試 験 報 告 書

ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

（試験番号：４Ｌ４３２）

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，ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙの*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，50，500，5000μg/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 5000μg/mlで生存細胞は認められず，500μg/mlで生存細胞が認められた．

予備試験の結果を基に，2500μg/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（$TCID_{50}$）は，代謝活性化法によらない場合の48時間処理で，184μg/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 750μg/ml，S9 Mix 共存下，非共存下は 1200μg/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），$TCID_{50}$は，24時間処理で 343μg/ml，S9 Mix 共存下，非共存下で 617，596μg/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，$TCID_{50}$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 400μg/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ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙの 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

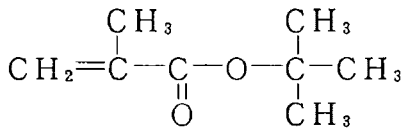
1. 試験物質

1.1 被験物質

より提供された ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙ（

Lot No.　　純度99.8%）を使用した．被験物質は，沸点67℃/70Torr，融点−60℃以下でエーテル臭を有する無色透明な液体であり，通常の取扱い条件では安定である．水に0.3%(20℃)，ｼﾞﾒﾁﾙｽﾙﾎｷｼﾄﾞ，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：ﾒﾀｸﾘﾙ酸 tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙ
化学式：$C_8H_{14}O_2$
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，協和醗酵工業株式会社，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/IU 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25cm²又は75cm²；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⁺	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±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３μg/mlの濃度で用時溶解し，ろ過滅菌した．

BPはDMSOに４mg/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，50，500，5000μg/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，5000μg/mlで生存細胞は認められなかった．500μg/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．50μg/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，39.1，78.1，158，313，625，1250，2500μg/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（$TCID_{50}$）は，184μg/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100，200，300，400，500，600，750μg/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 300，450，600，750，900，1050，1200μg/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 × 10^3個／mlの細胞懸濁液を25cm²フラスコに5ml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50μlの被験物質溶液と5ml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 30μlの被験物質溶液と0.5mlの S9 Mix 及び 2.5ml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5ml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 30μlの被験物質溶液と3ml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（$TCID_{50}$）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，$TCID_{50}$は，それぞれ 343，184及び 617，596μg/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

μg/ml，48時間処理では 50，100，200μg/ml，代謝活性化法による場合の S9 Mix 共存下では 188，375，750μg/ml，S9 Mix 非共存下では 175，350，700μg/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 0.03，10μg/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 50μl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 共存下の場合は 0.5mlの S9 Mix と 2.5mlの培養液の混液，また S9 Mix 非共存下の場合は3mlの培養液に 7.5μl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 0.1μg/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℃，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箇所に滴下し，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±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[1]．

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χ^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，非共存下にいて，細胞増殖抑制が認められ，$TCID_{50}$は，それぞれ343，184及び 617，596μg/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 400μg/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_{20}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ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙの 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 5.24	73.9 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 17.7	71.8 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	倍数体数 (%)	検2)定	染色体構造異常細胞1)の出現数と出現頻度（%） ギャップ g	染色分体型 ctb	染色分体型 cte	染色体型 csb	染色体型 cse	その他	合計 −g	合計 +g	検2)定	判3)定
陰性対照 (アセトン)	24	0	100	0	／	0	1	0	0	0	0	1	1	／	／
			100	0		1	0	0	0	0	0	0	1		
			200	0(0.0)		1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	2(1.0)		
	48	0	100	0	／	0	1	3	2	0	0	5	5	／	／
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)		0(0.0)	1(0.5)	3(1.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(2.5)	5(2.5)		
被験物質	24	100	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−	−
			100	0		0	0	0	0	1	0	1	1		
			200	0(0.0)		0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)		
		200	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−	−
			100	0		0	1	0	1	0	0	2	2		
			200	0(0.0)		0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)		
		# 400	100	1	−	0	3	4	2	0	0	8	8	***	+
			100	0		0	8	4	0	1	0	13	13		
			200	1(0.5)		0(0.0)	11(5.5)	8(4.0)	2(1.0)	1(0.5)	0(0.0)	21(10.5)	21(10.5)		
	48	50	100	0	−	0	0	1	0	0	0	1	1	−	−
			100	0		0	2	1	0	0	0	3	3		
			200	0(0.0)		0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	4(2.0)		
		100	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−	−
			100	1		0	2	0	0	0	0	2	2		
			200	1(0.5)		0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)		
		200	100	0	−	0	0	0	1	0	0	1	1	−	−
			100	0		0	2	1	0	0	0	3	3		
			200	0(0.0)		0(0.0)	2(1.0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	4(2.0)		
陽性対照 (MMC)	24	0.03	100	0	−	0	24	20	3	0	0	36	36	***	／
			100	0		0	21	26	1	0	0	42	42		
			200	0(0.0)		0(0.0)	45(22.5)	46(23.0)	4(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	78(39.0)	78(39.0)		
	48	0.03	100	0	−	4	38	54	5	1	1	73	74	***	／
			100	0		2	37	57	2	1	1	75	75		
			200	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:染色分体型切断，cte:染色分体型交換，csb:染色体型切断，cse:染色体型交換，その他:断片化

