

2004年3月31日

1, 3, 5-トリス (3, 5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸の  
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

厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 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
試験目的 -----	2
材料および方法 -----	2
1. 被験物質 -----	2
2. 陽性対照物質 -----	2
3. 細胞および培養条件 -----	3
4. S9 反応液 -----	3
5. 被験物質調製液の調製 -----	3
6. 細胞増殖抑制試験 -----	4
7. 染色体異常試験 -----	4
8. 染色体分析 -----	6
結果および考察 -----	6
参考文献 -----	8
Table 1 -----	9
Table 2 -----	10
Table 3 -----	11
Fig. 1 -----	12

## [要 約]

1, 3, 5-トリス (3, 5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸のチャイニーズ・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、構造異常誘発性に関しては陰性、倍数性細胞の誘発に関して陽性の結果を得た。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理 (6 時間処理後 18 時間の回復時間) した場合、5.0 mg/mL の濃度においても増殖抑制作用は認められなかった。また、連続処理 (24 時間) した場合には、濃度に依存して増殖率が低下し、50%の増殖抑制濃度は 4.3 mg/mL と推定された。

これらの結果に基づき、5.0 mg/mL の濃度を最高処理濃度とし、4 段階の濃度群 (0.63、1.3、2.5、5.0 mg/mL、公比 2) を設定して短時間処理法による染色体異常試験を実施した。染色体分析に先立ち、細胞増殖率の測定および分裂指数の分析を行い、染色体分析を行う濃度群 (1.3、2.5、5.0 mg/mL) を決定し、染色体分析を実施した。その結果、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常の誘発は認められなかった。倍数性細胞については、S9 mix 非存在下で短時間処理した中濃度群および高濃度群で統計学的に有意な増加 (出現率: 1.1%および3.4%) が認められた。S9 mix 存在下で短時間処理した場合には、傾向性検定で有意差が認められたものの、いずれの濃度群においても倍数性細胞数の統計学的有意差は認められなかった。

S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理において、構造異常については陰性の結果が得られたことから、5.0 mg/mL の濃度を最高処理濃度とし、5 段階の濃度群 (0.31、0.63、1.3、2.5、5.0 mg/mL、公比 2) を設定して連続処理法による染色体異常試験を実施した。細胞増殖率の測定および分裂指数の分析結果から、染色体分析を行う 3 濃度群 (1.3、2.5、5.0 mg/mL) を決定し、染色体分析を実施した結果、いずれの処理群においても、構造異常を有する細胞の統計学的な有意差は認められなかった。一方、倍数性細胞については、濃度に依存してその出現率が増加 (1.0~3.1%) し、S9 mix 非存在下の短時間処理群と同様の結果が得られた。

以上の結果より、1, 3, 5-トリス (3, 5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸は染色体の構造異常を誘発しないが、弱いながらも倍数性細胞を誘発すると判断した。

## [試験目的]

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-トリス (3, 5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸の染色体異常誘発作用を評価するため、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。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」(昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号、一部改正平成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 化学物質試験法ガイドライン 473/ほ乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験」(1997年7月21日採択) に基づき、「化学物質 GLP」(平成12年3月1日改正、環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14基局第1号) に準拠して実施した。

## [材料および方法]

### 1. 被験物質

被験物質である1, 3, 5-トリス (3, 5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸 [略称: TBHIA、別名: アデカスタブ AO-20、英名: 1, 3, 5-tris (3, 5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl) isocyanuric acid、CAS No.: 27676-62-6、分子量: 784.10、ロット番号: 純度: 100 wt%、製造: ] は白色粉末であり、 から提供された後、密閉して冷暗所で保管 (被験物質受領日から処理最終日までの実測値: 4~13℃) した。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。なお、試験終了後、被験物質提供元で返却した残余被験物質の分析を行い、被験物質は試験期間中の安定であったことが確認された。

### 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 (MMC、ロット番号: 366AAK、協和醗酵工業) およびシクロホスファミド (CP、ロット番号: 108H0568、Sigma Chemical) を日局注射用水 (ロット番号: K2B80、大塚製薬工場) に溶かし、用時調製して試験に用いた。

