

(別表1)

試験結果表 (予備試験)

被験物質の名称:アゾイック CC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年2月25日 より 2008年2月28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 ^{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	94 110 (102)	6 9 (8)	13 20 (17)	26 27 (27)	6 11 (9)
	1.22	95 109 (102)	12 6 (9)	21 12 (17)	25 33 (29)	9 9 (9)
	4.88	108 112 (110)	14 5 (10)	17 19 (18)	21 21 (21)	8 5 (7)
	19.5	118 101 (110)	13 7 (10)	19 18 (19)	22 29 (26)	10 7 (9)
	78.1	96 98 (97)	8 5 (7)	22 12 (17)	34 26 (30)	8 4 (6)
	313 #	83 * 111 * (97)	8 * 6 * (7)	16 11 (14)	30 * 16 * (23)	9 * 6 * (8)
	1250 #	85 * 99 * (92)	15 * 6 * (11)	13 16 (15)	18 * 22 * (20)	8 * 7 * (8)
	5000 #	75 * 108 * (92)	7 * 7 * (7)	13 24 (19)	14 * 16 * (15)	5 * 8 * (7)
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	163 167 (165)	17 17 (17)	20 18 (19)	54 53 (54)
1.22		173 138 (156)	17 17 (17)	14 22 (18)	68 63 (66)	10 6 (8)
4.88		155 112 (134)	20 19 (20)	25 9 (17)	49 53 (51)	6 10 (8)
19.5		144 166 (155)	12 16 (14)	15 18 (17)	76 88 (82)	8 6 (7)
78.1		137 145 (141)	14 8 (11)	17 18 (18)	120 132 (126)	6 9 (8)
313		191 184 (188)	12 13 (13)	25 19 (22)	270 270 (270)	5 * 11 * (8)
1250		298 * 310 * (304)	13 * 18 * (16)	21 15 (18)	390 * 381 * (386)	7 * 16 * (12)
5000 #		342 * 293 * (318)	8 * 17 * (13)	13 20 (17)	464 * 337 * (401)	8 * 5 * (7)
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	506 552 (529)	298 306 (302)	76 88 (82)	459 448 (454)	1677 1476 (1577)
	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	787 862 (825)	338 326 (332)	1027 1183 (1105)	315 292 (304)	131 126 (129)	

(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]ピロピルアミノ]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: アゾイックCC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年3月10日 より 2008年3月13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)	118 127 116 (120 ± 5.9)	7 7 16 (10 ± 5.2)	42 27 32 (34 ± 7.6)	12 18 13 (14 ± 3.2)	9 9 5 (8 ± 2.3)	
	9.77	126 120 127 (124 ± 3.8)	14 16 5 (12 ± 5.9)	NT	18 15 22 (18 ± 3.5)	7 6 2 (5 ± 2.6)	
	19.5	126 127 101 (118 ± 14.7)	14 12 13 (13 ± 1.0)	NT	19 14 21 (18 ± 3.6)	8 8 5 (7 ± 1.7)	
	39.1	114 125 111 (117 ± 7.4)	13 9 20 (14 ± 5.6)	NT	20 19 13 (17 ± 3.8)	9 10 10 (10 ± 0.6)	
	78.1	122 113 113 (116 ± 5.2)	12 12 9 (11 ± 1.7)	NT	17 20 14 (17 ± 3.0)	6 8 5 (6 ± 1.5)	
	156 #	116 123 145 (128 ± 15.1)	6 12 14 (11 ± 4.2)	NT	14 17 20 (17 ± 3.0)	6 * 2 * 7 * (5 ± 2.6)	
	313 #	115 * 127 * 136 * (126 ± 10.5)	9 * 7 * 9 * (8 ± 1.2)	28 24 39 (30 ± 7.8)	19 * 14 * 19 * (17 ± 2.9)	10 * 10 * 7 * (9 ± 1.7)	
	625 #	NT	NT	30 22 49 (34 ± 13.9)	NT	NT	
	1250 #	NT	NT	28 30 22 (27 ± 4.2)	NT	NT	
	2500 #	NT	NT	33 32 33 (33 ± 0.6)	NT	NT	
	5000 #	NT	NT	29 15 24 (23 ± 7.1)	NT	NT	
	陽性対照	S9Mixを必要とするもの	名称 AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
			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 621 569 564 (585 ± 31.6)	223 220 240 (228 ± 10.8)	79 71 88 (79 ± 8.5)	564 583 540 (562 ± 21.5)	2052 1955 1900 (1969 ± 77.0)	

