

最終報告書

表 題： 4-メチル-1-ペンテンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：SR02192

株式会社 化合物安全性研究所

目 次

表紙	1
目次	4
要約	7
緒言	8
材料および方法	8
成績	16
考察	17

Tables and Figure

Table 1	Effects of 4-methyl-1-pentene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)	19
Figure 1	Effects of 4-methyl-1-pentene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)	20
Table 2	Effects of 4-methyl-1-pentene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test)	21
Table 3-1	Results of the chromosomal aberration test of 4-methyl-1-pentene (6 hours treatment without metabolic activation)	22
Table 3-2	Results of the chromosomal aberration test of 4-methyl-1-pentene (6 hours treatment with metabolic activation)	23
Table 3-3	Results of the chromosomal aberration test of 4-methyl-1-pentene (24 hours treatment without metabolic activation)	24

要 約

4-メチル-1-ペンテンの *in vitro* における染色体異常誘発性を、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU 細胞) を用いて検討した。試験は、被験物質の調製媒体としてジメチルスルホキシドを使用し、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 系列で実施した。

予備試験 (細胞増殖抑制試験 : 9.38~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の結果、各系列で 50% 以上の細胞増殖抑制が認められ、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の IC_{50} はそれぞれ 102、209 および 105 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

被験物質の析出ならびに培養液 pH の変化は、予備試験および本試験ともに観察されなかった。

本試験 (染色体異常試験) の結果、染色体の構造異常ならびに数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合 (98.6、113、130 および 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、短時間処理法の代謝活性化による場合 (197、227 および 261 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合 (37.5、56.3、75.0、85.8、98.6、113、130 および 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のいずれの用量においても 5% 未満であった。

なお、染色体異常誘発性は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、50% 以上の細胞増殖抑制がみられた用量を含む試験群で評価した。短時間処理法の代謝活性化による場合では、細胞毒性が強く 50% 以上の細胞増殖抑制がみられた用量の標本は観察できなかったが、細胞毒性用量と観察可能用量とは公比 1.15 の非常に狭い用量間隔で設定しており、当該被験物質の染色体異常誘発性は十分に評価出来たものと考えられた。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、4-メチル-1-ペンテンは本試験条件においてほ乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないものと判断した。

緒言

4-メチル-1-ペンテンの *in vitro* における染色体異常誘発性を検討する目的で、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU 細胞) を用いる染色体異常試験を実施した。

当該試験は当初、被験物質の調製溶媒として十分な溶解性が得られるアセトン(最終濃度 1%)を使用し実施した。また、被験物質の揮発性を考慮し、培養容器には被験物質処理時に密栓が可能な 25 cm² 培養フラスコを選択し、さらに、予備試験における被験物質の最高濃度を 10 mM(841.6 µg/mL)ではなく 5000 µg/mL とした。

その結果、各系列に共通して被験物質による強い細胞増殖抑制がおおよそ 100~600 µg/mL の用量範囲で認められ、さらに高用量では正常な細胞増殖が生ずる 2 相性の反応が観察された。本試験(染色体異常試験)の最高用量を各系列とも 5000 µg/mL に設定し実施したところ、予備試験と同様に 2 相性の細胞増殖が認められた。染色体標本を作製したところ、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合では観察可能な標本が得られたが、連続処理法の 24-0 h 処理では溶媒対照群での分裂中期細胞が非常に少なく評価困難であった。

他方、被験物質は 100~600 µg/mL の濃度間で細胞増殖抑制を示すことが確認され、一方で、被験物質はジメチルスルホキシドに 30 mg/mL まで溶解することが確認されていることから、ジメチルスルホキシドの使用により細胞毒性用量までの評価が可能と考えられた。

以上のような経緯から、ジメチルスルホキシドを溶媒として予備試験ならびに本試験を再度実施した。本報告書では、溶媒としてジメチルスルホキシドを用いて実施した試験結果について報告する。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質は 4-メチル-1-ペンテンであり、CAS 番号は 691-37-2、分子式は C₆H₁₂、分子量は 84.16 である。当該試験では、より提供された純度 98.36% のロット番号 を使用した。

4-メチル-1-ペンテンは沸点が 54°C、蒸気圧が 35.6 kPa(267 mmHg)/25°C、融点が -154°C、比重が 0.664(20/4°C)、蒸気密度が 2.9(空気=1)、引火点が -25°C、発火点が 300°C で、溶解性は水にほとんど不溶の物理化学的性状を示す無色透明の液体で(Appendix 1-1 および 1-2)。アセトンには 500 mg/mL まで、ジメチルスルホキシドには 30 mg/mL まで溶解する。

