

最終報告書

表 題：2-クロロヒドロキノンジメチルエーテルのほ乳類培養細胞を用いる
染色体異常試験

試験番号：SR05396

株式会社 化合物安全性研究所

目次

	頁
表紙	1
目次	4
要約	8
緒言	9
材料および方法	9
成績	19
考察	21

Tables and Figure

Table 1	Effects of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR05396)	23
Figure 1	Effects of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR05396)	24
Table 2	Effects of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR05396)	25
Table 3-1	Results of the chromosomal aberration test of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene (6 hours treatment without metabolic activation) (SR05396)	26
Table 3-2	Results of the chromosomal aberration test of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene (6 hours treatment with metabolic activation) (SR05396)	27

Table 3-3	Results of the chromosomal aberration test of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene (24 hours treatment without metabolic activation) (SR05396)	28
Table 4	Effects of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene on growth rate of CHL/IU without metabolic activation (chromosomal aberration test, confirmatory test) (SR05396)	29
Table 5	Results of the chromosomal aberration test of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene (6 hours treatment without metabolic activation, confirmatory test) (SR05396)	30

要 約

2-クロロヒドロキノンジメチルエーテルの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いて検討した。試験は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の24-0 h処理による場合の3系列で実施した。

予備試験(細胞増殖抑制試験：6.76~1730 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の結果、各試験系列で50%以上の細胞増殖抑制が認められた。IC₅₀値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が262 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法の代謝活性化による場合が31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および連続処理法の24-0 h処理による場合が166 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。被験物質の析出が、試験液処理開始時の865 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量あるいは1730 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量、および処理終了時の865 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で観察された。被験物質による培養液pHへの影響は観察されなかった。

本試験(染色体異常試験)は、予備試験の結果に基づき、各試験系列ともIC₅₀より高用量を最高用量とした計7用量を設定した。また、短時間処理法の代謝活性化によらない場合については、用量間隔を狭めた6用量による確認試験を実施した。

本試験の結果、染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量：62.5~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で10.0% (D₂₀値：0.32 mg/mL)、その確認試験(評価用量：151~260 $\mu\text{g}/\text{mL}$)では、217 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で10.5% (D₂₀値：0.25 mg/mL) および260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では9.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、本試験と確認試験で再現性が確認され結果は陽性であった。短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量：3.91~31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)では、23.5 および31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で15.0 および34.5% (D₂₀値：0.025 mg/mL)と用量の増加に伴う10%を超える出現率が認められ、結果は陽性であった。いずれの試験系列においても、構造異常の出現率の増加は細胞増殖抑制が示された濃度で認められた。一方、連続処理法の24-0 h処理による場合(評価用量：31.3~188 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の構造異常の出現率は全て5%未満であった。数的異常の出現率は、確認試験の評価最高用量で6.5%と僅かな増加がみられたのみで、他の試験系列および用量は全て5%未満であり陰性と判断した。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、2-クロロヒドロキノンジメチルエーテルは、本試験条件において、ほ乳類の培養細胞に対し細胞増殖抑制を示す濃度で染色体異常誘発性を有すると判断した。

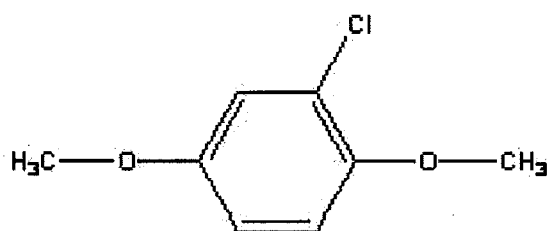
緒言

2-クロロヒドロキノンジメチルエーテルの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を検討する目的で、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いる染色体異常試験を実施した。

材料および方法

1. 被験物質

名称	: 2-クロロヒドロキノンジメチルエーテル
英名	: 2-Chloro-1,4-dimethoxybenzene
CAS No.	: 2100-42-7
官報公示整理番号	: 3-918
構造式	:



分子式	: C ₈ H ₉ ClO ₂
分子量	: 172.61
物理化学的性質	: 形状 ; 液体 外観 ; 透明 色 ; 無色 沸点 ; 247°C 融点 ; 8°C (凝固点) 引火点 ; 123°C 比重(20/20) ; 1.2315 屈折率 n _{20/D} ; 1.5470

分配係数 ; 2.69 (オクタノール/水)

蒸気圧 ; 0.108 mmHg (25°C)

溶解性 ; 水に 301 mg/L (25°C)。

試験施設において、別製造者の製品 (ロット番号 A005115701、ACROS ORGANICS) を用いてジメチルスルホキシドに対する溶解性を事前確認した。確認内容を、2. 被験物質の調製 (10 頁) に記載した。

純度 (GC) : 99.2% (Appendix 1)

不純物の名称およびその濃度 : 不明 (データなし)

