

最 終 報 告 書

4-chlorobenzoyl chloride のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：9051 (115-202)

平成 18 年 9 月 11 日

試験委託者

厚生労働省 医薬食品局

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

目 次

1. 要約.....	4
13. 被験物質.....	7
14. 試験材料および方法.....	9
15. 試験結果.....	17
16. 考察および結論	19
17. 参考文献.....	20

Figures

Figure 1	Growth inhibition of CHL cells treated with 4-chlorobenzoyl chloride	
	[Short-term treatment]	22
Figure 2	Growth inhibition of CHL cells treated with 4-chlorobenzoyl chloride	
	[Continuous treatment].....	23
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by 4-chlorobenzoyl chloride	
	[Short-term treatment: -S9]	24
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by 4-chlorobenzoyl chloride	
	[Short-term treatment: +S9]	25
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by 4-chlorobenzoyl chloride	
	[Continuous treatment: 24h].....	26

Tables

Table 1	Results of growth inhibition test of 4-chlorobenzoyl chloride [Short-term treatment]	27
Table 2	Results of growth inhibition test of 4-chlorobenzoyl chloride [Continuous treatment]	28
Table 3	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 4-chlorobenzoyl chloride [Short-term treatment: -S9]	29
Table 4	Chromosome aberration test in CHL cells treated 4-chlorobenzoyl chloride [Short-term treatment: +S9]	30
Table 5	Chromosome aberration test in CHL cells treated with 4-chlorobenzoyl chloride [Continuous treatment: 24h]	31

1. 要約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、4-chlorobenzoyl chloride は染色体異常を誘起しないものと判断した。

4-chlorobenzoyl chloride の変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に染色体異常試験の用量を設定した。短時間処理法-S9 処理では 118, 240, 490 および 1000 $\mu\text{g/mL}$ 、同+S9 処理では 151, 216 および 309 $\mu\text{g/mL}$ の 3~4 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、4-chlorobenzoyl chloride 処理群の場合、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても、明確な染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の誘発は認められなかった。さらに、連続処理法 24 時間処理で 151, 216 および 309 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。同試験法においても、4-chlorobenzoyl chloride 処理による染色体異常（構造異常ならびに数的異常）の誘発は認められなかった。

短時間処理法-S9 処理および連続処理法の陽性対照物質であるマイトマイシン C (MMC) ならびに同+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) 処理群では、染色体構造異常の出現頻度が上昇しており、陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.025$) な増加を示した。

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討する。

13. 被験物質

13.1. 被験物質名

4-chlorobenzoyl chloride

13.2. ロット番号

13.3. 純度

99.14%

13.4. 不純物の名称および濃度

3-chlorobenzoyl chloride (MCOC) : 0.59%

2-chlorobenzoyl chloride (OCOC) : 0.24%

13.5. 提供元

13.6. 製造年月日

2005 年 3 月 9 日

13.7. 使用期限

2005 年 9 月 9 日

13.8. 保存条件

密閉, 室温 (1~30°C)

13.9. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (H-3 : 23.3~25.3°C ; 2005 年 3 月 15 日~2005 年 6 月 20 日, C-3 : 22.1~26.6°C ; 2005 年 6 月 20 日~2005 年 8 月 25 日)

13.10. 化学名

4-クロロベンゾイルクロリド

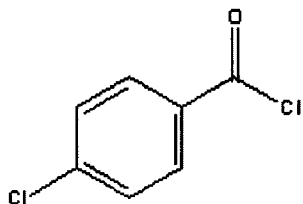
4-chlorobenzoyl chloride

p-chlorobenzoyl chloride

13.11. CAS No.

122-01-0

13.12. 化学構造



13.13. 分子式

$C_7H_4Cl_2O$

13.14. 分子量

175.01

13.15. 物質の状態

無色液体

13.16. 融点／沸点

融点：12～14℃／沸点：222℃

13.17. 溶解性

メタノール，エタノール，アセトン，DMSO，DMF，エーテル，ケトン，トルエンに易溶，水に難溶

13.18. 蒸気圧

110℃／20 mmHg

13.19. 比重

1.377／20℃

13.20. 臭気

強い刺激臭

13.21. 取り扱い上の注意

適切な保護具（マスク・手袋等）を着用し，吸い込んだり，目，皮膚および衣類に触れたりしないようにした。

13.22. 毒性

急性経口毒性（雄ラット） ; LD₅₀ 820 mg/kg

急性経口毒性（雄マウス） ; LD₅₀ 325 mg/kg

刺激性 ; 皮膚刺激，眼刺激（催涙性），粘膜刺激他

感作性 ; 腐食性

13.23. 残余被験物質の処理

実験終了後、1 g を資料保存施設管理責任者の管理下で安評センターに保存し、残りは安定性分析のため、被験物質等管理責任者を介して提供元に返却した。分析の結果(2005 年 9 月 2 日付報告)、被験物質が安定であることが確認された。

14. 試験材料および方法

14.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において遺伝毒性ガイドラインで指定されていることから、チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を使用した。CHL/IU 細胞は 1984 年 11 月 15 日に国立衛生試験所 (現 国立医薬品食品衛生研究所) から分与を受け、ジメチルスルホキシド (DMSO : GC 用 ; 純度 99.9% ; Lot No. K26414578 ; Merck) を容量比で 10% 添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては、凍結した細胞を融解した後、3~5 日ごとに継代したものを使用した。

なお、細胞増殖抑制試験では継代数 25 の細胞を、染色体異常試験では継代数 29 の細胞を、染色体異常試験 (追加試験) では継代数 6 の細胞を用いた。

凍結ロット毎にマイコプラズマ汚染検査 (陰性)、倍加時間の測定 (17.9 時間)、染色体数 (モード数 25 本の細胞が 82%) の測定ならびに陰性対照および陽性対照における構造異常出現頻度の確認を実施し、異常のない細胞を試験に使用した。