4-メチル-1-ペンテンは強酸化剤と接触すると激しい反応が起こりうる引火性の物質であることから、受入後は直射日光を避け、火気、熱源より遠ざけ、室温(実測範囲 17~29℃)、気密条件下で保存した。被験物質は、眼、皮膚および衣服にふれないよう、適切な保護具を着用して取扱った。

2. 被験物質の調製

いずれの調製においても、被験物質を精秤後、ジメチルスルホキシド(ロット番号 SF074、モレキュラーシーブによる脱水処理済み、株式会社同仁化学研究所)を用いて 30 mg/mL 調製液を調製した。

予備試験では、30 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 15、7.50、3.75、1.88 および 0.938 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では、30 mg/mL 調製液から公比 2 の段階希釈により 15、7.50、3.75 および 1.88 mg/mL 調製液を、公比 1.15 の段階希釈により 26.1、22.7、19.7 および 17.2 mg/mL 調製液を調製した。また、15 mg/mL 調製液から公比 1.15 の段階希釈で 13.0、11.3、9.86 および 8.58 mg/mL 調製液を、さらに、15 mg/mL 調製液から 11.3 mg/mL 調製液を、7.50 mg/mL 調製液から 5.63 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、予備試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体の反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質溶液は用時に調製し、予備試験では調製後 0.9 時間以内に、本試験では調製後 2.3 時間以内に使用した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の媒体のジメチルスルホキシド(ロット番号 SF074、株式会社同仁化学研究所)を使用した。ジメチルスルホキシドは、モレキュラーシーブを用いて脱水処理を行い、原液のまま使用した。

4. 陽性対照物質

代謝活性化によらない場合の陽性対照物質として、マイトマイシンC(ロット番号 413ACF、協和醗酵工業株式会社)を使用した。マイトマイシンCは、購入後室温で保存し、日本薬局方注射用水(ロット番号 5A87、株式会社大塚製薬工場)を用いて 5 および 10 µg/mL の濃度に調製した。購入したマイトマイシンCは、1 瓶中に日局マイトマイシンCを 2 mg(力価)含有しており、調製の際には 1 mg(力価)を 1 mg として換算した。

代謝活性化法による場合の陽性対照物質として、ベンゾ[a]ピレン(ロット番号 KLM1182、和光純薬工業株式会社)を使用した。ベンゾ[a]ピレンは、購入後冷所(2~8℃)で保存し、ジメチルス

ルホキシド(ロット番号 SF074、株式会社同仁化学研究所)を用いて 1 mg/mL の濃度に調製した。なお、購入したベンゾ[a]ピレンの含量は 101.0%であった(和光純薬工業株式会社 検査成績書)。

陽性対照物質の各調製液は-20℃以下で分注凍結保存し、調製後 2 カ月以内に試験に使用した(使用期限は調製後 1 年)。保存調製液は解凍後 1.6 時間以内に使用し、それぞれプレート内の液に対し 1 vol%の割合で添加した。

5. 試験系

試験系として、1999 年 2 月 2 日に大日本製薬株式会社より継代数 14 で入手した CHL/IU を使用した。CHL/IU は、雌性の新生チャイニーズハムスターの肺に由来し、染色体数(モード)は 25 本(2n=22)、倍化時間の測定値は 13.2 時間である。本細胞は、増殖速度、継代における染色体の安定性、染色体標本の観察の容易さおよび既知の変異原物質に対する感受性を考慮して選択した。

細胞の保存に際しては、10 vol%ジメチルスルホキシドを含む培地を用いて 1×10^6 cells/mL 細胞浮遊液を調製し、1 mL ずつアンプルに分注したものを漸次冷却して凍結させた後、液体窒素内に収納した。解凍後は、75 cm²培養フラスコを用いて 5.0%CO₂、37.0℃に設定した CO₂インキュベーター(MCO-175、三洋電機株式会社)で培養し、3 または 4 日毎に継代を行った。使用した細胞の継代数は、予備試験が 19 で、本試験が 23 であった。

6. 培地

イーグル MEM 培地(Code 05902、ロット番号 50850211、日水製薬株式会社)9.4 g を日本薬局方注射用水(ロット番号 5A87 および 5C92、株式会社大塚製薬工場)に溶解し、さらにフェノールレッド(ロット番号 PKF3307、和光純薬工業株式会社) 6 mg を加え、全量を 1 L とした。オートクレーブ滅菌後、室温まで冷却し、滅菌済みの炭酸水素ナトリウム溶液(炭酸水素ナトリウム:ロット 609F1546、関東化学株式会社)で pH7.2~7.4 に調整し、ろ過除菌した L-グルタミン溶液(L-グルタミン:ロット番号 EWR5134、和光純薬工業株式会社)を 0.292 g/L となるように添加した。さらに牛胎児血清(ロット番号 1195887、GIBCO)を最終調製量の 10%になるように加えた。牛胎児血清は、56℃で 30 分間非働化した後に使用した。

