

最終報告書

表題：1,2,4,5-ペンゼンテトラカルボン酸無水物の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：SR15148

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者の署名

表題：1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：SR15148

株式会社化合物安全性研究所

試験責任者



2016年3月17日

信頼性保証書

表題 : 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 : SR15148

本試験は、株式会社化合物安全性研究所 QAU によって、下記のとおり査察された。

査察段階	査察日	試験責任者 への報告日	運営管理者 への報告日
試験計画書	2015年11月26日	2015年11月30日	2015年11月30日
被験物質の受入・表示・保存	2015年11月26日	2015年11月30日	2015年11月30日
被験物質調製液の調製	2015年12月14日	2015年12月14日	2015年12月14日
試験の実施	2015年12月14日	2015年12月14日	2015年12月14日
観察	2016年1月25日	2016年1月25日	2016年1月25日
生データ	2016年2月29日 2016年3月1日	2016年3月1日	2016年3月1日
最終報告書(草案): 図表	2016年2月29日 2016年3月1日	2016年3月1日	2016年3月1日
最終報告書(草案): 本文	2016年2月29日 2016年3月1日	2016年3月1日	2016年3月1日
最終報告書(草案): 本文*	2016年3月1日	2016年3月1日	2016年3月1日
最終報告書	2016年3月17日	2016年3月17日	2016年3月17日

*: 改善内容の確認

プロセス調査による査察段階	査察日	試験責任者 への報告日	運営管理者 への報告日
標本作製	2015年11月26日	2015年11月30日	2015年11月30日

本試験は、「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23年3月31日 薬食発0331第8号・平成23・03・29 製局第6号・環企発第110331010号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)に従い実施された。

本試験は、試験計画書に従って実施され、また、本報告書には当該試験に使用した方法および手順が正確に記載されており、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映していることを確認した。

株式会社化合物安全性研究所

QAU 責任者



2016 年 3 月 17 日

目次	頁
表紙	1
試験責任者の署名	2
信頼性保証書	3
目次	5
表題	7
試験番号	7
試験目的	7
試験実施基準および試験法ガイドライン	7
試験委託者	7
試験施設	7
試験責任者	7
試験従事者およびその業務分担	8
試験日程	8
1 要約	9
2 緒言	10
3 材料および方法	10
4 成績	20
5 考察	21
6 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	22
7 参考資料	22
8 資料の保存	23
表および図	
表 1	1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の細胞増殖抑制試験の結果 (予備試験) (SR15148) 24
表 2	1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の染色体異常試験・細胞増殖率測定の結果 (本試験) (SR15148) 25
表 3-1	1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の染色体異常試験の結果 (短時間処理法 -S9 処理) (SR15148) 26
表 3-2	1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の染色体異常試験の結果 (短時間処理法 +S9 処理) (SR15148) 27

表 3-3	1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の染色体異常試験の結果 (連続処理法 24 時間処理) (SR15148)	28
図 1	1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の細胞増殖率の結果 (短時間処理法 -S9 処理) (SR15148)	29
図 2	1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の細胞増殖率の結果 (短時間処理法 +S9 処理) (SR15148)	30
図 3	1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の細胞増殖率の結果 (連続処理法 24 時間処理) (SR15148)	31
図 4	1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の異常出現頻度 (短時間処理法 -S9 処理) (SR15148)	32
図 5	1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の異常出現頻度 (短時間処理法 +S9 処理) (SR15148)	33
図 6	1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の異常出現頻度 (連続処理法 24 時間処理) (SR15148)	34

表題

1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号

SR15148

試験目的

チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討した。

試験実施基準および試験法ガイドライン


試験実施基準(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 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 8 号・平成 23・03・29 製局第 6 号・環企発第 110331010 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)

試験法ガイドライン : 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日薬食発 0331 第 7 号・平成 23・03・29 製局第 5 号・環企発第 110331010 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)


試験委託者

名称 : 厚生労働省 医薬・生活衛生局
所在地 : 東京都千代田区霞が関 1-2-2 (〒100-8916)
試験委託責任者 : 審査管理課 化学物質安全対策室

試験施設

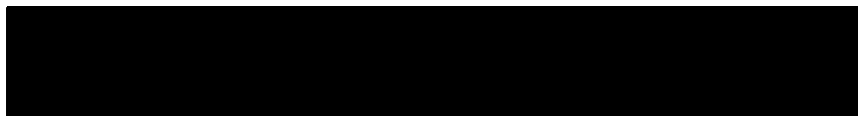
名称 : 株式会社化合物安全性研究所
所在地 : 札幌市清田区真栄 363 番 24 (〒004-0839)
運営管理者 : 

試験責任者

氏名 : 
所属 : 株式会社化合物安全性研究所 安全性研究部

試験従事者およびその業務分担

被験物質管理
試験操作・観察



試験日程

試験開始日	: 2015年11月26日
実験開始日	: 2015年11月30日
予備試験	
被験物質処理開始	: 2015年11月30日
細胞増殖率の測定	: 2015年12月1日
本試験	
被験物質処理開始	: 2015年12月14日
標本作製	: 2015年12月15日
標本観察終了日	: 2016年2月3日
実験終了日	: 2016年2月3日
試験終了日	: 2016年3月17日

1 要約

チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討した。試験は、短時間処理法 -S9 処理、短時間処理法 +S9 処理および連続処理法 24 時間処理の 3 試験系列で実施した。

予備試験 (細胞増殖抑制試験：被験物質の用量；17.2, 34.4, 68.8, 138, 275, 550, 1100, 2200 $\mu\text{g/mL}$) の結果、各試験系列で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) は短時間処理法 -S9 処理が 606 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法 +S9 処理が 644 $\mu\text{g/mL}$ および連続処理法 24 時間処理が 428 $\mu\text{g/mL}$ であった。培養液 pH への影響では、各試験系列ともに 1100 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量の処理開始時および処理終了時に低下 (pH 6.8~6.2) が認められた。被験物質の析出が、各試験系列ともに 1100 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量の処理開始時および処理終了時に認められた。

本試験 (染色体異常試験) は、予備試験の結果に基づき、短時間処理法 -S9 処理および短時間処理法 +S9 処理では 300, 400, 500, 600 および 700 $\mu\text{g/mL}$ の用量を、連続処理法 24 時間処理では 100, 200, 300, 400 および 500 $\mu\text{g/mL}$ の用量を設定した。

標本観察用量として、細胞増殖率の測定結果より、各試験系列とも 300, 400 および 500 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量を選択した。その結果、染色体の構造異常および数的異常の出現率は、各試験系列のいずれの用量も 5%未満であり、結果は陰性であった。

培養液 pH への影響では、短時間処理法 -S9 処理および短時間処理法 +S9 処理において 600 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量の処理開始時に低下 (pH 7.0~6.4) が認められた。被験物質の析出はいずれの試験系列においてもみられなかった。これらの結果は予備試験の結果と一致するもので、その再現性が確認された。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物は、当該試験条件において哺乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断した。

2 緒言

チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討した。

3 材料および方法

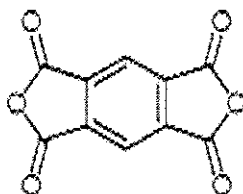
3.1 被験物質

名称 : 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物
別名¹⁾ : ピロメリット酸無水物 (Benzene-1,2,4,5-tetracarboxylic Dianhydride)

CAS 番号¹⁾ : 89-32-7

官報公示整理番号 (化審法)¹⁾ : (3)-1287

構造式²⁾ :



化学式¹⁾ : C₁₀H₂O₆

分子量²⁾ : 218.12

物理化学的性質¹⁾ : 固体, 結晶 ~ 粉末, 白色 ~ うすい黄色

融点 ; 286°C

沸点/沸騰範囲 ; 400°C

溶解度 ; アセトン, ジメチルホルムアミド, テトラヒドロフラン, ジメチルスルホキシドに可溶

オクタノール/水分配係数 ; 2.14

ロット番号 : TVUQD

純度³⁾ : 99.5 %

製造業者

入手日 : 2015年8月24日

入手量 : 25 g × 2 本 (関連試験と共用)

安定性 : 試験操作終了後, 被験物質の一部 [REDACTED] に送付し特性検査を依頼した。分析の結果, 得られた純度は 99.4% (メタノリシス法) であり (報告書, 整理 No. A0032, 2016年2月19日), 被験物質は試験期間中, 安定であったことが確認された。

- 保存場所および保存期間 : 被験物質保存室の冷蔵室 [2015年8月24日(入手)~2015年11月20日] および培養細胞試験室の冷蔵庫 [2015年11月20日~2015年12月14日(本試験の被験物質処理)]
- 保存条件 : 冷蔵 [実測範囲 5.1~7.9°C(被験物質保存室の冷蔵室), 1.1~6.3°C(培養細胞試験室の冷蔵庫)], 気密, 遮光, 湿気を避ける, 窒素ガスを充填.
- 取扱上の注意 : ゴム手袋, マスクおよび保護メガネを着用した.
- 残余被験物質の処置 : 関連試験の試験操作終了後, 焼却処分するために, 産業廃棄物として回収した.

