

## V. 考察および結論

3,4-ジクロロベンジルクロリドの遺伝子突然変異誘発性について、ネズミチフス菌 (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) および大腸菌 (WP2uvrA 株) を用いる復帰突然変異試験 (-S9mix および+S9mix) により検討した。

本試験の用量を設定するため 6.86~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で用量設定試験を実施した。その結果、各試験菌株において復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mix では 61.7  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上、+S9mix では 185.2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上で各試験菌株に認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。これらのことから、本試験では各試験菌株の最高用量を-S9mix では 100  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mix では 200  $\mu\text{g}/\text{plate}$  設定し、以下公比 2 で計 6~7 用量とした。

本試験の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mix では 50  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上、+S9mix の TA98 株では 200  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の試験菌株では 100  $\mu\text{g}/\text{plate}$  以上で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。

用量設定試験ではいずれの試験菌株においても生育阻害の認められない用量が 4 用量に満たなかった。したがって、再現性を確認するために本試験 2 回目を実施した。用量として、本試験で生育阻害が認められた用量、すなわち各試験菌株の-S9mix では 50  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mix の TA98 株では 200  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の試験菌株では 100  $\mu\text{g}/\text{plate}$  を最高用量に設定し、以下公比 2 で計 5 用量とした。

本試験 2 回目の結果、各試験菌株の被験物質群の復帰変異コロニー数は、用量依存性ならびに陰性対照群の 2 倍以上の増加は認められなかった。なお、生育阻害は各試験菌株の-S9mix では 50  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、+S9mix の TA98 株では 200  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 、その他の菌株では 100  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で認められた。被験物質の沈殿は認められなかった。

以上のことから、全試験菌株について再現性が確認された。

陰性および陽性対照群のそれぞれの復帰変異コロニー数は、共に背景データ (Attached sheet 1) の Mean $\pm$ 2.5S.D.の範囲内であったことから、当該試験が適正な条件下で実施されたことが確認された。

なお、無菌試験では、雑菌の汚染は認められなかった。

以上の結果より、当該試験条件下における 3,4-ジクロロベンジルクロリドの遺伝子突然変異誘発性は、陰性と判断された。

Appendix 1. Reverse mutation test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in *S.typhimurium* and *E.coli*  
(Dose determination test)

With(+) or Without(-) S9 mix	Test substance concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertants(number of colonies/plate) <sup>a)</sup>				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
S9mix (-)	Solvent control	148 136 ( 142 )	7 4 ( 6 )	29 20 ( 25 )	22 22 ( 22 )	5 6 ( 6 )
	6.86	166 146 ( 156 )	7 9 ( 8 )	24 23 ( 24 )	21 23 ( 22 )	6 3 ( 5 )
	20.6	139 107 ( 123 )	11 5 ( 8 )	29 16 ( 23 )	19 21 ( 20 )	4 4 ( 4 )
	61.7	3 * 1 * ( 2 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	28 * 4 * ( 16 )	0 * 0 * ( 0 )
	185.2	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	18 * 2 * ( 10 )	0 * 0 * ( 0 )
	555.6	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )
	1667	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )
	5000	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )
S9mix (+)	Solvent control	150 146 ( 148 )	9 9 ( 9 )	30 29 ( 30 )	41 45 ( 43 )	7 7 ( 7 )
	6.86	129 141 ( 135 )	9 8 ( 9 )	29 22 ( 26 )	37 34 ( 36 )	7 5 ( 6 )
	20.6	132 124 ( 128 )	7 6 ( 7 )	29 28 ( 29 )	41 42 ( 42 )	11 8 ( 10 )
	61.7	108 127 ( 118 )	8 5 ( 7 )	26 27 ( 27 )	35 40 ( 38 )	8 6 ( 7 )
	185.2	0 * 0 * ( 0 )	0 * 6 * ( 3 )	0 * 0 * ( 0 )	40 * 11 * ( 26 )	0 * 0 * ( 0 )
	555.6	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	5 * 0 * ( 3 )	0 * 0 * ( 0 )
	1667	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )
	5000	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )	0 * 0 * ( 0 )
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	396 428 ( 412 )	342 327 ( 335 )	186 179 ( 183 )	367 387 ( 377 )	348 351 ( 350 )
Positive control requiring S9 mix	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	1037 1106 ( 1072 )	319 298 ( 309 )	1048 1088 ( 1068 )	430 397 ( 414 )	299 282 ( 291 )

a) : The average number of colonies in each concentration.

\* : Inhibition against growth of bacteria.

Solvent : Dimethyl sulfoxide

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA: Sodium azide, 9-AA: 9-Aminoacridine,

2-AA: 2-Aminoanthracene

Study No. H-09002

Appendix 2. Reverse mutation test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in *S.typhimurium* and *E.coli* (Mutagenicity test)

With(+) or Without(-) S9 mix	Test substance concentration ( $\mu$ g/plate)	Number of revertants(number of colonies/plate) <sup>a)</sup>				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
S9mix (-)	Solvent control	115	6	31	28	4
		111 ( 119 )	6 ( 7 )	23 ( 29 )	26 ( 24 )	5 ( 5 )
		131	9	33	18	6
	1.56	121	5	32	14	5
		94 ( 108 )	8 ( 7 )	27 ( 30 )	22 ( 18 )	6 ( 6 )
	3.13	114	5	32	24	8
		125 ( 120 )	10 ( 8 )	37 ( 35 )	20 ( 22 )	5 ( 7 )
	6.25	117	9	30	26	2
112 ( 115 )		8 ( 9 )	27 ( 29 )	18 ( 22 )	3 ( 3 )	
12.5	134	6	37	35	6	
	119 ( 127 )	8 ( 7 )	32 ( 35 )	25 ( 30 )	7 ( 7 )	
25	99	8	21	19	6	
	119 ( 109 )	5 ( 7 )	32 ( 27 )	22 ( 21 )	3 ( 5 )	
50	49 *	0 *	20 *	8 *	0 *	
	70 *( 60 )	0 *( 0 )	12 *( 16 )	7 *( 8 )	0 *( 0 )	
100	0 *	0 *	12 *	0 *	0 *	
	0 *( 0 )	0 *( 0 )	9 *( 11 )	0 *( 0 )	0 *( 0 )	
S9mix (+)	Solvent control	150	5	31	38	11
		150 ( 147 )	9 ( 8 )	35 ( 34 )	39 ( 39 )	9 ( 10 )
		140	11	36	40	9
	6.25	133	7	36	34	5
		133 ( 133 )	6 ( 7 )	31 ( 34 )	37 ( 36 )	6 ( 6 )
	12.5	147	5	31	43	8
		150 ( 149 )	4 ( 5 )	33 ( 32 )	33 ( 38 )	9 ( 9 )
	25	134	9	36	42	10
159 ( 147 )		8 ( 9 )	37 ( 37 )	45 ( 44 )	6 ( 8 )	
50	148	10	30	37	5	
	121 ( 135 )	8 ( 9 )	27 ( 29 )	31 ( 34 )	10 ( 8 )	
100	97 *	10 *	28 *	33	8 *	
	93 *( 95 )	8 *( 9 )	18 *( 23 )	44 ( 39 )	7 *( 8 )	
200	0 *	0 *	10 *	0 *	0 *	
	0 *( 0 )	0 *( 0 )	10 *( 10 )	0 *( 0 )	0 *( 0 )	
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu$ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	441 413 ( 427 )	245 258 ( 252 )	170 185 ( 178 )	441 474 ( 458 )	437 411 ( 424 )
Positive control requiring S9 mix	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ( $\mu$ g/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	968 1064 ( 1016 )	231 231 ( 231 )	1166 1051 ( 1109 )	490 426 ( 458 )	202 220 ( 211 )

