

最 終 報 告 書

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
（試験番号：06-117）

財団法人 畜産生物科学安全研究所

試験表題：ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のほ乳類培養細胞
を用いる染色体異常試験

試験番号：06-117

試験委託者：

名 称 厚生労働省 医薬食品局 審査管理課
所 在 地 東京都千代田区霞が関 1-2-2
委託担当者 化学物質安全対策室

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所
所 在 地 神奈川県相模原市緑区橋本台 3 - 7 - 11

目 次

要約	1 頁
試験目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 対照物質	3
3. 溶媒	4
4. 試験細胞株	4
5. 培養液	4
6. 培養条件	4
7. S9 mix	4
8. 細胞増殖抑制試験	5
1) 被験物質の供試液の調製	5
2) 細胞の処理	5
3) 細胞増殖率の測定	6
9. 染色体異常試験	7
1) 被験物質および陽性対照物質の用量	7
2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製	8
3) 細胞の処理	8
4) 試験群の構成および使用シャーレ数	9
5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定	9
6) 染色体の観察	10
7) 染色体異常の分類および集計	10
8) 試験結果の判定	10
結果	11
1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）	11
2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）	11
3. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）－確認試験	11
4. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）	12
5. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）－確認試験	12

結論	13
----------	----

参考文献	13
------------	----

表：

表 1-1	ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の染色体異常 試験結果（短時間処理法：S9 mix 非存在下）	15
-------	--	----

表 1-2	ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の染色体異常 試験結果（短時間処理法：S9 mix 存在下）	16
-------	---	----

表 1-3	ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の染色体異常 試験結果（短時間処理法：S9 mix 存在下）－確認試験	17
-------	--	----

表 2-1	ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の染色体異常 試験結果（連続処理法：24 時間処理）	18
-------	---	----

表 2-2	ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の染色体異常 試験結果（連続処理法：24 時間処理）－確認試験	19
-------	--	----

図：

図 1	構造異常を有する細胞の出現頻度	20
-----	-----------------------	----

図 2	数的異常を有する細胞の出現頻度	21
-----	-----------------------	----

要 約

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU）を用いて *In vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、46.88～3000 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、短時間処理法の S9 mix 非存在下では、93.75～750 $\mu\text{g/mL}$ 用量で、S9 mix 存在下では 187.5～750 $\mu\text{g/mL}$ 用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。連続処理法 24 時間処理では、93.75 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。

したがって、染色体異常試験における用量は、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では 12.5、25、50、75 および 100 $\mu\text{g/mL}$ 、S9 mix 存在下では 25、50、100、150 および 200 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の場合は、6.25、25、50 および 100 $\mu\text{g/mL}$ とした。

試験の結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下ともに染色体異常細胞の増加は認められなかった。また、連続処理法 24 時間においても染色体異常細胞の増加は認められなかった。なお、短時間処理法 S9 mix 非存在下の 75 $\mu\text{g/mL}$ 以上、S9 mix 存在下の 150 $\mu\text{g/mL}$ 以上、連続処理法 24 時間の 100 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

報告書ピアレビューにおいて、短時間処理法 S9 mix 存在下の 100～150 $\mu\text{g/mL}$ 間、連続処理法 24 時間の 50～100 $\mu\text{g/mL}$ 間で毒性が出ないで細胞が数えられる可能性が考えられるため、確認試験の実施を求められた。そこで、短時間処理法 S9 mix 存在下では 100、125 および 150 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法 24 時間では 50、60、75 および 100 $\mu\text{g/mL}$ を設定し、確認試験を行った。

その結果、短時間処理法 S9 mix 存在下および連続処理法 24 時間ともに染色体異常細胞の増加は認められなかった。なお、短時間処理法 S9 mix 存在下の 150 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法 24 時間の 60 $\mu\text{g/mL}$ 以上では、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

試験目的

この試験は、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法^{1, 2)}

1. 被験物質

名 称： ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

(英名：4,4'-isopropylidenediphenol propoxylated)

CAS 番号： 37353-75-6

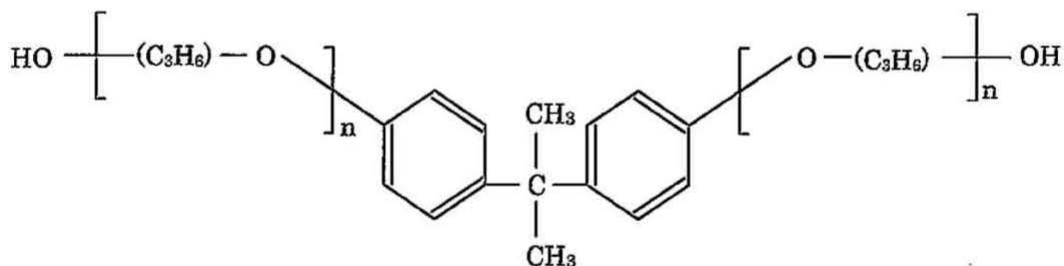
ロット番号：

純 度： 99%以上（水分：0.03%）

付加モル分布： 1 モル：0.0%、2 モル：5.7%、3 モル：11.4%、4 モル：22.1%、
5 モル：24.9%、6 モル：18.1%、7 モル：10.2%、8 モル以上：
7.6%（分析日：平成 18 年 10 月 19 日）

示 性 式： $(C_3H_6O)_n(C_3H_6O)_nC_{15}H_{16}O_2$

構 造 式：



入 手 先：

入手日・量： 平成 19 年 3 月 14 日・25g

物 性 等：

化学名 ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

分子量 502（付加モル数 5 モルと仮定した場合）

性状(常温) 無色透明液体

酸価 0.001 mgKOH/g

水酸基価 208 mgKOH/g
 pH 値 6.7 (トリオール法)
 動粘度(100℃) 25.1 mm²/s
 溶解性 水に不溶

安 定 性 : 安定〔実験終了後、(財)畜産生物科学安全研究所において保管した残余被験物質の純度、付加モル分布、酸価、水酸基価、pH 値を測定した結果、実験開始前の分析値と比べて変化はなく、実験期間中被験物質は安定であったことを確認した(下表)。分析は、三洋化成工業株式会社に委託して実施した。〕

測定日	2008-7-1	2006-10-19
純 度	99%以上	99%以上
水分, %	0.10	0.03
酸 化	0.001	0.001
水酸基価	211	208
pH (トリオール法)	6.8	6.7
動粘度 (100℃), mm ² /s	24.7	25.1
付加モル分布, %		
1 モル	0.1	0.0
2 モル	5.7	5.7
3 モル	11.4	11.4
4 モル	22.2	22.1
5 モル	25.1	24.9
6 モル	18.1	18.1
7 モル	10.2	10.2
8 モル以上	7.2	7.6

保管条件 : 冷暗所 (2~6℃)、密栓

2. 対照物質

陰性対照物質は、被験物質の溶媒として使用したジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた。陽性対照物質は、連続処理法および短時間処理法 S9 mix 非存在下では 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG、Aldrich Chemical Company、ロット番号 00613PN、純度 97%) を、短時間処理法 S9 mix 存在下では 3,4-Benzo[a]pyrene (B[a]P、Sigma Chemical Company、ロット番号 57F-3434、

純度 98%) を用いた。

3. 溶媒

本被験物質は水に不溶であり、予備的検討の結果、ジメチルスルホキシド (DMSO) に 600 mg/mL (3 mg/mL 用量の供試液濃度に相当) まで可溶であったことから、溶媒には DMSO (和光純薬工業株式会社、ロット番号 TSQ4964、100%) を用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[a]P の溶媒については、DMSO (和光純薬工業株式会社、ロット番号 EWP7032、100%) を用いた。

4. 試験細胞株

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 (元: 国立衛生試験所 変異原性部) から昭和 60 年 1 月 13 日に分与を受けたチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/ IU) を使用した。供試細胞は、細胞懸濁液に 10% の割合で DMSO を添加し、液体窒素条件下で保存しておいたものを培養液に戻し、解凍後の継代数が 5 回までのものを使用した。

5. 培養液

Eagle-MEM 粉末培地 (Gibco Laboratories、ロット番号 1348534) を常法に従い調製し、これに非動化 (56°C、30 分間加熱処理) 仔牛血清 (Gibco Laboratories、ロット番号 1364502) を 10% の割合で添加したものを用了。

6. 培養条件

供試細胞は、CO₂ インキュベーター (Napco 社) を用い、CO₂ 濃度 5%、空気 95%、温度 37°C、加湿条件下で培養した。

7. S9 mix

S9 mix は、ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素分画 (S9) にコファクターを加えて凍結されたものをキッコーマン株式会社から購入 (ロット番号: CAM-561、2007 年 6 月 8 日製造、2007 年 7 月 13 日購入) し、-80°C 以下で保存したものを、使用時に冷水中で解凍して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 mL あ

たりの組成は、次のとおりである。

[S9 製造法]

A. 使用動物

- a) 種・系統: Sprague-Dawley 系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- b) 性・週齢: 雄・7 週齢
- c) 体 重: 213~247 g

B. 誘導法

- a) 誘導物質: phenobarbital (PB)、5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路: 腹腔内投与
- c) 投与法 (投与開始日起算)
 - 1 日目: PB 30 mg/kg、2 日目: PB 60 mg/kg
 - 3 日目: PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg、4 日目: PB 60 mg/kg

C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離(9000×g)し、その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol/0.1 mL
KCl	33 μmol/0.1 mL
G-6-P	5 μmol/0.1 mL
NADP	4 μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4 μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1 mL

8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な用量を検討するため、46.88、93.75、187.5、375、750、1500 および 3000 μg/mL (溶媒に溶解可能な上限量) の用量を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行った。なお、試験には各用量について 2 枚のシャーレを使用した。

1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液 (原液) を調製し、次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。被験物質の添加量は、各シャーレの培養液量の 0.5 vol% とした。

2) 細胞の処理

短時間処理法の場合、直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ (Becton Dickinson 社) に 4×10^5 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え、培養開始 3

日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO (陰性対照) または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。また、S9 mix 存在下の場合は各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除き、S9 mix 0.5 mL を加えた後、DMSO または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加えて 18 時間培養した。一方、連続処理法の場合は短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し、培養開始 3 日後に DMSO または被験物質の供試液各 0.025 mL をシャーレに加えて 24 時間および 48 時間培養した。なお、短時間処理法および連続処理法ともに 375 μ g/mL 以上の用量ではその供試液を培養液に添加すると直ちに油滴様の被験物質の析出が認められ、特に 1500 μ g/mL 以上では油滴様の大きな固まりとなって培養終了時まで残存した。

培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10 vol% ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後、水洗し、0.1 w/v% クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後、室温で一晩自然乾燥した。

3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は、染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計 (モノセレーター II、MI-60、オリンパス光学工業株式会社) を用いて測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100% とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果は下表に示したとおり、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では、93.75~750 μ g/mL 用量で、S9 mix 存在下では 187.5~750 μ g/mL 用量で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められた。連続処理法の場合は、24 時間処理では 93.75 μ g/mL 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50% 細胞増殖抑制用量は 46.88~93.75 μ g/mL 用量域にあるものと判断され、48 時間処理では 46.88 μ g/mL 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50% 細胞増殖抑制用量は 46.88 μ g/mL 以下の用量域にあるものと判断された。

なお、短時間処理法における 1500 μ g/mL 以上の用量では、細胞増殖率の上昇が認められた。これは、1500 μ g/mL 以上の用量では析出した油滴様の被験物質が大きな固まりとなって培養終了時まで培養液表面に浮遊して認められたこ

とから、培養液中に溶解あるいは分散している被験物質濃度は、それ以下の用量と比べてむしろ低下しているものと推察され、これが細胞増殖率の上昇をもたらしたものと考えられる。このような現象は、水に難溶なため培養液中で析出がみられる化学物質においてしばしば認められている^{3,4,5,6)}。

〔短時間処理法〕

用 量 (μ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
46.88	89	95	[92.0]	95	102	[98.5]
93.75	47	40	[43.5]	88	92	[90.0]
187.5	17	19	[18.0]	16	16	[16.0]
375	17	18	[17.5]	20	21	[20.5]
750	14	16	[15.0]	15	14	[14.5]
1500	51	52	[51.5]	80	81	[80.5]
3000	49	54	[51.5]	67	65	[66.0]

[] : 平均値

〔連続処理法〕

用 量 (μ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
46.88	55	53	[54.0]	36	37	[36.5]
93.75	14	15	[14.5]	13	12	[12.5]
187.5	13	8	[20.5]	13	11	[12.0]
375	12	10	[11.0]	15	12	[13.5]
750	9	15	[12.0]	14	10	[12.0]
1500	21	16	[18.5]	15	14	[14.5]
3000	28	37	[32.5]	21	23	[22.0]

[] : 平均値

9. 染色体異常試験

1) 被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の用量は50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ、3用量以上のデータが得られることを考慮し、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では100 μ g/mLを最高用量とし、以下公比2で50、25および12.5 μ g/mLの4用量および細胞増殖抑制試験で46.88～93.75 μ g/mL間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことから、50 μ g/mLと100 μ g/mLの間量の75 μ g/mLを加えた計5用量を、S9 mix 非存在下では200 μ g/mLを最高

用量とし、以下公比 2 で 100、50 および 25 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量および細胞増殖抑制試験で 93.75~187.5 $\mu\text{g/mL}$ 間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことから、100 $\mu\text{g/mL}$ と 200 $\mu\text{g/mL}$ の中間量の 150 $\mu\text{g/mL}$ を加えた計 5 用量を、また、連続処理法 24 時間処理では、最高用量を 100 $\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2 で 50、25、12.5 および 6.25 $\mu\text{g/mL}$ の計 5 用量を設定した。陽性対照物質の MNNG は 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、B[a]P は 10 $\mu\text{g/mL}$ の用量を用いた。

2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈し、所定用量の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は 0.5 mg/mL、B[a]P は 2.0 mg/mL の供試液を調製した。

3) 細胞の処理

4×10³ 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に加え、3 日間培養後、下記の方法で処理した。培養には 1 用量当たり 4 枚のシャーレを用い、そのうち 2 枚は染色体標本作製用に、残りの 2 枚は細胞増殖率測定用に使用した。但し、陽性対照群については細胞増殖率の測定は行わず、用いるシャーレは染色体標本作製用の 2 枚とした。

短時間処理法の S9 mix 非存在下の場合は、各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。また、S9 mix 存在下の場合は、各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除いた後、S9 mix 0.5 mL を加え、続いて DMSO、被験物質供試液および B[a]P の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。S9 mix 非存在および存在下のいずれの場合も、培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。

連続処理法の場合は、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.025 mL ずつ加え、24 時間培養した。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

[短時間処理法 : S9 mix 非存在下]

用量(μ g/mL)	使用シャーレ数	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0 (陰性対照) ^a	4	4
12.5	4	--
25	4	4
50	4	4
75	4	--
100	4	4
150	--	4
200	--	4
2.5 (陽性対照) ^b	2	--
10 (陽性対照) ^c	--	2

a : DMSO、b : MNNG、c : B[a]P、使用シャーレ数 : 52

[連続処理法]

用量(μ g/mL)	使用シャーレ数
	24 時間処理
0 (陰性対照) ^a	4
6.25	4
12.5	4
25	4
50	4
100	4
2.5 (陽性対照) ^b	2

a : DMSO、b : MNNG、使用シャーレ数 : 26

5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

標本作製の 2 時間前に、培養中の各シャーレにコルセミド (Gibco Laboratories、ロット番号 1335046) を最終濃度として 0.2μ g/mL となるように添加した。培養終了後、培養液を取り除き、 0.2 w/v% トリプシン水溶液 2 mL で処理して細胞をシャーレから剥離し、新鮮培養液 5 mL を入れた遠沈管に移し、 1000 rpm、 5 分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の 75 mM 塩化カリウム水溶液 4 mL を加えて懸濁し、 37°C で 15 分間低張処理した。低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸 ($3:1$) 混合液 (v/v) 1 mL を添加して固定した。 1000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液 4 mL で懸濁・固定した。この操作を 3 回繰り返した後、少量の固定液で適切な密度に細胞を懸濁し、スライドガラスの 2 ヶ所に 1 滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、Sørensen 緩衝液 (pH6.8、株式会社ヤトロン、ロット番号 1478) を用

いて希釈した 1.4 vol%ギムザ液で約 15 分間染色した。水洗後、室温で乾燥して染色体標本とした。標本は、1 シャーレ当たり 3 枚作製した。

細胞増殖率の測定は、培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10 vol%ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後水洗し、0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色し、水洗後乾燥した。単層培養細胞密度計（モノセレーターⅡ、MI-60、オリンパス光学工業株式会社）を用いて陰性（溶媒）対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

6) 染色体の観察

染色体の観察は 60 倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率 600 倍で鏡検した。観察は標本をすべてコード化し、盲検法で行った。各用量とも、染色体が明瞭に識別でき、染色体の数が 25 ± 2 本の分裂中期像について、1 シャーレ当たり 100 個、すなわち、1 用量当たり 2 枚のシャーレの合計 200 個について観察した。

7) 染色体異常の分類および集計⁷⁾

染色体異常の分類は、構造異常については、染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換（二動原体、環状染色体など）およびその他（断片化など）とした。数的異常については、倍数性細胞（倍数体）のみを記録した。

ギャップ（染色分体型および染色体型）については、異常として記録したが、構造異常には含めなかった。ギャップは、染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は、観察した細胞 200 個中に認められた異常細胞数を表示した。

8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料 χ^2 検定を行って、有意差（有意水準 5%以下）が認められた場合は、Fisher の直接確率法を用いて陰性対照群と各用量群との間の有意差検定（有意水準は多重性を考慮して、5%または 1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、陰性対照群と比較して、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻

度が2用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められた場合、染色体異常誘発性は陽性と判定した。

結 果

1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表 1-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 0～1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 98.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数体の出現頻度は、陰性対照群で 0.5%の低値で認められた。被験物質群および陽性対照群では倍数体は認められなかった。

なお、75 および 100 μ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表 1-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞は、陰性対照群では認められなかった。被験物質群では 0.5 または 1.5%の出現頻度で認められたが、陰性対照群との間に有意差はなかった。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 73.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、25 μ g/mL でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、150 および 200 μ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

3. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）－確認試験

報告書ピアレビューにおいて、短時間処理法 S9 mix 存在下では、細胞増殖率が 100 μ g/mL で 87.5%、150 μ g/mL で 36.5%と、この間に 50%以上の開きがあるため、この用量間で毒性が出ないで染色体異常を示す用量がある可能性が考えられるため、確認試験を実施する必要があるとの指摘を受けた。この指摘に従い、100、125 および 150 μ g/mL 用量を設定し、確認試験を行った。

結果は表 1-3 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 0.5%と低値であった。被験物質群では 0.5%の出現頻度であり、陰性対照群との間に差は認められなかった。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 42.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、100 μ g/mL でのみ 1.0%の低い出現頻度で認められた。

なお、150 μ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

4. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

結果は表 2-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 0～1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 96.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、12.5 μ g/mL でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、100 μ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

5. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）－確認試験

報告書ピアレビューにおいて、連続処理法 24 時間処理では、細胞増殖率が 50 μ g/mL で 54.0%、100 μ g/mL で 11.5%であり、この用量間で毒性が出ないで細胞が数えられる可能性があるため、確認試験を実施する必要があるとの指摘を受けた。この指摘に従い、50、60、75 および 100 μ g/mL 用量を設定し、確認試験を行った。

結果は表 2-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 50 μ g/mL で 1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 94.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群で 0.5%の低値で認められた。被験物質群では、50 μ g/mL で 0.5%の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では認められなかった。

なお、60 μ g/mL 以上では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

結 論

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）について染色体異常誘発性の有無を調べるため、CHL/IU 細胞を用いた *In vitro* における染色体異常試験を実施した。その結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下並びに連続処理法 24 時間のいずれの方法においても染色体異常誘発作用は認められなかった。

したがって、本実験条件下では、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。本試験結果は、CHL/IU 細胞において染色体異常を有する細胞の出現頻度が 5%未満を陰性とする生物学的判断基準⁸⁾からみても陰性と判断されるものであった。

ビスフェノール A の変異原性については、*S. typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 または *E. coli* WP2uvrA を用いた復帰突然変異試験^{9,10,11)}で陰性の報告がある。また、CHO 細胞を用いた染色体異常試験で陽性¹²⁾および陰性¹³⁾、V-79 細胞を用いた細胞遺伝子突然変異試験で陰性⁹⁾との報告がある。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.
- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). "Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, 66, 277-290.
- 3) 佐々木澄志, 日下部博一, 若栗 忍, 中川ゆづき, 大嶋節子, 橋本恵子 (1998), ジイソプロピルベンゼ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, 6, 614-617.

- 4) 野田 篤, 昆 尚美 (1999), 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.
- 5) 尾崎正康, 古田鮎美, 三浦康義, 伊藤加奈, 鈴木暢子 (2002), シクロヘキサ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, 9, 255-259.
- 6) 野田 篤, 昆 尚美 (2002), 1, 4-ジメチル-2- (1-フェニルエチル) ベンゼ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, 9, 439-442.
- 7) 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、pp. 16-37.
- 8) 石館 基 監修, “改定増補 染色体異常試験データ集”, エル・アイ・シー、東京、1987、p. 19.
- 9) Schweikl, H, et., al. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutation Research*, 415(1-2):119-130, 1998.
- 10) Japan chemical industry ecology toxicology and information center, Japan: Mutagenicity test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation of the industrial safety and health law, 1996.
- 11) Masuda, et., al. Changes in the mutagenic and estrogenic activities of bisphenol A upon treatment with nitrite. *Mutation Research*, 585(1-2):137-1146, 2005.
- 12) Hilliard, CA, et., al. Chromosome aberration in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31(4), 316-326, 1998.
- 13) Ivett, JT, et., al. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. IV. Results with 15 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 14(3), 165-187, 1989.

表 1-1 ビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

検体の の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						キヤップの 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数			観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照 0	100	1	0	0	0	0	1	1	100.0	100	1	0	1
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	2	1		200	1	0	1
	(0.5) (0.5) (0) (0) (0) (1.0) (0.5)						(0.5) (0) (0.5)						
12.5	100	0	0	0	0	0	0	0	101.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
	(0) (0) (0) (0) (0) (0) (0)						(0) (0) (0)						
25	100	1	0	0	1	0	2	0	98.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
	200	1	0	0	1	0	2	1		200	0	0	0
	(0.5) (0) (0) (0.5) (0) (1.0) (0.5)						(0) (0) (0)						
50	100	1	0	0	0	0	1	1	88.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	1	0	0	0	0	1	1		200	0	0	0
	(0.5) (0) (0) (0) (0) (0.5) (0.5)						(0) (0) (0)						
75 #	--	--	--	--	--	--	--	--	49.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	(--) (--) (--) (--) (--) (--) (--)						(--) (--) (--)						
100 #	--	--	--	--	--	--	--	--	18.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	(--) (--) (--) (--) (--) (--) (--)						(--) (--) (--)						
陽性対照 2.5	100	36	96	3	0	0	98	1	--	100	0	0	0
	100	38	97	1	0	0	98	0		100	0	0	0
	200	74	193	4	0	0	196	1		200	0	0	0
	(37.0) (96.5) (2.0) (0) (0) (98.0)** (0.5)						(0) (0) (0)						

陰性対照:ジメチルスルホキシド。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 1-2 ビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

検体の 用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0)	(0)	(0)
25	100	1	0	0	0	0	1	0	98.0	100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
	200	1	0	0	0	0	1	1		200	1	0	1
		(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0.5)			(0.5)	(0)	(0.5)
50	100	0	1	0	0	0	1	0	93.0	100	0	0	0
	100	0	2	0	0	0	2	0		100	0	0	0
	200	0	3	0	0	0	3	0		200	0	0	0
		(0)	(1.5)	(0)	(0)	(0)	(1.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
100	100	0	1	0	0	0	1	0	87.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
150 #	--	--	--	--	--	--	--	--	36.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
200 #	--	--	--	--	--	--	--	--	12.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
陽性対照	100	14	71	0	1	0	75	0		100	0	0	0
10	100	11	70	0	0	0	71	1		100	0	0	0
	200	25	141	0	1	0	146	1		200	0	0	0
		(12.5)	(70.5)	(0)	(0.5)	(0)	(73.0)**	(0.5)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 1-3 ビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)-確認試験

検体の 用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	1	0	1	0	100.0	100	0	0	0
0	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	0	0	0
	(0) (0) (0) (0.5) (0) (0.5) (0)							(0) (0) (0)					
100	100	0	0	0	0	0	0	0	88.0	100	1	0	1
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	1	0	1
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	2	0	2
	(0) (0.5) (0) (0) (0) (0.5) (0)							(1.0) (0) (1.0)					
125	100	0	1	0	0	0	1	0	76.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0
	(0) (0.5) (0) (0) (0) (0.5) (0)							(0) (0) (0)					
150 #	--	--	--	--	--	--	--	--	44.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	(--) (--) (--) (--) (--) (--) (--)							(--) (--) (--)					
陽性対照	100	9	46	0	1	0	47	0	--	100	0	0	0
10	100	12	36	0	0	0	37	0		100	0	0	0
	200	21	82	0	1	0	84	0		200	0	0	0
	(10.5) (41.0) (0) (0.5) (0) (42.0)** (0)							(0) (0) (0)					

陰性対照:ジメチルスルホキシド。

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene。

**: $p<0.01$ 。

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 2-1 ビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)

検体の 用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	0	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0
0	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	2	0		200	0	0	0
(0.5) (0.5) (0) (0) (0) (1.0) (0)										(0) (0) (0)			
6 .25	100	1	0	0	0	0	1	0	90.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0
	200	1	0	0	1	0	2	0		200	0	0	0
	(0.5) (0) (0) (0.5) (0) (1.0) (0)										(0) (0) (0)		
12 .5	100	0	0	0	0	0	0	1	83.5	100	1	0	1
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	1		200	1	0	1
	(0) (0.5) (0) (0) (0) (0.5) (0.5)										(0.5) (0) (0.5)		
25	100	0	0	0	0	0	0	0	72.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
	(0) (0) (0) (0) (0) (0) (0)										(0) (0) (0)		
50	100	0	0	0	0	0	0	0	54.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
	(0) (0) (0) (0) (0) (0) (0)										(0) (0) (0)		
100 #	--	--	--	--	--	--	--	--	11.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	(--) (--) (--) (--) (--) (--) (--)										(--) (--) (--)		
陽性対照	100	34	91	1	0	0	95	0	--	100	0	0	0
2 .5	100	35	95	0	0	0	97	0		100	0	0	0
	200	69	186	1	0	0	192	0		200	0	0	0
(34.5) (93.0) (0.5) (0) (0) (96.0)** (0)										(0) (0) (0)			

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 2-2 ビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)-確認試験

検体 の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照 0	100	0	2	0	1	0	3	0	100.0	100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	2	0	1	0	3	0		200	1	0	1
		(0)	(1.0)	(0)	(0.5)	(0)	(1.0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
50	100	1	1	0	0	0	2	0	55.0	100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	2	0		200	1	0	1
		(0.5)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
60 #	--	--	--	--	--	--	--	--	43.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
75 #	--	--	--	--	--	--	--	--	17.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
100 #	--	--	--	--	--	--	--	--	19.5	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--		--	--	--	--
		(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)			(--)	(--)	(--)
陽性対照 2.5	100	46	93	2	0	0	96	0	--	100	0	0	0
	100	40	89	0	0	0	93	0		100	0	0	0
	200	86	182	2	0	0	189	0		200	0	0	0
		(44.0)	(91.0)	(1.0)	(0)	(0)	(94.5)**	(0)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:ジメチルスルホキシド。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

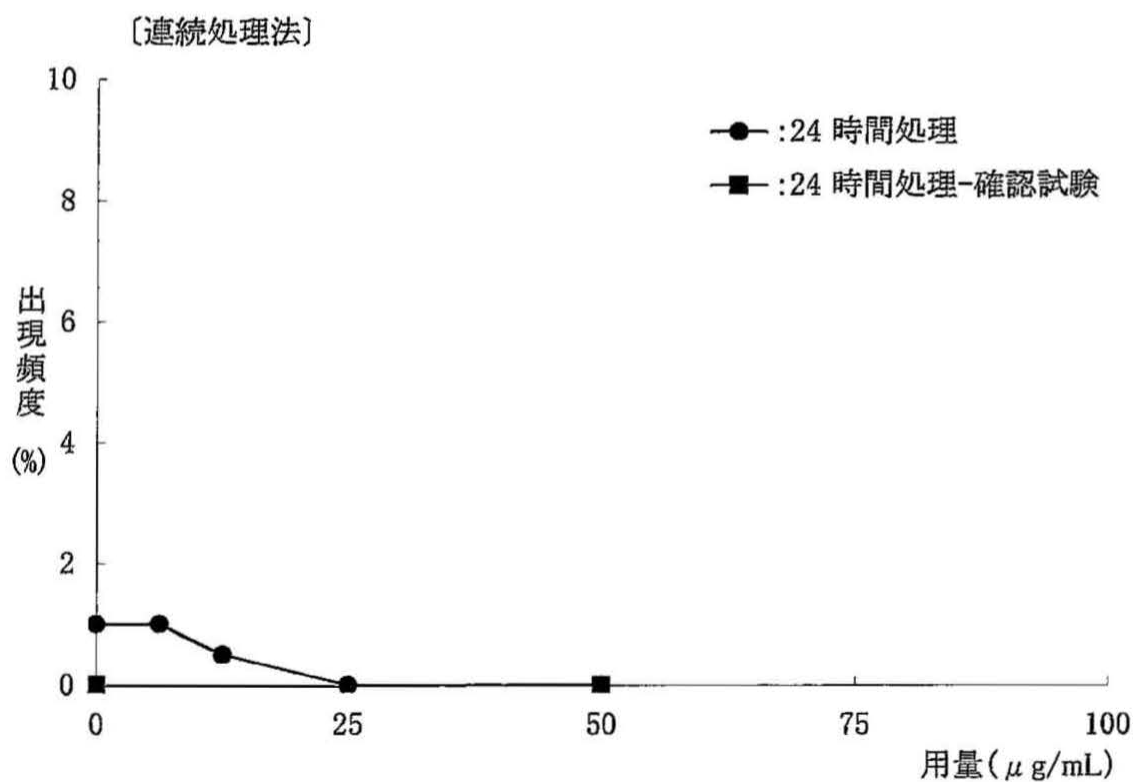
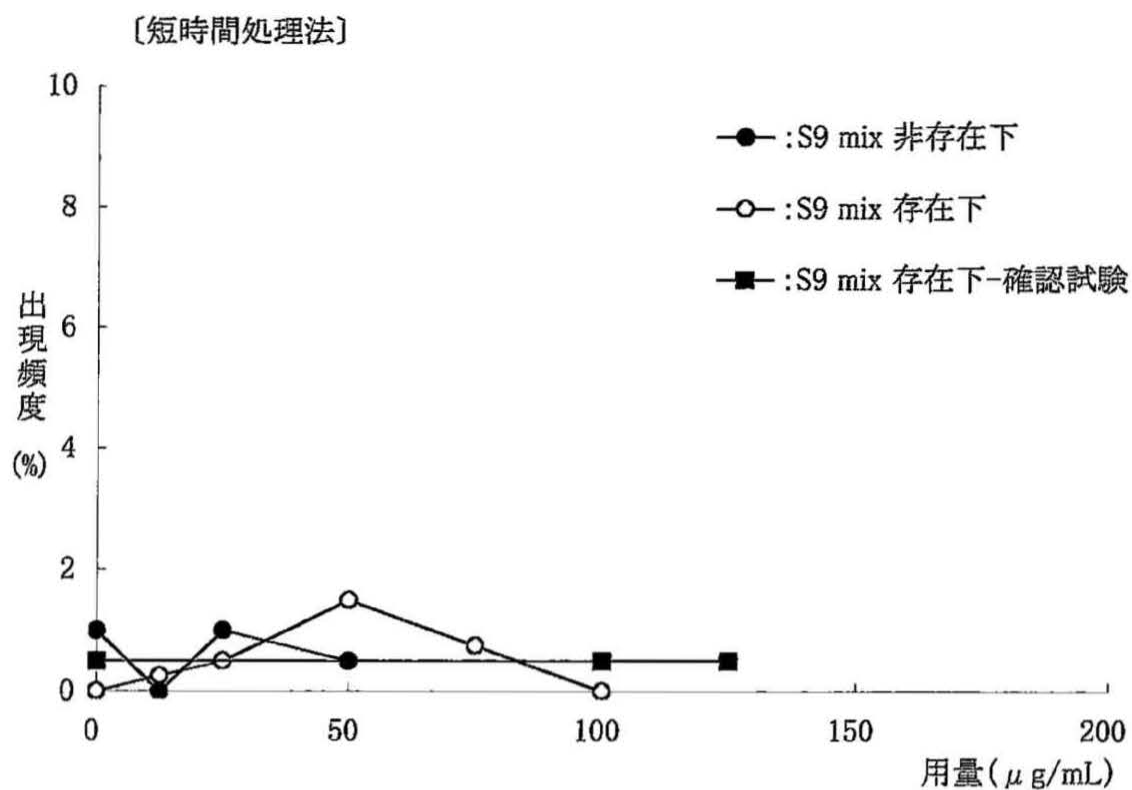


図 1 構造異常を有する細胞の出現頻度

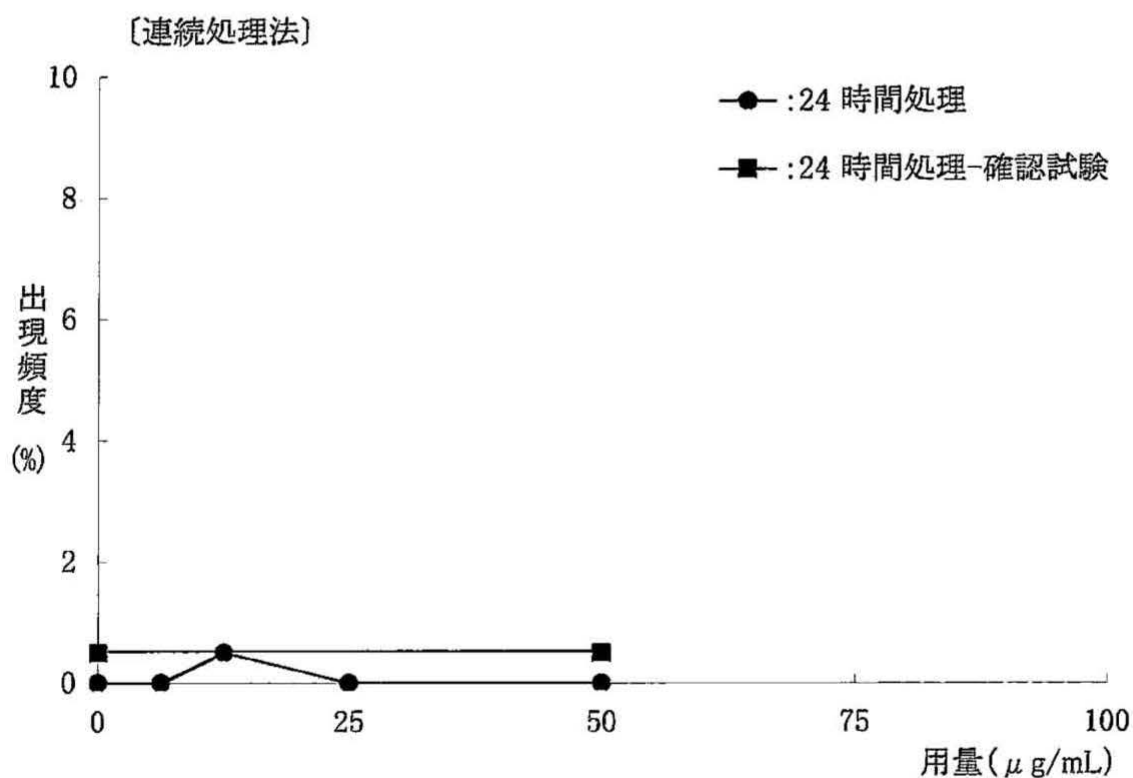
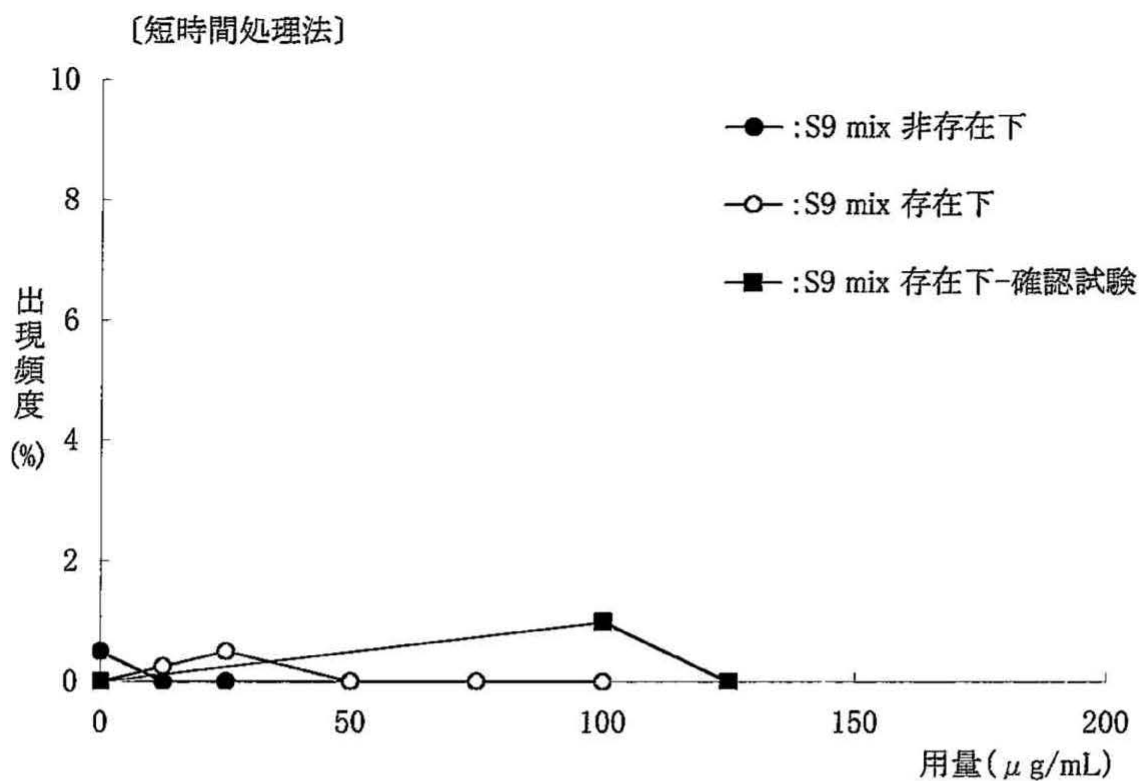


図 2 数的異常を有する細胞の出現頻度