

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験報告書

試験番号 7416

2011年 3月 3日

本文目次

[項目]	[ページ]
1. 要約	1
2. 試験材料	
2-1. 被験物質	2
2-2. 被験物質溶液	3
2-3. 陽性対照	5
2-4. 陰性(溶媒)対照	5
2-5. 使用した細胞	6
2-6. 代謝活性化	6
3. 試験方法	
3-1. 採用した試験方法	8
3-2. 試験構成	8
3-3. 短時間処理法による試験	8
3-4. 連続処理法による試験	9
3-5. 細胞増殖率の測定	10
3-6. 染色体標本の作製	10
3-7. 染色体の観察	10
4. 試験成績及び考察	
4-1. 短時間処理法による試験	12
4-2. 連続処理法による試験	13
5. 結果の判定	14
7. 参考文献	14
試験結果表 1～7	15
試験結果図 1～7	22

1. 要約

2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸の染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて検索した。

短時間処理法において、本試験は-S9処理、+S9処理ともに、0.48、0.95、1.4、1.9 mg/mlの4段階の用量で実施した。試験の結果、-S9処理において、構造異常及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。+S9処理においても、構造異常及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

連続処理法において、本試験は24時間処理、48時間処理ともに、0.48、0.95、1.4、1.9 mg/mlの4段階の用量で実施した。試験の結果、24時間処理において、構造異常及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。48時間処理においても、構造異常及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

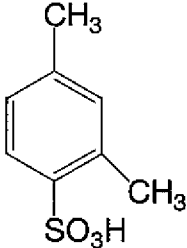
短時間処理法による本試験及び連続処理法による本試験で陰性と判断したため、短時間処理法の+S9処理の確認試験を実施した。確認試験は、0.95、1.4、1.9 mg/mlの3段階の用量で実施した。試験の結果、構造異常及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

以上の結果より、本被験物質のCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は、陰性と判定した。

2. 試験材料

2-1. 被験物質(被験物質番号：1248)

2-1-1. 被験物質の性質

化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸		
別 名	m-キシレン-4-スルホン酸		
CAS 番号	88-61-9		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分 子 量	186.23		
試験に供した化学物質の 純度(%)	99.7% (無水物換算)		
試験に供した化学物質の ロット番号			
不純物の名称及び含有率	水：16.1% 強熱残分：0.05%以下		
蒸 気 圧	—		
対 水 溶 解 度	—		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融 点	—		
沸 点	—		
常温における性状	結晶又は結晶性粉末		
安 定 性	水： — 光： — 熱： —		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	水	易溶 [19 mg/ml以上]*	[水を加えた際に、発色、発泡、発熱等の変化は見られなかった]*
	DMSO	—	—
	その他	—	—
備 考	(品名：m-キシレン-4-スルホン酸n水和物)		

* 当センターの試験による。

2-1-2. 被験物質の特性・同一性及び安定性

1) 特性・同一性

被験物質の同一性は、赤外吸収スペクトルを赤外分光光度計(Shimadzu FTIR-8200PC)を用いて測定し、文献値と比較することにより確認した。

2) 安定性

被験物質の安定性は使用開始前及び使用終了後にクロマトグラムを高速液体クロマトグラフ(Agilent Technologies 1090)を用いて測定し、それぞれのデータを比較することにより確認した。

2-1-3. 保管及び取り扱い

被験物質は、被験物質保管区域の保管庫内デシケータ中に密栓して室温かつ遮光条件下で保管した。被験物質の取り扱いは、黄色灯下で行った。

2-2. 被験物質溶液

2-2-1. 被験物質溶液の調製

1) 溶液の調製

被験物質を秤量し、滅菌した超純水(ミリ-Q水)を加えて溶解した溶液を最高調製溶液(処理用量の10倍)とした。これを超純水で段階希釈して各溶液を調製した。調製作業は、黄色灯下で行った。

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度(%)
	水	自家製	—	超純水(ミリ-Q水)	—
溶媒選択の理由	被験物質の水に対する溶解度は 19 mg/ml(1/10量添加で最終濃度は 1.9 mg/ml)以上であった。従って、水(超純水)を溶媒として選択した。				
被験物質溶液の性状	溶解				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	短時間処理法による試験				
	細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験			10分	25℃
	染色体異常試験(本試験)			10分	25℃
	染色体異常試験(確認試験)			10分	25℃
	連続処理法による試験				
	細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験			10分	25℃
	染色体異常試験(本試験)			10分	25℃
純度換算の有無	(有*) 無				

* 被験物質の純度は、無水物換算で99.7%であるが、水分を16.1%含んでいることから純度83.6%として純度換算を行った。

2) 被験物質調製溶液中の被験物質の濃度及び均一性

被験物質調製溶液中における被験物質の濃度及び均一性は、試験実施前に、用量設定試験と同じ操作により調製した最高濃度と最低濃度調製溶液について各3点サンプリングし、被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ(Agilent Technologies 1090)を用いて測定して確認した。

3) 被験物質調製溶液中の被験物質の安定性

被験物質調製溶液中の被験物質の安定性は、試験実施前に用量設定試験と同じ操作により調製した最高濃度と最低濃度調製溶液について確認した。被験物質調製時と3時間後の被験物質調製容器内の調製液をそれぞれ3点サンプリングし、被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ(Agilent Technologies 1090)を用いて測定し、それぞれの測定結果を比較することにより、被験物質調製溶液中の被験物質の安定性を確認した。

2-2-2. 被験物質溶液の処理

細胞への処理は、被験物質溶液を培養液に添加することにより行った。被験物質溶液の培養液への添加量は、処理溶液総量の10%とした。処理作業は、黄色灯下で行った。被験物質処理により培養液のpHの低下が認められたため、処理時の培養液に緩衝液[HEPES(GIBCO社)、Lot No. 684606、最終濃度 20mM]を添加した。

被験物質溶液の処理量

	培養液	S9 mix	被験物質溶液
短時間処理(-S9)	2.7 ml	—	0.3 ml
短時間処理(+S9)	2.2 ml	0.5 ml	0.3 ml
連続処理	4.5 ml	—	0.5 ml

2-3. 陽性対照

2-3-1. 陽性対照物質

物質名		製造元	Lot No.	グレード	純度	溶媒名
陽性対照	マイトマイシンC (MMC)	和光純薬工業 (株)	EPR2632	生化学用	1012 µg/ml (力価)	超純水
	ベンゾ [a] ピレン (B[a]P)	和光純薬工業 (株)	ELE2013	特級	99.8%	DMSO
陽性対照	超純水	自家製	—	(ミリ-Q水)	—	
物質溶媒	DMSO	和光純薬工業 (株)	KWP4671	インテリゴ	100.0%	

2-3-2. 陽性対照物質の選択理由

MMC、B[a]PともにCHL/IU細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されており、日本バイオアッセイ研究センターにおける背景データも豊富なため。

2-3-3. 陽性対照物質溶液の調製、保存について

MMC、B[a]Pともに、所定の濃度溶液を調製、分注し、凍結保存(-30℃)したものを1本ずつ使用した。

2-3-4. 陽性対照物質及び用量

短時間処理法

-S9処理：マイトマイシンC(MMC) 用量 0.0001 mg/ml

+S9処理：ベンゾ[a]ピレン(B[a]P) 用量 0.012 mg/ml

連続処理法

24、48時間処理：マイトマイシンC(MMC) 用量 0.000036 mg/ml

2-4. 陰性(溶媒)対照

陰性(溶媒)対照として、超純水(ミリ-Q水)を培養液に添加した。

2-5. 使用した細胞

2-5-1. 細胞

CHL/IU(チャイニーズハムスター新生仔肺由来の株細胞)のクローン11(国立衛生試験所[現国立医薬品食品衛生研究所]より1985年11月14日入手)を使用した。

