最 終 報 告 書

1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサン

のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号: 98-113)

財団法人　畜産生物科学安全研究所

目　次

要約 …… 1頁
試験目的 …… 2
材料および方法 …… 2
1．被験物質 …… 2
2．対照物質 …… 3
3．溶媒 …… 3
4．試験細胞株 …… 3
5．培養液 …… 4
6．培養条件 …… 4
7．S9 mix …… 4
8．細胞増殖抑制試験 …… 5
1）　被験物質の供試液の調製 …… 5
2）　細胞の処理 …… 5
3）　細胞増殖率の測定 …… 6
9．染色体異常試験 …… 7
1）　被験物質および陽性対照物質の用量 …… 7
2）　被験物質および陽性対照物質の供試液の調製 …… 7
3）　細胞の処理 …… 7
4）　試験群の構成および使用シャーレ数 …… 8
5）　染色体標本の作製および細胞増殖率の測定 …… 9
6）　染色体の観察 …… 10
7）　染色体異常の分類および集計 …… 10
8）　試験結果の判定 …… 10

結果 …… 11
1．染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）…… 11
2．染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）…… 11
3．染色体異常試験（連続処理法：24時間処理）…… 11
結論および参考事項 …… 12
参考文献 …… 12

表

表1　1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサンの染色体異常試験結果（短時間処理法：S9 mix 非存在下）…… 13
表2　1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサンの染色体異常試験結果（短時間処理法：S9 mix 存在下）…… 14
表3　1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサンの染色体異常試験結果（連続処理法：24時間処理）…… 15

図

図1　構造異常を有する細胞の出現頻度 …… 16
図2　数的異常を有する細胞の出現頻度 …… 18

要 約

1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサンの染色体異常誘発性の有無を検討するため，チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU）を用いて *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため，短時間処理法では 125～3000 μg/mL，連続連続処理法24時間処理では 12.5～400 μg/mL の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果，短時処理法 S9 mix 非存在下では，500 μg/mL でのみ 50%をやや上回る細胞増殖抑制が認められたが，その他の用量では 50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。また，S9 mix 存在下では，50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。連続処理法24時間処理では，50 μg/mL 以上で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。

したがって，染色体異常試験における用量は，短時間処理法の場合，S9 mix 非存在下では 93.75，187.5，375，750，1500 および 3000 μg/mL，S9 mix 存在下では 375，750，1500 および 3000 μg/mL とした。また，連続処理法24時間処理では，6.25，12.5，25，37.5，50 および 100 μg/mL とした。

試験の結果，短時間処理法においては，S9 mix 非存在および存在下ともに染色体異常を有する細胞の明らかな増加は認められなかった。また，連続処理法24時間処理においても染色体異常細胞の明らかな増加は認められなかった。

以上の成績から，本実験条件下では，1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサンの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。

試 験 目 的

この試験は，1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサンのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法[1, 2]

1．被験物質

名称(略号)：　1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサン(BTBTC)

別名　1,1-Bis(*tert*-butyldioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane; 1,1-Di(*t*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane;パーヘキサ3M; DIGIF; 3,3,5-Trimethylcyclohexylidene bis(1,1-dimethylethylperoxide); 3,3,5-Trimethylcyclohexylidene bis (*tert*-butylperoxide)

ＣＡＳ番号：　6731-36-8

ロット番号：

純　　度：　97.9%（平成10年10月13日分析）〔不純物：残分 2.1%の約９割は原料である 3,3,5-trimethylcyclohexane，約１割は不明〕

入手先(製造元)：

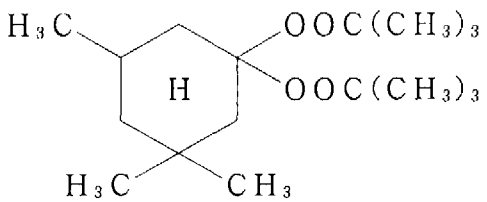
入　手　日：　平成10年10月16日

入　手　量：　250ｇ

物理化学的性状：

化 学 名　1,1-Bis(*tert*-butylperoxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane

構 造 式



分子式　$C_{17}H_{34}O_4$

分子量　302.46

性状(常温)　無色ないし淡黄色液体

融　点　−40℃以下

沸　点　測定不可

蒸気圧　4.3 mmHg (83℃)

溶解性　水，ジメチルスルホキシド (DMSO)：不溶；アセトン：易溶

安定性：　安定〔実験終了後，残余被験物質を　　において分析（平成11年6月17日）した結果，純度は97.8%で，実験期間中被験物質は安定であったことを確認した。〕

保管条件：　冷暗所（4℃），密栓

2．対照物質

陰性対照物質は，被験物質の溶媒として使用したアセトン（和光純薬工業株式会社，ロット番号 ESE3934，99.5%）を用いた。陽性対照物質は，連続処理法では 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG, Aldrich Chemical Company，ロット番号 00613PN，純度 97%）を，短時間処理法では 3,4-Benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P, Sigma Chemical Company，ロット番号 57F-3434，純度 98%）を用いた。

