

# 最 終 報 告 書

試験名：1,4-ビス（イソプロピルアミノ）アントラキノ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-1433

試験期間：2010年11月15日-2011年3月29日

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

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

2. 目次

2.	目次 .....	3
5.	要約 .....	10
6.	緒言 .....	11
7.	試験材料及び方法 .....	12
7.1	被験物質及び溶媒 .....	12
7.1.1	被験物質 .....	12
7.1.2	溶媒 .....	12
7.2	被験液の調製 .....	13
7.2.1	調製方法 .....	13
7.2.2	調製頻度 .....	13
7.2.3	安定性 .....	13
7.2.4	被験液の濃度・均一性確認 .....	14
7.3	対照物質 .....	14
7.3.1	陰性対照 .....	14
7.3.2	陽性対照 .....	14
7.4	使用細胞株 .....	15
7.4.1	細胞株 .....	15
7.4.2	細胞の選択理由 .....	16

7.4.3	培養条件 .....	16
7.5	S9 mix 及び培養液の調製 .....	16
7.5.1	S9 mix .....	16
7.5.2	培養液 .....	17
7.6	試験方法 <sup>1-5)</sup> .....	17
7.6.1	識別方法 .....	18
7.6.2	用量の設定 .....	18
7.6.3	細胞増殖抑制試験 .....	18
7.6.4	染色体異常試験 .....	20
7.6.5	標本の観察 .....	20
7.6.6	染色体異常の分類 .....	21
7.6.7	判定基準 .....	21
8.	試験結果 .....	22
8.1	細胞増殖抑制試験 .....	22
8.1.1	短時間処理法 .....	22
8.1.2	連続処理法 .....	22
8.2	染色体異常試験 短時間処理法 .....	23
9.	考察 .....	24
10.	参考文献 .....	26

図

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

M-1433

表

Table 1-1	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,4-bis(isopropylamino) anthraquinone [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 1-2	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,4-bis(isopropylamino) anthraquinone [Short-term treatment: -S9 mix]

## 5. 要約

1,4-ビス（イソプロピルアミノ）アントラキノ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。

細胞増殖抑制試験の結果を基に、3300 µg/mLを最高用量として、以下公比2で計3用量を設定し、染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の短時間処理法の結果、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、代謝活性化及び非代謝活性化のいずれの方法においても、すべての用量で陰性の判定基準である5%未満を示したため、陰性と判定した。一方、倍数体の出現率は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに全用量で疑陽性の判定基準である5%以上10%未満、あるいは陽性の判定基準である10%以上を示し、用量依存性を伴う増加を示したため、陽性と判定した。

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、1,4-ビス（イソプロピルアミノ）アントラキノンは本試験条件下において、染色体構造異常は誘発しないが、染色体数的異常は誘発すると結論した。

M-1433

## 6. 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、1,4-ビス（イソプロピルアミノ）アントラキノ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。

M-1433

## 7. 試験材料及び方法

### 7.1 被験物質及び溶媒

#### 7.1.1 被験物質

名称 : 1,4-ビス (イソプロピルアミノ) アントラキノン、  
1,4-bis(isopropylamino) anthraquinone  
官報公示整理番号 : 4-1263、5-5112  
CAS 番号 : 14233-37-5

構造式又は示性式 :



分子量 : 322.408  
性状 : 暗青色粉末  
入手量 : 20 g  
純度 : 99.73%  
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安定性を測定し、実験期間中安定であったことを確認した(Attached Data 2)。  
保存方法 : 冷暗所 (冷蔵庫内、許容値 : 1~10°C) (保存期間中の実測温度 : 3~7°C)、密閉  
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  
返却 : 実験終了後、被験物質の残余物は、安定性を確認した後、すべて株式会社ボゾリサーチセンターにて廃棄した。

#### 7.1.2 溶媒

名称 : カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na)  
ロット番号 : 0115  
規格 : 日本薬局方  
製造元 : 丸石製薬株式会社

