M-1346

最終報告書

試験名：アセナフチレンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：M-1346

試験施設
株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所
〒412-0039　静岡県御殿場市かまど 1284

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
〒100-8916　東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065　東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

1. 目次 2
1.1 試験計画書 6
1.2 試験目的 6
1.3 試験委託者 6
1.4 試験受託者 6
1.5 試験実施施設 6
1.6 被験物質 6

3. 要約 9
4. 緒言 11
5. 試験材料及び方法 12
5.1 被験物質及び溶媒 12
5.1.1 被験物質 12
5.1.2 溶媒 12
5.2 被験液の調製 13
5.2.1 調製方法 13
5.2.2 調製頻度 13
5.2.3 安定性 13
5.3 対照物質 13
5.3.1 溶媒対照 13
5.3.2 陽性対照 13
5.4 使用細胞株 14
5.4.1 細胞株 14
5.4.2 細胞の選択理由 15
5.4.3 培養条件 15
5.4.4 細胞の性状検査 15
5.5 S9 mix 及び培養液 15
5.5.1 S9 mix 15
5.5.2 培養液 16
5.6 試験方法 [1-5] 16

5.6.1 識別方法 17
5.6.2 用量の設定 17
5.6.3 細胞増殖抑制試験 18
5.6.4 染色体異常試験 19
5.6.5 標本の観察 20
5.6.6 染色体異常の分類 20
5.6.7 判定基準 20
6. 試験結果 22
6.1 細胞増殖抑制試験 22
6.1.1 短時間処理法 22
6.1.2 連続処理法 22
6.2 染色体異常試験 23
6.2.1 短時間処理法 23
7. 考察 25
8. 参考文献 27

Figures and Tables

Fig. 1-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene [Short-term treatment: +S9 mix]
Fig. 1-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Short-term treatment: –S9 mix]
Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Short-term treatment: +S9 mix]
Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Short-term treatment: –S9 mix]

Appendices

Appendix 1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Short-term treatment: +S9 mix]
Appendix 1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Short-term treatment: –S9 mix]
Appendix 1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Continuous treatment: 24 hr]
Appendix 1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Continuous treatment: 48 hr]
Appendix 2-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Short-term treatment: +S9 mix]
Appendix 2-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Short-term treatment: –S9 mix]
Appendix 2-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Continuous treatment: 24 hr]
Appendix 2-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Continuous treatment: 48 hr]
Appendix 3-1 Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Short-term treatment: +S9 mix]
Appendix 3-2 Results of observation in the chromosome aberration test in

cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Short-term treatment: –S9 mix]

試験実施概要

1.1　試験計画書

試験番号　：　M-1346
試験表題　：　アセナフチレンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

1.2　試験目的

ほ乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞株）を用いて、本被験物質の染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

1.3　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
〒100-8916　東京都千代田区霞ヶ関 1-2-2

1.4　試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065　東京都渋谷区大山町 36-7

1.5　試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所
〒412-0039　静岡県御殿場市かまど 1284

1.6　被験物質

製造者　：　新日鐵化学株式会社
名称　：　アセナフチレン
受領日　：　2008 年 10 月 30 日
保存場所　：　御殿場研究所　被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室　冷蔵庫

3. 要約

アセナフチレ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・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた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 1550 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 194 μg/mL において、非代謝活性化では 48.4 μg/mL において、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 96.9 μg/mL において 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では 113.5 μg/mL、非代謝活性化では 38.5 μg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 69.8 μg/mL、連続処理法の 48 時間処理では 68.4 μg/mL であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、短時間処理法の代謝活性化では 133 μg/mL を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、非代謝活性化では 88.9 μg/mL を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 100 μg/mL を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を設定した。ただし、染色体異常試験の短時間処理法で、染色体構造異常誘発性が明らかに陽性であることが確定したため、連続処理法の用量については、設定を行ったが、実験は実施しなかった。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の総出現率の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA）は、短時間処理法の代謝活性化では、最高用量の 133 μg/mL から 39.5 μg/mL で、陽性の判定基準である 10%以上から疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満からを示し、ほぼ用量依存的な増加が認められたため、総合的に陽性と判定した。一方、短時間処理法の非代謝活性化では、全用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、総合的に陰性と判定した。

なお、短時間処理法の代謝活性化における染色体異常誘発の強さの指標値は、観察細胞の 20%に何らかの以上が見られる用量である D20 値は、0.15 mg/mL、単位用量あたりの染色分体型交換（cte）を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値は、160 であった。

一方、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても 5%未満であったことから、アセナフチレンの染色体数的異常誘発性は、総合的に陰性と判定した。

すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考

えられた。

以上の結果から、アセナフチレンは本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

4. 緒言

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、アセナフチレンの安全性評価の一環として、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。

5. 試験材料及び方法

5.1 被験物質及び溶媒

5.1.1 被験物質

製造者	:	
名称	:	アセナフチレン
英名称	:	Acenaphthylene
ロット番号	:	
CAS 番号	:	208-96-8
化学構造式	:	
分子量	:	152.19
密度	:	0.899
純度	:	96.3%
不純物	:	アセナフテン 3.3%、ナフタレン 0.1%、1-メチルナフタレン 0.2%、その他 0.2%
融点	:	275°C
性状	:	黄色～赤黄色の粉末
入手量	:	10 g
安定性	:	試験終了後に製造者において特性を測定し、その結果を入手して実験期間中の安定性を確認した。(Attached Data 2)
保存方法	:	冷蔵（冷蔵内、保存期間中の実測温度：3°C～6°C）
保存場所	:	御殿場研究所　被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室　冷蔵庫
取扱い上の注意	:	取り扱いは、適切な保護具を身につけ、粉塵やエアゾールが発生しないように取扱う。また、火気厳禁とする。
返却	:	被験物質の残余物は、実験終了後に製造者に送付し、安定性を確認後、すべて製造者において廃棄した。

5.1.2 溶媒

名称	:	ジメチルスルホキシド（DMSO）
ロット番号	:	LTF0010
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　遺伝毒性試験室
溶媒の選択理由	:	被験物質情報によると、水に不溶であると記されていたことから、供試前試験を実施した。その結果、DMSOに155 mg/mLで良好に溶解することが確認されたため、溶媒としてDMSOを用いることとした。

