

食薬七研第 11-1751 号

2001 年 7 月 31 日

1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼンの
チャイニーズ・ハムスター培養細胞を
用いる染色体異常試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人 食品薬品安全センター

秦野研究所

[目 次]

	頁
要 約 -----	1
緒 言 -----	2
材料と方法 -----	2
1. 被験物質 -----	2
2. 陽性対照物質 -----	3
3. 細胞 -----	3
4. S9 反応液 -----	3
5. 細胞増殖抑制試験 -----	4
6. 染色体異常試験 -----	4
7. 染色体分析 -----	5
結果および考察 -----	6
参考文献 -----	7
Table 1 -----	8
Table 2 -----	9
Table 3 -----	10
Fig. 1 -----	11

[要 約]

1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼンの CHL/IU 細胞 (チャイニーズ・ハムスター、肺由来) を用いる染色体異常試験を実施した結果、陽性の結果が得られた。

S9 mix 非存在下 (MEM 培地中) および存在下 (MEM 培地の代わりに S9 反応液を使用) で短時間処理 (6時間処理後 18時間の回復時間) した場合、50%を越える増殖抑制作用は認められなかった。一方、連続処理 (新鮮培地中で 24時間処理) した場合、50%の増殖抑制濃度は 0.90 mg/mL となった。

このことから染色体異常試験では、すべての処理群においては、1.3 mg/mL (10 mM) の濃度を最高処理濃度とし、公比 2 で計 4ないし 5濃度を設定し、試験を実施した。

染色体分析の結果、S9 mix 存在下で短時間処理した場合には、染色体の構造異常を誘発しなかったが、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合および連続処理 (24時間) した場合には、染色体の構造異常を誘発した。また、倍数性細胞については、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合にのみ、有意な増加が認められた。

[緒 言]

化学物質の遺伝毒性を評価するための短期検索法の一つとして、哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験がある。化学物質によって誘発される染色体異常には、大別して構造異常(ギャップ、切断、交換)と数的異常(倍数性細胞、異数性細胞)があり、前者はDNA傷害、後者は細胞の分裂機構の異常などを反映している。本試験で用いた CHL/IU 細胞は、染色体数が少なく、一般的に化学物質に対して染色体異常の検出感度が高いため、染色体異常試験によく用いられる。

変異原物質の細胞内の標的(DNA または紡錘糸など)に対する作用は、直接作用する場合と、代謝活性化されて変異原活性が現れる場合に大別される。しかしながら、試験管内の変異原性試験に用いる微生物や培養細胞では、代謝活性化能が無いかあるいはあっても活性が低いことから、一般的にはラットの肝臓から調製した肝ホモジネート 9000 ×g 上清(S9)を化学物質の代謝活性化を検出するために用いる。染色体異常試験においては、直接作用を検出するための処理系列として、S9 mix 非存在下での短時間処理に加えて連続処理があり、代謝活性化作用をみるための処理系列として S9 mix 存在下での短時間処理がある。

OECD 既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼンの細胞遺伝学的影響を評価するため、CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験を実施した。なお本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 9 年 10 月 31 日、環保安第 287 号、衛生第 127 号、平成 09・10・31 基局第 2 号)および「OECD 毒性試験ガイドライン: 473」に準拠し、「化学物質 GLP」(昭和 59 年 3 月 31 日、環保業第 39 号、薬発第 229 号、59 基局第 85 号、改訂昭和 63 年 11 月 18 日、環企研第 233 号、衛生第 38 号、63 基局第 823 号)に基づいて実施した。

[材料と方法]

1. 被験物質

被験物質である 1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼン(略称: BTO、CAS No. 108-73-6)の物理化学的性状等を Appendix 1 に示した。BTO は から提供された後、

