

---

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンのは乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

---

最 終 報 告 書

作成日 2006年 11月 13日

株式会社日本バイオリサーチセンター  
羽島研究所

## 目 次

要 約	.....	8
緒 言	.....	9
方 法	.....	9
1. 被験物質, 媒体, 陽性対照物質及び陰性対照物質	.....	9
2. 検体液	.....	10
3. 試験細胞	.....	10
4. 培養液	.....	11
5. S9 mix	.....	11
6. 細胞数の調整及び細胞播種	.....	11
7. 細胞増殖抑制試験	.....	11
8. 染色体異常試験	.....	12
9. 標本観察	.....	14
10. 試験の成立条件	.....	14
11. 統計学的方法	.....	14
12. 判定基準	.....	14
試験成績	.....	15
1. 短時間処理法	.....	15
2. 連続処理法	.....	15
考 察	.....	16
文 献	.....	16

## Attachment, Table, Figure, Appendix及びPhotographの目次

Table 1	Cell growth inhibition test of 1,p-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells -The short treatment method-	..... 21
Table 2	Cell growth inhibition test of 1,p-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells -The continuous treatment method-	..... 22
Table 3	Chromosomal aberration test of 1,p-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells -The short treatment method-	..... 23
Table 4	Chromosomal aberration test of 1,p-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells -The continuous treatment method-	..... 24
Figure 1	Cell growth inhibition test of 1,p-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells	..... 25

## 要 約

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの染色体異常誘発性の有無を、ほ乳類の培養細胞(CHL/IU細胞)を用い、短時間処理法(6時間処理のS9 mix添加及びS9 mix無添加)と連続処理法(24時間処理)で検討した。

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの試験濃度は、細胞増殖抑制試験の結果から、50%細胞増殖抑制濃度及び細胞の生存率を指標に、短時間処理法のS9 mix添加では12.5, 25, 50, 100及び200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , S9 mix無添加では6.25, 12.5, 25, 50及び100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 連続処理法(24時間処理)では3.13, 6.25, 12.5, 25及び50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の公比2, 5段階を設定した。

試験の結果、連続処理法及び短時間処理法とも、数的及び構造的異常細胞の出現率は5%未満であった。

各試験系列で用いた陽性対照物質は、明らかな陽性結果を示し、陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、当試験施設のバックグラウンドデータのほぼ範囲内であった。

以上の結果、本試験条件下において、2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンに染色体異常誘発性はないと判定する。

## 緒 言

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの安全性に関する非臨床試験の一環として、ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無について検討した。

## 方 法

### 1. 被験物質, 媒体, 陽性対照物質及び陰性対照物質

#### 1.1 被験物質

被験物質の2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン [英語名称: 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene, 英語別名: 2,4-Diphenyl-4-methyl-1-pentene, CAS No.6362-80-7, 分子量: 236.36, 沸点: 310°C, 蒸気圧: 11 Pa(170°C), 揮発性: なし, 融点: -82°C以下, 比重: 0.975(20°C)] は, 無色透明の液体でスチレン臭がある。当試験には, から入手したもの [含量: 96.97% (不純物: 2,4-Diphenyl-4-methyl-2-pentene 2.54%)] を用いた。入手後は, 試験施設の被験物質保管室の保管庫内に室温 (設定: 23°C, 実測値: 20.0~25.3°C) ・遮光の条件下で保管した。

2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンのラットを用いる経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験(試験番号:100524)の投与期間終了後に製造元で被験物質を再分析した結果, 含量は96.9%であり, 使用期間中の安定性が確認された。

#### 1.2 媒体

媒体には, ジメチルスルホキシド [以下DMSO, 紫外部吸収スペクトル用, ロット番号: PU140, 使用期限: 2009年2月26日(自社規定), 株式会社同仁化学研究所] を用いた。DMSOは, 使用時まで試験施設の被験物質保管室の保管庫内に, 室温(設定: 23°C, 実測値: 20.0~24.8°C) ・遮光の条件下で保管した。