### 3. 細胞および培養条件

CHL/IU 細胞は染色体数のモードは 25 本で、染色体異常の検出感度にすぐれていることから、染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手 (1988 年 2 月入手、入手時の継代数 4) し、継代後、液体窒素 (-196°C) 中に凍結保存 (凍結保存時の継代数 21 および 23) した。その細胞 (倍加時間約 15 時間、マイコプラズマの汚染なし) を、解凍後、継代 7 および 10 代で試験に用いた。

培養には、仔牛血清 (CS、ロット番号:18060874、Cansera International) を 10 vol% 添加したイーグル MEM 培養液 (10%CS/MEM) を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>、37°C) 内で培養した。イーグル MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末 (日水製薬) を処方に従って調製したものをを用いた。

### 4. S9 反応液

S9 (ロット番号:RAA-461、2002 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、使用時まで超低温槽 (-80°C) 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<sup>+</sup>、オリエンタル酵母工業) および KCl を蒸留水に溶かし、混合液として超低温槽 (-80°C) に保管し、使用時はこれに S9、MgCl<sub>2</sub> および HEPES (pH 7.2) を加え、S9 mix とした。試験には、10%CS/MEM:S9 mix を 22:5 の割合で混和した S9 反応液 (2.7 mL/ディッシュ) を加えて処理を行った (各成分の最終濃度:5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-NADP<sup>+</sup>、0.83 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

### 5. 被験物質調製液の調製

溶解性および懸濁性の予備検討の結果、被験物質は水、ジメチルスルホキシドおよびアセトンに染色体異常試験に必要な濃度で不溶であったことから、カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC Na、ロット番号:WTH1105、和光純薬工業) の 0.5 w/v% の水溶液を媒体 (陰性対照) とし試験に用いた。被験物質を所定量秤量し、乳鉢を用いて被験物質を媒体に懸濁させて原液 (細胞増殖抑制試験および染色体異常試験ともに 50

mg/mL) を用時調製した。それを媒体で希釈して種々の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を 10 vol% 添加して処理を行った。なお、被験物質を媒体に懸濁させた際、発熱、発泡、変色などの変化はなく、懸濁性は良好であった。

## 6. 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、 $4 \times 10^3$  個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL ( $2 \times 10^4$  個) をプラスチックディッシュ (直径 6 cm) に播種した。培養開始 3 日目に、以下の手順で短時間処理および連続処理を行った。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理する場合、各ディッシュの培養液をそれぞれ 10%CS/MEM および S9 反応液 (2.7 mL/ディッシュ) と交換した後、媒体 (陰性対照) または各濃度の被験物質調製液 (0.3 mL) を各ディッシュに添加し 6 時間処理した。その後、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS、 $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  を含む) で洗浄し、10%CS/MEM でさらに 18 時間培養した。また、連続処理する場合には、各ディッシュの培養液を 10%CS/MEM (4.5 mL/ディッシュ) と交換した後、媒体 (陰性対照) または各濃度の被験物質調製液 (0.5 mL) を各ディッシュに添加し 24 時間処理した。

いずれの処理条件においても、0.16~5.0 mg/mL の濃度範囲 (公比 2) で処理を行った。各群 2 枚のディッシュを用いた。なお、処理液中の沈殿の有無を肉眼により観察したところ、いずれの処理濃度においても処理開始時および処理終了時ともに沈殿が認められた。

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 (媒体) 対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測した。

## 7. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験において、TBHIA は S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合、CHL/IU 細胞の増殖を抑制しなかった (Fig. 1)。また、24 時間連続処理した場

合、50%の増殖抑制濃度は4.3 mg/mLと推定された (Fig. 1)。

このことから染色体異常試験において、短時間処理群では5.0 mg/mLを最高処理濃度とし、公比2で計4濃度を設定して試験を実施した。また、連続処理群においても5.0 mg/mLを最高処理濃度とし、公比2で計5濃度を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 (媒体) 対照群と陽性対照群を設けた。陽性対照群については、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では、日局注射用水を10 vol% 加えたのち、MMC (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびCP (1 mg/mL) を最終濃度がそれぞれ0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加した。また、連続処理では、日局注射用水を10 vol% 加えたのち、MMC (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を最終濃度が0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加した。また、実験毎に無処理対照群も設けた。