2) χ2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	S9Mix の有無	処理濃度 (μg/ml)	観察細胞数	倍数体数 (%)	倍数体数 検2)定	染色体構造異常細胞1)の出現数と出現頻度（%） ギャップ g	染色分体型 ctb	染色分体型 cte	染色体型 csb	染色体型 cse	その他	合計 −g	合計 +g	検2)定	判3)定
陰性対照 (アセトン)	−	0	100	0	／	0	0	0	0	0	0	0	0	／	／
			100	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	100	0	／	0	1	0	1	0	0	2	2	／	／
			100	0		0	0	0	0	1	0	1	1		
			200	0(0.0)		0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	3(1.5)	3(1.5)		
被験物質	−	175	100	0	−	0	0	0	0	1	0	1	1	−	−
			100	0		0	3	0	0	0	0	3	3		
			200	0(0.0)		0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	4(2.0)	4(2.0)		
		# 350	100	0	−	0	1	1	0	0	0	2	2	−	−
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)		0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)		
		# 700	100	1	−	0	0	1	0	0	0	1	1	−	−
			100	0		0	0	0	0	1	0	1	1		
			200	1(0.5)		0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)		
	+	188	100	1	−	0	1	0	0	0	0	1	1	−	−
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	1(0.5)		0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)		
		$ 375	100	0	−	0	1	0	3	0	0	4	4	−	−
			100	0		0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	0(0.0)		0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	4(2.0)		
		# 750	100	0	−	0	2	0	1	0	0	2	2	−	−
			100	1		0	0	0	0	0	0	0	0		
			200	1(0.5)		0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	2(1.0)		
陽性対照 (BP)	−	10	100	0	−	0	0	0	0	0	0	0	0	−	／
			100	0		0	0	1	0	2	0	3	3		
			200	0(0.0)		0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	3(1.5)	3(1.5)		
	+	10	100	0	−	0	5	11	0	0	0	15	15	***	／
			100	0		0	9	19	0	1	0	27	27		
			200	0(0.0)		0(0.0)	14(7.0)	30(15.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	42(21.0)	42(21.0)		

1) ctb:染色分体型切断，cte:染色分体型交換，csb:染色体型切断，cse:染色体型交換，その他:断片化

2) χ2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: ベンゾ[a]ピレン

：細胞処理時に被験物質の析出（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（μg/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（μg/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

