

# 最 終 報 告 書

リアクティブブルー19 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験  
(試験番号：00-140)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

## 陳 述 書

試験表題：リアクティブブルー19 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号： 00-140

本試験は、OECD の試験法ガイドライン“OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 473, *In vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test(1997)” および OECD の GLP “OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(1997)” に定める基準に準拠して実施した。

試験責任者



試験表題：リアクティブブルー19 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：00-140

試験委託者：

名 称 製品評価技術センター  
所 在 地 東京都渋谷区西原二丁目 49 番 10 号  
委託責任者

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所  
所 在 地 神奈川県相模原市橋本台三丁目 7 番 11 号  
運営管理者  
試験責任者  
信頼性保証  
責 任 者

試験期間：

試験開始日 平成 12 年 11 月 29 日  
実験期間 開始日：平成 12 年 12 月 9 日  
終了日：平成 13 年 2 月 3 日  
試験終了日 平成 13 年 3 月 29 日

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因：

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は、最終報告書作成後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の保管については、試験委託者と協議して決める。

1. 試験計画書
2. 被験物質に関する記録
3. 試験結果に関する記録
4. 信頼性保証に関する記録
5. 最終報告書

試験責任者，担当者および業務分担

試験責任者

氏名

試験担当者およびその業務分担

実験操作

:

鏡検

:

データ整理

:

## 信頼性保証証明書

試験表題 : リアクティブブルー 19 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 : 00-140

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
-----------------	-------------------	-------------------

### 1. 試験実施状況査察

細胞培養開始 平成12年12月06日	平成12年12月06日	平成12年12月06日
-----------------------	-------------	-------------

染色体異常試験：被験物質の調製および添加 細胞増殖抑制試験再試験：細胞播き・細胞の継代 平成12年12月18日	平成12年12月18日	平成12年12月18日
---	-------------	-------------

染色体異常試験：細胞増殖率の測定(標本作製)・染色体標本の作製・培養細胞の観察 平成12年12月19日	平成12年12月19日	平成12年12月19日
--	-------------	-------------

染色体異常試験：細胞増殖率の測定(測定)・染色体標本の染色 細胞増殖抑制試験再試験：S9mixの使用 平成12年12月21日	平成12年12月21日	平成12年12月21日
--	-------------	-------------

染色体異常試験：染色体標本の観察 平成13年01月17日	平成13年01月17日	平成13年01月17日
---------------------------------	-------------	-------------

2. 生データ査察 平成13年03月10日	平成13年03月12日	平成13年03月12日
--------------------------	-------------	-------------

3. 報告書(草案)審査 平成13年03月10日	平成13年03月12日	平成13年03月12日
-----------------------------	-------------	-------------

4. 報告書審査 平成13年03月29日	平成13年03月29日	平成13年03月29日
-------------------------	-------------	-------------

上記の審査・査察により、本試験が「OECDのGLP」に従って実施され、本報告書には、当該試験で使用方法・手順が忠実に記載され、試験成績には、当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されていることを確認した。

平成 13 年 3 月 29 日  
財団法人 畜産生物科学安全研究所

## 目 次

要約 .....	1 頁
試験目的 .....	2
材料および方法 .....	2
1. 被験物質 .....	2
2. 対照物質 .....	3
3. 溶媒 .....	3
4. 試験細胞株 .....	4
5. 培養液 .....	4
6. 培養条件 .....	4
7. S9 mix .....	4
8. 細胞増殖抑制試験 .....	5
1) 被験物質の供試液の調製 .....	5
2) 細胞の処理 .....	5
3) 細胞増殖率の測定 .....	6
9. 染色体異常試験 .....	7
1) 被験物質および陽性対照物質の用量 .....	7
2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製 .....	7
3) 細胞の処理 .....	7
4) 試験群の構成および使用シャーレ数 .....	8
5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定 .....	8
6) 染色体の観察 .....	9
7) 染色体異常の分類および集計 .....	9
8) 試験結果の判定 .....	10
結果 .....	10
1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下） .....	10
2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下） .....	11
3. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理） .....	11
4. 染色体異常試験（連続処理法：48 時間処理） .....	11
5. D <sub>20</sub> 値 .....	12

結論 .....	13
参考文献 .....	14

表：

表 1－1	リアクティブブルー19 の染色体異常試験結果 (短時間処理法：S9 mix 非存在下) .....	15
表 1－2	リアクティブブルー19 染色体異常試験結果 (短時間処理法：S9 mix 存在下) .....	16
表 2－1	リアクティブブルー19 染色体異常試験結果 (連続処理法：24 時間処理) .....	17
表 2－2	リアクティブブルー19 染色体異常試験結果 (連続処理法：48 時間処理) .....	18

図：

図 1	構造異常を有する細胞の出現頻度 .....	19
図 2	数的異常を有する細胞の出現頻度 .....	20

写真

写真 1 .....	21
写真 2 .....	21

添付資料 .....	22
------------	----

## 要 約

リアクティブブルー19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由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いて *In vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、短時間処理法の場合は 312.5~5000  $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の場合は 31.25~2000  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では 2500  $\mu\text{g/mL}$  以上、S9 mix 存在下では 5000  $\mu\text{g/mL}$  で、また、連続処理法の場合は、24 時間および 48 時間処理ともに 500  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められた。

したがって、染色体異常試験における用量は、短時間処理法の場合は、S9 mix 非存在および存在下ともに 31.25, 625, 1250, 2500 および 5000  $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の場合は、24 時間処理では 62.5, 125, 250, 500 および 1000  $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 62.5, 125, 250 および 500  $\mu\text{g/mL}$ 、とした。

試験の結果、短時間処理法 S9 mix 非存在下では、用量依存的な染色体構造異常細胞の増加が認められ、625 および 1250  $\mu\text{g/mL}$  での増加は統計学的に有意なものであった。また、S9 mix 存在下では、2500  $\mu\text{g/mL}$  で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。

一方、連続処理法においては、24 時間処理で用量依存的な染色体構造異常細胞の増加が認められ、250 および 500  $\mu\text{g/mL}$  での増加は統計学的に有意なものであった。また、48 時間処理では、500  $\mu\text{g/mL}$  で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。

なお、短時間処理法 S9 mix 非存在下の 2500  $\mu\text{g/mL}$  以上および S9 mix 存在下の 5000  $\mu\text{g/mL}$  並びに連続処理法 24 時間処理の 1000  $\mu\text{g/mL}$  では、細胞に対する毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、リアクティブブルー19の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。計算された  $D_{20}$  値は、短時間処理法 S9 mix 非存在下では 1.32 mg/mL、S9 mix 存在下では 4.39 mg/mL、連続処理法 24 時間処理では 0.72 mg/mL、48 時間処理では 1.16 mg/mL であった。

## 試験目的

この試験は、リアクティブブルー19のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするために実施した。

## 材料および方法<sup>1, 2)</sup>

### 1. 被験物質

名 称 : リアクティブブルー19

別名 1-アミノ-4-(3-(2-(スルファート)エチル)スルホニルアニリノ)  
アントラキノ-2-スルホン酸 2ナトリウム塩

CAS番号 : 2580-78-1

ロット番号 :

純 度 : 77.1% (分析日: 平成12年10月25日)

不純物

1-アミノアントラキノ-2-スルホン酸 ナトリウム塩 : 5.3%

1-アミノ-4-ヒドロキアントラキノ-2-スルホン酸 ナトリウム塩 : 5.3%

1-アミノ-4-ヒドロキアントラキノ-2-スルホン酸 ナトリウム塩 : 4.3%

1-アミノ-4-(3-ベンチルスルホニルアニリノ)アントラキノ-2-スルホン酸 ナトリウム塩 : 3.7%

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 1.1%

水分 : 1.8%

入手先(製造元) :

の試験用精製物を、製品評価技術センターを通じて入手

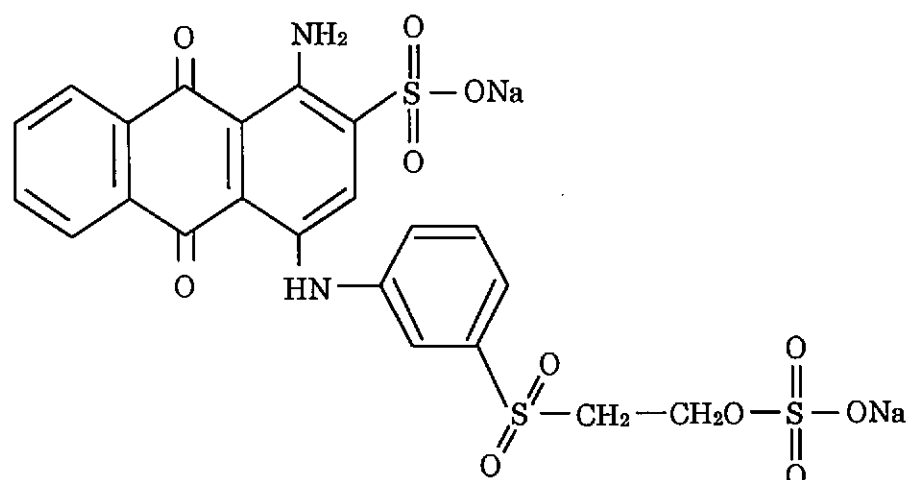
入 手 日 : 平成12年11月9日

入 手 量 : 25 g

物 性 等 :

化学名 1-アミノ-4-(3-(2-(スルファート)エチル)スルホニルアニリノ)アントラキノ-2-スルホン酸 2ナトリウム塩  
[ Disodium 1-amino-4-(3-(2-(sulfato)ethyl)sulfonylanilino)anthraquinone-2-sulfonate ]

### 構造式



分子式  $C_{22}H_{16}N_2O_{11}S_3Na_2$

分子量 626.56

性状(常温) 青色粉末

溶解性 水溶性 (50 mg/mL 以上)

安定性 : 安定 [実験終了後、残余被験物質を(財)畜産生物科学安全研究所において分析 (平成 13 年 3 月 7 日) した結果、純度は 77.0%で、実験期間中被験物質は安定であったことを確認した。]

保管条件 : 冷暗所 (4°C), 密栓

## 2. 対照物質

陰性対照物質は、被験物質の溶媒として使用した生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場, ロット番号 K8H89, 局方) を用いた。陽性対照物質は、連続処理法および短時間処理法 S9 mix 非存在下では 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG, Aldrich Chemical Company, ロット番号 00613PN, 純度 97%) を、短時間処理法 S9 mix 存在下では 3,4-Benzo[a]pyrene (B[a]P, Sigma Chemical Company, ロット番号 57F-3434, 純度 98%) を用いた。