入手量 : 25 g

安定性 : 実験終了後に、使用した被験物質の純度に関する分析成績を入手し被験物質の安定性について確認した (Appendix 2)。

保存場所 : 検体保存室および変異原性試験室

保存条件 : 密栓、遮光、冷所 (実測範囲 : 2~8°C)

保存期間 : 2007 年 1 月 13 日 (受入) ~ 2008 年 3 月 24 日 (最終使用日)

取扱上の注意 : 火気に注意し、使用に際しては、手袋、マスク等を着用し、吸入または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。

残余被験物質の処置 : 試験操作終了後、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

2. 被験物質の調製

被験物質は水への溶解性が低く、試験施設における溶解性確認において、ジメチルスルホキシドに 500 mg/mL の濃度まで溶解することが確認されたことから、ジメチルスルホキシドを調製溶媒に選択した。

被験物質を精秤し、ジメチルスルホキシド (ロット番号 SL045 および TA026、株式会社同仁化学研究所) を用いて溶解ならびに希釈し、所定の濃度に用時調製した。

予備試験では 173 mg/mL 調製液を調製し、173 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 86.5、43.3、21.6、10.8、5.41、2.70、1.35 および 0.676 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では 50 mg/mL 調製液を調製し、50 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.781 および 0.391 mg/mL 調製液を調製した。また、50

mg/mL 調製液より 37.5、18.8 および 9.38 mg/mL 調製液を、25 mg/mL 調製液より 4.69 および 2.35 mg/mL 調製液を調製した。

確認試験では 37.5 mg/mL 調製液を調製し、37.5 mg/mL 調製液から公比 1.2 の段階希釈により 31.3、26.0、21.7、18.1 および 15.1 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、予備試験、本試験および確認試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体との反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液は、予備試験では調製後 1.4 時間以内に、本試験では調製後 1.2 時間以内に、確認試験では調製後 0.4 時間以内に使用した。

調製はクリーンベンチ内で行い、調製に際してはマスクおよび手袋を着用し、吸引または眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体であるジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045 および TA026、株式会社同仁化学研究所)を使用した。

ジメチルスルホキシドは、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用し、プレート内の液に対し 1 vol% の割合で添加した。

4. 陽性対照物質

代謝活性化によらない場合の陽性対照物質として、マイトマイシン C(ロット番号 448ADJ、使用期限 2008 年 10 月、協和醗酵工業株式会社)を使用した。マイトマイシン C は、購入後室温で保存し、日本薬局方注射用水(ロット番号 5L88 および 7C95、株式会社大塚製薬工場)を用いて 5 および 10 µg/mL の濃度に調製した。購入したマイトマイシン C は、1 瓶中に日局マイトマイシン C を 2 mg(力価)含有しており、調製の際には 1 mg(力価)を 1 mg として換算した。

代謝活性化法による場合の陽性対照物質として、ベンゾ[a]ピレン[ロット番号 KLM1182、使用期限 2009 年 8 月(購入より 5 年)、和光純薬工業株式会社]を使用した。ベンゾ[a]ピレンは、購入後冷所(2~8°C)で保存し、ジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045 および TA026、株式会社同仁化学研究所)を用いて 1 mg/mL の濃度に調製した。なお、購入したベンゾ[a]ピレンの含量は 101.0%であった。

陽性対照物質の各調製液は-20°C以下で分注凍結保存し、調製後 7 ヶ月以内に試験に使用した(使用期限は調製後 1 年)。保存調製液は解凍後 0.8 時間以内に使用した。

陽性対照物質は、それぞれプレート内の液に対し 1 vol% の割合で添加した。

5. 試験系

試験系として、2005年5月17日に大日本製薬株式会社より継代数14で入手したCHL/IUを使用した。CHL/IUは、雌性の新生チャイニーズハムスターの肺に由来し、染色体数(モード)は25本($2n=22$)、倍加時間の測定値は13.6時間である。本細胞は、増殖速度、継代における染色体の安定性、染色体標本の観察の容易さおよび既知の変異原物質に対する感受性を考慮して選択した。また、供試細胞と同時に凍結保存した細胞を用いて蛍光染色法によりマイコプラズマチェックを行い、陰性であることを確認した。

細胞の保存に際しては、10 vol%ジメチルスルホキシドを含む培地を用いて 1×10^6 cells/mL細胞浮遊液を調製し、1 mLずつアンプルに分注したものを漸次冷却して凍結させた後、液体窒素内に保存した。解凍後は、75 cm²培養フラスコを用いて5.0%CO₂、37.0°Cに設定したCO₂インキュベーター(MCO-175、三洋電機株式会社)内で培養し、3または4日毎に継代を行った。試験では、継代数17(予備試験)あるいは23(本試験および確認試験)の細胞を使用した。