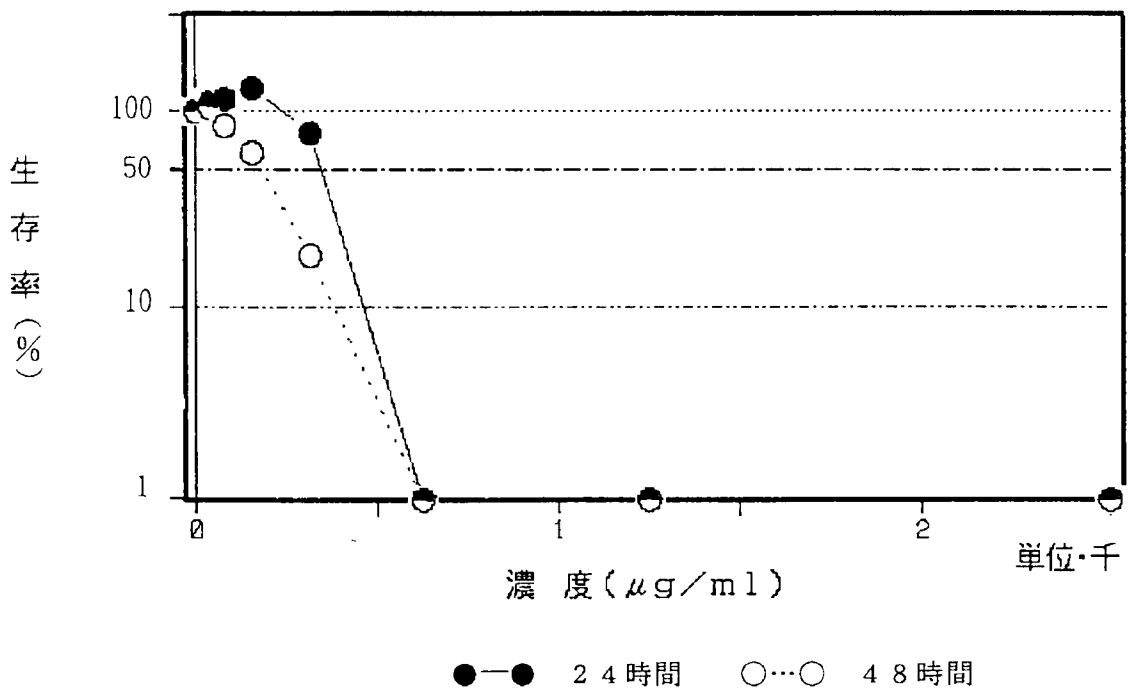


図　1　ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙの細胞毒性（細胞増殖抑制試験１）
（代謝活性化法によらない場合）

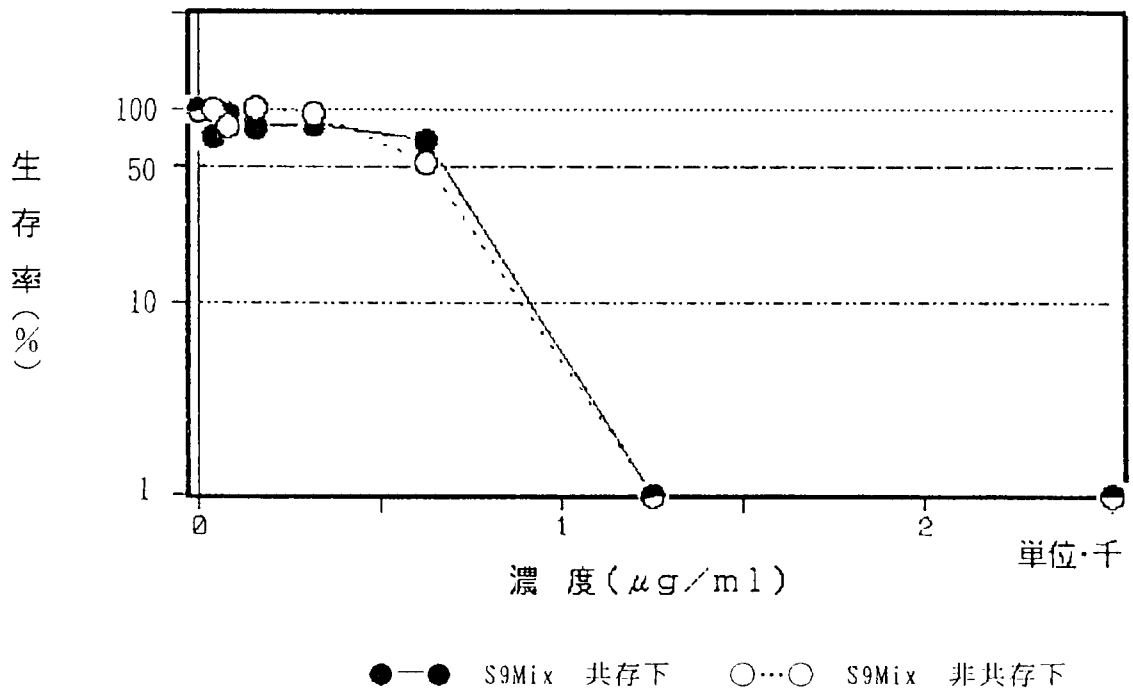


図　2　ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙの細胞毒性（細胞増殖抑制試験１）
（代謝活性化法による場合，６時間処理18時間回復）

