

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	2,4-ジフェニル-4-メチル-1-ペンテン		
別名	1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene		
C A S 番号	6362-80-7		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分子量	236.36		
試験に供した新規化学物質の純度	96.97%		
試験に供した新規化学物質のロット番号	412220		
不純物の名称 及び含有率	2,4-Diphenyl-4-methyl-2-pentene	2.54%	
	1,1,3-Trimethyl-3-phenylindan	0.24%	
	α -MS	0.07%	
蒸気圧	11 Pa (170°C)		
対水溶解度	10 ppm		
1-オクタノール/水分配係数	-		
融点	-82°C		
沸点	310°C		
常温における性状	無色透明の液体でスチレン臭		
安定性	常温・常圧で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	DMSO	482.4 mg/mL以上*	**
備考	* : 試験施設にて溶解度を確認 ** : 482.4 mg/mL DMSO溶液に発熱, 発泡は認められず.		

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

- 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
- 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 細胞の種類－培養条件

細胞名	CHL/IU	入手先	大日本製薬株式会社 ラボラトリープロダクツ部		
種	チャイニーズハムスター	入手年月日	2000年 11月 28日		
培養液	イーグルのMEM粉末を指定の調製方法に従って溶液とし、メンブランで濾過したもの	製造元	GIBCO		
血清の種類と添加量	仔牛 10%	製造元 (Lot No.)	GIBCO (472959)		
細胞周期	16.5 h	凍結条件	-196 °C		
継代数	15	培養条件	容器	プラスチックシャーレ	
染色体数 (モード)	25本		温度	37 °C	
			CO ₂ 濃度	5%	
備考	—				

3. S9 mix

(1) S9の入手方法等 (該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

自製・購入の別	1.自製 ○2.購入 (製造元: オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2004年 10月 1日製造
購入の場合のLot No.	04100107
保存温度	-80 °C

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質			
種・系統	ラット, Crj:CD (SD)	名 称	Phenobarbital (PB) 5,6-Benzoflavone (BF)		
性	雄	投与方法	i.p.		
週 齢	7 週	投与期間及び投与量	1日目	PB	0.03 g/kg
体重 (匹数)	210.5±8.8 g (63匹)	(g/kg体重)	2,3,4日目	PB	0.06 g/kg
			3日目	BF	0.08 g/kg

(3) S 9 m i x の組成

成分	S 9 mix 1mL中の量	成分	S 9 mix 1mL中の量
S9	0.3 mL	NADP	4 μ mol
MgCl ₂	5 μ mol	Na-リン酸緩衝液	— μ mol
KCl	33 μ mol	その他 (HEPES緩衝液*)	4 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol	注射用水	総量を1mLとする.

*pH 7.2

(4) S 9 m i x の処理条件(該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

① プレート法	2. 浮遊細胞法	3. その他 ()
S 9 量 (最終濃度)	5 %	
S 9 蛋白量 (最終濃度)	1.250 mg/mL	
処 理 時 間	6 h	
回 復 時 間	18 h	
備 考	—	

4. 被験物質溶液の調製 (被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと.)

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度
	ジメチルスルホキシド	株式会社同仁化学研究所	PU140	紫外部吸収 バケル用	100.0 %
溶媒選択の理由	ジメチルスルホキシド(DMSO)は、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で一般的に用いられており、被験物質が容易に溶解するため。				
被験物質溶液の性状	○溶解 懸濁 その他 ()				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	—				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	— 時間 — 分 — °C 細胞増殖抑制試験, 染色体異常試験 (短時間処理法, 連続処理法) とも用時調製				
純度換算の有無	有 ○無				

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2005年 2月 28日から 2005年 3月 1日	2005年 2月 28日から 2005年 3月 1日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 60 mm	直径 60 mm
	培 養 液 量	3.0 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	1	1
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/5mL	2.0×10^4 個/5mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	0.015 mL/培養器	0.015 mL/培養器
	S 9 mix 添 加 量		0.5 mL/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5 %
	S 9 蛋 白 の 最 終 濃 度		1.250 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
細胞増殖抑制測定法	血球計算盤を使用		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (6 - 18 h)		代謝活性化法による場合 (6 - 18 h)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.00469	97	0.00469	100
0.00938	97	0.00938	96
0.0188	95	0.0188	94
0.0375	80	0.0375	88
0.075	36	0.075	65
0.150	0	0.150	38
0.300 [†]	0	0.300 [†]	16
0.600 [†]	0	0.600 [†]	0
1.200 [†]	0	1.200 [†]	0
2.400 [†]	0	2.400 [†]	0

