

要 約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、2-ナフチルイソブチルエーテルは、染色体異常を誘起しないものと判定された

2-ナフチルイソブチルエーテルの染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU細胞)を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果に基づいて、濃度設定を行った。染色体異常試験では、短時間処理法-S9 処理で 76.8, 96.0 および 120 $\mu\text{g/mL}$ ならびに同+S9 処理で 16.1, 20.1 および 25.2 $\mu\text{g/mL}$ のそれぞれ3濃度について顕微鏡観察を実施した。その結果、2-ナフチルイソブチルエーテル処理群では、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても、明確な染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の誘発は認められなかった。

以上の結果より、連続処理法 24 時間処理群について 61.4, 76.8, 96.0 および 120 $\mu\text{g/mL}$ の4濃度について顕微鏡観察を実施したが、同試験法においても、2-ナフチルイソブチルエーテル処理による染色体異常の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の陽性対照物質マイトマイシン C (MMC) ならびに短時間処理法+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) では、いずれも染色体構造異常を陰性対照と比較して高頻度に誘発した。

1. 表題

2-ナフチルイソブチルエーテルのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2. 試験目的

被験物質の染色体異常誘発性をほ乳類培養細胞を用いて検討する。

3. 遵守した GLP および準拠したガイドライン

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, 環企発第 031121004 号)
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17 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, 環企発第 031121002 号)
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 473 (21st July 1997: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test)

4. 試験番号

9890 (115-209)

5. 試験施設

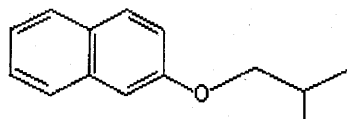
〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

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

13. 被験物質
- 13.1. 被験物質名
2-ナフチルイソブチルエーテル
- 13.2. ロット番号
GI01
- 13.3. 純度
99.1%
- 13.4. 製造元
東京化成工業株式会社
- 13.5. 購入年月日
平成 18 年 4 月 24 日
- 13.6. 購入量
500 g
- 13.7. 保存条件
冷蔵・遮光・除湿
- 13.8. 保存場所
安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫
- 7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch. 72
保存期間：2006年4月24日～同年7月10日
実測値：3.0～7.4℃
 - 6号館2階被験物質調製室内バイオマルチクーラー ch. 41
保存期間：2006年7月10日～同年8月3日（最終使用日）
実測値：5.0～6.6℃
- 13.9. 一般名
2-イソブトキシナフタレン
- 13.10. 化学名
2-Naphthylisobutyl ether
- 13.11. CAS No.
2173-57-1

13.12. 化学構造



13.13. 分子式

$C_{14}H_{16}O$

13.14. 分子量

200.28

13.15. 物質の状態

白色結晶塊

13.16. 融点

32.4°C (凝固点)

13.17. 引火点

68°C

13.18. 溶解性

水：不溶

DMSO：可溶 (50 mg/mL 以上)

13.19. 安定性

通常の取り扱い条件においては安定。

13.20. 取り扱い上の注意

酸化剤との接触に注意する。引火性が強く、燃焼しやすい液体。

取扱いは換気の良い場所で行い、粉塵が飛散しないように注意する。

適切な保護具を着用し、吸い込んだり、目、皮膚および衣類に触れないようにする。

13.21. 安定性分析

13.21.1. 安定性の確認方法

実験終了後に純度分析を実施した結果、純度が 99.6% (判定基準：98%以上) であったことから、被験物質の実験期間中の安定性が確認された。

純度分析の詳細を Reference data 1 に示す。

13.21.2. 安定性分析用被験物質の保存場所

安評センター被験物質調製室内冷蔵保管庫

- 7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch. 72

保存期間：2006年4月24日～同年9月13日（最終使用日）

実測値：3.0～7.7°C

13.22. 残余被験物質の処理

実験終了後、1.0 g の被験物質を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りは専用の容器に廃棄された。

14. 試験材料および方法

14.1. 試験細胞株

遺伝毒性ガイドラインは乳類培養細胞を用いる染色体試験法で指定されている、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/TU 細胞）を使用した。CHL/TU 細胞は、1984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, GC用, 純度99.9%, Lot No. K31758278, Merck）を容量比で10%添加された後、液体窒素中に保存された。試験には、凍結した細胞を融解した後、3～5日ごとに継代し、細胞増殖抑制試験では継代数21の細胞を、染色体異常試験では継代数27の細胞を用いた。

