



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

最 終 報 告 書

4-ビニルピリジンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1249

株式会社 **ポリリサーチセンター**

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目 次

	頁
目 次	1
試験実施概要	6
試験従事者一覧	8
要 約	9
緒 言	11
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び溶媒	12
1) 被験物質	12
2) 溶媒	13
2. 被験液の調製	13
1) 調製方法	13
2) 調製頻度	14
3) 安定性	14
3. 対照物質	14
1) 陰性対照	14
2) 陽性対照	14
4. 使用細胞株	16
1) 細胞株	16
2) 細胞の選択理由	16
3) 培養条件	16
4) 細胞の性状検査	16
5. S9mix 及び培養液	16
1) S9 mix	16

	頁
2) 培養液	18
6. 試験方法	18
1) 識別方法	19
2) 用量の設定	19
3) 細胞増殖抑制試験	20
4) 細胞増殖抑制試験（再試験）	21
5) 染色体異常試験	21
6) 確認試験（短時間処理法）	22
7) 標本の観察	23
8) 染色体異常の分類	23
9) 判定基準	24
試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験	25
1) 短時間処理法	25
2) 連続処理法	25
2. 細胞増殖抑制試験（再試験）	25
3. 染色体異常試験	26
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	26
2) 構造異常	26
3) 数的異常	27
4. 確認試験	27
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	27
2) 構造異常	27
3) 数的異常	28
考察	29
参考文献	30

要 約

4-ビニルピリジンの染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL/IU）を用いて染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 1100 µg/mL とし、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化ともに 17.2 µg/mL で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は代謝活性化では 14.8 µg/mL、非代謝活性化では 11.3 µg/mL とそれぞれ算出された。また、連続処理法では細胞毒性が強く、設定した最低濃度の 8.59 µg/mL においても 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を算出出来なかったため、細胞増殖抑制試験（再試験）を実施した。細胞増殖抑制試験（再試験）の結果、24 時間処理法では 8.59 µg/mL において 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 5.33 µg/mL、48 時間処理法では 2.15 µg/mL において 50%の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 2.15 µg/mL とそれぞれ算出された。これより、染色体異常試験では、短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化ともに 34.4 µg/mL を最高用量として、以下公比 2 で希釈した各 6 試験用量を設定し染色体異常誘発能を検討した。なお、連続処理法の 24 時間処理では 10 µg/mL を、48 時間処理では 3.50 µg/mL を最高用量として、以下公比 1.3 で希釈した各 6 試験用量を設定したが、短時間処理法及び確認試験において染色体構造異常の誘発能が陽性と判定され、総合判定が陽性と確定したため、試験は実施しなかった。

染色体異常試験の結果、短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、高用量では構造異常の出現率が陽性を示したが、用量依存性が認められなかった。そこで、確認試験を短時間処理法と同様の方法によって、代謝活性化では 34.4 µg/mL を、代謝活性化では 17.6 µg/mL を最高用量として、以下公比 1.25 で希釈した各 6 試験用量を設定し試験を実施した。その結果、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、用量依存性を伴う構造異常の出現率の増加が認められた。

一方、各処理法の陰性対照群における染色体の構造異常及び倍数体の出現率はすべて陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値と同様であった。更に、各処理法の陽性対照群における染色体構造異常の出現率はすべて陽性の判定基準を超え、試験施設の背景値と同様の顕著な誘発が認められた。したがって試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、4-ビニルピリジンは、本試験条件下において倍数体の誘発能は有さないものの、染色体の構造異常誘発能を有するものと判定した。

結 言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、4-ビニルピリジンの安全性試験の一環として、ほ乳類の培養細胞(CHL/IU)を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

Good Laboratory Practice (GLP)

- ・「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」
(平成 15 年 11 月 21 日：薬食発第 1121003 号、製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 17 年 4 月 1 日最終改正)
- ・「OECD Principles of Good Laboratory Practice」
(OECD 理事会：1997 年 11 月 26 日)

毒性試験法ガイドライン

- ・「新規化学物質等に係る試験の方法について」
(平成 15 年 11 月 21 日；薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成 17 年 4 月 1 日最終改定)
- ・「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 473」
(OECD 理事会：1997 年 7 月 21 日)

試験材料及び方法

1. 被験物質及び溶媒

1) 被験物質

被験物質情報 (Attached Data 1) は Acros Organics における非 GLP 下での分析に基づくものである。

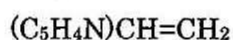
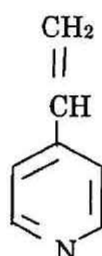
供給者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

製造者 :

名称 : 4-ビニルピリジン、4-vinylpyridine

CAS 番号 : 100-43-6

構造式又は示性式 :



純度 : 96.7%

入手量 : 250 mL

不純物 : 水 0.1%、hydroquinone 116 ppm

性状 : 黄褐色液体

分子量 : 105.14

ロット番号 :

安定性 : 試験終了後に、関東化学株式会社において安定性を測定し、その結果を入手して安定性を確認した (Attached Data 2)。

保存方法 : 冷凍 (冷凍庫: -20°C 以下、保存期間中の実測温度: -35°C ~ -20°C)、遮光、密栓、開封後は窒素充填

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室 冷凍庫及び第 1 研究棟被験物質調製室 冷凍庫

工事に伴い、被験物質を一時的に御殿場研究所 第 1 研究棟解剖室 冷凍庫 (機器番号: 1389) に移行したが、移行中の温度は -31°C ~ -30°C であったことから問題はなかったと考えら

れる。

残余物の取り扱い： 被験物質の残量物はすべて廃棄した。

2) 溶媒

名 称： ジメチルスルホキシド (DMSO)

ロット番号： SDP6175

規 格： 試薬特級

製 造 元： 和光純薬工業株式会社

保 存 方 法： 室温

保 存 場 所： 御殿場研究所 変異原室

溶媒の選択理由： 試験開始前に溶媒に対する溶解性の検討を実施した結果、被験物質は 110 mg/mL の濃度で注射用水に添加した場合には乳化状態となり、11 mg/mL の濃度で注射用水に添加した場合には僅かな不溶物を生じた。製造者よりの情報では水に対する溶解性は 29 g/L と記載されていたが、不溶物が認められたため更に DMSO に対する溶解性を検討し、被験物質が 110 mg/mL の濃度で DMSO に完全に溶解することが確認されたことから、DMSO を溶媒として選択した。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.2200 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 110 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1100 µg/mL）を調製した。次いで、110 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、55.0、27.5、13.8、6.88、3.44、1.72 及び 0.859 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

(2) 細胞増殖抑制試験（再試験）

被験物質 0.0550 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして 27.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、27.5 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 10 段階希釈し、13.8、6.88、3.44、1.72、0.859、0.430、0.215、0.107、0.054 及び 0.027 mg/mL の 11 濃度段階の被験液を調製した。

なお、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、1.72 mg/mL (最高濃度、プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：17.2 µg/mL) ～0.027 mg/mL の被験液を用いた。

(3) 染色体異常試験 短時間処理法

被験物質 0.0550 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして 27.5 mg/mL 溶液を調製した。次いで、27.5 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL) で順次 8 段階希釈し、13.8、6.88、3.44、1.72、0.859、0.430、0.215 及び 0.107 mg/mL の 9 濃度段階の被験液を調製した。なお、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、3.44 mg/mL (最高濃度、プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：34.4 µg/mL) ～0.107 mg/mL の被験液を用いた。

(4) 確認試験 (短時間処理法)

被験物質 0.0550 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして 27.5 mg/mL 溶液を調製した。次に、27.5 mg/mL 溶液を公比 8 (被験液 1 mL：溶媒 7 mL) で希釈し、3.44 mg/mL 溶液を調製した。更に、3.44 mg/mL 溶液を、公比 1.25 (被験液 4 mL：溶媒 1 mL) で希釈し、2.75、2.20、1.76、1.41、1.13、0.901、0.721 及び 0.577 mg/mL の 9 濃度段階の被験液を調製した。なお、代謝活性化では 3.44 mg/mL (最高濃度、プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：34.4 µg/mL) ～1.13 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では 1.76 mg/mL (最高濃度、プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：17.6 µg/mL) ～0.577 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を用いた。

2) 調製頻度

使用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

3) 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発砲、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液の安定性情報とした。

3. 対照物質

1) 陰性対照

溶媒として用いた DMSO を陰性対照物質とした。

2) 陽性対照

- (1) 陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化ではマイトマイシン C を用いた。

名 称 : シクロフォスファミド (以下 CP と略記する)
ロット番号 : SDP4062
製造元 : 和光純薬工業株式会社
純 度 : 生化学用 (97.0%以上)
保存方法 : 冷蔵、遮光
保存場所 : 御殿場研究所 変異原室 発癌性物質冷蔵保存庫

名 称 : マイトマイシン C (以下 MMC と略記する)
ロット番号 : 473AEJ
製造元 : 協和醗酵工業株式会社
力 価 : 2mg (力価) /瓶
保存方法 : 室温、遮光
保存場所 : 御殿場研究所 変異原室 発癌性物質室温保存庫

(2) 調製方法

染色体異常試験の短時間処理法では、CP 0.0140 g をプラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K6D80) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度 : 14 µg/mL) を調製した。MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K6D80) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL) 。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 µg/mL) 。

確認試験 (短時間処理法) では、染色体異常試験の短時間処理法と同様な方法により調製を行った。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

(3) 陽性対照物質の選択理由

前記 (毒性試験法ガイドライン) の毒性試験法ガイドラインに使用が推奨されていること、及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