14.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (IWAKI : Lot No. 919084 ; 旭テクノグラス) に非働化 (56°C, 30 分) 済みの仔牛血清 (Lot No. 511116 ; Invitrogen) を最終濃度で 10% になるよう添加した。調製後の培養液は使用時まで冷蔵所 (15°C 以下) に保存した。

14.3. 培養条件

CO₂ インキュベーター (三洋電機バイオメディカ) を用い、CO₂ 濃度 5%, 37°C の条件で細胞を培養した。

14.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. CAM-520 ; キッコーマン) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザー (設定値 : -80°C, 基準値 : -60°C 以下) に保存した。

14.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法を次に示す。

ロット番号	RAA-520
製造年月日	2005 年 4 月 28 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット : Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
体重	193~237 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB)および 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および 投与回数	PB : 30 mg/kg 1 回 (1 日目) 60 mg/kg 3 回 (2~4 日目) BF : 80 mg/kg 1 回 (3 日目)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	24.86 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の各内容物の量を以下に示す.

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

14.5. 被験物質液の調製

被験物質は水に難溶で DMSO およびアセトンに易溶であるが, DMSO と混合すると, 直ちに反応して発熱, 結晶を生じる. アセトン中では短時間 (調製後 50 分以内) であれば安定 (発熱, 発色, 発煙等の変化がない) である. また, 1%CMC・Na 水溶液中での懸濁性は不良であった. したがって, 溶媒にはモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行ったアセトン (分光分析用; 含量 100.0% : Lot No. 501F1723 ; 関東化学) を使用し, 調製液は調製後 50 分以内に使用した.

細胞増殖抑制試験では, 使用直前に被験物質 700 mg を目盛付き試験管に精密に量り, 約 1 mL のアセトン (使用溶媒) を加え, 攪拌しながら溶解させた. さらにアセトンを加えて 2 mL に定容し, 調製原液 (350 mg/mL 溶液) を準備した. アセトン 1 mL に対

し、この 350 mg/mL 調製原液を 1 mL 加えることにより、175 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、87.5, 43.8, 21.9, 10.9, 5.47, 2.73, 1.37 および 0.684 mg/mL 溶液を調製した。

染色体異常試験では、使用直前に被験物質 720 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 2 mL のアセトンを加え、攪拌しながら溶解させた。さらにアセトンを加えて 4 mL に定容し、調製原液 (180 mg/mL 溶液) を準備した。アセトン 0.9 mL に対し、この 180 mg/mL 調製原液を 2.1 mL 加えることにより、126 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、88.2, 61.7, 43.2, 30.3, 21.2 および 14.8 mg/mL 溶液を調製した。

追加試験では、使用直前に被験物質 600 mg を目盛付き試験管に精密に量り、約 2 mL のアセトンを加え、攪拌しながら溶解させた。さらにアセトンを加えて 3 mL に定容し、調製原液 (200 mg/mL 溶液) を準備した。アセトン 0.6 mL に対し、この 200 mg/mL 調製原液を 1.4 mL 加えることにより、140 mg/mL 溶液を調製した。以下同様な希釈を順次行うことにより、98.0, 68.6, 48.0, 33.6 および 23.5 mg/mL 溶液を調製した。

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

被験物質の溶媒であるアセトンを使用した。

14.6.2. 陽性対照 (短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理)

注射用水 (日本薬局方注射用水 : Lot No. K3G77 ; 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC : Lot No. 415ACF ; 協和醗酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液 : Lot No. 4C87N ; 大塚製薬工場) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

用量は、短時間処理法で 0.1 µg/mL、連続処理法で 0.05 µg/mL とした。

14.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

注射用水 (Lot No. K3G77) 5 mL に溶解したシクロホスファミド (CP : Lot No. 4028 ; 塩野義製薬) を生理食塩液 (Lot No. 4C87N) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後、凍結保存したものを試験に用いた。

用量は 12.5 µg/mL とした。

14.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

14.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 1750 µg/mL (10 mM 相当) を最高用量とし、以下 875, 438, 219, 109, 54.7, 27.3, 13.7, 6.84 および 3.42 µg/mL の 10 用量を細

胞増殖抑制試験の用量とした。

14.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 用量当たり 2 ウェルを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した。

14.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F：住友ベークライト）の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.7.6. に記載する割合で溶媒および被験物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各ウェルの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Lot No. 064K2309；Sigma-Aldrich）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500 μ L を加え、さらに 18 時間培養を続けた。

14.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.7.6. に記載する割合で溶媒および被験物質の処理を行った。

その後の操作は 14.7.3. に記載した方法に準じた。

14.7.5. 連続処理法 24 時間処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.7.6. に記載する割合で溶媒、被験物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた。

14.7.6. 処理量一覧

	陰性対照および被験物質		
	培養液	S9 mix	溶媒／ 被験物質液
-S9 処理	600 μ L	-	3 μ L
+S9 処理	500 μ L	100 μ L	3 μ L
24 時間処理	600 μ L	-	3 μ L

14.7.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.7.8. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウェルから培養液を除き、10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：Lot No. KLH9734；和光純薬工業）を加えて 10 分間細胞を固定した。次

いで、0.1%クリスタル・バイオレット (Lot No. K31134240 ; Merck) 水溶液で10分間細胞を染色した。各プレートを手洗した後、乾燥させた。各ウェルに色素溶出液 (30% エタノール, 1%酢酸水溶液) を3 mL 加え、5 分間放置した。各ウェルの溶出液を96 ウェルのプレート (アッセイプレート: IWAKI) に各々300 μ L 分注し、マイクロプレートリーダー (モデル450: BIO・RAD) を用いて570 nm での吸光度を測定した。陰性対照群での吸光度に対する比 (=細胞生存率) を各用量群について求めた。

