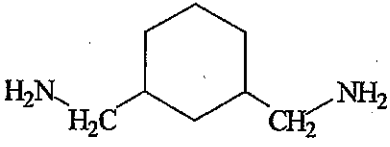


ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン		
別 名	—		
CAS 番号	2579-20-6		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、 その製法の概要)			
分 子 量	142.24		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	99.98%		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	50303		
不純物の名称 及び含有率	—		
蒸 気 圧	1866 Pa, 14 mmHg (120°C)		
対水溶解度	—		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融 点	-70°C以下		
沸 点	244°C		
常温における性状	無色透明液体		
安 定 性	所定の取扱い, 保管条件では安定		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	水	50 mg/mL で溶解*1	安定*2
	DMSO	50 mg/mL で溶解*1	—
	生理食塩液	50 mg/mL で溶解*1	安定*2

DMSO : ジメチルスルホキシド

*1 : 試験施設で実施した溶媒検討の結果による。

*2 : 溶液の調製時に発熱, 発泡, 変色は認められなかった。

2. 細胞の種類—培養条件

細胞名	CHL/IU	入手先	大日本製薬株式会社		
種	チャニーズハムスター	入手年月日	2003年9月2日		
培養液	イーグルMEM	製造元	日水製薬株式会社		
血清の種類と添加量	牛 10%	製造元 (Lot No.)	Invitrogen Corp. (444175)		
細胞周期	14.6 h	凍結条件	液体窒素中		
継代数	19~21*	培養 条件	容器	プラスチックプレート	
染色体数 (モード)	25本		温度	37℃	
			CO ₂ 濃度	5%	
備考	*: 細胞入手時継代数: 14, 凍結細胞継代数: 17				

3. S9 mix

(1) S9の入手方法等

自製・購入の別	1. 自製 ② 購入 (製造元: キッコーマン株式会社)
製造年月日	2005年1月14日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA-515
保存温度	-80℃以下 (実測値; -84~-82℃)

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	フェノバルビタール (PB), 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週令	7週	投与期間及び投与量 (g/kg 体重)	PB;4日間 0.03-0.06 BF;1日間 0.08
体重	206-239 g		

(3) S9 mix の組成

成分	S9 mix 1 mL 中の量	成分	S9 mix 1 mL 中の量
S9	0.3 mL	β -NADP ⁺	4 μ mol
MgCl ₂	5 μ mol	NADPH	- μ mol
KCl	33 μ mol	HEPES 緩衝液 (pH7.2)	4 μ mol
D-グルコース 6-リン酸	5 μ mol	精製水	残量

(4) S9 mix の処理条件

①. プレート法 2. 細胞浮遊法 3. その他 ()	
S9 量 (最終濃度)	5%
S9 蛋白量 (最終濃度)	1.37 mg/mL
処 理 時 間	6 h
回 復 時 間	18 h
備 考	

4. 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	生理食塩液	株式会社 大塚製薬工場	K4E90	—	—
溶媒選択の理由	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、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）には生理食塩液を選択した。				
被験物質溶液の性状	<input checked="" type="radio"/> 溶解 <input type="radio"/> 懸濁 <input type="radio"/> その他 ()				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	10分～20分 室温 : 細胞増殖抑制試験 10分～30分 室温 : 細胞増殖抑制試験-2 および 染色体異常試験（本試験）[同時調製] 5分 室温 : 染色体異常試験（確認試験）				
純度換算の有無	<input type="radio"/> 有 <input checked="" type="radio"/> 無				

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法 によらない場合	代謝活性化法 による場合
試験実施期間		2005年5月13日から 2005年5月17日	2005年5月13日から 2005年5月17日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	2.7 mL/培養器	2.2 mL/培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.3 mL/培養器	0.3 mL/培養器
	S 9 m i x 添 加 量		0.5 mL/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5%
	S9 蛋白の最終濃度		1.37 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
細胞増殖抑制 測定法	血球計算盤で細胞を計数した。		
備考	*: 培養開始日を 0 日とした。		

(2) 細胞増殖抑制試験の結果

代謝活性化法によらない場合 (6-18 h)		代謝活性化法による場合 (6-18 h)	
用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100	0 (溶媒)	100
125	98	125	96
250	86	250	99
500	5	500	19
750	0	750	0
1000	0	1000	0
1250	0	1250	0
1500	0	1500	0

(3) 染色体異常試験（本試験）の条件

		代謝活性化法 によらない場合	代謝活性化法 による場合
試験実施期間		2005年5月20日から 2005年6月1日	2005年5月20日から 2005年6月1日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	2.7 mL/培養器	2.2 mL/培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.3 mL/培養器	0.3 mL/培養器
	S 9 m i x 添 加 量		0.5 mL/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5%
	S9蛋白の最終濃度		1.37 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
備考	*: 培養開始日を0日とした。		

(4) 染色体異常試験（本試験）の結果（別表1, 3による。）

(5) 染色体異常試験（確認試験）の条件

		代謝活性化法 による場合
試験実施期間		2005年6月10日から 2005年6月16日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径6 cm
	培 養 液 量	2.2 mL/培養器
	用量あたりの培養器数	2枚
細胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数 *	3日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.3 mL/培養器
	S9 mix 添加量	0.5 mL/培養器
	S9 の 最 終 濃 度	5%
	S9 蛋白の最終濃度	1.37 mg/mL
	処 理 時 間	6 h
	回 復 時 間	18 h
備考	*: 培養開始日を0日とした。	

