

1匹・軽度2匹)、100 mg/kg群の雌雄各6匹(雄：中等度2匹・軽度4匹、雌：中等度4匹・軽度2匹)および300 mg/kg群の雌雄各6匹(雄：高度3匹・中等度3匹、雌：高度1匹・中等度4匹・軽度1匹)に観察され、30 mg/kg以上の群の雄および100 mg/kg以上の群の雌では有意な増加が見られた。前胃粘膜の扁平上皮の過形成が10 mg/kg群の雌1匹(中等度)、30 mg/kg群の雄2匹(軽度)、雌1匹(軽度)、100 mg/kg群の雌雄各6匹(雄：中等度3匹・軽度3匹、雌：中等度4匹・軽度2匹)、および300 mg/kg群の雌雄各6匹(雄：中等度6匹、雌：中等度5匹・軽度1匹)に観察され、100 mg/kg以上の群の雌雄では有意な増加が見られた。前胃粘膜下織の水腫が10 mg/kg群の雄1匹(軽度)、雌2匹(高度1匹・中等度1匹)、30 mg/kg群の雄1匹(中等度)、雌1匹(中等度)、100 mg/kg群の雄1匹(中等度)、雌2匹(中等度1匹・軽度1匹) および300 mg/kg群の雄3匹(中等度)に観察された。前胃粘膜の細胞浸潤が10 mg/kg群の雄2匹(中等度1匹・軽度1匹)、雌4匹(中等度1匹・軽度3匹)、30 mg/kg群の雄3匹(中等度1匹・軽度2匹)、雌4匹(軽度)、100 mg/kg群の雌1匹(軽度)および300 mg/kg群の雌雄各3匹(雄：中等度1匹・軽度2匹、雌：軽度3匹)に観察され、10 mg/kg群および30 mg/kg群の雌では有意な増加が見られた。前胃粘膜の軽度糜爛が300 mg/kg群の雄1匹に観察された。

腺胃粘膜では粘膜下織の軽度水腫が対照群の雌1匹および300 mg/kg群の雌1匹に、軽度うっ血が10 mg/kg群および300 mg/kg群の雄各1匹に、軽度糜爛が100 mg/kg群の雄1匹および300 mg/kg群の雌1匹にそれぞれ観察された。

回復期間終了時計画殺動物には、前胃粘膜の角化亢進が300 mg/kg群の雄1匹(軽度)、雌4匹(軽度)に観察され、雌に有意な増加が見られた。前胃粘膜の扁平上皮の過形成が300 mg/kg群の雌雄各5匹(雄：軽度5匹、雌：中等度2匹・軽度3匹)に観察され、雌雄に有意な増加が見られた。対照群の雌雄に異常な組織学的変化は観察されなかった。試験6日に死亡した300 mg/kg群の雌の前胃には粘膜下織の軽度水腫、中等度の細胞浸潤および中等度の糜爛が観察された。

腎臓の所見：投与期間終了時計画殺動物には、尿細管上皮の変性が300 mg/kg群の雄3匹(軽度)、雌2匹(軽度)に観察された。好塩基性尿細管上皮の増加が対照群の雄2匹(軽度)、雌1匹(軽度)、10 mg/kg群の雄2匹(軽度)、30 mg/kg群の雄2匹(軽度)、100 mg/kg群の雄1匹(軽度)、雌1匹(軽度)、および300 mg/kg群の雄6匹(軽度)、雌5匹(中等度2匹・軽度3匹)に観察され、300 mg/kg群の雌雄に有意な増加が見られた。尿細管上皮の硝子滴沈着が100 mg/kg群の雄2匹(軽度)および300 mg/kg群の雄6匹(高度1匹・中等度5匹)に観察され、300 mg/kg群に有意な増加が見られた。300 mg/kg群の雄に観察された中等度および高度な硝子滴沈着は抗ラット $\alpha_{2U}$ -グロブリン抗体で陽性を示した。乳頭への軽度石灰沈着が対照群の雄1匹および10 mg/kg群の雌1匹に観察された。尿細管の軽度壊死が300 mg/kg群の雌2匹に観察された。尿細管の軽度拡張が300 mg/kg群の雄4匹、雌4匹に観察され、雌雄ともに有意な増加であった。蛋白円柱が30 mg/kg群の雄1匹、100 mg/kg群の雌1匹、および300 mg/kg群の雌1匹に、間質の線維化が300 mg/kg群の雄2匹、雌1匹に、間質の細胞浸潤が300 mg/kg群の雌3匹に観察されたが、いずれの変化も軽度であった。

回復期間終了時計画殺動物には、好塩基性尿細管上皮の軽度な増加が対照群

の雄 2 匹および 300 mg/kg 群の雄 6 匹雌 5 匹に観察され、300 mg/kg 群の雌雄に有意な増加が見られた。300 mg/kg 群では乳頭への石灰沈着が雄 2 匹に、尿細管の拡張が雌雄各 3 匹、間質の線維化が雌 1 匹に、間質の細胞浸潤が雌 2 匹に観察されたが、いずれの変化も軽度であった。

## 5. 考察

3,4-ジクロロベンジルクロリドを 10 mg/kg、30 mg/kg、100 mg/kg および 300 mg/kg の用量で雌雄の Crl:CD(SD)SPF ラットに 28 日間にわたって強制経口投与し、その後 14 日間の回復試験期間を設けた。

一般状態の観察では、300 mg/kg 群の雌雄で、投与直後に一過性の流涎あるいは流涙が見られる例があった。この症状は雌雄とも回復試験期間中には観察されなかったことから、被験物質の刺激性<sup>2)</sup>に起因する変化と判断された。

