

2. 試験結果

2.1 細胞増殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、代謝活性化では 218 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は 115.2 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、非代謝活性化では 435 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は 244.6 $\mu\text{g/mL}$ であった。

(2) 被験液添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに色調変化は認められなかった。また、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、被験物質添加に伴う析出は認められなかった。

(3) 培養液交換前の培養状態の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともに、析出は認められなかった。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 54.4 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で、非代謝活性化では 27.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の浮遊・形態変化が認められた。

2) 連続処理法

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

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理では 218 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は 201.0 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、48 時間処理では 218 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は 175.1 $\mu\text{g/mL}$ であった。

(2) 被験液添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに色調変化は認められなかった。また、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、被験物質添加に伴う析出は認められなかった。

(3) 標本作製前の培養状態の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともに、析出は認められなかった。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 109 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の浮遊・形態変化が認められた。

2.2 染色体異常試験—短時間処理法

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

1) 被験液添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに色調変化は認められなかった。また、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、被験物質添加に伴う析出は認められなかった。

2) 培養液交換前の培養状態の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともに、析出は認められなかった。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化及び非代謝活性化では全ての濃度で細胞の浮遊・形態変化が認められた。

3) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では 218 $\mu\text{g/mL}$ で規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定した。また、109 $\mu\text{g/mL}$ では 11.5%、54.4 $\mu\text{g/mL}$ では 3.5% 及び 27.2 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% と 109 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上を示した。また、非代謝活性化においては 435 $\mu\text{g/mL}$ で規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定した。また、218 $\mu\text{g/mL}$ では 23.5%、109 $\mu\text{g/mL}$ では 2.5% 及び 54.4 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% と 218 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上を示した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、代謝活性化では 218 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定した。また、109 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0%、54.4 $\mu\text{g/mL}$ では 0% 及び 27.2 $\mu\text{g/mL}$ では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。また、非代謝活性化においては、435 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定した。また、218 $\mu\text{g/mL}$ では 2.5%、109 $\mu\text{g/mL}$ では 0% 及び 54.4 $\mu\text{g/mL}$ では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

2.3 確認試験

代謝活性化の結果を Fig. 2-3、Table 2-3 及び Table 3-3 に、非代謝活性化の結果を Fig. 2-4、Table 2-4 及び Table 3-4 に示した。

1) 被験液添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに色調変化は認められなかった。代謝活性化及び非代謝活性化ともに、被験物質添加に伴う析出は認められなかった。

2) 培養液交換前の培養状態の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともに、析出は認められなかった。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化及び非代謝活性化では全ての濃度で細胞の浮遊・形態変化が認められた。

3) 構造異常

構造異常の出現率は、代謝活性化では 150 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定した。また、125 $\mu\text{g/mL}$ では 36.0%、104 $\mu\text{g/mL}$ では 9.5% 及び 86.8 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0% であり、125 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上を、104 $\mu\text{g/mL}$ において疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示し、異常細胞の出現率に用量依存性が認められたため陽性と判定された。非代謝活性化では 300 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定し、240 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の細胞が観察されず UR と判定した。また、240 $\mu\text{g/mL}$ では 36.5%、192 $\mu\text{g/mL}$ では 20.0% 及び 154 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0% であり、192 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上を示し、異常細胞の出現率に用量依存性が認められたため陽性と判定された。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 数的異常

数的異常の出現率は、代謝活性化では 150 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定した。また、125 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0%、104 $\mu\text{g/mL}$ では 5.0% 及び 86.8 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% と 104 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示した。また、非代謝活性化においては、300 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定し、240 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の細胞が観察されず UR と判定した。また、240 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0%、192 $\mu\text{g/mL}$ では 8.0% 及び 154 $\mu\text{g/mL}$ では 5.5% と 192 及び 154 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

3. 考察及び結論

Allyl ethyl ether の染色体異常試験において、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率 (TA 値) は、短時間処理法の代謝活性化では 109 $\mu\text{g/mL}$ で、非代謝活性化では 218 $\mu\text{g/mL}$ の 1 用量のみで陽性であったことから、用量依存性又は再現性を確認するために、短時間処理法において陽性を示した近傍の用量として、代謝活性化では 150 $\mu\text{g/mL}$ を、非代謝活性化では 300 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、確認試験を実施した。その結果、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、異常細胞の出現率に用量依存性が認められ、更に染色体異常試験における短時間処理法との間に再現性が認められたため、陽性と判定した。このため、連続処理法は実施しなかった。また、染色体数的異常については、染色体異常試験では認められなかったものの、確認試験では疑陽性の判定基準を示した。また、確認試験の代謝活性化における染色体異常誘発性の強さの指標値については、観察細胞の 20%に何らかの異常が見られる用量である D20 値¹⁾は 0.11 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換 (cte) を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値¹⁾は 290 であった。なお、全ての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められたことから、試験は適切に実施されたと判断した。

