

本写しは原本と相違ありません

最終報告書

硫化亜鉛のは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号：B000874)

2001 年 4 月 6 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

陳述書

試験委託者： 経済産業省（旧通商産業省） 製品評価技術センター

表 題： 硫化亜鉛のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号： B000874

本試験は、下記の基準に従い実施したものである。

OECD Principles of Good Laboratory Practice, Decision of the council concerning mutual acceptance of data in the assessment of chemicals (1997)

試験責任者： 2001 年 4 月

株式会社三菱化学安全科学研究所

鹿島研究所 応用生物研究部

信頼性保証証明書

株式会社 三菱化学安全科学研究所
鹿島研究所

試験委託者：経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センター

表 題：硫化亜鉛のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：B000874

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを下記の通り確認した。


2001 年 4 月 6 日

調査内容	実施者	実施日	試験責任者 への報告日	運営管理者 への報告日
試験計画書	最終版	2000年11月21日	2000年11月21日	2000年11月21日
試験計画書変更書	(1)草案	2001年3月6日	2001年3月6日	2001年3月6日
	(1)最終版	2001年3月7日	2001年3月7日	2001年3月7日
試験実施状況	染色体異常試験(標本作製)	2000年12月5日	2000年12月5日	2000年12月5日
	被験物質の調製	2000年12月11日	2000年12月13日	2000年12月18日
生データ・報告書草案		2001年3月21日 ~2001年3月22日	2001年3月22日	2001年3月23日
最終報告書		2001年4月6日	2001年4月6日	2001年4月6日

目次

試験実施概要	1
試験責任者署名	3
要約	4
材料および方法	5
1. 試験物質	5
2. 細胞	6
3. 培地	6
4. S9 mix	7
5. 試験方法	7
6. 結果のまとめ	12
結果	13
考察および結論	15
参考文献	16
特記事項	17
表 1 染色体異常試験の結果（短時間処理法）[本試験 2]	18
表 2 染色体異常試験の結果（連続処理法）[本試験 2]	19
表 3 染色体異常試験の結果（連続処理法）[確認試験]	20
図 1 硫化亜鉛の細胞毒性（短時間処理法・－S9 mix）	21
図 2 硫化亜鉛の細胞毒性（短時間処理法・＋S9 mix）	21
図 3 硫化亜鉛の細胞毒性（連続処理法・24 時間処理）	22
図 4 硫化亜鉛の細胞毒性（連続処理法・48 時間処理）	22
図 5 硫化亜鉛の構造異常細胞出現頻度（短時間処理法）	23
図 6 硫化亜鉛の数的異常細胞出現頻度（短時間処理法）	23
図 7 硫化亜鉛の構造異常細胞出現頻度（連続処理法）	24
図 8 硫化亜鉛の数的異常細胞出現頻度（連続処理法）	24
写真	25
添付資料	26

試験実施概要

1. 表 題： 硫化亜鉛のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
(試験番号：B000874)
2. 試験目的： 硫化亜鉛のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性を検討する。
3. 適用ガイドライン：
OECD Guideline for Testing of Chemicals (No. 473, 1997)
4. 適用 G L P： OECD Principles of Good Laboratory Practice, Decision of the council concerning mutual acceptance of data in the assessment of chemicals (1997)
5. 試験委託者： 経済産業省（旧通商産業省） 製品評価技術センター
東京都渋谷区西原二丁目 49 番 10 号
6. 試験受託者： 株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設： 株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県鹿島郡波崎町砂山 14 番地
8. 試験責任者： 
株式会社三菱化学安全科学研究所
鹿島研究所 応用生物研究部
茨城県鹿島郡波崎町矢田部 4098 番 21 号

9.

10. 試験日程：試験開始 2000 年 11 月 21 日
実験開始 2000 年 11 月 24 日
実験終了 2001 年 2 月 28 日
試験終了 2001 年 4 月 6 日


11. 保 存：試験計画書，生データ，標本，記録文書および最終報告書は，鹿島研究所の保存施設に保存する。ただし，保存期間は最終報告書作成後 10 年間とし，以後の保存は試験委託者と協議の上，決定する。

試験責任者署名

試験委託者： 経済産業省（旧通商産業省） 製品評価技術センター

表 題： 硫化亜鉛のは乳類培養細胞を用いた染色体異常試験

試験番号： B000874



株式会社三菱化学安全科学研究所
鹿島研究所 応用生物研究部

要約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い、硫化亜鉛の *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

予備試験の結果に基づいて、細胞増殖抑制試験は、短時間処理法の S9 mix 非共存下（以下 -S9 mix）と、連続処理法の 24 時間処理（以下 24 時間処理）および 48 時間処理（以下 48 時間処理）では 313, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ を、短時間処理法の S9 mix 共存下（以下 +S9 mix）では 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ を設定した。その結果、被験物質の 50%細胞増殖抑制用量は、+S9 mix では 1305 $\mu\text{g/mL}$ 、24 時間処理では 2500 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 1389 $\mu\text{g/mL}$ であった。一方、-S9 mix では、いずれの用量においても 50%以上の細胞増殖抑制が認められなかった。

この結果に基づき、染色体異常試験（本試験 1）は、-S9 mix では 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ を、+S9 mix および 48 時間処理では 313, 625, 1250, 2500 $\mu\text{g/mL}$ を、24 時間処理では 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ を設定した。本試験 1 の細胞増殖率測定の結果、いずれの処理条件においても、細胞増殖抑制試験と比較して細胞増殖率が高く、+S9 mix および 48 時間処理の最高用量では 50%以上の細胞増殖抑制が認められなかった。

このため、-S9 mix では 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ を、+S9 mix および 48 時間処理では 313, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ を、24 時間処理では 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ を設定して再試験（本試験 2）を実施した。本試験 2 の標本観察の結果、染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は、24 時間処理の 2500 $\mu\text{g/mL}$ において 6.0%，48 時間処理の 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ においてそれぞれ 8.0, 10.0, 6.0% であった。

そこで、これらの結果の再現性ならびに用量依存性を確認するため、24 時間処理および 48 時間処理で 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ を設定し、確認試験を実施した。確認試験の標本観察の結果、染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は、48 時間処理の 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ においてそれぞれ 9.0, 8.5, 6.5% であり、染色体数的異常誘発の再現性が確認された。

なお、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は、本試験および確認試験のいずれの用量においても 5%未満であった。

従って、硫化亜鉛は、本試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常（数的異常）誘発性を有すると結論した。

材料および方法

1. 試験物質

1.1 被験物質

(1) 被験物質

経済産業省(旧通商産業省) 製品評価技術センターから提供された硫化亜鉛(製造元: ██████████ CAS番号: 1314-98-3, ロット番号: ██████████ 純度: 98.1%)を冷蔵, 暗所に気密で保存し, 使用した. 被験物質の組成および物理化学的性質は以下の通りである.

被験物質の安定性は, 通常の使用においては安定である(関東化学(株)MSDS[平成10年]による)ため, 確認しなかった.

示性式: ZnS

常温における性状: 微緑～白色の粉末

融点: 1180°C で昇華する

沸点: 昇華

溶解性: 水に $0.688 \text{ mg}/100\text{mL}$ (18°C)で溶解, ジメチルスルホキシドに $50 \text{ mg}/\text{mL}$ で不溶, 希塩酸, 希硫酸に溶解

(2) 被験物質懸濁液の調製

溶媒検討の結果, 本被験物質は局方生理食塩液(以下生食)に $50 \text{ mg}/\text{mL}$ で不溶であった. ジメチルスルホキシド(以下DMSO)には $500 \text{ mg}/\text{mL}$, アセトンには $250 \text{ mg}/\text{mL}$ でそれぞれほぼ均一に懸濁したが, 調製容器壁への付着が著しかった. 1%カルボキシメチルセルロースナトリウム(以下CMC-Na)水溶液には $50 \text{ mg}/\text{mL}$ でほぼ均一に懸濁し, 調製容器壁への付着は少なかった. これらの結果から, 本被験物質の溶媒には1%CMC-Na水溶液を用いた.

被験物質を1%CMC-Na水溶液に所定濃度で懸濁した. これを同じ溶媒で希釈し, 所定濃度の被験物質懸濁液を調製した. 被験物質懸濁液は全て用時調製とした.

1.2 陰性対照物質(溶媒)

CMC-Na(ナカライテスク(株), ロット番号 M0B1469; 1%水溶液として使用した.)

1.3 陽性対照物質

(1) 陽性対照物質

マイトマイシン C(以下 MMC, 協和発酵工業(株), ロット番号 317AJD, 含量 100%)

ベンゾ [a] ピレン (以下 BP, 東京化成工業(株), ロット番号 GG01, 含量 95.6%)

(2) 陽性対照物質液の調製

MMC を, 生食 (株)大塚製薬工場, ロット番号 K0E98[本試験 1, 確認試験], K0C97[本試験 2]) に 0.5 mg/mL で溶解した. これを生食で希釈し, 短時間処理法では 1 μ g/mL 溶液 (処理液中最終用量: 0.1 μ g/mL), 連続処理法では 0.3 μ g/mL 溶液 (処理液中最終用量: 0.03 μ g/mL) を調製した. MMC 溶液は全て用時調製とした.

BP を, DMSO (関東化学(株), ロット番号 204G1360) に 4 mg/mL (処理液中最終用量: 20 μ g/mL) で溶解し, 凍結保存した. これを使用直前に融解した.

2. 細胞

2000 年 7 月 25 日に大日本製薬(株)から購入した雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を使用した. この細胞は, 染色体数のモードが 25 本と少なく, 染色体が比較的大きいため標本観察が容易である等の利点があり, 培養細胞を用いる染色体異常試験で広く使用されている.

細胞は, 細胞懸濁液に対し最終 10%の割合で DMSO (関東化学(株), ロット番号 204G1360) を添加したものを 1 mL に小分けし, 液体窒素中で凍結保存した. 試験には, これを融解して培養し, 融解後の継代数が 5 代以内のものを使用した. 細胞の培養には, プラスチックプレート (直径 6 cm または 10 cm ; Becton Dickinson and Company) を用い, 炭酸ガス細胞培養装置内 (炭酸ガス 5%, 温度 37℃に設定, 加湿, NAPCO 社, 7300 型) で培養した.

3. 培地

3.1 MEM

イーグル MEM 培地「ニッスイ」① (日水製薬(株)) 約 8.3 g を精製水 880 mL に溶解し, オートクレーブ滅菌 (121℃, 15 分間) 後, 別に滅菌処理した 2.92% L-グルタミン水溶液と 10%炭酸水素ナトリウム水溶液をそれぞれ 8.8 mL, 11.2 mL 添加した.

この溶液を以下 MEM とする.

3.2 培養液

MEM 900 mL に, 非働化 (56℃, 30 分間加熱処理) した仔牛血清 (GIBCO BRL, ロット番号 1027934) を 100 mL 添加した.

4. S9 mix

4.1 S9

フェノバルビタール (1 日目 30 mg/kg, 2 日目以降 60 mg/kg を 1 日 1 回 3 日間腹腔内投与) と 5,6-ベンゾフラボン (3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与) で酵素誘導した SD 系雄ラット肝由来 S9 (キッコーマン㈱, ロット番号 RAA-433, 2000 年 9 月 29 日製造) を購入した. 購入した S9 は使用時まで -80℃ 以下に設定した超低温冷凍庫で保存した.

4.2 S9 mix

S9 mix 1 mL あたり以下の組成で用時調製し, 使用時まで水中に保存した.

S9	0.3 mL
D-グルコース-6-リン酸	5 μ mol
β -NADP ⁺	4 μ mol
HEPES (pH 7.2)	4 μ mol
塩化マグネシウム六水和物	5 μ mol
塩化カリウム	33 μ mol
精製水	残量

5. 試験方法

5.1 細胞増殖抑制試験

(1) 被験物質用量

細胞増殖抑制試験に先立ち, -S9 mix, +S9 mix および 24 時間処理, 48 時間処理で 50, 500, 5000 μ g/mL で予備試験を実施した. 1 用量あたり 1 枚のプレートを用い, 細胞の状態を位相差倒立顕微鏡を用いて観察した.

その結果, 陰性対照と比較した細胞生存率 (目測値) は下記の通りであった.

