



2-アミノ-5-メチル-ベンゼンスルホン酸の  
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
材料および方法 -----	3
1. 使用した細胞 -----	3
2. 培養液の調製 -----	3
3. 培養条件 -----	3
4. 被験物質および陽性対照物質 -----	3
5. 被験物質の調製 -----	4
6. 試験条件 -----	5
7. 細胞増殖抑制試験 -----	5
7.1 処理条件-----	5
7.2 標本作製法 -----	6
7.3 増殖抑制の指標とその結果 -----	6
8. 本試験の群構成 -----	6
8.1 連続処理（S9 mix非存在下） -----	7
8.2 短時間処理（S9 mix存在下および非存在下） -----	7
8.3 短時間処理（S9 mix存在下）の確認試験 -----	8
9. 染色体標本作製法 -----	8
10. 染色体分析 -----	9
11. 記録と判定 -----	9
結 果 -----	11
結 論 -----	12
特記事項 -----	12
文 献 -----	13

Tables 1～6

Figures 1～4

## [要 約]

2-アミノ-5-メチル-ベンゼンスルホン酸の*in vitro* 染色体異常誘発性を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL/IU)を用いて検討した。その結果、S9 mix 存在下の短時間処理で染色体異常が誘発された。しかしながら、確認試験により本物質による培地の酸性化により染色体異常が誘発されたものと結論した。

S9 mix 非存在下の連続処理 (48時間) および短時間処理 (6時間) における50%を越える増殖抑制濃度は、ともにそれぞれ 1.7 mg/ml であり生理的処理限界 (10 mM = 1.9mg/ml) に近似した値であった。また、S9 mix 存在下の短時間処理 (6時間) では、1.9 mg/ml (10 mM) の濃度において、約57%の増殖抑制が認められた。以上の結果より、連続処理および短時間処理ともに 1.9 mg/ml の濃度を本試験の最高処理濃度とし、最高処理濃度の1/2および1/4の濃度を、それぞれ中濃度および低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix 非存在下で24時間および48時間処理後標本を作製し、染色体分析を行った。短時間処理では、S9 mix 存在下および非存在下で 6時間処理後、新鮮な培養液でさらに18時間培養して標本を作製し、染色体分析を行った。

連続処理により、CHL/IU 細胞を24時間および48時間処理した高濃度群 (1.9 mg/ml) において、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、その他の処理群においては、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix 存在下および非存在下で 6時間処理した高濃度群 (1.9 mg/ml) において、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかったが、S9 mix 存在下の中濃度処理群 (0.95 mg/ml) においては、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用が認められた。一方、S9 mix 非存在下の中濃度処理群においては、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

2-アミノ-5-メチル-ベンゼンスルホン酸を培養液に添加すると、培養液が黄色化することから、本物質の染色体異常誘発に関しては、培養液の酸性化による可能性と、それ自身による DNA 障害作用による可能性が考えられたため、確認試験を行った。その結果、pH を調整して短時間処理した S9 mix 存在下のいずれの処理群でも、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められず、本物質による染色体異常誘発は、DNA への直接的な傷害によるものではなく培養液の酸性化に起因するものと結論した。

## [緒 言]

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、2-アミノ-5-メチル-ベンゼンスルホン酸の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL/IU）を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

本試験は、「新規化学物質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）および「OECD 毒性試験ガイドライン：473」に準拠し、「化学物質 GLP基準」（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。

## [材料および方法]

### 1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク (JCRB) から入手 (1988年2月、入手時：継代 4代、現在12代) したチャイニーズ・ハムスター由来の CHL/IU 細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

この CHL/IU 細胞株は、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、常用されている。

### 2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清 (FCS: Biocell、ロット番号: 4001776 および Cansera International、ロット番号: 2605420) を10%添加したイーグル MEM 培養液を用いた。MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末 (日水製薬 (株)) 9.4 g を 1 ℓ の蒸留水に溶解し、121°Cで15分間、高圧蒸気滅菌したのち、L-グルタミン (滅菌済み、日水製薬 (株)) 300 mg と10% NaHCO<sub>3</sub> 溶液、約 12.5 ml を加えて調製した。2倍濃度の MEM 培養液は、上記の培地 9.4 g を 500 ml の蒸留水に溶解し、以下 MEM 培養液と同様に調製した。

### 3. 培養条件

2×10<sup>4</sup> 個の CHL/IU 細胞を、培養液 5 ml を入れたディッシュ (径 6 cm、Corning) に播き、37°Cの CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>) 内で培養した。

