

最終報告書

クロロシクロヘキサンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号：B041796)

2006 年 9 月 15 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

2. 目次

2. 目次	3
5. 要約	10
6. 材料および方法	11
6.1 被験物質	11
6.1.1 名称	11
6.1.2 構造式	11
6.1.3 分子量	11
6.1.4 CAS 番号	11
6.1.5 ロット番号	11
6.1.6 純度	11
6.1.7 常温における性状（外観）	11
6.1.8 溶媒に対する溶解度（溶媒中の安定性）	11
6.1.9 その他の物理化学的性状	11
6.1.10 提供者	12
6.1.11 入手日	12
6.1.12 保存条件	12
6.1.13 保管場所	12
6.1.14 安定性の確認	12
6.2 対照物質	12

6.2.1	陰性対照物質	12
6.2.2	陽性対照物質	13
6.3	細胞	14
6.3.1	細胞	14
6.3.2	購入元	14
6.3.3	購入日	14
6.3.4	保存	14
6.3.5	特性検査	14
6.3.6	継代数	14
6.3.7	培養条件	14
6.3.8	細胞の選択理由	14
6.4	培地	15
6.4.1	MEM	15
6.4.2	MEM 培地	15
6.5	S9 mix	15
6.5.1	S9	15
6.5.2	S9 mix の調製	16
6.6	被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製	16
6.6.1	被験物質溶液の調製	16
6.6.2	陽性対照物質溶液の調製	17
6.7	細胞増殖抑制試験	17
6.7.1	処理条件	17
6.7.2	被験物質用量	17
6.7.3	被験物質用量の設定理由	17
6.7.4	細胞処理	18
6.7.5	細胞増殖率の測定	18
6.7.6	50%細胞増殖抑制用量の算出	19
6.8	染色体異常試験	19
6.8.1	処理条件	19
6.8.2	被験物質用量	19
6.8.3	陽性対照物質用量	19
6.8.4	陽性対照物質用量の設定理由	19
6.8.5	細胞処理	19
6.8.6	標本作製	20
6.8.7	細胞増殖率の測定	20
6.8.8	観察	20
6.8.9	判定基準	22
6.9	結果のまとめ	22
6.9.1	表	22

6.9.2 図	23
7. 結果	24
7.1 細胞増殖抑制試験	24
7.2 染色体異常試験	24
8. 考察および結論	24
9. 参考文献	25
表 1 細胞増殖抑制試験の結果	26
表 2 分裂指数測定結果	27
表 3 染色体異常試験の結果（短時間処理法）	28
表 4 染色体異常試験の結果（連続処理法）	29
図 1 クロロシクロヘキサン処理における細胞毒性 （短時間処理法・－S9 mix）	30
図 2 クロロシクロヘキサン処理における細胞毒性 （短時間処理法・＋S9 mix）	30
図 3 クロロシクロヘキサン処理における細胞毒性（連続処理法）	31
図 4 クロロシクロヘキサン処理における構造異常細胞出現頻	32
図 5 クロロシクロヘキサン処理における数的異常細胞出現頻度	32

5. 要約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い、クロロシクロヘキサンの *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

予備試験の結果に基づき、細胞増殖抑制試験は、短時間処理法 S9 mix 非共存下（以下－S9 mix）および S9 mix 共存下（以下＋S9 mix）、連続処理法 24 時間処理（以下 24 時間処理）で各々下記の用量を設定した。

－S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/mL

＋S9 mix : 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 µg/mL

24 時間処理 : 50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL

この結果、50%細胞増殖抑制用量（IC₅₀）は－S9 mix で 202 µg/mL、＋S9 mix で 406 µg/mL、24 時間処理で 205 µg/mL であった。

算出した IC₅₀ に基づき、染色体異常試験は下記の用量を設定した。

－S9 mix : 100, 150, 200, 250, 300, 350 µg/mL

＋S9 mix : 200, 300, 400, 450, 500 µg/mL

24 時間処理 : 150, 175, 200, 225, 250, 275 µg/mL

標本観察の結果、いずれの処理条件のいずれの被験物質用量においても、染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5%未満であった。

従って、クロロシクロヘキサンは、当試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有さないものと結論した。

