

試験報告書

クロベンタプロモシクロヘキサンのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号：4L424)

株式会社三菱化学安全科学研究所

目次

	頁
要約	7
材料及び方法	
1. 試験物質	8
2. 指標細胞	8
3. 培地	9
4. S9 Mix	9
5. 試験物質の調製	9
6. 細胞増殖抑制試験	10
7. 染色体異常試験	11
結果	
1. 細胞増殖抑制試験	14
2. 染色体異常試験	14
結論	14
参考文献	15
補足資料	15
表	16
図	19

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、クロベンタプロモシクロヘキサン の *in vitro*における染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験に先立ち、代謝活性化法によらない場合と代謝活性化法による場合について、50, 500, 5000 $\mu\text{g/ml}$ で予備試験を実施したところ、細胞増殖度は、代謝活性化法によらない場合の 500 $\mu\text{g/ml}$ で陰性対照の 1 割程度、代謝活性化法による場合の 5000 $\mu\text{g/ml}$ で 1～2 割程度であった。

予備試験の結果を基に、細胞増殖抑制試験を実施したところ、50%細胞増殖抑制濃度 (TCID₅₀) は、代謝活性化法によらない場合の 24時間、48時間処理で 48, 25 $\mu\text{g/ml}$ 、代謝活性化法による場合の S9 Mix 共存下、非共存下で 138, 33 $\mu\text{g/ml}$ であった。

染色体異常試験は、細胞増殖抑制試験の結果を基に、TCID₅₀を超える濃度を最高濃度とし、公比 2 で 3 濃度で実施した。その結果、染色体構造異常細胞の出現率は、代謝活性化法によらない場合の 24時間処理の 15, 30, 60 $\mu\text{g/ml}$ で 5.0, 40.0, 97.4%、48時間処理の 30 $\mu\text{g/ml}$ で 10.5%であった。更に、代謝活性化法による場合の S9 Mix 非共存下の 30, 60 $\mu\text{g/ml}$ 及び S9 Mix 共存下の 75, 150 $\mu\text{g/ml}$ での構造異常細胞出現率は、それぞれ 11.0, 90.5及び 62.5, 97.5%であった。なお、数的異常細胞の出現率は、全ての処理条件において 5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下におけるクロベンタプロモシクロヘキサンの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と結論した。

材料及び方法

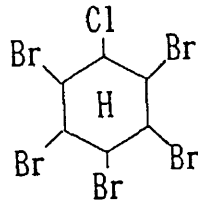
1. 試験物質

1.1 被験物質

より提供されたクロペンプロモシロヘキサン (lot No.

純度95%以上)を使用した。被験物質は、融点 185°C以上の白色粉末であり、通常の取扱い条件では安定である。オクタノール/水分配係数 4.72, 水への溶解度 10mg/l 以下 (20°C) である。なお、本ロットについては実験開始前及び実験終了後被験物質製造者が分析したデータを入手し、安定であることの確認を行った。

化学名：1, 2, 3, 4, 5-ペンプロモ-6-クロシロヘキサン
化学式：C₆H₆Br₅Cl
構造式：



分子量：513.09
CAS No.：87-84-3

1.2 対照物質

(1) 陰性対照物質

ジメチルスルホキシド (DMSOと略す, 関東化学株式会社, ロット番号：603E2089, 純度 >99.7%)

(2) 陽性対照物質

(a) 代謝活性化法によらない場合

マイトマイシンC (MMCと略す, 協和醸酵工業株式会社, ロット番号：967ADD, 純度 約 100%)

(b) 代謝活性化法による場合

ベンゾ[a]ピレン (BPと略す, 東京化成工業株式会社, ロット番号：AX01, 純度 99.5%)

2. 指標細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を使用した。細胞は、大日本製薬株式会社より1994年8月30日に購入し、細胞懸濁液に対して10%の割合でジメチルスルホキシド (DMSOと略す) を添加したものを1mlずつ小分けして、液体窒素中で凍結保存した。試験には、これを融解して培養し、その後の継代数が5代以内のものを使用

した。細胞の培養には、プラスチックシャーレ（直径6cm又は10cm；Becton Dickinson and Company）を用い、炭酸ガス5%，空気95%，温度37℃，加湿条件下に自動制御された炭酸ガス細胞培養装置（NAPCO 社，7300型）内で培養した。

3. 培地

3.1 MEM

イーグル最少培地（イーグル MEM培地「ニッスイ」①；日水製薬株式会社）を添付の処方に従って精製水に溶解し、オートクレーブ滅菌（121℃，15分間，以下同じ）を行った。この1ℓに、別に滅菌した10%炭酸水素ナトリウム水溶液12.5mlと0.292% L-グルタミン水溶液10mlを添加した。

3.2 培養液

MEMに非働化（56℃，30分間加熱処理）した子牛血清（GIBCO BRL，ロット番号：43N1140）を10%の割合で添加した。

4. S9 Mix

4.1 S9

市販品（キッコーマン株式会社，ロット番号：RAA-318，1994年11月11日製造）を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラット（体重192～229g）にフェノバルビタールを30mg/kgで1回，60mg/kgで3回，24時間間隔で腹腔内投与し，5,6-ベンゾフラボン80mg/kgをフェノバルビタールの第3回目の投与時に1回併用投与して作製した肝ホモジネートの9,000g上清分画である。使用時まで-80℃以下で保存した。

