N-シクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドの
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 ---------- 3

1　細胞 ---------- 3

2　被験物質および陽性対照物質 ---------- 3

3　S9 反応液 ---------- 3

4　予備試験 ---------- 4

5　染色体異常試験 ---------- 4

6　染色体分析 ---------- 6

結果 ---------- 6

参考文献 ---------- 7

Fig. 1

Tables 1～3

[要　　約]

N-シクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド（CBTSA）は、CHL/IU 細胞（チャイニーズ・ハムスター、肺）に染色体異常を誘発しなかった。

CBTSA で CHL/IU 細胞を処理した場合、2ディッシュともに 0.5%以上の分裂指数を示した最も高い濃度（MI max）は、連続処理（新鮮培地中で 24時間処理）では 0.081 mg/mL であった。また、短時間処理の S9 mix 存在下（S9 反応液中で 6時間処理後 18時間の回復時間）では 0.33 mg/mL、および非存在下（S9 反応液の代わりに MEM 培地を使用）では 0.16 mg/mL であった。

このことから染色体異常試験では、連続処理（24時間および 48時間処理）、短時間処理の S9 mix 存在下および非存在下において、MI max の 2倍濃度である 0.16 mg/mL、0.65 mg/mL および 0.33 mg/mL をそれぞれ最高処理濃度とし、公比 2で 5濃度を設定した。染色体分析が可能な最高濃度は、連続処理で 0.040 mg/mL の濃度であったことから、これらの濃度を含む 3濃度群を観察対象とした。また、短時間処理の S9 mix 存在下および非存在下において観察可能な最高濃度は、それぞれ 0.081 mg/mL および 0.041 mg/mL の濃度であったため、これらの濃度を含む 2濃度群を観察対象とした。

染色体分析の結果、CBTSA を S9 mix 存在下で短時間処理した場合、0.041 mg/mL の濃度において染色体の構造異常が有意（4.5%、$p < 0.05$）に増加したが、濃度依存性は認められなかった。また、0.081 mg/mL の濃度において、誘発頻度は低いながらも倍数性細胞が有意（1.88%、$p < 0.05$）に増加し、濃度依存性も認められた。しかしながら、それらの出現頻度は低いものであった。このことから、S9 mix 存在下の短時間処理についてのみ、追加試験（確認試験）を行った。その結果、0.081 mg/mL において、染色体の構造異常（gap を含む）が有意に増加（3.5%、$p < 0.05$）し、0.041 mg/mL では、倍数性細胞が有意に増加（1.13%、$p < 0.05$）したが、傾向性検定の結果、いずれも濃度依存性は認められなかった。従って、S9 mix 存在下の確認試験においては、染色体の構造異常、倍数性細胞誘発性ともに陰性と判定した。

以上の結果より、最終的に *N*-シクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドは、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

[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。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。

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、CBTSA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。

[材料と方法]

1　細胞

CHL/IU 細胞（JCRB 細胞バンクより入手）は、牛胎児血清（Cansera International、ロット番号：2605420 および Filtron、ロット番号：55301）を 10%含むイーグル MEM 培地（日水製薬）を用い、CO_2 インキュベーター（5% CO_2、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 12代）。

2　被験物質および陽性対照物質

被験物質である CBTSA（CAS No. 95-33-0）の物理化学的性状等は Appendix 1 に示した。CBTSA は　　から提供された後、密封、冷蔵し、使用のつどジメチルスルホキシド（DMSO、和光純薬工業、ロット番号：ESJ4625 および DLJ5663）に溶解して希釈した。

陽性対照物質として用いたシクロホスファミド（CPA、Sigma Chemical、ロット番号：73H0846）およびマイトマイシン C（MC、協和醗酵工業、ロット番号：051AEG）は、注射用蒸留水（大塚製薬工場、ロット番号：K5H71 および K7A89）に溶かし、用時調製して用いた。

3　S9 反応液

S9（キッコーマン、ロット番号：RAA-333、1995年 9月製造、RAA-338、1995年 12月製造、および RAA-363、1997年5月製造）は、7週齢の雄 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肝臓から調製したものを購入し、使用時まで－80℃で保管した。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）および KCl を蒸留水に溶かし、混合液として－80℃に保管し、使用時はこれに S9、$MgCl_2$ および HEPES 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 と等量）および MEM 培地（血清不含）を混和した S9 反応液をディッシュに加えた（5% S9、0.83 mM G-6-P、0.67 mM β-$NADP^+$、0.83 mM $MgCl_2$、5.5 mM KCl、0.67 mM

HEPES）。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 培地を使用した。

4　予備試験

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、被験物質の分裂指数に及ぼす影響を調べた。CHL/IU 細胞を 0.25%トリプシンを用いて単離した後、4×10^3 個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL（2×10^4個）をガラスディッシュ（直径 6 cm、池本理化）に播種して 3日間培養した。