3.2 対照物質およびその調製

3.2.1 陰性対照物質(媒体)

- 名称 : ジメチルスルホキシド (略称 ; DMSO)
(モレキュラーシーブによる脱水処理済み)
- ロット番号 : ECR2511
- 製造者 : 和光純薬工業株式会社

陰性対照物質 (媒体)の選択理由 :

試験施設において被験物質の調製確認を行った結果, アセトンには 250 mg/mL および 100 mg/mL で溶解せず, 均一に懸濁もしなかった. 一方, DMSO には 250 mg/mL では完全には溶解せず一部が不溶であったが, 220 mg/mL (予備試験の 2200 µg/mL の用量の処理に使用) では均一に懸濁し, 200 mg/mL で溶解した. いずれの調製液においても発熱, 発泡, 変色は認められなかった. 以上のことから, 本被験物質の媒体 (陰性対照物質) として DMSO を選択した. なお, 本試験の調製液の最高濃度は 70mg/mL であり, 全ての濃度が DMSO に溶解した.

3.2.2 陽性対照物質

3.2.2.1 短時間処理法 -S9 処理および連続処理法 24 時間処理

- 名称 : マイトマイシン C (以下, MMC と略す)
- ロット番号 : 569ACH
- 含量 : 101.3%
- 使用期限 : 2017年8月
- 製造者 : 協和発酵キリン株式会社

調製方法	: MMC 2mg の入ったバイアル瓶に日本薬局方注射用水 (ロット番号 ; K4F72, 株式会社大塚製薬工場) 5 mL を加え溶解した後, 日本薬局方生理食塩液 (ロット番号 ; K5A82, 株式会社大塚製薬工場) を用いて希釈し 5 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調製した (調製日 : 2015 年 6 月 24 日) . 調製の際には 1 mg (力価) を 1 mg とし て換算した.
保存条件	: -20°C 以下で 0.3mL ずつ分注凍結保存した.
使用期限	: 2016 年 6 月 23 日 (調製後 1 年)
調製液の添加容量	: プレート内の液に対し 1 vol% の割合で添加した.

3.2.2.2 短時間処理法 +S9 処理

名称	: 3,4-ベンゾピレン (以下, BP と略す)
ロット番号	: 2IGMD
純度	: 98.6%
使用期限	: 2017 年 12 月 (購入後 5 年)
製造者	: 東京化成工業株式会社
調製方法	: BP 25.4 mg をジメチルスルホキシド (ロット番号 ; EU020, 株式会社同仁化学研究所) 2.5 mL に溶解し, これをさらにジメチルスルホキシドを用いて 10 倍希釈し, 1 mg/mL の濃度に調製した (調製日 : 2015 年 6 月 24 日) . 調製の際には含量の補正は行わなかつた.
保存条件	: -20°C 以下で 0.3mL ずつ分注凍結保存した.
使用期限	: 2016 年 6 月 23 日 (調製後 1 年)
調製液の添加容量	: プレート内の液に対し 1 vol% の割合で添加した.

3.3 被験物質調製液の調製

調製方法	: 予備試験では, 被験物質を 439.9 mg 秤量した. 適量の DMSO を加え溶解した後, 2 mL に定容し, 最高濃度調製液 (220 mg/mL) とした. 最高濃度調製液の一部を, DMSO を用いて以下公比 2 で段階希釈して 110, 55, 27.5, 13.8, 6.88, 3.44 および 1.72 mg/mL を調製した. 本試験では, 被験物質を 140.0 mg 秤量した. 適量の DMSO を加え溶解した後, 2 mL に定容し, 最高濃度調製液 (70 mg/mL) とした. 最高濃度調製液の一部を, DMSO を用いて段階希釈し 60, 50, 40, 30, 20 および 10 mg/mL を調製した.
------	--

調製頻度	: 被験物質調製液は用時に調製し、予備試験では調製後 40 分以内に、本試験では調製後 35 分以内に使用した。
調製液の添加容量	: プレート内の液に対し 1 vol% の割合で添加した。
残余調製液の処理	: 残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3.4 細胞

細胞名	: CHL/IU
種 (由来組織)	: チャイニーズハムスター (新生チャイニーズハムスター (雌) の肺)
細胞の選択理由	: 増殖速度、継代における染色体の安定性、染色体標本の観察の容易さおよび既知の変異原物質に対する感受性を考慮し選択した。
入手先	: DS ファーマバイオメディカル株式会社
入手年月日	: 2013 年 7 月 23 日
入手時継代数	: 14
凍結条件	: 10 vol% DMSO を含む培地を用いて 1×10^6 cells/mL 細胞浮遊液を調製し、1 mL ずつアンプルに分注したものを漸次冷却して凍結させた後、液体窒素内で保存した。
培養条件	: 75 cm ² 培養フラスコを用いて、5.0%CO ₂ 、37.0 °C に設定した CO ₂ インキュベーター [MCO-18AIC (UV) ; パナソニック ヘルスケア株式会社] 内で培養し、3 日あるいは 4 日毎に継代を行い、他試験と共通で使用した。
マイコプラズマチェック	: 供試細胞と同時に凍結保存した細胞を用いて蛍光染色法によりマイコプラズマチェックを行い、陰性であることを確認した。
染色体数 (モード)	: 25
倍加時間	: 14.8 時間 (供試細胞と同時に保存した細胞での測定結果)
供試細胞の継代数	: 30 以下 (予備試験 : 19, 本試験 : 23)

3.5 培地

培地は事前あるいは試験開始後に下記の組成で必要量調製し、他試験と共通で使用した。

培地	: イーグル MEM 培地 (Code 05900, ロット番号 ; 717505, 日本製薬株式会社)
血清	: 牛胎児血清 (ロット番号 ; 1438137, GIBCO) を、56°C で 30 分間非働化した後、使用した。
調製方法	: イーグル MEM 培地 7.52 g に、日本薬局方注射用水 (ロット番号 ; 4K76, 株式会社大塚製薬工場) 800 mL を加え溶解させた。オー

トクレーブ滅菌後、室温まで冷却し、滅菌済みの 7.5%炭酸水素ナトリウム溶液 (ロット番号;606H1849, 関東化学株式会社) 26.9 mL を添加した。使用前に、ろ過除菌した L-グルタミン溶液 (ロット番号; PDG2279, 和光純薬工業株式会社) 0.292 g/L および牛胎児血清を 10%となるように添加した。

3.6 S9 mix

製造者 : キッコーマンバイオケミファ株式会社
 ロット番号 : CAM201507A
 製造年月日 : 2015 年 7 月 24 日
 製造方法 : フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導を行った Slc : SD ラット (雄, 7 週齢) の肝ホモジネートから調製した S9 (ロット番号; RAA201507A, S9 中蛋白含量 21.52 mg/mL) 1.05 mL に, コファクターミックス 2.45 mL を加え調製されている。S9 mix 1 mL 中のコファクターの成分濃度を次表に示す。

S9 mix 1 mL 中のコファクターの成分濃度		
MgCl ₂	(和光純薬工業株式会社 LAK4493)	5 μmol
KCl	(和光純薬工業株式会社 CTF5217)	33 μmol
G-6-P	(オリエンタル酵母工業株式会社 118401)	5 μmol
NADP	(オリエンタル酵母工業株式会社 045308)	4 μmol
HEPES 緩衝液	(pH7.2, 株式会社同仁化学研究所 ER207)	4 μmol

