

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。

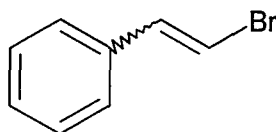
以上の試験結果より、本試験条件下において、 β -プロモスチレンは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能をさない (陰性) と判定した。

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)

- 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0.1mL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、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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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)	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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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)	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 B[a]P 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$) 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)	90 126 106 (107 \pm 18.0)	11 18 12 (14 \pm 3.8)	13 10 13 (12 \pm 1.7)	30 16 12 (19 \pm 9.5)	9 10 9 (9 \pm 0.6)		
	2.44	127 120 117 (121 \pm 5.1)	15 13 16 (15 \pm 1.5)	NT	NT	7 4 6 (6 \pm 1.5)		
	4.88	113 115 126 (118 \pm 7.0)	5 12 10 (9 \pm 3.6)	NT	NT	4 4 4 (4 \pm 0.0)		
	9.77	114 116 132 (121 \pm 9.9)	11 7 11 (10 \pm 2.3)	17 17 8 (14 \pm 5.2)	18 21 18 (19 \pm 1.7)	5 7 2 (5 \pm 2.5)		
	19.5	118 137 114 (123 \pm 12.3)	8 6 8 (7 \pm 1.2)	16 16 13 (15 \pm 1.7)	23 17 18 (19 \pm 3.2)	6 10 10 (9 \pm 2.3)		
	39.1	125 98 113 (112 \pm 13.5)	12 * 7 * 5 * (8 \pm 3.6)	18 27 17 (21 \pm 5.5)	19 23 16 (19 \pm 3.5)	5 * 6 * 4 * (5 \pm 1.0)		
	78.1	97 * 90 * 94 * (94 \pm 3.5)	7 * 6 * 8 * (7 \pm 1.0)	12 21 16 (16 \pm 4.5)	23 23 14 (20 \pm 5.2)	8 * 4 * 10 * (7 \pm 3.1)		
	156	NT	NT	15 * 15 * 7 * (12 \pm 4.6)	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を必要としなもの	名称 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	AF-2 0.01	SAZ 0.5	AF-2 0.01	AF-2 0.1	ICR-191 1.0
			506 510 469 (495 \pm 22.6)	286 252 247 (262 \pm 21.2)	66 82 69 (72 \pm 8.5)	477 460 419 (452 \pm 29.8)	2203 2306 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]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: 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)	122 140 110 (124 \pm 15.1)	13 7 8 (9 \pm 3.2)	18 13 25 (19 \pm 6.0)	53 47 38 (46 \pm 7.5)	13 8 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	8 6 6 (7 \pm 1.2)	
	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)	5 10 10 (8 \pm 2.9)	
	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)	12 10 7 (10 \pm 2.5)	
	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)	12 8 9 (10 \pm 2.1)	
	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)	13 * 8 * 12 * (11 \pm 2.6)	
	156	90 * 123 * 132 * (115 \pm 22.1)	NT	16 * 15 * 21 * (17 \pm 3.2)	22 * 31 * 28 * (27 \pm 4.6)	NT	
	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	S9Mixを必要とするもの	名称 用量 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	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	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)

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 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数(コロニー数/プレート)	
		塩基対置換型	
		TA1535	
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	8	
		11	
		13	(11 \pm 2.5)
	2.44	13	
		4	
		7	(8 \pm 4.6)
	4.88	5	
		8	
		10	(8 \pm 2.5)
	9.77	8	
9			
14		(10 \pm 3.2)	
19.5	6		
	16		
	11	(11 \pm 5.0)	
39.1	8		
	5		
	11	(8 \pm 3.0)	
78.1	10 *		
	11 *		
	12 *	(11 \pm 1.0)	
陽性対照	名称	2AA	
	用量($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	2.0	
	コロニー数/プレート	353	
		333	
		310	(332 \pm 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。

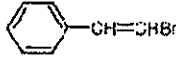
以上の結果から、 β -ブロモスチレンは本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数的異常は誘発しないと結論した。

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。
- (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、