試験 6 日に死亡した 300 mg/kg 群の雌の胃には粘膜黄色調、腺胃粘膜の暗赤色斑が認められ、組織学的には前胃の糜爛、細胞浸潤が観察された。「3,4-ジクロロベンジルクロリドのラットにおける 14 日間反復経口投与毒性予備試験(試験番号: X-99p)」で 1000 mg/kg を投与した死亡例でも剖検時に同様の変化が認められており、本被験物質による毒性で死亡したと考えられた。

反復投与による影響として、病理学的検査では、被験物質に起因する前胃の変化が 10 mg/kg 以上の群の雌雄、腎臓の変化が 100 mg/kg 以上の群の雄および 300 mg/kg 群の雌で観察された。前胃では剖検において前胃粘膜の肥厚が認められ、組織学的には前胃粘膜の角化亢進、扁平上皮の過形成が観察され、なかには糜爛、細胞浸潤も認められた。本被験物質と類似の化学構造で、皮膚や粘膜に対し、刺激性を有することが知られている 1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンを SD 系ラットに反復経口投与した試験<sup>1)</sup>でも前胃壁の肥厚、扁平上皮の増生、糜爛が認められていることより、それらの変化は本被験物質の前胃粘膜に対する直接的刺激作用によって生じたと推察された。

一方、300 mg/kg 群の雌雄ともに、腎臓重量の増加がみられ、組織学的には 100 mg/kg 以上の群の雄のみに尿細管上皮の硝子滴沈着が、300 mg/kg 群の雌雄に好塩基性尿細管上皮の増加、尿細管の拡張、尿細管上皮の変性が、雌のみに尿細管の壊死および間質の細胞浸潤が観察された。雄ラットのみに認められた尿細管上皮の硝子滴は、免疫組織化学的に  $\alpha_{2u}$ -globulin であることが証明された。そのため、これらの病変は、各種の薬物やパラジクロルベンゼンなどの化学物質の投与により沈着が著しく亢進することが知られている雄ラットに特異的に発現する  $\alpha_{2u}$  グロブリン腎症<sup>3), 4), 5)</sup>に類似した変化と考えられる。同変化は 1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンを投与した雄ラットにも認められている<sup>1)</sup>。雌雄で観察された好塩基性尿細管上皮の増加は、障害された尿細管上皮細胞の壊死・脱落後の再生性変化と考えられる。300 mg/kg 群の雄では尿量および沈渣中の円柱、雌では沈渣中の上皮細胞が、それらの病変と関連して増加したと考えられた。

肝臓の絶対重量および相対重量が 300 mg/kg 群の雌雄とも増加し、被験物質投与の影響と考えられた。しかしながら、投与期間終了時の血液、血液生化学的

および病理組織学的検査結果には肝臓機能に関連した項目の変化は認められなかった。

300 mg/kg 群の試験 4 週の雄の摂餌量および回復期間の雄の平均摂餌量が有意な高値を示したが、変化の程度としては僅かであり、雌では変化はなく、毒性学的意義はないと考えられた。

回復期間終了時に、300 mg/kg 群の雄の血小板数、血糖および総コレステロールならびに雌のナトリウムが有意な高値を示し、雌の総ビリルビンが有意な低値を示した。ナトリウムの変動幅は僅かであり、偶発的变化と考えられた。その他の項目は投与期間終了時には変動が認められていないため、毒性学的意義はないと判断した。また、300 mg/kg 群の雄の胸腺の重量が増加したが、その意義はわからなかった。

14 日間の回復期間により、被験物質投与に起因した腎臓の好塩基性尿細管上皮の増加、雄の肝臓および雌雄の腎臓の相対重量の増加等の変化は残存するが、前胃粘膜の扁平上皮の過形成、腎臓の尿細管の拡張および尿細管上皮の硝子滴沈着、間質の細胞浸潤等の変化は程度および発生率において回復あるいは回復傾向を示した。

以上の結果、被験物質による毒性学的影響として 10 mg/kg 以上の雌雄で前胃の組織変化、100 mg/kg 群以上の雄および 300 mg/kg 群の雌で腎臓の組織変化、300 mg/kg 群の雌雄で腎臓および肝臓の重量増加が認められた。従って、3,4-ジクロロベンジルクロリドの 28 日間反復経口投与による無影響量は雌雄ともに 10 mg/kg/day 未満であると考えられる。

## 6. 文献

- 1) 厚生労働省化学物質安全対策室(旧：厚生省生活化学安全対策室)監修：  
1-クロロ-2-(クロロメチル)ベンゼンのラットにおける反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験、「化学物質毒性試験報告」Vol.7, pp.492-502, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 1999.
- 2) 製品安全データシート, MSDS No. JW323441, 和光純薬工業株式会社, 大阪 2009.
- 3) Swenberg, J. A., Short, B., Borghoff, S., Strasser, J., and Charbonneau, M. : The Comparative Pathobiology of  $\alpha$  2u-Globulin Nephropathy, Toxicol. Appl. Pharmacol. 97:35-46, 1989.
- 4) 伊藤信行(編著) : 「最新毒性病理学」中山書店, pp.193-209, 東京, 1994.
- 5) 厚生労働省化学物質安全対策室(旧：厚生省生活化学安全対策室)監修：  
o-ジクロロベンゼンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験, 「化学物質毒性試験報告」Vol.8, pp.316-327, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, 2001.

