

最終報告書

表 題：モノイソプロピルナフタレンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：SR05351

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

	頁
表紙	1
目次	4
要約	8
緒言	9
材料および方法	9
成績	18
考察	20
参考資料	21

Tables and Figure

Table 1	Effects of isopropylnaphthalene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)	23
Figure 1	Effects of isopropylnaphthalene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)	24
Table 2	Effects of isopropylnaphthalene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test)	25
Table 3-1	Results of the chromosomal aberration test of isopropylnaphthalene (6 hours treatment without metabolic activation)	26
Table 3-2	Results of the chromosomal aberration test of isopropylnaphthalene (6 hours treatment with metabolic activation)	27
Table 3-3	Results of the chromosomal aberration test of isopropylnaphthalene (24 hours treatment without metabolic activation)	28

表題 : モノイソプロピルナフタレンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 : S R 0 5 3 5 1

試験目的 : チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IL)を用いて、モノイソプロピルナフタレンの*in vitro*における染色体異常誘発性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の適用

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・環境企発第 031121004 号 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『「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」の一部改正について』(平成 17 年 4 月 1 日薬食発第 0401003 号・平成 17・03・04 製局第 1 号・環境企発第 050401003 号 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・環境企発第 031121002 号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」の一部改正について』(平成 18 年 11 月 20 日薬食発第 1120001 号・平成 18・11・13 製局第 2 号・環境企発第 061120001 号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)

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 21(〒004-0839)
運営管理者 : 木口 雅夫

試験責任者

氏名 : 河村 公太郎
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 : 児玉 志穂(責任者)、大久保 操子、河村 公太郎
試験操作 : 遠藤 郁子、河村 公太郎、榊原 隆史、二平 佳苗

試験期間

試験開始日 : 2006 年 12 月 8 日
被験物質受入 : 2006 年 8 月 12 日
実験開始日 : 2006 年 12 月 11 日
予備試験
被験物質処理開始 : 2006 年 12 月 11 日
固定・染色 : 2006 年 12 月 12 日
本試験
被験物質処理開始 : 2006 年 12 月 25 日
標本作製 : 2006 年 12 月 26 日
標本観察 : 2007 年 10 月 22 日～2007 年 10 月 31 日
実験終了日 : 2007 年 10 月 31 日
試験終了日 : 2011 年 8 月 26 日

要 約

モノイソプロピルナフタレンの *in vitro* における染色体異常誘発性を、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IV)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 系列で実施した。

予備試験(細胞増殖抑制試験：6.64～1700 $\mu\text{g/mL}$)の結果、各試験系列で細胞増殖抑制が認められた。IC₅₀ 値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 37.9 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の代謝活性化による場合が 50.3 $\mu\text{g/mL}$ および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 28.7 $\mu\text{g/mL}$ であった。

被験物質の析出が、試験液処理開始時では各試験系列の 425 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で、また、試験液処理終了時では短時間処理法の代謝活性化による場合の 106 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量あるいは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 処理による場合の 850 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で観察された。

被験物質による培養液 pH への影響は観察されなかった。

予備試験の結果より、本試験(染色体異常試験)の用量として、各試験系列とも IC₅₀ より高用量を最高用量とし、以下公比 2 で低下させた用量および IC₅₀ 値付近を細かく選択した用量の計 6～8 用量を設定した。

本試験の結果、染色体の構造異常および数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(観察用量：6.25、12.5、25.0 および 33.3 $\mu\text{g/mL}$)および連続処理法の 24-0 h 処理による場合(6.25、12.5、18.8 および 25.0 $\mu\text{g/mL}$)では、いずれの用量においても 5%未満であった。短時間処理法の代謝活性化による場合(6.25、12.5、25.0、37.5 および 50.0 $\mu\text{g/mL}$)では、数的異常の出現率はいずれの用量においても 5%未満であったが、構造異常の出現率は 37.5 $\mu\text{g/mL}$ の用量(細胞増殖率 59.0%)で 5.5%と僅かな増加が認められ、結果は疑陽性であった。50.0 $\mu\text{g/mL}$ の用量については、強い細胞毒性がみられた用量であることから染色体異常誘発性の評価対象外とした。