連続処理では、新鮮培地 5 mL と培地交換した後、被験物質調製液を 50 μL ずつ添加し 24時間処理した。

S9 mix 存在下における短時間処理では、S9 反応液 3 mL と培地交換した後、被験物質調製液を 30 μL 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 非存在下の処理群においては、S9 反応液の代わりに MEM 培地を用いた以外の操作は、S9 mix 存在下の処理群と同様に行った。

連続処理および短時間処理ともに、0.081 ～ 2.6 mg/mL の濃度範囲で処理した。培養終了後、染色体標本を作製した（染色体標本作製法は、後述の「染色体異常試験」と同様）。1000細胞あたりの分裂中期像数をスコアし、溶媒対照群に対する被験物質処理群の分裂指数の相対値（%）を求めた。1濃度あたり 2枚のディッシュを用いた。

5　染色体異常試験

予備試験の結果、連続および短時間処理において、処理濃度に依存して CHL/IU 細胞の分裂を抑制した。また、MI max は、連続処理では 0.081 mg/mL、短時間処理のS9 mix 存在下および非存在下においては、それぞれ 0.33 mg/mL、および 0.16 mg/mL であった（Fig. 1）。

このことから染色体異常試験において、全ての処理方法で、それぞれ MI max の 2倍濃度を最高処理濃度とし、公比 2 で各 5濃度を設定した（連続処理：0.010、0.020、0.040、0.080、0.16 mg/mL、S9 mix 存在下の短時間処理：0.041、0.081、0.16、0.33、0.65 mg/mL、S9 mix 非存在下の短時間処理：0.021、0.041、0.083、0.17、0.33 mg/mL）。なお、連続処

理の48時間処理群の濃度は、24時間処理群と同じ濃度に設定した。

染色体異常試験においては1濃度あたり2枚のディッシュを用い、染色体標本を作製した。試験操作は、予備試験とほぼ同様に行った。連続処理では24時間と48時間の被験物質処理群に溶媒対照群と陽性対照群および無処理対照群（新鮮培地と交換）を設け、短時間処理では、被験物質をS9 mix存在下と非存在下で6時間処理した。なお、処理群の他に溶媒対照群、陽性対照群および無処理対照群を設けた。また、溶媒対照群と観察対象とした濃度群については、分裂指数の分析（1濃度あたり1000細胞の観察）を行い、細胞毒性の指標とした。さらに短時間処理のS9 mix存在下においては追加試験（確認試験）を実施した。追加試験では、本試験と同様に0.65 mg/mLを最高濃度とし、公比2で6濃度を設定した（短時間処理のS9 mix存在下：0.020、0.041、0.081、0.16、0.33、0.65 mg/mL）。また、1濃度あたり4枚のプラスチックディッシュ（直径6 cm、Corning）を用い、うち2ディッシュは染色体標本を作製し、別の2ディッシュについては、単層培養細胞密度計（Monocellater™、オリンパス光学工業）を用いて、溶媒対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計算し、細胞毒性の指標とした。

陽性対照群については、MCを新鮮培地5 mLに最終濃度が0.05 μg/mLとなるように添加し、またCPAをS9反応液およびMEM培地3 mLに最終濃度が5 μg/mLとなるように添加した。

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含有リン酸緩衝塩類溶液（Ca^{2+}およびMg^{2+}を含まない）により細胞をはがし、10 mLの遠沈管に集め遠沈した（1000 ～ 1200 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枚のスライド標本を作製した。

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。

染色体分析に先立って、分裂指数により、MI maxを観察対象の最高濃度とした。

6　染色体分析

染色体異常試験における MI max は、連続処理では 0.040 mg/mL、短時間処理の S9 mix 存在下および非存在下においては、それぞれ0.081 および0.041 mg/mL であったことから、これらの濃度を含む 3濃度群（連続処理）および 2濃度群（短時間処理）を観察対象とした（溶媒対照群に対する相対比を Table 1、2 に示した）。また、追加試験における短時間処理の S9 mix 存在下では、染色体分析の可能な最高濃度は、本試験同様 0.081 mg/mL であり、それ以上の濃度では充分な分裂中期細胞が得られなかったことから、この濃度を含む3濃度群を観察対照とした（Table 3）。

染色体分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験（MMS）研究会[1] による分類法に基づいて行った。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。また、異常を有する細胞は、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で表し、記録用紙に記録した。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。構造異常は 1群 200個、倍数性細胞は 1群 800個の分裂中期細胞を分析した。

