

B060315

最終報告書

フェニル尿素のは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号：B060315)

株式会社三菱化学安全科学研究所

2. 目次

1. 陳述書.....	2
2. 目次.....	3
3. 試験実施概要.....	6
3.1 表題.....	6
3.2 試験番号.....	6
3.3 試験目的.....	6
3.4 適用ガイドライン.....	6
3.5 適用 GLP.....	6
3.6 試験委託者.....	6
3.7 試験受託者.....	6
3.8 試験施設.....	7
5. 要約.....	10
6. 材料および方法.....	11
6.1 被験物質.....	11
6.1.1 名称.....	11
6.1.2 CAS 番号.....	11
6.1.3 構造式.....	11
6.1.4 分子量.....	11
6.1.5 製造元.....	11
6.1.6 ロット番号.....	11
6.1.7 純度（含量）.....	11
6.1.8 性状.....	11
6.1.9 その他の物理化学的性状.....	11
6.1.10 溶媒に対する溶解度（溶媒中の安定性）.....	12
6.1.11 入手日.....	12
6.1.12 入手量.....	12
6.1.13 保存条件.....	12

6.1.14 保管場所.....	12
6.1.15 安定性の確認.....	12
6.1.16 残余被験物質の処理.....	12
6.2 対照物質.....	13
6.2.1 陰性対照物質.....	13
6.2.2 陽性対照物質.....	13
6.3 細胞.....	14
6.3.1 細胞.....	14
6.3.2 購入元.....	14
6.3.3 購入日.....	14
6.3.4 保存.....	14
6.3.5 特性検査.....	14
6.3.6 継代数.....	14
6.3.7 培養条件.....	14
6.3.8 細胞の選択理由.....	15
6.4 培地.....	15
6.4.1 MEM.....	15
6.4.2 MEM 培地.....	15
6.5 S9 mix.....	15
6.5.1 S9.....	15
6.5.2 S9 mix の調製.....	16
6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製.....	16
6.6.1 被験物質溶液の調製.....	16
6.6.2 陽性対照物質溶液の調製.....	17
6.7 細胞増殖抑制試験.....	17
6.7.1 処理条件.....	17
6.7.2 被験物質用量.....	17
6.7.3 被験物質用量の設定理由.....	17
6.7.4 細胞処理.....	18
6.7.5 細胞増殖率の測定.....	18
6.7.6 50%細胞増殖抑制用量の算出.....	19
6.8 染色体異常試験.....	19
6.8.1 処理条件.....	19
6.8.2 被験物質用量.....	19
6.8.3 陽性対照物質用量.....	19
6.8.4 陽性対照物質用量の設定理由.....	19

6.8.5	細胞処理	19
6.8.6	標本作製	20
6.8.7	細胞増殖率の測定	20
6.8.8	観察	20
6.8.9	判定基準	22
6.9	結果のまとめ	23
6.9.1	表	23
6.9.2	図	23
7.	結果	24
7.1	細胞増殖抑制試験	24
7.2	染色体異常試験	24
8.	考察および結論	24
9.	参考文献	25
表 1	細胞増殖抑制試験の結果	26
表 2	分裂指数測定結果	27
表 3	染色体異常試験の結果（短時間処理法）	28
表 4	染色体異常試験の結果（連続処理法）	29
図 1	フェニル尿素処理における細胞毒性（短時間処理法・－S9 mix）	30
図 2	フェニル尿素処理における細胞毒性（短時間処理法・＋S9 mix）	30
図 3	フェニル尿素処理における細胞毒性（連続処理法）	31
図 4	フェニル尿素処理における構造異常細胞出現頻度	32
図 5	フェニル尿素処理における数的異常細胞出現頻度	32

3. 試験実施概要

3.1 表題

フェニル尿素のは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3.2 試験番号

B060315

3.3 試験目的

フェニル尿素のは乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性を検討する。

3.4 適用ガイドライン

(1) 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 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，環境企発第 031121002 号 環境省総合環境政策局長連名通知)

(2) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (No. 473, 1997)

3.5 適用 GLP

(1) 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について

(厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名基準，薬食発第 1121003 号，平成 15・11・17 製局第 3 号，環境企発第 031121004 号，平成 15 年 11 月 21 日)

(2) OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

3.6 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
東京都千代田区霞ヶ関一丁目 2 番 2 号

3.7 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号

(平成 19 年 3 月 31 日以前は，東京都港区芝二丁目 1 番 30 号)

3.8 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県神栖市砂山 14 番地

5. 要約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い、フェニル尿素の *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

予備試験の結果に基づき、細胞増殖抑制試験の用量は、短時間処理法 S9 mix 非共存下 (−S9 mix) および S9 mix 共存下 (+S9 mix)、連続処理法 24 時間処理 (24 時間処理) で各々、同じく 10 mmol/L ($\approx$ 1400 μ g/mL) を最高用量に、下記の用量を設定した。

−S9 mix : 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 μ g/mL

+S9 mix : 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 μ g/mL

24 時間処理 : 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 μ g/mL

この結果、50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) は 24 時間処理で 828 μ g/mL であった。

−S9 mix, +S9 mix では 50%以上の細胞増殖抑制は認められなかった。

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、染色体異常試験は下記の用量を設定した。

−S9 mix : 350, 700, 1400 μ g/mL

+S9 mix : 350, 700, 1400 μ g/mL

24 時間処理 : 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 μ g/mL

標本観察は、−S9 mix および +S9 mix では、細胞増殖率、相対分裂指数共に 50% 以上であったため、設定した上記 3 用量について実施した。24 時間処理では、細胞増殖率あるいは相対分裂指数が 50%未満となる最低用量を最高として、下記の用量を選択して実施した。