#### 1.3 陽性対照物質

試験には, マイトマイシンC(以下MMC)とジメチルニトロサミン(以下DMN)を用いた。

MMC [商品名: マイトマイシン注用2 mg, 1バイアル中に, 日局マイトマイシンC 2 mg(力価)と日局塩化ナトリウム48 mgを含有, ロット番号: 417ACG, 使用期限: 2007年7月, 協和醗酵工業株式会社] と, DMN [純度: 99.4%, ロット番号: DWP3368, 使用期限: 2007年2月21日(自社規定), 和光純薬工業株式会社] は, いずれも市販品を購入した。購入後は, いずれも使用時まで当試験施設の被験物質保管室の保管庫内に, 冷蔵(設定: 4°C, 実測値: 3.7~5.4°C, 使用冷蔵庫: MPR-311D, 三洋電機株式会社)の条件下で保管した。

#### 1.4 陰性対照物質

陰性対照物質は, 被験物質の媒体として用いたDMSOとした。

## 2. 検体液

### 2.1 被験物質

被験物質の必要量を秤量(電子天秤:AT261, メトラー・トレード株式会社)し, DMSOに溶解して最高濃度液(細胞増殖抑制試験:482.4 mg/mL、染色体異常試験の短時間処理法:40.2 mg/mL, 連続処理法:10.05 mg/mL)を調製した。最高濃度液より低い濃度液は, 最高濃度液からDMSOで段階希釈して調製した。調製は用時に行い, 使用後の残液は廃棄処分した。なお, 当試験における表示濃度は培養液に添加したときの最終濃度であるため, 各調製液はあらかじめ表示濃度の201倍の濃度を調製した。

### 2.2 陽性対照物質

MMC及びDMNとも, 生理食塩液(局方品, ロット番号:K3G70, 株式会社大塚製薬工場)に溶解して必要濃度(表示濃度の11倍)を調製した。調製は用時に行い, 使用後の残液は廃棄処分した。

	物質名	調製濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	試験濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )
連続処理法	MMC	0.55	0.05
短時間処理法	DMN	5500	500
	MMC	1.1	0.1

## 3. 試験細胞

試験には, 2000年11月28日に大日本製薬株式会社ラボラトリープロダクツ部から入手したチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株(CHL/IU)を用いた。細胞は液体窒素中に凍結保管(-196°C)した。試験に際し, 凍結保管してある細胞(継代数15回)を融解して増殖させ, 染色体数及び倍化時間を検査した[検査日:2005年2月21日~2005年2月25日]。

試験には, 当試験施設の基準に適合した細胞(倍化時間:15~18時間, 染色体数:23~27本の染色体を有する細胞が80%以上)を用いた。検査の結果をAttachment 1に示した。

細胞の継代は, 培養ビン(Nunc製)を用いて3~4日ごとに行った。以下に各試験における再培養からの継代数を示した。

細胞増殖抑制試験	.....	4回
染色体異常試験(短時間処理法)	.....	8回
染色体異常試験(連続処理法)	.....	9回

なお, 実験操作は空調設備を備えた染色体異常試験室(A棟)で行った。

#### 4. 培養液

Eagleの最少必須培養液(Eagle's minimum essential medium, 以下Eagle's MEM)の組成を, Attachment 2に示した。

培養液は, Eagle's MEM粉末(ロット番号: 1231892, GIBCO, リストNo.61100-061)と炭酸水素ナトリウムを注射用水に溶解し, 1Nの塩酸でpHを7.0~7.1(実測値: pH 7.028)に調整した。メンブランフィルター( $\phi$ 0.22  $\mu$ m, 日本ミリポア株式会社)で濾過した後, 非働化(56°C, 30分)した仔牛血清(ロット番号: 472959, GIBCO)を最終調製量の10%となるように加えて調製した。なお, 調製した培養液は用時に37°Cに加温して使用した。