3．溶媒

被験物質は水および DMSO に不溶であり，アセトンに可溶であるため，溶媒にはアセトンを用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[*a*]P の溶媒についても，DMSO〔和光純薬工業株式会社，ロット番号 ACH7185，純度 99.9%〕を用いた。

4．試験細胞株

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部（元：国立衛生試験所 変異原性部）から昭和60年1月13日に分与を受けたチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU）を使用した。供試細胞は，浮遊細胞液に10%の割合で DMSO を添加し，液体窒素条件下で保存しておいたも

のを培養液に戻し，解凍後の継代数が7回までのものを使用した。

5．培養液

Eagle-MEM 粉末培地（Gibco Laboratories，ロット番号 1015566，1019178）を常法に従い調製し，これに非働化（56℃，30分間加熱処理）仔牛血清（Gibco Laboratories，ロット番号 1013320，1015812，1019034）を10％の割合で添加したものを用いた。

6．培養条件

供試細胞は，CO_2インキュベーター（Napco 社）を用い，CO_2濃度5％，空気 95％，温度 37℃，加湿条件下で培養した。

7．S9 mix

S9 mix は，ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素画分（S9）にコファクターを加えて凍結されたものを，キッコーマン株式会社から購入（ロット番号 CAM-394，平成10年12月4日製造，平成10年12月18日購入）し，－80℃以下で保存したものを使用時に冷水中で解凍して用いた。使用したS9 の製造法および S9 mix の 1 mL 当たりの組成は，次のとおりである。

〔S9 製造法〕

A．使用動物

a）種・系統：　Sprague-Dawley 系ラット（日本エスエルシー株式会社）

b）性・週齢：　雄・7 週齢

c）体　　重：　200～239 g

B．誘導法

a）誘導物質：　Phenobarbital（PB），5,6-Benzoflavone（BF）

b）投与経路：　腹腔内投与

c）投与法（投与開始日起算）：

1日目 － PB 30 mg/kg，　2，3，4 日目 － PB 60 mg/kg

3日目 － BF 80 mg/kg

C．調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離（9,000×g）し，その上清を採取。

〔S9 mix 1 mL あたりの組成〕

S9	0.3 mL
$MgCl_2$	5 μmol/0.1 mL
KCl	33 μmol/0.1 mL
G-6-P	5 μmol/0.1 mL
NADP	4 μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4 μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1 mL

8．細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な用量を検討するため，短時間処理法の場合は，125，250，500，1000，2000 および 3000μg/mL，連続処理法の場合は，24時間処理では 12.5，25，50，100，200 および 400μg/mL，48時間処理では 125，250，500，1000，2000 および 3000 μg/mL の用量を用いて，次に記載する細胞増殖抑制試験を行なった。試験には各用量について2枚のシャーレを使用した。なお，連続処理法24時間処理においては，2回試験を実施しており，1回目の検討時には最高用量を 3000μg/mL として行なった。

1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は，使用時に被験物質をアセトンに溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで，原液の一部をアセトンで順次希釈して所定濃度の供試液を調製した。被験物質の供試液の添加量は，各シャーレの培養液量の 0.5 vol%とした。

2) 細胞の処理

短時間処理法の場合，直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に 4×10^3 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え，培養開始3日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き，アセトン（陰性対照）または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。また，S9 mix 存在下の場合は各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除き，S9 mix 0.5 mL を加えた後，アセトンまたは被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。培養6時間後に培養液を取り除き，新しい培養液 5 mL を加えて18時間培養した。一方，連続処理法の場合は，短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し，培養開始3日後にアセトンまたは被験物質の供試液各 0.025 mL を加えて24時間および48時間培養した。培養終了後，培養液を取り除き，生理

食塩液で細胞表面を2回洗浄し，10%ホルマリン水溶液を加えて約10分間固定した。固定後，水洗し，0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約10分間染色した。水洗後，室温で一晩自然乾燥した。

なお，100 μg/mL 以上の用量の供試液では培養液中に添加した際，油滴および油膜様の被験物質の析出が認められ，培養終了時まで残存した。

3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2）で固定・染色した細胞は，染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計（モノセレータⅡ，オリンパス光学工業株式会社）を用いて測定し，陰性対照群の細胞増殖率を 100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果は，下表に示したとおり，短時間処理法においては，S9 mix 非存在下では 500 μg/mL で50%をやや上回る細胞増殖抑制が認められたものの，他の用量においては 50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。また，S9 mix 存在下ではいずれの用量においても50%を上回る細胞増殖抑制は認められず，50%細胞増殖抑制用量は 3000 μg/mL 以上と判断された。連続処理法においては，24時間処理では 50 μg/mL 以上で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ，50%細胞増殖抑制用量は 25～50 μg/mL 間にあるものと判断された。48時間処理では全ての用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ，125 μg/mL でほぼ 50%細胞増殖抑制を示した。

