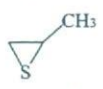


2. 試験材料及び方法

2.1 被験物質及び溶媒

2.1.1 被験物質

被験物質 Propylene sulfide は国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 総合評価研究室より提供された。その品質は保証されている。

供給者	: 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 総合評価研究室
製造者	: 東京化成工業株式会社
名称	: Propylene sulfide
ロット番号	: WLGSE
CAS番号	: 1072-43-1
構造式又は示性式	: 
純度	: 98%以上
密度	: 0.94
沸点	: 75°C
性状	: ごく薄い黄色透明液体
入手量	: 25 mL
保存方法	: 冷蔵 (保存期間中実測温度: 4~6°C)、遮光、密閉
分子量	: 74.14
取り扱い上の注意	: 引火性が強く、燃焼しやすい液体であり、蒸気は空気と混合して爆発性の混合ガスを形成するため、作業時は火気の使用を厳禁とした。
残余物の返却	: 実験終了後、被験物質の残量は全て試験委託者に返却した。

2.1.2 溶媒

名称	: ジメチルスルホキシド (DMSO)
ロット番号	: LTF0010
規格	: 試薬特級
製造元	: 和光純薬工業株式会社
保存方法	: 室温
溶媒の選択理由	: 試験開始前に溶媒に対する溶解性を検討したところ、DMSO に対して 75 mg/mL で溶解したため、DMSO を溶媒として用いることとした。

2.2 被験液の調製

2.2.1 調製方法

2.2.1.1 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.1500 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 75.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：750 µg/mL）を調製した。次いで、75.0 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、37.5、18.8、9.38、4.69、2.34、1.17 及び 0.586 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

2.2.1.2 染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.1500 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。メスアップして最高濃度の 75.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：750 µg/mL）を調製した。

次いで、75.0 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 4 段階希釈し、37.5、18.8、9.38 及び 4.69 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性法では 37.5、18.8、9.38 及び 4.69 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では 75.0、37.5、18.8 及び 9.38 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を用いた。

2.2.1.3 確認試験

確認試験（短時間処理法）では、被験物質 0.3750 g を 5 mL メスフラスコに秤取した。メスアップして最高濃度の 75.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：750 µg/mL）を調製した。次いで、75.0 mg/mL 溶液を公比 1.25（各濃度の被験液 2 mL：溶媒 0.50 mL）で順次 3 段階希釈し、60.0、48.0 及び 38.4 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を調製した。また、75.0 mg/mL 溶液を 1.5 倍希釈（被験液 2.0 mL：溶媒 1.0 mL）し、50.0 mg/mL の溶液を調製し、さらにこれを公比 1.25（各濃度の被験液 2 mL：溶媒 0.50 mL）で順次 4 段階希釈し、40.0、32.0、25.6 及び 20.5 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では 40.0、32.0、25.6 及び 20.5 mg/mL の被験液を、非代謝活性化では 75.0、60.0、48.0 及び 38.4 mg/mL の被験液を用いた。

2.2.2 調製頻度

使用時に調製した。

2.2.3 被験液の安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液の安定性情報とした。

2.3 対照物質

2.3.1 陰性対照物質

溶媒である DMSO を陰性対照とした。

2.3.2 陽性対照物質

1) シクロfosファミドとマイトマイシン C を、S9 による代謝活性化系と非代謝活性化系の陽性対照としてそれぞれ用いた。

(1) シクロfosファミド (以下 CP と略記する)

ロット番号 : SDP4062
製造元 : 和光純薬工業株式会社
純度 : 生化学用 (97.0%以上)
保存条件 : 冷蔵、遮光

(2) マイトマイシン C (以下 MMC と略記する)

ロット番号 : 498AFJ、500AFJ
製造元 : 協和醗酵工業株式会社
力価 : 2 mg (力価) / 瓶
保存条件 : 室温、遮光

2) 調製方法

染色体異常試験の短時間処理法代謝活性化では、CP 0.0140 g をプラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K7B93) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度 : 14 µg/mL) を調製した。染色体異常試験の短時間処理法非代謝活性化では、MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K7B93) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 µg/mL)。

確認試験 (短時間処理法代謝活性化) では、CP 0.0140 g をプラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K7B93) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度 : 14 µg/mL) を調製した。確認試験 (短時間処理法非代謝活性化) では、MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K7B93) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 µg/mL)。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

