

## 考 察

### 1. 反復投与毒性について

被験物質の投与による主な毒性として、雌雄の肝臓、雄の腎臓および雌の血液に対する影響が認められた。

肝臓に対する影響について、500 mg/kg 以上の群で雌雄に肝臓重量に変化が認められ、病理組織学検査では、小葉中心性の肝細胞肥大が観察された。また、1000mg/kg 群で雄の2匹および雌の3匹に認められた巣状壊死は、自然発生病変りとしても知られているが、1000 mg/kg 群にのみ比較的高い発現率で認められたことから、被験物質の投与に起因する変化と判断された。

血液生化学検査において、500 mg/kg 以上の群の雄および1000 mg/kg 群の雌に認められた総コレステロール濃度並びに1000 mg/kg 群の雌に認められたALT活性のいずれも高値は、被験物質の肝臓に対する影響と関連した変化と考えられる。

腎臓に対する影響について、500 mg/kg 以上の群で雄に腎臓重量の変化が認められた。病理組織学検査では500 mg/kg 以上の群の雄に近位尿細管上皮の再生像と考えられる好塩基化が認められ、本被験物質は尿細管に対する傷害性の影響を有するものと考えられた。

血液に対する影響について、1000 mg/kg 群で雌に赤血球数、血色素量およびヘマトクリット値の有意な低値並びに網状赤血球数の有意な高値が認められ、被験物質の投与による影響と考えられた。この貧血所見と関連して、出血、網内系組織における赤血球破壊亢進所見、骨髄等における造血細胞の変化など、その発現機序を推定できる変化は認められなかった。

これらの変化に加えて、1000 mg/kg 群では雄に投与期間中の体重増加量の低値が認められた。

500 mg/kg 群の雄および1000 mg/kg 群の雌に認められたカルシウム濃度の高値については、軽度な変化ではあるが、投与量設定試験においても1000 mg/kg 群で雌雄に認められた変化であることから、被験物質投与による何らかの影響と思われる。

なお、500 および1000 mg/kg 群の雌雄に認められた流涎は、投与直後にのみ認められた変化であり、詳細な臨床観察や感覚反射機能検査等で神経毒性を示唆する変化が認められていないことから、被験物質の毒性と関連した変化ではなく、投与液に対する忌

避反応と考えられる。

雌サテライト群の回復期間中の検査で認められた後肢の握力および測定開始後 30 分間の自発運動量の低値について、これらの各個体値は、後肢握力の 1 例(574 g)を除いて、いずれも当研究所の背景データにおける基準値の範囲[後肢握力：162～476(g)、測定開始後 30 分間の自発運動量：6567～19513(カウント/30 分)]内の値であり、後肢握力においては、むしろ対照群の値が高値傾向を示したこと、また、投与期間終了時の検査ではこのような変化傾向は認められていないことなどから、被験物質の投与とは無関係な偶発的変化と判断した。

血液学検査において、回復群の雄で認められた血小板数の低値については、その個体値は背景データにおける基準値の範囲[98～150( $10^4/\mu\text{L}$ )]内の値であり、むしろ、対照群の値がやや高値傾向を示したこと、また、投与期間終了時の検査ではこのような変化傾向は認められていないことなどから、投与とは無関係な偶発的変化と判断した。回復群の雌で認められた活性化部分トロンボプラスチン時間の延長については、肝臓等に関連するような変化は認められないことから、偶発的変化と思われる。

血液生化学検査において、30 mg/kg 以上の群で雄に認められたクレアチニンの低値については、いずれの投与群ともその個体値は、基準値の範囲[0.30～0.54(mg/dL)]内の値であり、また、用量相関性のない変化であることから、投与とは無関係な偶発的変化と判断した。また、回復群の雄で認められた ALT の高値および血糖の低値については、投与期間終了時の検査では認められておらず、また、その各個体値は、血糖における 1 例 (118 mg/dL) を除いて、いずれも基準値の範囲[ALT：21～59(IU/L)、血糖：131～182(mg/dL)]内の値であることなどから、偶発的変化と判断した。

器官重量において、120 および 500 mg/kg 群の雌で認められた副腎相対重量の低値および脾臓の絶対重量および相対重量の高値については、いずれも用量相関性はなく、被験物質とは無関係な偶発的変化と判断した。また、1000 mg/kg 群の雌で認められた甲状腺相対重量の高値については、関連性のある変化が病理組織学検査において認められていないことから、被験物質の影響とは考え難い。回復群の雄で認められた脾臓絶対重量の低値については、相対重量に変化はなく、投与期間終了時では認められない変化であり、むしろ対照群の値が高値傾向であったことなどから、投与とは無関係な偶発的変化と判断した。

一般状態、詳細な臨床観察、感覚反射機能検査、握力および自発運動量の測定並びに神経系器官・組織の病理学検査において、被験物質の神経行動毒性を示唆する変化は認められなかった。

以上のような、投与期間中あるいは投与期間終了時の検査で認められた変化は、回復期間中あるいは回復期間終了時の検査においては回復あるいは回復傾向にあり、可逆的な変化であると判断した。また、遅発的な毒性影響と考えられる変化も認められなかった。

本試験で認められたものと類似した肝臓に対する影響は、当研究所で実施したビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のラットにおける反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験においても認められている<sup>2)</sup>（未発表）。

