

最終報告書

2、3、4、4・テトラヒドロキシベンゾフェノンの ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1198

2007年 1月 18日

数ポゾリサーチセンター

東京本部 〒151-0065 東京都渋谷区大山町36-7本社・東京研究所 〒156-0042 東京都世田谷区羽根木1-3-11 御殿場研究所 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284 函南研究所 〒419-0101 静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目 次

		Ī	Į
目	ì	次1	
要	,	約	Δ
3 C	,	, o	.0
€±bz.	_	言	n
緒	i	声	.4
= h era	1.1.	The second of th	
		料及び方法	
1.		ស験物質及び溶媒 ⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯]	
]		被験物質	
2	2)	溶媒1	.4
2.	被	を験液の調製	.4
]	l)	調製方法	.4
2	2)	保存方法 ······]	.5
8	3)	安定性	.5
3.	太	†照物質 ······	.5
]	L)	陰性対照 ······1	.5
2	2)	陽性対照	5
4.	使	[用細胞株]	. 7
]	()	供試ほ乳類培養細胞	.7
		入手先及び入手年月日	
		細胞の選択理由 ····································	
		<u> </u>	
	5)	増殖様式	
6	3)	培養条件	7

	頁
S9mix 及び培養液 ····································	·17
) 細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験	17
)確認試験	19
試験方法	21
) 識別方法 ······	21
) 細胞増殖抑制試験	·22
) 染色体異常試験	23
)確認試験	24
) 標本の観察	25
) 染色体異常の分類	26
) 判定基準	26
吉果	
細胞増殖抑制試験	28
) 短時間処理法 ······	28
) 連続処理法	28
染色体異常試験	29
・ 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	29
構造異常 ⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯⋯	29
数的異常	30
確認試験	30
被験物質処理終了時の培養細胞の観察	30
横造異常 ······	31
数的異常	31
	32
文献	34
	S9mix 及び培養液) 細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験) 確認試験 :試験方法) 細胞増殖抑制試験) 染色体異常試験) 確認試験 - (標本の観察 - (製工・) (製工・

Figures and Tables

Fig. 1-1	Results of the cell-growth inhibition test treated with		
	2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment: +S9 mix]		
Fig. 1-2 Results of the cell-growth inhibition test treated with			
	2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment: -S9 mix]		
Fig. 1-3	Fig. 1-3 Results of the cell-growth inhibition test treated with		
	2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 24 hr]		
Fig. 1-4	Fig. 1-4 Results of the cell-growth inhibition test treated with		
	2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 48 hr]		
Fig. 2-1 Results of the chromosome aberration test treated with			
	2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment: +S9 mix]		
Fig. 2-2	Results of the chromosome aberration test treated with		
	2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment: -S9 mix]		
Fig. 2-3	Results of the chromosome aberration test treated with		
	2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 24 hr]		
Fig. 2-4	Results of the chromosome aberration test treated with		
	2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 48 hr]		
Fig. 2-5	Results of the confirmation test treated with		
	2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone		

- Fig. 2-6 Results of the confirmation test treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment: ·S9 mix]
- Table 1-1 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with

2.3.4.4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with

2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment: S9 mix]

Table 1-3 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with

2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 24 hr]

Table 1-4 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with

2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 48 hr]

Table 2.1 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with

2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment: +S9 mix]

Table 2-2 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with

2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment: -S9 mix]

Table 2-3 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with

2.3.4.4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 24 hr]

Table 2-4 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with

2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 48 hr]

Table 2-5 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone

[short-term treatment: +S9 mix]

Table 2-6 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone

[short-term treatment: -S9 mix]

Table 3-1 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with

2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment: +S9 mix]

Table 3-2 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with

2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment: -S9 mix]

- Table 3-3 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
 - 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 24 hr]
- Table 3-4 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
 - 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 48 hr]
- Table 3-5 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
 - 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone
 - [confirmation test: +S9 mix]
- Table 3-6 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with
 - 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone
 - [confirmation test: S9 mix]

要 約

2、3、4、4'-テトラヒドロキシベンゾフェ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・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 2500 µg/mL として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の代謝活性化では 625 µg/mL 以上の用量で、短時間処理法の非代謝活性化では 313 µg/mL 以上の用量で、連続処理法の 24 時間処理では 313 µg/mL 以上の用量で、連続処理法の 48 時間処理では 39.1 µg/mL 以上の用量で、50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は短時間処理の代謝活性化では 464.273 µg/mL、非代謝活性化では 184.036 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 205.955 µg/mL、48 時間処理では 33.500 µg/mL と算出された。これより、短時間処理法の代謝活性化では 625 µg/mL を、短時間処理法の非代謝活性化では 313 µg/mLを、連続処理法の 24 時間処理では 313 µg/mLを、連続処理法の 24 時間処理では 35.1 µg/mLを、連続処理法の 24 時間処理では 35.1 µg/mLを表高用量として、以下公比 2 で希釈した各 5 試験用量を設定し染色体異常誘発能を検討した。

染色体異常試験の結果、短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに染色体数的 異常(倍数体)の増加は認められなかったが、染色体構造異常の出現率が増加し、代謝活性化 では疑陽性を、非代謝活性化では陽性を示した。また、連続処理法においても、24 時間処理及 び 48 時間処理ともに染色体数的異常(倍数体)の増加は認められなかったが、染色体構造異常 の出現率が増加し、疑陽性を示した。一方、陽性対照群では、染色体構造異常の顕著な誘発が 認められた。また、陰性対照群における染色体数的異常(倍数体)の出現率は各々陰性の判定 基準内にあり、さらに試験施設の背景値と同様であった。従って試験は適切に実施されたもの と考えられた。

