

# 最終報告書

ジシクロヘキシルアミンの哺乳動物培養細胞を用いた染色体異常試験

(試験番号: 96-069)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

Study No. 96-069

## 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 .....	3
5. 培地 .....	3
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 .....	5
9. 染色体異常試験 .....	7
1) 被験物質および陽性対照物質の濃度 .....	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
(1) 連続処理法 .....	7
(2) 短時間処理法 .....	8
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 .....	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 .....	9

結果	10
1. 染色体異常試験（連続処理法）	10
2. 染色体異常試験（短時間処理法）	10
3. $D_{20}$ 値	11
結論および参考事項	11
参考文献	12

## 表

表1	ジシクロヘキシルアミンの染色体異常試験結果（連続処理法）	13
表2	ジシクロヘキシルアミンの染色体異常試験結果（短時間処理法）	15

## 図

図1	構造異常を有する細胞の出現頻度	17
図2	倍数性細胞の出現頻度	18

## 要 約

ジシクロヘキシルアミン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繊維芽細胞株 (CHL) 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濃度を決定するため、連続処理法では 100~600  $\mu\text{g/ml}$  濃度を、また、短時間処理法では 400~1400  $\mu\text{g/ml}$  濃度を用いて細胞増殖抑制試験を行った。その結果、連続処理法においては、24時間および48時間処理でそれぞれ 400 および 250  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で、また、短時間処理法では、S9 mix 非存在および存在下でそれぞれ 600 および 1000  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で 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濃度は、連続処理法の場合 100, 200, 250, 300, 400 500  $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法の場合 100, 200, 400, 600, 800 および 1000  $\mu\text{g/ml}$  とした。

試験の結果、連続処理法においては、染色体異常を有する細胞の増加は認められなかった。なお、48時間処理の 400 および 500  $\mu\text{g/ml}$  濃度では、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。一方、短時間処理法においては、S9 mix 非存在下で細胞に対する毒性のため観察可能な分裂中期像が認められなかった高用量を除く 100~600  $\mu\text{g/ml}$  濃度のうち 600  $\mu\text{g/ml}$  濃度でのみ染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。また、S9 mix 存在下では 800 および 1000  $\mu\text{g/ml}$  濃度で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められ、600~1000  $\mu\text{g/ml}$  濃度間では濃度依存性も認められた。

以上の成績から、本実験条件下では、ジシクロヘキシルアミンの CHL 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、短時間処理法において 0.96 mg/ml であった。

## 試 験 目 的

この試験は、ジシクロヘキシルアミンの哺乳動物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実施した。

### 材料および方法<sup>1), 2)</sup>

#### 1. 被験物質

名称(略号) : ジシクロヘキシルアミン (DCHA)

別名 ドデカヒドロジフェニルアミン, N-シクロヘキシルシクロヘキサミン

CAS番号 : 101-83-7

ロット番号 :

純 度 : 99.63 % (平成8年9月18日分析)

(不純物 ジシクロヘキシルイミン : 0.119%)

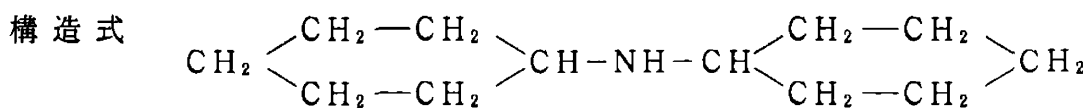
供 給 者 :

入 手 日 :

入 手 量 : 40g

物理化学的性状 :

化学名 ジシクロヘキシルアミン (Dicyclohexylamine)



分子式  $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}$

分子量 181.31

性状(常温) 無色透明の液体

沸 点 255.8 °C

融 点 -0.1 °C

蒸気圧 532 Pa (100 °C)

溶解性 水 : 微溶 0.16 g/100 ml ; アルコール, エーテル, ベンゼン, アセトン : 可溶

安定性：安定〔実験終了後、残余被験物質を試験委託者において分析した結果、純度は99.75%（1997年4月9日分析）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℃）、密栓（窒素充填）

## 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アセトン〔和光純薬工業(株)、ロット番号 DLK9754〕を用いた。陽性対照物質は、直接法では *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, Sigma chemical 社, ロット番号 109C-0469) を、代謝活性化法では 3,4-Benzo [*a*]pyrene (B[*a*]P, Sigma chemical 社, ロット番号 57F-3434)を用いた。

## 3. 溶媒

被験物質は水に難溶で、予備的検討の結果、ジメチルスルホキシド (DMSO) にも不溶で、アセトンには可溶であったため、溶媒にはアセトンを用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[*a*]P の溶媒は、DMSO〔和光純薬工業(株)、ロット番号 WDG4420〕を用いた。

## 4. 試験細胞株

チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL)〔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日入手〕を使用した。供試細胞は、浮遊細胞液に10%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地に戻し、解凍後の継代数が4回までのものを使用した。

