

M-1342

最終報告書

試験名：1-クロロアンスラキノンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：M-1342

報告日：2010年5月13日

試験施設

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

試験委託者

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

株式会社ボゾリサーチセンター

〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

1.	目次	2
4.	要約	9
5.	緒言	11
6.	試験材料及び方法	12
6.1	被験物質及び溶媒	12
6.1.1	被験物質	12
6.1.2	溶媒	12
6.2	被験液の調製	13
6.2.1	調製方法	13
6.2.2	調製頻度	13
6.2.3	安定性	13
6.3	対照物質	14
6.3.1	溶媒対照	14
6.3.2	陽性対照	14
6.4	使用細胞株	15
6.4.1	細胞株	15
6.4.2	細胞の選択理由	15
6.4.3	培養条件	15
6.4.4	細胞の性状検査	15
6.5	S9 mix 及び培養液	15
6.5.1	S9 mix	15
6.5.2	培養液	16

6.6	試験方法 ¹⁻⁵⁾	17
6.6.1	識別方法	17
6.6.2	用量の設定	17
6.6.3	細胞増殖抑制試験	18
6.6.4	染色体異常試験	19
6.6.5	標本の観察	21
6.6.6	染色体異常の分類	21
6.6.7	判定基準	22
7.	試験結果	23
7.1	細胞増殖抑制試験	23
7.1.1	短時間処理法	23
7.1.2	連続処理法	23
7.2	染色体異常試験	24
7.2.1	短時間処理法	24
7.2.2	連続処理法	25
8.	考察	27
9.	参考文献	29

Figures and Tables

Fig. 1-1	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone [Short-term treatment: +S9 mix]
Fig. 1-2	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone [Short-term treatment: -S9 mix]
Fig. 1-3	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone [Continuous treatment: 24 hr]
Fig. 1-4	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese

M-1342

	hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone [Continuous treatment: 48 hr]
Table 1-1	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 1-2	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone [Short-term treatment: -S9 mix]
Table 1-3	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone [Continuous treatment: 24 hr]

4. 要約

1-クロロアンスラキノ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・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

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 2450 $\mu\text{g/mL}$ 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 2450 $\mu\text{g/mL}$ においても、50%を超える細胞増殖抑制作用は認められなかった。一方、非代謝活性化では 153 $\mu\text{g/mL}$ で、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 76.6 $\mu\text{g/mL}$ で、それぞれ低用量域からの 50%を超える用量依存的な細胞増殖抑制作用が認められたが、これらの用量から最高用量までは、逆に細胞増殖率が増加傾向を示した。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の非代謝活性化では 118.1 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 74.3 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 41.2 $\mu\text{g/mL}$ であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められない場合は最高用量を 10 mM とする」との規定に従い、短時間処理法の代謝活性化では 2450 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下、公比 2 で計 8 用量を設定した。また、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を超える濃度において、細胞増殖率が逆に増加傾向を示したが、これらの用量域においては、単層細胞密度測定装置を用いての細胞密度測定に影響を及ぼすような析出物の固着は認められず、染色体観察用標本の作製に十分な細胞量が認められたことから、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定には従わず、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の 24 時間処理では 2450 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、連続処理法の 48 時間処理では 1230 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、いずれも以下、公比 2 で計 8 用量を設定した。

染色体異常試験において、染色体構造異常の総出現率の指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA）は、短時間処理法の代謝活性化では 1230 $\mu\text{g/mL}$ から 153 $\mu\text{g/mL}$ までの用量で疑陽性や陽性の判定基準内の数値を示したが、明らかな用量依存性は認められなかった。一方、非代謝活性化では、TA は 2450 $\mu\text{g/mL}$ から 76.6 $\mu\text{g/mL}$ までの用量で、疑陽性や陽性の判定基準内の数値を示したが、陽性の判定基準内の数値を示した用量では細胞増殖率が著しく低く、また、TA の明らかな用量依存性も認められなかった。さらに、連続処理法の 24 時間処理では、TA は 1230 $\mu\text{g/mL}$ から 19.1 $\mu\text{g/mL}$ までの用量で、疑陽性や陽性の判定基準内の数値を示したが、陽性の判定基準内の数値を示した用量では細胞増殖率が著しく低い用量があり、また、TA の明らかな用量依存性も認められなかった。

以上の染色体異常試験の結果から、総合的に判断して、1-クロロアンスラキノンは短時間処理法及び連続処理法ともに用量依存性を伴わない疑陽性から陽性の判定基準

にある TA の増加が認められたことから、染色体構造異常誘発性は総合的に疑陽性（軽微な陽性）であると判定した。一方、倍数性細胞の出現率は、連続処理法の 24 時間処理で疑陽性の判定基準内の数値を示したが、明らかな用量依存性は認められなかったことから、1-クロロアンスラキノンの染色体数的異常誘発性は、総合的に疑陽性（軽微な陽性）と判定した。

陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。更に、いずれの群においても同一用量における 2 枚のプレート間に染色体異常細胞の出現頻度の著しい差は認められなかったことから、試験は適切に実施されたと判断した。

以上の結果から、1-クロロアンスラキノンは本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数的異常ともに疑陽性（軽微な陽性）を示すと結論した。

M-1342

5. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、1-クロロア
ンスラキノンの安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色
体異常試験を実施したので、その成績を報告する。

M-1342

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

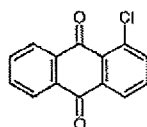
被験物質の純度等の特性は、非 GLP 下での分析に基づくものである (Attached Data 1)。

名称 : 1-クロロアンスラキノン

英名称 : 1-Chloroanthraquinone

CAS 番号 : 82-44-0

化学構造式 :



分子量 : 242.66

純度 : 99.11%

融点 : 164°C

性状 : 黄色粉末

入手量 : 25 g

安定性 : 実験終了後に、株式会社ボゾリサーチセンターにおいて特性を測定し、その結果を入手して安定性を確認した (Attached Data 2 及び 3)。

保存方法 : 冷暗所 (冷蔵庫内、保存期間中の実測温度 : 3~7°C)

