



受理番号 837-09-T-6347

最 終 報 告 書

財団法人化学物質評価研究機構
日田事業所

表 題 MSM パウダーのほ乳類培養細胞を用いる簡易染色体異常試験

試験委託者 クロレラ工業株式会社
〒105-0012 東京都港区芝大門 2-4-6

要 約 CHL/TU 細胞を用い、S9 mix 非存在下及び存在下で 6 時間(短時間処理法)、S9 mix 非存在下で 24 時間処理(連続処理法)し、MSM パウダーの染色体異常誘発能について検討した。

標本観察の結果、構造異常を持つ細胞及び数的異常細胞の出現頻度は、短時間処理法の S9 mix 非存在下及び存在下並びに 24 時間連続処理法のいずれにおいても、観察したすべての被験物質用量でいずれも 5%未満であったことから、構造異常及び数的異常とも陰性と判定した。

一方、媒体(蒸留水)を添加した陰性対照では、構造異常を持つ細胞及び数的異常細胞の出現頻度がいずれも 5%未満であったため、試験は適正に実施されたと評価した。

以上の結果から、MSM パウダーは本試験条件下では染色体異常を誘発しないものと判断した。

最終報告書作成者の署名

試 験 責 任 者:

2009 年 11 月 16 日

小 椋 正 造

本文書は正本を正確に転写したものです。

財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所

2009 年 11 月 16 日

試験責任者 小 椋 正 造

試験コード番号: P06-1323

被験物質コード番号: HR8136

委託者コード番号: K-0500

試験施設 財団法人化学物質評価研究機構 日田事業所
〒877-0061 大分県日田市石井町3丁目822番地

試験目的 CHL/IU 細胞を用いて、被験物質の染色体異常誘発能の有無を予測する。

試験法 評価実施項目は、化審法・変異原性試験ガイドラインに準拠した。

試験日程
試験開始日 2009年 9月25日
試験終了日 2009年11月16日

試験関係者
試験責任者: 小 椋 正 造
所 属: 日田事業所 試験第三課

資料の保管場所及び保管期間

試験に関する資料は、試験施設の資料保管施設にて試験終了日から5年間保管する。
保管期限後の処置は試験委託者の承認を得る。

正本の保管

試験計画書及び最終報告書の正本は1部とし、試験施設で保管する。また、試験責任者が正本と相違ないことを証明した写しを試験委託者に送付する。

1. 材料

1) 被験物質

名称	ロット番号	外観	純度	分子量
MSM パウダー	0903001	白色粉末	99.9% (GC 面積百分率)	94.13
室温 (被験物質保管室、デシケーター2、許容温度範囲: 10~30℃)で保管し、残余物は試験委託者に返却する。				

2) 陰性対照物質(媒体)

名称	ロット番号	グレード	提供元
蒸留水	K8G77	注射用、20 mL/アンプル	株式会社大塚製薬工場

3) 使用細胞

名称	提供元
CHL/IU 細胞	(財)ヒューマンサイエンス振興財団 ヒューマンサイエンス研究資源バンク

4) 使用培地及び S9

	名称	製造元	ロット番号
基礎培地	イーグル MEM 培地	日水製薬株式会社	60390411
血清[添加量]	新生仔牛血清[10%]	HyClone	ASC29136
S9	ラット S9	オリエンタル酵母工業株式会社	09071004
S9 mix	0.3 mL S9 + 5 μ mol $MgCl_2$ + 33 μ mol KCl + 5 μ mol G-6-P + 4 μ mol NADP + 4 μ mol HEPES (pH7.2) / 1 mL S9 mix		

2. 試験方法

1) 被験物質液の調製

媒体選択理由	被験物質は蒸留水に 94.1 mg/mL で溶解し、蒸留水で調製した 94.1 mg/mL の被験物質液は、室温にて調製後 2 時間まで発熱・発泡及び色調の変化がみられなかったことから、蒸留水を媒体に選択した。
調製法	媒体を加え攪拌して溶解させ、94.1 mg/mL の被験物質液を調製した。94.1 mg/mL の被験物質液を媒体で希釈して、培地中の被験物質用量の 100 倍濃度の各被験物質液を調製した。

