

『アセチルクエン酸トリブチルのチャイニーズ・ハムスター
培養細胞を用いる染色体異常試験』

PROJECT No. H-00349

平成 13 年 3 月 30 日

群馬県吾妻郡吾妻町大字大戸 3303-58

株式会社 実医研

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)	アセチルクエン酸トリブチル					
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)	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{COOC}_4\text{H}_9 \\ \\ \text{CH}_3\text{COO}-\text{C}-\text{COOC}_4\text{H}_9 \\ \\ \text{CH}_2\text{COOC}_4\text{H}_9 \end{array} $ $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_8$					
試験に供した新規化学物質の純度	98.8%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	XXXXXXXXXX			
不純物の名称及び濃度						
C A S 番 号	77-90-7	蒸 気 圧				
分 子 量	402.49	分 配 係 数				
融 点	-80℃	常温における性状	無色～わずかにうすい黄色、 澄明な液体			
沸 点	173℃					
安 定 性						
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	不溶	安定	DMSO	—	—
	エタノール	—	—	その他 ()	—	—

2. 細胞の種類

細胞 名	CHL/IU	入 手 先	国立医薬品食品衛生研究所 (旧名：国立衛生試験所)	
種	チャイニーズ・ハムスター	入 手 年 月 日	1991 年 10 月 31 日	
培 養 液	Eagle MEM	製 造 元	Gibco	
血清の種類と添加量	仔ウシ血清 10%	製造元 (Lot No.)	Gibco(1023609)	
細胞 周 期	約 15h	凍 結 条 件	液体窒素 (-196℃)	
継 代 数	9 継代 (細胞増殖抑制試験) 14 継代 (染色体異常試験) 19 継代 (確認試験)	培養 条件	容 器	
染 色 体 数 (モ ー ド)	25 本		温 度	37℃
			C O ₂ 濃 度	5%
備 考				

3.S9 mix

(1) S9 の入手方法等

自製・購入の別	1.自製 ②.購入（製造年月日：キッコーマン株式会社）
製造年月日	2000 年 12 月 1 日
購入の場合の Lot No.	RAA-436
保存温度	-80℃以下（設定温度；-85℃）

(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	PB および 5,6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週 令	7 週	投与期間及び投与量 (g/kg 体重)	PB 0.03g/kg 1 回
体 重	210~245g		PB 0.06g/kg 3 回 5,6-BF 0.08g/kg 1 回

(3) S9mix の組成

成 分	S9mix 1mL 中の量	成 分	S9mix 1mL 中の量
S9	0.3 mL	NADP	4 μ mol
MgCl ₂	5 μ mol	HEPES 緩衝液*	4 μ mol
KCl	33 μ mol	その他 ()	—
グルコース-6-リン酸	5 μ mol	—	—

(4) S9mix の処理条件

* PH 7.2

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)	1.29mg/mL
処 理 時 間	6h
回 復 時 間	18h
備 考	—

4.被験物質溶液の調製

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	DMSO	和光純薬工業株式会社	ELP3545	特級	99.0
溶媒選択の理由	溶解し、かつ、安定であるとされていることから DMSO を選択した。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="radio"/> 溶解 <input type="radio"/> 懸濁 <input type="radio"/> その他 ()				
被験物質が難溶性の場合における懸濁の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	0 時間 00 分 (用時調製) 室温				
純度換算の有無	<input checked="" type="radio"/> 有 <input type="radio"/> 無				

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

試験実施期間		代謝活性化によらない場合	代謝活性化による場合
		2000年12月16日から 2000年12月21日	2000年12月16日から 2000年12月21日
培 養 器	形 状	細胞培養用シャーレ	細胞培養用シャーレ
	大 き さ	φ 35mm	φ 35mm
	培 養 液 量	2 mL/培養器	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	約 1×10^4 個/mL	約 1×10^4 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	0.02 mL/培養器	0.02 mL/培養器
	S9 mix の添加量	—	0.33 mL/培養器
	S9 の最終濃度	—	5 %
	S9 蛋白の最終濃度	—	2.58 mg/培養器
	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	10%ホルマリン水溶液で固定 0.1%クリスタル・バイオレットで染色 モノセレーターで計測		
備 考	—		

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化によらない場合 (6-18h)		代謝活性化による場合 (6-18h)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.006	98	0.006	98
0.017	94	0.017	94
0.050	93	0.050	94
0.149	86	0.149	84
0.447 †	76	0.447 †	77
1.342 †	78	1.342 †	82
4.025 †	79	4.025 †	85

† : 被験物質の沈殿

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化によらない場合	代謝活性化による場合
試験実施期間		2001 年 1 月 12 日から 2001 年 1 月 18 日	2001 年 1 月 12 日から 2001 年 1 月 18 日
培 養 器	形 状	細胞培養用シャーレ	細胞培養用シャーレ
	大 き さ	φ 60mm	φ 60mm
	培 養 液 量	5 mL/培養器	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	約 1×10^4 個/mL	約 1×10^4 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	0.05 mL/培養器	0.05 mL/培養器
	S 9 mix の添加量	—	0.83 mL/培養器
	S 9 の最終濃度	—	5 %
	S 9 蛋白の最終濃度	—	6.45 mg/培養器
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
備 考		—	—

(4) 染色体異常試験結果（別表 1 による）

(5) 確認試験試験の条件

		代謝活性化によらない場合	代謝活性化による場合
試験実施期間		—	2001 年 2 月 5 日から 2001 年 2 月 13 日
培 養 器	形 状	—	細胞培養用シャーレ
	大 き さ	—	φ 60mm
	培 養 液 量	—	5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	—	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	—	約 1×10^4 個/mL
	前 培 養 日 数	—	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	—	0.05 mL/培養器
	S 9 mix の添加量	—	0.83 mL/培養器
	S 9 の最終濃度	—	5 %
	S 9 蛋白の最終濃度	—	6.45 mg/培養器
	処 理 時 間	—	6 h
	回 復 時 間	—	18 h
備 考		—	—