処理群 \ 用量 ($\mu\text{g/mL}$)	50	500	5000
- S9 mix	100 %	100 %	80 %
+ S9 mix	100 %	50 %	30 %
24時間処理	100 %	80 %	20 %
48時間処理	100 %	80 %	20 %

以上の結果から、細胞増殖抑制試験は、下記の用量を設定した。

- S9 mix : 313, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$

+ S9 mix : 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$

24時間処理 : 313, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$

48時間処理 : 313, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$

(2) 細胞処理

4×10^3 個/mL に調製した細胞懸濁液を 6 cm プレートに 5 mL ずつ播き、3 日間前培養した。

培養液を除去した後、下記の組成の細胞処理液を 1 用量あたり 2 枚のプレートに加えた。陰性対照として、溶媒も各条件で同様に処理した。短時間処理法では 6 時間細胞を処理後、MEM で細胞表面を 3 回洗浄し、新しい培養液 5 mL でさらに 18 時間培養した。連続処理法 24 時間処理群では 24 時間、連続処理法 48 時間処理群では 48 時間細胞を処理した。

	被験物質懸濁液 または陰性対照物質	S9 mix	培養液
- S9 mix	0.3 mL	—	2.7 mL
+ S9 mix	0.3 mL	0.5 mL	2.2 mL
連続処理法	0.5 mL	—	4.5 mL

(3) 細胞増殖率の測定

細胞表面を Ca^{2+} 、 Mg^{2+} フリーのリン酸緩衝液（以下 PBS(-)、ダルベッコ PBS「ニッスイ」、日水製薬(株)）で洗浄後、0.25% トリプシン処理し、培養液を加えて細胞を剥離した後、血球計算盤で細胞を計数した。

(4) 50%細胞増殖抑制用量の算出

各処理条件について、陰性対照値を 100%として生存曲線を作成し、被験物質の 50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) を算出した。

5.2 染色体異常試験 (本試験 1, 2)

(1) 被験物質用量および陽性対照物質用量

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、染色体異常試験 (本試験 1) は下記の用量を設定した。

－S9 mix : 1250, 2500, 5000 μ g/mL

＋S9 mix : 313, 625, 1250, 2500 μ g/mL

24 時間処理 : 625, 1250, 2500, 5000 μ g/mL

48 時間処理 : 313, 625, 1250, 2500 μ g/mL

本試験 1 の細胞増殖率測定の結果、いずれの処理条件においても、細胞増殖抑制試験と比較して細胞増殖率が高く、＋S9 mix および 48 時間処理の最高用量では 50%以上の細胞増殖抑制が認められなかった。

この結果に基づき、被験物質懸濁液調製時または細胞処理時における操作上の誤りがあった可能性を考慮して、下記の用量で再試験 (本試験 2) を実施した。

－S9 mix : 1250, 2500, 5000 μ g/mL

＋S9 mix : 313, 625, 1250, 2500, 5000 μ g/mL

24 時間処理 : 625, 1250, 2500, 5000 μ g/mL

48 時間処理 : 313, 625, 1250, 2500, 5000 μ g/mL

陽性対照物質の処理液中最終用量は、短時間処理法－S9 mix では MMC 0.1 μ g/mL, ＋S9 mix では BP 20 μ g/mL, 連続処理法では MMC 0.03 μ g/mL とした。いずれも、染色体異常誘発性が知られている用量である。

(2) 細胞処理

細胞増殖抑制試験と同様に細胞を処理した。

陽性対照については、下記の組成の細胞処理液で同様に細胞を処理した。

	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	培養液
－ S9 mix	0.3 mL	—	—	2.7 mL
＋ S9 mix	—	0.015 mL	0.5 mL	2.5 mL
連続処理法	0.5 mL	—	—	4.5 mL

(3) 標本作製

短時間処理法（本試験 1, 2）および連続処理法（本試験 1）については、処理終了の 2 時間前にコルセミドを最終用量が $0.1 \mu\text{g/mL}$ となるように加え、分裂中期細胞を蓄積した。連続処理法（本試験 2 および確認試験）については、処理終了後 MEM で細胞表面を 3 回洗浄し、新しい培養液 5 mL を加えた後、上記の用量でコルセミドを加え、さらに 2 時間処理した。いずれの場合も、コルセミド処理終了後、細胞表面を PBS(-) で洗浄し、0.25% トリプシン処理にて細胞を剥離した後、遠心管に回収し、遠心分離（1000 rpm, 5 分間；以下同様）により細胞を集めた。上清を除去し、各遠心管に 0.075 M 塩化カリウム溶液 4 mL を加えて低張処理（37℃, 15 分）を行った。次に、冷却したメタノール・酢酸（3:1v/v）混合液（固定液）0.5 mL を加え細胞を半固定した後、遠心分離し、上清を除去した。さらに、同固定液 4 mL を加え、同様の操作を 2～3 回繰り返した。その後、適量の固定液で細胞を懸濁させ、濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスに 2 箇所滴下して乾燥した。これを 3% ギムザ溶液で 20 分間染色し、水洗、乾燥後、封入して観察標本とした。なお、標本は、各プレートにつき 2 枚作製した。

(4) 細胞増殖率の測定

標本作製と同時期における細胞増殖率の測定を実施した。標本作製時にトリプシン処理にて剥離した細胞の一部を採取し、血球計算盤で細胞を計数した。

(5) 観察

(a) 予備鏡検

標本作製後、試験の適否確認のため予備鏡検を行い、各プレートから作製した 2 枚の標本における分裂中期細胞の有無を確認した。また、陰性対照群および陽性対照群については、構造異常細胞の有無が適切であることを確認した。

(b) 構造異常および数的異常

標本はすべてをコード化し、プレート 1 枚につき 100 個、すなわち 1 用量

200 個の分裂中期細胞を盲検法で観察した。分裂中期細胞は、染色体がよく拡がった細胞を観察した。染色体数が 25 ± 2 本または 35 本以上でない細胞は観察対象から除外した。

構造異常は、以下の分類¹⁾に従った。

染色体型切断
染色体型交換
染色体型切断
染色体型交換 (二動原体, 環状染色体など)
断片化

ギャップは、染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした。他の異常と区別して記録し、構造異常には含めなかった。

数的異常は、染色体数が 35 本以上のものとした。核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた。

(6) 試験結果の判定基準

染色体異常試験において、下記の条件をいずれも満たしている場合、試験成立とした。

(1)すべての陰性対照群において、構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度が共に 5%未満である。

(2)すべての陽性対照群において、構造異常細胞の出現頻度が 10%以上である。

構造異常を 1 個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし、ギャップのみをもつ細胞を除いて集計した。

被験物質の染色体異常誘発性の判定は、各処理条件において、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に 5%未満を陰性 (−), いずれか一方または両方が 5%以上 10%未満を疑陽性 (±), いずれか一方または両方が 10%以上を陽性 (+) とした。

結果が疑陽性の場合または用量依存性が認められない場合は、確認試験を実施した。確認試験の結果、再現性が認められた場合は陽性と判定し、再現性が認められない場合は陰性と判定した。

結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

5.3 染色体異常試験 (確認試験)

本試験の結果から、連続処理法の結果の再現性ならびに用量依存性を確認するため、下記の用量で確認試験を実施した。

24 時間処理：1250, 2500, 5000 μ g/mL

48 時間処理：1250, 2500, 5000 μ g/mL

試験方法は、本試験に準じた。

6. 結果のまとめ

染色体構造異常および数的異常をもつ細胞の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度（％）を表示した。染色体構造異常は種類別に細胞数を表示した。また、細胞増殖抑制試験および染色体異常試験における用量依存性について図示した。

結果

細胞増殖抑制試験の結果を図 1～4 に、染色体異常試験の結果を表 1～3 および図 1～8 に示す。

細胞増殖抑制試験の結果、被験物質の 50%細胞増殖抑制用量は、+S9 mix では $1305 \mu\text{g/mL}$ 、24 時間処理では $2500 \mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では $1389 \mu\text{g/mL}$ であった。-S9 mix では、いずれの用量においても 50%以上の細胞増殖抑制が認められなかった。

本試験 1 の細胞増殖率測定の結果、いずれの処理条件においても、細胞増殖抑制試験と比較して細胞増殖率が高く、+S9 mix および 48 時間処理の最高用量では 50%以上の細胞増殖抑制が認められなかった。この結果に基づき、被験物質懸濁液調製時または細胞処理時における操作上の誤りがあった可能性を考慮して、再試験（本試験 2）を実施した。

なお、本試験 1 の標本封入実施前に、本試験 2 の実施を決定した。よって、本試験 1 の標本については、予備鏡検および観察を実施しなかった。ただし、本試験 1 の連続処理法の標本の状態を顕微鏡観察により確認したところ、被験物質と思われる物質が全面に多量に付着し、染色体の観察が困難であった。よって、本試験 2 以降の連続処理法では、コルセミド処理の前に MEM による洗浄を実施することとした（5.2 (3)項参照）。

本試験 2 の細胞増殖率測定の結果、細胞増殖抑制試験と同等またはそれ以上の細胞増殖抑制が認められた。このため、本試験 2 における被験物質懸濁液調製および細胞処理は、適切に実施されたものと判断した。

本試験 2 の予備鏡検の結果、すべての用量でプレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため、すべてのプレートの標本を観察の対象とした。

本試験 2 の標本観察の結果、染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は、24 時間処理の $2500 \mu\text{g/mL}$ において 6.0%、48 時間処理の 1250, 2500, $5000 \mu\text{g/mL}$ においてそれぞれ 8.0, 10.0, 6.0%であった。

確認試験の予備鏡検の結果、すべての用量でプレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため、すべてのプレートの標本を観察の対象とした。

確認試験の標本観察の結果、染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は、48 時間処理の 1250, 2500, $5000 \mu\text{g/mL}$ においては、それぞれ 9.0, 8.5, 6.5%であった。一方、24 時

間処理では、いずれの用量においても5%未満であった。

・なお、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は、本試験および確認試験のいずれの被験物質処理群においても5%未満であった。

本試験1, 2 および確認試験のいずれの処理条件においても、被験物質処理終了時（短時間処理法では6時間処理終了時）に、培養液中に沈殿および浮遊した被験物質が認められた。

すべての陰性対照群における染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は5%未満であった。すべての陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は10%以上であった。この結果は、5.2(6)項に示した条件を満たすことから、試験成立と判断した。また、これらの出現頻度は、背景データ（添付資料）の範囲内の値であった。

考察および結論

硫化亜鉛の染色体異常誘発性を検討するため、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

その結果、染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は、24 時間処理の 2500 μ g/mL において 6.0%，48 時間処理の 1250, 2500, 5000 μ g/mL においてそれぞれ 8.0, 10.0, 6.0% であった。

確認試験の結果、染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は、48 時間処理の 1250, 2500, 5000 μ g/mL において、それぞれ 9.0, 8.5, 6.5% であり、染色体数的異常誘発の再現性が確認された。

一方、陰性対照群における染色体構造異常細胞出現頻度および陽性対照群における染色体構造異常細胞の出現頻度は、試験成立条件を満たし、かつ背景データ範囲内の値を示したことから、本試験が技術的に成立していることが示された。

従って、硫化亜鉛は、本試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常（数的異常）誘発性を有すると結論した。

参考文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会：“化学物質による染色体異常アトラス”
朝倉書店，東京，1988

特記事項

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

- (1) 試験計画書 8 ページ, 5.2 (3) 項において, 「処理終了の 2 時間前にコルセミドを最終用量が $0.1 \mu\text{g/mL}$ となるように加え…」と記載した。

しかし, 本試験 2 および確認試験における連続処理法では, 処理終了後 MEM で細胞表面を 3 回洗浄し, 新しい培養液 5 mL を加えた後, コルセミドを最終用量が $0.1 \mu\text{g/mL}$ となるように加え, さらに 2 時間処理した。

連続処理法においては処理終了時点で, 被験物質が培養液中に大量に沈殿, 浮遊していた。また本試験 1 の標本の状態を顕微鏡観察により確認したところ, 被験物質と思われる物質が全面に多量に付着し, 染色体の観察が困難であった。

よって, 本試験 2 以降の連続処理法では, コルセミド処理の前に MEM で洗浄し, 被験物質をできる限り除去することとした。

この操作変更は, より適切な標本作製するために実施したものであり, 試験成績の信頼性に悪影響は及ぼさなかったと考える。

- (2) 本試験 1 の細胞増殖率測定の結果, いずれの処理条件においても, 細胞増殖抑制試験と比較して細胞増殖率が高く, +S9 mix および 48 時間処理の最高用量では 50% 以上の細胞増殖抑制が認められなかった。この結果に基づき, 被験物質懸濁液調製時または細胞処理時における操作上の誤りがあった可能性を考慮して, 再試験 (本試験 2) を実施した。

この再試験は, 試験の信頼性を高めるために実施したものであり, 試験成績の信頼性に悪影響は及ぼさなかったと考える。

- (3) 確認試験の 24 時間処理において, MEM による洗浄をせずにコルセミドを添加した。このため, この試験については標本作製前に操作を中止し, 再試験を実施した。結果の評価には, 再試験のデータを採用した。

この再試験は, 上記(1)で述べた理由に基づいて, 適切な標本作製するために実施したものであり, 試験成績の信頼性に悪影響は及ぼさなかったと考える。

表 1 染色体異常試験の結果(短時間処理法)[本試験2]

被験物質の名称 酸化亜鉛

処理時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍數体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6-18	-	陰性対照 (CMC-Na)	100	1	0	0	0	0	1	0	95	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	105	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	1250 P	100	0	0	0	0	0	0	0	79	100	2	0	2
			100	0	0	0	0	0	0	1	102	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	90	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6-18	-	2500 P	100	1	0	0	0	0	1	0	51	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	39	100	2	0	2
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	45	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6-18	-	5000 P	100	0	0	0	0	0	0	1	16	100	5	0	5
			100	0	0	0	0	0	0	0	23	100	4	0	4
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	19	200	9 (4.5)	0 (0.0)	9 (4.5)
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	31	18	0	0	0	41	0	68	100	0	0	0
			100	18	19	0	0	0	32	0	73	100	0	0	0
			200	49 (24.5)	37 (18.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	73 (36.5)	0	71	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	101	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6-18	+	313 P	100	1	0	0	0	0	1	0	66	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	0	77	100	1	0	1
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	71	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6-18	+	625 P	100	1	0	0	0	0	1	0	51	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	54	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	53	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	1250 P	100	0	0	0	0	0	0	0	40	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	36	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	38	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	+	2500 P	100	1	0	0	0	0	1	0	21	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	1	25	100	1	0	1
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1	23	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	+	5000 P	100	0	0	0	0	0	0	0	11	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	8	100	3	0	3
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	10	200	4 (2.0)	0 (0.0)	4 (2.0)
6-18	+	陽性対照 (BP 20)	100	36	73	0	0	0	80	0	75	100	1	0	1
			100	25	63	0	0	0	70	0	60	100	0	0	0
			200	61 (30.5)	136 (68.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	150 (75.0)	0	68	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)

MMC:マイトマイシンC BP:ベンゾ[a]ピレン

CMC-Na:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

P:被験物質処理終了時(6時間処理終了時),培養液中に沈殿および浮遊した被験物質が認められた。

試験結果報告書の内容に関するお問い合わせには応じかねますので御了承下さい。

表 2 染色体異常試験の結果(連続処理法)[本試験2]

