

(試験番号：6L679)

厚生省生活衛生局 殿

## 試験報告書

2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号: 6L679)

株式会社三菱化学安全科学研究所

## 目次

要約	7
材料および方法	8
1. 試験物質	8
2. 細胞	9
3. 培地	9
4. S9 mix	9
5. 試験物質調製液	10
6. 細胞増殖抑制試験	10
7. 染色体異常試験	12
8. 追加試験	14
結果	15
考察および結論	15
参考文献	16
表	17
図	27

## 要約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/1U を用い、2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンの *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果、50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理法の24, 48時間処理で572, 683  $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法のS9 mix 共存下、非共存下で726, 565  $\mu\text{g/ml}$ であった。従って、染色体異常試験は、50%細胞増殖抑制濃度を超える濃度を最高濃度とし、その1/2, 1/4 および 1/8 の4濃度で実施した。その結果、染色体構造異常細胞あるいは数的異常細胞の誘発は観察されなかった。しかし、短時間処理法のS9 mix 非共存下の最高濃度の分裂指数が6.6であったため、さらに高濃度における標本作製が可能であると考えられたため、追加試験を実施した。その結果、S9 mix 非共存下の2000  $\mu\text{g/ml}$  で構造異常細胞の誘発が観察された。一方、数的異常細胞の誘発性は、試験の再現性が得られなかったため、陰性と判定した。

以上の結果より、本試験条件下における2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジンのCHL/1U細胞に対する染色体異常（構造異常）誘発性は陽性と結論した。

## 材料および方法

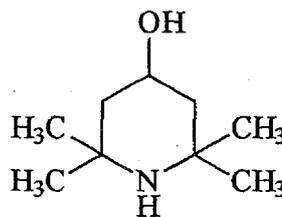
### 1. 試験物質

#### 1.1 被験物質

から送付された 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジン

(CAS 番号：2403-88-5, ロット番号： 純度 99.8 %) は、使用時まで室温で遮光して保存した。被験物質は下記の構造式、分子量を有する水に可溶の白色顆粒である。試験に使用したロットの安定性は、実験開始前および実験終了後に被験物質供給者が分析し、確認した。

構造式：



分子量：157.25

不純物：トリアセトンアミン(TAA)	0.1 % 以下
2,2,6,6-テトラメチル-4-アミルピペリジン(4AP)	0.02 %
2,2,6,6-テトラメチルテトラヒドロピペリジン-4-オール(TTPH)	0.04 %

#### 1.2 対照物質

##### 1) 陰性対照物質

局方生理食塩液 (生食と略す。 ㈱大塚製薬工場,

ロット番号 細胞増殖抑制試験および染色体異常試験 ; K6F82,

追加試験 1, 2 ; K7F75,

追加試験 3 ; K8B74)

##### 2) 陽性対照物質

###### (1) 連続処理法

マイトマイシン C (MMC と略す。 協和醗酵工業㈱, ロット番号：119AFG,  
含量 100 %)

###### (2) 短時間処理法

ベンゾ[a]ピレン (BP と略す。 東京化成工業㈱, ロット番号：AX01,  
含量 99.5 %)

## 2. 細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を使用した。細胞は大日本製薬(株)より 1996 年 11 月 6 日に購入し、細胞懸濁液に対し 10 %の割合でジメチルスルホキシド (DMSO と略す) を添加したものを 1 ml に小分けして、液体窒素中で凍結保存した。試験には、これを融解して培養し、その後の継代数が 5 代以内のものを使用した。細胞の培養には、プラスチックシャーレ (直径 6 cm または 10 cm ; < Becton Dickinson and Company) を用い、炭酸ガス細胞培養装置内 (NAPCO 社, 7300 型, 炭酸ガス 5 %, 温度 37 °C, 加湿) で培養した。

## 3. 培地

### 3.1 イーグル最少培地

イーグル最少培地 (MEM と略す。イーグル MEM 培地「ニッスイ」①, 日本製薬(株)) を添付の処方に従い調製し、オートクレーブ滅菌 (121 °C, 15 分間) を行った。この 1 l に、別に滅菌処理した 2.92 % L-グルタミン水溶液 10 ml と 10 %炭酸水素ナトリウム水溶液 12.7 ml を添加した。

### 3.2 培養液

上記の MEM 900 ml に対して、非働化 (56 °C, 30 分間加熱処理) した仔牛血清 (GIBCO BRL, ロット番号 細胞増殖抑制試験および染色体異常試験 ; 35K7844, 追加試験 1, 2 および 3 ; 39K0464) を 100 ml 添加した。

## 4. S9 mix

### 4.1 S9

フェノバルビタール (1 日目 30 mg/kg, 2 日目以降 60 mg/kg を 3 日間 1 日 1 回腹腔内投与) と 5, 6-ベンゾフラボン (3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与) で酵素誘導した SD 系雄ラット肝由来 S9 (キッコーマン(株), ロット番号 : RAA-355, 1996 年 11 月 22 日製造) を購入し、使用した。使用時まで -80 °C 以下で保存した。

## 4.2 S9 mix

S9 mix 10 ml あたり以下の組成で用時調製し、使用時まで氷中に保存した。

D- グルコース 6- リン酸	14.1 mg
$\beta$ -NADP <sup>+</sup>	33.5 mg
(以上, 用時秤量)	
20 mM HEPES (pH 7.2)	2 ml
50 mM 塩化マグネシウム六水和物	1 ml
330 mM 塩化カリウム	1 ml
精製水	3 ml
(以上, 予め滅菌調製した溶液を添加)	
S9	3 ml

## 5. 試験物質調製液

## 5.1 被験物質溶液

溶媒検討の結果、本被験物質は、生食に 50 mg/ml で溶解した。従って、本被験物質の溶媒は生食を用いた。

被験物質を所定濃度で生食に溶解し、メンブランフィルターでろ過滅菌を行った。この溶液をさらに同じ溶媒で希釈し各処理濃度の 10 倍の被験物質溶液を用時調製した。

## 5.2 陽性対照溶液

MMC は、生食（㈱大塚製薬工場、ロット番号：K6F82）で 3  $\mu$ g/ml に用時調製した。BP は、DMSO（関東化学㈱、ロット番号：610E1229）で 4 mg/ml に溶解し、凍結保存したものを室温で融解し使用した。

## 6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の処理濃度を決定するために、細胞増殖抑制試験を実施した。

## 6.1 被験物質濃度

細胞増殖抑制試験に先立ち、連続処理法の 24, 48 時間処理および短時間処理法の S9 mix 共存下で、5000, 500, 50  $\mu$ g/ml の 3 濃度で予備試験を実施した。この試験では、1 濃度あたり 1 枚のシャーレを用い、処理 24 または 48 時間後に位相差倒立顕微鏡で細胞の状態を観察した。

その結果、連続処理法の 24 および 48 時間処理では、5000  $\mu$ g/ml は生存細胞が認められず、500, 50  $\mu$ g/ml は陰性対照と差が認められなかった。短時間処理法の

S9 mix 共存下では、5000  $\mu\text{g/ml}$  は生存細胞が認められず、500  $\mu\text{g/ml}$  は陰性対照の約 70 %、50  $\mu\text{g/ml}$  は陰性対照と差が認められなかった。

以上の結果から、細胞増殖抑制試験は、連続処理法の 24, 48 時間処理および短時間処理法の S9 mix 非共存下では 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 500  $\mu\text{g/ml}$  の 6 濃度、短時間処理法の S9 mix 共存下では 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 500, 250  $\mu\text{g/ml}$  の 7 濃度を設定した (細胞増殖抑制試験 1)。

しかし、連続処理法において、500 ~ 1000  $\mu\text{g/ml}$  の範囲で細胞毒性が急激に変化したため、プロビット法による 50 %細胞増殖抑制濃度の算出ができなかった。そこで、1000, 800, 600, 400, 200, 100, 50  $\mu\text{g/ml}$  の 7 濃度で追加試験を実施した (細胞増殖抑制試験 2)。