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、モノイソプロピルナフタレンは、本試験条件において、代謝活性化系の存在下では乳類の培養細胞に対し細胞毒性用量において僅かな染色体異常誘発性を有する(疑陽性)と判断した。

緒 言

モノイソプロピルナフタレンの *in vitro* における染色体異常誘発性を検討する目的で、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

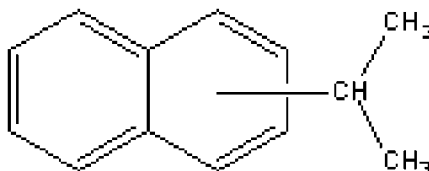
名称 : モノイソプロピルナフタレン

英名 : Isopropylnaphthalene

CAS No. : 29253-36-9

化審法官報公示整理番号 : (4)-961

構造式 :



分子式 : C₁₃H₁₄

分子量 : 170.25 (分子式より算出)

物理化学的性質 : 外観 ; 微黄色透明の液体

色数 (APHA) ; 20

比重 (15/4) ; 0.987

水分 ; 73 ppm

酸価 ; 0.000 KOHmg/g

沸点 ; 不明

溶解性 ; 水に不溶。ジメチルスルホキシドに 500 mg/mL まで溶解する (試験施設における確認)。

純度 (GC%) : 96.3% (Appendix 1)

不純物の名称およびその濃度：不純物の名称は不明。ガスクロ分析チャートで被験物質以外に 16 個のピークが認められ、その面積比(GC%)は最大のもので 0.712%であり、全て 1%未満であった(Appendix 1)。

入手量 : 500 mL(関連試験と共通)

安定性 : 実験終了後に、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し (Appendix 2)、被験物質の安定性について確認した。

保存条件 : 冷暗所(実測範囲：1～10℃)

取扱上の注意 : 使用に際しては、手袋、マスク等を着用し、吸入または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。

残余被験物質の処置 : 試験操作終了後、提供者に返却した。

2. 被験物質の調製

被験物質の調製媒体として、ジメチルスルホキシド(ロット番号 SI.045、株式会社同仁化学研究所)を使用した。

予備試験では、被験物質を精秤し、ジメチルスルホキシドを用いて溶解し 170 mg/mL 調製液を調製した。170 mg/mL 調製液からは、公比 2 の段階希釈により 85.0、42.5、21.3、10.6、5.31、2.66、1.33 および 0.664 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では、被験物質を精秤し、ジメチルスルホキシドを用いて溶解し 10 mg/mL 調製液を調製した。10 mg/mL 調製液からは、公比 2 の段階希釈により 5.0、2.5、1.25 および 0.625 mg/mL 調製液を、また、直接希釈により 8.33、6.67、4.17、3.75、3.33 および 1.88 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、予備試験では調製後 1.1 時間以内に、本試験では調製後 1.5 時間以内に使用した。

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、被験物質の媒体のジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、株式会社同仁化学研究所)を使用した。陰性対照物質は、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。

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 448ADJ、協和醗酵工業株式会社)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 5L88、株式会社大塚製薬工場)を用いて 5 および 10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製した。購入したマイトマイシンCは、1 瓶中に口局マイトマイシン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、ベンゾ[a]ピレン(ロット番号 KLM1182、和光純薬工業株式会社)を使用した。ベンゾ[a]ピレンは、購入後冷所(2~8°C)で保存し、ジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、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、購入したベンゾ[a]ピレンの含量は 101.0%であった。

陽性対照物質の各調製液は-20°C以下で分注凍結保存し、調製後 3 ヶ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、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、雌性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 13.6 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。