### 4. 被験物質および陽性対照物質

#### [被験物質]

2-アミノ-5-メチル-ベンゼンスルホン酸 (以下 AMBS と略す、CAS No. 88-44-8) は、分子量187.22の微黄白色粉末である。物理化学的性状等は Appendix 1 に示した。用いた被験物質は、ロット番号 純度98%以上 (不純物: パラトルイジン約 200 ppm) であり、 から提供された。被験物質は、使用時まで冷蔵保管した。

AMBS の0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC Na) 水溶液中での安定性

試験を秦野研究所において実施した。低濃度（4.75 mg/ ml）溶液および高濃度（19.0 mg/ ml）懸濁液について、室温遮光条件下で調製後 4時間までの安定性を調べた。その結果、調製 4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値（0時間）の平均値に対して、100および99.3%であった。これらの値は当研究所で規定している基準（平均含量が初期値の90.0%以上）を満たしていた（Appendix 2）。

#### [陽性対照物質]

##### 1) 連続処理の試験に用いる物質

(化 学 名)	マイトマイシン C
(略 号)	MC
(ロ ッ ト 番 号)	928ACF
(製 造 者)	協和醗酵工業(株)
(保 管 条 件)	冷蔵保管

##### 2) 短時間処理の試験に用いる物質

(化 学 名)	シクロホスファミド
(略 号)	CPA
(ロ ッ ト 番 号)	70H0948、73H0846
(製 造 者)	Sigma Chemical Co.
(保 管 条 件)	冷蔵保管

#### 5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。媒体は0.5% CMC Na 水溶液(ナカライテスク (株)、ロット番号：M9G8053)を用いた。原体を媒体に懸濁してメスアップにより原液（増殖抑制試験、本試験ともに 19 mg/ml）を調製し、ついで原液を媒体で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の10% (v/v) になるように加えた。染色体異常試験においては、連続処理および短時間処理に用いた高濃度群と低濃度群の被験物質調製液について、含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、いずれも当研究所の規定している基準(媒体中での平均含量が添加量の85.0~115%)の範囲内であった（Appendix 3）。

## 6. 試験条件

連続処理では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、ディッシュに培養液 4.5 ml と各濃度の被験物質調製液 0.5 ml を加え、24時間および48時間処理した。

短時間処理では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、MEM 培養液、2倍濃度の MEM 培養液および S9 mix をそれぞれ 14 : 8 : 5 の割合で混合した溶液 2.7 ml をディッシュに加えた。また、S9 mix 非存在下の処理群においては、MEM 培養液および2倍濃度の MEM 培養液をそれぞれ 8 : 1 の割合で混合した溶液 2.7 ml をディッシュに加え、さらに 0.3 ml の被験物質調製液を加えて6時間処理した。処理終了後、新鮮な培養液に交換し、さらに18時間培養した。S9 mix の調製は下記の組成で行った。

S9*	3
20 mM HEPES (pH 7.2)	2
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1
330 mM KCl	1
50 mM G-6-P	1
40 mM NADP	1
蒸留水	1
合計 10 ml	

\* S9 : Sprague-Dawley 系ラットにフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンを投与して調製したキッコマン (株) の S9 (ロット番号 : RAA-314, 1994 年8月製造およびロット番号 : RAA-338, 1995年12月製造) を購入し、使用時まで -80℃ の超低温槽内に保存した。

## 7. 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及ぼす影響を調べた。

### 7.1 処理条件

連続処理では48時間処理群について、また、短時間処理では S9 mix 存在下および非存在下の 6時間処理群について細胞増殖抑制試験を実施した。処理濃度は、連続処理および短時間処理ともに 0.059~1.9 mg/ml (10 mM) の範囲の濃度を用いた。ディッシュは 1濃度について2枚用いた。

## 7.2 標本作製法

培養終了後、培養液を捨てたのち、10%ホルマリン溶液を加え、細胞がディッシュに付着した状態で固定した。固定後、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。

## 7.3 増殖抑制の指標とその結果

被験物質の CHL/IU 細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計 (Monocellater™、オリンパス光学工業 (株)) を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の陰性対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理における50%を明らかに越える増殖抑制濃度 (約60%の増殖抑制濃度) は、60%の増殖抑制濃度をはさむ2濃度より算出したところ、1.7 mg/ml であった。短時間処理の S9 mix 非存在下における50%を明らかに越える増殖抑制濃度も 1.7 mg/ml となった。S9 mix 存在下では、10 mM (1.9 mg/ml) の濃度において約57%の増殖抑制がみられた (Table 1、2、3 および Fig.1)。

