

最 終 報 告 書

C.I. フルオレセントブライトナー271 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：7816 (115-181)

平成17年11月11日

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約.....	5
12. 被験物質.....	8
13. 試験材料および方法.....	10
14. 試験結果.....	18
15. 考察および結論.....	20
16. 参考文献.....	22

Figures

Figure 1	Growth inhibition of CHL cells treated with 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3- sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]]bis-, hexasodium salt [Short-term treatment].....	24
Figure 2	Growth inhibition of CHL cells treated with 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3- sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]]bis-, hexasodium salt [Continuous treatment]	25
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3- sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]]bis-, hexasodium salt [Short-term treatment: -S9]	26

Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3- sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]]bis-, hexasodium salt [Short-term treatment: +S9].....	27
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3- sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]]bis-, hexasodium salt [Continuous treatment: 24h]	28
Tables		
Table 1	Results of growth inhibition test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3- sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]]bis-, hexasodium salt [Short-term treatment].....	29
Table 2	Results of growth inhibition test of 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3- sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]]bis-, hexasodium salt [Continuous treatment]	30
Table 3	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3- sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]]bis-, hexasodium salt [Short-term treatment: -S9].....	31
Table 4	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3- sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]]bis-, hexasodium salt [Short-term treatment: +S9]	32
Table 5	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3- sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]]bis-, hexasodium salt [Continuous treatment: 24h].....	33

1. 要約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、C.I. フルオレセントブライトナー271 は弱いながらも染色体異常を誘起する可能性があるものと判断した。

C.I. フルオレセントブライトナー271 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・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に染色体異常試験の用量を設定した。短時間処理法-S9 処理ならびに同+S9 処理では 1250, 2500 および 5000 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、C.I. フルオレセントブライトナー271 処理群の場合、-S9 処理において用量依存性を伴い、統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な染色体構造異常の誘発が認められた (陽性)。ただし、 D_{20} 値 (観察細胞の 20% に何れかの異常がみられる濃度) の最小値は 11.6 mg/mL であり、染色体異常の誘発頻度は最高でも 9.0% であることから、非常に弱い反応であると考えられた。+S9 処理においては、1 用量のみ統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な染色体構造異常の誘発が認められたが、用量依存性は認められず、背景データ (Appendix 4) による陰性対照の基準値内であったことから陰性と判定した。

-S9 処理における陽性反応が弱い反応であったことから、長時間処理について評価するため連続処理法 24 時間処理による試験を追加して実施した。連続処理法では 78.1, 156, 313 および 625 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、用量依存性を伴い、統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な染色体構造異常の誘発が認められたが、その誘発頻度は最高でも 3.0% であり、背景データによる陰性対照の基準値内であった。したがって、連続処理法で認められた増加傾向は陽性反応ではないと判断した。

なお、数的異常については、いずれの処理法においても統計学的に有意な増加は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法の陽性対照物質であるマイトマイシン C (MMC) ならびに同+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) 処理群では、染色体構造異常の出現頻度が上昇しており、陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な増加を示した。

試験終了日 :

平成 17 年 11 月 11 日

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

C.I. フルオレセントブライトナー271

(英名 : 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt)

12.2. ロット番号

12.3. 純度／含量

91.0%

12.4. 不純物の名称および濃度

NaCl : 0.32%, Na₂SO₄ : 0.01%, 水 : 6.3%,

残り 2.37%不明 (各成分 1%未満)

12.5. 製造元

12.6. 保存条件

室温

12.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (C-3 : 実測値 17.9~29.8℃, 2004 年 7 月 28 日~2005 年 1 月 17 日)

12.8. CAS No.

41267-43-0

12.9. 化学名

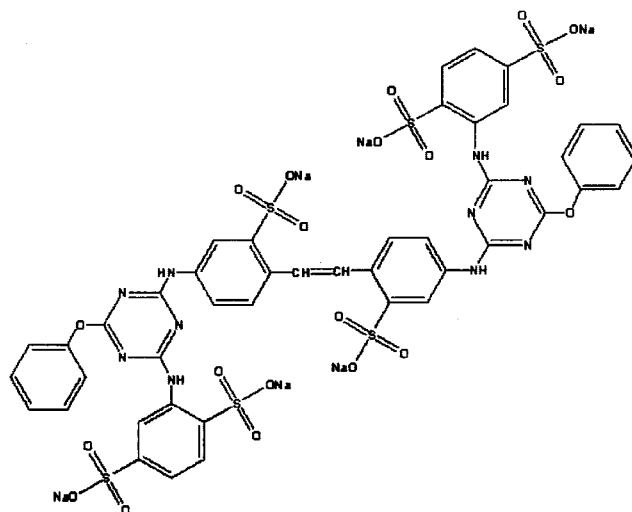
1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt

12.10. 一般名

スチルベン系蛍光増白剤

フルオレスセントー271

12.11. 化学構造



12.12. 分子式

$C_{44}H_{28}N_{10}Na_6O_{20}S_6$

12.13. 分子量

1347.08

12.14. 物質の状態

淡黄色結晶

12.15. 溶解性

水に可溶，有機溶媒に不溶～難溶

12.16. 残余被験物質の処理

1 g を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し，残りは安定性分析のため，被験物質等管理責任者を介して へ返却した。分析の結果 (2005 年 10 月 27 日付報告)，被験物質が安定であることが確認された。

13. 試験材料および方法

13.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、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）を使用した。CHL/IU 細胞は昭和 59 年 11 月 15 日に国立衛生試験所（現 国立医薬品食品衛生研究所）から分与を受け、ジメチルスルホキシド（DMSO, GC 用, 純度 99.9%, Lot No. K26414578, Merck）を容量比で 10% 添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結した細胞を融解した後、3～5 日ごとに継代したものを使用した。

なお、細胞増殖抑制試験では継代数 21 の細胞を、染色体異常試験では継代数 26 の細胞を、染色体異常試験（追加試験—連続処理法 24 時間処理）では継代数 21 の細胞を用いた。