### 3. 要約

アセナフチレンの復帰突然変異誘発能の有無を検討するため、ネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (以下、*S. typhimurium* と略す) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略す) WP2 *uvrA* を用いて、代謝活性化する場合及び代謝活性化しない場合の条件下で、プレインキュベーション法により実施した。なお、被験物質の溶媒にはジメチルスルホキシド(以下、DMSO と略す)を用いた。

試験は、19.5~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果より本試験は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 については 0.61~19.5 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537 については 2.44~78.1 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* については 9.77~313 µg/plate の範囲の 6 用量で実施した。

#### 1) 被験物質による沈殿及び着色

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化しない場合の 5000 µg/plate で認められた。また、被験物質による着色は、代謝活性化した場合の 5000 µg/plate で認められた。

#### 2) 生育阻害

実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 9.77 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 39.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* の 156 µg/plate 以上で認められた。

#### 3) 復帰変異コロニー数

2 回の本試験ともに、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても本被験物質による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

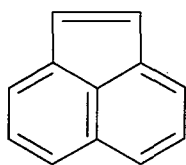
以上の試験結果より、本試験条件下において、アセナフチレンは、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。

## 5. 被験物質及び被験液の調製

## 5.1 被験物質及び溶媒

## 5.1.1 被験物質

|       |   |           |
|-------|---|-----------|
| 製造元   | : | 新日鐵化学株式会社 |
| 名称    | : | アセナフチレン   |
| ロット番号 | : | 7-MOM     |
| CAS番号 | : | 208-96-8  |
| 構造式   | : |           |



|            |   |   |
|------------|---|---|
| 純度         | : | 96.3%   |
| 不純物の名称及び濃度 | : | ナフタレン ; 0.1%、1-メチルナフタレン ; 0.2%、アセナフテン ; 3.3%、その他 ; 0.2%   |
| 分子量        | : | 152.20  |
| 融点         | : | 88-91°C   |
| 沸点         | : | 280°C   |
| 蒸気圧        | : | 2.67hPa(156°C)  |
| 分配係数       | : | 3.93~4.07   |
| 常温における性状   | : | 黄色固体  |
| 安定性        | : | 紫外線照射で二量体、108°C 加熱で種々のポリマーを生成する。強酸により、重合。還元するとアセナフテン、酸化するとナフタリン酸を生じる。なお、本試験終了後に残余となった被験物質を製造元において分析した結果、純度に大きな変動はなく、安定であることが確認された(別添1)。 |
| 溶解性        | : | 水 ; 不溶<br>DMSO ; 50mg/mL 以上   |
| 保存条件       | : | 冷蔵・遮光・密閉  |
| 保存場所       | : | 東京研究所 被験物質調製保存室   |
| 保存温度       | : | 保存期間中 2008.10.30~2009.2.20 の実測温度 -0.6~8.2°C   |
| 返却         | : | 試験終了後の残量はすべて製造元へ返却した。   |

なお、上記溶解性は、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果であり、水については 50mg/mL で溶解しなかったため、不溶とした。

### 5.1.2 溶媒

|       |   |                     |
|-------|---|---------------------|
| 名称    | : | DMSO                |
| 製造元   | : | 和光純薬工業株式会社          |
| ロット番号 | : | PEH6808             |
| 規格    | : | JIS 規格 試薬特級 99.0%以上 |
| 保存方法  | : | 室温保存                |
| 保存場所  | : | 東京研究所 被験物質調製保存室     |

### 5.1.3 溶媒の選択理由

溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水に 50mg/mL で溶解せず、DMSO に 50mg/mL で溶解し、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかったため、DMSO を溶媒として試験を実施した。

## 5.2 被験液の調製方法

### 5.2.1 用量設定試験用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤 (GR-120、株式会社エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 272.4 mg に最高調製濃度の 50 mg/mL となるように溶媒量を計算し、5.448 mL の DMSO を添加して溶解し、50 mg/mL の被験液を調製した。次いで、これを公比 4 で順次 4 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781 及び 0.195 mg/mL の計 5 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

### 5.2.2 本試験 1 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤 (GR-120、株式会社エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 40.2 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、3.216 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、これを 4 倍希釈して 3.13 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 9 段階希釈し、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122 及び 0.0061 mg/mL の計 10 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

### 5.2.3 本試験 2 回目用被験液の調製

滅菌した調製用試験管に被験物質を電子天秤 (GR-120、株式会社エー・アンド・ディ) を用いて秤量し、その秤量値 33.4 mg に最高調製濃度の 12.5 mg/mL となるように溶媒量を計算し、2.672 mL の DMSO を添加して溶解し、12.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、これを 4 倍希釈して 3.13 mg/mL の被験液を調製した。これをさらに公比 2 で順次 9 段階希釈し、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195、0.0977、0.0488、0.0244、0.0122 及び 0.0061 mg/mL の計 10 濃度の被験液を調製した。なお、被験液の調製において、発熱、ガスの発生等の反応性は認められなかった。また、被験液は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で用時調製した。

### 5.2.4 被験液の保存条件

被験液は用時調製とし、保存はしなかった。

## 6. 試験材料及び方法

### 6.1 試験菌株

#### 6.1.1 菌株の種類

次の 5 種類の菌株を用いた。

塩基対置換型

*S. typhimurium* TA100

*S. typhimurium* TA1535

*E. coli* WP2 *uvrA*

フレームシフト型

*S. typhimurium* TA98

*S. typhimurium* TA1537

なお、菌株は国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部より 1997 年 10 月 9 日に株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で入手したものから、2005 年 7 月 21 日に分与された。

#### 6.1.2 菌株の選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じて選択した。当該菌株は変異原性物質に対する感受性が高く、細菌を用いる変異原性試験に最も一般的に使用されている。

#### 6.1.3 菌株の保存及び解凍

入手した菌株から継代して凍結保存した菌懸濁液を培養し、得られた菌懸濁液 8.0 mL に対して、DMSO (和光純薬工業株式会社、JIS 規格試薬特級、ロット番号 PEN0496) を 0.7 mL の割合で添加して、滅菌チューブに 300  $\mu$ L ずつ分注し、 $-70^{\circ}\text{C}$  以下の超低温

