

M-1345

## 最終報告書

試験名：メチルスチリルケト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-1345

試験期間：2009年1月30日-2010年2月26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 東京都千代田区霞が関 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



6.5.1	S9 mix .....	15
6.5.2	培養液 .....	16
6.6	試験方法 <sup>1-5)</sup> .....	16
6.6.1	識別方法 .....	16
6.6.2	用量の設定 .....	17
6.6.3	細胞増殖抑制試験 .....	17
6.6.4	染色体異常試験 .....	18
6.6.5	標本の観察 .....	19
6.6.6	染色体異常の分類 .....	19
6.6.7	判定基準 .....	20
7.	試験結果 .....	21
7.1	細胞増殖抑制試験 .....	21
7.1.1	短時間処理法 .....	21
7.1.2	連続処理法 .....	21
7.2	染色体異常試験 .....	22
8.	考察 .....	24
9.	参考文献 .....	25

### Photographs of Metaphase Chromosomes

- Photo.1                      A metaphase chromosome from the negative control group  
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Photo.2                      A metaphase chromosome from the 100 µg/mL group with a  
break and chromatid exchanges  
[Short-term treatment: +S9 mix]



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

M-1345

表

Table 1-1	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Methyl styryl ketone [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 1-2	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Methyl styryl ketone [Short-term treatment: -S9 mix]

#### 4. 要約

メチルスチリルケト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 1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 93.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で、非代謝活性化では 46.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で、50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。また、連続処理法の 24 時間処理では 23.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 50%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 82.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非代謝活性化では 34.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 23.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。連続処理法の 48 時間処理では、最低用量の 11.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  においても、50%を超えない細胞増殖抑制作用は認められなかったが、細胞増殖率は 44%を示し、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 11.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、染色体異常試験における各処理法の最高用量を短時間処理法の代謝活性化では 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非代謝活性化では 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 40.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び 48 時間処理では 26.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とした。

染色体異常試験の結果、短時間処理法の代謝活性化においては、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で陽性、66.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で疑陽性を示し、用量の増加に伴う TA 値の上昇が認められたため陽性と判定した。染色体異常誘発性の強さの指標値については、観察細胞の 20%に何らかの異常が見られる用量である D20 値<sup>1)</sup>は 0.075 mg/mL、単用量あたりの染色分体交換（cte）を持つ細胞の出現率の比較値である TR 値<sup>1)</sup>は 560 であった。また、短時間処理法の非代謝活性化においても、44.4 及び 29.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で陽性を示し、用量の増加に伴う TA 値の上昇が認められたため陽性と判定した。染色体異常誘発性の強さの指標値については、D20 値<sup>1)</sup>は 0.032 mg/mL、TR 値<sup>1)</sup>は 1100 であった。一方、倍数性細胞の出現率においては、いずれの処理法においてもすべての用量で陰性の判定基準である 5%未満であった。

なお、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率は 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ことから、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、メチルスチリルケトンは本試験条件下において染色体数的異常誘

M-1345

発能は有さないが、染色体構造異常誘発能を有すると結論した。

M-1345

## 5. 緒言

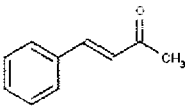
厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、メチルスチリルケトンの安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。

## 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、非 GLP 下での分析に基づくものである (Attached Data 1)。

名称	:	メチルスチリルケトン
英名称	:	Methyl styryl ketone
CAS 番号	:	122-57-6
化学構造式	:	
分子量	:	146.19
純度	:	99.8%
沸点	:	262°C
融点	:	39.6°C
性状	:	淡黄色結晶塊
入手量	:	25 g
安定性	:	実験終了後に、株式会社ポゾリサーチセンターにおいて安定性を測定し、実験期間中の安定性を確認した (Attached Data 2)。
保存方法	:	密栓、遮光、冷暗所 (保存期間中実測温度: 2~7°C)
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室、第 1 研究棟被験物質調製室 冷蔵庫及び生化学部標準物質保存場所
取扱い上の注意	:	取扱いは、適切な保護具を身につけ、粉塵やエアゾールが発生しないように取扱った。また、火気厳禁とした。
残余物の取扱い	:	被験物質の残余物は、実験終了後に安定性を確認し、その後、すべて株式会社ポゾリサーチセンターにおいて廃棄した。

## 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	:	供試前試験を実施し、被験物質は水にはほとんど溶解しないこと、DMSOには150 mg/mLで溶解することが確認されたため、溶媒としてDMSOを用いることとした。

