

M-1346

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

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

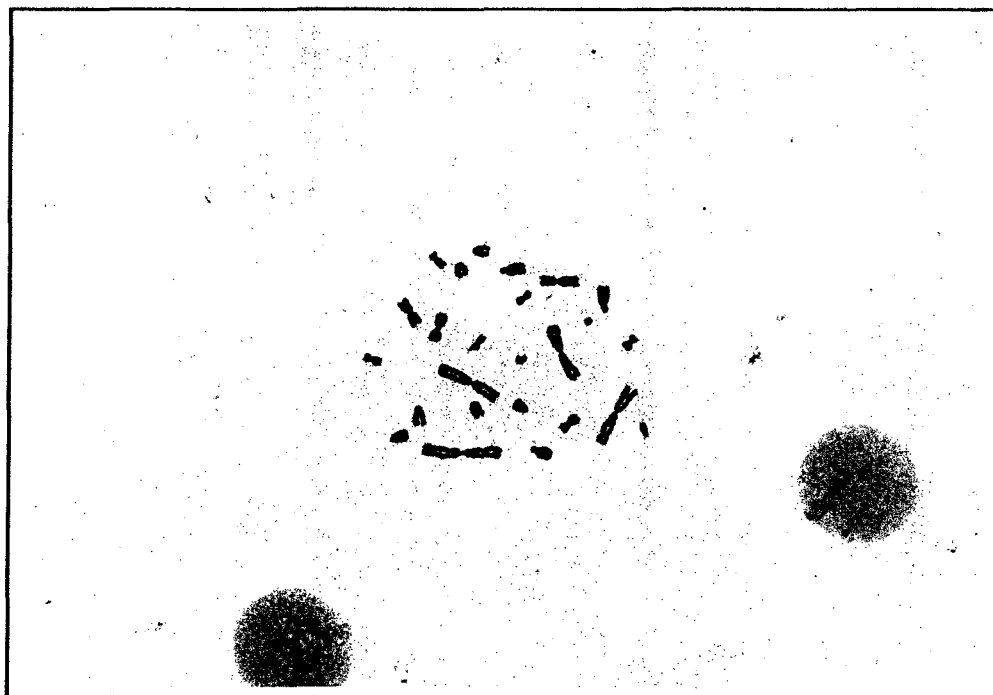


Photo. 1 A metaphase chromosome from the negative control group
[Short-term treatment: +S9 mix]

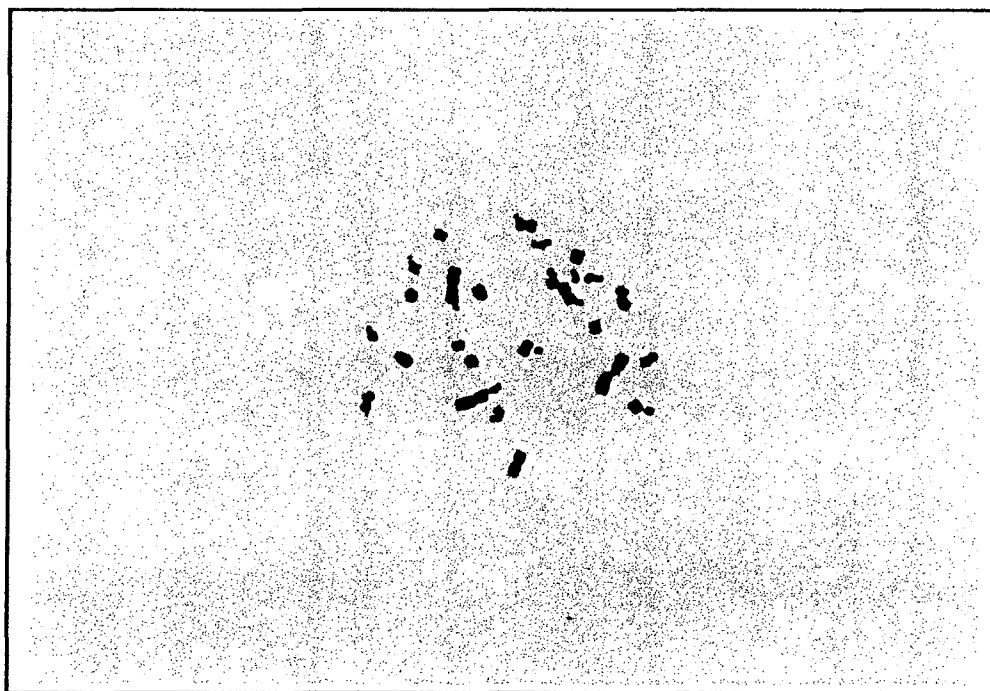


Photo. 2 A metaphase chromosome from the 133 µg/mL group with
chromatid breaks
[Short-term treatment: +S9 mix]

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

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

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

4. 要約

アセナフチレンの28日間反復経口投与毒性試験を6週齢のSprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD(SD)、1群雌雄各6又は12匹〕を用いて実施した。投与量は0(0.5 w/v%メチルセルロース水溶液：対照群)、4、20及び100 mg/kgとし、また、対照群と100 mg/kg投与群の一部の個体(1群雌雄各6匹)については投与期間終了後2週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

