

陳 述 書

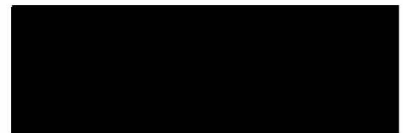
本報告書は、「2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験（試験番号：05-237）」の最終報告書原本の正確な写しであることに相違ありません。

平成 20 年 11 月 11 日

財団法人 畜産生物科学安全研究所

試験責任者

安全性研究部 首席研究員



信頼性保証責任者

信頼性保証室 首席研究員



最 終 報 告 書

2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)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：05-237)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

陳 述 書

試験表題：2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)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：05-237

本試験は、化審法ガイドライン「新規化学物質等に係る試験の方法について、最終改正：平成 17 年 4 月 1 日」（平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 1121002 号厚生労働省医薬食品局長、平成 15・11・13 製局第 2 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 031121002 号環境省総合環境政策局長、連名通知）および化審法 GLP「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 1121003 号厚生労働省医薬食品局長、平成 15・11・17 製局第 3 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 031121004 号環境省総合環境政策局長、連名通知）に定める基準に準拠して実施した。

試験責任者

（財）畜産生物科学安全研究所

安全性研究部 首席研究員



平成 20 年 // 月 // 日

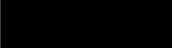
試験表題：2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンのほ乳類培養細胞を用
いる染色体異常試験

試験番号：05-237

試験委託者：

名 称 厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室
所 在 地 東京都千代田区霞が関 1-2-2
委託担当者 

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所
所 在 地 神奈川県相模原市橋本台 3 - 7 - 11
運営管理者 専務理事 
試験責任者 安全性研究部 首席研究員 
信頼性保証 信頼性保証室 首席研究員 
責 任 者

試験期間：

試験開始日 平成 18 年 11 月 17 日
実験開始日 平成 18 年 11 月 28 日
実験終了日 平成 19 年 1 月 31 日
試験終了日 平成 20 年 11 月 11 日

試験成績の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書からの逸脱：

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書か
らの逸脱はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は、最終報告書作成後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の保管については、試験委託者と協議して決める。

1. 試験計画書
2. 被験物質に関する記録
3. 試験結果に関する記録
4. 染色体標本
5. 信頼性保証に関する記録
6. 最終報告書

試験責任者，担当者および業務分担

試験責任者

氏名

平成 20 年 11 月 11 日

試験担当者およびその業務分担

実験操作 :

鏡検 :

データ整理 :

信頼性保証証明書

試験表題 : 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)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 : 05-237

<u>審査・査察実施日</u>	<u>試験責任者への報告日</u>	<u>運営管理者への報告日</u>
1. 試験計画書審査 平成18年11月17日	平成18年11月17日	平成18年11月17日
2. 試験計画書記載事項変更審査 (変-1) 平成20年04月28日	平成20年04月28日	平成20年04月28日
3. 試験実施状況査察 細胞培養開始 平成18年11月28日	平成18年11月28日	平成18年11月28日
染色体異常試験：細胞播き・細胞の継代 平成18年12月15日	平成18年12月15日	平成18年12月15日
染色体異常試験：被験物質の調製および添加 平成18年12月18日	平成18年12月18日	平成18年12月18日
染色体異常試験：細胞増殖率の測定(標本作製)・染色体標本の作製・培養細胞の観察 平成18年12月19日	平成18年12月19日	平成18年12月19日
染色体異常試験：染色体標本の染色・細胞増殖率の測定(測定) 平成18年12月20日	平成18年12月20日	平成18年12月20日
染色体異常試験：S9mixの使用 平成18年12月21日	平成18年12月21日	平成18年12月21日
染色体異常試験：染色体標本の観察 平成19年01月11日	平成19年01月11日	平成19年01月11日
4. 生データ査察 平成20年04月28日	平成20年04月28日	平成20年04月28日
5. 報告書(草案)審査 平成20年04月28日	平成20年04月28日	平成20年04月28日
6. 最終報告書審査 平成20年11月11日	平成20年11月11日	平成20年11月11日

上記の審査・査察により、本試験が「化審法GLP」に従って実施され、本報告書には、当該試験で使用した方法・手順が忠実に記載され、試験成績には、当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映されていることを確認した。

