食薬セ研第 12-1901 号

2002 年 4 月 10 日

二クロム酸ナトリウム・二水和物の
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 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

材料および方法 ---------- 3

1. 被験物質 ---------- 3

2. 陽性対照物質 ---------- 3

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 ---------- 4

6. 細胞増殖抑制試験 ---------- 4

7. 染色体異常試験 ---------- 5

8. 染色体分析 ---------- 6

結果および考察 ---------- 7

参考文献 ---------- 8

Table 1 ---------- 9

Table 2 ---------- 10

Fig. 1 ---------- 11

[要　　約]

二クロム酸ナトリウム・二水和物のチャイニーズ・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、陽性の結果を得た。

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%の増殖抑制濃度（IC_{50}）はそれぞれ 0.0083 mg/mL および 0.18 mg/mL となった。また、連続処理（新鮮培地中で 24 時間処理）した場合は 0.0011 mg/mL となった。

これらの結果に基づき、短時間処理法による最高処理濃度を S9 mix 非存在下では 0.018 mg/mL、S9 mix 存在下では 0.18 mg/mL の濃度とし、5 段階の濃度群（S9 mix 非存在下:0.0011、0.0023、0.0045、0.0090、0.018 mg/mL、S9 mix 存在下:0.011、0.023、0.045、0.090、0.18 mg/mL、公比 2）を設定して染色体異常試験を実施したが、観察可能な濃度群が 2 濃度しか得られないことから、濃度を再設定（S9 mix 非存在下:0.00056、0.0011、0.0023、0.0045、0.0090 mg/mL、S9 mix 存在下:0.0056、0.011、0.023、0.045、0.090 mg/mL、公比 2）して試験を実施した。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結果をもとに、染色体分析を行う濃度群を決定し、染色体分析を実施（S9 mix 非存在下:0.00056、0.0011、0.0023 mg/mL、S9 mix 存在下:0.0056、0.011、0.023 mg/mL）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場合ともに、濃度に依存して構造異常を有する細胞が誘発（最高出現率:S9 mix 非存在下および存在下でそれぞれ 40.5%および 50.5%）された。

以上の結果より、二クロム酸ナトリウム・二水和物は染色体異常を誘発すると判断した。

[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。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。

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、代謝活性化後の化学物質の変異原活性を検出するために、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、二クロム酸ナトリウム・二水和物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、平成 12 年 3 月 1 日一部改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号）に基づいて実施した。

[材料および方法]

1. 被験物質

被験物質である二クロム酸ナトリウム・二水和物［略称：CADD、英名：Chromic acid disodium salt dihydrate、CAS No.：7789-12-0、ロット番号：　　製造：　　］は橙黄色の結晶、固体であり、　　から提供された後、室温保管した。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。

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：328AJF、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）は日局注射用水（ロット番号：K1C75、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、倍加時間約 15 時間、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℃）中に凍結保存（現在の継代数21）した。その細胞（マイコプラズマの汚染のないことを確認済み）を、解凍後、継代 10 代以内で試験に用いた。

培養には、仔牛血清（CS、ロット番号：28110754、Cansera International）を 10 vol%添加したイーグル MEM 培養液（10%CS/MEM）を用い、CO_2 インキュベーター（5% CO_2、37℃）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用いた。

4. S9 反応液

S9（ロット番号：RAA-440 および RAA-448、2001 年 2 月製造および 2001 年 7 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℃）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、混合液として超低温槽（－80℃）に保管し、使用時はこれに S9、$MgCl_2$ および HEPES (pH 7.2) を加え、S9 mix とした。試験には、MEM（血清不含）:2×MEM（血清不含）:S9 mix を 14:8:5 の割合で混和した S9 反応液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$^+$、0.83 mmol/L $MgCl_2$、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、水に溶解することから、日局注射用水（陰性対照、ロット番号:K1C75、大塚製薬工場）を溶媒とし、使用時に被験物質を溶媒に溶解させ、試験に用いた。

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、4×10^3 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血清を含まない培養液（それぞれ MEM および S9 反応液、2.7 mL/ディッシュ）と交換した後、溶媒（陰性対照）または各濃度の被験物質調製液（0.3 mL、10 vol%）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、Ca^{2+} および Mg^{2+} を含む）で洗浄し、新鮮な培養液（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新鮮な培養液（4.5 mL/ディッシュ）と交換した後、溶媒(陰性対照）または各濃度の被験物質調製液（0.5 mL、10 vol%）を添加し 24 時間処理した。

