

最 終 報 告 書

シクロドデカ-1,5,9-トリエンのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1270

株式会社 ボゾリサーチセンター

目 次

	頁
目 次	1
試験実施概要	5
要 約	8
緒 言	10
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び溶媒	11
1) 被験物質	11
2) 溶媒	11
2. 被験液の調製	12
1) 調製方法	12
2) 調製頻度	13
3) 安定性	13
3. 対照物質	13
1) 溶媒対照	13
2) 陽性対照	13
4. 使用細胞株	14
1) 細胞株	14
2) 細胞の選択理由	15
3) 培養条件	15
4) 細胞の性状検査	15
5. S9mix 及び培養液	15
1) S9 mix	15

	頁
2) 培養液	16
6. 試験方法	17
1) 識別方法	17
2) 用量の設定	18
3) 細胞増殖抑制試験	19
4) 染色体異常試験	20
5) 標本の観察	22
6) 染色体異常の分類	22
7) 判定基準	23
試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験	24
1) 短時間処理法	24
2) 連続処理法	24
2. 染色体異常試験	25
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	25
2) 染色体構造異常	25
3) 染色体数的異常	25
3. 再試験	25
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	26
2) 染色体構造異常	26
3) 染色体数的異常	26
考察	27
参考文献	29

Figures and Tables

Fig. 1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene [Short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene [Short-term treatment: -S9 mix]

Fig. 1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene [Continuous treatment: 24 hr]

Fig. 1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene [Continuous treatment: 48 hr]

Fig. 2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene [Short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 2-2 Results of the retest in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene [Retest: -S9 mix]

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene [Short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene [Short-term treatment: -S9 mix]

Table 1-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene [Continuous treatment: 24 hr]

Table 1-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese

hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene [Continuous treatment:
48 hr]

Table 2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese
hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene [Short-term treatment:
+S9 mix]

Table 2-2 Cell-growth ratio in the retest in cultured Chinese hamster cells treated with
1,5,9-Cyclododecatriene [Retest: -S9 mix]

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with
1,5,9-Cyclododecatriene [Short-term treatment: +S9 mix]

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with
1,5,9-Cyclododecatriene [Retest: -S9 mix]

試験実施概要

1. 試験計画書

試験番号 : M-1270

試験表題 : シクロドデカ-1,5,9-トリエンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2. 試験目的

: ほ乳類の培養細胞（CHL/TU 細胞株）を用いて、本被験物質の染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

3. 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

4. 試験受託者

: 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

5. 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

6. 被験物質

製造者 : Fluka

名称 : シクロドデカ-1,5,9-トリエン、1,5,9-Cyclododecatriene

受領日 : 2007年5月8日

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室 室温保存庫及び第1研究棟被験物質調製室

要 約

シクロドデカ-1,5,9-トリエン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・ハムスター培養細胞（CHL/IU）を用いて染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 1700 $\mu\text{g/mL}$ として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の代謝活性化では 53.1 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 106 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 106 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 106 $\mu\text{g/mL}$ で 50% を超える細胞増殖抑制が認められ、被験物質の 50% 細胞増殖抑制濃度（概略値）は短時間処理法の代謝活性化では 29.3 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 77.3 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 65.8 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 63.5 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。これより、染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化では 53.1 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下公比 1.4 で希釈した各 5 試験用量を、非代謝活性化及び連続処理法の 24 時間処理と 48 時間処理では 106 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下公比 1.2 で希釈した各 5 試験用量を設定した。

染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化では、53.1、37.9、27.1、19.4 及び 13.8 $\mu\text{g/mL}$ の染色体構造異常の指標であるギャップを含まない総異常細胞の出現頻度（TA 値）は、それぞれ 45.0、67.0、30.5、2.5 及び 2.5% を示し、53.1、37.9、27.1 $\mu\text{g/mL}$ において、陽性の判定基準である 10% 以上を示したため陽性と判定した。短時間処理法の非代謝活性化では、最高用量においても細胞増殖抑制が認められず、準拠するガイドラインにおいて求められている 50% 以上の細胞増殖抑制を示す用量での染色体観察が出来ないと判断されたため、再試験を実施し、染色体標本の観察は実施しなかった。

染色体異常試験の短時間処理法・非代謝活性化・再試験の結果、最高用量の 96.7 $\mu\text{g/mL}$ においては、規定の細胞数を観察出来なかったものの、陰性の判定基準内にある染色体構造異常頻度が認められた。又、74.4、57.2 及び 44.0 $\mu\text{g/mL}$ の染色体構造異常の指標であるギャップを含まない総異常細胞の出現頻度（TA 値）は、それぞれ 1.0、0 及び 0% を示し、陰性の判定基準である 5% 未満を示したため陰性と判定した。

なお、染色体数異常（倍数体）については、短時間処理法の代謝活性化において、用量を狭い公比(1.4)で設定したにもかかわらず、1 用量のみで倍数体の出現率が疑陽性を示し、その前後の用量では出現率は陰性の判定基準にあったものの、僅かな増加が認められ、用量依存性も認められたことから疑陽性と判定し、誘発性は弱いと判断されたことから確認試験は実施しなかった。染色体異常試験の短時間処理法・非代謝活性化・再試験においては、倍数体の出現

率は陰性の判定基準である 5%未満を示したため、陰性と判定した。一方、陽性対照群では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。又、溶媒対照群における染色体の構造異常及び倍数体の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、更に試験施設の背景値と同様であった。したがって試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、シクロドデカ-1,5,9-トリエンは、本試験条件下において染色体構造異常誘発能と、弱い染色体数的（倍数体）誘発能を有するものと判定した。

結 言

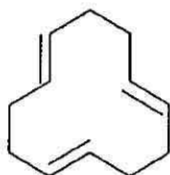
厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、シクロドデカ-1,5,9-トリエンの安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/TU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び溶媒

1) 被験物質

製造者 :
 名称 : シクロドデカ-1,5,9-トリエン、1,5,9-Cyclododecatriene
 CAS番号 : 4904-61-4
 構造式又は示性式 :



純度 : 94.7% (異性体合算値)
 入手量 : 20 g
 不純物 : 情報なし
 性状 : 無色澄明液体
 分子量 : 162.27
 ロット番号 :
 安定性 : 試験終了後に和光純薬工業㈱において特性を測定し、その結果を入手して安定性を確認した。
 保存方法 : 室温 (保存期間中の実測温度 : 15~25℃)、遮光
 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
 残余物の取り扱い : 被験物質の残余物は、関連する試験がすべて終了した後に、廃棄する。

2) 溶媒

名称 : アセトン
 ロット番号 : DPG0641
 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 : 試験開始前に溶媒に対する溶解性の検討を実施した結果、170 mg/mL の濃度で DMSO に不溶であったが、アセトンに溶解したため、アセトンを溶媒に用いた。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.3400 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 170 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1700 µg/mL）を調製した。次いで、170 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、85.0、42.5、21.3、10.6、5.31、2.66 及び 1.33 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