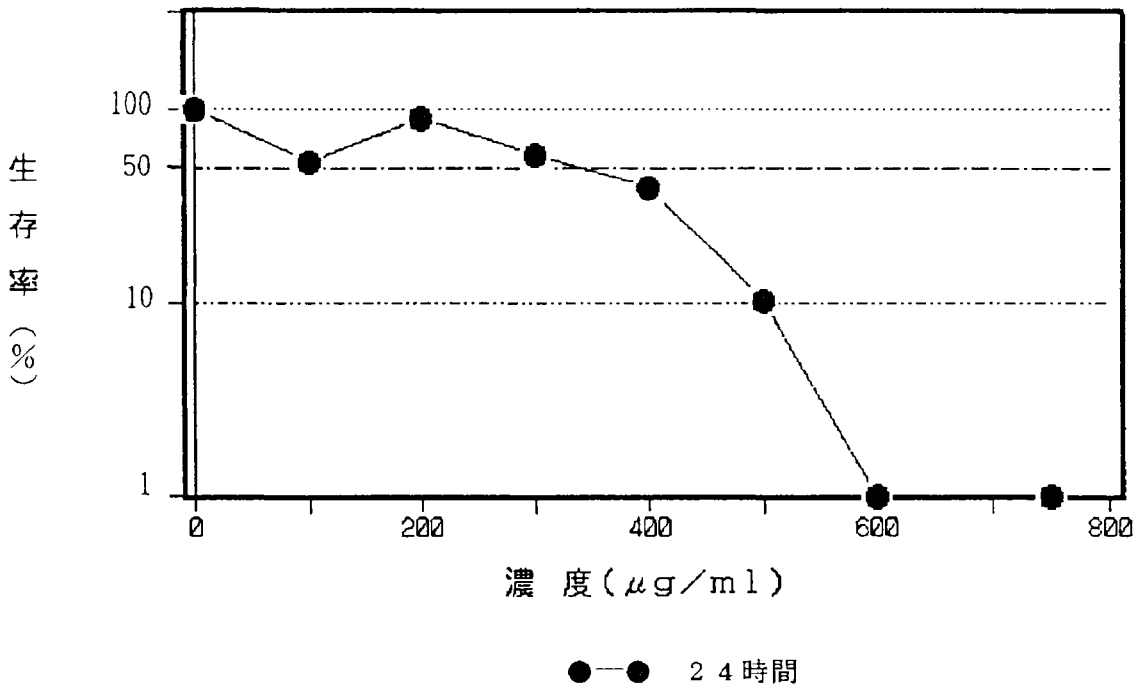


図　3　ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙの細胞毒性（細胞増殖抑制試験２）
（代謝活性化法によらない場合）