## 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 0.3000 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 150 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1500 µg/mL）を調製した。次いで、150 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、75.0、37.5、18.8、9.38、4.69、2.34 及び 1.17 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

被験物質 0.0750 g を 5 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 15.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：150 µg/mL）を調製した。次いで、15.0 mg/mL 溶液を公比 1.5（各濃度の被験液 2.0 mL：溶媒 1.0 mL）で順次 5 段階希釈し、10.0、6.67、4.44、2.96 及び 1.98 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では 15.0、10.0、6.67、4.44 及び 2.96 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では 10.0、6.67、4.44、2.96 及び 1.98 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を用いた。

### 6.2.2 調製頻度

用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

### 6.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液が安定であることを確認した。

## 6.3 対照物質

### 6.3.1 陰性対照

溶媒として用いたジメチルスルホキシド（DMSO）を陰性対照とした。

### 6.3.2 陽性対照

#### 1) 代謝活性化

名称 : シクロフォスファミド (CP)

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

## 2) 非代謝活性化

名称	:	マイトマイシン C (MMC)
ロット番号	:	525AHA
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

## 3) 調製方法

調製はすべて用時に行い、残余液はすべて一定期間貯蔵した後に焼却処分した。

## (1) 染色体異常試験 短時間処理法 代謝活性化

CP 0.0140 g を  $\gamma$  線滅菌済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: K8H76) を 20 mL 加えて溶解し、0.70 mg/mL 溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた。この時の最終濃度は 14  $\mu$ g/mL)。

## (2) 染色体異常試験 短時間処理法 非代謝活性化

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: K8H76) 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  $\mu$ g/mL)。

## 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 19 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 23 継代であった。

## 6.4.2 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常出現率が低いこと、種々の化学物質に対して感受性が高いこ

と、背景データも多いこと及びほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験に広く用いられていることから、本細胞株を選択した。

#### 6.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO<sub>2</sub>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

定期的実施されている性状検査において、プレート上で単層状に増殖すること、細胞倍加時間が 15~20 時間以内であること、染色体数の平均（モード）が 25 本であること及びマイコプラズマによる汚染がないことが確認された細胞から、30 代を越えない範囲で継代培養を行っているものを用いた。

### 6.5 S9 mix 及び培養液

#### 6.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素（S9/コファクターC セット、ロット番号：C081219101、オリエンタル酵母工業株式会社）を混合し、S9 mix を調製した。調製は使用時に行った。

##### 1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	08121910
製造日	:	2008 年 12 月 19 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	:	2009 年 6 月 18 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	:	C08121710
製造日	:	2008 年 12 月 17 日
保存方法	:	冷凍（超低温フリーザー）
使用期限	:	2009 年 6 月 16 日（製造後 6 箇月）(Lot No. C08121710)
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

## 6.5.2 培養液

Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO™、Cat.No.11095) に非働化 (56°C、30分) した牛血清 (bovine serum、BS) を 10 v/v% 添加した培養液 (BS-MEM) を用いた。調製後の培養液は冷蔵保存した。

## 1) 牛血清

ロット番号	:	616941
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	:	495144、510522
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<sup>1-5)</sup>

試験は以下のステージ順に実施した。なお、短時間処理法において明らかな陽性の結果が得られたため、連続処理法及び確認・追加試験は実施しなかった。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化

## 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。ただし、陽性対照 (Positive Control) は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」～「99」までの2桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

### 6.6.2 用量の設定

#### 1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を1500 µg/mL (10 mM相当) とし、以下公比2で希釈した750、375、188、93.8、46.9、23.4及び11.7 µg/mLの計8用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

#### 2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では93.8 µg/mLで、非代謝活性化では46.9 µg/mLで、50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。また、連続処理法の24時間処理では23.4 µg/mLで50%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82.6 µg/mL、非代謝活性化では34.8 µg/mL、連続処理法の24時間処理では23.4 µg/mLであった。連続処理法の48時間処理では、最低用量の11.7 µg/mLにおいても、50%を超えない細胞増殖抑制作用は認められなかったが、細胞増殖率は44%を示し、50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は11.7 µg/mL以下であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、短時間処理法の代謝活性化では150 µg/mLを最高用量として、以下、公比1.5で計5用量を、短時間処理法の非代謝活性化では100 µg/mLを最高用量として、以下、公比1.5で計5用量を、連続処理法の24時間処理では40.0 µg/mLを最高用量として、以下、公比1.5で計5用量を、連続処理法の48時間処理では26.7 µg/mLを最高用量として、以下、公比1.5で計6用量を設定した。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。なお、連続処理法の用量設定は実施したが、短時間処理法において総合判定が陽性と判断されたため、連続処理法は実施しなかった。