平成 20 年 11 月 11 日

財団法人 畜産生物科学安全研究所

信頼性保証責任者

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	8
6) 染色体の観察	9
7) 染色体異常の分類および集計	9
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	12
参考文献	12

表：

表 1-1	2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)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 1-2	2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)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 2-1	2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)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	17

要 約

2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)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、45.13～2900 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、短時間処理法では、S9 mix 非存在および存在下ともに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、362.5 $\mu\text{g/mL}$ 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、725、1450 および 2900 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の場合は、46.25、92.5、185 および 370 $\mu\text{g/mL}$ とした。

試験の結果、短時間処理法 S9 mix 非存在および存在下ともに染色体異常細胞の増加は認められなかった。また、連続処理法24時間においても染色体異常細胞の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、2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)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、2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)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 : 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサン

別 名 : パーヘキサ 25B

CAS 番号 : 78-63-7

ロット番号 : 060516

純 度 : 99.2%〔平成 18 年 5 月 15 日、日本油脂株式会社において分析(GC 法)〕

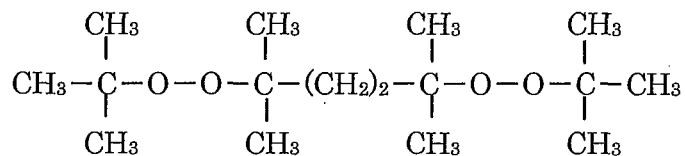
入 手 先 : 日本油脂株式会社 (東京都渋谷区恵比寿 4-20-3)

入手日・量 : 平成 18 年 5 月 18 日 (50g)

物 性 等 :

化学名 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサン
2,5-Dimethyl-2,5-di(t-butylperoxy)hexane

構造式



分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}_4$

分子量 290.45

性状 特異臭のある無色透明な液体

凝固点 3.9°C (純度 91.5%品)

比 重 0.873 (25°C)

引火点 65°C (セタ密閉式)

発火点 443°C (ASTM E659)

蒸気圧(mmHg) $0.1(28^\circ\text{C}), 0.4(50^\circ\text{C}), 0.7(65^\circ\text{C}), 760(250^\circ\text{C})$

溶解性 水に不溶、ジオール類に不溶、アルコール、エーテル、エステル、

ケトン等に可溶

安定性 : 安定 [実験終了後、(財)畜産生物科学安全研究所において保管した残余被験物質を日本油脂株式会社に委託して分析 (平成 19 年 3 月 15 日、GC 法) した結果、純度は 98.7% 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 (2~6℃)、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を用いた。陽性対照物質は、連続処理法および短時間処理法 S9 mix 非存在下では 1-Methy-1-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG、Aldrich Chemical Company、ロット番号 00613PN、純度 97%) を、短時間処理法 S9 mix 存在下では 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

本被験物質は水に不溶であり、予備的検討の結果、ジメチルスルホキシド (DMSO) に不溶、アセトンに可溶であったことから、溶媒にはアセトン (和光純薬工業株式会社、ロット番号 EWM6387、100%) を用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[a]P の溶媒については、DMSO (和光純薬工業株式会社、ロット番号 EWP7032、100%) 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、細胞懸濁液に 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 4 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 1214390) を常法に従い調製し、これに非動化 (56°C、30 分間加熱処理) 仔牛血清 (Gibco Laboratories、ロット番号 1364502) 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、CO₂ インキュベーター (Napco 社) を用い、CO₂ 濃度 5%、空気 95%、温度 37°C、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分画 (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-549、2006 年 9 月 8 日製造、2006 年 11 月 8 日購入) し、-80°C 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 あたりの組成は、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: 209~260 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 日目: PB 60 mg/kg
 - 3 日目: PB 60 mg/kg + BF 80 mg/kg、4 日目: PB 60 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 (9000 × g) し、その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

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、45.31、90.63、181.25、362.5、725、1450 および 2900 μg/mL (10 mM 相当) の用量を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行った。なお、試験には各用量について 2 枚のシャーレを使用した。

