

# 試 験 報 告 書

タクリ酸tert-ブチルエステルのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号：4 L 4 3 2)

株式会社三菱化学安全科学研究所

# 目 次

	頁
要 約 .....	7
材料及び方法	
1. 試験物質 .....	8
2. 指標細胞 .....	8
3. 培地 .....	9
4. S9 Mix .....	9
5. 試験物質の調製 .....	10
6. 細胞増殖抑制試験 .....	10
7. 染色体異常試験 .....	11
結 果	
1. 細胞増殖抑制試験 .....	14
2. 染色体異常試験 .....	14
結論 .....	14
参考文献 .....	15
補足資料 .....	15
表 .....	16
図 .....	19

## 要 約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU を用い、マクリル酸tert-ブチルエステルの *in vitro*における染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験に先立ち、代謝活性化法によらない場合と代謝活性化法による場合について、50, 500, 5000  $\mu\text{g/ml}$ で予備試験を実施したところ、いずれの処理条件においても 5000  $\mu\text{g/ml}$ で生存細胞は認められず、500  $\mu\text{g/ml}$ で生存細胞が認められた。

予備試験の結果を基に、2500  $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、細胞増殖抑制試験を実施した（細胞増殖抑制試験1）ところ、50%細胞増殖抑制濃度（TCID<sub>50</sub>）は、代謝活性化法によらない場合の48時間処理で、184  $\mu\text{g/ml}$ であった。しかし、代謝活性化法によらない場合の24時間処理及び代謝活性化法による場合の S9 Mix 共存下、非共存下では、増殖抑制の現れる濃度付近における細胞生存率が急激に減少し、染色体異常試験に用いる適切な濃度を設定することが出来なかった。従って、24時間処理は 750  $\mu\text{g/ml}$ , S9 Mix 共存下、非共存下は 1200  $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、追加試験を実施したところ（細胞増殖抑制試験2）、TCID<sub>50</sub>は、24時間処理で 343  $\mu\text{g/ml}$ , S9 Mix 共存下、非共存下で 617, 596  $\mu\text{g/ml}$ であった。

染色体異常試験は、細胞増殖抑制試験の結果を基に、TCID<sub>50</sub>を超える濃度を最高濃度とし、公比2で3濃度で実施した。その結果、染色体構造異常細胞の出現率は、代謝活性化法によらない場合の24時間処理の 400  $\mu\text{g/ml}$ で 10.5%であった。24時間処理の数的異常細胞の出現率は、5%未満であった。また、その他の処理条件では、構造異常又は数的異常細胞の出現率は5%未満であった。

以上の結果より、本試験条件下におけるマクリル酸tert-ブチルエステルの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と結論した。

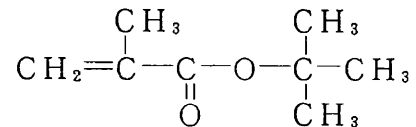
# 材料及び方法

## 1. 試験物質

### 1.1 被験物質

より提供された マクリル酸tert-ブチルエステル (Lot No. 純度99.8%) を使用した。被験物質は、沸点67°C/70Torr, 融点-60°C以下でエーテル臭を有する無色透明な液体であり、通常の実験条件では安定である。水に0.3%(20°C), ジメチルスルホキシド, アセトンには可溶である。なお、本ロットについては実験開始前及び実験終了後に被験物質製造者が分析したデータを入手し、安定であることの確認を行った。

化学名：マクリル酸 tert-ブチルエステル  
化学式：C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>  
構造式：



分子量：142.20  
CAS No.：585-07-9

### 1.2 対照物質

#### (1) 陰性対照物質

アセトン (和光純薬工業株式会社, ロット番号：KCF1401, 純度 99.5%)

#### (2) 陽性対照物質

##### (a) 代謝活性化法によらない場合

マイトマイシンC (MMCと略す, 協和醸酵工業株式会社, ロット番号：967ADD, 純度 約 100%)

##### (b) 代謝活性化法による場合

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

## 2. 指標細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/1U を使用した。細胞は、大日本製薬株式会社より1994年8月30日に購入し、細胞懸濁液に対して10%の割合でジメチルスルホキシド (DMSOと略す) を添加したものを1mlずつ小分けして、液体窒素中で凍結保存した。試験には、これを融解して培養し、その後の継代数が5代以内のものを使用

した。細胞の培養には、プラスチックシャーレ（直径10cm；Becton Dickinson and Company）を用い、被験物質で細胞を処理する時のみプラスチックフラスコ（培養表面積25cm<sup>2</sup>又は75cm<sup>2</sup>；Becton Dickinson and Company）を用いた。いずれの場合も、炭酸ガス5%，空気95%，温度37℃，加湿条件下に自動制御された炭酸ガス細胞培養装置（NAPCO社，7300型）内で培養した。

### 3. 培地

#### 3.1 MEM

Minimum Essential Medium (MEM 粉末Hanks' 塩；GIBCO BRL)を添付の処方に従い調製し、この1ℓに、炭酸水素ナトリウム 0.35gを加え、pHを 7.2～7.3 前後に調整した後、ポアサイズ 0.22μm のメンブランフィルターを用いて加圧ろ過滅菌した。

#### 3.2 培養液

MEM に非働化（56℃，30分間加熱処理）した子牛血清（GIBCO BRL，ロット番号：43N1140）を 10%の割合で添加した。

### 4. S9 Mix

#### 4.1 S9

市販品（キッコーマン株式会社，ロット番号：RAA-318，1994年11月11日製造）を使用した。このS9は、7週齢の雄のSD系ラット（体重 192～229 g）にフェノバルビタールを 30mg/kgで1回，60mg/kgで3回，24時間間隔で腹腔内投与し，5,6-ベンゾフラボン 80mg/kgをフェノバルビタールの第3回目の投与時に1回併用投与して作製した肝ホモジネートの 9,000g 上清分画である。使用時まで-80℃以下で保存した。