### 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陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。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  $2 \times 10^4$  個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養3日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 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観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、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、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度99%以上）で洗浄・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下で観察し、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、陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレは $\gamma$ 線滅菌済プラスチックプレート（直径60mm）を用いた。プレートは各群2枚とした。
- (2) プレート当たり  $2 \times 10^4$  個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養3日後に、倒立位相差顕微鏡で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、24時間処理及び48時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 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観察し、細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24時間及び48時間処理における被験物質の50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

## 6.6.4 染色体異常試験

- 1) 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 $\gamma$ 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  $2 \times 10^4$  個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 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観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、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 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25% トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所を滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2% ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- 5) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

#### 6.6.5 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。

#### 6.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常は更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もの(非染色部分が染色分体の同軸上にある)であって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるもの。
- 染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸上からはずれているもの及び非染色部位が染色分体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化(frg)他。

### 2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数(二倍体)と異なり、倍化した場合を数的異常と定義した。

- 倍数体 : polyploidy (核内倍加体: endoreduplication を含む)

## 6.6.7 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準<sup>1)</sup>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 (+)

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 Appendix 1-1 及び Appendix 2-1 に、非代謝活性化の結果を Appendix 1-2 及び Appendix 2-2 に示した。

##### 1) 50%細胞増殖抑制濃度 (Appendix 2-1 及び Appendix 2-2)

代謝活性化では 93.8 µg/mL 以上、非代謝活性化では 46.9 µg/mL 以上の用量で 50% 以上の細胞増殖抑制が認められた。50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、代謝活性化では 82.6 µg/mL、非代謝活性化では 34.8 µg/mL であった。

##### 2) 被験物質添加直後の観察 (Appendix 2-1 及び Appendix 2-2)

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 750 µg/mL 以上の用量で析出が認められた。

##### 3) 被験物質処理終了時の観察 (Appendix 2-1 及び Appendix 2-2)

代謝活性化及び非代謝活性化ともに 750 µg/mL 以上の用量で析出が認められた。被験物質用量群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 46.9 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。11.7 及び 23.4 µg/mL では異常は認められなかった。一方、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 Appendix 1-3 及び Appendix 2-3 に、48 時間処理の結果を Appendix 1-4 及び Appendix 2-4 に示した。

##### 1) 50%細胞増殖抑制濃度 (Appendix 2-3 及び Appendix 2-4)

24 時間処理では 23.4 µg/mL 以上、48 時間処理では 11.7 µg/mL 以上の用量で 50% 以上の細胞増殖抑制が認められた。50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、24 時間処理では 23.4 µg/mL であった。一方、48 時間処理では最低用量の 11.7 µg/mL においても 50% 以下の細胞増殖抑制が認められず、50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は 11.7 µg/mL 以下であった。

##### 2) 被験物質添加直後の観察 (Appendix 2-3 及び Appendix 2-4)

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともにすべての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 750 µg/mL 以上の用量で析出が認められた。

##### 3) 被験物質処理終了時の観察 (Appendix 2-3 及び Appendix 2-4)

24 時間処理及び 48 時間処理ともに、1500 µg/mL の用量で被験物質と思われる物質

のプレート底面への固着が認められた。被験物質用量群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理及び 48 時間処理ともに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

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

### 1) 被験物質添加直後の観察 (Appendix 3-1 及び Appendix 3-2)

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、すべての用量で析出は認められなかった。

### 2) 被験物質処理終了時の観察 (Appendix 3-1 及び Appendix 3-2)

代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての用量で析出は認められなかった。被験物質用量群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化及び非代謝活性化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。

### 3) 染色体構造異常 (Table 1-1 及び Table 1-2)

構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化においては、150 µg/mL では細胞毒性のため、規定数 (200 個) の観察が実施出来ず UR (unreliable) と判定された。100 µg/mL で 60.5%と陽性の判定基準である 10%以上を示した。66.7 µg/mL で 7.0%と疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示した。44.4 µg/mL で 3.0%及び 29.6 µg/mL で 0.5%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、100 及び 66.7 µg/mL では細胞毒性のため、規定数 (200 個) の観察が実施出来ず TOX または UR と判定された。44.4 µg/mL で 57.5%及び 29.6 µg/mL で 13.5%と陽性の判定基準である 10%以上を示した。19.8 µg/mL で 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、試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