さらに、短時間処理法-S9 処理および連続処理法24 時間処理においては細胞増殖抑制が認められたため、プロビット法を用いて50%細胞増殖抑制濃度を算出した。算出には13.7~438 μ g/mL の6 点 (-S9 処理) および109~438 μ g/mL の3 点 (24 時間処理) を用いた。

14.8. 染色体異常試験

14.8.1. 用量

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法-S9 処理および連続処理法24 時間処理では細胞毒性が認められ、50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ438 および299 μ g/mL と算出された。短時間処理法+S9 処理では50%以上の細胞増殖抑制は認められず、細胞生存率は438 μ g/mL において最低値 (71.2%) を示した。しかし、875 μ g/mL 以上の用量では、析出物が染色されたことにより見掛け上吸光度から算出される生存率は増加したが、培養終了時の顕微鏡による観察では半数以上の細胞が死滅していると推測された。

以上の結果を基に、染色体異常試験では、細胞の増殖を50%以上抑制すると推定される用量、すなわち、-S9 処理で630 μ g/mL, +S9 処理で900 μ g/mL, 24 時間処理で441 μ g/mL をそれぞれ最高用量とし、以下に示す6~7 用量を設定した。

処理法	用量 (μ g/mL)							
短時間処理法-S9 処理	—	106	151	216	309	441	630	
短時間処理法+S9 処理	—	106	<u>151</u>	<u>216</u>	<u>309</u>	441	630	900
連続処理法24 時間処理	74.1	106	<u>151</u>	<u>216</u>	<u>309</u>	441		

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

短時間処理法-S9 処理において、すべての用量で相対細胞増殖率が50%以上を示し、細胞の増殖を50%以上抑制する用量が得られなかった。したがって、-S9 処理のみ追加試験を実施した。追加試験では1000 μ g/mL を最高用量とし、以下に示す7 用量を設定した。

処理法	用量 (μ g/mL)							
短時間処理法-S9 処理	<u>118</u>	168	<u>240</u>	343	<u>490</u>	700	<u>1000</u>	

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

14.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

油性インクを用いて、試験番号、処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

14.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート（細胞培養用シャーレ：住友ベークライト）に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（Lot No. 064K2309 ; Sigma-Aldrich）を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

14.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理を行った。

その後の操作は 14.8.3. に記載した方法に準じた。

14.8.5. 連続処理法 24 時間処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、14.8.6. に記載する割合で溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理を行い、さらに 24 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

14.8.6. 処理量一覧

	陰性対照および被験物質			陽性対照		
	培養液	S9 mix	溶媒/ 被験物質液	培養液	S9 mix	陽性対照 物質液
-S9 処理	3.0 mL	-	0.015 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.015 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	3.0 mL	-	0.015 mL	2.7 mL	-	0.3 mL

14.8.7. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した。

14.8.8. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に、最終濃度で 0.2 μ g/mL となるようコルセミド溶液（Lot

No. 1227696 ; Invitrogen) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25%トリプシン溶液 (Lot No. 1233304 および 1263419 【追加試験】 ; Invitrogen) を用いてプレートから細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え、37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液 (メタノール 3 容 : 酢酸 1 容) で細胞を固定した。固定液を 2 回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とした。細胞密度を適切な濃度に調整し、細胞濃度確認のため染色体標本を 1 枚作製した。その後、染色体メタフェーズ展開装置 (HANABI) を用いて、スライドガラス上に細胞浮遊液を 1 滴滴下し、染色体標本を 2 枚作製した。スライド標本を十分に乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (Buffer tablets pH 6.8 : Lot No. TP601474 ; Merck) を用いて希釈した 1.2% ギムザ染色液 (Lot No. OB318388 ; Merck) で 12 分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

14.8.9. 細胞増殖抑制制度の測定

染色体標本作製時に、陰性対照群、各被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、ATP フォトメーター (ルミテスター C-100LU : キッコーマン) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

すなわち、1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に、低張処理した細胞液を 50 μ L 添加し、攪拌してから約 20 分間静置した。測定用チューブにこの混合液を 100 μ L 分注し、ATP 測定用試薬キット (ルシフェール 250 : キッコーマン) の発光試薬を 100 μ L 添加した後、相対発光量 (Relative Light Unit ; RLU) を測定した。陰性対照群における RLU に対する比 (=細胞生存率) を各用量群について求め、細胞増殖抑制制度とした。

14.8.10. 評価対象

観察用量としては、14.8.9.における相対細胞増殖率が陰性対照群の 50%未満になる最も低い用量を最高用量とした。なお、-S9 処理については追加試験において作成した標本から評価対象を選択した。+S9 処理および 24 時間処理では連続する 3 用量を評価対象 (観察用量) とした。-S9 処理においては連続する 3 用量では細胞毒性の強い用量範囲のみ観察することになるため、間隔を空けて 4 用量を評価対象 (観察用量) とした。

14.8.11. 染色体の観察

短時間処理法と連続処理法のそれぞれの標本を分けてコード化した。始めに短時間処理法について染色体の観察を実施し、その結果、陰性結果が得られたため、引き続き連続処理法の標本についても観察を行った。

各プレート当たり 100 個、すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下 ($\times$

600) で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ (gap)、染色分体切断 (ctb)、染色体切断 (csb)、染色分体交換 (cte)、染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。また、数的異常として、1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

14.9. 試験成立条件

陰性対照の構造異常細胞および倍数性細胞の出現頻度は背景データから求めた基準値内であり、かつ、いずれも 5%未満であること。陽性対照の構造異常細胞の出現頻度は上記の基準値内であり、かつ、10%以上であること。以上の条件を満たした場合に試験は成立したと判断した。

14.10. 結果の解析

ギャップのみ保有する細胞については異常細胞数に含めないで判定した。

異常細胞の出現頻度を、Fisher の直接確率計算法 (有意水準片側 2.5%) を用いて検定した。また、用量依存性については、Cochran Armitage の傾向検定 (有意水準片側 2.5%) を用いて検定した。

