



BOZO RESEARCH
CENTER INC.



最 終 報 告 書

プロピレンテトラマーのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1199

2006 年 9 月 29 日

株式会社 **ポリリサーチセンター**

東 京 本 部	〒151-0065	東 京 都 渋谷区 大 山 町 3 6 - 7
本社・東京研究所	〒156-0042	東 京 都 世田谷区 羽 根 木 1 - 3 - 11
御 殿 場 研 究 所	〒412-0039	静 岡 県 御 殿 場 市 か ま ど 1 2 8 4
函 南 研 究 所	〒419-0101	静 岡 県 田 方 郡 函 南 町 桑 原 三 本 松 1308-125

目 次

	頁
目 次	1
要 約	9
緒 言	10
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び溶媒	11
1) 被験物質	11
2) 溶媒	12
2. 被験液の調製	12
1) 調製方法	12
2) 保存方法	13
3) 安定性	13
3. 対照物質	13
1) 非処理対照及び溶媒対照	13
2) 陽性対照	13
4. 使用細胞株	14
1) 供試ほ乳類培養細胞	14
2) 入手先及び入手年月日	14
3) 細胞の選択理由	15
4) 染色体構成	15
5) 増殖様式	15
6) 培養条件	15

	頁
5. S9mix 及び培養液	15
1) S9 mix	15
2) 培養液	16
6. 試験方法	17
1) 識別方法	17
2) 細胞増殖抑制試験	18
3) 染色体異常試験	19
4) 標本の観察	20
5) 染色体異常の分類	20
6) 判定基準	21
試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験	22
1) 短時間処理法	22
2) 連続処理法	22
2. 染色体異常試験	23
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	23
2) 構造異常	23
3) 数的異常	24
考察	25
参考文献	26

Figures and Tables

Fig. 1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [short-term treatment: -S9 mix]

Fig. 1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [continuous treatment: 24 hr]

Fig. 1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [continuous treatment: 48 hr]

Fig. 2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 2-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [short-term treatment: -S9 mix]

Fig. 2-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [continuous treatment: 24 hr]

Fig. 2-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [continuous treatment: 48 hr]

Table 1-1 Cell growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2 Cell growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [short-term treatment: -S9 mix]

Table 1-3 Cell growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [continuous treatment: 24 hr]

Table 1-4 Cell growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [continuous treatment: 48 hr]

Table 2-1 Cell growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [short-term treatment: +S9 mix]

Table 2-2 Cell growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [short-term treatment: -S9 mix]

Table 2-3 Cell growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [continuous treatment: 24 hr]

Table 2-4 Cell growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer [continuous treatment: 48 hr]

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with
1-Propene, tetramer [short-term treatment: +S9 mix]

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with
1-Propene, tetramer [short-term treatment: -S9 mix]

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with
1-Propene, tetramer [continuous treatment: 24 hr]

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with
1-Propene, tetramer [continuous treatment: 48 hr]

要 約

プロピレンテトラマーの染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL/IU）を用いて染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 1700 µg/mL として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の代謝活性化では 1700 µg/mL においても 50%以上の細胞増殖抑制が認められず、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 425 µg/mL 以上の用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は短時間処理の代謝活性化では 1700.0 µg/mL 以上、短時間処理法の非代謝活性化では 315.3 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 336.7 µg/mL、48 時間処理では 219.2 µg/mL と算出された。これより、短時間処理法の代謝活性化では 1700 µg/mL を、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 425 µg/mL を最高用量として、以下公比 2 で希釈した各 4 試験用量を設定し染色体異常誘発能を検討した。

染色体異常試験の結果、短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに構造異常の出現率及び倍数体の増加は認められなかった。また、連続処理法においても、24 時間処理及び 48 時間処理ともに染色体の構造異常の出現率及び倍数体の増加は認められなかった。一方、陽性対照群では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。また、溶媒対照群における倍数体の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、更に試験施設の背景値と同様であった。従って試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、プロピレンテトラマーは、本試験条件下において染色体の構造異常及び倍数体の誘発能は有さないものと判定した。

結 言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、プロピレンテトラマーの安全性試験の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び溶媒

1) 被験物質

被験物質情報 (Attached Data 1) は における非 GLP 下での分析に基づくものである。

供給者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

製造者 :

名称 : プロピレンテトラマー、1-Propene, tetramer

CAS 番号 : 6842-15-5

構造式又は示性式 : $(\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}_2)_4$

純度 :

炭素数	二重結合の数	分子量	含有量(%)
11	2	152	0.9
11	1	154	10.3
12	2	166	2.1
12	1	168	71.2
13	2	180	0.8
13	1	182	12.3
14	2	194	0.1
14	1	196	2.1

*C8-10、15、16 (二重結合数 1、2、3) および C11-14

二重結合数 3 のオレフィンは検出されなかった。

性状 : 揮発性の高い液体

分子量 : 168.324

ロット番号 :

安定性 : 試験終了後、被験物質製造者において安定性を確認し、その結果を入手して安定性を確認した。(Attached Data 2)。

保存方法 : 室温、(保存期間中の実測温度: 15℃~25℃)、密封

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室、変異原室及び第 1 研究棟
被験物質調製室

取り扱い上の

注意 : 揮発性が高く火災・爆発を起こす危険があるため、着火源となるガスバーナーを用いなかった。

返 却 : 関連試験終了後に被験物質の残量はすべて被験物質製造者に返却した。

2) 溶媒

名 称 : アセトン

ロット番号 : DWP7563

規 格 : 試薬特級

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

保 存 方 法 : 室温

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

溶媒の選択理由 : 供試前の溶媒検討の結果、注射用水、DMSO、エタノールに不溶で、アセトンに可溶であったためアセトンを溶媒とし、溶解することとした。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.3400 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 170 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1700 µg/mL）を調製した。次いで、170 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、85.0、42.5、21.3、10.6、5.31、2.66 及び 1.33 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

(2) 染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.3400 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 170 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1700 µg/mL）を調製した。次いで、170 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 5 段階希釈し、85.0、42.5、21.3、10.6 及び 5.31 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を調製した。このうち、代謝活性化では 170 から 21.3 mg/mL の被験液を、非代謝活性化では 42.5 から 5.31 mg/mL の被験液を用いた。連続処理法では、被験物質 0.3400 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 170 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1700 µg/mL）を調製した。次いで、170 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度

の被験液 1 mL : 溶媒 1 mL) で順次 5 段階希釈し、85.0、42.5、21.3、10.6 及び 5.31 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理、48 時間処理ともに 42.5 から 5.31 mg/mL の被験液を用いた。

2) 保存方法

被験液は用時に調製し、保存は行わなかった。

3) 安定性

被験物質にアセトンを添加した際に、発泡、発熱、吸熱及び色調などの変化は認められなかったことから、被験物質は溶媒中で安定であったと判断した。

3. 対照物質

1) 非処理対照及び溶媒対照

溶媒として用いたアセトンを溶媒対照物質とし、更に非処理対照を設けた。

名 称 : アセトン

ロット番号 : DWP7563

規 格 : 試薬特級

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

保 存 方 法 : 室温

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室

2) 陽性対照

- (1) 陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化ではマイトマイシンCを用いた。

名 称 : シクロフォスファミド (以下 CP と略記する)

ロット番号 : SDP4062

製 造 元 : 和光純薬工業株式会社

純 度 : 生化学用 (97.0%以上)

保 存 方 法 : 冷蔵、遮光

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室 発癌性物質冷蔵保存庫

名 称 : マイトマイシン C (以下 MMC と略記する)

ロット番号 : 444ADF、459AEA

製 造 元 : 協和醗酵工業株式会社

力 価 : 2mg (力価) /瓶

保 存 方 法 : 室温、遮光

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室 発癌性物質室温保存庫

(2) 調製方法

CP をプラスチック遠沈管 (50 mL) に 0.0140 g 秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K4L74) を 20.0 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.9 mL に 0.1 mL を加えた時の最終濃度 : 14 µg/mL) を調製した。

MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K4L74、K5G95) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1.00 mg/mL) 。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.25 mL : 生理食塩液 4.75 mL) し、0.0500 及び 0.00250 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.9 mL に 0.00250 mg/mL 溶液を 0.1 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.05 µg/mL) 。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて発癌物質として処分した。

(3) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験法ガイドラインに使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