2-5-2. 選定理由

この系は、染色体異常試験において化学物質に対する感受性が高いことが知られていて、データも豊富なため。

2-5-3. 細胞の特徴

1) 培養条件

培養液 10%非働化仔牛血清(SAFC Biosciences 社、Lot No. 8B0525)を含むイーグルMEM(日水製薬(株))

条件 5%CO₂、37℃で培養し、2～4日毎に継代した。

2) 増殖

プレート上で単層状に増殖

倍加時間 約15時間

3) 染色体

染色体数モード 25本

4) 保存

ジメチルスルホキシド(DMSO、和光純薬工業株式会社、インフィニティピュア)を培養液に10%になるように加え、液体窒素中(-196℃)で保存したものを融解、培養して試験に使用した。

2-5-4. 継代数

国立衛生試験所(現国立医薬品食品衛生研究所)より継代数16を入手し、試験には総継代数28～36(当センターでの継代数は12～20)で使用した。

2-6. 代謝活性化

2-6-1. S9の入手方法等

自製・購入の別	購 入(製造元 キッコーマン株式会社)
製 造 年 月 日	2010年 7月30日 製造
購入の場合のLot No.	RAA-618
保 存 温 度	-80℃

2-6-2. S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・ Sprague-Dawley	名称	フェノバルビタール(PB) 5,6-ベンゾフラボン(BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間 及び 投与量	1日目：PB 30 mg/kg体重 2日目：PB 60 mg/kg体重 3日目：PB 60 mg/kg体重 BF 80 mg/kg体重 4日目：PB 60 mg/kg体重 5日目 S9調製
体重	206 - 239 g		

2-6-3. S9 mixの組成

成分	S9 mix 1ml中の量	成分	S9 mix 1ml中の量
S9	0.3 ml	NADP	4 µmol
MgCl ₂	5 µmol	Na-リン酸緩衝液	—
KCl	33 µmol	その他(HEPES)	4 µmol
グルコース-6-リン酸	5 µmol	—	—

注) キッコーマン株式会社製の「染色体異常試験用凍結S-9Mix(Lot No. CAM-618)」を用いた。

2-6-4. S9 mixの処理条件

① プレート法		2. 浮遊細胞法	3. その他()
S9量(最終濃度)		5%	
S9蛋白量(最終濃度)		1.4 mg/ml	
処理時間		6 h	
回復時間		20 h	
備考		—	

3. 試験方法

3-1. 採用した試験方法

試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成15年11月21日付け薬食発第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、最終改正平成18年11月20日)の別添「ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験」及びOECD試験法ガイドライン(OECD Guideline for the Testing of Chemicals, TG No.473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, 1997)に準拠して実施した。

3-2. 試験構成

染色体異常試験は、短時間処理法による試験及び連続処理法による試験により構成した。また、短時間処理法による試験、連続処理法による試験ともに陰性と判断したため、短時間処理法による試験の代謝活性化による場合(+S9処理)について確認試験を実施した。

3-3. 短時間処理法による試験

短時間処理法による試験は、代謝活性化による場合(+S9処理)、及び代謝活性化によらない場合(-S9処理)の条件下で行った。

3-3-1. 細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験

試験は、各用量3枚のシャーレを処理して、2枚を細胞増殖抑制試験に、1枚を染色体異常予備試験に用いた。最高用量を1.9 mg/ml(約10 mM)として、公比2で8段階の用量で実施した。細胞増殖抑制試験の対照として、陰性(溶媒)対照を設けた。染色体異常予備試験の対照として、陰性(溶媒)対照及び陽性対照を設けた。なお、染色体標本作製前に細胞を観察(位相差顕微鏡、100倍)した結果、-S9処理、+S9処理ともに、0.12 mg/ml以下の用量については毒性が認められなかったため、染色体標本作製しなかった。作製した染色体標本については全て染色体観察を行った。

実験方法

60 mmシャーレに20000個(4000個/ml×5 ml)の細胞を播種し、3日間培養後に培養液を交換(-S9処理：培養液 2.7 ml、+S9処理：培養液 2.2 ml及び S9mix 0.5 ml)した。直ちに、被験物質溶液(0.3 ml)を添加し、6時間作用させた後にリン酸緩衝生理食塩液(PBS)で一回洗浄し、新しい培養液3.5 mlを添加し、20時間培養後に細胞固定・染色又は染色体標本の作製を行った。

3-3-2. 染色体異常試験(本試験)

本試験は、細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験の結果に基づいて実施した。各用量4枚のシャーレを処理して、2枚を染色体標本作製、2枚を増殖率測定に用いた。細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験の結果に基づいて、-S9処理、+S9処理ともに、0.48、0.95、1.4、1.9 mg/mlの4段階の用量で試験を実施した。実験方法は、3-3-1と同じ方法で実施した。ただし、染色体標本は処理した全てのシャーレについて作製し、染色体観察を行った。試験の対照として、陰性(溶媒)対照及び陽性対照を設けた。

3-3-3. 染色体異常試験(確認試験)

染色体異常試験(本試験)の結果が陰性であったため、データの確認のために短時間処理法の+S9処理について確認試験を実施した。試験は、代謝活性化系を用いる場合のみ実施した。各用量4枚のシャーレを処理し、2枚を染色体標本作製、2枚を細胞増殖率測定に用いた。試験は、0.95、1.4、1.9 mg/mlの3段階の用量で試験を実施した。試験方法は、3-2-1と同じ方法で実施した。染色体標本は処理した全てのシャーレについて作製し、染色体観察を行った。対照として陰性(溶媒)対照及び陽性対照を設けた。

3-4. 連続処理法による試験

連続処理法は、24時間及び48時間処理として代謝活性化系を用いないで行った。

3-4-1. 細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験

試験は、各用量3枚のシャーレを処理して、2枚を細胞増殖抑制試験に、1枚を染色体異常予備試験に用いた。最高用量は1.9 mg/ml(約10 mM)として、公比2で8段階の用量で実施した。細胞増殖抑制試験の対照として、陰性(溶媒)対照を設けた。染色体異常予備試験の対照として、陰性(溶媒)対照及び陽性対照を設けた。なお、染色体標本作製前に細胞を観察(位相差顕微鏡、100倍)した結果、24時間処理、48時間処理ともに、0.12 mg/ml以下の用量については毒性が認められなかったため、染色体標本作製しなかった。作製した染色体標本については全て染色体観察を行った。

実験方法

60 mmシャーレに20000個(4000個/ml×5 ml)の細胞を播種し、3日後に培養液を交換(4.5 ml)後、被験物質溶液(0.5 ml)を添加し、24時間及び48時間培養後に細胞固定・染色又は染色体標本の作製を行った。

3-4-2. 染色体異常試験(本試験)

本試験は、細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験の結果に基づいて実施した。各用量4枚のシャーレを処理して、2枚を染色体標本作製、2枚を増殖率測定に用いた。細胞増殖抑制試験及び染色体異常予備試験の結果に基づいて、24時間処理、48時間処理ともに、0.48、0.95、1.4、1.9 mg/mlの4段階の用量で試験を実施した。実験方法は、3-4-1と同じ方法で実施した。染色体標本は処理した全てのシャーレについて作製し、染色体観察を行った。試験の対照として、陰性(溶媒)対照及び陽性対照を設けた。

3-5. 細胞増殖率の測定

細胞増殖率の測定用のシャーレは、PBSで洗浄後エタノール(10%酢酸含有)で5分間固定し、0.1%クリスタルバイオレットで10分間染色し、水で洗浄後に乾燥した。細胞増殖率は、細胞密度計(オリンパス・モノセレーター)を用いて測定し、陰性(溶媒)対照をコントロール(100%)、細胞の生育していないシャーレをブランク(0%)として算出した。