陰性対照群と比較し、被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、用量に依存性が認められるか、あるいは再現性が確認された場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は、試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

15. 試験結果

15.1. 細胞増殖抑制試験

15.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示した。

50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法-S9 処理で 438 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法 24 時間処理では 299 $\mu\text{g/mL}$ であった。短時間処理法+S9 処理では 50%以上の細胞増殖抑制は認められず、細胞生存率は 438 $\mu\text{g/mL}$ において最低値 (71.2%) を示した。なお、875 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では細胞生存率が高い値を示していたが、培養終了時の顕微鏡による観察において、半数以上の細胞が死滅していると推測された。その原因として、438 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では培養終了後に残存していた析出物が染色されており、そのため吸光度が増加し、結果として細胞生存率が高く算出されたものと思われる。

15.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始および処理終了時、全ての処理の 438 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において白色粉末状の析出物が認められ、さらに 875 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では白色油膜状の析出物も認められた。また、処理終了時に、全ての処理の 875 $\mu\text{g/mL}$ および 1750 $\mu\text{g/mL}$ の用量において培養液がそれぞれ橙色および黄色を呈していた。したがって、当該用量について pH を測定したところ (下表)、わずかな pH の低下が認められたが、いずれも 7.0 以上であった。

	pH 値		
	-S9 処理	+S9 処理	24 時間処理
陰性対照	7.9	7.7	7.4
875 $\mu\text{g/mL}$	7.7	7.6	7.2
1750 $\mu\text{g/mL}$	7.5	7.1	7.2

15.2. 染色体異常試験

15.2.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 1 に示した。

4-chlorobenzoyl chloride 処理群での染色体構造異常出現頻度は、118 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、240 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%、490 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%、1000 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%を示し、陰性対照群 (0.5%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、118 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、240、490 および 1000 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%を示し、陰性対照群 (0.5%) と同等であった。また、用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 1000 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 46.7%であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では、染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 31.5% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 2 に示した。

4-chlorobenzoyl chloride 処理群での染色体構造異常出現頻度は、151 および 216 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 309 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%を示し、陰性対照群 (0.0%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、151 および 216 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 309 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%を示し、陰性対照群 (0.0%) と同等であった。また、用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 309 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 41.4%であった。

一方、陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 16.0% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Figure 5, Table 5 および Appendix 3 に示した。

4-chlorobenzoyl chloride 処理群での染色体構造異常出現頻度は、151 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 216 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 309 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%を示し、陰性対照群 (1.0%) と比較し明確な増加は認められなかった。倍数性細胞の出現頻度は、151 および 216 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 309 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%を示し、陰性対照群 (0.0%) と同等であった。

また、用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 309 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 32.7%であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 17.5% ($p \leq 0.025$) であった。

15.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始および処理終了時、全ての処理の 309 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量において白色粉末状の析出物が認められ、さらに 441 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では白色油膜状の析出物も認められた。また、処理終了時に、-S9 処理の 1000 $\mu\text{g/mL}$ および+S9 処理の 900 $\mu\text{g/mL}$ の用量において培養液が橙色を呈していた。したがって、当該用量について pH を測定したところ (下表)、いずれも 7.0 以上であり、明確な低下は認められなかった。

	pH 値	
	-S9 処理	+S9 処理
陰性対照	7.5, 7.6	7.3, 7.3
900 $\mu\text{g/mL}$	—	7.1, 7.2
1000 $\mu\text{g/mL}$	7.6, 7.5	—

16. 考察および結論

4-chlorobenzoyl chloride の変異原性、すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため、培養細胞 (CHL/IU) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果を基に、短時間処理法-S9 処理、同+S9 処理では細胞毒性が顕著に認められる用量まで検討した。

その結果、4-chlorobenzoyl chloride 処理群の場合、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理いずれにおいても明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

さらに、連続処理法 24 時間処理についても細胞毒性が顕著に認められる用量まで検討し顕微鏡観察を実施したが、いずれの用量においても明確な染色体異常 (構造異常ならびに数的異常) の誘発は認められなかった。

なお、陰性対照および陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも背景データ (Appendix 4) から求めた基準値内であり、試験成立条件を満たしたことから、当該試験は適切な条件でなされたと判断された。

これまでに 4-chlorobenzoyl chloride の遺伝毒性について細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性¹⁾と報告されているが、発がん性の報告はない。異性体である 2-chlorobenzoyl chloride または 3-chlorobenzoyl chloride の遺伝毒性ならびに発がん性に関する報告も検索した限り認められなかった。類縁体である p-chlorobenzyl chloride については、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性¹⁾と報告されている。また、p-chlorobenzotrichloride については、細菌を用いる復帰突然変異試験で陽性¹⁾ (+S9 処理の TA100 株, TA98 株, TA1535 株, TA1537 株および WP2*uvrA* 株)、CHL 細胞を用いた染色体異常試験で構造異常が陽性¹⁾ (短時間処理法-S9 および+S9 処理ならびに連続処理法 24 時間および 48 時間処理) と報告されている。

以上の試験結果から、当該試験条件下において 4-chlorobenzoyl chloride のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

17. 参考文献

- 1) 労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質調査課 監修 “労働安全衛生法 有害性調査制度に基づく 既存化学物質 変異原性試験データ集”，日本化学物質安全・情報センター，1996