2) 試験条件

培養条件		温度: 37℃、炭酸ガス濃度: 5%、湿度: ほぼ 100%		
前培養		5×10 ³ cells/mL を 5 mL/dish で 3 日間		
設定用量		10 mmol/L 相当の 941 µg/mL を最高用量とし、公比 2 で希釈した 9 用量を設定した。純度補正は行わなかった。 対照には、媒体を被験物質液と同量添加した媒体対照を設置した。		
培養器		1 dish/dose		
処理法		短時間処理		連続処理
		-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix
処理 培地	基礎培地	3 mL	2.5 mL	5 mL
	S9 mix	—	0.5 mL	—
	被験物質調製液	30 µL	30 µL	50 µL
処理時間		6 時間		24 時間
培地交換		処理培地除去後、PBS(-)2 mL で 3 回洗浄		—
回復時間		18 時間(5 mL で培養)		—
コルセミド処理		細胞回収 2 時間前に 10 µg/mL のデメコルシン溶液を 50 µL /dish 添加した。		
細胞回収		0.25 w/v% トリプシン 2 mL で細胞を剥離して回収した。		
増殖率の測定		細胞計数装置(CDA-500)で生存細胞数を測定した。		
標本作製	低張処理	0.075 mol/L KCl で 15 分間処理した。		
	固定	固定液(酢酸:メタノール=1:3)で固定した。		
	染色	2 v/v% ギムザ溶液で 15 分間染色した。		
	枚数	1 枚/dose		

観察用量	短時間処理法の S9 mix 存在下及び 24 時間連続処理法においても細胞増殖率が 50%未満となるような細胞毒性がみられなかったため、いずれの処理法においても、10 mmol/L 相当の 941 µg/mL を最高用量に、連続した 235 及び 471 µg/mL の各 3 用量とした。 また、短時間処理法の S9 mix 非存在下では細胞増殖率が 50%未満となるような細胞毒性がみられなかったため、10 mmol/L 相当の 941 µg/mL を最高用量に、連続した 118、235 及び 471 µg/mL の 4 用量とした。
観察細胞数	構造異常: 200 cells/dose、数的異常: 200 cells/dose

3. 試験の成立条件及び結果の判定

試験の成立条件	媒体対照における構造異常を持つ細胞及び数的異常細胞の出現頻度が、いずれも 5%未満であること。
結果の判定	被験物質で処理した用量での染色体異常細胞の出現頻度が、5%未満を陰性、5%以上 10%未満を疑陽性、10%以上を陽性と判定した。

4. 試験結果及び考察

試験結果を表 1 及び図 1、標本観察結果を別表 1 及び 2 に示す。

いずれの処理法においても 10 mmol/L 相当の 941 µg/mL までのすべての被験物質用量で細胞増殖率が 50%未満となるような細胞毒性はみられなかった。

標本観察の結果、構造異常を持つ細胞及び数的異常細胞の出現頻度は、短時間処理法の S9 mix 非存在下及び存在下並びに 24 時間連続処理法のいずれにおいても、観察したすべての被験物質用量でいずれも 5%未満であったことから、構造異常及び数的異常とも陰性と判定した。

以上の結果から、MSM パウダーは本試験条件下では染色体異常を誘発しないものと判断した。

表1 MSMパウダーの簡易染色体異常試験結果

物質	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	処理-回復 時間(h)	S9 mix	細胞増殖率 (%)	培地中の被験物質の 析出 ^{a)}			分裂細胞の 出現度合	異常細胞の出現頻度 (%) ^{b)}	
					処理 開始時	処理 終了時	培養 終了時		構造異常	数的異常
蒸留水	0	6-18	-	100	-	-	-	abundant	2.0	0.0
MSMパウダー	3.68	6-18	-	98.5	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	7.35	6-18	-	102.8	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	14.7	6-18	-	113.6	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	29.4	6-18	-	102.3	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	58.8	6-18	-	96.4	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	118	6-18	-	95.6	-	-	-	abundant	2.5	0.5
	235	6-18	-	89.5	-	-	-	abundant	4.0	1.0
	471	6-18	-	94.6	-	-	-	abundant	3.0	3.0
	941	6-18	-	81.5	-	-	-	abundant	2.5	0.5
IC ₅₀ : >941 $\mu\text{g/mL}$										
蒸留水	0	6-18	+	100	-	-	-	abundant	1.5	1.0
MSMパウダー	3.68	6-18	+	102.7	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	7.35	6-18	+	96.6	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	14.7	6-18	+	93.2	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	29.4	6-18	+	89.3	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	58.8	6-18	+	90.5	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	118	6-18	+	85.9	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	235	6-18	+	84.4	-	-	-	abundant	1.5	1.5
	471	6-18	+	85.9	-	-	-	abundant	0.5	0.0
	941	6-18	+	75.7	-	-	-	abundant	1.0	2.5
IC ₅₀ : >941 $\mu\text{g/mL}$										
蒸留水	0	24-0	-	100	-	-	-	abundant	2.0	2.0
MSMパウダー	3.68	24-0	-	94.3	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	7.35	24-0	-	97.7	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	14.7	24-0	-	92.9	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	29.4	24-0	-	91.6	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	58.8	24-0	-	95.0	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	118	24-0	-	93.9	-	-	-	abundant	n.o.	n.o.
	235	24-0	-	95.2	-	-	-	abundant	2.0	0.5
	471	24-0	-	91.4	-	-	-	abundant	1.5	0.5
	941	24-0	-	87.5	-	-	-	abundant	3.5	0.5
IC ₅₀ : >941 $\mu\text{g/mL}$										