a) : The average number of colonies in each concentration.

\* : Inhibition against growth of bacteria.

Solvent : Dimethyl sulfoxide

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA: Sodium azide, 9-AA: 9-Aminoacridine,

2-AA: 2-Aminoanthracene

Study No. H-09002

Appendix 3. Reverse mutation test of 3,4-Dichlorobenzyl chloride in *S.typhimurium* and *E.coli* (Mutagenicity test 2)

With(+) or Without(-) S9 mix	Test substance concentration ( $\mu$ g/plate)	Number of revertants(number of colonies/plate) <sup>a)</sup>				
		Base-pair substitution type			Frameshift type	
		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
S9mix (-)	Solvent control	102	7	25	17	6
		91 ( 96 )	6 ( 6 )	23 ( 25 )	17 ( 19 )	5 ( 5 )
		95	5	26	23	5
	3.13	99	10	24	23	7
		93 ( 96 )	5 ( 8 )	15 ( 20 )	25 ( 24 )	3 ( 5 )
	6.25	95	6	28	14	4
		101 ( 98 )	3 ( 5 )	19 ( 24 )	21 ( 18 )	5 ( 5 )
12.5	102	6	28	20	3	
	109 ( 106 )	8 ( 7 )	29 ( 29 )	22 ( 21 )	2 ( 3 )	
25	89	6	23	19	5	
	91 ( 90 )	8 ( 7 )	30 ( 27 )	22 ( 21 )	4 ( 5 )	
50	53 *	2 *	13 *	10 *	0 *	
	69 *( 61 )	4 *( 3 )	8 *( 11 )	14 *( 12 )	0 *( 0 )	
S9mix (+)	Solvent control	112	7	27	31	8
		111 ( 113 )	9 ( 8 )	28 ( 30 )	30 ( 30 )	7 ( 9 )
		115	9	36	28	12
	6.25	107	8	25	—	10
		120 ( 114 )	8 ( 8 )	36 ( 31 )	— ( — )	7 ( 9 )
	12.5	125	9	35	34	12
		112 ( 119 )	9 ( 9 )	24 ( 30 )	34 ( 34 )	9 ( 11 )
	25	107	13	30	31	8
114 ( 111 )		8 ( 11 )	29 ( 30 )	30 ( 31 )	5 ( 7 )	
50	115	7	23	39	9	
	95 ( 105 )	4 ( 6 )	30 ( 27 )	41 ( 40 )	9 ( 9 )	
100	81 *	4 *	21 *	21	8 *	
	90 *( 86 )	5 *( 5 )	25 *( 23 )	36 ( 29 )	9 *( 9 )	
200	—	—	—	0 *	—	
	— ( — )	— ( — )	— ( — )	0 *( 0 )	— ( — )	
Positive control not requiring S9 mix	Name	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
	Concentration ( $\mu$ g/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies/plate	387 415 ( 401 )	321 308 ( 315 )	195 211 ( 203 )	552 527 ( 540 )	395 410 ( 403 )
Positive control requiring S9 mix	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	Concentration ( $\mu$ g/plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies/plate	1010 1118 ( 1064 )	272 255 ( 264 )	1142 1054 ( 1098 )	527 522 ( 525 )	245 222 ( 234 )

a) : The average number of colonies in each concentration.

\* : Inhibition against growth of bacteria.

Solvent : Dimethyl sulfoxide

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, SA: Sodium azide, 9-AA: 9-Aminoacridine,

2-AA: 2-Aminoanthracene

Study No. H-09002

## I. 要 約

3,4-ジクロロベンジルクロリドの変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株(CHL/IU 細胞)を用いて、短時間処理法の S9 無添加および S9 添加培養系列、ならびに連続処理法の 24 時間培養系列にて染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験は、S9 無添加培養系列で 0.035、0.03、0.025、0.02 mg/mL、S9 添加培養系列で 0.17、0.12、0.07、0.035 mg/mL、24 時間培養系列で 0.03、0.025、0.02、0.015 mg/mL のそれぞれ 4 用量で実施した。

その結果、被験物質で処理した全ての培養系列において構造異常を有する細胞（構造異常細胞）あるいは数的異常細胞（倍数体）の出現頻度は陰性対照群と同程度であった。なお、被験物質の沈殿は認められなかった。

一方、各培養系列の陽性対照群では、構造異常を有する細胞の出現頻度に顕著な増加が認められた。

以上の結果から、当該試験条件下における 3,4-ジクロロベンジルクロリドの染色体異常誘発性は陰性と判断された。

## II. 試験目的

3,4-ジクロロベンジルクロリドについては乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無を検討した。

## III. 試験材料および方法

### 1. 被験物質<sup>注</sup>

- |                  |  |
|------------------|--|
| (1) 名称           | 3,4-ジクロロベンジルクロリド   |
| (2) 別名 (商品名)     | 3,4-Dichlorobenzyl chloride, 97%   |
| (3) CAS No.      | 102-47-6   |
| (4) 化学式          | $C_7H_5Cl_3$   |
| (5) 分子量          | 195.47   |
| (6) Lot No.      | 10808AH  |
| (7) 純度           | 99.9%  |
| (8) 外観           | 無色透明液体   |
| (9) 保管条件         | 室温   |
| (10) 同一性         | 提供された情報と送付された被験物質のラベルを目視により比較し、同一であることを確認した。   |
| (11) 安定性         | 試験受託者で保管している同じロット番号の被験物質について、試験受託者にて安定性分析を実施した。その結果、約 16 週間保存後において安定であったため、当該試験の実験期間中においても安定であったと判断した。 |
| (12) 提供者 (試験受託者) |  |
| 名称               | 日生研株式会社  |
| 所在地              | 東京都青梅市新町 9-2221-1  |
| (13) 残余被験物質の処分   | 残余被験物質はサンプルとして少量採取した後、試験受託者に返却する。  |