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、次いで、原液の一部をアセトンで順次希釈して所定用量の供試液を調製した。被験物質の添加量は、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 4×10^5 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 をシャーレに加えて 24 時間および 48 時間培養した。なお、短時間処理法および連続処理法ともに 90.63 μg/mL 以上の用量ではその供試液を培養液に添加すると直ちに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。

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 vol%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。

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（モノセレーターII、MI-60、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、短時間処理法の場合は、S9 mix 非存在および存在下ともに50%を上回る細胞増殖抑制は認められなかった。連続処理法の場合は、24時間処理では362.5 $\mu\text{g/mL}$ 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181.25~362.5 $\mu\text{g/mL}$ 用量域にあるものと判断され、48時間処理では181.25 $\mu\text{g/mL}$ 以上で50%を上回る細胞増殖抑制が認められ、45.31 および 90.63 $\mu\text{g/mL}$ で50%近くの細胞増殖抑制を示した。

〔短時間処理法〕

用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
45.31	91	87	[89.0]	97	88	[92.5]
90.63	89	95	[92.0]	96	98	[97.0]
181.25	70	76	[73.0]	99	96	[97.5]
362.5	62	72	[67.0]	83	95	[89.0]
725	65	74	[69.5]	93	93	[93.0]
1450	73	73	[73.0]	95	98	[96.5]
2900	66	75	[70.5]	94	94	[94.0]

[] : 平均値

〔連続処理法〕

用 量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0.00 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
45.31	68	73	[70.5]	54	48	[51.0]
90.63	67	70	[68.5]	52	53	[52.5]
181.25	59	55	[57.0]	41	39	[40.0]
362.5	42	38	[40.0]	29	30	[29.5]
725	16	14	[15.0]	18	16	[17.0]
1450	15	15	[15.0]	12	10	[11.0]
2900	16	13	[14.5]	10	11	[10.5]

[] : 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、S9 mix 非存在および存在下ともに 2900 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公比 2 で 1450 および 725 $\mu\text{g/mL}$ の計 3 用量、また、連続処理法の場合は、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ことを考慮し、最高用量を 370 $\mu\text{g/mL}$ とし、以下公比 2 で 185、92.5 および 46.25 $\mu\text{g/mL}$ の計 4 用量とした。陽性対照物質の MNNG は 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、B[a]P は 10 $\mu\text{g/mL}$ 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、所定用量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 $\times 10^3$ 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。

短時間処理法の 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、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。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、被験物質供試液および B[a]P の供試液を各シャーレに 0.015 mL ずつ添加して培養した。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、被験物質供試液および MNNG の供試液を各シャーレに 0.025 mL ずつ加え、24 時間および 48 時間培養した。

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($\mu\text{g/mL}$)		使用シャーレ数	
		S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0	(陰性対照) ^a	4	4
725		4	4
1450		4	4
2900		4	4
2.5	(陽性対照) ^b	2	--
10	(陽性対照) ^c	--	2

a : アセトン、b : MNNG、c : B[a]P、使用シャーレ数 : 36

〔連続処理法〕

用量($\mu\text{g/mL}$)		使用シャーレ数	
		24 時間処理	48 時間処理
0	(陰性対照) ^a	4	4
46.25		4	4
92.5		4	4
185		4	4
370		4	4
2.5	(陽性対照) ^b	2	2

a : アセトン、b : MNNG、使用シャーレ数 : 44

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 275916) を最終濃度として $0.2 \mu\text{g/mL}$ 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 w/v% トリブシン水溶液 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、スライドガラスの2ヶ所に1滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、Sørensen 緩衝液(pH6.8、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 vol%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、MI-60、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

染色体の観察は60倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率600倍で鏡検した。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。構造異常および数的異常の総数は、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、さらに用量依存性が認められた場合、染色体異常誘発性は陽性と判定した。

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 1-1 に示す。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%と低値であった。被験物質群では 0 または 1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。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 93.5%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、2900 $\mu\text{g/mL}$ でのみ 0.5%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 1-2 に示す。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%と低値であった。被験物質群では 0 または 1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。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 39.5%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、陰性対照群では 0.5%の低い出現頻度で認められた。被験物質群および陽性対照群では認められなかった。

3. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

結果は表 2 に示す。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%と低値であった。被験物質群では 0 または 1.0%の出現頻度であり、陰性対照群との間に有意差は認められなかった。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 95.5%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、陰性対照群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、185 $\mu\text{g/mL}$ でのみ 1.0%の低い出現頻度で認められた。

結 論

2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンについて染色体異常誘発性の有無を調べるため、CHL/IU 細胞を用いた *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、2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)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⁾からみても陰性と判断されるものであった。

2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの変異原性については、*S. typhimurium* TA97, TA98, TA100 および TA1535 を用いた復帰突然変異試験で陰性との報告がある⁵⁾。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds 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 tests 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.
- 5) Errol Zeiger, et al. (1988). *Salmonella* mutation tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **11**, Supplement 12, 1-158.