保存条件 : -80°C で凍結保存

使用期限 : 製造後 6 ヶ月 (製造より 5 ヶ月以内に使用した)

3.7 試験方法

3.7.1 予備試験 (細胞増殖抑制試験)

3.7.1.1 試験系列

短時間処理法 -S9 処理, 短時間処理法 +S9 処理および連続処理法 24 時間処理の 3 試験系列について実施した。

3.7.1.2 試験群

被験物質の最高用量を 2200 μg/mL (約 10 mM に相当) とし, 以下公比 2 で低下させた計 8 用量 (2200, 1100, 550, 275, 138, 68.8, 34.4 および 17.2 μg/mL) の試験群を設定した。更に, 試験系列毎に陰性対照群を設定した。

処理開始時の生細胞数計数用にプレート2枚ならびに各試験群に2枚のプレートを使用し、各プレートには識別番号を明記した。

3.7.1.3 細胞の播種

直径 60 mm のプレートに、 0.4×10^4 cells/mL の濃度の細胞浮遊液をそれぞれ 5 mL ずつ播種し、5.0%CO₂、37.0°C に設定した CO₂ インキュベーター [MCO-175 ; パナソニック ヘルステア株式会社] 内で培養した。

3.7.1.4 被験物質調製液の処理

a. 短時間処理法 -S9 処理

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、新鮮培地 3 mL を加え、更に被験物質調製液を 0.03 mL 加え、6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して PBS(-) で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

b. 短時間処理法 +S9 処理

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、新鮮培地 2.5 mL と S9 mix 0.5 mL (S9 の最終濃度約 5 vol%) を加え、更に被験物質調製液を 0.03 mL 加え、6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して PBS(-) で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

c. 連続処理法 24 時間処理

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、新鮮培地 5 mL を加え、更に被験物質調製液を 0.05 mL 加え、24 時間培養した。

3.7.1.5 被験物質析出の有無の確認

被験物質調製液による処理の開始時と終了時に、被験物質の析出の有無を目視確認した。

3.7.1.6 被験物質調製液による培養液 pH への影響の有無の確認

被験物質調製液による処理の開始時と終了時に、培養液色の変化の有無を目視確認した。培養液色に変化が認められない場合には、被験物質調製液処理による培養液 pH への影響は無いものと判断した。培養液色の変化が認められた場合には、pH 試験紙 (BTB, ロット番号 10712001, 東洋濾紙株式会社) で培養液の pH を確認した。

3.7.1.7 細胞増殖率 (RICC) の測定および 50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) の算出

処理開始時は代表プレート 2 枚に、処理終了時はプレート毎に以下の処理を行った。プレート内の液を除去して PBS(-) で細胞を洗い、0.02%EDTA-0.25%トリプシンを 0.5 mL 加えて細胞を剥離し、新たに培地を 4.5 mL 加えてピペティングし細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液の一部を採取し、血球計算盤を用いて生細胞数を計数した。

各プレートの生細胞数より、次式により Relative increase in cell counts (RICC) を算出し、更に試験群毎にその平均値を算出した。なお、RICC が負の値となった場合は 0 とした。

$$\text{RICC} = \frac{\text{処理プレートの細胞増加数 (処理終了時の生細胞数} - \text{処理開始時の生細胞数*)}}{\text{対照プレートの細胞増加数 (処理終了時の生細胞数} - \text{処理開始時の生細胞数*)}} \times 100$$

* ; 処理開始時の生細胞数には、代表プレート 2 枚の平均値を用いた。

RICC が 50%以下まで低下した試験系列については、50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) を算出した。IC₅₀ は、RICC が 50%となる点を挟む 2 用量の結果を用いて算出した。

3.7.2 本試験 (染色体異常試験)

3.7.2.1 試験系列

短時間処理法 -S9 処理, 短時間処理法 +S9 処理および連続処理法 24 時間処理の 3 試験系列について実施した。

3.7.2.2 試験群

a. 被験物質

予備試験の結果、各試験系列で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、IC₅₀ は短時間処理法 -S9 処理が 606 μg/mL, 短時間処理法 +S9 処理が 644 μg/mL および連続処理法 24 時間処理が 428 μg/mL であった。これらの結果に基づき、各試験系列とも最高用量が 50%を超える細胞増殖抑制を示す用量となるよう以下の用量を設定した。

短時間処理法 -S9 処理 : 300, 400, 500, 600, 700 μg/mL

短時間処理法 +S9 処理 : 300, 400, 500, 600, 700 μg/mL

連続処理法 24 時間処理 : 100, 200, 300, 400, 500 μg/mL

b. 対照物質

各試験系列について、陰性対照群ならびに次表の陽性対照群を設定した。

試験系列	陽性対照物質	用量 (μg/mL)
短時間処理法 -S9 処理	MMC	0.1
短時間処理法 +S9 処理	BP	10
連続処理法 24 時間処理	MMC	0.05

c. プレート数

処理開始時の生細胞数計数用にプレート 2 枚ならびに各試験群に 2 枚のプレートを使用し、各プレートには識別番号を明記した。

3.7.2.3 細胞の播種

3.7.1.3 細胞の播種に準じた。

3.7.2.4 被験物質調製液の処理

a. 短時間処理法 -S9 処理

3.7.1.4 の a. 短時間処理法 -S9 処理に準じた。なお、陽性対照群は、細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し新鮮な培地 3 mL を加え、更に陽性対照物質調製液 0.03 mL を加え 6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して PBS(-) で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

b. 短時間処理法 +S9 処理

3.7.1.4 の b. 短時間処理法 +S9 処理に準じた。なお、陽性対照群は、細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し新鮮な培地 2.5 mL と S9 mix 0.5 mL (S9 の最終濃度約 5 vol%) を加え、更に陽性対照物質調製液 0.03 mL を加え 6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して PBS(-) で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

c. 連続処理法 24 時間処理

3.7.1.4 の c. 連続処理法 24 時間処理に準じた。なお、陽性対照群は、細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し新鮮な培地 5 mL を加え、更に陽性対照物質調製液 0.05 mL を加えた。更に、24 時間培養した。

3.7.2.5 被験物質析出の有無の確認

3.7.1.5 被験物質析出の有無の確認に準じた。

3.7.2.6 被験物質調製液による培養液 pH への影響の有無の確認

3.7.1.6 被験物質調製液による培養液 pH への影響の有無の確認に準じた。

3.7.2.7 細胞増殖率 (RICC) の測定

3.7.2.8 で得られた細胞浮遊液を使用し、その測定方法は 3.7.1.7 細胞増殖率 (RICC) の測定および 50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) の算出に準じた。ただし、本試験では IC₅₀ の算出は行わないこととした。

3.7.2.8 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前に、各プレートに最終濃度 0.2 µg/mL のコルセミド (ロット番号; 1696166, GIBCO) を加えた。培養終了時間に、プレート内の液をそれぞれ遠沈管に回収し、各プレートを 0.02 % EDTA-0.25 % トリプシン (0.5M EDTA : ロット番号; 1045847, GIBCO, 2.5% トリプシン : ロット番号; 1665790, GIBCO) で処理して細胞を剥離させ、得られた細胞浮遊液を同上の遠沈管に回収して 1000 rpm で 5 分間遠心分離した (遠心前に、細胞浮遊液の一部を細胞計数用に採取した)。上清を除去し、0.075 mol/L 塩化カリウム (ロット番号; 310U1825, 関東化学株式会社) を加え、穏やかにピペティングし 37°C で 15 分間細胞を膨満化 (低張処理) させた。氷冷したカルノア固定液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1, メタノール : ロット番号; 707B1087, 関東化学株式会社, 酢酸 : ロット番号; ECN4685, 和光純薬工業株

式会社)を加えて細胞を固定した後、1000 rpm で5分間遠心分離して上清を除去し、新しいカルノア固定液を加えた。細胞の固定操作を3回繰り返した後、細胞浮遊液をスライドグラス上に滴下し、自然乾燥させた。各プレートより、2枚の染色体標本作製した。各スライドは、3%ギムザ液 [ギムザ液：ロット番号；EQ885, 和光純薬工業株式会社, インスタント 燐酸緩衝液 (pH6.8)：ロット番号；E406, 株式会社 LSI メディエンス] で20分間染色し、水洗および風乾の後、封入剤 (マリノール, ロット番号；1300901, 武藤化学薬品株式会社) で封入した。

