

M-1310

最終報告書

試験名：4-ヒドロキシジフェニルメタンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：M-1310

報告日：2010年5月20日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

本資料は原本から複写したものに相違ありません。

株式会社 ボゾリサーチセンター

試験責任者： XXXXXXXXXX

日付：2010年5月26日

6.6	試験方法 ¹⁻⁵⁾	18
6.6.1	識別方法	19
6.6.2	用量の設定	19
6.6.3	細胞増殖抑制試験	20
6.6.4	染色体異常試験	21
6.6.5	確認試験	22
6.6.6	標本の観察	23
6.6.7	染色体異常の分類	23
6.6.8	判定基準	24
7.	試験結果	25
7.1	細胞増殖抑制試験	25
7.1.1	短時間処理法	25
7.1.2	連続処理法	25
7.2	染色体異常試験	26
7.2.1	短時間処理法	26
7.2.2	連続処理法	27
7.3	確認試験	27
8.	考察	29
9.	参考文献	30
Attached Data 1	試験成績書	31
Attached Data 2	4-ヒドロキシジフェニルメタンの安定性試験成績書	32
Attached Data 3	Background Data in the Testing Facility	33

Figures and Tables

Fig. 1-1	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Short-term treatment: +S9 mix]
Fig. 1-2	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Short-term treatment: -S9 mix]
Fig. 1-3	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Continuous treatment: 24 hr]
Fig. 1-4	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Continuous treatment: 48 hr]
Fig. 2-1	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese

	hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Short-term treatment: +S9 mix]
Fig. 2-2	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Short-term treatment: -S9 mix]
Fig. 2-3	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Continuous treatment: 24 hr]
Fig. 2-4	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Continuous treatment: 48 hr]
Fig. 2-5	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Confirmation test: 48 hr]
Table 1-1	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 1-2	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Short-term treatment: -S9 mix]
Table 1-3	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Continuous treatment: 24 hr]
Table 1-4	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Continuous treatment: 48 hr]
Table 2-1	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 2-2	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Short-term treatment: -S9 mix]
Table 2-3	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Continuous treatment: 24 hr]
Table 2-4	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane

M-1310

Table 2-5	[Continuous treatment: 48 hr] Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Confirmation test: 48 hr]
Table 3-1	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 3-2	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Short-term treatment: -S9 mix]
Table 3-3	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Continuous treatment: 24 hr]
Table 3-4	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Continuous treatment: 48 hr]
Table 3-5	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane [Confirmation test: 48 hr]

M-1310

2. 試験実施概要

2.1 試験計画書

試験番号 : M-1310
試験表題 : 4-ヒドロキシジフェニルメタンのほ乳類培養細胞を用いる
染色体異常試験

2.2 試験目的

ほ乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞株）を用いて、本被験物質の染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

2.3 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

2.4 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

2.5 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284
運営管理者 XXXXXXXXXX

2.6 被験物質

製造者 : 東京化成工業株式会社
名称 : 4-ヒドロキシジフェニルメタン
受領日 : 2008年 1月 24日
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

2.7 試験日程

試験開始日 : 2008年 2月 21日
実験開始日 : 2008年 3月 14日
細胞増殖抑制試験 : 2008年 3月 14日
染色体異常試験
短時間処理法 : 2008年 3月 28日
連続処理法 : 2008年 4月 11日

確認試験 : 2008年4月25日
実験終了日 : 2008年5月13日
試験終了日 : 2010年5月20日

2.8 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所 研究部

2.9 試験担当者

被験物質保存責任者 :
試験主担当者 :
試験担当者 :

2.10 試験の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

染色体異常試験において、連続処理法の24時間処理で、染色体標本を作製する際に誤って次用量(28.9 µg/mL、ディッシュ識別番号24-2-①、Slide No.63)の回収培養液中に最高用量(57.8 µg/mL、ディッシュ識別番号24-1-①、Slide No.12)の細胞液を回収した。しかしながら、Slide No.12のTAは4%を示し、対となる最高用量のSlide No.78(TA6%)と同様に僅かな染色体構造異常頻度の増加があることを示しており、同用量群の判定も疑陽性で、連続処理法の48時間処理や、確認試験において確認された本被験物質の染色体構造異常誘発性を判定する上において、問題はなかったものと考えられた。

染色体異常試験の確認試験(連続処理法48時間処理)において、試験方法を定めた試験計画書変更書(4)で陽性対照物質MMCの添加量を150 µLと記したが、これは誤植であり、実際には試験施設において連続処理法・48時間処理で常用されている100 µLを添加した。生データ等からもこれらの事実は確認できること及び確認試験の陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現率(%)は、わずかに高値であったものの施設の背景値とほぼ同様であったことから、問題はなかったものと考えられた。

その他に、試験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。

2.11 資料保存

試験計画書(試験計画書変更書を含む)原本、記録文書、生データ、染色体標本及び報告書類(最終報告書は原本)は株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所の資料保存施設に保存する。なお、その期間は最終報告書提出後10年間とする。期間終了後の保存については、厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室と株式会社ボゾリサーチセンター間で協議し、その処置を決定する。

M-1310

2.12 試験責任者の署名又は記名・捺印



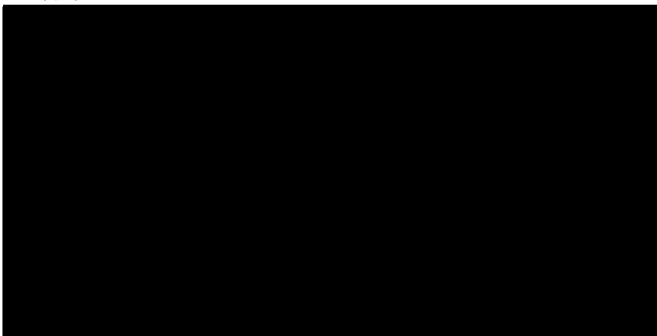
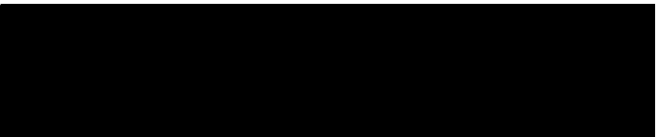
2010年5月20日



M-1310

3. 試験従事者一覧

被験液の調製 :
細胞の播種 :
被験物質の処理 :
細胞増殖抑制率測定用標本の作製 :
細胞増殖抑制率測定 :
染色体観察用標本の作製 :
染色体標本のコード化 :
染色体標本観察 :



4. 要約

4-ヒドロキシジフェニルメタ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、短時間処理法の代謝活性化では 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、非代謝活性化では 57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 28.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、それぞれ 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 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下と推測され、非代謝活性化では 32.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 24.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48 時間処理では 26.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「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」との規定から、短時間処理法の代謝活性化では、最低用量の 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても細胞増殖を 50% 以上抑制しない用量が求められなかったが、14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における細胞増殖抑制率が 67% と、50% の近傍の値を示したことから、14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、以下、公比 2 で希釈した計 4 用量を設定した。短時間処理法の非代謝活性化では 57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、以下、公比 2 で希釈した計 4 用量を設定した。また、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では、28.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における細胞増殖抑制率が、それぞれ 58% 及び 54% と低かったことから、57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、以下、公比 2 で希釈した計 4 用量を設定した。

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及び非代謝活性化では、いずれの用量においても陰性の判定基準である 5% 未満であった。これに対し、連続処理法では、24 時間処理において最高用量の 57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のみで、TA が疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を、48 時間処理では最高用量の 57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 1 用量のみで、陽性の判定基準である 10% 以上を示した。そこで、連続処理法の 48 時間処理について、最高用量を 57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、確認試験を実施した。その結果、48 時間処理における TA は、57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 30.0%、48.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 17.0%、40.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 11.5%、33.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 4.5% 及び 27.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 4.5% と、57.8~40.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 用量において、陽性の判定基準である 10% 以上を示し、明らかな用量依存性が認められた。しかしながら、連続処理法の 48 時間処理及び確認試験ともに陽性と判定された用量域では細胞増殖率 (%) が低かったことから、4-ヒドロキシジフェニルメタンの染色体構造異常誘発性は非特異的なものと考えられ、総合的に陰性と判定した。一方、染色体異常試験の結果、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、4-ヒドロキシジフェニルメタンの染色体数的異常誘発性は、総合的に陰性と判定した。

M-1310

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えられた。

以上の結果から、4-ヒドロキシジフェニルメタ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ともに誘発しないと結論した。

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、4-ヒドロキシジフェニルメタン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。

5-1. 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
保企発第 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)

5-2. 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
保企発第 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)

M-1310

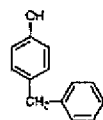
6. 試験材料及び方法

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）。

供給者	:	厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
製造者	:	東京化成工業株式会社
名称	:	4-ヒドロキシジフェニルメタン
別称	:	4-ベンジルフェノール
英名称	:	4-Hydroxydiphenylmethane、alpha-Phenyl-p-cresol
英別称	:	4-Benzylphenol
ロット番号	:	C770A
CAS 番号	:	101-53-1
化学構造式	:	



分子量	:	184.23
純度	:	99.8%
融点	:	84.9°C
性状	:	褐色粉末
入手量	:	25 g
安定性	:	実験終了後に、株式会社ボゾリサーチセンター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	:	実験終了後、被験物質の残余物は、安定性測定のため A-2283 に移管した。

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 19 mg/mL で不溶、DMSO には 190 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 0.3700 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 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 0.3700 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 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 10 段階希釈し、92.5、46.3、23.1、11.6、5.78、2.89、1.45、0.723、0.361 及び 0.181 mg/mL の 11 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では 1.45 から 0.181 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では 5.78 から 0.723 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 0.3700 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 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 8 段階希釈し、92.5、46.3、23.1、11.6、5.78、2.89、1.45 及び 0.723 mg/mL の 9 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、5.78 から 0.723 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を用いた。

3) 確認試験

確認試験（連続処理法 48 時間処理）では、被験物質 0.3700 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 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 32（被験液 0.1 mL：溶媒 3.1 mL）で希釈し、5.78 mg/mL の被験液を調製した。更に、5.78 mg/mL 被験液を公比 1.2（各濃度の被験液 2 mL：溶媒 0.4 mL）で順次 4 段階希釈し、4.82、4.01、3.35 及び 2.79 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。

M-1310

試験には 5.78 から 2.79 mg/mL 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。

6.3 対照物質

6.3.1 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。

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 K7192) 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 K7192) 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）。

確認試験（連続処理法48時間処理）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）。

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2004年11月2日に入手した。入手後、ジメチルスルホキシドを10v/v%添加した培養液に細胞を懸濁し、液体窒素中で大量に凍結保存した。試験に際しては、その一部を解凍後、再培養を開始し、継代培養を行ったものについて細胞の性状検査（6.4.4）を定期的実施して、適正であることが確認されたものを試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では6継代、染色体異常試験の短時間処理法では10継代、染色体異常試験の連続処理法では14継代、確認試験（連続処理法）では18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

試験に使用する細胞は、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~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。細胞は、30 継代を越えない範囲で試験に供した。

6.5 S9 mix 及び培養液

6.5.1 S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社より購入した S9 と、自家調製を行ったコファクターを用時に混合して S9 mix を調製した。本試験に用いた S9 の製品分析書に示された情報、保存条件及び使用期限とコファクターの保存条件、使用期限及び S9 mix の組成は以下の通りである。