〔短時間処理法〕

用　量	細胞増殖率（%）	
(μg/mL)	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0 （溶媒）	100　100 [100.0]	100　100 [100.0]
125	85　86 [85.5]	83　96 [89.5]
250	56　58 [57.0]	75　101 [88.0]
500	40　50 [45.0]	69　96 [82.5]
1000	49　55 [52.0]	71　82 [76.5]
2000	57　61 [59.0]	76　83 [79.5]
3000	46　65 [55.5]	61　76 [68.5]

[　]：平均値

〔連続処理法〕

用　量 (μg/mL)	細胞増殖率（%） 24 時間処理		
0 （溶媒）	100	100	[100.0]
12.5	96	93	[94.5]
25	90	90	[90.0]
50	39	47	[43.0]
100	26	25	[25.5]
200	28	32	[30.0]
400	14	15	[14.5]

[　]：平均値

〔連続処理法〕

用　量 (μg/mL)	細胞増殖率（%） 48 時間処理		
0 （溶媒）	100	100	[100.0]
125	47	50	[48.5]
250	29	29	[29.0]
500	6	0	[3.0]
1000	0	0	[0.0]
2000	0	0	[0.0]
3000	0	0	[0.0]

[　]：平均値

9．染色体異常試験

1）被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から，被験物質の用量は，短時間処理法の場合は，10 mM に相当する 3000 μg/mL を最高用量とし，S9 mix 非存在下では 93.75，187.5，375，750，1500 および 3000 μg/mL の6用量（公比2），S9 mix 存在下では 375，750，1500 および 3000 μg/mL の4用量（公比2）とした。連続処理法24時間処理の場合は，50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ，かつ3用量以上のデータが得られる事を考慮して 6.25，12.5，25，37.5，50 および 100 μg/mL とした。陽性対照物質の MNNG は 2.5 μg/mL，B[a]P は 10 μg/mL の用量を用いた。

2）被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は，使用時に被験物質をアセトンに溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで，原液の一部をアセトンで順次希釈し，所定濃度の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は 0.5 mg/mL，B[a]P は 2.0 mg/mL の供試液を調製した。

3）細胞の処理

4×10^3 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に加え，3日間培養後，下記の方法で処理した。培養には1用量当たり4枚のシャーレを用い，そのうち2枚は染色体標本作製用に，残りの2枚は細胞増殖率

測定用に使用した。但し，陽性対照群については細胞増殖率の測定は行わず，用いるシャーレは染色体標本作製用の2枚とした。

S9 mix 非存在下の場合は，各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き，アセトン，被験物質および MNNG の各供試液のそれぞれ 0.015 mL を各シャーレに添加して培養した。また，S9 mix 存在下の場合は，各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除いた後，S9 mix 0.5 mL を加え，続いてアセトン，被験物質および B[*a*]P の各供試液ののそれぞれ 0.015 mL を各シャーレに添加して培養した。S9 mix 非存在および存在下のいずれの場合も，培養6時間後に培養液を取り除き，新しい培養液 5 mL を加え，さらに18時間培養した。

連続処理法の場合は，アセトン，被験物質および MNNG の各供試液のそれぞれ 0.025 mL を各シャーレに添加し，24時間培養した。

なお，93.75 μg/mL 以上の用量の供試液では培養液中に添加した際，油滴および油膜様の被験物質の析出が認められ，培養終了時まで残存した。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

〔短時間処理法 ： S9 mix 非存在下〕

用量（μg/mL）	使用シャーレ数
0 （陰性対照）[a]	4
93.75	4
187.5	4
375	4
750	4
1500	4
3000	4
2.5（陽性対照）[b]	2

a ： アセトン，b ： MNNG，使用シャーレ総数 ： 30

〔短時間処理法 : S9 mix 存在下〕

用量（μg/mL）	使用シャーレ数
0 （陰性対照）[a]	4
375	4
750	4
1500	4
3000	4
10 （陽性対照）[b]	2

a : アセトン, b : B[a]P, 使用シャーレ総数 : 22

〔連続処理法 : 24 時間処理〕

用量（μg/mL）	使用シャーレ数
0 （陰性対照）[a]	4
6.25	4
12.5	4
25	4
37.5	4
50	4
100	4
10 （陽性対照）[b]	2