短時間処理法では、被験物質 0.3400 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 170 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1700 µg/mL）を調製した。次いで、170 mg/mL 溶液を公比 16（被験液 0.5 mL：溶媒 7.5 mL）で希釈し、10.6 mg/mL の被験液を調製した。更に 10.6 mg/mL 被験液を公比 1.2（各濃度の被験液 3 mL：溶媒 0.6 mL）で順次 4 段階希釈し 8.85、7.38、6.15 及び 5.12 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製し、非代謝活性化には 10.6 から 5.12 mg/mL の被験液を使用した。又、10.6 mg/mL 被験液を公比 2（被験液 3 mL：溶媒 3 mL）で希釈し、5.31 mg/mL の被験液を調製した。更に 5.31 mg/mL 被験液を公比 1.4（各濃度の被験液 2 mL：溶媒 0.8 mL）で順次 4 段階希釈し 3.79、2.71、1.94 及び 1.38 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製し、代謝活性化には 5.31 から 1.38 mg/mL の被験液を使用した。

(3) 再試験

染色体異常試験の短時間処理法・非代謝活性化・再試験では、被験物質 0.3400 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 170 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1700 µg/mL）を調製し

た。次いで、170 mg/mL 溶液を公比 8 (被験液 1.0 mL : 溶媒 7.0 mL) で希釈し、21.3 mg/mL の被験液を調製した。更に 21.3 mg/mL 被験液を公比 1.3 (各濃度の被験液 3 mL : 溶媒 0.9 mL) で順次 7 段階希釈し 16.35、12.57、9.67、7.44、5.72、4.40 及び 3.39 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製し、21.3 から 3.39 mg/mL の被験液を使用した。

2) 調製頻度

使用時に調製した。

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、被験液が安定性であることを確認した。

3. 対照物質

1) 溶媒対照

溶媒として用いるアセトンを経済対照物質とした。

2) 陽性対照

- (1) 陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化ではマイトマイシンCを用いた。

名 称 : シクロフォスファミド (以下 CP と略記する)

ロット番号 : SDP4062

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

名 称 : マイトマイシン C (以下 MMC と略記する)

ロット番号 : 485AFC

製造元 : 協和醗酵工業株式会社

力 価 : 2mg (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

(2) 調製方法

染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化では、CP 0.0140 gを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、7B91N) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度: 14 μ g/mL) を調製した。染色体異常試験の短時間処理法の非代謝活性化では、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、7B91N) 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 μ g/mL)。

再試験 (染色体異常試験・短時間処理法・非代謝活性化) では、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、K7B93) 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 μ g/mL)。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

(3) 陽性対照物質の選択理由

前記の毒性試験法ガイドライン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。

4. 使用細胞株

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入手 (2004 年 11 月 2 日) し、継代数の少ないものを培地にジメチルスルホキシド (DMSO : 試薬特級 99.0%以上、和光純薬工業株式会社) を 10vol% 添加した液体窒素中で保存し、これを融解し継代培養したものを使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 19 継代、染色体異常試験では短時間処理法で 23 継代、再試験で 5 継代であった。又、元株細胞はマイコプラズマ陰性であることを入手時の情報で確認した。

2) 細胞の選択理由

自然発生染色体異常の発現率が低いこと、更に種々の化学物質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。

3) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂濃度 5%、温度 37℃、高湿度条件下で培養した。継代は 1～4 日ごとに行った。

4) 細胞の性状検査

試験に使用する細胞は、凍結保存から解凍し、染色体のモード数、倍加時間及びマイコプラズマ汚染の有無等について 2007 年 5 月 14 日～2007 年 5 月 31 日に定期検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。細胞は、30 継代を越えない範囲で試験に供した。

5. S9 mix 及び培養液

1) S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社より購入した S9 と、自家調製を行ったコファクターを用時に混合して S9 mix を調製した。本試験に用いた S9 の製品分析書に示された情報、保存条件及び使用期限とコファクターの保存条件、使用期限及び S9 mix の組成は以下の通りである。

(1) S9

名 称	: S9
ロット番号	: 07021612
製 造 日	: 2007 年 2 月 16 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 : 2007 年 8 月 15 日 (製造後 6 箇月)
 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
 ロット番号 : 070405
 製 造 日 : 2007 年 4 月 5 日
 保存方法 : 冷凍 (超低温フリーザー)
 使用期限 : 2007 年 10 月 4 日 (製造後 6 箇月)
 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	20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mmol/L グルコース・6・リン酸水溶液	0.67 mL
		40mmol/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

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と同様になるように各成分の必要量を秤取し、精製水に溶解、pH 調整、ろ過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

2) 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No.11095-080) に、Invitrogen Corporation より購入し非働化 (56°C, 30 分) した牛血清 (BS) を 10 vol% 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： 571834

製造元： Invitrogen Corporation

保存方法： 冷凍（-80℃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： 1403807

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

6. 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。染色体異常試験の短時間処理法で陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

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 ^{注)}
		非代謝活性化・再試験

注) 染色体異常試験の短時間処理法の非代謝活性化では、最高用量においても細胞増殖抑制が認められず、準拠するガイドラインにおいて求められている 50%以上の細胞増殖抑制を示す用量での染色体観察が出来ないと判断されたため、染色体異常試験の短時間処理法・非代謝活性化・再試験を実施することとし、染色体標本の観察は実施しなかった。

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。更にこれに続けて非処理群 (Non Treatment) の場合は「NT」、溶媒対照 (Solvent Control) の場合は「SC」を、被

験物質用量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、短時間処理法の非代謝活性化・再試験では「-」とした。又、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。

2) 用量の設定

(1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 1700 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 850、425、213、106、53.1、26.6 及び 13.3 $\mu\text{g/mL}$ の計 8 用量を設定した。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は、短時間処理法の代謝活性化では 53.1 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 106 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 106 $\mu\text{g/mL}$ であった。又、50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、短時間処理法の代謝活性化では 29.3 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 77.3 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 65.8 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 63.5 $\mu\text{g/mL}$ であった。細胞増殖抑制試験の結果、本被験物質は非常に狭い用量範囲で細胞増殖抑制作用が急激な変化を示したことから、連続処理法においても同様な変動 (fluctuation) が生ずる可能性があり、遺伝毒性試験ガイドラインに定められた、50%以上の細胞増殖抑制を示す用量での染色体観察が出来ない可能性が想定された。そこで、遺伝毒性試験ガイドラインに従い、50%以上の細胞増殖抑制を示す用量での染色体観察を可能にするために、短時間処理法の非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では、明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量である 106 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下、公比を 1.2 に狭めた総計 5 用量を設定し、短時間処理法の代謝活性化では、明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量である 53.1 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下、公比を 1.4 に狭めた総計 5 用量を設定した。又、いずれの場合もこれに非処理群、溶媒対照群及び陽性対照群を設けた。

染色体異常試験の短時間処理法を実施した結果、非代謝活性化においては、細胞増

増殖抑制試験で明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められた用量である 106 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量に設定したにもかかわらず、細胞増殖抑制が殆ど認められなかった。そのため、準拠するガイドラインにおいて求められている 50%以上の細胞増殖抑制を示す用量での染色体観察が出来ないと判断された。そこで、非代謝活性化について、より高い用量を設定して再試験を実施することとし、213 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下、公比を 1.3 で希釈した総計 8 用量を設定した。又、これに非処理群、溶媒対照群及び陽性対照群を設けた。

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に予備試験として実施した。

(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非処理群、溶媒対照群及び被験物質用量群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- 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、代謝活性化においては、非処理群では培養液 0.833 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL を加えた。溶媒対照群及び被験物質用量群では培養液 0.833 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化においては、非処理群では処理を行わなかった。溶媒対照群及び被験物質用量群では培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色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、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計（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、溶媒対照の値を 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。

