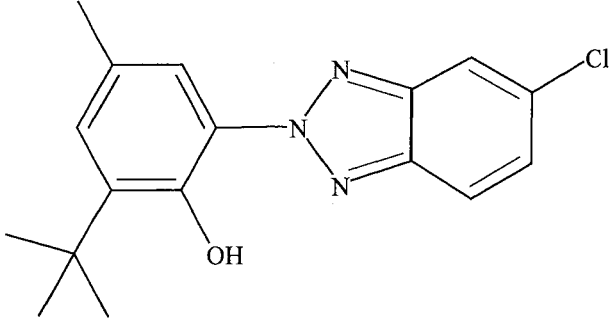


ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	ブメトリゾール		
別 名	2-(2'-ヒドロキシ-3-tert-ブチル-5'-メチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール		
C A S 番 号	3896-11-5		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分 子 量	315.80		
試験に供した新規化学物質の純度	99.9 %		
試験に供した新規化学物質のロット番号	01721IW4		
不純物の名称及び含有率	—		
蒸 気 圧	7.5×10^{-7} Pa (20℃)		
対 水 溶 解 度	<1mg/L (20℃) EEC A6		
1-オクタノール/水分配係数	logPow>6 (20-25℃)		
融 点	138-141℃		
沸 点	—		
常温における性状	淡黄色粉末, 臭いなし		
安 定 性	常温・常圧で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	DMSO	5 mg/mL以下*	**
備考			
* : 試験施設にて溶解度を確認			
** : 643.2 mg/mL DMSO懸濁液に発熱, 発泡は認められず.			

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

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

2. 細胞の種類－培養条件

細胞名	CHL/IU	入手先	大日本製薬株式会社 ラボラトリープロダクツ部
種	チャイニーズハムスター	入手年月日	2000年 11月 28日
培養液	イーグルのMEM粉末を指定の調製方法に従って溶液とし、メンブランで濾過したもの	製造元	GIBCO
血清の種類と添加量	仔牛 10 %	製造元 (Lot No.)	GIBCO (511116)
細胞周期	16.9 h	凍結条件	-196 °C
継代数	15	容器	プラスチックシャーレ
染色体数 (モード)	25 本	培養条件 温度	37 °C
		C O ₂ 濃度	5 %
備考	—		

3. S 9 mix

(1) S 9の入手方法等 (該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

自製・購入の別	1.自製 (2)購入 (製造元: オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2005年 1月 21日製造
購入の場合のLot No.	05012111
保存温度	-80 °C

(2) S 9の調製方法

使用動物		誘導物質			
種・系統	ラット, Crj:CD (SD)	名 称	Phenobarbital (PB) 5,6-Benzoflavone (BF)		
性	雄	投与方法	i.p.		
週 齢	7 週	投与期間及び投与量 (g / kg 体重)	1日目	PB	0.03 g/kg
体重 (匹数)	216.4 ± 8.9 g (45匹)		2,3,4日目	PB	0.06 g/kg
			3日目	BF	0.08 g/kg

(3) S 9 mixの組成

成 分	S 9 mix 1mL中の量	成 分	S 9 mix 1mL中の量
S9	0.3 mL	NADP	4 μ mol
MgCl ₂	5 μ mol	Na-リン酸緩衝液	— μ mol
KCl	33 μ mol	その他 (HEPES緩衝液*)	4 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol	注射用水	総量を1mLとする.

*pH 7.2

(4) S 9 mixの処理条件(該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

① プレート法	2. 浮遊細胞法	3. その他 ()
S 9 量 (最終濃度)	5 %	
S 9 蛋白量 (最終濃度)	1.257 mg/mL	
処 理 時 間	6 h	
回 復 時 間	18 h	
備 考	—	

4. 被験物質溶液の調製 (被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと.)

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度
	ジメチルスルホキシド	株式会社同仁化学研究所	PU140	紫外吸収 スペクトル用	100.0 %
溶媒選択の理由	ジメチルスルホキシド (DMSO) は、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で一般的に用いられており、良好な懸濁状態となるため。				
被験物質溶液の性状	溶解	(懸濁)	その他 ()		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	タッチミキサーで攪拌することにより均一な懸濁状態とした。				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	— 時間 — 分 — °C 細胞増殖抑制試験、染色体異常試験（短時間処理法、連続処理法）とも用時調製				
純度換算の有無	有 (無)				

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2005年 4月 25日から 2005年 4月 26日	2005年 4月 25日から 2005年 4月 26日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 60 mm	直径 60 mm
	培 養 液 量	3.0 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	1	1
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10 ⁴ 個/5mL	2.0×10 ⁴ 個/5mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.015 mL/培養器	0.015 mL/培養器
	S 9 m i x 添 加 量		0.5 mL/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5 %
	S 9 蛋白の最終濃度		1.257 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
細胞増殖抑制 測定法	血球計算盤を使用		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (6 – 18 h)		代謝活性化法による場合 (6 – 18 h)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.00625	95	0.00625	97
0.0125	94	0.0125	97
0.025	98	0.025	100
0.050 [†]	97	0.050 [†]	97
0.100 [†]	95	0.100 [†]	97
0.200 [†]	94	0.200 [†]	93
0.400 [†]	91	0.400 [†]	90
0.800 [†]	77	0.800 [†]	81
1.600 [†]	41	1.600 [†]	47
3.200 [†]	23	3.200 [†]	27

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記入すること。

[†]代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合とも、0.050 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（白色、微細及び油膜状）が認められた。

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2005年 5月 9日から 2005年 5月 10日	2005年 5月 9日から 2005年 5月 10日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 60 mm	直径 60 mm
	培 養 液 量	3.0 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2	2
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/5mL	2.0×10^4 個/5mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.015 mL/培養器	0.015 mL/培養器
	S 9 mix 添加量		0.5 mL/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5 %
	S 9 蛋白の最終濃度		1.257 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表1-1, 1-2による.)

6. 連続処理法による試験

(短時間処理法による試験で陰性と判定された場合に試験を実施すること.)

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		2005年 4月 25日から 2005年 4月 26日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	
	大 き さ	直径 60 mm	
	培 養 液 量	5.0 mL/培養器	mL/培養器
	用量当たりの培養器数	1	
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/ 5mL	個/ mL
	前 培 養 日 数	3 日間	日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.025 mL/培養器	mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	h
	回 復 時 間	0 h	h
細胞増殖抑制 測定法	血球計算盤を使用		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(24 - 0 h) 処理による場合		(- h) 処理による場合	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100		
0.00625	98		
0.0125	97		
0.025	94		
0.050 [†]	92		
0.100 [†]	92		
0.200 [†]	90		
0.400 [†]	84		
0.800 [†]	56		
1.600 [†]	29		
3.200 [†]	8		

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記入すること。

[†]0.050 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（白色の微細及び油膜状の析出物）が認められた。

(3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		2005年 5月 12日から 2005年 5月 13日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	
	大 き さ	直径 60 mm	
	培 養 液 量	5.0 mL/培養器	mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2	
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/ 5mL	個/ mL
	前 培 養 日 数	3 日間	日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.025 mL/培養器	mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	h
	回 復 時 間	0 h	h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表2-1による.)

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと.)		陽性				陰性	
判定の理由							
本被験物質は、短時間処理法（代謝活性化によらない場合及び代謝活性化による場合）及び連続処理法（24時間処理）とも構造異常・数的異常の出現率は5%未満で、用量に伴う増加も認められなかった。							
なお、本試験で用いた陽性対照物質は明らかな陽性結果を示し、陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、背景データの範囲内にあり、試験条件を満たすものであったことから、試験系に影響した他の要因がなく、試験が適切に実施されたことが確認された。							
また、染色体異常試験と同時に行った各処理濃度における生細胞数の測定結果は、用量設定試験として実施した細胞増殖抑制試験の結果を再現し、染色体異常試験が適切な濃度で実施されたことを確認した。							
以上の結果より、本被験物質は陰性と判断した。							
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
			+S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
		連続処理法		—	h処理	—	mg/mL
				—	h処理	—	mg/mL
	数的異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
			+S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
		連続処理法		—	h処理	—	mg/mL
				—	h処理	—	mg/mL

〔備考〕 D₂₀値は分裂中期像20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量であり、陽性と判定した試験系列について、異常のタイプ別に記入すること。

(2) 参考事項

[用量設定理由]

染色体異常試験の実施に先駆けて、試験濃度設定のために細胞増殖抑制試験を実施した。細胞増殖抑制試験の試験濃度は「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）に基づき、10mM相当の3.200 mg/mLを最高濃度として、以下公比2で計10濃度を設定した。すなわち、0.00625, 0.0125, 0.025, 0.050, 0.100, 0.200, 0.400, 0.800, 1.600及び3.200 mg/mLとした。

