

最終報告書訂正版

1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の

チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

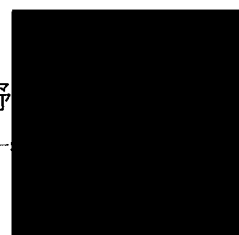
厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室 委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター秦野

〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729-1

TEL 0463-82-4751



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
(東京都千代田区霞が関 1-2-2)

試験番号 G-11-032

被験物質 1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester

試験項目 チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

試験開始日 2011 年 10 月 31 日

実験開始日 2011 年 11 月 7 日

実験終了日 2012 年 2 月 2 日

試験終了日 試験責任者の捺印日

試験資料保管場所 秦野研究所資料保存室

保管期間 試験終了後 10 年間
その後の保存については試験委託者と協議する。

運営管理者 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
所長 

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「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」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施したものである。

最終報告書作成 2012 年 3 月 19 日

訂正版作成 2013 年 1 月 9 日

試験責任者  

試験従事者

試験責任者

試験担当者

溶媒中の安定性試験用検体調製

原体および溶媒中の被験物質

安定性測定

培養

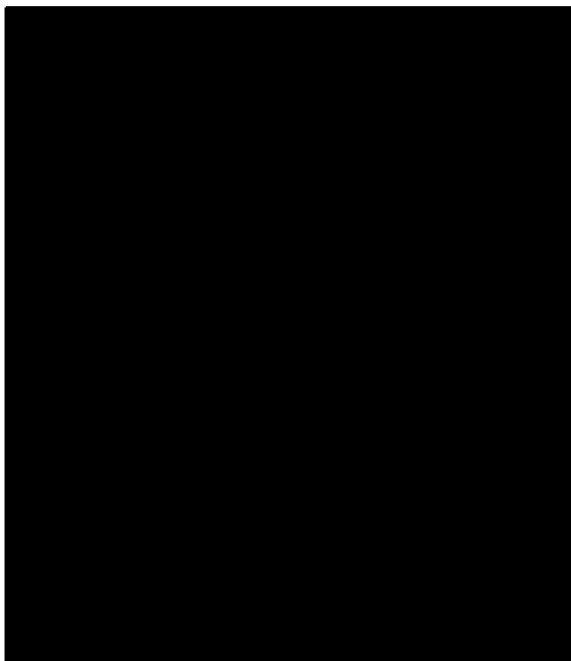
検体調製および細胞処理

細胞数測定

染色体標本作製

染色体分析

被験物質管理



目次

要約	5
試験目的	6
試験ガイドラインと GLP	6
材料と方法	6
1. 被験物質	6
2. 陽性対照物質	6
3. 細胞と培養条件	7
4. S9 反応液	7
5. 被験物質調製液の調製	7
6. 細胞増殖抑制試験	8
7. 染色体異常試験	8
8. 染色体分析	9
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	10
試験成績および考察	10
参考文献	12
Figure	13
Tables	14
Appendix	17

(最終ページ:22 ページ)

要約

1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の CHL/IU 細胞(チャイニーズ・ハムスター、雌肺由来)を用いる染色体異常試験を実施し、その染色体異常誘発性を調べた。

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果をもとに、S9 mix 非存在下の短時間処理および24 時間連続処理では 0.70 mg/mL、S9 mix 存在下の短時間処理では 1.9 mg/mL を最高処理濃度とし、以下の濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.022、0.044、0.088、0.18、0.35、0.70 mg/mL (公比 2)

S9 mix 存在下の短時間処理:0.059、0.12、0.24、0.48、0.95、1.9 mg/mL (公比 2)

24 時間連続処理:0.022、0.044、0.088、0.18、0.35、0.70 mg/mL (公比 2)

なお、肉眼観察の結果、S9 mix 非存在下の短時間処理および24 時間連続処理では、処理開始時および処理終了時共に、0.70 mg/mL の濃度群で培養液中に沈殿が認められた。また、S9 mix 存在下の短時間処理では処理開始時では0.48 mg/mL 以上の濃度で培養液中に沈殿が認められ、処理終了時では0.95 mg/mL 以上の濃度で培養液中に沈殿が認められた。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析結果をもとに分析可能な最高濃度を決定し、その濃度を含む以下の3ないし4 濃度群を観察対象とした。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.088、0.18、0.35 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.48、0.95、1.9 mg/mL

24 時間連続処理:0.044、0.088、0.18、0.35 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下の短時間処理および24 時間連続処理についてはいずれの被験物質処理群においても構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった。なお、24 時間連続処理の 0.35 mg/mL 濃度群については、細胞毒性のため倍数性細胞について、規定の細胞数を分析できなかった。

S9 mix 存在下の短時間処理については、0.95 mg/mL および 1.9 mg/mL 濃度群で構造異常を有する細胞が統計学的に有意に増加し(出現率:19.0%および 29.0%)、用量依存性も認められた。また、倍数性細胞については 0.48 mg/mL および 0.95 mg/mL 濃度群で統計学的に有意な増加(出現率:3.9%および 3.4%)が認められたものの 1.9 mg/mL 濃度群の出現率が低かった(出現率:1.4%)ため、傾向性検定では陰性の結果が得られた。