#### 4.2 S9 Mix

S9 Mix 1ml当り，以下の組成で用時調製し，使用時まで氷中に保存した。

S9	0.3ml
塩化マグネシウム（6水和物）	5μmol
塩化カリウム	33μmol
グルコース 6-リン酸	5μmol
β-NADP <sup>+</sup>	4μmol
HEPES(pH 7.2)	4μmol
滅菌精製水	残量

## 5. 試験物質の調製

### 5.1 被験物質溶液

被験物質をアセトンに溶解させて最高濃度の100倍の被験物質溶液を調製した。  
これをさらに溶媒を用いて希釈し、各濃度の100倍の被験物質溶液を調製した。

### 5.2 被験物質溶液の濃度確認

染色体異常試験に用いた最高及び最低濃度の被験物質溶液について濃度分析を実施し、いずれも所定濃度の  $100 \pm 5\%$  以内であることを確認した（15頁，補足資料参照）。

### 5.3 陽性対照物質溶液

MMCは局方生理食塩液に  $3 \mu\text{g/ml}$  の濃度で用時溶解し、ろ過滅菌した。

BPはDMSOに  $4 \text{mg/ml}$  の濃度で溶解し、凍結保存したものを室温で融解して使用した。

## 6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における適切な濃度を決定するために、細胞増殖抑制試験を実施した。

### 6.1 被験物質濃度

細胞増殖抑制試験に先立ち、代謝活性化法によらない場合の24時間処理と代謝活性化法による場合の S9 Mix 共存下について、 $50, 500, 5000 \mu\text{g/ml}$  の3濃度で細胞増殖を目視で観察する予備試験を実施した。この試験では、1濃度あたり1枚のシャーレを用い処理24時間後に観察した。その結果、いずれの処理条件においても、 $5000 \mu\text{g/ml}$  で生存細胞は認められなかった。 $500 \mu\text{g/ml}$  での細胞増殖は24時間処理では陰性対照の5割程度、S9 Mix 共存下では8割程度であった。 $50 \mu\text{g/ml}$  での細胞増殖はいずれの処理条件においても陰性対照との差は認められなかった。

予備試験の結果を基に、代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合について、 $39.1, 78.1, 158, 313, 625, 1250, 2500 \mu\text{g/ml}$  の7濃度で染色体異常試験を実施した（細胞増殖抑制試験1）。その結果、いずれの処理条件においても細胞増殖の抑制が見られ、代謝活性化法によらない場合の48時間処理の50%細胞増殖抑制濃度（TCID<sub>50</sub>）は、 $184 \mu\text{g/ml}$  であった。しかし、代謝活性化法によらない場合の24時間処理及び代謝活性化法による場合の S9 Mix 共存下、非共存下では、増殖抑制の現れる濃度付近での細胞生存率が急激に減少し、染色体異常試験に用いる適切な濃度を設定することが出来なかった。このため、代謝活性化法によらない場合の24時間処理は $100, 200, 300, 400, 500, 600, 750 \mu\text{g/ml}$  の7濃度、代謝活性化法による場合のS9 Mix

共存下, 非共存下については 300, 450, 600, 750, 900, 1050, 1200  $\mu\text{g/ml}$  の 7 濃度で追加試験を実施した (細胞増殖抑制試験 2)。

## 6.2 細胞処理

$4 \times 10^3$  個/ml の細胞懸濁液を 25cm<sup>2</sup> フラスコに 5 ml 播き, 3 日間培養した。

各フラスコから培養液を除去した後, 代謝活性化法によらない場合は, 細胞を 50  $\mu\text{l}$  の被験物質溶液と 5 ml の培養液にて 24 時間及び 48 時間処理した。

代謝活性化法による場合の S9 Mix 共存下では細胞を 30  $\mu\text{l}$  の被験物質溶液と 0.5 ml の S9 Mix 及び 2.5 ml の培養液にて 6 時間処理し, MEM で 3 回洗浄後新しい培養液 5 ml で更に 18 時間培養した。なお予備検討の結果, 代謝活性化法によらない場合と代謝活性化法による場合において細胞毒性に濃度差が認められたため, S9 Mix 非共存下についても細胞増殖抑制試験を行った。すなわち, 細胞を 30  $\mu\text{l}$  の被験物質溶液と 3 ml の培養液で S9 Mix 共存下と同様に処理した。

被験物質が低沸点物質であることを考慮し, 被験物質処理中は密栓下で培養を行い, 陰性対照も同様に処理した。各濃度あたり 2 本のフラスコを用いた。

## 6.3 細胞数の計測

処理終了後, 細胞表面をダルベッコのリン酸緩衝液 (ダルベッコ PBS「ニッスイ」; 日水製薬株式会社, PBS(-)と略す) で 1 回洗浄後, 0.25% トリプシン溶液 (溶媒: PBS(-)) 処理後, 培養液を加えピペッティングすることにより細胞を剥離し, 血球計算盤で細胞数を数えた。

## 6.4 50%細胞増殖抑制濃度の算出

代謝活性化法によらない場合並びに代謝活性化法による場合のそれぞれについて, 陰性対照値を 100% として生存曲線を作成した。細胞毒性が認められた場合には, 被験物質による 50% 細胞増殖抑制濃度 (TCID<sub>50</sub>) を求めた。

## 7. 染色体異常試験

### 7.1 試験物質濃度

細胞増殖抑制試験の結果, 代謝活性化法によらない場合の 24 時間, 48 時間処理及び代謝活性化法による場合の S9 Mix 共存下, 非共存下において, 細胞増殖の抑制が見られ, TCID<sub>50</sub> は, それぞれ 343, 184 及び 617, 596  $\mu\text{g/ml}$  であった。

これらの結果より, 代謝活性化法によらない場合の 24 時間処理では 100, 200, 400

$\mu\text{g/ml}$ , 48時間処理では 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ , 代謝活性化法による場合の S9 Mix 共存下では 188, 375, 750  $\mu\text{g/ml}$ , S9 Mix 非共存下では 175, 350, 700  $\mu\text{g/ml}$ のそれぞれ3濃度で染色体異常試験を実施した.