(備考)

AF-2 : 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド
SAZ : アジ化ナトリウム
ICR-191 : 2-オキシ-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

: 被験物質の沈澱が認められたことを示す。

* : 被験物質の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: アゾイックCC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年3月10日 より 2008年3月13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)	125 143 134 (134 ± 9.0)	10 17 14 (14 ± 3.5)	44 28 35 (36 ± 8.0)	24 58 56 (46 ± 19.1)	12 15 13 (13 ± 1.5)	
	9.77	NT	NT	NT	NT	5 10 10 (8 ± 2.9)	
	19.5	NT	NT	NT	NT	8 12 12 (11 ± 2.3)	
	39.1	125 143 155 (141 ± 15.1)	6 13 14 (11 ± 4.4)	NT	73 74 53 (67 ± 11.8)	10 10 15 (12 ± 2.9)	
	78.1	157 159 159 (158 ± 1.2)	6 9 11 (9 ± 2.5)	NT	90 106 118 (105 ± 14.0)	9 11 6 (9 ± 2.5)	
	156	169 169 190 (176 ± 12.1)	11 7 13 (10 ± 3.1)	NT	193 206 193 (197 ± 7.5)	8 9 9 (9 ± 0.6)	
	313	223 176 188 (196 ± 24.4)	13 16 13 (14 ± 1.7)	39 28 19 (29 ± 10.0)	209 264 219 (231 ± 29.3)	12 * 12 * 11 * (12 ± 0.6)	
	625	223 223 214 (220 ± 5.2)	11 * 15 * 10 * (12 ± 2.6)	29 20 37 (29 ± 8.5)	305 263 240 (269 ± 33.0)	NT	
	1250	217 * 214 * 248 * (226 ± 18.8)	14 * 12 * 12 * (13 ± 1.2)	23 23 23 (23 ± 0.0)	420 * 376 * 385 * (394 ± 23.2)	NT	
	2500 #	300 * 288 * 298 * (295 ± 6.4)	NT	31 38 29 (33 ± 4.7)	473 * 461 * 417 * (450 ± 29.5)	NT	
	5000 #	298 * 295 * 311 * (301 ± 8.5)	NT	21 26 27 (25 ± 3.2)	470 * 454 * 579 * (501 ± 68.0)	NT	
	陽性対照	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	S9Mixを必要とするもの	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	873 862 886 (874 ± 12.0)	337 275 324 (312 ± 32.7)	1139 1129 1120 (1129 ± 9.5)	337 322 323 (327 ± 8.4)	104 107 106 (106 ± 1.5)

(備考)