## 3. 溶媒

被験物質は水に可溶であるため、溶媒には生理食塩液を用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[a]P の溶媒については、ジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業株式会社, ロット番号 ACH7185, 純度 99.9%) を用いた。

#### 4. 試験細胞株

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部（元：国立衛生試験所 変異原性部）から昭和 60 年 1 月 13 日に分与を受けたチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU）を使用した。供試細胞は，細胞懸濁液に 10vol%の割合で DMSO を添加し，液体窒素条件下で保存しておいたものを培養液に戻し，解凍後の継代数が 4 回までのものを使用した。

#### 5. 培養液

Eagle-MEM 粉末培地（Gibco Laboratories, ロット番号 1021800）を常法に従い調製し，これに非動化（56℃, 30 分間加熱処理）仔牛血清（Gibco Laboratories, ロット番号 1068210）を 10%の割合で添加したものを用了。

#### 6. 培養条件

供試細胞は，CO<sub>2</sub> インキュベーター（Napco 社）を用い，CO<sub>2</sub> 濃度 5%，空気 95%，温度 37℃，加湿条件下で培養した。

#### 7. S9 mix

S9 mix は，ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素分画（S9）にコファクターを加えて凍結されたものをキッコーマン株式会社から購入（ロット番号：CAM-433，2000 年 9 月 29 日製造，2000 年 11 月 10 日，2000 年 11 月 21 日購入）し，-80℃以下で保存したものを，使用時に冷水中で解凍して用了。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 mL あたりの組成は，次のとおりである。

## 〔S9 製造法〕

### A. 使用動物

- a) 種・系統： Sprague-Dawley 系ラット（日本エスエルシー株式会社）
- b) 性・週齢： 雄・7 週齢
- c) 体 重： 205～245g

### B. 誘導法

- a) 誘導物質： phenobarbital (PB), 5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路： 腹腔内投与
- c) 投与法（投与開始日起算）
  - 1 日目－PB 30 mg/kg, 2, 3, 4 日目－PB 60 mg/kg
  - 3 日目－BF 80 mg/kg

### C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離(9000×g)し、その上清を採取

## S9 mix 1 mL 当たりの組成

S9	0.3	μmol
MgCl <sub>2</sub>	5	μmol/0.1 mL
KCl	33	μmol/0.1 mL
G-6-P	5	μmol/0.1 mL
NADP	4	μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4	μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1	mL

## 8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な用量を検討するため、短時間処理法では 312.5, 625, 1250, 2500 および 5000 μg/mL, 連続処理法では 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 および 2000 μg/mL の用量を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行った。試験には各用量について 2 枚のシャーレを使用した。

### 1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を生理食塩液に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで、原液の一部を生理食塩液で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。被験物質の添加量は、各シャーレの培養液量の 10 vol% とした。なお、供試液の調製に際しては、純度換算を行った。

### 2) 細胞の処理

短時間処理法の場合、直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に  $4 \times 10^3$  個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え、培養開始 3 日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除

き、生理食塩液（陰性対照）または、被験物質の供試液各 0.3 mL をシャーレに加えた。また、S9 mix 存在下の場合は各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除き、S9 mix 0.5 mL を加えた後、生理食塩液または被験物質の供試液各 0.3 mL をシャーレに加えた。培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加えて 18 時間培養した。一方、連続処理法の場合は、短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し、培養開始 3 日後に生理食塩液または被験物質の供試液各 0.5 mL を加えて 24 時間および 48 時間培養した。培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10 vol%ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後、水洗し、0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後、室温で一晩自然乾燥した。

### 3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は、染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計（モノセレーターII，MI-60，オリンパス光学工業株式会社）を用いて測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果は下表に示したとおり、短時間処理法の場合は、S9 mix 非存在下では 2500  $\mu$ g/mL 以上、S9 mix 存在下では 5000  $\mu$ g/mL で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量は S9 mix 非存在下では 1250～2500  $\mu$ g/mL 間、S9 mix 存在下では 2500～5000  $\mu$ g/mL 間にあるものと判断された。連続処理法の場合は、24 時間および 48 時間処理ともに 500  $\mu$ g/mL 以上で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量は 24 時間処理では 500  $\mu$ g/mL の近くに、48 時間処理では 250～500  $\mu$ g/mL 間にあるもの判断された。

#### 〔短時間処理法〕

用 量 ( $\mu$ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[ 100.0 ]	100	100	[ 100.0 ]
312.5	91	92	[ 91.5 ]	103	104	[ 103.5 ]
625	77	83	[ 80.0 ]	91	100	[ 95.5 ]
1250	63	65	[ 64.0 ]	86	87	[ 86.5 ]
2500	42	42	[ 42.0 ]	56	61	[ 58.5 ]
5000	20	24	[ 22.0 ]	38	39	[ 38.5 ]

[ ] : 平均値

〔連続処理法〕

用 量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[ 100.0 ]	100	100	[ 100.0 ]
31.25	96	97	[ 96.5 ]	95	97	[ 96.0 ]
62.5	96	98	[ 97.0 ]	88	90	[ 89.0 ]
125	84	83	[ 83.5 ]	83	83	[ 83.0 ]
250	73	72	[ 72.5 ]	60	55	[ 57.5 ]
500	50	45	[ 47.5 ]	29	31	[ 30.0 ]
1000	48	47	[ 47.5 ]	23	25	[ 24.0 ]
2000	38	32	[ 35.0 ]	27	35	[ 31.0 ]

[ ] : 平均値

## 9. 染色体異常試験

### 1) 被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の用量は、短時間処理法の場合は S9 mix 非存在および存在下ともに  $5000\mu\text{g/mL}$  を最高用量とし、以下公比 2 で 2500, 1250, 625 および  $312.5\mu\text{g/mL}$  の計 5 用量、連続処理法の場合は 24 時間処理では  $1000\mu\text{g/mL}$  を最高用量とし、以下公比 2 で 500, 250, 125 および  $62.5\mu\text{g/mL}$  の計 5 用量、48 時間処理では  $500\mu\text{g/mL}$  を最高用量とし、以下公比 2 で 250, 125 および  $62.5\mu\text{g/mL}$  の計 4 用量とした。陽性対照物質の MNNG は  $2.5\mu\text{g/mL}$ , B[a]P は  $10\mu\text{g/mL}$  の用量を用いた。

### 2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を生理食塩液に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで、原液の一部を生理食塩液で順次希釈し、所定用量の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は  $0.5\text{ mg/mL}$ , B[a]P は  $2.0\text{ mg/mL}$  の供試液を調製した。なお、供試液の調製に際しては、純度換算を行った。

### 3) 細胞の処理

$4 \times 10^3$  個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に加え、3 日間培養後、下記の方法で処理した。培養には 1 用量当たり 4 枚のシャーレを用い、そのうち 2 枚は染色体標本作製用に、残りの 2 枚は細胞増殖率測定用に使用した。但し、陽性対照群については細胞増殖率の測定は行わず、用いるシャーレは染色体標本作製用の 2 枚とした。

短時間処理法の S9 mix 非存在下の場合は、各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、生理食塩液および被験物質供試液は 0.3 mL、MNNG の供試液は 0.015 mL を各シャーレに添加して培養した。また、S9 mix 存在下の場合は、各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除いた後、S9 mix 0.5 mL を加え、続いて、生理食塩液および被験物質供試液は 0.3 mL、B[a]P の供試液は 0.015 mL を各シャーレに添加して培養した。S9 mix 非存在および存在下のいずれの場合も、培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。

連続処理法の場合は、生理食塩液および被験物質供試液は 0.5 mL、MNNG の供試液は 0.025 mL を各シャーレに加え、24 時間および 48 時間培養した。

#### 4) 試験群の構成および使用シャーレ数

##### 〔短時間処理法〕

用量( $\mu$ g/mL)		使用シャーレ数	
		S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0	(陰性対照) <sup>a</sup>	4	4
312.5		4	4
625		4	4
1250		4	4
2500		4	4
5000		4	4
2.5	(陽性対照) <sup>b</sup>	2	--
10	(陽性対照) <sup>c</sup>	--	2

a : 生理食塩液, b : MNNG, c : B[a]P, 使用シャーレ数 : 52

##### 〔連続処理法〕

用量( $\mu$ g/mL)		使用シャーレ数	
		24 時間処理	48 時間処理
0	(陰性対照) <sup>a</sup>	4	4
62.5		4	4
125		4	4
250		4	4
500		4	4
1000		4	--
2.5	(陽性対照) <sup>b</sup>	2	2

a : 生理食塩液, b : MNNG, 使用シャーレ数 : 48

#### 5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

標本作製の 2 時間前に、培養中の各シャーレにコルセミド (Gibco Laboratories,

ロット番号 1059548) を最終濃度として  $0.2\mu\text{g/mL}$  となるように添加した。培養終了後、培養液を取り除き、 $0.2\text{w/v}\%$  トリブシン水溶液  $2\text{ mL}$  で処理して細胞をシャーレから剥離し、新鮮培養液  $5\text{ mL}$  を入れた遠沈管に移し、 $1000\text{ rpm}$ 、 $5$  分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の  $75\text{mM}$  塩化カリウム水溶液  $4\text{ mL}$  を加えて懸濁し、 $37^\circ\text{C}$  で  $15$  分間低張処理した。低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸 ( $3:1$ ) 混合液 ( $\text{v/v}$ )  $1\text{ mL}$  を添加して固定した。 $1000\text{ rpm}$  で  $5$  分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液  $4\text{ mL}$  で懸濁・固定した。この操作を  $3$  回繰り返した後、少量の固定液で適切な密度に細胞を懸濁し、スライドガラスの  $2$  ヶ所に  $1$  滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、Sørensen 緩衝液 ( $\text{pH } 6.8$ , 株式会社ヤトロン, ロット番号 1478) を用いて希釈した  $1.4\text{ vol}\%$  ギムザ液で約  $15$  分間染色した。水洗後、室温で乾燥して染色体標本とした。標本は、 $1$  シャーレ当たり  $3$  枚作製した。