陽性対照であるMMC及びBPの濃度は, それぞれ広く使用されている 0.03, 10  $\mu\text{g/ml}$ とした.

## 7.2 細胞処理

代謝活性化法によらない場合は, 6.2と同様に処理した. 陽性対照 (MMC)については, 細胞を5mlの培養液と 50  $\mu\text{l}$ のMMC溶液からなる液で同様に処理した.

代謝活性化法による場合についても 6.2と同様に処理した. 陽性対照 (BP) については, S9 Mix 共存下の場合 0.5mlの S9 Mix と 2.5mlの培養液の混液, また S9 Mix 非共存下の場合 3mlの培養液に 7.5  $\mu\text{l}$ のBP溶液を加えた液を同様に処理した. 陰性対照についても同様に処理した.

## 7.3 標本作製

標本作製の2時間前に, コルセミドを最終濃度が 0.1  $\mu\text{g/ml}$ となるように各フラスコに加え, 分裂中期の細胞を蓄積させた. 細胞表面をPBS(-)で1回洗浄後, トリプシン処理により細胞を剥離し, 1000 rpm (最大遠心加速度, 170~180g), 5分間遠心分離 (以下同様) することにより細胞を集めた. 上清を除去し, これに4mlの 0.075 M 塩化カリウム溶液を加えて低張処理 (37°C, 15分) を行った. 更に, 4mlの冷却したメタノール・酢酸(3:1) 混合液 (カルノア固定液) を加え細胞を固定した. 遠心分離後固定液を捨て, 新しい固定液を4ml加えた. この操作を3~4回繰り返した. 固定終了後, 少量の固定細胞懸濁液を調製し, 濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスの2箇所滴下し, 乾燥してスライド標本とした. 各濃度あたり2枚作製した. これを, 1/150 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で希釈した3%ギムザ溶液で20分間染色し, 水洗, 乾燥後, 封入剤で封入して観察標本とした.

## 7.4 観 察

構造異常及び数的異常について盲検法で観察を行った.

### (1) 構造異常

染色体がよく拡がり  $25 \pm 2$ 本の染色体数をもつ分裂中期像を選び, 構造異常の有無を調べた. 異常の分類は以下の通りとした<sup>1)</sup>.



ギ ャ ッ プ	(染色分体型及び染色体型を含む；gと略す)
	染色分体型切断 (ctb と略す)
	染色分体型交換 (cte と略す)
	染色体型切断 (csb と略す)
	染色体型交換 (二動原体，環状染色体など；cse と略す)
そ の 他	(断片化)

ギャップは，染色分体に見られる非染色部分が染色分体の縦軸上にあり，その幅が染色分体の幅以上で著しく離れておらず，非染色部分の形状が明確なものとし，切断とは区別した．1本のフラスコあたり100個，すなわち各濃度あたり200個の細胞を調べた．

## (2) 数的異常

1本のフラスコあたり100個，すなわち各濃度あたり200個の分裂中期像を調べ核内倍加細胞を含む倍数体細胞数を計数した．

## (3) 有糸分裂指数

フラスコあたり1000個，すなわち各濃度あたり2000個の細胞について有糸分裂細胞数を数え，有糸分裂指数を求めた．

## 7.5 試験結果の判定基準

構造異常については，異常を1個以上もつ細胞を染色体異常細胞とし，ギャップのみの異常をもつ細胞を除いた場合（-g）と含めた場合（+g）の2通りの方法で集計した．+gの集計値について，陰性対照との間で $\chi^2$  検定を行った．数的異常についても同様に検定を実施した．

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は，ギャップのみを示す細胞を含めた場合の構造異常あるいは数的異常細胞の出現率が5%未満を陰性（-），5%以上10%未満を疑陽性（±），10%以上を陽性（+）とした．

なお，染色体異常の出現頻度を図示し，結果が陽性の場合には， $D_{20}$  値（分裂中期像の20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の濃度，mg/ml）を算出した．また，その代表的な染色体異常系の写真を添付した．

## 結 果

### 1. 細胞増殖抑制試験

結果を図1～4に示す。

代謝活性化法によらない場合の24時間、48時間処理及び代謝活性化法による場合のS9 Mix共存下、非共存下において、細胞増殖抑制が認められ、TCID<sub>50</sub>は、それぞれ343、184及び617、596  $\mu\text{g/ml}$ であった。

### 2. 染色体異常試験

結果を表1～3及び図5～8に示す。

代謝活性化法によらない場合の24時間処理の400  $\mu\text{g/ml}$ において、被験物質による染色体構造異常細胞の出現率は10.5%であった。また、24時間処理の数的異常細胞の出現率は5%未満であった。一方、その他の処理条件では、構造異常又は数的異常細胞の出現率は5%未満であった。

本試験の結果から算出したD<sub>20</sub>値は、代謝活性化法によらない場合の24時間処理では0.85mg/mlであった。

なお、陽性対照における染色体異常細胞出現頻度の著明な増加は、本試験の試験条件が適切であったことを示す。

## 結 論

以上の結果より、本試験条件下におけるマクリル酸tert-ブチルエステルのCHL/IU細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と結論した。

## 参考文献

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

## 補足資料

被験物質処理時に, 調製した被験物質溶液の濃度確認を実施した. その結果を下表に示す.