## 5. 培地

Eagle-MEM 粉末培地 (Gibco Laboratories, ロット番号 73K2362) を常法に従い調製し、これに非働化 (56℃, 30分間加熱処理) 仔牛血清 (Gibco Laboratories, ロット番号 36N2761) を10%の割合で添加したものをを用いた。

## 6. 培養条件

供試細胞は CO<sub>2</sub> インキュベーター (Napco 社, 6200型) を用い, CO<sub>2</sub> 濃度 5%, 空気 95%, 温度 37°C, 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画分 (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-356, 平成 8 年 12 月 13 日製造, 平成 8 年 12 月 18 日購入) し, -80°C 以下で保存したものを使用時に冷水中で解凍して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 ml 当たりの組成は, 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: 190~226 g

#### 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) 投与方法 (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 (9,000×g) し, その上清を採取。

---

### [S9 mix 1 ml あたりの組成]

---

S9	0.3 ml
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濃度を検討するため、連続処理法の24時間処理の場合は100, 200, 300, 400, 500 および 600  $\mu\text{g/ml}$  濃度、48時間処理の場合は100, 150, 200, 250, 300 および 350  $\mu\text{g/ml}$  濃度で、また、短時間処理法の S9 mix 非存在および存在下の場合は、400, 600, 800, 1000, 1200 および 1400  $\mu\text{g/ml}$  濃度で、次に記載する細胞増殖抑制試験を行なった。試験には各濃度について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アセトンに溶解して最高濃度の供試液（原液）を調製した。すなわち、原液の濃度は連続処理法では 99.9 mg/ml, 短時間処理法では 139.9 mg/ml とした。次いで原液の一部をアセトンで順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。被験物質の供試液の添加量は、各シャーレの培地量の 1.0% (v/v) とした。

### 2) 細胞の処理

連続処理法の場合、直径 3.5 cm の円形プラスチック製シャーレ (Becton Dickinson 社) に  $6 \times 10^5$  個/ml の細胞を含む培地 2 ml を加え、培養開始3日後にアセトン（陰性対照）または被験物質の供試液各 0.02 ml を加えて24時間および48時間培養した。一方、短時間処理法の場合は、連続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 S9 mix 非存在下の場合は培地を取り替えず、アセトンまたは被験物質の供試液各 0.02 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の培地を取り除き、S9 mix 希釈液（S9 mix を培地で6倍に希釈したもの）を 2 ml 加えた後、アセトンまたは被験物質の供試液各 0.02 ml をシャーレに加えた。そして、培養6時間後に培地を取り除き、新鮮培地で細胞表面を3回洗浄し、新しい培地 2 ml を加えて18時間培養した。培養終了後、培地を取り除き、生理食塩液で細胞表面を2回洗浄し、10%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%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（オリンパス光学工業株式会社、モノセレータ）によって測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各濃度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、連続処理法においては24時間処理で 400  $\mu\text{g/ml}$  以



上の濃度で、また48時間処理では 250  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で、50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、それぞれ 300~400  $\mu\text{g/ml}$  間および 200~250  $\mu\text{g/ml}$  間にあるものと判断された。

短時間処理法においては、S9 mix 非存在および存在下でそれぞれ 600 および 1000  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は、それぞれ 400~600  $\mu\text{g/ml}$  間および 800~1000  $\mu\text{g/ml}$  間にあるものと判断された。なお、800  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度では、被験物質の供試液をシャーレ中の培地に添加した際、一時的に培地表面に油滴様物の産生が認められたが、すぐに消失した。

〔連続処理法〕

濃 度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	細胞増殖率 (%)			
	24 時間処理		48 時間処理	
0 (溶媒)	100	100 [100.0] <sup>a</sup>	100	100 [100.0]
100	107	92 [ 99.5]	84	89 [ 86.5]
150	-- <sup>b</sup>	-- [ --- ]	69	78 [ 73.5]
200	79	75 [ 77.0]	55	66 [ 60.5]
250	--	-- [ --- ]	44	43 [ 43.5]
300	56	74 [ 65.0]	34	38 [ 36.0]
350	--	-- [ --- ]	20	17 [ 18.5]
400	45	43 [ 44.0]	--	-- [ --- ]
500	45	39 [ 42.0]	--	-- [ --- ]
600	32	36 [ 34.0]	--	-- [ --- ]

a : 平均値      b : 試験せず

〔短時間処理法〕

濃 度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	細胞増殖率 (%)			
	S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
0 (溶媒)	100	100 [100.0] <sup>a</sup>	100	100 [100.0]
400	84	75 [ 79.5]	95	85 [ 90.0]
600	35	33 [ 34.0]	76	82 [ 79.0]
800	12	10 [ 11.0]	59	61 [ 60.0]
1000	4	3 [ 3.5]	41	29 [ 35.0]
1200	4	2 [ 3.0]	10	7 [ 8.5]
1400	5	3 [ 4.0]	7	7 [ 7.0]

a : 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濃度

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の濃度は、50%細胞増殖抑制濃度の前後が含まれ、かつ3濃度以上のデータが得られることを考慮して、連続処理法では100, 200, 250, 300, 400 および 500  $\mu\text{g/ml}$  の6濃度を、また、短時間処理法では100, 200, 400, 600, 800 および 1000  $\mu\text{g/ml}$  の6濃度を設定した。陽性対照物質のMNNGは2.5  $\mu\text{g/ml}$ , B[a]Pは10  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で試験した。