6. 培地

イーグルMEM培地を以下の割合で混合し調製した。

イーグルMEM培地(Code 05902、ロット番号50860211、539609および53970511、日本製薬株式会社)9.4 gを日本薬局方注射用水(ロット番号6C97、6J92および7C95、株式会社大塚製薬工場)に溶解し、さらにフェノールレッド(ロット番号PKF3307、和光純薬工業株式会社)6 mgを加え、全量を1 Lとした。オートクレーブ滅菌後、室温まで冷却し、滅菌済みの炭酸水素ナトリウム(試薬特級、ロット番号609F1546、関東化学株式会社)溶液でpH7.2~7.4に調整し、ろ過除菌したL-グルタミン溶液(試薬特級、L-グルタミン:ロット番号SDJ5850、和光純薬工業株式会社)を0.292 g/Lとなるように添加した。さらに牛胎児血清(ロット番号1299355および1355894、GIBCO)を最終調製量の10%になるように加えた。なお、牛胎児血清は56°Cで30分間非働化した後に使用した。

7. S9 mix

S9 mixはキッコーマン株式会社より購入し(ロット番号CAM-547、2006年8月11日製造)、-80°C以下で凍結保存したものを、製造日より6ヵ月以内(使用期限:製造後6ヵ月)に使用した。

S9 mixは、フェノバルビタールおよび5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導したSlc:SD系ラット(雄、7週齢)の肝ホモジネートより調製したS9 1.05 mLに、コファクターミックス2.45 mLを加え、次頁の組成に調製されたものである。

S9 mix 1 mL 中の組成		
S9	(キッコーマン株式会社製 RAA-547、S9 中蛋白含量 25.98 mg/mL)	0.3 mL
MgCl ₂	(和光純薬工業株式会社 SDN0075)	5 μmol /0.1 mL
KCl	(和光純薬工業株式会社 WAE3815)	33 μmol /0.1 mL
G-6-P	(オリエンタル酵母工業株式会社 115601)	5 μmol /0.1 mL
NADP	(オリエンタル酵母工業株式会社 045601)	4 μmol /0.1 mL
HEPES 緩衝液	(株式会社同仁化学研究所 FX115)	4 μmol /0.2 mL
蒸留水		0.1 mL

8. 試験方法

(1) 予備試験(細胞増殖抑制試験)

1) 試験群

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 系列について実施した。

被験物質の最高用量は、10 mM 相当値(被験物質の分子量 172.61)の 1730 μg/mL とし、以下公比 2 で低下させた計 9 用量(1730、865、433、216、108、54.1、27.0、13.5 および 6.76 μg/mL)の試験群を設定した。更に、試験系列毎に陰性対照群を設定した。

各群につき 2 枚のプレートを使用し、各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

直径 60 mm の培養プレートに、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 0.4×10^4 cells/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合では 0.6×10^4 cells/mL の細胞浮遊液をそれぞれ 5 mL ずつ播種し、5.0% CO₂、37.0°C に設定した CO₂ インキュベーター内で培養した。

3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、培養液 3 mL に対して試験液を 30 μL の割合で試験チューブ内で混合し、その混合液 3 mL をプレートに添加し 6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して Ca²⁺および Mg²⁺フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

4) 短時間処理法の代謝活性化による場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、S9 mix 0.5 mL および培養液 2.5 mL の混和液に対し試験液を 30 μL の割合で試験チューブ内で混合し(S9 の最終濃度約 5 vol%)、その混合液 3 mL をプレートに添加し 6 時間培養した。6 時間経過後に、プ

プレート内の液を除去して Ca^{2+} および Mg^{2+} フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

5) 連続処理法の 24-0 h 処理による場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、培養液 5 mL に対して試験液を 50 μL の割合で試験チューブ内で混合し、その混合液 5 mL をプレートに添加した。更に、24 時間培養した。

6) 被験物質の析出の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、被験物質の析出の有無を目視確認した。

7) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、培養液色の変化の有無を目視確認した。培養液色に変化が認められない場合には、被験物質による培養液 pH への影響は無いものと判断した。

8) 細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) の算出

培養終了後、プレート内の液を除去して Ca^{2+} および Mg^{2+} フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、10%ホルマリンで約 10~15 分間固定した後、0.1 w/v%クリスタルバイオレットで約 10~15 分間の染色を行った。染色後、水道水を入れた水槽内でプレートを洗浄して風乾させた。対照群のプレートを 100%として、各プレートの細胞増殖率を単層培養細胞密度測定装置 (MONOCELLATER II、東洋測器株式会社) で測定した。細胞増殖率が 50%以下まで低下した場合には、用量を対数化した回帰計算により 50%細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) を算出した。

(2) 本試験および確認試験

1) 試験群

a 本試験

予備試験の結果、各試験系列で 50%以上の細胞増殖抑制がみられたことから、各試験系列とも IC_{50} 値より高用量を最高用量とし、以下公比 2 で低下させた用量および IC_{50} 値付近の濃度範囲を狭めた用量を加え計 7 用量を設定した。

b 確認試験

本試験の結果、短時間処理法の代謝活性化によらない場合において、評価最高用量においてのみ構造異常の 10%以上の増加が認められたことから、同系列について確認試験を実施した。確認試験の最高用量は本試験と同様とし、以下公比 1.2 で低下させた計 6 用量を設定した。