なお、凍結ロット毎にマイコプラズマ汚染検査を独立行政法人 医薬基盤研究所で実施した結果、汚染は認められなかった（細胞 Lot No. CLC-004, 2005年6月27日、試験結果報告書 NB-0001）。さらに、当該試験に使用した細胞は、2005年5月30日～同年6月1日および2005年6月6～8日に細胞の特性検査が実施され、倍加時間（15.2時間）、染色体数（25本保有細胞84%）等に異常は認められていない。

14.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（IWAKI, Lot No. 501095, 旭テクノグラス）に非働化（56°C, 30分）済みの仔牛血清（Lot No. 542384, Invitrogen）を最終濃度で10%になるよう添加した。調製後の培養液は、使用時まで冷暗所（15°C以下）に保存された。

14.3. 培養条件

CO₂インキュベーター（三洋電機）を用い、CO₂濃度5%、温度37°Cの条件で細胞を培養した。

14.4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のS9 mix（Lot No. CAM-540, キッコーマン）を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー（設定値：-80°C, 基準値：-60°C以下）に保存した。

14.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法を下表に示す。

ロット番号	RAA-540
製造年月日	2006年3月17日 (誘導物質投与開始後5日目)
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7週齢
体重	191~240 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB)および5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および投与回数	PB: 30 mg/kg 1回 (1日目) 60 mg/kg 3回 (2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回 (3日目)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	26.46 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す。

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol

14.5. 被験物質液の調製

被験物質は、水に不溶で、DMSOには可溶であることから、被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったDMSO (SeccoSolv[®], 純度≥99.5%, Lot No. K32997731 【細胞増殖抑制試験】, 純度≥99.5%, Lot No. K35364331 【染色体異常試験】, Merck) に溶解させた。

細胞増殖抑制試験では、使用直前に被験物質 1001.4 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液 (200.3 mg/mL 溶液) を準備した。この 200.3 mg/mL 調製原液 1 mL を DMSO 1 mL に加えることにより、100.2 mg/mL 溶液を調製した。以下、同様に希釈を行い、50.1, 25.0, 12.5, 6.26, 3.13 および 1.56 mg/mL 液を調製した。

染色体異常試験では、使用直前に被験物質 75.0 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、DMSO 約 4 mL を加え、攪拌しながら溶解させた。さらに、DMSO を加えて 5 mL に定容し、調製原液 (15.0 mg/mL 溶液) を準備した。この 15.0 mg/mL 調製原液 4 mL を DMSO 1 mL に加えることにより、12.0 mg/mL 溶液を調製した。以下、同様な希釈を行い、9.60, 7.68, 6.14, 4.92, 3.93, 3.15, 2.52, 2.01, 1.61, 1.29 および 1.03 mg/mL 液を調製した。

いずれの試験においても調製後、被験物質液を速やかに使用した。なお、被験物質液 (調製後 3.5 時間) に発熱、発泡、発煙等の変化は認められなかった。

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質液調製に用いる溶媒である DMSO を使用した。

14.6.2. 陽性対照 (短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理)

注射用水 (日本薬局方注射用水, Lot No. K5F73, 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC, 2 mg 力価/バイアル, Lot No. 459AEA, 協和発酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液, Lot No. 4C87N, 大塚製薬工場) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

処理濃度は、短時間処理法で 0.1 µg/mL, 連続処理法で 0.05 µg/mL とした。

14.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

注射用水 (Lot No. K5F73) 5 mL に溶解したシクロホスファミド (CP, 100 mg/バイアル, Lot No. 4066, 塩野義製薬) を生理食塩液 (Lot No. 4C87N) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

処理濃度は、12.5 µg/mL とした。

14.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

14.7.1. 処理濃度

細胞増殖抑制試験における被験物質の濃度として、ガイドラインで定められた 2003 µg/mL (10 mM 相当) を最高濃度とし、以下、1002, 501, 250, 125, 62.6, 31.3 および 15.6 µg/mL を設定した。

14.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 濃度当たり 2 ウェルを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

14.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート (細胞培養用マルチプレート 12F, 住友ベークライト) の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った. 6 時間培養を続けた後, 各ウェルの培養液を除去し, ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 115K2343, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した. 新鮮な培養液 500 μ L を加え, さらに 18 時間培養を続けた.