## 2. 生殖発生毒性について

雌雄親動物の生殖能に対する影響について、観察した各指標とも対照群と比べて有意な変化は認められなかった。また、児動物に対しても、発生に関する各指標において被験物質の投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、ビスフェノール A-EO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の親動物への反復投与における無影響量（NOEL）および無毒性量（NOAEL）は、雌雄とも 500 mg/kg 以上の群で肝臓に対する影響が認められたことから、いずれも 120 mg/kg/day と推定した。また、生殖発生毒性に関する NOEL および NOAEL は、最高用量群においても影響が認められなかったことから、いずれも 1000 mg/kg/day と推定した。

## 文 献

- 1) 日本毒性病理学会編、毒性病理組織学、2000。
- 2) 野田篤ら。ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のラットを用いる反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験。（財）畜産生物科学安全研究所 内部資料。

## 要 約

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の遺伝子突然変異誘発性の有無を検討するため、復帰突然変異試験を指標菌株として *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvrA を用い、S9 mix 非存在（直接法）および存在（代謝活性化法）下でプレインキュベーション法により行った。

用量は、用量設定試験（予備試験）の結果、いずれの菌株とも生育阻害が認められなかったため、直接法および代謝活性化法ともに 156～5000  $\mu$ g/プレートの範囲（公比 2）で設定した。

試験は 2 回実施した。その結果、全ての菌株において代謝活性化の有無にかかわらず、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。菌の生育阻害についても、いずれの菌株とも認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

## 目 的

この試験は、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性の有無を明らかにするために実施した。

## 材料および方法<sup>1, 2)</sup>

### 1. 被験物質

名 称： ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

（英名： 4,4'-isopropylidenediphenol propoxylated）

CAS 番号： 37353-75-6

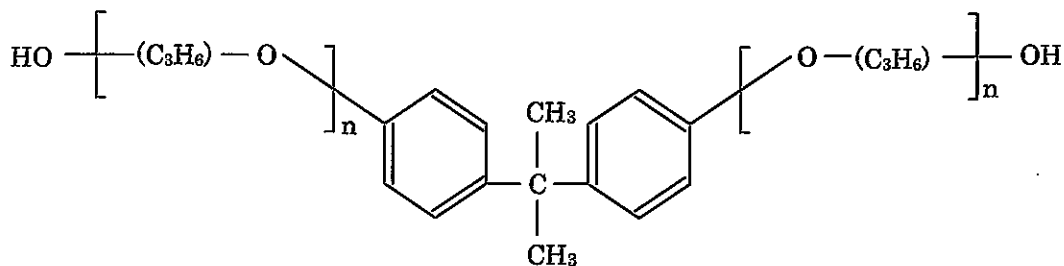
ロット番号： L3-6S005-A

純 度： 99%以上（水分：0.03%）

付加モル分布： 1 モル：0.0%、2 モル：5.7%、3 モル：11.4%、4 モル：22.1%、  
5 モル：24.9%、6 モル：18.1%、7 モル：10.2%、8 モル以上：  
7.6%（分析日：平成 18 年 10 月 19 日）

示 性 式：  $(C_3H_6O)_n(C_3H_6O)_nC_{15}H_{16}O_2$

構 造 式：



入 手 先： 三洋化成工業株式会社（京都府京都市東山区一橋野本町 11-1）

入手日・量： 平成 19 年 3 月 14 日・25g

物 性 等：

化学名 ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

分子量 502（付加モル数 5 モルと仮定した場合）

性状(常温) 無色透明液体

酸価 0.001 mgKOH/g

指標菌株	直接法 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	代謝活性化法 ( $\mu\text{g}$ /プレート)
TA100	AF-2 (0.01)	2-AA (1)
TA1535	SA (0.5)	2-AA (2)
WP2 $uvrA$	AF-2 (0.04)	2-AA (10)
TA98	AF-2 (0.1)	2-AA (1)
TA1537	9-AA (80)	2-AA (2)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (和光純薬工業株式会社、98%、ロット番号 PTQ1296)

2-AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業株式会社、>90%、ロット番号 KCM2259)

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、90%、ロット番号 KCG5232)

9-AA : 9-アミノアクリジン (Aldrich Chemical Company、98%、ロット番号 07721MZ)

#### 8. アミノ酸添加軟寒天培地の調製

0.6w/v%粉末寒天 (Difco Laboratories、ロット番号 5200601) および 0.5w/v% 塩化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、ロット番号 8251) の組成の軟寒天を調製した。溶解した軟寒天に、*S. typhimurium* 用には 0.5 mM D-ビオチン (Sigma Chemical Company、ロット番号 AASXB) および 0.5 mM L-ヒスチジン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 DLJ5479) 水溶液、*E. coli* 用には 0.5 mM L-トリプトファン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 EWP0420) 水溶液を 1/10 容加え、アミノ酸添加軟寒天培地とした。

#### 9. 用量設定試験 (予備試験)

本試験における被験物質の適切な用量を把握するために、20~5000  $\mu\text{g}$ /プレートの範囲で用量を設定し、本試験と同様の実験方法で試験を行った。試験は各用量 1 枚のプレートで行った。

その結果 (表 1-1、1-2)、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、全ての菌株で菌の生育阻害は認められなかった。なお、2000 および 5000  $\mu\text{g}$ /プレートで、培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

#### 10. 本試験

本試験は、同一菌株、同一用量で 2 回行った。

##### 1) 用量設定

用量設定試験の結果から、被験物質の用量は、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、5000  $\mu$ g/プレート を最高用量とし、以下公比 2 で 2500、1250、625、313 および 156  $\mu$ g/プレートの計 6 用量とした。

