

最終報告書

1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1287

目 次

	頁
目 次	1
試験実施概要	6
要 約	10
緒 言	12
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び溶媒	13
1) 被験物質	13
2) 溶媒	13
2. 被験液の調製	14
1) 調製方法	14
2) 調製頻度	15
3) 安定性	15
3. 対照物質	15
1) 溶媒対照	15
2) 陽性対照	15
4. 使用細胞株	16
1) 細胞株	16
2) 細胞の選択理由	17
3) 培養条件	17
4) 細胞の性状検査	17
5. S9mix 及び培養液	17
1) S9 mix	17

	頁
2) 培養液	18
6. 試験方法	19
1) 識別方法	19
2) 用量の設定	20
3) 細胞増殖抑制試験	21
4) 染色体異常試験	22
5) 染色体異常試験（再試験）・連続処理法・24時間処理	23
6) 標本の観察	24
7) 染色体異常の分類	24
8) 判定基準	25
試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験	26
1) 短時間処理法	26
2) 連続処理法	26
2. 染色体異常試験	27
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	27
2) 構造異常	27
3) 数的異常	27
3. 染色体異常試験（再試験）	28
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	28
2) 構造異常	28
3) 数的異常	28
考察	29
参考文献	30

Figures and Tables

- Fig. 1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Continuous treatment: 24 hr]
- Fig. 1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Continuous treatment: 48 hr]
- Fig. 2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 2-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 2-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Continuous treatment: 24 hr]
- Fig. 2-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Continuous treatment: 48 hr]
- Fig. 2-5 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Retest: 24 hr]

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese

- hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Table 1-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Table 1-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Continuous treatment: 24 hr]
- Table 1-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Continuous treatment: 48 hr]
- Table 2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Table 2-2 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Table 2-3 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Continuous treatment: 24 hr]
- Table 2-4 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Continuous treatment: 48 hr]
- Table 2-5 Cell-growth ratio in the retest in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Retest: 24 hr]
- Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

[Short-term treatment: -S9 mix]

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with
1,3,5-tri-tert-butylbenzene

[Continuous treatment: 24 hr]

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with
1,3,5-tri-tert-butylbenzene

[Continuous treatment: 48 hr]

Table 3-5 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with
1,3,5-tri-tert-butylbenzene

[Retest: 24 hr]

試験実施概要

1. 試験計画書

試験番号 : M-1287

試験表題 : 1,3,5-トリ・tert-ブチルベンゼンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

2. 試験目的 : ほ乳類の培養細胞 (CHL/IU 細胞株) を用いて、本被験物質の染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

3. 試験委託者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-24. 試験受託者 : 株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-75. 試験実施施設 : 株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

6. 被験物質

供給者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

製造者 : 和光純薬工業株式会社

名称 : 1,3,5-トリ・tert-ブチルベンゼン、
1,3,5-tri-tert-butylbenzene

受領日 : 2007年3月30日

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室

要 約

1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼンの染色体異常誘発能の有無を検討するため、ほ乳類培養細胞 (CHL/IU) を用いて染色体異常試験を実施した。

初めに、毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 2500 µg/mL を最高用量として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は、短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理では 78.13 µg/mL、連続処理法の 48 時間処理では 39.06 µg/mL であった。50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、短時間処理法の代謝活性化では 67.4 µg/mL、非代謝活性化では 62.9 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 57.6 µg/mL 及び 48 時間処理では 36.9 µg/mL であった。しかしながら、短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理では、50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量よりも高い用量においても、細胞増殖抑制作用は増強せずに飽和状態にあり、50%以下の細胞増殖抑制を示す用量も認められた。これらの用量における細胞増殖率測定用標本を培養用倒立位相差顕微鏡で観察した結果、染色体観察用標本の作製に耐えると推測される細胞数が観察された。そこで、より高用量における染色体観察を可能にするため、染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理における最高用量を 2500 µg/mL に設定した。また、染色体異常試験の連続処理法の 48 時間処理における最高用量は、50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量の 39.06 µg/mL における抑制率が 56%と低かったため、より強い細胞増殖抑制が認められる用量として 78.13 µg/mL を最高用量に設定した。

染色体異常試験の結果、短時間処理法及び連続処理法の 48 時間処理では染色体の構造異常及び倍数体の出現率の増加は認められなかった。しかしながら、連続処理法の 24 時間処理では設定した用量が高かったために、全用量で規定数の細胞を観察することが出来ず、試験が成立しなかった。そこで、連続処理法の 24 時間処理について、156.3 µg/mL を最高用量とし、78.13、39.06、19.53 及び 9.766 µg/mL の 5 用量を設定して染色体異常試験 (再試験) を実施した。その結果、染色体の構造異常及び倍数体の出現率の増加は認められなかった。

全ての試験において、各処理法の溶媒対照群における染色体の構造異常及び倍数体の出現率は全て陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値と同様であった。更に、各処理法の陽性対照群における染色体構造異常の出現率は全て陽性の判定基準を超え、試験施設の背景値と同様の顕著な誘発が認められた。従って試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼンは、本試験条件下において染色体の構造異常及び倍数体の誘発能は有さないものと判定した。

結 言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼンの安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

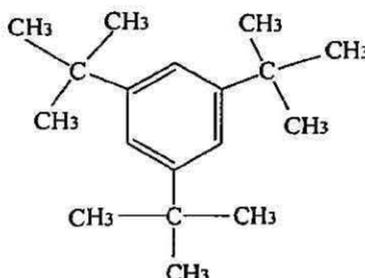
試験材料及び方法

1. 被験物質及び溶媒

1) 被験物質

被験物質情報は製造者における非 GLP 下での分析に基づくものである (Attached Data 1)。

製造者 :
 名称 : 1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼン、1,3,5-tri-tert-butylbenzene
 CAS 番号 : 1460-02-2
 構造式又は示性式 :



純度 : 99.2%
 不純物 : 不明
 入手量 : 7g
 性状 : 白色粉末
 分子量 : 246.43
 ロット番号 :
 安定性 : 試験終了後に東京化成工業株式会社にて特性を測定し、その結果を入手して安定性を確認した。
 保存方法 : 室温 (保存期間中の実測温度 : 15°C~25°C)
 保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室
 残余物の取り扱い : 被験物質の残余物は、すべて東京化成工業株式会社にて廃棄した。

2) 溶媒

名称 : アセトン
 ロット番号 : DPG0641
 規格 : 和光一級

製造元 : 和光純薬工業株式会社
保存方法 : 室温
保存場所 : 御殿場研究所 変異原室
溶媒の選択理由 : 試験開始前に被験物質の溶媒に対する溶解性の検討を実施したが、注射用水に 50 mg/mL で不溶、DMSO 及びエタノールに 500 mg/mL で不溶、0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁不可、アセトンに 250 mg/mL で可溶であったことから、アセトンを溶媒として用いた。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.5000 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 250.0 mg/mL 溶解液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2500 µg/mL）を調製した。次いで、250.0 mg/mL 溶解液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、125.0、62.50、31.25、15.63、7.813、3.906 及び 1.953 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

(2) 染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.5000 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 250.0 mg/mL 溶解液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2500 µg/mL）を調製した。次いで、250.0 mg/mL 溶解液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 4 段階希釈し、125.0、62.50、31.25 及び 15.63 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。

連続処理法では、被験物質 0.5000 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 250.0 mg/mL 溶解液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2500 µg/mL）を調製した。次いで、250.0 mg/mL 溶解液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 9 段階希釈し、125.0、62.50、31.25、15.63、7.813、3.906、1.953、0.9766 及び 0.4883 mg/mL の 10 濃度段階の被験液を調製した。このうち、24 時間処理では 250.0、125.0、62.50、31.25 及び 15.63 mg/mL の被験液を、48 時間処理では 7.813、3.906、1.953、0.9765 及び 0.4883 mg/mL の被験液を使用した。

染色体異常試験（再試験）・連続処理法・24時間処理では、被験物質 0.5000 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 250.0 mg/mL 溶解液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2500 µg/mL）を調製した。次いで、250.0 mg/mL 溶解液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 8 段階希釈し、125.0、62.50、31.25、15.63、7.813、3.906、1.953 及び 0.9766 mg/mL の 9 濃度段階の被験液を調製した。このうち、15.63、7.813、3.906、1.953 及び 0.9766 mg/mL の被験液を使用した。

2) 調製頻度

使用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

3) 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化は認められず、安定であることを確認した。

3. 対照物質

1) 溶媒対照

溶媒として用いたアセトンをも溶媒対照物質とした。

2) 陽性対照

- (1) 陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化ではマイトマイシンCを用いた。

名 称：シクロフォスファミド（以下 CP と略記する）

ロット番号：SDP4062

製造元：和光純薬工業株式会社

純 度：生化学用（97.0%以上）

保存方法：冷蔵、遮光

保存場所：御殿場研究所 変異原室 発癌性物質冷蔵保存庫

名 称：マイトマイシンC（以下 MMC と略記する）

ロット番号：481AEL

製造元：協和醗酵工業株式会社

力 価：2mg（力価）/瓶

保存方法：室温、遮光

保存場所：御殿場研究所 変異原室 発癌性物質室温保存庫

(2) 調製方法

染色体異常試験の短時間処理法では、CP 0.0140 g をプラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K6G71) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度：14 $\mu\text{g/mL}$) を調製した。MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K6G71) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL：生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 $\mu\text{g/mL}$)。