凍結ロット毎にマイコプラズマ汚染検査（陰性）、倍加時間の測定（17.9 時間）、染色体数（モード数 25 本の細胞が 82%）の測定ならびに陰性対照および陽性対照における構造異常出現頻度の確認を実施し、異常のない細胞を試験に使用した。

13.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（IWAKI, Lot No. 515014 【用量設定試験】および 317064 【染色体異常試験および追加試験】、旭テクノグラス）に非働化（56°C, 30 分）済み仔牛血清（Lot No. 427252 【用量設定試験, 染色体異常試験】および 472959 【追加試験】、Invitrogen）を最終濃度で 10% になるよう添加した。調製後の培養液は使用時まで冷暗所（4°C）に保存した。

13.3. 培養条件

CO₂ インキュベーター（三洋電機バイオメディカ）を用い、CO₂ 濃度 5%, 37°C の条件で細胞を培養した。

13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix（Lot No. CAM-499, キッコーマン）を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー（設定値 -80°C, 基準値 -60°C 以下）に保存した。

13.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法を次に示す。

ロット番号	RAA-499
製造年月日	平成 16 年 3 月 19 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット : Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
体重	214~245 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および 投与回数	PB : 30 mg/kg 1 回 (1 日目) 60 mg/kg 3 回 (2~4 日目) BF : 80 mg/kg 1 回 (3 日目)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	25.22 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の各内容物の量を以下に示した.

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol/0.1mL
KCl	33 μmol/0.1mL
G-6-P	5 μmol/0.1mL
NADP	4 μmol/0.1mL
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol/0.2mL
蒸留水	0.1 mL

13.5. 被験物質液の調製

被験物質は水に可溶であることから, 被験物質を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液, Lot No. K4B72, 大塚製薬工場) に溶解し, 調製原液とした. なお, 被験物質の純度は 95%未満 (91.0%) であるため, 最高用量の被験物質秤量の際に純度換算を実施した.

細胞増殖抑制試験では, 使用直前に調製原液 (50.0 mg/mL 溶液) を準備した. この 50 mg/mL 原液を使用溶媒で順次希釈し, 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195 および 0.0977 mg/mL 溶液を調製した. 調製後, 速やかに使用した.

染色体異常試験では, 使用直前に調製原液 (50.0 mg/mL 液) を準備した. この 50.0 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し, 25.0, 12.5, 6.25 および 3.13 mg/mL 溶液を調製した. 調製後, 速やかに使用した.

追加試験（連続処理法 24 時間処理）では、使用直前に調製原液（50.0 mg/mL 液）を準備した。この 50.0 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し、25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 および 0.781 mg/mL 溶液を調製した。調製後、速やかに使用した。

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性（溶媒）対照

被験物質の溶媒である生理食塩液を使用した。

13.6.2. 陽性対照（短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理）

注射用水（日本薬局方注射用水，Lot No. K2K80 および K3G77 【追加試験】，大塚製薬工場）5 mL に溶解したマイトマイシン C（MMC，Lot No. 382BBC および 415ACF 【追加試験】，協和醗酵工業）を生理食塩液（日本薬局方生理食塩液，Lot No. K2H96 および 4C87N 【追加試験】，大塚製薬工場）を用いて希釈し，1 mL ずつ分注した後，凍結保存したものを試験に用いた。

用量は，短時間処理法で 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ，連続処理法で 0.05 $\mu\text{g/mL}$ とした。

13.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

注射用水（Lot No. K2K80）5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP，Lot No. 3045，塩野義製薬）を生理食塩液（Lot No. K2H96）を用いて希釈し，1 mL ずつ分注した後，凍結保存したものを試験に用いた。

用量は 12.5 $\mu\text{g/mL}$ とした。

13.7. 細胞増殖抑制試験（予備試験）

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 5000 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし，以下 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5 および 9.77 $\mu\text{g/mL}$ の 10 用量を細胞増殖抑制試験の用量とした。

13.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 用量当たり 2 ウェルを用いた。

試験番号，処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

13.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F，住友ベークライト）の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し，3 日間培養した。培養終了後，13.7.6. に記載する割合で溶媒または被験物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後，各ウェルの培養液を除去し，ダルベッコリン酸緩衝液（Lot No. 73K2448，Sigma-Aldrich）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500 μL を加え，さら

に 18 時間培養を続けた。

13.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウエルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.7.6. に記載する割合で溶媒または被験物質の処理を行った。

その後の操作は 13.7.3. に記載の方法に準じた。

13.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウエルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.7.6. に記載する割合で溶媒または被験物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた。

13.7.6. 処理量一覧

	陰性対照および被験物質		
	培養液	S9 mix	溶媒または被験物質液
-S9 処理	540 μ L	—	60 μ L
+S9 処理	440 μ L	100 μ L	60 μ L
24 時間処理	540 μ L	—	60 μ L

13.7.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始時および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

13.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウエルから培養液を除き、10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用，Lot No. KLN8969，和光純薬工業）を加えて約 10 分間細胞を固定した。次いで、0.1%クリスタル・バイオレット（Lot No. K31134240，Merck）水溶液で 10 分間細胞を染色した。各プレートを水洗した後、乾燥させた。各ウエルに色素溶出液（30% エタノール，1%酢酸水溶液）を 3 mL 加え、5 分間放置した後、分光光度計（105-50 型，日立製作所）を用いて 580 nm での吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（＝細胞生存率）を各用量群について求めた。

さらに短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理については細胞増殖抑制が認められたため、プロビット法を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した。算出には 313～5000 μ g/mL の 5 点（+S9 処理），39.1～5000 μ g/mL の 8 点（24 時間処理）を用いた。

13.8. 染色体異常試験

13.8.1. 用量

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法-S9 処理では細胞の増殖を 50%以上抑制するほどの細胞毒性は認められなかった。短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理においては高用量群で細胞毒性が認められ、50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ 4739 および 2150 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。その結果を基に、染色体異常試験においてはガイドライン上の最高用量である 5000 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量に、以下に示した 4~5 用量 (公比 2) を設定した。