#### 6.4.3 本試験用量の設定

本試験の試験用量を設定するため、50 mg/mL の被験液を公比 4 で 4 段階希釈した計 5 用量 (19.5、78.1、313、1250、5000 µg/plate) を用い、用量設定試験を実施した。なお、用量設定試験の結果を別表 1 に示した。

用量設定試験の結果、本被験物質処理による生育阻害は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 19.5 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* の 313 µg/plate 以上で認められた。また、本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化しない場合の 5000 µg/plate で認められた。また、被験物質による着色は、代謝活性化した場合の 5000 µg/plate で認められた。

このため、本試験の試験用量は、生育阻害を示した最低用量を最高用量として、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 については 19.5 µg/plate、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535、TA98、TA1537 については 78.1 µg/plate、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* については 313 µg/plate をそれぞれ最高用量として、以下公比 2 で 5 段階希釈した計 6 用量を設定した。なお、本試験は同一用量で 2 回実施した。

#### 6.4.4 プレート数

被験物質処理群、陰性対照群及び陽性対照群のいずれについても、用量設定試験では 2 枚、2 回の本試験では 3 枚のプレートを用いた。

#### 6.4.5 試験操作（プレインキュベーション法）

- 1) 滅菌した小試験管に調製した被験液、溶媒又は陽性対照溶液を 0.1 mL 入れ、これに代謝活性化しない場合は 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を、代謝活性化する場合は S9 Mix 0.5 mL を加えた後、それぞれの小試験管に各菌株の培養液 0.1 mL を加えた。
- 2) 小試験管を攪拌後すぐに 37°C で 20 分間振盪しながらプレインキュベーションし、これに 45°C に保温されているトップアガーを 2.0 mL 加え攪拌後、最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。
- 3) 無菌試験として、調製した最高用量の被験液 0.1 mL 及び調製した S9 Mix 0.5 mL をそれぞれ小試験管に取り、これにトップアガーを 2.0 mL 加えた後に最小グルコース寒天平板培地に均一に重層した。なお、これら 1)~3) の一連の操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。
- 4) 最小グルコース寒天平板培地に重層したトップアガーが固化したことを確認し、最小グルコース寒天平板培地を逆さにしてインキュベータに入れ、37°C で用量設定試験、本試験 1 回目及び本試験 2 回目ともに 48 時間培養した。



- 5) 培養後、プレート上の被験物質による沈殿及び着色を確認した結果、代謝活性化しない場合の 5000 µg/plate で沈殿、代謝活性化した場合の 5000 µg/plate で着色が認められたものの、機器計測に影響がなかったため、自動コロニーカウンタ(コロニーアナライザーCA-11D systems、システムサイエンス株式会社)を用いて計数(面積補正、補正值:1.21)した。また、実体顕微鏡を用いて生育阻害の有無を観察した。

## 6.5 判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数(陰性対照値)に対して2倍以上となる増加を示し、用量反応性及び再現性が認められた場合あるいは明確な用量反応性を示さない場合であっても自然復帰変異コロニー数の2倍以上となる増加を示し、2回の本試験で再現性が認められた場合に陽性と判定することとした。なお、測定結果については、平均値±標準偏差も併せて記載した。

## 7. 試験結果

試験の結果を別表1~5及び図1~10に示した。なお、図は別表2、3より作成した。

### 7.1 培養終了後の観察結果

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化しない場合の 5000 µg/plate で認められた。また、被験物質による着色は、代謝活性化した場合の 5000 µg/plate で認められた。なお、実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1537 の 9.77 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA1535 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535、TA1537 の 39.1 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA98、*E. coli* WP2 *uvrA* 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 の 78.1 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、*E. coli* WP2 *uvrA* の 156 µg/plate 以上で認められた。

### 7.2 復帰変異コロニー数

2回の本試験ともに、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても本被験物質による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

### 7.3 試験系の成立条件

陽性対照値がそれぞれの菌株の陰性対照値に比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示し、陰性対照値及び陽性対照値の復帰変異コロニー数の平均値が背景データの管理限界(平均値±3SD:別添)内であり、無菌試験及び試験操作において雑菌の混入などの異常も認められなかったため、試験が適切に実施されたものと判断し

た。

## 8. 考察

2回の本試験ともに、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても本被験物質による復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の試験結果より、本試験条件下において、アセナフチレンは、細菌に対する復帰突然変異誘発能を有さない（陰性）と判定した。

## 9. 参考文献

- 1) B.N.Ames, F.D.Lee and W.E.Durston: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, Proc.Natl Acad.Sci.,USA, 70, No.3, pp.782-786, March 1973.
- 2) J.McCann, N.E.Spingarn, J.Kobori and B.N.Ames: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R Factor Plasmids, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 72, No.3, pp.979-983, March 1975.
- 3) M.H.L.Green and W.J.Muriel: Mutagen Testing using Trp+ Reversion in *Escherichia coli*, Mutation Res., 38, pp.3-32, 1976.
- 4) T.Yahagi, M.Nagao, Y.Seino, T.Matsushima, T.Sugimura and M.Okada: Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*, Mutation Res., 48, pp.121-130, 1977.
- 5) Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Res., 113, pp.173-215, 1983.
- 6) 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶 (編) : 環境変異原実験法, 講談社, pp.56-68, 1980.
- 7) 労働省安全衛生部化学物質調査課編 : 新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック, 中央労働災害防止協会, 1986.
- 8) 石館基 (監修) : 微生物を用いる変異原性試験データ集 (能美健彦, 松井道子編集), 株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1991.

