ブチルメタクリレートの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：3175（ 115－063 ）

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目　　次

1.	要　　約	7 頁
2.	試　験　題　目	8
3.	試　験　目　的	8
4.	試　験　番　号	8
9.	被　験　物　質	9
10.	試験材料および方法	11
11.	試　験　結　果	16
12.	考察および結論	17
13.	参考とした資料	18

Figures, Tables

Figure 1	Dose-survival curves of Butyl methacrylate [continuously exposure]	20
Figure 2	Dose-survival curves of Butyl methacrylate [short-term exposure]	21
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by Butyl methacrylate [continuously exposure : 24 hrs]	22
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by Butyl methacrylate [continuously exposure : 48 hrs]	23
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by Butyl methacrylate [short-term exposure : -S9]	24
Figure 6	Incidence of structural aberrations induced by Butyl methacrylate [short-term exposure : +S9]	25
Table 1	Results of growth inhibition test on Butyl methacrylate [continuously exposure]	26
Table 2	Results of growth inhibition test on Butyl methacrylate [short-term exposure]	27
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Butyl methacrylate [continuously exposure : 24 hrs]	28
Table 4	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Butyl methacrylate [continuously exposure : 48 hrs]	29
Table 5	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Butyl methacrylate [short-term exposure : -S9]	30
Table 6	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Butyl methacrylate [short-term exposure : +S9]	31

1. 要　　約：

本試験条件下の *in vitro* 試験系において，ブチルメタクリレートには染色体異常を誘起する作用がないものと判断した．

すなわち，ブチルメタクリレートの変異原性について，染色体異常誘発性の有無を検討するため，チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った．
あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に，試験用量を設定した．すなわち，連続処理法（24および48時間処理）ならびに短時間処理法 -S9で 178，355，710 および 1420μg/ml（≒10 mM），同処理法 +S9で 355，710 および 1420μg/ml のそれぞれ３～４用量について染色体異常を観察した．

その結果，被験物質処理群では連続処理法ならびに短時間処理法の各用量群で明確な染色体異常の誘発は認められなかった．
また，連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンＣ（MMC）および短時間処理法の陽性対照物質シクロホスファミド（CP）は，いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した．

2. 試　験　題　目：　ブチルメタクリレートの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試　験　目　的：　被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討するため，環保業第237号，薬発第306号，62基局第303号（昭和62年３月31日）の「新規化学物質に係る試験の方法について」ならびにＯＥＣＤ化学品ガイドライン 473（1983年５月26日）に従って，哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した．
なお，試験の実施は環企研第233号，衛生第38号，63基局第823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第４条に規定する試験施設について」ならびにＯＥＣＤのＧＬＰ（1982年）の基準を満たすものとした．

4. 試　験　番　号：　３１７５（115－063）

9. 被　験　物　質：

1) 被験物質名　　ブチルメタクリレート

2) CAS. No.　　９７－８８－１

3) ロット番号

4) 純　　度　　99.6%

5) 提　供　元

6) 保管条件　　冷暗所

7) 化　学　名　　メタクリル酸ｎ－ブチル

8) 化学構造

$$CH_2=\underset{\underset{CH_3}{|}}{C}-COOC_4H_9$$

9) 分　子　式　　$C_8H_{14}O_2$

10) 分　子　量　　142

11) 物質の状態　　無色液体

12) 融　　点　　－60℃以下

13) 沸　　点　　164℃

14) 溶　解　性　　水：0.04 wt%／20℃

15) 安　定　性　　熱，光で重合する．室温，黄色灯下で安定．

16) 蒸　気　圧　　2626 Pa

17) 取り扱い上の注意

a. 引火しやすく，またその蒸気は空気と混合して爆発性混合ガスを形成するので，火気は絶対に近づけない．
b. 静電気対策を行い，作業衣，作業靴は導電性のものを用いる．
c. 取り扱い後は，手洗い，洗顔を十分に行う．

18) 被験物質保管および残余被験物質の処理

保管用被験物質（約 1 g）以外の残余被験物質は，被験物質提供元へ返却した．

10. 試験材料および方法：

1) 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから，試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株（ＣＨＬ細胞）を選択した．ＣＨＬ細胞は昭和59年11月15日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受け，一部はジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；MERCK 社；純度99.7%以上；Lot No. K21387978 513）を容量比で 10%添加した後，液体窒素中に保存し，残りは３～５日ごとに継代した．

なお，染色体異常試験では継代数30および34の細胞を用いた．

2) 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 30P3066）に，メンブランフィルター（0.45μm：CORNING 社）を用いて加圧濾過除菌した非働化（56℃，30分）済み仔牛血清（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 39N9854）を最終濃度で 10%になるよう添加した．

調製後の培養液は使用時まで冷暗所（４℃）に保存した．

3) 培養条件

CO_2インキュベーターを用い，CO_2濃度５%，37℃の条件で細胞を培養した．

4) Ｓ９ ｍｉｘ

製造後６ヵ月以内のキッコーマン株式会社製 S9 mix（Lot No. CAM-350）を試験に使用した．S9 調製の際の動物種，性，臓器，誘導物質，誘導方法等ならびに S9 mix の組成を以下に示した．

a. ロット番号	ＲＡＡ－３５０
b. 製造日	平成８年８月23日（誘導物質投与開始後５日目）
c. 使用動物	ラット： Sprague-Dawley 系
d. 性／週齢	雄／７週齢
e. 体重	203 ～ 254 g
f. 臓器	肝臓
g. 誘導物質	Phenobarbital (PB)
	5,6-Benzoflavone (BF)
h. 投与量および回数	PB: 30 mg/kg １回（１日目）
	60 mg/kg ３回（２～４日目）
	BF: 80 mg/kg １回（３日目）
i. 投与方法	腹腔内投与
j. 蛋白含量	27.3 mg/ml

