最 終 報 告 書

Benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：9053 （ 115－204 ）

平成 18 年 9 月 19 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.....4

14. 被験物質.....7
15. 試験材料および方法.....8
16. 試験結果.....18
17. 考察および結論.....21
18. 参考文献.....22

Figures

Figure 1 Growth inhibition of CHL cells treated with benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Short-term treatment].....25
Figure 2 Growth inhibition of CHL cells treated with benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Continuous treatment].....26
Figure 3 Growth inhibition of CHL cells treated with benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Short-term treatment] (Additional study).....27
Figure 4 Growth inhibition of CHL cells treated with benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Continuous treatment] (Additional study).....28

Figure 5 Incidence of structural aberrations induced by benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Short-term treatment: –S9] 29

Figure 6 Incidence of structural aberrations induced by benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Short-term treatment: +S9] 30

Figure 7 Incidence of polyploidy cells induced by benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Short-term treatment: +S9] 31

Tables

Table 1 Results of growth inhibition test of benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Short-term treatment] 32

Table 2 Results of growth inhibition test of benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Continuous treatment] 33

Table 3 Results of growth inhibition test of benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Short-term treatment] (Additional study) 34

Table 4 Results of growth inhibition test of benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Continuous treatment] (Additional study) 35

Table 5 Chromosome aberration test in CHL cells treated with benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Short-term treatment: –S9] 36

Table 6 Chromosome aberration test in CHL cells treated with benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt [Short-term treatment: +S9] 37

1. 要約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において，benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt は，染色体異常を誘起するもの（陽性）と判断した.

Benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt の変異原性試験の一環として，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.

先に実施した細胞増殖抑制試験（追加試験）の結果を基に，染色体異常試験の用量を設定した．短時間処理法–S9 処理においては，528，755 および 1078 μg/mL の 3 用量について，同+S9 処理においては，755，1078，1540 および 2200 μg/mL の 4 用量について顕微鏡観察を実施した.

その結果，benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt 処理において，短時間処理法–S9 処理で用量依存性のある統計学的に有意（$p \leq 0.025$）な染色体構造異常の誘発が認められ，+S9 処理においても統計学的に有意（$p \leq 0.025$）な染色体構造異常の誘発が認められた．さらに，短時間処理法+S9 処理においては，用量依存性のある統計学的に有意（$p \leq 0.025$）な染色体倍数性異常の誘発も認められたが，その誘発頻度は最高でも 7.5%であることから，その誘発反応は弱いものであると考えられた.

短時間処理法–S9 処理における陽性対照物質マイトマイシン C（MMC）処理群および同+S9 処理における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.

14. 被験物質

14.1. 被験物質名

Benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt

14.2. 純度／含量

>95%

（不純物）

Benzenesulfonic acid, 2-hydroxy-, tin (2+) salt：<2%

Benzenesulfonic acid, 2,4-hydroxy-, tin (2+) salt：<2%

14.3. 提供元

14.4. 製造年月日

2005 年 9 月 22 日

14.5. 保存条件

室温

14.6. 保存場所

安評センター被験物質保管用室温保管庫

- 7 号館 2 階被験物質調製室 B 内室温保管室 ch. 74

  保存期間:2005 年 9 月 27 日～2006 年 1 月 31 日および 2006 年 5 月 2 日～同年 5 月 9 日（返却日）

  実測値：12.5～22.6°C および 20.4～22.1°C

  （電気配線工事中：2005 年 10 月 21 日，18：20～19：20，実測値：20.4～20.7°C）

  （電気年次点検期間中：2005 年 12 月 4 日，9：20～14：00，実測値：13.2～15.6°C）

- 6 号館 2 階被験物質調製室内スーパードライ ch. 40

  保存期間：2006 年 1 月 31 日～同年 5 月 2 日

  実測値：21.9～25.8°C

14.7.　一般名

フェノールスルホン酸スズ

14.8.　化学名

Benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt

14.9.　CAS No.

70974-33-3

14.10.　化学構造

$[C_6H_4(OH)SO_3]_2Sn$

14.11.　分子式

$C_{12}H_{10}O_8S_2Sn$

14.12.　分子量

465.05

14.13.　物質の状態

白色結晶性の固体

14.14.　安定性

実験終了後，株式会社 大和化成研究所で残余被験物質を分析した結果，被験物質は実験期間中安定であったことが確認された（2006 年 5 月 19 日付報告）.

14.15.　溶解度

水：420 mg/mL

14.16.　取り扱い上の注意

取り扱いに際しては，マスクおよび手袋を着用する.

14.17.　残余被験物質の処理

実験終了後，1 g の被験物質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，残りは被験物質等管理責任者を介して被験物質提供元に返却した.

15. 試験材料および方法

15.1.　試験細胞株

遺伝毒性ガイドラインのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において指定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，1984 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. K31758278, 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11の細胞を，細胞増殖抑制試験（追加試験）では，継代数16の細胞を，染色体異常試験では，継代数22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（15.2時間），染色体数（モード数25本の細胞が84%）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．

15.2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地（IWAKI, Lot No. 501095, 旭テクノグラス）に非働化（56°C, 30分）済みの仔牛血清（Lot No. 542384, 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（15°C以下）に保存した．

15.3. 培養条件

CO_2インキュベーター（三洋電機バイオメディカ）を用い，CO_2濃度5%，37°Cの条件で細胞を培養した．

15.4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のS9 mix（Lot No. CAM-534, 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．

15.4.1. 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以下に示す．

ロット番号	RAA-534
製造年月日	2005年12月2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	202～236g
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	26.04 mg/mL

15.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の各内容物の量を以下に示す.

S9	0.3	mL
$MgCl_2$	5	μmol
KCl	33	μmol
G-6-P	5	μmol
NADP	4	μmol
HEPES 緩衝液（pH7.2）	4	μmol

15.5. 被験物質液の調製

本被験物質は，水に易溶であることから，注射用水（日本薬局方注射用水，Lot No. K4F79，大塚製薬工場）に溶解させた.

細胞増殖抑制試験では，使用直前に被験物質 186 mg を精密に量り，目盛付き試験管に移した後，注射用水 3 mL を加え，撹拌しながら溶解させた．さらに，注射用水を加えて 4 mL に定容し，調製原液（46.5 mg/mL 液）を準備した. 注射用水 1 mL に 46.5 mg/mL 調製原液 1 mL を加えることにより，23.25 mg/mL 溶液を調製した．以下，同様に希釈を順次行い，11.63，5.81，2.91，1.45，0.727，0.363，0.182 および 0.0908 mg/mL 溶液を調製した.

細胞増殖抑制試験（追加試験）では，使用直前に被験物質 186 mg を精密に量り，目盛付き試験管に移した後，注射用水約 3 mL を加え，撹拌しながら溶解させた．さらに，注射用水を加えて 4 mL に定容し，調製原液（46.5 mg/mL 液）を準備した. 注射用水 2 mL に 46.5 mg/mL 調製原液 2 mL を加えることにより，23.25 mg/mL 溶液を調製した. 以下，同様に希釈を順次行い，11.63 および 5.81 mg/mL 溶液を調製した.

染色体異常試験では，使用直前に被験物質 176 mg を精密に量り，目盛付き試験管に移した後，注射用水約 6 mL を加え，撹拌しながら溶解させた．さらに，注射用水を加えて 8 mL に定容し，調製原液（22 mg/mL 液）を準備した. 注射用水 2.4 mL に 22 mg/mL 調製原液 5.6 mL を加えることにより，15.4 mg/mL 溶液を調製した．以下，同様に希釈を順次行い，10.8，7.55，5.28，3.70，2.59 および 1.81 mg/mL 溶液を調製した.