a : アセトン, b : B[a]P, 使用シャーレ総数 : 30

5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

標本作製の2時間前に，培養中の各シャーレにコルセミド（Gibco Laboratories, ロット番号 1010169）を最終濃度として 0.2 μg/mL となるように添加した。培養終了後，培養液を取り除き，0.2%トリプシン水溶液 2 mL で処理して細胞をシャーレから剥離し，新鮮培養液 5 mL を入れた遠沈管に移し，1000 rpm, 5分間遠心分離した。上清を捨て，細胞沈渣に低張液の 75 mM 塩化カリウム水溶液 4 mL を加えて懸濁し，37℃で15分間低張処理した。低張処理後，用時調製した冷却メタノール・酢酸（3:1）混合液（v/v）1 mL を添加して固定した。1000 rpm で5分間遠心分離し，上清を捨て，細胞沈渣を新しい固定液 4 mL で懸濁・固定した。この操作を3回繰り返した後，少量の固定液で適切な密度に細胞を懸濁し，スライドグラスの2か所に1滴ずつ滴下し，室温で一晩自然乾燥した。乾燥後，Sφrensen 緩衝液（pH 6.8, 株式会社ヤトロン，ロット番号 1478）を用いて希釈した 1.4 vol%ギムザ液で約15分間染色した。水洗後，室温で乾燥して染色体標本とした。標

本は，1シャーレ当たり3枚作製した。

細胞増殖率の測定は，培養終了後，培養液を取り除き，生理食塩液で細胞表面を2回洗浄し，10%ホルマリン水溶液を加えて約10分間固定した。固定後水洗し，0.1 w/v%クリスタルバイオレット水溶液で約10分間染色し，水洗後乾燥した。単層培養細胞密度計（モノセレーターⅡ，オリンパス光学工業株式会社）を用いて陰性（溶媒）対照群の細胞増殖率を100%とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

6) 染色体の観察

染色体は，60倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率 600倍で検鏡した。観察は標本をすべてコード化し，盲検法で行った。各用量とも染色体が明瞭に識別でき，染色体の数が25±2 本の分裂中期像について，1シャーレ当たり 100個，すなわち，1 用量当たり2枚のシャーレの合計 200個について観察した。

7) 染色体異常の分類および集計[3)]

染色体異常の分類は，構造異常については，染色分体型の切断と交換，染色体型の切断と交換（二動原体，環状染色体など）およびその他（断片化など）とした。数的異常については，倍数性細胞（倍数体）のみを記録した。

ギャップ（染色分体型および染色体型）については，異常として記録したが，構造異常には含めなかった。ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については，上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し，異常の種類別の集計を行った。構造異常の総数は，観察した細胞 200個中に認められた異常細胞数を表示した。

8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり，構造異常および倍数性細胞の出現頻度は，多試料 χ^2 検定を行って有意差（有意水準5%以下）が認められた場合は，Fisher の直接確率法を用いて陰性対照群と各用量群との間の有意差検定（有意水準は多重性を考慮して，5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果，陰性対照群と比較して，被験物質群における染色体異常細胞の出現頻度が2用量以上で有意に増加し，かつ用量依存性あるいは再現性が認められた場合，陽性と判定した。

結　果

1．染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表1に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は，陰性対照群では 1.5%の低値であった。また，被験物質群でも 0～1.0%の範囲の低い出現頻度であった。陽性対照群の MNNG による染色体構造細胞の出現頻度は，98.0%であり，顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数体は，陰性対照および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では 0～0.5%の範囲の低い出現頻度で認められた。

2．染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表2に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は，陰性対照群では 1.0%であり，また，被験物質群でも 0～0.5%の範囲の低値を示した。陽性対照群の B[*a*]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 46.5%であり，顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については，陰性対照および陽性対照群では認められなかった。また，被験物質群においても 750 μg/mLで 0.5%の低い出現頻度で認められたのみであった。

3．染色体異常試験（連続処理法：24時間処理）

結果は表3に示した。短時間処理法において染色体異常細胞の明らかな増加が認められなかったため，連続処理法24時間処理を行った。その結果，染色体の構造異常を有する細胞は，陰性対照群では認められなかった。被験物質群では 0～1.0%の範囲の低い出現頻度で認められ，陰性対照群との間に統計学的有意差はなかった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 97.5%であり，顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体の出現頻度は，陰性対照群では 1.0%の低値であり，被験物質群においても 0～1.0%の範囲の低値を示した。陰性対照群では倍数体は認められなかった。

結論および参考事項

1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサンおよびその類縁化合物の変異原性に関する報告は見当たらない。

そこで，今回 1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサンの染色体異常誘発性の有無を調べるため，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 *in vitro* における染色体異常試験を実施した。その結果，短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下並びに連続処理法24時間処理のいずれの方法においても染色体異常誘発作用は認められなかった。

したがって，本実験条件下では，1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサンの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した。本試験結果は，CHL/IU 細胞において染色体異常を有する細胞の出現頻度が 5%未満を陰性とする生物学的判断基準[4]からみても明らかな陰性と判断されるものであった。

なお，試験を通して顕著な細胞周期の遅延が疑われる所見は認められなかったため，連続処理法48時間処理などの確認試験は行わなかった。

参考文献

1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 componuds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, **48**, 337-354.

