

1,2,3-トリメチルベンゼンの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：2466（115-033）

財 団 法 人  
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目 次

1. 要 約	1 頁
2. 試 験 題 目	2
3. 試 験 目 的	2
4. 試 験 番 号	2
9. 被 験 物 質	4
10. 試験材料および方法	5
11. 試 験 結 果	11
12. 考察および結論	14
13. 参考とした資料	15

Figures, Tables および Appendices

Figure 1	Dose-survival curves of 1, 2, 3-Trimethylbenzene [direct method]	17
Figure 2	Dose-survival curves of 1, 2, 3-Trimethylbenzene [activation method]	18
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by 1, 2, 3-Trimethylbenzene [direct method:24 hrs]	19
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by 1, 2, 3-Trimethylbenzene [direct method:48 hrs]	20
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by 1, 2, 3-Trimethylbenzene [activation method]	21
Figure 6	Incidence of structural aberrations induced by 1, 2, 3-Trimethylbenzene at the confirmatory test [activation method:+S9]	22

Table 1	Results of growth inhibition test on 1, 2, 3-Trimethylbenzene [direct method]	23
Table 2	Results of growth inhibition test on 1, 2, 3-Trimethylbenzene [activation method]	24
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1, 2, 3-Trimethylbenzene [direct method : 24 hrs]	25
Table 4	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1, 2, 3-Trimethylbenzene [direct method : 48 hrs]	26
Table 5	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1, 2, 3-Trimethylbenzene [activation method : +S9]	27
Table 6	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1, 2, 3-Trimethylbenzene [activation method : -S9]	28
Table 7	Results of the confirmative examination of 1, 2, 3-Trimethylbenzene [activation method : +S9]	29

1. 要 約：

本試験条件下において、1,2,3-トリメチルベンゼンの染色体異常誘発性は疑陽性と判定した。

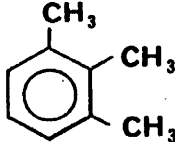
すなわち、1,2,3-トリメチルベンゼンの変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株(CHL)を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に、試験用量を設定した。直接法24時間処理で、90.0, 180 および 360  $\mu\text{g/ml}$ 、同48時間処理で、60.0, 120 および 240  $\mu\text{g/ml}$ 、代謝活性化法 +S9処理で 120, 240, 480 および 960  $\mu\text{g/ml}$ 、同-S9処理で 120, 240 および 480  $\mu\text{g/ml}$ のそれぞれ3～4用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、直接法ならびに代謝活性化法 -S9処理で染色体異常の誘発は認められなかったが、代謝活性化法 +S9処理において構造異常の僅かな増加が観察された。確認試験においてもほぼ同様の結果が得られたことから、僅かながらも染色体構造異常を誘発するものと考えられた。

また、直接法の陽性対照物質マイトマイシンC (MMC) および代謝活性化法の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。

2. 試験題目： 1, 2, 3-トリメチルベンゼンの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
3. 試験目的： 染色体異常誘発性を検討するため、環保業第237号、葉発第306号、62基局第303号（昭和62年3月31日）の「新規化学物質に係る試験の方法について」およびOECD化学品テストガイドライン473（1983年）に従って、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。  
なお、試験の実施は環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」およびOECDのGLP（1982年）の基準を満たすものとした。
4. 試験番号： 2466（115-033）

9. 被 験 物 質：

- |                            |   |
|----------------------------|---|
| 1) 被験物質名                   | 1, 2, 3-トリメチルベンゼン   |
| 2) ロット番号                   |   |
| 3) 純 度                     | 90.8%   |
| 4) 提 供 先                   |   |
| 5) 保 管 条 件                 | 遮光・室温   |
| 6) 一 般 名                   | Hemimellitene; Hemimellitol   |
| 7) 化 学 名                   | 1, 2, 3-Trimethylbenzene  |
| 8) 化 学 構 造                 |  |
| 9) 分 子 式                   | $C_9H_{12}$   |
| 10) 分 子 量                  | 120.20  |
| 11) CAS No.                | 5 2 6 - 7 3 - 8   |
| 12) 比 重                    | 0.8986  |
| 13) 物質の状態                  | 液体  |
| 14) 融 点                    | -25℃  |
| 15) 沸 点                    | 175~176℃  |
| 16) 被験物質保管および<br>残余被験物質の処理 | 試験終了後、約 2 gを安評センターに保管し、残りは焼却<br>処分した。   |

10. 試験材料および方法：

1) 試験細胞株

増殖速度，核型の安定性および既知変異原性物質に対する感受性，再現性等を考慮した結果，本染色体異常試験においてはチャイニーズ・ハムスターの肺から分離した線維芽細胞株（CHL細胞）を用いた。

上記の細胞株は昭和59年11月15日に国立衛生試験所から分与を受け，一部はジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；MERCCK社；独国，純度99.7%以上；Lot No. 027

I126178）を添加した後，液体窒素中に保存し，残りは3～5日ごとに継代した。

なお，染色体異常試験は継代数7の細胞を，確認試験には同14の細胞を用いた。

2) 培養液の調製

Eagle-MEM 粉末培地（LIFE TECHNOLOGIES 社，米国：L-グルタミン含有；Lot No. 76P8541 ならびに 73P1249）1袋を約 800 ml の精製水で溶解した後，2.2 g の炭酸水素ナトリウム（関東化学株式会社，東京都中央区；Lot No. 604E1491）を加えた。1 N塩酸を用いて pH を 7.2 に調整し，その後 1000 ml に定容した。メンブランフィルター（アクロキャップ™；0.2 μm；Gelman Sciences社，米国）を用いて加圧濾過除菌した後，あらかじめ非働化（56℃，30分）しておいた仔牛血清（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 39N4920 ならびに 45K0525）を最終濃度10%になるよう加えた。冷暗所に調製後の培養液を保存した。

3) 培養条件

CO<sub>2</sub>インキュベーター（FORMA 社，米国あるいは三洋電機特機株式会社，大阪府守口市）を用い，CO<sub>2</sub>濃度5%，37℃の条件で細胞を培養した。

4) S 9 m i x

キッコーマン株式会社（千葉県野田市）から S 9 m i x （Lot No. CAM-317 ならびに CAM-321）を購入し，使用時まで超低温フリーザー（MDF-390AT；三洋電機特機株式会社）に-80℃で凍結保存した。製造後6ヵ月以内の S 9 m i x を使用した。

S 9 のロット番号，誘導物質および誘導方法等は，添付書類によると以下のとおりである。

細胞増殖抑制試験		本試験および確認試験
a. ロット番号	RAA-317	RAA-321
b. 製造日	平成6年10月27日	平成7年1月20日
c. 使用動物	ラット：Sprague-Dawley系	同左
d. 週／週齢	雄／7週齢	同左
e. 体重	188～212g	189～230g
f. 誘導物質	Phenobarbital (PB) & 5,6-Benzoflavone (BF)	同左
g. 投与量	PB: 30 mg/kg 1回(1日目), 60 mg/kg 3回(2～4日目) および回数 BF: 80 mg/kg 1回(3日目)	同左
h. 投与方法	腹腔内投与	同左
i. 蛋白含量	26.9 mg/ml	27.7 mg/ml