1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	07113009
製造日	:	2007年11月30日
種・系統	:	ラット・SD系
性	:	雄
週齢	:	7週齢
誘導物質	:	フェノバルビタール(PB)及び5,6-ベンゾフラボン(BF)
投与方法	:	腹腔内投与
投与期間及び投与量	:	PB 4日間 30+60+60+60 mg/kg body weight BF 1日 80 mg/kg body weight
保存方法	:	冷凍(超低温フリーザー)
使用期限	:	2008年5月29日(製造後6箇月)
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) 補酵素

名称	:	コファクター
ロット番号	:	071227
製造日	:	2007年12月27日
保存方法	:	冷凍(超低温フリーザー)
使用期限	:	2008年6月26日(製造後6箇月)
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

3) S9 mix の組成

S9	2 mL		
補酵素	4.7 mL	20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40mmol/L 酸化型ニコチンアミドアデニン	

ジヌクレオチドリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
精製水	0.67 mL

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と同様になるように各成分の必要量を秤取し、精製水に溶解、pH調整、ろ過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

6.5.2 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No. 11095-080) に、Invitrogen Corporation より購入し非働化 (56°C, 30 分) した牛血清 (BS) を 10 vol% 添加して調製した培養液 (BS-MEM) を用いた。調製後の BS-MEM は冷蔵保存した。

1) 牛血清

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	: 366167、389953
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。染色体異常試験において、連続処理法の 24 時間処理で、最高用量のみで疑陽性と判定され、さらに 48 時間でも、最高用量のみで陽性と判定されたことから、確認試験 (連続処理法 48 時間処理) を実施した。

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
3. 確認試験	連続処理法	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。

3) 確認試験

染色体異常試験と同様に明記したラベルで識別した。

6.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 1850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10mM 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、非代謝活性化では 57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 28.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、それぞれ 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 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、非代謝活性化では 32.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 24.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48 時間処理では 26.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「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」との規定から、短時間処理法の代謝活性化では 14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を、非代謝活性化では 57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、以下、公比 2 で希釈した計 4 用量を、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として、以下、公比 2 で希釈した計 4 用量を設定し、被験液の調製方法を定めた。なお、短時間処理法の代謝活性化では、細胞増殖抑制試験で設定した最低用量 (14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) においても細胞増殖を 50% 以上抑制しない用量が求められなかったが、14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における細胞増殖抑制率が 67% と、50% の近傍を示したことから、14.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として定めた。また、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では、28.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における細胞増殖抑制率が、それぞれ 58% 及び 54% と低かったことから、57.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量に定めた。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。

3) 確認試験

染色体異常試験の連続処理法において、染色体構造異常の出現率 (TA) が、24 時間処理では 57.8 µg/mL で疑陽性、48 時間処理では 57.8 µg/mL で陽性と判定され、試験計画書に定めた確認試験実施要件の 3) 被験液の最高用量のみが陽性を示す場合に該当する結果であったため、確認試験(連続処理法 48 時間処理)を実施することとし、57.8 µg/mL を最高用量に定め、以下、公比 1.2 で希釈した 48.2、40.1、33.5 及び 27.9 µg/mL の計 5 用量を設定した。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 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、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。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 0.050 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 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、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 箇所点滴した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞点滴後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- (5) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で

18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（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 箇所点滴した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞点滴後、約 1~2 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。
- (4) 残る各群 2 枚のプレートは、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、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

6.6.5 確認試験

1) 連続処理法 48 時間処理

- (1) 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

μg/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、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 μg/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(2)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を作製した。
- (4) 残る各群2枚のプレートは、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を作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

6.6.6 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。

6.6.7 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) : 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。
- 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つ

で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）

6.6.8 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

代謝活性化では最低用量の 14.5 µg/mL 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 14.5 µg/mL 以下であった。非代謝活性化では 57.8 µg/mL 以上の用量で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は 32.0 µg/mL であった。

2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、変化は認められなかった。被験物質の添加に伴う析出は、代謝活性化では 231 µg/mL 以上の用量で、非代謝活性化では 463 µg/mL 以上の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質によると思われる析出は、代謝活性化では 231 µg/mL 以上の用量で、非代謝活性化では 925 µg/mL 以上の用量で認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では、231 µg/mL 以上の用量で細胞の剥離・死滅が認められたため TOX と判定し、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。非代謝活性化では、すべて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 時間処理法では 28.9 µg/mL 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は 24.1 µg/mL であった。また、48 時間処理法では 28.9 µg/mL 以上の用量で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は 26.6 µg/mL であった。

2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、変化は認められなかった。被験物質添加に伴う析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、463 µg/mL 以上の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質の析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、925 µg/mL 以上の用量で認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群

と比較すると、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、すべての用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.2 染色体異常試験

7.2.1 短時間処理法

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

1) 被験物質添加直後の観察

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

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質の析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、認められなかった。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では、7.23 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。非代謝活性化では、14.5 µg/mL の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現率(TA)は、短時間処理法の代謝活性化では 14.5 µg/mL では 3.5%、7.23 µg/mL では 0%、3.61 µg/mL では 1.0%及び 1.81 µg/mL では 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、非代謝活性化においては、57.8 µg/mL では 0%、28.9 µg/mL では 0.5%、14.5 µg/mL では 0%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。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は試験施設の背景値 (Attached Data 3) よりも僅かに高く、細胞がやや hypersensitive の状態にあったと推測されるものの、陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

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

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、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

7.2.2 連続処理法

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

1) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、24時間処理及び48時間処理ともに、変化は認められなかった。被験物質添加に伴う析出は、24時間処理及び48時間処理ともに、認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24時間処理及び48時間処理ともに、すべての用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。被験物質の析出は、24時間処理及び48時間処理ともに、認められなかった。

3) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現率(TA)は、連続処理法の24時間処理では57.8 µg/mLで5.0%、28.9 µg/mLで1.0%、14.5 µg/mLで0.5%及び7.23 µg/mLでは0.5%と、57.8 µg/mLで疑陽性の判定基準である5%以上10%未満を示し、その他の用量では陰性の判定基準である5%未満であった。48時間処理においては、57.8 µg/mLでは22.0%、28.9 µg/mLでは4.5%、14.5 µg/mLでは1.5%及び7.23 µg/mLでは0.5%と、57.8 µg/mLで陽性の判定基準である10%以上を示し、その他の用量では陰性の判定基準である5%未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 3)と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は24時間処理では試験施設の背景値内(Attached Data 3)であったものの、48時間処理では背景値よりも僅かに高く、細胞がややhypersensitiveの状態にあったと推測されるが、陽性の判定基準内であった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常(倍数体)の出現率は、24時間処理では57.8 µg/mLでは0%、28.9 µg/mLでは0.5%、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。また、48時間処理では57.8 µg/mLでは0%、28.9 µg/mLでは0.5%、14.5 µg/mLでは0%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。

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、また試験施設の背景値(Attached Data 3)と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

7.3 確認試験

48時間処理の結果を Fig. 2-5、Table 2-5 及び Table 3-5 に示した。

1) 被験液添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、変化は認められなかった。被験物質添加に伴う析出は、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

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、すべての用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。被験物質の析出は、すべての用量で認められなかった。

3) 構造異常

48時間処理におけるTAは、57.8 µg/mLで30.0%、48.2 µg/mLで17.0%、40.1 µg/mLで11.5%、33.5 µg/mLで4.5%及び27.9 µg/mLで4.5%と、57.8~40.1 µg/mLの3用量において、陽性の判定基準である10%以上を示し、明らかな用量依存性が認められた。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、陽性対照群においては背景値よりも僅かに高く、細胞がややhypersensitiveの状態にあったと推測されるが、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) 数的異常

数的異常(倍数体)の出現率は、48時間処理法では57.8 µg/mLでは0%、48.2 µg/mLでは0%、40.1 µg/mLでは0%、33.5 µg/mLでは0%及び27.9 µg/mLでは0%と陰性の判定基準である5%未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

8. 考察

染色体異常試験において、染色体構造異常の総出現率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及び非代謝活性化では、いずれの用量においても陰性の判定基準内にあったが、連続処理法では、24 時間処理及び 48 時間処理において、それぞれ最高用量のみで疑陽性及び陽性判定基準内の値を示した。確認試験を連続処理法の 48 時間処理によって実施した結果、3 用量において明らかな用量依存性を伴う、陽性の判定基準にある TA の増加が認められた。更に、染色体異常試験の連続処理法と確認試験の間に、結果の再現性が認められた。しかしながら、連続処理法の 48 時間処理及び確認試験ともに陽性と判定された用量域では細胞増殖率 (%) が低かったことから、4-ヒドロキシジフェニルメタンの染色体構造異常誘発性は非特異的なものと考えられ、総合的に陰性と判定した。一方、染色体異常試験の結果、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、4-ヒドロキシジフェニルメタンの染色体数的異常誘発性は、総合的に陰性と判定した。

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

4-ヒドロキシジフェニルメタンの類縁物質である 1,3-Benzenediol 及び 1,4-Benzenediol は、ヒトリンパ球由来の HL-60 培養細胞において小核を増加させると報告されている⁶⁾。また、同様に類縁物質の 2-cresol は、培養ヒト線維芽細胞において姉妹染色分体交換を増加させると報告されている⁷⁾が、4-cresol についての報告は認められない。また、母核である benzene に関しては多くの報告があるが、げっ歯類の骨髄細胞において染色体異常及び小核を誘発するとの報告⁸⁾や、マウスに吸入させた場合、精子細胞に染色体異常を、精母細胞に姉妹染色分体交換をそれぞれ誘発するとの報告⁹⁾がある。

以上の結果から、4-ヒドロキシジフェニルメタ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ともに誘発しないと結論した。

9. 参考文献

- 1) 石館基監修 (1987) : <改訂>染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー、東京
- 2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, **48**, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutation Res.*, **66**, 277-290
- 4) 石館 基 (1982) : ほ乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), *日本化粧品科学会誌*, **6**, 31-43
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271
- 6) Robertson ML, Eastmond DA, Smith MT (1991): Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes, *Mutation Res.*, **249**, 201-209
- 7) Cheng M (1984): Evaluation of the genotoxicity of cresols using sister-chromatid exchange, *Mutation Res.*, **137**, 51-55
- 8) Shelby MD (1988): The genetic toxicity of human carcinogens and its implications, *Mutation Res.*, **204**, 3-15
- 9) Au WW, Cantelli-Forti G, Hrelia P, Legator MS (1990): Cytogenetic assays in genotoxic studies: somatic cell effects of benzene and germinal cell effects of dibromochloropropane, *Teratog. Carcinog. Mutagen* **10**, 125-134




Attached Data 1

M-1310

試験成績書

2008年01月23日

東京化成工業株式会社 品質保証課
 〒103-0023
 東京都中央区日本橋本町4丁目10
 TEL: 03(5640)8860 FAX: 03(5640)8861

製品名: 4-Benzylphenol					
製品コード: H0239	等級: EP	製品ロット: C770A	判定: 合格		

項目	結果	規格値
純度(GC)	99.8 %	98.0 %以上
融点	84.9 deg-C	83.0 ~ 86.0 deg-C
メタノール溶状	澄明	ほとんど澄明以内

4-ヒドロキシジフェニルメタンの安定性試験成績書

試験番号 : A-2283
 試験実施施設 : 株式会社ボソリサーチセンター 御殿場研究所
 測定日 : 2010年3月17日
 測定法 : HPLC

 被験物質 : 4-ヒドロキシジフェニルメタン (ロット番号; C770A)
 使用試験番号 : M-1310
 測定対象物質 : 4-ヒドロキシジフェニルメタン

 保存期間 : 2008年1月24日 (入手日) ~2010年3月17日


 判定基準 : 4-ヒドロキシジフェニルメタン (ロット番号; C770A) の純度が、東京化成工業株式会社より発行されている成績書の規格値 (95.0%以上) を満たすこと。

結果 :

4-ヒドロキシジフェニルメタンのピーク面積 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	総類縁物質の合計ピーク面積 ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	総類縁物質 (%)	純度 (%)
36261558	33714	0.1	99.9
36191687	32888	0.1	99.9
36405759	34184	0.1	99.9

判定 : 測定結果は全て純度 99.9%であり、規格値を満たした。

基準 : 「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、環保企発第 031121004 号、平成 20 年 7 月 4 日最終改正)

試験責任者 :  2010年3月19日

Background data of chromosome aberration tests in cultured Chinese hamster cells, based on 5 recent studies carried out under the same conditions at Bozo Research Center Inc.

