

厚生省生活衛生局 殿

## 試 験 報 告 書

4-エチル-1,1'-ビフェニルのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号: 7L639)

1999年 1月 6日

株式会社三菱化学安全科学研究所

## 目 次

要約	7
材料および方法	8
1. 試験物質	8
2. 細胞	8
3. 培地	9
4. S9 mix	9
5. 試験物質調製液	10
6. 細胞増殖抑制試験	10
7. 染色体異常試験	11
結果	14
考察および結論	14
参考文献	14
表	15
図	21

## 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、4-エチル-1,1'-ビフェニルの *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果、50%細胞増殖抑制濃度は、連続処理法の24, 48時間処理で78, 66  $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法のS9 mix共存下、非共存下で97, 91  $\mu\text{g/ml}$ であった。しかし、すべての処理条件の高濃度側(5000, 2500  $\mu\text{g/ml}$ )においても、生存細胞が認められた。従って、染色体異常試験は、全ての処理条件において5000  $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、その1/2, 1/4の濃度を設定した。さらに50%細胞増殖抑制濃度の値から、連続処理法の24時間処理および短時間処理法では150  $\mu\text{g/ml}$ 、連続処理法の48時間処理では75  $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、各々その1/2, 1/4, 1/8の濃度を設定した。その結果、染色体構造異常細胞および数的異常細胞の誘発は全ての処理条件で観察されなかった。

以上の結果より、本試験条件下における4-エチル-1,1'-ビフェニルのCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と結論した。

## 材料および方法

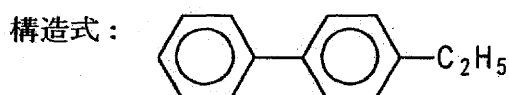
### 1. 試験物質

#### 1.1 被験物質

から提供された 4-エチル-1,1'-ビフェニル (CAS 番号 : 5707-44-8, ロット番号 : 純度 : 97.998 %) は使用時まで冷暗所に保存した。

被験物質は下記の構造式および分子量を有する白色固体である。

被験物質の安定性は、被験物質供給者より安定性を保証する資料を入手し、確認した。



分子量 : 182.27

不純物 : 9-メチルフルオレン 0.64 %

#### 1.2 対照物質

##### 1) 陰性対照物質

アセトン (国産化学株, ロット番号 : A605G1)

##### 2) 陽性対照物質

###### (1) 連続処理法

マイトマイシン C (MMC と略す. 協和醗酵工業株, ロット番号 : 139AFK, 含量 104 %)

###### (2) 短時間処理法

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

### 2. 細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/IU を使用した。細胞は大日本製薬株より 1996 年 11 月 6 日に購入し、細胞懸濁液に対し 10 % の割合でジメチルスルホキシド (DMSO と略す) を添加したものを 1 ml に小分けして、液体窒素中で凍結保存した。試験には、これを融解して培養し、その後の継代数が 5 代以内のものを使用し

た。細胞の培養には、プラスチックシャーレ（直径 6 cm または 10 cm ; Becton Dickinson and Company）を用い、炭酸ガス細胞培養装置内（NAPCO 社, 7300 型, 炭酸ガス 5 %, 温度 37 °C, 加湿）で培養した。

### 3. 培地

#### 3.1 イーグル最少培地

イーグル最少培地（MEM と略す。イーグル MEM 培地「ニッスイ」①, 日本製薬 ㈱）を添付の処方に従い調製し、オートクレーブ滅菌（121 °C, 15 分間）を行った。この 1 l に、別に滅菌処理した 2.92 % L-グルタミン水溶液 10 ml と 10 % 炭酸水素ナトリウム水溶液 12.7 ml を添加した。

#### 3.2 培養液

上記の MEM 900 ml に対して、非働化（56 °C, 30 分間加熱処理）した仔牛血清（GIBCO BRL, ロット番号 : 39K0464）を 100 ml 添加した。

### 4. S9 mix

#### 4.1 S9

フェノバルビタール（1 日目 30 mg/kg, 2 日目以降 60 mg/kg を 3 日間 1 日 1 回腹腔内投与）と 5, 6-ベンゾフラボン（3 日目に 80 mg/kg を 1 回腹腔内投与）で酵素誘導した SD 系雄ラット肝由来 S9（キッコーマン ㈱, ロット番号 : RAA-374, 1997 年 12 月 4 日製造）を購入した。購入した S9 は使用時まで -80 °C 以下で保存した。

#### 4.2 S9 mix

S9 mix 10 ml あたり以下の組成で用時調製し、使用時まで氷中に保存した。

D-グルコース 6-リン酸	14.1 mg
$\beta$ -NADP <sup>+</sup>	33.5 mg
(以上, 用時秤量)	
20 mM HEPES (pH 7.2)	2 ml
50 mM 塩化マグネシウム六水和物	1 ml
330 mM 塩化カリウム	1 ml
精製水	3 ml
(以上, 予め滅菌調製した溶液を添加)	
S9	3 ml

## 5. 試験物質調製液

### 5.1 被験物質溶液

溶媒検討の結果、本被験物質は、局方生理食塩液には 50 mg/ml で不溶であった。DMSO には 900 mg/ml が調製限界であった。アセトンには 500 mg/ml で溶解した。しかしながら、培養液に添加可能な溶媒の上限は、原則として、DMSO では培養液の 0.5 %、アセトンでは培養液の 1 % と規定している。上記の場合、培養液中の最終濃度は、DMSO では 4500  $\mu\text{g/ml}$ 、アセトンは 5000  $\mu\text{g/ml}$  となるため、より高濃度における評価が可能であるアセトンを溶媒とした。

被験物質をアセトンで所定濃度に用時溶解した。これを同じ溶媒を用いて希釈し、所定濃度の被験物質溶液を調製した。

### 5.2 陽性対照溶液

MMC は、局方生理食塩液（株大塚製薬工場、ロット番号：K7F75）で 3  $\mu\text{g/ml}$  に用時調製した。BP は、DMSO（関東化学株、ロット番号：810S1814）で 4 mg/ml に溶解し、凍結保存したものを室温で融解し使用した。

## 6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の処理濃度を決定するために、細胞増殖抑制試験を実施した。

### 6.1 被験物質濃度

細胞増殖抑制試験に先立ち、連続処理法の 24, 48 時間処理および短時間処理法の S9 mix 共存下で、5000, 500, 50  $\mu\text{g/ml}$  の 3 濃度で予備試験を実施した。この試験では、1 濃度あたり 1 枚のシャーレを用い、処理 24 または 48 時間後に位相差倒立顕微鏡により細胞の状態を肉眼的に観察した。