成　分	S9 mix 1 ml 中の量
S 9	0.3 ml
$MgCl_2$	5 μmol
KCl	33 μmol
G－6－P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES緩衝液	4 μmol

5) 被験物質溶液の調製

被験物質をDMSO (Lot No. K22063378 534) に溶解させ調製原液とした．この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に希釈した後，直ちに処理を行った．

6) 対照群

a. 溶媒対照

使用溶媒のDMSOを容量比 0.5%添加して試験した．

b. 陽性対照（連続処理法）

注射用水（株式会社 大塚製薬工場；Lot No. K6F81) 5 ml に溶解したマイトマイシンC（MMC：協和醗酵工業株式会社；Lot No. 103AFD) を生理食塩液（日本薬局方生理食塩液：株式会社 大塚製薬工場；Lot No. K6C82) を用いて希釈した後，24時間処理で 0.05μg/ml，48時間処理で 0.025μg/ml の用量で試験した．

c. 陽性対照（短時間処理法）

注射用水（Lot No. K6F81) 5 ml に溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社；Lot No. 60113) を生理食塩液（Lot No. K6C82) を用いて希釈した後，12.5μg/ml の用量で試験した．

7) 予備試験（細胞増殖抑制試験）

a. 試験用量

予備的な試験（4.05, 13.5, 45.0, 150 および 500μg／プレートの５用量：公比 10/3) の結果，明確な細胞増殖抑制作用は観察されなかった．本結果を参考に，10 mM 相当の濃度を含む６用量（公比２）を設定した．各試験系での試験用量範囲を以下に示した．

１用量当たり２ウエルを用いた．

試　験	用量数	試験用量（μg/ml)
連続処理法24時間処理	6	110 ～ 1420
連続処理法48時間処理	6	110 ～ 1420
短時間処理法 -S9処理	6	110 ～ 1420
短時間処理法 +S9処理	6	110 ～ 1420

b. 連続処理法

細胞培養フラスコ（培養面積 25 cm^2）に24時間処理の場合，培養液を用いて８×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 5 ml（４×10^4 細胞），48時間処理の場合，４×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 5 ml（２×10^4 細胞）を播種した．培養３日後に，使用溶媒（以下溶媒）あるいは被験物質溶液を 25μl 加えた．さらに24あるいは48時間培養を続けた後に細胞生存率（溶媒対照に対する比）を求めた．

c. 短時間処理法

培養液を用いて８×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 5 ml（４×10^4 細胞）を細胞培養フラスコに播種した．培養３日後に -S9処理の場合，培養液 2 ml を除き，溶媒あるいは被験物質溶液 15μl を加え，+S9処理の場合は培養液 2.5 ml を除き S9 mix 500μl，溶媒あるいは被験物質溶液 15μl を加えてそれぞれ６時間培養した．各フラスコの培養液を除去した後，ダルベッコリン酸緩衝液（LIFE TECHNOLOGIES 社）を用いて細胞を洗浄した．新鮮な培養液 3 ml を加え，さらに18時間培養を続けた後に細胞生存率を求めた．

d. 50％細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各フラスコから培養液を除き，生理食塩液を用いて細胞を１回洗浄した．10％中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：和光純薬工業株式会社；Lot No. D1014）を加えて約10分間細胞を固定した後，0.1％クリスタル・バイオレット（関東化学株式会社；Lot No. 607E4067）水溶液で10分間染色した．各フラスコを水洗した後，十分乾燥させた．

各フラスコに色素溶出液（30％エタノール，１％酢酸水溶液）を 10 ml 加え，５分間程度放置した後，580 nm での吸光度を分光光度計（105-50型；株式会社 日立製作所）を用いて測定した．溶媒対照群での吸光度に対する比（＝細胞生存率）を各用量群について求め，さらにプロビット法を用いて50％細胞増殖抑制濃度を算出した．なお，算出には 184～1420μg/ml の５点（連続処理法24時間処理），110～1420μg/ml の６点（連続処理法48時間処理）および 110～1420μg/ml の６点（短時間処理法-S9処理）を用いた．

e. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1～2 および Table 1～2 に示した．

50％細胞増殖抑制濃度は，連続処理法24時間処理で 532μg/ml，同48時間処理で 386μg/ml，短時間処理法-S9処理で 547μg/ml，同+S9処理では 10 mM（およそ 1420μg/ml）以上であった．なお，すべての用量で被験物質添加時に白濁が生じたが，攪拌後消失した．また，511μg/ml 以上の用量では培養液表面に油滴状の被験物質が観察されたが，培養終了時には特筆すべき変化は観察されなかった．

8) 本試験（染色体異常試験）

a. 試験用量

細胞増殖抑制試験結果を基に，各試験系それぞれ計４～５用量（公比２：下表参照）を本試験の用量に設定した．短時間処理法においては 10 mM 相当の用量を最高用量に設定した．

１用量当たり２フラスコを用いた．

試　験	試　験　用　量　（μg/ml）				
連続処理24時間処理	88.8,	178,	355,	710,	1420
連続処理48時間処理	88.8,	178,	355,	710,	1420
短時間処理法-S9処理	178,	355,	710,	1420	
短時間処理法+S9処理	178,	355,	710,	1420	