3-6. 染色体標本の作製

染色体標本の作製2時間前にコルセミドを最終用量0.1 μ g/ml となるように添加した。2時間後培養液を遠沈管に移し、トリプシン溶液を用いて細胞を剥がし、遠沈管に加えた。遠沈管を遠心(1000 rpm、5分)し、培養液を除去し、75 mM KCl溶液4 mlを徐々に添加し、37℃で20分間低張処理を行った。冷却した固定液(エタノール 3 : 酢酸 1) 0.5 mlを徐々に添加して遠心した。上清を除去し、冷却した固定液4 mlを徐々に添加して固定した後、遠心した。この操作を3回繰り返した後、適当な密度の細胞浮遊液を作製した。清浄なスライドグラスを並べ、細胞浮遊液を滴下した。これを乾燥後、2.5%ギムザ液(pH6.8)で12分間染色し、水洗後乾燥させた。

3-7. 染色体の観察

染色体構造異常については、各培養器当たり100個の分裂中期細胞を観察した。数的異常については、各培養器当たり100細胞以上の分裂中期細胞を観察する(構造異常細胞の観察と並行して行い、構造異常の観察対象となる細胞が100個に達するまで観察した)。染色体異常の誘発率は、染色体に異常をもつ細胞の出現率で表した。観察は、コード化した標本を用いブラインド法で行った。

3-7-1. 染色体異常の分類

- a) 構造異常
 - 切断 (染色分体型)
 - 交換 (染色分体型)
 - 切断 (染色体型)
 - 交換 (染色体型)
 - その他 (断片化など、ただし細粉化は含まない)
- b) ギャップ (染色分体型・染色体型)
- c) 数的異常
 - 倍数体
 - その他 (核内倍加等)

3-7-2. 観察基準

CHL/IU細胞が株細胞であること及びその染色体の特徴を考慮して観察基準を下記とした^{1,2)}。構造異常の観察対象は、染色体数が 25 ± 2 本の細胞とした。

a) 構造異常

1) 切断

断片が染色分体の縦軸からずれているもの。同一線上にあっても、その幅が染色分体の太さを越えるもの(ただし、細長い染色体では、この基準としない)。染色体型の切断については、動原体を持たない染色体があるため正確に判定できるもののみスコアした。

2) 交換

1本又は複数の染色体の2ヶ所以上で生じた切断が互いに結合したもの。染色体型については、環状、二動原体等明確に判断できるもののみとした。

3) その他

断片化：交換型を含まず、多くの染色体にギャップ、切断があるもの。

b) ギャップ

非染色部分が染色分体の縦軸上にあり、その幅が染色分体より狭く、非染色部分の形状が明確なもの。

c) 数的異常

1) 倍数体

3倍体(37本)以上のもの。異数性については検索しなかった。

2) その他

核内倍加等。

3-7-3. 判定

祖父尼らの判定基準¹⁾及び当センターでのバックグラウンドデータより、構造異常細胞あるいは数的異常細胞(倍数体、核内倍加を含む)の出現率について、下記の基準に従って判定した。なお、ギャップのみを持つ細胞は構造異常細胞に含めなかった。また、試験結果の統計処理は行わなかった。

染色体異常出現率	判定
5%未満	—
5%以上 ～ 10%未満	±
10%以上	+

4. 試験成績及び考察

4-1. 短時間処理法による試験

4-1-1. 細胞増殖抑制試験

短時間処理法の試験結果を表1及び図1に示した。-S9処理、+S9処理ともに、最高用量まで細胞増殖率の低下は認められなかった。

4-1-2. 染色体異常予備試験

短時間処理法の予備試験結果を2に示した。-S9処理では、構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。+S9処理でも、構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

このため、本試験の用量設定は、この結果及び細胞増殖抑制試験の結果を考慮して、-S9処理、+S9処理ともに、0.48、0.95、1.4、1.9 mg/mlの4段階とした。

4-1-3. 染色体異常試験(本試験)

短時間処理法の試験結果を表3及び図2、3に示した。-S9処理では、構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。+S9処理でも、構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

細胞増殖率は、-S9処理の0.48、0.95、1.4、1.9 mg/mlの用量でそれぞれ、96、94、91、97%を示し、+S9処理の同用量ではそれぞれ、104、105、107、106%を示した。

4-1-4. 染色体異常試験(確認試験)

短時間処理法による本試験及び連続処理法による本試験で、いずれも陰性と判断したため、短時間処理法の+S9処理の確認試験を実施した。その結果を表4及び図4に示した。構造異常及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。細胞増殖率は、0.95、1.4、1.9 mg/mlの用量でそれぞれ、108、124、116%を示した。

4-2. 連続処理法による試験

4-2-1. 細胞増殖抑制試験

連続処理法の試験結果を表5及び図5に示した。24時間処理では、0.95、1.9 mg/mlの用量でそれぞれ、87、79%の細胞増殖率を示した。48時間処理では、0.95、1.9 mg/mlの用量でそれぞれ、76、56%の細胞増殖率を示した。48時間処理の細胞増殖率は被験物質の用量に依存して減少しており、被験物質による増殖抑制作用が認められた。

4-2-2. 染色体異常予備試験

連続処理法の予備試験結果を表6に示した。24時間処理では、構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。48時間処理でも、構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

このため、本試験の用量設定は、この結果及び細胞増殖抑制試験の結果を考慮して、24時間処理、48時間処理ともに、0.48、0.95、1.4、1.9 mg/mlの4段階とした。

4-2-3. 染色体異常試験(本試験)

連続処理法の試験及び細胞増殖率の結果を表7及び図6、7に示した。24時間処理では、構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。48時間処理でも、構造異常を持つ細胞の出現率及び数的異常を持つ細胞の出現率は、何れの用量においても5%未満であった。

細胞増殖率は、24時間の0.48、0.95、1.4、1.9 mg/mlの用量でそれぞれ、95、80、77、73%、48時間処理の同用量ではそれぞれ、88、80、67、56%を示した。

なお、実施した全ての染色体異常試験及び染色体異常予備試験の陰性(溶媒)対照及び陽性対照の値は、当センターのバックグラウンドデータの範囲内にあり、試験が適切に行われたことを示していた。

5. 結果の判定

短時間処理法の-S9処理及び+S9処理において、数的異常及び構造異常を持つ細胞の出現率は、陰性の判定基準である5%未満を示した。また、連続処理法の24時間処理及び48時間処理においても、数的異常及び構造異常を持つ細胞の出現率は、陰性の判定基準である5%未満を示した。短時間処理法の+S9処理について確認試験を実施した結果、数的異常及び構造異常を持つ細胞の出現率は、陰性の判定基準である5%未満を示した。なお、短時間処理法、連続処理法ともに、試験ガイドラインで要求される最高用量(10 mM : 1.9 mg/ml)まで試験を実施した。

以上の結果より、本被験物質のCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

6. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態は発生しなかった。また、試験計画書に従わない事態は発生しなかった。

7. 参考文献

- 1) 祖父尼俊雄監修：染色体異常試験データ集、LIC、東京、1999
- 2) 日本環境変異原学会編：化学物質による染色体異常アトラス、朝倉書店、東京、1988

表1 細胞増殖抑制試験結果(短時間処理法)

被験物質名: 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

代謝活性化法によらない場合 (6-20h)		代謝活性化法による場合 (6-20h)	
用量 (mg/ml)	細胞増殖率(%)	用量 (mg/ml)	細胞増殖率(%)
0	100	0	100
0.015	101	0.015	99
0.03	103	0.03	105
0.059	101	0.059	101
0.12	107	0.12	102
0.24	106	0.24	102
0.48	106	0.48	108
0.95	102	0.95	112
1.9	106	1.9	106