### 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アセトンに溶解して最高濃度の供試液（原液）を調製した。すなわち、原液の濃度は連続処理法では50.0 mg/ml, 短時間処理法では100.1 mg/mlとした。次いで、上述の8-1)に記載した方法と同様の操作で原液の一部をアセトンで順次希釈し、所定濃度の供試液を調製した。陽性対照物質のMNNGは0.5 mg/ml, B[a]Pは2.0 mg/mlの供試液を調製した。

### 3) 細胞の処理

$4 \times 10^3$  個/mlの細胞を含む培地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濃度当たり2枚のシャーレを使用した。

#### (1) 連続処理法

アセトンおよび被験物質の各供試液は0.05 ml, MNNGの供試液は0.025 mlを各シャーレに添加し、24時間および48時間培養した。

#### (2) 短時間処理法

S9 mix非存在下の場合、各シャーレから培地2 mlを抜き取り、アセトンおよび被験物質の各供試液は0.03 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。また、S9 mix存在下の場合、各シャーレから培地2.5 mlを抜き取った後、各シャーレにS9 mixを0.5 mlずつ添加し、さらに、アセトンおよび被験物質の各供試液は0.03 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時間後に培地を取り除き、新鮮培地で細胞表面を3回洗浄し、新しい培地5 mlを加え、さらに18時間培養した。

#### 4) 試験群の構成および使用シャーレ数

〔連続処理法〕		
濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	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>	2	2
100	2	2
200	2	2
250	2	2
300	2	2
400	2	2
500	2	2
2.5 (陽性対照) <sup>b</sup>	2	2

a : アセトン, b : MNNG, 使用シャーレ総数 : 32

〔短時間処理法〕		
濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	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>	2	2
100	2	2
200	2	2
400	2	2
600	2	2
800	2	2
1000	2	2
10 (陽性対照) <sup>b</sup>	2	2

a : アセトン, b : B[a]P, 使用シャーレ総数 : 32

#### 5) 染色体標本の作製

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、培地を取り除き、0.2%トリプシン水溶液 2 ml で処理して細胞をシャーレから剝離し、新鮮培地 5 ml を入れた遠沈管に移し、1000 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 mM 塩化カリウム水溶液 4 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 (v/v) 1 ml を添加して固定した。1000 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 ml で懸濁・固定した。この操作を3回繰り返したのち、少量の固定液で適切な密度の細胞を懸濁し、スライドガラスの2か所に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 (pH 6.8) を用いて希釈した 1.4%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作製した。標本は、シャーレ当たり3枚作製した。

## 6) 染色体の観察

染色体は、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。標本はすべてコード化し、盲検法でおこなった。各供試濃度とも染色体が明瞭に識別できる染色体の数が  $25 \pm 2$  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濃度当たり2枚のシャーレの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、ギャップ（染色分体型および染色体型）、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）とした。数的異常については、倍数性細胞のみを記録した。

ギャップは、染色体の染色性が全く認められない部位を対象とし、その部位が染色分体幅以上のもので、しかも染色分体の縦軸線上にあるものとした。ただし、非染色部位が染色分体の縦軸線上にあっても著しく離れている場合には、切断とした。

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おこなった。構造異常の総数は、観察した細胞 200個中に認められた異常細胞数をギャップのみを有する細胞を含めた場合と、含めない場合とに区別して表示した。

## 8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、ギャップを含めた構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料  $\chi^2$  検定をおこなって有意差（有意水準 5%以下）が認められた場合は、Fisher の直接確率法を用いて陰性対照群と各濃度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。）をおこなった。その結果、陰性対照群に比較して、被験物質による染色体異常細胞の出現頻度が2濃度以上で有意に増加し、かつ濃度依存性あるいは再現性が認められた場合、陽性と判定した。

# 結 果

## 1. 染色体異常試験（連続処理法）

結果は表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24時間

および48時間処理ともに 0.5%であった。被験物質群では24時間および48時間処理でそれぞれ 0~1.5%および 0.5~1.0%の範囲の出現頻度で認められたが、陰性対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。一方、陽性対照群の MNNG による染色体構造異常の出現頻度は、24時間および48時間処理でそれぞれ 91.5%および 82.0%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性細胞は、陰性対照群および被験物質群では認められなかった。陽性対照群では、48時間処理でのみ 0.5%の低値を示す出現頻度で認められた。