### 4) 染色体数異常 (Table 1-1 及び Table 1-2)

数的異常 (倍数体) の出現率は、代謝活性化においては、150 µg/mL では細胞毒性のため、規定数 (200 個) の観察が実施出来ず UR (unreliable) と判定された。100 µg/mL で 0.5%、66.7 µg/mL で 0.5%、44.4 µg/mL で 0.5%及び 29.6 µg/mL で 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、100 µg/mL 及び 66.7 µg/mL では細胞毒性のため、規定数 (200 個) の観察が実施出来ず TOX または UR と判定された。44.4 µg/mL で 0%、29.6 µg/mL で 0%及び 19.8 µg/mL で 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

M-1345

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、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。

## 8. 考察

染色体異常試験の結果、短時間処理法の代謝活性化においては、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率 (TA 値) は、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で陽性、66.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で疑陽性を示し、用量の増加に伴う TA 値の上昇が認められたため陽性と判定した。染色体異常誘発性の強さの指標値については、観察細胞の 20% に何らかの異常が見られる用量である D20 値<sup>1)</sup>は 0.075  $\text{mg}/\text{mL}$ 、単位用量あたりの染色分体交換 (cte) を持つ細胞の出現率の比較値である TR 値<sup>1)</sup>は 560 であった。また、短時間処理法の非代謝活性化においても、44.4 及び 29.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で陽性を示し、用量の増加に伴う TA 値の上昇が認められたため陽性と判定した。染色体異常誘発性の強さの指標値については、D20 値<sup>1)</sup>は 0.032  $\text{mg}/\text{mL}$ 、TR 値<sup>1)</sup>は 1100 であった。一方、倍数性細胞の出現率においては、いずれの処理法においてもすべての用量で陰性の判定基準である 5%未満であった。

なお、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率は 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ことから、試験は適切に実施されたと考えられた。

メチルスチリルケトン<sup>8)</sup>は、細菌を用いる復帰突然変異試験では、*Salmonella typhimurium* TA100 及び TA1537 菌株の代謝活性化条件下で陽性<sup>6)</sup>を、雄性マウスを用いた小核試験では陰性<sup>7)</sup>を示している。また、幾何異性体の Methyl trans-styryl ketone (CAS 番号 1896-62-4) は、細菌を用いる復帰突然変異試験では、*Salmonella typhimurium* TA100 菌株及び *E. coli* WP2uvr/pKM 101 菌株の代謝活性化条件下で陽性<sup>8)</sup>を、雄性マウスを用いた小核試験では陰性<sup>8)</sup>を示している。さらに、母核に当る styrene は、細菌を用いる復帰突然変異試験では陰性<sup>9)</sup>を、培養細胞を用いる染色体異常試験では、CHL/IU 細胞において代謝活性化条件下で陽性<sup>1)</sup>を示している。

以上の結果から、メチルスチリルケトンは本試験条件下において染色体数的異常誘発能は有さないが、染色体構造異常誘発能は有すると結論した。

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) Prival MJ, Sheldon AT Jr., Popkin D (1982) Evaluation, using *Salmonella typhimurium*, of the mutagenicity of seven chemicals found in cosmetics, *Food Chem. Toxicol.* **20**, 427-432
- 7) National Toxicology Program, NIH “Methyl styryl ketone”  
<http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=BDB0B87D-123F-7908-7BADB81177038899>  
(accessed 2009-04-10)
- 8) National Toxicology Program, NIH “Methyl trans-styryl ketone”  
<http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm?objectid=BDB5AE86-123F-7908-7BE842A0A6A93346> (accessed 2009-04-10)
- 9) Milvy P and Garro AJ (1976) Mutagenic activity of styrene oxide (1,2-epoxyethylbenzene), a presumed styrene metabolite *Mutation Res.* **40**, 15-18