## 8. 本試験の群構成

細胞増殖抑制試験の結果より、連続処理と短時間処理の S9 mix 非存在下における50%を明らかに越える増殖抑制濃度 (1.7 mg/ml) が 10 mM (1.9 mg/ml) と近似しているため、染色体異常試験で用いる被験物質の最高処理濃度を、連続処理および短時間処理ともに 1.9 mg/ml (10 mM) とし、その1/2および1/4の濃度をそれぞれ中濃度および低濃度として設定した。陽性対照物質として用いた MC および CPA は、注射用水 ((株) 大塚製薬工場、ロット番号: K4C85 および K5H71) に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。



### 8.1 連続処理 (S9 mix 非存在下)

連続処理では、24時間と48時間処理の3段階の被験物質処理濃度群に、対照群を含め、下記の11群を設けた。各群2枚のディッシュを用いた。

群	濃度 (mg/ml)	処理時間 (h)
1) 無処理対照	—	—
2) 陰性対照	0	24
3) AMBS	0.48	24
4) AMBS	0.95	24
5) AMBS	1.9	24
6) 陽性対照 (MC)	0.00005	24
7) 陰性対照	0	48
8) AMBS	0.48	48
9) AMBS	0.95	48
10) AMBS	1.9	48
11) 陽性対照 (MC)	0.00005	48

### 8.2 短時間処理 (S9 mix 存在下および非存在下)

短時間処理では、S9 mix 存在下および非存在下の3段階の被験物質処理濃度群に、対照群を含め、下記の11群を設けた。各群2枚のディッシュを用いた。

群	濃度 (mg/ml)	S9 mix の有無	処理時間(h)
1) 無処理対照	—	—	—
2) 陰性対照	0	—	6-(18)
3) AMBS	0.48	—	6-(18)
4) AMBS	0.95	—	6-(18)
5) AMBS	1.9	—	6-(18)
6) 陽性対照 (CPA)	0.005	—	6-(18)
7) 陰性対照	0	+	6-(18)
8) AMBS	0.48	+	6-(18)
9) AMBS	0.95	+	6-(18)
10) AMBS	1.9	+	6-(18)
11) 陽性対照 (CPA)	0.005	+	6-(18)

### 8.3 短時間処理 (S9 mix 存在下) の確認試験

短時間処理の S9 mix 存在下の条件で実験を行ったところ、被験物質による培地酸性化による影響が示唆されたため、被験物質を含む培地の pH 調整を行い、確認試験を実施した。細胞を 3日間培養したのち培養液を捨て、被験物質調製液原液を 3 ml、MEM 培養液 10 ml および 2倍濃度の MEM 培養液 8 ml を加え、1N NaOH 120  $\mu$ l で pH を 7.48 に調整した。0.5% CMC Na を 10% (v/v) 含む MEM を用いて所定の濃度に調製後、各調製液 2.5 ml をディッシュに加え、さらに 0.5 ml の S9 mix を加えて 6時間処理した。処理終了後、新鮮な培養液に交換し、さらに 18時間培養した。また、0時間と 6時間で pH を測定した。3段階の被験物質処理群に、対照群を含め、下記の 5群を設けた。各群 2枚のディッシュを用いた。

群	濃度 (mg/ml)	S9 mix の有無	処理時間(h)
1) 陰性対照	0	+	6-(18)
2) AMBS	0.48	+	6-(18)
3) AMBS	0.95	+	6-(18)
4) AMBS	1.9	+	6-(18)
5) 陽性対照 (CPA)	0.005	+	6-(18)

### 9. 染色体標本作製法

- 1) 培養終了の 2時間前に、コルセミドを最終濃度が約 0.1  $\mu$ g/ml になるように培養液に加え、培養終了後、各群の細胞をリン酸緩衝生理食塩液 ( $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$ を含まない) で洗い、ピペッティングにより細胞をはがし、10 ml の遠沈管に集めた。
- 2) 1000~1200 rpm で 5分間遠沈し、上清を捨てたのち、沈殿した細胞に 3 ml の 0.075 M KCl 水溶液を加えることにより約 30分間低張処理を行った。
- 3) 低張処理後、低張液の上層に固定液 (氷酢酸 : メタノール = 1 : 3 v/v) 約 6 ml を加え、下方から静かにピペッティングしながら混和して固定し、その後 1000~1200 rpm で 5分間遠沈した。
- 4) 遠沈後上清を除き、再び新鮮な固定液を加えて細胞をピペッティングにより再浮遊させ、1000~1200 rpm で 5分間遠沈した。この操作を数回繰り返した。

