が回復 2 週に認められたが、いずれもごく軽度で一時的な変化であることから偶発性と判断した。

体重及び摂餌量では、低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、体重増加量も低値を示し、増加抑制が認められた。回復期間中においても 100 mg/kg 投与群の雌雄で低値がみられたが、体重増加量及び回復 14 日の摂餌量には対照群と差がなく休薬による回復性が認められた。

尿検査 (摂水量を含む) では、沈渣において小円形上皮細胞の陽性例の発現頻度の増加傾向が 100 mg/kg 投与群の雄で、摂水量及び尿量の高値並びに浸透圧の低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、被験物質投与による腎臓への影響が疑われた。なお、回復 2 週においても沈渣で小円形上皮細胞の陽性例の発現頻度の増加傾向及び尿量の高値あるいは浸透圧の低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、休薬による回復性は認められなかった。

血液学検査では、網赤血球率の低値及び血小板数の高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、ヘモグロビン量及び平均赤血球血色素濃度の高値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が 100 mg/kg 投与群の雌でみられ、いずれの変化も発現機序は明らかではないものの被験物質投与の影響が疑われた。なお、回復期間終了時においても血小板数の高値が 100 mg/kg 投与群の雄でみられたものの程度は軽減し、網赤血球率も増加に転じていることから、休薬により回復性が認められた。その他、赤血球数の

低値が 4 mg/kg 投与群の雄と 20 mg/kg 投与群の雌で、白血球百分率でリンパ球比率の低値が 4 mg/kg 投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度で高用量群には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。また、回復期間終了時にフィブリノーゲン量及び白血球百分率と実数で好塩基球の低値が 100 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれもごく軽度で投与期間終了時には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。

血液化学検査では、総コレステロールとリン脂質の高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、総たん白質及びアルブミンの高値が 100 mg/kg 投与群の雄でみられ、被験物質投与による肝臓への影響が疑われた。回復期間終了時においても総コレステロール及びリン脂質の高値が 100 mg/kg 投与群の雌でみられたものの程度は軽減していることから、休薬による回復性が認められた。その他、投与期間終了時に AST 及びクレアチニンの低値が 100 mg/kg の投与群の雌でみられたが、ごく軽度であり、障害を示唆するとされる高値ではないことから、重要ではないと判断した。また、トリグリセライドの高値が 4 mg/kg 投与群の雄で、尿素窒素の低値が 20 mg/kg 投与群の雌で、無機リンの低値が 4 mg/kg 投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度で高用量群には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。更に、回復期間終了時に、無機リンの高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、グルコースの低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、総たん白質、アルブミン及び A/G 比の低値が 100 mg/kg 投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度で投与期間終了時には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。

病理学検査では、剖検で粗毛、低栄養状態及び子宮の小型化が 100 mg/kg 投与群の雌でみられ、組織学的変化としては肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が 20 mg/kg 以上の投与群の雄及び 100 mg/kg 投与群の雌で、クッパー細胞の色素沈着及び単細胞壊死が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。更に、胸腺の萎縮、大腿骨（骨髄を含む）と胸骨（骨髄を含む）の骨髄細胞密度の低下、腎臓の尿細管の好塩基性化及び単細胞壊死、膀胱の被蓋細胞の肥大並びに副腎の球状帯のび慢性肥大の発現頻度の増加傾向が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、腺胃のびらんが 100 mg/kg 投与群の雄で、腸間膜リンパ節、脾臓のリンパ嚢胞及び子宮の萎縮が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。また、重量の変化としては肝臓の相対重量の高値が 20 mg/kg 以上の投与群の雌雄で、心臓の絶対重量の低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、相対重量の低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、胸腺の絶対及び相対重量の低値が 100 mg/kg 投与群の雌で、脾臓の絶対重量の低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、卵巣の絶対重量の低値が 100 mg/kg 投与群で認められた。回復期間終了時には、組織学的変化として、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、クッパー細胞の色素沈着が 100 mg/kg 投与群の雄で、腎臓の尿細管の好塩基性化が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、副腎の球状帯のび慢性肥大の発現頻度の増加傾向が 100 mg/kg 投与群の雄で認められたが、副腎の変化を除いてはいずれも投与期間終了時より軽減するか消失し、回復性が示唆された。なお、100 mg/kg 投与群で認められた投与期間終了時の脳、腎臓及び副腎の相対重量の高値、回復期間終了時

B-6582

の胸腺、心臓、肝臓、腎臓、副腎、精巣及び精巣上体の絶対重量の低値と相対重量の高値並びに脳及び脾臓の相対重量の高値については、体重が増加抑制されたことに伴った変化と考えられた。また、剖検で回復期間終了時に腎盂拡張及び甲状腺の小型化が 100 mg/kg 投与群の雌にみられたが、発現状況から偶発性と判断した。

以上の結果、アセナフチレンの本試験条件下における無影響量は主として病理学検査における雌雄の肝臓重量の高値及び雄の小葉中心性の肝細胞肥大から 4 mg/kg/day と推定された。なお、回復期間中あるいは回復期間終了時にも雌雄の握力及び尿検査に、雄の病理学検査の副腎に変化がみられたものの、その他についてはいずれも消失あるいは軽減し、回復性を示した。

要 約

アゾイック CC5 の遺伝子突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略した) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略した) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド (以下、DMSO と略す) を用いた。

試験は、1.22~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で予備試験を実施した。その結果より本試験は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1537 については 9.77~313 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535 については 39.1~1250 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* については 313~5000 µg/plate の範囲の 5 用量で実施した。また、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 については、用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められたため、39.1~5000 µg/plate の範囲の 8 用量で実施した。

1. 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化しない場合の 156 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 2500 µg/plate 以上で認められた。また、本被験物質による着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

2. 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 156 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 の 625 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 の 1250 µg/plate 以上で認められた。

3. 復帰変異コロニー数

2 回の本試験において、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 において、陰性対照値の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数が認められ、再現性を示した。なお、陰性対照値の 2 倍以上となる増加を示した菌株の各用量について比活性値を計算した結果、本試験 1 回目の代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 において、最大で 968Rev/mg となり、強い変異原性を示した。

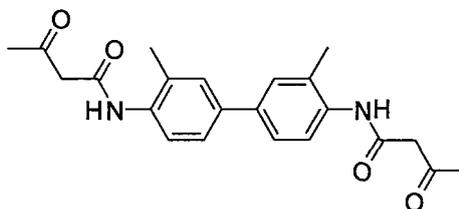
以上の試験結果より、本試験条件下において、アゾイック CC5 は、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する (陽性) と判定した。

被験物質及び被験液の調製

1. 被験物質及び溶媒

(1) 被験物質

名 称	ナフトール AS-G
別 名	アゾイック CC5、4,4'-Bisacetoaceto-o-tolidide
CAS 番号	91-96-3
ロット番号	GF01
構造式	



純 度	97.5%
分 子 量	380.44
融 点	198.2°C
常温における性状	淡黄色粉末
安 定 性	通常の取扱い条件においては安定。なお、試験終了後の被験物質について、製造元で分析をした結果、純度に変化がないことから成分に変性がないことが確認された。(別添 2)
保存方法	冷暗所・密栓
保存温度	保存期間(2008.1.28~2008.3.25)中の実測温度：0.7~9.8°C
保存場所	東京研究所 被験物質調製保存室
廃棄方法	試験終了後の残量は株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で焼却後、廃棄した。

なお、上記被験物質情報は、製造元からの情報による。

(2) 溶媒

名 称	DMSO
製 造 元	和光純薬工業株式会社
ロット番号	WKF6984
規 格	JIS 規格 試薬特級 99.0%以上
保存方法	室温保存
保存場所	東京研究所 被験物質調製保存室

(3) 溶媒の選択理由

溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水の 50 mg/mL、アセトンの 100 mg/mL で溶解せず、DMSO の 50 mg/mL では溶解し、いずれも発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、DMSO を溶媒として試験を実施した。

2. 被験液の調製方法

(1) 予備試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤（GR-120、株式会社エー・アンド・ディ）を用いて秤量し、その秤量値 203.5 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、4.070 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、50 mg/mL の被験液を公比 4 で順次 6 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781、0.195、0.0488 及び 0.0122 mg/mL の計 7 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

(2) 本試験 1 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤（GR-120、株式会社エー・アンド・ディ）を用いて秤量し、その秤量値 247.1 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、4.942 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、50 mg/mL の被験液を公比 2 で順次 9 段階希釈し、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195 及び 0.0977 mg/mL の計 10 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

(3) 本試験 2 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤（GR-120、株式会社エー・アンド・ディ）を用いて秤量し、その秤量値 315.5 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、6.310 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、50 mg/mL の被験液を公比 2 で順次 9 段階希釈し、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195 及び 0.0977 mg/mL の計 10 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

(4) 被験液の保存条件

被験液は用時調製とし、保存はしなかった。

試験材料及び試験方法

1. 試験菌株

(1) 菌株の種類

次の 5 種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

S. typhimurium TA100

S. typhimurium TA1535

E. coli WP2 *uvrA*

フレームシフト型

S. typhimurium TA98

S. typhimurium TA1537

表 3 菌株の換算生菌数一覧

菌 株	菌 数(cells/mL)		
	予備試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	5.51×10^9	5.23×10^9	4.96×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	5.04×10^9	5.02×10^9	4.87×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	8.18×10^9	8.09×10^9	7.94×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	6.21×10^9	5.91×10^9	5.35×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.07×10^9	3.09×10^9	3.11×10^9

(3) 本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mL の被験液を公比 4 で 6 段階希釈した計 7 用量 (1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 µg/plate) を用い、予備試験を実施した。なお、予備試験の結果を別表 1 に示した。

予備試験の結果、本被験物質処理による生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 の 1250 µg/plate 以上で認められた。なお、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 において、用量依存的な復帰変異コロニー数が認められた。また、本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化しない場合の 313 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 5000 µg/plate で認められた。また、本被験物質による着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

このため本試験の試験用量は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1537 については 313 µg/plate、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535 については 1250 µg/plate をそれぞれ最高用量として、以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量を設定した。また、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* については 5000 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 4 段階希釈した計 5 用量を設定した。なお、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 については、用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められたため、5000 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 7 段階希釈した計 8 用量を設定した。

(4) プレート数

被験物質処理群、陰性対照及び陽性対照処理群について、予備試験ではそれぞれ 2 枚、2 回の本試験ではそれぞれ 3 枚のプレートを用いた。

(5) 試験操作 (プレインキュベーション法)

- 1) 滅菌した小試験管に調製した被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1 mL 入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、それぞれの小試験管に各菌株の培養液 0.1 mL を加えた。
- 2) 小試験管を攪拌後すぐに 37°C で 20 分間振盪しながらプレインキュベーションし、これに 45°C に保温されているトッパアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最少グルコース寒天平板培地に均一に重層した。

- 3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを 2.0 mL 加えた後に最少グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら 1)～3)の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 4) 最少グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認し、最少グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°Cで予備試験では 49.5 時間、本試験 1 回目では 49.5 時間、本試験 2 回目では 48.5 時間培養した。
- 5) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色を確認した結果、代謝活性化しない場合の 156 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 2500 µg/plate 以上で沈殿が認められたため、目視による計数を行った。なお、陽性対照のみ自動コロニーカウンタ（コロニーアナライザー-CA-11D systems、システムサイエンス株式会社）を用いて計数（面積補正、補正值：1.21）した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

5. 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数（陰性対照値）に対して 2 倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の 2 倍以上となる増加を示し、2 回の本試験で再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

試験結果及び考察

1. 試験結果

試験の結果を別表 1～5 及び図 1～10 に示した。また、比活性値を別表 6～8 に示した。なお、図は別表 2、3 より作成した。

(1) 培養終了後の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化しない場合の 156 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 2500 µg/plate 以上で認められた。また、本被験物質による着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。なお、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 156 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 の 625 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 の 1250 µg/plate 以上で菌の生育阻害が認められた。

(2) 復帰変異コロニー数

代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 において、陰性対照値の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数が認められ、再現性を示した。

(3) 試験系の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理限界（平均値±3SD：別添1）内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。

2. 考察

2回の本試験において、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 において、陰性対照値の2倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数が認められ、再現性を示した。なお、陰性対照値の2倍以上となる増加を示した菌株の各用量について比活性値を計算した結果、本試験1回目の代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 において、最大で 968Rev/mg となり、強い変異原性を示した。

以上の試験結果より、本試験条件下において、アゾイック CC5 は、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する（陽性）と判定した。

参考文献

- (1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- (2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- (3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp⁺ Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- (4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- (5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- (6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶 (編): 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- (7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編: 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- (8) 石館 基 (監修): 微生物を用いる変異原性試験データ集 (能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.

(別表1)

試験結果表 (予備試験)

被験物質の名称:アゾイック CC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年2月25日 より 2008年2月28日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 ^{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	94 110 (102)	6 9 (8)	13 20 (17)	26 27 (27)	6 11 (9)
	1.22	95 109 (102)	12 6 (9)	21 12 (17)	25 33 (29)	9 9 (9)
	4.88	108 112 (110)	14 5 (10)	17 19 (18)	21 21 (21)	8 5 (7)
	19.5	118 101 (110)	13 7 (10)	19 18 (19)	22 29 (26)	10 7 (9)
	78.1	96 98 (97)	8 5 (7)	22 12 (17)	34 26 (30)	8 4 (6)
	313 #	83 * 111 * (97)	8 * 6 * (7)	16 11 (14)	30 * 16 * (23)	9 * 6 * (8)
	1250 #	85 * 99 * (92)	15 * 6 * (11)	13 16 (15)	18 * 22 * (20)	8 * 7 * (8)
	5000 #	75 * 108 * (92)	7 * 7 * (7)	13 24 (19)	14 * 16 * (15)	5 * 8 * (7)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	163 167 (165)	17 17 (17)	20 18 (19)	54 53 (54)
1.22		173 138 (156)	17 17 (17)	14 22 (18)	68 63 (66)	10 6 (8)
4.88		155 112 (134)	20 19 (20)	25 9 (17)	49 53 (51)	6 10 (8)
19.5		144 166 (155)	12 16 (14)	15 18 (17)	76 88 (82)	8 6 (7)
78.1		137 145 (141)	14 8 (11)	17 18 (18)	120 132 (126)	6 9 (8)
313		191 184 (188)	12 13 (13)	25 19 (22)	270 270 (270)	5 * 11 * (8)
1250		298 * 310 * (304)	13 * 18 * (16)	21 15 (18)	390 * 381 * (386)	7 * 16 * (12)
5000 #		342 * 293 * (318)	8 * 17 * (13)	13 20 (17)	464 * 337 * (401)	8 * 5 * (7)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	S9Mixを必要としないもの 用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	506 552 (529)	298 306 (302)	76 88 (82)	459 448 (454)	1677 1476 (1577)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	S9Mixを必要とするもの 用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	787 862 (825)	338 326 (332)	1027 1183 (1105)	315 292 (304)	131 126 (129)

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ : アジ化ナトリウム
ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]ピロピルアミノ]アクリジン・2HCl
2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
: 被験物質の沈澱が認められたことを示す。
()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

試験結果表 (本試験 1回目:-S9Mix)

被験物質の名称: アゾイックC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年3月10日 より 2008年3月13日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	118 127 116 (120 ± 5.9)	7 7 16 (10 ± 5.2)	42 27 32 (34 ± 7.6)	12 18 13 (14 ± 3.2)	9 9 5 (8 ± 2.3)	
	9.77	126 120 127 (124 ± 3.8)	14 16 5 (12 ± 5.9)	NT	18 15 22 (18 ± 3.5)	7 6 2 (5 ± 2.6)	
	19.5	126 127 101 (118 ± 14.7)	14 12 13 (13 ± 1.0)	NT	19 14 21 (18 ± 3.6)	8 8 5 (7 ± 1.7)	
	39.1	114 125 111 (117 ± 7.4)	13 9 20 (14 ± 5.6)	NT	20 19 13 (17 ± 3.8)	9 10 10 (10 ± 0.6)	
	78.1	122 113 113 (116 ± 5.2)	12 12 9 (11 ± 1.7)	NT	17 20 14 (17 ± 3.0)	6 8 5 (6 ± 1.5)	
	156 #	116 123 145 (128 ± 15.1)	6 12 14 (11 ± 4.2)	NT	14 17 20 (17 ± 3.0)	6 * 2 * 7 * (5 ± 2.6)	
	313 #	115 * 127 * 136 * (126 ± 10.5)	9 * 7 * 9 * (8 ± 1.2)	28 24 39 (30 ± 7.8)	19 * 14 * 19 * (17 ± 2.9)	10 * 10 * 7 * (9 ± 1.7)	
	625 #	NT	NT	30 22 49 (34 ± 13.9)	NT	NT	
	1250 #	NT	NT	28 30 22 (27 ± 4.2)	NT	NT	
	2500 #	NT	NT	33 32 33 (33 ± 0.6)	NT	NT	
	5000 #	NT	NT	29 15 24 (23 ± 7.1)	NT	NT	
	陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	S9Mixを必要としないもの	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		コロニー数/プレート	621 569 564 (585 ± 31.6)	223 220 240 (228 ± 10.8)	79 71 88 (79 ± 8.5)	564 583 540 (562 ± 21.5)	2052 1955 1900 (1969 ± 77.0)

(備考)

AF-2 : 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド
SAZ : アジ化ナトリウム
ICR-191 : 2-オキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

: 被験物質の沈澱が認められたことを示す。

* : 被験物質の生育阻害が認められたことを示す。

NT : 試験せず。

()内は、3枚の平均値及び標準偏差を示す。

(別表3)

試験結果表 (本試験 1回目:+S9Mix)

被験物質の名称: アゾイックCC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年3月10日 より 2008年3月13日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	125 143 134 (134 ± 9.0)	10 17 14 (14 ± 3.5)	44 28 35 (36 ± 8.0)	24 58 56 (46 ± 19.1)	12 15 13 (13 ± 1.5)	
	9.77	NT	NT	NT	NT	5 10 10 (8 ± 2.9)	
	19.5	NT	NT	NT	NT	8 12 12 (11 ± 2.3)	
	39.1	125 143 155 (141 ± 15.1)	6 13 14 (11 ± 4.4)	NT	73 74 53 (67 ± 11.8)	10 10 15 (12 ± 2.9)	
	78.1	157 159 159 (158 ± 1.2)	6 9 11 (9 ± 2.5)	NT	90 106 118 (105 ± 14.0)	9 11 6 (9 ± 2.5)	
	156	169 169 190 (176 ± 12.1)	11 7 13 (10 ± 3.1)	NT	193 206 193 (197 ± 7.5)	8 9 9 (9 ± 0.6)	
	313	223 176 188 (196 ± 24.4)	13 16 13 (14 ± 1.7)	39 28 19 (29 ± 10.0)	209 264 219 (231 ± 29.3)	12 * 12 * 11 * (12 ± 0.6)	
	625	223 223 214 (220 ± 5.2)	11 * 15 * 10 * (12 ± 2.6)	29 20 37 (29 ± 8.5)	305 263 240 (269 ± 33.0)	NT	
	1250	217 * 214 * 248 * (226 ± 18.8)	14 * 12 * 12 * (13 ± 1.2)	23 23 23 (23 ± 0.0)	420 * 376 * 385 * (394 ± 23.2)	NT	
	2500 #	300 * 288 * 298 * (295 ± 6.4)	NT	31 38 29 (33 ± 4.7)	473 * 461 * 417 * (450 ± 29.5)	NT	
	5000 #	298 * 295 * 311 * (301 ± 8.5)	NT	21 26 27 (25 ± 3.2)	470 * 454 * 579 * (501 ± 68.0)	NT	
	陽性対照	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	S9Mixを必要とするもの	用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
		コロニー数/プレート	873 862 886 (874 ± 12.0)	337 275 324 (312 ± 32.7)	1139 1129 1120 (1129 ± 9.5)	337 322 323 (327 ± 8.4)	104 107 106 (106 ± 1.5)

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

: 被験物質の沈澱が認められたことを示す。
* : 被験物質の生育阻害が認められたことを示す。
NT : 試験せず。
()内は、3枚の平均値及び標準偏差を示す。

(別表4)

試験結果表 (本試験 2回目:-S9Mix)

被験物質の名称: アゾイックCC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年3月24日 より 2008年3月27日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	98 103 106 (102 ± 4.0)	9 10 8 (9 ± 1.0)	15 17 17 (16 ± 1.2)	17 19 26 (21 ± 4.7)	5 10 13 (9 ± 4.0)	
	9.77	113 104 109 (109 ± 4.5)	10 7 11 (9 ± 2.1)	NT	26 16 15 (19 ± 6.1)	4 4 8 (5 ± 2.3)	
	19.5	98 116 115 (110 ± 10.1)	7 11 12 (10 ± 2.6)	NT	24 27 25 (25 ± 1.5)	5 6 7 (6 ± 1.0)	
	39.1	112 110 112 (111 ± 1.2)	9 11 9 (10 ± 1.2)	NT	21 25 22 (23 ± 2.1)	7 3 7 (6 ± 2.3)	
	78.1	95 107 97 (100 ± 6.4)	10 12 12 (11 ± 1.2)	NT	25 25 20 (23 ± 2.9)	3 3 16 (7 ± 7.5)	
	156 #	107 105 101 (104 ± 3.1)	13 7 6 (9 ± 3.8)	NT	18 25 21 (21 ± 3.5)	10* 6* 5* (7 ± 2.6)	
	313 #	112* 77* 118* (102 ± 22.1)	9* 6* 11* (9 ± 2.5)	19 18 21 (19 ± 1.5)	21* 25* 17* (21 ± 4.0)	7* 4* 13* (8 ± 4.6)	
	625 #	NT	NT	12 19 (17 ± 4.4)	NT	NT	
	1250 #	NT	NT	15 20 12 (16 ± 4.0)	NT	NT	
	2500 #	NT	NT	13 16 16 (15 ± 1.7)	NT	NT	
	5000 #	NT	NT	11 16 9 (12 ± 3.6)	NT	NT	
	陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	S9Mixを必要としないもの	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	548 514 500 (521 ± 24.7)	335 334 307 (325 ± 15.9)	75 63 65 (68 ± 6.4)	502 511 482 (498 ± 14.8)	1902 1994 1887 (1928 ± 57.9)	

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ : アジ化ナトリウム
ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]プロピルアミン/アクリジン・2HCl

: 被験物質の沈澱が認められたことを示す。
* : 被験物質の生育阻害が認められたことを示す。
NT : 試験せず。
()内は、3枚の平均値及び標準偏差を示す。

(別表5)

試験結果表 (本試験 2回目:+S9Mix)

被験物質の名称: アソニックCC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年3月24日 より 2008年3月27日						
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)						
		塩基対置換型			フレームシフト型			
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537		
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	114 130 107 (117 ± 11.8)	7 14 10 (10 ± 3.5)	12 11 24 (16 ± 7.2)	50 31 40 (40 ± 9.5)	11 17 9 (12 ± 4.2)		
	9.77	NT	NT	NT	NT	11 13 10 (11 ± 1.5)		
	19.5	NT	NT	NT	NT	12 6 7 (8 ± 3.2)		
	39.1	141 144 174 (153 ± 18.2)	8 9 11 (9 ± 1.5)	NT	70 48 70 (63 ± 12.7)	11 17 16 (15 ± 3.2)		
	78.1	162 154 172 (163 ± 9.0)	13 10 16 (13 ± 3.0)	NT	113 110 87 (103 ± 14.2)	13 15 12 (13 ± 1.5)		
	156	199 207 195 (200 ± 6.1)	12 13 15 (13 ± 1.5)	NT	162 145 143 (150 ± 10.4)	9 12 10 (10 ± 1.5)		
	313	226 185 227 (213 ± 24.0)	11 12 7 (10 ± 2.6)	29 22 18 (23 ± 5.6)	182 210 168 (187 ± 21.4)	21 * 11 * 6 * (13 ± 7.6)		
	625	210 232 232 (225 ± 12.7)	14 * 5 * 14 * (11 ± 5.2)	24 23 19 (22 ± 2.6)	225 240 188 (218 ± 26.8)	NT		
	1250	309 * 272 * 329 * (303 ± 28.9)	12 * 15 * 9 * (12 ± 3.0)	22 13 16 (17 ± 4.6)	288 * 339 * 322 * (316 ± 26.0)	NT		
	2500 #	373 * 346 * 374 * (364 ± 15.9)	NT	19 21 26 (22 ± 3.6)	382 * 375 * 278 * (345 ± 58.1)	NT		
	5000 #	356 * 366 * 345 * (356 ± 10.5)	NT	19 21 18 (19 ± 1.5)	429 * 520 * 527 * (492 ± 54.7)	NT		
	陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
			用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
			コロニー数/プレート	777 748 782 (769 ± 18.4)	345 323 333 (334 ± 11.0)	1205 1093 1182 (1160 ± 59.2)	333 303 333 (323 ± 17.3)	104 97 93 (98 ± 5.6)

(備考)

2AA :2-アミノアントラセン

B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

: 被験物質の沈澱が認められたことを示す。

* : 被験物質の生育阻害が認められたことを示す。

NT : 試験せず。

()内は、3枚の平均値及び標準偏差を示す。

(別表6)

予備試験における比活性値

被験物質の名称:アゾイック CC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年2月25日 より 2008年2月28日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)					
	1.22					
	4.88					
	19.5					
	78.1					
	313					
	1250					
	5000					
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)					
	1.22					
	4.88					
	19.5					
	78.1				922	
	313				690	
	1250				266	
	5000				69	

(備考)

比活性値は、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したものののみ記載した。

(別表7)

本試験1回目における比活性値

被験物質の名称: アゾイックCC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年3月10日 より 2008年3月13日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)					
	9.77					
	19.5					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313					
	625					
	1250					
	2500					
	5000					
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)				
9.77						
19.5						
39.1						
78.1					755	
156					968	
313					591	
625					357	
1250					278	
2500		64			162	
5000		33			91	

(備考)

比活性値は、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したのみ記載した。

(別表8)

本試験2回目における比活性値

被験物質の名称: アゾイックCC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年3月24日 より 2008年3月27日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)					
	9.77					
	19.5					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313					
	625					
	1250					
	2500					
	5000					
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)					
	9.77					
	19.5					
	39.1					
	78.1				807	
	156				705	
	313				470	
	625				285	
	1250	149			221	
	2500	99			122	
	5000	48			90	

(備考)

比活性値は、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したのもののみ記載した。

4. 要約

アゾイック CC5 の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を、遺伝毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する、3850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の代謝活性化では、50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量及び 50%細胞増殖抑制濃度 (IC50、概略値) は、それぞれ 241 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 200.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。短時間処理法の非代謝活性化では、50%を超える細胞増殖抑制作用は最高用量においても認められなかった。また、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では、高用量域において被験物質の析出・固着が著しく、正確な細胞密度測定が不可能であったため、当該標本の顕微鏡による観察を実施し、最高用量においても染色体標本観察に十分な細胞が存在することを確認した。これらの結果から、染色体異常試験における最高用量を、短時間処理法の代謝活性化では 241 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 3850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常を有する細胞の総出現率のうち、ギャップを含まない場合 (TA 値) は、すべての処理法において陰性と判定された。倍数体の総出現頻度においては、短時間処理法の代謝活性化では、全ての用量で陰性と判定されたが、非代謝活性化では、963 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上において倍数体の総出現頻度に用量依存性の増加が認められ、最高用量の 3850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では陽性の判定基準内の増加を示したため陽性と判定された。連続処理法の 24 時間処理では、241 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においてのみ疑陽性と判定された。連続処理法の 48 時間処理では、全ての用量において倍数体の総出現頻度の増加が認められ、高用量では downturn が認められたものの用量依存性が確認された。短時間処理法の非代謝活性化及び 48 時間処理について、染色体数的異常誘発性の強さの指標値である PD20 値¹⁾ (観察細胞の 20%に数的異常が見られる用量) を求めたが、それぞれ 5.3 mg/mL 及び 0.36 mg/mL であった。以上の結果から、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の 48 時間処理で用量依存性を伴った倍数体の総出現頻度の増加が認められたこと、代謝活性化を伴わない方法において、ほぼ被験物質による処理時間の長さに伴って倍数体の総出現頻度が増加していたことから、本被験物質は染色体数的異常を誘発するものと総合的に判断した。

なお、全ての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、アゾイック CC5 は本試験条件下において染色体構造異常は誘発し

M-1308

ないが、染色体数的異常を誘発すると結論した。

5. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、アゾイック CC5 の安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞 (CHL/IU) を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

Good Laboratory Practice (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、
環境企発第 031121004 号、平成 17 年 4 月 1 日最終改正)
- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」
(OECD 理事会：1997 年 11 月 26 日)

遺伝毒性試験ガイドライン

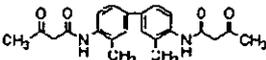
- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
(平成 15 年 11 月 21 日；薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、
環境企発第 031121002 号、平成 18 年 11 月 20 日最終改正)
- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 473」
(OECD 理事会：1997 年 7 月 21 日)

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

被験物質の純度等の特性は、東京化成工業株式会社における非 GLP 下での分析に基づくものである (Attached Data 1)。

製造者	:	東京化成工業株式会社
名称	:	アゾイック CC5
英名称	:	Azoic CC5
英名別称	:	Naphthol AS-G N,N'-Bis(acetoacetyl)-3,3'-dimethylbenzidine
ロット番号	:	GF01
CAS 番号	:	91-96-3
化学構造式	:	
分子量	:	380.44
純度	:	97.5 %
融点	:	198.2 °C
性状	:	淡灰色粉末
入手量	:	25 g
安定性	:	試験終了後に東京化成工業株式会社において特性を測定し、その結果を入手して安定性を確認した (Attached Data 2)。
保存方法	:	冷蔵 (保存期間中の実測温度: 3~6°C)、遮光、防湿
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室 冷蔵庫
取扱い上の注意	:	特になし
返却	:	被験物質の残余物は、東京化成工業において全て廃棄した。

6.1.2 溶媒

名称	:	注射用水
ロット番号	:	7D74N
規格	:	日本薬局方
製造元	:	株式会社大塚製薬工場
保存方法	:	室温
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室
溶媒の選択理由	:	試験開始前に被験物質の溶媒に対する溶解性の検討を

実施した結果、注射用水では 38.5 mg/mL で、DMSO では 385 mg/mL で不溶であった。しかしながら、注射用水では、超音波処理を施すことで良好な懸濁性が得られたことから、注射用水に被験物質を懸濁させることとした。

6.2 被験液の調製

6.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.3850 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 38.5 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：3850 μ g/mL）を調製した。次いで、38.5 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 7 段階希釈し、19.3、9.63、4.81、2.41、1.20、0.602 及び 0.301 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

2) 染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.3850 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 38.5 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：3850 μ g/mL）を調製した。次いで、38.5 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 7 段階希釈し、19.3、9.63、4.81、2.41、1.20、0.602 及び 0.301 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では、2.41 から 0.301 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では、38.5 から 4.81 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を用いた。連続処理法では、被験物質 0.3850 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 38.5 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：3850 μ g/mL）を調製した。次いで、38.5 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 4 段階希釈し、19.3、9.63、4.81 及び 2.41 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理及び 48 時間処理ともに 38.5 から 2.41 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を用いた。

6.2.2 調製頻度

用時に調製した。

6.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液が安定であることを確認した。

ロット番号 : 571834
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存方法 : 冷凍 (-80°C 設定の冷凍庫)
 保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号 : 300142、366167
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存方法 : 冷蔵
 保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 冷蔵庫

6.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。確認試験及び追加試験は実施しなかった。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理

6.6.1 識別方法

1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「-」とし、連続処理法では 24 時間処理を「24-」、48 時間処理を「48-」とした。更にこれに続けて陰性対照 (Negative Control) の場合は「NC」を、被験物質用量群の場合は濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。ただし、陽性対照 (Positive Control) は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」~「99」までの 2 桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

6.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 3850 µg/mL とし、以下公比 2 で希釈した 1930、963、481、241、120、60.2 及び 30.1 µg/mL の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では、241 µg/mL で 50%を