なお、類縁物質である isophthalic acid、terephthalic acid および dimethyl terephthalate についてはいずれも復帰突然変異試験で陰性の結果が得られている。

以上の結果より、1,3-benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester は本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

試験目的

1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の染色体異常誘発作用を調べるため、その CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

試験ガイドラインと GLP

本試験は、新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知)に準拠し、「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」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質である 1,3-benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester[化学名(別名):dimethyl isophthalate、isophthalic acid dimethyl ester、略称:DMIP、CAS 番号:1459-93-4、分子式: $C_{10}H_{10}O_4$ 、分子量:194.18、ロット番号:FGM01、純度:99.9%(GC)、Appendix 1 参照]は、白色～ほとんど白色の結晶～粉末である。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 2 に示す。被験物質は [REDACTED] から入手し、使用時まで冷蔵(実測値:4～6°C)、暗所で保管した。

被験物質原体の安定性については、製品安全データシート中に、適切な条件下においては安定であることが記載されている。また、当該試験において、冷蔵保管した被験物質を用いて実験開始前(測定日:2011 年 11 月 7 日)および実験終了後(測定日:2012 年 2 月 2 日)にフーリエ変換赤外分光光度計を用いて赤外吸収スペクトルを測定し、両者の測定結果に変化の無いことを確認した(Appendix 3)。

2. 陽性対照物質

S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理用の陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC、ロット番号:535AHF、協和醗酵キリン)を用いた。また、S9 mix 存在下の短時間処理用の陽性対照物質としてシクロホスファミド(CP、ロット番号:079K1569、Sigma Chemical)を用いた。

試験には、これらの陽性対照物質を日局注射用水(ロット番号:K1D73、大塚製薬工場)に溶かし、凍結保存(-30°C)した原液(MMC:20 μ g/mL、CP:1 mg/mL、調製日:MMC および CP 共に 2011 年 12 月 14 日)を用時解凍して、調製後 6 ヶ月以内に試験に用いた。

3. 細胞と培養条件

CHL/IU 細胞は、染色体数のモードが 25 本で、我が国においては染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手(1988 年 2 月 10 日入手、入手時の継代数 4)し、継代後、液体窒素(気相)中に凍結保存(現在の継代数 23)した。その細胞(倍加時間約 15 時間、マイコプラズマの汚染なし)を、解凍後、継代 9 代(細胞増殖抑制試験)、7 代(染色体異常試験)で試験に用いた。

培養には、仔牛血清(CS、ロット番号:522123、Biological Industries)を 10 vol%添加したイーグル MEM 培養液(10%CS/MEM)を用い、CO₂ インキュベーター(5%CO₂、37°C の加湿条件下)内で培養した。イーグル MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末(日水製薬)4.7 g に精製水を 500 mL 加えて溶解し、高压蒸気滅菌(121°C、15 分)したものに、L-グルタミン(日水製薬)を約 0.15 g、10 w/v%NaHCO₃ 水溶液を約 10 mL 無菌的に添加して調製した。

4. S9 反応液

S9(ロット番号:RAA-636、2011 年 9 月 2 日製造、キッコーマン)は、フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンを投与した 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットの肝臓から調製したものを購入し、使用時まで超低温槽(-80°C)に保管し、調製後 6 ヶ月以内に使用した。グルコース-6-リン酸(G-6-P、Sigma)、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸(β-NADP⁺、オリエンタル酵母工業)および KCl を精製水に溶かし、混合液として超低温槽(-80°C)に保管し、使用時(調製後 6 ヶ月以内に使用)はこれに S9、MgCl₂ および HEPES(pH 7.2)を加え、S9 mix とした。試験には 10%CS/MEM:S9 mix を 25:5 の割合で混和した S9 反応液を用いた(各成分の最終濃度:5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-NADP⁺、0.83 mmol/L MgCl₂、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度で水およびジメチルスルホキシドには溶解しないが、アセトンに溶解したことから、溶媒としてアセトン(ロット番号:DCN6767、和光純薬、HPLC 用)を用いた。

被験物質を秤量したのち、溶媒(アセトン)を加えて原液[細胞増殖抑制試験:194 mg/mL、染色体異常試験:190 mg/mL]を用時調製した。その原液を溶媒で段階希釈して下記の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を 1 vol%添加して処理を行った。

[細胞増殖抑制試験]

0.758、1.52、3.03、6.06、12.1、24.3、48.5、97.0、194 mg/mL(公比 2)

[染色体異常試験]

S9 mix 非存在下の短時間処理:2.19、4.38、8.75、17.5、35.0、70.0 mg/mL(公比 2)

S9 mix 存在下の短時間処理:5.94、11.9、23.8、47.5、95.0、190 mg/mL(公比 2)

24 時間連続処理 2.19、4.38、8.75、17.5、35.0、70.0 mg/mL(公比 2)