染色体異常試験において、染色体構造異常の出現率(TA)が短時間処理法の代謝活性化では 疑陽性、非代謝活性化では陽性の結果が得られたが、いずれも用量依存的な増加が認められな かったため確認試験を実施した。その結果、確認試験の代謝活性化においては、320 及び 400 μ g/mL で TA 値が疑陽性を示したが、用量依存性は認められなかった。染色体異常試験の代謝 活性化においても 78.1~313 μ g/mL で TA 値は疑陽性を示し、明確な用量依存性は得られてい なかったことから、再現性があることが確認された。一方、確認試験の非代謝活性化において は、TA 値は 9.88 μ g/mL では陰性、14.8 μ g/mL で疑陽性、22.2 μ g/mL で陽性、33.3 μ g/mL で陽性、50 μ g/mL で疑陽性を示した。22.2~50 μ g/mL では用量依存性は認められなかったも のの、9.88~22.2 µg/mL では TA 値の用量依存的な増加が認められた。これらの結果から総合的に判断すると、本被験物質の染色体構造異常誘発性は陽性であり、染色体構造異常の誘発能を有するものと判定された。一方、染色体数的異常(倍数体)の出現頻度の増加はいずれの処理法においても認められなかった。確認試験における陽性対照群では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。また、陰性対照群における染色体数的異常(倍数体)の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、さらに試験施設の背景値と同様であった。従って試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、2、3、4、4・テトラヒドロキシベンゾフェノンは、本試験条件下において 染色体数的異常(倍数体)の誘発能は有さないものの、弱い染色体の構造異常の誘発能を有す るものと判定した。

赭 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、2、3、4、4・テトラヒドロキシベンゾフェノンの安全性試験の一環として、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。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び溶媒

1) 被験物質

被験物質は東京化成工業株式会社より購入して用いた。被験物質情報 (Attached Data 1 及び3) は株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所における GLP 下での分析に基づくものである。

供 給 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

製造者:

名 称 : 2、3、4、4・テトラヒドロキシベンゾフェノン、

2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone

CAS番号 : 31127·54·5

構造式

又は示性式:

он он

純 度 : 99.86% (Lot.GL01)、99.91% (Lot.JSCXB)

不純物: 不明

性 状 : 黄色粉末

分 子 量 : 246.218

ロット番号:

安 定 性 : 試験終了後に特性を測定し安定性を確認した (Attached Data 2

及び4)。

保存方法 : 冷暗所(冷蔵庫:管理温度 1℃~10℃) (保存期間中の実測温

度:2℃~9℃)

保 存 場 所 : 御殿場研究所 被験物質保存室 冷蔵庫及び第 1 研究棟被験物質

調製室 冷蔵庫

取り扱い上の

注意 : 特になし

返 却 : 被験物質の残量はすべて廃棄した。

2) 溶媒

名 称: ジメチルスルホキシド (DMSO)

ロット番号: ELM5004、CEQ5898、SDP6175

規 格 : 試薬特級

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

保存方法: 室温

保存場所: 御殿場研究所変異原室

溶媒の選択理由 : 供試前の溶媒検討を実施し、被験物質が DMSO に溶解すること

を確認し、DMSO を溶媒に用いることとした。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 細胞增殖抑制試験

被験物質 2.5000 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 250 mg/mL 溶液 (プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度: 2500 μg/mL) を調製した。次いで、250 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 5 mL: 溶媒 5 mL) で順次 7 段階希釈し、125、62.5、31.3、15.6、7.81、3.91 及び 1.95 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

短時間処理法では、被験物質 2.5000 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 250 mg/mL 溶液(プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度: 2500 μg/mL)を調製した。次いで、250 mg/mL 溶液を公比 2(各濃度の被験液 5 mL:溶媒 5 mL)で順次 7 段階希釈し、125、62.5、31.3、15.6、7.81、3.91及び 1.95 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。このうち、代謝活性化では 62.5 から 3.91 mg/mLの被験液を、非代謝活性化では 31.3 から 1.95 mg/mLの被験液を用いた。

連続処理法では、被験物質 2.5000 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 250 mg/mL 溶液 (プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度: 2500 μg/mL) を調製した。次いで、250 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 5 mL:溶媒 5 mL) で順次 10 段階希釈し、125、62.5、31.3、15.6、7.81、3.91、1.95、0.977、0.488 及び 0.244 mg/mL の 11 濃度段階の被験液を調製した。このうち、24 時間処理では 31.3 から 1.95 mg/mL の被験液を、48 時間処理では 3.91 から 0.244

mg/mLの被験液を用いた。

(3) 確認試験 (短時間処理法)

被験物質 0.5000 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 50.0 mg/mL 溶液 (プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度: 500 μg/mL) を調製した。次いで、50.0 mg/mL 溶液を公比 1.25 (各濃度の被験液 2.00 mL:溶媒 0.50 mL) で順次 4 段階希釈し、40.0、32.0、25.6 及び 20.5 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。また、50.0 mg/mL 溶液を公比 10 (被験液 1.00 mL:溶媒 9.00 mL)で希釈し、5.00 mg/mL 溶液を調製し、次いで 5.00 mg/mL 溶液を公比 1.50 (各濃度の被験液 2.00 mL:溶媒 1.00 mL)で順次 5 段階希釈し、3.33、2.22、1.48、0.988 及び 0.658 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を調製した。短時間処理法の代謝活性化では 50.0 から 20.5 mg/mL の被験液を、短時間処理法の非代謝活性化では 5.00 から 0.658 mg/mL の被験液を、短時間処理法の非代謝活性化では 5.00 から 0.658 mg/mL の被験液を用いた。

2) 保存方法

被験液は用時に調製し、保存は行わなかった。

3) 安定性

被験物質に DMSO を添加した際に、発泡、発熱、吸熱及び色調などの変化は認められなかった。

3. 対照物質

1) 陰性対照

溶媒として用いたジメチルスルフォキシドを陰性対照物質とした。

- 2) 陽性対照
 - (1) 陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化では マイトマイシンCを用いた。

ロット番号: SDP4062

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 変異原室 発癌性物質冷蔵保存庫

名 称: マイトマイシン C (以下 MMC と略記する)

ロット番号: 444ADF、463AEC

製 造 元:協和醗酵工業株式会社

力 価: 2mg(力価)/瓶

保 存 方 法 : 室温、遮光

保 存 場 所: 御殿場研究所 変異原室 発癌性物質室温保存庫

(2) 調製方法

CP をプラスチック遠沈管(50 mL)に 0.0140 g 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、K4L74)を 20.0 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液(培養液 4.9 mL に 0.1 mL を加えた時の最終濃度:14 μg/mL)を調製した。