表 1-1 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

被験物質		染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
の用量	観察	染色分体		染色体		その他	総異常	出現数	増殖率	観察	倍数体	その他	総異常
(μ g/mL)	細胞数	切断	交換	切断	交換		細胞数	(%)	(%)	細胞数			細胞数
陰性対照 0	100	1	0	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	2	0		200	0	0	0
	(0) (0.5) (0) (0) (0) (1.0) (0)									(0) (0) (0)			
725	100	0	2	0	0	0	2	0	77.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
	200	0	2	0	0	0	2	1		200	0	0	0
	(0) (1.0) (0) (0) (0) (1.0) (0.5)									(0) (0) (0)			
1450	100	0	0	0	0	0	0	0	83.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
	(0) (0) (0) (0) (0) (0) (0)									(0) (0) (0)			
2900	100	2	0	0	0	0	2	0	82.0	100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	2	0	0	0	0	2	0		200	1	0	1
	(1.0) (0) (0) (0) (0) (1.0) (0)									(0.5) (0) (0.5)			
陽性対照 2.5	100	30	90	2	0	0	92	0	—	100	0	0	0
	100	45	91	1	0	0	95	0		100	0	0	0
	200	75	181	3	0	0	187	0		200	0	0	0
	(37.5) (90.5) (1.5) (0) (0) (93.5)** (0)									(0) (0) (0)			

陰性対照:アセトン.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

表 1-2 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)ヘキサンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

被験物質		染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
の用量	観察	染色分体		染色体		その他	総異常	出現数	増殖率	観察	倍数体	その他	総異常
(μ g/mL)細胞数	細胞数	切断	交換	切断	交換		細胞数	(%)	(%)	細胞数			細胞数
陰性対照	100	0	1	0	0	0	1	0		100	1	0	1
	100	0	2	0	0	0	2	0	100.0	100	0	0	0
	200	0	3	0	0	0	3	0		200	1	0	1
		(0) (1.5) (0) (0) (0) (1.5) (0)		(0.5) (0) (0.5)									
725	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	87.5	100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		(0) (0) (0) (0) (0) (0) (0)		(0) (0) (0)									
1450	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0	91.5	100	0	0	0
	200	0	2	0	0	0	2	0		200	0	0	0
		(0) (1.0) (0) (0) (0) (1.0) (0)		(0) (0) (0)									
2900	100	0	2	0	0	0	2	0		100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	93.5	100	0	0	0
	200	0	2	0	0	0	2	0		200	0	0	0
		(0) (1.0) (0) (0) (0) (1.0) (0)		(0) (0) (0)									
陽性対照	100	13	38	3	1	0	43	0		100	0	0	0
	100	7	34	1	1	0	36	0	---	100	0	0	0
	200	20	72	4	2	0	79	0		200	0	0	0
		(10.0) (36.0) (2.0) (1.0) (0) (39.5)** (0)		(0) (0) (0)									

陰性対照:アセトン.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

**: $p < 0.01$.

表 2 2,5-ジメチル-2,5-ジ(tert-ブチルペルオキシ)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 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	1	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0
	100	0	2	0	0	0	2	0		100	0	0	0
	200	0	3	0	0	0	3	0		200	0	0	0
		(0)	(1.5)	(0)	(0)	(0)	(1.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
46 .25	100	0	1	0	0	0	1	0	75.0	100	0	0	0
	100	0	1	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	200	0	2	0	0	0	2	0		200	0	0	0
		(0)	(1.0)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)			(0)	(0)	(0)
92 .5	100	0	0	0	0	0	0	0	73.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0)	(0)	(0)
185	100	0	0	0	0	0	0	0	64.5	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	2	0	2
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	2	0	2
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(1.0)	(0)	(1.0)
370	100	0	0	0	0	0	0	0	46.0	100	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0)	(0)	(0)
陽性対照	100	38	98	1	0	0	98	0	---	100	0	0	0
	100	21	91	1	0	0	93	0		100	0	0	0
	200	59	189	2	0	0	191	0		200	0	0	0
		(29.5)	(94.5)	(1.0)	(0)	(0)	(95.5)**	(0)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:アセトン.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