(代謝活性化法によらない場合  
代謝活性化法による場合 S9 Mix共存下 単位: mg/ml

設定濃度	5.0	75.0
分析結果	5.07	73.9
	5.24	73.4
MEAN	5.16(103)	73.7(98.3)

代謝活性化法による場合 S9 Mix非共存下 単位: mg/ml

設定濃度	17.5	70
分析結果	17.2	71.8
	17.7	71.1
MEAN	17.5(100)	71.5(102)

かっこ内は設定濃度に対する割合 (%) を示す.

表 1 染色体異常試験結果 (代謝活性化法によらない場合)

被験物質名 : メタクリル酸tert-ブチルエステル

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	倍數体數		g	染色体構造異常細胞(1)の出現數と出現頻度 (%)						合計		判定		
				(%)	檢2) 定		ctb	cte	csb	cse	その他	-g	+g				
陰性対照 (アセトン)	24	0	100	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
			200	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	2(1.0)	1
			100	0	0	1	3	2	0	0	0	0	0	0	5	5	5
陰性対照 (MMC)	48	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0(0.0)	0	0(0.0)	3(1.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(2.5)	5(2.5)	5	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
被験物質	24	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
被験物質	24	200	100	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	2	2	2	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			200	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	2	
			100	1	1	3	4	2	0	0	0	0	0	8	8	8	
被験物質	48	50	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	3	3	3	
			200	0(0.0)	0	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	4(2.0)	4		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
陰性対照 (MMC)	24	0.03	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			100	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	3	3		
			200	0(0.0)	0	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	4(2.0)	4		
			100	0	0	0	24	20	3	0	0	0	36	36	36		
陰性対照 (MMC)	48	0.03	100	0	0	0	21	26	1	0	0	0	42	42	42		
			100	0	0	0	45(22.5)	46(23.0)	4(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	78(39.0)	78(39.0)			
			200	0(0.0)	0	0(0.0)	4	38	54	5	1	1	73	73			
			100	0	0	0	2	37	57	2	1	1	75	75			
陰性対照 (MMC)	48	0.03	200	0(0.0)	0	6(3.0)	75(37.5)	111(55.5)	7(3.5)	2(1.0)	2(1.0)	148(74.0)	149(74.5)				
			200	0(0.0)	0	6(3.0)	75(37.5)	111(55.5)	7(3.5)	2(1.0)	2(1.0)	148(74.0)	149(74.5)				

1) ctb: 染色体分型切断, cte: 染色体分型交換, csb: 染色体分型切断, cse: 染色体分型交換, その他: 断片化

2) x2 検定を用いて有意差を検定, 構造異常については \*g のみ検定; \*\* (p<0.001)

3) 判定基準 (+g の集計値) 5% 未満: - 陰性, 5% 以上 10% 未満: ± 疑陽性, 10% 以上: + 陽性

MMC: マイトマイシン C

# : 細胞処理時に被験物質の析出 (分離) が認められた。

表 2 染色体異常試験結果 (代謝活性化法による場合)

被験物質名 : メタクリル酸tert-ブチルエステル

処理	S9 Mixの有無	処理濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	観察細胞数	倍數体數		染色体構造異常細胞(1)の出現數と出現頻度 (%)										判(3)				
				(% )	検2)定	g	染色体分型			染色体型			その他	合計			検2)定			
							ctb	cte	csb	cse	ctb	cte		cse	-g			+g		
陰性対照 (アセトン)	-	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		/	
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
	+	0	100	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	/		
			100	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1		/	
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	3(1.5)	0			
被験物質	-	175	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-		
			100	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3		-	
			200	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	4(2.0)	0				
		# 350	100	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	-		
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		-	
			200	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	0				
	# 700	-	-	100	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-		
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		-	
				200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	0				
		+	-	188	100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		-
					200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	0			
# 375	-	-	100	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	-			
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		-		
			200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	0					
	# 750	-	-	100	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	-		
				100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		-	
				200	1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	0				
陽性対照 (BP)	-	10	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-			
			100	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	3	-				
			200	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	3(1.5)	0					
	+	-	10	100	0	0	5	11	0	0	0	0	0	0	0	15	/			
				100	0	0	9	19	0	0	1	0	0	0	27	/				
				200	0(0.0)	14(7.0)	30(15.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	42(21.0)	42(21.0)	0	0	0					

1) ctb: 染色体分型切斷, cte: 染色体分型交換, csb: 染色体切斷, cse: 染色体型交換, その他: 断片化

2)  $2 \times 2$ 検定を用いて有意差を検定, 構造異常については+gのみ検定; \*\*\*( $p < 0.001$ )

3) 判定基準 (+gの集計値) 5%未満: -陰性, 5%以上10%未満: ±疑陽性, 10%以上: +陽性

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

BP: ベンゼン[a]ピレン

# : 細胞処理時に被験物質の折出(分離)が認められた。

\$ : S9 Mixの影響のため被験物質の有無の判別が出来なかった。

表3 有糸分裂指数

(1)代謝活性化法によらない場合

処 理	処 理 時 間 (h)	処 理 濃 度 ( $\mu$ g/ml)	観 察 細 胞 数	有 糸 分 裂 指 数 (%)
陰 性 対 照 (アセトン)	24	0	2000	4.2
メタクリル酸 tert- ブチルエステル	24	100	2000	3.4
	24	200	2000	3.8
	24	400	2000	0.9
陽 性 対 照 (MMC)	24	0.03	2000	3.0
陰 性 対 照 (アセトン)	48	0	2000	3.3
メタクリル酸 tert- ブチルエステル	48	50	2000	3.7
	48	100	2000	2.3
	48	200	2000	1.8
陽 性 対 照 (MMC)	48	0.03	2000	3.0