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記入すること。

[†]代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合とも、0.300 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（油状）が認められた。

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2005年 3月 14日から 2005年 3月 15日	2005年 3月 14日から 2005年 3月 15日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 60 mm	直径 60 mm
	培 養 液 量	3.0 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2	2
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/5mL	2.0×10^4 個/5mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.015 mL/培養器	0.015 mL/培養器
	S 9 mix 添加量		0.5 mL/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5 %
	S 9 蛋白の最終濃度		1.250 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表1-1, 1-2による.)

6. 連続処理法による試験

(短時間処理法による試験で陰性と判定された場合に試験を実施すること.)

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		2005年 2月 28日から 2005年 3月 1日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	
	大 き さ	直径 60 mm	
	培 養 液 量	5.0 mL/培養器	mL/培養器
	用量当たりの培養器数	1	
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/5mL	個/mL
	前 培 養 日 数	3 日間	日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.025 mL/培養器	mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	h
	回 復 時 間	0 h	h
細胞増殖抑制 測定法	血球計算盤を使用		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(24 - 0h) 処理による場合		(- h) 処理による場合	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100		
0.00469	95		
0.00938	91		
0.0188	68		
0.0375	35		
0.075	0		
0.150	0		
0.300 [†]	0		
0.600 [†]	0		
1.200 [†]	0		
2.400 [†]	0		

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。
 連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。
 細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記入すること。
[†]0.300 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（油状）が認められた。

(3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		2005年 3月 17日から 2005年 3月 18日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	
	大 き さ	直径 60 mm	
	培 養 液 量	5.0 mL/培養器	mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2	
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/ 5mL	個/ mL
	前 培 養 日 数	3 日間	日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	0.025 mL/培養器	mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	h
	回 復 時 間	0 h	h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表2による.)

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと.)		陽性		陰性				
判定の理由 本被験物質は、短時間処理法（代謝活性化によらない場合及び代謝活性化による場合）及び連続処理法（24時間処理）とも構造異常・数的異常の出現率は5%未満で、用量に伴う増加も認められなかった。 なお、本試験で用いた陽性対照物質は明らかな陽性結果を示し、陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、背景データの範囲内にあり、試験条件を満たすものであったことから、試験系に影響した他の要因がなく、試験が適切に実施されたことが確認された。 また、染色体異常試験と同時に行った各処理濃度における生細胞数の測定結果は、用量設定試験として実施した細胞増殖抑制試験の結果を再現し、染色体異常試験が適切な濃度で実施されたことを確認した。 以上の結果より、本被験物質は陰性と判断した。								
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h処理	—	mg/mL	
			+S9 mix	—	h処理	—	mg/mL	
		連続処理法	/		—	h処理	—	mg/mL
					—	h処理	—	mg/mL
	数的異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h処理	—	mg/mL	
			+S9 mix	—	h処理	—	mg/mL	
		連続処理法	/		—	h処理	—	mg/mL
					—	h処理	—	mg/mL

[備考] D₂₀値は分裂中期像20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量であり、陽性と判定した試験系列について、異常のタイプ別に記入すること。

(2) 参考事項

[用量設定理由]

染色体異常試験の実施に先駆けて、試験濃度設定のために細胞増殖抑制試験を実施した。細胞増殖抑制試験の試験濃度は「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成15年11月21日）に基づき、10mMの2.400 mg/mLを最高濃度として、以下公比2で計10濃度を設定した。すなわち、0.00469, 0.00938, 0.0188, 0.0375, 0.075, 0.150, 0.300, 0.600, 1.200及び2.400 mg/mLとした。