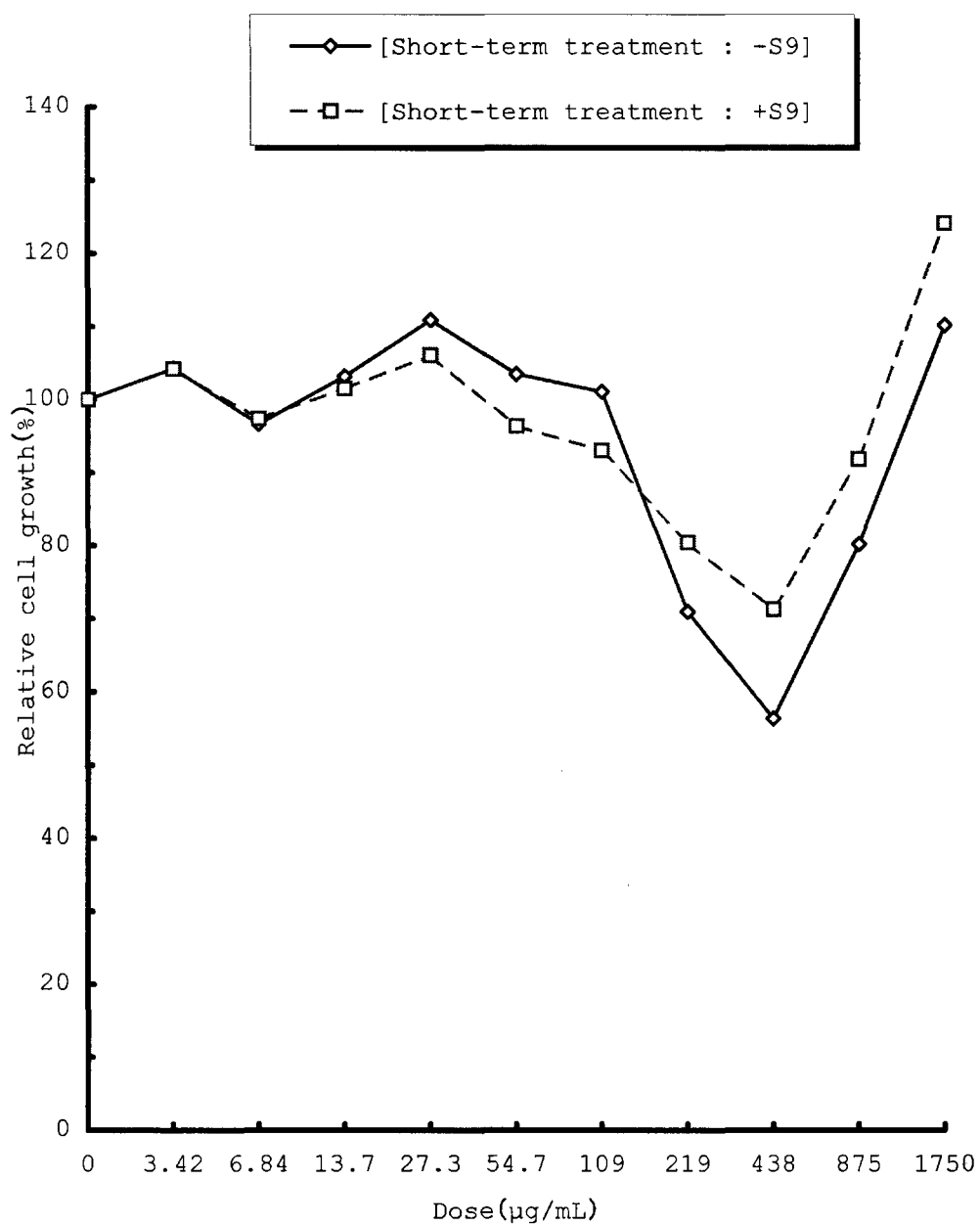


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with 4-chlorobenzoyl chloride [Short-term treatment]