以上の結果から、Allyl ethyl ether は本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、倍数体の誘発においては明確な結果が再現されず、equivocal と結論した。

4. 参考文献

- 1) 石館基監修 (1987) : <改訂> 染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー、東京
- 2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* - A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, **48**, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutation Res.*, **66**, 277-290
- 4) 石館 基 (1982) : 哺乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), 日本香粧品科学会誌, **6**, 31-43
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271

最終報告書

Diallyl carbonate のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 : A716 (079-401)

要 約

Diallyl carbonate 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・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL/IU) 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の結果を基に、Diallyl carbonate の濃度を設定した。染色体異常試験においては、短時間処理法- S9 処理で 355, 710 および 1420 $\mu\text{g/mL}$ ならびに同+S9 処理で 11.8, 14.6 および 18.0 $\mu\text{g/mL}$ 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、Diallyl carbonate 処理群では、短時間処理法+S9 処理において染色体構造異常の誘発が認められた。なお、倍数性細胞の出現頻度については、両処理法とも陰性対照と比較し、明確な増加は認められなかった。

短時間処理法- S9 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高頻度に誘発した。

したがって、Diallyl carbonate は、当該試験条件下では、ほ乳類培養細胞に対して染色体異常誘発性を誘発するもの (陽性) と判定された。

1. 表題

Diallyl carbonate 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. 準拠したガイドライン

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，環保企発第 031121002 号）

4. 試験番号

A716（079-401）

5. 被験物質

5.1. 被験物質名

Diallyl carbonate

5.2. ロット番号

06317MD

5.3. 純度／含量

99%

5.4. 製造元

Sigma-Aldrich

5.5. 保存条件

気密，冷蔵（2～8° C）

5.6. 化学名

Diallyl carbonate

5.7. CAS No.

15022-08-9

5.8. 分子式

$C_7H_{10}O_3$

5.9. 分子量

142.16

5.10. 物質の状態

液体

5.11. 沸点

95-97° C (60 mmHg)

5.12. 安定性

安定である.

強酸化剤, 強塩基, 強酸との接触を避ける.

5.13. 引火点

59° C

5.14. 取り扱い上の注意

皮膚, 目への接触および吸入を避ける.

手袋・マスク着用のこと.

5.15. 残余被験物質の処理

被験物質の残余がある場合は, 焼却処分する.

6. 試験材料および方法

6.1. 試験細胞株

遺伝毒性ガイドライン「ほ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/IU 細胞) を使用した. CHL/IU 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% 添加した後, 液体窒素中に保存した. 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 11 の細胞を, 染色体異常試験では継代数 15 の細胞を, 染色体異常試験 - 追加試験では継代数 20 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. さらに, 当該試験に使用した細胞は, 細胞の特性検査が実施され, 倍加時間および染色体数等に異常は認められていない.

6.2. 培養液の調製

MEM 液体培地 (Lot No. 281601, Invitrogen) に非働化 (56°C, 30 分) 済みの仔牛血清 (Lot No. 605022, Invitrogen) を最終濃度で 10% になるように添加した. 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.

6.3. 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℃ の条件で細胞を培養した。

6.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix（染色体異常試験用凍結 S-9Mix, Lot No. CAM-565, 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℃、基準値：-60℃ 以下）に保存した。

6.4.1. 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-565
製造年月日	2007 年 9 月 7 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	227～269 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	26.03 mg/mL

6.4.2. 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

6.5. 被験物質液の調製

被験物質は DMSO に易溶であることから、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. K36323231, 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 284 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 1.5 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。次いで、DMSO を加えて 2 mL に定容し、調製原液 (142 mg/mL 溶液) を準備した。DMSO 0.5 mL に、この 142 mg/mL 調製原液 0.5 mL を加えることにより、71.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、35.5, 17.8, 8.88, 4.44, 2.22, 1.11, 0.555 および 0.277 mg/mL 溶液を調製した。この被験物質溶液は、用時調製された。