本試験および確認試験ともに、陽性対照群を除く各群には被験物質の細胞増殖への影響を確認するためのサテライト群 2 枚を加えた 4 枚のプレートを使用し、陽性対照群では 2 枚のプレートを使用した。各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

8. 試験方法、(1) 予備試験、2) 細胞の播種と同様の方法で実施した。

3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

8. 試験方法、(1) 予備試験、3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合と同様の方法で実施した。

4) 短時間処理法の代謝活性化による場合

8. 試験方法、(1) 予備試験、4) 短時間処理法の代謝活性化による場合と同様の方法で実施した。

5) 連続処理法の 24-0 h 処理による場合

8. 試験方法、(1) 予備試験、5) 連続処理法の 24-0 h 処理による場合と同様の方法で実施した。

6) 被験物質の析出の有無の確認

8. 試験方法、(1) 予備試験、6) 被験物質の析出の有無の確認と同様の方法で実施した。

7) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認

8. 試験方法、(1) 予備試験、7) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認と同様の方法で実施した。

8) 細胞増殖率の測定

8. 試験方法、(1) 予備試験、8) 細胞増殖率の測定および 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) の算出と同様の方法で実施した。IC₅₀ は算出しなかった。

9) 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前に、各プレートに最終濃度 0.2 μg/mL のコルセミド(ロット番号 1335046 および 1391345、GIBCO)を加えた。培養終了時間に、プレート内の液をそれぞれ遠沈管に回収し、各プレートを 0.02% EDTA-0.25% トリプシン(0.5M EDTA : ロット番号 1118913 および 1390894、GIBCO、2.5% トリプシン : ロット番号 1301997 および 366711、GIBCO)で処理して細胞を剥離させ、得られた細胞浮遊液を同上の遠沈管に回収して 1000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を除去し、0.075 mol/L 塩化カリウム (ロット番号 403F1156 および 810X1990、関東化学株式会社)を加え、穏やかにピペティングを繰り返しながら常温で 30 分間放置し細胞を膨満化させた。氷冷したカルノア固定液(メタノール : 酢酸 = 3 : 1、メタノール : ロット番号 801W1028、関

東化学株式会社、酢酸：ロット番号 EWG7255、和光純薬工業株式会社)を加えて細胞を固定した後、1000 rpm で5分間遠心分離して上清を除去し、新しいカルノア固定液を加えた。細胞の固定操作を3回繰り返した後、細胞浮遊液をスライドグラス上に滴下し、一夜以上自然乾燥させた。各プレートより、2枚(細胞毒性により、得られた細胞が少ない用量については1枚)の染色体標本を作製した。

各スライドは、2%ギムザ液(ギムザ液：ロット番号 LL130 および LE158、和光純薬工業株式会社、インスタントリン酸緩衝液(pH7.2)：ロット番号 A636 および R637、株式会社 三菱化学ヤトロン)で20分間染色し、水洗および風乾の後、封入剤(マリノール、ロット番号 0501201 および 0700901、武藤化学薬品株式会社)で封入した。

10) 染色体標本の観察

標本観察の前に各用量の各プレートにつき1枚の標本を選択してブラインド化した。

観察用量として、本試験では、各試験系列とも細胞増殖率が50%未満で標本の観察が可能な最高用量を高用量とする4あるいは5用量を選択した。すなわち、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では62.5、125、188 および 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4用量を、短時間処理法の代謝活性化による場合では3.91、7.81、15.6、23.5 および 31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5用量を、連続処理法の24-0 h 処理による場合では31.3、62.5、93.8、125 および 188 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5用量を選択した。また、確認試験では、細胞増殖率が50%未満で標本の観察が可能な最高用量を高用量とする4用量、すなわち151、181、217 および 260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の4用量を選択した。

総合倍率600倍の顕微鏡(BX50：オリンパス光学工業株式会社およびBX51TF：オリンパス株式会社)で、1枚あたり100個の分裂中期像を選択して観察し、以下の分類に従って染色体異常の判定を行った。構造異常については 25 ± 2 本の染色体をもつものを観察対象とした。

①構造異常(structural aberration)

・染色分体切断(ctb: chromatid break)

染色分体のはっきりした不連続部分(切断部分)で、不連続部分が染色分体の幅以上である場合、あるいは切断片が染色分体の長軸線上から外れている場合に染色分体切断として判定した。

・染色分体交換(cte: chromatid exchange)

染色分体の2ヵ所以上の切断部位が相互に交換(結合反応)しているものを染色分体交換として判定した。

- ・染色体切断(csb: chromosome break)

両方の染色分体の同じ位置に切断が生じている場合に、染色体切断として判定した。切断の判定基準は、染色分体切断に準じた。

- ・染色体交換(cse: chromosome exchange)