詳細な観察を含む一般状態では、100 mg/kg投与群の雌で流涎が散見されたほか、一部で粗毛及び削瘦も認められた。更に、オープンフィールド内観察に立ち上がり回数¹の低値も認められた。

機能検査、握力及び自発運動量では、100 mg/kg投与群の雄で聴覚に、100 mg/kg投与群の雌で痛覚に弱い反応の動物が散見された。また、100 mg/kg投与群の雌で前肢握力の低値が、100 mg/kg投与群の雌雄で自発運動量の低値がみられた。

体重及び摂餌量では、低値が100 mg/kg投与群の雌雄でみられ、体重増加量も低値を示した。

尿検査(摂水量を含む)では、沈渣において小円形上皮細胞の陽性例の発現頻度の増加傾向が100 mg/kg投与群の雄で、摂水量及び尿量の高値と浸透圧の低値が100 mg/kg投与群の雌雄でみられた。

血液学検査では、網赤血球率の低値及び血小板数の高値が100 mg/kg投与群の雌雄で、ヘモグロビン量及び平均赤血球色素濃度の高値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が100 mg/kg投与群の雌でみられた。

血液化学検査では、総コレステロール及びリン脂質の高値が100 mg/kg投与群の雌雄で、総たん白質及びアルブミンの高値が100 mg/kg投与群の雄でみられた。

病理学検査では、剖検で粗毛、低栄養状態及び子宮の小型化が100 mg/kg投与群の雌でみられ、重量及び組織学検査では20 mg/kg以上の投与群の雌雄で肝臓に、100 mg/kg投与群の雌雄で胸腺、心臓、大腿骨(骨髄を含む)、胸骨(骨髄を含む)、膀胱、腎臓、脾臓及び副腎に、雄で胃に、雌で腸間膜リンパ節、子宮及び卵巣に変化が認められた。

上述した変化のうち、回復期間中あるいは回復期間終了時にも雌雄の握力及び尿検査に、雄の病理学検査の副腎に変化がみられたが、その他の変化は休薬とともに軽減あるいは消失し、回復性を示した。

以上の結果、アセナフチレンの本試験条件下における無影響量は病理学検査における肝臓の変化などから4 mg/kg/dayと推定された。

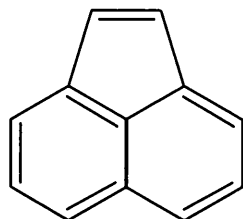
6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び媒体

6.1.1 被験物質

被験物質は新日鐵化学株式会社より提供された。本試験に使用した被験物質のロット番号、純度等は次の通りである。また、検査成績書を添付資料1に示した。

名称	:	アセナフチレン
英名	:	Acenaphthylene
CAS 番号	:	208-96-8
官報公示整理番号	:	4-644
分子量	:	152.19
分子式	:	C ₁₂ H ₈
構造式	:	



ロット番号	:	7-MOM
純度	:	96.3 %
不純物	:	
アセナフテン	:	3.3 %
入手量	:	775 g
安定性	:	投与終了後、被験物質について提供先で安定性を実施し、安定であることが確認された（添付資料2）。
保存方法	:	冷蔵（許容範囲 1~10°C；実測値 3~7°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
取扱い上の注意	:	マスク、手袋を着用した。 換気のよい場所で行い粉塵が飛散しないように取り扱った。
返却	:	被験物質 1 g を保存試料として保存した。分析用に小分けした被験物質の残量は廃棄した。また、被験物質の残量は提供先に返却し、安定性を確認後廃棄した。

6.1.2 媒体

名称	:	メチルセルロース 400cP
ロット番号	:	EWM1974
メーカー	:	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 第1研究棟被験物質調製室

なお、媒体については、本試験に先立って実施した被験液中のアセナフチレンの安定性・均一性試験（試験番号：A-2171）において、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液中での被験物質の安定性及び均一性に良好な結果が得られていることから、0.5w/v%メチルセルロース水溶液を選択した。

6.2 投与液の調製

6.2.1 媒体の調製

調製方法	:	メチルセルロース 400cP を注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号；8K74）に溶解し、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液とした。
保存方法	:	冷所（冷蔵庫内、許容範囲 1~10°C；実測値 4~6°C）に保存し、調製後 8 日以内に被験液の調製に使用した。

6.2.2 被験液の調製

濃度ごとに必要量の被験物質を正確に採取し、0.5 w/v%メチルセルロース水溶液に懸濁して 0.8 mg/mL 液（低用量群液）、4 mg/mL 液（中用量群液）及び 20 mg/mL 液（高用量群液）を調製した。被験液は 8 日に 1 回以上の頻度で調製し、調製後 8 日以内に使用した。

6.2.3 投与液の保存方法

投与液は 1 日必要分ずつ褐色ガラス瓶に分注し、使用時まで冷所（冷蔵庫内、許容範囲 1~10°C；実測値 3~6°C）に保存した。

6.2.4 媒体中での安定性

本被験物質の 0.1 及び 200 mg/mL 懸濁液（媒体：0.5 w/v%メチルセルロース水溶液）は、冷所（冷蔵庫内、1~10°C）、遮光で 8 日間、その後室温で 24 時間安定であることが株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で確認されている（試験番号：A-2171、添付資料 3）。