染色体異常試験において、短時間処理法- S9 処理および連続処理法 24 時間処理では、使用直前に被験物質 284 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 1.5 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。次いで、DMSO を加えて 2 mL に定容し、調製原液 (142 mg/mL 溶液) を準備した。DMSO 0.5 mL に、この 142 mg/mL 調製原液 0.5 mL を加えることにより、71.0 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、35.5 および 17.8 mg/mL 溶液を調製した。短時間処理法+S9 処理では、使用直前に被験物質 90.0 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 1.5 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。次いで、DMSO を加えて 2 mL に定容し、調製原液 (45.0 mg/mL 溶液) を準備した。DMSO 1.8 mL に、この 45.0 mg/mL 調製原液 0.2 mL を加えることにより、4.50 mg/mL 溶液を調製した。DMSO 0.3 mL に、この 4.50 mg/mL 溶液 0.7 mL を加えることにより、3.15 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、2.21, 1.54, 1.08 および 0.756 mg/mL 溶液を調製した。この被験物質溶液は、用時調製された。

染色体異常試験 - 追加試験では、使用直前に被験物質 40.0 mg を精密に量り、目盛付き試験管に移した後、約 1.5 mL の DMSO を加え、攪拌しながら溶解させた。次いで、DMSO を加えて 2 mL に定容し、調製原液 (20.0 mg/mL 溶液) を準備した。DMSO 1.8 mL に、この 20.0 mg/mL 調製原液 0.2 mL を加えることにより、2.00 mg/mL 溶液を調製した。DMSO 0.2 mL に、この 2.00 mg/mL 溶液 1.8 mL を加えることにより、1.80 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、1.62, 1.46, 1.31, 1.18, 1.06, 0.957, 0.861 および 0.775 mg/mL 溶液を調製した。この被験物質溶液は、用時調製された。

なお、被験物質液に発熱、発泡、発煙等の変化は認められなかった。

6.6. 対照群

6.6.1. 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。

6.6.2. 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; 大塚蒸留水, 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC; マイトマイシン注用 2 mg, 協和発酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液; 大塚生食注, 大塚製薬工場) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後 6 ヶ月以内の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 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法で 0.05 $\mu\text{g/mL}$ とした。

6.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

生理食塩液 5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP；注射用エンドキサン[®] 100 mg 10V, 塩野義製薬）を生理食塩液を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後 6 ヶ月以内の凍結保存したものを試験に用いた。

処理濃度は 12.5 $\mu\text{g/mL}$ とした。

6.7. 細胞増殖抑制試験（予備試験）

6.7.1. 処理濃度

細胞増殖抑制試験（予備試験）における被験物質の処理濃度として、ガイドライン上定められた 10 mM 相当の 1420 $\mu\text{g/mL}$ を最高濃度とし、以下 710, 355, 178, 88.8, 44.4, 22.2, 11.1, 5.55, 2.77 $\mu\text{g/mL}$ の 10 濃度を設定した。

6.7.2. 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。

6.7.3. 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、12.7.6.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生理食塩液（Sigma-Aldrich）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 1 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた。

6.7.4. 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、12.7.6.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、12.7.3.に記載した方法に準じた。

6.7.5. 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、12.7.6.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。

6.7.6. 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

6.7.7. 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。

6.7.8. 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，和光純薬工業）を加えて約 10 分間細胞を固定した。次いで、クリスタル・バイオレット（Merck）の 0.1%水溶液で 10 分間細胞を染色した。各プレートを手洗した後、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）を 3 mL 加え，5 分放置した。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 680，Bio-Rad Laboratories）を用いて，570 nm での吸光度を測定した。陰性対照群における吸光度に対する比を各濃度群について求め，相対細胞増殖率とした。細胞増殖抑制が認められたため，短時間処理法+S9 処理についてプロビット法を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した。

6.8. 染色体異常試験および追加試験

6.8.1. 処理濃度

細胞増殖抑制試験の結果，短時間処理法- S9 処理および連続処理法 24 時間処理では細胞毒性は認められなかった。短時間処理法+S9 処理では細胞毒性が認められ，50%細胞増殖抑制濃度は，24.8 μ g/mL であった。したがって，染色体異常試験では，- S9 処理および 24 時間処理については 10 mM 相当の 1420 μ g/mL を最高濃度とし，+S9 処理については，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 処理では 45.0 μ g/mL を最高濃度とし，下表に示す 4～6 濃度を設定した。

処理法	濃度 (μ g/mL)									
短時間処理法- S9 処理	-	-	-	-	-	-	178	355	710	1420
短時間処理法+S9 処理	7.56	10.8	15.4	22.1	31.5	45.0	-	-	-	-
連続処理法 24 時間処理	-	-	-	-	-	-	178	355	710	1420

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。

短時間処理法+S9 処理において，相対細胞増殖率が 50%未満を示した処理濃度（15.4 μ g/mL 以下）では，重度の細胞増殖抑制のために染色体観察ができなかった。したがって，+S9