(6) 染色体異常試験（確認試験）の結果（別表2, 4による。）

6. 連続処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		(24-0 h) 処理による 場合
試験実施期間		2005年5月13日から 2005年5月17日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm
	培 養 液 量	4.5 mL/培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.5 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h
	回 復 時 間	0 h
細胞増殖抑制 測定法	血球計算盤で細胞を計数した。	
備考	*: 培養開始日を 0 日とした。	

(2) 細胞増殖抑制試験の結果

(24-0 h) 処理による場合	
用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100
12.5	102
25	104
50	121
75	110
100	123
125	115
150	110
200	86

(3) 細胞増殖抑制試験-2 の条件

		(24-0 h) 処理による 場合
試験実施期間		2005年5月20日から 2005年5月24日
培養器	形 状	円形プラスチックプレート
	大 き さ	直径 6 cm
	培 養 液 量	4.5 mL/培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.5 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h
	回 復 時 間	0 h
細胞増殖抑制 測定法	血球計算盤で細胞を計数した。	
備考	*: 培養開始日を 0 日とした。	

(4) 細胞増殖抑制試験-2 の結果

(24-0 h) 処理による場合	
用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100
100	106
150	95
200	106
250	100
300	76
350	26
400	3
450	1
500	1

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> 陽 性 陰 性 </div>				
<p>判定の理由</p> <p>短時間処理法 S9 mix 非共存下 (-S9 mix) の 400, 450, 500 µg/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 8.5, 16.8, 16.5% を示し, ほぼ用量依存的な増加傾向を伴った異常誘発傾向が認められた。</p>					
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	-S9 mix	6-18 h 処理	0.56 mg/mL

(2) 参考事項

- 細胞増殖抑制試験に先立ち, 予備試験を実施した。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) ならびに連続処理法 24 時間処理 (以下 24 時間処理) について, 15, 150 µg/mL および 1500 µg/mL (約 10 mmol/L) 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。

用量 (µg/mL)	15	150	1500
-S9 mix	100%	100%	0%
+S9 mix	100%	100%	0%
24 時間処理	100%	20%	0%

この結果に基づき, 細胞増殖抑制試験の用量は下記を設定した。

- S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/mL
- +S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 µg/mL
- 24 時間処理 : 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 µg/mL

- 細胞増殖抑制試験の結果, 50%細胞増殖抑制用量 (IC₅₀) は, -S9 mix で 297 µg/mL, +S9 mix で 353 µg/mL であった。一方, 24 時間処理では 50%以上の細胞増殖抑制が認められなかったため, 下記の用量を設定して細胞増殖抑制試験-2 を実施した。

24 時間処理 : 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 µg/mL

細胞増殖抑制試験-2 の結果, IC₅₀ は 320 µg/mL であった。

- 短時間処理法について, IC₅₀ に基づき, 下記の用量を設定して染色体異常試験 (本試験) を実施した。

- S9 mix : 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 µg/mL
- +S9 mix : 250, 300, 350, 400, 450, 500 µg/mL

- ・本試験の結果、+S9 mix の 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、染色体構造異常細胞の出現頻度は 5.5% と疑陽性の範疇 (5%以上 10%未満) であったため、染色体構造異常誘発の再現性を確認するために、下記の用量を設定して確認試験を実施した。
+S9 mix : 400, 450, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- ・構造異常は、以下の分類¹に従って観察した。
染色体型切断
染色体型交換
染色体型切断
染色体型交換 (二動原体、環状染色体など)
断片化
ギャップは、染色体体に見られる非染色部分の幅が染色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。
- ・数的異常は、動原体数が 35 以上の倍数体細胞 (核内倍加細胞を含む) とした。
- ・染色体異常細胞は、下記の定義で集計した。
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
- ・被験物質の染色体異常誘発性の判定基準は下記の通りとした。
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。
- ・統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。
- ・確認試験の判定基準は下記の通りとした。
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
- ・確認試験の結果、いずれの被験物質用量においても、染色体構造異常細胞の出現頻度は 5%未満を示し、本試験で認められた構造異常誘発の再現性は認められなかった (判定 : +S9 mix ; 陰性)。
- ・-S9 mix の 400, 450, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において染色体構造異常細胞の出現頻度は各々 8.5, 16.8, 16.5% を示し、陽性と判定されたが、これらの用量における細胞増殖率は各々 12, 7, 5% と低値であったことから、強い細胞毒性に副次的に起因して染色体異常が誘発された可能性も示唆された。
- ・本試験および確認試験の標本観察の結果、陰性対照群における染色体構造異常および数的異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件においても 5%未満であった。一方、陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件においても 10%以上であった。これらによって当試験は技術的に成立していることが示された。

- ・染色体異常試験において、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。

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

- ・本試験および確認試験の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(別表1, 2)。
- ・短時間処理法の結果、陽性と判定されたため、連続処理法については染色体異常試験を実施しなかった。
- ・陽性対照物質に関する情報は以下の通りである。
 - マイトマイシンC (協和発酵工業株式会社, ロット番号 435ADB, 含量 99%)
 - ベンゾ[a]ピレン (東京化成工業株式会社, ロット番号 GG01, 含量 95.6%)
- ・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

別表 1 分裂指数測定結果 (本試験)

処理	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 (生理食塩液)	—	0	1000	49	4.9	100
1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン	—	200	1000	37	3.7	76
	—	250	1000	50	5.0	102
	—	300	1000	45	4.5	92
	—	350	1000	40	4.0	82
	—	400	1000	13	1.3	27
	—	450	1000	7	0.7	14
	—	500	1000	20	2.0	41
陰性対照 (生理食塩液)	+	0	1000	85	8.5	100
1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン	+	250	1000	94	9.4	111
	+	300	1000	97	9.7	114
	+	350	1000	90	9.0	106
	+	400	1000	47	4.7	55
	+	450	1000	39	3.9	46
	+	500	1000	34	3.4	40