(2) 連続処理法

- ① 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに非処理群、溶媒対照群及び被験物質用量群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- 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 日後に非処理群では処理を行わず、溶媒対照群及び被験物質処理群では培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色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、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。

4) 染色体異常試験

(1) 短時間処理法

- ① 代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれに非処理群、溶媒対照群、被験物質用量群及び陽性対照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- 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、代謝活性化においては、非処理群では培養液 0.833 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL を加えた。溶媒対照群及び被験物質用量群では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。非代謝活性化においては、非処理群では処理を行わなかった。溶媒対照群及び被験物質用量群では培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色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 各群 2 枚のプレートについて、染色体観察用標本作製のため、培養終了約 2 時間前にコルセミド（ジメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL

加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液 (Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.) で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 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作製した。

- ⑤ 残る各群 2 枚のプレートは、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作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

(2) 短時間処理法・非代謝活性化・再試験

- ① 非処理群、溶媒対照群、被験物質用量群及び陽性対照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート (直径 60 mm) を用いた。
- 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、非代謝活性化においては、非処理群では処理を行わず、溶媒対照群及び被験物質用量群では培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加える。陽性対照群では培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL (最終濃度：0.075 $\mu\text{g/mL}$) を加える。いずれの場合も、その後 6 時間培養する。
- ③ 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色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 各群 2 枚のプレートについて、染色体観察用標本作製のため、培養終了約 2 時間前にコルセミド (ジメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社) を 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液 (Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.) で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 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作製した。
- ⑤ 残る各群 2 枚のプレートは、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作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

(2) 連続処理法

短時間処理法で陽性が確定したため、連続処理法は実施しなかった。

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。又、染色体異常試験の短時間処理法の非代謝活性化では、最高用量においても細胞増殖抑制が認められず、準拠するガイドラインにおいて求められている 50% 以上の細胞増殖抑制を示す用量での染色体観察が出来ないと判断されたため、標本観察は実施しなかった。更に、短時間処理法の非代謝活性化・再試験の被験物質用量群については、標本のコード化が終了した後に、コード化担当者が 50% 以上の細胞増殖抑制を示す用量で、染色体観察が出来ると判断した用量を最高用量として、低用量域に計 4 用量を観察対象標本として選択した後に、観察者が盲検法によって標本観察を行った。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とする。

6) 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数値異常に大別し、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（非染色部分が染色分体の同軸上にある）ものであって、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と定義した。
- 染色分体型切断(ctb) : 切断とは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と定義した。
- 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つ

てもその長さが染色分体の幅以上に離れているものを
染色体型切断と定義した。

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) 他。

(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。

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

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。

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

染色体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。

試験結果

1. 細胞増殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化では 53.1 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 106 $\mu\text{g/mL}$ で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は短時間処理法の代謝活性化では 29.3 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 77.3 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

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すると、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 13.3 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の形態変化が認められ、非代謝活性化の 850 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では細胞の剥離・死滅が認められたため TOX と判定した。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに色調変化は認められなかった。肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに析出は認められなかった。

2) 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 1-3 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4 及び Table 1-4 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理及び 48 時間処理ともに 106 $\mu\text{g/mL}$ で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 24 時間処理では 65.8 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 63.5 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

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すると、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 26.6 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の形態変化が認められ、106 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では細胞の剥離・死滅が認められ TOX と判定した。肉眼による培養液の色調の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに色調変化は認められなかった。肉眼による被験物質の析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに析出は認められなかった。

2. 染色体異常試験

短時間処理法の代謝活性化の結果を Fig. 2-1、Table 2-1 及び 3-1 に示した。なお、非代謝活性化では、最高用量においても細胞増殖抑制が認められず、準拠するガイドラインにおいて求められている 50%以上の細胞増殖抑制を示す用量での染色体観察が出来ないと判断されたため、染色体異常試験の短時間処理法・非代謝活性化・再試験を実施することとし、染色体標本の観察は実施しなかったため、被験物質処理終了時の培養細胞の観察の結果は採用しないこととした。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

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すると、代謝活性化では 13.8 µg/mL 以上の濃度で細胞の形態変化が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化では色調変化は認められなかった。又、肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化では析出は認められなかった。

2) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化では、53.1 µg/mL で 45.0%、37.9 µg/mL で 67.0%、27.1 µg/mL で 30.5%と陽性の判定基準である 10%以上を、19.4 µg/mL で 2.5%及び 13.8 µg/mL で 2.5%と陰性の判定基準である 5%未満を示した。なお、53.1 µg/mL では TA 値に downturn が認められたため、D20 値の算出には採用しなかった。

各処理法ともに溶媒及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性及び陽性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) よりわずかに低い値も陽性対照群で認められたが、ほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

3) 染色体数的異常

倍数体の出現率は、代謝活性化では、53.1 µg/mL で 0.5%、37.9 µg/mL で 0%、27.1 µg/mL で 1.5%及び 13.8 µg/mL で 2.5%と陰性の判定基準である 5%未満を、19.4 µg/mL で 8.0%と疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示した。

各処理法ともに溶媒対照群における倍数体の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

3. 再試験

短時間処理法の非代謝活性化・再試験の結果を Fig. 2-2、Table 2-2 及び 3-2 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

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すると、74.4 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の形態変化が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、色調変化は認められなかった。又、肉眼による被験物質の析出の観察では、析出は認められなかった。

2) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現率 (TA) は、96.7 $\mu\text{g/mL}$ で規定数の細胞が観察されず unreliable (UR) と判定された。又 74.4 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、57.2 $\mu\text{g/mL}$ で 0% 及び 44 $\mu\text{g/mL}$ で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。

溶媒及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は、各々陰性及び陽性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) よりわずかに低い値も陽性対照群で認められたが、ほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

3) 染色体数的異常

倍数体の出現率は、96.7 $\mu\text{g/mL}$ で規定数の細胞が観察されず UR と判定された。又 74.4 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、57.2 で 1.0% 及び 44.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

溶媒対照群における倍数体の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

考 察

染色体異常試験の短時間処理法の結果、代謝活性化では、最高用量以下の3用量において染色体構造異常の総出現率(TA)が、陽性の判定基準を超える高い値を示した。用量依存性については、最高用量でTAのdownturnが認められたものの、以下の2用量では用量の増加に伴うTAの増加が認められたことから、陽性と判定した。染色体異常誘発性の強さの指標値については、観察細胞の20%に何らかの異常が見られる用量であるD20値¹⁾は0.024 mg/mL、単用量あたりの染色分体交換(cte)を持つ細胞の出現頻度の比較値であるTR値²⁾は1400であった。又、染色体数的異常(倍数体)の出現率は、中間の1用量(19.4 µg/mL)で疑陽性の判定基準にある値を示した。染色体異常試験の短時間処理法の非代謝活性化・再試験では、染色体構造異常の総出現率(TA)及び染色体数的異常(倍数体)出現率ともに陰性の判定基準にあり、陰性と判定した。総合的には、染色体構造異常については、短時間処理法の代謝活性化において、染色体構造異常の総出現率(TA)が用量依存性を伴って陽性の判定基準を超えたため、陽性と判定した。染色体数的異常(倍数体)については、短時間処理法の代謝活性化において、1用量のみで倍数体の出現率が疑陽性を示し、その前後の用量では出現率は陰性の判定基準にあるものの、僅かな増加と用量依存性が認められた。本被験物質は、細胞増殖抑制試験の結果、非常に狭い用量範囲で細胞増殖抑制作用が急激な変化を示した。このような化合物では、実験間で結果に変動(fluctuation)が生じ、正確な再現性を得ることが難しい場合が多い。事実、染色体異常試験の短時間処理の代謝活性化では、用量を公比1.4に狭めて設定したが、高用量域での細胞増殖抑制作用が再現しなかった。同様に短時間処理法の非代謝活性化においても、細胞増殖抑制試験と染色体異常試験で、細胞増殖抑制作用の再現性が乏しく、再試験の実施を余儀なくされた。したがって、本被験物質の染色体数的異常(倍数体)誘発性については、出現頻度が疑陽性の範囲内で高くないことから、fluctuationによって再現性を正確に確認することは難しいと判断し、確認試験は実施せず、本試験結果のみから疑陽性と判定した。