処理法		用量 ($\mu\text{g/mL}$)				
短時間処理法-S9 処理	-	625	<u>1250</u>	<u>2500</u>	<u>5000</u>	
短時間処理法+S9 処理	-	625	<u>1250</u>	<u>2500</u>	<u>5000</u>	
連続処理法 24 時間処理	313	625	1250	2500	5000	

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

13.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート (細胞培養用シャーレ、住友ベークライト) に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質または陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 103K2403, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

13.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質または陽性対照物質の処理を行った。

以下の操作は 13.8.3. に記載した方法に準じた。

13.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質または陽性対照物質の処理を行い、

さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

13.8.6. 処理量一覧

	陰性対照および被験物質			陽性対照		
	培養液	S9 mix	溶媒または被験物質液	培養液	S9 mix	陽性対照物質液
-S9 処理	2.7 mL	-	0.3 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	2.7 mL	-	0.3 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

13.8.7. 析出等の観察

各処理法において、処理開始時および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

13.8.8. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に、最終濃度で 0.2 µg/mL となるようコルセミド溶液 (Lot No. 1187876, Invitrogen) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25%トリプシン溶液 (Lot No. 1194331, Invitrogen) を用いてプレートから細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え、37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) で細胞を固定した。固定液を 2 回交換した後、新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし、脱脂洗浄済みのスライドガラス上に 2 滴滴下した。スライド標本を十分に乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8, Lot No. TP601374, Merck) を用いて希釈した 1.2%ギムザ染色液 (Merck ; Lot No. OB318388) で 12 分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

1 プレート当たり 3 枚の染色体標本を作製した。

13.8.9. 細胞増殖抑制制度の測定

染色体標本作製時に、陰性対照群、各被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、ATP フォトメーター (ルミテスター C-100LU, キッコーマン) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理した細胞液を 50 µL 添加し攪拌してから約 20 分間静置した。測定用チューブにこの混合液を 100 µL 分注し、ATP 測定用試薬キット (ルシフェール 250, キッコーマン) の発光試薬を 100 µL 添加した後、相対発光量 (Relative Light Unit : RLU) を測定した。陰性対照群における RLU に対する比 (=細胞生存率) を各用量群について求め、細胞増殖抑制制度とした。

13.8.10. 評価対象

短時間処理法においては、13.8.9.の細胞相対増殖率がいずれの処理群においても50%以上であったことから、試験した最も高い用量を最高用量とし、連続する3用量を評価対象（観察用量）とした。

連続処理法 24 時間処理においては、全ての用量で細胞相対増殖率が50%以下を示したことから、全ての標本を評価対象外とした。

13.8.11. 染色体の観察

短時間処理法の標本のみコード化し、観察を実施した。連続処理法の標本については観察評価対象が3用量得られなかったことから、コード化および観察を実施しなかった。

各プレート当たり100個、すなわち1用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下（×600）で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ（gap）、染色分体切断（ctb）、染色分体切断（csb）、染色分体交換（cte）、染色体交換（cse）およびその他（oth）の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数値的異常として1用量当たり200個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

13.9. 染色体異常試験（追加試験—連続処理法 24 時間処理）

連続処理法 24 時間処理において、観察評価対象が3用量得られなかったことから、追加試験を実施した。

13.9.1. 用量

細胞増殖抑制試験および染色体異常試験の結果を基に、5000 µg/mL を最高用量に、以下に示した7用量（公比2）を設定した。

処理法	用量（µg/mL）						
連続処理法 24 時間処理	<u>78.1</u>	<u>156</u>	<u>313</u>	<u>625</u>	1250	2500	5000

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

13.9.2. 使用プレート数および識別方法

13.8.2.に記載した方法に準じた。

13.9.3. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.9.4.に記載する割合で溶媒、被験物質または陽性対照物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた。被験物質（または肉眼では観察されない析出物）による ATP 量測定阻害が懸念されたため、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Lot No. 103K2403）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、最終

濃度で 0.2 µg/mL となるようコルセミド溶液 (Lot No. 1187876) を添加した。さらに 2 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

13.9.4. 処理量一覧

	陰性対照および被験物質			陽性対照		
	培養液	S9 mix	溶媒または被験物質液	培養液	S9 mix	陽性対照物質液
24 時間処理	2.7 mL	—	0.3 mL	2.7 mL	—	0.3 mL

13.9.5. 析出等の観察

13.8.7. に記載した方法に準じた。

13.9.6. 標本の作製

培養終了後、培養液を遠心管に全量移した後、0.25% トリプシン溶液 (Lot No. 1208746) を用いてプレートから細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。その後の操作は 13.8.8. に記載した方法に準じた。

13.9.7. 細胞増殖抑制制度の測定

13.8.9. に記載した方法に準じた。

13.9.8. 評価対象

観察用量としては、13.9.7. の細胞相対増殖率が 50% 未満になる用量の中で最も低い用量を最高用量とした。連続する 3 用量はいずれも中程度の細胞毒性を示すため、さらに低い用量を 1 用量加え、合計 4 用量を評価対象とした。

13.9.9. 染色体の観察

標本をコード化して観察した。

観察方法は 13.8.11. に記載した方法に準じた。

13.10. 結果の解析

最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めない場合について行った。

異常細胞の出現頻度を、Fisher の直接確率計算法 (有意水準片側 2.5%) を用いて検定した。また、用量依存性については、Cochran Armitage の傾向検定 (有意水準片側 2.5%) を用いて検定した。

陰性対照群と比較し、被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、用量に依存性が認められるか、あるいは再現性が確認された場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

短時間処理法-S9 処理において、陽性結果が得られたことから D_{20} 値 (観察細胞の 20% に何れかの異常がみられる濃度) ならびに TR 値 (単位濃度当たりの cte をもつ細胞の出

現頻度の比較値)を算出した。

14. 試験結果

14.1. 細胞増殖抑制試験

14.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示した。

50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法+S9 処理では 4739 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法 24 時間処理では 2150 $\mu\text{g/mL}$ であった。短時間処理法-S9 処理では、いずれの被験物質処理群においても細胞生存率が陰性対照群の 50%以上であった。