4. 使用細胞株

1) 細胞株

チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた。細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手（2004年11月2日）し、継代数の少ないものを液体窒素中で保存し、これを融解し継代培養したものを使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では11継代、細胞増殖抑制試験（再試験）では13継代、染色体異常試験の短時間処理法では15継代、確認試験で19継代であった。また、元株細胞はマイコプラズマ陰性であることを入手時の情報で確認した。

2) 細胞の選択理由

自然発生染色体異常の発現率が低いこと、更に種々の化学物質に対して感受性が高く、バックグラウンドデータが豊富であること等の理由から本細胞を選択した。

3) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂濃度 5%、温度 37℃、高湿度条件下で培養した。継代は1～4日ごとに行った。

4) 細胞の性状検査

試験に使用する細胞は凍結保存から解凍し、30代を越えない範囲で継代培養を行っているものについて、染色体のモード数、倍加時間及びマイコプラズマ汚染の有無等の特性について定期的に検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。

5. S9 mix 及び培養液

1) S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社より S9 と、自家調製を行ったコファクターを用時に混合して S9 mix を調製した。本試験に用いた S9 の製品分析書に示された情報、保存条件及び使用期限とコファクターの保存条件、使用期限及び S9 mix の組成は以下の通りであった。

(1) S9

名 称	: S9
ロット番号	: 06070704
調 製 日	: 2006 年 7 月 7 日
種 ・ 系 統	: ラット・SD 系
性	: 雄
週 齢	: 7 週齢

誘導物質 : フェノバルビタール (PB) 及び 5, 6-ベンゾフラボン (BF)

投与法 : 腹腔内投与

投与期間及び投与量

: PB 4日間 30+60+60+60 mg/kg body weight

BF 1日 80 mg/kg body weight

保存方法 : 冷凍 (超低温フリーザー)

使用期限 : 2007年1月6日 (製造後6箇月)

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(2) 補酵素

名称 : コファクター

ロット番号 : 061005

製造日 : 2006年10月5日

保存方法 : 冷凍 (超低温フリーザー)

使用期限 : 2007年4月4日 (製造後6箇月)

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(3) S9 mix の組成

S9 2 mL

補酵素	4.7 mL	20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40mmol/L 酸化型ニコチンアミド・アデニン	
		ジヌクレオチドリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
		精製水	0.67 mL

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と同様になるように各成分の必要量を秤取し、精製水に融解、pH 調整、ろ過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

2) 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No.11095-080) に、Invitrogen Corporation より購入し非働化 (56℃, 30 分) した牛血清 (BS) を 10 vol% 添加して調製した培養液 (BS-MEM) を用いた。調製後の BS-MEM は冷蔵保存した。

(1) 牛血清

ロット番号 : 511116、542384

製造元 : Invitrogen Corporation

保存方法 : 冷凍 (−80℃設定の冷凍庫)

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

試験計画書に記載した血清 (ロット番号 511116) が終了したため、新たに購入した血清 (ロット番号 542384) を使用した。しかしながら、ロット番号 542384 の血清は、購入に際してロットチェックを実施し、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に使用可能なことを確認した後に使用に供したこと、陰性対照群及び陽性対照群の染色体構造異常及び倍数体の出現率には異常が認められなかったことから、試験に影響を及ぼすことはなかったと考えられる。

(2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号 : 1354864

製造元 : Invitrogen Corporation

保存方法 : 冷蔵

保存場所 : 御殿場研究所 変異原室 冷蔵庫

6. 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。なお、短時間処理法において明らかに陽性の結果が得られたため連続処理法は実施しなかった。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
2. 細胞増殖抑制試験（再試験）	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
3. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
4. 確認試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化

1) 識別方法

(1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「-」とし、連続処理法では24 時間処理を「24-」、48 時間処理を「48-」とした。更にこれに続けて陰性対照群(Negative Control)の場合「NC」を、被験物質用量群の場合は濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。なお、細胞増殖抑制試験（再試験）における識別も同様に行った。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。ただし、陽性対照群(Positive Control)は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」～「99」までの2桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

(3) 確認試験

染色体異常試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。

2) 用量の設定

(1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 1100 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 550、275、138、68.8、34.4、17.2 及び 8.59 $\mu\text{g/mL}$ の計 8 用量を設定した。

(2) 細胞増殖抑制試験（再試験）

最高用量を 17.2 $\mu\text{g/mL}$ (0.156 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 8.59、4.30、2.15、1.07、0.54 及び 0.27 $\mu\text{g/mL}$ の計 7 用量を設定した。

(3) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化ともに 17.2 $\mu\text{g/mL}$ で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は代謝活性化では 14.8 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 11.3 $\mu\text{g/mL}$ であった。そこで、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 34.4 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下公比 2 で希釈した 17.2、8.59、4.30、2.15 及び 1.07 $\mu\text{g/mL}$ の計 6 用量を設定した。なお、連続処理法の用量は、細胞増殖抑制試験（再試験）の結果より定めたが、短時間処理法及び確認試験において、染色体構造異常で明らかに陽性の結果が得られたため試験は実施しなかった。

(4) 確認試験（短時間処理法）

染色体異常試験の短時間処理法において、代謝活性化及び非代謝活性化ともに高用量で陽性の結果が得られたため、陽性を示した近傍の用量として、代謝活性化では 34.4、27.5、22.0、17.6、14.1 及び 11.3 $\mu\text{g/mL}$ の計 6 用量を、非代謝活性化では 17.6、14.1、11.3、9.01、7.21 及び 5.77 $\mu\text{g/mL}$ の計 6 用量を設定した。

3) 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するために予備試験として実施した。

(1) 短時間処理法

- ① 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに被験物質用量群、陰性対照群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質処理群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。いずれの場合も、その後 6 時間培養した。
- ③ 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- ④ 培養終了後、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、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（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照の値を 100%として、代

謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

(2) 連続処理法

- ① 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質処理群、陰性対照群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5 mL）を播種した。培養 3 日後に培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。いずれの場合も、その後 24 時間及び 48 時間培養した。
- ③ 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

4) 細胞増殖抑制試験（再試験）

染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として実施した。

- ① 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質用量群、陰性対照群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。いずれの場合も、その後 24 時間及び 48 時間培養した。
- ② 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。
- ③ 培養終了後、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、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（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照の値を 100%として、24 時間及び 48 時間処理のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

5) 染色体異常試験

(1) 短時間処理法

- ① 代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれに被験物質用量群、陰性対照群及び陽性対

照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。

- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。いずれの場合も、その後 6 時間培養した。
 - ③ 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
 - ④ 各群 2 枚のプレートについて、染色体観察用標本作製のために培養終了約 2 時間前にコルセミド（ジメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
 - ⑤ 残る各群 2 枚のプレートは、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。
- 6) 確認試験（短時間処理法）
- ① 代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれに被験物質用量群、陰性対照群及び陽性対照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
 - ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終

濃度：14 µg/mL) を加えた。非代謝活性化では培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL (最終濃度：0.075 µg/mL) を加えた。いずれの場合も、その後 6 時間培養した。

- ③ 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- ④ 各群 2 枚のプレートについて、染色体観察用標本作製のために培養終了約 2 時間前にコルセミド (ジメコルシン溶液、10 µg/mL、和光純薬工業株式会社) を 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液 (Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.) で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所点滴した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- ⑤ 残る各群 2 枚のプレートは、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

7) 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に染色体数 46～54 本を持つ細胞を倍数体とし、その出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とした。

8) 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常は更に以下のように定義・分類した。

(1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体又は染色分体の同軸上に断片がある (非染色部分が染色

分体の同軸上にある)ものであって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるものと定義した。

染色分体型切断(ctb) : 切断とは断片が染色分体の同軸上からはずれているもの及び非染色部位が染色分体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものと定義した。

染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。

染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものを染色体型切断と定義した。

染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。

その他(other) : 断片化 (frg) 他。

(2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数(二倍体)と異なり倍化した場合を数的異常と定義した。

倍数体 : polyploidy (核内倍加体 : endoreduplication を含む)

9) 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準¹⁾に従い染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率(%)によって以下のように判定した。

<u>異常細胞の出現率</u>	<u>判定基準</u>
5% 未満	陰 性 (－)
5% 以上 10% 未満	疑陽性 (±)
10% 以上	陽 性 (+)

染色体構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合 (TAG) と含まない場合 (TA) とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

なお、判定に際しては統計学的手法を用いなかった。

試験結果

1. 細胞増殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法における代謝活性化の結果を Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化及び非代謝活性化ともに 17.2 µg/mL において 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は代謝活性化では 14.8 µg/mL、非代謝活性化では 11.3 µg/mL であった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 17.2 µg/mL 以上で、非代謝活性化では 8.59 µg/mL 以上で細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察及び被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに変化は認められなかった。

2) 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Fig. 1-3-1 及び Table 1-3-1 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4-1 及び Table 1-4-1 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに最低用量の 8.59 µg/mL においても 50%を超えない細胞増殖抑制が認められず、50%細胞増殖抑制濃度を求めることが出来なかった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 8.59 µg/mL 以上で細胞の不連続性が認められ、24 時間処理では 1100µg/mL で、48 時間処理では 550µg/mL 以上で細胞の死滅 (TOX) が認められた。肉眼による培養液の色調の観察及び被験物質の析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに変化は認められなかった。

2. 細胞増殖抑制試験 (再試験)

24 時間処理の結果を Fig. 1-3-2 及び Table 1-3-2 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4-2 及