下線を付した用量について顕微鏡観察を実施した．

b. 連続処理法

細胞培養フラスコ（培養面積 25 cm^2）に24時間処理の場合，培養液を用いて８×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 5 ml（４×10^4 細胞），48時間処理の場合，４×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 5 ml（２×10^4 細胞）を播種した．培養３日後に溶媒，被験物質溶液 25μl あるいは陽性対照物質溶液 500μl を加え，さらに24および48時間培養を続けた後に染色体標本を作製した．

c. 短時間処理法

培養液を用いて８×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 5 ml（４×10^4 細胞）を培養フラスコに播種した．培養３日後に -S9処理の場合，培養液 2 ml を除き，溶媒，被験物質溶液 15μl あるいは陽性対照物質溶液 300μl を加え，+S9処理の場合は培養液 2.5 ml を除き S9 mix 500μl，溶媒，被験物質溶液 15μl あるいは陽性対照物質溶液 300μl を加えてそれぞれ６時間培養した．各フラスコの培養液を除去した後，ダルベッコリン酸緩衝液（LIFE TECHNOLOGIES 社）を用いて細胞を洗浄した．新鮮な培養液 3 ml を加え，さらに18時間培養を続けた後に染色体標本を作製した．

d. 標本の作製

染色体標本作製の２時間前に，最終濃度で 0.2μg/ml，すなわち培養液 1 ml 当たり 20μl のコルセミド溶液（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 22K5165）を添加し，細胞分裂を中期で停止させた．次いで，培養液を遠心管に全量移した後，0.25%トリプシン溶液（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 16K9063）を用いてフラスコから細胞を剥離し，遠心管内の培養液に加えた．細胞懸濁液を 1000 r.p.m.で５分間遠心分離して培養液を除いた後，37℃に保温しておいた 75 mM 塩化カリウム水溶液を約 5 ml 加え，37℃中で20分程度低張処理を行った．遠心分離により低張液を除いた後，４℃に冷却した固定液（メタノール３容：酢酸１容）で細胞を固定した．固定液を３回交換した後，新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし，脱脂洗浄済みのスライドガラス上に１～２滴ずつ滴下した．スライド標本を十分乾燥させ，1/100 M ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 6.8：MERCK 社；Lot No. 322 S 601974）を用いて希釈した 1.2%ギムザ染色液（MERCK 社；Lot No. 540074625）で12分間染色した．スライドを軽く水洗した後，乾燥させた．

e. 染色体の観察

各フラスコ当たり 100個，すなわち１用量当たり 200個の分裂中期像を顕微鏡下（×600 程度）で観察し，染色体の形態的変化としてギャップ（gap），染色分体切断（ctb），染色体切断（csb），染色分体交換（cte），染色体交換（cse）およびその他（oth）の構造異常に分類した．同時に，多倍体細胞の出現率を記録した．ただし，染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し，染色体切断様の像が認められる場合，その非染色性領域が当該染色体の分体幅と同程度以上，かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した．なお，ギャップのみ保有する細胞を含めた場合（+gap）と，含めない場合（-gap）とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した．

すべての標本をコード化した後，マスキング法で観察した．

9) 結果の解析

各試験群の構造異常を有する細胞ならびに多倍体細胞の出現頻度を，下記に示す基準を用いて判断し，さらに再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した．最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めた場合について行った．なお，統計学的手法を用いた検定は実施しなかった．

５%未満 ---- 陰　性（－）
５%以上～10%未満 ---- 疑陽性（±）
10%以上 ---- 陽　性（＋）

11. 試　験　結　果：

1) 連続処理法24時間処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 1 に示した.

ブチルメタクリレート処理群での染色体構造異常ならびに多倍体細胞の出現頻度は，溶媒対照と同等であった．また，最高用量の 1420μg/ml では観察可能な分裂中期像はほとんど観察されなかった.

一方，陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され，その出現頻度は +gapで 71.0%を示した.

2) 連続処理法48時間処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 2 に示した.

被験物質処理群での染色体構造異常ならびに多倍体細胞の出現頻度は，溶媒対照と同等であった．また，最高用量の 1420μg/ml では生存細胞は極僅かしか観察されず，710μg/ml においても分裂中期像の顕著な減少が認められた.

陽性対照では構造異常細胞が +gapで 60.5%出現した.

3) 短時間処理法 -S9処理

試験結果を Figure 5, Table 5 および Appendix 3 に示した.

被験物質処理群での染色体構造異常ならびに多倍体細胞の出現頻度は，溶媒対照と同等であった．また，最高用量の 1420μg/ml では観察可能な分裂中期像はほとんど観察されず，710μg/ml においてもわずかに減少していた.

一方，CP で処理した群では代謝活性化が行われないため，染色体異常の明確な誘発は認められなかった.

4) 短時間処理法 +S9処理

試験結果を Figure 6, Table 6 および Appendix 4 に示した.

被験物質処理群での染色体構造異常ならびに多倍体細胞の出現頻度は，溶媒対照と同等であった．また，いずれの処理群においても顕著な細胞毒性作用は観察されなかった.

一方，代謝活性化を必要とする陽性対照物質 CP で処理した細胞では，多数の異常が出現し，+gapで 67.5%の細胞に構造異常が認められた.

すべての試験用量において被験物質添加の際に培養液が白濁したが，攪拌後消失した．また，710μg/ml 以上の用量では培養液表面に油滴状の被験物質が観察されたが，培養終了時には特筆すべき変化は観察されなかった.

12. 考察および結論：

ブチルメタクリレートの変異原性，すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため，培養細胞（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した．
試験用量として細胞増殖抑制試験結果を基に連続処理法ならびに短時間処理法において，細胞の増殖が抑制される濃度あるいは 10 mM 相当の濃度まで検討した．
その結果，連続処理法（24および48時間処理）ならびに短時間処理法（-S9および+S9処理）のブチルメタクリレート処理群では明確な染色体異常の誘発は認められなかった．
一方，溶媒対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当センターの背景データの範囲内であり，本試験が有効であることを示していた．

以上の試験結果から，本試験条件下においてブチルメタクリレートの哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し，陰性と判定した．
なお，類縁化合物であるメタクリル酸 *tert*-ブチルエステル，メタクリル酸（2-ヒドロキシプロピル）エステルおよびメタクリル酸 2-ヒドロキシエチルエステルの変異原性については，*Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA1537 および *Esherichia coli* WP2 *uvrA* を用いた復帰突然変異試験で陰性，CHL細胞を用いた *in vitro* 染色体異常試験で陽性と報告されている．

13. 参考とした資料：

・Ishidate, M., Jr., and Odashima, S. : Chromosome tests with 134 compoundson Chinese hamster cells *in vitro* -A screening for chemical carcinogens. Mut. Res., 48 : 337～354, 1977.

