最 終 報 告 書

試験名：4-シクロヘキセン-1,2-ジカルボン酸ビス（2-エチルヘキシル）の
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：M-1408

試験期間：2010年5月21日-2011年6月30日

試験実施施設
株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所
〒412-0039　静岡県御殿場市かまど1284

試験委託者
厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室
〒100-8916　東京都千代田区霞が関1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065　東京都渋谷区大山町36-7

2.　目次

2.　目次 3

5.　要約 10
6.　緒言 11

7.　試験材料及び方法 12
　7.1　被験物質及び溶媒 12
　　7.1.1　被験物質 12
　　7.1.2　溶媒 12
　7.2　被験液の調製 13
　　7.2.1　調製方法 13
　　7.2.2　調製頻度 13
　　7.2.3　安定性 13
　　7.2.4　濃度の確認 13
　7.3　対照物質 14
　　7.3.1　陰性対照 14
　　7.3.2　陽性対照 15
　7.4　使用細胞株 16
　　7.4.1　細胞株 16
　　7.4.2　細胞の選択理由 16

7.4.3 培養条件 16
7.4.4 性状検査 16
7.5 S9 mix 及び培養液の調製 16
7.5.1 S9 mix 16
7.5.2 培養液 17
7.6 試験方法 [1-5] 18
7.6.1 識別方法 18
7.6.2 用量の設定 18
7.6.3 細胞増殖抑制試験 19
7.6.4 染色体異常試験 20
7.6.5 標本の観察 21
7.6.6 染色体異常の分類 21
7.6.7 判定基準 22
8. 試験結果 23
8.1 細胞増殖抑制試験 23
8.1.1 短時間処理法 23
8.1.2 連続処理法 23
8.2 染色体異常試験 24
8.2.1 短時間処理法（再試験） 24
8.2.2 連続処理法 24
9. 考察 26
10. 参考文献 27

図

Fig. 1-1 Results of the retest in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate [Short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 1-2 Results of the retest in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate [Short-term treatment:–S9 mix]

Fig. 1-3	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate [Continuous treatment: 24hr]
Fig. 1-4	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate [Continuous treatment: 48hr]

表

Table 1-1	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate [Retest: +S9 mix]
Table 1-2	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate [Retest: –S9 mix]
Table 1-3	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate [Continuous treatment: 24hr]
Table 1-4	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate [Continuous treatment: 48hr]

5. 要約

4-シクロヘキセン-1,2-ジカルボン酸ビス（2-エチルヘキシル）の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果から、短時間処理法及び連続処理法の24時間処理では4000、2000及び1000 μg/mLの計3用量を設定し、連続処理法の48時間処理では、50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量（62.5 μg/mL）における抑制率と50%細胞増殖抑制濃度（概略値：52.9 μg/mL）を勘案しながら、125、62.5、31.3、15.6及び7.81 μg/mLの計5用量を設定し、染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の短時間処理法では、定常的な方法では染色体観察用標本を作製することが出来ず、標本作製方法を変更したが、観察が可能な標本を作製することが出来なかったことから、標本作製方法を検討することとし、実験を中止して染色体異常試験 短時間処理法（再試験）を実施した。

短時間処理法（再試験）及び連続処理法ともに、すべての用量でギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA値）及び倍数体の出現頻度ともに5%未満を示した。

なお、すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、4-シクロヘキセン-1,2-ジカルボン酸ビス（2-エチルヘキシル）は本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数的異常を誘発しないと結論した。

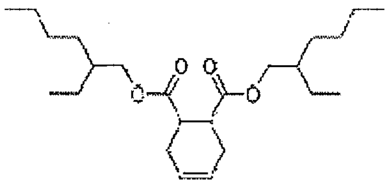
6. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室の依頼により、4-シクロヘキセン-1,2-ジカルボン酸ビス（2-エチルヘキシル）の安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。

7. 試験材料及び方法

7.1 被験物質及び溶媒

7.1.1 被験物質

名称	:	4-シクロヘキセン-1,2-ジカルボン酸ビス（2-エチルヘキシル）
英語名称	:	Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate
CAS 番号	:	2915-49-3
構造式又は示性式	:	
分子量	:	394.59
純度	:	99.0%
不純物	:	不明
性状	:	ほとんど無色透明液体
入手量	:	20 g
安定性	:	実験終了後に、株式会社ボゾリサーチセンターにおいて安定性を測定し、実験期間中安定であったことを確認した。
保存方法	:	冷暗所（冷蔵庫内、許容範囲：1～10°C、保存期間中の実測温度：3～6°C）
保存場所	:	御殿場研究所　被験物質保存室及び第1研究棟　被験物質調製室　冷蔵庫
返却	:	実験終了後、被験物質の残余物は、安定性を確認した後、すべて株式会社ボゾリサーチセンターにおいて廃棄した。

7.1.2 溶媒

名称	:	アセトン
ロット番号	:	ALE1516
規格	:	試薬特級
製造元	:	和光純薬工業株式会社
保存方法	:	室温

保存場所　：　御殿場研究所　遺伝毒性試験室
溶媒の選択理由　：　供試前試験を実施し、アセトンに対する溶解性を検討した。その結果、アセトンに対して、400 mg/mL の濃度で溶解したため、アセトンを溶媒として用いた。

7.2 被験液の調製

7.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験
被験物質 0.8000 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 400 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：4000 μg/mL）を調製した。次いで、400 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、200、100、50.0、25.0、12.5、6.25 及び 3.13 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