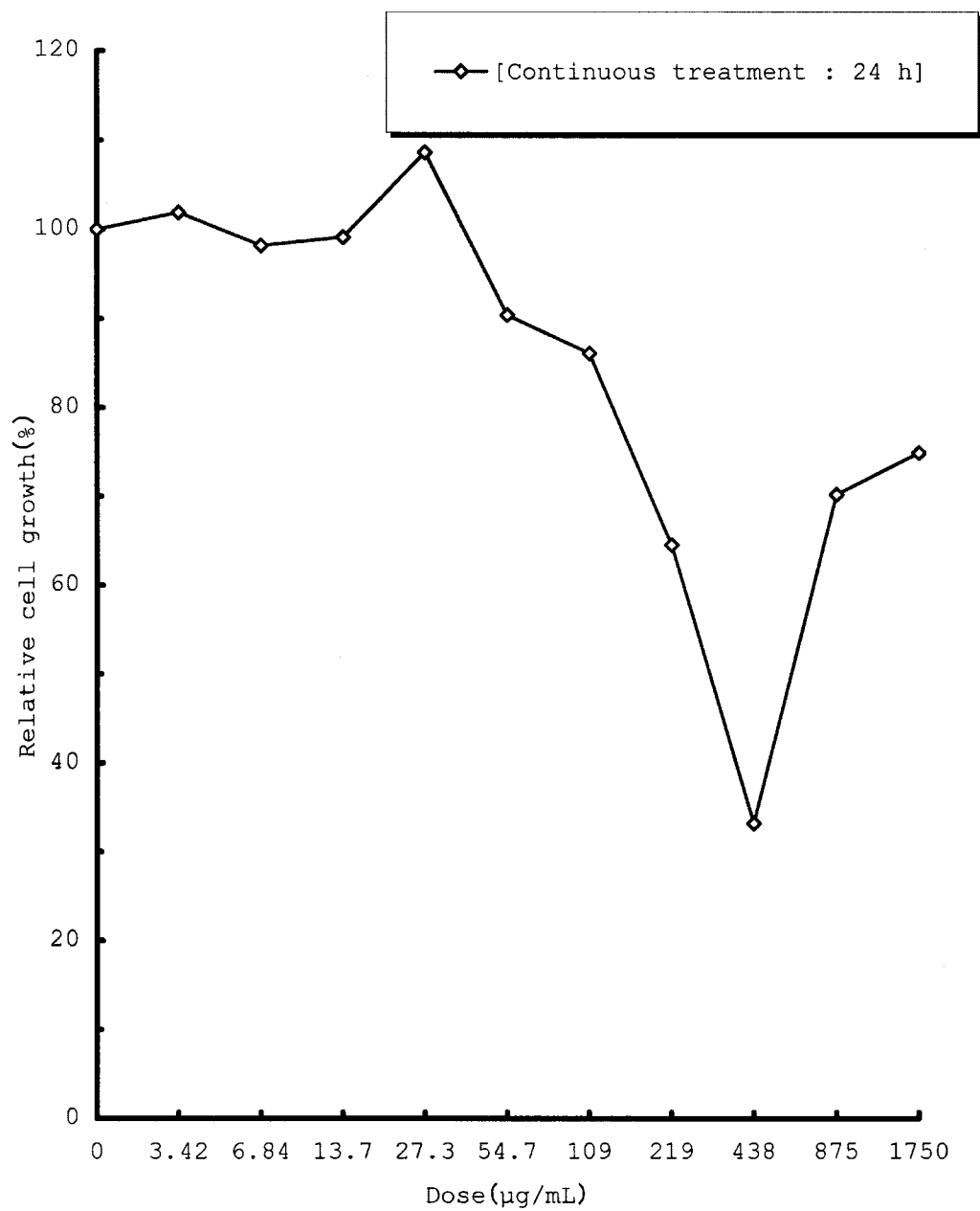


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with 4-chlorobenzoyl chloride
[Continuous treatment]

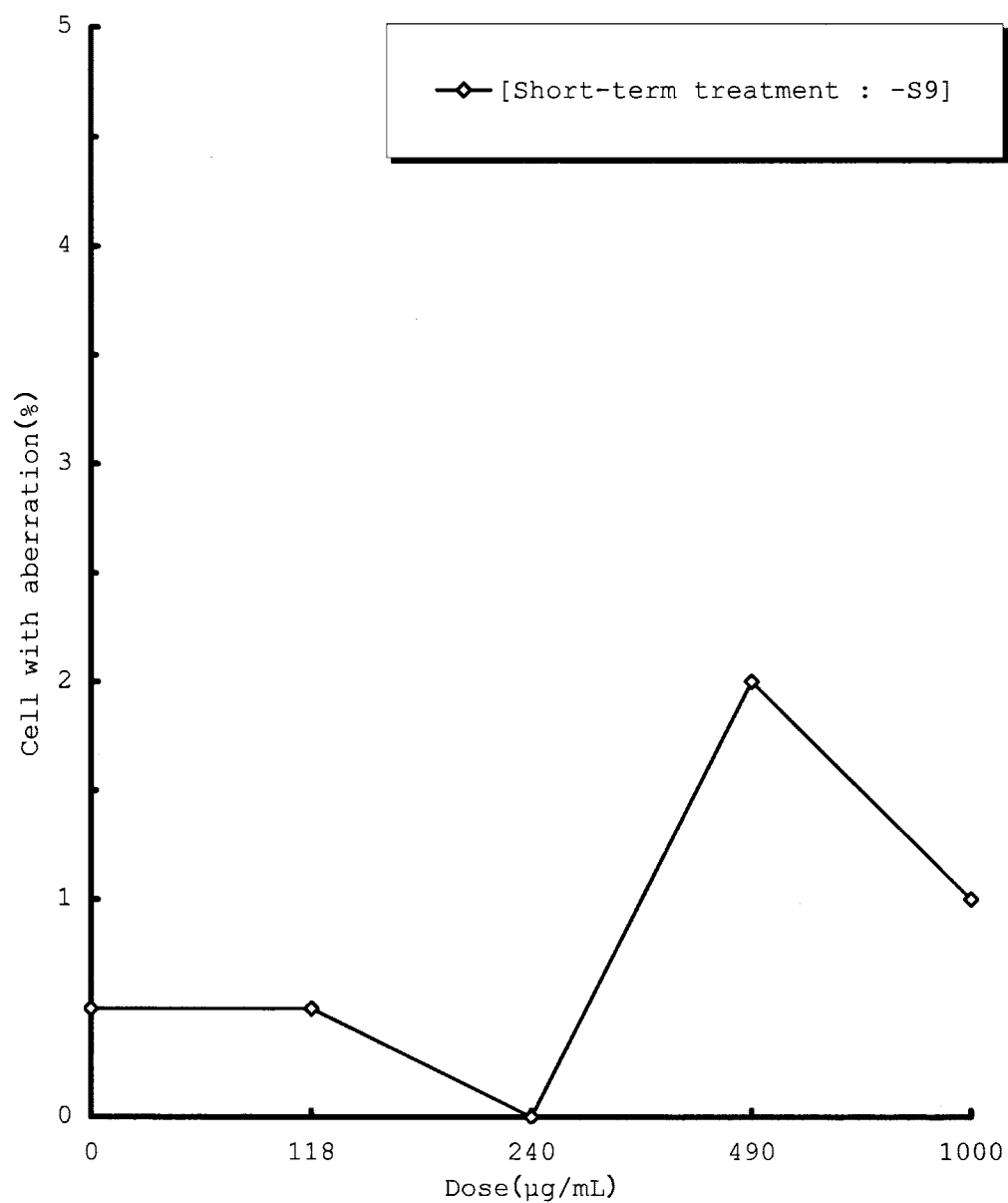


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by 4-chlorobenzoyl chloride [Short-term treatment:-S9]

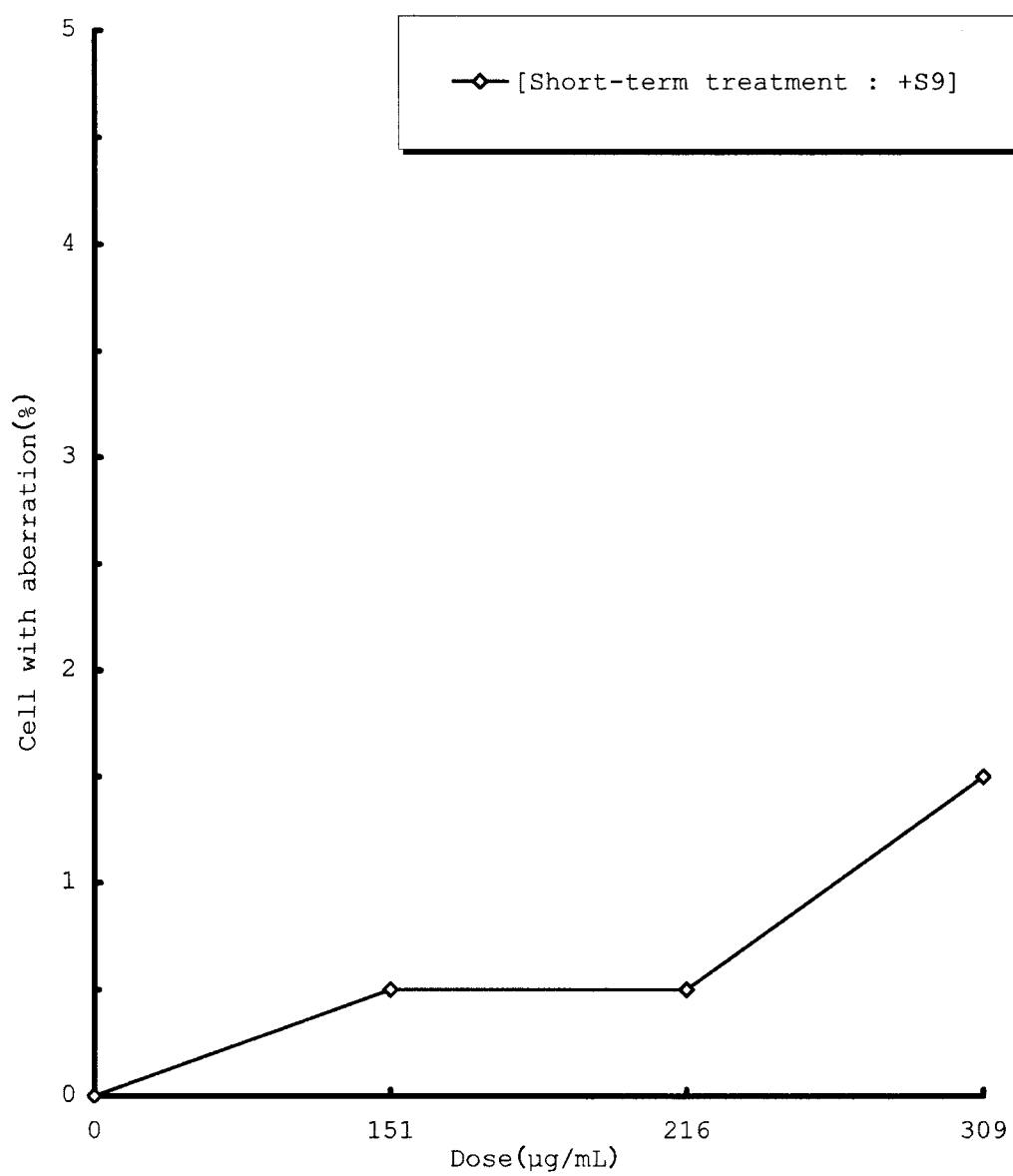


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by 4-chlorobenzoyl chloride [Short-term treatment:+S9]