別表 2 分裂指数測定結果 (確認試験)

処理	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 (生理食塩液)	+	0	1000	95	9.5	100
1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン	+	400	1000	104	10.4	109
	+	450	1000	76	7.6	80
	+	500	1000	50	5.0	53

別表 3 染色体異常試験の結果 (本試験)

被験物質の名称 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン

処理回数 時間(h)	被験物質の名称	被験物質の用量 (µg/mL)	染色体構造異常細胞数出現頻度(%)				細胞増殖率 (%)	キヤノン の出阻数	染色体異常細胞数(%)	染色体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	断片化				観察細胞数	倍率		
6-18	-	陰性対照 (生理食塩液)	100	0	0	0	0	0	1	100	0	0	
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	2 (1.0)	101	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	200	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	95	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	250	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	90	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	300	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	92	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	350	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	87	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	400	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	84	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	450	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	85	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	500	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	86	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	陰性対照 (MMC-0.1)	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	92	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陰性対照 (生理食塩液)	100	1	0	0	0	0	0	1	100	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	97	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	250	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	100	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	300	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	95	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	350	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	91	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	400	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	94	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	450	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	92	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	500	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	95	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陰性対照 (BP20)	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	97	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	MMC-0.1	100	1	0	0	0	0	0	1	100	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	97	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	250	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	100	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	300	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	94	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	350	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	92	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	400	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	95	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	450	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	98	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	500	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	77	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	MMC-0.1	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	84	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	生理食塩液	100	1	0	0	0	0	0	1	100	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	80	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	250	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	45	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	300	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	46	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	350	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	45	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	400	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	28	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	450	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	25	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	500	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	27	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	MMC-0.1	100	11	0	0	0	0	0	11	100	0	0
			200	11 (5.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	78	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	生理食塩液	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	0	200	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC: マイトマイシンC, BP: ペンシリン [a] ビリン

別表 4 染色体異常試験の結果 (確認試験)

被験物質の名称 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン

処理回復 時間(h)	被験物質の用量 (ug/ml)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)						細胞増殖率 (%)	染色体数異常細胞数(出現頻度%)					
		観察細胞数	染色体型切斷	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)	ギヤップ の出現数		観察細胞数	倍染色体	核内倍加	総異常細胞数(%)		
6-18	+	雌性対照 (生理食塩液)	100	0	0	0	0	0	97	100	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	103	100	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	400	100	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	85	100	0	0	0	0
			200	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	+	450	100	0	0	0	0	0	56	100	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	59	100	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	57	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	500	100	1	3	0	0	0	28	100	0	0	0	0
			100	1	1	0	0	2	0	43	100	0	0	0
			200	2 (1.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	0	36	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	雌性対照 (BP20)	100	4	79	0	0	0	79	100	0	0	0	0
			100	12	72	0	0	76	0	100	0	0	0	0
			200	16 (8.0)	151 (75.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	155 (77.5)	0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

BP: ペンゾ [a] ピレン

図1 1,3-ビス(アミノメチル)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)

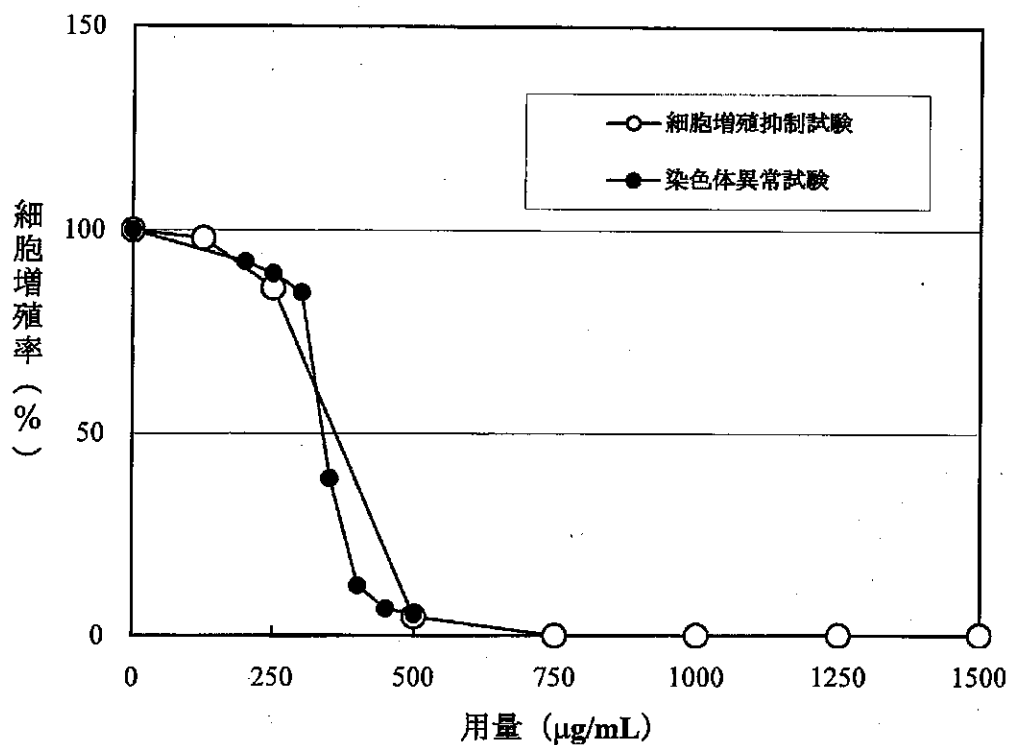


図2 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における細胞毒性(短時間処理法・+S9 mix)

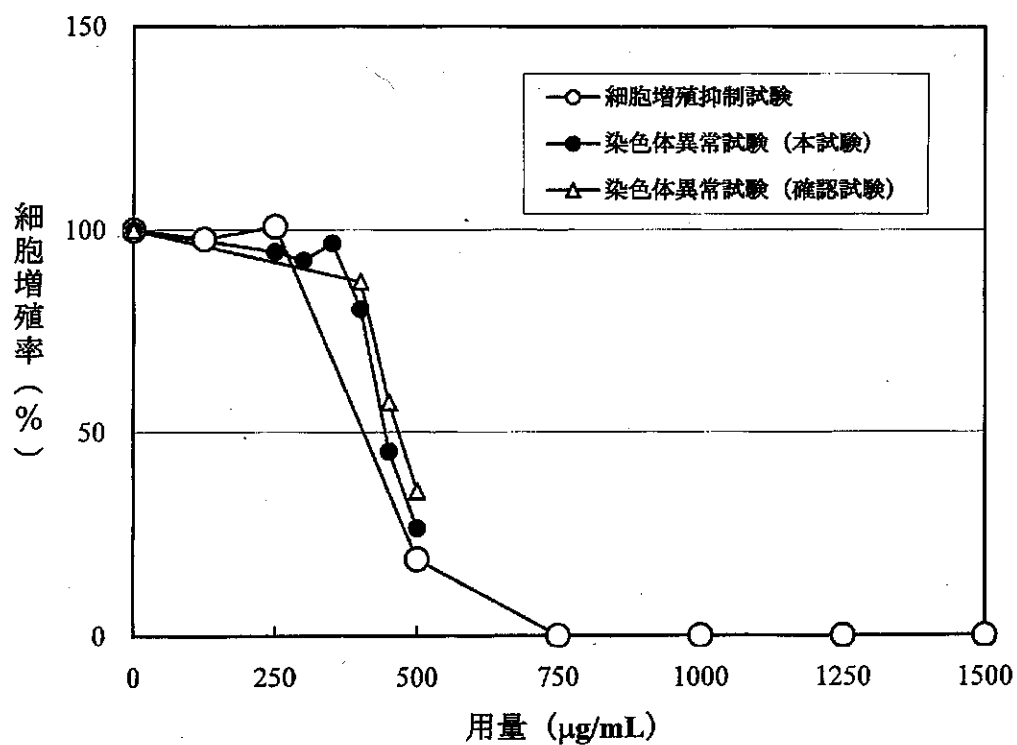


図3 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における細胞毒性(連続処理法)

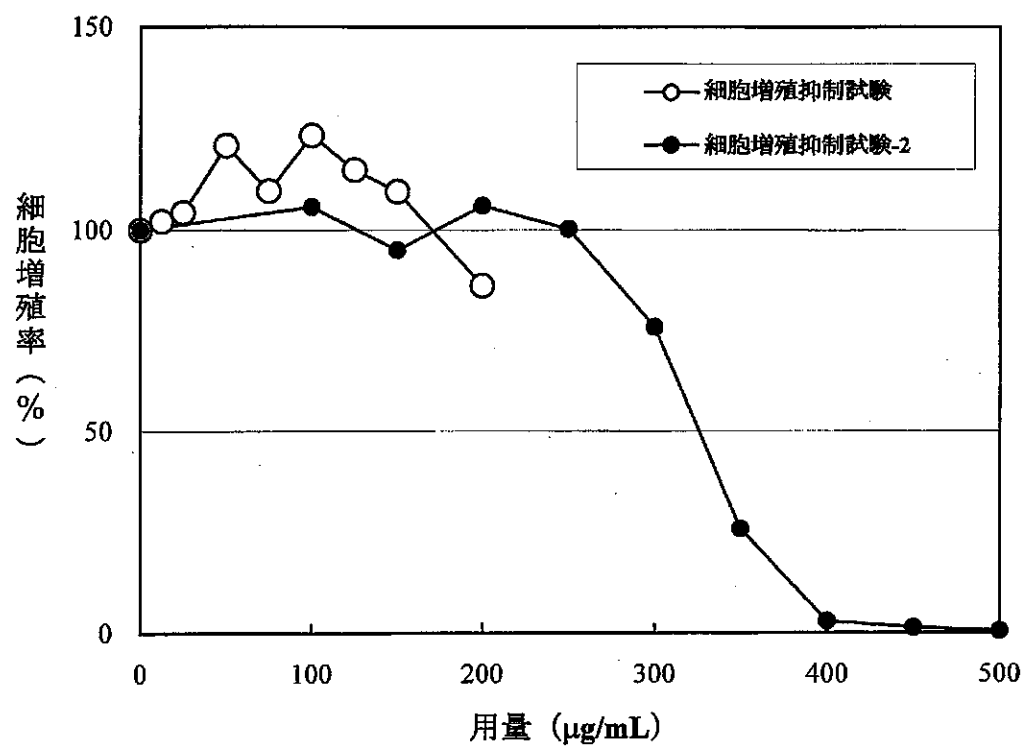


図4 1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン
処理における構造異常細胞出現頻度

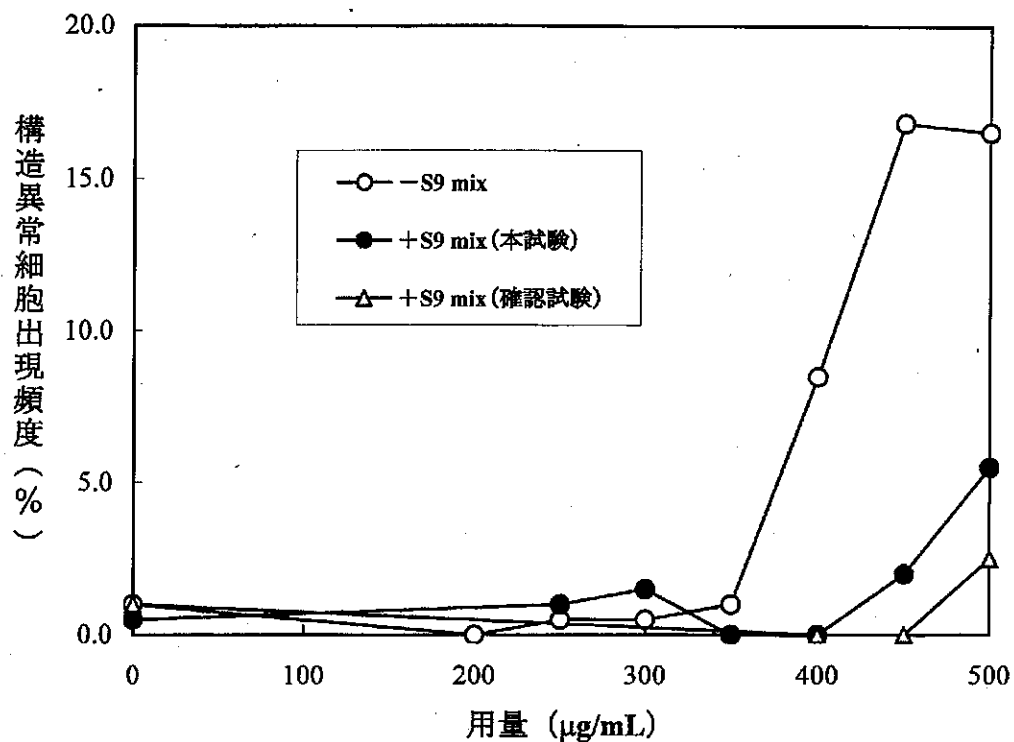
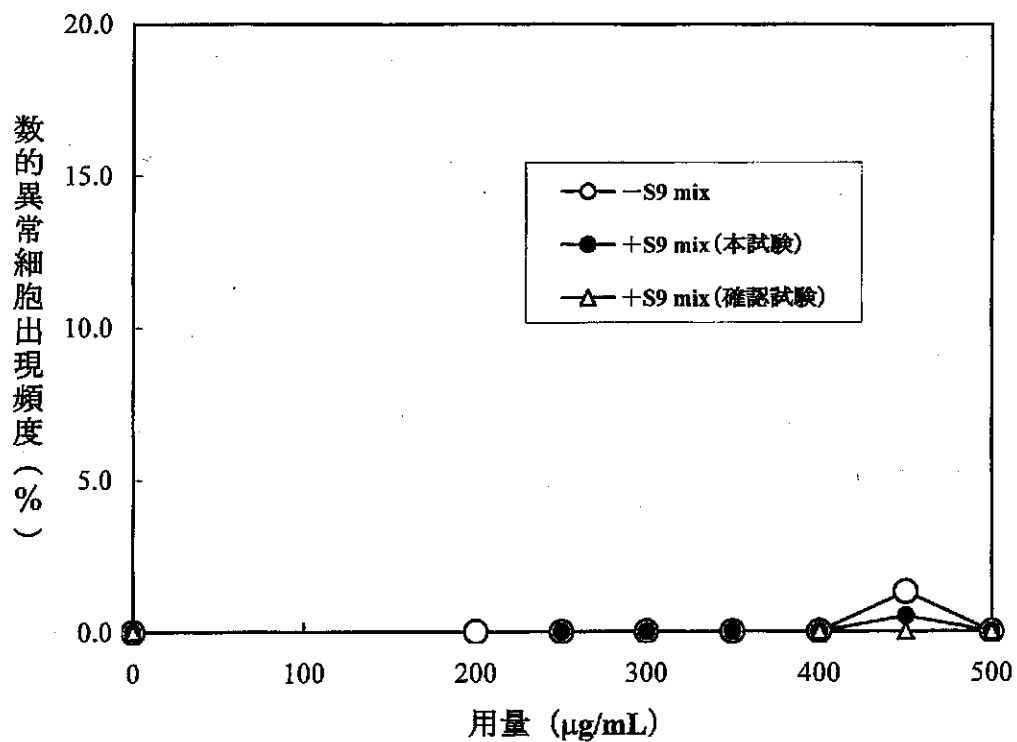


図5 1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン
処理における数的異常細胞出現頻度



3. 試験実施概要

3.1 表題

1,3-ビス(アミノメチル)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

3.2 試験番号

B041800

3.3 試験目的

1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン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

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、1,3-ビス (アミノメチル) 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, 1250, 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

+S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

24 時間処理 : 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

この結果、50%細胞増殖抑制用量 (IC_{50}) は -S9 mix で 297 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+S9 mix で 353 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。一方、24 時間処理では 50%以上の細胞増殖抑制が認められなかったため、下記の用量を設定して細胞増殖抑制試験-2 を実施した。

24 時間処理 : 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

この結果、 IC_{50} は 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

算出した IC_{50} に基づき、染色体異常試験は下記の用量を設定した。

-S9 mix : 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

+S9 mix : 250, 300, 350, 400, 450, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

標本観察の結果、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は、-S9 mix の 400, 450, 500 で各々 8.5, 16.8, 16.5% を示した。一方、+S9 mix では、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において 5.5% (疑陽性 : 5%以上 10%未満) であったため、400, 450, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量について確認試験を実施した。

標本観察の結果、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理用量においても 5%未満を示し、染色体構造異常誘発の再現性は認められなかった。

従って、1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサンは、当試験条件下 (短時間処理法 S9 mix 非共存下) において CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性を有するものと結論した。

表1 細胞増殖抑制試験の結果 (短時間処理法)

用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)	
	-S9 mix	+S9 mix
陰性対照 (生理食塩液)	100	100
125	98	96
250	86	99
500	5	19
750	0	0
1000	0	0
1250	0	0
1500	0	0

表2 細胞増殖抑制試験の結果 (連続処理法)

用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)	
	24時間処理	
	細胞増殖抑制試験	細胞増殖抑制試験-2
陰性対照 (生理食塩液)	100	100
12.5	102	/
25	104	
50	121	
75	110	
100	123	
125	115	/
150	110	
200	86	106
250	/	100
300		76
350		26
400		3
450		1
500		1

表3 分裂指数測定結果 (本試験)

処理	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 (生理食塩液)	—	0	1000	49	4.9	100
1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキササン	—	200	1000	37	3.7	76
	—	250	1000	50	5.0	102
	—	300	1000	45	4.5	92
	—	350	1000	40	4.0	82
	—	400	1000	13	1.3	27
	—	450	1000	7	0.7	14
	—	500	1000	20	2.0	41
陰性対照 (生理食塩液)	+	0	1000	85	8.5	100
1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキササン	+	250	1000	94	9.4	111
	+	300	1000	97	9.7	114
	+	350	1000	90	9.0	106
	+	400	1000	47	4.7	55
	+	450	1000	39	3.9	46
	+	500	1000	34	3.4	40

表4 分裂指数測定結果 (確認試験)

処理	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 (生理食塩液)	+	0	1000	95	9.5	100
1,3-ビス (アミノメチル) シクロヘキササン	+	400	1000	104	10.4	109
	+	450	1000	76	7.6	80
	+	500	1000	50	5.0	53

表 5 染色体異常常試験の結果 (本試験)

被験物質の名称 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン

試験回数 期間(d)	被験物質の用量 (ug/mL)	染色体構造異常常試験(出現率%)		染色体型交換		断片化		総異常細胞数(%)	ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体異常常試験(出現率%)	
		染色体型交換	染色体型交換	染色体型交換	断片化	断片化	断片化				細胞増殖率	細胞増殖率
6-18	-	100	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.0)	0	99	100	0 (0.0)
6-18	-	100	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.0)	0	101	100	0 (0.0)
6-18	200	100	0	0	0	0	0	0	0	95	100	0 (0.0)
6-18	200	100	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	90	100	0 (0.0)
6-18	250	100	0	0	0	0	0	0	0	87	100	0 (0.0)
6-18	300	100	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	92	100	0 (0.0)
6-18	350	100	0	0	0	0	0	0	0	84	100	0 (0.0)
6-18	400	100	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	85	100	0 (0.0)
6-18	450	100	0	0	0	0	0	0	0	36	100	0 (0.0)
6-18	500	100	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	42	100	0 (0.0)
6-18	500	100	5	6	7	0	0	6	2	14	100	0 (0.0)
6-18	450	82	6	13	10	0	0	17	2	12	200	0 (0.0)
6-18	450	73	4	6	2	0	0	10	1	8	82	2 (0.0)
6-18	500	155	10	16	13	1	0.6	26	1	7	155	2 (1.3)
6-18	500	100	4	12	0	0	0	15	1	5	100	0 (0.0)
6-18	500	100	4	15	0	0	0	18	1	6	100	0 (0.0)
6-18	500	100	8	27	13.5	0	0.6	33	2	5	200	0 (0.0)
6-18	500	100	12	27	0	0	0	34	2	5	100	0 (0.0)
6-18	500	100	13	32	0	0	0	43	1	1	100	0 (0.0)
6-18	500	200	25	59	29.5	0	0.6	77	1	1	200	0 (0.0)
6-18	500	100	1	1	0	0	0	1	0	103	100	0 (0.0)
6-18	500	100	0	0	0	0	0	0	0	97	100	0 (0.0)
6-18	500	100	1	1	0	0	0	1	0	100	200	0 (0.0)
6-18	500	100	1	0	0	0	0	1	0	94	100	0 (0.0)
6-18	500	100	0	0	0	0	0	0	0	95	100	0 (0.0)
6-18	500	100	1	0	0	0	0	1	0	91	100	0 (0.0)
6-18	500	100	0	0	0	0	0	0	0	94	100	0 (0.0)
6-18	500	100	1	2	0	0	0	3	0	92	100	0 (0.0)
6-18	500	100	1	2	1.0	0	0.5	3	0	92	200	0 (0.0)
6-18	500	100	0	0	0	0	0	0	0	95	100	0 (0.0)
6-18	500	100	0	0	0	0	0	0	0	77	100	0 (0.0)
6-18	500	100	0	0	0	0	0	0	0	84	100	0 (0.0)
6-18	500	100	0	0	0	0	0	0	0	80	200	0 (0.0)
6-18	500	100	2	1	0	0	0	3	2	45	100	1 (0.0)
6-18	500	100	0	1	0	0	0	1	0	46	100	0 (0.0)
6-18	500	200	2	2	1.0	0	0.5	4	2	45	200	1 (0.5)
6-18	500	100	2	3	0	0	0	7	0	28	100	0 (0.0)
6-18	500	100	2	2	1	0	0	4	0	25	100	0 (0.0)
6-18	500	200	4	5	2.5	0	0.6	11	0	27	200	0 (0.0)
6-18	500	100	11	70	0	0	0	70	0	100	100	0 (0.0)
6-18	500	100	24	77	0	0	0	28	0	100	100	0 (0.0)
6-18	500	200	35	147	73.5	0	0.6	148	0	100	200	0 (0.0)