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、液体窒素内に収納した。解凍後は、75 cm²培養フラスコを用いて 5.0%CO₂、37.0°Cに設定した CO₂ インキュベーター(MCO-175、三洋電機株式会社)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 17(予備試験)あるいは 21(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 05902、ロット番号 50860211、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 6C97、株式会社大塚製薬工場)に溶解し、さらにフェノールレッド(ロット

番号 PKF3307、和光純薬工業株式会社)6 mg を加え、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、滅菌済みの炭酸水素ナトリウム (試薬特級、ロット番号 609F1546、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 SDJ5850、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 1299355、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。

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-547、2006 年 8 月 11 日製造)、-80℃ 以下で凍結保存したものを、製造日より 5 ヶ月以内 (使用期限：製造後 6 ヶ月) 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-547、S9 中蛋白 含量 25.98 mg/mL)	0.3 mL
MgCl ₂	(和光純薬工業株式会社 SDN0075)	5 μmol /0.1 mL
KCl	(和光純薬工業株式会社 WAE3815)	33 μmol /0.1 mL
G-6-P	(オリエンタル酵母工業株式会社 115601)	5 μmol /0.1 mL
NADP	(オリエンタル酵母工業株式会社 045601)	4 μmol /0.1 mL
HEPES 緩衝液	(株式会社同仁化学研究所 FX115)	4 μmol /0.2 mL
蒸留水		0.1 mL

8. 試験方法

(1) 予備試験

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 系列について実施した。

被験物質の最高用量は、10 mM 相当値 (被験物質の分子量 170.25) の 1700 μg/mL とし、以下公比 2 で低下させた計 9 用量 (1700、850、425、213、106、53.1、26.6、13.3 および 6.64 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%CO₂、37.0°C に設定した CO₂ インキュベーター内で培養した。

3) 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 μ L 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 Ca²⁺および Mg²⁺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。

4) 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 μ L 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 Ca²⁺および Mg²⁺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。

5) 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 μ L 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。

6) 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。

7) 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。

8) 細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) の算出

培養終了後、プレート内の液を除去して Ca²⁺および Mg²⁺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。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 (MONOCELLATER II、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 (IC₅₀) を算出した。

(2) 本試験

1) 試験群

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 IC₅₀ 値より高用量を最高用量とし、以下公比 2 で低下させた用量および IC₅₀ 値付近を細かく選択した用量の計 6~8 用量を設定した。

陽性対照群を除く各群にはサテライト群 2 枚を加えた 4 枚のプレートを使用し、陽性対照群では 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、2)細胞の播種と同様の方法で実施した。

3) 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、3)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。

4) 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、4)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。

5) 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、5)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。

6) 被験物質の析出の有無の確認

8. 試験方法、(1)予備試験、6)被験物質の析出の有無の確認と同様の方法で実施した。

7) 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、7)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。

8) 細胞増殖率の測定

8. 試験方法、(1)予備試験、8)細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) の算出と同様の方法で実施した。IC₅₀ は算出しなかった。

9) 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 1335046、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 1118913、GIBCO、2.5% トリプシン : ロット番号 1301997、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 403F1156、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 801W1028、関東化学株式会社、酢酸：ロット番号 EWG7255、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(細胞毒性により、得られた細胞が少ない用量については 1 枚)の染色体標本作製した。

各スライドは、2%ギムザ液(ギムザ液：ロット番号 LL130、和光純薬工業株式会社、インスタントリン酸緩衝液(pH7.2)：ロット番号 A636、株式会社三菱化学ヤトロン)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 0501201、武藤化学薬品株式会社)で封入した。