Period for NC : July-2005 – October-2007

Treatment		Cells observed	Polyploide cells(%)	Number of aberration								
S9 mix	Time			g	ctb	cte	csb	cse	other	TA	TAG	
NC	+	6-18	1000	(7)	(1)	(2)	(0)	(0)	(1)	(0)	(3)	(4)
			%	0.7	0.1	0.2	0.0	0.0	0.1	0.0	0.3	0.4
			Min(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			Max(%)	1.5	0.5	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	1.0
	-	6-18	1000	(3)	(0)	(1)	(2)	(0)	(1)	(0)	(4)	(4)
			%	0.3	0.0	0.1	0.2	0.0	0.1	0.0	0.4	0.4
			Min(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
			Max(%)	1.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.5	0.0	0.5	0.5
	-	24-0	1000	(1)	(5)	(2)	(4)	(0)	(0)	(0)	(6)	(11)
			%	0.1	0.5	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0	0.6	1.1
			Min(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
			Max(%)	0.5	1.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.5
-	48-0	1000	(2)	(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(3)	
		%	0.2	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	
		Min(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
		Max(%)	1.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	

Period for PC : September-2007 – March-2008

PC	+	6-18	1000	(0)	(0)	(52)	(415)	(2)	(0)	(0)	(449)	(449)
			%	0.0	0.0	5.2	41.5	0.2	0.0	0.0	44.9	44.9
			Min(%)	0.0	0.0	1.5	25.0	0.0	0.0	0.0	29.5	29.5
			Max(%)	0.0	0.0	10.5	55.5	1.0	0.0	0.0	58.5	58.5
	-	6-18	1000	(3)	(1)	(58)	(227)	(0)	(0)	(0)	(277)	(278)
			%	0.3	0.1	5.8	22.7	0.0	0.0	0.0	27.7	27.8
			Min(%)	0.0	0.0	3.0	15.5	0.0	0.0	0.0	22.5	22.5
			Max(%)	0.5	0.5	9.0	31.5	0.0	0.0	0.0	35.5	36.0
	-	24-0	1000	(3)	(0)	(73)	(270)	(1)	(0)	(0)	(331)	(331)
			%	0.3	0.0	7.3	27.0	0.1	0.0	0.0	33.1	33.1
			Min(%)	0.0	0.0	3.5	21.5	0.0	0.0	0.0	26.5	26.5
			Max(%)	1.0	0.0	14.0	32.5	0.5	0.0	0.0	39.0	39.0
-	48-0	1000	(1)	(0)	(97)	(509)	(2)	(3)	(0)	(559)	(559)	
		%	0.1	0.0	9.7	50.9	0.2	0.3	0.0	55.9	55.9	
		Min(%)	0.0	0.0	4.5	43.5	0.0	0.0	0.0	48.5	48.5	
		Max(%)	0.5	0.0	17.5	53.5	1.0	1.5	0.0	61.5	61.5	

(): number of observed.

Negative control(NC) : dimethylsulfoxide(DMSO)

Positive control(PC) : CP ; Cyclophosphamide, 14 µg/mL

MMC ; Mitomycin C, 0.075 µg/mL (used for the short-term treatment)

MMC ; Mitomycin C, 0.050 µg/mL (used for the continuous treatment)

S9 mix : + ; with metabolic activation - ; without metabolic activation

Time : treatment hours - hours of incubation without test article

Max(%) and Min(%) : maximum and minimum data of these studies where each study was taken into consideration

Aberration :

g ; gap (chromatid and chromosome gap)

ctb ; chromatid break

cte ; chromatid exchange

csb ; chromosome break

cte ; chromosome exchange

other ; fragmentation etc.

TA : total number of cells with aberrations excluding gaps

TAG : total number of cells with aberrations including gaps

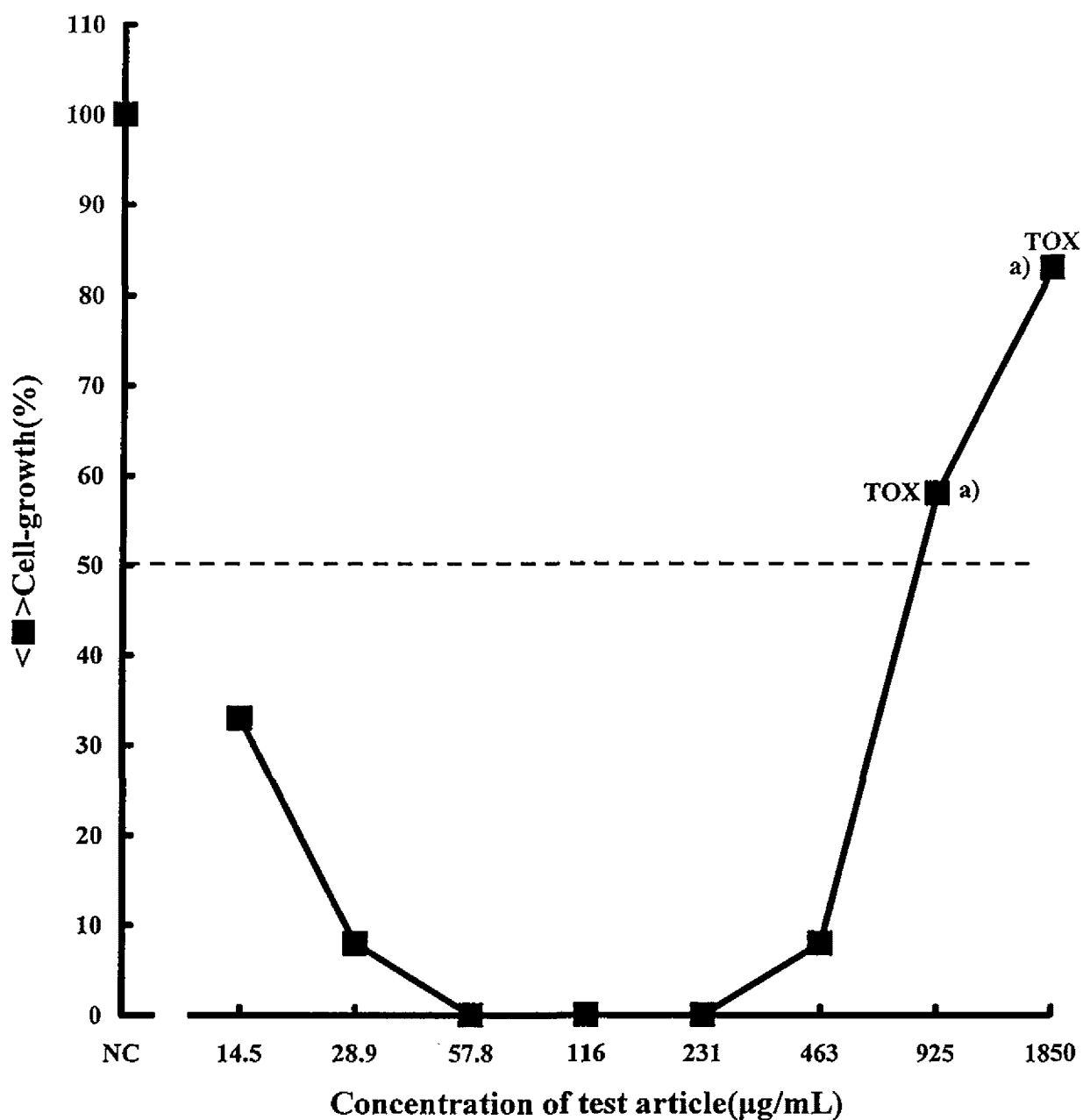


Fig. 1-1

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

a) These values were judged to be unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

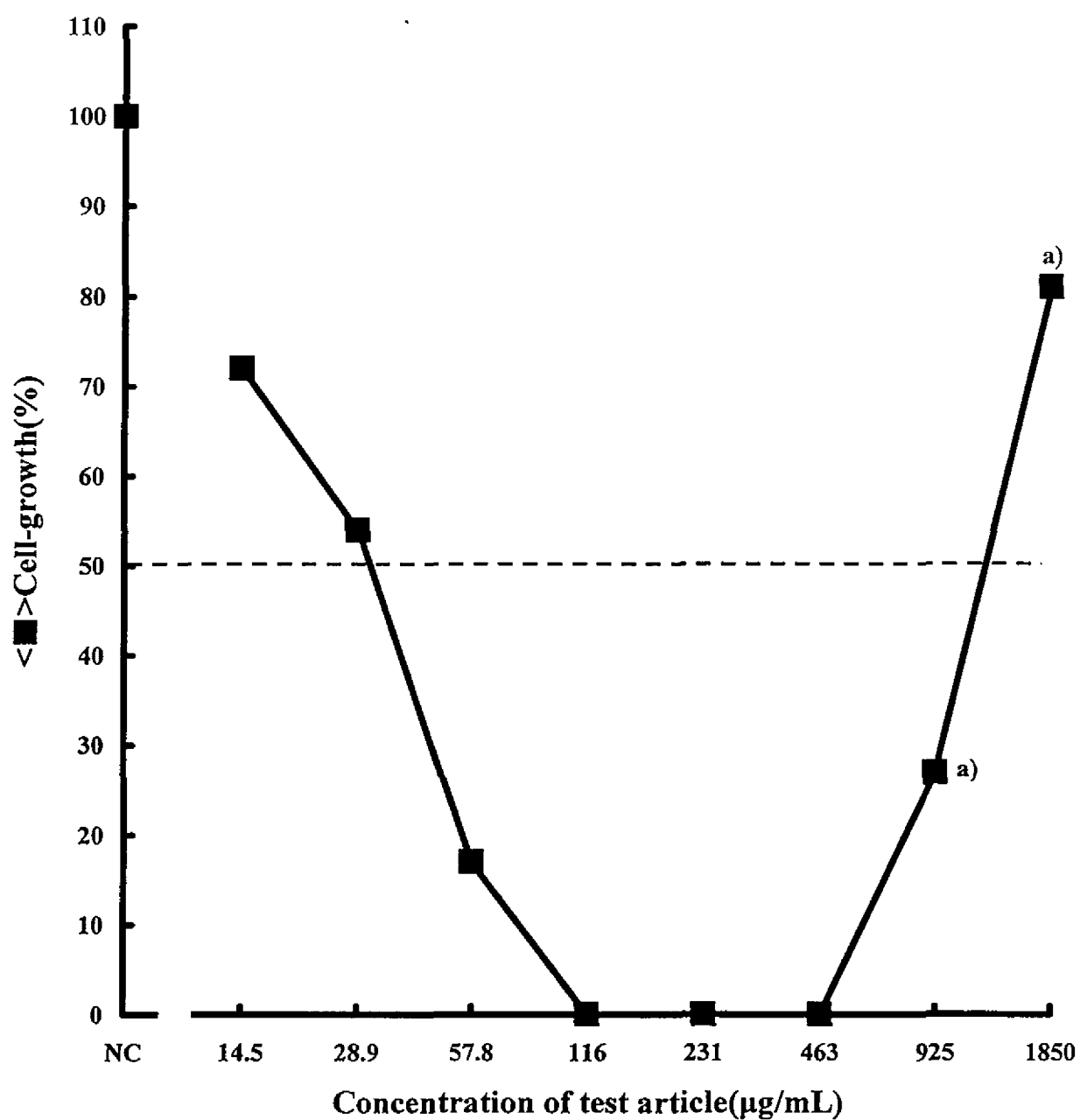


Fig. 1-2

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

a) These values were judged to be unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

