

# C.I. フルオレセントブライトナー271の細菌を用いる復帰変異試験

## Reverse Mutation Test of C.I. Fluorescent brightner 271 in Bacteria

### 要約

C.I. フルオレセントブライトナー271について、細菌を用いる復帰変異試験を実施した。

試験菌株として、*Salmonella typhimurium* (TA100, TA98, TA1535, TA1537)および*Escherichia coli* (WP2 *uvrA*)の5菌株を用いた。用量設定試験においてはS9 mix無添加群および添加群の各試験菌株において8.19~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の8用量、本試験ではS9 mix無添加群および添加群のTA100, TA1535, WP2 *uvrA*およびTA98ならびにS9 mix添加群の全菌株において156~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の6用量、S9 mix無添加群のTA1537において78.1~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の7用量で試験を実施した。

その結果、S9 mix無添加群および添加群のいずれにおいても、溶媒対照に比べ復帰変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。これらの試験結果は、用量設定試験および本試験において再現性が確認された。

以上の結果より、本試験条件下ではC.I. フルオレセントブライトナー271は、変異原性を有しない(陰性)と結論した。

### 方法

#### 1. 試験菌株

細菌を用いる復帰変異試験に広く使用されていることから、試験菌株としてヒスチジン要求性の*Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535およびTA1537<sup>1)</sup>ならびにトリプトファン要求性の*Escherichia coli* WP2 *uvrA*<sup>2)</sup>の5種類の菌株を選択した。

ネズミチフス菌は昭和58年9月9日にカリフォルニア大学のAmes BN教授から、また、大腸菌については昭和58年3月16日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受けた。平成15年9月16日~9月19日に菌株の特性検査を実施し、当該試験に用いた菌株が規定の特性を保持していることを確認した。

各菌株の菌懸濁液はジメチルスルホキシド(DMSO, Merck)を添加した後、凍結保存用チューブに0.2 mLずつ分注した。これを液体窒素を用いて凍結し、超低温フリーザーに-80°Cで保存した。

#### 2. 培地の調製

##### 1) 最少グルコース寒天平板培地(プレート)

オリエンタル酵母工業製のテスメディアAN培地を購

入し、試験に用いた。本プレートは、Vogel-Bonnerの最少培地Eを含む水溶液(0.02%硫酸マグネシウム・7水塩, 0.2%クエン酸・1水塩, 1%リン酸二カリウム・無水塩, 0.192%リン酸一アンモニウム, 0.066%水酸化ナトリウム[いずれも最終濃度])に2%のグルコース(和光純薬工業)と1.1%の寒天(伊那寒天BA-30A)を加え、径90 mmのシャーレに1枚当たり30 mLを分注したものである。

##### 2) トップアガー(軟寒天)

塩化ナトリウム0.5 w/v%を含む0.6 w/v% Bacto-agar (BD Diagnostic Systems)水溶液10容量に対し、ネズミチフス菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-ヒスチジン(関東化学)-0.5 mmol/L D-ビオチン(関東化学)水溶液を1容量加え、大腸菌を用いる試験の場合、0.5 mmol/L L-トリプトファン(関東化学)水溶液を同じく1容量加え用いた。

#### 3. 前培養条件

内容量200 mLのバツフル付三角フラスコに2.5 w/v% ニュートリエントブロス(Nutrient Broth No.2, Oxoid)溶液を25 mL分注し、これに融解した菌懸濁液を50  $\mu\text{L}$ 接種した。ウォーターバスシェーカー(MM-10, タイテック)を用い、37°Cの条件で8時間振盪(往復振盪:100回/分)培養し、菌濃度を確認した後試験に使用した。

#### 4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製されたものである。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.1 mL
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu\text{mol}$
KCl	33 $\mu\text{mol}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}$
NADPH	4 $\mu\text{mol}$
NADH	4 $\mu\text{mol}$
Na-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 $\mu\text{mol}$

#### 5. 被験物質

被験物質のC.I.フルオレセントブライトナー271(ロット番号:040303)は純度91.0%(不純物としてNaCl:0.32

%,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ :0.01%, 水:6.3%(残り2.37%不明,各成分1%未満)を含有する]の淡黄色結晶である。本剤は水に可溶である。日本化薬(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

#### 6. 被験物質液の調製

試験の都度、被験物質を注射用水(大塚製薬工場)を用いて溶解し、調製原液とした。なお、本被験物質の純度は95%未満(91.0%)であるため、最高用量の被験物質秤量の際に純度換算を実施した。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。

#### 7. 試験用量の設定

8.19~5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ の8用量(公比2.5)を用いて用量設定試験を実施した。その結果、S9 mix無添加群および添加群の各試験菌株でいずれの用量においても復帰変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった。また、S9 mix無添加群のTA1537株において、5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ で試験菌株に対する生育阻害作用が観察され、コロニー数が減少した。被験物質処理時およびコロニー数計測時、析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