び Table 1-4-2 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理では 8.59 $\mu\text{g/mL}$ で、48 時間処理では 2.15 $\mu\text{g/mL}$ で 50% 以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 24 時間処理では 5.33 $\mu\text{g/mL}$ で、48 時間処理では 2.15 $\mu\text{g/mL}$ であった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 0.54 $\mu\text{g/mL}$ 以上において細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察及び被験物質の析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに変化は認められなかった。

3. 染色体異常試験

短時間処理法の結果を Fig. 2-1-1、2-2-1、Table 2-1-1、2-2-1、3-1 及び 3-2 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態は、細胞増殖抑制試験の場合とほぼ同様であった。すなわち、被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 2.15 $\mu\text{g/mL}$ 以上において、非代謝活性化では 1.07 $\mu\text{g/mL}$ 以上において細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察及び被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに変化は認められなかった。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化では 34.4 $\mu\text{g/mL}$ で細胞毒性のため観察が出来ず TOX と判定したが、17.2 $\mu\text{g/mL}$ で 17.0%、8.59 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、4.30 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、2.15 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0% 及び 1.07 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0% を示し、17.2 $\mu\text{g/mL}$ では陽性の判定基準である 10% 以上を示したため陽性と、その他の用量では陰性の判定基準である 5% 未満を示したため陰性と判定した。また、非代謝活性化では、34.4 $\mu\text{g/mL}$ 及び 17.2 $\mu\text{g/mL}$ で細胞毒性のため観察が出来ず TOX と判定したが、8.59 $\mu\text{g/mL}$ で 11.0%、4.30 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、2.15 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5% 及び 1.07 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% を示し、8.59 $\mu\text{g/mL}$ では陽性の判定基準である 10% 以上を示したため陽性と、その他の用量では陰性の判定基準である 5% 未満を示したため陰性と判定した。

各処理法ともに陰性対照群及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性及び陽性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ同様であ

ったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

3) 数的異常

倍数体の出現率は、代謝活性化では 34.4 µg/mL で細胞毒性のため観察が出来ず TOX と判定したが、17.2 µg/mL で 1.0%、8.59 µg/mL で 0%、4.30 µg/mL で 0%、2.15 µg/mL で 0%及び 1.07 µg/mL で 0%を示し、いずれの用量でも陰性の判定基準である 5%未満を示したため陰性と判定した。また、非代謝活性化では、34.4 µg/mL 及び 17.2 µg/mL で細胞毒性のため観察が出来ず TOX と判定したが、8.59 µg/mL で 0%、4.30 µg/mL で 0.5%、2.15 µg/mL で 0%及び 1.07 µg/mL で 0.5%を示し、いずれの用量でも陰性の判定基準である 5%未満を示したため陰性と判定した。

各処理法ともに陰性対照群における倍数体の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

4. 確認試験

結果を Fig. 2-1-2、2-2-2、Table 2-1-2、2-2-2、3-3 及び 3-4 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態は、細胞増殖抑制試験の場合と同様な傾向を示した。すなわち、被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 14.1 µg/mL 以上で、非代謝活性化では 5.77 µg/mL 以上で細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察及び被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに変化は認められなかった。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化では 34.4 µg/mL、27.5 µg/mL 及び 22.0 µg/mL で細胞毒性のため観察が出来ず TOX と判定したが、17.6 µg/mL で 22.0%、14.1 µg/mL で 11.0%及び 11.3 µg/mL で 7.0%を示し、17.6 µg/mL 及び 14.1 µg/mL では陽性の判定基準である 10%以上を示したため陽性と、11.3 µg/mL では疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示したため疑陽性と判定した。また、非代謝活性化では、17.6 µg/mL 及び 14.1 µg/mL で細胞毒性のため観察が出来ず TOX と判定したが、11.3 µg/mL で 43.5%、9.01 µg/mL で 16.0%、7.21 µg/mL で 6.5%及び 5.77 µg/mL で 3.0%を示し、11.3 µg/mL 及び 9.01 µg/mL では陽性の判定基準である 10%以上を示したため陽性と、7.21 µg/mL では疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示したため疑陽性と、5.77 µg/mL では陰性の判

定基準である 5%未満を示したため陰性と判定した。

各処理法ともに陰性対照群及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性及び陽性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

3) 数的異常

倍数体の出現率は、代謝活性化では 34.4 µg/mL、27.5 µg/mL 及び 22.0 µg/mL で細胞毒性のため観察が出来ず TOX と判定したが、17.6 µg/mL で 0%、14.1 µg/mL で 0%及び 11.3 µg/mL で 0%を示し、陰性の判定基準である 5%未満を示したため陰性と判定した。また、非代謝活性化では、17.6 µg/mL 及び 14.1 µg/mL で細胞毒性のため観察が出来ず TOX と判定したが、11.3 µg/mL で 0%、9.01 µg/mL で 1.0%、7.21 µg/mL で 0%及び 5.77 µg/mL で 0%を示し、陰性の判定基準である 5%未満を示したため陰性と判定した。

各処理法ともに陰性対照群における倍数体の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

考 察

被験物質は、染色体異常試験の短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに高用量で染色体の構造異常を有する細胞の出現率（TA）の増加を示した。しかしながら、TA 値が陽性を示したのは 1 用量のみで、用量依存的な増加が認められなかったため、陽性を示した近傍の用量において、用量範囲を狭めて確認試験を実施した。その結果、確認試験においては代謝活性化及び非代謝活性化ともに、染色体の構造異常を有する細胞の出現率増加に用量依存性が認められたことから、総合的に判断して、本被験物質の染色体構造異常誘発は陽性と判定した。確認試験における染色体異常誘発性の強さの指標値は、代謝活性化では D_{20} 値は 0.017 mg/mL、TR 値は 970、非代謝活性化では D_{20} 値は 0.0093 mg/mL、TR 値は 1900 であった。

一方、染色体異常試験及び確認試験ともに、倍数性細胞の出現率の増加はいかなる用量においても認められなかった。

なお、陰性対照群における染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、いずれの処理法においても 5%未満であった。また、陽性対照物質の CP あるいは MMC を処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。更に、2 枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

本被験物質の類縁化合物である 2-ビニルピリジンは、細菌を用いる復帰突然変異試験⁶⁾及び哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験⁷⁾において、変異原性を有することが報告されている。

以上の結果から、4-ビニルピリジンは、本試験条件下において染色体の数的異常（倍数体）の誘発能は有さないが、構造異常の誘発能を有するものと判定した。

参考文献

- 1) 石館 基監修 (1987): <改訂>染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー、東京
- 2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, **48**, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, **66**, 277-290
- 4) 石館 基 (1982): 哺乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), *日本化粧品科学会誌*, **6**, 31-43
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271
- 6) 厚生省 (1997): 2-ビニルピリジンの細菌を用いる復帰突然変異試験、生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修、化学物質点検推進連絡協議会編、化学物質毒性試験報告、5、323-327
- 7) 厚生省 (1997): 2-ビニルピリジンの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修、化学物質点検推進連絡協議会編、化学物質毒性試験報告、5、329-332