その結果、陰性対照群を 100 % としたときの細胞生存率は、連続処理法の 24 時間では 5000  $\mu\text{g/ml}$  で 70 %、500  $\mu\text{g/ml}$  で 0 %、50  $\mu\text{g/ml}$  で 80 %、48 時間処理では 5000  $\mu\text{g/ml}$  で 40 %、500  $\mu\text{g/ml}$  で 0 %、50  $\mu\text{g/ml}$  で 70 %、短時間処理法の S9 mix 共存下では 5000  $\mu\text{g/ml}$  で 80 %、500  $\mu\text{g/ml}$  で 5 %、50  $\mu\text{g/ml}$  で 40 % であった。

以上の結果から、細胞増殖抑制試験は下記の濃度を設定した。

連続処理法 24 時間処理, 48 時間処理ならびに短時間処理法 S9 mix 非共存下 :

5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5  $\mu\text{g/ml}$

短時間処理法 S9 mix 共存下 :

5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1, 19.5, 9.8  $\mu\text{g/ml}$

## 6.2 細胞処理

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

シャーレから培養液を除去した後, 連続処理法では, 被験物質溶液 0.05 ml, 培養液 5 ml を添加し, 24 時間または 48 時間細胞を処理した。

短時間処理法の S9 mix 共存下では, 被験物質溶液 0.03 ml, S9 mix 0.5 ml, 培養液 2.5 ml で, また, S9 mix 非共存下では, 被験物質溶液 0.03 ml, 培養液 3 ml で 6 時間細胞を処理した後, MEM で 3 回洗浄し, 新しい培養液 5 ml でさらに 18 時間細胞を処理した。

陰性対照として, 溶媒も各条件で同様に処理した。

各濃度あたり 2 枚のシャーレを用いた。

## 6.3 細胞増殖率の測定

細胞表面を  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  フリーのリン酸緩衝液 (PBS(-)) と略す。ダルベッコ PBS 「ニッスイ」, 日水製薬(株) で一回洗浄後, 0.25 % トリプシン(溶媒: PBS(-)) 処理後, 培養液を加え, ピペッティングにより細胞を剥離し, 血球計算盤で細胞を数えた。

## 6.4 50 % 細胞増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) の算出

連続処理法および短時間処理法のそれぞれについて, 陰性対照値を 100 % として生存曲線を作成し, 被験物質の 50 % 細胞増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。なお, IC<sub>50</sub> は, プロビット法により算出した。

## 7. 染色体異常試験

### 7.1 試験物質濃度

細胞増殖抑制試験の結果は図 1 ~ 2 に示すごとく, IC<sub>50</sub> は連続処理法の 24, 48 時間処理で 78, 66  $\mu\text{g/ml}$ , 短時間処理法の S9 mix 共存下, 非共存下で 97, 91  $\mu\text{g/ml}$  あった。しかし, すべての処理条件の高濃度側 (5000, 2500  $\mu\text{g/ml}$ ) においても, 生存細胞が認められた。

この結果より, 全ての処理条件において 5000  $\mu\text{g/ml}$  を最高濃度とし, その 1/2, 1/4 の濃度を設定した。同時に IC<sub>50</sub> 値から, 連続処理法の 24 時間処理および短時間処理法では 150  $\mu\text{g/ml}$ , 連続処理法の 48 時間処理では 75  $\mu\text{g/ml}$  を最高濃度とし, その 1/2, 1/4, 1/8 の濃度をそれぞれ設定した。

陽性対照である MMC, BP の濃度はそれぞれ, 染色体異常誘発性が知られている

陽性対照である MMC, BP の濃度はそれぞれ, 染色体異常誘発性が知られている 0.03, 20  $\mu\text{g/ml}$  とした.

## 7.2 細胞処理

細胞を 6.2 と同様に処理した.

陽性対照については, 連続処理法では, 培養液 5 ml, MMC 溶液 0.05 ml で, 短時間処理法の S9 mix 共存下では培養液 2.5 ml, S9 mix 0.5ml, BP 溶液 0.015 ml で, S9 mix 非共存下では培養液 3 ml, BP 溶液 0.015 ml で同様に細胞を処理した.

## 7.3 標本作製

処理終了の 2 時間前に, コルセミドを最終濃度が 0.1  $\mu\text{g/ml}$  となるように各シャーレに加え, 分裂中期の細胞を蓄積させた. 処理終了後, 細胞表面を PBS (-) で 1 回洗浄し, 0.25 % トリプシン処理により細胞を剥離した後, 遠心分離 (1000 rpm, 5 分間; 以下同じ) により細胞を集めた. 上清を除去し, これに 0.075 M 塩化カリウム溶液 4 ml を加えて低張処理 (37  $^{\circ}\text{C}$ , 15 分) を行った. 次に, 冷却したメタノール・酢酸 (3:1) 混合液 4 ml を加え細胞を固定した後, 遠心分離し, 上清を除去した. さらに, 同固定液 4 ml を加え, 同様の操作を 2~3 回繰り返した. 固定終了後, 少量の固定液で細胞を懸濁し, 濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラス上の 2 箇所へ滴下し, 乾燥した. これを 3 % ギムザ溶液で 20 分間染色し, 水洗, 乾燥後, 封入して観察標本とした. 各シャーレにつき 2 枚の標本作製した.

## 7.4 観 察

### 1) 予備鏡検

標本作製後, 試験の適否確認のため予備鏡検を行った.

予備鏡検において, 50 個以上の分裂中期細胞が観察されなかった標本は, 観察の対象から除外し, 結果表に "TOX" と記載した.

陰性対照および陽性対照については, 各々構造異常細胞の出現状態が適切であることを確認した.

### 2) 分裂指数/分裂活性

予備鏡検時に, シャーレ 1 枚につき 1000 個, 1 濃度 2000 個の細胞中の分裂中期細胞を数え, 分裂指数を求めた. また, これから陰性対照と各処理群の分裂指数の比 (分裂活性) を算出した.