6. 材料および方法

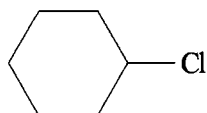
6.1 被験物質

6.1.1 名称

クロロシクロヘキサン

(英語名称 : Chlorocyclohexane)

6.1.2 構造式



6.1.3 分子量

118.61

6.1.4 CAS 番号

542-18-7

6.1.5 ロット番号

6.1.6 純度

99.7%

6.1.7 常温における性状 (外観)

無色液体

6.1.8 溶媒に対する溶解度 (溶媒中の安定性)

水 : : 50 mg/mL で不溶 [他試験 (試験番号 : B041795) の溶媒検討の結果による]

生理食塩液 : 50 mg/mL で不溶 [溶媒検討の結果による]

ジメチルスルホキシド : 500 mg/mL で溶解 (安定 : 溶液に発熱, 発泡, 変色は認められず) [溶媒検討の結果による]

6.1.9 その他の物理化学的性状

蒸気圧 : 6.73 mmHg (25°C)

対水溶解度：500 mg/L (25℃)
分配係数： 3.36 (1-オクタノール/水)
融点： -44℃
沸点： 142℃

6.1.10 提供者

6.1.11 入手日

2005 年 3 月 16 日

6.1.12 保存条件

冷蔵（許容範囲：1～10℃；実測値：2.4～8.8℃），暗所，密閉

6.1.13 保管場所

試験施設，被験物質保管場所（54）

（被験物質を受領してから 2005 年 3 月 28 日に試験責任者に移管されるまでは，被験物質保管場所（42）において保管されていた。）

6.1.14 安定性の確認

当研究所において，実験開始前と実験終了後に赤外吸収スペクトル（IR）法で赤外吸収スペクトルを測定し，被験物質の特性に変化がないことを確認した。

測定機器：島津フーリエ変換赤外分光光度計（FTIR-8300，株式会社島津製作所）

方法：

- (1) セル板（KBr）の上に被験物質を一滴落とした。
- (2) (1) の上にもう一枚のセル板（KBr）を密着させた。
- (3) 分光光度計にセットし，IR スペクトルを測定した。

6.2 対照物質

6.2.1 陰性対照物質

6.2.1.1 名称

ジメチルスルホキシド（以下 DMSO）

6.2.1.2 製造元

関東化学株式会社

6.2.1.3 グレード (規格)

分光分析用

6.2.1.4 ロット番号

510F1666

6.2.1.5 純度

100.0%

6.2.1.6 陰性対照物質の選択理由

溶媒検討の結果、本被験物質は生理食塩液に 50 mg/mL で溶解しなかったが、DMSO には 500 mg/mL で溶解し、溶液に発熱、発泡、変色は認められなかった。従って、本被験物質の溶媒（陰性対照物質）には DMSO を用いた。

6.2.2 陽性対照物質

6.2.2.1 名称

マイトマイシン C (MMC) [S9 mix 非共存下]

ベンゾ[a]ピレン (BP) [S9 mix 共存下]

6.2.2.2 製造元

MMC：協和発酵工業株式会社

BP：東京化成工業株式会社

6.2.2.3 ロット番号

MMC：435ADB

BP：GG01

6.2.2.4 含量

MMC：99%

BP：95.6%

6.2.2.5 陽性対照物質の選択理由

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において広く使用され、適用ガイドラインにおいて例示されている。

6.3 細胞

6.3.1 細胞

CHL/IU (雌チャイニーズハムスター肺由来)

6.3.2 購入元

大日本製薬株式会社

6.3.3 購入日

2003 年 9 月 2 日

6.3.4 保存

最終 10 v/v% の割合で DMSO を添加した培養液に細胞を浮遊させ、約 1 mL に小分けし、2003 年 9 月 9 日に凍結した後に液体窒素保存容器に移して保存した。試験においては、これを試験期間中に融解、培養して、他試験と共通で使用した。

6.3.5 特性検査

6.3.4 項の凍結細胞について、以下の特性を事前に確認した。

染色体モード (2n) : 25

倍加時間 : 14.6 時間

マイコプラズマ : 陰性

6.3.6 継代数

購入時 : 14

凍結時 : 17

使用時 : 21~23 (融解後 21 日以内)