細胞増殖率の測定は、培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を  $2$  回洗浄し、 $10\text{ vol}\%$  ホルマリン水溶液を加えて約  $10$  分間固定した。固定後水洗し、 $0.1\text{ w/v}\%$  クリスタルバイオレット水溶液で約  $10$  分間染色し、水洗後乾燥した。単層培養細胞密度計 (モノセレーター II, MI-60, オリンパス光学工業株式会社) を用いて陰性 (溶媒) 対照群の細胞増殖率を  $100\%$  とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

## 6) 染色体の観察

染色体の観察は、 $60$  倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率  $600$  倍で検鏡した。観察は標本をすべてコード化し、盲検法で行った。各用量とも、染色体が明瞭に識別でき、染色体の数が  $25\pm 2$  本の分裂中期像について、 $1$  シャーレ当たり  $100$  個、すなわち  $1$  用量当たり  $2$  枚のシャーレの合計  $200$  個について観察した。

## 7) 染色体異常の分類および集計<sup>3)</sup>

染色体異常の分類は、構造異常については、染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換 (二動原体、環状染色体など) およびその他 (断片化など) とした。数的異常については、倍数性細胞 (倍数体) のみを記録した。

ギャップ (染色分体型および染色体型) については、異常として記録したが、構造異常には含めなかった。ギャップは、染色分体幅よりも狭い非染色性部位と

した。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は観察した細胞 200 個中に認められた異常細胞数を表示した。

#### 8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料  $\chi^2$  検定を行って、有意差（有意水準 5%以下）が認められた場合は、Fisher の直接確立法を用いて陰性対照群と各用量群との間の有意差検定（有意水準は多重性を考慮して、5%または 1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻度が陰性対照群に比べ 2 用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められた場合、染色体異常誘発性は陽性と判定した。なお、単一用量でのみ有意な増加が認められた場合には、それに近い用量を用いて確認試験を行い、その結果、再現性が認められた場合には、染色体異常誘発性は陽性とした。陽性結果が得られた場合には、D<sub>20</sub> 値〔分裂中期像の 20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量（mg/mL）〕を算出した。

### 結 果

#### 1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表 1-1 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.5%と低値であった。被験物質群では 312.5, 625 および 1250  $\mu$ g/mL でそれぞれ 4.5, 6.5 および 20.5%と用量に依存した出現頻度の増加が認められ、625 および 1250  $\mu$ g/mL での増加は陰性対照群と比較して統計学的に有意なものであった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 98.0%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数体は、陰性対照群では 0.5%の低い出現頻度で認められ、被験物質群においても 0 ないし 0.5%の出現頻度であった。また、陽性対照群においてもその出現頻度は 0.5%であった。

なお、2500 および 5000  $\mu\text{g/mL}$  では、被験物質の細胞に対する毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

## 2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表 1-2 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 0.5% と低値であった。被験物質群では 312.5, 625, 1250 および 2500  $\mu\text{g/mL}$  でそれぞれ 0, 1.0, 3.0, 12.0% の出現頻度で認められ、2500  $\mu\text{g/mL}$  での増加には陰性対照群との間に有意差が認められた。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 69.0% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体の出現頻度は、陰性対照群では 0.5% と低値であった。被験物質群では 625 および 2500  $\mu\text{g/mL}$  において 0.5% の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では倍数体は認められなかった。

なお、5000  $\mu\text{g/mL}$  では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

## 3. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

結果は表 2-1 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0% と低値であった。被験物質群では 62.5, 125, 250 および 500  $\mu\text{g/mL}$  でそれぞれ 2.0, 2.0, 6.0 および 14.5% と用量依存的な出現頻度の増加が認められ、250 および 500  $\mu\text{g/mL}$  での増加は統計学的に有意なものであった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 99.0% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照および陽性対照群並びに被験物質群のいずれの群においても認められなかった。

なお、1000  $\mu\text{g/mL}$  では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

## 4. 染色体異常試験（連続処理法：48 時間処理）

結果は表 2-2 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対

照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 62.5, 125, 250 および 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  でそれぞれ 1.5, 1.5, 1.0 および 10.0%であり, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では陰性対照群と比べて有意な増加を示した。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 91.5%であり, 顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については, 陰性対照群では認められなかった。被験物質群では 0 ないし 1.0%の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では, 2.0%の低い出現頻度であった。

## 5. $D_{20}$ 値<sup>4)</sup>

短時間処理法および連続処理法のいずれの方法においても染色体異常細胞の増加が認められたため,  $D_{20}$  値を算出した。

その結果は次表に示したとおりであり, 短時間処理法および連続処理法のそれぞれ  $D_{20}$  値は, いずれも S 値 (対象となった  $D_{20}$  値のうち, 相関係数  $r$  が大きく, 陰性対照群を含む群数  $n$  が多いものほどより妥当性が高いとする考えに基づく指標) が小さいものを採用した。すなわち, 短時間処理法の場合は S9 mix 非存在下では 1.32 mg/mL, S9 mix 存在下では 4.39 mg/mL, 連続処理法の場合は 24 時間処理では 0.72 mg/mL, 48 時間処理では 1.16 mg/mL であった。

回帰曲線		D <sub>20</sub> 値 ( $\mu\text{g/mL}$ )	S 値 $\left[ S = \frac{D_{20}}{r} \times \frac{1}{n^2} \right]$
短時間処理法			
S9 mix 非存在下	$y = 0.0152686x - 0.100008$ ( $r = 0.967649$ )	<u>1316.43</u>	<u>85.0275</u>
	$y = 19.5995x - 43.5977$ ( $r = 0.904489$ )	1753.39	121.435
S9 mix 存在下	$y = 0.00484x - 1.2375$ ( $r = 0.957548$ )	<u>4387.91</u>	<u>183.298</u>
	$y = 8.63705x - 20.8481$ ( $r = 0.823017$ )	53630*	2606.51
連続処理法			
24 時間処理	$y = 0.0278x - 0.112503$ ( $r = 0.982093$ )	<u>723.471</u>	<u>29.4665</u>
	$y = 10.298x - 16.494$ ( $r = 0.876114$ )	3497.72	159.692
48 時間処理	$y = 0.0174x - 0.262502$ ( $r = 0.877045$ )	<u>1164.51</u>	<u>53.1107</u>
	$y = 5.81341x - 9.19018$ ( $r = 0.70567$ )	104998*	5951.7

\*：算出に用いた最高用量の 10 倍以上の値を示し，対象外のものであった。

## 結 論

リアクティブブルー-19 について染色体異常誘発性の有無を調べるため，CHL/IU 細胞を用いた *In vitro* における染色体異常試験を実施した。その結果，短時間処理法 S9 mix 非存在下および連続処理法 24 時間処理において染色体構造異常細胞の用量依存的，かつ，有意な増加が認められた。また，短時間処理法 S9 mix 存在下および連続処理法 48 時間処理においても標本を観察し得た高用量で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。

なお，陰性対照群では，染色体異常細胞の出現頻度は背景データ（添付資料）の範囲内であり，陽性対照群においても，それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の染色体異常細胞の出現頻度が認められた。また，細胞増殖抑制試験および染色体異常試験を通して雑菌の混入は認められなかった。以上により，本試験は有効と判定した。

したがって，本実験条件下では，リアクティブブルー-19 の CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。また，本被験物質の D<sub>20</sub> 値は，短時間処理法 S9 mix

非存在下では 1.32 mg/mL, S9 mix 存在下では 4.39 mg/mL, 連続処理法 24 時間処理では 0.72 mg/mL, 48 時間処理では 1.16 mg/mL であった。本試験結果は, CHL/IU 細胞において染色体異常を有する細胞の出現頻度が 5%以上 10%未満を疑陽性, 10%以上を陽性とする生物学的判断基準<sup>5)</sup>からみても陽性と判断されるものであった。

#### 参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.
- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). "Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, 66, 277-290.
- 3) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス", 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 16-37.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化審法毒性試験法の解説 改定版", 化学工業日報社, 東京, 1992, pp. 51-52.
- 5) 石館 基 監修, "改定増補 染色体異常試験データ集", エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 19.

表 1-1 リアクティブブルー19の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	0	0	1	0	2	1		100	0	0	0
	100	1	0	0	0	0	1	0	100.0	100	1	0	1
	200	2	0	0	1	0	3	1		200	1	0	1
		( 1.0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 1.5 )	( 0.5 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
312.5	100	1	2	0	0	0	3	1		100	1	0	1
	100	2	4	0	0	0	6	1	89.5	100	0	0	0
	200	3	6	0	0	0	9	2		200	1	0	1
		( 1.5 )	( 3.0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 4.5 )	( 1.0 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
625	100	6	1	0	0	0	7	4		100	1	0	1
	100	5	2	0	0	0	6	0	78.0	100	0	0	0
	200	11	3	0	0	0	13	4		200	1	0	1
		( 5.5 )	( 1.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 6.5 )*	( 2.0 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
1250	100	15	4	1	0	0	18	1		100	0	0	0
	100	21	5	0	0	0	23	0	63.5	100	0	0	0
	200	36	9	1	0	0	41	1		200	0	0	0
		( 18.0 )	( 4.5 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 20.5 )**	( 0.5 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
2500 #	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—	39.5	100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )			( — )	( — )	( — )
5000 #	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—	23.0	100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )			( — )	( — )	( — )
陽性対照	100	59	97	6	0	0	100	3		100	1	0	1
	100	46	95	0	2	0	96	2	—	100	0	0	0
	2.5	200	105	192	6	2	196	5		200	1	0	1
		( 52.5 )	( 96.0 )	( 3.0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 98.0 )**	( 2.5 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )

陰性対照:生理食塩液。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

\*:p&lt;0.05.

\*\*:p&lt;0.01.

表 1-2 リアクティブブルー19の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	1	0	1
	200	1	0	0	0	0	1	0		200	1	0	1
		( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
312.5	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	88.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
625	100	1	0	0	1	0	2	0		100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	84.5	100	0	0	0
	200	1	0	0	1	0	2	0		200	1	0	1
		( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
1250	100	1	2	0	0	0	3	0		100	0	0	0
	100	2	1	0	1	0	3	0	75.0	100	0	0	0
	200	3	3	0	1	0	6	0		200	0	0	0
		( 1.5 )	( 1.5 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 3.0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
2500	100	10	2	0	0	0	12	0		100	0	0	0
	100	10	3	0	0	0	12	0	53.5	100	1	0	1
	200	20	5	0	0	0	24	0		200	1	0	1
		( 10.0 )	( 2.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 12.0 )	** ( 0 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
5000 #	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—	37.5	100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )			( — )	( — )	( — )
陽性対照	100	19	69	0	0	0	71	1		100	0	0	0
	100	19	66	1	0	0	67	0	—	100	0	0	0
	10	200	38	135	1	0	138	1		200	0	0	0
		( 19.0 )	( 67.5 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 69.0 )	** ( 0.5 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )

陰性対照:生理食塩液.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

#:細胞毒性のため, 観察可能な分裂中期像は認められなかった。

\*\*: $p<0.01$ .