染色体異常試験の連続処理法では、MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K6G71) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL：生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 $\mu\text{g/mL}$)。

染色体異常試験 (再試験) ・連続処理法・24 時間処理では、MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K6G71) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL：生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 $\mu\text{g/mL}$)。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

(3) 陽性対照物質の選択理由

前記 (緒言 毒性試験法ガイドライン) の毒性試験法ガイドラインに使用が推奨されていること、及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

4. 使用細胞株

1) 細胞株

チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞 (CHL/TU) を用いた。細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手 (2004 年 11 月 2 日) し、継代数の少ないものを液体窒素中で保存し、これを融解し継代培養したものを使用した。使用時の細胞継代数は、細

胞増殖抑制試験では13継代、染色体異常試験では短時間処理法で21継代、連続処理法で25継代、染色体異常試験（再試験）で7継代であった。また、元株細胞はマイコプラズマ陰性であることを入手時の情報で確認した。

2) 細胞の選択理由

自然発生染色体異常の発現率が低いこと、さらに種々の化学物質に対して感受性が高く、バックグラウンドデータが豊富であること等の理由から本細胞を選択した。

3) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂濃度 5%、温度 37℃、高湿度条件下で培養した。継代は1～4日ごとに行った。

4) 細胞の性状検査

試験に使用する細胞は凍結保存から解凍し、30代を越えない範囲で継代培養を行っているものについて、染色体のモード数、倍加時間及びマイコプラズマ汚染の有無等の特性について定期的に検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。

5. S9 mix 及び培養液

1) S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社より購入したS9と、自家調製を行ったコファクターを用時に混合してS9 mixを調製した。本試験に用いたS9の製品分析書に示された情報、保存条件及び使用期限とコファクターの保存条件、使用期限及びS9 mixの組成は以下の通りであった。

(1) S9

名 称	: S9
ロット番号	: ①06121510、②07021612
製 造 日	: ①2006年 12月 15日、②2007年 2月 16日
種・系統	: ラット・SD系
性	: 雄
週 齢	: 7週齢
誘導物質	: フェノバルビタール (PB) 及び5,6-ベンゾフラボン (BF)
投 与 法	: 腹腔内投与
投与期間及び投与量	: PB 4日間 30+60+60+60 mg/kg body weight

BF 1日 80 mg/kg body weight

保存方法 : 冷凍 (超低温フリーザー)

使用期限 : ①2007年6月14日 (製造後6箇月)、②2007年8月15日 (製造後6箇月)

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(2) 補酵素

名称 : コファクター

ロット番号 : 070209

製造日 : 2007年2月9日

保存方法 : 冷凍 (超低温フリーザー)

使用期限 : 2007年8月8日 (製造後6箇月)

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(3) S9 mix の組成

S9	2 mL		
補酵素	4.7 mL	20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mmol/L グルコース・6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40mmol/L 酸化型ニコチンアミド-アデニン	
		ジヌクレオチドリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
		注射用水 (精製水)	0.67 mL

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と同様になるように各成分の必要量を秤取し、注射用水に融解、pH調整、ろ過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

2) 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No.11095-080) に、Invitrogen Corporation より購入し非働化 (56℃, 30分) した牛血清 (BS) を 10 vol% 添加して調製した培養液 (BS-MEM) を用いた。調製後の BS-MEM は冷蔵保存した。

(1) 牛血清

ロット番号：571834

製造元：Invitrogen Corporation

保存方法：冷凍（-80℃設定の冷凍庫）

保存場所：御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号：1380929

製造元：Invitrogen Corporation

保存方法：冷蔵

保存場所：御殿場研究所 変異原室 冷蔵庫

6. 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
3. 染色体異常試験（再試験）	連続処理法	24 時間処理

1) 識別方法

(1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「-」とし、連続処理法では24時間処理を「24」、48時間処理を「48」とした。更にこれに続けて非処理群（Non Treatment）の場合は「NT」、溶媒対照群（Solvent Control）の場合は「SC」を、被験物質用量群の場合は濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。ただし、陽性対照群（Positive Control）は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダム

にコード化した「01」～「99」までの2桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。なお、染色体異常試験（再試験）では、染色体異常試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。

2) 用量の設定

(1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を2500 µg/mL (10 mM相当) とし、以下公比2で希釈した1250、625.0、312.5、156.3、78.13、39.06及び19.53 µg/mLの計8用量を設定した。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、明らかに50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は、短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化、連続処理法の24時間処理では78.13 µg/mL、連続処理法の48時間処理では39.06 µg/mLであった。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では67.4 µg/mL、非代謝活性化では62.9 µg/mL、連続処理法の24時間処理では57.6 µg/mL及び48時間処理では36.9 µg/mLであった。しかしながら、短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化、連続処理法の24時間処理では、50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量よりも高い用量においても、細胞増殖抑制作用は増強せずに飽和状態にあり、50%以下の細胞増殖抑制を示す用量も認められた。これらの用量における細胞増殖率測定用標本を培養用倒立位相差顕微鏡で観察した結果、染色体観察用標本の作製に耐えると推測される細胞数が観察された。そこで、より高用量における染色体観察を可能にするため、染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化、連続処理法の24時間処理における最高用量を2500 µg/mLに設定した。また、染色体異常試験の連続処理法の48時間処理における最高用量は、50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量の39.06 µg/mLにおける抑制率が56%と低かったため、より強い細胞増殖抑制が認められる用量として78.13 µg/mLを最高用量に設定した。各処理法ともに、以下一定の公比で希釈した計5用量を設定し、さらに、各処理法ごとに非処理群、溶媒対照群及び陽性対照群を設けた。

(3) 染色体異常試験（再試験）

染色体異常試験の連続処理法において、24時間処理の染色体標本観察を実施した結果、設定した用量が高かったために、全用量で規定数の細胞を観察することが出来ず、試験が成立しなかった。そこで、染色体異常試験の24時間処理について、156.3 µg/mL

を最高用量とし、78.13、39.06、19.53 及び 9.766 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量を設定して再試験を実施した。さらに、これに非処理群、溶媒対照群及び陽性対照群を設けた。

3) 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するために予備試験として実施した。

(1) 短時間処理法

- ① 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに非処理群、溶媒対照群及び被験物質用量群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート (直径 60 mm) を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞 (培養液 5.0 mL) を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。また、非処理群では、培養液 0.833 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL を加えた。非代謝活性化では培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。なお、非処理群については処理を行わなかった。いずれの場合も、その後 6 時間培養した。
- ③ 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の培養状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- ④ 培養終了後、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計 (モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社) を用いて細胞密度を測定し、溶媒対照の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) を求めた。

(2) 連続処理法

- ① 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに非処理群、溶媒対照群及び被験物質用量群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート (直径 60 mm) を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞 (培養液 5.0 mL) を播種した。培養 3 日後に、細

胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。なお、非処理群については処理を行わなかった。いずれの場合も、その後 24 時間及び 48 時間培養した。

- ③ 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

4) 染色体異常試験

(1) 短時間処理法

- ① 代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれに非処理群、溶媒対照群、被験物質用量群及び陽性対照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き、溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。また、非処理群では、培養液 0.833 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL を加えた。さらに、陽性対照群では培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。なお、非処理群については処理を行わなかった。さらに、陽性対照群では培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。いずれの場合も、その後 6 時間培養した。
- ③ 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の培養状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- ④ 各群 2 枚のプレートについて、染色体観察用標本作製のため、培養終了の約 2 時間前にコルセミド（ジメコルシン溶液、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、染色体標本の作製に際して、被験物質用量群については、析出を可能な限り除去するために培養液を廃棄し、新しい培養液 5.0 mL を添加した

遠沈管に細胞を回収した。さらに、0.25%トリプシン溶液 (Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.) で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所点滴した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。

- ⑤ 残る各群 2 枚のプレートは、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

(2) 連続処理法

- ① 24 時間処理及び 48 時間処理のそれぞれに非処理群、溶媒対照群、被験物質用量群及び陽性対照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート (直径 60 mm) を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞 (培養液 5.0 mL) を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。なお、非処理群については処理を行わなかった。さらに、陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL (最終濃度：0.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えた。いずれの場合も、その後 24 時間及び 48 時間培養した。
- ③ 各群 2 枚のプレートについて、24 時間及び 48 時間の培養終了後、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の培養状態を確認した。染色体標本の作製に際して、被験物質用量群については培養液を廃棄し、新しい培養液 5.0 mL を添加し、析出を可能な限り除去した。その他の操作については短時間処理法と同様にして染色体標本を作製した。
- ④ 残る各群 2 枚のプレートは、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

5) 染色体異常試験 (再試験) ・連続処理法・24 時間処理

- ① 非処理群、溶媒対照群、被験物質用量群及び陽性対照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート (直径 60 mm) を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞 (培養液 5.0 mL) を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験

液 0.050 mL を加えた。なお、非処理群については処理を行わなかった。さらに、陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL (最終濃度: 0.050 µg/mL) を加えた。その後 24 時間培養した。