超える細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀、概略値) は 200.7 µg/mL であった。短時間処理法の非代謝活性化では、最高用量の 3850 µg/mL においても 50% を超える細胞増殖抑制作用は認められなかった。また、連続処理法の 24 時間処理では、最高用量の 3850 µg/mL から 963 µg/mL において、48 時間処理では、最高用量の 3850 µg/mL 及び 1930 µg/mL において、被験物質と推測される物質のプレートの底面への固着が著しく認められたため、単層細胞密度測定装置 (機器登録 No.926) による測定は行ったが、IC₅₀ の算出からは除外した。しかしながら、単層細胞密度測定用標本を顕微鏡 (機器 No.2143) によって観察したところ、これらの用量においても、染色体観察用標本の観察に十分と推測される細胞の存在が確認された。これらの結果より、ガイドラインに定められた「細胞増殖が明らかに 50% 以上抑制される用量を最高用量とする。」及び「50% 以上の細胞増殖抑制が認められない場合は、5mg/mL 又は 10mM (いずれか低い方) を最高用量とする。」との規定から、短時間処理法の代謝活性化では 241 µg/mL、短時間処理法の非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 3850 µg/mL を最高用量とした。また、これに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

6.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として実施した。

1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに、被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート (直径 60 mm) を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞 (培養液 5.0 mL) を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 培養終了後、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置 (モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社) を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100% として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞

増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

2) 連続処理法

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50% 細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

6.6.4 染色体異常試験

1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。

- (4) 各群 2 枚のプレート (枝番号-1 及び-2) について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド (デメコルシン溶液、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社) を 0.100 mL 加えた。培養終了後、 0.25% トリプシン溶液 (Trypsin 0.25% 、Invitrogen Co.) で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所 to 滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、 2% ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。
- (5) 残る各群 2 枚のプレート (枝番号-3 及び-4) は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した (培養終了時の結果は、参考データとした)。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

短時間処理法の非代謝活性化において、倍数体の出現率が陽性と判定されたが、染色体構造異常については陰性と判定されたため、連続処理法を実施した。

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート (直径 60 mm) を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞 (培養液 5.0 mL) を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL (最終濃度： $0.050 \mu\text{g}/\text{mL}$) を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 各群 2 枚のプレート (枝番号-1 及び-2) について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド (デメコルシン溶液、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社) を 0.1 mL 加えた。培養終了後、被験物質処理群については可能な限り析出を除去するために培養液を廃棄し、新しい培養液 5.0 mL を添加した遠沈管に細胞を回収した。 0.25% トリプシン溶液 (Trypsin 0.25% 、Invitrogen Co.) で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所 to 滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日以上空気乾燥し、 2% ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。
- (4) 残る各群 2 枚のプレート (枝番号-3 及び-4) は、培養の終了時に肉眼で析出の有

無を確認し、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

6.6.5 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とする。

6.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常はさらに以下のように定義・分類した。

1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

- ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体又は染色分体の同軸上に断片がある（非染色部分が染色分体の同軸上にある）ものであって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるもの。
- 染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸上からはずれているもの、及び非染色部位が染色分体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの、及び非染色部位が染色体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化(frg)他。

2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数（二倍体）と異なり、倍化した場合を数的異常と定義した。

- 倍数体 : polyploidy（核内倍加体：endoreduplication を含む）

6.6.7 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準¹⁾に従い染色体の構造並びに

M-1308

数的異常を持つ細胞の出現率(%)によって以下のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5% 未満	陰 性 (-)
5% 以上 10% 未満	疑陽性 (±)
10% 以上	陽 性 (+)

染色体構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合 (TAG) と含まない場合 (TA) とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

7. 試験結果

7.1 細胞増殖抑制試験

7.1.1 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化では、241 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 200.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ だった。一方、非代謝活性化では、細胞増殖抑制は認められず、50%細胞増殖抑制濃度は求められなかった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 963 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で白桃色に変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化では、全ての用量で析出が認められた。一方、非代謝活性化では、60.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化では、全ての用量で析出が認められた。一方、非代謝活性化では、60.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で析出が認められた。被験物質用量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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 963 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量では、被験物質と思われる物質が多量に存在していたため観察不能であった。また、代謝活性化では 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、非代謝活性化では、241 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.1.2 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 1-3 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4 及び Table 1-4 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理法及び 48 時間処理法ともに、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度の測定を行ったが、24 時間処理では 241 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、48 時間処理では 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で、プレート底面に被験物質と思われる物質の固着が認められ、更に 24 時間処理では 963 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、48 時間処理では 1930 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量では、多量の固着が認められたため、これらの測定値は信頼性に欠けるものと判断した。また、その他の用量では細胞増殖抑制は認められなかったため、50%細胞増殖抑制濃度は求められなかった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、963 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で白桃色に変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 60.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上

の用量で析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24時間処理及び48時間処理ともに、60.2 µg/mL以上の用量で析出が認められた。被験物質用量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、24時間処理では963 µg/mL以上、48時間処理では481 µg/mL以上の用量で被験物質と思われる物質が多量に存在していたため、観察不能であった。また、24時間処理では241 µg/mL以上、48時間処理では241 µg/mLの用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.2 染色体異常試験

7.2.1 短時間処理法

代謝活性化の結果を Fig. 2-1、Table 2-1 及び Table 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 2-2、Table 2-2 及び Table 3-2 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、代謝活性化では全ての用量で認められなかった。一方、非代謝活性化では963 µg/mL以上の用量で白桃色に変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、全ての用量で析出が認められた。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともに全ての用量で析出が認められた。被験物質用量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、代謝活性化では60.2 µg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。一方、非代謝活性化では全ての用量で被験物質と思われる物質が多量に存在していたため、観察不能であった。

3) 染色体構造異常

染色体構造異常の総出現率 (TA) は、代謝活性化では241 µg/mLでは0.5%、120 µg/mLでは1.0%、60.2 µg/mLでは2.5%及び30.1 µg/mLでは0%と陰性の判定基準である5%未満であったため、陰性と判定した。また、非代謝活性化においては、3850 µg/mLでは2.5%、1930 µg/mLでは1.5%、963 µg/mLでは1.0%及び481 µg/mLでは0.5%と陰性の判定基準である5%未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の総出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その総出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の総出現率は、代謝活性化では241 µg/mLでは0%、120 µg/mLでは0.5%、60.2 µg/mLでは0%及び30.1 µg/mLでは0.5%と陰性の判定基準である5%未満であったため、陰性と判定した。一方、非代謝活性化においては、3850 µg/mLで

は 15.0%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 6.5%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 6.0%及び 481 $\mu\text{g/mL}$ では 3.0%と 3850 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10%以上、1930 $\mu\text{g/mL}$ 及び 963 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満、481 $\mu\text{g/mL}$ で陰性の判定基準である 5%未満であったため、陽性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の総出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) 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。

7.2.2 連続処理法

24 時間処理の結果を Fig. 2-3、Table 2-3 及び Table 3-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 2-4、Table 2-4 及び Table 3-4 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、963 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白桃色に変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で析出が認められた。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で析出が認められた。被験物質用量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、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 963 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で被験物質と思われる物質が多量に存在していたため、観察不能であった。また、24 時間処理では 241 $\mu\text{g/mL}$ 以上、48 時間処理では 481 $\mu\text{g/mL}$ の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染構造異常の総出現率 (TA) は、24 時間処理では 3850 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、481 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%及び 241 $\mu\text{g/mL}$ では 0%と陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。また、48 時間処理においては、3850 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、481 $\mu\text{g/mL}$ では 0%及び 241 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%と陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の総出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その総出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の総出現率は、24 時間処理では 3850 $\mu\text{g/mL}$ では 4.0%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 3.5%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 3.5%、481 $\mu\text{g/mL}$ では 4.5%及び 241 $\mu\text{g/mL}$ では 6.5%と 241 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満であったため、疑陽性と判定した。また、48 時間処理では 3850 $\mu\text{g/mL}$ では 30.5%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 21.0%、963 $\mu\text{g/mL}$

M-1308

では 30.5%、481 µg/mL では 27.0%及び 241 µg/mL では 18.5%と全ての用量で陽性の判定基準である 10%以上であったため、陽性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の総出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) 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。

8. 考察

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標である、染色体構造異常を有する細胞の総出現率のうちギャップを含まない場合（TA 値）は、いずれの処理法においても陰性の判定基準である 5%未満であった。

一方、倍数体の総出現率においては、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の 48 時間処理で用量依存性を伴う増加が、連続処理法の 24 時間処理で最低用量において増加が認められたため、陽性と判定した。陽性と判定した処理法のうち、異常細胞の総出現率に用量依存性が認められた短時間処理法の非代謝活性化及び 48 時間処理について、染色体数的異常誘発性の強さの指標値である PD20 値¹⁾（観察細胞の 20% に数的異常が見られる用量）を求めたが、それぞれ 5.3 mg/mL 及び 0.36 mg/mL であった。

なお、全ての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の総出現率は 5%未満で、陰性の判定基準内であった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

倍数体細胞の形成機序には、核内倍加、細胞融合、細胞質分裂の阻害等が知られている。本試験においては核内倍加体（endoreduplication）や細胞融合の際に特徴的に認められる細粉化（pulverization）や premature chromosome condensation は全く観察されなかったことから、本試験における倍数体の出現頻度の増加は、これらの機序に起因するものとは考え難い。IARC の分類において Group 1 とされている asbestos は、細胞膜を貫通することによって細胞質分裂を物理的に阻害し、倍数体の出現頻度を増加させると報告⁶⁾をされている。同様に、Vitamine B₂ が不溶性の針状結晶を形成した場合に、倍数体の出現頻度が増加することが Kawaguchi 等⁷⁾によって報告されている。本被験物質も培養液中では析出を生じ、顕微鏡観察において微細な針状結晶が細胞膜周辺に認められ、細胞質内に 2 核、3 核が存在する細胞が散見される（Photo 3 及び 4）ことから、asbestos や Vitamine B₂ と同様に細胞質分裂の物理的阻害が倍数体の出現頻度増加の機序であることが推測される。

本被験物質は化学構造上、benzidine (4,4'-diaminobiphenyl, CAS Registry No.92-87-5) を母核とするが、benzidine は IARC の Group 1 に分類される発癌物質で、強い染色体構造異常の誘発性を有する⁸⁾。また、本被験物質の類縁化合物である 3,3'-dimethylbenzidine は、細菌を用いる復帰突然変異試験⁹⁾及びマウスリンフォーマ TK 試験¹⁰⁾において陽性を示し、CHO 細胞を用いた試験においても姉妹染色分体交換と染色体構造異常を誘発することが報告されている¹¹⁾。しかしながら、本被験物質は

M-1308

官能基であるアミノ基に acetoacetyl が付加されているため、DNA との反応性を失い、染色体構造異常を誘発しなかったものと推測される。

以上の結果から、アゾイック CC5 は本試験条件下において染色体構造異常は誘発しないが、染色体数的異常を誘発すると結論した。

Table 1-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5

[Short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
+	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			100		-	-	-	-	
		Test article	30.1	83	83	-	-	+	+
				83		-	-	+	+
			60.2	83	83	-	-	+	+
				83		-	-	+	+
			120	66	66	+	-	+	+
				66		+	-	+	+
			241	33	42	+	-	+	+
				50		+	-	+	+
			481	16	25	++	-	+	+
				33		++	-	+	+
			963	16	16	g)	Whitish pink	+	+
				16		g)	Whitish pink	+	+
1930	16	25	g)	Whitish pink	+	+			
	33		g)	Whitish pink	+	+			
3850	33	33	g)	Whitish pink	+	+			
	33		g)	Whitish pink	+	+			

Concentration of 50% cell-growth inhibition : **200.7** $\mu\text{g/mL}$

NC: Negative Control(water for injection)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test suspensions and ²⁾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.

Table 1-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5

[Short-term treatment : -S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		Test article	30.1	99	99	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
			60.2	99	99	-	-	+	+
				99		-	-	+	+
			120	99	99	-	-	+	+
				99		-	-	+	+
			241	116	108	+	-	+	+
				99		+	-	+	+
481	116	108	++	-	+	+			
	99		++	-	+	+			
963	116	117	g)	Whitish pink	+	+			
	116		g)	Whitish pink	+	+			
1930	99	99	g)	Whitish pink	+	+			
	99		g)	Whitish pink	+	+			
3850	99	108	g)	Whitish pink	+	+			
	116		g)	Whitish pink	+	+			

Concentration of 50% cell-growth inhibition : above **3850.0** $\mu\text{g/mL}$

NC: Negative Control(water for injection)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test suspensions and ²⁾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.

Table 1-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Continuous treatment : 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	24-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		Test article	30.1	83	91	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
			60.2	99	99	-	-	+	+
				99		-	-	+	+
			120	99	99	-	-	+	+
				99		-	-	+	+
			241	99	99	+	-	+	+
				99		+	-	+	+
			481	99	99	++	-	+	+
				99		++	-	+	+
		963	116	108 ^{h)}	g)	Whitish pink	+	+	
			99		g)	Whitish pink	+	+	
1930	116	108 ^{h)}	g)	Whitish pink	+	+			
	99		g)	Whitish pink	+	+			
3850	116	108 ^{h)}	g)	Whitish pink	+	+			
	99		g)	Whitish pink	+	+			

Concentration of 50% cell-growth inhibition : above **481.0** $\mu\text{g/mL}$

NC: Negative Control(water for injection)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test suspensions and ²⁾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 were judged to be 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 the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{o)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	48-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			100		-	-	-	-	
		30.1	100	100	-	-	-	-	-
			100		-	-	-	-	
		60.2	100	100	-	-	+	+	+
			100		-	-	+	+	
		120	100	100	-	-	+	+	+
			100		-	-	+	+	
		241	100	100	+	-	+	+	+
			100		+	-	+	+	
		481	100	96	g)	-	+	+	+
			91		g)	-	+	+	
		963	100	100	g)	Whitish pink	+	+	+
			100		g)	Whitish pink	+	+	
		1930	116	112 ^{h)}	g)	Whitish pink	+	+	+
			108		g)	Whitish pink	+	+	
		3850	108	104 ^{h)}	g)	Whitish pink	+	+	+
			100		g)	Whitish pink	+	+	
Concentration of 50% cell-growth inhibition : above 963.0 $\mu\text{g/mL}$									

NC: Negative Control(water for injection)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test suspensions and ²⁾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.

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 were judged to be 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 the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
 [Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{e)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
+	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			100		-	-	-	-	
		Test article	30.1	83	75	-	-	+	+
				66		-	-	+	+
			60.2	66	66	+	-	+	+
				66		+	-	+	+
		120	66	66	+	-	+	+	
			66		+	-	+	+	
		241	33	33	++	-	+	+	
			33		++	-	+	+	
PC	100	100	-	-	-	-			
	100		-	-	-	-			

NC: Negative Control(water for injection)

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

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test suspensions and ²⁾ 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

Table 2-2

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CCS

[Short-term treatment : -S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
							1)	2)
-	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-
			99		-	-	-	-
		481	85	85	g)	-	+	+
			85		g)	-	+	+
		963	99	85	g)	Whitish pink	+	+
			71		g)	Whitish pink	+	+
		1930	85	92	g)	Whitish pink	+	+
			99		g)	Whitish pink	+	+
		3850	99	92	g)	Whitish pink	+	+
			85		g)	Whitish pink	+	+
		PC	85	85	-	-	-	-
			85		-	-	-	-

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 $\mu\text{g/mL}$)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test suspensions and ²⁾ at the end of treatment.

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

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.

Table 2-3

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Continuous treatment: 24hr]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
							1)	2)
-	24-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-
			125		-	-	-	-
		241	99	88	+	-	+	+
			99		+	-	+	+
		481	99	88	++	-	+	+
			99		++	-	+	+
		963	99	88	g)	Whitish pink	+	+
			99		g)	Whitish pink	+	+
		1930	99	88	g)	Whitish pink	+	+
			99		g)	Whitish pink	+	+
		3850	125	111	g)	Whitish pink	+	+
			125		g)	Whitish pink	+	+
		PC	125	111	-	-	-	-
			125		-	-	-	-

NC: Negative Control(water for injection)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test suspensions and ²⁾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 and crystals

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 2-4

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5
[Continuous treatment : 48hr]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
							1)	2)
-	48-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-
			109		-	-	-	-
		241	81	78	-	-	+	+
			81		-	-	+	+
		481	72	69	+	-	+	+
			72		+	-	+	+
		963	81	78	g)	Whitish pink	+	+
			81		g)	Whitish pink	+	+
		1930	81	78	g)	Whitish pink	+	+
			81		g)	Whitish pink	+	+
		3850	81	78	g)	Whitish pink	+	+
			81		g)	Whitish pink	+	+
		PC	90	82	-	-	-	-
			81		-	-	-	-

NC: Negative Control(water for injection)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test suspensions and ²⁾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.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates and crystals

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

4. 要約

アゾイック CC5 の 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹] を用いて実施した。投与量は 0 (0.5 w/v% メチルセルロース水溶液：対照群)、8、40、200 及び 1000 mg/kg/day とし、また、対照群と 1000 mg/kg 投与群の一部の個体 (1 群雌雄各 6 匹) については投与期間終了後 2 週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

一般状態、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力、自発運動量及び血液学検査に被験物質投与の影響は認められなかった。

体重では、低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられ、投与期間中の体重増加量にも低値が認められた。

摂餌量では、低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられた。

尿検査では、摂水量の低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌で、尿量の低値が 1000 mg/kg の投与群の雄でみられた。

血液化学検査では、リン脂質の高値が 40 mg/kg 投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌雄で、高値傾向が 200 mg/kg 投与群の雄で、総コレステロールの高値が 1000 mg/kg 投与群の雌雄でみられた。

病理学検査では、肝臓において相対重量の高値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄と 200 mg/kg 以上の投与群の雌で、組織学的に小葉中心性の肝細胞肥大が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられた。

上述したいずれの変化も休薬により、軽減あるいは消失し回復性を示した。

以上の結果、アゾイック CC5 の本試験条件下における無影響量は主として雌雄で体重及び摂餌量の低値と病理学組織学検査における小葉中心性肝細胞肥大、雄で肝臓の相対重量の変化から、雌雄とも 8 mg/kg/day と推定された。

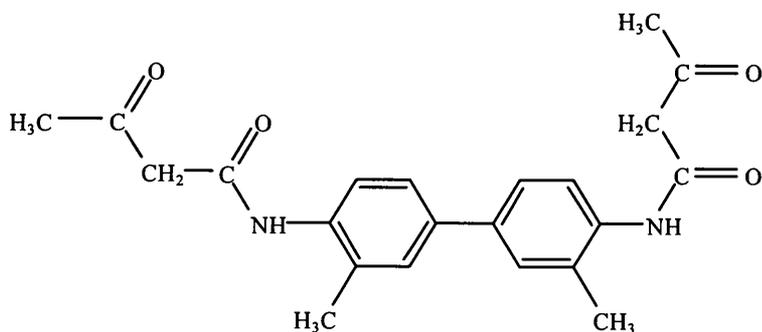
6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

被験物質は東京化成工業株式会社より購入した。本試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、試験成績を添付資料1に示した。

名称	:	アゾイック CC5
英名	:	Azoic CC5
別名	:	ナフトール AS-G
化学名	:	N,N'-(3,3'-dimethylbiphenyl-4,4'-ylene)di (acetoacetamide)
官報公示整理番号	:	5-2275
CAS 番号	:	91-96-3
分子量	:	380.44
分子式	:	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄
構造式	:	



ロット番号	:	4EPBE
純度	:	96.9 %
入手量	:	500 g
性状	:	薄い黄色粉末
保存方法	:	冷暗所（冷蔵庫内、実測値 3~8°C）、密栓
安定性	:	投与終了後、被験物質について購入先で安定性の確認を実施し、安定であることが確認された（添付資料2）。
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	マスク、手袋を着用した。 取扱い場所及び周囲の火気を厳禁し、高温物及び強酸化剤との接触を避けた。
返却	:	被験物質 1 g を保存試料として保存した。分析用に小分けした被験物質の残量は廃棄した。また、被験物質の残量は安定性を確認後、すべて廃棄した。

6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

アゾイック CC5 の 0 (0.5 w/v%メチルセルロース水溶液)、100、300 及び 1000 mg/kg/day を 1 群雌雄各 5 匹のラットに 14 日間反復経口投与した結果¹⁾、主な変化として雄では 100 mg/kg 以上の投与群の摂餌量と器官重量、雌では 300 mg/kg 以上の投与群の血液化学検査に変化がみられたものの、被験物質投与との関連性は明らかではなかった。したがって、本試験における投与量は、毒性試験ガイドラインにおける最大投与量である 1000 mg/kg を最高用量とし、公比 5 で除して、200、40 及び 8 mg/kg の 4 用量を設定した。群構成表を次の表 1 に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	8	1.6	5	雄	6	2001~2006	-	-
				雌	6	2101~2106	-	-
中用量群	40	8	5	雄	6	3001~3006	-	-
				雌	6	3101~3106	-	-
高用量群	200	40	5	雄	6	4001~4006	-	-
				雌	6	4101~4106	-	-
最高用量群	1000	200	5	雄	6	5001~5006	6	5007~5012
				雌	6	5101~5106	6	5107~5112

6.11 観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りとした。

- 投与 1 日 (day 1 of administration) : 投与開始日
 投与 1 週 (week 1 of administration) : 投与 1 から投与 7 日
 回復 1 日 (day 1 of recovery) : 回復開始日 (投与期間終了の翌日)
 回復 1 週 (week 1 of recovery) : 回復 1 から回復 7 日

6.11.1 一般状態の観察

全個体について投与期間中は毎日 3 回、投与前と投与直後及び約 2 時間後(ただし、休日と詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定を実施する時は投与前と投与直後の 2 回)、回復期間中は毎日 1 回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。

6.11.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定

詳細な一般状態の観察は、全個体について、投与開始前に 1 回、投与期間中及び回復期間中は毎週 1 回実施した。また、機能検査、握力及び自発運動量の測定は、投与 4 週 (雄を投与 25 日、雌を投与 26 日) 及び回復 2 週 (回復 11 日) に行った。なお、

7. 試験結果

7.1 一般状態

成績を Table 1-1~1-3 及び Appendix 1~12 に示した。

1) 投与期間

いずれの動物においても、投与期間を通じて異常は認められなかった。

2) 回復期間

いずれの動物においても、回復期間を通じて異常は認められなかった。

7.2 詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量

7.2.1 詳細な一般状態

成績を Table 2-1~2-18 及び Appendix 13~84 に示した。

1) 投与期間

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 及び Appendix 85~91 に示した。

1) 投与 4 週

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群の雌雄と対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復 2 週

着地開脚幅の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で認められた。

7.2.3 握力

成績を Table 2-21、2-22 及び Appendix 92~98 に示した。

1) 投与 4 週

各被験物質投与群の雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復 2 週

1000 mg/kg 投与群の雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.4 自発運動量

成績を Fig. 1~4、Table 2-23、2-24 及び Appendix 99~105 に示した。

1) 投与 4 週

各被験物質投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様に推移し、有意差は認められなかつ

た。

2) 回復 2 週

測定開始後 0~60 分の測定値の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。

7.3 体重

成績を Fig.5、Table 3-1、3-2 及び Appendix 106~112 に示した。

1) 投与期間

有意な低値が 40 mg/kg 投与群の雄で投与 7 から 28 日、雌で投与 24 及び 28 日に、200 及び 1000 mg/kg 投与群の雄で投与 4 から 28 日に、200 mg/kg 投与群の雌で投与 28 日に、1000 mg/kg 投与群の雌で投与 17 から 28 日に認められた。更に、投与期間中での体重増加量の有意な低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄で認められた。なお、8 mg/kg 投与群の雄についても投与期間を通じて低値傾向が認められた。

2) 回復期間

有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で回復 1 から 14 日、雌で回復 1 日に認められた。

7.4 摂餌量

成績を Fig.6、Table 4-1、4-2 及び Appendix 113~119 に示した。

1) 投与期間

有意な低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄で投与 7 から 28 日に、40 mg/kg 投与群の雌で投与 21 及び 28 日に、200 mg/kg 投与群の雌で投与 7 及び 28 日に、1000 mg/kg 投与群の雌で投与 21 及び 28 日に認められた。

2) 回復期間

有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で回復 7 日に認められた。

7.5 尿検査（摂水量含む）

成績を Table 5-1~5-8 及び Appendix 120~140 に示した。

1) 投与 4 週

各被験物質投与群の雌雄とも定性的項目で異常は認められなかった。また、摂水量の有意な低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌で、尿量の有意な低値が 1000 mg/kg の雄で認められた。

2) 回復 2 週

1000 mg/kg 投与群の雌雄とも定性的項目で異常は認められず、また、尿量、摂水量及び浸透圧でも対照群との間に有意差は認められなかった。

7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-6 及び Appendix 141~161 に示した。

1) 投与期間終了時

フィブリノーゲン量の有意な低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄で、プロトロビン時間の有意な短縮が 40 及び 200 mg/kg 投与群の雄で、ヘモグロビン量とヘマトクリット値の有意な高値と網赤血球率の有意な低値が 200 mg/kg 投与群の雄で認められた。また、白血球百分率で好酸球比率と分画実数で好酸球数の有意な低値が 40 及び 200 mg/kg 投与群の雄で認められた。

2) 回復期間終了時

赤血球数の有意な低値と網赤血球率の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、血小板数の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。また、白血球百分率でリンパ球比率の有意な低値と好中球比率の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、好酸球比率の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雌で、分画実数で好中球数の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で認められた。

7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 及び Appendix 162~175 に示した。

1) 投与期間終了時

ALT の有意な低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌で、ALP の有意な低値が 40 mg/kg 投与群の雌と 1000 mg/kg 投与群の雄で、総コレステロールの有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌雄で、リン脂質の有意な高値が 40 mg/kg 投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌雄で、高値傾向が 200 mg/kg の投与群の雄で認められた。

2) 回復期間終了時

AST、ALT 及びカリウムの有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で認められた。

7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 及び Appendix 176~203 に示した。

1) 投与期間終了時

最終体重の有意な低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄で認められた。

脳	:	絶対重量の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄に、相対重量の有意な高値が 200 mg/kg 投与群の雄と 40 mg/kg 以上の投与群の雌に認められた。
胸腺	:	絶対重量の有意な低値が 200 mg/kg 以上の投与群の雄に認められた。
心臓	:	相対重量の有意な高値が 200 mg/kg 投与群の雄に認められた。
肝臓	:	相対重量の有意な高値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄と 200 mg/kg 以上の投与群の雌に認められた。

- 脾臓 : 絶対重量の有意な低値が 200 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌に認められた。
- 腎臓 : 絶対重量の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雌に認められた。
- 副腎 : 絶対重量の有意な低値が各被験物質投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌に、相対重量の有意な低値が 40 mg/kg 投与群の雄に認められた。
- 精巣 : 相対重量の有意な高値が 40 及び 200 mg/kg 投与群に認められた。
- 卵巣 : 絶対重量の有意な低値が 200 mg/kg 投与群に認められた。

2) 回復期間終了時

最終体重の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で認められた。

- 脳 : 相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄に認められた。
- 心臓 : 絶対重量の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄に認められた。
- 脾臓 : 相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄に認められた。
- 副腎 : 絶対重量の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄に認められた。
- 精巣 : 相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群に認められた。
- 精巣上体 : 相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群に認められた。

7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 及び Appendix 204~287 に示した。

1) 投与期間終了時

- 腎臓 : 陥凹巣が対照群及び 40 mg/kg 投与群の雌各 1 例に、のう胞が 200 mg/kg 投与群の雄 1 例と 40 及び 1000 mg/kg 投与群の雌各 1 例に認められた。
- 脾臓 : 白色巣が 40 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。
- 精巣 : 小型化が 40 mg/kg 投与群の 1 例に認められた。

2) 回復期間終了時

- 腎臓 : 陥凹巣が 1000 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に、のう胞が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に認められた。
- 脾臓 : 白色巣が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に認められた。

胃 : 前胃の隆起巣が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に、腺胃の暗赤色巣が対照群の雌 1 例に認められた。

7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-4 及び Appendix 204~287 に示した。

1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓で認められた。

肝臓 : 軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が 40 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例、200 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌全例、1000 mg/kg 投与群の雌 5 例で、軽度な小葉中心性の肝細胞肥大が 200 mg/kg 投与群の雄 3 例、1000 mg/kg 投与群の雄全例と雌 1 例で認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

眼球 : 軽微な網膜異形成が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例で、軽微な網膜萎縮が対照群の雄 1 例、1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。

心臓 : 軽微な限局性の心筋炎が対照群の雌 1 例で認められた。

腎臓 : 軽微な再生尿細管が対照群の雌雄各 3 例、1000 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌 1 例で認められた。

肝臓 : 軽微あるいは軽度な門脈周囲の肝細胞の空胞化が対照群の雄 2 例と雌 5 例、8 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌全例、40 mg/kg 投与群の雌 4 例、200 mg/kg 投与群の雌 5 例、1000 mg/kg 投与群の雌 3 例で、軽微な限局性壊死が 40 mg/kg 投与群の雌 1 例で、軽微な微小肉芽腫が対照群の雌雄各 5 例、8 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌全例、40 mg/kg 投与群の雄全例と雌 5 例、200 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌全例、1000 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 5 例で認められた。

肺 : 軽微な肺胞マクロファージの出現が対照群の雌雄各 1 例、1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。

下垂体 : 軽微な異所性頭蓋咽頭組織が対照群の雄 1 例で認められた。

前立腺 : 軽微な間質性細胞浸潤が 1000 mg/kg 投与群の 2 例で認められた。

脾臓 : 軽微な髓外造血が対照群の雄 1 例と雌 2 例で認められた。また、軽微な線維性被膜が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。

- 甲状腺 : 軽微な異所性胸腺が対照群の雄 1 例で認められた。
 精巣 : 軽度な精子肉芽腫が 40 mg/kg 投与群の 1 例で認められた。

以下に示す所見については、剖検時にみられた肉眼所見に相当すると考えられた。

- 腎臓 : 陥凹巣がみられた対照群及び 40 mg/kg 投与群の雌各 1 例では軽微な線維化が認められた。のう胞がみられた 200 mg/kg 投与群の雄 1 例と 40 及び 1000 mg/kg 投与群の雌各 1 例では軽微なのう胞が認められた。
 脾臓 : 白色巣がみられた 40 mg/kg 投与群の雄 1 例では軽微な線維性被膜が認められた。
 精巣 : 小型化がみられた 40 mg/kg 投与群の 1 例では高度な精細管萎縮が認められた。

2) 回復期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が肝臓で認められた。

- 肝臓 : 軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が 1000 mg/kg 投与群の雄 3 例、軽度な小葉中心性の肝細胞肥大が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

- 腎臓 : 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例では軽微な再生尿細管が認められた。
 肝臓 : 軽微な門脈周囲の肝細胞の空胞化が対照群の雌 2 例、1000 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例で、軽微あるいは軽度の微小肉芽腫が対照群の雄 4 例と雌全例、1000 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌全例で認められた。

以下に示す所見については、剖検時にみられた肉眼所見に相当すると考えられた。

- 腎臓 : 陥凹巣がみられた 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例では軽微なのう胞が認められた。陥凹巣とのう胞がみられた 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例では軽微なのう胞と線維化が認められた。
 脾臓 : 白色巣がみられた 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例では軽度な炎症性細胞浸潤が認められた。
 胃 : 前胃の隆起巣がみられた 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例では軽微な異所性胃底腺が認められた。また、腺胃の暗赤色巣がみられた対照群の雌 1 例では軽微な腺胃のびらんが認められた。

8. 考察

アゾイック CC5 の 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Cri:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹] を用いて実施した。投与量は 0 (0.5 w/v% メチルセルロース水溶液：対照群)、8、40、200 及び 1000 mg/kg/day とし、また、対照群と 1000 mg/kg 投与群の一部の個体 (1 群雌雄各 6 匹) については投与期間終了後 2 週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

一般状態、詳細な一般状態の観察及び握力では異常は認められなかった。

機能検査では、回復 2 週に着地開脚幅の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、ごく軽度な変化であり、投与 4 週には認められていないことから偶発性的変化と判断した。

自発運動量では、回復 2 週に測定開始後 0~60 分の測定値の高値が 1000 mg/kg 投与群の雌でみられたが、ごく軽度な変化であり、10 分間隔の測定値に異常は認められていないことから偶発性的変化と判断した。

体重では、投与期間中に低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられ、体重増加量も低値を示し、被験物質投与の影響が疑われた。また、8 mg/kg 投与群の雄で投与期間を通じて低値傾向が認められたが、ごく軽度な変化であった。なお、回復期間中も低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で回復 1 から 14 日、雌で回復 1 日にみられたが、体重増加量は雌雄とも対照群と差がなく回復性が認められた。

摂餌量では、投与期間中に低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられ、被験物質投与の影響が疑われた。なお、回復期間中も低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で回復 7 日にみられたが回復 14 日には変化がみられていないことから、回復性が認められた。