細胞増殖抑制試験の結果から、Probit法で求めた被験物質の50 %細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では1.8649 mg/mL、代謝活性化による場合では2.0209 mg/mLであった。一方、連続処理法(24時間処理)では0.8366 mg/mLであった。このことから、染色体異常試験の試験濃度は、 IC_{50} 及び細胞の生存率を指標に、細胞増殖を50 %以上抑制する濃度を最高濃度とし、公比2により5段階設定した。すなわち、短時間処理法（代謝活性化によらない場合及び代謝活性化による場合）では、0.150, 0.300, 0.600, 1.200及び2.400 mg/mLとした。連続処理法(24時間処理)では、0.075, 0.150, 0.300, 0.600及び1.200 mg/mLとした。

[被験物質の析出]

被験物質の析出は、短時間処理法及び連続処理法とも、細胞増殖抑制試験では0.050 mg/mL以上の濃度において認められ、染色体異常試験ではすべての濃度において認められた。

[染色体異常の観察及び結果判定の方法]

1シャーレあたり100個、1濃度あたり200個の分裂中期像を観察した。染色体の異常については、数的異常として倍数体及び核内倍化を記録した。また、構造的異常として染色分体切断、染色分体交換、染色体切断、染色体交換及びその他に分類し、これらの異常を1つでも有する細胞を陽性細胞1個として記録した。

結果の判定は、石館の方法を用いて行った。

[備考] 「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

8. その他

試験実施施設	名称	株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所				
	所在地	〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地		電話	058 (392) 6222	
				FAX	058 (392) 1284	
試験責任者	職氏名	試験管理部 主任研究員 [REDACTED]				
	経験年数	17年				
試験番号	971124					
試験期間	2005年 4月 1日より 2006年 11月 13日					

[備考]

1. 本様式への記載は、最終報告書より転記して記載すること。
2. 最終報告書と同じ試験番号を記載すること。
3. 本様式の作成責任者は、本様式の欄外に、所属及び氏名を記載すること。

別表 1-1

染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称： プメトリゾール

処理時間 (hr)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数（出現頻度%）							ギャップの 出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数（出現頻度%）			
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	1	0	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0)
6-18	-	0.150 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	95	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	1	0	1 (0.5)
6-18	-	0.300 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	95	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0)
6-18	-	0.600 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	89	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	0	0	0 (0)
6-18	-	1.200 [†]	100	1	0	0	0	0	1	0	48	100	2	0	2
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	3	0	3 (1.5)
6-18	-	2.400 [†]	100	0	1	0	0	0	1	0	34	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	2	0	2
			200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0		200	2	0	2 (1.0)
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	32	39	0	0	0	55	0	88	100	0	0	0
			100	21	36	0	0	0	50	0		100	0	0	0
			200	53	75	0	0	0	105 (52.5)	0		200	0	0	0 (0)

〔備考〕

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethylsulfoxide

MMC; Mitomycin C

別表 1 - 2 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称： ブメトリゾール

処理時間 (hr)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数（出現頻度%）							ギャップの 出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数（出現頻度%）			
			観察細胞数	染色体分体切斷	染色体分体交換	染色体切斷	染色体交換	その他	総異常数（%）			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
			200	0	0	0	0	0	0（0）	0		200	1	0	1（0.5）
6-18	+	0.150 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	96	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
			200	0	0	0	0	0	0（0）	0		200	1	0	1（0.5）
6-18	+	0.300 [†]	100	1	1	0	0	0	2	0	91	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	1	1	0	0	0	2（1.0）	0		200	0	0	0（0）
6-18	+	0.600 [†]	100	1	0	0	0	0	1	0	85	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1（0.5）	0		200	0	0	0（0）
6-18	+	1.200 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	51	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	2	0	2
			200	0	0	0	0	0	0（0）	0		200	3	0	3（1.5）
6-18	+	2.400 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	34	100	2	0	2
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
			200	0	0	0	0	0	0（0）	0		200	3	0	3（1.5）
6-18	+	陽性対照 (DMN) 0.500	100	32	63	0	1	0	73	0	85	100	0	0	0
			100	34	61	0	1	0	72	0		100	0	0	0
			200	66	124	0	2	0	145（72.5）	0		200	0	0	0（0）

【備考】

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethylsulfoxide
DMN; Dimethylnitrosamine

別表 2-1

染色体異常試験の結果 (連続処理法)

被験物質の名称: ブメトリゾール

処理時間 (hr)	被験物質 の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数 (出現頻度%)							ギャップの 出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
		200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0)
24-0	0.075 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	97	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	0	0	0 (0)
24-0	0.150 [†]	100	0	0	0	1	0	1	0	92	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	1	0	1
		200	1	0	0	1	0	2 (1.0)	0		200	2	0	2 (1.0)
24-0	0.300 [†]	100	0	1	0	0	0	1	0	88	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
		200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0		200	1	0	1 (0.5)
24-0	0.600 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	62	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	2	0	2
		200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	3	0	3 (1.5)
24-0	1.200 [†]	100	0	0	0	0	0	0	0	34	100	2	0	2
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 (0)	0		200	2	0	2 (1.0)
24-0	陽性対照 (MMC) 0.00005	100	20	26	0	0	0	44	0	88	100	0	0	0
		100	20	30	0	0	0	43	0		100	0	0	0
		200	40	56	0	0	0	87 (43.5)	0		200	0	0	0 (0)

〔備考〕

1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethylsulfoxide

MMC; Mitomycin C

図1 細胞増殖抑制試験結果

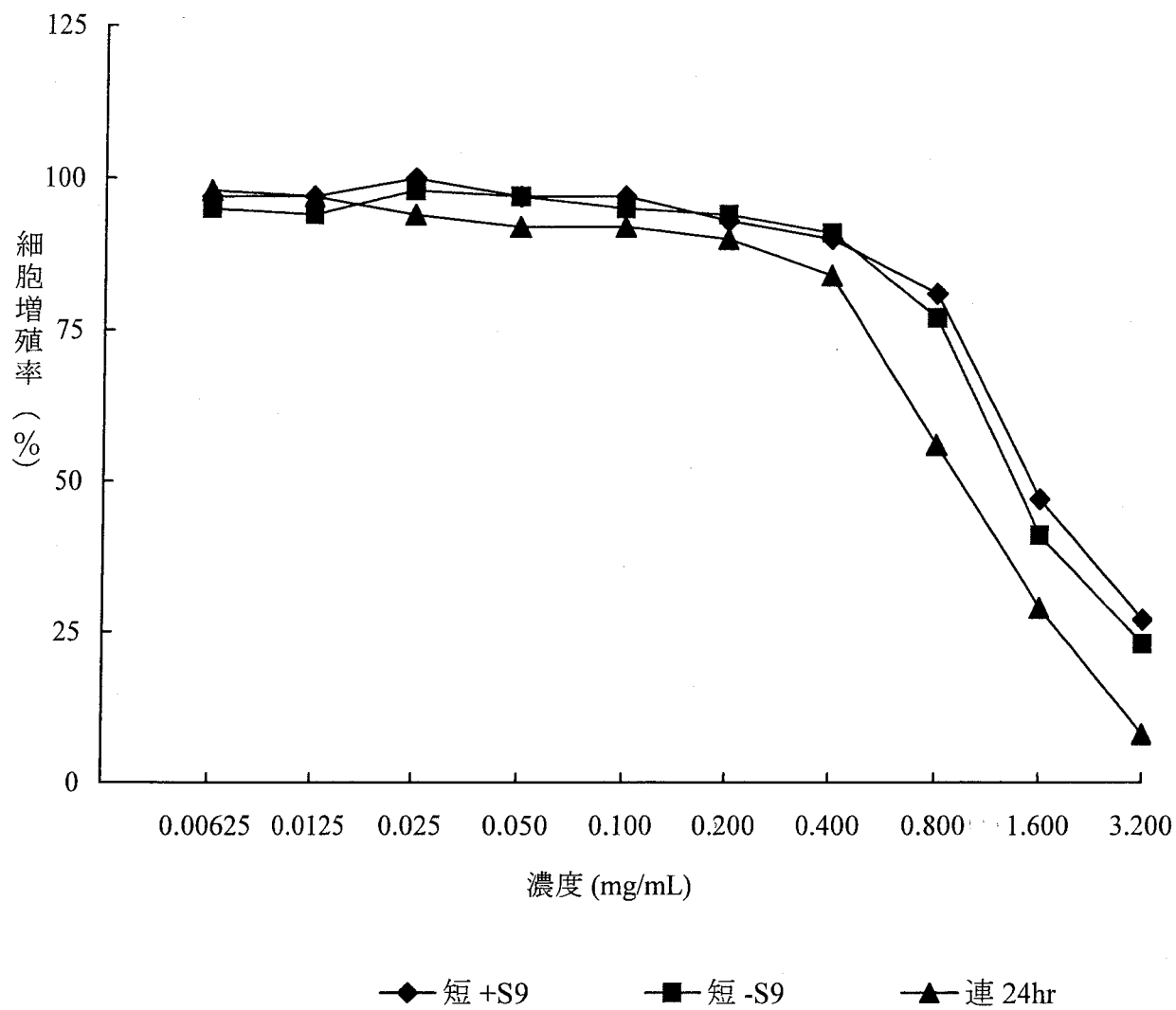
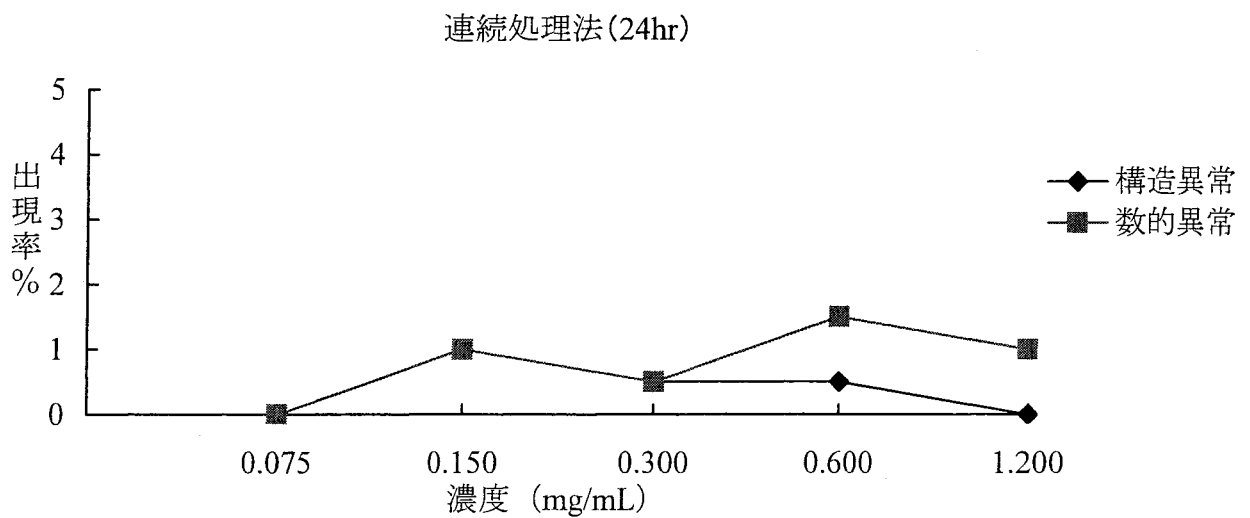
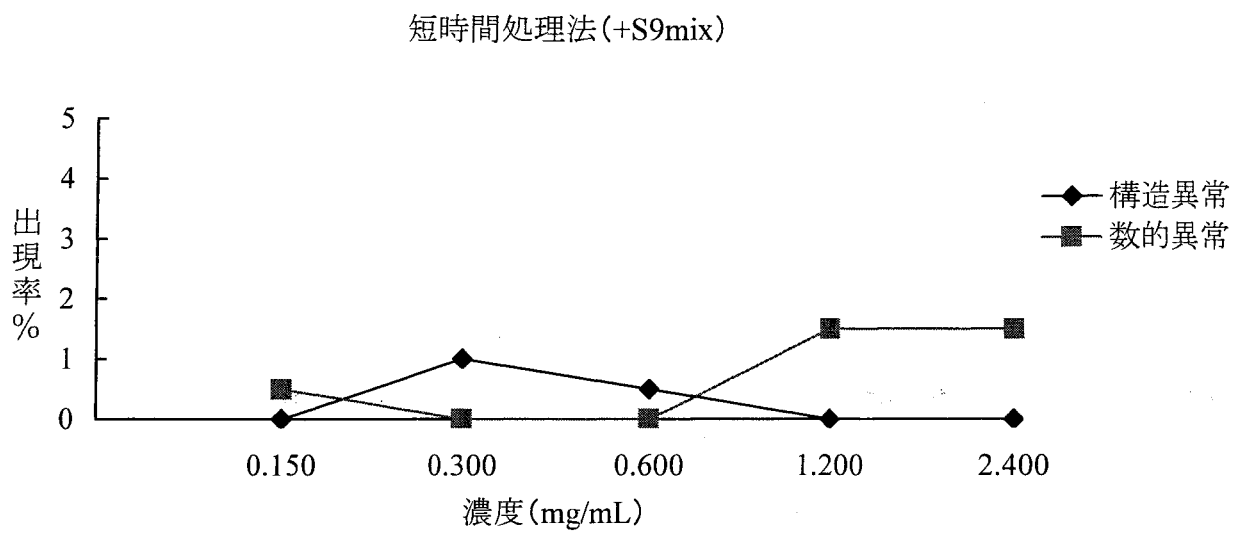
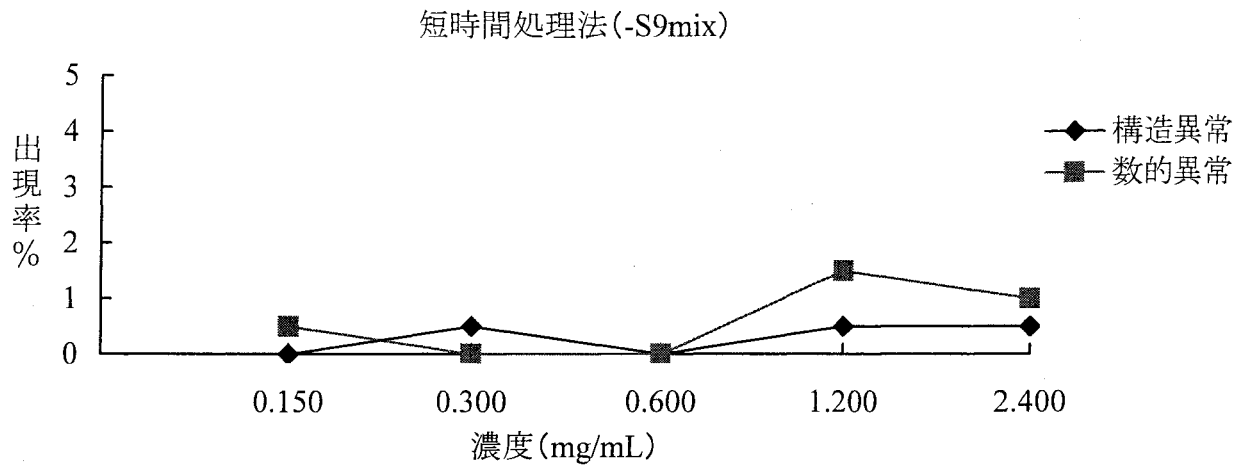


図2 用量反応曲線

Study No. 971124



ブメトリゾールのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

最 終 報 告 書

作成日 2006年 11月 13日

本報告書は最終報告書を複写したものに
相違ありません。

2006 年 12 月 12 日

試験責任者

株式会社日本バイオリサーチセンター

羽島研究所

信頼性保証書

試験番号：971124

表 題：ブメトリゾールのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

当試験に関して、2005年4月4日から2006年11月13日にかけて調査を実施し、その結果は運営管理者及び試験責任者に報告した。

当試験は「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」（平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環企発第031121004号）並びにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE（OECD 化学物質の安全性試験の実施に関する基準）に従って実施され、この最終報告書には試験の方法が正確に記載され、かつ生データが正確に反映されていることを保証する。

（調査の状況は、別紙1のとおりである。）

2006年 11月13日

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

信頼性保証部門責任者



別紙1

調 査 項 目	調査実施日			調査結果報告日		
1. 試験計画書及び主計画表	2005年	4月	4日	2005年	4月	4日
2. 細胞の再培養	2005年	4月	15日	2005年	4月	15日
3. 添加（細胞増殖抑制試験）	2005年	4月	25日	2005年	4月	25日
4. 細胞播種（短時間処理法）	2005年	5月	6日	2005年	5月	12日
5. 試験計画書変更書（No.1）	2005年	5月	9日	2005年	5月	12日
6. 被験物質の管理	2005年	5月	9日	2005年	5月	12日
7. 検体の調製	2005年	5月	9日	2005年	5月	12日
8. 添加（短時間処理法）	2005年	5月	9日	2005年	5月	12日
9. 細胞数計測，標本作製（短時間処理法）	2005年	5月	10日	2005年	5月	12日
10. 添加（連続処理法）	2005年	5月	12日	2005年	5月	12日
11. 試験計画書変更書（No.2）	2005年	5月	19日	2005年	5月	19日
12. 標本観察	2005年	5月	19日	2005年	5月	19日
13. 試験計画書変更書（No.3）	2005年	5月	25日	2005年	5月	25日
14. 生データ	2005年	6月	24日	2005年	6月	29日
	～	6月	27日			
15. 標本	2005年	6月	27日	2005年	6月	29日
16. 最終報告書（一次案）	2005年	6月	27日	2005年	6月	29日
	～	6月	28日			
17. 生データ（再調査）	2005年	7月	8日	2005年	7月	8日
18. 最終報告書（一次案）（再調査）	2005年	7月	8日	2005年	7月	8日
19. 試験計画書変更書（No.4）	2006年	9月	11日	2006年	9月	11日
20. 最終報告書	2006年	11月	13日	2006年	11月	13日

最終報告書作成者署名

試験番号：971124

表 題：ブメトリゾールのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

2006 年 11 月 13 日

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

試験責任者



被験物質名：ブメトリゾール (CAS No.3896-11-5)

試験系：チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU細胞)

試験委託者：厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設：株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地

試験目的：ブメトリゾールのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無について検討した。

準拠したガイドライン：

「OECD化学品テストガイドライン、473 In vitro 哺乳類動物細胞を用いる染色体異常試験」(1997年7月21日採択)、平成15年11月21日付(薬食発第1121002号：厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・13製局第2号：経済産業省製造産業局長、環保企発第031121002号：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」の別添「化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験」

遵守した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(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)並びにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE (OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

試験開始日：2005年 4月 1日

試験終了日：2006年 11月 13日

試験実施日：試験系細胞の再培養実施日(実験開始日) 2005年 4月 15日

細胞増殖抑制試験

細胞播種日 2005年 4月 22日

検体液添加日 2005年 4月 25日

細胞数計測日 2005年 4月 26日

染色体異常試験

1) 短時間処理法

細胞播種日 2005年 5月 6日

検体液添加日 2005年 5月 9日

標本作製及び細胞数計測日 2005年 5月 10日

2) 連続処理法

細胞播種日	2005年 5月 9日
検体液添加日	2005年 5月 12日
標本作製及び細胞数計測日	2005年 5月 13日
標本観察終了日（実験終了日）	2005年 5月 26日

資料及び標本保存場所：

この試験において当試験施設で発生したすべての資料及び標本は、株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所の資料保管室及び標本保管室にそれぞれ保存する。
保存期間は、最終報告書提出後10年間とする。

試験計画書に従わなかったこと：

該当事項はなかった。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態：

該当事項はなかった。

試験従事者及び業務分担

試験責任者:

(試験計画書の作成、検体の調製、試験の実施、細胞数の計測、標本作製、データのまとめ及び確認、最終報告書の作成)

試験従事者:

(試験の実施、細胞数の計測、標本作製、標本観察、データのまとめ及び確認)

(被験物質、陽性対照物質及び陰性対照物質の管理)

目 次

要 約	8
緒 言	9
方 法	9
1. 被験物質, 媒体, 陽性対照物質及び陰性対照物質	9
2. 検体液	10
3. 試験細胞	10
4. 培養液	11
5. S9 mix	11
6. 細胞数の調整及び細胞播種	11
7. 細胞増殖抑制試験	11
8. 染色体異常試験	12
9. 標本観察	14
10. 試験の成立条件	14
11. 統計学的方法	14
12. 判定基準	14
試験成績	15
1. 短時間処理法	15
2. 連続処理法	15
考 察	16
文 献	16

Attachment, Table, Figure, Appendix及びPhotographの目次

Attachment 1	Composition of Eagle's minimum essential medium (MEM) (List No.61100-061)	 17
Attachment 2	Preparation of S9	 18
Attachment 3	Composition of S9 mix	 18
Attachment 4	The background data of chromosomal aberration test in cultured CHL cells	 19
Table 1	Cell growth inhibition test of bumetrizole in cultured CHL cells -The short treatment method-	 20
Table 2	Cell growth inhibition test of bumetrizole in cultured CHL cells -The continuous treatment method-	 21
Table 3	Chromosomal aberration test of bumetrizole in cultured CHL cells -The short treatment method-	 22
Table 4	Chromosomal aberration test of bumetrizole in cultured CHL cells -The continuous treatment method-	 23
Figure 1	Cell growth inhibition test of bumetrizole in cultured CHL cells	 24
Appendix 1-1	Chromosomal aberration test of bumetrizole in cultured CHL cells -The short treatment method-	 25
Appendix 1-2	Chromosomal aberration test of bumetrizole in cultured CHL cells -The short treatment method-	 26
Appendix 2	Chromosomal aberration test of bumetrizole in cultured CHL cells -The continuous treatment method-	 27
Photograph 1～3		 28
Photograph 4, 5		 29

要 約

ブメトリゾールの染色体異常誘発性の有無を、ほ乳類の培養細胞(CHL/TU細胞)を用い、短時間処理法(6時間処理のS9 mix添加及びS9 mix無添加)と連続処理法(24時間処理)で検討した。

ブメトリゾールの試験濃度は、細胞増殖抑制試験の結果から、50%細胞増殖抑制濃度及び細胞の生存率を指標に、短時間処理法(S9 mix添加及びS9 mix無添加)では150, 300, 600, 1200及び2400 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法(24時間処理)では75, 150, 300, 600及び1200 $\mu\text{g/mL}$ の公比2, 5段階を設定した。

試験の結果、連続処理法及び短時間処理法とも、数的及び構造的異常細胞の出現率は5%未満であった。

各試験系列で用いた陽性対照物質は、明らかな陽性結果を示し、陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、当試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった。

以上の結果、本試験条件下において、ブメトリゾールに染色体異常誘発性はないと判定する。

緒 言

ブメトリゾールの安全性に関する非臨床試験の一環として、ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無について検討した。

方 法

1. 被験物質、媒体、陽性対照物質及び陰性対照物質

1.1 被験物質

被験物質のブメトリゾール [日本語別名：2-(2-ヒドロキシ-3-tert-ブチル-5'-メチルフェニル)-5- クロロベンゾトリアゾール, 英語名：bumetrizole, 英語別名：2-(2-Hydroxy-3-tert-butyl-5'-methylphenyl)-5-chlorobenzotriazole, CAS No. 3896-11-5, 分子量：315.80, 蒸気圧：7.5×10E-7 Pa (20℃), 融点：138-141℃, 相対密度：1.32 g/cm³ (25℃)] は、淡黄色の粉末で臭いはない。当試験には、XXXXXXXXXX から入手したもの [ロット番号：01721IW4, 含量：99.9 %] を用いた。入手後は、試験施設の被験物質保管室の保管庫内に室温 (設定：23℃, 実測値：20.0～25.3℃) ・密閉の条件下で保管した。

入手後に試験施設で被験物質を分析した結果、含量は99.5%であった。ブメトリゾールのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (試験番号: 100624) の投与期間終了後に試験施設で被験物質を再分析した結果、含量は100.6%であり、使用期間中の安定性が確認された。

1.2 媒体

媒体には、ジメチルスルホキシド [以下DMSO, 紫外吸収スペクトル用, ロット番号：PU140, 使用期限：2009年2月26日 (自社規定), 株式会社同仁化学研究所] を用いた。DMSOは、使用時まで試験施設の被験物質保管室の保管庫内に、室温 (設定：23℃, 実測値：20.4～24.9℃) ・遮光の条件下で保管した。

1.3 陽性対照物質

試験には、マイトマイシンC (以下MMC) とジメチルニトロサミン (以下DMN) を用いた。

MMC [商品名：マイトマイシン注用2 mg, 1バイアル中に、日局マイトマイシンC 2 mg (力価) と日局塩化ナトリウム48 mgを含有, ロット番号：417ACG, 使用期限：2007年7月, 協和発酵工業株式会社] と、DMN [純度：99.4%, ロット番号：DWP3368, 使用期限：2007年2月21日 (自社規定), 和光純薬工業株式会社] は、いずれも市販品を購入した。購入後は、いずれも使用時まで当試験施設の被験物質保管室の保管庫内に、冷蔵 (設定：4℃, 実測値：3.5～6.7℃, 冷蔵庫：MPR-311D, 三洋電機株式会社) の条件下で保管した。

1.4 陰性対照物質

陰性対照物質は、被験物質の媒体として用いたDMSOとした。

2. 検体液

2.1 被験物質

被験物質の必要量を秤量(電子天秤：AT261，メトラー・トレド株式会社)し，DMSOに懸濁して最高濃度液(細胞増殖抑制試験：643.2 mg/mL，染色体異常試験の短時間処理法：482.4 mg/mL，連続処理法：241.2 mg/mL)を調製した。最高濃度液より低い濃度液は，最高濃度液からDMSOで段階希釈して調製した。調製は用時に行い，使用後の残液は廃棄処分した。なお，当試験における表示濃度は培養液に添加したときの最終濃度であるため，各調製液はあらかじめ表示濃度の201倍の濃度を調製した。

2.2 陽性対照物質

MMC及びDMNとも，生理食塩液(局方品，ロット番号：K3G70，株式会社大塚製薬工場)に溶解して必要濃度(表示濃度の11倍)を調製した。調製は用時に行い，使用後の残液は廃棄処分した。

	物質名	調製濃度 (μg/mL)	試験濃度 (μg/mL)
連続処理法	MMC	0.55	0.05
短時間処理法	DMN	5500	500
	MMC	1.1	0.1

3. 試験細胞

試験には，2000年11月28日に大日本製薬株式会社ラボラトリプロダクツ部から入手したチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を用いた。細胞は，DMSOを10 %添加した培養液に浮遊して，1 mLに小分けをして液体窒素保存容器内に凍結保存した。試験に際し，凍結してある細胞(継代数：15回，染色体モード数：25本，倍化時間：16.9時間，マイコプラズマ：陰性)を融解し，増殖させて使用した。

細胞の継代は，培養ビン(Nunc製)を用いて3～4日ごとに行った。以下に各試験における再培養からの継代数を示した。

細胞増殖抑制試験		3回
染色体異常試験(短時間処理法)		7回
染色体異常試験(連続処理法)		8回

なお，実験操作は空調設備を備えた染色体異常試験室(A棟)で行った。

4. 培養液

Eagleの最少必須培養液(Eagle's minimum essential medium, 以下Eagle's MEM)の組成を, Attachment 1に示した。

培養液は, Eagle's MEM粉末(ロット番号: 1231892, GIBCO, リストNo.61100-061)と炭酸水素ナトリウムを注射用水に溶解し, 1Nの塩酸でpHを7.0~7.1(実測値: pH 7.044)に調整した。メンブランフィルター(φ0.22 μm, 日本ミリポア株式会社)で濾過した後, 非働化(56°C, 30分)した仔牛血清(ロット番号: 511116, GIBCO)を最終調製量の10%となるように加えて調製した。なお, 調製した培養液は用時に37°Cに加温して使用した。

5. S9 mix

S9は, Attachment 2の条件により2005年1月21日にオリエンタル酵母工業株式会社で製造されたもの(ロット番号: 05012111)を使用した。S9は, 2005年2月10日に購入し, 使用時まで-80°C設定の冷凍庫[型式: BFV-130(LR), エスペック株式会社]内に凍結保管した。

S9 mixは, S9以外の各物質を調製混合して溶液とし, これをメンブランフィルター(φ0.2 μm, Nalge)で濾過した後, 使用直前にS9を加えて調製した。S9 mixの組成をAttachment 3に示した。

6. 細胞数の調整及び細胞播種

培養ビンに0.25%トリプシン液を加えて細胞を剥離し, 遠心分離[1000 rpm, 5分間, 小形冷却遠心機(型式: CF 5RX, 日立工機株式会社), 以下同様]により細胞を回収した後, 新鮮な培養液を加えて細胞浮遊液を作製した。この浮遊液中の細胞数を血球計算盤を用いて計測し, 細胞数が 2×10^4 個/5 mLになるように培養液を加えて調整した。調整した細胞浮遊液を5 mLずつ, 直径60 mmの滅菌シャーレ(CORNING)に播種し, 温度を37 °C, CO₂濃度を5%に設定した炭酸ガスインキュベーター(型式: BNA-121D, エスペック株式会社, 以下CO₂インキュベーター)内で3日間培養したものを試験に用いた。

シャーレは, 細胞増殖抑制試験では1濃度につき1枚を, 染色体異常試験では1濃度につき細胞数の計測用に1枚, 染色体標本作製用に2枚を用いた。また, シャーレには試験番号, 被験物質名又は対照物質名, 濃度を記入し, さらに短時間処理法の場合はS9 mixの有無を, 連続処理法の場合は培養時間を記入することにより識別した。

7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験におけるブメトリゾールの試験濃度を設定するために, 細胞増殖抑制試験を行った。試験は, 短時間処理法のS9 mix添加及びS9 mix無添加と連続処理法の24時間処理の3系列で実施した。

短時間処理法では, S9 mix添加用シャーレからは培養液を2.5 mL除去した後, ここにS9 mix 0.5 mLと検体液15 μLを添加した。S9 mix無添加用シャーレからは培養液を2.0 mL除去した後, 検体液をS9 mix添加の

場合と同様に添加した。いずれのシャーレもCO₂インキュベーター内で6時間培養した後、新鮮な培養液5.0 mLに取り替え、さらに18時間培養した。一方、連続処理法では、シャーレに検体液25 μ Lを添加し、CO₂インキュベーター内で24時間培養した。

いずれの試験系列とも、検体液添加時と処理終了時に被験物質の析出の有無を肉眼的に観察した。

短時間処理法及び連続処理法とも、培養終了後、各シャーレに0.25 %トリプシン液を約3 mL添加して細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後に血球計算盤を用いて、生細胞数を計測した。計測は1枚のシャーレ当たり3回行い、その平均値を用いて陰性対照群の生細胞数を100%として各濃度における細胞の生存率を求めた。

試験濃度は、短時間処理法及び連続処理法とも「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)に基づき、10 mM相当の3200 μ g/mLを最高濃度とし、以下公比2により1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5及び6.25 μ g/mLの計10濃度を設定し、その他に陰性対照を設けた。

短時間処理法の結果をTable 1及びFigure 1に示した。

S9 mix添加における細胞の生存率は、6.25~400 μ g/mLでは90 %以上を示したが、800 μ g/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の3200 μ g/mLでは27%であった。

S9 mix無添加における細胞の生存率は、6.25~400 μ g/mLでは90 %以上を示したが、800 μ g/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の3200 μ g/mLでは23 %であった。

Probit法により算出した50%細胞増殖抑制濃度(IC₅₀)は、S9 mix添加では2020.9 μ g/mL、S9 mix無添加では1864.9 μ g/mLであった。

なお、検体液添加時及び処理終了時に、S9 mix添加及びS9 mix無添加とも、50 μ g/mL以上の濃度において白色の油膜状の析出物及び白色の微細な析出物が認められた。

連続処理法の結果をTable 2及びFigure 1に示した。

細胞の生存率は、6.25~200 μ g/mLでは90 %以上を示したが、400 μ g/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の3200 μ g/mLでは8 %であった。

Probit法により算出したIC₅₀は、836.6 μ g/mLであった。

なお、検体液添加時及び処理終了時に、50 μ g/mL以上の濃度において白色の油膜状の析出物及び白色の微細な析出物が認められた。

8. 染色体異常試験

試験は、短時間処理法のS9 mix添加及びS9 mix無添加と連続処理法の24時間処理の3系列で実施した。

8.1 試験濃度及び処理群

試験濃度は、細胞増殖抑制試験の結果に基づき、IC₅₀及び細胞の生存率を指標に、短時間処理法のS9 mix添加及びS9 mix無添加では150, 300, 600, 1200及び2400 μ g/mL、連続処理法(24時間処理)では75, 150, 300, 600及び1200 μ g/mLの公比2, 5段階を設定した。

処理群は、各試験系列ごとに被験物質、陰性対照及び陽性対照群を設けた。陽性対照として短時間処理法のS9 mix添加にはDMN (500 $\mu\text{g/mL}$) を、S9 mix無添加にはMMC (0.1 $\mu\text{g/mL}$) を、連続処理法にはMMC (0.05 $\mu\text{g/mL}$) を用いた。

8.2 検体液の処理

8.2.1 短時間処理法

S9 mix添加用シャーレからは培養液を2.5 mL除去した後に、S9 mix 0.5 mLと被験物質及び陰性対照物質の場合は15 μL を、陽性対照物質の場合は0.3 mLを添加した。S9 mix無添加用シャーレからは培養液を2.0 mL除去した後に、検体液をS9 mix添加の場合と同様に添加した。いずれのシャーレもCO₂インキュベーター内で6時間培養した後、新鮮な培養液5.0 mLに取り替え、さらに18時間培養してから染色体標本の作製及び生細胞数の計測をした。なお、検体液添加時と処理終了時に被験物質の析出の有無を肉眼的に観察した。

8.2.2 連続処理法

シャーレに、被験物質及び陰性対照物質の場合は25 μL を、陽性対照物質の場合は0.5 mLを添加し、CO₂インキュベーター内で24時間培養した後に染色体標本の作製及び生細胞数の計測をした。なお、検体液添加時と処理終了時に被験物質の析出の有無を肉眼的に観察した。

8.2.3 標本作製

短時間処理法及び連続処理法とも、培養終了2時間前に10 $\mu\text{g/mL}$ 濃度のコルセミド液を各シャーレに0.1 mL添加して、分裂中期細胞を得た。培養終了後、各シャーレに0.25%トリプシン液を約3 mL加えて細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後、75 mmol/L塩化カリウム水溶液で低張処理(37 °C, 15分間)をした。低張処理が終了した後、再び遠心分離し、メタノールと酢酸を3:1の割合で混合して氷冷した固定液で脱水固定を行い、同固定液で細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液をスライドガラス上の2カ所に一滴ずつ滴下して細胞を広げ、乾燥後、2%のGiemsa染色液で約15分間染色した。

スライド標本は1シャーレ当たり3枚作製し、乱数を用いてコード番号を割り付けた。なお、観察終了後にスライド標本は、試験番号、被験物質名又は対照物質名、濃度、試験法、S9 mixの有無(短時間処理法)又は培養時間(連続処理法)、標本作製日を記入したラベルを貼付した。

8.2.4 細胞数の計測

短時間処理法及び連続処理法とも、培養終了後、各シャーレに0.25%トリプシン液を約3 mL添加して細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後に血球計算盤を用いて、生細胞数を計測した。

計測は1枚のシャーレ当たり3回行い、その平均値を用いて陰性対照群の生細胞数を100%として各濃度における細胞の生存率を求めた。

9. 標本観察

石館の方法¹⁾を参考にして、染色体がよく広がった分裂中期像の細胞を1シャーレ当たり100個、1濃度当たり200個観察した。標本の観察はコード番号順に行い、観察結果と試験濃度との照合は、各処理法ごとに標本観察終了後に行った。

染色体異常は、数的異常と構造的異常に分類した。数的異常は倍数体(polyploid)及び核内倍化(endoreduplication)を観察対象とし、構造的異常は①ギャップ(以下gap)、②染色分体型切断(chromatid break, 以下ctb)、③染色分体型切断(chromosome break, 以下csb)、④染色分体型交換(chromatid exchange, 以下cte)、⑤染色分体型交換(chromosome exchange, 以下cse)、⑥断片化(fragmentation, 以下frg)に分類し、これらの染色体異常を有する細胞を陽性細胞1個として記録した。なお、ギャップと切断の判別は、染色体又は染色分体の断片が軸の同一線上にあるものをギャップとし、同一線上からはずれているものを切断としたが、断片が同一線上にあっても非染色性部分が染色分体幅より大きいものは切断とした。染色体異常の総数は、ギャップを含めた場合と含めない場合とに分けて記録した。

当試験で認められた染色体異常を、型別に代表例について写真撮影した(Photograph 1〜5)。

10. 試験の成立条件

陰性対照群において、染色体異常を有する細胞の出現率が5%未満で、陽性対照群においてギャップ以外の染色体異常を有する細胞の出現率が10%以上を示し、さらに陰性及び陽性対照群の染色体異常の出現率が、ほぼ当試験施設のバックグラウンドデータ(Attachment 4)の範囲内を示し、試験系に影響した他の要因がない場合に試験成立とした。

11. 統計学的方法

染色体異常を有する細胞の出現率は、下記の判定基準に従ったため有意差検定は行わなかった。

12. 判定基準

試験の結果は、数的異常又は構造的異常を有する細胞の出現率が5%未満の場合を陰性、5%以上10%未満の場合を疑陽性とした。さらにその出現率が10%以上を示し、濃度に依存して増加した場合を陽性とした。なお、構造的異常の染色体を有する細胞の出現率は、ギャップを含めた場合と含めない場合で算出し、ギャップを含めない場合の出現率により判定した。

試験成績

1. 短時間処理法

試験結果をTable 3 (Appendix 1-1～1-2)に示した。

ブメトリゾール処理群の数的異常細胞の出現率は、S9 mix添加及びS9 mix無添加ともすべての濃度で1.5 %以下と陰性であった。同様に、構造的異常細胞の出現率も、S9 mix添加及びS9 mix無添加とも、すべての濃度で1.0 %以下と陰性であった。

ブメトリゾール処理群のS9 mix添加における細胞の生存率は、150及び300 $\mu\text{g/mL}$ では90 %以上を示したが、600 $\mu\text{g/mL}$ 以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の2400 $\mu\text{g/mL}$ では34 %であった。S9 mix無添加における細胞の生存率は、150及び300 $\mu\text{g/mL}$ では90 %以上を示したが、600 $\mu\text{g/mL}$ 以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の2400 $\mu\text{g/mL}$ では34 %であった。

検体液添加時及び処理終了時に、S9 mix添加及びS9 mix無添加とも、すべての濃度において白色の油膜状の析出物及び白色の微細な析出物が認められた。

陰性対照の数的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では0.5 %、S9 mix無添加では0 %であった。構造的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では0 %、S9 mix無添加では0.5 %であった。また、陽性対照 (S9 mix添加 : DMN ; 500 $\mu\text{g/mL}$, S9 mix無添加 : MMC ; 0.1 $\mu\text{g/mL}$) の数的異常細胞の出現率は、S9 mix添加及びS9 mix無添加とも0 %であった。構造的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では72.5 %、S9 mix無添加では52.5 %であった。

陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、バックグラウンドデータの範囲内であり、試験条件を満たすものであった。

2. 連続処理法

試験結果をTable 4 (Appendix 2)に示した。

ブメトリゾール処理群の数的異常細胞の出現率は、すべての濃度で1.5 %以下と陰性であった。同様に、構造的異常細胞の出現率も、すべての濃度で1.0 %以下と陰性であった。

ブメトリゾール処理群の細胞の生存率は、75及び150 $\mu\text{g/mL}$ では90 %以上を示したが、300 $\mu\text{g/mL}$ 以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の1200 $\mu\text{g/mL}$ では34 %であった。

検体液添加時及び処理終了時に、すべての濃度において白色の油膜状の析出物及び白色の微細な析出物が認められた。

陰性対照における数的異常細胞の出現率は0 %、構造的異常細胞の出現率は0.5 %であった。また、陽性対照 (MMC : 0.05 $\mu\text{g/mL}$) における数的異常細胞の出現率は0 %、構造的異常細胞の出現率は43.5 %であった。

陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、バックグラウンドデータの範囲内であり、試験条件を満たすものであった。

考 察

ブメトリゾールの染色体異常誘発性の有無を、ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験により検討した。ブメトリゾール処理群の数的異常細胞及び構造的異常細胞の出現率は、いずれの試験系列においても、5%に満たなかったため、ブメトリゾールは数的異常及び構造的異常のいずれも誘発しないものと思われる。連続処理法及び短時間処理法の各試験系列において、陰性対照及び陽性対照群の異常細胞出現率は、バックグラウンドデータの範囲内であり、試験の成立条件を満たすものであった。

以上の結果、本試験条件下において、ブメトリゾールに染色体異常誘発性はないと判定する。なお、ブメトリゾールは当試験施設で同時期に実施した細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性の結果が得られている²⁾。また、関連物質の2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールでは復帰変異試験³⁾、染色体異常試験⁴⁾で陰性との報告がある。

文 献

- 1) 石館 基監修：染色体異常試験データ集(改訂増補)，株式会社エル・アイ・シー（東京，1987）。
- 2) ████████：ブメトリゾールの細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号：901924），株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所（2006）。
- 3) ████████：化学物質毒性試験報告，10，237（2003）。
- 4) ████████：化学物質毒性試験報告，10，243（2003）。

Attachment 1. Composition of Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (List No.61100-061)

Constituents	Concentration (mg/L) *	Constituents	Concentration (mg/L) *
CaCl ₂ (anhyd.)	200	L-Methionine	15
KCl	400	L-Phenylalanine	32
MgSO ₄ (anhyd.)	97.67	L-Threonine	48
NaCl	6800	L-Tryptophane	10
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	140	L-Tyrosine (disodium salt)	52.1
		L-Valine	46
D-Glucose	1000		
Phenol red	10		
L-Arginine · HCl	126	D-Ca pantothenate	1
L-Cystine · 2HCl	31.29	Choline chloride	1
L-Glutamine	292	Folic acid	1
L-Histidine HCl · H ₂ O	42	Iso-Inositol	2
L-Isoleucine	52	Nicotinamide	1
L-Leucine	52	Pyridoxal · HCl	1
L-Lysine · HCl	72.5	Riboflavin	0.1
		Thiamine · HCl	1

*: Final concentration in distilled water per liter.

Attachment 2. Preparation of S9

Animal used		Inducing substance	
Species, Strain	Rat, Crj : CD (SD)	Name	Phenobarbital (PB)
Sex	Male		5,6-Benzoflavone (BF)
Age	7 weeks	Administration method	i.p.
Body weight	216.4±8.9 g* (n=45)	Day of administration and Dose	day 1 PB 30mg/kg day 2,3 and 4 PB 60mg/kg day 3 BF 80mg/kg

*: Mean±S.D.

Attachment 3. Composition of S9 mix

Constituents	Quantity in 1mL S9 mix	Constituents	Quantity in 1mL S9 mix
S9	0.3 mL	Glucose-6-phosphate	5 μ mol
MgCl ₂	5 μ mol	NADP	4 μ mol
KCl	33 μ mol	HEPES buffer (pH 7.2)	4 μ mol

Attachment 4.

The background data of chromosomal aberration test in cultured CHL cells

Test cells : A fibroblast cell line from the lung of a Chinese hamster (CHL/IU)

Supplier of cells : Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.

Date of supply of cells : 2000.11.28

Accumulation of data : 2004.3.2 ~ 2004.12.24

	Time	S9 mix	Cell number		Numerical aberration		Structural aberration							
					Polyploid	endoreduplication	gap	ctb	csb	cte	cse	frg	Total (+g)	Total (-g)
Negative control	24-0	—	1600	Mean±S.D. (min / max)	0.3±0.45 (0 / 1)	0±0 (0 / 0)	0±0 (0 / 0)	0.1±0.34 (0 / 1)	0±0 (0 / 0)	0.1±0.34 (0 / 1)	0±0 (0 / 0)	0±0 (0 / 0)	0.3±0.45 (0 / 1)	0.3±0.45 (0 / 1)
	6-18	+	1600	Mean±S.D. (min / max)	0.4±0.51 (0 / 1)	0±0 (0 / 0)	0±0 (0 / 0)	0.1±0.25 (0 / 1)	0±0 (0 / 0)	0.2±0.40 (0 / 1)	0.1±0.34 (0 / 1)	0±0 (0 / 0)	0.4±0.62 (0 / 2)	0.4±0.62 (0 / 2)
	6-18	—	1600	Mean±S.D. (min / max)	0.2±0.40 (0 / 1)	0±0 (0 / 0)	0±0 (0 / 0)	0.2±0.75 (0 / 3)	0±0 (0 / 0)	0.3±0.45 (0 / 1)	0±0 (0 / 0)	0±0 (0 / 0)	0.4±0.81 (0 / 3)	0.4±0.81 (0 / 3)
MMC 0.05µg/mL	24-0	—	1600	Mean±S.D. (min / max)	0.4±0.51 (0 / 1)	0±0 (0 / 0)	0±0 (0 / 0)	19.9±5.59 (10 / 30)	0.1±0.25 (0 / 1)	30.8±3.08 (26 / 35)	0.3±0.45 (0 / 1)	0±0 (0 / 0)	43.0±1.86 (41 / 47)	43.0±1.86 (41 / 47)
DMN 500µg/mL	6-18	+	1600	Mean±S.D. (min / max)	0±0 (0 / 0)	0±0 (0 / 0)	0±0 (0 / 0)	23.9±4.60 (17 / 31)	0±0 (0 / 0)	58.6±4.83 (51 / 68)	0.3±0.45 (0 / 1)	0.1±0.34 (0 / 1)	68.3±3.75 (62 / 76)	68.3±3.75 (62 / 76)
MMC 0.1µg/mL	6-18	—	1600	Mean±S.D. (min / max)	0.2±0.54 (0 / 2)	0±0 (0 / 0)	0±0 (0 / 0)	26.8±4.85 (16 / 36)	0±0 (0 / 0)	38.5±4.75 (31 / 46)	0.1±0.25 (0 / 1)	0±0 (0 / 0)	54.1±5.02 (49 / 68)	54.1±5.02 (49 / 68)

(min / max) : No. of cells with numerical or structural aberration observed in 100 cells.

Hashima Laboratory , Nihon Bioresearch Inc.

Table 1. Cell growth inhibition test of bumetrizole in cultured CHL cells
-The short treatment method-

Test Substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Treated for 6 hr with S9 mix			Treated for 6 hr without S9 mix		
		No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	70	100	—	64	100	—
bumetrizole	6.25	68	97	2020.9	61	95	1864.9
	12.5	68	97		60	94	
	25	70	100		63	98	
	50*	68	97		62	97	
	100*	68	97		61	95	
	200*	65	93		60	94	
	400*	63	90		58	91	
	800*	57	81		49	77	
	1600*	33	47		26	41	
	3200*	19	27		15	23	

a): (bumetrizole treated group / negative control) $\times 100$.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Table 2. Cell growth inhibition test of bumetrizole in cultured CHL cells
-The continuous treatment method-

Test Substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Treated for 24 hr		
		No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	63	100	—
bumetrizole	6.25	62	98	836.6
	12.5	61	97	
	25	59	94	
	50*	58	92	
	100*	58	92	
	200*	57	90	
	400*	53	84	
	800*	35	56	
	1600*	18	29	
	3200*	5	8	

a): (bumetrizole treated group / negative control) $\times 100$.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Table 3. Chromosomal aberration test of bumetrizole in cultured CHL cells
— The short treatment method —

Test substance	Concentration (μg/mL)	With (+) or without (-) S9 mix	No.of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations											Survival ratio ^{e)} (%)
				No.of Polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No.of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)		Judgement ^{b)}	
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)		
Negative control	—	+	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	100
bumetrizole	150*	+	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	96
	300*	+	200	0	0	0	—	0	1	0	1	0	0	2	2	1.0	1.0	—	91
	600*	+	200	0	0	0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	85
	1200*	+	200	3	0	1.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	51
	2400*	+	200	3	0	1.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	34
Dimethylnitrosamine	500	+	200	0	0	0	—	0	66	0	124	2	0	145	145	72.5	72.5	+	85
Negative control	—	—	200	0	0	0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	100
bumetrizole	150*	—	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	95
	300*	—	200	0	0	0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	95
	600*	—	200	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	89
	1200*	—	200	3	0	1.5	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	48
	2400*	—	200	2	0	1.0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	34
Mitomycin C	0.1	—	200	0	0	0	—	0	53	0	75	0	0	105	105	52.5	52.5	+	88

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; $\pm$: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times 100$.

e): (bumetrizole treated group or positive control / negative control) $\times 100$.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Table 4. Chromosomal aberration test of bumetrizole in cultured CHL cells
— The continuous treatment method —

Test substance	Concentration (μg/mL)	Time of treatment (hr)	No.of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)	
				No.of Polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No.of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)			Judgement ^{b)}
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)		
Negative control	—	24	200	0	0	0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	100
bumetrizole	75*	24	200	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	97
	150*	24	200	2	0	1.0	—	0	1	0	0	1	0	2	2	1.0	1.0	—	92
	300*	24	200	1	0	0.5	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	88
	600*	24	200	3	0	1.5	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	62
	1200*	24	200	2	0	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	34
Mitomycin C	0.05	24	200	0	0	0	—	0	40	0	56	0	0	87	87	43.5	43.5	+	88

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times 100$.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; $\pm$: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times 100$.

e): (bumetrizole treated group or positive control / negative control) $\times 100$.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

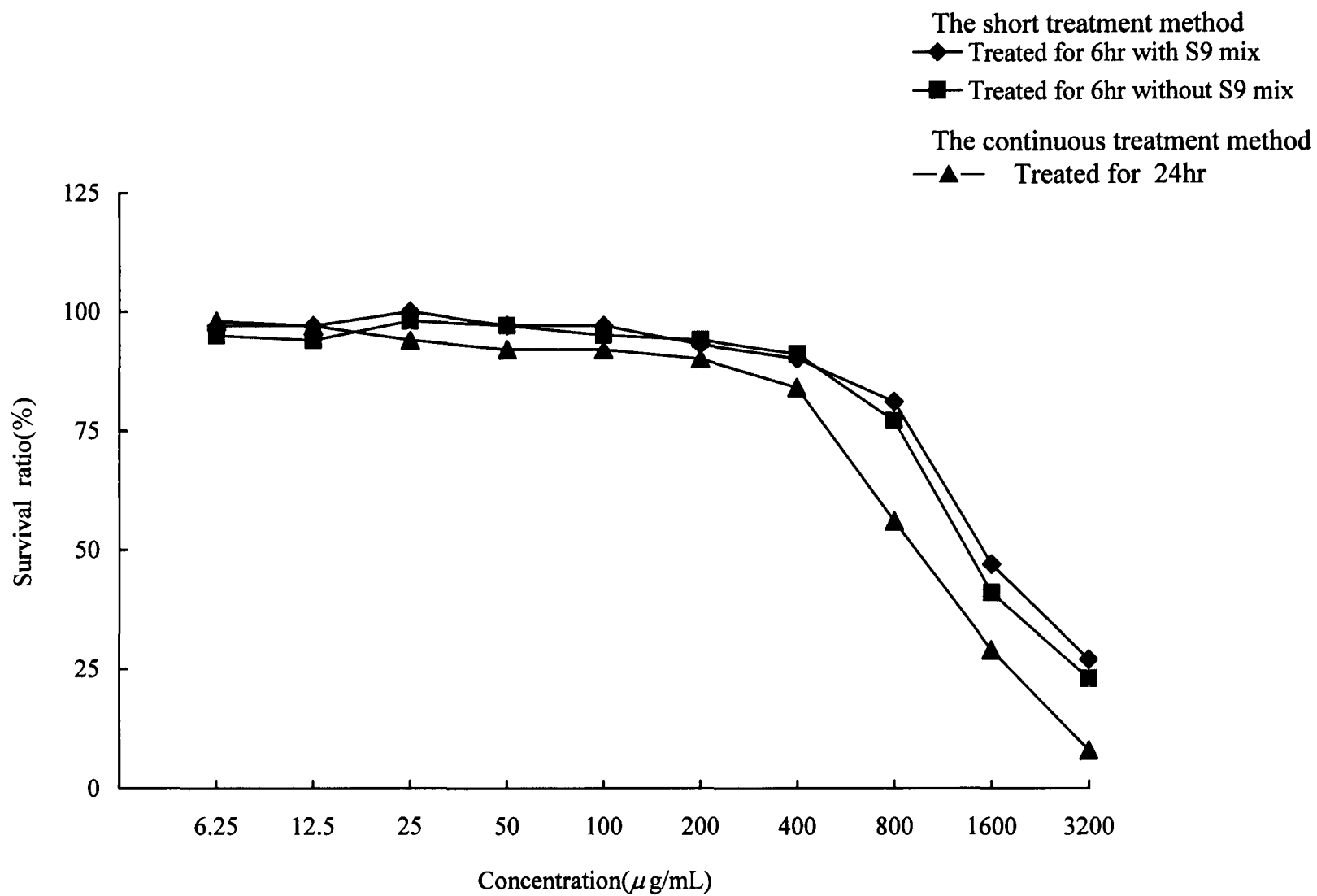


Figure 1. Cell growth inhibition test of bumetrizole in cultured CHL cells.