- ③ 各群 2 枚のプレートについて、染色体観察用標本作製のため、培養終了の約 2 時間前にコルセミド (ジメコルシン溶液、10 µg/mL、和光純薬工業株式会社) を 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25% トリプシン溶液 (Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.) で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール: 酢酸=3:1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所へ滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2% ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- ④ 残る各群 2 枚の細胞増殖抑制率測定用標本のプレートは、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

6) 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に染色体数 46~54 本を持つ細胞を倍数体とし、その出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とした。

7) 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常はさらに以下のように定義・分類した。

(1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体または染色分体の同軸上に断片があるもの (非染色部分が染色分体の同軸上にある) であって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるもの。

染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸上からはずれているもの、及び

非染色部位が染色分体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。

- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの、及び非染色部位が染色体の同軸上にあっても、その長さが染色分体の幅以上に離れているもの。
- 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化 (frg) 他。

(2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数（二倍体）と異なり、倍化した場合を数的異常と定義した。

倍数体 : polyploidy (核内倍加体 : endoreduplication を含む)

8) 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準³⁾に従い染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率 (%) によって以下のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5% 未満	陰性 (-)
5% 以上 10% 未満	疑陽性 (±)
10% 以上	陽性 (+)

染色体構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合 (TAG) と含まない場合 (TA) とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

試験結果

1. 細胞増殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化及び非代謝活性化ともに明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は 78.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では 67.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非代謝活性化では 62.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察すると、代謝活性化では細胞の浮遊・形態変化は認められなかったが、非代謝活性化では 39.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で細胞の浮遊・形態変化が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに培養液交換前の観察において変化は認められなかった。肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化では 156.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で、非代謝活性化では 78.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で、培養液表面に被験物質と思われる物質の析出が認められた。

2) 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 1-3 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4 及び Table 1-4 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は、24 時間処理では 78.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48 時間処理では 39.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、24 時間処理では 57.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48 時間処理では 36.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察すると、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 39.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で細胞の浮遊・形態変化が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに培養終了時の観察において変化は認められなかった。肉眼による被験物質の析出の観察では、24 時間処理においては 312.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で、48 時間処理では 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で培養液

表面に被験物質と思われる物質の析出が認められた。

2. 染色体異常試験

短時間処理法の結果を Fig. 2-1、2-2、Table 2-1、2-2、3-1 及び 3-2 に、連続処理法の結果を Fig. 2-3、2-4、Table 2-3、2-4、3-3 及び 3-4 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察すると、短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化ともに細胞の浮遊・形態変化は認められなかった。連続処理法では 24 時間処理で全用量に細胞の浮遊・形態変化が認められ、48 時間処理では、39.06 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊・形態変化が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、短時間処理法及び連続処理法ともに変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質の析出の観察では、短時間処理法では全用量で、連続処理法の 24 時間処理では 312.5 µg/mL 以上の用量で析出が認められたが、48 時間処理では析出は認められなかった。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では 2500 µg/mL では 1.0%、1250 µg/mL で 0.5%、625.0 µg/mL で 0.5%、312.5 µg/mL で 0% 及び 156.3 µg/mL で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。また、非代謝活性化においても、2500 µg/mL で 0.5%、1250 µg/mL で 0%、625.0 µg/mL で 0.5%、312.5 µg/mL で 0% 及び 156.3 µg/mL で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。更に、連続処理法の 24 時間処理では細胞毒性のため全用量で規定数の分裂中期像が観察出来ず、UR (Unreliable) と判定された。また、48 時間処理では、78.13 µg/mL で UR、39.06 µg/mL で 0.5%、19.53 µg/mL で 0%、9.766 µg/mL で 0.5% 及び 4.883 µg/mL で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。

各処理法ともに溶媒対照群における染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 2) とほぼ同様であった。陽性対照群における染色体構造異常の出現率は、試験施設の背景値 (Attached Data 2) に比べやや高低が見られたが、染色体構造異常の出現率は陽性の判定基準内にあり、十分に高い出現率を示したことから、試験は適切に実施されたと考えられた。

3) 数的異常

倍数体の出現率は、短時間処理法の代謝活性化では 2500 µg/mL で 2.0%、1250 µg/mL で 1.5%、625.0 µg/mL で 1.0%、312.5 µg/mL で 1.0% 及び 156.3 µg/mL で 1.0% と陰性の

判定基準である5%未満であった。また、非代謝活性化においては、2500 µg/mLで0.5%、1250 µg/mLで0.5%、625.0 µg/mLで0%、312.5 µg/mLで0%及び156.3 µg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満であった。更に、連続処理法の24時間処理では細胞毒性のため全用量で規定数の分裂中期像が観察出来ず、UR (Unreliable) と判定された。また、48時間処理では、78.13 µg/mLでUR、39.06 µg/mLで0%、19.53 µg/mLで1.0%、9.766 µg/mLで0.5%及び4.883 µg/mLで0.5%と陰性の判定基準である5%未満であった。

各処理法ともに陰性対照群における倍数体の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 2) とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

3. 染色体異常試験 (再試験)

24時間処理の結果を Fig. 2-5、Table 2-5 及び 3-5 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察すると、全用量に細胞の浮遊・形態変化が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、色調変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質の析出の観察では、析出は認められなかった。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、156.3 µg/mL では細胞毒性のため規定数の分裂中期像が観察出来ず、UR (Unreliable) と判定され、78.13 µg/mL で0.5%、39.53 µg/mL で0%、19.53 µg/mL で0%及び9.766 µg/mL で0.5%と陰性の判定基準である5%未満を示した。

溶媒対照群及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性及び陽性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 2) とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

3) 数的異常

倍数体の出現率は、156.3 µg/mL でUR、78.13 µg/mL で0%、39.53 µg/mL で0%、19.53 µg/mL で0%及び9.766 µg/mL で1.0%と陰性の判定基準である5%未満であった。

陰性対照群における倍数体の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 2) とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

考 察

被験物質は、染色体異常試験において、短時間処理法、連続処理法及び連続処理法（再試験）ともに染色体の構造異常を有する細胞の出現率は増加せず、倍数性細胞の出現率の増加も認められなかった。

なお、いずれの処理法においても陰性対照群における染色体の構造異常及び倍数体の出現率は全て陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値と同様であった。更に、いずれの処理法においても陽性対照群における染色体構造異常の出現率は全て陽性の判定基準を超え、試験施設の背景値と同様に顕著な誘発が認められた。また、2枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、1,3,5-トリ-tert-ブチルベンゼンは、本試験条件下において染色体の構造異常及び倍数体の誘発能は有さないものと判定した。

参考文献

- 1) 石館 基監修 (1987): <改訂>染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー、東京
- 2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, 66, 277-290
- 4) 石館 基 (1982): 哺乳動物細胞を用いる検索と問題点 (Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), *日本化粧品科学会誌*, 6, 31-43
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): *Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271