なお、1,5,9-Cyclododecatriene (CAS Registry No.4904-61-4)は、細菌を用いる復帰突然変異試験⁶⁾、ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験⁷⁾及びラットを用いる小核試験⁸⁾においては陰性と報告されている。これらの試験に用いられた1,5,9-Cyclododecatrieneは、いずれも純度100%と記載されている。これに対して本試験に用いた被験物質は同一CAS No.であるが、異性体合算値で純度94.7%であり、ガスクロマトグラフによる各異性体のピーク比は実験開始前で55.241:33.136:6.336、実験終了後で54.923:32.168:6.123であった。したがって、特定の異

性体や不純物が本試験において認められた clastogenicity の原因である可能性は否定出来ないと考えられる。

溶媒対照群における染色体構造異常を有する細胞及び倍数性細胞の出現頻度は、いずれの処理法においても5%未満であった。又、短時間処理法の代謝活性化では、CPによって、短時間処理法の非代謝活性化・再試験ではMMCによって処理された陽性対照群の細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。更に、2枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、シクロドデカ-1,5,9-トリエンは、本試験条件下において染色体構造異常誘発能と、弱い染色体数的（倍数体）誘発能を有するものと判定した。

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, *Mutation Res.*, 48, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation 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) DuPont Co. (1996): Unpublished Data, Haskell Laboratory Report No.585-96.
- 7) DuPont Co. (1996): Unpublished Data, Haskell Laboratory Report No.1997-00115.
- 8) DuPont Co. (1996): Unpublished Data, Haskell Laboratory Report No.1028-96.