24 時間処理 : 600, 800, 1000 μ g/mL

標本観察の結果、いずれの処理条件のいずれの被験物質用量においても、染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5%未満であった。

従って、フェニル尿素は、当試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有さないものと結論した。

6. 材料および方法

6.1 被験物質

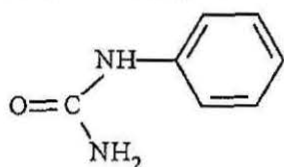
6.1.1 名称

フェニル尿素

6.1.2 CAS 番号

64-10-8

6.1.3 構造式



6.1.4 分子量

136.15

6.1.5 製造元

和光純薬工業株式会社

6.1.6 ロット番号

6.1.7 純度 (含量)

100.2%

6.1.8 性状

殆ど白色結晶性粉末

6.1.9 その他の物理化学的性状

蒸気圧：0.000939 mmHg (25℃)

対水溶解度：17000 mg/L (25℃)

1-オクタノール/水分配係数：0.83

融点：147.6℃

沸点：238℃

6.1.10 溶媒に対する溶解度（溶媒中の安定性）

生理食塩液：14 mg/mL で不溶 [溶媒検討の結果による]

水：50 mg/mL で不溶 [他試験（試験番号：B060314）の溶媒検討の結果による]

ジメチルスルホキシド：400 mg/mL で溶解（安定*） [溶媒検討の結果による]

アセトン：500 mg/mL で不溶 [溶媒検討の結果による]

（*：溶液に発熱，発泡，変色は認められなかった）

6.1.11 入手日

2006 年 5 月 29 日

6.1.12 入手量

25 g

6.1.13 保存条件

室温（許容範囲：10～30℃；実測値：20.1～25.3℃），遮光

6.1.14 保管場所

被験物質保管場所（52）

6.1.15 安定性の確認

当研究所において，実験開始前と実験終了後に赤外吸収スペクトル（IR）法で赤外吸収スペクトルを測定し，被験物質の特性に変化がないことを確認した。

測定機器：島津フーリエ変換赤外分光光度計（FTIR-8300，株式会社島津製作所）

方法：

- (1) KBr 粒状結晶をメノウ乳鉢で粉末にした。
- (2) KBr 粉末をミニハンドプレスにて加圧し，錠剤を作製した。
- (3) KBr 粉末約 1 g と被験物質 約 5 mg を秤量した。
- (4) (3)で秤量した KBr 粉末と被験物質をメノウ乳鉢にて粉碎・混合した。
- (5) (4)の混合物をミニハンドプレスにて加圧し，錠剤を作製した。
- (6) 分光光度計にセットし，IR スペクトルを測定した。

6.1.16 残余被験物質の処理

被験物質の残余は実験終了後に廃棄した。

6.2 対照物質

6.2.1 陰性対照物質

6.2.1.1 名称

ジメチルスルホキシド (DMSO)

6.2.1.2 製造元

関東化学株式会社

6.2.1.3 ロット番号

707X1808

6.2.1.4 陰性対照物質の選択理由

溶媒検討の結果、下記の通りであった。

- ・生理食塩液：14 mg/mL (約 100 mmol/L) で不溶
- ・ジメチルスルホキシド (DMSO)
 - ：500 mg/mL で均一に懸濁，400 mg/mL で溶解
(調製液に発熱，発泡，変色は認められなかった。)
- ・アセトン：500 mg/mL で不溶
- ・1 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム溶液
 - ：50 mg/mL で均一な懸濁状態得られず

以上の結果に基づき、本被験物質の溶媒(陰性対照物質)には DMSO を選択した。

6.2.2 陽性対照物質

6.2.2.1 名称

マイトマイシン C (MMC) [S9 mix 非共存下]

ベンゾ[a]ピレン (BP) [S9 mix 共存下]

6.2.2.2 製造元

MMC：協和発酵工業株式会社

BP：東京化成工業株式会社

6.2.2.3 ロット番号

MMC：454ADK

BP：GG01

6.2.2.4 含量

MMC : 103%

BP : 95.6%

6.2.2.5 陽性対照物質の選択理由

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において広く使用され、適用ガイドラインにおいて例示されている。

6.3 細胞

6.3.1 細胞

CHL/IU (雌チャイニーズハムスター肺由来)

6.3.2 購入元

大日本製薬株式会社

6.3.3 購入日

2005 年 5 月 17 日

6.3.4 保存

最終 10 v/v% の割合で DMSO を添加した培地に細胞を浮遊させ、約 1 mL に小分けして、2005 年 5 月 24 日に凍結した後に液体窒素保存容器に移して保存した。これを 2006 年 7 月 3 日、2006 年 8 月 11 日に融解し、継代培養して他試験と共通で使用した。

6.3.5 特性検査

6.3.4 項の凍結細胞について、以下の特性を 2005 年 6 月 9 日までに確認した。

染色体モード (2n) : 25

倍加時間 : 14.9 時間

マイコプラズマ感染 : 陰性

6.3.6 継代数

購入時 : 14

凍結時 : 17

使用時 : 19~21 (融解後 14 日以内)

6.3.7 培養条件

容器 : プラスチックプレート (直径 6 cm または 10 cm ; Becton Dickinson and

Company)

培養器：炭酸ガス細胞培養装置 (Jouan S.A., 6301C 型または 7300 型)