被験物質の名称 硫化亜鉛

処理時間(h)	被験物質の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数異常の細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍數体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24 - 0	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	109	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	91	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 - 0	625 P	100	0	0	0	0	0	0	0	71	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	76	100	1	0	1
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	73	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
24 - 0	1250 P	100	0	0	0	0	0	0	1	42	100	6	0	6
		100	0	0	0	0	0	0	0	29	100	1	0	1
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	35	200	7 (3.5)	0 (0.0)	7 (3.5)
24 - 0	2500 P	100	0	1	0	0	0	1	0	11	100	6	0	6
		100	0	0	0	0	0	0	0	13	100	6	0	6
		200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	12	200	12 (6.0)	0 (0.0)	12 (6.0)
24 - 0	5000 P	100	0	0	0	0	0	0	1	9	100	4	0	4
		100	0	0	0	0	0	0	0	5	100	2	0	2
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	7	200	6 (3.0)	0 (0.0)	6 (3.0)
24 - 0	陽性対照 (MMC 0.03)	100	11	7	0	0	0	18	0	66	100	0	0	0
		100	14	8	0	0	0	20	0	59	100	0	0	0
		200	25 (12.5)	15 (7.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	38 (19.0)	0	63	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48 - 0	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	102	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	98	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48 - 0	313 P	100	0	0	0	0	0	0	0	85	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	111	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	98	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
48 - 0	625 P	100	0	0	0	0	0	0	0	60	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	58	100	2	0	2
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	59	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
48 - 0	1250 P	100	0	0	0	0	0	0	0	14	100	8	0	8
		100	0	0	0	0	0	0	0	13	100	8	0	8
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	14	200	16 (8.0)	0 (0.0)	16 (8.0)
48 - 0	2500 P	100	2	0	0	0	0	2	0	4	100	10	0	10
		100	0	0	0	0	0	0	0	4	100	10	0	10
		200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	4	200	20 (10.0)	0 (0.0)	20 (10.0)
48 - 0	5000 P	100	0	0	0	0	0	0	0	3	100	8	0	8
		100	0	0	1	0	0	1	1	3	100	4	0	4
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	3	200	12 (6.0)	0 (0.0)	12 (6.0)
48 - 0	陽性対照 (MMC 0.03)	100	23	17	0	0	0	35	0	54	100	0	0	0
		100	25	21	1	0	0	41	0	64	100	0	0	0
		200	48 (24.0)	38 (19.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	76 (38.0)	0	59	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC CMC-Na:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

P:被験物質処理終了時、培養液中に沈殿および浮遊した被験物質が認められた。

表 3 染色体異常試験の結果(連続処理法)[確認試験]

被験物質の名称 硫化亜鉛

処理-回復 時間(h)	被験物質の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数の異常細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24 - 0	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	93	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	107	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 - 0	1250 P	100	0	0	0	0	0	0	0	25	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	0	31	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	28	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
24 - 0	2500 P	100	0	0	0	0	0	0	0	14	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	9	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	12	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 - 0	5000 P	100	0	0	0	0	0	0	0	7	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	3	100	2	0	2
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	5	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
24 - 0	陽性対照 (MMC 0.03)	100	16	5	0	0	0	21	2	78	100	0	0	0
		100	17	8	0	0	0	25	0	77	100	0	0	0
		200	33 (16.5)	13 (6.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	46 (23.0)	2	78	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48 - 0	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	98	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	102	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48 - 0	1250 P	100	0	0	1	0	0	1	0	57	100	9	0	9
		100	0	0	0	0	0	0	0	61	100	9	0	9
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	59	200	18 (9.0)	0 (0.0)	18 (9.0)
48 - 0	2500 P	100	1	0	0	0	0	1	1	19	100	8	0	8
		100	1	0	0	0	0	1	0	27	100	9	0	9
		200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1	23	200	17 (8.5)	0 (0.0)	17 (8.5)
48 - 0	5000 P	100	0	0	0	0	0	0	0	5	100	6	0	6
		100	0	0	0	0	0	0	0	3	100	7	0	7
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	4	200	13 (6.5)	0 (0.0)	13 (6.5)
48 - 0	陽性対照 (MMC 0.03)	100	20	15	0	0	0	33	0	54	100	1	0	1
		100	21	17	0	0	0	36	0	58	100	0	0	0
		200	41 (20.5)	32 (16.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	69 (34.5)	0	56	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)

MMC:マイトマイシンC CMC-Na:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

P:被験物質処理終了時、培養液中に沈殿および浮遊した被験物質が認められた。

図1 硫化亜鉛の細胞毒性
(短時間処理法・-S9 mix)

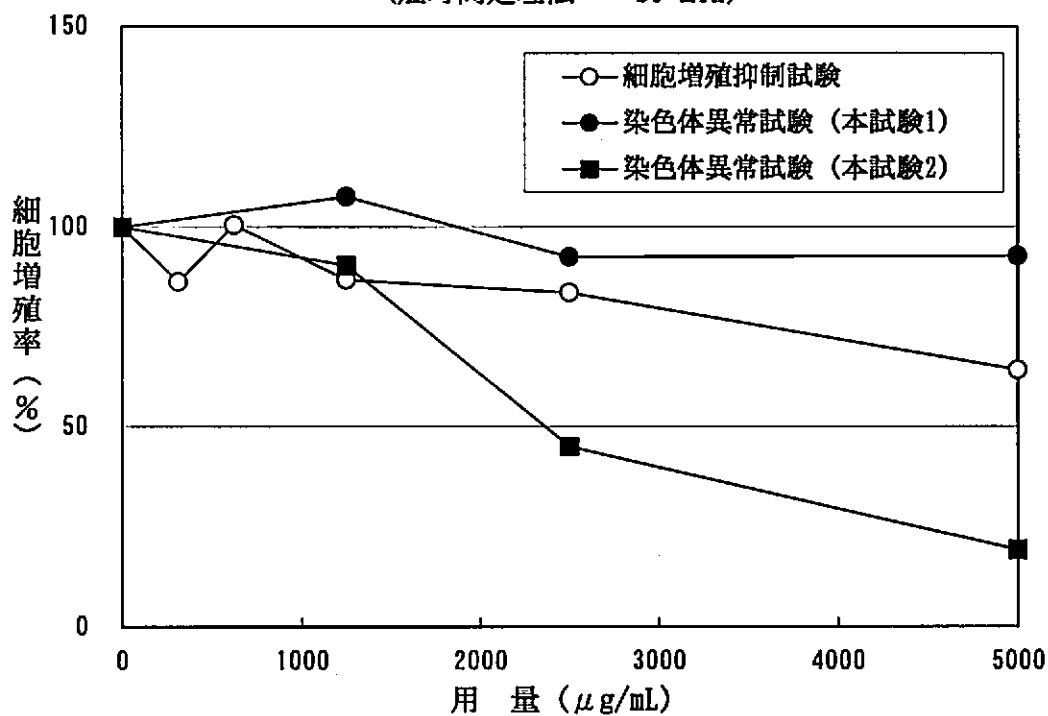


図2 硫化亜鉛の細胞毒性
(短時間処理法・+S9 mix)

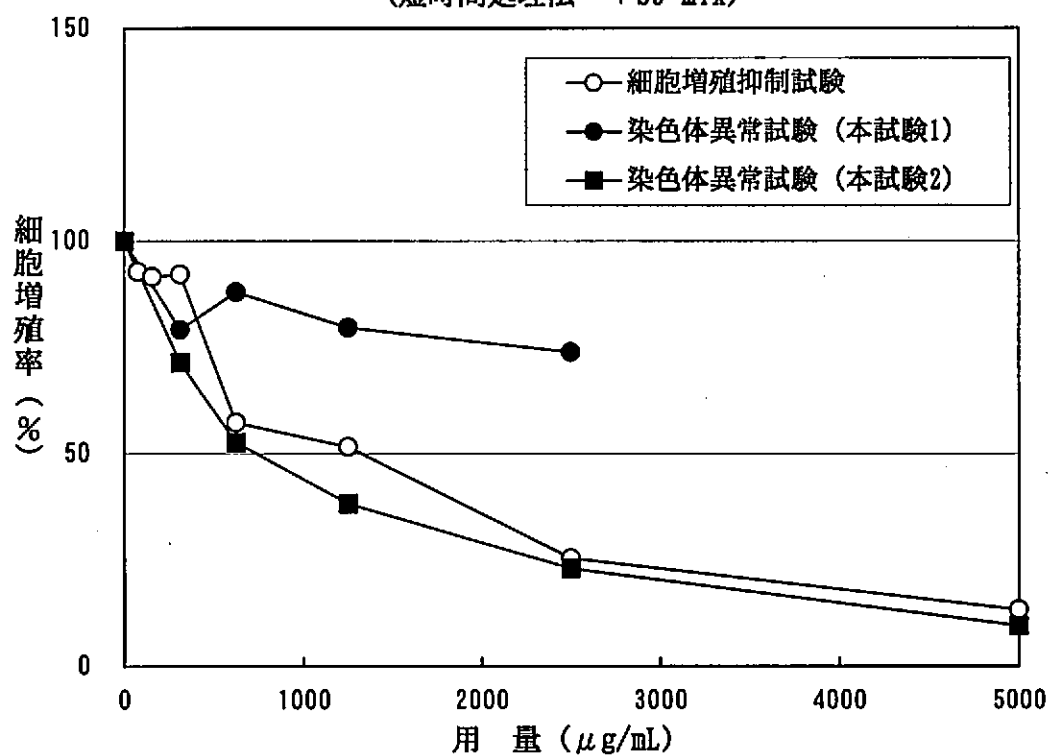


図3 硫化亜鉛の細胞毒性
(連続処理法・24時間処理)

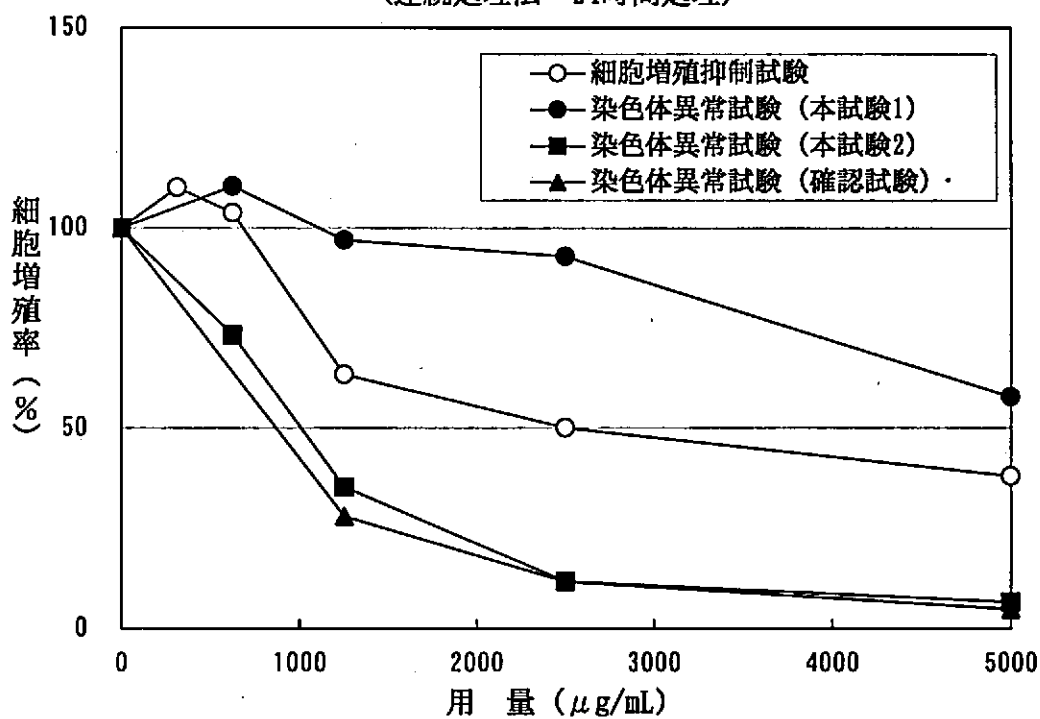


図4 硫化亜鉛の細胞毒性
(連続処理法・48時間処理)