なお、被験物質調製液(原液)調製時に目視により、発熱、発泡、変色等の変化の無いことを確認し

た。

被験物質の溶媒中での安定性については、秦野研究所において室温、遮光下で保管した 0.0100 mg/mL 溶液および 200 mg/mL 溶液について被験物質調製液の調製 24 時間の安定性を確認した(分析方法は Appendix 4 参照)。0.0100 mg/mL 溶液については調製直後および調製 24 時間後の平均含量が 98.0%および 100.5%、各測定値のばらつきが 99.4~101.1%、平均残存率は 102.5%であった。また、200 mg/mL 溶液については調製直後および調製 24 時間後の平均含量が 97.5%および 100.0%、各測定値のばらつきは 98.9~101.0%、平均残存率は 102.5%であった。これらの測定値は、いずれも試験計画書に記載した許容基準の範囲内(調製直後および保管後の平均含量が、それぞれ調製濃度の 90.0~110.0%、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の 90.0~110.0%以内、調製直後の平均測定値に対する保管後の残存率の平均値が 90.0%以上)であった(Appendix 5)。

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、試験法ガイドラインに従い 1.9 mg/mL (10 mmol/L)を最高処理濃度とする 9 濃度群(0.0076~1.9 mg/mL、公比 2)を設定して細胞増殖抑制試験を実施した。

CHL/IU 細胞を 0.25%トリプシン溶液を用いてはがした後、 4×10^3 個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL (2×10^4 個)をガラスディッシュ(直径 6 cm)に播種した。培養開始 3 日目に以下の手順で短時間処理および連続処理を行った。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理する場合、各ディッシュの培養液をそれぞれ 10%CS/MEM および S9 反応液と交換(3 mL/ディッシュ)した後、溶媒(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を 1 vol%添加(30 μ L/ディッシュ)し 6 時間処理した。処理後、MEM(血清不含)で細胞を洗浄し、10%CS/MEM(5 mL/ディッシュ)でさらに 18 時間培養した。連続処理する場合は各ディッシュの培養液を 10%CS/MEM と交換(5 mL/ディッシュ)した後、溶媒(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を 1 vol%添加(50 μ L/ディッシュ)し 24 時間処理した。各群 2 枚のディッシュを用いた。また、処理開始時および終了時における培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

培養終了後、培養液を捨て、5 mL の 0.02 w/v%EDTA 含有 PBS(Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含)を加えて細胞を剥がし、細胞を遠沈管に移した後、0.5 mL の細胞浮遊液を 9 mL の ISOTON[®] II (Beckman Coulter)に加え、コールターカウンター(Z2、Beckman Coulter)で細胞数を測定した。

7. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験とほぼ同じ試験条件で染色体異常試験を行った。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理については、0.70 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 2 で 6 濃度群を設定した。また S9 mix 存在下の短時間処理については 1.9 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 2 で計 6 濃度群を設定した。さらに溶媒(陰性)対照群および陽性対照群も設けた。1 濃度あたり 2 枚のディッシュを用いた。

陽性対照群については、培養液を10% CS/MEMまたはS9反応液と交換した後、MMC (20 µg/mL)を、S9 mix 非存在下の短時間処理では15 µL/ディッシュ(最終濃度:0.1 µg/mL)、連続処理では12.5 µL/ディッシュ(最終濃度:0.05 µg/mL)添加した。S9 mix 存在下の短時間処理ではCP (1 mg/mL) を30 µL/ディッシュ(最終濃度:10 µg/mL)添加した。なお、MMC および CP はこれらの濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。また、陰性対照群および被験物質処理群については、処理開始時および処理終了時に培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が0.1 µg/mLになるように添加した。培養終了後、培養液を捨て0.02 w/v% EDTA 含有PBS(Ca²⁺およびMg²⁺不含)をディッシュあたり5 mL加えてピペッティングにより細胞をはがし、細胞を遠沈管に移した。陰性対照群および被験物質処理群については、0.5 mLの細胞懸濁液を9 mLのISOTON[®] II (Beckman Coulter)に加え、コールターカウンター(Z2, Beckman Coulter)を用いて、細胞数の測定を行った。残りの細胞懸濁液については、遠沈(1400 rpm、5分)し、上清を捨てた後、3 mLの低張液(0.075 mol/L KCl水溶液)を加え、約30分間低張処理を行った。低張処理後、固定液(メタノール:氷酢酸=3:1(v/v))を6 mL加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作をさらに1回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス(あらかじめフロスト部分に試験番号、コード番号およびスライド番号を記入)上に滴下し、そのまま風乾した。1ディッシュあたり4~6枚のスライド標本作製した。ただし、20%未満の細胞増殖率(80%を超える増殖抑制)を示した被験物質処理群については、染色体標本作製しなかった。

作製したスライド標本を70 vol%メタノールに軽く浸漬したのち3 vol%ギムザ液(pH 6.8の1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈調製)で8分染色後、水道水ですすいで風乾した。

8. 染色体分析

染色体分析に先立って、1ディッシュから得られた1枚の標本を用いて濃度の高い方から分裂指数の分析(500細胞/標本)を行った。0.5%未満の分裂指数を示した場合は染色体分析不能と判断し、分析可能な最高濃度群を決定した。また、標本あたりの分析可能な分裂中期細胞数が少ない場合は、その数を考慮して観察対象群を決定した。

ディッシュ1枚から得られたスライド標本4枚を、4人の観察者がそれぞれ処理条件が分からない状態で分析した。染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を探し、1群あたり200個(100細胞/ディッシュ、25細胞/観察者)の分裂中期細胞(染色体数:23~27本)について構造異常の種類と数を、1群あたり800個(400細胞/ディッシュ、100細胞/観察者)の分裂中期細胞について倍数性細胞(染色体数が38本以上)の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。