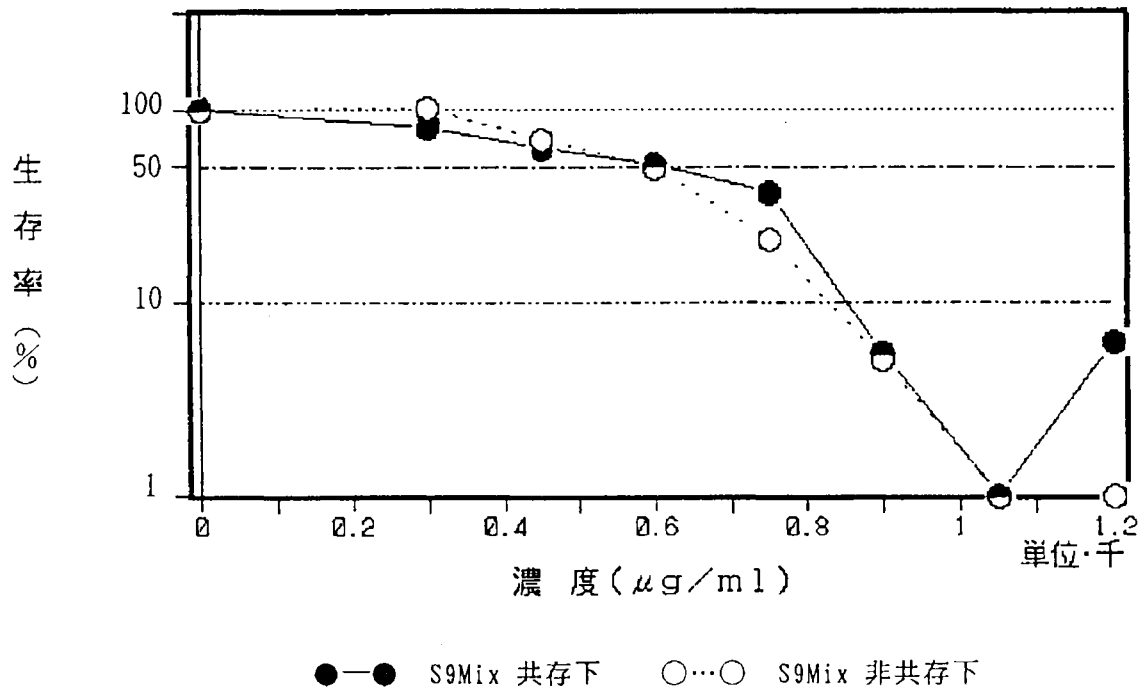


図　4　ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙの細胞毒性（細胞増殖抑制試験２）
（代謝活性化法による場合，６時間処理18時間回復）

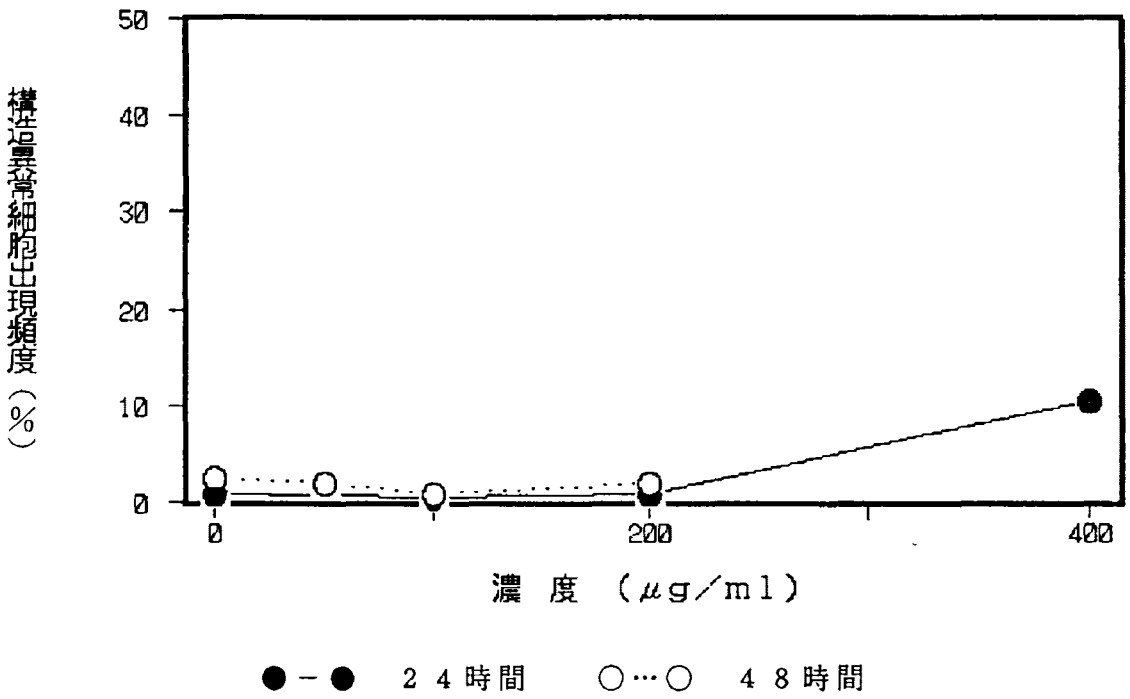


図 5 ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙの構造異常細胞出現頻度
（代謝活性化法によらない場合）