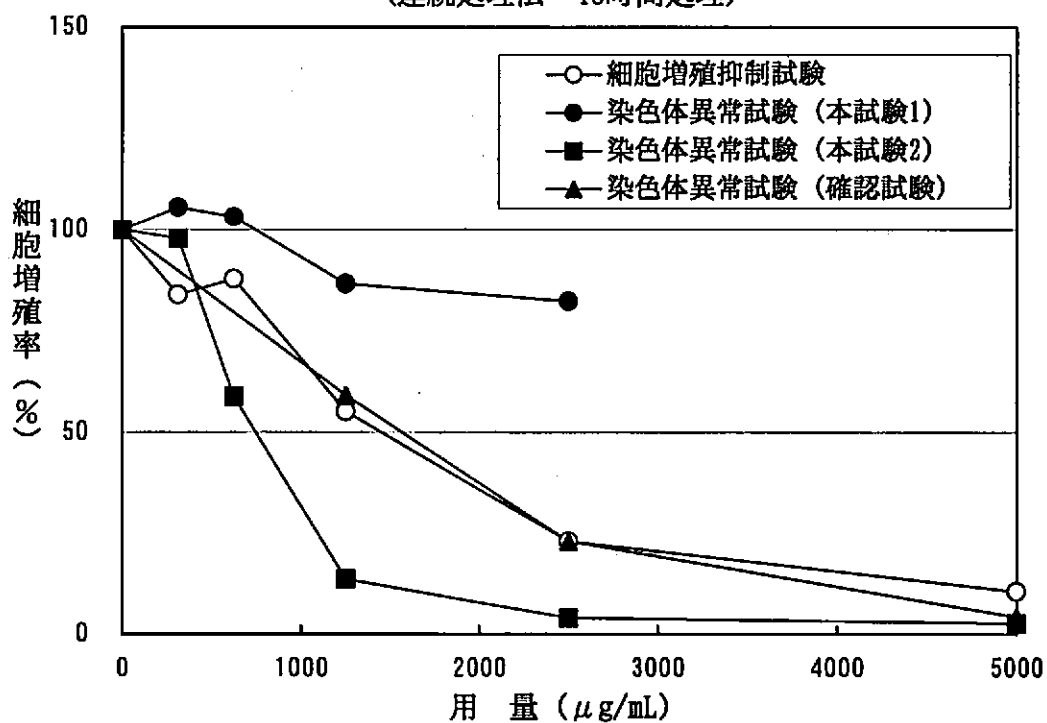


図5 硫化亜鉛の構造異常細胞出現頻度（短時間処理法）

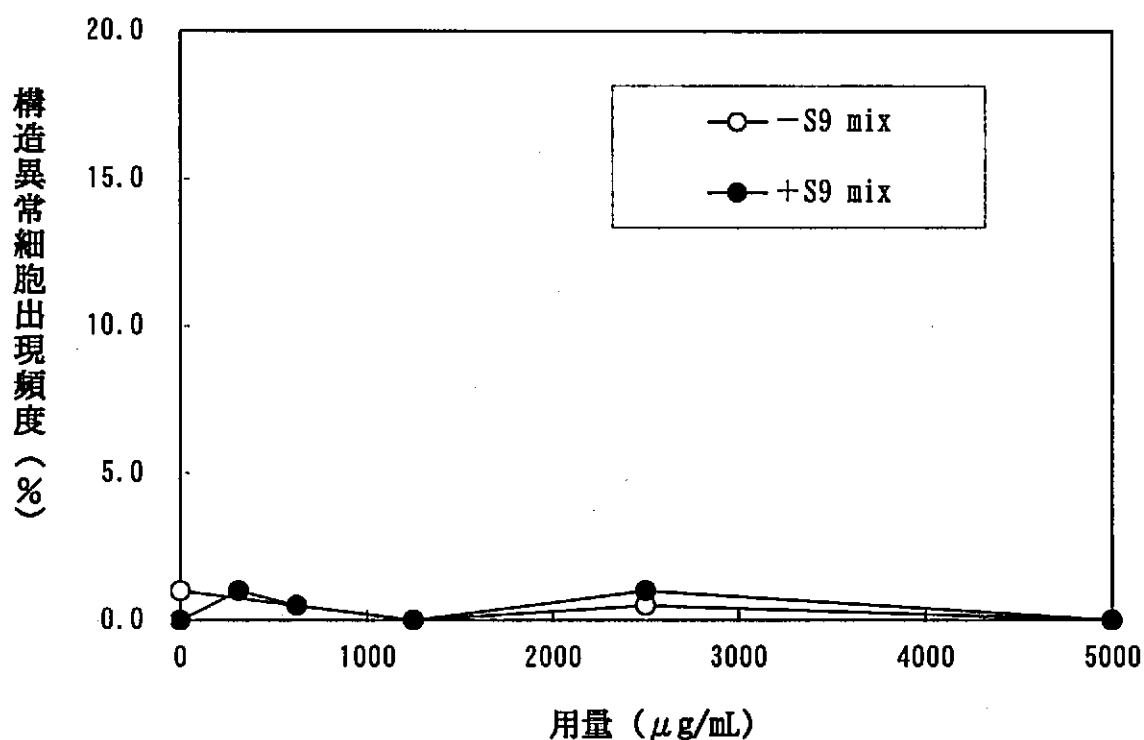


図6 硫化亜鉛の数的異常細胞出現頻度（短時間処理法）

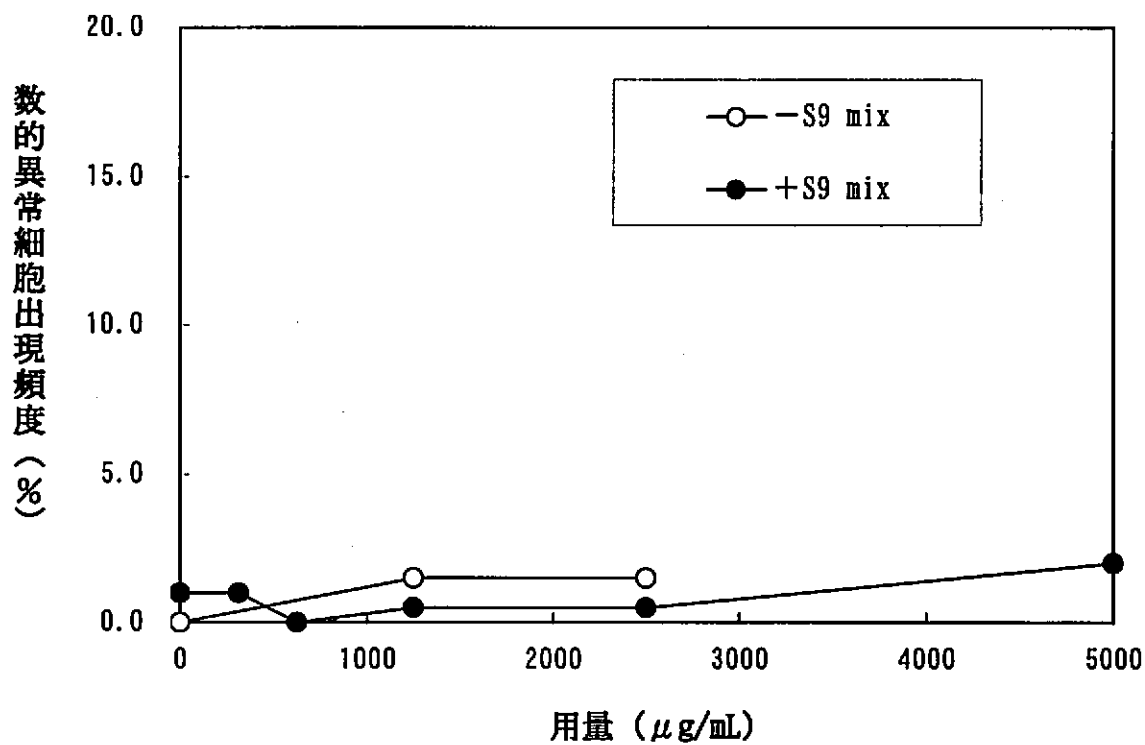


図7 硫化亜鉛の構造異常細胞出現頻度（連続処理法）

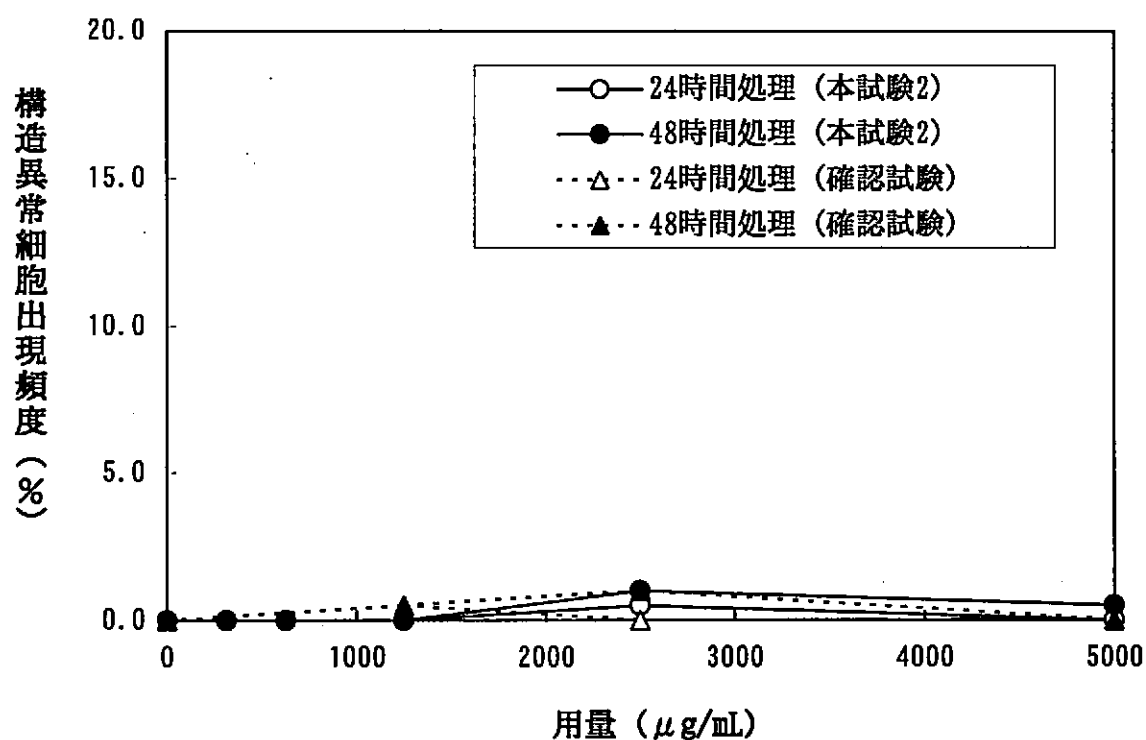
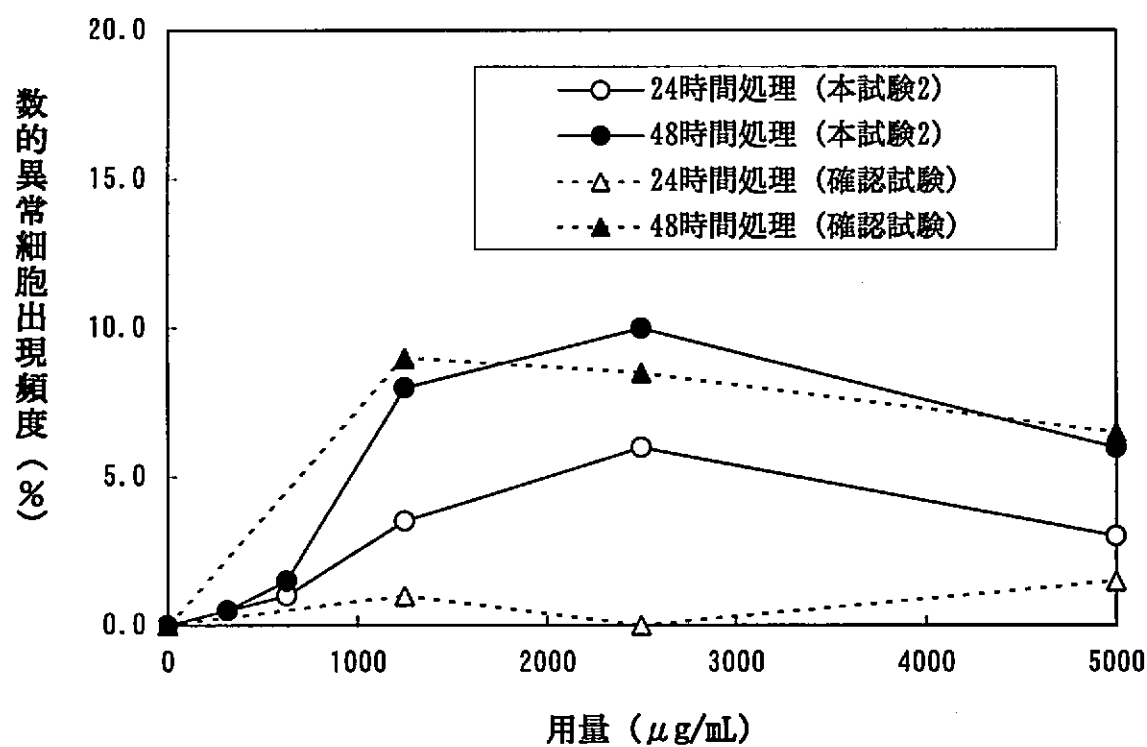


図8 硫化亜鉛の数的異常細胞出現頻度（連続処理法）



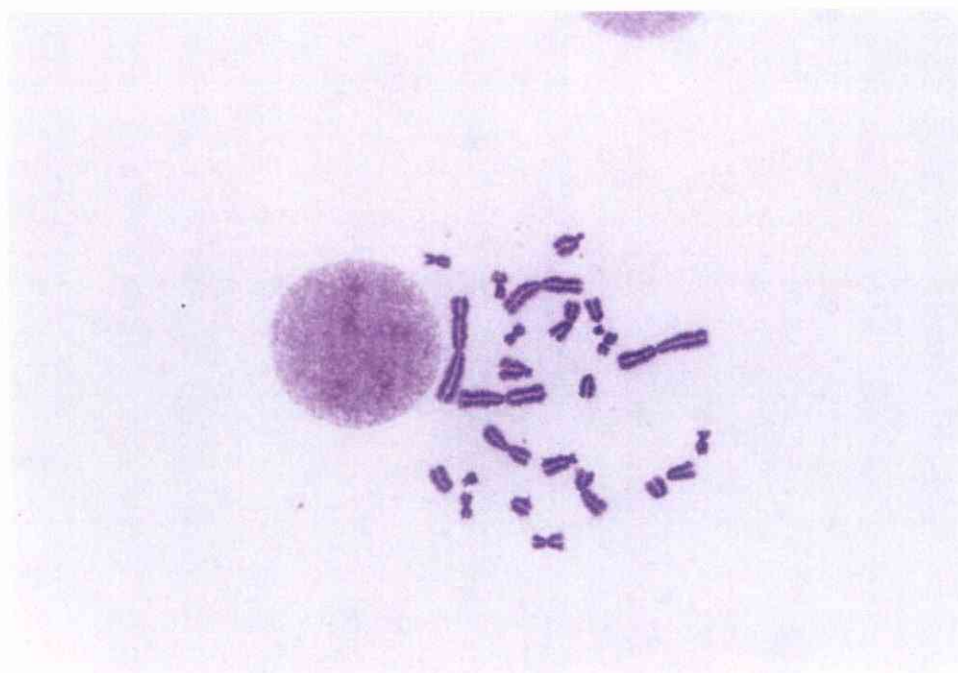


写真1 陰性対照群にみられた正常細胞

(連続処理法 48 時間処理) [確認試験]