n.o.: 観察せず、abundant: 分裂細胞が十分に出現

a) 被験物質の析出は、有りを+、無しを-とした。

b) 用量当たり200個の分裂細胞を観察し、染色体異常細胞の出現頻度を求めた。

注) ガイドラインに毒性のみられない場合の上限と記載されている10 mmol/L相当の941 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量に公比2で希釈した上記用量を設定した。

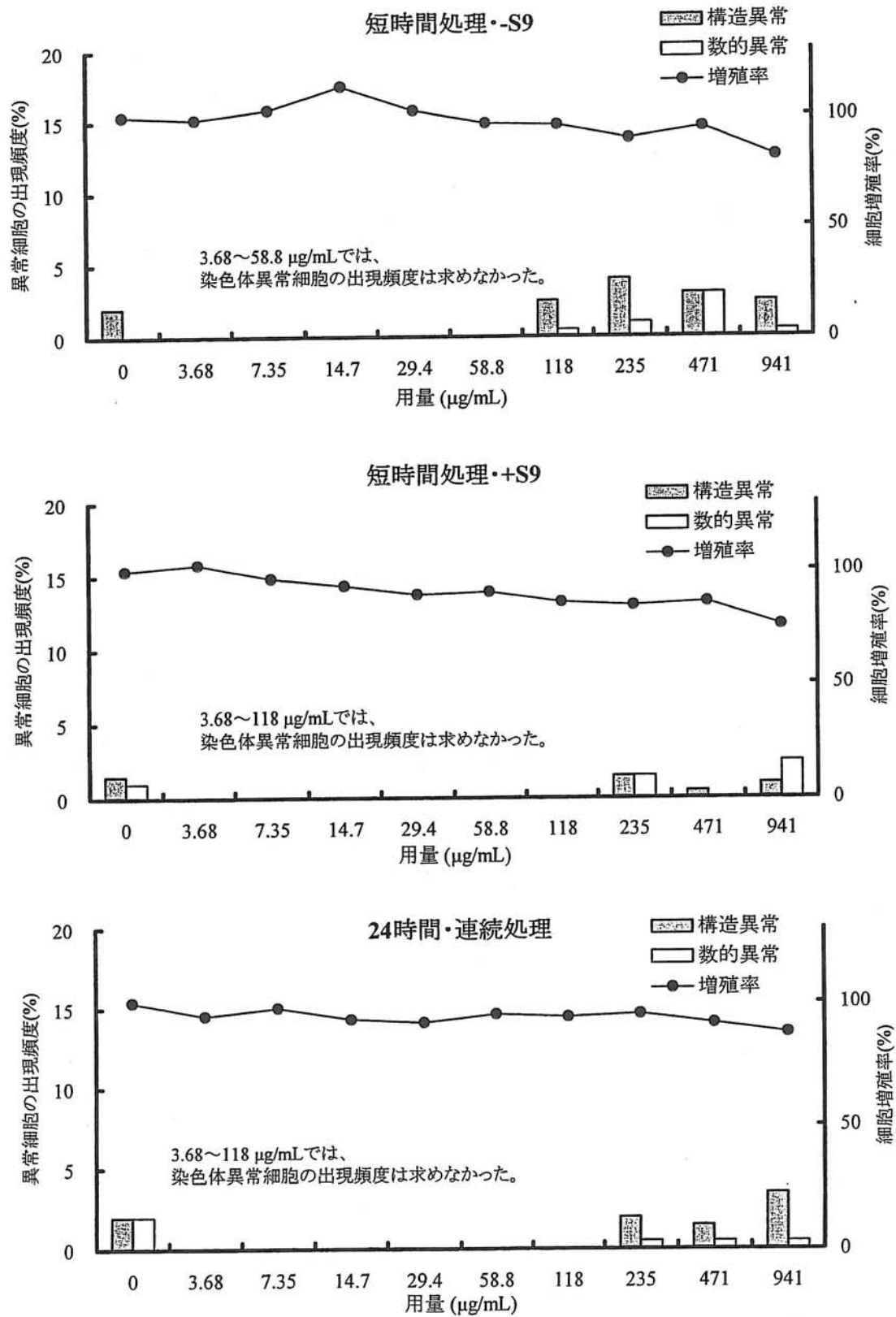


図1 MSMパウダーの簡易染色体異常試験結果

別表 1 染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質名: MSM/バウダー			染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)										ギャップ の出現数 (出現頻度%)		細胞 増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
処理時間 (h)	S9 mix	用量 (μ g/mL)	観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体交換	その他	総異常細胞数	観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体交換	その他	観察細胞数	倍率	その他	総異常細胞数		
6 - 18	-	陰性対照 (D.W.) 0	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	100	0	0	0	
			100	1	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	100	0	0	0	
			200	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6 - 18	-	118	100	1	1	0	0	0	2	4	0	0	0	100	1	0	1		
			100	2	1	0	0	0	0	3	1	0	0	0	100	0	0	0	
			200	3 (1.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	5 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	
6 - 18	-	235	100	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	100	2	0	2		
			100	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	100	0	0	0	
			200	7 (3.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (4.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	
6 - 18	-	471	100	2	2	0	0	0	4	2	0	0	0	100	3	0	3		
			100	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	100	3	0	3	
			200	4 (2.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	6 (3.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	
6 - 18	-	941	100	2	0	0	0	0	2	1	0	0	0	100	0	0	0		
			100	1	2	0	0	0	0	3	1	0	0	0	100	1	0	1	
			200	3 (1.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	
6 - 18	+	陰性対照 (D.W.) 0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	0	1		
			100	0	3	0	0	0	0	3	1	0	0	0	100	1	0	1	