3.7.2.9 観察用量の選択

観察用量は、3.7.2.7 の細胞増殖率 (RICC) の測定において、細胞増殖率が陰性対照群の50%未満である用量を最高用量とし、各試験系列ともに300, 400 および 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の3用量を選択した。

3.7.2.10 選択標本の確認

3.7.2.9 で選択した用量の標本ならびに対照群の標本について実施した。

作製した1枚の標本あたり約75個以上の分裂中期細胞が得られることを確認した。

3.7.2.11 染色体標本のコード化

選択した観察用量の標本について、1プレートにつき1枚の標本を選択してコード化した。

3.7.2.12 染色体標本の観察⁴⁾

総合倍率1000倍の顕微鏡 (BX51TF; オリンパス株式会社) で、1枚あたり150個 (用量あたり300個) の分裂中期像を選択して観察し、以下の分類に従って染色体異常の判定を行った。構造異常については 25 ± 2 本の染色体をもつものを観察対象とした。

a. 構造異常 (structural aberration)

・染色体分体切断 (ctb : chromatid break)

染色体分体のはっきりした不連続部分 (切断部分) で、不連続部分が染色体分体の幅以上である場合、あるいは切断片が染色体分体の長軸線上から外れている場合に染色体分体切断として判定した。

・染色体分体交換 (cte : chromatid exchange)

染色体分体の2ヵ所以上の切断部位が相互に交換 (結合反応) しているものを染色体分体交換として判定した。

・染色体切断 (csb : chromosome break)

両方の染色体分体の同じ位置に切断が生じている場合に、染色体切断として判定した。切断の判定基準は、染色体分体切断に準じた。

- ・染色体交換 (cse : chromosome exchange)

両方の染色分体の同じ位置で同じ方向に交換が生じている場合に、染色体交換として判定した。

- ・その他 (others)

その他の構造異常として、断片化 (fragmentation) がある。一つの分裂中期像のほとんど全ての染色体に切断やギャップが現れ、交換型の異常が含まれていない場合に断片化として判定した。

b. ギャップ (gap)

染色分体あるいは染色体上に生じた非染色部分 (染色性が全くみられない部分) で、非染色部分の幅が染色分体の幅より狭い場合にギャップとして判定した。

c. 数的異常 (numerical aberration)

- ・倍数体 (poly : polyploid)

染色体数 (25 ± 2) が倍加し、染色体数が 36 以上 (三倍体、四倍体等) となったものを倍数体として判定した。

- ・その他 (others)

その他の数的異常として核内倍加がある。倍加した染色体が分離せずに平行に並んでいる場合に核内倍加 (end : endoreduplication) と判定し、倍数体とは区別し計数した。

3.7.2.13 観察結果の集計方法

プレート毎および用量毎に、構造異常および数的異常それぞれについて、分類毎の異常細胞数ならびに総異常細胞数 (total) を求めた。また、各用量の総異常細胞の出現率を求めた。出現率 (%) は観察した細胞数 (分裂中期像の数) に対する出現数の百分率で算出した。なお、構造異常は 1 個の細胞に複数の構造異常がある場合にも、構造異常を有する細胞数は 1 とし計数し、ギャップは構造異常には含めなかった。

a. 構造異常について

- ・ctb : 染色分体切断をもつ細胞数
- ・cte : 染色分体交換をもつ細胞数
- ・csb : 染色体切断をもつ細胞数
- ・cse : 染色体交換をもつ細胞数
- ・others : その他の構造異常をもつ細胞数
- ・総異常細胞数 (total) : 何らかの構造異常をもつ細胞数

b. ギャップについて

- ・gap : ギャップをもつ細胞数

c. 数的異常について

- ・ poly : 倍数体の細胞数
- ・ others : その他の数的異常をもつ細胞数
- ・ 総異常細胞数 (total) : 何らかの数的異常をもつ細胞数

3.7.2.14 試験の成立条件

以下の2点を、試験結果が正しく評価出来る条件とした。試験の結果、いずれの試験系列もその条件を満たしていた。

- a. 各試験系列の陰性対照群の染色体異常の構造異常および数的異常の出現率が、ともに5%未満である。
- b. 各試験系列の陽性対照群の染色体異常の構造異常の出現率が10%以上である。

3.7.2.15 試験結果の評価⁵⁾

染色体の構造異常および数的異常の出現率 (%) が、いずれも5%未満の場合を陰性、いずれかの出現率あるいは双方の出現率が5%以上10%未満の場合には確認試験を実施し、再現性が認められる場合を疑陽性、いずれかの出現率あるいは双方の出現率が10%以上で、再現性あるいは用量の増加にともなう増加が認められる場合を陽性とした。統計学的手法は用いなかった。

3.7.2.16 再試験

いずれかの試験系列において、染色体標本の質が劣悪である、あるいは陰性対照群又は陽性対照群の染色体異常の出現率が試験の成立条件を満たさなかった場合には、該当する試験系列あるいは全試験系列について再試験を実施することとした。当該試験において上記該当事項は発生せず、再試験は行わなかった。

4 成績

4.1 予備試験

細胞増殖抑制試験 (予備試験) の結果を表1および図1~3に示す。

各試験系列で50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) は短時間処理法 -S9 処理が 606 µg/mL, 短時間処理法 +S9 処理が 644 µg/mL および連続処理法 24 時間処理が 428 µg/mL であった。

培養液 pH への影響では、各試験系列の 1100 µg/mL 以上の用量で、処理開始時 (1100 µg/mL の各試験系列 : pH 6.4, 2200 µg/mL の各試験系列 : pH 6.2) および処理終了時に低下 [1100 µg/mL : pH 6.4 (短時間処理法 -S9 処理および短時間処理法 +S9 処理) または pH6.8 (連続処理法 24 時間処理), 2200 µg/mL の各試験系列 : pH 6.2] が認められた。

被験物質の析出が、各試験系列の 1100 µg/mL 以上の用量で、処理開始時および処理終了時に認められた。

4.2 本試験

染色体異常試験 (本試験) の結果を表 2, 3-1 ~ 3-3 および図 1 ~ 6 に示す。

細胞増殖への影響では、各試験系列で 50%を超える細胞増殖抑制が認められた。

培養液 pH への影響では、短時間処理法 -S9 処理および短時間処理法 +S9 処理において 600 µg/mL 以上の用量の処理開始時に低下 (600 µg/mL : pH 7.0, 700 µg/mL : pH 6.4) が認められた。

被験物質の析出はいずれの試験系列においてもみられなかった。

標本観察の結果、染色体の構造異常および数的異常の出現率は、短時間処理法 -S9 処理、短時間処理法 +S9 処理および連続処理法 24 時間処理のいずれの用量においても 5%未満であった。陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法 -S9 処理で 46.3%、短時間処理法 +S9 処理で 54.0%および連続処理法 24 時間処理で 49.0%であった。

5 考察

1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の *in vitro* における染色体異常誘発性の有無をチャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて検討した。

試験の結果、染色体の構造異常ならびに数的異常の出現率は短時間処理法 -S9 処理、短時間処理法 +S9 処理および連続処理法 24 時間処理のいずれの用量においても 5%未満であり、結果は陰性であった。

被験物質処理による析出の有無および培養液 pH への影響では、予備試験と本試験で同様の結果が得られ再現性が確認された。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物は、当該試験条件において哺乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断した。

1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の遺伝毒性についての情報は得られていない。なお、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の類縁物質では、4 および 5 位のカルボン酸無水部位に代わり 4 位にカルボン酸が付いた trimellitic anhydride (CAS 番号 552-30-7) および trimellitic anhydride の 1 および 2 位のカルボン酸無水部位が開裂した trimellitic acid (CAS 番号 528-44-9) は、

復帰突然変異試験で陰性、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO) を用いた染色体異常試験では陰性と報告されている⁶⁾。また、1,2-ベンゼンジカルボン酸無水物である phthalic anhydride (CAS 番号 85-44-9) は、復帰突然変異試験で陰性、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO) を用いた染色体異常試験では陰性と報告されている⁷⁾。