・石館　基：　培養細胞を用いる染色体異常の検出法，組織培養，　5 : 115～122, 1979.

・Evans, H. J. : Cytological methods of detecting chemical mutagens. In A. Hollander (Ed.), Chemical Mutagens, Vol.4 : 1～25, Plenum, New York, 1976.

・Matsuoka, A., *et al.* : Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro* . Mut. Res., 66 : 277～290, 1979.

・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.

・Evans, H. J. and O' Riordan, M. L. : Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberration in mutagens tests, Mut. Res., 31 : 135～148, 1975.

・Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research. Toxicol. Appl. Pharmacol., 22, 269～275, 1972.

・　　化学物質毒性試験報告，4，499～506，1996.

・　　化学物質毒性試験報告，4，579～586，1996.

・　　化学物質毒性試験報告，5，543～552，1997.

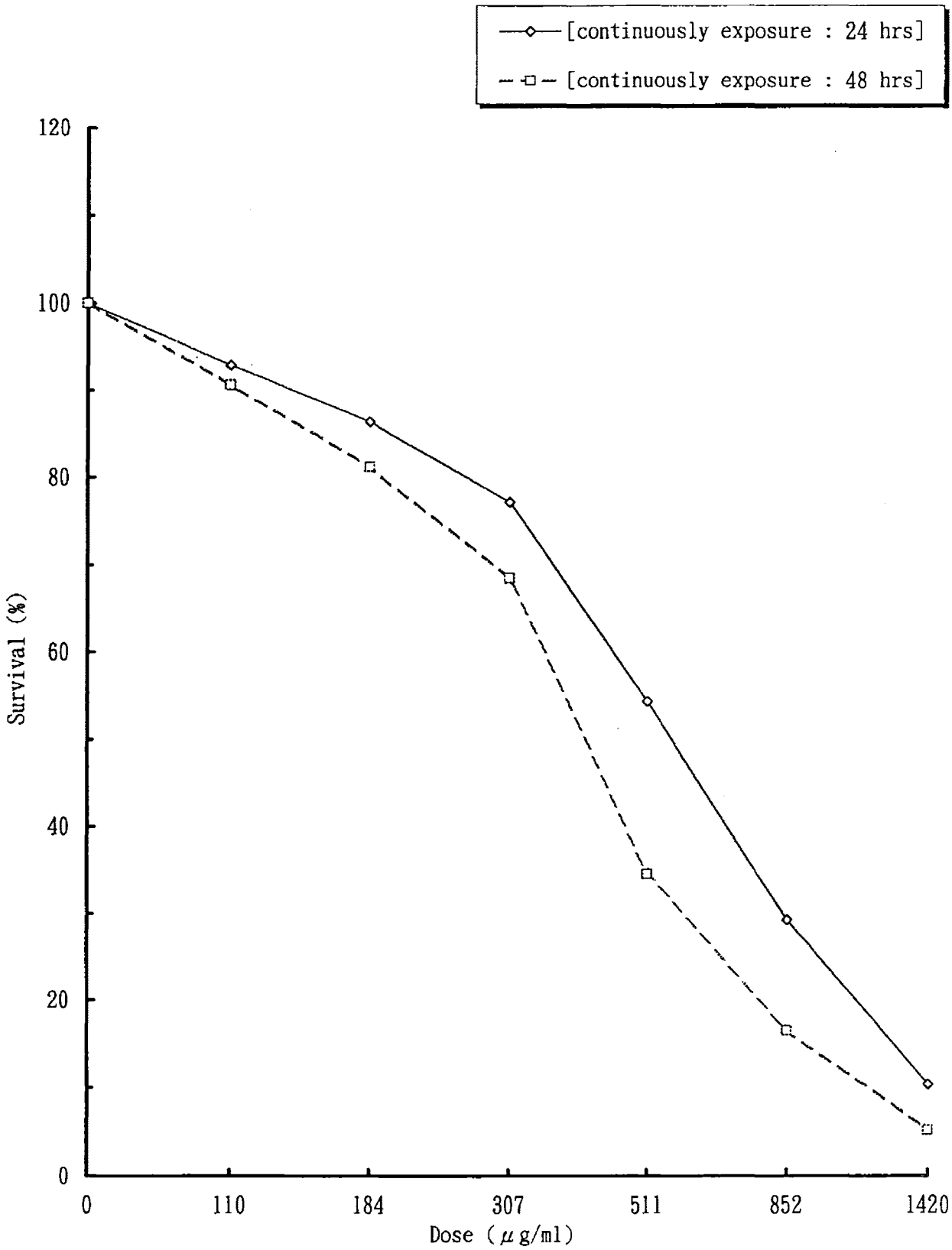

Figure 1. Dose-survival curves of Butyl methacrylate [continuously exposure]

