最終報告書

表　　題：リン酸トリアリルのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：ＳＲ０８２０８

株式会社 化合物安全性研究所

陳 述 書

表題：リン酸トリアリルのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：ＳＲ０８２０８

１．本試験は GLP 基準「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号・平成 15･11･17 製局第 3 号・環保企発第 031121004 号、最終改正 平成 20 年 7 月 4 日 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)に従い、試験方法は「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号・平成 15･11･13 製局第 2 号・環保企発第 031121002 号、最終改正 平成 18 年 11 月 20 日 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)および OECD 試験法ガイドライン(OECD Guideline for The Testing of Chemicals; *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (473), 21st July 1997)に基づいて実施したものであります。

２．本試験は、試験計画書に従って実施し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因は認められませんでした。

株式会社 化合物安全性研究所

試験責任者 [redacted] [redacted] 2011 年 10 月 28 日

信 頼 性 保 証 書

表題：リン酸トリアリルのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：ＳＲ０８２０８

本試験は、株式会社 化合物安全性研究所 ＱＡＵによって、下記のとおり査察された。

査　察　段　階	査　察　日	試験責任者への報告日	運営管理者への報告日
試験計画書	2010 年 7 月 30 日	2010 年 7 月 30 日	2010 年 7 月 30 日
試験計画書変更書(No. 1)	2011 年 10 月 3 日	2011 年 10 月 3 日	2011 年 10 月 3 日
被験物質の受入・表示・保存	2010 年 7 月 30 日	2010 年 7 月 30 日	2010 年 7 月 30 日
被験物質の調製	2010 年 9 月 2 日	2010 年 9 月 2 日	2010 年 9 月 2 日
試験の実施	2010 年 9 月 2 日	2010 年 9 月 2 日	2010 年 9 月 2 日
標本作製	2010 年 9 月 3 日	2010 年 9 月 3 日	2010 年 9 月 3 日
観察	2011 年 2 月 28 日	2011 年 2 月 28 日	2011 年 2 月 28 日
生データ	2011 年 4 月 14 日	2011 年 4 月 14 日	2011 年 4 月 14 日
最終報告書(草案)：図表	2011 年 4 月 14 日	2011 年 4 月 14 日	2011 年 4 月 14 日
最終報告書(草案)：本文	2011 年 4 月 14 日	2011 年 4 月 14 日	2011 年 4 月 14 日
最終報告書	2011 年 10 月 28 日	2011 年 10 月 28 日	2011 年 10 月 28 日

1. 本試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号・平成 15･11･17 製局第 3 号・環保企発第 031121004 号、最終改正 平成 20 年 7 月 4 日 厚生労働省医薬食品局長･経済産業省製造産業局長･環境省総合環境政策局長連名通知)、「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号・平成 15･11･13 製局第 2 号・環保企発第 031121002 号、最終改正 平成 18 年 11 月 20 日厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)および OECD 試験法ガイドライン（OECD Guideline for The Testing of Chemicals ; *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (473), 21st July 1997）に従い実施された。

2. 本試験は、試験計画書に従って実施され、また、本報告書には当該試験に使用した方法および手順が正確に記載されており、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映していることを確認した。

株式会社 化合物安全性研究所

ＱＡＵ責任者 [redacted] [redacted] 2011 年 10 月 28 日

目　次

頁

表紙 …… 1

陳述書 …… 2

信頼性保証書 …… 3

目次 …… 4

表題、試験番号、試験目的、試験実施基準および試験法ガイドライン、
試験委託者、試験施設、試験責任者 …… 6

試験従事者およびその業務分担、試験期間 …… 7

要約 …… 8

緒言 …… 9

材料および方法 …… 9

成績 …… 19

考察 …… 21

参考資料 …… 21

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 …… 22

資料の保存 …… 22

試験責任者の記名なつ印 …… 22

Tables and Figure

Table 1　Effects of triallyl phosphate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR08208) …… 23

Figure 1　Effects of triallyl phosphate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR08208) …… 24

Table 2　Effects of triallyl phosphate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR08208) …… 25

Table 3-1　Results of the chromosomal aberration test of triallyl phosphate (6 hours treatment without metabolic activation) (SR08208) …… 26

Table 3-2　Results of the chromosomal aberration test of triallyl phosphate (6 hours treatment with metabolic activation) (SR08208) …… 27

Table 3-3　Results of the chromosomal aberration test of triallyl phosphate (24 hours treatment without metabolic activation) (SR08208) …… 28

Appendix

Appendix 1　試験成績書(2010 年 5 月 11 日)····· 29

表題　　：リン酸トリアリルのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号　　：ＳＲ０８２０８

試験目的　　：チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いて、リン酸トリアリルの*in vitro*における染色体異常誘発性の有無を検討することを目的とした。

試験実施基準および試験法ガイドライン

試験実施基準(GLP)　：「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号・平成 15･11･17 製局第 3 号・環保企発第 031121004 号、最終改正 平成 20 年 7 月 4 日 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)

試験法ガイドライン　：「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号・平成 15･11･13 製局第 2 号・環保企発第 031121002 号、最終改正 平成 18 年 11 月 20 日 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)

OECD 試験法ガイドライン(OECD Guideline for The Testing of Chemicals; *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (473), 21st July 1997)

試験委託者

名称　　：厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

所在地　　：東京都千代田区霞が関 1-2-2(〒100-8916)

試験施設

名称　　：株式会社 化合物安全性研究所

所在地　　：札幌市清田区真栄 363 番 24(〒004-0839)

