

最終報告書

4-クロロ-*m*-クレゾールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号：B060313)

株式会社三菱化学安全科学研究所

2. 目次

1. 陳述書	2
2. 目次	3
3. 試験実施概要	7
3.1 表題	7
3.2 試験番号	7
3.3 試験目的	7
3.4 適用ガイドライン	7
3.5 適用 GLP	7
3.6 試験委託者	7
3.7 試験受託者	7
3.8 試験施設	8
5. 要約	11
6. 材料および方法	13
6.1 被験物質	13
6.1.1 名称	13
6.1.2 CAS 番号	13
6.1.3 構造式	13
6.1.4 分子量	13
6.1.5 製造元	13
6.1.6 ロット番号	13
6.1.7 純度（含量）	13
6.1.8 性状	13
6.1.9 その他の物理化学的性状	13
6.1.10 溶媒に対する溶解度（溶媒中の安定性）	14
6.1.11 入手日	14
6.1.12 入手量	14

6.1.13 保存条件.....	14
6.1.14 保管場所.....	14
6.1.15 安定性の確認.....	14
6.1.16 残余被験物質の処理.....	14
6.2 対照物質.....	15
6.2.1 陰性対照物質.....	15
6.2.2 陽性対照物質.....	15
6.3 細胞.....	16
6.3.1 細胞.....	16
6.3.2 購入元.....	16
6.3.3 購入日.....	16
6.3.4 保存.....	16
6.3.5 特性検査.....	16
6.3.6 継代数.....	16
6.3.7 培養条件.....	16
6.3.8 細胞の選択理由.....	17
6.4 培地.....	17
6.4.1 MEM.....	17
6.4.2 MEM 培地.....	17
6.5 S9 mix.....	17
6.5.1 S9.....	17
6.5.2 S9 mix の調製.....	18
6.6 被験物質溶液および陽性対照物質溶液の調製.....	18
6.6.1 被験物質溶液の調製.....	18
6.6.2 陽性対照物質溶液の調製.....	19
6.7 細胞増殖抑制試験.....	19
6.7.1 処理条件.....	19
6.7.2 被験物質用量.....	19
6.7.3 被験物質用量の設定理由.....	19
6.7.4 細胞処理.....	20
6.7.5 細胞増殖率の測定.....	20
6.7.6 50%細胞増殖抑制用量の算出.....	21
6.8 染色体異常試験.....	21
6.8.1 処理条件.....	21
6.8.2 被験物質用量.....	21
6.8.3 陽性対照物質用量.....	21

6.8.4	陽性対照物質用量の設定理由	21
6.8.5	細胞処理	21
6.8.6	標本作製	22
6.8.7	細胞増殖率の測定	22
6.8.8	観察	23
6.8.9	判定基準	24
6.9	結果のまとめ	25
6.9.1	表	25
6.9.2	図	25
6.9.3	D ₂₀ 値	26
6.9.4	写真	26
7.	結果	27
7.1	細胞増殖抑制試験	27
7.2	染色体異常試験	27
8.	考察および結論	28
9.	参考文献	28
10.	特記事項	29
10.1	試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	29
10.2	試験計画書に従わなかったこと	29
表 1	細胞増殖抑制試験の結果	30
表 2	分裂指数測定結果（本試験）	31
表 3	分裂指数測定結果（確認試験）	32
表 4	染色体異常試験の結果（本試験）	33
表 5	染色体異常試験の結果（確認試験）	34
図 1	4-クロロ- <i>m</i> -クレゾール処理における細胞毒性 （短時間処理法・－S9 mix）	35
図 2	4-クロロ- <i>m</i> -クレゾール処理における細胞毒性 （短時間処理法・＋S9 mix）	35
図 3	4-クロロ- <i>m</i> -クレゾール処理における細胞毒性（連続処理法）	36
図 4	4-クロロ- <i>m</i> -クレゾール処理における構造異常細胞出現頻度	37
図 5	4-クロロ- <i>m</i> -クレゾール処理における数的異常細胞出現頻度	37

3. 試験実施概要

3.1 表題

4-クロロ-*m*-クレゾールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3.2 試験番号

B060313

3.3 試験目的

4-クロロ-*m*-クレゾールのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性を検討する。

3.4 適用ガイドライン

(1) 新規化学物質等に係る試験の方法について

(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号 厚生労働省医薬食品局長，平成 15・11・13 製局第 2 号 経済産業省製造産業局長，環境企発第 031121002 号 環境省総合環境政策局長連名通知)

(2) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (No. 473, 1997)

3.5 適用 GLP

(1) 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について

(厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名基準，薬食発第 1121003 号，平成 15・11・17 製局第 3 号，環境企発第 031121004 号，平成 15 年 11 月 21 日)

(2) OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997)

3.6 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
東京都千代田区霞ヶ関一丁目 2 番 2 号

3.7 試験受託者

株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号
(平成 19 年 3 月 31 日以前は，東京都港区芝二丁目 1 番 30 号)