(6) 確認試験結果（別表 3 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 12 月 16 日から 2000 年 12 月 21 日	2000 年 12 月 16 日から 2000 年 12 月 21 日
培 養 器	形 状	細胞培養用シャーレ	細胞培養用シャーレ
	大 き さ	φ 35mm	φ 35mm
	培 養 液 量	2 mL/培養器	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	約 1×10^4 個/mL	約 1×10^4 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	0.02 mL/培養器	0.02 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	10%ホルマリン水溶液で固定 0.1%クリスタル・バイオレットで染色 モノセレーターで計測		
備 考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

24h 処理による場合		48h 処理による場合	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.006	101	0.006	96
0.017	95	0.017	95
0.050	58	0.050	37
0.149	45	0.149	17
0.447 †	46	0.447 †	12
1.342 †	46	1.342 †	12
4.025 †	46	4.025 †	11

† : 被験物質の沈殿

(3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		2001 年 1 月 12 日から 2001 年 1 月 18 日	2001 年 1 月 12 日から 2001 年 1 月 18 日
培 養 器	形 状	細胞培養用シャーレ	細胞培養用シャーレ
	大 き さ	φ 60mm	φ 60mm
	培 養 液 量	5 mL/培養器	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	約 1×10^4 個/mL	約 1×10^4 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	0.05 mL/培養器	0.05 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	10%ホルマリン水溶液で固定 0.1%クリスタル・バイオレットで染色 モノセレーターで計測		
備 考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表 2 による)

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと)		陽 性		陰性	
判定の理由					
被験物質群では、短時間処理法、連続処理法のいずれの培養系列においても、切断、交換等の構造異常を有する細胞の出現頻度は0～1.5％、数的異常を有する細胞の出現頻度は0～0.5％であり、陰性対照群と比較して差はなかった。また、ギャップの出現数に関しても1用量につき0～2個であり、陰性対照群とほぼ同程度であった。なお、被験物質の沈殿が短時間処理法のS9無添加およびS9添加培養系列で認められ、その濃度は0.5mg/mL以上であった。					
一方、各陽性対照群では、それぞれ染色体の構造異常を有する細胞の顕著な増加が認められた。すなわち、構造異常の出現率はS9無添加および添加培養系列では各々22.5 および 37.5％であった。また、24 および 48 時間培養系列では、各々45.5 および 67.0％であった。数的異常の出現率については、いずれの培養系列も0～1.0％であった。					
以上の結果より、当該試験条件下におけるアセチルクエン酸トリブチルの染色体異常誘発作用は陰性と判断された。					
結果の評価に統計学的手法は用いない。					
その他、試験の信頼性に影響を及ぼした要因はない。					
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	-S9mix	- h 処理	_____ mg/mL
			+S9mix	- h 処理	_____ mg/mL
		連続処理法	_____	- h 処理	_____ mg/mL
			_____	- h 処理	_____ mg/mL
	数的異常	短時間処理法	-S9mix	- h 処理	_____ mg/mL
			+S9mix	- h 処理	_____ mg/mL
		連続処理法	_____	- h 処理	_____ mg/mL
			_____	- h 処理	_____ mg/mL

(2) 参考事項

50%細胞増殖抑制濃度を求めるために0.006、0.017、0.050、0.149、0.447、1.342、4.025mg/mLの濃度で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、50%細胞増殖抑制濃度は短時間処理法のS9無添加およびS9添加培養系列では4.025mg/mL以上であるが、0.447mg/mL以上の濃度での細胞増殖抑制率は0.447mg/mLと同程度であった。連続処理法の24時間培養系列では50%細胞増殖抑制濃度は約0.09mg/mL、48時間培養系列では約0.04mg/mLであった。なお、被験物質の沈殿が全ての培養系列で認められ、その濃度は0.447mg/mL以上であった。このことから、染色体異常試験の用量を短時間処理法のS9無添加およびS9添加培養系列では被験物質の沈殿が認められる濃度から認められない濃度および細胞増殖抑制が認められる濃度から認められない濃度まで網羅するために最高用量を1mg/mLとし、以下公比2で0.5、0.25、0.125mg/mLのそれぞれ計4用量とした。連続処理法の24時間培養系列では50%細胞増殖抑制濃度を明らかに上回る濃度である0.15mg/mLを最高用量とし、以下公比2で0.075、0.038、0.019mg/mLの計4用量、48時間培養系列では50%細胞増殖抑制濃度を明らかに上回る濃度である0.05mg/mLを最高用量とし、以下公差で0.04、0.03、0.02mg/mLの計4用量とした。

染色体異常試験で測定した細胞増殖率はS9無添加およびS9添加培養系列の0.125、0.25、0.5、1mg/mLの場合はそれぞれ99、95、89、70%および99、94、89、77%であり24時間培養系列の0.019、0.038、0.075、0.15mg/mLおよび48時間培養系列の0.02、0.03、0.04、0.05mg/mLの場合はそれぞれ90、73、60、35%および86、73、62、34%であった。

染色体異常試験の結果、全培養系列において、構造異常あるいは数的異常（倍数体）を有する細胞の出現頻度は陰性対照群と比較して差は認められなかったことから、結果を陰性と判定した。結果が陰性であった場合には短時間処理法のS9添加培養系列について確認試験を実施しなければならないことから回復時間を18時間から24時間に延長した確認試験を実施した。その結果、染色体異常試験とほぼ同様な結果が得られ、被験物質による染色体異常誘発性は細胞周期の遅延に左右されないことが確認された。