4.2 S9 Mix

S9 Mix 1ml当たり，以下の組成で用時調製し，使用時まで氷中に保存した。

S9	0.3ml
塩化マグネシウム（6水和物）	5μmol
塩化カリウム	33μmol
グルコース 6-リン酸	5μmol
β-NADP ⁺	4μmol
HEPES(pH 7.2)	4μmol
滅菌精製水	残量

5. 試験物質の調製

5.1 被験物質懸濁液

被験物質をDMSOに用時懸濁させて最高濃度の200倍の被験物質懸濁液を調製した。

これをさらに溶媒を用いて希釈し、各濃度の200倍の被験物質懸濁液を調製した。
なお、156 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度においては、被験物質はDMSOに対し溶解した。

5.2 被験物質溶液の濃度確認

染色体異常試験に用いた最高及び最低濃度の被験物質溶液について濃度分析を実施し、いずれも所定濃度の $100 \pm 5\%$ 以内であることを確認した（15頁、補足資料参照）。

5.3 陽性対照物質溶液

MMCは局方生理食塩液に3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で用時溶解し、ろ過滅菌した。

BPはDMSOに4 mg/ml の濃度で溶解し、凍結保存したものを用時室温で融解して使用した。

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における適切な濃度を決定するために、細胞増殖抑制試験を実施した。

6.1 被験物質濃度

細胞増殖抑制試験に先立ち、代謝活性化法によらない場合の24時間処理と代謝活性化法による場合のS9 Mix 共存下について、50, 500, 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の3濃度で細胞増殖を目視で観察する予備試験を実施した。この試験では1濃度あたり1枚のシャーレを用い処理24時間後に観察した。その結果、代謝活性化法によらない場合の24時間処理の5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生存細胞は認められず、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で陰性対照の1割以下、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では5割程度の細胞増殖であった。この50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ については更に24時間処理を継続し48時間処理としたところ、細胞増殖は陰性対照の5割以下であった。代謝活性化法による場合の5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の細胞増殖は、陰性対照の1～2割程度、500, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、陰性対照と差が認められなかった。

予備試験の結果を基に、代謝活性化法によらない場合の24時間処理及び代謝活性化法による場合のS9 Mix 非共存下では15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の6濃度、代謝活性化法によらない場合の48時間処理では7.81, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の7濃度、代謝活性化法による場合のS9 Mix 共存下では19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の9濃度で細胞増殖抑制試験を実施した。

6.2 細胞処理

4×10^3 個/ ml の細胞懸濁液を6 cmシャーレに5 ml播き、3日間培養した。

各シャーレから培養液を除去した後、代謝活性化法によらない場合は、細胞を 25 μ l の被験物質懸濁液と 5 ml の培養液にて、24 時間及び 48 時間処理した。

代謝活性化法による場合の S9 Mix 共存下は、細胞を 15 μ l の被験物質懸濁液と 0.5 ml の S9 Mix 及び 2.5 ml の培養液にて 6 時間処理し、MEM で 3 回洗浄後新しい培養液 5 ml で更に 18 時間培養した。なお予備検討の結果、代謝活性化法によらない場合と代謝活性化法による場合において細胞毒性に濃度差が認められたため、S9 Mix 非共存下についても細胞増殖抑制試験を行った。すなわち、細胞を 15 μ l の被験物質懸濁液と 3 ml の培養液にて S9 Mix 共存下と同様に処理した。

陰性対照も同様に処理した。各濃度あたり 2 枚のシャーレを用いた。

6.3 細胞数の計測

処理終了後の観察において、一部の濃度で培養液中に棒状結晶が認められたため、血球計算盤を用いて、細胞数の計測を行った。

処理終了後、細胞表面をダルベッコのリン酸緩衝液（ダルベッコ PBS「ニッスイ」；日水製薬株式会社、PBS(-)と略す）で 1 回洗浄後、0.25%トリプシン溶液（溶媒：PBS(-)）処理後、培養液を加えピペティングすることにより細胞を剥離し、血球計算盤で細胞数を数えた。

6.4 50%細胞増殖抑制濃度の算出

代謝活性化法によらない場合並びに代謝活性化法による場合のそれぞれについて、陰性対照値を 100% として生存曲線を作成した。細胞毒性が認められた場合は、被験物質による 50% 細胞増殖抑制濃度 (TCID₅₀) を求めた。

7. 染色体異常試験

7.1 試験物質濃度

細胞増殖抑制試験の結果、代謝活性化法によらない場合の 24 時間、48 時間処理及び代謝活性化法による場合の S9 Mix 共存下、非共存下において、細胞増殖抑制が認められ、TCID₅₀ は、それぞれ 48, 25 及び 138, 33 μ g/ml であった。

これらの結果より、代謝活性化法によらない場合の 24 時間処理及び代謝活性化法による場合の S9 Mix 非共存下では 15, 30, 60 μ g/ml、代謝活性化法によらない場合の 48 時間処理では 7.5, 15, 30 μ g/ml、代謝活性化法による場合の S9 Mix 共存下では 37.5, 75, 150 μ g/ml のそれぞれ 3 濃度で染色体異常試験を実施した。

陽性対照であるMMC及びBPの濃度は、それぞれ広く使用されている 0.03, 20 $\mu\text{g/ml}$ とした。

7.2 細胞処理

代謝活性化法によらない場合は、6.2 と同様に処理した。陽性対照 (MMC) については、細胞を 5 ml の培養液と 50 μl の MMC 溶液からなる液で同様に処理した。