4. 使用細胞株

1) 供試は乳類培養細胞

細胞は、チャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞 (CHL/IU) を用いた。入手後液体窒素で凍結保存していた細胞を融解後、継代培養して試験に用いた。

2) 入手先及び入手年月日

元株細胞は、2004 年 11 月 2 日にヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。入手後、継代数の少ない細胞をジメチルスルホキシドを 10 vol% 添加した培養液に懸濁し、液体窒素中で保存した。この保存細胞を融解後、継代培養し細胞の性状検査を実施して性状などが適正であることを定期的に確認した後に試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験で 13 継代、染色体異常試験では短時間処理法で 17 継代、連続処理法で 13 継代であった。また、元株細胞はマイコプラズマ陰性であることが入手時の情報で確認されている。

3) 細胞の選択理由

染色体数が少なく比較的大型で染色体異常の観察に適すること、自然発生の染色体異常出現率が低いこと、種々の化学物質に対して感受性が高いこと、バックグラウンドデータが豊富であることなどの理由から本細胞を選択した。

4) 染色体構成

直近の定期性状検査において、細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験・短時間処理法に使用した細胞では85%の、染色体異常試験・連続処理法に使用した細胞では80%の細胞が染色体数25本を示し、モードは25本で適切であった。

5) 増殖様式

直近の定期性状検査においてプレート上で単層状に増殖し、細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験・短時間処理法に使用した細胞では倍加時間は17.0時間を、染色体異常試験・連続処理法に使用した細胞では倍加時間は17.4時間を示した。これらは入手時の特性（単層状に増殖、倍加時間17.2時間）と同様であり適切な増殖様式であった。

6) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂濃度5%、温度37℃の高湿度条件下で培養し、1～4日ごとに継代培養した。

5. S9 mix 及び培養液

1) S9 mix

S9 mix は、オリエンタル酵母工業株式会社より S9/コファクターC セット（ロット番号 C050805051）を購入し、用時に調製を行った。なお、製品分析書に記載された S9 及びコファクターC についての詳細情報及び保存条件を以下に記載した。

(1) S9

名 称	: S9
ロット番号	: 05080505
製 造 日	: 2005 年 8 月 5 日
種 ・ 系 統	: ラット・SD 系
性	: 雄
週 齢	: 7 週齢
誘 導 物 質	: フェノバルビタール (PB) 及び 5, 6-ベンゾフラボン (BF)
投 与 法	: 腹腔内投与

投与期間及び投与量

: PB 4日間 30+60+60+60 mg/kg body weight
 BF 1日 80 mg/kg body weight
 保存方法 : 冷凍 (超低温フリーザー)
 使用期限 : 2006年2月4日 (製造後6箇月)
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(2) 補酵素

名 称 : コファクターC
 ロット番号 : C05080303
 製造日 : 2005年8月3日
 保存方法 : 冷凍 (超低温フリーザー)
 使用期限 : 2006年2月2日 (製造後6箇月)
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(3) S9 mix の組成

S9	2 mL		
補酵素	4.7 mL	20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40mmol/L 酸化型ニコチンアミド・アデニン	
		ジヌクレオチドリリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
		精製水	0.67 mL

2) 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No.11095-080) に、Invitrogen Corporation より購入し非働化 (56℃, 30 分) した牛血清 : BS (仔牛血清 : CS) を 10 vol% 添加して調製した培養液 : BS-MEM (CS-MEM) を用いた。調製後の BS-MEM (CS-MEM) は冷蔵保存した。

(1) 牛血清 : BS (仔牛血清 : CS)

名 称 : Bovine serum (Calf serum)

ロット番号： 511116、(364570)

製造元： Invitrogen Corporation

保存方法： 冷凍（－80℃）

保存場所： 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号： 1270498、1313340

製造元： Invitrogen Corporation

保存方法： 冷蔵

保存場所： 御殿場研究所 変異原室 冷蔵庫

6. 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理

1) 識別方法

(1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「-」とし、連続処理法では24 時間処理を「24-」、48 時間処理を「48-」とした。更にこれに続けて溶媒対照群(Solvent Control)を「SC」、非処理対照群(Non Treatment Control)を「NC」、被験物質処理群を濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルを使用機材等に貼付して識別した。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。ただし、陽性対照群(Positive Control)は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」～「99」までの2桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルを使用機材等に貼付して識別した。

2) 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の処理濃度を設定するための予備試験として実施した。いずれの処理法においても最高用量を 1700 µg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 850、425、213、106、53.1、26.6 及び 13.3 µg/mL の計 8 用量を設定し、これに溶媒対照と非処理対照を設けた。また、短時間処理法では代謝活性化と非代謝活性化で試験を実施した。

(1) 短時間処理法

シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を 2 枚とし、シャーレ 1 枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種し 3 日間培養した後、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では、溶媒対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及びアセトン 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非処理対照群では培養液 0.833 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL を加えた。非代謝活性化では、溶媒対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、アセトン 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非処理対照群については処理を行わなかった。各群ともに添加後 6 時間培養し、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて更に 18 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を洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。単層培養細胞密度計（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞の染色の濃淡から細胞密度を測定し、溶媒対照群の値を 100%として 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

(2) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し 3 日間培養した後、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、非処理対照群以外については培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒対照群についてはアセトン 0.050 mL を、被験物質処理群については、各濃度の被験液 0.050 mL を加え、非処理対照群では処理を行わず、24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。培養終了後、短時間処理法と同様に培養液の色、細胞の状態及び析出の有無を観察した後に、洗浄、固定、染色、細胞密度測定を行い、50%細胞増殖抑制

濃度（概略値）を求めた。

3) 染色体異常試験

(1) 用量設定の根拠

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 50%以上の細胞増殖抑制が認められなかった。50%細胞増殖抑制濃度は、短時間処理法の非代謝活性化では 315.3 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 336.7 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 219.2 $\mu\text{g/mL}$ と算出され、50%以上の細胞増殖抑制が認められた用量はいずれも 425 $\mu\text{g/mL}$ であった。そこで、短時間処理法の代謝活性化では 1700 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公比 2 で希釈した 850、425 及び 213 $\mu\text{g/mL}$ の計 4 用量を、短時間処理法の非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 425 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公比 2 で希釈した 213、106 及び 53.1 $\mu\text{g/mL}$ の計 4 用量を設定した。また、いずれの場合もこれに溶媒対照群、非処理対照群及び陽性対照群を設けた。

(2) 短時間処理法

シャーレは、線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を 4 枚とし、シャーレ 1 枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種し 3 日間培養した後、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では、溶媒対照群については培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及びアセトン 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非処理対照群については培養液 0.833 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び CP 0.1 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では、溶媒対照群については培養液 0.050 mL を取り除き、アセトン 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非処理対照群については処理を行わなかった。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き、MMC 0.100 mL（最終濃度：0.05 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後 6 時間培養し、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。なお、染色体観察用標本作製に際しては、細胞分裂を分裂中期で停止させるため標本作製約 2 時間前にコルセミド 0.1 mL（最終濃度：0.2 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。培養終了後、各群 2 枚のシャーレについて 0.25%トリブシン溶液で単離した細胞を遠心分離し、0.075M 塩化カリウム溶液で低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。

スライドガラス 1 枚につき 2 箇所固定した細胞を滴下し、空気乾燥後 2% ギムザ液で染色標本作製した。染色体観察用標本は、1 枚のシャーレから 2 枚作製した。各処理群で残る 2 枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じ洗浄、固定、染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、細胞増殖抑制試験と同様の方法で、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

(3) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し 3 日間培養した後、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、溶媒対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、アセトン 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非処理対照群については処理を行わなかった。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き、MMC 0.100 mL (最終濃度: 0.05 µg/mL) を加えた。各群ともに添加後 24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。なお、染色体観察用標本は各群 2 枚のシャーレについて短時間処理法と同様に作製した。各処理群で残る 2 枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じて洗浄、固定、染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、培養終了時に、細胞増殖抑制試験と同様の方法で、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

4) 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に染色体数 46～54 本を持つ細胞を倍数体とし、その出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とした。

5) 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数異常に大別し、更に以下のように定義・分類した。

(1) 構造異常

染色体構造が、その細胞が本来持っている固有の構造(核型)と異なる場合を構造異常と定義した。

ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体又は染色分体の同軸上に断片がある(非染色部分が染色分体の同軸上にある)ものであって、その長さが染色分体

