

1
2 実験動物等における影響（遺伝毒性）

3
4 （7）遺伝毒性

5 ① *in vitro* 試験

6 BBP の *in vitro* 遺伝毒性試験の結果を表 1 に示す。

7
8 表 1 BBP の *in vitro* 遺伝毒性試験

試験	対象	試験条件	試験結果		文献
			S9 -	S9 +	
微生物					
復帰突然 変異試験	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> (TA98、TA100、 TA1535、 TA1537)	333~11,550 µg/plate	-	-	Zeiger et al. 1985
復帰突然 変異試験	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> (TA98、TA100)	~1,000 µg/plate	-	-	Kozumbo et al. 1982
復帰突然 変異試験	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> (TA98、TA100、 TA1535、 TA1537、 TA1538)	0.1、1.0、5.0、10.0 µL /plate	-	-	Monsanto 1976b (EU RAR 2007 より 引用)
復帰突然 変異試験	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> (TA98、TA100、 TA1535、 TA1537、 TA1538)	0.001、0.01、0.1、1.0、5.0、 10.0 µL/plate	-	-	Monsanto 1976c (EU RAR 2007 より 引用)

突然変異試験	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (D4)	0.1、1.0、5.0、10.0 $\mu\text{L}/\text{plate}$	—	—	Monsanto 1976b (EU RAR 2007 より引用)
突然変異試験	<i>E. coli</i> (野生株、 <i>uvrA</i> ⁻)	30 mg/plate	—	NA	Kurata 1975 (Omori 1976 より引用)
DNA 修復試験	<i>B. subtilis</i> (<i>recA</i> ⁻) <i>E. coli</i> (<i>uvrA</i> ⁻ 、 <i>polA</i> ⁻ 、 <i>recA</i> ⁻)	30 mg/plate	—	NA	Kurata 1975 (Omori 1976 より引用)
哺乳類細胞					
突然変異試験	マウスリンパ腫細胞 (L5178Y TK ^{+/-})	S9 ⁻ : 0.015~0.040 $\mu\text{L}/\text{mL}$ S9 ⁺ : 0.20~1.20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ S9 ^{+/-} ともに 4 時間処理	—	—	Barber et al. 2000
突然変異試験	マウスリンパ腫細胞 (L5178Y TK)	S9 ⁻ : 5~80 nL/mL S9 ⁺ : 30~100 nL/mL S9 ^{+/-} ともに 4 時間処理	—	—	Myhr & Caspary 1991 (NTP 1997 より引用)
突然変異試験	マウスリンパ腫細胞 (L5178Y TK)	0.06、0.16、0.32、0.65、1.25、2.5、5.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (1.25、2.5、5.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ は不溶) 処理時間記載なし	—	—	Monsanto 1976d (EU RAR 2007 より引用)
染色体異常試験	チャイニーズハムスター卵巣細胞	S9 ⁻ : 125~1,250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 14 時間処理 S9 ⁺ : 125~1,250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 2 時間処理	—	—	Galloway et al. 1987 (NTP 1997 より引用)
姉妹染色分体交換試験	チャイニーズハムスター卵巣細胞	S9 ⁻ : 0.40~12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 26 時間処理 S9 ⁺ : 125~1,250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 2 時間処理	—	—	Galloway et al. 1987 (NTP 1997 より引用)
<u>DNA 損傷</u>	<u>マウス骨芽細胞</u>	<u>S9⁻: 10⁻⁶M</u> <u>24 時間処理</u>	<u>±</u>	<u>NA</u>	<u>Sabbieti et al., 2009</u>