尿検査では、投与 4 週に摂水量の低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌で、尿量の低値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられ、被験物質投与の影響が疑われた。なお、これらの変化は休薬により、いずれも消失し、回復性が認められた。

血液学検査では、投与期間終了時にフィブリノーゲン量の低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄でみられたがごく軽度な変化であり、投与量との関連性がないことから偶発性と判断した。また、プロトロンビン時間の短縮が 40 及び 200 mg/kg 投与群の雄で、ヘモグロビン量とヘマトクリット値の高値及び網赤血球率の低値が 200 mg/kg 投与群の雄で、更に、白血球百分率及び実数において好酸球の低値が 40 及び 200 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれも軽度であり、最高用量群ではみられていないことから偶発性的変化と判断した。なお、回復期間終了時にも赤血球数の低値と網赤血球率の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、血小板数の高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で、更に白血球百分率においてリンパ球比率の低値と好中球比率の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、好酸球比率の低値が 1000 mg/kg 投与群の雌で、各分画の実数で好中球数の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれの変化もごく軽度であり、投与期間終了時には認められていないことから偶発性的変化と判断した。

血液化学検査では、投与期間終了時にリン脂質の高値が 40 mg/kg 投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌雄で、高値傾向が 200 mg/kg 投与群の雄で、総コレステロールの高値が 1000 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、被験物質投与による肝臓への影響が示唆された。なお、これらの変化は休薬により消失し、回復性が認められた。その他、投与期間終了時に ALT の低値が 40 mg/kg 以上の投与群の雌で、ALP の低値が 40 mg/kg 投与群の雌と 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれもごく軽度であり、障害を示唆するとされる高値ではないことから、重要ではないと判断した。また、回復期間終了時に AST 及び ALT の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれもごく軽度であり、投与期間終了時には認められていないことから、偶発性の変化と判断した。更に、カリウムの高値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、他の電解質には変化がなく、投与期間終了時には認められていないことから偶発性の変化と判断した。

病理学検査では、投与期間終了時に肝臓において相対重量の高値が 40 mg/kg 以上の投与群の雄と 200 mg/kg 以上の投与群の雌で、組織学的検査に小葉中心性の肝細胞肥大が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄でみられ、被験物質投与の影響が示唆された。なお、回復期間終了時でも肝臓において組織学検査に小葉中心性の肝細胞肥大が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたものの、休薬により程度及び頻度は軽減し、回復性が認められた。また、投与期間終了時に胸腺において絶対重量の低値が 200 mg/kg 以上の投与群の雄で認められた。なお、回復期間終了時には異常はなく回復性が認められた。その他、器官重量では投与あるいは回復期間終了時に絶対重量の低値が脳、心臓、脾臓、腎臓及び卵巣に、相対重量の高値が脳、心臓、脾臓、精巣及び精巣上体にみられたが、これらの変化はいずれも体重の増加が抑制されたことに伴った 2 次的変化と考えられた。副腎については投与期間終了時に絶対重量の低値が各被験物質投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌で、相対重量の低値が 40 mg/kg 投与群の雄で、また、回復期間終了時に絶対重量の低値が 1000 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれもごく軽度であり、通常みられる程度の変化であることから偶発性の変化と判断した。更に、剖検では、投与あるいは回復期間終了時に腎臓の限局性の陥凹巣及びのう胞、脾臓の限局性の白色巣、精巣の小型化、前胃の限局性の隆起巣及び腺胃の暗赤色巣がみられたが、いずれの変化もその出現状況などから偶発性の変化と判断した。

以上の結果、アゾイック CC5 の本試験条件下における無影響量は、主として雌雄で体重及び摂餌量の低値と病理学組織検査における小葉中心性肝細胞肥大、雄で肝臓の相対重量の変化から、雌雄とも 8 mg/kg/day と推定された。なお、いずれの変化も休薬による回復性が認められた。

3. 要約

モルダント ブラック-7の復帰突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド(以下、DMSO と略す)を用いた。

試験は、19.5~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537、*E. coli* WP2 *uvrA* については2.44~78.1 µg/plate の範囲の6用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* については9.77~313 µg/plate の範囲の6用量で実施した。なお、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100 については、生育阻害を示した高用量での変異原性を確認するため、2.44~313 µg/plate の範囲の8用量で実施した。

1) 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。また、本被験物質によるプレート上の着色は、代謝活性化しない場合の39.1 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の78.1 µg/plate 以上で認められた。

2) 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 の39.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 及び代謝活性化した場合のすべての菌株の78.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の313 µg/plate 以上で認められた。

3) 復帰変異コロニー数

2回の本試験ともに、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 において、陰性対照値の2倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性を示した。また、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 においても用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、*S. typhimurium* TA98 の用量設定試験及び本試験2回目では陰性対照値の2倍以上に増加した。なお、復帰変異コロニー数が陰性対照値の2倍を超え、再現性が認められた菌株について比活性値を求めたところ、最大で2459 (Rev/mg)となり、本被験物質の変異原性は非常に強いものと判断された。

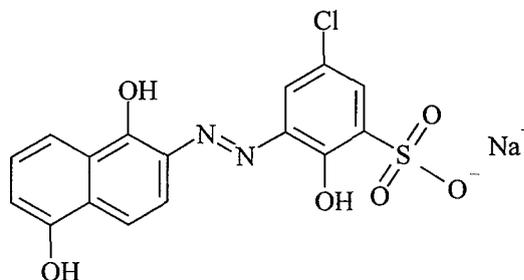
以上の試験結果より、本試験条件下において、モルダント ブラック-7は、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有する（陽性）と判定した。

5. 被験物質及び被験液の調製

5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

製造元	:	山田化学工業株式会社
名称	:	モルダント ブラック-7
ロット番号	:	08001
CAS番号	:	3618-60-8
構造式	:	



純度	:	92.7%(HPLC)
不純物の名称及び濃度	:	不明不純物 7.3% (うち、塩分として塩素イオン 7100mg/kg、硫酸イオン 1300mg/kg)
分子量	:	416.77
融点	:	情報提供なし
沸点	:	情報提供なし
蒸気圧	:	情報提供なし
分配係数	:	情報提供なし
常温における性状	:	黒色粉末
安定性	:	本試験終了後に残余となった被験物質を製造元において分析した結果、純度に大きな変動はなく、安定であることが確認された(別添1)。
溶解性	:	水；不溶 DMSO；50mg/mL以上
保存条件	:	室温
保存温度	:	保存期間(東京研究所 2008.11.13~2009.3.3；14.9~28.6℃)
返却	:	試験終了後の残量はすべて製造元へ返却した。

<i>S. typhimurium</i> TA1535	桃
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	茶
<i>S. typhimurium</i> TA98	赤
<i>S. typhimurium</i> TA1537	緑

2) 濃度の識別

代謝活性化しない場合は「-」、代謝活性化する場合は「+」とし、これに続けて陰性対照(Solvent Control)を「SC」、陽性対照(Positive Control)を「PC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」…の番号を各菌の色のマーカーで記載し、識別した。

6.4.2 前培養

- 1) ニュートリエントブロス No.2 培養液 10mL を入れた滅菌済み L 字型試験管に凍結保存菌株を解凍して得た菌懸濁液を *S. typhimurium* 株では各 20 μ L、*E. coli* 株では 10 μ L 接種した。使用後の菌懸濁液は廃棄した。
- 2) 各試験菌株を接種した L 字型試験管を振盪恒温槽 (COOL BATH SHAKER ML-10 PU-6 接続型、タイテック株式会社) にセットし、プログラム制御により前培養開始まで 4°C の水浴中に放置(6 時間 30 分)した後、37°C に上昇後 9 時間前培養した。
- 3) 前培養終了時に培養液の吸光度をデジタル比色計 (Mini photo 518R、タイテック株式会社) で測定した。なお、培養液は使用まで室温下に維持した。それぞれの菌株の換算生菌数を表 3 に示した。

表 3 菌株の換算生菌数一覧

菌 株	菌 数(cells/mL)		
	用量設定試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	4.48×10^9	5.35×10^9	5.59×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	4.91×10^9	4.89×10^9	4.98×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	8.14×10^9	8.09×10^9	8.13×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	5.66×10^9	5.55×10^9	5.68×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.09×10^9	3.10×10^9	3.01×10^9

6.4.3 本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mL の被験液を公比 4 で 4 段階希釈した計 5 用量 (19.5、78.1、313、1250、5000 μ g/plate) を用い、用量設定試験を実施した。なお、用量設定試験の結果を別表 1 に示した。

用量設定試験の結果、本被験物質処理による生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 及び代謝活性化した場合のすべての菌株の 78.1 μ g/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* の 313 μ g/plate 以上で認められた。なお、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98

及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 において、陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加が認められた。また、本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。また、本被験物質によるプレート上の着色は、代謝活性化の有無にかかわらず 78.1 µg/plate 以上で認められた。

このため、本試験の試験用量は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA1537 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537、*E. coli* WP2 *uvrA* については 78.1 µg/plate、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* については 313 µg/plate をそれぞれ最高用量として、以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量を設定した。また、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100 については、生育阻害を示した高用量での変異原性を確認するため、313 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 7 段階希釈した計 8 用量を設定した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

6.4.4 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群のいずれについても、用量設定試験では 2 枚、2 回の本試験では 3 枚のプレートを用いた。

6.4.5 試験操作（プレインキュベーション法）

- 1) 滅菌した小試験管に調製した被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1 mL 入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、それぞれの小試験管に各菌株の培養液 0.1 mL を加えた。
- 2) 小試験管を攪拌後すぐに 37°C で 20 分間振盪しながらプレインキュベーションし、これに 45°C に保温されているトップアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを 2.0 mL 加えた後に最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら 1)~3) の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 4) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で用量設定試験では 48.5 時間、本試験 1 回目では 49 時間、本試験 2 回目では 48.5 時間培養した。
- 5) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色を確認した結果、代謝活性化しない場合の 39.1 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 78.1 µg/plate 以上で着色が認められたものの、機器計測に影響がなかったため、自動コロニーカウンタ (コロニーアナライザー CA-11D systems、システムサイエンス株式会社) を用いて計

数（面積補正、補正值：1.21）した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

6.5 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数（陰性対照値）に対して2倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の2倍以上となる増加を示し、2回の本試験で再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

7. 試験結果

試験の結果を別表1～5及び図1～10に示した。また、比活性値を別表6～8に示した。なお、図は別表2、3より作成した。

7.1 培養終了後の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。また、本被験物質によるプレート上の着色は、代謝活性化しない場合の39.1 µg/plate以上、代謝活性化した場合の78.1 µg/plate以上で認められた。なお、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA1535の39.1 µg/plate以上、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA100、TA1537及び代謝活性化した場合のすべての菌株の78.1 µg/plate以上、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA98、*E. coli* WP2 *uvrA*の313 µg/plate以上で認められた。

7.2 復帰変異コロニー数

2回の本試験ともに、代謝活性化した場合の*S. typhimurium* TA100、TA1537において、陰性対照値の2倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性を示した。また、代謝活性化しない場合の*S. typhimurium* TA100、TA98においても用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、*S. typhimurium* TA98の用量設定試験及び本試験2回目では陰性対照値の2倍以上に増加した。

7.3 試験系の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、本試験2回目の代謝活性化しない場合の*E. coli* WP2 *uvrA*の陽性対照値を除き、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理限界(平均値±3SD：別添2)内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断した。なお、本試験2回目の代謝活性化しない場合の*E. coli* WP2 *uvrA*の陽性対照値につい

ても、管理限界をわずかに超える程度(117:39~104)であり、使用した試薬及び試験操作に問題はないことから、判定には影響しないと判断した。

8. 考察

2回の本試験ともに、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1537 において、陰性対照値の2倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、再現性を示した。また、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 においても用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められ、*S. typhimurium* TA98 の用量設定試験及び本試験2回目では陰性対照値の2倍以上に増加した。なお、復帰変異コロニー数が陰性対照値の2倍を超え、再現性が認められた菌株について比活性値を求めたところ、最大で2459 (Rev/mg)となり、本被験物質の変異原性は非常に強いものと判断された。

以上の試験結果より、本試験条件下において、モルダント ブラック-7は、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有する(陽性)と判定した。

9. 参考文献

- 1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp+ Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- 5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- 6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶(編): 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編: 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館基(監修): 微生物を用いる変異原性試験データ集(能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.

(別表1)

試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: モルダント ブラック-7

No. T-0310

試験実施期間		2009年2月9日 より 2009年2月12日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	105 112 (109)	18 12 (15)	27 36 (32)	17 21 (19)	13 14 (14)
	19.5	113 116 (115)	9 7 (8)	44 24 (34)	10 17 (14)	4 5 (5)
	78.1	179 * 140 * (160)	18 * 10 * (14)	28 39 (34)	27 11 (19)	6 * 7 * (7)
	313	148 * 137 * (143)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	50 * 34 * (42)	0 * 0 * (0)
	1250	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	5000	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	128 98 (113)	10 13 (12)	30 37 (34)	39 39 (39)
19.5		132 119 (126)	13 7 (10)	47 29 (38)	61 34 (48)	53 51 (52)
78.1		198 * 197 * (198)	7 * 9 * (8)	11 * 15 * (13)	42 * 39 * (41)	78 * 70 * (74)
313		343 * 305 * (324)	16 * 10 * (13)	0 * 0 * (0)	34 * 54 * (44)	13 * 8 * (11)
1250		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	61 * 55 * (58)	0 * 0 * (0)
5000		0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)	0 * 0 * (0)
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	S9Mixを必要とするもの 用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	522 485 (504)	321 332 (327)	81 88 (85)	419 390 (405)	1781 1617 (1699)
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	S9Mixを必要とするもの 用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	975 1022 (999)	283 257 (270)	1249 1140 (1195)	401 434 (418)	117 123 (120)

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
SAZ : アジ化ナトリウム
ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl
2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
()内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

試験結果表 (本試験1回目:-S9Mix)

被験物質の名称:モルダント ブラック-7

No. T-0310

試験実施期間		2009年2月25日 より 2009年2月28日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537	
S9Mix (一)	陰性対照 (DMSO)	97 89 90 (92 ± 4.4)	22 7 8 (12 ± 8.4)	31 35 39 (35 ± 4.0)	44 25 33 (34 ± 9.5)	20 8 5 (11 ± 7.9)	
	2.44	114 96 97 (102 ± 10.1)	8 10 13 (10 ± 2.5)	NT	NT	6 12 6 (8 ± 3.5)	
	4.88	113 94 91 (99 ± 11.9)	10 10 6 (9 ± 2.3)	NT	NT	13 12 12 (12 ± 0.6)	
	9.77	108 111 118 (112 ± 5.1)	12 8 13 (11 ± 2.6)	21 29 35 (28 ± 7.0)	35 27 28 (30 ± 4.4)	10 5 20 (12 ± 7.6)	
	19.5	106 101 131 (113 ± 16.1)	17 10 13 (13 ± 3.5)	36 37 29 (34 ± 4.4)	21 34 26 (27 ± 6.6)	4 8 12 (8 ± 4.0)	
	39.1	131 148 120 (133 ± 14.1)	8 * 10 * 7 * (8 ± 1.5)	23 30 20 (24 ± 5.1)	33 38 32 (34 ± 3.2)	6 6 5 (6 ± 0.6)	
	78.1	152 * 162 * 175 * (163 ± 11.5)	11 * 8 * 9 * (9 ± 1.5)	34 27 27 (29 ± 4.0)	24 59 28 (37 ± 19.2)	7 * 9 * 13 * (10 ± 3.1)	
	156	NT	NT	14 5 6 (8 ± 4.9)	37 47 43 (42 ± 5.0)	NT	
	313	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	49 * 44 * 45 * (46 ± 2.6)	NT	
	陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	S9Mixを必要としな いもの	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		コロニー数/プレート	617 625 621 (621 ± 4.0)	342 335 318 (332 ± 12.3)	96 109 96 (100 ± 7.5)	475 485 459 (473 ± 13.1)	1728 1560 1770 (1686 ± 111.1)

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT: 試験せず。

()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表3)

試験結果表 (本試験1回目:+S9Mix)

被験物質の名称:モルダント ブラック-7

No. T-0310

試験実施期間		2009年2月25日 より 2009年2月28日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	91 91 104 (95 ± 7.5)	10 11 11 (11 ± 0.6)	33 33 32 (33 ± 0.6)	47 48 44 (46 ± 2.1)	18 10 22 (17 ± 6.1)	
	2.44	126 114 103 (114 ± 11.5)	7 5 2 (5 ± 2.5)	31 41 34 (35 ± 5.1)	45 36 51 (44 ± 7.5)	22 16 16 (18 ± 3.5)	
	4.88	93 112 120 (108 ± 13.9)	6 5 2 (4 ± 2.1)	27 41 37 (35 ± 7.2)	44 41 42 (42 ± 1.5)	22 17 18 (19 ± 2.6)	
	9.77	99 109 117 (108 ± 9.0)	7 15 7 (10 ± 4.6)	41 31 28 (33 ± 6.8)	55 37 45 (46 ± 9.0)	37 25 33 (32 ± 6.1)	
	19.5	99 102 132 (111 ± 18.2)	7 9 8 (8 ± 1.0)	31 28 33 (31 ± 2.5)	48 49 33 (43 ± 9.0)	48 51 51 (50 ± 1.7)	
	39.1	118 162 126 (135 ± 23.4)	7 8 8 (8 ± 0.6)	26 28 31 (28 ± 2.5)	45 54 42 (47 ± 6.2)	75 74 73 (74 ± 1.0)	
	78.1	197 * 221 * 167 * (195 ± 27.1)	9 * 16 * 10 * (12 ± 3.8)	19 * 18 * 13 * (17 ± 3.2)	65 * 66 * 61 * (64 ± 2.6)	72 * 55 * 59 * (62 ± 8.9)	
	156	272 * 216 * 241 * (243 ± 28.1)	NT	NT	NT	NT	
	313	329 * 332 * 278 * (313 ± 30.3)	NT	NT	NT	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名称 用量(μg/プレート)	B[a]P 5.0	2AA 2.0	2AA 10.0	B[a]P 5.0
		コロニー数/プレート	977 1032 938 (982 ± 47.2)	285 253 278 (272 ± 16.8)	1045 992 1151 (1063 ± 81.0)	322 378 373 (358 ± 31.0)	119 109 102 (110 ± 8.5)

(備考)

2AA :2-アミノアントラセン
B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

*:被験物質による生育阻害が認められたことを示す。
NT:試験せず。
()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表4)

試験結果表 (本試験2回目:-S9Mix)

被験物質の名称:モルダント ブラック-7

No. T-0310

試験実施期間		2009年3月2日 より 2009年3月5日					
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	69 82 83 (78 ± 7.8)	15 8 8 (10 ± 4.0)	31 27 32 (30 ± 2.6)	18 17 20 (18 ± 1.5)	8 9 5 (7 ± 2.1)	
	2.44	85 110 93 (96 ± 12.8)	8 8 6 (7 ± 1.2)	NT	NT	7 5 11 (8 ± 3.1)	
	4.88	106 108 116 (110 ± 5.3)	8 13 10 (10 ± 2.5)	NT	NT	3 2 4 (3 ± 1.0)	
	9.77	99 95 77 (90 ± 11.7)	5 16 10 (10 ± 5.5)	34 32 37 (34 ± 2.5)	31 26 19 (25 ± 6.0)	5 1 5 (4 ± 2.3)	
	19.5	79 93 94 (89 ± 8.4)	7 11 11 (10 ± 2.3)	42 31 33 (35 ± 5.9)	20 15 21 (19 ± 3.2)	2 5 4 (4 ± 1.5)	
	39.1	96 111 131 (113 ± 17.6)	8 * 12 * 11 * (10 ± 2.1)	33 34 23 (30 ± 6.1)	16 19 19 (18 ± 1.7)	8 3 8 (6 ± 2.9)	
	78.1	124 * 155 * 176 * (152 ± 26.2)	11 * 7 * 7 * (8 ± 2.3)	39 33 35 (36 ± 3.1)	28 23 24 (25 ± 2.6)	7 * 5 * 9 * (7 ± 2.0)	
	156	NT	NT	8 19 12 (13 ± 5.6)	21 35 24 (27 ± 7.4)	NT	
	313	NT	NT	0 * 0 * 0 * (0 ± 0.0)	36 * 45 * 44 * (42 ± 4.9)	NT	
	陽性対照	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	S9Mixを必要としなもの	用量(μg/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
		コロニー数/プレート	546 632 627 (602 ± 48.3)	321 322 350 (331 ± 16.5)	126 110 116 (117 ± 8.1)	439 459 448 (449 ± 10.0)	1439 1388 1196 (1341 ± 128.1)

(備考)

AF-2 :2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ :アジ化ナトリウム

ICR-191 :2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT: 試験せず。

()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表5)

試験結果表 (本試験2回目:+S9Mix)

被験物質の名称:モルダント ブラック7

No. T-0310

試験実施期間		2009年3月2日 より 2009年3月5日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	106	11	35	40	6
		116	7	35	33	7
		114 (112 ± 5.3)	10 (9 ± 2.1)	23 (31 ± 6.9)	48 (40 ± 7.5)	8 (7 ± 1.0)
	2.44	116	10	28	34	8
		98	12	27	35	15
		106 (107 ± 9.0)	8 (10 ± 2.0)	39 (31 ± 6.7)	37 (35 ± 1.5)	12 (12 ± 3.5)
	4.88	99	9	41	36	25
		114	5	32	31	19
		125 (113 ± 13.1)	3 (6 ± 3.1)	25 (33 ± 8.0)	38 (35 ± 3.6)	14 (19 ± 5.5)
	9.77	113	5	32	29	18
		115	11	29	34	21
		115 (114 ± 1.2)	9 (8 ± 3.1)	35 (32 ± 3.0)	44 (36 ± 7.6)	33 (24 ± 7.9)
19.5	107	5	30	53	36	
	113	13	25	44	38	
	107 (109 ± 3.5)	8 (9 ± 4.0)	37 (31 ± 6.0)	50 (49 ± 4.6)	44 (39 ± 4.2)	
39.1	137	15	28	47	59	
	125	5	28	46	63	
	120 (127 ± 8.7)	6 (9 ± 5.5)	26 (27 ± 1.2)	50 (48 ± 2.1)	77 (66 ± 9.5)	
78.1	167 *	10 *	15 *	36 *	54 *	
	198 *	13 *	15 *	48 *	58 *	
	165 * (177 ± 18.5)	5 * (9 ± 4.0)	13 * (14 ± 1.2)	45 * (43 ± 6.2)	77 * (63 ± 12.3)	
156	243 *					
	212 *					
	246 * (234 ± 18.8)	NT	NT	NT	NT	
313	313 *					
	347 *					
	332 * (331 ± 17.0)	NT	NT	NT	NT	
陽性対照	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量(μg/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	1067	289	1097	347	139
	1094	276	1029	423	120	
	1088 (1083 ± 14.2)	271 (279 ± 9.3)	1063 (1063 ± 34.0)	406 (392 ± 39.9)	128 (129 ± 9.5)	

(備考)

2AA :2-アミノアントラセン
B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT: 試験せず。

()内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表6)

用量設定試験における比活性値表

被験物質の名称: モルダント ブラック-7

No. T-0310

試験実施期間		2009年2月9日 より 2009年2月12日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)					
	19.5					
	78.1					
	313				73	
	1250					
	5000					
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)					
	19.5					2256
	78.1					845
	313	674				
	1250					
	5000					

(備考)

比活性値は、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示した値のみ記載した。

比活性=被験物質1mgあたりの復帰変異コロニー数

下記の計算式により算出する。

比活性=(当該用量のコロニー数-陰性対照のコロニー数)×1000/当該用量(μg/plate)

(別表7)

本試験1回目における比活性値表

被験物質の名称:モルダント ブラック-7

No. T-0310

試験実施期間		2009年2月25日 より 2009年2月28日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量(μg/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)					
	2.44					
	4.88					
	9.77					
	19.5					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313					
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)					
	2.44					
	4.88					
	9.77					
	19.5					1692
	39.1					1458
	78.1	1280				576
	156	949				
	313	696				

(備考)

比活性値は、陰性対照の2倍以上の復帰変異コロニー数を示した値のみ記載した。

比活性=被験物質1mgあたりの復帰変異コロニー数

下記の計算式により算出する。

比活性=(当該用量のコロニー数-陰性対照のコロニー数)×1000/当該用量(μg/plate)

4. 要約

モルダントブラック-7の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL/IU 細胞株) を用いた染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 65.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、非代謝活性化では 131 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、更に連続処理法の 24 時間処理では 131 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 50% を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、短時間処理法の代謝活性化では 49.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非代謝活性化では 121.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、更に連続処理法の 24 時間処理では 105.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定を参照し、更に各処理における 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量における抑制率と 50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) を勘案しながら、短時間処理法の代謝活性化では 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.25 で計 5 用量を、非代謝活性化及び連続処理法の 24 時間処理では 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、以下、公比 2 で計 5 用量を設定し、被験液の調製方法を定めた。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率 (TA 値) は、短時間処理法の代謝活性化では 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 4.5%、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 4.5%、40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 3.0%、32.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 2.5 % 及び 25.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 2.0% 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、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では規定数の細胞が観察されず UR (unreliable) と判定した。125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 13.5%、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 9.0%、31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 4.0% 及び 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 1.5% と 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上を、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示した。非代謝活性化においては、TA 値の増加に用量依存性が認められたことから、陽性と判定した。また、染色体構造異常誘発能の強さを、構造異常が 20% 出現する推定被験物質濃度 (SD_{20} 値) を指標として検討したところ、 SD_{20} 値は 0.18 mg/mL 、単位用量あたりの染色分体交換 (cte) を持つ細胞の出現率の比較値である TR 値¹⁾は 120 であった。なお、短時間処理法で明らかに陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

一方、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても 5% 未満であったことから、モルダントブラック-7の染色体数異常誘発性は陰性と判定した。

全ての処理法において、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

M-1350

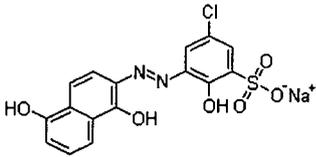
以上の結果から、モルダントブラック-7は本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

被験物質モルダントブラック-7は山田化学工業株式会社より提供された。被験物質情報 (Attached Data 1) は、山田化学工業株式会社における非 GLP 下での分析に基づくものである。

製造者	:	山田化学工業株式会社
名称	:	モルダントブラック-7
英語別称	:	Mordant Black-7
ロット番号	:	08001
CAS 番号	:	3618-60-8
構造式又は示性式	:	
分子量	:	416.77
純度	:	92.7%
不純物	:	不明不純物 7.3% (うち、塩分として塩素イオン 7100 mg/kg、硫酸イオン 1300 mg/kg)
性状	:	無色～微黄色透明液体
安定性	:	実験終了後に、山田化学工業株式会社において安定性を測定し、実験期間中の安定性を確認した (Attached Data 2)。
入手量	:	25 g
保存方法	:	密閉、冷暗所 (実測温度: 3～6°C)、吸湿性有りシリカゲルと同梱 (防湿)
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室 冷蔵庫
取り扱い上の注意	:	特に無し
返却	:	実験終了後、被験物質の残余物はすべて山田化学工業株式会社にて廃棄した。

6.1.2 溶媒

名称	:	注射用水
ロット番号	:	9A75N
規格	:	日本薬局方
製造元	:	株式会社大塚製薬工場
保存方法	:	室温

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化

6.6.1 識別方法

1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「-」とし、連続処理法では 24 時間処理を「24-」、48 時間処理を「48-」とした。更にこれに続けて陰性対照 (Negative Control) の場合は「NC」を、被験物質用量群の場合は濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。また、陽性対照 (Positive Control) は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」~「99」までの 2 桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

6.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 4200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、以下公比 2 で希釈した 2100、1050、525、263、131、65.6 及び 32.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 65.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、非代謝活性化では 131 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、更に連続処理法の 24 時間処理では 131 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 50% を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、短時間処理法の代謝活性化では 49.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非代謝活性化では 121.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、更に連続処理法の 24 時間処理では 105.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定を参照し、更に各処理における 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量における抑制率と 50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) を勘案しながら、短時間処理法の代謝活性化では 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.25 で計 5 用量を、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の 24 時間処理では 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、以下、公比 2 で計 5 用量を設定し、被験液の調製方法を定めた。また、連続処理法の 48 時間処理では、最低用量の 32.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、細胞増殖抑制率が 67%を示し、50%細胞増殖抑制濃度を超えない直前の値が得られず、2 点直線法による 50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) を求めることが出来なかつ

た。しかしながら、32.8 µg/mL以上の用量における細胞増殖抑制率に用量依存性が認められ、外挿した場合に、10~15 µg/mLに50%細胞増殖抑制濃度が存在すると推測されることから、31.3 µg/mLを最高用量として、以下、公比2で計5用量を設定した。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

6.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するために予備試験として実施した。なお、以下の試験操作は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径60 mm）を用いた。プレートは各群2枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液5.0 mL）を播種した。培養3日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液1.333 mLを取り除き、S9 mix 0.833 mLに続き溶媒0.500 mLを加えた。被験物質処理群については、培養液1.333 mLを取り除き、S9 mix 0.833 mLに続き各濃度の被験液0.500 mLを加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液0.500 mLを取り除き、溶媒0.500 mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.500 mLを取り除き、各濃度の被験液0.500 mLを加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6時間培養した。
- (3) 培養6時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液（牛血清含）で洗浄し、新しい培養液5.0 mLを加え更に18時間培養を続けた。
- (4) 培養終了後、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度99%以上）で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養6時間後と同様の方法で18時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした。）。

2) 連続処理法

- (1) 24時間処理と48時間処理のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径60 mm）を用いた。プレートは各群2枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液5.0 mL）を播種した。培養3日後に、

倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、24 時間処理及び48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び48 時間培養した。

- (3) 24 時間及び48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び48 時間処理における被験物質の50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

6.6.4 染色体異常試験

1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群4枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養3日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養6時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液（牛血清含）で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に18 時間培養を続けた。
- (4) 各群2枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を0.075M 塩化カリウム溶液で約15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス1枚につき2箇所点滴した。染色体標本はプレート当たり2枚作製した。細胞点滴後、約1日空気乾燥し、2%ギムザ液で約15 分間染色して染色体標本作製した。

- (5) 残る各群 2 枚のプレート (枝番号-3 及び-4) は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し確認した (培養終了時の結果は、参考データとした。)。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

短時間処理法の非代謝活性化において陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

6.6.5 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。

6.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常はさらに以下のように定義・分類した。

1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

- ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体又は染色分体の同軸上に断片がある (非染色部分が染色分体の同軸上にある) ものであって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるものと定義した。
- 染色分体型切断(ctb) : 切断とは断片が染色分体の同軸上からはずれているもの及び非染色部位が染色分体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものと定義した。
- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものを染色体型切断と定義した。
- 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化(frg)他。

2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数 (二倍体) と異なり倍化した場合を数的異常と定義した。

M-1350

倍数体 : polyploidy (核内倍加体 : endoreduplication を含む)

6.6.7 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準¹⁾に従い染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率(%)によって以下のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5% 未満	陰 性 (-)
5% 以上 10% 未満	疑陽性 (±)
10% 以上	陽 性 (+)

染色体構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合 (TAG) と含まない場合 (TA) とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

7. 試験結果

7.1 細胞増殖抑制試験

7.1.1 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Appendix 1-1 及び Appendix 2-1 に、非代謝活性化の結果を Appendix 1-2 及び Appendix 2-2 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、代謝活性化では 65.6 µg/mL 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 49.2 µg/mL であった。また、非代謝活性化では 131 µg/mL 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 121.4 µg/mL であった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う肉眼による培養の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、65.6 µg/mL 以上で紫色に、また 32.8 µg/mL の用量では淡紫色に変化が認められた。被験物質の添加に伴う析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、最高用量の 4200 µg/mL の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質と思われる物質による析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、525 µg/mL 以上の用量で認められた。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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、525 µg/mL 以上で被験物質と思われる物質がシャーレ底面に固着していたため、観察不能であった。また、65.6 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.1.2 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Appendix 1-3 及び Appendix 2-3 に、48 時間処理の結果を Appendix 1-4 及び Appendix 2-4 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理法では 131 µg/mL 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 105.2 µg/mL であった。また、48 時間処理法では 32.8 µg/mL 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 32.8 µg/mL 以下であった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う肉眼による培養の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、65.6 µg/mL 以上で紫色に、また 32.8 µg/mL の用量で淡紫色に変化が認められた。被験物質の添加に伴う析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、最高用量の 4200 µg/mL の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質と思われる物質による析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、525 µg/mL 以上の用量で認められた。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、24時間処理では、525 µg/mL以上で被験物質と思われる物質がシャーレ底面に固着していたため、観察不能であり、131 µg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。48時間処理では、525 µg/mL以上で被験物質と思われる物質がシャーレ底面に固着していたため観察不能であり、32.8 µg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.2 染色体異常試験