室温で保管した。また、被験物質原体は、試験期間中安定であったことが
により確認された (Appendix 2)。

溶解性の予備検討の結果、水に溶解することから、局方注射用水 (ロット番号 : K8L76
および K9K79、大塚製薬工場) に被験物質を溶解して試験に用いた。

2. 陽性対照物質

陽性対照物質として用いたマイトマイシン C (MC、ロット番号 : 263AIC、協和醗酵工
業) およびシクロホスファミド (CPA、ロット番号 : 108H0568、Sigma Chemical) は局
方注射用水 (ロット番号 : K9K79、大塚製薬工場) に溶かし、用時調製して試験に用いた。

3. 細胞

CHL/IU 細胞 (JCRB 細胞バンクより入手) は、仔牛血清 (ロット番号 : 28110754、
Cansera International) を 10 vol% 含むイーグル MEM 培地 (日水製薬) を用い、CO₂ イ
ンキュベーター (5% CO₂、37℃) 内で培養した。また、解凍後継代 10 代以内で試験に用
いた (親株の継代数は、1988 年 2 月に入手した時点で 4 代、現在は 21 代)。

4. S9 反応液

S9 (ロット番号 : RAA-417 および RAA-423、1999 年 12 月製造および 2000 年 3 月製造、
キッコーマン) は、フェノバルビタールと 5, 6-ベンゾフラボンを投与した 7 週齢の雄
Sprague-Dawley 系ラットの肝臓から調製したものを購入し、使用時までディープフリー
ザー (-80℃) に保管した。グルコース-6-リン酸 (G-6-P、Sigma Chemical)、β-ニコチ
ンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (β-NADP⁺、オリエンタル酵母工業) および KCl
を蒸留水に溶かし、混合液としてディープフリーザー (-80℃) に保管し、使用時はこれ
に S9、MgCl₂ および HEPES buffer (pH 7.2) を加え、S9 mix とした。S9 mix 存在下で
短時間処理する場合、S9 mix、2 倍濃度 MEM 培地 (血清不含で、S9 mix と被験物質調製
液の添加量の合計と等量) および MEM 培地 (血清不含) を混和して S9 反応液 (被験物質調
製液を 10 vol% で添加したときの各成分の最終濃度 : 5 vol% S9、0.83 mM G-6-P、0.67
mM β-NADP⁺、0.83 mM MgCl₂、5.5 mM KCl、0.67 mM HEPES) とした。一方、S9
mix 非存在下で短時間処理する場合は、S9 反応液の代わりに MEM 培地に 2 倍濃度 MEM

培地(被験物質調製液の添加量と等量)を混合したものを使用した。

5. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖におよぼす影響を調べた。CHL/IU細胞を0.25%トリプシンを用いてはがした後、 4×10^3 個/mLの細胞懸濁液とし、その5 mL (2×10^4 個)をプラスチックディッシュ(直径6 cm)に播種して3日間培養した。

S9 mix存在下で短時間処理する場合、S9反応液2.7 mLと培地交換した後、被験物質調製液を0.3 mLずつ添加し6時間処理した。リン酸緩衝塩類溶液(Ca^{2+} および Mg^{2+} を含む)で洗浄後、新鮮培地に交換し、さらに18時間培養した。一方、S9 mix非存在下で短時間処理する場合、S9反応液の代わりにMEM培地を用いた以外の操作は、S9 mix存在下の処理と同様に行った。また、連続処理においては、新鮮培地4.5 mLと培地交換した後、被験物質調製液を0.5 mLずつ添加し24時間処理した。全ての処理系列において、0.041 ~ 1.3 mg/mL (10 mM)の濃度範囲(公比2)で処理した。

培養終了後、10 vol%ホルマリン溶液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計(Monocellater™、オリンパス光学工業)を用い、陰性(局方注射用水)対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測した。1濃度あたり2枚のディッシュを用いた。

6. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験において、高濃度で短時間処理した場合、BTOはCHL/IU細胞の増殖を抑制したが、50%を越える程の増殖抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。一方、24時間連続処理した場合、50%の増殖抑制濃度は0.90 mg/mLとなった(Fig. 1)。