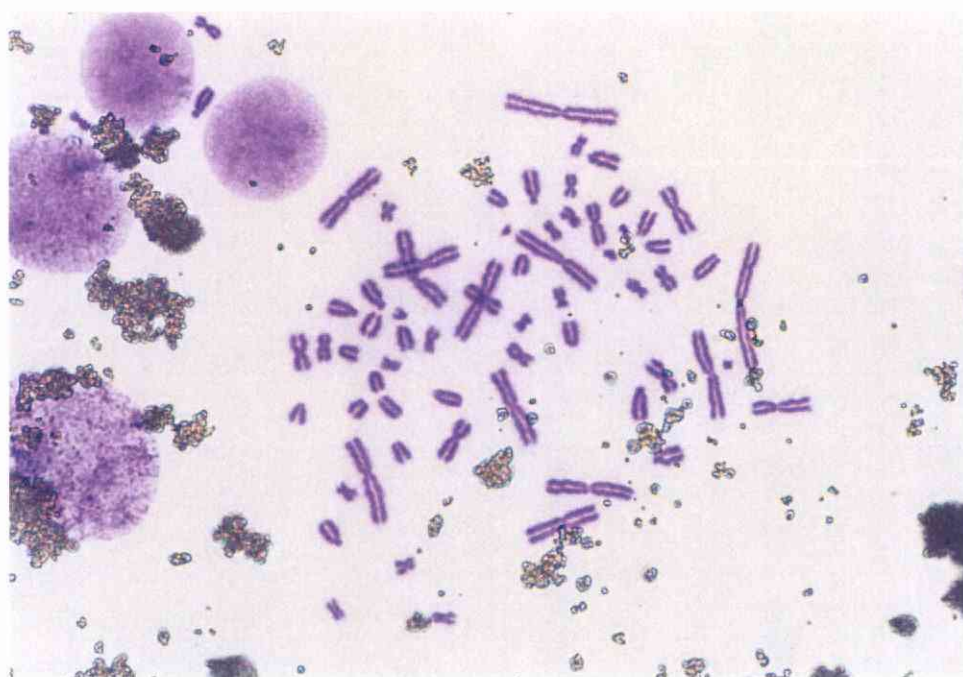


写真2 被験物質処理群にみられた数的異常細胞

(連続処理法 48 時間処理, 1250 μ g/mL) [確認試験]

添付資料

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

染色体異常試験背景データ (%) (1998年4月～2000年12月)

短時間処理法-S9 mix (群数: 93)

	陰性対照		陽性対照 (MMC 0.1 μ g/mL)	
	数的異常	構造異常	数的異常	構造異常
平均	0.1	1.3	0.1	49.1
標準偏差	0.2	0.9	0.2	12.4
最大値	1.0	3.5	1.0	95.5
最小値	0.0	0.0	0.0	19.0

短時間処理法+S9 mix (群数: 113)

	陰性対照		陽性対照 (BP 20 μ g/mL)	
	数的異常	構造異常	数的異常	構造異常
平均	0.2	1.0	0.1	73.9
標準偏差	0.4	0.7	0.2	12.6
最大値	2.0	3.0	0.5	93.0
最小値	0.0	0.0	0.0	38.5

連続処理法24時間処理 (群数: 58)

	陰性対照		陽性対照 (MMC 0.03 μ g/mL)	
	数的異常	構造異常	数的異常	構造異常
平均	0.1	1.1	0.1	25.7
標準偏差	0.2	1.0	0.2	7.3
最大値	1.0	4.5	1.0	52.0
最小値	0.0	0.0	0.0	14.0

連続処理法48時間処理 (群数: 24)

	陰性対照		陽性対照 (MMC 0.03 μ g/mL)	
	数的異常	構造異常	数的異常	構造異常
平均	0.2	0.9	0.2	40.8
標準偏差	0.3	0.6	0.2	10.1
最大値	1.0	2.0	0.5	61.0
最小値	0.0	0.0	0.0	18.5

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	硫化亜鉛		
別 名	—		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)	ZnS		
試験に供した新規 化学物質の純度	98.1 %	試験に供した新規 化学物質の Lot No.	<div></div>
不純物の名称及び濃度	—		
C A S 番 号	1314-98-3	蒸 気 圧	—
分 子 量	—	分 配 係 数	—
融 点	1180℃で昇華 する	常温における性状	微緑～白色粉末
沸 点	昇華		
安 定 性	通常の使用においては安定である		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	水	0.688 mg/100mL (18℃)	—
	DMSO	*1 50 mg/mL で不溶	*2
	アセトン	—	—
	希塩酸・希硫酸	可溶	—

DMSO : ジメチルスルホキシド

*1 : 当研究所での溶媒検討の結果による (細菌を用いる復帰突然変異試験)。

*2 : 被験物質溶液調製時に、発熱、発泡、変色は認められなかった。

2. 細胞の種類－培養条件

細胞名	CHL/TU	入手先		大日本製薬株式会社
種	チャイニーズハムスター	入手年月日		2000年7月25日
培養液	イーグルMEM	製造元		日水製薬株式会社
血清の種類と添加量	仔牛 10 %	製造元 (Lot No.)		GIBCO BRL (1027934)
細胞周期	約 18.1 h	凍結条件		液体窒素中
継代数	18, 20, 22 *	培養 条件	容器	プラスチックシャーレ
染色体数 (モード)	25 本		温度	37 ℃
			CO2 濃度	5 %
備考	*: 継代数 17 で凍結した細胞を使用した。			

3. S9 mix

(1) S9 の入手方法等

自製・購入の別	1. 自製 2. 購入 (製造元 キョーマン株式会社)
製造年月日	2000年9月29日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA - 433
保存温度	-80 ℃以下

(2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	フェバルルビタル (PB) 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週	投与期間及び投与量 (g/kg 体重)	PB:4 日間 0.03 - 0.06 BF:1 日間 0.08
体重	205 - 245 g		

(3) S9 mix の組成

成 分	S9 mix 1 mL 中の 量	成 分	S9 mix 1 mL 中の 量
S9	0.3 mL	β -NADP ⁺	4 μ mol
MgCl ₂ · 6H ₂ O	5 μ mol	NADPH	- μ mol
KCl	33 μ mol	HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μ mol
D-グルコース-6-リン酸	5 μ mol	滅菌精製水	残 量

(4) S9 mix の処理条件

1. プレート法		2. 細胞浮遊法	3. その他 ()
S9 量 (最終濃度)		5 %	
S9 蛋白量 (最終濃度)		1.37 mg/mL	
処 理 時 間		6 h	
回 復 時 間		18 h	
備 考			

4. 被験物質溶液の調製

	名 称	製 造 元	Lot No.	グ レード	純度 (%)
使用溶媒	1 % CMC-Na* 水溶液	(CMC-Na 粉末) ナカニシ株式会社	M0B1469	—	—
溶媒選択の理由	溶媒検討の結果, 本被験物質は局方生理食塩液には 50 mg/mL で不溶であった. DMSO には 500 mg/mL, アセトンには 250 mg/mL で各々ほぼ均一に懸濁したが, 調製容器壁への付着が著しかった. 一方, 1 % CMC-Na 水溶液には 50 mg/mL でほぼ均一に懸濁し, 調製容器壁への付着は少なかった. これらの結果から, 1%CMC-Na 水溶液を溶媒として選択した.				
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	その他 ()		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	ミキサーによる攪拌および超音波処理を実施した.				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	15 分 ~ 30 分 室温 (短時間処理法 細胞増殖抑制試験) 25 分 室温 (短時間処理法 染色体異常試験 [本試験 1]) 15 分 ~ 25 分 室温 (短時間処理法 染色体異常試験 [本試験 2]) 55 分 室温 (連続処理法 細胞増殖抑制試験) 50 分 室温 (連続処理法 染色体異常試験 [本試験 1]) 35 分 ~ 55 分 室温 (連続処理法 染色体異常試験 [本試験 2]) 10 分 ~ 20 分 室温 (連続処理法 染色体異常試験 [確認試験])				
純度換算の有無	有 無				

* CMC-Na : カルボキシメチルセルロースナトリウム

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法 によらない場合	代謝活性化法 による場合
試験実施期間		2000年11月24日から 2000年11月28日	2000年11月24日から 2000年11月28日
培養器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	2.7 mL/培養器	2.2 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.3 mL/培養器	0.3 mL/培養器
	S 9 m i x 添 加 量		0.5 mL/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5 %
	S9 蛋白の最終濃度		1.37 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
細胞増殖抑制 測定法	血球計算盤で細胞数を計測した。		
備考	*: 培養開始日を 0 日とした。		

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (6 - 18 h)		代謝活性化法による場合 (6 - 18 h)	
用 量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	用 量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100	0 (溶媒)	100
313	86	78.1	93
625	100	156	91
1250	87	313	92
2500	84	625	57
5000	64	1250	52
		2500	25
		5000	13

(3) 染色体異常試験 [本試験 1*] の条件

		代謝活性化法 によらない場合	代謝活性化法 による場合
試験実施期間		2000 年 12 月 1 日から 2000 年 12 月 5 日	2000 年 12 月 1 日から 2000 年 12 月 5 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	2.7 mL/培養器	2.2 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数 **	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.3 mL/培養器	0.3 mL/培養器
	S 9 m i x 添 加 量		0.5 mL/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5 %
	S9 蛋白の最終濃度		1.37 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
<p>備考 * : 細胞増殖抑制試験の再現性が得られなかったため、標本作製（染色）まで行い、その後の操作は実施しなかった。</p> <p>** : 培養開始日を 0 日とした。</p>			

(4) 染色体異常試験 [本試験 2] の条件

		代謝活性化法 によらない場合	代謝活性化法 による場合
試験実施期間		2000 年 12 月 8 日から 2001 年 1 月 26 日	2000 年 12 月 8 日から 2001 年 1 月 26 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	2.7 mL/培養器	2.2 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.3 mL/培養器	0.3 mL/培養器
	S 9 m i x 添 加 量		0.5 mL/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5 %
	S9 蛋白の最終濃度		1.37 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
備考 *: 培養開始日を 0 日とした。			

(5) 染色体異常試験 [本試験 2] 結果 (別表 1 による。)

6. 連続処理法による試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		2000 年 11 月 24 日から 2000 年 11 月 28 日	2000 年 11 月 24 日から 2000 年 11 月 29 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	4.5 mL/培養器	4.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.5 mL/培養器	0.5 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	48 h
	回 復 時 間	0 h	0 h
細胞増殖抑制 測定法	血球計算盤で細胞数を計測した。		
備考	*: 培養開始日を 0 日とした。		

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(24 - 0 h) 処理による場合		(48 - 0 h) 処理による場合	
用 量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)	用 量 (μg/mL)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100	0 (溶媒)	100
313	110	313	84
625	104	625	88
1250	63	1250	55
2500	50	2500	23
5000	38	5000	11

(3) 染色体異常試験 [本試験 1*] の条件

試験実施期間		2000 年 12 月 1 日から 2000 年 12 月 5 日	2000 年 12 月 1 日から 2000 年 12 月 6 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	4.5 mL/培養器	4.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数 **	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.5 mL/培養器	0.5 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	48 h
	回 復 時 間	0 h	0 h
<p>備考 * : 細胞増殖抑制試験の再現性が得られなかったため、標本作製（染色）まで行い、その後の操作は実施しなかった。</p> <p>** : 培養開始日を 0 日とした。</p>			

(4) 染色体異常試験 [本試験 2] の条件

試験実施期間		2000 年 12 月 8 日から 2001 年 1 月 26 日	2000 年 12 月 8 日から 2001 年 1 月 26 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	4.5 mL/培養器	4.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.5 mL/培養器	0.5 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h**	48 h**
	回 復 時 間	0 h	0 h
<p>備考 * : 培養開始日を 0 日とした。</p> <p>** : 本試験 1 の標本の状態を顕微鏡で観察したところ、被験物質と思われる物質が全面に多量に付着し、染色体分析が困難であったため、被験物質処理終了後、MEM による洗浄を 3 回行い、MEM 培地を添加後、コルセミドを加えて 2 時間処理した。</p>			

(5) 染色体異常試験 [本試験 2] 結果 (別表 2 による。)

(6) 染色体異常試験 [確認試験] の条件

試験実施期間		2001 年 2 月 10 日から 2001 年 2 月 28 日	2001 年 2 月 2 日から 2001 年 2 月 28 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	4.5 mL/培養器	4.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.5 mL/培養器	0.5 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h**	48 h**
	回 復 時 間	0 h	0 h
備考 *: 培養開始日を 0 日とした. **: 本試験 2 と同様に, MEM による洗浄を実施した.			

(7) 染色体異常試験 [確認試験] 結果 (別表 3 による.)