14.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行った.

その後の操作は, 14.7.3. に記載した方法に準じた.

14.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 14.7.6. に記載する割合で溶媒あるいは被験物質の処理を行い, さらに 24 時間培養を続けた.

14.7.6. 処理量一覧

	溶媒あるいは被験物質		
	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	600 μ L	-	6 μ L
+S9 処理	500 μ L	100 μ L	6 μ L
24 時間処理	600 μ L	-	6 μ L

14.7.7. 析出等の観察

各処理法において, 処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した.

14.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウェルから培養液を除き, 10%中性緩衝ホルマリン液 (組織固定用, Lot No. DPR8664, 和光純薬工業) を加えて 10 分間細胞を固定した. 次に, クリスタル・バイオレット (Lot No. K31134240, Merck) の 0.1% 水溶液で 10 分間細胞を染色した. 各プレートを水洗した後, 乾燥させた. 各ウェルに色素溶出液 (30% エタノール, 1% 酢酸水溶液) 3 mL を加え, 5 分間放置した. 各ウェルの溶出液を 96 ウェルのプレート (アッセイプレート, IWAKI) に各々 300 μ L 分注し, マイクロプレートリーダー (モデル 450, BIO・RAD) を用いて 570 nm での吸光度を測定した. 陰性対照群での吸光度に対する比 (相対細胞増殖率) を各濃度群について求めた.

細胞増殖抑制が認められたため、50%細胞増殖抑制濃度を算出した。

14.8. 染色体異常試験

14.8.1. 処理濃度

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法-S9 処理、短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理で細胞毒性が認められ、50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ 99.1, 33.2 および 106 µg/mL と算出された。したがって、染色体異常試験では、細胞の増殖を 50% 以上抑制すると推定される濃度、すなわち、-S9 処理および 24 時間処理では 150 µg/mL、+S9 処理では 49.2 µg/mL をそれぞれ最高濃度とし、下表に示す 7 または 8 濃度を設定した。

処理法	濃度 (µg/mL)							
-S9 処理	—	39.3	49.2	61.4	<u>76.8</u>	<u>96.0</u>	<u>120</u>	150
+S9 処理	10.3	12.9	<u>16.1</u>	<u>20.1</u>	<u>25.2</u>	31.5	39.3	49.2
24 時間処理	—	39.3	49.2	<u>61.4</u>	<u>76.8</u>	<u>96.0</u>	<u>120</u>	150

下線を付した濃度について染色体異常の観察を実施した。

14.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 濃度当たり 2 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

14.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート (細胞培養用シャーレ、住友ベークライト) に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液 (Lot No. 016K2433, Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

14.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行った。

その後の操作は、14.8.3. に記載した方法に準じた。

14.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。

培養終了後、14.8.6.に記載する割合で溶媒、被験物質あるいは陽性対照物質の処理を行い、さらに24時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

14.8.6. 処理量一覧

	溶媒および被験物質			陽性対照		
	培養液	S9 mix	処理液	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.03 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

14.8.7. 析出等の観察

各処理法において、処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.8.8. 標本作製

染色体標本作製のおよそ2時間前に、最終濃度0.2 µg/mLとなるようコルセミド溶液 (Lot No. 1305832, Invitrogen) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25%トリプシン溶液 (Lot No. 1300409, Invitrogen) を用いてプレートより細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を1000 r/minで5分間遠心分離して培養液を除いた後、37°Cに保温しておいた75 mmol/L塩化カリウム水溶液5 mLを加え、37°Cの条件下で16分間の低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液(メタノール3容:酢酸1容)で細胞を固定した。固定液を2回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とした。細胞密度を適切な濃度に調整し、細胞濃度確認のため染色体標本を1枚作製した。染色体メタフェーズ展開装置 (HANABI) を用いて、スライドガラス上に細胞浮遊液を1滴滴下し、染色体標本を2枚作製した。スライド標本は十分に乾燥させ、1/100 mol/Lナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8, Lot No. TP794874, Merck) を用いて1.2 v/v%に希釈したギムザ液 (Lot No. OB408561, Merck) で12分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