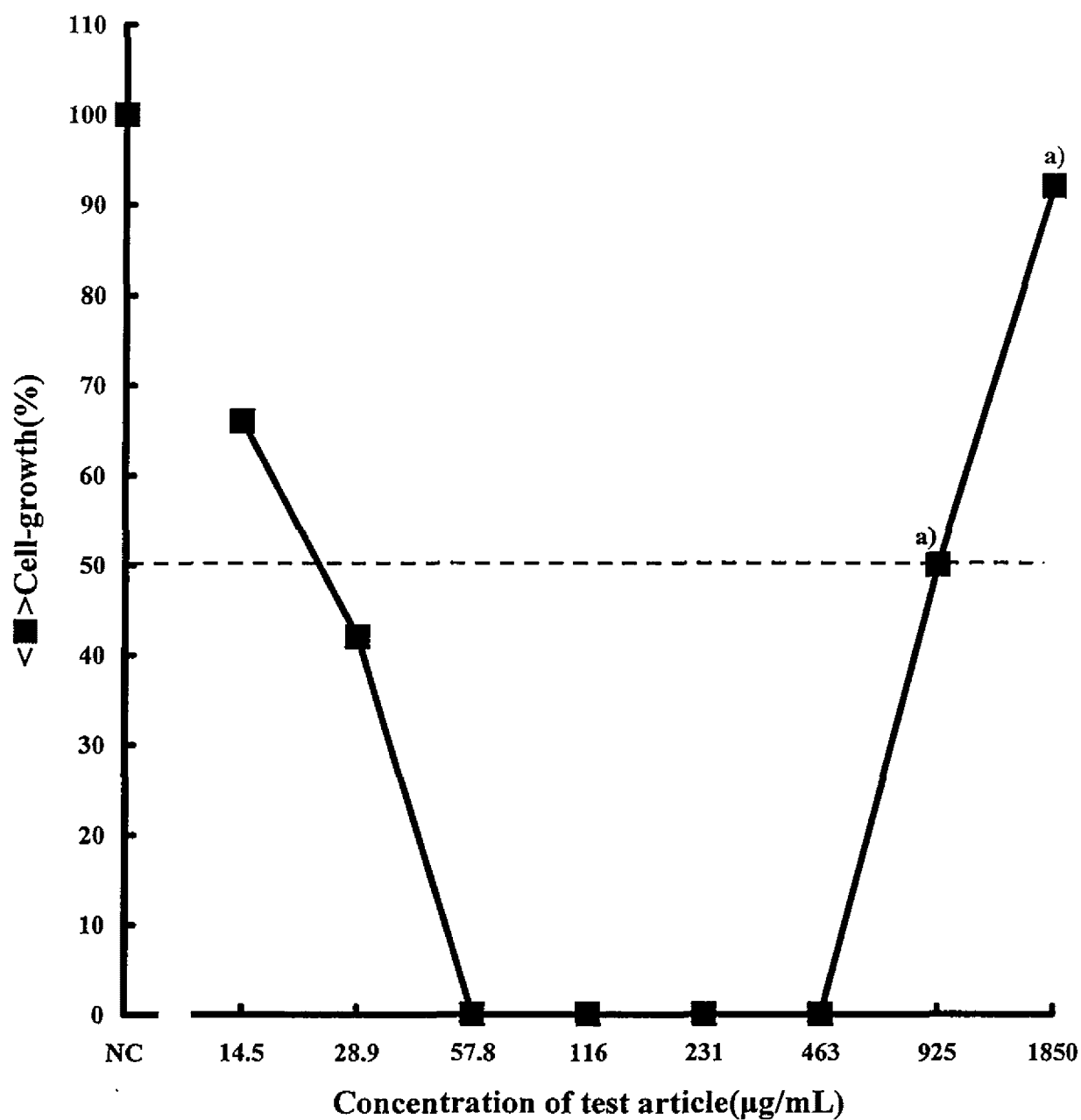


Fig. 1-3
Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(DMSO)

a) These values were judged to be unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

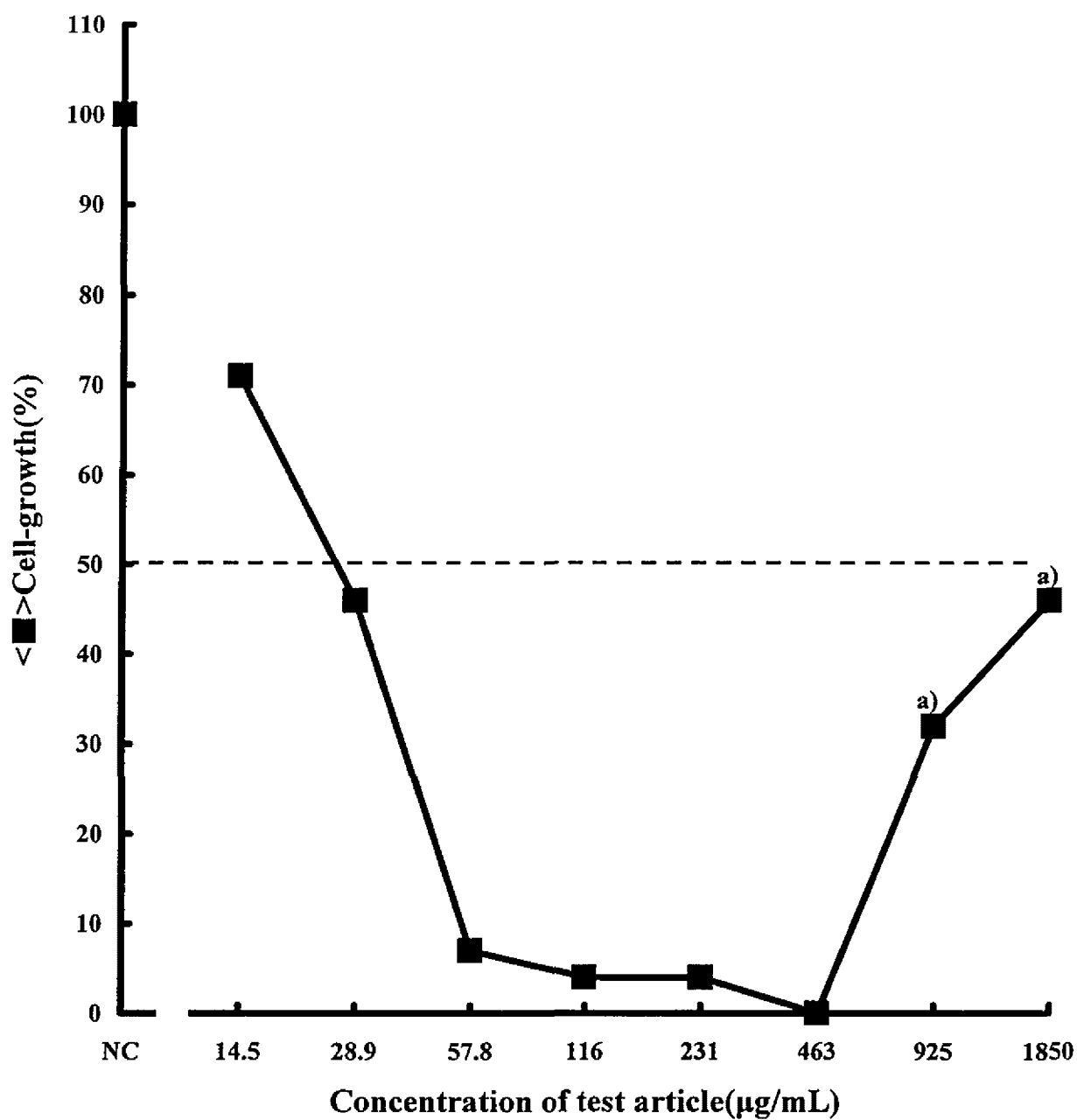


Fig. 1-4
Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(DMSO)

a) These values were judged to be unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

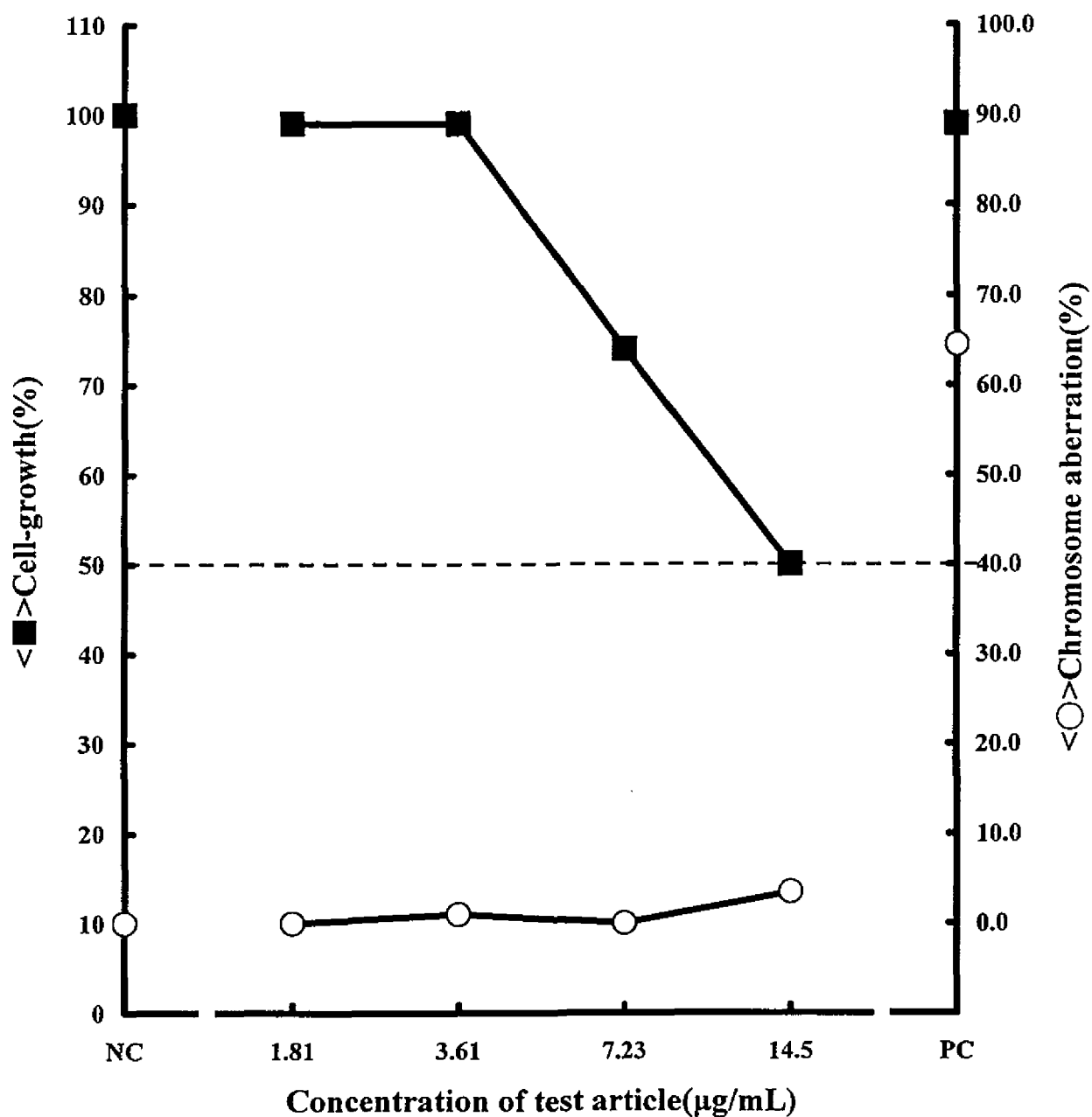


Fig. 2-1
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 µg/mL)