<sup>注</sup>: 本被験物質は、Sigma-Aldrich 社製造の製品 (3,4-Dichlorobenzyl chloride, 97%) を試験受託者が購入したものである。特性は製造元の情報による。

## 2. 対照物質

### (1) 陰性対照物質

Dimethyl Sulfoxide (DMSO、特級、Lot No. CDQ4624、和光純薬工業株式会社) を用いた。

### (2) 陽性対照物質

#### ① Mitomycin C (MMC)

MMC (Lot No. KLH1017、和光純薬工業株式会社) は注射用蒸留水 (局方、Lot No. 61008D、扶桑薬品工業株式会社) で溶解し、生理食塩液 (局方、Lot No. 60820D、扶桑薬品工業株式会社) で段階希釈して 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (最終濃度; 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) となるように調製後、 $-20^{\circ}\text{C}$  以下 (型式: GR-W22A、冷凍冷蔵庫、株式会社東芝) に保存したものを連続処理法および短時間処理法の S9 無添加培養系列の場合に用時解凍して用いた。

#### ② Benzo[a]pyrene (B[a]P)

B[a]P (Lot No. KLG2702、和光純薬工業株式会社) は 4  $\text{mg}/\text{mL}$  (最終濃度; 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) となるように DMSO (特級、Lot No. PEL2769、和光純薬工業株式会社) に溶解し、 $-80^{\circ}\text{C}$  以下 (型式: MDF-192AT、超低温フリーザー、三洋電機特機株式会社) に保存したものを短時間処理法の S9 添加培養系列の場合に用時解凍して用いた。

## 3. 被験物質の用量および調製

### (1) 用量

細胞増殖抑制試験では 0.003、0.008、0.025、0.074、0.222、0.667、2  $\text{mg}/\text{mL}$  (最終濃度)、細胞増殖抑制試験 2 回目の短時間処理法の S9 無添加培養系列では 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07  $\text{mg}/\text{mL}$  (最終濃度)、連続処理法の 24 時間培養系列では 0.005、0.01、0.015、0.02、0.03、0.04、0.05  $\text{mg}/\text{mL}$  (最終濃度) とした。また、染色体異常試験の短時間処理法の S9 無添加培養系列では 0.02、0.025、0.03、0.035  $\text{mg}/\text{mL}$  (最終濃度)、S9 添加培養系列では 0.035、0.07、0.12、0.17  $\text{mg}/\text{mL}$  (最終濃度)、連続処理法の 24 時間培養系列では 0.015、0.02、0.025、0.03  $\text{mg}/\text{mL}$  (最終濃度) とした。

### (2) 使用した溶媒および溶媒選択の理由

DMSO (特級、Lot No. CDQ4624、和光純薬工業株式会社) を用いた。事前に溶媒に対する溶解性の検討を実施した結果、水には不溶であったが DMSO には任意の割合で溶解したことから、DMSO を選択した。

### (3) 調製方法

被験物質を高精度・分析用セミ・マイクロ電子天びん（型式：ER-182A、株式会社エー・アンド・デイ）で、細胞増殖抑制試験で 1000 mg（実秤量値：1001.0 mg）、細胞増殖抑制試験 2 回目で 70 mg（実秤量値：70.2 mg）、染色体異常試験では 85 mg（実秤量値：85.2 mg）秤量後、DMSO に溶解させ、それぞれ 5 mL、10 mL および 5 mL にメスアップしたものを最高用量とし、段階希釈して試験に供した。なお、被験物質液は用時調製した。また、被験物質液の状態を調製時に確認した結果、発熱、発泡、着色（変色）はなかった。

## 4. 使用細胞

本邦で染色体異常試験に汎用されており、検出感度に優れているチャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を使用した。使用株化細胞は 1991 年 10 月 31 日、国立医薬品食品衛生研究所（旧名：国立衛生試験所）より入手した。なお、同株化細胞は入手後培養し、石館の方法<sup>1)</sup>で、液体窒素容器中で凍結保存した。また、細胞株の保存ロットについてマイコプラズマの汚染がないものを使用した。

## 5. 培養液

### (1) 培養液

Eagle's Minimum Essential Medium (MEM ; Lot No.464676、GIBCO、Invitrogen)

### (2) 添加血清

Bovine serum (BS ; Lot No. 687676、GIBCO、Invitrogen)

### (3) 調製

NaHCO<sub>3</sub>（特級、Lot No. WKF0320、和光純薬工業株式会社）2.2 g を純水 950 mL に溶解させ、さらに MEM 9.6 g を加え溶解させた。これを 0.1 mol/L HCl で pH 7.2 に調整し、シリンジフィルター（0.2 μm、IWAKI GLASS）を用いて濾過滅菌した。その後 900 mL を採取し、非働化した BS を 100 mL 加えたものを使用した。

## 6. ラット肝ホモジネート（S9）および S9 mix の調製

### (1) S9 の種類と購入先および保存法

Phenobarbital および 5,6-Benzoflavone で誘導された Sprague-Dawley 系雄性ラットの S9 (Lot No. RAA-590) をキッコーマン株式会社から購入し、-80℃ 以下（型式：MDF-192AT、サンヨー超低温フリーザー、三洋電機メディカシステム株式会社）で保存した、製造後 6 ヶ月以内のものを用時に解凍して使用した。

## (2) S9 mix の組成と調製法

1 mL あたりの S9 mix の組成を以下に示す。

成 分	組 成
S9	0.3 mL (30%)
MgCl <sub>2</sub>	5 μmol
KCl	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol

S9 mix は上記組成で必要量を用時調製した。調製方法として、グルコース-6-リン酸 (Lot No. 118803) および NADP (Lot No. 045604、以上、オリエンタル酵母工業株式会社) を純水に溶解し、これに 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、330 mmol/L KCl の混合液、さらに、HEPES 緩衝液を混合させ、シリンジフィルター (0.2 μm、IWAKI GLASS) で濾過滅菌した後、S9 を加えた。

## 7. 試験操作

試験は石館の方法<sup>1)</sup>に従って実施した。培養系列として短時間処理法の S9 無添加および S9 添加培養系列、ならびに連続処理法の 24 時間時間培養系列の計 3 系列を設定した。ただし、細胞増殖抑制試験 2 回目は S9 無添加培養系列および 24 時間培養系列のみ実施した。