このことから染色体異常試験において、すべての処理群において1.3 mg/mL (10 mM)を最高処理濃度とし、以下公比2で計4ないし5濃度を設定して試験を実施した。しかしながら、S9 mix存在下の短時間処理群においては、設定した4濃度群では観察可能な3濃度群が得られなかったことから、1.3 mg/mL (10 mM)を最高処理濃度とし、以下公比2で計5濃度を再設定して試験を実施した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュ(ただし、無処理対照群および

陽性対照群では2枚)を用い、そのうちの2枚より染色体標本を作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。試験操作は、細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。すべての処理系列で被験物質処理群、陰性(局方注射用水)対照群と陽性対照群を設けた。また、無処理対照群も設けた。陽性対照群については、S9 mix 非存在下の短時間処理および連続処理では、MC(原液濃度:20 µg/mL)を最終濃度がそれぞれ0.1 µg/mLおよび0.05 µg/mLとなるように添加した。S9 mix 存在下の短時間処理では、CPA(原液濃度:1 mg/mL)を最終濃度が5 µg/mLとなるように添加した。

染色体標本作製のディッシュについては、培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が0.1 µg/mLとなるように添加した。培養終了後、培地を除き、0.02% EDTAを含むリン酸緩衝塩類溶液(Ca²⁺ および Mg²⁺ を含まない)を加えて細胞をはがし、15 mLの遠沈管に集め、遠沈した(1000 ~ 1500 rpm、5分)。上清を捨てた後、沈殿した細胞に0.075 M KCl 水溶液3 mLを加え、30分間低張処理を行った。低張処理後、固定液(メタノール:氷酢酸=3:1 v/v)を6 mL加え遠沈した後、上清を除き、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。固定液の交換を数回行った後、少量の固定液で細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス(あらかじめフロスト部分に試験系識別番号、コード番号およびスライド番号を記入)上に滴下し、そのまま風乾した。1ディッシュあたり6枚のスライド標本作製した。

3%ギムザ液(pH 6.8の1/15 Mリン酸緩衝液で希釈調製)でスライド標本を染色後、蒸留水ですすいで風乾した。試験計画番号、試験系識別番号および標本作製の日付を明示したスライドケースに、スライド標本をコード番号順に入れて保存した。

7. 染色体分析

染色体分析に先立って、各処理系列の相対増殖率および分裂指数を調べ、20%以上の相対増殖率で、かつ2ディッシュともに0.5%以上の分裂指数の場合を観察可能と判断した。また、染色体の構造異常については、日本環境変異原学会・哺乳動物試験研究会(JEMS・MMS)¹⁾による分類法に基づいて分類した。ただし、ギャップについては、染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義し、構造異常誘発性の判定には含めないこととした。染色体分析においては、染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を観察した。各群ごとに、観察細胞数、染色体型および染色分体型の構造異常の種類と数、倍数性細胞の数

を記録用紙に記入した。ディッシュ 1枚から得られたスライド標本 4枚を、4人の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化して分析した。構造異常は 1群 200個 (ディッシュあたり 100個)、倍数性細胞は 1群 800個 (ディッシュあたり 400個) の分裂中期細胞を分析した。

構造異常 (ギャップを除く) を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性 (溶媒) 対照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法²⁾ ($p < 0.01$) により有意差検定を実施した。また、コ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³⁾ ($p < 0.01$) により用量依存性の有無を検討した。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

[結果および考察]

染色体分析に先立ち、細胞増殖率および分裂指数の測定を行った結果 (Table 1~3)、染色体分析が可能な最高濃度は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では、それぞれ 1.3 mg/mL および 0.33 mg/mL となった。連続処理では、0.33 mg/mL となった。従って、染色体分析に際してはそれらの濃度を含め以下 3 濃度群を観察対象とした。