3) 陽性対照物質の選択理由

前述の遺伝毒性試験法ガイドラインに使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

2.4 使用細胞株

2.4.1 供試哺乳類培養細胞

哺乳類の培養細胞（チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞、CHL/IU 細胞株）を用いた。2004年11月2日にヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。入手後、液体窒素中で保存した細胞の一部を融解後、継代培養し、後述（5.4.4）する細胞の性状検査を実施し、性状などが適正であることを定期的に確認した後に試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では23継代、染色体異常試験の短時間処理法では25継代、確認試験（短時間処理法）では9継代であった。

2.4.2 細胞の選択理由

本細胞株は、自然発生の染色体異常出現率が低く、種々の化学物質に対して感受性が高いことから哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験に広く用いられており、背景データも多いことから本試験に用いる細胞株として選択した。

2.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂濃度5%、温度37°C、高湿度条件下で培養した。継代は1~4日ごとに行った。

2.4.4 細胞の性状検査

細胞の性状は、モード数が25本、倍加時間が18.7時間（継代数3の時点）であり、細胞形態には問題のないことを確認した。また、細胞はマイコプラズマ陰性であることを確認した。

2.5 S9 mix 及び培養液の調製

2.5.1 S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社よりS9を購入し、自家調製を行ったコファクターと用時に混合してS9 mixを調製した。本試験に用いたS9の製品分析書に示された情報、保存条件、使用期限、コファクターの保存条件、使用期限及びS9 mixの組成は以下の通りである。

1) S9

名称	: S9
ロット番号	: 07061503
製造日	: 2007年6月15日
種・系統	: ラット・SD系
性	: 雄
週齢	: 7週齢
誘導物質	: フェノバルビタール (PB) 及び5,6-ベンゾフラボン (BF)
投与経路	: 腹腔内
投与期間及び投与量	: PB 4日間 30+60+60+60 mg/kg body weight BF 1日 80 mg/kg body weight

Appendix 3

保存条件 : 冷凍 (超低温フリーザー)
使用期限 : 2007年12月14日 (製造後6箇月)

2) 補酵素

名称 : コファクター
ロット番号 : 070929
調製日 : 2007年9月29日
保存方法 : 冷凍 (超低温フリーザー)
使用期限 : 2008年3月28日 (調製後6箇月)

3) S9 mix の組成

S9	2 mL	
補酵素	4.7 mL	
20 mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2)		1.34 mL
50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液		0.67 mL
330 mmol/L 塩化カリウム水溶液		0.67 mL
50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液		0.67 mL
40 mmol/L 酸化型ニコチンアミドアデニン ジヌクレオチドリン酸(NADP)水溶液		0.67 mL
精製水		0.67 mL

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と同様になるように各成分の必要量を秤取し、精製水に溶解、pH調整、濾過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

2.5.2 細胞培養液

培養液は、非働化 (56°C, 30分) した牛血清を 10 vol% 添加した Eagle's Essential Medium (GIBCO™, Cat.No. 11095-072、11095-080、Invitrogen Co.)を用いた。調製後の培養液(BS-MEM)は冷蔵保存した。

1) 牛血清 (BS)

ロット番号 : 571834
製造元 : Invitrogen Corporation
保存条件 : 冷凍 (-80°Cの冷凍庫)

2) MEM (Minimum Essential Medium, 1×Liquid)

ロット番号 : 281601
製造元 : Invitrogen Corporation
保存条件 : 冷蔵

2.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。なお、確認試験において陽性結果が得られたため、連続処理法は実施しなかった。

- 1) 細胞増殖抑制試験
 - (1) 短時間処理法：代謝活性化及び非代謝活性化
 - (2) 連続処理法：24時間処理及び48時間処理
- 2) 染色体異常試験
 - (1) 短時間処理法：代謝活性化及び非代謝活性化
- 3) 確認試験
 - (1) 短時間処理法：代謝活性化及び非代謝活性化

2.6.1 識別方法

個々の培養は、試験番号及びコード化した処理番号を明記したラベルで識別した。個々の染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した番号及びスライド枝番号を明記したラベルで識別した。