5.2　被験液の調製

5.2.1　調製方法

1)　細胞増殖抑制試験

被験物質0.3100 gを2 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155 mg/mL溶液（プレートに0.050 mL添加した際の最終濃度：1550 μg/mL）を調製した。次いで、155 mg/mL溶液を公比2（各濃度の被験液1 mL：溶媒1 mL）で順次7段階希釈し、77.5、38.8、19.4、9.69、4.84、2.42及び1.21 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0.0400gを2 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20.0 mg/mL溶液（プレートに0.050 mL添加した際の最終濃度：200 μg/mL）を調製した。次いで、20.0 mg/mL溶液を公比1.5（各濃度の被験液2.0 mL：溶媒1.0 mL）で順次6段階希釈し、13.3、8.89、5.93、3.95、2.63及び1.76 mg/mLの7濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では13.3、8.89、5.93、3.95及び2.63 mg/mLの5濃度段階の被験液を、非代謝活性化では8.89、5.93、3.95、2.63及び1.76 mg/mLの5濃度段階の被験液を用いた。

5.2.2　調製頻度

用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

5.2.3　安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化がないことを肉眼的及び触知にて観察し、被験液の安定性を確認した。

5.3　対照物質

5.3.1　溶媒対照

溶媒として用いたジメチルスルホキシド（DMSO）を陰性対照物質とした。

5.3.2　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。

名称	:	シクロフォスファミド（以下 CP と略記する）
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 遺伝毒性試験室 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	:	525AHA
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 遺伝毒性試験室 発癌性物質室温保存庫

2) 調製方法

染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化では、CP 0.0140 g をプラスチック遠沈管（50 mL）に秤取した。これに生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K8H76）を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液（培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度：14 μg/mL）を調製した。短時間処理法の非代謝活性化では 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、ロット番号 K8H76）を注射筒で 2 mL 加えて溶解した（1 mg/mL）。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈（溶液 0.250 mL：生理食塩液 4.750 mL）し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した（培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 μg/mL）。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

3) 陽性対照物質の選択理由

前記の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。

5.4 使用細胞株

5.4.1 細胞株

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。細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから 2004 年 11 月 2 日に入手した。入手後、ジメチルスルホキシドを 10v/v%添加した培養液に細胞を溶解し、液体窒素中で大量に凍結保存した。試験に際しては、その一部を解凍後、再培養を開始し、継代培養を行ったものについて細胞の性状検査（5.4.4）を定期的に実施して、適正であることが確認されたものを試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 7 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 11 継代であった。

5.4.2 細胞の選択理由

自然発生染色体異常の発現率が低いこと、さらに種々の化学物質に対して感受性が高く、バックグラウンドデータが豊富であること等の理由から本細胞を選択した。

5.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO_2濃度 5%、温度 37℃、高湿度条件下で培養した。継代は 1~4 日ごとに行った。

5.4.4 細胞の性状検査

試験に使用する細胞は、凍結保存から解凍し、染色体のモード数、倍加時間及びマイコプラズマ汚染の有無等について 2008 年 12 月 1 日～2008 年 12 月 18 日に定期検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。細胞は、30 継代を越えない範囲で試験に供した。

5.5 S9 mix 及び培養液

5.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素（S9／コファクターC セット、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：C081219101、C090213121）を混合し、S9 mix を調製した。調製は使用時に行った。

1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	08121910、09021312
製造日	:	2008 年 12 月 19 日、2009 年 2 月 13 日
種・系統	:	ラット·SD 系
性	:	雄
週齢	:	7 週齢
誘導物質	:	フェノバルビタール(PB)及び 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+60 mg/kg body weight
		BF 1 日 80 mg/kg body weight
保存方法	:	冷凍（超低温フリーザー）
使用期限	:	2009 年 6 月 18 日（製造後 6 箇月）
		2009 年 8 月 12 日（製造後 6 箇月）
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) 補酵素

名称	:	コファクター
ロット番号	:	C08121710、C09021211
製造日	:	2008 年 12 月 17 日、2009 年 2 月 12 日

保存方法	:	冷凍（超低温フリーザー）
使用期限	:	2009年6月16日（製造後6箇月）
		2009年8月11日（製造後6箇月）
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 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

5.5.2 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°C, 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	:	616941
製造元	:	Invitrogen Corporation
保存方法	:	冷凍（–80°C設定の冷凍庫）
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) Minimum Essential Medium（MEM）

ロット番号	:	510522
製造元	:	Invitrogen Corporation
保存方法	:	冷蔵
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 冷蔵庫

5.6 試験方法[1-5)]

試験は以下のステージ順に実施した。なお、短時間処理法において明らかに陽性の結果が得られたため、連続処理法は実施しなかった。

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

5.6.1 識別方法

1) 細胞増殖抑制試験

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）の場合は「NC」を、被験物質処理群の場合は濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

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。又、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で使用機材等を識別した。

5.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 1550 μg/mL（10 mM 相当）とし、以下公比 2 で希釈した 775、388、194、96.9、48.4、24.2 及び 12.1 μg/mL の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

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 194 μg/mL において、非代謝活性化では 48.4 μg/mL において、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 96.9 μg/mL において 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では 113.5 μg/mL、非代謝活性化では 38.5 μg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 69.8 μg/mL、連続処理法の 48 時間処理では 68.4 μg/mL であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、短時間処理法の代謝活性化では 133 μg/mL を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、非代謝活性化では 88.9 μg/mL を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 100 μg/mL を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を設定することとした。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。

5.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するために予備試験として実施した。

1) 短時間処理法

(1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。

(2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、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 に続き溶媒 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 に続き各濃度の被験液 0.050 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、溶媒 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。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。

(3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。

(4) 培養終了後、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度 99%以上）で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、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

(1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。

(2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 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。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。

(3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と

同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

5.6.4 染色体異常試験

1) 短時間処理法

(1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。

(2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、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 に続き溶媒 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 に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 μg/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、溶媒 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 を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 μg/mL）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。

(3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。

(4) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 μg/mL、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸＝3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日以上空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。

(5) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

5.6.5 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。同時に倍数体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。

5.6.6 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、構造異常はさらに以下のように定義・分類した。

1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

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。
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。
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。
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	:	polyploidy（核内倍加体：endoreduplication を含む）

5.6.7 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準[1]に従い染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率(%)よって以下のように判定した。

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

染色体構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合（TAG）と含まない場合（TA）とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

6. 試験結果

6.1 細胞増殖抑制試験

6.1.1 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 Appendix 1-1 及び 2-1 に、非代謝活性化の結果を Appendix 1-2 及び 2-2 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化では 194 μg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 113.5 μg/mL と算出された。また、非代謝活性化では 48.4 μg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 38.5 μg/mL と算出された。

2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、変化は認められなかった。被験物質の添加に伴う析出は、代謝活性化では 96.9 μg/mL 以上の用量で、非代謝活性化では 194 μg/mL 以上の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質の析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、388 μg/mL 以上の用量で認められた。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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、24.2 μg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