陰性対照群，陽性対照群および被験物質処理群について，構造異常および数的異常を盲検法で観察した。

### (1) 構造異常

シャーレ1枚につき100個，1濃度200個の細胞を調べた。

染色体がよく拡がった分裂中期細胞を観察し，構造異常細胞を数えた。ただし，構造異常がなく，染色体数が $25 \pm 2$ 本でない細胞は除外した。異常の分類は以下のとおりとした<sup>1)</sup>。

ギャップ	(染色分体型および染色体型を含む；gapと略す)
染色分体型切断	(ctbと略す)
染色分体型交換	(cteと略す)
染色体型切断	(csbと略す)
染色体型交換	(二動原体，環状染色体など；cseと略す)
断片化	(frgと略す)

ギャップは，染色分体に見られる非染色部分が染色分体の軸上にあり，その幅が染色分体の幅以上で著しく離れておらず，非染色部分の形状が明確なものとし，切断とは区別した。

### (2) 数的異常

シャーレ1枚につき100個，1濃度200個の分裂中期細胞を調べ，核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた。

## 7.5 試験結果の判定基準

構造異常を1個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし，ギャップのみの異常をもつ細胞を除いた場合(-gap)と含めた場合(+gap)で集計した。

被験物質の染色体異常誘発性の判定は，+gapの構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に5%未満を陰性(-)，いずれか一方または両方が5%以上10%未満を疑陽性(±)，いずれか一方または両方が10%以上を陽性(+)とした。

## 7.6 結果のまとめ

染色体構造異常をもつ細胞および倍数体の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度(%)を表示するとともに，用量依存性について図示した。

## 結 果

結果を表 1～6 および図 3～10 に示す。

短時間処理法および連続処理法のいずれの処理条件においても、被験物質による構造異常および数的異常細胞の出現頻度は 5%未満であった。

なお、陽性対照による染色体構造異常細胞の出現頻度は著しく増加した。

## 考 察 お よ び 結 論

4-エチル-1,1'-ビフェニルの染色体異常誘発性を検討するため、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。その結果、染色体構造異常および数的異常細胞とも出現頻度は、連続処理法および短時間処理法のいずれも 5%未満であった。

一方、陰性対照および陽性対照では染色体構造異常を有する細胞の出現頻度は期待通りの値を示し、本試験が技術的に成立していることが示された。

従って、4-エチル-1,1'-ビフェニルの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と結論した。

なお、類似化合物の染色体異常誘発性に関する情報は添付資料 1 にまとめた。

## 参 考 文 献

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

表1 染色体異常試験結果 (連続処理法 24時間処理)

被験物質名: 4-ethyl-1,1'-bifluorene

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	数的異常細胞の出現数と出現頻度 (%)	判2) 定	染色体構造異常細胞 1) の出現数と出現頻度 (%)								判2) 定		
						ギャップ	染色体分体型			染色体型		frg	合計			
							gap	ctb	cte	csb	cse		-gap		+gap	
陰性対照 [アセトン]	24	0	100	0	-	0	0	0	1	0	0	1	1	-		
			100	1		0	0	1	1	0	0	2	2			
			200	1 (0.5)		0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)			
被験物質	24	18.8	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
			100	1		0	0	0	0	0	0	0	0			
			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)	0 (0.0)			
			100	1		0	0	0	0	0	0	0	0			
			100	1		0	0	0	1	0	0	1	1			
			200	2 (1.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)			
		75	100	1	-	0	0	1	0	0	0	1	1	-		
			100	1		0	0	0	0	0	1	1				
			200	2 (1.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)			
		150	100	1	-	0	0	1	0	0	0	1	1	-		
			TOX													
			100	1 (1.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.0)		1 (1.0)	
		1250 ※◇	TOX		-											
			100	0		0	1	0	0	0	0	0	1	1	-	
			100	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.0)	1 (1.0)		
2500 ※◇	TOX															
	TOX		-													
	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	-			
100	0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)					
5000 ※#	TOX		-													
	100	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	-			
	100	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)				
陽性対照 [MMC]	24	0.03	100	0	-	0	10	8	0	0	0	18		18	+	
			100	0		2	10	15	0	0	0	25	26			
			200	0 (0.0)		2 (1.0)	20 (10.0)	23 (11.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	43 (21.5)	44 (22.0)			

1) gap: 染色体分体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色体分体型切断, cte: 染色体分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, frg: 断片化

2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-), 5%以上10%未満を疑陽性(±), 10%以上を陽性(+)とした。

MMC: マイトマイシンC

※: 被験物質処理開始時, 培養液中に浮遊した物質が認められた。

◇: 被験物質処理開始時, 培養液表面に分離した物質が認められた。

#: 被験物質処理開始時, 培養液表面に塊状に浮遊した物質が認められた。

表2 染色体異常試験結果（連続処理法 48時間処理）

被験物質名： 4-エチル-1,1'-ビフェニル

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	数的異常細胞の出現数と出現頻度 (%)	判2) 定	染色体構造異常細胞 1) の出現数と出現頻度 (%)								判2) 定		
						ギャップ gap	染色分体型		染色体型		frg	合計				
							ctb	cte	csb	cse		-gap	+gap			
陰性対照 [アセトン]	48	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
			100	0		0	1	0	0	0	1	1				
			200	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)				
被験物質	48	9.98	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-		
			100	1		0	0	1	0	0	1	1				
			200	1 (0.5)		0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)				
		18.8	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	0		1	0	0	0	0	0	1				
			200	0 (0.0)		1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)				
		37.5	100	1	-	1	1	0	0	0	0	1	2	-		
			100	0		0	0	1	0	0	1	1				
			200	1 (0.5)		1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	3 (1.5)				
		75	TOX										+			
		1250 ※◇	TOX													
		2500 ※◇	TOX													
		5000 ※#	TOX													
		陽性対照 [MMC]	48	0.03	100	0	-	2	12	23	0	0	0	32	33	+
					100	1		1	21	17	2	0	0	34	35	
					200	1 (0.5)		3 (1.5)	33 (16.5)	40 (20.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	66 (33.0)	68 (34.0)	

1) gap: 染色分体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, frg: 断片化

2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-), 5%以上10%未満を疑陽性(±), 10%以上を陽性(+)とした.

MMC: マイトマイシンC

※: 被験物質処理開始時, 培養液中に浮遊した物質が認められた.

◇: 被験物質処理開始時, 培養液表面に分離した物質が認められた.

#: 被験物質処理開始時, 培養液表面に塊状に浮遊した物質が認められた.