7. S9 mix

S9 mix はキッコーマン株式会社より購入し(ロット番号 CAM-527、2005 年 8 月 12 日製造)、-80℃以下で凍結保存したものを、製造日より 4 カ月以内(使用期限:製造後 6 カ月)に使用した。

S9 mix は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット(雄、7 週齢)の肝ホモジネートより調製した S9 1.05 mL に、コファクターミックス 2.45 mL を加え、次頁の組成に調製されている。

S9 mix 1 mL 中の組成		
S9	(キッコーマン株式会社製 RAA-527、S9 中蛋白含量 24.20 mg/mL、S9 蛋白の培地中での最終濃度は 1.21 mg/mL)	0.3 mL
MgCl ₂	(和光純薬工業株式会社 PTN2433)	5 μmol /0.1 mL
KCl	(和光純薬工業株式会社 WAK2693)	33 μmol /0.1 mL
G-6-P	(オリエンタル酵母工業株式会社 115501)	5 μmol /0.1 mL
NADP	(オリエンタル酵母工業株式会社 045503)	4 μmol /0.1 mL
HEPES 緩衝液	(株式会社同仁化学研究所 FX115)	4 μmol /0.2 mL
蒸留水		0.1 mL

8. 試験方法

(1) 予備試験

1) 試験群

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 系列について実施した。

被験物質の最高用量を、被験物質の溶解性の上限に基づく 300 μg/mL とし、以下公比 2 で低下させた計 6 用量 (300、150、75.0、37.5、18.8 および 9.38 μg/mL) の試験群を設定した。更に、試験系列毎に陰性対照群を設定した。

被験物質の沸点が比較的 low 揮発する可能性が考えられたため、被験物質処理時に密栓が可能な 25 cm² 培養フラスコ (FALCON、以下、単にフラスコと表記) を使用した。

各群につき 2 枚のフラスコを使用し、各フラスコには識別番号を明記する。

2) 細胞の播種

各フラスコに、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では 0.4×10^4 cells/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合では 0.6×10^4 cells/mL の細胞浮遊液をそれぞれ 6 mL ずつ播種し、5.0%CO₂、37.0°C に設定した CO₂ インキュベーターで培養した。

3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

細胞播種後 3 日目に、フラスコ内の培養液を除去し、新鮮な培地 3.6 mL を添加した。CO₂ インキュベーターで約 1 時間培養した後、試験液 36 μL を加えて混合し、密栓をして 6 時間培養した。6 時間経過後に、フラスコ内の液を除去して Ca²⁺ および Mg²⁺ フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地 6 mL を加えて更に 18 時間培養した。

4) 短時間処理法の代謝活性化による場合

細胞播種後 3 日目に、フラスコ内の培養液を除去し、新鮮な培地 3 mL を添加した。CO₂ インキュベーターで約 1 時間培養した後、S9 mix 0.6 mL および試験液 36 μL を加えて混合し (S9 の最終濃度約 5 vol%)、密栓をして 6 時間培養した。6 時間経過後に、フラスコ内の液を除去して Ca²⁺ および Mg²⁺ フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地 6 mL を加えて更に 18 時間培養した。

5) 連続処理法の 24-0 h 処理による場合

細胞播種後 3 日目に、フラスコ内の培養液を除去し、新たな培地 6 mL を添加した。CO₂ インキュベーターで約 1 時間培養した後、試験液 60 μL を加えて混合し、24 時間培養した。

6) 被験物質の析出の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、被験物質の析出の有無を目視確認した。

7) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、被験物質による培養液色の変化の有無を目視確認した。培養液色に変化が認められない場合には、被験物質による培養液 pH への影響は無いものと判断した。

8) 細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) の算出

培養終了後、フラスコ内の液を除去して Ca²⁺ および Mg²⁺ フリーの Dulbecco のリン酸緩衝液で細胞を洗い、0.02% EDTA (ロット番号 1118913、GIBCO) - 0.25% トリプシン (ロット番号 1233302、GIBCO) で処理して細胞を回収し、1000 rpm (150 × g) で 5 分間遠心した。上清を除去し、1 mL の新鮮培地に細胞を再浮遊させ、更に 0.5 w/v% トリパンブルー (ロット番号 LDG8629、和光純薬工業株式会社) で細胞浮遊液を 2 倍に希釈した後、血球計算盤を用いて生細胞数を計数した。各フラスコ毎にフラスコ当たりの生細胞数を求め、対照群の値を 100% としたときの各フラスコの生細胞数の百分率 (細胞増殖率) を算出し、更に試験群毎にその平均値を算出した。細胞増殖率が 50% 以下まで低下した場合には、用量を対数化した回帰計算により 50% 細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) を算出した。