6.3.7 培養条件

容器 : プラスチックプレート (直径 6 cm または 10 cm ; Becton Dickinson and Company)

温度 : 37°C

CO₂ 濃度 : 5%

湿度 : 加湿条件下

培養器 : 炭酸ガス細胞培養装置 (Jouan S.A., 6301C 型または 7300 型)

6.3.8 細胞の選択理由

染色体数のモードが 25 本と少なく、染色体が比較的大きいため標本観察が容易

である等の利点があり、培養細胞を用いる染色体異常試験で広く使用されている。また、適用ガイドラインにおいて推奨されている。

6.4 培地

MEM および MEM 培地は、試験開始後に調製したものを、他試験と共通で使用した。

6.4.1 MEM

- (1) イーグル MEM 培地「ニッスイ」①（日水製薬株式会社，ロット番号：530502）8.3 g を精製水 880 mL に溶解した。
- (2) オートクレーブ滅菌（121°C，20 分間）した。
- (3) この溶液に，別に滅菌処理した 2.92 w/v%L-グルタミン水溶液 8.8 mL と，10 w/v%炭酸水素ナトリウム水溶液 11.2 mL を添加した。

6.4.2 MEM 培地

MEM 900 mL に，非働化（56°C，30 分間加熱処理）した牛血清（Invitrogen Corp.，ロット番号：444175）を 100 mL 添加した。

6.5 S9 mix

6.5.1 S9

6.5.1.1 製造元

キッコーマン株式会社

6.5.1.2 ロット番号

RAA-515

6.5.1.3 製造日

2005 年 1 月 14 日

6.5.1.4 入手日

2005 年 1 月 28 日

6.5.1.5 製造方法

フェノバルビタール（1 日目 30 mg/kg を 1 回腹腔内投与，2 日目以降 60 mg/kg を 1 日 1 回 3 日間腹腔内投与）と 5, 6-ベンゾフラボン（フェノバルビタール投与 3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与）で酵素誘導した 7 週齢 SD 系雄ラット（体重：206～239 g）の肝臓より調製された。

6.5.1.6 蛋白含量

27.41 mg/mL (細胞処理時の最終蛋白含量 : 1.37 mg/mL)

6.5.1.7 保存条件

-80°C 以下 (実測値 : -84~-82°C)

6.5.1.8 使用期限

6.5.1.3 項の製造日から 6 ヶ月間 (最終使用日 : 2005 年 5 月 30 日)

6.5.2 S9 mix の調製

S9 mix 1 mL あたり以下の組成で用時調製した。使用時まで氷中に保存した。

S9	0.3 mL
D-グルコース 6-リン酸	5 μ mol
β -NADP ⁺	4 μ mol
HEPES (pH 7.2)	4 μ mol
MgCl ₂	5 μ mol
KCl	33 μ mol
滅菌精製水	残量

6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製**6.6.1 被験物質溶液の調製**

- (1) 被験物質を所定量秤量した。
- (2) これに DMSO を加えて、振盪撹拌により溶解させた。
- (3) DMSO を加え所定量にメスアップし、最高処理用量の 100 倍濃度 (細胞増殖抑制試験 : 200 mg/mL, 染色体異常試験 [短時間処理法] : 50 mg/mL, 染色体異常試験 [連続処理法] : 27.5 mg/mL) 溶液 (最高濃度溶液) とした。
- (4) 最高濃度溶液を DMSO で段階希釈して、各処理用量の 100 倍濃度 (細胞増殖抑制試験 : 5, 10, 12.5, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150 mg/mL, 染色体異常試験 [短時間処理法] : 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 mg/mL, 染色体異常試験 [連続処理法] : 15, 17.5, 20, 22.5, 25 mg/mL) の被験物質溶液を調製した。
- (5) 上記操作ならびに調製後使用時までの保存 (細胞増殖抑制試験 : 10~30 分間, 染色体異常試験 [短時間処理法] : 10~25 分間, 染色体異常試験 [連続処理法] : 10 分間) は、室温、黄色灯下で実施した。