また、S9mixの組成を以下に示した。

成分	S9mix 1ml中の量
S9	0.3 ml
MgCl <sub>2</sub>	5 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES緩衝液	4 μmol
精製水	残量

5) 被験物質溶液の調製

DMSO (和光純薬工業株式会社, Lot No. 309 K18572778 ならびに K20471078 404) に被験物質を溶解して調製原液とした。調製原液を順次所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。

6) 対照試験

a. 溶媒対照

使用溶媒のDMSO (Lot No. 309 K18572778 ならびに K20471078 404) を容量比 0.5% 添加して試験した。



b. 陽性対照（直接法の場合）

注射用蒸留水（株式会社大塚製薬工場，徳島県鳴門市；Lot No. K4E87）5 ml に溶解したマイトマイシンC（MMC：協和醗酵工業株式会社，東京都千代田区；Lot No. 968ADD）を生理食塩液（株式会社大塚製薬工場，Lot No. K4A92）を用いて希釈した後，24時間処理で 0.05  $\mu\text{g/ml}$ ，48時間処理で 0.025  $\mu\text{g/ml}$  の用量で試験した。

c. 陽性対照（代謝活性化法の場合）

注射用蒸留水（Lot No. K4E87）5 ml に溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社，大阪府大阪市；Lot No. 4016）を生理食塩液（Lot No. K4A92）を用いて希釈した後，12.5  $\mu\text{g/ml}$  の用量で試験した。

7) 細胞増殖抑制試験

a. 直接法

細胞培養用マルチプレート（12ウェル：住友ベークライト株式会社，東京都千代田区）のウェルに24時間処理の場合，培養液を用いて  $6.8 \times 10^3$  細胞/ml に調製した細胞浮遊液 1 ml を，48時間処理の場合， $3.4 \times 10^3$  細胞/ml に調製した細胞浮遊液 1 ml をそれぞれ播種した。培養3日目に溶媒（溶媒対照群）あるいは被験物質溶液を 5  $\mu\text{l}$  加え，さらに24あるいは48時間培養を続けた後に細胞生存率（溶媒対照に対する比）を求めた。

b. 代謝活性化法

培養液を用いて  $6.8 \times 10^3$  細胞/ml に調製した細胞浮遊液 1 ml を各ウェルに播種した。培養3日目に +S9処理の場合，培養液 500  $\mu\text{l}$  を除き S9 mix 100  $\mu\text{l}$ ，溶媒あるいは被験物質溶液 3  $\mu\text{l}$  を加え，-S9処理では培養液 400  $\mu\text{l}$  を除き，次いで溶媒あるいは被験物質溶液 3  $\mu\text{l}$  のみ加え（S9 mix は添加しない）6時間培養した。培養液を除去した後，生理食塩液を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 500  $\mu\text{l}$  を加え，さらに18時間培養を続けた後に細胞生存率を求めた。

c. 試験用量

細胞増殖抑制試験における試験用量を下表に示した。

各試験それぞれ10用量（公比 10/7）を設定した。あらかじめ予備的な試験を実施した結果を基に本用量を設定した。

試 験	用量数	試験用量 ( $\mu\text{g/ml}$ )
直接法 24時間処理	10	29.3 ~ 726
直接法 48時間処理	10	29.3 ~ 726
代謝活性化法+S9処理	10	29.3 ~ 726
代謝活性化法-S9処理	10	29.3 ~ 726

## 8) 50%細胞増殖抑制濃度の算出

7) で処理を行った各プレートから培養液を除き、生理食塩液を用いて細胞を1回洗浄した。組織固定用10%中性緩衝ホルマリン液（和光純薬工業株式会社，大阪府大阪市；Lot No. E1014）を加えて約10分間細胞を固定した後，0.1%クリスタル・バイオレット（関東化学株式会社，東京都中央区；Lot No. 112G0031）水溶液で10分間染色した。各プレートを水洗した後，十分乾燥させた。

各ウエルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を適量加え，5分間程度放置した後，分光光度計（UV-201；株式会社日立製作所，東京都千代田区）を用いて580 nmでの吸光度を測定した。各ウエルの吸光度から固定された細胞の色素量を溶媒対照の値に対する比（細胞生存率）として算出した。

## 9) 染色体異常試験

## a. 直接法

直径60 mmのプレート（住友ベークライト株式会社）に24時間処理の場合，培養液を用いて $8 \times 10^3$ 細胞/mlに調製した細胞浮遊液5 ml（ $4 \times 10^4$ 細胞）を，48時間処理の場合，同様に $4 \times 10^3$ 細胞/mlに調製した細胞浮遊液5 ml（ $2 \times 10^4$ 細胞）を播種した。培養3日目に溶媒または被験物質溶液25  $\mu$ lあるいは陽性対照物質溶液500  $\mu$ lを加え，24および48時間後に染色体標本を作製した。

## b. 代謝活性化法

培養液を用いて $8 \times 10^3$ 細胞/mlに調製した細胞浮遊液5 ml（ $4 \times 10^4$ 細胞）をプレートに播種した。培養3日目に培養液2.5 mlを除きS9 mix 500  $\mu$ l，溶媒または被験物質溶液15  $\mu$ lあるいは陽性対照物質溶液300  $\mu$ lを加え6時間培養した。また対照として，溶媒または被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液のみを加えた群（培養液2 mlを除去するのみでS9 mixは添加しない）についても同様に培養した。培養液を除去した後，生理食塩液を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液3 mlを加え，さらに18時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

## c. 試験用量

本試験における試験用量を下表に示した。

細胞増殖抑制試験結果を基に，以下の3～4用量（公比2）を設定した。

試 験	試 験 用 量 ( $\mu$ g/ml)				
	22.5	45.0	90.0	180	360
直接法24時間処理	22.5	45.0	<u>90.0</u>	<u>180</u>	<u>360</u>
直接法48時間処理	30.0	<u>60.0</u>	<u>120</u>	<u>240</u>	
代謝活性化法+S9処理	60.0	<u>120</u>	<u>240</u>	<u>480</u>	<u>960</u>
代謝活性化法-S9処理	30.0	60.0	<u>120</u>	<u>240</u>	<u>480</u>

