

## 細菌を用いる復帰突然変異試験結果報告書

## 1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	クロロシクロヘキサン		
別 名	—		
CAS 番号	542-18-7		
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	118.61		
試験に供した新規化学物質 の純度 (%)	99.7%		
試験に供した新規化学物質 のロット番号	5C1114		
不純物の名称及び含有率	—		
蒸 気 圧	6.73 mmHg (25°C)		
対水溶解度	500 mg/L (25°C)		
1-オクタノール/水分配係数	3.36		
融 点	-44°C		
沸 点	142°C		
常温における性状	無色液体		
安 定 性	—		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	DMSO	50 mg/mL で溶解 *1	安定 *2
	水	50 mg/mL で不溶 *1	—
	アセトン	—	—
	生理食塩水	50 mg/mL で不溶 *1	—

DMSO : ジメチルスルホキシド

\*1: 当研究所での溶媒検討の結果による。

\*2: 被験物質溶液調製時に、発熱、発泡、変色は認められなかった。

## 2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
TA100	カリフォルニア大学 ██████████	1983年5月27日
TA1535		
TA98		
TA1537		
WP2uvrA/pKM101	日本バイオアッセイ研究センター	1997年9月18日

## 3. S9 mix

(1) S9の入手方法等 (該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

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2月25日 製造
購入の場合の Lot No.	RAA-517
保存温度	-85°C ~ -80°C

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	SD系ラット	名称	フェナバルビタール (PB), 5,6-ベンゾフラボン (BF)
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間 及び投与量 (g/kg 体重)	PB;            1日目: 0.03 2~4日目: 0.06 BF; PB投与3日目: 0.08
体重	210-249g		

(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	0.1 mL	$\beta$ -NADPH	4 $\mu$ mol
MgCl <sub>2</sub>	8 $\mu$ mol	$\beta$ -NADH	4 $\mu$ mol
KCl	33 $\mu$ mol	Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 $\mu$ mol
D-グルコース 6-リン酸	5 $\mu$ mol	滅菌精製水	残量

## 4. 被験物質溶液の調製 (被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと。)

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度(%)
	DMSO	関東化学株式会社	508F1409	分光分析用	100
溶媒選択の理由	溶媒検討の結果、被験物質は 50 mg/mL で注射用水に不溶、DMSO に溶解した。また、DMSO を加えた際に発熱、発泡、変色は認められなかった。この結果から、溶媒には DMSO を用いた。				
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	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	15分～25分			室温	
純度換算の有無	有		無		

## 5. 前培養の条件等

## (1) 条件

ニュートリエントブロス	名称	製造元	Lot No.
	Oxoid Nutrient Broth No.2	Oxoid 社	261002
前培養時間	8 時間		
培養容器 (形状・容量)	L 型試験管 22 mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	20 $\mu$ L

## (2) 前培養終了時の生菌数等

菌株名		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	TA98	TA1537
生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)	予備試験	2.51	1.98	6.24	3.77	2.08
	本試験 1	2.51	1.96	6.11	3.54	2.09
	本試験 2	2.49	1.98	6.11	3.43	2.08
測定方法 (いずれかを○で囲むこと)		1. O.D.値よりの換算			2. 段階希釈法	
		3. 濁度よりの換算				

## 6. 最少グルコース寒天平板培地 (該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

自製・購入の別	1. 自製 2. 購入 (製造元: オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2005年3月5日 製造
購入の場合の Lot No.	クリメディア AM-N 培地 ANI190CU
使用寒天の名称・ 製造元・Lot No.	名称: 伊那寒天 (BA-30A) 製造元: 伊那食品工業株式会社 Lot No.: 40721

## 7. 試験の方法 (該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

## (1) 試験方法とその選定理由

採用した試験方法	1. プレインキュベーション法 2. プレート法 3. その他 ( )
その他の場合は その選定理由	

## (2) 試験条件

組 成	菌懸濁液	0.1 mL
	被験物質溶液	0.1 mL
	Na-リン酸緩衝液 (直接法による場合)	0.5 mL
	S9 mix (代謝活性化法による場合)	0.5 mL
	トップアガー	2 mL
	その他 ( )	—
プレインキュベーション	温 度	37°C
	時 間	20分
インキュベーション	温 度	37°C
	時 間	48時間

## 8. コロニー計測の方法

計測方法	1. マニュアル (目視) 計測 2. 機器 (自動コロニーカウンター) 計測
補正の有無	1. 無 2. 有 (補正の方法: 面積および数え落とし補正)

## 9. 試験の結果

(1) 試験結果は別表 1～3 および図 1-1～2-2 による。

(2) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと。)	陽 性	陰 性
判定の理由  予備試験の結果に基づいて、菌の生育阻害の認められる用量を最高用量として本試験を2回実施した結果、S9 mixの有無にかかわらず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の2倍未満であった。  以上の結果から、被験物質は本試験条件下において変異原性を有さない（陰性）と結論した。		

(3) 参考事項

- ・予備試験を 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の7用量で実施した結果、S9 mix 非存在下では TA100, TA1535 の 78.1  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量, WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 の 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で、S9 mix 存在下ではすべての菌株の 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で菌の生育阻害が認められた。また、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められず、いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性（溶媒）対照値の2倍未満であった。
- 予備試験の結果から本試験は明らかな生育阻害を示す用量を最高用量として、S9 mix 非存在下の TA100, TA1535 は 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の7用量, WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の6用量で、S9 mix 存在下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の6用量, WP2uvrA/pKM101 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の7用量で実施した。
- ・S9 mix 非存在下および存在下のすべての菌株で菌の生育阻害が認められた。
- ・S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。
- ・試験結果には統計学的検定を実施しなかった。

別表 1

## 試験結果表 (予備試験)

試験期間		2005年 5月23日 ~ 2005年 5月26日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	123	15	65	17	16
	1.22	118	16	69	26	21
	4.88	111	15	82	16	16
	19.5	100	19	64	24	22
	78.1	94 *	16 *	68	18	18
	313	0 *	0 *	59 *	20 *	8 *
	1250	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
S9 mix (+)	陰性対照	133	16	104	24	19
	1.22	117	10	104	24	25
	4.88	107	14	98	24	16
	19.5	112	16	92	31	25
	78.1	88	17	84	31	22
	313	90 *	7 *	77 *	24 *	12 *
	1250	0 *	0 *	56 *	0 *	0 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
陽性対照 S9 mix (-)	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	623	560	640	837	389
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
	(コロニー数/プレート)	959	212	600	423	154

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。  
陰性対照: ジメチルスルホキシド (DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub>: アシ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

別表 2

試験結果表 (本試験 1)

試験期間		2005年6月7日 ~ 2005年6月10日					
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (µg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照	103 91 ( 98 ) 100 ( 6 )	9 12 ( 11 ) 13 ( 2 )	94 86 ( 88 ) 85 ( 5 )	22 16 ( 20 ) 22 ( 3 )	11 13 ( 12 ) 13 ( 1 )	
	2.44	108 102 ( 101 ) 92 ( 8 )	6 9 ( 8 ) 8 ( 2 )	/	/	/	
	4.88	129 93 ( 103 ) 88 ( 22 )	11 10 ( 11 ) 11 ( 1 )	/	/	/	
	9.77	116 96 ( 102 ) 95 ( 12 )	6 11 ( 8 ) 7 ( 3 )	84 74 ( 85 ) 98 ( 12 )	28 22 ( 26 ) 28 ( 3 )	11 11 ( 12 ) 15 ( 2 )	
	19.5	92 95 ( 94 ) 94 ( 2 )	8 9 ( 9 ) 9 ( 1 )	117 106 ( 105 ) 93 ( 12 )	17 24 ( 19 ) 16 ( 4 )	12 8 ( 12 ) 17 ( 5 )	
	39.1	94 106 ( 101 ) 104 ( 6 )	11 6 ( 8 ) 8 ( 3 )	109 88 ( 94 ) 84 ( 13 )	17 16 ( 19 ) 23 ( 4 )	13 14 ( 13 ) 12 ( 1 )	
	78.1	108 * 96 * ( 105 ) 111 * ( 8 )	13 * 10 * ( 10 ) 7 * ( 3 )	102 87 ( 90 ) 81 ( 11 )	22 22 ( 23 ) 24 ( 1 )	16 13 ( 14 ) 13 ( 2 )	
	156	112 * 94 * ( 104 ) 107 * ( 9 )	9 * 10 * ( 9 ) 8 * ( 1 )	101 93 ( 88 ) 70 ( 16 )	17 29 ( 24 ) 25 ( 6 )	18 16 ( 17 ) 16 ( 1 )	
	313	/	/	59 * 79 * ( 63 ) 51 * ( 14 )	17 * 15 * ( 18 ) 22 * ( 4 )	9 * 10 * ( 11 ) 14 * ( 3 )	
	S9 mix (+)	陰性対照	96 103 ( 104 ) 113 ( 9 )	10 10 ( 11 ) 13 ( 2 )	116 130 ( 116 ) 103 ( 14 )	24 25 ( 26 ) 30 ( 3 )	15 13 ( 13 ) 11 ( 2 )
		9.77	81 115 ( 110 ) 133 ( 26 )	13 8 ( 11 ) 11 ( 3 )	108 117 ( 111 ) 108 ( 5 )	25 18 ( 24 ) 29 ( 6 )	13 14 ( 14 ) 15 ( 1 )
		19.5	108 95 ( 104 ) 108 ( 8 )	9 8 ( 8 ) 6 ( 2 )	115 110 ( 111 ) 108 ( 4 )	19 25 ( 24 ) 27 ( 4 )	23 19 ( 18 ) 11 ( 6 )
39.1		103 120 ( 114 ) 120 ( 10 )	7 7 ( 9 ) 14 ( 4 )	100 100 ( 98 ) 93 ( 4 )	26 26 ( 27 ) 30 ( 2 )	19 22 ( 19 ) 17 ( 3 )	
78.1		109 116 ( 108 ) 98 ( 9 )	11 14 ( 11 ) 9 ( 3 )	117 110 ( 111 ) 105 ( 6 )	29 29 ( 27 ) 22 ( 4 )	19 21 ( 17 ) 11 ( 5 )	
156		119 * 112 * ( 109 ) 95 * ( 12 )	8 * 11 * ( 10 ) 11 * ( 2 )	93 109 ( 103 ) 108 ( 9 )	28 24 ( 25 ) 24 ( 2 )	19 15 ( 18 ) 19 ( 2 )	
313		106 * 87 * ( 98 ) 100 * ( 10 )	8 * 6 * ( 6 ) 3 * ( 3 )	81 * 114 * ( 90 ) 76 * ( 21 )	22 * 24 * ( 24 ) 27 * ( 3 )	15 * 10 * ( 13 ) 15 * ( 3 )	
625		/	/	49 * 50 * ( 56 ) 69 * ( 11 )	/	/	
陽性対照 S9 mix (-)		名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (µg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	692 587 ( 641 ) 644 ( 53 )	570 635 ( 612 ) 630 ( 36 )	1226 1219 ( 1161 ) 1038 ( 107 )	907 894 ( 929 ) 986 ( 50 )	444 381 ( 426 ) 452 ( 39 )	
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	用量 (µg/プレート)	1	2	2	0.5	2	
	(コロニー数/プレート)	1446 1280 ( 1350 ) 1324 ( 86 )	230 193 ( 215 ) 222 ( 19 )	880 674 ( 719 ) 604 ( 143 )	441 461 ( 433 ) 396 ( 33 )	205 226 ( 202 ) 175 ( 26 )	