運営管理者　　：[redacted]

試験責任者

氏名　　：[redacted]

所属　　：株式会社 化合物安全性研究所　安全性研究部

試験従事者およびその業務分担

被験物質管理　：[redacted]

試験操作　：

試験期間

試験開始日　：2010 年 7 月 30 日

被験物質受人　：2010 年 5 月 6 日

実験開始日　：2010 年 8 月 2 日

予備試験

被験物質処理開始　：2010 年 8 月 2 日

固定・染色　：2010 年 8 月 3 日

本試験

被験物質処理開始　：2010 年 9 月 2 日

標本作製　：2010 年 9 月 3 日

観察終了日　：2011 年 3 月 8 日

実験終了日　：2011 年 3 月 8 日

試験終了日　：2011 年 10 月 28 日

要　約

リン酸トリアリルの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いて検討した。試験は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 試験系列で実施した。

予備試験[細胞増殖抑制試験：8.59～2200 μg/mL(10 mM 相当濃度)]の結果、各試験系列で 50%以上の細胞増殖抑制が認められた。IC_{50} 値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 1570 μg/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合が 1677 μg/mL および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 722 μg/mL であった。被験物質の析出ならびに被験物質処理による培養液 pH への影響は観察されなかった。

本試験(染色体異常試験)は、予備試験の結果に基づき、各試験系列とも IC_{50} 値より高用量を最高用量とした試験群を設定した。その結果、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量：275～2200 μg/mL)の構造異常の出現率は、細胞増殖抑制用量の 1925 および 2200 μg/mL の用量でそれぞれ 6.0%および 35.0%と用量に依存して増加が認められた。2200 μg/mL の用量は極めて強い細胞増殖抑制がみられた用量であることから得られた結果は参考値とし、当該試験系列は疑陽性と判断した(D_{20} 値：2.0 mg/mL)。また、短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量：138～1833 μg/mL)の構造異常の出現率は、細胞増殖抑制用量の 1467 および 1833 μg/mL の用量でそれぞれ 5.5%および 19.5%と用量に依存して増加が認められ、陽性と判断した(D_{20} 値：1.9 mg/mL)。連続処理法の 24-0 h 処理による場合(評価用量：34.4～550 μg/mL)の構造異常の出現率は、いずれの用量も 5%未満であった。また、染色体の数的異常の出現率は、各試験系列のいずれの用量においても 5%未満であった。なお、染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群において、被験物質の析出あるいは被験物質処理による培養液 pH への影響は観察されなかった。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は、各試験系列で明確な陽性値を示し本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、リン酸トリアリルのほ乳類の培養細胞に対する染色体異常誘発性は、本試験条件において、代謝活性化系の非存在下で疑陽性および代謝活性化系の存在下で陽性と判断した。

緒　言

リン酸トリアリルの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討する目的で、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いる染色体異常試験を実施した。

材料および方法

1. 被験物質

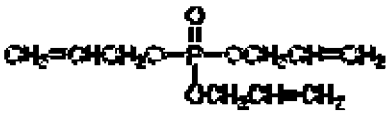
名称　　：リン酸トリアリル；Triallyl Phosphate

別名　　：Phosphoric Acid Triallyl Ester

CAS No.　　：1623-19-4

化審法官報公示整理番号：(2)-1960

構造式[1)]　　：



分子式[1)]　　：$C_9H_{15}O_4P$

分子量[1)]　　：218.19

物理化学的性質　　：外観　；無色～うすい黄色の透明液体[2)]

沸点/沸騰範囲；113℃/0.5kPa[2)]

密度　；1.08[2)]

比重(20/20)；1.0822 (Appendix 1)

屈折率(n20/D)；1.4493 (Appendix 1)

溶解度；水：難溶[2)]

試験施設において、蒸留水(日本薬局方注射用水)およびジメチルスルホキシドを用いて調製確認を行った。確認内容を、2. 被験物質の調製(10頁)に記載した。

オクタノール/水分配係数；1.76[2)]

ロット番号　　：3MAPA

純度　　：99.4%(GC)(Appendix 1)

不純物の名称およびその濃度：データなし

製造者　：名称　；東京化成工業株式会社
　所在地；東京都北区豊島 6 丁目 15 番 9 号（〒114-0003）
入手量　：500 mL×2 本(関連試験と共用)
保存条件　：窒素充填、密栓、冷暗所(実測範囲：2～9℃)。火気や熱源等の着火源から遠ざけ保存した。
保存場所　：被験物質保存室および変異原性試験室
保存期間　：2010 年 5 月 6 日(受入)～2010 年 9 月 2 日(最終使用日)
安定性 [2)]　：空気中の水分により分解する。重合する恐れがある。
　実験終了後、試験に使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し、被験物質の安定性について確認する。
有害性情報、他 [2)]　：急性毒性データ　マウス腹腔内 LDLo 500 mg/kg
　マウス静脈内 LD_{50} 70800 μg/kg
取扱上の注意 [2)]　：取扱いは換気のよい場所で行い適切な保護具を着用した。また、漏れ、あふれ、飛散あるいはみだりに蒸気を発生させないように注意し取扱った。
残余被験物質の処置　：試験操作終了後、安定性分析のため分析者へ送付する。