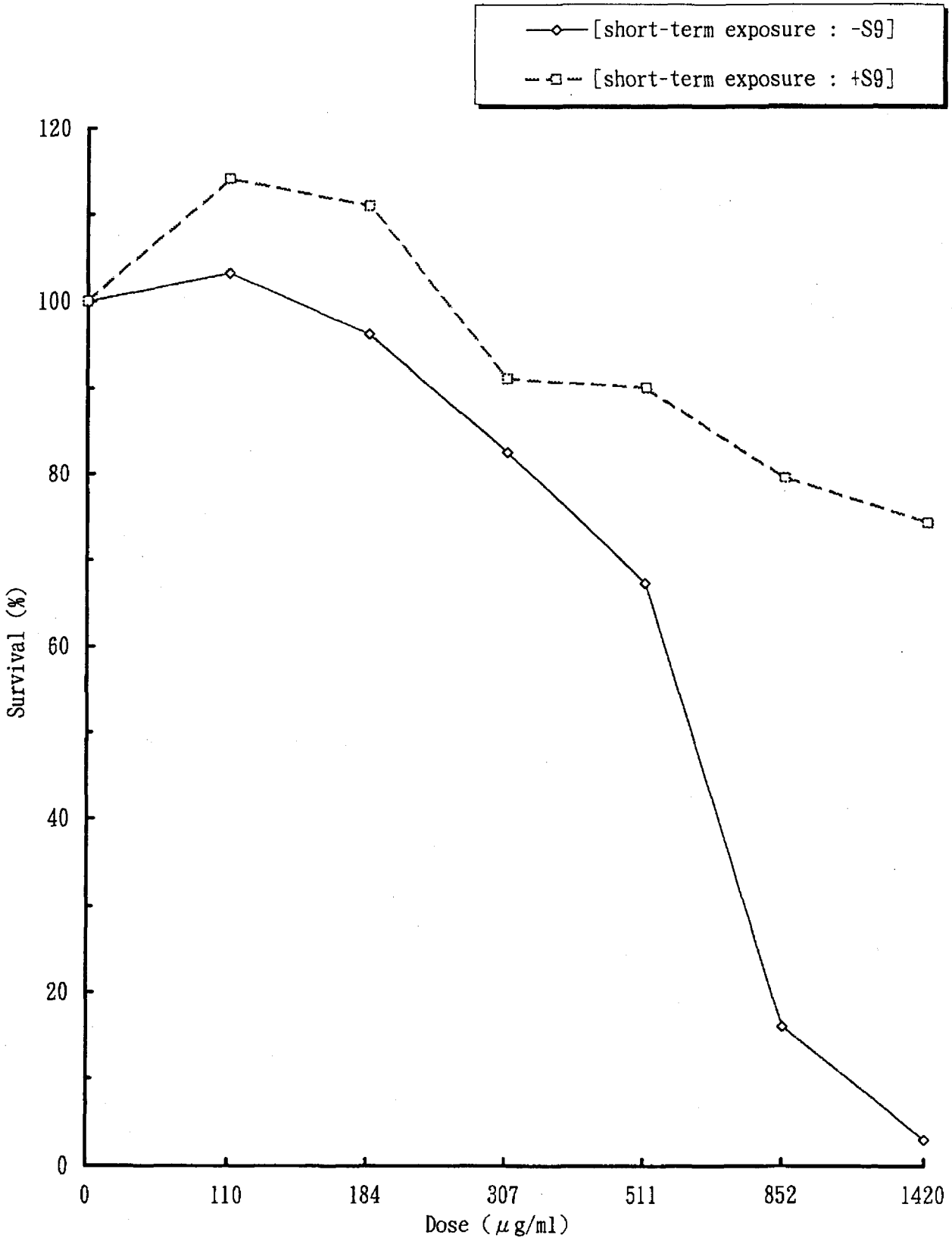

Figure 2. Dose-survival curves of Butyl methacrylate [short-term exposure]