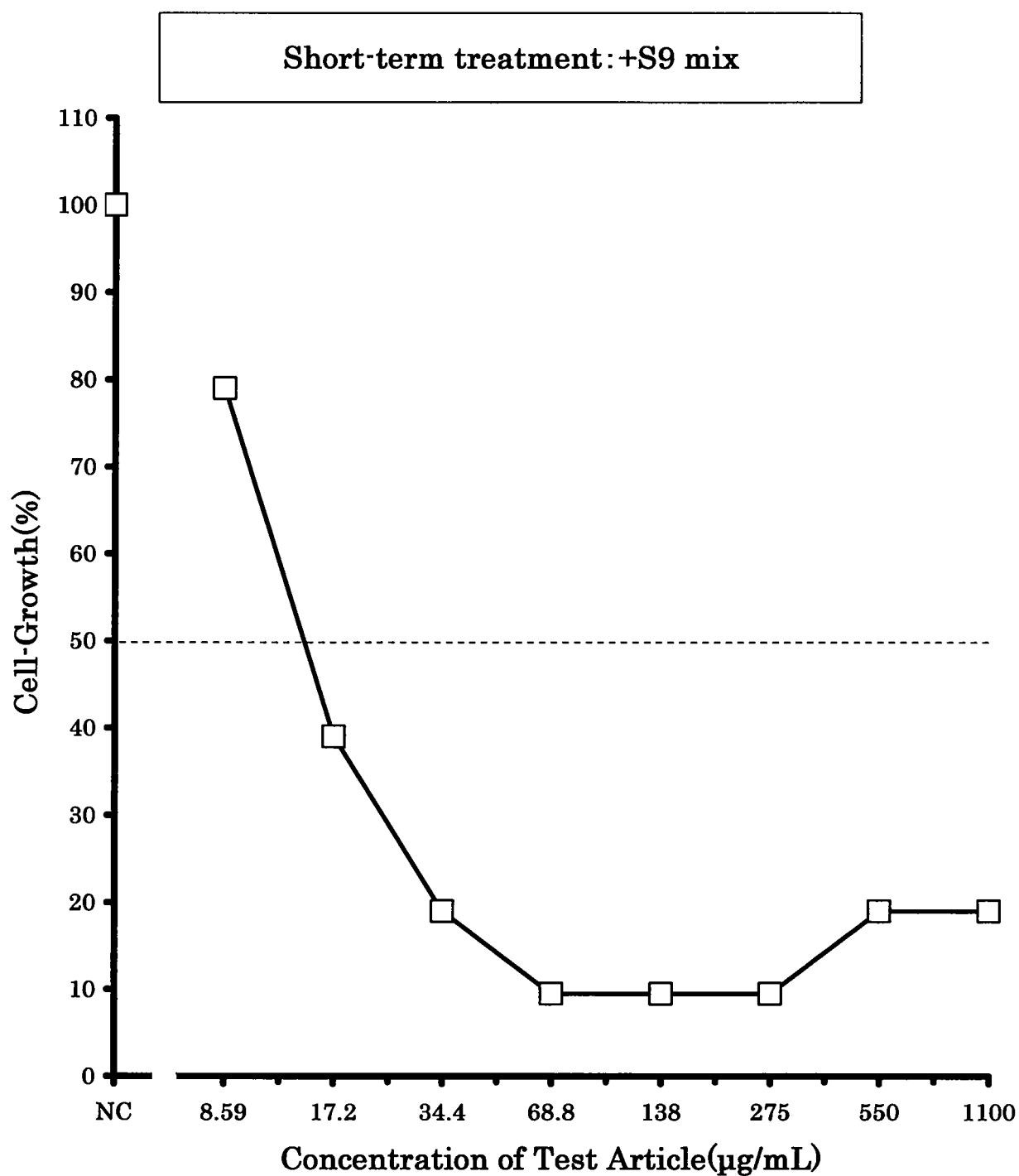


Fig.1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine

NC: Negative control

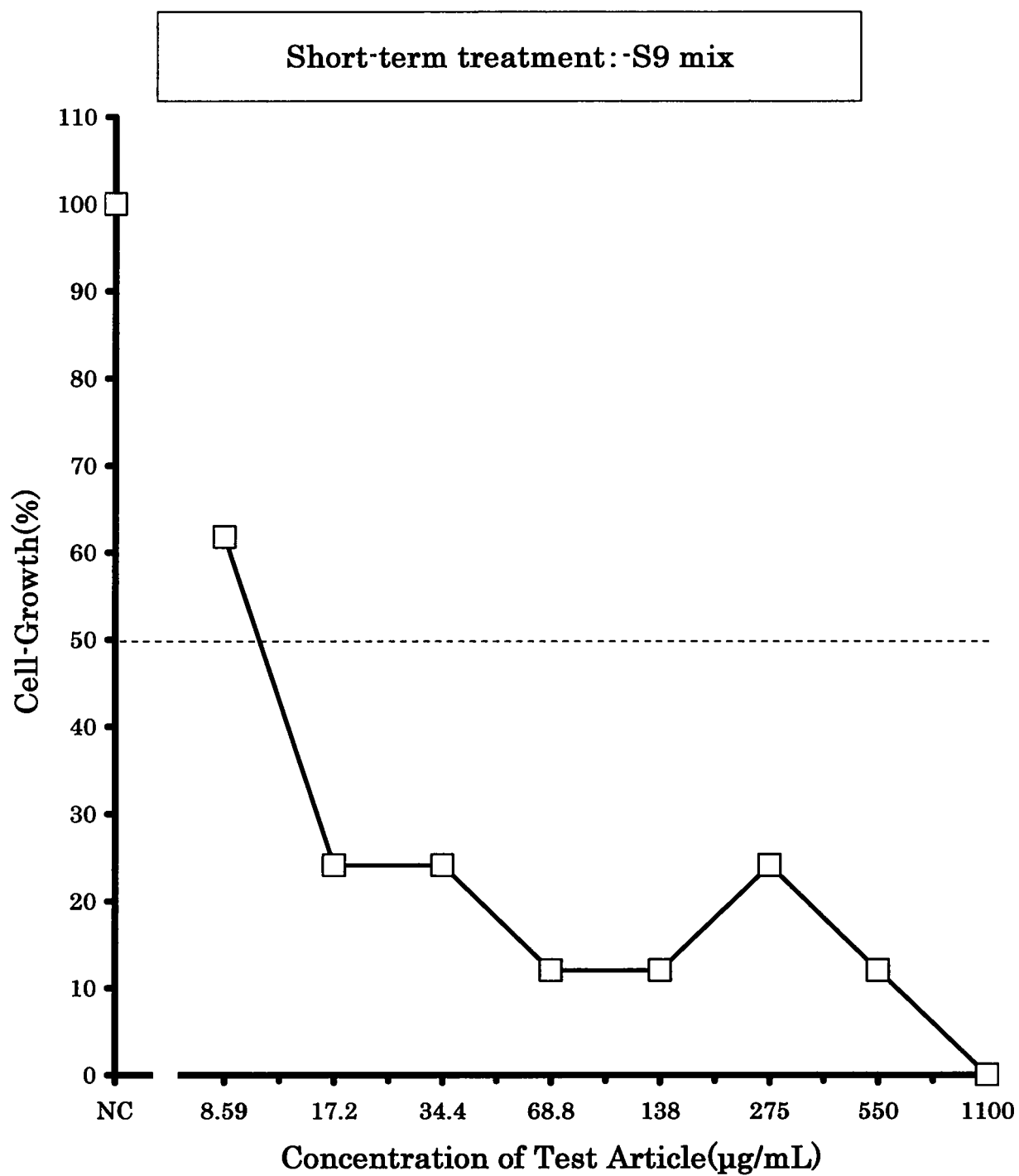


Fig.1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine

NC: Negative control

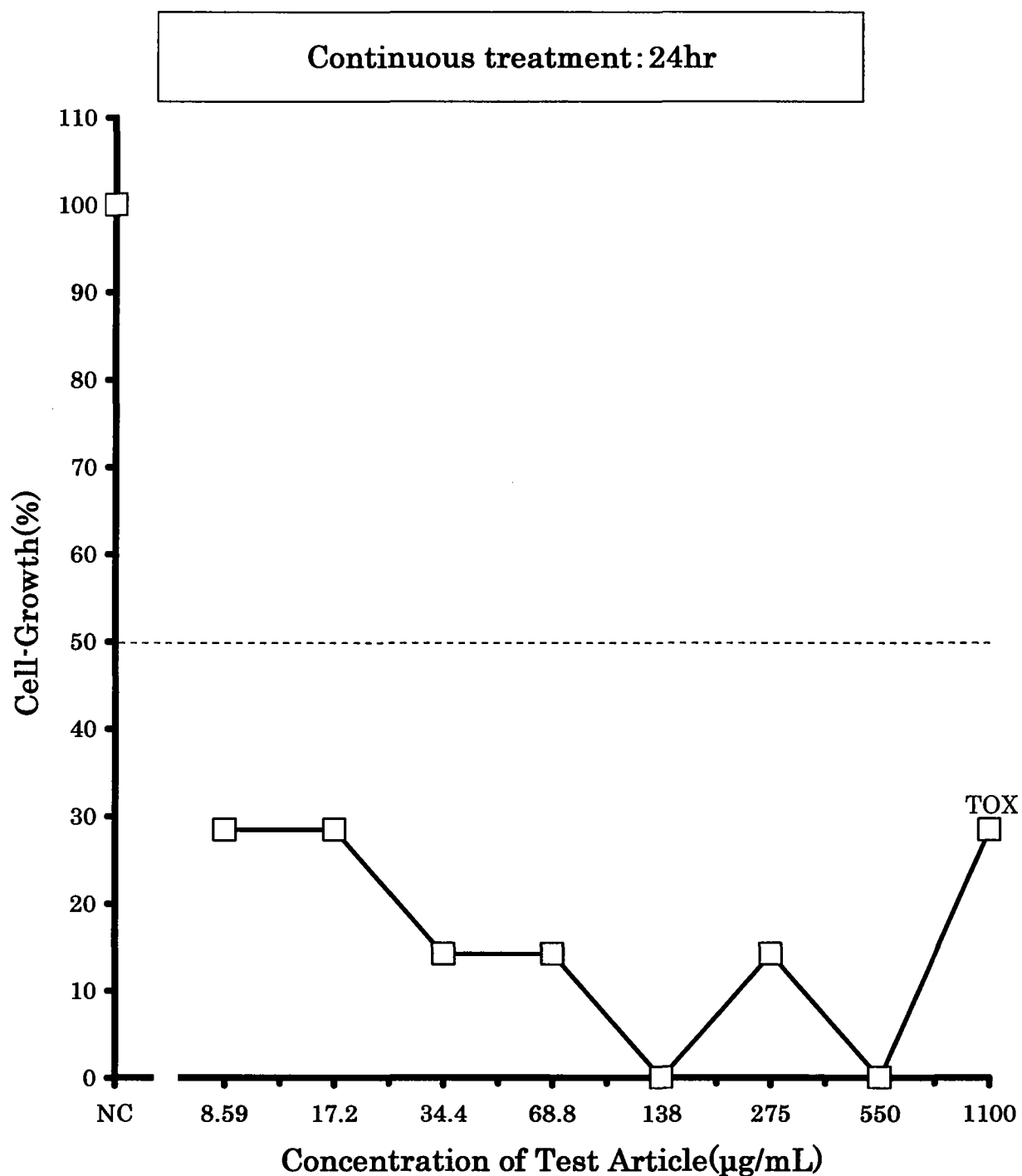


Fig.1-3-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine

NC: Negative control

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

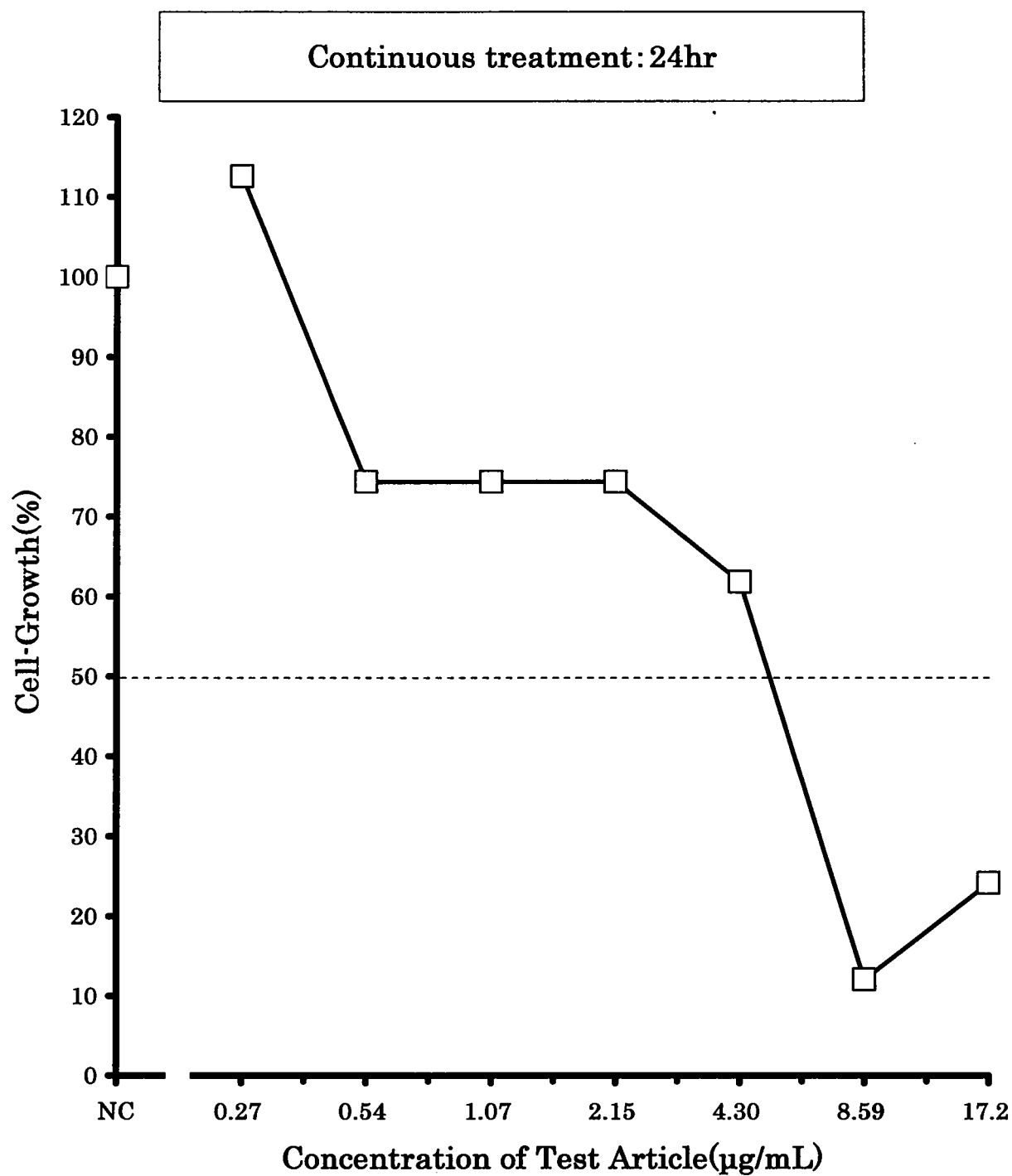


Fig.1-3-2 Results of the cell-growth inhibition test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine

NC: Negative control

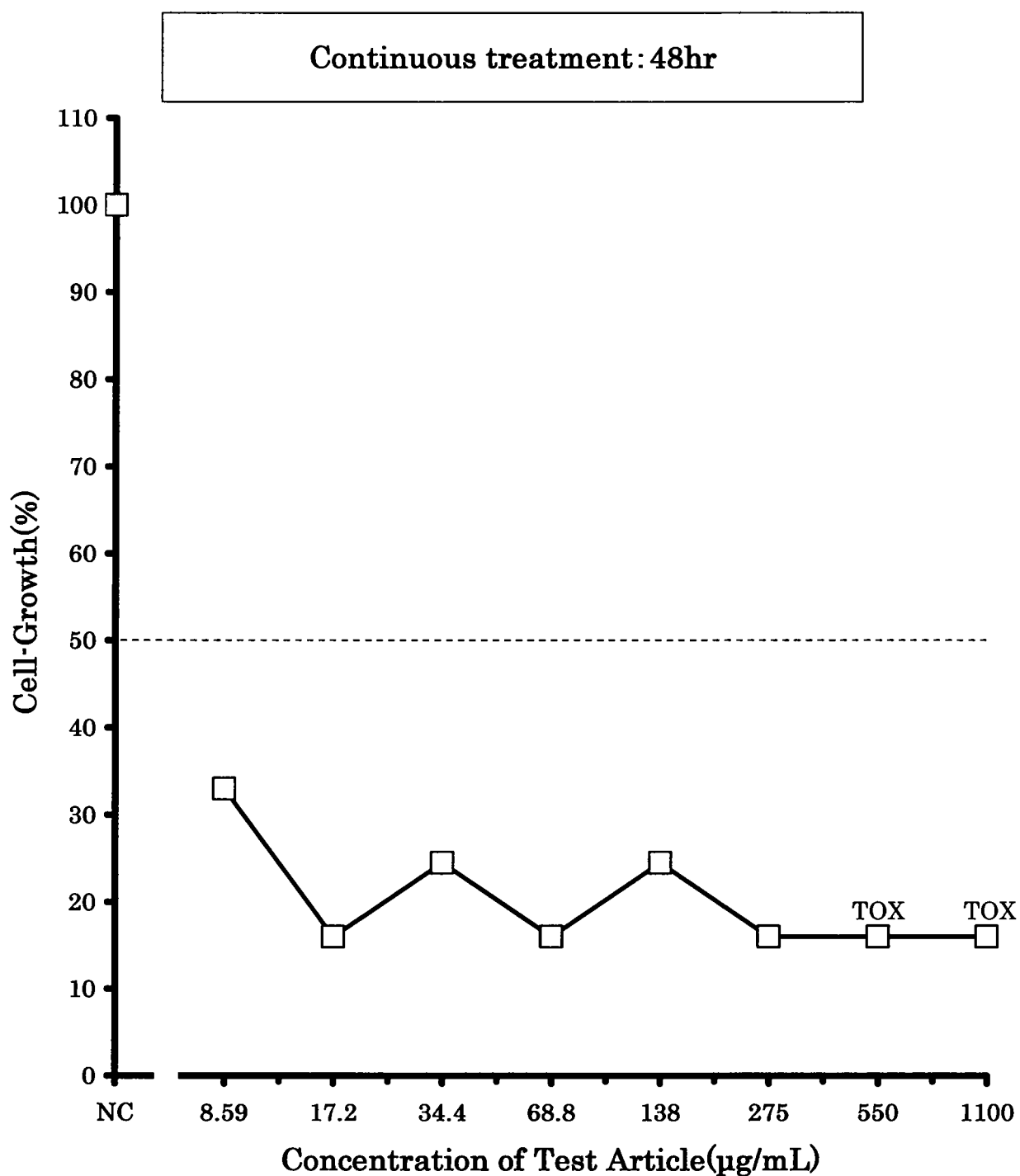


Fig.1-4-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine

NC: Negative control

TOX: Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

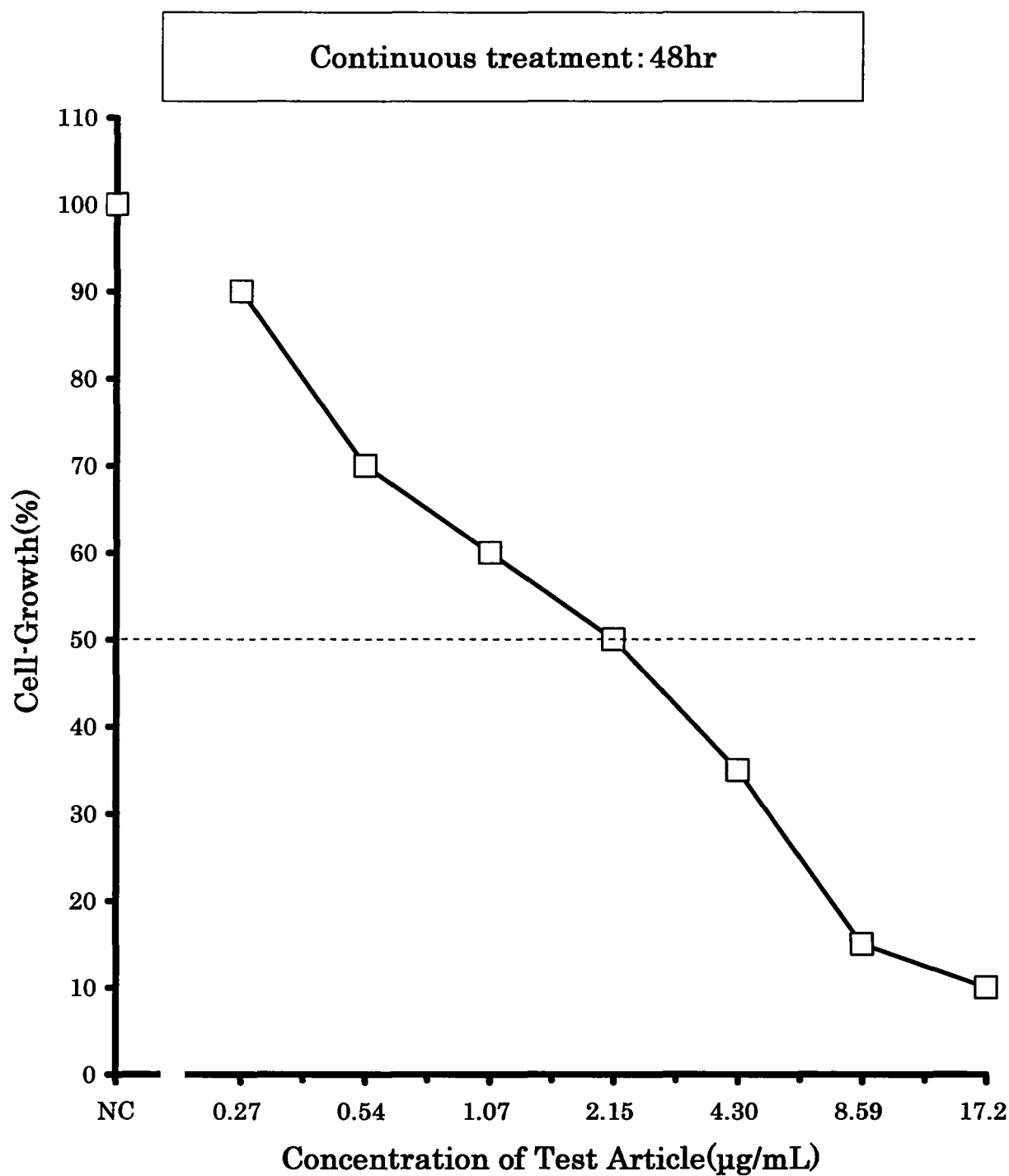


Fig.1-4-2 Results of the cell-growth inhibition test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine

NC: Negative control

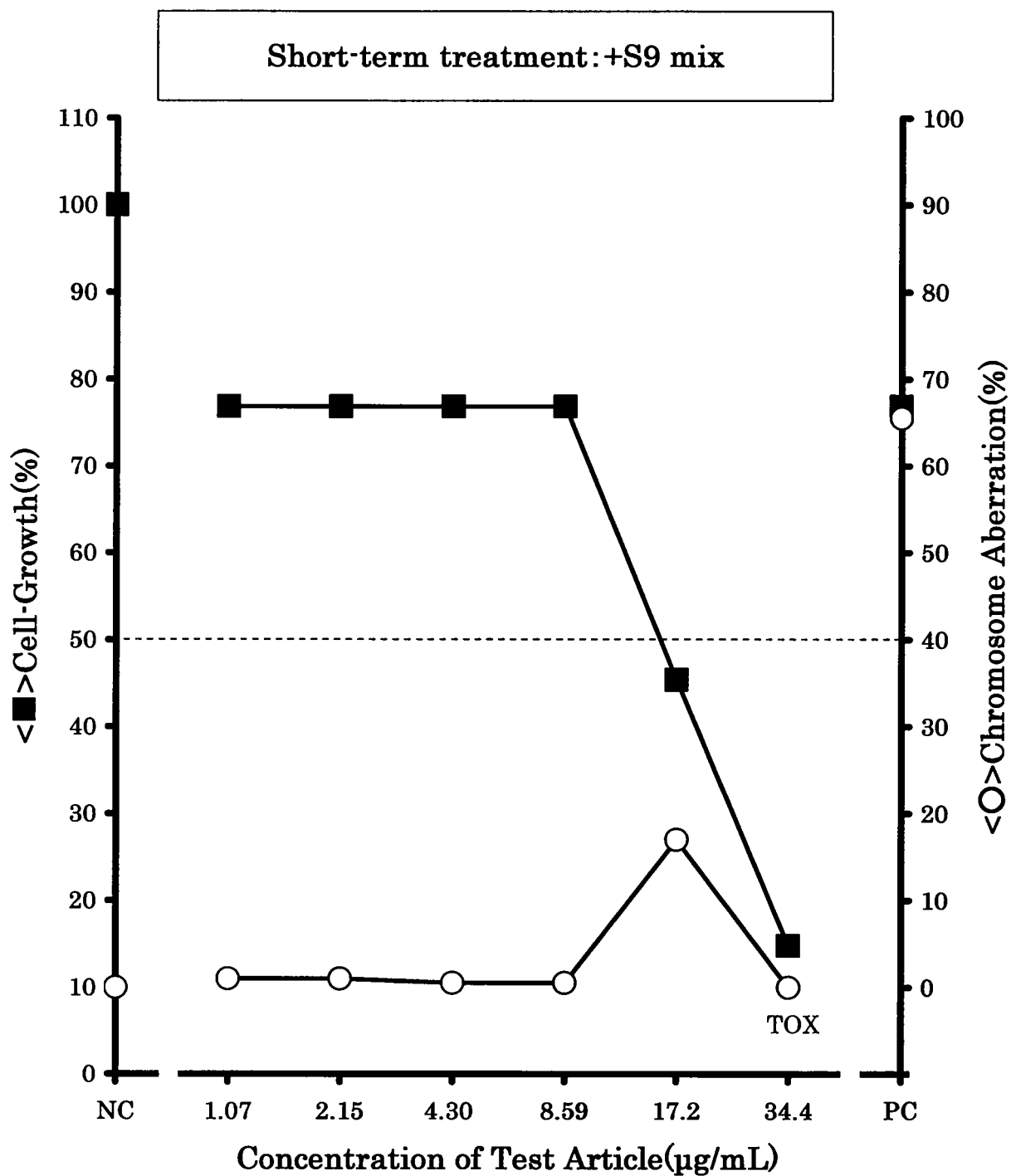


Fig.2-1-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine

NC: Negative control PC: Positive control

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

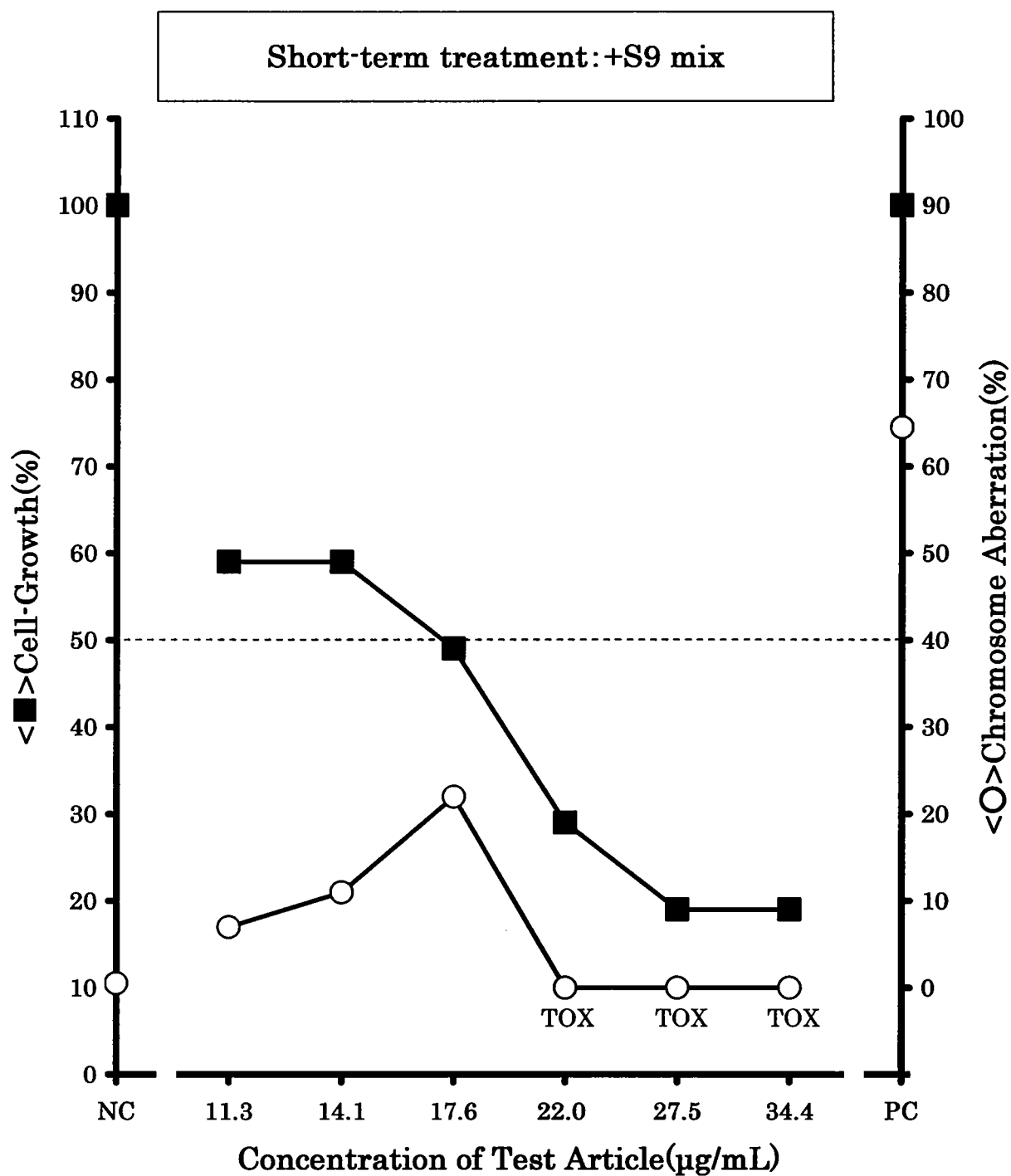


Fig.2-1-2 Results of the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine

NC: Negative control PC: Positive control

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

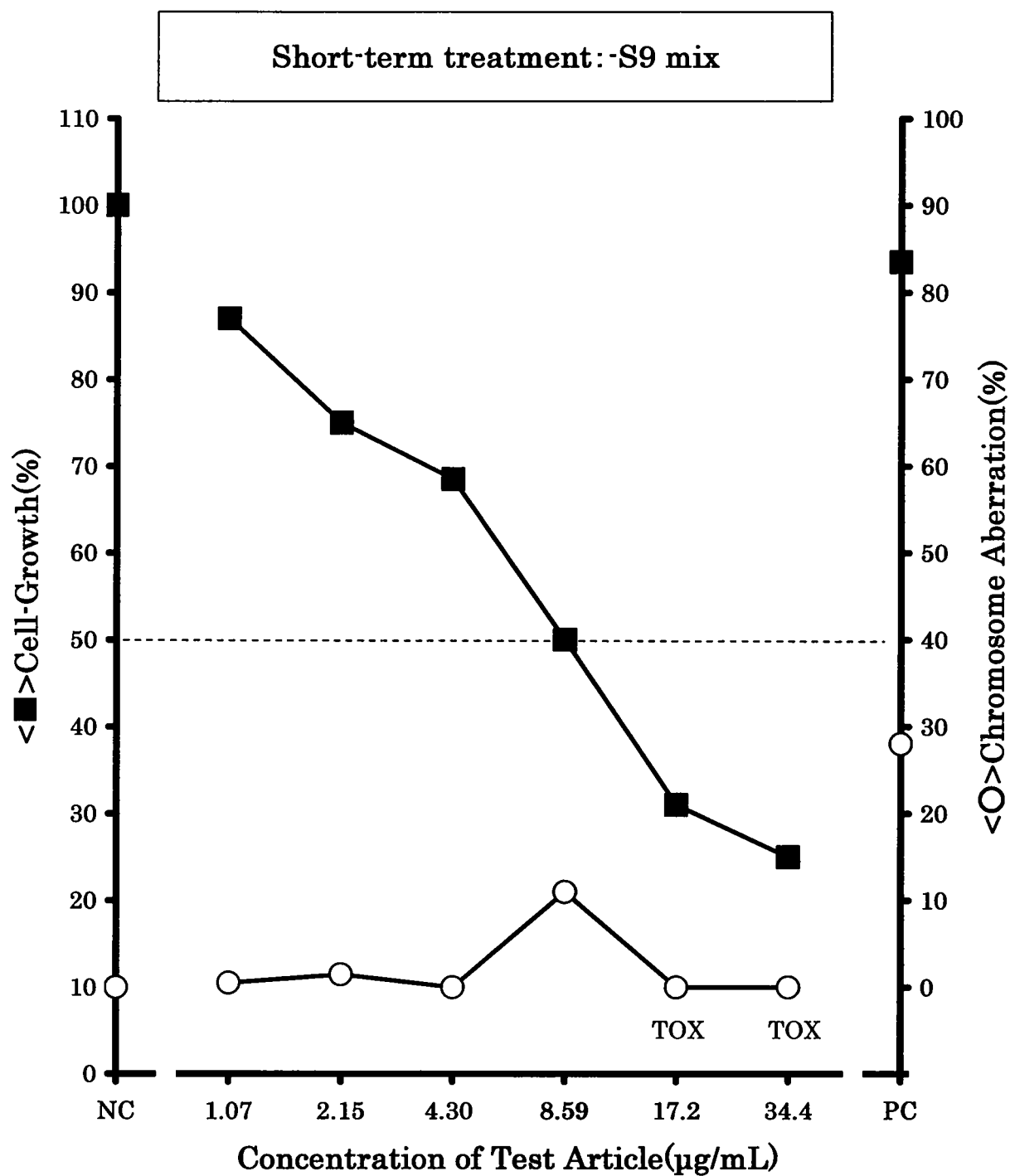


Fig.2-2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine

NC: Negative control PC: Positive control

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

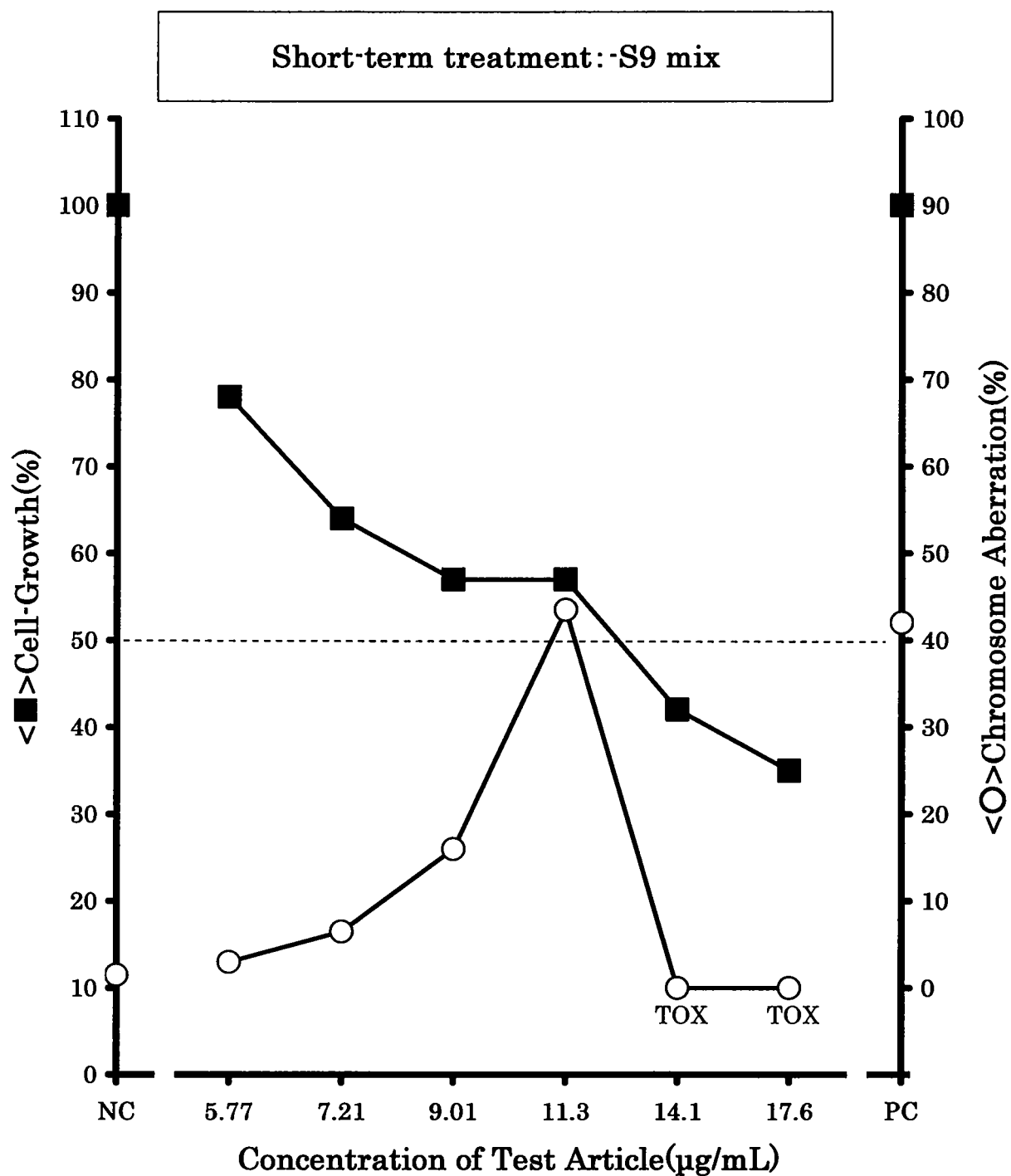


Fig.2-2-2 Results of the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine

NC: Negative control PC: Positive control

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
+	6-18	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—	
			100		—	—	—	
		Test article	8.59	79	79	—	—	—
				79		—	—	—
			17.2	39	39	+	—	—
				39		+	—	—
			34.4	19	19	+++	—	—
				19		+++	—	—
			68.8	19	10	+++	—	—
				0		+++	—	—
			138	19	10	+++	—	—
				0		+++	—	—
			275	0	10	+++	—	—
				19		+++	—	—
			550	19	19	+++	—	—
				19		+++	—	—
			1100	19	19	+++	—	—
				19		+++	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					14.8	µg/mL		

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
c) Observation of plate at the end of treatment
d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.