## 6.2 細胞処理

4 × 10<sup>3</sup> 個/ml の細胞懸濁液を 6 cm シャーレに 5 ml 播き、3 日間培養した。

シャーレから培養液を除去した後、連続処理法では、細胞を被験物質溶液 0.5 ml、培養液 4.5 ml で 24 または 48 時間処理した。

短時間処理法では、S9 mix 共存下は、細胞を被験物質溶液 0.3 ml、S9 mix 0.5 ml、培養液 2.2 ml で、また、S9 mix 非共存下は、被験物質溶液 0.3 ml、培養液 2.7 ml で 6 時間処理後、MEM で 3 回洗浄し新しい培養液 5 ml でさらに 18 時間培養した。

陰性対照として、被験物質溶液に使用した溶媒も各条件で同様に処理した。各濃度あたり 2 枚のシャーレを用いた。

## 6.3 細胞増殖率の測定

細胞表面を Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>フリーのダルベッコのリン酸緩衝液 (PBS(-) と略す。ダルベッコ PBS「ニッスイ」、日水製薬㈱) で洗浄し、メタノールで 10 分間固定、3 %ギムザ液 (1/150 M リン酸緩衝液, pH 6.8, で希釈) で 10 分間染色後、軽く水洗し乾燥した。染色した各シャーレを単層培養細胞密度計 (モノセレーター, オリンパス光学工業㈱) を用いて細胞増殖率を測定した。

## 6.4 50 %細胞増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) の算出

連続処理法および短時間処理法のそれぞれについて、陰性対照値を 100 %として生存曲線を作成し、被験物質の 50 %細胞増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。なお、IC<sub>50</sub> は、プロビット法により算出した。

## 7. 染色体異常試験

### 7.1 試験物質濃度

細胞増殖抑制試験の結果を図1～3に示すごとく、 $IC_{50}$ は、連続処理法の24, 48時間処理で572, 683  $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法のS9 mix共存下、非共存下で726, 565  $\mu\text{g/ml}$ あった。

この結果から、連続処理法および短時間処理法のいずれの処理条件においても800  $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、その1/2, 1/4および1/8の4濃度(800, 400, 200, 100  $\mu\text{g/ml}$ )で染色体異常試験を実施した。

陽性対照であるMMC, BPの濃度はそれぞれ、染色体異常誘発性が知られている0.03, 20  $\mu\text{g/ml}$ とした。

### 7.2 細胞処理

細胞を6.2と同様に処理した。

陽性対照については、連続処理法では、細胞を培養液5 ml, MMC溶液50  $\mu\text{l}$ で、短時間処理法のS9 mix共存下では培養液2.5 ml, S9 mix 0.5 ml, BP溶液15  $\mu\text{l}$ で、S9 mix非共存下では培養液3 ml, BP溶液15  $\mu\text{l}$ で同様に処理した。

### 7.3 標本作製

処理終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が0.1  $\mu\text{g/ml}$ となるようにシャーレに加え、分裂中期の細胞を蓄積させた。処理終了後、細胞表面をPBS(-)で1回洗浄し、0.25%トリプシン(溶媒：PBS(-))処理により細胞を剥離し、遠心分離(1000 rpm, 5分間；以下同じ)により細胞を集めた。上清を除去し、これに0.075 M塩化カリウム溶液4 mlを加えて低張処理(37℃, 15分)を行った。さらに、冷却したメタノール・酢酸(3:1)混合液4 mlを加え細胞を固定し、遠心分離後、固定液を捨て新しい固定液を4 ml加えた。この操作を3～4回繰り返した。固定終了後、少量の固定液で細胞を懸濁し、濡らした手ぬぐいにしたスライドガラス上の2箇所水滴下し、乾燥して染色体標本とした。これを3%ギムザ溶液で20分間染色し、水洗、乾燥後、封入剤で封入して観察標本とした。各シャーレ2枚の標本作製した。

### 7.4 観察

#### 1) 予備鏡検

標本作製後、試験の適否確認のため予備鏡検を行った。

その結果、いずれの標本においても1枚のシャーレあたり50個以上の分裂中期細胞が得られたため、全ての標本を観察対象とした。

陰性対照および陽性対照については、各々構造異常細胞の出現状態が適切であることを確認した。

## 2) 分裂指数/分裂活性

予備鏡検時に、シャーレ1枚につき1000個、1濃度2000個の細胞中の分裂中期細胞を数え、分裂指数を求めた。またこれから陰性対照と各処理群の分裂指数の比(分裂活性)を算出した。

## 3) 構造異常および数的異常

陰性対照、陽性対照および被験物質処理群について、構造異常および数的異常を盲検法で観察した。

### (1) 構造異常

シャーレ1枚につき100個、1濃度200個の細胞を調べた。

染色体がよく広がった分裂中期細胞を観察し、構造異常細胞を数えた。ただし、構造異常がなく、染色体数が $25 \pm 2$ 本でない細胞は除外した。異常の分類は以下のとおりとした<sup>1)</sup>。

ギャップ	(染色分体型および染色体型を含む；gapと略す)
染色分体型切断	(ctbと略す)
染色分体型交換	(cteと略す)
染色体型切断	(csbと略す)
染色体型交換	(二動原体、環状染色体など；cseと略す)
断片化	(figと略す)

ギャップは、染色分体に見られる非染色部分が染色分体の軸上にあり、その幅が染色分体の幅以上で著しく離れておらず、非染色部分の形状が明確なものとし切断とは区別した。

### (2) 数的異常

シャーレ1枚につき100個、1濃度200個の分裂中期細胞を調べ、核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた。

## 7.5 試験結果の判定基準

構造異常を1個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし、ギャップのみの異常をもつ細胞を除いた場合(-gap)と含めた場合(+gap)で集計した。

被験物質の染色体異常誘発性の判定は、+gapの構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に5%未満を陰性(-)、両方またはいずれかが5%以上10%未満

を疑陽性（±），いずれか一方または両方が10%以上を陽性（+）とした。

#### 7.6 結果のまとめ

染色体構造異常をもつ細胞および倍数体の出現数並びに合計及びそれぞれの出現頻度(%)を表示するとともに、用量依存性について図示した。

なお、結果が陽性の場合には  $D_{20}$  値(分裂中期像の20%に異常を誘発させるために必要な被験物質濃度, mg/ml)を算出した。また、その代表的な染色体異常像の写真を添付した。

#### 8. 追加試験

7. 染色体異常試験における短時間処理法 S9 mix 非共存下の  $800 \mu\text{g/ml}$  において、分裂指数が6.6であり、さらに高濃度でも標本観察が可能であると考えられたため、追加試験を実施した。処理方法等は、7. 染色体異常試験の項と同様とした。処理濃度は、以下のとおりとした。

追加試験 1 ; 1200, 1000,  $800 \mu\text{g/ml}$

追加試験 2, 3 ; 2000, 1500,  $1000 \mu\text{g/ml}$

## 結 果

結果を表1～10および図4～13に示す。

染色体異常試験および追加試験1において、いずれの処理条件においても、被験物質による染色体構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度は5%未満であった。

追加試験1において、最高濃度の分裂指数が6.3となったため、さらに高濃度における標本作製が可能であると判断し、同条件下について2000, 1500, 1000  $\mu\text{g/ml}$ の3濃度で追加試験2を実施した。

追加試験2の結果、2000  $\mu\text{g/ml}$ の+gapの構造異常細胞出現頻度および数的異常細胞出現頻度がそれぞれ6.0, 7.0%となり疑陽性の結果が得られた。ただし、細胞毒性が見られ、観察した分裂中期細胞数は所定の半分(100個)であった。なお、分裂指数は、低濃度から順に5.5, 3.4, 1.6であった。これらから、再現性確認のため、同条件下、同濃度で追加試験3を実施した。

追加試験3の結果、2000  $\mu\text{g/ml}$ の+gapの構造異常細胞出現頻度は17.5%となり、陽性結果となった。一方、数的異常細胞の出現頻度はいずれの濃度においても5%未満であった。なお、このときの分裂指数は低濃度から順に7.3, 3.7, 3.3であった。