#### 5. S9 mix

S9は, Attachment 3の条件により2004年10月1日にオリエンタル酵母工業株式会社で製造されたもの(ロット番号: 04100107)を使用した。S9は, 2004年11月2日に購入し, 使用時まで-80°C設定の冷凍庫 [型式: BFV-130(LR), エスペック株式会社] 内に凍結保管した。

S9 mixは, S9以外の各物質を調製混合して溶液とし, これをメンブランフィルター( $\phi$ 0.2  $\mu$ m, Nalge)で濾過した後, 使用直前にS9を加えて調製した。S9 mixの組成をAttachment 4に示した。

#### 6. 細胞数の調整及び細胞播種

培養ビンに0.25%トリプシン液を加えて細胞を剥離し, 遠心分離 [1000 rpm, 5分間, 小形冷却遠心機(型式: CF 5RX, 日立工機株式会社), 以下同様] により細胞を回収した後, 新鮮な培養液を加えて細胞浮遊液を作製した。この浮遊液中の細胞数を血球計算盤を用いて測定し, 細胞数が $2 \times 10^4$ 個/5 mLになるように培養液を加えて調整した。調整した細胞浮遊液を5 mLずつ, 直径60 mmの滅菌シャーレ(CORNING)に播種し, 温度を37 °C, CO<sub>2</sub>濃度を5%に設定した炭酸ガスインキュベーター(型式: BNA-121D, エスペック株式会社, 以下CO<sub>2</sub>インキュベーター)内で3日間培養したものを試験に用いた。

シャーレは, 細胞増殖抑制試験では1濃度につき1枚を, 染色体異常試験では1濃度につき細胞数の測定用に1枚, 染色体標本作製用に2枚を用いた。また, シャーレには試験番号, 被験物質名又は対照物質名, 濃度を記入し, さらに短時間処理法の場合はS9 mixの有無を, 連続処理法の場合は培養時間を記入することにより識別した。

#### 7. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテンの試験濃度を設定するために, 細胞増殖抑制試験を行った。試験は, 短時間処理法のS9 mix添加及びS9 mix無添加と連続処理法の24時間処理の3系列で実施した。

短時間処理法では, S9 mix添加用シャーレからは培養液を2.5 mL除去した後, ここにS9 mix 0.5 mLと検体液15  $\mu$ Lを添加した。S9 mix無添加用シャーレからは培養液を2.0 mL除去した後, 検体液をS9 mix添加の

場合と同様に添加した。いずれのシャーレもCO<sub>2</sub>インキュベーター内で6時間培養した後、新鮮な培養液5.0 mLに取り替え、さらに18時間培養した。一方、連続処理法では、シャーレに検体液25  $\mu$ Lを添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間培養した。

いずれの試験系列とも、検体液添加時と処理終了時に被験物質の析出の有無を肉眼的に観察した。

短時間処理法及び連続処理法とも、培養終了後、各シャーレに0.25 %トリプシン液を約3 mL添加して細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後に血球計算盤を用いて、生細胞数を測定した。測定は1枚のシャーレ当たり3回行い、その平均値を用いて陰性対照群の生細胞数を100%として各濃度における細胞の生存率を求めた。

試験濃度は、短時間処理法及び連続処理法とも「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成15年11月21日)に基づき、10 mMの2400  $\mu$ g/mLを最高濃度とし、以下公比2により1200, 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.8, 9.38及び4.69  $\mu$ g/mLの計10濃度を設定し、その他に陰性対照を設けた。

短時間処理法の結果をTable 1及びFigure 1に示した。

S9 mix添加における細胞の生存率は、4.69~18.8  $\mu$ g/mLでは90%以上を示したが、37.5  $\mu$ g/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、600  $\mu$ g/mL以上の濃度では生細胞は認められなかった。