設定条件 (温度：37℃, CO₂ 濃度：5%, 湿度：加湿)

6.3.8 細胞の選択理由

染色体数のモードが 25 本と少なく、染色体が比較的大きいため標本観察が容易である等の利点があり、培養細胞を用いる染色体異常試験で広く使用されている。また、適用ガイドラインにおいて推奨されている。

6.4 培地

MEM および MEM 培地は、2006 年 6 月 29 日～2006 年 8 月 24 日に、他試験と共通で調製して使用した。

6.4.1 MEM

- (1) イーグル MEM 培地「ニッスイ」① (日水製薬株式会社, ロット番号: 54060311, 548603) 8.3 g を精製水 880 mL に溶解した。
- (2) オートクレーブ滅菌 (121℃, 20 分間) した。
- (3) この溶液に、別に滅菌処理した 2.92 w/v% L-グルタミン水溶液 8.8 mL と、10 w/v% 炭酸水素ナトリウム水溶液 11.2 mL を添加した。

6.4.2 MEM 培地

MEM 900 mL に、非働化 (56℃, 30 分間加熱処理) した牛血清 (Invitrogen Corp., ロット番号: 444175) を 100 mL 添加した。

6.5 S9 mix

6.5.1 S9

6.5.1.1 製造元

キッコーマン株式会社

6.5.1.2 ロット番号

RAA-542

6.5.1.3 製造日

2006 年 4 月 21 日

6.5.1.4 入手日

2006 年 5 月 12 日

6.5.1.5 製造方法

フェノバルビタール（1日目 30 mg/kg を1回腹腔内投与，2日目以降 60 mg/kg を1日1回3日間腹腔内投与）と5,6-ベンゾフラボン（フェノバルビタール投与3日目に 80 mg/kg を1回腹腔内投与）で酵素誘導した7週齢SD系雄ラット（体重：210～245 g）の肝臓より調製された。

6.5.1.6 蛋白含量

25.48 mg/mL（細胞処理時の最終蛋白含量：1.27 mg/mL）

6.5.1.7 保存条件

−80℃以下（実測値：−84～−81℃）

6.5.1.8 使用期限

製造日から6ヶ月間（最終使用日：2006年7月31日）

6.5.2 S9 mix の調製

S9 mix 1 mL あたり以下の組成で用時調製した。使用時まで氷中に保存した。

S9	0.3 mL
D-グルコース 6-リン酸	5 μmol
β-NADP ⁺	4 μmol
HEPES (pH 7.2)	4 μmol
MgCl ₂	5 μmol
KCl	33 μmol
精製水	残量

6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製

6.6.1 被験物質溶液の調製

- (1) 被験物質を所定量秤量し，適量の DMSO を加え，振盪撹拌により溶解させた。
- (2) DMSO を加えて所定量に定容し，最高濃度（最高処理用量の 100 倍濃度；細胞増殖抑制試験および染色体異常試験〔短時間処理法〕：140 mg/mL，染色体異常試験〔連続処理法〕：120 mg/mL）溶液とした。
- (3) 最高濃度溶液の一部を DMSO で段階希釈して，各処理用量の 100 倍濃度（細胞増殖抑制試験：20, 40, 60, 80, 100, 120 mg/mL，染色体異常試験〔短時間処理法〕：35, 70 mg/mL，染色体異常試験〔連続処理法〕：20, 40, 60, 80, 100 mg/mL）溶液を調製した。

- (4) 上記操作は室温，黄色灯下で行い，被験物質溶液は調製当日内に使用した（調製後，使用までの時間；細胞増殖抑制試験：25～40 分間，染色体異常試験〔短時間処理法〕：20～30 分間，染色体異常試験〔連続処理法〕：15～20 分間）。

6.6.2 陽性対照物質溶液の調製

6.6.2.1 MMC 溶液の調製

- (1) 2 mg 入りバイアル瓶の MMC を，注射用水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号：K5E85）5 mL に用時溶解した。
- (2) これを生理食塩液（株式会社大塚製薬工場，ロット番号：K4L77）で段階希釈し，処理用量の 10 倍濃度（短時間処理法：1 $\mu\text{g/mL}$ ，連続処理法：0.5 $\mu\text{g/mL}$ ）の溶液を調製した。

6.6.2.2 BP 溶液の調製

- (1) BP 20 mg を秤量し，DMSO（関東化学株式会社，ロット番号：707X1808）5 mL に溶解した（4 mg/mL：処理用量の 200 倍濃度）。
- (2) 上記溶液を 2006 年 5 月 31 日に調製し，0.2 mL ずつ分注して，冷凍庫（許容温度：-40～-15℃，実測値：-27.1～-21.9℃）で保存した。
- (3) このうちの 1 本を，使用当日に融解して使用した。

6.7 細胞増殖抑制試験

6.7.1 処理条件

-S9 mix：短時間処理法（6 時間処理，18 時間回復）S9 mix 非共存下
+S9 mix：短時間処理法（6 時間処理，18 時間回復）S9 mix 共存下
24 時間処理：連続処理法（24 時間処理）S9 mix 非共存下

6.7.2 被験物質用量

-S9 mix：400，600，800，1000，1200，1400 $\mu\text{g/mL}$
+S9 mix：400，600，800，1000，1200，1400 $\mu\text{g/mL}$
24 時間処理：200，400，600，800，1000，1200，1400 $\mu\text{g/mL}$