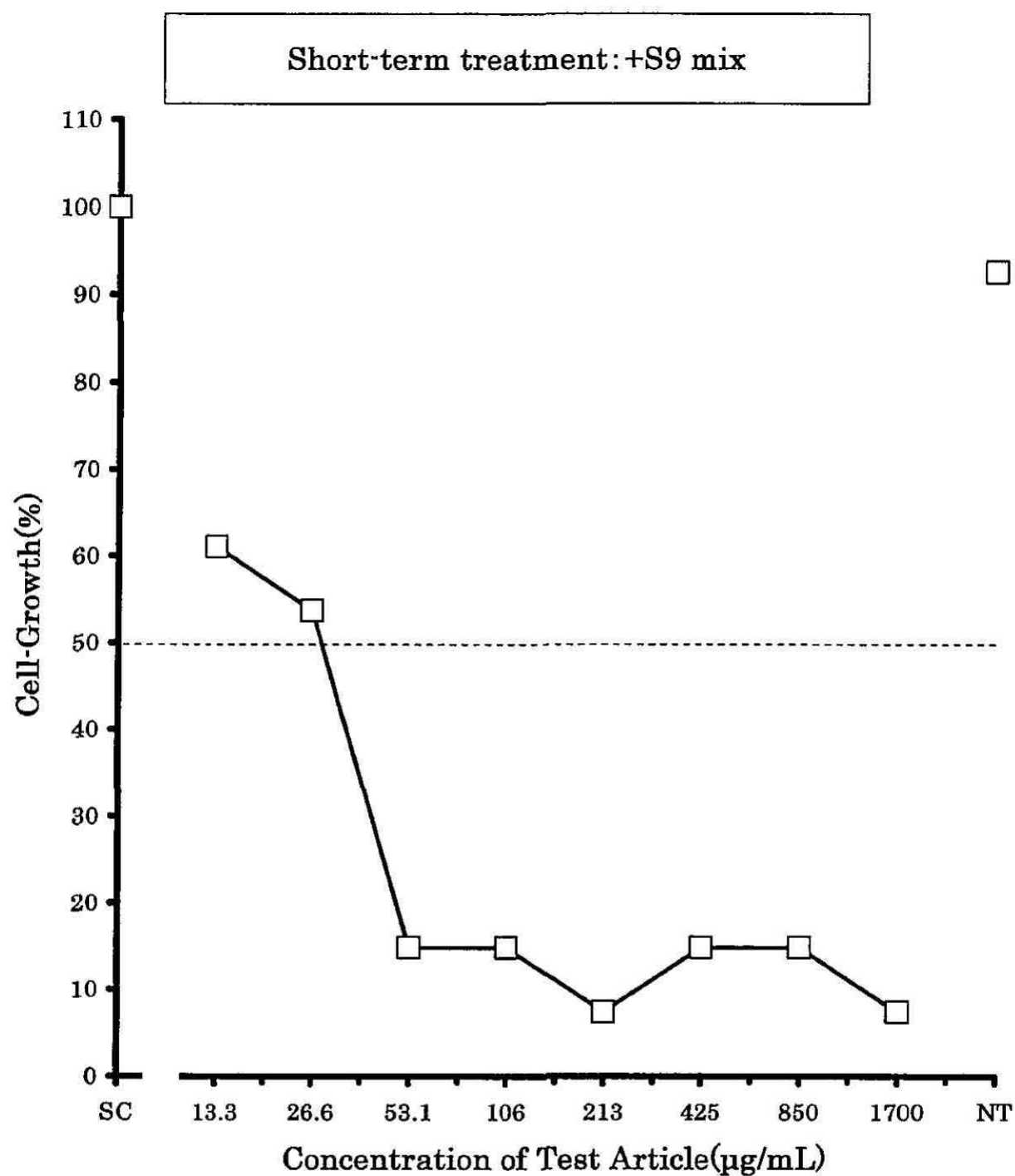


Fig.1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene

SC: Solvent control

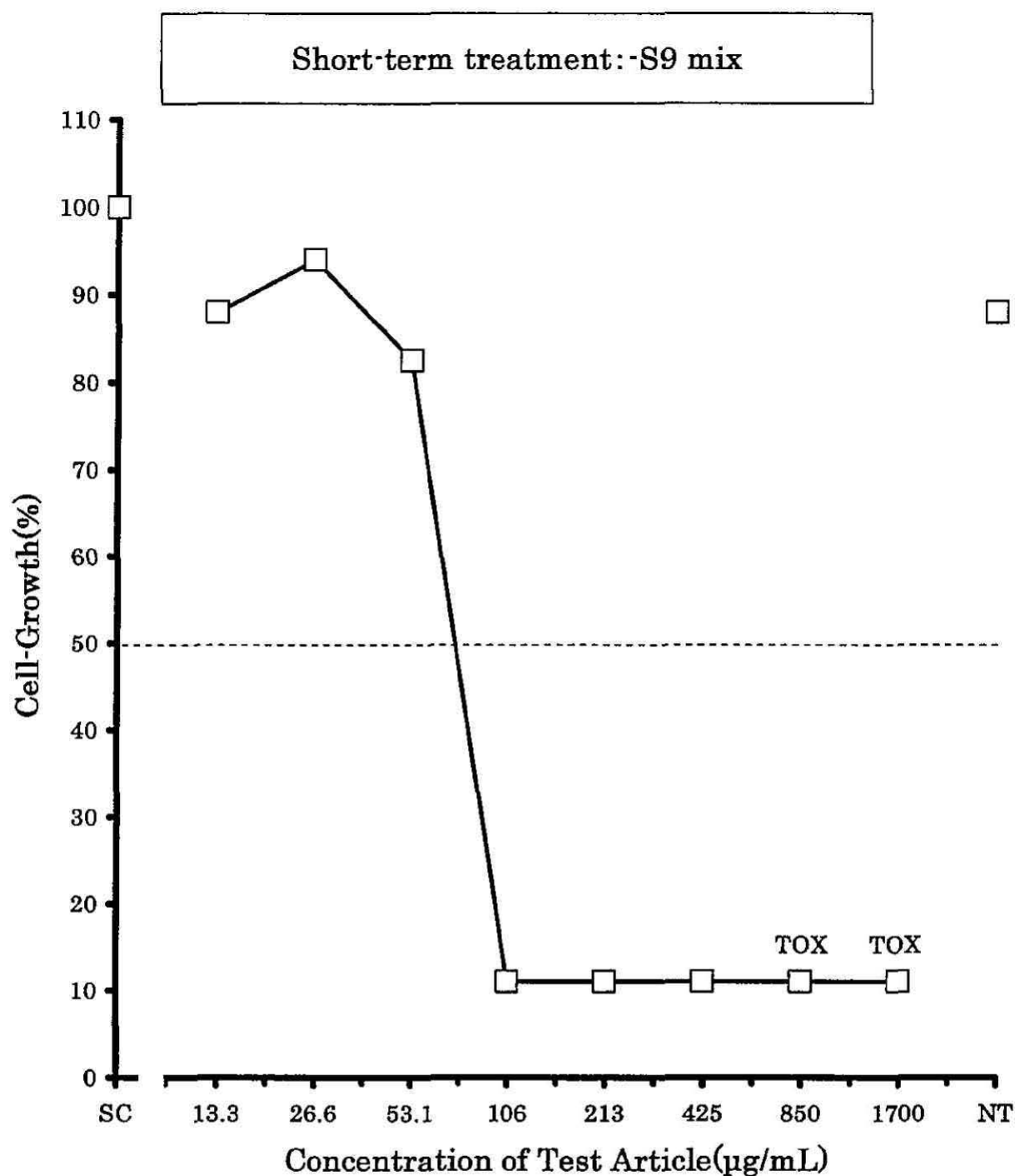


Fig.1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene

SC: Solvent control

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

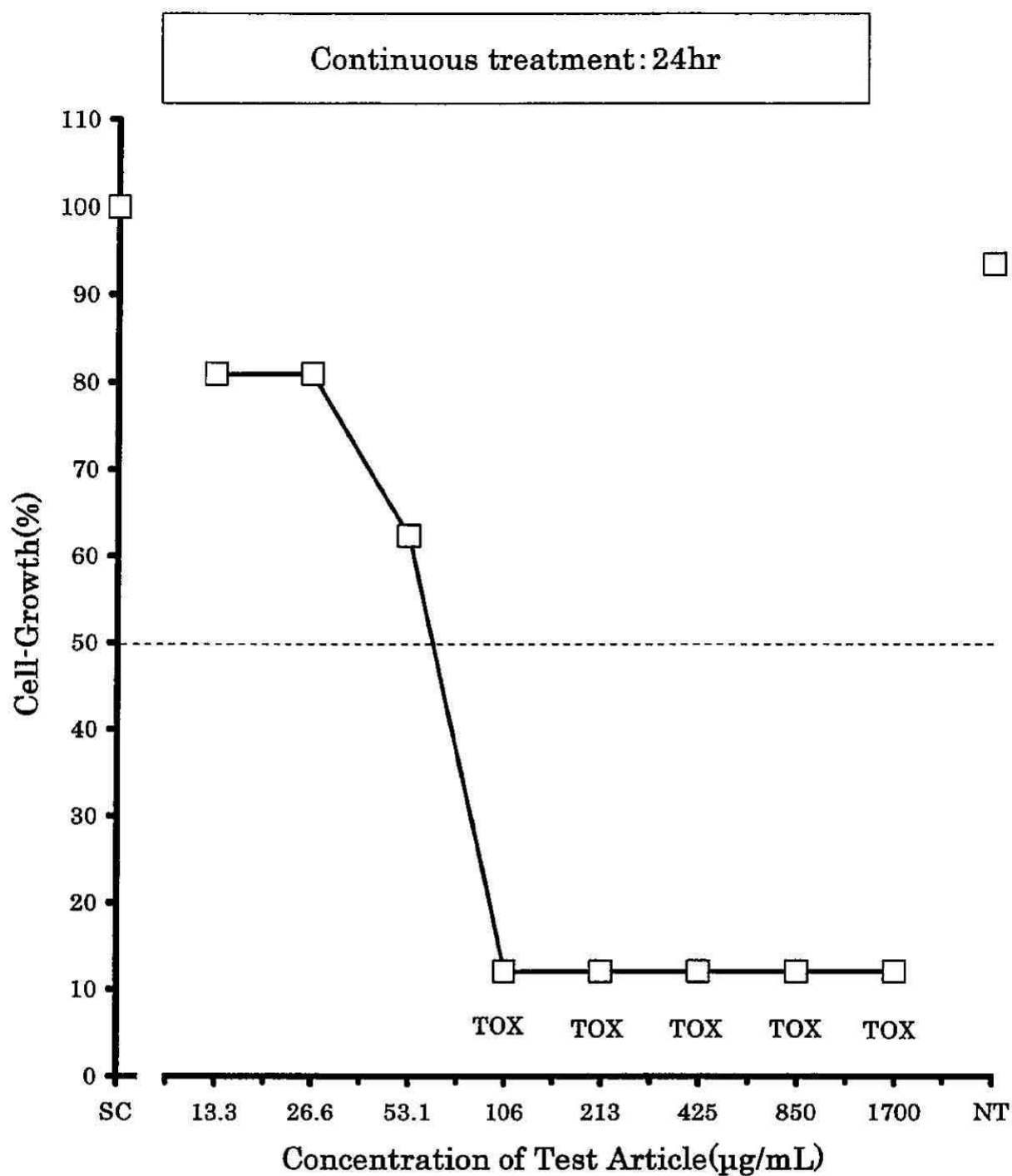


Fig.1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene

SC: Solvent control

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

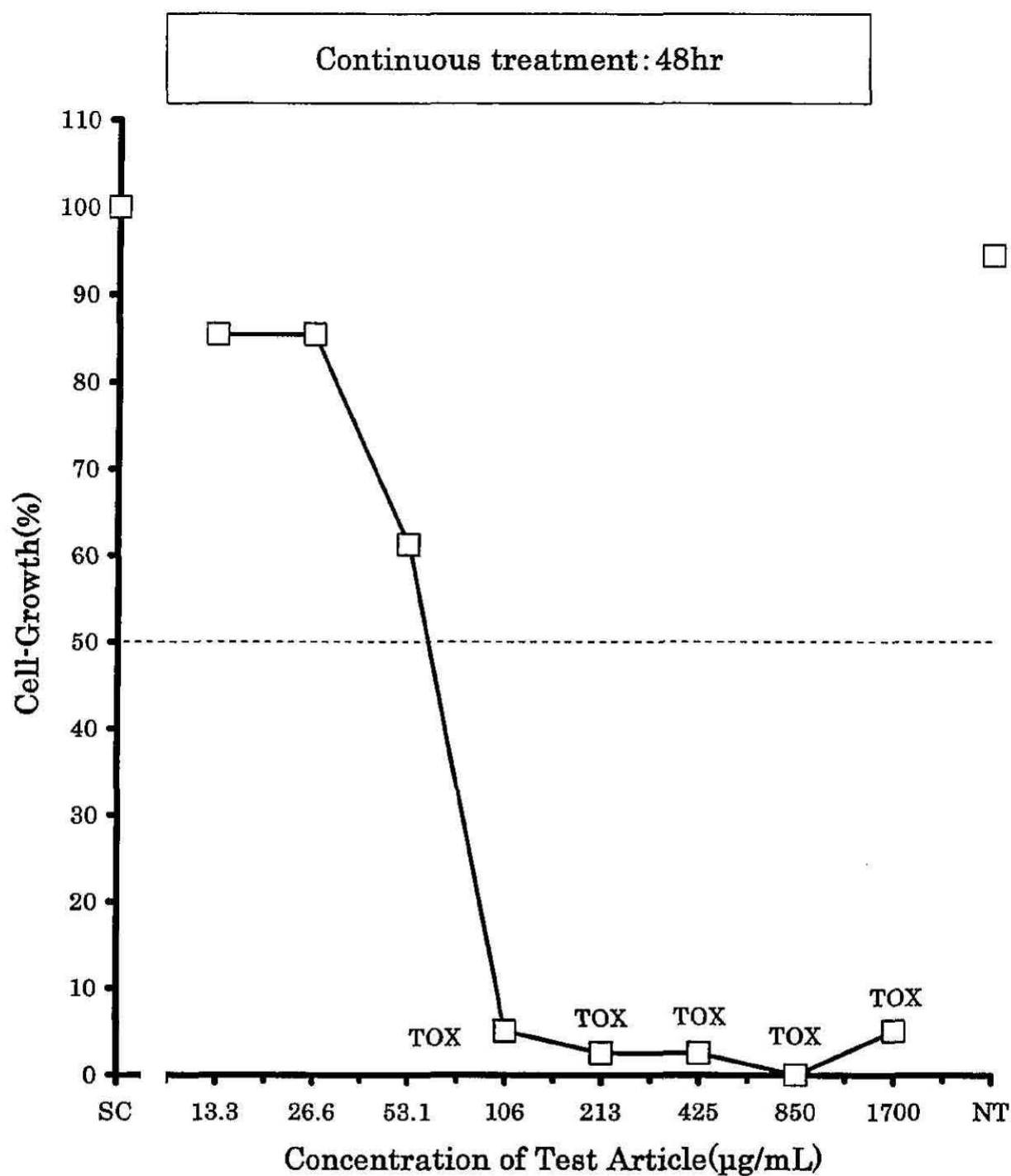


Fig.1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene

SC: Solvent control

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

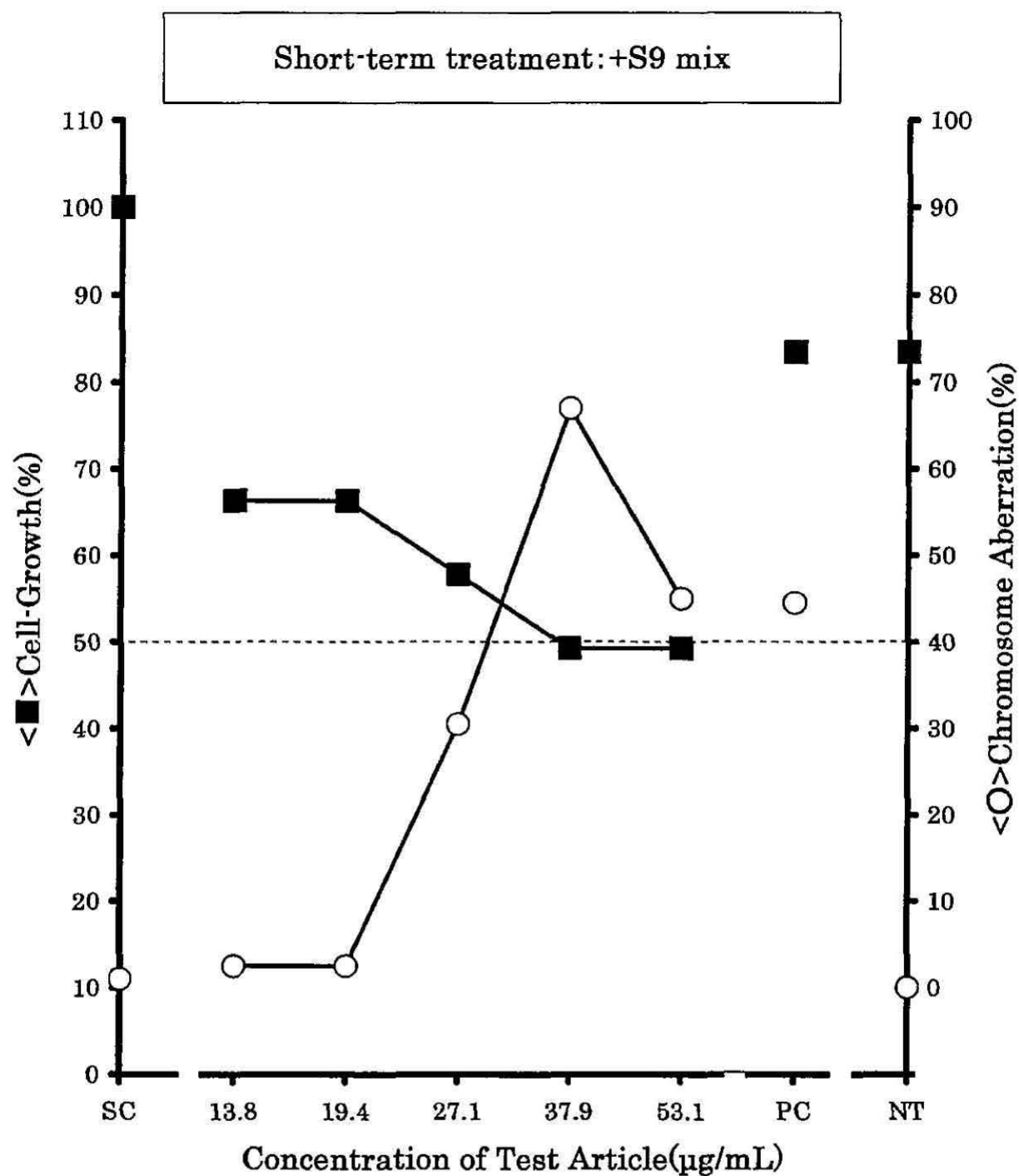


Fig.2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene

SC: Solvent control

PC: Positive control

NT: Non treatment

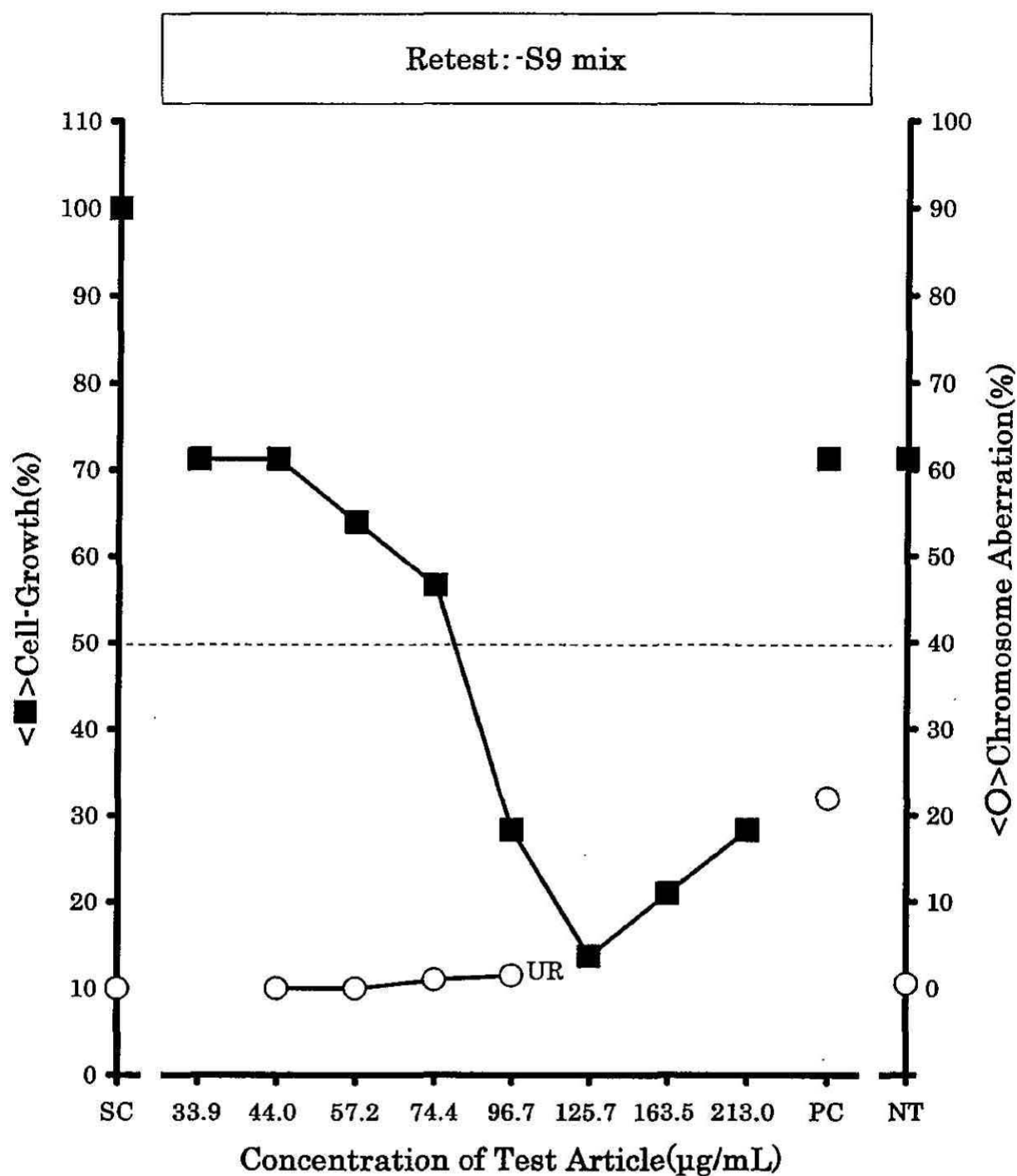


Fig.2-2 Results of the retest in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene

SC: Solvent control PC: Positive control NT: Non treatment

UR: This value was judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene
[Short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate No. 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{d)}
+	6·18	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			116		—	—	—