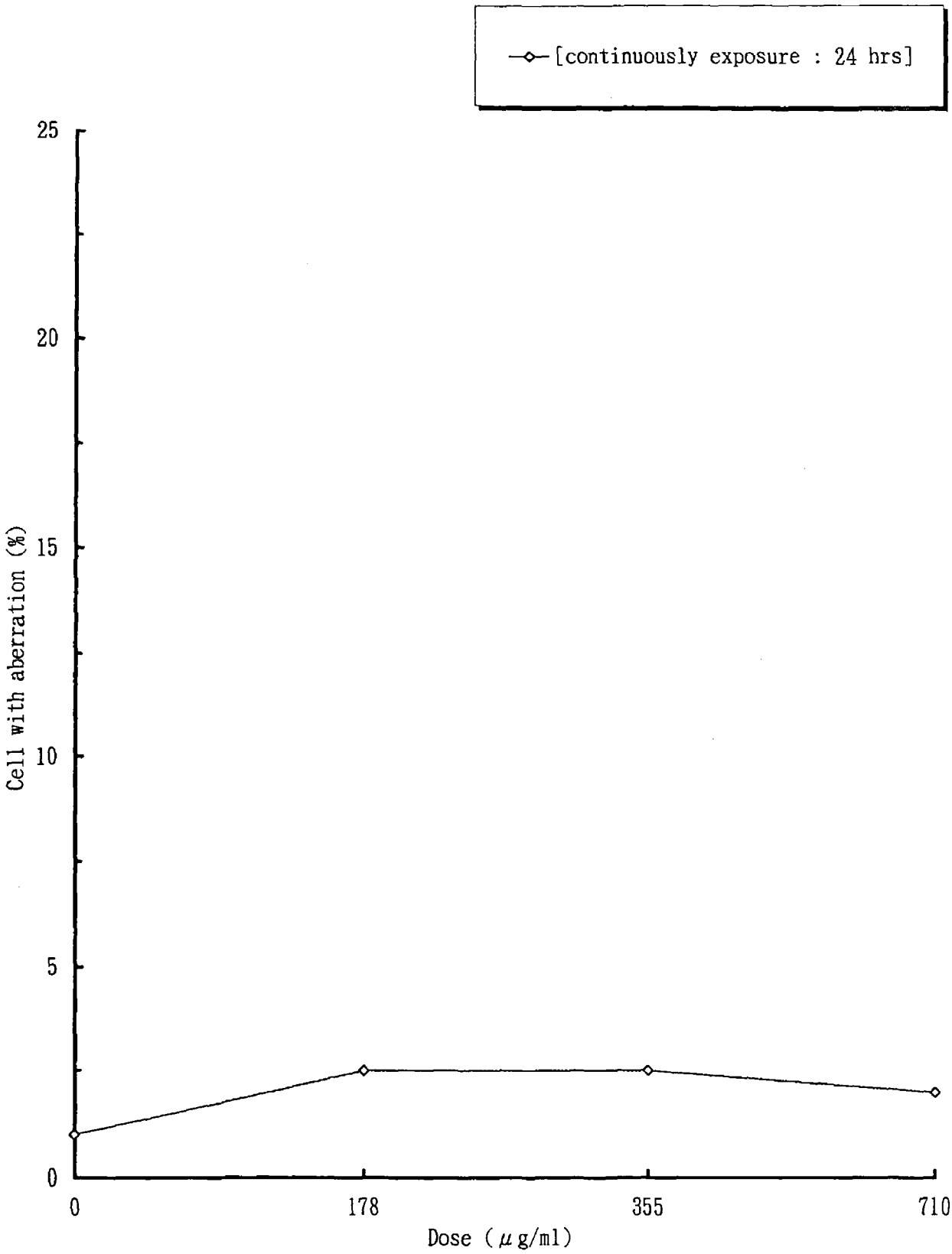

Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by Butyl methacrylate [continuously exposure : 24hrs]

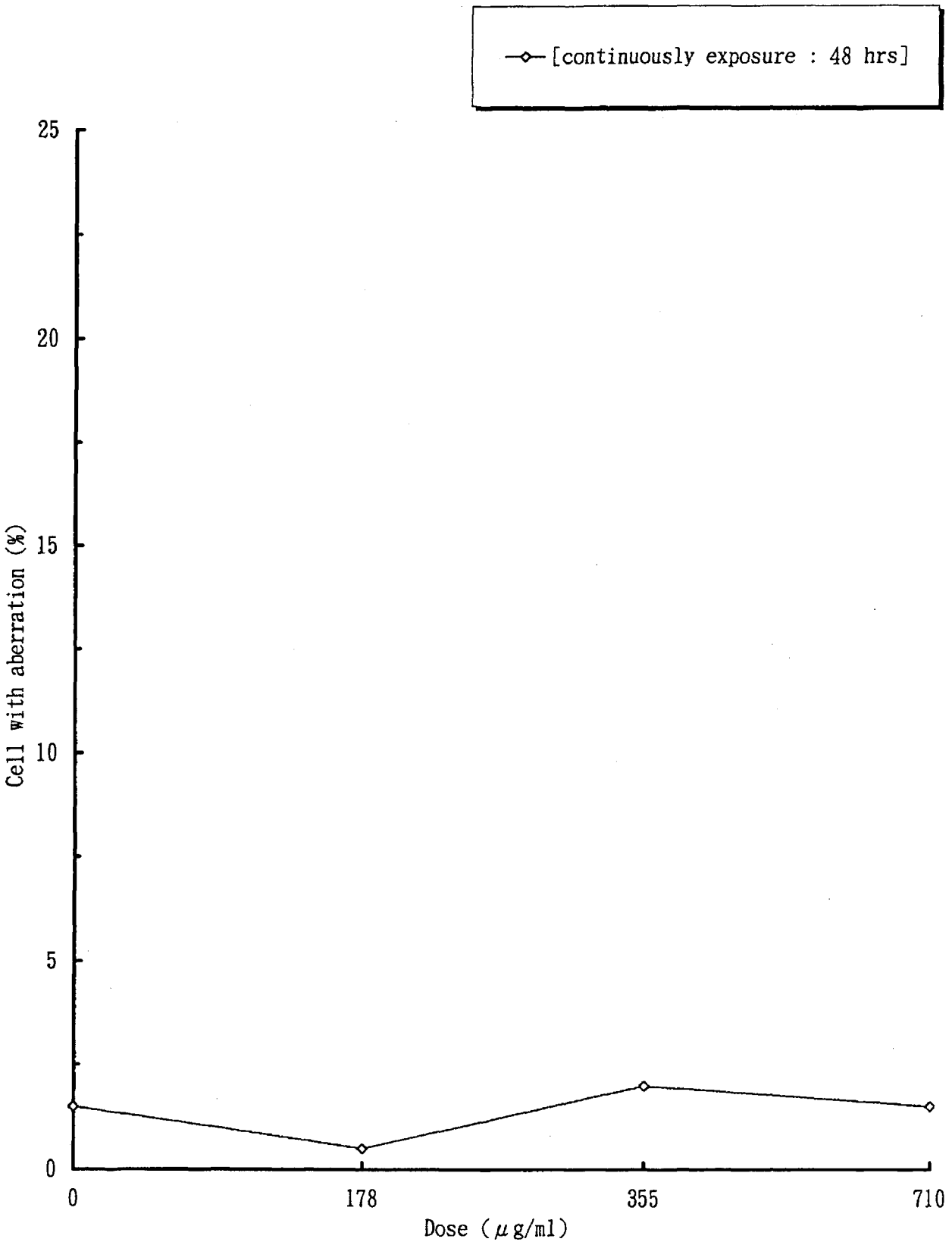

Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by Butyl methacrylate [continuously exposure : 48hrs]