従って、本試験ではS9 mix無添加群および添加群とも、すべての試験菌株において5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ を最高用量とし、それぞれ6~7用量(公比2)を設定した。

#### 8. 陽性対照物質

陽性対照物質として下記に示した調製済み陽性対照物質溶液(オリエンタル酵母工業)を使用した。

- 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)  
アクリルアミド(AF-2)
- アジ化ナトリウム( $\text{NaN}_3$ )
- 9-アミノアクリジン塩酸塩(9-AA)
- 2-アミノアントラセン(2-AA)

#### 9. 試験方法

Amesらの原法<sup>1)</sup>の改良法であるプレインキュベーション法に準じて、S9 mix無添加群および添加群それぞれについて試験を実施した。試験管に、使用溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液を100  $\mu\text{L}$ 、次いでS9 mix無添加群の場合、0.1 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 7.4)を500  $\mu\text{L}$ 、S9 mix添加群の場合、S9 mixを500  $\mu\text{L}$ 添加し、さらに試験菌液100  $\mu\text{L}$ を加え、37°Cで20分間振盪培養(プレインキュベーション)した。培養終了後、あらかじめ45°Cに保温したトップアガーを2 mL添加し、混合液をプレート上に重層した。37°Cの条件で48時間各プレートを培養した後、被験物質の試験菌株に対する生育阻害作用を確認するため、実体顕微鏡( $\times 40$ )を用いてプレート上の試験菌株の生育状態を観察した。次いで、復帰変異により生じたコロニーを計測

した。計測に際してはコロニーアナライザー(CA-11, システムサイエンス)を用いた。各濃度につき3枚のプレートを使用した。

#### 10. 結果の解析

復帰変異コロニー数が溶媒対照の2倍以上に増加し、かつ、再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に、陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

#### 結果および考察

用量設定試験の結果をTable 1~2に、本試験の結果をTable 3~4に示した。S9 mix無添加群および添加群とも、いずれの試験菌株においてもC.I.フルオレセントブライトナー271処理による復帰変異コロニー数の明確な増加傾向は認められなかった。また、S9 mix無添加群のTA1537株を除き、各試験菌株のいずれの処理群においても試験菌株に対する生育阻害作用は観察されなかった。S9 mix無添加群のTA1537株においては、5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ で生育阻害が認められ(用量設定試験のみ)、コロニー数が減少した。一方、陽性対照物質はそれぞれの試験菌株において、溶媒対照群の2倍以上の復帰変異コロニーを誘発した。なお、被験物質処理時およびコロニー数計測時、析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

以上の試験結果から、当該試験条件下において、C.I.フルオレセントブライトナー271の微生物に対する遺伝子突然変異に関し、陰性と判定した。

なお、本被験物質(C.I.フルオレセントブライトナー271)の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告は現在までない。

類縁体であるFluorescent brightener 24, Fluorescent brightener 225およびFluorescent brightener 260についてはCHL細胞を用いた染色体異常試験、Don細胞を用いた染色体異常試験およびDon細胞を用いた姉妹染色分体交換試験で陰性<sup>3,4)</sup>と報告されている。また、Fluorescent brightener 84についてもCHL細胞を用いた染色体異常試験で陰性<sup>3)</sup>と報告されている。

#### 文献

- 1) Maron DM, Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Res, 113: 173-215(1983).
- 2) Green MH, Muriel WJ: Mutagen testing using TRP<sup>+</sup> reversion in *Escherichia coli*. Mutation Res, 38: 3-32(1978).
- 3) 賀田恒夫, 石館基(監修):「環境変異原性データ集1」サイエンティスト社, 東京(1980)pp.199-200.
- 4) 祖父尼俊雄(監修):「染色体異常試験データ集」改訂1998年版, エル・アイ・シー, 東京(1999) pp.238-239.

連絡先

試験責任者: 嶋田佐和子

試験担当者: 田中 仁, 古屋有佳子, 木下裕加,  
上田摩弥, 永井美穂, 仲村渠奈美子,  
夏目匡克, 赤星まゆみ

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Sawako Shimada (Study Director)