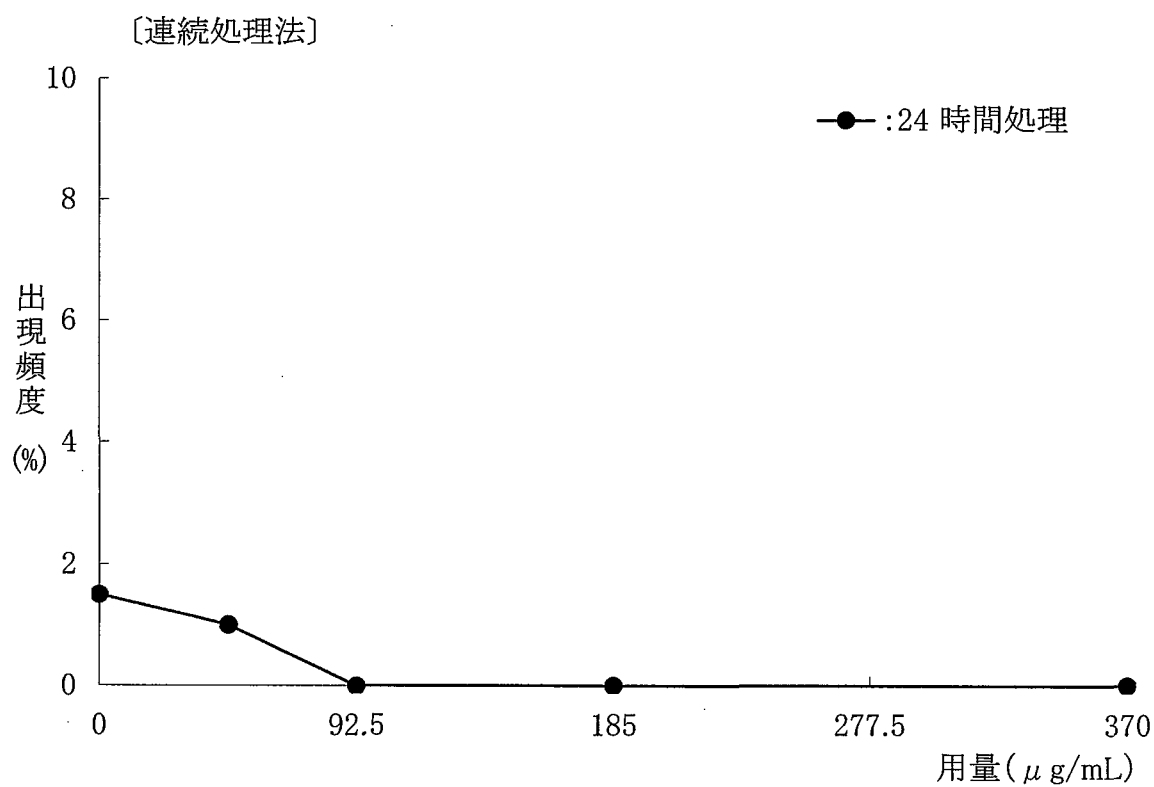