14.8.9. 相対細胞増殖率の測定

染色体標本作製時に陰性対照、各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて、ATP フォトメーター (ルミテスターC-100LU, キッコーマン) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。すなわち、1% Tween 80 水溶液2 mLを分注した小試験管に、低張処理を開始した細胞液50 µLを添加し、攪拌した。測定用チューブにこの混合液100 µLを分注した。細胞液添加から約20分経過後、測定用チューブにATP測定用試薬キット (ルシフェール250, キッコーマン) の発光試薬液100 µLを添加し、相対発光量 (Relative Light Unit : RLU) 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)

を各濃度群について求めた。

14.8.10. 評価対象

短時間処理法では、14.8.9.における相対細胞増殖率が陰性対照群の50%未満になる最も低い濃度を最高濃度とした3濃度を評価対象（観察濃度）とした。連続処理法24時間処理では、相対細胞増殖率が陰性対照群の50%未満になる濃度（120 µg/mL）では観察可能な分裂像が減少していたため、120 µg/mLを最高濃度とし、連続する4濃度を評価対象（観察濃度）とした。

14.8.11. 染色体の観察

短時間処理法および連続処理法のそれぞれの標本を分けてコード化した。短時間処理法について染色体の観察を実施し、その結果、陰性結果が得られたため、引き続き連続処理法の標本についても観察を行った。

各プレート当たり100個、すなわち、1濃度当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下（×600）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）、染色分体切断（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。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合は、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ、本来の軸からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として、1濃度当たり200個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

14.9. 試験成立条件

- a. 陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は、背景データから求めた基準値内であり、かつ、いずれも5%未満であること
- b. 陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は、上記の基準値内であり、かつ、10%以上であること

上記の条件を満たした場合に、試験は成立したと判断した。

14.10. 結果の解析

異常細胞の出現頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満、かつ、再現性が認められた場合に疑陽性、10%以上、かつ、再現性あるいは被験物質の濃度に依存性が認められた場合は、陽性と判定した。なお、ギャップのみ保有する細胞については、異常細胞数から除外して判定した。

統計学的手法を用いた検定は、実施しなかった。

15. 試験結果

15.1. 細胞増殖抑制試験

15.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示す。

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 時間処理の全てにおいて、濃度依存性を伴った細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、それぞれ 99.1, 33.2 および 106 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された。

15.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時、全ての処理の 62.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において白色粉末状の析出物が認められた。さらに、短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理では、125 および 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において白色膜状の析出物、501 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で白色油滴状の析出物も認められた。短時間処理法+S9 処理では、125~501 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において白色膜状の析出物、1002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で白色油滴状の析出物が認められた。

被験物質処理終了時、短時間処理法の 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度および連続処理法 24 時間処理の 501 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において白色油滴状の析出物が認められた。

15.2. 染色体異常試験

15.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Table 3 および Appendix 1 に示す。

2-ナフチルイソブチルエーテル処理群での染色体構造異常出現頻度は、76.8, 96.0 および 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 0.0, 1.5 および 2.5%であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、76.8, 96.0 および 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 0.0, 0.0 および 0.5%であり、陰性対照群 (0.0%) と同等であった。また、濃度に依存した細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での細胞増殖率は 24.1%であった。

陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 44.0%であった。

15.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Table 4 および Appendix 2 に示す。

2-ナフチルイソブチルエーテル処理群での染色体構造異常出現頻度は、16.1, 20.1 および 25.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 0.0, 0.0 および 1.5%であり、陰性対照群 (0.0%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、16.1, 20.1 および 25.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でそれぞれ 0.5, 0.0 および 1.0%であり、陰性対照群 (0.5%) と同等であった。また、

濃度に依存した細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 25.2 µg/mL での細胞増殖率は 40.2%であった。

陽性対照物質 CP で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 17.0%であった。

15.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Table 5 および Appendix 3 に示す。

2-ナフチルイソブチルエーテル処理群での染色体構造異常出現頻度は 61.4, 76.8, 96.0 および 120 µg/mL でそれぞれ 1.0, 0.5, 1.0 および 2.2%であり、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、61.4, 76.8, 96.0 および 120 µg/mL でそれぞれ 0.0, 0.0, 0.0 および 0.0%であり、陰性対照群 (0.5%) と同等であった。また、濃度に依存した細胞増殖率の減少が観察され、染色体異常評価群中の最高濃度である 120 µg/mL での細胞増殖率は 40.3%であった。最高濃度の 120 µg/mL では強い分裂阻害がみられ、分析可能な分離中期像は 182 細胞であった。

陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 42.0%であった。

15.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始時、全ての処理法の 39.3µg/mL 以上の濃度において白色粉末状の析出物が認められた。さらに、短時間処理法-S9-処理および連続処理法 24 時間処理では、120 µg/mL 以上の濃度において白色膜状の析出物も認められた。

被験物質処理終了時、全ての処理法とも、析出は認められなかった。

16. 考察および結論

2-ナフチルイソブチルエーテルの染色体異常誘発性を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/TU 細胞) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

短時間処理法-S9 処理, 同+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間処理では, 細胞の増殖を 50%以上抑制する濃度まで検討した。

その結果, 2-ナフチルイソブチルエーテル処理群では, 短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理のいずれにおいても, 染色体異常の誘発頻度は, 陰性対照群と同等の値を示し, 明確な染色体構造異常の誘発は認められなかった。

短時間処理法において陰性と判定されたことから, 連続処理法 24 時間処理の染色体の観察を実施した。その結果, いずれの濃度においても明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも背景データ (Appendix 4) から求めた基準値内であり, 試験成立条件を満たしたことから, 当該試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から, 当該試験条件下において, 2-ナフチルイソブチルエーテルのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定された。

なお, これまでに 2-ナフチルイソブチルエーテルの遺伝毒性および発がん性に関する報告はない。類縁体である naphthalene は, 細菌およびヒト細胞株での遺伝子突然変異試験で陰性, CHO 細胞, リンパ球および着床前のマウス胚を用いた染色体異常試験で陽性との報告がある¹⁾。さらに, マウス骨髄での染色体異常誘発は認められないが, ショウジョウバエの翅毛スポット試験で陽性反応が認められている¹⁾。1-Methylnaphthalene および 2-methylnaphthalene は, ヒトリンパ球において姉妹染色分体交換を誘発し, さらに, 1-methylnaphthalene は, 弱いながらも染色体異常も誘発すると報告されている²⁾。2-Naphthylamine は, マウス骨髄小核試験で明確な陽性反応がみられている³⁾。Glycidyl 1-naphthyl ether は, 細菌を用いた復帰変異試験で陽性⁴⁾, マウスリンパ球での染色体異常試験で陽性, マウス骨髄での染色体異常試験で陽性との報告もある⁵⁾

17. 参考文献

- 1) Schreiner CA.: Genetic toxicity of naphthalene: a review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2003, 6(2): 161-183.
- 2) Kulka U, Schmid E, Huber R, Bauchinger M.; Analysis of the cytogenetic effect in human lymphocytes induced by metabolically activated 1- and 2-methylnaphthalene. *Mutat. Res.* 1988, 208(3-4): 155-158.
- 3) Mirkova E, Ashby J.: Activity of the human carcinogens benzidine and 2-naphthylamine in male mouse bone marrow micronucleus assays. *Mutagenesis* 1988 Sep, 3(5): 437-439.
- 4) Einisto P, Hooberman BH, Sinsheimer JE.: Base-pair mutations caused by six aliphatic epoxides in *Salmonella typhimurium* TA100, TA104, TA4001, and TA4006. *Environ Mol Mutagen.* 1993, 21(3): 253-257.
- 5) Das L, Das SK, Chu EH, Sinsheimer JE.: Chromosomal aberrations in mouse lymphocytes exposed *in vivo* and *in vitro* to aliphatic epoxides. *Mutat. Res.* 1993, 299(1): 19-24.

18. 参考とした資料

- Ishidate M Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - A screening for chemical carcinogens. *Mutat Res* 1977; 48: 337-354.
- Ishidate M. Chromosome aberration test *in vitro* for chemical mutagens in our environment. *The Tissue Culture* 1979; 5: 115-122.
- Evans HJ. In: Hollaender A editor. Cytological methods of detecting chemical mutagens. *Chemical Mutagens.* New York Plenum press 1976; 4: 1-25.
- Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M. Jr. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutat Res* 1979; 66: 277-290.
- Ishidate M. Chromosomal aberration test *in vitro*. Tokyo: REALIZE INC. 1987.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research [editorial]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 22: 269-275.