細胞増殖抑制試験の結果から、Probit法で求めた被験物質の50%細胞増殖抑制濃度（IC₅₀）は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では0.0526 mg/mL、代謝活性化による場合では0.1015 mg/mLであった。一方、連続処理法（24時間処理）では0.0239 mg/mLであった。このことから、染色体異常試験の試験濃度は、IC₅₀及び細胞の生存率を指標に、公比2により5段階設定した。すなわち、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では、0.00625, 0.0125, 0.025, 0.050及び0.100 mg/mL、代謝活性化による場合では、0.0125, 0.025, 0.050, 0.100及び0.200 mg/mLとした。連続処理法（24時間処理）では、0.00313, 0.00625, 0.0125, 0.025及び0.050 mg/mLとした。

[被験物質の析出]

被験物質の析出は、短時間処理法及び連続処理法とも、細胞増殖抑制試験では0.300 mg/mL以上の濃度において認められたが、染色体異常試験ではすべての濃度において認められなかった。

[染色体異常の観察及び結果判定の方法]

1シャーレあたり100個、1濃度あたり200個の分裂中期像を観察した。染色体の異常については、数的異常として倍数体及び核内倍化を記録した。また、構造的異常として染色分体切断、染色分体交換、染色体切断、染色体交換及びその他に分類し、これらの異常を1つでも有する細胞を陽性細胞1個として記録した。

結果の判定は、石館の方法を用いて行った。

[備考]「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

別表 1-1 染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質の名称: 2,4-ジブフェニル4-メチル1-ペンテン

処理時間 (hr)	S9 mix	被験物質の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数 (出現頻度%)							細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数			総異常細胞数 (%)		
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	その他	総異常数 (%)		ギャンプの出現数	倍數体	その他		出現頻度 (%)	
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	0	0	0	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
6-18	-	0.00625	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	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
6-18	-	0.0125	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	2	0	0	0	0	0	2 (1.0)	0	0	0	0	0	0
6-18	-	0.025	100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	2	0	0	0	0	0	2 (1.0)	0	0	0	0	0	0
6-18	-	0.050	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	-	0.100	100	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6-18	-	陽性対照 (MMC) 0.0001	100	26	31	0	0	0	0	0	0	46	0	0	0	0
			100	31	41	0	0	0	0	0	0	0	59	0	0	0
			200	57	72	0	0	0	0	0	0	0	105 (52.5)	0	0	0

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に↑印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethyl sulfoxide
MMC; Mitomycin C

別表 1-2 染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質の名称: 2,4-ジブフェニル-4-メチル-1-ペンテン

処理時間 (hr)	S9 mix	被験物質の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数 (出現頻度%)										細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)						
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	染色体交換	染色体切断	染色体交換	染色体交換	染色体切断		染色体交換	染色体交換	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	染色体切断
6-18	+	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	観察細胞数	倍數体	その他	総異常細胞数 (%)
			100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1	0	0	1
			200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	2	0	0	2 (1.0)
6-18	+	0.0125	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	200	0	0	0	0 (0)
6-18	+	0.025	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	71	100	1	0	0	1	
			100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	71	100	0	0	0	0	
			200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	71	200	1	0	0	1 (0.5)	
6-18	+	0.050	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49	100	0	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49	100	0	0	0	0	
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49	200	0	0	0	0 (0)	
6-18	+	0.100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	100	0	0	0	0	
			100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	30	100	1	0	0	1	
			200	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	30	200	2	0	0	2 (1.0)	
6-18	+	0.200	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83	100	2	0	0	2	
			100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	83	100	0	0	0	0	
			200	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	83	200	2	0	0	2 (1.0)	
6-18	+	陽性対照 (DMN) 0.500	100	24	48	0	0	0	0	0	0	0	0	83	100	1	0	0	1	
			100	42	59	0	0	0	0	0	0	0	0	83	100	0	0	0	0	
			200	66	107	0	0	0	0	0	0	0	0	83	200	1	0	0	1 (0.5)	

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の折出が認められた場合、その用量に*印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethyl sulfoxide
DMN; Dimethyl nitrosamine

別表2 染色体異常試験の結果(連続処理法)