6.2.5 被験液の濃度・均一性確認

投与 1 週と 4 週の投与に用いる各濃度の被験液について、その濃度・均一性を株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で HPLC 法を用いて確認した。その結果、表

されている。

6.3 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験法ガイドラインによりラットを用いた試験が必要とされている。この試験に使用された系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

6.4 試験動物及び群分け

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] 雌雄各 47 匹^{注)} を 5 週齢で入手し、当所で 8 日間検疫・馴化飼育し、一般状態の観察 (1 回/日)、体重測定 (3 回) 及び詳細な一般状態の観察 (1 回) を行い、体重増加量、一般状態及び詳細な一般状態の観察に異常がみられず健康と思われる雌雄各 36 匹 (主群として雌雄各 24 匹、回復群として雌雄各 12 匹) を選び、6 週齢で試験に供した。投与開始日の体重範囲は、雄で 209~234 g、雌で 147~177 g であった。動物は検疫・馴化期間中の体重増加量により選別後、群分け当日 (投与開始の 2 日前) の体重に基づいて層別化し、各群の平均体重ができるだけ均等となるよう各群を構成した。個体の割付けはコンピュータを用いたブロック配置法及び無作為抽出法の組合せ (ブロック配置法で必要な群を構成し、試験群及び群内の個体番号を無作為に割当てた) により行った。また、余剰動物は投与開始日に試験系から除外した。

注) : 試験計画書に従い、注文匹数は雌雄各 45 匹であったが、実際には雌雄各 47 匹が納入された。

6.5 飼育条件

動物は温度 21~25°C (許容範囲:23±3°C)、相対湿度 46~61 %、(許容範囲:50±20 %)、換気回数 1 時間 10~15 回、照明 1 日 12 時間 (07:00~19:00) の動物飼育室 (303 号室) で、ブラケット式金属製網ケージ (W 250×D 350×H 200 mm : 日本ケージ株式会社) で個別飼育し、毎日 1 回の飼育室内の清掃を実施した。固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 : 090309、090407) 及び御殿場市営水道水を給水瓶により自由に摂取させた。

6.6 飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用ロットについて Eurofins Scientific Analytics で分析を行い、また、飲料水については東芝機械環境センター株式会社に水道法に準拠する水質検査を定期的に (年 4 回) 依頼した。これらの分析成績書を入手し、試験成績に影響がないことを確認した後、写しを保存した。

6.7 動物の識別及びケージへの表示

動物は入荷時に小動物耳標を装着して個体識別した。入荷から群分け前までの間は試験番号、性別及び耳標番号を明記したケージラベルをつけた。群分け後は、性別及

び用量ごと（対照群、低、中及び高用量群の順）に4桁の番号をつけた。この場合、1000の位は群、100の位は性（0番を雄、1番を雌）、10と1の位は個体番号とした。各飼育ケージには、群分け前まで使用したケージラベルの裏に用量（群）ごとに色分けしたラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び剖検予定日を明記した。ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定中は、観察者に対して投与の情報を制限するため、ケージラベルを裏返して試験番号、性別及び耳標番号のみを表示した。

6.8 投与経路、投与期間、投与回数及び回復期間とそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口投与を選択し、投与期間は28日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回（7回/週）とした。回復期間は障害の可逆性を検討するのに適当と考えられる2週間（14日間）とし、この間投与を行わなかった。

6.9 投与方法

投与容量は5 mL/kg 体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した（08:00~11:21の間）。対照群には媒体（0.5 w/v%メチルセルロース水溶液）を同様に投与した。個体ごとの投与液量（表示単位：0.1 mL）は最新の体重を基準に算出した。

6.10 投与量及びその設定根拠並びに群構成

アセナフチレンの0（0.5 w/v%メチルセルロース水溶液）、100、300及び1000 mg/kg/dayを1群雌雄各5匹のラットに14日間反復経口投与した結果¹⁾、主な変化として、雌雄で1000 mg/kg投与群で全例が死亡し、100 mg/kg以上の投与群の器官重量に変化がみられことから、本試験における投与量は、100 mg/kg投与群を高用量とし、公比5で除し、20 mg/kgを中用量に、4 mg/kgを低用量に設定し、対照群を加え4群構成とした。1群当たりの動物を主群では雌雄各6匹、回復群では対照群及び高用量群で雌雄各6匹とした。群構成を表1に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	5	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	4	0.8	5	雄	6	2001~2006	-	-
				雌	6	2101~2106	-	-
中用量群	20	4	5	雄	6	3001~3006	-	-
				雌	6	3101~3106	-	-
高用量群	100	20	5	雄	6	4001~4006	6	4007~4012
				雌	6	4101~4106	6	4107~4112

7. 試験結果

7.1 一般状態の観察

成績を Table 1-1~1-3 及び Appendix 1~10 に示した。

1) 投与期間

流涎が 100 mg/kg 投与群の雌で投与 16 日以降に散見された。また、粗毛が 100 mg/kg 投与群の雌 2/12 例で、削瘦が 100 mg/kg 投与群の雌 1/12 例でいずれも投与 24 日以降に認められた。