7.2.1 短時間処理法

代謝活性化の結果を Appendix 3-1、Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Appendix 3-2、Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う肉眼による培養の色調の観察においては、代謝活性化では、40.0 µg/mL以上で紫色に、25.6 µg/mL以上の用量で淡紫色に変化が認められた。非代謝活性化では、62.5 µg/mL以上で紫色に、15.6 µg/mL以上の用量で淡紫色に変化が認められた。被験物質添加に伴う析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質と思われる物質による析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに認められなかった。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、代謝活性化では、50.0 µg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。非代謝活性化では、31.3 µg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では 62.5 µg/mL では 4.5%、50.0 µg/mL では 4.5%、40.0 µg/mL では 3.0%、32.0 µg/mL では 2.5%及び 25.6 µg/mL では 2.0%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、250 µg/mL では規定数の細胞が観察されず UR (unreliable) と判定した。125 µg/mL では 13.5%、62.5 µg/mL では 9.0%、31.3 µg/mL では 4.0%及び 15.6 µg/mL では 1.5%と 125 µg/mL で陽性の判定基準である 10%以上を、62.5 µg/mL において疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示した。250 µg/mL の用量においては、規定数の細胞が観察されず UR と判定したが、陽性の判定基準である 10%以上を示した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、代謝活性化では 62.5 µg/mL では 0.5%、50.0 µg/mL では 1.5%、40.0 µg/mL では 0.5%、32.0 µg/mL では 0%及び 25.6 µg/mL では 1.5%と陰

M-1350

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、250 µg/mL では規定数の細胞が観察されず UR (unreliable) と判定した。125 µg/mL では 0.5%、62.5 µg/mL では 0%、31.3 µg/mL では 1.0%及び 15.6 µg/mL では 2.5%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) 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。

8. 考察

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、短時間処理法の代謝活性化では、陰性の判定基準を示したが、非代謝活性化では、陽性の判定基準である 10%以上の TA 値を示したこと及び TA 値の増加には用量依存性が認められたことから、総合的に陽性と判定した。短時間処理法の非代謝活性化において陽性結果が得られたことから、染色体構造異常誘発能の強さを、構造異常が 20%出現する推定被験物質濃度（SD₂₀ 値）を指標として検討したところ、SD₂₀ 値は 0.18 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換（cte）を持つ細胞の出現率の比較値である TR 値¹⁾は 120 であった。なお、短時間処理法で明らかに陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

一方、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても 5%未満であったことから、モルダントブラック-7 の染色体数的異常誘発性は陰性と判定した。

全ての処理法において、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値（Attached Data 3）と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

多くのアゾ化合物を用いた遺伝毒性試験においては、代謝活性化の条件下で陽性を示すことが報告されている⁶⁾。更に、アゾ化合物の遺伝毒性発現には、アゾ基の還元的開裂反応が重要で、それによって生じる個々の化合物が遺伝毒性に役割を果たしていることが示唆されている。本被験物質も化学構造的にアゾ化合物に属することから、その還元的開裂が重要な役割を果たすと推察され、被験物質自体やその還元的開裂産物に関する遺伝毒性試験の報告を調査したが、見当たらなかった。本被験物質と類似の化学構造を有するアゾ化合物では、Acid Alizarin Violet N の *Salmonella* 菌株を用いた復帰突然変異試験では、代謝活性化の条件下において遺伝毒性⁷⁾が認められているが、一方、Allura Red AC の染色体異常試験では、非代謝活性化では疑陽性、連続処理法では陽性と報告されており¹⁾、遺伝毒性の発現が非代謝活性化の条件下で生じている点において、本被験物質の結果と一致している。更に、後者の物質については、*Salmonella* 菌株を用いた復帰突然変異試験及びキイロショウジョウバエ (*Drosophilla melanogaster*) を用いた伴性劣性致死試験においては、陰性と報告されている⁸⁾。また、複数のアゾ化合物を用いたマウス多臓器 DNA 単鎖切断試験 (Comet assay) では、本被験物質と同様に、水溶性のスルホン酸ナトリウム基を構造内に有する化合物は、肝臓における DNA 損傷性が低いと報告されている⁹⁾。これらの結果から、アゾ化合物の遺伝毒性の発現機構には、アゾ基の還元反応とは別の要因が存在する可能性も示唆されるが、還元によらないアゾ化合物の遺伝毒性発現機構については不明な点が多く、製造過程に生じた不純物に起因する可能性も示唆されている⁶⁾。本被験物質同様に非

代謝活性化において遺伝毒性が認められる橙色 203 号の復帰突然変異試験において、Combes らは、その遺伝毒性はアゾ基由来ではなく、ニトロ基の存在に起因すると推察している¹⁰⁾が、本被験物質にはアゾ基を除いて遺伝毒性に直接関与すると考えられる反応基は見当たらない。なお、肝癌を誘発することが知られている 3'-methyl-*N,N*-dimethyl-4-aminoazobenzene (3'-Me-DAB) の *Salmonella* 菌株を用いた復帰突然変異試験において、S9 の誘導剤と種差の比較検討を実施しているが、ポリ塩化ビフェニル (PCB) で誘導したラット肝 S9 によって強い遺伝毒性が得られるが¹¹⁾、フェノバルビタール誘導では遺伝毒性の誘発が認められなかったと報告している¹²⁾。更に、同化合物に対する遺伝毒性は、ヒト肝 S9 を用いた場合には陰性を示し、遺伝毒性の発現に種差や性差が認められたと報告している¹¹⁾ことから、S9 によるアゾ基の還元開裂には種特異性を考慮する必要が示唆される。

以上の結果から、モルダントブラック-7 は本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7
[Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)								Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.				
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g		TAG(%)	Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells		other	Total (%)	Judge-ment	
6-18	-	NC	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	100	100	0	0	0	-	01-1	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	90	100	0	0	0	-	87-1	
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-		
		15.6	100	1	1	0	0	0	2	0	2	-	100	100	3	2	5	-	67-1	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	100	100	0	0	0	-	14-1	
			200	2(1.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	-	(105)	200	3(1.5)	2(1.0)	5(2.5)	-		
		31.3	100	1	3	0	0	0	4	0	4	-	100	100	2	0	2	-	31-1	
			100	1	3	0	0	0	4	0	4	-	90	100	0	0	0	-	03-1	
			200	2(1.0)	6(3.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	8(4.0)	0(0.0)	8(4.0)	-	(100)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	-		
		62.5	100	2	7	0	0	1	10	0	10	±	81	100	0	0	0	-	38-1	
			100	0	8	0	0	0	8	0	8	±	72	100	0	0	0	-	69-1	
			200	2(1.0)	15(7.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	18(9.0)	0(0.0)	18(9.0)	±	(81)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-		
		125	100	3	10	0	0	1	14	0	14	+	63	100	0	0	0	-	24-1	
			100	2	11	0	0	0	13	0	13	+	45	100	1	0	1	-	90-1	
			200	5(2.5)	21(10.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	27(13.5)	0(0.0)	27(13.5)	+	(57)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-		
		250	1	0	0	0	0	0	0	0	0	UR	27	1	0	0	0	UR	41-1	
			8	0	0	0	0	0	0	0	0	UR	8	8	0	0	0	UR	41-2	
			4	0	1	0	0	0	1	0	1	UR	18	4	0	0	0	UR	08-1	
			8	1	1	0	0	0	2	0	2	UR	18	8	0	0	0	UR	08-2	
			21	1(4.8)	2(9.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(14.3)	0(0.0)	3(14.3)	UR	(24)	21	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	UR		
		PC	100	3	30	0	0	0	33	0	33	+	109	100	0	0	0	-	43-1	
			100	6	30	0	0	0	36	0	36	+	90	100	0	0	0	-	47-1	
				200	9(4.5)	60(30.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	69(34.5)	0(0.0)	69(34.5)	+	(105)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (water for injection)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

Appendix 2-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment : -S9 mix]

Cell-growth inhibition test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}	
							1)	2)
-	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-
			93		-	-	-	-
		32.8	66	75	-	Light-purple	-	-
			79		-	Light-purple	-	-
		65.6	79	79	+	Purple	-	-
			73		+	Purple	-	-
		131	46	45	++	Purple	-	-
			40		++	Purple	-	-
		263	13	17	++	Purple	-	-
			20		++	Purple	-	-
		525	0	3	g)	Purple	-	+
			6		g)	Purple	-	+
		1050	6	6	g)	Purple	-	+
			6		g)	Purple	-	+
		2100	6	6	g)	Purple	-	+
			6		g)	Purple	-	+
		4200	13	13	g)	Purple	+	+
			13		g)	Purple	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					121.4	µg/mL		

NC: Negative Control(water for injection)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test suspensions and ²⁾ at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

+ : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

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.

Appendix 2-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	24-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			91		-	-	-	-	
		32.8	91	91	-	Light-purple	-	-	-
			83		-	Light-purple	-	-	
		65.6	74	73	-	Purple	-	-	-
			66		-	Purple	-	-	
		131	33	35	++	Purple	-	-	-
			33		++	Purple	-	-	
		263	16	17	+++	Purple	-	-	-
			16		+++	Purple	-	-	
		525	16	30	g)	Purple	-	-	+
			41		g)	Purple	-	-	+
		1050	33	30	g)	Purple	-	-	+
			24		g)	Purple	-	-	+
		2100	66	69	g)	Purple	-	-	+
			66		g)	Purple	-	-	+
		4200	33	39	g)	Purple	+	-	+
			41		g)	Purple	+	-	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					105.2 µg/mL				

NC: Negative Control(water for injection)

- 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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test suspensions and ²⁾ at the end of treatment.
- d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 +++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- 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.

Appendix 2-4

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	48-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			96		-	-	-	-	
		Test article	32.8	32	33	++	Light-purple	-	-
				32		++	Light-purple	-	-
			65.6	24	24	++	Purple	-	-
				24		++	Purple	-	-
			131	17	14	++	Purple	-	-
				10		++	Purple	-	-
			263	0	4	+++	Purple	-	-
				7		+++	Purple	-	-
			525	7	4	g)	Purple	-	+
				0		g)	Purple	-	+
			1050	3	5	g)	Purple	-	+
				7		g)	Purple	-	+
			2100	46	45	g)	Purple	-	+
				42		g)	Purple	-	+
			4200	21	18	g)	Purple	+	+
				14		g)	Purple	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : below					32.8	µg/mL			

NC: Negative Control(water for injection)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test suspensions and ²⁾ at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.

++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

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.

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 3-1

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Observation ^{a)}				
S9 mix	time (hr)		Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}		
					1)	2)	
+	6-18	0 (NC)	-	-	-	-	
		Test article	25.6	-	Light-purple	-	-
				-	Light-purple	-	-
			32.0	-	Light-purple	-	-
				-	Light-purple	-	-
			40.0	-	Purple	-	-
				-	Purple	-	-
		50.0	+	Purple	-	-	
			+	Purple	-	-	
		62.5	++	Purple	-	-	
			++	Purple	-	-	
		PC		-	-	-	-
		-	-	-	-		

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 µg/mL)

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.
- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) - : No changes of color
- d) - : Absence of precipitates/crystals

Appendix 3-2

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Mordant Black-7

[Short-term treatment: -S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Observation ^{a)}				
S9 mix	time (hr)		Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates/Crystals ^{d)}		
					1)	2)	
-	6-18	0 (NC)	-	-	-	-	
			-	-	-	-	
		Test article	15.6	-	Light-purple	-	-
				-	Light-purple	-	-
			31.3	+	Light-purple	-	-
				+	Light-purple	-	-
			62.5	+	Purple	-	-
				+	Purple	-	-
			125	+	Purple	-	-
				+	Purple	-	-
		250	++	Purple	-	-	
			++	Purple	-	-	
		PC	-	-	-	-	
			-	-	-	-	

NC: Negative Control(water for injection)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 µg/mL)

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test solutions and ²⁾ at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.
- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
 + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
 ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) - : No changes of color
- d) - : Absence of precipitates/crystals

4. 要約

モルダントブラック-7の28日間反復経口投与毒性試験を6週齢のSprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD(SD)、1群雌雄各6又は12匹〕を用いて実施した。投与量は0（注射用水：対照群）、40、200及び1000 mg/kgとし、対照群と1000 mg/kg投与群の一部の個体（1群雌雄各6匹）については投与期間終了後2週間の休薬期間を設けて、毒性変化の可逆性を検討した。

機能検査、握力及び血液学検査に、被験物質投与の影響は認められなかった。

一般状態では、投与期間中に軟便と着色尿が200 mg/kg以上の投与群の雌雄で認められた。

詳細な一般状態の観察では、投与期間中にオープンフィールド内観察における排糞数の高値が1000 mg/kg投与群の雄で認められた。

自発運動量では、投与4週に1000 mg/kg投与群の雌で高値がみられた。

体重及び摂餌量では、投与期間の初期に低値が1000 mg/kg投与群の雄でみられた。

尿検査（摂水量を含む）では、投与4週にビリルビンの陽性例の増加傾向が1000 mg/kg投与群の雌で、摂水量の高値が200 mg/kg以上の投与群の雄と1000 mg/kg投与群の雌で、尿量の低値と浸透圧の高値が1000 mg/kg投与群の雄と40 mg/kg以上の投与群の雌でみられた。

血液化学検査では、投与期間終了時にカリウムの高値が200 mg/kg以上の投与群の雌でみられた。

病理学検査では、腎臓において絶対あるいは相対重量の高値が1000 mg/kg投与群の雌雄で、組織学検査に尿細管上皮細胞の褐色色素が200 mg/kg以上の投与群の雌で、尿細管上皮細胞の好酸性小滴が1000 mg/kg投与群の雄で認められた。更に、盲腸及び結腸の粘膜の過形成が200 mg/kg以上の投与群の雌雄で、直腸の粘膜の過形成が1000 mg/kg投与群の雌雄で認められた。

上述した変化についてはいずれも休薬により、軽減あるいは消失し回復性を示した。

以上の結果、モルダントブラック-7の本試験条件下における無影響量は雄では病理検査における大腸（盲腸と結腸）の粘膜の過形成などから40 mg/kg/dayと推定された。一方、雌では尿検査における尿量の低値と浸透圧の高値から40 mg/kg/dayを下回ると考えられた。

B-6586

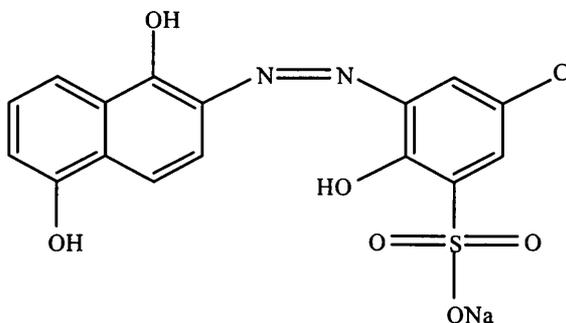
6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

被験物質は山田化学工業株式会社より提供された。本試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、分析チャートを添付資料1に示した。

名称	:	モルダントブラック-7
英名	:	Mordant Black -7
CAS 番号	:	3618-60-8
官報公示整理番号	:	5-2111
分子量	:	416.77
分子式	:	C ₁₆ H ₁₀ ClN ₂ NaO ₆ S
構造式	:	



ロット番号	:	08001
純度	:	92.7 %
不純物	:	7.3 % (うち塩分として塩素イオン 7100 mg/kg、硫酸イオン 1300 mg/kg が含有)
入手量	:	700 g (100g を 7 本)
安定性	:	投与終了後、提供先で安定性を確認した結果、安定であることが確認された (添付資料 2)。
保存方法	:	冷暗所 (実測値 3~8°C)、密閉、吸湿性あり、シリカゲルと同梱
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室
取扱い上の注意	:	マスク、手袋及び保護眼鏡を着用した。 火気や熱源などの着火源から遠ざけ、酸化剤との接触を避けた。
返却	:	被験物質 1 g を保存試料として保存した。分析用に小分けした被験物質の残量は廃棄した。また、被験物質の残量は提供先に送付し安定性を確認後、すべて廃棄した。

の間投与を行わなかった。

6.9 投与方法

投与容量は 5 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した（08:01~12:13の間）。対照群には媒体（注射用水）を同様に投与した。個体ごとの投与液量（表示単位：0.1 mL）は最新の体重を基準に算出した。

6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

モルダントブラック-7の0（注射用水）、100、300及び1000 mg/kg/dayを1群雌雄各5匹のラットに14日間反復経口投与した結果¹⁾、主な変化として、雄は1000 mg/kg投与群の1例に死亡が、雌は1000 mg/kg投与群の器官重量に変化が認められた。従って、本試験における投与量は、1000 mg/kg投与群を高用量とし、公比5で除し、200 mg/kgを中用量に、40 mg/kgを低用量とし、対照群を加え4群構成とした。1群当たりの動物を主群では雌雄各6匹、回復群では対照群及び高用量群で雌雄各6匹とした。群構成表を次の表1に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	40	8	5	雄	6	2001~2006	-	-
				雌	6	2101~2106	-	-
中用量群	200	40	5	雄	6	3001~3006	-	-
				雌	6	3101~3106	-	-
高用量群	1000	200	5	雄	6	4001~4006	6	4007~4012
				雌	6	4101~4106	6	4107~4112

6.11 観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りとした。

- 投与1日（day 1 of administration）：投与開始日
- 投与1週（week 1 of administration）：投与1から投与7日
- 回復1日（day 1 of recovery）：回復開始日（投与期間終了の翌日）
- 回復1週（week 1 of recovery）：回復1から回復7日

6.11.1 一般状態の観察

全個体について投与期間中は毎日3回、投与前と投与直後及び約2時間後（ただし、休日と詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定を実施する時は投与前と投与直後の2回）、回復期間中は毎日1回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及

7. 試験結果

7.1 一般状態

成績を Table 1-1~1-3 及び Appendix 1~10 に示した。

1) 投与期間

軟便が 200 及び 1000 mg/kg 投与群の雌雄で投与 2 日以降に認められた。また、着色尿が 200 mg/kg 投与群の雄で投与 2~14 日と雌で投与 2~9 日に散見され、1000 mg/kg 投与群の雌雄全例で投与 2 日以降より投与期間を通じて認められた。

2) 回復期間

1000 mg/kg 投与群の回復 1 日に軟便が雌雄で散見された。また、着色尿が雌雄全例で認められた。

7.2 詳細な一般状態、機能検査、握力及び自発運動量

7.2.1 詳細な一般状態

成績を Table 2-1~2-18 及び Appendix 11~70 に示した。

1) 投与期間

オープンフィールド内観察において排糞数の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で投与 1 及び 2 週に認められた。

2) 回復期間

いずれの検査項目においても異常はなく、雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 及び Appendix 71~76 に示した。

1) 投与 4 週

いずれの検査項目においても異常はなく、雌雄とも各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復 2 週

いずれの検査項目においても異常はなく、雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.3 握力

成績を Table 2-21、2-22 及び Appendix 77~82 に示した。

1) 投与 4 週

雌雄とも各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復 2 週

雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.4 自発運動量

成績を Fig. 1~4、Table 2-23、2-24 及び Appendix 83~88 に示した。

1) 投与 4 週

有意な高値が 40 mg/kg 投与群の雄の測定開始後 0~10 分の測定値に、1000 mg/kg 投与群の雌に測定開始後 50~60 分の測定値にみられ、更に、測定開始後 0~60 分の合計値にも有意な高値が認められた。

2) 回復 2 週

有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌の測定開始後 0~10 分と 30~40 分の測定値に認められた。

7.3 体重

成績を Fig.5、Table 3-1、3-2 及び Appendix 89~94 に示した。

1) 投与期間

有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で投与 4、7 及び 10 日に認められた。

2) 回復期間

1000 mg/kg 投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

7.4 摂餌量

成績を Fig.6、Table 4-1、4-2 及び Appendix 95~100 に示した。

1) 投与期間

有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で投与 7 日に、有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で投与 14 日に認められた。

2) 回復期間

雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群とほぼ同様に推移し、有意差は認められなかった。

7.5 尿検査（摂水量含む）

成績を Table 5-1~5-8 及び Appendix 101~118 に示した。

1) 投与 4 週

色調において淡紫色が 40 mg/kg 投与群の雌 1/6 例と 200 mg/kg 投与群の雌雄各全例で、紫色が 1000 mg/kg 投与群の雌雄各全例でみられた。また、ビリルビンの陽性例が 1000 mg/kg 投与群の雌 3/12 例でみられ、陽性例の増加傾向が認められた。また、摂水量の有意な高値が 200 mg/kg 以上の投与群の雄と 1000 mg/kg 投与群の雌で、尿量の有意な低値と浸透圧の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄と 40 mg/kg 以上の投与群の雌で認められた。

2) 回復 2 週

浸透圧の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。

7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-6 及び Appendix 119~136 に示した。

1) 投与期間終了時

いずれの検査項目においても、雌雄とも各被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

2) 回復期間終了時

平均赤血球色素濃度の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、白血球百分率の実数で好酸球数の有意な低値が 1000 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 及び Appendix 137~148 に示した。

1) 投与期間終了時

カリウムの有意な高値が 200 mg/kg 以上の投与群の雌で、無機リンの有意な低値が 40 mg/kg 投与群の雄で認められた。

2) 回復期間終了時

いずれの検査項目においても、雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 及び Appendix 149~172 に示した。

1) 投与期間終了時

腎臓 : 絶対及び相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。

2) 回復期間終了時

いずれの器官においても、雌雄とも 1000 mg/kg 投与群と対照群の間に有意差は認められなかった。

7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 投与期間終了時

下垂体	:	のう胞が 40 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。
胃	:	腺胃の暗赤色巢が 200 mg/kg 投与群の雌 2 例で、前胃の隆起巢が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。
腎臓	:	暗調化が 40 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 5 例、200 mg/kg 以上の投与群の雌雄各全例で認められた。
精巣	:	小型化が 40 及び 1000 mg/kg 投与群の各 1 例で認められた。
精巣上体	:	小型化が 40 及び 1000 mg/kg 投与群の各 1 例で認められた。

2) 回復期間終了時

肺	:	暗赤色巢が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。
腎臓	:	暗調化が 1000 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 5 例で認められた。
胃	:	漿膜の隆起巢が対照群の雌 1 例で認められた。
腭リンパ節	:	結節が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。

7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-5 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が盲腸、直腸、結腸及び腎臓で認められた。

盲腸	:	軽微あるいは軽度な粘膜の過形成が対照群の雌雄各 1 例、40 mg/kg 投与群の雌雄各 2 例、200 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌 4 例、1000 mg/kg 投与群の雌雄各全例にみられ、200 mg/kg 以上の投与群の雌雄で発現頻度の増加傾向が認められた。
結腸	:	軽微あるいは軽度な粘膜の過形成が 200 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 4 例、1000 mg/kg 投与群の雄全例と雌 5 例に認められた。
直腸	:	軽微あるいは軽度な粘膜の過形成が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 4 例に認められた。
腎臓	:	軽微あるいは軽度な尿細管上皮細胞の好酸性小滴が 1000 mg/kg 投与群の雄 3 例に、軽微な尿細管上皮細胞の褐色色素が 200 mg/kg 投与群の雌 1 例、1000 mg/kg 投与群の雌全例に認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

- 眼球 : 軽微な網膜異形成と結膜の石灰沈着の肉芽腫が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。
- 下垂体 : 軽度な異所性頭蓋咽頭管組織が 40 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。
- 甲状腺 : 軽微な鰓後体のう胞が対照群の雌雄各 1 例、1000 mg/kg 投与群の雌 2 例に認められた。
- 心臓 : 軽微な限局性の心筋炎が対照群の雄 1 例、1000 mg/kg 投与群の雄 2 例に認められた。
- 肺 : 軽微な動脈壁の鈣質沈着が 1000 mg/kg 投与群の雄 2 例に、軽微な肺泡マクロファージの集簇が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例に、軽微な限局性肺炎が対照群の雄 1 例に認められた。
- 胃 : 軽微あるいは軽度の腺胃のびらんが 200 mg/kg 投与群の雌 2 例で、軽度な扁平上皮の限局性過形成が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。
- 盲腸 : 軽微な粘膜の細胞浸潤が対照群の雄 1 例、200 mg/kg 投与群の雌 1 例に認められた。
- 肝臓 : 軽微な微小肉芽腫が対照群の雌雄各 4 例、1000 mg/kg 投与群の雄 4 例と雌 5 例に認められた。
- 腎臓 : 軽微あるいは軽度な再生尿管が対照群の雄 2 例と雌 1 例、40 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例、200 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例、1000 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌 1 例に、軽微な間質性の細胞浸潤が対照群の雌 1 例、40 mg/kg 投与群の雌 1 例、200 mg/kg 投与群の雄 1 例、1000 mg/kg 投与群の雌 1 例に認められた。
- 精巣 : 軽度あるいは高度な精細管の萎縮が 40 及び 1000 mg/kg 投与群の各 1 例で認められた。
- 精巣上体 : 軽微な間質性の細胞浸潤が対照群の 1 例、1000 mg/kg 投与群の 2 例に、高度な精子数の減少が 40 mg/kg 投与群の 1 例に、軽微あるいは軽度な管腔の細胞残屑が 40 mg/kg 投与群と 1000 mg/kg 投与群の各 1 例に認められた。
- 前立腺 : 軽微な間質性の細胞浸潤が対照群の 3 例、1000 mg/kg 投与群の 1 例に認められた。
- 大腿部骨格筋 : 軽微な筋線維の変性/壊死が 1000 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に認められた。

2) 回復期間終了時

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

- | | | |
|-------|---|--|
| 肺 | : | 軽微な限局性肺炎と骨化生が 1000 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。 |
| 胃 | : | 軽度なのう胞封入が対照群の雌 1 例で認められた。 |
| 盲腸 | : | 軽微な粘膜の細胞浸潤が対照群の雌雄各 1 例に認められた。 |
| 腎臓 | : | 軽微な再生尿細管が対照群の雄 1 例と雌 2 例、1000 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例に、軽微な尿細管の好酸性小滴が対照群の雄 1 例に認められた。 |
| 腭リンパ節 | : | 軽度なリンパ節炎が 1000 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。 |

8. 考察

モルダントブラック-7の28日間反復経口投与毒性試験を6週齢のSprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD(SD)、1群雌雄各6又は12匹〕を用いて実施した。投与量は0（注射用水：対照群）、40、200及び1000 mg/kgとし、対照群と1000 mg/kg投与群の一部の個体（1群雌雄各6匹）については投与期間終了後2週間の休薬期間を設けて毒性変化の可逆性を検討した。

一般状態では、投与期間中に軟便と着色尿が200 mg/kg以上の投与群の雌雄でみられた。なお、回復期間中については軟便と着色尿が回復1日にみられたが、その後異常は認められなかった。

詳細な一般状態の観察では、投与期間中にオープンフィールド内観察において排糞数の高値が1000 mg/kg投与群の雄でみられたが、他に異常は認められなかった。

機能検査と握力では、投与及び回復期間を通じて異常は認められなかった。

自発運動量では、投与4週に1000 mg/kg投与群の雌の測定開始後50~60分の測定値と測定開始後0~60分の合計値に高値がみられ、中枢及び末梢神経系の病理学検査に異常はみられていないものの、被験物質投与の影響が疑われた。なお、回復2週にも1000 mg/kg投与群の雌で測定開始後0~10分と30~40分の測定値に高値がみられたが、投与期間中に比べて変化の程度は減少し、休薬による回復性が認められた。その他、投与4週に40 mg/kg投与群の雄で測定開始後0~10分の測定値に高値がみられたが、投与量との関連性が認められていないことから偶発性と判断した。

体重及び摂餌量では、投与期間中に低値が1000 mg/kg投与群の雄でみられたが、投与期間初期のみの変化であった。

尿検査（摂水量を含む）では、投与4週にビリルビンの陽性例の増加傾向が1000 mg/kg投与群の雌で、摂水量の高値が200 mg/kg以上の投与群の雄と1000 mg/kg投与群の雌で、尿量の低値と浸透圧の高値が1000 mg/kg投与群の雄と40 mg/kg以上の投与群の雌でみられた。これらの変化は休薬によりいずれも消失し、回復性が認められた。また、色調において淡紫色あるいは紫色が40 mg/kg以上の投与群の雌と200 mg/kg以上の投与群の雄にみられたが、本被験物質の色調（黒~紫色）を反映したものと考えられたことから、毒性学的意義はないと判断した。

血液学検査では、回復期間終了時に平均赤血球血色素濃度の低値が1000 mg/kg投与群の雄でみられたが、ごく軽度であり、赤血球数など関連する項目には変化はないことから偶発性と判断した。また、白血球百分率の実数で好酸球数の低値が1000 mg/kg投与群の雌雄でみられたが、ごく軽度であり、白血球数及び他の白血球百分率には変化がないことから、偶発性と判断した。

血液化学検査では、投与期間終了時にカリウムの高値が200 mg/kg以上の投与群の雌でみられ、被験物質投与による腎臓への影響が疑われた。この変化は休薬により消失し、回復性が認められた。その他、投与期間終了時に無機リンの低値が40 mg/kg投

与群の雄でみられたが、ごく軽度であり、高用量群では同様な変化はみられていないことから、偶発性と判断した。

病理学検査では、投与期間終了時に腎臓の絶対及び相対重量の高値が 1000 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の高値が 1000 mg/kg 投与群の雌で認められた。また、組織学検査で腎臓の尿細管上皮細胞の好酸性小滴が 1000 mg/kg 投与群の雄で、尿細管上皮細胞の褐色色素が 200 mg/kg 以上の投与群の雌で、また、盲腸の粘膜の過形成が 200 mg/kg 以上の投与群の雌雄で発現頻度の増加傾向が、結腸の粘膜の過形成が 200 mg/kg 以上の投与群の雌雄で、直腸の粘膜の過形成が 1000 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、いずれも被験物質投与の影響が疑われた。これらの変化はいずれも休薬により消失し、回復性が認められた。その他、投与あるいは回復期間終了時に剖検において腎臓の暗調化が 40 mg/kg 以上の投与群の雌雄にみられたが、本被験物質の色調から、被験物質の沈着が示唆されたが、毒性学的意義はないと判断した。更に、下垂体ののう胞、腺胃と肺の暗赤色巣、胃において前胃と漿膜の隆起巣、精巣及び精巣上体の小型化及び腓リンパ節の結節がみられたが、いずれの変化もその出現状況などから偶発性と判断した。

以上の結果、モルダントブラック-7の本試験条件下における無影響量は雄では病理検査における大腸(盲腸と結腸)の粘膜の過形成などから 40 mg/kg/day と推定された。一方、雌では尿検査における尿量の低値と浸透圧の高値から 40 mg/kg/day を下回ると考えられた。なお、いずれの変化も休薬による回復性が認められた。

要 約

ビスフェノール A・EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、復帰突然変異試験を指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、S9 mix 非存在（直接法）および存在（代謝活性化法）下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験（予備試験）の結果、菌の生育阻害が認められる用量または 5000 μ g/プレート を最高用量とし、直接法においては、TA98、TA100、TA1535 および TA1537 では 62.5～2000 μ g/プレートの範囲（公比 2）、WP2uvrA では 156～5000 μ g/プレートの範囲（公比 2）、代謝活性化法では、いずれの菌株とも 156～5000 μ g/プレートの範囲（公比 2）で設定した。

試験は 2 回実施した。その結果、全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害については、直接法では、TA1535 の 1000 μ g/プレート以上、TA98、TA100 および TA1537 の 2000 μ g/プレート、代謝活性化法においては、試験 1 回目では TA1535 の 1000 μ g/プレート以上、TA100 の 5000 μ g/プレート、試験 2 回目では TA1535 の 1000 μ g/プレート以上の用量で認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、ビスフェノール A・EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