被験物質の名称: 2,4-ジブフェニル4-メチル1-ペンテン

処理時間 (hr)	被験物質 の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数(出現頻度%)							ギャップの 出現数	細胞着産率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	染色体交換	その他			総異常数 (%)	観察細胞数	倍數体	その他
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	100	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)		200	0	0	0 (0)
24-0	0.00313	100	0	0	0	0	0	0	0	98	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
		200	0	0	0	0	0	0	0 (0)		200	1	0	1 (0.5)
24-0	0.00625	100	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	0	1		100	1	0	1
		200	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)		200	1	0	1 (0.5)
24-0	0.0125	100	0	0	0	0	0	0	0	82	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)		200	1	0	1 (0.5)
24-0	0.025	100	0	1	0	0	0	0	1	48	100	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
		200	0	1	0	0	0	0	1 (0.5)		200	0	0	0 (0)
24-0	0.050	100	1	0	0	0	0	0	1	27	100	1	0	1
		100	1	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
		200	2	0	0	0	0	0	2 (1.0)		200	1	0	1 (0.5)
24-0	陽性対照 (MMC)	100	23	36	0	0	0	0	48	85	100	0	0	0
		100	24	31	0	0	0	0	45		100	0	0	0
		200	47	67	0	0	0	0	93 (46.5)		200	0	0	0 (0)

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に「印」を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethyl sulfoxide
MMC; Mitomycin C