S9 mix無添加における細胞の生存率は、4.69~18.8  $\mu$ g/mLでは90%以上を示したが、37.5  $\mu$ g/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、150  $\mu$ g/mL以上の濃度では生細胞は認められなかった。

Probit法により算出した50%細胞増殖抑制濃度(IC<sub>50</sub>)は、S9 mix添加では101.5  $\mu$ g/mL、S9 mix無添加では52.6  $\mu$ g/mLであった。

なお、S9 mix添加及びS9 mix無添加とも、検体液添加時には300  $\mu$ g/mL以上の濃度において白色の油状の析出物が認められた。また、処理終了時には300  $\mu$ g/mL以上の濃度において透明の油状の析出物が認められた。

連続処理法の結果をTable 2及びFigure 1に示した。

細胞の生存率は、4.69及び9.38  $\mu$ g/mLでは90%以上を示したが、18.8  $\mu$ g/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、75  $\mu$ g/mL以上の濃度では生細胞は認められなかった。

Probit法により算出したIC<sub>50</sub>は、23.9  $\mu$ g/mLであった。

なお、検体液添加時には300  $\mu$ g/mL以上の濃度において白色の油状の析出物が、処理終了時には300  $\mu$ g/mL以上の濃度において透明の油状の析出物が認められた。

## 8. 染色体異常試験

試験は、短時間処理法のS9 mix添加及びS9 mix無添加と連続処理法の24時間処理の3系列で実施した。

### 8.1 試験濃度及び処理群

試験濃度は、細胞増殖抑制試験の結果に基づき、IC<sub>50</sub>及び細胞の生存率を指標に、短時間処理法のS9 mix添加では12.5, 25, 50, 100及び200  $\mu$ g/mL、S9 mix無添加では6.25, 12.5, 25, 50及び100  $\mu$ g/mL、連続処理法(24時間処理)では3.13, 6.25, 12.5, 25及び50  $\mu$ g/mLの公比2, 5段階を設定した。

処理群は、各試験系列ごとに被験物質、陰性対照及び陽性対照群を設けた。陽性対照として短時間処理法のS9 mix添加にはDMN(500 µg/mL)を、S9 mix無添加にはMMC(0.1 µg/mL)を、連続処理法にはMMC(0.05 µg/mL)を用いた。

## 8.2 検体液の処理

### 8.2.1 短時間処理法

S9 mix添加用シャーレからは培養液を2.5 mL除去した後に、S9 mix 0.5 mLと被験物質及び陰性対照物質の場合は15 µLを、陽性対照物質の場合は0.3 mLを添加した。S9 mix無添加用シャーレからは培養液を2.0 mL除去した後に、検体液をS9 mix添加の場合と同様に添加した。いずれのシャーレもCO<sub>2</sub>インキュベーター内で6時間培養した後、新鮮な培養液5.0 mLに取り替え、さらに18時間培養してから染色体標本の作製及び生細胞数の測定をした。なお、検体液添加時と処理終了時に被験物質の析出の有無を肉眼的に観察した。

### 8.2.2 連続処理法

シャーレに、被験物質及び陰性対照物質の場合は25 µLを、陽性対照物質の場合は0.5 mLを添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間培養した後に染色体標本の作製及び生細胞数の測定をした。なお、検体液添加時と処理終了時に被験物質の析出の有無を肉眼的に観察した。

### 8.2.3 標本作製

短時間処理法及び連続処理法とも、培養終了2時間前に10 µg/mL濃度のコルセミド液を各シャーレに0.1 mL添加して、分裂中期細胞を得た。培養終了後、各シャーレに0.25%トリプシン液を約3 mL加えて細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後、75 mmol/L塩化カリウム水溶液で低張処理(37 °C, 15分間)をした。低張処理が終了した後、再び遠心分離し、メタノールと酢酸を3:1の割合で混合して氷冷した固定液で脱水固定を行い、同固定液で細胞浮遊液を調製した。この細胞浮遊液をスライドグラス上の2ヵ所に一滴ずつ滴下して細胞を広げ、乾燥後、2%のGiemsa染色液で約15分間染色した。