なお、被験物質の細胞に対する毒性のため、48時間処理の 400 および 500  $\mu\text{g/ml}$  濃度では観察可能な分裂中期像が認められなかった。

## 2. 染色体異常試験（短時間処理法）

結果は表 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、S9 mix 非存在および存在下でそれぞれ 1.5%および 0.5%であった。これに対し、被験物質群では S9 mix 非存在下の 100, 200, 400 および 600  $\mu\text{g/ml}$  濃度でそれぞれ 1.0, 1.0, 2.5 および 10.0%の出現頻度で認められ、600  $\mu\text{g/ml}$  濃度の出現頻度の増加は、陰性対照群と比べて統計学的に有意なものであった。また、S9 mix 存在下においては、100, 200, 400, 600, 800 および 1000  $\mu\text{g/ml}$  濃度でそれぞれ 0.5, 1.5, 0, 0.5, 13.5 および 31.0%の出現頻度で認められ、陰性対照群と比較して 800 および 1000  $\mu\text{g/ml}$  濃度の出現頻度は統計学的有意差のある高値を示した。さらに 600~1000  $\mu\text{g/ml}$  濃度間では濃度依存性も認められた。

一方、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、S9 mix 非存在下で 1.0%, S9 mix 存在下で 56.5%を示し、B[a]P は代謝活性化されて顕著な染色体異常を誘発することが確認された。

倍数性細胞については、陰性対照および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では S9 mix 非存在および存在下でそれぞれ 0~1.5%および 0~1.0%の範囲の出現頻度で認められたが、いずれも低値を示すもので、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。

なお、被験物質の細胞に対する毒性のため、S9 mix 非存在下の 800 および 1000  $\mu\text{g/ml}$  濃度では観察可能な分裂中期像が認められなかった。また、800 および 1000  $\mu\text{g/ml}$  濃度では、被験物質の供試液をシャーレ中の培地に添加した際、一時的に培地表面に油滴様物

の産生が認められたが、すぐに消失した。

### 3. D<sub>20</sub>値<sup>4)</sup>

短時間処理法において陽性値を示す染色体異常細胞の増加が認められたため、D<sub>20</sub>値（分裂中期像 20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の濃度, mg/ml）を算出した。

その結果は下表に示したとおりであり、S値（対照となったD<sub>20</sub>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）が最小となった 0.96 mg/ml を本被験物質のD<sub>20</sub>値とした。

短時間処理法	D <sub>20</sub> 値 (mg/ml)	S 値
S9 mix 非存在下	1.50	70.94
S9 mix 存在下	<u>0.96</u>	<u>24.01</u>
	1.94	61.42

### 結論および参考事項

ジシクロヘキシルアミンのチャイニーズハムスター肺由来の繊維芽細胞株（CHL）を用いた *in vitro* における染色体異常試験を実施した結果、連続処理法においては染色体異常を有する細胞の増加は認められなかった。一方、短時間処理法においては、S9 mix 非存在下で検査が可能であった 100~600 μg/ml 濃度のうちの最高濃度 600 μg/ml において染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。また、S9 mix 存在下では濃度依存性の有意な染色体構造異常細胞の増加が認められた。

したがって、本実験条件下では、ジシクロヘキシルアミンの CHL 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、短時間処理法において 0.96 mg/ml であった。本試験結果は、CHL 細胞において、染色体異常を有する細胞の出現頻度が10%以上を陽性とする生物学的判定基準<sup>5)</sup> からみても明らかな陽性を示すものであった。

なお、ジシクロヘキシルアミンの変異原性については、すでにヒトリンパ球を用いた染色体異

常試験<sup>6)</sup>においても陽性と報告されており、一方、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 を用いた復帰突然変異試験<sup>7)</sup> およびシリアンハムスター由来の BHK21c13 細胞を用いたトランスフォーメーション試験<sup>8)</sup> では陰性と報告されている。

#### 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 test 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 改訂版,” 化学工業日報社, 東京, 1992, pp.51-52.
- 5) 石館 基 監修, “改訂増補 染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー, 東京, 1987, p.19.
- 6) International Agency for Research on Cancer (IARC). (1987). “IARC Monograph on Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans,” Suppl.6, World Health Organization, Lyon, pp.240-241.
- 7) Mortelmans, K., Haworth, S., Lowlor, T., Speck, W., Tainer, B. and Zeiger, E. (1986). *Salmonella* mutagenicity tests : II. Results from the testing of 270 chemicals, *Environmental Mutagenesis*, **8**(suppl.7), 1-119.
- 8) 賀田恒夫, 石館 基 監修, “環境変異原データ集,” サイエンティスト社, 東京, 1980, p141.