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定	陽 性	陰 性
<p>判定の理由</p> <p>本試験の標本観察の結果、連続処理法 48 時間処理において、数的異常を持つ細胞の出現頻度は、1250，2500，5000 $\mu\text{g/mL}$ では各々 8.0，10.0，6.0 %であった。本結果の再現性および用量依存性を検討するために、同処理条件、上記用量で確認試験を実施したところ、数的異常を持つ細胞の出現頻度は、各々 9.0，8.5，6.5 %となり、染色体数的異常誘発の再現性が得られた。</p>		

(2) 参考事項

- 細胞増殖抑制試験に先立ち、短時間処理法の代謝活性化法によらない場合（以下－S9 mix）および代謝活性化法による場合（以下＋S9 mix）、連続処理法 24 時間処理（以下 24 時間処理）および 48 時間処理（以下 48 時間処理）で、それぞれ 50，500，5000 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量で予備試験を実施した。この試験では、1 用量あたり 1 枚のプレートを用い、位相差倒立顕微鏡により細胞の状態を観察した。

その結果、陰性対照と比較した細胞生存率（目測値）は下記の通りであった。

処理群 \ 用量 ($\mu\text{g/mL}$)	50	500	5000
－S9 mix	100 %	100 %	80 %
＋S9 mix	100 %	50 %	30 %
24 時間処理	100 %	80 %	20 %
48 時間処理	100 %	80 %	20 %

以上の結果から、細胞増殖抑制試験は、下記の用量を設定した。

－S9 mix：313，625，1250，2500，5000 $\mu\text{g/mL}$

＋S9 mix：78.1，156，313，625，1250，2500，5000 $\mu\text{g/mL}$

24 時間処理：313，625，1250，2500，5000 $\mu\text{g/mL}$

48 時間処理：313，625，1250，2500，5000 $\mu\text{g/mL}$

- ・ 細胞増殖抑制試験の結果、+ S9 mix, 24 時間処理および 48 時間処理において、細胞増殖を 50 % 抑制する用量は以下の通りであった。

+ S9 mix : 1305 $\mu\text{g/mL}$

24 時間処理 : 2500 $\mu\text{g/mL}$

48 時間処理 : 1389 $\mu\text{g/mL}$

また、-S9 mix では、いずれの用量においても 50%以上の細胞増殖抑制は認められなかった。

以上の結果から、染色体異常試験（本試験 1）は、下記の用量を設定した。

-S9 mix : 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$

+S9 mix : 313, 625, 1250, 2500 $\mu\text{g/mL}$

24 時間処理 : 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$

48 時間処理 : 313, 625, 1250, 2500 $\mu\text{g/mL}$

- ・ 本試験 1 の細胞増殖率測定の結果、いずれの処理条件においても、細胞増殖抑制試験と比較して細胞増殖率が高く、+S9 mix および 48 時間処理の最高用量では 50 % 以上の細胞増殖抑制は認められなかった。

この結果に基づき、被験物質懸濁液調製時または細胞処理時における操作上の誤りがあった可能性を考慮して、下記の用量で再試験（本試験 2）を実施した。

-S9 mix : 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$

+S9 mix : 313, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$

24 時間処理 : 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$

48 時間処理 : 313, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$

- ・ 本試験 1 の標本については、予備鏡検および観察を実施しなかった。
- ・ 本試験 2 および確認試験の予備鏡検において、すべての用量でプレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため、全てのプレートの標本を観察対象とした。

- ・ 染色体構造異常の分類は以下の通りとした。

染色分体型切断

染色分体型交換

染色体型切断

染色体型交換 (二動原体, 環状染色体など)

断片化

ギャップは, 染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした。他の異常と区別して記録し, 構造異常には含めなかった。

数的異常は, 染色体数が 35 本以上のものとした。核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた。

- ・ 染色体異常試験において, 下記の条件をいずれも満たしている場合, 試験成立とした。

(1) すべての陰性対照群において, 構造異常細胞及び数的異常細胞の出現頻度が共に 5 % 未満である。

(2) すべての陽性対照群において, 構造異常細胞の出現頻度が 10 % 以上である。

- ・ 構造異常を 1 個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし, ギャップのみをもつ細胞を除いて集計した。

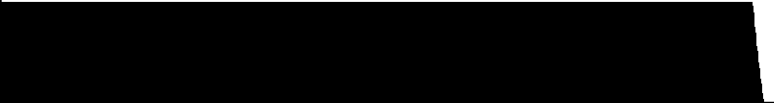

- ・ 被験物質の染色体異常誘発性の判定は, 各処理条件において, 構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に 5 % 未満を陰性 (－), いずれか一方または両方が 5 % 以上 10 % 未満を疑陽性 (±), いずれか一方または両方が 10 % 以上を陽性 (+) とした。

結果が疑陽性の場合または用量依存性が認められない場合は, 確認試験を実施した。確認試験の結果, 再現性が認められた場合は陽性と判定し, 再現性が認められない場合は陰性と判定した。

結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

- ・ 本試験 2 の標本観察の結果、24 時間処理 2500 $\mu\text{g/mL}$ の数的異常を持つ細胞の出現頻度は 6.0%であった。そこで、1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ を設定して確認試験を実施した。その結果、数的異常細胞を持つ細胞の出現頻度は、いずれの用量においても 5 %未満となったため、再現性が得られなかったものとし、24 時間処理は陰性と判断した。
- ・ すべての陰性対照群における染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5 %未満であった。すべての陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度 10 %以上であった。この結果は、前述の成立条件を満たすことから、試験成立と判断した。また、これらの出現頻度は、背景データ（添付資料）の範囲内の値であった。
- ・ 本試験 1, 2 および確認試験のいずれの処理条件においても、被験物質処理終了時（短時間処理法では 6 時間処理終了時）に、培養液中に沈殿および浮遊した被験物質が認められた。
- ・ 陽性対照物質に関する情報は以下の通りである。
 - マイトマイシン C（協和発酵工業株式会社，ロット番号 317AJD，含量 100 %）
 - ベンゾ[a]ピレン（東京化成工業株式会社，ロット番号 GG01，含量 95.6 %）

8.その他

試験実施施設	名 称	株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
	所 在 地	茨城県鹿島郡波崎町砂山 14 番地 電話 0479 (46) 2871 FAX 0479 (46) 2874
試験責任者	職 氏 名	
	経験年数	
試験期間	2000 年 11 月 21 日より 2001 年 4 月 6 日	
試験番号	B000874	

別表 1 染色体異常試験の結果(短時間処理法)[本試験2]

被験物質の名称 硫化亜鉛

処理時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)						ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数の異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6-18	-	陰性対照 (CMC-Na)	100	1	0	0	0	0	0	95	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	0	105	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	1250 P	100	0	0	0	0	0	0	79	100	2	0	2
			100	0	0	0	0	0	0	102	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	90	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6-18	-	2500 P	100	1	0	0	0	0	1	51	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	39	100	2	0	2
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	45	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6-18	-	5000 P	100	0	0	0	0	0	0	16	100	5	0	5
			100	0	0	0	0	0	0	23	100	4	0	4
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	19	200	9 (4.5)	0 (0.0)	9 (4.5)
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	31	18	0	0	0	41	68	100	0	0	0
			100	18	19	0	0	0	32	73	100	0	0	0
			200	49 (24.5)	37 (18.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	73 (36.5)	71	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	99	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	101	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	100	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6-18	+	313 P	100	1	0	0	0	0	1	66	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	77	100	1	0	1
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	71	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6-18	+	625 P	100	1	0	0	0	0	1	51	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	54	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	53	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	1250 P	100	0	0	0	0	0	0	40	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	36	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	38	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	+	2500 P	100	1	0	0	0	0	1	21	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	25	100	1	0	1
			200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	23	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	+	5000 P	100	0	0	0	0	0	0	11	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	8	100	3	0	3
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10	200	4 (2.0)	0 (0.0)	4 (2.0)
6-18	+	陽性対照 (BP 20)	100	36	73	0	0	0	80	75	100	1	0	1
			100	25	63	0	0	0	70	60	100	0	0	0
			200	61 (30.5)	136 (68.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	150 (75.0)	68	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)

MMC:マイトマイシンC BP:ベンゾ[a]ピレン

CMC-Na:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

P:被験物質処理終了時(6時間処理終了時),培養液中に沈殿および浮遊した被験物質が認められた。

別表 2 染色体異常試験の結果(連続処理法)[本試験2]

被験物質の名称 硫化亜鉛

処理時間(h)	被験物質の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数異常の細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍數体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24-0	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	109	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	91	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	625 P	100	0	0	0	0	0	0	0	71	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	76	100	1	0	1
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	73	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
24-0	1250 P	100	0	0	0	0	0	0	1	42	100	6	0	6
		100	0	0	0	0	0	0	0	29	100	1	0	1
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	35	200	7 (3.5)	0 (0.0)	7 (3.5)
24-0	2500 P	100	0	1	0	0	0	1	0	11	100	6	0	6
		100	0	0	0	0	0	0	0	13	100	6	0	6
		200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	12	200	12 (6.0)	0 (0.0)	12 (6.0)
24-0	5000 P	100	0	0	0	0	0	0	1	9	100	4	0	4
		100	0	0	0	0	0	0	0	5	100	2	0	2
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	7	200	6 (3.0)	0 (0.0)	6 (3.0)
24-0	陽性対照 (MMC 0.03)	100	11	7	0	0	0	18	0	66	100	0	0	0
		100	14	8	0	0	0	20	0	59	100	0	0	0
		200	25 (12.5)	15 (7.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	38 (19.0)	0	63	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	102	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	98	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48-0	313 P	100	0	0	0	0	0	0	0	85	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	111	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	98	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
48-0	625 P	100	0	0	0	0	0	0	0	60	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	58	100	2	0	2
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	59	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
48-0	1250 P	100	0	0	0	0	0	0	0	14	100	8	0	8
		100	0	0	0	0	0	0	0	13	100	8	0	8
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	14	200	16 (8.0)	0 (0.0)	16 (8.0)
48-0	2500 P	100	2	0	0	0	0	2	0	4	100	10	0	10
		100	0	0	0	0	0	0	0	4	100	10	0	10
		200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	4	200	20 (10.0)	0 (0.0)	20 (10.0)
48-0	5000 P	100	0	0	0	0	0	0	0	3	100	8	0	8
		100	0	0	1	0	0	1	1	3	100	4	0	4
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	3	200	12 (6.0)	0 (0.0)	12 (6.0)
48-0	陽性対照 (MMC 0.03)	100	23	17	0	0	0	35	0	54	100	0	0	0
		100	25	21	1	0	0	41	0	64	100	0	0	0
		200	48 (24.0)	38 (19.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	76 (38.0)	0	59	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC:マイトマイシンC CMC-Na:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

P:被験物質処理終了時、培養液中に沈殿および浮遊した被験物質が認められた。

別表 3 染色体異常試験の結果(連続処理法)[確認試験]

被験物質の名称 硫化亜鉛

処理-回復 時間(h)	被験物質の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24 - 0	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	93	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	107	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 - 0	1250 P	100	0	0	0	0	0	0	0	25	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	1	0	31	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	28	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
24 - 0	2500 P	100	0	0	0	0	0	0	0	14	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	9	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	12	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24 - 0	5000 P	100	0	0	0	0	0	0	0	7	100	1	0	1
		100	0	0	0	0	0	0	0	3	100	2	0	2
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	5	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
24 - 0	陽性対照 (MMC 0.03)	100	16	5	0	0	0	21	2	78	100	0	0	0
		100	17	8	0	0	0	25	0	77	100	0	0	0
		200	33 (16.5)	13 (6.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	46 (23.0)	2	78	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48 - 0	陰性対照 (CMC-Na)	100	0	0	0	0	0	0	0	98	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	102	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
48 - 0	1250 P	100	0	0	1	0	0	1	0	57	100	9	0	9
		100	0	0	0	0	0	0	0	61	100	9	0	9
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	59	200	18 (9.0)	0 (0.0)	18 (9.0)
48 - 0	2500 P	100	1	0	0	0	0	1	1	19	100	8	0	8
		100	1	0	0	0	0	1	0	27	100	9	0	9
		200	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	1	23	200	17 (8.5)	0 (0.0)	17 (8.5)
48 - 0	5000 P	100	0	0	0	0	0	0	0	5	100	6	0	6
		100	0	0	0	0	0	0	0	3	100	7	0	7
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	4	200	13 (6.5)	0 (0.0)	13 (6.5)
48 - 0	陽性対照 (MMC 0.03)	100	20	15	0	0	0	33	0	54	100	1	0	1
		100	21	17	0	0	0	36	0	58	100	0	0	0
		200	41 (20.5)	32 (16.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	69 (34.5)	0	56	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)

MMC:マイトマイシンC CMC-Na:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液

P:被験物質処理終了時、培養液中に沈殿および浮遊した被験物質が認められた。

図1 硫化亜鉛の細胞毒性
(短時間処理法・-S9 mix)

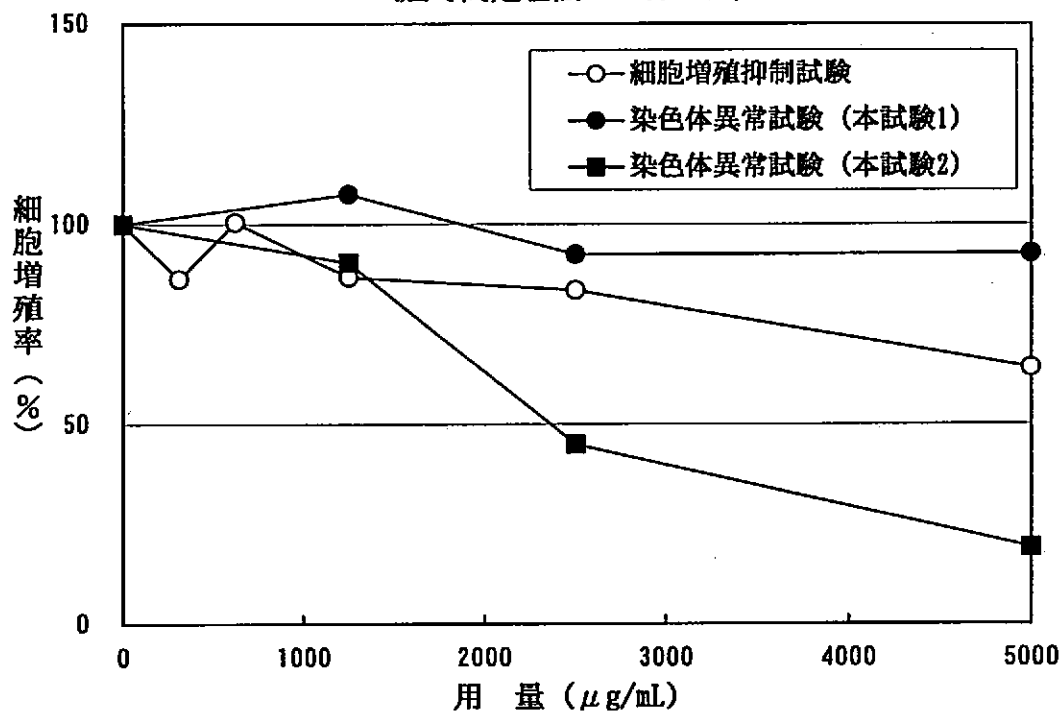


図2 硫化亜鉛の細胞毒性
(短時間処理法・+S9 mix)

