

## 最終報告書

表 題： tert-ペン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

試験番号：SR05345

株式会社 化合物安全性研究所

## 目 次

|              | 頁  |
|--------------|----|
| 表紙·····      | 1  |
| 目次·····      | 4  |
| 要約·····      | 8  |
| 緒言·····      | 9  |
| 材料および方法····· | 9  |
| 成績·····      | 18 |
| 考察·····      | 20 |

## Tables and Figure

|           |                                                                                                                                |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1   | Effects of tert-pentylbenzene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)·····            | 22 |
| Figure 1  | Effects of tert-pentylbenzene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)·····            | 23 |
| Table 2   | Effects of tert-pentylbenzene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test)····· | 24 |
| Table 3-1 | Results of the chromosomal aberration test of tert-pentylbenzene (6 hours treatment without metabolic activation)·····         | 25 |
| Table 3-2 | Results of the chromosomal aberration test of tert-pentylbenzene (6 hours treatment with metabolic activation)·····            | 26 |
| Table 3-3 | Results of the chromosomal aberration test of tert-pentylbenzene (24 hours treatment without metabolic activation)·····        | 27 |

## 要 約

tert-ペンチルベンゼンの *in vitro* における染色体異常誘発性を、チャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL/IU)を用いて検討した。試験は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 系列で実施した。

予備試験(細胞増殖抑制試験 : 5.86~1500  $\mu\text{g/mL}$ )の結果、各試験系列で細胞増殖抑制が認められた。IC<sub>50</sub> 値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 35.1  $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の代謝活性化による場合が 67.9  $\mu\text{g/mL}$  および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 32.7  $\mu\text{g/mL}$  であった。

被験物質の析出が、試験液処理開始時では各試験系列の 188  $\mu\text{g/mL}$  以上あるいは 375  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量で、また、試験液処理終了時では短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合の 1500  $\mu\text{g/mL}$  の用量で観察された。

被験物質による培養液 pH への影響は観察されなかった。

予備試験の結果より、本試験(染色体異常試験)の用量として、各試験系列とも IC<sub>50</sub> より高用量を最高用量とし以下公比 1.25 で用量を低下させた計 7 用量を設定した。

本試験の結果、染色体の構造異常および数異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量 : 20.5、25.6 および 32.0  $\mu\text{g/mL}$ )、短時間処理法の代謝活性化による場合(41.0、51.2、64.0 および 80.0  $\mu\text{g/mL}$ )ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合(16.4、20.5、25.6 および 32.0  $\mu\text{g/mL}$ )のいずれの用量においても 5%未満であった。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、tert-ペンチルベンゼンは本試験条件においては乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断した。

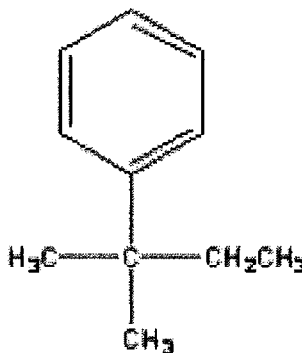
## 緒 言

tert-ペンチルベンゼンの *in vitro* における染色体異常誘発性を検討する目的で、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いる染色体異常試験を実施した。

## 材料および方法

### 1. 被験物質

|         |                                   |
|---------|-----------------------------------|
| 名称      | : tert-ペンチルベンゼン                   |
| 英名      | : tert-pentylbenzene              |
| 別名      | : tert-アミルベンゼン ; tert-amylbenzene |
| CAS No. | : 2049-95-8                       |
| 化学物質番号  | : 化審法 3-22                        |
| 構造式     | :                                 |



|         |                                                                                                                                                 |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 化学式     | : $C_6H_5C(CH_3)_2CH_2CH_3$                                                                                                                     |
| 分子量     | : 148.24                                                                                                                                        |
| 物理化学的性質 | : 外観 ; 無色澄明の液体<br>臭い ; 特異臭<br>沸点 ; 189～191℃<br>引火点 ; 60℃<br>発火点 ; データなし<br>蒸気圧 ; データなし<br>比重(密度) ; 0.875 g/mL (20℃)<br>溶解性 ; 水に不溶。エタノール、エーテルに易溶 |

純度(含量) : 99.5% (Appendix 1)

不純物の名称およびその濃度 : 不明(不純物の特定は実施していない)

入手量 : 300 g(関連試験と共通)

安定性 : 実験終了後に、残余被験物質について製造者が実施した純度に関する分析成績を入手し(Appendix 2)、実験期間中の安定性を確認した。

保存条件 : 密閉、冷暗所(実測範囲 : 1~8℃)

取扱上の注意 : 火気厳禁(危険物第4類、第2石油類(非水溶性)危険等級3)とし、漏れ、溢れ、飛散などしないように取扱い、使用後は容器を密閉した。ゴム手袋およびマスク等を着用し、皮膚との接触も避け取扱った。また、着衣等に付着しないように注意した。

残余被験物質の処置 : 試験操作終了後、一部を純度分析のため製造者へ送付した。残余の被験物質は焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

## 2. 被験物質の調製

被験物質を精秤し、ジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、株式会社同仁化学研究所)を用いて溶解し、150 mg/mL あるいは 10.0 mg/mL 調製液を調製した。

予備試験では、150 mg/mL 調製液からジメチルスルホキシドを用いて公比 2 で段階希釈し、75.0、37.5、18.8、9.38、4.69、2.34、1.17 および 0.586 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では、10.0 mg/mL 調製液からジメチルスルホキシドを用いて公比 1.25 の段階希釈により 8.00、6.40、5.12、4.10、3.28 および 2.62 mg/mL 調製液を、また、2 倍希釈により 5.00 調製液を調製した。さらに、5.00 mg/mL 調製液を公比 1.25 で段階希釈し、4.00、3.20、2.56、2.05、1.64 および 1.31 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、予備試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体の反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液は、予備試験では調製後 0.9 時間以内に、本試験では調製後 1.4 時間以内に使用した。

残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

### 3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の媒体のジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、株式会社同仁化学研究所)を使用した。陰性対照物質は、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い原液のまま使用した。

### 4. 陽性対照物質

代謝活性化によらない場合の陽性対照物質として、マイトマイシンC(ロット番号 448ADJ、協和醗酵工業株式会社)を使用した。マイトマイシンCは、購入後室温で保存し、日本薬局方注射用水(ロット番号 5L88、株式会社大塚製薬工場)を用いて 5 および 10  $\mu\text{g/mL}$  の濃度に調製した。購入したマイトマイシンCは、1 瓶中に日局マイトマイシンCを 2 mg(力価)含有しており、調製の際には 1 mg(力価)を 1 mg として換算した。

代謝活性化法による場合の陽性対照物質として、ベンゾ[a]ピレン(ロット番号 KLM1182、和光純薬工業株式会社)を使用した。ベンゾ[a]ピレンは、購入後冷所(2~8°C)で保存し、ジメチルスルホキシド(ロット番号 SL045、株式会社同仁化学研究所)を用いて 1 mg/mL の濃度に調製した。なお、購入したベンゾ[a]ピレンの含量は 101.0%であった。

陽性対照物質の各調製液は-20°C以下で分注凍結保存し、調製後 3 ヶ月以内に試験に使用した(使用期限は調製後 1 年)。保存調製液は解凍後 0.8 時間以内に使用し、それぞれプレート内の液に対し 1 vol%の割合で添加した。

### 5. 試験系

試験系として、2005 年 5 月 17 日に大日本製薬株式会社より継代数 14 で入手した CHL/IU を使用した。CHL/IU は、雌性の新生チャイニーズハムスターの肺に由来し、染色体数(モード)は 25 本(2n=22)、倍加時間の測定値は 13.6 時間である。本細胞は、増殖速度、継代における染色体の安定性、染色体標本の観察の容易さおよび既知の変異原物質に対する感受性を考慮して選択した。

細胞の保存に際しては、10 vol%ジメチルスルホキシドを含む培地を用いて  $1 \times 10^6$  cells/mL 細胞浮遊液を調製し、1 mL ずつアンプルに分注したものを漸次冷却して凍結させた後、液体窒素内に収納した。解凍後は、75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコを用いて 5.0%CO<sub>2</sub>、37.0°Cに設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター(MCO-175、三洋電機株式会社)内で培養し、3 または 4 日毎に継代を行った。試験では、継代数 17(予備試験)あるいは 21(本試験)の細胞を使用した。

### 6. 培地

イーグル MEM 培地を以下の割合で混合し調製した。

イーグル MEM 培地(Code 05902、ロット番号 50860211、日本製薬株式会社)9.4 g を日本薬局方注射用水(ロット番号 6C97、株式会社大塚製薬工場)に溶解し、さらにフェノールレッド(ロット

番号 PKF3307、和光純薬工業株式会社)6 mg を加え、全量を 1 L とした。オートクレーブ滅菌後、室温まで冷却し、滅菌済みの炭酸水素ナトリウム (試薬特級、ロット番号 609F1546、関東化学株式会社) 溶液で pH7.2~7.4 に調整し、ろ過除菌した L-グルタミン溶液 (試薬特級、L-グルタミン: ロット番号 EWR5134 および SDJ5850、和光純薬工業株式会社) を 0.292 g/L となるように添加した。さらに牛胎児血清 (ロット番号 1299355、GIBCO) を最終調製量の 10% になるように加えた。

## 7. S9 mix

S9 mix はキッコーマン株式会社より購入し (ロット番号 CAM-547、2006 年 8 月 11 日製造)、-80℃ 以下で凍結保存したものを、製造日より 4 ヶ月以内 (使用期限: 製造後 6 ヶ月) に使用した。

S9 mix は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット (雄、7 週齢) の肝ホモジネートより調製した S9 1.05 mL に、コファクターミックス 2.45 mL を加え、次表の組成に調製されたものである。

| S9 mix 1 mL 中の組成  |                                            |                 |
|-------------------|--------------------------------------------|-----------------|
| S9                | (キッコーマン株式会社製 RAA-547、S9 中蛋白含量 25.98 mg/mL) | 0.3 mL          |
| MgCl <sub>2</sub> | (和光純薬工業株式会社 SDN0075)                       | 5 μmol /0.1 mL  |
| KCl               | (和光純薬工業株式会社 WAE3815)                       | 33 μmol /0.1 mL |
| G-6-P             | (オリエンタル酵母工業株式会社 115601)                    | 5 μmol /0.1 mL  |
| NADP              | (オリエンタル酵母工業株式会社 045601)                    | 4 μmol /0.1 mL  |
| HEPES 緩衝液         | (株式会社同仁化学研究所 FX115)                        | 4 μmol /0.2 mL  |
| 蒸留水               |                                            | 0.1 mL          |

## 8. 試験方法

### (1) 予備試験

#### 1) 試験群

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 系列について実施した。

被験物質の最高用量は、10 mM 相当値 (被験物質の分子量 148.24) の 1500 μg/mL とし、以下公比 2 で低下させた計 9 用量 (1500、750、375、188、93.8、46.9、23.4、11.7 および 5.86 μg/mL) の試験群を設定した。更に、試験系列毎に陰性対照群を設定した。

各群につき 2 枚のプレートを使用し、各プレートには識別番号を明記した。

## 2) 細胞の播種

直径 60 mm の培養プレートに、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では  $0.4 \times 10^4$  cells/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合では  $0.6 \times 10^4$  cells/mL の細胞浮遊液をそれぞれ 5 mL ずつ播種し、5.0%CO<sub>2</sub>、37.0℃に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

## 3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、培養液 3 mL に対して試験液を 30  $\mu$ L の割合で試験チューブ内で混合し、その混合液 3 mL をプレートに添加し 6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して Ca<sup>2+</sup>および Mg<sup>2+</sup>フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

## 4) 短時間処理法の代謝活性化による場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、S9 mix 0.5 mL および培養液 2.5 mL の混和液に対し試験液を 30  $\mu$ L の割合で試験チューブ内で混合し (S9 の最終濃度約 5 vol%)、その混合液 3 mL をプレートに添加し 6 時間培養した。6 時間経過後に、プレート内の液を除去して Ca<sup>2+</sup>および Mg<sup>2+</sup>フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地 5 mL を加えて更に 18 時間培養した。

## 5) 連続処理法の 24-0 h 処理による場合

細胞播種後 3 日目に、プレートの培養液を除去し、培養液 5 mL に対して試験液を 50  $\mu$ L の割合で試験チューブ内で混合し、その混合液 5 mL をプレートに添加した。更に、24 時間培養した。

## 6) 被験物質の析出の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、被験物質の析出の有無を目視確認した。

## 7) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、培養液色の変化の有無を目視確認した。培養液色に変化が認められない場合には、被験物質による培養液 pH への影響は無いものと判断した。

8) 細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) の算出

培養終了後、プレート内の液を除去して Ca<sup>2+</sup>および Mg<sup>2+</sup>フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、10%ホルマリンで約 10~15 分間固定した後、0.1 w/v%クリスタルバイオレットで約 10~15 分間の染色を行った。染色後、水道水を入れた水槽内でプレートを洗浄して風乾させた。対照群のプレートを 100%として、各プレートの細胞増殖率を単層培養細胞密度測定装置 (MONOCELLATER II、東洋測器株式会社) で測定した。細胞増殖率が 50%以下まで低下した場合には、用量を対数化した回帰計算により 50%細胞増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。



## (2) 本試験

## 1) 試験群

予備試験の結果、各試験系列で 50%以上の細胞増殖抑制がみられたことから、各試験系列とも  $IC_{50}$  値より高用量を最高用量とし、以下公比 1.25 で用量を低下させた計 7 用量を設定した。

陽性対照群を除く各群にはサテライト群 2 枚を加えた 4 枚のプレートを使用し、陽性対照群では 2 枚のプレートを使用した。各プレートには識別番号を明記した。

## 2) 細胞の播種

8. 試験方法、(1)予備試験、2)細胞の播種と同様の方法で実施した。

## 3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

8. 試験方法、(1)予備試験、3)短時間処理法の代謝活性化によらない場合と同様の方法で実施した。

## 4) 短時間処理法の代謝活性化による場合

8. 試験方法、(1)予備試験、4)短時間処理法の代謝活性化による場合と同様の方法で実施した。

## 5) 連続処理法の 24-0 h 処理による場合

8. 試験方法、(1)予備試験、5)連続処理法の 24-0 h 処理による場合と同様の方法で実施した。

## 6) 被験物質の析出の有無の確認

8. 試験方法、(1)予備試験、6)被験物質の析出の有無の確認と同様の方法で実施した。

## 7) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認

8. 試験方法、(1)予備試験、7)被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認と同様の方法で実施した。

## 8) 細胞増殖率の測定

8. 試験方法、(1)予備試験、8)細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度 ( $IC_{50}$ ) の算出と同様の方法で実施した。 $IC_{50}$  は算出しなかった。

## 9) 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前に、各プレートに最終濃度 0.2  $\mu\text{g/mL}$  のコルセミド (ロット番号 1335046、GIBCO) を加えた。培養終了時間に、プレート内の液をそれぞれ遠沈管に回収し、各プレートを 0.02% EDTA-0.25% トリプシン (0.5M EDTA : ロット番号 118913、GIBCO、2.5% トリプシン : ロット番号 1301997、GIBCO) で処理して細胞を剥離させ、得られた細胞浮遊液を上記の遠沈管に回収して 1000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を除去し、0.075 mol/L 塩化カリウム (ロ

ット番号 403F1156、関東化学株式会社)を加え、穏やかにピペッティングを繰り返しながら常温で 30 分間放置し細胞を膨満化させた。氷冷したカルノア固定液(メタノール：酢酸=3：1、メタノール：ロット番号 801W1028、関東化学株式会社、酢酸：ロット番号 EWG7255、和光純薬工業株式会社)を加えて細胞を固定した後、1000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を除去し、新しいカルノア固定液を加えた。細胞の固定操作を 3 回繰り返した後、細胞浮遊液をスライドグラス上に滴下し、一夜以上自然乾燥させた。各プレートより、2 枚(細胞毒性により、得られた細胞が少ない用量については 1 枚)の染色体標本を作製した。

各スライドは、2%ギムザ液(ギムザ液：ロット番号 SR014、和光純薬工業株式会社、インスタント磷酸緩衝液(pH7.2)：ロット番号 A636、株式会社三菱化学ヤトロン)で 20 分間染色し、水洗および風乾の後、封入剤(マリノール、ロット番号 0501201、武藤化学薬品株式会社)で封入した。

#### 10) 染色体標本の観察

標本観察の前に各用量の各プレートにつき 2 枚の標本を選択してブラインド化した。

観察用量として、短時間処理法の代謝活性化による場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、細胞増殖率が 50%未満で標本の観察が可能な用量を高用量とする 4 用量を選択し、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では、観察可能な最高用量を高用量とする 3 用量を選択した。すなわち、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では 20.5、25.6 および 32.0  $\mu\text{g/mL}$  の用量を、短時間処理法の代謝活性化による場合では 41.0、51.2、64.0 および 80.0  $\mu\text{g/mL}$  の用量を、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 16.4、20.5、25.6 および 32.0  $\mu\text{g/mL}$  の用量を選択した。

総合倍率 1000 倍の顕微鏡(BX51TF、オリンパス光学工業株式会社)で、1 枚あたり 100 個の分裂中期像を選択して観察し、以下の分類に従って染色体異常の判定を行った。構造異常については 25 $\pm$ 2 本の染色体をもつものを観察対象とした。

##### ①構造異常(structural aberration)

##### ・染色分体切断(ctb: chromatid break)

染色分体のはっきりした不連続部分(切断部分)で、不連続部分が染色分体の幅以上である場合、あるいは切断片が染色分体の長軸線上から外れている場合に染色分体切断として判定した。

##### ・染色分体交換(cte: chromatid exchange)

染色分体の 2 ヲ所以上の切断部位が相互に交換(結合反応)しているものを染色分体交換として判定した。

- ・染色体切断(csb: chromosome break)

両方の染色分体の同じ位置に切断が生じている場合に、染色体切断として判定した。切断の判定基準は、染色分体切断に準じた。

- ・染色体交換(cse: chromosome exchange)

両方の染色分体の同じ位置で同じ方向に交換が生じている場合に、染色体交換として判定した。

- ・その他(others)

その他の構造異常として、断片化(fragmentation)がある。一つの分裂中期像のほとんど全ての染色体に切断やギャップが現れ、交換型の異常が含まれていない場合に断片化として判定した。

## ②ギャップ(gap)

染色分体あるいは染色体上に生じた非染色部分(染色性が全くみられない部分)で、非染色部分の幅が染色分体の幅より狭い場合にギャップとして判定した。

## ③数的異常(numerical aberration)

- ・倍数体(poly: polyploid)

染色体数( $25 \pm 2$ )が倍加し、三倍体、四倍体等になったものを倍数体として判定した。

- ・その他(others)

その他の数的異常として核内倍加がある。倍加した染色体が分離せずに平行に並んでいる場合に核内倍加(end: endoreduplication)と判定し、倍数体とは区別した。

## 11) 観察結果の集計方法

プレート毎に以下の細胞出現数を求め、試験群毎にその合計値を算出した。更に、構造異常および数的異常の total については、それぞれ出現率(%)を求めた。出現率(%)は、観察した細胞数(分裂中期像の数)に対する出現数の百分率で算出した。

### ①構造異常について

- ・ctb: 染色分体切断をもつ細胞数
- ・cte: 染色分体交換をもつ細胞数
- ・csb: 染色体切断をもつ細胞数
- ・cse: 染色体交換をもつ細胞数
- ・others: その他の構造異常をもつ細胞数
- ・total: 何らかの構造異常をもつ細胞数

## ②ギャップについて

- ・ gap: ギャップをもつ細胞数

## ③数的異常について

- ・ poly: 倍数体の細胞数
- ・ others: その他の数的異常をもつ細胞数
- ・ total: 何らかの数的異常をもつ細胞数

## 9. 試験結果の評価

構造異常または数的異常の total の出現率(%)が 10%以上増加し、その出現様式に用量依存性がみられる場合、あるいは 5%以上増加する結果について確認試験により再現性がみられる場合を陽性、それ以外を陰性とし、統計学的手法は用いなかった。

D<sub>20</sub> 値(細胞の 20%に異常が認められる濃度)は、いずれの試験系列においても異常細胞の 5%以上の出現はみられなかったことから算出しなかった。

## 成 績

### 1. 予備試験

細胞増殖率の結果を Table 1 および Figure 1 に、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 1 に示す。

各試験系列で 50% を越える細胞増殖抑制が認められ、 $IC_{50}$  値は短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 35.1  $\mu\text{g/mL}$ 、短時間処理法の代謝活性化による場合が 67.9  $\mu\text{g/mL}$  および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 32.7  $\mu\text{g/mL}$  であった。

被験物質の析出が、試験液処理開始時では短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 375  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量ならびに短時間処理法の代謝活性化による場合の 188  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量で観察され、試験液処理終了時では短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化法による場合の 1500  $\mu\text{g/mL}$  の用量で観察された。

被験物質による培養液 pH への影響は観察されなかった。

### 2. 本試験

本試験の細胞増殖率、被験物質の析出および培養液 pH への影響の結果を Table 2 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 3-1~3-3 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群における細胞増殖への影響の検討では、各試験系列で細胞増殖抑制がみられた。短時間処理法の代謝活性化によらない場合では 40.0  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量、短時間処理法の代謝活性化による場合では 80.0  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 32.0  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量で、それぞれ 50% を越える細胞増殖抑制が認められた。

被験物質の析出がならびに培養液 pH への影響は、いずれの試験系列にも観察されなかった。

染色体の構造異常および数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(評価用量: 20.5、25.6 および 32.0  $\mu\text{g/mL}$ )、短時間処理法の代謝活性化による場合(41.0、51.2、64.0 および 80.0  $\mu\text{g/mL}$ )ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合(16.4、20.5、25.6 および 32.0  $\mu\text{g/mL}$ )のいずれの用量においても 5% 未満であった。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 44.0%、短時間処理法の代謝活性化による場合が 49.0%および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 50.5%であった。

## 考 察

tert-ペンチルベンゼンの *in vitro* における染色体異常誘発性を、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU) を用いて検討した。

予備試験 (細胞増殖抑制試験) の結果、各試験系列で 50% を越える細胞増殖抑制が認められたことから、本試験 (染色体異常試験) の用量として、各試験系列とも  $IC_{50}$  より高用量を最高用量とし、以下公比 1.25 で用量を低下させた計 7 用量を設定した。

本試験の結果、染色体の構造異常ならびに数値異常の出現率は各試験系列のいずれの用量も 5% 未満で、結果は陰性であった。なお、評価最高用量は、短時間処理法の代謝活性化による場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 50% 以上の細胞増殖抑制がみられた用量であったが、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では観察可能な最高用量とし、50% 以上の細胞増殖抑制を示す用量を選択することは出来なかった。しかし、短時間処理法の代謝活性化によらない場合における評価最高用量と 50% を越える細胞増殖抑制を示した最低用量との用量比は 1.25 と小さいもので、強い細胞増殖抑制が狭い用量間隔で生じており、当該評価用量にて染色体異常試験誘発性は適切に評価されたものと考えられた。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各試験系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、tert-ペンチルベンゼンは、本試験条件においては哺乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断した。

Table 1 Effects of tert-pentylbenzene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)

Growth rate (% to the control)

| Group                                 | Concentration<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | S9-                                          | S9+                                          | S9-                                          |
|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
|                                       |                                       | 6-18 hr<br>(Mean)                            | 6-18 hr<br>(Mean)                            | 24-0 hr<br>(Mean)                            |
| Control <sup>a</sup>                  | —                                     | 100 , 100<br>(100.0)                         | 100 , 100<br>(100.0)                         | 100 , 100<br>(100.0)                         |
| tert-Pentylbenzene                    | 5.86                                  | 97 , 99<br>( 98.0)                           | 95 , 96<br>( 95.5)                           | 98 , 98<br>( 98.0)                           |
|                                       | 11.7                                  | 98 , 100<br>( 99.0)                          | 90 , 94<br>( 92.0)                           | 89 , 91<br>( 90.0)                           |
|                                       | 23.4                                  | 97 , 96<br>( 96.5)                           | 90 , 88<br>( 89.0)                           | 83 , 82<br>( 82.5)                           |
|                                       | 46.9                                  | 17 , 16<br>( 16.5)                           | 85 , 85<br>( 85.0)                           | 16 , 14<br>( 15.0)                           |
|                                       | 93.8                                  | 15 , 16<br>( 15.5)                           | 21 , 18<br>( 19.5)                           | 15 , 14<br>( 14.5)                           |
|                                       | 188                                   | 14 , 15<br>( 14.5)                           | 17 <sup>+</sup> , 16 <sup>+</sup><br>( 16.5) | 14 , 15<br>( 14.5)                           |
|                                       | 375                                   | 15 <sup>+</sup> , 14 <sup>+</sup><br>( 14.5) | 18 <sup>+</sup> , 16 <sup>+</sup><br>( 17.0) | 13 <sup>+</sup> , 14 <sup>+</sup><br>( 13.5) |
|                                       | 750                                   | 15 <sup>+</sup> , 14 <sup>+</sup><br>( 14.5) | 21 <sup>+</sup> , 20 <sup>+</sup><br>( 20.5) | 16 <sup>+</sup> , 15 <sup>+</sup><br>( 15.5) |
|                                       | 1500                                  | 13 <sup>#</sup> , 13 <sup>#</sup><br>( 13.0) | 18 <sup>#</sup> , 14 <sup>#</sup><br>( 16.0) | 21 <sup>+</sup> , 18 <sup>+</sup><br>( 19.5) |
| IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                                       | 35.1                                         | 67.9                                         | 32.7                                         |

a : Dimethyl sulfoxide

<sup>+</sup> : Precipitation at the beginning of treatment

<sup>#</sup> : Precipitation at the beginning and end of treatment

Change of pH in culture medium was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.



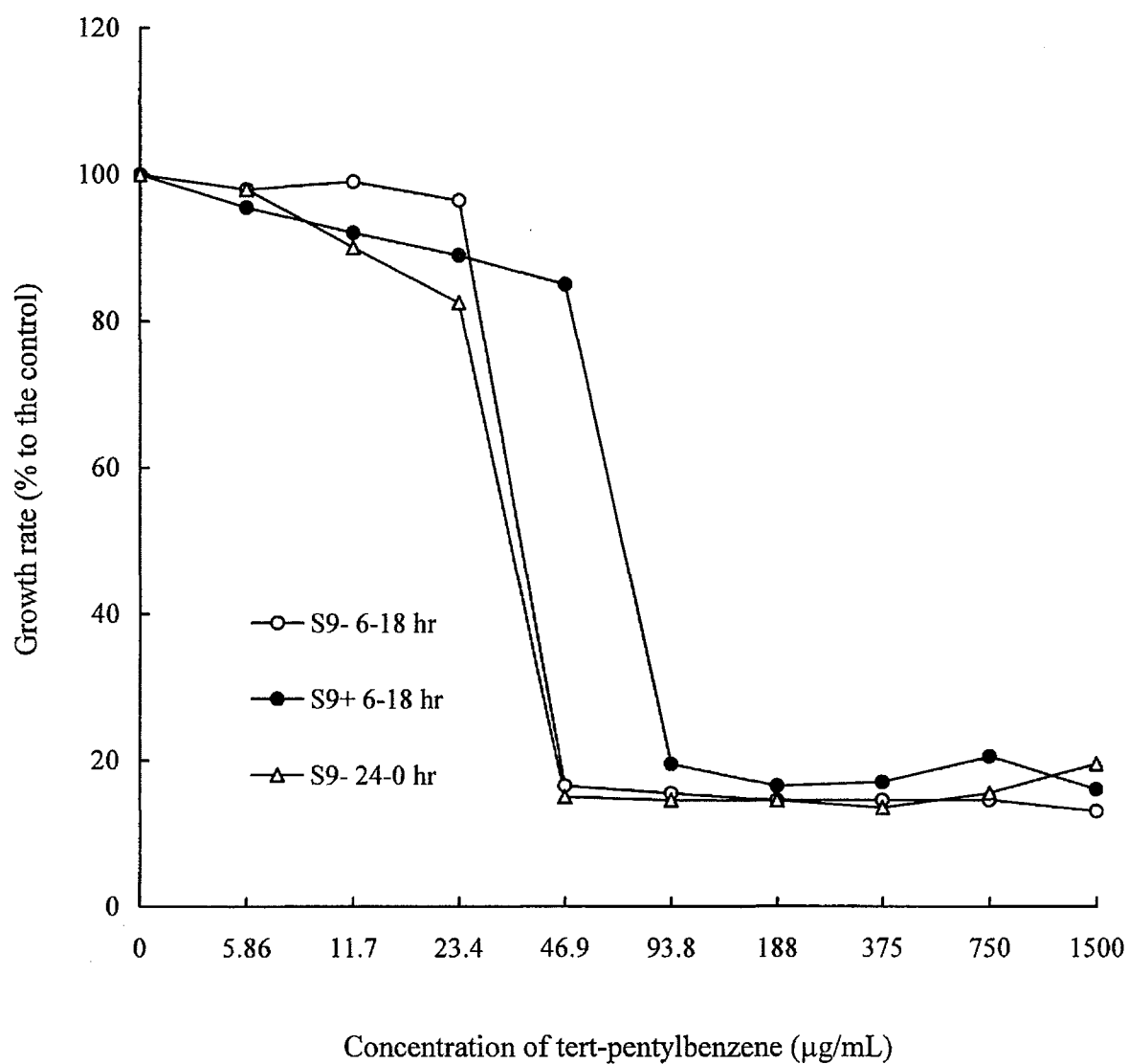


Figure 1 Effects of tert-pentylbenzene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)

Each point represents mean value (n=2).

Table 2 Effects of tert-pentylbenzene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test)

Growth rate (% to the control)

| Group                | Concentration<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | S9-                  |                      | Concentration<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | S9+<br>6-18 hr<br>(Mean) |
|----------------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|--------------------------|
|                      |                                       | 6-18 hr<br>(Mean)    | 24-0 hr<br>(Mean)    |                                       |                          |
| Control <sup>a</sup> | —                                     | 100 , 100<br>(100.0) | 100 , 100<br>(100.0) | —                                     | 100 , 100<br>(100.0)     |
| tert-Pentylbenzene   | 13.1                                  | 102 , 97<br>( 99.5)  | 100 , 102<br>(101.0) | 26.2                                  | 98 , 93<br>( 95.5)       |
|                      | 16.4                                  | 102 , 97<br>( 99.5)  | 100 , 99<br>( 99.5)  | 32.8                                  | 91 , 91<br>( 91.0)       |
|                      | 20.5                                  | 103 , 103<br>(103.0) | 103 , 99<br>(101.0)  | 41.0                                  | 90 , 92<br>( 91.0)       |
|                      | 25.6                                  | 98 , 96<br>( 97.0)   | 108 , 103<br>(105.5) | 51.2                                  | 91 , 88<br>( 89.5)       |
|                      | 32.0                                  | 93 , 91<br>( 92.0)   | 36 , 50<br>( 43.0)   | 64.0                                  | 84 , 86<br>( 85.0)       |
|                      | 40.0                                  | 20 , 17<br>( 18.5)   | 14 , 15<br>( 14.5)   | 80.0                                  | 37 , 37<br>( 37.0)       |
|                      | 50.0                                  | 12 , 13<br>( 12.5)   | 15 , 13<br>( 14.0)   | 100                                   | 26 , 25<br>( 25.5)       |

a : Dimethyl sulfoxide

Precipitation or changes of pH in culture medium was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

Table 3-1 Results of the chromosomal aberration test of tert-pentylbenzene (6 hours treatment without metabolic activation)

| Time schedule <sup>a</sup><br>(hours) | S9 | Group                | Concentration<br>(µg/mL) | Growth<br>rate (%) | Number of<br>metaphase<br>observed | Structural aberrations |     |     |     |        |           | Gap | Numerical aberrations |        |           | Judgment <sup>c</sup> |
|---------------------------------------|----|----------------------|--------------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|--------|-----------|-----|-----------------------|--------|-----------|-----------------------|
|                                       |    |                      |                          |                    |                                    | ctb                    | cte | csb | cse | others | total (%) |     | poly                  | others | total (%) |                       |
| 6-18                                  | -  | Control <sup>b</sup> | —                        | 100.0              | 100                                | 1                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 1         | 0   | 1                     | 0      | 1         | -                     |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 1                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 1         | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 2                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 2 ( 1.0)  | 0   | 1                     | 0      | 1 ( 0.5)  |                       |
|                                       |    | tert-Pentylbenzene   | 13.1                     | 99.5               | Not observed                       | -                      | -   | -   | -   | -      | -         | -   | -                     | -      | -         | -                     |
|                                       |    |                      | 16.4                     | 99.5               | Not observed                       | -                      | -   | -   | -   | -      | -         | -   | -                     | -      | -         |                       |
|                                       |    |                      | 20.5                     | 103.0              | 100                                | 2                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 2         | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 0                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 0         | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 2                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 2 ( 1.0)  | 0   | 0                     | 0      | 0 ( 0.0)  |                       |
|                                       |    |                      | 25.6                     | 97.0               | 100                                | 0                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 0         | 0   | 2                     | 0      | 2         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 0                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 0         | 0   | 1                     | 0      | 1         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 0                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 0 ( 0.0)  | 0   | 3                     | 0      | 3 ( 1.5)  |                       |
|                                       |    |                      | 32.0                     | 92.0               | 100                                | 0                      | 1   | 0   | 0   | 0      | 1         | 0   | 1                     | 0      | 1         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 1                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 1         | 0   | 1                     | 0      | 1         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 1                      | 1   | 0   | 0   | 0      | 2 ( 1.0)  | 0   | 2                     | 0      | 2 ( 1.0)  |                       |
|                                       |    |                      | 40.0                     | 18.5               | Toxic                              | -                      | -   | -   | -   | -      | -         | -   | -                     | -      | -         |                       |
|                                       |    |                      | 50.0                     | 12.5               | Toxic                              | -                      | -   | -   | -   | -      | -         | -   | -                     | -      | -         |                       |
|                                       |    | Mitomycin C          | 0.1                      |                    | 100                                | 13                     | 28  | 0   | 0   | 0      | 39        | 2   | 0                     | 0      | 0         | +                     |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 10                     | 44  | 1   | 1   | 0      | 49        | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 23                     | 72  | 1   | 1   | 0      | 88 (44.0) | 2   | 0                     | 0      | 0 ( 0.0)  |                       |

ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

- : Blank

Table 3-2 Results of the chromosomal aberration test of tert-pentylbenzene (6 hours treatment with metabolic activation)

| Time schedule <sup>a</sup><br>(hours) | S9 | Group                | Concentration<br>(µg/mL) | Growth<br>rate (%) | Number of<br>metaphase<br>observed | Structural aberrations |     |     |     |        |           | Gap | Numerical aberrations |        |           | Judgment <sup>c</sup> |
|---------------------------------------|----|----------------------|--------------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|--------|-----------|-----|-----------------------|--------|-----------|-----------------------|
|                                       |    |                      |                          |                    |                                    | ctb                    | cte | csb | cse | others | total (%) |     | poly                  | others | total (%) |                       |
| 6-18                                  | +  | Control <sup>b</sup> | —                        | 100.0              | 100                                | 2                      | 0   | 1   | 0   | 0      | 2         | 0   | 0                     | 0      | 0         | —                     |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 1                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 1         | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 3                      | 0   | 1   | 0   | 0      | 3 ( 1.5)  | 0   | 0                     | 0      | 0 ( 0.0)  |                       |
|                                       |    | tert-Pentylbenzene   | 26.2                     | 95.5               | Not observed                       | -                      | -   | -   | -   | -      | -         | -   | -                     | -      | -         | —                     |
|                                       |    |                      | 32.8                     | 91.0               | Not observed                       | -                      | -   | -   | -   | -      | -         | -   | -                     | -      | -         |                       |
|                                       |    |                      | 41.0                     | 91.0               | 100                                | 1                      | 1   | 0   | 0   | 0      | 2         | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 0                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 0         | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 1                      | 1   | 0   | 0   | 0      | 2 ( 1.0)  | 0   | 0                     | 0      | 0 ( 0.0)  |                       |
|                                       |    |                      | 51.2                     | 89.5               | 100                                | 1                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 1         | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 1                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 1         | 0   | 0                     | 1      | 1         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 2                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 2 ( 1.0)  | 0   | 0                     | 1      | 1 ( 0.5)  |                       |
|                                       |    |                      | 64.0                     | 85.0               | 100                                | 2                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 2         | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 0                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 0         | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 2                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 2 ( 1.0)  | 0   | 0                     | 0      | 0 ( 0.0)  |                       |
|                                       |    |                      | 80.0                     | 37.0               | 100                                | 0                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 0         | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 2                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 2         | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 2                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 2 ( 1.0)  | 0   | 0                     | 0      | 0 ( 0.0)  |                       |
|                                       |    |                      | 100                      | 25.5               | Toxic                              | -                      | -   | -   | -   | -      | -         | -   | -                     | -      | -         |                       |
|                                       |    | Benzo[a]pyrene       | 10                       |                    | 100                                | 13                     | 40  | 0   | 0   | 0      | 48        | 2   | 0                     | 0      | 0         | +                     |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 11                     | 44  | 0   | 0   | 0      | 50        | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 24                     | 84  | 0   | 0   | 0      | 98 (49.0) | 2   | 0                     | 0      | 0 ( 0.0)  |                       |

ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; —, negative +, positive

- : Blank

Table 3-3 Results of the chromosomal aberration test of tert-pentylbenzene (24 hours treatment without metabolic activation)

| Time schedule <sup>a</sup><br>(hours) | S9 | Group                | Concentration<br>(µg/mL) | Growth<br>rate (%) | Number of<br>metaphase<br>observed | Structural aberrations |     |     |     |        |            | Gap | Numerical aberrations |        |           | Judgment <sup>c</sup> |
|---------------------------------------|----|----------------------|--------------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|--------|------------|-----|-----------------------|--------|-----------|-----------------------|
|                                       |    |                      |                          |                    |                                    | ctb                    | cte | csb | cse | others | total (%)  |     | poly                  | others | total (%) |                       |
| 24-0                                  | -  | Control <sup>b</sup> | —                        | 100.0              | 100                                | 0                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 0          | 0   | 0                     | 0      | 0         | -                     |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 1                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 1          | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 1                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 1 ( 0.5)   | 0   | 0                     | 0      | 0 ( 0.0)  |                       |
|                                       |    | tert-Pentylbenzene   | 13.1                     | 101.0              | Not observed                       | -                      | -   | -   | -   | -      | -          | -   | -                     | -      | -         | -                     |
|                                       |    |                      | 16.4                     | 99.5               | 100                                | 0                      | 1   | 0   | 0   | 0      | 1          | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 0                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 0          | 0   | 2                     | 0      | 2         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 0                      | 1   | 0   | 0   | 0      | 1 ( 0.5)   | 0   | 2                     | 0      | 2 ( 1.0)  |                       |
|                                       |    |                      | 20.5                     | 101.0              | 100                                | 2                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 2          | 1   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 2                      | 1   | 0   | 0   | 0      | 3          | 1   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 4                      | 1   | 0   | 0   | 0      | 5 ( 2.5)   | 2   | 0                     | 0      | 0 ( 0.0)  |                       |
|                                       |    |                      | 25.6                     | 105.5              | 100                                | 0                      | 1   | 0   | 0   | 0      | 1          | 1   | 1                     | 0      | 1         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 0                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 0          | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 0                      | 1   | 0   | 0   | 0      | 1 ( 0.5)   | 1   | 1                     | 0      | 1 ( 0.5)  |                       |
|                                       |    |                      | 32.0                     | 43.0               | 100                                | 1                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 1          | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 0                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 0          | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 1                      | 0   | 0   | 0   | 0      | 1 ( 0.5)   | 0   | 0                     | 0      | 0 ( 0.0)  |                       |
|                                       |    |                      | 40.0                     | 14.5               | Toxic                              | -                      | -   | -   | -   | -      | -          | -   | -                     | -      | -         |                       |
|                                       |    |                      | 50.0                     | 14.0               | Toxic                              | -                      | -   | -   | -   | -      | -          | -   | -                     | -      | -         |                       |
|                                       |    | Mitomycin C          | 0.05                     |                    | 100                                | 12                     | 43  | 0   | 1   | 0      | 54         | 0   | 0                     | 0      | 0         | +                     |
|                                       |    |                      |                          |                    | 100                                | 17                     | 36  | 0   | 0   | 0      | 47         | 0   | 0                     | 0      | 0         |                       |
|                                       |    |                      |                          |                    | 200                                | 29                     | 79  | 0   | 1   | 0      | 101 (50.5) | 0   | 0                     | 0      | 0 ( 0.0)  |                       |

ctb, chromatid break    cte, chromatid exchange    csb, chromosome break    cse, chromosome exchange    poly, polyploid

<sup>a</sup> : Time schedule ; treatment time-recovery time<sup>b</sup> : Dimethyl sulfoxide<sup>c</sup> : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

- : Blank