

最 終 報 告 書

塩基性炭酸ニッケル（Ⅱ）のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：7823（115-188）

平成17年5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
12. 被験物質.....	8
13. 試験材料および方法.....	10
14. 試験結果.....	18
15. 考察および結論.....	20
16. 参考文献.....	21

Figures

Figure 1	Growth inhibition of CHL cells treated with nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Short-term treatment]	24
Figure 2	Growth inhibition of CHL cells treated with nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Continuous treatment]	25
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Short-term treatment: -S9].....	26
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Short-term treatment: +S9].....	27
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Continuous treatment: 24h]	28

Tables

Table 1	Results of growth inhibition test of nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Short-term treatment]	29
Table 2	Results of growth inhibition test of nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Continuous treatment].....	30
Table 3	Chromosome aberration test in CHL cells treated with nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Short-term treatment: -S9].....	31
Table 4	Chromosome aberration test in CHL cells treated nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Short-term treatment: +S9].....	32
Table 5	Chromosome aberration test in CHL cells treated with nickel (II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Continuous treatment: 24h]	33

1. 要約

当該試験条件下の *in vitro* 試験系において、塩基性炭酸ニッケル (II) は染色体異常を誘起しないものと判断した。

塩基性炭酸ニッケル (II) 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用量を設定した。染色体異常試験の短時間処理法-S9 処理では 47.1, 67.2 および 96.0 $\mu\text{g/mL}$, 同+S9 処理では 120, 172, 245 および 350 $\mu\text{g/mL}$ の 3~4 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、塩基性炭酸ニッケル (II) 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。+S9 処理の倍数性細胞については Cochran Armitage の傾向検定で有意差が認められたが、最大の出現頻度でも 1.5% と低く、当センターの陰性対照の背景データ (Appendix 4) の範囲内であったため、生物学的に有意な増加ではないと判断した。

また、連続処理法 24 時間処理についても 5.94, 11.9, 23.8 および 47.5 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、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。

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。

12. 被験物質

12.1. 被験物質名

塩基性炭酸ニッケル (Ⅱ) (英名 : Nickel (Ⅱ) carbonate hydroxide tetrahydrate)

12.2. ロット番号

12.3. 含量

94.7%

本被験物質 (分子量 376.18) 中の Ni (原子量 58.69) の含量は理論値では 46.8% ($58.69 \times 3 / 376.18$) であるが, 本ロットの Ni 含量測定結果は 44.3%であったため, 94.7% ($44.3 / 46.8$) とした.

12.4. 製造元

12.5. 保存条件

室温・密閉

12.6. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (C-3)

12.7. CAS No.

39430-27-8

12.8. 化学名

Nickel (Ⅱ) carbonate hydroxide tetrahydrate

12.9. 分子式

$\text{NiCO}_3 \cdot 2\text{Ni(OH)}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

12.10. 分子量

376.18

304.11 (無水物)

12.11. 物質の状態

うすい緑の粉末

12.12. 溶解性

二酸化炭素を含む水に不溶, 酸に可溶

12.13. 取り扱い上の注意

吸い込んだり，目，皮膚および衣類に触れないように適切な保護具を着用した．屋内作業における取り扱い場所では，局所排気装置を使用した．

12.14. 残余被験物質の処理

被験物質の一部（2 g）を保存した後，残りは廃棄処分した．

12.15. 安定性

他の試験機関（食品薬品安全センター秦野研究所）にて保管されていた同一ロットの被験物質について実施した品質分析の結果（平成 17 年 1 月 15 日付報告），安定性に関して問題はなかった．

13. 試験材料および方法

13.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU 細胞) を選択した。

CHL/IU 細胞は昭和 59 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、一部については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 27 の細胞を、染色体異常試験では継代数 2 の細胞を、染色体異常試験 (追加試験) では継代数 7 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。

13.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (IWAKI : Lot No. 317064 ; 旭テクノグラス) に非働化 (56°C, 30 分) 済み仔牛血清 (Lot No. 427252 【細胞増殖抑制試験】ならびに 472959 【染色体異常試験および追加試験】; 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暗所 (4°C) に保存した。

13.3. 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。

13.4. S9 mix

製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (Lot No. CAM-506 ; 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 (設定温度 -80°C) に保存した。

13.4.1. 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した。

ロット番号	RAA-506
製造年月日	平成 16 年 7 月 16 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	207~240 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	26.69 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の各内容物の量を以下に示した.