識別方法はシャーレの側面および蓋に油性インキで試験を識別する符合およびシャーレを識別する番号を記入した。

### (1) 前培養

凍結保存された細胞を解凍後、5 mL の培養液を用いて 25 cm<sup>2</sup> 細胞培養用フラスコ (Becton Dickinson labware) に入れ、CO<sub>2</sub> インキュベーター (型式: 3110 シリーズ、サーモエレクトロン株式会社) で培養した (実測値: CO<sub>2</sub> 濃度 5%、温度 37.0℃、湿度 95%)。培養終了後、トリプシン処理して浮遊させた細胞を 1000rpm で 5 分間遠心分離 (型式: 5800、ユニバーサル冷却遠心機、久保田商事株式会社) して集め新鮮培養液に懸濁した後、血球計算盤を用いて細胞数を計数した。計数結果から、細胞数が 1×10<sup>4</sup> cells/mL となるように新鮮培養液で希釈調整した。

## (2) 細胞増殖抑制試験

継代培養後、 $1 \times 10^4$  cells/mL に調整した細胞浮遊液を 35 mm 細胞培養用シャーレ (Becton Dickinson labware) に 2 mL ずつ播き (継代数 17) 3 日間培養した後、全シャーレに通し番号を記入し、連続処理法の 24 時間培養系列、短時間処理法の S9 添加および S9 無添加培養系列の計 3 系列に分別した。なお、各培養系列の各用量について 2 枚ずつのシャーレを使用した。連続処理法の場合には各シャーレに陰性対照物質または被験物質液を 0.01 mL/mL ずつ加え、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、温度 37.0°C、湿度 95% に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター (型式: MIP-3158 サーモエレクトロン株式会社) で 24 時間培養した。

短時間処理法の S9 添加および S9 無添加培養系列の場合には、S9 添加培養系列のみ S9 の最終濃度が 5% となる量の S9 mix を加え、その後、各シャーレに連続処理法と同様な条件で陰性対照物質または各被験物質液を加えた。両系列とも 6 時間培養後にシャーレ内を生理食塩液で洗浄した後、新鮮培地を加え、さらに CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 18 時間培養した。

培養終了後、シャーレ内を生理食塩液で洗浄後、細胞を 10% ホルマリン水溶液で固定した。その後 0.1% クリスタル・バイオレットで 10 分間染色したあと、水洗、乾燥させた。これをモノセレーター (オリンパス光学工業株式会社) を用いてそれぞれのシャーレの染色性から間接的に細胞増殖率を測定した。得られた結果を図示し、概略の 50% 細胞増殖抑制濃度を求めた。

## (3) 細胞増殖抑制試験 2 回目

短時間処理法の S9 無添加培養系列および連続処理法の 24 時間培養系列について、細胞増殖抑制試験と同様の方法で行った。試験には継代数 20 の細胞を用いた。

## (4) 染色体異常試験

継代培養した細胞浮遊液を血球計算板を用いて細胞数を確認した後、 $1 \times 10^4$  cells/mL に希釈調整し、必要枚数の 60 mm 細胞培養用シャーレ (標本作製用、Becton Dickinson labware) に 5 mL、35 mm 細胞培養用シャーレ (細胞増殖率測定用) に 2 mL ずつ入れた (継代数 22)。3 日間培養した後、連続処理法の 24 時間培養系列、短時間処理法の S9 添加および S9 無添加培養系列の計 3 系列に分別し、各系列について陰性対照群、陽性対照群をおいた。なお、各培養系列、用量につき標本作製用 2 枚、細胞増殖率測定用 1 枚とした。

連続処理法の 24 時間培養系列では、シャーレに陰性対照物質および各濃度の被験物質液を 0.01 mL/mL、陽性対照物質の MMC を 0.01 mL/mL 添加して 24 時間培養した。

短時間処理法の S9 添加および S9 無添加培養系列の場合、S9 添加培養系列のみ

S9 の最終濃度が 5%となる量の S9 mix を加え、さらにシャーレに連続処理法と同様な条件で陰性対照物質または各濃度の被験物質液を加え、陽性対照物質として S9 無添加培養系列の場合は MMC を 0.01 mL/mL、S9 添加培養系列の場合は B[a]P を 0.005 mL/mL 加えた。両系列とも 6 時間培養後にシャーレ内を生理食塩液で洗浄した後、新鮮培地を加え、さらに 18 時間培養した。連続処理法および短時間処理法ともに温度 37.0℃、湿度 95%、CO<sub>2</sub>濃度 5%に設定した CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。

全ての培養系列の全シャーレについて、培養終了 2 時間前にコルセミド溶液 (Lot No.PEL7660、和光純薬工業株式会社) を最終濃度が 0.2 μg/mL となるよう加え、分裂中期細胞を蓄積させた。培養終了後、37℃で温めた 0.25%トリプシン溶液で細胞を剥離し、1000 rpm で 5 分間遠心分離(テーブルトップ遠心機、型式:8100、久保田商事株式会社) して細胞を集めた後、0.075 mol/L KCl 溶液により 37℃で 15 分間低張処理した。冷却したカルノア液(メタノール:酢酸の容量比が 3:1 の混合液)を 1 mL 加え、遠心分離をして上清を捨て、さらに 5 mL のカルノア液で細胞を固定した。再び遠心分離し、以下、同様な処理を 2 回繰り返した。その後、濡らしたガーゼ上のスライドガラス 2 ヲ所に、得られた細胞懸濁液を 1~2 滴ずつ滴下した。

乾燥させたスライドガラスを 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8) で 1.5%に調製したギムザ染色液で約 15 分間染色し、水洗、乾燥させてプレート標本とし、作製したプレート標本にランダムイズした番号を割り当てた。

全ての培養系列について、培養終了時に陰性対照群と各用量群の細胞増殖率を細胞増殖抑制試験と同様な方法で測定した。

## 8. 観 察

よく広がった 1 用量当たり 200 個 (各プレート当たり 100 個) の分裂中期像を、倍率が 750 倍の微分干渉型生物顕微鏡 (BHS-323N、株式会社オリンパス) で観察した。

染色体異常の分類については、数的異常は倍数体、構造異常は染色分体型切断(ctb)、染色分体型交換(cte)、染色体型切断(csb)、染色体型交換(cse)およびその他(o)に分類した。染色分体あるいは染色体型ギャップ(g)については上記分類とは別に記録した。ギャップの判定基準は染色分体幅よりも狭い非染色性部位のものとした。その他とは 1 個の分裂中期像に多数のギャップ、切断などがあった場合に断片化 (Frg.) として記録した。これらの異常を 1 個でも有する細胞を異常細胞 1 個として記録した。

染色体が観察できる細胞がない場合、またはプレート当たり 50 個以下である場合は Toxic (TOX) として記録した。

## 9.判 定

染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照群と比較して明らかに上昇し、かつ、用量依存性が認められた場合、または、単独な用量で明らかに上昇し、かつ、再現性が認められた場合には陽性と判定し、それ以外は陰性と判定した。