			200	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	
6 - 18	+	235	100	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	100	1	0	1		
			100	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	100	2	0	2	
			200	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)	
6 - 18	+	471	100	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	100	0	0	0		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6 - 18	+	941	100	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	100	3	0	3		
			100	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	100	2	0	2	
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	5 (2.5)	0 (0.0)	5 (2.5)	

処理時間は処理時間・回復時間を表す。

異常細胞数は1回目に観察した100細胞分の観察データを1行目、追加して観察した100細胞分のデータを2行目、その合計を3行目に表す。

細胞増殖率は各被験物質群の値を1及び3行目に表す。

D.W.: 蒸留水、MMC: マイトマイシンC、CPA: シクロホスファミド・水和物

別表 2 染色体異常試験の結果 (連続処理法)

P06-1323

被験物質名: MSMパウダー

処理時間 (h)	用量 ($\mu\text{g/mL}$) 陰性対照 (D.W.) 0	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数 (出現頻度%)	細胞 増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体分体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数			観察細胞数	倍數体	その他	総異常細胞数
24 - 0		100	2	0	0	0	0	2	0	0	100	2	0	2
		100	2	0	0	0	0	2	0	0	100	2	0	2
		200	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	4 (2.0)	0 (0.0)	4 (2.0)
		100	3	1	0	0	0	3	1	0	100	1	0	1
24 - 0	235	100	0	1	0	0	0	1	2	0	100	0	0	0
		200	3 (1.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (2.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
		100	1	1	0	0	0	2	0	0	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	0	100	1	0	1
24 - 0	471	200	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
		100	5	1	0	0	0	5	0	0	100	1	0	1
		100	1	1	0	0	0	2	0	0	100	0	0	0
		200	6 (3.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (3.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)

処理時間は処理時間-回復時間を表す。

異常細胞数は1回目に観察した100細胞分の観察データを1行目、追加して観察した100細胞分のデータを2行目、その合計を3行目に表す。

細胞増殖率は各被験物質群の数値を1及び3行目に表す。

D.W.: 蒸留水、MMC: マイトマイシンC