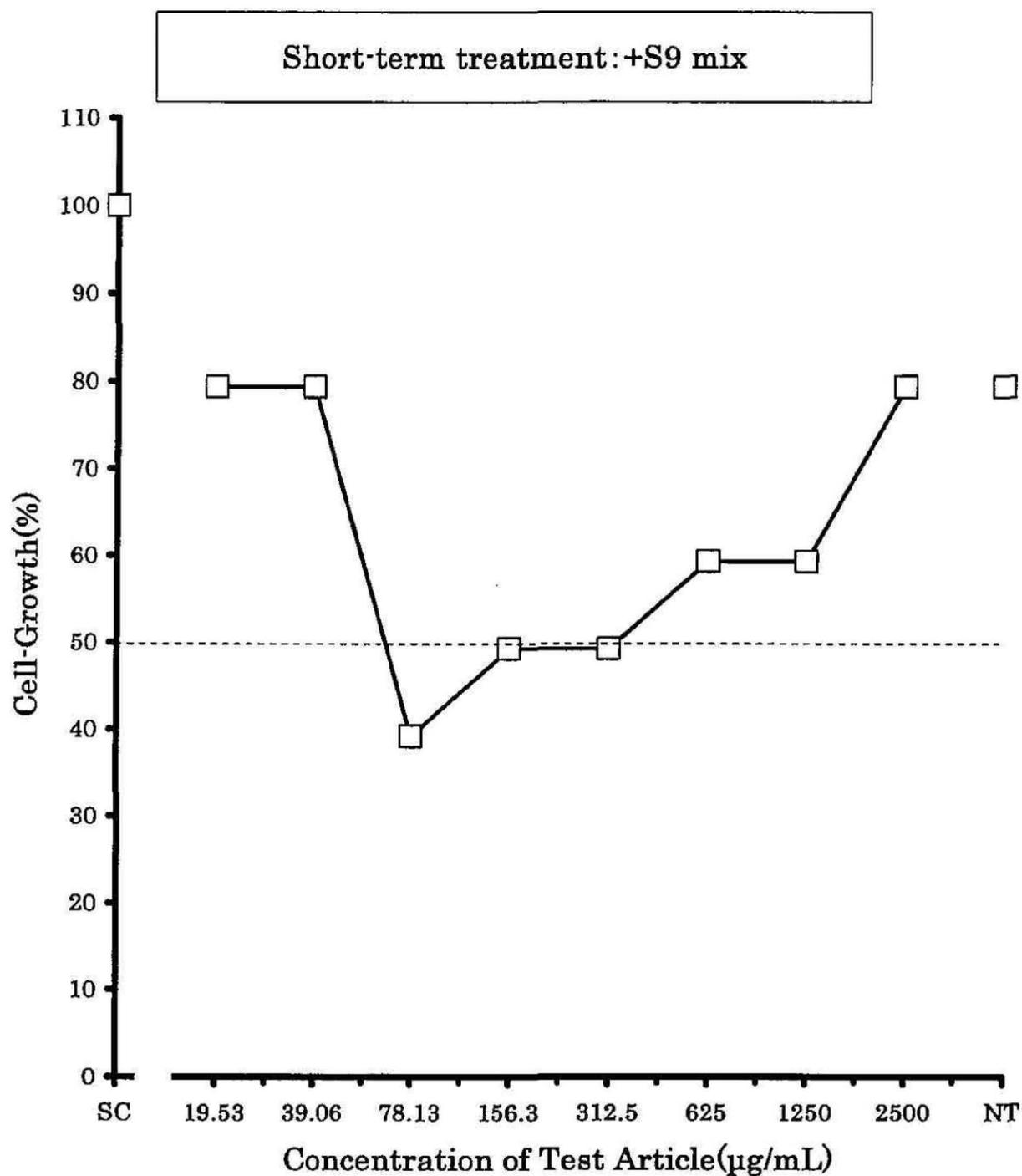


Fig. 1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

SC: Solvent control

NT: Non Treatment

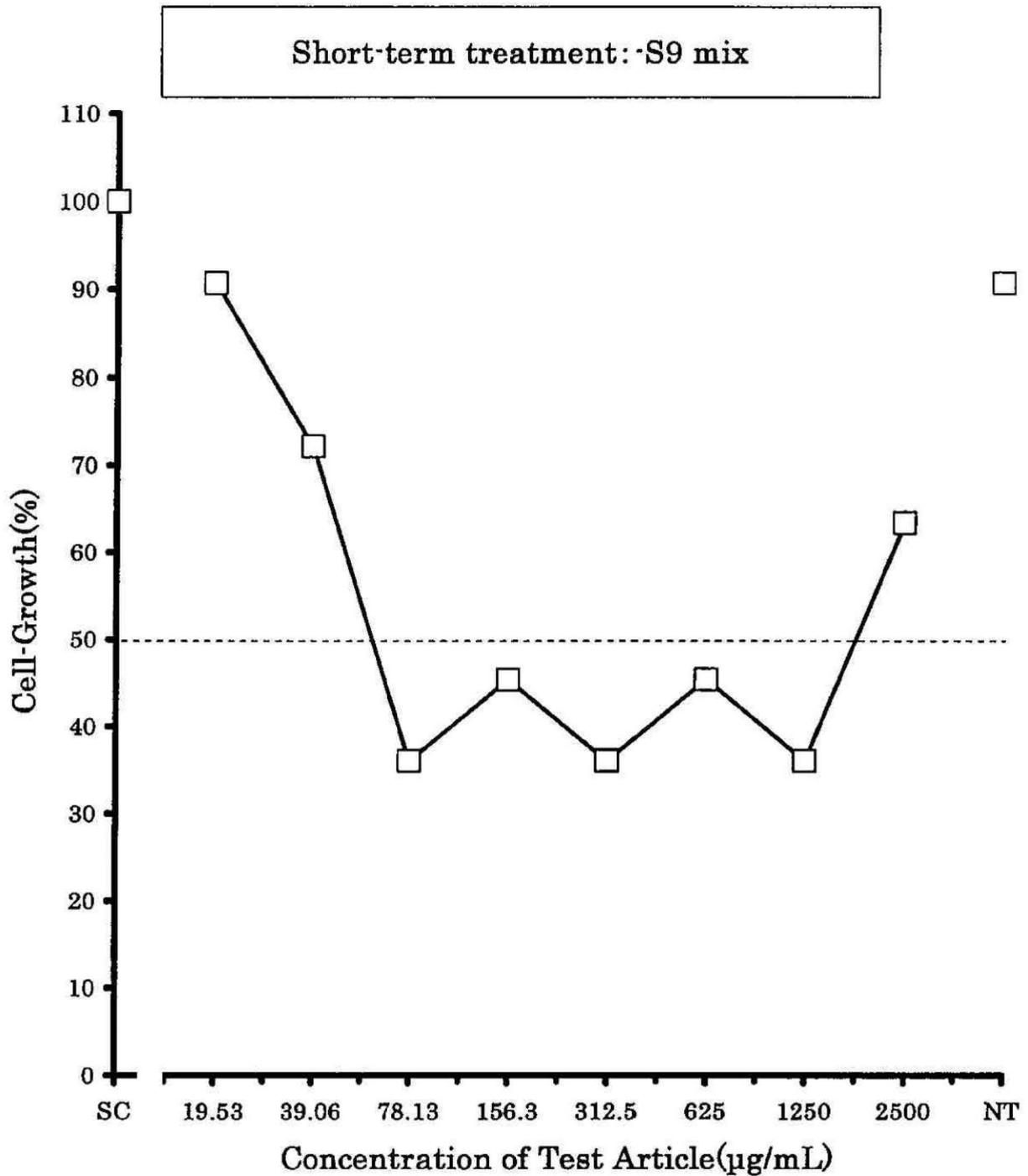


Fig.1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

SC: Solvent control

NT: Non Treatment

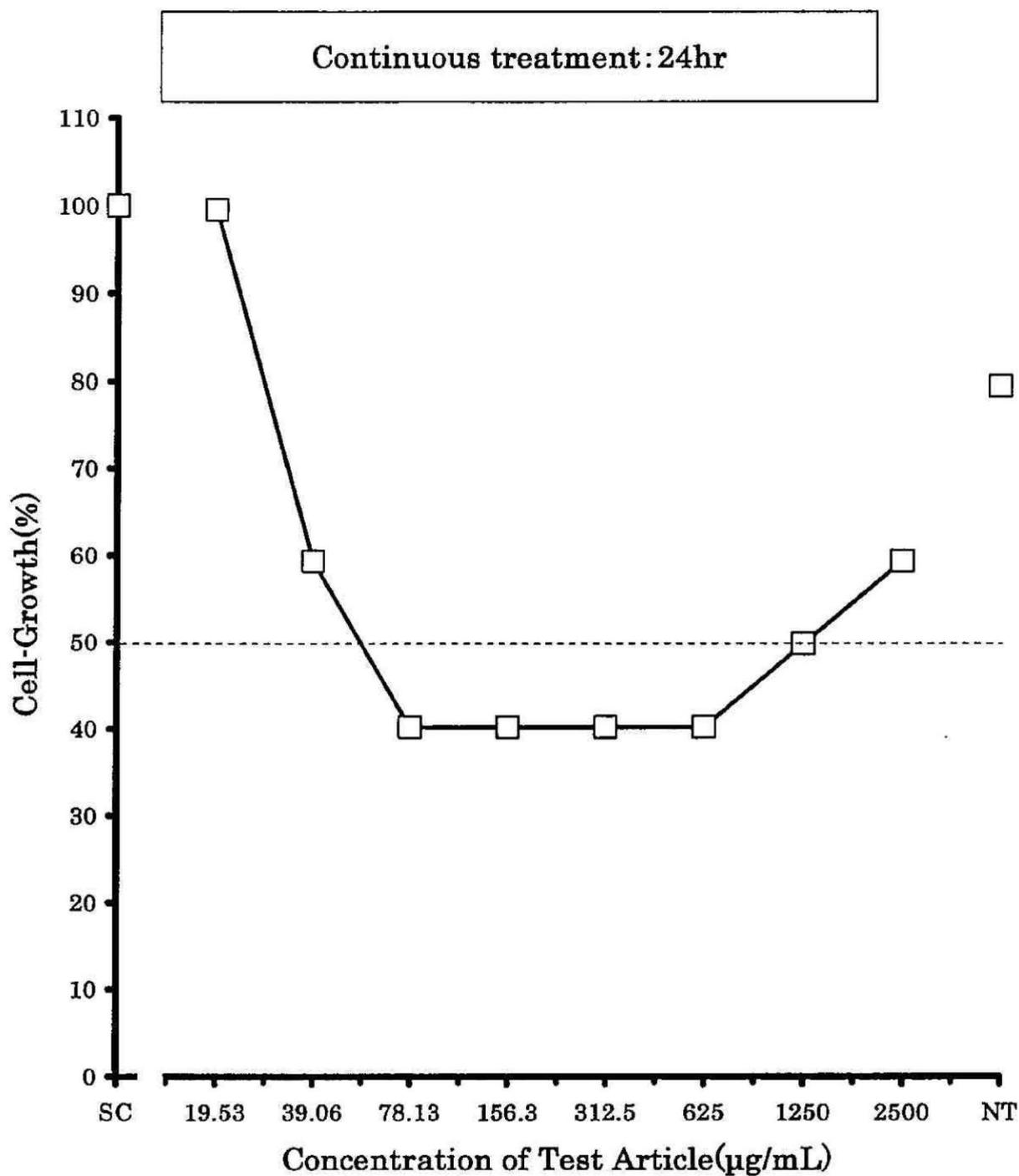


Fig.1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

SC: Solvent control

NT: Non Treatment

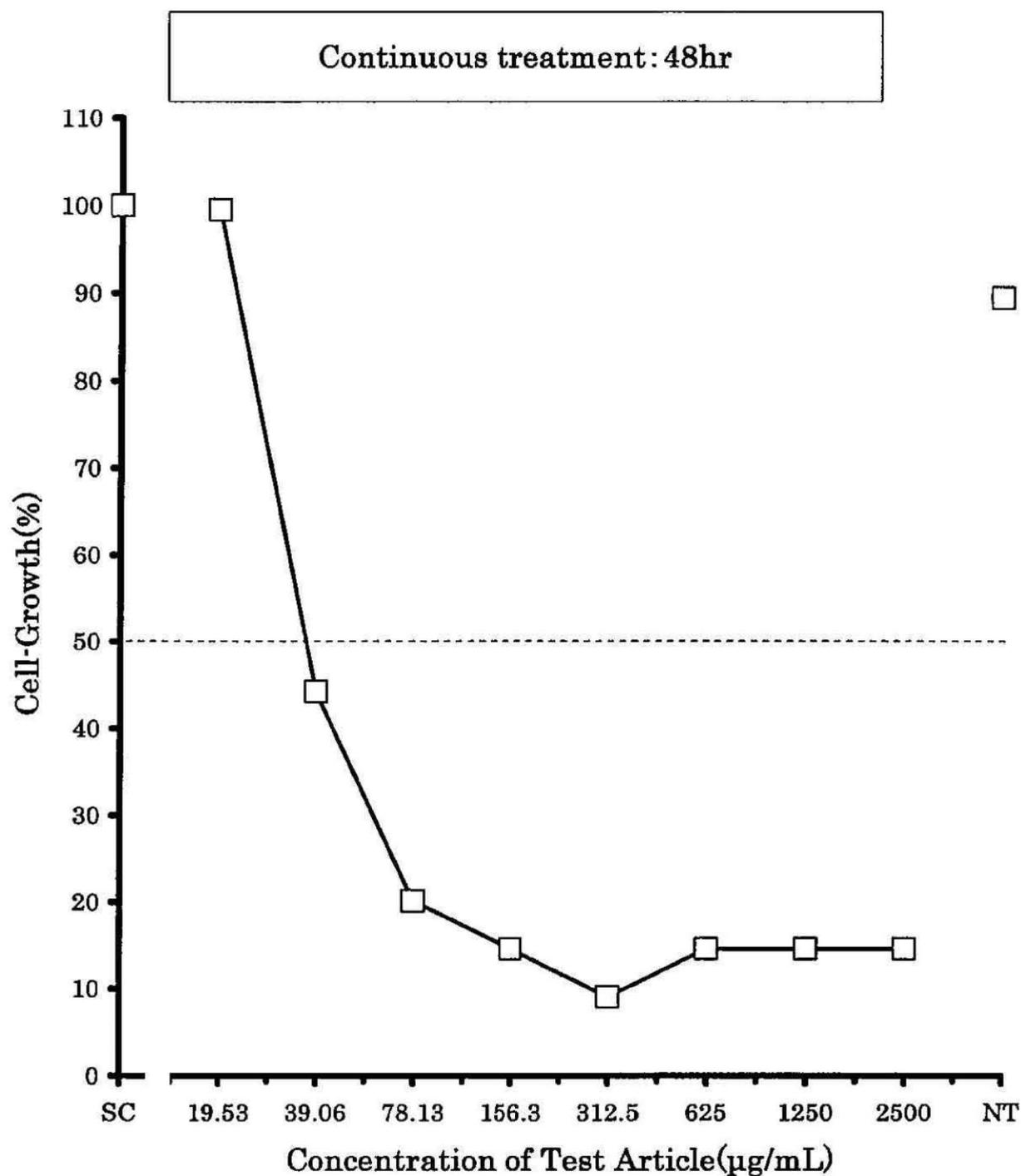


Fig.1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

SC: Solvent control

NT: Non Treatment

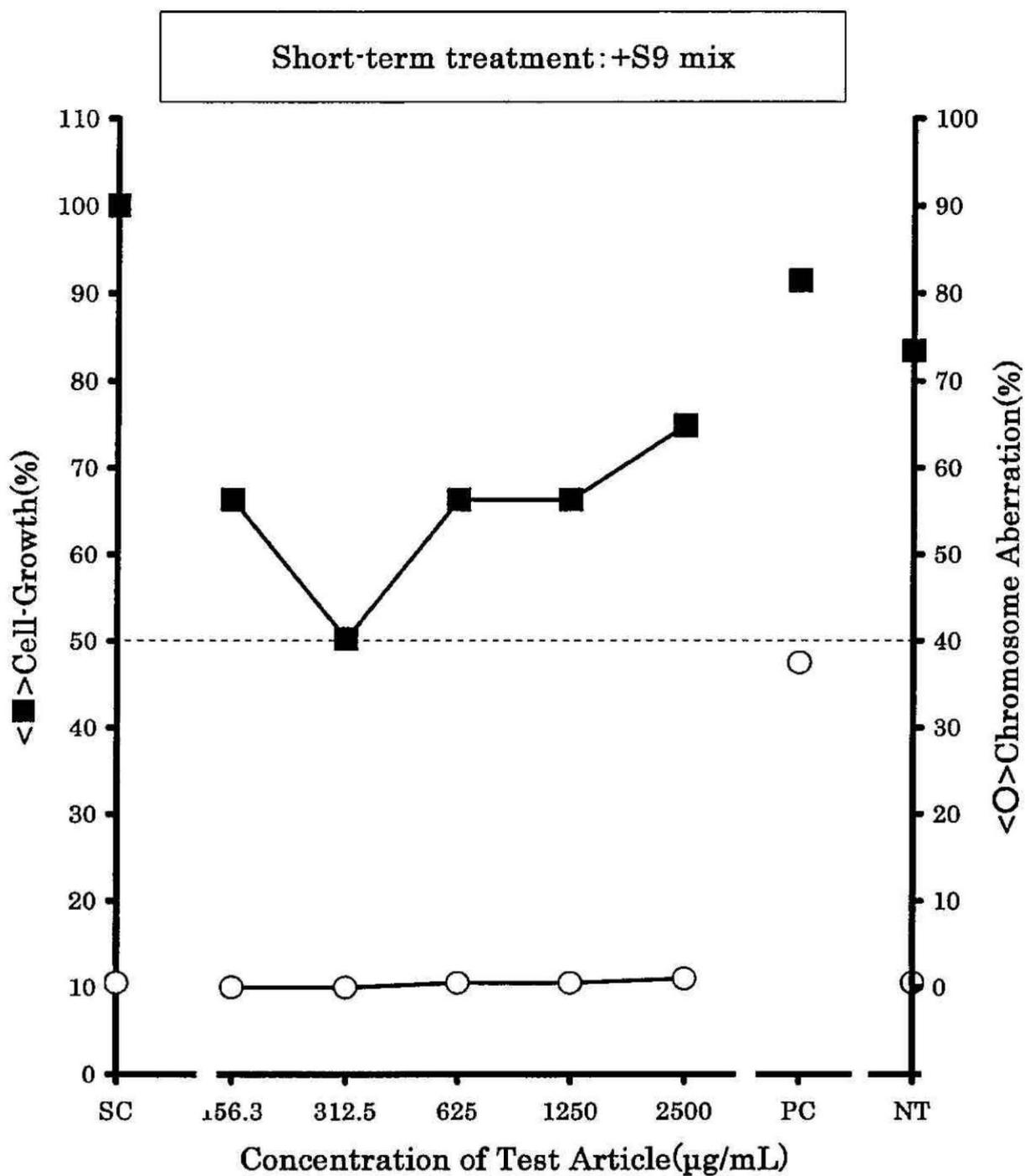


Fig.2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

SC: Solvent Control

PC: Positive control

NT: Non Treatment

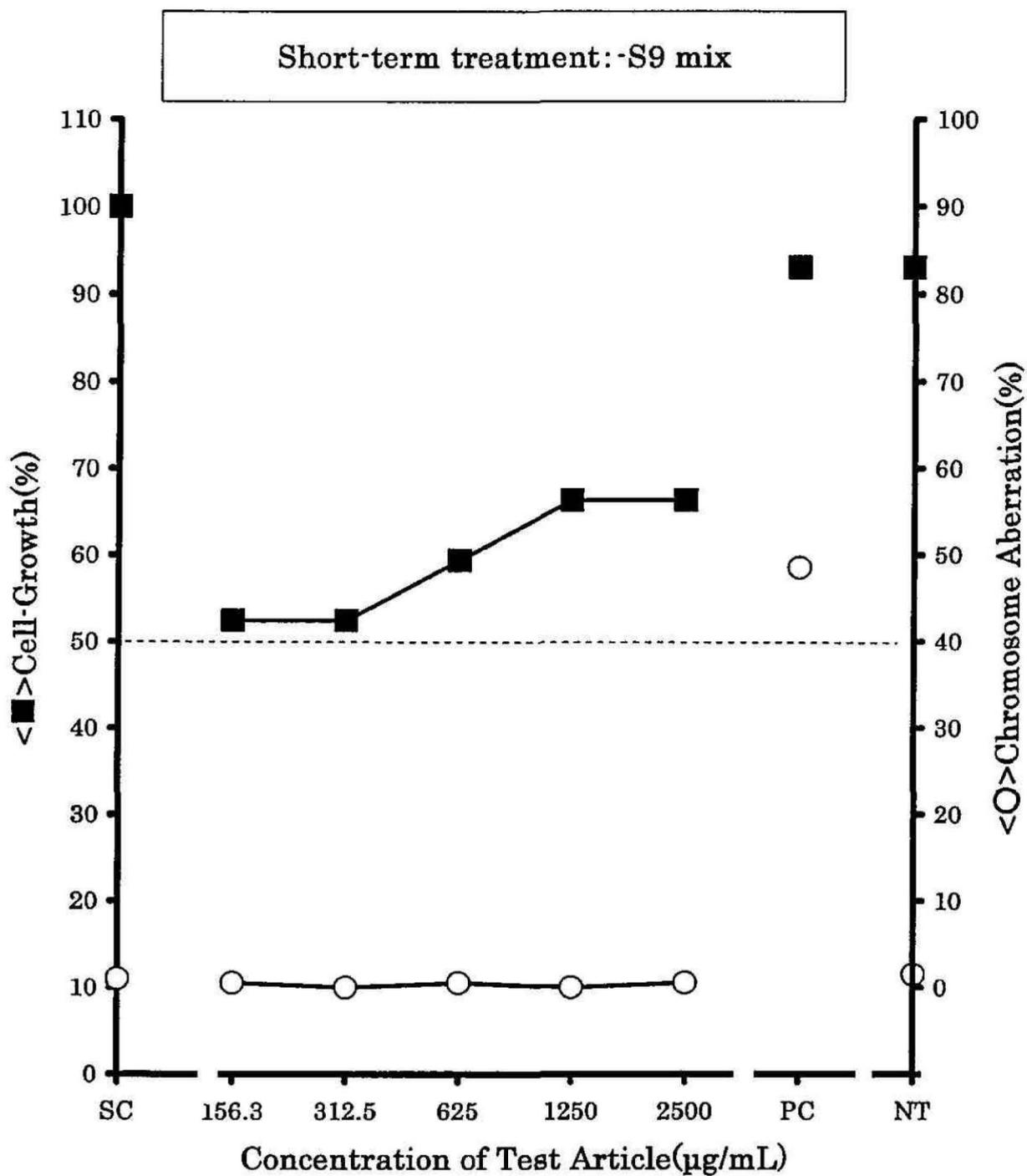


Fig. 2-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

SC: Solvent Control

PC: Positive control

NT: Non Treatment

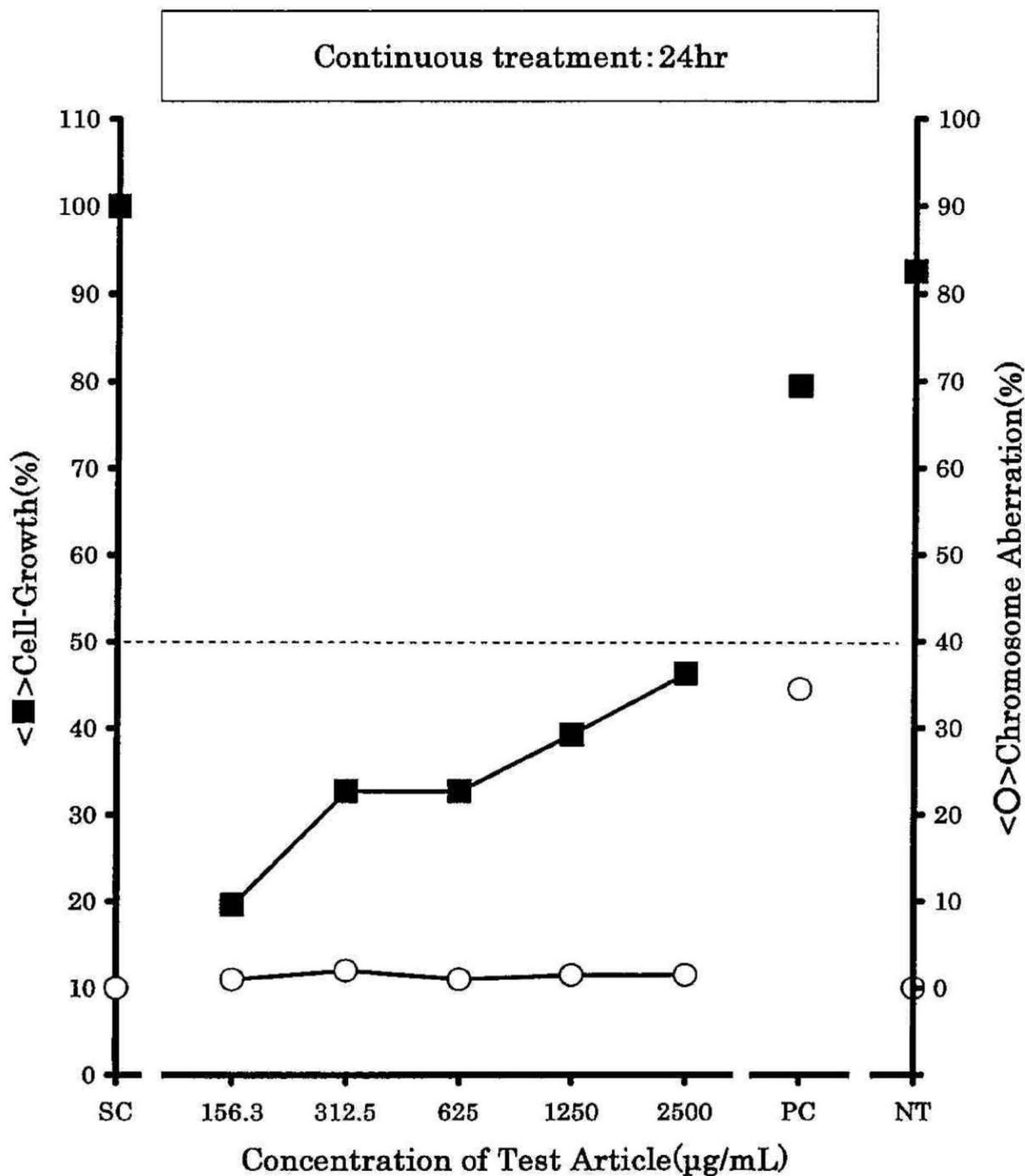


Fig.2-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

SC: Solvent Control PC: Positive control NT: Non Treatment

TOX1: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

TOX2: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

UR: This value was judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

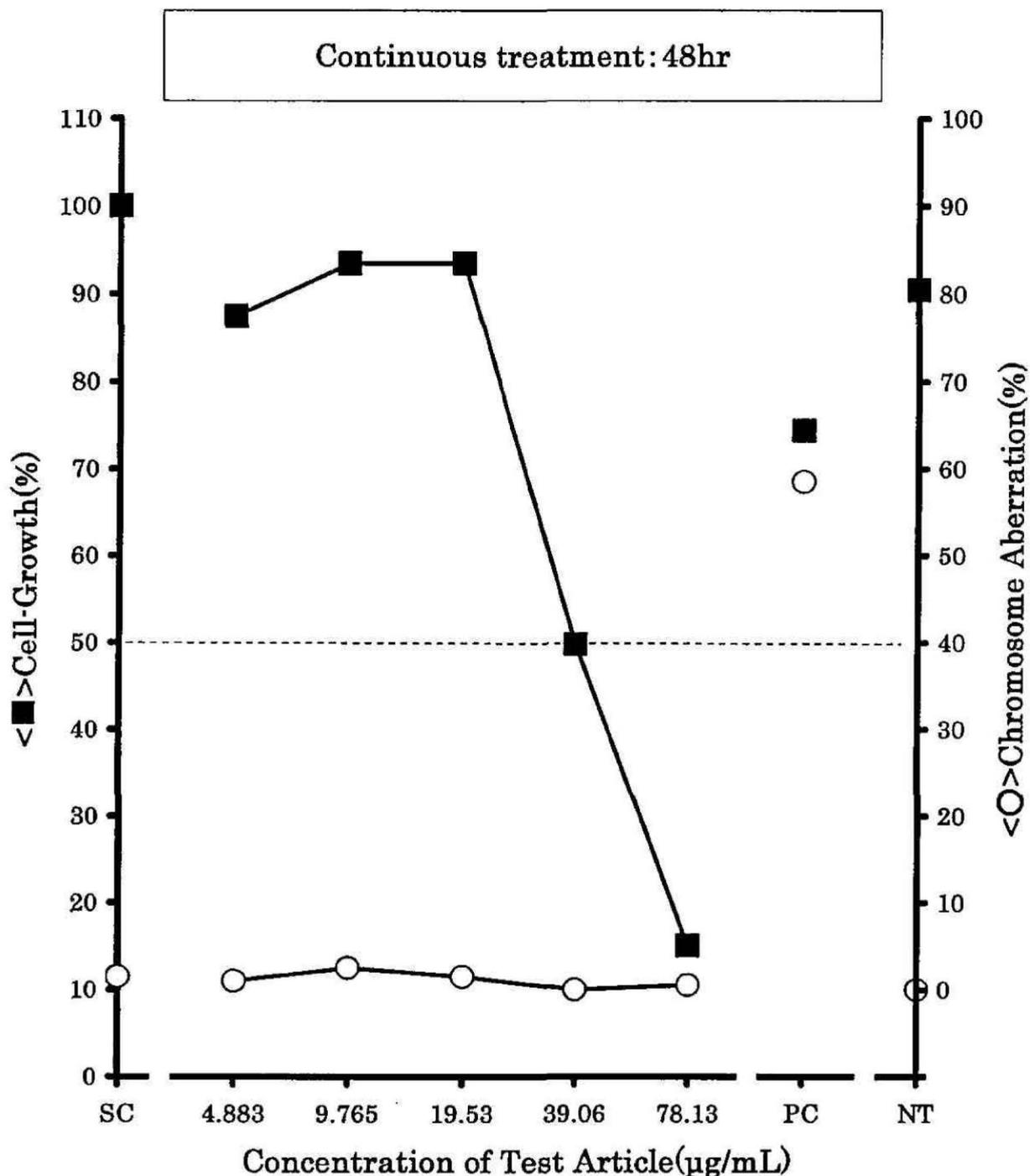


Fig.2-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

SC: Solvent Control PC: Positive control NT: Non Treatment