10) 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。

観察用量として、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、細胞増殖率が 50%未満で標本の観察が可能な用量を高用量とする 4 あるいは 5 用量を選択し、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 4 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 6.25、12.5、25.0 および 33.3 $\mu\text{g/mL}$ の用量を、短時間処理法の代謝活性化による場合では 6.25、12.5、25.0、37.5 および 50.0 $\mu\text{g/mL}$ の用量を、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 6.25、12.5、18.8 および 25.0 $\mu\text{g/mL}$ の用量を選択した。

総合倍率 600 倍の顕微鏡(BX50、オリンパス光学工業株式会社)で、1 枚あたり 100 個の分裂中期像を選択して観察し、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)

- ・染色体分体切断(ctb: chromatid break)

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

- ・染色体分体交換(cte: chromatid exchange)

染色体分体の 2 ヶ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体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、倍数体とは区別した。

11) 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、構造異常および数的異常の total については、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。

D₂₀ 値(細胞の 20%に異常が認められる濃度)は、各試験系列の染色体異常誘発性の判定が陰性あるいは疑陽性であったことから算出しなかった。

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、 IC_{50} 値は短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 37.9 $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の代謝活性化による場合が 50.3 $\mu\text{g/mL}$ および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 28.7 $\mu\text{g/mL}$ であった。

被験物質の析出が、試験液処理開始時では各試験系列の 425 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で観察され、試験液処理終了時では短時間処理法の代謝活性化による場合の 106 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量ならび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 処理による場合の 850 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で観察された。

被験物質による培養液 pH への影響は観察されなかった。

2. 本試験

本試験の細胞増殖率、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、各試験系列で細胞増殖抑制がみられた。短時間処理法の代謝活性化によらない場合では 33.3 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量、短時間処理法の代謝活性化による場合では 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 33.3 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で、それぞれ 50% を超える細胞増殖抑制が認められた。

被験物質の析出が、試験液処理終了時において、短時間処理法の代謝活性化による場合の 83.3 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で観察された。

被験物質による培養液 pH への影響は観察されなかった。

染色体の構造異常および数異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合（観察用量：6.25、12.5、25.0 および 33.3 $\mu\text{g/mL}$ ）および連続処理法の 24-0 h 処理による場合（6.25、12.5、18.8 および 25.0 $\mu\text{g/mL}$ ）では、いずれの用量においても 5% 未満であった。短時間処理法

の代謝活性化による場合(6.25、12.5、25.0、37.5 および 50.0 $\mu\text{g/mL}$)では、数的異常の出現率はいずれの用量においても5%未満であったが、構造異常の出現率は37.5 $\mu\text{g/mL}$ の用量(細胞増殖率59.0%)および50.0 $\mu\text{g/mL}$ の用量(細胞増殖率35.0%)でそれぞれ5.5および17.0%と5%および10%を超えるものであった。

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36.5%、短時間処理法の代謝活性化による場合が35.5%および連続処理法の24-0 h処理による場合が37.0%であった。

考 察

モノイソプロピルナフタレンの *in vitro* における染色体異常誘発性を、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IV) を用いて検討した。

予備試験 (細胞増殖抑制試験) の結果、各試験系列で 50% を超える細胞増殖抑制が認められたことから、本試験 (染色体異常試験) の用量として、各試験系列とも IC₅₀ より高用量を最高用量とし、以下公比 2 で低下させた用量および IC₅₀ 値付近を細かく選択した用量の計 6~8 用量を設定した。

本試験の結果、染色体の構造異常ならびに数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、いずれの用量においても 5% 未満であり、結果は陰性であった。短時間処理法の代謝活性化による場合では、数的異常の出現率はいずれの用量においても 5% 未満であったが、構造異常の出現率は 37.5 および 50.0 µg/mL の用量で用量の増加に伴う増加が認められた。しかし、50.0 µg/mL の用量は強い細胞毒性 (細胞増殖率 35.0%) がみられ染色体の構造異常の出現率の増加は細胞毒性による非特異的な反応と考えられた。従って、当該試験系列では 37.5 µg/mL の用量までを評価対象とし、結果は疑陽性と判定するのが適切と考えられた。なお、標本観察における最高用量は、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。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を示す用量を選択出来なかったが、評価最高用量と 50% を超える細胞増殖抑制を示した最低用量との用量比は 1.33 と小さいもので、強い細胞増殖抑制が狭い用量間隔で生じており、当該評価用量にて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、モノイソプロピルナフタレンは、本試験条件において、代謝活性化系の存在下では乳類の培養細胞に対し細胞毒性用量において僅かな染色体異常誘発性を有する (疑陽性) と判断した。