2) 染色体異常試験
短時間処理法（再試験）では、被験物質 4.000 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 400 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：4000 μg/mL）を調製した。次いで、400 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 2 段階希釈し、200 及び 100 mg/mL の 3 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化及び非代謝活性化ともに、400、200 及び 100 mg/mL の被験液を用いた。
連続処理法では、被験物質 4.000 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 400 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：4000 μg/mL）を調製した。次いで、400 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 9 段階希釈し、200、100、50.0、25.0、12.5、6.25、3.13、1.56 及び 0.781 mg/mL の 10 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理では 400、200 及び 100 mg/mL の被験液を、48 時間処理では 12.5、6.25、3.13、1.56 及び 0.781 mg/mL の被験液を用いた。

7.2.2 調製頻度

用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

7.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、変化が認められなかったことから、被験液が安定であることを確認した。

7.2.4 濃度の確認

染色体異常試験の短時間処理法（再試験）及び連続処理法に用いた最高濃度及び最

低濃度の被験液について、株式会社ボゾリサーチセンター　御殿場研究所においてHPLC法により濃度の確認を実施した。その結果、表示値に対する濃度の割合は100.0～109.7%（表示値に対する割合：100±10%以内）であり、いずれも許容範囲内であった（添付資料2及び3）。分析法の概略を次に示す。

1) 測定対象標準物質

名称	:	4-シクロヘキセン-1,2-ジカルボン酸ビス（2-エチルヘキシル）
ロット番号	:	AX01
保存方法	:	冷暗所（冷蔵庫内、許容値：1～10°C、実測値：2～8°C）
保存場所	:	御殿場研究所　被験物質保存室、生化学部標準物質保存場所

2) HPLC測定条件

カラム	:	L-column　ODS（5 μm、2.1 mm i.d.×150 mm、財団法人化学物質評価研究機構）
カラム恒温槽設定温度	:	40°C
移動相	:	アセトニトリル／精製水（85/15、v/v）
流速	:	0.6 mL/min
検出	:	UV（測定波長190 nm）
オートサンプラー設定温度	:	4°C
試料注入量	:	10 μL
注入順序	:	

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液（システム適合性用）
2	3	標準溶液（定量用）
3	1	測定実測試料（0.781 mg/mL）
4	1	測定実測試料（100 mg/mL）
5	1	測定実測試料（400 mg/mL）

標準溶液及び測定実測試料の測定は24時間以内に実施した（バリデーション試験で、オートサンプラー内における24時間保存後までの安定性が確認されている）。この注入順序は、濃度測定の全項目であり、各測定日に必要な試料のみ注入した。

7.3　対照物質

7.3.1　陰性対照

溶媒として用いたアセトンを陰性対照とした。

7.3.2 陽性対照

1) 代謝活性化

シクロフォスファミド（CP）

ロット番号	:	PEG0397
製造元	:	和光純薬工業株式会社
純度	:	生化学用（97.0%以上）
保存方法	:	冷蔵、遮光
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 発癌性物質冷蔵保存庫

2) 非代謝活性化

マイトマイシン C（MMC）

ロット番号	:	542AIA
製造元	:	協和醗酵キリン株式会社
力価	:	2 mg（力価）/瓶
保存方法	:	室温、遮光
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 発癌性物質室温保存庫

3) 調製方法

調製はすべて用時に行い、残余液はすべて一定期間貯蔵した後に焼却処分した。

(1) 染色体異常試験　短時間処理法　代謝活性化

CP 0.0140 g をγ線滅菌済プラスチック遠沈管（50 mL）に秤取した。これに生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号：K9L94）を 20 mL 加えて溶解し、0.70 mg/mL 溶液を調製した（培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた。この時の最終濃度は 14 μg/mL）。

(2) 染色体異常試験　短時間処理法　非代謝活性化

MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号：K9L94）を注射筒で 2 mL 加えて溶解した（1 mg/mL）。次に、この溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈（溶液 0.250 mL：生理食塩液 4.750 mL）し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した（培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 μg/mL）。

(3) 染色体異常試験　連続処理法

MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号：K9L94）を注射筒で 2 mL 加えて溶解した（1 mg/mL）。次に、この溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈（溶液 0.250 mL：生理食塩液 4.750 mL）し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した（培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 μg/mL）。

4) 陽性対照物質の選択理由

遺伝毒性試験ガイドライン（前述 6.2）に使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

7.4 使用細胞株

7.4.1 細胞株

チャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた。細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから2009年11月25日に入手し、継代培養を行ったものについて細胞の性状検査を実施して、適正であることが確認されたものを試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験で13継代、染色体異常試験の短時間処理法（再試験）及び連続処理法でそれぞれ21継代及び3継代であった。

7.4.2 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常の発現率が低いこと、更に種々の化学物質の染色体異常誘発性に対して感受性が高く、バックグラウンドデータが豊富であること等の理由から本細胞を選択した。

7.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO_2濃度5%、温度37°C、高湿度条件下で培養した。

継代は1~4日ごとに行った。

7.4.4 性状検査

定期的に実施される性状検査において、プレート上で単層状に増殖すること、細胞倍加時間が15～20時間以内であること、染色体数の平均（モード）が25本であること及びマイコプラズマによる汚染がないことが確認された細胞から、30代を越えない範囲で継代培養を行っているものを用いた。

7.5 S9 mix及び培養液の調製

7.5.1 S9 mix

S9及び補酵素（S9／コファクターC セット、ロット番号：C100312131、オリエンタル酵母工業株式会社）を混合し、S9 mixを調製した。調製は使用時に行った。