溶媒の背景データ（Appendix 2）と被験物質処理群間で、フィッシャーの直接確率法[2] により、familywise の有意水準を 5%として有意差検定を実施した。直接確率法で有意差がある場合、用量依存性の有無をコクラン・アーミテッジの傾向性検定[3]（$p < 0.05$）により判定した。最終的な判定は、追加試験の結果を参考にし、再現性等を検討して行った。

[結　　果]

染色体分析の結果、CBTSA で連続処理した場合、いずれの処理群においても染色体の構造異常の増加はみられなかった（Table 1）。短時間処理においては、S9 mix 存在下の 0.041 mg/mL の濃度においてのみ染色体の構造異常が有意（4.5%、$p< 0.05$）に増加したが、濃度依存性は認められなかった（Table 2）。また、倍数性細胞の数は、S9 mix 存在下の短時間処理群においてのみ有意に増加し（0.081 mg/mL、1.88%、$p < 0.05$）、傾向性検定において有意差も認められた（$p < 0.05$、Table 2）。しかしながら、倍数性細胞の出現頻度は低く、明確な判定ができなかったことから S9 mix 存在下の短時間処理群についてのみ

確認試験を行うこととした。

確認試験における短時間処理の染色体分析の結果を Table 3 に示した。S9 mix 存在下で短時間処理した 0.081 mg/mL の濃度では、染色体の構造異常（gap を含む）が有意に増加（3.5%、$p < 0.05$）したが、傾向性検定の結果、濃度依存性は認められなかった。倍数性細胞については、0.081 mg/mL では毒性のため、規定数の分析ができなかった。また、0.41 mg/mL では倍数性細胞が有意に増加（1.13%、$p < 0.05$）したが、傾向性検定の結果、濃度依存性は認められなかった。よって、追加試験における S9 mix 存在下の短時間処理群では染色体の構造異常、倍数性細胞誘発性ともに陰性と判定した。

本試験において、陽性対照物質として用いた MC は、連続処理において染色体の構造異常を誘発し（Table 1）、CPA は短時間処理の S9 mix 存在下において染色体の構造異常を誘発した（Table 2、3）。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、CBTSA は、上記の試験条件下で、試験管内の CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

[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)

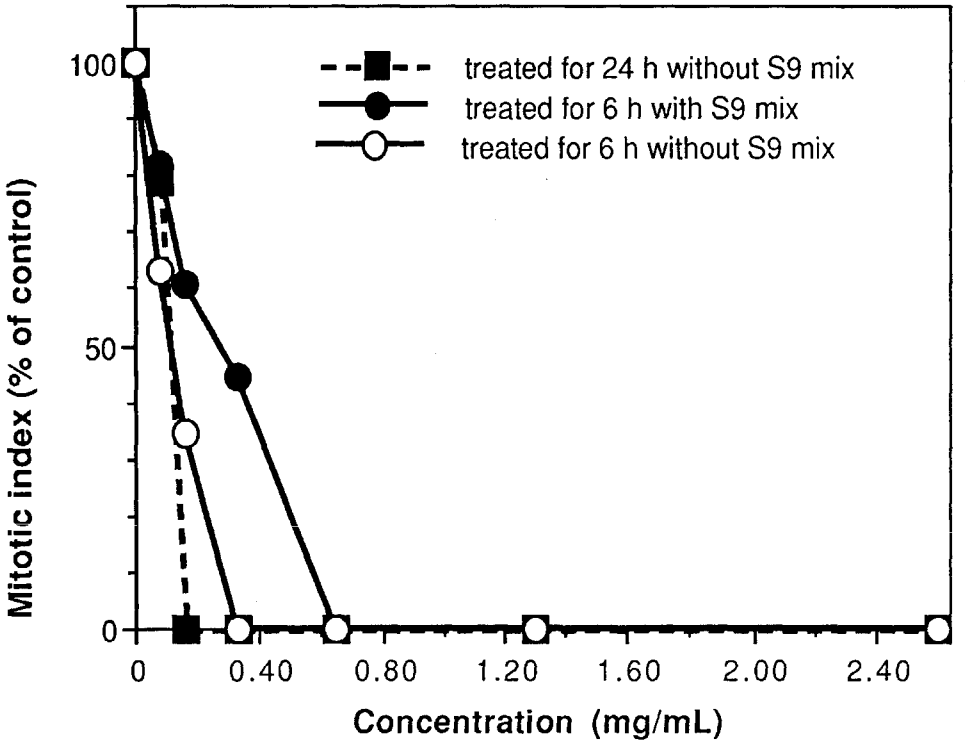

Fig.1 Mitotic inhibition of CHL/IU cells treated with *N* -cyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with *N* -cyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (CBTSA)* without S9 mix