2.6.2 用量の設定

2.6.2.1 細胞増殖抑制試験

最高用量を750 µg/mLとし、以下公比2で希釈した375、188、93.8、46.9、23.4、11.7及び5.86 µg/mLの計8用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2.6.2.2 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では375 µg/mLで、非代謝活性化では750 µg/mLで、連続処理法の24時間処理では375 µg/mL及び48時間処理では750 µg/mLで、それぞれ50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。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 µg/mL、非代謝活性化では551.5 µg/mL、連続処理法の24時間処理では367.8 µg/mL、48時間処理では517.9 µg/mLであった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「細胞増殖が明らかに50%以上抑制される用量」として、短時間処理法の代謝活性化では375 µg/mL、非代謝活性化では750 µg/mLを最高用量として、以下、公比2で希釈した計4用量を設定した。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。なお、連続処理法は、用量の設定は行なったが、確認試験(短時間処理法)において陽性と判定されたため、実施しなかった。

2.6.2.3 確認試験

確認試験(短時間処理法)では、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400 µg/mLを最高用量とし、以下公比1.25で希釈した320、256及び205 µg/mLの計4用量を、非代謝活性化では750 µg/mLを最高用量とし、以下公比1.25で希釈した600、480及び384 µg/mLの計4用量をそれぞれ設定した。

2.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として実施した。

2.6.3.1 短時間処理法

- 1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- 3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- 4) 培養終了後、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

2.6.3.2 連続処理法

- 1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- 3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

2.6.4 染色体異常試験

2.6.4.1 短時間処理法

- 1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- 3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- 4) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.100 mL 加えた。培養終了後、0.25% トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所へ滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2% ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- 5) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2.6.5 確認試験

2.6.5.1 短時間処理法

- 1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常

のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL (最終濃度: 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL (最終濃度: 0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。

- 3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- 4) 各群 2 枚のプレート (枝番号-1 及び-2) について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド (デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社) を 0.100 mL 加えた。培養終了後、0.25% トリプシン溶液 (Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.) で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール: 酢酸=3:1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所へ滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2% ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。
- 5) 残る各群 2 枚のプレート (枝番号-3 及び-4) は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した (培養終了時の結果は、参考データとしよう)。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2.6.6 染色体標本の観察

顕微鏡下で各濃度当たり 200 個 (プレート当たり 100 個) のよく広がった分裂中期像について構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の数も記録した。なお、客観的に観察するため染色体標本はすべて盲検法により観察した。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とする。

2.6.7 染色体異常の分類

染色体異常の種類は以下のように分類した。

2.6.7.1 構造異常

ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体または染色分体の同軸上に断片があるもの (非染色部分が染色分体の同軸上にある) であって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染

- 色部位が認められるものとした。
- 染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸上からはずれているもの、及び非染色部位が染色分体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものとした。
- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものとした。
- 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化 (frg) 他。

2.6.7.2 数的異常

倍数性 : polyploidy (endoreduplication を含む)。

2.6.8 判定基準

判定は石館らの基準¹⁾に従い、染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率 (%) によって被験物質の染色体異常誘発性を次のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5% 未満	陰 性 (-)
5%以上 10%未満	疑陽性 (±)
10%以上	陽 性 (+)

構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合 (TAG) と含まない場合 (TA) とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を、被験物質の染色体異常誘発性陽性と判定した。

なお、判定に際しては統計学的手法を用いなかった。

3. 試験結果

3.1 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 375 µg/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 208.2 µg/mL であった。また、非代謝活性化では 750 µg/mL 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 551.5 µg/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、被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに認められなかった。

(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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに全ての用量で細胞の浮遊、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 375 µg/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 367.8 µg/mL であった。また、48 時間処理では 750 µg/mL 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 517.9 µg/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、被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに認められなかった。

(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 時間処理では 93.8 µg/mL 以上の濃度で、48 時間処理では 23.4 µg/mL 以上の濃度で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3.2 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、被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに認められなかった。

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、代謝活性化では 93.8 µg/mL 以上の濃度で、非代謝活性化では 188 µg/mL 以上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 375 µg/mL では 24.5%、188 µg/mL では 2.5%、93.8 µg/mL では 2.0% 及び 46.9 µg/mL では 0% と 375 µg/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、750 µg/mL では 10.5%、375 µg/mL では 0.5%、188 µg/mL では 0% 及び 93.8 µg/mL では 0.5% と 750 µg/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であった。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 375 µg/mL では 0.5%、188 µg/mL では 0.5%、93.8 µg/mL では 0% 及び 46.9 µg/mL では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。また、非代謝活性化においては、750 µg/mL では 0.5%、375 µg/mL では 1.0%、188 µg/mL では 0% 及び 93.8 µg/mL では 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