- 5) 遠沈して得た白色の細胞塊に、0.2~0.5 ml の固定液を加え、十分に懸濁させた。
- 6) 細胞浮遊液の少量を、あらかじめ洗浄しておいたスライドグラス上に滴下し、そのまま風乾した。
- 7) スライド標本は各ディッシュにつき 6枚作製した。
- 8) スライドグラスのフロスト部分に鉛筆で、試験系識別番号、コード番号およびスライド番号を記入した。
- 9) 乾燥したスライドは、ギムザ原液 (Merck) 4.5 ml を M/15 リン酸緩衝液 (pH 6.8) 150 ml に希釈した染色液で約 8分間染色後、蒸留水で軽くすすいで風乾した。
- 10) 染色したスライド標本は、コード番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

## 10. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、複数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た状態で分析した。よく広がり、かつ染色体が散逸していない分裂中期像を探し、異常を有する細胞については、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で記録用紙に記録した。

染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験 (MMS) 分科会<sup>1)</sup> による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常と倍数性細胞 (polyploid) の有無について観察した。また原則として構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析することとした。

## 11. 記録と判定

無処理対照、陰性および陽性対照群と被験物質処理群のそれぞれについて、観察細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数などの分析結果を集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を持つ細胞の出現頻度については、林<sup>2)</sup> の方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法<sup>3)</sup> により、多重性を考慮し、familywise の有意水準を 5%として検定を実施した。フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定<sup>4)</sup> ( $p<0.05$ ) を行った。以上 2回の検定でともに有意差が認められた場合を陽性とした。傾

向性検定で有意差が認められない場合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

なお、0.5% CMC Na 水溶液を10% (v/v) 添加した場合の、gapを含む構造異常 (TAG) と数的異常に関する秦野研究所における背景データ (1989~1993年) は以下の通りである。

群	構 造 異 常				数 的 異 常			
	試験数	観察細胞数	異常細胞数	平均値* ±SD	試験数	観察細胞数	倍数性細胞数	平均値** ±SD
(連続処理)								
24時間	19	3800	25	1.3±1.2	19	15200	26	1.4±3.3
48時間	19	3800	43	2.3±1.9	19	15200	23	1.2±1.1
(短時間処理)								
S9 mix 非存在下	10	2000	12	1.2±1.0	10	8000	22	2.2±1.7
S9 mix 存在下	10	2000	22	2.2±1.4	10	8000	21	2.1±1.4

\* ; 200細胞あたりの平均異常細胞数

\*\* ; 800細胞あたりの平均倍数性細胞数

## [結 果]

連続処理による染色体分析の結果を Table 4 および Fig. 2 に示した。

AMBS を加えて24時間および48時間処理した高濃度群 (1.9 mg/ml) では、細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかった。特に48時間処理では、構造異常を有する細胞が誘発されたが、観察可能な細胞は51細胞と極端に少なく、評価することができなかった。その他の低濃度および中濃度処理群においては、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果を Table 5 および Fig. 3 に示した。

AMBS を加えて S9 mix 非存在下で 6時間処理した場合、高濃度群 (1.9 mg/ml) では、細胞毒性のため分析が不可能となったが、それ以外のいずれの処理群においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。一方、S9 mix 存在下で 6時間処理した場合、高濃度群 (1.9 mg/ml) では細胞毒性のため十分な細胞数を分析できなかった。中濃度群 (0.95 mg/ml) においては、倍数性細胞 ( $P<0.05$ ) および構造異常 ( $P<0.05$ ) を有する細胞ともに有意に増加し、傾向性検定においていずれも有意差がみられた。

細胞を用いる本試験では、AMBS を培養液に加えると培養液の色が黄色に変化したことから、本試験と同じ処理条件で、処理直後と処理終了時の培養液の pH を測定した。その結果、S9 mix 非存在下の中濃度群 (0.95 mg/ml) における処理直後および処理終了後の培養液の pH (2 デイッシュの平均値) は、それぞれ5.88および6.73であった。また、S9 mix 存在下の中濃度群 (0.95 mg/ml) における処理直後および処理終了後の培養液の pH は、それぞれ5.84および6.26であった。従って、本試験で誘発された染色体の構造異常に関しては、AMBS 添加による培養液の酸性化による可能性<sup>5)</sup> と、AMBS それ自身による DNA 傷害作用に起因する可能性が考えられた。そのため、染色体異常が誘発された S9 mix 存在下の短時間処理濃度群につき、pH を調整して確認試験を行った。