2AA : 2-アミノアントラセン
B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

: 被験物質の沈澱が認められたことを示す。
* : 被験物質の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: アノイックCC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年3月24日 より 2008年3月27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)	98 103 106 (102 ± 4.0)	9 10 8 (9 ± 1.0)	15 17 17 (16 ± 1.2)	17 19 26 (21 ± 4.7)	5 10 13 (9 ± 4.0)		
	9.77	113 104 109 (109 ± 4.5)	10 7 11 (9 ± 2.1)	NT	26 16 15 (19 ± 6.1)	4 4 8 (5 ± 2.3)		
	19.5	98 116 115 (110 ± 10.1)	7 11 12 (10 ± 2.6)	NT	24 27 25 (25 ± 1.5)	5 6 7 (6 ± 1.0)		
	39.1	112 110 112 (111 ± 1.2)	9 11 9 (10 ± 1.2)	NT	21 25 22 (23 ± 2.1)	7 3 7 (6 ± 2.3)		
	78.1	95 107 97 (100 ± 6.4)	10 12 12 (11 ± 1.2)	NT	25 25 20 (23 ± 2.9)	3 3 16 (7 ± 7.5)		
	156 #	107 105 101 (104 ± 3.1)	13 7 6 (9 ± 3.8)	NT	18 25 21 (21 ± 3.5)	10* 6* 5* (7 ± 2.6)		
	313 #	112* 77* 118* (102 ± 22.1)	9* 6* 11* (9 ± 2.5)	19 18 21 (19 ± 1.5)	21* 25* 17* (21 ± 4.0)	7* 4* 13* (8 ± 4.6)		
	625 #	NT	NT	12 19 (17 ± 4.4)	NT	NT		
	1250 #	NT	NT	15 20 12 (16 ± 4.0)	NT	NT		
	2500 #	NT	NT	13 16 16 (15 ± 1.7)	NT	NT		
	5000 #	NT	NT	11 16 9 (12 ± 3.6)	NT	NT		
	陽性対照	S9Mixを必要としないもの	名称 用量(μg/プレート)	AF-2 0.01	SAZ 0.5	AF-2 0.01	AF-2 0.1	ICR-191 1.0
			コロニー数/プレート	548 514 500 (521 ± 24.7)	335 334 307 (325 ± 15.9)	75 63 65 (68 ± 6.4)	502 511 482 (498 ± 14.8)	1902 1994 1887 (1928 ± 57.9)

(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]プロピルアミン/アクリジン・2HCl

: 被験物質の沈澱が認められたことを示す。
* : 被験物質の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: アソニックCC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年3月24日 より 2008年3月27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)	114 130 107 (117 ± 11.8)	7 14 10 (10 ± 3.5)	12 11 24 (16 ± 7.2)	50 31 40 (40 ± 9.5)	11 17 9 (12 ± 4.2)	
	9.77	NT	NT	NT	NT	11 13 10 (11 ± 1.5)	
	19.5	NT	NT	NT	NT	12 6 7 (8 ± 3.2)	
	39.1	141 144 174 (153 ± 18.2)	8 9 11 (9 ± 1.5)	NT	70 48 70 (63 ± 12.7)	11 17 16 (15 ± 3.2)	
	78.1	162 154 172 (163 ± 9.0)	13 10 16 (13 ± 3.0)	NT	113 110 87 (103 ± 14.2)	13 15 12 (13 ± 1.5)	
	156	199 207 195 (200 ± 6.1)	12 13 15 (13 ± 1.5)	NT	162 145 143 (150 ± 10.4)	9 12 10 (10 ± 1.5)	
	313	226 185 227 (213 ± 24.0)	11 12 7 (10 ± 2.6)	29 22 18 (23 ± 5.6)	182 210 168 (187 ± 21.4)	21 * 11 * 6 * (13 ± 7.6)	
	625	210 232 232 (225 ± 12.7)	14 * 5 * 14 * (11 ± 5.2)	24 23 19 (22 ± 2.6)	225 240 188 (218 ± 26.8)	NT	
	1250	309 * 272 * 329 * (303 ± 28.9)	12 * 15 * 9 * (12 ± 3.0)	22 13 16 (17 ± 4.6)	288 * 339 * 322 * (316 ± 26.0)	NT	
	2500 #	373 * 346 * 374 * (364 ± 15.9)	NT	19 21 26 (22 ± 3.6)	382 * 375 * 278 * (345 ± 58.1)	NT	
	5000 #	356 * 366 * 345 * (356 ± 10.5)	NT	19 21 18 (19 ± 1.5)	429 * 520 * 527 * (492 ± 54.7)	NT	
	陽性対照	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	777 748 782 (769 ± 18.4)	345 323 333 (334 ± 11.0)	1205 1093 1182 (1160 ± 59.2)	333 303 333 (323 ± 17.3)	104 97 93 (98 ± 5.6)