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であった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

3.3 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。また、被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化では認められなかったが、非代謝活性化では、750 µg/mL で被験物質と思われる物質のシャーレ底面への固着が認められた。

2) 培養液交換前の培養状態の観察

代謝活性化では、析出は認められなかったが、非代謝活性化では、750 µg/mL で被験物質と思われる物質のシャーレ底面への固着が認められた。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ともに全ての用量で細胞の浮遊、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、代謝活性化では400 µg/mL では19.0%、320 µg/mL では11.5%、256 µg/mL では2.5%及び205 µg/mL では1.0%と400及び320 µg/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、750 µg/mL では0.5%、600 µg/mL では0.5%、480 µg/mL では0.5%及び384 µg/mL では0%と陰性の判定基準である5%未満であった。

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400 µg/mL では0.5%、320 µg/mL では0.5%、256 µg/mL では1.0%及び205 µg/mL では0.5%と陰性の判定基準である5%未満であった。非代謝活性化では750 µg/mL では1.0%、600 µg/mL では0.5%、480 µg/mL では0%及び384 µg/mL では1.0%と陰性の判定基準である5%未満であった。

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。

4. 考察及び結論

本被験物質は、染色体異常試験 短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化において、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) が、最高用量でのみ陽性の判定基準である 10%以上を示した。そのため、陽性を示した近傍の用量を最高用量として確認試験を実施したところ、代謝活性化では、TA 値に用量依存的な増加傾向が認められた。また、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。これらの結果より、本被験物質は代謝活性化の条件下において染色体構造異常の誘発性があるものと考えられた。なお、短時間処理法の代謝活性化における、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 0.30 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 48 であった。

一方、本被験物質は、全ての処理法において倍数体細胞の出現率を全く増加させなかったことから、染色体数的異常の誘発性はないものと考えられた。

各処理法の陰性対照群における染色体の構造異常及び倍数体の出現率は全て陰性の判定基準内であった。更に、各処理法の陽性対照群における染色体構造異常の出現率は全て陽性の判定基準を超え顕著な誘発が認められた。従って試験は適切に実施されたものと考えられた。

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。

5. 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), 日本化粧品科学会誌, **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

Azoxybenzene のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：A717（079-402）

要 約

Azoxybenzene 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、Azoxybenzene 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 33.3, 62.5 および 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ならびに同+S9 処理で 7.81, 15.6 および 31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、Azoxybenzene 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、Azoxybenzene 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。

Appendix 4

1. 表題

Azoxybenzene 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，環境企発第 031121002 号）

4. 試験番号

A717（079-402）

5. 被験物質

5.1. 被験物質名

Azoxybenzene

5.2. ロット番号

SDP6746

5.3. 純度／含量

製造元で測定されていない。

5.4. 規格

化学用

5.5. 製造元

和光純薬工業株式会社

5.6. 保存条件

遮光，気密，冷蔵（2～8° C）

5.7. 化学名

Azoxybenzene

5.8. CAS No.

495-48-7

5.9. 分子式

$C_{12}H_{10}N_2O$

5.10. 分子量

198.22

5.11. 物質の状態

形状：結晶～結晶性粉末および塊

色：うすい黄色～黄褐色

5.12. 融点

36.8° C

5.13. 溶解性

エタノールに溶け、水にほとんど溶けない。

5.14. 安定性

光により変質する。

日光、熱、強酸化剤との接触を避ける。

5.15. 取り扱い上の注意

保護眼鏡、保護手袋・保護マスク着用し、局所排気装置を使用する。

5.16. 残余被験物質の処理

被験物質に残余を、専用の容器（安全廃棄システム、NALGENE®）に廃棄した。

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、純度 99.7%以上、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 代の細胞を、染色体異常試験では継代数 16 代の細胞を用いた。

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（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、使用時まで冷蔵所（15°C 以下）に保存された。

6.3. 培養条件

Appendix 4

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。

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°C、基準値：-60°C 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