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 (pH 7.2)	4 μmol/0.2mL
蒸留水	0.1 mL

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水、DMSO ともに不溶ではあるが、水に良好に懸濁することから、被験物質を生理食塩液（日本薬局方生理食塩液：Lot No. K4B72；大塚製薬工場）に懸濁し、調製原液とした。本被験物質は秤量の際、純度換算および無水物換算を実施し、その換算係数は1.306とした。なお、換算係数は以下の式で求めた。

$$\frac{\text{塩基性炭酸ニッケル（Ⅱ）の分子量}}{\text{塩基性炭酸ニッケル（Ⅱ）無水物の分子量} \times 0.947} = \frac{376.18}{304.11 \times 0.947} = 1.306$$

細胞増殖抑制試験では、使用直前に調製原液（30.4 mg/mL 液）を準備した。この 30.4 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し、15.2, 7.60, 3.80, 1.90, 0.950, 0.475, 0.238, 0.119 および 0.0594 mg/mL 液を調製した。

染色体異常試験では以下の通りに調製した。

- ・短時間処理法-S9 処理

使用直前に調製原液（4.00 mg/mL 液）を準備した。この 4.00 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し、2.80, 1.96, 1.37, 0.960, 0.672 および 0.471 mg/mL 液を調製した。

- ・短時間処理法+S9 処理および連続処理法 24 時間処理

使用直前に調製原液（30.4 mg/mL 液）を準備した。この 30.4 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し、15.2, 7.60, 3.80, 1.90, 0.950, 0.475, 0.238, 0.119 および 0.0594 mg/mL 液を調製した。

- ・染色体異常試験（追加試験）

使用直前に調製原液（5.00 mg/mL 液）を準備した。この 5.00 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し、3.50, 2.45, 1.72, 1.20, 0.840 および 0.588 mg/mL 液を調製した。

いずれにおいても調製後、速やかに処理を行った。

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒（生理食塩液）で試験した。

13.6.2. 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. K2K80 ; 大塚製薬工場) 5 mL に溶解したマイトマイシン C (MMC : Lot No. 382BBC ; 協和醗酵工業) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液 : Lot No. K2H96 ; 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 $\mu\text{g/mL}$, 連続処理法で 0.05 $\mu\text{g/mL}$ とした.

13.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

注射用水 (Lot No. K2K80) 5 mL に溶解したシクロホスファミド (CP : Lot No. 3045 ; 塩野義製薬) を生理食塩液 (Lot No. K2H96) 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 $\mu\text{g/mL}$ とした.

13.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

13.7.1. 用量

ガイドライン上定められた最高用量である 3040 $\mu\text{g/mL}$ (無水物の 10 mM 相当) を最高用量とし, 以下 1520, 760, 380, 190, 95.0, 47.5, 23.8, 11.9 および 5.94 $\mu\text{g/mL}$ の 10 用量を細胞増殖抑制試験の用量とした.

13.7.2. 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.

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.

13.7.3. 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, 13.7.6. に記載した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. 103K2403 ; Sigma-Aldrich) を用いて細胞を洗浄した. 新鮮な培養液 500 μL を加え, さらに 18 時間培養を続けた.

13.7.4. 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, 13.7.6. に記載した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 13.7.3. に記載の方法に準じた.

13.7.5. 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、13.7.6.に記載した割合で溶媒および被験物質の処理を行った。さらに、24時間培養を続けた。

13.7.6. 処理量一覧

	溶媒および被験物質		
	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	540 μ L	—	60 μ L
+S9 処理	440 μ L	100 μ L	60 μ L
24 時間処理	540 μ L	—	60 μ L

13.7.7. 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。

13.7.8. 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. KLN8969；和光純薬工業）を加えて約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。各プレートを水洗した後、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4 mL 加え、5分間放置した後、分光光度計（105-50 型：日立製作所）を用いて波長 580 nm で吸光度を測定した。陰性対照群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、いずれの処理法とも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5.94～1520 μ g/mL の9点（-S9 処理）、23.8～1520 μ g/mL の7点（+S9 処理）および5.94～760 μ g/mL の8点（24時間処理）を用いた。

13.8. 染色体異常試験

13.8.1. 用量

細胞増殖抑制試験結果から、短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理では、細胞の増殖を50%以上抑制すると予想される用量を最高用量とした。短時間処理法+S9 処理では、細胞増殖抑制試験において、高用量群では被験物質懸濁物の影響により、正確な細胞増殖抑制作用が確認できなかったため、3040 μ g/mL（無水物 10 mM 相当）を最高用量とし、以下に示した6～7用量（公比 10/7 【-S9 処理】、公比 2 【+S9 処理および24時間処理】）を設定した。

処理法	用量 (μg/mL)						
短時間処理法-S9 処理	<u>47.1</u>	<u>67.2</u>	<u>96.0</u>	137	196	280	400
短時間処理法+S9 処理	—	95.0	190	380	760	1520	3040
連続処理法 24 時間処理	—	<u>5.94</u>	<u>11.9</u>	<u>23.8</u>	<u>47.5</u>	95.0	190

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、評価対象群が 3 用量得られなかったことから、用量を変えて追加試験を実施した。追加試験では 500 μg/mL を最高用量とし、以下に示した 7 用量（公比 10/7）を設定し、そのうち 6 用量について処理した。