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合、染色体の構造異常および倍数性細胞が濃度依存的に増加した (Table 1)。一方、S9 mix 存在下で短時間処理した場合には、高濃度群で染色体の構造異常の有意な増加が認められたが、低頻度 (3.5%) であることから陰性と判断した (Table 2)。また、倍数性細胞の有意な増加は認められなかった (Table 2)。24時間連続処理した場合には、染色体の構造異常が濃度依存的に増加したが、倍数性細胞の有意な増加は認められなかった (Table 3)。

染色体の構造異常の誘発が認められた S9mix 非存在下の短時間処理群および連続処理群について、 D_{20} 値⁴⁾ を求めたところ、それぞれ 2.0 mg/mL および 0.54 mg/mL となった。また、倍数性細胞陽性となった S9mix 非存在下の短時間処理群における D_{20} 値は 6.4 mg/mL となった。

3つの水酸基の結合位置のみが異なる pyrogallol (1, 2, 3-benzenetriol) や水酸基が 3つではなく 2つ結合した hydroquinone (1, 4-benzenediol) については、タマネギを用いた染色体異常試験で陽性の結果が得られている^{5, 6)}。一方、フェノールについては、タマネギ

を用いた染色体異常試験では陰性の結果が得られており⁷⁾、フェノールに水酸基が結合することにより染色体異常誘発作用を獲得することが示唆された。

陽性対照物質として用いた MC は、S9 mix 非存在下で短時間処理および 24 時間連続処理した場合において染色体の構造異常を誘発し (Table 1、3)、CPA は S9 mix 存在下で短時間処理した場合において染色体の構造異常を誘発した (Table 2)。これらの陽性対照物質の結果より、本実験系の成立が確認された。

以上の結果より、1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼンは、本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

[参考文献]

- 1) 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)
- 2) 吉村 功 編：「毒性・薬効データの統計解析、事例研究によるアプローチ」，サイエンティスト社，東京 (1987)
- 3) 吉村 功，大橋靖夫 編集：「毒性試験講座 14、毒性試験データの統計解析」，地人書館，東京 (1992)
- 4) 石館 基 監修：「<改定>染色体異常試験データ集」，エル・アイ・シー，東京 (1987)
- 5) 賀田 恒夫，石館 基 監修：「環境変異原性データ集 1」，サイエンティスト社，東京，p353，(1980)
- 6) 賀田 恒夫，石館 基 監修：「環境変異原性データ集 1」，サイエンティスト社，東京，p215，(1980)
- 7) 賀田 恒夫，石館 基 監修：「環境変異原性データ集 1」，サイエンティスト社，東京，p329，(1980)

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with benzen 1, 3, 5-triol (BTO)** for 6 h without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ⁵⁾	Total no. of cells with aberrations		No. of ⁶⁾ polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾		
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL	
Non-treatment				—	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.00)			
						100	2	0	0	2	0	0	4	0	3 (3.0)	1 (1.0)	0 (0.00)			
						200	2	0	0	2	0	0	4	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0.00)			
Solvent ¹⁾	0	—	6 - (18)	100.0	—	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	1 (0.25)			
						100	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.00)			
						200	1	2	0	1	0	0	4	0	4 (2.0)	3 (1.5)	1 (0.13)			
BTO	0.16	—	6 - (18)	90.0	—	not observed														
BTO	0.33	—	6 - (18)	87.5	—	100	0	2	0	0	1	0	3	1	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.25)			
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.25)			
						200	0	3	0	0	1	0	4	1	4 (2.0)	4 (2.0)	2 (0.25)			
BTO	0.65	—	6 - (18)	74.5	—	100	0	1	5	1	2	10	19	0	5 (5.0)	5 (5.0)	5 (1.25)			
						100	0	3	5	0	0	10	18	0	7 (7.0)	7 (7.0)	1 (0.25)			
						200	0	4	10	1	2	20	37	0	12 (6.0)	12 (6.0)	6 (0.75)	+	+	
BTO	1.3	—	6 - (18)	72.0	9.4, 8.0	100	3	11	16	0	0	10	40	1	12 (12.0)	11 (11.0)	22 (5.50)			
						100	0	10	14	0	0	20	44	0	16 (16.0)	16 (16.0)	11 (2.75)			
						200	3	21	30	0	0	30	84	1	28 (14.0)	27 *(13.5)	33 *(4.13)			
MC	0.1 µg/mL	—	6 - (18)	—	—	100	4	45	88	0	1	0	138	0	62 (62.0)	62 (62.0)	0 (0.00)			
						100	4	40	96	0	0	10	150	2	63 (63.0)	62 (62.0)	3 (0.75)			
						200	8	85	184	0	1	10	288	2	125 (62.5)	124 *(62.0)	3 (0.38)			