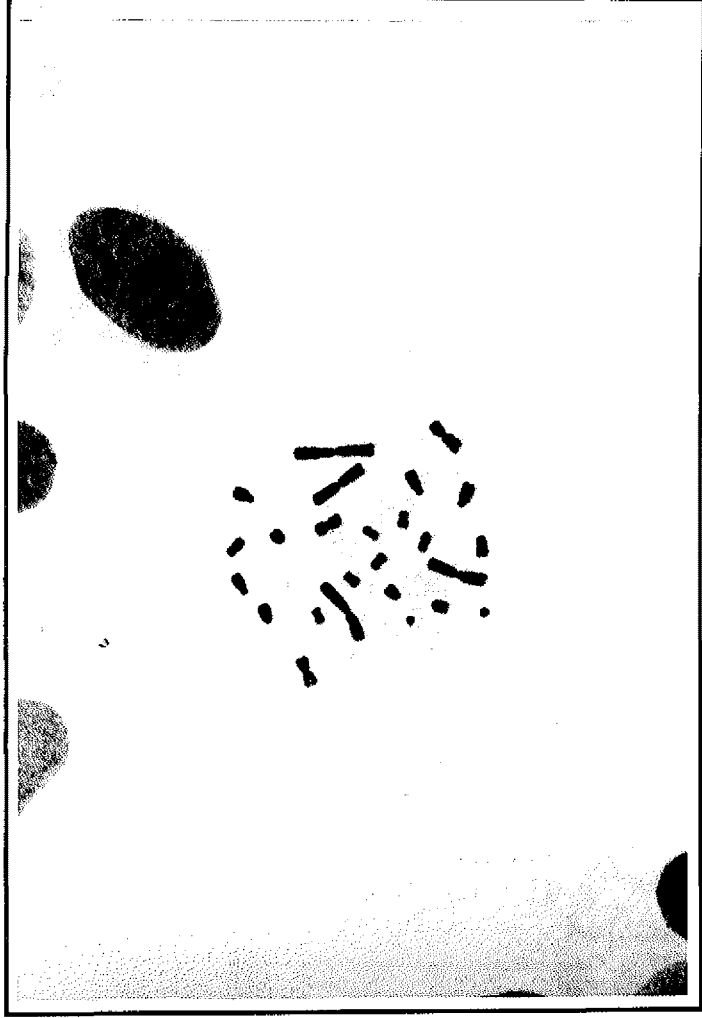


Photo. 1 A metaphase chromosome from the negative control group  
[Short-term treatment: +S9 mix]

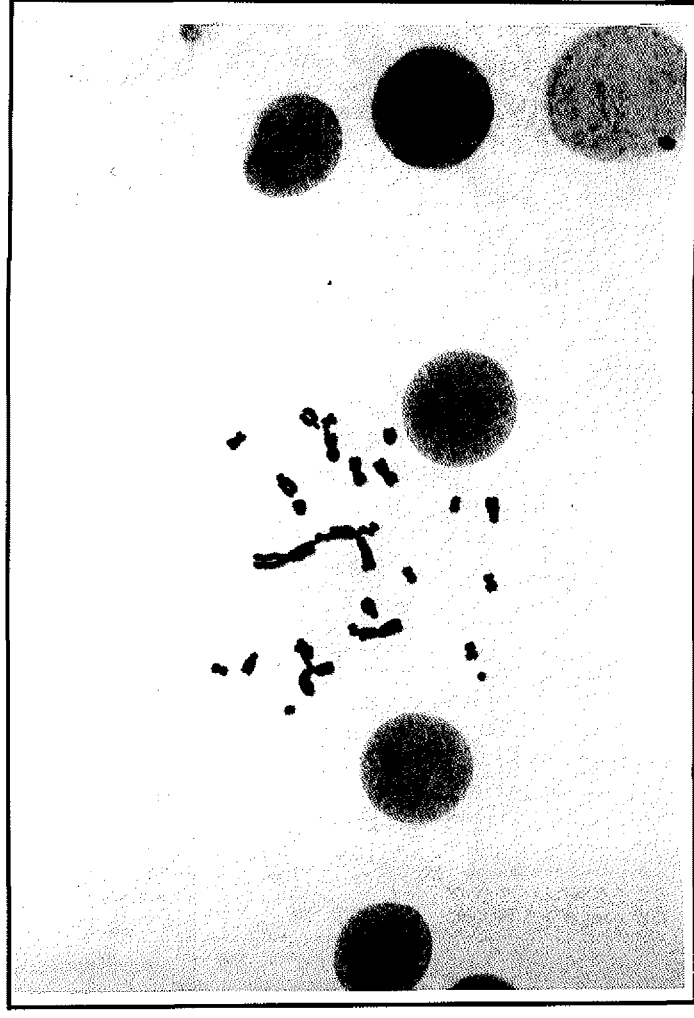


Photo. 2 A metaphase chromosome from the 100 µg/mL group with a break  
and chromatid exchanges  
[Short-term treatment: +S9 mix]