[備考]括弧には処理時間及び回復時間を記入した。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、用量の低い順に記録した。

細胞増殖率は2枚のシャーレの平均値を表示した。

表2 染色体異常予備試験結果(短時間処理法)

被験物質名: 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

処理時間(h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の出現頻度 (%)							ギャップの 出現頻度 (%)	染色体数異常の出現頻度 (%)			
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞		観察細胞数	倍体	その他	総異常細胞
6-20	-	陰性対照 [超純水] (10%)	100	0	0	0	0	0	0	0	101	1.0	0	1.0
		0.24	100	0	0	0	0	0	0	0	101	1.0	0	1.0
		0.48	100	0	0	0	0	0	0	0	101	1.0	0	1.0
		0.95	100	0	1	0	0	0	1	0	100	0	0	0
		1.9	100	0	1	0	0	0	1	0	101	1.0	0	1.0
		陽性対照 [MMC] (0.0001)	100	7	58	0	0	0	62	0	100	0	0	0
6-20	+	陰性対照 [超純水] (10%)	100	0	1	0	0	0	1	0	101	1.0	0	1.0
		0.24	100	1	1	0	0	0	1	0	101	1.0	0	1.0
		0.48	100	0	0	0	0	0	0	0	101	1.0	0	1.0
		0.95	100	0	0	0	0	0	0	0	101	1.0	0	1.0
		1.9	100	0	0	0	0	0	0	0	101	1.0	0	1.0
		陽性対照 [B[a]P] (0.012)	100	1	27	0	0	0	28	0	100	0	0	0

[備考] 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入した。

超純水: ミリ-Q水

MMC: マイトマイシンC

B[a]P: ベンゾ [a] ピレン

表3 染色体異常本試験結果(短時間処理法)

被験物質名: 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

処理時間(h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)						ギャップの 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体数異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数		観察細胞数	倍染色体	その他	総異常細胞数
6-20	-	陰性対照	100	0	0	0	0	0	0		101	1	0	1
		[超純水]	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		(10%)	200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)		201	1(0.5)	0(0)	1(0.5)
		0.48	100	0	1	0	0	0	1	93	102	2	0	2
			100	0	0	0	0	0	1	99	100	0	0	0
			200	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	(96)	202	2(1.0)	0(0)	2(1.0)
		0.95	100	0	1	0	0	0	1	92	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	95	101	1	0	1
			200	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	(94)	201	1(0.5)	0(0)	1(0.5)
		1.4	100	0	0	0	0	0	0	86	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	95	102	2	0	2
			200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(91)	202	2(1.0)	0(0)	2(1.0)
		1.9	100	0	0	0	0	0	0	101	101	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	92	101	1	0	1
			200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(97)	202	2(1.0)	0(0)	2(1.0)
		陽性対照	100	6	58	0	0	0	60	-	100	0	0	0
		[MMC]	100	6	51	0	0	0	55	-	100	0	0	0
		(0.0001)	200	12(6.0)	109(54.5)	0(0)	0(0)	0(0)	115(57.5)	-	200	0(0)	0(0)	0(0)
6-20	+	陰性対照	100	0	0	0	0	0	0		101	1	0	1
		[超純水]	100	0	0	0	0	0	0	100	101	1	0	1
		(10%)	200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)		202	2(1.0)	0(0)	2(1.0)
		0.48	100	0	0	0	0	0	0	103	101	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	105	102	2	0	2
			200	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	(104)	203	3(1.5)	0(0)	3(1.5)
		0.95	100	0	0	0	0	0	0	107	101	1	0	1
			100	0	1	0	0	0	1	102	103	3	0	3
			200	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	(105)	204	4(2.0)	0(0)	4(2.0)
		1.4	100	0	1	0	0	0	1	109	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	104	103	3	0	3
			200	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	(107)	203	3(1.5)	0(0)	3(1.5)
		1.9	100	0	0	0	0	0	0	104	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	108	101	1	0	1
			200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(106)	201	1(0.5)	0(0)	1(0.5)
		陽性対照	100	0	29	0	1	0	30	-	100	0	0	0
		[B[a]P]	100	1	30	0	0	0	31	-	100	0	0	0
		(0.012)	200	1(0.5)	59(29.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	61(30.5)	-	200	0(0)	0(0)	0(0)

[備考] 1. 処理時間の欄には、処理時間-回復時間の順に記入した。

2. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入し、括弧内に出現頻度を記入した。

超純水: ミリ-Q水

MMC: マイトマイシンC

B[a]P: ベンゾ [a] ピレン

表4 染色体異常確認試験結果(短時間処理法)

被験物質名: 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

処理時間(h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップの 出現数 (%)	細胞 増殖率 (%)	染色体数異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	染色体	その他	総異常細胞数
6・20	+	陰性対照 [超純水] (10%)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		101	1	0	1
			200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)		201	1(0.5)	0(0)	1(0.5)
		0.95	100	0	0	0	0	0	0	0	101	101	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	1	114	101	1	0	1
			200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	(108)	202	2(1.0)	0(0)	2(1.0)
		1.4	100	0	0	0	0	0	0	0	124	102	2	0	2
			100	0	0	0	0	0	0	1	123	100	0	0	0
			200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	(124)	202	2(1.0)	0(0)	2(1.0)
		1.9	100	0	0	0	0	0	0	0	119	102	2	0	2
			100	0	1	0	0	0	1	0	113	101	1	0	1
			200	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	(116)	203	3(1.5)	0(0)	3(1.5)
		陽性対照 [B[a]P] (0.012)	100	1	28	0	0	0	28	0	—	101	1	0	1
			100	1	26	0	0	0	27	0	—	100	0	0	0
			200	2(1.0)	54(27.0)	0(0)	0(0)	0(0)	55(27.5)	0(0)	—	201	1(0.5)	0(0)	1(0.5)

【備考】 1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入した。

2. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入し、括弧内に出現頻度を記入した。

超純水：ミリ-Q水

B[a]P：ベンゾ[a]ピレン

表5 細胞増殖抑制試験結果(連続処理法)

被験物質名: 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

(24-0h) 処理による場合		(48-0h) 処理による場合	
用量 (mg/ml)	細胞増殖率(%)	用量 (mg/ml)	細胞増殖率(%)
0	100	0	100
0.015	96	0.015	98
0.03	82	0.03	92
0.059	91	0.059	97
0.12	82	0.12	90
0.24	93	0.24	96
0.48	95	0.48	92
0.95	87	0.95	76
1.9	79	1.9	56

[備考]括弧には処理時間及び回復時間を記入した。

連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、用量の低い順に記録した。

細胞増殖率は2枚のシャーレの平均値を表示した。

表6 染色体異常予備試験結果(連続処理法)

被験物質名: 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

処理時間(h)	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の出現頻度 (%)							ギャップの 出現頻度 (%)	染色体数異常の出現頻度 (%)			
		観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞		観察細胞数	倍數体	その他	総異常細胞
24・0	陰性対照 [超純水] (10%)	100	0	0	0	0	0	0	0	102	2.0	0	2.0
	0.24	100	0	0	0	0	0	0	0	101	1.0	0	1.0
	0.48	100	1	0	0	0	0	1	0	100	0	0	0
	0.95	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
	1.9	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
	陽性対照 [MMC] (0.000036)	100	1	32	0	0	0	33	0	100	0	0	0
48・0	陰性対照 [超純水] (10%)	100	0	0	0	0	0	0	0	101	1.0	0	1.0
	0.24	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
	0.48	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
	0.95	100	0	0	0	0	0	0	0	102	1.0	1.0	2.0
	1.9	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
	陽性対照 [MMC] (0.000036)	100	4	62	0	0	0	64	0	100	0	0	0