## 2) 実験方法

### (1) プレインキュベーション法 (直接法)

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL (和光純薬工業株式会社、リン酸水素二ナトリウム・十二水塩：ロット番号 WAF3531、リン酸二水素ナトリウム・二水塩：ロット番号 CAJ2723) および前培養した懸濁菌液 0.1 mL を分注し、37°C で 20 分間振盪培養後、45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。最少グルコース寒天平板培地 (プレート) (テスメディア AN 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 ANI420FW・2007 年 6 月 5 日製造・2007 年 8 月 10 日購入；ロット番号 ANI730IW・2007 年 9 月 11 日製造・2007 年 11 月 12 日購入) は、Vogel-Bonner E 培地 (0.2 w/v% クエン酸・一水塩、1w/v% リン酸二カリウム・無水塩、0.192 w/v% リン酸一アンモニウム、0.066 w/v% 水酸化ナトリウム、0.02 w/v% 硫酸マグネシウム・七水塩) に寒天粉末を 1.5 w/v% およびグルコースを 2 w/v% となるように加え、30 mL ずつ分注したものである。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり、溶媒 (DMSO) 0.1 mL および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

### (2) プレインキュベーション法 (代謝活性化法)

滅菌小試験管に被験物質の供試液 0.1 mL、S9 mix 0.5 mL および前培養した懸濁菌液 0.1 mL を分注し、37°C で 20 分間振盪培養後、45°C に保温したアミノ酸添加軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地上に広げた。37°C で 48 時間培養後、復帰変異コロニーを計数し、同時に指標菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて観察した。陰性対照および陽性対照群においては、上記の被験物質の供試液 0.1 mL にかわり、溶媒 (DMSO) 0.1 mL および陽性対照物質溶液 0.1 mL を用いて同様に実施した。試験は各用量 3 枚のプレートで行った。

## 11. 無菌試験

用量設定試験および本試験において、用いた溶媒、S9 mix および最高用量の被験物質の供試液について、それぞれ 0.1 mL に 0.6w/v% 軟寒天培地 2 mL を加え、最少グルコース寒天平板培地（テスメディア AN 培地、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号 ANI420FW、ANI730IW）に重層後、37℃で 48 時間培養し、菌の生育の有無を調べた。最少グルコース寒天平板培地は、それぞれ 3 枚ずつ使用した。

## 12. 試験の有効性

以下の 3 基準を満たす場合に、試験は適切な条件下で実施され、試験は有効であると判定した。

- (1) 試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液および S9 mix に雑菌の混入がない。
- (2) 各指標菌株の陰性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における背景データの範囲内の値を示す（自然復帰変異体数）。
- (3) 各指標菌株の陽性対照における復帰変異コロニー数が、当研究所における陽性対照値の背景データの範囲あるいはその近くの値を示す。

## 13. 結果の判定

結果の判定は、各用量におけるプレートでの復帰変異コロニー数の平均値を基に、原則的に以下の 3 基準を満たす場合を陽性とした。

- (1) 被験物質処理群において陰性対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数が出現する。
  - (2) 被験物質用量の増加とともに復帰変異コロニー数が増加する（用量依存性）。
  - (3) 2 回にわたる本試験の結果から復帰変異コロニー数の増加に再現性が認められる。
- 但し、明確な用量依存性が認められない場合においても、陽性値を示す試験結果に再現性が認められれば陽性と判定する。



## 結 果

試験を2回実施した結果(表2-1、2-2、3-1、3-2および図1-1、1-2、1-3、2-1、2-2、2-3)、直接法および代謝活性化法のいずれの場合も、供試したすべての菌株において復帰変異コロニー数は、陰性対照値の2倍を超えることはなかった。菌の生育阻害については、直接法および代謝活性化法のいずれの場合にも認められなかった。なお、2500および5000 $\mu$ g/プレートでは、培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

陰性対照群では背景データ(添付資料)の範囲内の復帰変異コロニー数が認められた。陽性対照群においては明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められ、その程度は、それぞれ背景データ(添付資料)の範囲内またはその近くの陽性値を示すものであった。また、試験に用いた菌液、溶媒、被験物質の供試液およびS9 mixなどには、雑菌の混入は認められなかった。

## 結 論

ビスフェノールA-PO付加物(平均付加モル数5モル)について遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、全ての指標菌株で復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

試験の有効性については、2回にわたる本試験ともに有効であることが確認された。

したがって、本実験条件下ではビスフェノールA-PO付加物(平均付加モル数5モル)の遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定した。

ビスフェノールAの変異原性については、*S. typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535または*E. coli* WP2uvrAを用いた復帰突然変異試験<sup>3,4,5)</sup>で陰性との報告がある。また、CHO細胞を用いた染色体異常試験で陽性<sup>6)</sup>および陰性<sup>7)</sup>、V-79細胞を用いた細胞遺伝子突然変異試験で陰性<sup>3)</sup>との報告がある。

## 文 献

- 1) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation. Research*, **113**, 173-215.
- 2) Green, M. H. (1984). "Handbook of Mutagenicity Test Procedures" 1, Vol.