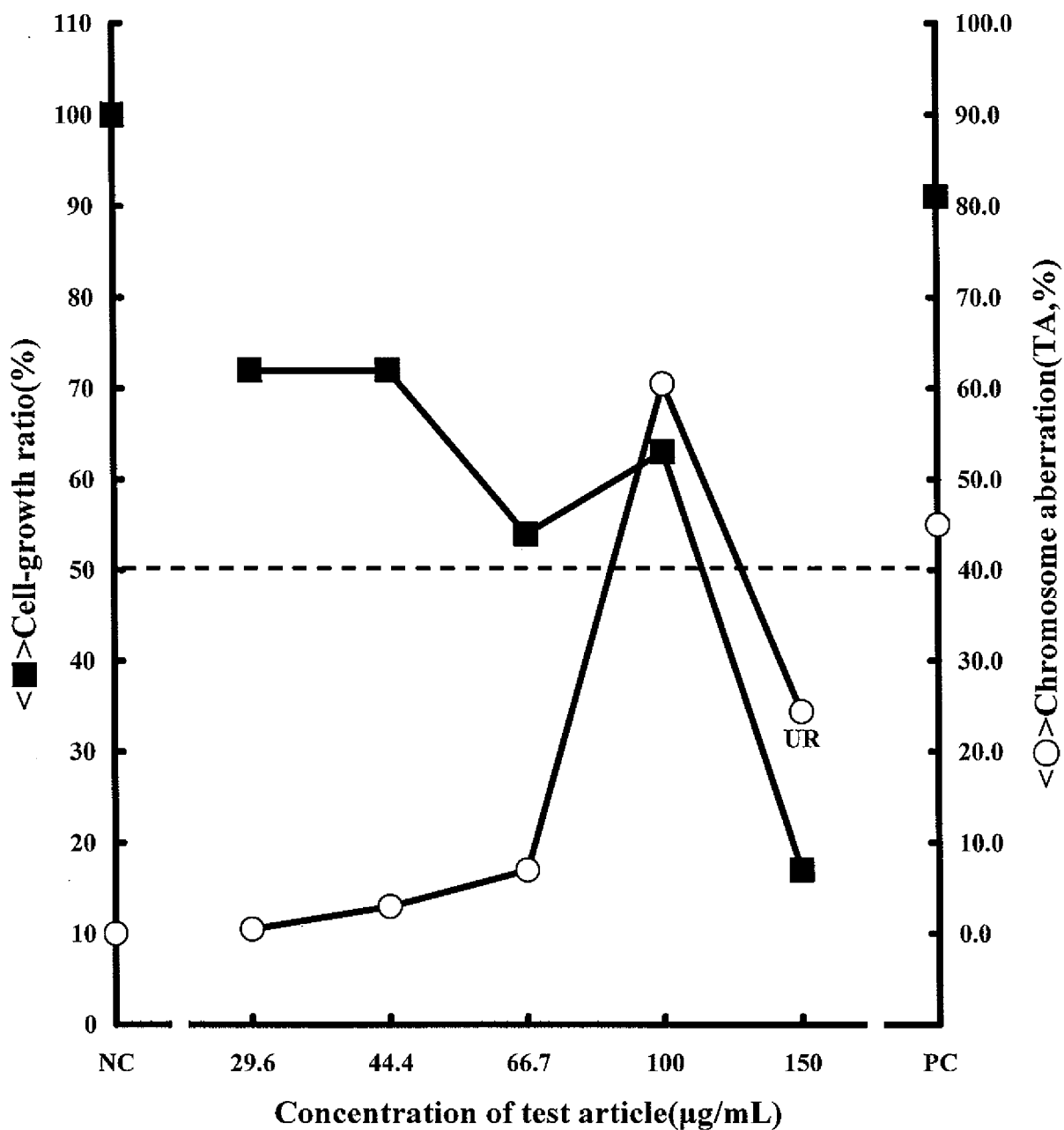


Fig. 1-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Methyl styryl ketone

[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosome could be observed due to severe cytotoxicity.