2) 回復期間

いずれの動物においても、回復期間を通じて異常は認められなかった。

7.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量

7.2.1 詳細な一般状態の観察

成績を Table 2-1~2-18 及び Appendix 11~70 に示した。

1) 投与期間

(1) 投与 1 週

いずれの検査項目においても異常はなく、各被験物質投与群の雌雄と対照群との間に有意差は認められなかった。

(2) 投与 2 週

手に持っただけの観察において軽度の流涎が 100 mg/kg 投与群の雌 1/12 例でみられ、また、オープンフィールド内観察において立ち上がり回数の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

(3) 投与 3 週

手に持っただけの観察において軽度あるいは中等度の流涎が 100 mg/kg 投与群の雌 3/12 例でみられ、また、オープンフィールド内観察において立ち上がり回数の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

(4) 投与 4 週

手に持っただけの観察において軽度な粗毛が 100 mg/kg 投与群の雌 2/12 例、軽度の流涎が 100 mg/kg 投与群の雌 4/12 例でみられ、また、オープンフィールド内観察において立ち上がり回数の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

2) 回復期間

(1) 回復 1 週

オープンフィールド内観察において立ち上がり回数の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。

(2) 回復 2 週

いずれの検査項目においても異常はなく、100 mg/kg 投与群の雌雄と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.2 機能検査

成績を Table 2-19、2-20 及び Appendix 71~76 に示した。

1) 投与 4 週

聴覚反応において弱い反応を示す動物が 100 mg/kg 投与群の雄 3/12 例で、また、痛覚反応において弱く反応する動物が 100 mg/kg 投与群の雌 1/12 例で認められた。

2) 回復 2 週

いずれの検査項目においても異常はなく、100 mg/kg 投与群の雌雄と対照群との間に有意差は認められなかった。

7.2.3 握力

成績を Table 2-21、2-22 及び Appendix 77~82 に示した。

1) 投与 4 週

前肢の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

2) 回復 2 週

前肢及び後肢の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

7.2.4 自発運動量

成績を Fig. 1~4、Table 2-23、2-24 及び Appendix 83~88 に示した。

1) 投与 4 週

測定開始後 20~30 分の測定値において有意な高値が 20 mg/kg 投与群の雌と 100 mg/kg 投与群の雄で有意な低値が、測定開始後 0~10 分及び 10~20 分の測定値において有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられた。更に、100 mg/kg 投与群の雄では測定開始後 0~60 分の測定値にも有意な低値が認められた。

2) 回復 2 週

測定開始後 40~50 分の測定値において有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

7.3 体重

成績を Fig.5、Table 3-1、3-2 及び Appendix 89~94 に示した。

1) 投与期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で投与 4 から 28 日、雌で投与 10 から 28 日に認められた。更に、100 mg/kg 投与群の雌雄では投与期間中の体重増加量でも有意な低値が認められた。

2) 回復期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で回復 1 から 14 日に認められた。

7.4 摂餌量

成績を Fig.6、7、Table 4-1、4-2 及び Appendix 95~100 に示した。

1) 投与期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で投与 7 から 28 日に認められた。

2) 回復期間

有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で回復 7 日に認められた。

7.5 尿検査（摂水量含む）

成績を Table 5-1~5-8 及び Appendix 101~118 に示した。

1) 投与 4 週

沈渣において小円形上皮細胞の陽性例が対照群の雌 1/12 例、20 mg/kg 投与群の雄 1/6 例、100 mg/kg 投与群の雄 4/12 例、雌 2/12 例でみられ、100 mg/kg 投与群の雄で発現頻度の増加傾向が認められた。また、摂水量及び尿量の有意な高値と浸透圧の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

2) 回復 2 週

沈渣において小円形上皮細胞の陽性例が、100 mg/kg 投与群の雌雄各 2/6 例でみられ発現頻度の増加傾向が認められた。また、尿量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で、浸透圧の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

7.6 血液学検査

成績を Table 6-1~6-6 及び Appendix 119~136 に示した。

1) 投与期間終了時

赤血球数の有意な低値が 4 mg/kg 投与群の雄と 20 mg/kg 投与群の雌で、ヘモグロビン量と平均赤血球血色素濃度の有意な高値が 100 mg/kg の投与群の雌で、網赤血球率の有意な低値と血小板数の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、活性化部分トロンボプラスチン時間の有意な延長が 100 mg/kg 投与群の雌で、また、白血球百分率でリンパ球比率の有意な低値が 4 mg/kg 投与群の雌で認められた。

2) 回復期間終了時

網赤血球率の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、血小板数の有意な高値とフィブリノーゲン量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。また、白血球百分率で好塩基球比率と分画実数で好塩基球の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。

7.7 血液化学検査

成績を Table 7-1~7-4 及び Appendix 137~148 に示した。

1) 投与期間終了時

AST 及びクレアチニンの有意な低値が 100 mg/kg の投与群の雌で、総コレステロールとリン脂質の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、トリグリセライドの有意な

高値が 4 mg/kg 投与群の雄で、尿素窒素の有意な低値が 20 mg/kg 投与群の雌で、無機リンの有意な低値が 4 mg/kg 投与群の雌で、総たん白質とアルブミンの有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。

2) 回復期間終了時

無機リンの有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、グルコースの有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、総コレステロール及びリン脂質の有意な高値と総たん白質、アルブミン及び A/G 比の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。