TOX1: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

TOX2: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

UR: This value was judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

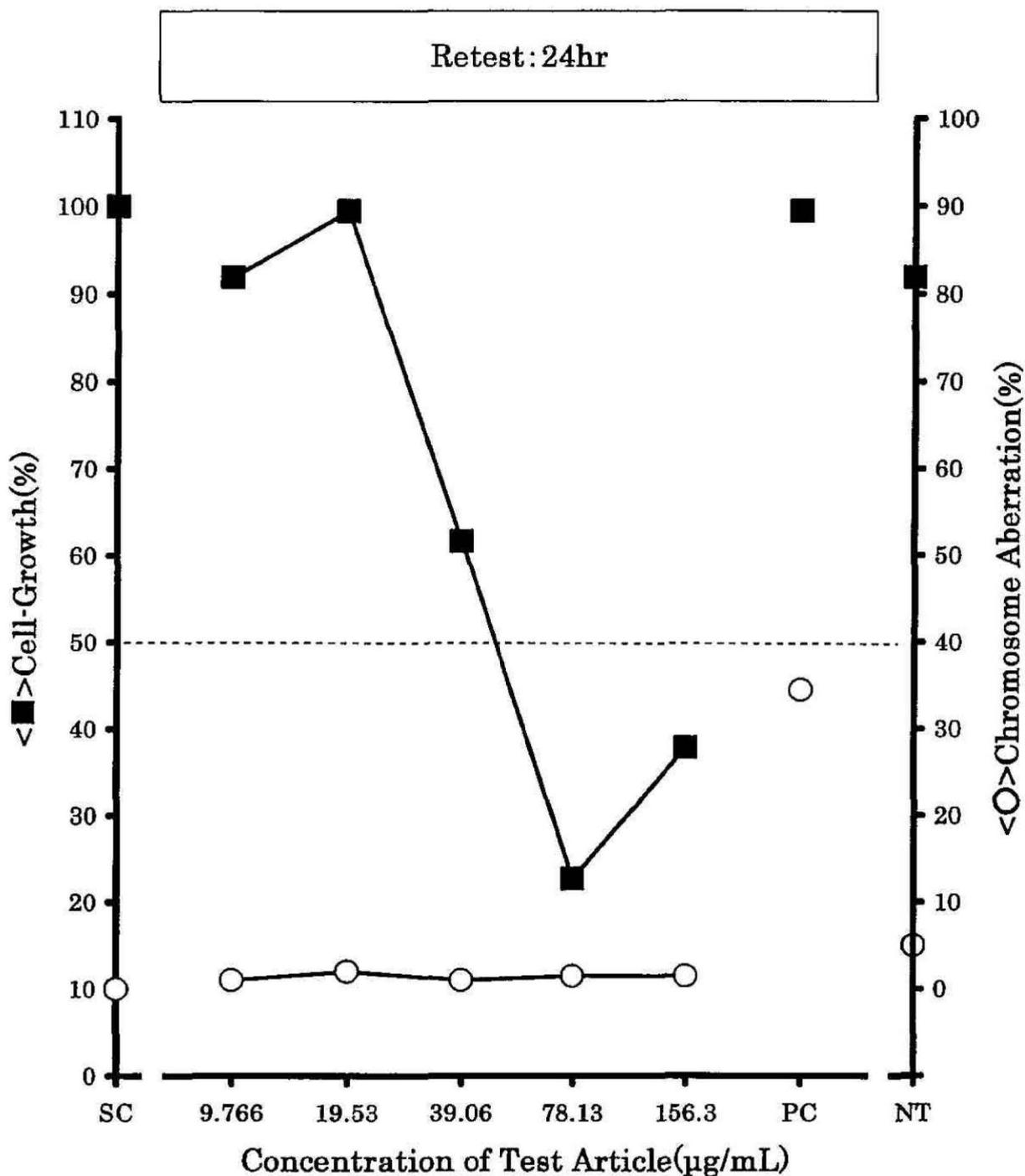


Fig.2-5 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene

SC: Solvent control PC: Positive control NT: Non treatment

TOX1: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

TOX2: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

UR: This value was judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene [Short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
+	6-18	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		19.53	79	79	—	—	—
			79		—	—	—
		39.06	79	79	—	—	—
			79		—	—	—
		78.13	39	39	—	—	—
			39		—	—	—
		156.3	59	49	—	—	+
			39		—	—	+
		312.5	59	49	—	—	+
			39		—	—	+
		625.0	59	59	—	—	+
			59		—	—	+
		1250	59	59	—	—	+
			59		—	—	+
		2500	79	79	—	—	+
			79		—	—	+
		NT	79	79	—	—	—
			79		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					67.4	µg/mL	

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of educt

Table 1-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Short-term treatment: S9 mix]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	6-18	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			83		—	—	—
		19.53	83	91	—	—	—
			83		—	—	—
		39.06	66	72	+	—	—
			66		+	—	—
		78.13	33	36	++	—	+
			33		++	—	+
		156.3	33	45	++	—	+