14.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始および処理終了時、いずれの処理においても pH の変動、析出等、特筆すべき変化は認められなかった。

14.2. 染色体異常試験

14.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 1 に示した。

C.I. フルオレセントブライトナー271 処理群での染色体構造異常出現頻度は、1250 $\mu\text{g/mL}$ で 2.5%、2500 $\mu\text{g/mL}$ で 4.0%、5000 $\mu\text{g/mL}$ で 9.0%を示し、2500 および 5000 $\mu\text{g/mL}$ において陰性対照群 (0.5%) と比較し有意 ($p \leq 0.025$) な増加が認められた。さらに出現頻度の増加には有意 ($p \leq 0.025$) な用量依存性が認められた。倍数性細胞の出現頻度は全ての用量で 0.0%を示し、陰性対照群 (0.0%) と同等であった。また、全ての用量で細胞生存率が陰性対照群の 50%以上であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 42.5% ($p \leq 0.025$) であった。

14.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 2 に示した。

C.I. フルオレセントブライトナー271 処理群での染色体構造異常出現頻度は、1250 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%、2500 $\mu\text{g/mL}$ で 3.0%、5000 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%を示し、2500 $\mu\text{g/mL}$ において陰性対照群 (0.0%) と比較し有意 ($p \leq 0.025$) な増加が認められた。しかし出現頻度の増加に用量依存性は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、1250 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%、2500 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、5000 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%を示し、陰性対照群 (0.5%) と同等であった。また、全ての用量で細胞生存率が陰性対照群の 50%以上であった。

一方、陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は、27.0% ($p \leq 0.025$) であった。

14.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Figure 5, Table 5 および Appendix 3 に示した.

C.I. フルオレセントブライトナー271 処理群での染色体構造異常出現頻度は, 78.1 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 156 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%, 313 $\mu\text{g/mL}$ で 3.0%, 625 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%を示し, 313 $\mu\text{g/mL}$ において陰性対照群 (0.0%) と比較し有意 ($p \leq 0.025$) な増加が認められた. また, 出現頻度の増加に有意 ($p \leq 0.025$) な用量依存性が認められた. 倍数性細胞の出現頻度は, 78.1 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 156 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 313 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 625 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%を示し, 陰性対照群 (0.0%) と同等であった. また, 用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され, 染色体異常評価群中の高用量である 625 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 46.8%であった.

一方, 陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され, その出現頻度は 26.5% ($p \leq 0.025$) であった.

14.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始および処理終了時, いずれの処理においても pH の変動, 析出等, 特筆すべき変化は認められなかった.

14.3. D_{20} 値ならびにTR値算出結果

本染色体異常試験結果から算出した D_{20} 値 (mg/mL) ならびにTR値 (mg当たり) は次の通りであった.

試験	異常の種類	D_{20} 値	TR 値
短時間処理法-S9 処理	構造異常	11.6	0.300

15. 考察および結論

C.I. フルオレセントブライトナー271 の染色体異常誘発性の有無を検討するため、培養細胞 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果を基に、短時間処理法-S9 処理、同+S9 処理ではガイドライン上定められた最高用量である 5000 µg/mL まで検討した。

その結果、C.I. フルオレセントブライトナー271 処理群の場合、-S9 処理において用量依存性を伴い、統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な染色体構造異常の誘発が認められた (陽性)。+S9 処理においては、1 用量のみ統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な染色体構造異常の誘発が認められたが、用量依存性は認められず、背景データ (Appendix 4) による陰性対照の基準値内であったことから陰性と判定した。

-S9 処理における陽性反応が弱い反応であったことから、長時間処理について評価するため連続処理法 24 時間処理による試験を追加して実施した。24 時間処理では細胞の増殖が抑制される濃度まで検討した。その結果、用量依存性を伴い、統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な染色体構造異常の誘発が認められたが、その誘発頻度は最高でも 3.0% であり、背景データによる陰性対照の基準値内であった。したがって、連続処理法で認められた増加傾向は陽性反応ではないと判断した。

変異原性の強さに関する相対的比較値である D_{20} 値の最小値は 11.6 (mg/mL)、TR 値の最大値は 0.300 とそれぞれ算出された。

なお、数的異常については、いずれの処理法においても統計学的に有意な増加は認められなかった。

また、本被験物質 C.I. フルオレセントブライトナー271 (1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]] bis-, hexasodium salt) の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告は現在までない。

類縁体である Fluorescent brightener 24, Fluorescent brightener 225 および Fluorescent brightener 260 については CHL 細胞を用いた染色体異常試験、Don 細胞を用いた染色体異常試験および Don 細胞を用いた姉妹染色分体交換試験で陰性¹⁾²⁾と報告されている。また、Fluorescent brightener 84 についても CHL 細胞を用いた染色体異常試験で陰性¹⁾と報告されている。

なお、陰性対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当施設での背景データの範囲内であり、当該試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において C.I. フルオレセントブライトナー271 のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。ただし、 D_{20} 値の最小値は 11.6 mg/mL であり、染色体異常誘発頻度は最高でも 9.0% であることから、非常に

弱い反応であると考えられた.

16. 参考文献

- 1) 賀田恒夫・石館基監修“環境変異原性データ集 1”, サイエンティスト社, 東京, 1980, p199-200.
- 2) 祖父尼俊雄監修“染色体異常試験データ集<改訂 1998 年版>”, エル・アイ・シー, 東京, 1999, P238-239.