6.7.3 被験物質用量の設定理由

細胞増殖抑制試験に先立ち，予備試験を実施した。各処理条件について 50，500 および 5000 $\mu\text{g/mL}$ を設定し，1 用量あたり 1 枚のプレートを用いて実施した。処理終了後のプレートを位相差倒立顕微鏡で観察し，陰性対照群プレートの細胞密度を 100% として相対的な細胞密度を判断した。各プレートの細胞密度は下記の通りであった。

処理条件 \ 用量 (μg/mL)	50	500	5000
-S9 mix	100%	100%	0%
+S9 mix	100%	100%	0%
24 時間処理	100%	80%	0%

以上の結果に基づき、適用ガイドラインで規定されている 10 mmol/L (≒1400 μg/mL) を最高用量に、6.7.2 項の用量を設定した。

6.7.4 細胞処理

- (1) 4×10^3 個/mL に調整した細胞浮遊液をプラスチックプレート（直径 6 cm）に 5 mL ずつ播き、3 日間前培養した。
- (2) MEM 培地を除去した後、被験物質溶液、S9 mix および MEM 培地を、下記の組成でプレートに添加した。陰性対照群については、DMSO を用いて同様に実施した。各処理条件、処理用量につき 2 枚のプレートを用いた。

処理条件	被験物質溶液 または DMSO	S9 mix	MEM 培地
-S9 mix	0.03 mL	—	3.0 mL
+S9 mix	0.03 mL	0.5 mL	2.5 mL
24 時間処理	0.05 mL	—	5.0 mL

- (3) 短時間処理法では 6 時間、連続処理法では 24 時間、細胞を処理した。
- (4) 短時間処理法では 6 時間処理後、MEM で細胞表面を 1 回洗浄し、新たに MEM 培地 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。
- (5) 処理開始時および処理終了時に、被験物質の沈殿等の有無を目視で観察した。

6.7.5 細胞増殖率の測定

- (1) 細胞表面を Ca^{2+} 、 Mg^{2+} フリーのダルベッコリン酸緩衝液（以下 PBS(-)、日水製薬株式会社）で洗浄した。
- (2) 10 v/v% ホルマリン溶液で 5 分間固定した。
- (3) 10 v/v% ホルマリン溶液を捨て、3 v/v% ギムザ液で 10 分間染色した。
- (4) 水洗、乾燥後、染色した各プレートについて単層培養細胞密度計（モノセレーター、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た。
- (5) 陰性対照群の測定値（平均値）を 100% として、細胞増殖率を算出した。

6.7.6 50%細胞増殖抑制用量の算出

50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) は、細胞増殖率が 50% を挟む 2 用量を結ぶ直線式より算出した。-S9 mix, +S9 mix では、50%以上の細胞増殖抑制が認められなかったため、 IC_{50} は算出しなかった。

6.8 染色体異常試験

6.8.1 処理条件

-S9 mix, +S9 mix, 24 時間処理

先ず、短時間処理法のみについて実施した。短時間処理法の結果、判定が陰性であったため、引き続き連続処理法を実施した。

6.8.2 被験物質用量

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、-S9 mix, +S9 mix では 1400 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、24 時間処理では IC_{50} を超える用量を最高用量として、各々下記の用量を設定した。

-S9 mix : 350, 700, 1400 $\mu\text{g/mL}$

+S9 mix : 350, 700, 1400 $\mu\text{g/mL}$

24 時間処理 : 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 $\mu\text{g/mL}$

6.8.3 陽性対照物質用量

-S9 mix : MMC, 0.1 $\mu\text{g/mL}$

+S9 mix : BP, 20 $\mu\text{g/mL}$

24 時間処理 : MMC, 0.05 $\mu\text{g/mL}$

6.8.4 陽性対照物質用量の設定理由

上記用量で染色体異常を誘発することが知られている。

6.8.5 細胞処理

6.7.4 項に示した方法で実施した。

陽性対照群については、下記の組成で同様に実施した。

処理条件	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	MEM 培地
-S9 mix	0.3 mL	—	—	2.7 mL
+S9 mix	—	0.015 mL	0.5 mL	2.5 mL
24 時間処理	0.5 mL	—	—	4.5 mL

陰性対照群および被験物質処理群については、各処理条件、処理用量につき4枚のプレートを用い、2枚を標本作製に、2枚を細胞増殖率の測定に使用した。陽性対照群については、細胞増殖率測定を実施しないので、各処理条件につき2枚のプレートを用いた。

6.8.6 標本作製

- (1) 処理終了の2時間前に、標本作製用プレートにコルセミドを最終用量が0.1 $\mu\text{g/mL}$ となるように加え、分裂中期細胞を蓄積した。
- (2) 処理終了後、細胞表面をPBS(-)で洗浄した。
- (3) 0.25 w/v%トリプシン処理にて細胞を剥離した。
- (4) 細胞浮遊液を遠心管に回収し、遠心分離(1000 rpm, 5分間; 以下同様)により細胞を集めた。
- (5) 上清を除去後、各遠心管に0.075 mol/L塩化カリウム溶液4 mLを加えて低張処理(37°C, 15分)を行った。
- (6) 冷却した固定液(メタノール・酢酸混合液[3:1, v/v])0.5 mLを加え、混和した後に、遠心分離し、上清を除去した。
- (7) 固定液4 mLを加え、混和した後に、遠心分離し、上清を除去した。
- (8) (7)の操作を再度実施した。
- (9) 適量の固定液に細胞を浮遊させた。
- (10) 濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスに2箇所滴下して乾燥させた。プレートあたり2枚の標本作製した。
- (11) 3 v/v%ギムザ溶液で20分間染色し、水洗、乾燥した。
- (12) カバーガラスおよび封入剤で封入した。