6.6.2 陽性対照物質溶液の調製

6.6.2.1 MMC 溶液の調製

- (1) 2 mg 入りバイアル瓶の MMC を、注射用水（株式会社大塚製薬工場，ロット番号：K3L91）5 mL に用時溶解した。
- (2) これを生理食塩液（株式会社大塚製薬工場，ロット番号：K4E90）で段階希釈し、処理用量の 10 倍濃度（短時間処理法：1 $\mu\text{g/mL}$ ，連続処理法：0.5 $\mu\text{g/mL}$ ）の溶液を調製した。

6.6.2.2 BP 溶液の調製

- (1) BP 20 mg を秤量し、DMSO（関東化学株式会社，ロット番号：508F1409）に溶解して 5 mL とした（4 mg/mL：処理用量の 200 倍濃度）。
- (2) 上記溶液を 2005 年 2 月 9 日に調製し、0.2 mL ずつ分注して、冷凍庫（実測値：-27.5~-22.1°C）で保存した。
- (3) このうちの 1 本を、使用当日に融解して使用した。

6.7 細胞増殖抑制試験

6.7.1 処理条件

- －S9 mix：短時間処理法（6 時間処理，18 時間回復）S9 mix 非共存下
- ＋S9 mix：短時間処理法（6 時間処理，18 時間回復）S9 mix 共存下
- 24 時間処理：連続処理法（24 時間処理）S9 mix 非共存下

6.7.2 被験物質用量

- －S9 mix：125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/mL}$
- ＋S9 mix：100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 $\mu\text{g/mL}$
- 24 時間処理：50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$

6.7.3 被験物質用量の設定理由

細胞増殖抑制試験に先立ち、予備試験を実施した。各処理条件について 50, 500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ を設定し、1 用量あたり 1 枚のプレートを用いて実施した。処理終了後のプレートを位相差倒立顕微鏡で観察し、陰性対照群プレートの細胞密度を 100% として相対的な細胞密度を判断した。

その結果、各プレートの細胞密度は以下の通りであった。

処理条件 \ 用量 (μg/mL)	50	500	5000
－S9 mix	100%	50%	10%
＋S9 mix	100%	30%	20%
24 時間処理	100%	5%	0%

以上の結果に基づいて、50%以上の細胞増殖抑制が認められると考えられる用量を最高用量に、6.7.2 項の用量を設定した。

6.7.4 細胞処理

- (1) 4×10^3 個/mL に調製した細胞浮遊液を 6 cm プレートに 5 mL ずつ播き、3 日間前培養した。
- (2) MEM 培地を除去した後、被験物質溶液、S9 mix および MEM 培地を、下記の組成でプレートに添加した。陰性対照群については、DMSO を用いて同様に実施した。各処理条件、処理用量につき 2 枚のプレートを用いた。

処理条件	被験物質溶液 または DMSO	S9 mix	MEM 培地
－S9 mix	0.03 mL	－	3.0 mL
＋S9 mix	0.03 mL	0.5 mL	2.5 mL
24 時間処理	0.05 mL	－	5.0 mL

- (3) 短時間処理法では 6 時間、連続処理法では 24 時間細胞を処理した。
- (4) 短時間処理法では 6 時間処理後、MEM で細胞表面を 1 回洗浄し、新たに MEM 培地 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。
- (5) 処理開始時および処理終了時に、被験物質の沈殿等の有無を目視で観察した。

6.7.5 細胞増殖率の測定

- (1) 細胞表面を Ca^{2+} 、 Mg^{2+} フリーのダルベッコリン酸緩衝液（以下 PBS(-)、日水製薬株式会社）で洗浄した。
- (2) 0.25 w/v% トリプシンで 5 分間処理した。
- (3) MEM 培地を加え、ピペッティングにより細胞を剥離した。
- (4) 血球計算盤で細胞を計数した。
- (5) 陰性対照群の測定値（平均値）を 100% として、細胞増殖率を算出した。

6.7.6 50%細胞増殖抑制用量の算出

各処理条件について、細胞増殖率が 50%を挟む 2 用量を結ぶ直線式より 50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) を算出した。