スライド標本は1シャーレ当たり3枚作製し、乱数を用いてコード番号を割り付けた。なお、観察終了後にスライド標本は、試験番号、被験物質名又は対照物質名、濃度、試験法、S9 mixの有無(短時間処理法)又は培養時間(連続処理法)、標本作製日を記入したラベルを貼付した。

### 8.2.4 細胞数の測定

短時間処理法及び連続処理法とも、培養終了後、各シャーレに0.25%トリプシン液を約3 mL添加して細胞を剥離し、遠心分離により細胞を回収した後に血球計算盤を用いて、生細胞数を測定した。

測定は1枚のシャーレ当たり3回を行い、その平均値を用いて陰性対照群の生細胞数を100%として各濃度における細胞の生存率を求めた。

## 9. 標本観察

石館の方法<sup>1)</sup>を参考にして、染色体がよく広がった分裂中期像の細胞を1シャーレ当たり100個、1濃度当たり200個観察した。標本の観察はコード番号順に行い、観察結果と試験濃度との照合は、各処理法ごとに標本観察終了後に行った。

染色体異常は、数的異常と構造的異常に分類した。数的異常は倍数体(polyploid)及び核内倍化(endoreduplication)を観察対象とし、構造的異常は①ギャップ(以下gap)、②染色分体型切断(chromatid break, 以下ctb)、③染色分体型切断(chromosome break, 以下csb)、④染色分体型交換(chromatid exchange, 以下cte)、⑤染色分体型交換(chromosome exchange, 以下cse)、⑥断片化(fragmentation, 以下frg)に分類し、これらの染色体異常を有する細胞を陽性細胞1個として記録した。なお、ギャップと切断の判別は、染色体又は染色分体の断片が軸の同一線上にあるものをギャップとし、同一線上からはずれているものを切断としたが、断片が同一線上にあっても非染色性部分が染色分体幅より大きいものは切断とした。染色体異常の総数は、ギャップを含めた場合と含めない場合とに分けて記録した。

当試験で認められた染色体異常を、型別に代表例について写真撮影した(Photograph 1~4)。

## 10. 試験の成立条件

陰性対照群において、染色体異常を有する細胞の出現率が5%未満で、陽性対照群においてギャップ以外の染色体異常を有する細胞の出現率が10%以上を示し、さらに陰性及び陽性対照群の染色体異常の出現率が、ほぼ当試験施設のバックグラウンドデータ(Attachment 5)の範囲内を示し、試験系に影響した他の要因がない場合に試験成立とした。

## 11. 統計学的方法

染色体異常を有する細胞の出現率は、下記の判定基準に従ったため有意差検定は行わなかった。

## 12. 判定基準

試験の結果は、数的異常又は構造的異常を有する細胞の出現率が5%未満の場合を陰性、5%以上10%未満の場合を疑陽性とした。さらにその出現率が10%以上を示し、濃度に依存して増加した場合を陽性とした。なお、構造的異常の染色体を有する細胞の出現率は、ギャップを含めた場合と含めない場合で算出し、ギャップを含めない場合の出現率により判定した。

## 試験成績

## 1. 短時間処理法

試験結果をTable 3 (Appendix 1-1~1-2)に示した。

2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテン処理群の数的異常細胞の出現率は、S9 mix添加及びS9 mix無添加ともすべての濃度で1.0%以下と陰性であった。同様に、構造的異常細胞の出現率も、S9 mix添加及びS9 mix無添加とも、すべての濃度で1.5%以下と陰性であった。