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; TAG, total no. of cells with aberrations including gaps; TA, total no. of cells with aberrations excluding gaps; MC, mitomycin C.

1) Distilled water for injection was used as solvent and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analysed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01.

*, Significantly different from the solvent control at p<0.01 by Fisher's exact probability test.

**, Purity was 100 wt% (on anhydrous basis).

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with benzen 1, 3, 5-triol (BTO)** for 6 h with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ⁵⁾	Total no. of cells with aberrations		No. of ⁶⁾ polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL
Non-treatment				—	—	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.25)		
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.00)		
						200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	1 (0.13)		
Solvent ¹⁾	0	+	6 - (18)	100.0	—	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.00)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.00)		
						200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.00)		
BTO	0.081	+	6 - (18)	95.0	—	100	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	1 (0.25)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.25)		
						200	1	0	1	0	0	0	2	1	2 (1.0)	1 (0.5)	2 (0.25)		
BTO	0.16	+	6 - (18)	94.0	—	100	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.00)		
						100	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.00)		
						200	0	2	0	2	0	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0 (0.00)	+	-
BTO	0.33	+	6 - (18)	91.5	5.8, 3.0	100	0	2	2	1	0	0	5	1	4 (4.0)	4 (4.0)	1 (0.25)		
						100	0	2	1	0	0	0	3	2	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.25)		
						200	0	4	3	1	0	0	8	3	7 (3.5)	7*(3.5)	2 (0.25)		
BTO	0.65	+	6 - (18)	36.5	0.4, 0.4	not observed due to the small number of metaphases													
BTO	1.3	+	6 - (18)	34.0	Tox, Tox	not observed due to extreme cytotoxicity													
CPA	5 µg/mL	+	6 - (18)	—	—	100	0	5	13	0	1	0	19	0	17 (17.0)	17 (17.0)	2 (0.50)		
						100	0	6	9	0	0	0	15	0	13 (13.0)	13 (13.0)	2 (0.50)		
						200	0	11	22	0	1	0	34	0	30 (15.0)	30*(15.0)	4 (0.50)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; TAG, total no. of cells with aberrations including gaps; TA, total no. of cells with aberrations excluding gaps; CPA, cyclophosphamide; Tox, cytotoxic.

1) Distilled water for injection was used as solvent and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analysed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01.

*, Significantly different from the solvent control at p<0.01 by Fisher's exact probability test.