			50		++	—	+
		312.5	33	36	++	—	+
			33		++	—	+
		625.0	50	45	++	—	+
			33		++	—	+
		1250	33	36	++	—	+
			33		++	—	+
		2500	66	63	++	—	+
			50		++	—	+
		NT	83	91	—	—	—
			83		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					62.9	µg/mL	

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of educt

Table 1-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene [Continuous treatment: 24hr]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	24	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		19.53	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		39.06	59	59	++	—	—
			59		++	—	—
		78.13	40	40	+++	—	—
			40		+++	—	—
		156.3	40	40	+++	—	—
			40		+++	—	—
		312.5	40	40	+++	—	+
			40		+++	—	+
		625.0	40	40	+++	—	+
			40		+++	—	+
		1250	59	50	++	—	+
			40		++	—	+
		2500	59	59	++	—	+
			59		++	—	+
		NT	79	79	—	—	—
			79		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					57.6	µg/mL	

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of educt

Table 1-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene [Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	48	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		19.53	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		39.06	39	44	+	—	—
			49		+	—	—
		78.13	20	20	+++	—	—
			20		+++	—	—
		156.3	9	15	+++	—	—
			20		+++	—	—
		312.5	9	9	+++	—	—
			9		+++	—	—
		625.0	9	15	+++	—	+
			20		+++	—	+
		1250	20	15	+++	—	+