2. 被験物質の調製

試験施設において、被験物質の調製確認を行った。被験物質は蒸留水(日本薬局方注射用水、50 mg/mL の濃度まで検討)に混合せず調製困難であり、ジメチルスルホキシドには 200 mg/mL の濃度まで溶解し、反応性はみられなかった。以上のことから、当該試験の媒体としてジメチルスルホキシドを選択した。

被験物質を精秤し、ジメチルスルホキシド(脱水処理済み、ロット番号 BT159、株式会社同仁化学研究所)を用いて溶解ならびに希釈し、所定の濃度に調製した。

予備試験では 220 mg/mL 調製液を調製し、220 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 110、55.0、27.5、13.8、68.8、34.4、17.2 および 8.59 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では 220 mg/mL 調製液を調製し、220 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 110、55.0、27.5、13.8、68.8 および 34.4 mg/mL 調製液を調製した。また、220 mg/mL 調製液より 192.5、183.3、165.0、146.7、137.5 を、110 mg/mL 調製液より 82.5 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、予備試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体との反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液は、プレート内の液に対し 1 vol%の割合で添加し、予備試験では調製後 0.9 時間以内に、本試験では調製後 1.4 時間以内に使用した。

調製はクリーンベンチ内で行い、調製に際しては、保護眼鏡、マスク、手袋および白衣等を着用し、吸引または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、ジメチルスルホキシド[ロット番号 BT159、使用期限 2014 年 12 月(購入より 5 年)、株式会社同仁化学研究所]をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用した。

ジメチルスルホキシドは、プレート内の液に対し 1 vol%の割合で添加した。

4. 陽性対照物質

代謝活性化によらない場合の陽性対照物質として、マイトマイシン C(ロット番号 542AIA、使用期限 2013 年 1 月、協和発酵キリン株式会社)を使用した。マイトマイシン C は、購入後室温で保存し、日本薬局方注射用水(ロット番号 9K88、株式会社大塚製薬工場)を用いて 5 および 10 μg/mL の濃度に調製した。購入したマイトマイシン C は、1 瓶中に日局マイトマイシン C を 2 mg(力価)含有しており、調製の際には 1 mg(力価)を 1 mg として換算した。

代謝活性化法による場合の陽性対照物質として、3,4-ベンゾピレン[ロット番号 8JB8G、使用期限 2014 年 7 月(購入より 5 年)、東京化成工業株式会社]を使用した。3,4-ベンゾピレンは、購入後冷所(2～8℃)で保存し、ジメチルスルホキシド(ロット番号 WF032、株式会社同仁化学研究所)を用いて 1 mg/mL の濃度に調製した。なお、購入した 3,4-ベンゾピレンの含量は 98.2%であった。

陽性対照物質の各調製液は-20℃以下で分注凍結保存し、調製後 1 ヵ月以内に試験に使用した(使用期限は調製後 1 年)。保存調製液は解凍後 0.8 時間以内に使用した。

陽性対照物質は、それぞれプレート内の液に対し 1 vol%の割合で添加した。

5. 試験系

試験系として、2005 年 5 月 17 日に大日本製薬株式会社より継代数 14 で入手した CHL/IU を使用した。CHL/IU は、雌の新生チャイニーズハムスターの肺に由来し、染色体数(モード)は 25 本(2n=22)、倍加時間の測定値は 15.0 時間である。本細胞は、増殖速度、継代における染色体の安定性、染色体標本の観察の容易さおよび既知の変異原物質に対する感受性を考慮して選択した。また、供試細胞と同時に凍結保存した細胞を用いて蛍光染色法によりマイコプラズマチェックを行い、陰性であることを確認した。

細胞の保存に際しては、10 vol%ジメチルスルホキシドを含む培地を用いて 1×10^6 cells/mL 細胞浮遊液を調製し、1 mL ずつアンプルに分注したものを漸次冷却して凍結

させた後、液体窒素内に保存した。解凍後は、75 cm^2 培養フラスコを用いて 5.0%CO_2、37.0℃に設定した CO_2 インキュベーター[MCO-175、三洋電機株式会社あるいはMCO-18AIC(UV)、三洋電機バイオメディカ]内で培養し、3 または 4 日毎に継代を行った。試験では、継代数 18(予備試験)あるいは 19(本試験)の細胞を使用した。

6. 培地

イーグル MEM 培地を以下の割合で混合し調製した。

イーグル MEM 培地 (Code 05900、ロット番号 632001 および 634004、カナマイシンおよびフェノールレッド含有、日水製薬株式会社)9.4 g を日本薬局方注射用水(ロット番号 8L88 および 9K88、株式会社大塚製薬工場)に溶解し全量を 1 L とした。オートクレーブ滅菌後、室温まで冷却し、滅菌済みの 7.5%炭酸水素ナトリウム (試薬特級、ロット番号 905X1946、関東化学株式会社) 溶液で pH7.2～7.4 に調整し、ろ過除菌した L-グルタミン溶液(試薬特級、L-グルタミン：ロット番号 PEH6211 および CDK3266、和光純薬工業株式会社)を 0.292 g/L となるように添加した。さらに牛胎児血清(ロット番号 672248、GIBCO)を最終調製量の 10%になるように加えた。なお、牛胎児血清は 56℃で 30 分間非働化した後に使用した。オートクレーブ滅菌後は、無菌的に調製した。

7. S9 mix

S9 mix はキッコーマン株式会社より購入し(ロット番号 CAM-614、2010 年 6 月 4 日製造)、-80℃以下で凍結保存したものを、製造日より 3 ヵ月以内(使用期限：製造後 6 ヵ月)に使用した。