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、0.0063～3.0 mg/mL（10 mmol/L）の濃度範囲（公比 2）で細胞増殖抑制試験を実施したが、いずれの濃度群においても 50%以下の増殖率を示したことから、最終的に 0.00063～0.020

mg/mL の濃度範囲（公比 2）で処理を行った。また、S9 mix 存在下で短時間処理した場合には、0.094～3.0 mg/mL (10 mmol/L) の濃度範囲（公比 2）ではいずれも 50%未満の増殖率を示したことから、最終的に 0.0063～0.20 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。

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、CADD 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た（Fig. 1)。S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合の IC_{50} 値は、それぞれ 0.0083 mg/mL および 0.18 mg/mL となり、連続処理した場合は 0.0011 mg/mL となった。

このことから短時間処理法による染色体異常試験において、IC_{50} 値をもとに最高処理濃度を決定し（S9 mix 非存在下:0.018 mg/mL、S9 mix 存在下:0.18 mg/mL)、公比 2 で計 5 濃度を設定して染色体異常試験を実施した。しかしながら、分析可能な濃度が 2 濃度しか得られなかったことから、S9mix 非存在下および存在下における最高処理濃度をそれぞれ 0.0090 mg/mL および 0.090 mg/mL とし、公比 2 で計 5 濃度を設定して再試験を実施した。

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（日局注射用水）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、MC（原液濃度:20 μg/mL）および CPA（原液濃度:1 mg/mL）を最終濃度がそれぞれ 0.1 μg/mL および 5 μg/mL となるように添加した。また、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 μg/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 (Ca^{2+}および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。遠沈（1000～1500 rpm、5 分）し、上清を捨てた後、3 mL の 0.075 mol/L KCl 水溶液を加え、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、ピペッティングし遠沈した。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、空気乾燥した。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 3vol%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。

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。染色体がよく広がり、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 [1]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。

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 [2]（$p<0.01$）により有意差検定を実施した。また、コクラン・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]

細胞増殖抑制試験の結果より、5 濃度（S9 mix 非存在下:0.0011、0.0023、0.0045、0.0090、0.018 mg/mL、S9 mix 存在下:0.011、0.023、0.045、0.090、0.18 mg/mL、公比 2）を設定してまず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、細胞増殖率および分裂指数の測定を行った結果、分裂抑制のため染色体分析可能な濃度群が 3 濃度得られなかった。そこで、それぞれ 5 濃度を再設定（S9 mix 非存在下:0.00056、0.0011、0.0023、0.0045、0.0090 mg/mL、S9 mix 存在下:0.0056、0.011、0.023、0.045、0.090 mg/mL、公比 2）して染色体異常試験を実施し、細胞増殖率および分裂指数の測定を行った結果、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では、それぞれ 0.0023 mg/mL および 0.023 mg/mL となった（Tables 1、2)。従って、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、CADD は、S9 mix 非存在下で処理した場合、低濃度（0.00056 mg/mL）群から構造異常が誘発され、高濃度（0.0023 mg/mL）群では 40.5%の細胞に構造異常が認められた（Table 1)。また、S9 mix 存在下で処理した場合にも同様に、中濃度および高濃度群で構造異常の有意な増加が認められ、高濃度群では 50.5%の細胞に構造異常が誘発された（Table 2)。

以上のように、CADD で短時間処理した場合、明らかに陽性の結果が得られたことから、S9 mix 非添加および添加群における D_{20} 値 [4]を求めたところ、それぞれ 0.00087 mg/mL および 0.0096 mg/mL となった。

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した場合において染色体の構造異常を誘発し（Table 1)、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。

なお、CADD 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でも陽性の結果が得られている [5]。また関連物質であるクロム酸カリウム（無水物）については *B. sub. rec⁺/rec⁻*を用いた DNA 修復試験、*E. coli.* Hs30R を用いた復帰突然変異試験およびヒトリンパ球、Syrian hamstar 細胞を用いた染色体異常試験で陽性の結果が報告されている [6]ことから、クロム酸イオンは変異原活性を有すると考えられる。