処理法	用量 (μg/mL)						
短時間処理法+S9 処理	58.8	84.0	<u>120</u>	<u>172</u>	<u>245</u>	<u>350</u>	500

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。

ただし、58.8 μg/mL については処理を実施しなかった。

13.8.2. 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。

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。

13.8.3. 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、13.8.6. に記載した割合で溶媒、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. 103K2403 ; 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を作製した。

13.8.4. 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、13.8.6. に記載した割合で溶媒、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 13.8.3. に記載の方法に準じた。

13.8.5. 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、13.8.6. に記載した割合で溶媒、被験物質および陽性対照物質の処理を行っ

た。さらに、24 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

13.8.6. 処理量一覧

	溶媒, 被験物質および陽性対照物質		
	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	2.7 mL	—	0.3 mL
+S9 処理	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL
24 時間処理	2.7 mL	—	0.3 mL

13.8.7. 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。

13.8.8. 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 µg/mLとなるようコルセミド溶液(Lot No. 1187876 ; 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. 1208746 ; 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て細胞浮遊液とし、脱脂洗浄済みのスライドガラス上に2滴ずつ滴下した。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(pH 6.8 : Lot No. TP601374 ; 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。

1 プレート当たり2~3枚の染色体標本を作製した。

13.8.9. 細胞増殖抑制制度の測定

染色体標本作製時に陰性対照、各被験物質処理群および陽性対照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 µL 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 µL 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 µL 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。

13.8.10. 評価対象

-S9 処理および 24 時間処理においては、13.8.9.における相対細胞増殖率が 50%未満になる最も低い用量を最高用量とした。-S9 処理は連続する 3 用量、24 時間処理では観察最高用量 (47.5 µg/mL) で観察可能な細胞が規定数 (200 個) に満たない懸念があったため、連続する 4 用量を評価対象 (観察用量) とした。+S9 処理については染色体異常試験で作製した標本が細胞毒性作用のため、観察可能用量が 2 用量しか得られなかったことから、追加試験を実施し、その標本を観察した。13.8.9.における相対細胞増殖率が 50%未満になる用量は観察不可能であり、また、50%以上の用量でも観察可能な細胞が規定数 (200 個) に満たない懸念があった。したがって、相対細胞増殖率が 50%以上になる最も高い用量を最高用量とし、連続する 4 用量を評価対象 (観察用量) とした。

13.8.11. 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コード化して観察した。ただし、短時間処理法+S9 処理については追加試験の標本を採用し、先に実施した染色体異常試験の標本はコード化および観察を実施しなかった。

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 (×600) で観察した。ただし、24 時間処理の 47.5 µg/mL は細胞毒性作用のため 183 個の細胞しか観察できなかった。

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。

13.9. 結果の解析

最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めない場合について行った。

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。

14. 試験結果

14.1. 細胞増殖抑制試験

14.1.1. 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 215 $\mu\text{g/mL}$, 同+S9 処理では 1495 $\mu\text{g/mL}$, 連続処理法 24 時間処理では 114 $\mu\text{g/mL}$ であった. ただし, 高用量群においては, 培養終了後に残存していた被験物質の懸濁物が染色されたため, 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. 本事象は特に+S9 処理で顕著に認められた.

14.1.2. 析出等の観察

被験物質処理開始および処理終了時, いずれの処理においても 95.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量においてうすい緑色の被験物質懸濁物の残存が認められた.

14.2. 染色体異常試験

14.2.1. 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.

塩基性炭酸ニッケル(II)処理群での染色体構造異常出現頻度は, 47.1 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 67.2 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 96.0 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%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, 47.1 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 67.2 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 96.0 $\mu\text{g/mL}$ 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 96.0 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 45.6%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 29.5% ($p \leq 0.025$) であった.

14.2.2. 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.

塩基性炭酸ニッケル(II)処理群での染色体構造異常出現頻度は, 120 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 172 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 245 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%, 350 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%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, 陰性対照群で 0.0%であり, 120 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 172 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 245 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 350 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%を示し, Cochran Armitage の傾向検定では有意差が認められたが, 出現頻度の最大でも 1.5%と低い値であった. 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 350 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 56.9%であり, 細胞生存率が 41.8%の 500 $\mu\text{g/mL}$ では細胞毒性作用のため, 観察不可能であった.