图1 細胞增殖抑制試驗結果

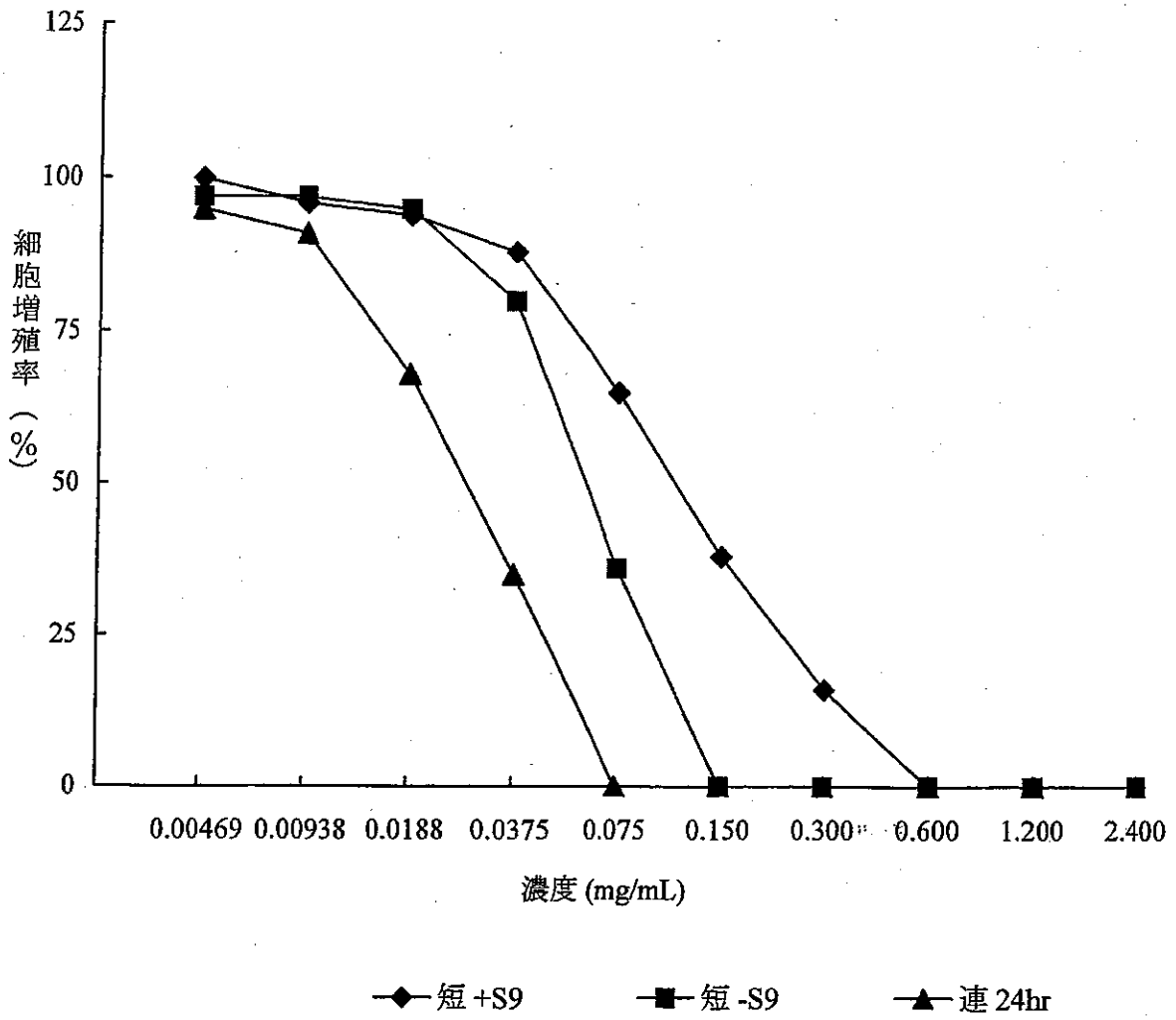
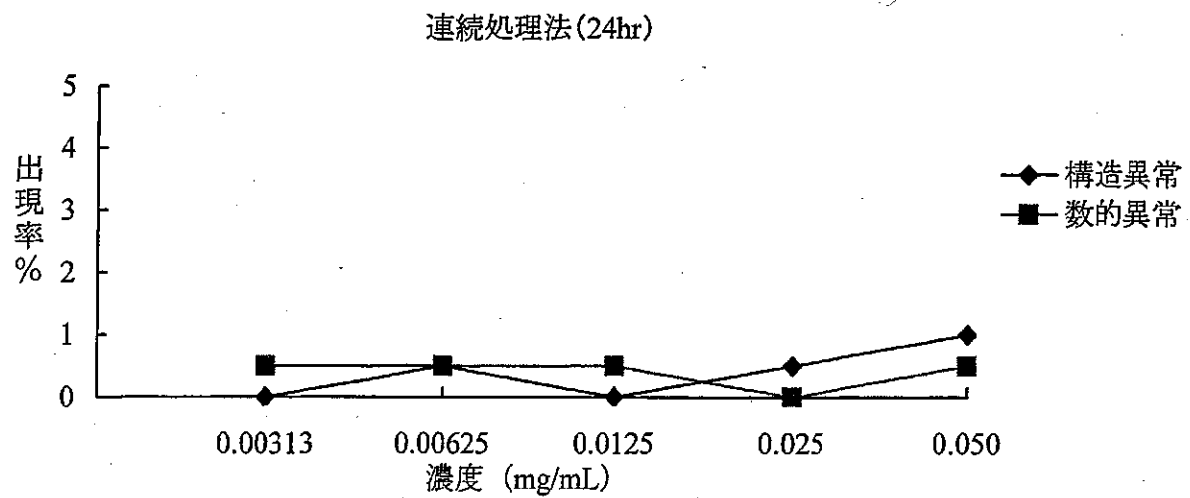