			9		+++	—	+
		2500	20	15	+++	—	+
			9		+++	—	+
		NT	89	89	—	—	—
			89		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					36.9	$\mu\text{g/mL}$	

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of educt

Table 2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene [Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{d)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
+	6-18	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—	
			99		—	—	—	
		Test article	156.3	66	66	—	—	+
				66		—	—	+
			312.5	50	50	—	—	+
				50		—	—	+
			625.0	66	66	—	—	+
				66		—	—	+
		1250	66	66	—	—	+	
			66		—	—	+	
		2500	83	75	—	—	+	
			66		—	—	+	
		PC	83	91	—	—	—	
			99		—	—	—	
		NT	83	83	—	—	—	
			83		—	—	—	

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

PC : Positive Control(cyclophosphamide, 14 $\mu\text{g/mL}$)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of educt

Table 2-2 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene [Short-term treatment: -S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%) ^{b)}	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
-	6-18	0(SC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	
			87		-	-	-	
		Test article	156.3	49	52	-	-	+
				49		-	-	+
			312.5	49	52	-	-	+
				49		-	-	+
			625.0	49	59	-	-	+
				62		-	-	+
		1250	62	66	-	-	+	
			62		-	-	+	
		2500	62	66	-	-	+	
			62		-	-	+	
		PC	87	93	-	-	-	
			87		-	-	-	
		NT	87	93	-	-	-	
			87		-	-	-	