2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテン処理群のS9 mix添加における細胞の生存率は、12.5及び25 µg/mLでは90%以上を示したが、50 µg/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の200 µg/mLでは30%であった。S9 mix無添加における細胞の生存率は、6.25及び12.5 µg/mLでは90%以上を示したが、25 µg/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の100 µg/mLでは31%であった。

検体液添加時と処理終了時の被験物質の析出は、S9 mix添加及びS9 mix無添加とも、すべての濃度において認められなかった。

陰性対照の数的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では1.0%、S9 mix無添加では0.5%であった。構造的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では0.5%、S9 mix無添加では0%であった。また、陽性対照(S9 mix添加：DMN；500 µg/mL、S9 mix無添加：MMC；0.1 µg/mL)の数的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では0.5%、S9 mix無添加では0%であった。構造的異常細胞の出現率は、S9 mix添加では68.5%、S9 mix無添加では52.5%であった。

陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、バックグラウンドデータのほぼ範囲内であり、試験条件を満たすものであった。

## 2. 連続処理法

試験結果をTable 4 (Appendix 2)に示した。

2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテン処理群の数的異常細胞の出現率は、すべての濃度で0.5%以下と陰性であった。同様に、構造的異常細胞の出現率も、すべての濃度で1.0%以下と陰性であった。

2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテン処理群の細胞生存率は、3.13及び6.25 µg/mLでは90%以上を示したが、12.5 µg/mL以上では濃度が増加するに従いその値は減少し、最高濃度の50 µg/mLでは27%であった。

検体液添加時と処理終了時の被験物質の析出は、すべての濃度において認められなかった。

陰性対照における数的異常細胞の出現率は0%、構造的異常細胞の出現率も0%であった。また、陽性対照(MMC；0.05 µg/mL)における数的異常細胞の出現率は0%、構造的異常細胞の出現率は46.5%であった。

陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、バックグラウンドデータのほぼ範囲内であり、試験条件を満たすものであった。

## 考 察

2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンの染色体異常誘発性の有無を、ほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験により検討した。

2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテン処理群の数的異常細胞及び構造的異常細胞の出現率は、いずれの試験系列においても、5%に満たなかったため、2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンは数的異常及び構造的異常のいずれも誘発しないものと思われる。

連続処理法及び短時間処理法の各試験系列において、陰性対照及び陽性対照群の異常細胞出現率は、バックグラウンドデータのほぼ範囲内であり、試験の成立条件を満たすものであった。

以上の結果、本試験条件下において、2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンに染色体異常誘発性はないと判定する。なお、2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンは当試験施設で同時期に実施した細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性の結果が得られている<sup>2)</sup>。また、関連物質の $\alpha$ -メチルスチレンでは復帰変異試験、染色体異常試験において陰性、姉妹染色分体交換試験において陽性との報告がある<sup>3)</sup>。

## 文 献

- 1) 石館 基監修：染色体異常試験データ集(改訂増補)，株式会社エル・アイ・シー（東京，1987）。
- 2) 三輪芳久ら：2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンの細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号：901824），株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所（2006）。
- 3) (財)化学物質評価研究機構：化学物質安全性（ハザード）評価シート（2001）。

Table 1. Cell growth inhibition test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells  
-The short treatment method-

Test Substance	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Treated for 6 hr with S9 mix			Treated for 6 hr without S9 mix		
		No. of cells ( $\times 10^4/\text{plate}$ )	Survival ratio <sup>a)</sup> (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	No. of cells ( $\times 10^4/\text{plate}$ )	Survival ratio <sup>a)</sup> (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	68	100	—	64	100	—
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	4.69	68	100	101.5	62	97	52.6
	9.38	65	96		62	97	
	18.8	64	94		61	95	
	37.5	60	88		51	80	
	75	44	65		23	36	
	150	26	38		0	0	
	300*	11	16		0	0	
	600*	0	0		0	0	
	1200*	0	0		0	0	
2400*	0	0	0	0			

a): (1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene treated group / negative control)  $\times 100$ .