6 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験計画書に従わなかったこととして、試験計画書では培地の調製方法として、イーグル MEM 培地 7.52 g を日本薬局方注射用水に溶解し、全量を 800 mL とすると記載しているが、実際にはイーグル MEM 培地 7.52 g に日本薬局方注射用水を 800 mL 加えて溶解し調製した。当該試験計画書からの逸脱については、使用する培地の容積は培地の全容量に対し無視出来る程度であることから、試験成績の信頼性への影響はないと判断した。

試験計画書に従わなかったこととして、試験計画書では、染色体標本の観察について、1 枚の標本あたり約 50 個以上の分裂中期細胞が得られることを確認した後、1 枚あたり 100 個 (用量あたり 200 個) の分裂中期像を選択して観察するとしているが、実際には、1 枚の標本あたり約 75 個以上の分裂中期細胞が得られることを確認した後、1 枚あたり 150 個 (用量あたり 300 個) の分裂中期像を選択して観察した。しかし、採用した観察数は、試験法ガイドラインの参照試験法ガイドラインである経済協力開発機構の「OECD Guideline for the Testing of Chemicals; *In vitro* mammalian chromosomal aberration test (473)」(26th September 2014) ならびに「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正について (平成 27 年 12 月 21 日薬生発 1221 第 1 号・20151209 製局第 1 号・環企発第 1512211 号) の試験条件に基づくもので、当該事象による試験成績の信頼性への影響はないと判断した。

その他、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

7 参考資料

- 1) 安全データシート； ██████████
- 2) ██████████ ホームページ；オンラインカタログ
- 3) 試験成績書； ██████████
- 4) 化学物質による染色体異常アトラス；日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編，1988 年，朝倉書店
- 5) 祖父尼俊雄監修「染色体異常試験データ集・改訂 1998 年版」，1999 年，株式会社エル・アイ・シー
- 6) OECD SIDS, Trimellitic Anhydride and Trimellitic Acid, 2002
- 7) WHO Concise International Chemical Assessment Document 75, 2009

8 資料の保存

8.1 資料の種類

以下を、株式会社化合物安全性研究所の資料保存室に保存する。

1. 試験計画書
2. 生データその他の記録文書
3. 最終報告書
4. 染色体標本

8.2 保存期間

試験終了後 10 年間保存し、その後の保存については試験委託者との協議により決定する。

表1 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の細胞増殖抑制試験の結果
(予備試験) (SR15148)

RICC (%)				
試験群	用量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (平均値)	6-18 h (平均値)	24-0 h (平均値)
ジメチルスルホ キシド	—	97.4 , 102.6 (100.0)	102.4 , 97.6 (100.0)	87.4 , 112.6 (100.0)
	17.2	115.3 , 108.9 (112.1)	83.3 , 108.6 (96.0)	133.6 , 118.4 (126.0)
	34.4	104.7 , 125.1 (114.9)	97.6 , 101.6 (99.6)	131.2 , 137.9 (134.6)
	68.8	77.0 , 104.7 (90.9)	112.7 , 109.8 (111.3)	102.5 , 104.2 (103.4)
	138	123.0 , 115.3 (119.2)	104.5 , 114.7 (109.6)	89.7 , 129.5 (109.6)
	275	93.2 , 84.7 (89.0)	86.1 , 77.1 (81.6)	72.2 , 107.6 (89.9)
	550	25.1 , 91.1 (58.1)	61.6 , 67.8 (64.7)	23.3 , 31.7 (27.5)
	1100 *#	0.0 , 0.0 (0.0)	0.0 , 0.0 (0.0)	0.0 , 0.0 (0.0)
2200 *#	0.0 , 0.0 (0.0)	0.0 , 0.0 (0.0)	0.0 , 0.0 (0.0)	
IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		606	644	428

RICC: Relative increase in cell counts

*: 被験物質処理開始時および終了時に被験物質の析出が認められた。

#: 被験物質処理開始時および終了時に培養液pHの低下が認められた。

表2 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の染色体異常試験・
細胞増殖率測定の結果(本試験)(SR15148)

RICC (%)						
試験群	S9-		S9+		S9-	
	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	6-18 h (平均値)	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	6-18 h (平均値)	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	24-0 h (平均値)
ジメチルスルホ キシド	—	90.1 , 109.9 (100.0)	—	103.5 , 96.5 (100.0)	—	106.5 , 93.5 (100.0)
1,2,4,5-ベン ゼンテトラ カルボン酸 無水物	300	82.3 , 99.5 (90.9)	300	98.5 , 76.4 (87.5)	100	110.2 , 100.2 (105.2)
	400	81.3 , 77.1 (79.2)	400	91.5 , 116.6 (104.1)	200	104.6 , 82.4 (93.5)
	500	64.1 , 32.8 (48.5)	500	51.3 , 46.2 (48.8)	300	80.6 , 86.1 (83.4)
	600 #	9.4 , 4.2 (6.8)	600 #	43.2 , 21.1 (32.2)	400	65.8 , 81.7 (73.8)
	700 #	0.0 , 0.0 (0.0)	700 #	26.1 , 8.0 (17.1)	500	51.0 , 41.0 (46.0)
マイトマイシンC	0.1	71.9 , 69.3 (70.6)	—	—	0.05	68.8 , 54.0 (61.4)
3,4-ベンゾピレ ン	—	—	10	68.3 , 41.2 (54.8)	—	—

RICC: Relative increase in cell counts

被験物質処理開始時および終了時に被験物質の析出はみられなかった。

: 被験物質処理開始時に培養液pHの低下が認められた。

表 3-1 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の染色体異常試験の結果 (短時間処理法 -S9処理) (SR15148)

処理時間- 回復時間 (hours)	S9	試験詳	用量 (µg/mL)	RICC (%)	観察 細胞数	構造異常を有する細胞					観察 細胞数	gap	数的異常を有する細胞		判定 ^a			
						ctb	cte	csb	cse	others			総異常細胞数 (%)	poly		others	総異常細胞数 (%)	
6-18	-	DMSO	—	100.0	150	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	-	
					150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		1
					300	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1		0
			150	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	-	
			150	1	1	0	0	0	2	0	0	2	0	1	0	1		
			300	1	2	0	0	0	3	0	0	3 (1.0)	0	1	0	1 (0.3)		
	150	2	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0	2				
	150	3	0	1	0	0	3	0	0	3	0	3	0	3				
	300	5	0	1	0	0	5	0	0	5 (1.7)	0	5	0	5 (1.7)				
	150	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	3	1	4				
	150	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	6	0	6				
	300	1	0	0	1	0	2	0	0	2 (0.7)	0	9	1	10 (3.3)				
			600 *	6.8	観察対象外													
			700 *	0.0	観察対象外													
		マイトマイシンC	0.1	70.6	150	20	48	2	2	0	68	0	0	0	0	0	+	
				150	19	59	3	1	0	71	0	0	0	0	0			
				300	39	107	5	3	0	139 (46.3)	0	0	0	0	0 (0.0)			

ctb, 染色体切断 cte, 染色体交換 csb, 染色体切断 cse, 染色体交換 gap, ギャップ poly, 倍数体 others, その他

RICC : Relative increase in cell counts

DMSO: ジメチルスルホキシド

a: 染色体の構造異常と数的異常の出現率による判定; -, 陰性 +, 陽性

被験物質の処理開始時および終了時に被験物質の析出はみられなかった。

*: 被験物質の処理開始時に培養液のpHの低下が認められた。

表 3-2 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の染色体異常試験の結果 (短時間処理法 +S9処理) (SR15148)

