

最 終 報 告 書

2,2', 6,6'-テトラ-*tert*ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
(試験番号：08-121-2)

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	8
6) 染色体の観察	9
7) 染色体異常の分類および集計	9
8) 試験結果の判定	9
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
結論	12
文献	12

文献	12
----------	----

表：

表 1-1	2,2', 6,6'-テトラ・ <i>tert</i> ブチル・4,4'-メチレンジフェノールの染色体異常 試験結果（短時間処理法：S9 mix 非存在下）	1
表 1-2	2,2', 6,6'-テトラ・ <i>tert</i> ブチル・4,4'-メチレンジフェノールの染色体異常 試験結果（短時間処理法：S9 mix 存在下）	2
表 2	2,2', 6,6'-テトラ・ <i>tert</i> ブチル・4,4'-メチレンジフェノールの染色体異常 試験結果（連続処理法：24 時間処理）	3

図：

図 1	構造異常を有する細胞の出現頻度	4
図 2	数的異常を有する細胞の出現頻度	5

要 約

2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール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。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、15.6～1000 μ g/mL の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、短時間処理法および連続処理法のいずれの場合も 50% を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。

したがって、染色体異常試験における用量は、短時間処理法および連続処理法ともに、250、500 および 1000 μ g/mL とした。

試験の結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下ともに染色体異常細胞の増加は認められなかった。また、連続処理法 24 時間においても染色体異常細胞の増加は認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

試験目的

この試験は、2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール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. 被験物質

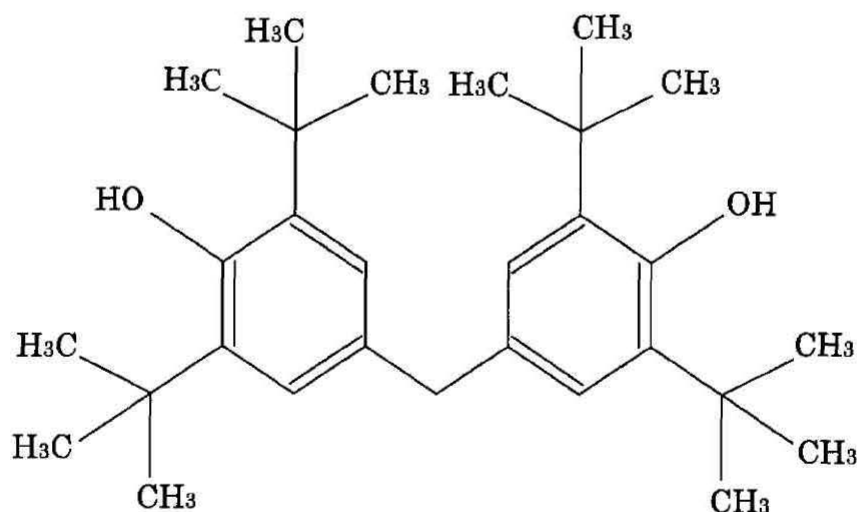
名 称 : 2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール
(英名 : 2,2', 6,6'-tetra-*tert*-butyl-4,4'-methylenediphenol)
別名 : 4,4'-メチレンビス(2,6-ジ-*tert*-ブチルフェノール)、
Bis(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)methane、
Phenol, 4, 4'-methylenebis(2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-

CAS 番号 : 118-82-1

ロット番号 :

純 度 : 99.6% (GC 法、分析 : 東京化成工業株式会社)

構 造 式 :



分 子 式 : $C_{29}H_{44}O_2$

分 子 量 : 424.67

入 手 先 :

入手日・量 : 平成 20 年 12 月 9 日・20 g

物理化学的性状：

常温における性状 白色～うすい黄色の結晶性粉末

分子量 424.67

沸点 289℃

融点 155℃

溶解性 水：10 mg 以下/L (20℃)

オクタノール/水分配係数 6.24

安定性：安定 [実験終了後、(財) 畜産生物科学安全研究所において保管した残余被験物質を分析 (2010 年 5 月 18 日：東京化成工業株式会社、GC 法) した結果、純度は 99.6%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 (2～6℃)、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アセトン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 EWM6387) 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-Methy-l-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