(2) 本試験

1) 試験群

予備試験の結果、各系列で 50% 以上の細胞増殖抑制がみられたことから、各系列とも IC₅₀ 値より高用量を最高用量とした。各系列とも、最高用量より公比 2 で低下させた系列と、それらの用量間を 2 分割あるいは 5 分割する用量の試験群を設定した。

陽性対照群を除く各群にはサテライト群 2 枚を加えた 4 枚のプレートを使用し、陽性対照群では 2 枚のプレートを使用した。各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

8. 試験方法、(1)予備試験、2)細胞の播種と同様の方法で実施した。

3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

8. 試験方法、(1)予備試験、3)短時間処理法の代謝活性化によらない場合と同様の方法で実施した。

4) 短時間処理法の代謝活性化による場合

8. 試験方法、(1)予備試験、4)短時間処理法の代謝活性化による場合と同様の方法で実施した。

5) 連続処理法の24-0 h処理による場合

8. 試験方法、(1)予備試験、5)連続処理法の24-0 h処理による場合と同様の方法で実施した。

6) 被験物質の析出の有無の確認

8. 試験方法、(1)予備試験、6)被験物質の析出の有無の確認と同様の方法で実施した。

7) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認

8. 試験方法、(1)予備試験、7)被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認と同様の方法で実施した。

8) 細胞増殖率の測定

8. 試験方法、(1)予備試験、8)細胞増殖率の測定および50%細胞増殖抑制濃度(IC₅₀)の算出と同様の方法で実施した。IC₅₀は算出しなかった。

9) 染色体標本の作製

培養終了の約2時間前に、各プレートに最終濃度0.2 µg/mLのコルセミド(ロット番号1238727、GIBCO BRL)を加えた。培養終了時間に、プレート内の液をそれぞれ遠沈管に回収し、各プレートを0.02%EDTA(ロット番号1118913、GIBCO)-0.25%トリプシン(ロット番号1233302、GIBCO)で処理して細胞を剥離させ、得られた細胞浮遊液を上記の遠沈管に回収して約1000 rpmで約5分間遠心分離した。上清を除去し、0.075 mol/L塩化カリウム(ロット番号403F1156、関東化学株式会社)を加え、穏やかにピペティングを繰り返しながら常温で約30分間放置し細胞を膨満化させた。氷冷したカルノア固定液(メタノール：酢酸=3：1、メタノール：ロット番号611C1096、関東化学株式会社、酢酸：ロット番号ASE7431、和光純薬工業株式会社)を用いて細胞を固定した後、1000 rpmで5分間遠心分離して上清を除去し、新しいカルノア固定液を加えた。細胞の固定操作を3回繰り返した後、細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、一夜以上自然乾燥させた。各プレートより、1枚(細胞毒性により得られた細胞数が少ない場合)あるいは2枚の染色体標本を作製した。

各スライドは、2%ギムザ液(ギムザ液：ロット番号 SR014、和光純薬工業株式会社、インスタントリン酸緩衝液：ロット番号 L430、株式会社三菱化学ヤトロン)で 20 分間染色し、水洗および風乾の後、封入剤(マリノール、ロット番号 0301119、武藤化学薬品株式会社)で封入した。

10) 染色体標本の観察

標本観察の前に各用量の各プレートにつき 1 枚の標本を選択してブラインド化した。

観察用量として、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では 50%以上の細胞増殖抑制がみられた用量を含む 98.6、113、130 および 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 用量を、短時間処理法の代謝活性化による場合では、細胞増殖抑制がみられた用量は細胞がほとんど得られず標本が作製出来なかったことから、その用量と連続する低用量の 197、227 および 261 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 用量を、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では細胞増殖抑制がみられた全ての用量を含む 37.5、56.3、75.0、85.8、98.6、113、130 および 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 8 用量を選択した。

総合倍率 1000 倍の顕微鏡(BX51TF、オリンパス光学工業株式会社)で、1 枚あたり 100 個の分裂中期像を選択して観察し、以下の分類に従って染色体異常の判定を行った。構造異常については 25 ± 2 本の染色体をもつものを観察対象とした。

①構造異常(structural aberration)

・染色分体切断(ctb: chromatid break)

