

最終報告書

三酸化二ひ素の TK6 細胞を用いる TK 遺伝子突然変異試験

試験番号: N-G104

試験期間: 2016年1月14日-2016年3月29日

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

試験委託者 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

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

1. 目次

1.	目次		2
2.	試験	実施概要	4
	2.1	試験番号	4
	2.2	試験表題	4
	2.3	試験目的	4
	2.4	試験委託者	4
	2.5	試験受託者	4
	2.6	試験実施施設	4
	2.7	試験日程	4
	2.8	試験責任者	4
	2.9	試験担当者	5
	2.10	予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのあ	
		る事態及び試験計画書に従わなかったこと	5
	2.11	資料保存	5
	2.12	試験責任者の記名・押印及びその日付	5
3.	要約		5
4.	緒言		7
5.	試験	材料	8
	5.1	被験物質及び溶媒	8
	5.1.1	被験物質	3
	5.1.2	溶媒	8
	5.2	溶媒の選定根拠	3
	5.3	被験液の調製	3
	5.3.1	調製方法	9
	5.3.2	調製頻度)
	5.4	対照物質)
	5.4.1	陰性対照)
	5.4.2	陽性対照)
	5.5	使用細胞株10)
	5.5.1	細胞株10)
	5.5.2	細胞株の選択理由10)
	5.5.3	培養条件10)
	5.6	S9 mix 及び培養液の調製10)
	5.6.1	S9 mix	
	5.6.2	培養液1	l
	5 7	試驗方法	,

	5.7.1	識別方法12
	5.7.2	用量の設定12
	5.7.3	用量設定試験13
	5.7.4	遺伝子突然変異試験14
	5.7.5	確認試験16
	5.7.6	コロニーの観察16
	5.7.7	試験結果の表示16
	5.7.8	結果の計算17
	5.8 統	計解析19
	5.9 結	果の判定19
	5.9.1	試験成立基準19
6.	試験結果	-及び考察20
7.	参考文献	₹22
表	Table 1 Table 2	Results of the gene mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Arsenic (III) trioxide [Short-term treatment: -S9 mix]
付	· 表	
	Appendix 1	Results from the survival assay of the dose range finding test in cultured mouse lymphoma cells treated with Arsenic (III) trioxide25
	Appendix 2	Results of the gene mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Arsenic (III) trioxide (Individual Data) [Short-term treatment: -S9 mix]26
	Appendix 2-	Results of the gene mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Arsenic (III) trioxide (Individual Data) [Short-term treatment: +S9 mix]27

2. 試験実施概要

2.1 試験番号

N-G104

2.2 試験表題

三酸化二ひ素の TK6 細胞を用いる TK 遺伝子突然変異試験

2.3 試験目的

三酸化二ひ素の安全性に関する非臨床試験の一環として、ヒトリンパ芽球由来の培養細胞(TK6)のチミジンキナーゼ遺伝子座の変異を指標として、三酸化二ひ素の遺伝毒性誘発性を検討した。また、並行して実施するマウスリンフォーマ TK 試験を用いた当該被験物質の遺伝毒性誘発性との比較をした。

2.4 試験委託者

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

2.5 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

2.6 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 〒156-0042 東京都世田谷区羽根木 1-3-11

2.7 試験日程

試験開始日 : 2016年 1月 14日 被験物質受領日 : 2015年 12月 25日 実験開始日 : 2016年 2月 8日 実験終了日 : 2016年 3月 29日 試験終了日 : 2016年 3月 29日

2.8 試験責任者

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

2.9 試験担当者

被験物質保存責任者

試験担当者

2.10 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

予見することができなかった試験の信頼性に及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったことはなかった。

2.11 資料保存

試験計画書(原本)、記録文書、生データ及び報告書類(最終報告書の原本を含む)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を提出後 10 年間とする。期間終了後の保存については、国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部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。

2.12 試験責任者の記名・押印及びその日付

216年 3月29日

株式会社ボゾリサーチセンター 東京研究所 研究部

3. 要約

三酸化二ひ素の遺伝毒性誘発性を評価するため、ヒトリンパ芽球細胞(TK6)のチミジンキナーゼ遺伝子座の変異を指標として、遺伝子突然変異試験を実施した。

松浦らの報告 $^{1)}$ によると、本被験物質の L5178Y $tk^{+/-}$ -clone 3 .7.2C 細胞への細胞毒性は強く、「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 4 90」が推奨する最高用量の 10 mM 19 80 10

遺伝子突然変異試験の結果、被験物質処理群における総遺伝子突然変異頻度 (T-MF) は、非代謝活性化では同時陰性対照群の 7.08×10^{-6} に対し、 $4.24\sim6.25$ $\mu g/mL$ の用量間で増加が認められ、かつ濃度依存性の反応が確認され、代謝活性化でも同様に同時陰性対照群の 8.43×10^{-6} に対し、 $3.69\sim5.76$ $\mu g/mL$ の用量間で有意な増加が認められ、かつ濃度依存性の反応が確認された。したがって、短時間処理法において陽性と判定したため、連続処理法は実施しなかった。

いずれの処理法においても陰性対照群におけるコロニー形成率はPE0及びPE3ともに $70 \sim 130\%$ の範囲内にあったことから、使用細胞のコロニー形成能は適切であったと判断された。また、短時間処理法において陰性対照群における T-MF は $3 \sim 10 \times 10^{-6}$ の範囲内にあったことから、本細胞株の自然突然変異頻度の範囲内にあり、一方で陽性対照群ではいずれの処理法でも顕著な T-MF の増加が確認されたため、既存変異原物質に対する感受性は適切であると判断した。