短時間処理 (S9 mix 存在下) による染色体分析の結果を Table 6 および Fig. 4 に示した。

AMBS を加えて S9 mix 存在下で 6時間処理した場合、いずれの処理群においても染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。処理時における培地の pH は、溶媒対照、各処理群とも pH 6.80~7.19 を示し、この pH 域での被験物質の染色体異常に及ぼす影響は認められなかった。一方、本試験と並行して実施された復帰突然変異試

験 (M-94-087) では、AMBS の検定菌に対する変異原活性は認められていないことから、AMBS 処理によって誘発された染色体異常誘発は、DNA に対する直接的な作用よりむしろ、AMBS 添加による培地の酸性化に起因することが示唆された。

陽性対照として用いた連続処理での MC 処理群および S9 mix 存在下での CPA 処理群では染色分体交換 (cte) や染色分体切断 (ctb) などの構造異常を持つ細胞が誘発された。

## [結 論]

2-アミノ-5-メチル-ベンゼンスルホン酸は、連続処理により、24時間および48時間処理した場合、10mM (1.9 mg/ml) の濃度を除くいずれの処理群 (0.48~0.95 mg/ml) においても染色体異常を誘発しなかった。

短時間処理において、S9 mix 存在下および非存在下で6時間処理した場合、S9 mix 非存在下の 10mM の濃度を除く処理群 (0.48~0.95 mg/ml) では、染色体の構造異常や倍数性細胞は誘発されなかった。一方、S9 mix 存在下の中濃度群 (0.95 mg/ml) では、染色体の構造異常および倍数性細胞が有意に増加した。試験結果に、pH の影響が考えられたため、pH 調整を行い確認試験を行ったところ、S9 mix 存在下では、いずれの処理群でも染色体の構造異常および倍数性細胞を誘発しなかった。

従って、S9 mix 存在下における 2-アミノ-5-メチル-ベンゼンスルホン酸処理による染色体異常の誘発は、培地の酸性化によるものであり、本化学物質による染色体異常誘発性はないものと考えられる。

## [特記事項]

本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

## [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、（1988）
- 2) 林 真：染色体異常試験の統計学的処理、変異原性試験、1：255 - 261（1992）
- 3) 吉村 功 編著：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、（1987）
- 4) 吉村 功、大橋 靖夫 責任編集：毒性試験講座14、毒性試験データの統計解析、地人書館、P218～223、（1992）
- 5) Morita, T. *et al* :Mutation Res. 268 :297-305（1992）

Table 1 Growth inhibition of CHL/IU cells continuously treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid (AMBS) for 48 h without S9 mix

Concentration of AMBS (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0	100 ,	100	100.0
0.059	105 ,	104	104.5
0.12	107 ,	104	105.5
0.24	110 ,	111	110.5
0.48	111 ,	107	109.0
0.95	102 ,	100	101.0
1.9	23 ,	27	25.0

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 2 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid (AMBS) for 6 h with S9 mix

Concentration of AMBS (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0	100 ,	100	100.0
0.059	98 ,	100	99.0
0.12	90 ,	93	91.5
0.24	94 ,	100	97.0
0.48	90 ,	89	89.5
0.95	84 ,	91	87.5
1.9	41 ,	45	43.0

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)



Table 3 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid (AMBS) for 6 h without S9 mix

Concentration of AMBS (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0	100 ,	100	100.0
0.059	97 ,	93	95.0
0.12	106 ,	85	95.5
0.24	97 ,	85	91.0
0.48	94 ,	81	87.5
0.95	91 ,	89	90.0
1.9	26 ,	19	22.5

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 4 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid (AMBS)\* without S9 mix

Group	Concen- tration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Total	Others <sup>3)</sup>		No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>		
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul	total		TAG (%)	TA (%)	SA	NA				
Control <sup>1)</sup>			200	0	1	0	1	0	0	2	0	0	2	( 1.0 )	2	( 1.0 )	0.25		
Vehicle	0	24	200	0	3	0	0	0	0	3	0	0	3	( 1.5 )	3	( 1.5 )	0.13		
AMBS	0.48	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	( 0.0 )	0	( 0.0 )	0.13		
AMBS	0.95	24	200	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	( 0.5 )	1	( 0.5 )	0.25	NT	NT
AMBS	1.9	24	0T														T		
MC	0.00005	24	200	5	51	81	1	1	0	139	2	2	97	( 48.5 )	93	( 46.5 )	0.13		
Vehicle <sup>1)</sup>			200	0	0	3	0	0	0	3	0	0	3	( 1.5 )	3	( 1.5 )	0.38		
AMBS	0.48	48	200	0	1	0	1	1	0	3	1	1	3	( 1.5 )	3	( 1.5 )	0.13		
AMBS	0.95	48	200	4	1	0	0	1	0	6	0	0	6	( 3.0 )	2	( 1.0 )	0.25	NT	NT
AMBS	1.9	48	51T	2	24	4	0	0	430	460	1	1	51	( 100 )	51	( 100 )	3.36 <sup>6)</sup> T		
MC	0.00005	48	200	8	58	125	2	7	10	210	16	16	103	( 51.5 )	102	( 51.0 )	0.25		