各陽性対照群では、構造異常を有する細胞の出現頻度が顕著に増加し、陰性および陽性各対照群では、共にバックグラウンドデータ（添付資料1）の近似値であったことから、当該試験が適正な条件下で実施されたことが確認された。

8.その他

試験実施施設	名称	株式会社 実医研 榛名試験所		
	所在地	群馬県吾妻郡吾妻町大字大戸 3303-58	電話	0279 (69) 2216
試験責任者			FAX	0279 (69) 2851
	職氏名			
	経験年数			
試験期間	平成 12 年 12 月 12 日 より 平成 13 年 3 月 30 日			
試験番号	H-00349			

別表1 染色体異常試験の結果(短時間処理法)

被験物質の名称: アセチルケン酸トリブチル

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度 %)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (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	その他	総異常細胞数 (%)			観察細胞数	倍 数 体	その他	総異常細胞数 (%)
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	1	0	1
			100	1	0	0	0	0	1	1		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	1		200	1	0	1 (0.5)
6-18	-	0.125	100	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	1	0	1
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	1	0	1 (0.5)
6-18	-	0.25	100	0	0	0	0	0	0	1	95	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	1		200	0	0	0 (0.0)
6-18	-	0.5 ↑	100	0	0	0	0	0	0	0	89	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0.0)
6-18	-	1 ↑	100	0	0	0	0	0	0	1	70	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	1		200	1	0	1 (0.5)
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	6	16	1	3	0	26	3		100	0	0	0
			100	5	11	0	3	0	19	2		100	0	0	0
			200	11	27	1	6	0	45 (22.5)	5		200	0	0	0 (0.0)
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	1	0	1	0	100	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	1		100	0	0	0
			200	1	0	0	1	0	2 (1.0)	1		200	0	0	0 (0.0)
6-18	+	0.125	100	0	0	0	0	0	0	1	99	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	1		200	0	0	0 (0.0)
6-18	+	0.25	100	0	0	0	0	0	0	0	94	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0.0)
6-18	+	0.5 ↑	100	1	1	0	0	0	2	0	89	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	2	1	0	0	0	3 (1.5)	0		200	0	0	0 (0.0)
6-18	+	1 ↑	100	1	0	0	0	0	1	0	77	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0.0)
6-18	+	陽性対照 (B[a]P) 0.02	100	10	24	0	4	0	34	5		100	0	0	0
			100	16	30	1	4	0	41	6		100	1	0	1
			200	26	54	1	8	0	75 (37.5)	11		200	1	0	1 (0.5)

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入する。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入する。
3. 陰性、陽性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入する。

4. 各群のプレートごとのデーターを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入する。
5. 被験物質の析出が認められた場合は、その用量に↑印を付す。

陰性対照: Dimethyl sulfoxide (DMSO) 陽性対照: Mitomycin C (MMC) Benzo[a] Pyrene (B[a]P)

PROJECT No. H-00349

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。

別表2 染色体異常試験の結果(連続処理法)

被験物質の名称: アセチルクエン酸トリブチル

処理時間 (h)	被験物質の 用量 (mg/mL)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度 %)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (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	その他	総異常細胞数 (%)			観察細胞数	倍 数 体	その他	総異常細胞数 (%)
24	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
		200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0.0)
24	0.019	100	0	0	0	0	0	0	1	90	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
		200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	1		200	0	0	0 (0.0)
24	0.038	100	0	0	0	0	0	0	0	73	100	0	0	0
		100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0.0)
24	0.075	100	0	0	0	0	0	0	0	60	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0		200	0	0	0 (0.0)
24	0.15	100	0	0	0	0	0	0	1	35	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
		200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	1		200	0	0	0 (0.0)
24	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	19	33	1	4	0	49	8		100	0	0	0
		100	16	28	1	4	0	42	5		100	1	0	1
		200	35	61	2	8	0	91 (45.5)	13		200	1	0	1 (0.5)
48	陰性対照 (DMSO)	100	1	0	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0.0)
48	0.02	100	0	0	0	0	0	0	1	86	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	1		200	0	0	0 (0.0)
48	0.03	100	0	0	0	1	0	1	0	73	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0.0)
48	0.04	100	0	0	0	1	0	1	0	62	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0.0)
48	0.05	100	1	0	0	0	0	1	0	34	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	1		100	1	0	1
		200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	1		200	1	0	1 (0.5)
48	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	27	51	1	7	0	70	5		100	1	0	1
		100	26	47	0	5	1	64	5		100	1	0	1
		200	53	98	1	12	1	134 (67.0)	10		200	2	0	2 (1.0)

〔備考〕

1. 被験物質の用量は、低い方から順に記入する。
2. 陰性、陽性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、横外にその名称を記入する。

3. 各群のプレートごとのデーターを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入する。

陰性対照: Dimethyl sulfoxide (DMSO) 陽性対照: Mitomycin C (MMC)

PROJECT No. H-00349

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。

別表3 染色体異常試験の結果(短時間処理法, 確認試験)

被験物質の名称: アセチルクエン酸トリブチル

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度 %)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度 %)			
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数 (%)			観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数 (%)
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	1	0	0	0	0	1	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0		200	0	0	0 (0.0)
6-18	+	0.125	100	0	0	0	0	0	0	0	93	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0		200	0	0	0 (0.0)
6-18	+	0.25	100	0	1	0	0	0	1	0	95	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
			200	1	1	0	0	0	2 (1.0)	0		200	0	0	0 (0.0)
6-18	+	0.5 †	100	0	0	0	0	0	0	0	87	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0		100	1	0	1
			200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0		200	1	0	1 (0.5)
6-18	+	1 †	100	1	0	0	0	0	1	0	71	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	1		200	0	0	0 (0.0)
6-18	+	陽性対照 (B[a]P) 0.02	100	13	30	0	4	0	43	5		100	1	0	1
			100	19	38	1	5	0	49	5		100	0	0	0
			200	32	68	1	9	0	92 (46.0)	10		200	1	0	1 (0.5)