		13.3	66	61	+	—	—
			66		+	—	—
		26.6	50	54	++	—	—
			66		++	—	—
		53.1	16	15	+++	—	—
			16		+++	—	—
		106	16	15	+++	—	—
			16		+++	—	—
		213	0	7	+++	—	—
			16		+++	—	—
		425	16	15	+++	—	—
			16		+++	—	—
		850	16	15	+++	—	—
			16		+++	—	—
		1700	16	7	+++	—	—
			0		+++	—	—
		NT	100	93	—	—	—
			100		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					29.3	µg/mL	

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the solvent control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

 + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

 ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

 +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene
[Short-term treatment: S9 mix]

Cell-growth inhibition test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate No. 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
—	6·18	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—	
			100		—	—	—	
		Test article	13.3	88	88	+	—	—
				88		+	—	—
			26.6	88	94	+	—	—
				100		+	—	—
			53.1	88	83	++	—	—
				77		++	—	—
			106	11	11	+++	—	—
				11		+++	—	—
			213	11	11	+++	—	—
				11		+++	—	—
			425	11	11	+++	—	—
				11		+++	—	—
			850	11	11	TOX	—	—
				11		TOX	—	—
			1700	11	11	TOX	—	—
				11		TOX	—	—
			NT	88	88	—	—	—
				88		—	—	—

Concentration of 50% cell-growth inhibition:				77.3	µg/mL