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C, NT : not tested, T : Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) 0.5 % carboxymethylcellulose sodium solution was used as vehicle. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran - Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$  when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test. 6) One hundred and nineteen cells were analysed. \* : Purity was more than 98 %. Paratoluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

Table 5 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid (AMBS)\*\* with and without S9mix

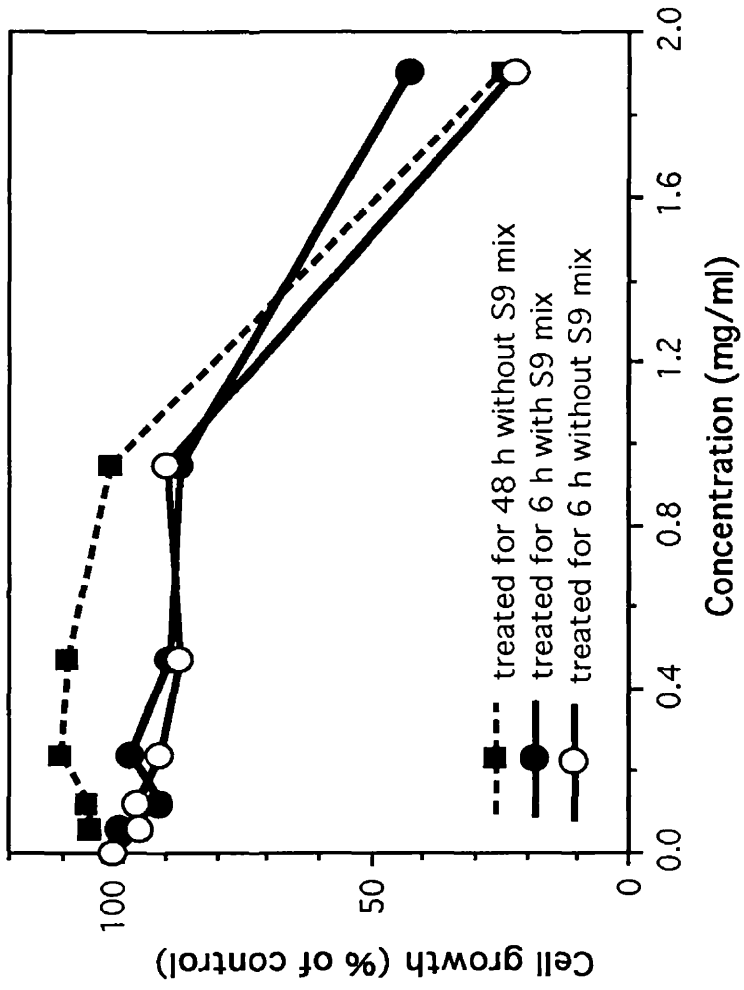
Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Total	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	Trend test <sup>5)</sup>			
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul	Others <sup>3)</sup>		TAG (%)	TA (%)		SA	NA		
Control <sup>1)</sup>	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1	( 0.5 )	1	( 0.5 )	0.75		
Vehicle	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1	( 0.5 )	1	( 0.5 )	0.63		
AMBS	0.48	-	6-(18)	200	1	0	0	1	1	0	3	0	3	( 1.5 )	2	( 1.0 )	0.25		
AMBS	0.95	-	6-(18)	200	1	0	0	1	0	0	2	0	2	( 1.0 )	1	( 0.5 )	0.25	NT	NT
AMBS	1.9	-	6-(18)	0 <sup>T</sup>													T		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1	( 0.5 )	1	( 0.5 )	0.00		
Vehicle <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	1	2	0	0	0	3	0	3	( 1.5 )	3	( 1.5 )	0.38		
AMBS	0.48	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	1	0	( 0.0 )	0	( 0.0 )	0.25		
AMBS	0.95	+	6-(18)	200	0	19	23	0	0	0	42	0	14*	( 7.0 )	14	( 7.0 )	1.38*	+	+
AMBS	1.9	+	6-(18)	5 <sup>T</sup>	0	4	6	0	0	0	10	0	4	( 80.0 )	4	( 80.0 )	0.00 <sup>6)</sup>	T	
CPA	0.005	+	6-(18)	200	5	66	189	1	5	20	286	3	122	( 61.0 )	122	( 61.0 )	0.25		