いずれの試験においても，被験物質液は調製後 1 時間以内に使用した.

15.6. 対照群

15.6.1. 陰性（溶媒）対照

被験物質の調製に用いた溶媒である注射用水を使用した.

15.6.2. 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. K4D88，大塚製薬工場）5 mL に溶解したマイトマイシン C（MMC，2 mg 力価／バイアル，Lot No. 433ADA，協和醗酵工業）を生理食塩液（日本薬局方生理食塩液，Lot No. 4C87N，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 μg/mL，連続処理法で 0.05 μg/mL とした．

15.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

注射用水（Lot No. K4D88）5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP，100 mg／バイアル，Lot No. 4028，塩野義製薬）を生理食塩液（Lot No. 4C87N）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 μg/mL とした．

15.7. 細胞増殖抑制試験（予備試験）

15.7.1. 用量

細胞増殖抑制試験における被験物質の用量として，ガイドライン上定められた 10 mM 相当の 4650 μg/mL を最高用量とし，以下，2325，1163，581，291，145，72.7，36.3，18.2 および 9.08 μg/mL の計 10 段階を設定した．

15.7.2. 使用ウエル数および識別方法

1 用量当たり 2 ウエルを用いた．

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，各ウエルを識別した．

15.7.3. 短時間処理法–S9 処理

12 ウエルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F，住友ベークライト）の各ウエルに，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，15.7.6.に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った．6 時間培養を続けた後，各ウエルの培養液を除去し，ダルベッコリン酸緩衝液（Lot No. 075K24491，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．

15.7.4. 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，15.7.6.に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った．

その後の操作は 15.7.3.に記載した方法に準じた．

15.7.5. 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，15.7.6.に記載する割合で，溶媒あるいは被験物質の処理を行い，さらに 24 時間培養を続けた．

15.7.6. 処理量一覧

	陰性対照および被験物質		
	培養液	S9 mix	処理液
–S9 処理	540 μL	–	60 μL
+S9 処理	440 μL	100 μL	60 μL
24 時間処理	540 μL	–	60 μL

15.7.7. 析出等の観察

各処理法において，処理開始および処理終了時に，析出等の有無を肉眼で観察した．

15.7.8. 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. EWK9790，和光純薬工業）を加えて，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）3 あるいは 5 mL を加え，5 分間放置した．各ウエルの溶出液を，96 ウエルのプレート（アッセイプレート，IWAKI）に，各々300 μL 分注し，マイクロプレートリーダー（モデル 450，BIO・RAD）を用いて，570 nm での吸光度を測定した．各用量群について陰性対照群の吸光度に対する比（相対細胞増殖率）を求めた．

15.8. 細胞増殖抑制試験（追加試験）

細胞増殖抑制試験において，全ての処理法の 1163 μg/mL 以上の用量で，析出物が残存し，染色されたため，正確な相対細胞増殖率が測定できなかった．したがって，細胞増殖抑制度を把握するため，測定方法を変えて追加試験を実施した．また，染色体異常試験において，析出物が染色体標本上に付着し，顕微鏡観察に支障を来すことが懸念されたため，染色体標本を作製し，観察が可能であるかどうかを検討した．

15.8.1. 用量

追加試験の用量として，10 mM 相当の 4650 μg/mL を最高用量とし，以下，2325，1163 および 581 μg/mL の計 4 段階を設定した．

15.8.2. 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．ただし，標本作製は，1 用量当たり 1 枚のプレートについて実施した．

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．

15.8.3. 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，15.8.6.に記載する割合で，溶媒あるいは被験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. 075K24491, 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，相対細胞増殖率の測定および染色体標本の作製を行った．

15.8.4. 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，15.8.6.に記載する割合で，溶媒あるいは被験物質の処理を行った．

その後の操作は，15.8.3.に記載した方法に準じた．

15.8.5. 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，15.8.6.に記載する割合で，溶媒あるいは被験物質の処理を行った．さらに 24 時間培養を続けた後，相対細胞増殖率の測定および染色体標本の作製を行った．

15.8.6. 処理量一覧

	溶媒あるいは被験物質		
	培養液	S9 mix	処理液
–S9 処理	2.7 mL	–	0.3 mL
+S9 処理	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	2.7 mL	–	0.3 mL

15.8.7. 析出等の観察

各処理法において，処理開始および処理終了時に，析出等の有無を肉眼で観察した．

15.8.8. 染色体標本の作製

培養終了のおよそ 2 時間前に，最終濃度が 0.2 μg/mL となるようコルセミド溶液（Lot No. 1294210, 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. 1300409, Invitrogen）を用いて

プレートより細胞を剥離し，遠心管内の培養液に加えた．この細胞浮遊液の一部（0.5 mL）を細胞数計数用に分取した．残りの細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離し，培養液を除いた後，37°C の条件で保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液約 5 mL を加えた．この細胞浮遊液の一部（50 μL）を ATP 測定に使用した．残りの細胞浮遊液を，37°C の条件下で 16 分間低張処理した．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，細胞浮遊液とした．細胞密度を適切な濃度に調整し，用手法によりスライドガラス上に細胞浮遊液を 2 滴滴下し，染色体標本を 1 枚作製した．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（Buffer tablets pH 6.8, Lot No. TP601474, Merck）を用いて 1.2 v/v%に希釈したギムザ液（Lot No. OB408561, Merck）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．

15.8.9. 相対細胞増殖率の測定

相対細胞増殖率を算出するため，ATP フォトメーターを用いて，相対発光量（Relative Light Unit：RLU）の測定を行った．すなわち，1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に，低張処理を開始した細胞液 50 μL を添加し，撹拌した．測定用チューブに，この混合液 100 μL を分注した．細胞液添加から約 20 分経過後，測定用チューブに ATP 測定用試薬キット（ルシフェール 250，キッコーマン）の発光試薬液 100 μL を添加し，RLU を測定した．各用量群について陰性対照群の RLU に対する比（相対細胞増殖率）を求めた．

また，析出物の影響により RLU が適切に測定されない可能性があるため，血球計算盤を用いて細胞数の計数を行った．すなわち，15.8.8.で分取した細胞浮遊液（0.5 mL）を 1000 r/min で 5 分間遠心分離し，上清 0.25 mL を捨て，沈渣を残りの液 0.25 mL に再浮遊して，細胞懸濁液を作製した．この細胞懸濁液について，血球計算盤を用いて細胞数を計数した．各用量群について陰性対照群の細胞数に対する比（相対細胞増殖率）を求めた．

算出された相対細胞増殖率に，析出物の影響と思われる大きな差が認められなかったため，RLU から求めた相対細胞増殖率を採用した．

15.8.10. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制が認められたため，プロビット法あるいは対数確率紙を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した．

15.8.11. 標本の観察

各標本を顕微鏡下（× 600 程度）で観察し，析出物の残存程度，分裂中期像の量等により，染色体異常の観察が可能な標本であるかどうかを判定した．

15.9. 染色体異常試験

15.9.1. 用量

細胞増殖抑制試験（追加試験）の結果，短時間処理法–S9 処理，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，細胞毒性が認められ，50%細胞増殖抑制濃度は，それぞれ 1086，1796 および 510 μg/mL であった．また，染色体標本は，短時間処理法（両処理）の 1163 μg/mL 以下の用量および連続処理法の 581 μg/mL においては，観察可能な状態であったが，それより高い用量では，分裂中期像の減少により観察不可能な状態であった．したがって，染色体異常試験では，細胞の増殖を 50%以上抑制すると推定される用量，すなわち，–S9 処理では 1540 μg/mL，+S9 処理では 2200 μg/mL，24 時間処理では 1078 μg/mL をそれぞれ最高用量とし，次に示す 5～6 用量を設定した．

処理法	用量（μg/mL）							
短時間処理法–S9 処理	—	—	370	<u>528</u>	<u>755</u>	<u>1078</u>	1540	—
短時間処理法+S9 処理	—	—	370	528	<u>755</u>	<u>1078</u>	<u>1540</u>	<u>2200</u>
連続処理法 24 時間処理	181	259	370	528	755	1078	—	—

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．

15.9.2. 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．

15.9.3. 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，15.9.6.に記載する割合で，溶媒，被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った．

その後の操作は，15.8.3.に記載した方法に準じた．

15.9.4. 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，15.9.6.に記載する割合で，溶媒，被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った．

その後の操作は，15.8.3.に記載した方法に準じた．

15.9.5. 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，15.9.6.に記載する割合で，溶媒，被験物質あるい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.