両方の染色分体の同じ位置で同じ方向に交換が生じている場合に、染色体交換として判定した。

- ・その他(others)

その他の構造異常として、断片化(fragmentation)がある。一つの分裂中期像のほとんど全ての染色体に切断やギャップが現れ、交換型の異常が含まれていない場合に断片化として判定した。

②ギャップ(gap)

染色分体あるいは染色体上に生じた非染色部分(染色性が全くみられない部分)で、非染色部分の幅が染色分体の幅より狭い場合にギャップとして判定した。

③数的異常(numerical aberration)

- ・倍数体(poly: polyploid)

染色体数(25±2)が倍加し、三倍体、四倍体等になったものを倍数体として判定した。

- ・その他(others)

その他の数的異常として核内倍加がある。倍加した染色体が分離せずに平行に並んでいる場合に核内倍加(end: endoreduplication)と判定し、倍数体とは区別し計数した。

11) 観察結果の集計方法

プレート毎に以下の細胞出現数を求め、試験群毎にその合計値を算出した。更に、構造異常(1個の細胞に複数の構造異常がある場合にも、構造異常を有する細胞数は1として計数)および数的異常を有する細胞の total について、それぞれ出現率(%)を求めた。出現率(%)は、観察した細胞数(分裂中期像の数)に対する出現数の百分率で算出した。

①構造異常について

- ・ctb: 染色分体切断をもつ細胞数
- ・cte: 染色分体交換をもつ細胞数
- ・csb: 染色体切断をもつ細胞数
- ・cse: 染色体交換をもつ細胞数

- ・ others: その他の構造異常をもつ細胞数
- ・ total: 何らかの構造異常をもつ細胞数

②ギャップについて

- ・ gap: ギャップをもつ細胞数

③数的異常について

- ・ poly: 倍数体の細胞数
- ・ others: その他の数的異常をもつ細胞数
- ・ total: 何らかの数的異常をもつ細胞数

9. 試験結果の評価

構造異常または数的異常の total の出現率(%)が10%以上増加し、その出現様式に用量依存性がみられる場合、あるいは5%以上増加する結果について確認試験により再現性がみられる場合を陽性、それ以外を陰性とし、統計学的手法は用いなかった。

また、陽性と判定した短時間処理法の代謝活性化によらない場合および短時間処理法の代謝活性化による場合については、 D_{20} 値(細胞の20%に異常が認められる濃度)を算出した。

成績

1. 予備試験

細胞増殖率の結果を Table 1 および Figure 1 に、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 1 に示す。

各試験系列で 50% を超える細胞増殖抑制が認められた。IC₅₀ 値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 262 µg/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合が 31.2 µg/mL および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 166 µg/mL であった。

被験物質の析出が、試験液処理開始では各試験系列の 865 µg/mL 以上の用量あるいは 1730 µg/mL の用量で、処理終了時では各試験系列の 865 µg/mL 以上の用量で観察された。

被験物質による培養液 pH への影響は観察されなかった。

2. 本試験

細胞増殖率、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 2 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 3-1~3-3 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群における細胞増殖への影響の検討では、50% を超える細胞増殖抑制が、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では 250 µg/mL 以上の用量、短時間処理法の代謝活性化による場合では 31.3 µg/mL 以上の用量および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 188 µg/mL 以上の用量で認められた。

被験物質の析出および被験物質による培養液 pH への影響は観察されなかった。

染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量：62.5~250 µg/mL)の 250 µg/mL の用量で 10.0%、短時間処理法の代謝活性化による場合(評価用量：3.91~31.3 µg/mL)の 23.5 および 31.3 µg/mL の用量で 15.0 および 34.5% と 10% を超えるものであった。連続処理法の 24-0 h 処理による場合(評価用量：31.3~188 µg/mL)では、いずれの値も 5% 未満であった。D₂₀ 値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 0.32 mg/mL および短時間処理法の代謝活性化による場合が 0.025 mg/mL であった。数的異常の出現率は、いずれの試験系列においても 5% 未満であった。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 43.5%、短時間処理法の代謝活性化による場合が 44.0%および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 46.5%であった。

3. 確認試験

細胞増殖率、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 4 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 5 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群における細胞増殖への影響の検討では、50%を超える細胞増殖抑制が、260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で認められた。

被験物質の析出および被験物質による培養液 pH への影響は観察されなかった。

染色体の構造異常の出現率(評価用量:151~260 $\mu\text{g}/\text{mL}$)は、217 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で 10.5%と 10%を超え、260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では 9.0%であり、 D_{20} 値は 0.25 mg/mL であった。数的異常の出現率は 260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で 6.5%と 5%を超えるものであったが、他の用量では全て 5%未満であった。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は 48.0%であった。

考 察

2-クロロハイドロキノンジメチルエーテルの *in vitro* における染色体異常誘発性の有無を、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いて検討した。