代謝活性化法による場合についても、6.2 と同様に処理した。陽性対照 (BP) については、S9 Mix 共存下の場合には 0.5 ml の S9 Mix と 2.5 ml の培養液の混液、また S9 Mix 非共存下の場合には 3 ml の培養液に 15 μl の BP 溶液を加えた液を同様に処理した。

陰性対照についても同様に処理した。

7.3 標本作製

標本作製の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 $\mu\text{g/ml}$ となるように各シャーレに加え、分裂中期の細胞を蓄積させた。細胞表面を PBS(-) で 1 回洗浄後、トリプシン処理により細胞を剥離し、1000 rpm (最大遠心加速度, 170~180g), 5 分間遠心分離 (以下同様) することにより細胞を集めた。上清を除去し、これに 4 ml の 0.075 M 塩化カリウム溶液を加えて低張処理 (37°C, 15分) を行った。更に、4 ml の冷却したメタノール・酢酸(3:1) 混合液 (カルノア固定液) を加え細胞を固定した。遠心分離後固定液を捨て、新しい固定液を 4 ml 加えた。この操作を 3~4 回繰り返した。固定終了後、少量の固定細胞懸濁液を調製し、濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスの 2 箇所滴下し、乾燥してスライド標本とした。各濃度あたり 2 枚作製した。これを、1/150 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で希釈した 3% ギムザ溶液で 20 分間染色し、水洗、乾燥後、封入剤で封入して観察標本とした。

7.4 観 察

構造異常及び数的異常について盲検法で観察を行った。

(1) 構造異常

染色体がよく拡がり 25 \pm 2 本の染色体数をもつ分裂中期像を選び、構造異常の有無を調べた。異常の分類は以下の通りとした¹⁾。

{ 染色体型切断 染色体型交換 染色体型切断 染色体型交換 その他	ギャップ	(染色分体型及び染色体型を含む；gと略す)
	染色体型切断	(ctbと略す)
	染色体型交換	(cteと略す)
	染色体型切断	(csbと略す)
	染色体型交換	(二動原体、環状染色体など；cseと略す)
	その他	(断片化)

ギャップは、染色分体に見られる非染色部分が染色分体の縦軸上にあり、その幅が染色分体の幅以上で著しく離れておらず、非染色部分の形状が明確なものとし、切断とは区別した。1枚のシャーレあたり100個、すなわち各濃度あたり200個の細胞を調べた。

(2) 数的異常

1枚のシャーレあたり100個、すなわち各濃度あたり200個の分裂中期像を調べ核内倍加細胞を含む倍数体細胞数を計数した。

(3) 有糸分裂指数

シャーレあたり1000個、すなわち各濃度あたり2000個の細胞について有糸分裂細胞数を数え、有糸分裂指数を求めた。

7.5 試験結果の判定基準

構造異常については、異常を1個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし、ギャップのみの異常をもつ細胞を除いた場合(-g)と含めた場合(+g)の2通りの方法で集計した。+gの集計値について、陰性対照との間で χ^2 検定を行った。数的異常についても同様に検定を実施した。

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、ギャップのみを示す細胞を含めた場合の構造異常あるいは数的異常細胞の出現率が5%未満を陰性(-)、5%以上10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とした。

なお、染色体異常の出現頻度を図示し、結果が陽性の場合には、 D_{20} 値(分裂中期像の20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の濃度, mg/ml)を算出した。また、その代表的な染色体異常像の写真を添付した。

結 果

1. 細胞増殖抑制試験

結果を図1～3に示す。

代謝活性化法によらない場合の24時間、48時間処理及び代謝活性化法による場合のS9 Mix 共存下、非共存下において、細胞増殖抑制が認められ、TCID₅₀は、それぞれ48、25及び138、33 μ g/mlであった。

2. 染色体異常試験

結果を表1～3並びに図4～7に示す。

代謝活性化法によらない場合の24時間処理では、被験物質による染色体構造異常細胞の出現率は15、30、60 μ g/mlで5.0、40.0、97.4%であった。また、24時間処理の60 μ g/mlでは、細胞毒性のため所定の細胞数(200個)が観察できなかった。更に、48時間処理の30 μ g/mlにおいて構造異常細胞の出現率が10.5%であった。一方、代謝活性化法による場合のS9 Mix 非共存下の30、60 μ g/ml及びS9 Mix 共存下の75、150 μ g/mlにおいて構造異常細胞の出現率は、それぞれ11.0、90.5及び62.5、97.5%であった。なお、数的異常細胞の出現率は、全ての処理条件において5%未満であった。

代謝活性化法によらない場合の24時間処理及び代謝活性化法による場合のS9 Mix 非共存下の60 μ g/mlでは、標本作製におけるコルセミド添加直前の観察において培養液中に被験物質の棒状結晶の析出が認められた。一方、代謝活性化法による場合のS9 Mix 共存下の150 μ g/mlでは認められなかった。

本試験の結果から求めたD₂₀値は、代謝活性化法によらない場合の24時間処理では0.016mg/ml、48時間処理では0.062mg/ml、代謝活性化法による場合のS9 Mix 非共存下では0.018mg/ml、S9 Mix 共存下では0.036mg/mlであった。

有糸分裂指数は、いずれの処理においても最高濃度において顕著な減少が認められた。更に、代謝活性化法によらない場合の24時間処理の30 μ g/mlと代謝活性化法による場合のS9 Mix 共存下の75 μ g/mlの有糸分裂指数は、陰性対照値の半分以下であった。

なお、陽性対照における染色体異常細胞出現頻度の著明な増加は、本試験の試験条件が適切であったことを示す。

結 論

以上の結果より、本試験条件下におけるクロバクプロモシクロハキソンのCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と結論した。

参考文献

- 1) 日本環境変異学会・哺乳動物試験分科会 ; “化学物質による染色体異常アトラス”
朝倉書店, 東京, 1988

補足資料

被験物質処理時に, 調製した被験物質溶液の濃度確認を実施した. その結果を下表に示す.