ギャップおよび切断を除く構造異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会¹⁾による分類法に基づいて行った。ギャップおよび切断については染色分体幅よりも狭い非染色性部位をギャップ、それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないことと

した。

染色体の構造異常(ギャップを除く)を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性対照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法($p < 0.01$ 、片側)により有意差検定を実施した。細胞毒性により分析細胞数が規定数に満たなかった被験物質処理群については統計解析ソフトウェア SAS®を用いて有意差検定を行った。また、有意差が認められた処理条件については、統計解析ソフトウェア SAS®を用いてコクラン・アーミテッジの傾向性検定($p < 0.01$ 、片側)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を総合的に行った。

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

染色体異常試験に先立ち実施した被験物質の溶媒中での安定性試験において、調製直後に測定した 0.0100 mg/mL の平均含量が判断基準を満たさなかった。試料溶液調製の際に用いたアセトン(規格: 試薬特級)を HPLC で調べた結果、試料溶液調製に用いたアセトンには被験物質のピーク保持時間付近に不純物由来のピークが認められた。そこで、アセトン(規格: HPLC 用)について同様に確認したところ、アセトン(試薬特級)に見られた不純物由来のピークはほとんど認められなかった。

以上の結果より、試料溶液を調製する際に使用したアセトン(試薬特級)は不適であると判断し、アセトン(HPLC 用)を用いて試料溶液の再調製を行い、被験物質調製液の安定性を確認した。なお、染色体異常試験については、安定性試験で用いた HPLC 用アセトンを使用して被験物質調製液を調製し、実験を行ったことから、試験の信頼性に影響はないものと判断した。

そのほか本試験期間中に、「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」はなかった。

試験成績および考察

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果、50%の細胞増殖抑制濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ 0.37 mg/mL および 0.96 mg/mL、24 時間連続処理では 0.34 mg/mL と推定された。肉眼観察の結果、処理開始時ではすべての処理条件で 0.49 mg/mL 以上の濃度群で培養液中に沈殿が認められ、処理終了時では、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理では 0.97 mg/mL 以上の濃度群で、S9 mix 存在下の短時間処理では 1.9 mg/mL の濃度群で培養液中に沈殿が認められた(Figure 1)。

以上の結果より、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理では 0.70 mg/mL を最高処理濃度とし、また S9 mix 存在下の短時間処理では 1.9 mg/mL を最高処理濃度として下記の濃度群を設定し、染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.022、0.044、0.088、0.18、0.35、0.70 mg/mL (公比 2)

S9 mix 存在下の短時間処理:0.059、0.12、0.24、0.48、0.95、1.9 mg/mL (公比 2)

24 時間連続処理:0.022、0.044、0.088、0.18、0.35、0.70 mg/mL (公比 2)

なお、肉眼観察の結果、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理では、処理開始時および処理終了時共に、0.70 mg/mL の濃度群で培養液中に沈殿が認められた。また、S9 mix 存在下の短時間処理では処理開始時では 0.48 mg/mL 以上の濃度群で培養液中に沈殿が認められ、処理終了時では 0.95 mg/mL 以上の濃度群で培養液中に沈殿が認められた。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析の結果、分析可能な最高濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ 0.35 mg/mL および 1.9 mg/mL となったことから、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理については、その濃度を含む下記の 3 濃度群を観察対象とした。また、24 時間連続処理では、分析可能な最高濃度は 0.35 mg/mL となったが、この濃度は構造異常について規定の 200 細胞分析出来ない可能性が考えられたことから、その濃度を含む下記の 4 濃度群を観察対象とした。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.088、0.18、0.35 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.48、0.95、1.9 mg/mL

24 時間連続処理:0.044、0.088、0.18、0.35 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理については構造異常を有する細胞および倍数性細胞について統計学的に有意な増加は認められなかった (Table 1、Table 3)。なお、24 時間連続処理の 0.35 mg/mL 濃度群では、細胞毒性のため倍数性細胞について規定の 800 細胞を分析できなかった。

S9 mix 存在下の短時間処理については、構造異常では中濃度群 (0.95 mg/mL) および高濃度群 (1.9 mg/mL) で統計学的に有意な増加 (19.0% および 29.0%) が認められ、用量依存性も認められた (Table 2)。また倍数性細胞では低濃度群 (0.48 mg/mL) および中濃度群 (0.95 mg/mL) で統計学的に有意な増加 (出現率:3.9% および 3.4%) が認められたものの、高濃度群 (1.9 mg/mL) ではその出現率が 1.4% と低く、傾向性検定では陰性となった (Table 2)。

陽性の結果が得られた S9 mix 存在下の短時間処理について D_{20} 値を求めたところ、構造異常を有する細胞では 1.1mg/mL となった。なお、倍数性細胞については最高濃度の 10 倍以上の濃度 (197.6 mg/mL) となり、対象外となった。

S9 mix 存在下の短時間処理で染色体異常が誘発されたが、S9 mix 非存在下の短時間処理では染色体異常が認められないことから、被験物質の代謝産物により染色体異常が誘発されたと考えられた。