1 +: 陽性、-: 陰性、NA: データなし

2 S9^{+/-}: 代謝活性化系 (S9mix) 存在下および非存在下

3

1
2 BBP は、*Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537、
3 TA1538)、*Saccharomyces cerevisiae*(D4)、*E. coli* (野生株、*uvrA*)、マウスリン
4 パ腫細胞 (L5178Y TK+/-)を用いた突然変異試験では、代謝活性化系の存在下及
5 び非存在下で突然変異を誘発しなかった。*B. subtilis* (*recA*)及び *E. coli*(*uvrA*、
6 *polA*、*recA*)を用いた DNA 修復試験は、代謝活性化系の非存在下で実施されてお
7 り、いずれも陰性であった。チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を用いた染色体
8 異常及び姉妹染色分体交換試験は、代謝活性化系の存在下及び非存在下で陰性
9 であった。

10
11 ~~Sabbietiら(2009)は、MC3T3-E1骨芽細胞及び雄 Harlan Sprague-Dawley~~
12 ~~ICR(CD-1)マウスの頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞(COBs)を10⁻⁶MのBBPで~~
13 ~~24時間処理したところ、DNA塩基の損傷や、細胞生存率の低下を伴うアポトー~~
14 ~~シスタンパク質の増加、p53及びリン酸化型p53(セリン15及び20)の増加が~~
15 ~~生じたことを示した(いずれもp<0.05。p53の増加に関するp値の記載なし)。~~
16 ~~著者らは、BBPはこれらのマウス骨芽細胞でDNA損傷の増加を引き起こすこ~~
17 ~~とを示したとしている。また、BBPはマウス骨芽細胞にアポトーシスを誘導し、~~
18 ~~その一部はp53の活性化を介しているとしている。~~能美専門委員修正

19
20
21 【事務局より】

22 ○突然変異試験(Barber et al. 2000)について、原著73頁Table4では、S9
23 なしの一部の用量(BBP 0.015 µL/mLと0.030 µL/mLの一試験)とS9ありの
24 BBP 0.60 µL/mL以上の用量でMutant frequencyがAcetone(Control)と比
25 べ陽性結果が出ておりますが、著者は、72頁の本文右側のカラムにおいて、BBP
26 をnon-mutagenicと判断したと記載しております。

27 S9なしの陽性データの解釈については、non-mutagenicと判断した理由が明
28 確に原著に記載されておられません。また、S9ありの陽性データの解釈につい
29 ては、原著78頁に、BBP濃度0.60–1.20 µl/ml、survival valuesが10.4–1.0%
30 で陽性を示しているが、通常ルールでは生存率が10–20%を超える培養からの
31 データのみを用い、90%超の毒性を示す培養からの結果は信頼性がないと考え
32 られることから、BBPはマウスリンパ腫細胞試験においてmutagenicではない
33 と結論付けられた旨記載されています。

34 本専門調査会として、S9なしとありの場合ともに、陰性と判断してもよろし
35 いでしょうか。

1 →【能美専門委員コメント】

2 陰性と結論して良いです。

3
4 【事務局より】

5 ○突然変異試験 (Myhr & Caspary 1991) について、NTP Technical Report
6 1997 の 145 ページ Table C2 では、BBP 30、40、60 nL/mL において、Average
7 Mutant Fraction が Ethanol (Control) と比べ有意に陽性 ($p \leq 0.05$) という結
8 果になっております。60 nL/mL については、Precipitate が形成されており (脚
9 注 f)、著者は原著 142 頁で 60 nL/mL の陽性結果について、「(沈殿が生成した
10 濃度で mutant colonies の増加が観察されたことについて) experimental
11 quality control parameters から有効ではないと考えられた」と解釈し、陰性と
12 判断しております。一方、BBP 30、40 nL/mL については、原著に陰性と判断
13 した理由が記載されておられません。さらに、146 頁、147 頁 Table C2 で BBP 80
14 nL/mL においても Ethanol (Control) と比べ有意に陽性となっているものの、
15 原著にその理由等が明記されておられません。原著ではこれらの試験をすべて陰
16 性と判断しておりますが、本専門調査会においてもこれらの結果についてすべ
17 て陰性と判断してもよろしいでしょうか。