なお、追加試験3の結果から算出した $D_{20}$ 値は、2.3 mg/mlであった。

一方、短時間処理法S9 mix非共存下を除いて、陽性対照による染色体構造異常細胞の出現頻度は著しく増加した。

## 考 察 お よ び 結 論

2,2,6,6-テトラフル-4-ヒドロキシペリジンの染色体異常誘発性を検討するため、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。その結果、短時間処理法のS9 mix非共存下の2000  $\mu\text{g/ml}$ において、染色体構造異常細胞の誘発が観察された。なお、数的異常細胞の誘発性は、試験の再現性が得られなかったため、陰性と判定した。

一方、陰性対照および陽性対照では染色体構造異常を有する細胞出現頻度は期待通りの値を示し、本試験が技術的に成立していることが示された。

従って、2,2,6,6-テトラフル-4-ヒドロキシペリジンのCHL/IU細胞に対する染色体異常誘

発性は陽性と結論した。

なお、類似化合物の染色体異常誘発性に関する他の情報は得られなかった。

## 参 考 文 献

- 1) 日本環境変異学会・哺乳動物試験分科会：“化学物質による染色体異常アトラス”  
朝倉書店，東京，1988

表1 染色体異常試験結果（連続処理法）【本試験】

被験物質名：2, 2, 6, 6-テトラメチル-4-ヒドロキシヘリソン

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	倍数体数		染色体構造異常細胞 1) の出現数と出現頻度 (%)								判定 <sup>2)</sup>	
				判定 <sup>2)</sup>	(< %)	ギャップ		染色体分体型		染色体型		frg	合計		
						gap	ctb	cte	csb	cse	-gap		+gap		
溶媒 [生食]	24	0	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)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
	48	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0 ( 0.0)		0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	2 ( 1.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)			
被験物質	24	100	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0		0	1	0	0	0	1	1			
			200	0 ( 0.0)		0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)		
		200	100	0	-	0	1	1	0	0	0	2	2	-	
			100	0		0	0	1	0	0	1	1			
			200	0 ( 0.0)		0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	3 ( 1.5)	3 ( 1.5)		
	400	100	0	-	0	0	0	1	0	0	1	1	-		
		100	0		0	0	0	0	0	0	0				
		200	0 ( 0.0)		0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)				
	800	100	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
		76	0		0	0	0	0	0	0	0				
		176	1 ( 0.6)		0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)			
	48	100	100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-	
			100	0		1	0	1	0	0	1	2			
			200	0 ( 0.0)		1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	2 ( 1.0)	3 ( 1.5)		
		200	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0		1	0	0	1	0	0	1	2		
			200	0 ( 0.0)		1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	2 ( 1.0)		
400		100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
		100	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)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)			
800	100	3	-	0	0	3	2	0	0	4	4	-			
	100	1		0	0	0	0	0	0	0					
	200	4 ( 2.0)		0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	3 ( 1.5)	2 ( 1.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	4 ( 2.0)	4 ( 2.0)				
陽性対照 [MMC]	24	0.03	100	0	-	0	7	19	0	0	24	24	+		
			100	0		0	8	22	3	1	0	34		34	
			200	0 ( 0.0)		0 ( 0.0)	15 ( 7.5)	41 ( 20.5)	3 ( 1.5)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	58 ( 29.0)		58 ( 29.0)	
48	0.03	100	0	-	2	9	22	4	0	0	33	34	+		
		100	0		0	5	28	2	0	0	31	31			
		200	0 ( 0.0)		2 ( 1.0)	14 ( 7.0)	50 ( 25.0)	6 ( 3.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	64 ( 32.0)	65 ( 32.5)			

1) gap: 染色体分体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色体分体型切断, cte: 染色体分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, frg: 断片化  
 2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現率が5%未満を陰性(-), 5%以上10%未満を疑陽性(±), 10%以上を陽性(+)とした。  
 生食: 局方生理食塩液 MMC: マイトマイシンC

表2 染色体異常試験結果（短時間処理法）【本試験】

被験物質名：2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシヘキシノン

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	倍数体数		染色体構造異常細胞 1) の出現数と出現頻度 (%)								判2)定
				判2)定	%	ギャップ gap	染色分体型		染色体型		frg	合計		
							ctb	cte	csb	cse		-gap	+gap	
溶媒 [生食]	-	0	100	0	/	0	0	0	0	1	0	1	1	/
			100	0	/	0	1	0	0	0	0	1	1	/
			200	0 (0.0)	/	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	/
	+	0	100	1	/	0	0	0	0	0	0	0	0	/
			100	0	/	0	0	0	0	0	0	0	0	/
			200	1 (0.5)	/	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	/
被験物質	-	100	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-
			200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	-
		200	100	1	-	0	0	0	1	0	0	1	1	-
			100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			200	1 (0.5)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	-
		400	100	0	-	0	0	0	1	0	0	1	1	-
			100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-
			200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	-
		800	100	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0	-	0	0	0	0	1	0	1	1	-
			200	1 (0.5)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	-
	+	100	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	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)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
		200	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0	-	0	0	0	1	0	0	1	1	-
			200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	-
		400	100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-
			100	0	-	0	0	0	1	0	0	1	1	-
			200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	-
		800	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-
			200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	-
陽性対照 [BP]	-	20	100	0	-	0	0	0	1	0	0	1	-	
			100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	
			200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	-
	+	20	100	0	-	1	9	79	1	0	0	80	80	+
			100	0	-	1	10	78	0	0	0	80	80	+
			200	0 (0.0)	-	2 (1.0)	19 (9.5)	157 (78.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	160 (80.0)	160 (80.0)	+

1) gap: 染色分体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, frg: 断片化

2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現率が5%未満を陰性(-), 5%以上10%未満を疑陽性(±), 10%以上を陽性(+)とした。

S9の用量(5%), 被験物質処理時間(6h), 被験物質処理後の細胞回復時間(18h)

生食: 局方生理食塩液 BP: ベンツ[a]ピレン

表3 染色体異常試験結果（短時間処理法）〔追加試験 1〕

被験物質名：2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシトランスピロリン

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	倍数体数		染色体構造異常細胞 1) の出現数と出現頻度 (%)								
				判定	判定	ギャップ		染色体分体型		染色体型		frg	合計	
						gap	ctb	cte	csb	cse	-gap		tgap	
溶媒 [生食]	-	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	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)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
被 験 物 質	6h	800	100	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0		0	0	1	0	0	1	1		
			200	1 ( 0.5)		0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	1 ( 0.5)	
		1000	100	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	1		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)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
		1200	100	1	-	0	0	0	0	1	0	1	1	
			100	0		0	0	1	0	0	1	1		
			200	1 ( 0.5)		0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)	
陽性対照 [BP]	-	20	100	0	-	0	0	0	1	0	0	1	1	
			100	0		0	1	0	0	1	1			
			200	0 ( 0.0)		0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	2 ( 1.0)	2 ( 1.0)		

1) gap: 染色体分体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色体分体型切断, cte: 染色体分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, frg: 断片化

2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現率が5%未満を陰性(-), 5%以上10%未満を疑陽性(±), 10%以上を陽性 (+)とした.