染色体標本用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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように添加した。培養終了後、培養液を捨て、0.02%EDTA 含有PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ および $\text{Mg}^{2+}$ 不含) をディッシュあたり5 mL加えて細胞をはがし、15 mLの遠沈管に移したのち、遠沈 (1000~1500 rpm、約5分) し、上清を捨て、3 mLの0.075 mol/L KCl 水溶液を加え、約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)) を低張液の約2倍量加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作を数回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、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枚のスライド標本を作製した。

作製したスライド標本を3 vol%ギムザ液 (pH 6.8 の1/15 mol/Lリン酸緩衝液で希釈調製) で染色後、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目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。

## 8. 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。

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状態で分析した。染色体がよく拡がり、かつ散逸していない分裂中期細胞を捜し、1群あたり200個(100細胞/ディッシュ)の分裂中期細胞について構造異常の種類と数を、1群あたり800個(400細胞/ディッシュ)の分裂中期細胞について倍数性細胞(染色体数が38本以上)の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。ギャップを除く染色体異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会<sup>1)</sup>による分類法に基づいて行った。ギャップについては、染色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。

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(媒体)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<sup>2)</sup>( $p < 0.01$ 、片側)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<sup>3)</sup>( $p < 0.01$ 、片側)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]

細胞増殖抑制試験の結果より、4濃度(0.63、1.3、2.5、5.0 mg/mL、公比2)を設定し、短時間処理法による試験を実施した。

染色体分析に先立ち、細胞増殖率の測定および分裂指数の分析を行った結果(Tables 1、2)、染色体分析が可能な最高濃度(20%以上の増殖率でかつ0.5%以上の分裂指数を示した濃度)は、S9 mix非存在下および存在下の短時間処理ともに5.0 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、染色体分析を行った。その結果、TBHIAは、S9 mix非存在下および存在下



で短時間処理したいずれの処理群においても染色体の構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった (Tables 1、2)。倍数性細胞については、S9 mix 非存在下で短時間処理した中濃度群および高濃度群で、その出現頻度 (1.1%および 3.4%) に統計学的な有意差が認められ、濃度依存的に増加していることから、生物学的には陽性であると判断した (Table 1)。S9 mix 存在下で短時間処理した場合には、傾向性検定で有意差が認められたが、いずれの濃度群においても統計学的な有意差は認められなかった (Table 2)。

短時間処理法による試験で構造異常について陰性の結果が得られたことから、細胞増殖抑制試験の結果に基づき、5 濃度 (0.31、0.63、1.3、2.5、5.0mg/mL、公比 2) を設定して 24 時間連続処理法による試験を実施した。細胞増殖率の測定および分裂指数の分析を行った結果 (Table 3)、染色体分析が可能な最高濃度は、5.0 mg/mL となったことから、その濃度を含め以下 3 濃度群を観察対象とし、染色体分析を行った。その結果、いずれの処理群においても染色体の構造異常の統計学的に有意な増加は認められなかった (Table 3)。一方、倍数性細胞については、S9 mix 非存在下の短時間処理群と同様に、濃度に依存してその出現率が増加 (1.0~3.1%) し、陽性の結果が得られた (Table 3)。

以上のように、倍数性細胞について陽性の結果が得られたことから、S9 mix 非存在下の短時間処理群および 24 時間連続処理群の  $D_{20}$  値<sup>4)</sup>を求めたところ、それぞれ 30 mg/mL および 33 mg/mL となった。

陽性対照物質として用いた MMC 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 (Tables 1、3)、CP 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。

なお、TBHIA については、当研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験および他の試験で陰性の結果が得られている<sup>5)、6)</sup>。また関連物質である 1, 3, 5-トリス (2-プロペニル) イソシアヌル酸 (triallyl isocyanurate) については染色体異常試験で代謝活性化された場合に構造異常および倍数性細胞ともに陽性と報告されているが<sup>7)</sup>、当該試験と並行して実施した 1, 3, 5-トリス (2-プロペニル) イソシアヌル酸の染色体異常試験