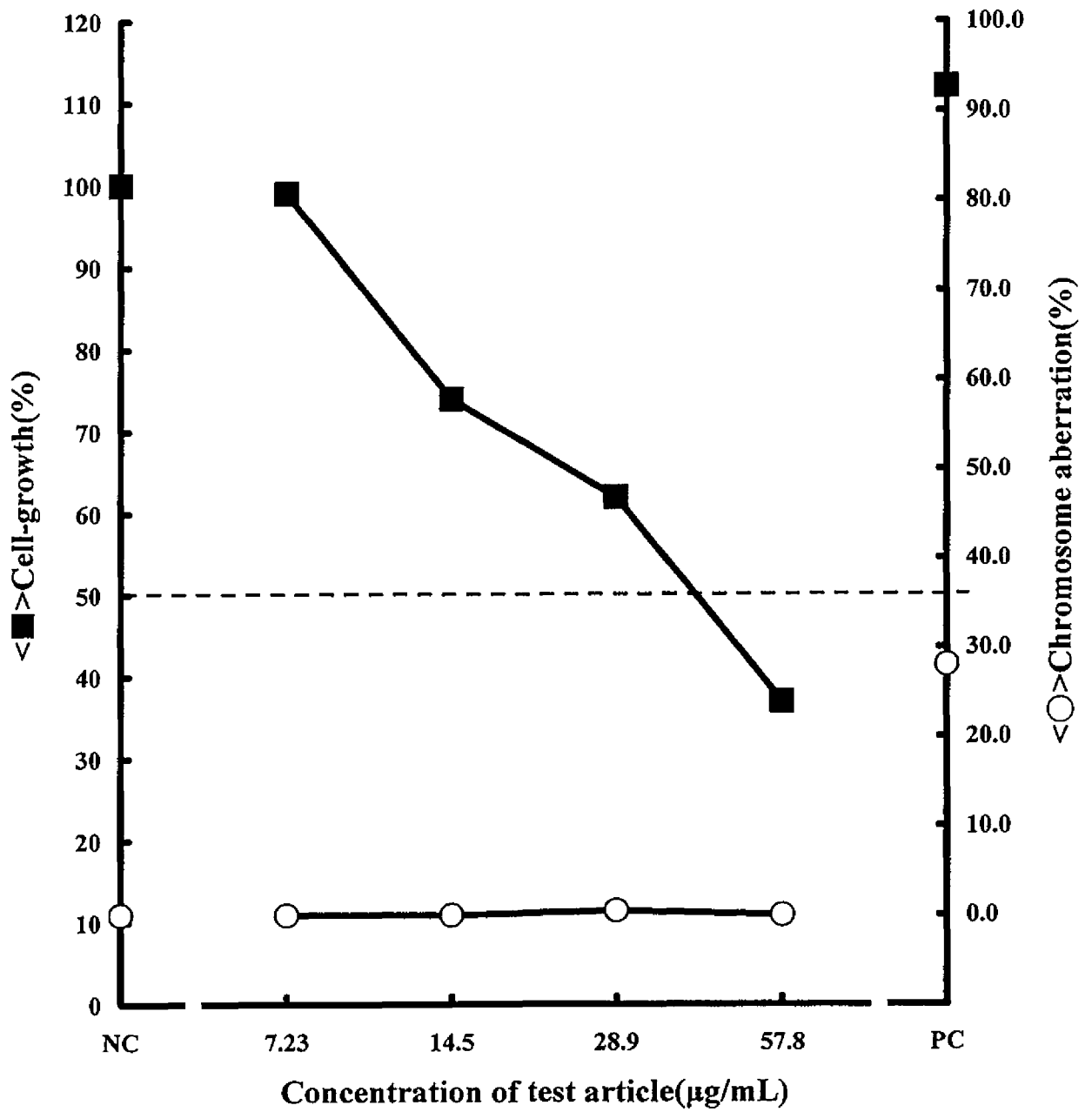


Fig. 2-2
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)
PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 µg/mL)

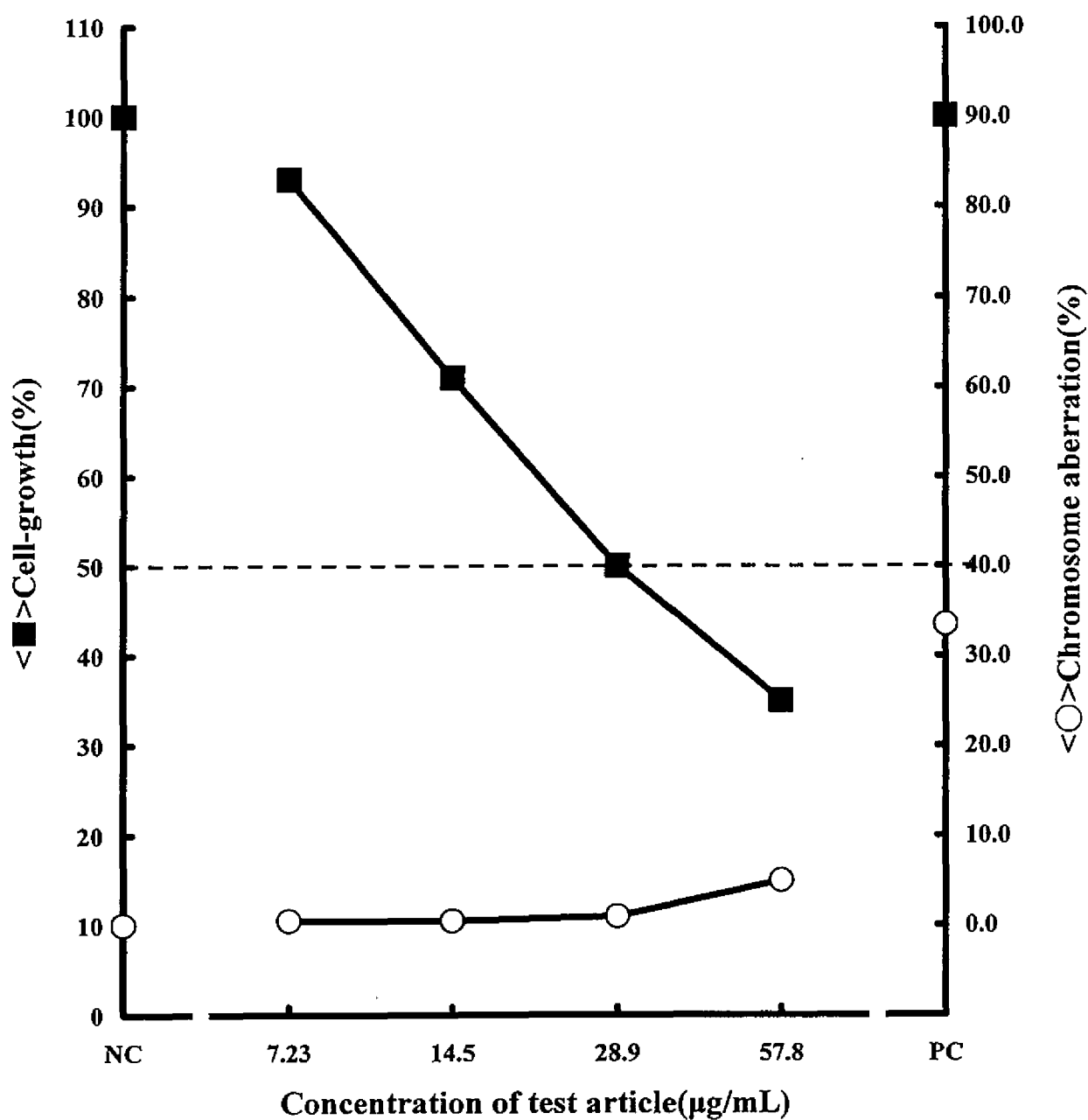


Fig. 2-3

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(DMSO)

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

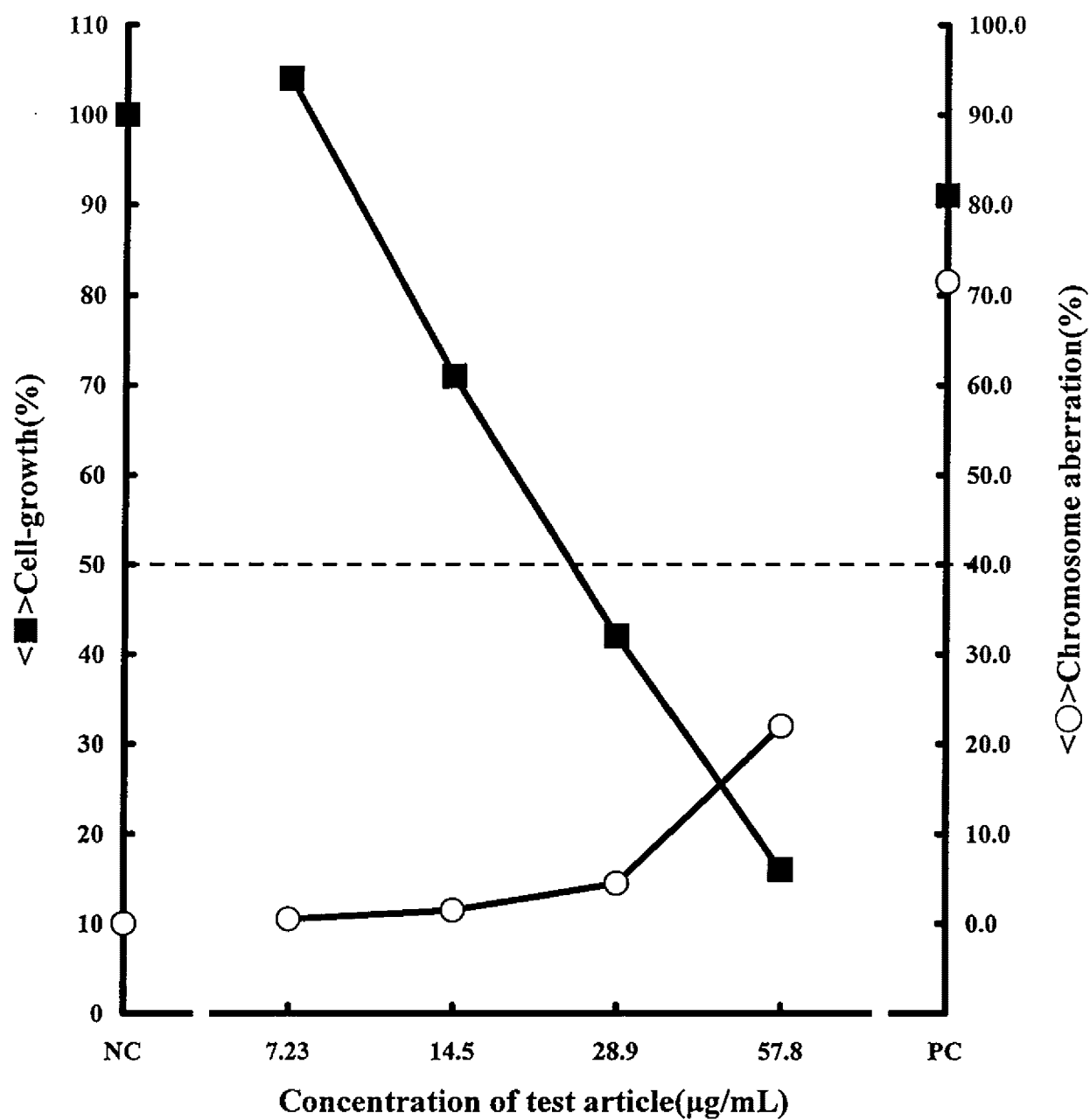


Fig. 2-4
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(DMSO)