15.9.6. 処理量一覧

	溶媒あるいは被験物質			陽性対照物質		
	培養液	S9 mix	処理液	培養液	S9 mix	処理液
–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

15.9.7. 析出等の観察

各処理法において，処理開始および処理終了時に，析出等の有無を肉眼で観察した.

15.9.8. 標本の作製

染色体標本作製の2時間前に，最終濃度が0.2 μg/mL となるようコルセミド溶液（Lot No. 1294210, 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. 1300409, 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，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5 mL を加え，37°C の条件下で16分間低張処理した．その後の操作は，15.8.8.に記載した方法に準じた．ただし，1プレート当たりの標本作製枚数は，細胞濃度確認用に1枚，染色体異常観察用に2枚とした.

15.9.9. 相対細胞増殖率の測定

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.

相対発光量（RLU）の測定については，15.8.9.に記載した方法に準じた．各用量群について陰性対照群の RLU に対する比（相対細胞増殖率）を求めた.

15.9.10. 評価対象

–S9 処理の場合，15.9.9.における相対細胞増殖率が陰性対照群の50%未満になる用量（1540 μg/mL）では観察可能な分裂像が認められなかったため，1078 μg/mL 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．+S9 処理の場合，相対細胞増殖率が陰性対照群の50%未満になる用量（2200 μg/mL）を最高用量としたが，連続する3用量では相対細胞増殖率の低い用量範囲のみ観察することになるため，連続する4用量を評価対象とした.

15.9.11. 染色体の観察

短時間処理法と連続処理法のそれぞれの標本を分けて，コード化した．始めに短時間処理法について染色体の観察を実施し，その結果，陽性結果が得られたことから，連続処理法の標本については，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，染色体の形態的変化として，ギャップ（gap），染色分体切断（ctb），染色体切断（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．

15.10. 試験成立条件

a. 陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は，背景データから求めた基準値内であり，かつ，いずれも 5%未満であること

b. 陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は，上記の基準値内であり，かつ，10%以上であること

上記の条件を満たした場合に試験は成立したと判断した．

15.11. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞については，染色体異常細胞数から除外して判定した．

染色体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的な妥当性も考慮して行った．

15.12. D_{20}値ならびにTR値の算出法

D_{20}値は，分裂中期像の 20%にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であり，最小二乗法により算出した．TR値は，一定濃度（mg/mL）当たりの交換型異常（cte）出現数を示す比較値であり，染色分体交換の出現頻度（%）を被験物質濃度（mg/mL 換算）で割ることにより算出した．

16. 試験結果

16.1. 細胞増殖抑制試験

16.1.1. 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.

全ての処理の 1163 μg/mL 以上の用量において，細胞表面に付着した析出物が残存し，染色されたため，正確な相対細胞増殖率が得られなかった．特に，24 時間処理では，吸光度が高すぎて測定範囲外となったため，相対細胞増殖率が算出できなかった.

16.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時，全ての処理の 2325 μg/mL 以上の用量において白濁が認められ，さらに，4650 μg/mL では白色粉末状の析出物も認められた．処理終了時には，–S9 処理および同+S9 処理では，処理開始時と同様の析出が観察され，24 時間処理では，1163 μg/mL 以上の用量において白濁が認められた．さらに，染色後の細胞を顕微鏡で観察したところ，–S9 処理および同+S9 処理の 1163 μg/mL の用量においても析出物が認められた.

また，処理開始時に，全ての処理の 1163 μg/mL 以上の用量において培養液が黄色を呈していた．したがって，pH の変化を調べるため，新たに準備した培養液に被験物質液を添加し，pH を測定した．測定は，S9 mix を添加しない条件で，処理後 0，6 および 24 時間に実施した．その結果（下表），高用量において，陰性対照と比較してわずかに pH が低下した.

	pH 値（各 2 ウエル）		
用量（μg/mL）	処理後 0 h	処理後 6 h	処理後 24 h
陰性対照	8.2，8.2	8.2，8.2	8.1，8.3
291	8.0，8.0	8.3，8.3	8.3，8.1
581	7.9，8.0	8.3，8.3	8.2，8.1
1163	7.7，7.7	8.3，8.4	8.2，8.1
2325	7.2，7.2	8.1，8.2	8.1，8.0
4650	6.5，6.6	7.5，7.4	7.1，7.1

16.2. 細胞増殖抑制試験（追加試験）

16.2.1. 追加試験結果

試験結果を Figure 3，4 および Table 3，4 に示した.

短時間処理法–S9 処理および同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理の全てにおいて，濃度依存性を伴った細胞増殖抑制作用が認められ，50%細胞増殖抑制濃度は，それぞれ 1086，1796 および 510 μg/mL と算出された.

16.2.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時，全ての処理の 2325 μg/mL 以上の用量において白濁が認められ，さらに，4650 μg/mL では白色粉末状の析出物も認められた．処理終了時には，–S9 処理および+S9 処理では，処理開始時と同様の析出が観察され，24 時間処理では，1163 μg/mL 以上の用量において白濁が認められた．

また，処理開始時に，全ての処理の 1163 μg/mL 以上の用量において培養液が黄色を呈していた．したがって，処理開始時および処理終了時に培養液の pH を測定した．その結果（下表），高用量において，陰性対照と比較してわずかに pH が低下した．

	pH 値（各 2 プレート）					
	–S9 処理		+S9 処理		24 時間処理	
用量 (μg/mL)	処理開始	処理終了	処理開始	処理終了	処理開始	処理終了
陰性対照	8.3，8.4	7.4，7.4	7.3，7.2	7.3，7.4	7.7，7.8	7.4，7.5
581	8.3，8.2	7.4，7.5	7.3，7.4	7.4，7.4	7.7，7.7	7.5，7.4
1163	8.1，8.1	7.5，7.5	7.3，7.3	7.3，7.4	7.6，7.7	7.4，7.5
2325	7.7，7.7	7.3，7.4	7.1，7.2	7.1，7.2	7.5，7.6	7.4，7.4
4650	7.2，7.3	6.9，6.9	6.6，6.5	6.4，6.3	7.1，7.1	6.8，6.8