表 2-1 リアクティブブルー19の染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	2	0	0	0	0	2	1		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	1	100.0	100	0	0	0
	200	2	0	0	0	0	2	2		200	0	0	0
		( 1.0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 1.0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
62.5	100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	1	0	0	2	0	3	0	91.5	100	0	0	0
	200	2	0	0	2	0	4	0		200	0	0	0
		( 1.0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 2.0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
125	100	1	1	0	2	0	3	0		100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0	86.0	100	0	0	0
	200	1	2	0	2	0	4	0		200	0	0	0
		( 0.5 )	( 1.0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 2.0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
250	100	3	3	0	0	0	6	1		100	0	0	0
	100	4	3	0	0	0	6	0	73.5	100	0	0	0
	200	7	6	0	0	0	12	1		200	0	0	0
		( 3.5 )	( 3.0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 6.0 )*	( 0.5 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
500	100	11	1	0	0	0	12	3		100	0	0	0
	100	15	4	0	0	0	17	1	45.5	100	0	0	0
	200	26	5	0	0	0	29	4		200	0	0	0
		( 13.0 )	( 2.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 14.5 )**	( 2.0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
1000 #	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—	28.5	100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )			( — )	( — )	( — )
陽性対照	100	33	98	3	0	0	98	2		100	0	0	0
	100	46	99	2	0	0	100	4	—	100	0	0	0
	2.5	200	79	197	5	0	198	6		200	0	0	0
		( 39.5 )	( 98.5 )	( 2.5 )	( 0 )	( 0 )	( 99.0 )**	( 3.0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )

陰性対照:生理食塩液.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

\*:p<0.05.

\*\* :p<0.01.

表 2-2 リアクティブブルー19の染色体異常試験結果(連続処理法:48時間処理)

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	2	1	0	0	0	2	0	100.0	100	0	0	0
	200	2	1	0	0	0	2	0		200	0	0	0
		( 1.0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
62.5	100	0	1	0	1	0	2	0		100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0	87.0	100	0	0	0
	200	0	2	0	1	0	3	0		200	0	0	0
		( 0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 1.5 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
125	100	0	2	0	0	0	2	0		100	2	0	2
	100	0	0	0	1	0	1	0	82.5	100	0	0	0
	200	0	2	0	1	0	3	0		200	2	0	2
		( 0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 1.5 )	( 0 )			( 1.0 )	( 0 )	( 1.0 )
250	100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0	61.5	100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	2	0		200	0	0	0
		( 0.5 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
500	100	5	7	2	1	0	9	0		100	1	0	1
	100	4	8	0	0	0	11	0	27.5	100	1	0	1
	200	9	15	2	1	0	20	0		200	2	0	2
		( 4.5 )	( 7.5 )	( 1.0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 10.0 )**	( 0 )			( 1.0 )	( 0 )	( 1.0 )
陽性対照	100	39	88	4	4	0	93	1		100	2	0	2
	100	43	87	5	3	0	90	3	—	100	2	0	2
	2.5	200	82	175	9	7	183	4		200	4	0	4
		( 41.0 )	( 87.5 )	( 4.5 )	( 3.5 )	( 0 )	( 91.5 )**	( 2.0 )			( 2.0 )	( 0 )	( 2.0 )

陰性対照:生理食塩液.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

\*\*:p&lt;0.01.

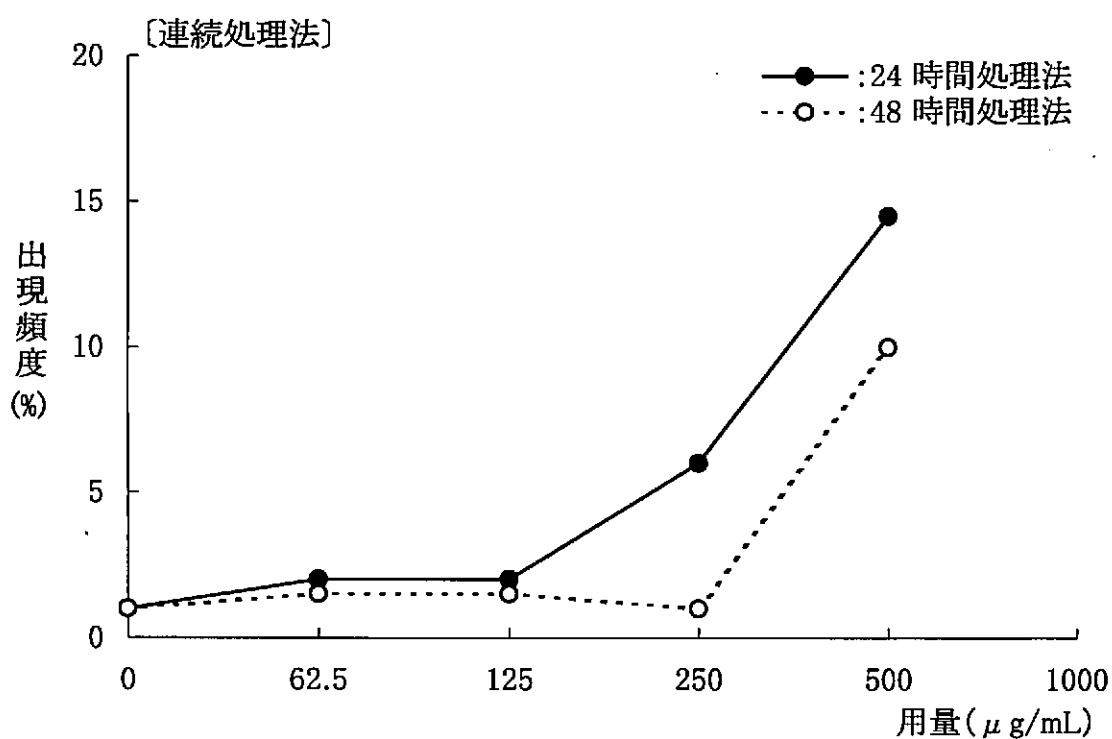
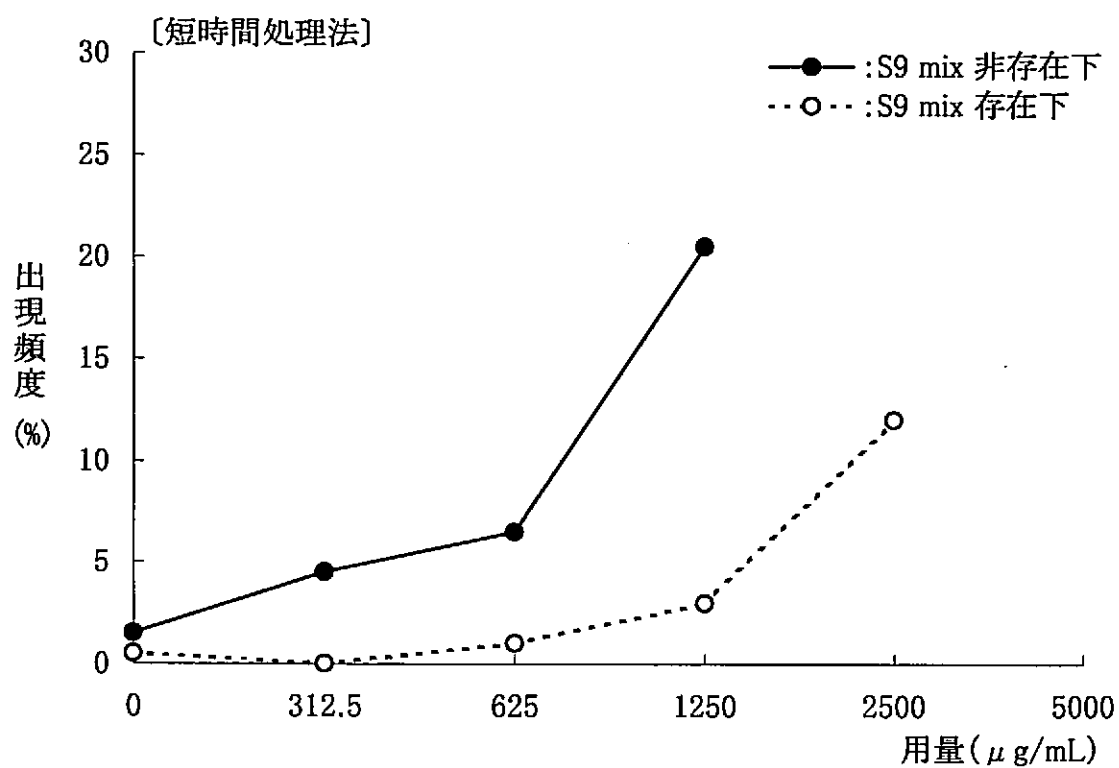