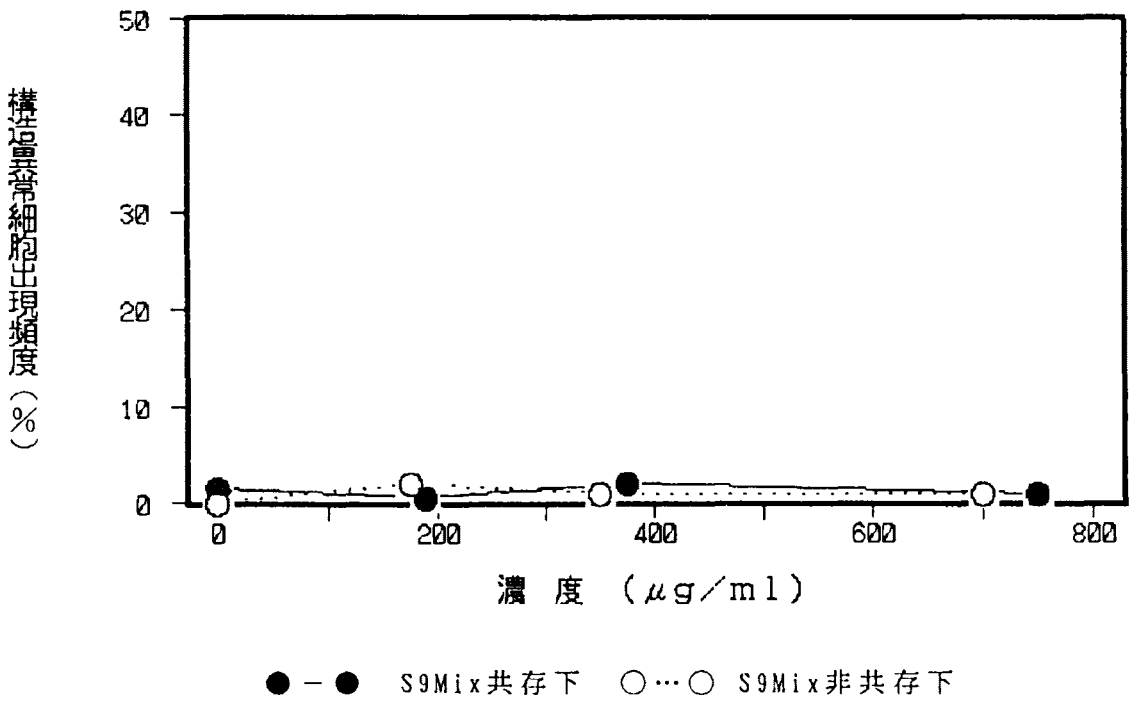


図 6 ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙの構造異常細胞出現頻度
（代謝活性化法による場合）