16.3. 染色体異常試験

16.3.1. 短時間処理法–S9 処理

試験結果を Figure 5，Table 5 および Appendix 1 に示した．

Benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt 処理群での染色体構造異常出現頻度は，528，755 および 1078 μg/mL の用量で，それぞれ 4.5，12.5 および 24.0%を示し，全ての用量において，陰性対照群（1.5%）と比較し有意（p≤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≤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，528，755 および 1078 μg/mL の用量で，それぞれ 0.0，0.5 および 1.0%を示し，陰性対照群（0.0%）と同等であった．また，用量に依存した相対細胞増殖率の減少傾向が観察され，染色体異常評価群中の最高用量である 1078 μg/mL での相対細胞増殖率は，52.9%であった．なお，1540 μg/mL における相対細胞増殖率は 40.6%であったが，観察可能な分裂像が認められなかった．

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，43.5%（p≤0.025）であった．

16.3.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 6，Table 6 および Appendix 2 に示した．

Benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt 処理群での染色体構造異常出現頻度は，755，

1078，1540 および 2200 μg/mL の用量で，それぞれ 1.0，0.0，1.0 および 14.0%を示し，2200 μg/mL において，陰性対照群（0.0%）と比較し有意（p≤0.025）な増加が認められた．倍数性細胞の出現頻度は，755，1078，1540 および 2200 μg/mL の用量で，それぞれ 0.0，1.0，2.5 および 7.5%を示し，2200 μg/mL において，陰性対照群（0.5%）と比較し有意（p≤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≤0.025）な用量依存性が認められた．また，用量に依存した相対細胞増殖率の減少傾向が観察され，染色体異常評価群中の最高用量である 2200 μg/mL での相対細胞増殖率は，42.7%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，24.0%（p≤0.025）であった．

16.3.3. 析出等の観察

被験物質処理開始，+S9 処理の 1540 μg/mL 以上の用量において，白色粉末状の析出が認められた．処理終了時には，+S9 処理の 1540 μg/mL 以上の用量および 24 時間処理の 755 μg/mL 以上の用量において，白濁が認められた．

また，処理開始時に，全ての処理の 755 μg/mL 以上の用量において，培養液が黄色を呈していたため，処理開始時および処理終了時に培養液の pH を測定した．その結果（下表），高用量において，処理開始時に，陰性対照と比較してわずかに pH が低下したが，いずれも 7.0 以上であったため，pH の影響はないと判断した．

	pH 値（各 2 プレート）					
	–S9 処理		+S9 処理		24 時間処理	
用量（μg/mL）	処理開始	処理終了	処理開始	処理終了	処理開始	処理終了
陰性対照	8.2，8.3	7.6，7.7	8.1，8.2	7.4，7.4	8.3，8.4	7.7，7.7
755	7.9，8.1	7.5，7.6	7.9，8.0	7.4，7.5	8.1，8.1	7.8，7.7
1078	7.9，7.9	7.5，7.6	7.9，7.9	7.4，7.5	8.0，8.1	7.7，7.8
1540	7.8，7.8	7.5，7.6	7.8，7.8	7.4，7.4	—	—
2200	—	—	7.6，7.6	7.3，7.3	—	—

16.4. D_{20}値ならびにTR値算出結果

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/mL当たり）は以下の通りであった．

処理法	異常の種類	D_{20}値	TR 値（用量μg/mL）	
短時間処理法–S9 処理	構造異常	0.964	10.2	(1078)
短時間処理法+S9 処理	構造異常	4.12	3.86	(2200)
	数的異常	4.73	—	

17. 考察および結論

Benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt 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.

短時間処理法–S9 処理ならびに同+S9 処理では，細胞増殖を 50%程度抑制する用量まで検討した.

その結果，benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt 処理群では，短時間処理法–S9 処理で，用量依存性のある統計学的に有意（$p \leq 0.025$）な染色体構造異常の誘発が認められ，+S9 処理においても，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．さらに，+S9 処理においては，用量依存性のある統計学的に有意（$p \leq 0.025$）な染色体倍数性異常の誘発も認められたが，その誘発頻度は最高でも 7.5%であることから，その誘発反応は弱いものであると考えられた.

なお，陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度は，いずれも背景データ（Appendix 3）から求めた基準値内であり，試験成立条件を満たしたことから，当該試験は適切な条件でなされたと判断された.

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，0.964（mg/mL），TR 値の最大値は，10.2 とそれぞれ算出された.

これまでに，benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) saltの遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告はない. 類縁体である 2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸については，細菌を用いる復帰突然変異試験で陽性[1)]，CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陰性[2)]と報告されている．また，3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムについては，細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性[3)]，CHL/IU細胞を用いた染色体異常試験で陰性[4)]と報告されている.

以上の試験結果から，当該試験条件下において，benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt 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.

18. 参考文献

1) 中嶋圓，益森勝志，板倉真由実，化学物質毒性試験報告書 Vol. 6, 303-307, 1998.

2) 中嶋圓，益森勝志，板倉真由実，化学物質毒性試験報告書 Vol. 6, 308-311, 1998.

3) 野田篤，昆尚美，化学物質毒性試験報告書 Vol. 6, 329-332, 1998.

4) 野田篤，昆尚美，化学物質毒性試験報告書 Vol. 6, 333-335, 1998.

Exp. No. 9053(115-204)