3.8 試験施設

株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
茨城県神栖市砂山 14 番地

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、4-クロロ-*m*-クレゾールのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の *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（24 時間処理）で各々下記の用量を設定した。

－S9 mix : 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$

＋S9 mix : 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$

24 時間処理 : 50, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g/mL}$

この結果、50%細胞増殖抑制用量（ IC_{50} ）は－S9 mix で 100 $\mu\text{g/mL}$ 、＋S9 mix で 98 $\mu\text{g/mL}$ 、24 時間処理で 60 $\mu\text{g/mL}$ であった。

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、染色体異常試験（本試験）は下記の用量を設定した。

－S9 mix : 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 $\mu\text{g/mL}$

＋S9 mix : 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 $\mu\text{g/mL}$

本試験の標本観察は細胞増殖率あるいは相対分裂指数が 50%未満となる最低用量を最高として、下記の用量を選択して実施した。

－S9 mix : 120, 140, 160 $\mu\text{g/mL}$

＋S9 mix : 120, 140, 160 $\mu\text{g/mL}$

標本観察の結果、－S9 mix では、140 $\mu\text{g/mL}$ の 1 プレートにおいてのみ、染色体構造異常、数的異常を持つ細胞の出現頻度が共に 5%以上（各々 5.0%, 8.0%）を示した（もう 1 プレートでは共に 0.0%）。また、＋S9 mix では、比較的強い細胞増殖抑制がみられた 160 $\mu\text{g/mL}$ においてのみ、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度が 13.5%を示した。

従って、本試験の結果に基づき下記用量を設定し、確認試験を実施した。

－S9 mix : 140, 150, 160 $\mu\text{g/mL}$

＋S9 mix : 140, 150, 160 $\mu\text{g/mL}$

確認試験の標本観察の結果、－S9 mix の 150, 160 $\mu\text{g/mL}$ において、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は各々 6.5, 9.0%を示し、140 $\mu\text{g/mL}$ では染色体数

常を持つ細胞の出現頻度は 8.0%を示した。+S9 mix の 140, 150, 160 $\mu\text{g/mL}$ においては、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は各々 13.5, 18.0, 33.5%を示した。

従って、4-クロロ-*m*-クレゾールは、当試験条件下（+S9mix 処理条件）において CHL/IU 細胞に対する染色体構造異常誘発性を有するものと結論した。また、-S9 mix 処理条件下においても、染色体構造異常、数的異常誘発性を誘発する可能性が示唆された。

6. 材料および方法

6.1 被験物質

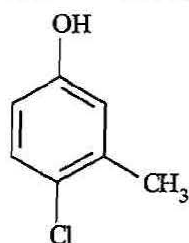
6.1.1 名称

4-クロロ-*m*-クレゾール

6.1.2 CAS 番号

59-50-7

6.1.3 構造式



6.1.4 分子量

142.58

6.1.5 製造元

和光純薬工業株式会社

6.1.6 ロット番号

6.1.7 純度 (含量)

100.0%

6.1.8 性状

白色粒状

6.1.9 その他の物理化学的性状

蒸気圧：0.05 mmHg (20℃)

対水溶解度：1 g/260 mL (20℃)

1-オクタノール/水分配係数：3.1

融点：65.7℃

沸点：235℃

6.1.10 溶媒に対する溶解度（溶媒中の安定性）

生理食塩液：15 mg/mL で不溶〔溶媒検討の結果による〕

水：50 mg/mL で不溶〔他試験（試験番号：B060312）の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*）〔溶媒検討の結果による〕

（*：溶液に発熱，発泡，変色は認められなかった）

6.1.11 入手日

6.1.12 入手量

25 g

6.1.13 保存条件

室温（許容範囲：10～30℃；実測値：20.1～25.3℃），遮光

6.1.14 保管場所

被験物質保管場所（52）

6.1.15 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) KBr 粒状結晶をメノウ乳鉢で粉末にした。
- (2) KBr 粉末をミニハンドプレスにて加圧し，錠剤を作製した。
- (3) KBr 粉末約 1 g と被験物質 約 5 mg を秤量した。
- (4) (3)で秤量した KBr 粉末と被験物質をメノウ乳鉢にて粉碎・混合した。
- (5) (4)の混合物をミニハンドプレスにて加圧し，錠剤を作製した。
- (6) 分光光度計にセットし，IR スペクトルを測定した。

6.1.16 残余被験物質の処理

被験物質の残余は実験終了後に廃棄した。

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 (DMSO)

6.2.1.2 製造元

関東化学株式会社

6.2.1.3 ロット番号

707X1808

6.2.1.4 陰性対照物質の選択理由

溶媒検討の結果、生理食塩液には 15 mg/mL (約 100 mmol/L) 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 を選択した。