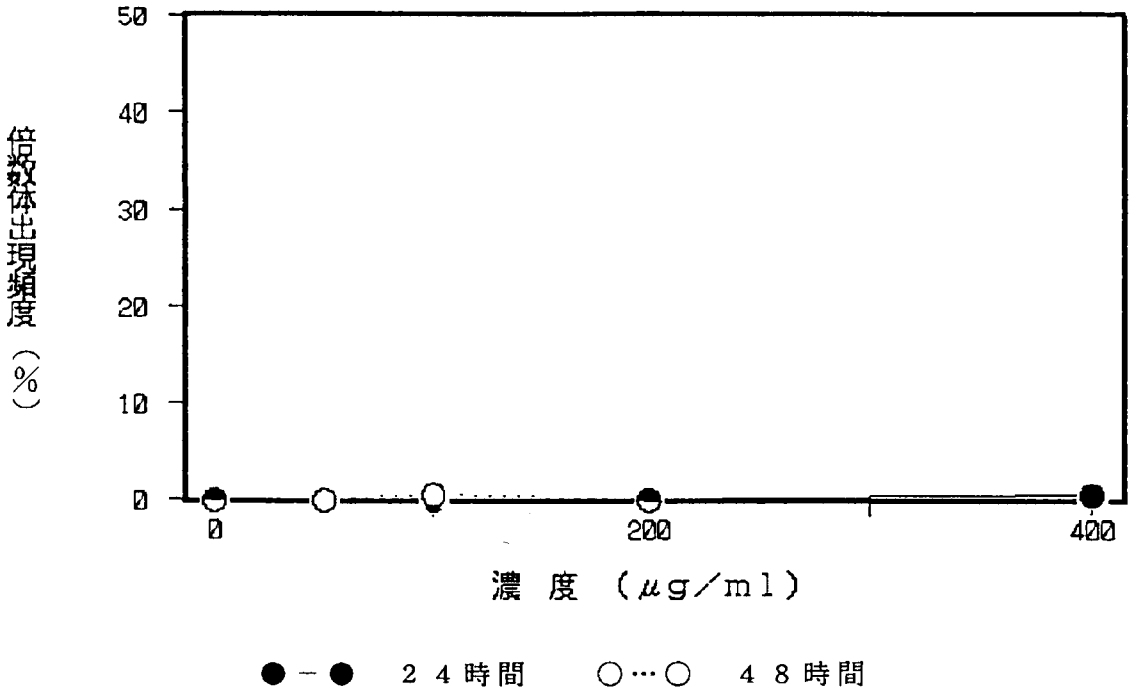


図 7 ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙの倍数体細胞出現頻度
（代謝活性化法によらない場合）

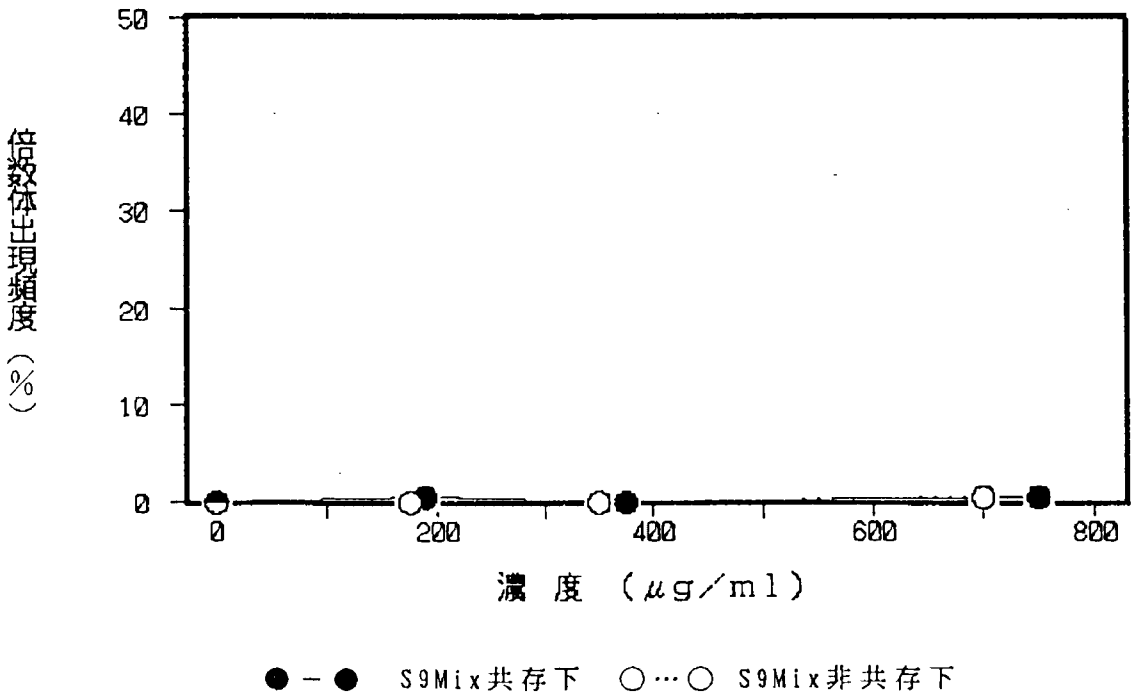


図 8 ﾒﾀｸﾘﾙ酸tert-ﾌﾞﾁﾙｴｽﾃﾙの倍数体細胞出現頻度
（代謝活性化法による場合）