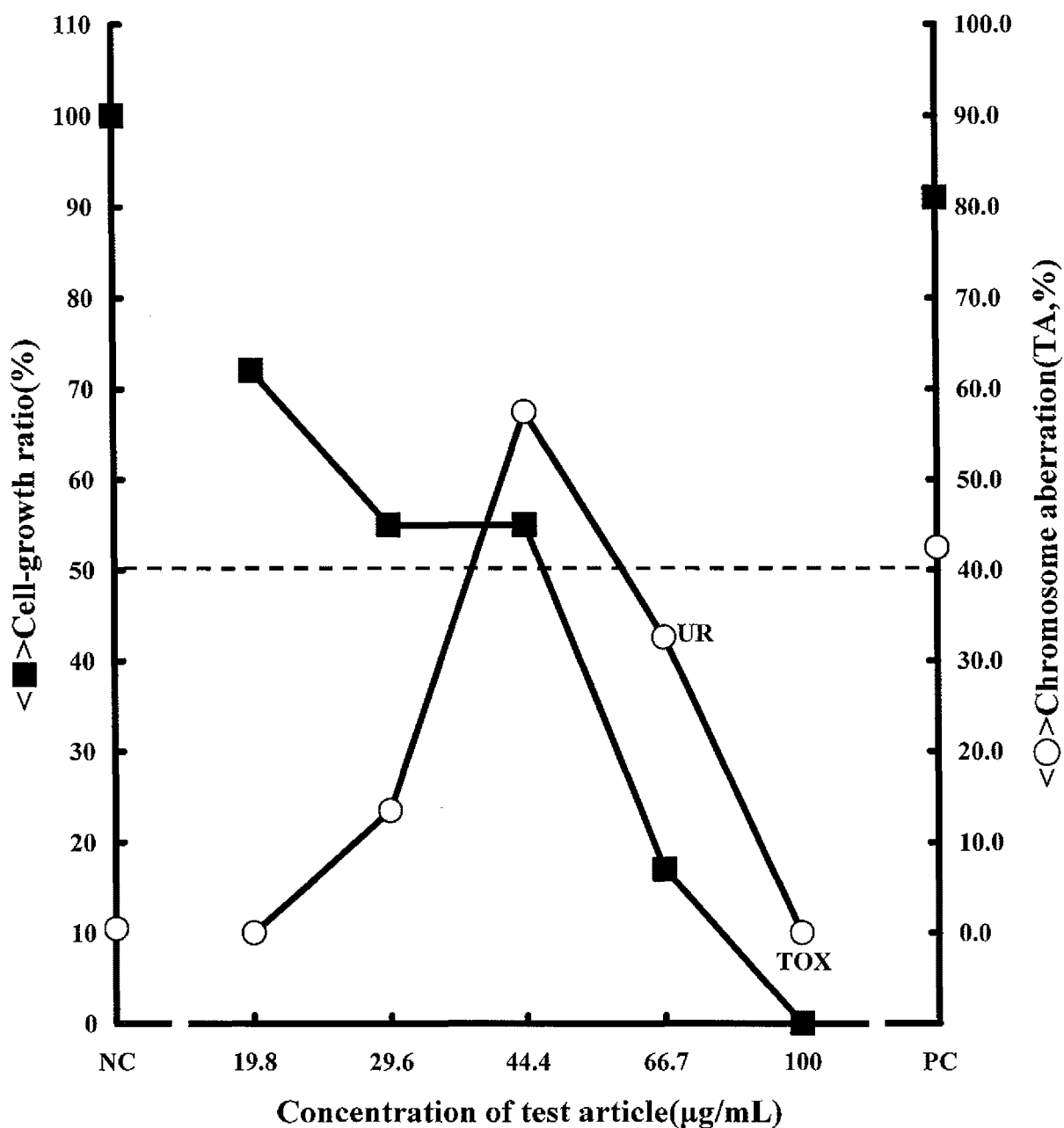


Fig. 1-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Methyl styryl ketone

[Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosome could be observed due to severe cytotoxicity.

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.



Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Methyl styryl ketone  
[Short-term treatment:+S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.			
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)	Judge-ment	
6-18	+	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	23-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	119	100	0	0	0	-	30-1
			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)	0(0.0)	0(0.0)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		29.6	100	0	0	0	0	0	0	1	1	1	-	79	100	0	0	0	-	24-1
			100	0	0	1	0	0	1	0	1	1	-	79	100	0	0	0	-	38-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	-	(72)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
		44.4	100	0	1	0	0	0	1	0	1	1	-	79	100	1	0	1	-	72-1
			100	2	3	0	0	0	5	1	6	6	-	79	100	0	0	0	-	36-1
			200	2(1.0)	4(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	6(3.0)	1(0.5)	7(3.5)	7(3.5)	0(0.0)	-	(72)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-
		66.7	100	1	7	0	0	0	8	0	8	8	±	59	100	0	0	0	-	22-1
			100	1	5	0	0	0	6	1	7	7	±	59	100	1	0	1	-	65-1
			200	2(1.0)	12(6.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	14(7.0)	1(0.5)	15(7.5)	15(7.5)	0(0.0)	-	(54)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-
		100	100	14	55	0	0	0	59	0	59	59	+	79	100	0	0	0	-	54-1
			100	19	56	0	1	0	62	0	62	62	+	59	100	1	0	1	-	51-1
			200	33(16.5)	111(55.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	121(60.5)	0(0.0)	121(60.5)	121(60.5)	0(0.0)	-	(63)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-
		150	23	2	1	0	0	0	2	0	2	2	UR	19	23	0	2	2	UR	10-1
			27	5	3	1	0	1	8	0	8	8	UR	19	27	0	1	1	UR	10-2
			40	5	1	0	0	4	10	2	12	12	UR	19	40	0	0	0	UR	67-1
			37	6	3	0	1	2	11	1	12	12	UR	19	37	1	0	1	UR	67-2
			127	18(14.2)	8(6.3)	1(0.8)	1(0.8)	7(5.5)	31(24.4)	3(2.4)	34(26.8)	34(26.8)	0(0.0)	-	(17)	127	1(0.8)	3(2.4)	4(3.1)	-
PC	100	6	46	1	0	0	49	0	49	49	+	100	100	0	0	0	-	18-1		
	100	8	36	1	0	0	41	0	41	41	+	100	100	0	0	0	-	12-1		
	200	14(7.0)	82(41.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	90(45.0)	0(0.0)	90(45.0)	90(45.0)	0(0.0)	-	(91)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-		

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, 14µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Methyl styryl ketone  
[Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)								Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.			
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g		TAG(%)	Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells		other	Total (%)	Judge-ment
6-18	NC	100	100	1	1	0	0	0	1	0	1	-	100	100	0	0	0	0	61-1
		100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	83	100	0	0	0	0	17-1
		200	100	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
	19.8	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	66	100	0	0	0	0	56-1
		100	100	0	0	0	0	0	0	1	1	-	66	100	0	0	0	0	50-1
		200	100	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	-	(72)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
	29.6	100	100	9	5	0	0	0	14	0	14	-	50	100	0	0	0	0	80-1
		100	100	6	6	1	0	0	13	0	13	+	50	100	0	0	0	0	91-1
		200	100	15(7.5)	11(5.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	27(13.5)	0(0.0)	27(13.5)	+	(55)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
	44.4	100	100	14	46	1	0	0	55	0	55	-	50	100	0	0	0	0	70-1
		100	100	28	49	0	0	0	60	0	60	+	50	100	0	0	0	0	42-1
		200	100	42(21.0)	95(47.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	115(57.5)	0(0.0)	115(57.5)	+	(55)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-
	66.7	19	100	7	1	0	0	0	8	0	8	-	16	19	0	0	0	0	66-1
		12	100	1	0	0	0	1	2	0	2	-	12	12	0	0	0	0	66-2
		40	100	7	6	0	0	1	13	1	14	UR	16	40	0	0	0	0	UR
		24	100	7	2	0	0	0	8	0	8	UR	16	24	0	0	0	0	UR
		95	100	22(23.2)	9(9.5)	0(0.0)	0(0.0)	2(2.1)	31(32.6)	1(1.1)	32(33.7)	UR	(17)	95	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	UR
	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	37-1
		0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	37-2
		0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	TOX	0	0	0	0	0	0	TOX
		0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	TOX	0	0	0	0	0	0	TOX
		0	100	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	TOX	(0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	TOX
	PC	100	100	11	35	0	0	0	42	0	42	-	83	100	0	0	0	0	32-1
		100	100	8	40	1	0	0	43	0	43	+	83	100	0	0	0	0	85-1
200		100	19(9.5)	75(37.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	85(42.5)	0(0.0)	85(42.5)	+	(91)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	

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, 0.075µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.