S9 mix は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット(雄、7 週齢)の肝ホモジネートより調製した S9 1.05 mL に、コファクターミックス 2.45 mL を加え、次表の組成に調製されたものである。

S9 mix　1 mL 中の組成

S9	(キッコーマン株式会社製 RAA-614、S9 中蛋白含量 26.28 mg/mL)	0.3 mL
$MgCl_2$	(和光純薬工業株式会社 SDN0075)	5 μmol
KCl	(和光純薬工業株式会社 CDL2642)	33 μmol
G-6-P	(オリエンタル酵母工業株式会社 118907)	5 μmol
NADP	(オリエンタル酵母工業株式会社 045910)	4 μmol
HEPES 緩衝液	(株式会社同仁化学研究所　PE026)	4 μmol
蒸留水		0.1 mL

8. 試験方法

(1) 予備試験(細胞増殖抑制試験)

1) 試験群

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 試験系列について実施した。

被験物質の最高用量を試験法ガイドラインに従い 10 mM 相当濃度(被験物質の分子量 : 218.19)の 2200 μg/mL とし、以下公比 2 で低下させた計 9 用量(2200、1100、550、275、138、68.8、34.4、17.2 および 8.59 μg/mL)の試験群を設定した。更に、試験系列毎に陰性対照群を設定した。

各群につき 2 枚のプレートを使用し、各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

直径 60 mm の培養プレートに、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 0.4×10^4 cells/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合では 0.6×10^4 cells/mL の細胞浮遊液をそれぞれ 5 mL ずつ播種し、5.0% CO_2、37.0℃に設定した CO_2 インキュベーター内で培養した。

3) 試験液の処理

a 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、培養液 3 mL に対して試験液を 30 μL の割合で試験チューブ内で混合し、その混合液 3 mL をプレートに添加し 6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して Ca^{2+}および Mg^{2+}フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

b 短時間処理法の代謝活性化による場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、S9 mix 0.5 mL および培養液 2.5 mL の混和液に対し試験液を 30 μL の割合で試験チューブ内で混合し(S9 の最終濃度約 5 vol%)、その混合液 3 mL をプレートに添加し 6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して Ca^{2+}および Mg^{2+}フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

c 連続処理法の 24-0 h 処理による場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、培養液 5 mL に対して試験液を 50 μL の割合で試験チューブ内で混合し、その混合液 5 mL をプレートに添加した。更に、24 時間培養した。

4) 被験物質の析出の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、被験物質の析出の有無を目視確認した。

5) 被験物質による培養液pHへの影響の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、培養液色の変化の有無を目視確認した。培養液色に変化が認められない場合には、被験物質による培養液 pH への影響は無いものと判断した。

6) 細胞増殖率の測定および50%細胞増殖抑制濃度(IC_{50})の算出

培養終了後、プレート内の液を除去して Ca^{2-}および Mg^{2+}フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、10%ホルマリンで約 10～15 分間固定した後、0.1 w/v%クリスタルバイオレットで約 10～15 分間の染色を行った。染色後、水道水を入れた水槽内でプレートを洗浄して風乾させた。陰性対照群のプレートを 100%として、各プレートの細胞増殖率を単層培養細胞密度測定装置(MONOCELLATERⅡ、東洋測器株式会社)で測定した。細胞増殖率が 50%以下まで低下した場合には、用量を対数化した回帰計算により 50%細胞増殖抑制濃度(IC_{50})を算出した。

(2) 本試験(染色体異常試験)

1) 試験群

a 被験物質

予備試験の結果、各試験系列で 50%以上の細胞増殖抑制がみられたことから、各試験系列とも IC_{50} 値より高用量を最高用量とした計 7 用量を設定した。

b 対照物質

各試験系列について、陰性対照群ならびに次表の陽性対照群を設定した。

試験系列	陽性対照物質	用量 (μg/mL)
短時間処理法の代謝活性化によらない場合	マイトマイシン C	0.1
短時間処理法の代謝活性化による場合	3,4-ベンゾピレン	10
連続処理法の 24-0 h 処理による場合	マイトマイシン C	0.05

c サテライト群

被験物質の細胞増殖への影響を確認するためのサテライト群を、陽性対照群を除く各用量に設定した。

d プレート数

陽性対照群を除く各群に 4 枚のプレート(2 枚はサテライト群)を、陽性対照群には 2 枚のプレートを使用した。各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、2)細胞の播種と同様の方法で実施した。

3) 試験液の処理

a 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、3)試験液の処理、a 短時間処理法の代謝活性化によらない場合と同様の方法で実施した。

b 短時間処理法の代謝活性化による場合

8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、3)試験液の処理、b 短時間処理法の代謝活性化による場合と同様の方法で実施した。

c 連続処理法の 24-0 h 処理による場合

8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、3)試験液の処理、c 連続処理法の 24-0 h 処理による場合と同様の方法で実施した。

4) 被験物質の析出の有無の確認

8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、4)被験物質の析出の有無の確認と同様の方法で実施した。

5) 被験物質による培養液pHへの影響の有無の確認

8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、5)被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認と同様の方法で実施した。

6) 細胞増殖率の測定

8. 試験方法、(1)予備試験(細胞増殖抑制試験)、6)細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度(IC_{50})の算出と同様の方法で実施した。IC_{50}値は算出しなかった。