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 29.5% ($p \leq 0.025$) であった。

14.2.3. 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。

塩基性炭酸ニッケル(II)処理群での染色体構造異常出現頻度は、5.94 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 11.9 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 23.8 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%, 47.5 $\mu\text{g/mL}$ で 1.1%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。ただし、47.5 $\mu\text{g/mL}$ においては、観察細胞が規定数の 200 個に満たなかったため、統計検定から除外した。

倍数性細胞の出現頻度は、5.94 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 11.9 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%, 23.8 $\mu\text{g/mL}$ で 0.0%, 47.5 $\mu\text{g/mL}$ 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。

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 47.5 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 37.8%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 22.0% ($p \leq 0.025$) であった。

14.2.4. 析出等の観察

被験物質処理開始および処理終了時、-S9 処理の 96.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量、+S9 処理の 120 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量、24 時間処理の 95.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量、それぞれにおいてうすい緑色の被験物質懸濁物の残存が認められた。

15. 考察および結論

塩基性炭酸ニッケル(Ⅱ)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/U)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、塩基性炭酸ニッケル(Ⅱ)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。+S9 処理の倍数性細胞については、Cochran Armitage の傾向検定で有意差が認められたが、最大の出現頻度でも 1.5%と低く、当センターの陰性対照の背景データ(Appendix 4)の範囲内であったため、生物学的に有意な増加ではないと判断した。

また、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。

また、本被験物質塩基性炭酸ニッケル(Ⅱ)の遺伝毒性について RTECS では、ハムスター卵巣に姉妹染色分体交換を誘発すると報告している¹⁾が、発がん性の報告は現在までない。

また、IARC ではニッケル化合物の発がん性をグループ 1 (ヒトに対して発がん性がある)としている¹⁾。類縁体であるスルファミン酸ニッケル、硫酸ニッケルおよび塩化ニッケルについては、細菌を用いた復帰突然変異試験で陰性²⁾と報告している。

なお、陰性対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当施設での背景データ(Appendix 4)の範囲内であり、当該試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、当該試験条件下において塩基性炭酸ニッケル(Ⅱ)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。

16. 参考文献

- 1) “製品安全データシート (MSDS No. JW140103)”, 和光純薬工業株式会社, 大阪, 2002.
- 2) 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”, JETOC, 東京, 1996, p.142-147.