の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるものと定義した。

染色分体型切断(ctb)：切断とは断片が染色分体の同軸上からはずれているもの及び非染色部位が染色分体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものと定義した。

染色分体型交換(cte)：四放射状交換など。

染色体型切断(csb)：断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものを染色体型切断と定義した。

染色体型交換(cse)：二動原体染色体、環状染色体など。

その他(other)：断片化 (frg) 他。

(2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数（二倍体）と異なり倍化した場合を数的異常と定義した。

倍数体：polyploidy（核内倍加体：endoreduplication を含む）

6) 判定基準

石館らの判定基準^{1,2,3)}に従い、各試験群の異常細胞の出現率に対して以下のような判定基準を設けた。

異常細胞の出現率	判定基準
5% 未満	陰 性 (－)
5% 以上 10% 未満	疑陽性 (±)
10% 以上	陽 性 (+)

染色体構造異常を有する細胞の出現率はギャップを含む場合(TAG)と含まない場合(TA)について集計し、ギャップを含まない場合について判定を行った。異常細胞の出現に用量依存性又は再現性が認められた場合を染色体異常誘発能陽性と判定した^{2,3,4)}。

なお、判定に際しては統計学的手法を用いなかった。

試験結果

1. 細胞増殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化では最高用量の 1700 µg/mL においても 50%以上の細胞増殖抑制が認められず、50%細胞増殖抑制濃度は 1700.0 µg/mL 以上であった。また非代謝活性化では 425 µg/mL 以上の用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 315.3 µg/mL であった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、溶媒対照群と比較すると、代謝活性化では最高用量の 1700 µg/mL においても細胞の不連続性は認められなかった。一方、非代謝活性化では 106 µg/mL 以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに変化は認められなかった。肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに変化は認められなかった。

2) 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 1-3 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4 及び Table 1-4 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 425 µg/mL 以上の濃度で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度はそれぞれ 336.7 µg/mL 及び 219.2 µg/mL であった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、溶媒対照群と比較すると、24 時間処理では 106 µg/mL 以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。一方、48 時間処理では 213 µg/mL 以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに変化は認められなかった。肉眼による被験物質の析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに変化は認められ

なかった。

2. 染色体異常試験

短時間処理法の結果を Fig. 2-1、2-2、Table 2-1、2-2、3-1、3-2 に、連続処理法の結果を Fig. 2-3、2-4、Table 2-3、2-4、3-3、3-4 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態は、細胞増殖抑制試験の場合とほぼ同様であった。すなわち、被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、溶媒対照群と比較すると、短時間処理法の代謝活性化においては最高用量の 1700 $\mu\text{g/mL}$ においても細胞の不連続性は認められなかった。短時間処理法の非代謝活性化においては 106 $\mu\text{g/mL}$ 及び 213 $\mu\text{g/mL}$ では微少に、425 $\mu\text{g/mL}$ では半数に細胞の不連続性が認められた。連続処理法の 24 時間処理においては、53.1 $\mu\text{g/mL}$ 、106 及び 231 $\mu\text{g/mL}$ では微少に、425 $\mu\text{g/mL}$ では多数に細胞の不連続性が認められた。連続処理法の 48 時間処理においては、106 及び 213 $\mu\text{g/mL}$ では微少に、425 $\mu\text{g/mL}$ では多数に細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、短時間処理法及び連続処理法ともに色調変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質の析出の観察では、短時間処理法及び連続処理法ともに析出は認められなかった。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では 1700 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、850 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、425 $\mu\text{g/mL}$ で 0% 及び 213 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。また、非代謝活性化においても、425 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、213 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、106 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0% 及び 53.1 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。更に、連続処理法の 24 時間処理では 425 $\mu\text{g/mL}$ で 2.5%、213 $\mu\text{g/mL}$ で 4.0%、106 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5% 及び 53.1 $\mu\text{g/mL}$ で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。また、48 時間処理では、425 $\mu\text{g/mL}$ で 3.5%、213 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、106 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% 及び 53.1 $\mu\text{g/mL}$ で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。

各処理法ともに溶媒対照群における染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、非処理対照群に比べ著しい増加はなかったことから、溶媒は染色体構造異常の誘発に影響を及ぼさなかったと考えられた。また非処理対照群、溶媒対照群及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は、試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

3) 数的異常

倍数体の出現率は、短時間処理法の代謝活性化では1700 µg/mLで0%、850 µg/mLで0%、425 µg/mLで0%及び213 µg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満であった。また、非代謝活性化においては、425 µg/mLで0%、213 µg/mLで1.5%、106 µg/mLで0%及び53.1 µg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満であった。更に、連続処理法の24時間処理では425 µg/mLで1.5%、213 µg/mLで1.0%、106 µg/mLで0.5%及び53.1 µg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満であった。また、48時間処理では、425 µg/mLで1.5%、213 µg/mLで1.5%、106 µg/mLで0.5%及び53.1 µg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満であった。

各処理法ともに溶媒対照群における倍数体の出現率は陰性の判定基準内にあり、非処理対照群に比べ著しい増加はなかったことから、溶媒は倍数体の誘発に影響を及ぼさなかったと考えられた。また非処理対照群、溶媒対照群及び陽性対照群における倍数体の出現率は、試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

考 察

被験物質は、染色体異常試験において、短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに染色体の構造異常を有する細胞の出現率は増加せず、倍数性細胞の出現率の増加も認められなかった。また、連続処理法でも、24 時間連続処理及び 48 時間連続処理ともに染色体の構造異常を有する細胞の出現率は増加せず、倍数性細胞の出現率の増加も認められなかった。

プロピレンテトラマーの類縁体である propene (CAS Registry No.115-07-1) は IARC classification ではグループ 3 に分類されており⁶⁾、National Toxicology Program の報告によればマウス及びラットに吸入させた場合、発癌性は認められていない⁷⁾。また、Salmonella と E. coli を用いた復帰突然変異試験⁸⁾では、いずれも陰性と報告されている。同様に、プロピレンテトラマーの類縁体である 2-propenoic acid, butyl ester (CAS Registry No.141-32-2) は IARC classification ではグループ 3 に分類されており⁹⁾、ラットに吸入させた場合、発癌性は認められていない⁷⁾。また、Salmonella を用いた復帰突然変異試験及びハムスターとラットを用いた in vivo 染色体異常試験では陰性と報告されている¹⁰⁾。一方、2-propenoic acid, methyl ester (CAS Registry No.96-33-3) は IARC のグループ 3 に分類されており¹¹⁾、ラットに吸入させた場合、発癌性は認められていない⁷⁾。また、Salmonella を用いた復帰突然変異試験では陰性と報告¹²⁾されているが、チャイニーズ・ハムスターの培養細胞を用いた染色体異常試験¹²⁾とマウスリンフォーマ TK 試験¹³⁾では陽性と報告されている。

なお、溶媒対照群及び非処理対照群における染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、いずれの処理法においても 5%未満であった。また、陽性対照物質の CP あるいは MMC を処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。更に、2 枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、プロピレンテトラマーは、本試験条件下において染色体の構造異常及び倍数体の誘発能は有さないものと判定した。

参考文献

- 1) 石館基監修 (1987): <改訂>染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー、東京
- 2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, **48**, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, **66**, 277-290
- 4) 石館 基 (1982): 哺乳動物細胞を用いる検索と問題点 (Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment · Mammalian Cell Systems), *日本香粧品科学会誌*, **6**, 31-43
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271
- 6) IARC (1987): Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Geneva, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Suppl. 7, 71
- 7) Abram FSH, Anderson D, Deschamps J, Firth JG, Shkolenok G, Jenkins PG, Kello, D, Tcheknavorian-Asenbauer A, Wilkinson M, Edited by Richardson ML and Gangolli S (1998): The Dictionary of Substances and their Effects, The Royal Society of Chemistry, UK, **6**, 835-837
- 8) Ashby J, Tennant yR. *Mutation Res.* (1988) Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the USNCI/NTP, **204**, 17-115
- 9) IARC (1987): Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Geneva, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Suppl. 7, 59
- 10) IARC (1986): Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Geneva, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, **39**, 67-79
- 11) IARC (1987): Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals

- to Man, Geneva, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Suppl. 7, 66
- 12) IARC (1986): Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Geneva, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 39, 99-112
 - 13) Moore MM, Amtower A, Doerr CL, Brock KH, Dearfield KL (1988) Environ Mol. Mutagen. 11, 49-63

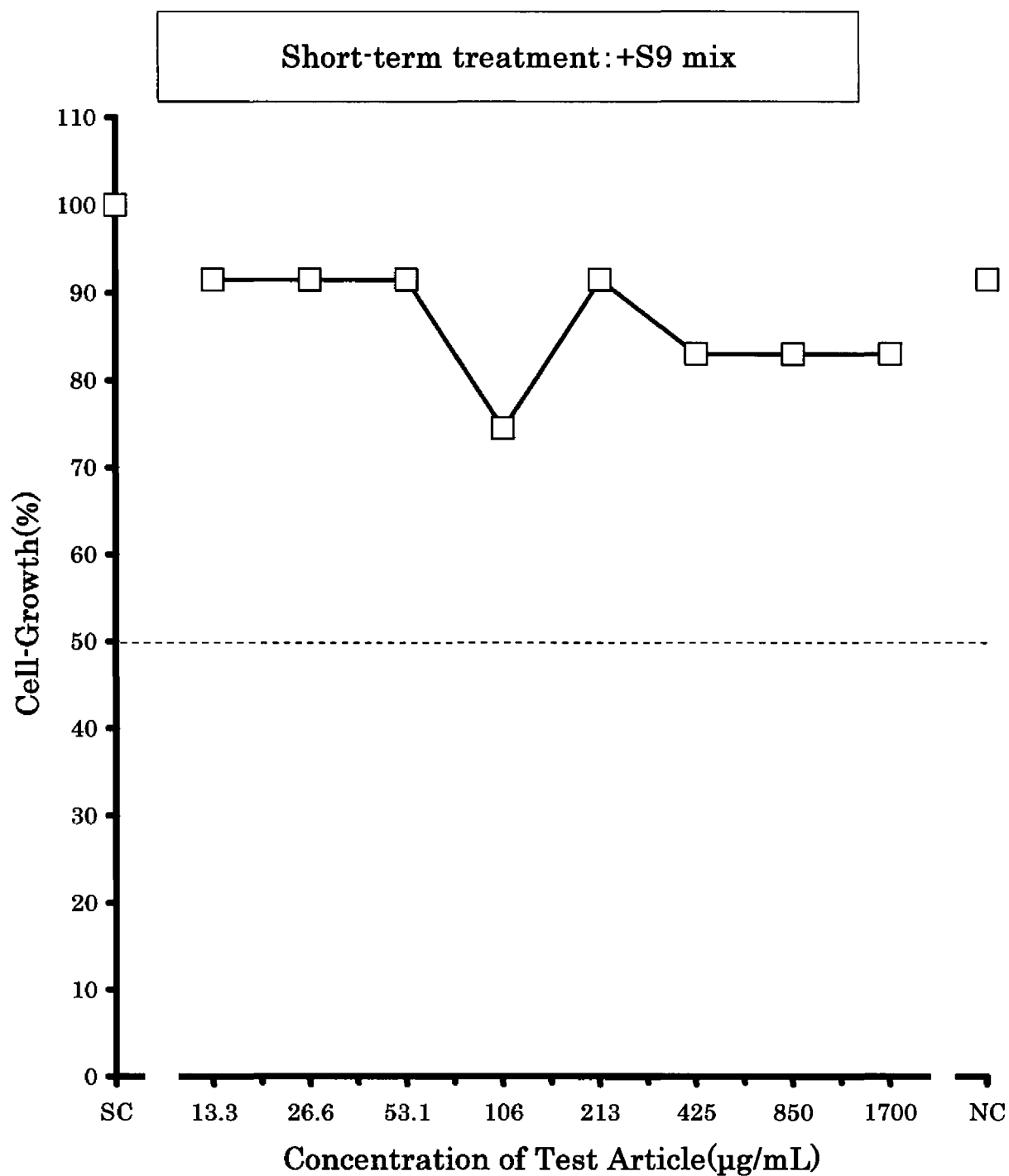


Fig.1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer

SC: Solvent control

NC: Non treatment control

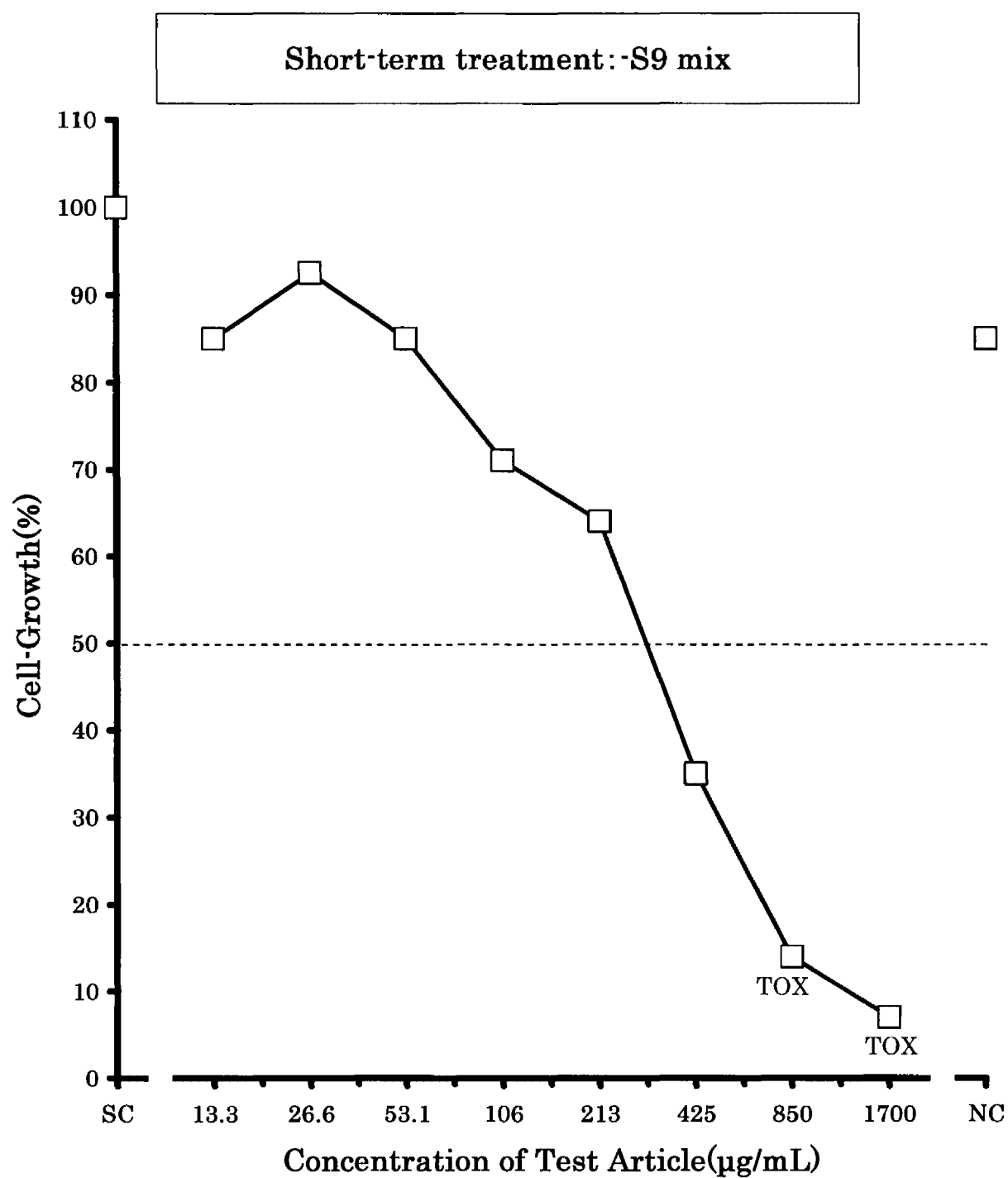


Fig.1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene,tetramer

SC: Solvent control

NC: Non treatment control

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

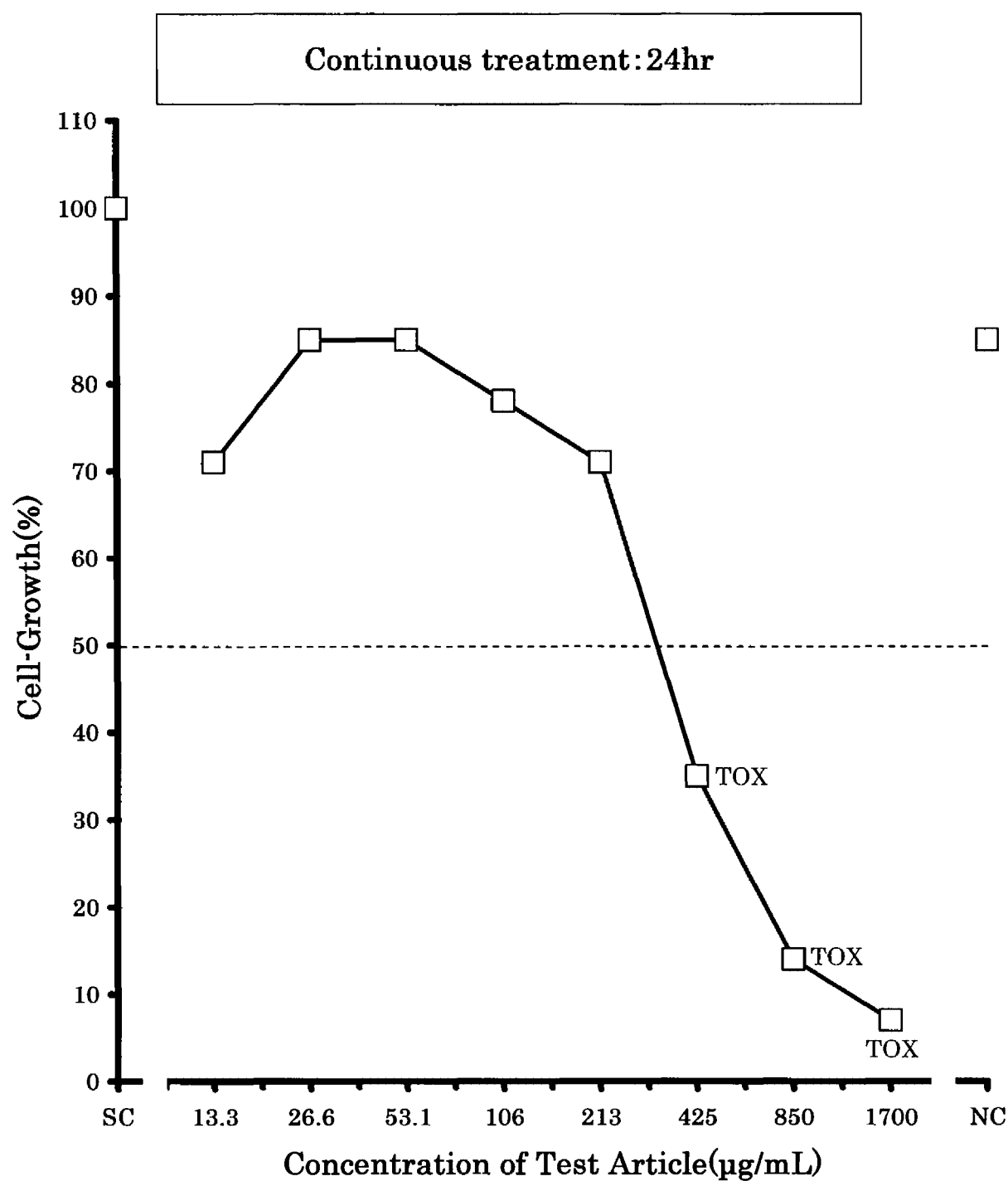


Fig.1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene,tetramer