表3 染色体異常試験結果(短時間処理法 S9 mix共存下)

被験物質名: 4-エチル-1,1'-ビフェニル

処理	S9 mixの有無	処理濃度(μg/ml)	観察細胞数	数的異常細胞の出現数と出現頻度(%)	判2)定	染色体構造異常細胞1)の出現数と出現頻度(%)							判2)定		
						ギャップ	染色分体型		染色体型		frg	合計			
							gap	ctb	cte	csb		cse		-gap	+gap
陰性対照 [アセトン]	+	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0		
			100	0		0	0	0	1	0	1	1			
			200	0 (< 0.0)		0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	1 (< 0.5)	0 (< 0.0)	1 (< 0.5)	1 (< 0.5)			
被 験 物 質	+	18.8	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0		
			100	0		0	0	0	0	0	0	0			
			200	0 (< 0.0)		0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)			
		37.5	100	2	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	1		0	0	0	0	0	0	0			
			200	3 (< 1.5)		0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)			
		75	100	3	-	0	1	1	0	0	0	2	2	2	
			100	0		0	0	0	0	0	0	0			
			200	3 (< 1.5)		0 (< 0.0)	1 (< 0.5)	1 (< 0.5)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	2 (< 1.0)	2 (< 1.0)		
		150	TOX												
			1250 ※◇	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				100	0		0	0	0	0	0	0	0		
				200	0 (< 0.0)		0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)		
			2500 ※◇	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				100	0		0	0	0	0	0	0			
				200	0 (< 0.0)		0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)		
			5000 ※#	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				100	0		0	3	0	0	3	3			
200	0 (< 0.0)			0 (< 0.0)	3 (< 1.5)		0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	3 (< 1.5)	3 (< 1.5)				
陽性対照 [BP]	+		20	100	1	-	0	13	81	0	0	0	83	83	
				100	0		0	11	76	0	0	76	76		
				200	1 (< 0.5)		0 (< 0.0)	24 (< 12.0)	157 (< 78.5)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	0 (< 0.0)	159 (< 79.5)	159 (< 79.5)	

1) gap: 染色分体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色分体型切断, cte: 染色分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, frg: 断片化

2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-), 5%以上10%未満を疑陽性(±), 10%以上を陽性(+)とした。

S9の用量(5%), 被験物質処理時間(6h), 被験物質処理後の細胞回復時間(18h)

BP: ベンゾ[a]ピレン

※: 被験物質処理開始時, 培養液中に浮遊した物質が認められた。

◇: 被験物質処理開始時, 培養液表面に分離した物質が認められた。

#: 被験物質処理開始時, 培養液表面に塊状に浮遊した物質が認められた。

表4 染色体異常試験結果（短時間処理法 S9 mix非共存下）

被験物質名： 4-エチル-1,1'-ビフェニル

処理	S9 mix の有無	処理濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	観察 細胞数	数的異常細胞の出現 数と出現頻度 (%)	判2) 定	染色体構造異常細胞 1) の出現数と出現頻度 (%)								判2) 定	
						ギャップ gap	染色体分体型		染色体型		frg	合計			
							ctb	cte	csb	cse		-gap	+gap		
陰性対照 [アセトン]	-	0	100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-	
			100	1		0	0	0	2	0	0	2	2		
			200	1 (0.5)		0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (1.5)		3 (1.5)
被 験 物 質	-	18.8	100	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	-	
			100	0		2	0	0	0	0	0	0	2		
			200	0 (0.0)		2 (1.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)		3 (1.5)
		37.5	100	1	-	0	0	0	2	0	0	0	2	2	-
			100	0		0	3	0	0	0	0	3	3		
			200	1 (0.5)		0 (0.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (2.5)	5 (2.5)		
		75	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			TOX												
		100	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
		150	TOX												
		1250 *◇	TOX												
		2500 *◇	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
			100	1		0	0	0	0	0	0	0	0		
			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)	0 (0.0)	0 (0.0)	
		5000 *#	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
100	0		0	0		0	1	0	0	1	1				
200	0 (0.0)		0 (0.0)	0 (0.0)		0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)				
陽性対照 [BP]	-	20	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
			100	1		0	0	0	0	0	0	0			
			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)	0 (0.0)		

1) gap: 染色体分体型または染色体型のギャップ, ctb: 染色体分体型切断, cte: 染色体分体型交換, csb: 染色体型切断, cse: 染色体型交換, frg: 断片化

2) 判定は, +gapの構造異常細胞または数的異常細胞の出現頻度が5%未満を陰性(-), 5%以上10%未満を疑陽性(±), 10%以上を陽性(+)とした。

S9の用量(5%), 被験物質処理時間(6h), 被験物質処理後の細胞回復時間(18h)

BP: ベンゾ[a]ピレン

\*: 被験物質処理開始時, 培養液中に浮遊した物質が認められた。

◇: 被験物質処理開始時, 培養液表面に分離した物質が認められた。

#: 被験物質処理開始時, 培養液表面に塊状に浮遊した物質が認められた。

表5 分裂指数 (連続処理法)

処理	処理時間 (h)	処理濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (アセトン)	24	0	2000	157	7.9	100
4-エチル-1,1'-ビフェニル	24	18.8	2000	89	4.5	57
	24	37.5	2000	59	3.0	38
	24	75	2000	19	1.0	12
	24	150	2000	10	0.5	6
	24	1250	2000	22	1.1	14
	24	2500	2000	12	0.6	8
	24	5000	2000	19	1.0	12
	陽性対照 (MMC)	24	0.03	2000	72	3.6
陰性対照 (アセトン)	48	0	2000	134	6.7	100
4-エチル-1,1'-ビフェニル	48	9.38	2000	127	6.4	95
	48	18.8	2000	127	6.4	95
	48	37.5	2000	85	4.3	63
	48	75	2000	13	0.7	10
	48	1250	2000	1	0.1	1
	48	2500	2000	4	0.2	3
	48	5000	2000	4	0.2	3
陽性対照 (MMC)	48	0.03	2000	52	2.6	39

MMC : マイトマイシンC

表6 分裂指数 (短時間処理法)

処理	S9 mix の有無	処理濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	観察 細胞数	分裂中期 細胞数	分裂指数 (%)	分裂活性 (%)
陰性対照 (アセトン)	—	0	2000	99	5.0	100
4-エチル-1,1'-ビフェニル	—	18.8	2000	73	3.7	74
	—	37.5	2000	141	7.1	142
	—	75	2000	18	0.9	18
	—	150	1768	17	1.0	19
	—	1250	2000	20	1.0	20
	—	2500	2000	42	2.1	42
	—	5000	2000	58	2.9	59
陽性対照 (BP)	—	20	2000	140	7.0	141
陰性対照 (アセトン)	+	0	2000	207	10.4	100
4-エチル-1,1'-ビフェニル	+	18.8	2000	67	3.4	32
	+	37.5	2000	106	5.3	51
	+	75	2000	128	6.4	62
	+	150	857	9	1.1	10
	+	1250	2000	28	1.4	14
	+	2500	2000	58	2.9	28
	+	5000	2000	26	1.3	13
陽性対照 (BP)	+	20	2000	44	2.2	21

BP : ベンゾ[a]ピレン



図1 4-エチル-1,1'-ビフェニルの細胞毒性(連続処理法)