7.8 器官重量

成績を Table 8-1~8-8 及び Appendix 149~172 に示した。

1) 投与期間終了時

最終体重の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

脳	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
胸腺	:	絶対及び相対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
心臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、相対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。
肝臓	:	相対重量の有意な高値が 20 mg/kg 以上の投与群の雌雄で認められた。
脾臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。
腎臓	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。
副腎	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。
卵巣	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群で認められた。

2) 回復期間終了時

最終体重の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。

脳	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。
胸腺	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
心臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雄で認められた。

		られた。
肝臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
脾臓	:	相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
腎臓	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。
副腎	:	絶対重量の有意な低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。
精巣	:	絶対重量の有意な低値と相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群で認められた。
精巣上体	:	絶対重量の有意な低値と相対重量の有意な高値が 100 mg/kg 投与群で認められた。

7.9 剖検所見

成績を Table 9-1、9-2 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 投与期間終了時

外部所見	:	粗毛が 100 mg/kg 投与群の雌 2/6 例で、低栄養状態が 100 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で認められた。
子宮	:	小型化が 100 mg/kg 投与群の 2/6 例で認められた。

2) 回復期間終了時

腎臓	:	腎盂拡張が 100 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で認められた。
甲状腺	:	小型化が 100 mg/kg 投与群の雌 1/6 例で認められた。

7.10 病理組織学検査

成績を Table 10-1~10-6 及び Appendix 173~244 に示した。

1) 投与期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が副腎、大腿骨（骨髄を含む）、胸骨（骨髄を含む）、腎臓、肝臓、腸間膜リンパ節、脾臓、胃、胸腺、膀胱及び子宮で認められた。

副腎	:	軽微な球状帯のび慢性肥大が、20 mg/kg 投与群の雌 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 2 例でみられ、100 mg/kg 投与群の雌雄で発現頻度の増加傾向が認められた。
大腿骨（骨髄を含む）	:	軽微あるいは軽度な骨髄細胞密度の低下が 100 mg/kg

- 投与群の雄 1 例と雌 2 例で認められた。
- 胸骨（骨髄を含む）： 軽微な骨髄細胞密度の低下が 100 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例で認められた。
- 腎臓： 軽微~中等度の尿細管の好塩基性化が 100 mg/kg 投与群の雌雄各全例で、軽微な単細胞壊死が 100 mg/kg 投与群の雌雄各全例で認められた。
- 肝臓： 軽微なクッパー細胞の色素沈着が 100 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例で、軽微な肝細胞の単細胞壊死が 100 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例で、軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が 20 mg/kg 投与群の雄 5 例、100 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌全例で認められた。
- 腸間膜リンパ節： 軽微な萎縮が 100 mg/kg 投与群の雌 3 例で認められた。
- 脾臓： 軽微なリンパ濾胞の萎縮が 100 mg/kg 投与群の雌 2 例で認められた。
- 胃： 軽微な腺胃のびらんが 100 mg/kg 投与群の雄 2 例で認められた。
- 胸腺： 軽微~中等度な萎縮が 100 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 4 例で認められた。
- 膀胱： 軽微な被蓋細胞の肥大が 100 mg/kg 投与群の雄 4 例と雌全例で認められた。
- 子宮： 剖検において小型化が認められた 100 mg/kg 投与群の 2 例に軽度な萎縮が認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

- 腎臓： 軽微な尿細管拡張が 100 mg/kg 投与群の雌 1 例で、軽微な再生尿細管が対照群の雄 3 例と雌 1 例、4 mg/kg 投与群の雄 1 例、20 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 2 例で、軽微な皮髄境界部の鉍質沈着が 4 及び 20 mg/kg 投与群の雄各 1 例に、軽微な間質性の細胞浸潤が 4 mg/kg 投与群の雄 1 例、20 mg/kg 投与群の雄 2 例と雌 1 例、100 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例に、腎芽腫が 4 mg/kg 投与群の雌 1 例で認められた。
- 肝臓： 軽微あるいは軽度な辺縁帯の肝細胞の空胞化が対照群の雌雄各 2 例、4 mg/kg 投与群の雌雄各 3 例、20 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 5 例、100 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例で、軽微な髓外造血が 100 mg/kg 投与群の雄 1 例で、軽微な限局性の出血が 20 mg/kg 投与群の雄 1 例で、軽

- 微な微小肉芽腫が対照群の雄 4 例と雌全例、4 mg/kg 投与群の雄全例と雌 5 例、20 mg/kg 投与群の雌雄各 5 例、100 mg/kg 投与群の雄 4 例と雌 2 例で認められた。
- 肺（気管支を含む）： 軽微な肺胞マクロファージの出現が 100 mg/kg 投与群の雄 1 例で認められた。
- 前立腺： 軽微あるいは軽度な間質性の細胞浸潤が対照群の 3 例、100 mg/kg 投与群の 2 例で認められた。
- 脾臓： 軽微な髓外造血が対照群の雄 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 3 例で認められた。
- 精巣： 軽微な精細管の萎縮が 100 mg/kg 投与群の 1 例で認められた。
- 甲状腺： 軽微な異所性胸腺が対照群の雄 1 例、100 mg/kg 投与群の雌 1 例で、軽微な總後体遺残が対照群の雌雄各 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 1 例と雌 3 例で認められた。