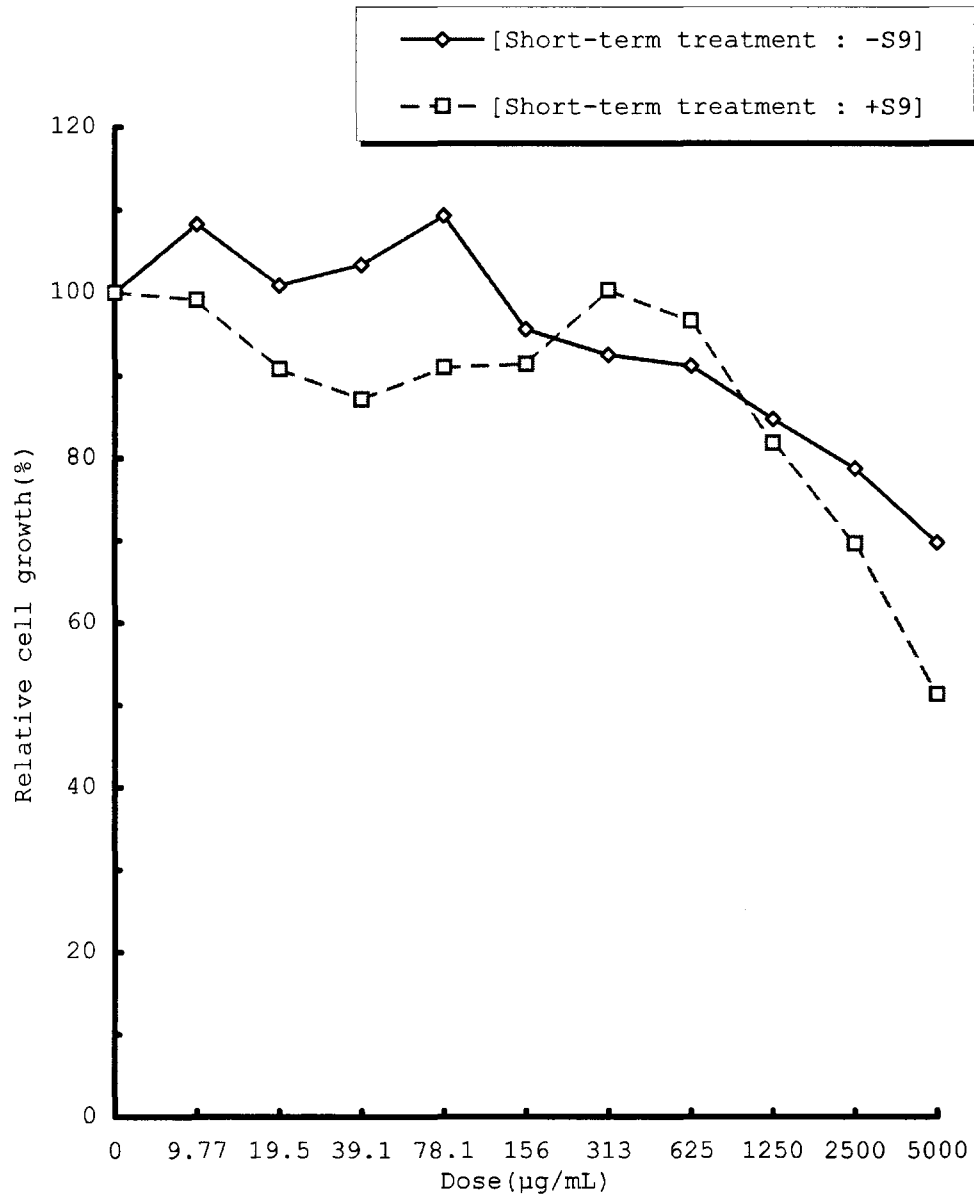


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis [(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt [Short-term treatment]