S9の用量 (5%), 被験物質処理時間 (6h), 被験物質処理後の細胞回復時間 (18h)

生食: 局方生理食塩液 BP: ベンツ[a]ピレン

表4 染色体異常試験結果（短時間処理法）〔追加試験 2〕

被験物質名：2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシヘキシリン

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	倍数体数		染色体構造異常細胞 1) の出現数と出現頻度 (%)								判定
				判定	%	ギャップ	染色分体型		染色体型		frg	合計		
						gap	ctb	cte	csb	cse		-gap	igap	
溶媒 [生食]	-	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	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)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	
被 験 物 質	-	1000	100	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	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)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)		
		1500	100	6	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-
			100	2		2	0	0	0	0	0	2		
			200	8 ( 4.0)		2 ( 1.0)	1 ( 0.5)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)	1 ( 0.5)	3 ( 1.5)	
		2000	100	7	±	細胞毒性								±
			100	7 ( 7.0)		1 ( 1.0)	0 ( 0.0)	4 ( 4.0)	0 ( 0.0)	1 ( 1.0)	0 ( 0.0)	5 ( 5.0)	6 ( 6.0)	
		陽性対照 [BP]	-	20	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0
100	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)	0 ( 0.0)	0 ( 0.0)		

1) gap: 染色分体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, frg: 断片化

2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現率が5%未満を陰性(-), 5%以上10%未満を疑陽性(±), 10%以上を陽性(+)とした。

S9の用量(5%), 被験物質処理時間(6h), 被験物質処理後の細胞回復時間(18h)

生食: 局方生理食塩液 BP: ベンツ[a]ピレン

表5 染色体異常試験結果（短時間処理法）〔追加試験 3〕

被験物質名：2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシヘキサン

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	倍数体数		染色体構造異常細胞 1) の出現数と出現頻度 (%)								
				判定	判定	ギャップ		染色分体型		染色体型		frg	合計	
						gap	ctb	cte	csb	cse	-gap		+gap	
溶媒 [生食]	-	0	100	0	-	1	2	0	0	0	0	2	3	-
			100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-
			200	0 (0.0)	-	1 (0.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	4 (2.0)
被 験 物 質	-	1000	100	0	-	1	0	0	0	0	0	0	1	-
			100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			200	0 (0.0)	-	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)
		1500	100	1	-	0	1	2	1	0	0	4	4	-
			100	0	-	0	0	2	0	0	0	2	2	-
			200	1 (0.5)	-	0 (0.0)	1 (0.5)	4 (2.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	6 (3.0)	-
		2000	100	0	-	0	5	15	0	0	0	18	18	-
			100	0	-	1	0	17	0	0	0	17	17	+
			200	0 (0.0)	-	1 (2.5)	5 (2.5)	32 (16.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	35 (17.5)	35 (17.5)	+
陽性対照 [BP]	-	20	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	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)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

1) gap: 染色分体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, frg: 断片化

2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現率が5%未満を陰性(-), 5%以上10%未満を疑陽性(±), 10%以上を陽性(+)とした。

S 9の用量 (5%), 被験物質処理時間 (6h), 被験物質処理後の細胞回復時間 (18h)

生食: 局方生理食塩液 BP: ベンツ[a]ピレン

表 6 分裂指数 (連続処理法) [本試験]

処理	処理時間 (h)	処理濃度 ( $\mu$ g/ml)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (生食)	24	0	2000	178	8.9	100
2, 2, 6, 6-テトラメチル- 4-ヒドロキシペリジン	24	100	2000	151	7.6	85
	24	200	2000	157	7.9	88
	24	400	2000	144	7.2	81
	24	800	2000	18	0.9	10
陽性対照 (MMC)	24	0.03	2000	86	4.3	48
陰性対照 (生食)	48	0	2000	111	5.6	100
2, 2, 6, 6-テトラメチル- 4-ヒドロキシペリジン	48	100	2000	90	4.5	81
	48	200	2000	102	5.1	92
	48	400	2000	91	4.6	82
	48	800	2000	26	1.3	23
陽性対照 (MMC)	48	0.03	2000	75	3.8	68

生食 : 局方生理食塩液

MMC : マイトマイシンC

表 7 分裂指数 (短時間処理法) [本試験]

処理	S9 mix の有無	処理濃度 ( $\mu$ g/ml)	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (生食)	—	0	2000	135	6.8	100
2,2,6,6-テトラメチル- 4-ヒドロキシビペリジン	—	100	2000	142	7.1	105
	—	200	2000	167	8.4	124
	—	400	2000	141	7.1	104
	—	800	2000	132	6.6	98
陽性対照 (BP)	—	20	2000	159	8.0	118
陰性対照 (生食)	+	0	2000	199	10.0	100
2,2,6,6-テトラメチル- 4-ヒドロキシビペリジン	+	100	2000	183	9.2	92
	+	200	2000	195	9.8	98
	+	400	2000	188	9.4	94
	+	800	2000	188	9.4	94
陽性対照 (BP)	+	20	2000	30	1.5	15

生食 : 局方生理食塩液

BP : ベンゾ[a]ピレン

表 8 分裂指数 (短時間処理法) [追加試験 1]

処理	S9 mix の有無	処理濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (生食)	—	0	2000	74	3.7	100
2, 2, 6, 6-テトラメチル- 4-ヒドロキシビヘリジソン	—	800	2000	155	7.8	209
	—	1000	2000	152	7.6	205
	—	1200	2000	125	6.3	169
陽性対照 (BP)	—	20	2000	59	3.0	80

生食 : 局方生理食塩液

BP : ベンゾ[a]ピレン

表 9 分裂指数 (短時間処理法) [追加試験 2]

処理	S9 mix の有無	処理濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (生食)	—	0	2000	90	4.5	100
2,2,6,6-テトラフル 4-ヒドロキシビペリジン	—	1000	2000	109	5.5	121
	—	1500	2000	68	3.4	76
	—	2000	2000	32	1.6	36
陽性対照 (BP)	—	20	2000	99	5.0	110

生食 : 局方生理食塩液

BP : ベンゾ[a]ピレン

表 10 分裂指数 (短時間処理法) [追加試験 3]

処理	S9 mix の有無	処理濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (生食)	—	0	2000	101	5.1	100
2, 2, 6, 6-テトラメチル- 4-ヒドロキシビペリジン	—	1000	2000	145	7.3	144
	—	1500	2000	73	3.7	72
	—	2000	2000	66	3.3	65
陽性対照 (BP)	—	20	2000	104	5.2	103

生食 : 局方生理食塩液

BP : ベンゾ[a]ピレン

図1 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの細胞毒性  
(連続処理法) [細胞増殖抑制試験1]

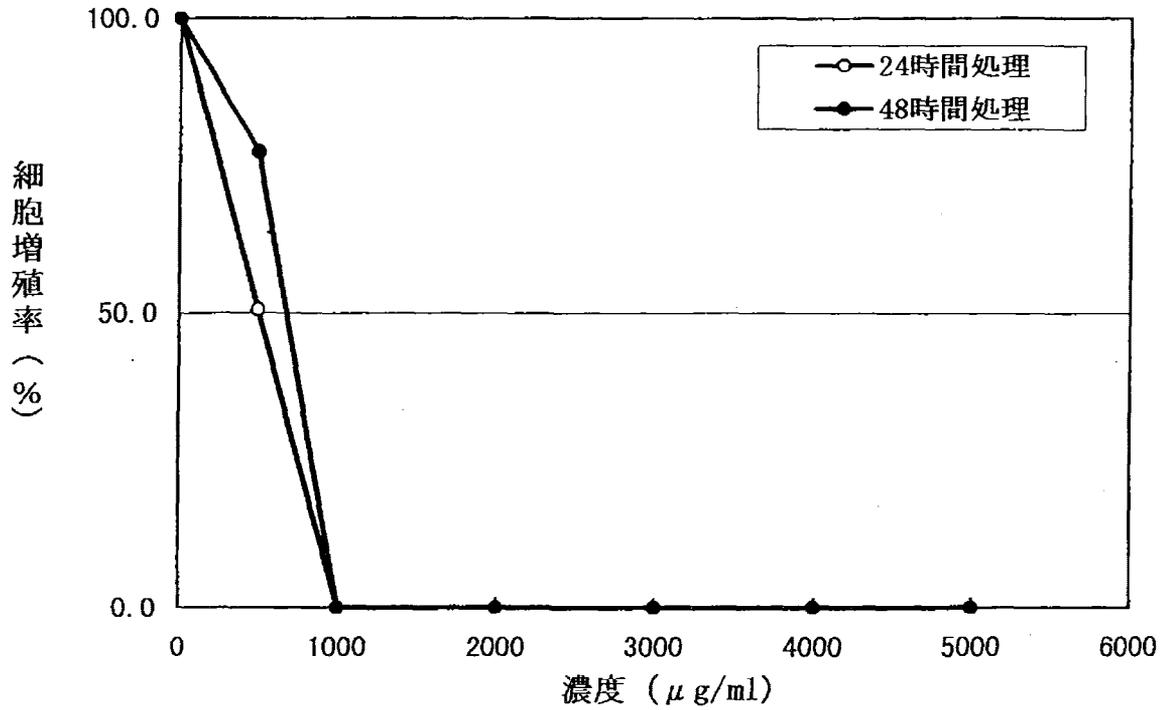


図2 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの細胞毒性  
(短時間処理法) (6時間処理, 18時間回復)  
[細胞増殖抑制試験1]