(備考)

2AA :2-アミノアントラセン

B[a]P :ベンゾ[a]ピレン

: 被験物質の沈澱が認められたことを示す。

* : 被験物質の生育阻害が認められたことを示す。

NT : 試験せず。

()内は、3枚の平均値及び標準偏差を示す。

(別表6)

予備試験における比活性値

被験物質の名称:アゾイック CC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年2月25日 より 2008年2月28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 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照(DMSO)					
	1.22					
	4.88					
	19.5					
	78.1					
	313					
	1250					
	5000					
S9Mix (+)	陰性対照(DMSO)					
	1.22					
	4.88					
	19.5					
	78.1				922	
	313				690	
	1250				266	
	5000				69	

(備考)

比活性値は、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したものののみ記載した。

(別表7)

本試験1回目における比活性値

被験物質の名称: アゾイックCC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年3月10日 より 2008年3月13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)					
	9.77					
	19.5					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313					
	625					
	1250					
	2500					
	5000					
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)				
9.77						
19.5						
39.1						
78.1					755	
156					968	
313					591	
625					357	
1250					278	
2500		64			162	
5000		33			91	

(備考)

比活性値は、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したのみ記載した。

(別表8)

本試験2回目における比活性値

被験物質の名称: アゾイックCC5

No. T-0141

試験実施期間		2008年3月24日 より 2008年3月27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)				
		塩基置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 _{uvrA}	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)					
	9.77					
	19.5					
	39.1					
	78.1					
	156					
	313					
	625					
	1250					
	2500					
	5000					
S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)					
	9.77					
	19.5					
	39.1					
	78.1				807	
	156				705	
	313				470	
	625				285	
	1250	149			221	
	2500	99			122	
	5000	48			90	

(備考)

比活性値は、陰性対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数を示したのもののみ記載した。

4. 要約

アゾイック CC5 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、遺伝毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する、3850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量及び 50%細胞増殖抑制濃度 (IC50、概略値) は、それぞれ 241 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 200.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。短時間処理法の非代謝活性化では、50%を超える細胞増殖抑制作用は最高用量においても認められなかった。また、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では、高用量域において被験物質の析出・固着が著しく、正確な細胞密度測定が不可能であったため、当該標本の顕微鏡による観察を実施し、最高用量においても染色体標本観察に十分な細胞が存在することを確認した。これらの結果から、染色体異常試験における最高用量を、短時間処理法の代謝活性化では 241 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 3850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常を有する細胞の総出現率のうち、ギャップを含まない場合 (TA 値) は、すべての処理法において陰性と判定された。倍数体の総出現頻度においては、短時間処理法の代謝活性化では、全ての用量で陰性と判定されたが、非代謝活性化では、963 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上において倍数体の総出現頻度に用量依存性の増加が認められ、最高用量の 3850 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では陽性の判定基準内の増加を示したため陽性と判定された。連続処理法の 24 時間処理では、241 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においてのみ疑陽性と判定された。連続処理法の 48 時間処理では、全ての用量において倍数体の総出現頻度の増加が認められ、高用量では downturn が認められたものの用量依存性が確認された。短時間処理法の非代謝活性化及び 48 時間処理について、染色体数的異常誘発性の強さの指標値である PD20 値¹⁾ (観察細胞の 20%に数的異常が見られる用量) を求めたが、それぞれ 5.3 mg/mL 及び 0.36 mg/mL であった。以上の結果から、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の 48 時間処理で用量依存性を伴った倍数体の総出現頻度の増加が認められたこと、代謝活性化を伴わない方法において、ほぼ被験物質による処理時間の長さに伴って倍数体の総出現頻度が増加していたことから、本被験物質は染色体数的異常を誘発するものと総合的に判断した。