(別表1)

## 試験結果表 (用量設定試験)

被験物質の名称: アセナフチレン

No. T-0306

| 試験実施期間    |                   | 2009年1月15日 より 2009年1月19日 |                     |                       |                     |                       |
|-----------|-------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| 代謝活性化系の有無 | 被験物質の用量 (μg/プレート) | 復帰変異数(コロニー数/プレート)        |                     |                       |                     |                       |
|           |                   | 塩基対置換型                   |                     |                       | フレームシフト型            |                       |
|           |                   | TA100                    | TA1535              | WP2 <sub>uvrA</sub>   | TA98                | TA1537                |
| S9Mix (-) | 陰性対照 (DMSO)       | 119<br>151 ( 135 )       | 16<br>15 ( 16 )     | 31<br>31 ( 31 )       | 22<br>25 ( 24 )     | 11<br>17 ( 14 )       |
|           | 19.5              | 143<br>126 ( 135 )       | 13<br>19 ( 16 )     | 32<br>32 ( 32 )       | 19<br>17 ( 18 )     | 13 *<br>21 * ( 17 )   |
|           | 78.1              | 58 *<br>68 * ( 63 )      | 13 *<br>12 * ( 13 ) | 17 *<br>22 * ( 20 )   | 16 *<br>15 * ( 16 ) | 17 *<br>18 * ( 18 )   |
|           | 313               | 45 *<br>43 * ( 44 )      | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 11 *<br>10 * ( 11 )   | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      |
|           | 1250              | 0 *<br>0 * ( 0 )         | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 7 *<br>6 * ( 7 )      | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      |
|           | 5000 #            | 0 *<br>0 * ( 0 )         | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      |
|           | S9Mix (+)         | 陰性対照 (DMSO)              | 124<br>130 ( 127 )  | 15<br>15 ( 15 )       | 27<br>37 ( 32 )     | 38<br>39 ( 39 )       |
| 19.5      |                   | 150<br>125 ( 138 )       | 19<br>11 ( 15 )     | 28<br>34 ( 31 )       | 40<br>37 ( 39 )     | 19<br>19 ( 19 )       |
| 78.1      |                   | 146<br>146 ( 146 )       | 10 *<br>11 * ( 11 ) | 32<br>34 ( 33 )       | 52 *<br>56 * ( 54 ) | 15 *<br>14 * ( 15 )   |
| 313       |                   | 0 *<br>0 * ( 0 )         | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 9 *<br>8 * ( 9 )      | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      |
| 1250      |                   | 0 *<br>0 * ( 0 )         | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 7 *<br>8 * ( 8 )      | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      |
| 5000      |                   | 0 *<br>0 * ( 0 )         | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      | 0 *<br>0 * ( 0 )    | 0 *<br>0 * ( 0 )      |
| 陽性対照      |                   | S9Mixを必要としないもの           | 名称 AF-2             | SAZ                   | AF-2                | AF-2                  |
|           | 用量(μg/プレート)       | 0.01                     | 0.5                 | 0.01                  | 0.1                 | 1.0                   |
|           | コロニー数/プレート        | 547<br>581 ( 564 )       | 328<br>358 ( 343 )  | 99<br>85 ( 92 )       | 546<br>503 ( 525 )  | 2120<br>2057 ( 2089 ) |
|           | S9Mixを必要とするもの     | 名称 B[a]P                 | 2AA                 | 2AA                   | B[a]P               | B[a]P                 |
|           | 用量(μg/プレート)       | 5.0                      | 2.0                 | 10.0                  | 5.0                 | 5.0                   |
|           | コロニー数/プレート        | 1125<br>1166 ( 1146 )    | 319<br>327 ( 323 )  | 1231<br>1163 ( 1197 ) | 420<br>348 ( 384 )  | 139<br>158 ( 149 )    |

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
 SAZ : アジ化ナトリウム  
 ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl  
 2AA : 2-アミノアントラセン  
 B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\* : 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

# : 被験物質の沈澱が認められたことを示す。

( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

## 試験結果表 (本試験1回目:-S9Mix)

被験物質の名称:アセナフチレン

No. T-0306

| 試験実施期間      |                   | 2009年2月2日 より 2009年2月5日           |                                   |                                 |                                   |                                       |
|-------------|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| 代謝活性化系の有無   | 被験物質の用量 (µg/プレート) | 復帰変異数(コロニー数/プレート)                |                                   |                                 |                                   |                                       |
|             |                   | 塩基対置換型                           |                                   |                                 | フレームシフト型                          |                                       |
|             |                   | TA100                            | TA1535                            | WP2uvrA                         | TA98                              | TA1537                                |
| S9Mix (-)   | 陰性対照 (DMSO)       | 153<br>125<br>107 ( 128 ± 23.2 ) | 18<br>10<br>7 ( 12 ± 5.7 )        | 31<br>26<br>30 ( 29 ± 2.6 )     | 18<br>7<br>23 ( 16 ± 8.2 )        | 10<br>14<br>7 ( 10 ± 3.5 )            |
|             | 0.61              | NT                               | NT                                | NT                              | NT                                | 10<br>8<br>8 ( 9 ± 1.2 )              |
|             | 1.22              | NT                               | NT                                | NT                              | NT                                | 7<br>2<br>5 ( 5 ± 2.5 )               |
|             | 2.44              | 118<br>118<br>120 ( 119 ± 1.2 )  | 8<br>11<br>13 ( 11 ± 2.5 )        | 35<br>24<br>34 ( 31 ± 6.1 )     | 21<br>13<br>18 ( 17 ± 4.0 )       | 6<br>7<br>7 ( 7 ± 0.6 )               |
|             |                   | 4.88                             | 128<br>126<br>130 ( 128 ± 2.0 )   | 7<br>7<br>10 ( 8 ± 1.7 )        | 34<br>32<br>29 ( 32 ± 2.5 )       | 26<br>15<br>12 ( 18 ± 7.4 )           |
|             | 9.77              | 144<br>126<br>130 ( 133 ± 9.5 )  | 17<br>10<br>11 ( 13 ± 3.8 )       | 31<br>31<br>35 ( 32 ± 2.3 )     | 16<br>27<br>28 ( 24 ± 6.7 )       | 7 *<br>5 *<br>8 * ( 7 ± 1.5 )         |
|             |                   | 19.5                             | 119<br>105<br>117 ( 114 ± 7.6 )   | 15<br>13<br>13 ( 14 ± 1.2 )     | 32<br>31<br>43 ( 35 ± 6.7 )       | 21<br>18<br>18 ( 19 ± 1.7 )           |
|             | 39.1              | 118<br>105<br>126 ( 116 ± 10.6 ) | 13 *<br>5 *<br>11 * ( 10 ± 4.2 )  | 27<br>32<br>29 ( 29 ± 2.5 )     | 21<br>14<br>10 ( 15 ± 5.6 )       | NT                                    |
|             |                   | 78.1                             | 40 *<br>40 *<br>47 * ( 42 ± 4.0 ) | 12 *<br>7 *<br>6 * ( 8 ± 3.2 )  | 19 *<br>18 *<br>20 * ( 19 ± 1.0 ) | 10 *<br>10 *<br>16 * ( 12 ± 3.5 )     |
|             | 陽性対照              | 名称                               | AF-2                              | SAZ                             | AF-2                              | AF-2                                  |
| 用量(µg/プレート) |                   | 0.01                             | 0.5                               | 0.01                            | 0.1                               | 1.0                                   |
| コロニー数/プレート  |                   | 615<br>618<br>589 ( 607 ± 15.9 ) | 325<br>322<br>292 ( 313 ± 18.2 )  | 122<br>88<br>102 ( 104 ± 17.1 ) | 469<br>498<br>438 ( 468 ± 30.0 )  | 1870<br>1668<br>1775 ( 1771 ± 101.1 ) |

(備考)

AF-2 :2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ :アジ化ナトリウム

ICR-191 :2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

\*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。

NT: 試験せず。

( )内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表3)

## 試験結果表 (本試験1回目: +S9Mix)

被験物質の名称: アセナフチレン

No. T-0306

| 試験実施期間    |                   | 2009年2月2日 より 2009年2月5日          |                                      |                                  |                                      |                                   |                                  |
|-----------|-------------------|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 代謝活性化系の有無 | 被験物質の用量 (μg/プレート) | 復帰変異数(コロニー数/プレート)               |                                      |                                  |                                      |                                   |                                  |
|           |                   | 塩基対置換型                          |                                      |                                  | フレームシフト型                             |                                   |                                  |
|           |                   | TA100                           | TA1535                               | WP2uvrA                          | TA98                                 | TA1537                            |                                  |
| S9Mix (+) | 陰性対照 (DMSO)       | 139<br>139<br>130 ( 136 ± 5.2 ) | 15<br>16<br>7 ( 13 ± 4.9 )           | 41<br>27<br>26 ( 31 ± 8.4 )      | 37<br>34<br>42 ( 38 ± 4.0 )          | 12<br>10<br>12 ( 11 ± 1.2 )       |                                  |
|           | 2.44              | NT                              | 19<br>7<br>15 ( 14 ± 6.1 )           | NT                               | 36<br>36<br>37 ( 36 ± 0.6 )          | 11<br>13<br>10 ( 11 ± 1.5 )       |                                  |
|           | 4.88              | NT                              | 10<br>10<br>16 ( 12 ± 3.5 )          | NT                               | 55<br>49<br>36 ( 47 ± 9.7 )          | 13<br>10<br>11 ( 11 ± 1.5 )       |                                  |
|           | 9.77              |                                 | 133<br>128<br>112 ( 124 ± 11.0 )     | 14<br>10<br>8 ( 11 ± 3.1 )       | 33<br>27<br>30 ( 30 ± 3.0 )          | 38<br>31<br>48 ( 39 ± 8.5 )       | 6<br>7<br>11 ( 8 ± 2.6 )         |
|           | 19.5              |                                 | 121<br>110<br>132 ( 121 ± 11.0 )     | 10<br>10<br>13 ( 11 ± 1.7 )      | 31<br>29<br>24 ( 28 ± 3.6 )          | 42<br>38<br>39 ( 40 ± 2.1 )       | 15<br>13<br>11 ( 13 ± 2.0 )      |
|           | 39.1              |                                 | 142<br>141<br>134 ( 139 ± 4.4 )      | 8 *<br>14 *<br>21 * ( 14 ± 6.5 ) | 27<br>37<br>33 ( 32 ± 5.0 )          | 43<br>42<br>36 ( 40 ± 3.8 )       | 13 *<br>11 *<br>7 * ( 10 ± 3.1 ) |
|           | 78.1              |                                 | 121<br>123<br>144 ( 129 ± 12.7 )     | 11 *<br>15 *<br>7 * ( 11 ± 4.0 ) | 23<br>28<br>28 ( 26 ± 2.9 )          | 31 *<br>41 *<br>46 * ( 39 ± 7.6 ) | 7 *<br>10 *<br>21 * ( 13 ± 7.4 ) |
|           | 156               |                                 | 74 *<br>40 *<br>72 * ( 62 ± 19.1 )   | NT                               | 7 *<br>11 *<br>9 * ( 9 ± 2.0 )       | NT                                | NT                               |
|           | 313               |                                 | 0 *<br>0 *<br>0 * ( 0 ± 0.0 )        | NT                               | 22 *<br>7 *<br>7 * ( 12 ± 8.7 )      | NT                                | NT                               |
|           | 陽性対照              | S9Mixを必要とするもの                   | 名称<br>用量(μg/プレート)                    | B[a]P<br>5.0                     | 2AA<br>2.0                           | 2AA<br>10.0                       | B[a]P<br>5.0                     |
|           |                   | コロニー数/プレート                      | 1033<br>1084<br>1073 ( 1063 ± 26.8 ) | 228<br>241<br>258 ( 242 ± 15.0 ) | 1076<br>1184<br>1165 ( 1142 ± 57.7 ) | 422<br>404<br>339 ( 388 ± 43.7 )  | 134<br>138<br>142 ( 138 ± 4.0 )  |