処理時間- 回復時間 (hours)	S9	試験群	用量 (µg/mL)	RICC (%)	観察 細胞数	構造異常を有する細胞					観察 細胞数	数的異常を有する細胞		判定 ^a			
						ctb	cte	csb	cse	others		総異常細胞数 (%)	gap		poly	others	総異常細胞数 (%)
6-18	+	DMSO	—	100.0	150	1	0	1	0	0	1	0	150	0	0	0	-
					150	2	0	1	1	0	2	150	0	0	0		
					300	3	0	2	1	0	3	300	0	0	0	(0.0)	
			150	0	0	0	1	0	1	150	0	1	0	1			
			150	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0	0			
			300	0	0	0	1	0	1	300	0	1	0	1	(0.3)		
	-		1,2,4,5-ベンゼンテ トラカルボン酸無水 物	400	104.1	150	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0	-
						150	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0	
						300	0	0	0	0	0	0	300	0	0	0	
				150	0	0	0	0	0	0	150	3	0	3	0		
				150	0	0	0	0	0	0	150	0	0	0	0		
				300	0	0	0	0	0	0	300	3	0	3	0	3	
			600 *	32.2	観察対象外												
			700 *	17.1	観察対象外												
		3,4-ベンゾピレン	10	54.8	150	17	78	4	1	0	89	150	0	0	0	+	
150	18				62	4	1	0	73	150	0	0	0				
300	35				140	8	2	0	162	300	0	0	0	0	0		(0.0)

ctb, 染色体切断 cte, 染色分体交換 csb, 染色体切断 cse, 染色分体交換 gap, ギャップ poly, 倍数体 others, その他

RICC: Relative increase in cell counts

DMSO: ジメチルスルホキシド

a: 染色体の構造異常と数的異常の出現率による判定; -, 陰性 +, 陽性

被験物質の処理開始時および終了時に被験物質の析出はみられなかった。

*: 被験物質の処理開始時に培養液のpHの低下が認められた。

表 3-3 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の染色体異常試験の結果 (連続処理法 24時間処理) (SR15148)

処理時間- 回復時間 (hours)	S9	試験群	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	RICC (%)	観察 細胞数	構造異常を有する細胞					観察 細胞数	数的異常を有する細胞		判定 ^a				
						ctb	ctc	csb	cse	others		総異常細胞数 (%)	gap		poly	others	総異常細胞数 (%)	
24-0	-	DMSO	—	100.0	150	2	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0	-	
					150	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0		0
			300	4	0	2	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	(0.0)
			観察対象外															
			観察対象外															
			300	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
	300	1	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	(0.0)	
	150	2	1	1	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	2		
	150	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
	300	2	2	1	0	0	0	0	0	4	0	0	2	0	0	2	(0.7)	
	150	2	1	1	0	0	0	0	0	3	0	0	6	0	0	6		
150	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	2			
300	4	1	1	0	0	0	0	0	5	0	0	8	0	0	8	(2.7)		
150	27	57	3	0	0	0	0	0	82	0	0	1	0	0	1			
150	22	42	4	0	0	0	0	0	65	0	0	0	0	0	0			
300	49	99	7	0	0	0	0	0	147	0	0	1	0	0	1	(0.3)		

ctb, 染色体切断 ctc, 染色体交換 csb, 染色体切断 cse, 染色体交換 cte, ギャップ gap, 倍數体 poly, others, その他

RICC : Relative increase in cell counts

DMSO : ジメチルスルホキシド

a : 染色体の構造異常と数的異常の出現率による判定; -, 陰性 +, 陽性

被験物質の処理開始時および終了時に被験物質の析出はみられなかった。

被験物質の処理開始時および終了時に培養液のpHへの影響はみられなかった。

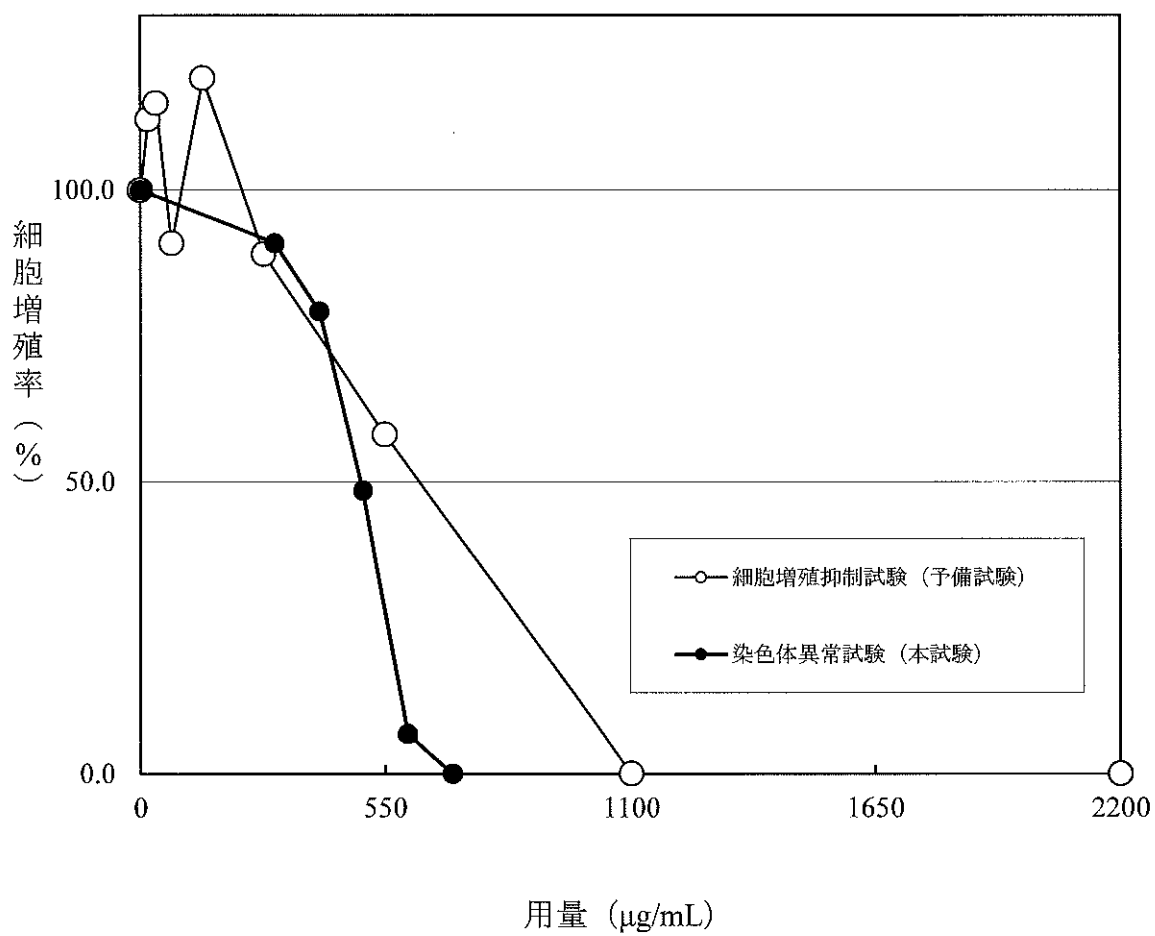


図1 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の細胞増殖率の結果 (短時間処理法 -S9処理) (SR15148)