単位 : mg/ml

設定濃度	1.50	30.0
分析結果	1.47	30.4
	1.48	30.2
MEAN	1.48(98.7)	30.3(101)

かっこ内は設定濃度に対する割合 (%) を示す.

表 1 染色体異常試験結果 (代謝活性化法によらない場合)

被験物質名 : クロベニタブ ロモシクロヘキサン

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	倍數体數 (%)	検2) 定	染色体構造異常細胞1)の出現數と出現頻度 (%)										計 + g	検2) 定	判3)	
						ギヤップ g	ctb	cte	csb	cse	その他	- g							
陰性対照 (DMSO)	2 4	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	/	
			100	0	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	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)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)		
	4 8	0	100	0	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	
			100	0	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	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)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
被験物質	2 4	15	100	0	-	0	5	0	1	0	0	0	0	0	6	6	±		
			100	0	-	0	4	0	0	0	0	0	0	4	4	**			
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	9(4.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	10(5.0)	10(5.0)	/			
			100	0	-	0	14	25	0	0	0	0	0	31	31			+	
			100	0	-	0	37	30	1	0	0	1	0	49	49	***			
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	51(25.5)	55(27.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	80(40.0)	80(40.0)	+			
	4 8	#	60	51	0	-	0	27	20	1	0	0	20	49	49		+		
				100	0	-	0	59	66	2	0	0	20	98	98	***			
				151	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	86(57.0)	86(57.0)	3(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	40(26.5)	147(97.4)	147(97.4)	/			
				100	0	-	0	1	0	0	0	0	0	1	1			-	
				100	0	-	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2			-
				200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	3(1.5)		+	
陽性対照 (MMC)	2 4	0.03	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/		
			100	0	-	0	1	0	1	0	0	0	2	2	/				
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)		/			
	4 8	0.03	100	1	-	0	3	9	3	1	0	0	13	13	+				
			100	0	-	0	1	5	2	1	0	0	8	8		***			
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	14(7.0)	5(2.5)	2(1.0)	2(1.0)	0(0.0)	21(10.5)	21(10.5)		/			
2 4	0.03	100	0	-	0	15	14	0	0	0	0	25	25	/					
		100	0	-	0	19	17	0	0	0	0	32	32		***				
		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	34(17.0)	31(15.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	57(28.5)	58(29.0)		/				
4 8	0.03	100	0	-	0	16	22	6	1	0	0	37	37	/					
		100	0	-	0	10	21	2	1	0	0	34	34		***				
		200	1(0.5)	1(0.5)	43(21.5)	8(4.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	71(35.5)	71(35.5)	/						

1) ctb: 染色体分型切断, cte: 染色体分型交換, csb: 染色体分型切断, cse: 染色体分型交換, その他: 断片化
 2) x2検定を用いて有意差を検定, 構造異常については+gのみ検定; *** (p<0.001), ** (p<0.01), * (p<0.05)
 3) 判定基準 (+gの集計値) 5%未満: 一陰性, 5%以上10%未満: 土疑陽性, 10%以上: 土陽性
 DMSO: シメチルホルムソール MMC: マイトマイシン C
 #: 標本作製直前の観察において培養液中に棒状結晶が認められた.

表 2 染色体異常試験結果 (代謝活性化法による場合)

被験物質名 : クロロベントシア ロモンシクロヘキサン

処理	S9 Mixの有無 (μg/ml)	処理濃度	観察細胞数	倍数体数		ギヤップ	染色体構造異常細胞(1)の出現数と出現頻度 (%)						判(3)			
				(%)	検2) 定		g	ctb	cte	csb	cse	その他	合計	検2) 定		
陰性対照 (DMSO)	-	0	100	0	-	0	0	1	0	0	0	0	1	1	/	
			100	0	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0		/
			200	0(0.0)		0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)		
	+	0	100	0	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	
			100	0		0	0	0	0	0	0	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)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
被験物質	-	15	100	0	-	0	0	0	1	0	0	0	1	1	-	
			100	0	-	1	1	0	0	0	0	0	1	2		-
			200	0(0.0)		1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	3(1.5)	-		
		100	0	-	1	6	10	0	0	0	0	0	13		14	+
		100	0	-	0	6	2	1	0	0	0	0	8	8	+	
		200	0(0.0)		1(0.5)	12(6.0)	12(6.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	21(10.5)	22(11.0)	+		
	100	0	-	4	58	71	4	1	11	93	93	93	+			
	100	0	-	3	60	65	5	0	11	88	88	88		+		
	200	0(0.0)		7(3.5)	118(59.0)	136(68.0)	9(4.5)	1(0.5)	22(11.0)	181(90.5)	181(90.5)	181(90.5)			+	
	+	37.5	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0		-
			100	0	-	0	0	0	0	0	0	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)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
100		0	-	2	33	52	1	1	1	62	62	62	+			
100		0	-	1	38	52	0	1	0	63	63	63		+		
200		0(0.0)		3(1.5)	71(35.5)	104(52.0)	1(0.5)	2(1.0)	1(0.5)	125(62.5)	125(62.5)	125(62.5)			+	
100	0	-	2	60	54	2	0	0	26	97	97	+				
100	0	-	1	64	54	3	0	31	98	98	98		+			
200	0(0.0)		3(1.5)	124(62.0)	108(54.0)	5(2.5)	0(0.0)	57(28.5)	195(97.5)	195(97.5)	195(97.5)			+		
陽性対照 (BP)	-	20	100	0	-	0	1	0	0	0	0	0	1		1	-
			100	0	-	0	0	0	1	0	0	0	1	1	-	
			200	0(0.0)		0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	2(1.0)		
	100	0	-	1	26	70	1	0	0	76	76	76	/			
	100	0	-	2	19	84	1	1	0	86	86	86		/		
	200	0(0.0)		3(1.5)	45(22.5)	154(77.0)	2(1.0)	1(0.5)	0(0.0)	162(81.0)	162(81.0)	162(81.0)			/	

1) ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型切断, csb: 染色分体型切断, cse: 染色分体型交換, その他: 断片化
 2) x2検定を用いて有意差を検定, 構造異常については+gのみ検定; *** (p<0.001), ** (p<0.01), * (p<0.05)
 3) 判定基準 (+gの集計値) 5%未満: - 陰性, 5%以上10%未満: ± 疑陽性, 10%以上: + 陽性
 S9濃度 (5%), 被験物質処理時間 (6h) 被験物質処理後の細胞回復時間 (18h)
 DMSO: シメチルスルホキシド BP: ベンゾ[a]ピレン

#: 標本作製直前の観察において培養液中に棒状結晶が認められた.

表3 有糸分裂指数

(1)代謝活性化法によらない場合

処 理	処 理 時 間 (h)	処 理 濃 度 ($\mu\text{g/ml}$)	観 察 細 胞 数	有 糸 分 裂 指 数 (%)
陰 性 対 照 (DMSO)	24	0	2000	6.4
クロベンダプロール シロヘキサン	24	15	2000	6.0
	24	30	2000	2.5
	24	60	2000	0.45
陽 性 対 照 (MMC)	24	0.03	2000	4.9
陰 性 対 照 (DMSO)	48	0	2000	5.3
クロベンダプロール シロヘキサン	48	7.5	2000	4.5
	48	15	2000	5.0
	48	30	2000	2.1
陽 性 対 照 (MMC)	48	0.03	2000	4.2

(2)代謝活性化法による場合

処 理	S9 Mixの 有 無	処 理 濃 度 ($\mu\text{g/ml}$)	観 察 細 胞 数	有 糸 分 裂 指 数 (%)
陰 性 対 照 (DMSO)	+	0	2000	12.4
クロベンダプロール シロヘキサン	+	37.5	2000	11.4
	+	75	2000	4.8
	+	150	2000	0.40
陽 性 対 照 (BP)	+	20	2000	2.5
陰 性 対 照 (DMSO)	-	0	2000	4.5
クロベンダプロール シロヘキサン	-	15	2000	4.7
	-	30	2000	4.7
	-	60	2000	0.90
陽 性 対 照 (BP)	-	20	2000	6.6

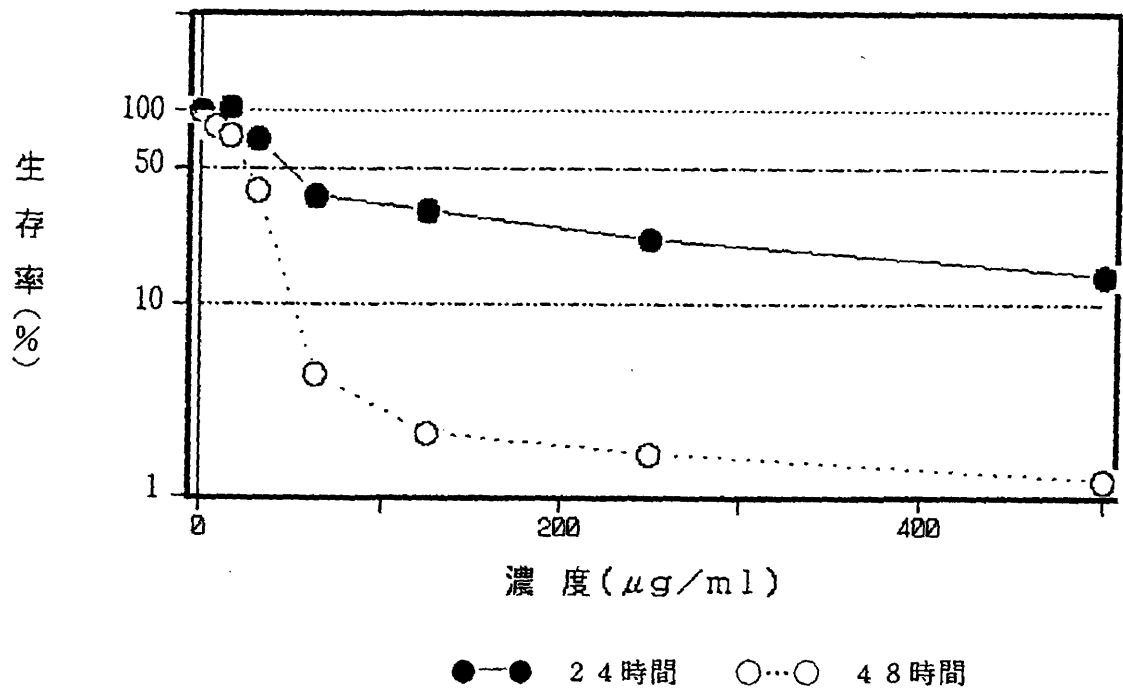


図 1 カロチノール誘導体の細胞毒性 (代謝活性化法によらない場合)