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

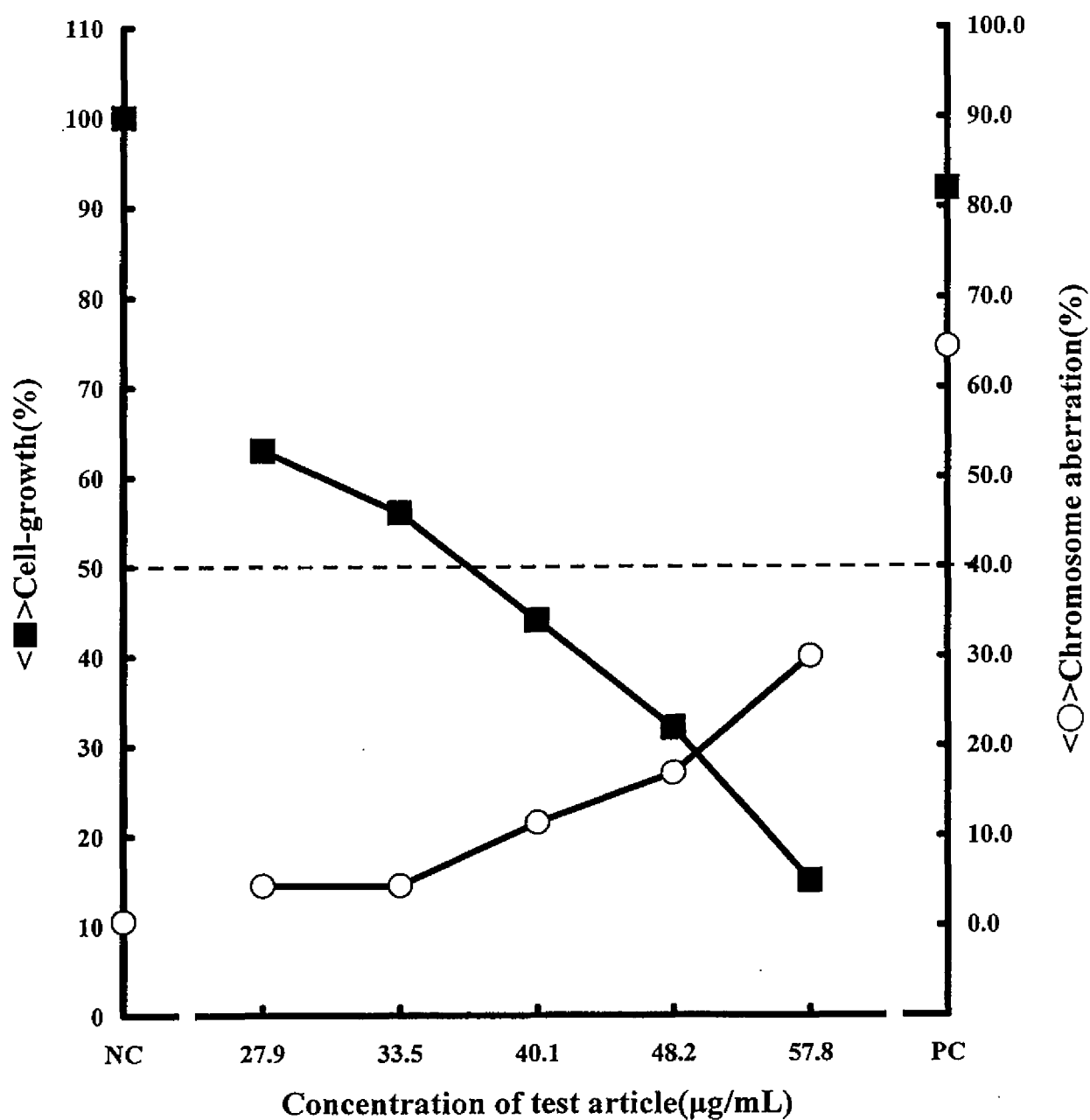


Fig. 2-5
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Confirmation test: 48hr]

NC: Negative Control(DMSO)

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

Table 1-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
+	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			100		-	-	-	-	
		14.5	33	33	++	-	-	-	-
			33		++	-	-	-	-
		28.9	16	8	+++	-	-	-	-
			0		+++	-	-	-	-
		57.8	0	0	+++	-	-	-	-
			0		+++	-	-	-	-
		116	0	0	+++	-	-	-	-
			0		+++	-	-	-	-
		231	0	0	TOX	-	+	+	+
			0		TOX	-	+	+	+
		463	0	8	TOX	-	+	+	+
			16		TOX	-	+	+	+
		925	66	58 ^{g)}	TOX	-	+	+	+
			50		TOX	-	+	+	+
		1,850	83	83 ^{g)}	TOX	-	+	+	+
			83		TOX	-	+	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : below						14.5	µg/mL		

NC: Negative Control(DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

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

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

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

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

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

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates

g) These values were judged to be unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

Table 1-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Short-term treatment: -S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1) 2)		
-	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			83		-	-	-	-	
		14.5	66	72	+	-	-	-	-
			66		+	-	-	-	-
		28.9	66	54	++	-	-	-	-
			33		++	-	-	-	-
		57.8	16	17	++	-	-	-	-
			16		++	-	-	-	-
		116	0	0	+++	-	-	-	-
			0		+++	-	-	-	-
		231	0	0	+++	-	-	-	-
			0		+++	-	-	-	-
		463	0	0	+++	-	+	-	-
			0		+++	-	+	-	-
		925	16	27 ^{g)}	+++	-	+	+	+
			33		+++	-	+	+	+
1,850	83	81 ^{g)}	+++	-	+	+	+		
	66		+++	-	+	+	+		
Concentration of 50% cell-growth inhibition :					32.0	µg/mL			

NC: Negative Control(DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

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

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

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

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

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates

g) These values were judged to be unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

Table 1-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	24-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			100		-	-	-	-	
		14.5	66	66	+	-	-	-	-
			66		+	-	-	-	
		28.9	33	42	++	-	-	-	-
			50		++	-	-	-	
		57.8	0	0	++	-	-	-	-
			0		++	-	-	-	
		116	0	0	+++	-	-	-	-
			0		+++	-	-	-	
		231	0	0	+++	-	-	-	-
			0		+++	-	-	-	
		463	0	0	+++	-	+	-	-
			0		+++	-	+	-	
		925	50	50 ^{g)}	+++	-	+	+	+
			50		+++	-	+	+	
		1,850	83	92 ^{g)}	+++	-	+	+	+
			100		+++	-	+	+	
Concentration of 50% cell-growth inhibition :						24.1	µg/mL		

NC: Negative Control(DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

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

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

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

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

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates

g) These values were judged to be unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

Table 1-4

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Continuous treatment : 48hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	48-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		14.5	78	71	++	-	-	-	-
			64		++	-	-	-	-
		28.9	50	46	++	-	-	-	-
			42		++	-	-	-	-
		57.8	7	7	++	-	-	-	-
			7		++	-	-	-	-
		116	0	4	+++	-	-	-	-
			7		+++	-	-	-	-
		231	7	4	+++	-	-	-	-
			0		+++	-	-	-	-
		463	0	0	+++	-	+	-	-
			0		+++	-	+	-	-
		925	28	32 ^{g)}	+++	-	+	+	+
			35		+++	-	+	+	+
		1,850	50	46 ^{g)}	+++	-	+	+	+
			42		+++	-	+	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition :						26.6	$\mu\text{g/mL}$		

NC: Negative Control(DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

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

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

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

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

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates

g) These values were judged to be unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

Table 2-1

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
+	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		Test article	1.81	99	99	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
			3.61	99	99	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
		7.23	74	74	+	-	-	-	
			74		+	-	-	-	
		14.5	50	50	++	-	-	-	
			50		++	-	-	-	
		PC	99	99	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 µg/mL)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

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

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

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-2

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Short-term treatment: -S9 mix]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	
		Test article	7.23	99	99	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
			14.5	74	74	+	-	-	-
				74		+	-	-	-
		28.9	74	62	++	-	-	-	
			50		++	-	-	-	
		57.8	24	37	++	-	-	-	
			50		++	-	-	-	
		PC	124	112	-	-	-	-	
			99		-	-	-	-	

NC: Negative Control(DMSO)

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

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

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

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

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-3

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Continuous treatment: 24hr]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{e)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	24-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			100		-	-	-	-	
		7.23	100	93	+	-	-	-	-
			85		+	-	-	-	-
			71		++	-	-	-	-
			71		++	-	-	-	-
		14.5	42	50	++	-	-	-	-
			57		++	-	-	-	-
		28.9	42	35	++	-	-	-	-
			28		++	-	-	-	-
		57.8	100	100	-	-	-	-	-
			100		-	-	-	-	-
		PC		100	100	-	-	-	-
				100		-	-	-	-

NC: Negative Control(DMSO)

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

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

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

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

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-4

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Continuous treatment: 48hr]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	48-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			100		-	-	-	-	
		7.23	108	104	+	-	-	-	-
			100		+	-	-	-	-
			75		++	-	-	-	-
			66		++	-	-	-	-
		14.5	33	42	++	-	-	-	-
			50		++	-	-	-	-
		28.9	16	16	++	-	-	-	-
			16		++	-	-	-	-
		57.8	91	91	-	-	-	-	-
			91		-	-	-	-	-
		PC		91	91	-	-	-	-
						-	-	-	-

NC: Negative Control(DMSO)

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

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

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

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

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-5

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Confirmation test: 48hr]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
-	48-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			108		-	-	-	-	
		Test article	27.9	66	63	+	-	-	-
				66		+	-	-	-
			33.5	58	56	++	-	-	-
				58		++	-	-	-
			40.1	50	44	++	-	-	-
				41		++	-	-	-
		48.2	33	32	++	-	-	-	
			33		++	-	-	-	
		57.8	16	15	++	-	-	-	
			16		++	-	-	-	
		PC	100	92	-	-	-	-	
			91		-	-	-	-	

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 µg/mL)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

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

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

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Short-term treatment:+S9 mix]

S9 mix	Time (h)	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	NC	200	0.0	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	55-1 33-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			
	1.81	NC	200	0.0	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	10-1 95-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			
	3.61	3.61	200	0.0	-	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	-	59-1 01-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)			
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)			
	7.23	7.23	200	0.5	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	98-1 84-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			
14.5	14.5	200	0.0	-	0	6	1	0	0	0	3.5	3.5	-	60-1 20-1	
		(100)	(0)		(0)	(4)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)				
		(100)	(0)		(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(3)	(3)				
PC	PC	200	0.0	-	0	21	123	0	0	0	64.5	64.5	+	89-1 30-1	
		(100)	(0)		(0)	(13)	(63)	(0)	(0)	(0)	(67)	(67)			
		(100)	(0)		(0)	(8)	(60)	(0)	(0)	(0)	(62)	(62)			