7) 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前に、各プレートに最終濃度 0.2 μg/mL のコルセミド(ロット番号 771425、GIBCO)を加えた。培養終了時間に、プレート内の液をそれぞれ遠沈管に回収し、各プレートを 0.02% EDTA－0.25%トリプシン(0.5M EDTA:ロット番号 1390894、GIBCO、2.5%トリプシン：ロット番号 753372、GIBCO)で処理して細胞を剥離させ、得られた細胞浮遊液を同上の遠沈管に回収して 1000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を除去し、0.075 mol/L 塩化カリウム（ロット番号 810X1990、関東化学株式会社)を加え、穏やかにピペッティングを繰り返しながら常温で 30 分間放置し細胞を膨満化させた。氷冷したカルノア固定液(メタノール：酢酸＝3：1、メタノール：ロット番号 110N1127、関東化学株式会社、酢酸：ロット番号 EPQ3760、和光純薬工業株式会社)を加えて細胞を固定した後、1000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を除去し、新しいカルノア固定液を加えた。細胞の固定操作を 3 回繰り返した後、細胞浮遊液をスライドグラス上に滴下し、一夜以上自然乾燥させた。各プレートより、2 枚の染色体標本を作製した。

各スライドは、2%ギムザ液(ギムザ液:ロット番号 KH933、和光純薬工業株式会社、インスタント燐酸緩衝液(pH7.2):ロット番号 R942、三菱化学メディエンス株式会社)で 20 分間染色し、水洗および風乾の後、封入剤(マリノール、ロット番号 0701201、武藤化学薬品株式会社)で封入した。

8) 染色体標本の観察

標本観察の前に各用量の各プレートにつき 1 枚の標本を選択してブラインド化した。

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合では、各試験系列とも細胞増殖率が 50%未満で標本の観察が可能な最高用量を高用量とする 6 あるいは 7 用量を、また、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では観察可能な最高用量を高用量とする 5 用量を選択した。すなわち、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では 275、550、1100、1375、1650、1925 および 2200 μg/mL の 7 用量を、短時間処理法の代謝活性化による場合では 138、275、550、1100、1467 および 1833 μg/mL の 6 用量を、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 34.4、68.8、138、275 および 550 μg/mL の 5 用量を選択した。

総合倍率 600 倍の顕微鏡(BX51TF、オリンパス株式会社)で、1 枚あたり 100 個の分裂中期像を観察し、以下の分類に従って染色体異常の判定を行った。構造異常については 25±2 本の染色体をもつものを観察対象とした。

①構造異常(structural aberration)

・染色分体切断(ctb: chromatid break)

染色分体のはっきりした不連続部分(切断部分)で、不連続部分が染色分体の幅以上である場合、あるいは切断片が染色分体の長軸線上から外れている場合に染色分体切断として判定した。

・染色分体交換(cte: chromatid exchange)

染色分体の 2 ヵ所以上の切断部位が相互に交換(結合反応)しているものを染色分体交換として判定した。

・染色体切断(csb: chromosome break)

両方の染色分体の同じ位置に切断が生じている場合に、染色体切断として判定した。切断の判定基準は、染色分体切断に準じた。

・染色体交換(cse: chromosome exchange)

両方の染色分体の同じ位置で同じ方向に交換が生じている場合に、染色体交換として判定した。

・その他(others)

その他の構造異常として、断片化(fragmentation)がある。一つの分裂中期像のほとんど全ての染色体に切断やギャップが現れ、交換型の異常が含まれていない場合に断片化として判定した。

②ギャップ(gap)

染色分体あるいは染色体上に生じた非染色部分(染色性が全くみられない部分)で、非染色部分の幅が染色分体の幅より狭い場合にギャップとして判定した。

③数的異常(numerical aberration)

・倍数体(poly: polyploid)

染色体数(25±2)が倍加し、三倍体、四倍体等になったものを倍数体として判定した。

・その他(others)

その他の数的異常として核内倍加がある。倍加した染色体が分離せずに平行に並んでいる場合に核内倍加(end: endoreduplication)と判定し、倍数体とは区別し計数した。

9) 観察結果の集計方法

プレート毎に以下の細胞出現数を求め、試験群毎にその合計値を算出した。更に、構造異常(1個の細胞に複数の構造異常がある場合にも、構造異常を有する細胞数は1として計数)および数的異常を有する細胞の total について、それぞれ出現率(%)を求めた。出現率(%)は、観察した細胞数(分裂中期像の数)に対する出現数の百分率で算出した。

①構造異常について

・ctb: 染色分体切断をもつ細胞数

・cte: 染色分体交換をもつ細胞数

・csb: 染色体切断をもつ細胞数

・cse: 染色体交換をもつ細胞数

・others: その他の構造異常をもつ細胞数

・total:何らかの構造異常をもつ細胞数

②ギャップについて

・gap: ギャップをもつ細胞数

③数的異常について

・poly: 倍数体の細胞数

・others: その他の数的異常をもつ細胞数

・total: 何らかの数的異常をもつ細胞数

9. 試験結果の評価

構造異常または数的異常の total の出現率(%)が 10%以上増加し、その出現様式に用量依存性がみられる場合、あるいは 5%以上増加する結果について確認試験により再現性がみられる場合を陽性、それ以外を陰性とし、統計学的手法は用いなかった。

また、構造異常の増加がみられた短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合について D_{20} 値(細胞の 20%に異常が認められる濃度)を、最小二乗法により回帰曲線を求め算出した。

成　績

1. 予備試験

細胞増殖率の結果を Table 1 および Figure 1 に、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 1 に示す。