目的

この試験は、ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法^{1, 2)}

1. 被験物質

名称：ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

（英名：4,4'-isopropylidenediphenol ethoxylated）

CAS 番号：32492-61-8

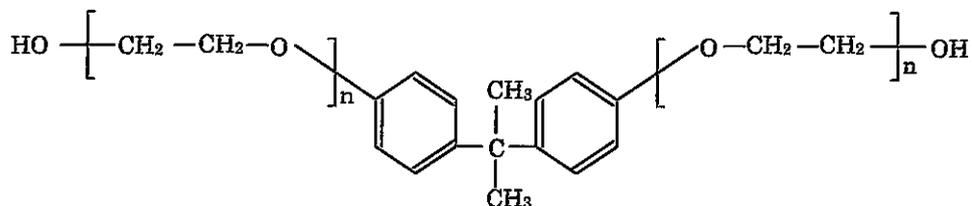
ロット番号：L3-6S004-A

純度：99%以上（水分：0.04%）

付加モル分布：1 モル：0.0%、2 モル：5.6%、3 モル：16.9%、4 モル：23.3%、
5 モル：21.1%、6 モル：15.8%、7 モル：8.2%、8 モル：4.0%
9 モル以上：5.1%（分析日：平成 18 年 10 月 19 日）

示性式： $(C_2H_4O)_n(C_2H_4O)_nC_{15}H_{16}O_2$

構造式：



入手先：三洋化成工業株式会社（京都府京都市東山区一橋野本町 11-1）

入手日・量：平成 19 年 3 月 14 日・25 g

物性等：

化学名　　ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

分子量　　432（付加モル数 5 モルと仮定した場合）

性状(常温)　無色透明液体

酸価　　0.013 mgKOH/g

水酸基価　239 mgKOH/g

指標菌株	直接法 (μg /プレート)	代謝活性化法 (μg /プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	SA (0.5)	2-AA (2)
WP2uvzA	AF-2 (0.04)	2-AA (10)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (1)
TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業株式会社、98%、ロット番号 PTQ1296)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社、>90%、ロット番号 KCM2259)

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、90%、ロット番号 KCG5232)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Aldrich Chemical Company、98%、ロット番号 07721MZ)

8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6w/v%粉末寒天 (Difco Laboratories、ロット番号 5200601) および 0.5w/v% 塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、ロット番号 8251) の組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天に、*S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ビオチン (Sigma Chemical Company、ロット番号 AASXB) および 0.5 mM L-ヒスチジン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 DLJ5479) 水溶液、*E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 EWP0420) 水溶液を 1/10 容加え、アミノ酸添加軟寒天培地とした。

9. 用量設定試験 (予備試験)

本試験における被験物質の適切な用量を把握するために、20~5000 μg /プレートの範囲で用量を設定し、本試験と同様の実験方法で試験を行った。試験は各用量 1 枚のプレートで行った。

その結果 (表 1-1、1-2)、直接法の場合は、TA 98、TA100、TA1535 および TA1537 では 2000 μg /プレート以上の用量で菌の生育阻害が認められ、WP2uvzA では菌の生育阻害は認められなかった。また、代謝活性化法の場合は、TA100、TA1535 および TA1537 では 5000 μg /プレートで菌の生育阻害が認められ、TA 98 および WP2uvzA では菌の生育阻害は認められなかった。

10. 本試験

本試験は、同一菌株、同一用量で2回行った。

1) 用量設定

用量設定試験の結果から、被験物質の用量については、直接法の場合、TA 98、TA100、TA1535 および TA1537 では 2000 μ g/プレート を最高用量とし、以下公比 2 で 1000、500、250、125 および 62.5 μ g/プレート、WP2uvrA では 5000 μ g/プレート を最高用量とし、以下公比 2 で 2500、1250、625、313 および 156 μ g/プレート、また、代謝活性化法の場合は、いずれの菌株とも 5000 μ g/プレート を最高用量とし、以下公比 2 で 2500、1250、625、313 および 156 μ g/プレートの各計 6 用量とした。

2) 実験方法

(1) プレインキュベーション法（直接法）

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL (和光純薬工業株式会社、リン酸水素二ナトリウム・十二水塩：ロット番号 WAF3531、リン酸二水素ナトリウム・二水塩：ロット番号 CAJ2723) および前培養した懸濁菌液 0.1 mL を分注し、37°C で 20 分間振盪培養後、45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。最少グルコース寒天平板培地 (プレート) (テスメディア AN 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 ANI420FW・2007年6月5日製造・2007年8月10日購入；ロット番号 ANI730IW・2007年9月11日製造・2007年11月12日購入) は、Vogel-Bonner E 培地 (0.2 w/v% クエン酸・一水塩、1w/v% リン酸二カリウム・無水塩、0.192 w/v% リン酸一アンモニウム、0.066 w/v% 水酸化ナトリウム、0.02 w/v% 硫酸マグネシウム・七水塩) に寒天粉末を 1.5 w/v% およびグルコースを 2 w/v% となるように加え、30 mL ずつ分注したものである。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり、溶媒 (DMSO) 0.1 mL および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

(2) プレインキュベーション法（代謝活性化法）

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL、S9 mix 0.5 mL および前培養した懸

濁菌液 0.1 mL を分注し、37℃で 20 分間振盪培養後、45℃に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。37℃で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり、溶媒 (DMSO) 0.1 mL および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

11. 無菌試験

用量設定試験および本試験において、用いた溶媒、S9 mix および最高用量の被験物質の供試液について、それぞれ 0.1 mL に 0.6 w/v% 軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地 (テスメディア AN 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 ANI730IW) に重層後、37℃で 48 時間培養し、菌の生育の有無を調べた。最少グルコース寒天平板培地は、それぞれ 3 枚ずつ使用した。

12. 試験の有効性

以下の 3 基準を満たす場合に、試験は適切な条件下で実施され、試験は有効であると判定した。

- (1) 試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液および S9 mix に雑菌の混入がない。
- (2) 各指標菌株の陰性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における背景データの範囲内の値を示す (自然復帰変異体数)。
- (3) 各指標菌株の陽性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における陽性対照値の背景データの範囲あるいはその近くの値を示す。

13. 結果の判定

結果の判定は、各用量におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、原則的に以下の 3 基準を満たす場合を陽性とした。

- (1) 被験物質処理群において陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
- (2) 被験物質用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する (用量依存性)。
- (3) 2 回にわたる本試験の結果から復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。

但し、明確な用量依存性が認められない場合においても、陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定する。

結 果

試験を2回実施した結果（表 2-1-1、2-1-2、2-2、3-1-1、3-1-2、3-2 および図 1-1、1-2、1-3、1-4、1-5、2-1、2-2、2-3、2-4、2-5）、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、供試したすべての菌株において復帰変異コロニー数は、陰性対照値の2倍を超えることはなかった。菌の生育阻害については、直接法では、TA1535の1000 μ g/プレート以上、TA98、TA100 および TA1537の2000 μ g/プレート、代謝活性化法においては、試験1回目ではTA1535の1000 μ g/プレート以上、TA100の5000 μ g/プレート、試験2回目ではTA1535の1000 μ g/プレート以上の用量で認められた。

陰性対照群では背景データ（添付資料）の範囲内の復帰変異コロニー数が認められた。陽性対照群においては明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められ、その程度は、それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内またはその近くの陽性値を示すものであった。また、試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液およびS9 mixなどには、雑菌の混入は認められなかった。その他、実験中被験物質の析出等、特記すべき変化は認められなかった。

結 論

ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数5モル）について遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての指標菌株で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

試験の有効性については、2回にわたる本試験ともに有効であることが確認された。

したがって、本実験条件下ではビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数5モル）の遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

ビスフェノール A の変異原性については、*S. typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 または *E. coli* WP2uvrA を用いた復帰突然変異試験^{3,4,5)} で陰性と報告がある。また、CHO 細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁶⁾ および陰性⁷⁾、V-79 細胞を用いた細胞遺伝子突然変異試験で陰性⁸⁾ との報告がある。

表 1-1 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の
用量設定試験結果[直接法]

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照〔局方精製水〕	153	14	19	29	14
20	121	10	18	28	9
50	107	5	18	38	16
100	104	13	30	34	14
200	108	8	21	32	10
500	123	10	24	26	15
1000	93	5	21	45	14
2000	90 *	6 *	18	34 *	6 *
5000	109 *	6 *	13	33 *	6 *
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異コロニー数 /プレート	759	384	771	369	388

* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 1-2 S9 mix 存在下におけるビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の
 用量設定試験結果〔代謝活性化法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照〔局方精製水〕	86	9	29	37	13
20	88	7	36	31	13
50	105	6	14	27	13
100	102	8	33	26	8
200	79	10	20	27	12
500	101	6	19	28	10
1000	83	3	23	26	19
2000	107	5	27	19	16
5000	103 *	5 *	19	24	3 *
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異コロニー数 /プレート	603	302	505	369	138

* : 菌の生育阻害が認められた。
 2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1-1 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-EO (平均付加モル数5モル)の
 復帰変異試験結果[本試験1回目-直接法]

用 量 [μ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	117	10	--	28	13
[局方精製水]	114	6	--	28	6
	110	4	--	16	13
	(114 \pm 4)	(7 \pm 3)	--	(24 \pm 7)	(11 \pm 4)
62.5	99	14	--	31	11
	107	10	--	18	11
	112	6	--	28	12
	(106 \pm 7)	(10 \pm 4)	--	(26 \pm 7)	(11 \pm 1)
125	95	9	--	23	10
	118	6	--	21	10
	111	8	--	17	9
	(108 \pm 12)	(8 \pm 2)	--	(20 \pm 3)	(10 \pm 1)
250	108	5	--	19	6
	118	9	--	17	5
	96	4	--	24	8
	(107 \pm 11)	(6 \pm 3)	--	(20 \pm 4)	(6 \pm 2)
500	93	9	--	25	12
	107	6	--	21	11
	111	5	--	22	4
	(104 \pm 9)	(7 \pm 2)	--	(23 \pm 2)	(9 \pm 4)
1000	91	12*	--	27	10
	95	6*	--	17	11
	126	6*	--	15	11
	(104 \pm 19)	(8 \pm 3)	--	(20 \pm 6)	(11 \pm 1)
2000	84*	0*	--	18*	2*
	104*	0*	--	14*	3*
	96*	0*	--	18*	4*
	(95 \pm 10)	(0 \pm 0)	--	(17 \pm 2)	(3 \pm 1)
陽性対照	AF-2	SA	--	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	--	0.1	80
復帰変異	828	420	--	499	334
コロニー数	845	474	--	530	472
/プレート	892	454	--	525	432
	(855 \pm 33)	(449 \pm 27)	--	(518 \pm 17)	(413 \pm 71)

(): 平均値 \pm 標準偏差

* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 2-1-2 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の
 復帰変異試験結果[本試験1回目-直接法]

用 量 [μ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰性対照	--	--	20	--	--
[局方精製水]	--	--	23	--	--
	--	--	15	--	--
	--	--	(19 \pm 4)	--	--
156	--	--	25	--	--
	--	--	15	--	--
	--	--	18	--	--
	--	--	(19 \pm 5)	--	--
313	--	--	19	--	--
	--	--	19	--	--
	--	--	18	--	--
	--	--	(19 \pm 1)	--	--
625	--	--	31	--	--
	--	--	17	--	--
	--	--	18	--	--
	--	--	(22 \pm 8)	--	--
1250	--	--	26	--	--
	--	--	26	--	--
	--	--	16	--	--
	--	--	(23 \pm 6)	--	--
2500	--	--	22	--	--
	--	--	26	--	--
	--	--	21	--	--
	--	--	(23 \pm 3)	--	--
5000	--	--	18	--	--
	--	--	18	--	--
	--	--	20	--	--
	--	--	(19 \pm 1)	--	--
陽性対照	--	--	AF-2	--	--
μ g/プレート	--	--	0.04	--	--
復帰変異	--	--	988	--	--
コロニー数	--	--	1005	--	--
/プレート	--	--	941	--	--
	--	--	(978 \pm 33)	--	--

(): 平均値 \pm 標準偏差

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

表 2-2 S9 mix 存在下におけるビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の
 復帰変異試験結果[本試験1回目-代謝活性化法]

用 量 [μ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	100	8	28	24	9
[局方精製水]	121	6	29	19	9
	109	11	17	26	14
	(110 \pm 11)	(8 \pm 3)	(25 \pm 7)	(23 \pm 4)	(11 \pm 3)
156	88	9	20	30	14
	102	8	21	32	14
	88	6	21	33	6
	(93 \pm 8)	(8 \pm 2)	(21 \pm 1)	(32 \pm 2)	(11 \pm 5)
313	111	2	19	21	13
	109	10	23	33	14
	96	10	25	35	12
	(105 \pm 8)	(7 \pm 5)	(22 \pm 3)	(30 \pm 8)	(13 \pm 1)
625	95	8	17	27	10
	104	3	26	47	18
	100	9	27	37	11
	(100 \pm 5)	(7 \pm 3)	(23 \pm 6)	(37 \pm 10)	(13 \pm 4)
1250	106	3	21	18	4
	96	7	34	24	13
	81	7	42	26	18
	(94 \pm 13)	(6 \pm 2)	(32 \pm 11)	(23 \pm 4)	(12 \pm 7)
2500	81	9*	31	30	5
	96	6*	29	34	10
	88	10*	18	24	15
	(88 \pm 8)	(8 \pm 2)	(26 \pm 7)	(29 \pm 5)	(10 \pm 5)
5000	86*	9*	31	28	11
	108*	7*	28	18	8
	106*	6*	23	35	7
	(100 \pm 12)	(7 \pm 2)	(27 \pm 4)	(27 \pm 9)	(9 \pm 2)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	577	226	664	332	108
コロニー数	503	176	624	313	112
/プレート	496	187	577	333	106
	(525 \pm 45)	(196 \pm 26)	(622 \pm 44)	(326 \pm 11)	(109 \pm 3)

* : 菌の生育阻害が認められた。

(): 平均値 \pm 標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3-1-1 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-EO (平均付加モル数5モル)の
復帰変異試験結果 [本試験2回目 - 直接法]

用 量 [μ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	122	9	--	21	5
[局方精製水]	113	10	--	17	9
	96	7	--	25	5
	(110 \pm 13)	(9 \pm 2)	--	(21 \pm 4)	(6 \pm 2)
62.5	117	5	--	22	7
	122	13	--	22	6
	137	7	--	24	7
	(125 \pm 10)	(8 \pm 4)	--	(23 \pm 1)	(7 \pm 1)
125	116	9	--	20	4
	115	9	--	27	7
	109	10	--	25	5
	(113 \pm 4)	(9 \pm 1)	--	(24 \pm 4)	(5 \pm 2)
250	111	5	--	24	6
	109	7	--	12	9
	123	12	--	33	4
	(114 \pm 8)	(8 \pm 4)	--	(23 \pm 11)	(6 \pm 3)
500	101	13	--	20	9
	109	6	--	20	6
	109	7	--	24	6
	(106 \pm 5)	(9 \pm 4)	--	(21 \pm 2)	(7 \pm 2)
1000	100	8*	--	20	5
	102	6*	--	21	2
	90	8*	--	22	11
	(97 \pm 6)	(7 \pm 1)	--	(21 \pm 1)	(6 \pm 5)
2000	96*	0*	--	16*	5*
	68*	0*	--	27*	6*
	74*	0*	--	24*	4*
	(79 \pm 15)	(0 \pm 0)	--	(22 \pm 6)	(5 \pm 1)
陽性対照	AF-2	SA	--	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	--	0.1	80
復帰変異	928	491	--	461	747
コロニー数	892	469	--	482	953
/プレート	882	457	--	459	837
	(901 \pm 24)	(472 \pm 17)	--	(467 \pm 13)	(846 \pm 103)

(): 平均値 \pm 標準偏差

* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 3-1-2 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の
 復帰変異試験結果〔本試験2回目-直接法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照 〔局方精製水〕	---	---	13	---	---
	---	---	19	---	---
	---	---	16	---	---
	---	---	(16 \pm 3)	---	---
156	---	---	22	---	---
	---	---	26	---	---
	---	---	17	---	---
	---	---	(22 \pm 5)	---	---
313	---	---	14	---	---
	---	---	13	---	---
	---	---	21	---	---
	---	---	(16 \pm 4)	---	---
625	---	---	30	---	---
	---	---	19	---	---
	---	---	24	---	---
	---	---	(24 \pm 6)	---	---
1250	---	---	16	---	---
	---	---	16	---	---
	---	---	17	---	---
	---	---	(16 \pm 1)	---	---
2500	---	---	23	---	---
	---	---	21	---	---
	---	---	25	---	---
	---	---	(23 \pm 2)	---	---
5000	---	---	22	---	---
	---	---	12	---	---
	---	---	13	---	---
	---	---	(16 \pm 6)	---	---
陽性対照	---	---	AF-2	---	---
μ g/プレート	---	---	0.04	---	---
復帰変異 コロニー数 /プレート	---	---	1264	---	---
	---	---	1235	---	---
	---	---	1220	---	---
	---	---	(1240 \pm 22)	---	---

(): 平均値 \pm 標準偏差

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

表 3-2 S9 mix 存在下におけるビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の
 復帰変異試験結果[本試験2回目-代謝活性化法]

用 量 〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
陰性対照 〔局方精製水〕	88 99 91 (93 ± 6)	6 7 6 (6 ± 1)	21 20 22 (21 ± 1)	34 18 23 (25 ± 8)	10 16 2 (9 ± 7)
156	103 114 91 (103 ± 12)	10 10 6 (9 ± 2)	22 25 20 (22 ± 3)	34 30 25 (30 ± 5)	17 10 16 (14 ± 4)
313	88 86 111 (95 ± 14)	12 5 8 (8 ± 4)	33 18 32 (28 ± 8)	22 31 21 (25 ± 6)	7 12 7 (9 ± 3)
625	81 98 92 (90 ± 9)	11 4 6 (7 ± 4)	20 20 32 (24 ± 7)	33 23 33 (30 ± 6)	8 15 9 (11 ± 4)
1250	111 69 85 (88 ± 21)	9 10 6 (8 ± 2)	23 22 19 (21 ± 2)	27 31 26 (28 ± 3)	14 9 13 (12 ± 3)
2500	95 92 92 (93 ± 2)	8* 4* 12* (8 ± 4)	17 16 21 (18 ± 3)	26 30 27 (28 ± 2)	12 11 15 (13 ± 2)
5000	91 88 72 (84 ± 10)	9* 2* 0* (4 ± 5)	17 25 15 (19 ± 5)	25 35 28 (29 ± 5)	12 2 5 (6 ± 5)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μg/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異 コロニー数 /プレート	483 438 612 (511 ± 90)	204 196 199 (200 ± 4)	462 458 453 (458 ± 5)	244 254 210 (236 ± 23)	112 103 105 (107 ± 5)

* : 菌の生育阻害が認められた。
 (): 平均値±標準偏差
 2-AA: 2-アミノアントラセン

要 約

ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU）を用いて *In vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、46.88～3000 μ g/mL の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、短時間処理法の S9 mix 非存在および存在下ともに、750 μ g/mL 以上の用量で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められた。連続処理法 24 時間処理では、375 μ g/mL 以上の用量で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められた。

したがって、染色体異常試験における用量は、短時間処理法の場合では 100、200、400、600 および 800 μ g/mL、連続処理法の場合は 50、100、200、300 および 400 μ g/mL とした。

試験の結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下ともに 400 μ g/mL でのみ染色体構造異常細胞の増加が認められた。連続処理法 24 時間では染色体異常細胞の増加は認められなかった。なお、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下の 600 μ g/mL 以上、また、連続処理法 24 時間の 300 μ g/mL 以上では、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下ともに 1 用量のみで染色体異常細胞の増加が認められたことから、いずれの条件の場合も 300、400 および 500 μ g/mL 用量を設定して確認試験を行った。その結果、S9 mix 非存在下では 300 および 400 μ g/mL で、また、S9 mix 存在下では 400 μ g/mL で染色体構造異常細胞の増加が認められ、試験結果の再現性が確認された。なお、S9 mix 非存在および存在下ともに 500 μ g/mL では、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。

試験目的

この試験は、ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法^{1, 2)}

1. 被験物質

名 称 : ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

（英名 : 4,4'-isopropylidenediphenol ethoxylated）

CAS 番号 : 32492-61-8

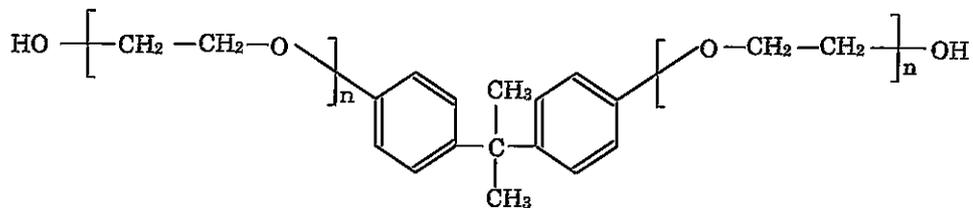
ロット番号 : L3-6S004-A

純 度 : 99%以上（水分 : 0.04%）

付加モル分布 : 1 モル : 0.0%、2 モル : 5.6%、3 モル : 16.9%、4 モル : 23.3%、
5 モル : 21.1%、6 モル : 15.8%、7 モル : 8.2%、8 モル : 4.0%
9 モル以上 : 5.1%（分析日 : 平成 18 年 10 月 19 日）

示 性 式 : $(C_2H_4O)_n(C_2H_4O)_nC_{15}H_{16}O_2$

構 造 式 :



入 手 先 : 三洋化成工業株式会社（京都府京都市東山区一橋野本町 11-1）

入手日・量 : 平成 19 年 3 月 14 日・25 g

物 性 等 :

化学名 : ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

分子量 : 432（付加モル数 5 モルと仮定した場合）

性状(常温) : 無色透明液体

酸価 : 0.013 mgKOH/g

水酸基価 : 239 mgKOH/g

[S9 製造法]

A. 使用動物

- a) 種・系統： Sprague-Dawley 系ラット（日本エスエルシー株式会社）
- b) 性・週齢： 雄・7 週齢
- c) 体 重： 213~247 g (CAM-561)、194~235 g (CAM-578)

B. 誘導法

- a) 誘導物質： phenobarbital (PB)、5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路： 腹腔内投与
- c) 投与法（投与開始日起算）
 - 1 日目：PB 30 mg/kg、 2 日目：PB 60 mg/kg
 - 3 日目：PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg、 4 日目：PB 60 mg/kg

C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離(9000×g)し、その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol/0.1 mL
KCl	33 μmol/0.1 mL
G-6-P	5 μmol/0.1 mL
NADP	4 μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4 μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1 mL

8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な用量を検討するため、46.88、93.75、187.5、375、750、1500 および 3000 μg/mL（溶媒に溶解可能な上限量）の用量を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行った。なお、試験には各用量について2枚のシャーレを使用した。

1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製し、次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。被験物質の添加量は、各シャーレの培養液量の 0.5 vol% とした。

2) 細胞の処理

短時間処理法の場合、直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に 4×10⁵ 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え、培養開始 3 日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除

き、DMSO（陰性対照）または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。また、S9 mix 存在下の場合は各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除き、S9 mix 0.5 mL を加えた後、DMSO または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加えて 18 時間培養した。一方、連続処理法の場合は短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し、培養開始 3 日後に DMSO または被験物質の供試液各 0.025 mL をシャーレに加えて 24 時間および 48 時間培養した。なお、短時間処理法および連続処理法ともに 1500 μ g/mL 以上の用量ではその供試液を培養液に添加すると直ちに粒状の被験物質の析出が認められ、培養終了時まで残存した。

培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10 vol% ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後、水洗し、0.1 w/v% クリストルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後、室温で一晩自然乾燥した。

3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は、染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計（モノセレーターⅡ、MI-60、オリンパス光学工業株式会社）を用いて測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100% とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果は下表に示したとおり、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在および存在下ともに 750 μ g/mL 以上の用量で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量は 375~750 μ g/mL 用量域にあるものと判断された。連続処理法の場合は、24 時間処理では 375 μ g/mL 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量は 187.5~375 μ g/mL 用量域にあるものと判断され、48 時間処理では 375 μ g/mL 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、187.5 μ g/mL で 50%細胞増殖抑制を示した。

〔短時間処理法〕

用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
46.88	96	100	[92.0]	105	95	[100.0]
93.75	87	91	[89.0]	103	93	[98.0]
187.5	87	91	[89.0]	101	92	[95.5]
375	57	58	[57.5]	69	60	[64.5]
750	15	12	[13.5]	11	12	[11.5]
1500	15	12	[13.5]	13	11	[12.0]
3000	21	13	[17.0]	17	16	[16.5]

[]: 平均値

〔連続処理法〕

用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
46.88	95	97	[96.0]	95	95	[95.0]
93.75	88	81	[84.5]	83	80	[81.5]
187.5	68	62	[65.0]	49	51	[50.0]
375	14	11	[12.5]	13	10	[11.5]
750	17	12	[14.5]	14	14	[14.0]
1500	12	10	[11.0]	11	13	[12.0]
3000	13	9	[11.0]	10	11	[10.5]

[]: 平均値

9. 染色体異常試験

1) 被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の用量は 50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ、3 用量以上のデータが得られることを考慮し、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在および存在下ともに $800\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公比 2 で 400、200 および $100\mu\text{g/mL}$ の 4 用量および細胞増殖抑制試験で 375~750 $\mu\text{g/mL}$ 間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことから、 $400\mu\text{g/mL}$ と $800\mu\text{g/mL}$ の中間量の $600\mu\text{g/mL}$ を加えた計 5 用量を、また、連続処理法 24 時間では、最高用量を $400\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2 で 200、100 および $50\mu\text{g/mL}$ の 4 用量および細胞増殖抑制試験で 187.5~375 $\mu\text{g/mL}$ 間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことから、 $200\mu\text{g/mL}$ と $400\mu\text{g/mL}$ の中間量の $300\mu\text{g/mL}$ を加えたの計 5 用量を設定した。陽性対照物質の MNNG は $2.5\mu\text{g/mL}$ 、B[a]P は $10\mu\text{g/mL}$ の用量を用いた。

2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈し、所定用量の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は 0.5 mg/mL、B[a]P は 2.0 mg/mL の供試液を調製した。

3) 細胞の処理

4×10³ 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に加え、3 日間培養後、下記の方法で処理した。培養には 1 用量当たり 4 枚のシャーレを用い、そのうち 2 枚は染色体標本作製用に、残りの 2 枚は細胞増殖率測定用に使用した。但し、陽性対照群については細胞増殖率の測定は行わず、用いるシャーレは染色体標本作製用の 2 枚とした。

短時間処理法の S9 mix 非存在下の場合は、各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。また、S9 mix 存在下の場合は、各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除いた後、S9 mix 0.5 mL を加え、続いて DMSO、被験物質供試液および B[a]P の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。S9 mix 非存在および存在下のいずれの場合も、培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。

連続処理法の場合は、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.025 mL ずつ加え、24 時間培養した。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

[短時間処理法：S9 mix 非存在下]

用量(μ g/mL)		使用シャーレ数	
		S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0	(陰性対照) ^a	4	4
100		4	4
200		4	4
400		4	4
600		4	4
800		4	4
2.5	(陽性対照) ^b	2	--
10	(陽性対照) ^c	--	2

a : DMSO、b : MNNG、c : B[a]P、使用シャーレ数 : 52

[連続処理法]

用量(μ g/mL)		使用シャーレ数
		24 時間処理
0	(陰性対照) ^a	4
50		4
100		4
200		4
300		4
400		4
2.5	(陽性対照) ^b	2

a : DMSO、b : MNNG、使用シャーレ数 : 26

5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

標本作製の2時間前に、培養中の各シャーレにコルセミド(Gibco Laboratories、ロット番号 1335046)を最終濃度として0.2 μ g/mLとなるように添加した。培養終了後、培養液を取り除き、0.2 w/v%トリプシン水溶液2 mLで処理して細胞をシャーレから剥離し、新鮮培養液5 mLを入れた遠沈管に移し、1000 rpm、5分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の75 mM塩化カリウム水溶液4 mLを加えて懸濁し、37°Cで15分間低張処理した。低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液(v/v)1 mLを添加して固定した。1000 rpmで5分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液4 mLで懸濁・固定した。この操作を3回繰り返した後、少量の固定液で適切な密度に細胞を懸濁し、スライドガラスの2ヶ所に1滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、Sørensen 緩衝液(pH6.8、株式会社ヤトロン、ロット番号 1478)を用いて希釈した1.4 vol%ギムザ液で約15分間染色した。水洗後、室温で乾燥して

染色体標本とした。標本は、1シャーレ当たり3枚作製した。

細胞増殖率の測定は、培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を2回洗浄し、10 vol%ホルマリン水溶液を加えて約10分間固定した。固定後水洗し、0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約10分間染色し、水洗後乾燥した。単層培養細胞密度計（モノセレーターII、MI-60、オリンパス光学工業株式会社）を用いて陰性（溶媒）対照群の細胞増殖率を100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

6) 染色体の観察

染色体の観察は60倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率600倍で鏡検した。観察は標本をすべてコード化し、盲検法で行った。各用量とも、染色体が明瞭に識別でき、染色体の数が 25 ± 2 本の分裂中期像について、1シャーレ当たり100個、すなわち、1用量当たり2枚のシャーレの合計200個について観察した。

7) 染色体異常の分類および集計³⁾

染色体異常の分類は、構造異常については、染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換（二動原体、環状染色体など）およびその他（断片化など）とした。数的異常については、倍数性細胞（倍数体）のみを記録した。

ギャップ（染色分体型および染色体型）については、異常として記録したが、構造異常には含めなかった。ギャップは、染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は、観察した細胞200個中に認められた異常細胞数を表示した。

8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料 χ^2 検定を行って、有意差（有意水準5%以下）が認められた場合は、Fisherの直接確率法を用いて陰性対照群と各用量群との間の有意差検定（有意水準は多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、陰性対照群と比較して、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻度が2用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められた場合、染色体異

常誘発性は陽性と判定した。なお、単一用量のみで陽性値を示した場合には、それに近い用量を用いて再実験を行い、その結果、再現性が認められる場合には、染色体異常誘発性は陽性と判定した。

結 果

1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表 1-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 100、200 および 400 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 1.5、3.5 および 40.0%の出現頻度で認められ、400 $\mu\text{g/mL}$ で有意な増加が認められた。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 96.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数体は、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、200 $\mu\text{g/mL}$ でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、600 および 800 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表 1-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 0.5%と低値であった。100、200 および 400 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 0.5、0.5 および 12.5%の出現頻度で認められ、400 $\mu\text{g/mL}$ で有意な増加が認められた。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 82.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群では 1.0%の低い出現頻度で認められた。被験物質群では、0 または 0.5%の出現頻度で認められた。陽性対照群では認められなかった。

なお、600 および 800 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

3. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

結果は表 2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 2.0%と低値であった。被験物質群では 0~2.0%の出現頻度であり、陰性対照群

との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 94.5% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群、被験物質群および陽性対照群のいずれにも認められなかった。

なお、300 および 400 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

4. 染色体異常試験：確認試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

400 $\mu\text{g/mL}$ でのみ染色体構造異常細胞の有意な増加が認められたことから、結果の再現性を確認するため、300、400 および 500 $\mu\text{g/mL}$ 用量を設定し、確認試験を行った。その結果は表 3-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.5% と低値であった。被験物質群では 300 および 400 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 16.0 および 46.0% の出現頻度で認められ、300 および 400 $\mu\text{g/mL}$ で有意な増加が認められた。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 89.0% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群では 0.5% の低い出現頻度で認められた。被験物質群では、400 $\mu\text{g/mL}$ でのみ 0.5% の出現頻度で認められた。陽性対照群では認められなかった。

なお、500 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

5. 染色体異常試験：確認試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

400 $\mu\text{g/mL}$ でのみ染色体構造異常細胞の有意な増加が認められたことから、結果の再現性を確認するため、300、400 および 500 $\mu\text{g/mL}$ 用量を設定し、確認試験を行った。その結果は表 3-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 0.5% と低値であった。被験物質群では 300 および 400 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 2.0 および 19.0% の出現頻度で認められ、400 $\mu\text{g/mL}$ で有意な増加が認められた。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 72.0% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群では認められなかった。被験物質群および陽性対

照群では、いずれも 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、500 μ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

6. D₂₀ 値⁴⁾

短時間処理法において、陽性値を示す染色体構造異常細胞の増加が認められたため、D₂₀ 値〔分裂中期像の 20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量 (mg/mL)〕を算出した。

その結果は下表に示すとおりであり、S9 mix 非存在および存在下の構造異常に関する D₂₀ 値は、それぞれ S 値が小さい 0.23 および 0.71 mg/mL を採用した。なお、確認試験については、被験物質群で 3 用量以上のデータが得られなかったため、D₂₀ 値は採用対象外とした。