本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) に不溶、アセトンに 200 mg/mL (1 mg/mL 用量の供試液濃度に相当) まで可溶であったことから、溶媒にはアセトンを用いた。

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 TSQ4964、100%) 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 7 回までのものを使用した。

5. 培養液

Eagle-MEM 液体培地 (Gibco Laboratories、ロット番号 677637) に、非動化 (56°C、30 分間加熱処理) 仔牛血清 (Gibco Laboratories、ロット番号 682074) を 10% の割合で添加したものを用いた。

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°C、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-604・2009 年 10 月 23 日製造・2009 年 11 月 6 日購入、ロット番号: CAM-609・2010 年 2 月 5 日製造・2010 年 4 月 13 日購入) し、-80°C 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: 183~269 g (CAM-604)、219~257 g (CAM-609)

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 日目: PB 60 mg/kg
 - 3 日目: PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg、4 日目: PB 60 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 mL
MgCl ₂	5 μ mol/0.1 mL
KCl	33 μ mol/0.1 mL
G-6-P	5 μ mol/0.1 mL
NADP	4 μ mol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4 μ mol/0.2 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、15.6、31.3、62.5、125、250、500 および 1000 μ g/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。なお、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アセトンに溶解して最高用量の供試液（原液）を調製し、次いで、原液の一部をアセトン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 0.5 vol% とした。

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、アセトン（陰性対照）または被験物質の供試液各 0.015 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、アセトンまたは被験物質の供試液各 0.015 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 日後にアセトンまたは被験物質の供試液各 0.025 mL をシャーレに加えて 24 時間および 48 時間培養した。なお、短時間処理法および連続処理法ともにいずれの用量とも、被験物質供試液をシャーレ中に添加すると直ちに油滴様またはうろこ様の被験物質の析出・浮遊が認められ、所定の培養時間終了時まで残存した。

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、10 vol%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。

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、短時間処理法および連続処理法のいずれの場合も、50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。

〔短時間処理法〕

用 量 (μ 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]
15.6	114	96	[105.0]	90	118	[104.0]
31.3	122	94	[108.0]	84	116	[100.0]
62.5	126	101	[113.5]	98	98	[98.0]
125	113	99	[106.0]	84	105	[94.5]
250	112	90	[101.0]	78	89	[83.5]
500	105	98	[101.5]	78	78	[78.0]
1000	85	76	[80.5]	76	84	[80.0]

[] : 平均値

〔連続処理法〕

用 量 (μ 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]
15.6	105	105	[105.0]	112	124	[118.0]
31.3	106	99	[102.5]	105	109	[107.0]
62.5	111	101	[106.0]	119	121	[112.0]
125	102	102	[102.0]	115	116	[115.5]
250	109	99	[104.5]	123	108	[115.5]
500	113	96	[104.5]	116	116	[116.0]
1000	113	101	[107.0]	95	99	[97.0]

[] : 平均値

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、短時間処理法および連続処理法ともに $1000 \mu\text{g/mL}$ (供試液調製可能上限用量) を最高用量とし、以下公比 2 で 500 および $250 \mu\text{g/mL}$ の計 3 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アセトンに溶解して最高用量の供試液 (原液) を調製した。次いで、原液の一部をアセトンで順次希釈し、所定用量の供試液を調製した。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、アセトン、被験物質供試液および MNNG 供試液は各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。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、続いてアセトン、被験物質供試液および B[a]P 供試液は各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。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、アセトン、被験物質供試液および MNNG の供試液は各シャーレに 0.025 mL ずつ加え、24 時間培養した。

なお、短時間処理法および連続処理法ともにいずれの用量とも、被験物質供試液をシャーレ中に添加すると直ちに油滴様またはうろこ様の被験物質の析出・浮遊が認められ、所定の培養時間終了時まで残存した。

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
250	4	4
500	4	4
1000	4	4
2.5 (陽性対照) ^b	2	--
10 (陽性対照) ^c	--	2

a : アセトン、b : MNNG、c : B[a]P、使用シャーレ数 : 36

〔連続処理法〕

用量(μ g/mL)	使用シャーレ数
	24 時間処理
0 (陰性対照) ^a	4
250	4
500	4
1000	4
2.5 (陽性対照) ^b	2

a : アセトン、b : MNNG、使用シャーレ数 : 18

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 621989)を最終濃度として 0.2μ 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、 0.2 w/v%トリプシン水溶液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(pH6.8、株式会社ヤトロネ、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、10 vol%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倍で鏡検した。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。