各ポイントは RICC (Relative increase in cell counts) の2つの値の平均値を表す。

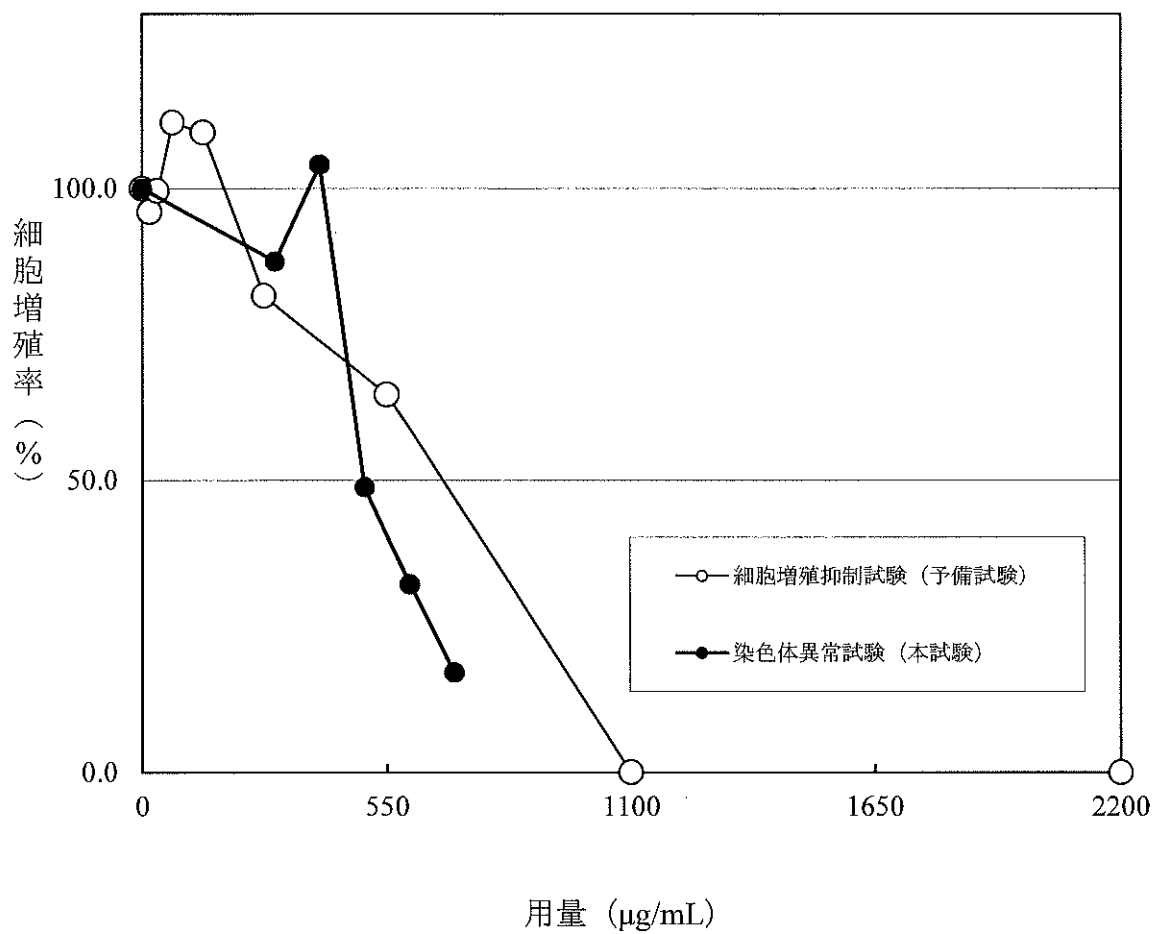


図2 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の細胞増殖率の結果 (短時間処理法+S9処理) (SR15148)

各ポイントはRICC (Relative increase in cell counts) の2つの値の平均値を表す。

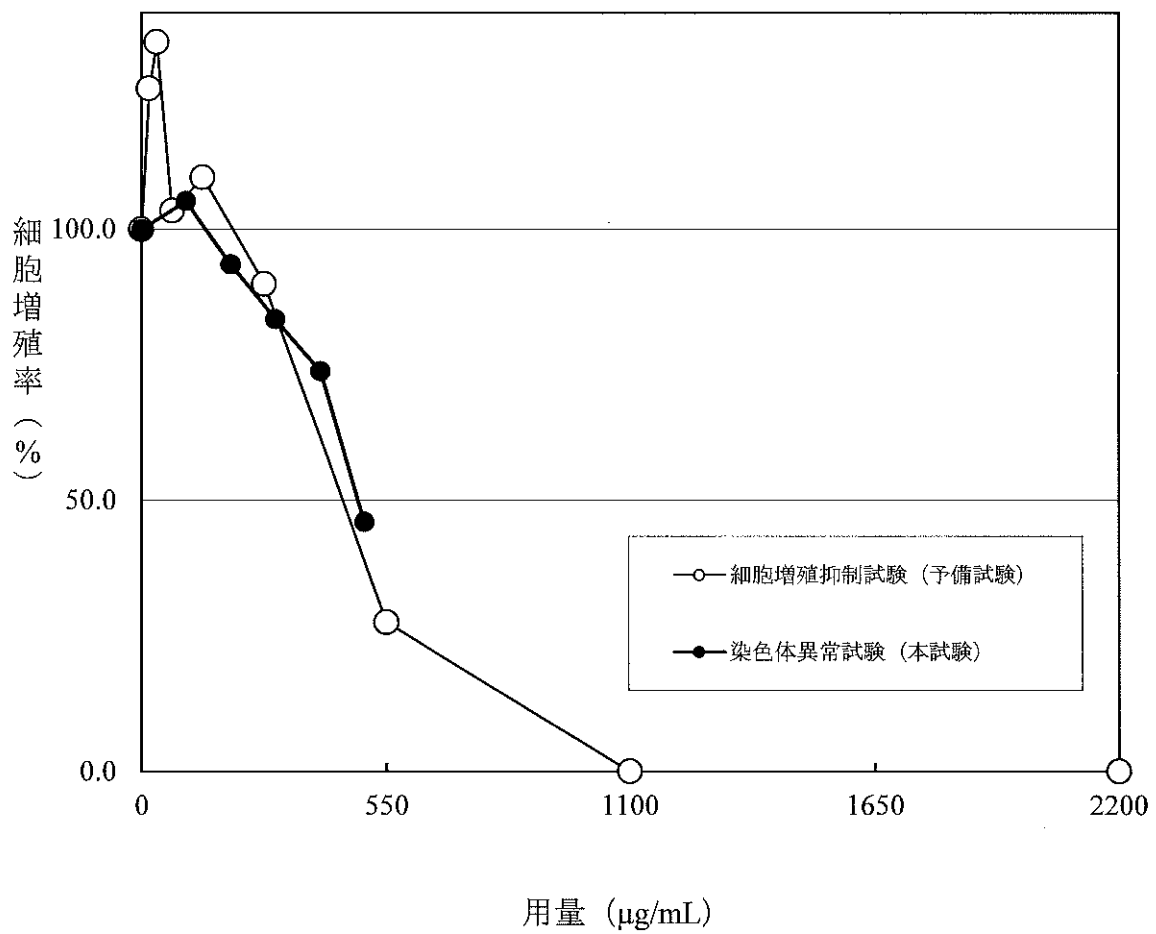


図3 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の細胞増殖率の結果 (連続処理法24時間処理) (SR15148)

各ポイントはRICC (Relative increase in cell counts) の2つの値の平均値を表す。

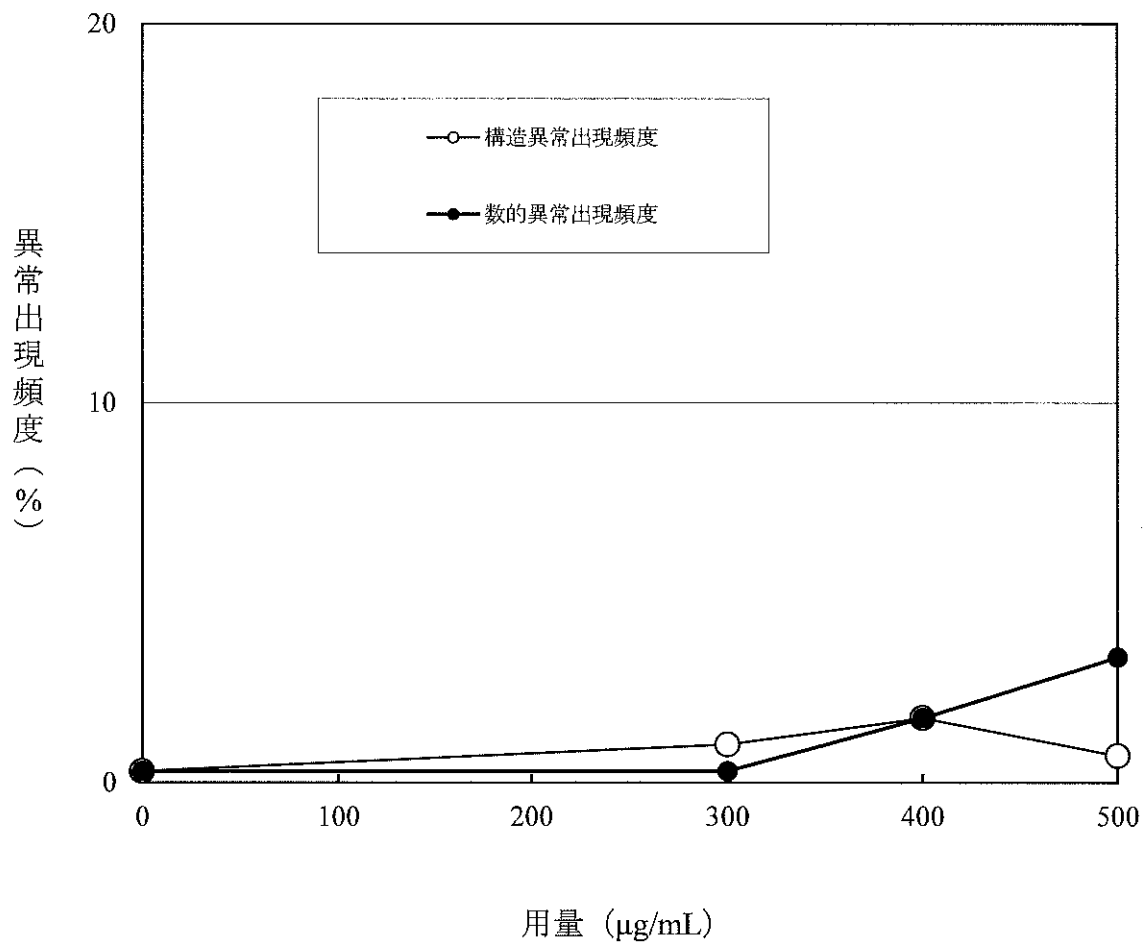


図4 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の異常出現頻度 (短時間処理法 -S9処理) (SR15148)