Group	Concen-tration (mg/mL)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Trend test[5]		Concurrent[6] cytotoxicity (%)
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Control[1]			200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.00			—
Solvent[1]	0	24	200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25			100.0
CBTSA	0.010	24	200	0	0	0	0	0	0	0	2	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			128.0
CBTSA	0.020	24	200	0	3	0	3	0	0	6	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.38	NT	NT	128.0
CBTSA	0.040	24	200	1	1	0	0	1	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.88			160.0
CBTSA	0.080 **	24	—											—			—
CBTSA	0.16 **	24	—											—			—
MC	0.00005	24	200	1	28	99	0	0	0	128	0	85 (42.5)	85 (42.5)	0.25			—
Solvent[1]	0	48	200	0	1	0	1	0	0	2	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			100.0
CBTSA	0.010	48	200	1	2	0	2	0	0	5	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.38			135.3
CBTSA	0.020	48	200	0	3	0	0	0	0	3	1	3 (1.5)	3 (1.5)	0.38	NT	NT	164.7
CBTSA	0.040	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38			117.6
CBTSA	0.080 **	48	—											—			—
CBTSA	0.16 **	48	—											—			—
MC	0.00005	48	200	1	40	80	6	0	0	127	1	66 (33.0)	65 (32.5)	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, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C, NT: not tested.

1) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) More than nine 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) Relative metaphase frequency to the solvent control, representing cytotoxicity, was calculated. * : Purity of test substance was 98.8 %. Dibenzothiazyldisulfide (0.68 wt%) was contained as impurity.

** : Chromosome analysis was not performed because there were few cells due to cytotoxicity.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with *N* -cyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (CBTSA)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Trend test[5]		Concurrent[6] cytotoxicity (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Control				200	0	0	0	2	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.13			—
Solvent[1]	0	−	6 - (18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25			100.0
CBTSA	0.021	−	6 - (18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38			61.9
CBTSA	0.041	−	6 - (18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.75	NT	NT	72.6
CBTSA	0.083 ***	−	6 - (18)	—											—			—
CBTSA	0.17 ***	−	6 - (18)	—											—			—
CBTSA	0.33 ***	−	6 - (18)	—											—			—
CPA	0.005	−	6 - (18)	200	0	1	0	3	0	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.00			
Solvent[1]	0	+	6 - (18)	200	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38			100.0
CBTSA	0.041	+	6 - (18)	200	3	5	3	0	0	0	11	1	9 *(4.5)	7 (3.5)	0.88			97.0
CBTSA	0.081	+	6 - (18)	200	1	6	2	1	0	0	10	2	5 (2.5)	4 (2.0)	1.88 *	−	+	140.9
CBTSA	0.16 ***	+	6 - (18)	—											—			—
CBTSA	0.33 ***	+	6 - (18)	—											—			—
CBTSA	0.65 ***	+	6 - (18)	—											—			—
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	5	102	379	8	3	50	547	2	179 (89.5)	179 (89.5)	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, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide, NT: not tested.
1) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) More than nine 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 ($p<0.05$). 6) Relative metaphase frequency to the solvent control, representing cytotoxicity, was calculated. * : Significantly different from historical solvent control ($p<0.05$) by Fisher's exact test using a Bonferroni correction for multiple comparisons. ** : Purity of test substance was 98.8 %. Dibenzothiazyldisulfide (0.68 wt%) was contained as impurity.
*** : Chromosome analysis was not performed because there were few cells due to cytotoxicity.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with N-cyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (CBTSA)** with S9 mix in confirmation test

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Trend test[5]		Concurrent[6] cytotoxicity (%)
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Solvent[1]	0	+	6 - (18)	200	0	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.88			100.0
CBTSA	0.020	+	6 - (18)	200	0	1	0	0	3	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.38			101.0
CBTSA	0.041	+	6 - (18)	200	0	0	2	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	1.13*	–	–	76.5 ****
CBTSA	0.081	+	6 - (18)	199	0	2	9	0	0	10	21	0	7 *(3.5)	7 (3.5)	0.79[7]			90.5 ****
CBTSA	0.16 ***	+	6 - (18)	—											—			77.5 ****
CBTSA	0.33 ***	+	6 - (18)	—											—			149.0****
CBTSA	0.65 ***	+	6 - (18)	—											—			151.0****
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	2	12	46	0	1	0	61	0	44 (22.0)	42 (21.0)	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 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) Dimethylsulfoxide was used as solvent. 2) More than nine 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 ($p < 0.05$). 6) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with Monocellater™. 7) Seven hundred and sixty-one cells were analysed * : Significantly different from historical solvent control ($p < 0.05$) by Fisher's exact test using a Bonferroni's correction for multiple comparisons. ** : Purity of test substance was 98.8 %. Dibenzothiazyldisulfide (0.68 wt%) was contained as impurity. *** : Chromosome analysis was not performed because there was no metaphase due to severe cytotoxicity. **** : Measured value did not represent the real cell confluency because test substance adhered onto culture dishes.