2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal aberration test on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, **66**, 277-290.

3) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編，“化学物質による染色体異常アトラス” 朝倉書店，東京，1988，pp.16-37.

4) 石館　基 監修，　改定増補 染色体異常試験データ集” エル・アイ・シー，東京，1987，p.19.

表1　　1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサンの染色体異常試験結果（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

被験物質の用量（μg/mL）	染色体構造異常の細胞数（%）							ギャップの出現数（%）	染色体の数的異常の細胞数（%）				細胞増殖率（%）
	観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数		観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数	
陰性対照（アセトン）	100	0	0	0	1	0	1	0	100	0	0	0	
	100	1	0	0	1	0	2	0	100	0	0	0	
0	200	1(0.5)	0(0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	3(1.5)	0(0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	100.0
93.75	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
	100	0	0	0	1	0	1	0	100	0	0	0	
	200	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	70.5
187.5	100	1	0	0	0	0	1	0	100	0	0	0	
	100	1	0	0	0	0	1	0	100	0	0	0	
	200	2(1.0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	50.0
375	100	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
	200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	200	0(0)	0(0)	0(0)	50.5
750	100	0	1	0	0	0	1	1	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
	200	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	200	0(0)	0(0)	0(0)	41.5
1500	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
	100	0	1	0	0	0	1	0	100	1	0	1	
	200	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	200	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	41.0
3000	100	0	1	0	2	0	2	0	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	100	1	0	1	
	200	0(0)	1(0.5)	0(0)	2(1.0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	200	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	46.5
陽性対照（MNNG）	100	32	97	1	0	0	98	3	100	0	0	0	
	100	32	97	0	0	0	98	1	100	0	0	0	
2.5	200	64(32.0)	194(97.0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	196(98.0)**	4(2.0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	--

MNNG：1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.　　**：$p<0.01$.

表2　　1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサンの染色体異常試験結果（短時間処理法：S9 mix 存在下）

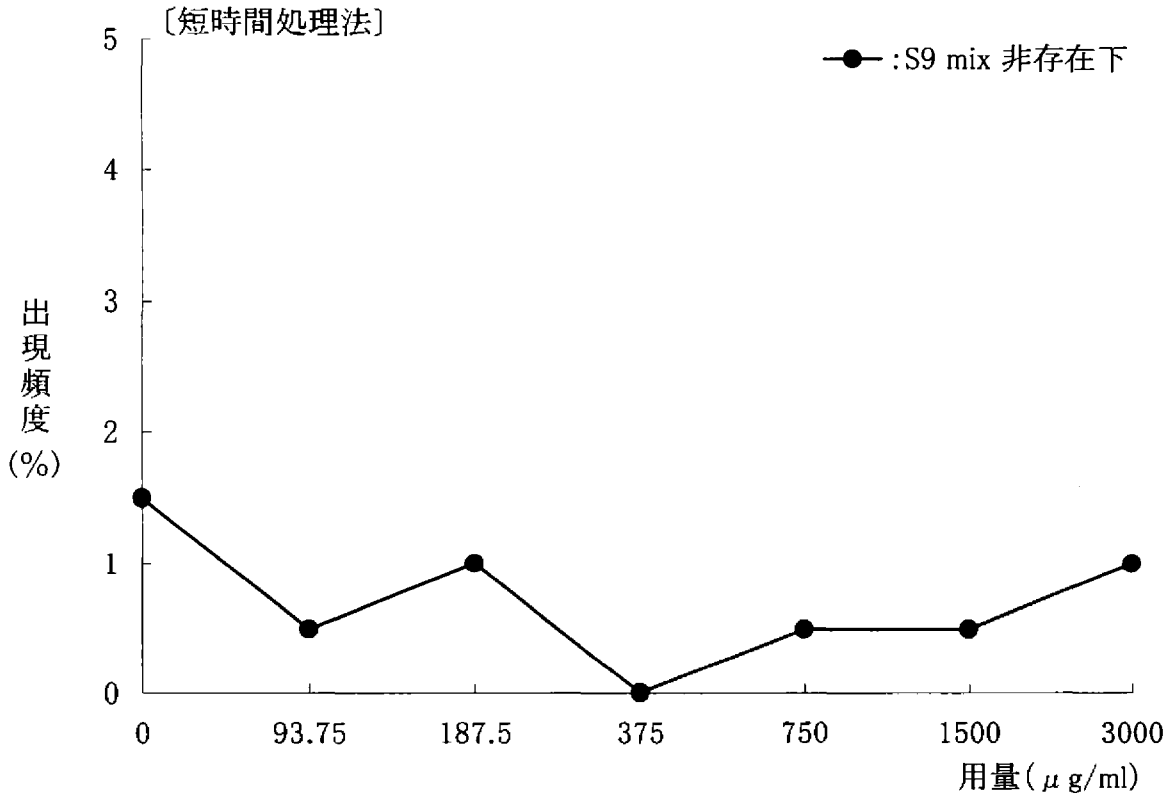
被験物質の用量（μg/mL）	染色体構造異常の細胞数（%）							ギャップの出現数（%）	染色体の数的異常の細胞数（%）				細胞増殖率（%）
	観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数		観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数	
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
(アセトン)	100	0	1	0	1	0	2	0	100	0	0	0	
0	200	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	2(1.0)	0(0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	100.0
375	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
	100	0	0	0	1	0	1	0	100	0	0	0	
	200	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	97.5
750	100	0	0	0	0	0	0	0	100	1	0	1	
	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
	200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	200	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	102.0
1500	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
	200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	98.5
3000	100	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	
	200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	90.0
陽性対照	100	8	47	0	0	0	49	1	100	0	0	0	
(B[*a*]P)	100	4	43	0	0	0	44	0	100	0	0	0	
10	200	12(6.0)	90(45.0)	0(0)	0(0)	0(0)	93(46.5)**	1(0.5)	200	0(0)	0(0)	0(0)	--