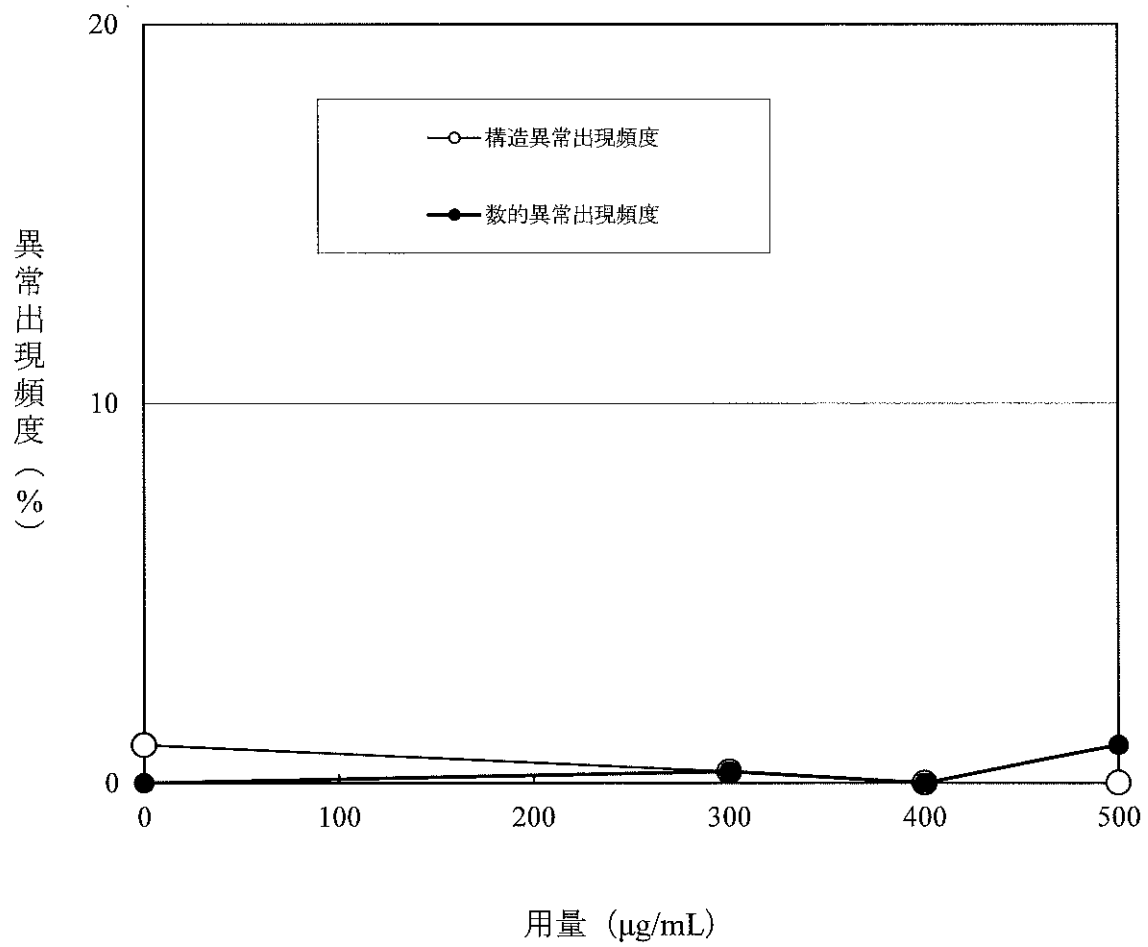


図5 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の異常出現頻度 (短時間処理法+S9処理) (SR15148)

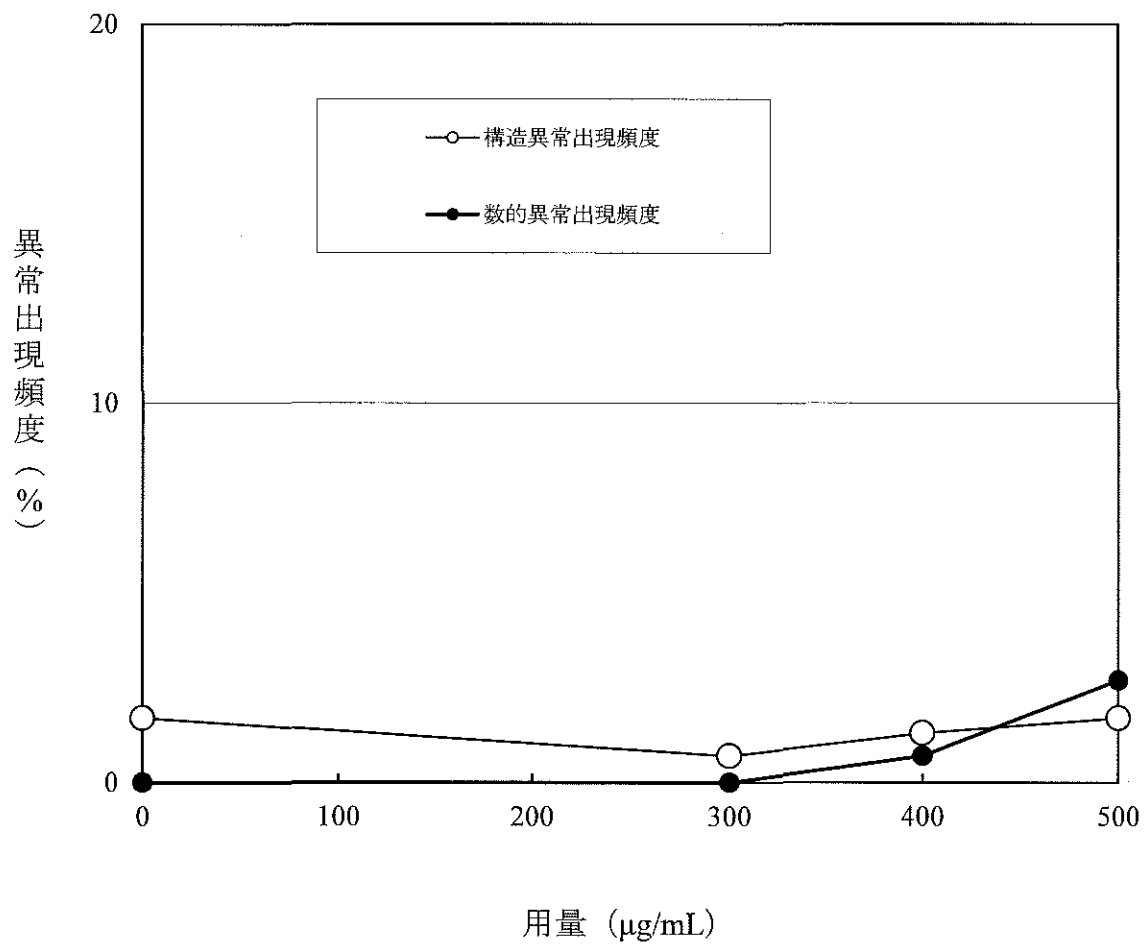


図6 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸無水物の異常出現頻度 (連続処理法24時間処理) (SR15148)