表1-1 ジシクロロヘキシルアミンの染色体異常試験結果（連続処理法：24時間処理）

試験群	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	観察 細胞数	倍數性細胞		構造異常を有する細胞数と出現頻度(%)				判定		
			細胞数 (%)	判定	ギャップ		染色体型			合計	
					g	切断	交換	切断			交換
陰性対照 (アセトン)	--	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0(0)	--	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)
被験物質	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0(0)	--	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)
200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0(0)	--	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0(0)	--	0(0)	0(0)	2(1.0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)
300	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0(0)	--	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)
400	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0(0)	--	1(0.5)	0(0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)
500	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	200	0(0)	--	0(0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)
陽性対照 (MNNG)	2.5	100	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	100	0	0	0	1	2	1	0	0	0	2
	200	0(0)	--	0(0)	2(1.0)	2(1.0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)
			陽性対照を含む場合		-gのみを有する細胞を除く場合		MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine				
			1	7	90	0	0	0	0	0	91
			2	8	92	2	0	0	0	0	92
			3(1.5)	15(7.5)	182(91.0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	183(91.5)**
											183(91.5)

+g : ギャップのみを有する細胞を含む場合      -g : ギャップのみを有する細胞を除く場合      MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine  
 \*\*: P < 0.01



表1-2 ジシクロヘキシルアミンの染色体異常試験結果(連続処理法:48時間処理)

試験群	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	観察 細胞数	倍数性細胞		構造異常を有する細胞数と出現頻度(%)				判定				
			細胞数 (%)	判定	ギャップ		染色体型			合計			
					g	交換	切断	交換			その他	+g	-g
陰性対照 (アセトン)	--	100 100 200	0 0 0(0)	--	0 0 0(0)	0 1 1(0.5)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	0 1 1(0.5)	0 1 1(0.5)	--		
被験物質	100	100 100 200	0 0 0(0)	--	1 0 1(0.5)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	1 0 1(0.5)	0 0 0(0)	--	
	200	100 100 200	0 0 0(0)	--	0 0 0(0)	1 1 2(1.0)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	1 1 2(1.0)	1 1 2(1.0)	--	
	250	100 100 200	0 0 0(0)	--	0 0 0(0)	1 0 1(0.5)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	1 0 1(0.5)	1 0 1(0.5)	--	
	300	100 100 200	0 0 0(0)	--	0 0 0(0)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	0 0 0(0)	--	
	400*	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
	500*	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
陽性対照 (MNNG)	2.5	100 100 200	1 0 1(0.5)	--	2 1 3(1.5)	12 21 33(16.5)	81 71 152(76.0)	8 11 19(9.5)	2 5 7(3.5)	85 79 164(82.0)**	0 0 164(82.0)	85 79 164(82.0)	+

+g: ギャップのみを有する細胞を含む場合  
 \*\*: P < 0.01  
 # : 細胞毒性のため, 観察可能な分裂中期像なし  
 MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

表2-1 ジシクロロヘキシルアミンの染色体異常試験結果(短時間処理法: S9mix 非存在下)

試験群	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	観察 細胞数	倍數性細胞		構造異常を有する細胞数と出現頻度(%)				判定		
			細胞数 (%)	判定	ギャップ		染色体型			交換	
					g	切断	交換	切断			交換
				+	g			+	g	判定	
陰性対照 (アセトン)	--	100	0	--	1	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	--	1	0	0	0	0	0	1
	200	0(0)	--	2(1.0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)
被験物質	100	0	0	--	0	1	0	0	0	0	1
	100	0	0	--	0	0	1	0	0	0	1
	200	0(0)	--	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)
200	100	0	0	--	1	0	0	0	0	0	1
	100	0	0	--	0	0	0	1	0	0	1
	200	0(0)	--	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	2(1.0)
400	100	1	1	--	0	0	0	0	0	0	1
	100	2	3(1.5)	--	0	0	2	0	0	0	4
	200	3(1.5)	--	0(0)	0(0)	3(1.5)	0(0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	5(2.5)
600	100	0	0	--	1	2	10	1	0	0	11
	100	0	0	--	1	1	8	3	0	0	9
	200	0(0)	--	2(1.0)	3(1.5)	18(9.0)	4(2.0)	0(0)	0(0)	0(0)	20(10.0)**
800*	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
1000*	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
陽性対照 (B[a]P)	10	0	0	--	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	--	0	1	0	1	0	0	2
	200	0(0)	--	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)

+g: ギャップのみを有する細胞を含む場合  
 \*\*: P < 0.01  
 # : 細胞毒性のため, 観察可能な分裂中期像なし  
 B[a]P: 3,4-benzo[a]pyrene

表2-2 ジシクロヘキシルアミンの染色体異常試験結果(短時間処理法: S9mix 存在下)