B[*a*]P：3,4-Benzo[*a*]pyrene.　　**：$p<0.01$.

表3　　1,1－ビス(*tert*－ブチルペロキシ)－3,3,5－トリメチルシクロヘキサンの染色体異常試験結果（連続処理法：24時間処理）

被験物質の用量（μg/mL）	染色体構造異常の細胞数（%）							ギャップの出現数（%）	染色体の数的異常の細胞数（%）				細胞増殖率（%）
	観察細胞数	染色分体切断	染色分体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常細胞数		観察細胞数	倍数体	その他	総異常細胞数	
陰性対照（アセトン）	100	0	0	0	0	0	0	2	100	1	0	1	
	100	0	0	0	0	0	0	0	100	1	0	1	
0	200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	200	2(1.0)	0(0)	2(1.0)	100.0
6.25	100	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
	200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	200	0(0)	0(0)	0(0)	91.5
12.5	100	0	0	0	0	0	0	0	100	2	0	2	
	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
	200	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	200	2(1.0)	0(0)	2(1.0)	86.5
25	100	1	1	0	0	0	1	1	100	0	0	0	
	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
	200	1(0.5)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	1(0.5)	200	0(0)	0(0)	0(0)	85.0
37.5	100	0	1	0	0	0	1	0	100	0	0	0	
	100	0	1	0	0	0	1	0	100	1	0	1	
	200	0(0)	2(1.0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.0)	0(0)	200	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	70.5
50	100	0	1	0	0	0	1	0	100	0	0	0	
	100	0	0	0	1	0	1	0	100	0	0	0	
	200	0(0)	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	0(0)	2(1.0)	0(0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	52.5
100	100	0	1	0	0	0	1	0	100	1	0	1	
	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	
	200	0(0)	1(0.5)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.5)	0(0)	200	1(0.5)	0(0)	1(0.5)	34.0
陽性対照（MNNG）	100	33	99	2	0	0	99	0	100	0	0	0	
	100	27	95	1	0	0	96	0	100	0	0	0	
2.5	200	60(30.0)	194(97.0)	3(1.5)	0(0)	0(0)	195(97.5)**	0(0)	200	0(0)	0(0)	0(0)	--

MNNG：1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.　　**：$p<0.01$.