(2)代謝活性化法による場合

処 理	S9 Mixの 有 無	処 理 濃 度 ( $\mu$ g/ml)	観 察 細 胞 数	有 糸 分 裂 指 数 (%)
陰 性 対 照 (アセトン)	+	0	2000	6.9
メタクリル酸 tert- ブチルエステル	+	188	2000	7.7
	+	375	2000	5.9
	+	750	2000	5.4
陽 性 対 照 (BP)	+	10	2000	4.8
陰 性 対 照 (アセトン)	-	0	2000	6.0
メタクリル酸 tert- ブチルエステル	-	175	2000	7.5
	-	350	2000	5.5
	-	700	2000	5.1
陽 性 対 照 (BP)	-	10	2000	4.9

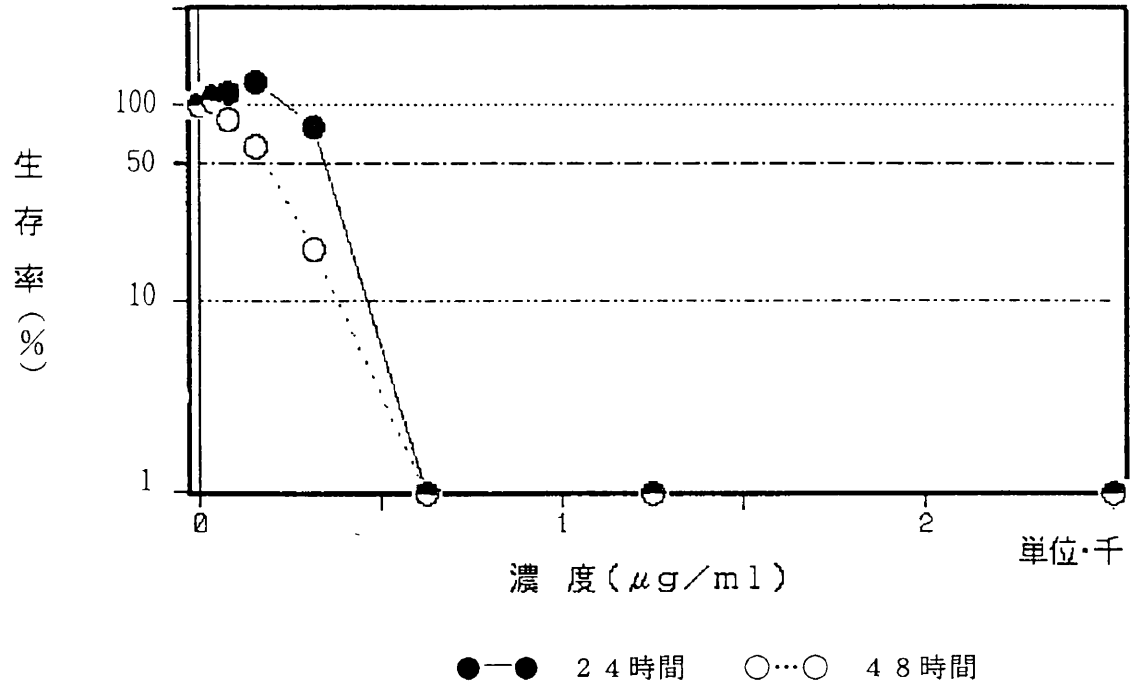


図 1 メタクリル酸tert-ブチルエステルの細胞毒性 (細胞増殖抑制試験1)  
(代謝活性化法によらない場合)

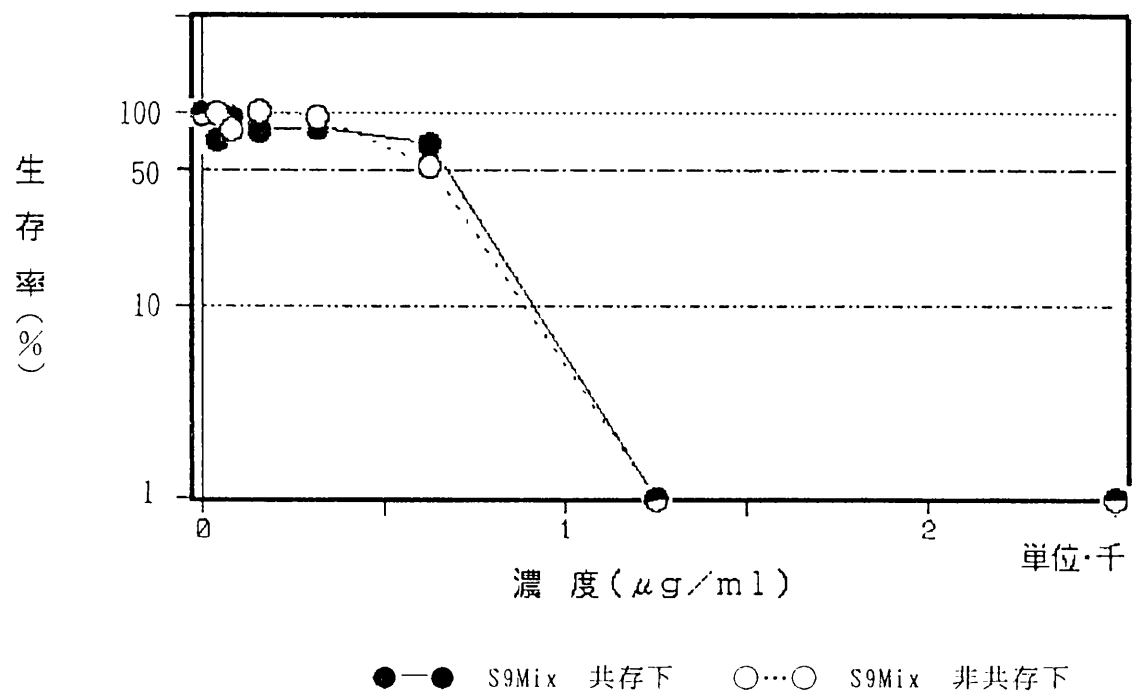


図 2 メタクリル酸tert-ブチルエステルの細胞毒性 (細胞増殖抑制試験1)  
(代謝活性化法による場合, 6時間処理18時間回復)