(試験計画番号:G-01-078)では陰性の結果が得られている<sup>8)</sup>。また butylated hydroxytoluene については、染色体異常試験で陰性の結果が報告されている<sup>9)</sup>。

以上の結果より、TBHIA は、本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体の構造異常を誘発しないが、弱いながらも倍数性細胞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」, サイエンス社, 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：「〈改訂〉染色体異常試験データ集」, エル・アイ・シー, 東京 (1987)
- 5) 原 巧：「1, 3, 5-トリス (3, 5-ジ-*tert*-ブチル-4-ヒドロキシベンジル) イソシアヌル酸の細菌を用いる復帰突然変異試験」, 試験計画番号:M-01-091, (2003)
- 6) 秋田大学医学部公衆衛生学教室 試験レポート
- 7) 祖父尼 俊雄 監修：「染色体異常試験データ集 改訂 1998 年版」, エル・アイ・シー, 東京, p. 449-500 (1999)
- 8) 田中 憲穂：「1, 3, 5-トリス (2-プロペニル) イソシアヌル酸のチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験」, 試験計画番号:G-01-078, (2003)
- 9) 祖父尼 俊雄 監修：「染色体異常試験データ集 改訂 1998 年版」, エル・アイ・シー, 東京, p. 92 (1999)

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1,3,5-tris (3,5-di-*tert* -butyl-4-hydroxybenzyl) isocyanuric acid (TBHIA)\*\* for 6 h without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent <sup>2)</sup> cell growth (%)	Mitotic <sup>3)</sup> index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others <sup>5)</sup>	Number of cells with aberrations		Number <sup>6)</sup> of polyploid cells (%)	Trend test <sup>7)</sup>		
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>4)</sup>	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL	
Non-treatment				—	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )			
						100	0	0	1	2	0	0	3	0	1 ( 1.0 )	1 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )			
						200	0	0	1	2	0	0	3	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )			
Negative <sup>1)</sup> 0		—	6 - (18)	100	—	100	0	1	0	0	1	0	2	0	2 ( 2.0 )	2 ( 2.0 )	0 ( 0.0 )			
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 1.0 )	1 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )			
						200	0	2	0	0	1	0	3	0	3 ( 1.5 )	3 ( 1.5 )	0 ( 0.0 )			
TBHIA	0.63	—	6 - (18)	102	—	not observed														
TBHIA	1.3	—	6 - (18)	102	—	100	1	1	1	0	0	0	3	0	3 ( 3.0 )	2 ( 2.0 )	2 ( 0.5 )			
						100	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	4 ( 1.0 )				
						200	1	1	1	0	0	0	3	0	3 ( 1.5 )	2 ( 1.0 )	6 ( 0.8 )			
TBHIA	2.5	—	6 - (18)	99	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	6 ( 1.5 )			
						100	1	0	0	0	0	0	1	1	1 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )	3 ( 0.8 )			
						200	1	0	0	0	0	0	1	1	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	9*( 1.1 )			
TBHIA	5.0	—	6 - (18)	95	7.6, 9.2	100	0	1	0	0	1	10	12	0	3 ( 3.0 )	3 ( 3.0 )	14 ( 3.5 )			
						100	1	1	1	1	0	0	4	0	4 ( 4.0 )	3 ( 3.0 )	13 ( 3.3 )			
						200	1	2	1	1	1	10	16	0	7 ( 3.5 )	6 ( 3.0 )	27*( 3.4 )			
MMC	0.1 µg/mL	—	6 - (18)	—	—	100	2	16	40	0	1	0	59	0	38 ( 38.0 )	36 ( 36.0 )	0 ( 0.0 )			
						100	2	26	34	2	0	0	64	0	47 ( 47.0 )	45 ( 45.0 )	0 ( 0.0 )			
						200	4	42	74	2	1	0	123	0	85 ( 42.5 )	81*( 40.5 )	0 ( 0.0 )			

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; POL, polyploid; MMC, mitomycin C.