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

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

NC: Negative control (DMSO)

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

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Short-term treatment:-S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	NC		200	0.0	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	99-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)				
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)				
	7.23		200	0.0	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	29-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)				
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)				
	6-18	14.5	200	0.0	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	96-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)				
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)				
	28.9		200	0.0	-	1	1	0	0	0	0	0.5	1.0	-	36-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)				
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)				
	57.8		200	0.5	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	90-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)				
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)				
	PC		200	0.5	-	1	15	44	0	0	0	28.0	28.5	+	82-1
			(100)	(0)		(1)	(10)	(24)	(0)	(0)	(0)	(32)	(33)		
			(100)	(1)		(0)	(5)	(20)	(0)	(0)	(0)	(24)	(24)		

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

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

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075 μ g/mL)

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Continuous treatment:24hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.	
						g	ctb	cte	csb	cse	other					
-	24-0	NC	200	0.0	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	07-1 24-1	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)					
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)					
	7.23	7.23	7.23	200	0.0	-	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	-	35-1 41-1
				(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)				
				(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(1)				
	14.5	14.5	14.5	200	0.5	-	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	-	64-1 17-1
				(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)				
				(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(1)				
	28.9	28.9	28.9	200	0.5	-	1	0	2	0	0	0	1.0	1.5	-	63-1 05-1
				(100)	(0)		(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(2)			
				(100)	(1)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(1)			
57.8	57.8	57.8	200	0.0	-	0	3	6	0	1	0	5.0	5.0	±	12-1 12-2 78-1 78-2	
			(97)	(0)		(0)	(1)	(2)	(0)	(1)	(0)	(4)	(4)			
			(3)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			
			(57)	(0)		(0)	(1)	(3)	(0)	(0)	(0)	(4)	(4)			
(43)	(0)	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)							
PC	PC	PC	200	0.0	-	1	14	57	0	0	0	33.5	34.0	+	75-1 11-1	
			(100)	(0)		(0)	(5)	(27)	(0)	(0)	(0)	(31)	(31)			
			(100)	(0)		(1)	(9)	(30)	(0)	(0)	(0)	(36)	(37)			

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

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

NC: Negative control (DMSO)

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

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Continuous treatment:48hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.			
						g	ctb	cte	csb	cse	other							
-	48-0	NC	200	0.0	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	09-1			
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	39-1					
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)						
	48-0	7.23	NC	200	0.0	-	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	-	61-1		
				(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(1)	13-1					
				(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)						
	48-0	14.5	NC	200	0.0	-	0	1	2	0	0	0	1.5	1.5	-	47-1		
				(100)	(0)		(1)	(2)	(0)	(0)	(3)	(3)	15-1					
				(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)						
	48-0	28.9	NC	200	0.5	-	0	3	5	0	1	0	4.5	4.5	-	65-1		
				(100)	(0)		(1)	(3)	(0)	(1)	(5)	(5)	45-1					
				(100)	(1)		(2)	(2)	(0)	(0)	(4)	(4)						
48-0	57.8	NC	200	0.0	-	1	17	29	0	0	0	22.0	22.0	+	66-1			
			(77)	(0)		(4)	(9)	(0)	(0)	(13)	(13)	66-2						
			(23)	(0)		(2)	(6)	(0)	(0)	(7)	(7)	87-1						
48-0	57.8	NC	(100)	(0)	-	(1)	(11)	(14)	(0)	(0)	(0)	(24)	(24)					
			48-0	PC		200	0.0	-	1	27	133	0	0	0	71.5	72.0	+	50-1
						(100)	(0)		(9)	(69)	(0)	(0)	(0)	(73)	(73)	71-1		
(100)	(0)	(1)			(18)	(64)	(0)		(0)	(0)	(70)	(71)						

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

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

NC: Negative control (DMSO)

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

Table 3-5 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Hydroxydiphenylmethane
[Confirmation test:48hr]

S9 mix	Time (h)	Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
		NC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	1 (0) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (0) (1)	0.5 (0) (1)	-	18-1 93-1
		27.9	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	5 (1) (4)	4 (2) (2)	0 (0) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	4.5 (4) (5)	4.5 (4) (5)	-	14-1 22-1
		33.5	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	1 (0) (1)	3 (1) (2)	5 (2) (3)	0 (0) (0)	1 (0) (1)	0 (0) (0)	4.5 (3) (6)	5.0 (3) (7)	-	67-1 92-1
-	48-0	40.1	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	4 (0) (4)	16 (9) (7)	0 (0) (0)	3 (1) (2)	0 (0) (0)	11.5 (10) (13)	11.5 (10) (13)	+	21-1 32-1
		48.2	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	9 (7) (2)	26 (16) (10)	0 (0) (0)	2 (0) (2)	0 (0) (0)	17.0 (22) (12)	17.0 (22) (12)	+	02-1 83-1
		57.8	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	13 (4) (9)	50 (33) (17)	0 (0) (0)	2 (0) (2)	0 (0) (0)	30.0 (36) (24)	30.0 (36) (24)	+	80-1 42-1
		PC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	15 (5) (10)	122 (60) (62)	0 (0) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	64.5 (61) (68)	64.5 (61) (68)	+	68-1 04-1

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

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

NC: Negative control (DMSO)

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

M-1310

信頼性保証書 (1/2)

試験番号 : M-1310
試験表題 : 4-ヒドロキシジフェニルメタンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

本試験は以下に示す基準を遵守して実施されたことを保証致します。

- 「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
保企発第 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)

なお、調査は下記の通り実施致しました。

2010年5月20日
株式会社ボゾリサーチセンター
信頼性保証部門

試験における調査

調査項目	調査担当者	調査日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
試験計画書		2008年 2月 21日	2008年 2月 21日
試験計画書変更書 (1)		2008年 3月 21日	2008年 3月 24日
細胞播種		2008年 3月 28日	2008年 3月 29日
調製・被験物質の保存		2008年 3月 31日	2008年 4月 1日
被験物質の処理			
染色体標本作製 (固定)		2008年 4月 1日	2008年 4月 2日

信頼性保証書 (2/2)

調査項目	調査担当者	調査日	試験責任者及び 運営管理者への 報告日
染色体標本作製 (染色)	[Redacted]	2008年 4月 2日	2008年 4月 3日
染色体標本観察		2008年 4月 7日	2008年 4月 7日
試験計画書変更書 (2)		2008年 4月 10日	2008年 4月 11日
染色体標本観察 (連続処理法)		2008年 4月 18日	2008年 4月 19日
試験計画書変更書 (3)		2008年 4月 22日	2008年 4月 23日
試験計画書変更書 (4)		2008年 4月 24日	2008年 4月 25日
生データ		2008年 5月 30日	
		2008年 6月 2日	
		2008年 6月 3日	2008年 6月 3日
改善確認		2008年 6月 6日	2008年 6月 9日
最終報告書草案・図・表・写真		2008年 6月 3日	2008年 6月 3日
改善確認		2008年 6月 6日	2008年 6月 9日
試験計画書変更書 (5)		2008年 9月 10日	2008年 9月 11日
試験計画書変更書 (6)		2010年 2月 4日	2010年 2月 4日
生データ (被験物質関係)		2010年 5月 12日	2010年 5月 13日
最終報告書		2010年 5月 20日	2010年 5月 20日

プロセス調査

調査項目	調査担当者	調査日	部門責任者及び 運営管理者への 報告日
培養細胞の性状検査	[Redacted]	2008年 5月 9日	
		2008年 5月 12日	
		2008年 5月 15日	2008年 5月 16日
陽性対照物質の管理	[Redacted]	2008年 3月 19日	2008年 3月 19日

物質名称：4-ヒドロキシジフェニルメタン

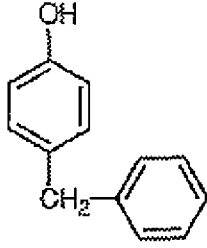
CAS 番号：101-53-1

試験名称：4-ヒドロキシジフェニルメタンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験機関の名称：株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

ほ乳類を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	4-ヒドロキシジフェニルメタン					
別名	4-Hydroxydiphenylmethane					
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)	化学構造式： 					
試験に供した新規化学物質の純度	99.8 wt%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	C770A			
不純物の名称及び濃度	—					
C A S 番号	101-53-1	蒸気圧	—			
分子量	184.23	分配係数	—			
融点	84.9 °C	常温における性状	褐色粉末			
沸点	— °C					
安定性	実験終了後の被験物質の品質に問題はなく、実験期間中は安定であった。					
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	注射用水	不溶	—	DMSO	溶解	—
	エチルアルコール	—	—	その他 (アセトン)	—	—

2. 細胞の種類－培養条件

細胞名	CHL/TU	入手先	ヒューマンサイエンス 研究資源バンク	
種	チャイニーズハムスター (肺由来線維芽細胞)	入手年月日	2004年 11月 2日	
培養液	Minimum Essential Medium	製造元	Invitrogen Co.	
血清の種類と添加量	牛血清 10%	製造元 (Lot No.)	571834	
細胞周期	15.6 h	凍結条件	液体窒素凍結 10%DMSO・10%CS添加MEM	
継代数	細胞増殖抑制試験: 6 短時間処理: 10 連続処理: 14 確認試験: 18	培養 条件	容器	γ線滅菌済プラスチック プレート (直径 60mm)
染色体数 (モード)	25本		温度	37±0.5°C
			CO ₂ 濃度	5.0±1.0%
備考				

3. S9 mix

(1) S9の入手方法等

自製・購入の別	1. 自製 ② 購入 (製造元 オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2007年 11月 30日製造 (S9) 2007年 12月 27日製造 (コファクター)
購入の場合の Lot No.	07113009 (S9) 自家調製 (コファクター)
保存温度	約-80°C

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	・フェバルピタール ・5,6-ベンゾフラボン
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週令	7週	投与期間及び投与量	・フェバルピタール 4日間: 0.03+0.06+0.06+0.06 ・5,6-ベンゾフラボン 1日間: 0.08
体重	222.0±16.9 g	(g / kg 体重)	

(3) S9 mixの組成

成分	S9 mix 1mL 中の量	成分	S9 mix 1mL 中の量
S9	0.3 mL	NADP	4.0 μ mol
MgCl ₂	5.0 μ mol	HEPES 酸緩衝液 (pH7.2)	4.0 μ mol
KCl	33.0 μ mol	その他 (精製水)	0.1 mL
グルコース-6-リン酸	5.0 μ mol	—	—

(4) S9 mixの処理条件

	① プレート法	2. 浮遊細胞法	3. その他 ()
S9量 (最終濃度)	5%		
S9蛋白量 (最終濃度)	1.124 mg/mL		
処理時間	6h		
回復時間	18h		
備考			

4. 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
		ジメチルスルホキシド (DMSO)	和光純薬工業株式会社	LTF0010	試薬特級
溶媒選択の理由	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 19 mg/mL で不溶、DMSO には 190 mg/mL で溶解することが確認されたため、DMSO を溶媒として使用した。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="checkbox"/> 溶解 <input type="checkbox"/> 懸濁 その他 (_____)				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	なし				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	約 1 時間 室温				
純度換算の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/>				