ギャップについては、構造異常に含めない結果で表記し、総合判定でもギャップを含めない結果で評価した。

## 10.統計学的解析

統計学的手法は用いなかった。

#### IV. 試験結果

50%細胞増殖抑制濃度を求めるために0.003、0.008、0.025、0.074、0.222、0.667 および2 mg/mLの用量で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、いずれの培養系列においても細胞増殖率の顕著な減少が認められ、短時間処理法のS9添加培養系列におけ50%細胞増殖抑制濃度は約0.1 mg/mLと求められた。しかしながら短時間処理法のS9無添加培養系列および連続処理法の24時間培養系列では、急激な細胞増殖抑制作用により適切な50%細胞増殖抑制濃度を求めることできなかった。なお、被験物質の沈殿は0.222 mg/mL以上で認められた (Fig. 1-1、1-2、Table 1)。

細胞増殖抑制試験の結果から、短時間処理法のS9無添加培養系列では、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07 mg/mL、連続処理法の24時間培養系列では、0.005、0.01、0.015、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mLのそれぞれ7用量で細胞増殖抑制試験2回目を実施した。その結果、いずれの培養系列においても細胞増殖率の減少が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法のS9無添加培養系列で約0.028 mg/mL、連続処理法の24時間培養系列で約0.025 mg/mLと求められた。なお、被験物質の沈殿は認められなかった (Fig. 2-1、2-2、Table 2)。

以上の結果から染色体異常試験は、短時間処理法のS9無添加培養系列では0.02、0.025、0.03、0.035 mg/mL、S9添加培養系列では0.035、0.07、0.12、0.17 mg/mL、連続処理法の24時間培養系列では0.015、0.02、0.025、0.03 mg/mLのそれぞれ4用量で実施した。その結果、いずれの培養系列においても陰性対照の構造異常細胞の出現頻度は0.5%、数的異常(倍数体)細胞の出現頻度は0.0%であった。また、被験物質処理群ではいずれも、構造異常細胞の出現頻度は0.5~1.5%、数的異常(倍数体)細胞の出現頻度は0.0%であり、陰性対照群と同程度であった。被験物質の沈殿は認められなかった。一方、各陽性対照群では、それぞれ染色体の構造異常細胞の出現頻度に顕著な増加が認められ、構造異常細胞の出現頻度は、短時間処理法のS9無添加およびS9添加培養系列では25.5 および41.0%、連続処理法の24時間培養系列では36.5%であった。また、全ての培養系列での数的異常(倍数体)細胞の出現頻度は0.0%であった。染色体異常試験で測定した細胞増殖率は、短時間処理法のS9無添加培養系列の0.02、0.025、0.03、0.035 mg/mLではそれぞれ86、60、39、32%、S9添加培養系列の0.035、0.07、0.12、0.17 mg/mLではそれぞれ93、77、49、29%、連続処理法の24時間培養系列の0.015、0.02、0.025、0.03 mg/mLでは99、73、48、30%であった (Fig. 3-1、3-2、Appendix 1、2)。

## V. 考察および結論

3,4-ジクロロベンジルクロリドの変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を用いて短時間処理法の S9 無添加および S9 添加培養系列、ならびに連続処理法の 24 時間培養系列にて、染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験および同試験 2 回目の結果、いずれの培養系列においても細胞増殖率の減少が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法の S9 無添加培養系列で約 0.028 mg/mL、S9 添加培養系列で約 0.1 mg/mL、連続処理法の 24 時間培養系列で約 0.025 mg/mL と求められた。なお、被験物質の沈殿は細胞増殖抑制試験の 0.222mg/mL 以上で認められた。

これらのことより染色体異常試験の用量は、強い細胞毒性を示す用量から、弱い細胞毒性を示す用量あるいは細胞毒性を示さない用量まで網羅されるように設定した。すなわち短時間処理法の S9 無添加培養系列では 0.02、0.025、0.03、0.035 mg/mL、S9 添加培養系列では 0.035、0.07、0.12、0.17 mg/mL、連続処理法の 24 時間培養系列では 0.015、0.02、0.025、0.03 mg/mL のそれぞれ 4 用量とした。その結果、被験物質で処理した全ての培養系列において、構造異常細胞あるいは数的異常（倍数体）細胞の出現頻度は陰性対照群と同程度であった。被験物質の沈殿は認められなかった。

各陽性対照群では、構造異常を有する細胞の出現頻度が顕著に増加し、陰性および陽性各対照群では、共にバックグランドデータ（添付資料 1）の Mean $\pm$ 2.5S.D.の範囲内であったことから、当該試験が適正な条件下で実施されたことが確認された。

また、染色体異常試験の細胞増殖率より、いずれの培養系列においても強い細胞毒性を示す用量から、弱い細胞毒性を示す用量あるいは細胞毒性を示さない用量まで網羅されている。これらのことから当該試験の用量設定は適切である事が示された。

以上の結果から、当該試験条件下における 3,4-ジクロロベンジルクロリドの染色体異常誘発性は陰性と判定された。

## VI. 参考文献

- 1) 石館基：染色体異常による変異原の検出法、変異原と毒性、1 (4)、64-73、1978.

## 1. 要約

3,4-ジクロロベンジルクロリドの28日間反復経口投与毒性試験(回復14日間)を雌雄のSprague-Dawley系ラットを用いて実施した。雌雄とも5群構成とし、1群には媒体である0.5% CMCを、他の4群には被験物質を、それぞれ10、30、100および300 mg/kgの用量で28日間にわたり強制経口投与した。雌雄とも回復試験に用いる動物を含む対照群および300 mg/kg投与群は各12匹、その他の群は各6匹とした。

投与期間中に300 mg/kg群の雌1匹が死亡し、胃粘膜黄色調、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。

一般状態の変化としては、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。

300 mg/kg群の雌雄で腎臓および肝臓重量の増加が認められた。300 mg/kg群の尿検査では、雄の尿量、沈渣中の円柱および雌の沈渣中の上皮細胞の増加が認められた。

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以上の群の雌雄で、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。前胃では粘膜の肥厚があり、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、細胞浸潤が認められた。腎臓では、組織学的には100 mg/kg以上の群の雄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、雌では尿細管の壊死および間質の細胞浸潤が観察された。

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高値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。

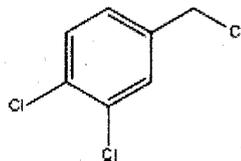
以上の結果、3,4-ジクロロベンジルクロリドの28日間反復経口投与による無影響量は雌雄ともに10 mg/kg/day未満であると判断された。