1) Calboxymethyl cellulose sodium solution (0.5 w/v%) 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 number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

\*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

\*\*, Purity was 100 wt%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 1,3,5-tris (3,5-di-*tert* -butyl-4-hydroxybenzyl) isocyanuric acid (TBHIA)\*\* for 6 h with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent <sup>2)</sup> cell growth (%)	Mitotic <sup>3)</sup> index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations						Others <sup>5)</sup>	Number of cells with aberrations		Number <sup>6)</sup> of polyploid cells (%)	Trend test <sup>7)</sup>			
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>4)</sup>		total	+gap (%)		-gap (%)	-gap	POL	
Negative <sup>1)</sup>	0	+	6 - (18)	100	—	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 1.0 )	1 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )			
						100	0	2	1	0	0	10	13	0	4 ( 4.0 )	4 ( 4.0 )	1 ( 0.3 )			
						200	0	3	1	0	0	10	14	0	5 ( 2.5 )	5 ( 2.5 )	1 ( 0.1 )			
TBHIA	0.63	+	6 - (18)	96	—	not observed														
TBHIA	1.3	+	6 - (18)	97	—	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )	2 ( 0.5 )			
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )			
						200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	2 ( 0.3 )			
TBHIA	2.5	+	6 - (18)	90	—	100	1	1	1	0	0	0	3	0	3 ( 3.0 )	2 ( 2.0 )	5 ( 1.3 )			
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 1.0 )	1 ( 1.0 )	1 ( 0.3 )			
						200	1	2	1	0	0	0	4	0	4 ( 2.0 )	3 ( 1.5 )	6 ( 0.8 )			
TBHIA	5.0	+	6 - (18)	88	9.6, 8.0	100	0	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 1.0 )	1 ( 1.0 )	2 ( 0.5 )	-	+	
						100	1	4	6	0	0	0	11	0	7 ( 7.0 )	6 ( 6.0 )	7 ( 1.8 )			
						200	1	4	7	0	0	0	12	0	8 ( 4.0 )	7 ( 3.5 )	9 ( 1.1 )			
CP	10 µg/mL	+	6 - (18)	—	—	100	1	24	53	3	0	0	81	0	57 ( 57.0 )	56 ( 56.0 )	0 ( 0.0 )			
						100	2	31	63	2	0	0	98	0	54 ( 54.0 )	52 ( 52.0 )	0 ( 0.0 )			
						200	3	55	116	5	0	0	179	0	111 ( 55.5 )	108 *( 54.0 )	0 ( 0.0 )			

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; POL, polyploid; CP, cyclophosphamide.

1) Calboxymethyl cellulose sodium solution (0.5 w/v%) 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 number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