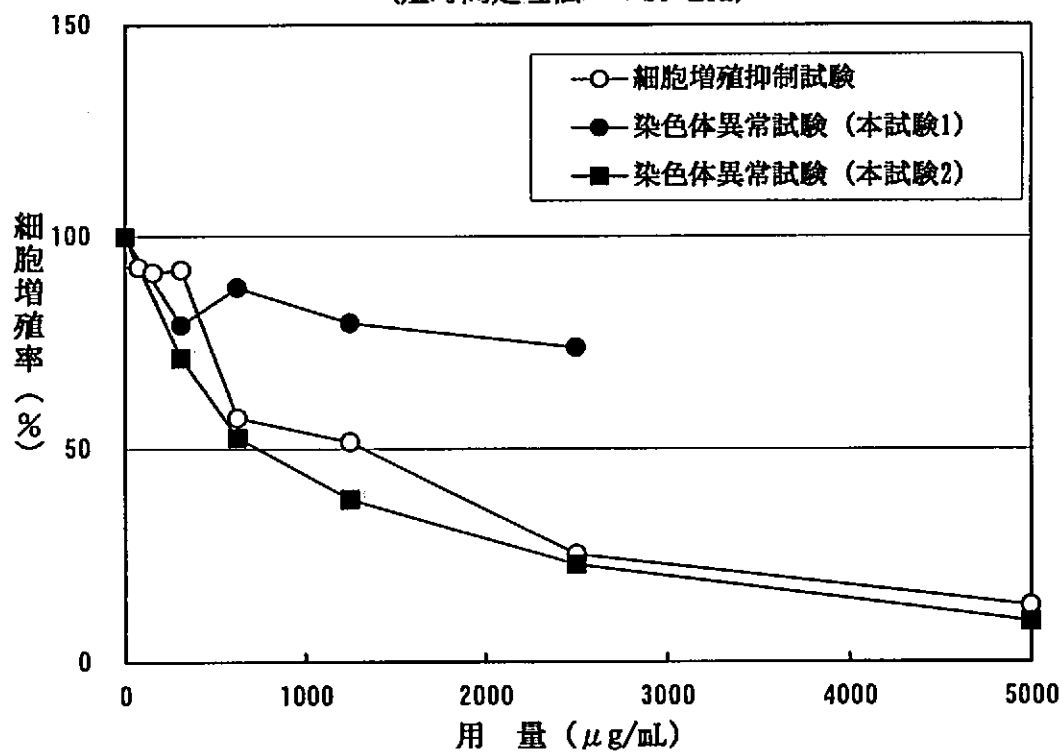


図3 硫化亜鉛の細胞毒性
(連続処理法・24時間処理)

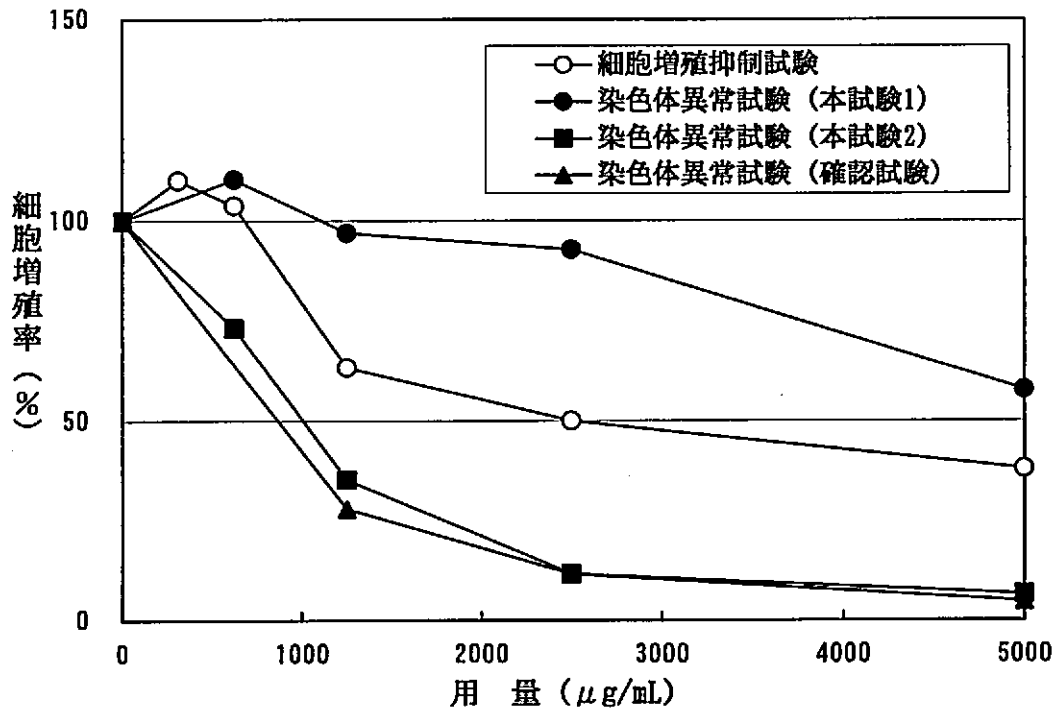


図4 硫化亜鉛の細胞毒性
(連続処理法・48時間処理)