6.1.2 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Appendix 1-3 及び 2-3 に、48 時間処理の結果を Appendix 1-4 及び Table 2-4 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理法では 96.9 μg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 69.8 μg/mL と算出された。また、48 時間処理法では 96.9 μg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 68.4 μg/mL と算出された。

2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、変化は認められなかった。被験物質添加に伴う析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、194 μg/mL 以上の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質の析出は、24 時間処理では 388 μg/mL 以上の用量で、48 時間処理では 194 μg/mL 以上の用量で認められた。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 時間処理及び 48 時間処理ともに、12.1 μg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

6.2　染色体異常試験

6.2.1　短時間処理法

代謝活性化の結果を Fig. 1-1、Table 1-1 及び Appendix 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2、Table 1-2 及び Appendix 3-2 に示した。

1)　被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、変化は認められなかった。被験物質の添加に伴う析出は、代謝活性化では 133 μg/mL 以上の用量で認められた。非代謝活性化では認められなかった。

2)　被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質の析出は、代謝活性化では 133 μg/mL で認められたが、非代謝活性化では全用量で認められなかった。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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、59.3 μg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3)　染色体構造異常

染構造異常の出現率（TA）は、短時間処理法の代謝活性化においては、133 μg/mL では 17.0%、88.9 μg/mL では 11.0%、59.3 μg/mL では 11.0%、39.5 μg/mL では 7.0%、26.3 μg/mL では 0.5%を示し、133～59.3 μg/mL では 10%以上を示したことから陽性と、39.5 μg/mL では 5% 以上 10% 未満を示したことから疑陽性と、その他の用量では 5% 未満であったことから陰性と判定された。染色体異常誘発の強さの指標値は、観察細胞の 20%に何らかの以上が見られる用量である D20 値は 0.15 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換(cte)を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値は 160 であった。

また、短時間処理法の非代謝活性化においては、88.9 μg/mL では 4.0%、59.3 μg/mL では 0.5%、39.5 μg/mL では 0.5%、26.3 μg/mL では 1.0%、17.6 μg/mL では 1.5%を示し、全用量で 5%未満であったことから陰性と判定された。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値（Attached Data 3）と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は試験施設の背景値（Attached Data 3）の陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4)　染色体数的異常

数的異常（倍数体）の出現率は、短時間処理法の代謝活性化においては、133 μg/mL では 0.5%、88.9 μg/mL では 1.5%、59.3 μg/mL では 1.0%、39.5 μg/mL では 1.0%、26.3 μg/mL では 0.5%を示し、全ての用量で 5%未満であったことから陰性と判定された。

また、短時間処理法の非代謝活性化においては、88.9 μg/mL では 0.5%、59.3 μg/mL では 0%、39.5 μg/mL では 0%、26.3 μg/mL では 0%、17.6 μg/mL では 0%、を示し、全ての用量で 5%未満であったことから陰性と判定された。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、

また試験施設の背景値（Attached Data 3）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。

7. 考察

アセナフチレンは、細胞増殖抑制試験の短時間処理法の代謝活性化では 194 μg/mL において、非代謝活性化では 48.4 μg/mL において、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 96.9 μg/mL において 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では 113.5 μg/mL、非代謝活性化では 38.5 μg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 69.8 μg/mL、連続処理法の 48 時間処理では 68.4 μg/mL であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、短時間処理法の代謝活性化では 133 μg/mL を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、非代謝活性化では 88.9 μg/mL を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 100 μg/mL を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を設定した。ただし、染色体異常試験の短時間処理法で、染色体構造異常誘発性が明らかに陽性であることが確定したため、連続処理法の用量については、設定を行ったが、実験は実施しなかった。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の総出現率の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率(TA)は、短時間処理法の代謝活性化では、最高用量の 133 μg/mL から 39.5 μg/mL で、陽性の判定基準である 10%以上から疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満からを示し、ほぼ用量依存的な増加が認められたため、総合的に陽性と判定した。一方、短時間処理法の非代謝活性化では、全用量で陰性の判定基準である 5%未満を示したため、総合的に陰性と判定した。

なお、短時間処理法の代謝活性化における染色体異常誘発の強さの指標値は、観察細胞の 20%に何らかの以上が見られる用量である D20 値は、0.15 mg/mL、単位用量あたりの染色分体型交換（cte）を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値は、160 であった。

一方、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても 5%未満であったことから、アセナフチレンの染色体数的異常誘発性は、総合的に陰性と判定した。

陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。更に、いずれの群においても同一用量における 2 枚のプレート間に染色体異常細胞の出現頻度の著しい差は認められなかったことから、試験は適切に実施されたと判断した。

アセナフチレンは、細菌を用いる復帰突然変異試験において TA1537 及び TA1538 菌株に対して、代謝活性化及び非代謝活性化の条件下で陰性を示しているが、全ての

1,2-環結合型の acenaphene は、TA1537 菌株において間接型の flameshift mutagen であることが報告されている[6]。

以上の結果から、アセナフチレンは本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

8. 参考文献

1) 石館基監修 (1987)：＜改訂＞染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー 、東京

2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* – A screening for chemical carcinogens, Mutation Res., **48**, 337-354

3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, Mutation Res., **66**, 277-290

4) 石館 基 (1982)：ほ乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), 日本香粧品科学会誌, **6**, 31-43

5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271

6) Donnelly K. Brown K, Kampbell D (1987): Chemical and biological characterization of hazardous industrial waste: I. Prokaryotic bioassays and chemical analysis of a wood-preserving bottom-sediment waste, Mutation Res., **180**, 31-42