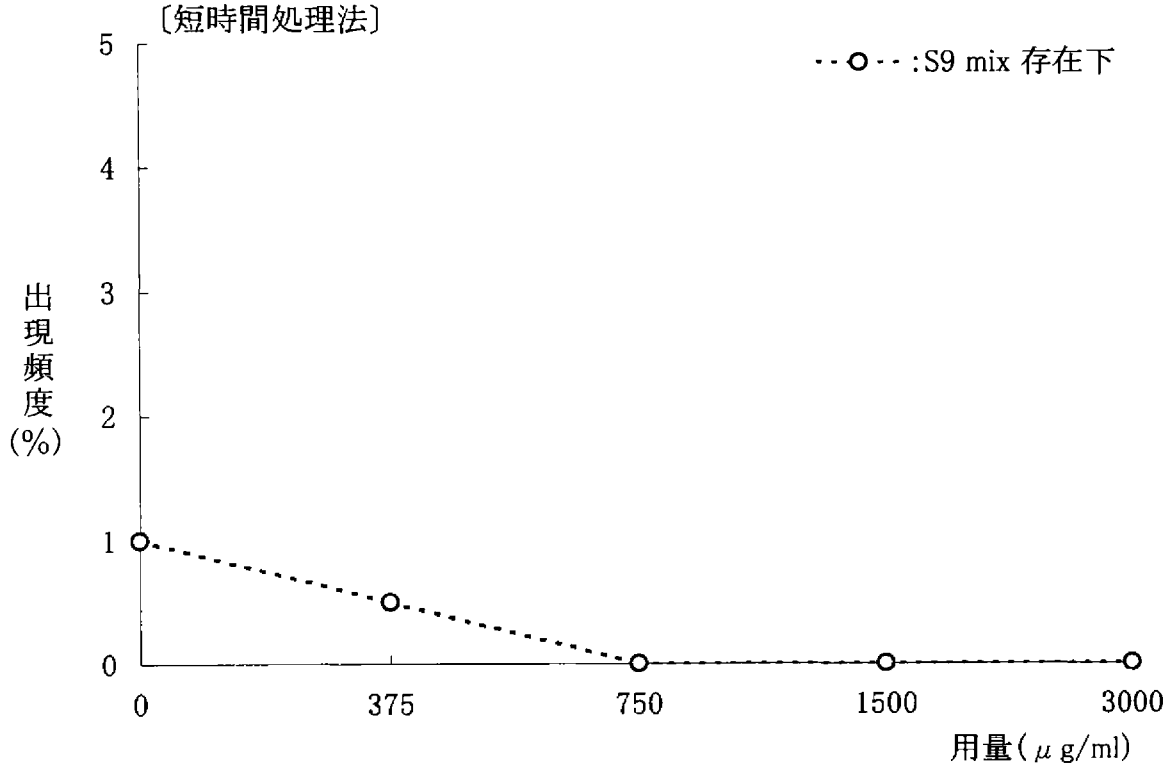


図 1－1　構造異常を有する細胞の出現頻度

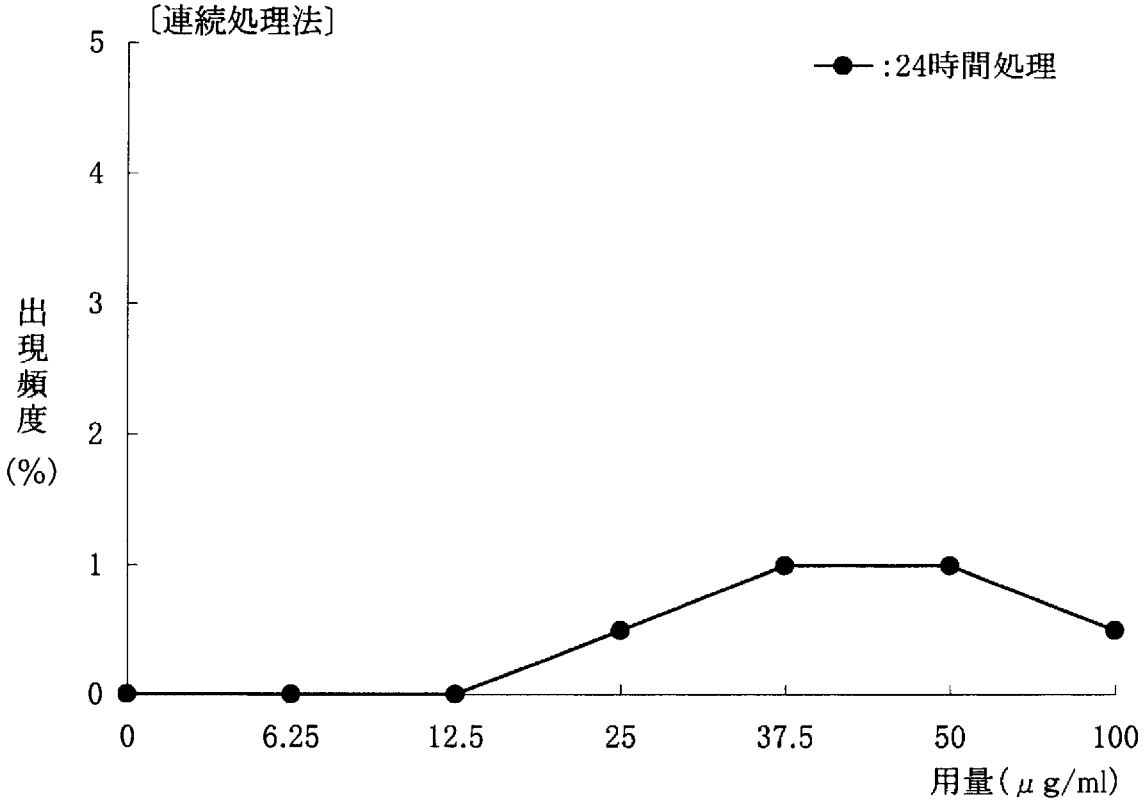
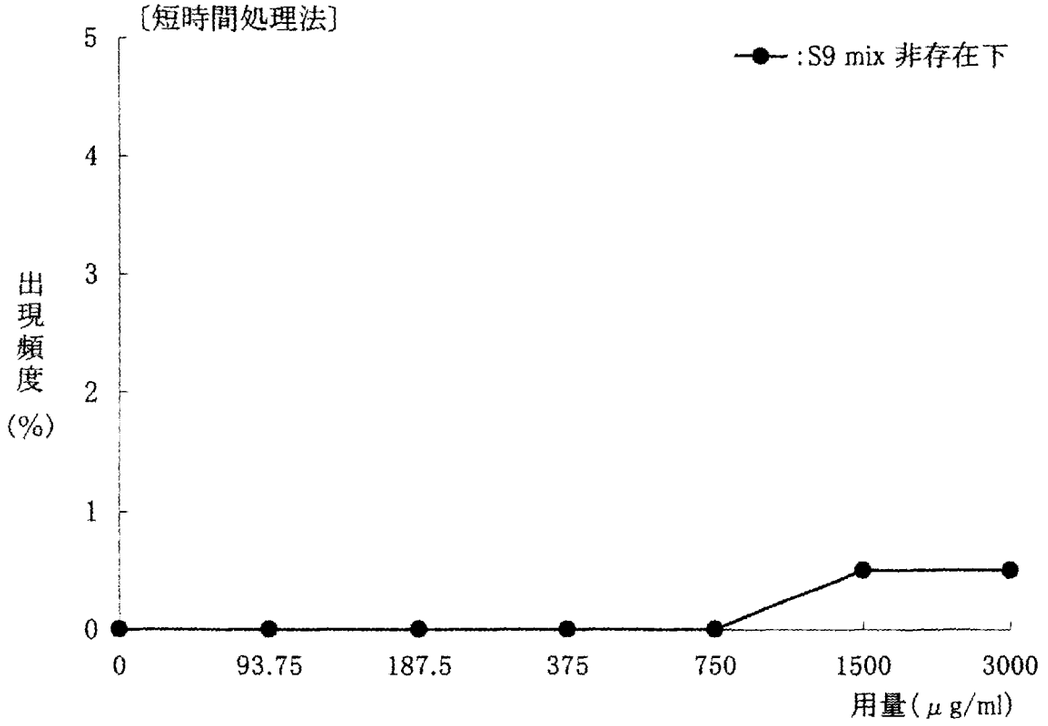