なお、全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えられた。

以上の結果から、アゾイック CC5 は本試験条件下において染色体構造異常は誘発し

M-1308

ないが、染色体数的異常を誘発すると結論した。

5. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、アゾイック CC5 の安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞 (CHL/IU) を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

Good Laboratory Practice (GLP)

- 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」
(平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、
環境企発第 031121004 号、平成 17 年 4 月 1 日最終改正)
- 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」
(OECD 理事会：1997 年 11 月 26 日)

遺伝毒性試験ガイドライン

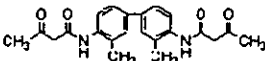
- 「新規化学物質等に係る試験の方法について」
(平成 15 年 11 月 21 日；薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、
環境企発第 031121002 号、平成 18 年 11 月 20 日最終改正)
- 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 473」
(OECD 理事会：1997 年 7 月 21 日)

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

被験物質の純度等の特性は、東京化成工業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	:	東京化成工業株式会社
名称	:	アゾイック CC5
英名称	:	Azoic CC5
英名別称	:	Naphthol AS-G N,N'-Bis(acetoacetyl)-3,3'-dimethylbenzidine
ロット番号	:	GF01
CAS 番号	:	91-96-3
化学構造式	:	
分子量	:	380.44
純度	:	97.5 %
融点	:	198.2 °C
性状	:	淡灰色粉末
入手量	:	25 g
安定性	:	試験終了後に東京化成工業株式会社において特性を測定し、その結果を入手して安定性を確認した (Attached Data 2)。
保存方法	:	冷蔵 (保存期間中の実測温度: 3~6°C)、遮光、防湿
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	:	特になし
返却	:	被験物質の残余物は、東京化成工業において全て廃棄した。

6.1.2 溶媒

名称	:	注射用水
ロット番号	:	7D74N
規格	:	日本薬局方
製造元	:	株式会社大塚製薬工場
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	:	試験開始前に被験物質の溶媒に対する溶解性の検討を

実施した結果、注射用水では 38.5 mg/mL で、DMSO では 385 mg/mL で不溶であった。しかしながら、注射用水では、超音波処理を施すことで良好な懸濁性が得られたことから、注射用水に被験物質を懸濁させることとした。

6.2 被験液の調製

6.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.3850 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 38.5 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：3850 µg/mL）を調製した。次いで、38.5 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 7 段階希釈し、19.3、9.63、4.81、2.41、1.20、0.602 及び 0.301 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 0.3850 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 38.5 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：3850 µg/mL）を調製した。次いで、38.5 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 7 段階希釈し、19.3、9.63、4.81、2.41、1.20、0.602 及び 0.301 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では、2.41 から 0.301 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では、38.5 から 4.81 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を用いた。連続処理法では、被験物質 0.3850 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。超音波処理を行いながら溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 38.5 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.500 mL 添加した際の最終濃度：3850 µg/mL）を調製した。次いで、38.5 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 4 段階希釈し、19.3、9.63、4.81 及び 2.41 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理及び 48 時間処理ともに 38.5 から 2.41 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を用いた。

6.2.2 調製頻度

用時に調製した。

6.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液が安定であることを確認した。

ロット番号 : 571834
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存方法 : 冷凍 (-80°C 設定の冷凍庫)
 保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号 : 300142、366167
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存方法 : 冷蔵
 保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 冷蔵庫

6.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。確認試験及び追加試験は実施しなかった。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理

6.6.1 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、被験物質用量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。ただし、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。

6.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 3850 µg/mL とし、以下公比 2 で希釈した 1930、963、481、241、120、60.2 及び 30.1 µg/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、241 µg/mL で 50%を