Appendix 1-1. Chromosomal aberration test of bumetizole in cultured CHL cells
-The short treatment method-

Test substance	Concentration (μg/mL)	With (+) or without (-) S9 mix	No.of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations											Survival ratio ^{e)} (%)		
				No.of Polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)							No.of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)			Judgement ^{b)}	
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)				
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	+	100	0	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	100	
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
bumetizole	150*	+	100	0	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	96	
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	300*	+	100	0	0	0	—	0	1	0	1	0	0	2	2	1.0	1.0	—	91		
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	600*	+	100	0	0	0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	85		
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	1200*	+	100	1	0	1.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	51	
			100	2	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	2400*	+	100	2	0	1.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	34
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Dimethylnitrosamine	500	+	100	0	0	0	—	0	32	0	63	1	0	73	73	72.5	72.5	+	85		
			100	0	0			0	34	0	61	1	0	72	72						

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times$ 100.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; $\pm$: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times$ 100.

e): (bumetizole treated group or positive control / negative control) $\times$ 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Appendix 1-2. Chromosomal aberration test of bumetizole in cultured CHL cells
-The short treatment method-

Test substance	Concentration (μg/mL)	With (+) or without (-) S9 mix	No.of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)	
				No.of Polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No.of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)			Judgement ^{b)}
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)		
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	—	100	0	0	0	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	100
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0					
bumetizole	150*	—	100	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	95
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0				
	300*	—	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	95
			100	0	0			0	1	0	0	0	1	1					
	600*	—	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	89
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0					
	1200*	—	100	2	0	1.5	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	48
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0					
	2400*	—	100	0	0	1.0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	34
			100	2	0			0	0	0	0	0	0	0					
Mitomycin C	0.1	—	100	0	0	0	—	0	32	0	39	0	0	55	55	52.5	52.5	+	88
			100	0	0			0	21	0	36	0	0	50	50				

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times$ 100.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; $\pm$: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times$ 100.

e): (bumetizole treated group or positive control / negative control) $\times$ 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Appendix 2. Chromosomal aberration test of bumetizole in cultured CHL cells
—The continuous treatment method—

Test substance	Concentration (μg/mL)	Time of treatment (hr)	No.of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)		
				No.of Polyploid cells	No.of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)						No.of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)			Judgement ^{b)}	
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)			
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	24	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	100	
			100	0	0			0	1	0	0	1	1							
bumetizole	75*	24	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	97	
			100	0	0			0	0	0	0	0	0							
	150*	24	100	1	0	1.0	—	0	0	0	0	1	0	1	1	1.0	1.0	—	92	
			100	1	0			0	1	0	0	0	1	1						
	300*	24	100	0	0	0.5	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	88	
			100	1	0			0	0	0	0	0	0	0						
	600*	24	100	1	0	1.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	—	62	
			100	2	0			0	1	0	0	0	1	1						
	1200*	24	100	2	0	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	34
			100	0	0			0	0	0	0	0	0	0						
Mitomycin C	0.05	24	100	0	0	0	—	0	20	0	26	0	0	44	44	43.5	43.5	+	88	
			100	0	0			0	20	0	30	0	0	43	43					

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) $\times$ 100.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ; $\pm$: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) $\times$ 100.

e): (bumetizole treated group or positive control / negative control) $\times$ 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

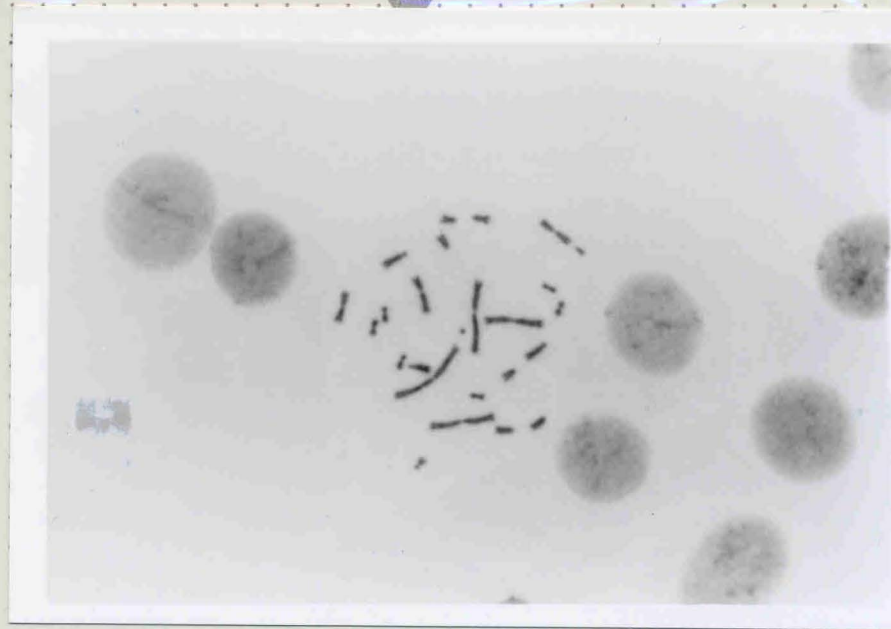
No.

Photograph 1

Negative control

The continuous treatment method
(24 hr)

Type :normal



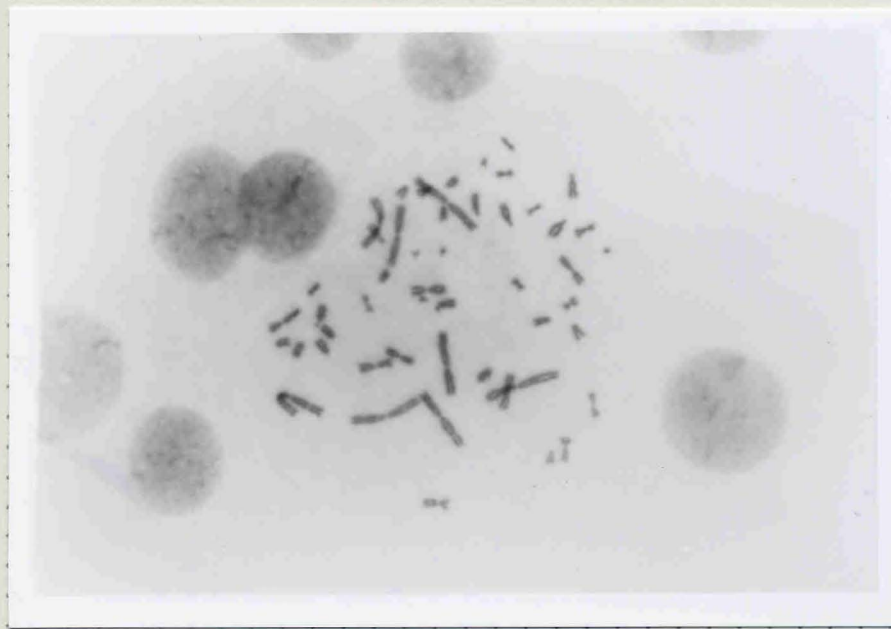
No.

Photograph 2

bumetrizole 2400 $\mu\text{g/mL}$

The short treatment method
(+S9 mix)

Type :polyploid



No.

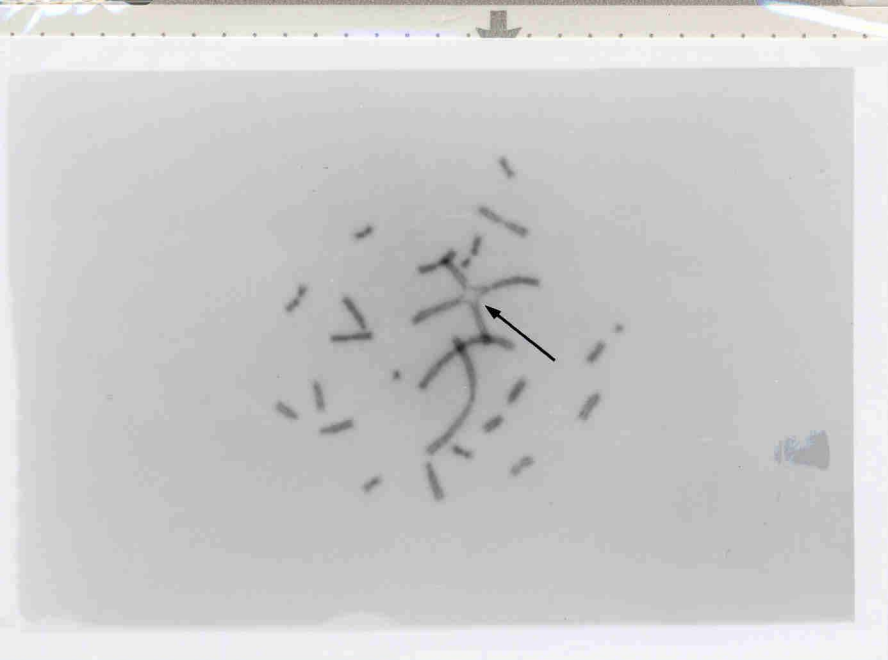
Photograph 3

bumetrizole 600 $\mu\text{g/mL}$

The continuous treatment method
(24 hr)

Type :ctb





No.

Photograph 4

MMC 0.1 $\mu\text{g/mL}$

The short treatment method
(-S9 mix)

Type : cte



No.

Photograph 5

bumetrizole 150 $\mu\text{g/mL}$

The continuous treatment method
(24 hr)

Type : cse

No.

←E·L



R2100
古紙配合率100%
再生紙を使用しています