【備考】

1. 処理時間の欄には、処理時間-回復時間の順に記入する。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入する。
3. 陰性、陽性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入する。

4. 各群のプレートごとのデータを一及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入する。
5. 被験物質の析出が認められた場合は、その用量に†印を付す。

PROJECT No. H-00349

陰性対照: Dimethylsulfoxide (DMSO) 陽性対照: Mitomycin C (MMC) Benzo[a]Pyrene (B[a]P)

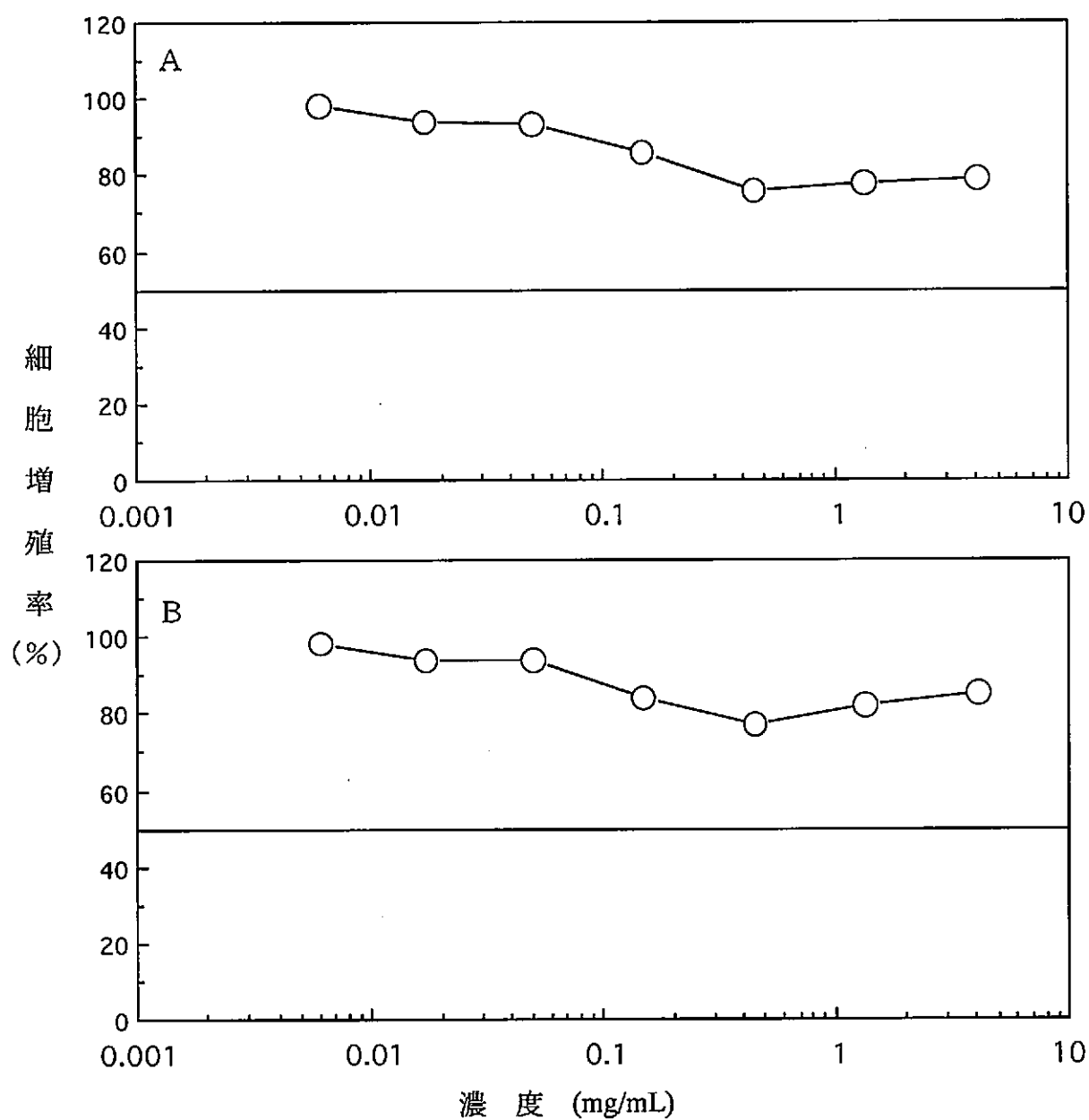


図 1-1. アセチルクエン酸トリブチルがCHL/IU細胞の増殖に及ぼす影響
(短時間処理法)

A : 代謝活性化によらない場合 (-S 9)

B : 代謝活性化による場合 (+S 9)