6.8 染色体異常試験

6.8.1 処理条件

－S9 mix, ＋S9 mix, 24 時間処理

先ず、短時間処理法のみについて実施した。短時間処理法の結果、判定が陰性であったため、引き続き連続処理法を実施した。

6.8.2 被験物質用量

細胞増殖抑制試験で算出した IC_{50} を参考に、50%以上の細胞増殖抑制が認められると考えられる用量を最高用量に、下記の用量を設定した。

－S9 mix : 100, 150, 200, 250, 300, 350 $\mu\text{g/mL}$

＋S9 mix : 200, 300, 400, 450, 500 $\mu\text{g/mL}$

24 時間処理 : 150, 175, 200, 225, 250, 275 $\mu\text{g/mL}$

6.8.3 陽性対照物質用量

－S9 mix : MMC, 0.1 $\mu\text{g/mL}$

＋S9 mix : BP, 20 $\mu\text{g/mL}$

24 時間処理 : MMC, 0.05 $\mu\text{g/mL}$

6.8.4 陽性対照物質用量の設定理由

上記用量で染色体異常を誘発することが知られている。

6.8.5 細胞処理

6.7.4 項に示した方法で実施した。

陽性対照群については、下記の組成で同様に実施した。

処理条件	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	MEM 培地
－S9 mix	0.3 mL	—	—	2.7 mL
＋S9 mix	—	0.015 mL	0.5 mL	2.5 mL
24 時間処理	0.5 mL	—	—	4.5 mL

6.8.6 標本作製

- (1) 処理終了の2時間前にコルセミドを最終用量が0.1 µg/mLとなるように各プレートに加え、分裂中期細胞を蓄積した。
- (2) 処理終了後、細胞表面をPBS(-)で洗浄した。
- (3) 0.25 w/v%トリプシン処理にて細胞を剥離した。
- (4) 細胞浮遊液を遠心管に回収し、遠心分離（1000 rpm, 5 分間；以下同様）により細胞を集めた。
- (5) 上清を除去後、各遠心管に0.075 mol/L 塩化カリウム溶液4 mLを加えて低張処理（37°C, 15 分）を行った。
- (6) 冷却した固定液（メタノール・酢酸混合液 [3 : 1, v/v]）0.5 mLを加え、混和した後に、遠心分離し、上清を除去した。
- (7) 固定液4 mLを加え、混和した後に、遠心分離し、上清を除去した。
- (8) (7)の操作を再度実施した。
- (9) 適量の固定液に細胞を浮遊させた。
- (10) 濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスに2箇所滴下して乾燥させた。プレートあたり2枚の標本作製した。
- (11) 3 v/v%ギムザ溶液で20分間染色し、水洗、乾燥した。
- (12) カバーガラスおよび封入剤で封入した。

6.8.7 細胞増殖率の測定

6.8.6 (3)項で得られた細胞浮遊液の一部を採取し、血球計算盤で細胞を計数した。陰性対照群の測定値（平均値）を100%として、細胞増殖率を算出した。陽性対照群については測定を実施しなかった。

6.8.8 観察

6.8.8.1 分裂指数の測定および相対分裂指数の算出

1枚のプレートあたり500個、すなわち各用量あたり1000個の細胞について、分裂中期細胞を数え、下式により分裂指数（%）を算出した。

$$\text{分裂指数 (\%)} = (\text{分裂中期細胞数}) / (\text{観察細胞数}) \times 100$$

またこれをもとに、各処理用量について、陰性対照値を100%として下式により相対分裂指数（%）を算出した。

$$\text{相対分裂指数 (\%)} = (\text{被験物質処理群の分裂指数}) / (\text{陰性対照群の分裂指数}) \times 100$$

陽性対照群については実施しなかった。

6.8.8.2 予備鏡検

試験の適否確認のため予備鏡検を行い，以下の項目について確認した．

- (1) 各プレートから作製した2枚の標本で合わせて50個以上の分裂中期細胞が得られる．（得られない場合，そのプレートの標本は観察対象から除外した．）
- (2) 陰性対照群および陽性対照群において，染色体異常を持つ細胞の出現頻度が適切である．

6.8.8.3 観察

6.8.8.3.1 標本のコード化

標本をランダムに並べ替え，情報記載部分をラベルで覆った後に観察した．

6.8.8.3.2 観察対象とした分裂中期細胞の選択基準

- (1) 染色体がよく広がっている．
- (2) 動原体数が 25 ± 2 または 35 以上である（断片化を除く）．

6.8.8.3.3 観察細胞数

プレートあたり 100 個（用量あたり 200 個）

6.8.8.3.4 構造異常[1]