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン  
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

\*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。  
NT: 試験せず。  
( )内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表4)

## 試験結果表 (本試験2回目:-S9Mix)

被験物質の名称:アセナフチレン

No. T-0306

| 試験実施期間    |                   | 2009年2月19日 より 2009年2月23日          |                                  |                                   |                                  |                                      |
|-----------|-------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 代謝活性化系の有無 | 被験物質の用量 (μg/プレート) | 復帰変異数(コロニー数/プレート)                 |                                  |                                   |                                  |                                      |
|           |                   | 塩基対置換型                            |                                  |                                   | フレームシフト型                         |                                      |
|           |                   | TA100                             | TA1535                           | WP2uvrA                           | TA98                             | TA1537                               |
| S9Mix (-) | 陰性対照 (DMSO)       | 144<br>122<br>116 ( 127 ± 14.7 )  | 7<br>8<br>17 ( 11 ± 5.5 )        | 34<br>32<br>24 ( 30 ± 5.3 )       | 18<br>14<br>18 ( 17 ± 2.3 )      | 20<br>13<br>18 ( 17 ± 3.6 )          |
|           | 0.61              | NT                                | NT                               | NT                                | NT                               | 23<br>11<br>17 ( 17 ± 6.0 )          |
|           | 1.22              | NT                                | NT                               | NT                                | NT                               | 13<br>24<br>21 ( 19 ± 5.7 )          |
|           | 2.44              | 100<br>110<br>98 ( 103 ± 6.4 )    | 2<br>5<br>7 ( 5 ± 2.5 )          | 26<br>35<br>26 ( 29 ± 5.2 )       | 15<br>18<br>19 ( 17 ± 2.1 )      | 8<br>18<br>15 ( 14 ± 5.1 )           |
|           | 4.88              | 106<br>104<br>92 ( 101 ± 7.6 )    | 7<br>9<br>7 ( 8 ± 1.2 )          | 27<br>24<br>34 ( 28 ± 5.1 )       | 9<br>13<br>8 ( 10 ± 2.6 )        | 16<br>17<br>21 ( 18 ± 2.6 )          |
|           | 9.77              | 112<br>97<br>97 ( 102 ± 8.7 )     | 11<br>12<br>7 ( 10 ± 2.6 )       | 26<br>31<br>27 ( 28 ± 2.6 )       | 29<br>13<br>18 ( 20 ± 8.2 )      | 17 *<br>24 *<br>14 * ( 18 ± 5.1 )    |
|           | 19.5              | 98<br>118<br>98 ( 105 ± 11.5 )    | 11<br>7<br>9 ( 9 ± 2.0 )         | 32<br>30<br>36 ( 33 ± 3.1 )       | 15<br>20<br>18 ( 18 ± 2.5 )      | 17 *<br>19 *<br>13 * ( 16 ± 3.1 )    |
|           | 39.1              | 110<br>113<br>98 ( 107 ± 7.9 )    | 8 *<br>6 *<br>8 * ( 7 ± 1.2 )    | 39<br>33<br>22 ( 31 ± 8.6 )       | 15<br>9<br>19 ( 14 ± 5.0 )       | NT                                   |
|           | 78.1              | 53 *<br>52 *<br>53 * ( 53 ± 0.6 ) | 7 *<br>8 *<br>7 * ( 7 ± 0.6 )    | 20 *<br>14 *<br>16 * ( 17 ± 3.1 ) | 5 *<br>10 *<br>10 * ( 8 ± 2.9 )  | NT                                   |
|           | 陽性対照              | S9Mixを必要としな<br>いもの                | 名称 AF-2<br>用量(μg/プレート) 0.01      | 名称 SAZ<br>用量 0.5                  | 名称 AF-2<br>用量 0.01               | 名称 AF-2<br>用量 0.1                    |
|           |                   | 564<br>573<br>596 ( 578 ± 16.5 )  | 221<br>235<br>257 ( 238 ± 18.1 ) | 66<br>84<br>95 ( 82 ± 14.6 )      | 474<br>560<br>557 ( 530 ± 48.8 ) | 1548<br>1637<br>1519 ( 1568 ± 61.5 ) |

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
 SAZ : アジ化ナトリウム  
 ICR-191 : 2-メキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノ]プロピルアミノ]アクリジン・2HCl

\*: 被験物質による生育阻害が認められたことを示す。  
 NT: 試験せず。  
 ( )内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

(別表5)