染色分体のはっきりした不連続部分(切断部分)で、不連続部分が染色分体の幅以上である場合、あるいは切断片が染色分体の長軸線上から外れている場合に染色分体切断として判定した。

・染色分体交換(cte: chromatid exchange)

染色分体の 2 ヶ所以上の切断部位が相互に交換(結合反応)しているものを染色分体交換として判定した。

・染色体切断(csb: chromosome break)

両方の染色分体の同じ位置に切断が生じている場合に、染色体切断として判定した。切断の判定基準は、染色分体切断に準じた。

・染色体交換(cse: chromosome exchange)

両方の染色分体の同じ位置で同じ方向に交換が生じている場合に、染色体交換として判定した。

・その他(others)

その他の構造異常として、断片化(fragmentation)がある。一つの分裂中期像のほとんど全ての染色体に切断やギャップが現れ、交換型の異常が含まれていない場合に断片化として判定した。

②ギャップ(gap)

染色分体あるいは染色体上に生じた非染色部分(染色性が全くみられない部分)で、非染色部分の幅が染色分体の幅より狭い場合にギャップとして判定した。

③数的異常(numerical aberration)

- ・倍数体(poly: polyploid)

染色体数(25±2)が倍化し、三倍体、四倍体等になったものを倍数体として判定した。

- ・その他(others)

その他の数的異常として核内倍加がある。倍加した染色体が分離せずに平行に並んでいる場合に核内倍加(end: endoreduplication)と判定し、倍数体とは区別した。

11) 観察結果の集計方法

プレート毎に以下の細胞出現数を求め、試験群毎にその合計値を算出した。更に、構造異常および数的異常の total については、それぞれ出現率(%)を求めた。出現率(%)は、観察した細胞数(分裂中期像の数)に対する出現数の百分率で算出した。

①構造異常について

- ・ctb: 染色分体切断をもつ細胞数
- ・cte: 染色分体交換をもつ細胞数
- ・csb: 染色体切断をもつ細胞数
- ・cse: 染色体交換をもつ細胞数
- ・others: その他の構造異常をもつ細胞数
- ・total: 何らかの構造異常をもつ細胞数

②ギャップについて

- ・gap: ギャップをもつ細胞数

③数的異常について

- ・poly: 倍数体の細胞数
- ・others: その他の数的異常をもつ細胞数
- ・total: 何らかの数的異常をもつ細胞数

9. 試験結果の評価

構造異常または数的異常の total の出現率(%)が10%以上増加し、その出現様式に用量依存性がみられる場合、あるいは5%以上増加する結果について確認試験により再現性がみられる場合を陽性、それ以外を陰性とし、統計学的手法は用いなかった。

D₂₀ 値(細胞の20%に異常が認められる濃度)については、各系列とも陰性結果であったことから算出しなかった。

成績

1. 予備試験

細胞増殖率への影響の結果を Table 1 および Figure 1 に示す。

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量ならびに短時間処理法の代謝活性化による場合の 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で、強い細胞増殖抑制が認められた。各系列の IC_{50} は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 102 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、短時間処理法の代謝活性化による場合が 209 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 105 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

被験物質の析出ならびに培養液 pH の変化は観察されなかった。

2. 本試験

細胞増殖率への影響の結果を Table 2 に、染色体異常誘発性の評価結果を Table 3-1~3-3 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群の細胞増殖への影響の検討において、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で 50% を越える強い細胞増殖抑制が認められた。短時間処理法の代謝活性化による場合では、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量では細胞毒性により細胞はほとんどみられなかった。連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、56.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で細胞増殖は抑制され、130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量では 50% 以上の細胞増殖抑制が認められた。

被験物質の析出ならびに培養液 pH の変化は観察されなかった。

染色体の構造異常ならびに数的異常の出現率では、短時間処理法の代謝活性化によらない場合 (98.6、113、130 および 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、短時間処理法の代謝活性化による場合 (197、227 および 261 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合 (37.5、56.3、75.0、85.8、98.6、113、130 および 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のいずれの用量においても 5% 未満であった。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率では、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 61.0%、短時間処理法の代謝活性化による場合が 58.5% および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 62.5% であった。

考 察

4-メチル-1-ペンテンの *in vitro* における染色体異常誘発性を、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU 細胞) を用いて検討した。

被験物質の溶媒 (ジメチルスルホキシド) への溶解性が低かったことから、処理最高濃度をガイドラインの規定 (10 mM : 841.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ あるいは 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の低い濃度) より低い 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。その結果、予備試験では各系列において 50% を超える細胞増殖抑制が認められたことから、当該濃度において染色体異常誘発性は適切に評価することが可能と判断した。本試験は、予備試験結果に基づき、各系列とも IC_{50} 値より高用量を最高用量とする 9 試験群を設定した。