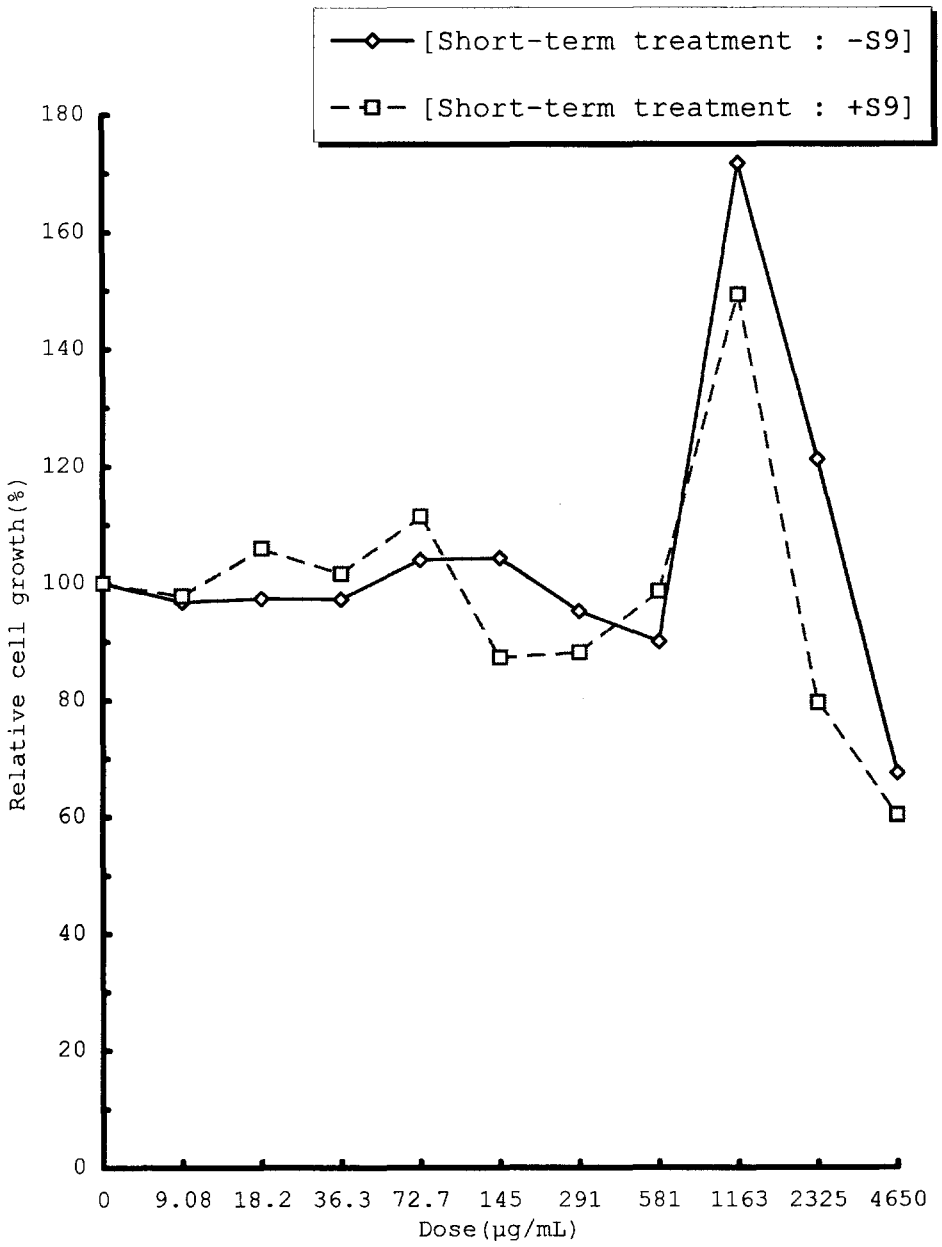

Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)salt [Short-term treatment]

Exp. No. 9053(115-204)

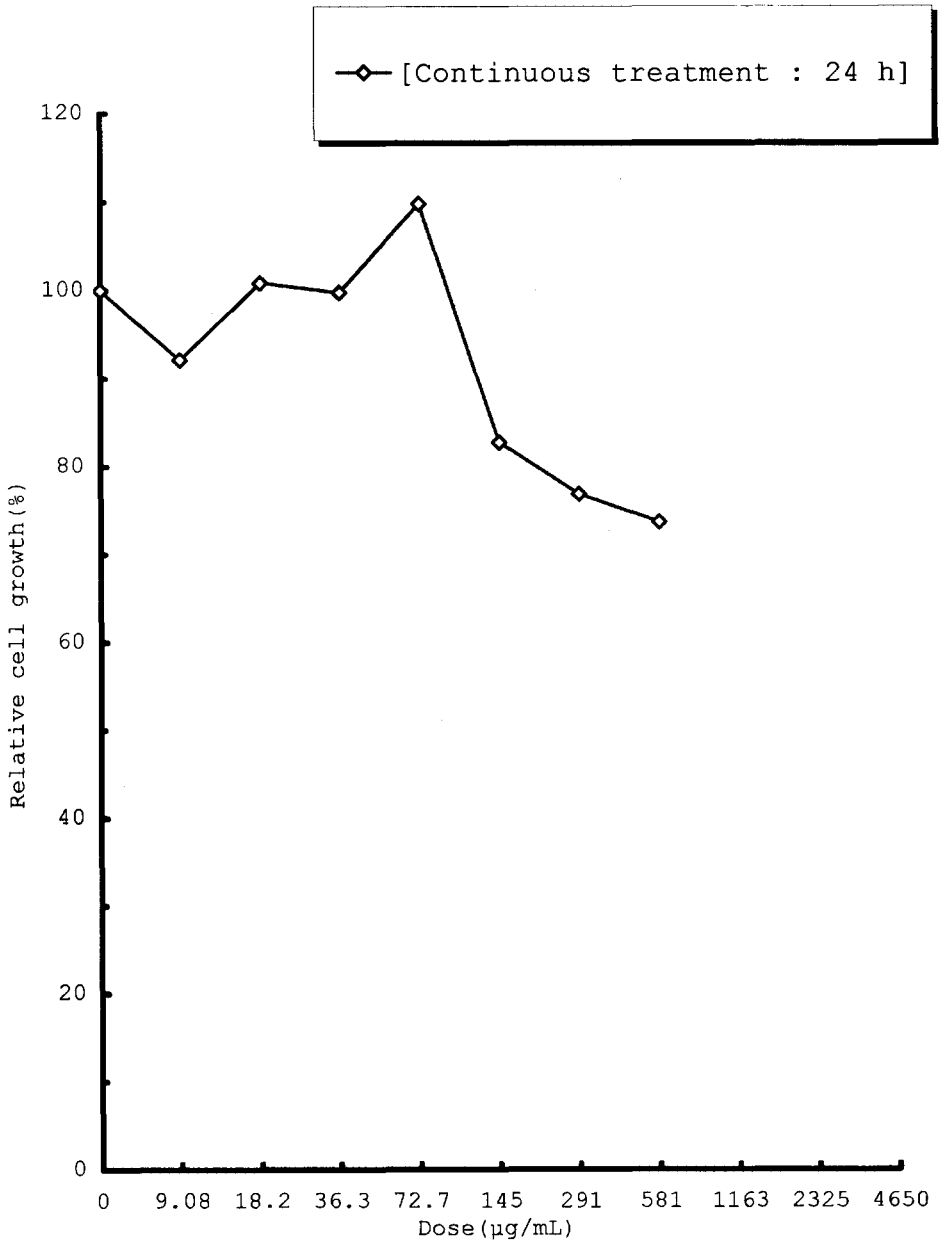

Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)salt [Continuous treatment]