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	:	被験物質情報において、水に不溶と記載されていたことから、溶媒選択のための供試前試験を実施した。ジメチルスルホキシドでは330 mg/mLでの検討を試みたが、被験物質の嵩が高いために溶解不可能であった。そこで、0.5 w/v% CMC-Na 水溶液に33.0 mg/mLで懸濁することとした。
調製方法	:	CMC-Naをガラスビン(200 mL)に1.0000 g秤取した。これに注射用水(日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号：0H94N)を200 mL加えて溶解し0.5w/v% CMC-Na 水溶液を調製し、オートクレーブで滅菌後、冷蔵保存し、調製後1箇月以内に溶媒として使用した。

## 7.2 被験液の調製

### 7.2.1 調製方法

#### 1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.3300 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理（超音波発生装置、機器 No.917）を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 33.0 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：3300 µg/mL）を調製した。次いで、33.0 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 7 段階希釈し、16.5、8.25、4.13、2.06、1.03、0.516 及び 0.258 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 0.8250 g を 25 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理（超音波発生装置、機器 No.917）を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 33.0 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：3300 µg/mL）を調製した。次いで、33.0 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 10 mL：溶媒 10 mL）で順次 2 段階希釈し、16.5 及び 8.25 mg/mL の 3 濃度段階の被験液を調製した。

### 7.2.2 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。

### 7.2.3 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。

### 7.2.4 被験液の濃度・均一性確認

染色体異常試験の短時間処理法に用いた最高濃度及び最低濃度の被験液について、株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所において吸光光度法により濃度及び均一性の確認を実施した（Attached Data 1）。その結果、表示値に対する濃度及び均一性（C.V.）の割合は、最高濃度で102.7%（C.V.：4.1%）、最低濃度で87.3%（C.V.：1.0%）で、最高濃度における濃度及び均一性及び最低濃度における均一性は許容範囲内であったが、最低濃度における表示値に対する濃度の割合が許容範囲（表示値に対する割合： $100 \pm 10\%$ ）を2.7%下回った。

分析方法の概略を以下に示す。

#### 1) 標準物質

被験物質の一部を標準物質として使用した。

名称	:	1,4-ビス（イソプロピルアミノ）アントラキノン
ロット番号	:	R006493
純度	:	100%
保存方法	:	冷暗所（許容範囲：1~10°C）（保存期間中実測温度：2~8°C）、密閉
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び生化学部標準物質保存場所

#### 2) 吸光光度計測定条件

測定波長	:	640 nm
対照試料	:	希釈液 [エタノール/精製水混液 (8/2、v/v) ]
セル	:	1 cm 石英セル
ゼロ補正	:	測定実施前に、対照セル及びサンプルセルに対照試料を入れ、ゼロ補正を実施した。
測定順序	:	

測定順序	測定回数	測定内容
1	3	標準溶液（システム適合性用）
2	3	標準溶液（定量用）
3	1	測定実測試料

### 7.3 対照物質

#### 7.3.1 陰性対照

溶媒として用いた0.5w/v%CMC-Na水溶液を陰性対照とした。

#### 7.3.2 陽性対照

##### 1) 代謝活性化

シクロフォスファミド（CP）

M-1433

ロット番号 : PEG0397  
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

### マイトマイシン C (MMC)

ロット番号 : 547AIJ  
製造元 : 協和醗酵キリン株式会社  
力価 : 2 mg (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: K0G97) 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: K0G97) 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)。

### 4) 陽性対照物質の選択理由

遺伝毒性試験ガイドライン (前述 6.2) 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。

## 7.4 使用細胞株

### 7.4.1 細胞株

ヒューマンサイエンス研究資源バンクから 2009 年 11 月 25 日に入手した、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。入手後、液体窒素中で凍結保存を行った細胞を再培養し、定期的に行われる性状検査において、細胞の特性 (培養形態に問題がないこと、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、マイコプラズマによる汚染がないこと及び既知の遺伝毒性誘発物質に対する感受性に問題がないこと) が適正であることが確認された細胞を、細胞増殖抑制試験では 21 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 3 継代で試

M-1433

験に供した。

#### 7.4.2 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。

#### 7.4.3 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。

### 7.5 S9 mix 及び培養液の調製

#### 7.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素 (S9/コファクターC セット、ロット番号 : C100910061、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	:	10091006
製造日	:	2010年9月10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 (-80°C 設定の冷凍庫)
使用期限	:	2011年3月9日
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C
ロット番号	:	C10090806
製造日	:	2010年9月8日
保存方法	:	冷凍 (-80°C 設定の冷凍庫)
使用期限	:	2011年3月7日
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

M-1433

3) S9 mix の組成

S9	2 mL		
補酵素	4.7 mL	20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	1.34 mL
		50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330 mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40 mmol/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

7.5.2 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	:	731681
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) MEM

ロット番号	:	822962
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

7.6 試験方法<sup>1-5)</sup>

試験は以下に示したステージの順に実施した。なお、染色体異常試験 短時間処理法で、染色体数的異常に明らかな陽性結果が得られたため、染色体異常試験 連続処理法は実施しなかった。

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

### 7.6.1 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。

### 7.6.2 用量の設定

#### 1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を3300 µg/mL (10mM相当) とし、以下公比2で希釈した1650、825、413、206、103、51.6及び25.8 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、短時間処理法では50%を超える細胞増殖抑制作用は認められず、連続処理法では3300 µg/mLで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、短時間処理法では求められず、連続処理法の24時間処理では3057.4 µg/mL、48時間処理では2586.5 µg/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「50%以上の細胞毒性が認められない場合は、最高用量を10mM相当とし、以下3用量を設定する。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」との規定を参照し、更に各処理における50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量における抑制率と50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) を勘案しながら、短時間処理法では3300 µg/mLを最高用量として、以下、公比2で計3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、連続処理法は用量の設定は行ったが、短時間処理法で、染色体数的異常に明らかな陽性結果が得られたため、実験は実施しなかった。

### 7.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として実施した。なお、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、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

## 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 $\gamma$ 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 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、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 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡で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 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、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群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡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。

#### 7.6.4 染色体異常試験

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、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

- 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、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 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- 3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡で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 0.075 M 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 箇所へ滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、1 日以上空気乾燥し、2% ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- 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。

#### 7.6.5 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。

### 7.6.6 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)など。

#### 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。

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

### 7.6.7 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。

## 8. 試験結果

### 8.1 細胞増殖抑制試験

#### 8.1.1 短時間処理法

1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化 (Appendix 2-1) 及び非代謝活性化 (Appendix 2-2) とともに 50%以上の細胞増殖抑制作用が認められず、50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は算出できなかった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調及び析出の肉眼観察において、代謝活性化 (Appendix 2-1) 及び非代謝活性化 (Appendix 2-2) とともにすべての用量で析出が認められた。一方、培養液の色調については、代謝活性化 (Appendix 2-1) 及び非代謝活性化 (Appendix 2-2) とともに 103 µg/mL 以上の用量で淡紫色～紫色の色調変化が認められた。

3) 被験物質処理終了時の観察

代謝活性化 (Appendix 2-1) 及び非代謝活性化 (Appendix 2-2) とともにすべての用量で析出が認められた。

被験物質処理群の細胞の状態を、陰性対照群と比較しながら倒立位相差顕微鏡下で観察すると、代謝活性化 (Appendix 2-1) では、多量の析出のために 1650 µg/mL 以上の用量では観察不能であったが、413 及び 825 µg/mL の用量では細胞の浮遊及び形態変化が認められ、その他の用量では異常は認められなかった。一方、非代謝活性化 (Appendix 2-2) では、多量の析出のために 825 µg/mL 以上の用量ではにより観察不能であったが、その他の用量では異常は認められなかった。

#### 8.1.2 連続処理法

1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理 (Appendix 2-3) 及び 48 時間処理 (Appendix 2-4) とともに 3300 µg/mL の用量で 50%以上の細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) はそれぞれ 3057.4 µg/mL 及び 2586.5 µg/mL であった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調及び析出の肉眼観察において、24 時間処理 (Appendix 2-3) 及び 48 時間処理 (Appendix 2-4) とともにすべての用量で析出が認められた。一方、培養液の色調については、24 時間処理 (Appendix 2-3) 及び 48 時間処理 (Appendix 2-4) とともに 103 µg/mL 以上の用量で淡紫色～紫色への変化が認められた。

3) 被験物質処理終了時の観察

24 時間処理 (Appendix 2-3) 及び 48 時間処理 (Appendix 2-4) とともにすべての用量で析出が認められた。

被験物質処理群の細胞の状態を、陰性対照群と比較しながら倒立位相差顕微鏡下で観察すると、24時間処理（Appendix 2-3）及び48時間処理（Appendix 2-4）ともに、多量の析出のために825 µg/mL以上の用量では観察不能であったが、その他の用量では異常は認められなかった。

## 8.2 染色体異常試験 短時間処理法

### 1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調及び析出の肉眼観察において、代謝活性化（Appendix 3-1）及び非代謝活性化（Appendix 3-2）ともにすべての用量で析出が認められた。一方、培養液の色調については、代謝活性化（Appendix 3-1）及び非代謝活性化（Appendix 3-2）ともにすべての用量で紫色の色調変化が認められた。

### 2) 被験物質処理終了時の観察

代謝活性化（Appendix 3-1）及び非代謝活性化（Appendix 3-2）ともにすべての用量で析出が認められた。

被験物質処理群の細胞の状態を、陰性対照群と比較しながら倒立位相差顕微鏡下で観察したが、多量の析出のために代謝活性化（Appendix 3-1）及び非代謝活性化（Appendix 3-2）ともに、すべての用量で観察不能であった。

### 3) 染色体構造異常

構造異常の出現率(TA)は、代謝活性化(Table 1-1)では3300、1650及び825 µg/mLでそれぞれ0.5、1.0及び0%と陰性の判定基準である5%未満であった。一方、非代謝活性化(Table 1-2)では3300、1650及び825 µg/mLでそれぞれ0.5、0.5及び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、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) 染色体数的異常

数的異常(倍数体)の出現率は、代謝活性化(Table 1-1)では3300及び1650 µg/mLでそれぞれ13.5及び12.5%と陽性の判定基準である10%以上を示し、825 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。一方、非代謝活性化(Table 1-2)では3300、1650及び825 µg/mLでそれぞれ22.0、18.0及び11.0%と陽性の判定基準である10%以上を示した。

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。

## 9. 考察

1,4-ビス（イソプロピルアミノ）アントラキノ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。

染色体異常試験の短時間処理法の結果、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、代謝活性化及び非代謝活性化のいずれの方法においても、すべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、陰性と判定した。一方、倍数体の出現率は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに全用量で疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満、あるいは陽性の判定基準である 10%以上を示し、用量依存性を伴う増加を示したため、陽性と判定した。

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、陰性の判定基準内であった。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。

なお、本被験物質の基本骨格をなす 9,10-anthraquinone は、細菌を用いる復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ TK 試験、染色体異常試験及びマウス小核試験において陰性と報告<sup>6,7)</sup>されている。本被験物質と同様にアントラキノン染料として使用されている 2,6-dihydroxyanthraquinone は、*Salmonella* 菌を用いる復帰突然変異試験及び V79 培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験で陰性を示している<sup>8)</sup>。また、類似のアントラキノン骨格を持つ化合物においては、抗カビ剤として用いられる 1,4-dihydroxyanthraquinone は、*Salmonella* 菌を用いる復帰突然変異試験では陽性、ラット肝細胞を用いる不定期 DNA 合成試験では陰性<sup>8)</sup>と、2-エチルアントラキノン<sup>9)</sup>は CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験で染色体構造異常について陽性<sup>9)</sup>と、2-アミノアントラキノン<sup>10)</sup>は、細菌を用いる復帰突然変異試験で陽性<sup>10)</sup>と報告されている。さらに、食品添加物として使用され、平成 16 年に既存添加物名簿から削除されたアカネ色素もアントラキノン骨格を持つ成分の複合体であるが、遺伝毒性を示す成分が含まれていることが報告<sup>11)</sup>されている。アントラキノン化合物の染色体数的異常誘発についての報告は少ないが、前述の 2-エチルアントラキノン<sup>9)</sup>は CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験で数的異常について陽性<sup>9)</sup>と報告されている。本被験物質においては、染色体数的異常のみが陽性となったが、いずれも倍数体の増加は析出が著しい用量域で認められていることから、物理的な刺激による非特異的な誘発である可能性も考えられる<sup>12)</sup>。

M-1433

以上の結果から、1,4-ビス（イソプロピルアミノ）アントラキノン  
は本試験条件下において、染色体構造異常は誘発しないが、  
染色体数的異常は誘発すると結論した。

10. 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, *Mutat. Res.*, **48**, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M and Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutat. Res.*, **66**, 277-290
- 4) 石館 基 (1982) : 哺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) Butterworth, BE, Marthre OB and Ballinger K (2001): The preparation of anthraquinone used in the National Toxicology Program cancer bioassay was contaminated with the mutagen 9-nitroanthracene, *Mutagenesis* **16**, 169-177
- 7) US EPA, Anthraquinone (122701) Fact Sheet, [http://www.epa.gov/opppddl/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet\\_122701.html](http://www.epa.gov/opppddl/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_122701.html), (accessed 2011-01-26)
- 8) Westendorf J, Marquardt H, Poginsky B, Dominiak M, Schmidt J, Marquardt H (1990): Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones, *Mutat. Res.* **240**: 1-12
- 9) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修 (2001) : 化学物質毒性試験報告 Vol.8(1), pp. 196-199, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京
- 10) Zeiger E. (1987): Carcinogenicity of mutagens: Predictive capability of the Salmonella mutagenesis assay for rodent carcinogenicity, *Cancer Res.* **47**(5), 1287 -1296
- 11) アカネ色素に係る食品健康影響評価に関する審議結果、[http://www.fsc.go.jp/iken-bosyu/pc\\_maddercolor160705\\_betten.pdf](http://www.fsc.go.jp/iken-bosyu/pc_maddercolor160705_betten.pdf)、 (accessed 2011-01-28)
- 12) Kawaguchi Y, Hayashi H, Sato M, Shindo Y (1997): Needle crystals of vitamin B<sub>2</sub> induce polyploidy in Chinese hamster lung (CHL/IU) cells, *Mutat. Res.* **371**: 1-7

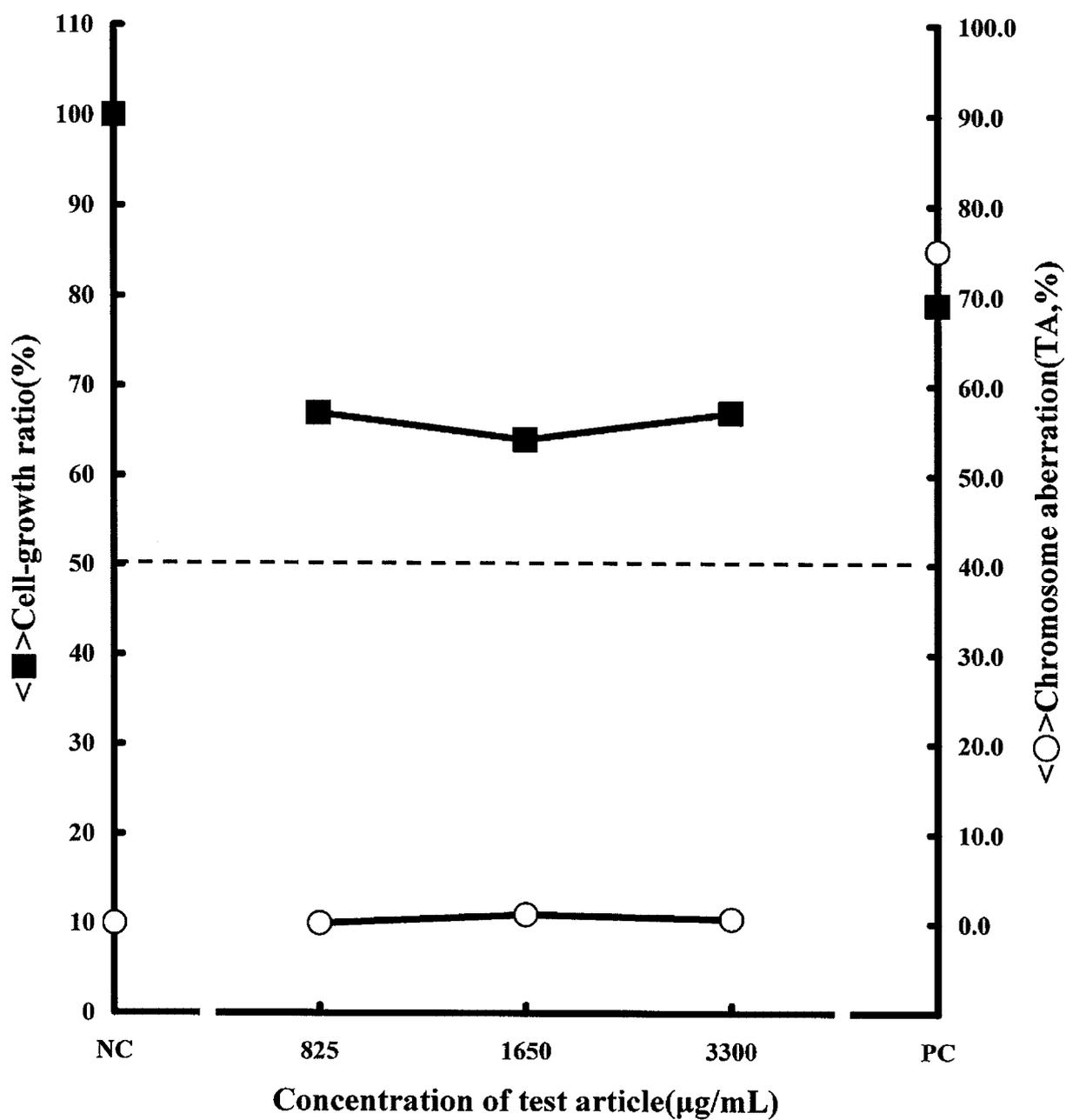


Fig. 1-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,4-bis(isopropylamino) anthraquinone [Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