## 2. 被験物質および媒体

## 2.1. 被験物質(Appendix 55)

コード名： 3,4-ジクロロベンジルクロリド 3,4-dichlorobenzyl chloride

構造式：



組成式：  $C_7H_5Cl_3$

ロット番号： 10808AH

CAS 番号： 102-47-6

分子量： 195.47

純度： 99.9%  
性状： 無色透明液体  
安定性： 「3,4-ジクロロベンジルクロリドの開封後室温暗所における密閉保存下での長期安定性試験(試験番号：P-56)」において、保存開始後約 32 週間の安定性が得られ、投与期間における安定性が確認されている。  
購入元： Sigma-Aldrich Japan K.K.(東京都品川区)  
保管条件： 室温(実測温度範囲：8~28℃)、暗所で密閉して保管した。  
保管場所： 被験物質保管ロッカー No. R4  
被験物質取り扱い上の注意事項： 取扱い時には保護眼鏡(ゴーグル)、マスクおよび手袋を着用し、ドラフト内で取り扱った。  
被験物質サンプルの保管： 同一ロットの被験物質 5.0g を採取し(2009 年 7 月 22 日)、保管用サンプルとして、試験施設内に保管した。  
残余被験物質の処分： 当該試験より除外して、当社試薬棚に移管した。

## 2.2. 媒体

名称： 0.5% Sodium carboxymethyl cellulose(CMC)  
CMC  
製造元： 国産化学株式会社(東京都中央区)  
ロット番号： I115424  
注射用水  
製造元： 株式会社大塚製薬工場(徳島県鳴門市)  
ロット番号： 8C75N  
媒体調製方法： 注射用水 100 mL に 0.5 g の割合で CMC を加え溶解した。  
保存方法： CMC、注射用水および調製済み媒体は室温(温度実測値：15~25℃)保存した。媒体は調製後 10 日以内に使用した。  
保管場所： 被験物質等保管室、分注後は被験物質保管ロッカー No. R10

## 3. 試験方法

### 3.1. 使用動物

#### 3.1.1. 動物種(系統)およびその選択理由

動物は日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター(神奈川県厚木市)で生産された Crl:CD(SD)ラット(SPF/VAF)を使用した。ラットは化学物質の反復経口投与毒性試験で頻繁に用いられる動物種であり、本系統については当社のもつ背景データが豊富であるため使用した。

#### 3.1.2. 入荷時の週齢、購入動物数および体重範囲

雌雄ともに 4 週齢の動物を各 47 匹購入した(雌雄とも 2009 年 7 月 23 日)。入荷時の体重範囲は、雄 71~82 g、雌 61~73 g であった。これは試験計画書に記

載した体重範囲(雄 50~110 g、雌 50~110 g)内であった。

### 3.1.3. 検疫・馴化期間

入荷後、動物は雄 12 日間、雌 13 日間の検疫・馴化期間をおいた。入荷時、触診を含む観察を行った。また、検疫・馴化期間中は毎日一般状態の観察を行った。馴化期間中に異常が観察された動物はいなかった。

### 3.1.4. 群分け

投与開始前日(試験 -1 日)に全動物の体重を測定した。このとき、馴化期間中に異常が観察された動物および低あるいは高体重の動物を除外対象とし、その他の健康状態の良い動物を対象として体重層別に無作為に各群に配分した。群分け後、除外動物はジエチルエーテル深麻酔下で安楽殺した。

## 3.2. 動物飼育管理

### 3.2.1. 飼育環境

バリアーシステム下の飼育室(4 号棟、飼育室 43)で、室温は 20~25℃、湿度は 30~70%、照明時間は 7~19 時の 12 時間、換気(オールフレッシュエア)回数は 10 回転/時以上に設定した。試験期間中の飼育室の温度(最低 22℃、最高 24℃)および湿度(最低 43%、最高 69%)は設定範囲内であった。

### 3.2.2. ケージおよび収容数

動物は、検疫・馴化飼育期間および投与期間を通じて幅 21 cm、奥行き 35 cm、高さ 20 cm の単線メッシュ(ステンレス)製ケージに、個別に収容した。

### 3.2.3. 動物の識別

群分け前は、尾の腹側面に油性インキで仮番号(雄：1~47、雌：51~97)を記入して識別した。群分け後は、尾の背側面に油性インキで個体番号を記入して識別した。

### 3.2.4. 群およびケージの識別

試験番号、群および個体番号をカードに記入し、カードケースを用いてケージに装着して識別した。

### 3.2.5. 飼料(Appendix 56)

飼料にはラット用固形飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社、東京都板橋区)を用いた。使用した飼料と同一ロット(ロット番号 090512、090706)の飼料成分および微生物の有無は製造業者で検査し、飼料中の有害物質の濃度は Eurofins Analytics K.K.(東京都板橋区)で測定した。分析結果を入手した結果、いずれも設定した基準値の範囲内であった。

### 3.2.6. 飲料水(Appendix 57)

水道水(井戸水)を給水瓶(ポリカーボネイト製)で自由に摂取させた。水道水は、試験施設において原水(井戸水)に次亜塩素酸ナトリウムを添加して消毒したものを与えた(動物試験前、期間中および期間後の塩素濃度：0.35～0.50ppm)。動物試験開始前の水道水の混入物および有害物質について株式会社ヤクルト本社中央研究所付属分析センター(東京都国立市)で検査したところ、水道法水質基準値の範囲内であることを確認した。

### 3.3. 試験の実施

#### 3.3.1. 投与用量および群の構成

試験群の投与用量は 0 mg/kg 体重(対照群)、10 mg/kg 体重(最低用量群)、30 mg/kg 体重(中間用量群)、100 mg/kg 体重(高用量群)および 300 mg/kg 体重(最高用量群)とした。本試験動物として、各群に雌雄各 6 匹を配分し、5 群で雌雄合計 60 匹を用いた。また、回復試験動物として対照群および最高用量群に雌雄各 6 匹を配分し、2 群で雌雄合計 24 匹を用いた。

##### 本試験群

群	投与用量 (mg/kg 体重)	動物数および個体番号			
		雄		雌	
A 対照	0	6	101 ~ 106	6	151 ~ 156
B 最低用量	10	6	201 ~ 206	6	251 ~ 256
C 中間用量	30	6	301 ~ 306	6	351 ~ 356
D 高用量	100	6	401 ~ 406	6	451 ~ 456
E 最高用量	300	6	501 ~ 506	6	551 ~ 556

##### 回復試験群

群	投与用量 (mg/kg 体重)	動物数および個体番号			
		雄		雌	
A 対照	0	6	107 ~ 112	6	157 ~ 162
E 最高用量	300	6	507 ~ 512	6	557 ~ 562