図1 構造異常を有する細胞の出現頻度

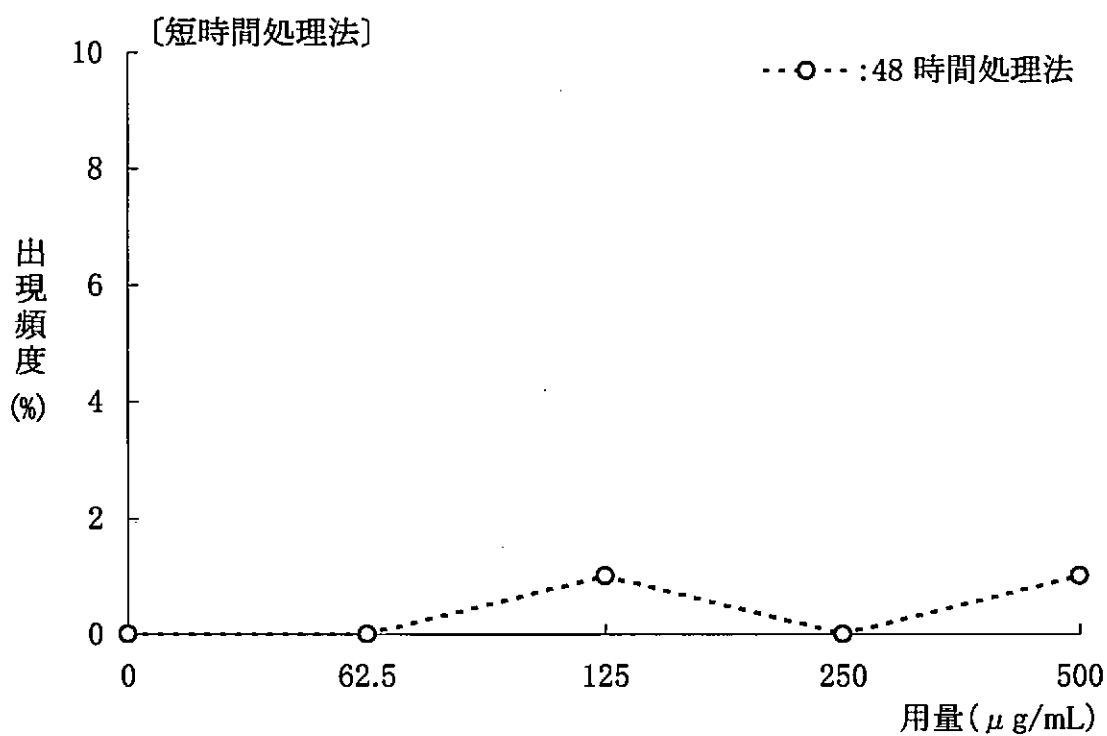
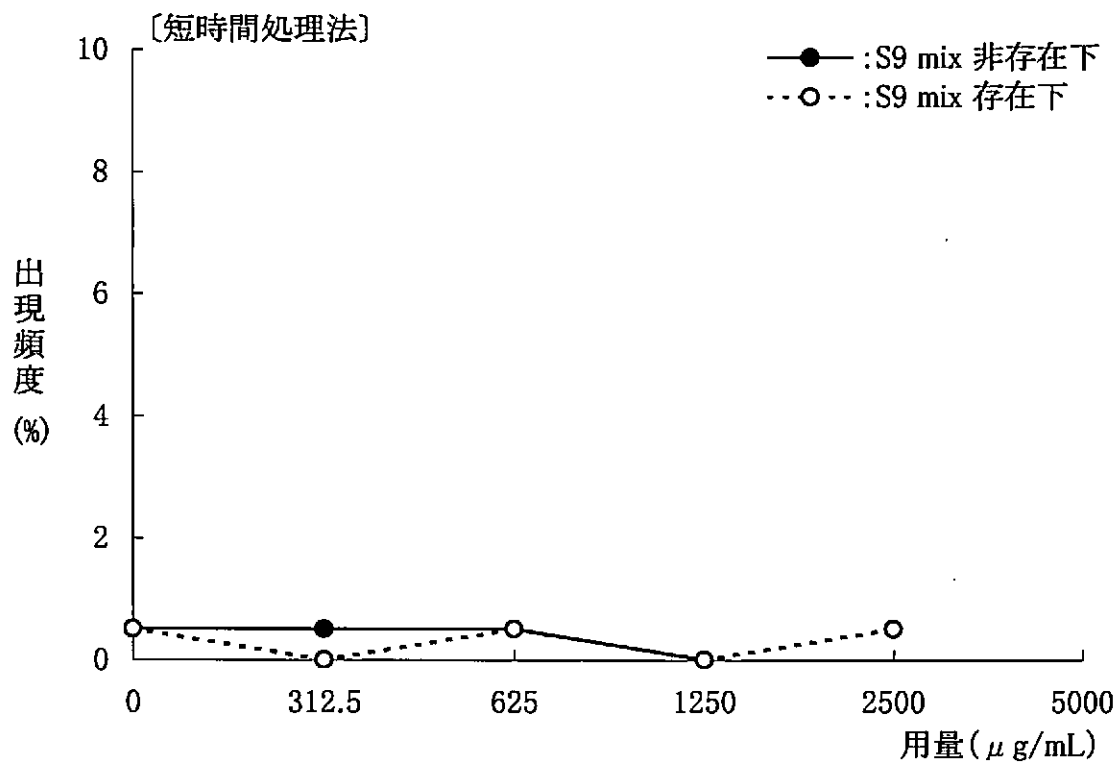


図2 数的異常を有する細胞の出現頻度

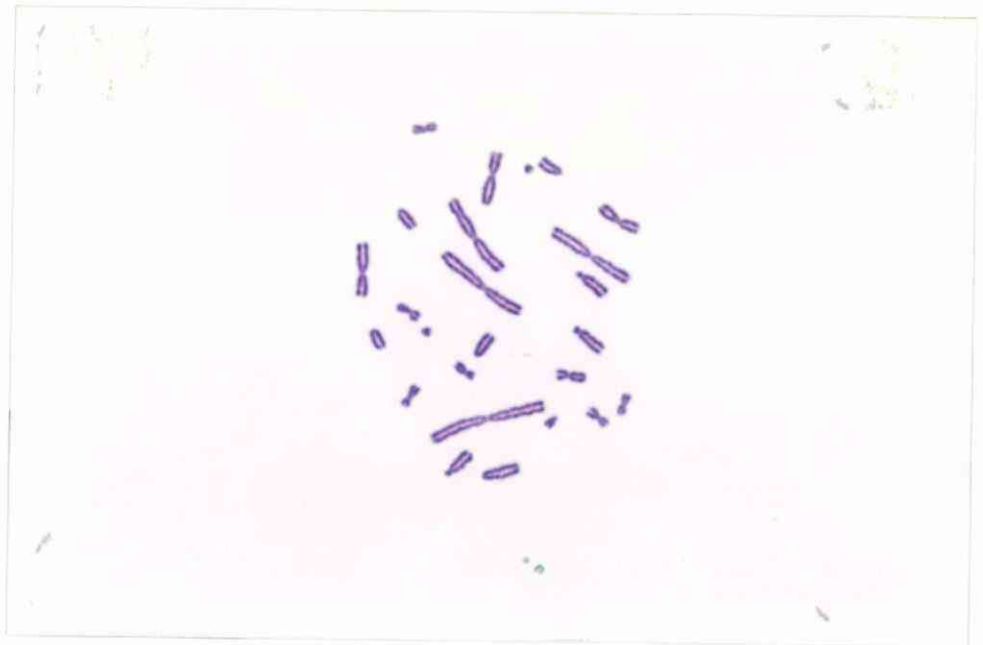


写真 1. 陰性対照群（生理食塩液），短時間処理法 S9 mix 非存在下  
分裂中期像（ギムザ染色，×960）



写真 2. 被験物質群（1250  $\mu\text{g/mL}$ ），短時間処理法 S9 mix 非存在下  
染色分体型切断および交換がみられる分裂中期像  
（ギムザ染色，×960）

添付資料

染色体異常細胞の出現頻度:背景データ

	陰性対照値(%) (n:236)	陽性対照値(%)	
		MNNG(n:102)	B[a]P(n:63)
構造異常細胞	0~2.5	68.0~100	24.0~75.5
数的異常細胞(倍数体)	0~1.5	0~2.5	0~1.5

MNNG : 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (2.5  $\mu$ g/mL).

B[a]P : 3,4-Benzo[a]pyrene (10  $\mu$ g/mL).

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

既存化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	リアクティブブルー19		
別 名	1-アミノ-4-(3-(2-(スルファート)エチル)スルホニルアニリノ)アントラキノ-2-スルホン酸 2ナトリウム		
構造式または示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
試験に供した既存 化学物質の純度	77.1%	試験に供した既存 化学物質の Lot.No.	■■■■■
不純物の名称及び濃度	1-アミノアントラキノ-2-スルホン酸 ナトリウム塩 : 5.3% 1-アミノ-4-ブチロアントラキノ-2-スルホン酸 ナトリウム塩 : 5.3% 1-アミノ-4-ヒドロキシアントラキノ-2-スルホン酸 ナトリウム塩 : 4.3% 1-アミノ-4-(3-ビニルスルホニルアニリノ)アントラキノ-2-スルホン酸 ナトリウム塩 : 3.7% Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 1.1% 水分 : 1.8%		
CAS 番号	2580-78-1		
分 子 量	626.56	蒸 気 圧	—
融 点	—	分配係数	—
沸 点	—	常温における性状	青色粉末
安 定 性	常温で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	50mg/mL以上	安定
	DMSO	—	—
	エタノール	—	—
	その他(アセト)	—	—

DMSO : ジメチルスルホキシド

## 2.細胞の種類－培養条件

細胞名	CHL/IU	入手先	国立医薬品食品衛生研究所	
種	チャイニーズハムスター	入手年月日	昭和60年1月13日	
培養液	イーグルのMEM	製造元	Gibco Laboratories	
血液の種類と添加量	仔牛 10%	製造元 (Lot No.)	Gibco Laboratories(1068210)	
細胞周期	約 16 h	凍結条件	液体窒素条件下	
継代数	4	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 ℃
			CO <sub>2</sub> 濃度	5 %
備考				

## 3.S9 mix

### (1) S9 mix の入手方法

自製・購入の別	1. 自製 ② 購入 (製造元 キッコーマン株式会社)
製造年月日	平成12年9月29日 製造
購入の場合の Lot No.	CAM-433
保存温度	-80°C以下 (超低温槽 ウルトラディープ CF-41SD)

### (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
週齢	7 週	投与期間及び投与量 (mg/kg 体重)	PB 30 mg/kg 1 回 PB 60 mg/kg 3 回 5, 6-BF 80 mg/kg 1 回
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	NADP	4 μmol
MgCl <sub>2</sub>	5 μmol	酸緩衝液(HEPES)	4 μmol
KCl	33 μmol	その他( )	0.1 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol		

## (4) S9 mix の処理条件

① プレート法      2. 浮遊細胞法      3. その他 (                      )	
S9 量 (最終濃度)	4.55 %
S9 蛋白量 (最終濃度)	1.23 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

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	生理食塩液	(株)大塚製薬工場	K8H89	局方	—
溶 媒 選 択 の 理 由	被験物質は水に可溶であるため、溶媒には生理食塩液を用いた。				
被験物質溶媒の性状	③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	—				
溶媒の調製から使用 までの保存時間と温度	約 15 分, 20℃				
純 度 換 算 の 有 無	③有                      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