**, Purity was 100 wt% (on anhydrous basis).

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with benzen 1, 3, 5-triol (BTO)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (h)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ⁵⁾	No. of cells with aberrations		No. of ⁶⁾ polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾		
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL	
Solvent ¹⁾	0	24	100.0	—	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.00)			
					100	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.25)			
					200	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	1 (0.13)			
BTO	0.081	24	98.0	—	100	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.00)			
					100	1	5	0	0	1	0	7	0	7 (7.0)	6 (6.0)	0 (0.00)			
					200	1	7	0	0	1	0	9	0	9 (4.5)	8 (4.0)	0 (0.00)			
BTO	0.16	24	93.0	—	100	0	4	3	0	0	0	7	0	7 (7.0)	7 (7.0)	0 (0.00)			
					100	2	5	5	0	1	0	13	1	11 (11.0)	10 (10.0)	0 (0.00)			
					200	2	9	8	0	1	0	20	1	18 (9.0)	17 *(8.5)	0 (0.00)			
BTO	0.33	24	84.0	3.8, 2.2	100	2	10	4	0	0	10	26	0	14 (14.0)	12 (12.0)	0 (0.00)	+	-	
					100	1	10	8	2	2	0	23	0	13 (13.0)	12 (12.0)	0 (0.00)			
					200	3	20	12	2	2	10	49	0	27 (13.5)	24 *(12.0)	0 (0.00)			
BTO	0.65	24	61.0	0.8, 0.4	not observed due to the small number of metaphases														
BTO	1.3	24	29.0	0.0, 0.0	not observed due to extreme cytotoxicity														
MC	0.05 µg/mL	24	—	—	100	2	30	92	0	0	0	124	0	61 (61.0)	60 (60.0)	0 (0.00)			
					100	6	34	73	2	2	0	117	1	64 (64.0)	63 (63.0)	0 (0.00)			
					200	8	64	165	2	2	0	241	1	125 (62.5)	123 *(61.5)	0 (0.00)			

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; TAG, total no. of cells with aberrations including gaps; TA, total no. of cells with aberrations excluding gaps; MC, mitomycin C.

1) Distilled water for injection was used as solvent and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analysed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01.

*, Significantly different from solvent control at p<0.01 by Fisher's exact probability test.

** , Purity was 100 wt% (on anhydrous basis).

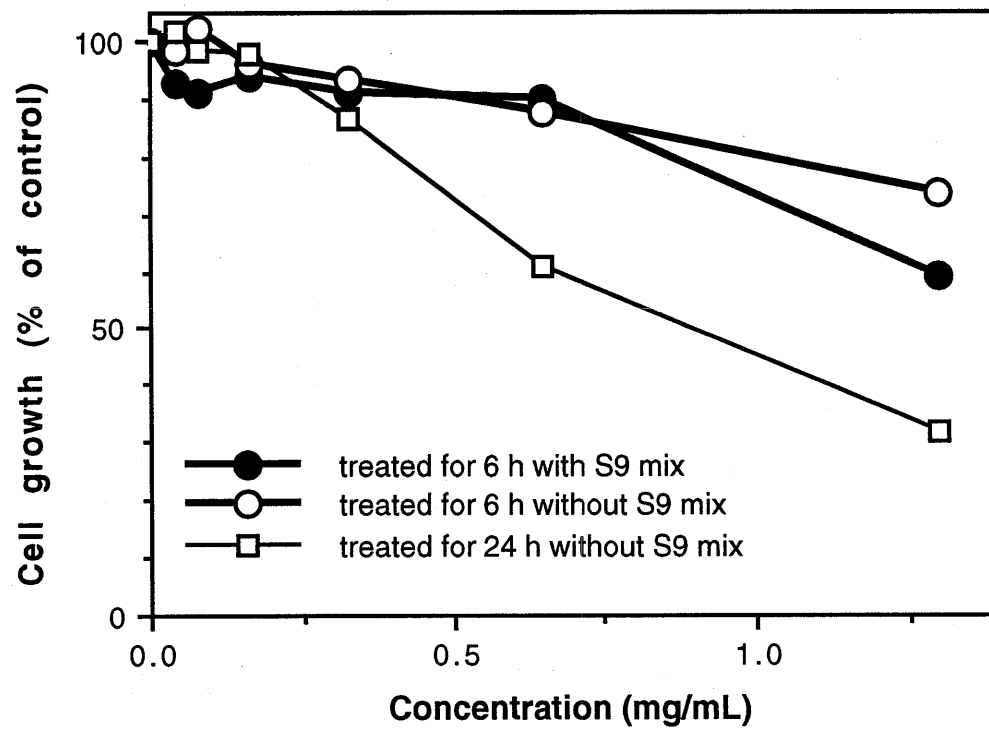


Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with benzen 1,3,5-triol