- (1) 染色分体型切断
- (2) 染色分体型交換
- (3) 染色体型切断
- (4) 染色体型交換（二動原体，環状染色体など）
- (5) 断片化

6.8.8.3.5 ギャップ

ギャップは，染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした．

他の異常と区別して記録し，構造異常には含めなかった．

6.8.8.3.6 数的異常

動原体数が 35 以上の倍数体細胞（核内倍加細胞を含む）

6.8.9 判定基準

6.8.9.1 染色体異常細胞

構造異常細胞：染色体構造異常を1個以上持つ細胞

数的異常細胞：染色体数的異常を持つ細胞

6.8.9.2 データ採用基準

観察可能な分裂中期細胞数がプレートあたり 50 個以上の標本のデータを採用データとした。

6.8.9.3 試験成立基準

以下の基準を満たしている場合に試験成立とした。

- (1) 陰性対照群および陽性対照群ならびに3用量以上の被験物質処理群について、データ採用基準を満たしている。
- (2) 陰性対照群において、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が5%未満である。
- (3) 陽性対照群において、構造異常細胞の出現頻度が10%以上である。

6.8.9.4 判定基準[2]

陰性：いずれの被験物質処理群においても、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が5%未満である。

疑陽性：いずれかの被験物質処理群において、構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が5%以上10%未満である。

陽性：いずれかの被験物質処理群において、構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が10%以上であり、用量依存的な増加傾向が認められる。

6.8.9.5 統計学的手法

判定に統計学的手法は用いなかった。

6.9 結果のまとめ

6.9.1 表

- (1) 細胞増殖率
- (2) 分裂指数および相対分裂指数
- (3) プレート毎の構造異常細胞および数的異常細胞の出現数
- (4) 用量毎の構造異常細胞および数的異常細胞の出現数合計および出現頻度
- (5) プレートあたり 50 個以上の分裂中期細胞が観察できなかった標本の欄は「Tox」と記載した。

6.9.2 図

- (1) 細胞増殖率
- (2) 染色体異常細胞出現頻度

7. 結果

7.1 細胞増殖抑制試験 (表 1, 図 1~3)

－S9 mix および＋S9 mix の 1000 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では, 処理開始時, 被験物質が細胞処理液表面に分離して認められた. また, －S9 mix の 2000 $\mu\text{g/mL}$ では, 処理終了時, 被験物質によるプレート底面の腐食が認められた.

50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) は, －S9 mix で 202 $\mu\text{g/mL}$, ＋S9 mix で 406 $\mu\text{g/mL}$, 24 時間処理で 205 $\mu\text{g/mL}$ であった.

7.2 染色体異常試験 (表 2~4, 図 1~5)

いずれの処理条件, 処理用量においても, 処理開始時および終了時, 細胞処理液中に被験物質の沈殿等は認められなかった.

いずれの処理条件においても, 細胞増殖率の結果と比較して, 相対分裂指数の顕著な低下はみられなかった.

予備鏡検の結果, ＋S9 mix の 500 $\mu\text{g/mL}$ では, いずれのプレートにおいても 50 個以上の分裂中期細胞が得られなかったため, これらのプレートから作製した標本は観察の対象から除外した.

標本観察の結果, 染色体構造異常または染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は, いずれの処理条件のいずれの被験物質用量においても 5%未満であった.

陰性対照群におけ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, いずれの処理条件においても 5%未満であった. また, 陽性対照群における構造異常細胞の出現頻度は, いずれの処理条件においても 10%以上であった.

8. 考察および結論

クロロシクロヘキサ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.

染色体異常試験の結果, いずれの処理条件の被験物質処理群においても, 染色体構造異常または染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5%未満であった.

陰性対照群および陽性対照群では染色体異常細胞の出現頻度は期待通りの値を示し, 当試験が技術的に成立していることが示された.

分裂指数測定の結果,細胞増殖率を指標とした場合に比べて顕著な分裂抑制が認められなかったことから,被験物質の細胞周期に対する著しい影響は無いものと考えられた.