		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		平成12年12月 9日から 平成12年12月25日	平成12年12月 9日から 平成12年12月25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	3 mL／培養器	2.5 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	$4 \times 10^3$ 個／mL	$4 \times 10^3$ 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
	S9 mix 添 加 量		0.5 mL／培養器
	S9 の 最 終 濃 度		4.55 %
	S9 蛋白の最終濃度		1.23 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		単層培養細胞密度計を使用 10%ホルマリン水溶液固定 0.1%クリスタルバイオレット水溶液染色	
備 考			

## (2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (6-18h)		代謝活性化法による場合 (6-18h)	
用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	細胞増殖率 (%)	用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100.0	0 (溶媒)	100.0
312.5	91.5	312.5	103.5
625	80.0	625	95.5
1250	64.0	1250	86.5
2500	42.0	2500	58.5
5000	22.0	5000	38.5

## (3) 染色体異常試験の条件

		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		平成12年12月22日から 平成12年12月27日	平成12年12月22日から 平成12年12月27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	3 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	4 枚	4 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	$4 \times 10^3$ 個/mL	$4 \times 10^3$ 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
	S9 mix 添加量		0.5 mL/培養器
	S9 の 最 終 濃 度		4.55 %
	S9 蛋白の最終濃度		1.23 mg/mL
	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。)

## 6. 連続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		平成12年12月 9日から 平成12年12月14日	平成12年12月 9日から 平成12年12月15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	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	4×10 <sup>3</sup> 個／mL	4×10 <sup>3</sup> 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		単層培養細胞密度計を使用 10%ホルマリン水溶液固定 0.1%クリスタルバイオレット水溶液染色	
備 考			

### (2) 細胞増殖抑制試験結果

(24-0h) 処理による場合		(48-0h) 処理による場合	
用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	細胞増殖率 (%)	用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100.0	0 (溶媒)	100.0
31.25	96.5	31.25	96.0
62.5	97.0	62.5	89.0
125	83.5	125	83.0
250	72.5	250	57.5
500	47.5	500	30.0
1000	47.5	1000	24.0
2000	35.0	2000	31.0

## (3) 染色体異常試験の条件

試 験 実 施 期 間		平成12年12月15日から 平成12年12月20日	平成12年12月15日から 平成12年12月21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	5 mL/培養器	5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	4 枚	4 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	$4 \times 10^3$ 個/mL	$4 \times 10^3$ 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			

## (4) 染色体異常試験結果（別表2による。）

## 7. 結果の判定および参考事項

## (1) 試験結果

判 定		<div>陽性</div> 陰性			
判定の理由 短時間処理法 S9 mix 非存在下および連続処理法24時間処理において、染色体構造異常細胞の用量依存的、かつ、有意な増加が認められた。また、短時間処理法 S9 mix 存在下および連続処理法48時間処理においても標本を観察し得た高用量で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。 従って、本実験条件下において、本被験物質の染色体異常誘発性は陽性と判定した。					
D <sub>20</sub> 値	構造異常	短時間処理法	－ S9 mix	6 — 18 h 処理	1.32 mg/mL
			＋ S9 mix	6 — 18 h 処理	4.39 mg/mL
		連続処理法	<div></div>	24 — 0 h 処理	0.72 mg/mL
				48 — 0 h 処理	1.16 mg/mL
	数的異常	短時間処理法	－ S9 mix	— h 処理	— mg/mL
			＋ S9 mix	— h 処理	— mg/mL
		連続処理法	<div></div>	— h 処理	— mg/mL
				— h 処理	— mg/mL

## (2) 参考事項

### 1. 細胞の選択理由

供試細胞は、染色体が比較的大きいため標本観察が容易であり、また、染色体モードが25本と少なく、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において広く用いられているためこれを使用した。

### 2. 被験物質用量の設定理由

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、短時間処理法および連続処理法ともに、50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ、3 用量以上のデータが得られることを考慮して設定した。

### 3. 染色体異常の分類および集計

染色体異常の分類は、構造異常については染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換（二動原体、環状染色体など）およびその他（断片化など）とした。数的異常については、倍数性細胞のみを記録した。ギャップ（染色分体型および染色体型）については、異常として記録したが構造異常には含めなかった。ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を 1 つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は、観察した細胞200個中に認められた異常細胞数を表示した。

### 4. 試験結果の判定基準

試験結果の判定にあたっては、構造異常および倍数性細胞の出現頻度について多試料 $\chi^2$ 検定を行い、有意差（有意水準5%以下）を認めた場合は、Fisher の直接確立法により陰性（溶媒）対照群に対する各群の比較検定（有意水準は多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻度が陰性（溶媒）対照群に比べ 2用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められる場合に、染色体異常誘発性は陽性とした。なお、単一用量でのみ有意な増加が認められた場合は、それに近い用量を用いて確認試験を行い、その結果、再現性果が認められた場合は、染色体異常誘発性は陽性とした。

## 8. その他

試験実施施設	名 称	財団法人 畜産生物科学安全研究所		
	所 在 地	神奈川県相模原市橋本台三丁目7番11号		電話 042 (762) 2775 FAX 042 (762) 7979
試験責任者	職 氏 名			
	経 験 年 数			
試験期間	平成12年11月29日 より 平成13年3月29日			
試験番号	00-140			

表 1-1 リアクティブブルー19の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	0	0	1	0	2	1		100	0	0	0
	100	1	0	0	0	0	1	0	100.0	100	1	0	1
	200	2	0	0	1	0	3	1		200	1	0	1
		( 1.0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 1.5 )	( 0.5 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
312.5	100	1	2	0	0	0	3	1		100	1	0	1
	100	2	4	0	0	0	6	1	89.5	100	0	0	0
	200	3	6	0	0	0	9	2		200	1	0	1
		( 1.5 )	( 3.0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 4.5 )	( 1.0 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
625	100	6	1	0	0	0	7	4		100	1	0	1
	100	5	2	0	0	0	6	0	78.0	100	0	0	0
	200	11	3	0	0	0	13	4		200	1	0	1
		( 5.5 )	( 1.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 6.5 )*	( 2.0 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
1250	100	15	4	1	0	0	18	1		100	0	0	0
	100	21	5	0	0	0	23	0	63.5	100	0	0	0
	200	36	9	1	0	0	41	1		200	0	0	0
		( 18.0 )	( 4.5 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 20.5 )**	( 0.5 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
2500 #	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—	39.5	100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )			( — )	( — )	( — )
5000 #	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—	23.0	100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )			( — )	( — )	( — )
陽性対照	100	59	97	6	0	0	100	3		100	1	0	1
	100	46	95	0	2	0	96	2	—	100	0	0	0
	2.5	200	105	192	6	2	196	5		200	1	0	1
		( 52.5 )	( 96.0 )	( 3.0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 98.0 )**	( 2.5 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )

陰性対照:生理食塩液.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

\*:p<0.05.

\*\* :p<0.01.

表 1-2 リアクティブブルー19の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	1	0	1
	200	1	0	0	0	0	1	0		200	1	0	1
		( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
312.5	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	88.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
625	100	1	0	0	1	0	2	0		100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	84.5	100	0	0	0
	200	1	0	0	1	0	2	0		200	1	0	1
		( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
1250	100	1	2	0	0	0	3	0		100	0	0	0
	100	2	1	0	1	0	3	0	75.0	100	0	0	0
	200	3	3	0	1	0	6	0		200	0	0	0
		( 1.5 )	( 1.5 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 3.0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
2500	100	10	2	0	0	0	12	0		100	0	0	0
	100	10	3	0	0	0	12	0	53.5	100	1	0	1
	200	20	5	0	0	0	24	0		200	1	0	1
		( 10.0 )	( 2.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 12.0 )	** ( 0 )			( 0.5 )	( 0 )	( 0.5 )
5000 #	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—	37.5	100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )			( — )	( — )	( — )
陽性対照	100	19	69	0	0	0	71	1		100	0	0	0
	100	19	66	1	0	0	67	0	—	100	0	0	0
	200	38	135	1	0	0	138	1		200	0	0	0
		( 19.0 )	( 67.5 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 69.0 )	** ( 0.5 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )

陰性対照:生理食塩液.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

#:細胞毒性のため,観察可能な分裂中期像は認められなかった。

\*\*:p&lt;0.01.

表 2-1 リアクティブブルー19の染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	2	0	0	0	0	2	1		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	1	100.0	100	0	0	0
	200	2	0	0	0	0	2	2		200	0	0	0
		( 1.0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 1.0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
62.5	100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	1	0	0	2	0	3	0	91.5	100	0	0	0
	200	2	0	0	2	0	4	0		200	0	0	0
		( 1.0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 2.0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
125	100	1	1	0	2	0	3	0		100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0	86.0	100	0	0	0
	200	1	2	0	2	0	4	0		200	0	0	0
		( 0.5 )	( 1.0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 2.0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
250	100	3	3	0	0	0	6	1		100	0	0	0
	100	4	3	0	0	0	6	0	73.5	100	0	0	0
	200	7	6	0	0	0	12	1		200	0	0	0
		( 3.5 )	( 3.0 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 6.0 )	( 0.5 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
500	100	11	1	0	0	0	12	3		100	0	0	0
	100	15	4	0	0	0	17	1	45.5	100	0	0	0
	200	26	5	0	0	0	29	4		200	0	0	0
		( 13.0 )	( 2.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 14.5 )	( 2.0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
1000 #	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—	28.5	100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )	( — )			( — )	( — )	( — )
陽性対照	100	33	98	3	0	0	98	2		100	0	0	0
	100	46	99	2	0	0	100	4	—	100	0	0	0
	2.5	200	79	197	5	0	198	6		200	0	0	0
		( 39.5 )	( 98.5 )	( 2.5 )	( 0 )	( 0 )	( 99.0 )	( 3.0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )

陰性対照:生理食塩液.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

#:細胞毒性のため, 観察可能な分裂中期像は認められなかった.

\*:p&lt;0.05.

\*\*:p&lt;0.01.