Jin Tanaka, Yukako Furuya,

Yuka Kishita, Maya Ueda,

Miho Nagai, Namiko Nakandakari,

Masakatsu Natsume,

Mayumi Akahoshi

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden, Iwata-shi, Shizuoka,

437-1213, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

Table 1 Summary data on dose-finding study of C.I. fluorescent brightner 271  
[Non-activation method: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0 <sup>a</sup>	140	142	123	13	16	11	19	17	15	30	24	30	8	13	14
		[135 $\pm$ 10]			[13 $\pm$ 3]			[17 $\pm$ 2]			[28 $\pm$ 3]			[12 $\pm$ 3]		
	8.19	139	128	114	18	16	12	29	30	21	16	30	23	14	8	10
		[127 $\pm$ 13]			[15 $\pm$ 3]			[27 $\pm$ 5]			[23 $\pm$ 7]			[11 $\pm$ 3]		
	20.5	120	130	124	14	11	17	21	16	28	21	17	20	9	12	8
		[125 $\pm$ 5]			[14 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 6]			[19 $\pm$ 2]			[10 $\pm$ 2]		
	51.2	138	128	131	9	12	13	23	28	30	23	16	17	6	8	11
		[132 $\pm$ 5]			[11 $\pm$ 2]			[27 $\pm$ 4]			[19 $\pm$ 4]			[8 $\pm$ 3]		
	128	105	111	123	8	8	12	20	17	24	12	13	13	14	20	15
		[113 $\pm$ 9]			[9 $\pm$ 2]			[20 $\pm$ 4]			[13 $\pm$ 1]			[16 $\pm$ 3]		
320	111	102	136	10	16	12	14	14	25	25	17	25	11	7	13	
	[116 $\pm$ 18]			[13 $\pm$ 3]			[18 $\pm$ 6]			[22 $\pm$ 5]			[10 $\pm$ 3]			
800	119	97	90	8	10	12	23	18	23	26	20	20	7	6	6	
	[102 $\pm$ 15]			[10 $\pm$ 2]			[21 $\pm$ 3]			[22 $\pm$ 3]			[6 $\pm$ 1]			
2000	122	108	128	7	13	15	17	24	16	18	19	24	6	6	7	
	[119 $\pm$ 10]			[12 $\pm$ 4]			[19 $\pm$ 4]			[20 $\pm$ 3]			[6 $\pm$ 1]			
5000	127	114	112	15	13	13	21	16	20	24	12	17	5*	4*	6*	
	[118 $\pm$ 8]			[14 $\pm$ 1]			[19 $\pm$ 3]			[18 $\pm$ 6]			[5 $\pm$ 1]			
Positive control		860	817	850 <sup>b</sup>	451	475	481 <sup>c</sup>	149	140	151 <sup>a</sup>	651	678	721 <sup>d</sup>	267	216	197 <sup>e</sup>
		[842 $\pm$ 23]			[469 $\pm$ 16]			[147 $\pm$ 6]			[683 $\pm$ 35]			[227 $\pm$ 36]		

a) Negative control (Water for injection)

b) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c)  $\text{NaN}_3$ ; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

d) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$

\*: Growth inhibition was observed.

Table 2 Summary data on dose-finding study of C.I. fluorescent brightner 271  
[Activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0 <sup>a</sup>	109	142	125	12	22	13	30	23	19	27	32	27	26	18	13
		[125 $\pm$ 17]			[16 $\pm$ 6]			[24 $\pm$ 6]			[29 $\pm$ 3]			[19 $\pm$ 7]		
	8.19	140	132	124	9	14	7	28	28	19	29	26	20	20	9	15
		[132 $\pm$ 8]			[10 $\pm$ 4]			[25 $\pm$ 5]			[25 $\pm$ 5]			[15 $\pm$ 6]		
	20.5	122	141	138	12	14	17	26	14	14	32	24	27	10	14	13
		[134 $\pm$ 10]			[14 $\pm$ 3]			[18 $\pm$ 7]			[28 $\pm$ 4]			[12 $\pm$ 2]		
	51.2	133	109	134	18	14	8	21	24	23	17	21	25	14	14	14
		[125 $\pm$ 14]			[13 $\pm$ 5]			[23 $\pm$ 2]			[21 $\pm$ 4]			[14 $\pm$ 0]		
	128	134	106	137	13	20	17	21	21	13	22	27	18	15	8	14
		[126 $\pm$ 17]			[17 $\pm$ 4]			[18 $\pm$ 5]			[22 $\pm$ 5]			[12 $\pm$ 4]		
320	113	127	137	16	14	11	21	20	22	25	27	41	14	17	10	
	[126 $\pm$ 12]			[14 $\pm$ 3]			[21 $\pm$ 1]			[31 $\pm$ 9]			[14 $\pm$ 4]			
800	124	128	125	9	13	6	32	22	24	24	28	20	10	13	9	
	[126 $\pm$ 2]			[9 $\pm$ 4]			[26 $\pm$ 5]			[24 $\pm$ 4]			[11 $\pm$ 2]			
2000	110	115	134	21	14	17	22	28	26	32	21	21	7	12	15	
	[120 $\pm$ 13]			[17 $\pm$ 4]			[25 $\pm$ 3]			[25 $\pm$ 6]			[11 $\pm$ 4]			
5000	114	97	119	20	13	20	29	27	23	29	25	32	15	12	13	
	[110 $\pm$ 12]			[18 $\pm$ 4]			[26 $\pm$ 3]			[29 $\pm$ 4]			[13 $\pm$ 2]			
Positive control		908	964	934 <sup>b</sup>	363	358	373 <sup>c</sup>	635	588	544 <sup>d</sup>	371	418	394 <sup>e</sup>	158	189	156 <sup>e</sup>
		[935 $\pm$ 28]			[365 $\pm$ 8]			[589 $\pm$ 46]			[394 $\pm$ 24]			[168 $\pm$ 19]		

a) Negative control (Water for injection)

b) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e) 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

