

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 $\alpha_{2U}$ -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<sup>2)</sup>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<sup>1)</sup>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  $\alpha_{2u}$ -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  $\alpha_{2u}$  グロブリン腎症<sup>3), 4), 5)</sup>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<sup>1)</sup>。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  $\alpha$  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。

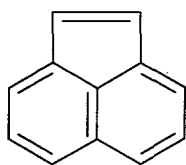
以上の試験結果より、本試験条件下において、アセナフチレンは、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。

## 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  $\mu$ L ずつ分注し、 $-70^{\circ}\text{C}$  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 <sub>uvrA</sub>	TA98	TA1537
S9Mix (一)	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 (十)	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	SAZ 0.5	AF-2 0.01	AF-2 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 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	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  $\text{mg/mL}$ 、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

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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 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。