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide, NT: not tested, T: Toxic; this group was excluded from judgement in case of less than one hundred cells for structural aberration analysed or less than four hundred cells for polyploid cells analysed. 1) 0.5% carboxymethylcellulose sodium solution was used as vehicle. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran - Armitage's trend test was done at  $p < 0.05$ . 6) Five cells were analysed. \* : Significantly different from historical solvent control data with respect to TAG and polyploid at  $p < 0.05$  by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. \*\* : Purity was more than 98 %. Paratoluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.

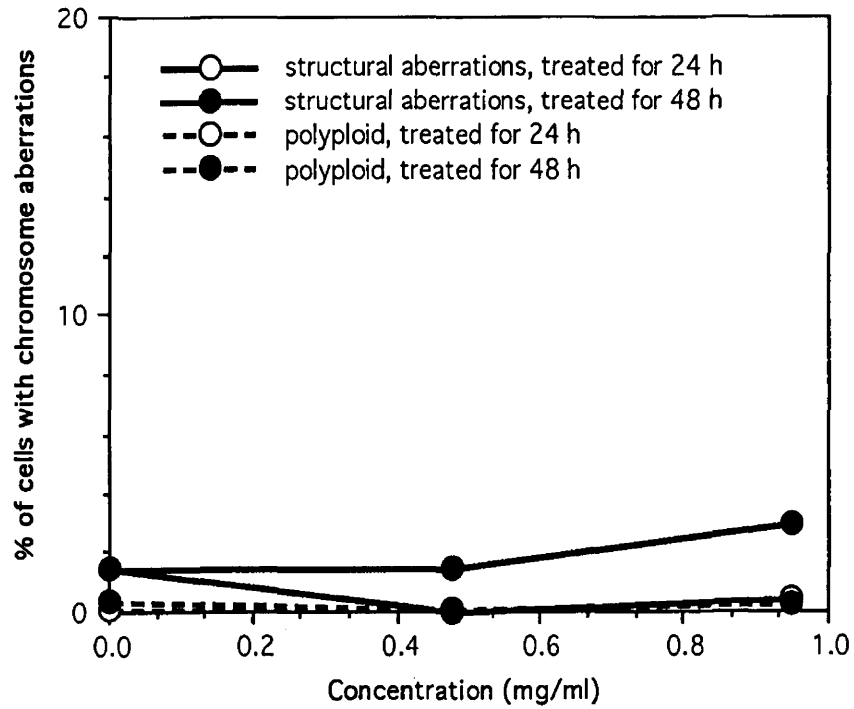
Table 6 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with pH-adjusted 2- amino- 5- methylbenzensulfonic acid (AMBS)\* under presence of S9 mix

Group	Concen- ration (mg/ml)	S 9 mix (h)	Time of exposure cells	No. of structural aberrations										Trend test <sup>5)</sup>								
				analysed gap			ctb			cse			mul <sup>2)</sup> total			Others <sup>3)</sup>	No. of cells with aberrations		Polyploid <sup>4)</sup> (%)	SA	NA	
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul	total	TAG (%)	TA (%)	TA (%)	TA (%)	TA (%)		TA (%)	TA (%)				TA (%)
Solvent <sup>1)</sup>	0	+	6-(18)	200	0	3	2	0	0	0	5	1	3	3	3	3	3	3	3	3	0.75	
AMBS <sup>6)</sup>	0.48	+	6-(18)	200	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.38	
AMBS	0.95	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13	NT
AMBS	1.9	+	6-(18)	200	2	6	0	0	1	0	9	0	6	6	6	6	6	6	6	6	0.13	NT
CPA	0.005	+	6-(18)	200	6	71	169	6	1	0	253	0	123	123	123	123	123	123	123	123	0.25	