染色体異常誘発性は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、細胞増殖抑制が 50% 以上の用量を含む連続した 4 用量あるいは 8 用量で評価した。短時間処理法の代謝活性化による場合では、細胞毒性がみられた用量では標本作製ができなかったことから、その用量と連続する低用量の 3 用量で評価した。

その結果、構造異常ならびに数的異常の出現率は各系列のいずれの用量においても 5% 未満で、用量に関連した増加もみられず、結果は陰性であった。なお、短時間処理法の代謝活性化による場合では細胞毒性用量における標本観察はできなかったが、毒性用量と観察可能用量とは公比 1.15 の非常に狭い用量間隔で設定しており、当該被験物質の染色体異常誘発性は十分に評価できたものと考えられた。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、4-メチル-1-ペンテンは、本試験条件においてはほ乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないものと判断した。

Table 1 Effects of 4-methyl-1-pentene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)

Compound	Concentration (µg/mL)	S9-		S9+		S9-	
		6-18 hours		6-18 hours		24-0 hours	
		Cell number ^b (×10 ⁴ cells/plate)	Growth rate ^c (%)	Cell number (×10 ⁴ cells/plate)	Growth rate (%)	Cell number (×10 ⁴ cells/plate)	Growth rate (%)
Control ^a	-	197.0 , 208.0 (202.5)	- , - (100.0)	316.0 , 178.6 (247.3)	- , - (100.0)	198.6 , 197.0 (197.8)	- , - (100.0)
4-Methyl-1-pentene	9.38	150.0 , 147.6 (148.8)	74.1 , 72.9 (73.5)	295.6 , 265.0 (280.3)	119.5 , 107.2 (113.4)	218.6 , 188.6 (203.6)	110.5 , 95.3 (102.9)
	18.8	180.0 , 194.0 (187.0)	88.9 , 95.8 (92.4)	264.0 , 254.0 (259.0)	106.8 , 102.7 (104.8)	177.0 , 206.6 (191.8)	89.5 , 104.4 (97.0)
	37.5	196.6 , 212.0 (204.3)	97.1 , 104.7 (100.9)	297.6 , 285.6 (291.6)	120.3 , 115.5 (117.9)	207.0 , 125.6 (166.3)	104.7 , 63.5 (84.1)
	75.0	170.6 , 185.0 (177.8)	84.2 , 91.4 (87.8)	228.0 , 234.0 (231.0)	92.2 , 94.6 (93.4)	188.0 , 200.0 (194.0)	95.0 , 101.1 (98.1)
	150	0.6 , 10.6 (5.6)	0.3 , 5.2 (2.8)	238.6 , 236.6 (237.6)	96.5 , 95.7 (96.1)	0.0 , 1.0 (0.5)	0.0 , 0.5 (0.3)
	300	0.0 , 0.0 (0.0)	0.0 , 0.0 (0.0)	0.6 , 1.0 (0.8)	0.2 , 0.4 (0.3)	0.0 , 0.0 (0.0)	0.0 , 0.0 (0.0)
IC ₅₀		102		209		105	

a : Dimethyl sulfoxide

b : Viable cell number per flask measured by trypan blue dye exclusion method

c : Percentage to the control mean value

The figure in parentheses represents mean value of two flasks.