\*: White oily precipitations were noted at the time of application of the test solution and clean oily precipitations were noted on completion of the incubation.

Table 2. Cell growth inhibition test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells  
-The continuous treatment method-

Test Substance	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Treated for 24 hr		
		No. of cells ( $\times 10^4/\text{plate}$ )	Survival ratio <sup>a)</sup> (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	65	100	—
	4.69	62	95	
	9.38	59	91	
	18.8	44	68	
	37.5	23	35	
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	75	0	0	23.9
	150	0	0	
	300*	0	0	
	600*	0	0	
	1200*	0	0	
	2400*	0	0	

a): (1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene treated group / negative control)  $\times 100$ .

\*: White oily precipitations were noted at the time of application of the test solution and clean oily precipitations were noted on completion of the incubation.

Table 3. Chromosomal aberration test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells  
— The short treatment method —

Test substance	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	With (+) or without (-) S9 mix	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio <sup>e)</sup> (%)		
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence <sup>a)</sup> (%)	Judgement <sup>b)</sup>	Types <sup>c)</sup> and numbers (cumulative)						No. of cells with chromosome aberration		Incidence <sup>d)</sup> (%)			Judgement <sup>b)</sup>	
								gap	ctb	csb	cte	cse	frg	(+g)	(-g)	(+g)	(-g)			
Negative control	—	+	200	2	0	1.0	—	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	100
	12.5	+	200	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	98
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	25	+	200	1	0	0.5	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	90	
	50	+	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	71
	100	+	200	2	0	1.0	—	0	1	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	49	
	200	+	200	2	0	1.0	—	0	2	0	1	0	0	3	3	1.5	1.5	—	30	
Dimethylnitrosamine	500	+	200	1	0	0.5	—	0	66	0	107	0	0	137	137	68.5	68.5	+	83	
Negative control	—	—	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	100	
	6.25	—	200	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	98	
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	12.5	—	200	0	0	0	—	0	2	0	0	0	0	2	2	1.0	1.0	—	98	
	25	—	200	1	0	0.5	—	0	2	0	0	0	0	2	2	1.0	1.0	—	82	
	50	—	200	0	0	0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	53	
	100	—	200	1	0	0.5	—	0	3	0	0	0	0	3	3	1.5	1.5	—	31	
Mitomycin C	0.1	—	200	0	0	0	—	0	57	0	72	0	0	105	105	52.5	52.5	+	89	

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells)  $\times$  100.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ;  $\pm$ : equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; frg: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells)  $\times$  100.

e): {1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene treated group or positive control / negative control}  $\times$  100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

Table 4. Chromosomal aberration test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in cultured CHL cells  
 — The continuous treatment method —

Test substance	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Time of treatment (hr)	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio <sup>e</sup> (%)					
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence <sup>a)</sup> (%)	Judgement <sup>b)</sup>	Types <sup>c)</sup> and numbers (cumulative)			No. of cells with chromosome aberration		Incidence <sup>d)</sup> (%)	Judgement <sup>b)</sup>									
								gap	ctb	csb	cte	fig			(+g)	(-g)							
Negative control	—	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	3.13	24	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	
	6.25	24	200	1	0	0.5	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	—	—	—	100	
	12.5	24	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	82	
	25	24	200	0	0	0	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	—	—	—	48	
Mitomycin C	0.05	24	200	1	0	0.5	—	0	2	0	0	0	0	2	2	1.0	1.0	—	—	—	—	27	
																							85

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells)  $\times$  100.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%) ;  $\pm$ : equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells)  $\times$  100.

e): {1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene treated group or positive control / negative control}  $\times$  100.

(+g) : Total aberrant cells including the gap; (-g) : total aberrant cells excluding the gap.