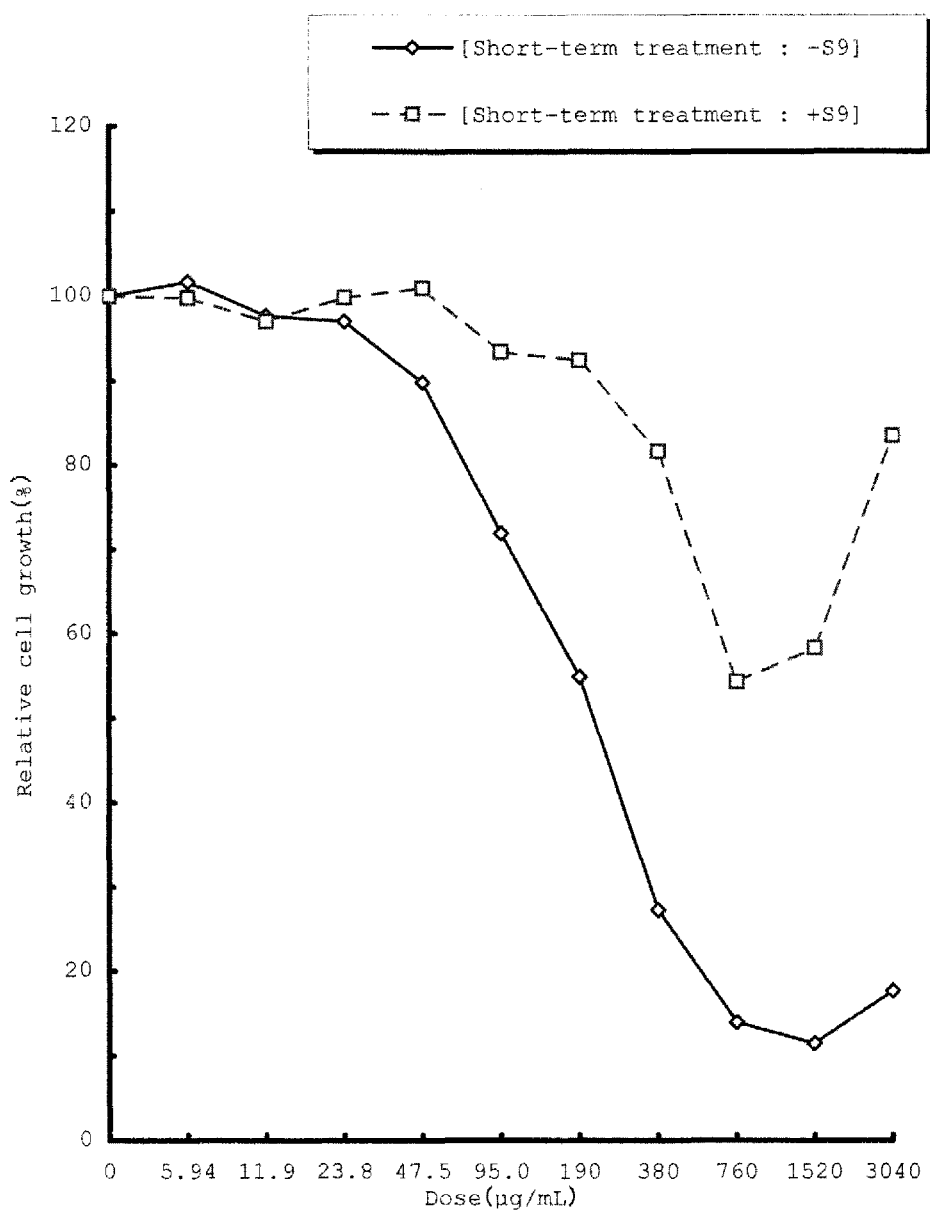


Figure 1. Growth inhibition of CHL cells treated with nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Short-term treatment]

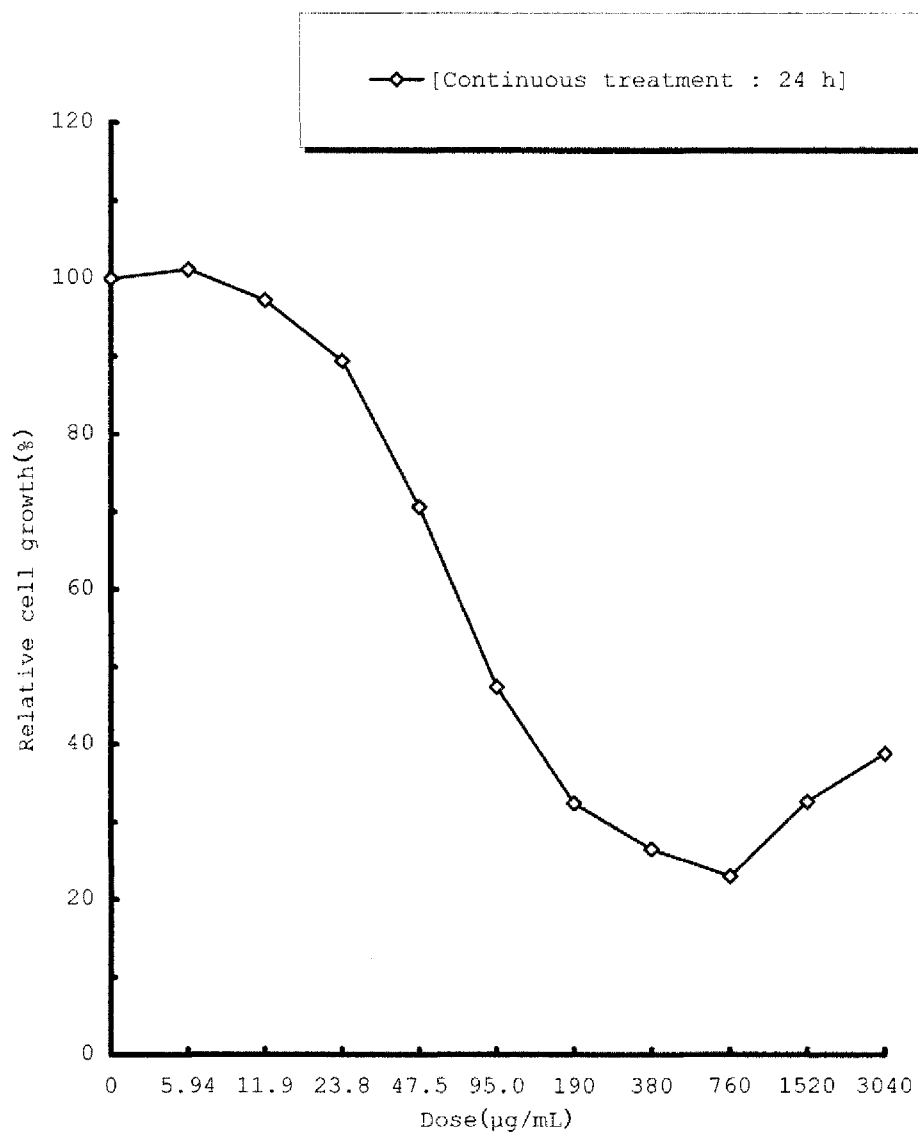


Figure 2. Growth inhibition of CHL cells treated with nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Continuous treatment]