SC: Solvent control

NC: Non treatment control

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

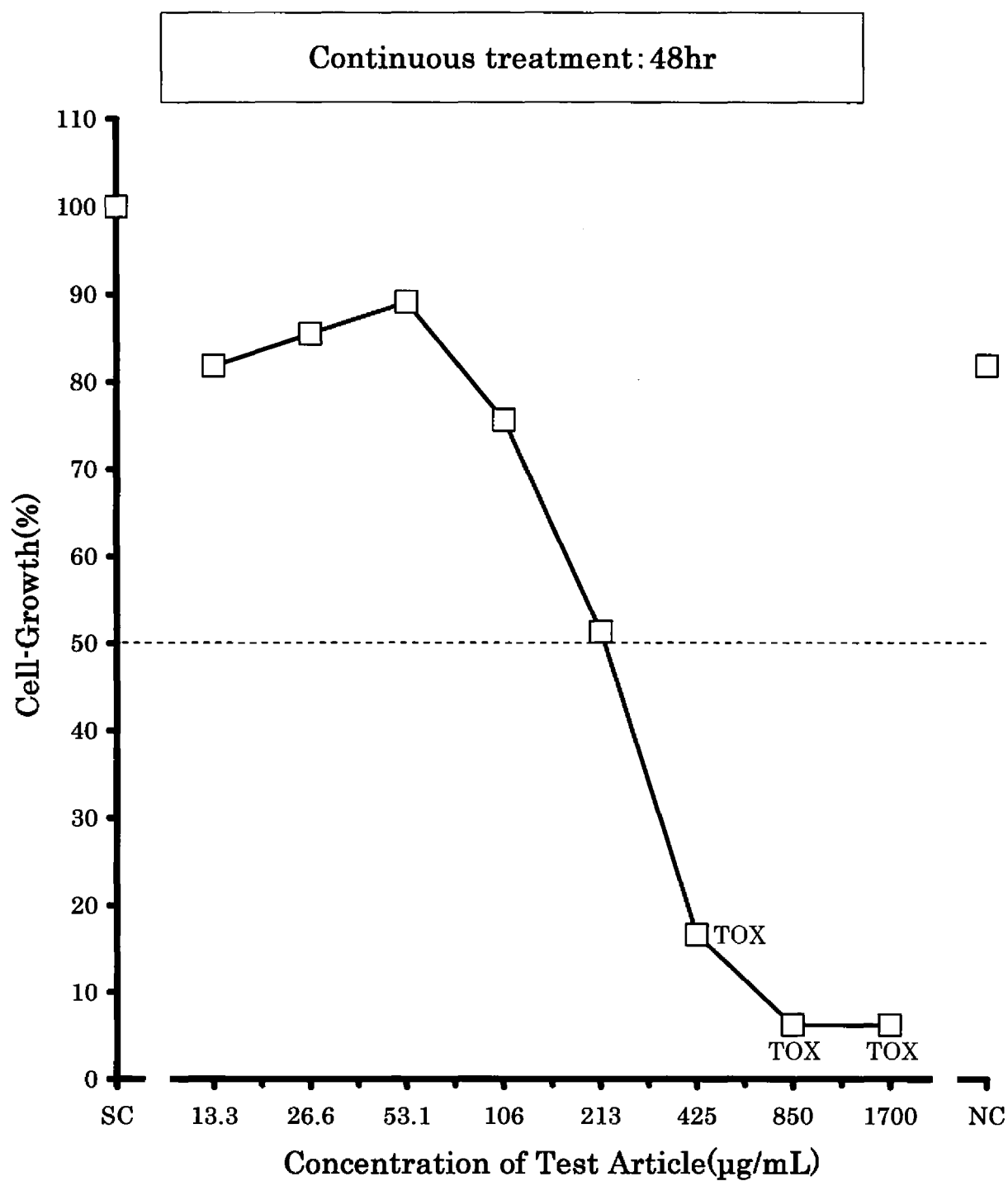


Fig.1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene,tetramer

SC: Solvent control

NC: Non treatment control

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

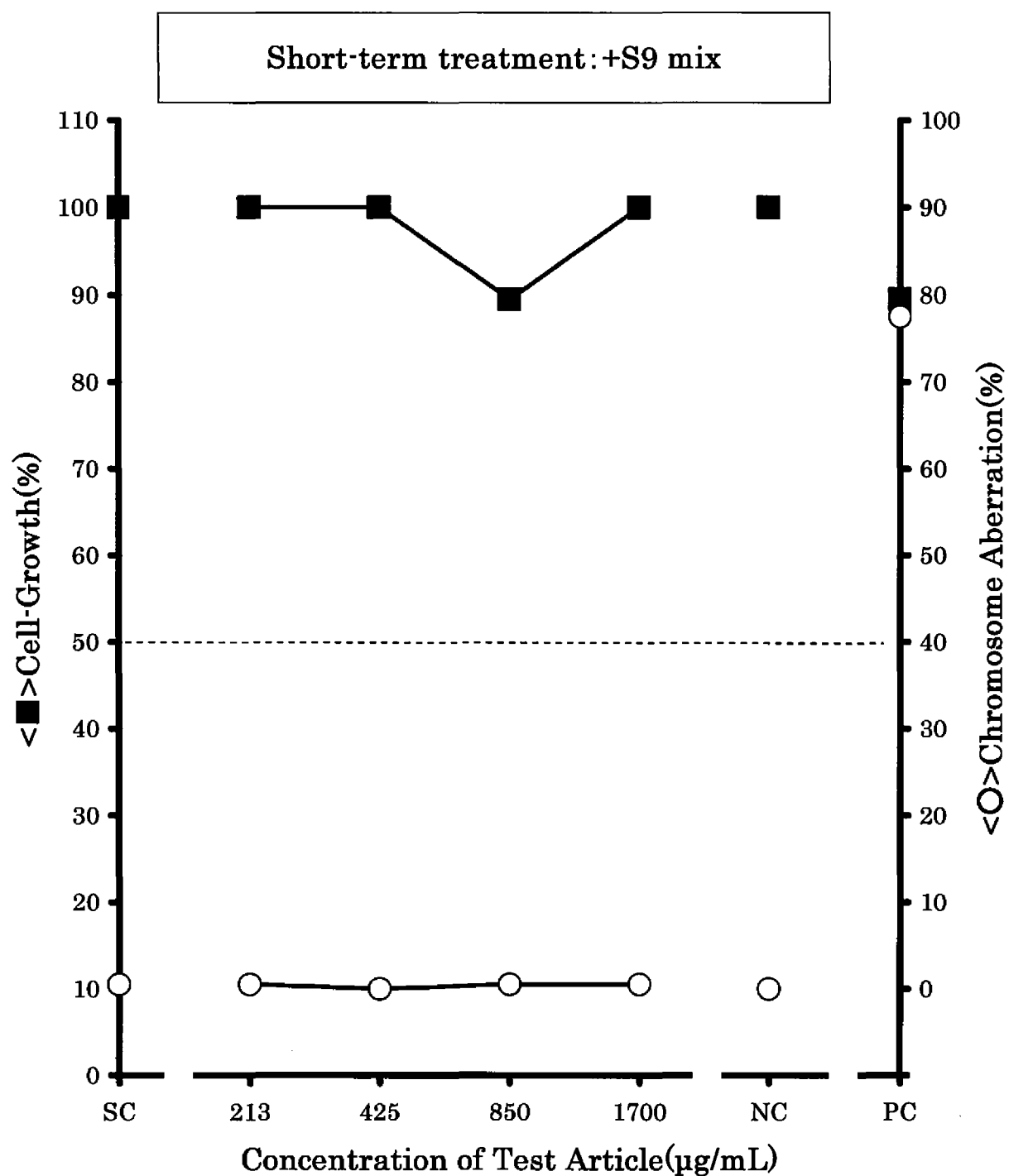


Fig.2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer

SC: Solvent control

NC: Non treatment control

PC: Positive control

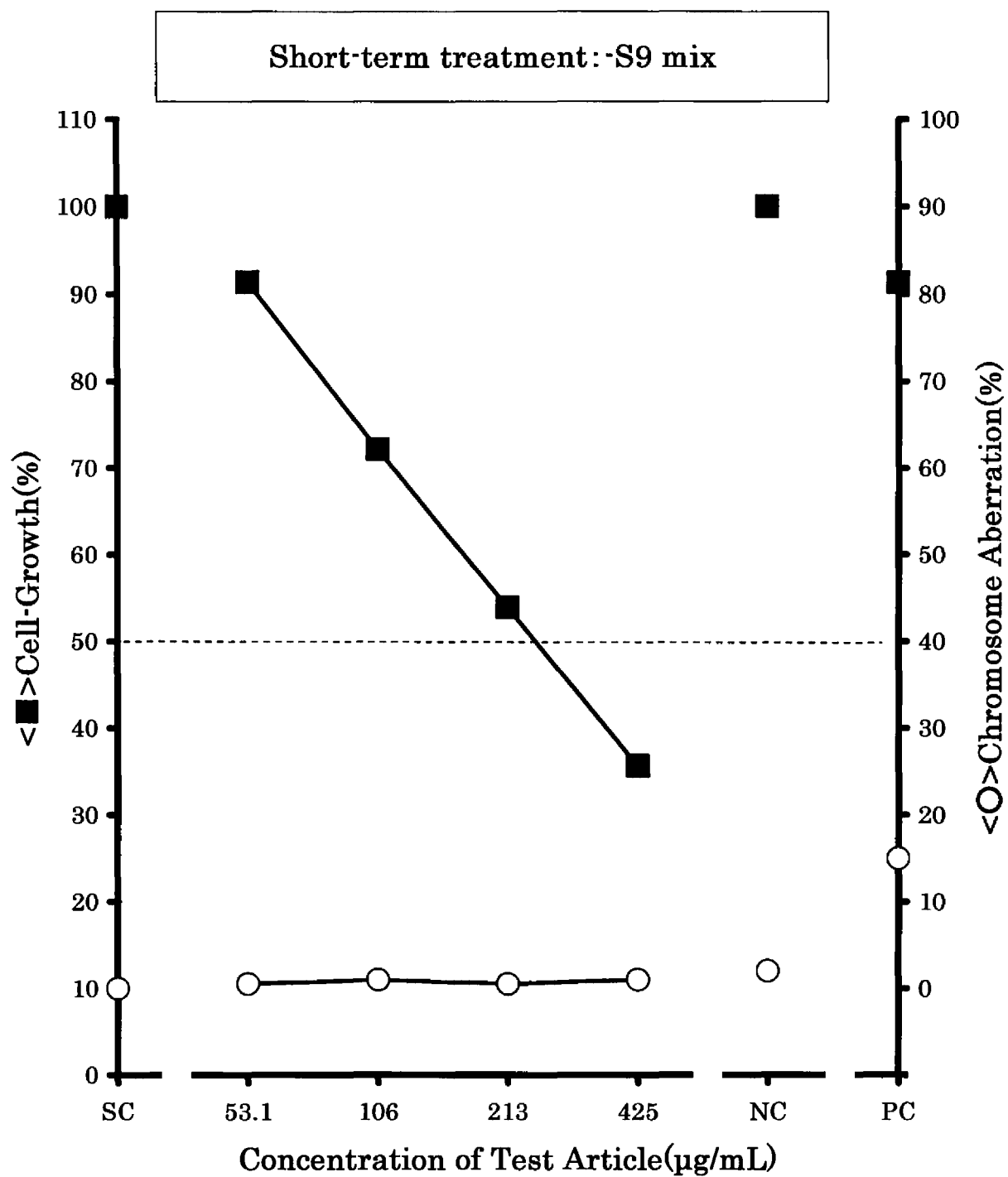


Fig.2-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer

SC: Solvent control

NC: Non treatment control

PC: Positive control

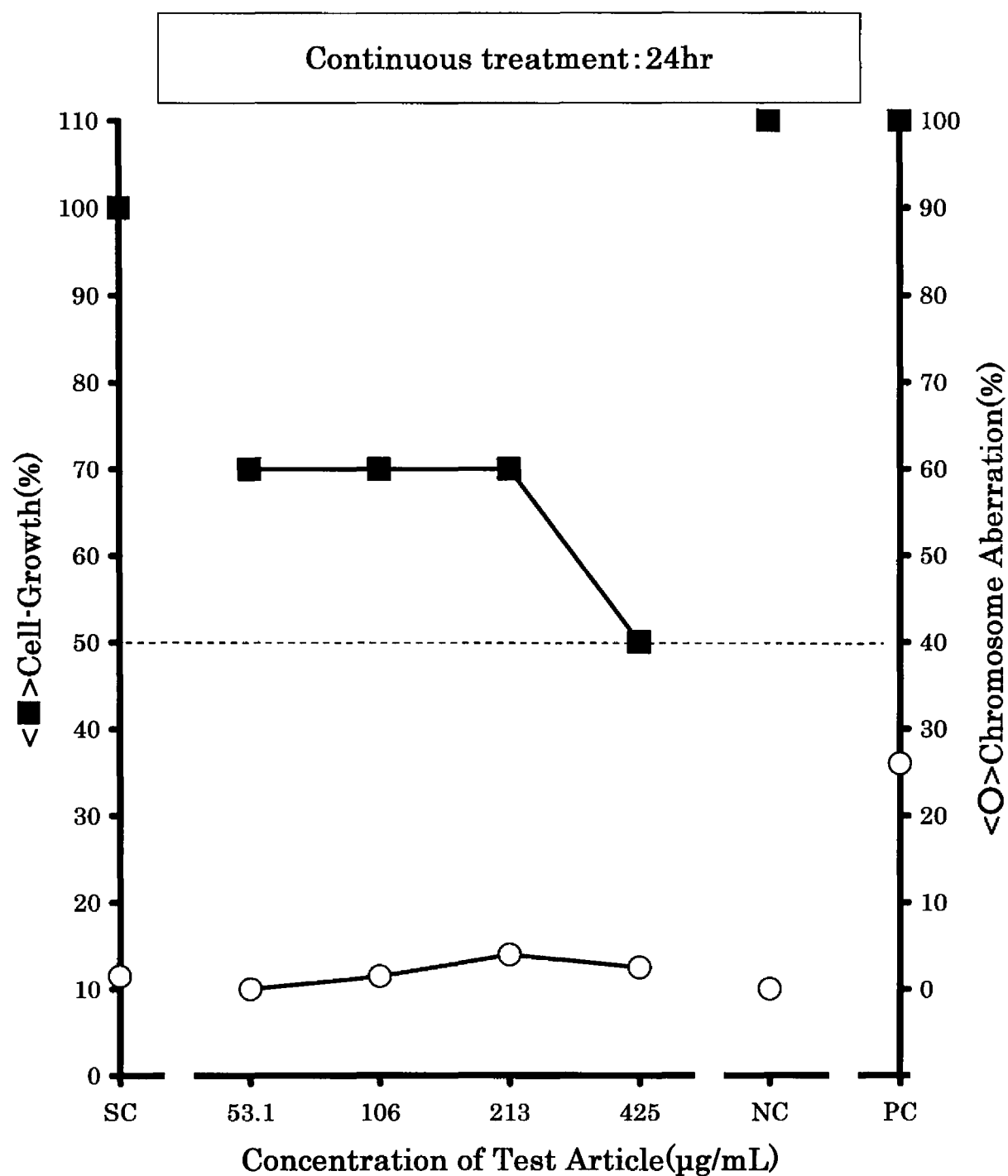


Fig.2-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer

SC: Solvent control