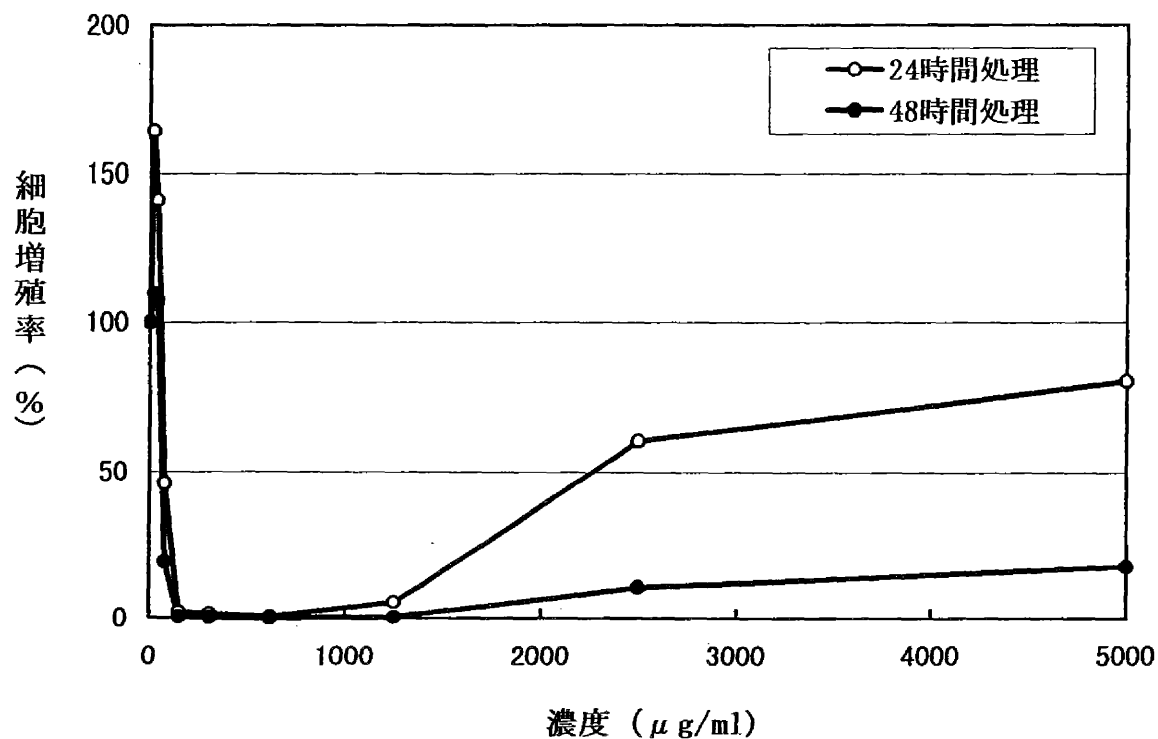


図2 4-エチル-1,1'-ビフェニルの細胞毒性(短時間処理法)  
(6時間処理, 18時間回復)

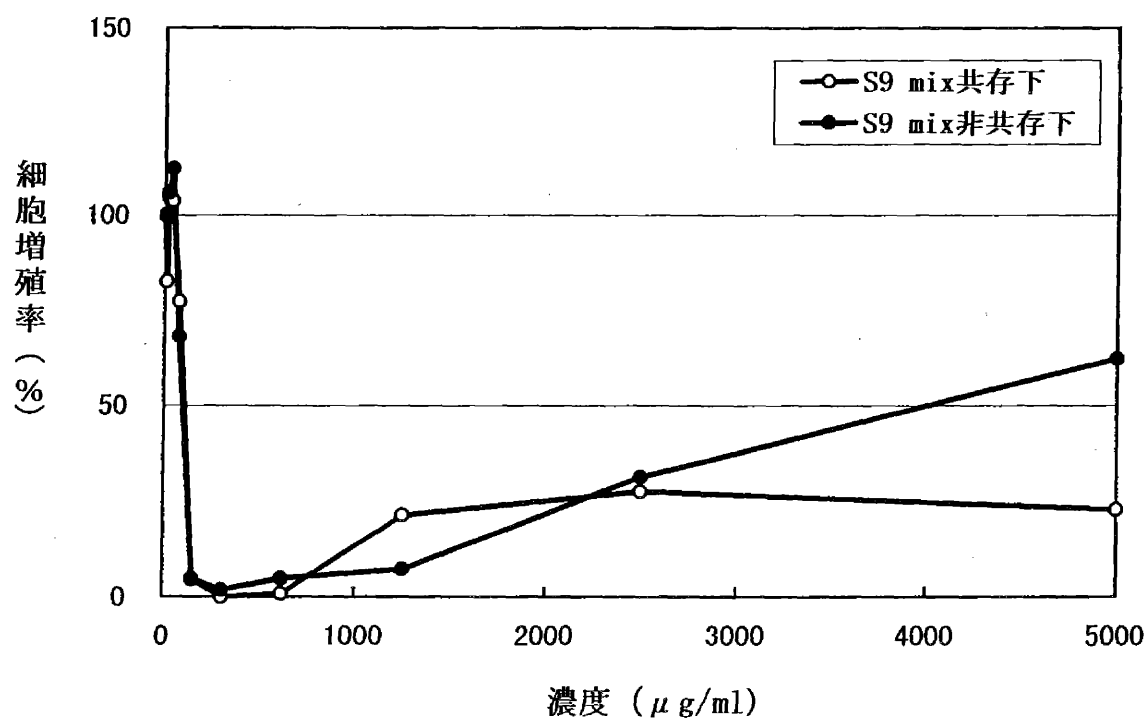


図3 4-エチル-1,1'-ビフェニルの構造異常細胞出現頻度  
(連続処理法) [9.38~75  $\mu\text{g/ml}$ ]