以上の結果から、三酸化二ひ素は本試験条件(短時間処理)下において遺伝毒性誘発性を有すると結論した。

4. 緒言

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部の依頼により、三酸化二ひ素の安全性評価の一環として、ヒトリンパ芽球由来の培養細胞(TK6)のチミジンキナーゼ遺伝子座の変異を指標として、遺伝子突然変異試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の参考とするガイドラインに準拠して実施した。

1) 参考とするガイドラインなど

• 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 490」 (OECD 理事会: 2015年7月28日)

- 試験材料 5.
- 5.1 被験物質及び溶媒
- 被験物質 5.1.1

供給者 :

名称 三酸化二ひ素

別名 (英名) : Arsenic (III) trioxide

CAS 番号 1327-53-3 ロット番号 T22B051 :

分子式 As_2O_3 分子量 197.84

性状 白色~透明な固体 あるいは結晶性粉末

溶解性 水に溶ける(1.2-3.7 g/100mL、20°C)。 安定性 保存条件下にて安定。

保存方法 : 室温

保存場所 東京研究所 被験物質保存室

有害性 水溶液は弱酸であり、還元剤と反応して非常に有毒な

> ガス(アルシン)を生ずることがある。酸と反応する とヒ素の有害なヒュームをだす危険がある。強熱する

> と分解し、強い溶血作用を持つ酸化ヒ素(Ⅲ)の煙霧を

未使用残余被験物質の処理

実験終了後の残量はすべて供給者に返却した。

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

5.1.2 溶媒

> 名称 注射用水

ロット番号 5198N

規格 日本薬局方

製造元 株式会社大塚製薬工場 :

保存方法 室温 :

保存場所 東京研究所 培養細胞試験室

5.2 溶媒の選定根拠

本被験物質の水への溶解度が 1.2~3.7 g/100 mL(20°C下)であることから、溶媒 として注射用水を選定した。

- 5.3 被験液の調製

以下の操作は、滅菌済みの器具を用いて、可能な限り無菌的あるいは準無菌的に実 施した。なお、本被験液は併行実施する関連試験(試験番号:N-G103)と共有した。

5.3.1 調製方法

- 1) 用量設定試験
- (1) 被験物質 0.0500 g を 5 mL メスフラスコに秤取した。
- (2) 溶媒を加えてメスアップ後、最高濃度の 1.00 mg/mL 溶液を調製した。
- (3) 1.00 mg/mL 溶液を公比 2(各濃度の被験液 5 mL:溶媒 5 mL)で 5 段階希釈して、0.050、0.025、0.0125、0.00625 及び 0.00313 mg/mL の計 6 濃度段階の被験液を調製した。
- 2) 遺伝子突然変異試験
- (1) 短時間処理法では、被験物質 0.0300 g を 10 mL メスフラスコに秤取する。
- (2) 溶媒を加えてメスアップ後、最高濃度の 3.00 mg/mL 溶液を調製する。
- (3) 3.00 mg/mL 溶液を 3.33 倍希釈 (3.00 mg/mL 溶液 1.5 mL: 溶媒 3.5 mL) し、0.900 mg/mL 溶液を調製する。0.900 mg/mL 溶液を公比 1.25 (各濃度の被験液 2.0 mL: 溶媒 0.5 mL) で 5 段階希釈して、0.720、0.576、0.461、0.369 及び 0.295 mg/mLの計 6 濃度段階の被験液を調製し、これを短時間処理法の代謝活性化に用いる。
- (4) (3) の 0.900 mg/mL 溶液を公比 1.2 (各濃度の被験液 1.0 mL:溶媒 0.2 mL) で 5 段階希釈して、0.750、0.625、0.521、0.434 及び 0.362 mg/mL の計 6 濃度段階の被験液を調製し、これを短時間処理法の非代謝活性化に用いる。

5.3.2 調製頻度

用時に調製した。

5.4 対照物質

5.4.1 陰性対照

溶媒として使用した注射用水を陰性対照とした。

5.4.2 陽性対照

1) 非代謝活性化系

名称 : メタンスルフォン酸メチル (MMS)

ロット番号 : AWR0610

製造元 : 株式会社ワコーケミカル

保存方法 : 冷蔵、遮光

保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

2) 代謝活性化系

名称 : シクロフォスファミド (CP)

ロット番号 : CTN3690

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

東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

3) 陽性対照物質の選択理由

「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 490」に使用が推奨されているため。

4) 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) 遺伝子突然変異試験 短時間処理法 非代謝活性化及び連続処理法 MMS をγ線滅菌済プラスチック遠心管 (50 mL)に 0.0100 g を秤取した。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: K5E97)を 10 mL 加えて溶解し 1.0 mg/mL 溶液を調製した。次いで、1.0 mg/mL 溶液を 2 倍希釈 (1.0 mg/mL 溶液 5 mL: 生理食塩液 5 mL) し、0.50 mg/mL 溶液を調製した(非代謝活性化では 1.0 mg/mL 溶液、連続処理法では 0.50 mg/mL 溶液を培養液に 1
- (2) 遺伝子突然変異試験 短時間処理法 代謝活性化 CPをγ線滅菌済プラスチック遠心管 (50 mL)に 0.0100 g を秤取した。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: K5E97)を 20 mL 加えて溶解し 0.50 mg/mL 溶液を調製した(培養液に 1 v/v%添加した際の最終濃度:5 μg/mL)。

v/v%添加した際の最終濃度:10 μg/mL 及び5 μg/mL)。

5.5 使用細胞株

5.5.1 細胞株

ヒトリンパ芽球細胞(TK6)を用いる。

細胞は、国立医薬品食品衛生研究所から 2012 年 6 月 29 日に入手し、凍結保存した 細胞について定期的に細胞の性状検査を実施して、性状が適正である (細胞倍加時間が 10 ~ 15 時間の範囲内、変異原物質対する感受性が適正及び微生物やマイコプラズマによる汚染がない) ことが確認されたものを 30 継代以内で試験に使用した。