1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	10031213
製造日	:	2010年3月12日
種・系統	:	ラット·SD系
性	:	雄
週齢	:	7週齢
誘導物質	:	フェノバルビタール（PB）及び5, 6-ベンゾフラボン（BF）
投与法	:	腹腔内投与

投与期間及び投与量： PB 4日間 30+60+60+60 mg/kg body weight
BF 1日 80 mg/kg body weight
保存方法 ： 冷凍（超低温フリーザー）
使用期限 ： 2010年9月11日
保存場所 ： 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) 補酵素
名称 ： コファクターC
ロット番号 ： C10031013
製造日 ： 2010年3月10日
保存方法 ： 冷凍（超低温フリーザー）
使用期限 ： 2010年9月9日
保存場所 ： 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

3) S9 mixの組成

S9	2 mL		
補酵素	4.7 mL	20 mmol/L HEPES緩衝液（pH 7.2）	1.34 mL
		50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330 mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40 mmol/L 酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）水溶液	0.67 mL
		精製水	0.67 mL

7.5.2 培養液

Minimum Essential Medium（MEM、GIBCO™、Cat.No. 11095）に、非働化（56°C, 30分）した牛血清（bovine serum、BS）を10 v/v%添加して調製した培養液（BS-MEM）を用いた。調製後のBS-MEMは冷蔵保存した。

1) 牛血清
ロット番号 ： 731681
製造元 ： Invitrogen Corporation
保存方法 ： 冷凍（−80°C設定の冷凍庫）
保存場所 ： 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) Minimum Essential Medium（MEM）
ロット番号 ： 744784、767914
製造元 ： Invitrogen Corporation
保存方法 ： 冷蔵
保存場所 ： 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 冷蔵庫

7.6 試験方法 [1-5)]

試験は以下に示したステージの順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	短時間処理法（再試験）	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理

7.6.1 識別方法

1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「–」とし、連続処理法では 24 時間処理を「24-」、48 時間処理を「48-」とした。更にこれに続けて陰性対照（Negative Control）の場合は「NC」を、被験物質処理群の場合は濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、･･･の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。ただし、陽性対照（Positive Control）は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」～「99」までの 2 桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

7.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 4000 μg/mL とし、以下公比 2 で希釈した 2000、1000、500、250、125、62.5 及び 31.3 μg/mL の計 8 用量を設定し、陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法及び連続処理法の 24 時間処理では 50%以上の細胞毒性が認められなかったことから、試験計画書通りに 4000、2000 及び 1000 μg/mL の計 3 用量を設定した。一方、連続処理法の 48 時間処理では、62.5 μg/mL で 50%以上の細胞毒性が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 52.9 μg/mL であったことから、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定を参照し、50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量における抑制率と 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を勘案しながら、125、62.5、31.3、

15.6及び7.81 μg/mLの計5用量を設定した。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

7.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として実施した。なお、以下の無菌性を必要とする試験操作は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

1) 短時間処理法

(1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径60 mm）を用いた。プレートは各群2枚とした。

(2) プレート当たり2×10^4個の細胞（培養液5.0 mL）を播種した。培養3日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液0.883 mLを取り除き、S9 mix 0.833 mLに続き溶媒0.050 mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.883 mLを取り除き、S9 mix 0.833 mLに続き各濃度の被験液0.050 mLを加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液0.050 mLを取り除き、溶媒0.050 mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.050 mLを取り除き、各濃度の被験液0.050 mLを加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6時間培養した。

(3) 培養6時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を牛血清を添加した生理食塩液で洗浄し、新しい培養液5.0 mLを加え更に18時間培養を続けた。

(4) 培養終了後、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度99%以上）で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養6時間後と同様の方法で18時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

2) 連続処理法

(1) 24時間処理と48時間処理のそれぞれに陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径60 mm）を用いた。プレートは各群2枚とした。

(2) プレート当たり2×10^4個の細胞（培養液5.0 mL）を播種した。培養3日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、24時間処理及び48時間処理ともに陰性対照群については、培養液0.050 mLを取り除き、溶媒0.050 mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.050 mLを取り除き、

各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。

(3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

7.6.4 染色体異常試験

以下の無菌性を必要とする試験操作は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

1) 短時間処理法（再試験）

(1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。

(2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 μg/mL）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 μg/mL）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。

(3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、滅菌したキャピラリピペットを用いて培養液を吸引しながら廃棄した。被験物質処理群については、培養液表面に油滴状に浮遊する被験物質を吸引しながら十分に取り除いた。牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。

(4) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 μg/mL、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、被験物質処理群については、染色体標本の作製に際して、ワイパークロス(商品名：ケイドライ、日本製紙クレシア株式会社)で培養液表面に油滴状に浮遊する被験物質を可能な限り除去した後に、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、新しい培養液 5.0 mL を添加した遠沈管に細胞を回収した。遠心分離によって集め

た細胞を 0.075 M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸＝3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。

(5) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

(1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。

(2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL（最終濃度：0.050 μg/mL）を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。

(3) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため 24 時間及び 48 時間の培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 μg/mL、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。その他は、短時間処理法（再試験）と同様にして染色体標本を作製した。

(4) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、24 時間及び 48 時間の培養の終了時に肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

7.6.5 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。

7.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常は更に以下のように定義・分類した。

1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

ギャップ(g)	:	染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体又は染色分体の同軸上に断片があるもの（非染色部分が染色分体の同軸上にある）であって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるもの。
染色分体型切断(ctb)	:	断片が染色分体の同軸上からはずれているもの及び非染色部位が染色分体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
染色分体型交換(cte)	:	四放射状交換など。
染色体型切断(csb)	:	断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあっても､その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
染色体型交換(cse)	:	二動原体染色体、環状染色体など。
その他(other)	:	断片化(frg)など。