超える細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀、概略値) は 200.7 µg/mL であった。短時間処理法の非代謝活性化では、最高用量の 3850 µg/mL においても 50%を超える細胞増殖抑制作用は認められなかった。また、連続処理法の 24 時間処理では、最高用量の 3850 µg/mL から 963 µg/mL において、48 時間処理では、最高用量の 3850 µg/mL 及び 1930 µg/mL において、被験物質と推測される物質のプレートの底面への固着が著しく認められたため、単層細胞密度測定装置 (機器登録 No.926) による測定は行ったが、IC₅₀ の算出からは除外した。しかしながら、単層細胞密度測定用標本を顕微鏡 (機器 No.2143) によって観察したところ、これらの用量においても、染色体観察用標本の観察に十分と推測される細胞の存在が確認された。これらの結果より、ガイドラインに定められた「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。」及び「50%以上の細胞増殖抑制が認められない場合は、5mg/mL 又は 10mM (いずれか低い方) を最高用量とする。」との規定から、短時間処理法の代謝活性化では 241 µg/mL、短時間処理法の非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 3850 µg/mL を最高用量とした。また、これに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

6.6.3 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の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γ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 2×10^4 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 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 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 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 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、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、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、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）。

2) 連続処理法

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理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 γ 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 2×10^4 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 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 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観察し、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。

6.6.4 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 γ 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 4 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 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 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（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 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（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、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) 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 0.100 mL 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 to 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。

2) 連続処理法

短時間処理法の非代謝活性化において、倍数体の出現率が陽性と判定されたが、染色体構造異常については陰性と判定されたため、連続処理法を実施した。

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理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 γ 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 4 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 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、陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL (最終濃度：0.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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) 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 0.1 mL 加えた。培養終了後、被験物質処理群については可能な限り析出を除去するために培養液を廃棄し、新しい培養液 5.0 mL を添加した遠沈管に細胞を回収した。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 to 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。
- (4) 残る各群 2 枚のプレート (枝番号-3 及び-4) は、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。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。

6.6.5 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とする。

6.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常はさらに以下のように定義・分類した。

1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

- ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体又は染色分体の同軸上に断片がある（非染色部分が染色分体の同軸上にある）ものであって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるもの。
- 染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸上からはずれているもの、及び非染色部位が染色分体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの、及び非染色部位が染色体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化(frg)他。

2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数（二倍体）と異なり、倍化した場合を数的異常と定義した。

- 倍数体 : polyploidy（核内倍加体：endoreduplication を含む）

6.6.7 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準¹⁾に従い染色体の構造並びに

M-1308

数的異常を持つ細胞の出現率(%)によって以下のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5% 未満	陰 性 (-)
5% 以上 10% 未満	疑陽性 (±)
10% 以上	陽 性 (+)

染色体構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合 (TAG) と含まない場合 (TA) とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

7. 試験結果

7.1 細胞増殖抑制試験

7.1.1 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 Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化では、241 µg/mL 以上の用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 200.7 µg/mL だった。一方、非代謝活性化では、細胞増殖抑制は認められず、50%細胞増殖抑制濃度は求められなかった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う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 963 µg/mL 以上の用量で白桃色に変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化では、全ての用量で析出が認められた。一方、非代謝活性化では、60.2 µg/mL 以上の用量で析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化では、全ての用量で析出が認められた。一方、非代謝活性化では、60.2 µg/mL 以上の用量で析出が認められた。被験物質用量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 963 µg/mL 以上の用量では、被験物質と思われる物質が多量に存在していたため観察不能であった。また、代謝活性化では 120 µg/mL 以上、非代謝活性化では、241 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.1.2 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 1-3 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4 及び Table 1-4 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理法及び 48 時間処理法ともに、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度の測定を行ったが、24 時間処理では 241 µg/mL 以上、48 時間処理では 120 µg/mL 以上の用量で、プレート底面に被験物質と思われる物質の固着が認められ、更に 24 時間処理では 963 µg/mL 以上、48 時間処理では 1930 µg/mL 以上の用量では、多量の固着が認められたため、これらの測定値は信頼性に欠けるものと判断した。また、その他の用量では細胞増殖抑制は認められなかったため、50%細胞増殖抑制濃度は求められなかった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う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、963 µg/mL 以上の用量で白桃色に変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 60.2 µg/mL 以上