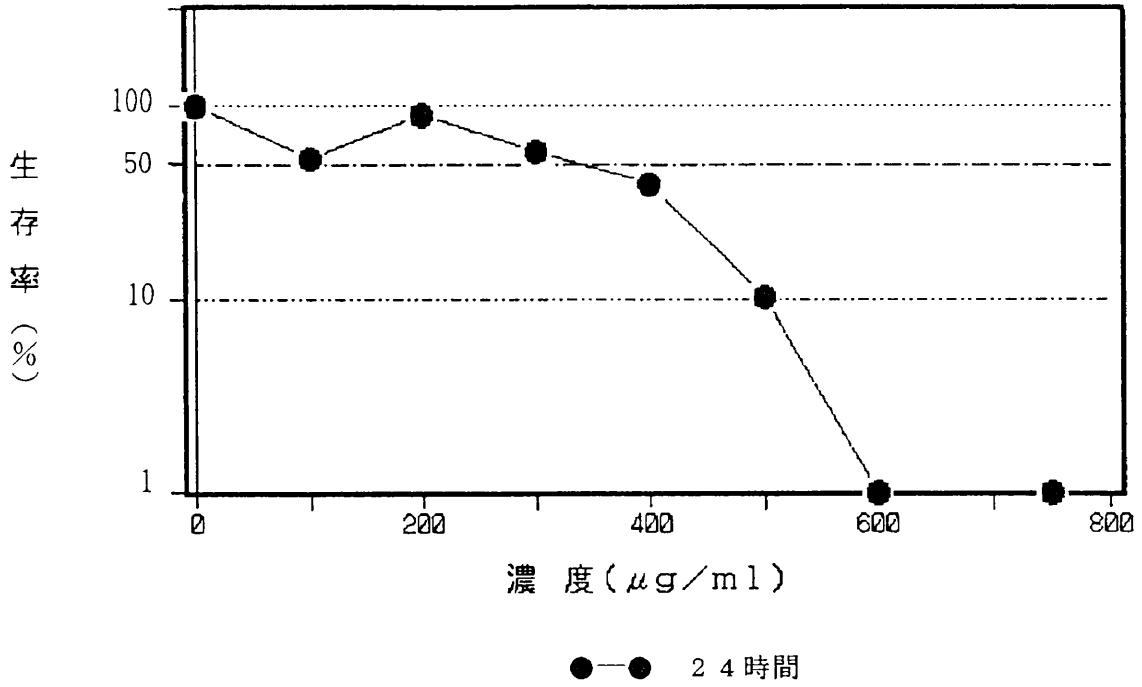


図 3 tert-ブチルアクリル酸の細胞毒性 (細胞増殖抑制試験 2)  
(代謝活性化法によらない場合)

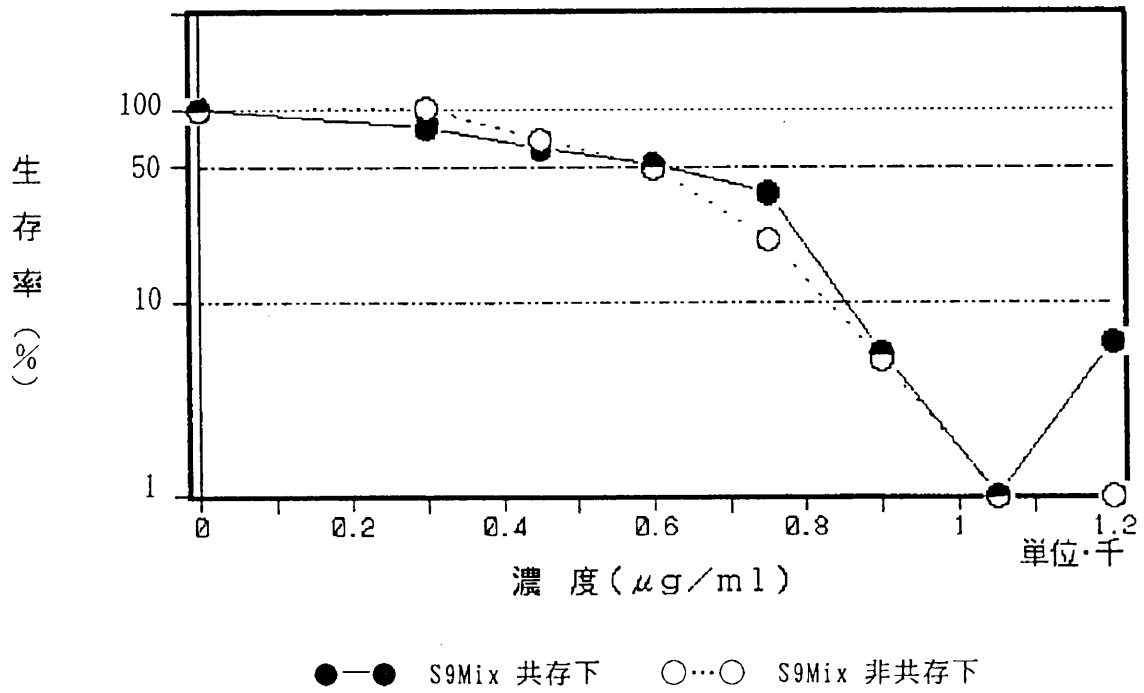


図 4 tert-ブチルアクリル酸の細胞毒性 (細胞増殖抑制試験 2)  
(代謝活性化法による場合, 6時間処理18時間回復)