以上の結果より、CADD 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) 原　巧　他:「二クロム酸ナトリウム・二水和物の細菌を用いる復帰突然変異試験」, 食薬セ研第 12-1897 号 (2002)

6) 賀田恒夫・石館　基:環境変異原性データ集 1, サイエンティスト社, 東京, p. 341 (1980)

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with chromic acid disodium salt dihydrate (CADD)** for 6 h without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent[2] cell growth (%)	Mitotic[3] index (%)	Number of cells analysed	Number of structural aberrations							Others[5]	Total number of cells with aberrations		Number[6] of polyploid cells (%)	Trend test[7]	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul[4]	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL
Non-treatment				—	—	100	0	0	0	5	1	0	6	0	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (0.25)		
						100	0	1	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.00)		
						200	0	1	0	6	1	0	8	0	4 (2.0)	4 (2.0)	1 (0.13)		
Negative[1]	0	−	6 - (18)	100.0	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.00)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.25)		
						200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.13)		
CADD	0.00056	−	6 - (18)	92.5	—	100	2	15	1	0	0	0	18	0	16 (16.0)	14 (14.0)	0 (0.00)		
						100	2	8	0	0	1	0	11	0	11 (11.0)	9 (9.0)	1 (0.25)		
						200	4	23	1	0	1	0	29	0	27 (13.5)	23 *(11.5)	1 (0.13)		
CADD	0.0011	−	6 - (18)	97.5	—	100	1	21	2	2	1	0	27	0	21 (21.0)	21 (21.0)	1 (0.25)		
						100	4	23	4	0	1	0	32	0	24 (24.0)	22 (22.0)	0 (0.00)		
						200	5	44	6	2	2	0	59	0	45 (22.5)	43 *(21.5)	1 (0.13)	+	−
CADD	0.0023	−	6 - (18)	77.5	2.0, 1.4	100	4	37	11	0	0	0	52	0	37 (37.0)	35 (35.0)	0 (0.00)		
						100	4	56	13	1	0	0	74	0	48 (48.0)	46 (46.0)	1 (0.25)		
						200	8	93	24	1	0	0	126	0	85 (42.5)	81 *(40.5)	1 (0.13)		
CADD	0.0045	−	6 - (18)	55.0	0.4, 0.8	not observed due to the small number of metaphases													
CADD	0.0090	−	6 - (18)	47.5	0.0, 0.0	not observed due to the small number of metaphases													
MC	0.1 μg/mL	−	6 - (18)	—	—	100	1	46	50	1	0	0	98	1	56 (56.0)	56 (56.0)	0 (0.00)		
						100	3	42	62	2	1	0	110	0	59 (59.0)	58 (58.0)	0 (0.00)		
						200	4	88	112	3	1	0	208	1	115 (57.5)	114 *(57.0)	0 (0.00)		

Abreviations: 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 number of cells with aberrations including gaps; TA, total number of cells with aberrations excluding gaps; MC, mitomycin C.

1) Distilled water for injection JP 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 analysed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$.