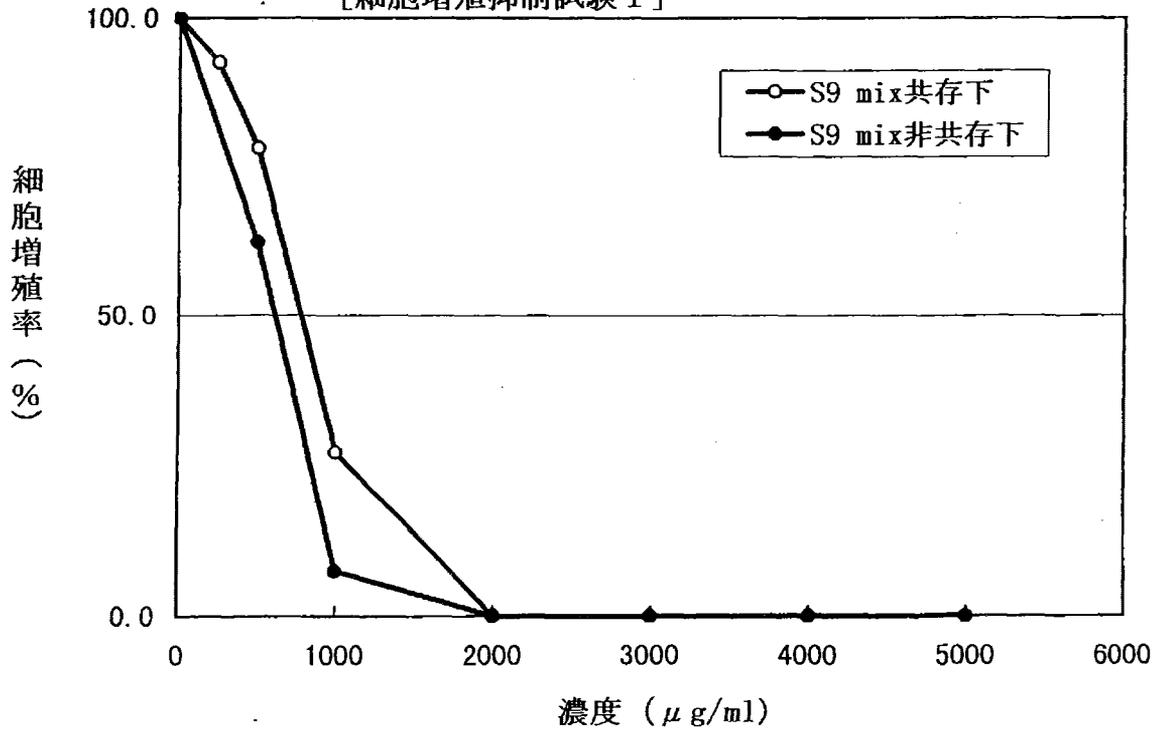


図3 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの細胞毒性  
(短時間処理法) [細胞増殖抑制試験2]

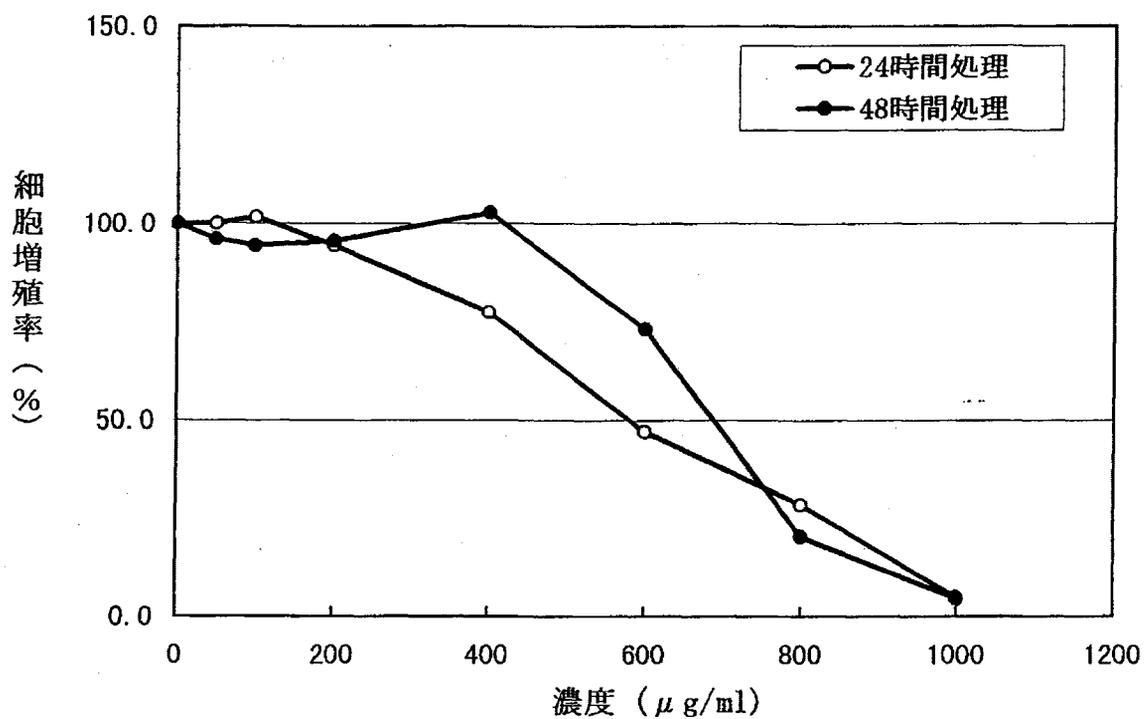


図4 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの  
構造異常細胞出現頻度 (連続処理法) [本試験]