短時間処理法	回帰曲線	D ₂₀ 値 (μ g/mL)	S 値 $\left[S = \frac{D_{20}}{r} \times \frac{1}{n^2} \right]$
S9 mix 非存在下	$y = 0.100571x - 6.10001$ ($r = 0.902534$)	259.517	17.9714
	$y = 39.5311x - 73.5122$ ($r = 0.807268$)	<u>232.024</u>	<u>17.9637</u>
S9 mix 存在下	$y = 0.0308572x - 1.9$ ($r = 0.87831$)	<u>709.722</u>	<u>50.5034</u>
	$y = 11.959x - 22.218$ ($r = 0.774597$)	3390.22	273.547

S 値：対象となった D₂₀ 値のうち、相関係数 r が大きく、陰性対照群を含む群数 n が多いものほどより妥当性が高いとする考えに基づく指標。

結 論

ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）について染色体異常誘発性の有無を調べるため、CHL/IU 細胞を用いた *In vitro* における染色体異常試験を実施した。その結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下において染色体構造異常細胞の増加が認められた。

したがって、本実験条件下では、ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。本被験物質の染色体の構造異常誘発に関する D₂₀ 値は、S9 mix 非存在下で 0.23 mg/mL、S9 mix 存在

下で 0.71 mg/mL であった。本試験結果は、CHL/TU 細胞において染色体異常を有する細胞の出現頻度が 10%以上を陽性とする生物学的判断基準⁵⁾からみても陽性と判断されるものであった。

ビスフェノール A の変異原性については、*S. typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 または *E. coli* WP2uvrA を用いた復帰突然変異試験^{6,7,8)} で陰性の報告がある。また、CHO 細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁹⁾ および陰性¹⁰⁾、V-79 細胞を用いた細胞遺伝子突然変異試験で陰性⁶⁾ との報告がある。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.
- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). "Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, 66, 277-290.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修、“化審法毒性試験法の解説改訂版”、化学工業日報社、東京、1992、pp. 51-52.
- 3) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編、“化学物質による染色体異常アトラス”、朝倉書店、東京、1988、pp. 16-37.
- 5) 石館 基 監修、“改定増補 染色体異常試験データ集”、エル・アイ・シー、東京、1987、p. 19.
- 6) Schweickl, H, et., al. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutation Research*, 415(1-2):119-130, 1998.
- 7) Japan chemical industry ecology- toxicology and information center, Japan; Mutagenicity test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation of the industrial safety and health law, 1996.
- 8) Masuda, et., al. Changes in the mutagenic and estrogenic activities of bisphenol A upon treatment with nitrite. *Mutation Research*, 585(1-2):137-1146, 2005.
- 9) Hilliard, CA, et., al. Chromosome aberration *in vitro* related to cytotoxicity of

表 1-1 ビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

検体の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数			観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
0	100	0	2	0	0	0	2	1	100.0	100	0	0	0
	200	0	2	0	0	0	2	1		200	0	0	0
		(0)	(1.0)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0.5)		(0)	(0)	(0)	(0)
100	100	2	0	0	0	0	2	0	99.0	100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	200	2	1	0	0	0	3	0		200	0	0	0
		(1.0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(1.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	
200	100	2	3	0	0	0	5	0	92.0	100	0	0	0
	100	1	1	0	0	0	2	0		100	1	0	1
	200	3	4	0	0	0	7	0		200	1	0	1
		(1.5)	(2.0)	(0)	(0)	(0)	(3.5)	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)	
400	100	26	29	1	0	0	35	0	58.0	100	0	0	0
	100	19	41	0	0	0	45	1		100	0	0	0
	200	45	70	1	0	0	80	1		200	0	0	0
		(22.5)	(35)	(0.5)	(0)	(0)	(40.0)**	(0.5)		(0)	(0)	(0)	
600 #	--	--	--	--	--	--	--	--	37.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
800 #	--	--	--	--	--	--	--	--	25.0	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
陽性対照	100	47	95	0	0	0	97	0	--	100	0	0	0
2.5	100	42	90	2	0	0	96	0	--	100	0	0	0
	200	89	185	2	0	0	193	0	--	200	0	0	0
		(44.5)	(92.5)	(1.0)	(0)	(0)	(96.5)**	(0)		(0)	(0)	(0)	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 1-2 ビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

検体 の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
0	100	0	0	0	1	0	1	0	100.0	100	1	0	1
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	2	0	2
		(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)		(1.0)	(0)	(1.0)	
100	100	0	0	0	1	0	1	0	92.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	
200	100	0	1	0	0	0	1	0	89.0	100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	1	0	1
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)	
400	100	3	12	0	0	0	12	0	74.0	100	0	0	0
	100	6	12	0	0	0	13	0		100	1	0	1
	200	9	24	0	0	0	25	0		200	1	0	1
		(4.5)	(12.0)	(0)	(0)	(0)	(12.5)**	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)	
600 #	--	--	--	--	--	--	--	--	18.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
800 #	--	--	--	--	--	--	--	--	13.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
陽性対照	100	29	79	0	1	0	80	0		100	0	0	0
10	100	15	83	1	0	0	84	0	--	100	0	0	0
	200	44	162	1	1	0	164	0		200	0	0	0
		(22.0)	(81.0)	(0.5)	(0.5)	(0)	(82.0)**	(0)		(0)	(0)	(0)	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 2 ビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)

検体の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数			観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	1	1	0	0	0	2	0		100	0	0	0	
0	100	1	2	0	0	0	2	0	100.0	100	0	0	0	
	200	2	3	0	0	0	4	0		200	0	0	0	
		(1.0)	(1.5)	(0)	(0)	(0)	(2.0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
50	100	0	2	0	0	0	2	0	92.0	100	0	0	0	
	100	1	1	0	1	0	2	0		100	0	0	0	
	200	1	3	0	1	0	4	0		200	0	0	0	
		(0.5)	(1.5)	(0)	(0.5)	(0)	(2.0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	
100	100	0	0	0	0	0	0	0	80.5	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0	
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	
200	100	0	0	0	0	0	0	0	68.5	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0	
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	
300 #	--	--	--	--	--	--	--	--	42.0	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
400 #	--	--	--	--	--	--	--	--	20.0	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
陽性対照	100	37	91	1	0	0	94	0		100	0	0	0	
2.5	100	40	91	1	0	0	95	0		100	0	0	0	
	200	77	182	2	0	0	189	0		200	0	0	0	
		(38.5)	(91.0)	(1.0)	(0)	(0)	(94.5)**	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 3-1 ビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)-確認試験

検体の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他			総異常 細胞数	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	2	1	0	1	0	3	0		100	0	0	0
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	1	0	1
	200	2	1	0	1	0	3	0		200	1	0	1
		(1.0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)	(1.5)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
300	100	5	7	0	0	0	12	0	90.0	100	0	0	0
	100	12	13	0	0	0	20	0		100	0	0	0
	200	17	20	0	0	0	32	0		200	0	0	0
		(8.5)	(10.0)	(0)	(0)	(0)	(16.0)**	(0)			(0)	(0)	(0)
400	100	47	50	3	0	0	58	0	54.5	100	1	0	1
	100	19	29	0	0	0	34	0		100	0	0	0
	200	66	79	3	0	0	92	0		200	1	0	1
		(33.0)	(39.5)	(1.5)	(0)	(0)	(46.0)**	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
500 #	--	--	--	--	--	--	--	--	29.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
陽性対照	100	51	87	3	0	0	91	0		100	0	0	0
2.5	100	45	79	1	0	0	87	0	--	100	0	0	0
	200	96	166	4	0	0	178	0		200	0	0	0
		(48.0)	(83.0)	(2.0)	(0)	(0)	(89.0)**	(0)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 3-2 ビスフェノールA-EO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)-確認試験

検体の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常細胞数	出現数(%)	増殖率(%)	観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0	
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0	
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	0	0	0	
		(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)	
300	100	1	0	0	0	0	1	0	94.5	100	0	0	0	
	100	1	3	0	0	0	3	0		100	0	1	1	
	200	2	3	0	0	0	4	0		200	0	1	1	
		(1.0)	(1.5)	(0)	(0)	(0)	(2.0)	(0)		(0)	(0.5)	(0.5)		
400	100	8	10	0	1	0	12	0	54.5	100	0	0	0	
	100	15	24	3	0	0	26	0		100	0	1	1	
	200	23	34	3	1	0	38	0		200	0	1	1	
		(11.5)	(17.0)	(1.5)	(0.5)	(0)	(19.0)**	(0)		(0)	(0.5)	(0.5)		
500 #	--	--	--	--	--	--	--	--	21.0	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)	(--)	(--)		
陽性対照	100	15	66	0	0	0	69	0		100	1	0	1	
10	100	11	75	2	0	0	75	0		100	0	0	0	
	200	26	141	2	0	0	144	0		200	1	0	1	
		(13.0)	(70.5)	(1.0)	(0)	(0)	(72.0)**	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)		

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

要 約

ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の 0（被験物質の媒体である局方オリブ油のみ投与）、30、120、500 および 1000 mg/kg/day を、1 群雌雄各 12 匹の SD シラットに、交配開始 2 週間前から、雄は 42 日間、雌は分娩後哺育 4 日まで経口投与し、その反復投与毒性および生殖発生毒性を調べた。また、雄については対照群および 1000 mg/kg 群の各 12 匹からそれぞれ 5 匹を選別し、雌についてはサテライト群として別に 1 群 5 匹の対照群および 1000 mg/kg 群を設け、投与終了後 14 日間観察を継続し、毒性の回復性についても検討した。

1. 反復投与毒性

1000 mg/kg 群で雄に投与期間中の体重増加量の低値が認められた。血液学検査では、1000 mg/kg 群で雌に赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値の低値並びに網状赤血球数の高値が認められた。血液生化学検査では、500 mg/kg 群の雄に総コレステロール濃度およびカルシウム濃度、1000 mg/kg 群の雌雄に総コレステロール濃度、雌に ALT 活性およびカルシウム濃度のいずれも高値が認められた。器官重量では、500 mg/kg 群の雌雄に肝臓相対重量、雌に肝臓絶対重量、雄に腎臓の絶対重量および相対重量、1000 mg/kg 群の雌雄に肝臓相対重量、雌に肝臓絶対重量、雄に腎臓相対重量のいずれも高値が認められた。病理組織学検査では、500 および 1000mg/kg 群の雌雄に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、雄に腎臓の近位尿細管の好塩基化が認められた。一般状態、詳細な臨床観察、感覚反射機能検査、握力、自発運動量、摂餌量および尿検査において、被験物質の投与による影響は認められなかった。

回復群においては、雄雌とも各検査指標に投与による影響は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

親動物の性周期（雌）、交尾成立期間、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率、分娩および哺育状態に変化は認められなかった。児動物に対しても、総出産児数、新生児数、性比、出生率、体重、形態および哺育 4 日生存率に、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の親動物への反復投与における無影響量（NOEL）および無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも 500 mg/kg 以上の群で肝臓に対する影響が認められたことから、いずれも 120 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL および NOAEL は、最高用量群においても影響が認められなかったことから、いずれも 1000 mg/kg/day と推定した。

目 的

ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）をラットに反復経口投与し、本物質の反復投与毒性および生殖発生毒性を検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質であるビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）（CAS No. 32492-61-8）は、水に不溶な無色透明液体で、試験には、三洋化成工業株式会社（京都府京都市東山区一橋野本町 11-1）から提供されたロット番号 L3-6S004-A（純度 99%以上）のものを冷暗所（2～6℃）、密栓下で保管し、使用した。用いた被験物質は投与終了後に分析し、使用期間中安定であったことを確認した（Appendix 1）。本物質の特性は、Appendix 1 に示す。

ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）は水のほか油にも溶けにくいですが、食物油には懸濁可能であったことから、投与液はオリーブ油（局方、ロット番号 BH17、宮澤薬品株式会社）を媒体とし、所定の投与用量となる濃度の懸濁液に調製した。調製した投与液は、1 日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷所（2～6℃）遮光下で密栓して保管した。投与液中の被験物質は、冷所遮光下で少なくとも 7 日間は安定であることが確認された（Appendix 2）ので、調製後 7 日以内に使用した。初回に調製された投与液について分析し、所定の濃度で調製されていることを確認した（Appendix 3）。

2. 動物および飼育条件

動物は、SD 系 [CrI : CD(SD)] ラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センター（神奈川県厚木市下古沢 795）から 8 週齢のものを搬入（雄 68 匹、雌 80 匹）し、12 日間試験環境に馴化させた。馴化期間中に検疫および雌については 10 日間の性周期観察も併せて行い、発育および一般健康状態が良好で、雌では性周期に異常の認められなかったものについて、投与開始前日に体重を測定し、体重分布の中央値に近い雄は 60 匹、雌は 70 匹を選び、10 週齢で試験に用いた。1 群の動物数は雌雄各 12 匹とし、雌についてはさらに対照群と最高用量群の回復群として各 5 匹からなる 2 群のサテライト群を設け、無作為抽出法により群分けを行った。なお、雌の回

回復群については交配を行わなかった。雄の回復群については、投与 42 日に対照群と最高用量群の中から無作為抽出法によりそれぞれ 5 匹を選別し、回復群とした。投与開始時の平均体重(体重範囲)は、雄 361(334~396)g、雌 235(216~260)g であった。ラットは、温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数 10 回以上/時(オールフレッシュエアー方式)、照明 12 時間/日(午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)に設定したバリアシステム動物室(第 1 室)で、個体別にステンレス製金網ケージ [260W×380D×180 H(mm)] に収容し、これをステンレス製 5 段のラックに配置して飼育した。ただし、交尾の成立した雌は、巣作り材料(ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社)を入れたポリカーボネート製ケージ [265W×426D×200H(mm)] に収容し、分娩後は児動物と同居させた。飼料(固型飼料ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社、ロット番号 20070470、20070678)および飲料水(孔径 $1 \mu\text{m}$ のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水)は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶(ポリカーボネートケージの場合)により、自由に摂取させた。

動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札の貼付、並びに耳パンチ法により行った。

飼育期間中、動物室の温度は $22.1 \sim 25.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 46~60% の範囲で推移(Appendix 4)し、また飼料、巣作り材料(床敷)および飲料水の汚染物質の分析結果(Appendices 5、6、7)は、いずれも当研究所で設定した許容範囲内にあることが確認された。したがって、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化はなかったものと判断した。

本試験は、動物実験を科学的観点および倫理的な配慮の下に実施するために遵守すべき事項等を定めた、「財団法人 畜産生物科学安全研究所の動物実験実施規定」に従い、本施設の動物実験委員会の承認を得て行った。

3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

本物質の 500、1000 および 2000 mg/kg を雌雄各 1 匹のラットに 3 日間反復経口投与した結果、2000 mg/kg 投与の雄、500 mg/kg 以上投与の雌で体重増加抑制、さらに、2000 mg/kg 投与の雌雄で軽度な自発運動低下が認められた。そこで、1 群雌雄各 4 匹のラットに、本被験物質を 0 (局方オリブ油のみ投与)、50、100、200、500 および 1000

mg/kg/day で 14 日間反復経口投与し、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定、血液学および血液生化学検査、剖検並びに器官重量の測定を行った。その結果、500 mg/kg 以上の群で投与直後の流涎、尿ケトン体の低値傾向、血清総コレステロールおよび肝臓重量の高値傾向、さらに、1000 mg/kg 群で血液プロトロンビン時間の低値傾向およびカルシウムの高値傾向が認められた。

したがって、本試験における投与量については、1000 mg/kg/day を最高用量とし、以下、500、120 および 30 mg/kg/day の計 4 用量を設定した。

試験群の構成は、①溶媒投与群(以下、対照群)、②被験物質の 30 mg/kg/day 投与群(30 mg/kg 群)、③同 120 mg/kg/day 投与群(120 mg/kg 群)、④同 500 mg/kg/day 投与群(500 mg/kg 群)、⑤同 1000 mg/kg/day 投与群(1000 mg/kg 群)の 5 群とした。

投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を胃内に投与した。対照群には、媒体として用いた局方オリブ油を同様に投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。投与期間は、雌雄とも交配開始 14 日前から、雄は 42 日間、雌は交配および妊娠期間を経て分娩後の哺育 4 日まで、最短 42 日～最長 47 日間、1 日 1 回、午前中(9:00~12:35)に投与した。ただし、雌の回復群は、雄と同様に 42 日間投与した。

4. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

親動物について、次の項目を観察あるいは検査した。なお、感覚反射機能検査、握力、自発運動量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および病理組織学検査については、各群から無作為抽出法により雌雄各 5 匹を選び、検査の対象とした。

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日、投与直後から投与後 1 時間に、動物の生死、外観、行動等について観察した。さらに、朝夕 2 回は、動物の生死や瀕死状態の有無について確認した。また、妊娠、出産、哺育の状態については、注意深く観察した。

(2) 詳細な臨床観察

投与開始前日およびその後は週 1 回、ケージサイドでの観察に加えて、動物をケージから取り出す時およびケージ外のアルミ製オープンフィールド

の性比については χ^2 検定を用いた。

結 果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態および死亡 (Tables 1~4, Appendices 10~13)

投与期間において、500 mg/kg 群で投与 8 日以降、1000 mg/kg 群で投与 3 日以降、また、雌のサテライト群で投与 6 日以降、いずれも全例に流涎が認められた。この流涎は、投与直後に口周囲を軽度に濡らす程度の一過性のものであった。回復期間においては、いずれの群にも一般状態の変化は認められなかった。また、投与期間および回復期間を通じて、いずれの投与群にも死亡は認められなかった。

2) 詳細な臨床観察 (Tables 5, 6, Appendices 14, 15)

投与期間中および回復期間中とも、各観察項目に有意な変化は認められなかった。

3) 感覚反射機能検査 (Tables 7, 8, Appendices 16, 17)

投与期間中および回復期間中の検査において、各検査項目に変化は認められなかった。

4) 握力および自発運動量 (Tables 9, 10, Appendices 18, 19)

投与期間中の検査において、被験物質投与各群とも握力および自発運動量に有意な変化は認められなかった。回復期間中の検査においては、雌のサテライト群に後肢の握力および測定開始後 30 分間の自発運動量に有意な低値が認められた。

5) 体重 (Tables 11, 12, Appendices 20, 21)

投与期間中において、1000 mg/kg 群で雄に体重増加量の有意な低値が認められた。各測定時点での体重に有意差は認められなかった。雌では、被験物質投与各群とも交配前、妊娠期間および哺育期間を通じて体重および体重増加量に有意な変化は認められなかった。回復期間においては、1000 mg/kg 群の雄に体重増加量の有意な高値が認められ、回復傾向が確認された。また、体重増加量の有意な高値は雌のサテライト群にも認められた。

6) 摂餌量 (Tables 13, 14, Appendices 22, 23)

投与期間中および回復期間中、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

500 mg/kg 群の雄の投与 35 日の摂餌量に有意な低値、同群の雌の哺育 0 日の摂餌量および雌のサテライト群の投与 28 日の摂餌量に有意な高値が認められたが、これらはいずれも摂餌量の前後の推移からみて投与との関連性は認められず、被験物質の投与とは無関係な偶発的変化と判断した。

7) 雄の尿検査 (Table 15, Appendix 24)

投与期間中および回復期間中の検査において、各検査項目に有意な変化は認められなかった。

8) 血液学検査 (Tables 16, 17, Appendices 25, 26, 背景データ : Appendices 42, 43)

投与期間終了時屠殺動物において、1000 mg/kg 群で雌に赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値の有意な低値並びに網状赤血球数の有意な高値が認められた。

回復期間終了時屠殺動物においては、1000 mg/kg 群で雄に血小板数の有意な低値、雌に活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が認められた。投与期間終了時屠殺動物において認められた変化は認められなかった。

9) 血液生化学検査 (Tables 18, 19, Appendices 27, 28, 背景データ : Appendices 42, 43)

投与期間終了時屠殺動物の検査において、500 mg/kg 以上の群の雄および 1000 mg/kg 群の雌に総コレステロール濃度、さらに 1000 mg/kg 群では雌に ALT 活性およびカルシウム濃度のいずれも有意な高値が認められた。カルシウム濃度の有意な高値は 500 mg/kg の雄にも認められた。なお、被験物質投与各群の雄のクレアチニン濃度は対照群と比べて全般的に低値で有意差が認められたが、用量相関性は認められなかった。

回復期間終了時屠殺動物の検査においては、1000 mg/kg 群の雄で ALT の有意な高値および血糖の有意な低値が認められた。

10) 剖検 (Tables 20, 21, Appendices 29~30)

投与期間終了時屠殺動物および回復期間終了時屠殺動物とも、被験物質の投与による変化は認められなかった。投与とは無関係な変化としては、胸腺の赤色域が投与期間終了時屠殺動物の対照群の雌の1匹に、腎臓の腎盂拡張（片側性）が回復期間終了時屠殺動物の対照群の雄の1匹に認められた。

11) 器官重量 (Tables 22, 23, Appendices 32~35)

投与期間終了時屠殺動物では、500mg/kg 以上の群で雄に肝臓および腎臓の相対重量、雌に肝臓の絶対重量および相対重量のいずれも有意な高値が認められた。また、500 mg/kg の雄の腎臓の絶対重量も有意な高値を示した。これらの変化に加えて、雌で120 mg/kg 群の副腎相対重量に有意な低値、500 mg/kg 群の脾臓の絶対重量および相対重量に有意な高値、1000 mg/kg 群の甲状腺相対重量に有意な高値が認められた。

回復期間終了時屠殺動物においては、1000 mg/kg 群で雄に脾臓絶対重量の有意な低値が認められた。投与期間終了時屠殺動物で認められた変化は認められなかった。

12) 病理組織学検査 (Tables 24~26, Appendices 29~31, Photos 1, 2)

被験物質の投与に起因すると考えられる変化が肝臓および腎臓に認められた。

肝臓では、小葉中心性肝細胞肥大が500 mg/kg 群で雄の2匹および雌の3匹、1000 mg/kg 群で雄の3匹および雌の5匹に、また、巣状壊死が1000 mg/kg 群で雄の2匹および雌の3匹に認められた。腎臓では、雄で近位尿細管の好塩基化が対照群で1匹、30 mg/kg 群で2匹、120 mg/kg 群で1匹、500 mg/kg 群で3匹および1000 mg/kg 群で5匹に認められ、500 mg/kg 以上の群では変化の重症化が認められた。これら肝臓および腎臓の変化は、回復群では、1000 mg/kg 群で腎臓の近位尿細管の好塩基化が雄の1匹に認められた以外には、認められなかった。また、雌雄の肝臓および雄の腎臓以外の器官には、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。さらに、精子形成サイクル検査においても、各検査ステージに変化は認められなかった。

その他、心臓の心筋変性・線維化、肺の泡沫細胞集簇、肝臓の微小肉芽腫、小葉周辺性肝細胞脂肪変性、腺胃の胃底腺拡張、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴、近位尿細

管上皮の好酸性小体、硝子円柱、孤立性嚢胞および皮質リンパ球浸潤、脾臓の髄外造血および褐色色素沈着、前立腺の間質リンパ球浸潤が対照群と 1000 mg/kg 群または対照群あるいは 1000 mg/kg 群にのみ認められたが、これらはいずれもラットにおける自然発生病変として発現する変化¹⁾であり、また、1000 mg/kg 群における発現率や変化の程度に対照群との差は認められないことから、被験物質の投与とは無関係な変化と判断した。また、剖検で被験物質とは無関係に認められた胸腺の赤色域には出血が、腎盂の拡張（左側）した腎臓には水腎症が観察された。

500 および 1000 mg/kg 群で認められた妊娠不成立の各 1 ペアについて、それぞれ雄（動物番号 039 および 053）の下垂体、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢等並びに雌（動物番号 544 および 558）の下垂体、卵巣および子宮等に変化は認められず、妊娠不成立の原因となるような所見は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響

(1) 性周期検査 (Table 27, Appendices 37, 38)

被験物質投与各群とも、対照群と比べて平均性周期に有意な変化は認められなかった。一時的に発情前期 (I) 像や発情後期 I (III) 像が認められない、あるいは、発情休止期 (V) 像が 3 日以上持続するなどの性周期の乱れが生じた個体が、30 mg/kg 群で 2 匹（動物番号 523、529）、120 mg/kg 群で 1 匹（動物番号 541）および 1000 mg/kg 群で 1 匹（動物番号 556）認められたが、その発現に用量相関性はなく、また、発現率に有意差もなかった。なお、30 mg/kg 群の 1 匹（動物番号 529）および 120 mg/kg 群の 1 匹（動物番号 541）は、性周期検査期間中に 1 性周期のみのデータとなったため、群平均性周期の算出からは除外した。性周期の乱れが生じたそれらの個体は、その後の交配で交尾が確認され、正常な妊娠、分娩および哺育が認められた。

(2) 交尾率および受胎率 (Table 27, Appendix 38)

交尾成立までに要する日数、交尾率および受胎率に有意な変化は認められなかった。いずれの投与群とも交尾不成立は認められず、500 および 1000 mg/kg 群で各 1 例の妊娠不成立が認められた。

(3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 27、Appendix 38)

黄体数、着床数および着床率に有意な変化は認められなかった。

(4) 出産率および妊娠期間 (Table 27、Appendix 38)

出産率および妊娠期間に有意な変化は認められなかった。

(5) 分娩および哺育状態 (Table 27、Appendix 38)

分娩および哺育状態に異常は認められなかった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重 (Table 28、Appendix 39)

一腹当たりの総出産児数、分娩率、哺育 0 日および 4 日の新生児数および体重、出生率、性比並びに哺育 4 日の生存率に有意な変化は認められず、新生児の一般状態にも異常は認められなかった。

(2) 形態 (Table 29、30、Appendices 40、41)

外表検査において、30 mg/kg 群で無尾を呈する児動物が 1 匹 (発現率 0.6%) 認められた。内臓検査では、内臓異常を有する児動物は認められなかった。内臓変異については、左臍動脈遺残を呈する児動物が 120 mg/kg 群で 1 匹 (0.6%) および 500 mg/kg 群で 2 匹 (1.2%) 認められた。これらの異常および変異の発現率はいずれも低く、また、用量相関性のない変化であることから、自然発生的範疇のものと判断した。

考 察

1. 反復投与毒性について

被験物質の投与による主な毒性として、雌雄の肝臓、雄の腎臓および雌の血液に対する影響が認められた。

肝臓に対する影響について、500 mg/kg 以上の群で雌雄に肝臓重量に変化が認められ、病理組織学検査では、小葉中心性の肝細胞肥大が観察された。また、1000mg/kg 群で雄の2匹および雌の3匹に認められた巣状壊死は、自然発生病変りとしても知られているが、1000 mg/kg 群にのみ比較的高い発現率で認められたことから、被験物質の投与に起因する変化と判断された。

血液生化学検査において、500 mg/kg 以上の群の雄および1000 mg/kg 群の雌に認められた総コレステロール濃度並びに1000 mg/kg 群の雌に認められたALT活性のいずれも高値は、被験物質の肝臓に対する影響と関連した変化と考えられる。

腎臓に対する影響について、500 mg/kg 以上の群で雄に腎臓重量の変化が認められた。病理組織学検査では500 mg/kg 以上の群の雄に近位尿細管上皮の再生像と考えられる好塩基化が認められ、本被験物質は尿細管に対する傷害性の影響を有するものと考えられた。

血液に対する影響について、1000 mg/kg 群で雌に赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値の有意な低値並びに網状赤血球数の有意な高値が認められ、被験物質の投与による影響と考えられた。この貧血所見と関連して、出血、網内系組織における赤血球破壊亢進所見、骨髄等における造血細胞の変化など、その発現機序を推定できる変化は認められなかった。

これらの変化に加えて、1000 mg/kg 群では雄に投与期間中の体重増加量の低値が認められた。

500 mg/kg 群の雄および1000 mg/kg 群の雌に認められたカルシウム濃度の高値については、軽度な変化ではあるが、投与量設定試験においても1000 mg/kg 群で雌雄に認められた変化であることから、被験物質投与による何らかの影響と思われる。

なお、500 および1000 mg/kg 群の雌雄に認められた流涎は、投与直後にのみ認められた変化であり、詳細な臨床観察や感覚反射機能検査等で神経毒性を示唆する変化が認められていないことから、被験物質の毒性と関連した変化ではなく、投与液に対する忌

避反応と考えられる。

雌サテライト群の回復期間中の検査で認められた後肢の握力および測定開始後 30 分間の自発運動量の低値について、これらの各個体値は、後肢握力の 1 例(574 g)を除いて、いずれも当研究所の背景データにおける基準値の範囲[後肢握力：162～476(g)、測定開始後 30 分間の自発運動量：6567～19513(カウント/30 分)]内の値であり、後肢握力においては、むしろ対照群の値が高値傾向を示したこと、また、投与期間終了時の検査ではこのような変化傾向は認められていないことなどから、被験物質の投与とは無関係な偶発的変化と判断した。

血液学検査において、回復群の雄で認められた血小板数の低値については、その個体値は背景データにおける基準値の範囲[98～150($10^4/\mu\text{L}$)]内の値であり、むしろ、対照群の値がやや高値傾向を示したこと、また、投与期間終了時の検査ではこのような変化傾向は認められていないことなどから、投与とは無関係な偶発的変化と判断した。回復群の雌で認められた活性化部分トロンボプラスチン時間の延長については、肝臓等に関連するような変化は認められないことから、偶発的変化と思われる。

血液生化学検査において、30 mg/kg 以上の群で雄に認められたクレアチニンの低値については、いずれの投与群ともその個体値は、基準値の範囲[0.30～0.54(mg/dL)]内の値であり、また、用量相関性のない変化であることから、投与とは無関係な偶発的変化と判断した。また、回復群の雄で認められた ALT の高値および血糖の低値については、投与期間終了時の検査では認められておらず、また、その各個体値は、血糖における 1 例 (118 mg/dL) を除いて、いずれも基準値の範囲[ALT：21～59(IU/L)、血糖：131～182(mg/dL)]内の値であることなどから、偶発的変化と判断した。

器官重量において、120 および 500 mg/kg 群の雌で認められた副腎相対重量の低値および脾臓の絶対重量および相対重量の高値については、いずれも用量相関性はなく、被験物質とは無関係な偶発的変化と判断した。また、1000 mg/kg 群の雌で認められた甲状腺相対重量の高値については、関連性のある変化が病理組織学検査において認められていないことから、被験物質の影響とは考え難い。回復群の雄で認められた脾臓絶対重量の低値については、相対重量に変化はなく、投与期間終了時では認められない変化であり、むしろ対照群の値が高値傾向であったことなどから、投与とは無関係な偶発的変化と判断した。

一般状態、詳細な臨床観察、感覚反射機能検査、握力および自発運動量の測定並びに神経系器官・組織の病理学検査において、被験物質の神経行動毒性を示唆する変化は認められなかった。

以上のような、投与期間中あるいは投与期間終了時の検査で認められた変化は、回復期間中あるいは回復期間終了時の検査においては回復あるいは回復傾向にあり、可逆的な変化であると判断した。また、遅発的な毒性影響と考えられる変化も認められなかった。

本試験で認められたものと類似した肝臓に対する影響は、当研究所で実施したビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のラットにおける反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験においても認められている²⁾（未発表）。

2. 生殖発生毒性について

雌雄親動物の生殖能に対する影響について、観察した各指標とも対照群と比べて有意な変化は認められなかった。また、児動物に対しても、発生に関する各指標において被験物質の投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の親動物への反復投与における無影響量（NOEL）および無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも 500 mg/kg 以上の群で肝臓に対する影響が認められたことから、いずれも 120 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL および NOAEL は、最高用量群においても影響が認められなかったことから、いずれも 1000 mg/kg/day と推定した。

文 献

- 1) 日本毒性病理学会編、毒性病理組織学、2000。
- 2) 野田篤ら。ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験。（財）畜産生物科学安全研究所 内部資料。

要 約

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、復帰突然変異試験を指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、S9 mix 非存在（直接法）および存在（代謝活性化法）下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験（予備試験）の結果、いずれの菌株とも生育阻害が認められなかったため、直接法および代謝活性化法ともに 156～5000 μ g/プレートの範囲（公比 2）で設定した。

試験は 2 回実施した。その結果、全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害についても、いずれの菌株とも認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