各試験系列で 50%を超える細胞増殖抑制が認められた。IC_{50} 値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 1570 μg/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合が 1677 μg/mL および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 722 μg/mL であった。

被験物質の析出は、各試験系列のいずれの用量にも観察されなかった。

被験物質処理による培養液 pH への影響は、各試験系列のいずれの用量にも観察されなかった。

2. 本試験

細胞増殖率、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 2 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 3-1～3-3 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群における細胞増殖への影響の検討では、50%を越える細胞増殖抑制が、短時間処理法の代謝活性化によらない場合の 1925 μg/mL 以上の用量、短時間処理法の代謝活性化による場合の 1833 μg/mL 以上の用量および連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 825 μg/mL 以上の用量で認められた。

被験物質の析出は、各試験系列のいずれの用量にも観察されなかった。

被験物質処理による培養液 pH への影響は、各試験系列のいずれの用量にも観察されなかった。

染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量：275～2200 μg/mL)では、1925 μg/mL(細胞増殖率 44.5%)および 2200 μg/mL(細胞増殖率 25.5%)の用量でそれぞれ 6.0%および 35.0%と用量に関連し増加が認められた(D_{20} 値：2.0 mg/mL)。短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量：138～1833 μg/mL)の構造異常の出現率は、1467 μg/mL(細胞増殖率 71.5%)および 1833 μg/mL(細胞増殖率 47.0%)の用量で 5.5%および 19.5%と用量に関連し増加が認められた(D_{20} 値：1.9 mg/mL)。連続処理法の 24-0 h 処理による場合(評価用量：34.4～550 μg/mL)の構造異常

の出現率は、いずれの用量も 5%未満であった。染色体の数的異常の出現率は、各試験系列のいずれの用量においても 5%未満であった。なお、評価最高用量は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合では 50%以上の細胞増殖抑制がみられた用量であった。 一方、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、50%以上の細胞増殖抑制がみられた用量(825 および 1100 μg/mL)は細胞毒性により観察可能な標本を得ることが出来ず、評価最高用量は細胞増殖抑制が 50%未満の評価可能な最高用量(550 μg/mL：細胞増殖率 61.5%)となった。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 59.0%、短時間処理法の代謝活性化による場合が 56.0%および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 61.5%であった。

考　察

リン酸トリアリルの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いて検討した。

予備試験(細胞増殖抑制試験)の結果に基づき、本試験(染色体異常試験)用量として、各試験系列とも IC_{50} 値より高用量を最高用量とする計 5～7 用量を設定した。

本試験の結果、染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では、細胞増殖抑制用量の 1925 および 2200 μg/mL の用量でそれぞれ 6.0%および 35.0%と用量に依存して増加が認められた。2200 μg/mL の用量は極めて強い細胞増殖抑制がみられた用量であることから得られた結果は参考値とし、当該試験系列は疑陽性と判定するのが適当と判断した。また、短時間処理法の代謝活性化による場合の構造異常の出現率は、細胞増殖抑制用量の 1467 および 1833 μg/mL の用量でそれぞれ 5.5%および 19.5%と用量に依存して増加が認められ、陽性と判断した。連続処理法の 24-0 h 処理による場合の構造異常の出現率は、いずれの用量も 5%未満で陰性であった。染色体の数的異常の出現率は各試験系列の全ての用量で 5%未満であり陰性であった。なお、評価最高用量は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合では 50%以上の細胞増殖抑制がみられた用量であったが、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では細胞増殖抑制が 50%未満の評価可能な最高用量となった。しかし、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、評価最高用量と 50%以上の細胞増殖抑制がみられた用量との間は公比 1.5 と小さな用量比で設定しており、評価可能な用量範囲における染色体異常誘発性は適切に評価されたものと考えられた。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、リン酸トリアリルのほ乳類の培養細胞に対する染色体異常誘発性は、本試験条件において、代謝活性化系の非存在下で疑陽性および代謝活性化系の存在下で陽性と判断した。

参考資料

1) オンラインカタログ；東京化成工業株式会社
2) 製品安全データシート(2010 年 4 月 22 日改定)、東京化成工業株式会社

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

資料の保存

1. 資料保存施設および保存資料

以下の資料を、株式会社 化合物安全性研究所の資料保存室に保存する。

(1) 試験計画書、試験計画書変更書

(2) 生データその他の記録文書

(3) 最終報告書

(4) 染色体標本

2. 保存期間

試験終了後 10 年間保存し、その後の保存については試験委託者との協議により決定する。

試験責任者の記名なつ印

[redacted] [redacted] 2011 年 10 月 28 日

Table 1 Effects of triallyl phosphate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR08208)

Growth rate (% to the control)

Group	Concentration (μg/mL)	S9- 6-18 h (Mean)	S9+ 6-18 h (Mean)	S9- 24-0 h (Mean)
Control [a]	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
Triallyl phosphate	8.59	104 , 103 (103.5)	98 , 96 (97.0)	111 , 103 (107.0)
	17.2	100 , 102 (101.0)	104 , 100 (102.0)	94 , 97 (95.5)
	34.4	90 , 95 (92.5)	97 , 98 (97.5)	86 , 109 (97.5)
	68.8	95 , 94 (94.5)	90 , 89 (89.5)	109 , 93 (101.0)
	138	91 94 (92.5)	90 , 106 (98.0)	84 , 91 (87.5)
	275	95 , 87 (91.0)	89 , 95 (92.0)	69 , 76 (72.5)
	550	81 , 93 (87.0)	81 , 88 (84.5)	57 , 61 (59.0)
	1100	89 , 90 (89.5)	78 , 78 (78.0)	36 , 37 (36.5)
	2200	13 , 12 (12.5)	34 , 30 (32.0)	9 , 9 (9.0)
IC_{50} (μg/mL)		1570	1677	722

a : Dimethyl sulfoxide

Precipitation and change of pH in culture medium were not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