・下線を付した用量群について顕微鏡観察を実施した。

また、確認試験での用量（公差150）を以下に示す。

代謝活性化法+S9処理	350,	500,	650,	800
-------------	------	------	------	-----

#### 10) 標本の作製

染色体標本作製の2時間前に、最終濃度で  $0.2 \mu\text{g/ml}$ 、すなわち培養液 1 ml 当たり  $20 \mu\text{l}$  のコルセミド溶液 (LIFE TECHNOLOGIES 社; Lot No. 14P7346) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。培養液の全量を遠心管に移した後、0.25%トリプシン溶液 (LIFE TECHNOLOGIES 社; Lot No. 16N8347 あるいは 21K1644) を用いてプレートより細胞を剥離させ、遠心管内の培養液に加えた。遠心分離 (1000 r.p.m., 5分間) により上清をのぞき、回収した細胞にあらかじめ  $37^\circ\text{C}$  に保温しておいた  $75 \text{ mM}$  塩化カリウム水溶液をおよそ 5 ml 加え、 $37^\circ\text{C}$  で15~20分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、 $4^\circ\text{C}$  に冷却した固定液 (メタノール3容: 酢酸1容) で細胞を固定した。固定液を3回新鮮なものに交換した後、細胞に固定液を適量加えて細胞浮遊液とし、脱脂洗浄済みのスライドガラス上に1~2滴ずつ滴下した。スライド標本を十分乾燥させ、 $1/100 \text{ M}$  ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.2: MERCK社; Lot No. 322 S 601868) を用いて希釈したギムザ溶液で12分程度染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

#### 11) 染色体の観察

各プレートあたり100個の分裂中期像を顕微鏡下 ( $\times 600$ 程度) で観察し、染色体の形態的变化、すなわちギャップ (gap)、染色分体切断 (ctb)、染色体切断 (csb)、染色分体交換 (cte)、染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した。ただし、ギャップはその不連続部分 (非染色性部位) が明確であり、当該染色体の分体幅と同程度以上、かつ本来の位置からずれていない場合にのみ計数した。構造異常の観察と同時に、倍数性細胞の出現数についても記録した。すべての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。

#### 12) プレート (ウエル) 数および識別

細胞増殖抑制試験で用量当たり2ウエル、染色体異常試験で用量当り2枚のプレートを使用した。油性ペンで番号等を明記することにより、各プレートを識別した。

13) 結果の解析

構造異常のギャップのみ保有する細胞を異常細胞に含めた場合(+gap)と、含めない場合(-gap)とに区別して出現頻度を算出し、最終評価に際しては +gap での出現頻度を基に判定した。また、同一細胞に2種以上の異常型が出現した場合、それぞれの型の出現数を1個と記録した。

各試験群の構造異常を有する細胞ならびに倍数性細胞の出現頻度を、下記に示す基準を用いて判断し、さらに再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。

なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

5%未満	-----	陰性(-)
5%以上~10%未満	----	疑陽性(±)
10%以上	-----	陽性(+)

11. 試験結果：

## 1) 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示した。

プロビット法を用いて算出した50%細胞増殖抑制濃度は以下のとおりであった。

直接法24時間処理	180 $\mu\text{g/ml}$
直接法48時間処理	130 $\mu\text{g/ml}$
代謝活性化法+S9処理	218 $\mu\text{g/ml}$
代謝活性化法-S9処理	213 $\mu\text{g/ml}$

ただし、122  $\mu\text{g/ml}$  以上の用量で被験物質溶液添加時に白濁が生じ、さらに 249  $\mu\text{g/ml}$  以上の用量で油滴状の析出が認められたが、培養液交換あるいは培養終了時には消失していた。

以上の結果を基に染色体異常試験の試験用量を設定した。直接法24時間処理で90.0～360  $\mu\text{g/ml}$ 、同48時間処理で 60.0～240  $\mu\text{g/ml}$ 、代謝活性化法 +S9処理で 120～960  $\mu\text{g/ml}$ 、同-S9処理で 120～480  $\mu\text{g/ml}$  のそれぞれ3～4用量について顕微鏡観察を実施した。

## 2) 染色体異常試験

## a. 直接法24時間処理

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 3 および Table 3 に、各プレートの分析結果を Appendix 1 に示した。

溶媒対照における染色体構造異常を有する細胞の出現頻度は、ギャップのみ保有の細胞を含めた場合(+gap)、含めない場合(-gap)それぞれ 1.5 および 1.0%であり倍数性細胞の出現頻度については 0.5%であった。

1, 2, 3-トリメチルベンゼンを 90.0, 180 および 360  $\mu\text{g/ml}$  で処理した場合の染色体構造異常出現頻度は、+gapで 4.5, 0.5 および 1.0%、-gapでも同程度であった。倍数性細胞の出現頻度は各群それぞれ 0.5, 0.0 および 0.0%であった。

なお、高用量の 360  $\mu\text{g/ml}$  では被験物質 1, 2, 3-トリメチルベンゼンの影響により生存細胞ならびに分裂中期像のいずれもが大きく減少していた。

一方、陽性対照物質(MMC)で処理した細胞は、ギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)あるいは染色分体交換(cte)などの異常が多数観察され、その出現頻度は+gapで 64.5%と顕著な増加を示した。

b. 直接法48時間処理

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 4 および Table 4 に、各プレートの分析結果を Appendix 2 に示した。

溶媒対照での構造異常出現頻度は +gap および -gap それぞれ 2.0 および 1.5% であり、倍数性細胞の出現頻度については 0.0% であった。

1, 2, 3-トリメチルベンゼン処理群での構造異常出現頻度は 60.0, 120 および 240  $\mu\text{g/ml}$  処理でそれぞれ 3.5, 2.0 および 2.5% (+gap), -gap でも同程度であった。倍数性細胞の出現頻度は各群 2.0% 以下であった。

なお、被験物質の影響により高用量の 240  $\mu\text{g/ml}$  処理群では生存細胞、分裂中期像とも大きく減少していた。

陽性対照では構造異常細胞が +gap で 46.5% 出現した。

c. 代謝活性化法 (+S9 処理)

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 5 および Table 5 に、各プレートの分析結果を Appendix 3 に示した。

溶媒対照での構造異常出現頻度は、+gap, -gap いずれも 1.5%, 倍数性細胞の出現頻度については 0.0% であった。

1, 2, 3-トリメチルベンゼンを 120, 240 および 480  $\mu\text{g/ml}$  で処理した場合の構造異常出現頻度は、+gap で 3.5, 6.5 および 5.5%, -gap で 3.5, 6.0 および 4.5% を示し、僅かに増加する傾向が認められた。倍数性細胞については、各群 3.0% 以下の出現頻度であった。

なお、最高用量の 960  $\mu\text{g/ml}$  処理においては細胞がほとんど観察されなかった。

また、代謝活性化を必要とする陽性対照物質 CP で処理した細胞では、多数の異常が出現し、+gap で 51.5% の細胞に構造異常が認められた。

d. 代謝活性化法 (-S9 処理)

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 5 および Table 6 に、各プレートの分析結果を Appendix 4 に示した。