Table 3 Summary data on bacterial reverse mutation test of C.I. fluorescent brightner 271  
[Non-activation method: -S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0 <sup>a</sup>	138	127	125	17	12	12	27	21	21	16	21	25	10	7	12
		[130 $\pm$ 7]			[14 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 3]			[21 $\pm$ 5]			[10 $\pm$ 3]		
	78.1													5	6	7
		[6 $\pm$ 1]														
	156	138	128	147	9	14	12	24	19	16	22	13	18	7	8	6
		[138 $\pm$ 10]			[12 $\pm$ 3]			[20 $\pm$ 4]			[18 $\pm$ 5]			[7 $\pm$ 1]		
	313	126	155	138	14	12	14	25	22	19	21	15	14	4	6	4
		[140 $\pm$ 15]			[13 $\pm$ 1]			[22 $\pm$ 3]			[17 $\pm$ 4]			[5 $\pm$ 1]		
	625	135	139	135	7	11	10	16	27	25	17	19	26	5	6	6
	[136 $\pm$ 2]			[9 $\pm$ 2]			[23 $\pm$ 6]			[21 $\pm$ 5]			[6 $\pm$ 1]			
1250	131	130	127	17	13	8	19	31	20	26	23	16	5	7	6	
	[129 $\pm$ 2]			[13 $\pm$ 5]			[23 $\pm$ 7]			[22 $\pm$ 5]			[6 $\pm$ 1]			
2500	93	130	108	13	14	19	20	25	19	16	17	13	6	4	5	
	[110 $\pm$ 19]			[15 $\pm$ 3]			[21 $\pm$ 3]			[15 $\pm$ 2]			[5 $\pm$ 1]			
5000	149	144	128	13	14	13	30	21	17	14	15	18	5	2	3	
	[140 $\pm$ 11]			[13 $\pm$ 1]			[23 $\pm$ 7]			[16 $\pm$ 2]			[3 $\pm$ 2]			
Positive control		877	882	933 <sup>b</sup>	530	502	546 <sup>c</sup>	149	130	122 <sup>b</sup>	758	695	805 <sup>d</sup>	229	362	326 <sup>d</sup>
		[897 $\pm$ 31]			[526 $\pm$ 22]			[134 $\pm$ 14]			[753 $\pm$ 55]			[306 $\pm$ 69]		

a) Negative control (Water for injection)

b) AF-2; 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, 0.01  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) NaN<sub>3</sub>; Sodium azide, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$ d) AF-2, 0.1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e) 9-AA; 9-Aminoacridine hydrochloride, 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$ Table 4 Summary data on bacterial reverse mutation test of C.I. fluorescent brightner 271  
[Activation method: +S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Revertant colonies per plate [Mean $\pm$ S.D.]														
		TA100			TA1535			WP2 <i>uvrA</i>			TA98			TA1537		
Test substance	0 <sup>a</sup>	157	139	146	15	15	16	24	31	25	24	32	22	10	16	12
		[147 $\pm$ 9]			[15 $\pm$ 1]			[27 $\pm$ 4]			[26 $\pm$ 5]			[13 $\pm$ 3]		
	156	147	138	151	7	10	13	24	25	28	24	20	28	9	8	9
		[145 $\pm$ 7]			[10 $\pm$ 3]			[26 $\pm$ 2]			[24 $\pm$ 4]			[9 $\pm$ 1]		
	313	149	146	137	11	19	10	28	21	19	28	26	25	8	8	7
		[144 $\pm$ 6]			[13 $\pm$ 5]			[23 $\pm$ 5]			[26 $\pm$ 2]			[8 $\pm$ 1]		
	625	150	145	137	20	15	15	29	24	27	27	19	22	8	11	13
		[144 $\pm$ 7]			[17 $\pm$ 3]			[27 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 4]			[11 $\pm$ 3]		
	1250	131	164	131	18	13	13	18	21	31	33	27	29	7	7	8
	[142 $\pm$ 19]			[15 $\pm$ 3]			[23 $\pm$ 7]			[30 $\pm$ 3]			[7 $\pm$ 1]			
2500	117	160	140	11	11	13	27	24	28	30	20	25	7	9	5	
	[139 $\pm$ 22]			[12 $\pm$ 1]			[26 $\pm$ 2]			[25 $\pm$ 5]			[7 $\pm$ 2]			
5000	137	112	142	14	14	12	19	30	22	27	32	36	8	10	11	
	[130 $\pm$ 16]			[13 $\pm$ 1]			[24 $\pm$ 6]			[32 $\pm$ 5]			[10 $\pm$ 2]			
Positive control		780	879	820 <sup>b</sup>	377	347	364 <sup>c</sup>	606	594	605 <sup>d</sup>	358	331	339 <sup>d</sup>	127	129	116 <sup>d</sup>
		[826 $\pm$ 50]			[363 $\pm$ 15]			[602 $\pm$ 7]			[343 $\pm$ 14]			[124 $\pm$ 7]		

a) Negative control (Water for injection)

b) 2-AA; 2-Aminoanthracene, 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$  c) 2-AA, 2  $\mu\text{g}/\text{plate}$  d) 2-AA, 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$  e) 2-AA, 0.5  $\mu\text{g}/\text{plate}$