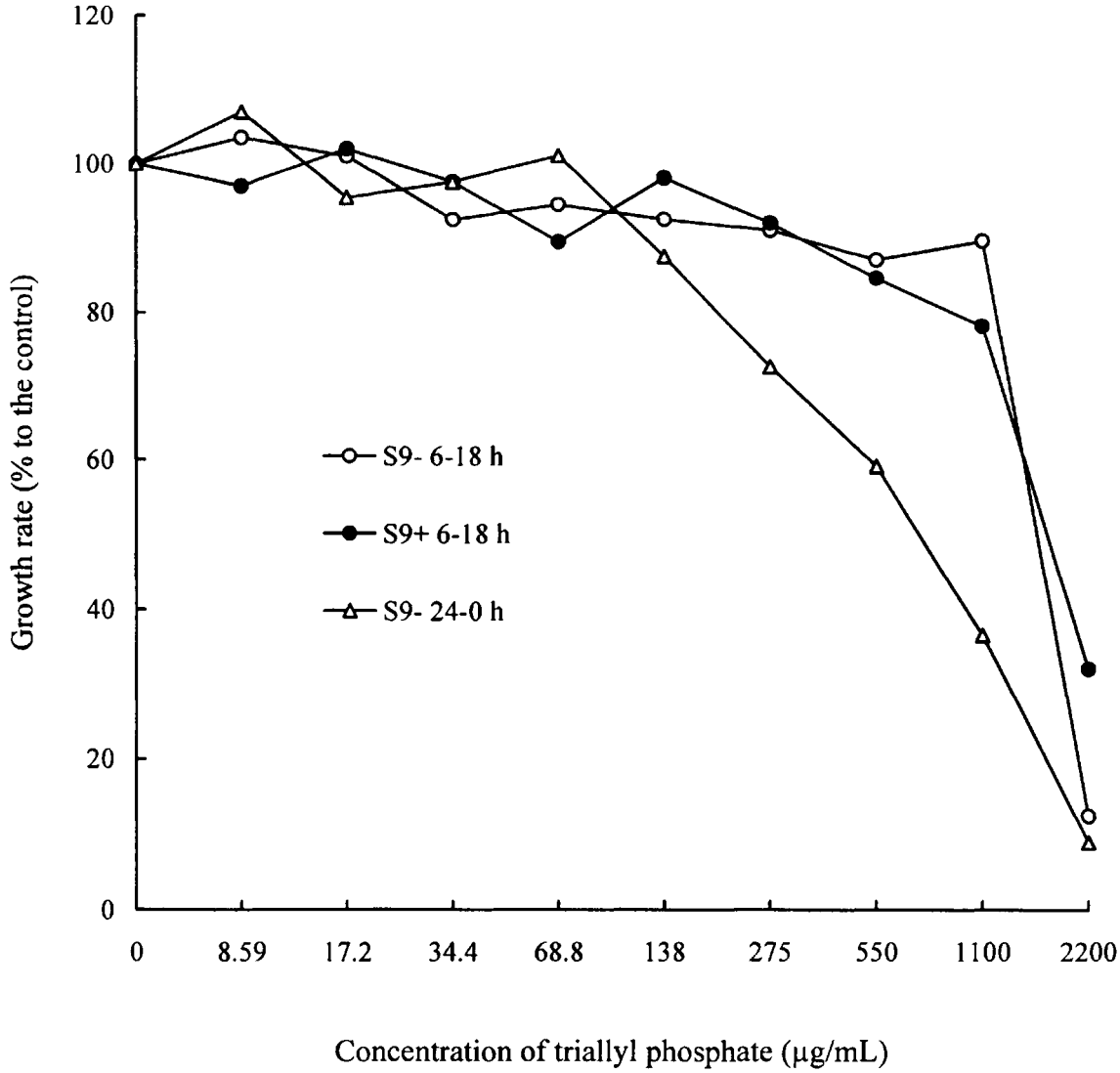


Figure 1 Effects of triallyl phosphate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR08208)

Each point represents mean value (n=2).

Table 2 Effects of triallyl phosphate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR08208)

Growth rate (% to the control)

Group	Concentration (μg/mL)	S9- 6-18 h (Mean)	S9+ 6-18 h (Mean)	S9- 24-0 h (Mean)
Control [a]	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
Triallyl phosphate	34.4	-	-	96 , 88 (92.0)
	68.8	-	-	96 , 84 (90.0)
	138	-	96 , 94 (95.0)	77 , 83 (80.0)
	275	98 , 97 (97.5)	99 , 91 (95.0)	70 , 67 (68.5)
	550	90 , 91 (90.5)	88 , 86 (87.0)	53 , 70 (61.5)
	825	-	-	49 , 40 (44.5)
	1100	75 , 78 (76.5)	81 , 76 (78.5)	36 , 35 (35.5)
	1375	69 , 78 (73.5)	-	-
	1467	-	70 , 73 (71.5)	-
	1650	66 , 60 (63.0)	-	-
	1833	-	47 , 47 (47.0)	-
	1925	47 , 42 (44.5)	-	-
	2200	20 , 31 (25.5)	37 , 37 (37.0)	-

a : Dimethyl sulfoxide
Precipitation and change of pH in culture medium were not observed.
The figure in parentheses represents mean value of two plates.
-: Blank