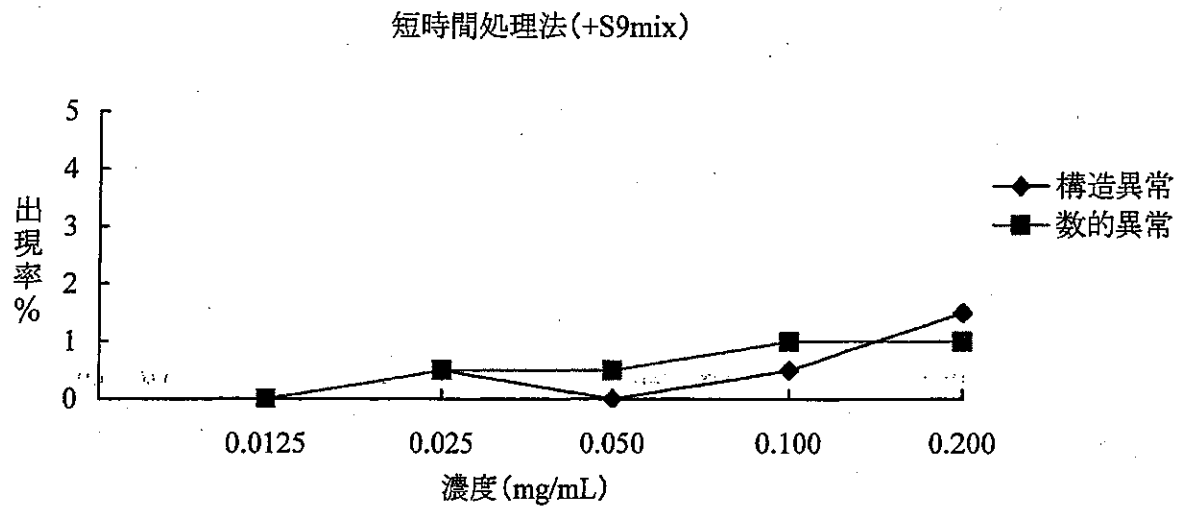
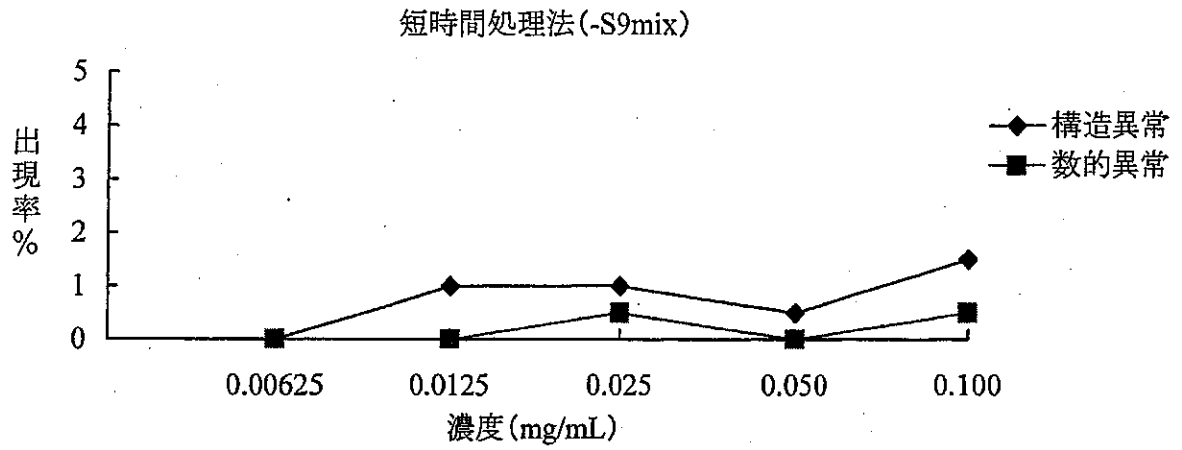