試験群	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	観察細胞数	倍數性細胞		構造異常を有する細胞数と出現頻度(%)				判定				
			細胞数 (%)	判定	ギャップ		染色体型			合計			
					g	交換	切断	交換			その他	-g	
陰性対照 (アセトン)	--	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	200	0(0)	--	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	--
被験物質	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
	200	0(0)	--	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	--
200	100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	100	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	1	
	200	0(0)	--	2(1.0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3(1.5)	1(0.5)	--
400	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	200	2(1.0)	--	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	--
600	100	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	
	100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	200	2(1.0)	--	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	--
800	100	1	1	3	12	1	1	0	0	0	12	12	
	100	0	0	7	14	1	1	0	0	0	15	15	
	200	1(0.5)	--	10(5.0)	26(13.0)	2(1.0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	27(13.5)**	27(13.5)	+
1000	100	0	4	19	29	6	0	0	0	0	33	31	
	100	0	3	16	28	10	0	0	0	0	29	29	
	200	0(0)	--	7(3.5)	35(17.5)	57(28.5)	16(8.0)	0(0)	0(0)	0(0)	62(31.0)**	60(30.0)	+
陽性対照 (B[a]P)	10	0	6	11	58	1	1	0	0	0	64	61	
	100	0	2	2	45	0	2	0	0	0	49	47	
	200	0(0)	--	8(4.0)	103(51.5)	1(0.5)	3(1.5)	0(0)	0(0)	0(0)	113(56.5)**	108(54.0)	+

+g: ギャップのみを有する細胞を含む場合      -g: ギャップのみを有する細胞を除く場合      B[a]P: 3,4-benzo[a]pyrene

\*\* :  $P < 0.01$

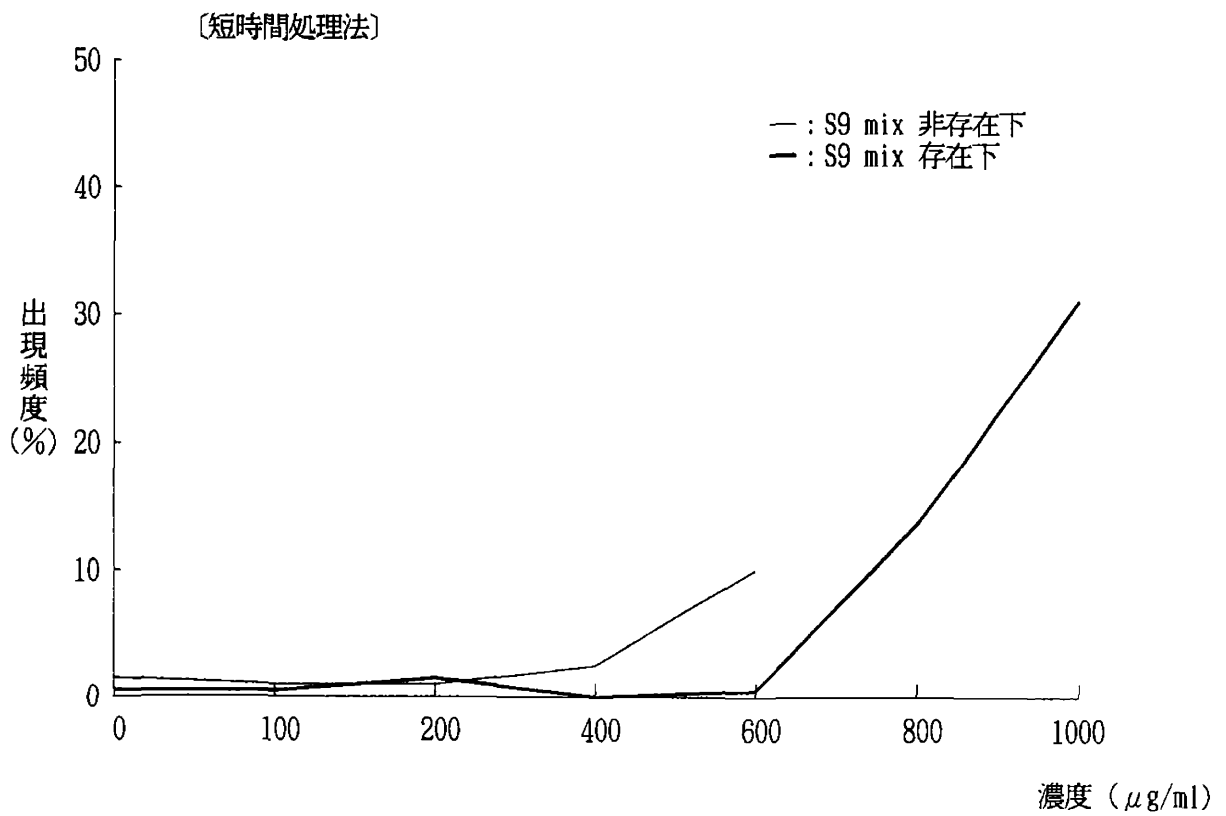
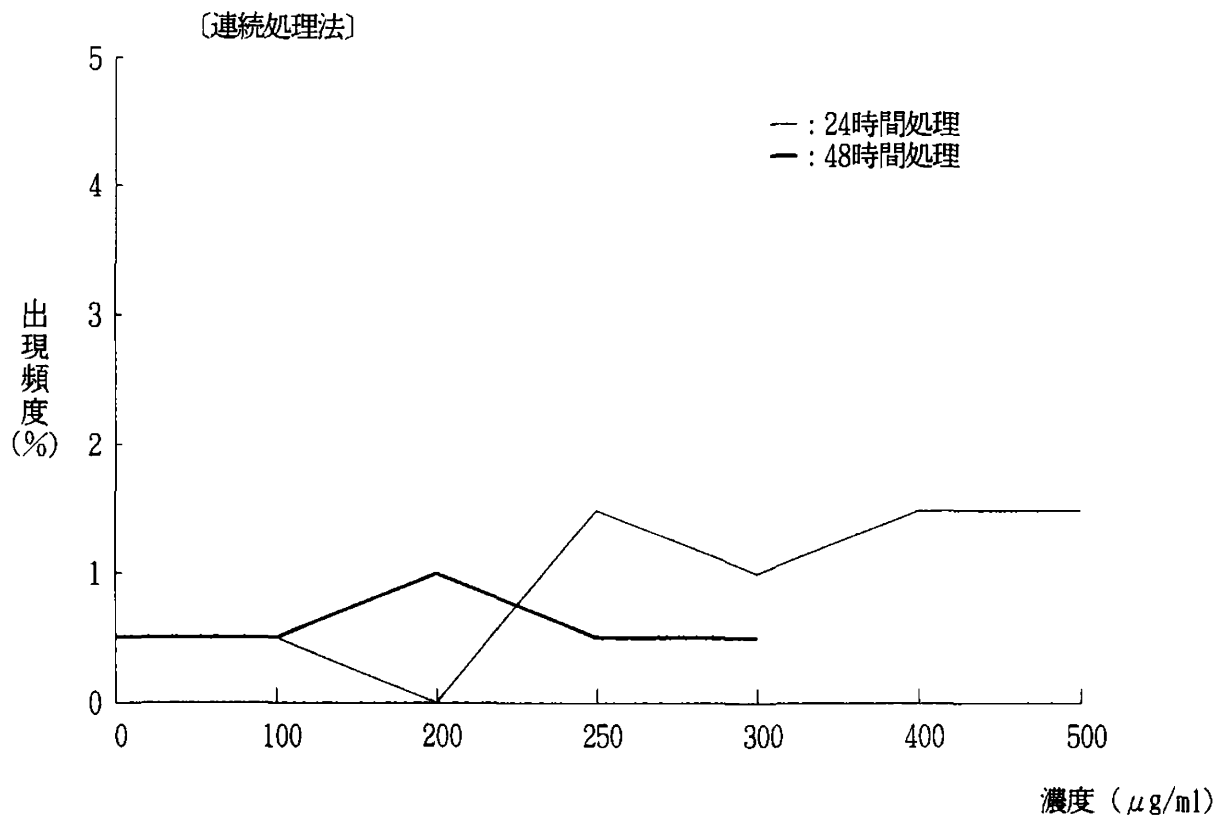