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、 K4L74)を注射筒で2 mL 加えて溶解した(1.00 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈(溶液 0.25 mL:生理食塩液 4.75 mL)し、0.0500 及び 0.00250 mg/mL の溶液を調製した(培養液 4.9 mL に 0.00250 mg/mL 溶液を 0.1 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.05 μg/mL)。

なお、確認試験では CP をプラスチック遠沈管 (50 mL) に 0.0140 g 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、K6D80) を 20.0 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.9 mL に 0.1 mL を加えた時の最終濃度: 14 μg/mL) を調製した。また、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、K6D80) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した(1.00 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈(溶液 0.25 mL:生理食塩液 4.75 mL)し、0.0500 及び 0.00250 mg/mL の溶液を調製した(培養液 4.850 mL に 0.00250 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 μg/mL)。

調製は用時とし、残余液はすべて発癌物質として処分した。

(3) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験法ガイドライン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。

4. 使用細胞株

1) 供試ほ乳類培養細胞

細胞は、チャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞(CHL/IU)を用いた。入手後液体窒素で凍結保存していた細胞を融解後、継代培養して試験に用いた。

2) 入手先及び入手年月日

元株細胞は、2004年11月2日にヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。 入手後、継代数の少ない細胞をジメチルスルホキシドを10 vol%添加した培養液に懸濁し、 液体窒素中で保存した。この保存細胞を融解後、継代培養し細胞の性状検査を実施して性 状などが適正であることを定期的に確認した後に試験に使用した。使用時の細胞継代数は、 細胞増殖抑制試験では17継代、染色体異常試験では短時間処理法では5継代、連続処理法 では21継代、確認試験では19継代であった。また、元株細胞はマイコプラズマ陰性であ ることが入手時の情報で確認されている。

3) 細胞の選択理由

染色体数が少なく比較的大型で染色体異常の観察に適すること、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、バックグラウンドデータ が豊富であることなどの理由から本細胞を選択した。

4) 染色体構成

試験に使用した細胞は、直近の定期性状検査において 85%の細胞が染色体数 25 本を示し、モードは 25 本で適切であった。

5) 增殖様式

試験に使用した細胞は、直近の定期性状検査においてプレート上で単層状に増殖し、倍加時間は細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験に用いた細胞は17.0時間、確認試験に用いた細胞は16.3時間であった。これらは入手時の特性(単層状に増殖、倍加時間17.2時間)と同様であり適切な増殖様式であった。

6) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO2 濃度 5%、温度 37℃の高湿度条件下で培養し、1~4 日ごとに継代培養した。

5. S9 mix 及び培養液

- 1) 細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験
- (1) S9 mix

S9 mix は、オリエンタル酵母工業株式会社より S9/コファクターC セット (ロット番号 C050415011) を購入し、用時に調製を行った。なお、製品分析書に記載された S9 及びコファクターC についての詳細情報及び保存条件を以下に記載した。

(I) S9

名 称: S9

ロット番号: 05041501

製 造 日: 2005年4月15日

種 ・ 系 統 : ラット・SD 系

性 : 雄

誘 導 物 質: フェノバルビタール (PB) と 5,6-ベンゾフラボン (BF)

投 与 法: 腹腔内投与

投与期間及び投与量

: PB 4日間 30+60+60+60mg/kg body weight

BF 1日 80mg/kg body weight

保 存 方 法 : 冷凍(-80℃)

使 用 期 限: 2005年10月14日

保 存 場 所: 御殿場研究所 変異原室 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: C05041301

製 造 日: 2005年4月13日

保 存 方 法: 冷凍(-80℃)

使 用 期 限: 2005年10月12日

保 存 場 所: 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

③ S9 mix の組成

S9 2 mL

補酵素 4.7 mL 20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2) 1.34 mL

50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液 0.67 mL

330mmol/L 塩化カリウム水溶液 0.67 mL

50mmol/L グルコース・6・リン酸水溶液 0.67 mL

40mmol/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

(2) 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No.11095-080) に、Life Technologies Inc.より購入し非働化(56℃, 30分)した仔牛血清(CS)を 10 vol%添加して調製した培養液(CS·MEM)を用いた。 調製後の CS·MEM は冷蔵保存した。

① 仔牛血清

名 称: Calf serum (CS)

ロット番号: 364570

製 造 元: Life Technologies Inc.

保 存 方 法: 冷凍 (-80℃)

保 存 場 所: 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

2 Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号: 1254437、1266074

製 造 元: Invitrogen Corporation

保存方法:冷蔵

保存場所: 御殿場研究所 変異原室 冷蔵庫

2) 確認試験

(1) S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社より S9 を購入し、自家調製を行ったコファクターと用時に混合して S9 mix を調製した。試験に用いた S9 の製品分析書に示された情報、保存条件、使用期限、コファクターの保存条件、使用期限及び S9 mix の組成は以下の通りである。

(1) S9

名 称: S9

ロット番号: 06051202

製 造 日: 2006年5月12日

種 · 系 統 : ラット・SD 系

性 : 雄

誘 導 物 質: フェノバルビタール (PB) と 5,6·ベンゾフラボン (BF)

投 与 法: 腹腔内投与

投与期間及び投与量

: PB 4日間 30+60+60+60mg/kg body weight

BF 1日 80mg/kg body weight

保 存 方 法 : 冷凍(超低温フリーザー)

使 用 期 限: 2006年11月11日(製造後6箇月)

保 存 場 所: 御殿場研究所 変異原案 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: 060616

製 造 日: 2006年6月16日

保 存 方 法: 冷凍(超低温フリーザー)

使 用 期 限: 2006年12月15日(製造後6箇月)

保 存 場 所: 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(3) S9 mix の組成

S9 2 mL

補酵素 4.7 mL 20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2) 1.34 mL

50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液 0.67 mL

330mmol/L 塩化カリウム水溶液 0.67 mL

50mmol/L グルコース·6·リン酸水溶液 0.67 mL

40mmol/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

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と同様になるように各成分の必要量を秤取し、注射用水に溶解、pH 調製、濾過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

(2) 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No.11095-080) に、Invitrogen Corporation より購入し非働化(56℃, 30分)した 牛血清(BS)を 10 vol%添加して調製した培養液(BS・MEM)を用いた。 調製後の BS・MEM は冷蔵保存した。

① 牛血清

ロット番号: 511116

製 造 元: Invitrogen Corporation

保 存 方 法 : 冷凍 (-80℃設定の冷凍庫)

保 存 場 所: 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

2 Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号: 1335043

製 造 元: Invitrogen Corporation

保存方法:冷蔵

保存場所: 御殿場研究所 変異原室 冷蔵庫

6. 試験方法 1-4)

試験は以下のステージ順に実施した。

1.	細胞増殖抑制試験	短時間処理法・連続処理法	
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
		連続処理法	24 時間連続処理
			48 時間連続処理
	確認試験	短時間処理法	代謝活性化
			非代謝活性化

1) 識別方法

(1) 細胞增殖抑制試験

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)を「NC」、被験物質処理群を濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、 \cdots の枝番号を明記したラベルを使用機材等に貼付して識別した。

(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を使用機材等に貼付して識別した。

(3) 確認試験

染色体異常試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。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」 \sim 「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。

2) 細胞增殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の処理濃度を設定するための予備試験として実施した。 いずれの処理法においても最高用量を 2500 μg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 1250、625、313、156、78.1、39.1 及び 19.5 μg/mL の計 8 用量を設定すし、これに陰性対照を設けた。また、短時間処理法では代謝活性化と非代謝活性化で試験を実施した。

(1) 短時間処理法

シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート(直径 60 mm)を 2 枚とし、シャーレ1 枚当たり 2×104個の細胞(培養液 5.0 mL)を播種し 3 日間培養した後、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 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び DMSO 0.050mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び各濃度の被験液 0.050mL 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 0.050mL を取り除き、DMSO 0.050mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050mL を取り除き、A濃度の被験液 0.050 mL を加えた。各群ともに添加後 6 時間培養し、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。培養終了後、培養液を取り除き生理食塩液で細胞を洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。単層培養細胞密度計(モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社)を用いて細胞の染色の濃淡から細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として 50%細胞増殖抑制濃度(概略値)を求めた。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認

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

短時間処理法と同様に細胞を播種し3日間培養した後、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、培養液0.050 mLを取り除き、陰性対照群についてはDMSO0.050mLを、被験物質処理群については、各濃度の被験液0.050 mLを加え、24時間あるいは48時間培養を続けた。培養終了後、短時間処理法と同様に培養液の色、細胞の状態及び折出の有無を観察した後に、洗浄、固定、染色、細胞密度測定を行い、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)を求めた。

3) 染色体異常試験

(1) 用量設定の根拠

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 625 µg/mL で、非代謝活性化では 313 µg/mL で、連続処理法の 24 時間処理では 313 µg/mL で、48 時間処理では 39.1 µg/mL で 50%以上の細胞増殖抑制が認められた。そこで、短時間処理法の代謝活性化では 625 µg/mL を最高用量とし、以下公比 2 で希釈した 313、156、78.1 及び 39.1 µg/mL の計 5 用量を、短時間処理法の非代謝活性化では 313 µg/mL を最高用量とし、以下公比 2 で希釈した 156、78.1、39.1 及び 19.5 µg/mL の計 5 用量を、連続処理法の 24時間では 313 µg/mL を最高用量とし、以下公比 2 で希釈した 156、78.1、39.1 及び 19.5 µg/mL の計 5 用量を、連続処理法の 48 時間処理では 39.1 µg/mL を最高用量とし、以下公比 2 で希釈した 19.5、9.77、4.88 及び 2.44 µg/mL の計 5 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。

(2) 短時間処理法

シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート(直径 60 mm)を 4 枚とし、シャーレ1 枚当たり 2×104 個の細胞(培養液 5.0 mL)を播種し 3 日間培養した後、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 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び DMSO 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び CP 0.1 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 0.050 mL を取り除き、は培養液 0.050 mL を取り除き、DMSO 0.050 mL を加えた。 被験物質処理群については培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。 陽性対照群については培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。 陽性対照群については培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。 陽性対照群につい

ては培養液 0.1 mL を取り除き、MMC 0.1 mL を加えた。各群ともに添加後 6 時間培養し、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。なお、染色体観察用標本作製に際しては、細胞分裂を分裂中期で停止させるため標本作製約 2 時間前にコルセミド 0.1 mL(最終濃度:0.2 µg/mL)を加えた。培養終了後、各群 2 枚のシャーレについて 0.25%トリプシン溶液で単離した細胞を遠心分離し、0.075M塩化カリウム溶液で低張処理し、メチルアルコール:酢酸=3:1 液で固定した。スライドガラス 1 枚につき 2 箇所に固定した細胞を滴下し、空気乾燥後 2%ギムザ液で染色標本を作製した。染色体観察用標本は、1 枚のシャーレから 2 枚作製した。各処理群で残る 2 枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じ洗浄、固定、染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、細胞増殖抑制試験と同様の方法で、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

(3) 連続処理法

短時間処理法において染色体構造異常の出現率 (TA) が疑陽性及び陽性を示したが、明確な用量依存性が認められなかったため連続処理法を実施した。

短時間処理法と同様に細胞を播種し3日間培養した後、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、陰性対照群については、培養液0.050 mLを取り除き、DMSO0.050mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.050 mLを取り除き、各濃度の被験液0.050 mLを加えた。陽性対照群については培養液0.1 mLを取り除き、MMC0.1 mLを加えた。各群ともに添加後24時間あるいは48時間培養を続けた。なお、染色体観察用標本は各群2枚のシャーレについて短時間処理法と同様に作製した。なお、染色体観察用標本は各群2枚のシャーレについて短時間処理法と同様に作製した。各処理群で残る2枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じて洗浄、固定、染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、培養終了時に、細胞増殖抑制試験に同様の方法で、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

4) 確認試験

(1) 用量設定の根拠

染色体異常試験において、短時間処理法の代謝活性化では疑陽性の、非代謝活性化では陽性の結果が得られたが、いずれも用量依存的な増加が認められなかった。また、連続処理法の 24 時間処理では規定数の分裂中期像が観察されたのは 2 用量と不足し、48 時間処理では最高用量における細胞毒性がやや低かった。そこで、確認試験を実施することとし、短時間処理法の代謝活性化では最高用量を 500 μg/mL とし、以下公比 1.25

で希釈した 400、320、256 及び 205 $\mu g/mL$ の計 5 用量を、短時間処理法の非代謝活性 化では最高用量を 50 $\mu g/mL$ とし、以下公比 1.50 で希釈した 33.3、22.2、14.8、9.88 及び 6.58 $\mu g/mL$ の計 6 用量を設定した。

(2) 短時間処理法

シャーレはy線滅菌済プラスチックプレート(直径 60 mm)を4枚とし、シャーレ1 枚当たり 2×104個の細胞(培養液 5.0 mL)を播種し3日間培養した後、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 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び DMSO 0.050 mL を加え た。被験物質処理群については培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び各 濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を取り除き、 S9 mix 0.833 mL 及び CP 0.1 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 0.050 mL を取り除き、DMSO 0.050 mL を加えた。被験物質処理群について は培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群につい ては培養液 0.150 mL を取り除き、MMC 0.150 mL を加えた。各群ともに添加後 6 時間 培養し、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養し た。なお、染色体観察用標本作製に際しては、細胞分裂を分裂中期で停止させるため標 本作製約 2 時間前にコルセミド 0.1 mL (最終濃度 : 0.2 μg/mL) を加えた。 培養終了後、 各群 2 枚のシャーレについて 0.25%トリプシン溶液で単離した細胞を遠心分離し、 0.075M 塩化カリウム溶液で低張処理し、メチルアルコール:酢酸=3:1液で固定した。 スライドガラス 1 枚につき 2 箇所に固定した細胞を滴下し、空気乾燥後 2%ギムザ液で 染色標本を作製した。染色体観察用標本は、1 枚のシャーレから 2 枚作製した。各処理 群で残る 2 枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じ洗浄、固定、染色し、単層培養細 胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間 の培養終了時に、細胞増殖抑制試験と同様の方法で、析出の有無、培養液の色及び細胞 の状態を確認した。

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。同時に染色体数 46 ~54 本を持つ細胞を倍数体とし、そ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。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とした。

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

染色体構造が、その細胞が本来持っている固有の構造(核型)と異なる場合を構造 異常と定義した。

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(非染色部分が染色 分体の同軸上にある)ものであって、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と定義し

た。

染色分体型切断(ctb): 切断とは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と定義した。

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を染色体

型切断と定義した。

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) 他。

(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。

倍数体 : polyploid (核内倍加体: endoreduplication を含む)

7) 判定基準

石館らの判定基準 1,2,3)に従い、各試験群の異常細胞の出現率に対して以下のような判定 基準を設けた。

異常細胞の出現率	判定基準
5% 未満	陰 性(一)
5% 以上 10% 未満	疑陽性(±)
10% 以上	陽 性(+)

染色体構造異常を有する細胞の出現率はギャップを含む場合(TAG)と含まない場合(TA) について集計し、ギャップを含まない場合について判定を行った。異常細胞の出現に用量依存性又は再現性が認められた場合を染色体異常誘発能陽性と判定した 2.3.4。

なお、判定に際しては統計学的手法を用いなかった。

試験結果

1. 細胞增殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

(1) 50%細胞增殖抑制濃度

代謝活性化では $625~\mu g/m L$ 以上の濃度で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は $464.273~\mu g/m L$ であった。また非代謝活性化では $313~\mu g/m L$ 以上の濃度で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は $184.036~\mu g/m L$ であった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 156 µg/mL 以上の濃度で細胞の不連続性が認められ、1250 µg/mL 以上の濃度では被験物質と思われる析出物のため細胞状態の観察が不可能であった。一方、非代謝活性化では 39.1 µg/mL 以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化では 156 µg/mL 以上の濃度で、非代謝活性化では 78.1 µg/mL 以上の濃度で変化が認められた。肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 2500 µg/mL で析出が認められた。

2) 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 1·3 及び Table 1·3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1·4 及び Table 1·4 に示した。

(1) 50%細胞增殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理では 313 μ g/mL 以上の濃度で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 205.955 μ g/mL であった。48 時間処理では 39.1 μ g/mL 以上の濃度で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 33.500 μ g/mL であった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理では 39.1 µg/mL 以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。一方、48 時間処理では 19.5 µg/mL 以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液

の色調の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 78.1 μg/mL 以上の濃度で変化が認められた。 肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 2500 μg/mL で析出が認められた。

2. 染色体異常試験

短時間処理法の結果を Fig. 2-1、2-2、Table 2-1、2-2、3-1、3-2 に、連続処理法の結果を Fig. 2-3、2-4、Table 2-3、2-4、3-3、3-4 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態は、細胞増殖抑制試験の場合とほぼ同様であった。すなわち、被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、短時間処理法の代謝活性化においては156 µg/mLでは微少に、313 µg/mLでは半数に、625 µg/mLでは多数に細胞の不連続性が認められた。短時間処理法の非代謝活性化においては39.1 µg/mL及び78.1 µg/mLでは微少に、156 µg/mLでは半数に、313 µg/mLでは多数に細胞の不連続性が認められた。連続処理法の24時間処理においては、39.1 µg/mL及び78.1 µg/mLでは微少に、156 µg/mLでは半数に、313 µg/mLでは多数に細胞の不連続性が認められた。連続処理法の24時間処理においては、39.1 µg/mL及び78.1 µg/mLでは微少に、156 µg/mLでは半数に、313 µg/mLでは微少に、39.1 µg/mLでは半数に細胞の不連続性が認められた。連続処理法の48時間処理においては、19.5 µg/mLでは微少に、39.1 µg/mLでは半数に細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、短時間処理法の代謝活性化では156 µg/mL以上の濃度で、非代謝活性化では78.1 µg/mL以上の濃度で、連続処理法の24時間処理では78.1 µg/mL以上の濃度で淡黄色から淡褐色の色調変化が認められた。肉眼による被験物質の析出の観察では、短時間処理法及び連続処理法ともに析出は認められなかった。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では 625 µg/mL では TOX、313 µg/mL で 7.5%、156 µg/mL で 9.0%、78.1 µg/mL で 9.5%及び 39.1 µg/mL で 3.0%と疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満から、陰性の判定基準である 5%未満を示した。また、非代謝活性化においても、313 µg/mL で TOX、156 µg/mL で 2.5%、78.1 µg/mL で 4.0%、39.1 µg/mL で 9.0%及び 19.5 µg/mL で 11.5%と、陽性の判定基準である 10%以上から、陰性の判定基準である 5%未満を示した。さらに、連続処理法の 24 時間処理では 313 µg/mL、156 µg/mL 及び 78.1 µg/mL で TOX、39.1 µg/mL で 5.5%及び 19.5 µg/mL で 5.0%と疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示した。また、48 時間処理では、39.1 µg/mL で 7.0%、19.5 µg/mL で 2.5%、9.77 µg/mL で 2.0%、4.88 µg/mL で 1.0%及び 2.44 µg/mL

で 1.5%と疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満から、陰性の判定基準である 5%未満を示した。なお、連続処理法の 24 時間処理の 156 µg/mL 及び 78.1 µg/mL では、観察細胞数が規定数に満たなかったため TOX と判定したが、TA はそれぞれ 27.3 及び 14.0%を示し、それ以下の濃度を含めて用量依存的な出現率の増加が認められた。

各処理法ともに陰性及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性及び陽性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 5)と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

3) 数的異常

染色体数的異常 (倍数体) の出現率は、短時間処理法の代謝活性化では 625 μg/mL で TOX、313 μg/mL で 1.5%、156 μg/mL で 3.5%、78.1 μg/mL で 4.0%及び 39.1 μg/mL で 1.5%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、非代謝活性化においては、313 μg/mL で TOX、156 μg/mL で 1.0%、78.1 μg/mL で 0.5%、39.1 μg/mL で 3.5%及び 19.5 μg/mL で 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。さらに、連続処理法の 24 時間処理では 313 μg/mL、156 μg/mL及び 78.1 μg/mLで TOX、39.1 μg/mLで 0%及び 19.5 μg/mL で 1.0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、48 時間処理では、39.1 μg/mL で 0.5%、19.5 μg/mL で 0.5%、9.77 μg/mL で 1.0%、4.88 μg/mL で 0.5%及び 2.44 μg/mL で 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

各処理法ともに陰性対照群における染色体数的異常(倍数体)の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 5)と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

3. 確認試験

結果を Fig. 2.5、2.6、Table 2.5、2.6、3.5、3.6 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、 代謝活性化においては 205 μg/mL 及び 256 μg/mL では微少に、320 μg/mL、400 μg/mL 及び 500 μg/mL では半数に細胞の不連続性が認められた。非代謝活性化においては 14.8 μg/mL 及び 22.2 μg/mL では微少に、33.3 μg/mL 及び 50 μg/mL では半数に細胞の不連続 性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化においては全用量で、 非代謝活性化においては 33.3 μg/mL 以上の用量で色調変化が認められた。肉眼による被験 物質の析出の観察では、析出は認められなかった。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化では 500 μ g/mL では TOX、400 μ g/mL で 5.0%、320 μ g/mL で 5.5%、256 μ g/mL で 2.5%及び 205 μ g/mL で 3.5%と疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満から、陰性の判定基準である 5%未満を示した。また、非代謝活性化に おいては、50 μ g/mL で 6.0%、33.3 μ g/mL で 10.5%、22.2 μ g/mL で 12.5%、14.8 μ g/mL で 7.5%、9.88 μ g/mL で 1.0%及び 6.58 μ g/mL で 1.5%と、陽性の判定基準である 10%以上から、陰性の判定基準である 5%未満を示した。

各処理法ともに陰性及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性及び陽性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 5)と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

3) 数的異常

数的異常(倍数体)の出現率は、代謝活性化では 500 μ g/mLで TOX、400 μ g/mLで 1.0%、320 μ g/mLで 2.0%、256 μ g/mLで 2.0%及び 205 μ g/mLで 0.5%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、非代謝活性化においては、50 μ g/mLで 1.0%、33.3 μ g/mLで 0.5%、22.2 μ g/mLで 0.5%、14.8 μ g/mLで 0%、9.88 μ g/mLで 0%及び 6.58 μ g/mLで 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

各処理法ともに陰性対照群における染色体数的異常(倍数体)の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 5)と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

考 察

被験物質は、染色体異常試験の短時間処理法・非代謝活性化において、19.5 µg/mL で構造異常を有する細胞の出現率(TA)が陽性を示したが、連続処理法の24時間処理及び48時間処理の同一用量においては、TA はそれぞれ疑陽性及び陰性を示し、被験物質に対する暴露時間の経過とともに構造異常の出現率が増加する傾向は認められなかった。また、短時間処理法及び連続処理法ともに、19.5 µg/mL 以外の用量において明確な用量依存性は認められないもののTAの増加が認められ、疑陽性を示した。これらの結果から総合的に判断すると、本被験物質の染色体構造異常誘発性は疑陽性であり、弱い構造異常の誘発能を有するものと判定された。一方、染色体数的異常(倍数体)の出現頻度の増加はいずれの処理法においても認められなかった。

なお、陰性対照群における染色体の構造異常を有する細胞及び染色体数的異常(倍数体)の 出現頻度は、いずれの処理法においても 5%未満であった。また、陽性対照物質の CP あるいは MMC を処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。更に、2 枚のシャーレ 間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認 められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

染色体異常試験において、短時間処理法の代謝活性化では疑陽性の、非代謝活性化では陽性の結果が得られたが、いずれの場合も構造異常を有する細胞の出現率 (TA) に用量依存的な増加が認められなかったため確認試験を実施した。

その結果、確認試験の代謝活性化においては、2 用量で疑陽性を示したが TA 値の用量依存的な増加は認められず、染色体異常試験の代謝活性化と同様な結果が得られ再現性が確認された。一方、確認試験の非代謝活性化においては、染色体異常試験で陽性を示した近傍の用量で試験を実施したが、低用量では TA 値の用量依存的な増加が認められたが、高用量では用量依存的な増加は認められず、D20 値は求められなかった。以上の結果から判断すると、本被験物質の染色体構造異常誘発性は陽性であり、染色体構造異常の誘発能を有するものと判定された。一方、染色体数的異常(倍数体)の出現頻度の増加はいずれの処理法においても認められなかった。確認試験における陽性対照群では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。また、陰性対照群における染色体の構造異常を有する細胞及び染色体数的異常(倍数体)の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、さらに試験施設の背景値と同様であった。従って試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、2、3、4、4、テトラヒドロキシベンゾフェノンは、本試験条件下において

染色体数的異常(倍数体)の誘発能は有さないものの、弱い染色体構造異常の誘発能を有する ものと判定した。

参考文献

- Ishidate, M. Jr. and Odashima, S.: Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro - A screening for chemical carcinogens, Mutation Res., 48, 337-354 (1977)
- 2) 石館基監修: 染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー (1987)
- 3) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集: 厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q&A、サイエンティスト社、 1992
- 4) Matsuoka, A., et al.: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, Mutation Res., 66, 277-290 (1979)

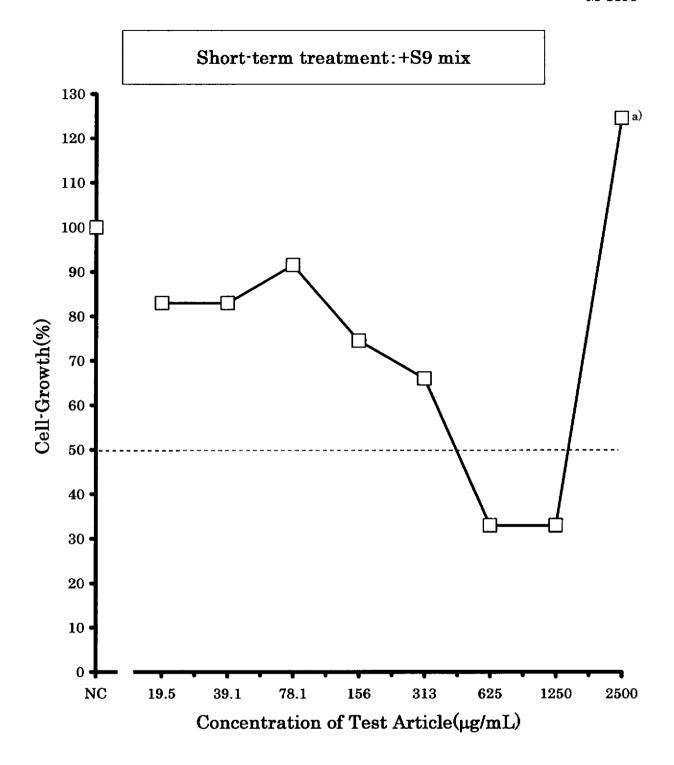


Fig.1-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone

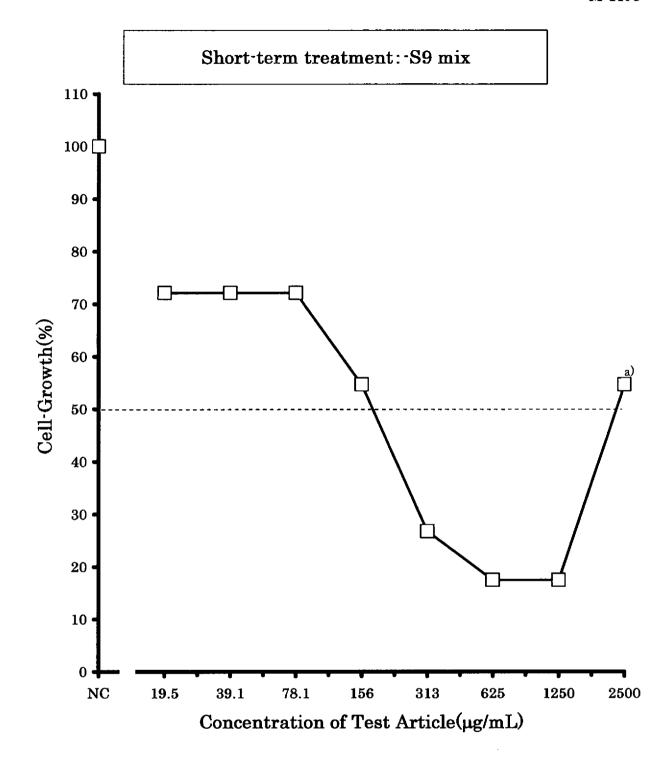


Fig.1-2 Results of the cell-growth inhibition test treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone

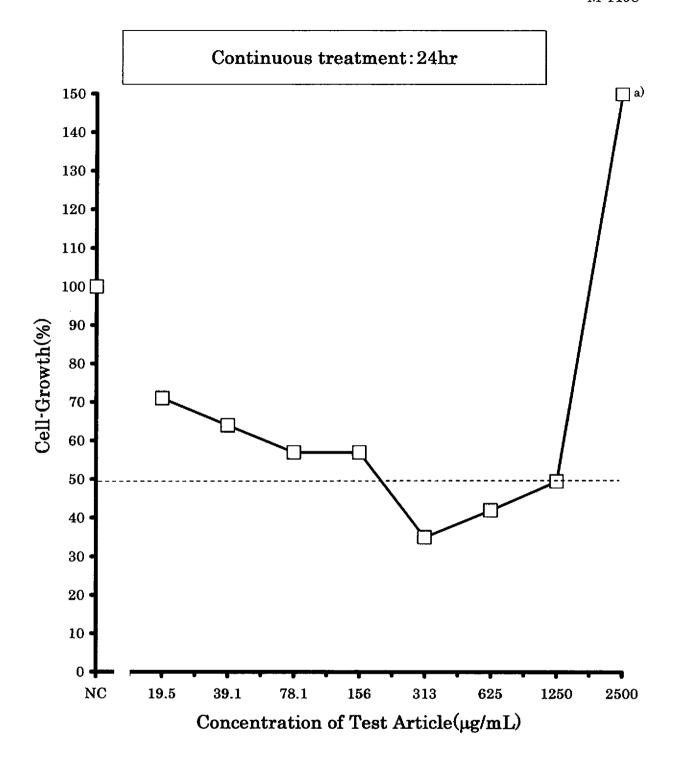


Fig.1-3 Results of the cell-growth inhibition test treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone

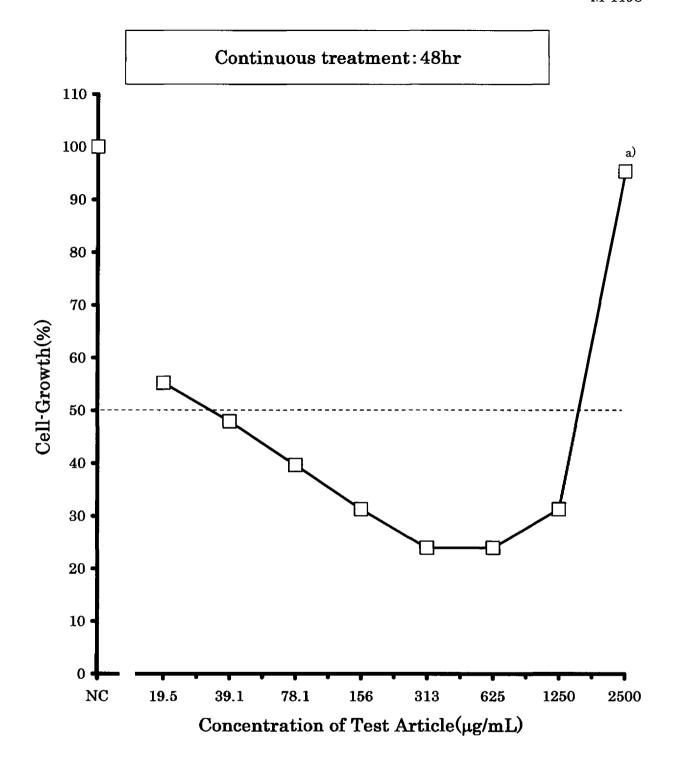


Fig. 1-4 Results of the cell-growth inhibition test treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone

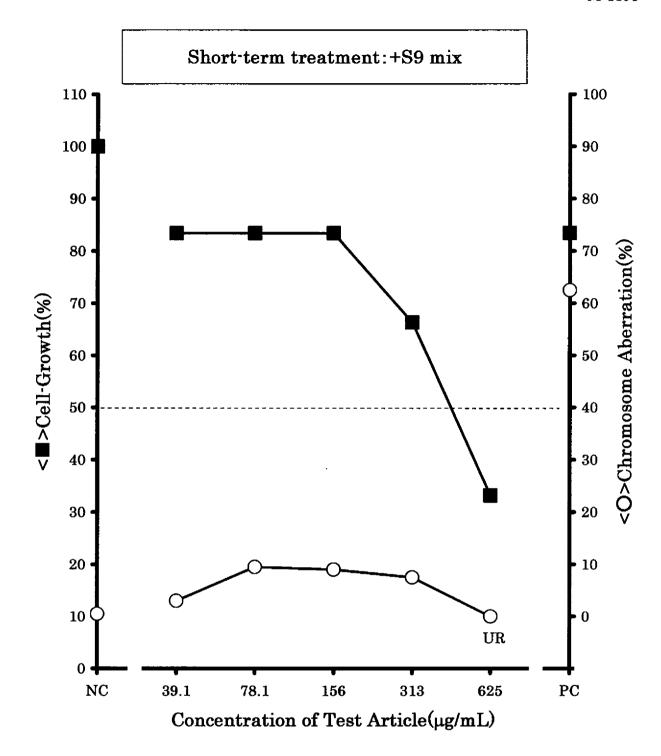


Fig.2-1 Results of the chromosome aberration test treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone

NC: Negative control PC: Positive control

UR: This value was judged to be unreliable since sufficient number of chromosomes could not be observed due to severe cytotoxicity.

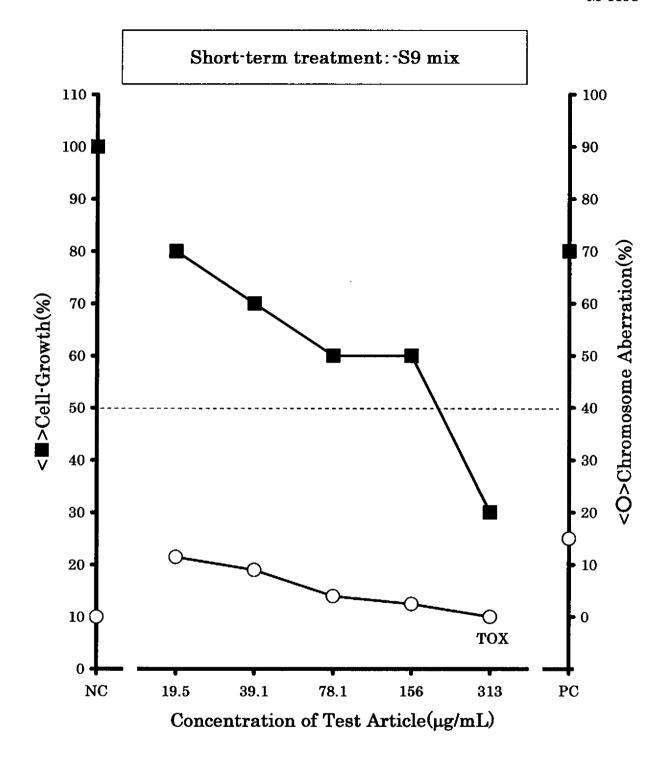


Fig.2-2 Results of the chromosome aberration test treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone

PC: Positive control

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.