表 1-1 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の  
用量設定試験結果〔直接法〕

用 量 〔 $\mu$ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照〔局方精製水〕	126	8	14	33	18
20	120	8	13	13	16
50	91	8	25	26	16
100	99	10	26	32	19
200	110	7	22	27	19
500	106	9	20	28	13
1000	109	9	20	26	16
2000 #	117	8	20	25	6
5000 #	77	5	25	35	13
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異コロニー数 /プレート	808	353	819	282	477

# : 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

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

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 1-2 S9 mix 存在下におけるビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の  
用量設定試験結果〔代謝活性化法〕

用 量 〔 $\mu$ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照〔局方精製水〕	100	7	22	36	9
20	91	9	20	28	9
50	95	9	30	31	13
100	105	7	25	33	7
200	113	11	25	21	8
500	111	5	19	26	10
1000	97	9	16	25	10
2000 #	126	4	24	20	9
5000 #	115	7	20	23	11
陽性対照	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA	2- AA
$\mu$ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異コロニー数 /プレート	583	257	596	302	98

# : 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。  
2-AA: 2-アミノアントラセン

表 2-1 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の  
 復帰変異試験結果〔本試験1回目-直接法〕

用 量 〔 $\mu$ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰性対照	123	3	29	21	6
〔局方精製水〕	127	15	23	25	13
	133	11	24	31	18
	(128 $\pm$ 5)	(10 $\pm$ 6)	(25 $\pm$ 3)	(26 $\pm$ 5)	(12 $\pm$ 6)
156	105	14	30	24	7
	111	5	17	25	10
	118	8	24	33	17
	(111 $\pm$ 7)	(9 $\pm$ 5)	(24 $\pm$ 7)	(27 $\pm$ 5)	(11 $\pm$ 5)
313	115	9	23	15	9
	128	3	16	23	13
	106	11	29	22	18
	(116 $\pm$ 11)	(8 $\pm$ 4)	(23 $\pm$ 7)	(20 $\pm$ 4)	(13 $\pm$ 5)
625	111	12	12	25	5
	112	11	24	31	17
	105	9	20	29	14
	(109 $\pm$ 4)	(11 $\pm$ 2)	(19 $\pm$ 6)	(28 $\pm$ 3)	(12 $\pm$ 6)
1250	101	11	26	24	13
	109	2	18	26	11
	117	10	16	31	16
	(109 $\pm$ 8)	(8 $\pm$ 5)	(20 $\pm$ 5)	(27 $\pm$ 4)	(13 $\pm$ 3)
2500 #	99	10	19	21	13
	114	8	22	25	12
	109	12	21	30	15
	(107 $\pm$ 8)	(10 $\pm$ 2)	(21 $\pm$ 2)	(25 $\pm$ 5)	(13 $\pm$ 2)
5000 #	104	8	19	25	15
	121	6	18	22	17
	103	8	20	25	21
	(109 $\pm$ 10)	(7 $\pm$ 1)	(19 $\pm$ 1)	(24 $\pm$ 2)	(18 $\pm$ 3)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	848	420	941	382	546
コロニー数	815	444	998	404	640
/プレート	891	404	994	431	426
	(851 $\pm$ 38)	(423 $\pm$ 20)	(978 $\pm$ 32)	(406 $\pm$ 25)	(537 $\pm$ 107)

# : 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

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

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 2-2 S9 mix 存在下におけるビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の  
 復帰変異試験結果[本試験1回目-代謝活性化法]

用 量 〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数/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
陰性対照 〔局方精製水〕	108 83 85 ( 92 ± 14 )	10 7 9 ( 9 ± 2 )	15 13 23 ( 17 ± 5 )	29 37 27 ( 31 ± 5 )	12 18 16 ( 15 ± 3 )
156	111 150 94 ( 118 ± 29 )	8 9 5 ( 7 ± 2 )	18 21 17 ( 19 ± 2 )	30 25 40 ( 32 ± 8 )	21 16 15 ( 17 ± 3 )
313	110 121 110 ( 114 ± 6 )	2 10 12 ( 8 ± 5 )	23 20 23 ( 22 ± 2 )	28 21 35 ( 28 ± 7 )	15 23 20 ( 19 ± 4 )
625	104 124 136 ( 121 ± 16 )	9 4 6 ( 6 ± 3 )	20 27 25 ( 24 ± 4 )	33 25 29 ( 29 ± 4 )	13 12 15 ( 13 ± 2 )
1250	100 122 106 ( 109 ± 11 )	7 15 8 ( 10 ± 4 )	16 34 30 ( 27 ± 9 )	28 31 30 ( 30 ± 2 )	14 22 20 ( 19 ± 4 )
2500 #	107 99 113 ( 106 ± 7 )	3 12 8 ( 8 ± 5 )	20 31 28 ( 26 ± 6 )	34 38 27 ( 33 ± 6 )	13 9 16 ( 13 ± 4 )
5000 #	112 125 114 ( 117 ± 7 )	4 8 9 ( 7 ± 3 )	24 22 20 ( 22 ± 2 )	26 30 24 ( 27 ± 3 )	16 12 14 ( 14 ± 2 )
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
μg/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異 コロニー数 /プレート	529 601 611 ( 580 ± 45 )	281 247 240 ( 256 ± 22 )	487 530 489 ( 502 ± 24 )	303 266 283 ( 284 ± 19 )	131 112 117 ( 120 ± 10 )

# : 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

( ): 平均値±標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3-1 S9 mix 非存在下におけるビスフェノールA-PO (平均付加モル数5モル)の  
 復帰変異試験結果 [本試験2回目 - 直接法]