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。

(平均値)  
(標準偏差)

陰性対照: ジメチルスルホキシド (DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

別表 3

試験結果表 (本試験 2)

試験期間		2005年6月21日 ~ 2005年6月24日					
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (µg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照	95 113 ( 104 ) 105 ( 9 )	10 8 ( 9 ) 10 ( 1 )	62 75 ( 71 ) 75 ( 8 )	19 15 ( 16 ) 13 ( 3 )	18 13 ( 13 ) 9 ( 5 )	
	2.44	103 97 ( 101 ) 102 ( 3 )	10 10 ( 10 ) 10 ( 0 )	/	/	/	
	4.88	112 102 ( 103 ) 94 ( 9 )	14 11 ( 12 ) 10 ( 2 )	/	/	/	
	9.77	110 104 ( 109 ) 114 ( 5 )	8 9 ( 8 ) 8 ( 1 )	88 59 ( 74 ) 76 ( 15 )	18 23 ( 20 ) 19 ( 3 )	16 9 ( 11 ) 8 ( 4 )	
	19.5	113 104 ( 108 ) 108 ( 5 )	8 10 ( 11 ) 14 ( 3 )	75 86 ( 78 ) 73 ( 7 )	19 18 ( 17 ) 13 ( 3 )	9 11 ( 11 ) 13 ( 2 )	
	39.1	110 117 ( 109 ) 99 ( 9 )	14 9 ( 12 ) 14 ( 3 )	67 78 ( 73 ) 74 ( 6 )	19 18 ( 18 ) 16 ( 2 )	10 12 ( 14 ) 19 ( 5 )	
	78.1	85 * 86 * ( 84 ) 82 * ( 2 )	7 * 13 * ( 9 ) 6 * ( 4 )	84 73 ( 79 ) 80 ( 6 )	24 21 ( 20 ) 16 ( 4 )	9 15 ( 12 ) 13 ( 3 )	
	156	85 * 88 * ( 87 ) 87 * ( 2 )	7 * 7 * ( 8 ) 9 * ( 1 )	80 61 ( 71 ) 72 ( 10 )	15 18 ( 16 ) 15 ( 2 )	10 11 ( 12 ) 15 ( 3 )	
	313	/	/	68 * 78 * ( 68 ) 59 * ( 10 )	13 * 17 * ( 11 ) 3 * ( 7 )	9 * 7 * ( 9 ) 10 * ( 2 )	
	S9 mix (+)	陰性対照	101 111 ( 111 ) 121 ( 10 )	13 14 ( 13 ) 11 ( 2 )	83 110 ( 102 ) 114 ( 17 )	25 18 ( 23 ) 25 ( 4 )	19 17 ( 18 ) 17 ( 1 )
		9.77	111 115 ( 114 ) 117 ( 3 )	9 15 ( 12 ) 13 ( 3 )	87 91 ( 93 ) 101 ( 7 )	22 23 ( 26 ) 32 ( 6 )	17 17 ( 15 ) 12 ( 3 )
		19.5	123 111 ( 117 ) 118 ( 6 )	9 9 ( 11 ) 16 ( 4 )	99 89 ( 93 ) 92 ( 5 )	24 24 ( 24 ) 23 ( 1 )	17 16 ( 16 ) 15 ( 1 )
39.1		114 129 ( 115 ) 101 ( 14 )	9 15 ( 12 ) 11 ( 3 )	90 115 ( 96 ) 84 ( 16 )	23 20 ( 25 ) 32 ( 6 )	15 18 ( 17 ) 18 ( 2 )	
78.1		129 126 ( 125 ) 121 ( 4 )	11 15 ( 14 ) 15 ( 2 )	93 84 ( 86 ) 82 ( 6 )	18 25 ( 23 ) 26 ( 4 )	19 19 ( 16 ) 11 ( 5 )	
156		119 * 110 * ( 113 ) 110 * ( 5 )	11 * 11 * ( 10 ) 9 * ( 1 )	93 108 ( 101 ) 102 ( 8 )	27 22 ( 24 ) 24 ( 3 )	22 13 ( 17 ) 16 ( 5 )	
313		86 * 91 * ( 87 ) 84 * ( 4 )	7 * 13 * ( 9 ) 8 * ( 3 )	99 * 97 * ( 95 ) 88 * ( 6 )	24 * 24 * ( 24 ) 24 * ( 0 )	11 * 15 * ( 15 ) 18 * ( 4 )	
625		/	/	58 * 68 * ( 57 ) 44 * ( 12 )	/	/	
陽性対照 S9 mix (-)		名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (µg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	688 672 ( 695 ) 726 ( 28 )	554 597 ( 573 ) 568 ( 22 )	1230 976 ( 1020 ) 853 ( 192 )	984 805 ( 852 ) 767 ( 116 )	328 310 ( 329 ) 350 ( 20 )	
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	用量 (µg/プレート)	1	2	2	0.5	2	
	(コロニー数/プレート)	1669 1290 ( 1452 ) 1398 ( 195 )	200 248 ( 247 ) 293 ( 47 )	876 714 ( 752 ) 667 ( 110 )	379 372 ( 394 ) 430 ( 32 )	188 189 ( 189 ) 190 ( 1 )	

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。

(平均値)  
(±標準偏差)

陰性対照: ジメチルスルホキシド (DMSO)

AF-2: 2-(2-フルル)-3-(5-ニトロ-2-フルル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン



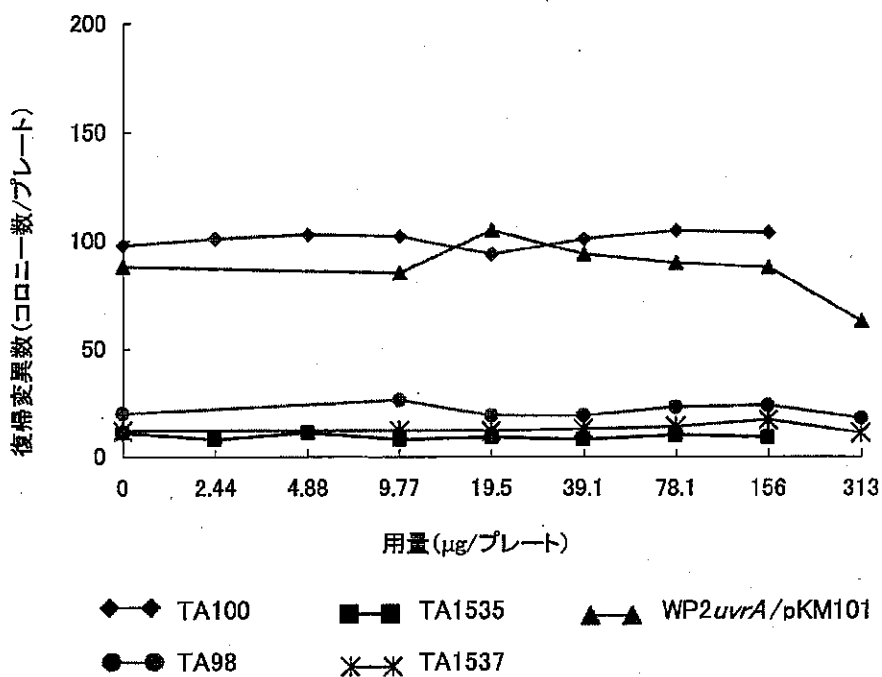


図 1-1 用量-反応曲線 (本試験 1; -S9 mix)