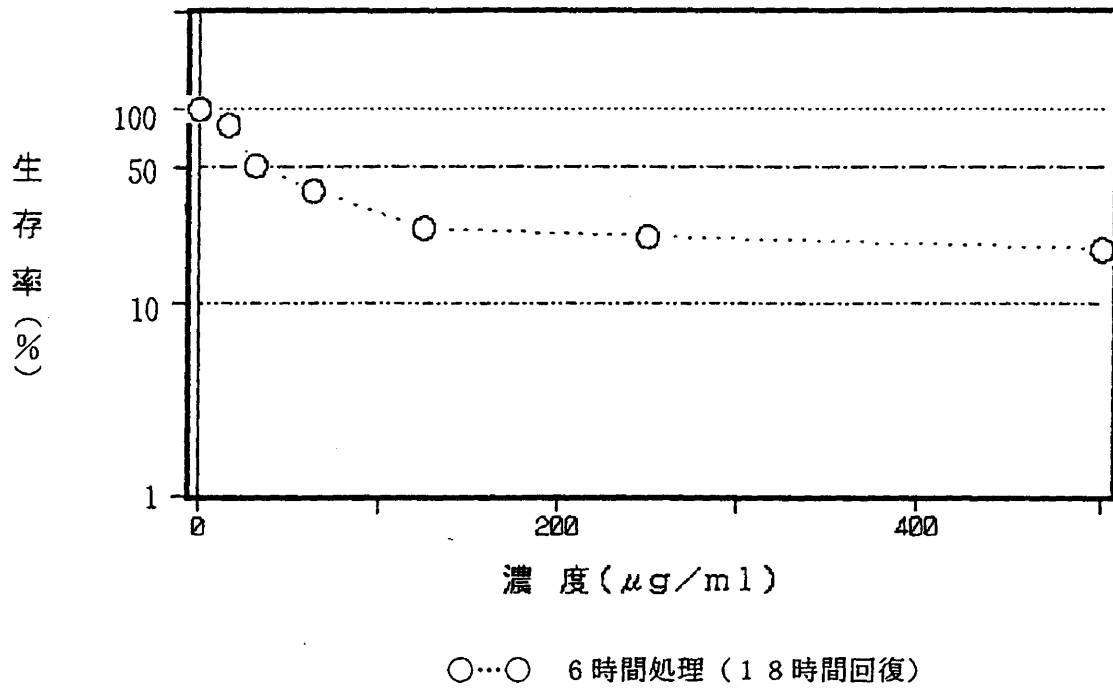


図 2 クロム・ソル・ロシロキチの細胞毒性
(代謝活性化法による場合/S9 Mix非共存下)

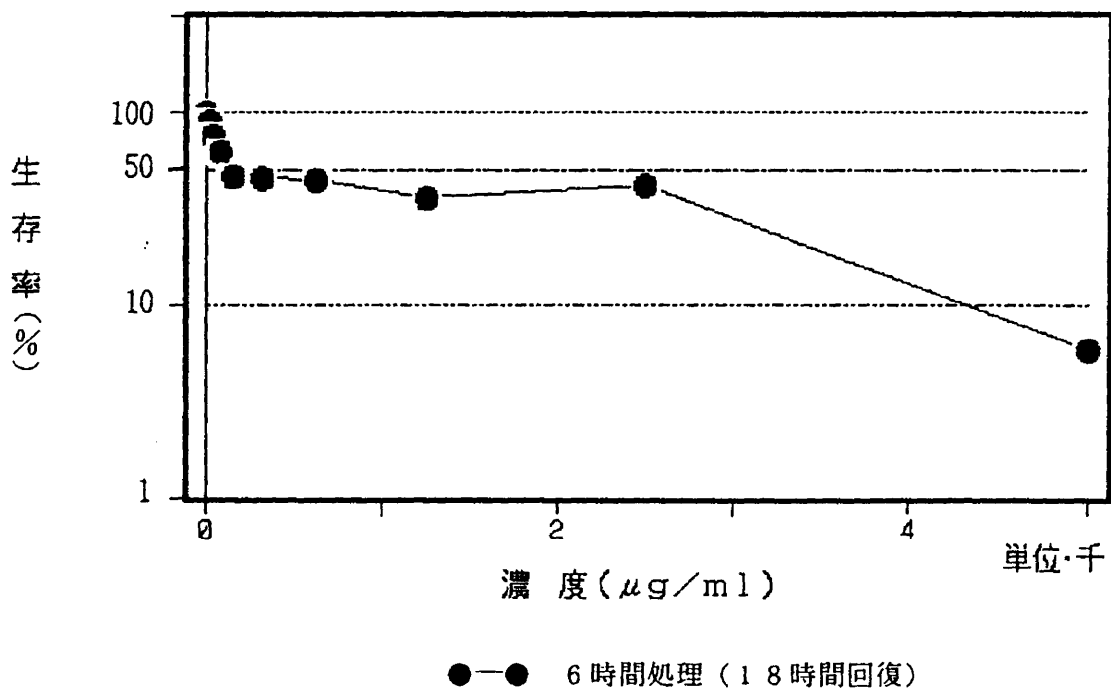


図 3 クロム・ソル・ロシロキチの細胞毒性
(代謝活性化法による場合/S9 Mix共存下)