2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数（二倍体）と異なり、倍化した場合を数的異常と定義した。

倍数性	:	polyploidy（核内倍加体：endoreduplication を含む）

7.6.7 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準[1]に従い染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率（%）によって以下のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5%未満	陰　性 (–)
5%以上 10%未満	疑陽性 (±)
10%以上	陽　性 (+)

構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合（TAG）と含まない場合（TA）とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

8. 試験結果

8.1 細胞増殖抑制試験

8.1.1 短時間処理法

1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化（Appendix 1-1、Appendix 2-1）及び非代謝活性化（Appendix 1-2、Appendix 2-2）ともに50%を超える細胞増殖抑制は認められず、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は算出出来なかった。

2) 被験物質添加直後の観察

代謝活性化（Appendix 2-1）及び非代謝活性化（Appendix 2-2）ともに、すべての用量で被験物質添加に伴う培養液の色調の変化は認められなかったが代謝活性化（Appendix 2-1）では62.5 μg/mL以上の用量で、非代謝活性化（Appendix 2-2）では、すべての用量で、肉眼による観察で被験物質添加に伴う析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の観察

代謝活性化（Appendix 2-1）では250 μg/mL以上の用量で、非代謝活性化（Appendix 2-2）では62.5 μg/mL以上の用量で析出が認められた。代謝活性化（Appendix 2-1）及び非代謝活性化（Appendix 2-2）ともに、被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較したが、すべての用量で細胞の浮遊・形態変化は認められなかった。

8.1.2 連続処理法

1) 50%細胞増殖抑制濃度

24時間処理法（Appendix 1-3、Appendix 2-3）では50%を超える細胞増殖抑制は認められなかった。48時間処理法（Appendix 1-4、Appendix 2-4）では62.5 μg/mLで50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は52.9 μg/mLだった。

2) 被験物質添加直後の観察

24時間処理（Appendix 2-3）及び48時間処理（Appendix 2-4）ともに、すべての用量で被験物質添加に伴う培養液の色調の変化は認められなかった。24時間処理（Appendix 2-3）及び48時間処理（Appendix 2-4）ともに、すべての用量で、肉眼による観察で被験物質添加に伴う析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の観察

24時間処理（Appendix 2-3）及び48時間処理（Appendix 2-4）ともに、62.5 μg/mL以上の用量で析出が認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較したが、24時間処理（Appendix 2-3）ではすべての用量で細胞の浮遊・形態変化は認められず、48時間処理（Appendix 2-4）では250及び125 μg/mLの用量で細胞の浮遊・形態変化が認められた。

8.2 染色体異常試験

8.2.1 短時間処理法（再試験）

1) 代謝活性化（Appendix 3-1）及び非代謝活性化（Appendix 3-2）ともに、すべての用量で被験物質添加に伴う培養液の色調の変化は認められなかった。代謝活性化（Appendix 3-1）及び非代謝活性化（Appendix 3-2）ともに、すべての用量で肉眼による被験物質添加に伴う析出が認められた。

2) 被験物質処理終了時の観察
代謝活性化（Appendix 3-1）及び非代謝活性化（Appendix 3-2）ともに、すべての用量で析出が認められた。代謝活性化（Appendix 3-1）及び非代謝活性化（Appendix 3-2）ともに、被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較したが、すべての用量で細胞の浮遊・形態変化は認められなかった。

3) 染色体構造異常
構造異常の出現率（TA）は、代謝活性化（Fig. 1-1、Table 1-1）においては、4000、2000 及び 1000 μg/mL ではそれぞれ 0.5、0 及び 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、非代謝活性化（Fig. 1-2、Table 1-2）においては、4000、2000 及び 1000 μg/mL ではそれぞれ 0、0.5 及び 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。
なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常
数的異常（倍数体）の出現率は、代謝活性化（Table 1-1）においては、4000、2000 及び 1000 μg/mL ではそれぞれ 0.5、0 及び 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、非代謝活性化（Table 1-2）においては、4000、2000 及び 1000 μg/mL ではそれぞれ 0.5、0 及び 0.5%と陰性の判定基準である 5%未満であった。
なお、陰性対照群においては、染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

8.2.2 連続処理法

1) 被験物質添加直後の観察
24 時間処理（Appendix 3-3）及び 48 時間処理（Appendix 3-4）ともに、すべての用量で被験物質添加に伴う培養液の色調の変化は認められなかった。24 時間処理（Appendix 3-3）ではすべての用量で、48 時間処理（Appendix 3-4）では 31.3 μg/mL 以上の用量で、肉眼による観察で被験物質添加に伴う析出が認められた。

2) 被験物質処理終了時の観察
24 時間処理（Appendix 3-3）ではすべての用量で、48 時間処理（Appendix 3-4）では 62.5 μg/mL 以上の用量で析出が認められた。被験物質処理群の細胞の状態

を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理（Appendix 3-3）では、すべての用量で細胞の浮遊・形態変化は認められず、48 時間処理（Appendix 3-4）では 62.5 μg/mL 以上の用量で細胞の浮遊・形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