処理について追加試験を実施した。追加試験では、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、20.0 $\mu\text{g/mL}$ を最高濃度とし、以下に示す 10 濃度を設定した。

処理法	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)									
短時間処理法+S9 処理	7.75	8.61	9.57	10.6	11.8	13.1	14.6	16.2	18.0	20.0

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

6.8.2. 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。

6.8.3. 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、12.8.6. 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生理食塩液（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。

6.8.4. 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、12.8.6. 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、12.8.3. に記載した方法に準じた。

6.8.5. 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、12.8.6. 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。

6.8.6. 処理量一覧

	溶媒あるいは被験物質			陽性対照物質		
	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

6.8.7. 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。

6.8.8. 標本の作製

染色体標本作製のおよそ2時間前に、最終濃度 $0.2 \mu\text{g/mL}$ となるようにコルセミド溶液 (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 (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約 5 mL を加え、 37°C の条件で、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、 $1/100 \text{ mol/L}$ ナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8, Merck) を用いて $1.2 \text{ v/v}\%$ に希釈したギムザ液 (Merck) で12分間程度染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

6.8.9. 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 $50 \mu\text{L}$ を添加し、攪拌した。測定用チューブにこの混合液 $100 \mu\text{L}$ 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 $100 \mu\text{L}$ 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に対する比を各濃度群について求め、相対細胞増殖率とした。

6.8.10. 評価対象

観察濃度として、- S9 処理および24時間処理では、6.8.9.の相対細胞増殖率が 50% 以上であったため、 10 mM 相当の $1420 \mu\text{g/mL}$ を最高濃度とし、+S9 処理においては、6.8.9.で得られた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。- S9 処理および24時間処理では、連続する3濃度を評価対象 (観察濃度) とし、+S9 処理においては連続する3濃度では濃度間隔が狭く、細胞毒性発現領域のみの観察となることが予想されたため、間隔を空けて3濃度を評価対象 (観察濃度) とした。

6.8.11. 染色体の観察

短時間処理法と連続処理法のそれぞれの標本を分けて無作為にコード化し、マスキング法で観察した。短時間処理法について染色体の観察を実施し、その結果、陽性結果が得られたため、連続処理法の標本については観察を実施しなかった。また、短時間処理法+S9 処理については、追加試験において作製した標本を観察に供した。

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 ($\times 600$) 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。

6.9. 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。

6.10. 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。

6.11. D_{20} 値ならびに TR 値の算出法

D_{20} 値は分裂中期像の 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り、最小二乗法により算出した。TR 値は一定濃度 (mg/mL) 当たりの交換型異常 (cte) 出現数を示す比較値であり、染色分体交換の出現頻度 (%) を被験物質濃度 (mg/mL 換算) で割ることにより算出した。

7. 試験結果

7.1. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

7.1.1. 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 処理および連続処理法 24 時間では細胞毒性は認められなかった。短時間処理法+S9 処理においては、濃度に依存した細胞増殖率の低下が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 24.8 $\mu\text{g/mL}$ であった。

7.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始時、短時間処理法- S9 処理および連続処理法 24 時間の 1420 $\mu\text{g/mL}$ の濃度において透明な油滴状の析出物が認められたが、処理終了時にはいずれの処理法とも析出等の特筆すべき変化は認められなかった。

7.2. 染色体異常試験

7.2.1. 短時間処理法- S9 処理

試験結果を Table 3 および Appendix 1 に示す。

Diallyl carbonate 処理群の染色体構造異常出現頻度は、355, 710 および 1420 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 0.5, 1.0 および 1.0%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、355 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 710 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 1420 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%を示し、陰性対照群 (0.0%) と比較し同等であった。また、顕著な相対細胞増殖率の減少は認められず、最高濃度においても陰性対照の 119.4%であった。

陽性対照の MMC 処理による染色体構造異常出現頻度は 62.5%であった。

7.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Table 4 および Appendix 2 に示す。

Diallyl carbonate 処理群の染色体構造異常出現頻度は、11.8, 14.6 および 18.0 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 0.0, 1.5 および 19.5%であり、陰性対照群 (0.0%) と比較し 18.0 $\mu\text{g/mL}$ の濃度において明確な増加が認められた。倍数性細胞の出現頻度は、11.8 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 14.6 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 18.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%を示し、陰性対照群 (0.0%) と比較し同等であった。

また、濃度に依存した相対細胞増殖率の低下が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 18.0 $\mu\text{g/mL}$ での相対細胞生存率は 23.7%であった。最高濃度の 20.0 $\mu\text{g/mL}$ での相対細胞生存率は 9.9%であった。