MMC : マイトマイシンC, BP : ペンソ [a] ピレン

表 6 染色体異常試験の結果 (複製試験)

被験物質の名称: 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサジン

処理-回復 時間(h)	SP mix +	被験物質の用量 (ug/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)				染色体数異常細胞数(出現頻度%)				細胞増殖率 (%)	染色体数異常細胞数(出現頻度%)			
			複製細胞数	染色体型切断	染色体型交換	断片化	異常細胞数(%)	核内倍加	細胞数	核内倍加					
6-18	+	陰性対照 (生理食塩液)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	400	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	90	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)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	450	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	56	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)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	500	100	0	0	0	0	0	0	0	59	0	0	0	
			100	1	3	0	0	0	0	0	28	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)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陰性対照 (BP20)	100	1	1	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
			100	2 (1.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
			100	4	79	0	0	0	0	79	0	100	0	0	0
6-18	+	陰性対照 (BP20)	100	12	72	0	0	0	0	76	100	0	0	0	
			200	16 (8.0)	151 (75.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	155 (77.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

BP: ベンジル [a] ピレン

図1 1,3-ビス(アミノメチル)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)

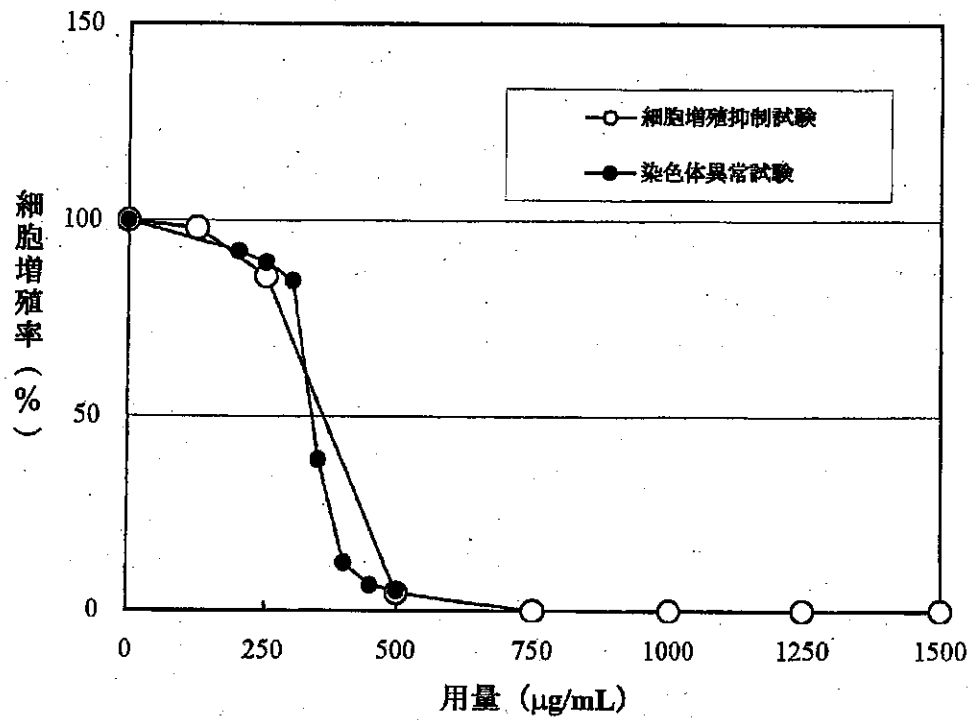


図2 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における細胞毒性 (短時間処理法・+S9 mix)