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：454ADK

BP：GG01

6.2.2.4 含量

MMC：103%

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

2005 年 5 月 17 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、2005 年 5 月 24 日に凍結した後に液体窒素保存容器に移して保存した。これを 2006 年 7 月 3 日、2006 年 8 月 11 日に融解し、継代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 2005 年 6 月 9 日までに確認済みである。

染色体モード (2n) : 25

倍加時間 : 14.9 時間

マイコプラズマ感染 : 陰性

6.3.6 継代数

購入時 : 14

凍結時 : 17

使用時 : 19~23 (融解後 18 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)

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

設定条件 (温度 : 37°C, CO₂ 濃度 : 5%, 湿度 : 加湿)

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、2006 年 6 月 29 日～2006 年 8 月 24 日に、他試験と共通で調製して使用した。

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: 54060311, 548603) 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-542

6.5.1.3 製造日

2006 年 4 月 21 日

6.5.1.4 入手日

2006 年 5 月 12 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: 210~245 g) の肝臓より調製された。

6.5.1.6 蛋白含量

25.48 mg/mL (細胞処理時の最終蛋白含量: 1.27 mg/mL)

6.5.1.7 保存条件

-80℃以下 (実測値: -84~-81℃)

6.5.1.8 使用期限

製造日から 6 ヶ月間 (最終使用日: 2006 年 8 月 28 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
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, 適量の DMSO を加え, 振盪攪拌により溶解させた。
- (2) DMSO を加えて所定量に定容し, 最高濃度 (最高処理用量の 100 倍濃度; 細胞増殖抑制試験: 50 mg/mL, 染色体異常試験 [本試験]: 18 mg/mL, 染色体異常試験 [確認試験]: 16 mg/mL) 溶液とした。
- (3) 最高濃度溶液の一部を 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, 15, 20, 25, 30, 40 mg/mL, 染色体異常試験 [本試験]: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 mg/mL, 染色体異常試験 [確認試験]: 14, 15 mg/mL) 溶液を調製した。
- (4) 上記操作は室温, 黄色灯下で行い, 被験物質溶液は調製当日内に使用した (調製後, 使用までの時間; 細胞増殖抑制試験: 30~40 分間, 染色体異常試験 [本

試験] : 25～40 分間, 染色体異常試験 [確認試験] : 10～20 分間) .

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 : K5E85) 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 : K4L77) で段階希釈し, 処理用量の 10 倍濃度 (1 $\mu\text{g/mL}$) 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 : 707X1808) 5 mL に溶解した (4 mg/mL : 処理用量の 200 倍濃度) .
- (2) 上記溶液を 2006 年 5 月 31 日に調製し, 0.2 mL ずつ分注して, 冷凍庫 (許容温度 : $-40\sim-15^{\circ}\text{C}$, 実測値 : $-27.1\sim-21.9^{\circ}\text{C}$) 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 : 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$
- ＋S9 mix : 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$
- 24 時間処理 : 50, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g/mL}$

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 および 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. 各プレートの細胞密度は下記の通りであった.

処理条件 \ 用量 (μg/mL)	50	500	5000
-S9 mix	100%	0%	0%
+S9 mix	100%	0%	0%
24 時間処理	70%	0%	0%

以上の結果に基づき、50%以上の細胞増殖抑制が得られると考えられる用量を最高として、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 に調整した細胞浮遊液をプラスチックプレート（直径 6 cm）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) 10 v/v% ホルマリン溶液で 5 分間固定した。
- (3) 10 v/v% ホルマリン溶液を捨て、3 v/v% ギムザ液で 10 分間染色した。
- (4) 水洗、乾燥後、染色した各プレートについて単層培養細胞密度計（モノセレーター、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定した。
- (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

50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) は、細胞増殖率が 50%を挟む 2 用量を結ぶ直線式より算出した。

6.8 染色体異常試験

6.8.1 処理条件

－S9 mix, ＋S9 mix

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、判定が陽性であったため、連続処理法は実施しなかった。

6.8.2 被験物質用量

染色体異常試験（本試験）では、細胞増殖抑制試験の結果に基づき、 IC_{50} を超える用量を最高用量として、下記の用量を設定した。

－S9 mix : 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 $\mu\text{g/mL}$

＋S9 mix : 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 $\mu\text{g/mL}$

標本観察の結果、－S9 mix では、140 $\mu\text{g/mL}$ の 1 プレートにおいてのみ、染色体構造異常、数的異常を持つ細胞の出現頻度が共に 5%以上（各々 5.0%, 8.0%）を示した（もう 1 プレートでは共に 0.0%）。また、＋S9 mix では、比較的強い細胞増殖抑制がみられた最高用量の 160 $\mu\text{g/mL}$ においてのみ、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度が 13.5%を示した。従って、下記用量を設定し、－S9 mix および＋S9 mix について確認試験を実施した。

－S9 mix : 140, 150, 160 $\mu\text{g/mL}$

＋S9 mix : 140, 150, 160 $\mu\text{g/mL}$

6.8.3 陽性対照物質用量

－S9 mix : MMC, 0.1 $\mu\text{g/mL}$

＋S9 mix : BP, 20 $\mu\text{g/mL}$

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

陰性対照群および被験物質処理群については、各処理条件、処理用量につき 4 枚のプレートを用い、2 枚を標本作製に、2 枚を細胞増殖率の測定に使用した。陽性対照群については、細胞増殖率測定を実施しないので、各処理条件につき 2 枚のプレートを用いた。

6.8.6 標本作製

- (1) 処理終了の 2 時間前に、標本作製用プレートにコルセミドを最終用量が 0.1 $\mu\text{g/mL}$ となるように加え、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

標本作製と同時期における細胞増殖率は、細胞増殖率測定用のプレートを用いて、6.7.5 項に示した方法で実施した。

陽性対照群については実施しなかった。

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。
- (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 観察標本の選定

6.8.7項の細胞増殖率あるいは6.8.8.1項の相対分裂指数が50%未満となる最低用量を最高として、本試験では下記の用量を選択した。

－S9 mix : 120, 140, 160 µg/mL

＋S9 mix : 120, 140, 160 µg/mL

確認試験では設定した全ての用量を選択した。

6.8.8.4 観察

6.8.8.4.1 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。

6.8.8.4.2 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)。

6.8.8.4.3 観察細胞数

プレートあたり100個(用量あたり200個)

6.8.8.4.4 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

6.8.8.4.5 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。

6.8.8.4.6 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 100 個得られた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]

下記の基準に従って、構造異常と数的異常のそれぞれについて判定した。

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。

6.8.9.6 確認試験

6.8.9.6.1 確認試験実施条件

以下のいずれかの場合には、該当する処理条件について確認試験を実施した。

(1) 判定が疑陽性の場合

(2) 染色体異常誘発に用量依存性が認められない場合

(3) 染色体異常試験の結果から、再検討が必要と考えられる場合

本試験の－S9 mix は(3)，＋S9 mix は(2)に各々該当したため、確認試験を実施した（6.8.2 項参照）。

6.8.9.6.2 確認試験の設定用量

本試験の結果に基づいて決定した（6.8.2 項参照）。

6.8.9.6.3 確認試験の判定基準

陰性：染色体異常誘発の再現性が認められない場合

陽性：染色体異常誘発の再現性が認められる場合

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

6.9.2 図

(1) 細胞増殖率

(2) 染色体異常細胞出現頻度

6.9.3 D₂₀ 値

陽性となった処理条件について、D₂₀ 値（分裂中期細胞の 20%に異常を誘発させるために必要な用量 [mg/mL]）を算出した。

7. 結果

7.1 細胞増殖抑制試験（表 1, 図 1～3）

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。

50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) は, -S9 mix で 100 $\mu\text{g/mL}$, +S9 mix で 98 $\mu\text{g/mL}$, 24 時間処理で 60 $\mu\text{g/mL}$ であった。

7.2 染色体異常試験（表 2～5, 図 1, 2, 4, 5）

いずれの試験, 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。

分裂指数測定の結果, いずれの試験, 処理条件においても, 細胞増殖率の結果と比較して顕著な細胞分裂抑制は認められなかった。

本試験の標本観察の結果, -S9 mix では, 140 $\mu\text{g/mL}$ の 1 プレートにおいてのみ, 染色体構造異常, 数的異常を持つ細胞の出現頻度が共に 5%以上 (各々 5.0%, 8.0%) を示した (もう 1 プレートでは共に 0.0%)。+S9 mix では, 比較的強い細胞増殖抑制がみられた最高用量の 160 $\mu\text{g/mL}$ においてのみ, 染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度が 13.5%を示した。染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は, いずれの被験物質用量においても 5%未満であった。

確認試験の標本観察の結果, -S9 mix では, 150, 160 $\mu\text{g/mL}$ において染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は各々 6.5, 9.0%を示し, 140 $\mu\text{g/mL}$ において染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は 8.0%を示した。+S9 mix では, 140, 150, 160 $\mu\text{g/mL}$ において, 染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は各々 13.5, 18.0, 33.5%を示した。染色体数的異常を持つ細胞の出現頻度は, 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, いずれの試験, 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, いずれの試験, 処理条件においても 10%以上であった。+S9 mix の結果より算出した D_{20} 値は, 本試験で 0.22 mg/mL , 確認試験で 0.15 mg/mL であった。

8. 考察および結論

4-クロロ-*m*-クレゾール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。

本試験の結果、+S9mixにおいて、比較的強い細胞毒性が示された最高用量の160 $\mu\text{g/mL}$ でのみ10%以上の染色体構造異常誘発が示された。確認試験の結果、10%以上の染色体構造異常誘発が再現され、明瞭な用量依存性も認められた。

-S9 mix では、本試験において、140 $\mu\text{g/mL}$ の1プレートでのみ疑陽性レベル(5%以上10%未満)の染色体構造異常および数的異常誘発が示された。確認試験の結果、大きなプレート間差もなく疑陽性レベルの染色体構造異常誘発を示し、用量依存性もみられた。また、染色体数的異常誘発は140 $\mu\text{g/mL}$ においてのみ疑陽性レベルの値を示し、本試験と同様の傾向がみられた。当結果より、-S9 mix 処理条件下においても、染色体構造異常、数的異常誘発性を誘発する可能性が示唆された。

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特に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、4-クロロ-*m*-クレゾールは、当試験条件(+S9mix 処理条件)下においてCHL/IU細胞に対する染色体構造異常誘発性を有するものと結論した。

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)	100.0	100.0	100.0
50	80.0	83.8	58.2
100	70.4	49.1	26.4
150			10.9
200	0.0	0.0	0.0
250			0.0
300	0.0	0.0	0.0
400	0.0	0.0	
500	0.0	0.0	

DMSO : ジメチルスルホキシド

表 2 分裂指数測定結果 (本試験)

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	75	7.5	100.0
4-クロロ- <i>m</i> -クレゾール	6-18	—	60	1000	84	8.4	112.0
	6-18	—	80	1000	77	7.7	102.7
	6-18	—	100	1000	46	4.6	61.3
	6-18	—	120	1000	71	7.1	94.7
	6-18	—	140	1000	46	4.6	61.3
	6-18	—	160	1000	53	5.3	70.7
	6-18	—	180	1000	42	4.2	56.0
陰性対照 (DMSO)	6-18	+	0	1000	128	12.8	100.0
4-クロロ- <i>m</i> -クレゾール	6-18	+	40	1000	109	10.9	85.2
	6-18	+	60	1000	86	8.6	67.2
	6-18	+	80	1000	96	9.6	75.0
	6-18	+	100	1000	95	9.5	74.2
	6-18	+	120	1000	96	9.6	75.0
	6-18	+	140	1000	82	8.2	64.1
	6-18	+	160	1000	28	2.8	21.9

DMSO:ジメチルスルホキシド

表 3 分裂指数測定結果 (確認試験)

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	63	6.3	100.0
4-クロロ- <i>m</i> -クレゾール	6-18	—	140	1000	41	4.1	65.1
	6-18	—	150	1000	11	1.1	17.5
	6-18	—	160	1000	30	3.0	47.6
陰性対照 (DMSO)	6-18	+	0	1000	64	6.4	100.0
4-クロロ- <i>m</i> -クレゾール	6-18	+	140	1000	20	2.0	31.3
	6-18	+	150	1000	20	2.0	31.3
	6-18	+	160	1000	9	0.9	14.1

DMSO:ジメチルスルホキシド

表 4 染色体異常試験の結果 (本試験)

被験物質の名称 4-クロロ-m-クレゾール

処理・回復 時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 (μg/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	染色体分型切断	染色体分型交換	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	倍染色体	核内倍加	総異常細胞数(%)	
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	1	0	0	0	0	1	0	96.2	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	103.8	100	0	0	0	
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	-	60	N.D.							0	75.0	N.D.				
											92.3					
											83.7					
6-18	-	80	N.D.							0	79.8	N.D.				
											79.8					
											79.8					
6-18	-	100	N.D.							0	74.0	N.D.				
											50.0					
											62.0					
6-18	-	120	100	0	0	0	0	0	0	0	63.5	100	1	0	1	
			100	0	1	0	0	0	1	0	47.1	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	55.3	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	
6-18	-	140	100	0	0	0	0	0	0	0	72.1	100	0	0	0	
			100	0	5	0	0	0	5	0	66.3	100	0	8	8	
			200	0 (0.0)	5 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	0	69.2	200	0 (0.0)	8 (4.0)	8 (4.0)	
6-18	-	160	100	0	0	0	0	0	0	0	39.4	100	0	0	0	
			100	1	1	0	0	0	2	0	36.5	100	0	0	0	
			200	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	38.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	-	180	N.D.							0	33.7	N.D.				
											31.7					
											32.7					
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	5	21	0	0	0	25	0	0	100	0	0	0	
			100	17	22	0	0	0	32	0		100	0	0	0	
			200	22 (11.0)	43 (21.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	57 (28.5)	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	1	114.3	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	85.7	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	+	40	N.D.							0	74.5	N.D.				
											72.0					
											73.3					
6-18	+	60	N.D.							0	103.1	N.D.				
											103.1					
											103.1					
6-18	+	80	N.D.							0	109.3	N.D.				
											116.8					
											113.0					
6-18	+	100	N.D.							0	95.7	N.D.				
											98.1					
											96.9					
6-18	+	120	100	0	4	0	0	0	4	0	78.3	100	0	0	0	
			100	1	2	0	0	0	2	0	99.4	100	0	0	0	
			200	1 (0.5)	6 (3.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	0	88.8	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	+	140	100	1	3	0	0	0	3	0	64.6	100	0	1	1	
			100	1	2	0	0	0	3	0	69.6	100	0	0	0	
			200	2 (1.0)	5 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (3.0)	0	67.1	200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
6-18	+	160	100	4	13	0	0	0	14	0	19.9	100	0	0	0	
			100	3	12	1	0	0	13	0	12.4	100	0	0	0	
			200	7 (3.5)	25 (12.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	27 (13.5)	0	16.1	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	+	陽性対照 (BP20)	100	15	83	0	0	0	85	0	0	100	0	0	0	
			100	16	79	0	0	0	81	0		100	0	0	0	
			200	31 (15.5)	162 (81.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	166 (83.0)	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: ペンゾ [a] ピレン

N.D.: 標本観察を実施しなかった

表 5 染色体異常試験の結果 (確認試験)

被験物質の名称 4-クロロ-m-クレゾール

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	倍數体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	1	0	0	0	0	1	0	103.3	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	96.7	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	140	100	2	1	0	0	0	3	0	57.3	100	1	6	7
			100	3	3	0	0	0	5	0	54.5	100	0	9	9
			200	5 (2.5)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (4.0)	0	55.9	200	1 (0.5)	15 (7.5)	16 (8.0)
6-18	-	150	100	2	3	0	0	0	5	0	58.2	100	0	0	0
			100	2	7	0	0	0	8	0	51.6	100	0	4	4
			200	4 (2.0)	10 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	13 (6.5)	0	54.9	200	0 (0.0)	4 (2.0)	4 (2.0)
6-18	-	160	100	2	8	0	0	0	9	0	47.9	100	0	2	2
			100	3	8	0	0	0	9	0	34.7	100	0	4	4
			200	5 (2.5)	16 (8.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	18 (9.0)	0	41.3	200	0 (0.0)	6 (3.0)	6 (3.0)
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	12	23	0	0	0	29	1		100	0	0	0
			100	10	28	1	0	0	36	0		100	0	0	0
			200	22 (11.0)	51 (25.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	65 (32.5)	1		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	100.0	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	140	100	3	10	0	1	0	13	0	24.7	100	1	0	1
			100	3	13	0	0	0	14	0	27.1	100	0	1	1
			200	6 (3.0)	23 (11.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	27 (13.5)	0	25.9	200	1 (0.5)	1 (0.5)	2 (1.0)
6-18	+	150	100	4	12	0	0	0	14	0	16.5	100	1	0	1
			100	7	20	0	0	0	22	0	20.0	100	0	0	0
			200	11 (5.5)	32 (16.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	36 (18.0)	0	18.2	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	+	160	100	12	24	0	0	0	30	0	8.2	100	0	0	0
			100	15	30	0	0	0	37	0	8.2	100	0	0	0
			200	27 (13.5)	54 (27.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	67 (33.5)	0	8.2	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陽性対照 (BP20)	100	18	83	1	0	0	85	0		100	0	0	0
			100	10	80	1	0	0	83	0		100	0	0	0
			200	28 (14.0)	163 (81.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	168 (84.0)	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

図1 4-クロロ-*m*-クレゾール処理における細胞毒性
(短時間処理法・-S9 mix)

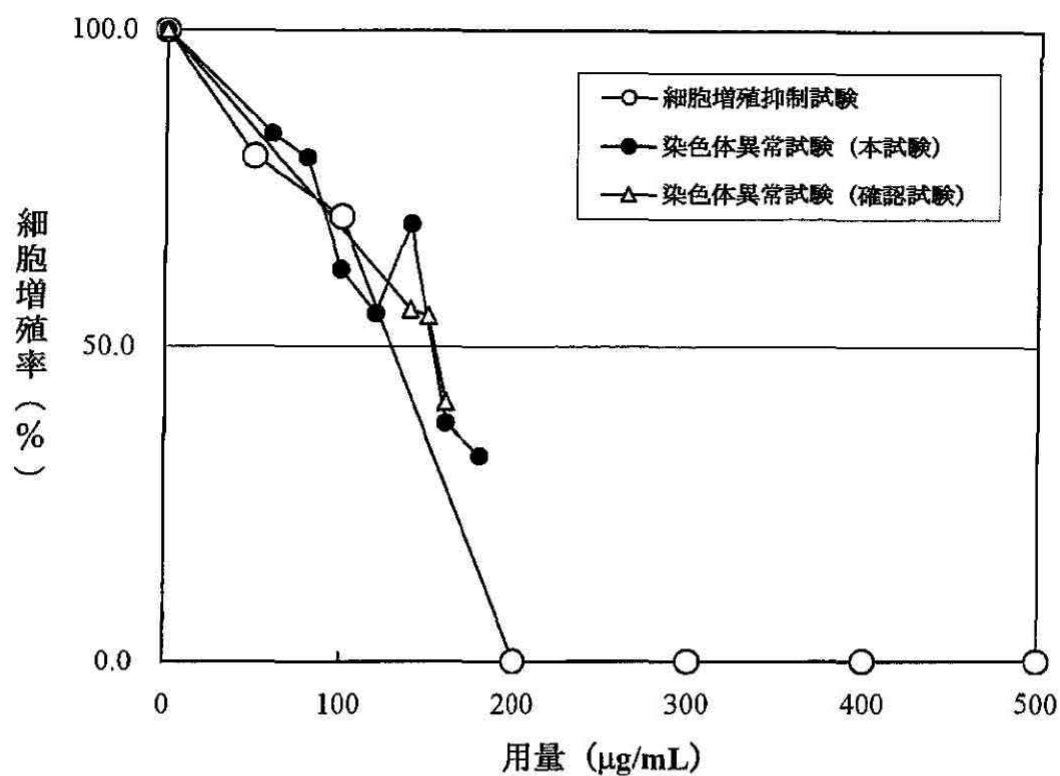


図2 4-クロロ-*m*-クレゾール処理における細胞毒性
(短時間処理法・+S9 mix)

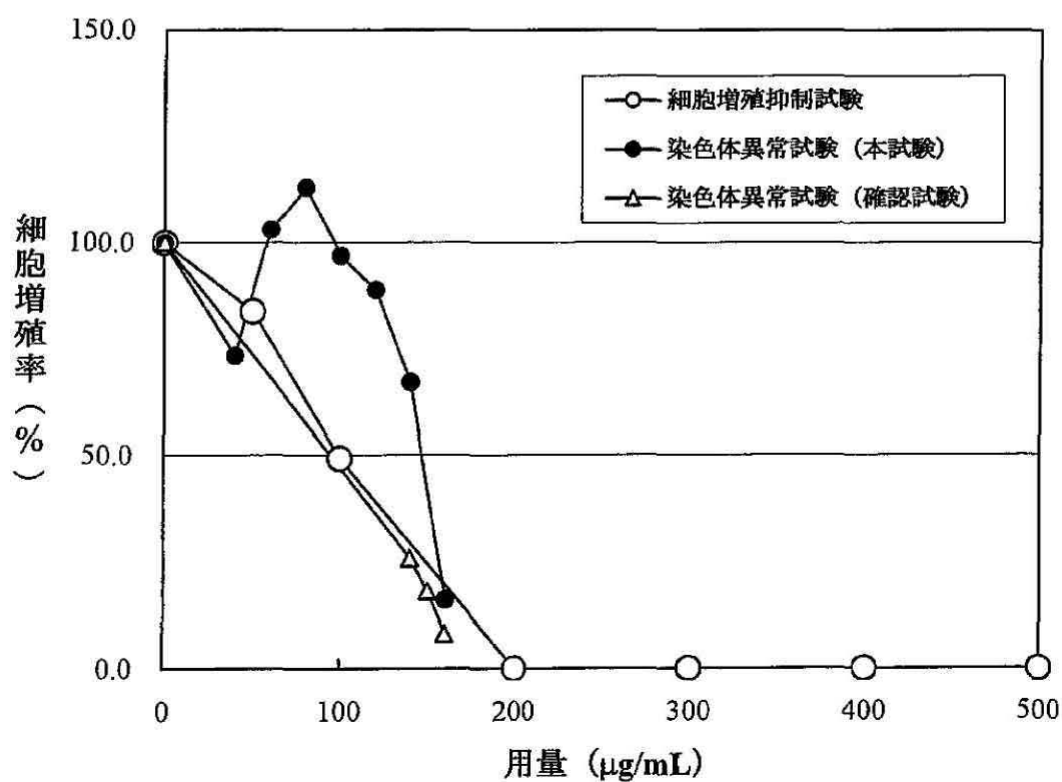


図3 4-クロロ-*m*-クレゾール処理における細胞毒性
(連続処理法)