目 的

この試験は、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法^{1, 2)}

1. 被験物質

名 称： ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

（英名： 4,4'-isopropylidenediphenol propoxylated）

CAS 番号： 37353-75-6

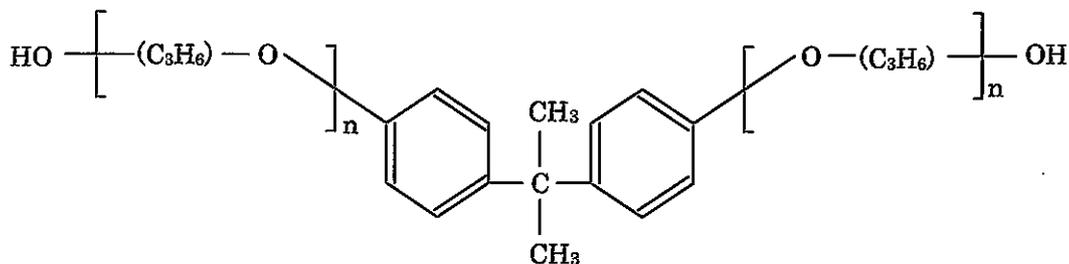
ロット番号： L3-6S005-A

純 度： 99%以上（水分：0.03%）

付加モル分布： 1 モル：0.0%、2 モル：5.7%、3 モル：11.4%、4 モル：22.1%、
5 モル：24.9%、6 モル：18.1%、7 モル：10.2%、8 モル以上：
7.6%（分析日：平成 18 年 10 月 19 日）

示 性 式： $(C_3H_6O)_n(C_3H_6O)_nC_{15}H_{16}O_2$

構 造 式：



入 手 先： 三洋化成工業株式会社（京都府京都市東山区一橋野本町 11-1）

入手日・量： 平成 19 年 3 月 14 日・25g

物 性 等：

化学名 ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

分子量 502（付加モル数 5 モルと仮定した場合）

性状(常温) 無色透明液体

酸価 0.001 mgKOH/g

指標菌株	直接法 (μg /プレート)	代謝活性化法 (μg /プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	SA (0.5)	2-AA (2)
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2 (0.04)	2-AA (10)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (1)
TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業株式会社、98%、ロット番号 PTQ1296)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社、>90%、ロット番号 KCM2259)

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、90%、ロット番号 KCG5232)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Aldrich Chemical Company、98%、ロット番号 07721MZ)

8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6w/v%粉末寒天 (Difco Laboratories、ロット番号 5200601) および 0.5w/v% 塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、ロット番号 8251) の組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天に、*S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ビオチン (Sigma Chemical Company、ロット番号 AASXB) および 0.5 mM L-ヒスチジン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 DLJ5479) 水溶液、*E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 EWP0420) 水溶液を 1/10 容加え、アミノ酸添加軟寒天培地とした。

9. 用量設定試験 (予備試験)

本試験における被験物質の適切な用量を把握するために、20~5000 μg /プレートの範囲で用量を設定し、本試験と同様の実験方法で試験を行った。試験は各用量 1 枚のプレートで行った。

その結果 (表 1-1、1-2)、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、全ての菌株で菌の生育阻害は認められなかった。なお、2000 および 5000 μg /プレートで、培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

10. 本試験

本試験は、同一菌株、同一用量で 2 回行った。

1) 用量設定

用量設定試験の結果から、被験物質の用量は、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、5000 μ g/プレート を最高用量とし、以下公比 2 で 2500、1250、625、313 および 156 μ g/プレートの計 6 用量とした。

2) 実験方法

(1) プレインキュベーション法 (直接法)

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL (和光純薬工業株式会社、リン酸水素二ナトリウム・十二水塩：ロット番号 WAF3531、リン酸二水素ナトリウム・二水塩：ロット番号 CAJ2723) および前培養した懸濁菌液 0.1 mL を分注し、37°C で 20 分間振盪培養後、45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。最少グルコース寒天平板培地 (プレート) (テスメディア AN 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 ANI420FW・2007 年 6 月 5 日製造・2007 年 8 月 10 日購入；ロット番号 ANI730IW・2007 年 9 月 11 日製造・2007 年 11 月 12 日購入) は、Vogel-Bonner E 培地 (0.2 w/v% クエン酸・一水塩、1w/v% リン酸二カリウム・無水塩、0.192 w/v% リン酸一アンモニウム、0.066 w/v% 水酸化ナトリウム、0.02 w/v% 硫酸マグネシウム・七水塩) に寒天粉末を 1.5 w/v% およびグルコースを 2 w/v% となるように加え、30 mL ずつ分注したものである。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり、溶媒 (DMSO) 0.1 mL および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

(2) プレインキュベーション法 (代謝活性化法)

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL、S9 mix 0.5 mL および前培養した懸濁菌液 0.1 mL を分注し、37°C で 20 分間振盪培養後、45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり、溶媒 (DMSO) 0.1 mL および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

11. 無菌試験

用量設定試験および本試験において、用いた溶媒、S9 mix および最高用量の被験物質の供試液について、それぞれ 0.1 mL に 0.6w/v% 軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地（テスメディア AN 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 ANI420FW、ANI730IW）に重層後、37℃で 48 時間培養し、菌の生育の有無を調べた。最少グルコース寒天平板培地は、それぞれ 3 枚ずつ使用した。

12. 試験の有効性

以下の 3 基準を満たす場合に、試験は適切な条件下で実施され、試験は有効であると判定した。

- (1) 試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液および S9 mix に雑菌の混入がない。
- (2) 各指標菌株の陰性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における背景データの範囲内の値を示す（自然復帰変異体数）。
- (3) 各指標菌株の陽性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における陽性対照値の背景データの範囲あるいはその近くの値を示す。

13. 結果の判定

結果の判定は、各用量におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、原則的に以下の 3 基準を満たす場合を陽性とした。

- (1) 被験物質処理群において陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
 - (2) 被験物質用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する（用量依存性）。
 - (3) 2 回にわたる本試験の結果から復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。
- 但し、明確な用量依存性が認められない場合においても、陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定する。

結 果

試験を2回実施した結果(表2-1、2-2、3-1、3-2および図1-1、1-2、1-3、2-1、2-2、2-3)、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、供試したすべての菌株において復帰変異コロニー数は、陰性対照値の2倍を超えることはなかった。菌の生育阻害については、直接法および代謝活性化法のいずれの場合にも認められなかった。なお、2500および5000 μ g/プレートでは、培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

陰性対照群では背景データ(添付資料)の範囲内の復帰変異コロニー数が認められた。陽性対照群においては明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められ、その程度は、それぞれ背景データ(添付資料)の範囲内またはその近くの陽性値を示すものであった。また、試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液およびS9 mixなどには、雑菌の混入は認められなかった。

結 論

ビスフェノールA-PO付加物(平均付加モル数5モル)について遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての指標菌株で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

試験の有効性については、2回にわたる本試験ともに有効であることが確認された。

したがって、本実験条件下ではビスフェノールA-PO付加物(平均付加モル数5モル)の遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

ビスフェノールAの変異原性については、*S. typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535または*E. coli* WP2uvrAを用いた復帰突然変異試験^{3,4,5)}で陰性との報告がある。また、CHO細胞を用いた染色体異常試験で陽性⁶⁾および陰性⁷⁾、V-79細胞を用いた細胞遺伝子突然変異試験で陰性³⁾との報告がある。

文 献

- 1) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation. Research*, **113**, 173-215.
- 2) Green, M. H. (1984). "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" 1, Vol.

表 1-1 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の
用量設定試験結果〔直接法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照〔局方精製水〕	126	8	14	33	18
20	120	8	13	13	16
50	91	8	25	26	16
100	99	10	26	32	19
200	110	7	22	27	19
500	106	9	20	28	13
1000	109	9	20	26	16
2000 #	117	8	20	25	6
5000 #	77	5	25	35	13
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異コロニー数 /プレート	808	353	819	282	477

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 1-2 S9 mix 存在下におけるビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の
用量設定試験結果〔代謝活性化法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照〔局方精製水〕	100	7	22	36	9
20	91	9	20	28	9
50	95	9	30	31	13
100	105	7	25	33	7
200	113	11	25	21	8
500	111	5	19	26	10
1000	97	9	16	25	10
2000 #	126	4	24	20	9
5000 #	115	7	20	23	11
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異コロニー数 /プレート	583	257	596	302	98

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。
2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の
 復帰変異試験結果〔本試験1回目-直接法〕

用 量 〔 μ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	123	3	29	21	6
〔局方精製水〕	127	15	23	25	13
	133	11	24	31	18
	(128 \pm 5)	(10 \pm 6)	(25 \pm 3)	(26 \pm 5)	(12 \pm 6)
156	105	14	30	24	7
	111	5	17	25	10
	118	8	24	33	17
	(111 \pm 7)	(9 \pm 5)	(24 \pm 7)	(27 \pm 5)	(11 \pm 5)
313	115	9	23	15	9
	128	3	16	23	13
	106	11	29	22	18
	(116 \pm 11)	(8 \pm 4)	(23 \pm 7)	(20 \pm 4)	(13 \pm 5)
625	111	12	12	25	5
	112	11	24	31	17
	105	9	20	29	14
	(109 \pm 4)	(11 \pm 2)	(19 \pm 6)	(28 \pm 3)	(12 \pm 6)
1250	101	11	26	24	13
	109	2	18	26	11
	117	10	16	31	16
	(109 \pm 8)	(8 \pm 5)	(20 \pm 5)	(27 \pm 4)	(13 \pm 3)
2500 #	99	10	19	21	13
	114	8	22	25	12
	109	12	21	30	15
	(107 \pm 8)	(10 \pm 2)	(21 \pm 2)	(25 \pm 5)	(13 \pm 2)
5000 #	104	8	19	25	15
	121	6	18	22	17
	103	8	20	25	21
	(109 \pm 10)	(7 \pm 1)	(19 \pm 1)	(24 \pm 2)	(18 \pm 3)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	848	420	941	382	546
コロニー数	815	444	998	404	640
/プレート	891	404	994	431	426
	(851 \pm 38)	(423 \pm 20)	(978 \pm 32)	(406 \pm 25)	(537 \pm 107)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

(): 平均値 \pm 標準偏差

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 2-2 S9 mix 存在下におけるビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の
 復帰変異試験結果[本試験1回目-代謝活性化法]

用 量 〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
陰性対照 〔局方精製水〕	108 83 85 (92 ± 14)	10 7 9 (9 ± 2)	15 13 23 (17 ± 5)	29 37 27 (31 ± 5)	12 18 16 (15 ± 3)
156	111 150 94 (118 ± 29)	8 9 5 (7 ± 2)	18 21 17 (19 ± 2)	30 25 40 (32 ± 8)	21 16 15 (17 ± 3)
313	110 121 110 (114 ± 6)	2 10 12 (8 ± 5)	23 20 23 (22 ± 2)	28 21 35 (28 ± 7)	15 23 20 (19 ± 4)
625	104 124 136 (121 ± 16)	9 4 6 (6 ± 3)	20 27 25 (24 ± 4)	33 25 29 (29 ± 4)	13 12 15 (13 ± 2)
1250	100 122 106 (109 ± 11)	7 15 8 (10 ± 4)	16 34 30 (27 ± 9)	28 31 30 (30 ± 2)	14 22 20 (19 ± 4)
2500 #	107 99 113 (106 ± 7)	3 12 8 (8 ± 5)	20 31 28 (26 ± 6)	34 38 27 (33 ± 6)	13 9 16 (13 ± 4)
5000 #	112 125 114 (117 ± 7)	4 8 9 (7 ± 3)	24 22 20 (22 ± 2)	26 30 24 (27 ± 3)	16 12 14 (14 ± 2)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μg/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異 コロニー数 /プレート	529 601 611 (580 ± 45)	281 247 240 (256 ± 22)	487 530 489 (502 ± 24)	303 266 283 (284 ± 19)	131 112 117 (120 ± 10)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

(): 平均値±標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3-1 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の
 復帰変異試験結果 [本試験2回目 - 直接法]

用 量 [μ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	100	9	19	33	4
[局方精製水]	129	13	19	24	9
	118	7	21	25	4
	(116 \pm 15)	(10 \pm 3)	(20 \pm 1)	(27 \pm 5)	(6 \pm 3)
156	101	12	19	29	13
	98	17	18	25	3
	90	7	20	20	6
	(96 \pm 6)	(12 \pm 5)	(19 \pm 1)	(25 \pm 5)	(7 \pm 5)
313	87	15	19	24	12
	97	6	29	24	5
	95	10	12	33	4
	(93 \pm 5)	(10 \pm 5)	(20 \pm 9)	(27 \pm 5)	(7 \pm 4)
625	103	8	17	24	9
	98	9	24	21	12
	107	9	26	20	4
	(103 \pm 5)	(9 \pm 1)	(22 \pm 5)	(22 \pm 2)	(8 \pm 4)
1250	93	8	15	20	9
	100	4	15	18	6
	95	8	23	31	2
	(96 \pm 4)	(7 \pm 2)	(18 \pm 5)	(23 \pm 7)	(6 \pm 4)
2500 #	104	7	11	25	5
	77	5	24	15	3
	83	7	21	19	5
	(88 \pm 14)	(6 \pm 1)	(19 \pm 7)	(20 \pm 5)	(4 \pm 1)
5000 #	113	5	21	14	8
	94	9	20	14	7
	87	6	20	34	3
	(98 \pm 13)	(7 \pm 2)	(20 \pm 1)	(21 \pm 12)	(6 \pm 3)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	769	445	983	493	777
コロニー数	786	436	998	566	371
/プレート	815	482	993	537	799
	(790 \pm 23)	(454 \pm 24)	(991 \pm 8)	(532 \pm 37)	(649 \pm 241)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

(): 平均値 \pm 標準偏差

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 3-2 S9 mix 存在下におけるビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の
 復帰変異試験結果[本試験2回目-代謝活性化法]

用 量 [μ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照 [局方精製水]	101	12	21	24	11
	92	9	24	23	9
	107	7	25	37	10
	(100 \pm 8)	(9 \pm 3)	(23 \pm 2)	(28 \pm 8)	(10 \pm 1)
156	107	8	22	13	17
	94	6	15	23	11
	101	9	26	26	17
	(101 \pm 7)	(8 \pm 2)	(21 \pm 6)	(21 \pm 7)	(15 \pm 3)
313	110	7	18	31	13
	107	9	25	35	12
	110	14	17	22	11
	(109 \pm 2)	(10 \pm 4)	(20 \pm 4)	(29 \pm 7)	(12 \pm 1)
625	114	7	31	31	11
	116	11	21	21	20
	106	11	23	32	11
	(112 \pm 5)	(10 \pm 2)	(25 \pm 5)	(28 \pm 6)	(14 \pm 5)
1250	113	6	21	32	5
	99	10	29	25	11
	110	8	22	28	9
	(107 \pm 7)	(8 \pm 2)	(24 \pm 4)	(28 \pm 4)	(8 \pm 3)
2500 #	104	11	21	29	7
	101	12	18	26	11
	112	6	24	30	13
	(106 \pm 6)	(10 \pm 3)	(21 \pm 3)	(28 \pm 2)	(10 \pm 3)
5000 #	98	8	21	21	9
	99	11	15	26	6
	105	8	28	21	5
	(101 \pm 4)	(9 \pm 2)	(21 \pm 7)	(23 \pm 3)	(7 \pm 2)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異 コロニー数 /プレート	557	251	530	249	45
	436	234	559	270	98
	536	225	594	229	116
	(510 \pm 65)	(237 \pm 13)	(561 \pm 32)	(249 \pm 21)	(86 \pm 37)

: 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

(): 平均値 \pm 標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

要 約

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU）を用いて *In vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、46.88～3000 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、短時間処理法の S9 mix 非存在下では、93.75～750 $\mu\text{g/mL}$ 用量で、S9 mix 存在下では 187.5～750 $\mu\text{g/mL}$ 用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。連続処理法 24 時間処理では、93.75 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。

したがって、染色体異常試験における用量は、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では 12.5、25、50、75 および 100 $\mu\text{g/mL}$ 、S9 mix 存在下では 25、50、100、150 および 200 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の場合は、6.25、25、50 および 100 $\mu\text{g/mL}$ とした。

試験の結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下ともに染色体異常細胞の増加は認められなかった。また、連続処理法 24 時間においても染色体異常細胞の増加は認められなかった。なお、短時間処理法 S9 mix 非存在下の 75 $\mu\text{g/mL}$ 以上、S9 mix 存在下の 150 $\mu\text{g/mL}$ 以上、連続処理法 24 時間の 100 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

報告書ピアレビューにおいて、短時間処理法 S9 mix 存在下の 100～150 $\mu\text{g/mL}$ 間、連続処理法 24 時間の 50～100 $\mu\text{g/mL}$ 間で毒性が出ないで細胞が数えられる可能性が考えられるため、確認試験の実施を求められた。そこで、短時間処理法 S9 mix 存在下では 100、125 および 150 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法 24 時間では 50、60、75 および 100 $\mu\text{g/mL}$ を設定し、確認試験を行った。

その結果、短時間処理法 S9 mix 存在下および連続処理法 24 時間ともに染色体異常細胞の増加は認められなかった。なお、短時間処理法 S9 mix 存在下の 150 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法 24 時間の 60 $\mu\text{g/mL}$ 以上では、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）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。

試験目的

この試験は、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法^{1, 2)}

1. 被験物質

名 称 : ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

(英名 : 4,4'-isopropylidenediphenol propoxylated)

CAS 番号 : 37353-75-6

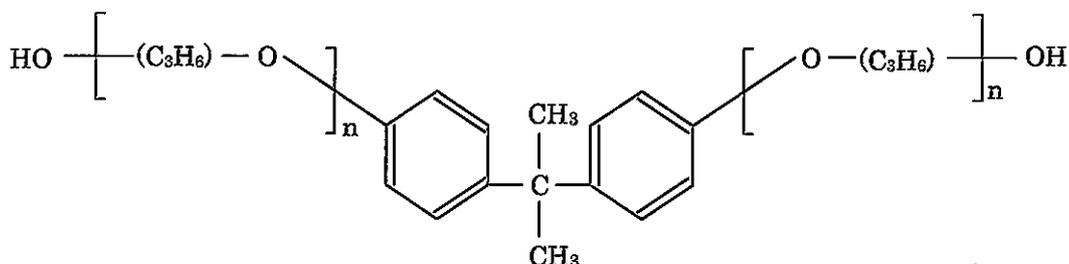
ロット番号 : L3-6S005-A

純 度 : 99%以上 (水分 : 0.03%)

付加モル分布 : 1 モル : 0.0%、2 モル : 5.7%、3 モル : 11.4%、4 モル : 22.1%、
5 モル : 24.9%、6 モル : 18.1%、7 モル : 10.2%、8 モル以上 :
7.6% (分析日 : 平成 18 年 10 月 19 日)

示 性 式 : $(C_3H_6O)_n(C_3H_6O)_nC_{15}H_{16}O_2$

構 造 式 :



入 手 先 : 三洋化成工業株式会社 (京都府京都市東山区一橋野本町 11-1)

入手日・量 : 平成 19 年 3 月 14 日・25g

物 性 等 :

化学名 : ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

分子量 : 502 (付加モル数 5 モルと仮定した場合)

性状(常温) : 無色透明液体

酸価 : 0.001 mgKOH/g

たりの組成は、次のとおりである。

[S9 製造法]

A. 使用動物

- a) 種・系統： Sprague-Dawley 系ラット（日本エスエルシー株式会社）
- b) 性・週齢： 雄・7週齢
- c) 体 重： 213~247 g

B. 誘導法

- a) 誘導物質： phenobarbital (PB)、5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路： 腹腔内投与
- c) 投与法（投与開始日起算）

1日目：PB 30 mg/kg、 2日目：PB 60 mg/kg

3日目：PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg、 4日目：PB 60 mg/kg

C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離(9000×g)し、その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol/0.1 mL
KCl	33 μmol/0.1 mL
G-6-P	5 μmol/0.1 mL
NADP	4 μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4 μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1 mL

8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な用量を検討するため、46.88、93.75、187.5、375、750、1500 および 3000 μg/mL（溶媒に溶解可能な上限量）の用量を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行った。なお、試験には各用量について2枚のシャーレを使用した。

1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製し、次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。被験物質の添加量は、各シャーレの培養液量の 0.5 vol% とした。

2) 細胞の処理

短時間処理法の場合、直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に 4×10^5 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え、培養開始 3

日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO (陰性対照) または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。また、S9 mix 存在下の場合は各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除き、S9 mix 0.5 mL を加えた後、DMSO または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加えて 18 時間培養した。一方、連続処理法の場合は短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し、培養開始 3 日後に DMSO または被験物質の供試液各 0.025 mL をシャーレに加えて 24 時間および 48 時間培養した。なお、短時間処理法および連続処理法ともに 375 μ g/mL 以上の用量ではその供試液を培養液に添加すると直ちに油滴様の被験物質の析出が認められ、特に 1500 μ g/mL 以上では油滴様の大きな固まりとなって培養終了時まで残存した。

培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10 vol% ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後、水洗し、0.1 w/v% クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後、室温で一晩自然乾燥した。

3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は、染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計 (モノセレーター II、MI-60、オリンパス光学工業株式会社) を用いて測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100% とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果は下表に示したとおり、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では、93.75~750 μ g/mL 用量で、S9 mix 存在下では 187.5~750 μ g/mL 用量で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められた。連続処理法の場合は、24 時間処理では 93.75 μ g/mL 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50% 細胞増殖抑制用量は 46.88~93.75 μ g/mL 用量域にあるものと判断され、48 時間処理では 46.88 μ g/mL 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50% 細胞増殖抑制用量は 46.88 μ g/mL 以下の用量域にあるものと判断された。

なお、短時間処理法における 1500 μ g/mL 以上の用量では、細胞増殖率の上昇が認められた。これは、1500 μ g/mL 以上の用量では析出した油滴様の被験物質が大きな固まりとなって培養終了時まで培養液表面に浮遊して認められたこ

とから、培養液中に溶解あるいは分散している被験物質濃度は、それ以下の用量と比べてむしろ低下しているものと推察され、これが細胞増殖率の上昇をもたらしたものと考えられる。このような現象は、水に難溶なため培養液中で析出がみられる化学物質においてしばしば認められている^{3,4,5,6)}。

[短時間処理法]

用 量 (μ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
46.88	89	95	[92.0]	95	102	[98.5]
93.75	47	40	[43.5]	88	92	[90.0]
187.5	17	19	[18.0]	16	16	[16.0]
375	17	18	[17.5]	20	21	[20.5]
750	14	16	[15.0]	15	14	[14.5]
1500	51	52	[51.5]	80	81	[80.5]
3000	49	54	[51.5]	67	65	[66.0]

[]: 平均値

[連続処理法]

用 量 (μ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
46.88	55	53	[54.0]	36	37	[36.5]
93.75	14	15	[14.5]	13	12	[12.5]
187.5	13	8	[20.5]	13	11	[12.0]
375	12	10	[11.0]	15	12	[13.5]
750	9	15	[12.0]	14	10	[12.0]
1500	21	16	[18.5]	15	14	[14.5]
3000	28	37	[32.5]	21	23	[22.0]

[]: 平均値

9. 染色体異常試験

1) 被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の用量は50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ、3用量以上のデータが得られることを考慮し、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では100 μ g/mLを最高用量とし、以下公比2で50、25および12.5 μ g/mLの4用量および細胞増殖抑制試験で46.88~93.75 μ g/mL間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことから、50 μ g/mLと100 μ g/mLの間量の75 μ g/mLを加えた計5用量を、S9 mix 非存在下では200 μ g/mLを最高

用量とし、以下公比 2 で 100、50 および 25 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量および細胞増殖抑制試験で 93.75~187.5 $\mu\text{g/mL}$ 間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことから、100 $\mu\text{g/mL}$ と 200 $\mu\text{g/mL}$ の中間量の 150 $\mu\text{g/mL}$ を加えた計 5 用量を、また、連続処理法 24 時間処理では、最高用量を 100 $\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2 で 50、25、12.5 および 6.25 $\mu\text{g/mL}$ の計 5 用量を設定した。陽性対照物質の MNNG は 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、B[a]P は 10 $\mu\text{g/mL}$ の用量を用いた。

2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈し、所定用量の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は 0.5 mg/mL、B[a]P は 2.0 mg/mL の供試液を調製した。

3) 細胞の処理

4×10⁸ 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に加え、3 日間培養後、下記の方法で処理した。培養には 1 用量当たり 4 枚のシャーレを用い、そのうち 2 枚は染色体標本作製用に、残りの 2 枚は細胞増殖率測定用に使用した。但し、陽性対照群については細胞増殖率の測定は行わず、用いるシャーレは染色体標本作製用の 2 枚とした。

短時間処理法の S9 mix 非存在下の場合は、各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。また、S9 mix 存在下の場合は、各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除いた後、S9 mix 0.5 mL を加え、続いて DMSO、被験物質供試液および B[a]P の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。S9 mix 非存在および存在下のいずれの場合も、培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。

連続処理法の場合は、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.025 mL ずつ加え、24 時間培養した。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

[短時間処理法：S9 mix 非存在下]

用量(μ g/mL)	使用シャーレ数	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0 (陰性対照) ^a	4	4
12.5	4	--
25	4	4
50	4	4
75	4	--
100	4	4
150	--	4
200	--	4
2.5 (陽性対照) ^b	2	--
10 (陽性対照) ^c	--	2

a : DMSO、b : MNNG、c : B[a]P、使用シャーレ数 : 52

[連続処理法]

用量(μ g/mL)	使用シャーレ数
	24 時間処理
0 (陰性対照) ^a	4
6.25	4
12.5	4
25	4
50	4
100	4
2.5 (陽性対照) ^b	2

a : DMSO、b : MNNG、使用シャーレ数 : 26

5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

標本作製の2時間前に、培養中の各シャーレにコルセミド(Gibco Laboratories、ロット番号 1335046)を最終濃度として0.2 μ g/mLとなるように添加した。培養終了後、培養液を取り除き、0.2 w/v%トリプシン水溶液2 mLで処理して細胞をシャーレから剥離し、新鮮培養液5 mLを入れた遠沈管に移し、1000 rpm、5分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の75 mM塩化カリウム水溶液4 mLを加えて懸濁し、37°Cで15分間低張処理した。低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液(v/v)1 mLを添加して固定した。1000 rpmで5分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液4 mLで懸濁・固定した。この操作を3回繰り返した後、少量の固定液で適切な密度に細胞を懸濁し、スライドガラスの2ヶ所に1滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、S ϕ rensen 緩衝液(pH6.8、株式会社ヤトロン、ロット番号 1478)を用

いて希釈した 1.4 vol%ギムザ液で約 15 分間染色した。水洗後、室温で乾燥して染色体標本とした。標本は、1 シャーレ当たり 3 枚作製した。

細胞増殖率の測定は、培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10 vol%ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後水洗し、0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色し、水洗後乾燥した。単層培養細胞密度計（モノセレーター II、MI-60、オリンパス光学工業株式会社）を用いて陰性（溶媒）対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

6) 染色体の観察

染色体の観察は 60 倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率 600 倍で鏡検した。観察は標本をすべてコード化し、盲検法で行った。各用量とも、染色体が明瞭に識別でき、染色体の数が 25 ± 2 本の分裂中期像について、1 シャーレ当たり 100 個、すなわち、1 用量当たり 2 枚のシャーレの合計 200 個について観察した。

7) 染色体異常の分類および集計⁷⁾

染色体異常の分類は、構造異常については、染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換（二動原体、環状染色体など）およびその他（断片化など）とした。数的異常については、倍数性細胞（倍数体）のみを記録した。

ギャップ（染色分体型および染色体型）については、異常として記録したが、構造異常には含めなかった。ギャップは、染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は、観察した細胞 200 個中に認められた異常細胞数を表示した。

8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料 χ^2 検定を行って、有意差（有意水準 5%以下）が認められた場合は、Fisher の直接確率法を用いて陰性対照群と各用量群との間の有意差検定（有意水準は多重性を考慮して、5%または 1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、陰性対照群と比較して、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻

度が2用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められた場合、染色体異常誘発性は陽性と判定した。

結 果

1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表 1-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 0~1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 98.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数体の出現頻度は、陰性対照群で 0.5%の低値で認められた。被験物質群および陽性対照群では倍数体は認められなかった。

なお、75 および 100 μ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表 1-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞は、陰性対照群では認められなかった。被験物質群では 0.5 または 1.5%の出現頻度で認められたが、陰性対照群との間に有意差はなかった。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 73.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、25 μ g/mL でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、150 および 200 μ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

3. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）－確認試験

報告書ピアレビューにおいて、短時間処理法 S9 mix 存在下では、細胞増殖率が 100 μ g/mL で 87.5%、150 μ g/mL で 36.5%と、この間に 50%以上の開きがあるため、この用量間で毒性が出ないで染色体異常を示す用量がある可能性が考えられるため、確認試験を実施する必要があるとの指摘を受けた。この指摘に従い、100、125 および 150 μ g/mL 用量を設定し、確認試験を行った。

結果は表 1-3 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 0.5%と低値であった。被験物質群では 0.5%の出現頻度であり、陰性対照群との間に差は認められなかった。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 42.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、100 μ g/mL でのみ 1.0%の低い出現頻度で認められた。

なお、150 μ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

4. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

結果は表 2-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 0~1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 96.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、12.5 μ g/mL でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、100 μ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

5. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）－確認試験

報告書ピアレビューにおいて、連続処理法 24 時間処理では、細胞増殖率が 50 μ g/mL で 54.0%、100 μ g/mL で 11.5%であり、この用量間で毒性が出ないで細胞が数えられる可能性があるため、確認試験を実施する必要があるとの指摘を受けた。この指摘に従い、50、60、75 および 100 μ g/mL 用量を設定し、確認試験を行った。

結果は表 2-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 50 μ g/mL で 1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 94.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群で 0.5%の低値で認められた。被験物質群では、50 μ g/mL で 0.5%の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では認められなかった。

なお、60 μ g/mL 以上では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

結 論

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）について染色体異常誘発性の有無を調べるため、CHL/IU 細胞を用いた *In vitro* における染色体異常試験を実施した。その結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下並びに連続処理法 24 時間のいずれの方法においても染色体異常誘発作用は認められなかった。

したがって、本実験条件下では、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）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。本試験結果は、CHL/IU 細胞において染色体異常を有する細胞の出現頻度が 5%未満を陰性とする生物学的判断基準⁸⁾からみても陰性と判断されるものであった。

ビスフェノール A の変異原性については、*S. typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 または *E. coli* WP2uvrA を用いた復帰突然変異試験^{9,10,11)}で陰性の報告がある。また、CHO 細胞を用いた染色体異常試験で陽性¹²⁾および陰性¹³⁾、V-79 細胞を用いた細胞遺伝子突然変異試験で陰性⁹⁾との報告がある。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.
- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). "Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, 66, 277-290.
- 3) 佐々木澄志, 日下部博一, 若栗 忍, 中川ゆづき, 大嶋節子, 橋本恵子 (1998), ジイソプロピルベンゼンのチャイニーズハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験, 化学物質毒性試験報告, 6, 614-617.