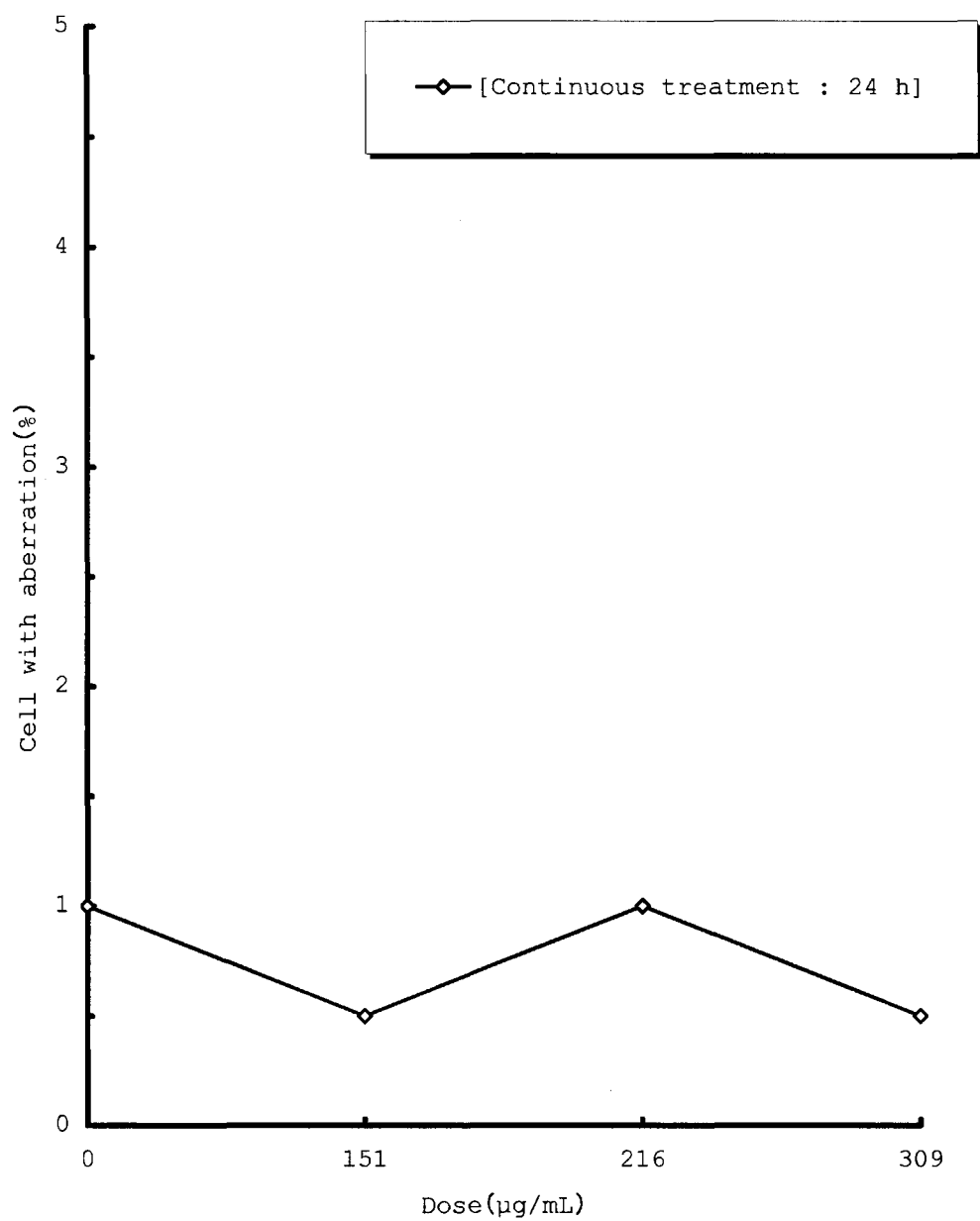


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by 4-chlorobenzoyl chloride [Continuous treatment:24 h]

Table 1. Results of growth inhibition test of 4-chlorobenzoyl chloride [Short-term treatment]

[Short-term treatment : -S9]				[Short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]	Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]
4-chlorobenzoyl chloride	0 a)	100.0 100.0	[100.0]	4-chlorobenzoyl chloride	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	3.42	106.5 102.1	[104.3]		3.42	104.5 103.9	[104.2]
	6.84	97.6 95.7	[96.7]		6.84	95.9 98.9	[97.4]
	13.7	101.7 104.6	[103.2]		13.7	101.1 101.8	[101.5]
	27.3	107.3 114.4	[110.9]		27.3	104.8 107.4	[106.1]
	54.7	105.7 101.2	[103.5]		54.7	94.8 98.0	[96.4]
	109	99.8 102.3	[101.1]		109	89.5 96.5	[93.0]
	219	60.9 80.9	[70.9]		219	79.1 81.8	[80.5]
	438 d)	54.9 57.7	[56.3]		438 d)	79.5 62.8	[71.2]
	875 d)	80.7 79.7	[80.2]		875 d)	88.5 95.0	[91.8]
	1750 d)	101.9 118.5	[110.2]		1750 d)	122.1 126.1	[124.1]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[Short-term treatment : -S9] 438 (µg/mL)

[Short-term treatment : +S9] Not calculated

a): Negative control(Acetone: 5 µL/mL)

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 2. Results of growth inhibition test of 4-chlorobenzoyl chloride [Continuous treatment]

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]
4-chlorobenzoyl chloride	0 a)	100.0 100.0	[100.0]
	3.42	99.6 104.2	[101.9]
	6.84	99.1 97.2	[98.2]
	13.7	101.9 96.2	[99.1]
	27.3	109.3 107.8	[108.6]
	54.7	90.1 90.7	[90.4]
	109	86.0 86.2	[86.1]
	219	67.6 61.4	[64.5]
	438 d)	33.2 33.1	[33.2]
	875 d)	71.1 69.3	[70.2]
	1750 d)	75.0 74.8	[74.9]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[Continuous treatment : 24 h] 299 (µg/mL)

a): Negative control (Acetone: 5 µL/mL)

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 4-chlorobenzoyl chloride
[Short-term treatment : -S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
4-chlorobenzoyl chloride	0 a)	6	100.0	200	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	118	6	90.0	200	2	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	240	6	62.9	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
	490 d)	6	51.4	200	2	2	2	0	0	0	4 (2.0)	200	0 (0.0)
	1000 d)	6	46.7	200	1	1	1	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
MMC b)	0.1	6	48.6	200	3	14	53	0	0	0	63 (31.5) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange
oth: others, -gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

a): Negative control (Acetone: 5 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Mitomycin C)

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 4-chlorobenzoyl chloride
[Short-term treatment : +S9]

Exp. No. 9051 (115-202)

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
4-chlorobenzoyl chloride	0 a)	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
	151	6	63.8	200	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	216	6	63.7	200	4	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	309 d)	6	41.4	200	0	0	3	0	0	0	3 (1.5)	200	2 (1.0)
	441 d)	6	24.9	NE									
CP b)	12.5	6	69.8	200	5	10	24	0	0	0	32 (16.0)	* 200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange

oth: others, -gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

NE: Not examined

a): Negative control (Acetone: 5 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Cyclophosphamide)

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with 4-chlorobenzoyl chloride
[Continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 9051 (115-202)

Compound	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
4-chlorobenzoyl chloride	0 a)	24	100.0	200	0	1	1	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	151	24	106.5	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	216	24	88.0	200	1	2	0	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	309 d)	24	32.7	200	4	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	441 d)	24	24.7	NE									
MMC b)	0.05	24	98.6	200	4	7	30	0	0	0	35 (17.5) *	200	0 (0.0)

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange

oth: others, -gap: total number of cells with aberrations except gap

* :Significant difference from control (Fisher's exact test): $p \leq 0.025$

NE:Not examined

a): Negative control (Acetone: 5 $\mu\text{L/mL}$)

b): Positive control (Mitomycin C)

d): Visible precipitation was observed at the end of exposure period.