--	--	--	--	------	-------

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the solvent control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene
[Continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate No. 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{d)}
—	24	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		13.3	87	81	—	—	—
			74		—	—	—
		26.6	87	81	+	—	—
			74		+	—	—
		53.1	62	62	+	—	—
			62		+	—	—
		106	12	12	TOX	—	—
			12		TOX	—	—
		213	12	12	TOX	—	—
			12		TOX	—	—
		425	12	12	TOX	—	—
			12		TOX	—	—
		850	12	12	TOX	—	—
			12		TOX	—	—
		1700	12	12	TOX	—	—
			12		TOX	—	—
		NT	99	93	—	—	—
			87		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					65.8	µg/mL	

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the solvent control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene
[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate No. 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	48	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		13.3	88	85	—	—	—
			82		—	—	—
		26.6	88	85	+	—	—
			82		+	—	—
		53.1	58	61	++	—	—
			64		++	—	—
		106	5	5	TOX	—	—
			5		TOX	—	—
		213	0	3	TOX	—	—
			5		TOX	—	—
		425	0	3	TOX	—	—
			5		TOX	—	—
		850	0	0	TOX	—	—
			0		TOX	—	—
		1700	5	5	TOX	—	—
			5		TOX	—	—
		NT	94	94	—	—	—
			94		—	—	—