なお、モノイソプロピルナフタレンの類縁化合物の変異原性では、ナフタレンについて、EPA 概要資料¹⁾において *Salmonella typhimurium* を用いた複数の復帰突然変異試験で陰性、CHO 細胞を用

いた姉妹染色分体交換試験の代謝活性化の非存在下および存在下とともに陽性および染色体異常試験の代謝活性化系の存在下で陽性、培養マウス胚への処理による染色体損傷の増加は肝代謝系の添加により増強、マウス末梢リンパによる姉妹染色分体交換試験で陰性、*in vitro* 不定期 DNA 合成試験で陰性、マウスの *in vivo* 小核試験で陰性と報告されている。2,6-ジイソプロピルナフタレンでは、マウスリンパ腫突然変異試験では代謝活性化の非存在下および存在下とともに細胞毒性用量で陽性、復帰突然変異試験で陰性、*in vivo* および *in vitro* 不定期 DNA 合成試験で陰性、マウス小核試験で陰性と報告されている²⁾。ジイソプロピルナフタレンでは、復帰突然変異試験で陰性³⁾、染色体異常試験の代謝活性化系の存在下で陽性⁴⁾と報告されている。

参考資料

- 1) TOXICOLOGICAL REVIEW of NAPHTHALENE, In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), EPA, 1998
- 2) BIOPESTICIDES REGISTRATION ACTION DOCUMENT: 2,6-Diisopropylnaphthalene (PC Code 055803), US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs
- 3) ビス(1-メチルエチル)ナフタレンの細菌を用いる復帰突然変異試験、化学物質毒性試験報告、7 : 702-705(1999)
- 4) ビス(1-メチルエチル)ナフタレンのチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験、化学物質毒性試験報告、7 : 706-710(1999)

Table 1 Effects of isopropyl naphthalene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)

Growth rate (% to the control)				
Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control ^a	—	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
Isopropyl naphthalene	6.64	98 , 103 (100.5)	93 , 97 (95.0)	99 , 93 (96.0)
	13.3	94 , 101 (97.5)	87 , 97 (92.0)	98 , 95 (96.5)
	26.6	88 , 91 (89.5)	83 , 88 (85.5)	53 , 55 (54.0)
	53.1	11 , 14 (12.5)	44 , 50 (47.0)	13 , 14 (13.5)
	106	11 , 13 (12.0)	25 [†] , 27 [†] (26.0)	14 , 15 (14.5)
	213	13 , 15 (14.0)	24 [†] , 27 [†] (25.5)	13 , 16 (14.5)
	425	11 ⁺ , 12 ⁺ (11.5)	26 [#] , 26 [#] (26.0)	15 ⁺ , 13 ⁺ (14.0)
	850	11 [#] , 17 [#] (14.0)	20 [#] , 20 [#] (20.0)	16 [#] , 16 [#] (16.0)
	1700	12 [#] , 13 [#] (12.5)	19 [#] , 21 [#] (20.0)	15 [#] , 16 [#] (15.5)
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		37.9	50.3	28.7

a : Dimethyl sulfoxide

⁺ : Precipitation at the beginning of treatment

[#] : Precipitation at the beginning and end of treatment

[†] : Precipitation at the end of treatment

Change of pH in culture medium was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