NC: Non treatment control

PC: Positive control

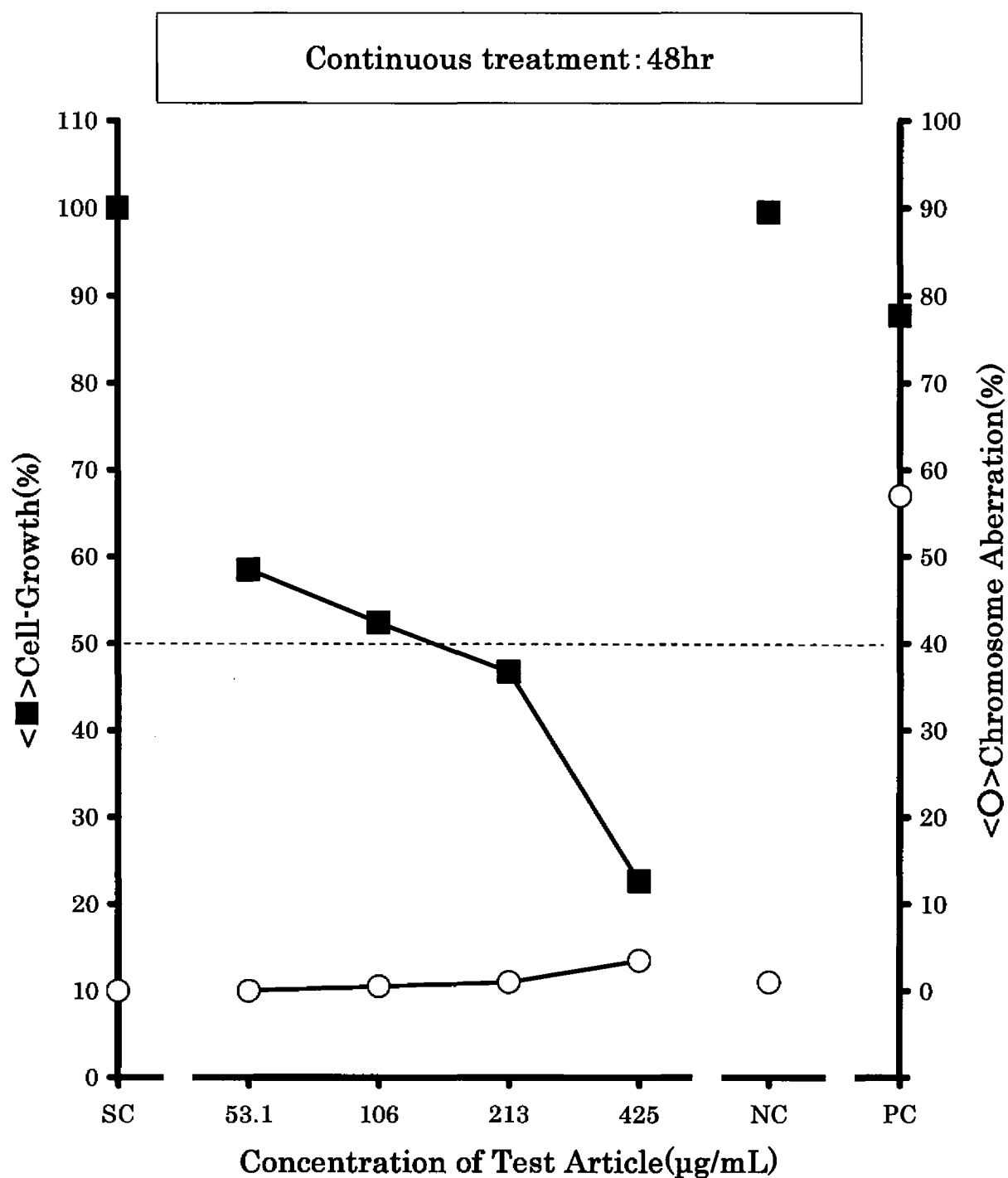


Fig.2-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer

SC: Solvent control

NC: Non treatment control

PC: Positive control

Table 1-1 Cell-growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene,tetramer [short-term treatment:+S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
+	6-18	0(SC)		100 ^{a)}	100	—	—	—	
				100		—	—	—	
		Test article	13.3	100	92	—	—	—	
				83		—	—	—	
			26.6	100	92	—	—	—	
				83		—	—	—	
			53.1	83	92	—	—	—	
				100		—	—	—	
			106	83	75	—	—	—	
				66		—	—	—	
			213	100	92	—	—	—	
				83		—	—	—	
			425	83	83	—	—	—	
				83		—	—	—	
			850	83	83	—	—	—	
				83		—	—	—	
			1700	83	83	—	—	—	
				83		—	—	—	
			NC		100	92	—	—	—
					83		—	—	—

Concentration of 50% cell-growth inhibition : above 1700.0 µg/mL

SC : Solvent Control(acetone)

NC : Non treatment Control

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-2 Cell-growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene,tetramer
[short-term treatment:-S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
—	6-18	0(SC)		100 ^{a)}	100	—	—	—	
				100		—	—	—	
		Test article	13.3	85	85	—	—	—	
				85		—	—	—	
			26.6	100	93	—	—	—	
				85		—	—	—	
			53.1	85	85	—	—	—	
				85		—	—	—	
			106	71	71	+	—	—	
				71		+	—	—	
			213	71	64	++	—	—	
				57		++	—	—	
			425	28	35	+++	—	—	
				42		+++	—	—	
			850	14	14	TOX	—	—	
				14		TOX	—	—	
			1700	14	7	TOX	—	—	
				0		TOX	—	—	
			NC		85	85	—	—	—
					85		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition: 315.3 µg/mL									

SC : Solvent Control(acetone)