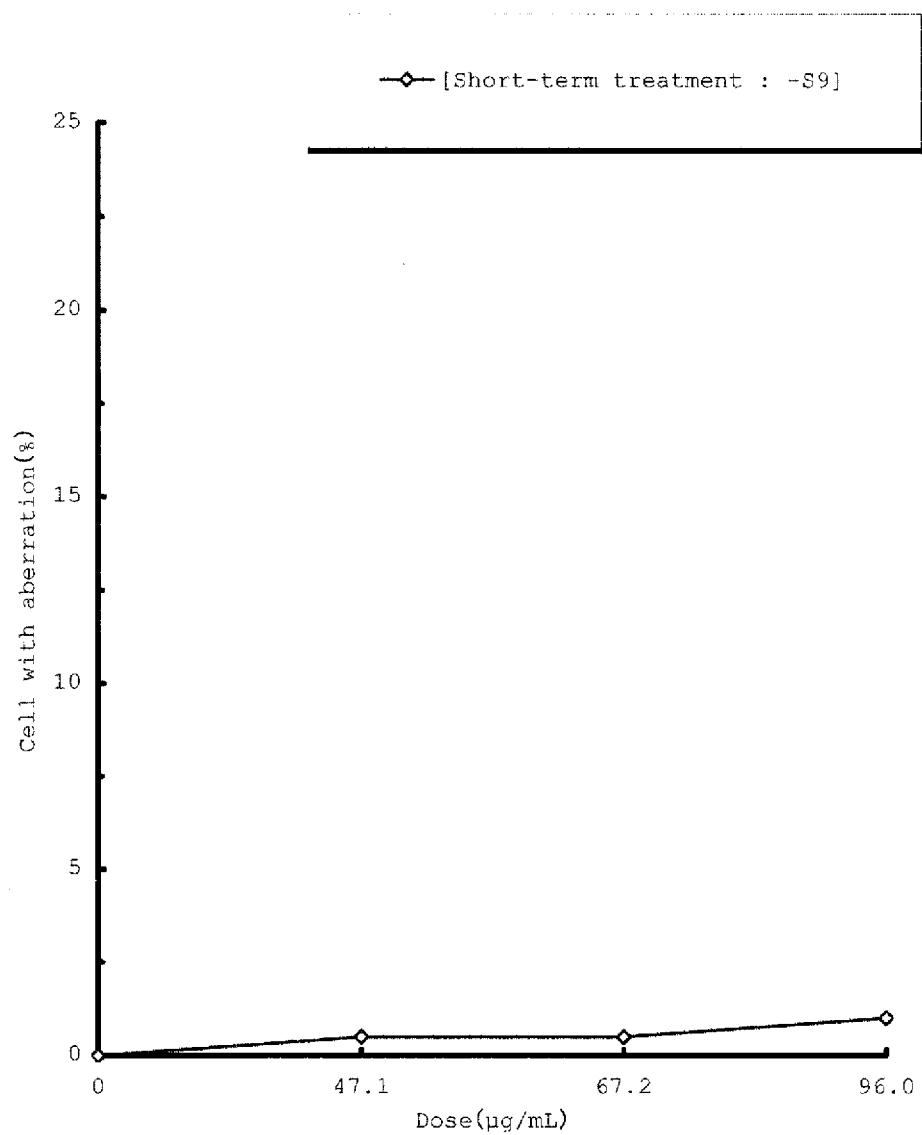


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by
nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate
[Short-term treatment:-S9]

Exp. No. 7823 (115-188)