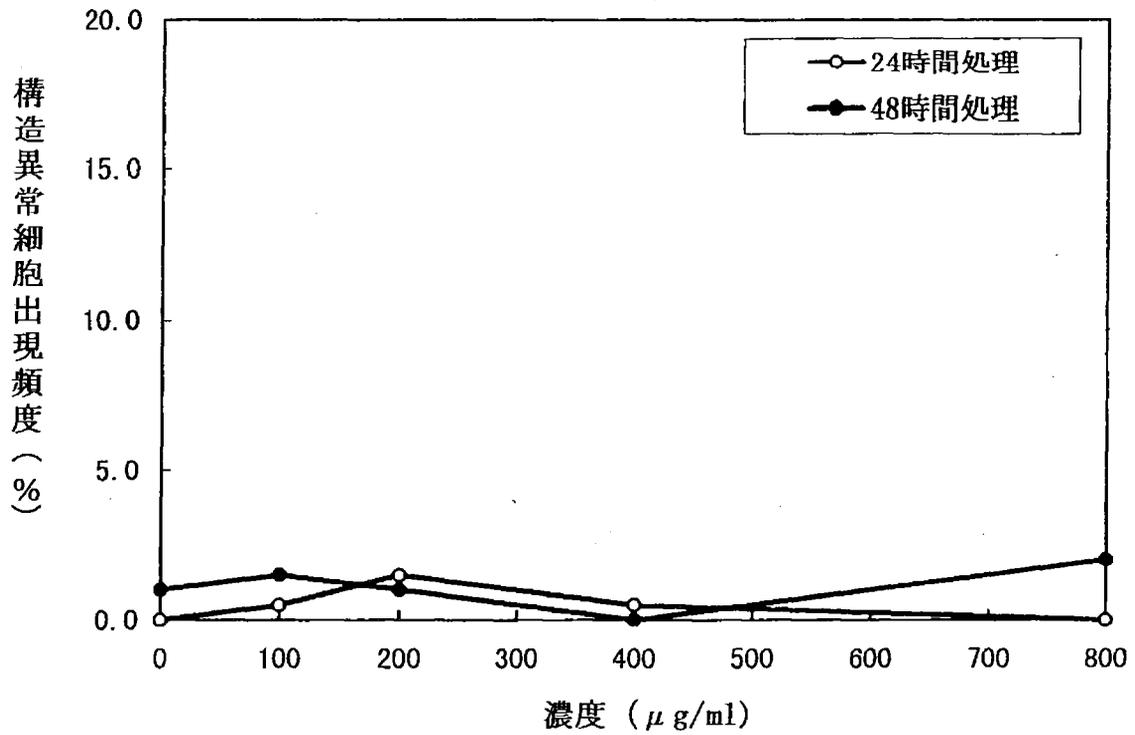


図5 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの  
構造異常細胞出現頻度 (短時間処理法) [本試験]

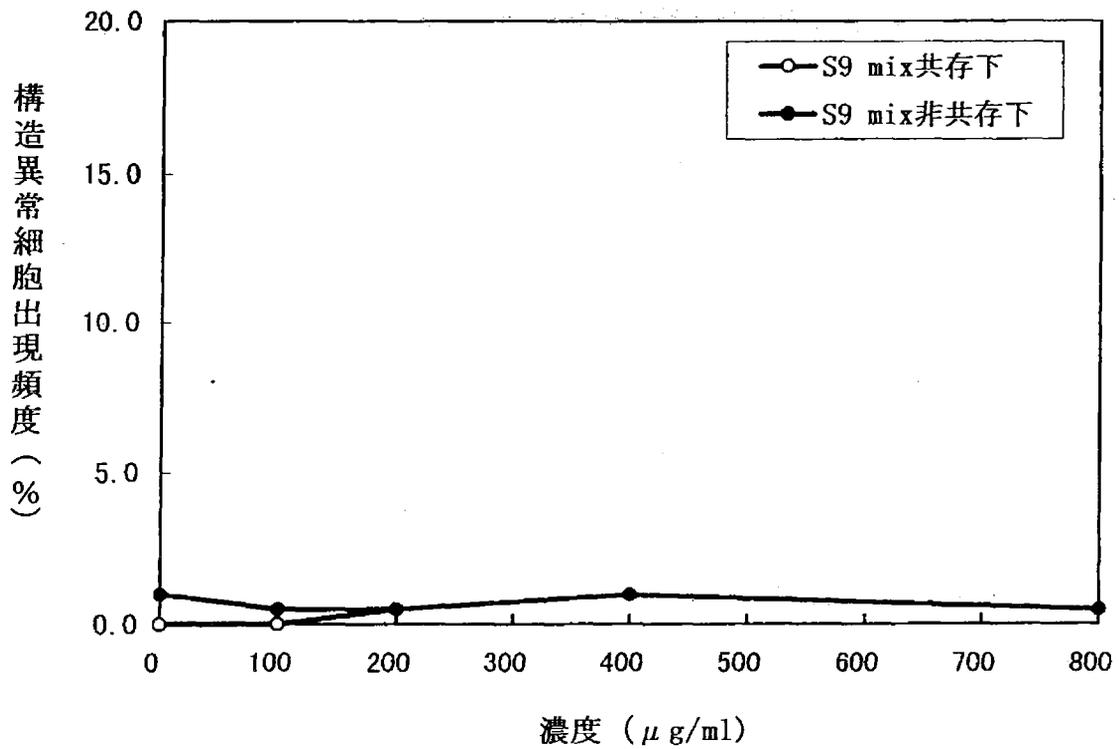


図6 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの  
倍数体細胞出現頻度 (連続処理法) [本試験]

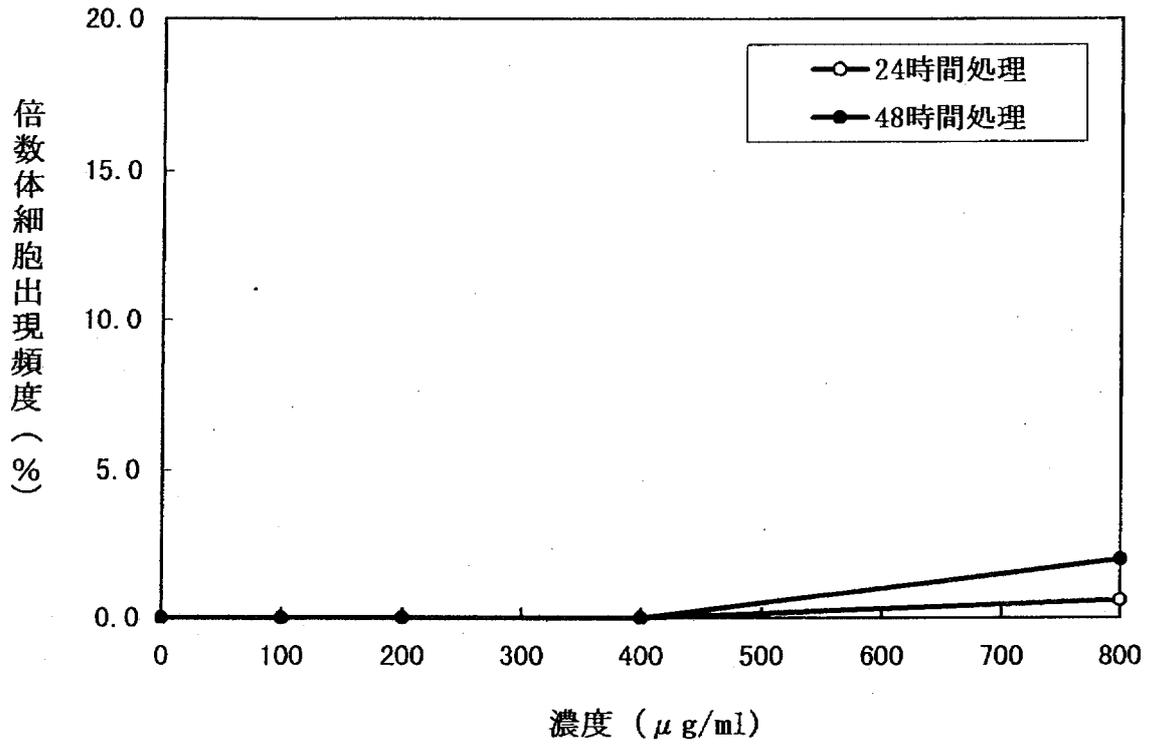


図7 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの  
倍数体細胞出現頻度 (短時間処理法) [本試験]