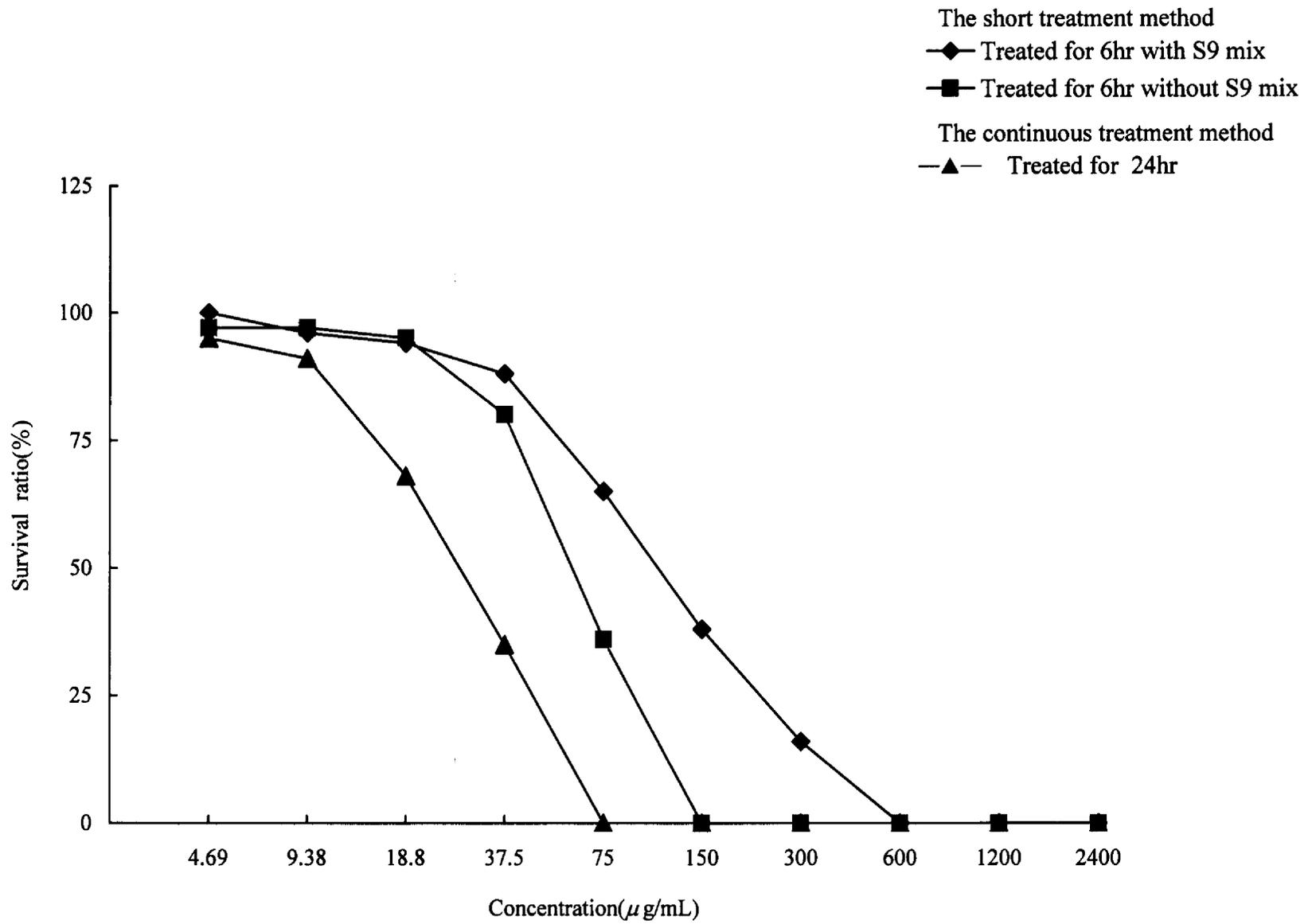


Figure 1. Cell growth inhibition test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in cultured CHL cells.