PROJECT No. H-00349

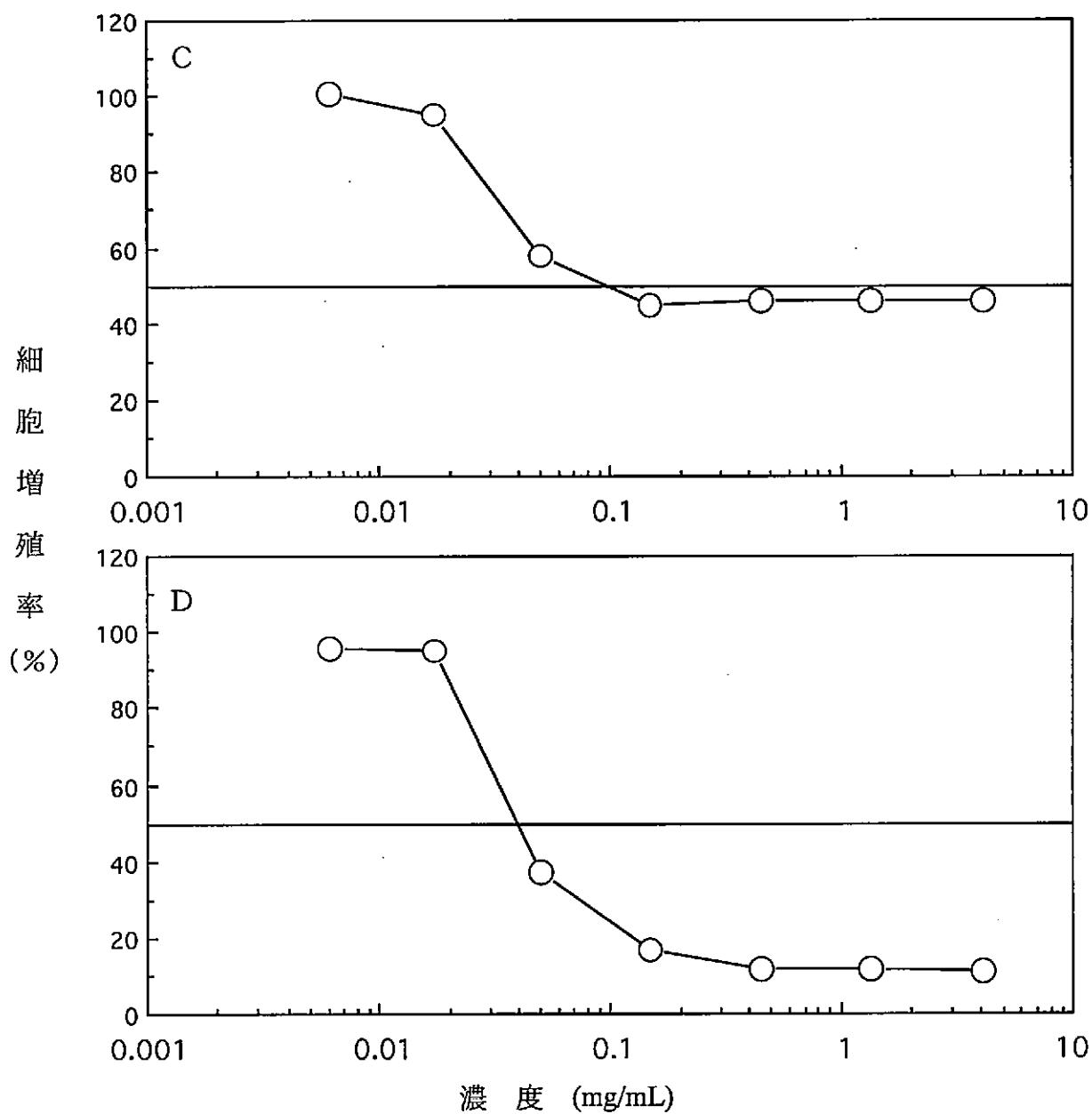


図 1-2. アセチルクエン酸トリブチルがCHL/IU細胞の増殖に及ぼす影響
(連続処理法)