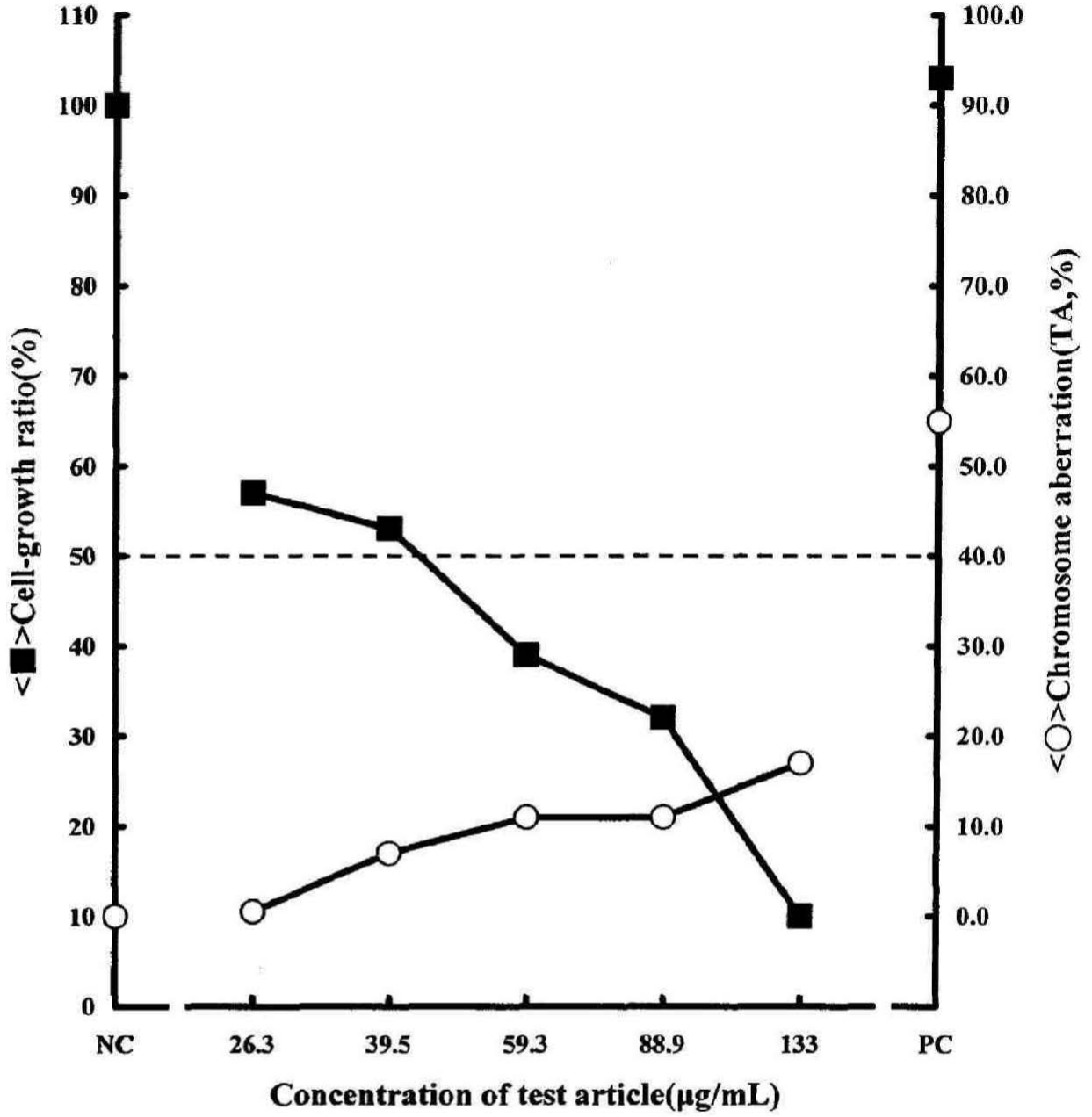


Fig. 1-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Short-term treatment : +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 μg/mL)

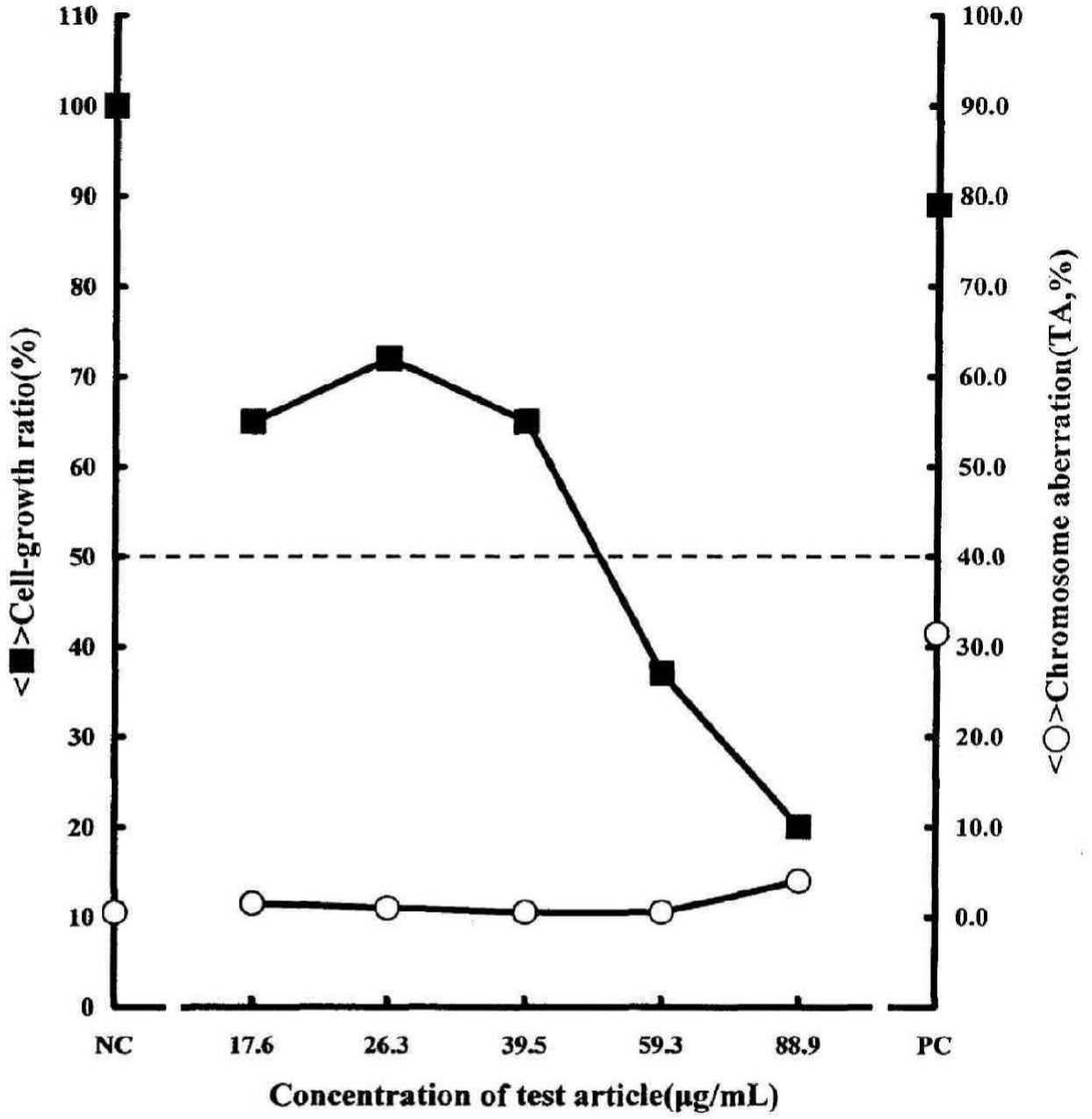


Fig. 1-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Short-term treatment:-S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 μg/mL)