\*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

\*\* , Purity was 100 wt%.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 1,3,5-tris (3,5-di-*tert* -butyl-4-hydroxybenzyl) isocyanuric acid (TBHIA)\*\* for 24 h without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (h)	Concurrent <sup>2)</sup> cell growth (%)	Mitotic <sup>3)</sup> index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations.							Others <sup>5)</sup>	Number of cells with aberrations		Number <sup>6)</sup> of polyploid cells (%)	Trend test <sup>7)</sup>		
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL	
Non-treatment					100	0	1	1	0	0	0	2	0	2 ( 2.0 )	2 ( 2.0 )	0 ( 0.0 )			
					100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 1.0 )	1 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )			
					200	0	2	1	0	0	0	3	0	3 ( 1.5 )	3 ( 1.5 )	0 ( 0.0 )			
Negative <sup>1)</sup>	0	24	100	—	100	1	1	1	1	0	0	4	0	4 ( 4.0 )	3 ( 3.0 )	0 ( 0.0 )			
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )			
					200	1	1	1	1	0	0	4	0	4 ( 2.0 )	3 ( 1.5 )	0 ( 0.0 )			
TBHIA	0.31	24	99	—															
TBHIA	0.63	24	87	—															
TBHIA	1.3	24	83	—															
TBHIA	2.5	24	74	—	100	0	1	0	1	0	0	2	0	2 ( 2.0 )	2 ( 2.0 )	3 ( 0.8 )			
					100	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	5 ( 1.3 )				
					200	0	1	0	1	0	0	2	0	2 ( 1.0 )	2 ( 1.0 )	8 *( 1.0 )			
TBHIA	5.0	24	68	1.8, 2.4	100	0	1	1	2	0	0	4	0	3 ( 3.0 )	3 ( 3.0 )	14 ( 3.5 )			
					100	0	0	1	0	0	0	1	0	1 ( 1.0 )	1 ( 1.0 )	11 ( 2.8 )			
					200	0	1	2	2	0	0	5	0	4 ( 2.0 )	4 ( 2.0 )	25 *( 3.1 )			
MMC	0.05 µg/mL	24	—	—	100	2	12	14	0	0	0	28	0	25 ( 25.0 )	23 ( 23.0 )	2 ( 0.5 )			
					100	4	14	18	4	0	0	40	0	28 ( 28.0 )	26 ( 26.0 )	2 ( 0.5 )			
					200	6	26	32	4	0	0	68	0	53 ( 26.5 )	49 *( 24.5 )	4 ( 0.5 )			

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; POL, polyploid; MC, mitomycin C.

1) Calboxymethyl cellulose sodium solution (0.5 w/v%) 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 number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

\*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

\*\* , Purity was 100 wt%.

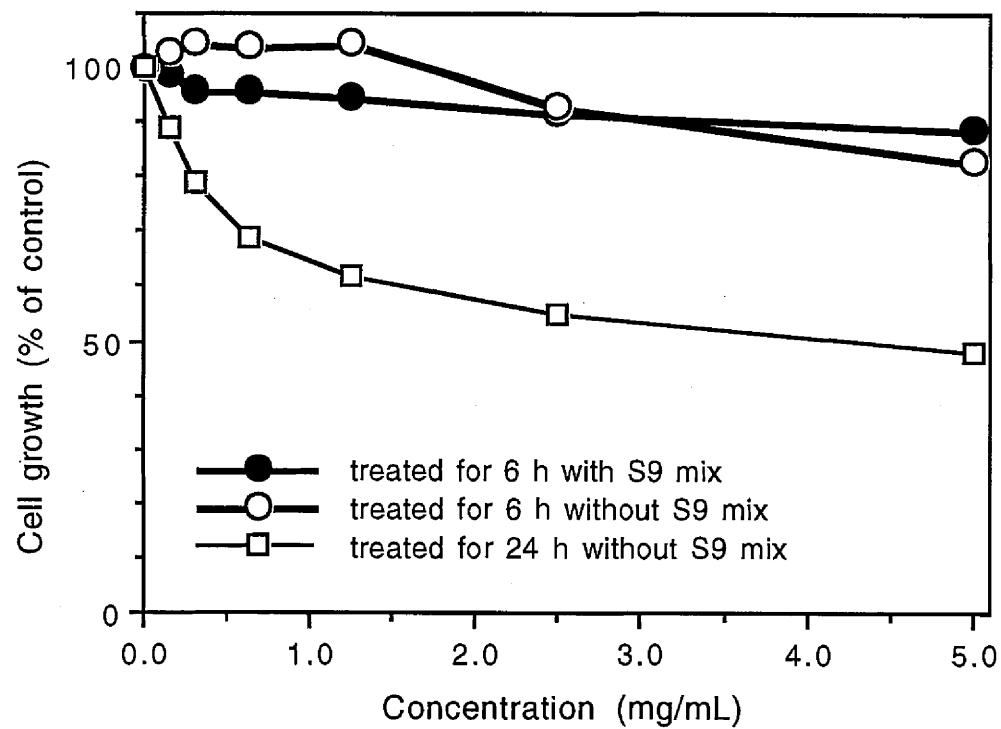


Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 1,3,5-tris(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl) isocyanuric acid

Precipitation was observed at all dosage groups at the beginning and the end of the treatment by the naked eye