C.I. フルオレセントブライトナー271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

*In Vitro* Chromosomal Aberration Test  
of C.I. Fluorescent brightner 271 in Cultured Chinese Hamster Cells

要約

C.I. フルオレセントブライトナー271の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響について、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果をもとに、短時間処理法S9 mix非存在下および存在下とも5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高処理濃度とした625~5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲でそれぞれ4用量を設定した。S9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。S9 mix非存在下および存在下とも1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のそれぞれ3用量(公比2)について顕微鏡観察を実施した。

その結果、S9 mix非存在下において用量依存性を伴い、統計学的に有意な染色体構造異常の誘発が認められた。S9 mix存在下においては、1用量のみ統計学的に有意な染色体構造異常の誘発が認められたが、用量依存性は認められず、背景データによる基準値内であった。S9 mix非存在下における陽性反応が弱い反応であったことから、連続処理法24時間処理による試験を追加して実施した。5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高処理濃度とした78.1~5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で7用量を設定した。S9 mix非存在下における24時間連続処理後、標本を作製し、78.1, 156, 313, 625  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4用量(公比2)について顕微鏡観察を実施した。その結果、用量依存性を伴い、統計学的に有意な染色体構造異常の誘発が認められたが、その誘発頻度は最高でも3.0%であり、背景データによる基準値内であった。

以上の結果より、本試験条件下ではC.I. フルオレセントブライトナー271は、非常に弱いながらも染色体異常を誘発する(陽性)と結論した。

方法

1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を選択した。昭和59年11月15日に国立衛生試験所(現:国立医薬品食品衛生研究所)から分与を受け、ジメチルスルホキシド(DMSO, Merck)を10 vol%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞を融解し3~5日ごとに継代したものを使用した。なお、細胞増殖抑制

試験では継代数21、染色体異常試験では継代数26、染色体異常試験(連続処理法24時間処理)では継代数21の細胞を用いた。

2. 培養液の調製

Eagle-MEM液体培地(旭テクノグラス)に、非働化(56°C, 30分)済み仔牛血清(Invitrogen)を最終濃度で10 vol%になるよう加えた後、試験に使用した。調製後の培養液は冷暗所(4°C)に保存した。

3. 培養条件

CO<sub>2</sub>インキュベーター(三洋電機バイオメディカ)を用い、CO<sub>2</sub>濃度5%, 37°Cの条件で細胞を培養した。

4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコマン製S9 mixを試験に使用した。S9 mix中のS9は誘導剤としてフェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンを投与したSprague-Dawley系雄ラットの肝臓から調製した。また、S9 mixの組成は松岡らの方法<sup>1)</sup>に従った。S9 mixの組成を以下に示す。

成分	S9 mix 1 mL中の量
S9	0.3 mL
MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu\text{mol}/0.1 \text{ mL}$
KCl	33 $\mu\text{mol}/0.1 \text{ mL}$
G-6-P	5 $\mu\text{mol}/0.1 \text{ mL}$
NADP	4 $\mu\text{mol}/0.1 \text{ mL}$
HEPES緩衝液(pH 7.2)	4 $\mu\text{mol}/0.2 \text{ mL}$
蒸留水	0.1 mL

5. 被験物質

被験物質のC.I. フルオレセントブライトナー271(ロット番号:040303)は純度91.0%[不純物としてNaCl:0.32%, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:0.01%, 水:6.3%(残り2.37%不明, 各成分1%未満)を含有する]の淡黄色結晶である。本剤は水に可溶である。日本化薬(東京)から提供された被験物質を使用した。被験物質は、使用時まで室温で保管した。試験終了後、被験物質提供元において残余被験物質を分析した結果、安定性に問題はなかった。

6. 被験物質液の調製

試験の都度、生理食塩液(大塚製薬工場)で被験物質を溶解し、調製原液とした。なお、本被験物質の純度は95%未満(91.0%)であるため、最高用量の被験物質秤量

の際に純度換算を実施した。調製原液を使用溶媒を用いて順次所定濃度に希釈した後、速やかに処理を行った。

7. 細胞増殖抑制試験(予備試験)