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.075µg/mL)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of educt

Table 2-3 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene [Continuous treatment: 24hr]

Chromosome aberration test									
Study type	S9 mix	time (hr)	Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
				Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
—		24	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—	
				114		—	—	—	
			Test article	156.3	28	20	+++	—	—
					14		+++	—	—
				312.5	42	33	++	—	+
					28		++	—	+
				625.0	42	33	++	—	+
					28		++	—	+
			1250	42	39	++	—	+	
				42		++	—	+	
			2500	57	46	++	—	+	
				42		++	—	+	
			PC	85	79	—	—	—	
				85		—	—	—	
			NT	99	93	—	—	—	
				99		—	—	—	

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05 $\mu\text{g/mL}$)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of educt

Table 2-4 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene [Continuous treatment: 48hr]

Chromosome aberration test									
Study type	S9 mix	time (hr)	Treatment and Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
				Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
-		48	0(SC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	
				99		-	-	-	
			Test article	4.883	87	87	-	-	-
					87		-	-	-
				9.765	93	93	-	-	-
					93		-	-	-
				19.53	93	93	-	-	-
					93		-	-	-
			39.06	56	50	+	-	-	
				43		+	-	-	
			78.13	12	15	+++	-	-	
				18		+++	-	-	
			PC	74	74	-	-	-	
				74		-	-	-	
			NT	93	90	-	-	-	
				87		-	-	-	

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-5 Cell-growth ratio in the retest in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Retest: 24hr]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
-	24	0(SC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	
			85		-	-	-	
		Test article	9.766	85	92	+	-	-
				85		+	-	-
			19.53	99	99	+	-	-
				85		+	-	-
			39.06	57	62	+	-	-
				57		+	-	-
		78.13	28	23	+++	-	-	
			14		+++	-	-	
		156.3	28	38	++	-	-	
			42		++	-	-	
		PC	99	99	-	-	-	
			85		-	-	-	
		NT	85	92	-	-	-	
			85		-	-	-	

SC : Solvent Control(acetone)

NT : Non Treatment

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05µg/mL)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Short-term treatment:+S9 mix]

S9 mix	Time (h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.	
						g	ctb	cte	csb	cse	other					
+	6-18	SC	200	0.5	-	0	0	0	0	1	0	0.5	0.5	-	87-1	
			(100)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	46-1	
			(100)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)	(1)	-	46-1	
		2500	200	2.0	-	1	0	2	0	0	0	0	1.0	1.5	-	53-1
			(100)	(3)	(1)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)	-	23-1
		1250	200	1.5	-	0	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	-	08-1
			(100)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	60-1
		(100)	200	1.0	-	0	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	-	34-1
			(100)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	40-1
		(100)	312.5	1.0	-	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	84-1
(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	85-1		
(100)	156.3	1.0	-	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	26-1		
	(100)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	82-1		
(100)	PC	1.0	-	1	8	70	0	0	1	37.5	37.5	+	24-1			
	(100)	(1)	(1)	(4)	(37)	(0)	(0)	(1)	(39)	(39)	(39)	+	39-1			
(100)	NT	0.5	-	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	-	44-1			
	(100)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	76-1			
(100)																

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

SC: Solvent control (acetone)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 μ g/mL)

NT: Not Treatment

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Short-term treatment:-S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						μ	ctb	cte	csb	cse	other				
-	6-18	SC	200 (100) (100)	1.0 (0) (2)	-	0 (0) (0)	1 (1) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1.0 (2) (0)	1.0 (2) (0)	-	54-1 36-1
		2500	200 (100) (100)	0.5 (0) (1)	-	0 (0) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (1) (1)	0.5 (0) (1)	-	13-1 11-1
		1250	200 (100) (100)	0.5 (1) (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)	-	48-1 06-1
		625.0	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	-	42-1 52-1
		312.5	200 (100) (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)	-	72-1 55-1
		156.3	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	-	99-1 75-1
		PC	200 (100) (100)	1.5 (3) (0)	-	4 (3) (1)	19 (11) (8)	89 (46) (43)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	48.5 (51) (46)	49.5 (52) (47)	+	91-1 22-1
		NT	200 (100) (100)	0.5 (1) (0)	-	1 (0) (1)	2 (2) (0)	1 (0) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1.5 (2) (1)	2.0 (2) (2)	-	31-1 28-1

μ : chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

SC: Solvent control (acetone)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075 μ g/mL)

NT: Not Treatment

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Continuous treatment:24hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						μ	ctb	cte	csb	cse	other				
		SC	200 (100) (100)	0.5 (1) (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)	-	57-1 25-1
		2500	40 (15) (9) (9) (7)	2.5 (0) (0) (0) (1)	UR	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)	0.0 (0) (0) (0) (0)	UR	97-1 97-2 21-1 21-2
		1250	28 (3) (1) (13) (11)	0.0 (0) (0) (0) (0)	UR	0 (0) (0) (0) (0)	0 (0) (0) (0) (0)	0 (0) (0) (0) (0)	0 (0) (0) (0) (0)	1 (0) (0) (1) (0)	0 (0) (0) (0) (0)	3.6 (0) (0) (1) (0)	3.6 (0) (0) (1) (0)	UR	74-1 74-2 63-1 63-2
-	24-0	625.0	25 (3) (7) (7) (8)	0.0 (0) (0) (0) (0)	UR	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)	0.0 (0) (0) (0) (0)	UR	41-1 41-2 56-1 56-2
		312.5	127 (29) (23) (39) (36)	1.6 (1) (1) (0) (0)	UR	0 (0) (0) (0) (0)	0 (0) (0) (0) (0)	1 (0) (0) (0) (1)	0 (0) (0) (0) (0)	0 (0) (0) (0) (0)	0 (0) (0) (0) (0)	0.8 (0) (0) (0) (1)	0.8 (0) (0) (0) (1)	UR	68-1 68-2 93-1 93-2
		156.3	159 (17) (42) (69) (31)	0.6 (0) (1) (0) (0)	UR	1 (1) (0) (0) (0)	0 (0) (0) (0) (0)	1 (0) (0) (0) (1)	0 (0) (0) (0) (0)	0 (0) (0) (0) (0)	0 (0) (0) (0) (0)	0.6 (0) (0) (0) (1)	1.3 (1) (0) (0) (1)	UR	37-1 37-2 90-1 90-2
		PC	200 (100) (100)	0.5 (0) (1)	-	4 (3) (1)	17 (6) (11)	77 (36) (41)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	44.5 (40) (49)	45.5 (42) (49)	+	45-1 29-1
		NT	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	1 (0) (1)	1 (0) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (0) (1)	0.5 (0) (1)	-	94-1 96-1

μ : chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

SC: Solvent control (acetone)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 μ g/mL)

NT: Not Treatment

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Continuous treatment:48hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
		SC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	1 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	-	10-1 03-1
		78.13	114 (40) (51) (9) (14)	0.9 (1) (0) (0) (0)	UR	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) (0)	UR	92-1 92-2 59-1 59-2	
		39.06	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	-	05-1 12-1	
-	48-0	19.53	200 (100) (100)	1.0 (1) (1)	-	1 (1) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	-	65-1 47-1	
		9.766	200 (100) (100)	0.5 (1) (0)	-	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	-	70-1 83-1	
		4.883	200 (100) (100)	0.5 (1) (0)	-	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1 (1) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (0) (1)	0.5 (0) (1)	-	02-1 78-1	
		PC	200 (100) (100)	1.0 (0) (2)	-	1 (1) (0)	20 (6) (14)	127 (66) (61)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	67.5 (67) (68)	67.5 (67) (68)	+	79-1 66-1
		NT	200 (100) (100)	0.5 (1) (0)	-	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	-	32-1 73-1	

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

SC: Solvent control (acetone)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 μ g/mL)

NT: Not Treatment

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

Table 3-5 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,3,5-tri-tert-butylbenzene
[Retest:24hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
		SC	200 (100) (100)	0.5 (1) (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)	-	16-1 67-1
		156.3	100 (31) (27) (21) (21)	0.0 (0) (0) (0) (0)	UR	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) (0)	UR	81-1 81-2 01-1 01-2	
		78.13	200 (67) (33) (100)	0.0 (0) (0) (0)	-	0 (0) (0) (0)	0 (0) (0) (0)	1 (0) (0) (1)	0 (0) (0) (0)	0 (0) (0) (0)	0 (0) (0) (0)	0.5 (0) (0) (1)	0.5 (0) (0) (1)	-	64-1 64-2 27-1
-	24-0	39.06	200 (100) (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)	-	50-1 80-1
		19.53	200 (100) (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)	-	61-1 35-1
		9.766	200 (100) (100)	1.0 (1) (1)	-	0 (0) (0)	1 (1) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (1) (1)	0.5 (0) (1)	-	51-1 20-1
		PC	200 (100) (100)	0.5 (1) (0)	-	1 (0) (1)	10 (4) (6)	69 (38) (31)	0 (0) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	38.0 (42) (34)	38.5 (42) (35)	+	04-1 30-1
		NT	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	-	88-1 09-1

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

SC: Solvent control (acetone)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 $\mu\text{g/mL}$)

NT: Not Treatment

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.