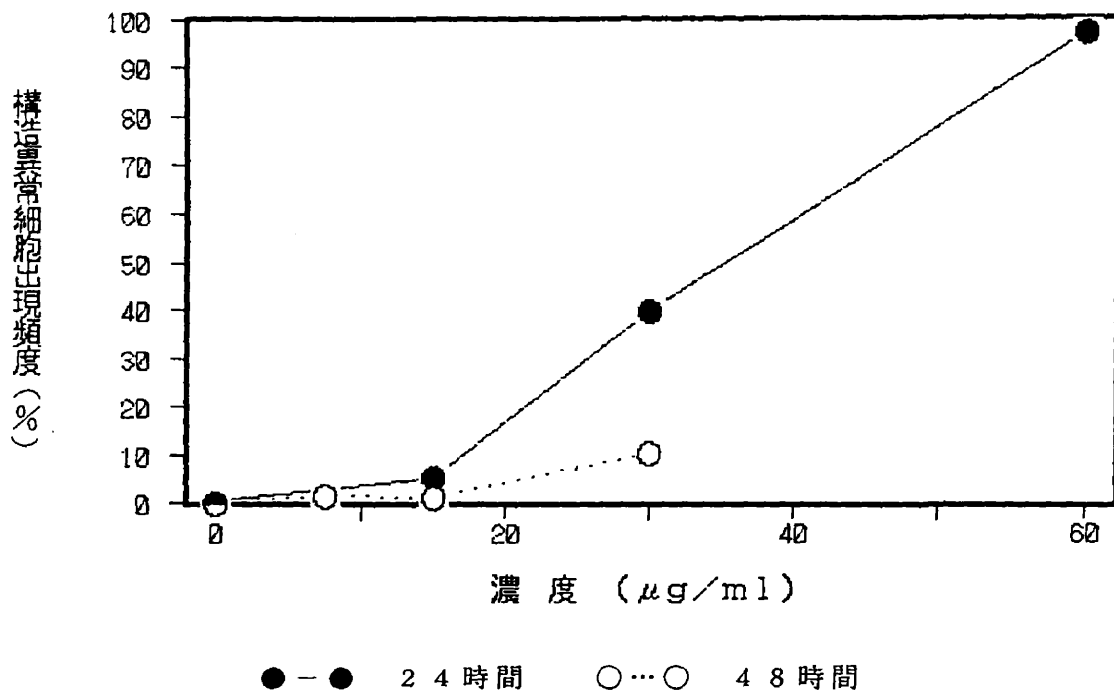


図 4 クロロホルム・α-シチクロン・α-キチンの構造異常細胞出現頻度 (代謝活性化法によらない場合)

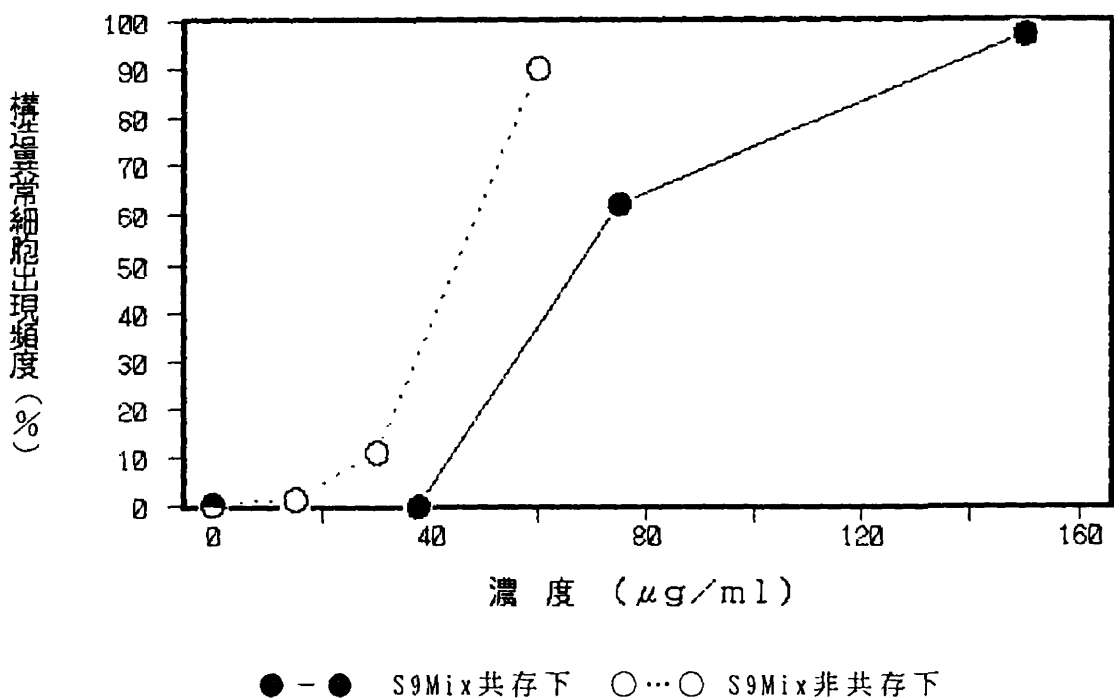


図 5 クロロホルム・α-シチクロン・α-キチンの構造異常細胞出現頻度 (代謝活性化法による場合)