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Short-term treatment:+S9 mix]

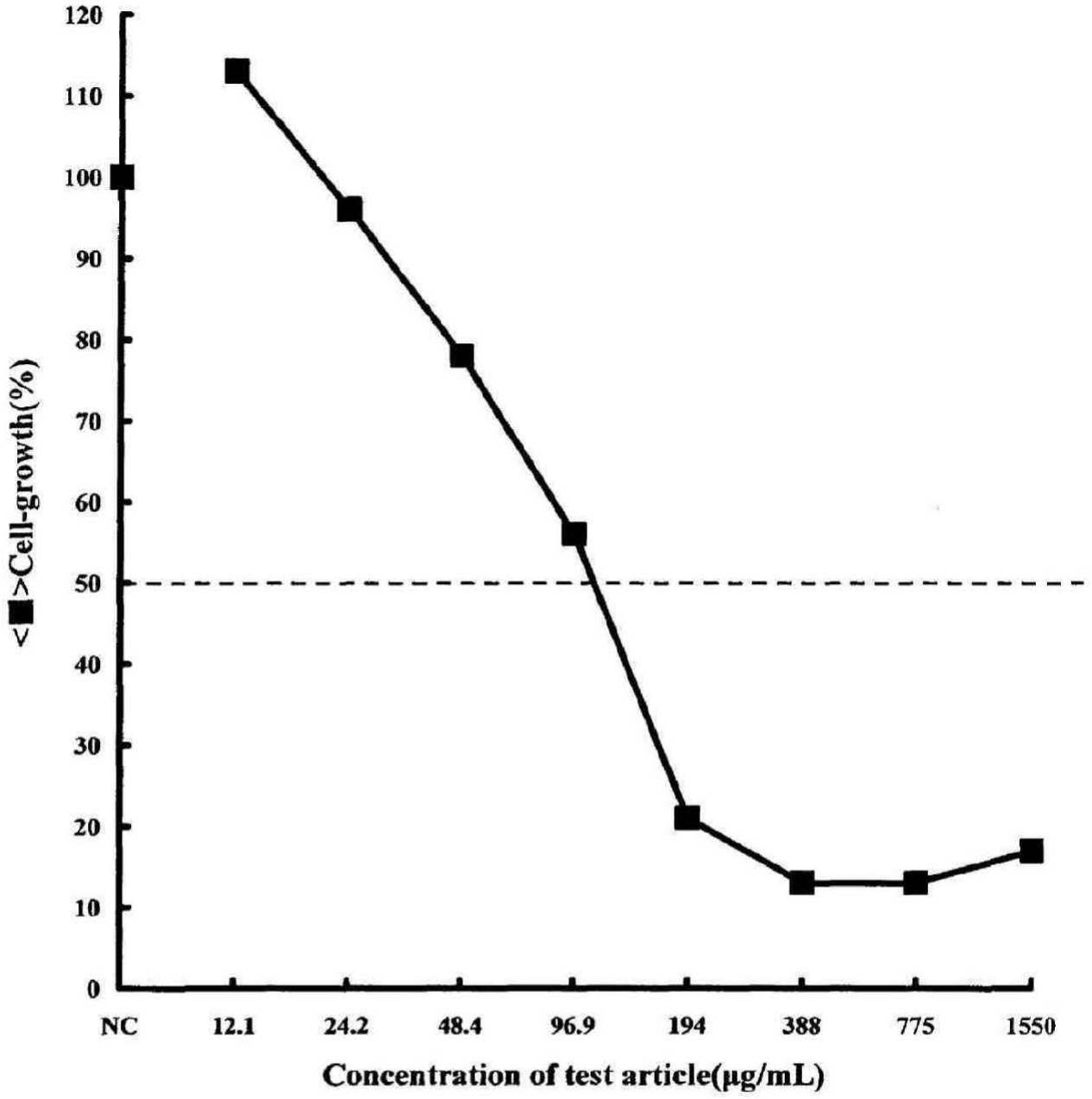
Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Judge-ment	Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Judge-ment	Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)			Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	100	1	0	1		68-1
		NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	115	100	0	0	0	-	58-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(100)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
			100	0	1	0	0	0	1	0	1		61	100	1	0	1		47-1
		26.3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	61	100	0	0	0	-	46-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(57)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
			100	2	4	0	0	0	5	0	5		61	100	1	0	1		18-1
		39.5	100	2	8	0	0	0	9	0	9	±	53	100	1	0	1	-	84-1
			200	4(2.0)	12(6.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	14(7.0)	0(0.0)	14(7.0)		(53)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
			100	3	10	0	0	0	12	1	13		38	100	1	0	1		64-1
6-18	+	59.3	100	5	9	0	0	0	10	0	10	+	46	100	1	0	1	-	32-1
			200	8(4.0)	19(9.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	22(11.0)	1(0.5)	23(11.5)		(39)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
			100	4	8	0	0	1	12	0	12		38	100	2	0	2		66-1
		88.9	100	3	9	0	0	0	10	0	10	+	30	100	1	0	1	-	73-1
			200	7(3.5)	17(8.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	22(11.0)	0(0.0)	22(11.0)		(32)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)		
			61	6	8	0	0	0	11	0	11		22	61	0	0	0		70-1
			39	3	7	0	0	0	8	0	8			39	0	0	0		70-2
		133	85	8	6	0	0	0	12	0	12	+	0	85	1	0	1	-	89-1
			15	3	0	0	0	0	3	0	3			15	0	0	0		89-2
			200	20(10.0)	21(10.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	34(17.0)	0(0.0)	34(17.0)		(10)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
			100	3	54	0	0	0	54	0	54		107	100	0	0	0		91-1
		PC	100	9	51	0	0	0	56	0	56	+	115	100	0	0	0	-	29-1
			200	12(6.0)	105(52.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	110(55.0)	0(0.0)	110(55.0)		(103)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other: including fragmentation
TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.
NC: Negative control (DMSO)
PC: Positive control (cyclophosphamide, 14μg/mL)
Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).
Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene
[Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)										Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)					Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge-ment		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge-ment	
6-18	-	NC	100	0	0	0	1	0	1	0	1		100	100	0	0	0		30-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	93	100	0	0	0	-	52-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		17.6	100	1	0	0	0	0	1	0	1		60	100	0	0	0		08-1
			100	0	2	0	0	0	2	0	2	-	66	100	0	0	0	-	07-1
			200	1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)		(65)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		26.3	100	0	0	0	0	0	0	0	0		73	100	0	0	0		86-1
			100	0	2	0	0	0	2	0	2	-	66	100	0	0	0	-	56-1
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		(72)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		39.5	100	1	0	0	0	0	1	0	1		53	100	0	0	0		37-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	73	100	0	0	0	-	85-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(65)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		59.3	100	0	0	0	0	0	0	0	0		26	100	0	0	0		31-1
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	46	100	0	0	0	-	17-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(37)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		88.9	100	3	1	0	0	0	4	0	4		13	100	1	0	1		77-1
			100	3	1	0	0	0	4	0	4	-	26	100	0	0	0	-	65-1
			200	6(3.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	8(4.0)	0(0.0)	8(4.0)		(20)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		PC	100	9	22	0	0	0	29	0	29		86	100	0	0	0		35-1
			100	11	25	0	1	0	34	0	34	+	86	100	0	0	0	-	67-1
			200	20(10.0)	47(23.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	63(31.5)	0(0.0)	63(31.5)		(89)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other: including fragmentation
TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.
NC: Negative control (DMSO)
PC: Positive control (mitomycin C, 0.075μg/mL)
Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).
Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