2) 回復期間終了時

被験物質投与によると考えられる変化が副腎、腎臓及び肝臓で認められた。

- 副腎： 軽微な球状帯のび慢性肥大が対照群の雄 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 1 例でみられ、100 mg/kg 投与群の雄で発現頻度の増加傾向が認められた。
- 腎臓： 軽微あるいは軽度な尿細管の好塩基性化が 100 mg/kg 投与群の雌雄各全例に（剖検において腎盂拡張がみられた 100 mg/kg 投与群の雌 1 例を含む）認められた。
- 肝臓： 軽微なクッパー細胞の色素沈着が 100 mg/kg 投与群の雄 4 例で、軽微な小葉中心性の肝細胞肥大が 100 mg/kg 投与群の雄 3 例と雌 1 例で認められた。

以下に示す所見については、その出現状況あるいは病理組織学的性状からいずれも偶発性の変化と判断した。

- 腎臓： 剖検において腎盂拡張が認められた 100 mg/kg 投与群の雌 1 例で中等度な腎盂拡張と軽度な再生尿細管が認められた。また、軽微な再生尿細管が対照群の雄 2 例、100 mg/kg 投与群の雄 1 例で、軽微な皮髄境界部の鉍質沈着が対照群の雌 1 例で、軽微な間質性な細胞浸潤が対照群の雄 2 例、100 mg/kg 投与群の雄 3 例で認められた。
- 肝臓： 軽微あるいは軽度な辺縁帯の肝細胞の空胞化が対照群の雌 3 例で、軽微な髓外造血が 100 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例で、軽微な微小肉芽腫が対照群の雄 3 例と雌 5 例、100 mg/kg 投与群の雄 5 例と雌 4 例で認められた。

B-6582

- 脾臓 : 軽微な髄外造血が対照群及び 100 mg/kg 投与群の雌各 1 例で認められた。
- 甲状腺 : 剖検において小型化が認められた 100 mg/kg 投与群の雌 1 例で軽微な異所性胸腺と鰓後体遺残がみられたが、小型化に相当する所見は認められなかった。

8. 考察

アセナフチレンの 28 日間反復経口投与毒性試験を 6 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、1 群雌雄各 6 又は 12 匹] を用いて実施した。投与量は 0 (0.5 w/v% メチルセルロース水溶液：対照群)、4、20 及び 100 mg/kg とし、また、対照群と 100 mg/kg 投与群の一部の個体 (1 群雌雄各 6 匹) については投与期間終了後 2 週間の休薬期間を設け、毒性変化の可逆性を検討した。

詳細な観察を含む一般状態では、100 mg/kg 投与群の雌で流涎が散見されたほか、一部で粗毛及び削瘦も認められた。更に、オープンフィールド内観察に立ち上がり回数 of 低値も認められた。なお、これらの変化は休薬により消失した。その他、回復期間中に 100 mg/kg 投与群の雄でオープンフィールド内観察に立ち上がり回数の低値がみられたが、投与期間中には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。

機能検査、握力及び自発運動量では、100 mg/kg 投与群の雄で聴覚に、100 mg/kg 投与群の雌で痛覚に弱い反応の動物が散見された。また、100 mg/kg 投与群の雌で前肢握力の低値が、100 mg/kg 投与群の雌雄で自発運動量の低値がみられた。これらの変化は病理学検査では中枢及び末梢神経系に異常はみられていないものの被験物質投与の影響が疑われた。なお、回復 2 週においても 100 mg/kg 投与群の雌雄で前肢及び後肢握力の低値が認められた。その他、自発運動量について 20 mg/kg 投与群の雌で高値が投与 4 週に、100 mg/kg 投与群の雌で高値が回復 2 週に認められたが、いずれもごく軽度で一時的な変化であることから偶発性と判断した。

体重及び摂餌量では、低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、体重増加量も低値を示し、増加抑制が認められた。回復期間中においても 100 mg/kg 投与群の雌雄で低値がみられたが、体重増加量及び回復 14 日の摂餌量には対照群と差がなく休薬による回復性が認められた。

尿検査 (摂水量を含む) では、沈渣において小円形上皮細胞の陽性例の発現頻度の増加傾向が 100 mg/kg 投与群の雄で、摂水量及び尿量の高値並びに浸透圧の低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、被験物質投与による腎臓への影響が疑われた。なお、回復 2 週においても沈渣で小円形上皮細胞の陽性例の発現頻度の増加傾向及び尿量の高値あるいは浸透圧の低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄でみられ、休薬による回復性は認められなかった。

血液学検査では、網赤血球率の低値及び血小板数の高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、ヘモグロビン量及び平均赤血球血色素濃度の高値並びに活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が 100 mg/kg 投与群の雌でみられ、いずれの変化も発現機序は明らかではないものの被験物質投与の影響が疑われた。なお、回復期間終了時においても血小板数の高値が 100 mg/kg 投与群の雄でみられたものの程度は軽減し、網赤血球率も増加に転じていることから、休薬により回復性が認められた。その他、赤血球数の

低値が 4 mg/kg 投与群の雄と 20 mg/kg 投与群の雌で、白血球百分率でリンパ球比率の低値が 4 mg/kg 投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度で高用量群には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。また、回復期間終了時にフィブリノーゲン量及び白血球百分率と実数で好塩基球の低値が 100 mg/kg 投与群の雄でみられたが、いずれもごく軽度で投与期間終了時には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。