6.8.7 細胞増殖率の測定

標本作製と同時期における細胞増殖率は、細胞増殖率測定用のプレートを用いて、6.7.5項に示した方法で実施した。

陽性対照群については実施しなかった。

6.8.8 観察

6.8.8.1 分裂指数の測定および相対分裂指数の算出

1枚のプレートあたり500個、すなわち各用量あたり1000個の細胞について、分裂中期細胞を数え、下式により分裂指数(%)を算出した。

$$\text{分裂指数}(\%) = (\text{分裂中期細胞数}) / (\text{観察細胞数}) \times 100$$

またこれをもとに、各処理用量について、陰性対照値を100%として下式により相対分裂指数(%)を算出した。

$$\text{相対分裂指数 (\%)} = \frac{\text{(被験物質処理群の分裂指数)}}{\text{(陰性対照群の分裂指数)}} \times 100$$

陽性対照群については実施しなかった。

6.8.8.2 予備鏡検

試験の適否確認のため予備鏡検を行い、以下の項目について確認した。

- (1) 各プレートから作製した2枚の標本で合わせて50個以上の分裂中期細胞が得られる。
- (2) 陰性対照群および陽性対照群において、染色体異常を持つ細胞の出現頻度が適切である。

6.8.8.3 観察標本の選定

－S9 mix および＋S9 mix では、細胞増殖率、相対分裂指数共に50%以上であったため、設定した全3用量を選択した。24時間処理では、6.8.7項の細胞増殖率あるいは6.8.8.1項の相対分裂指数が50%未満となる最低用量を最高として、下記の用量を選択した。

24時間処理：600, 800, 1000 µg/mL

6.8.8.4 観察

6.8.8.4.1 標本のコード化

標本をランダムに並べ替え、情報記載部分をラベルで覆った後に観察した。

6.8.8.4.2 観察対象とした分裂中期細胞の選択基準

- (1) 染色体がよく広がっている。
- (2) 動原体数が 25 ± 2 または35以上である（断片化を除く）。

6.8.8.4.3 観察細胞数

プレートあたり100個（用量あたり200個）

6.8.8.4.4 構造異常[1]

- (1) 染色分体型切断
- (2) 染色分体型交換
- (3) 染色体型切断
- (4) 染色体型交換（二動原体、環状染色体など）
- (5) 断片化

6.8.8.4.5 ギャップ

ギャップは、染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした。

他の異常と区別して記録し、構造異常には含めなかった。

6.8.8.4.6 数的異常

動原体数が 35 以上の倍数体細胞（核内倍加細胞を含む）

6.8.9 判定基準

6.8.9.1 染色体異常細胞

構造異常細胞：染色体構造異常を 1 個以上持つ細胞

数的異常細胞：染色体数的異常を持つ細胞

6.8.9.2 データ採用基準

観察可能な分裂中期細胞数がプレートあたり 100 個得られた標本のデータを採用データとした。

6.8.9.3 試験成立基準

以下の基準を満たしている場合に試験成立とした。

- (1) 陰性対照群および陽性対照群ならびに 3 用量以上の被験物質処理群について、データ採用基準を満たしている。
- (2) 陰性対照群において、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が 5%未満である。
- (3) 陽性対照群において、構造異常細胞の出現頻度が 10%以上である。

6.8.9.4 判定基準 [2]

下記の基準に従って、構造異常と数的異常のそれぞれについて判定した。

陰性：いずれの被験物質処理群においても、異常細胞の出現頻度が 5%未満である。

疑陽性：いずれかの被験物質処理群において、異常細胞の出現頻度が 5%以上 10%未満である。

陽性：いずれかの被験物質処理群において、異常細胞の出現頻度が 10%以上であり、用量依存的な増加傾向が認められる。

6.8.9.5 統計学的手法

判定に統計学的手法は用いなかった。

6.9 結果のまとめ

6.9.1 表

- (1) 細胞増殖率
- (2) 分裂指数および相対分裂指数
- (3) プレート毎の構造異常細胞および数的異常細胞の出現数
- (4) 用量毎の構造異常細胞および数的異常細胞の出現数合計および出現頻度

6.9.2 図

- (1) 細胞増殖率
- (2) 染色体異常細胞出現頻度

7. 結果

7.1 細胞増殖抑制試験 (表 1, 図 1~3)

いずれの処理条件, 処理用量においても, 処理開始時および終了時, 細胞処理液中に被験物質の沈殿等は認められなかった.

50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) は 24 時間処理で 828 $\mu\text{g/mL}$ であった.

—S9 mix, +S9 mix では 50%以上の細胞増殖抑制は認められなかった.

7.2 染色体異常試験 (表 2~4, 図 1~5)

いずれの処理条件, 処理用量においても, 処理開始時および終了時, 細胞処理液中に被験物質の沈殿等は認められなかった.

分裂指数測定の結果, いずれの試験, 処理条件においても, 細胞増殖率の結果と比較して顕著な細胞分裂抑制は認められなかった.

標本観察の結果, 染色体構造異常または染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は, いずれの処理条件のいずれの被験物質用量においても 5%未満であった.

陰性対照群における染色体構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度は, いずれの処理条件においても 5%未満であった. また, 陽性対照群における構造異常細胞の出現頻度は, いずれの処理条件においても 10%以上であった.

8. 考察および結論

フェニル尿素の染色体異常誘発性を検討するため, ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した.