e) — : No changes of color
f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Short-term treatment: -S9 mix]

Cell-growth inhibition test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	6-18	0(NC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
				99		—	—	
		Test article	8.59	74	62	++	—	—
				49		++	—	
			17.2	24	24	+++	—	—
				24		+++	—	
			34.4	24	24	+++	—	—
				24		+++	—	
			68.8	0	12	+++	—	—
				24		+++	—	
			138	0	12	+++	—	—
				24		+++	—	
			275	24	24	+++	—	—
				24		+++	—	
			550	0	12	+++	—	—
				24		+++	—	
			1100	0	0	+++	—	—
				0		+++	—	
Concentration of 50% cell-growth inhibition:						11.3	µg/mL	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
c) Observation of plate at the end of treatment
d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.
e) — : No changes of color
f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-3-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Continuous treatment:24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
—	24	Test article	0(NC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
					132		—	—	—
			8.59	33	28	+++	—	—	
				33		+++	—	—	
			17.2	33	28	+++	—	—	
				33		+++	—	—	
			34.4	33	14	+++	—	—	
				0		+++	—	—	
			68.8	0	14	+++	—	—	
				33		+++	—	—	
			138	0	0	+++	—	—	
				0		+++	—	—	
			275	33	14	+++	—	—	
				0		+++	—	—	
			550	0	0	+++	—	—	
				0		+++	—	—	
			1100	33	28	TOX	—	—	
				33		TOX	—	—	
Concentration of 50% cell-growth inhibition : below 8.59 µg/mL									