の用量で析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24時間処理及び48時間処理ともに、60.2 µg/mL以上の用量で析出が認められた。被験物質用量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時間処理では963 µg/mL以上、48時間処理では481 µg/mL以上の用量で被験物質と思われる物質が多量に存在していたため、観察不能であった。また、24時間処理では241 µg/mL以上、48時間処理では241 µg/mLの用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.2 染色体異常試験

7.2.1 短時間処理法

代謝活性化の結果を Fig. 2-1、Table 2-1 及び Table 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 2-2、Table 2-2 及び Table 3-2 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、代謝活性化では全ての用量で認められなかった。一方、非代謝活性化では963 µg/mL以上の用量で白桃色に変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、全ての用量で析出が認められた。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともに全ての用量で析出が認められた。被験物質用量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、代謝活性化では60.2 µg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。一方、非代謝活性化では全ての用量で被験物質と思われる物質が多量に存在していたため、観察不能であった。

3) 染色体構造異常

染色体構造異常の総出現率 (TA) は、代謝活性化では241 µg/mLでは0.5%、120 µg/mLでは1.0%、60.2 µg/mLでは2.5%及び30.1 µg/mLでは0%と陰性の判定基準である5%未満であったため、陰性と判定した。また、非代謝活性化においては、3850 µg/mLでは2.5%、1930 µg/mLでは1.5%、963 µg/mLでは1.0%及び481 µg/mLでは0.5%と陰性の判定基準である5%未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の総出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (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、その総出現率は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) の総出現率は、代謝活性化では241 µg/mLでは0%、120 µg/mLでは0.5%、60.2 µg/mLでは0%及び30.1 µg/mLでは0.5%と陰性の判定基準である5%未満であったため、陰性と判定した。一方、非代謝活性化においては、3850 µg/mLで

は 15.0%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 6.5%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 6.0%及び 481 $\mu\text{g/mL}$ では 3.0%と 3850 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10%以上、1930 $\mu\text{g/mL}$ 及び 963 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満、481 $\mu\text{g/mL}$ で陰性の判定基準である 5%未満であったため、陽性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の総出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (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。

7.2.2 連続処理法

24 時間処理の結果を Fig. 2-3、Table 2-3 及び Table 3-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 2-4、Table 2-4 及び Table 3-4 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う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、963 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で白桃色に変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で析出が認められた。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で析出が認められた。被験物質用量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 963 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で被験物質と思われる物質が多量に存在していたため、観察不能であった。また、24 時間処理では 241 $\mu\text{g/mL}$ 以上、48 時間処理では 481 $\mu\text{g/mL}$ 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

染構造異常の総出現率 (TA) は、24 時間処理では 3850 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、481 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%及び 241 $\mu\text{g/mL}$ では 0%と陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。また、48 時間処理においては、3850 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、481 $\mu\text{g/mL}$ では 0%及び 241 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%と陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の総出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (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、その総出現率は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) の総出現率は、24 時間処理では 3850 $\mu\text{g/mL}$ では 4.0%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 3.5%、963 $\mu\text{g/mL}$ では 3.5%、481 $\mu\text{g/mL}$ では 4.5%及び 241 $\mu\text{g/mL}$ では 6.5%と 241 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満であったため、疑陽性と判定した。また、48 時間処理では 3850 $\mu\text{g/mL}$ では 30.5%、1930 $\mu\text{g/mL}$ では 21.0%、963 $\mu\text{g/mL}$

M-1308

では 30.5%、481 µg/mL では 27.0%及び 241 µg/mL では 18.5%と全ての用量で陽性の判定基準である 10%以上であったため、陽性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の総出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (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。