〔備考〕 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入した。

超純水：ミリ-Q水

MMC：マイトマイシンC

表7 染色体異常本試験結果(連続処理法)

被験物質名: 2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

処理時間(h)	被験物質の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップの出現数 (%)	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	倍染色体	その他	総異常細胞数
24・0	陰性対照 [超純水] (10%)	100	0	0	0	0	0	0	0		101	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
		200	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)		201	1(0.5)	0(0)	1(0.5)
	0.48	100	0	0	0	0	0	0	0	97	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	93	100	0	0	0
		200	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	(95)	200	0(0)	0(0)	0(0)
	0.95	100	0	0	0	0	0	0	0	81	101	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	78	101	1	0	1
		200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(80)	202	2(1.0)	0(0)	2(1.0)
	1.4	100	0	0	0	0	0	0	0	78	101	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	75	101	1	0	1
		200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(77)	202	2(1.0)	0(0)	2(1.0)
	1.9	100	0	0	0	0	0	0	0	75	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	71	100	0	0	0
		200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(73)	200	0(0)	0(0)	0(0)
	陽性対照 [MMC] (0.000036)	100	9	40	0	0	0	44	3	—	101	1	0	1
		100	11	39	0	0	0	47	2	—	100	0	0	0
		200	20(10.0)	79(39.5)	0(0)	0(0)	0(0)	91(45.5)	5(2.5)	—	201	1(0.5)	0(0)	1(0.5)
48・0	陰性対照 [超純水] (10%)	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	1	100	100	0	0	0
		200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)		200	0(0)	0(0)	0(0)
	0.48	100	0	0	0	0	0	0	0	91	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0	85	100	0	0	0
		200	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	(88)	200	0(0)	0(0)	0(0)
	0.95	100	0	1	0	0	0	1	0	81	101	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	1	79	100	0	0	0
		200	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	(80)	201	1(0.5)	0(0)	1(0.5)
	1.4	100	0	0	0	0	0	0	0	67	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	66	100	0	0	0
		200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(67)	200	0(0)	0(0)	0(0)
	1.9	100	0	0	0	0	0	0	0	59	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	53	102	2	0	2
		200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	(56)	202	2(1.0)	0(0)	2(1.0)
	陽性対照 [MMC] (0.000036)	100	9	69	0	0	0	69	1	—	100	0	0	0
		100	12	79	0	0	0	81	0	—	100	0	0	0
		200	21(10.5)	148(74.0)	0(0)	0(0)	0(0)	150(75.0)	1(0.5)	—	200	0(0)	0(0)	0(0)

〔備考〕 1. 処理時間の欄には、処理時間－回復時間の順に記入した。

2. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入し、括弧内に出現頻度を記入した。

超純水：ミリ-Q水

MMC：マイトマイシンC

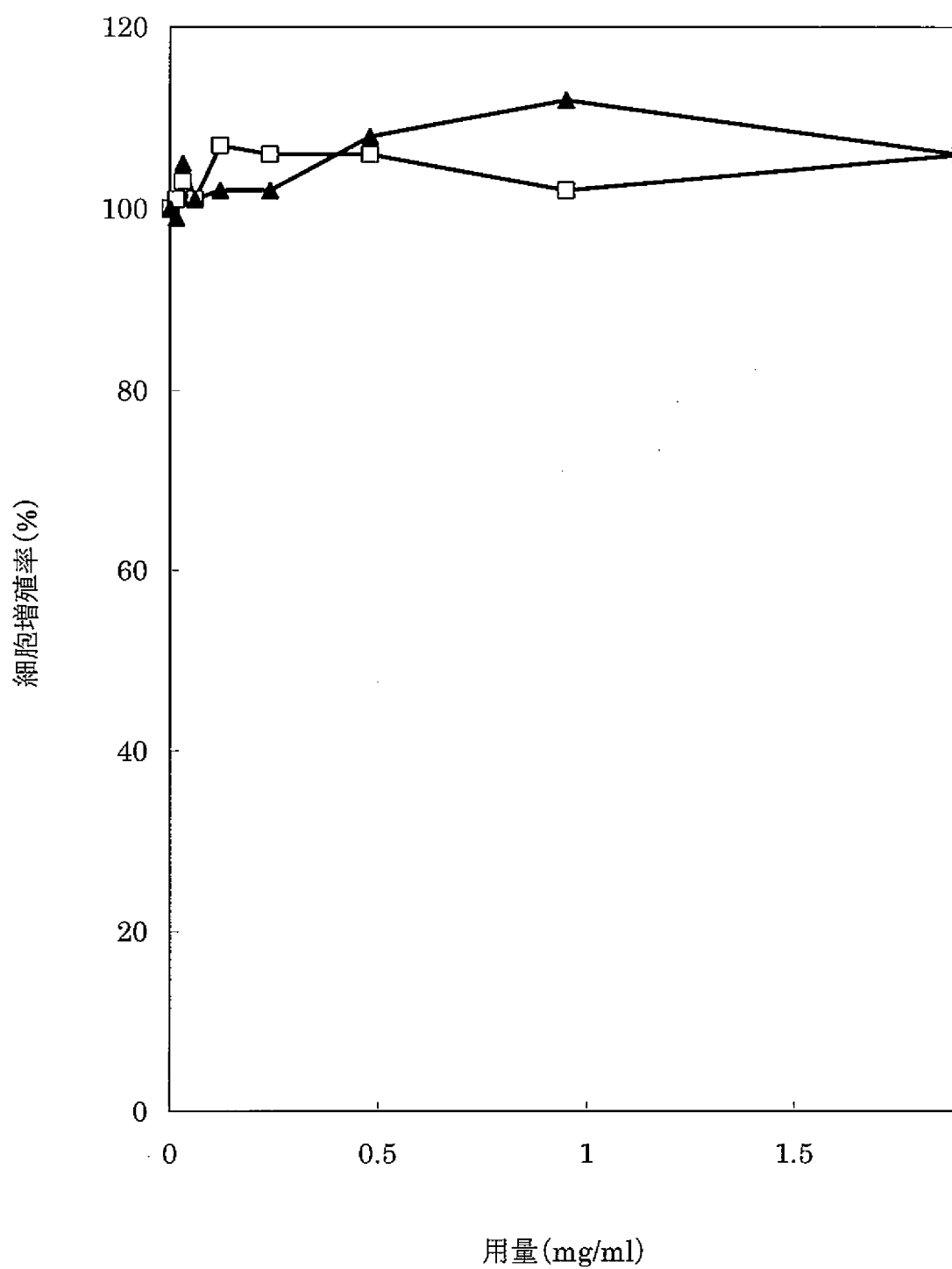


図1 細胞増殖抑制試験結果(短時間処理法)