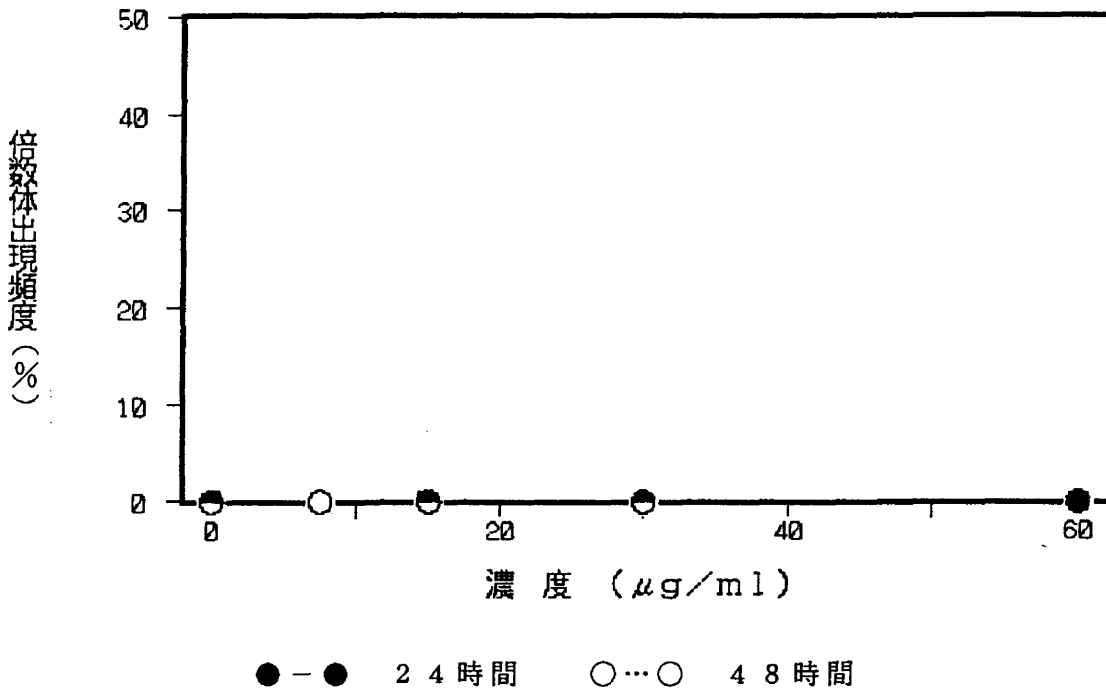


図 6 *Clostridium botulinum* の倍数体細胞出現頻度 (代謝活性化法によらない場合)

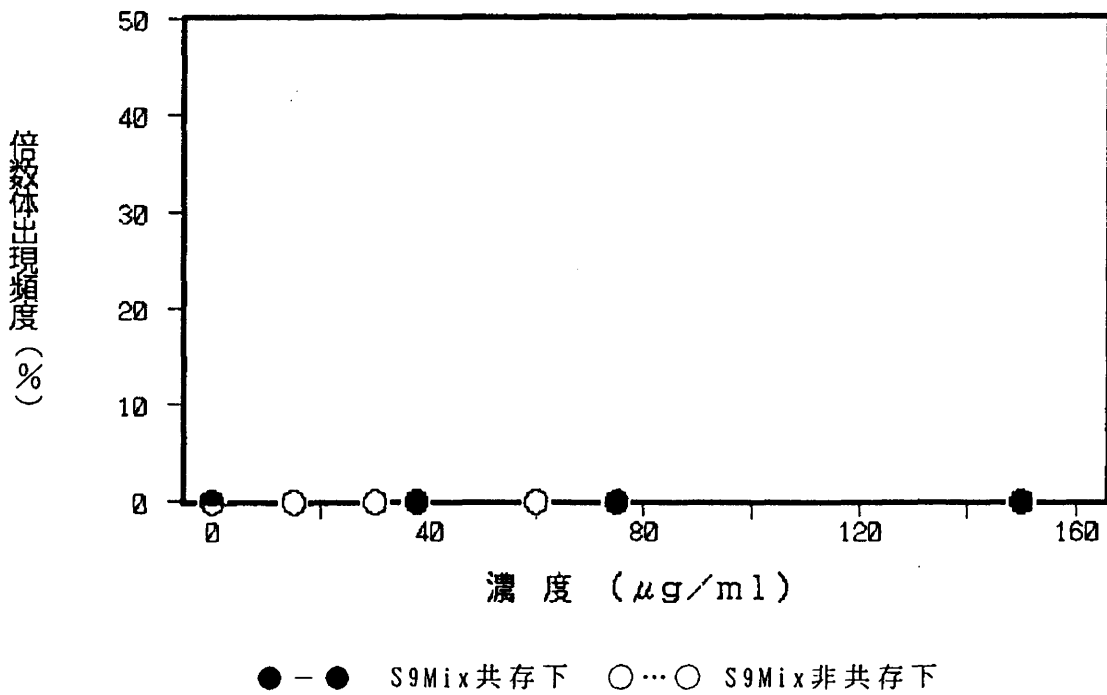


図 7 *Clostridium botulinum* の倍数体細胞出現頻度 (代謝活性化法による場合)