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

**, Purity was 100.07 wt%, and SO_4 (0.07 wt%), Cl (0.008 wt%) and Ca (6 ppm) were contained as impurity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with chromic acid disodium salt dihydrate (CADD)** for 6 h with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent[2] cell growth (%)	Mitotic[3] index (%)	Number of cells analysed	Number of structural aberrations							Others[5]	Total number of cells with aberrations		Number[6] of polyploid cells (%)	Trend test[7]	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul[4]	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL
Negative[1]	0	+	6 - (18)	100.0	—	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.00)		
						100	1	1	0	0	0	0	2	1	2 (2.0)	1 (1.0)	1 (0.25)		
						200	1	2	0	0	0	0	3	1	3 (1.5)	2 (1.0)	1 (0.13)		
CADD	0.0056	+	6 - (18)	101.0	—	100	2	2	0	0	0	0	4	0	4 (4.0)	2 (2.0)	0 (0.00)		
						100	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (0.25)		
						200	2	4	0	0	0	0	6	0	6 (3.0)	4 (2.0)	1 (0.13)		
CADD	0.011	+	6 - (18)	98.0	—	100	1	6	0	0	0	0	7	0	6 (6.0)	5 (5.0)	1 (0.25)		
						100	0	12	5	0	0	0	17	0	14 (14.0)	14 (14.0)	0 (0.00)		
						200	1	18	5	0	0	0	24	0	20 (10.0)	19 *(9.5)	1 (0.13)	+	−
CADD	0.023	+	6 - (18)	80.5	2.8, 2.0	100	1	34	33	1	0	0	69	0	50 (50.0)	49 (49.0)	0 (0.00)		
						100	0	36	47	0	0	0	83	0	52 (52.0)	52 (52.0)	0 (0.00)		
						200	1	70	80	1	0	0	152	0	102 (51.0)	101 *(50.5)	0 (0.00)		
CADD	0.045	+	6 - (18)	51.5	0.0, 0.0	not observed due to the small number of metaphases													
CADD	0.090	+	6 - (18)	54.0	0.0, 0.0	not observed due to the small number of metaphases													
CPA	5 μg/mL	+	6 - (18)	—	—	100	6	22	50	3	0	10	91	0	55 (55.0)	51 (51.0)	1 (0.25)		
						100	2	35	82	5	0	0	124	0	66 (66.0)	65 (65.0)	0 (0.00)		
						200	8	57	132	8	0	10	215	0	121 (60.5)	116 *(58.0)	1 (0.13)		

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 number of cells with aberrations including gaps; TA, total number of cells with aberrations excluding gaps; CPA, cyclophosphamide.

1) Distilled water for injection JP 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 analysed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at $p<0.01$.

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

**, Purity was 100.07 wt%, and SO_4 (0.07 wt%), Cl (0.008 wt%) and Ca (6 ppm) were contained as impurity.

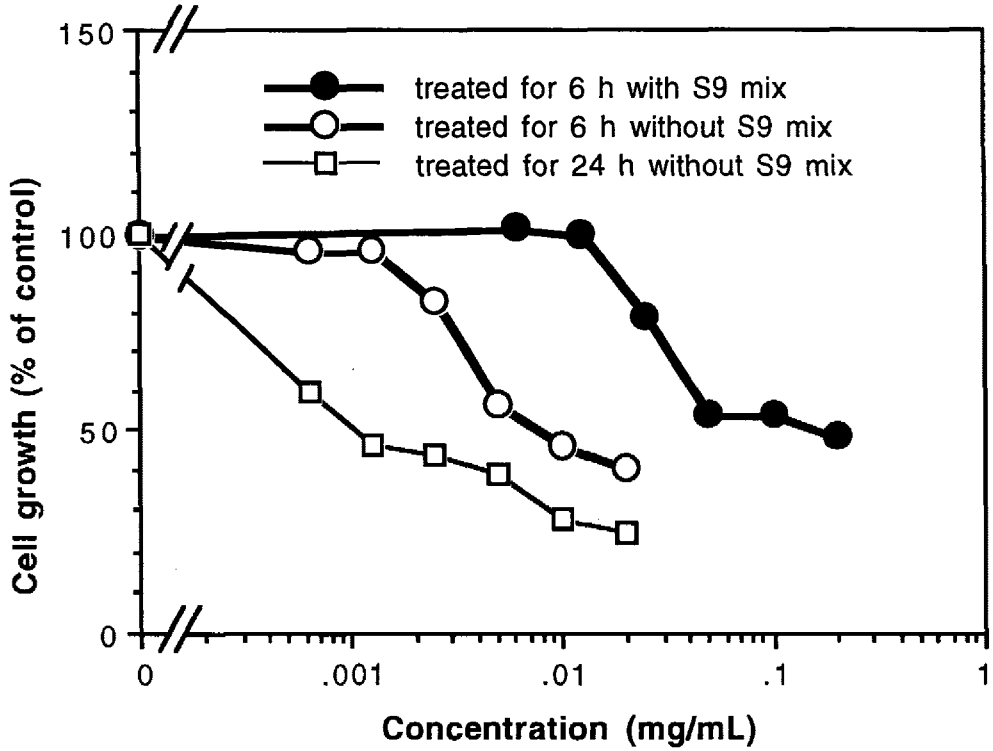

Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with chromic acid disodium salt dihydrate