圖2 用量反應曲線

Study No. 971024



被験物質名：2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテン (CAS No.6362-80-7)

試験系：チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/TU細胞)

試験委託者：厚生労働省 医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設：株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所
岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地

試験目的：2,4-ジフェニル4-メチル-1-ペンテンのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無について検討した。

準拠したガイドライン：

「OECD/化学品テストガイドライン、473 In vitro 哺乳類動物細胞を用いる染色体異常試験」(1997年7月21日採択)、平成15年11月21日付(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)「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験」

遵守した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(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)並びにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE (OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

試験開始日：2005年 1月 31日

試験終了日：2006年 11月 13日

試験実施日：試験系細胞の再培養実施日 (実験開始日)	2005年 2月 15日
細胞増殖抑制試験	
細胞播種日	2005年 2月 25日
検体液添加日	2005年 2月 28日
細胞数測定日	2005年 3月 1日
染色体異常試験	
1) 短時間処理法	
細胞播種日	2005年 3月 11日
検体液添加日	2005年 3月 14日
標本作製及び細胞数測定日	2005年 3月 15日

要 約

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

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

c): ctb: chromatid break; csc: chromosome break; ctc: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

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

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

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

Test substance	Concentration (µg/mL)	Time of treatment (hr)	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)			
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{b)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)		No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)		Judgement ^{b)}							
								gap	ctb	ctc	cse	fig	(+g)		(-g)	(+g)	(-g)				
Negative control	—	24	200	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	3.13	24	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98
	6.25	24	200	1	0	0.5	—	0	0	0	1	0	1	1	0.5	0.5	—	—	—	—	100
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	12.5	24	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	82
	25	24	200	0	0	0	—	0	0	0	1	0	1	1	0.5	0.5	—	—	—	—	48
Mitomycin C	50	24	200	1	0	0.5	—	0	2	0	0	0	2	2	1.0	1.0	—	—	—	—	27
	0.05	24	200	0	0	0	—	0	47	0	67	0	0	93	46.5	46.5	—	—	—	—	85

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

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

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

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

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

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

The short treatment method
 ◆ Treated for 6hr with S9 mix
 ■ Treated for 6hr without S9 mix
 The continuous treatment method
 ▲ Treated for 24hr