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-3-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test (retest)							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}	
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}
—	24	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		0.27	125	113	—	—	—
			99		—	—	—
		0.54	74	74	+	—	—
			74		+	—	—
		1.07	74	74	++	—	—
			74		++	—	—
		2.15	74	74	+++	—	—
			74		+++	—	—
		4.30	49	62	+++	—	—
			74		+++	—	—
		8.59	0	12	+++	—	—
			24		+++	—	—
		17.2	24	24	+++	—	—
			24		+++	—	—
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					5.33	µg/mL	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
c) Observation of plate at the end of treatment
d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.
e) — : No changes of color
f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-4-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	48	0(NC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
				100		—	—	
		Test article	8.59	33	33	+++	—	—
				33		+++	—	
			17.2	16	16	+++	—	—
				16		+++	—	
			34.4	16	25	+++	—	—
				33		+++	—	
			68.8	16	16	+++	—	—
				16		+++	—	
			138	33	25	+++	—	—
				16		+++	—	
			275	16	16	+++	—	—
				16		+++	—	
			550	16	16	TOX	—	—
				16		TOX	—	
			1100	16	16	TOX	—	—
				16		TOX	—	
Concentration of 50% cell-growth inhibition : below						8.59	µg/mL	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 1-4-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test (retest)								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	48	0(NC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
				100		—	—	
		0.27	90	90	—	—	—	
			90		—	—		
		0.54	70	70	+	—	—	
			70		+	—		
		1.07	60	60	++	—	—	
			60		++	—		
		2.15	50	50	+++	—	—	
			50		+++	—		
		4.30	30	35	+++	—	—	
			40		+++	—		
		8.59	10	15	+++	—	—	
			20		+++	—		
		17.2	10	10	+++	—	—	
			10		+++	—		
Concentration of 50% cell-growth inhibition:						2.15	µg/mL	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

- a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.
b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.
c) Observation of plate at the end of treatment
d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.
+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.
++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.
+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.
e) — : No changes of color
f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-1-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
+	6-18	0(NC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
				116		—	—	—
		Test article		83	77	—	—	—
				83		—	—	—
				83	77	+	—	—
				83		+	—	—
				83	77	++	—	—
				83		++	—	—
				83	77	++	—	—
				83		++	—	—
				49	45	+++	—	—
				49		+++	—	—
				16	15	+++	—	—
				16		+++	—	—
		PC		83	77	—	—	—
				83		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(cyclophosphamide, 14μg/mL)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-1-2 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Short-term treatment: +S9 mix]

Confirmation test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
+	6-18	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			100		—	—	—
		Test article	59	59	—	—	—
			59		—	—	—
			11.3	59	+	—	—
			59		+	—	—
			14.1	59	++	—	—
			59		++	—	—
			17.6	49	+++	—	—
			39		+++	—	—
			22.0	29	+++	—	—
			39		+++	—	—
			27.5	19	+++	—	—
			19		+++	—	—
			34.4	19	+++	—	—
			19		+++	—	—
		PC	100	100	—	—	—
			100		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(cyclophosphamide, 14µg/mL)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

 + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

 ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

 +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Short-term treatment:-S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	6-18	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			100		—	—	—
		1.07	87	87	+	—	—
			87		+	—	—
		2.15	75	75	++	—	—
			75		++	—	—
		4.30	75	69	++	—	—
			62		++	—	—
		8.59	50	50	++	—	—
			50		++	—	—
		17.2	37	31	+++	—	—
			25		+++	—	—
		34.4	25	25	+++	—	—
			25		+++	—	—
		PC	100	94	—	—	—
			87		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.075µg/mL)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

 + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

 ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

 +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-2-2 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Short-term treatment:-S9 mix]

Confirmation test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	6-18	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			100		—	—	—
		5.77	71	78	++	—	—
			85		++	—	—
		7.21	71	64	+++	—	—
			57		+++	—	—
		9.01	57	57	+++	—	—
			57		+++	—	—
		11.3	57	57	+++	—	—
			57		+++	—	—
		14.1	42	42	+++	—	—
			42		+++	—	—
		17.6	28	35	+++	—	—
			42		+++	—	—
		PC	100	100	—	—	—
			100		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.075µg/mL)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Short-term treatment: +S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	NC	200	0.0	—	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—	32-1 73-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		34.4	(100)	(0)	TOX	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			0	0.0		0	0	0	0	0	0	0.0	0.0		78-1 78-2 23-1 23-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		17.2	200	1.0	—	0	9	26	0	0	0	17.0	17.0	+	38-1 99-1
			(100)	(2)		(0)	(6)	(13)	(0)	(0)	(0)	(19)	(19)		
		8.59	(100)	(0)	—	(0)	(3)	(13)	(0)	(0)	(0)	(15)	(15)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		4.30	200	0.0	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	07-1 88-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		2.15	(100)	(0)	—	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		1.07	200	0.0	—	0	2	0	0	0	0	1.0	1.0	—	74-1 19-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		PC	(100)	(0)	—	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(5)	(59)	(0)	(0)	(0)	(63)	(63)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 μ g/mL)

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Short-term treatment:-S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	6-18	NC	200	0.0	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	86-1 18-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		34.4	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	37-1 37-2 28-1 28-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		17.2	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	39-1 39-2 61-1 61-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		8.59	200	0.0	—	0	14	10	0	0	0	11.0	11.0	+	48-1 62-1
			(100)	(0)		(0)	(9)	(3)	(0)	(0)	(0)	(11)	(11)		
			(100)	(0)		(0)	(5)	(7)	(0)	(0)	(0)	(11)	(11)		
			(100)	(0)		(0)	(5)	(7)	(0)	(0)	(0)	(11)	(11)		
		4.30	200	0.5	—	1	2	0	0	0	0	1.0	1.5	—	63-1 22-1
			(100)	(1)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
		2.15	200	0.0	—	0	1	2	0	0	0	1.5	1.5	—	81-1 43-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		1.07	200	0.5	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	06-1 17-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		PC	200	0.0	—	0	16	43	0	0	0	28.0	28.0	+	15-1 65-1
			(100)	(0)		(0)	(7)	(22)	(0)	(0)	(0)	(26)	(26)		
			(100)	(0)		(0)	(9)	(21)	(0)	(0)	(0)	(30)	(30)		
			(100)	(0)		(0)	(9)	(21)	(0)	(0)	(0)	(30)	(30)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075 μ g/mL)

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Confirmation test: +S9 mix]

S9 mix	Time (h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	NC	200	0.5	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	27-1 50-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		34.4	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	29-1 29-2 25-1 25-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		27.5	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	84-1 84-2 34-1 34-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		22.0	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	49-1 49-2 52-1 52-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		17.6	200	0.0	—	1	16	34	0	0	1	22.0	22.5	+	26-1 95-1
			(100)	(0)		(0)	(7)	(17)	(0)	(0)	(1)	(21)	(21)		
		14.1	200	0.0	—	3	11	12	0	0	0	11.0	12.0	+	55-1 03-1
			(100)	(0)		(1)	(3)	(3)	(0)	(0)	(0)	(6)	(7)		
		11.3	200	0.0	—	1	8	7	0	0	0	7.0	7.5	±	20-1 97-1
			(100)	(0)		(1)	(2)	(2)	(0)	(0)	(0)	(4)	(5)		
		PC	200	0.0	—	0	16	119	0	0	0	64.5	64.5	+	91-1 40-1
			(100)	(0)		(0)	(10)	(64)	(0)	(0)	(0)	(71)	(71)		
			(100)	(0)		(0)	(6)	(55)	(0)	(0)	(0)	(58)	(58)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 μ g/mL)

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 4-Vinylpyridine
[Confirmation test:-S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	6-18	NC	200	0.0	—	0	2	1	0	0	0	1.5	1.5	—	08-1 59-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)		
		17.6	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	69-1 69-2 94-1 94-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		14.1	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	58-1 58-2 76-1 76-2
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		11.3	200	0.0	—	1	55	44	0	0	12	43.5	44.0	+	46-1 66-1
			(100)	(0)		(0)	(25)	(26)	(0)	(0)	(6)	(43)	(43)		
			(100)	(0)		(1)	(30)	(18)	(0)	(0)	(6)	(44)	(45)		
		9.01	200	1.0	—	2	15	18	0	0	0	16.0	17.0	+	57-1 05-1
			(100)	(1)		(1)	(6)	(11)	(0)	(0)	(0)	(16)	(17)		
			(100)	(1)		(1)	(9)	(7)	(0)	(0)	(0)	(16)	(17)		
		7.21	200	0.0	—	0	8	5	0	0	0	6.5	6.5	±	56-1 72-1
			(100)	(0)		(0)	(3)	(3)	(0)	(0)	(0)	(6)	(6)		
			(100)	(0)		(0)	(5)	(2)	(0)	(0)	(0)	(7)	(7)		
		5.77	200	0.0	—	0	5	1	0	0	0	3.0	3.0	—	70-1 44-1
			(100)	(0)		(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)		
			(100)	(0)		(0)	(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)		
		PC	200	0.5	—	0	20	73	0	0	0	42.0	42.0	+	01-1 13-1
			(100)	(0)		(0)	(11)	(29)	(0)	(0)	(0)	(37)	(37)		
			(100)	(1)		(0)	(9)	(44)	(0)	(0)	(0)	(47)	(47)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075 μ g/mL)