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

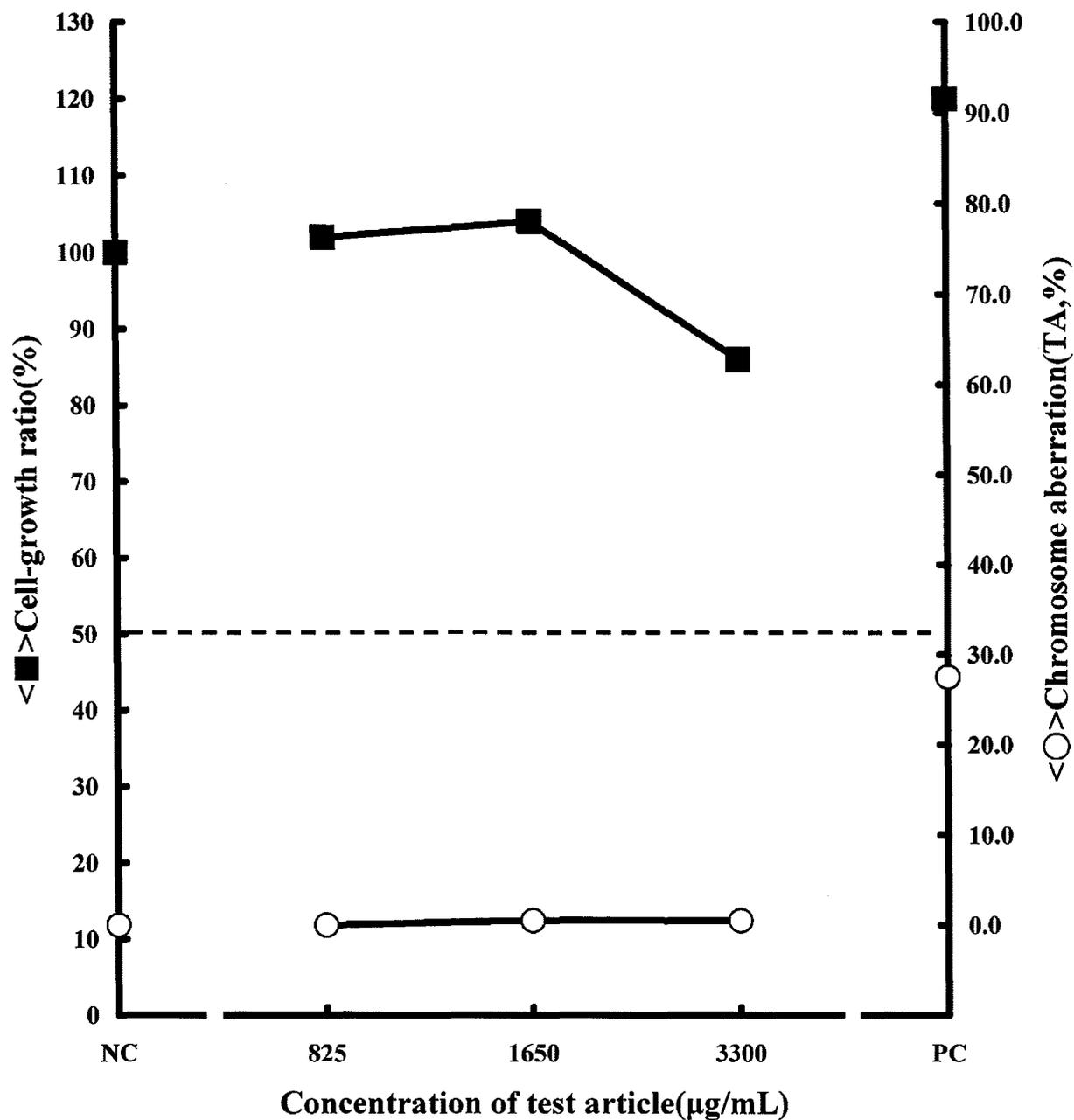


Fig. 1-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,4-bis (isopropylamino) anthraquinone [Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

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

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,4-bis(isopropylamino)anthraquinone  
[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	-	19-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	0	-	49-1
			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)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	
		825	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	64	100	8	0	8	-	38-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	1	1	-	70	100	6	0	6	±	80-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	-	(67)	200	14(7.0)	0(0.0)	14(7.0)	-	
		1650	100	0	1	0	0	0	1	0	1	1	-	70	100	13	0	13	-	95-1
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	1	-	58	100	12	0	12	+	25-1
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	-	(64)	200	25(12.5)	0(0.0)	25(12.5)	-	
		3300	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	70	100	14	0	14	-	97-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	1	-	64	100	13	0	13	+	35-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	-	(67)	200	27(13.5)	0(0.0)	27(13.5)	-	
		PC	100	8	75	0	0	0	75	0	75	75	+	76	100	0	0	0	-	51-1
			100	4	74	0	0	0	75	0	75	75	+	82	100	0	0	0	-	32-1
			200	12(6.0)	149(74.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	150(75.0)	0(0.0)	150(75.0)	150(75.0)	+	(79)	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 (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

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.

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,4-bis(isopropylamino)anthraquinone  
[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	-	50-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0	-	78-1
			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)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	100	11	0	11		45-1	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	104	100	11	0	11	+	05-1	
		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)	(102)	200	22(11.0)	0(0.0)	22(11.0)			
	-	1650	100	1	0	0	0	0	1	0	1	99	100	13	0	13		84-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	23	0	23	+	40-1	
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(104)	200	36(18.0)	0(0.0)	36(18.0)			
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	79	100	17	0	17		88-1		
		100	1	0	0	0	0	1	0	1	85	100	27	0	27	+	14-1		
		200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(86)	200	44(22.0)	0(0.0)	44(22.0)				
	-	PC	100	3	25	0	0	0	28	0	28	109	100	0	0	0		71-1	
			100	4	23	0	0	0	27	0	27	119	100	0	0	0	-	65-1	
			200	7(3.5)	48(24.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	55(27.5)	0(0.0)	55(27.5)	(120)	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 (0.5w/v% sodium carboxymethyl cellulose solution)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075 µg/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.