従って,クロロシクロヘキサンは,当試験条件下において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有さないものと結論した.

9. 参考文献

- [1] 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会・第3分科会・遺伝毒性ワーキンググループ編「医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A」サイエンティスト社, 東京, 2000
- [2] 祖父尼俊雄監修「染色体異常試験データ集・改訂 1998 年版」株式会社エル・アイ・シー, 東京, 1999

表1 細胞増殖抑制試験の結果

用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)		
	短時間処理法		連続処理法
	- S9 mix	+ S9 mix	24時間処理
陰性対照 (DMSO)	100	100	100
50			97
100		88	101
125	93		
200		87	63
250	34		
300		57	0*
400		61	0
500	9	2	0
750	4	12	
1000	2	0	
1500	0		
2000	0		

DMSO : ジメチルスルホキシド

*:IC50値は「0.4」として算出した.

表 2 分裂指数測定結果

処理	処理-回復 時間 (h)	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 (%)	相対分裂指数 (%)
陰性対照 (DMSO)	6-18	—	0	1000	71	7.1	100
クロロシクロ ヘキサン	6-18	—	100	1000	60	6.0	85
	6-18	—	150	1000	69	6.9	97
	6-18	—	200	1000	51	5.1	72
	6-18	—	250	1000	48	4.8	68
	6-18	—	300	1000	56	5.6	79
	6-18	—	350	1000	39	3.9	55
陰性対照 (DMSO)	6-18	+	0	1000	115	11.5	100
クロロシクロ ヘキサン	6-18	+	200	1000	95	9.5	83
	6-18	+	300	1000	76	7.6	66
	6-18	+	400	1000	53	5.3	46
	6-18	+	450	1000	29	2.9	25
	6-18	+	500	1000	5	0.5	4
陰性対照 (DMSO)	24-0	—	0	1000	46	4.6	100
クロロシクロ ヘキサン	24-0	—	150	1000	49	4.9	107
	24-0	—	175	1000	45	4.5	98
	24-0	—	200	1000	51	5.1	111
	24-0	—	225	1000	48	4.8	104
	24-0	—	250	1000	41	4.1	89
	24-0	—	275	1000	16	1.6	35

DMSO : ジメチルスルホキシド

表 3 染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質の名称 クロロシクロヘキサン

処理-回復 時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数の異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色体型切断	染色体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍數体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	0	1	0	0	0	1	0	99	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	101	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	100	100	1	0	0	0	0	1	0	91	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	89	100	1	0	1
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	90	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
6-18	-	150	100	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0
			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	87	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	200	100	0	1	1	0	0	2	0	83	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	74	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	78	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	250	100	0	0	0	0	0	0	0	56	100	0	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	58	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	57	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	300	100	0	0	0	0	0	0	0	64	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	56	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	60	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	350	100	0	1	0	0	0	1	0	26	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	3	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	15	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	34	33	3	0	0	53	0		100	0	0	0
			100	42	31	1	0	0	53	0		100	0	0	0
			200	76 (38.0)	64 (32.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	106 (53.0)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	108	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	92	100	0	0	0
			200	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)
6-18	+	200	100	0	0	0	0	0	0	0	79	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	82	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	81	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	300	100	1	0	1	0	0	2	1	46	100	0	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	55	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	1	50	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	400	100	1	0	1	0	0	2	0	40	100	1	1	2
			100	0	0	1	0	0	1	0	36	100	1	0	1
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	38	200	2 (1.0)	1 (0.5)	3 (1.5)
6-18	+	450	100	0	1	0	0	0	1	0	33	100	0	0	0
			66	1	1	0	0	0	2	0	6	66	0	0	0
			166	1 (0.6)	2 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.8)	0	20	166	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	500	Tox								3	Tox			
											4				
											4				
6-18	+	陽性対照 (BP20)	100	42	49	3	2	0	66	0		100	0	0	0
			100	34	53	0	1	0	62	0		100	0	0	0
			200	76 (38.0)	102 (51.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	128 (64.0)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC, BP : ベンゾ [a] ピレン