染色体異常試験の結果, いずれの処理条件の被験物質処理群においても, 染色体構造異常または染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5%未満であった.

陰性対照群および陽性対照群では染色体異常細胞の出現頻度は期待通りの値を示し, 当試験が技術的に成立していることが示された.

分裂指数測定の結果, 細胞増殖率を指標とした場合に比べて特に顕著な分裂抑制が認められなかったことから, 被験物質の細胞周期に対する著しい影響は無いものと考えられた.

従って, フェニル尿素は, 当試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有さないものと結論した.

9. 参考文献

- [1] 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会・第3分科会・遺伝毒性ワーキンググループ編「医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A」サイエンティスト社，東京，2000
- [2] 祖父尼俊雄監修「染色体異常試験データ集・改訂1998年版」株式会社エル・アイ・シー，東京，1999

表 1 細胞増殖抑制試験の結果

用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)		
	短時間処理法		連続処理法
	-S9 mix	+S9 mix	24時間処理
陰性対照 (DMSO)	100.0	100.0	100.0
200			83.4
400	86.4	110.0	73.4
600	84.5	112.5	67.7
800	84.5	106.0	52.4
1000	76.4	106.0	37.6
1200	74.5	108.0	27.9
1400	64.5	104.0	20.1

DMSO : ジメチルスルホキシド

表 2 分裂指数測定結果

処理	処理-回復 時間 (h)	S9 mix の有無	処理濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	相対分裂 指数 (%)
陰性対照 (DMSO)	6-18	—	0	1000	44	4.4	100.0
フェニル尿素	6-18	—	350	1000	47	4.7	106.8
	6-18	—	700	1000	40	4.0	90.9
	6-18	—	1400	1000	55	5.5	125.0
陰性対照 (DMSO)	6-18	+	0	1000	80	8.0	100.0
フェニル尿素	6-18	+	350	1000	76	7.6	95.0
	6-18	+	700	1000	76	7.6	95.0
	6-18	+	1400	1000	75	7.5	93.8
陰性対照 (DMSO)	24-0	—	0	1000	57	5.7	100.0
フェニル尿素	24-0	—	200	1000	44	4.4	77.2
	24-0	—	400	1000	42	4.2	73.7
	24-0	—	600	1000	35	3.5	61.4
	24-0	—	800	1000	34	3.4	59.6
	24-0	—	1000	1000	28	2.8	49.1
	24-0	—	1200	1000	12	1.2	21.1

DMSO:ジメチルスルホキシド

表 3 染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質の名称 フェニル尿素

処理・回復 時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色体型切斷	染色体型交換	染色体型切斷	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍數体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	0	1	0	0	0	1	0	103.4	100	0	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	96.6	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	350	100	0	0	0	0	0	0	0	96.6	100	0	0	0
			100	1	1	0	0	0	2	0	96.6	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	96.6	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	700	100	0	0	0	1	0	1	0	88.9	100	3	0	3
			100	0	1	0	0	0	1	0	85.0	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	87.0	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6-18	-	1400	100	0	1	1	0	0	2	0	77.3	100	3	0	3
			100	0	0	0	0	0	0	0	70.5	100	5	0	5
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	73.9	200	8 (4.0)	0 (0.0)	8 (4.0)
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	32	34	2	0	0	55	1		100	0	0	0
			100	40	33	3	0	0	61	1		100	0	0	0
			200	72 (36.0)	67 (33.5)	5 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	116 (58.0)	2		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	1	0	0	0	1	0	102.2	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	97.8	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	350	100	0	0	0	0	0	0	0	114.4	100	1	0	1
			100	0	0	2	0	0	2	0	102.2	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	108.3	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	+	700	100	0	0	0	0	0	0	0	106.7	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	97.8	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	102.2	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	+	1400	100	0	0	1	0	0	1	2	102.2	100	2	0	2
			100	0	1	0	0	0	1	0	97.8	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2	100.0	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6-18	+	陽性対照 (BP20)	100	21	82	1	0	0	84	0		100	0	0	0
			100	13	79	0	0	0	80	0		100	0	0	0
			200	34 (17.0)	161 (80.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	164 (82.0)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC, BP : ペンゾ [a] ピレン

表 4 染色体異常試験の結果 (連続処理法)

被験物質の名称 フェニル尿素

処理-回復 時間(h)	被験物質の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体型切断	染色体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍數体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	105.2	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	94.8	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	200	N.D.								82.5	N.D.			
										84.5				
										83.5				
24-0	400	N.D.								71.1	N.D.			
										71.1				
										71.1				
24-0	600	100	0	0	1	0	0	1	0	62.9	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	68.0	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	65.5	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24-0	800	100	0	1	1	0	0	1	0	49.5	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	54.6	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	52.1	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	1000	100	0	0	1	0	0	1	0	36.1	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0	34.0	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	35.1	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	1200	N.D.								36.1	N.D.			
										34.0				
										35.1				
24-0	陽性対照 (MMC 0.05)	100	37	40	2	0	0	64	2		100	1	0	1
		100	39	51	7	0	0	72	1		100	1	0	1
		200	76 (38.0)	91 (45.5)	9 (4.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	136 (68.0)	3		200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC

N.D. : 標本観察を実施しなかった

図1 フェニル尿素処理における細胞毒性
(短時間処理法・-S9 mix)