血液化学検査では、総コレステロールとリン脂質の高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、総たん白質及びアルブミンの高値が 100 mg/kg 投与群の雄でみられ、被験物質投与による肝臓への影響が疑われた。回復期間終了時においても総コレステロール及びリン脂質の高値が 100 mg/kg 投与群の雌でみられたものの程度は軽減していることから、休薬による回復性が認められた。その他、投与期間終了時に AST 及びクレアチニンの低値が 100 mg/kg の投与群の雌でみられたが、ごく軽度であり、障害を示唆するとされる高値ではないことから、重要ではないと判断した。また、トリグリセライドの高値が 4 mg/kg 投与群の雄で、尿素窒素の低値が 20 mg/kg 投与群の雌で、無機リンの低値が 4 mg/kg 投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度で高用量群には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。更に、回復期間終了時に、無機リンの高値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、グルコースの低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、総たん白質、アルブミン及び A/G 比の低値が 100 mg/kg 投与群の雌でみられたが、いずれもごく軽度で投与期間終了時には同様な変化は認められていないことから偶発性と判断した。

病理学検査では、剖検で粗毛、低栄養状態及び子宮の小型化が 100 mg/kg 投与群の雌でみられ、組織学的変化としては肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が 20 mg/kg 以上の投与群の雄及び 100 mg/kg 投与群の雌で、クッパー細胞の色素沈着及び単細胞壊死が 100 mg/kg 投与群の雌雄で認められた。更に、胸腺の萎縮、大腿骨（骨髄を含む）と胸骨（骨髄を含む）の骨髄細胞密度の低下、腎臓の尿細管の好塩基性化及び単細胞壊死、膀胱の被蓋細胞の肥大並びに副腎の球状帯のび慢性肥大の発現頻度の増加傾向が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、腺胃のびらんが 100 mg/kg 投与群の雄で、腸間膜リンパ節、脾臓のリンパ嚢胞及び子宮の萎縮が 100 mg/kg 投与群の雌で認められた。また、重量の変化としては肝臓の相対重量の高値が 20 mg/kg 以上の投与群の雌雄で、心臓の絶対重量の低値が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、相対重量の低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、胸腺の絶対及び相対重量の低値が 100 mg/kg 投与群の雌で、脾臓の絶対重量の低値が 100 mg/kg 投与群の雄で、卵巣の絶対重量の低値が 100 mg/kg 投与群で認められた。回復期間終了時には、組織学的変化として、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、クッパー細胞の色素沈着が 100 mg/kg 投与群の雄で、腎臓の尿細管の好塩基性化が 100 mg/kg 投与群の雌雄で、副腎の球状帯のび慢性肥大の発現頻度の増加傾向が 100 mg/kg 投与群の雄で認められたが、副腎の変化を除いてはいずれも投与期間終了時より軽減するか消失し、回復性が示唆された。なお、100 mg/kg 投与群で認められた投与期間終了時の脳、腎臓及び副腎の相対重量の高値、回復期間終了時

B-6582

の胸腺、心臓、肝臓、腎臓、副腎、精巣及び精巣上体の絶対重量の低値と相対重量の高値並びに脳及び脾臓の相対重量の高値については、体重が増加抑制されたことに伴った変化と考えられた。また、剖検で回復期間終了時に腎盂拡張及び甲状腺の小型化が 100 mg/kg 投与群の雌にみられたが、発現状況から偶発性と判断した。

以上の結果、アセナフチレンの本試験条件下における無影響量は主として病理学検査における雌雄の肝臓重量の高値及び雄の小葉中心性の肝細胞肥大から 4 mg/kg/day と推定された。なお、回復期間中あるいは回復期間終了時にも雌雄の握力及び尿検査に、雄の病理学検査の副腎に変化がみられたものの、その他についてはいずれも消失あるいは軽減し、回復性を示した。

要 約

アゾイック CC5 の遺伝子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* と略した) TA100、TA1535、TA98、TA1537 及び大腸菌 *Escherichia coli* (以下、*E. coli* と略した) 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、1.22~5000 µg/plate の範囲の被験物質処理用量で予備試験を実施した。その結果より本試験は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1537 については 9.77~313 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535 については 39.1~1250 µg/plate の範囲の 6 用量、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* については 313~5000 µg/plate の範囲の 5 用量で実施した。また、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 については、用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められたため、39.1~5000 µg/plate の範囲の 8 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 156 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 2500 µg/plate 以上で認められた。また、本被験物質による着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

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 156 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 の 625 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 の 1250 µg/plate 以上で認められた。

3. 復帰変異コロニー数

2 回の本試験において、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 において、陰性対照値の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数が認められ、再現性を示した。なお、陰性対照値の 2 倍以上となる増加を示した菌株の各用量について比活性値を計算した結果、本試験 1 回目の代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 において、最大で 968Rev/mg となり、強い変異原性を示した。

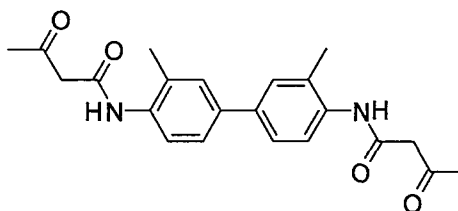
以上の試験結果より、本試験条件下において、アゾイック CC5 は、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する (陽性) と判定した。