用 量 [ $\mu$ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	100	9	19	33	4
[局方精製水]	129	13	19	24	9
	118	7	21	25	4
	(116 $\pm$ 15)	(10 $\pm$ 3)	(20 $\pm$ 1)	(27 $\pm$ 5)	(6 $\pm$ 3)
156	101	12	19	29	13
	98	17	18	25	3
	90	7	20	20	6
	(96 $\pm$ 6)	(12 $\pm$ 5)	(19 $\pm$ 1)	(25 $\pm$ 5)	(7 $\pm$ 5)
313	87	15	19	24	12
	97	6	29	24	5
	95	10	12	33	4
	(93 $\pm$ 5)	(10 $\pm$ 5)	(20 $\pm$ 9)	(27 $\pm$ 5)	(7 $\pm$ 4)
625	103	8	17	24	9
	98	9	24	21	12
	107	9	26	20	4
	(103 $\pm$ 5)	(9 $\pm$ 1)	(22 $\pm$ 5)	(22 $\pm$ 2)	(8 $\pm$ 4)
1250	93	8	15	20	9
	100	4	15	18	6
	95	8	23	31	2
	(96 $\pm$ 4)	(7 $\pm$ 2)	(18 $\pm$ 5)	(23 $\pm$ 7)	(6 $\pm$ 4)
2500 #	104	7	11	25	5
	77	5	24	15	3
	83	7	21	19	5
	(88 $\pm$ 14)	(6 $\pm$ 1)	(19 $\pm$ 7)	(20 $\pm$ 5)	(4 $\pm$ 1)
5000 #	113	5	21	14	8
	94	9	20	14	7
	87	6	20	34	3
	(98 $\pm$ 13)	(7 $\pm$ 2)	(20 $\pm$ 1)	(21 $\pm$ 12)	(6 $\pm$ 3)
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	769	445	983	493	777
コロニー数	786	436	998	566	371
/プレート	815	482	993	537	799
	(790 $\pm$ 23)	(454 $\pm$ 24)	(991 $\pm$ 8)	(532 $\pm$ 37)	(649 $\pm$ 241)

# : 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

( ): 平均値  $\pm$  標準偏差

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

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 3-2 S9 mix 存在下におけるビスフェノールA-PO(平均付加モル数5モル)の  
 復帰変異試験結果[本試験2回目-代謝活性化法]

用 量 [ $\mu$ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照 [局方精製水]	101	12	21	24	11
	92	9	24	23	9
	107	7	25	37	10
	(100 $\pm$ 8)	(9 $\pm$ 3)	(23 $\pm$ 2)	(28 $\pm$ 8)	(10 $\pm$ 1)
156	107	8	22	13	17
	94	6	15	23	11
	101	9	26	26	17
	(101 $\pm$ 7)	(8 $\pm$ 2)	(21 $\pm$ 6)	(21 $\pm$ 7)	(15 $\pm$ 3)
313	110	7	18	31	13
	107	9	25	35	12
	110	14	17	22	11
	(109 $\pm$ 2)	(10 $\pm$ 4)	(20 $\pm$ 4)	(29 $\pm$ 7)	(12 $\pm$ 1)
625	114	7	31	31	11
	116	11	21	21	20
	106	11	23	32	11
	(112 $\pm$ 5)	(10 $\pm$ 2)	(25 $\pm$ 5)	(28 $\pm$ 6)	(14 $\pm$ 5)
1250	113	6	21	32	5
	99	10	29	25	11
	110	8	22	28	9
	(107 $\pm$ 7)	(8 $\pm$ 2)	(24 $\pm$ 4)	(28 $\pm$ 4)	(8 $\pm$ 3)
2500 #	104	11	21	29	7
	101	12	18	26	11
	112	6	24	30	13
	(106 $\pm$ 6)	(10 $\pm$ 3)	(21 $\pm$ 3)	(28 $\pm$ 2)	(10 $\pm$ 3)
5000 #	98	8	21	21	9
	99	11	15	26	6
	105	8	28	21	5
	(101 $\pm$ 4)	(9 $\pm$ 2)	(21 $\pm$ 7)	(23 $\pm$ 3)	(7 $\pm$ 2)
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu$ g/プレート	1	2	10	1	2
復帰変異 コロニー数 /プレート	557	251	530	249	45
	436	234	559	270	98
	536	225	594	229	116
	(510 $\pm$ 65)	(237 $\pm$ 13)	(561 $\pm$ 32)	(249 $\pm$ 21)	(86 $\pm$ 37)

# : 培養終了時のプレート上に被験物質と思われる油滴様物が認められた。

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

2-AA: 2-アミノアントラセン

## 要 約

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU）を用いて *In vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、46.88～3000  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、短時間処理法の S9 mix 非存在下では、93.75～750  $\mu\text{g/mL}$  用量で、S9 mix 存在下では 187.5～750  $\mu\text{g/mL}$  用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。連続処理法 24 時間処理では、93.75  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。

したがって、染色体異常試験における用量は、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では 12.5、25、50、75 および 100  $\mu\text{g/mL}$ 、S9 mix 存在下では 25、50、100、150 および 200  $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の場合は、6.25、25、50 および 100  $\mu\text{g/mL}$  とした。

試験の結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下ともに染色体異常細胞の増加は認められなかった。また、連続処理法 24 時間においても染色体異常細胞の増加は認められなかった。なお、短時間処理法 S9 mix 非存在下の 75  $\mu\text{g/mL}$  以上、S9 mix 存在下の 150  $\mu\text{g/mL}$  以上、連続処理法 24 時間の 100  $\mu\text{g/mL}$  では、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