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2008年3月14日から 2008年3月20日	2008年3月14日から 2008年3月20日
培養器	形状	シャーレ	シャーレ
	大きさ	φ60mm	φ60mm
	培養液量	4.950 mL/培養器	4.117 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2枚	2枚
細胞	播種細胞数	4×10 ³ 個/mL	4×10 ³ 個/mL
	前培養日数	3日間	3日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.050 mL/培養器	0.050 mL/培養器
	S9 mix 添加量	—	0.833 mL/培養器
	S9 の最終濃度	—	5%
	S9 蛋白の最終濃度	—	1.124 mg/mL
	処理時間	6h	6h
	回復時間	18h	18h
細胞増殖抑制測定法	単細胞密度測定装置 (モノセレータ)による。		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (6-18h) a)		代謝活性化法による場合 (6-18h) a)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%) b)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%) b)
0 (陰性対照群)	100	0 (陰性対照群)	100
0.0145	72	0.0145	33
0.0289	54	0.0289	8
0.0578	17	0.0578	0
0.116	0	0.116	0
0.231	0	0.231	0
0.463	0	0.463	8
0.925	27*	0.925	58*
1.85	81*	1.85	83*

a): 括弧内は処理時間及び回復時間を表す。

b): 陰性対照群を100%とした。

* : 固着した被験物質が測定されたものと推測される信頼の出来ない値で、用量設定には採用しなかった。

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2008年 3月 28日から 2008年 4月 9日	2008年 3月 28日から 2008年 4月 9日
培 養 器	形 状	シャーレ	シャーレ
	大 き さ	φ60 mm	φ60 mm
	培 養 液 量	4.950 mL/培養器	4.117 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	4枚	4枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数	3日間	3日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	0.050 mL/培養器	0.050 mL/培養器
	S 9 m i x 添 加 量	—	0.833 mL/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度	—	5%
	S 9 蛋 白 の 最 終 濃 度	—	1.124 mg/mL
	処 理 時 間	6h	6h
	回 復 時 間	18h	18h
備考			

(4) 染色体異常試験結果

別表 1-1 及び 1-2 に示す。

6. 連続処理法による試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		2008年3月14日から 2008年3月20日	2008年3月14日から 2008年3月20日
培 養 器	形 状	シャーレ	シャーレ
	大 き さ	φ60 mm	φ60 mm
	培 養 液 量	4.950 mL/培養器	4.950 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2枚	2枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数	3日間	3日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	0.050 mL/培養器	0.050 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	48 h
	回 復 時 間	0 h	0 h
細胞増殖抑制 測定法	単層細胞密度測定装置(モノセレータ)による。		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(24-0h) 処理による場合 a)		(48-0h) 処理による場合 a)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%) b)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%) b)
0 (陰性対照群)	100	0 (陰性対照群)	100
0.0145	66	0.0145	71
0.0289	42	0.0289	46
0.0578	0	0.0578	7
0.116	0	0.116	4
0.231	0	0.231	4
0.463	0	0.463	0
0.925	50*	0.925	32*
1.85	92*	1.85	46*

a): 括弧内は処理時間及び回復時間を表す。

b): 非処理群を100%とした。

* : 固着した被験物質が測定されたものと推測される信頼の出来ない値で、用量設定には採用しなかった。

(3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		2008年4月11日から 2008年4月18日	2008年4月11日から 2008年4月23日
培 養 器	形 状	シャーレ	シャーレ
	大 き さ	φ60 mm	φ60 mm
	培 養 液 量	4.950 mL/培養器	4.950 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	4枚	4枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数	3日間	3日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	0.050 mL/培養器	0.050 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	48 h
	回 復 時 間	0 h	0 h
備考			

(4) 染色体異常試験結果

別表 1-3 及び 1-4 に示す。

(5) 確認試験の条件

試験実施期間		2008年4月25日から 2008年5月13日	
培 養 器	形 状	シャーレ	
	大 き さ	φ 60 mm	
	培 養 液 量	4.950 mL/培養器	
	用量当たりの培養器数	4 枚	
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	
	前 培 養 日 数	3 日間	
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	0.050 mL/培養器	
	処 理 時 間	48 h	
	回 復 時 間	0 h	
備考			

(6) 確認試験の結果
別表 1-5 に示す。

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定		陽 性	陰 性		
<p>判定の理由</p> <p>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及び非代謝活性化では、いずれの用量においても陰性の判定基準である 5%未満であった。これに対し、連続処理法では、24 時間処理において最高用量の 57.8 µg/mL で TA 値が疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を、48 時間処理では最高用量の 57.8 µg/mL の 1 用量のみで陽性の判定基準である 10%以上を示した。そこで、連続処理法の 48 時間処理について、最高用量を 57.8 µg/mL とし、確認試験を実施した。その結果、48 時間処理における TA 値は、57.8 µg/mL で 30.0%、48.2 µg/mL で 17.0%、40.1 µg/mL で 11.5%、33.5 µg/mL で 4.5%及び 27.9 µg/mL で 4.5%と、57.8~40.1 µg/mL の 3 用量において、陽性の判定基準である 10%以上を示し、明らかな用量依存性が認められた。更に、染色体異常試験の連続処理法と確認試験の間に、結果の再現性が認められた。しかしながら、連続処理法の 48 時間処理及び確認試験ともに陽性と判定された用量域では細胞増殖率 (%) が低かったことから、4-ヒドロキシジフェニルメタンの染色体構造異常誘発性は非特異的なものと考えられ、総合的に陰性と判定した。一方、染色体異常試験の結果、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、4-ヒドロキシジフェニルメタンの染色体数的異常誘発性は、総合的に陰性と判定した。</p> <p>陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。更に、いずれの群においても同一用量における 2 枚のプレート間に染色体異常細胞の出現頻度の著しい差は認められなかったことから、試験は適切に実施されたと判断した。</p> <p>以上の結果から、4-ヒドロキシジフェニルメタ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ともに誘発しないと結論した。</p>					
D ₂₀ 値	構造異常	0	0	0	0
		1	1	1	1
	数的異常	0	0	0	0
		1	1	1	1

(2) 参考事項

特になし

8. その他

試験実施施設	名 称	株式会社ポゾリサーチセンター 御殿場研究所	
	所 在 地	静岡県御殿場市かまど 1284	電話 0550(82)2000 FAX 0550(82)2379
試験責任者	職 氏 名	主任研究員	
	経験年数	35 年	
試験番号	M-1310		
試験期間	2008 年 2 月 21 日より 2010 年 5 月 20 日		

別表1-1 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称 4-ヒドロキシジフェニルメタン

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)				
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)	
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	0.00723	100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(99)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	0.0145	100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(74)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	0.0289	100	1	0	0	0	0	1	0	74	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	1	50	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	(62)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	0.0578	100	0	0	0	0	0	0	0	24	100	1	0	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	50	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(37)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	-	陽性対照 (MMC)	100	10	24	0	0	0	32	1	124	100	0	0	0	
			100	5	20	0	0	0	24	0	99	100	1	0	1	
			200	15 (7.5)	44 (22.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	56 (28.0)	1 (0.5)	(112)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	

MMC: マイトマイシンC

別表1-2 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称 4-ヒドロキシジフェニルメタン

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	0.00181	100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(99)	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	0.00861	100	1	0	0	0	0	1	0	99	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	99	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(99)	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	0.00723	100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(74)	200	1 (0.5)	0 (0.0)
6-18	+	0.0145	100	4	0	0	0	0	4	0	50	100	0	0	0
			100	2	1	0	0	0	3	0	50	100	0	0	0
			200	6 (3.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (3.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	(50)	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陽性対照 (CP)	100	13	63	0	0	0	67	0	99	100	0	0	0
			100	8	60	0	0	0	62	0	99	100	0	0	0
			200	21 (10.5)	123 (61.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	129 (64.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	(99)	200	0 (0.0)	0 (0.0)

CP: シクロフォスファミド

別表1-3 染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称 4-ヒドロキシジフェニルメタン

処理時間 (h)	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	0.00723	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0	85	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(93)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	0.0145	100	0	0	0	0	0	0	0	71	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	0	71	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(71)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24-0	0.0289	100	0	1	0	0	0	1	1	42	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0	57	100	1	0	1
		200	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	(50)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24-0	0.0578	97	1	2	0	1	0	4	0	42	97	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0		3	0	0	0
		57	1	3	0	0	0	4	0	28	57	0	0	0
		43	1	1	0	0	0	2	0		43	0	0	0
		200	3 (1.5)	6 (3.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	10 (5.0)	0 (0.0)	(35)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	陽性対照 (MMC)	100	5	27	0	0	0	31	0	100	100	0	0	0
		100	9	30	0	0	0	36	1	100	100	0	0	0
		200	14 (7.0)	57 (28.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	67 (33.5)	1 (0.5)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC: マイトマイシン C

別表1-4 染色体異常試験の結果(連続処理法)

被験物質の名称 4-ヒドロキシジフェニルメタン

処理時間 (h)	被験物質 の用量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)				
		観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)	
48-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	0.00723	100	0	1	0	0	0	1	0	108	100	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	
		200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(104)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	0.0145	100	1	2	0	0	0	3	0	75	100	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	0	66	100	0	0	0	
		200	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	(71)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	0.0280	100	1	3	0	1	0	5	0	33	100	0	0	0	
		100	2	2	0	0	0	0	4	0	50	100	1	0	1
		200	3 (1.5)	5 (2.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	9 (4.5)	0 (0.0)	(42)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
48-0	0.0578	77	4	9	0	0	0	13	0	16	77	0	0	0	
		23	2	6	0	0	0	7	0	23	23	0	0	0	
		100	11	14	0	0	0	24	1	16	100	0	0	0	
		200	17 (8.5)	29 (14.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	44 (22.0)	1 (0.5)	(16)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
48-0	陽性対照 (MMC)	100	9	69	0	0	0	73	0	91	100	0	0	0	
		100	18	64	0	0	0	70	1	91	100	0	0	0	
		200	27 (13.5)	133 (66.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	143 (71.5)	1 (0.5)	(91)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

MMC: マイトマイシン C

別表1-5 確認試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称 4-ヒドロキシジフェニルメタン

処理時間 (h)	被験物質 の用量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
48-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	108	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	(100)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	0.0279	100	1	2	0	1	0	4	0	66	100	0	0	0
		100	4	2	0	0	0	5	0	66	100	0	0	0
		200	5 (2.5)	4 (2.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	9 (4.5)	0 (0.0)	(63)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	0.0335	100	1	2	0	0	0	3	0	58	100	0	0	0
		100	2	3	0	1	0	6	1	58	100	0	0	0
		200	3 (1.5)	5 (2.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	9 (4.5)	1 (0.5)	(56)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	0.0401	100	0	9	0	1	0	10	0	50	100	0	0	0
		100	4	7	0	2	0	13	0	41	100	0	0	0
		200	4 (2.0)	16 (8.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	23 (11.5)	0 (0.0)	(44)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	0.0482	100	7	16	0	0	0	22	0	33	100	0	0	0
		100	2	10	0	2	0	12	0	33	100	0	0	0
		200	9 (4.5)	26 (13.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	34 (17.0)	0 (0.0)	(32)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	0.0578	100	4	33	0	0	0	36	0	16	100	0	0	0
		100	9	17	0	2	0	24	0	16	100	0	0	0
		200	13 (6.5)	50 (25.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	60 (30.0)	0 (0.0)	(15)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	陽性対照 (MMC)	100	5	60	0	1	0	61	0	100	100	0	0	0
		100	10	62	0	0	0	68	0	91	100	0	0	0
		200	15 (7.5)	122 (61.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	129 (64.5)	0 (0.0)	(92)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC: マイトマイシン C