なお、構造異常については、処理終了時に沈殿物が認められた濃度でのみ構造異常が誘発されたことから、生体内では起こり得ない高濃度条件下での結果と考えられた。

また、倍数性細胞については、用量依存的に出現率が低下していることから、細胞増殖の著しい遅延もしくは停止により倍数性細胞の出現率が低下しているものと考えられた。

なお、1,3-benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester については、当研究所で実施した細菌を用いる復

帰突然変異試験(試験番号:M-11-043)では陰性の結果が得られている。

陽性対照物質として用いた MMC は、S9 mix 非存在下の短時間処理および連続処理において染色体の構造異常を誘発し(Table 1、Table 3)、CP は S9 mix 存在下の短時間処理において染色体の構造異常を誘発した(Table 2)。これらの結果より、本実験系の成立が確認された。

1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester は、今回の試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発したが、復帰突然変異試験結果は陰性であり、類縁物質である isophthalic acid、terephthalic acid および dimethyl terephthalate についても復帰突然変異試験で陰性の結果^{2)~4)}が報告されている。

以上の結果より、1,3-benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester は、本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

参考文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編:「化学物質による染色体異常アトラス」, 朝倉書店, 東京(1988)
- 2) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修、労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集、社団法人日本化学物質安全・情報センター、東京(1996) p84
- 3) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修、労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集、社団法人日本化学物質安全・情報センター、東京(1996) p201
- 4) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修、労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集、社団法人日本化学物質安全・情報センター、東京(1996) p174

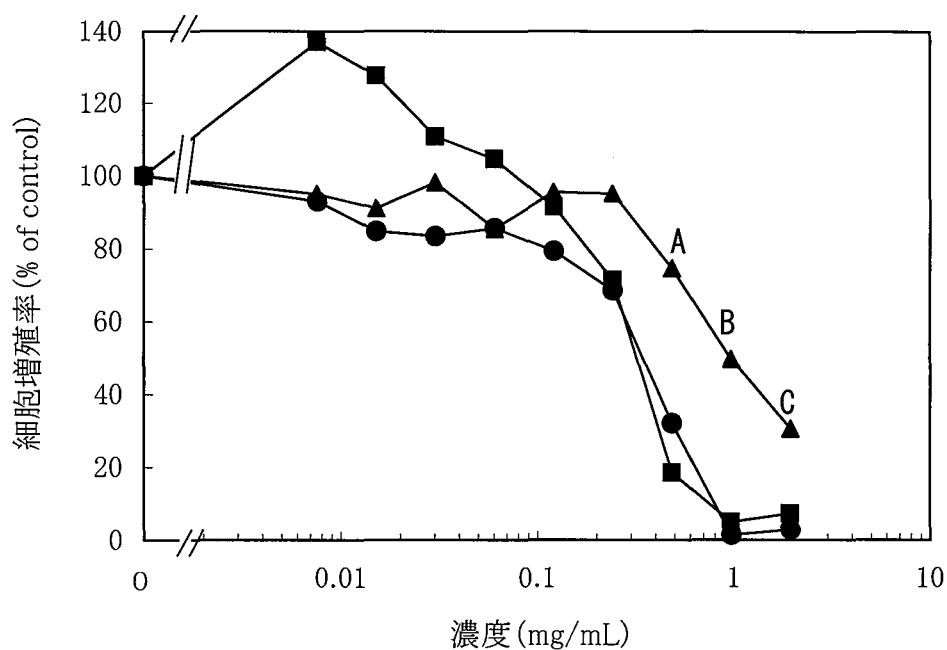


Figure1 1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester で CHL/IU 細胞を処理した場合の増殖抑制作用

- : S9 mix 非存在下の短時間処理
- ▲: S9 mix 存在下の短時間処理
- : 24 時間連続処理

肉眼観察の結果、すべての処理条件で処理開始時に 0.49 mg/mL (A) 以上の濃度で培養液中に沈殿が認められ、処理終了時では S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理では 0.97 mg/mL (B) 以上の濃度、S9 mix 存在下の短時間処理では 1.9 mg/mL (C) の濃度で培養液中に沈殿が認められた。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 1,3-benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester (DMIP) for 6 hours without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ¹⁾	0	—	6 - (18)	100	NA	100	1	0	0	2	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	3 (0.8)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)		
						200	1	0	0	2	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	5 (0.6)		
DMIP	0.022	—	6 - (18)	102	NA	not observed													
DMIP	0.044	—	6 - (18)	97	NA	not observed													
DMIP	0.088	—	6 - (18)	94	NA	100	1	2	0	3	0	0	6	0	4 (4.0)	3 (3.0)	1 (0.3)		
						100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.3)		
						200	2	2	0	3	0	0	7	0	5 (2.5)	3 (1.5)	2 (0.3)		
DMIP	0.18	—	6 - (18)	87	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)		
						200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.4)	NA	NA
DMIP	0.35	—	6 - (18)	71	6.8, 6.0	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	4 (1.0)		
						100	0	0	3	0	0	0	3	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)		
						200	0	1	3	0	0	0	4	0	2 (1.0)	2 (1.0)	5 (0.6)		
DMIP	0.70 ^{pbe}	—	6 - (18)	10	NA	not made chromosome specimens													
MMC	0.1 µg/mL	—	6 - (18)	NA	NA	100	5	25	44	0	0	0	74	3	43 (43.0)	41 (41.0)	0 (0.0)		
						100	7	42	72	0	0	0	121	1	64 (64.0)	63 (63.0)	0 (0.0)		
						200	12	67	116	0	0	0	195	4	107 (53.5)	104 * (52.0)	0 (0.0)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

- 1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 1 vol% to each dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$ (one-side).