#### 3.3.2. 投与用量の設定理由

先に実施した「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)」では、被験物質を 1000 mg/kg、300 mg/kg、100 mg/kg および 30 mg/kg の用量で 14 日間強制経口投与した。その結果、1000 mg/kg、300 mg/kg、100 mg/kg および 30 mg/kg 群の死亡率は雌雄ともそれぞれ 100%、0%、0%および 0%となり、1000 mg/kg の用量は明らかに毒性量であった。300 mg/kg 群の雄ではクレアチニンの増加が用量に関連してみられ、雌において前胃粘膜の赤色斑が観察されたことから、被験物質投与との関連が疑われた。本被験物質と類似の化学構造をもつ 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<sup>1)</sup>では、10

mg/kg 以上の群の雄および 50 mg/kg 群の雌に前胃壁の肥厚、扁平上皮の増生、糜爛および潰瘍が認められている。これらの結果に基づき、最高用量には明らかな毒性発現が期待できる 300 mg/kg とし、公比約 3 で高用量、中間用量および最低用量をそれぞれ 100 mg/kg、30 mg/kg および 10 mg/kg に設定した。対照群には媒体を投与した。

### 3.4. 投与方法、投与経路および期間の選択理由

#### 3.4.1. 投与方法

投与期間中は毎日午前中に経口投与用胃管を用いて投与した。

#### 3.4.2. 投与経路および投与期間の選択理由

「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、環保企発第 031121002 号、平成 18 年 11 月 20 日最終改正)に従い、投与経路は強制経口投与とし、投与期間は 28 日間とした。

### 3.5. 被験物質投与液の調製方法、投与液量および投与液中の濃度測定

#### 3.5.1. 被験物質投与液の調製方法

先に実施した「3,4-ジクロロベンジルクロリドの 0.5% (w/v) CMC 溶液中での安定性試験(試験番号:P-57)」において、被験物質の媒体内における 28 日間の安定性が確認されていることから、2 週間分の投与液をそれぞれ投与開始前週(試験-7 日、第 1 回)および試験 2 週(試験 8 日および試験 10 日(最低用量群再調製)、第 2 回)に調製した。

調製は、2 週間分の所定量の被験物質をディスポーザブルシリンジでピーカーに量りとり、媒体である 0.5%CMC で共洗いしつつ所定の容量のメスフラスコ内に移してメスアップした後、震盪・混和して乳化した。これらの操作はドラフト内で行った。なお、被験物質の純度は 100%に近似しているため純度換算は行わなかった。対照群には媒体を投与した。

調製した被験物質投与液および媒体は、分注までの間は被験物質等保管室あるいは被験物質保管ロッカー(No.R13、14)内に、投与日毎に小分け後は投与日まで被験物質保管ロッカー(No.R10、R12~15)内に、遮光下、室温(実測値:15~25℃)で密閉保存した。

#### 3.5.2. 投与液量

投与液量は 10 mL/kg 体重とし、直近の体重に基づいて算出した。

### 3.6. 投与液中の被験物質濃度測定(Appendix 58)

第 1 回および第 2 回被験物質調製日に調製した被験物質投与液について、各用量群の 3 ヶ所から、対照群については 1 ヶ所から分析用サンプルを採取し、被験物質の濃度および均一性を確認した。

その結果、各用量群の投与液中の被験物質濃度は許容範囲である設定濃度の ±10%以内(設定濃度に対する割合:91.3~104.6%)であった。また、各用量群の

投与液中の 3 ヶ所の測定値の変動係数(CV)も許容範囲である 10%以内(2.2~4.1%)であった。

以下に測定方法を示す。

### 3.6.1. 試薬

- 1) アセトニトリル(残留農薬試験・PCB 試験用、関東化学株式会社、Lot No. 102U1779)
- 2) 精製水
- 3) 注射用水(株式会社大塚製薬工場、Lot No.8C75N)
- 4) Sodium Carboxymethyl Cellulose (国産化学株式会社)

### 3.6.2. 標準原液の調製

被験物質である 3,4-ジクロロベンジルククロリド(Lot No. 10808AH)を標準物質として使用した。3,4-ジクロロベンジルククロリド約 100.1 mg (純度による補正值)を正確に量りとり、アセトニトリルを加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした(1000.00 µg/mL)。

### 3.6.3. 標準溶液の調製

標準原液をアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液で希釈し、次表のように標準溶液を調製した。

標準溶液	採取溶液	分取量(mL)	総量(mL)	標準溶液濃度(µg/mL)
ST5	標準原液	0.2	100	2.00
ST4	ST5	50	100	1.00
ST3	ST4	50	100	0.50
ST2	ST3	40	100	0.20
ST1	ST2	40	100	0.08

### 3.6.4. 分析試料の調製

#### 1) 0.0 mg/mL 濃度

0.0 mg/mL 濃度の被験物質投与液 5.000 mL をマイクロピペットで 200 mL 容三角フラスコに量りとり、ホールピペットおよびマイクロピペットを用いてアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液 95 mL を加え、20 分間横振り震盪した。上清液からマイクロピペットで 2.000 mL を量りとり、アセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。この溶液を分析試料とした。

#### 2) 1.0 mg/mL 濃度

1.0 mg/mL 濃度の被験物質投与液 5.000 mL をマイクロピペットで 200 mL 容三角フラスコに量りとり、ホールピペットおよびマイクロピペットを用いてアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液 95 mL を加え、20 分間横振り震盪した。上清液からマイクロピペットで 2.000 mL を量りとり、アセトニトリル/精製水

(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。この溶液を分析試料とした。

### 3) 3.0 mg/mL 濃度

3.0 mg/mL 濃度の被験物質投与液 5.000 mL をマイクロピペットで 200 mL 容三角フラスコに量りとり、ホールピペットおよびマイクロピペットを用いてアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液 95 mL を加え、20 分間横振り震盪した。上清液からマイクロピペットで 2.000 mL を量りとり、アセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。さらに、その溶液からホールピペットで 40 mL を量りとりアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。この溶液を分析試料とした。

### 4) 10.0 mg/mL 濃度

10.0 mg/mL 濃度の被験物質投与液 5.000 mL をマイクロピペットで 200 mL 容三角フラスコに量りとり、ホールピペットおよびマイクロピペットを用いてアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液 95 mL を加え、20 分間横振り震盪した。上清液からマイクロピペットで 2.000 mL を量りとり、アセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。さらに、その溶液からマイクロピペットで 10 mL を量りとりアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。この溶液を分析試料とした。