Tox : 細胞毒性のため、プレートあたり50個以上の分裂中期細胞が得られなかった。

表 4 染色体異常試験の結果（連続処理法）

被験物質の名称 クロロシクロヘキサン

処理-回復 時間(h)	被験物質の用量 ($\mu\text{g/mL}$)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体型切断	染色体型交換	染色体型切断	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	103	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	97	100	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	150	100	0	0	0	0	0	0	0	70	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	71	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	71	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	175	100	0	0	0	0	0	0	0	70	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	66	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	68	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	200	100	1	0	1	0	0	2	0	65	100	1	1	2
		100	0	0	0	0	0	0	0	62	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	64	200	2 (1.0)	1 (0.5)	3 (1.5)
24-0	225	100	0	0	0	0	0	0	0	53	100	2	0	2
		100	1	0	0	0	0	1	0	53	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	53	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
24-0	250	100	1	1	0	0	0	1	0	41	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	37	100	1	0	1
		200	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	39	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24-0	275	100	0	1	0	1	0	2	0	18	100	1	0	1
		100	1	3	2	0	0	6	0	13	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	4 (2.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	8 (4.0)	0	15	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)
24-0	陽性対照 (MMC 0.05)	100	25	19	1	0	0	36	0		100	0	0	0
		100	30	24	0	0	0	50	0		100	0	0	0
		200	55 (27.5)	43 (21.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	86 (43.0)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

DMSO : ジメチルスルホキシド

MMC : マイトマイシンC

図1 クロロシクロヘキサン処理における細胞毒性
(短時間処理法・-S9 mix)

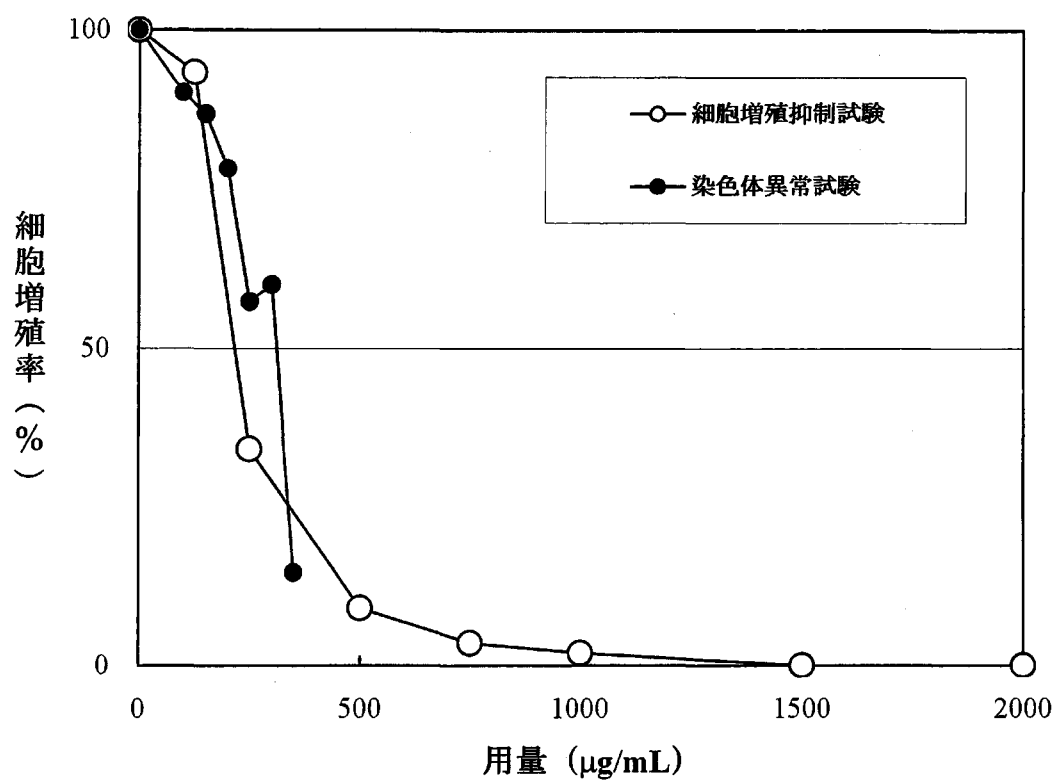


図2 クロロシクロヘキサン処理における細胞毒性
(短時間処理法・+S9 mix)