溶媒対照での構造異常出現頻度は +gap で 2.5%, -gap で 2.0% であり、倍数性細胞の出現頻度も 1.0% であった。

1, 2, 3-トリメチルベンゼン処理群における構造異常出現頻度は 120, 240 および 480  $\mu\text{g/ml}$  処理でそれぞれ 3.0, 1.5 および 1.5% (+gap), -gap においてもほぼ同じ頻度であった。また、倍数性細胞はいずれの処理群とも 1.0% 以下であった。

なお、高用量の 480  $\mu\text{g/ml}$  処理では細胞も分裂中期像も顕著に減少していた。

一方、CP で処理した群では代謝活性化が行われないため、染色体異常の明確な誘発は認められなかった。

上述 a. ~ d. の各試験系の 90.0 あるいは 120  $\mu\text{g/ml}$  以上の用量において、被験物質溶液添加時僅かに白濁が生じ、さらに 240 あるいは 360  $\mu\text{g/ml}$  以上の用量で油滴状の析出が認められたが、培養液の交換もしくは培養終了時には消失していた。

3) 確認試験

代謝活性化法 +S9処理で観察された染色体構造異常の出現は、10%を超えることはなく、疑陽性（±）と判断されることから、350、500、650 および 800  $\mu\text{g/ml}$  の4用量を用いた確認試験を実施した。

試験結果を Figure 6 および Table 7 に示した。

各処理群の染色体異常出現頻度(+gap) は 350  $\mu\text{g/ml}$  で 1.5%、500  $\mu\text{g/ml}$  で 3.5%、650  $\mu\text{g/ml}$  で 4.5% および 800  $\mu\text{g/ml}$  で 5.5% であり、僅かながらも増加する傾向が確認された。

12. 考察および結論：

1, 2, 3-トリメチルベンゼンの変異原性，すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため，培養細胞（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果を基に直接法ならびに代謝活性化法において，細胞の増殖が抑制される濃度まで検討した。その結果，直接法および代謝活性化法 -S9処理のいずれの試験群においても，溶媒対照群に比較して染色体異常の明確な誘発は認められなかった。しかし，代謝活性化法 +S9処理での高用量群において，僅かではあるが染色体構造異常の誘発傾向が観察された。240 ならびに 480  $\mu\text{g}/\text{ml}$  処理群において疑陽性（±）と判定されたことから確認試験を実施した。同試験においても染色体構造異常が用量に依存して増加する傾向が確認され，本試験同様疑陽性結果が得られた。一方，溶媒対照群あるいは陽性対照群での染色体異常出現頻度はいずれも当センターの背景データの範囲内であり，本試験が有効であることを示していた。

以上の試験結果から，本試験条件下において1, 2, 3-トリメチルベンゼンの哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し，疑陽性と判定した。



13. 参考とした資料：

- Ishidate, M., Jr., and Odashima, S. : Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* -A screening for chemical carcinogens. *Mut. Res.*, 48 : 337~354, 1977.
- : 培養細胞を用いる染色体異常の検出法, 組織培養, 5 : 115~122, 1979.
- Evans, H. J. : Cytological methods of detecting chemical mutagens. In A. Hollander (Ed.), *Chemical Mutagens*, Vol.4 : 1~25, Plenum, New York, 1976.
- Matsuoka, A., *et al.* : Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mut. Res.*, 66 : 277~290, 1979.
- 石館 基 監修 : 染色体異常試験データ集, リアライズ, 東京, 1983.
- Evans, H. J. and O' Riordan, M. L. : Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests, *Mut. Res.*, 31 : 135~148, 1975.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 22, 269~275, 1972.

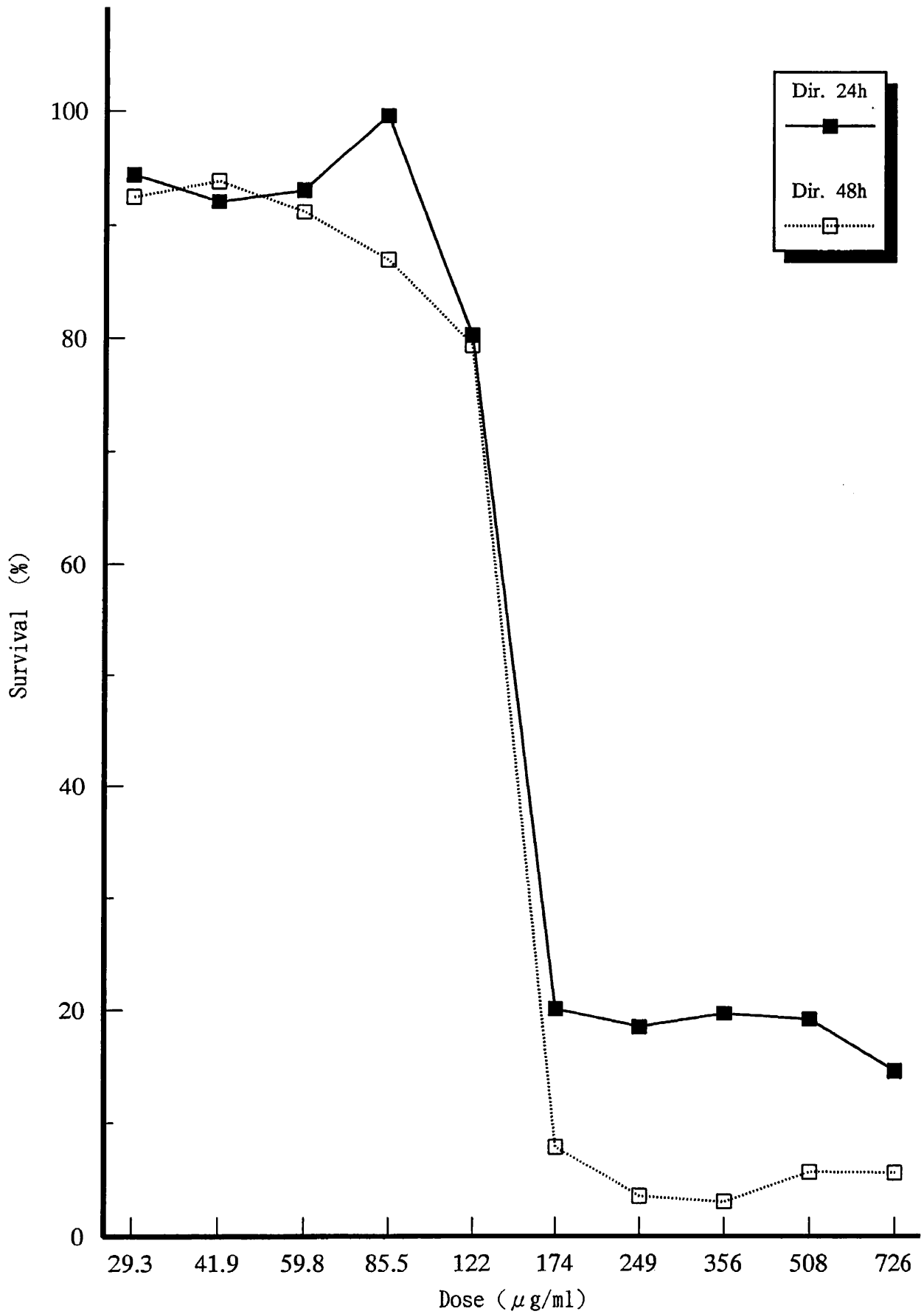


Figure 1. Dose-survival curves of 1,2,3-Trimethylbenzene [direct method]