## 試験結果表 (本試験2回目:+S9Mix)

被験物質の名称:アセナフチレン

No. T-0306

| 試験実施期間    |                   | 2009年2月19日 より 2009年2月23日            |                                 |                                  |                                   |                                   |                                 |
|-----------|-------------------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 代謝活性化系の有無 | 被験物質の用量 (μg/プレート) | 復帰変異数(コロニー数/プレート)                   |                                 |                                  |                                   |                                   |                                 |
|           |                   | 塩基対置換型                              |                                 |                                  | フレームシフト型                          |                                   |                                 |
|           |                   | TA100                               | TA1535                          | WP2uvrA                          | TA98                              | TA1537                            |                                 |
| S9Mix (+) | 陰性対照 (DMSO)       | 156<br>129<br>106 ( 130 ± 25.0 )    | 7<br>10<br>.5 ( 7 ± 2.5 )       | 32<br>29<br>22 ( 28 ± 5.1 )      | 33<br>29<br>35 ( 32 ± 3.1 )       | 14<br>13<br>15 ( 14 ± 1.0 )       |                                 |
|           | 2.44              | NT                                  | 5<br>10<br>7 ( 7 ± 2.5 )        | NT                               | 41<br>17<br>33 ( 30 ± 12.2 )      | 22<br>24<br>11 ( 19 ± 7.0 )       |                                 |
|           | 4.88              | NT                                  | 8<br>6<br>8 ( 7 ± 1.2 )         | NT                               | 38<br>31<br>33 ( 34 ± 3.6 )       | 25<br>16<br>25 ( 22 ± 5.2 )       |                                 |
|           | 9.77              | 124<br>104<br>107 ( 112 ± 10.8 )    | 8<br>10<br>12 ( 10 ± 2.0 )      | 31<br>30<br>30 ( 30 ± 0.6 )      | 39<br>36<br>28 ( 34 ± 5.7 )       | 12<br>28<br>19 ( 20 ± 8.0 )       |                                 |
|           | 19.5              | 106<br>112<br>101 ( 106 ± 5.5 )     | 13<br>8<br>4 ( 8 ± 4.5 )        | 31<br>33<br>28 ( 31 ± 2.5 )      | 31<br>25<br>26 ( 27 ± 3.2 )       | 12<br>16<br>14 ( 14 ± 2.0 )       |                                 |
|           | 39.1              | 105<br>113<br>127 ( 115 ± 11.1 )    | 7 *<br>4 *<br>7 * ( 6 ± 1.7 )   | 26<br>25<br>36 ( 29 ± 6.1 )      | 36<br>45<br>36 ( 39 ± 5.2 )       | 10 *<br>19 *<br>18 * ( 16 ± 4.9 ) |                                 |
|           | 78.1              | 113<br>122<br>96 ( 110 ± 13.2 )     | 2 *<br>5 *<br>8 * ( 5 ± 3.0 )   | 33<br>26<br>24 ( 28 ± 4.7 )      | 24 *<br>26 *<br>33 * ( 28 ± 4.7 ) | 13 *<br>11 *<br>9 * ( 11 ± 2.0 )  |                                 |
|           | 156               | 105 *<br>77 *<br>58 * ( 80 ± 23.6 ) | NT                              | 9 *<br>14 *<br>10 * ( 11 ± 2.6 ) | NT                                | NT                                |                                 |
|           | 313               | 0 *<br>0 *<br>0 * ( 0 ± 0.0 )       | NT                              | 8 *<br>6 *<br>4 * ( 6 ± 2.0 )    | NT                                | NT                                |                                 |
|           | 陽性対照              | S9Mixを必要とするもの                       | 名称<br>用量(μg/プレート)               | B[a]P<br>5.0                     | 2AA<br>2.0                        | 2AA<br>10.0                       | B[a]P<br>5.0                    |
|           |                   | コロニー数/プレート                          | 990<br>973<br>976 ( 980 ± 9.1 ) | 230<br>232<br>231 ( 231 ± 1.0 )  | 892<br>894<br>913 ( 900 ± 11.6 )  | 412<br>400<br>318 ( 377 ± 51.2 )  | 117<br>123<br>133 ( 124 ± 8.1 ) |

(備考)

2AA :2-アミノアントラセン  
B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

\*:被験物質による生育阻害が認められたことを示す。  
NT:試験せず。  
( )内は、3枚のプレートの平均値及び標準偏差を示す。

### 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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  において、非代謝活性化では 48.4  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 38.5  $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 69.8  $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 68.4  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  から 39.5  $\mu\text{g/mL}$  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  $\text{mg/mL}$ 、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



M-1346

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。

## 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

被験物質の純度等の特性は、新日鐵化学株式会社における非 GLP 下での分析に基づくものである (Attached Data 1)。

|         |   |   |
|---------|---|---|
| 製造者     | : | 新日鐵化学株式会社   |
| 名称      | : | アセナフチレン   |
| 英名称     | : | Acenaphthylene  |
| ロット番号   | : | 7-MOM   |
| 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              |

M-1346

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fos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。

|             |        |                    |
|-------------|--------|--------------------|
| 1. 細胞増殖抑制試験 | 短時間処理法 | 代謝活性化<br>非代謝活性化    |
|             | 連続処理法  | 24 時間処理<br>48 時間処理 |
| 2. 染色体異常試験  | 短時間処理法 | 代謝活性化<br>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  $\mu\text{g/mL}$  (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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  において、非代謝活性化では 48.4  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 38.5  $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 69.8  $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 68.4  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$  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 $\gamma$ 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  $2 \times 10^4$  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 $\gamma$ 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  $2 \times 10^4$  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 $\gamma$ 線滅菌済プラスチックプレート（直径60mm）を用いた。プレートは各群4枚とした。
- (2) プレート当たり $2 \times 10^4$ 個の細胞（培養液5.0mL）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0.883mLを取り除き、S9 mix 0.833mLに続き溶媒0.050mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.883mLを取り除き、S9 mix 0.833mLに続き各濃度の被験液0.050mLを加えた。陽性対照群については培養液0.933mLを除き、S9 mix 0.833mLに続きCP 0.100mL（最終濃度：14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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0.050mLを取り除き、溶媒0.050mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.050mLを取り除き、各濃度の被験液0.050mLを加えた。陽性対照群については培養液0.150mLを除き、MMC 0.150mL（最終濃度：0.075  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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5.0mL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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を0.1mL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。

## 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、



M-1346

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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において、非代謝活性化では 48.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非代謝活性化では 38.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 69.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 68.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から 39.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\text{mg}/\text{mL}$ 、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