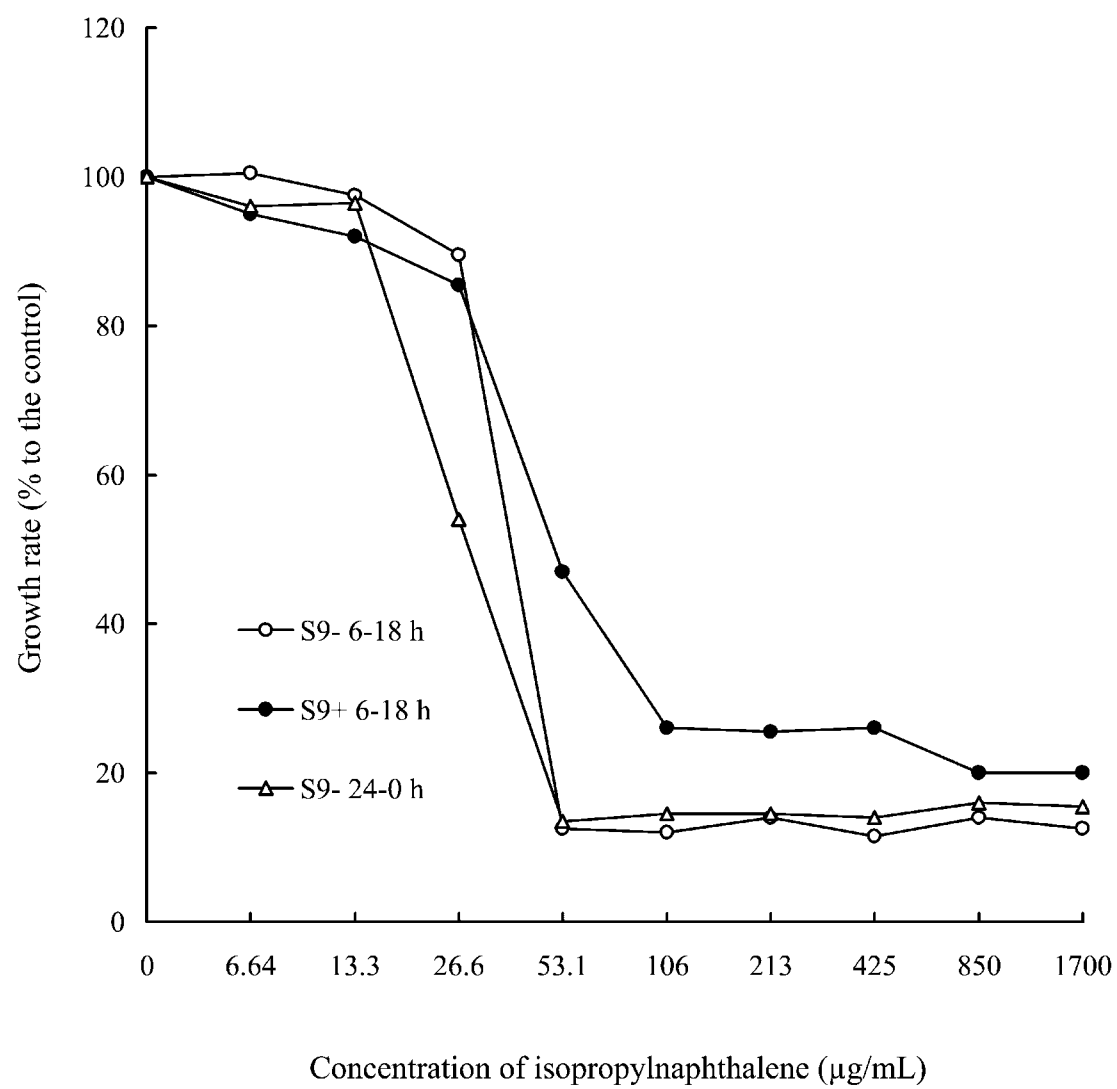


Figure 1 Effects of isopropyl naphthalene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)

Each point represents mean value (n=2).