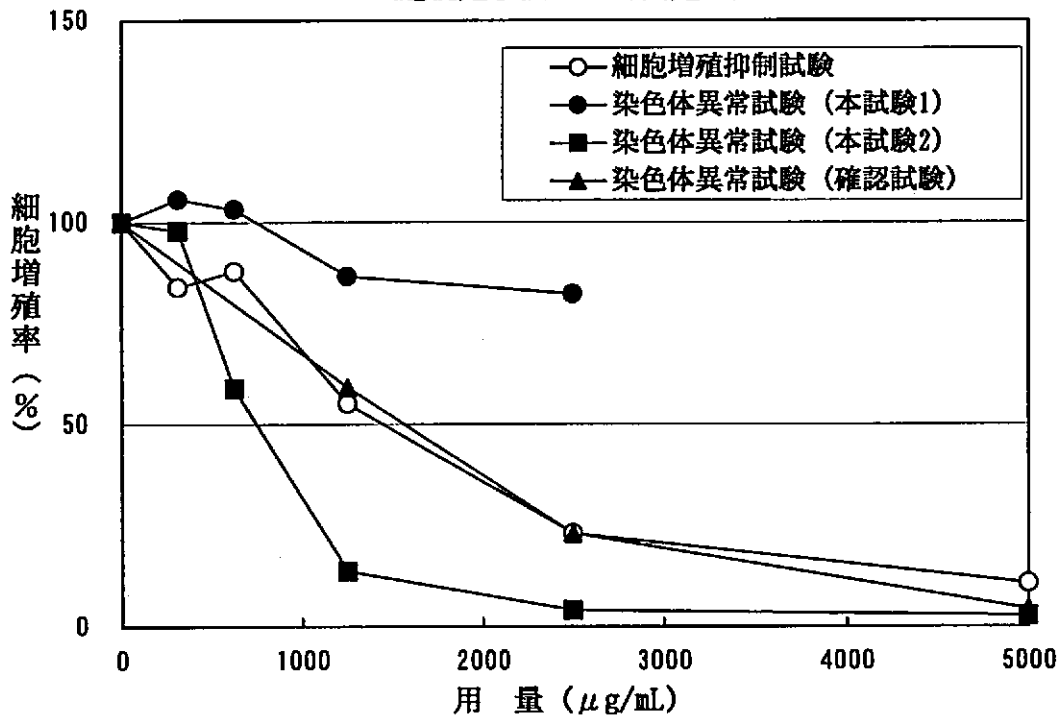


図5 硫化亜鉛の構造異常細胞出現頻度（短時間処理法）

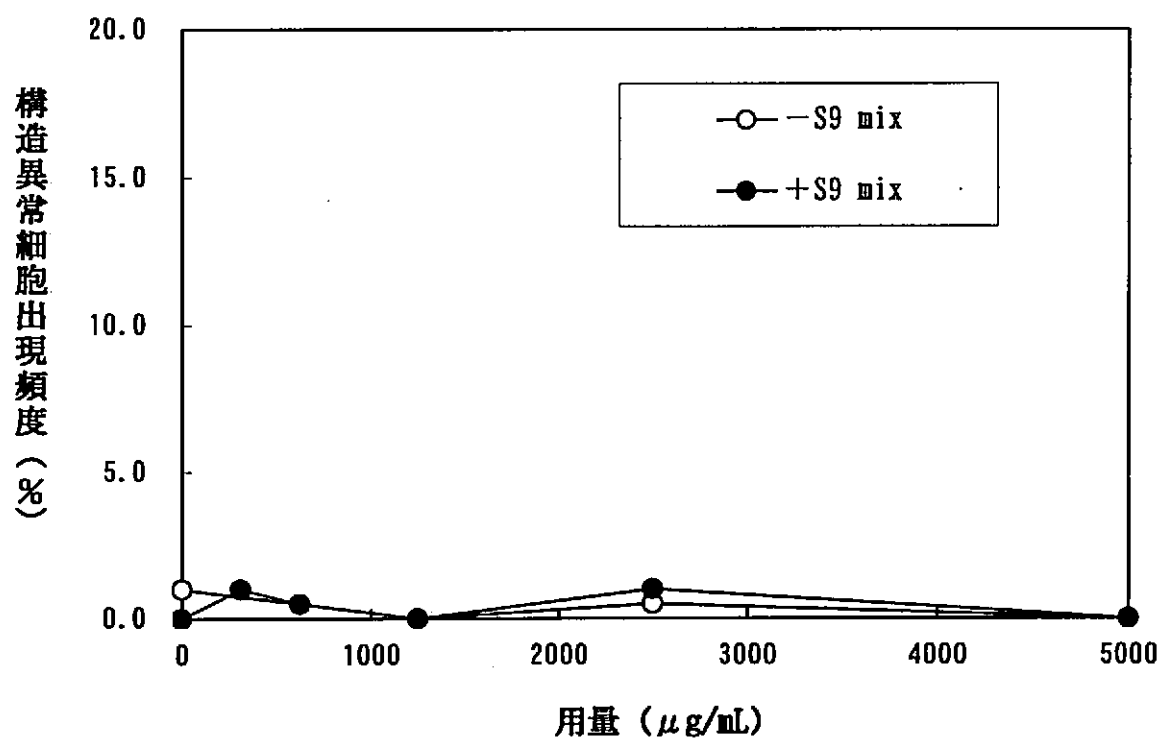


図6 硫化亜鉛の数的異常細胞出現頻度（短時間処理法）

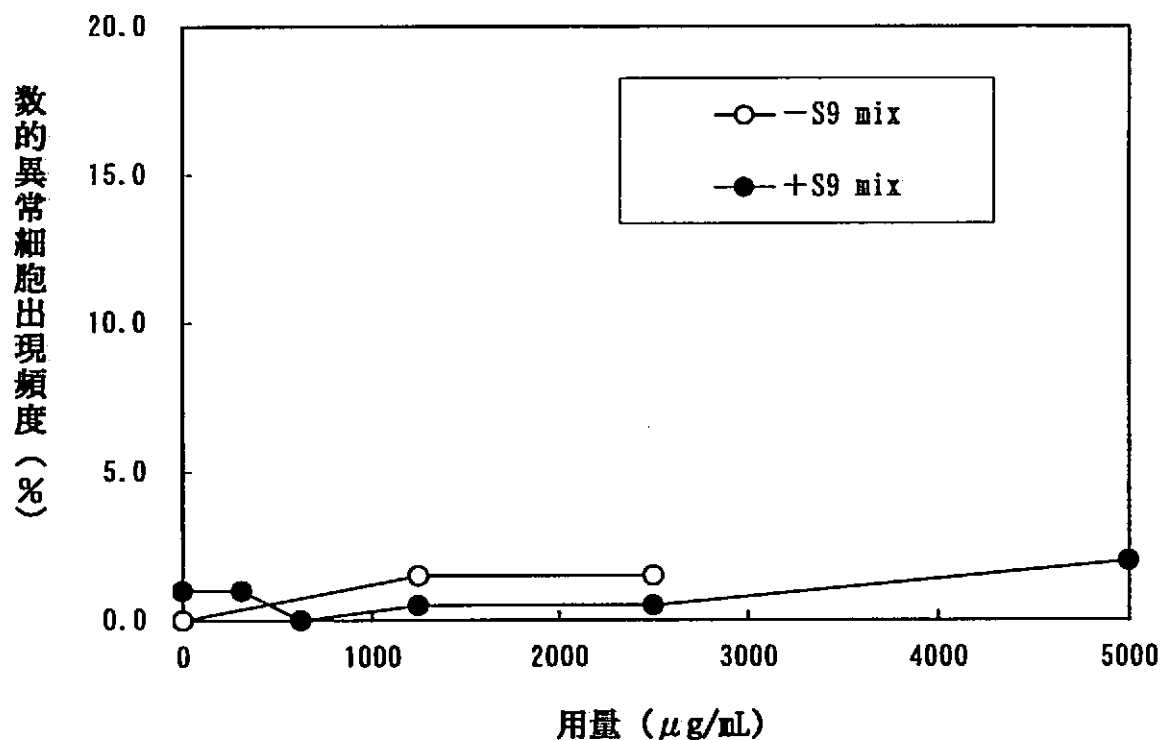


図7 硫化亜鉛の構造異常細胞出現頻度（連続処理法）

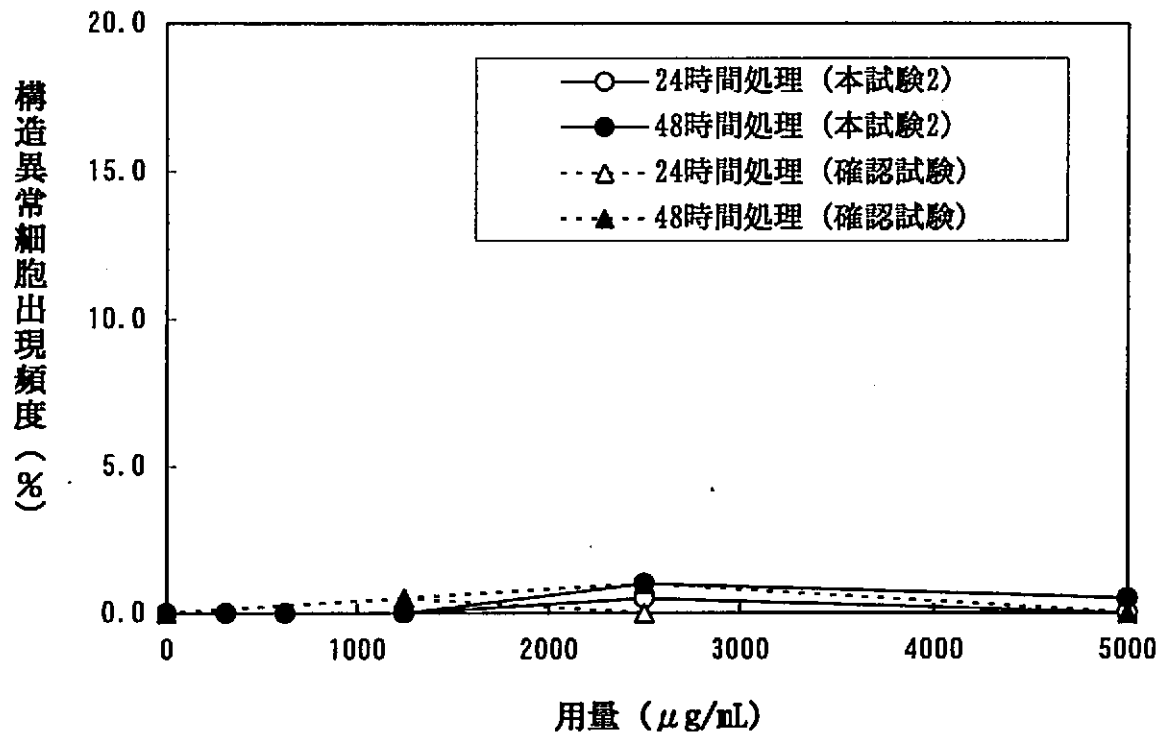
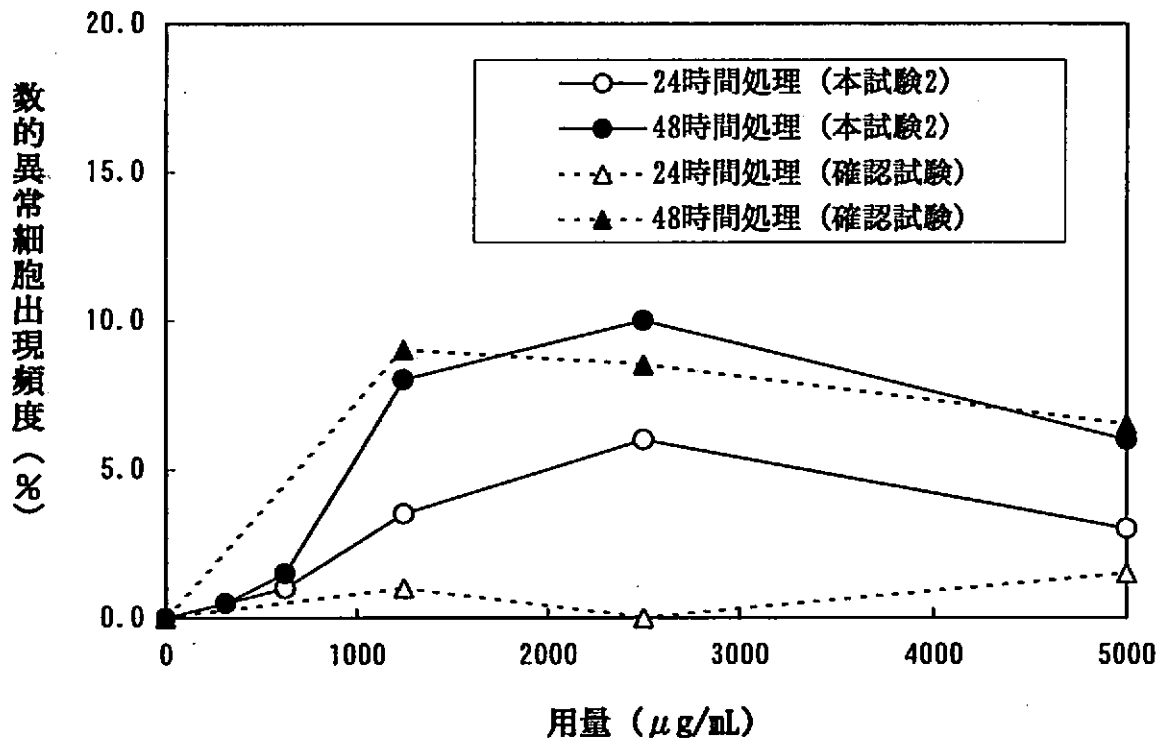


図8 硫化亜鉛の数的異常細胞出現頻度（連続処理法）



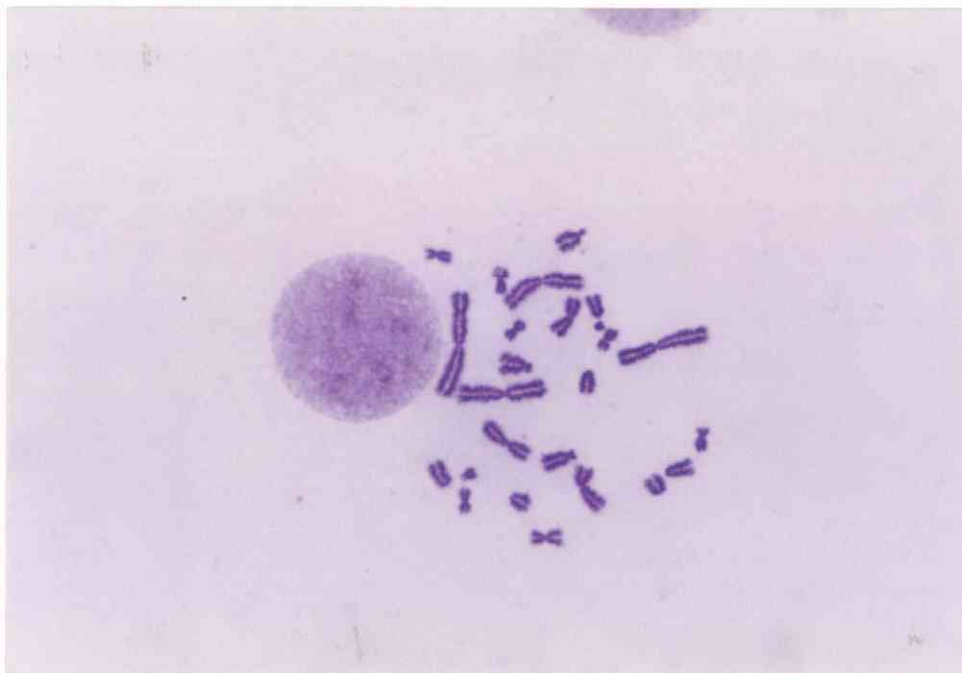


写真1 陰性対照群にみられた正常細胞
(連続処理法 48 時間処理 [確認試験])



写真2 被験物質処理群にみられた数的異常細胞
(連続処理法 48 時間処理, 1250 $\mu\text{g/mL}$ [確認試験])

添付資料

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

染色体異常試験背景データ (%) (1998年4月～2000年12月)

短時間処理法-S9 mix (群数: 93)

	陰性対照		陽性対照 (MMC 0.1 μ g/mL)	
	数的異常	構造異常	数的異常	構造異常
平均	0.1	1.3	0.1	49.1
標準偏差	0.2	0.9	0.2	12.4
最大値	1.0	3.5	1.0	95.5
最小値	0.0	0.0	0.0	19.0

短時間処理法+S9 mix (群数: 113)

	陰性対照		陽性対照 (BP 20 μ g/mL)	
	数的異常	構造異常	数的異常	構造異常
平均	0.2	1.0	0.1	73.9
標準偏差	0.4	0.7	0.2	12.6
最大値	2.0	3.0	0.5	93.0
最小値	0.0	0.0	0.0	38.5

連続処理法24時間処理 (群数: 58)

	陰性対照		陽性対照 (MMC 0.03 μ g/mL)	
	数的異常	構造異常	数的異常	構造異常
平均	0.1	1.1	0.1	25.7
標準偏差	0.2	1.0	0.2	7.3
最大値	1.0	4.5	1.0	52.0
最小値	0.0	0.0	0.0	14.0

連続処理法48時間処理 (群数: 24)

	陰性対照		陽性対照 (MMC 0.03 μ g/mL)	
	数的異常	構造異常	数的異常	構造異常
平均	0.2	0.9	0.2	40.8
標準偏差	0.3	0.6	0.2	10.1
最大値	1.0	2.0	0.5	61.0
最小値	0.0	0.0	0.0	18.5

GENETIC TOXICITY IN VITRO (NON-BACTERIAL IN VITRO TEST)

TEST SUBSTANCE

- Zinc sulfide (CAS No. 1314-98-3)

Remarks: Source: [REDACTED] Lot No. [REDACTED] Purity: 98.1 %, Kept in an airtight container and in a refrigerator and dark until use

METHOD

Method/guideline: OECD Guideline for *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (No. 473, 1997)

- Test type: Chromosomal aberration test
- GLP: YES
- Year: 2000-2001
- Species/Strain: CHL/IU cell
- Metabolic activation: With and without S9 from rat liver, induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone
- Statistical methods: none

REMARKS FIELD FOR TEST CONDITIONS

Study Design:

For continuous treatment, cells were treated for 24 or 48 hrs without S9. For short-term treatment, cells were treated for 6 hrs with and without S9 mix and cultivated with fresh media for 18 hrs.

- **Concentration:** -S9 (24 hrs continuous treatment [main test]): 0, 625, 1250, 2500, 5000 µg/mL
-S9 (24 hrs continuous treatment [confirmation test]):
0, 1250, 2500, 5000 µg/mL
-S9 (48 hrs continuous treatment [main test]):
0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/mL
-S9 (48 hrs continuous treatment [confirmation test]):
0, 1250, 2500, 5000 µg/mL
-S9 (short-term treatment): 0, 1250, 2500, 5000 µg/mL
+S9 (short-term treatment): 0, 313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/mL
- **Plates/test:** 2
- **Solvent:** 1% sodium carboxymethylcellulose solution
- **Positive controls:** - S9, Mitomycin C
+ S9, Benzo[a]pyrene

RESULTS

- **Cytotoxic concentration:**

The 50% cell growth inhibitory concentrations were estimated to be 1305 µg/mL by the +S9 mix method, and 2500 µg/mL by the 24-hour method, and 1389 µg/mL by 48-hour method.

The test substance did not inhibit cell growth more than 50 % by the - S9 mix method.

- **Genotoxic effects:**

	clastogenicity			polyploidy		
	+	?	-	+	?	-
- With metabolic activation:	[]	[]	[X]	[]	[]	[X]
- Without metabolic activation:	[]	[]	[X]	[X*]	[]	[]

*;48 hrs continuous treatment

REMARKS FIELD FOR RESULTS.

Structural chromosomal aberrations were not induced up to the highest concentration of 5000 µg/mL on short-term treatment with and without S9 mix, 5000 µg/mL on 24 hrs and 48 hrs continuous treatment. Numerical chromosomal aberrations were not induced up to the highest concentration of 5000 µg/mL on short-term treatment with and without S9 mix. However, the incidence of cells with numerical aberrations were 6.0% at 2500 µg/mL for 24 hrs continuous treatment and 8.0% at 1250 µg/mL, 10.0% at 2500 µg/mL, and 6.0% at 5000 µg/mL for 48 hrs continuous treatment in the main test. Furthermore, the incidence of cells with numerical aberrations were 9.0% at 1250 µg/mL, 8.5% at 2500 µg/mL, and 6.5% at 5000 µg/mL for 48 hrs continuous treatment in the confirmation test.

The incidence of cells with numerical aberrations were less than 5.0% for 24 hrs continuous treatment in the confirmation test, and the reproducibility was not confirmed.

POLYPLOID (%)					
		24 hrs continuous treatment method		48 hrs continuous treatment	
		Main test	Confirmation test	Main test	Confirmation test
Conc. (µg/mL)		Incidence(%)	Incidence(%)	Incidence(%)	Incidence(%)
Solvent	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Zinc sulfide	313	—	—	0.5	—
Zinc sulfide	625	1.0	—	1.5	—
Zinc sulfide	1250	3.5	1.0	8.0	9.0
Zinc sulfide	2500	6.0	0.0	10.0	8.5
Zinc sulfide	5000	3.0	1.5	6.0	6.5

CONCLUSIONS

Numerical chromosomal aberration in CHL/IU cells is positive without metabolic activation.

DATA QUALITY

- **Reliabilities:** The reproducibility of polyploidy in the continuous treatment method was confirmed.

Remarks field for Data Reliability

Well conducted study, carried out by the Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd. (Japan).

REFERENCES (Free Text)

Mammalian Mutagenicity Study Group of Japan Environmental Mutagen Society: Atlas of chromosomal aberrations induced by chemicals, Asakura Press, Tokyo, 1988.

GENERAL REMARKS