図 1－2　構造異常を有する細胞の出現頻度



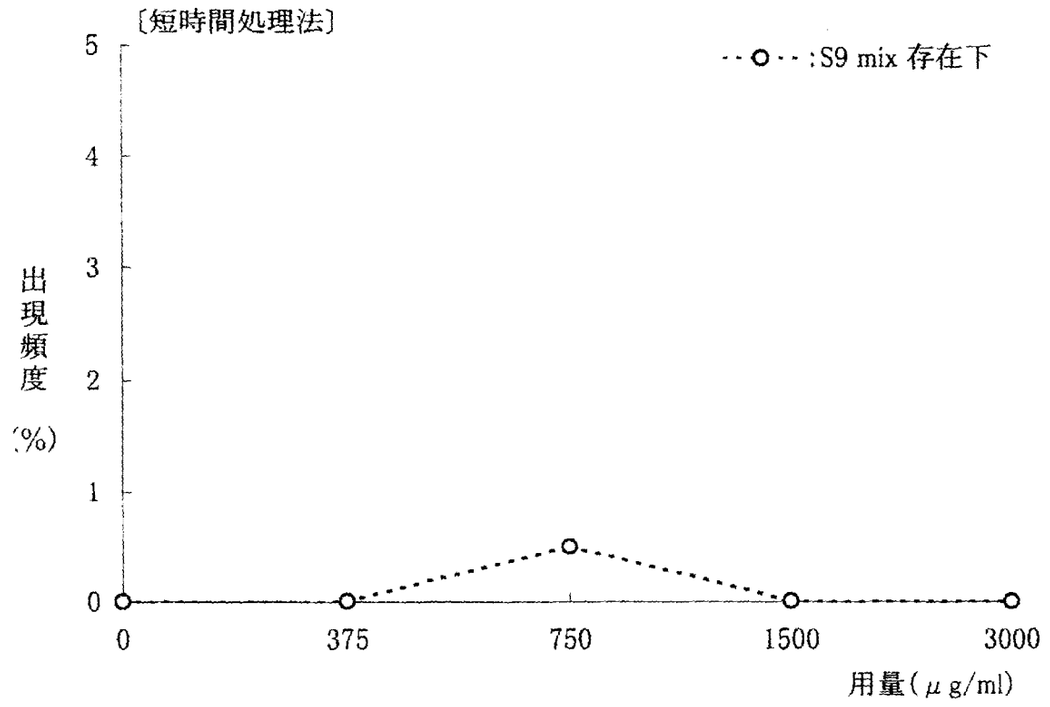


図 2－1　数的異常を有する細胞の出現頻度