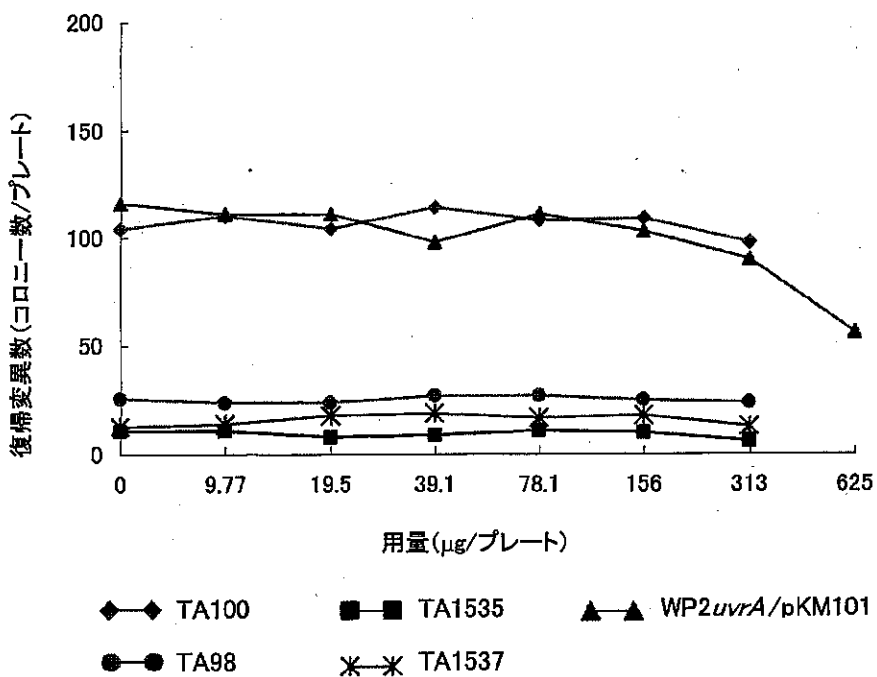


図 1-2 用量-反応曲線 (本試験 1; +S9 mix)

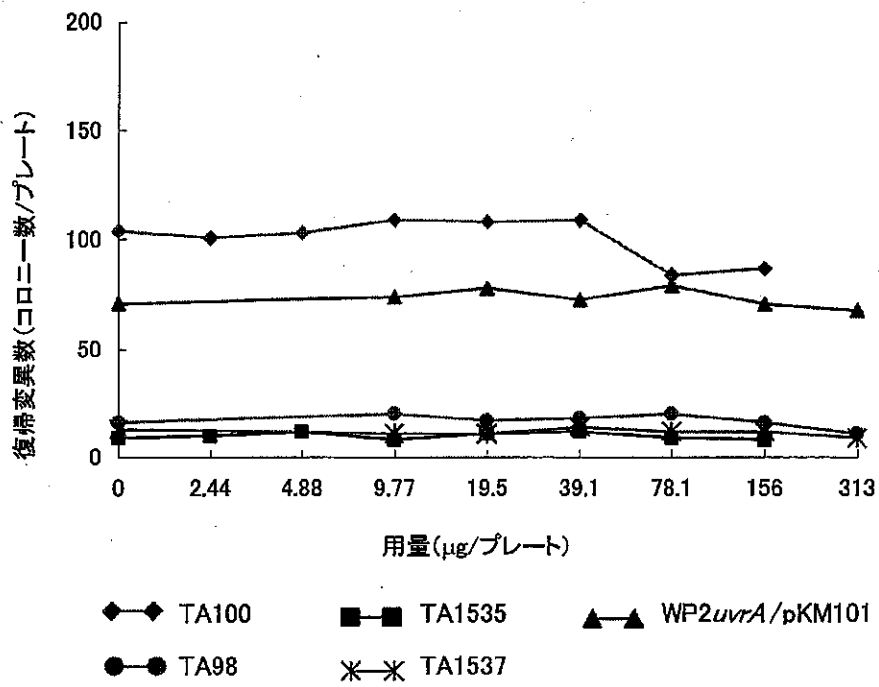


図 2-1 用量-反応曲線 (本試験 2; -S9 mix)

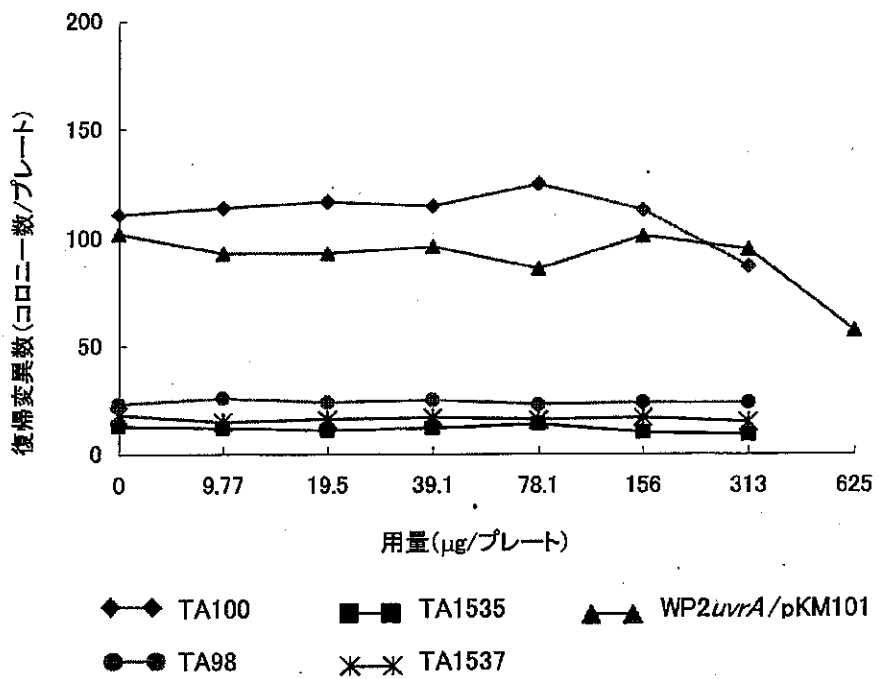


図 2-2 用量-反応曲線 (本試験 2; +S9 mix)

### 3. 試験実施概要

#### 3.1 表題

クロロシクロヘキサンの細菌を用いる復帰突然変異試験

#### 3.2 試験番号

B041795

#### 3.3 試験目的

ネズミチフス菌株および大腸菌株を用いる復帰突然変異試験を実施し、クロロシクロヘキサンの変異原性を検討する。

#### 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 Guideline for the Testing of Chemicals (No.471, 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

(2005 年 7 月 31 日までは茨城県鹿島郡波崎町砂山 14 番地)

## 5. 要約

ネズミチフス菌株 TA100, TA1535, TA98 および TA1537 ならびに大腸菌株 WP2uvrA/pKM101 の 5 菌株を用いる復帰突然変異試験でクロロシクロヘキサンの変異原性を調べた。試験は S9 mix 非存在下および存在下でプレインキュベーション法により実施した。

予備試験を 1.22, 4.88, 19.5, 78.1, 313, 1250, 5000  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 用量で実施した結果, S9 mix 非存在下では TA100, TA1535 の 78.1  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量, WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 の 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で, S9 mix 存在下ではすべての菌株の 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で菌の生育阻害が認められた。また, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められず, いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍未満であった。

予備試験の結果から本試験は, S9 mix 非存在下の TA100, TA1535 は 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 用量, WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 6 用量で, S9 mix 存在下の TA100, TA1535, TA98, TA1537 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 6 用量, WP2uvrA/pKM101 は 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 313, 625  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の 7 用量で実施した。

2 回の本試験の結果, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの試験菌株においても被験物質処理群における復帰変異コロニー数は陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍未満であった。また, S9 mix 非存在下では TA100, TA1535 の 78.1  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量, WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 の 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  の用量で, S9 mix 存在下では TA100, TA1535 の 156  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量, WP2uvrA/pKM101, TA98, TA1537 の 313  $\mu\text{g}/\text{プレート}$  以上の用量で菌の生育阻害が認められた。なお, S9 mix の有無にかかわらず, いずれの用量においてもプレート上に沈殿物は認められなかった。

当該試験の陰性 (溶媒) 対照値および陽性対照値は, 当研究所の適正範囲内であった。また, 陽性対照により誘発された復帰変異コロニー数は, S9 mix 非存在下および存在下のいずれの試験菌株においても陰性 (溶媒) 対照値の 2 倍を超えて増加し, 明らかな陽性結果を示した。従って, 本試験の妥当性が確認された。

以上の結果から, クロロシクロヘキサンは本試験条件下において変異原性を有しないと結論した。

表1 試験結果表 (予備試験)

試験期間		2005年5月23日 ~ 2005年5月26日				
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)				
		塩基置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537
S9 mix (-)	陰性対照	123	15	65	17	16
	1.22	118	16	69	26	21
	4.88	111	15	82	16	16
	19.5	100	19	64	24	22
	78.1	94 *	16 *	68	18	18
	313	0 *	0 *	59 *	20 *	8 *
	1250	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
S9 mix (+)	陰性対照	133	16	104	24	19
	1.22	117	10	104	24	25
	4.88	107	14	98	24	16
	19.5	112	16	92	31	25
	78.1	88	17	84	31	22
	313	90 *	7 *	77 *	24 *	12 *
	1250	0 *	0 *	56 *	0 *	0 *
	5000	0 *	0 *	0 *	0 *	0 *
陽性対照 S9 mix (-)	名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
	用量 (μg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	623	560	640	837	389
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	用量 (μg/プレート)	1	2	2	0.5	2
	(コロニー数/プレート)	959	212	600	423	154

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。  
陰性対照: ジメチルスルホキシド (DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

表2 試験結果表 (本試験1)

試験期間		2005年6月7日 ~ 2005年6月10日					
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (µg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照	103 91 ( 98 ) 100 ( 6 )	9 12 ( 11 ) 13 ( 2 )	94 86 ( 88 ) 85 ( 5 )	22 16 ( 20 ) 22 ( 3 )	11 13 ( 12 ) 13 ( 1 )	
	2.44	108 102 ( 101 ) 92 ( 8 )	6 9 ( 8 ) 8 ( 2 )	/	/	/	
	4.88	129 93 ( 103 ) 88 ( 22 )	11 10 ( 11 ) 11 ( 1 )	/	/	/	
	9.77	116 96 ( 102 ) 95 ( 12 )	6 11 ( 8 ) 7 ( 3 )	84 74 ( 85 ) 98 ( 12 )	28 22 ( 26 ) 28 ( 3 )	11 11 ( 12 ) 15 ( 2 )	
	19.5	92 95 ( 94 ) 94 ( 2 )	8 9 ( 9 ) 9 ( 1 )	117 106 ( 105 ) 93 ( 12 )	17 24 ( 19 ) 16 ( 4 )	12 8 ( 12 ) 17 ( 5 )	
	39.1	94 106 ( 101 ) 104 ( 6 )	11 6 ( 8 ) 8 ( 3 )	109 88 ( 94 ) 84 ( 13 )	17 16 ( 19 ) 23 ( 4 )	13 14 ( 13 ) 12 ( 1 )	
	78.1	108 * 96 * ( 105 ) 111 * ( 8 )	13 * 10 * ( 10 ) 7 * ( 3 )	102 87 ( 90 ) 81 ( 11 )	22 22 ( 23 ) 24 ( 1 )	16 13 ( 14 ) 13 ( 2 )	
	156	112 * 94 * ( 104 ) 107 * ( 9 )	9 * 10 * ( 9 ) 8 * ( 1 )	101 93 ( 88 ) 70 ( 16 )	17 29 ( 24 ) 25 ( 6 )	18 16 ( 17 ) 16 ( 1 )	
	313	/	/	59 * 79 * ( 63 ) 51 * ( 14 )	17 * 15 * ( 18 ) 22 * ( 4 )	9 * 10 * ( 11 ) 14 * ( 3 )	
	S9 mix (+)	陰性対照	96 103 ( 104 ) 113 ( 9 )	10 10 ( 11 ) 13 ( 2 )	116 130 ( 116 ) 103 ( 14 )	24 25 ( 26 ) 30 ( 3 )	15 13 ( 13 ) 11 ( 2 )
9.77		81 115 ( 110 ) 133 ( 26 )	13 8 ( 11 ) 11 ( 3 )	108 117 ( 111 ) 108 ( 5 )	25 18 ( 24 ) 29 ( 6 )	13 14 ( 14 ) 15 ( 1 )	
19.5		108 95 ( 104 ) 108 ( 8 )	9 8 ( 8 ) 6 ( 2 )	115 110 ( 111 ) 108 ( 4 )	19 25 ( 24 ) 27 ( 4 )	23 19 ( 18 ) 11 ( 6 )	
39.1		103 120 ( 114 ) 120 ( 10 )	7 7 ( 9 ) 14 ( 4 )	100 100 ( 98 ) 93 ( 4 )	26 26 ( 27 ) 30 ( 2 )	19 22 ( 19 ) 17 ( 3 )	
78.1		109 116 ( 108 ) 98 ( 9 )	11 14 ( 11 ) 9 ( 3 )	117 110 ( 111 ) 105 ( 6 )	29 29 ( 27 ) 22 ( 4 )	19 21 ( 17 ) 11 ( 5 )	
156		119 * 112 * ( 109 ) 95 * ( 12 )	8 * 11 * ( 10 ) 11 * ( 2 )	93 109 ( 103 ) 108 ( 9 )	28 24 ( 25 ) 24 ( 2 )	19 15 ( 18 ) 19 ( 2 )	
313		106 * 87 * ( 98 ) 100 * ( 10 )	8 * 6 * ( 6 ) 3 * ( 3 )	81 * 114 * ( 90 ) 76 * ( 21 )	22 * 24 * ( 24 ) 27 * ( 3 )	15 * 10 * ( 13 ) 15 * ( 3 )	
625		/	/	49 * 50 * ( 56 ) 69 * ( 11 )	/	/	
陽性対照 S9 mix (-)		名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (µg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
	(コロニー数/プレート)	692 587 ( 641 ) 644 ( 53 )	570 635 ( 612 ) 630 ( 36 )	1226 1219 ( 1161 ) 1038 ( 107 )	907 894 ( 929 ) 986 ( 50 )	444 381 ( 426 ) 452 ( 39 )	
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	用量 (µg/プレート)	1	2	2	0.5	2	
	(コロニー数/プレート)	1446 1280 ( 1350 ) 1324 ( 86 )	230 193 ( 215 ) 222 ( 19 )	880 674 ( 719 ) 604 ( 143 )	441 461 ( 433 ) 396 ( 33 )	205 226 ( 202 ) 175 ( 26 )	

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。

(平均値)  
(±標準偏差)

陰性対照: ジメチルスルホキシド (DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリジン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

表3 試験結果表 (本試験2)

試験期間		2005年6月21日 ~ 2005年6月24日					
代謝活性化系の有無	被験物質用量 (µg/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)					
		塩基対置換型			フレームシフト型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA/pKM101	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	陰性対照	95 113 ( 104 ) 105 ( 9 )	10 8 ( 9 ) 10 ( 1 )	62 75 ( 71 ) 75 ( 8 )	19 15 ( 16 ) 13 ( 3 )	18 13 ( 13 ) 9 ( 5 )	
	2.44	103 97 ( 101 ) 102 ( 3 )	10 10 ( 10 ) 10 ( 0 )	/	/	/	
	4.88	112 102 ( 103 ) 94 ( 9 )	14 11 ( 12 ) 10 ( 2 )	/	/	/	
	9.77	110 104 ( 109 ) 114 ( 5 )	8 9 ( 8 ) 8 ( 1 )	88 59 ( 74 ) 76 ( 15 )	18 23 ( 20 ) 19 ( 3 )	16 9 ( 11 ) 8 ( 4 )	
	19.5	113 104 ( 108 ) 108 ( 5 )	8 10 ( 11 ) 14 ( 3 )	75 86 ( 78 ) 73 ( 7 )	19 18 ( 17 ) 13 ( 3 )	9 11 ( 11 ) 13 ( 2 )	
	39.1	110 117 ( 109 ) 99 ( 9 )	14 9 ( 12 ) 14 ( 3 )	67 78 ( 73 ) 74 ( 6 )	19 18 ( 18 ) 16 ( 2 )	10 12 ( 14 ) 19 ( 5 )	
	78.1	85 * 86 * ( 84 ) 82 * ( 2 )	7 * 13 * ( 9 ) 6 * ( 4 )	84 73 ( 79 ) 80 ( 6 )	24 21 ( 20 ) 16 ( 4 )	9 15 ( 12 ) 13 ( 3 )	
	156	85 * 88 * ( 87 ) 87 * ( 2 )	7 * 7 * ( 8 ) 9 * ( 1 )	80 61 ( 71 ) 72 ( 10 )	15 18 ( 16 ) 15 ( 2 )	10 11 ( 12 ) 15 ( 3 )	
	313	/	/	68 * 78 * ( 68 ) 59 * ( 10 )	13 * 17 * ( 11 ) 3 * ( 7 )	9 * 7 * ( 9 ) 10 * ( 2 )	
	S9 mix (+)	陰性対照	101 111 ( 111 ) 121 ( 10 )	13 14 ( 13 ) 11 ( 2 )	83 110 ( 102 ) 114 ( 17 )	25 18 ( 23 ) 25 ( 4 )	19 17 ( 18 ) 17 ( 1 )
		9.77	111 115 ( 114 ) 117 ( 3 )	9 15 ( 12 ) 13 ( 3 )	87 91 ( 93 ) 101 ( 7 )	22 23 ( 26 ) 32 ( 6 )	17 17 ( 15 ) 12 ( 3 )
		19.5	123 111 ( 117 ) 118 ( 6 )	9 9 ( 11 ) 16 ( 4 )	99 89 ( 93 ) 92 ( 5 )	24 24 ( 24 ) 23 ( 1 )	17 16 ( 16 ) 15 ( 1 )
39.1		114 129 ( 115 ) 101 ( 14 )	9 15 ( 12 ) 11 ( 3 )	90 115 ( 96 ) 84 ( 16 )	23 20 ( 25 ) 32 ( 6 )	15 18 ( 17 ) 18 ( 2 )	
78.1		129 126 ( 125 ) 121 ( 4 )	11 15 ( 14 ) 15 ( 2 )	93 84 ( 86 ) 82 ( 6 )	18 25 ( 23 ) 26 ( 4 )	19 19 ( 16 ) 11 ( 5 )	
156		119 * 110 * ( 113 ) 110 * ( 5 )	11 * 11 * ( 10 ) 9 * ( 1 )	93 108 ( 101 ) 102 ( 8 )	27 22 ( 24 ) 24 ( 3 )	22 13 ( 17 ) 16 ( 5 )	
313		86 * 91 * ( 87 ) 84 * ( 4 )	7 * 13 * ( 9 ) 8 * ( 3 )	99 * 97 * ( 95 ) 88 * ( 6 )	24 * 24 * ( 24 ) 24 * ( 0 )	11 * 15 * ( 15 ) 18 * ( 4 )	
625		/	/	58 * 68 * ( 57 ) 44 * ( 12 )	/	/	
陽性対照 S9 mix (-)		名称	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		用量 (µg/プレート)	0.01	0.5	0.005	0.1	80
陽性対照 S9 mix (+)	名称	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	
	用量 (µg/プレート)	1	2	2	0.5	2	
		688 672 ( 695 ) 726 ( 28 )	554 597 ( 573 ) 568 ( 22 )	1230 976 ( 1020 ) 853 ( 192 )	984 805 ( 852 ) 767 ( 116 )	328 310 ( 329 ) 350 ( 20 )	
		1669 1290 ( 1452 ) 1398 ( 195 )	200 248 ( 247 ) 293 ( 47 )	876 714 ( 752 ) 667 ( 110 )	379 372 ( 394 ) 430 ( 32 )	188 189 ( 189 ) 190 ( 1 )	

(備考) \*: 菌の生育阻害が認められた。 (±標準偏差)

陰性対照: ジメチルスルホキシド (DMSO)

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド, NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム, 9-AA: 9-アミノアクリン塩酸塩, 2-AA: 2-アミノアントラセン

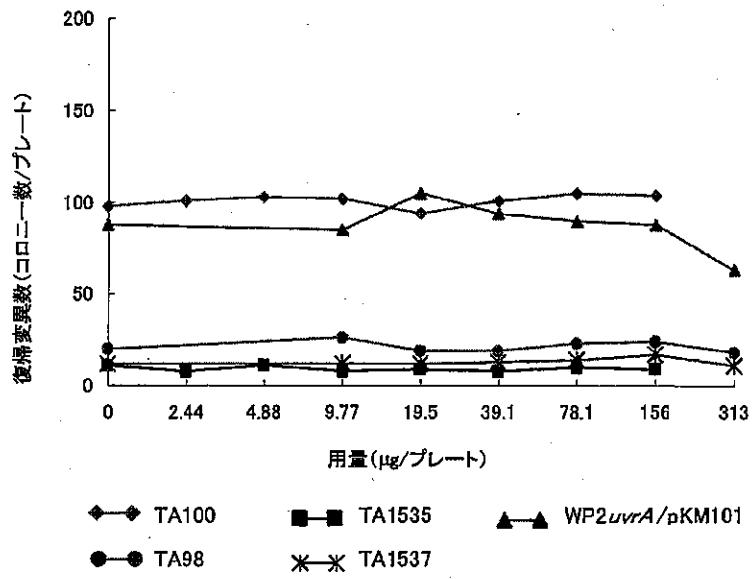


図 1-1 用量-反応曲線 (本試験 1; -S9 mix)

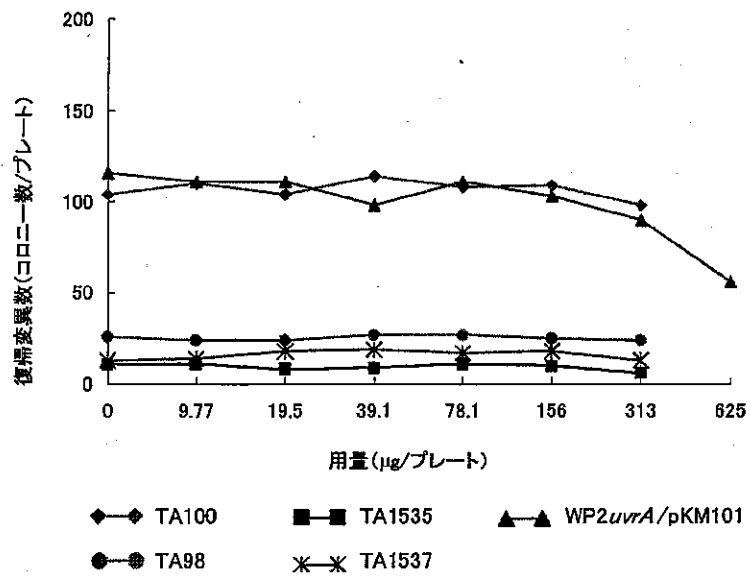


図 1-2 用量-反応曲線 (本試験 1; +S9 mix)



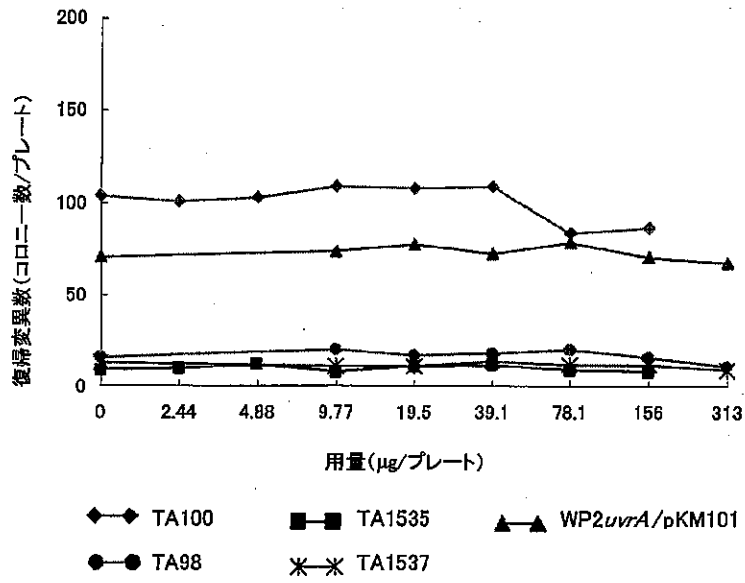


図 2-1 用量-反応曲線 (本試験 2; -S9 mix)

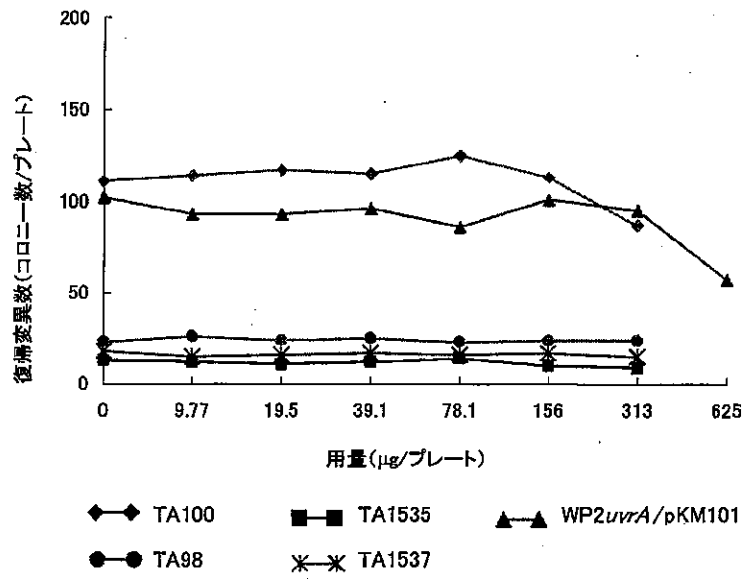
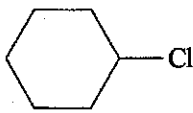


図 2-2 用量-反応曲線 (本試験 2; +S9 mix)

## 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)	クロロシクロヘキサン		
別 名	—		
CAS 番号	542-18-7		
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	118.61		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	99.7%		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	5C1114		
不純物の名称 及び含有率	—		
蒸 気 圧	6.73 mmHg (25°C)		
対水溶解度	500 mg/L (25°C)		
1-オクタノール/水分配係数	3.36		
融 点	-44°C		
沸 点	142°C		
常温における性状	無色液体		
安 定 性	—		
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 で不溶*1	—
	DMSO	500 mg/mL で溶解*1	安定*2
	生理食塩液	50 mg/mL で不溶*1	—

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/TU	入手先	大日本製薬株式会社	
種	チャイニーズハムスター	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	21~23*	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 <sub>2</sub> 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	$\beta$ -NADP <sup>+</sup>	4 $\mu$ mol
MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ mol	NADPH	- $\mu$ mol
KCl	33 $\mu$ mol	HEPES 緩衝液 (pH7.2)	4 $\mu$ mol
D-グルコース 6-リン酸	5 $\mu$ 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

	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
使用溶媒	ジメチルスルホキシド	関東化学株式会社	510F1666	分光分析用	100.0
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 で溶解しなかったが, ジメチルスルホキシド (以下 DMSO) には 500 mg/mL で溶解し, 溶液に発熱, 発泡, 変色は認められなかった. 従って, 本被験物質の溶媒 (陰性対照物質) には DMSO を用いた.				
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~30 分 室温 : 細胞増殖抑制試験 10 分~25 分 室温 : 染色体異常試験 (短時間処理法) 10 分 室温 : 染色体異常試験 (連続処理法)				
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20日から 2005年5月24日	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	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	3.0 mL/培養器	2.5 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	$4 \times 10^3$ 個/mL	$4 \times 10^3$ 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	0.03 mL/培養器	0.03 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	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	93	100	88
250	34	200	87
500	9	300	57
750	4	400	61
1000	2	500	2
1500	0	750	12
2000	0	1000	0

## (3) 染色体異常試験の条件

		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27日から 2005年6月8日	2005年5月27日から 2005年6月8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	3.0 mL/培養器	2.5 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	$4 \times 10^3$ 個/mL	$4 \times 10^3$ 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	0.03 mL/培養器	0.03 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%
	S 9 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) 染色体異常試験の結果 (別表 1, 2 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	5.0 mL/培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	$4 \times 10^3$ 個/mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.05 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
50	97
100	101
200	63
300	0*
400	0
500	0

\* : IC50 値は「0.4」として算出した。

## (3) 染色体異常試験の条件

		(24-0 h) 処理による 場合
試験実施期間		2005年6月17日から 2005年6月28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	5.0 mL/培養器
	用量あたりの培養器数	2 枚
細胞	播 種 細 胞 数	$4 \times 10^3$ 個/mL
	前 培 養 日 数 *	3 日間
処理条件	被験物質溶液添加量	0.05 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h
	回 復 時 間	0 h
備考	*: 培養開始日を0日とした.	

## (4) 染色体異常試験の結果 (別表 1, 3 による.)

## 7. 結果の判定及び参考事項

## (1) 結果の判定

判 定	陽 性	陰 性
<p>判定の理由</p> <p>染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの処理条件のいずれの被験物質用量においても5%未満であった。</p>		

## (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、50, 500, 5000 µg/mL を設定し、1 用量あたり 1 枚のプレートを用いて実施した。処理終了後のプレートを位相差倒立顕微鏡で観察し、陰性対照群プレートの細胞密度を 100% として相対的な細胞密度を判断した。その結果、各プレートの細胞密度は以下の通りであった。

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

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, 1500, 2000 µg/mL
  - +S9 mix : 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000 µg/mL
  - 24 時間処理 : 50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL
- 細胞増殖抑制試験の結果、50%細胞増殖抑制用量 (IC<sub>50</sub>) は、-S9 mix で 202 µg/mL, +S9 mix で 406 µg/mL, 24 時間処理で 205 µg/mL であった。IC<sub>50</sub> を参考に、染色体異常試験は下記の用量を設定した。
    - S9 mix : 100, 150, 200, 250, 300, 350 µg/mL
    - +S9 mix : 200, 300, 400, 450, 500 µg/mL
    - 24 時間処理 : 150, 175, 200, 225, 250, 275 µg/mL
  - 染色体異常試験の予備鏡検の結果、+S9 mix の 500 µg/mL では、いずれのプレートにおいても 50 個以上の分裂中期細胞が得られなかったため、これらのプレートから作製した標本は観察の対象から除外した。
  - 構造異常は、以下の分類<sup>1</sup>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。

- ・ 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。
- ・ 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。
 
$$\text{分裂指数 (\%)} = \frac{\text{分裂中期細胞数}}{\text{観察細胞数}} \times 100$$
 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。
 
$$\text{相対分裂指数 (\%)} = \frac{\text{被験物質処理群の分裂指数}}{\text{陰性対照群の分裂指数}} \times 100$$
- ・ 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)。
- ・ 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

処理	処理-回復 時間 (h)	S9 mix の有無	処理濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	相対分裂指数 (%)
陰性対照 (DMSO)	6-18	—	0	1000	71	7.1	100
クロロシクロ ヘキサン	6-18	—	100	1000	60	6.0	85
	6-18	—	150	1000	69	6.9	97
	6-18	—	200	1000	51	5.1	72
	6-18	—	250	1000	48	4.8	68
	6-18	—	300	1000	56	5.6	79
	6-18	—	350	1000	39	3.9	55
陰性対照 (DMSO)	6-18	+	0	1000	115	11.5	100
クロロシクロ ヘキサン	6-18	+	200	1000	95	9.5	83
	6-18	+	300	1000	76	7.6	66
	6-18	+	400	1000	53	5.3	46
	6-18	+	450	1000	29	2.9	25
	6-18	+	500	1000	5	0.5	4
陰性対照 (DMSO)	24-0	—	0	1000	46	4.6	100
クロロシクロ ヘキサン	24-0	—	150	1000	49	4.9	107
	24-0	—	175	1000	45	4.5	98
	24-0	—	200	1000	51	5.1	111
	24-0	—	225	1000	48	4.8	104
	24-0	—	250	1000	41	4.1	89
	24-0	—	275	1000	16	1.6	35

DMSO : ジメチルスルホキシド

別表 2 染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質の名称	クロロクシロヘキサン	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 (%)	染色体異常細胞数(出現頻度%)		細胞増殖率 (%)	染色体異常細胞数(出現頻度%)	細胞増殖率 (%)	染色体異常細胞数(出現頻度%)
			染色体構造異常細胞数(出現頻度%)	染色体交換	染色体型切断	染色体型交換		染色体異常細胞数(%)	染色体異常細胞数(%)				
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	101	0	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	100	0	0	0	0	0
6-18	-	100	100	0	0	0	0	91	0	0	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	89	0	0	0	0	0
6-18	-	150	100	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	83	0	0	0	0	0
6-18	-	200	100	0	1	0	0	87	0	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	83	0	0	0	0	0
6-18	-	250	100	0	0	0	0	74	0	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	78	0	0	0	0	0
6-18	-	300	100	0	0	0	0	56	0	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	58	0	0	0	0	0
6-18	-	350	100	0	0	0	0	64	0	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	56	0	0	0	0	0
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	34	33	0	0	60	0	0	0	0	0
			200	42	31	1	0	26	0	0	0	0	0
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	108	0	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	92	0	0	0	0	0
6-18	+	200	100	0	0	0	0	79	0	0	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	82	0	0	0	0	0
6-18	+	300	100	0	0	0	0	46	0	0	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	55	0	0	0	0	0
6-18	+	400	100	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	36	0	0	0	0	0
6-18	+	450	100	0	0	0	0	38	0	0	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	33	0	0	0	0	0
6-18	+	500	66	1	1	0	0	6	0	0	0	0	0
			166	1 (0.6)	2 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	20	0	0	0	0	0
6-18	+	陰性対照 (BP20)	100	42	49	2	0	66	0	0	0	0	0
			200	34	53	0	1	62	0	0	0	0	0
6-18	+	Tox	102 (38.0)	102 (38.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	128 (64.0)	0	0	0	0	0	0
			166	1 (0.6)	2 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.8)	0	0	0	0	0

DMSO : ジメチルスルホキシド  
 MMC : マイトマイシンC, BP : ベンゾ [a] ピレン  
 Tox : 細胞毒性のため、プレートあたり50個以上の分裂中期細胞が得られなかった。

別表 3 染色体異常試験の結果 (連続処理法)

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 (%)	染色体数			総異常細胞数(%)	
		観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体型交換	断片化	総異常細胞数(%)	ギャンプの出現数	観察細胞数	倍率	核内倍加		総異常細胞数(%)				
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	103	0	0	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	97	0	0	0	0	0
24-0	150	200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	100	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	0	0	0	0	0
24-0	175	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	71	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)	71	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66	0	0	0	0	0
24-0	225	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)	68	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
		100	1	0	1	0	0	0	2	0	0	65	0	1	1	2	2
24-0	250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	62	0	0	0	0	0
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	64	0	2 (1.0)	1 (0.5)	3 (1.5)	3 (1.5)
24-0	275	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	53	0	0	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	53	0	1	0	0	1
24-0	陽性対照 (MMC 0.05)	200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	53	0	3 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)
		100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	41	0	0	0	0	0
24-0	250	100	1	0	0	0	0	1	0	0	1	37	0	1	0	0	1
		200	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	39	0	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	
24-0	275	100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0
		100	1	3	2	0	0	6	0	0	0	13	0	1	0	0	1
24-0	陽性対照 (MMC 0.05)	200	1 (0.5)	4 (2.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	8 (4.0)	8 (4.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	15	0	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)
		100	25	19	1	0	36	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0
24-0	陽性対照 (MMC 0.05)	100	30	24	0	0	50	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
		200	55 (27.5)	43 (21.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	86 (43.0)	86 (43.0)	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)

DMSO: ジメチルスルホキシド  
MMC: マイトマイシンC



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

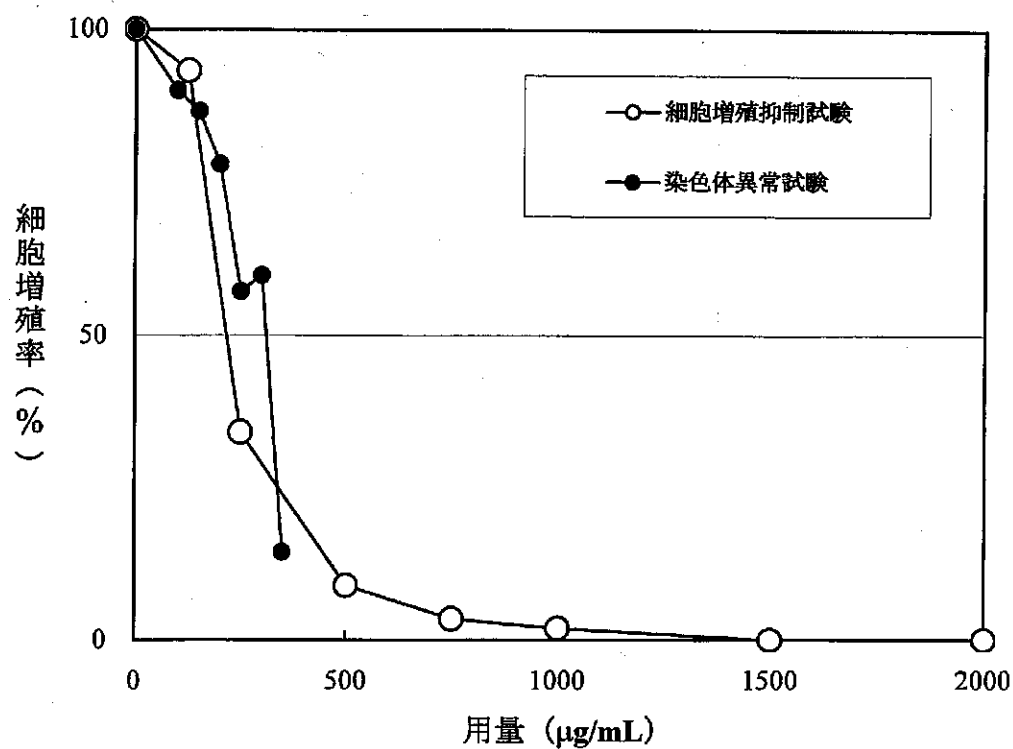


図2 クロロシクロヘキサン処理における細胞毒性  
(短時間処理法・+S9 mix)

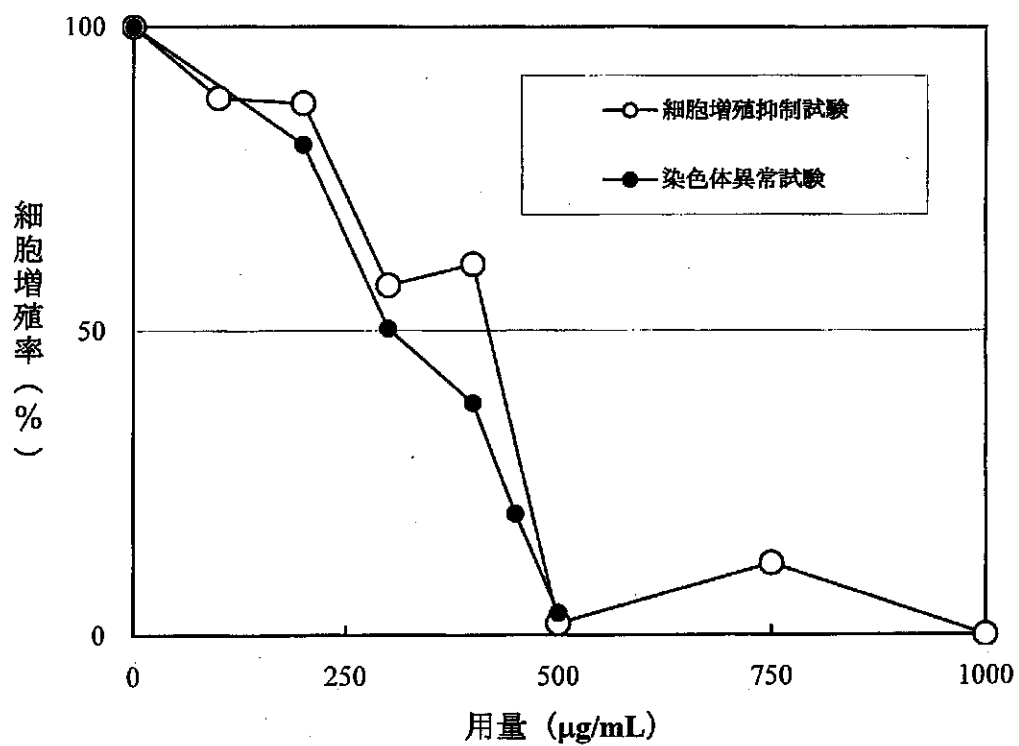


図3 クロロシクロヘキサン処理における細胞毒性  
(連続処理法)

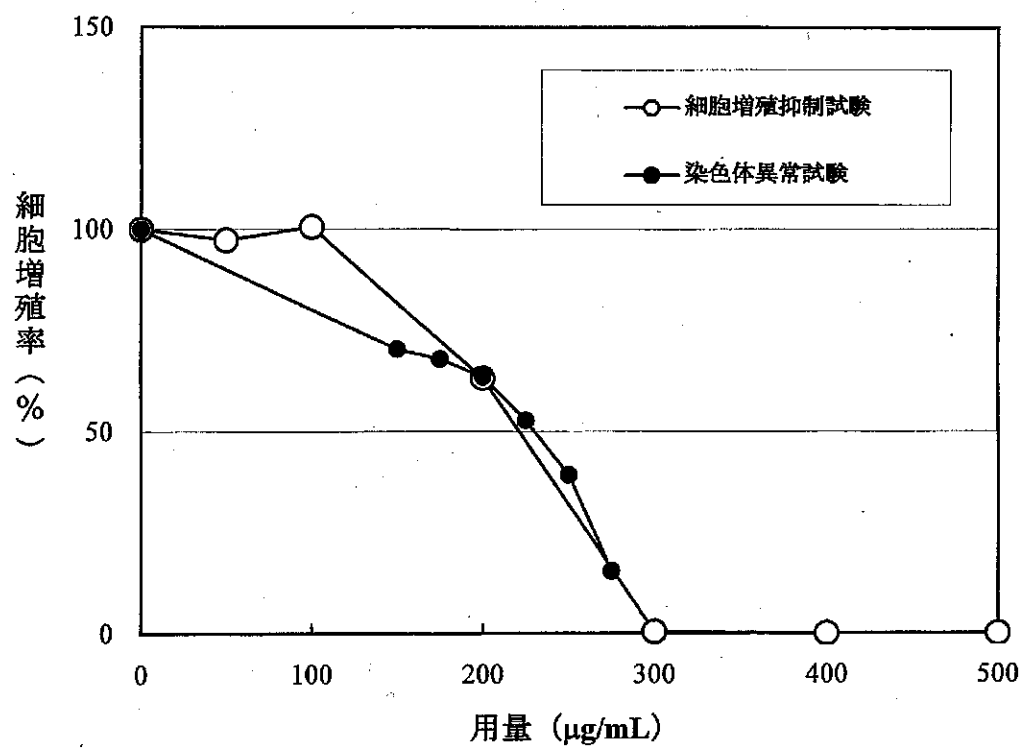


図4 クロシクロヘキサン処理における  
構造異常細胞出現頻度

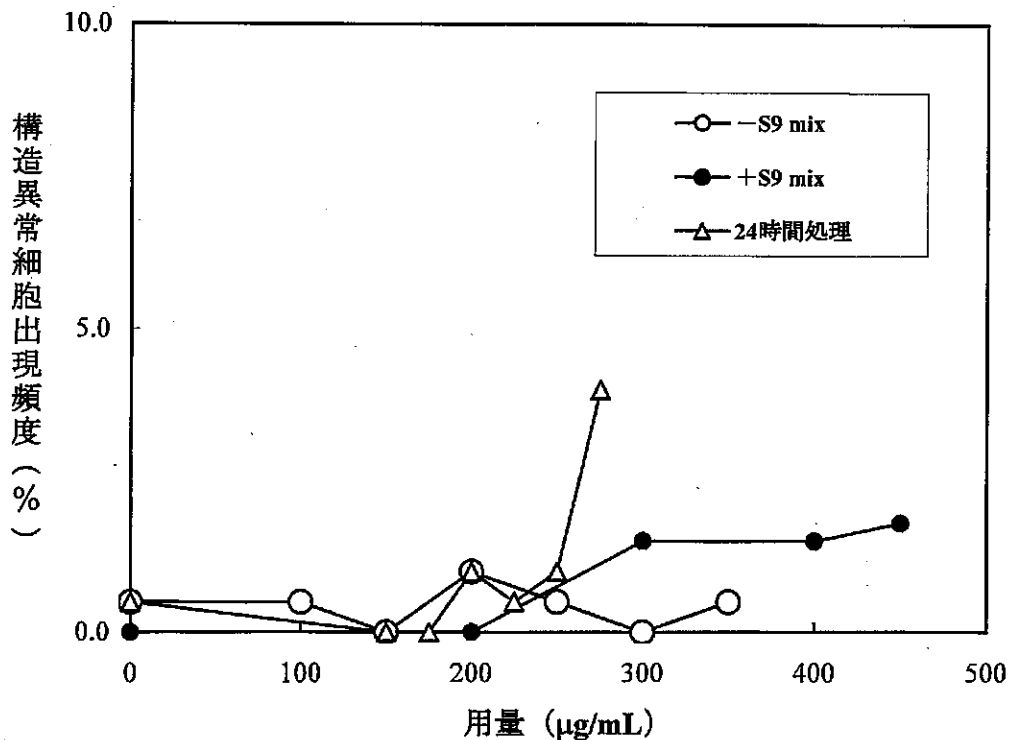
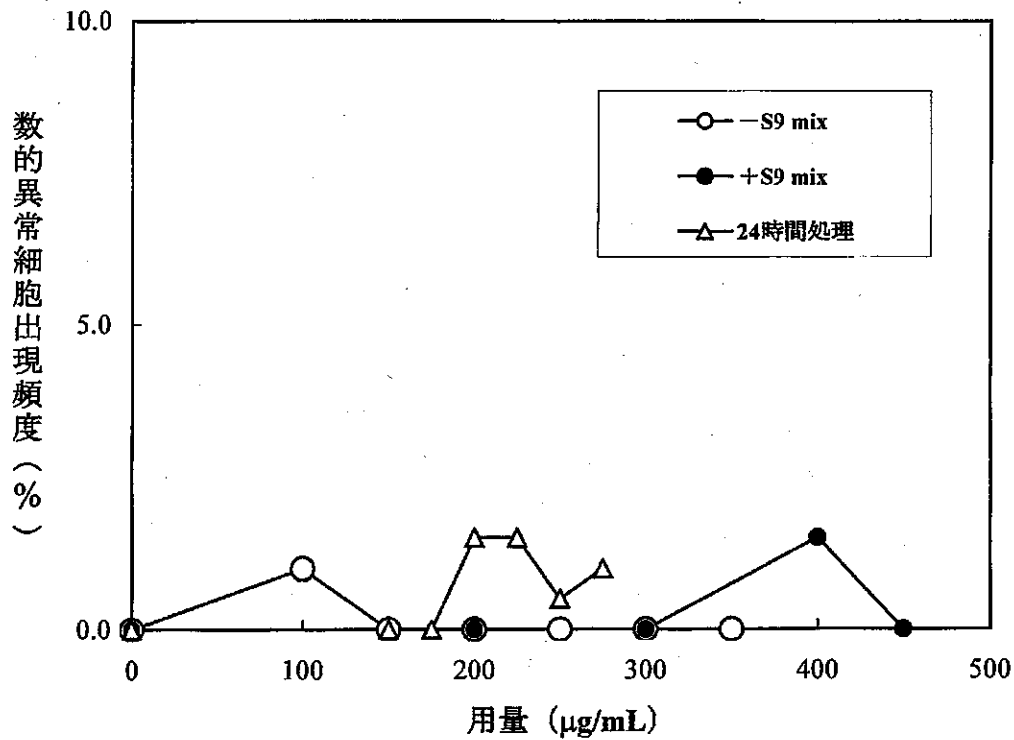


図5 クロシクロヘキサン処理における  
数的異常細胞出現頻度



### 3. 試験実施概要

#### 3.1 表題

クロロシクロヘキサンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

#### 3.2 試験番号

B041796

#### 3.3 試験目的

クロロ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, 環保企発第 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, 環保企発第 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  
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、クロロシクロヘキサンの *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

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

-S9 mix : 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

+S9 mix : 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$

24 時間処理 : 50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$

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

算出した  $\text{IC}_{50}$  に基づき、染色体異常試験は下記の用量を設定した。

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

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

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

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

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

表1 細胞増殖抑制試験の結果

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

DMSO : ジメチルスルホキシド

\*: IC50値は「0.4」として算出した.

表 2 分裂指数測定結果

処理	処理-回復 時間 (h)	S9 mix の有無	処理濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	相対分裂指数 (%)
陰性対照 (DMSO)	6-18	—	0	1000	71	7.1	100
クロロシクロ ヘキサン	6-18	—	100	1000	60	6.0	85
	6-18	—	150	1000	69	6.9	97
	6-18	—	200	1000	51	5.1	72
	6-18	—	250	1000	48	4.8	68
	6-18	—	300	1000	56	5.6	79
	6-18	—	350	1000	39	3.9	55
陰性対照 (DMSO)	6-18	+	0	1000	115	11.5	100
クロロシクロ ヘキサン	6-18	+	200	1000	95	9.5	83
	6-18	+	300	1000	76	7.6	66
	6-18	+	400	1000	53	5.3	46
	6-18	+	450	1000	29	2.9	25
	6-18	+	500	1000	5	0.5	4
陰性対照 (DMSO)	24-0	—	0	1000	46	4.6	100
クロロシクロ ヘキサン	24-0	—	150	1000	49	4.9	107
	24-0	—	175	1000	45	4.5	98
	24-0	—	200	1000	51	5.1	111
	24-0	—	225	1000	48	4.8	104
	24-0	—	250	1000	41	4.1	89
	24-0	—	275	1000	16	1.6	35

DMSO : ジメチルスルホキシド

表 3 染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質の名称	クロモソームヘキサン	被験物質の用量		染色体異常細胞数(出現割合%)		断片化	総異常細胞数(%)	ギャンプの出現数	細胞増殖率 (%)	染色体学的異常細胞数(出現割合%)			
		濃度 (µg/mL)	時間 (分)	染色体型切斷	染色体型交換					再液体	核内倍加	総異常細胞数(%)	
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	99	0	0	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	100	100	0	0	0	0	0	89	100	1	0	
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	90	200	2 (1.0)	2 (1.0)
6-18	-	150	100	0	0	0	0	0	90	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	83	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	200	100	0	1	0	0	0	83	100	0	0	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	74	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	250	100	0	0	0	0	0	56	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	57	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	300	100	0	0	0	0	0	64	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	56	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	350	100	0	0	0	0	0	26	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	3	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	34	3	0	0	53	0	15	200	0 (0.0)	0 (0.0)
			200	76 (36.0)	64 (32.0)	4 (2.0)	0 (0.0)	106 (53.0)	0	108	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	92	100	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	200	100	0	0	0	0	0	79	100	0	0	
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	82	100	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	300	100	1	0	0	0	2	81	200	0 (0.0)	0 (0.0)	
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	46	100	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	400	100	1	0	0	0	1	55	100	0	0	
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	50	200	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	450	100	0	0	0	0	0	40	100	1	1	
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	0	36	100	1	1
6-18	+	500	66	1	0	0	0	2	33	200	2 (1.0)	1 (0.5)	
			166	1 (0.6)	2 (1.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.8)	0	6	66	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	陽性対照 (BP20)	42	49	3	2	65	0	100	0	0	0	
			34	53	0	1	62	0	100	0	0	0	
			76 (38.0)	102 (51.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	128 (64.0)	0	200	0 (0.0)	0 (0.0)		
			Tox						Tox				
									3				
									4				

DMSO : ジメチルスルホキシド  
 MMC : マイトマイシンC, BP : ベンゾ [a] ピレン  
 Tox : 細胞毒性のため, プレートあたり50個以上の分裂中期細胞が得られなかった。



表 4 染色体異常誘発の結果 (連続処理法)

被験物質の名称 クロロシクロヘキサン

処理回数 時間(h)	被験物質の用量 ( $\mu$ g/mL)	染色体構造異常誘発率(出現頻度%)										細胞増殖率 (%)	染色体異常細胞数(出現頻度%)				
		染色体型切斷	染色体型交換	染色体型切斷	染色体型交換	染色体型切斷	染色体型交換	染色体型切斷	染色体型交換	染色体型切斷	染色体型交換		ギヤップ の出現数	倍率体	核内倍加	総異常細胞数(%)	
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	103	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97	100	0	0	0
24-0	150	200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	100	0	0	0
24-0	175	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	71	100	0	0	0
		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	71	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66	100	0	0	0
24-0	225	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	68	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
		100	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	65	100	1	1	2
24-0	250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	62	100	1	0	1
		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	64	200	2 (1.0)	1 (0.5)	3 (1.5)
24-0	275	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	53	100	2	0	2
		100	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	53	100	1	0	1
24-0	250	200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	53	200	3 (1.5)	0 (0.0)	3 (1.5)
		100	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	41	100	0	0	0
24-0	275	100	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	37	100	1	0	1
		200	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0	39	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
24-0	MMBC 0.05	100	0	1	0	1	0	0	0	0	2	0	18	100	1	0	1
		100	1	3	2	0	0	0	0	0	6	0	13	100	1	0	1
24-0	MMBC 0.05	200	1 (0.5)	4 (2.0)	2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (4.0)	0	15	200	2 (1.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	
		100	25	19	1	0	0	0	0	36	0	0	100	0	0	0	
24-0	MMBC 0.05	100	30	24	0	0	0	0	50	0	0	0	100	0	0	0	
		200	55 (27.5)	43 (21.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	86 (43.0)	0	0	0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

DMSO:ジメチルスルホキシド  
MMBC:マイトマイシンC

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

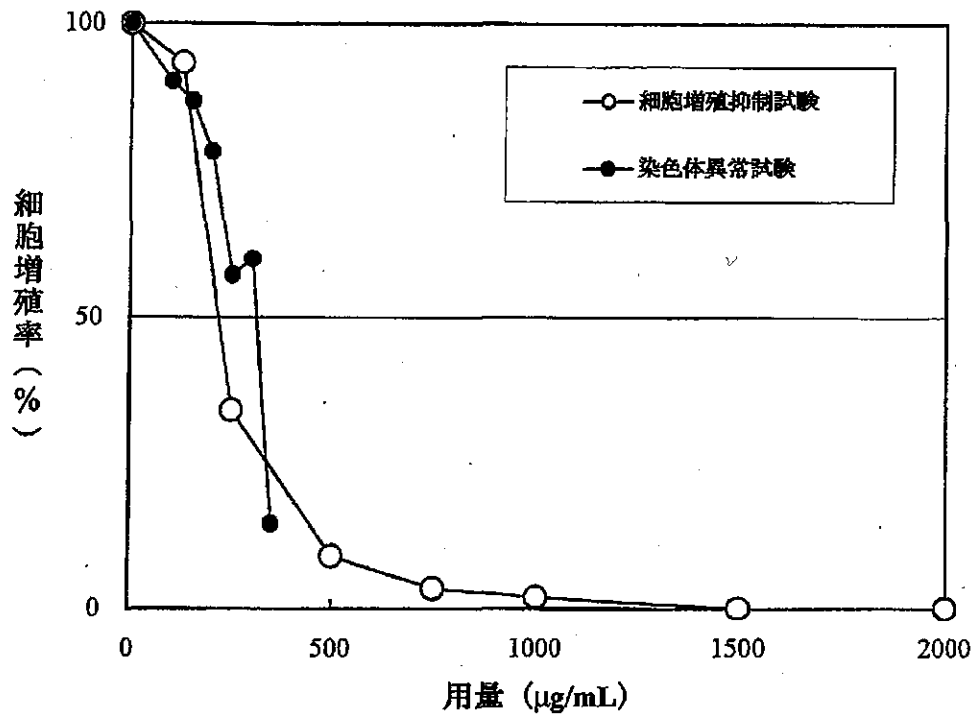


図2 クロシクロヘキサン処理における細胞毒性  
(短時間処理法・+S9 mix)