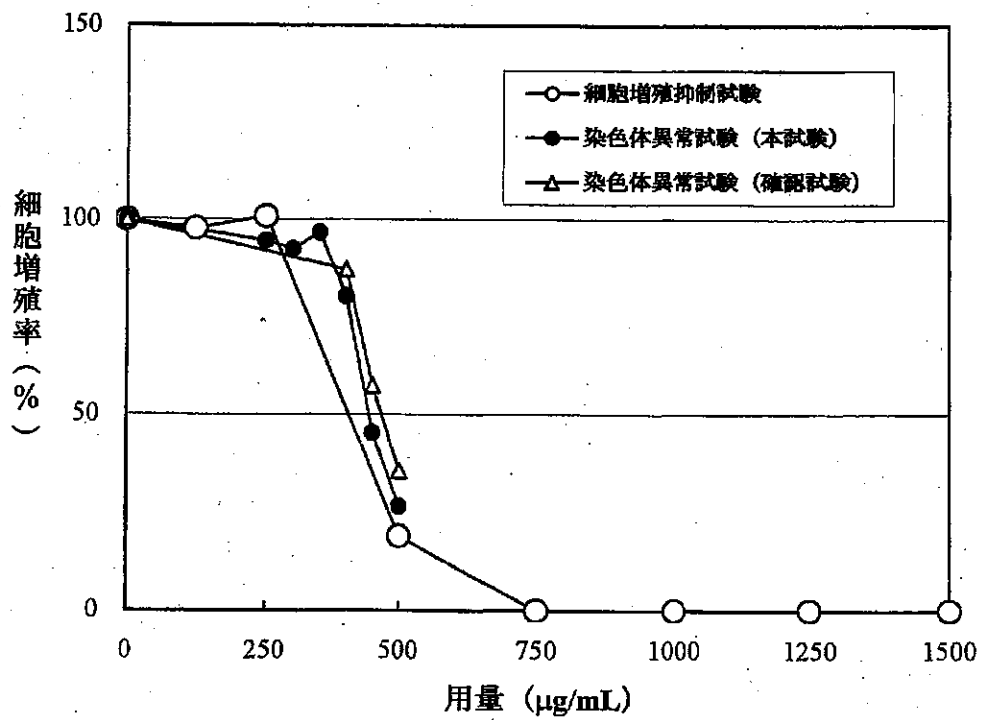


図3 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における細胞毒性(連続処理法)

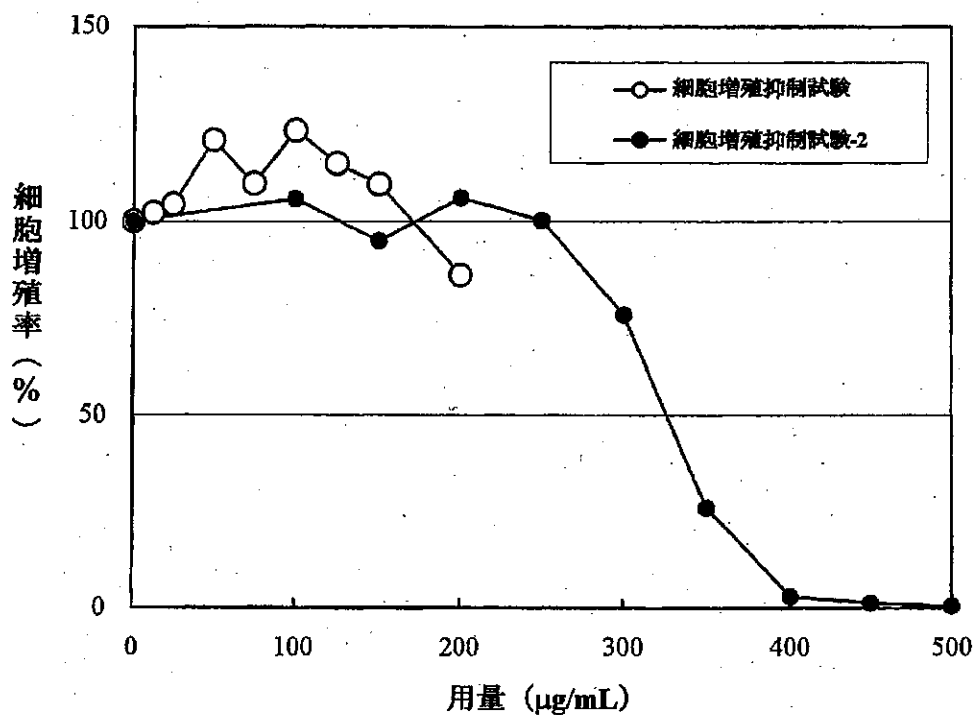


図4 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における構造異常細胞出現頻度

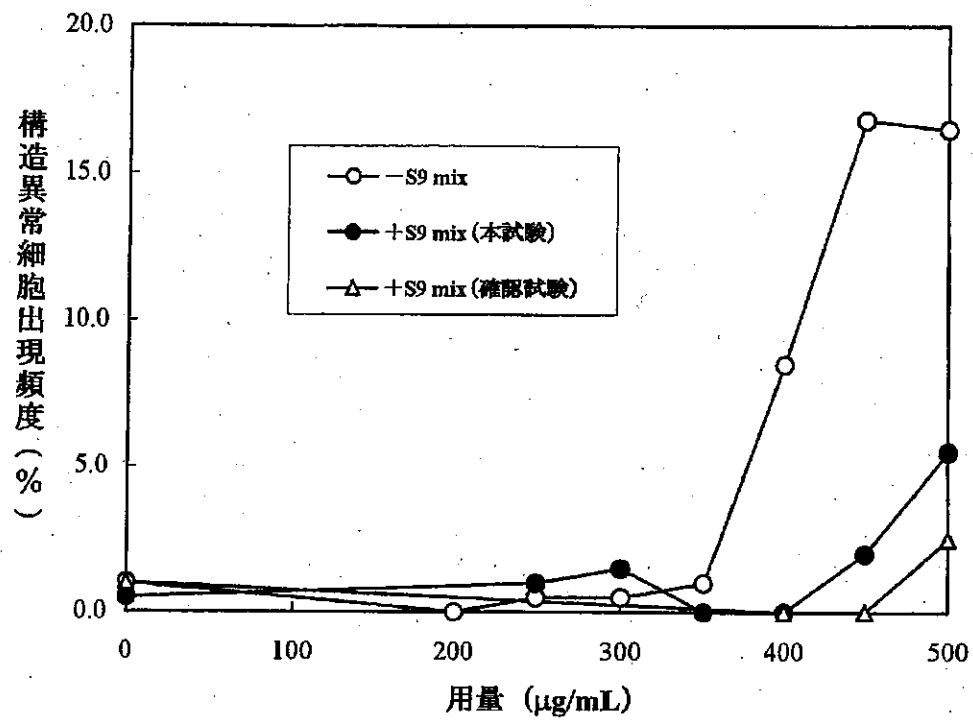


図5 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン
処理における数的異常細胞出現頻度