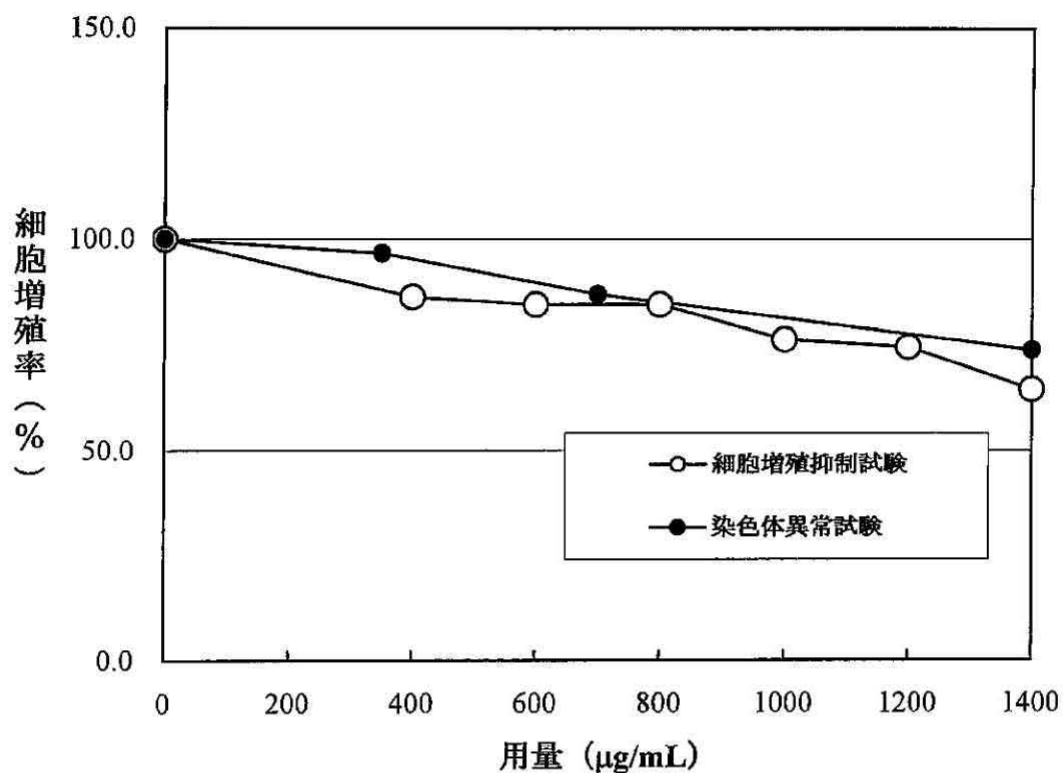


図2 フェニル尿素処理における細胞毒性
(短時間処理法・+S9 mix)

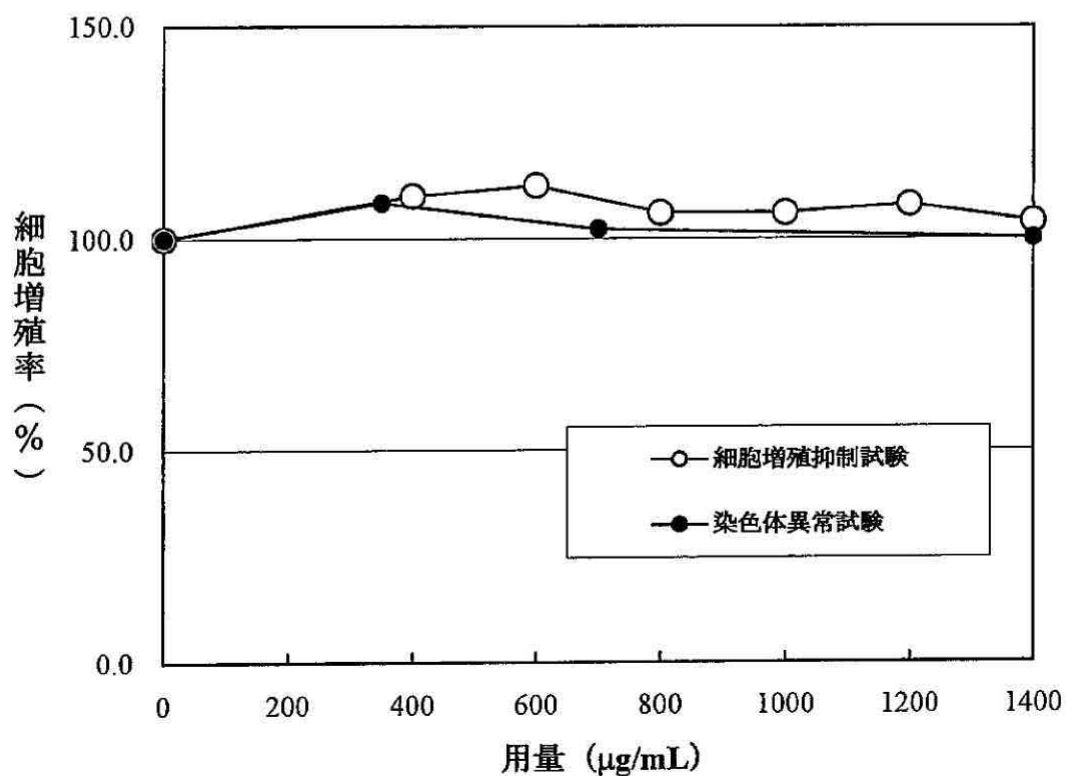


図3 フェニル尿素処理における細胞毒性
(連続処理法)