被験物質名：2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

—□— -S9処理
—▲— +S9処理

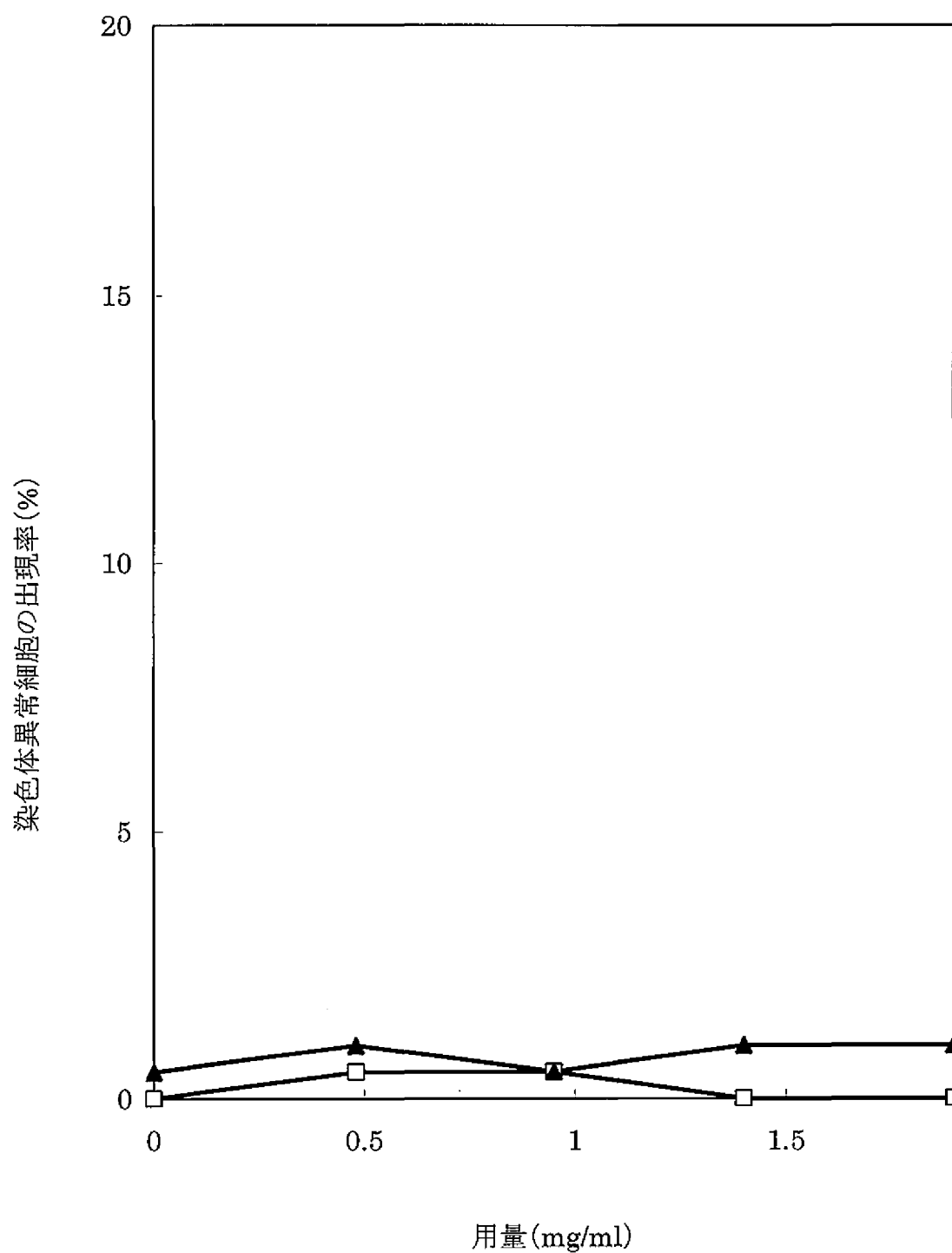


図2 染色体異常本試験結果(短時間処理法、-S9)

被験物質名：2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

—□— 構造異常
—▲— 数的異常(倍数体)

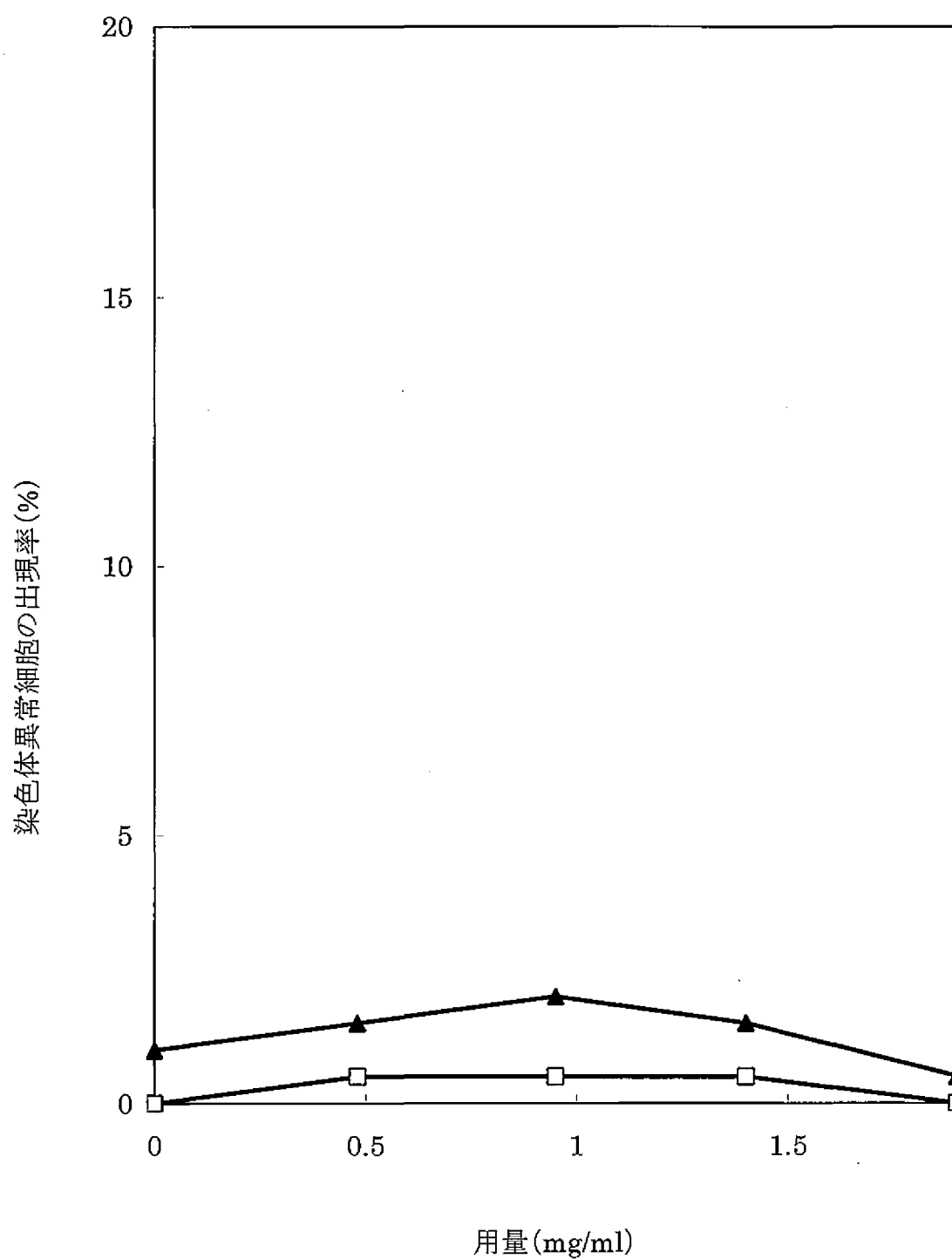


図3 染色体異常本試験結果(短時間処理法、+S9)

被験物質名：2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

—□— 構造異常
—▲— 数的異常(倍数体)

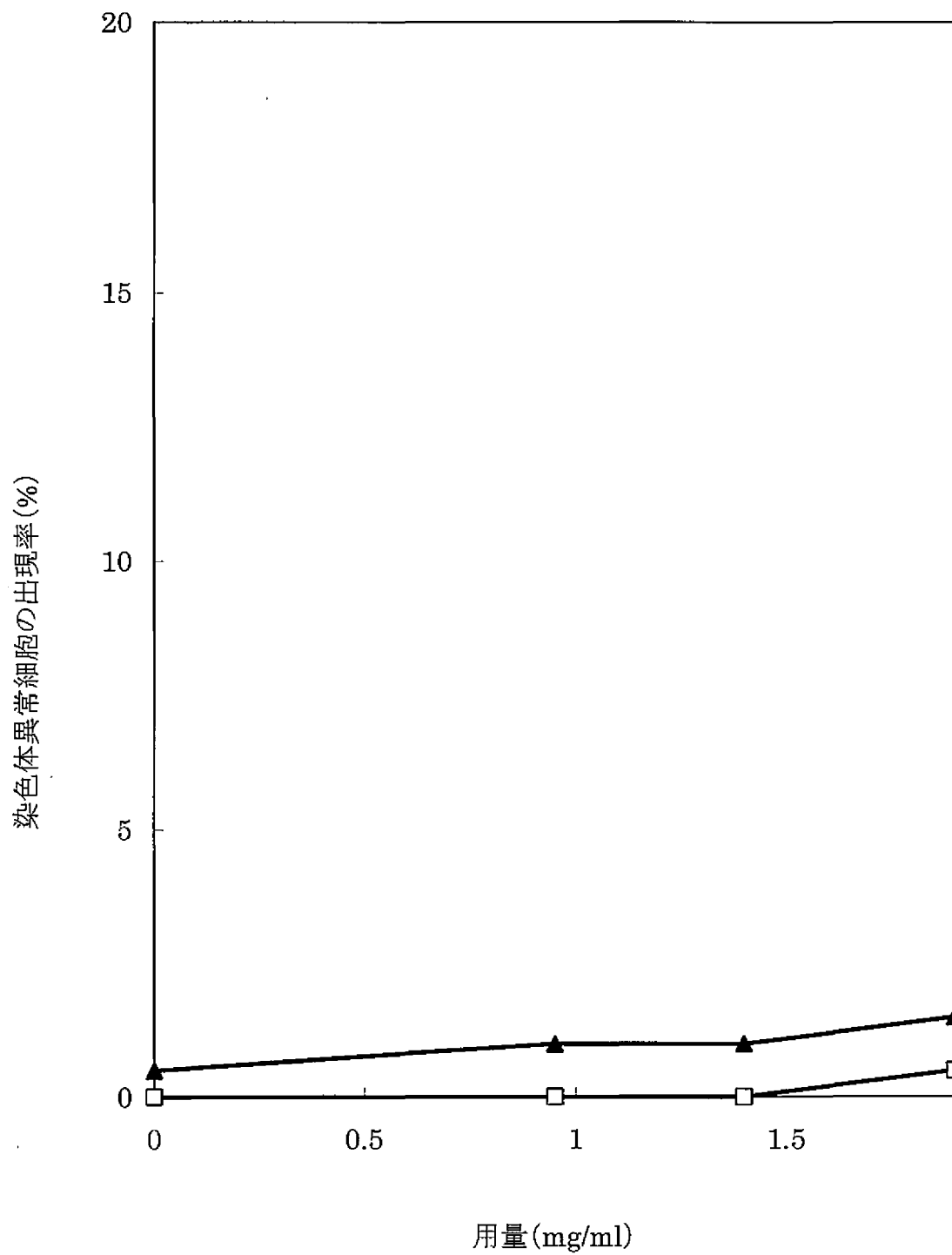


図4 染色体異常確認試験結果(短時間処理法、+S9)

被験物質名：2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

—□— 構造異常
—▲— 数的異常(倍数体)

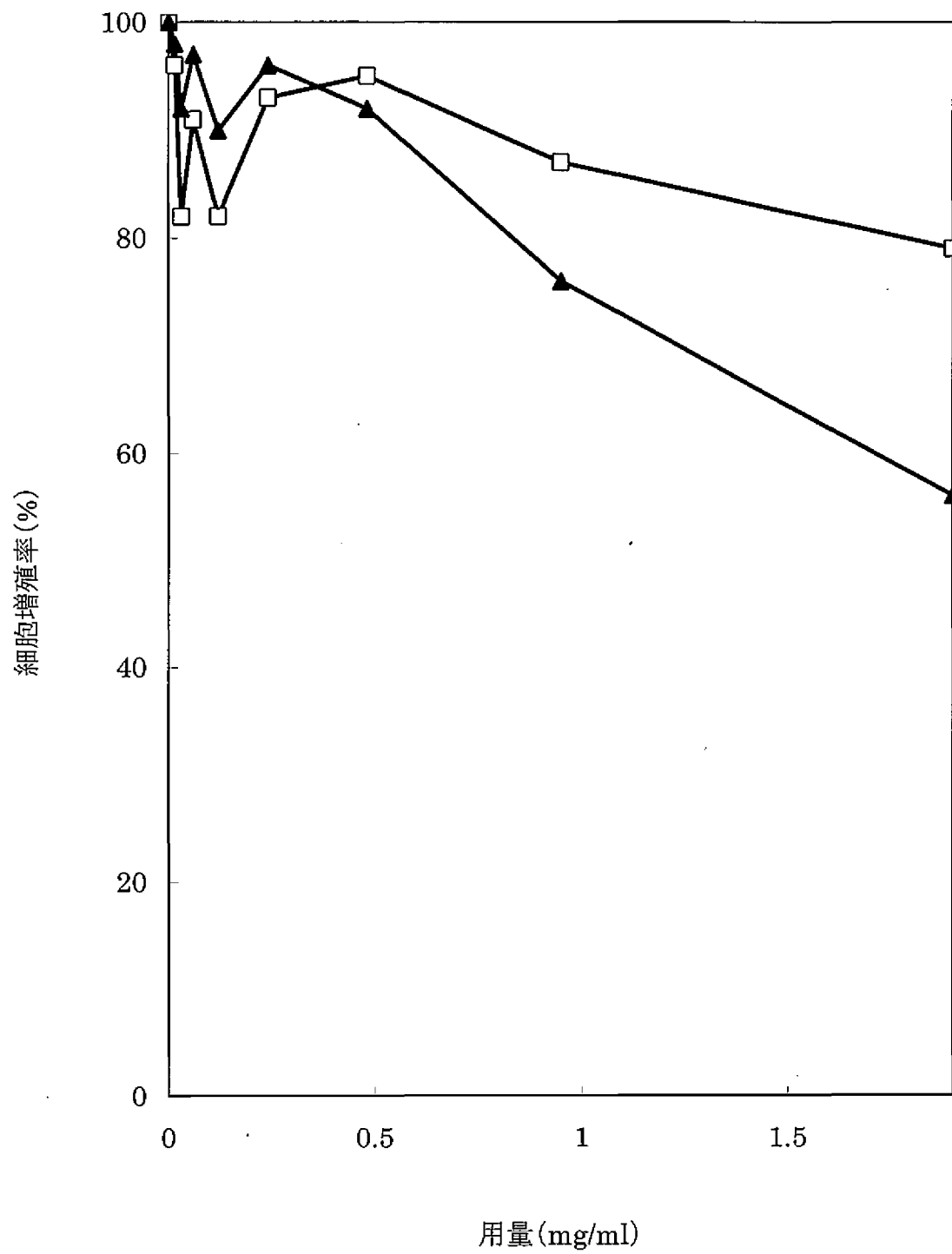


図5 細胞増殖抑制試験結果(連続処理法)

被験物質名：2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

—□— 24時間処理
—▲— 48時間処理

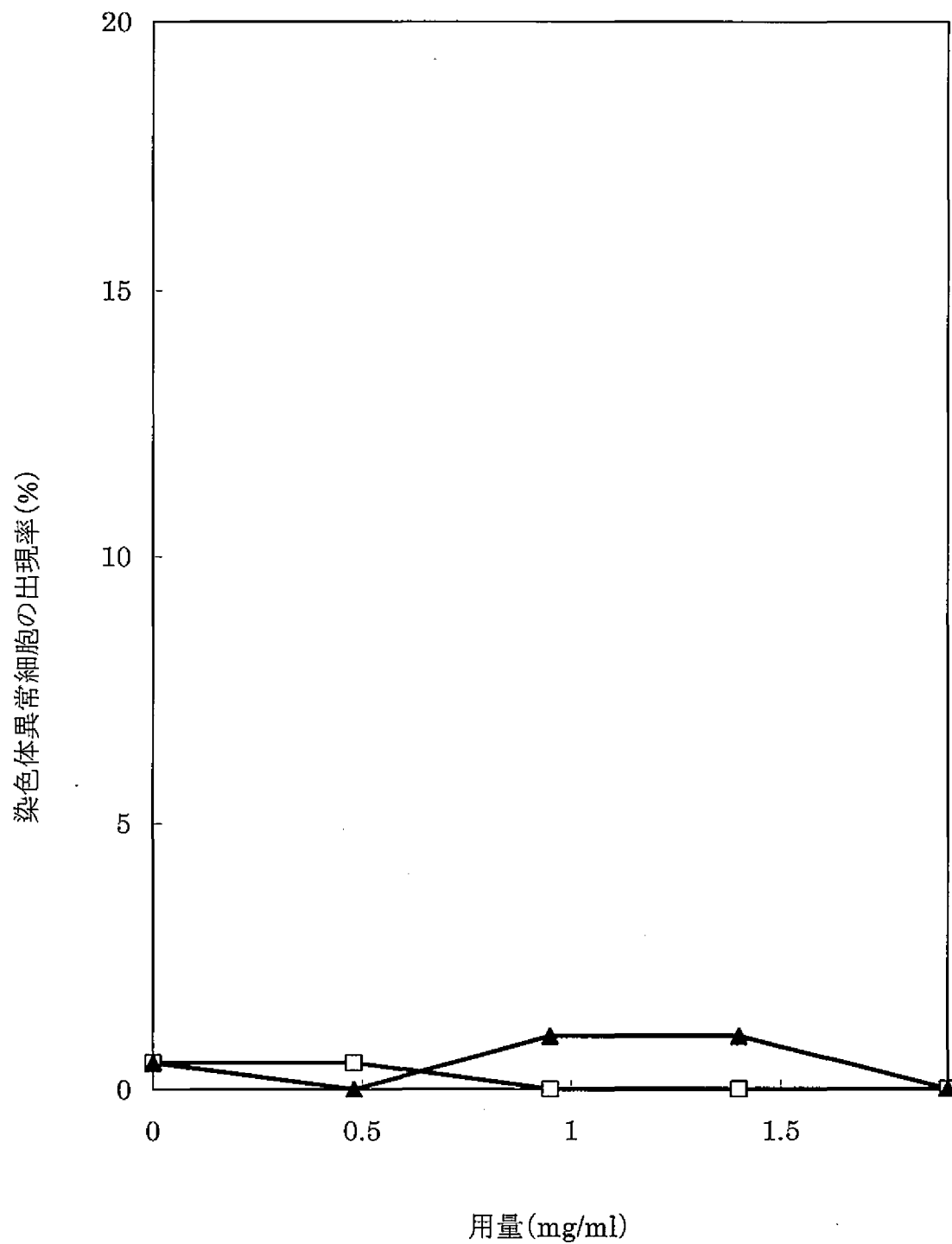


図6 染色体異常本試験結果(連続処理法、24h)

被験物質名：2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

—□— 構造異常
—▲— 数的異常(倍数体)

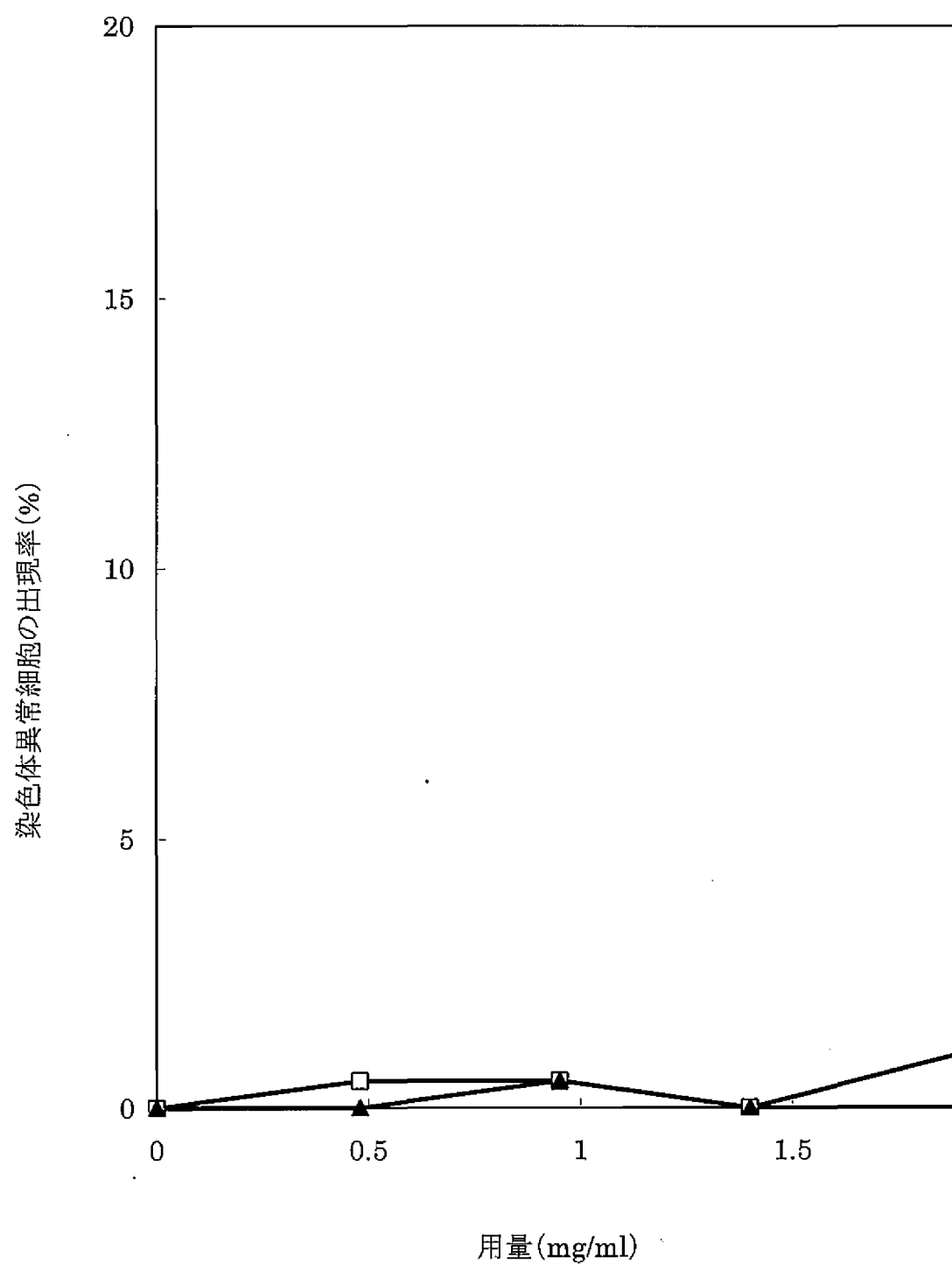


図7 染色体異常本試験結果(連続処理法、48h)

被験物質名：2,4-ジメチルベンゼンスルホン酸

—□— 構造異常
—▲— 数的異常(倍数体)