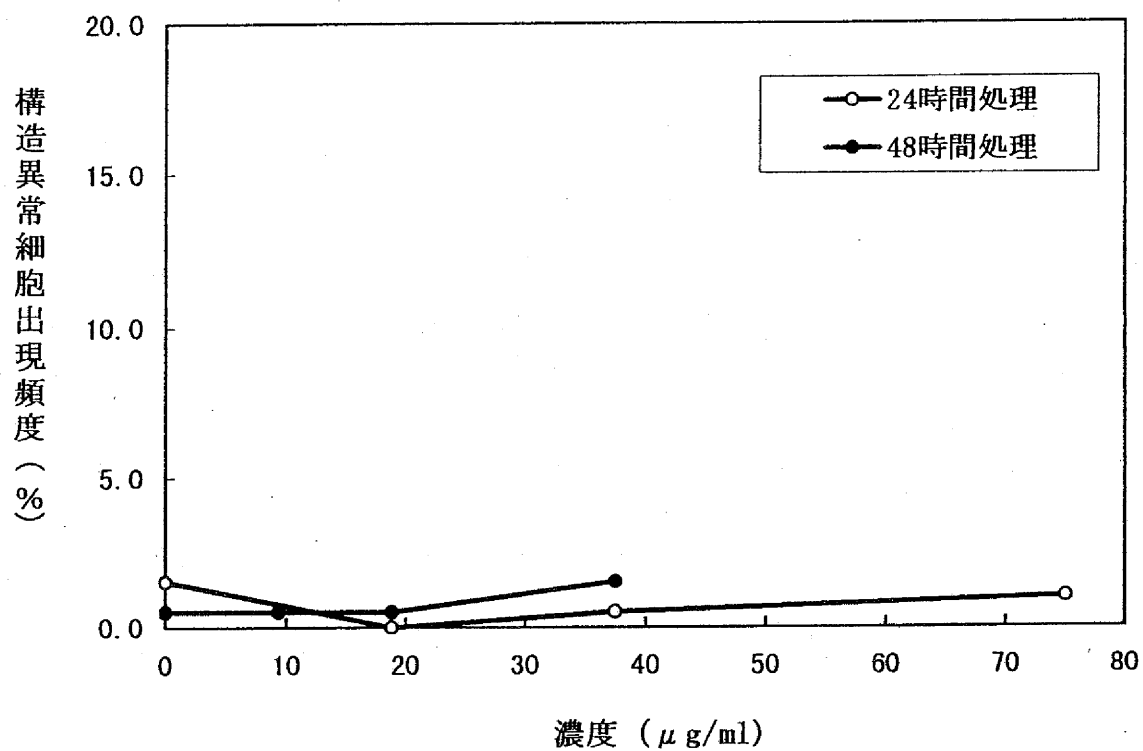


図4 4-エチル-1,1'-ビフェニルの構造異常細胞出現頻度  
(連続処理法) [1250~5000  $\mu\text{g/ml}$ ]

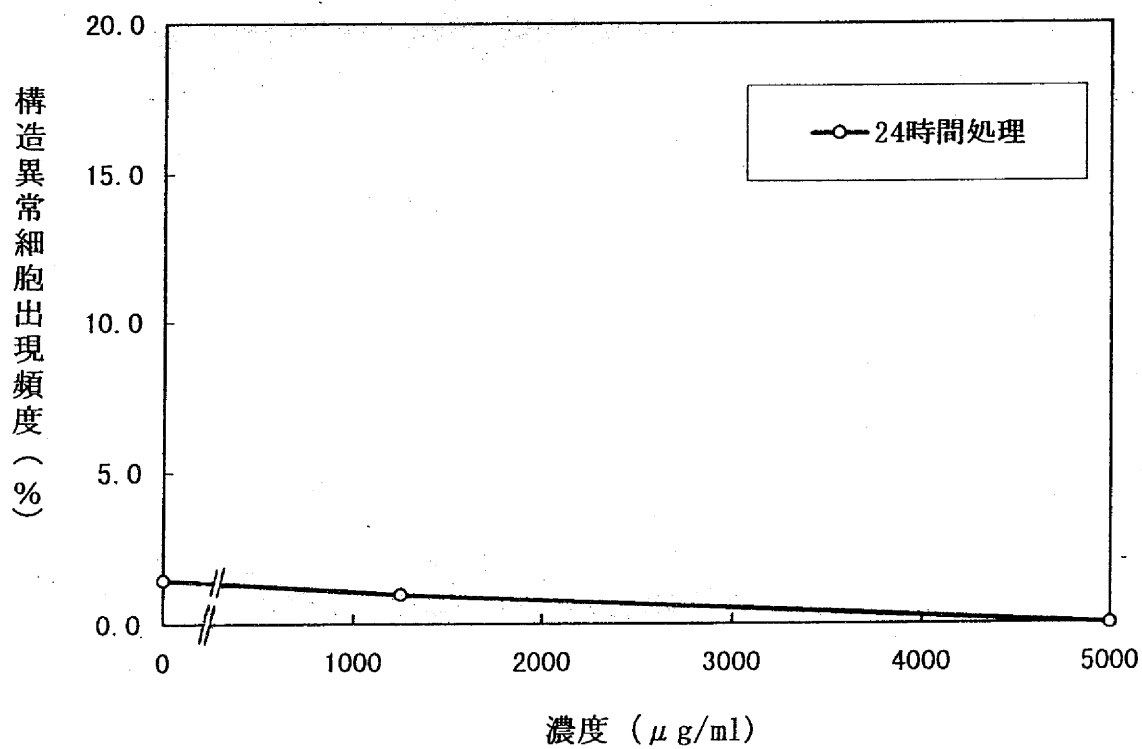


図5 4-エチル-1,1'-ビフェニルの構造異常細胞出現頻度  
(短時間処理法) [18.8~75  $\mu\text{g/ml}$ ]