C : 24 h 処理

D : 48 h 処理

PROJECT No. H-00349

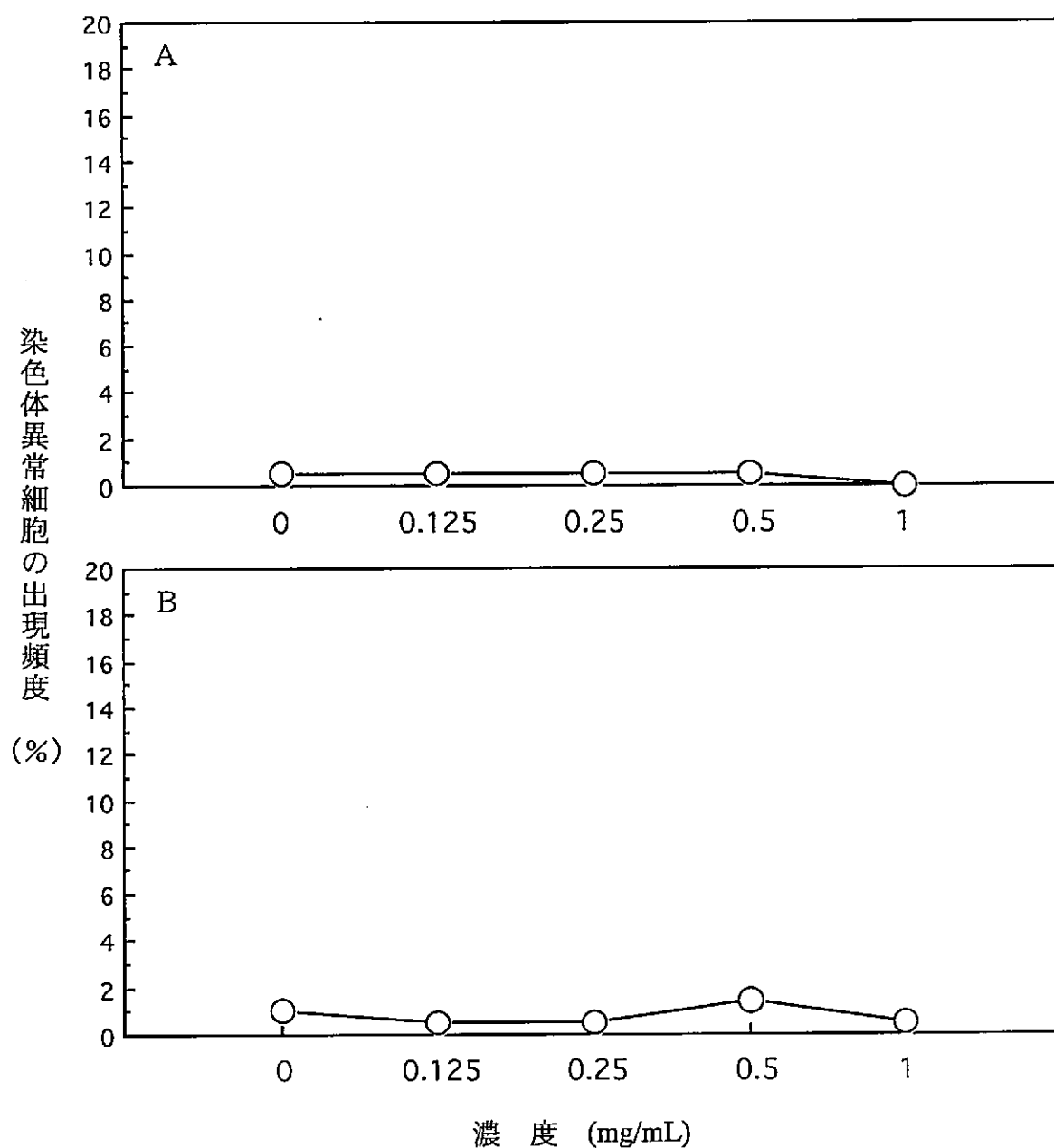


図 2-1. アセチルクエン酸トリブチルの染色体異常誘発性、用量-反応曲線
(短時間処理法, 染色体異常試験)

A: 代謝活性化によらない場合 (-S9)

B: 代謝活性化による場合 (+S9)

PROJECT No. H-00349

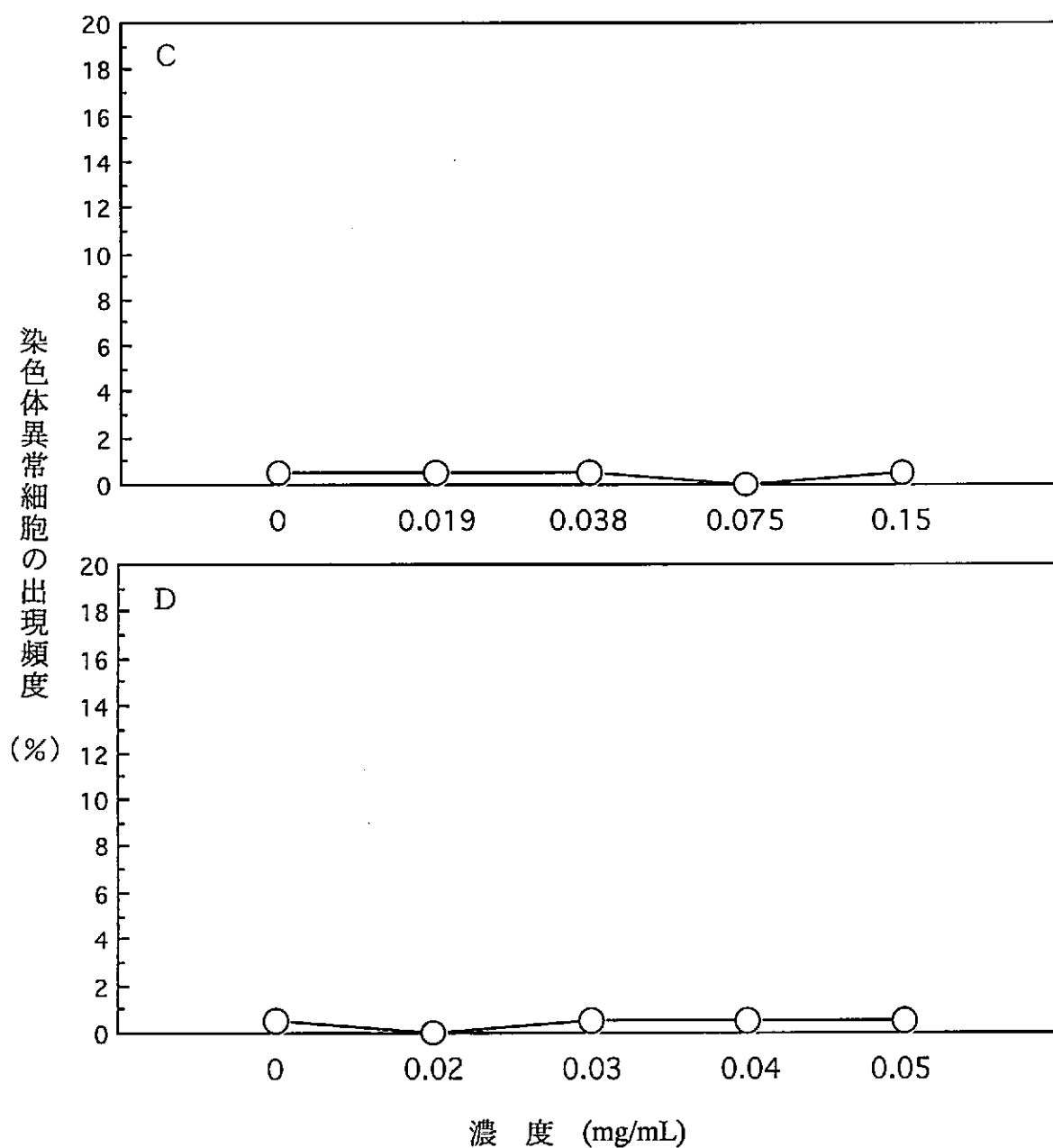


図 2-2. アセチルクエン酸トリブチルの染色体異常誘発性、用量-反応曲線
(連続処理法, 染色体異常試験)