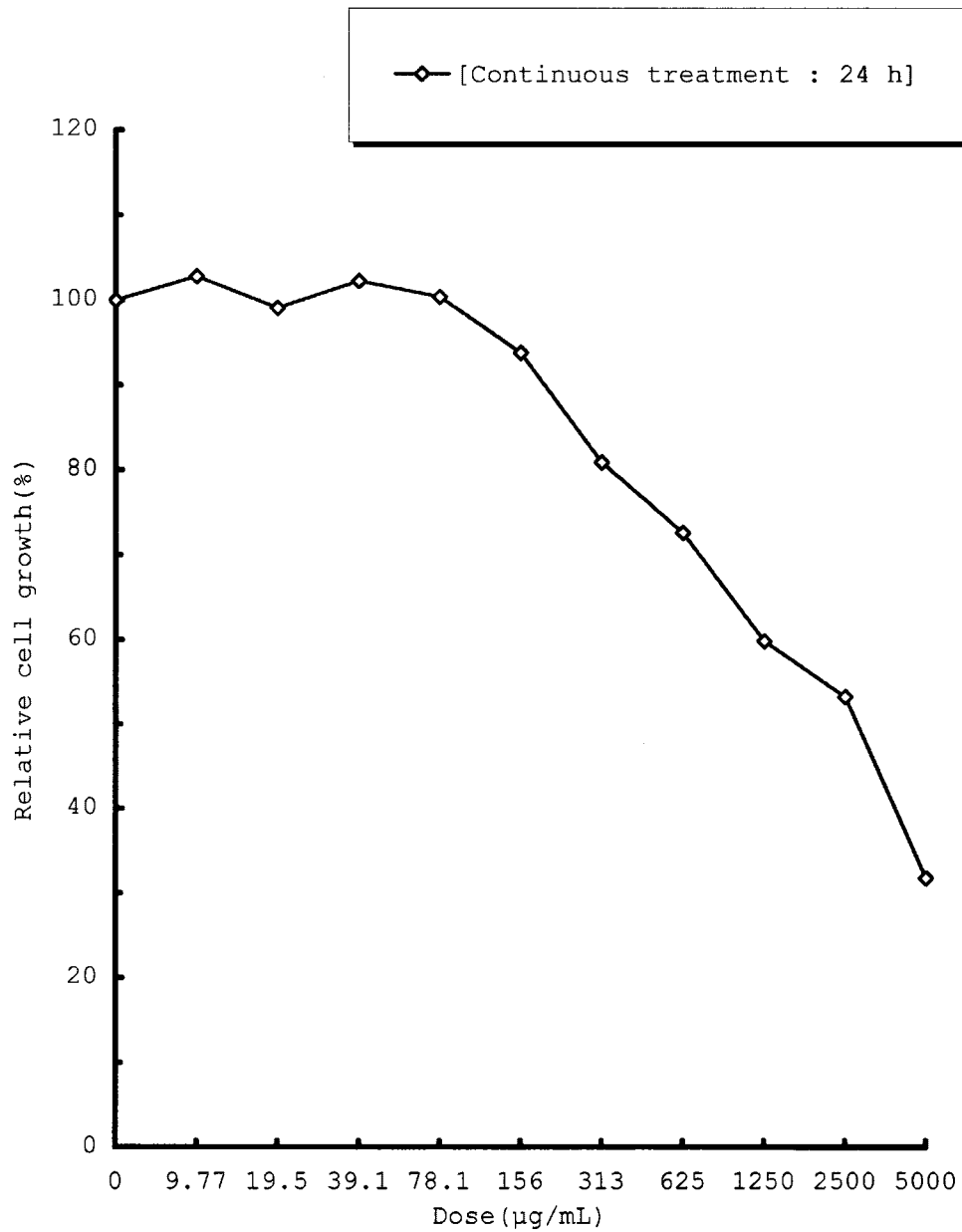


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis [(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt [Continuous treatment]

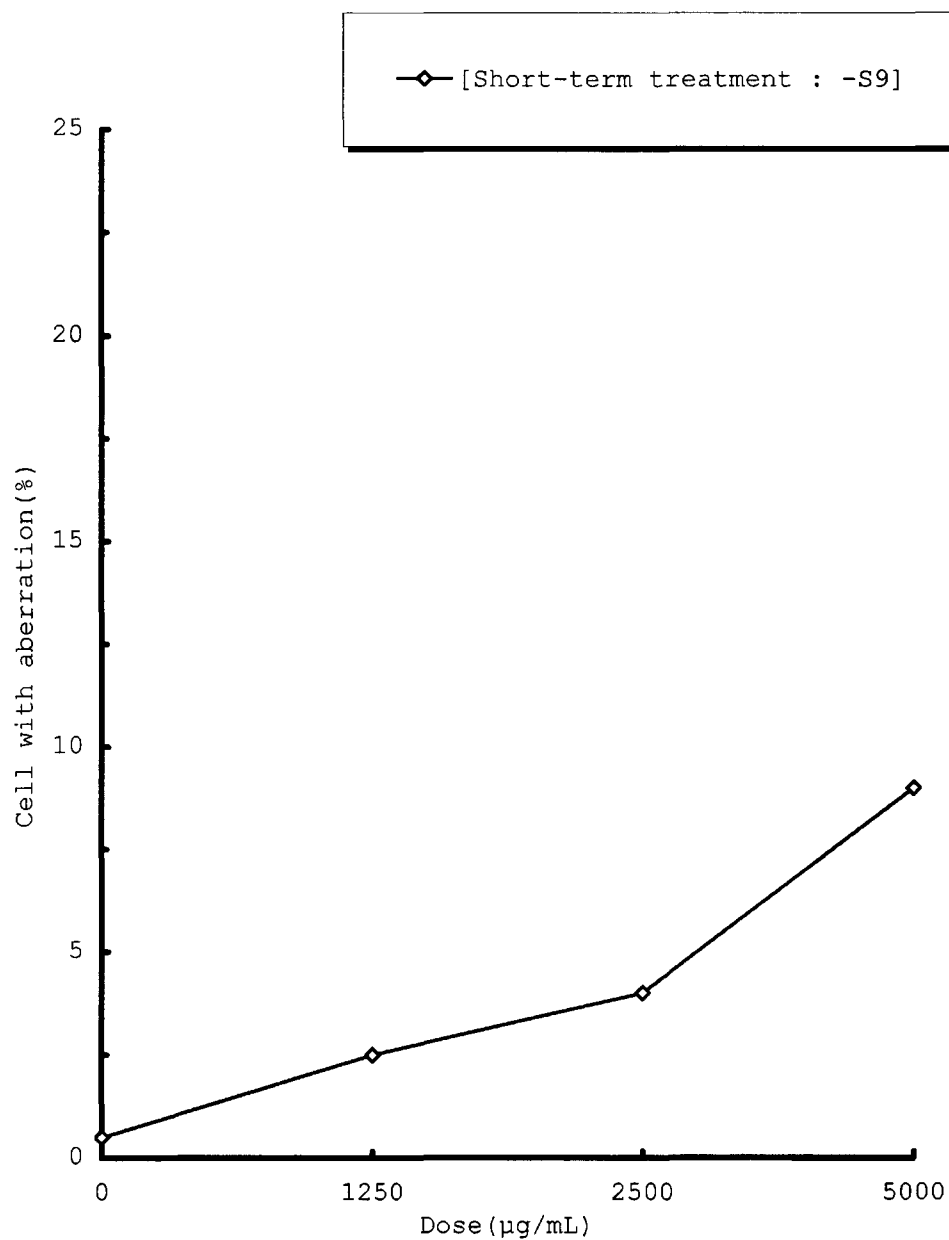


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-, hexasodium salt [Short-term treatment:-S9]