構造異常の出現率（TA）は、24 時間処理（Fig. 1-3、Table 1-3）においては、4000、2000 及び 1000 μg/mL ではそれぞれ 0、0 及び 0.5%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、48 時間処理（Fig. 1-4、Table 1-4）においては、125、62.5、31.3、15.6 及び 7.81 μg/mL ではそれぞれ 0、0.5、0、0 及び 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常（倍数体）の出現率は、24 時間処理（Table 1-3）においては、4000、2000 及び 1000 μg/mL ではそれぞれ 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、48 時間処理（Table 1-4）においては、125、62.5、31.3、15.6 及び 7.81 μg/mL ではそれぞれ 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

なお、陰性対照群においては、染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

9. 考察

4-シクロヘキセン-1,2-ジカルボン酸ビス（2-エチルヘキシル）の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、短時間処理法（再試験）及び連続処理法のすべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示した。
また、倍数性細胞の出現頻度は、短時間処理法（再試験）及び連続処理法ともにすべての用量で陰性の判定基準である 5%未満であった。

すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

なお、4-シクロヘキセン-1,2-ジカルボン酸ビス（2-エチルヘキシル）の類縁化合物であるベンゼン-1,4-ジカルボン酸ビス（2-エチルヘキシル）では、微生物を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）[6]及び CHO 細胞を用いる染色体異常試験 [6]において、シクロヘキセンでは微生物を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）[7]において、それぞれ陰性と報告されている。

以上の結果から、4-シクロヘキセン-1,2-ジカルボン酸ビス（2-エチルヘキシル）は本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数的異常を誘発しないと結論した。

10. 参考文献

1) 石館基監修 (1987)：<改訂>染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー、東京
2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* – A screening for chemical carcinogens, Mutat. Res., 48, 337-354
3) Matsuoka A, Hayashi M and Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, Mutat. Res., 66, 277-290
4) 石館 基 (1982)：哺乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), 日本香粧品科学会誌, 6, 31-43
5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271
6) Barber, ED (1994): Genetic toxicology testing of DI (2-Ethylhexyl) Terephthalate, Environ. Mol. Mutagen. 23(2), 228-233
7) Sycheva, LP Zholdakova, ZI Polyakova, EE Lukmanova, NE Akhal' Tseva, LV and Zhurkov, VS (2000): Mutagenic Acitivity of Cyclohexene and products of its chlorination, Bull. Exp. Ciol. Med, 129(6), 581-583

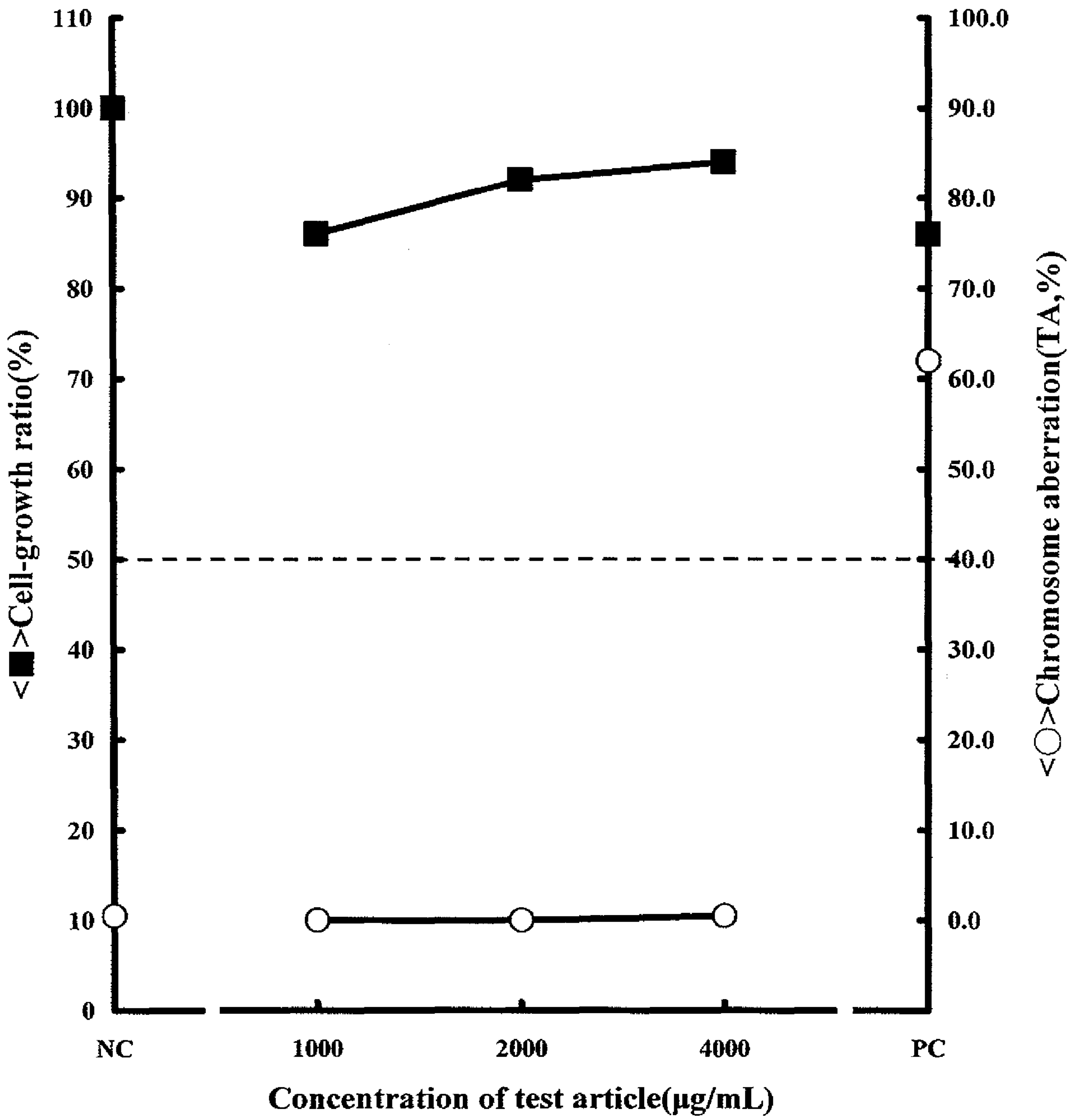


Fig. 1-1
Results of the retest in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate
[Short-term treatment:+S9 mix]