Table 3-1 Results of the chromosomal aberration test of triallyl phosphate (6 hours treatment without metabolic activation) (SR08208)

Time schedule [a] (hours)	S9	Group	Concentration (μg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment [c]
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
6-18	–	Control [b]	—	100.0	100	0	1	1	0	0	2	0	1	0	1	–
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					200	0	1	1	0	0	2 (1.0)	0	2	0	2 (1.0)	
		Triallyl phosphate	275	97.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±
					100	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	2	0	2 (1.0)	
			550	90.5	100	1	1	0	0	0	2	0	1	0	1	
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					200	1	1	0	0	0	2 (1.0)	0	2	0	2 (1.0)	
			1100	76.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	1	0	0	0	0	1	0	2	0	2	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	2	0	2 (1.0)	
			1375	73.5	100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	
					100	1	2	0	0	0	3	0	1	0	1	
					200	2	2	0	0	0	4 (2.0)	0	2	0	2 (1.0)	
			1650	63.0	100	1	1	0	0	0	2	0	3	0	3	
					100	2	0	1	0	0	2	0	3	0	3	
					200	3	1	1	0	0	4 (2.0)	0	6	0	6 (3.0)	
			1925	44.5	100	1	2	1	0	0	4	0	4	0	4	
					100	1	7	0	0	0	8	0	1	0	1	
					200	2	9	1	0	0	12 (6.0)	0	5	0	5 (2.5)	
			2200 [d]	25.5	100	13	30	0	0	0	34	0	2	1	3	
					100	6	32	0	1	0	36	1	1	0	1	
					200	19	62	0	1	0	70 (35.0)	1	3	1	4 (2.0)	
		Mitomycin C	0.1		100	14	47	1	0	0	56	0	0	0	0	+
					100	12	52	1	1	0	62	0	0	0	0	
					200	26	99	2	1	0	118 (59.0)	0	0	0	0 (0.0)	

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative ±, equivocal +, positive

d : Reference data because of severe cell growth inhibition.

Table 3-2 Results of the chromosomal aberration test of triallyl phosphate (6 hours treatment with metabolic activation) (SR08208)

Time schedule [a] (hours)	S9	Group	Concentration (μg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment [c]
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
6-18	+	Control [b]	—	100.0	100	3	0	0	1	0	3	0	1	0	1	–
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
					200	4	0	0	1	0	4 (2.0)	0	1	0	1 (0.5)	
		Triallyl phosphate	138	95.0	100	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	+
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	1	1	0	1 (0.5)	0	0	0	0 (0.0)	
			275	95.0	100	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0 (0.0)	
			550	87.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	0	1 (0.5)	
			1100	78.5	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0 (0.0)	
			1467	71.5	100	2	2	1	0	0	4	1	0	0	0	
					100	4	5	0	0	0	7	0	1	1	2	
					200	6	7	1	0	0	11 (5.5)	1	1	1	2 (1.0)	
			1833	47.0	100	3	11	1	1	0	15	0	0	0	0	
					100	6	22	0	0	0	24	1	2	0	2	
					200	9	33	1	1	0	39 (19.5)	1	2	0	2 (1.0)	
			2200	37.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		3,4-Benzopyrene	10		100	11	52	0	1	0	57	0	0	1	1	+
					100	11	48	0	0	0	55	0	0	0	0	
					200	22	100	0	1	0	112 (56.0)	0	0	1	1 (0.5)	

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; –, negative +, positive

- : Blank

Table 3-3 Results of the chromosomal aberration test of triallyl phosphate (24 hours treatment without metabolic activation) (SR08208)

Time schedule [a] (hours)	S9	Group	Concentration (μg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment [c]
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
24-0	-	Control [b]	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	1	1	0	1 (0.5)	
		Triallyl phosphate	34.4	92.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	-
					100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	2	0	2 (1.0)	
			68.8	90.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	1	3	0	0	0	4	0	0	0	0	
					200	1	3	0	0	0	4 (2.0)	0	0	0	0 (0.0)	
			138	80.0	100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	2	0	2 (1.0)	
			275	68.5	100	2	0	0	0	0	2	0	5	0	5	
					100	0	1	0	0	0	1	0	2	0	2	
					200	2	1	0	0	0	3 (1.5)	0	7	0	7 (3.5)	
			550	61.5	100	2	0	1	0	0	3	0	3	0	3	
					100	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	
					200	2	0	1	0	0	3 (1.5)	0	6	0	6 (3.0)	
			825	44.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			1100	35.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Mitomycin C	0.05		100	10	60	0	1	0	65	0	0	0	0	+
					100	7	55	0	0	0	58	0	0	0	0	
					200	17	115	0	1	0	123 (61.5)	0	0	0	0 (0.0)	

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; –, negative +, positive

- : Blank

東京化成工業株式会社 | 試験成績書 1/1 ページ

試験成績書

2010年05月11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: Triallyl Phosphate				
製品コード: P0264	等級: EP	製品ロット: 3MAPA	判定: 合格	

項目	結果	規格値
純度(GC)	99.4 %	94.0 %以上
比重 (20/20)	1.0822	1.0800 ~ 1.0840
屈折率 n20/D	1.4493	1.4470 ~ 1.4500