*, Significantly different from the negative control at $p < 0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.
pbe, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with 1,3-benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester (DMIP) for 6 hours with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ¹⁾	0	+	6 - (18)	100	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)		
						100	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)		
						200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	3 (0.4)		
DMIP	0.059	+	6 - (18)	98	NA										not observed				
DMIP	0.12	+	6 - (18)	100	NA										not observed				
DMIP	0.24	+	6 - (18)	98	NA										not observed				
DMIP	0.48 ^{pb}	+	6 - (18)	79	NA	100	1	2	1	0	0	0	4	0	4 (4.0)	3 (3.0)	17 (4.3)		
						100	0	3	1	0	0	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	14 (3.5)		
						200	1	5	2	0	0	0	8	0	8 (4.0)	7 (3.5)	31 *(3.9)		
DMIP	0.95 ^{pbe}	+	6 - (18)	51	NA	100	2	8	19	0	0	0	29	0	21 (21.0)	20 (20.0)	8 (2.0)		
						100	0	10	24	0	0	0	34	0	18 (18.0)	18 (18.0)	19 (4.8)		
						200	2	18	43	0	0	0	63	0	39 (19.5)	38 *(19.0)	27 *(3.4)	+	-
DMIP	1.9 ^{pbe}	+	6 - (18)	36	3.4, 2.0	100	2	12	39	0	0	0	53	0	31 (31.0)	30 (30.0)	8 (2.0)		
						100	3	15	36	0	0	0	54	0	28 (28.0)	28 (28.0)	3 (0.8)		
						200	5	27	75	0	0	0	107	0	59 (29.5)	58 *(29.0)	11 (1.4)		
CP	10 µg/mL	+	6 - (18)	NA	NA	100	3	13	7	1	0	0	24	0	20 (20.0)	18 (18.0)	1 (0.3)		
						100	2	20	8	1	1	0	32	1	27 (27.0)	25 (25.0)	1 (0.3)		
						200	5	33	15	2	1	0	56	1	47 (23.5)	43 *(21.5)	2 (0.3)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 1 vol% to each dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.

5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$ (one-side).

*, Significantly different from the negative control at $p < 0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

pb, Precipitation was observed at the beginning of the treatment in the medium by the naked eye.

pbe, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells continuously treated with 1,3-benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester (DMIP) for 24 hours without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾	
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total	+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ¹⁾	0	24	100	NA	100	1	0	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	1 (0.3)	
					100	0	3	0	0	1	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	2 (0.5)	
					200	1	3	0	1	1	0	6	0	6 (3.0)	5 (2.5)	3 (0.4)	
DMIP	0.022	24	102	NA	not observed												
DMIP	0.044	24	107	NA	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	
					100	2	1	0	1	0	0	4	0	4 (4.0)	2 (2.0)	2 (0.5)	
					200	3	2	0	1	0	0	6	0	6 (3.0)	3 (1.5)	2 (0.3)	
DMIP	0.088	24	91	NA	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	
					100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	
					200	1	2	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	NA NA
DMIP	0.18	24	72	NA	100	3	3	1	0	0	0	7	0	6 (6.0)	4 (4.0)	0 (0.0)	
					100	2	1	0	0	0	0	3	1	3 (3.0)	1 (1.0)	1 (0.3)	
					200	5	4	1	0	0	0	10	1	9 (4.5)	5 (2.5)	1 (0.1)	
DMIP	0.35	24	57	1.6, 1.8	100	2	3	1	0	0	0	6	0	6 (6.0)	4 (4.0)	0 (0.0)	
					100	1	3	1	0	0	0	5	0	5 (5.0)	4 (4.0)	0 (0.0)	
					200	3	6	2	0	0	0	11	0	11 (5.5)	8 (4.0)	0 (0.0) ⁸⁾	
DMIP	0.70 ^{pbe}	24	11	NA	not made chromosome specimens												
MMC	0.05 µg/mL	24	NA	NA	100	9	36	64	0	0	0	109	2	54 (54.0)	53 (53.0)	0 (0.0)	
					100	6	40	73	1	0	0	120	1	59 (59.0)	58 (58.0)	1 (0.3)	
					200	15	76	137	1	0	0	229	3	113 (56.5)	111 * (55.5)	1 (0.1)	

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Acetone was used as a solvent and added at the level of 1 vol% to each dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.

5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p < 0.01$ (one-side). 8) Seven hundred and twelve cells were analyzed in each group.