18
19 →【能美専門委員コメント】

20 陰性で良いです。

21 -S9 の実験は 3 度行われていますが、再現性のある結果にはなっておらず、ま
22 た Relative Total Growth が下がり過ぎている場合には、その用量の試験結果は
23 (毒性によるものとして) 無視して結論を出すため、陰性となります。

24
25
26 【能美専門委員コメント】

27 ○細胞形質転換試験は遺伝毒性試験ではないので、削除してください。

28 ○Sabbieti et al. (2009) について、骨芽細胞に DNA 損傷を起こしたという
29 報告ですが、DNA 損傷の測定がキットによる比色法で陽性対照がないこと、
30 BBP の用量依存性が示されていないこと、他の細胞では DNA 損傷が検出
31 されないのになぜ骨芽細胞で DNA 損傷がおこるのか議論されていないこと
32 から、細胞死に基づく二次的な DNA 損傷を見ている可能性を否定できませ
33 せん。評価書に記載するとしても、表の中の一つのデータとして記載すれば良
34 いと思います。

1 ② *in vivo* 試験

2 BBP の *in vivo* 遺伝毒性試験の結果を表 2 に示す。

3

表2 BBP の *in vivo* 遺伝毒性試験

試験	対象	試験条件	試験結果	文献
小核試験	Alpk:AP ₅ SD ラット 骨髓細胞	1 mg/L (0.183 mg/kg 体重/日相当)を雌(19匹)の妊娠期及び授乳期に飲水投与し、分娩後 22 日に骨髓を採取	—	Ashby et al. 1997
染色体異常試験	B6C3F1 マウス骨 髄細胞	1,250、2,500、3,750、5,000 mg/kg 体重で単回腹腔内投与(雄、各群 10 匹)し、投与後 17 時間又は 36 時間に骨髓を採取	17 時間: 5,000 mg/kg 体重: ± ²⁾ 1,250~3,750 mg/kg 体重: — 36 時間: —	NTP 1997
姉妹染色 分体交換 試験	B6C3F1 マウス骨 髄細胞	1,250、2,500、5,000 mg/kg 体重で単回腹腔内投与(雄、各群 5 匹)し、投与後 23 時間又は 42 時間に骨髓を採取	23 時間: — ¹⁾ 42 時間: ± ²⁾ 確認試験未実施	NTP 1997
優性致死 試験	B6C3F1 マウス、 CD-1 マウス	400~600、1,280~1,840、3,200~4,560 mg/kg 体重/日の BBP を試験 1、5、10 日目に皮下投与し、未投与の雌と交配し、交配開始 17 日後に屠殺	— (胎児死亡率の有意な増加なし)	Bishop et al. 1987

伴性劣性致死試験	Canton-S 野生型 ショウジョウバエ	雄に 500 ppm 注入 雄に 10,000、50,000 ppm 混餌投与(3日間) <i>Base</i> 雌と交配 F1 雌を兄弟と交配 F2 雄の野生型の数を調べた	—	Valencia 1985(NTP 1997より引用)
----------	--------------------------	---	---	-----------------------------------

+:陽性、±:疑陽性、-:陰性

1) 5,000 mg/kg 体重/日投与群を除いて trend を算出すると、p 値が 0.0067 となり、有意であった。

2) NTP (1997)は弱い陽性と記載しているが、本専門調査会としては、用量依存性がないことから疑陽性と判断した。

1
2 BBP は、B6C3F1 マウス及び CD-1 マウスを用いた優性致死試験、並びにシ
3 ョウジョウバエを用いた伴性劣性致死試験において陰性であった。Alpk:AP_fSD
4 ラット骨髄細胞を用いた小核試験は陰性であった。B6C3F1 マウス骨髄細胞を
5 用いた染色体異常及び姉妹染色分体交換試験では、用量依存性を欠いた疑陽性
6 結果が報告されている弱い陽性であった。 能美専門委員修正