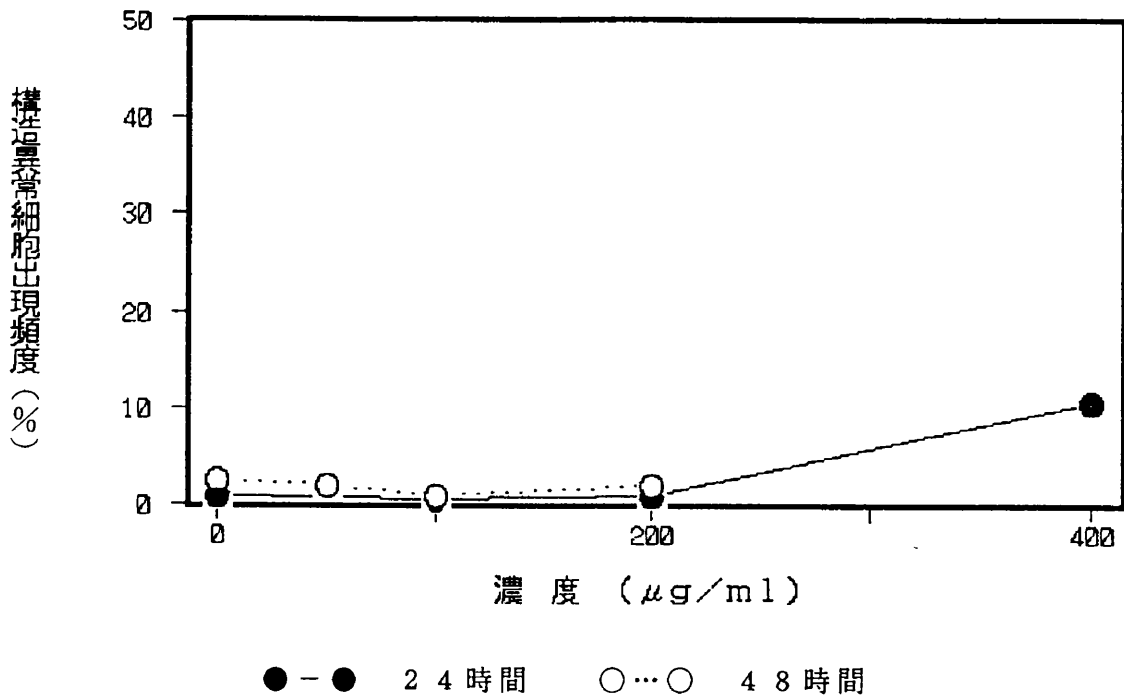


図 5 マクリル酸tert-ブチルエステルの構造異常細胞出現頻度 (代謝活性化法によらない場合)

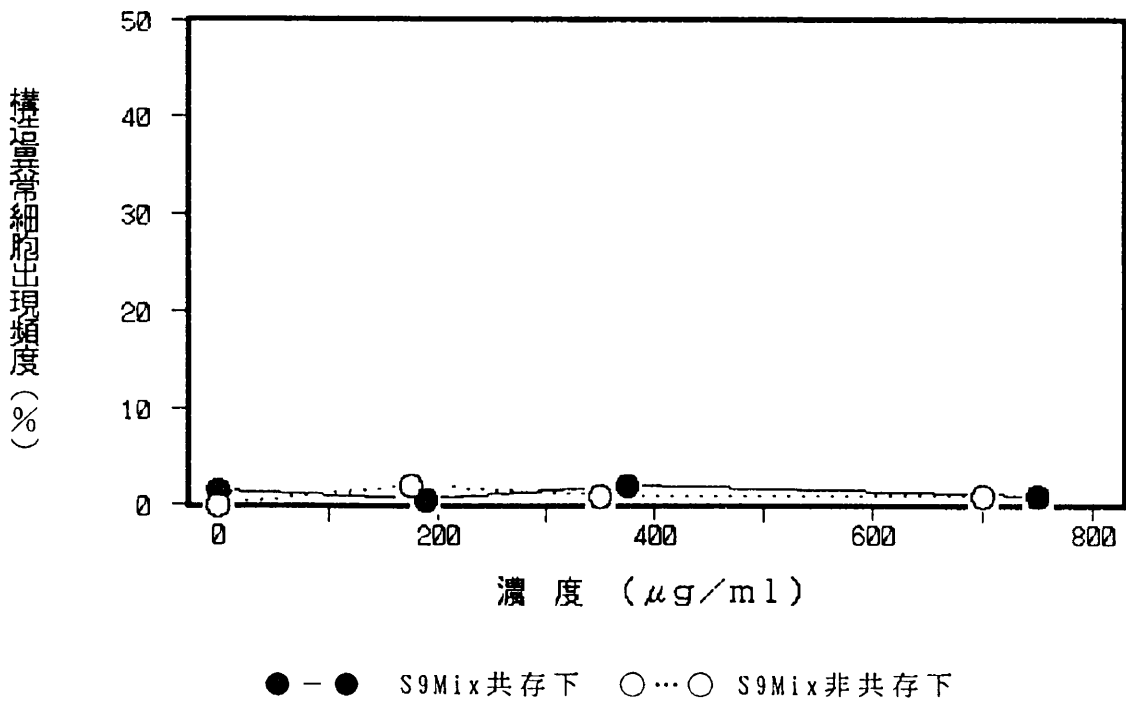


図 6 マクリル酸tert-ブチルエステルの構造異常細胞出現頻度 (代謝活性化法による場合)

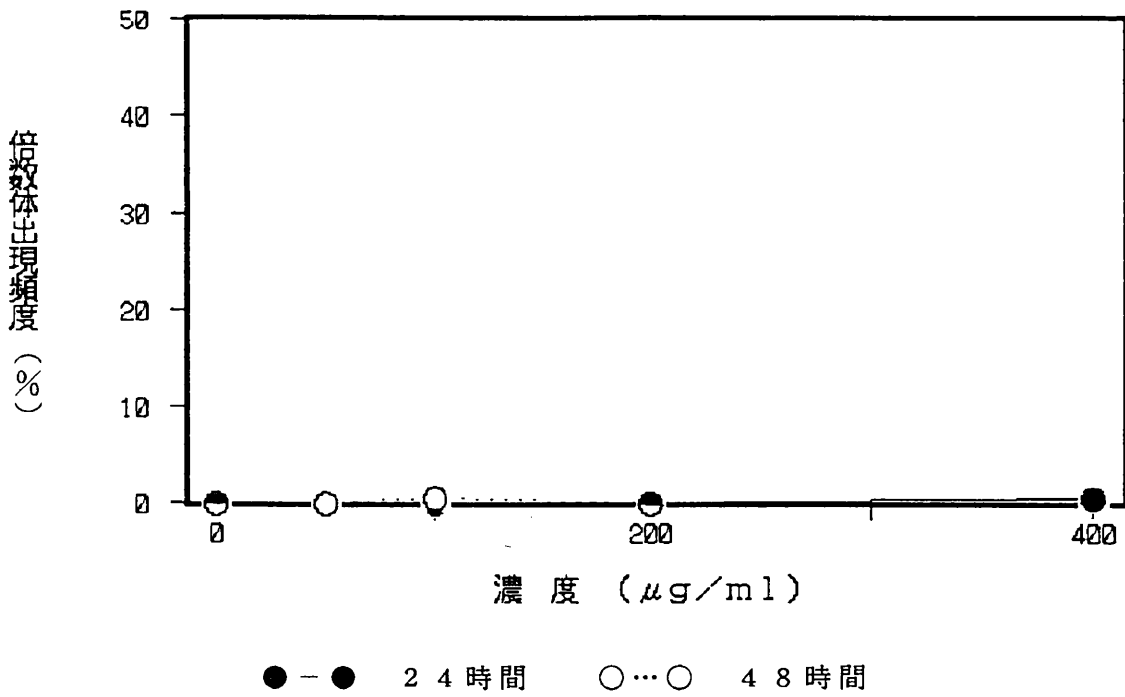


図 7 マクリル酸tert-ブチルエステルの倍数体細胞出現頻度  
(代謝活性化法によらない場合)

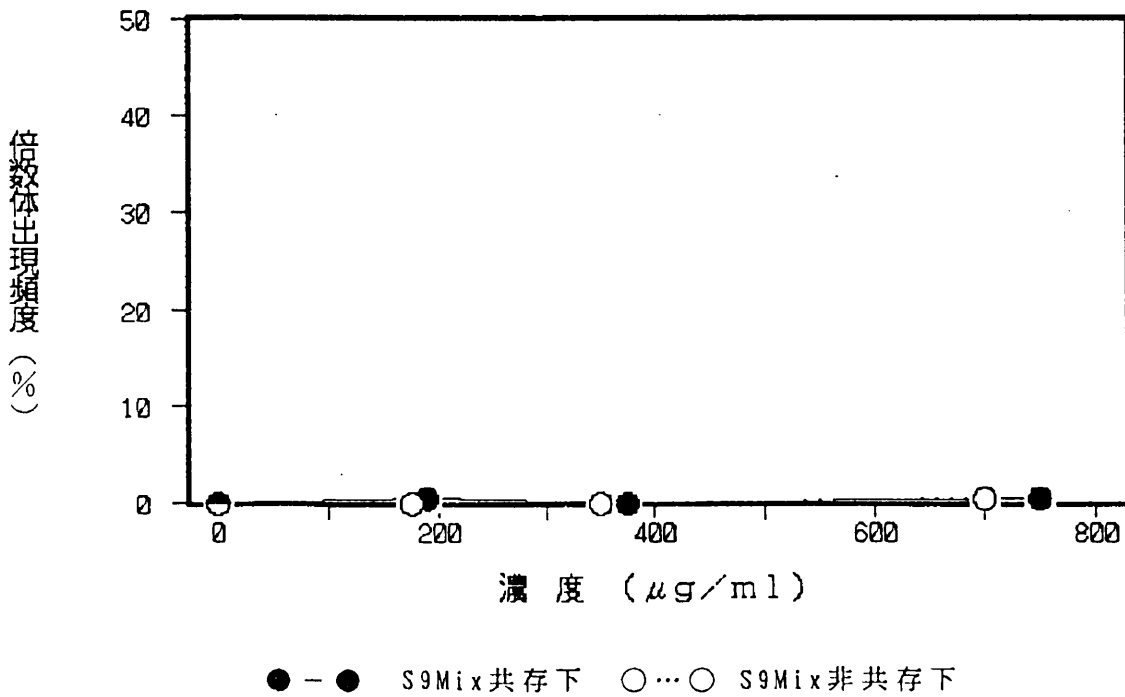


図 8 マクリル酸tert-ブチルエステルの倍数体細胞出現頻度  
(代謝活性化法による場合)