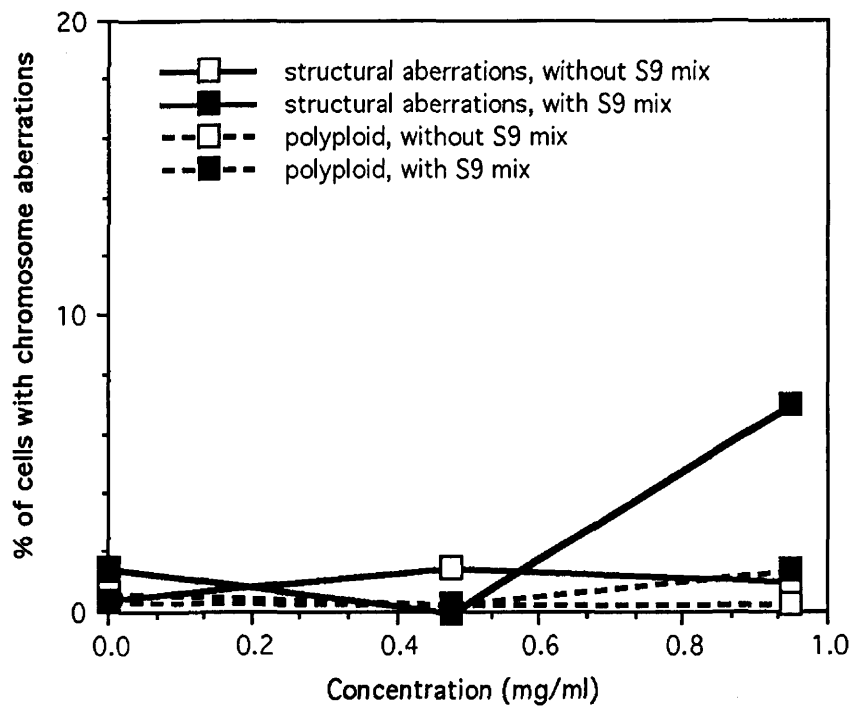
Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, ctc : chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide, NT: not tested.  
 1) 0.5 % carboxymethylcellulose sodium was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran · Armitage's trend test was done at p < 0.05 when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical data of negative control (vehicle) at p < 0.05 by Fisher's exact test. 6) The pH of treatment solution was adjusted with 1 N NaOH before adding to the dish. \* : Purity was more than 98 %. Paratoluidine (about 200 ppm) was contained as impurity.



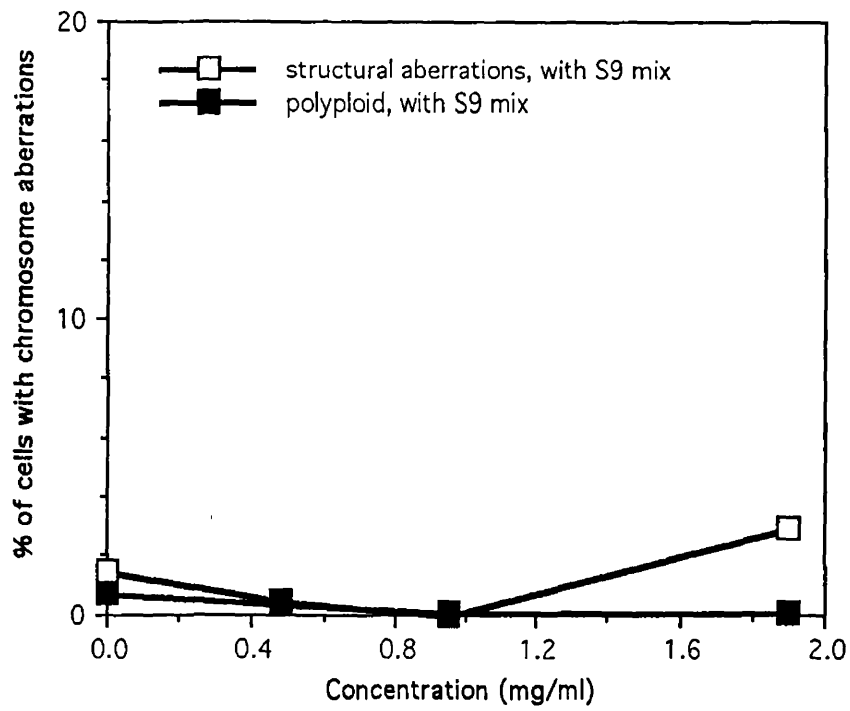
**Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid**



**Fig. 2** Induction of chromosome aberrations in CHL/IU cells continuously treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid without S9 mix



**Fig. 3** Induction of chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid for 6 h with and without S9 mix



**Fig. 4** Induction of chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with pH-adjusted 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid for 6 h with S9 mix