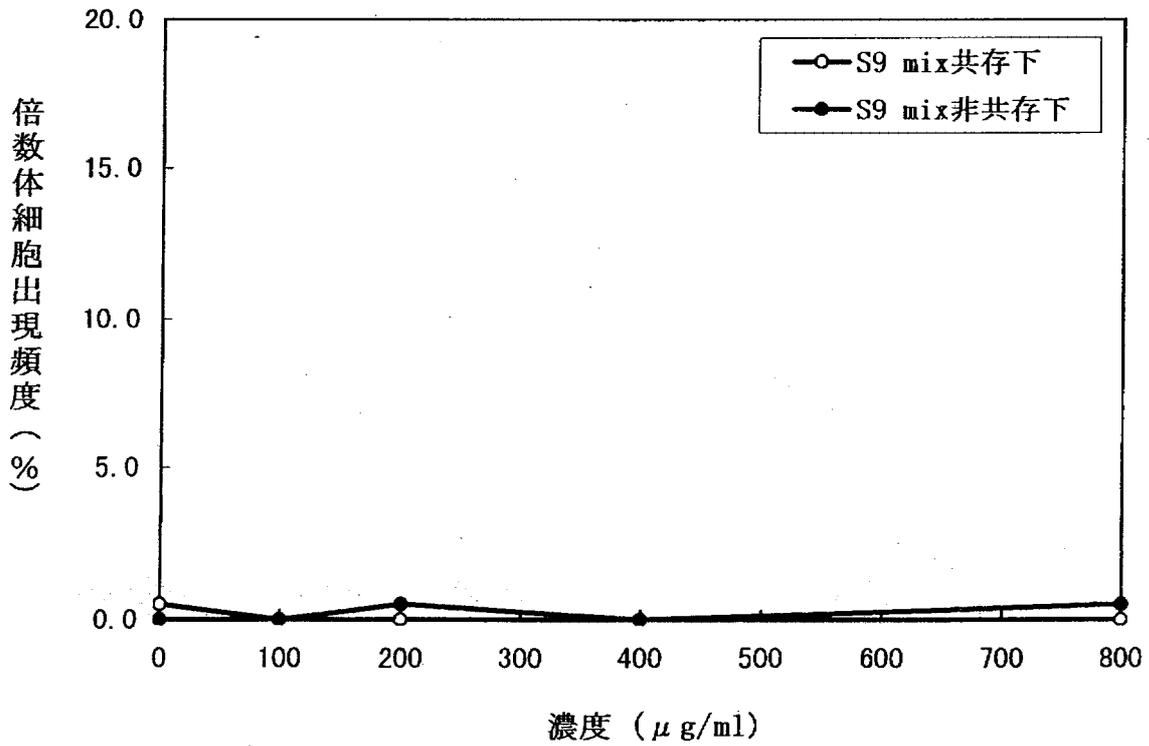


図8 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの  
構造異常細胞出現頻度 (短時間処理法) [追加試験 1]

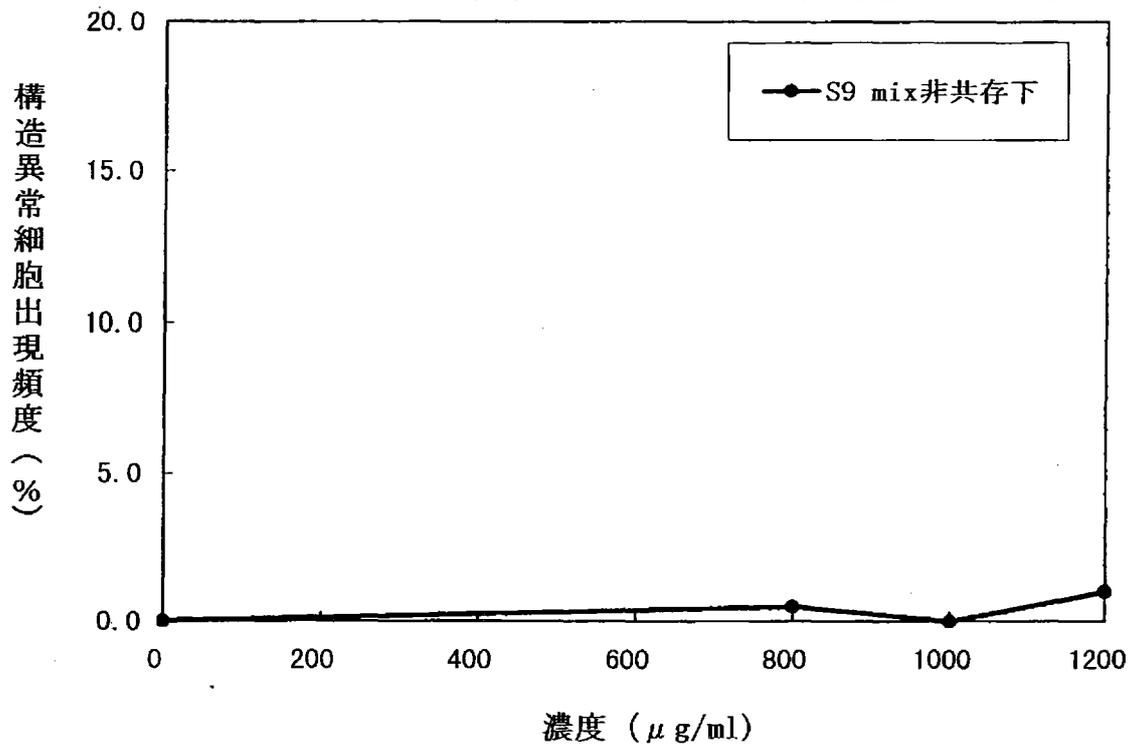


図9 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの  
倍数体細胞出現頻度 (短時間処理法) [追加試験 1]

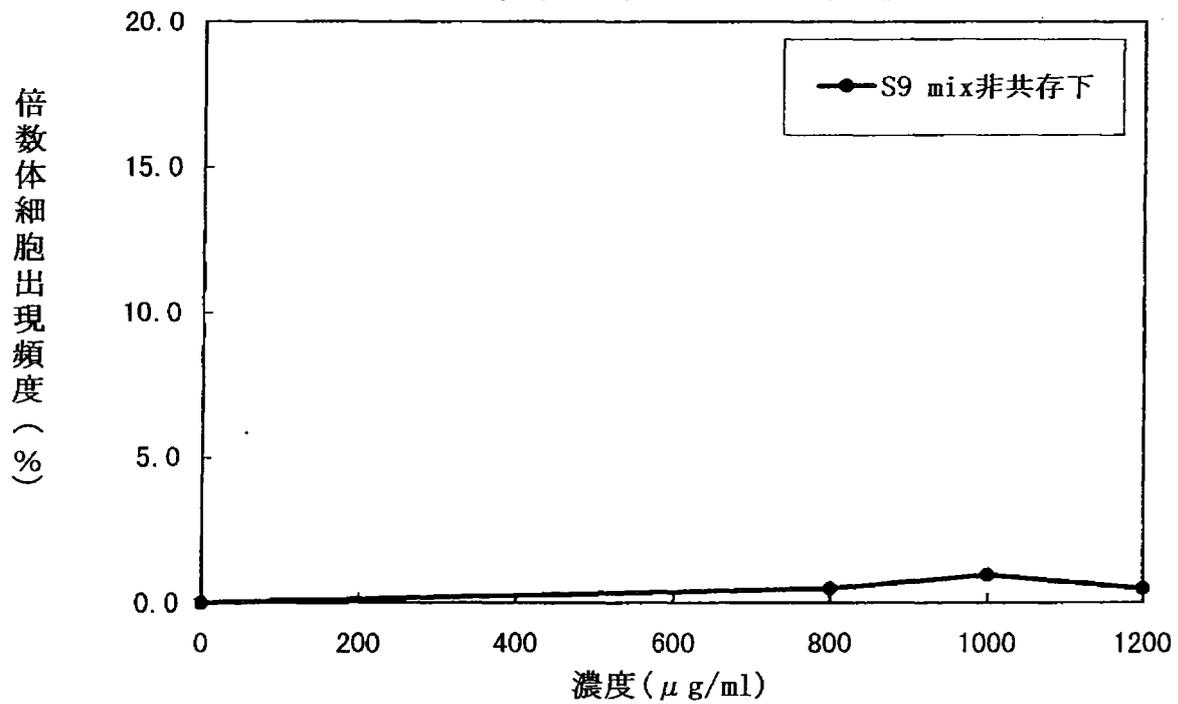


図10 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの  
構造異常細胞出現頻度 (短時間処理法) [追加試験 2]