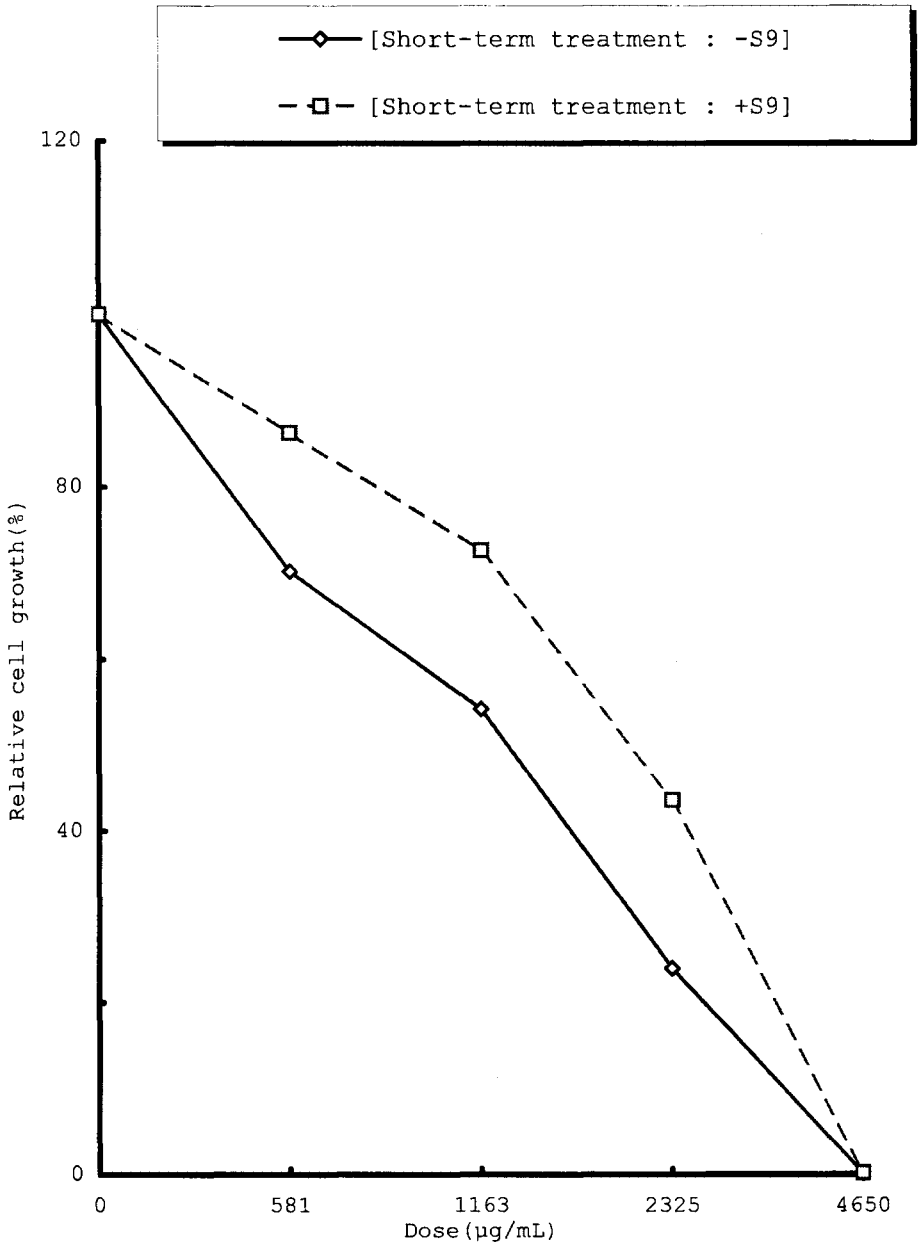

Figure 3. Growth inhibition of CHL cells treated with benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)salt [Short-term treatment] (Additional study)

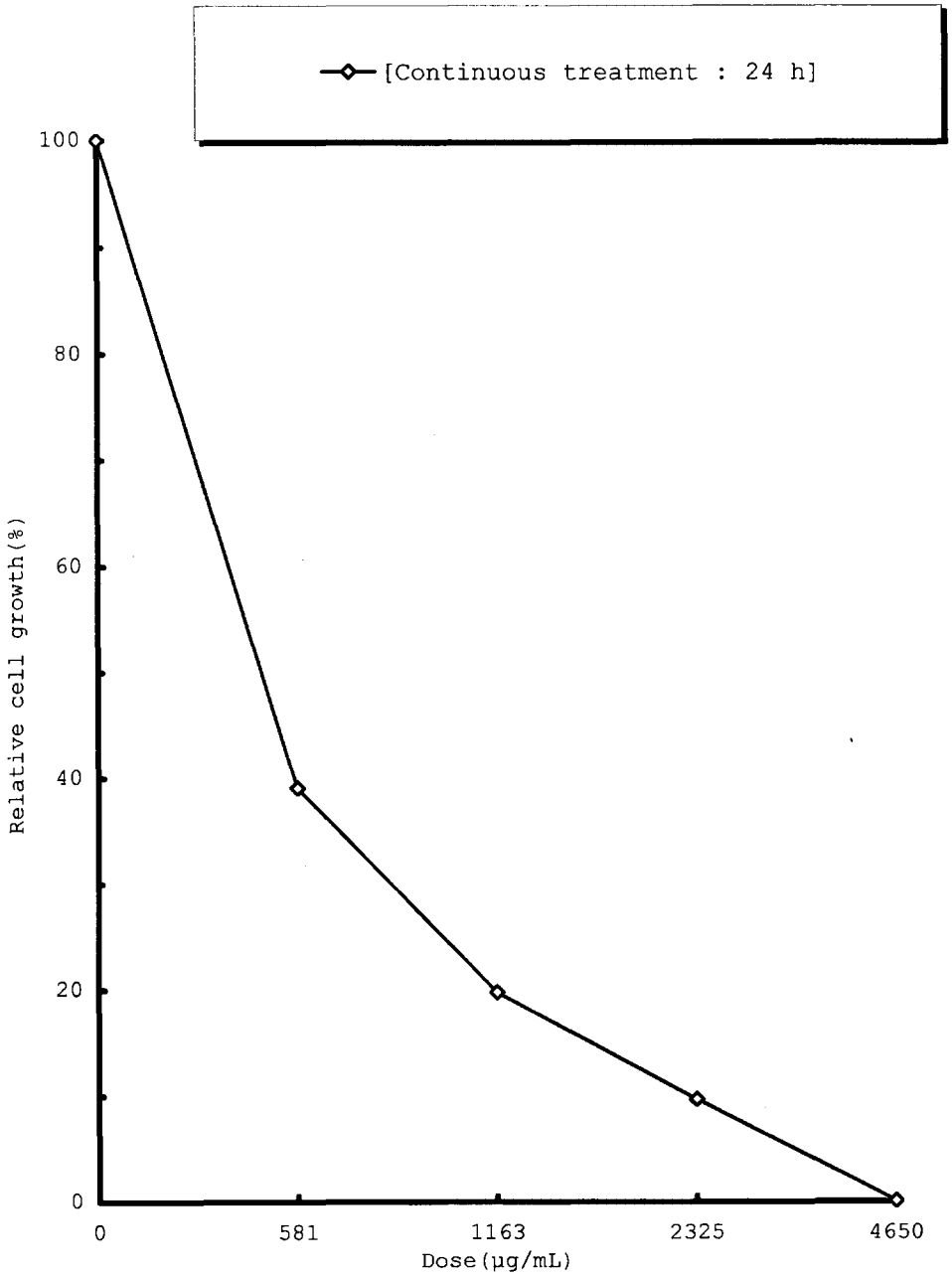

Figure 4. Growth inhibition of CHL cells treated with benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)salt [Continuous treatment] (Additional study)