12ウエルの細胞培養用マルチプレートに細胞を播種し、培養3日後に被験物質液を処理した。短時間処理法ではS9 mix非存在下(-S9処理)あるいは存在下(+S9処理)で6時間処理した後、新鮮な培養液に交換してさらに18時間培養を続けた。連続処理法の場合、24時間連続して処理を実施した。

細胞を10 vol%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業)で固定した後、0.1 w/v%クリスタルバイオレット(関東化学)水溶液で10分間染色した。色素溶出液(30 vol%エタノール, 1 vol%酢酸水溶液)を3 mL加え、5分間放置して色素を溶出した後、分光光度計(105-50型, 日立製作所)を用いて580 nmでの吸光度を測定した。各用量群について溶媒対照群での吸光度に対する比, すなわち相対細胞増殖率を算出し、さらにプロビット法を用いて50%細胞増殖抑制濃度を算出した。

その結果、細胞増殖を50%抑制する濃度は、短時間処理法+S9処理で4739  $\mu\text{g/mL}$ , 連続処理法24時間処理で2150  $\mu\text{g/mL}$ と算出された。短時間処理法-S9処理では、いずれの被験物質処理群においても相対細胞増殖率が溶媒対照群の50%以上であった(Fig. 1~2)。

被験物質処理開始および処理終了時にいずれの用量においてもpHの変動、被験物質の析出等、特筆すべき変化は観察されなかった。

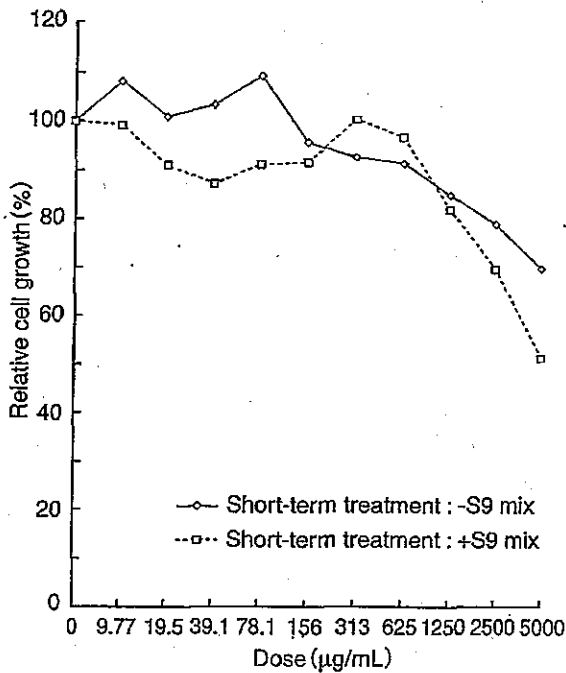


Fig. 1 Growth inhibition of CHL cells treated with C.I. fluorescent brightner 271 [Short-term treatment: 6 hr]

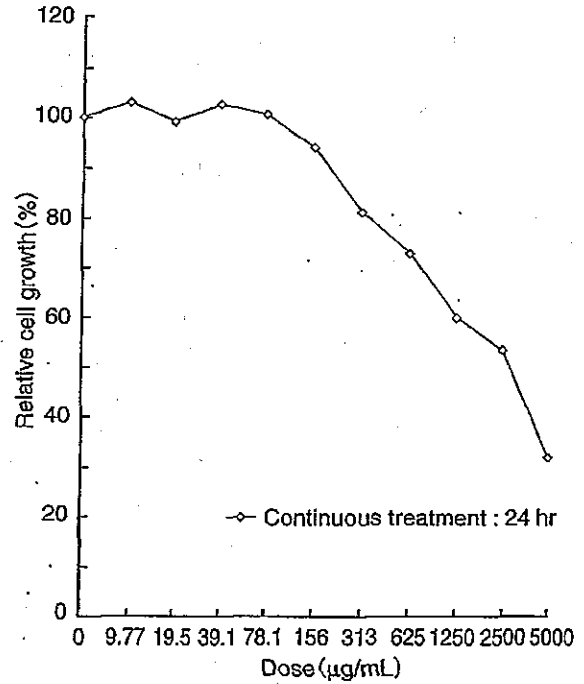


Fig. 2 Growth inhibition of CHL cells treated with C.I. fluorescent brightner 271 [Continuous treatment: 24 hr]

8. 試験用量および試験群の設定

細胞増殖抑制試験結果をもとに、染色体異常試験では短時間処理法-S9処理および+S9処理ならびに連続処理法24時間処理とも5000  $\mu\text{g/mL}$ を最高処理濃度とし、以下それぞれ公比2で減じた4または7用量ならびに溶媒対照群を設定した。

なお、陽性対照として、短時間処理の場合、-S9処理でマイトマイシンC(MMC, 協和醗酵工業)を0.1  $\mu\text{g/mL}$ , +S9処理でシクロホスファミド(CP, 塩野義製薬)を12.5  $\mu\text{g/mL}$ の用量で、連続処理の場合MMCを0.05  $\mu\text{g/mL}$ の用量で試験した。