8) 試験結果の判定

試験結果は、構造異常および倍数性細胞の出現頻度について、下記の生物学的判定基準⁴⁾を参考に判定を行った。すなわち、被験物質群における染色体異常出現頻度が2用量以上で5%以上を示し、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判定した。

[生物学的判定基準]

(出現頻度)	(判定)
0～5%未満	・・・陰性
5～10%未満	・・・疑陽性
10%以上	・・・陽性

9) 陽性対照群の試験結果判定基準

10%以上の染色体構造異常細胞の出現頻度が確認されることをもって、陽性と判定した。

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 に示す。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 または 1.0%の出現頻度であり、いずれの用量とも陰性値を示した。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 97.0%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、陰性および陽性対照群並びに被験物質群のいずれ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 に示す。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 0 または 0.5%の出現頻度であり、いずれの用量とも陰性値を示した。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 44.0%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、被験物質群では 500 μ g/mL でのみ 0.5%の低い出現頻度で認められた。陰性および陽性対照群では認められなかった。

3. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

結果は表 2 に示す。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 0 または 0.5%の出現頻度であり、いずれの用量とも陰性値を示した。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 99.0%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、500 μ g/mL でのみ 1.0%の低い出現頻度で認められた。

結 論

2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール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並びに連続処理法 24 時間のいずれの方法においても染色体異常誘発作用は認められなかった。

したがって、本実験条件下では、2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

なお、2,2', 6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの変異原性については、*Salmonella typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102 および *Escherichia coli* WP2/pKM101 を用いた復帰突然変異試験⁵⁾で陰性との報告がある。

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) 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.
- 5) 蜂谷紀之, 滝澤行雄, プラスチック添加剤の変異原性試験, 変異原性試験, **3(3)**:147-154, 1994.

表 1-1 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール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	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	細胞数						
陰性対照	100	2	0	0	0	0	2	0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
	200	2	0	0	0	0	2	0	200	0	0	0
		(1.0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)		(0)	(0)	(0)
250	100	0	0	0	1	0	1	0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	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)
500	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	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)
1000	100	0	1	0	0	0	1	0	100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0	100	0	0	0
	200	0	2	0	0	0	2	0	200	0	0	0
		(0)	(1.0)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)		(0)	(0)	(0)
陽性対照	100	46	97	0	0	0	98	0	100	0	0	0
	100	47	91	3	1	0	96	0	100	0	0	0
	200	93	188	3	1	0	194	0	200	0	0	0
		(46.5)	(94.0)	(1.5)	(0.5)	(0)	(97.0)	(0)		(0)	(0)	(0)

陰性対照:アセトン.

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

表 1-2 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノールの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

被験物質		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(%)			
の用量	観察	染色分体		染色体		その他	総異常	出現数	増殖率	観察	倍数体	その他	総異常
(μ g/mL)	細胞数	切断	交換	切断	交換		細胞数	(%)	(%)	細胞数			細胞数
陰性対照	100	0	1	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	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)
250	100	1	1	0	0	0	1	0	92.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		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)
500	100	0	1	0	0	0	1	1	104.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
	200	0	1	0	0	0	1	1		200	1	0	1
		(0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(0.5)	(0.5)			(0.5)	(0)	(0.5)
1000	100	0	0	0	0	0	0	0	109.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0)	(0)	(0)
陽性対照	100	5	40	0	0	0	41	0	--	100	0	0	0
	100	5	47	0	0	0	47	0		100	0	0	0
	200	10	87	0	0	0	88	0		200	0	0	0
		(5.0)	(43.5)	(0)	(0)	(0)	(44.0)	(0)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:アセトン.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