NC : Non treatment Control

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-3 Cell-growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene,tetramer
[continuous treatment:24hr]

Cell-growth inhibition test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
—	24	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—	
			100		—	—	—	
		Test article	13.3	71	71	—	—	—
				71		—	—	—
			26.6	85	85	—	—	—
				85		—	—	—
			53.1	85	85	—	—	—
				85		—	—	—
			106	85	78	+	—	—
				71		+	—	—
			213	71	71	+	—	—
				71		+	—	—
			425	42	35	TOX	—	—
				28		TOX	—	—
			850	14	14	TOX	—	—
				14		TOX	—	—
			1700	14	7	TOX	—	—
				0		TOX	—	—
			NC	85	85	—	—	—
				85		—	—	—

Concentration of 50% cell-growth inhibition: 336.7 µg/mL

SC : Solvent Control(acetone)

NC : Non treatment Control

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-4 Cell-growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene,tetramer
[continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
—	48	0(SC)		100 ^{a)}	100	—	—	—	
				93		—	—	—	
		Test article	13.3	79	82	—	—	—	
				79		—	—	—	
			26.6	86	85	—	—	—	
				79		—	—	—	
			53.1	86	89	—	—	—	
				86		—	—	—	
			106	73	76	—	—	—	
				73		—	—	—	
			213	53	51	+	—	—	
				46		+	—	—	
			425	19	17	TOX	—	—	
				13		TOX	—	—	
			850	6	6	TOX	—	—	
				6		TOX	—	—	
			1700	6	6	TOX	—	—	
				6		TOX	—	—	
			NC		79	82	—	—	—
					79		—	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition:						219.2	µg/mL		

SC : Solvent Control(acetone)

NC : Non treatment Control

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-1 Cell-growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene,tetramer
[short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
+	6-18	0(SC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
				100		—	—	
		Test article	213	100	100	—	—	—
				100		—	—	
			425	100	100	—	—	—
				100		—	—	
			850	79	90	—	—	—
				100		—	—	
			1700	100	100	—	—	—
				100		—	—	
		NC		100	100	—	—	—
				100		—	—	
		PC		79	90	—	—	—
				100		—	—	

SC : Solvent Control(acetone)

NC : Non treatment Control

PC : Positive Control(cyclophosphamide, 14µg/mL)

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-2 Cell-growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene,tetramer
[short-term treatment: S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	6-18	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			119		—	—	—
		53.1	100	91	—	—	—
			100		—	—	—
		106	79	72	+	—	—
			79		+	—	—
		213	59	54	+	—	—
			59		+	—	—
		425	39	36	++	—	—
			39		++	—	—
		NC	119	100	—	—	—
			100		—	—	—
		PC	100	91	—	—	—
			100		—	—	—

SC : Solvent Control(acetone)

NC : Non treatment Control

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05 $\mu\text{g/mL}$)

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-3 Cell-growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene,tetramer
[continuous treatment:24hr]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	24	0(SC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
				100		—	—	
		Test article	53.1	80	70	+	—	—
				60		+	—	
			106	60	70	+	—	—
				80		+	—	
			213	60	70	+	—	—
				80		+	—	
			425	40	50	+++	—	—
				60		+++	—	
		NC		100	110	—	—	—
				120		—	—	
		PC		120	110	—	—	—
				100		—	—	

SC : Solvent Control(acetone)

NC : Non treatment Control

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05µg/mL)

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-4 Cell-growth ratio in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene,tetramer
[continuous treatment:48hr]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	48	0(SC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			112		—	—	—
		53.1	62	58	—	—	—
			62		—	—	—
		106	62	52	+	—	—
			49		+	—	—
		213	37	47	+	—	—
			62		+	—	—
		425	24	23	+++	—	—
			24		+++	—	—
		NC	112	100	—	—	—
			99		—	—	—
		PC	99	88	—	—	—
			87		—	—	—

SC : Solvent Control(acetone)

NC : Non treatment Control

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05 $\mu\text{g/mL}$)

a) The plate in the solvent control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer
[short-term treatment: +S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	SC	200 (100) (100)	0.5 (0) (1)		1 (1) (0)	1 (0) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (0) (1)	1.0 (1) (1)		40-1 53-1
		1700	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	—	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	—	25-1 62-1
		850	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	—	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1 (0) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (0) (1)	0.5 (0) (1)	—	42-1 43-1
		425	200 (100) (100)	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)	—	38-1 80-1
		213	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	—	0 (0) (0)	1 (0) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (0) (1)	0.5 (0) (1)	—	32-1 02-1
		NC	200 (100) (100)	0.5 (0) (1)	—	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)	—	88-1 07-1
		PC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	—	2 (1) (1)	22 (11) (11)	144 (74) (70)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	77.5 (78) (77)	77.5 (78) (77)	+	95-1 03-1

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

SC: Solvent control (acetone)

NC: Nontreatment control

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 μ g/mL)

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer
[short-term treatment:-S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	6-18	SC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)		2 (1) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	1.0 (1) (1)		90-1 89-1
		425	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	1 (0) (1)	1 (0) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1.0 (0) (2)	1.0 (0) (2)	-	28-1 21-1
		213	200 (100) (100)	1.5 (2) (1)	-	0 (0) (0)	1 (0) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (0) (1)	0.5 (0) (1)	-	61-1 22-1
		106	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	2 (0) (2)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1.0 (0) (2)	1.0 (0) (2)	-	20-1 01-1
		53.1	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	1 (0) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (0) (1)	0.5 (0) (1)	-	55-1 08-1
		NC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0 (0) (0)	3 (1) (2)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	2.0 (2) (2)	2.0 (2) (2)	-	66-1 54-1
		PC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	3 (2) (1)	8 (7) (1)	22 (9) (13)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	15.0 (16) (14)	16.0 (18) (14)	+	79-1 11-1

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

SC: Solvent control (acetone)

NC: Nontreatment control

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer
[continuous treatment:24hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	24-0	SC	200 (100) (100)	1.0 (2) (0)		0 (0) (0)	3 (1) (2)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1.5 (1) (2)	1.5 (1) (2)		15-1 45-1
		425	200 (100) (100)	1.5 (3) (0)	-	3 (2) (1)	2 (0) (2)	4 (3) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	2.5 (3) (2)	4.0 (5) (3)	-	84-1 67-1
		213	200 (100) (100)	1.0 (1) (1)	-	1 (1) (0)	0 (0) (0)	8 (4) (4)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	4.0 (4) (4)	4.5 (5) (4)	-	27-1 06-1
		106	200 (100) (100)	0.5 (0) (1)	-	0 (0) (0)	0 (0) (0)	3 (1) (2)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1.5 (1) (2)	1.5 (1) (2)	-	18-1 68-1
		53.1	200 (100) (100)	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)	-	56-1 04-1
		NC	200 (100) (100)	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)	-	31-1 93-1
		PC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	4 (3) (1)	13 (6) (7)	43 (24) (19)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	26.0 (29) (23)	27.5 (31) (24)	+	99-1 13-1

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

SC: Solvent control (acetone)

NC: Nontreatment control

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1-Propene, tetramer
[continuous treatment:48hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
--	48-0	SC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)		2 (1) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	1.0 (1) (1)		92-1 59-1
		425	200 (100) (100)	1.5 (1) (2)	—	1 (1) (0)	2 (1) (1)	5 (2) (3)	0 (0) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	3.5 (3) (4)	3.5 (3) (4)	—	35-1 65-1
		213	200 (100) (100)	1.5 (1) (2)	—	0 (0) (0)	2 (1) (1)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1.0 (1) (1)	1.0 (1) (1)	—	73-1 94-1
		106	200 (100) (100)	0.5 (0) (1)	—	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	—	33-1 29-1
		53.1	200 (100) (100)	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)	—	64-1 86-1
		NC	200 (100) (100)	0.5 (1) (0)	—	0 (0) (0)	1 (0) (1)	1 (1) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	1.0 (1) (1)	1.0 (1) (1)	—	57-1 49-1
		PC	200 (100) (100)	0.5 (0) (1)	—	5 (3) (2)	39 (21) (18)	99 (45) (54)	0 (0) (0)	2 (1) (1)	0 (0) (0)	57.0 (51) (63)	58.0 (53) (63)	+	69-1 14-1

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

SC: Solvent control (acetone)

NC: Nontreatment control

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)