表 2-2 リアクティブブルー19の染色体異常試験結果(連続処理法:48時間処理)

被験物質 の用量 ( $\mu$ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	2	1	0	0	0	2	0	100.0	100	0	0	0
	200	2	1	0	0	0	2	0		200	0	0	0
		( 1.0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
62.5	100	0	1	0	1	0	2	0		100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0	87.0	100	0	0	0
	200	0	2	0	1	0	3	0		200	0	0	0
		( 0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 1.5 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
125	100	0	2	0	0	0	2	0		100	2	0	2
	100	0	0	0	1	0	1	0	82.5	100	0	0	0
	200	0	2	0	1	0	3	0		200	2	0	2
		( 0 )	( 1.0 )	( 0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 1.5 )	( 0 )			( 1.0 )	( 0 )	( 1.0 )
250	100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0	61.5	100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	2	0		200	0	0	0
		( 0.5 )	( 0.5 )	( 0 )	( 0 )	( 0 )	( 1.0 )	( 0 )			( 0 )	( 0 )	( 0 )
500	100	5	7	2	1	0	9	0		100	1	0	1
	100	4	8	0	0	0	11	0	27.5	100	1	0	1
	200	9	15	2	1	0	20	0		200	2	0	2
		( 4.5 )	( 7.5 )	( 1.0 )	( 0.5 )	( 0 )	( 10.0 )**	( 0 )			( 1.0 )	( 0 )	( 1.0 )
陽性対照	100	39	88	4	4	0	93	1		100	2	0	2
	100	43	87	5	3	0	90	3	—	100	2	0	2
	2.5	200	82	175	9	7	183	4		200	4	0	4
		( 41.0 )	( 87.5 )	( 4.5 )	( 3.5 )	( 0 )	( 91.5 )**	( 2.0 )			( 2.0 )	( 0 )	( 2.0 )

陰性対照:生理食塩液.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

\*\*:p&lt;0.01.

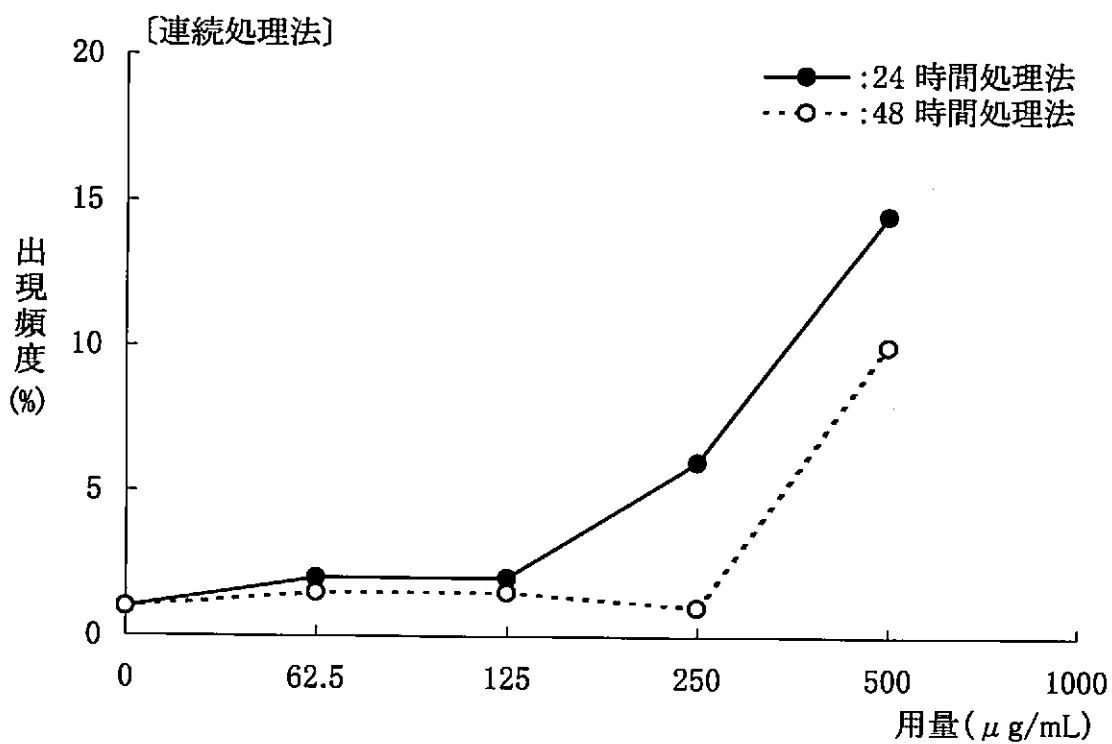
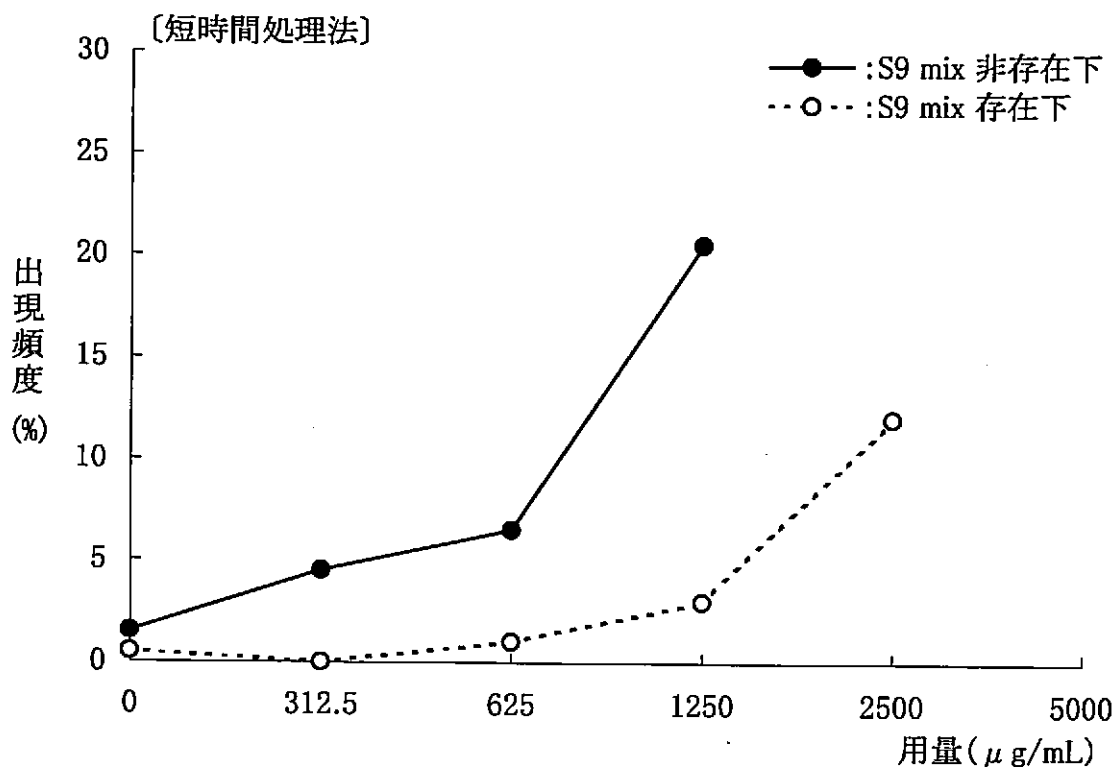


図1 構造異常を有する細胞の出現頻度

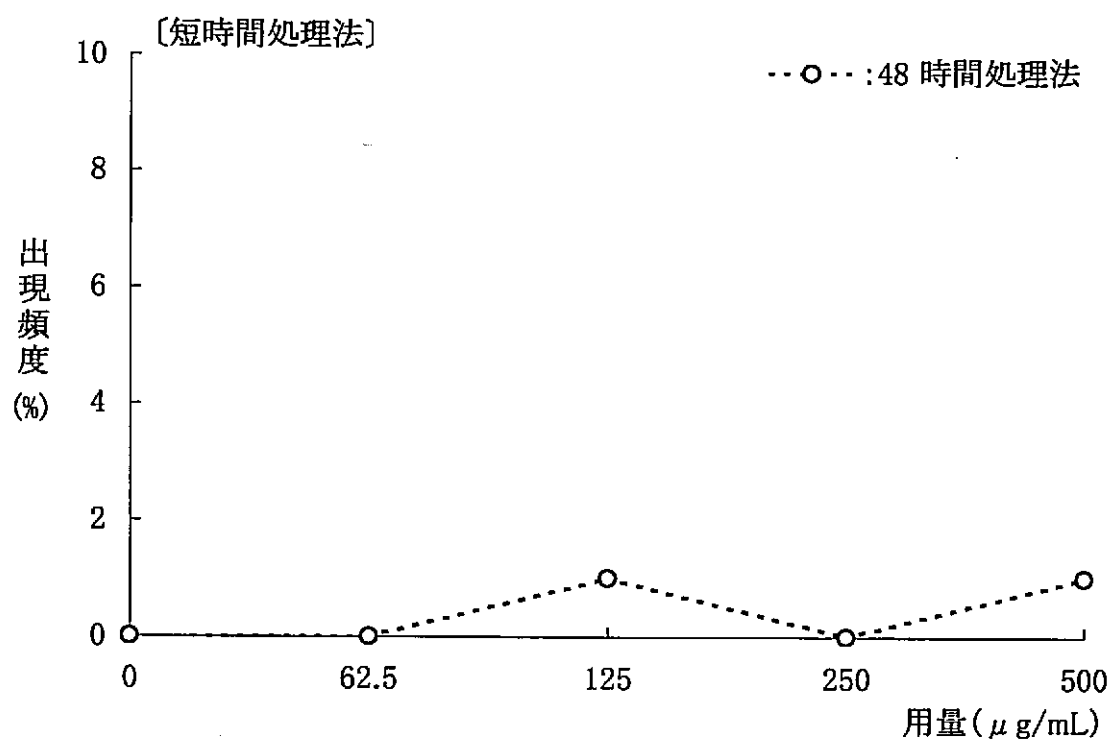
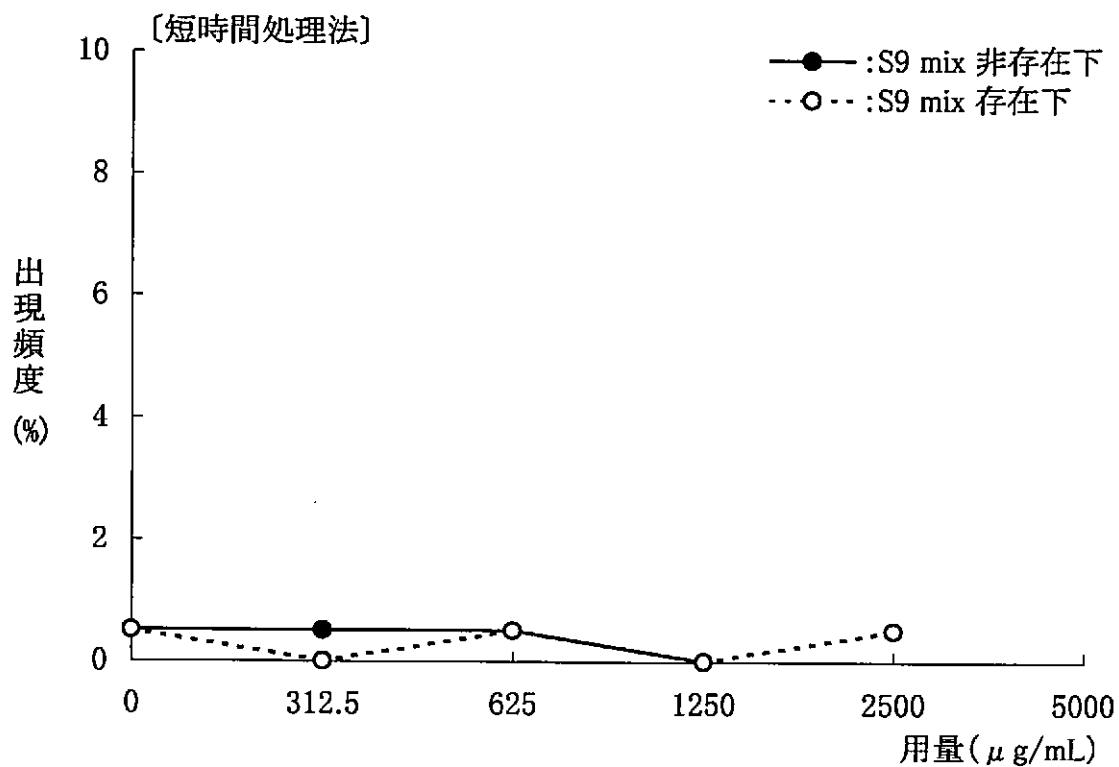