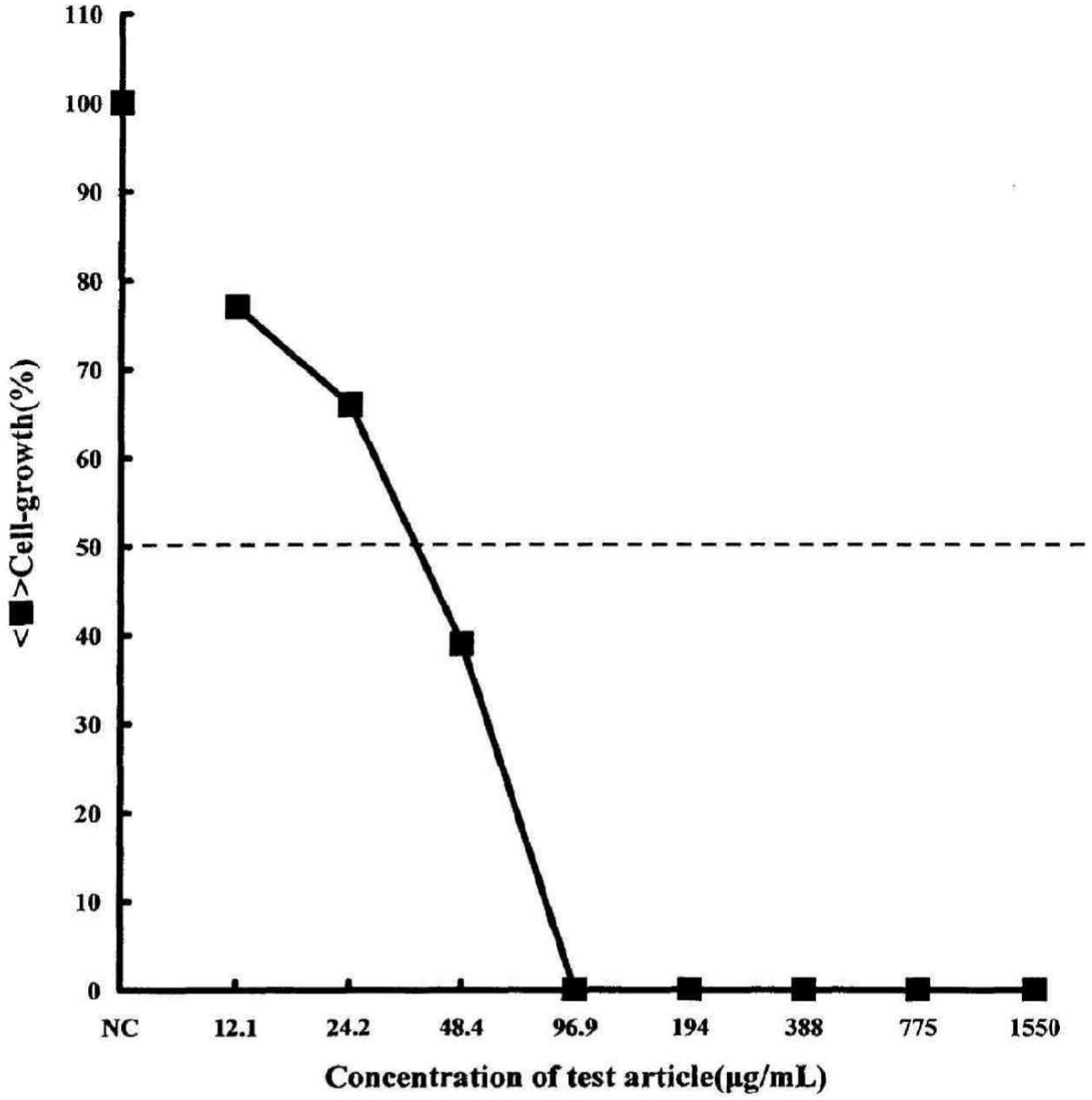


Appendix 1-1

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Short-term treatment:+S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