- : Blank

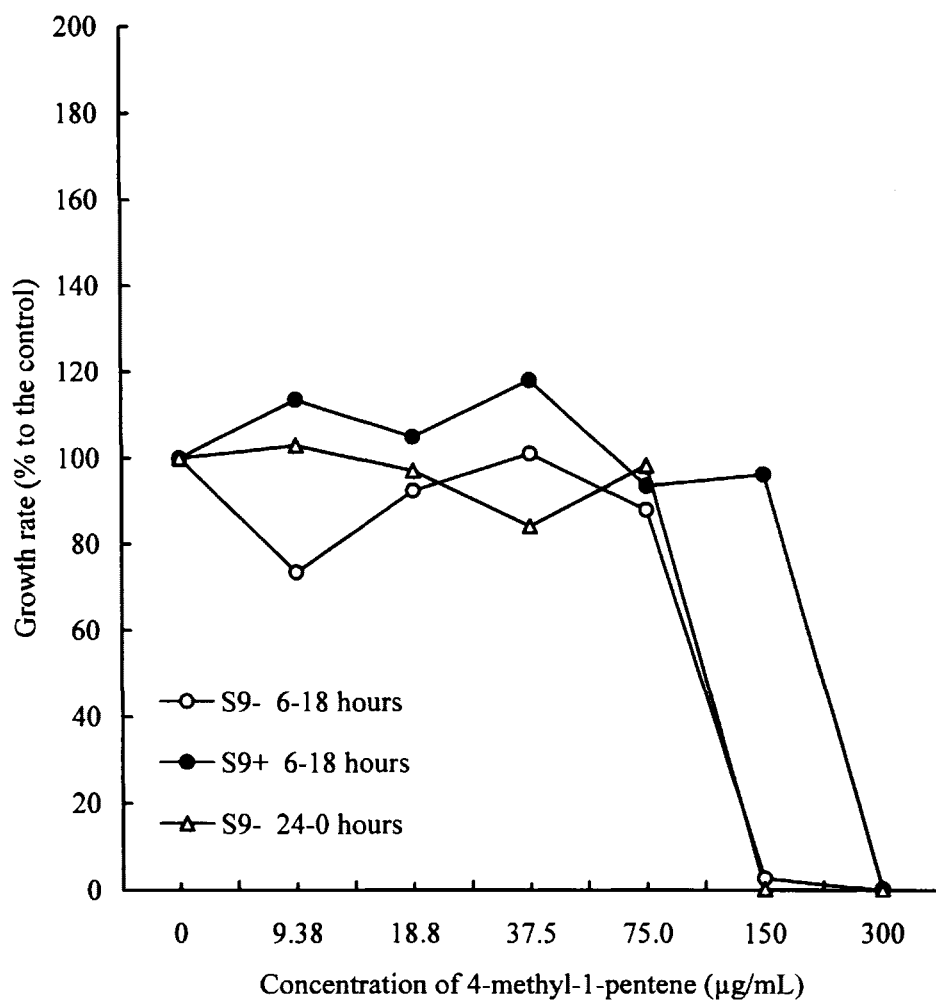


Figure 1 Effects of 4-methyl-1-pentene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)

Each point represents mean value (n=2).

Table 2 Effects of 4-methyl-1-pentene on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test)

Compound	Concentration (µg/mL)	S9- 6-18 hours		Concentration (µg/mL)	S9+ 6-18 hours		Concentration (µg/mL)	S9- 24-0 hours	
		Cell number ^b (×10 ⁴ cells/plate)	Growth rate ^c (%)		Cell number (×10 ⁴ cells/plate)	Growth rate (%)		Cell number (×10 ⁴ cells/plate)	Growth rate (%)
Control ^a	-	133.6 , 155.6 (144.6)	- , - (100.0)	-	227.0 , 184.0 (205.5)	- , - (100.0)	-	155.6 , 157.0 (156.3)	- , - (100.0)
4-Methyl-1-pentene	18.8	146.6 , 161.6 (154.1)	101.4 , 111.8 (106.6)	37.5	211.6 , 273.0 (242.3)	103.0 , 132.8 (117.9)	18.8	161.6 , 155.0 (158.3)	103.4 , 99.2 (101.3)
	37.5	137.6 , 162.0 (149.8)	95.2 , 112.0 (103.6)	75.0	210.0 , 225.6 (217.8)	102.2 , 109.8 (106.0)	37.5	136.0 , 142.6 (139.3)	87.0 , 91.2 (89.1)
	56.3	174.6 , 134.6 (154.6)	120.7 , 93.1 (106.9)	113	234.6 , 217.6 (226.1)	114.2 , 105.9 (110.1)	56.3	132.0 , 113.0 (122.5)	84.5 , 72.3 (78.4)
	75.0	143.6 , 149.6 (146.6)	99.3 , 103.5 (101.4)	150	240.6 , 225.6 (233.1)	117.1 , 109.8 (113.5)	75.0	115.0 , 95.6 (105.3)	73.6 , 61.2 (67.4)
	85.8	112.6 , 149.0 (130.8)	77.9 , 103.0 (90.5)	172	188.0 , 186.6 (187.3)	91.5 , 90.8 (91.2)	85.8	85.0 , 91.6 (88.3)	54.4 , 58.6 (56.5)
	98.6	148.0 , 128.6 (138.3)	102.4 , 88.9 (95.7)	197	168.0 , 201.6 (184.8)	81.8 , 98.1 (90.0)	98.6	97.0 , 109.0 (103.0)	62.1 , 69.7 (65.9)
	113	133.0 , 131.6 (132.3)	92.0 , 91.0 (91.5)	227	171.0 , 195.6 (183.3)	83.2 , 95.2 (89.2)	113	116.6 , 117.6 (117.1)	74.6 , 75.2 (74.9)
	130	123.6 , 169.6 (146.6)	85.5 , 117.3 (101.4)	261	168.6 , 180.0 (174.3)	82.0 , 87.6 (84.8)	130	86.6 , 68.6 (77.6)	55.4 , 43.9 (49.7)
150	30.0 , 24.6 (27.3)	20.7 , 17.0 (18.9)	300	1.0 , 1.0 (1.0)	0.5 , 0.5 (0.5)	150	37.0 , 29.0 (33.0)	23.7 , 18.6 (21.2)	