8. 考察

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標である、染色体構造異常を有する細胞の総出現率のうちギャップを含まない場合（TA 値）は、いずれの処理法においても陰性の判定基準である 5%未満であった。

一方、倍数体の総出現率においては、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の 48 時間処理で用量依存性を伴う増加が、連続処理法の 24 時間処理で最低用量において増加が認められたため、陽性と判定した。陽性と判定した処理法のうち、異常細胞の総出現率に用量依存性が認められた短時間処理法の非代謝活性化及び 48 時間処理について、染色体数的異常誘発性の強さの指標値である PD20 値¹⁾（観察細胞の 20% に数的異常が見られる用量）を求めたが、それぞれ 5.3 mg/mL 及び 0.36 mg/mL であった。

なお、全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総出現率は 5%未満で、陰性の判定基準内であった。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えられた。

倍数体細胞の形成機序には、核内倍加、細胞融合、細胞質分裂の阻害等が知られている。本試験においては核内倍加体（endoreduplication）や細胞融合の際に特徴的に認められる細粉化（pulverization）や premature chromosome condensation は全く観察されなかったことから、本試験における倍数体の出現頻度の増加は、これらの機序に起因するものとは考え難い。IARC の分類において Group 1 とされている asbestos は、細胞膜を貫通することによって細胞質分裂を物理的に阻害し、倍数体の出現頻度を増加させると報告⁶⁾をされている。同様に、Vitamine B₂ が不溶性の針状結晶を形成した場合に、倍数体の出現頻度が増加することが Kawaguchi 等⁷⁾によって報告されている。本被験物質も培養液中では析出を生じ、顕微鏡観察において微細な針状結晶が細胞膜周辺に認められ、細胞質内に 2 核、3 核が存在する細胞が散見される（Photo 3 及び 4）ことから、asbestos や Vitamine B₂ と同様に細胞質分裂の物理的阻害が倍数体の出現頻度増加の機序であることが推測される。

本被験物質は化学構造上、benzidine (4,4'-diaminobiphenyl, CAS Registry No.92-87-5) を母核とするが、benzidine は IARC の Group 1 に分類される発癌物質で、強い染色体構造異常の誘発性を有する⁸⁾。また、本被験物質の類縁化合物である 3,3'-dimethylbenzidine は、細菌を用いる復帰突然変異試験⁹⁾及びマウスリンフォーマ TK 試験¹⁰⁾において陽性を示し、CHO 細胞を用いた試験においても姉妹染色分体交換と染色体構造異常を誘発することが報告されている¹¹⁾。しかしながら、本被験物質は

M-1308

官能基であるアミノ基に acetoacetyl が付加されているため、DNA との反応性を失い、染色体構造異常を誘発しなかったものと推測される。

以上の結果から、アゾイック CC5 は本試験条件下において染色体構造異常は誘発しないが、染色体数的異常を誘発すると結論した。

Table 1-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with Azoic CC5

[Short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates/Crystals ^{f)}		
							1)	2)	
+	6-18	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			100		-	-	-	-	
		Test article	30.1	83	83	-	-	+	+
				83		-	-	+	+
			60.2	83	83	-	-	+	+
				83		-	-	+	+
			120	66	66	+	-	+	+
				66		+	-	+	+
			241	33	42	+	-	+	+
				50		+	-	+	+
			481	16	25	++	-	+	+
				33		++	-	+	+
			963	16	16	g)	Whitish pink	+	+
				16		g)	Whitish pink	+	+
			1930	16	25	g)	Whitish pink	+	+
33	g)	Whitish pink		+		+			
3850	33	33	g)	Whitish pink	+	+			
	33		g)	Whitish pink	+	+			

Concentration of 50% cell-growth inhibition : **200.7** $\mu\text{g/mL}$

NC: Negative Control(water for injection)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test suspensions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test suspensions and ²⁾at the end of treatment.

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.