9. 染色体標本の作製

直径60 mmのプレートを用い、細胞増殖抑制試験と同様に被験物質等の処理を行った。培養終了2時間前に、最終濃度で0.2  $\mu\text{g/mL}$ となるようコルセミド(Invitrogen)を添加した。トリプシン処理で細胞を剥離させ、遠心分離により細胞を回収した。75 mmol/L塩化カリウム水溶液で低張処理を行った後、固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。空気乾燥法で染色体標本作製した後、1.2 vol%ギムザ染色液で12分間染色した。

10. 染色体の観察

各プレートあたり100個、すなわち用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)、染色体切断(csb)、染色分体交換(cte)、染色体交換(cse)およびそ

の他(oth)の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。染色体の分析は日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会による分類法<sup>2)</sup>に従って実施した。

短時間処理法および連続処理法の標本を別々にコード化し、染色体分析を実施した。

### 11. 結果の解析

ギャップを含めない場合(-gap)について染色体構造異常の出現頻度を表示した。

各試験群の構造異常を有する細胞あるいは倍数性細胞の出現頻度を、Fisherの直接確率計算法(有意水準片側2.5%)を用いて検定した。また用量依存性については、Cochran Armitageの傾向検定(有意水準片側2.5%)を用いて検定した。溶媒対照群と比較し被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。ただし、最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

また、分裂中期像の20%にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であるD<sub>20</sub>値を最小二乗法により算出し、一定濃度(mg/mL)あたりの交換型異常(cte)出現数を示す比較値であるTR値を、染色体交換の出現頻度(%)を被験物質濃度(mg/mL換算)で割ることにより算出した。

### 12. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に各プレートの低張処理した細胞液を一定量採取し、ATP測定用試薬キット(ルシフェール250, キッコーマン)およびATPフォトメーター(ルミテスターC-100LU, キッコーマン)を用いて相対発光量(Relative Light Unit:RLU)を求めATP含量を測定した。陰性対照群におけるRLUに対する比(=相対細胞増殖率)を各用量群について求め、細胞増殖抑制度とした。

### 結果および考察

短時間処理法での試験結果をTable 1~2に示した。C.I.フルオレセントブライトナー271処理群の場合、染色体構造異常出現頻度は、-S9処理では1250 μg/mLで2.5%, 2500 μg/mLで4.0%(p<0.025), 5000 μg/mLで9.0%(p<0.025)を示し、用量依存性(p<0.025)も認められた。+S9処理では1250 μg/mLで0.0%, 2500 μg/mLで3.0%(p<0.025), 5000 μg/mLで1.5%を示した。倍数性細胞の誘発傾向は、-S9処理および+S9処理ともいずれの用量においても観察されなかった。また、-S9処理ならびに+S9処理とも全ての試験用量で相対細胞増殖率が溶媒対照群の50%以上であった。一方、S9 mix非存在下における陽性対照物質MMCで処理した細胞、およびS9 mix存在下における陽性対照物質CPで処理した細胞では染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

C.I.フルオレセントブライトナー271における-S9処理の結果は、弱い陽性反応であったことから、連続処理

法24時間処理による染色体異常試験を追加して実施し、結果をTable 3に示した。C.I.フルオレセントブライトナー271処理群での染色体構造異常出現頻度は、78.1 μg/mLで0.5%, 156 μg/mLで1.5%, 313 μg/mLで3.0%(p<0.025); 625 μg/mLで2.0%を示し、用量依存性(p<0.025)も確認された。倍数性細胞の誘発傾向はいずれの用量においても観察されなかった。また、試験用量に依存した相対細胞増殖率の減少が観察され、625 μg/mLでの相対細胞増殖率は46.8%であった。一方、陽性対照物質MMCで処理した細胞では染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

変異原性の強さに関する相対的比較値であるD<sub>20</sub>値の最小値は11.6(mg/mL), TR値の最大値は0.300(mg当たり)と算出された。なお、被験物質処理開始および処理終了時に、いずれの用量においてもpHの変動、被験物質の析出等、特筆すべき変化は観察されなかった。

以上の試験結果から、当該試験条件下においてC.I.フルオレセントブライトナー271のチャイニーズ・ハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し、陽性と判定した。ただし、D<sub>20</sub>値の最小値は11.6 mg/mLであり、染色体異常誘発頻度は最高でも9.0%であることから、非常に弱い反応であると考えられた。

なお、本被験物質(C.I.フルオレセントブライトナー271)の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告は現在までない。

類縁体であるFluorescent brightener 24, Fluorescent brightener 225およびFluorescent brightener 260についてはCHL細胞を用いた染色体異常試験、Don細胞を用いた染色体異常試験およびDon細胞を用いた姉妹染色分体交換試験で陰性<sup>3,4)</sup>と報告されている。また、Fluorescent brightener 84についてもCHL細胞を用いた染色体異常試験で陰性<sup>3)</sup>と報告されている。

### 文献

- 1) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. Mutation Res, 66:277-290(1979).
- 2) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(編):「化学物質による染色体異常アトラス」朝倉書店, 東京(1988)pp.31-35.
- 3) 賀田恒夫, 石館基(監修):「環境変異原性データ集1」サイエンティスト社, 東京(1980)pp.199-200.
- 4) 祖父尼俊雄(監修):「染色体異常試験データ集」改訂1998年版, エル・アイ・シー, 東京(1999)pp.238-239.