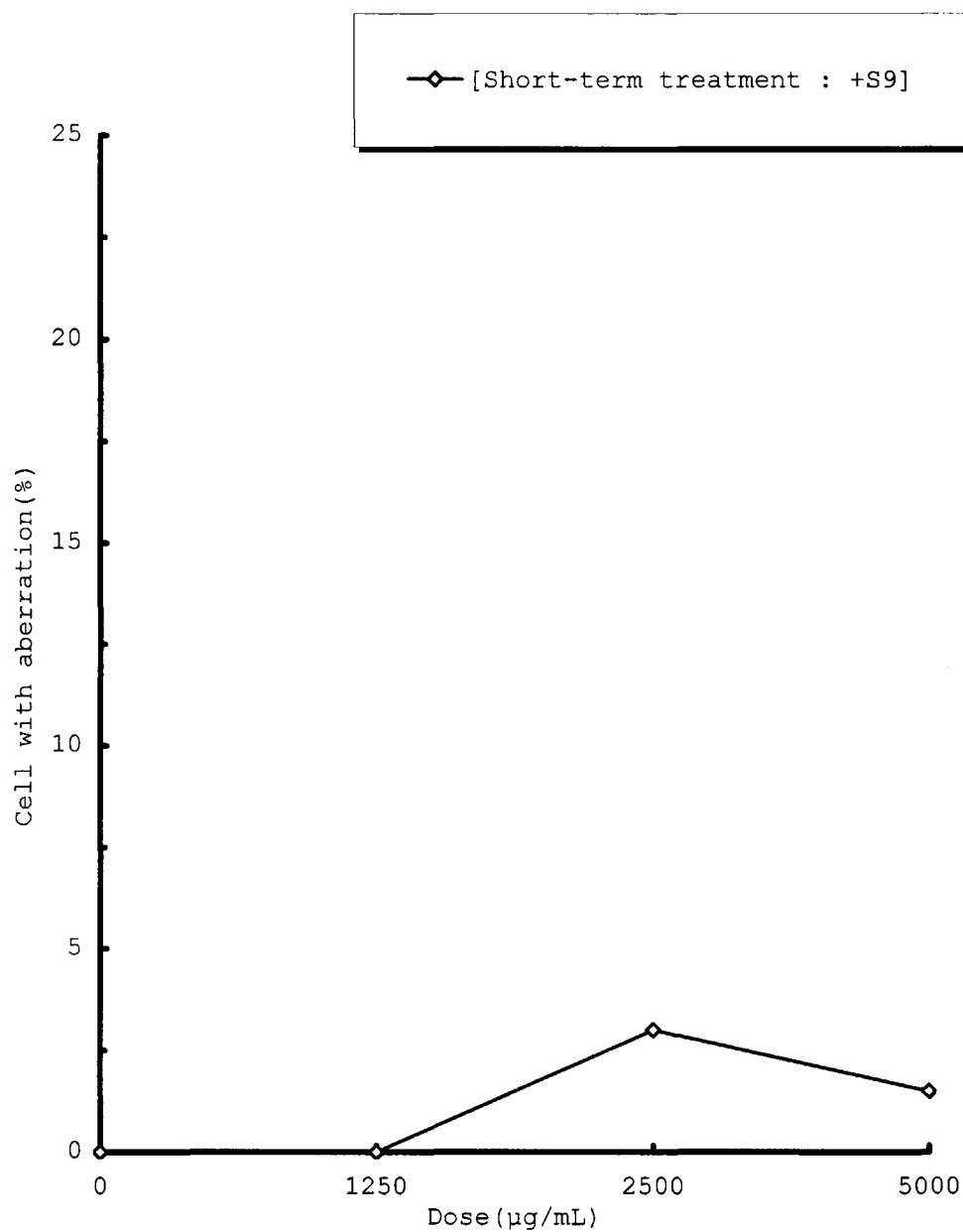


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by 1,4-Benzenedisulfonic acid, 2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-, hexasodium salt [Short-term treatment:+S9]

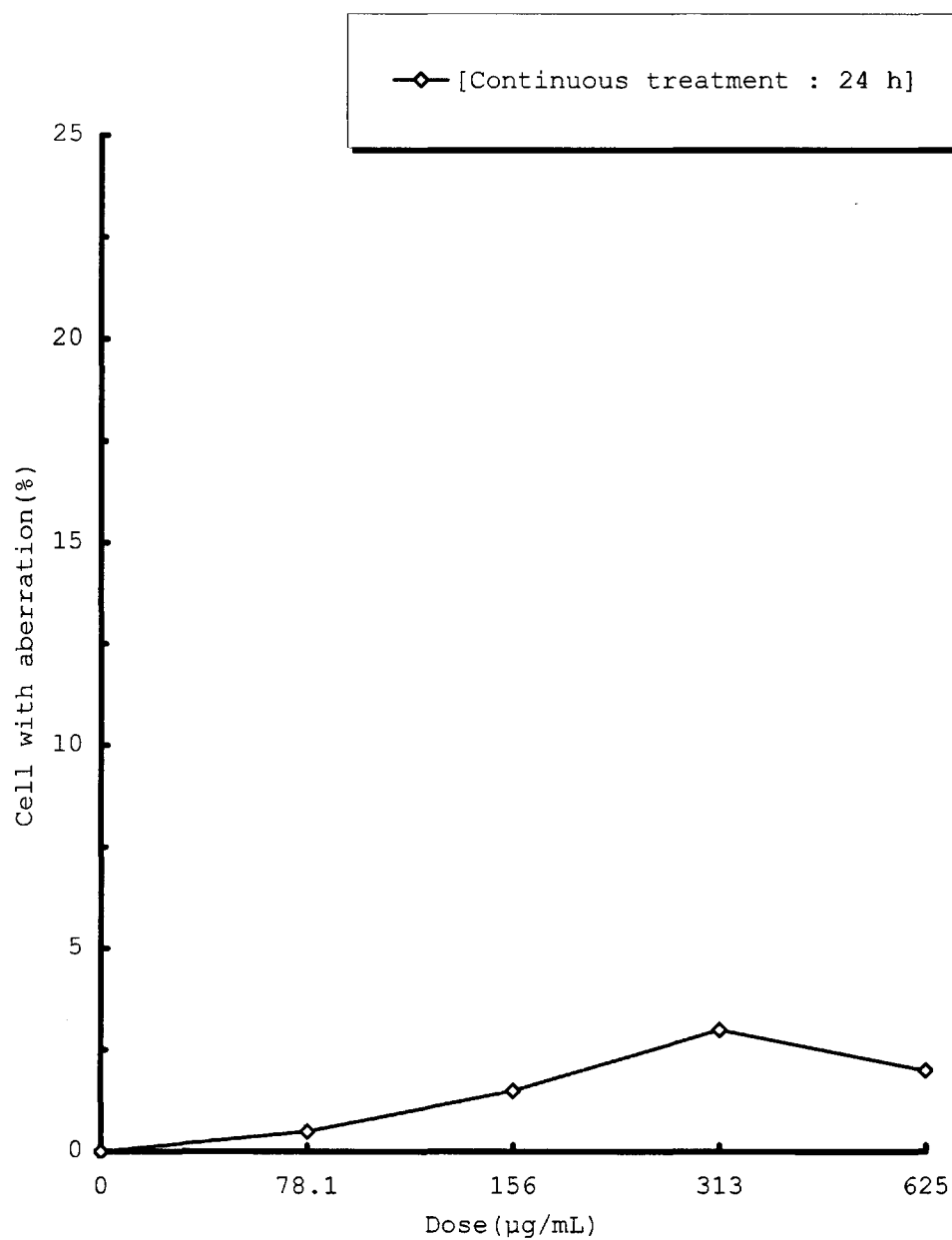


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-, hexasodium salt [Continuous treatment:24 h]