表 2 2,2',6,6'-テトラ-*tert*-ブチル-4,4'-メチレンジフェノール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	100	0	0	0
	100	1	0	0	0	0	1	0		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)						
250	100	1	0	0	0	0	1	0	104.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		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)						
500	100	0	0	0	0	0	0	0	110.0	100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	2	0	2
	(0) (0) (0) (0) (0) (0) (0)						(1.0) (0) (1.0)						
1000	100	0	1	0	0	0	1	0	102.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	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)						
陽性対照	100	60	99	3	1	0	99	0	—	100	0	0	0
	100	46	99	5	0	0	99	0		100	0	0	0
	200	106	198	8	1	0	198	0		200	0	0	0
	(53.0) (99.0) (4.0) (0.5) (0) (99.0) (0)						(0) (0) (0)						

陰性対照:アセトン.

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

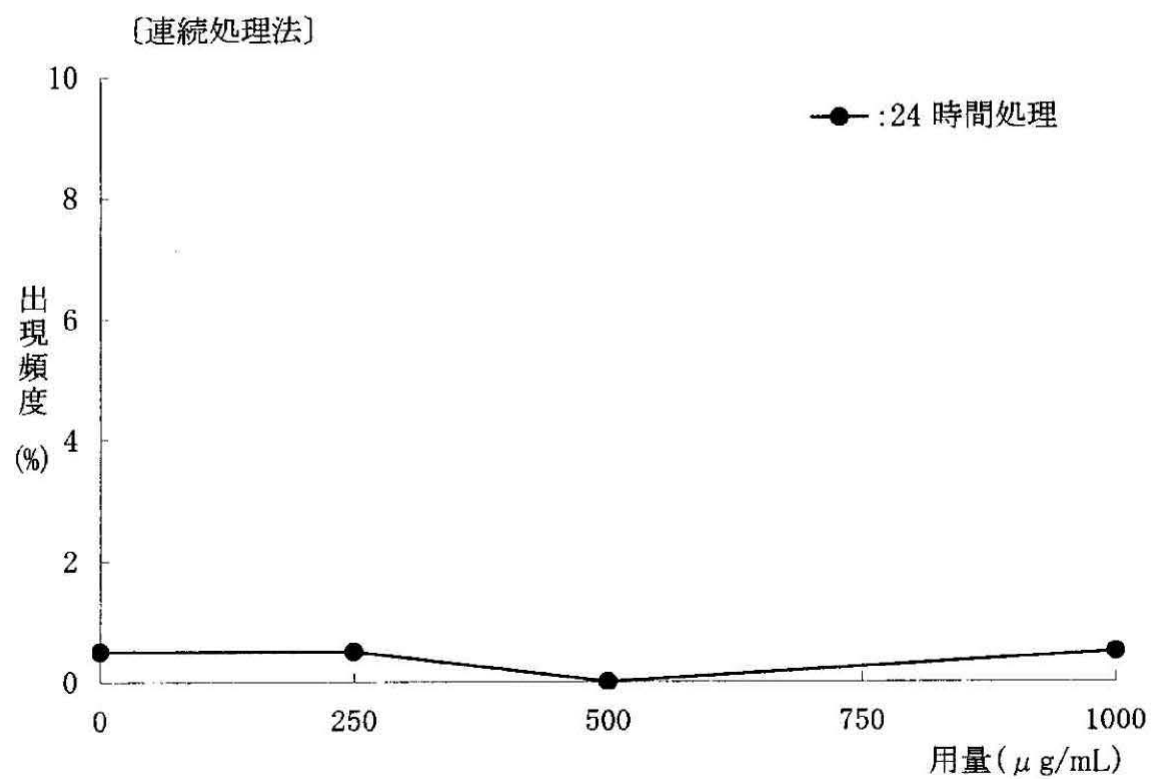
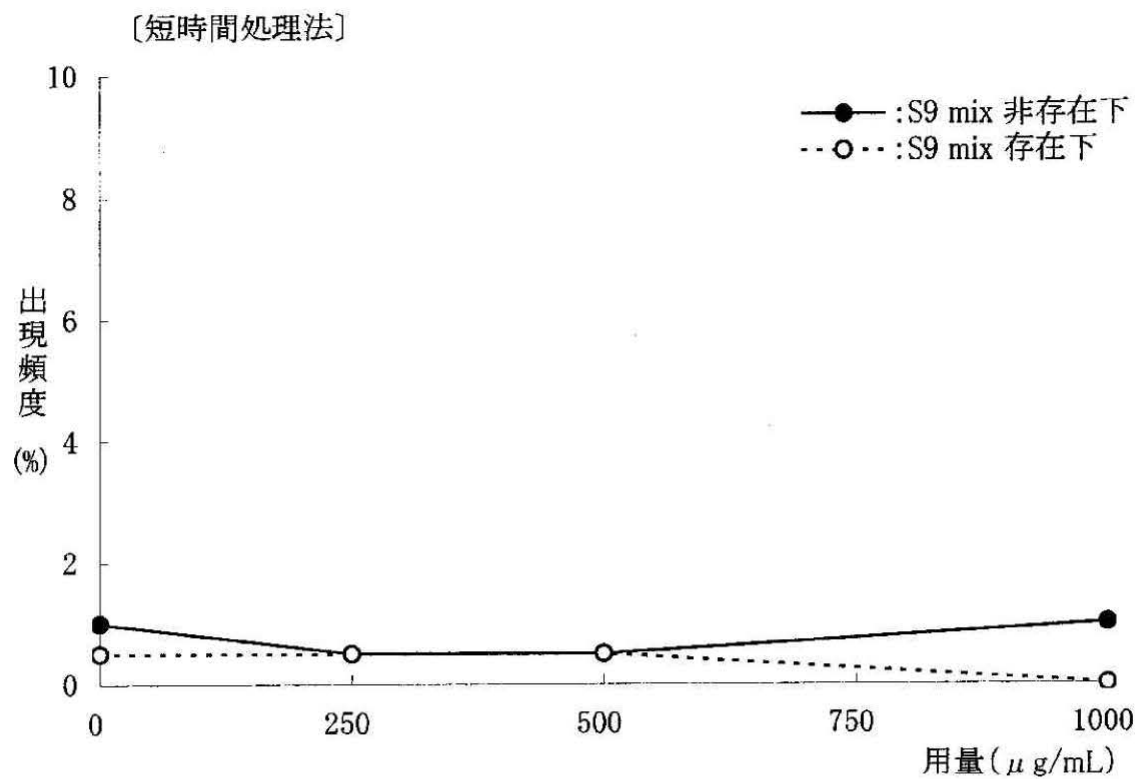