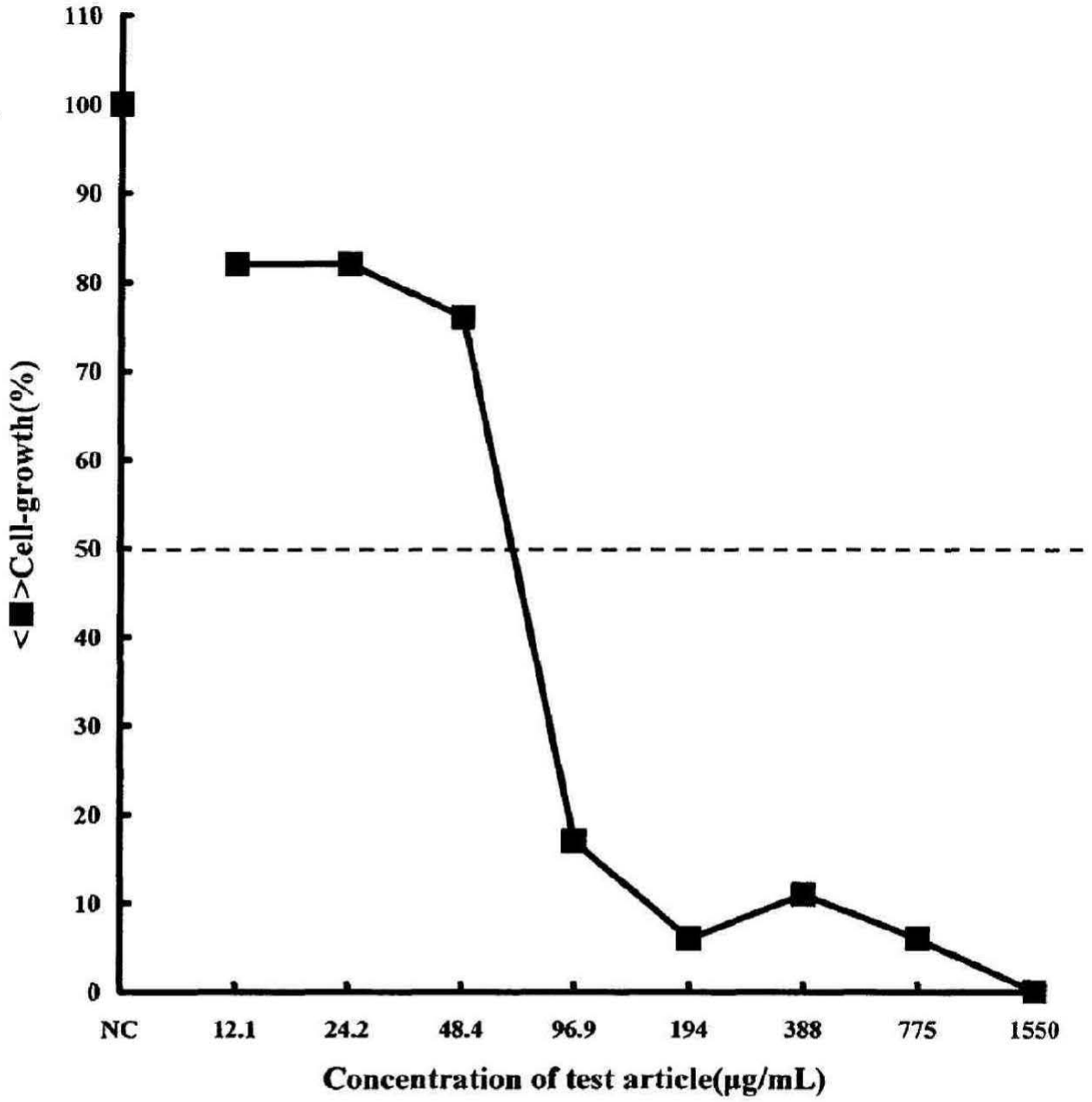


Appendix 1-2

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Short-term treatment:-S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

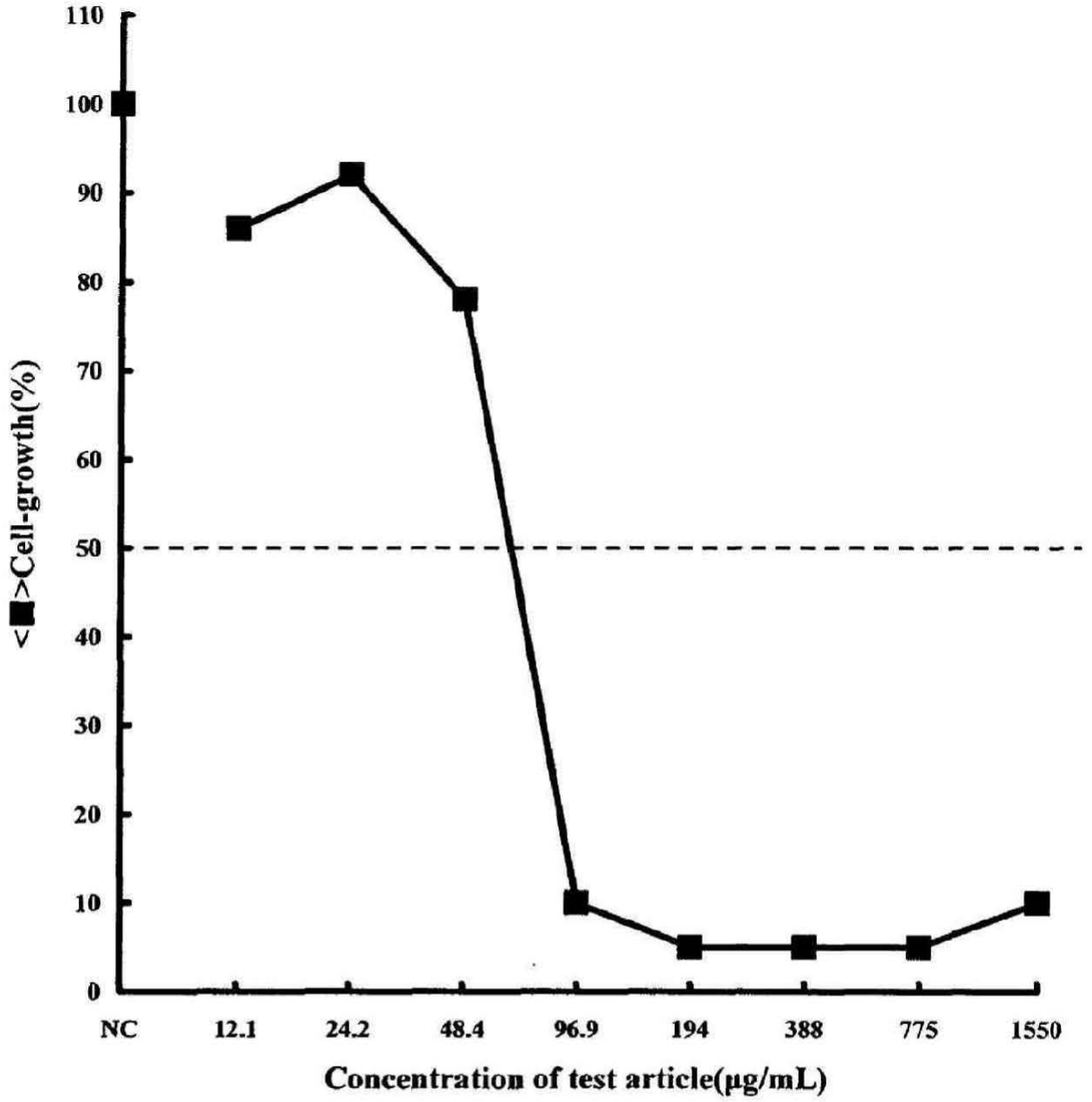


Appendix 1-3

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(DMSO)