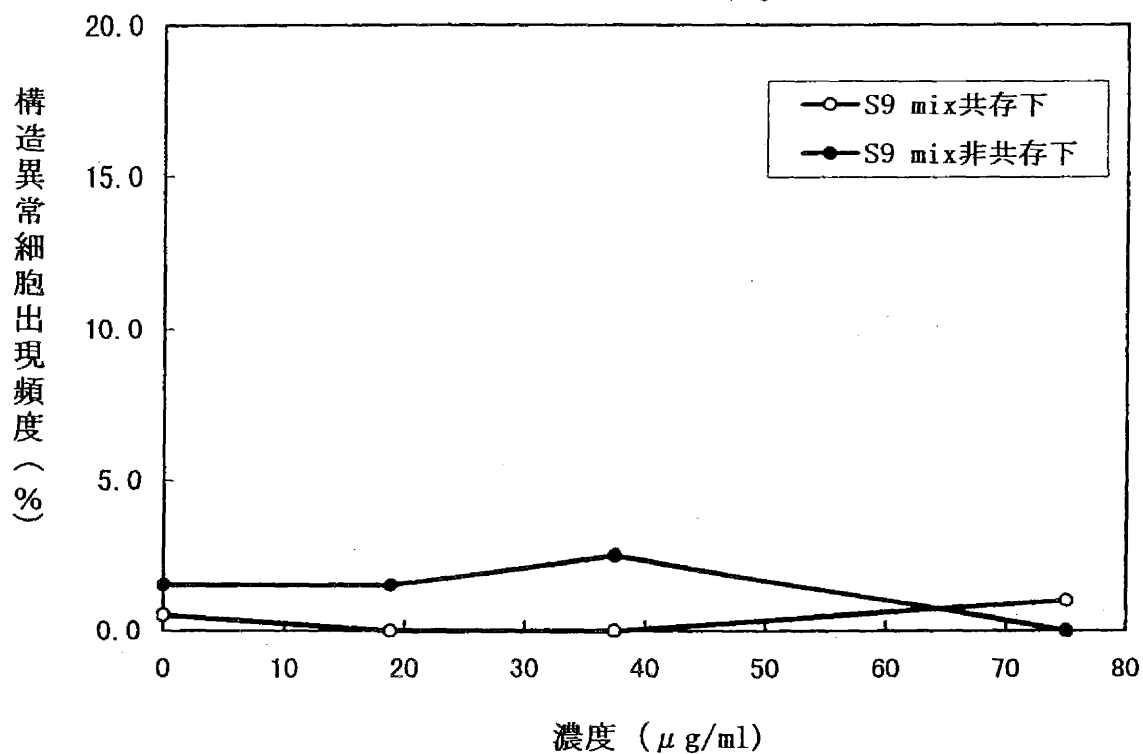


図6 4-エチル-1,1'-ビフェニルの構造異常細胞出現頻度  
(短時間処理法) [1250~5000  $\mu\text{g/ml}$ ]

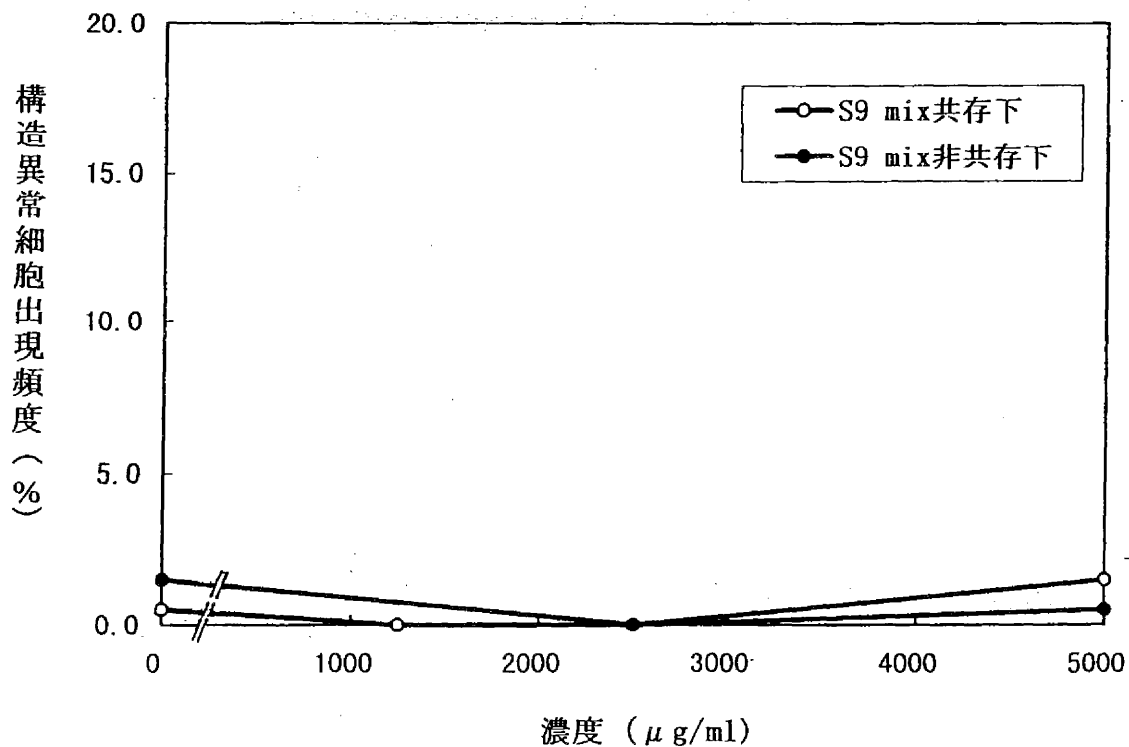


図7 4-エチル-1,1'-ビフェニルの数的異常細胞出現頻度  
(連続処理法) [9.38~75  $\mu\text{g/ml}$ ]

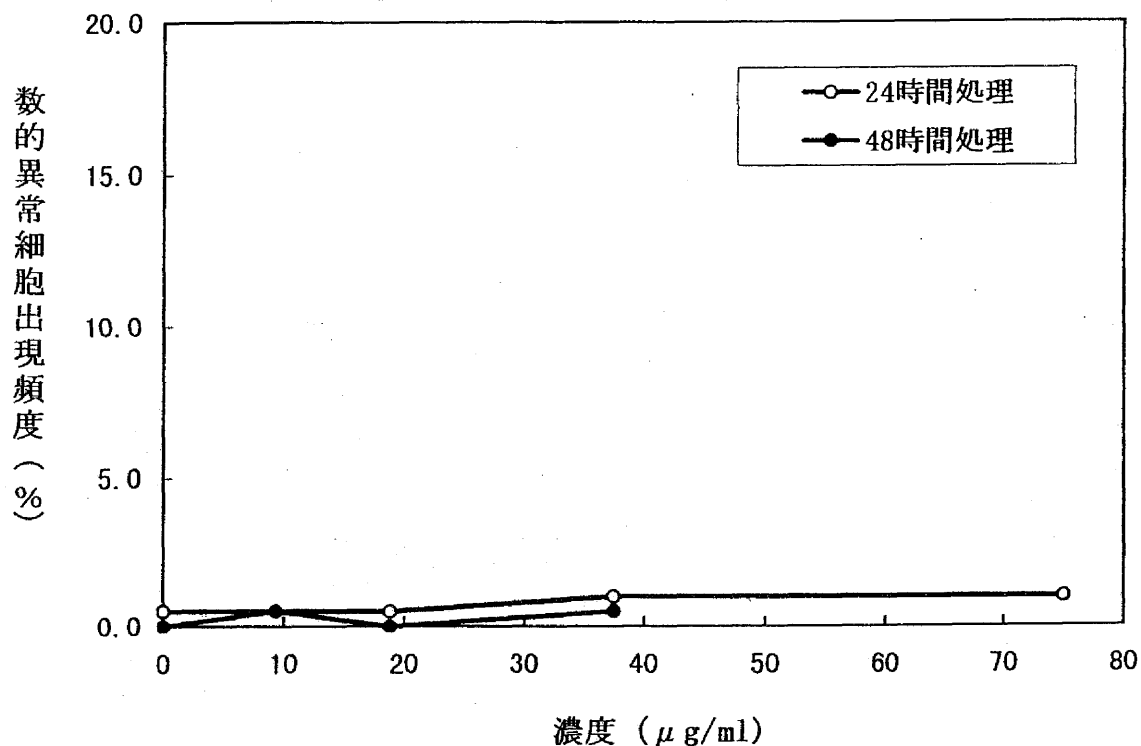


図8 4-エチル-1,1'-ビフェニルの数的異常細胞出現頻度  
(連続処理法) [1250~5000  $\mu\text{g/ml}$ ]