Concentration of 50% cell-growth inhibition: 63.5 µg/mL

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the solvent control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene
[Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test						
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}	
S9 mix	time (hr)		Plate No. 3 and 4	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
+	6-18	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—
			99		—	—
		Test article	66	66	++	—
			66		++	—
			66	66	++	—
			66		++	—
			49	58	++	—
			66		++	—
			49	49	+++	—
			49		+++	—
			49	49	+++	—
			49		+++	—
		PC	83	83	—	—
			83		—	—
		NT	83	83	—	—
			83		—	—

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

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

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the solvent control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates

Table 2-2 Cell-growth ratio in the retest in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene
[Retest: -S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate No. 3 and 4	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
-	6-18	0(SC)	100 ^{a)}	100	-	-	-
			133		-	-	-
		Test article	83	71	-	-	-
			83		-	-	-
			83	71	-	-	-
			83		-	-	-
			83	64	-	-	-
			66		-	-	-
			66	57	+	-	-
			66		+	-	-
			33	28	++	-	-
			33		++	-	-
			16	14	+++	-	-
			16		+++	-	-
			33	21	+++	-	-
			16		+++	-	-
			33	28	+++	-	-
			33		+++	-	-
		PC	83	71	-	-	-
			83		-	-	-
		NT	83	71	-	-	-
			83		-	-	-

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

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

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the solvent control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene
[Short-term treatment: +S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	SC	200	1.0	—	0	0	1	1	0	0	1.0	1.0	—	23-1 30-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		53.1	200	0.5	—	5	38	72	1	0	9	45.0	46.0	+	24-1 38-1
			(100)	(1)		(3)	(20)	(39)	(1)	(0)	(6)	(49)	(50)		
			(100)	(0)		(2)	(18)	(33)	(0)	(0)	(3)	(41)	(42)		
		37.9	200	0.0	—	15	71	103	0	0	5	67.0	68.5	+	72-1 36-1
			(100)	(0)		(7)	(37)	(46)	(0)	(0)	(2)	(60)	(61)		
			(100)	(0)		(8)	(34)	(57)	(0)	(0)	(3)	(74)	(76)		
		27.1	200	1.5	—	2	9	57	0	0	1	30.5	31.5	+	22-1 65-1
			(100)	(2)		(0)	(3)	(27)	(0)	(0)	(1)	(29)	(29)		
			(100)	(1)		(2)	(6)	(30)	(0)	(0)	(0)	(32)	(34)		
		19.4	200	8.0	±	1	2	3	0	0	0	2.5	2.5	—	54-1 51-1
			(100)	(5)		(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(11)		(1)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)		
		13.8	200	2.5	—	0	2	2	0	1	0	2.5	2.5	—	10-1 67-1
			(100)	(0)		(0)	(2)	(1)	(0)	(1)	(0)	(4)	(4)		
			(100)	(5)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		PC	200	0.0	—	3	15	78	0	1	0	44.5	45.5	+	18-1 12-1
			(100)	(0)		(2)	(4)	(42)	(0)	(0)	(0)	(44)	(45)		
			(100)	(0)		(1)	(11)	(36)	(0)	(1)	(0)	(45)	(46)		
		NT	200	1.0	—	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—	61-1 17-1
			(100)	(2)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		

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.

SC: Solvent control (acetone)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 μ g/mL)

NT: Non treatment

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,5,9-Cyclododecatriene
[Retest:-S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	6-18	SC	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	15-1 95-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		96.7	132	0.0	UR	0	2	0	0	0	0	1.5	1.5	UR	55-1 55-2 71-1 71-2
			(87)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(13)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(15)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(17)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		74.4	200	1.0	—	0	1	1	0	0	0	1.0	1.0	—	11-1 43-1
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		57.2	200	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	31-1 99-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		44.0	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	05-1 77-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		PC	200	0.0	—	0	6	40	0	0	0	22.0	22.0	+	69-1 40-1
			(100)	(0)		(0)	(3)	(21)	(0)	(0)	(0)	(24)	(24)		
			(100)	(0)		(0)	(3)	(19)	(0)	(0)	(0)	(20)	(20)		
		NT	200	0.0	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	44-1 58-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(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.

SC: Solvent control (acetone)

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

NT: Non treatment

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

別表1-1 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称 シクロドデカ-1,5,9-トリエン

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	そ の 他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍 数 体	そ の 他	総異常細胞数 (%)
6-18	-	溶媒対照 (アセトン)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	133	100	1	0	1
			200	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)
6-18	-	0.044	100	0	0	0	0	0	0	0	83	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	83	100	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)	(71)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	-	0.0572	100	0	0	0	0	0	0	0	83	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	66	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	(64)	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6-18	-	0.0744	100	1	0	0	0	0	1	0	66	100	1	0	1
			100	0	1	0	0	0	1	0	66	100	1	0	1
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	(57)	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6-18	-	0.0967	TOX								33				
			TOX								33				
			TOX								(28)				
6-18	-	陽性対照 (MMC)	100	3	21	0	0	0	24	0	83	100	0	0	0
			100	3	19	0	0	0	20	0	83	100	0	0	0
			200	6 (3.0)	40 (20.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	44 (22.0)	0 (0.0)	(71)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC: マイトマイシンC

「代謝活性化法によらない場合」については、所期の細胞増殖抑制が得られなかったため再試験を実施した。本報告書に記載した「代謝活性化法によらない場合」の結果は再試験におけるものである。

別表1-2 染色体異常試験の結果（短時間処理法）

被験物質の名称 シクロデカ-1,5,9-トリエン

処理時間 (h)	S9 mix	被験物質 の用量 (mg/ml)	染色体構造異常の細胞数 (出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)			
			観察細胞数	染色体分断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)			観察細胞数	倍 数 体	その他	総異常細胞数 (%)
6-18	+	溶媒対照 (アセトン)	100	0	0	1	0	0	1	0	100	100	1	0	1
			100	0	1	0	0	0	1	0	99	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	(100)	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6-18	+	0.0138	100	2	1	0	1	0	4	0	66	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0	66	100	5	0	5
			200	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	5 (2.5)	0 (0.0)	(66)	200	5 (2.5)	0 (0.0)	5 (2.5)
6-18	+	0.0194	100	0	2	0	0	0	2	0	66	100	5	0	5
			100	2	1	0	0	0	3	1	66	100	11	0	11
			200	2 (1.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	1 (0.5)	(66)	200	16 (8.0)	0 (0.0)	16 (8.0)
6-18	+	0.0271	100	3	27	0	0	1	29	0	49	100	2	0	2
			100	6	30	0	0	0	32	2	66	100	1	0	1
			200	9 (4.5)	57 (28.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	61 (30.5)	2 (1.0)	(58)	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
6-18	+	0.0379	100	37	46	0	0	2	60	7	49	100	0	0	0
			100	34	57	0	0	3	74	8	49	100	0	0	0
			200	71 (35.5)	103 (51.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	134 (67.0)	15 (7.5)	(49)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	0.0531	100	20	39	1	0	6	49	3	49	100	1	0	1
			100	18	33	0	0	3	41	2	49	100	0	0	0
			200	38 (19.0)	72 (36.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	9 (4.5)	90 (45.0)	5 (2.5)	(49)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	+	陽性対照 (CP)	100	4	42	0	0	0	44	2	83	100	0	0	0
			100	11	36	0	1	0	45	1	83	100	0	0	0
			200	15 (7.5)	78 (39.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	89 (44.5)	3 (1.5)	(83)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

CP: シクロフォスファミド

その他: 断片化