Appendix 1-4

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(DMSO)

Appendix 2-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Short-term treatment:+S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)		Cell-growth ratio		Observation[c]			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%)[b]	Condition of cells[d]	Color of medium[e]	Precipitates/Crystals[f]	
								1)	2)
+	6-18	0 (NC)		100[a]	100	-	-	-	-
				129		-	-	-	-
		Test article	12.1	129	113	-	-	-	-
				129		-	-	-	-
			24.2	99	96	+	-	-	-
				120		+	-	-	-
			48.4	89	78	++	-	-	-
				89		++	-	-	-
			96.9	59	56	++	-	+	-
				69		++	-	+	-
			194	19	21	+++	-	+	-
				29		+++	-	+	-
			388	10	13	+++	-	+	+
				19		+++	-	+	+
			775	10	13	+++	-	+	+
				19		+++	-	+	+
			1550	19	17	+++	-	+	+
				19		+++	-	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : **113.5** μg/mL									

NC: Negative Control(DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment.Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions.Precipitates/crystals were observed 1)immediately after addition of the test solutions and 2)at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolater. Their shape was normal.
+ : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals
+ : Presence of precipitates

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 2-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Short-term treatment:-S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)		Cell-growth ratio		Observation[c]			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%)[b]	Condition of cells[d]	Color of medium[e]	Precipitates/Crystals[f]	
								1)	2)
-	6-18	0 (NC)		100[a]	100	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
		Test article	12.1	66	77	-	-	-	-
				88		-	-	-	-
			24.2	55	66	++	-	-	-
				77		++	-	-	-
			48.4	33	39	++	-	-	-
				44		++	-	-	-
			96.9	0	0	++	-	-	-
				0		++	-	-	-
			194	0	0	+++	-	+	-
				0		+++	-	+	-
			388	0	0	TOX	-	+	+
				0		TOX	-	+	+
			775	0	0	TOX	-	+	+
				0		TOX	-	+	+
			1550	0	0	TOX	-	+	+
				0		TOX	-	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : **38.5** μg/mL									

NC: Negative Control(DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment.Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions.Precipitates/crystals were observed 1)immediately after addition of the test solutions and 2)at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolater. Their shape was normal.
++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
TOX : There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals
+ : Presence of precipitates

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 2-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Continuous treatment:24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)		Cell-growth ratio		Observation[c]			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%)[b]	Condition of cells[d]	Color of medium[e]	Precipitates/Crystals[f]	
								1)	2)
-	24-0	0 (NC)		100[a]	100	-	-	-	-
				112		-	-	-	-
		Test article	12.1	74	82	+	-	-	-
				100		+	-	-	-
			24.2	74	82	+	-	-	-
				100		+	-	-	-
			48.4	87	76	++	-	-	-
				74		++	-	-	-
			96.9	12	17	+++	-	-	-
				24		+++	-	-	-
			194	0	6	TOX	-	+	-
				12		TOX	-	+	-
			388	0	11	TOX	-	+	+
				24		TOX	-	+	+
			775	0	6	TOX	-	+	+
				12		TOX	-	+	+
			1550	0	0	TOX	-	+	+
				0		TOX	-	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : **69.8** μg/mL									

NC: Negative Control(DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment.Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions.Precipitates/crystals were observed 1)immediately after addition of the test solutions and 2)at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolater. Their shape was normal.
+ : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
TOX : There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals
+ : Presence of precipitates

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 2-4

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)		Cell-growth ratio		Observation[c]			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean (%)[b]	Condition of cells[d]	Color of medium[e]	Precipitates/Crystals[f]	
								1)	2)
-	48-0	0 (NC)		100[a]	100	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
		Test article	12.1	94	86	+	-	-	-
				78		+	-	-	-
			24.2	89	92	+	-	-	-
				94		+	-	-	-
			48.4	78	78	+	-	-	-
				78		+	-	-	-
			96.9	10	10	+++	-	-	-
				10		+++	-	-	-
			194	5	5	TOX	-	+	+
				5		TOX	-	+	+
			388	5	5	TOX	-	+	+
				5		TOX	-	+	+
			775	5	5	TOX	-	+	+
				5		TOX	-	+	+
			1550	15	10	TOX	-	+	+
				5		TOX	-	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : **68.4** μg/mL									

NC: Negative Control(DMSO)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment.Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions.Precipitates/crystals were observed 1)immediately after addition of the test solutions and 2)at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolater. Their shape was normal.
+ : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
TOX : There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals
+ : Presence of precipitates

All calculations were carried out using Excel 2003

Appendix 3-1

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Short-term treatment:+S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)		Observation[a]			
S9 mix	time (hr)			Condition of cells[b]	Color of medium[c]	Precipitates/Crystals[d]	
						1)	2)
+	6-18	0 (NC)		-	-	-	-
				-	-	-	-
		Test article	26.3	-	-	-	-
				-	-	-	-
			39.5	-	-	-	-
				-	-	-	-
			59.3	+	-	-	-
				+	-	-	-
			88.9	++	-	-	-
				++	-	-	-
			133	+++	-	+	+
				+++	-	+	+
		PC		-	-	-	-
				-	-	-	-

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 μg/mL)

a) Condition of cells was observed at the end of treatment.Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions.Precipitates/crystals were observed [1]immediately after addition of the test solutions and [2]at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.

b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolater. Their shape was normal.
+ : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

c) - : No changes of color

d) - : Absence of precipitates/crystals
+ : Presence of precipitates

Appendix 3-2

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Acenaphthylene

[Short-term treatment: -S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)		Observation[a]			
S9 mix	time (hr)			Condition of cells[b]	Color of medium[c]	Precipitates/Crystals[d]	
						1)	2)
-	6-18	0 (NC)		-	-	-	-
				-	-	-	-
		Test article	17.6	-	-	-	-
				-	-	-	-
			26.3	-	-	-	-
				-	-	-	-
			39.5	-	-	-	-
				-	-	-	-
			59.3	+	-	-	-
				+	-	-	-
			88.9	++	-	-	-
				++	-	-	-
		PC		-	-	-	-
				-	-	-	-

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 μg/mL)

a) Condition of cells was observed at the end of treatment.Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions.Precipitates/crystals were observed [1]immediately after addition of the test solutions and [2]at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.

b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolater. Their shape was normal.
+ : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.

c) - : No changes of color

d) - : Absence of precipitates/crystals