報告書ピアレビューにおいて、短時間処理法 S9 mix 存在下の 100～150  $\mu\text{g/mL}$  間、連続処理法 24 時間の 50～100  $\mu\text{g/mL}$  間で毒性が出ないで細胞が数えられる可能性が考えられるため、確認試験の実施を求められた。そこで、短時間処理法 S9 mix 存在下では 100、125 および 150  $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法 24 時間では 50、60、75 および 100  $\mu\text{g/mL}$  を設定し、確認試験を行った。

その結果、短時間処理法 S9 mix 存在下および連続処理法 24 時間ともに染色体異常細胞の増加は認められなかった。なお、短時間処理法 S9 mix 存在下の 150  $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法 24 時間の 60  $\mu\text{g/mL}$  以上では、細胞毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。



## 試験目的

この試験は、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするために実施した。

## 材料および方法<sup>1, 2)</sup>

### 1. 被験物質

名 称 : ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

(英名 : 4,4'-isopropylidenediphenol propoxylated)

CAS 番号 : 37353-75-6

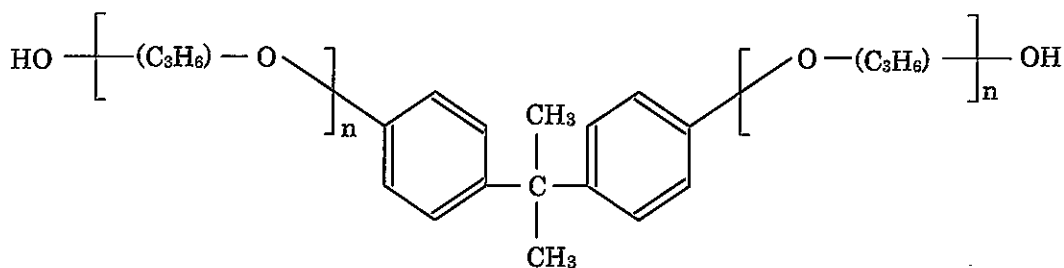
ロット番号 : L3-6S005-A

純 度 : 99%以上 (水分 : 0.03%)

付加モル分布 : 1 モル : 0.0%、2 モル : 5.7%、3 モル : 11.4%、4 モル : 22.1%、  
5 モル : 24.9%、6 モル : 18.1%、7 モル : 10.2%、8 モル以上 :  
7.6% (分析日 : 平成 18 年 10 月 19 日)

示 性 式 :  $(C_3H_6O)_n(C_3H_6O)_nC_{15}H_{16}O_2$

構 造 式 :



入 手 先 : 三洋化成工業株式会社 (京都府京都市東山区一橋野本町 11-1)

入手日・量 : 平成 19 年 3 月 14 日・25g

物 性 等 :

化学名 : ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）

分子量 : 502 (付加モル数 5 モルと仮定した場合)

性状(常温) : 無色透明液体

酸価 : 0.001 mgKOH/g

たりの組成は、次のとおりである。

[S9 製造法]

A. 使用動物

- a) 種・系統： Sprague-Dawley 系ラット（日本エスエルシー株式会社）
- b) 性・週齢： 雄・7週齢
- c) 体 重： 213~247 g

B. 誘導法

- a) 誘導物質： phenobarbital (PB)、5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路： 腹腔内投与
- c) 投与法（投与開始日起算）

1日目：PB 30 mg/kg、 2日目：PB 60 mg/kg

3日目：PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg、 4日目：PB 60 mg/kg

C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離(9000×g)し、その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

S9	0.3 mL
MgCl <sub>2</sub>	5 μmol/0.1 mL
KCl	33 μmol/0.1 mL
G-6-P	5 μmol/0.1 mL
NADP	4 μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4 μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1 mL

8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な用量を検討するため、46.88、93.75、187.5、375、750、1500 および 3000 μg/mL（溶媒に溶解可能な上限量）の用量を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行った。なお、試験には各用量について2枚のシャーレを使用した。

1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製し、次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。被験物質の添加量は、各シャーレの培養液量の 0.5 vol% とした。

2) 細胞の処理

短時間処理法の場合、直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に  $4 \times 10^5$  個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え、培養開始 3

日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO (陰性対照) または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。また、S9 mix 存在下の場合は各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除き、S9 mix 0.5 mL を加えた後、DMSO または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加えて 18 時間培養した。一方、連続処理法の場合は短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し、培養開始 3 日後に DMSO または被験物質の供試液各 0.025 mL をシャーレに加えて 24 時間および 48 時間培養した。なお、短時間処理法および連続処理法ともに 375  $\mu$ g/mL 以上の用量ではその供試液を培養液に添加すると直ちに油滴様の被験物質の析出が認められ、特に 1500  $\mu$ g/mL 以上では油滴様の大きな固まりとなって培養終了時まで残存した。

培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10 vol% ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後、水洗し、0.1 w/v% クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後、室温で一晩自然乾燥した。

### 3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は、染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計 (モノセレーター II、MI-60、オリンパス光学工業株式会社) を用いて測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100% とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果は下表に示したとおり、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では、93.75~750  $\mu$ g/mL 用量で、S9 mix 存在下では 187.5~750  $\mu$ g/mL 用量で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められた。連続処理法の場合は、24 時間処理では 93.75  $\mu$ g/mL 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50% 細胞増殖抑制用量は 46.88~93.75  $\mu$ g/mL 用量域にあるものと判断され、48 時間処理では 46.88  $\mu$ g/mL 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50% 細胞増殖抑制用量は 46.88  $\mu$ g/mL 以下の用量域にあるものと判断された。