被験物質及び被験液の調製

1. 被験物質及び溶媒

(1) 被験物質

名 称	ナフトール AS-G
別 名	アゾイック CC5、4,4'-Bisacetoaceto-o-tolidide
CAS 番号	91-96-3
ロット番号	GF01
構造式	



純 度	97.5%
分 子 量	380.44
融 点	198.2°C
常温における性状	淡黄色粉末
安 定 性	通常の取扱い条件においては安定。なお、試験終了後の被験物質について、製造元で分析をした結果、純度に変化がないことから成分に変性がないことが確認された。(別添 2)
保存方法	冷暗所・密栓
保存温度	保存期間(2008.1.28~2008.3.25)中の実測温度：0.7~9.8°C
保存場所	東京研究所 被験物質調製保存室
廃棄方法	試験終了後の残量は株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所で焼却後、廃棄した。

なお、上記被験物質情報は、製造元からの情報による。

(2) 溶媒

名 称	DMSO
製 造 元	和光純薬工業株式会社
ロット番号	WKF6984
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

(3) 溶媒の選択理由

溶解性試験を実施した結果、本被験物質は水の 50 mg/mL、アセトンの 100 mg/mL で溶解せず、DMSO の 50 mg/mL では溶解し、いずれも発熱、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。

2. 被験液の調製方法

(1) 予備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 203.5 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、4.070 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、50 mg/mL の被験液を公比 4 で順次 6 段階希釈し、50、12.5、3.13、0.781、0.195、0.0488 及び 0.0122 mg/mL の計 7 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。

(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 247.1 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、4.942 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、50 mg/mL の被験液を公比 2 で順次 9 段階希釈し、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195 及び 0.0977 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。

(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 315.5 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、6.310 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、50 mg/mL の被験液を公比 2 で順次 9 段階希釈し、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781、0.391、0.195 及び 0.0977 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。

(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。

試験材料及び試験方法

1. 試験菌株

(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

表 3 菌株の換算生菌数一覧

菌 株	菌 数(cells/mL)		
	予備試験	本試験 1 回目	本試験 2 回目
<i>S. typhimurium</i> TA100	5.51×10^9	5.23×10^9	4.96×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1535	5.04×10^9	5.02×10^9	4.87×10^9
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	8.18×10^9	8.09×10^9	7.94×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA98	6.21×10^9	5.91×10^9	5.35×10^9
<i>S. typhimurium</i> TA1537	3.07×10^9	3.09×10^9	3.11×10^9

(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 6 段階希釈した計 7 用量 (1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000 µg/plate) を用い、予備試験を実施した。なお、予備試験の結果を別表 1 に示した。

予備試験の結果、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* TA 株及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 の 1250 µg/plate 以上で認められた。なお、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 において、用量依存的な復帰変異コロニー数が認められた。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 313 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 5000 µg/plate で認められた。また、本被験物質による着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。

このため本試験の試験用量は、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA 株及び代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1537 については 313 µg/plate、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA1535 については 1250 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。また、代謝活性化の有無にかかわらず *E. coli* WP2 *uvrA* については 5000 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 4 段階希釈した計 5 用量を設定した。なお、代謝活性化する場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 については、用量依存的な復帰変異コロニー数の増加が認められたため、5000 µg/plate を最高用量として、以下公比 2 で 7 段階希釈した計 8 用量を設定した。

(4) プレート数

被験物質処理群、陰性対照及び陽性対照処理群について、予備試験ではそれぞれ 2 枚、2 回の本試験ではそれぞれ 3 枚のプレートを用いた。

(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、最少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 S9Mix 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 加えた後に最少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) 最少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、最少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で予備試験では 49.5 時間、本試験 1 回目では 49.5 時間、本試験 2 回目では 48.5 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 156 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 2500 µg/plate 以上で沈殿が認められたため、目視による計数を行った。なお、陽性対照のみ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。

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。

試験結果及び考察

1. 試験結果

試験の結果を別表 1～5 及び図 1～10 に示した。また、比活性値を別表 6～8 に示した。なお、図は別表 2、3 より作成した。

(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 156 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の 2500 µg/plate 以上で認められた。また、本被験物質による着色は、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。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 156 µg/plate 以上、代謝活性化しない場合の *S. typhimurium* TA100、TA1535、TA98 及び代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1537 の 313 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA1535 の 625 µg/plate 以上、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 の 1250 µg/plate 以上で菌の生育阻害が認められた。

(2) 復帰変異コロニー数

代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 において、陰性対照値の 2 倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数が認められ、再現性を示した。

(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 1）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。

2. 考察

2回の本試験において、代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA100、TA98 において、陰性対照値の2倍以上となる用量依存的な復帰変異コロニー数が認められ、再現性を示した。なお、陰性対照値の2倍以上となる増加を示した菌株の各用量について比活性値を計算した結果、本試験1回目の代謝活性化した場合の *S. typhimurium* TA98 において、最大で 968Rev/mg となり、強い変異原性を示した。

以上の試験結果より、本試験条件下において、アゾイック CC5 は、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有する（陽性）と判定した。

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.