陽性対照の CP 処理による染色体構造異常出現頻度は 36.5%であった。

7.2.3. 析出等の観察

被験物質処理開始時、短時間処理法- S9 処理および連続処理法 24 時間の 1420 $\mu\text{g/mL}$ の濃度において透明な油滴状の析出物が認められた。被験物質処理終了時には、いずれの処理法とも析出等の特筆すべき変化は認められなかった。

7.3. D_{20} 値ならびに TR 値算出結果

染色体異常試験結果から算出した D_{20} 値 (mg/mL) ならびに TR 値は次の通りであった。

処理法	異常の種類	D ₂₀ 値	TR 値
短時間処理法+S9 処理	構造異常	0.0210	944

8. 考察および結論

Diallyl carbonate の染色体異常誘発性の有無を検討するため、培養細胞（CHL/IU）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果を基に、短時間処理法- S9 処理、同+S9 処理において、細胞の増殖を 50%以上抑制すると予想される濃度あるいは 10 mM 相当の濃度まで検討した。

Diallyl carbonate 処理の場合は、短時間処理法- S9 処理では染色体異常の誘発はみられなかったが、同法での+S9 処理において、染色体構造異常の誘発が認められた。ただし、染色体異常の誘発がみられた濃度は、相対細胞増殖率が低値を示していた濃度のみであった。変異原性の強さに関する相対的比較値である D₂₀ 値の最小値は 0.0210 (mg/mL) , TR 値の最大値は 944 と算出され、既知変異原性物質に比較して本被験物質の変異原性は中等度であることを示していた。

陰性対照あるいは陽性対照の染色体異常出現頻度はいずれも当施設での背景データ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実施されたものと判断された。

以上の結果から、当該試験条件下において、Diallyl carbonate の培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定された。

9. 参考文献

- ☐ 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: 337-54.
- ☐ Ishidate M. Chromosome aberration test *in vitro* for chemical mutagens in our environment. *The Tissue Culture* 1979; 5: 115-22.
- ☐ 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: 277-90.
- ☐ 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: 269-75.

最終報告書

Propylene sulfide のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

N-M179

1. 要 約

Propylene sulfide の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果、50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、短時間処理法の代謝活性化では 208.2 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 551.5 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 367.8 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 517.9 $\mu\text{g/mL}$ であった。これらの結果より、短時間処理法の代謝活性化では 375 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 750 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とした。なお、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理は、短時間処理法の確認試験において陽性と判定されたため、実施しなかった。

染色体異常試験の結果、被験物質用量群におけるギャップを含まない染色体構造異常を有する細胞の出現率 (TA 値) は、短時間処理法の代謝活性化では、最高用量の 375 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上、188、93.8 及び 46.9 $\mu\text{g/mL}$ では陰性の判定基準である 5% 未満を示したため、陽性と判定した。非代謝活性化では、最高用量の 750 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10% 以上、375、188 及び 93.8 $\mu\text{g/mL}$ では陰性の判定基準である 5% 未満を示したため、陽性と判定した。しかしながら、陽性の判定を示したものは、代謝活性化及び非代謝活性化ともに最高用量のみであったことから、ガイドラインに従って用量依存性又は再現性を確認するために、確認試験を実施することとし、陽性を示した近傍の用量を最高用量として、代謝活性化では 400、320、256 及び 205 $\mu\text{g/mL}$ の計 4 用量を、非代謝活性化では 750、600、480 及び 384 $\mu\text{g/mL}$ の計 4 用量をそれぞれ設定した。

確認試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率 (TA 値) は、代謝活性化では 400 及び 320 $\mu\text{g/mL}$ では陽性の判定基準である 10% 以上、256 及び 205 $\mu\text{g/mL}$ では陰性の判定基準である 5% 未満であり、染色体異常試験の結果との間に再現性が認められ、用量の増加に伴う TA 値の増加も認められたため、陽性と判定した。一方、非代謝活性化では全ての用量で陰性の判定基準である 5% 未満であり、染色体異常試験の結果との間に再現性が認められず、更に用量依存性も認められなかったことから、陰性と判定した。また、数的異常 (倍数体) の出現率は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに陰性の判定基準である 5% 未満であったことから、陰性と判定した。

なお、全ての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5% 未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められたことから、本試験は適切に実施されていたと考えられた。

以上の結果から、Propylene sulfide は本試験条件下においては染色体数的異常誘発能を有さないが、染色体構造異常誘発能を有すると結論した。