*, Significantly different from the negative control at $p < 0.01$ (one-side) by Fisher's exact probability test.

pbe, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Appendix 1



試験成績書

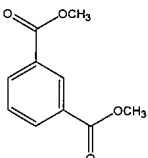
2011年09月27日

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

製品名: Dimethyl Isophthalate					
製品コード: I0157	等級: EP	製品ロット: FGM01	判定: 合格		
項目	結果	規格値			
メノール溶状	澄明	ほとんど澄明以内			
純度(GC)	99.9 %	99.0 %以上			
融点	68.9 deg-C	67.0 ~ 71.0 deg-C			
酸価	0.1	0.5 以下			

Appendix 2

被験物質の一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPACの命名法による)	イソフタル酸ジメチル		
別名	1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester、Dimethyl isophthalate、Isophthalic acid dimethyl ester		
C A S 番号	1459-93-4		
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)			
分子量	194.18		
試験に供した新規化学物質の純度 (%)	99.9%(GC)		
試験に供した新規化学物質のロット番号	FGM01		
不純物の名称及び含有率	_____		
蒸気圧	1.3 Pa/25℃		
対水溶解度	不溶 (290 mg/L)		
1-オクタノール／水分配係数	1.7		
融点	69℃		
沸点	124℃/0.3 kPa		
常温における性状	白色～ほとんど白色、結晶～粉末		
安定性	適切な条件下においては安定 (製品安全データシートより)		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性*
	水	20.0 mg/mLで不溶	50.0 mg/mLの濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。(試験番号:M-11-043)。
	DMSO	50.0 mg/mLで溶解	50.0 mg/mLの濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。また、調製後24時間の安定性 (0.01 mg/mLおよび50.0 mg/mL、室温、遮光保管)を確認した (試験番号:M-11-043)。
	アセトン	200 mg/mLで溶解	194 mg/mLの濃度では調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。また、調製後24時間の安定性 (0.01 mg/mLおよび200 mg/mL、室温、遮光保管)を確認した。

【備考】 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

*: (財) 食品薬品安全センター秦野研究所において確認した。

Appendix 3

被験物質原体の安定性測定方法

① 使用機器

フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR-8300) 島津製作所

② 測定条件

測定方法 臭化カリウム錠剤法

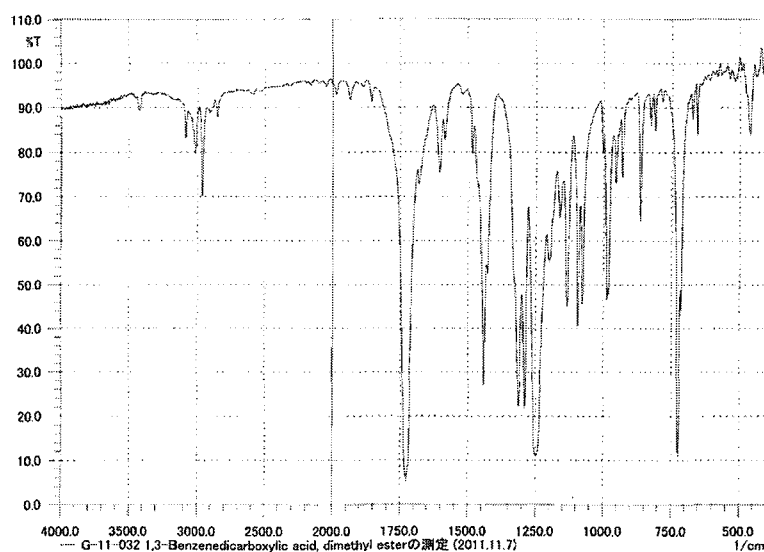
波数範囲 4000～400 cm^{-1}

③ 測定方法

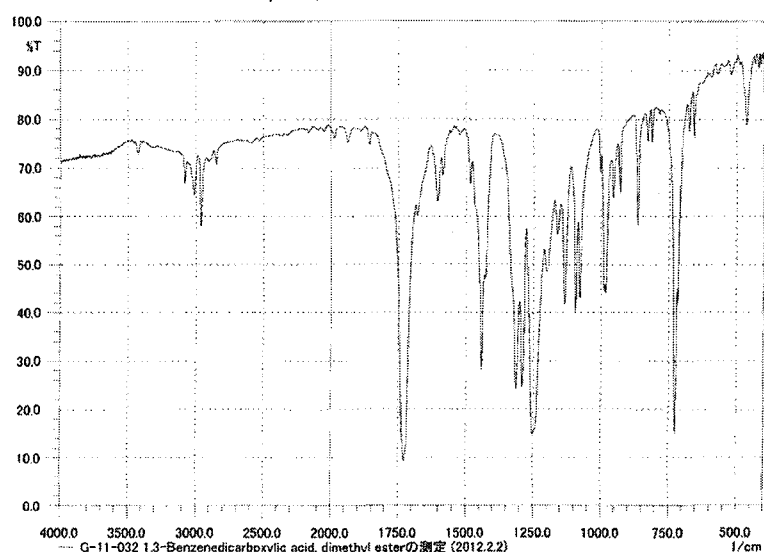
被験物質を採り(実験開始前:1.5 mg、実験終了後:1.1 mg)、めのう製乳鉢で粉末とし、これに赤外吸収スペクトル用臭化カリウム(島津製作所)を加え(実験開始前:0.1500 g、実験終了後:0.1101 g)、吸湿しないように注意しながら速やかによくすり合わせた後、錠剤成型器に入れて加圧製錠した。同様の方法で対照臭化カリウム錠剤を製錠し、それぞれを測定した。