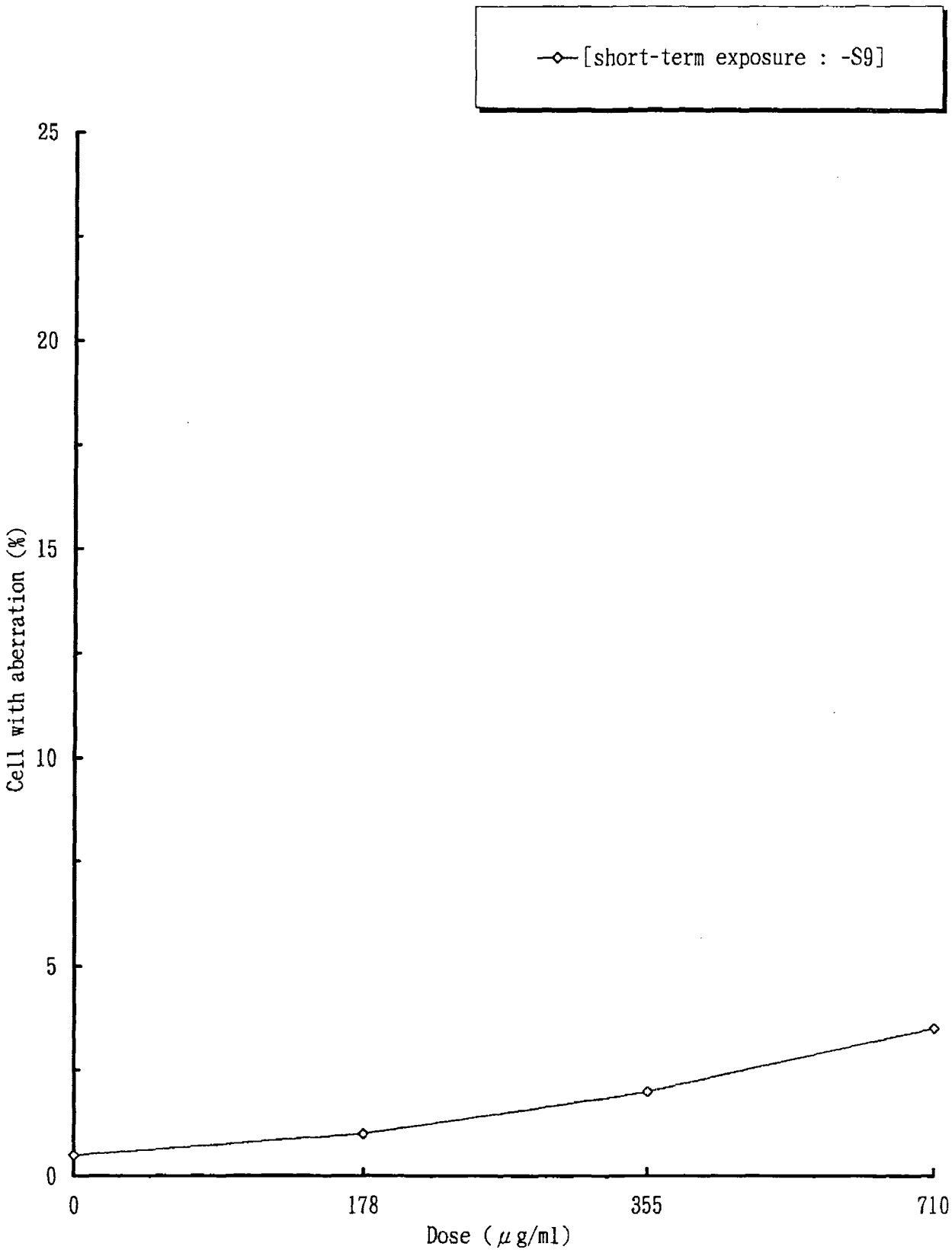

Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by Butyl methacrylate [short-term exposure : -S9]