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

Growth rate (% to the control)				
Group	Concentration (µg/mL)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control ^a	—	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
Isopropylnaphthalene	6.25	99 , 100 (99.5)	97 , 95 (96.0)	95 , 97 (96.0)
	12.5	98 , 98 (98.0)	94 , 89 (91.5)	96 , 100 (98.0)
	18.8	-	-	94 , 95 (94.5)
	25.0	91 , 95 (93.0)	80 , 79 (79.5)	77 , 80 (78.5)
	33.3	29 , 32 (30.5)	-	18 , 16 (17.0)
	37.5	-	57 , 61 (59.0)	-
	41.7	13 , 13 (13.0)	-	14 , 13 (13.5)
	50.0	14 , 12 (13.0)	36 , 34 (35.0)	13 , 13 (13.0)
	66.7	-	29 , 29 (29.0)	-
	83.3	-	22 [†] , 21 [†] (21.5)	-
	100	-	24 [†] , 19 [†] (21.5)	-

a : Dimethyl sulfoxide

[†] : Precipitation at the end of treatment

Change of pH in culture medium was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

- : Blank

Table 3-1 Results of the chromosomal aberration test of isopropyl naphthalene (6 hours treatment without metabolic activation)

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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
					100	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	
					200	0	0	1	1	0	1 (0.5)	0	0	0	0 (0.0)	
		Isopropyl naphthalene	6.25	99.5	100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)	
			12.5	98.0	100	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	2	0	2 (1.0)	
			25.0	93.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
					100	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
					200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)	
			33.3	30.5	100	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
					36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					29	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
					165	2	0	0	0	0	2 (1.2)	0	0	1	1 (0.6)	
			41.7	13.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			50.0	13.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Mitomycin C	0.1		100	11	36	0	0	0	42	0	1	0	1	+
					100	7	25	0	0	0	31	2	0	0	0	
					200	18	61	0	0	0	73 (36.5)	2	1	0	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 3-2 Results of the chromosomal aberration test of isopropyl naphthalene (6 hours treatment with metabolic activation)

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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0	0 (0.0)	
		Isopropyl naphthalene	6.25	96.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
					100	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	
					200	1	1	0	0	0	2 (1.0)	0	0	0	0 (0.0)	
			12.5	91.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	1	0	0	0 (0.0)	
			25.0	79.5	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)	
			37.5	59.0	100	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	
					100	3	2	0	0	0	5	0	0	0	0	
					200	3	8	0	0	0	11 (5.5)	0	0	0	0 (0.0)	
			50.0	35.0	100	13	15	1	0	0	24	0	2	0	2	
					100	4	7	0	0	0	10	0	0	0	0	
					200	17	22	1	0	0	34 (17.0)	0	2	0	2 (1.0)	
			66.7	29.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			83.3	21.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			100	21.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Benzo[a]pyrene	10		100	6	30	0	0	0	32	0	0	0	0	+
					100	5	39	0	0	0	39	0	0	0	0	
					200	11	69	0	0	0	71 (35.5)	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

Table 3-3 Results of the chromosomal aberration test of isopropyl naphthalene (24 hours treatment without metabolic activation)

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	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)	
		Isopropyl naphthalene	6.25	96.0	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-
					100	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	2	0	2 (1.0)	
			12.5	98.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0	0 (0.0)	
			18.8	94.5	100	1	4	0	0	0	5	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	1	4	0	0	0	5 (2.5)	0	0	0	0 (0.0)	
			25.0	78.5	100	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	2	0	2 (1.0)	
			33.3	17.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			41.7	13.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			50.0	13.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Mitomycin C	0.05		100	6	28	2	1	0	33	0	0	0	0	+
					100	10	30	0	3	0	41	0	0	0	0	
					200	16	58	2	4	0	74 (37.0)	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 +, positive

- : Blank