1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester の赤外吸収スペクトル測定結果

実験開始前



実験終了後



Appendix 4

投与検体中の被験物質濃度測定法

① 試薬

蒸留水(HPLC 用)	和光純薬工業(ロット番号:DCH5318)
アセトニトリル(HPLC 用)	和光純薬工業(ロット番号:DCG7377)

② 使用機器

電子天秤(R200D)	ザルトリウス
高速液体クロマトグラフ	島津製作所

主要構成:LC-10AD VP(ポンプ)、SIL-10AD VP(オートインジェクタ)、CTO-10AC VP(カラムオーブン)、SPD-10A VP(検出器)、SCL-10A VP(システムコントローラ)、DGU-20A3(デガッサ)、C-R7A plus(データ処理装置)

③ 標準溶液の調製

被験物質 10.00 mg を精密に量り、アセトニトリルに溶解して正確に 50 mL とした。この液 1 mL を正確にとり、アセトニトリルを加えてそれぞれ正確に 20 mL とし、標準原液とした。さらにこの標準原液を 1、1 および 4 mL を正確にとり、アセトニトリルを加えてそれぞれ正確に 20、10 および 10 mL とし標準溶液(約 0.5000、1.000 および 4.000 $\mu\text{g/mL}$ 、各濃度 $n=1$)を調製した。

④ 試料溶液の調製

投与検体の 1 mL を正確に採り、アセトニトリルで適宜希釈し、試料溶液(約 1.00 $\mu\text{g/mL}$)を調製した。試料溶液は、投与検体の採取から $n=3$ で調製した。

⑤ 検量線の作成および投与検体中被験物質濃度の算出

試料溶液および標準溶液を高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により測定した。標準溶液は $n=3$ で測定し、得られた DMIP のピーク面積と調製濃度を基に、最小二乗法により検量線を作成した。試料溶液は各 $n=1$ で測定し、得られた DMIP のピーク面積から、先の検量線を用いて、試料溶液中の DMIP 濃度を求めた。さらに、希釈係数を乗じて投与検体中の DMIP 濃度を算出し、調製濃度に対する割合(%)および各測定濃度の平均値に対するばらつき(%)を算出した。

⑥ HPLC 測定条件

検出器	紫外分光光度計(測定波長 210 nm)
分析カラム	XTerra RP18(内径 4.6 mm、長さ 100 mm、粒子径 3.5 μm 、Waters)
移動相	蒸留水/アセトニトリル混液(65:35 v/v)
流量	1 mL/min
カラム設定温度	40°C
試料注入量	10 μL
オートインジェクタ洗浄液	アセトニトリル

システムの適合性 測定開始前および測定終了後に標準溶液(1.000 $\mu\text{g/mL}$)を 1 回ずつ測定し、ピーク保持時間および強度(ピーク面積)の変動(測定開始前に対する測定終了後の偏差%)が許容基準内(ピーク保持時間が $\pm 3.0\%$ 以内、ピーク強度が $\pm 5.0\%$ 以内)であることを確認した。

⑦ 数値の取り扱い

被験物質の秤量:有効数字 3 桁以上
標準物質の秤量:有効数字 4 桁以上

投与検体の濃度:有効数字 3 桁(有効数字 4 桁目を四捨五入)

標準溶液の濃度:有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の濃度およびそれらの平均値:有効数字 4 桁(有効数字 5 桁目を切り捨て)

測定結果の含量(%）、ばらつき(%）、および残存率(%）ならびにそれらの平均値:

小数点以下第 1 位(小数点以下第 2 位を四捨五入)

Appendix 5

安定性試験結果

被験物質: 1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester
 ロット番号: FGM01
 媒体: アセトン

調製年月日 2011年11月17日
 測定年月日 A 2011年11月17日(調製直後)
 B 2011年11月18日(調製後24時間)
 保存条件 室温、遮光

調製濃度 (mg/mL)	A				B				
	試料 番号	測定濃度 (mg/mL)	含量 ^{a)} (%)	ばらつき ^{b)} (%)	試料 番号	測定濃度 (mg/mL)	含量 ^{a)} (%)	ばらつき ^{b)} (%)	残存率 ^{c)} (%)
0.0100	10	0.009809	98.1	100.1	16	0.01001	100.1	99.6	102.1
	11	0.009841	98.4	100.4	17	0.009992	99.9	99.4	101.9
	12	0.009762	97.6	99.6	18	0.01016	101.6	101.1	103.6
	平均	0.009804	98.0		平均	0.01005	100.5		102.5
200	13	194.0	97.0	99.5	19	200.8	100.4	100.5	103.0
	14	193.9	97.0	99.5	20	197.7	98.9	98.9	101.4
	15	196.8	98.4	101.0	21	201.1	100.6	100.7	103.2
	平均	194.9	97.5		平均	199.8	100.0		102.5

a): 各測定時の測定濃度／調製濃度×100 b): 各測定時の測定濃度／各測定時の平均測定濃度×100 c): 各測定時の測定濃度／初回の平均測定濃度×100

安定性の判断基準(溶液検体)

調製直後および保管後の平均含量がそれぞれ調製濃度の90.0～110.0%以内であり、また、各測定値のばらつきがそれぞれ平均値の90.0～110.0%以内であり、かつ、調製直後の測定平均値に対する保管後の残存率の平均値が90.0%以上を示す期間とする。