NC: Negative Control(acetone)
PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 μg/mL)

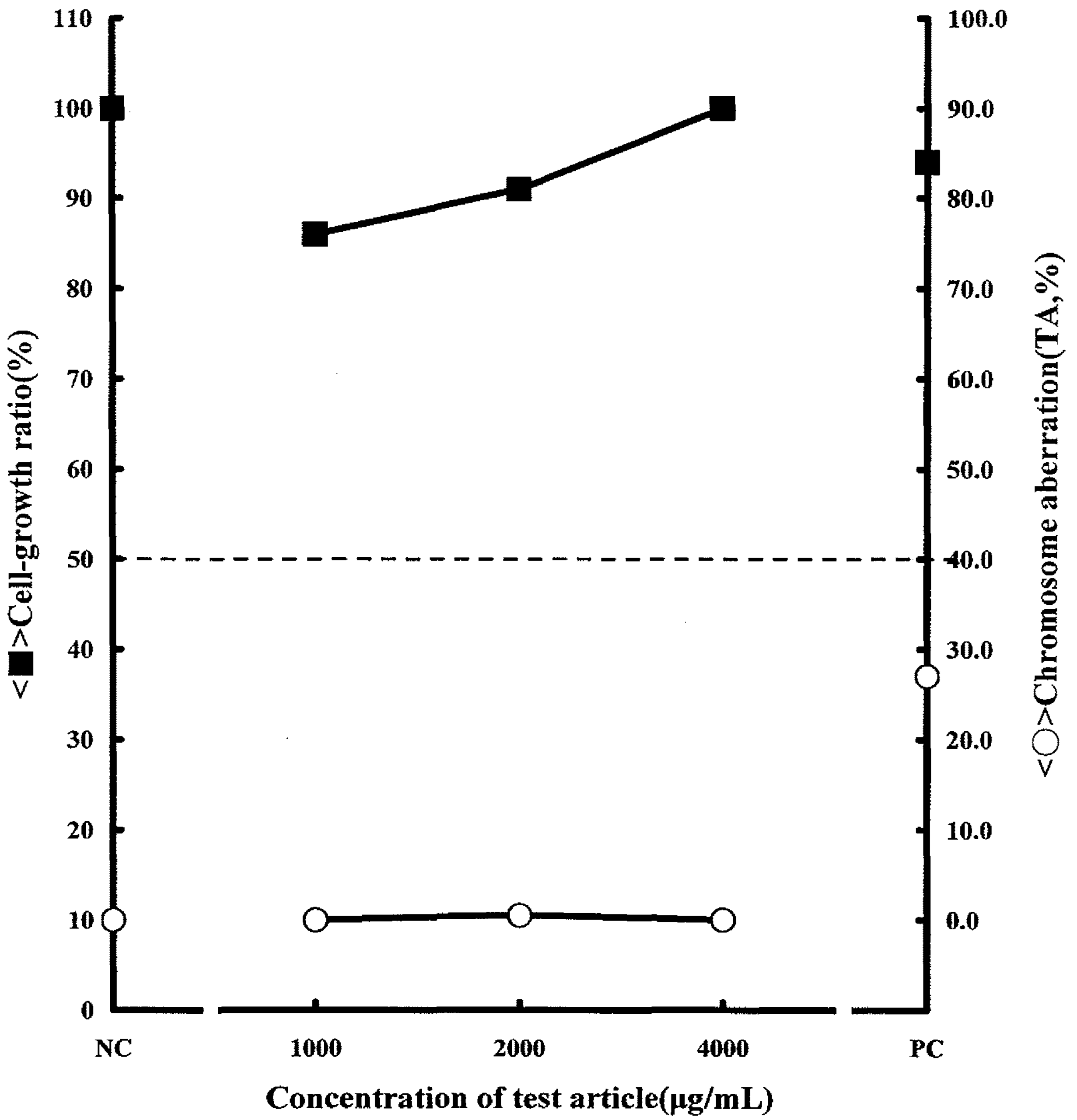


Fig. 1-2
Results of the retest in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate
[Short-term treatment:-S9 mix]

NC: Negative Control(acetone)
PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 μg/mL)