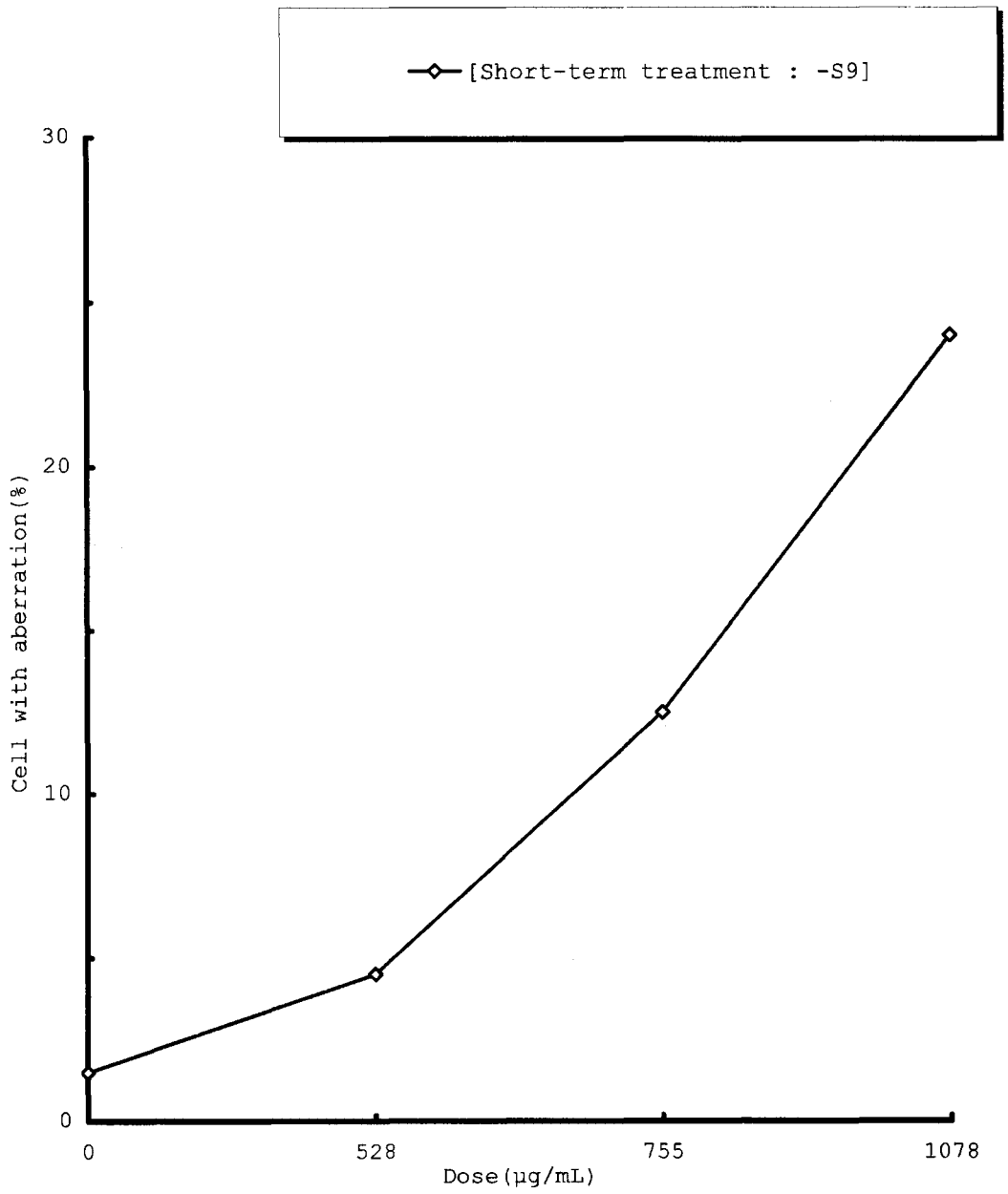

Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)salt [Short-term treatment:-S9]

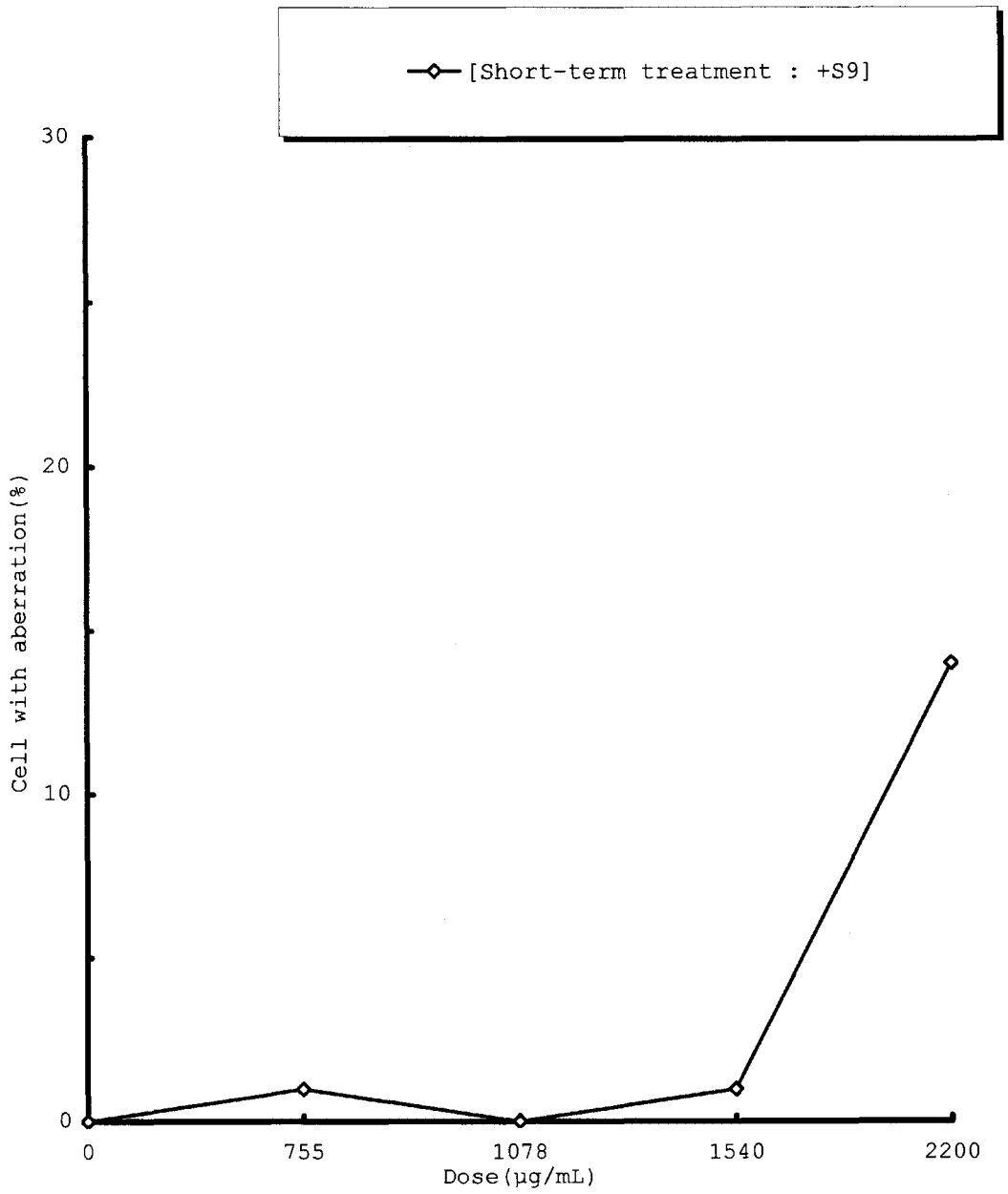

Figure 6. Incidence of structural aberrations induced by benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)salt [Short-term treatment:+S9]

Exp. No. 9053(115-204)

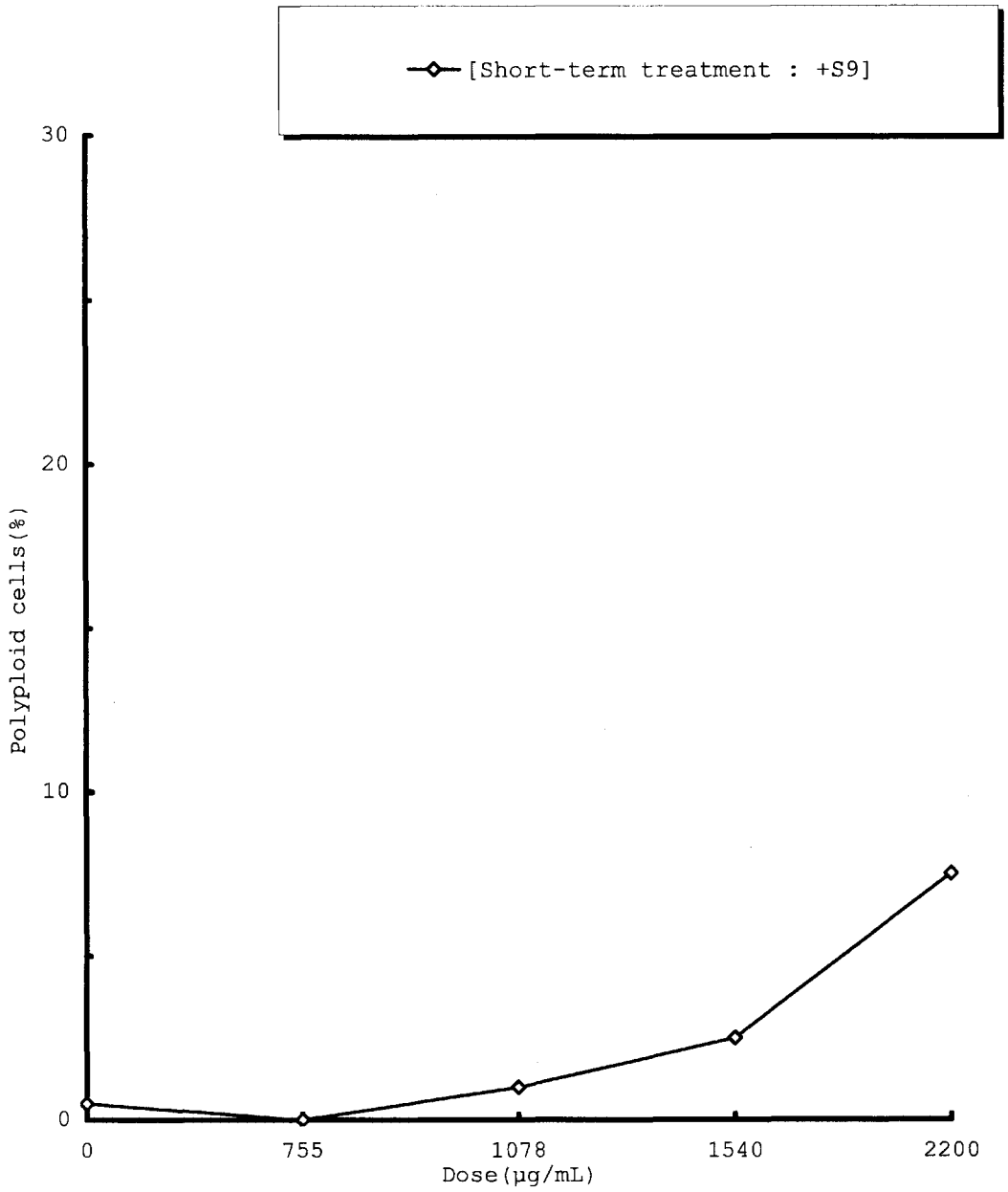

Figure 7. Incidence of polyploid cells induced by benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)salt [Short-term treatment:+S9]

Table 1. Results of growth inhibition test of benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)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]
Benzenesulfonic acid,4-hydroxy-, tin(2+)salt	0 a)	100.0 100.0	[100.0]	Benzenesulfonic acid,4-hydroxy-, tin(2+)salt	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	9.08	94.5 99.0	[96.8]		9.08	95.4 100.1	[97.8]
	18.2	100.1 94.8	[97.5]		18.2	103.8 108.0	[105.9]
	36.3	93.2 101.3	[97.3]		36.3	101.6 101.6	[101.6]
	72.7	99.8 108.2	[104.0]		72.7	109.3 113.4	[111.4]
	145	104.3 104.3	[104.3]		145	84.4 90.2	[87.3]
	291	96.9 93.5	[95.2]		291	83.8 92.4	[88.1]
	581	90.7 89.2	[90.0]		581	93.2 103.9	[98.6]
	1163	162.4 181.0	[171.7]		1163	149.0 149.5	[149.3]
	2325 d)	144.0 98.3	[121.2]		2325 d)	81.1 77.9	[79.5]
	4650 d)	58.7 76.2	[67.5]		4650 d)	77.6 43.0	[60.3]

a): Negative control (Water for injection : 100 μL/mL)
d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 2. Results of growth inhibition test of benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)salt
[Continuous treatment]

[Continuous treatment : 24 h]

Compound	Dose(μg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
Benzenesulfonic acid,4-hydroxy-, tin(2+)salt	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	9.08	89.0 95.2	[92.1]
	18.2	102.5 99.0	[100.8]
	36.3	100.1 99.2	[99.7]
	72.7	109.5 109.8	[109.7]
	145	78.0 87.3	[82.7]
	291	74.8 78.9	[76.9]
	581	77.1 70.0	[73.6]
	1163 d)	- -	[-]
	2325 d)	- -	[-]
	4650 d)	- -	[-]

- : The absorption at 570 nm could not be measured due to precipitation.
a): Negative control (Water for injection : 100 μL/mL)
d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Exp. No. 9053(115-204)

Table 3. Results of growth inhibition test of benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)salt
[Short-term treatment] (Additional study)

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose(μg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]	Compound	Dose(μg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
Benzenesulfonic acid,4-hydroxy-, tin(2+)salt	0 a)	100.0 100.0	[100.0]	Benzenesulfonic acid,4-hydroxy-, tin(2+)salt	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	581	73.4 66.9	[70.2]		581	85.3 87.2	[86.3]
	1163	47.9 60.5	[54.2]		1163	75.5 69.7	[72.6]
	2325 d)	26.7 21.2	[24.0]		2325 d)	48.0 39.2	[43.6]
	4650 d)	0.1 0.1	[0.1]		4650 d)	0.2 0.2	[0.2]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[Short-term treatment : -S9] --- 1086(μg/mL)
[Short-term treatment : +S9] --- 1796(μg/mL)

a): Negative control (Water for injection, 100 μL/mL)
d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Exp. No. 9053(115-204)

Table 4. Results of growth inhibition test of benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)salt
[Continuous treatment] (Additional study)

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose(μg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
Benzenesulfonic acid,4-hydroxy-, tin(2+)salt	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	581	39.8 38.3	[39.1]
	1163 d)	20.4 19.2	[19.8]
	2325 d)	8.1 11.3	[9.7]
	4650 d)	0.1 0.1	[0.1]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[Continuous treatment : 24 h] --- 510(μg/mL)

a): Negative control (Water for injection, 100 μL/mL)
d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)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			
Benzenesulfonic acid,4-hydroxy-, tin(2+)salt	0 a)	6	100.0	200	2	3	0	0	0	0	3 (1.5) #	200	0 (0.0)
	528	6	85.1	200	4	9	0	0	0	0	9 (4.5) *	200	0 (0.0)
	755	6	63.7	200	9	17	9	0	0	0	25 (12.5) *	200	1 (0.5)
	1078	6	52.9	200	15	33	22	0	0	0	48 (24.0) *	200	2 (1.0)
	1540	6	40.6	Toxic									
MMC b)	0.1	6	101.5	200	8	33	71	0	1	0	87 (43.5) *	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
* :Significant difference from control (Fisher's exact test):$p \leq 0.025$
# :Significant difference from control (Cochran-Armitage trend test):$p \leq 0.025$
a): Negative control (Water for injection, 100 µL/mL)
b): Positive control (Mitomycin C)

Table 6. Chromosome aberration test in CHL cells treated with benzenesulfonic acid,4-hydroxy-,tin(2+)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					
Benzenesulfonic acid,4-hydroxy-, tin(2+)salt	0 a)	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	#	200	1 (0.5)	#
	755	6	82.9	200	1	2	1	0	0	0	2 (1.0)		200	0 (0.0)	
	1078	6	66.2	200	3	0	0	0	0	0	0 (0.0)		200	2 (1.0)	
	1540 d)	6	58.6	200	1	1	1	0	0	0	2 (1.0)		200	5 (2.5)	
	2200 d)	6	42.7	200	7	16	17	0	0	0	28 (14.0)	*	200	15 (7.5)	*
CP b)	12.5	6	74.7	200	4	16	34	0	0	0	48 (24.0)	*	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
* :Significant difference from control (Fisher's exact test):$p \leq 0.025$
# :Significant difference from control (Cochran-Armitage trend test):$p \leq 0.025$
a): Negative control (Water for injection, 100 µL/mL)
b): Positive control (Cyclophosphamide)
d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.