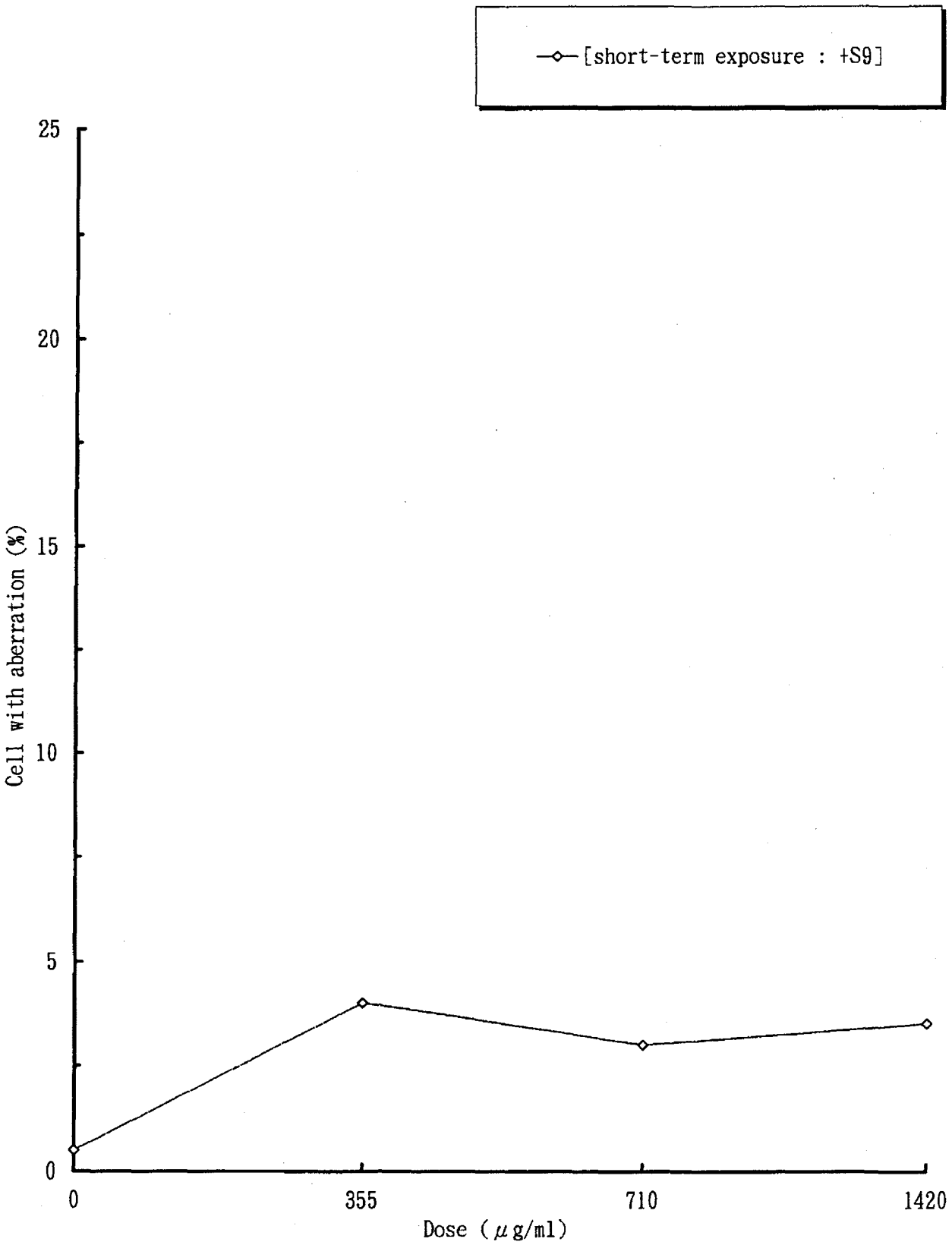

Figure 6. Incidence of structural aberrations induced by Butyl methacrylate [short-term exposure : +S9]

Table 1. Results of growth inhibition test on Butyl methacrylate [continuously exposure] Exp. No. 3175 (115-063)

[continuously exposure : 24 hrs]				[continuously exposure : 48 hrs]			
Compound	Dose (μg/ml)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (μg/ml)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Butyl methacrylate	110	95.4 90.3	[92.9]	Butyl methacrylate	110	86.8 94.4	[90.6]
	184	88.6 84.2	[86.4]		184	81.2 81.2	[81.2]
	307	79.1 75.3	[77.2]		307	74.0 63.0	[68.5]
	511	58.9 49.8	[54.4]		511	30.4 38.9	[34.6]
	852	28.9 29.6	[29.3]		852	15.4 17.6	[16.5]
	1420	9.3 11.4	[10.3]		1420	4.5 6.0	[5.3]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[continuously exposure : 24 hrs] ——— 532 (μg/ml)
[continuously exposure : 48 hrs] ——— 386 (μg/ml)

a): Solvent control

Table 2. Results of growth inhibition test on Butyl methacrylate [short-term exposure] Exp. No. 3175 (115-063)

[short-term exposure : -S9]				[short-term exposure : +S9]			
Compound	Dose (μg/ml)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (μg/ml)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Butyl methacrylate	110	104.4 102.1	[103.2]	Butyl methacrylate	110	117.8 110.5	[114.2]
	184	99.6 92.8	[96.2]		184	112.4 109.4	[110.9]
	307	91.4 73.6	[82.5]		307	91.2 90.9	[91.0]
	511	71.7 62.8	[67.3]		511	90.0 89.9	[90.0]
	852	19.5 12.4	[15.9]		852	79.6 79.4	[79.5]
	1420	3.1 2.9	[3.0]		1420	74.3 74.2	[74.2]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[short-term exposure : -S9] ——— 547 (μg/ml)
[short-term exposure : +S9] ——— >1420 (μg/ml)

a): Solvent control

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Butyl methacrylate [continuously exposure : 24 hrs]

Exp. No. 3175 (115-063)

Compound	Dose (μg/ml)	Number of Cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	200	1	2	0	0	0	0	1.0 −	1.0 −	0.0 −	−
Butyl methacrylate	178	200	2	2	1	0	0	0	2.5 −	1.5 −	0.0 −	−
	355	200	1	2	3	0	0	0	2.5 −	2.0 −	1.0 −	−
	710	200	1	0	2	1	0	0	2.0 −	1.5 −	0.0 −	−
	1420	Toxic										
MMC b)	0.05	200	36	68	126	0	1	1	71.0 +	70.0 +	0.0 −	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Solvent control
b): Positive control (Mitomycin C)

Table 4. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Butyl methacrylate [continuously exposure : 48 hrs]

Exp. No. 3175 (115-063)

Compound	Dose (μg/ml)	Number of Cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	200	1	0	2	0	0	0	1.5 −	1.0 −	1.5 −	−
Butyl methacrylate	178	200	0	0	1	0	0	0	0.5 −	0.5 −	0.0 −	−
	355	200	1	1	2	1	0	0	2.0 −	2.0 −	0.5 −	−
	710	200	0	0	3	0	0	0	1.5 −	1.5 −	4.5 −	−
	1420	Toxic										
MMC b)	0.025	200	31	56	96	0	0	0	60.5 +	57.0 +	1.0 −	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Solvent control
b): Positive control (Mitomycin C)

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Butyl methacrylate [short-term exposure : -S9]

Exp. No. 3175 (115-063)

Compound	Dose (μg/ml)	Number of Cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	200	1	0	0	0	0	0	0.5 −	0.0 −	0.5 −	−
Butyl methacrylate	178	200	0	0	2	0	0	0	1.0 −	1.0 −	1.5 −	−
	355	200	1	2	1	0	0	0	2.0 −	1.5 −	1.5 −	−
	710	200	4	2	3	0	0	0	3.5 −	2.5 −	1.0 −	−
	1420	Toxic										
CP b)	12.5	200	2	2	2	0	0	0	3.0 −	2.0 −	0.5 −	−

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Solvent control
b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 6. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Butyl methacrylate [short-term exposure : +S9]

Exp. No. 3175 (115-063)

Compound	Dose (μg/ml)	Number of Cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	200	0	0	1	0	0	0	0.5 −	0.5 −	1.0 −	−
Butyl methacrylate	355	200	2	0	6	0	0	0	4.0 −	3.0 −	0.0 −	−
	710	200	0	1	6	0	0	0	3.0 −	3.0 −	1.0 −	−
	1420	200	1	1	6	0	0	0	3.5 −	3.0 −	0.5 −	−
CP b)	12.5	200	15	28	125	0	3	0	67.5 +	66.0 +	0.5 −	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Solvent control
b): Positive control (Cyclophosphamide)