表 1-1 ビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

検体の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	0	0	0	0	1	1		100	1	0	1
0	100	0	1	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	2	1		200	1	0	1
		(0.5)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0.5)			(0.5)	(0)	(0.5)
12.5	100	0	0	0	0	0	0	0	101.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		(0)		(0)	(0)
25	100	1	0	0	1	0	2	0	98.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
	200	1	0	0	1	0	2	1		200	0	0	0
		(0.5)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(1.0)	(0.5)			(0)	(0)	(0)
50	100	1	0	0	0	0	1	1	88.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	1	0	0	0	0	1	1		200	0	0	0
		(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0.5)			(0)	(0)	(0)
75 #	--	--	--	--	--	--	--	--	49.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)		(--)	(--)
100 #	--	--	--	--	--	--	--	--	18.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)		(--)	(--)
陽性対照	100	36	96	3	0	0	98	1		100	0	0	0
2.5	100	38	97	1	0	0	98	0	--	100	0	0	0
	200	74	193	4	0	0	196	1		200	0	0	0
		(37.0)	(96.5)	(2.0)	(0)	(0)	(98.0)**	(0.5)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 1-2 ビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

検体の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							キヤップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0	
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0)	(0)	(0)	(0)
25	100	1	0	0	0	0	1	0	98.0	100	1	0	1	
	100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0	
	200	1	0	0	0	0	1	1		200	1	0	1	
		(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0.5)		(0.5)	(0)	(0.5)	(0.5)	
50	100	0	1	0	0	0	1	0	93.0	100	0	0	0	
	100	0	2	0	0	0	2	0		100	0	0	0	
	200	0	3	0	0	0	3	0		200	0	0	0	
		(0)	(1.5)	(0)	(0)	(0)	(1.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	
100	100	0	1	0	0	0	1	0	87.5	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0	
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	
150 #	--	--	--	--	--	--	--	--	36.5	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)	(--)	(--)	(--)	
200 #	--	--	--	--	--	--	--	--	12.5	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)	(--)	(--)	(--)	
陽性対照	100	14	71	0	1	0	75	0		100	0	0	0	
10	100	11	70	0	0	0	71	1	---	100	0	0	0	
	200	25	141	0	1	0	146	1		200	0	0	0	
		(12.5)	(70.5)	(0)	(0.5)	(0)	(73.0)**	(0.5)		(0)	(0)	(0)	(0)	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため,観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 1-3 ビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)-確認試験

検体の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							キヤップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)				
	観察細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常細胞数	出現数(%)	増殖率(%)	観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0	
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0	
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	0	0	0	
		(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)	(0)
100	100	0	0	0	0	0	0	0	88.0	100	1	0	1	
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	1	0	1	
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	2	0	2	
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)		(1.0)	(0)	(1.0)		
125	100	0	1	0	0	0	1	0	76.5	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0	
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)		(0)	(0)	(0)		
150 #	--	--	--	--	--	--	--	--	44.5	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)	(--)	(--)	(--)	
陽性対照	100	9	46	0	1	0	47	0		100	0	0	0	
10	100	12	36	0	0	0	37	0	--	100	0	0	0	
	200	21	82	0	1	0	84	0		200	0	0	0	
		(10.5)	(41.0)	(0)	(0.5)	(0)	(42.0)**	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 2-1 ビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)

検体の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)					
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0	
0	100	0	1	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0	
	200	1	1	0	0	0	2	0		200	0	0	0	
		(0.5)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)			(0)	(0)	(0)	(0)
6.25	100	1	0	0	0	0	1	0	90.5	100	0	0	0	
	100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0	
	200	1	0	0	1	0	2	0		200	0	0	0	
		(0.5)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(1.0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	
12.5	100	0	0	0	0	0	0	1	83.5	100	1	0	1	
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0	
	200	0	1	0	0	0	1	1		200	1	0	1	
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0.5)		(0.5)	(0)	(0.5)	(0.5)	
25	100	0	0	0	0	0	0	0	72.0	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0	
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	
50	100	0	0	0	0	0	0	0	54.0	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0	
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0	
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	
100 #	--	--	--	--	--	--	--	--	11.5	--	--	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)		(--)	(--)	(--)	(--)	
陽性対照	100	34	91	1	0	0	95	0		100	0	0	0	
2.5	100	35	95	0	0	0	97	0	--	100	0	0	0	
	200	69	186	1	0	0	192	0		200	0	0	0	
		(34.5)	(93.0)	(0.5)	(0)	(0)	(96.0)**	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 2-2 ビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)-確認試験

検体 の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	2	0	1	0	3	0		100	1	0	1
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
	200	0	2	0	1	0	3	0		200	1	0	1
		(0)	(1.0)	(0)	(0.5)	(0)	(1.0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
50	100	1	1	0	0	0	2	0	55.0	100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	2	0		200	1	0	1
		(0.5)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)	
60 #	--	--	--	--	--	--	--	--	43.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
75 #	--	--	--	--	--	--	--	--	17.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
100 #	--	--	--	--	--	--	--	--	19.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
陽性対照	100	46	93	2	0	0	96	0		100	0	0	0
2.5	100	40	89	0	0	0	93	0	--	100	0	0	0
	200	86	182	2	0	0	189	0		200	0	0	0
		(44.0)	(91.0)	(1.0)	(0)	(0)	(94.5)**	(0)		(0)	(0)	(0)	

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため,観察可能な分裂中期像は認められなかった。

要 約

ビスフェノール A-PO 付加物 (平均付加モル数 5 モル) の 0 (被験物質の媒体である局方オリブ油のみ投与)、30、120 および 500 mg/kg/day を、1 群雌雄各 12 匹の SD 系ラットに、交配開始 2 週間前から、雄は 42 日間、雌は分娩後哺育 4 日まで経口投与し、その反復投与毒性および生殖発生毒性を調べた。また、雄については対照群および 500 mg/kg 群の各 12 匹からそれぞれ 5 匹を選別し、雌についてはサテライト群として別に 1 群 5 匹の対照群および 500 mg/kg 群を設け、投与終了後 14 日間観察を継続し、毒性の回復性についても検討した。

1. 反復投与毒性

500 mg/kg 群で雌雄に消瘦例、さらに雄には眼瞼下垂や自発運動の低下例および投与期間中の体重増加量の低値、妊娠雌には 1 例の死亡が認められた。血液生化学検査では、120 および 500 mg/kg 群で雄に総タンパク濃度の低値、500 mg/kg 群で雄にアルブミン濃度の低値、雌雄に総コレステロール濃度の高値が認められた。器官重量では、500 mg/kg 群で雄に肝臓の絶対および相対重量、雌に相対重量の高値が認められ、剖検においても同群の雌雄に肝臓の大型化が確認された。病理組織学検査では、120 および 500 mg/kg 群で雌雄に小腸における腸絨毛の乳糜管拡張、500 mg/kg 群で雌雄に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。詳細な臨床観察、感覚反射機能検査、握力、自発運動量および摂餌量において、被験物質の投与による影響は認められなかった。

回復群においては、雌に肝臓相対重量の高値、雌雄の全例に乳糜管の拡張が認められるものの、変化の程度は軽減する傾向にあった。

2. 生殖発生毒性

500 mg/kg 群の雌で性周期の乱れを呈する個体の発現が増加した。親動物の交尾成立期間、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率、分娩および哺育状態に変化は認められなかった。

児動物に対しては、500 mg/kg 群で新生児体重の低値が認められた。総出産児数、新生児数、性比、出生率、形態および哺育 4 日生存率に、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の親動物への反復投与における無影響量（NOEL）および無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも 120 mg/kg 以上の群で総タンパク濃度の低下および小腸に対する影響が認められたことから、いずれも 30 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL および NOAEL は、500 mg/kg 群で性周期および新生児体重に影響が認められたことから、いずれも 120 mg/kg/day と推定した。

目 的

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）をラットに反復経口投与し、本物質の反復投与毒性および生殖発生毒性を検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質であるビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）（CAS No. 37353-75-6）は、水に不溶な無色透明液体で、試験には、三洋化成工業株式会社（京都府京都市東山区一橋野本町 11-1）から提供されたロット番号 L3-6S005-A（純度 99%以上）のものを冷暗所（2～6℃）、密栓下で保管し、使用した。用いた被験物質は投与終了後に分析し、使用期間中安定であったことを確認した（Appendix 1）。本物質の特性は、Appendix 1 に示す。

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）は水のほか油にも溶けにくいですが、食物油にはわずかに溶け、溶解しない高濃度においても均一な懸濁液として調製可能であったことから、投与液はオリーブ油（局方、ロット番号 BH17、宮澤薬品株式会社）を媒体とし、所定の投与用量となる濃度の懸濁液に調製した。調製した投与液は、1 日の使用量ごとに小分けし、使用時まで冷所（2～6℃）遮光下で密栓して保管した。投与液中の被験物質は、冷所遮光下で少なくとも 7 日間は安定であることが確認された（Appendix 2）ので、調製後 7 日以内に使用した。初回に調製された投与液について分析し、所定の濃度で調製されていることを確認した（Appendix 3）。

2. 動物および飼育条件

動物は、SD 系 [CrI : CD(SD)]ラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバー株式会社 筑波飼育センター（茨城県石岡市上林 955）から 8 週齢のものを搬入（雄 57 匹、雌 67 匹）し、12 日間試験環境に馴化させた。馴化期間中に検疫および雌については 10 日間の性周期観察も併せて行い、発育および一般健康状態が良好で、雌では性周期に異常の認められなかったものについて、投与開始前日に体重を測定し、体重分布の中央値に近い雄は 48 匹、雌は 58 匹を選び、10 週齢で試験に用いた。1 群の動物数は雌雄各 12 匹とし、雌についてはさらに対照群と最高用量群の回復群として各 5 匹からなる 2 群の

サテライト群を設け、無作為抽出法により群分けを行った。なお、雌の回復群については交配を行わなかった。雄の回復群については、投与 42 日に対照群と最高用量群の中から無作為抽出法によりそれぞれ 5 匹を選別し、回復群とした。投与開始時の平均体重(体重範囲)は、雄 361(329~385)g、雌 228(199~253)g であった。ラットは、温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数 10 回以上/時(オールフレッシュエアー方式)、照明 12 時間/日(午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)に設定したバリアーシステム動物室(第 2 室)で、個別別にステンレス製金網ケージ [260W×380D×180 H(mm)] に収容し、これをステンレス製 5 段のラックに配置して飼育した。ただし、交尾の成立した雌は、巣作り材料(ホワイトフレーク、日本チャールス・リバー株式会社)を入れたポリカーボネート製ケージ [265W×426D×200H(mm)] に収容し、分娩後は児動物と同居させた。飼料(固型飼料ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社、ロット番号 20070470、20070678)および飲料水(孔径 $1\mu\text{m}$ のカートリッジフィルターで濾過後紫外線照射した殺菌水道水)は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶(ポリカーボネートケージの場合)により、自由に摂取させた。

動物の個体識別は、ラックおよびケージへの標識札の貼付、並びに耳パンチ法により行った。

飼育期間中、動物室の温度は $22.2 \sim 25.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 45~58%の範囲で推移(Appendix 4)し、また飼料、巣作り材料および飲料水の汚染物質の分析結果(Appendices 5、6、7)は、いずれも当研究所で設定した許容範囲内にあることが確認された。したがって、動物の飼育期間を通じて、試験成績の信頼性に影響を及ぼすと思われる環境要因の変化は、なかったものと判断した。

本試験は、動物実験を科学的観点および倫理的な配慮の下に実施するために遵守すべき事項等を定めた、「財団法人 畜産生物科学安全研究所の動物実験実施規定」に従い、本施設の動物実験委員会の承認を得て行った。

3. 投与量の設定、試験群の構成および投与方法

本物質の 500、1000 および 2000 mg/kg を雌雄各 1 匹のラットに 3 日間反復経口投与した結果、1000 mg/kg 以上投与の雌雄で体重増加抑制が認められ、さらに 2000 mg/kg 投与の雌雄で腹臥位、自発運動低下および便による下腹部の汚れが認められた。

また、500 mg/kg 以上投与の雌雄で、投与直後に一過性の流涎が認められた。そこで、1 群雌雄各 4 匹のラットに、本被験物質を 0 (局方オリブ油のみ投与)、50、100、200、500 および 1000 mg/kg/day で 14 日間反復経口投与し、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定、血液学および血液生化学検査、剖検並びに器官重量の測定を行った。その結果、100 mg/kg 以上の群で、雄に投与直後の流涎および体重増加の抑制傾向、雌に血清総コレステロールの高値傾向、200 mg/kg 以上の群では、雌においても流涎および血清総コレステロールの高値傾向が認められた。さらに、500 mg/kg 以上の群では、雌雄に肝臓重量の高値、雄に副腎重量の高値、雌に血清総タンパク、アルブミンおよびカルシウムの高値並びに血液プロトロンビン時間の低値が認められた。1000 mg/kg 群では、一般状態の変化、体重増加の明らかな抑制および雄 1 匹、雌 2 匹の死亡が認められた。50 mg/kg 群では、変化は認められなかった。

したがって、本試験における投与量については、500 mg/kg/day を最高用量とし、以下、120 および 30 mg/kg/day の計 3 用量を設定した。

試験群の構成は、①溶媒投与群(以下、対照群)、②被験物質の 30 mg/kg/day 投与群(30 mg/kg 群)、③同 120 mg/kg/day 投与群(120 mg/kg 群)、④同 500 mg/kg/day 投与群(500 mg/kg 群)の 4 群とした。

投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、投与液を胃内に投与した。対照群には、媒体として用いた局方オリブ油を同様に投与した。各個体の投与液量は、至近日の測定体重を基に算出した。投与期間は、雌雄とも交配開始 14 日前から、雄は 42 日間、雌は交配および妊娠期間を経て分娩後の哺育 4 日まで、最短 42 日～最長 53 日間、1 日 1 回、午前中(9:00～11:56)に投与した。ただし、雌の回復群は、雄と同様に 42 日間投与した。

4. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

親動物について、次の項目を観察あるいは検査した。なお、感覚反射機能検査、握力、自発運動量、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および病理組織学検査については、各群から無作為抽出法により雌雄各 5 匹を選び、検査の対象とした。

結 果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態および死亡 (Tables 1~4, Appendices 10~13)

一般状態の変化について、120 mg/kg 群で雌雄とも 12 匹中 11 匹に投与 4 日以降、500 mg/kg 群で雌のサテライト群を含む雌雄の全例に投与 2 日以降、流涎が認められた。この流涎は、投与直後に口周囲を軽度ないし中等度に濡らす程度の一過性のものであった。また、500 mg/kg 群では、雄の 2 匹に軽度な眼瞼下垂が投与 33 日以降認められ、このうちの 1 匹には投与 41 日以降、中等度の自発運動の低下および消瘦が認められた。さらに、500 mg/kg 群の雌の 1 匹にも軽度の消瘦が投与 40 日以降認められた。120 mg/kg 群の雌の 1 匹に軽度な紅涙が投与 30 日以降に認められたが、500 mg/kg 群では紅涙は認められなかった。回復期間においては、いずれの群にも一般状態の変化は認められなかった。

死亡について、500 mg/kg 群の雌の 1 匹 (動物番号 552) が分娩予定日の妊娠 22 日 (投与開始後 39 日) の朝、分娩出来ずに衰弱し、死亡した。この例の前日までの一般状態には、投与直後の一過性の流涎以外に異常は認められなかった。その他の投与群では、投与期間および回復期間を通じて死亡は認められなかった。

2) 詳細な臨床観察 (Tables 5, 6, Appendices 14, 15)

投与期間中および回復期間中とも、各観察項目に有意な変化は認められなかった。

3) 感覚反射機能検査 (Tables 7, 8, Appendices 16, 17)

投与期間中および回復期間中の検査において、各検査項目に変化は認められなかった。

4) 握力および自発運動量 (Tables 9, 10, Appendices 18, 19)

投与期間中および回復期間中の検査において、握力および自発運動量とも有意な変化は認められなかった。

5) 体重 (Tables 11, 12, Appendices 20, 21)

500 mg/kg 群で雄に投与期間中の体重増加量の有意な低値が認められた。雌では、

被験物質投与各群とも交配前、妊娠期間および哺育期間を通じて体重および体重増加量に有意な変化は認められなかった。

雌のサテライト群では、500 mg/kg 群で回復 14 日の体重および回復期間中の体重増加量に有意な低値が認められた。

6) 摂餌量 (Tables 13, 14, Appendices 22, 23)

投与期間中において、120 mg/kg 群の雌および 500 mg/kg 群の雄で、いずれも投与 14 日の摂餌量のみ、対照群と比べてやや高値で有意差が認められた。回復期間中の摂餌量は、対照群と比べて有意差は認められなかった。

7) 雄の尿検査 (Table 15, Appendix 24)

投与期間中の検査において、各検査項目に有意な変化は認められなかった。

回復期間中の検査では、カリウムの有意な低値が認められた。

8) 血液学検査 (Tables 16, 17, Appendices 25, 26, 背景データ : Appendices 42, 43)

500 mg/kg 群で雄に MCH およびプロトロンビン時間の有意な低値が認められた。

回復期間終了時屠殺動物においては、雄に白血球百分率における好中球の比率の有意な低値および雌に活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な低値が認められた。

9) 血液生化学検査 (Tables 18, 19, Appendices 27, 28, 背景データ : Appendices 42, 43)

120 mg/kg 群で雄に総タンパク濃度の有意な低値が認められた。500 mg/kg 群では、雄に総タンパク濃度およびアルブミン濃度の有意な低値並びに雌雄に総コレステロール濃度の有意な高値が認められた。なお、雄は 30 および 120 mg/kg 群の尿素窒素濃度、30 mg/kg 群のカルシウム濃度、30 および 500 mg/kg 群の無機リン濃度がいずれも有意な高値、雌では 30, 120 および 500 mg/kg 群の総ビリルビン濃度は有意な低値、120 mg/kg 群の塩素濃度は有意な高値を示したが、これらの変化には用量相関性は認められなかった。

回復期間終了時屠殺動物では、血糖値の有意な低値および無機リン濃度の有意な高

値が雄に、カリウム濃度の有意な低値が雌に認められた。総タンパク、アルブミおよび総コレステロールの濃度には変化は認められなかった。

10) 剖検 (Tables 20, 21, Appendices 29~30)

投与期間終了時屠殺動物において、肝臓の大型化が、500 mg/kg 群で雄の 2 匹および雌の 1 匹に認められた。胸腺の赤色域が 120 mg/kg 群および脾臓の大型化が 500 mg/kg 群に認められたが、胸腺および脾臓の変化はいずれも雌の 1 匹のみの発現であった。500 mg/kg 群の雌の死亡例 (動物番号 552) では、肝臓の大型化が認められた。

回復期間終了時屠殺動物では、変化は認められなかった。

11) 器官重量 (Tables 22, 23, Appendices 32~35)

投与期間終了時屠殺動物において、500 mg/kg 群で雄に肝臓の絶対および相対重量、腎臓の相対重量並びに脳相対重量のいずれも有意な高値、雌に肝臓の相対重量の有意な高値が認められた。なお、30 mg/kg 群で雌に脾臓の絶対および相対重量の有意な高値、120 mg/kg 群で雌に胸腺の相対重量の有意な高値が認められたが、これらの変化には用量相関性は認められなかった。

回復期間終了時屠殺動物においては、雌の肝臓の相対重量にのみ、有意な高値が認められた。

12) 病理組織学検査 (Tables 24~26, Appendices 29~31, Photos 1, 2)

被験物質の投与に起因すると思われる変化が、肝臓および小腸に認められた。

投与期間終了時屠殺動物において、肝臓では、小葉中心性肝細胞肥大が 500 mg/kg 群で検査対象各 5 匹中雄の 4 匹および雌の 5 匹中 5 匹に認められた。この変化は、回復期間終了時屠殺動物では認められなかった。

なお、肝臓において門脈周囲性リンパ球浸潤、微小肉芽腫、巣状壊死、その修復像と思われる肉芽腫および胆管過形成が回復群を含む対照群あるいは被験物質投与群で認められたが、いずれも用量相関性のない変化で、発現率や変化の程度に対照群との差は認められないことから、被験物質とは無関係な変化と判断した。

小腸では、腸絨毛の乳糜管拡張が 120 mg/kg 群で雄の 2 匹および雌の 1 匹、500

mg/kg 群では雄の 5 匹および雌の 5 匹に認められ、変化の程度は雄で強い傾向にあった。回復期間終了時屠殺動物においても、乳糜管の拡張は雌雄の全例に認められたが、変化の程度は軽減する傾向にあった。乳糜管を構成する細胞や腸間膜リンパ節には変化は認められなかった。

肝臓および小腸以外の器官においては、肺の泡沫細胞集簇、動脈壁鈣質沈着および骨化生、心臓の心筋変性・線維化、腺胃の胃底腺拡張、腎臓の近位尿細管上皮硝子滴、好塩基性尿細管、下垂体前葉の嚢胞、膀胱の粘膜下組織リンパ球浸潤、脾臓の髄外造血および褐色色素沈着、前立腺の間質リンパ球浸潤並びに精巣上体の精子肉芽腫が対照群と 500 mg/kg 群または対照群あるいは 500 mg/kg 群にのみ認められたが、これらはいずれもラットにおける自然発生病変として発現する変化^りであり、また、500 mg/kg 群における発現率や変化の程度に対照群との差は認められなかった。さらに、剖検で認められた、120 mg/kg 群の雌で認められた赤色域を有する胸腺には出血、500 mg/kg 群の雌で認められた大型化した脾臓には対照例と比べて髄外造血巣の増加が認められたが、これらも単発性の変化であり、被験物質の投与との関連性は認められなかった。

500 mg/kg 群で認められた雌の死亡例では、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大および小腸の乳糜管拡張が認められ、肝臓の変化は生存例と比べて強い傾向にあった。

500 mg/kg 群で認められた妊娠不成立の 1 ペアについて、雄では、下垂体、精巣、精巣上体、前立腺および精囊等に変化はなく、また、雌にも下垂体、卵巣および子宮等に変化は認められず、妊娠不成立の原因となるような所見は認められなかった。

精子形成サイクル検査において、500 mg/kg 群でステージ X II の精祖細胞数に有意な高値が認められた。病理組織学検査では精巣に変化は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響

(1) 性周期検査 (Table 27、Appendices 37, 38)

被験物質投与各群とも、対照群と比べて平均性周期に有意な変化は認められなかった。ただし、一時的に発情前期 (I) 像や発情後期 I (III) 像が認められない、あるいは、発情休止期 (V) 像が 3 日以上持続するなどの性周期の乱れが生じた個体が、500 mg/kg

群でのみ 17 匹中 5 匹（動物番号 542、546、547、549、557）に認められ、その発現は有意に高かった。これらの個体は、その後の交配で交尾が確認され、1 例（動物番号 549）は不妊であったが、その他は正常な妊娠、分娩および哺育が認められた。なお、1 例（動物番号 542）は性周期検査期間中に 1 性周期のみのデータとなったため、群平均性周期の算出からは除外した。

(2) 交尾率および受胎率 (Table 27、Appendix 38)

交尾成立までに要する日数、交尾率および受胎率に有意な変化は認められなかった。いずれの投与群とも交尾不成立は認められず、500 mg/kg 群で 1 例の妊娠不成立例が認められた。また、30 mg/kg 群で交尾成立までに 12 日を要した例（動物番号 020 と 525 のペア）の雌は、交配前は順調な性周期を示していたが、交配開始後 2 日から発情休止期(V)像が続き、交配開始後 11 日に発情前期(I)像が認められ、翌日、発情後期 I (III) 像と共に精子および膣栓が認められ、交尾が確認されたことから、偽妊娠を起こしたものと判断した。

(3) 黄体数、着床数および着床率 (Table 27、Appendix 38)

黄体数、着床数および着床率に有意な変化は認められなかった。

(4) 出産率および妊娠期間 (Table 27、Appendix 38)

出産率および妊娠期間に有意な変化は認められなかった。

(5) 分娩および哺育状態 (Table 27、Appendix 38)

500 mg/kg 群で分娩予定日の妊娠 22 日の朝に分娩出来ずに死亡した 1 匹（動物番号 552）について、その性周期、交尾、受胎、黄体数、着床数および着床率に異常は認められなかった。子宮内には、12 匹の死亡胎児が確認された。その他の投与群の雌に分娩および哺育状態の異常は認められなかった。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性および体重 (Table 28、Appendix 39)

500 mg/kg 群で新生児体重に低値傾向が認められ、哺育 0 日の雌および哺育 4 日の雄で有意な低値が認められた。

一腹当たりの総出産児数、分娩率、哺育 0 日および 4 日の新生児数、出生率、性比並びに哺育 4 日の生存率に有意な変化は認められず、新生児の一般状態にも異常は認め

られなかった。

(2) 形態 (Table 29、30、Appendices 40、41)

外表検査では、いずれの投与群においても外表異常を有する児動物は認められなかった。内臓検査では、内臓異常として脾臓の大型化を呈する児動物が 30 mg/kg 群で 1 匹(発現率 0.6%)認められ、また、内臓変異については、左臍動脈遺残を呈する児動物が対照群で 1 匹(0.6%)および 120 mg/kg 群で 1 匹(0.6%)、胸腺の頸部残留を呈する児動物が 120 mg/kg 群で 1 匹(0.6%)認められた。

考 察

1. 反復投与毒性について

被験物質の投与による主な毒性影響として、肝臓および小腸に変化が認められた。

肝臓に対する影響について、500 mg/kg 群で雄は絶対および相対重量、雌は相対重量の高値が認められ、剖検においても同群の雌雄に肝臓の大型化が確認された。病理組織学検査では、肝臓に小葉中心性の肝細胞肥大が観察された。

血液生化学検査において、500 mg/kg 群で雌雄に認められた総コレステロール濃度の高値は、被験物質の肝臓に対する影響と関連した変化と考えられる。しかしながら、血清 AST、ALT 等の肝細胞逸脱酵素の活性増加は認められず、肝機能に対する影響は小さいものと考えられた。

小腸に対する影響について、120 および 500 mg/kg 群で雌雄に腸絨毛の乳糜管の拡張が認められ、雄の変化は雌に比べて強い傾向にあった。

小腸におけるリンパ管拡張症は一般的に腸間膜リンパの閉塞により発現し、低蛋白血症を伴うこと、また、リンパ管末端の乳糜管の拡張は、ある種の免疫修飾作用物質や降圧剤等の化学物質のサルやラットへの投与により発現することが知られている²⁾。

血液生化学検査で、120 および 500 mg/kg 群の雄に認められた総タンパク濃度の低値並びに 500 mg/kg 群の雄に認められたアルブミン濃度の低値は、この乳糜管の拡張と関連した変化と考えられる。

前述の化学物質による乳糜管の拡張の事例では乳糜管そのもののほか、腸間膜リンパ節にも変化は認められていない²⁾が、本試験で認められた乳糜管の拡張においても、乳糜管を構成する細胞や腸間膜リンパ節に、リンパ流の閉塞の原因となる変化は認められず、その発現機序は不明である。

500 mg/kg 群で認められた雄の眼瞼下垂や自発運動の低下例および投与期間中体重増加量の低値、雌雄の消瘦例は、被験物質の投与による毒性影響を示す変化と考えられる。

また、500 mg/kg 群で分娩予定日に、分娩出来ずに被験物質の投与による毒性影響が認められた雌の 1 匹についても、生存例に認められた肝臓および小腸の変化が認められ、被験物質の投与による毒性影響に分娩によるストレスが加わって衰弱死したものと推察される。

なお、120 および 500 mg/kg 群の雌雄に認められた流涎は、投与直後にのみ認められた変化であり、詳細な臨床観察や感覚反射機能検査等で神経毒性を示唆する変化が認

められていないことから、被験物質の毒性と関連した変化ではなく、投与液に対する忌避反応と考えられる。

雌のサテライト群で認められた回復 14 日の体重および回復期間中の体重増加量の低値は、投与期間中からの体重推移から判断して、対照群の回復期間中の体重増加量が大きかったための偶発的な変化と考えられた。

また、120 mg/kg 群の雌および 500 mg/kg 群の雄で認められた投与 14 日目の摂餌量の高値については、変化に用量相関性は認められず、体重にも変化は認められなかったことから、被験物質の投与とは無関係な偶発的な変化と判断した。

回復期間中の尿検査で認められた 500 mg/kg 群のカリウム排泄量の低値について、その個体値は、当研究所の背景データにおける基準値の範囲[1.06~5.79(mEq/18hr)]内の値であり、また、投与期間終了時の検査ではこのような変化傾向は認められていないことなどから、投与とは無関係な偶発的な変化と判断した。

血液学検査において、500 mg/kg 群で雄に認められた MCH の低値について、その個体値は、基準値の範囲[17.0~19.2(pg)]内の値であり、赤血球数や血色素量に変化はなく、また、用量相関性も認められないことから、投与とは無関係な偶発的な変化と判断した。また、同群の雄に認められたプロトロンビン時間の低値については、延長性の変化ではなく、また、雌には認められていないことから、毒性学的意義のない変化と判断した。

また、雄回復群の 500 mg/kg 群に認められた白血球百分率における好中球比率の低値および雌サテライト群の 500 mg/kg 群に認められた活性化部分トロンボプラスチン時間の低値については、これらの各個体値は、いずれも基準値の範囲[好中球比率：8.2~28.8(%)、活性化部分トロンボプラスチン時間：13.8~18.9(秒)]内の値であり、また、投与期間終了時の検査ではこのような変化傾向は認められていないこと、雌の活性化部分トロンボプラスチン時間においては対照群でやや高値傾向にあったことなどから、いずれも被験物質とは無関係な偶発的な変化と判断した。

血液生化学検査において、30 および 120 mg/kg 群の雄に認められた無機リンの変化には用量相関性は認められず、また、軽微な変化であり、雌雄共通の変化でもないことから、毒性学的意義はないものと考えられる。

30 mg/kg 群の雄に認められたカルシウムの高値、また、30 および 120 mg/kg 群の雄に認められた尿素窒素の高値については、それらの各個体値は、尿素窒素において

120 mg/kg 群の 1 例 (16.8 mg/dL) が基準値の範囲を僅かに上回った以外は、いずれも基準値の範囲[カルシウム : 8.9~10.8(mg/dL)、尿素窒素 : 10.5~16.7(mg/dL)]内の値であり、また、用量相関性のない変化であることから、投与とは無関係な偶発的変化と判断した。また、120 mg/kg 群で雌に認められた塩素の高値についても、その各個体値は、いずれも基準値の範囲[96~108(mEq/L)]内の値であり、むしろ、対照群の値がやや低値傾向であったこと、また、用量相関性のない変化であることなどから、投与とは無関係な偶発的変化と判断した。また、雄回復群の 500 mg/kg 群に認められた血糖値の低値および無機リン濃度の高値、雌サテライト群の 500 mg/kg 群に認められたカリウム濃度の低値についても、それらの各個体値は、血糖において 1 例 (130 mg/dL)、カリウムにおいて 2 例 (3.74、3.68 mg/dL) が基準値の範囲を僅かに外れた以外は、いずれも基準値の範囲[血糖 : 131~182(mg/dL)、カリウム : 3.79~5.44(mg/dL)]内の値であり、また、血糖値およびカリウム濃度の変化は投与期間終了時の検査では認められていないことなどから、いずれの変化も被験物質とは無関係な偶発的なものと判断した。

精子形成サイクル検査では、500 mg/kg 群でステージ X II の精祖細胞数に有意な高値が認められたが、その変化の程度は極僅かで、他のステージに有意な変化はなく、また、病理組織学検査においても精巣に変化は認められないことから、被験物質投与による影響とは考え難い。

詳細な臨床観察、感覚反射機能検査、握力および自発運動量の測定並びに神経系器官・組織の病理学検査において、被験物質の神経行動毒性を示唆する変化は認められなかった。

以上のような、投与期間中あるいは投与期間終了時の検査で認められた変化は、回復期間中あるいは回復期間終了時の検査においては回復あるいは回復傾向にあり、可逆的な変化であると判断した。また、遅発的な毒性影響と考えられる変化も認められなかった。

本試験で認められたものと類似した肝臓に対する影響は、当研究所で実施したビスフェノール A-EO 付加物 (平均付加モル数 5 モル) のラットにおける反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験においても認められている³⁾ (未発表)。

2. 生殖発生毒性について

雌の性周期検査において、被験物質投与各群の平均性周期に有意な変化は認められなかったが、500 mg/kg 群で性周期の乱れを生じた個体が 17 匹中 5 匹に認められ、その発現は有意に高かった。内分泌攪乱物質として知られるビスフェノール A の 28 日間反復投与において、発情休止期の延長傾向が報告⁴⁾されており、本試験においても軽度ながら被験物質投与の影響が認められたものと考えられる。なお、当研究所で実施したビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）についての本試験と同様の試験では、性周期の乱れを生じた個体が認められたものの、その発現に有意な変化はなく、また、用量依存性もなかった⁵⁾（未発表）。

性周期以外に、雌雄親動物の生殖能に対する影響は認められなかった。

児動物については、500 mg/kg 群で新生児体重に低値傾向が認められ、哺育 0 日の雌および哺育 4 日の雄で有意な低値が認められた。雌親動物の体重および摂餌量に影響がないことから、新生児体重の変化は被験物質投与の影響と考えられる。

児動物の剖検において、30 mg/kg 群で脾臓の大型化、120 mg/kg 群で左臍動脈遺残または胸腺頸部残留を呈する例が 1 例ずつ認められたが、用量相関性のない低い発現率の変化であることから、自然発生的範疇のものと判断した。

児動物に対し、その他の発生に関する各指標において被験物質投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の親動物への反復投与における無影響量（NOEL）および無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも 120 mg/kg 以上の群で総タンパク濃度の低下および小腸に対する影響が認められたことから、いずれも 30 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL および NOAEL は、500 mg/kg 群で性周期および新生児体重に影響が認められたことから、いずれも 120 mg/kg/day と推定した。

文 献

- 1) 日本毒性病理学会編，毒性病理組織学，2000。
- 2) Gopinath, C., Prentice, D. E. and Lewis D. J. Atlas of experimental toxicological