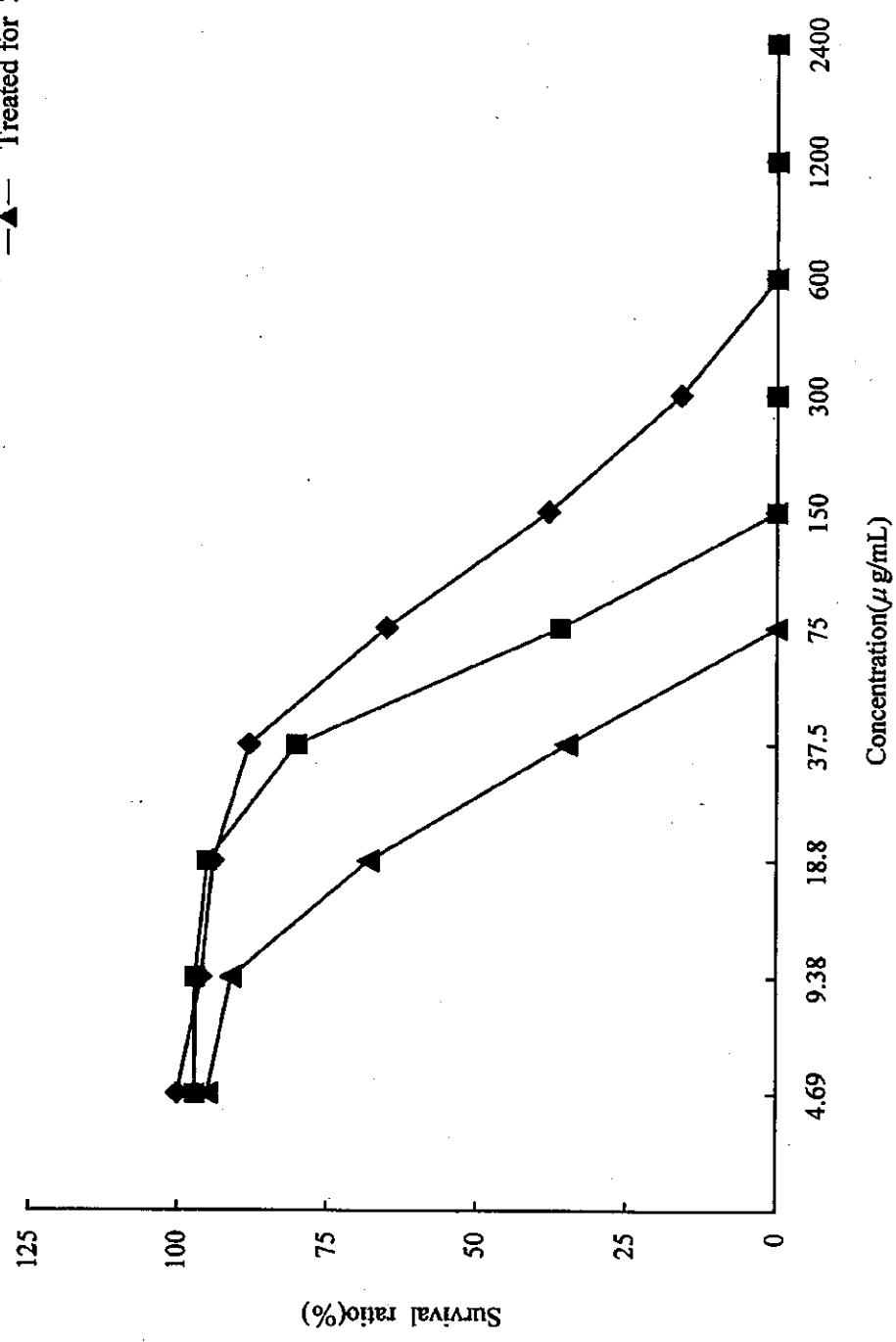


Figure 1. Cell growth inhibition test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in cultured CHL cells.

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

Test substance	Concentration (μg/mL)	With (+) or without (-) S9 mix	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations											Survival ratio ^{a)} (%)								
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ¹⁾ (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)				No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)	Judgement ^{b)}	Survival ratio ^{a)} (%)											
								gap	ctb	ctc	cse	fig	(+g)				(-g)	(+g)		(-g)							
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	-	+	100	1	0	1.0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
	12.5	+	100	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	
	25	+	100	1	0	0.5	-	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	50	+	100	1	0	0.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	71
	100	+	100	1	0	1.0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49
	200	+	100	2	0	1.0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30
Dimethylnitrosamine	500	+	100	1	0	0.5	-	0	24	0	48	0	0	62	62	0	0	0	0	0	0	0	68.5	68.5	68.5	0	83
			100	0	0			0	42	0	59	0	0	75	75	0	0	0	0	0	0	0				0	83

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.
 b): Judged on the basis of incidence as: -; negative (less than 5.0%); ±; equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +; positive (10.0% or higher).
 c): ctb: chromatid break; csc: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.
 d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.
 e): {1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene treated group or positive control / negative control} × 100.
 (+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

Appendix 1-2. Chromosomal aberration test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene in cultured CHL cells
 -The short treatment method-

Test substance	Concentration (µg/mL)	With (+) or without (-) S9 mix	No. of metaphase examined	No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)			
								Types ^{c)} and numbers (cumulative)							No. of cells with chromosome aberration				Incidence ^{d)} (%)	Judgement ^{b)}	
								gap	ctb	csb	cte	cse	fig	frg	(+g)	(-g)	(+g)				(-g)
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	-	-	100	0	0	0.5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene	6.25	-	100	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98
	12.5	-	100	0	0	0	-	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1.0	1.0	1.0	1.0	98
	25	-	100	0	0	0.5	-	0	2	0	0	0	0	2	2	2	1.0	1.0	1.0	1.0	82
	50	-	100	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	53
Mitomycin C	100	-	100	0	0	0.5	-	0	2	0	0	0	0	2	2	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	31
	0.1	-	100	0	0	0	-	0	26	0	31	0	0	46	46	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	89

a) : (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.
 b) : Judged on the basis of incidence as; -: negative (less than 5.0%) ; ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%) ; +: positive (10.0% or higher) .
 c) : ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.
 d) : (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.
 e) : {1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl)bisbenzene treated group or positive control / negative control} × 100.
 (+g) : Total aberrant cells including the gap; (-g) : total aberrant cells excluding the gap.

Appendix 2. Chromosomal aberration test of 1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene in cultured CHL cells
 —The continuous treatment method—

Test substance	Concentration (µg/mL)	Time of treatment (hr)	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)					
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)		No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)	Judgement ^{b)}										
								gap	ctb	ctb	cse			ctc	cse	fig	(+g)		(-g)				
Negative control	—	24	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
(Dimethyl sulfoxide)			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	3.13	24	100	0	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98
	6.25	24	100	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene	12.5	24	100	0	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	82
	25	24	100	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	48
	50	24	100	1	0	0.5	—	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27
Mitomycin C	0.05	24	100	0	0	0	—	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
			100	0	0	0	—	0	23	0	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
			100	0	0	0	—	0	24	0	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.
 b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%); ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).
 c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; ctc: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.
 d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.
 e): {1,1'-(1,1-dimethyl-3-methylene-1,3-propanediyl) bisbenzene treated group or positive control / negative control} × 100.
 (+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.