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室 冷蔵庫

取扱い上の注意 : 取り扱いは、適切な保護具を身につけ、粉塵やエアゾールが発生しないように取扱った。また、火気厳禁とした。

返却 : 被験物質の残余物は、実験終了後に安定性を確認し、その後、すべて株式会社ボゾリサーチセンターにて廃棄した。

6.1.2 溶媒

名称 : ジメチルスルホキシド (DMSO)

ロット番号 : LTF0010

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	:	被験物質情報によると、水に不溶であると記されていたことから、供試前試験を実施した。その結果、DMSOに245 mg/mLで良好に懸濁することが確認されたため、溶媒としてDMSOを用いることとした。

6.2 被験液の調製

6.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.4900 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 245 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2450 µg/mL）を調製した。次いで、245 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、123、61.3、30.6、15.3、7.66、3.83 及び 1.91 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 0.4900g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 245 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2450 µg/mL）を調製した。次いで、245 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、123、61.3、30.6、15.3、7.66、3.83 及び 1.91 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化及び非代謝活性化ともに全濃度の被験液を使用した。

連続処理法では、被験物質 0.4900 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で懸濁した後に、メスアップして最高濃度の 245 mg/mL 懸濁液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2450 µg/mL）を調製した。次いで、245 mg/mL 懸濁液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 8 段階希釈し、123、61.3、30.6、15.3、7.66、3.83、1.91 及び 0.957 mg/mL の 9 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理では 245～1.91 mg/mL の被験液を、48 時間処理では 123～0.957 mg/mL の被験液を使用した。

6.2.2 調製頻度

用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分する。

6.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化がないことを肉眼的及び触知にて観察し、被験液の安定性を確認した。

6.3 対照物質

6.3.1 溶媒対照

溶媒として用いたジメチルスルホキシド (DMSO) を陰性対照物質とした。

6.3.2 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	:	525AHA、540AHK
製造元	:	協和醗酵工業株式会社、協和発酵キリン株式会社
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、ロット番号 K8H76) 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。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、ロット番号 K8H76) 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)。連続処理法では、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、ロット番号 K9F98) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次に、この溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 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。

6.4 使用細胞株

6.4.1 細胞株

チャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた。細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから 2004 年 11 月 2 日に入手した。入手後、ジメチルスルホキシドを 10v/v% 添加した培養液に細胞を懸濁し、液体窒素中で大量に凍結保存した。試験に際しては、その一部を解凍後、再培養を開始し、継代培養を行ったものについて細胞の性状検査（6.4.4）を定期的実施して、適正であることが確認されたものを試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 3 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 7 継代、染色体異常試験の連続処理法では 21 継代であった。

6.4.2 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常出現率が低いこと、種々の化学物質に対して感受性が高いこと、背景データも多いこと及びほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験に広く用いられていることから、本細胞株を選択した。

6.4.3 培養条件

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

6.4.4 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 2008 年 12 月 1 日 ~ 2008 年 12 月 18 日及び 2009 年 12 月 1 日 ~ 2009 年 12 月 22 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。

6.5 S9 mix 及び培養液

6.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素（S9/コファクターCセット、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：C081219101）を混合し、S9 mix を調製した。調製は使用時に行った。

1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	08121910
製造日	:	2008 年 12 月 19 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)
 投与方法 : 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 : 2009 年 6 月 18 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C
 ロット番号 : C08121710
 製造日 : 2008 年 12 月 17 日
 保存方法 : 冷凍 (超低温フリーザー)
 使用期限 : 2009 年 6 月 16 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

6.5.2 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 : 616941、731681
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存方法 : 冷凍 (-80°C 設定の冷凍庫)
 保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号 : 510522、643748
 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

6.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。なお、染色体異常試験の連続処理法では、48時間処理については、実験は実施したが標本観察は行わなかった。

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
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理

6.6.1 識別方法

1) 細胞増殖抑制試験

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

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。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。

6.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 2450 µg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 1230、613、306、153、76.6、38.3 及び 19.1 µg/mL の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では、最高用量の 2450 µg/mL においても、50%を超える細胞増殖抑制作用は認められなかった。一方、短時間処理法の非代謝活性化では 153 µg/mL で、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 76.6 µg/mL で、それぞれ低用量域からの 50%を超える用量依存的な細胞増殖抑制作用が認められたが、これらの用量から最高用量までは、逆に細胞増殖率が増加傾向を示した。50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、短時間処理法の非代謝活性化では 118.1 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 74.3 µg/mL、48 時間処理では 41.2 µg/mL であ

った。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められない場合は最高用量を 10 mM とする」との規定に従い、短時間処理法の代謝活性化では 2450 µg/mL を最高用量として、以下、公比 2 で計 8 用量を設定することとした。また、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を超える濃度において、細胞増殖率が逆に増加傾向を示したが、これらの用量域においては、単層細胞密度測定装置を用いての細胞密度測定に影響を及ぼすような析出物の固着は認められず、染色体観察用標本の作製に十分な細胞量が認められたことから、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定には従わず、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の 24 時間処理では 2450 µg/mL を最高用量として、連続処理法の 48 時間処理では 1230 µg/mL を最高用量として、いずれも以下、公比 2 で計 8 用量を設定することとした。

6.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するために予備試験として実施した。なお、以下の試験操作は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施された。

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被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 培養終了後、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度 99%以上）で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験

物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

2) 連続処理法

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で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。

6.6.4 染色体異常試験

以下の試験操作は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施された。

1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。

- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 µg/mL、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、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 箇所へ滴下した。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 日以上空気乾燥し、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（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL（最終濃度：0.050 µg/mL）を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 µg/mL、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。染色体標本の作製に際して、被験物質処理群については、析出が著しく染色体観察用標本の作製や観察を妨げると推測されたため、可能な限り析出を除去するために培養液を廃棄し、新しい培養液 5.0 mL を添加した遠沈管に細胞を回収した。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 箇所へ滴下した。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 日以上空気乾燥し、2%

ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。

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

6.6.5 標本の観察

染色体観察用標本を作製した後に、標本観察担当者以外の試験担当者が、被験物質処理群の標本を顕微鏡下で観察し、プレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の分裂中期像が観察出来ると予測される最高用量以下の連続した 3 用量及び当該試験において細胞増殖率が 50%を下回った用量のうち、最低用量を最高用量として以下の連続した 3 用量を選択し、標本のコード化を行った。なお、細胞増殖率が 50%を下回らなかった場合には、当該処理法における標本観察がガイドラインで定められた 3 用量以上を確保出来るように留意しながら、適宜用量数を変更し、生データにその理由を記載した。その後、標本観察担当者は、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、短時間処理法の代謝活性化については、2450、1230 及び 613 $\mu\text{g/mL}$ を対象とした最初の観察において TA(%)の増加及び downturn 現象が認められたため、306、153、76.6 及び 38.3 $\mu\text{g/mL}$ を対象とし、また非代謝活性化については、観察を実施しなかった中間用量で強い細胞増殖抑制作用が認められ、その上下の用量で TA(%)が疑陽性を示したことから、306 及び 153 $\mu\text{g/mL}$ を対象として再度コード化を実施し、標本観察を実施した。更に、短時間処理法の非代謝活性化と同様に、連続処理法においても、中間用量で強い細胞増殖抑制作用が認められたことから、被験物質処理群の全用量を染色体標本観察の対象とした。また、連続処理法の標本観察において、24 時間処理で明確ではないものの部分的な用量依存性が認められたことから、試験計画書の規定とは異なるものの、レビューアーの意見を考慮して、48 時間処理の標本観察は実施しなかった。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。

6.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常はさら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。
- 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。
- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化(frg)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）と異なり倍加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）

6.6.7 判定基準

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

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

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。

7. 試験結果

7.1 細胞増殖抑制試験

7.1.1 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 Appendix 1-1 及び 2-1 に、非代謝活性化の結果を Appendix 1-2 及び 2-2 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化では最高用量の 2450 µg/mL においても、50%を超える細胞増殖抑制作用は認められなかった。非代謝活性化では 153 及び 306 µg/mL で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 118.1 µg/mL と算出された。しかしながら、613 µg/mL 以上では細胞増殖率が 50%を超え、逆に増加傾向を示す逆転現象が認められた。

2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、変化は認められなかった。被験物質の添加に伴う析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 38.3 µg/mL 以上の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の観察

被験物質の析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、38.3 µg/mL 以上の用量で認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では、38.3 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。非代謝活性化では、153 及び 306 µg/mL で被験物質の添加に伴う析出が著しかったため観察が出来なかったものの、38.3 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.1.2 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Appendix 1-3 及び 2-3 に、48 時間処理の結果を Appendix 1-4 及び Table 2-4 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理法では 76.6～306 µg/mL で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 74.3 µg/mL と算出された。しかしながら、613 µg/mL 以上では細胞増殖率が 50%を超え、逆に増加傾向を示す逆転現象が認められた。また、48 時間処理法では 38.3 µg/mL を除く設定した全用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 41.2 µg/mL と算出された。

2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、変化は認められなかった。被験物質添加に伴う析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、38.3 µg/mL 以上の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の観察

被験物質の析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 38.3 µg/mL 以上の用量で認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理では、153~613 µg/mL では被験物質の添加に伴う析出が著しかったため観察が出来なかったものの、1230 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。また、48 時間処理では、153~613 µg/mL では被験物質の添加に伴う析出が著しかったため観察が出来なかったものの、19.1 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.2 染色体異常試験

7.2.1 短時間処理法

代謝活性化の結果を Fig. 1-1、Table 1-1 及び Appendix 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2、Table 1-2 及び Appendix 3-2 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、変化は認められなかった。被験物質の添加に伴う析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 38.3 µg/mL 以上の用量で認められた。

2) 被験物質処理終了時の観察

被験物質の析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 76.6 µg/mL 以上の用量で認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では、76.6 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。非代謝活性化では、153 及び 306 µg/mL では被験物質の添加に伴う析出が著しかったため観察が出来なかったものの、76.6 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化においては、2450 µg/mL では 4.0%、1230 µg/mL では 5.5%、613 µg/mL では 11.0%、306 µg/mL では 7.5%、153 µg/mL では 6.5%、76.6 µg/mL では 3.5% 及び 38.3 µg/mL では 2.5% を示し、613 µg/mL では 10% 以上を示したことから陽性、1230、306 及び 153 µg/mL では 5% 以上 10% 未満を示したことから疑陽性、その他の用量では 5% 未満であったことから陰性と判定された。

また、短時間処理法の非代謝活性化においては、2450 µg/mL では 5.0%、1230 µg/mL では 6.0%、613 µg/mL では 7.0%、306 µg/mL では 13.5%、153 µg/mL では 13.5%、76.6 µg/mL では 8.5%、38.3 µg/mL では 1.5% 及び 19.1 µg/mL では 1.5% を示し、306 及び 153 µg/mL では 10% 以上を示したことから陽性、2450、1230、613 及び 76.6 µg/mL では 5% 以上 10% 未満を示したことから疑陽性、その他の用量では 5% 未満であったことから陰性と判定された。なお、陽性が認められた用量では、細胞増殖率は低かった。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、

また試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあり、試験施設の背景値 (Attached Data 3) の範囲内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、短時間処理法の代謝活性化においては、2450 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、1230 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、613 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、306 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、153 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、76.6 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% 及び 38.3 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0% を示し、全ての用量で 5% 未満であったことから陰性と判定された。

また、短時間処理法の非代謝活性化においては、2450 $\mu\text{g/mL}$ では 1.5%、1230 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0%、613 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0%、306 $\mu\text{g/mL}$ では 3.0%、153 $\mu\text{g/mL}$ では 3.5%、76.6 $\mu\text{g/mL}$ では 4.5%、38.3 $\mu\text{g/mL}$ では 1.5% 及び 19.1 $\mu\text{g/mL}$ では 0% を示し、全ての用量で 5% 未満であったことから陰性と判定された。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) と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。