予備試験(細胞増殖抑制試験)の結果に基づき、本試験(染色体異常試験)用量として、各試験系列とも IC_{50} より高用量を最高用量とした計7用量を設定した。また、短時間処理法の代謝活性化によらない場合については、用量間隔を狭めた確認試験を実施した。

本試験および確認試験の結果、染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では10%あるいは10%を僅かに超える出現率が再現性を持って認められ陽性と判断した。短時間処理法の代謝活性化による場合では、用量の増加に伴う10%を超える出現率が認められたことから陽性と判断した。両試験系列とも、構造異常の出現率は細胞増殖抑制がみられた用量で増加しており、当該被験物質は細胞増殖抑制を示す濃度で構造異常を出現させるものと考えられた。連続処理法の24-0h処理による場合では、構造異常の出現率は5%未満で陰性であった。被験物質の数的異常の出現率への影響では、短時間処理法の代謝活性化によらない場合の確認試験において、評価最高用量(260 $\mu\text{g}/\text{mL}$)で6.5%と僅かな増加が認められたが、強い細胞毒性がみられた用量であり、また、同系列の本試験の250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では増加はみられず再現性がないことから陰性と判断した。他の試験系列および用量の数的異常の出現率は全て5%未満であり、陰性であった。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、2-クロロハイドロキノンジメチルエーテルは、本試験条件において、ほ乳類の培養細胞に対し細胞増殖抑制を示す濃度において染色体異常誘発性を有すると判断した。

Table 1 Effects of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR05396)

Growth rate (% to the control)				
Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control ^a	-	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
2-Chloro-1,4-dimethoxybenzene	6.76	94 , 95 (94.5)	87 , 90 (88.5)	96 , 96 (96.0)
	13.5	100 , 95 (97.5)	79 , 80 (79.5)	94 , 96 (95.0)
	27.0	94 , 98 (96.0)	55 , 54 (54.5)	88 , 92 (90.0)
	54.1	92 , 95 (93.5)	31 , 31 (31.0)	84 , 86 (85.0)
	108	86 , 84 (85.0)	28 , 28 (28.0)	73 , 76 (74.5)
	216	65 , 64 (64.5)	23 , 23 (23.0)	33 , 37 (35.0)
	433	12 , 13 (12.5)	20 , 22 (21.0)	13 , 13 (13.0)
	865	14 ⁺ , 13 ⁺ (13.5)	20 [#] , 23 [#] (21.5)	19 ⁺ , 17 ⁺ (18.0)
	1730	22 [#] , 21 [#] (21.5)	27 [#] , 32 [#] (29.5)	26 [#] , 23 [#] (24.5)
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		262	31.2	166

a : Dimethyl sulfoxide

: Precipitation at the beginning and end of treatment

+ : Precipitation at the end of treatment

Change of pH in culture medium was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates

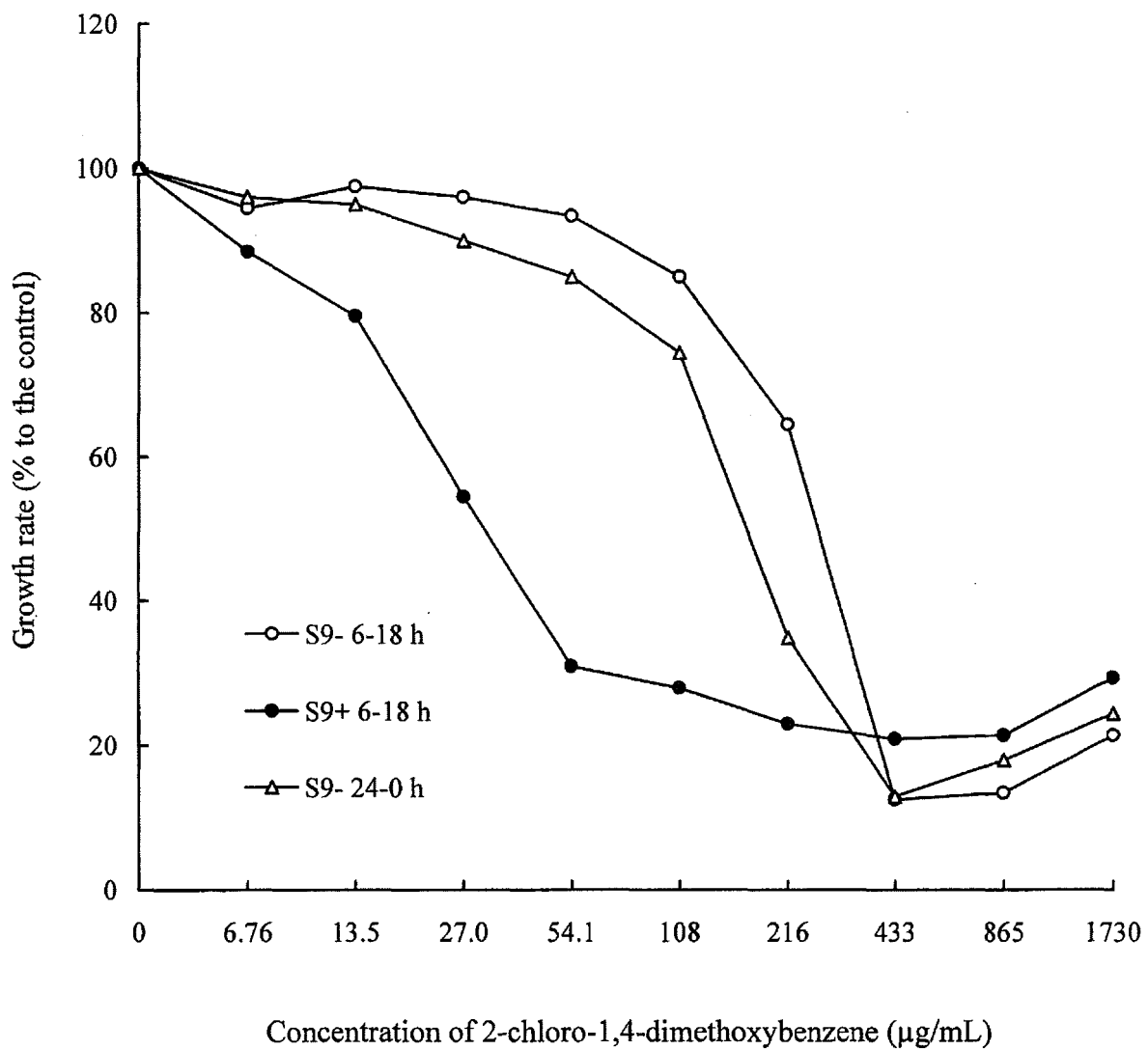


Figure 1 Effects of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test) (SR05396)

Each point represents mean value (n=2).

Table 2 Effects of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test) (SR05396)

Growth rate (% to the control)

Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-	S9+	S9-
		6-18 h (Mean)	6-18 h (Mean)	24-0 h (Mean)
Control ^a	-	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
2-Chloro-1,4-dimethoxybenzene	3.91	-	85 , 82 (83.5)	-
	7.81	-	86 , 84 (85.0)	-
	15.6	-	67 , 66 (66.5)	94 , 99 (96.5)
	23.5	-	55 , 54 (54.5)	-
	31.3	100 , 100 (100.0)	47 , 43 (45.0)	94 , 94 (94.0)
	46.9	-	37 , 35 (36.0)	-
	62.5	97 , 98 (97.5)	37 , 36 (36.5)	83 , 80 (81.5)
	93.8	-	-	82 , 77 (79.5)
	125	90 , 88 (89.0)	-	68 , 66 (67.0)
	188	81 , 82 (81.5)	-	48 , 49 (48.5)
	250	43 , 42 (42.5)	-	19 , 17 (18.0)
	375	12 , 11 (11.5)	-	-
500	11 , 11 (11.0)	-	-	

a : Dimethyl sulfoxide

Precipitation or changes of pH in culture medium was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates

- : Blank

Table 3-1 Results of the chromosomal aberration test of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene (6 hours treatment without metabolic activation) (SR05396)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c								
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)									
6-18	-	Control ^b	—	100.0	100	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	-								
					100	0	0	0	0	0	0	1	0	1										
					200	1	1	0	0	0	1 (0.5)	0	2	0	2 (1.0)									
		2-Chloro-1,4- dimethoxybenzene	-				31.3	100.0	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	+						
							62.5	97.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0				
									100	2	0	0	0	0	2	0	0		0	0				
							200					100	89.0	1	1	0	0		0	2	0	0	0	
												100	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	
							200					100	89.0	1	1	0	0		0	2 (1.0)	0	0	0	0 (0.0)
												100	1	1	0	0	0		1	0	0	1	1	
							188	81.5				100	81.5	1	0	0	0		1	0	1	0	1	
												100	1	0	0	0	0		1	0	1	0	1	
												200	2	1	0	0	0		2 (1.0)	0	1	1	2 (1.0)	
							250	42.5				100	42.5	2	10	1	0		0	12	0	0	0	0
												100	2	8	0	0	0		8	0	3	0	3	
200	4	18	1	0	0	20 (10.0)						0	3	0	3 (1.5)									
375	11.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
500	11.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
Mitomycin C	0.1				100		12	35	0	1	0	41	0	1	0	1								
					100	7	39	1	0	0	46	0	0	0	0									
					200	19	74	1	1	0	87 (43.5)	0	1	0	1 (0.5)									

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations; -, negative +, positive