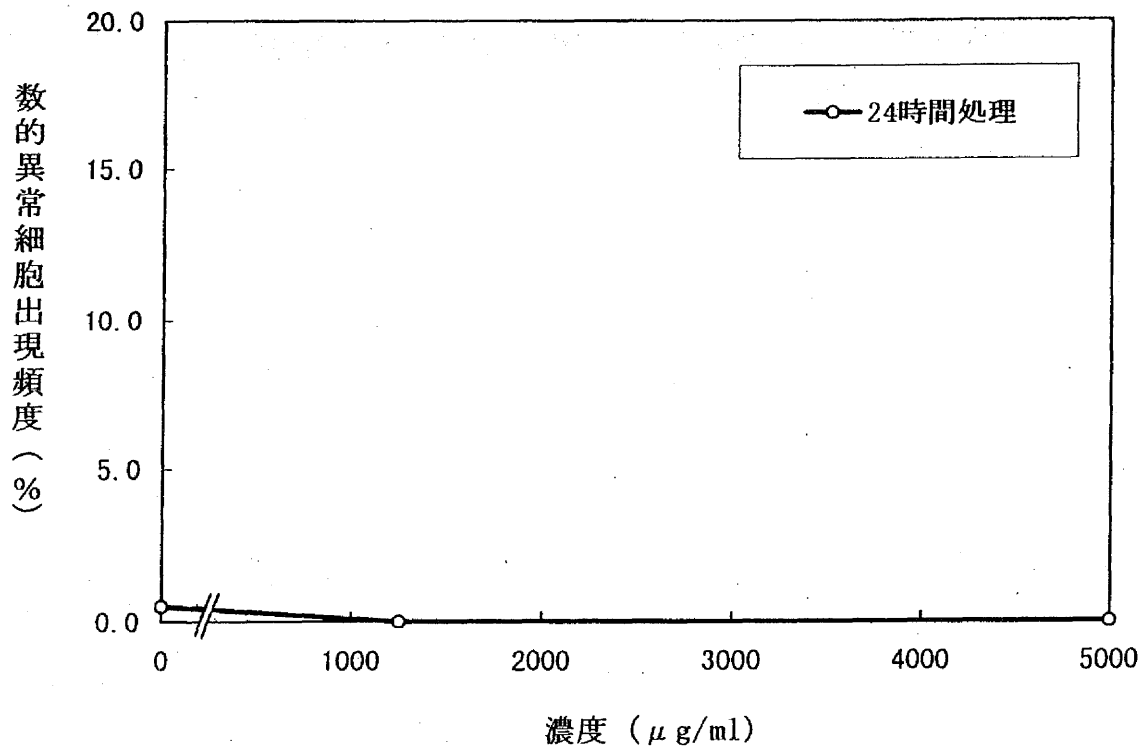


図9 4-エチル-1,1'-ビフェニルの数的異常細胞出現頻度  
(短時間処理法) [18.8~75  $\mu$ g/ml]

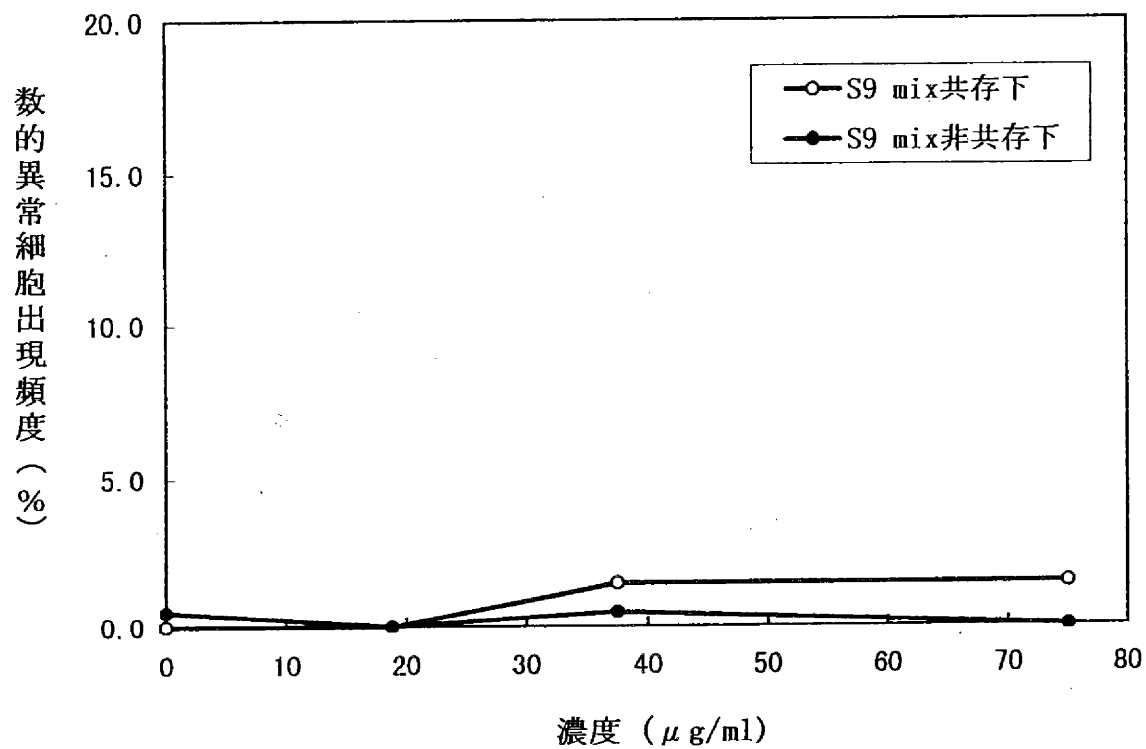


図10 4-エチル-1,1'-ビフェニルの数的異常細胞出現頻度  
(短時間処理法) [1250~5000  $\mu$ g/ml]