連絡先

試験責任者: 嶋田佐和子  
試験担当者: 田中 仁, 菊池正憲, 上田摩弥,  
古屋有佳子, 永井美穂, 木下裕加,  
赤星まゆみ, 夏目匡克,  
仲村渠奈美子, 鈴木ゆみ子,  
大野久実, 中嶋 圓, 鈴木雅也  
(財)食品農医薬品安全性評価センター  
〒437-1213 静岡県磐田市塩新田582-2  
Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Sawako Shimada (Study director)  
Jin Tanaka, Masanori Kikuchi,  
Maya Ueda, Yukako Furuya,  
Miho Nagai, Yuka Kishita,  
Mayumi Akahoshi,  
Masakatsu Natsume,  
Namiko Nakandakari, Yumiko Suzuki,  
Kumi Oono, Madoka Nakajima,  
Masaya Suzuki  
Biosafety Research Center, Foods, Drugs and  
Pesticides (An-pyo Center)  
582-2 Shioshinden, Iwata-shi, Shizuoka,  
437-1213, Japan  
Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

染色体異常試験

Table 1 Chromosome aberration test in CHL cells treated with C.I. fluorescent brightner 271 [Short-term treatment:-S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Test substance	0 <sup>a)</sup>	6	100.0	200	2	1	0	0	0	0	1( 0.5)*	200	0( 0.0)
	1250	6	87.4	200	3	4	1	0	0	0	5( 2.5)	200	0( 0.0)
	2500	6	72.4	200	8	7	1	0	0	0	8( 4.0)*	200	0( 0.0)
	5000	6	82.3	200	5	16	3	0	0	0	18( 9.0)*	200	0( 0.0)
MMC <sup>b)</sup>	0.1	6	102.2	200	9	28	70	0	1	0	85(42.5)*	200	0( 0.0)

Abbreviation; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth:others

-gap:total number of cells with aberrations except gap

\* $p \leq 0.025$ : Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

\* $p \leq 0.025$ : Significant difference from control (Fisher's exact test)

a) Negative control (isotonic sodium chloride solution)

b) Positive control (mitomycin C)

Table 2 Chromosome aberration test in CHL cells treated with C.I. fluorescent brightner 271 [Short-term treatment:+S9 mix]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Test substance	0 <sup>a)</sup>	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0( 0.0)	200	1( 0.5)
	1250	6	84.0	200	1	0	0	0	0	0	0( 0.0)	200	0( 0.0)
	2500	6	75.0	200	1	2	4	0	0	0	6( 3.0)*	200	2( 1.0)
	5000	6	60.2	200	1	0	3	0	0	0	3( 1.5)	200	1( 0.5)
CP <sup>b)</sup>	12.5	6	93.2	200	4	13	42	0	0	0	54(27.0)*	200	0( 0.0)

Abbreviation; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth:others

-gap:total number of cells with aberrations except gap

\* $p \leq 0.025$ : Significant difference from control (Fisher's exact test)

a) Negative control (isotonic sodium chloride solution)

b) Positive control (cyclophosphamide)

Table 3 Chromosome aberration test in CHL cells treated with C.I. fluorescent brightner 271 [Continuous treatment:24 hr]

Compound	Dose ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Time of exposure (hr)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Test substance	0 <sup>a)</sup>	24	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0( 0.0)*	200	0( 0.0)
	78.1	24	87.5	200	2	1	0	0	0	0	1( 0.5)	200	0( 0.0)
	156	24	61.3	200	2	3	0	0	0	0	3( 1.5)	200	2( 1.0)
	313	24	51.3	200	4	3	3	0	0	0	6( 3.0)*	200	1( 0.5)
	625	24	46.8	200	3	3	1	0	0	0	4( 2.0)	200	0( 0.0)
	1250	24	47.9	NA <sup>c)</sup>									
MMC <sup>b)</sup>	0.05	24	92.2	200	5	18	41	0	0	0	53(26.5)*	200	1( 0.5)

Abbreviation; ctb:chromatid break, cte:chromatid exchange, csb:chromosome break, cse:chromosome exchange, oth:others

-gap:total number of cells with aberrations except gap

\* $p \leq 0.025$ : Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

\* $p \leq 0.025$ : Significant difference from control (Fisher's exact test)

a) Negative control (isotonic sodium chloride solution)

b) Positive control (mitomycin C)

c) Not analyzed