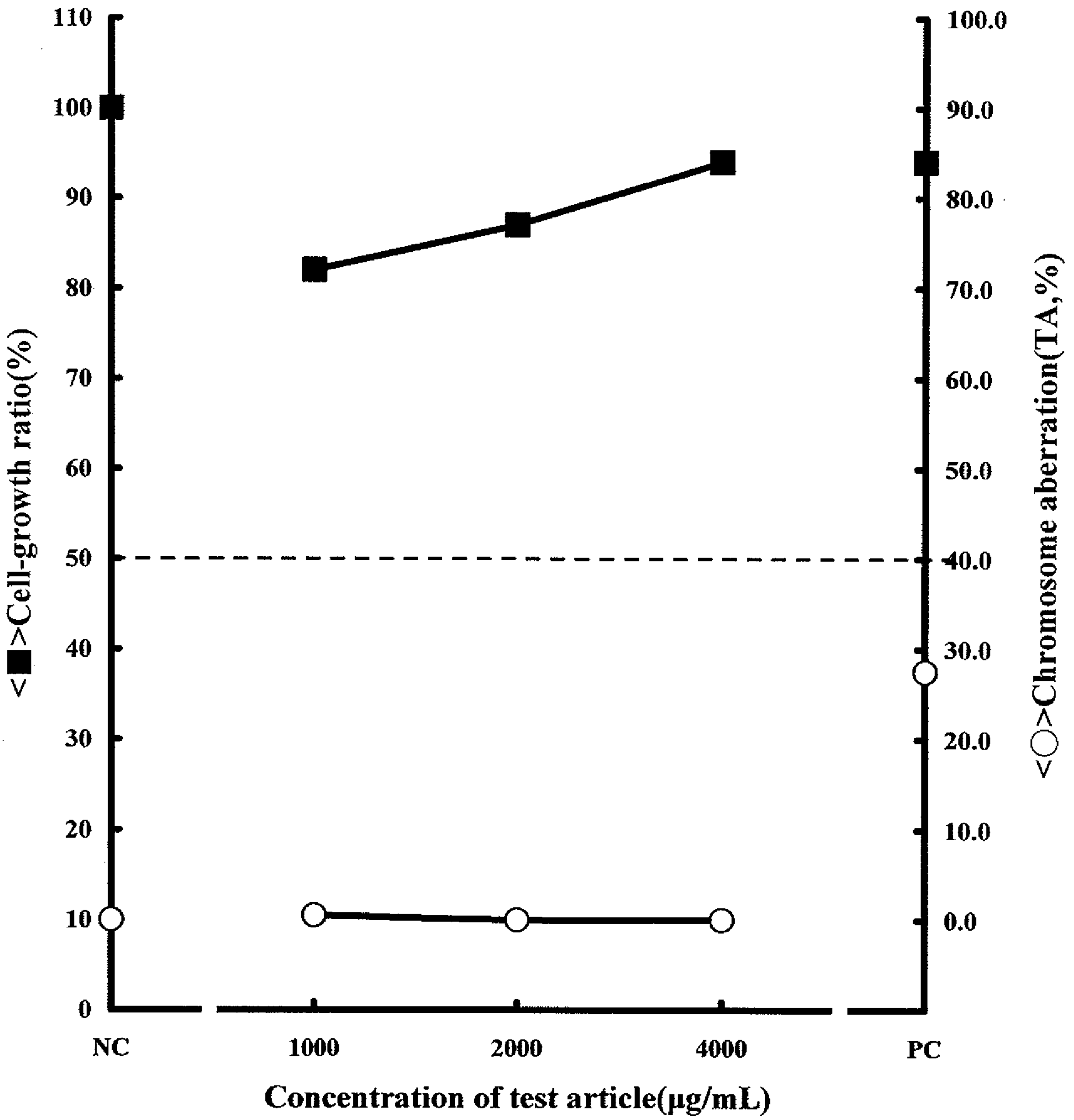


Fig. 1-3
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate
[Continuous treatment:24hr]

NC: Negative Control(acetone)
PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 μg/mL)