図 1 構造異常を有する細胞の出現頻度

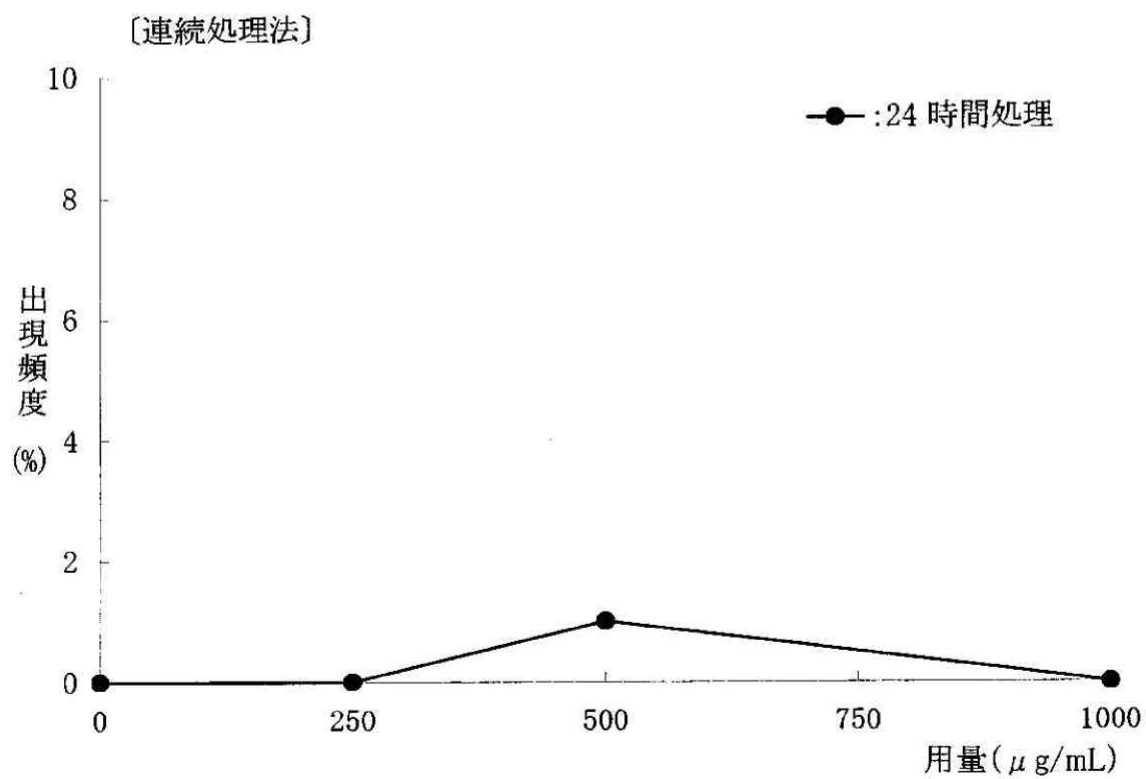
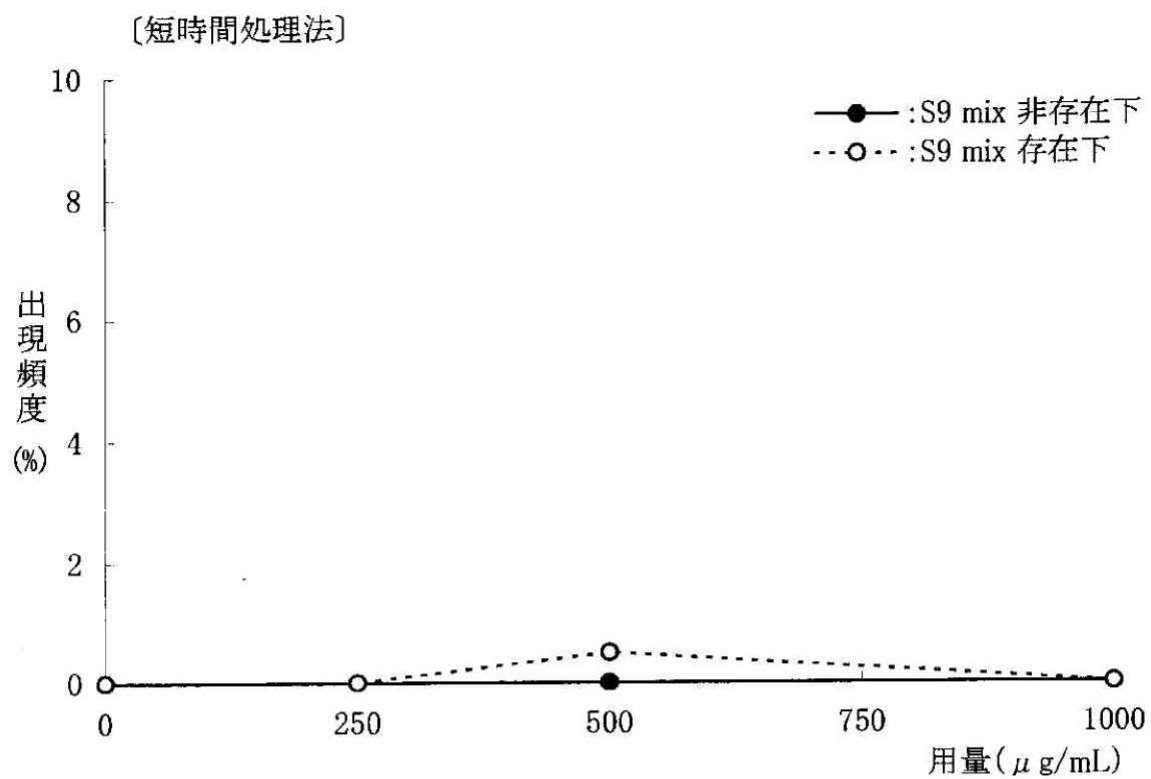


図2 数的異常を有する細胞の出現頻度