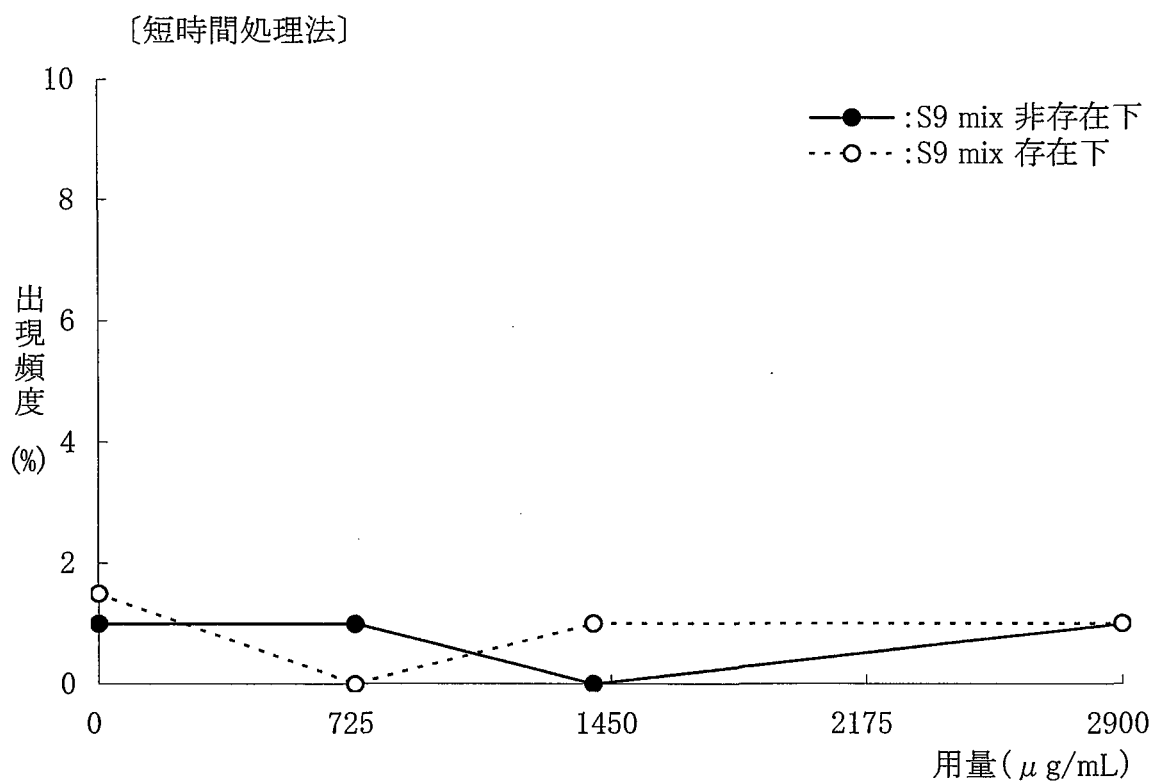