なお、短時間処理法における 1500  $\mu$ g/mL 以上の用量では、細胞増殖率の上昇が認められた。これは、1500  $\mu$ g/mL 以上の用量では析出した油滴様の被験物質が大きな固まりとなって培養終了時まで培養液表面に浮遊して認められたこ

とから、培養液中に溶解あるいは分散している被験物質濃度は、それ以下の用量と比べてむしろ低下しているものと推察され、これが細胞増殖率の上昇をもたらしたものと考えられる。このような現象は、水に難溶なため培養液中で析出がみられる化学物質においてしばしば認められている<sup>3,4,5,6)</sup>。

[短時間処理法]

用 量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[ 100.0 ]	100	100	[ 100.0 ]
46.88	89	95	[ 92.0 ]	95	102	[ 98.5 ]
93.75	47	40	[ 43.5 ]	88	92	[ 90.0 ]
187.5	17	19	[ 18.0 ]	16	16	[ 16.0 ]
375	17	18	[ 17.5 ]	20	21	[ 20.5 ]
750	14	16	[ 15.0 ]	15	14	[ 14.5 ]
1500	51	52	[ 51.5 ]	80	81	[ 80.5 ]
3000	49	54	[ 51.5 ]	67	65	[ 66.0 ]

[ ]: 平均値

[連続処理法]

用 量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[ 100.0 ]	100	100	[ 100.0 ]
46.88	55	53	[ 54.0 ]	36	37	[ 36.5 ]
93.75	14	15	[ 14.5 ]	13	12	[ 12.5 ]
187.5	13	8	[ 20.5 ]	13	11	[ 12.0 ]
375	12	10	[ 11.0 ]	15	12	[ 13.5 ]
750	9	15	[ 12.0 ]	14	10	[ 12.0 ]
1500	21	16	[ 18.5 ]	15	14	[ 14.5 ]
3000	28	37	[ 32.5 ]	21	23	[ 22.0 ]

[ ]: 平均値

## 9. 染色体異常試験

### 1) 被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の用量は50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ、3用量以上のデータが得られることを考慮し、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では100 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公比2で50、25および12.5 $\mu\text{g/mL}$ の4用量および細胞増殖抑制試験で46.88~93.75 $\mu\text{g/mL}$ 間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことから、50 $\mu\text{g/mL}$ と100 $\mu\text{g/mL}$ の間量の75 $\mu\text{g/mL}$ を加えた計5用量を、S9 mix 非存在下では200 $\mu\text{g/mL}$ を最高

用量とし、以下公比 2 で 100、50 および 25  $\mu\text{g/mL}$  の 4 用量および細胞増殖抑制試験で 93.75~187.5  $\mu\text{g/mL}$  間で細胞増殖率の急激な変化が認められたことから、100  $\mu\text{g/mL}$  と 200  $\mu\text{g/mL}$  の中間量の 150  $\mu\text{g/mL}$  を加えた計 5 用量を、また、連続処理法 24 時間処理では、最高用量を 100  $\mu\text{g/mL}$  とし、以下公比 2 で 50、25、12.5 および 6.25  $\mu\text{g/mL}$  の計 5 用量を設定した。陽性対照物質の MNNG は 2.5  $\mu\text{g/mL}$ 、B[a]P は 10  $\mu\text{g/mL}$  の用量を用いた。

## 2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈し、所定用量の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は 0.5 mg/mL、B[a]P は 2.0 mg/mL の供試液を調製した。

## 3) 細胞の処理

4×10<sup>8</sup> 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に加え、3 日間培養後、下記の方法で処理した。培養には 1 用量当たり 4 枚のシャーレを用い、そのうち 2 枚は染色体標本作製用に、残りの 2 枚は細胞増殖率測定用に使用した。但し、陽性対照群については細胞増殖率の測定は行わず、用いるシャーレは染色体標本作製用の 2 枚とした。

短時間処理法の S9 mix 非存在下の場合は、各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。また、S9 mix 存在下の場合は、各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除いた後、S9 mix 0.5 mL を加え、続いて DMSO、被験物質供試液および B[a]P の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。S9 mix 非存在および存在下のいずれの場合も、培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。

連続処理法の場合は、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.025 mL ずつ加え、24 時間培養した。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

[短時間処理法：S9 mix 非存在下]

用量( $\mu$ g/mL)	使用シャーレ数	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0 (陰性対照) <sup>a</sup>	4	4
12.5	4	--
25	4	4
50	4	4
75	4	--
100	4	4
150	--	4
200	--	4
2.5 (陽性対照) <sup>b</sup>	2	--
10 (陽性対照) <sup>c</sup>	--	2

a : DMSO、b : MNNG、c : B[a]P、使用シャーレ数 : 52

[連続処理法]

用量( $\mu$ g/mL)	使用シャーレ数
	24 時間処理
0 (陰性対照) <sup>a</sup>	4
6.25	4
12.5	4
25	4
50	4
100	4
2.5 (陽性対照) <sup>b</sup>	2

a : DMSO、b : MNNG、使用シャーレ数 : 26

5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

標本作製の2時間前に、培養中の各シャーレにコルセミド(Gibco Laboratories、ロット番号 1335046)を最終濃度として0.2 $\mu$ g/mLとなるように添加した。培養終了後、培養液を取り除き、0.2 w/v%トリプシン水溶液2 mLで処理して細胞をシャーレから剥離し、新鮮培養液5 mLを入れた遠沈管に移し、1000 rpm、5分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の75 mM塩化カリウム水溶液4 mLを加えて懸濁し、37°Cで15分間低張処理した。低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸(3:1)混合液(v/v)1 mLを添加して固定した。1000 rpmで5分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液4 mLで懸濁・固定した。この操作を3回繰り返した後、少量の固定液で適切な密度に細胞を懸濁し、スライドガラスの2ヶ所に1滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、S $\phi$ rensen 緩衝液(pH6.8、株式会社ヤトロン、ロット番号 1478)を用

いて希釈した 1.4 vol%ギムザ液で約 15 分間染色した。水洗後、室温で乾燥して染色体標本とした。標本は、1 シャーレ当たり 3 枚作製した。

細胞増殖率の測定は、培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10 vol%ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後水洗し、0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色し、水洗後乾燥した。単層培養細胞密度計（モノセレーターⅡ、MI-60、オリンパス光学工業株式会社）を用いて陰性（溶媒）対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

#### 6) 染色体の観察

染色体の観察は 60 倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率 600 倍で鏡検した。観察は標本をすべてコード化し、盲検法で行った。各用量とも、染色体が明瞭に識別でき、染色体の数が  $25 \pm 2$  本の分裂中期像について、1 シャーレ当たり 100 個、すなわち、1 用量当たり 2 枚のシャーレの合計 200 個について観察した。

#### 7) 染色体異常の分類および集計<sup>7)</sup>

染色体異常の分類は、構造異常については、染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換（二動原体、環状染色体など）およびその他（断片化など）とした。数的異常については、倍数性細胞（倍数体）のみを記録した。

ギャップ（染色分体型および染色体型）については、異常として記録したが、構造異常には含めなかった。ギャップは、染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は、観察した細胞 200 個中に認められた異常細胞数を表示した。

#### 8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料  $\chi^2$  検定を行って、有意差（有意水準 5%以下）が認められた場合は、Fisher の直接確率法を用いて陰性対照群と各用量群との間の有意差検定（有意水準は多重性を考慮して、5%または 1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、陰性対照群と比較して、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻

度が2用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められた場合、染色体異常誘発性は陽性と判定した。

## 結 果

### 1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表 1-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 0~1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 98.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数体の出現頻度は、陰性対照群で 0.5%の低値で認められた。被験物質群および陽性対照群では倍数体は認められなかった。

なお、75 および 100  $\mu$ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

### 2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表 1-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞は、陰性対照群では認められなかった。被験物質群では 0.5 または 1.5%の出現頻度で認められたが、陰性対照群との間に有意差はなかった。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 73.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、25  $\mu$ g/mL でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、150 および 200  $\mu$ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

### 3. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）－確認試験

報告書ピアレビューにおいて、短時間処理法 S9 mix 存在下では、細胞増殖率が 100  $\mu$ g/mL で 87.5%、150  $\mu$ g/mL で 36.5%と、この間に 50%以上の開きがあるため、この用量間で毒性が出ないで染色体異常を示す用量がある可能性が考えられるため、確認試験を実施する必要があるとの指摘を受けた。この指摘に従い、100、125 および 150  $\mu$ g/mL 用量を設定し、確認試験を行った。



結果は表 1-3 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 0.5%と低値であった。被験物質群では 0.5%の出現頻度であり、陰性対照群との間に差は認められなかった。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 42.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、100  $\mu$ g/mL でのみ 1.0%の低い出現頻度で認められた。

なお、150  $\mu$ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

#### 4. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

結果は表 2-1 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 0~1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 96.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では、12.5  $\mu$ g/mL でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。

なお、100  $\mu$ g/mL では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

#### 5. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）－確認試験

報告書ピアレビューにおいて、連続処理法 24 時間処理では、細胞増殖率が 50  $\mu$ g/mL で 54.0%、100  $\mu$ g/mL で 11.5%であり、この用量間で毒性が出ないで細胞が数えられる可能性があるため、確認試験を実施する必要があるとの指摘を受けた。この指摘に従い、50、60、75 および 100  $\mu$ g/mL 用量を設定し、確認試験を行った。

結果は表 2-2 に示す。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 50  $\mu$ g/mL で 1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 94.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群で 0.5%の低値で認められた。被験物質群では、50  $\mu$ g/mL で 0.5%の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では認められなかった。

なお、60  $\mu$ g/mL 以上では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

## 結 論

ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）について染色体異常誘発性の有無を調べるため、CHL/IU 細胞を用いた *In vitro* における染色体異常試験を実施した。その結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下並びに連続処理法 24 時間のいずれの方法においても染色体異常誘発作用は認められなかった。

したがって、本実験条件下では、ビスフェノール A-PO 付加物（平均付加モル数 5 モル）の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。本試験結果は、CHL/IU 細胞において染色体異常を有する細胞の出現頻度が 5%未満を陰性とする生物学的判断基準<sup>8)</sup>からみても陰性と判断されるものであった。

ビスフェノール A の変異原性については、*S. typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535 または *E. coli* WP2uvrA を用いた復帰突然変異試験<sup>9,10,11)</sup>で陰性との報告がある。また、CHO 細胞を用いた染色体異常試験で陽性<sup>12)</sup>および陰性<sup>13)</sup>、V-79 細胞を用いた細胞遺伝子突然変異試験で陰性<sup>9)</sup>との報告がある。

## 参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.
- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). "Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, 66, 277-290.
- 3) 佐々木澄志, 日下部博一, 若栗 忍, 中川ゆづき, 大嶋節子, 橋本恵子 (1998), ジイソプロピルベンゼンのチャイニーズハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験, 化学物質毒性試験報告, 6, 614-617.