7.2.2 連続処理法

24 時間処理の結果を Fig. 1-3、Table 1-3 及び Appendix 3-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4 及び Appendix 3-4 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに変化は認められなかった。被験物質の添加に伴う析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 76.6 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で認められた。

2) 被験物質処理終了時の観察

被験物質の析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 76.6 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理では 153 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で、48 時間処理では 76.6 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染構造異常の出現率 (TA) は、連続処理法の 24 時間処理においては、2450 $\mu\text{g/mL}$ では 4.0%、1230 $\mu\text{g/mL}$ では 5.5%、613 $\mu\text{g/mL}$ では 9.0%、306 $\mu\text{g/mL}$ では 11.5%、153 $\mu\text{g/mL}$ では 6.5%、76.6 $\mu\text{g/mL}$ では 7.5%、38.3 $\mu\text{g/mL}$ では 5.5% 及び 19.1 $\mu\text{g/mL}$ では 10.5% を示し、306 $\mu\text{g/mL}$ 及び 19.1 $\mu\text{g/mL}$ では 10% 以上を示したことから陽性、1230、613、153、76.6 及び 38.3 $\mu\text{g/mL}$ では 5% 以上 10% 未満を示したことから疑陽性、その他の用量では 5% 未満であったことから陰性と判定された。

また、連続処理法の 48 時間処理においては、24 時間処理で総合的に疑陽性 (軽微な陽性) として確定させたため、標本観察は実施しなかった。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあり、試験施設の背景値 (Attached Data 3) の範囲内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、連続処理法の 24 時間処理においては、2450 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0%、1230 $\mu\text{g/mL}$ では 1.5%、613 $\mu\text{g/mL}$ では 6.0%、306 $\mu\text{g/mL}$ では 6.0%、153 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0%、76.6 $\mu\text{g/mL}$ では 9.5%、38.3 $\mu\text{g/mL}$ では 3.5% 及び 19.1 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0% を示し、613、306 及び 76.6 $\mu\text{g/mL}$ では 5% 以上 10% 未満であったことから疑陽性と判定された。

また、連続処理法の 48 時間処理においては、24 時間処理で総合的に疑陽性 (軽微な陽性) として確定させたため、標本観察は実施しなかった。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) と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。

8. 考察

1-クロロアンスラキノンは、細胞増殖抑制試験の短時間処理法・代謝活性化では50%以上の細胞毒性が認められなかったため、10 mM相当の2450 µg/mLを最高用量として公比2で計8用量を染色体異常試験のために設定した。これに対して、短時間処理法・非代謝活性化及び連続処理法においては、細胞増殖率が用量依存的な減少を示し、50%以下に減少した後に逆に増加傾向を示す現象が認められた。この細胞増殖率の増加を示した用量域では、細胞密度測定に影響を及ぼすような析出物の固着は認められず、染色体観察用標本の作製に十分な細胞量が認められたことから、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定には従わず、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法の24時間処理では2450 µg/mLを最高用量として、連続処理法の48時間処理では1230 µg/mLを最高用量として公比2で計8用量を染色体異常試験のために設定した。ただし、染色体異常試験において、短時間処理法で染色体の構造異常を持つ細胞の出現率(TA)が陽性の判定基準にあったため、染色体異常試験の連続処理は実施しなかった。

染色体異常試験において、染色体構造異常の総出現率の指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率(TA)は、短時間処理法の代謝活性化では1230 µg/mLから153 µg/mLまでの用量で疑陽性や陽性の判定基準内の数値を示したが、明らかな用量依存性は認められなかった。一方、非代謝活性化では、TAは2450 µg/mLから76.6 µg/mLまでの用量で、疑陽性や陽性の判定基準内の数値を示したが、陽性の判定基準内の数値を示した用量では細胞増殖率が著しく低く、また、TAの明らかな用量依存性も認められなかった。さらに、連続処理法の24時間処理では、TAは1230 µg/mLから19.1 µg/mLまでの用量で、疑陽性や陽性の判定基準内の数値を示したが、陽性の判定基準内の数値を示した用量では細胞増殖率が著しく低い用量があり、また、TAの明らかな用量依存性も認められなかった。

以上の染色体異常試験の結果から、総合的に判断して、1-クロロアンスラキノンは短時間処理法及び連続処理法ともに用量依存性を伴わない疑陽性から陽性の判定基準にあるTAの増加が認められたことから、染色体構造異常誘発性は総合的に疑陽性(軽微な陽性)であると判定した。一方、倍数性細胞の出現率は、連続処理法の24時間処理で疑陽性の判定基準内の数値を示したが、明らかな用量依存性は認められなかったことから、1-クロロアンスラキノンの染色体数的異常誘発性は、総合的に疑陽性(軽微な陽性)と判定した。

陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。更に、いずれの群においても同一用量における2枚のプレート間に染色体異常細胞の出現頻度の著しい差は認められなかったことから、試験は適切に実施されたと判断した。

1-クロロアンスラキノン及びその類縁物質である 2-chloroanthraquinone は、細菌を用いる復帰突然変異試験において TA100 及び TA1537 菌株に対して、代謝活性化及び非代謝活性化の条件下で陰性を示すと報告されている⁶⁾。

以上の結果から、1-クロロアンスラキノンは本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数的異常ともに疑陽性（軽微な陽性）を示すと結論した。

9. 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) : ほ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) Brown JP and Brown RJ (1976): Mutagenesis by 9,10-anthraquinone derivatives and related compounds in *Salmonella typhimurium*, *Mutation Res.*, **40**, 203-224

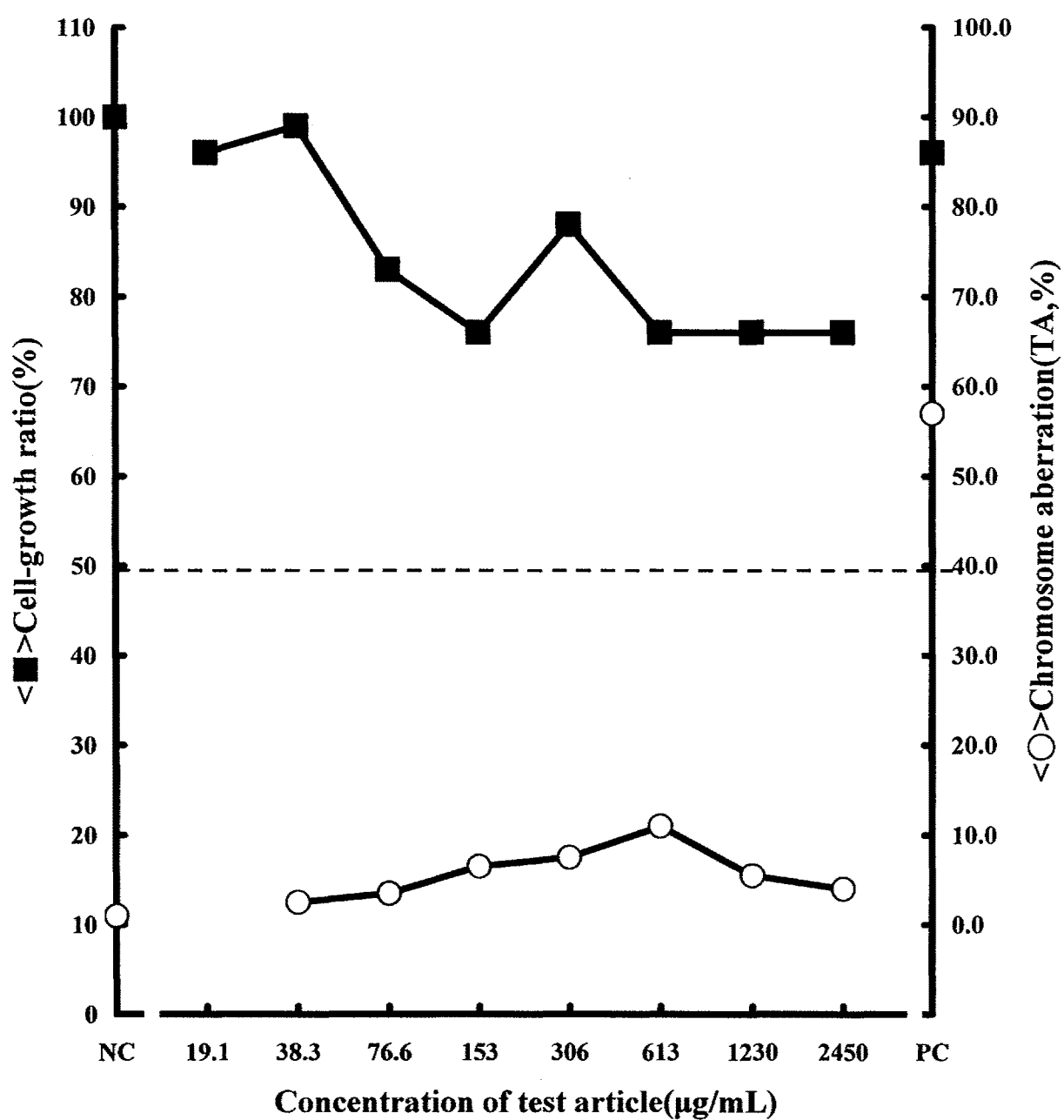


Fig. 1-1
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone
[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control (DMSO)

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

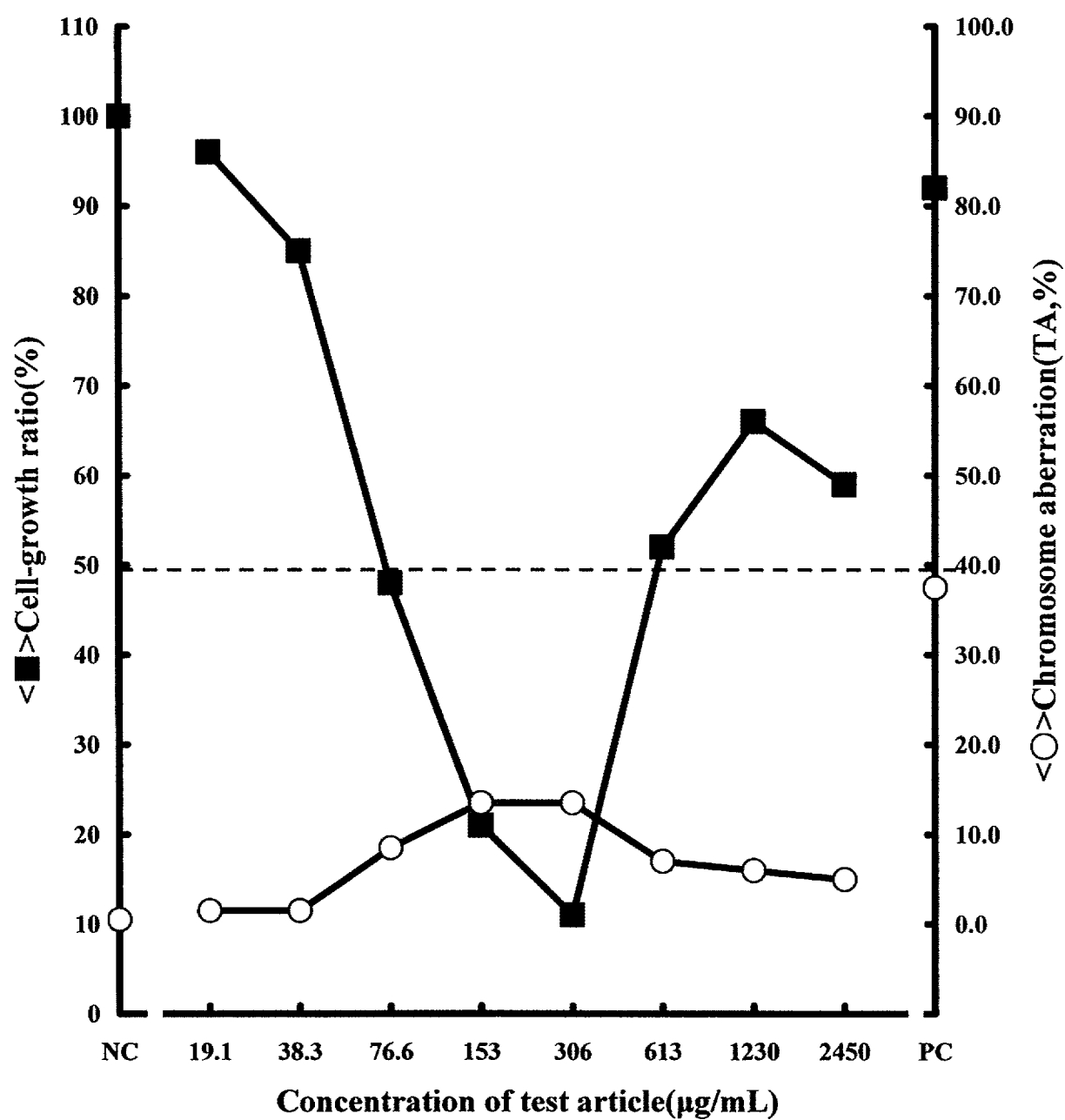


Fig. 1-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone
[Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control (DMSO)

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

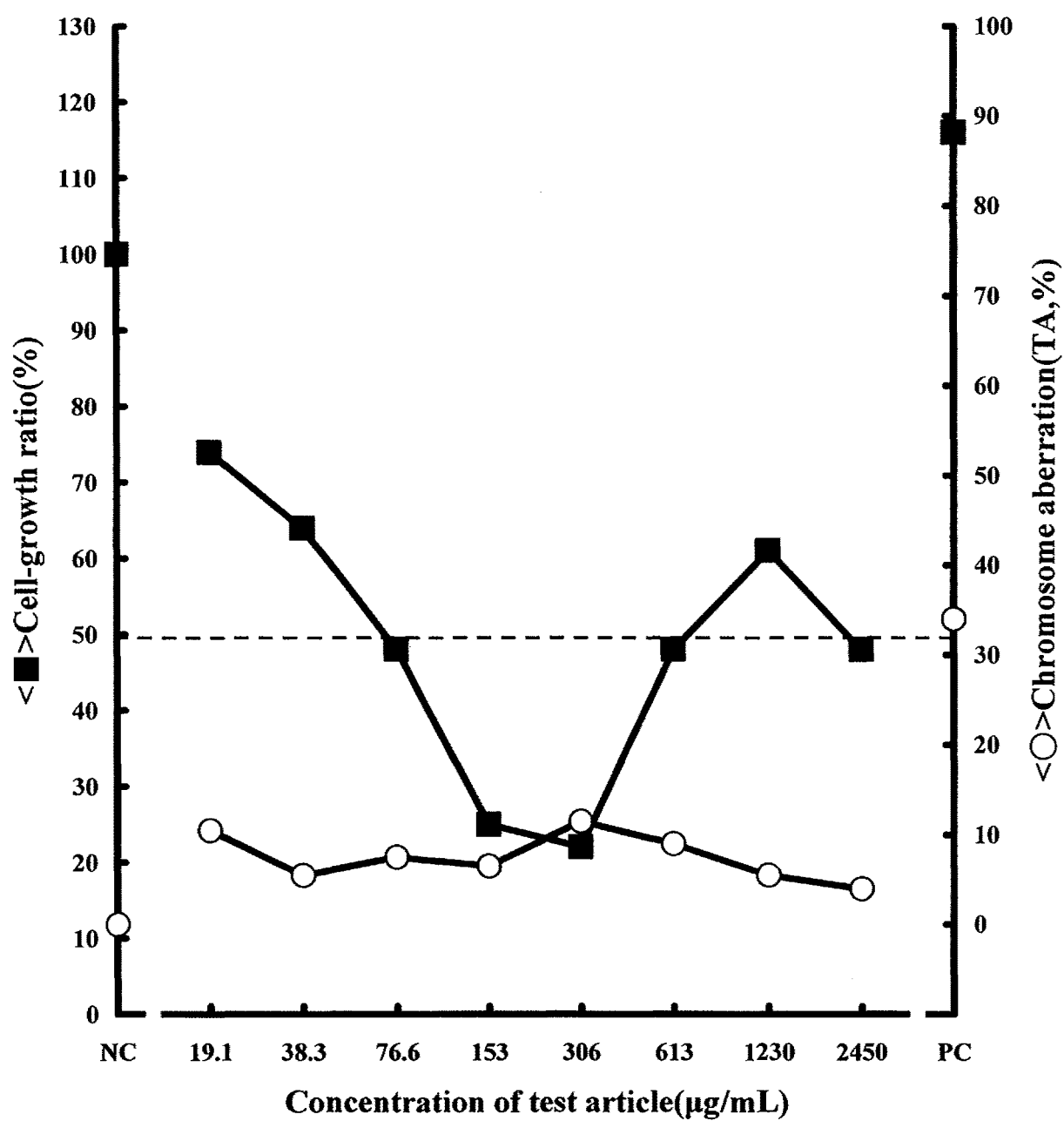


Fig. 1-3
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone
[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(DMSO)

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

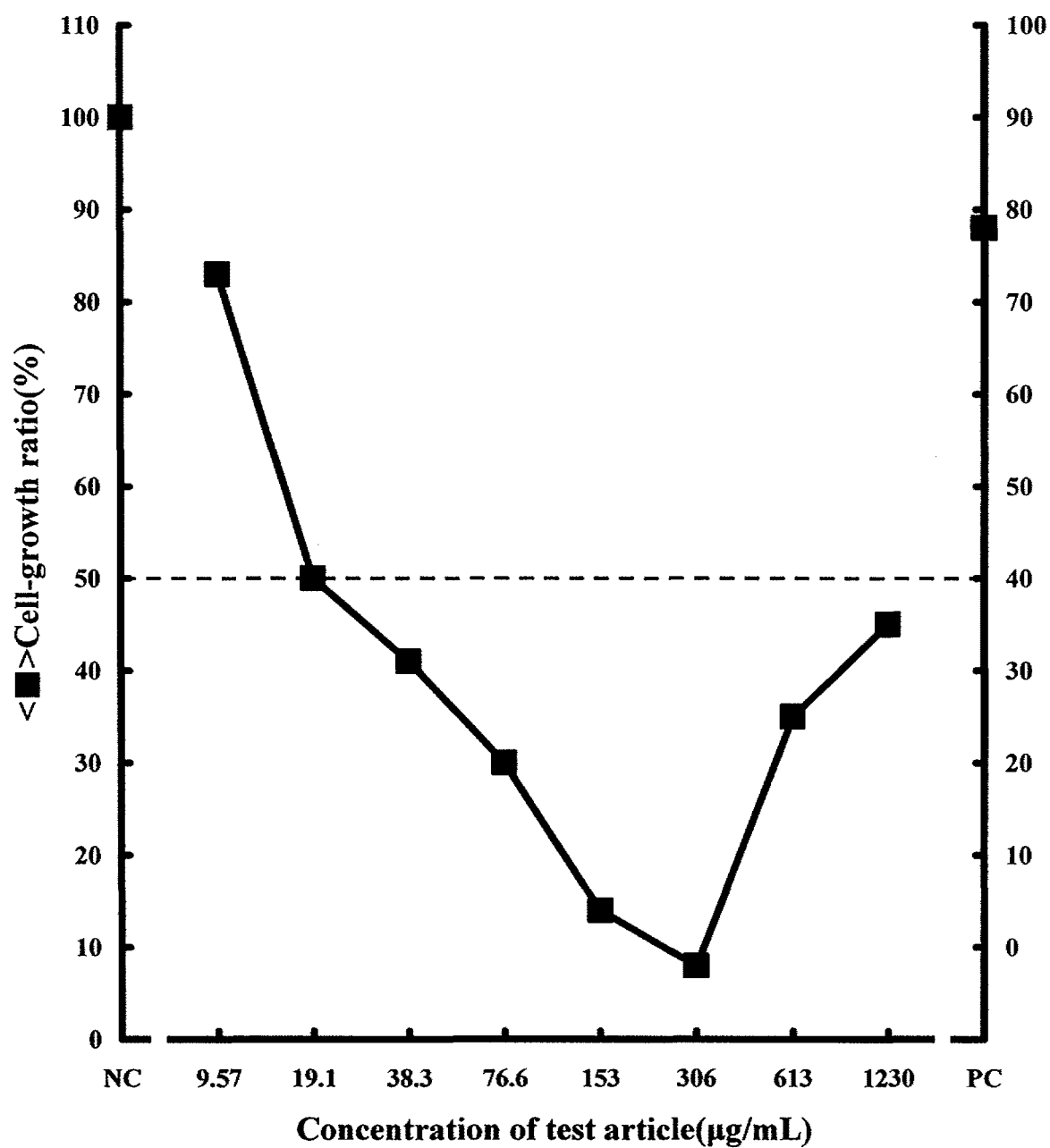


Fig. 1-4

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone

[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(DMSO)

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

Chromosome preparations were not observed.

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone
[Short-term treatment:+S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)					Slide No.	
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge- ment	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)		Judge- ment
6-18	+	NC	100	1	0	0	0	0	1	0	1		100	100	1	0	1		57-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	92	100	0	0	0	-	74-1
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		(100)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		38.3	100	0	1	0	0	0	1	0	1		92	100	0	0	0		41-1
			100	1	3	0	0	0	4	0	4	-	99	100	2	0	2	-	17-1
			200	1(0.5)	4(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(2.5)	0(0.0)	5(2.5)		(99)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		76.6	100	2	2	0	0	0	4	0	4		76	100	1	0	1		30-1
			100	1	3	0	0	0	3	0	3	-	84	100	0	0	0	-	92-1
			200	3(1.5)	5(2.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	7(3.5)	0(0.0)	7(3.5)		(83)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		153	100	4	2	0	1	0	7	0	7		76	100	0	0	0		73-1
			100	2	4	0	0	0	6	0	6	±	69	100	0	0	0	-	72-1
			200	6(3.0)	6(3.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	13(6.5)	0(0.0)	13(6.5)		(76)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		306	100	2	5	0	0	0	7	0	7		76	100	0	0	0		66-1
			100	3	6	0	0	0	8	1	9	±	92	100	0	0	0	-	02-1
			200	5(2.5)	11(5.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	15(7.5)	1(0.5)	16(8.0)		(88)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		613	100	3	10	0	0	0	13	0	13		69	100	0	0	0		51-1
			100	3	7	0	0	0	9	0	9	+	76	100	0	0	0	-	79-1
			200	6(3.0)	17(8.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	22(11.0)	0(0.0)	22(11.0)		(76)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		1230	100	2	2	0	0	0	4	0	4		69	100	0	0	0		85-1
			100	5	2	0	0	0	7	0	7	±	76	100	0	0	0	-	91-1
			200	7(3.5)	4(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	11(5.5)	0(0.0)	11(5.5)		(76)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		2450	100	0	2	0	1	0	3	0	3		76	100	0	0	0		14-1
			100	1	4	0	0	0	5	1	6	-	69	100	0	0	0	-	67-1
			200	1(0.5)	6(3.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	8(4.0)	1(0.5)	9(4.5)		(76)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		PC	100	7	49	0	0	0	53	0	53		92	100	0	0	0		13-1
			100	9	56	0	0	0	61	0	61	+	92	100	0	0	0	-	55-1
			200	16(8.0)	105(52.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	114(57.0)	0(0.0)	114(57.0)		(96)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

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

other: including fragmentation

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

NC: Negative control (DMSO)

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

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone
[Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article ($\mu\text{g/mL}$)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)					Slide No.	
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge- ment	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)		Judge- ment
6-18	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	07-1
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	124	100	0	1	1	-	62-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(100)	200	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)			
		19.1	100	0	0	0	1	0	1	0	1	-	99	100	0	0	0	-	28-1
			100	1	1	0	0	0	2	0	2	-	116	100	0	0	0	-	34-1
			200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	(96)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
		38.3	100	0	0	0	1	0	1	0	1	-	99	100	2	0	2	-	25-1
			100	2	0	0	0	0	2	0	2	-	91	100	1	0	1	-	61-1
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	(85)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)			
		76.6	100	2	8	0	0	0	10	0	10	$\pm$	49	100	6	0	6	-	96-1
			100	3	4	0	0	0	7	0	7	$\pm$	58	100	3	0	3	-	59-1
			200	5(2.5)	12(6.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	17(8.5)	0(0.0)	17(8.5)	(48)	200	9(4.5)	0(0.0)	9(4.5)			
		153	100	2	9	0	2	0	12	1	13	+	24	100	3	0	3	-	58-1
			100	5	10	0	1	0	15	1	16	+	24	100	4	0	4	-	21-1
			200	7(3.5)	19(9.5)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	27(13.5)	2(1.0)	29(14.5)	(21)	200	7(3.5)	0(0.0)	7(3.5)			
		306	100	6	7	0	1	0	14	0	14	+	16	100	3	0	3	-	53-1
			100	5	9	0	1	0	13	0	13	+	8	100	3	0	3	-	19-1
			200	11(5.5)	16(8.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	27(13.5)	0(0.0)	27(13.5)	(11)	200	6(3.0)	0(0.0)	6(3.0)			
		613	100	4	7	0	0	0	11	0	11	$\pm$	58	100	2	0	2	-	89-1
			100	1	1	0	1	0	3	0	3	$\pm$	58	100	0	0	0	-	11-1
			200	5(2.5)	8(4.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	14(7.0)	0(0.0)	14(7.0)	(52)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)			
		1230	100	1	4	0	0	0	5	0	5	$\pm$	74	100	1	0	1	-	80-1
			100	3	5	0	0	0	7	0	7	$\pm$	74	100	1	0	1	-	50-1
			200	4(2.0)	9(4.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	12(6.0)	0(0.0)	12(6.0)	(66)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)			
		2450	100	2	1	0	0	0	3	0	3	$\pm$	66	100	1	0	1	-	63-1
			100	1	5	0	1	0	7	0	7	$\pm$	66	100	2	0	2	-	97-1
			200	3(1.5)	6(3.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	10(5.0)	0(0.0)	10(5.0)	(59)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)			
		PC	100	8	35	0	0	0	40	0	40	+	99	100	0	0	0	-	65-1
			100	5	32	0	0	0	35	0	35	+	108	100	0	0	0	-	15-1
			200	13(6.5)	67(33.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	75(37.5)	0(0.0)	75(37.5)	(92)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			

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

other: including fragmentation

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

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075 $\mu\text{g/mL}$)

Table 1-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Chloroanthraquinone
[Continuous treatment:24hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.		
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge- ment	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)	Judge- ment
24-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	01-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	93	100	0	0	0	-	60-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		19.1	100	2	6	0	0	0	8	0	8	+	75	100	1	0	1	-	35-1
			100	2	11	0	0	0	13	0	13	+	68	100	1	0	1	-	95-1
			200	4(2.0)	17(8.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	21(10.5)	0(0.0)	21(10.5)	(74)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)			
		38.3	100	2	4	0	0	0	5	0	5	±	62	100	2	0	2	-	29-1
			100	2	4	0	0	0	6	0	6	±	62	100	5	0	5	-	78-1
			200	4(2.0)	8(4.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	11(5.5)	0(0.0)	11(5.5)	(64)	200	7(3.5)	0(0.0)	7(3.5)			
		76.6	100	5	3	0	0	0	8	0	8	±	49	100	9	0	9	±	86-1
			100	3	4	0	0	0	7	0	7	±	43	100	10	0	10	±	49-1
			200	8(4.0)	7(3.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	15(7.5)	0(0.0)	15(7.5)	(48)	200	19(9.5)	0(0.0)	19(9.5)			
		153	100	2	7	0	0	0	9	1	10	±	24	100	2	0	2	-	19-1
			100	0	4	0	0	0	4	0	4	±	24	100	2	0	2	-	23-1
			200	2(1.0)	11(5.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	13(6.5)	1(0.5)	14(7.0)	(25)	200	4(2.0)	0(0.0)	4(2.0)			
		306	100	4	8	0	1	0	13	0	13	+	24	100	6	0	6	±	71-1
			100	2	8	0	0	0	10	1	11	+	18	100	6	0	6	±	94-1
			200	6(3.0)	16(8.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	23(11.5)	1(0.5)	24(12.0)	(22)	200	12(6.0)	0(0.0)	12(6.0)			
		613	100	3	8	0	0	0	10	0	10	±	43	100	8	0	8	±	93-1
			100	5	1	0	2	0	8	0	8	±	49	100	4	0	4	±	88-1
			200	8(4.0)	9(4.5)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	18(9.0)	0(0.0)	18(9.0)	(48)	200	12(6.0)	0(0.0)	12(6.0)			
		1230	100	1	4	0	0	0	5	1	6	±	62	100	3	0	3	-	47-1
			100	3	3	0	0	0	6	0	6	±	56	100	0	0	0	-	27-1
			200	4(2.0)	7(3.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	11(5.5)	1(0.5)	12(6.0)	(61)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)			
		2450	100	2	2	0	0	0	4	0	4	-	43	100	3	0	3	-	52-1
			100	3	1	0	0	0	4	0	4	-	49	100	1	0	1	-	76-1
			200	5(2.5)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	8(4.0)	0(0.0)	8(4.0)	(48)	200	4(2.0)	0(0.0)	4(2.0)			
		PC	100	7	25	0	0	0	30	0	30	+	112	100	0	0	0	-	44-1
			100	6	35	0	0	0	38	0	38	+	112	100	0	0	0	-	90-1
			200	13(6.5)	60(30.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	68(34.0)	0(0.0)	68(34.0)	(116)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			

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

other: including fragmentation

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

NC: Negative control (DMSO)

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

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

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