C : 24 h 処理

D : 48 h 処理

PROJECT No. H-00349

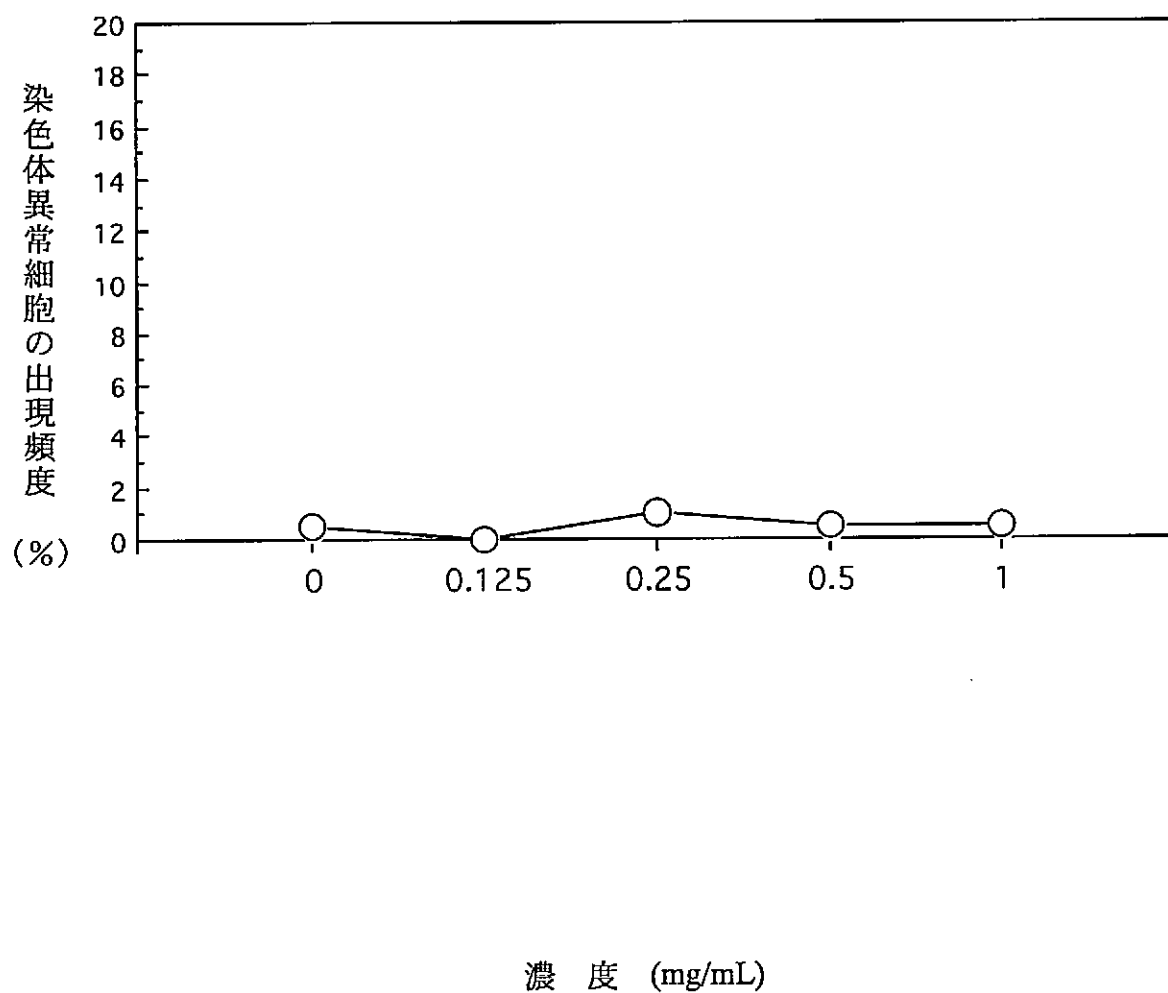


図 3. アセチルクエン酸トリブチルの染色体異常誘発性、用量-反応曲線
(短時間処理法, 確認試験)

代謝活性化による場合 (+ S 9)

PROJECT No. H-00349

添付資料 1

背景データ (Mean±S.D.)

S9mix	処理時間	処 理	観察細胞数	倍数体	構造異常細胞の出現頻度 (%)								合 計
					ギャップ g	染色分体型 ctb	染色体型 cte	染色体型		その他	- g	+ g	
								csb	cse				
—	6-18	陰性対照											
		DMSO	2200	0.1 ± 0.29	0.3 ± 0.46	0.5 ± 0.51	0.1 ± 0.35	0.0 ± 0.00	0.1 ± 0.29	0.0 ± 0.00	0.7 ± 0.48	1.0 ± 0.49	
		陽性対照											
		MMC	3600	0.3 ± 0.44	1.7 ± 1.10	5.8 ± 1.94	14.2 ± 2.97	0.2 ± 0.40	1.6 ± 0.93	0.0 ± 0.00	19.5 ± 2.80	20.7 ± 2.94	
+	6-18	陰性対照											
		DMSO	2200	0.1 ± 0.29	0.5 ± 0.60	0.2 ± 0.39	0.2 ± 0.43	0.0 ± 0.00	0.2 ± 0.39	0.0 ± 0.00	0.6 ± 0.50	1.0 ± 0.58	
		陽性対照											
		B [a] P	3600	0.3 ± 0.50	3.4 ± 1.98	13.7 ± 2.88	32.4 ± 4.98	0.5 ± 0.51	4.0 ± 1.38	0.0 ± 0.00	43.6 ± 3.67	44.9 ± 3.52	
—	24	陰性対照											
		DMSO	1600	0.1 ± 0.34	0.4 ± 0.51	0.3 ± 0.45	0.3 ± 0.48	0.0 ± 0.00	0.1 ± 0.25	0.0 ± 0.00	0.6 ± 0.50	1.1 ± 0.57	
		陽性対照											
		MMC	3000	0.7 ± 0.48	4.2 ± 1.68	15.1 ± 3.35	30.7 ± 3.85	0.3 ± 0.47	3.1 ± 1.06	0.1 ± 0.25	42.1 ± 3.28	43.3 ± 3.25	
—	48	陰性対照											
		DMSO	1800	0.2 ± 0.38	0.4 ± 0.61	0.3 ± 0.46	0.2 ± 0.43	0.0 ± 0.00	0.2 ± 0.38	0.0 ± 0.00	0.7 ± 0.49	1.1 ± 0.54	
		陽性対照											
		MMC	3200	0.9 ± 0.30	4.8 ± 1.93	26.5 ± 3.53	47.9 ± 4.75	0.8 ± 0.45	4.0 ± 1.08	1.5 ± 0.67	62.8 ± 3.97	63.2 ± 3.76	
DMSO : Dimethyl sulfoxide , MMC : Mitomycin C , B [a]P : Benzo [a] pyrene													