Table 1. Results of growth inhibition test of 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene) imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl) imino]] bis-,hexasodium salt [Short-term treatment]

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]	Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]
1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethene-diylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]] bis-, hexasodium salt	0 a)	100.0	[100.0]	1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethene-diylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]] bis-, hexasodium salt	0 a)	100.0	[100.0]
	9.77	108.4	[108.3]	9.77	100.4	[99.2]	
	19.5	108.2			98.0		
		99.4	[100.9]	19.5	90.4	[90.9]	
		102.3			91.3		
	39.1	101.6	[103.4]	39.1	87.1	[87.1]	
		105.2			87.0		
	78.1	109.7	[109.3]	78.1	90.9	[91.0]	
		108.9			91.0		
	156	97.7	[95.6]	156	84.8	[91.4]	
	93.4			98.0			
313	92.2	[92.5]	313	100.2	[100.3]		
	92.7			100.4			
625	91.3	[91.2]	625	93.5	[96.6]		
	91.0			99.6			
1250	86.0	[84.7]	1250	85.7	[81.8]		
	83.4			77.8			
2500	77.4	[78.7]	2500	71.3	[69.6]		
	79.9			67.8			
5000	70.3	[69.7]	5000	52.6	[51.3]		
	69.0			50.0			

50% Growth inhibition dose was as follows:

[Short-term treatment : -S9] ———>5000 (µg/mL)

[Short-term treatment : +S9] ——— 4739 (µg/mL)

a): Negative control (Saline, 100 µL/mL)

Table 2. Results of growth inhibition test of 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt [Continuous treatment]

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt	0 a)	100.0	[100.0]
		100.0	
	9.77	102.7	[102.8]
		102.8	
	19.5	97.7	[99.1]
		100.5	
	39.1	102.0	[102.3]
		102.5	
	78.1	101.1	[100.4]
		99.6	
	156	99.5	[93.8]
		88.0	
	313	80.8	[80.9]
		81.0	
	625	72.3	[72.6]
		72.8	
	1250	60.8	[59.9]
		58.9	
	2500	53.6	[53.2]
		52.8	
	5000	30.8	[31.7]
		32.6	

50% Growth inhibition dose was as follows:

[Continuous treatment : 24 h] ——— 2150 (µg/mL)

a): Negative control (Saline, 100 µL/mL)

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis
[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]] bis-,hexasodium salt
[Short-term treatment : -S9]

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethene- diylbis[(3-sulfo-4,1- phenylene)imino-(6- phenoxy-1,3,5-triazine- 4,2-diyl)imino]] bis-, hexasodium salt	0 a)	6	100.0	200	2	1	0	0	0	0	1 (0.5) #	200	0 (0.0)
	1250	6	87.4	200	3	4	1	0	0	0	5 (2.5)	200	0 (0.0)
	2500	6	72.4	200	8	7	1	0	0	0	8 (4.0) *	200	0 (0.0)
	5000	6	82.3	200	5	16	3	0	0	0	18 (9.0) *	200	0 (0.0)
MMC b)	0.1	6	102.2	200	9	28	70	0	1	0	85 (42.5) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

#: $p \leq 0.025$ Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

*: $p \leq 0.025$ Significant difference from control (Fisher's exact test)

a): Negative control (Saline, 100 µL/mL)

b): Positive control (Mitomycin C)

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]] bis-,hexasodium salt
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Dose (µg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]] bis-,hexasodium salt	0 a)	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
	1250	6	84.0	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
	2500	6	75.0	200	1	2	4	0	0	0	6 (3.0) *	200	2 (1.0)
	5000	6	60.2	200	1	0	3	0	0	0	3 (1.5)	200	1 (0.5)
CP b)	12.5	6	93.2	200	4	13	42	0	0	0	54 (27.0) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

*: $p \leq 0.025$ Significant difference from control (Fisher's exact test)

a): Negative control (Saline, 100 µL/mL)

b): Positive control (Cyclophosphamide)

)

)

Exp. No. 7816 (115-181)

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethenediylbis
[(3-sulfo-4,1-phenylene)imino-(6-phenoxy-1,3,5-triazine-4,2-diyl)imino]]bis-,hexasodium salt
[Continuous treatment : 24 h]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
1,4-Benzenedisulfonic acid,2,2'-[1,2-ethene- diylbis[(3-sulfo-4,1- phenylene)imino-(6- phenoxy-1,3,5-triazine- 4,2-diyl)imino]]bis-, hexasodium salt	0 a)	24	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0) #	200	0 (0.0)
	78.1	24	87.5	200	2	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	156	24	61.3	200	2	3	0	0	0	0	3 (1.5)	200	2 (1.0)
	313	24	51.0	200	4	3	3	0	0	0	6 (3.0) *	200	1 (0.5)
	625	24	46.8	200	3	3	1	0	0	0	4 (2.0)	200	0 (0.0)
	1250	24	47.9	NE e)									
MMC b)	0.05	24	92.2	200	5	18	41	0	0	0	53 (26.5) *	200	1 (0.5)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap

#: $p \leq 0.025$ Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

*: $p \leq 0.025$ Significant difference from control (Fisher's exact test)

a): Negative control (Saline, 100 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Mitomycin C)

e): Not examined