- : Blank

Table 3-2 Results of the chromosomal aberration test of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene (6 hours treatment with metabolic activation) (SR05396)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)	
6-18	+	Control ^b	—	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-
					100	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)	
		3.91	83.5	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	+
				100	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0		
		200	83.5	200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	1	0	0	0 (0.0)		
				100	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0		
		7.81	85.0	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
				200	3	0	0	0	0	3 (1.5)	0	0	0	0 (0.0)		
		15.6	66.5	100	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0		
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		200	66.5	200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0 (0.0)		
				100	5	19	0	0	0	24	1	0	0	0		
		23.5	54.5	100	3	5	0	0	0	6	0	0	0	0		
				200	8	24	0	0	0	30 (15.0)	1	0	0	0 (0.0)		
		31.3	45.0	100	13	30	1	0	0	36	0	3	0	3		
				100	9	29	0	0	0	33	0	6	0	6		
		200	45.0	200	22	59	1	0	0	69 (34.5)	0	9	0	9 (4.5)		
				46.9	36.0	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		62.5	36.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Benzo[a]pyrene	10	/	100	6	40	2	0	0	43	0	0	0	0			
			100	8	42	0	1	0	45	1	0	0	0			
			200	14	82	2	1	0	88 (44.0)	1	0	0	0 (0.0)			

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations; -, negative +, positive

-: Blank

Table 3-3 Results of the chromosomal aberration test of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene (24 hours treatment without metabolic activation) (SR05396)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c				
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)					
24-0	-	Control ^b	—	100.0	100	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	-				
					100	1	0	0	0	0	1	0	0	0						
					200	1	1	0	0	0	2 (1.0)	0	0	0 (0.0)						
		2-Chloro-1,4- dimethoxybenzene	-				Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
							15.6	96.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
									100	1	0	0	0	0	1	0	0		0	
							31.3	94.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
									100	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0		0 (0.0)	
							62.5	81.5	100	1	0	0	0	0	1	0	1		0	1
									100	0	0	0	0	0	0	0	2		0	2
							200		100	1	0	0	0	1 (0.5)	0	3	0		3 (1.5)	
									100	0	0	0	0	0	0	0	0		0	
							93.8	79.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
									100	1	0	0	0	0	1	0	1		0	1
							200		100	1	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0		1 (0.5)	
									100	0	1	0	0	0	1	0	0		0	
							125	67.0	100	0	1	0	0	0	0	0	0		0	0
									100	0	0	0	0	0	0	0	1		0	1
							200		100	0	1	0	0	1 (0.5)	0	1	0		1 (0.5)	
									100	1	0	0	0	0	1	0	2		1	3
188	48.5						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		1	
		100	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	2	2	4 (2.0)								
250	18.0	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
		100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
Mitomycin C	-	0.05			100	13	37	0	1	0	49	0	0	0	+					
					100	5	39	0	0	0	44	0	0	0						
					200	18	76	0	1	0	93 (46.5)	0	0	0 (0.0)						

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations; -, negative +, positive

- : Blank

Table 4 Effects of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene on growth rate of CHL/IU without metabolic activation (chromosomal aberration test, confirmatory test) (SR05396)

Growth rate (% to the control)

Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-
		6-18 h (Mean)
Control ^a	-	100 , 100 (100.0)
2-Chloro-1,4-dimethoxybenzene	151	85 , 82 (83.5)
	181	76 , 77 (76.5)
	217	63 , 66 (64.5)
	260	34 , 33 (33.5)
	313	18 , 17 (17.5)
	375	14 , 11 (12.5)

a : Dimethyl sulfoxide

Precipitation or changes of pH in culture medium was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates

Table 5 Results of the chromosomal aberration test of 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene (6 hours treatment without metabolic activation, confirmatory test) (SR05396)

Time schedule ^a (hours)	S9	Group	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c	
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)		
6-18	-	Control ^b	—	100.0	100	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	-
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					200	2	0	0	0	0	2 (1.0)	0	0	0	0 (0.0)		
		2-Chloro-1,4- dimethoxybenzene	151	83.5	100	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	+
					100	1	0	0	1	0	2	0	2	0	2		
			200	2	0	0	1	0	3 (1.5)	0	4	0	4 (2.0)				
			181	76.5	100	1	0	0	0	0	0	1	0	2	2	4	
					100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
			200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	3	2	5 (2.5)				
		217	64.5	100	3	6	1	0	0	0	9	1	0	0	0		
				100	5	9	0	0	0	12	0	1	2	3			
				200	8	15	1	0	0	21 (10.5)	1	1	2	3 (1.5)			
		260	33.5	100	1	6	0	0	0	0	6	0	4	2	6		
				100	6	8	0	0	0	12	0	7	0	7			
				200	7	14	0	0	0	18 (9.0)	0	11	2	13 (6.5)			
		313	17.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		375	12.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Mitomycin C	0.1	/	100	11	39	0	1	0	48	0	0	0	0		
100	15				39	0	1	0	48	0	1	0	1				
200	26				78	0	2	0	96 (48.0)	0	1	0	1 (0.5)				

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations; -, negative +, positive

- : Blank