9 【事務局より】

10 ○染色体異常試験 (NTP 1997) について、原著 154 頁 TableC7 の結果につい
11 て、原著 142 頁最後から 2 行目に「Responses were rather weak」とありますが
12 が、本専門調査会として弱い陽性と判断してもよろしいでしょうか。

13 →【能美専門委員コメント】

14 現在のテストガイドラインでは上限が 2000 mg/kg ですから、5000 mg/kg と
15 いう投与量の妥当性を疑います。また陽性になっているのは 5000 mg/kg のみで
16 用量依存性はありません。±で良いです。

18 【事務局より】

19 ○姉妹染色分体交換試験 (NTP 1997) について、原著 153 頁 Table C6 の結果
20 について、原著 142 頁最後から 2 行目に「Responses were rather weak,
21 however, and the SCE test was not repeated.」とありますが、本調査会として
22 弱い陽性と判断してよろしいでしょうか。

23 →【能美専門委員コメント】

24 One-tailed trend analysis という方法では P=0.025 となっていますが、用量

1 | 依存性はなく土で良いと思います。

2

3

4 | ③ 遺伝毒性のまとめ 能美専門委員修正

5 | *in vivo* 試験では、染色体異常試験及び姉妹染色体交換試験で弱い疑陽性を示
6 | す報告があるが、小核試験は陰性であった。また、*in vitro* 試験では、復帰突
7 | 然変異試験、突然変異試験及び DNA 修復試験が陰性であることから、DNA と
8 | の反応に基づく変異を誘発することを示唆するものではないと考えた。

9 | 以上より、本専門調査会としては、BBP は生体にとって問題となる遺伝毒性
10 | はないものと判断した。

11 |

12 |

1 |
2 (8) その他の知見

3 ①細胞形質転換試験

4 哺乳類細胞を用いた細胞形質転換試験が実施された。BBP の細胞形質転
5 換試験の結果を表 1 に示す。

6 マウス繊維芽細胞 (BALB/c-3T3) を用いた試験では陰性であった。シ
7 ルリアンハムスター胚細胞を用いた試験においては、24 時間の BBP 処理
8 では陰性、7 日間処理では陽性であったが、陽性となった機構は不明であ
9 る。 能美専門委員修正

10
11
12 【中江専門委員コメント】

13 7 日間試験での陽性については EU RAR が言うように「遺伝毒性」でないで
14 すが、評価書案に掲載するのであれば、本調査会がこの所見がなにを表してい
15 て、それをどう考えるのかは記載せねばなりません。

16
17 (事務局より：EU RAR (2007) は、7 日間試験においてのみ陽性であったこ
18 とは、形質転換が突然変異以外の作用機序 (例えば、遺伝子発現の変化) を介
19 して生じることを示唆しているとしている。)

20
21 表 1 BBP の細胞形質転換試験

対象	試験条件	試験結果		文献
		S9 -	S9 +	
マウス繊維芽細胞 (BALB/c-3T3)	用量不明 ¹⁾ 処理時間記載なし	- ²⁾		Monsanto 1985 (EU RAR 2007 より 引用)
マウス繊維芽細胞 (BALB/c-3T3 A-31)	0.010~0.160 µL/mL 3 日間処理	-	NA	Barber et al. 2000

シリアンハムスター胚細胞	24 時間処理:25、50、 100、150、250 µg/mL 7 日間処理:1、2、5、10、 20 µg /mL (≥ 25 µg /mL で沈殿)	24 時間: — ²⁾ 7 日間: + ²⁾ (2、5、10 µg/mL で陽性)	Le Boeuf et al. 1996(EU RAR 2007 より引用) ³⁾
--------------	---	--	--

- 1 +:陽性、-:陰性、NA:データなし
- 2 1) EU RAR (2007)149 ページには、0.49 nL/mL~8,000 nL/mL、151 ページには、10、
- 3 20、40、80、160 nL/mL と記載されている。
- 4 2) S9 の有無の記載なし。
- 5 3) EU RAR(2007)によれば、本試験は GLP に従って実施された。
- 6