細胞継代数は用量設定試験で3継代、遺伝子突然変異試験で10継代であった。

5.5.2 細胞株の選択理由

毒性試験ガイドラインに使用が推奨されているため。

5.5.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、 CO_2 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下で $1\sim4$ 日ごとに継代培養を行った。

5.6 S9 mix 及び培養液の調製

5.6.1 S9 mix

S9 及び補酵素 (S9/コファクターC セット、ロット番号: C151030081、C151120091) を混合し、S9 mix を調製した。調製は用時に行った。

1) S9

名称 : S9

製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社

ロット番号 : 15103008、15112009

製造日 : 2015年10月30日、2015年11月20日

種・系統: ラット·SD系週齢・性: 7週齢・雄性

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: PB4 日間連続投与 30+60+60+60 (mg/kg 体重)

PB 投与 3 日目 BF 投与 80 (mg/kg 体重)

使用期限 : 2016年4月29日、2016年5月19日

保存方法 : 冷凍(-70°C以下)

保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 超低温フリーザ

2) 補酵素

名称 : コファクターC

製造元 : オリエンタル酵母工業株式会社

ロット番号 : C15102808、C15111809

製造日 : 2015年10月28日、2015年11月18日

保存方法 : 冷凍 (-70°C 以下)

使用期限 : 2016年4月27日、2016年5月17日

保存場所 : 東京研究所 培養細胞試験室 超低温フリーザ

3) S9 mix の組成 (1 mL 中)

水 : 0.7 mL S9 : 0.3 mL MgCl₂ : $5 \mu \text{mol/mL}$ KCl : $33 \mu \text{mol/mL}$

グルコース-6-リン酸

5 µmol/mL

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)

4 μmol/mL

HEPES 緩衝液 (pH7.2)

: $4 \mu mol/mL$

5.6.2 培養液

非働化(56°C、30 分)した馬血清 (HS)を、RPMI Medium 1640 (GIBCO[™] Cat.No.11875)に 0、10 及び 20 v/v%添加した培養液(それぞれ RPMI-0、RPMI-10 及び RPMI-20 と略記した。)を用いた。調製後の培養液は冷蔵保存した。

1) 馬血清

ロット番号

1671318

製造元

Life Technologies Corporation

使用期限

2019年6月

保存方法

冷凍 (-20°C 以下)

保存場所

東京研究所 培養細胞試験室 冷凍庫

2) RPMI Medium 1640

ロット番号

1713312

製造元

Life Technologies Corporation

使用期限

2016年8月

保存方法

冷蔵

保存場所

東京研究所 培養細胞試験室 冷蔵庫

5.7 試験方法

試験は以下に示したステージの順に実施した²⁻⁴⁾。

• :

:

:

		· ·	
1. 用量設定試験	短時間処理法	非代謝活性化	
		代謝活性化	
	連続処理法	24 時間処理	
2.遺伝子突然変異試験	短時間処理法	非代謝活性化	_
		代謝活性化	

5.7.1 識別方法

以下の表示に従い、処理方法及び処理群を明記したラベルで使用器材の識別を行った。

項目	内 容	表示		
	短時間処理法 非代謝活性化	_		
処理方法	短時間処理法 代謝活性化	+		
	連続処理法 24 時間処理	24-		
	陰性対照群 (Negative Control)	NC(2 系列の場合、NC1、NC2)		
処理群	被験物質処理群	高濃度から1、2、3…N		
	陽性対照群 (Positive Control)	PC		
同一処理群内	7での識別	1, 2, 3···N		

5.7.2 用量の設定

1) 用量設定試験

松浦らの報告 $^{1)}$ によると、本被験物質の L5178Y $tk^{+/-}$ -clone 3.7.2C 細胞への細胞毒性は強く、「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 490」が推奨する最高用量の 10~mM (1980 $\mu\text{g/mL}$) からの希釈では、RSG が $10\sim20\%$ を示す用量を算定することが困難と考えられた。そこで、松浦らの報告を参考として、最高用量を $10.0~\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2~で希釈した 5.00、2.50、1.25、0.625 及び

0.313 μg/mLの計 6 用量を設定した。これに加えて陰性対照群を設けた。

2) 遺伝子突然変異試験

用量設定試験の結果に基づき、「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 490」を参考として RSG が 10~20%を示す用量を選定した。これに加えて陰性対照群、陽性対照群を設けた。

処理	見方法	用 量(µg/mL)
短時間処理法	非代謝活性化	2.95、3.69、4.61、5.76、7.20、9.00 (公比 1.2)
应时间处理伍	代謝活性化	2.95、3.69、4.61、5.76、7.20、9.00 (公比 1.25)
連続処理法	24 時間処理	3.62、4.34、5.21、6.25、7.50、9.00 (公比 1.2)

5.7.3 用量設定試験

遺伝子突然変異試験の用量を設定するための予備試験として実施した。遺伝子突然変異試験の最高用量の設定に用いた細胞毒性の指標としては、relative suspension growth (RSG)を用いた。以下の無菌性を必要とする試験操作は、無菌環境下において、滅菌済みの器具を用いて、無菌的に実施した。

- 1) 短時間処理法の非代謝活性化、代謝活性化及び連続処理法のそれぞれに陰性対照 群及び被験物質処理群を設けた。容器はプラスチック製のチューブまたはフラス コを用い、使用個数は各群1個用いた。
- 2) 対数増殖期にある細胞を RPMI-10 で約 1×10⁶ cells/mL の細胞浮遊液に調製した。
- 3) 下表に従い、被験液処理を行った。

内 容 物	容 量 (mL)				
	非代謝活性化	代謝活性化	連続処理法		
細胞浮遊液(10 ⁶ cells/mL)	4.9	4.9	4.9		
RPMI-0	3.5	3.5			
RPMI-10			44.6		
S9 mix		1.5			
150 mM KCl	1.5				
被験液又は溶媒	0.1	0.1	0.5		

- 4) 肉眼または倒立位相差顕微鏡下で析出の有無及び培養液の色調を観察した。
- 5) 短時間処理法では、容器のキャップをかたく締め、約 37°C で 4 時間振盪培養を行った。連続処理法では、容器のキャップは半開きとし、37°C、5% CO_2 条件下で 24 時間静置培養を行った。
- 6) 培養終了後に、肉眼または倒立位相差顕微鏡下で析出の有無を観察した。細胞を十分にピペッティング又はミキサー処理した後に、細胞濃度を測定する(血球計算盤を用いる場合は、4箇所について計数を行い、平均(四捨五入して整数で表示)を算出した。この時の細胞濃度は「平均×10⁴ cells/mL」。細胞濃度測定機器を用いた場合は表示値とした)。
- 7) 内容物を約 1000 rpm で約 5 分間遠心した後、上清を除去し、約 10 mL の RPMI-0 を加え、細胞を懸濁後、再度遠心した。
- 8) 上清を除去し、RPMI-10を適量加え細胞濃度を測定した(血球計算盤を用いる場

合は、4 箇所について計数を行い、平均 (四捨五入して整数で表示) を算出した。 この時の細胞濃度は「平均 $\times 10^4$ cells/mL」)。

- 9) 得られた細胞濃度から、RPMI-10 で希釈し、浮遊液 A を調製した。このとき、細胞濃度及び調製量の上限は 3×10^5 cells/mL、20 mL とした。
- 10) 9)で調製した各浮遊液 A を 37°C、5%CO₂条件下で培養した。
- 11) 約 22~24 時間後に、各細胞濃度を求めた(細胞濃度測定機器を用いた場合の結果の表示方法: ADAM-MC (NanoEn Tek, Inc.)の表示値)。
- 12) RPMI-10 を用いて継代培養した。このとき、細胞濃度及び調製量の上限は 3×10⁵ cells/mL、20 mL とした。
- 13) 12)から約 22~24 時間後に、11)と同様に各細胞濃度を求めた(結果の表示方法: ADAM-MC (NanoEn Tek, Inc.)の表示値)。
- 14) 5.7.8 項より、陰性対照群の値を 100%として、被験物質処理群の relative suspension growth (%RSG)を求めた。

5.7.4 遺伝子突然変異試験

以下の無菌性を必要とする試験操作は、無菌環境下において、滅菌済みの器具を用いて、無菌的に実施した。

- 1) 短時間処理法の代謝活性化及び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。容器はプラスチック製のチューブまたはフラス コを用い、使用個数は陰性対照群では2個、被験物質処理群及び陽性対照群では 1個とした。
- 2) 対数増殖期にある細胞を RPMI-10 で約 1×10⁶ cells/mL の細胞浮遊液に調製した。
- 3) 下表により、被験液処理を行った。なお、処理液の量は適宜スケールダウンして も差支えない。

内 容 物	容 量 (mL)			
P3 谷 物	非代謝活性化	代謝活性化		
細胞浮遊液 (10 ⁶ cells/mL)	4.9	4.9		
RPMI-0	3.5	3.5		
RPMI-10				
S9 mix		1.5		
150 mM KCl	1.5			
被験液又は溶媒又は 陽性対照物質溶液	0.1	0.1		

- 4) 肉眼または倒立位相差顕微鏡下で析出の有無及び培養液の色調を観察した。
- 5) 短時間処理法では、容器のキャップをかたく締め、約 37°C で 4 時間振盪培養を 行った。
- 6) 培養終了後に、肉眼または倒立位相差顕微鏡下で析出の有無を観察した。細胞を 十分にピペッティング又はミキサー処理した後に、細胞濃度を測定する(血球計

算盤を用いる場合は、4箇所について計数を行い、平均(四捨五入して整数で表示)を算出した。この時の細胞濃度は「平均×10⁴ cells/mL」。細胞濃度測定機器を用いた場合は表示値とした)。

- 7) 内容物を遠心(設定:1000 rpm、5分)した。
- 8) 上清を除去し、約10 mLの RPMI-0 を加えて細胞を懸濁した後に、再度遠心した。
- 9) 上清を除去し、RPMI-10 を適量加えて細胞を懸濁した後に、それぞれ細胞濃度を 測定した(血球計算盤を用いる場合は、4 箇所について計数を行い、平均(四捨 五入して整数で表示)を算出した。この時の細胞濃度は「平均×10⁴ cells/mL」)
- 10) RPMI-10 を用いて、細胞濃度: 8 cells/mL、調製量: 25 mL(陰性対照群のみ 50 mL) となるように希釈を行った。
- 11) 96 ウエルプレート 1 枚(陰性対照群のみ 2 枚)に、各 0.2 mL/ウエル分注した (PE0)。
- 12) 96 ウエルプレートは 37°C、5% CO_2 条件下で 14 日間培養し、その後コロニーを含むウエルの数を記録した。
- 13) RPMI-10 を用いて、9)の残液を継代培養した。このとき、細胞濃度及び調製量の上限は 3×10^5 cells/mL、50 mL とした。
- 14) 13) から約 22~24 時間後に、5.7.3 11)と同様に各細胞濃度を求めた(結果の表示方法: ADAM-MC (NanoEn Tek, Inc.)の表示値)。
- 15) 13)と同様に継代培養を行った。
- 16) 15) から約 22~24 時間後に、5.7.3 11)と同様に各細胞濃度を求めた(結果の表示方法: ADAM-MC (NanoEn Tek, Inc.)の表示値)。
- 17) 16) から約 22~24 時間後に、5.7.3 11)と同様に各細胞濃度を求めた(結果の表示方法: ADAM-MC (NanoEn Tek, Inc.)の表示値)。
- 18) RPMI-10 を用いて、細胞濃度: 2×10⁵ cells/mL、調製量: 50 mL (陰性対照群のみ 100 mL) を調製した (細胞浮遊液 A)。
- 19) RPMI-10 を用いて、細胞浮遊液 A を細胞濃度: 8 cells/mL、調製量: 25 mL(陰性対照群のみ 50 mL) に調製した(細胞浮遊液 B)。
- 20) 各細胞浮遊液 B を、96 ウエルプレート 1 枚 (陰性対照群のみ 2 枚) に、各 0.2 mL/ウエル分注した (PE3)。
- 21) 細胞浮遊液 A の残液に trifluorothymidine (TFT)を最終濃度 3 μg/mL になるよう に添加した(細胞浮遊液 C)。
- 22) 細胞浮遊液 C を 96 ウエルプレート 2 枚 (陰性対照群のみ 4 枚) に、各 0.2 mL/ウエル分注した (MF)。
- 23) 37°C、5%CO₂条件下で、PE3 及び MF 用の 96 ウエルプレートはそれぞれ 12 日間培養し、5.7.6 項に従いコロニーを観察した。なお、この時点では MF 用の 96 ウエルプレートについては、Normally Growing Mutant (NG) コロニーのみ観察した。
- 24) MF 用の 96 ウエルプレートに 30 μg/mL の TFT 溶液を 25 μL/well ずつ添加し、 37°C、5%CO₂条件下で 12 日間培養した。

- 25) 12 日間培養後、5.7.6 項に従いコロニーを観察する。
- 26) 6.7.8 項に従い、PEO、RSO、RSG、RTG、PE3、RS3、MF及び%SCを算出した。

5.7.5 確認試験

遺伝子突然変異試験の結果において、以下の項目に該当しなかったため、確認試験を実施しなかった。

- 1) 被験物質処理群の中間用量で陽性を示すが、被験液の濃度に伴う遺伝子突然変異頻度の増加が認められない場合。
- 2) 被験物質処理群の最高用量のみで陽性を示す場合。

5.7.6 コロニーの観察

コロニーは、下記の基準に従い、まず大きさで分類し、大きさで判断に迷うものに ついては形態を参照した。

- 1) Normally Growing Mutant (NG) コロニーの観察
- (1) PE0、PE3 及び MF 用の 96 ウエルプレートは、細胞播種 14 日後に肉眼でコロニーを観察した。
- (2) 汚染が認められたウェルは観察対象から除外し、総ウェル数から減じて計算した。
- (3) PE0 及び PE3 用の 96 ウエルプレートは、1 個またはそれ以上の数のコロニーを 含むウェルとコロニーを含まないウェルを区別して計測した。
- (4) MF用の96ウエルプレートでは大きなコロニー(ウェルの直径の1/5以上のもの) を NG コロニーとし、それ含むウェルのみを計測した。なお、現時点で判定が不確実なものや明らかに小さなコロニーは、カウントする必要はない。
- 2) Slowly Growing Mutant (SG) コロニーの観察
- (1) NG コロニーの観察後、MF 用の 96 ウエルプレートに 30 μ g/mL の TFT 溶液を 25 μ L/ウェルずつ添加した。
- (2) 5%、 CO_2 存在下、37°C で 12 日間培養、同様に新たにコロニーを含むウェルを SG コロニーとして計測した。

5.7.7 試験結果の表示

試験結果は以下のように分類して表示した。すべての計算には Microsoft 社の Excel 2010 を使用し、Excel に設定された計算式によって、有効桁数の設定を行なわずに算出した。

plating efficiency (PE)

細胞のコロニー形成能(いわゆる平板効率)。被験物

質処理群の細胞毒性を求めるPE0及び遺伝子突然変異

頻度を求めるための PE3 を算出した。

relative survival (RS)

細胞毒性の指標。被験物質処理群の PE0 (PE3)と陰性

対照群の PE0 (PE3)との比である RS0 (RS3)を算出した。

relative suspension growth (RSG)

被験物質処理群の細胞増殖率。処理終了1日後、2日 後及び3日後の積として表した。また、被験物質処理 群のRSGと陰性対照群のRSGとの比(%RSG)を算出 した。

relative total growth (RTG)

RSGとRS3の積として表した。

mutant frequency (MF)

突然変異コロニーの出現率(突然変異頻度)。突然変

異発現期間後のコロニー形成能 (PE3)も考慮して求め

た。

%SC

SG コロニーをもたらす遺伝子突然変異頻度の割合。

5.7.8 結果の計算

遺遺伝子突然変異試験における陰性対照群は、2系列の結果を個別に算出し、その 平均値を代表値とした。

1) PE (PE0 及び PE3)

ポアソン分布の式に従い、小数点以下3桁を四捨五入し、小数点以下2桁まで表示した。

$$PE = \frac{-\ln(EW/TW)}{N}$$

EW:コロニーを含まないウエルの数

TW :総ウエル数

N : 1.6 (Plating 時のウエル当たりの平均細胞数)

2) RS (RS0 及び RS3)

小数点第1位を四捨五入して整数で表示(%)した。

3) RSG 及び%RSG

小数点第3位を四捨五入して、小数点以下2桁まで表示した。

RSG = 処理群の DCG (Day 1) × DCG (Day 2) × Daily cell growth (Day 3) 陰性対照群の DCG (Day 1) × DCG (Day 2) × DCG (Day 3)

DCG: Daily cell growth

Daily cell growth は1日当たりの細胞増殖率。 処理終了から1日後及び2日後に求めた。

| Daily cell growth = 翌日の細胞濃度/調製した細胞濃度 |

4) RTG

小数点第3位を四捨五入して、小数点以下2桁まで表示した。 $RTG = RSG \times \%RS3$

5) MF (T-MF、L-MF 及び S-MF)

突然変異発現期間後のコロニー形成能 (PE3)を考慮して算出し、小数点第 3 位を四捨五入して、小数点以下 2 桁まで表示した。なお、MF は $\times 10^{-6}$ で表示した。

(1) T-MF(総遺伝子突然変異頻度)

$$T-MF = \frac{-\ln(EW/TW)}{PE3 \times N}$$

EW:TW-(A+B+C)···コロニーを含まないウエルの数

TW : 総ウエル数

N : 40000 (Plating 時のウエル当たりの平均細胞数)

(2) L-MF (Large colony の遺伝子突然変異頻度)

$$L-MF = \frac{-\ln(EW/TW)}{PE3 \times N}$$

EW:TW-(A+C)…コロニーを含まないウエルの数

TW :総ウエル数

N : 40000 (Plating 時のウエル当たりの平均細胞数)

(3) S-MF (SG コロニーの遺伝子突然変異頻度)

$$S-MF = \frac{-\ln(EW/TW)}{PE3 \times N}$$

EW: TW-(B+C)…コロニーを含まないウエルの数

TW :総ウエル数

N: 40000 (Plating 時のウエル当たりの平均細胞数)

A:NGコロニーのみを含むウエル数

: SG コロニーのみを含むウエル数

C:NGとSGコロニー両者を含むウエル数

6) %SC

В

小数点第1位を四捨五入して整数で表示(%)した。

 $%SC = S-MF \times 100$

T-MF

5.8 統計解析

統計解析は T-MF の値を指標として大森らの方法 4)に従って行う。

5.9 結果の判定

判定は T-MF の値を用いて行い、以下に基準を示す。

- 1) 陽性
- (1) 少なくとも1つの試験濃度で、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められること。
- (2) 傾向検定で評価し、濃度依存性の増加が認められること。
- 2) 陰性
- (1) 試験した濃度のいずれにおいても、同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められないこと。
- (2) 適切な傾向検定の評価で、濃度依存性の増加が認められないこと。

5.9.1 試験成立基準

以下に示した内容を満たした場合において、被験物質の遺伝子突然変異誘発性を正 しく評価できたものとした。

- 1) 非代謝活性化及び代謝活性化のいずれかで陽性結果が得られていない限り、2つの条件すべてで試験を実施していること。
- 2) 評価可能な用量が4用量以上であること。
- 3) 陰性対照群における T-MF が Duplicate culture 間で同等であり、それぞれ 3 \sim 10 \times 10 $^{-6}$ であること。
- 4) 陰性対照群における PE0 及び PE3 が 70~130%であること。
- 5) 陽性対照群における T-MF が同時陰性対照と比較して統計学的に有意な増加が認められること。

6. 試験結果及び考察

結果を Table 1~2、Appendix 1及び Appendix 2-1~2-2 に示した。

松浦らの報告 1 によると、本被験物質の L5178Y $tk^{+/-}$ -clone 3.7.2C 細胞への細胞毒性は強く、「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 490」が推奨する最高用量の 10 mM (1980 μ g/mL) では、相対細胞増殖率 (Relative Suspension Growth: RSG)が $10\sim20\%$ を示す用量を算定することが困難と考えられた。そこで、松浦らの報告を参考として、最高用量を $10.0~\mu$ g/mL とし、以下公比 $2~\sigma$ 希釈した 5.00~2.50~1.25~0.625~D $0.313~\mu$ g/mL の計 6~ 用量を設定して用量設定試験を行った。その結果、L5178Y $tk^{+/-}$ -clone 3.7.2C 細胞同様に TK6 細胞においても毒性が認められ、理論上の 20%RSG を示す用量は、短時間処理法では $9~\mu$ g/mL、連続処理法では $8~\mu$ g/mL と算定 された。これらの結果に基づき、遺伝子突然変異試験の用量については、「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 490」を参考として、短時間処理法の非代謝活性 化では $45.0~\mu$ g/mL を最高用量とし、以下公比 1.2~で希釈した 37.5~、31.3~、26.0~、21.7~ 及び $18.0~\mu$ g/mL の計 6~ 用量、短時間処理法の代謝活性化では $85.0~\mu$ g/mL を最高用量 とし、以下公比 1.2~ で希釈した 1.2~ で 1.2~

遺伝子突然変異試験の結果、被験物質処理群における総遺伝子突然変異頻度 (T-MF) は、非代謝活性化では同時陰性対照群の 7.08×10^{-6} に対し、 $4.24 \sim 6.25$ µg/mL の用量間で増加が認められ、かつ濃度依存性の反応が確認され、代謝活性化でも同様に同時陰性対照群の 8.43×10^{-6} に対し、 $3.69 \sim 5.76$ µg/mL の用量間で有意な増加が認められ、かつ濃度依存性の反応が確認された。したがって、短時間処理法において陽性と判定したため、連続処理法は実施しなかった。

いずれの処理法においても陰性対照群におけるコロニー形成率はPE0及びPE3ともに $70 \sim 130$ %の範囲内にあったことから、使用細胞のコロニー形成能は適切であったと判断された。また、短時間処理法において陰性対照群における T-MF は $3 \sim 10 \times 10^{-6}$ の範囲内にあったことから、本細胞株の自然突然変異頻度の範囲内にあり、一方で陽性対照群ではいずれの処理法でも顕著な T-MF の増加が確認されたため、既存変異原物質に対する感受性は適切であると判断した。

なお、V79 細胞に対して、三酸化二ひ素は $75\mu g$ As/L で小核形成の有意な増加を示すことが確認されている $^{5)}$ 。 $Muta^{TM}$ マウスを用いた in vivo 遺伝子突然変異試験においては陰性の結果が報告されている $^{6)}$ 。この他、ヒ素化合物については多数の遺伝毒性試験の成績が報告されているが、培養細胞を用いた試験では、細胞毒性が強く発現する用量で一部陽性を示すことが知られているが、点突然変異の誘発能は低いと考えられている。本試験においても長時間暴露により検出し得る可能性があるため、追跡

して調査したい。

以上の結果から、三酸化二ひ素は本試験条件(短時間処理)下において遺伝毒性誘発性を有すると結論した。

7. 参考文献

- 1) 無機および有機ヒ化 合物の *in vitro* 遺伝子突然変異誘発性と, その食物摂取からの遺伝毒性リスク, Environ. Mutagen Res., **27**, 153-160
- 2) Clive, D., Johnson, O., Spector, J., Batson, A. and Brown, M. (1979): Validation and characterization of the L5178Y/TK^{+/-}mouse lymphoma mutagen assay system, Mutation Res., 59, 61-108
- 3) 小島肇夫:最新 動物実験代替法の技法ノウハウ【2011年度 最新版】、pp. 228 - 227、技術情報教会、東京
- 4) Takashi Omori, Masamitsu H., Makoto H., Yoriko H., Isao Y. (2002): A new statistical method for evaluation of L5178Y $tk^{+/-}$ mammalian cell mutation data using microwell method, Mutation Research 517, 199-208
- 5) Gebel T, Birkenkamp P, Luthin S, Dunkelberg H.(1998): Arsenic(III), but not antimony(III), induces DNA-protein crosslinks., Anticancer Res., 18, 4253-4257.
- 6) Noda, Y., Suzuki, T., Kohara, A., Hasegawa, A., Yotsuyanagi, T., Hayashi, M., Sofuni, T., Yamanaka, K., Okada, S., (2002): *In vivo* genotoxicity evaluation of dimethylarsinic acid in Muta(TM) Mouse. Mutat. Res. 513, 205-212.

Table 1 N-G104

Results of the mutation test in TK6 human lymphoblastoid cells treated with Arsenic (III) trioxide

[Short-term treatment : -S9 mix]

			Surviv	al assay		Viab	oility assay		Ŋ	Autation assa	у	
Cor	atment icentra µg/mI	ation	Plating efficiency (PE0)	Relative ^{a)} survival (RS0 : %)	Plating efficiency (PE3)	Relative ^{a)} survival (RS3:%)	Relative survival growth (RSG, %RSG)	Relative total growth (RTG: %)	Mutar N-MF	s-MF	×10 ⁻⁶) T-MF	%SC ^{b)}
	_	-1	0.92	100	1.12	100	1.00 (100.00)	100.00	6.04	1.38	7.86	18
NC	0	-2	1.08	100	1.05	100	1.00 (100.00)	100.00	5.12	0.95	6.30	15
	ave	rage	1.00	100	1.08	100	1.00 (100.00)	100.00	5.58	1.17	7.08	16
	3.	62	0.84	84	1.12	103	1.07 (106.64)	110.27	4.07	1.32	5.66	23
	4.:	34	0.79	79	1.25	115	1.14 (114.32)	131.90	4.94	1.51	6.90	22
article	5.:	21	0.98	98	0.98	91	1.06 (105.71)	95.69	14.91	0.81	16.38	5
ar	6.:	25	0.98	98	1.05	97	0.67 (67.02)	64.74	12.46	1.54	15.11	10
Test	7.:	50	1.01	101	1.12	103	0.42 (42.33)	43.77	10.68	1.82	13.69	13
	9.	00	1.05	104	1.01	93	0.51 (51.36)	48.01	9.63	2.86	13.98	N/A
	PC		0.05	5	0.61	57	0.13 (13.20)	7.54	0.00	114.08	114.08	100

NC: Negative Control (water for injection), PC: Positive Control (methylmethanesulfonate; 10 µg/mL)

a) These values showed as a relative survival against the negative control value.

b) These values are ratios of the mutant frequency that brings small colony.

Table 2 N-G104

Results of the mutation test in TK6 human lymphoblastoid cells treated with Arsenic (III) trioxide

[Short-term treatment : +S9 mix]

			Surviv	al assay		Viab	ility assay		N	Autation assa	у	
Treatmen		ment and	nt and Plating Relative a)	Di ci Dolotino	Relative a)	eletine a) Relative	Relative	Mutant frequency (×10 ⁻⁶)]	
1	ncentra (μg/mL		Plating Relative as survival (PE0) (RS0:%)	survival	Plating Relative of survival (RS3:%)	survival	survival growth	total growth (RTG : %)	N-MF	S-MF	T-MF	%SC ^{b)}
	_	-1	1.30	100	1.08	100	1.00 (100.00)	100.00	6.97	1.49	9.01	17
NC	"	- 2	1.27	100	1.06	100	1.00 (100.00)	100.00	5.34	1.98	7.85	25
	aver	rage	1.29	100	1.07	100	1.00 (100.00)	100.00	6.15	1.73	8.43	21
Ī	3.6	69	1.16	90	1.25	116	1.23 (122.84)	143.07	6.61	1.40	8.59	16
article	4.6	61	0.98	76	1.08	101	0.41 (40.95)	41.30	7.97	3.09	12.45	25
표	5.3	76	0.92	72	1.05	98	0.59 (59.41)	57.93	11.84	1.68	14.65	11
Test	7.2	20	0.58	45	1.12	104	0.08 (8.45)	8.82	0.00	1.45	1.45	100
	9.0	00	1.08	84	N/A	N/A	0.03 (3.13)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	PC		0.41	32	1.05	98	0.14 (14.07)	13.73	5.30	10.52	19.35	54

NC: Negative Control (water for injection), PC: Positive Control (cyclophosphamide; 5 µg/mL)

All calculations were carried out using Excel 2010

a) These values showed as a relative survival against the negative control value.

b) These values are ratios of the mutant frequency that brings small colony.

Apendix 1

Results of the mutation test in TK6 human lymphoblastoid cells treated with Arsenic (III) trioxide (Individual Data)

[Short-term treatment : -S9 mix]

Dose (μg/mL)	SG	RSG	%RSG
NC (0)	23.92	1.00	100
0.313	21.72	0.91	91
0.625	24.38	1.02	102
1.25	20.52	0.86	86
2.50	25.48	1.07	107
5.00	22.17	0.93	93
10.0	2.42	0.10	10

[Short-term treatment : +S9 mix]

Dose (µg/mL)	SG	RSG	%RSG
NC (0)	18.90	1.00	100
0.313	21.13	1,12	112
0.625	24.46	1.29	129
1.25	23.52	1.24	124
2.50	23.39	1.24	124
5.00	21.61	1.14	114
10.0	0.76	0.04	4

[Continuous treatment: 24hr]

Dose (μg/mL)	SG	RSG	%RSG
NC (0)	24.62	1.00	100
0.313	27.75	1.13	113
0.625	23.00	0.93	93
1.25	23.86	0.97	97
2.50	20.57	0.84	84
5.00	13.27	0.54	54
10.0	N/A	N/A	N/A

NC: Negative control (Water for injection)

SG: Suspension growth

RSG: Relative suspension growth

Appendix 1

Results of the mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Arsenic (III) trioxide (Individual Data)

[Short-term treatment : -S9 mix]

Т		Observation a)			Survival assay		Viability assay		Mutation assay			
	atment and	Color of ^{b)} medium	Precipitates ^{c)}		Wells	Number of	Wells	Number of	Wells	Number of colonies		
	μg/mL)		1)	2)	observed	colonies	observed	colonies	observed	NG colony	SG colony	NG and SG colonies
NC	0 -1	-	-	-	192	148	192	160	384	91	23	0
	-2	-		-	192	158	192	156	384	74	15	0
Test article	3.62	-	-	-	96	71	96	80	192	32	11	0
	4.34	-	-	•	96	69	96	83	192	42	14	0
	5.21	-	*	-	96	76	96	76	192	85	6	0
	6.25	-	-	-	96	76	96	78	192	78	12	0
	7.50	-	-		96	77	96	80	192	73	15	0
	9.00	-	-	-	96	78	96	77	192	62	21	0
	PC	-	**	-	96	96	96	96	192	0	154	0

NC: Negative Control (water for injection) , PC: Positive Control (methylmethanesulfonate ; $10~\mu g/mL$)

c) - : Absence of precipitates

a) Color of medium was observed immediately after addition of the test extract suspensions. Precipitates were observed 11 immediately after addition of the test extract suspensions and ²⁾ at the end of treatment. b) - : No change of color

Appendix 2

Results of the mutation test in cultured mouse lymphoma cells treated with Arsenic (III) trioxide (Individual Data)

[Short-term treatment : +S9 mix]

Treatment and Concentration (µg/mL)		Observation a)			Survival assay		Viability assay		Mutation assay			
		Color of b)	Precipitates c)		Wells	Number of	Wells	Number of	Wells	Number of colonies		
		medium	1)	2)	observed	colonies	observed	colonies	observed	NG colony	SG colony	NG and SG colonies
NC	0 -1	-	-	-	192	168	192	158	384	100	24	0
	-2	-	_	-	192	167	192	157	384	78	31	0
Test article	3.69	-	-	-	96	81	96	83	192	54	13	0
	4.61	-	-	-	96	76	96	79	192	56	24	0
	5.76	-	-	-	96	74	96	78	192	75	13	0
	7.20	-	-	-	96	58	96	80	175	0	11	0
	9.00	-	-	-	96	79	96	96	192	0	0	0
PC		_	-	-	96	46	96	78	191	38	68	0

NC: Negative Control (water for injection) , PC: Positive Control (cyclophosphamide ; 5 μ g/mL)

b) - : No change of color
c) - : Absence of precipitates

a) Color of medium was observed immediately after addition of the test extract suspensions. Precipitates were observed ¹⁾ immediately after addition of the test extract suspensions and ²⁾ at the end of treatment.