### 5) 30.0 mg/mL 濃度

30.0 mg/mL 濃度の被験物質投与液 5.000 mL をマイクロピペットで 200 mL 容三角フラスコに量りとり、ホールピペットおよびマイクロピペットを用いてアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液 95 mL を加え、20 分間横振り震盪した。上清液からマイクロピペットで 2.000 mL を量りとり、アセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。さらに、その溶液からマイクロピペットで 4.000 mL を量りとりアセトニトリル/精製水(70/30、v/v)混液を加えメスフラスコで正確に 100 mL にメスアップした。この溶液を分析試料とした。

### 3.6.5. HPLC 条件

HPLC :	Agilent 1100 series LC/MSD
カラム :	COSMOSIL 5C18-MS- II Packed Column(4.6×250 mm、5 μm、Nacalai Tesque, Inc.、Manf. No. K64295)
ガードカラム :	COSMOSIL 5C18-MS- II Guard Column(4.6×10 mm、5 μm、Nacalai Tesque, Inc.、Lot No. M9A2562)
カラム温度 :	40°Cに設定(実測値 : 40.0°C)
移動相 :	アセトニトリル/精製水=70/30 (v/v)
注入量 :	20 μL
検出波長 :	UV 202 nm
オートサンプラー温度 :	4°Cに設定(実測値 : 3.9~4.1°C)

統計解析ソフトは SAS(SAS Institute Japan 株式会社、東京都港区)および EXSUS(株式会社シーエーシー、東京都中央区)を使用した。

#### 4. 試験成績

##### 4.1. 死亡率(Table 1~4)

300 mg/kg 群において、試験 6 日に雌 1 匹(個体番号 561)が死亡した。300 mg/kg 群の雌の死亡率は 8.3%であった。

投与期間および回復期間を通じて、その他の投与群および対照群に死亡した動物はいなかった。

##### 4.2. 一般状態(Table 5~8、Appendix 1~4)

300 mg/kg 群では、雄では流涎が試験 8 日および 9 日に 2 匹、試験 11 日から 16 日に 1 匹に観察され、流涙が試験 14 日および 15 日に 1 匹に観察された。同群の雌 1 匹には、試験 2 日に流涙および流涎、試験 5 日に自発運動の減少が観察され、試験 6 日に死亡した。

その他の投与群および対照群に異常な所見は投与期間中観察されなかった。

回復期間では、300 mg/kg 群および対照群に異常な所見は観察されなかった。

##### 4.3. 詳細な状態の観察(Table 9~12、Appendix 5~8)

投与期間および回復期間を通じて、各投与群および対照群に異常な所見は観察されなかった。

##### 4.4. 機能検査(Table 13 および 14、Appendix 9 および 10)

投与期間および回復期間を通じて、各投与群の雌雄に有意な変化を示す項目はなかった。

##### 4.5. 体重(Table 15~18、Appendix 11~14)

投与期間および回復期間を通じて、各投与群の雌雄の体重に明らかな変動はみられなかった。

##### 4.6. 摂餌量(Table 19~22、Appendix 15~18)

300 mg/kg 群では、試験 4 週の雄の摂餌量が対照群に比較して有意な高値を示した。また、同群では回復期間における雄の平均摂餌量が対照群に比較して有意な高値を示した。

その他の投与群の投与期間および回復期間中の摂餌量に明らかな変動はみられなかった。

##### 4.7. 尿検査(Table 23 および 24、Appendix 19 および 20)

投与期間終了時では、300 mg/kg 群の雄の尿量、雄の沈渣中の円柱(Casts)および雌の沈渣中の上皮細胞(Epithelial cell)が有意な高値を示し、雄のケトン体(Ketone)および雌の総蛋白(Protein)が有意な低値を示した。また、100 mg/kg、30

mg/kg および 10mg/kg 群の雄における沈渣中の上皮細胞(Epithelial cell)ならびに 10 mg/kg 群の雌の pH が有意な低値を示した。

#### 4.8. 血液学的検査(Table 25~28、Appendix 21~24)

投与期間終了時では、100 mg/kg および 10 mg/kg 群の雄の白血球百分比における好酸球(Eosino)が有意な増加を示した。

回復期間終了時では、300 mg/kg 群の雄の血小板数(PLT)が有意な高値を示した。

#### 4.9. 血液生化学的検査(Table 29~32、Appendix 25~28)

投与期間終了時では、各投与群の雌雄の検査項目に明らかな変動はみられなかった。

回復試験終了時では、300 mg/kg 群の雄の血糖(GLU)および総コレステロール(TCHO)ならびに雌のナトリウム(Na)が有意な高値を示し、雌の総ビリルビン(TB)が有意な低値を示した。

#### 4.10. 器官重量および体重比(Table 33~40、Appendix 29~36)

投与期間終了時では、300 mg/kg 群の雌雄の肝臓および腎臓(右・左・両側)の絶対重量および相対重量ともに有意な高値を示した。30 mg/kg 群の雌の脾臓の絶対重量が有意な高値を、同群の雌の副腎(左・両側)の相対重量が有意な低値を示した。

回復試験終了時では、300 mg/kg 群の雄の胸腺の絶対重量および相対重量、雄の肝臓および雌雄の腎臓(雄：左・両側、雌：右・両側)の相対重量が有意な高値を、雄の副腎(右)の絶対重量が有意な低値を示した。

#### 4.11. 剖検所見(Table 41~45、Appendix 37~44)

投与期間終了時計画殺動物では、前胃粘膜の肥厚が 10 mg/kg 群の雌 1 匹、300 mg/kg 群の雄 4 匹および雌 3 匹に観察され、300 mg/kg 群の雄に有意差が見られた。胃粘膜の黄色調が 300 mg/kg 群の雌雄各 1 匹に観察された。腺胃粘膜の暗赤色斑が 10 mg/kg 群の雄 2 匹、100 mg/kg 群の雄 1 匹、および 300 mg/kg 群の雌雄各 1 匹に観察された。対照群および 30 mg/kg 群の雌雄に異常な肉眼的変化は観察されなかった。

回復期間終了時計画殺動物では、胃粘膜の黄色調が 300 mg/kg 群の雄 1 匹および雌 2 匹に観察された。対照群の雌雄に異常な肉眼的変化は観察されなかった。

300 mg/kg 群の試験 6 日に死亡した回復試験群の雌 1 匹に、胃粘膜の黄色調、腺胃粘膜の暗赤色斑および脾臓の退色が観察された。

#### 4.12. 病理組織学的所見(Table 46~50、Appendix 45~54)

被験物質投与によると考えられる変化が胃および腎臓に観察され、その他の臓器・器官では観察されなかった。胃および腎臓の所見は以下のものであった。

胃の所見：投与期間終了時計画殺動物には、前胃粘膜の角化亢進が 10 mg/kg 群の雄 1 匹(軽度)、30 mg/kg 群の雄 4 匹(中等度 1 匹・軽度 3 匹)、雌 3 匹(中等度