図 1 構造異常を有する細胞の出現頻度

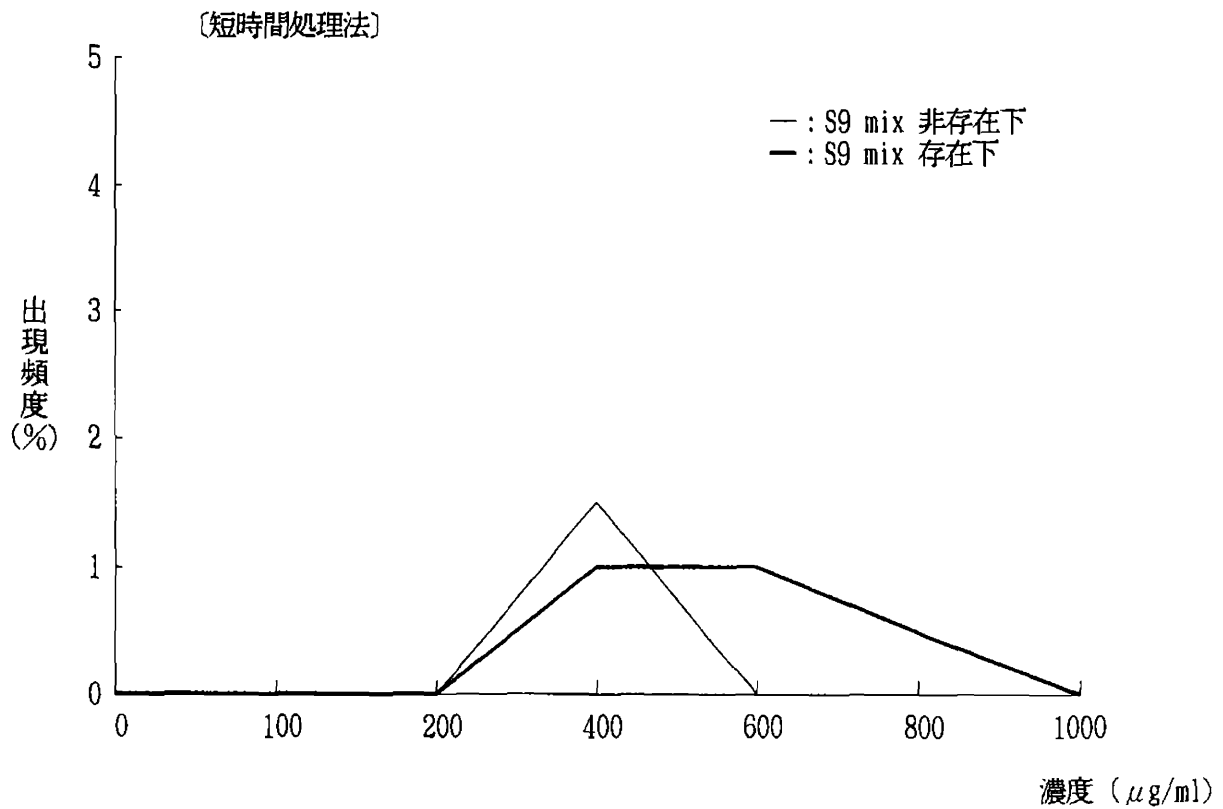
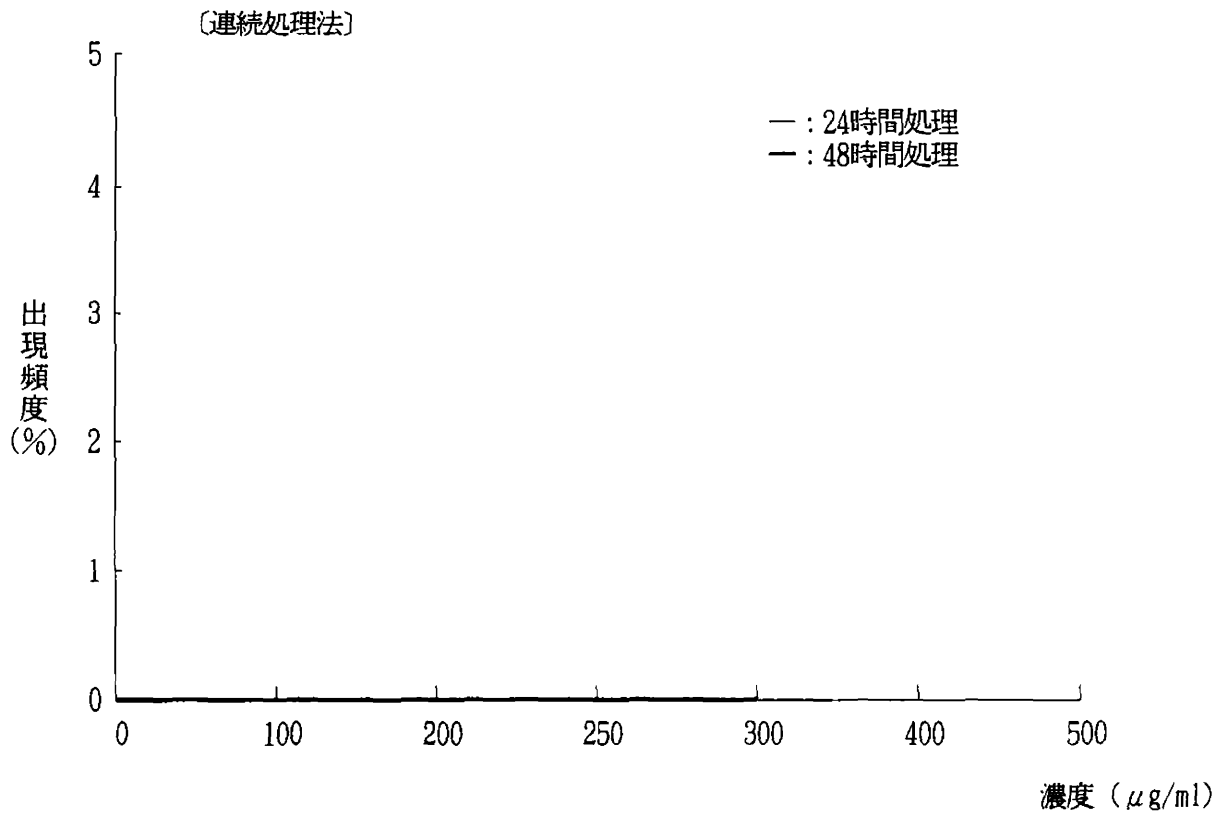


図 2 倍数性細胞の出現頻度