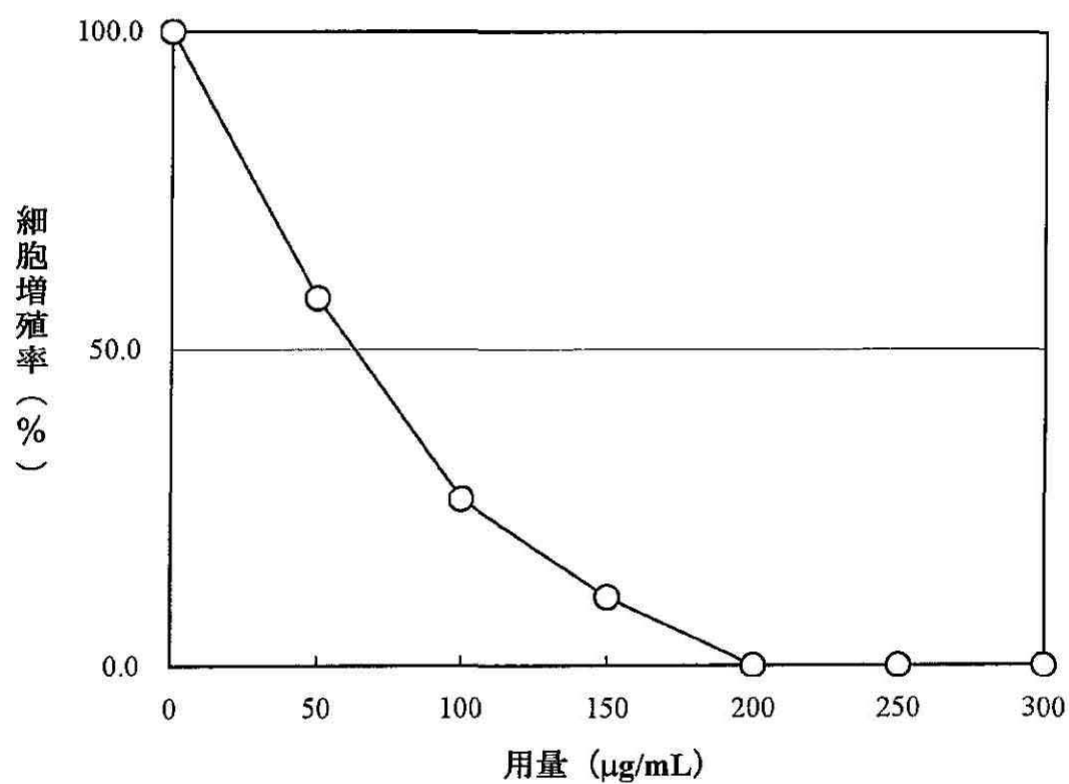


図4 4-クロロ-*m*-クレゾール処理における
構造異常細胞出現頻度

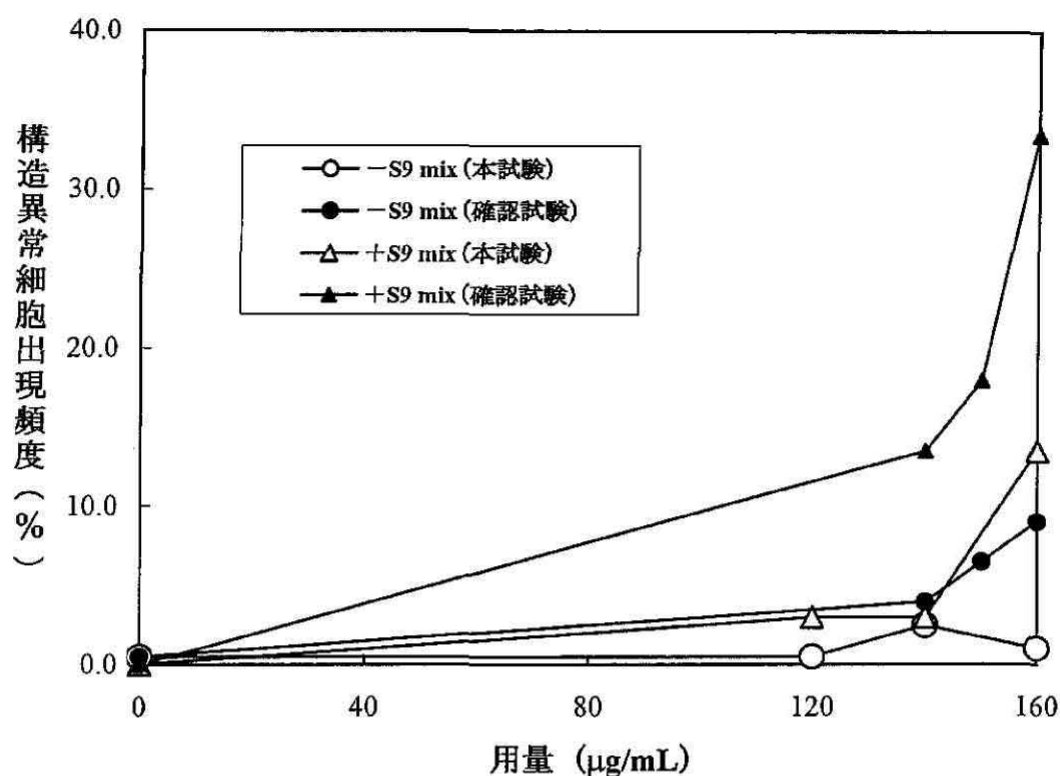


図5 4-クロロ-*m*-クレゾール処理における
数的異常細胞出現頻度