図2 数的異常を有する細胞の出現頻度



写真 1. 陰性対照群（生理食塩液），短時間処理法 S9 mix 非存在下  
分裂中期像（ギムザ染色，×960）

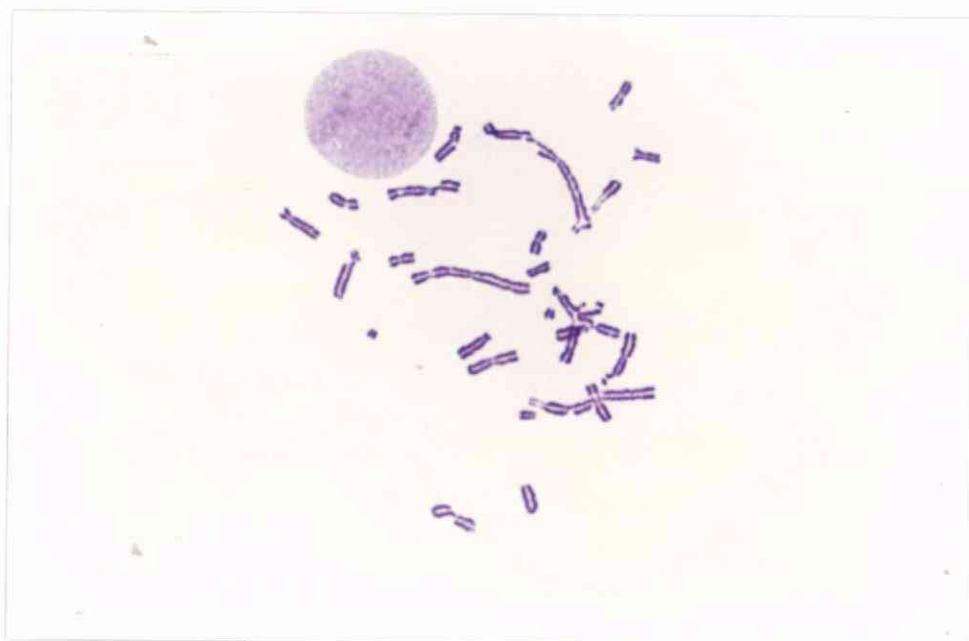


写真 2. 被験物質群（1250  $\mu\text{g/mL}$ ），短時間処理法 S9 mix 非存在下  
染色分体型切断および交換がみられる分裂中期像  
（ギムザ染色，×960）

## 陳 述 書

試験表題：リアクティブブルー19 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号： 00-140

本試験は、OECD の試験法ガイドライン“OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 473, *In vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test(1997)”および OECD の GLP “OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(1997)” に定める基準に準拠して実施した。

試験責任者



試験表題：リアクティブブルー19 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：00-140

試験委託者：

名 称 製品評価技術センター  
所 在 地 東京都渋谷区西原二丁目 49 番 10 号  
委託責任者

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所  
所 在 地 神奈川県相模原市橋本台三丁目 7 番 11 号  
運営管理者  
試験責任者  
信頼性保証  
責 任 者

試験期間：

試験開始日 平成 12 年 11 月 29 日  
実験期間 開始日：平成 12 年 12 月 9 日  
終了日：平成 13 年 2 月 3 日  
試験終了日 平成 13 年 3 月 29 日

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因：

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は、最終報告書作成後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の保管については、試験委託者と協議して決める。

1. 試験計画書
2. 被験物質に関する記録
3. 試験結果に関する記録
4. 信頼性保証に関する記録
5. 最終報告書

試験責任者，担当者および業務分担

試験責任者

氏名

試験担当者および

実験操作

鏡検

データ整理

## 信頼性保証証明書

試験表題 : リアクティブブルー 19 のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 : 00-140

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
1. 試験実施状況査察		
細胞培養開始 平成12年12月06日	平成12年12月06日	平成12年12月06日
染色体異常試験：被験物質の調製および添加 細胞増殖抑制試験再試験：細胞播き・細胞の継代 平成12年12月18日	平成12年12月18日	平成12年12月18日
染色体異常試験：細胞増殖率の測定(標本作製)・染色体標本の作製・培養細胞の観察 平成12年12月19日	平成12年12月19日	平成12年12月19日
染色体異常試験：細胞増殖率の測定(測定)・染色体標本の染色 細胞増殖抑制試験再試験：S9mixの使用 平成12年12月21日	平成12年12月21日	平成12年12月21日
染色体異常試験：染色体標本の観察 平成13年01月17日	平成13年01月17日	平成13年01月17日
2. 生データ査察		
平成13年03月10日	平成13年03月12日	平成13年03月12日
3. 報告書(草案)審査		
平成13年03月10日	平成13年03月12日	平成13年03月12日
4. 報告書審査		
平成13年03月29日	平成13年03月29日	平成13年03月29日

上記の審査・査察により、本試験が「OECDのGLP」に従って実施され、本報告書には、当該試験で使用方法・手順が忠実に記載され、試験成績には、当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されていることを確認した。

平成 13 年 3 月 29 日  
財団法人 畜産生物科学安全研究所

## ROBUST SUMMARY TEMPLATE

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

#### TEST SUBSTANCE

Reactive blue 19 (CAS No. 2580-78-1)

Source : [REDACTED] — purity : 77.1% ; 1-amino-anthraquinone-2-sulufonate : 5.3%, 1-amino-4-bromoanthraquinone-2-sulufonate : 5.3%, 1-amino-4-hydroxyanthraquinone-2-sulufonate : 4.3%, 1-amino-4-(3-vinylsulfonylanilino)anthraquinone-2-sulufonate : 3.7%, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 1.1%, water : 1.8%. Stability during use confirmed by HPLC.

#### METHOD

- Metod/guideline : OECD Test Guidelines 473
- Test type : Chromosomal aberration test
- GLP : Yes (OECD)
- Year : 2001
- Species/Strain : Chinese hamster lung (CHL/IU) cells
- Metabolic activation : with and without S9 mix
- Statistical methods : Multi-sample  $\chi^2$  test at  $p < 0.05$  and Fisher's exact test at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$

#### REMARKS FIELD FOR TEST CONDITIONS

- Study Design :
  - Concentration : without S9 mix (24 hr continuous treatment) :  
0, 62.5, 125, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$   
without S9 mix (48 hr continuous treatment) :  
0, 62.5, 125, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$   
without S9 mix (6 hr short-term treatment) :  
0, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g/mL}$   
with S9 mix (6 hr short-term treatment) :  
0, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g/mL}$
- Plates/test : 4 (2:Chromosome analysis, 2:Cell Growth rate)
- Solvent : saline
- Positive controls : without S9 mix : 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine  
with S9 mix : 3,4-Benzo[a]pyrene

#### RESULTS

- Cytotoxic concentration : Cytotoxicity was observed at more than 2500  $\mu\text{g/mL}$  without S9 mix and at 5000  $\mu\text{g/mL}$  with S9 mix in 6 hr short-term treatment, and at 1000  $\mu\text{g/mL}$  after 24 hr continuous treatment without S9 mix.
- Genotoxic effects : positive in the short-term and continuous treatment with or without S9 mix

#### REMARKS FIELD FOR RESULTS

After 6 hr short-term treatment, structural chromosomal aberrations excluding gaps were induced at 625  $\mu\text{g/mL}$  (6.5%) and 1250  $\mu\text{g/mL}$  (20.5%) without S9 mix and at 2500  $\mu\text{g/mL}$  (12.0%) with S9 mix, respectively. Structural chromosomal aberrations excluding gaps were induced at 250  $\mu\text{g/mL}$  (6.0%) and 500  $\mu\text{g/mL}$  (14.5%) after 24 hr continuous treatment, and at 500  $\mu\text{g/mL}$  (10.0%) after 48 hr continuous treatment without S9 mix, respectively.

D<sub>20</sub> value : 1.32 mg/mL (6 hr short-term treatment without S9 mix).  
4.39 mg/mL (6 hr short-term treatment with S9 mix).  
0.72 mg/mL (24 hr continuous treatment without S9 mix).  
1.16 mg/mL (48 hr continuous treatment without S9 mix).

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。

D<sub>20</sub> value is concentration (mg/mL) of the test substance where 20% of metaphases show structural chromosome aberrations.

## CONCLUTIONS

This chemical induced structural chromosomal aberrations in CHL/IU cells after short-term and continuous treatment with or without metabolic activation.

## DATA QUALITY

• Reliabilities : valid without restriction

## REFERENCES (Free Text)

Ishidate, M.Jr. and odashima, S.(1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.

Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M.Jr.(1979). Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro. *Mutation Research*, 66, 277-290.