図 1 構造異常を有する細胞の出現頻度

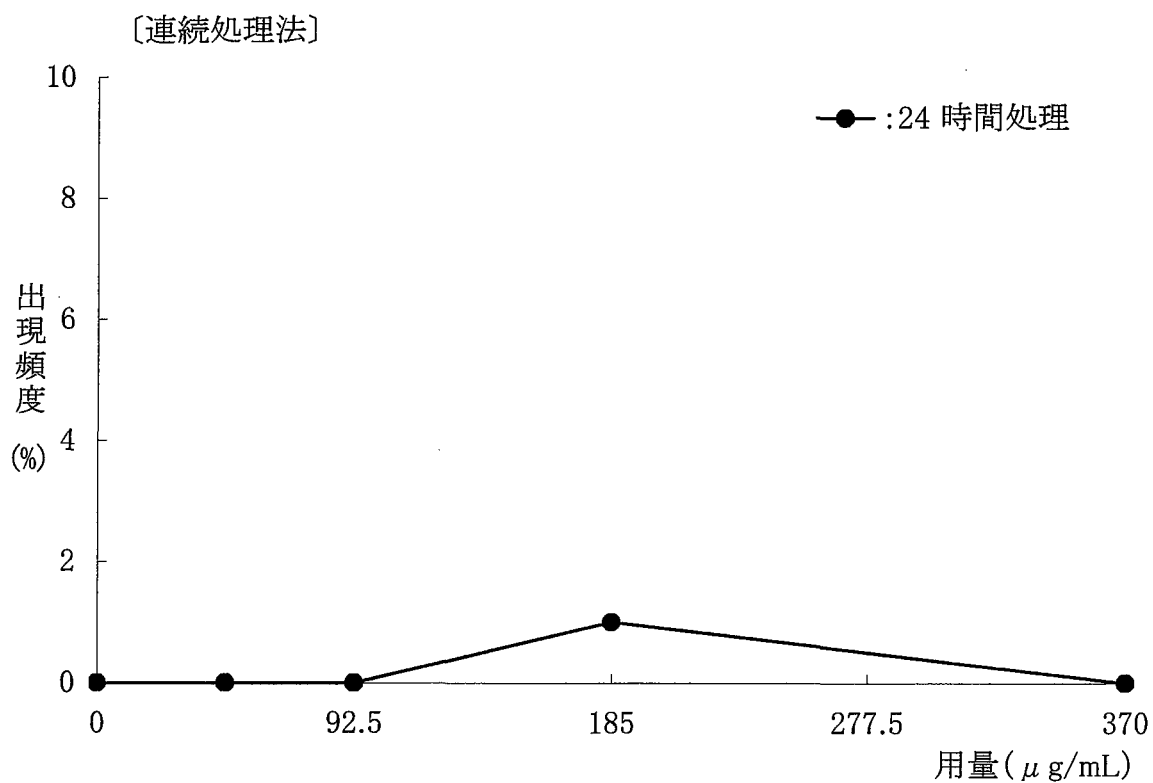
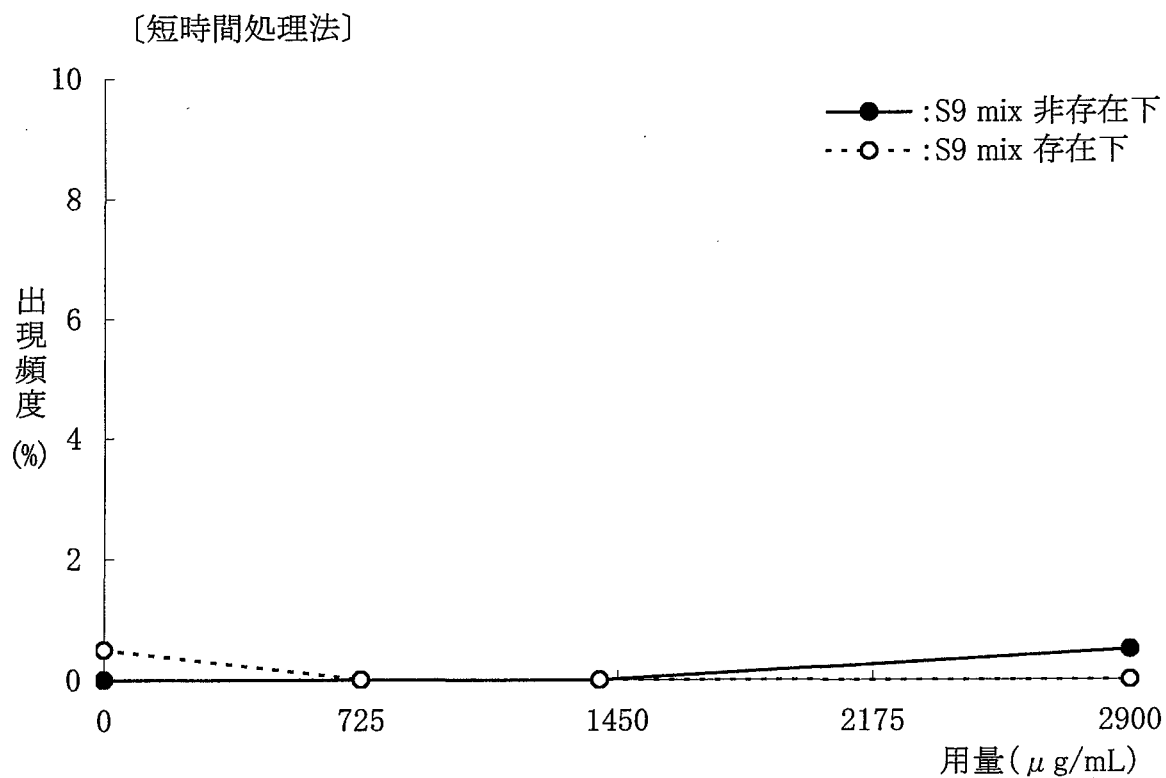


図 2 数的異常を有する細胞の出現頻度