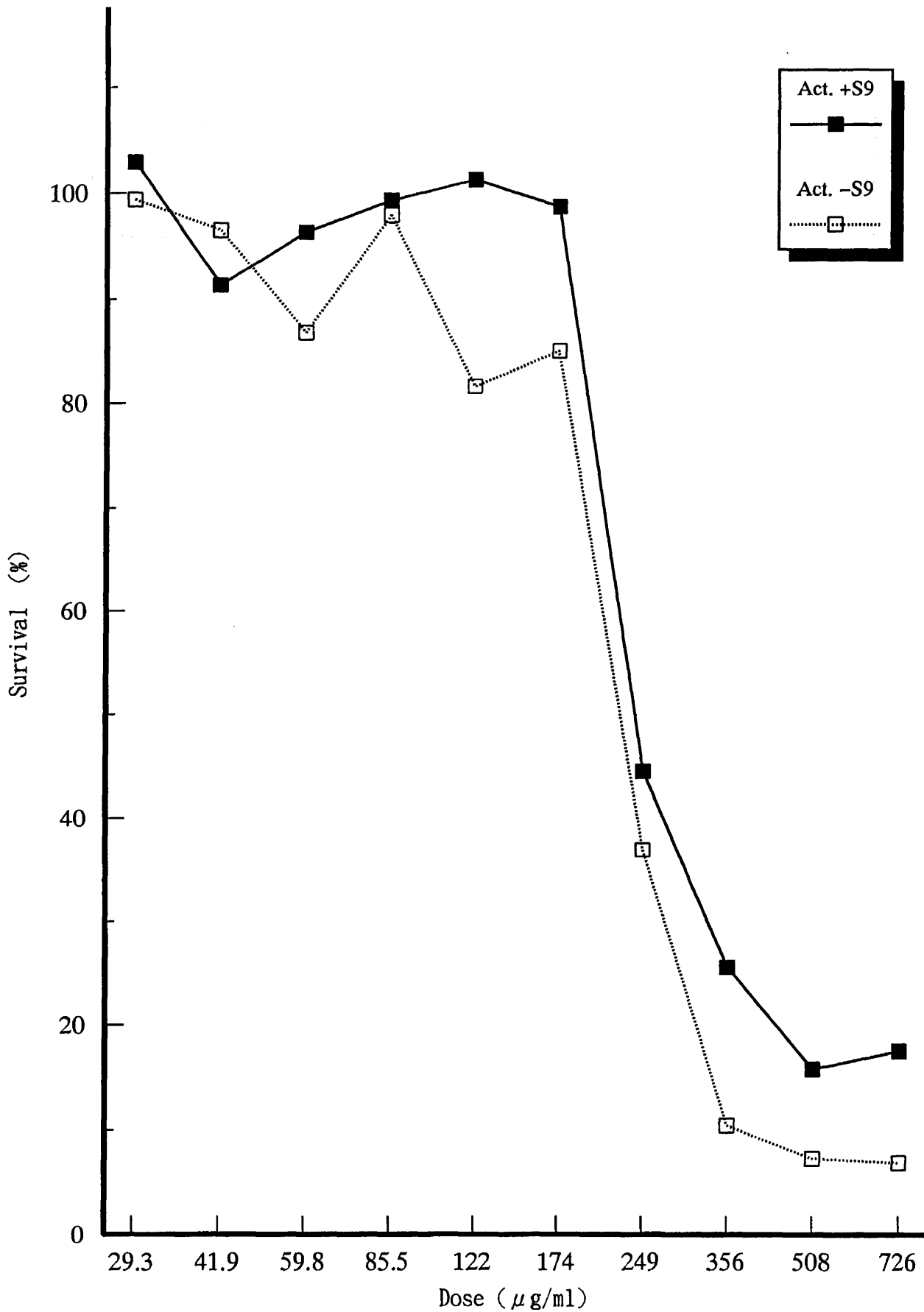


Figure 2. Dose-survival curves of 1,2,3-Trimethylbenzene [activation method]

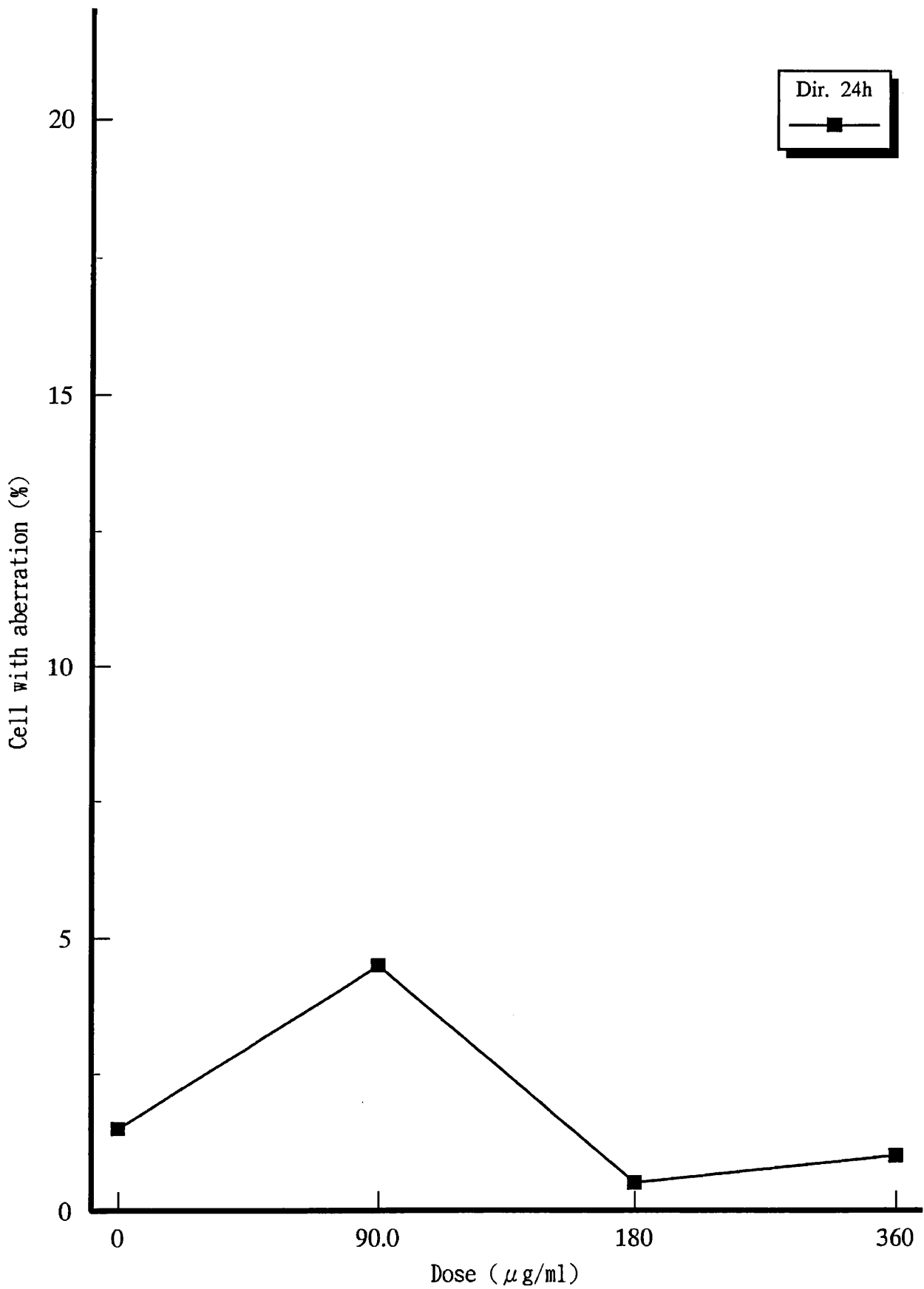


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by 1,2,3-Trimethylbenzene [direct method : 24hrs]

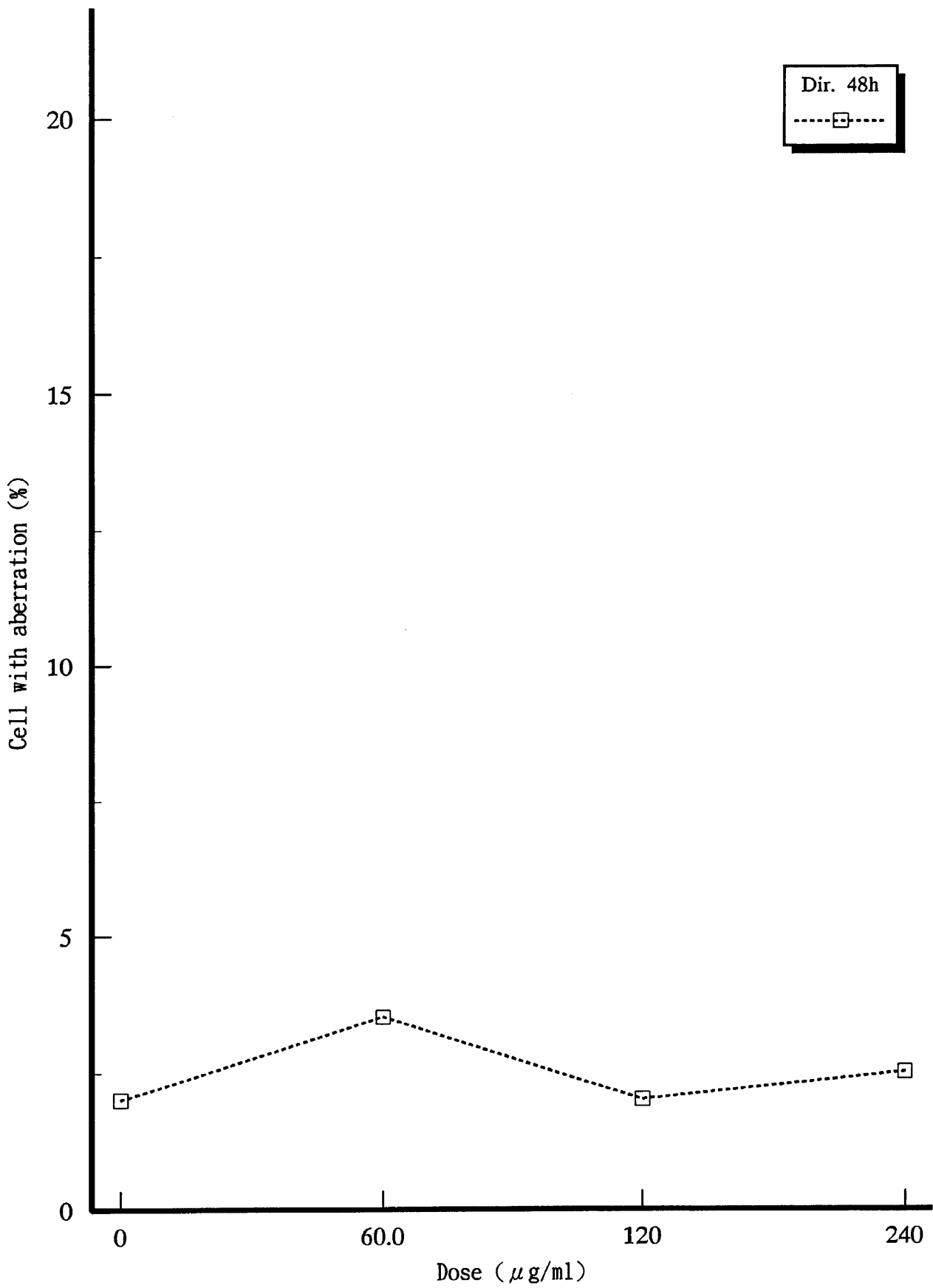


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by 1,2,3-Trimethylbenzene [direct method : 48hrs]

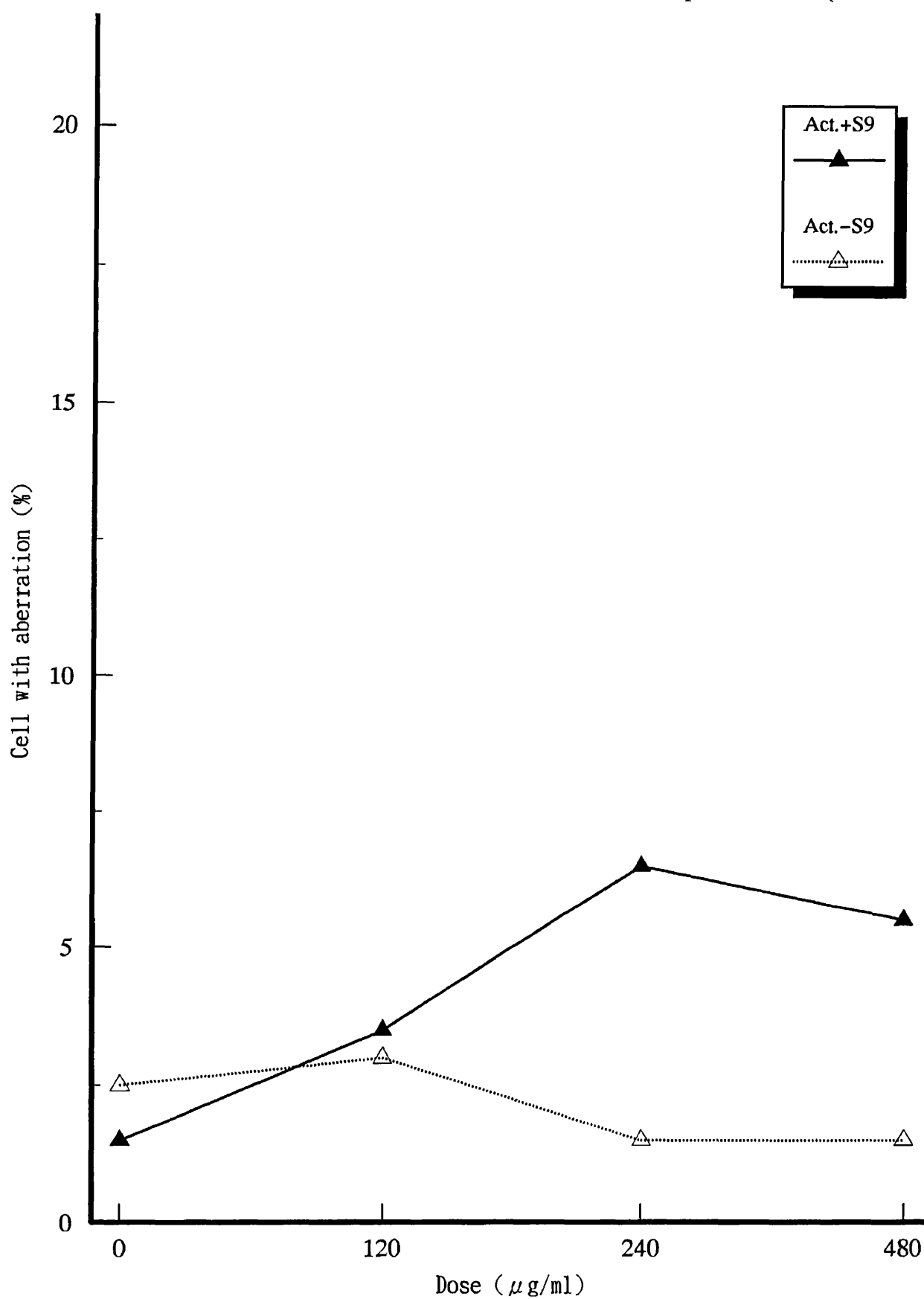


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by 1,2,3-Trimethylbenzene [activation method]

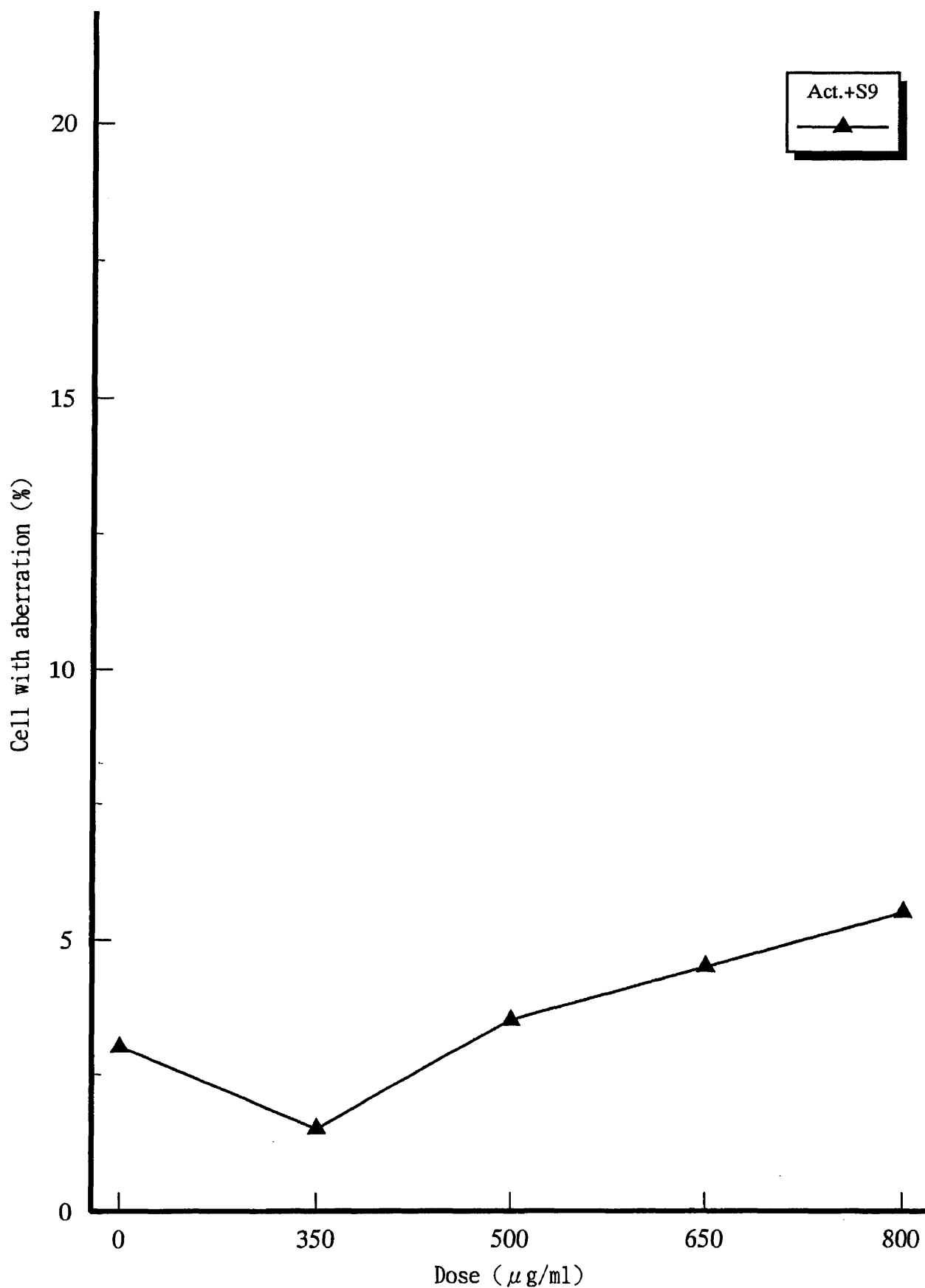


Figure 6. Incidence of structural aberrations induced by 1,2,3-Trimethylbenzene at the confirmatory test [activation method : +S9]