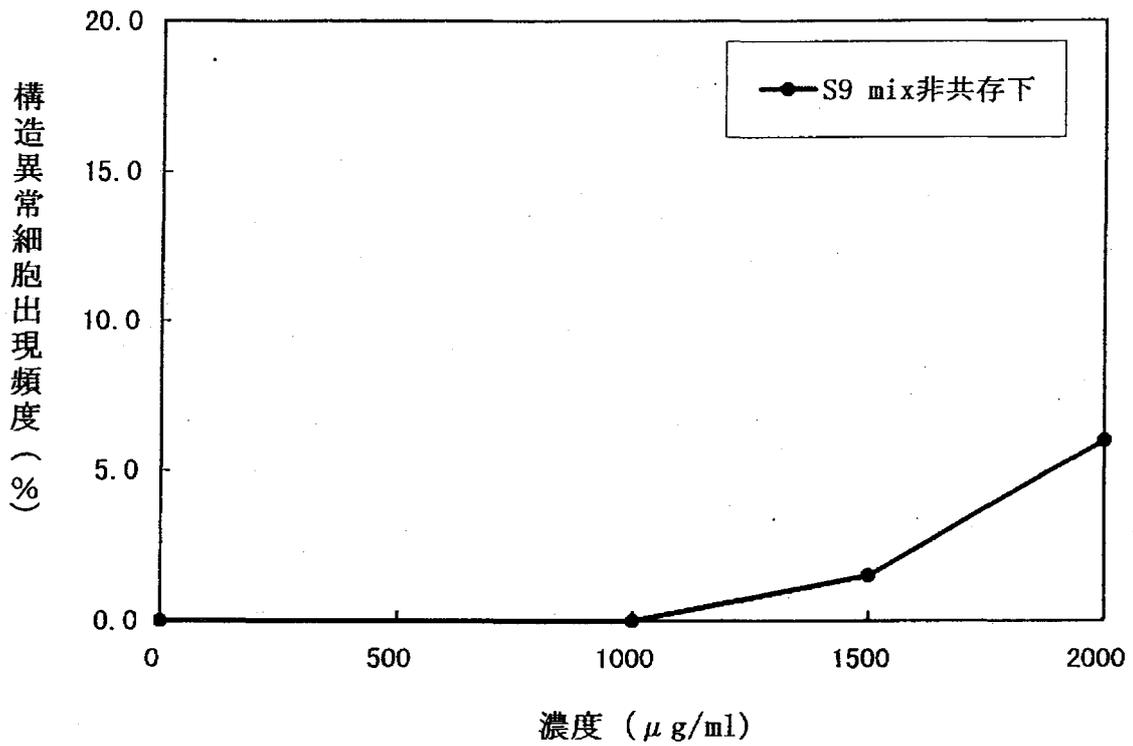


図11 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの  
倍数体細胞出現頻度 (短時間処理法) [追加試験 2]

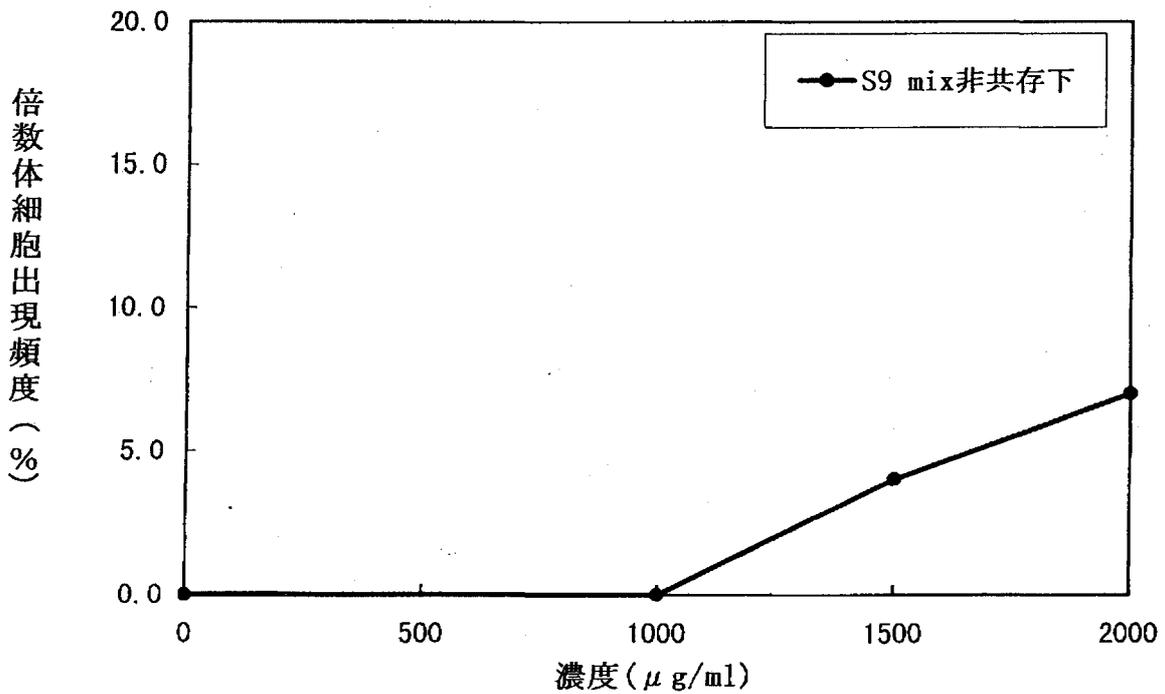


図12 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの  
構造異常細胞出現頻度 (短時間処理法) [追加試験 3]

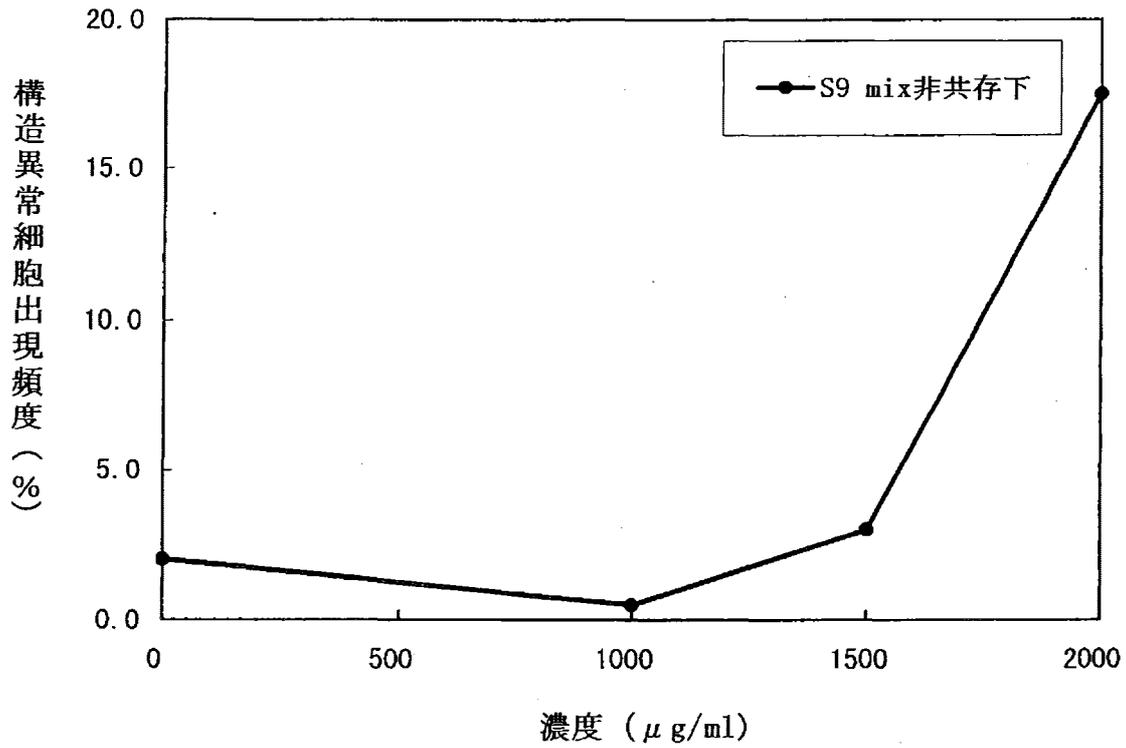


図13 2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシペリジンの  
倍数体細胞出現頻度 (短時間処理法) [追加試験 3]