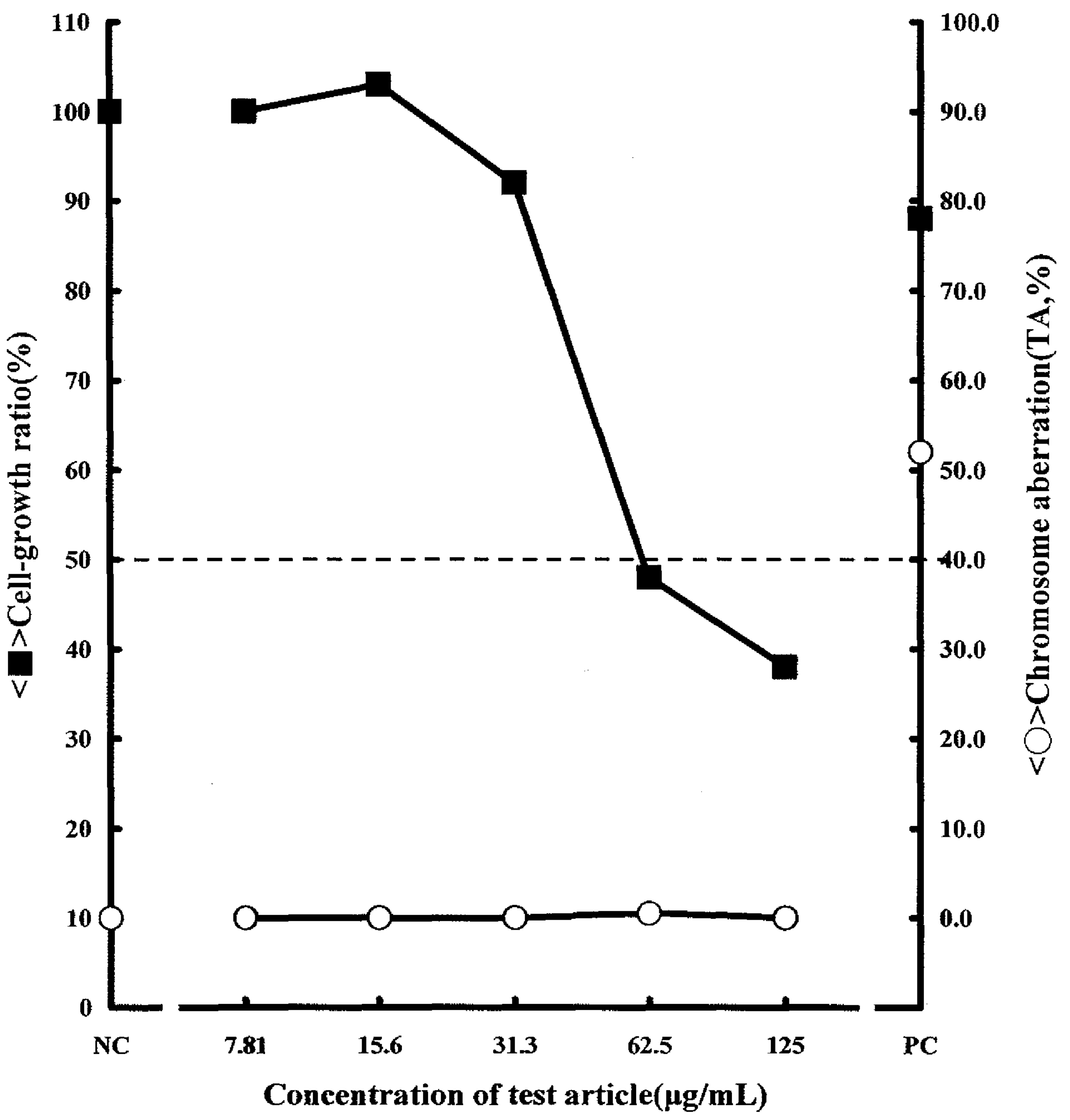


Fig. 1-4
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate
[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(acetone)
PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 μg/mL)

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate [Retest:+S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)										Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)					Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judgement		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judgement	
6-18	+	NC	100	0	1	0	0	0	1	0	1		100	100	0	0	0		69-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	105	100	0	0	0	-	48-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		1000	100	0	0	0	0	0	0	0	0		94	100	0	0	0		90-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	82	100	0	0	0	-	76-1
			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)		(86)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		2000	100	0	0	0	0	0	0	0	0		94	100	0	0	0		57-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	94	100	0	0	0	-	82-1
			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)		(92)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		4000	100	0	1	0	0	0	1	0	1		99	100	1	0	1		77-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	94	100	0	0	0	-	47-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(94)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		PC	100	7	54	0	0	0	59	0	59		88	100	0	0	0		67-1
			100	8	60	0	0	0	65	0	65	+	88	100	0	0	0	-	32-1
			200	15(7.5)	114(57.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	124(62.0)	0(0.0)	124(62.0)		(86)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (acetone)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14μg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate [Retest:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)										Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)					Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judgement		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judgement	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	100	0	0	0		02-1
		NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	0	-	86-1
			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)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		88	100	0	0	0		93-1
		1000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	83	100	1	0	1	-	62-1
			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)		(86)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
			100	1	0	0	0	0	1	0	1		88	100	0	0	0		72-1
6-18	-	2000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	94	100	0	0	0	-	12-1
			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)		(91)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		105	100	1	0	1		26-1
		4000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	94	100	0	0	0	-	49-1
			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)		(100)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
			100	3	26	0	0	0	29	0	29		94	100	0	0	0		79-1
		PC	100	6	19	0	0	0	25	0	25	+	94	100	0	0	0	-	15-1
			200	9(4.5)	45(22.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	54(27.0)	0(0.0)	54(27.0)		(94)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (acetone)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075μg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate [Continuous treatment:24hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)										Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)					Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge-ment		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge-ment	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	100	0	0	0		08-1
		NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	105	100	0	0	0	-	14-1
			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)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		84	100	0	0	0		44-1
		1000	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	84	100	0	0	0	-	58-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(82)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		89	100	0	0	0		74-1
24-0	-	2000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	89	100	0	0	0	-	46-1
			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)		(87)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		94	100	0	0	0		88-1
		4000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	0	-	29-1
			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)		(94)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
			100	3	28	0	0	0	30	0	30		94	100	0	0	0		78-1
		PC	100	5	20	0	0	0	25	0	25	+	99	100	0	0	0	-	06-1
			200	8(4.0)	48(24.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	55(27.5)	0(0.0)	55(27.5)		(94)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (acetone)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050μg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with Bis(2-ethylhexyl)4-Cyclohexene-1,2-dicarboxylate
[Continuous treatment:48hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)										Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)					Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge-ment		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	Judge-ment	
48-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	100	0	0	0		17-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	95	100	0	0	0	-	42-1
			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)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		7.81	100	0	0	0	0	0	0	0	0		95	100	0	0	0		64-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	95-1
			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)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		15.6	100	0	0	0	0	0	0	0	0		104	100	0	0	0		01-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	97	100	0	0	0	-	75-1
			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)		(103)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		31.3	100	0	0	0	0	0	0	0	0		90	100	0	0	0		56-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	90	100	0	0	0	-	60-1
			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)		(92)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		62.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0		53	100	0	0	0		30-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	41	100	0	0	0	-	04-1
			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)		(48)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		125	100	0	0	0	0	0	0	0	0		34	100	0	0	0		23-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	41	100	0	0	0	-	59-1
			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)		(38)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		PC	100	6	51	0	0	0	53	0	53		87	100	0	0	0		09-1
			100	6	47	0	0	0	51	0	51	+	85	100	0	0	0	-	52-1
			200	12(6.0)	98(49.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	104(52.0)	0(0.0)	104(52.0)		(88)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation
TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.
NC: Negative control (acetone)
PC: Positive control (mitomycin C, 0.050μg/mL)
Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).
Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.