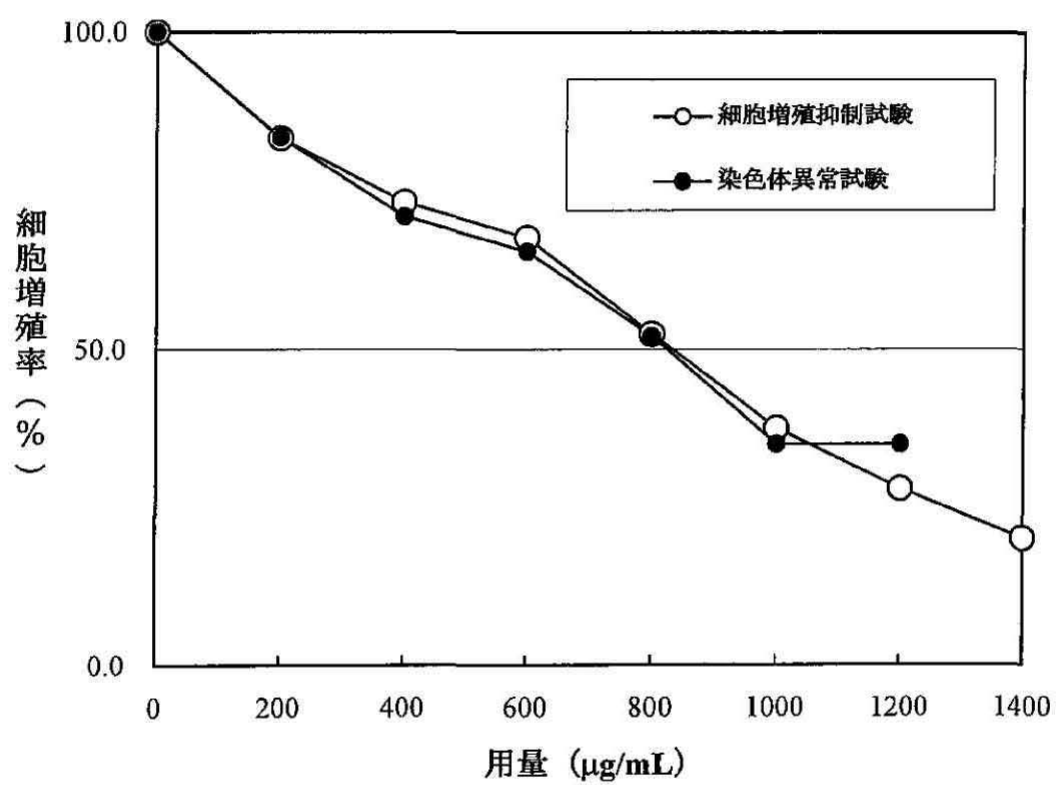


図4 フェニル尿素処理における構造異常細胞出現頻度

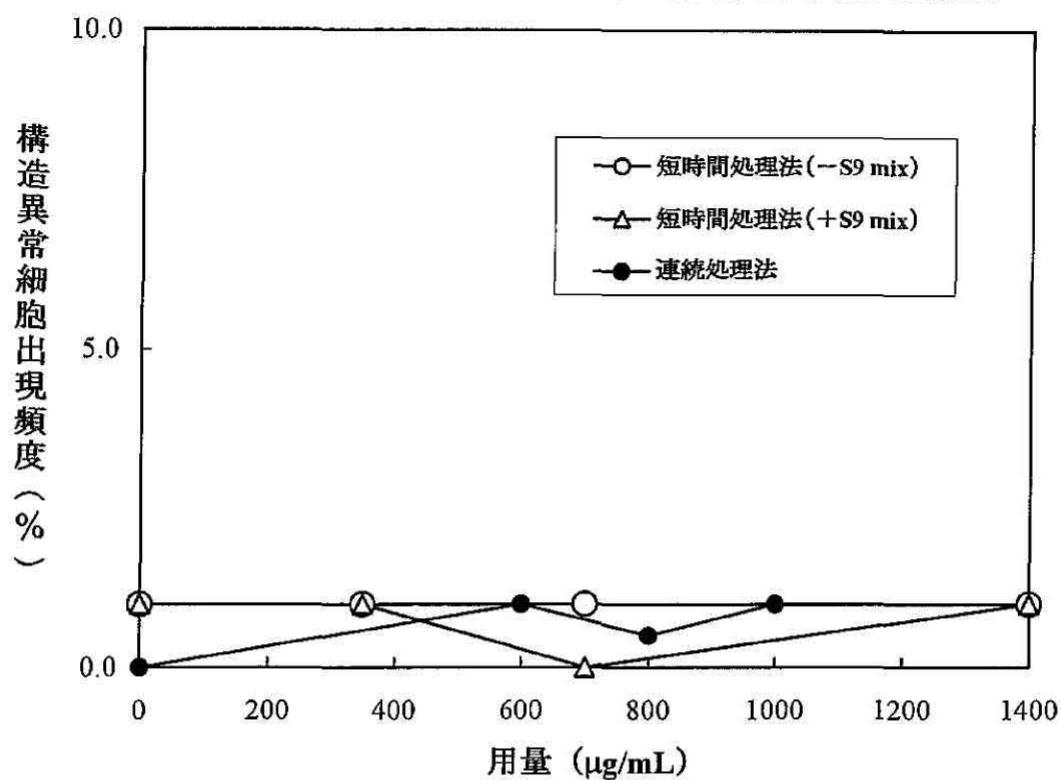


図5 フェニル尿素処理における数的異常細胞出現頻度