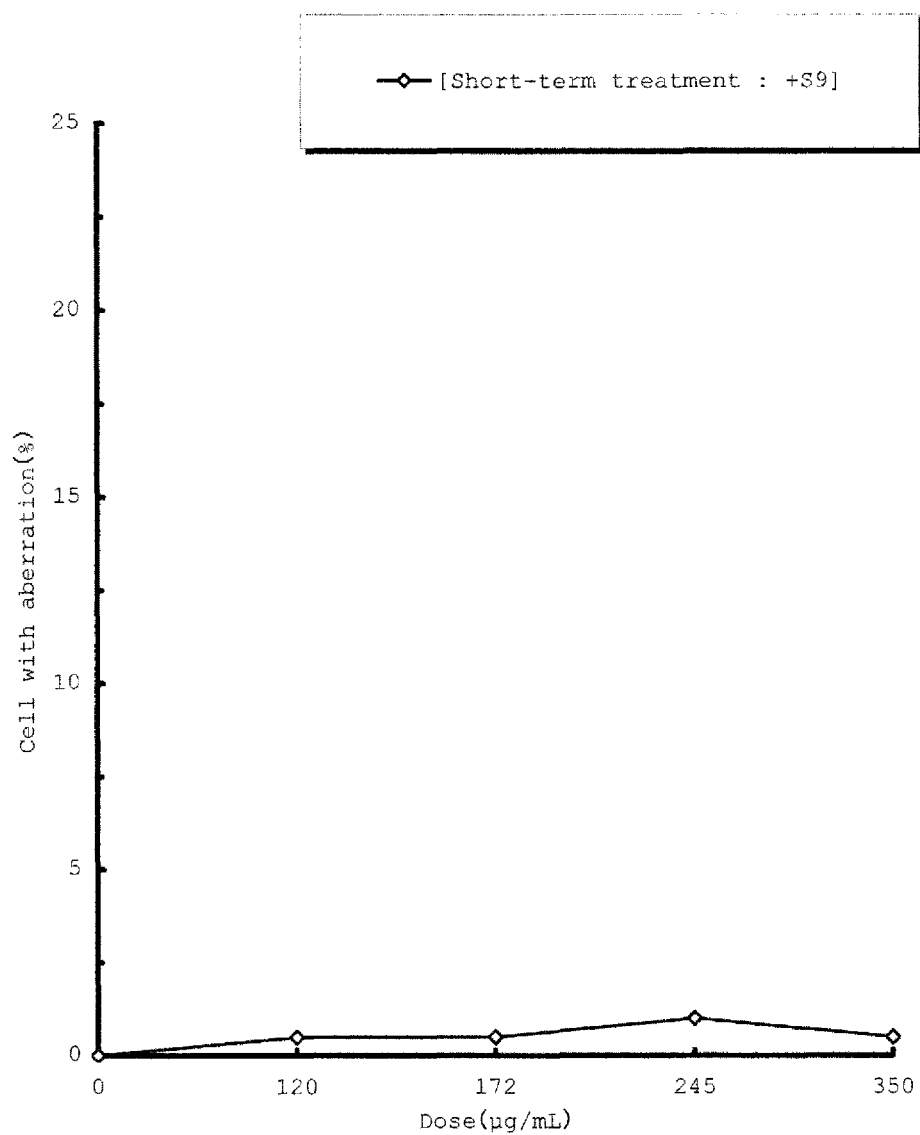


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Short-term treatment: +S9]

Exp. No. 7823 (115-188)

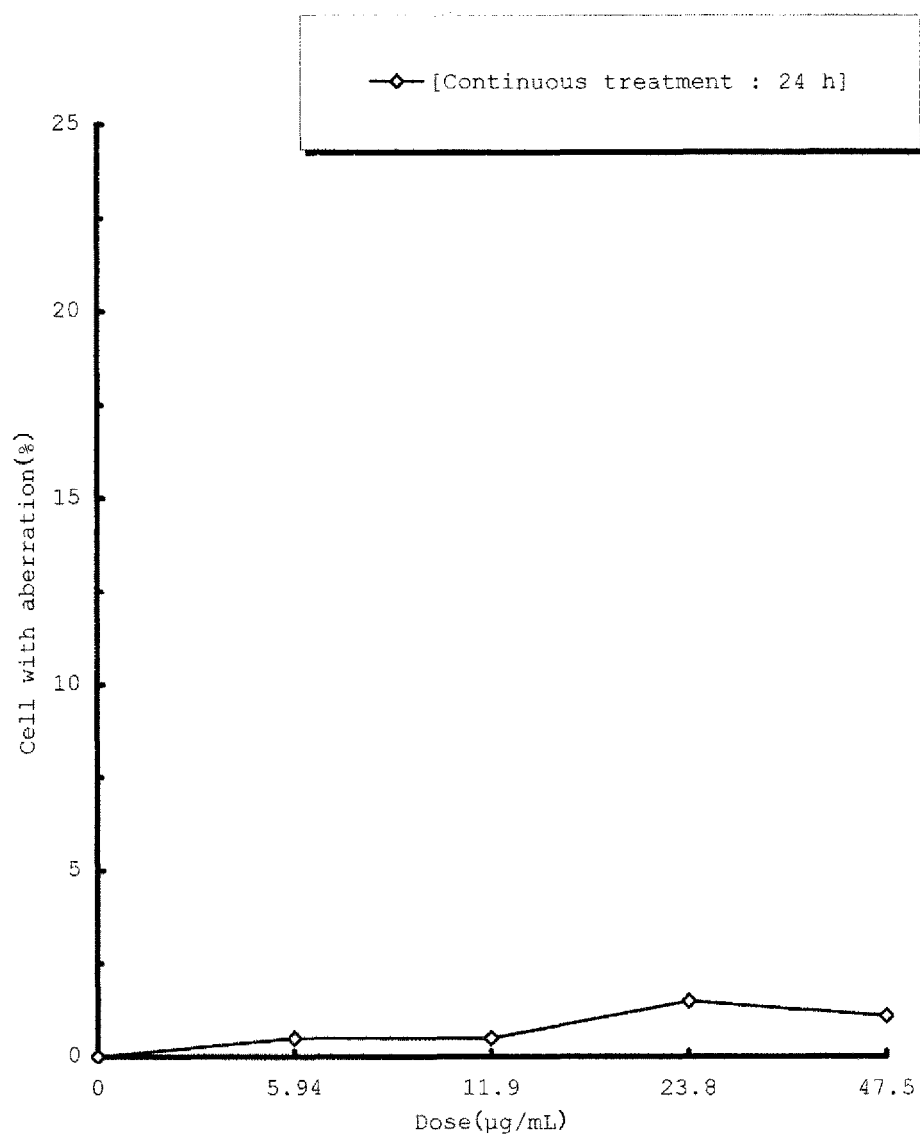


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate [Continuous treatment:24 h]