a : Dimethyl sulfoxide

b : Viable cell number per flask measured by trypan blue dye exclusion method

c : Percentage to the control mean value

The figure in parentheses represents mean value of two flasks.

- : Blank

Table 3-1 Results of the chromosomal aberration test of 4-methyl-1-pentene (6 hours treatment without metabolic activation)

Time schedule ^a (hours)	S9	Compound	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c	
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)		
6-18	-	Control ^b	—	100.0	100	1	1	0	0	0	2	0	2	0	2	-	
					100	0	1	0	0	0	1	0	1				
					200	1	2	0	0	0	3 (1.5)	0	3 (1.5)				
				18.8	106.6	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				37.5	103.6	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				56.3	106.9	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				75.0	101.4	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				85.8	90.5	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
				98.6	95.7	100	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	-
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
						200	2	0	0	0	0	2 (1.0)	0	0	0 (0.0)		
				113	91.5	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-
						100	0	1	0	0	0	1	1	0	1		
						200	1	1	0	0	0	2 (1.0)	1	1	0 (0.5)		
				130	101.4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
						100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	
						200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0 (0.5)		
				150	18.9	100	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	-
						100	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	
						200	2	0	0	0	0	2 (1.0)	0	2	0 (1.0)		
		Mitomycin C	0.1		100	18	55	0	0	0	61	1	0	0	+		
				100	19	54	1	0	0	61	0	0	0				
				200	37	109	1	0	0	122 (61.0)	1	0	0 (0.0)				

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

Table 3-2 Results of the chromosomal aberration test of 4-methyl-1-pentene (6 hours treatment with metabolic activation)

Time schedule ^a (hours)	S9	Compound	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c		
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)			
6-18	+	Control ^b	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
					100	0	0	0	0	0	0	1	0	1				
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	1	0	1 (0.5)			
		4-Methyl-1-pentene	37.5	117.9	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			75.0	106.0	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			113	110.1	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			150	113.5	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			172	91.2	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			197	90.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
			200		100	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0	0 (0.0)	
					100	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0		
			227	89.2	100	2	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0		
					200	2	1	0	0	0	3 (1.5)	0	0	0	0 (0.0)			
			261	84.8	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
100	0	0			1	0	0	1	0	0	0	0						
200		100	0	0	1	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0 (0.0)						
		200	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-						
300	0.5	Toxic	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
Benzo[a]pyrene	10		100	23	56	0	2	0	61	0	0	0	0					
			100	19	52	0	1	0	56	0	0	0	0					
			200	42	108	0	3	0	117 (58.5)	0	0	0	0 (0.0)					

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Dimethyl sulfoxide

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

Table 3-3 Results of the chromosomal aberration test of 4-methyl-1-pentene (24 hours treatment without metabolic activation)

Time schedule ^a (hours)	S9	Compound	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c			
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)				
24-0	-	Control ^b	—	100.0	100	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	-		
					100	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0				
					200	3	2	0	0	0	4 (2.0)	0	0	0	0 (0.0)				
		-	-	4-Methyl-1-pentene	18.8	101.3	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
					37.5	89.1	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
							100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
					56.3	78.4	200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0 (0.0)		
							100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
																		200	
					75.0	67.4	100	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
							100	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1		
							200	2	0	1	0	0	2 (1.0)	0	2	0	2 (1.0)		
					85.8	56.5	100	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0		
							100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
							200	0	1	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)		
					98.6	65.9	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
							100	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)		
					113	74.9	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
							100	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)		
					130	49.7	100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
							100	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
							200	2	0	0	0	0	2 (1.0)	0	0	0	0 (0.0)		
					150	21.2	100	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0		
							100	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0		
200	4						0	0	0	0	4 (2.0)	0	0	0	0 (0.0)				
Mitomycin C	0.05					100	17	50	0	0	0	59	0	0	0	0			
						100	13	60	0	0	0	66	0	0	0	0			
		200	30	110		0	0	0	125 (62.5)	0	0	0	0 (0.0)						

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid
a : Time schedule ; treatment time-recovery time
b : Dimethyl sulfoxide
c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive