

最 終 報 告 書

2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
(試験番号：00-138)

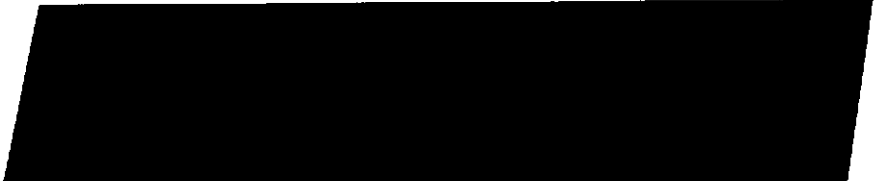
財団法人 畜産生物科学安全研究所

陳 述 書

試験表題：2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾ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： 00-138

本試験は、OECD の試験法ガイドライン“OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 473, *In vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test(1997)”および OECD の GLP “OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(1997)” に定める基準に準拠して実施した。



平成 13 年 3 月 29 日

試験表題：2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾ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：00-138

試験委託者：

名 称 製品評価技術センター

所 在 地 東京都渋谷区西原二丁目 49 番 10 号

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所

所 在 地 神奈川県相模原市橋本台三丁目 7 番 11 号

試験期間：

試験開始日 平成 12 年 11 月 8 日

実験期間 開始日：平成 12 年 11 月 11 日

終了日：平成 13 年 2 月 16 日

試験終了日 平成 13 年 3 月 29 日

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因：

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は、最終報告書作成後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の保管については、試験委託者と協議して決める。

1. 試験計画書
2. 被験物質に関する記録
3. 試験結果に関する記録
4. 信頼性保証に関する記録
5. 最終報告書

試験責任者、担当者および業務分担



信頼性保証証明書

試験表題 : 2,3,5,6-テトラクロロベンゾ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 : 00-138

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
1. 試験実施状況査察		
細胞培養開始 平成12年11月08日	平成12年11月08日	平成12年11月08日
染色体異常試験：被験物質の調製および添加・細胞播き・細胞の継代 平成12年11月27日	平成12年11月27日	平成12年11月27日
染色体異常試験：細胞増殖率の測定(標本作製)・染色体標本の作製・培養細胞の観察 平成12年11月28日	平成12年11月28日	平成12年11月28日
染色体異常試験：S9mixの使用・細胞増殖率の測定(測定) 平成12年11月30日	平成12年11月30日	平成12年11月30日
染色体異常試験：染色体標本の染色 平成12年12月01日	平成12年12月01日	平成12年12月01日
染色体異常試験：染色体標本の観察 平成12年12月19日	平成12年12月19日	平成12年12月19日
2. 生データ査察		
平成13年03月08日	平成13年03月08日	平成13年03月08日
3. 報告書(草案)審査		
平成13年03月08日	平成13年03月08日	平成13年03月08日
4. 報告書審査		
平成13年03月29日	平成13年03月29日	平成13年03月29日

上記の審査・査察により、本試験が「OECDのGLP」に従って実施され、本報告書には、当該試験で使用した方法・手順が忠実に記載され、試験成績には、当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されていることを確認した。

平成 13 年 3 月 29 日
財団法人 畜産生物科学安全研究所

目 次

要約	1 頁
試験目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 対照物質	3
3. 溶媒	3
4. 試験細胞株	3
5. 培養液	4
6. 培養条件	4
7. S9 mix	4
8. 細胞増殖抑制試験	5
1) 被験物質の供試液の調製	5
2) 細胞の処理	5
3) 細胞増殖率の測定	6
9. 染色体異常試験	7
1) 被験物質および陽性対照物質の用量	7
2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製	7
3) 細胞の処理	7
4) 試験群の構成および使用シャーレ数	8
5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定	9
6) 染色体の観察	9
7) 染色体異常の分類および集計	10
8) 試験結果の判定	10
結果	11
1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）	11
2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）	11
3. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）	11
4. 染色体異常試験（連続処理法：48 時間処理）	12

5. 確認試験	12
1) 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）	12
2) 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）	13
6. D ₂₀ 値	13
結論	13
参考文献	14

表：

表 1-1	2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果 （短時間処理法：S9 mix 非存在下）	15
表 1-2	2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果 （短時間処理法：S9 mix 存在下）	16
表 2-1	2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果 （連続処理法：24 時間処理）	17
表 2-2	2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果 （連続処理法：48 時間処理）	18
表 3-1	2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果 （確認試験；短時間処理法：S9 mix 非存在下）	19
表 3-2	2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果 （確認試験；短時間処理法：S9 mix 存在下）	20

図：

図 1	構造異常を有する細胞の出現頻度	21
図 2	数的異常を有する細胞の出現頻度	23
図 3	構造異常を有する細胞の出現頻度	24
図 4	数的異常を有する細胞の出現頻度	25

写真

写真 1	26
写真 2	26

添付資料	27
------------	----

要 約

2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いて *In vitro* における染色体異常試験を実施した。

用量は、細胞増殖抑制試験の結果に基づき、50%を上回る細胞増殖抑制が認められる用量を最高用量とし、以下公比 2 で設定した。すなわち、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では 4.688, 9.375, 18.75, 37.5 および 75 $\mu\text{g/mL}$, S9 mix 存在下では 9.375, 18.75, 37.5, 75 および 150 $\mu\text{g/mL}$, また、連続処理法の場合は 4.688, 9.375, 18.75, 37.5 および 75 $\mu\text{g/mL}$ とした。

試験の結果、短時間処理法 S9 mix 非存在下の 75 $\mu\text{g/mL}$ および S9 mix 存在下の 150 $\mu\text{g/mL}$ のそれぞれ単一用量で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。連続処理法 24 時間および 48 時間処理においては染色体異常細胞の増加は認められなかった。そこで、短時間処理法 S9 mix 非存在下では 50, 75 および 100 $\mu\text{g/mL}$, また、S9 mix 存在下においては 100, 125 および 150 $\mu\text{g/mL}$ の用量を設定して確認試験を行った。その結果、S9 mix 非存在下では 75 $\mu\text{g/mL}$ で染色体構造異常細胞の増加傾向が認められたが、陰性対照値との間に有意差は認められなかった。S9 mix 存在下では 150 $\mu\text{g/mL}$ でのみ染色体構造異常細胞の有意な増加が認められ、用量依存性に関しては明らかではなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、短時間処理法 S9 mix 存在下において再現性のある染色体構造異常細胞の増加が認められたことから、2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。計算された D_{20} 値は、0.089 mg/mL であった。

試驗目的

この試験は、2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法 1, 2)

1. 被驗物質

名称(略号) : 2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノン (TCBQ)

別名 クロラニル，テトラクロロ-1，4-ベンゾキノン，

2, 3, 5, 6-テトラ-2, 5-シクロヘキサンジエン-1, 4-ジオン

CAS 番号 : 118-75-2

ロット番号 : XXXXXXXXXX

純 度 : 99.5% (分析日:平成 11 年 11 月 10 日)

入手先(製造元):

造の試薬を、製品評価技術センターを通じて入手

入 手 日 : 平成12年9月14日

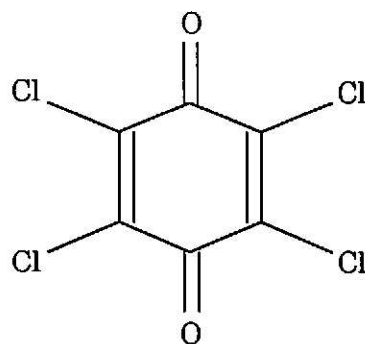
入 手 量 : 20 g

物 性 等 ：

化学名 2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノン

(2, 3, 5, 6-Tetrachloro-*p*-benzoquinone)

構造式



分子式 $C_6Cl_4O_2$

分子量 245.87

性状(常温) 黄金色の結晶性粉末

融点 290℃

溶解性 油溶性〔水に殆ど溶けず (250 mg/L, 25℃), エチルアルコールに微溶, エチルエーテルに可溶〕

安定性 : 安定〔実験終了後, 残余被験物質を(財)畜産生物科学安全研究所において分析 (平成 13 年 3 月 5 日) した結果, 純度は 99.5% で, 実験期間中被験物質は安定であったことを確認した。〕

保管条件 : 冷暗所 (4℃), 密栓

2. 対照物質

陰性対照物質は、被験物質の溶媒として使用したカボキシメチルセルロースナトリウム (関東化学株式会社, ロット番号 007G1484) の 1w/v% 水溶液 (1w/v% CMC・Na 水溶液) を用いた。陽性対照物質は、連続処理法および短時間処理法 S9 mix 非存在下では 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG, Aldrich Chemical Company, ロット番号 00613PN, 純度 97%) を、短時間処理法 S9 mix 存在下では 3,4-Benzo[a]pyrene (B[a]P, Sigma Chemical Company, ロット番号 57F-3434, 純度 98%) を用いた。

3. 溶媒

被験物質は水に難溶であり、予備的検討の結果、ジメチルスルホキシド (DMSO) およびアセトンに不溶であったことから、溶媒には 1w/v% CMC・Na 水溶液を用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[a]P の溶媒については、DMSO (和光純薬工業株式会社, ロット番号 ACH7185, 純度 99.9%) を用いた。

4. 試験細胞株

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 (元: 国立衛生試験所 変異原性部) から昭和 60 年 1 月 13 日に分与を受けたチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) を使用した。供試細胞は、細胞懸濁液に 10% の割合で DMSO を添加し、液体窒素条件下で保存しておいたものを培養液に戻し、解凍後の継代数が 8 回までのものを使用した。

5. 培養液

Eagle-MEM 粉末培地 (Gibco Laboratories, ロット番号 1021800, 1084659) を常法に従い調製し, これに非動化 (56℃, 30 分間加熱処理) 仔牛血清 (Gibco Laboratories, ロット番号 1064545, 1068210) を 10vol% の割合で添加したものをを用いた。

6. 培養条件

供試細胞は, CO₂ インキュベーター (Napco 社) を用い, CO₂ 濃度 5%, 空気 95%, 温度 37℃, 加湿条件下で培養した。

7. S9 mix

S9 mix は, ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素分画 (S9) にコファクターを加えて凍結されたものをキッコーマン株式会社から購入 (ロット番号: CAM-433, 2000 年 9 月 29 日製造, 2000 年 11 月 10 日購入) し, -80℃ 以下で保存したものを, 使用時に冷水中で解凍して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 mL あたりの組成は, 次のとおりである。

〔S9 製造法〕

A. 使用動物

- a) 種・系統: Sprague-Dawley 系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- b) 性・週齢: 雄・7 週齢
- c) 体 重: 205~245 g

B. 誘導法

- a) 誘導物質: phenobarbital (PB), 5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路: 腹腔内投与
- c) 投与法 (投与開始日起算)
 - 1 日目 - PB 30 mg/kg, 2, 3, 4 日目 - PB 60 mg/kg
 - 3 日目 - BF 80 mg/kg

C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離 (9000×g) し, その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

S9	0.3	μmol
MgCl ₂	5	$\mu\text{mol}/0.1\text{ mL}$
KCl	33	$\mu\text{mol}/0.1\text{ mL}$
G-6-P	5	$\mu\text{mol}/0.1\text{ mL}$
NADP	4	$\mu\text{mol}/0.1\text{ mL}$
HEPES 緩衝液	4	$\mu\text{mol}/0.2\text{ mL}$
蒸留水	0.1	mL

8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な用量を検討するため、短時間処理法および連続処理法ともに 37.5, 75, 150, 300, 600, 1200 および 2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行った。試験には各用量について 2 枚のシャーレを使用した。

1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を 1w/v% CMC・Na 水溶液に懸濁して最高用量の供試液（原液）を調製し、次いで、原液の一部を溶媒で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。被験物質の添加量は、各シャーレの培養液量の 10 vol% とした。なお、原液の調製時には約 2 分間の超音波破碎を行った。

2) 細胞の処理

短時間処理法の場合、直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に 4×10^3 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え、培養開始 3 日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、1w/v% CMC・Na 水溶液（陰性対照）または被験物質の供試液各 0.3 mL をシャーレに加えた。また、S9 mix 存在下の場合は各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除き、S9 mix 0.5 mL を加えた後、1w/v% CMC・Na 水溶液または被験物質の供試液各 0.3 mL をシャーレに加えた。培養 6 時間後に培養液を取り除き、新しい培養液 5 mL を加えて 18 時間培養した。一方、連続処理法の場合は、短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し、培養開始 3 日後に 1w/v% CMC・Na 水溶液または被験物質の供試液各 0.5 mL を加えて 24 時間および 48 時間培養した。培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10vol% ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後、

水洗し、0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後、室温で一晩自然乾燥した。なお、短時間処理法および連続処理法ともに所定の培養時間終了時、150 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量ではシャーレ中に被験物質の残存が認められた。

3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は、染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計（モノセレーターⅡ，MI-60，オリンパス光学工業株式会社）を用いて測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果は下表に示したとおり、短時間処理法の場合は、S9 mix 非存在下では 75 $\mu\text{g/mL}$ で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制用量は 37.5 ~ 75 $\mu\text{g/mL}$ 間にあるものと判断された。S9 mix 存在下では 50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。連続処理法の場合は 37.5 および 75 $\mu\text{g/mL}$ で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、24 時間処理ではこの 2 用量あたりに 50%細胞増殖抑制用量があるものと判断され、48 時間処理では 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 以下に 50%細胞増殖抑制用量があるものと判断された。なお、短時間処理法および連続処理法ともに 150 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では、シャーレの底に被験物質が付着し、正確な細胞増殖率の測定値は得られなかった。また、細胞を固定・染色する直前の培養顕微鏡による観察では、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在および存在下ともに 150 $\mu\text{g/mL}$ では陰性対照群の細胞増殖の程度に比べ、その 30%前後の増殖を示すにすぎず、300 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では生細胞はほとんど認められなかった。連続処理法の場合は、150 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で生細胞はほとんど認められなかった。