Table 1. Results of growth inhibition test of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate
[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]
Saline a)	0	100.0 100.0	[100.0]	Saline a)	0	100.0 100.0	[100.0]
nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate	5.94	101.9 101.4	[101.7]	nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate	5.94	101.1 98.6	[99.9]
	11.9	96.4 98.9	[97.7]		11.9	95.9 98.1	[97.0]
	23.8	94.2 99.8	[97.0]		23.8	100.5 99.0	[99.8]
	47.5	90.3 89.3	[89.8]		47.5	100.1 101.7	[100.9]
	95.0 d)	71.4 72.4	[71.9]		95.0 d)	95.0 91.8	[93.4]
	190 d)	59.0 50.8	[54.9]		190 d)	90.5 94.3	[92.4]
	380 d)	26.0 28.5	[27.3]		380 d)	77.8 85.4	[81.6]
	760 d)	15.7 12.2	[14.0]		760 d)	53.1 55.5	[54.3]
	1520 d)	10.8 12.1	[11.5]		1520 d)	55.8 60.9	[58.4]
	3040 d)	18.3 17.0	[17.7]		3040 d)	87.9 79.1	[83.5]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[Short-term treatment : -S9] ——— 215 (µg/mL)

[Short-term treatment : +S9] ——— 1495 (µg/mL)

a): Negative control

d): The remainder of the test substance was observed at the end of exposure period.

Table 2. Results of growth inhibition test of nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate
[Continuous treatment]

[Continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (µg/mL)	Relative cell growth(%)	[Mean]
Saline a)	0	100.0 100.0	[100.0]
nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate	5.94	101.1 101.2	[101.2]
	11.9	95.9 98.5	[97.2]
	23.8	90.1 88.7	[89.4]
	47.5	71.1 70.1	[70.6]
	95.0 d)	45.7 49.1	[47.4]
	190 d)	33.7 31.0	[32.4]
	380 d)	28.8 24.1	[26.5]
	760 d)	23.4 22.5	[23.0]
	1520 d)	29.0 36.1	[32.6]
	3040 d)	40.6 36.9	[38.8]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[Continuous treatment : 24 h] — 114 (µg/mL)

a): Negative control

d): The remainder of the test substance was observed at the end of exposure period.

Table 3. Chromosome aberration test in CHL cells treated with nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate
[Short-term treatment : -S9]

Compound	Dose (µg/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			
Saline a)	0	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	1 (0.5)
nickel(II)car- bonate hydroxide tetrahydrate	47.1	6	70.9	200	2	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	67.2	6	61.0	200	1	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	2 (1.0)
	96.0 d)	6	45.6	200	2	2	0	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	137 d)	6	27.1	Toxic									
MMC b)	0.1	6	71.8	200	5	18	46	0	0	0	59 (29.5) *	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

b): Positive control (Mitomycin C)

d): The remainder of the test substance was observed at the end of exposure period.

Table 4. Chromosome aberration test in CHL cells treated with nickel(II)carbonate hydroxide tetrahydrate
[Short-term treatment : +S9]

Compound	Dose (µg/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			
Saline a)	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0) #
nickel(II)car- bonate hydroxide tetrahydrate	120 d)	6	101.5	200	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	172 d)	6	94.8	200	1	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	0 (0.0)
	245 d)	6	69.4	200	2	1	1	0	0	0	2 (1.0)	200	0 (0.0)
	350 d)	6	56.9	200	1	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	3 (1.5)
	500 d)	6	41.8	Toxic									
CP b)	12.5	6	98.3	200	3	7	54	0	0	0	59 (29.5) *	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): $p \leq 0.025$

#:Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test): $p \leq 0.025$

a): Negative control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

d): The remainder of the test substance was observed at the end of exposure period.

Table 5. Chromosome aberration test in CHL cells treated with nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate
[Continuous treatment : 24 h]

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			
Saline a)	0	24	100.0	200	2	0	0	0	0	0	0 (0.0)	200	0 (0.0)
nickel(II)car- bonate hydroxide tetrahydrate	5.94	24	79.7	200	0	0	1	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	11.9	24	83.7	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	200	1 (0.5)
	23.8	24	58.2	200	0	3	0	0	0	0	3 (1.5)	200	0 (0.0)
	47.5	24	37.8	183	1	0	2	0	0	0	2 (1.1) !	200	3 (1.5)
	95.0 d)	24	16.7	Toxic									
MMC b)	0.05	24	71.6	200	3	11	36	0	0	0	44 (22.0) *	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

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

!: This value was not used in the statistical analysis

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

d): The remainder of the test substance was observed at the end of exposure period.