

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。

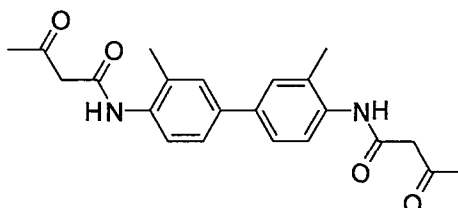
以上の試験結果より、本試験条件下において、アゾイック CC5 は、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する (陽性) と判定した。

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0.1mL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パガーを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)	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: アノイック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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 及び 200.7 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 3850 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 $\mu\text{g/mL}$ 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

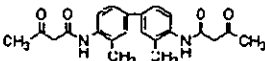
- ・ 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
(平成 15 年 11 月 21 日；薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、
環境企発第 031121002 号、平成 18 年 11 月 20 日最終改正)
- ・ 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 473」
(OECD 理事会：1997 年 7 月 21 日)

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