Table 1. Results of growth inhibition test on 1,2,3-Trimethylbenzene [direct method]

Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	24 h treatment		48 h treatment	
	Survival (%)	[ Mean ]	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Survival (%) [ Mean ]
0	100.0	[100.0 ]	0	100.0 [100.0 ]
29.3	88.8	[ 94.4 ]	29.3	87.6 [ 92.5 ]
41.9	89.0	[ 92.1 ]	41.9	94.2 [ 93.9 ]
59.8	91.8	[ 93.1 ]	59.8	85.6 [ 91.2 ]
85.5	98.6	[ 99.6 ]	85.5	91.5 [ 87.0 ]
122	79.3	[ 80.3 ]	122	85.7 [ 79.4 ]
174	20.8	[ 20.1 ]	174	8.2 [ 7.8 ]
249	16.8	[ 18.5 ]	249	3.2 [ 3.5 ]
356	20.6	[ 19.7 ]	356	3.7 [ 3.0 ]
508	22.6	[ 19.2 ]	508	7.7 [ 5.6 ]
726	17.9	[ 14.6 ]	726	5.7 [ 5.5 ]

50% Growth inhibition dose was as follows:

24 h treatment ----- 180 ( $\mu\text{g/ml}$ )48 h treatment ----- 130 ( $\mu\text{g/ml}$ )



Table 2. Results of growth inhibition test on 1,2,3-Trimethylbenzene [activation method]

Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	With S9 mix		Without S9 mix	
	Survival (%)	[ Mean ]	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Survival (%) [ Mean ]
0	100.0	[100.0 ]	0	100.0 [100.0 ]
29.3	92.7	[102.9 ]	29.3	103.4 [ 99.4 ]
41.9	95.0	[ 91.3 ]	41.9	94.5 [ 96.5 ]
59.8	83.0	[ 96.3 ]	59.8	89.7 [ 86.8 ]
85.5	88.3	[ 99.3 ]	85.5	95.6 [ 97.9 ]
122	98.2	[101.2 ]	122	86.7 [ 81.6 ]
174	93.3	[ 98.7 ]	174	88.4 [ 85.0 ]
249	42.0	[ 44.5 ]	249	40.4 [ 36.9 ]
356	23.6	[ 25.5 ]	356	12.5 [ 10.4 ]
508	14.5	[ 15.8 ]	508	3.7 [ 7.2 ]
726	19.8	[ 17.5 ]	726	5.2 [ 6.8 ]

50% Growth inhibition dose was as follows:

With S9 mix ----- 218 ( $\mu\text{g/ml}$ )  
 Without S9 mix ----- 213 ( $\mu\text{g/ml}$ )

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1,2,3-Trimethylbenzene [direct method : 24 hrs]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final Judge- ment
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO #	0	200	2	1	0	1	0	0	1.5 -	1.0 -	0.5 -	-
Test sub.	90.0	200	3	4	0	2	0	0	4.5 -	3.0 -	0.5 -	-
	180	200	0	0	0	1	0	0	0.5 -	0.5 -	0.0 -	-
	360	200	0	1	0	1	0	0	1.0 -	1.0 -	0.0 -	-
MMC #	0.05	200	19	63	0	100	0	1	64.5 +	63.5 +	0.0 -	+

#: Solvent control ##: Positive control (mitomycin C)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange oth: Others

Table 4. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1,2,3-Trimethylbenzene [direct method : 48 hrs]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge- ment		
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth						
DMSO #	0	200	1	2	0	1	0	0	2.0	-	1.5	-	0.0	-
Test sub.	60.0	200	1	2	0	4	0	0	3.5	-	3.0	-	0.5	-
	120	200	1	2	0	1	0	0	2.0	-	1.5	-	0.0	-
	240	200	0	2	0	3	0	0	2.5	-	2.5	-	2.0	-
MMC #	0.025	200	14	38	0	76	2	0	46.5	+	45.0	+	0.0	+

#: Solvent control ##: Positive control (mitomycin C)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange oth: Others

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1,2,3-Trimethylbenzene [activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu$ g/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge- ment
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
DMSO #	0	200	0	1	0	2	0	0	1.5 -	1.5 -	0.0 -	-
Test sub.	120	200	0	5	0	4	0	0	3.5 -	3.5 -	2.0 -	-
	240	200	3	7	0	12	0	0	6.5 $\pm$	6.0 $\pm$	1.0 -	$\pm$
	480	200	2	4	0	6	1	0	5.5 $\pm$	4.5 -	3.0 -	$\pm$
	960	Toxic										
CP ##	12.5	200	5	40	0	89	1	0	51.5 +	51.5 +	0.0 -	+

#: Solvent control ##: Positive control (cyclophosphamide)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange oth: Others

Table 6. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 1,2,3-Trimethylbenzene [activation method : -S9]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Number of cells	No. of cells with structural aberrations							Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge- ment
			gap	ctb	ctb	cte	cse	oth	oth				
DMSO #	0	200	1	2	0	1	1	0	2.5	2.0	1.0	-	
Test sub.	120	200	1	4	0	1	0	0	3.0	2.5	1.0	-	
	240	200	1	2	0	0	0	0	1.5	1.0	0.0	-	
	480	200	2	2	0	0	0	0	1.5	1.0	1.0	-	
CP ##	12.5	200	1	0	0	2	0	0	1.5	1.0	1.0	-	

#: Solvent control ##: Positive control (cyclophosphamide)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange oth: Others

Table 7. Results of the confirmative examination of 1,2,3-Trimethylbenzene [activation method : +S9]

Compound	Dose ( $\mu$ g/ml)	Number of cells	Number of cells with aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-esp) (%)	Polyploid cells (%)	Final Judge- ment	
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth					pol
DMSO #	0	100	1	0	0	2	0	0	0	3.0 -	2.5 -	0.0 -	-
		100	0	0	1	1	0	1	0				
Test sub.	350	100	0	0	0	1	0	0	1	1.5 -	1.5 -	1.0 -	-
		100	1	1	0	2	0	0	1				
	500	100	0	1	0	4	0	0	0	3.5 -	3.5 -	0.5 -	-
		100	0	0	0	2	1	0	1				
	650	100	1	0	0	0	1	0	0	4.5 -	3.5 -	0.5 -	-
		100	1	2	0	5	0	0	1				
	800	100	1	5	0	3	0	0	1	5.5 $\pm$	5.0 $\pm$	1.5 -	$\pm$
		100	1	2	0	4	0	0	2				
CP ##	12.5	100	2	20	0	52	0	0	0	59.0 +	58.5 +	0.0 -	+
		100	8	14	0	53	0	0	0				

#: Solvent control    #: Positive control (cyclophosphamide)  
 ctb: Chromatid break    csb: Chromosome break    cte: Chromatid exchange    cse: Chromosome exchange  
 oth: Others    pol: Polyploid cell