DMSO : Dimethyl sulfoxide , MMC : Mitomycin C , B [a]P : Benzo [a] pyrene

収集期間 : 1999年8月1日～2001年1月31日

PROJECT No. H-00349

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

TEST SUBSTANCE

- Identity: O-Acetyl tributyl citrate (CAS No. 77-90-7)
- Remarks (source): 
Purity: 98.8%
Stored at 4°C in dark until use. Stability during the period of use was confirmed by HPLC.

METHOD

- Method/guideline: OECD #473
 - Type of test: Chromosomal aberration test
 - GLP: Yes
 - Year (study performed): December 11, 2000 ~ February 23, 2001
 - Species/Strain: CHL/IU
 - Metabolic activation:
Species and cell type:
Sprague-Dawley male rat liver homogenates (S9)
Quantity: A volume of 0.83mL/5 mL (final concentration: 5%).
Induced or not induced:
Induced with phenobarbital and 5,6-benzoflavone.
 - Concentrations tested:
- S9: 0, 0.125, 0.250, 0.500, 1 μ g/mL (short term treatment)
+ S9: 0, 0.125, 0.250, 0.500, 1 μ g/mL (short term treatment)
24 hr: 0, 0.019, 0.038, 0.075, 0.15 μ g/mL (continuous treatment)
48 hr: 0, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 μ g/mL (continuous treatment)
 - Statistical methods: No statistical method was followed.
- Remarks field for Test Conditions
- Test Design:
- Procedure
- In the case of short term treatment without (-S9) and with (+S9), the cells were treated for 6 hrs without and with S9 and cultivated with fresh medium for 18 hrs. In the case of continuous treatment, the cells were treated for 24 and 48 hrs without S9.
- In the case of confirmation test, the cells were treated for 6 hrs with S9 and cultivated with fresh medium for 24 hrs
- Frequency of dosing: One time
- Plates/dose: 2

Negative control:

The solvent, dimethyl sulfoxide (DMSO) was used

Positive controls:

Mitomycin C was used in continuous treatment for 24 hrs and 48 hrs and also in short term treatment without S9.

B(a)P was used in short term treatment with S9.

Description of confirmation study:

A confirmation test was carried out in short-term treatment with S9 with the recovery period of 24 hr instead of 18 hr to assess whether the test substance in the presence of S9 increased the chromosomally aberrant cells by changing the cell proliferation time.

Number of metaphases analyzed: 100 metaphases/plate or specimen

Criteria for evaluating results:

The test substance was judged positive (+) when the incidence of cells with chromosomally aberration increased dose-dependently as compared with those of concurrent negative controls or a reproducible increase in the incidence of cells with chromosomally aberration at one or more concentrations and the others were judged negative (-).

RESULTS

- Cytotoxic concentration:

Short term treatment with and without metabolic activation:

Little cytotoxicity was noted at the dose of 0.5mg/mL or above. But, none of the tested doses caused to decrease the cell growth to 50% or more.

Continuous treatment for 24 hrs:

Cytotoxicity was noted at the dose of 0.38mg/mL or above and the dose of about 0.09mg/mL caused to decrease the cell growth to 50% or more.

Continuous treatment for 48 hrs:

Cytotoxicity was noted at the dose of 0.03mg/mL or above and the dose of about 0.04mg/mL caused to decrease the cell growth to 50% or more

- Genotoxic effects:

- Short term treatment without metabolic activation (-S9)
- Short term treatment with metabolic activation (+S9)
- Continuous treatment for 24 hrs and 48 hrs

- Statistical analysis:

Statistical analysis was not done.

CONCLUSION

Chromosomal aberration in CHL/IU cells is negative either in short term treatment without metabolic activation (–S9) and with metabolic activation (+S9) or in continuous treatment for 24 hrs and 48 hrs.

DATA QUALITY

- Reliabilities: Valid without restriction

Remarks field for Data Reliability

Well conducted study, carried out by Nippon Experimental Medical Research Institute Co. Ltd., Gunma, Japan.

REFERENCES

None

GENERAL REMARKS

In the case of short term treatment with and without metabolic activation system, the doses were selected and used to cover the dose-range of little toxic to non-toxic and soluble to insoluble. But, in the case of continuous treatment for 24 hr and 48 hrs, the doses were selected and used to cover the dose-range of toxic (more than 50% growth inhibition) to non-toxic or little toxic.