〔短時間処理法〕

用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
37.5	47	58	[52.5]	95	83	[89.0]
75	38	42	[40.0]	73	67	[70.0]
150*	47	52	[49.5]	78	63	[70.5]
300*	75	74	[74.5]	109	101	[105.0]
600*	116	109	[112.5]	132	124	[128.0]
1200*	139	129	[134.0]	—	141	[—]
2400*	—	—	[—]	—	—	[—]

[] : 平均値 — : 測定不可

* : シャーレの底に被験物質が付着し、正確な測定値は得られなかった。

〔連続処理法〕

用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
37.5	47	47	[47.0]	37	34	[35.5]
75	51	48	[49.5]	36	36	[36.0]
150*	57	54	[55.5]	63	45	[54.0]
300*	73	64	[68.5]	57	41	[49.0]
600*	91	102	[96.5]	73	53	[63.0]
1200*	128	110	[119.0]	108	80	[94.0]
2400*	—	—	[—]	136	109	[122.5]

[] : 平均値 — : 測定不可

* : シャーレの底に被験物質が付着し、正確な測定値は得られなかった。

9. 染色体異常試験

1) 被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から、被験物質の用量は、50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ、3 用量以上のデータが得られることを考慮して設定した。すなわち、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では最高用量を $75\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2 で 37.5, 18.75, 9.375 および $4.688\mu\text{g/mL}$ の 5 用量、S9 mix 存在下では $150\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公比 2 で 75, 37.5, 18.75 および $9.375\mu\text{g/mL}$ の 5 用量とした。連続処理法の場合は 24 時間および 48 時間処理ともに最高用量を $75\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2 で 37.5, 18.75, 9.375 および $4.688\mu\text{g/mL}$ の各 5 用量とした。陽性対照物質の MNNG は $2.5\mu\text{g/mL}$ 、B[a]P は $10\mu\text{g/mL}$ の用量を用いた。

2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を 1w/v% CMC・Na 水溶液に懸濁して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで、原液の一部を溶媒で順次希釈し、所定用量の供試液を調製した。なお、原液の調製時には約 2 分間の超音波破碎を行った。陽性対照物質の MNNG は 0.5 mg/mL 、B[a]P は 2.0 mg/mL の供試液を調製した。

3) 細胞の処理

4×10^3 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に加え、3 日間培養後、下記の方法で処理し

た。培養には1用量当たり4枚のシャーレを用い、そのうち2枚は染色体標本作製用に、残りの2枚は細胞増殖率測定用に使用した。但し、陽性対照群については細胞増殖率の測定は行わず、用いるシャーレは染色体標本作製用の2枚とした。

短時間処理法のS9 mix非存在下の場合は、各シャーレとも3 mLを残して培養液を取り除き、1w/v%CMC・Na水溶液および被験物質供試液は0.3 mL、MNNGの供試液は0.015 mLを各シャーレに添加して培養した。また、S9 mix存在下の場合は、各シャーレとも2.5 mLを残して培養液を取り除いた後、S9 mix 0.5 mLを加え、続いて、1w/v%CMC・Na水溶液および被験物質供試液は0.3 mL、B[a]Pの供試液は0.015 mLを各シャーレに添加して培養した。S9 mix非存在および存在下のいずれの場合も、培養6時間後に培養液を取り除き、新しい培養液5 mLを加え、さらに18時間培養した。

連続処理法の場合は、1w/v%CMC・Na水溶液および被験物質供試液は0.5 mL、MNNGの供試液は0.025 mLを各シャーレに加え、24時間および48時間培養した。

なお、短時間処理法S9 mix存在下の150 μ g/mLでは培養終了時に被験物質の残存が認められた。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

〔短時間処理法〕

用量(μ g/mL)	使用シャーレ数	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0 (陰性対照) ^a	4	4
4.688	4	--
9.375	4	4
18.75	4	4
37.5	4	4
75	4	4
150	--	4
2.5 (陽性対照) ^b	2	--
10 (陽性対照) ^c	--	2

a : 1w/v%CMC・Na水溶液, b : MNNG, c : B[a]P, 使用シャーレ数 : 52

〔連続処理法〕

用量($\mu\text{g/mL}$)	使用シャーレ数	
	24 時間処理	48 時間処理
0 (陰性対照) ^a	4	4
4.688	4	4
9.375	4	4
18.75	4	4
37.5	4	4
75	4	4
2.5 (陽性対照) ^b	2	2

a : 1w/v%CMC・Na 水溶液, b : MNNG, 使用シャーレ数 : 52

5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

標本作製の 2 時間前に、培養中の各シャーレにコルセミド (Gibco Laboratories, ロット番号 1028396, 1059548) を最終濃度として $0.2\mu\text{g/mL}$ となるように添加した。培養終了後、培養液を取り除き、0.2w/v%トリブシン水溶液 2 mL で処理して細胞をシャーレから剥離し、新鮮培養液 5 mL を入れた遠沈管に移し、1000 rpm, 5 分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の 75 mM 塩化カリウム水溶液 4 mL を加えて懸濁し、 37°C で 15 分間低張処理した。低張処理後、用時調製した冷却メタノール・酢酸 (3 : 1) 混合液 (v/v) 1 mL を添加して固定した。1000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液 4 mL で懸濁・固定した。この操作を 3 回繰り返した後、少量の固定液で適切な密度に細胞を懸濁し、スライドガラスの 2 ヶ所に 1 滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、Sørensen 緩衝液 (pH 6.8, 株式会社ヤトロン, ロット番号 1478) を用いて希釈した 1.4 vol%ギムザ液で約 15 分間染色した。水洗後、室温で乾燥して染色体標本とした。標本は、1 シャーレ当たり 3 枚作製した。

細胞増殖率の測定は、培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10vol%ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後水洗し、0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色し、水洗後乾燥した。単層培養細胞密度計 (モノセレーター II, MI-60, オリンパス光学工業株式会社) を用いて陰性 (溶媒) 対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

6) 染色体の観察

染色体の観察は 60 倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率 600 倍で検鏡

した。観察は標本をすべてコード化し、盲検法で行った。各用量とも、染色体が明瞭に識別でき、染色体の数が 25 ± 2 本の分裂中期像について、1 シャーレ当たり 100 個、すなわち 1 用量当たり 2 枚のシャーレの合計 200 個について観察した。

7) 染色体異常の分類および集計³⁾

染色体異常の分類は、構造異常については、染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換（二動原体、環状染色体など）およびその他（断片化など）とした。数的異常については、倍数性細胞（倍数体）のみを記録した。

ギャップ（染色分体型および染色体型）については、異常として記録したが、構造異常には含めなかった。ギャップは、染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞とし、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は観察した細胞 200 個中に認められた異常細胞数を表示した。

8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料 χ^2 検定を行って、有意差（有意水準 5%以下）が認められた場合は、Fisher の直接確立法を用いて陰性対照群と各用量群との間の有意差検定（有意水準は多重性を考慮して、5%または 1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻度が陰性対照群に比べ 2 用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められた場合、染色体異常誘発性は陽性と判定した。なお、単一用量でのみ有意な増加が認められた場合は、それに近い用量を用いて確認試験を行い、その結果、再現性のある結果が認められた場合には、染色体異常誘発性は陽性と判定した。陽性結果が得られた場合には、 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推定用量 (mg/mL)〕を算出した。

結 果

1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表 1-1 に示した。染色体の構造異常を有する細胞は、陰性対照群では認められなかった。被験物質群では 4.688, 9.375, 18.75, 37.5 および 75 μ g/mL でそれぞれ 1.0, 0.5, 1.0, 3.0 および 6.0% の出現頻度で認められ、75 μ g/mL での増加は陰性対照群と比べ統計学的に有意なものであった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 92.5% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数体は、陰性対照および陽性対照群並びに被験物質群のいずれの群においても認められなかった。

2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表 1-2 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0% と低値であった。被験物質群では 9.375, 18.75, 37.5, 75 および 150 μ g/mL でそれぞれ 0, 0.5, 2.0, 2.5 および 45.0% の出現頻度で認められ、150 μ g/mL での増加は陰性対照群と比べて有意なものであった。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 57.0% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群では 0.5% の低い出現頻度で認められた。被験物質群においても 9.375 および 150 μ g/mL でのみ 1.0% の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では、倍数体は認められなかった。

なお、培養終了時の培養顕微鏡による細胞観察において、150 μ g/mL では陰性対照群と比べて 30~40% 程度の増殖にすぎなかった。

3. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

結果は表 2-1 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0% と低値であった。被験物質群では 0~5.0% の範囲の出現頻度で認められたが、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 92.0% であり、顕著な染色体異常誘発が

確認された。

倍数体については、陰性対照では認められなかった。被験物質群では 9.375 および 18.75 $\mu\text{g/mL}$ でのみ、0.5%の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では 0.5%の低い出現頻度であった。

4. 染色体異常試験（連続処理法：48 時間処理）

結果は表 2-2 に示した。染色体の構造異常を有する細胞は、陰性対照群では認められなかった。被験物質群では 0.5 ないし 1.0%の出現頻度で認められたが、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 84.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群では認められなかった。被験物質群では 9.375 および 75 $\mu\text{g/mL}$ でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められ、また、陽性対照群においても 0.5%の低い出現頻度であった。

5. 確認試験

短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下において、単一用量でのみ染色体構造異常細胞の有意な増加が認められたため、これらに近い用量を設定し、用量依存性および結果の再現性が得られるか否かを目的とした確認試験を行った。

用量は、S9 mix 非存在下では 50, 75 および 100 $\mu\text{g/mL}$ 、S9 mix 存在下では 100, 125 および 150 $\mu\text{g/mL}$ とした。

1) 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表 3-1 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.5%の低値であった。被験物質群では 50, 75 および 100 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 3.5, 5.5 および 2.0%の出現頻度であり、75 $\mu\text{g/mL}$ で増加傾向が認められたが、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 83.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および被験物質群では認められず、陽性対照群でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。

2) 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表 3-2 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 0.5%と低値であった。被験物質群では 100, 125 および 150 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 0.5, 2.0 および 34.5%であり、150 $\mu\text{g/mL}$ での増加は陰性対照群と比べて有意なものであった。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 45.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では 125 $\mu\text{g/mL}$ でのみ、1.0%の低い出現頻度で認められた。

なお、150 $\mu\text{g/mL}$ においては培養終了時の培養顕微鏡による細胞観察で、陰性対照群の 30%程度の増殖を示すにすぎなかった。

6. D_{20} 値⁴⁾

短時間処理法 S9 mix 存在下において染色体異常細胞の増加が認められたため、 D_{20} 値を算出した。

その結果は下表に示したとおりであり、 D_{20} 値は、S 値（対象となった D_{20} 値のうち、相関係数 r が大きく、陰性対照群を含む群数 n が多いものほどより妥当性が高いとする考えに基づく指標）が最小となった 0.089 mg/mL とした。

回帰曲線		D_{20} 値 ($\mu\text{g/mL}$)	S 値 $\left[S = \frac{D_{20}}{r} \times \frac{1}{n^2} \right]$
短時間処理法			
S9 mix 存在下	$y = 0.286378x - 5.37142$ ($r = 0.901744$)	<u>88.5943</u>	<u>2.7291</u>
	$y = 21.735x - 22.44$ ($r = 0.683628$)	89.6636	3.64329
S9 mix 存在下 (確認試験)	$y = 0.151084x - 4.78914$ ($r = 0.592525$)	164.075	17.3068
	$y = 113.418x - 222.706$ ($r = 0.777231$)	138.012	11.098

結 論

2, 3, 5, 6 - テトラクロロベンゾキノンについて染色体異常誘発性の有無を調べる

ため、CHL/IU 細胞を用いた *In vitro* における染色体異常試験を実施した。その結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下の最高用量のみで染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。確認試験の結果、S9 mix 存在下においては最高用量でのみ染色体構造異常細胞の有意な増加が認められ、再現性のある結果が得られた。

なお、陰性対照群では、染色体異常細胞の出現頻度は背景データ（添付資料）の範囲内であり、陽性対照群においても、それぞれ背景データ（添付資料）の範囲内の染色体異常細胞の出現頻度が認められた。また、細胞増殖抑制試験および染色体異常試験を通して雑菌の混入は認められなかった。以上により、本試験は有効と判定した。

したがって、本実験条件下では、2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノンの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。本試験結果は、CHL/IU 細胞において染色体異常を有する細胞の出現頻度が 5%以上 10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とする生物学的判断基準⁵⁾からみても陽性と判断されるものであった。また、本被験物質の D₂₀ 値は、0.089 mg/mL であった。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.
- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). "Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, 66, 277-290.
- 3) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス", 朝倉書店, 東京, 1988, pp. 16-37.
- 4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修, "化審法毒性試験法の解説 改定版", 化学工業日報社, 東京, 1992, pp. 51-52.
- 5) 石館 基 監修, "改定増補 染色体異常試験データ集", エル・アイ・シー, 東京, 1987, p. 19.

表 1-1 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノン¹の染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0)	(0)	(0)
4 .688	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	1	0	0	1	0	2	0	100.0	100	0	0	0
	200	1	0	0	1	0	2	0		200	0	0	0
		(0.5)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(1.0)	(0)			(0)	(0)	(0)
9 .375	100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	94.5	100	0	0	0
	200	1	0	0	0	0	1	0		200	0	0	0
		(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
18 .75	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	1	2	0	0	0	2	0	92.0	100	0	0	0
	200	1	2	0	0	0	2	0		200	0	0	0
		(0.5)	(1.0)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)			(0)	(0)	(0)
37 .5	100	1	2	0	1	0	3	0		100	0	0	0
	100	2	2	0	0	0	3	2	70.0	100	0	0	0
	200	3	4	0	1	0	6	2		200	0	0	0
		(1.5)	(2.0)	(0)	(0.5)	(0)	(3.0)	(1.0)			(0)	(0)	(0)
75	100	1	4	0	0	0	4	0		100	0	0	0
	100	6	6	0	0	0	8	1	43.5	100	0	0	0
	200	7	10	0	0	0	12	1		200	0	0	0
		(3.5)	(5.0)	(0)	(0)	(0)	(6.0)**	(0.5)			(0)	(0)	(0)
陽性対照	100	24	91	0	0	0	93	2		100	0	0	0
	100	41	91	0	0	0	92	1	—	100	0	0	0
	200	65	182	0	0	0	185	3		200	0	0	0
		(32.5)	(91.0)	(0)	(0)	(0)	(92.5)**	(1.5)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**:p<0.01.

表 1-2 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギヤップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	1	0	0	0	1	0		100	1	0	1
	100	0	1	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0
	200	1	2	0	0	0	2	0		200	1	0	1
		(0.5)	(1.0)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
9.375	100	0	0	0	0	0	0	1		100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	98.0	100	1	0	1
	200	0	0	0	0	0	0	1		200	2	0	2
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0.5)			(1.0)	(0)	(1.0)
18.75	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0	91.0	100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
37.5	100	0	1	0	1	0	2	0		100	0	0	0
	100	1	2	0	0	0	2	0	90.5	100	0	0	0
	200	1	3	0	1	0	4	0		200	0	0	0
		(0.5)	(1.5)	(0)	(0.5)	(0)	(2.0)	(0)			(0)	(0)	(0)
75	100	1	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	2	3	0	1	0	4	0	79.0	100	0	0	0
	200	3	4	0	1	0	5	0		200	0	0	0
		(1.5)	(2.0)	(0)	(0.5)	(0)	(2.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
150 #	100	32	35	2	0	0	45	0		100	2	0	2
	100	24	38	0	0	0	45	1	87.5 †	100	0	0	0
	200	56	73	2	0	0	90	1		200	2	0	2
		(28.0)	(36.5)	(1.0)	(0)	(0)	(45.0)**	(0.5)			(1.0)	(0)	(1.0)
陽性対照	100	15	60	0	1	0	61	1		100	0	0	0
	100	17	52	2	1	0	53	0	—	100	0	0	0
10	200	32	112	2	2	0	114	1		200	0	0	0
		(16.0)	(56.0)	(1.0)	(1.0)	(0)	(57.0)**	(0.5)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:1%カルボキシメチルセルローズナトリウム水溶液。

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

#:培養終了時に被験物質の残存が認められた。

†:シャーレの底に被験物質が付着し、正確な測定値は得られなかった。

**:p<0.01.

表 2-1 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							キヤップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	1	0	1	0	100.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	2	0	2	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)	(1.0)	(0)			(0)	(0)	(0)
4 .688	100	0	1	0	1	0	2	0		100	0	0	0
	100	1	1	0	0	0	1	0	93.5	100	0	0	0
	200	1	2	0	1	0	3	0		200	0	0	0
		(0.5)	(1.0)	(0)	(0.5)	(0)	(1.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
9 .375	100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	87.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	1	0	1
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
18 .75	100	1	1	0	1	0	3	0		100	1	0	1
	100	0	1	0	0	0	1	0	79.5	100	0	0	0
	200	1	2	0	1	0	4	0		200	1	0	1
		(0.5)	(1.0)	(0)	(0.5)	(0)	(2.0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
37 .5	100	4	4	0	0	0	6	0		100	0	0	0
	100	2	4	0	0	0	4	0	61.5	100	0	0	0
	200	6	8	0	0	0	10	0		200	0	0	0
		(3)	(4.0)	(0)	(0)	(0)	(5.0)	(0)			(0)	(0)	(0)
75	100	3	2	0	0	0	3	0		100	0	0	0
	100	2	4	0	0	0	4	0	47.0	100	0	0	0
	200	5	6	0	0	0	7	0		200	0	0	0
		(2.5)	(3.0)	(0)	(0)	(0)	(3.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
陽性対照	100	24	91	0	1	0	92	2		100	1	0	1
	100	18	91	0	0	0	92	0	—	100	0	0	0
	200	42	182	0	1	0	184	2		200	1	0	1
		(21.0)	(91.0)	(0)	(0.5)	(0)	(92.0)	(1.0)			(0.5)	(0)	(0.5)

陰性対照:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**:p<0.01.

表 2-2 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノン の染色体異常試験結果(連続処理法:48時間処理)

被験物質 の用量 (μg/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色体分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
0	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0)	(0)	(0)
4 .688	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	1	0	1	0	87.5	100	0	0	0
	200	0	1	0	1	0	2	0		200	0	0	0
		(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)	(1.0)	(0)			(0)	(0)	(0)
9 .375	100	0	1	0	0	0	1	0		100	1	0	1
	100	0	1	0	0	0	1	0	74.5	100	0	0	0
	200	0	2	0	0	0	2	0		200	1	0	1
		(0)	(1.0)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
18 .75	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	76.5	100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
37 .5	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	1	0	1	0	55.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
75	100	0	0	0	0	0	0	1		100	1	0	1
	100	1	1	1	1	0	2	0	31.0	100	0	0	0
	200	1	1	1	1	0	2	1		200	1	0	1
		(0.5)	(0.5)	(0.5)	(0.5)	(0)	(1.0)	(0.5)			(0.5)	(0)	(0.5)
陽性対照	100	31	80	4	2	0	85	1		100	1	0	1
	100	32	78	2	2	0	84	2	—	100	0	0	0
2 .5	200	63	158	6	4	0	169	3		200	1	0	1
		(31.5)	(79.0)	(3.0)	(2.0)	(0)	(84.5)	(1.5)			(0.5)	(0)	(0.5)

陰性対照:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**:p<0.01.

表 3-1 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果(確認試験;短時間処理法:S9mix非存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						キヤップの細胞 出現数 (%)	増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数			観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	1	0	0	1	0	2	0	100.0	100	0	0	0
	200	1	1	0	1	0	3	0		200	0	0	0
		(0.5)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)	(1.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	
50	100	2	2	0	1	0	5	0		100	0	0	0
	100	0	1	0	1	0	2	0	66.5	100	0	0	0
	200	2	3	0	2	0	7	0		200	0	0	0
		(1.0)	(1.5)	(0)	(1.0)	(0)	(3.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	
75	100	5	0	0	1	0	5	0		100	0	0	0
	100	2	4	0	1	0	6	0	46.0	100	0	0	0
	200	7	4	0	2	0	11	0		200	0	0	0
		(3.5)	(2.0)	(0)	(1.0)	(0)	(5.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	
100	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	2	0	1	0	3	0	48.5	100	0	0	0
	200	0	3	0	1	0	4	0		200	0	0	0
		(0)	(1.5)	(0)	(0.5)	(0)	(2.0)	(0)		(0)	(0)	(0)	
陽性対照	100	30	78	0	0	0	83	0		100	1	0	1
	100	24	78	0	0	0	84	0	—	100	0	0	0
	2.5	200	54	156	0	0	167	0		200	1	0	1
		(27.0)	(78.0)	(0)	(0)	(0)	(83.5)	** (0)		(0.5)	(0)	(0.5)	

陰性対照:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p<0.01$.

表 3-2 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノン¹⁾の染色体異常試験結果(確認試験;短時間処理法:S9mix存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色体分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
100	100	1	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	79.5	100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0
		(0.5)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
125	100	1	2	0	0	0	3	0		100	2	0	2
	100	1	1	0	0	0	1	0	79.5	100	0	0	0
	200	2	3	0	0	0	4	0		200	2	0	2
		(1.0)	(1.5)	(0)	(0)	(0)	(2.0)	(0)			(1.0)	(0)	(1.0)
150 [#]	100	21	33	1	0	0	41	0		100	0	0	0
	100	13	23	0	0	0	28	0	53.5 [†]	100	0	0	0
	200	34	56	1	0	0	69	0		200	0	0	0
		(17.0)	(28.0)	(0.5)	(0)	(0)	(34.5) ^{**}	(0)			(0)	(0)	(0)
陽性対照	100	7	50	0	0	0	52	1		100	0	0	0
	100	7	34	2	2	0	39	0	—	100	0	0	0
	200	14	84	2	2	0	91	1		200	0	0	0
		(7.0)	(42.0)	(1.0)	(1.0)	(0)	(45.5) ^{**}	(0.5)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液。

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene。

[#]:培養終了時に被験物質の残存が認められた。

[†]:シャーレの底に被験物質が付着し、正確な測定値は得られなかった。

^{**}: $p<0.01$ 。

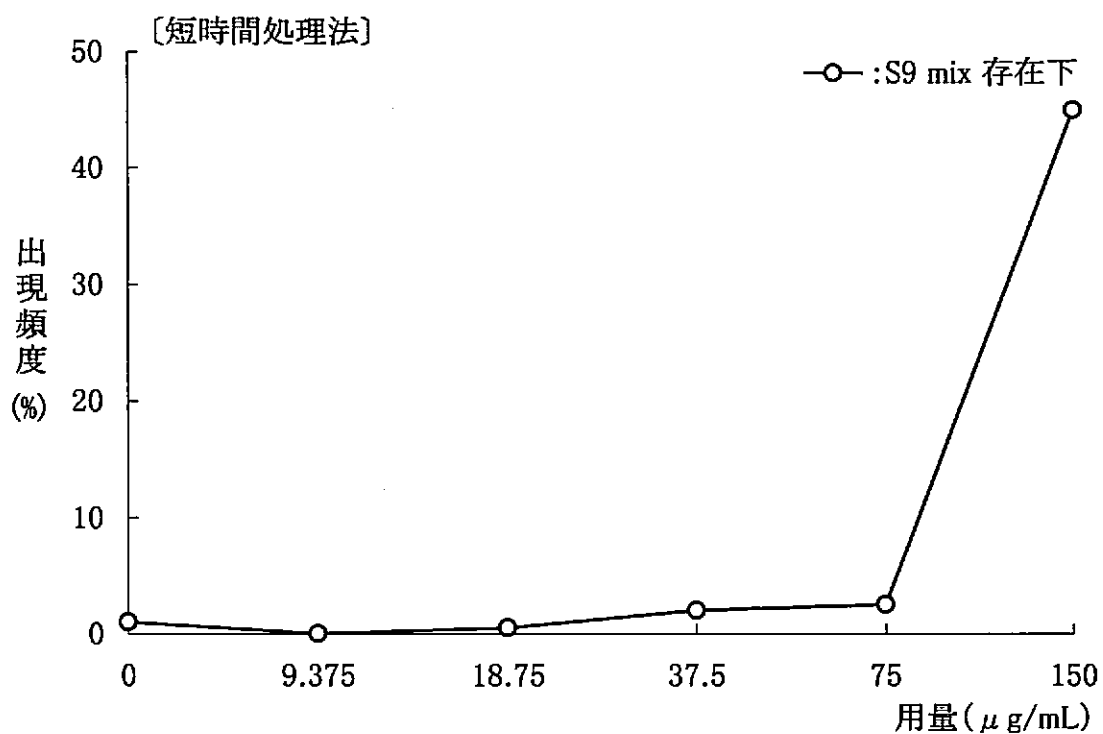
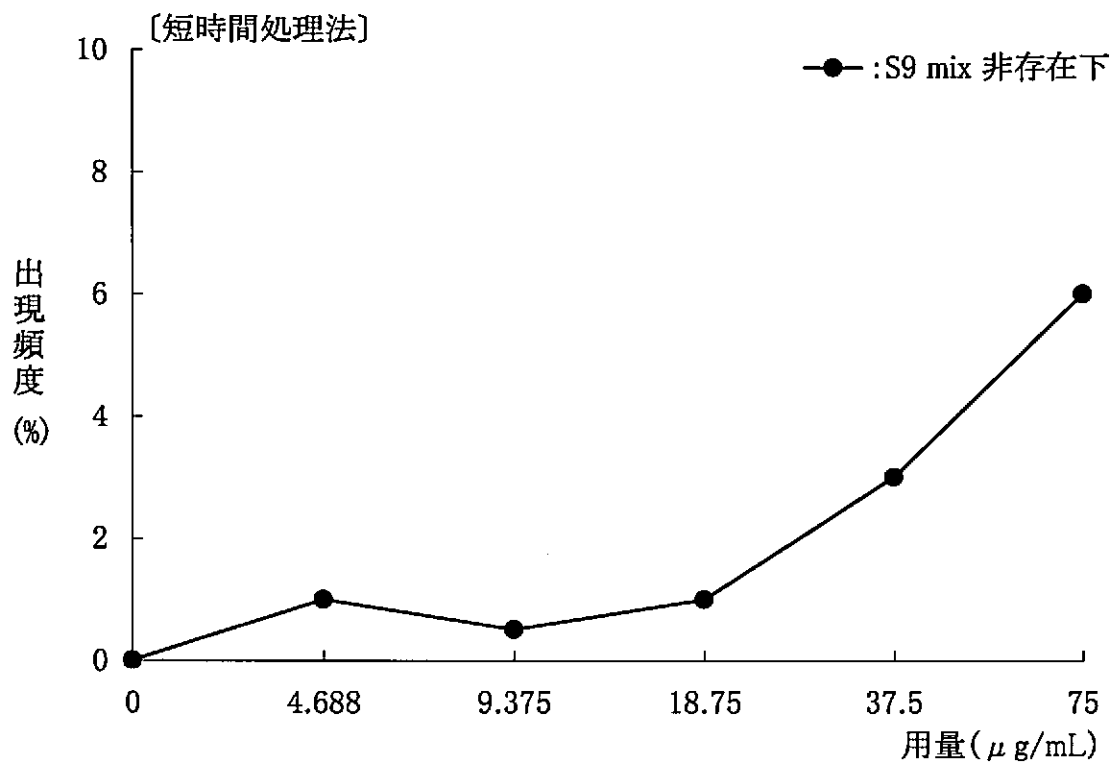


図 1-1 構造異常を有する細胞の出現頻度

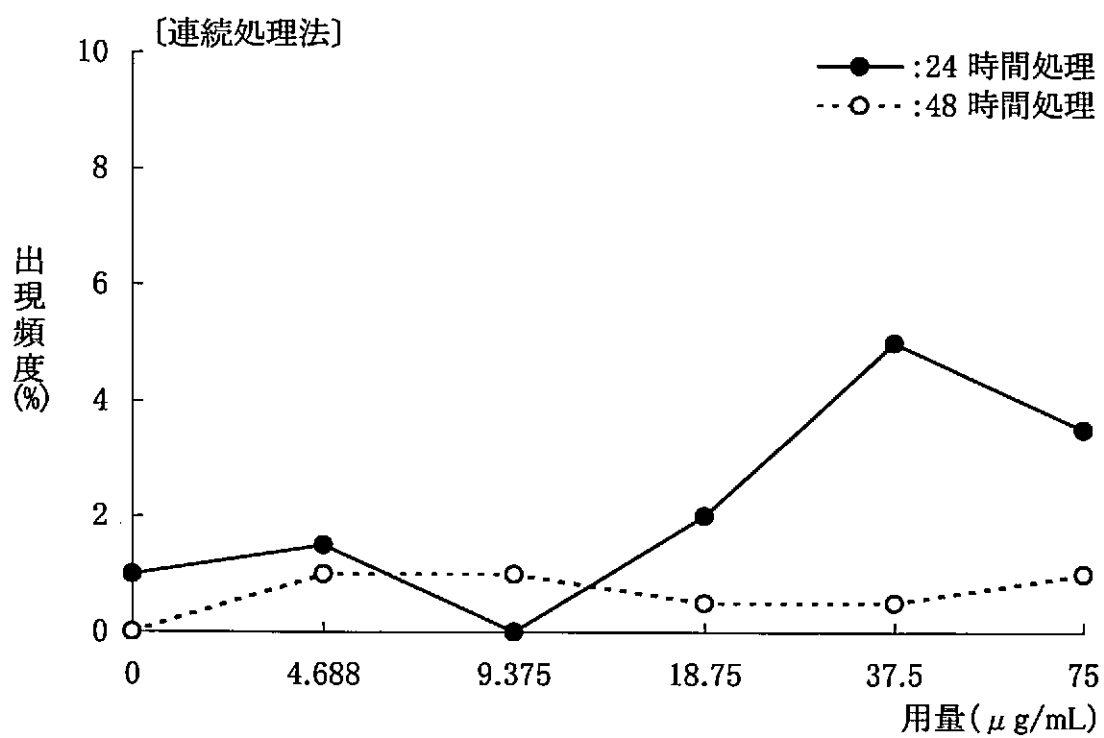


図 1-2 構造異常を有する細胞の出現頻度

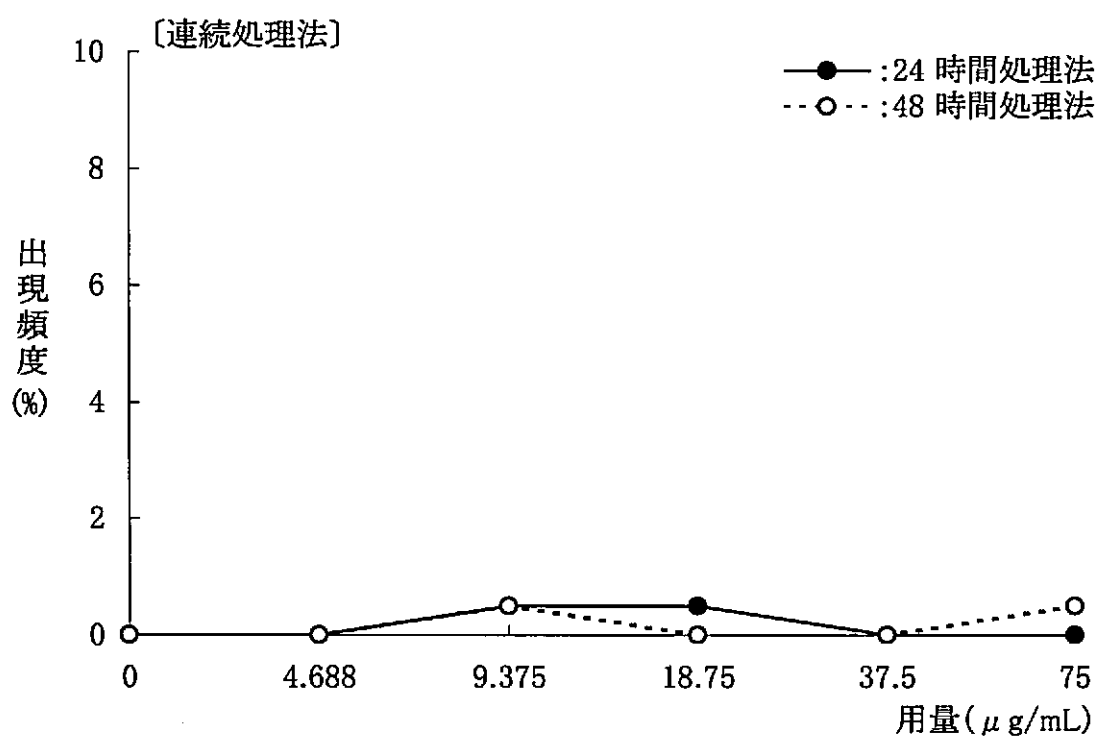
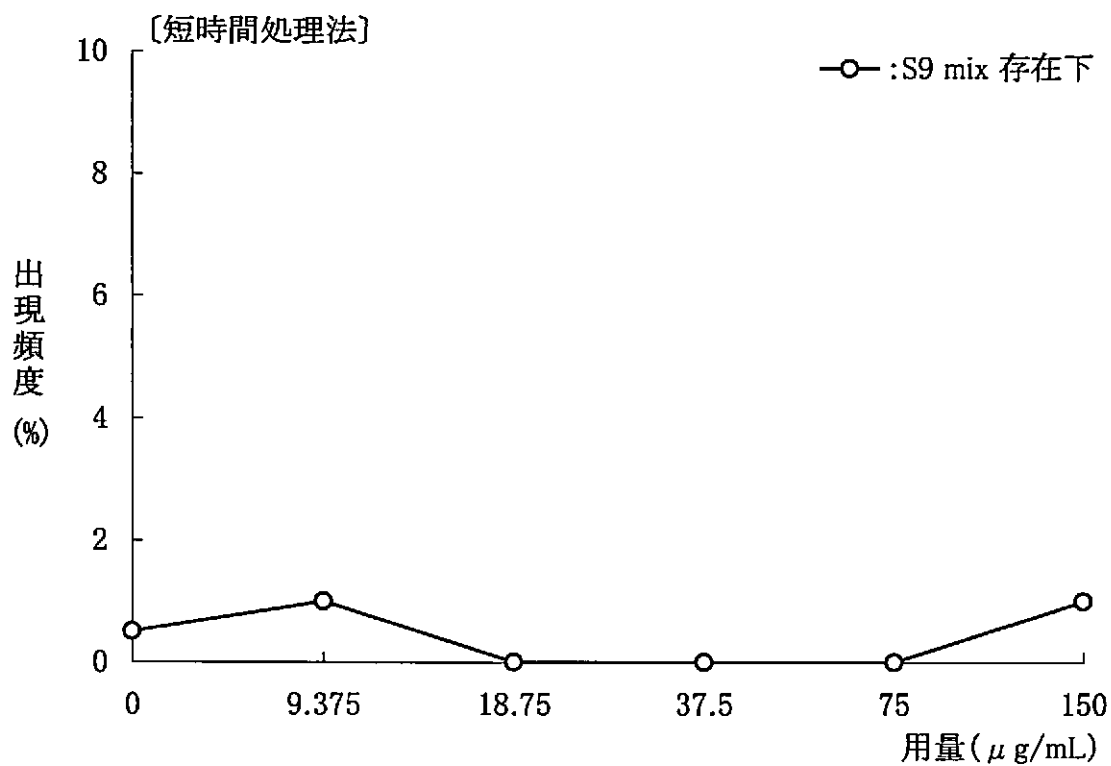


図 2 数的異常を有する細胞の出現頻度

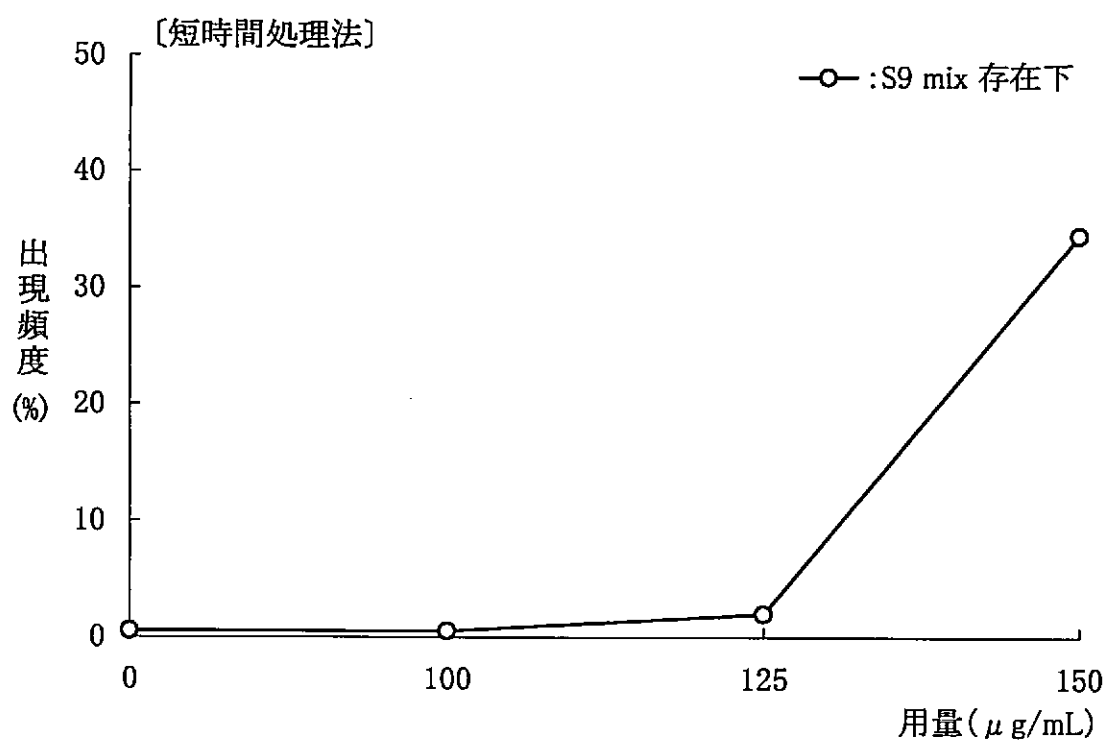
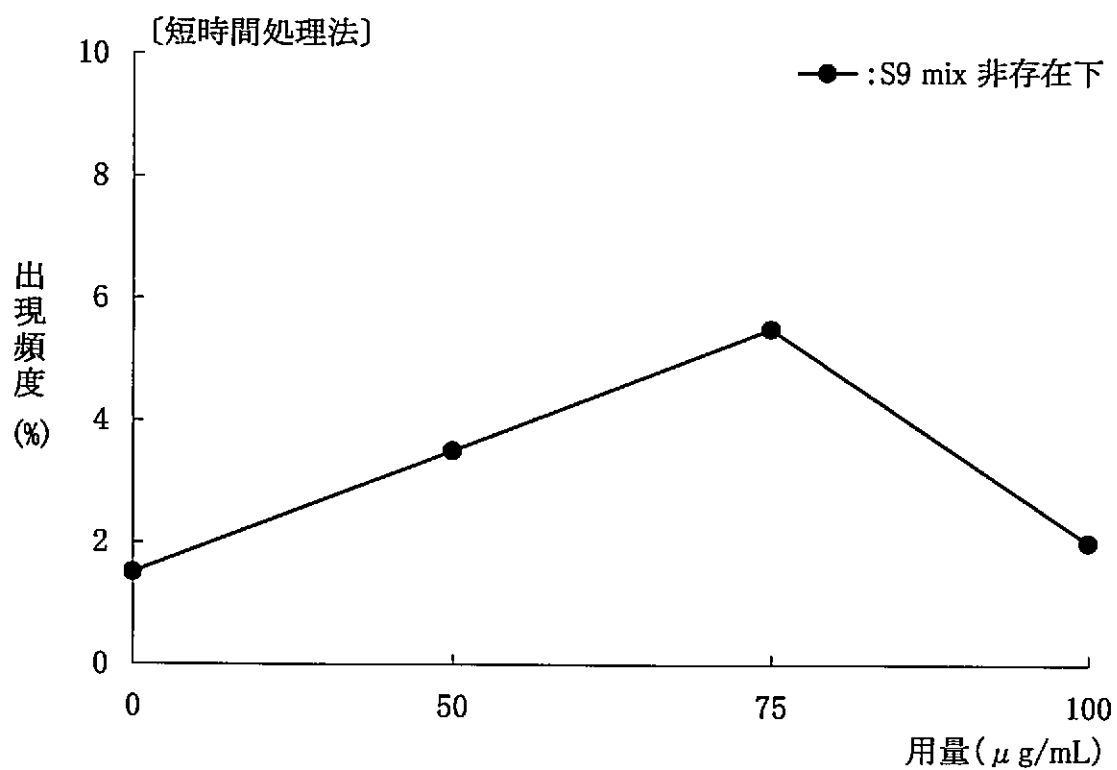


図3 構造異常を有する細胞の出現頻度(確認試験)

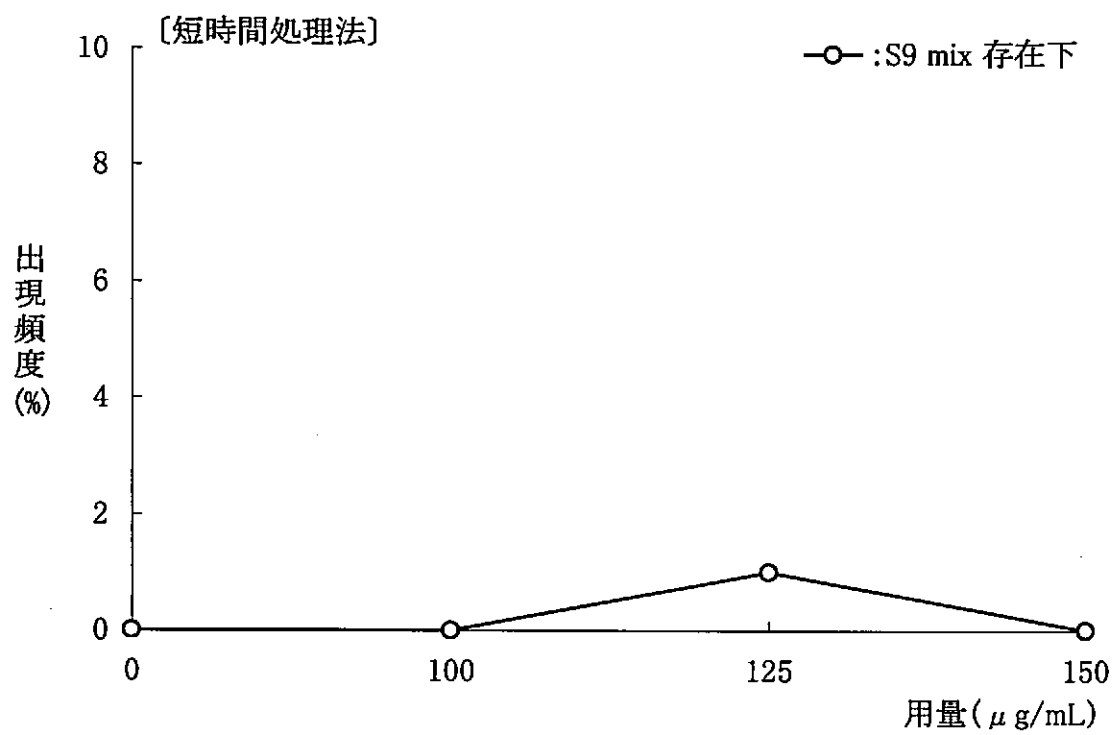


図 4 数的異常を有する細胞の出現頻度(確認試験)



写真 1. 陰性対照群 (1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液), 短時間処理法 S9 mix 存在下, 分裂中期像 (ギムザ染色, $\times 960$)



写真 2. 被験物質群 (150 $\mu\text{g/mL}$), 短時間処理法 S9 mix 存在下 染色分体型切断および交換がみられる分裂中期像 (ギムザ染色, $\times 960$)

添付資料

染色体異常細胞の出現頻度:背景データ

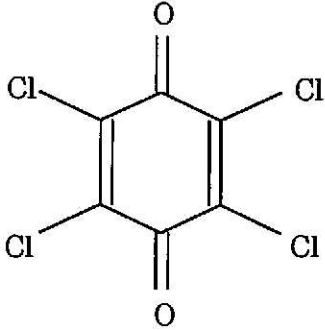

	陰性対照値(%) (n:236)	陽性対照値(%)	
		MNNG(n:102)	B[a]P(n:63)
構造異常細胞	0~2.5	68.0~100	24.0~75.5
数的異常細胞(倍数体)	0~1.5	0~2.5	0~1.5

MNNG : 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (2.5 μ g/mL).

B[a]P : 3,4-Benzo[a]pyrene (10 μ g/mL).

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

既存化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾキノン		
別 名	クロラニル テトラクロロ-1, 4-ベンゾキノン 2, 3, 5, 6-テトラ-2, 5-シクロヘキサンジエン-1, 4- ジオン		
構造式または示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
試験に供した既存 化学物質の純度	99.5%	試験に供した既存 化学物質の Lot.No.	
不純物の名称及び濃度	—		
CAS 番号	118-75-2		
分 子 量	245.87	蒸 気 圧	—
融 点	290°C	分配係数	—
沸 点	—	常温における性状	黄金色の結晶性粉末
安 定 性	常温で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	250mg/L, 25°C	安定
	DMSO	—	—
	エタノール	微溶	—
	その他(エチルエーテル)	可溶	—

DMSO : ジメチルスルホキシド

2.細胞の種類－培養条件

細胞名	CHL/IU	入手先	国立医薬品食品衛生研究所		
種	チャイニーズハムスター	入手年月日	昭和60年1月13日		
培養液	イーグルのMEM	製造元	Gibco Laboratories		
血液の種類と添加量	仔牛 10%	製造元(Lot No.)	Gibco Laboratories (1068210, 1064545)		
細胞周期	約 16 h	凍結条件	液体窒素条件下		
継代数	8	培養条件	容器	プラスチックシャーレ	
染色体数 (モード)	25 本		温度	37 ℃	
			CO ₂ 濃度	5 %	
備考					

3.S9 mix

(1) S9 mix の入手方法

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	平成12年9月29日 製造
購入の場合の Lot No.	CAM-433
保存温度	-80℃以下 (超低温槽 ウルトラディープ CF-41SD)

(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	PB および 5, 6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7 週	投与期間及び投与量 (mg/kg 体重)	PB 30 mg/kg 1 回 PB 60 mg/kg 3 回 5, 6-BF 80 mg/kg 1 回
体重	205~245 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	NADP	4 μmol
MgCl ₂	5 μmol	酸緩衝液(HEPES)	4 μmol
KCl	33 μmol	その他()	0.1 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol		

(4) S9 mix の処理条件

① プレート法 2. 浮遊細胞法 3. その他 ()	
S9 量 (最終濃度)	4.55 %
S9 蛋白量 (最終濃度)	1.23 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			
	カルボキシメチルセルロースナトリウムの1w/v%水溶液 (1w/v%CMC・Na水溶液)			
	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	関東化学(株)	007G1484	試薬	—
溶媒選択の理由	被験物質は水に難溶であり、予備的検討の結果、DMSOおよびアセトンに不溶であったことから、溶媒には1w/v%CMC・Na水溶液を用いた。			
被験物質溶媒の性状	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	溶媒に被験物質を懸濁させ、ボルテックスミキサーで混合攪拌および約2分間の超音波破碎を行った。			
溶媒の調製から使用 までの保存時間と温度	約 15 分, 20℃			
純 度 換 算 の 有 無	有 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		平成12年11月11日から 平成12年11月16日	平成12年11月11日から 平成12年11月16日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	3 mL／培養器	2.5 mL／培養器
	用量当たりの培養器数	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
	S9 mix 添 加 量		0.5 mL／培養器
	S9 の 最 終 濃 度		4.55 %
	S9 蛋白の最終濃度		1.23 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		単層培養細胞密度計を使用 10%ホルマリン水溶液固定 0.1%クリスタルバイオレット水溶液染色	
備 考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (6-18h)		代謝活性化法による場合 (6-18h)	
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	0 (溶媒)	100.0
37.5	52.5	37.5	89.0
75	40.0	75	70.0
150 *	49.5	150 *	70.5
300 *	74.5	300 *	105.0
600 *	112.5	600 *	128.0
1200 *	134.0	1200 *	141.0
2400 *	—	2400 *	—
備 考 * : シャーレの底に被験物質が付着し、正確な測定値は得られなかった。			
— : 測定不可			

(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		平成12年11月27日から 平成12年12月 4日	平成12年11月27日から 平成12年12月 4日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	3 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	4 枚	4 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
	S9 mix 添加量		0.5 mL/培養器
	S9 の 最 終 濃 度		4.55 %
	S9 蛋白の最終濃度		1.23 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
備 考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表1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

試験実施期間		平成12年11月11日から 平成12年11月16日	平成12年11月11日から 平成12年11月17日
培養器	形状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大きさ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培養液量	5 mL／培養器	5 mL／培養器
	用量当たりの培養器数	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	0.5 mL／培養器	0.5 mL／培養器
	処理時間	24 h	48 h
	回復時間	0 h	0 h
細胞増殖抑制測定法		単層培養細胞密度計を使用 10%ホルマリン水溶液固定 0.1%クリスタルバイオレット水溶液染色	
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(24-0h) 処理による場合		(48-0h) 処理による場合	
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	0 (溶媒)	100.0
37.5	47.0	37.5	35.5
75	49.5	75	36.0
150 *	55.5	150 *	54.0
300 *	68.5	300 *	49.0
600 *	96.5	600 *	63.0
1200 *	119.0	1200 *	94.0
2400 *	—	2400 *	122.5
備考 * : シャーレの底に被験物質が付着し、正確な測定値は得られなかった。 — : 測定不可			

(3) 染色体異常試験の条件

試 験 実 施 期 間		平成12年12月 9日から 平成12年12月14日	平成12年12月 9日から 平成12年12月15日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	5 mL/培養器	5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	4 枚	4 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	0.5 mL/培養器	0.5 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	48 h
	回 復 時 間	0 h	0 h
備 考			

(4) 染色体異常試験結果（別表2による。）

7. 短時間処理法における試験（確認試験）

(1) 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		平成12年2月10日から 平成12年2月15日	平成12年2月10日から 平成12年2月15日
培養器	形状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大きさ	直径 6 cm	直径 6 cm
	培養液量	3 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	4 枚	4 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
	S9 mix 添加量		0.5 mL/培養器
	S9 の最終濃度		4.55 %
	S9 蛋白の最終濃度		1.23 mg/mL
	処理時間	6 h	6 h
	回復時間	18 h	18 h
備考			

(2) 染色体異常試験結果（確認試験）（別表3による。）

8. 結果の判定および参考事項

(1) 試験結果

判 定		<div>陽性</div> 陰性			
判定の理由 短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下の最高用量で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。確認試験の結果， S9 mix 存在下における最高用量で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められ，再現性のある結果が得られた。 従って，本実験条件下において，本被験物質の染色体異常誘発性は陽性と判定した。					
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	－ S9 mix	－ h 処理	－ mg/mL
			＋ S9 mix	6 — 18 h 処理	0.089 mg/mL
		連続処理法	<div></div>	－ h 処理	－ mg/mL
				－ h 処理	－ mg/mL
	数的異常	短時間処理法	－ S9 mix	－ h 処理	－ mg/mL
			＋ S9 mix	－ h 処理	－ mg/mL
		連続処理法	<div></div>	－ h 処理	－ mg/mL
				－ h 処理	－ mg/mL

(2) 参考事項

1. 細胞の選択理由

供試細胞は、染色体が比較的大きいため標本観察が容易であり、また、染色体モードが25本と少なく、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において広く用いられているためこれを使用した。

2. 被験物質用量の設定理由

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、短時間処理法および連続処理法ともに、50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ、かつ、3 用量以上のデータが得られることを考慮して設定した。

3. 染色体異常の分類および集計

染色体異常の分類は、構造異常については染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換（二動原体、環状染色体など）およびその他（断片化など）とした。数的異常については、倍数性細胞のみを記録した。ギャップ（染色分体型および染色体型）については、異常として記録したが構造異常には含めなかった。ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を 1つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は、観察した細胞200個中に認められた異常細胞数を表示した。

4. 試験結果の判定基準

試験結果の判定にあたっては、構造異常および倍数性細胞の出現頻度について多試料 χ^2 検定を行い、有意差（有意水準5%以下）を認めた場合は、Fisher の直接確立法により陰性（溶媒）対照群に対する各群の比較検定（有意水準は多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻度が陰性（溶媒）対照群に比べ 2用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められる場合に、染色体異常誘発性は陽性とした。なお、単一用量でのみ有意な増加が認められた場合は、それに近い用量を用いて確認試験を行い、その結果、再現性果が認められた場合は、染色体異常誘発性は陽性とした。

5. 被験物質の残存について

短時間処理法および連続処理法ともに所定の培養時間終了時、150 μ g/mL以上の用量ではシャーレ中に被験物質の残存が認められた。

8. その他

試験実施施設	名 称	財団法人 畜産生物科学安全研究所	
	所 在 地	神奈川県相模原市橋本台三丁目7番11号	電話 042 (762) 2775 FAX 042 (762) 7979
試験責任者	職 氏 名		
	経 験 年 数		
試験 期 間	平成12年11月8日 より 平成13年3月29日		
試験 番 号	00-138		

表 1-1 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0)	(0)	(0)
4 .688	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	1	0	0	1	0	2	0	100.0	100	0	0	0
	200	1	0	0	1	0	2	0		200	0	0	0
		(0.5)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(1.0)	(0)			(0)	(0)	(0)
9 .375	100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	94.5	100	0	0	0
	200	1	0	0	0	0	1	0		200	0	0	0
		(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
18 .75	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	1	2	0	0	0	2	0	92.0	100	0	0	0
	200	1	2	0	0	0	2	0		200	0	0	0
		(0.5)	(1.0)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)			(0)	(0)	(0)
37 .5	100	1	2	0	1	0	3	0		100	0	0	0
	100	2	2	0	0	0	3	2	70.0	100	0	0	0
	200	3	4	0	1	0	6	2		200	0	0	0
		(1.5)	(2.0)	(0)	(0.5)	(0)	(3.0)	(1.0)			(0)	(0)	(0)
75	100	1	4	0	0	0	4	0		100	0	0	0
	100	6	6	0	0	0	8	1	43.5	100	0	0	0
	200	7	10	0	0	0	12	1		200	0	0	0
		(3.5)	(5.0)	(0)	(0)	(0)	(6.0)	(0.5)			(0)	(0)	(0)
陽性対照	100	24	91	0	0	0	93	2		100	0	0	0
	100	41	91	0	0	0	92	1	—	100	0	0	0
	2 .5	200	65	182	0	0	185	3		200	0	0	0
		(32.5)	(91.0)	(0)	(0)	(0)	(92.5)	(1.5)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

表 1-2 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	1	0	0	0	1	0		100	1	0	1
	100	0	1	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0
	200	1	2	0	0	0	2	0		200	1	0	1
		(0.5)	(1.0)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)	
9.375	100	0	0	0	0	0	0	1		100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	98.0	100	1	0	1
	200	0	0	0	0	0	0	1		200	2	0	2
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0.5)		(1.0)	(0)	(1.0)	
18.75	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0	91.0	100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	
37.5	100	0	1	0	1	0	2	0		100	0	0	0
	100	1	2	0	0	0	2	0	90.5	100	0	0	0
	200	1	3	0	1	0	4	0		200	0	0	0
		(0.5)	(1.5)	(0)	(0.5)	(0)	(2.0)	(0)		(0)	(0)	(0)	
75	100	1	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	2	3	0	1	0	4	0	79.0	100	0	0	0
	200	3	4	0	1	0	5	0		200	0	0	0
		(1.5)	(2.0)	(0)	(0.5)	(0)	(2.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	
150 #	100	32	35	2	0	0	45	0		100	2	0	2
	100	24	38	0	0	0	45	1	87.5 †	100	0	0	0
	200	56	73	2	0	0	90	1		200	2	0	2
		(28.0)	(36.5)	(1.0)	(0)	(0)	(45.0)**	(0.5)		(1.0)	(0)	(1.0)	
陽性対照	100	15	60	0	1	0	61	1		100	0	0	0
	100	17	52	2	1	0	53	0	—	100	0	0	0
	200	32	112	2	2	0	114	1		200	0	0	0
		(16.0)	(56.0)	(1.0)	(1.0)	(0)	(57.0)**	(0.5)		(0)	(0)	(0)	

陰性対照:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液。

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

#:培養終了時に被験物質の残存が認められた。

†:シャーレの底に被験物質が付着し、正確な測定値は得られなかった。

**: $p < 0.01$.

表 2-1 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色体分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	1	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	1	0	1	0	100.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	2	0	2	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)	(1.0)	(0)			(0)	(0)	(0)
4 .688	100	0	1	0	1	0	2	0		100	0	0	0
	100	1	1	0	0	0	1	0	93.5	100	0	0	0
	200	1	2	0	1	0	3	0		200	0	0	0
		(0.5)	(1.0)	(0)	(0.5)	(0)	(1.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
9 .375	100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	87.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	1	0	1
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
18 .75	100	1	1	0	1	0	3	0		100	1	0	1
	100	0	1	0	0	0	1	0	79.5	100	0	0	0
	200	1	2	0	1	0	4	0		200	1	0	1
		(0.5)	(1.0)	(0)	(0.5)	(0)	(2.0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
37 .5	100	4	4	0	0	0	6	0		100	0	0	0
	100	2	4	0	0	0	4	0	61.5	100	0	0	0
	200	6	8	0	0	0	10	0		200	0	0	0
		(3)	(4.0)	(0)	(0)	(0)	(5.0)	(0)			(0)	(0)	(0)
75	100	3	2	0	0	0	3	0		100	0	0	0
	100	2	4	0	0	0	4	0	47.0	100	0	0	0
	200	5	6	0	0	0	7	0		200	0	0	0
		(2.5)	(3.0)	(0)	(0)	(0)	(3.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
陽性対照	100	24	91	0	1	0	92	2		100	1	0	1
	100	18	91	0	0	0	92	0	—	100	0	0	0
	2 .5	200	42	182	0	1	0	184	2	200	1	0	1
			(21.0)	(91.0)	(0)	(0.5)	(0)	(92.0)	** (1.0)		(0.5)	(0)	(0.5)

陰性対照:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**:p<0.01.

表 2-2 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果(連続処理法:48時間処理)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0)	(0)	(0)
4 .688	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	1	0	1	0	87.5	100	0	0	0
	200	0	1	0	1	0	2	0		200	0	0	0
		(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)	(1.0)	(0)			(0)	(0)	(0)
9 .375	100	0	1	0	0	0	1	0		100	1	0	1
	100	0	1	0	0	0	1	0	74.5	100	0	0	0
	200	0	2	0	0	0	2	0		200	1	0	1
		(0)	(1.0)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
18 .75	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	76.5	100	0	0	0
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
37 .5	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	1	0	1	0	55.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	1	0	1	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
75	100	0	0	0	0	0	0	1		100	1	0	1
	100	1	1	1	1	0	2	0	31.0	100	0	0	0
	200	1	1	1	1	0	2	1		200	1	0	1
		(0.5)	(0.5)	(0.5)	(0.5)	(0)	(1.0)	(0.5)			(0.5)	(0)	(0.5)
陽性対照	100	31	80	4	2	0	85	1		100	1	0	1
	100	32	78	2	2	0	84	2	—	100	0	0	0
	200	63	158	6	4	0	169	3		200	1	0	1
		(31.5)	(79.0)	(3.0)	(2.0)	(0)	(84.5)	(1.5)			(0.5)	(0)	(0.5)

陰性対照:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**:p<0.01.

表 3-1 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果(確認試験;短時間処理法:S9mix非存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	1	0	0	1	0	2	0	100.0	100	0	0	0
	200	1	1	0	1	0	3	0		200	0	0	0
		(0.5)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0)	(1.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	
50	100	2	2	0	1	0	5	0		100	0	0	0
	100	0	1	0	1	0	2	0	66.5	100	0	0	0
	200	2	3	0	2	0	7	0		200	0	0	0
		(1.0)	(1.5)	(0)	(1.0)	(0)	(3.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	
75	100	5	0	0	1	0	5	0		100	0	0	0
	100	2	4	0	1	0	6	0	46.0	100	0	0	0
	200	7	4	0	2	0	11	0		200	0	0	0
		(3.5)	(2.0)	(0)	(1.0)	(0)	(5.5)	(0)		(0)	(0)	(0)	
100	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	2	0	1	0	3	0	48.5	100	0	0	0
	200	0	3	0	1	0	4	0		200	0	0	0
		(0)	(1.5)	(0)	(0.5)	(0)	(2.0)	(0)		(0)	(0)	(0)	
陽性対照	100	30	78	0	0	0	83	0		100	1	0	1
	100	24	78	0	0	0	84	0	—	100	0	0	0
	200	54	156	0	0	0	167	0		200	1	0	1
		(27.0)	(78.0)	(0)	(0)	(0)	(83.5)**	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)	

陰性対照:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine。

**: $p<0.01$ 。

表 3-2 2,3,5,6-テトラクロロベンゾキノンの染色体異常試験結果(確認試験;短時間処理法:S9mix存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)				
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数	
		切断	交換	切断	交換									
陰性対照	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0	
	200	0	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0	
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)		(0)	(0)	(0)		
100	100	1	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	79.5	100	0	0	0	
	200	1	1	0	0	0	1	0		200	0	0	0	
		(0.5)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0)		(0)	(0)	(0)		
125	100	1	2	0	0	0	3	0		100	2	0	2	
	100	1	1	0	0	0	1	0	79.5	100	0	0	0	
	200	2	3	0	0	0	4	0		200	2	0	2	
		(1.0)	(1.5)	(0)	(0)	(0)	(2.0)	(0)		(1.0)	(0)	(1.0)		
150 *	100	21	33	1	0	0	41	0		100	0	0	0	
	100	13	23	0	0	0	28	0	53.5 †	100	0	0	0	
	200	34	56	1	0	0	69	0		200	0	0	0	
		(17.0)	(28.0)	(0.5)	(0)	(0)	(34.5)**	(0)		(0)	(0)	(0)		
陽性対照	100	7	50	0	0	0	52	1		100	0	0	0	
	100	7	34	2	2	0	39	0	—	100	0	0	0	
	10	200	14	84	2	2	0	91	1		200	0	0	0
		(7.0)	(42.0)	(1.0)	(1.0)	(0)	(45.5)**	(0.5)		(0)	(0)	(0)		

陰性対照:1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液。

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

#:培養終了時に被験物質の残存が認められた。

†:シャーレの底に被験物質が付着し、正確な測定値は得られなかった。

**:p<0.01.

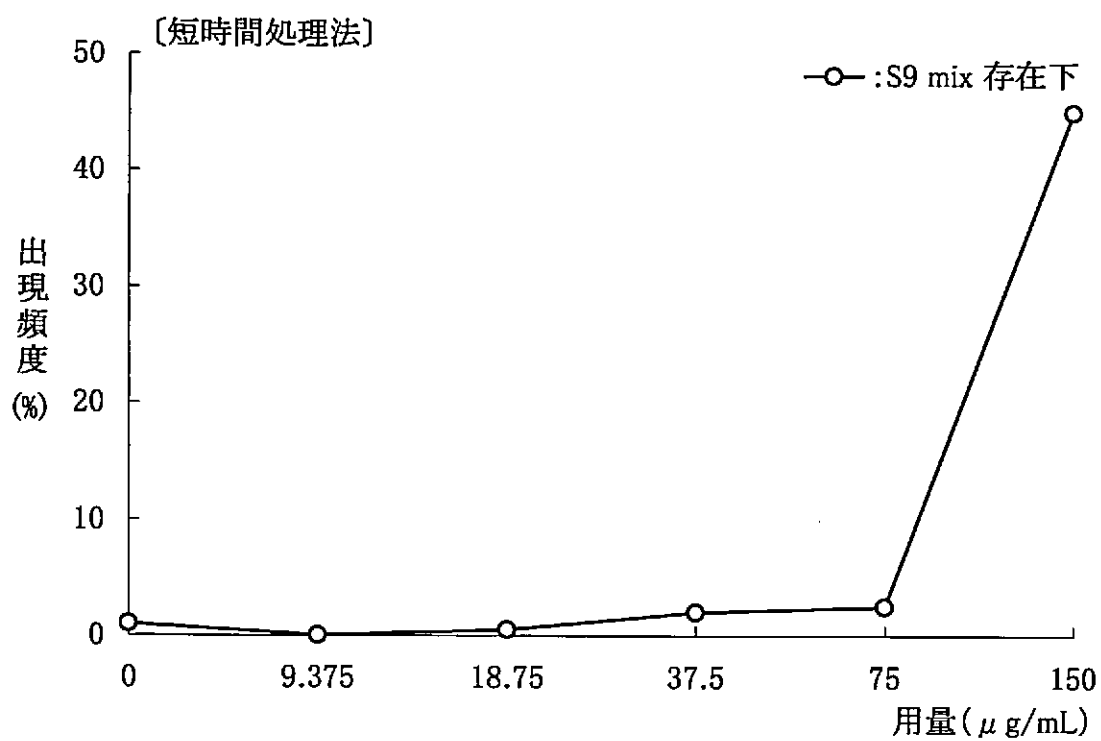
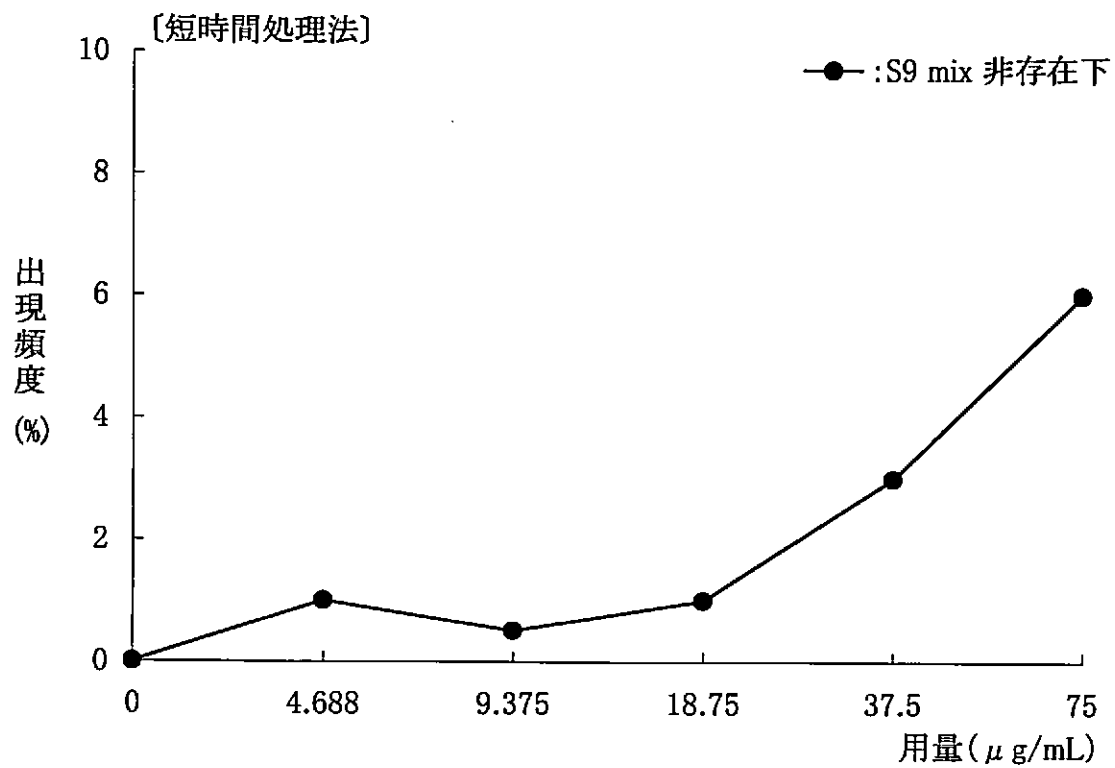


図 1-1 構造異常を有する細胞の出現頻度

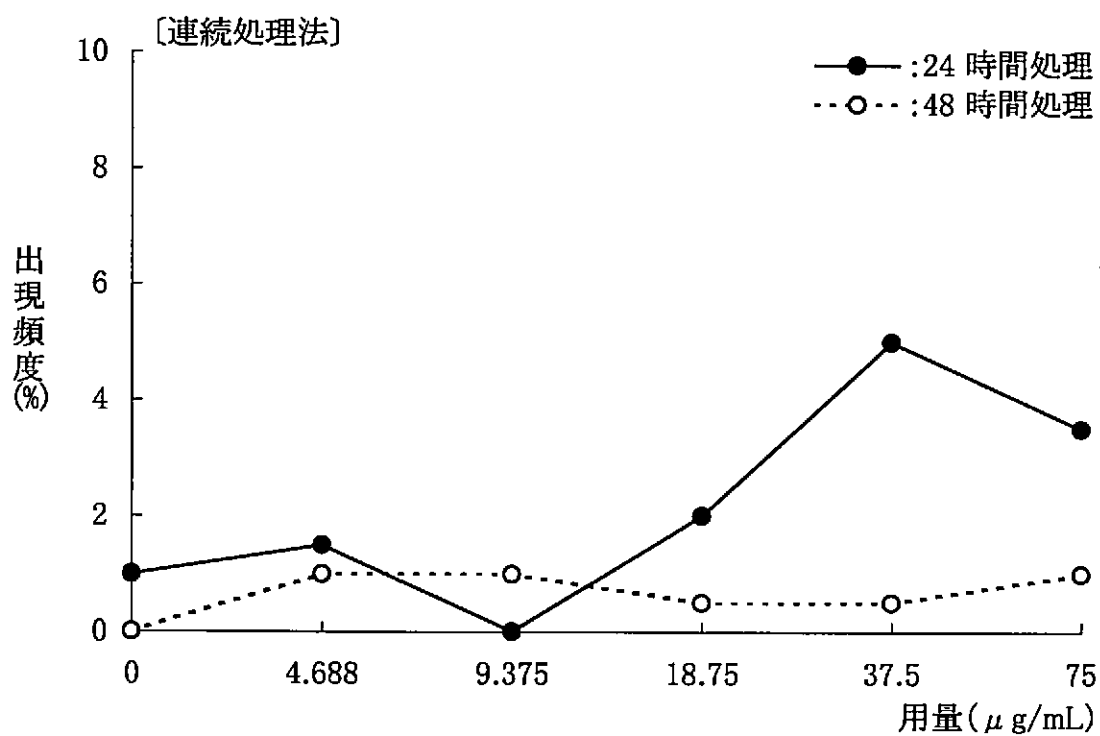


図 1-2 構造異常を有する細胞の出現頻度

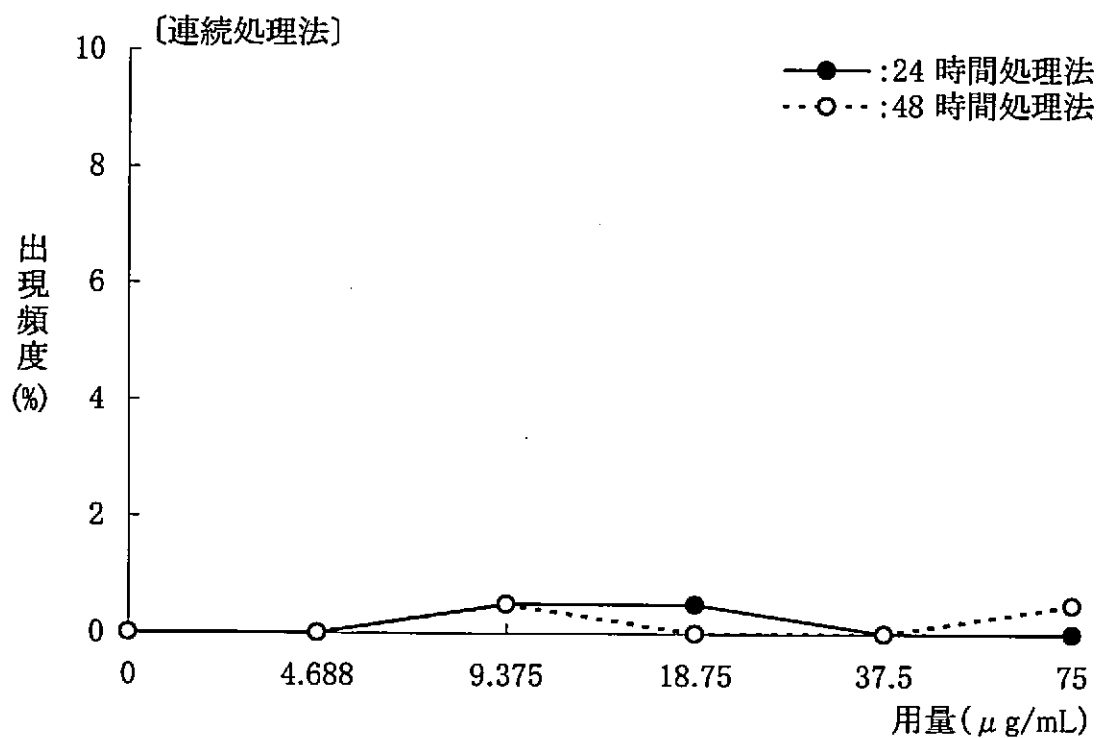
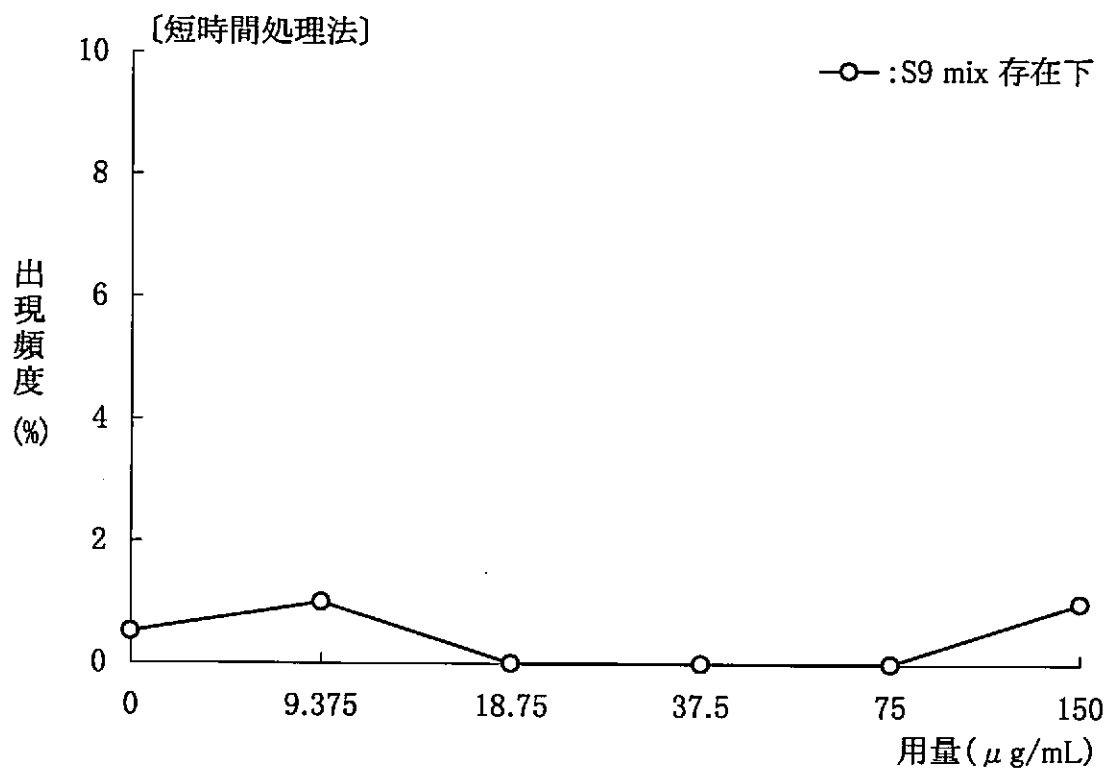


図 2 数的異常を有する細胞の出現頻度

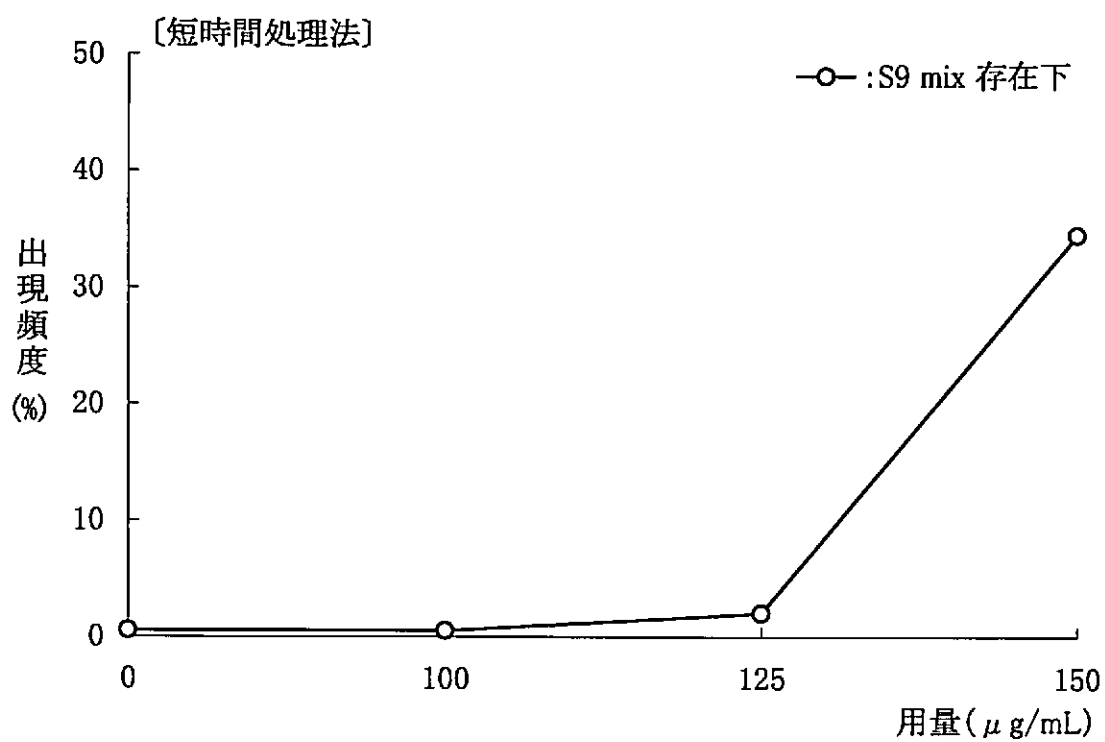
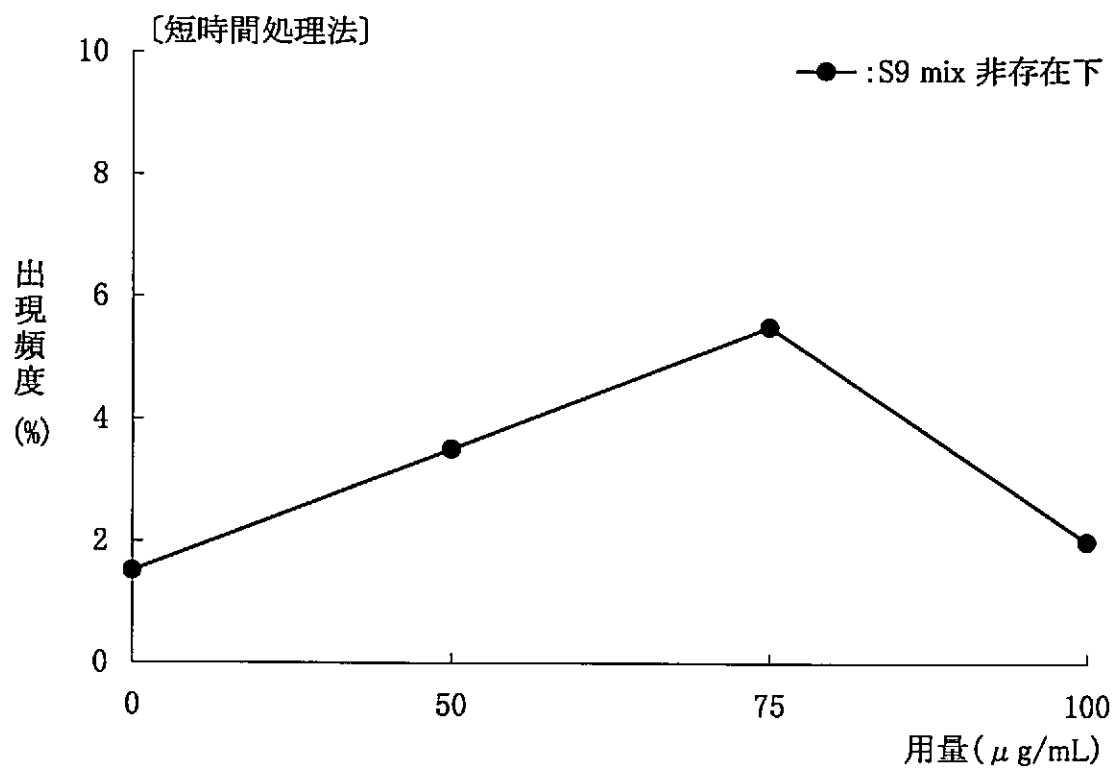


図 3 構造異常を有する細胞の出現頻度(確認試験)

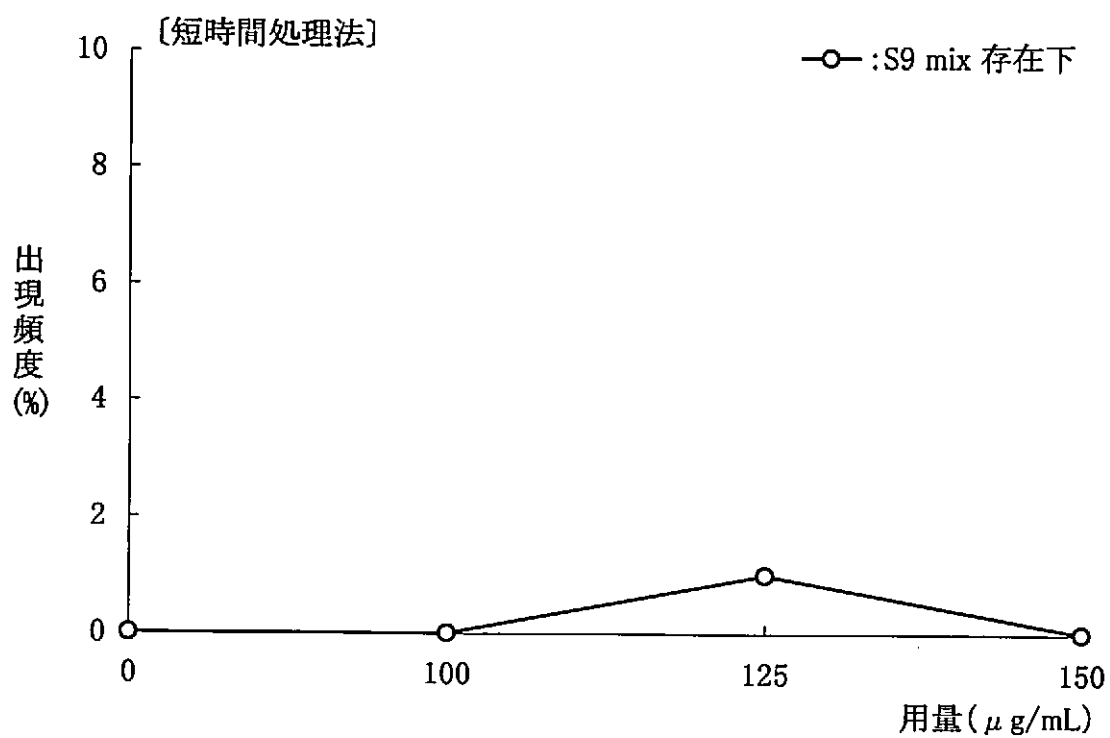


図 4 数的異常を有する細胞の出現頻度(確認試験)

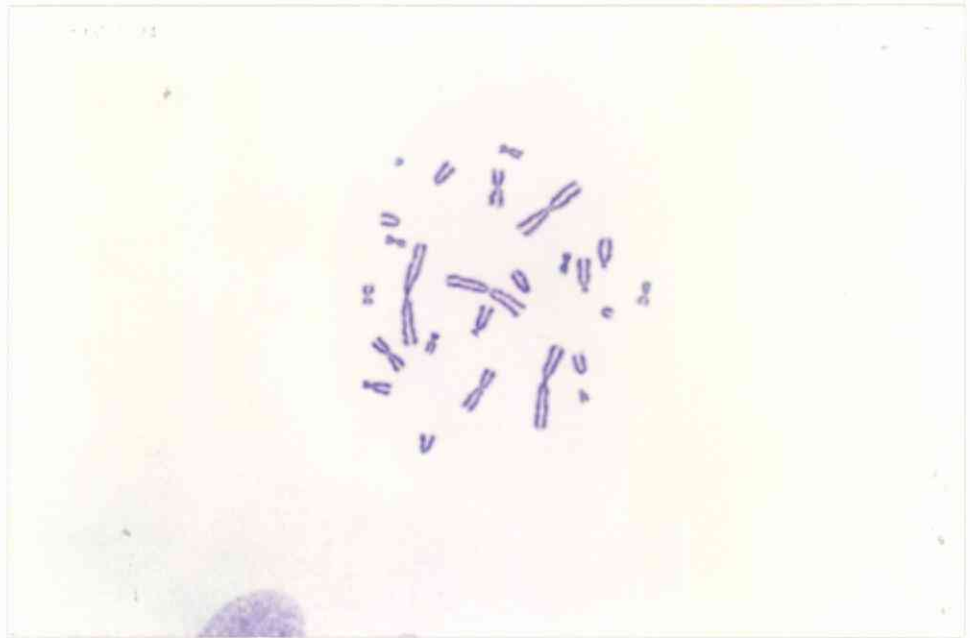


写真 1. 陰性対照群 (1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液),
短時間処理法 S9 mix 存在下, 分裂中期像 (ギムザ染色, $\times 960$)

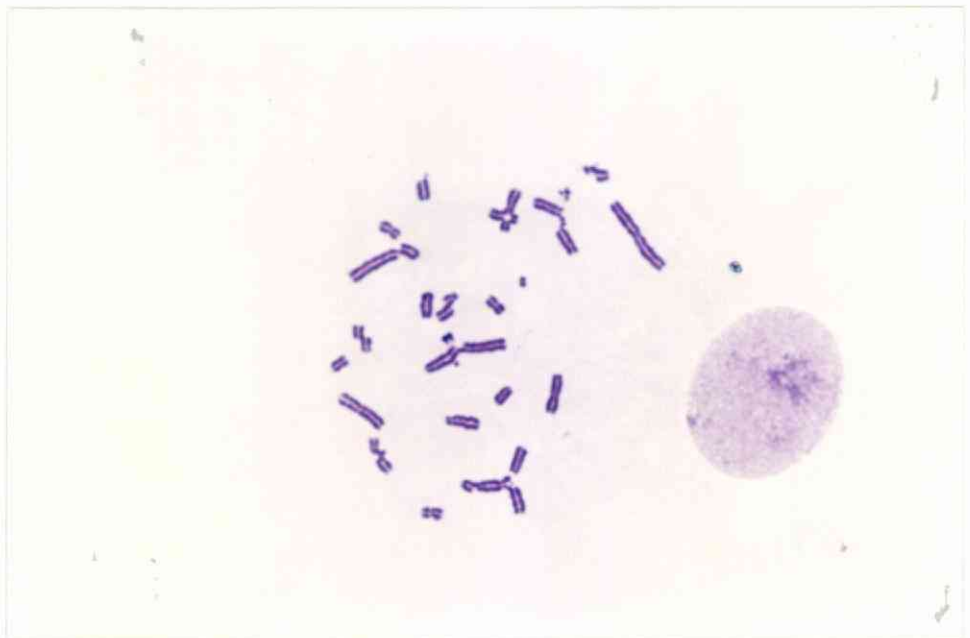


写真 2. 被験物質群 (150 $\mu\text{g/mL}$), 短時間処理法 S9 mix 存在下
染色分体型切断および交換がみられる分裂中期像
(ギムザ染色, $\times 960$)

陳 述 書

試験表題：2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾ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： 00-138

本試験は、OECD の試験法ガイドライン“OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 473, *In vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test(1997)”および OECD の GLP “OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(1997)” に定める基準に準拠して実施した。

試験責任者



試験表題：2, 3, 5, 6-テトラクロロベンゾ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：00-138

試験委託者：

名 称 製品評価技術センター
所 在 地 東京都渋谷区西原二丁目 49 番 10 号
委託責任者

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所
所 在 地 神奈川県相模原市橋本台三丁目 7 番 11 号
運営管理者
試験責任者
信頼性保証
責 任 者

試験期間：

試験開始日 平成 12 年 11 月 8 日
実験期間 開始日：平成 12 年 11 月 11 日
終了日：平成 13 年 2 月 16 日
試験終了日 平成 13 年 3 月 29 日

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因：

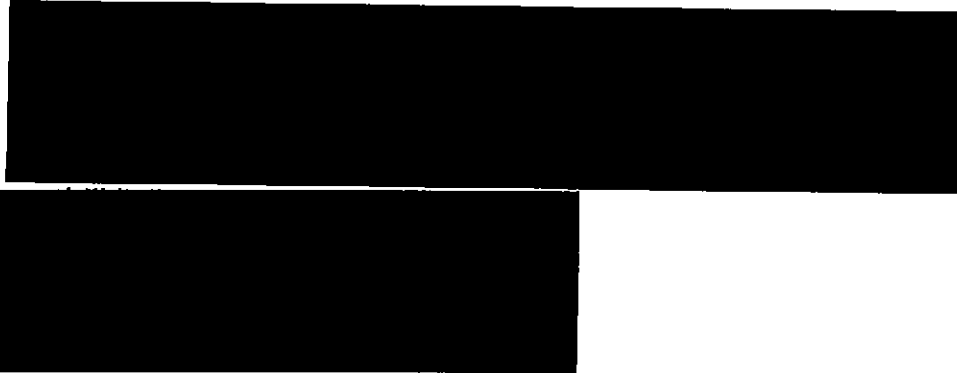
本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は、最終報告書作成後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の保管については、試験委託者と協議して決める。

1. 試験計画書
2. 被験物質に関する記録
3. 試験結果に関する記録
4. 信頼性保証に関する記録
5. 最終報告書

試験責任者、担当者および業務分担



信頼性保証証明書

試験表題 : 2,3,5,6-テトラクロロベンゾ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 : 00-138

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
1. 試験実施状況査察		
細胞培養開始 平成12年11月08日	平成12年11月08日	平成12年11月08日
染色体異常試験：被験物質の調製および添加・細胞播き・細胞の継代 平成12年11月27日	平成12年11月27日	平成12年11月27日
染色体異常試験：細胞増殖率の測定(標本作製)・染色体標本の作製・培養細胞の観察 平成12年11月28日	平成12年11月28日	平成12年11月28日
染色体異常試験：S9mixの使用・細胞増殖率の測定(測定) 平成12年11月30日	平成12年11月30日	平成12年11月30日
染色体異常試験：染色体標本の染色 平成12年12月01日	平成12年12月01日	平成12年12月01日
染色体異常試験：染色体標本の観察 平成12年12月19日	平成12年12月19日	平成12年12月19日
2. 生データ査察		
平成13年03月08日	平成13年03月08日	平成13年03月08日
3. 報告書(草案)審査		
平成13年03月08日	平成13年03月08日	平成13年03月08日
4. 報告書審査		
平成13年03月29日	平成13年03月29日	平成13年03月29日

上記の審査・査察により、本試験が「OECDのGLP」に従って実施され、本報告書には、当該試験で使用した方法・手順が忠実に記載され、試験成績には、当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されていることを確認した。

平成 13 年 3 月 29 日
財団法人 畜産生物科学安全研究所

ROBUST SUMMARY TEMPLATE

GENETIC TOXICITY IN VITRO (NON-BACTERIAL IN VIOTRO TEST)

TEST SUBSTANCE

2,3,5,6-Tetrachloro-*p*-benzoquinone (CAS No. 118-75-2)

Source : [REDACTED] — purity : 99.5%. Stability during use confirmed by titration method.

METHOD

- Method/guideline : OECD Test Guidelines 473
- Test type : Chromosomal aberration test
- GLP : Yes (OECD)
- Year : 2001
- Species/Strain : Chinese hamster lung (CHL/IU) cells
- Metabolic activation : with and without S9 mix
- Statistical methods : Multi-sample χ^2 test at $p < 0.05$ and Fisher's exact test at $p < 0.05$ or $p < 0.01$

REMARKS FIELD FOR TEST CONDITIONS

- Study Design :
 - Concentration : without S9 mix (24 and 48 hr continuous treatment) :
0, 4.688, 9.375, 18.75, 37.5, 75 $\mu\text{g/mL}$
without S9 mix (6 hr short-term treatment) :
0, 4.688, 9.375, 18.75, 37.5, 75 $\mu\text{g/mL}$
with S9 mix (6 hr short-term treatment) :
0, 9.375, 18.75, 37.5, 75, 150 $\mu\text{g/mL}$
[Confirmative test]
without S9 mix (6 hr short-term treatment) :
0, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$
with S9 mix (6 hr short-term treatment) :
0, 100, 125, 150 $\mu\text{g/mL}$
- Plates/test : 4 (2:Chromosome analysis, 2:Cell Growth rate)
- Solvent : 1% solution of sodium carboxymethyl cellulose
- Positive controls : without S9 mix : 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine
with S9 mix : 3,4-Benzo[*a*]pyrene

RESULTS

- Cytotoxic concentration : Cytotoxicity was not observed.
- Genotoxic effects : positive in the 6 hr short-term treatment with S9 mix

REMARKS FIELD FOR RESULTS

After 6 hr short-term treatment, structural chromosomal aberrations excluding gaps were induced at 75 $\mu\text{g/mL}$ (6.0%) without S9 mix and at 150 $\mu\text{g/mL}$ (45.0%) with S9 mix, respectively.

In a confirmatory test, structural chromosomal aberrations excluding gaps were induced at 150 $\mu\text{g/mL}$ (34.5%) with S9 mix.

Test substance was observed in 150 $\mu\text{g/mL}$ at the end of culture.

D_{20} value : 0.089 mg/mL (with metabolic activation).

D_{20} value is concentration (mg/mL) of the test substance where 20% of metaphases show structural chromosome aberrations.

CONCLUSIONS

This chemical induced structural chromosomal aberrations in CHL/TU cells after short-term treatment with metabolic activation.

DATA QUALITY

- Reliabilities : valid without restriction

REFERENCES (Free Text)

Ishidate, M.Jr. and Odashima, S.(1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.

Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M.Jr.(1979). Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro. *Mutation Research*, 66, 277-290.