

最終報告書

試験名：β-プロモステレンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：M-1309

試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

1. 目次

1.	目次	2
2.	試験実施概要	6
2.1	試験計画書	6
2.2	試験目的	6
2.3	試験委託者	6
2.4	試験受託者	6
2.5	試験実施施設	6
2.6	被験物質	6
4.	要約	9
5.	緒言	10
6.	試験材料及び方法	11
6.1	被験物質及び溶媒	11
6.1.1	被験物質	11
6.1.2	溶媒	11
6.2	被験液の調製	12
6.2.1	調製方法	12
6.2.2	調製頻度	12
6.2.3	安定性	13
6.3	対照物質	13
6.3.1	陰性対照	13
6.3.2	陽性対照	13
6.4	使用細胞株	14
6.4.1	細胞株	14
6.4.2	細胞の選択理由	14
6.4.3	培養条件	14
6.4.4	細胞の性状検査	14
6.5	S9 mix 及び培養液	15
6.5.1	S9 mix	15
6.5.2	培養液	16

6.6	試験方法	16
6.6.1	識別方法	17
6.6.2	用量の設定	17
6.6.3	細胞増殖抑制試験	18
6.6.4	染色体異常試験	19
6.6.5	標本の観察	20
6.6.6	染色体異常の分類	20
6.6.7	判定基準	21
7.	試験結果	22
7.1	細胞増殖抑制試験	22
7.1.1	短時間処理法	22
7.1.2	連続処理法	22
7.2	染色体異常試験	23
7.2.1	短時間処理法	23
7.2.2	連続処理法	24
7.2.3	短時間処理法（再試験）	25
8.	考察	26
9.	参考文献	27

Figures and Tables

Fig. 1-1	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Short-term treatment: +S9 mix]
Fig. 1-2	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Short-term treatment: -S9 mix]
Fig. 1-3	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Continuous treatment: 24 hr]
Fig. 1-4	Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Continuous treatment: 48 hr]
Fig. 2-1	Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

Fig. 2-2	[Short-term treatment: +S9 mix] Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
Fig 2-3	[Short-term treatment: -S9 mix] Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
Fig 2-4	[Continuous treatment: 24 hr] Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
Fig. 2-5	[Continuous treatment: 48 hr] Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [retest: +S9 mix]
Table 1-1	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 1-2	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Short-term treatment: -S9 mix]
Table 1-3	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Continuous treatment: 24 hr]
Table 1-4	Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Continuous treatment: 48 hr]
Table 2-1	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 2-2	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Short-term treatment: -S9 mix]
Table 2-3	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Continuous treatment: 24 hr]
Table 2-4	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Continuous treatment: 48 hr]

Table 2-5	Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [retest: +S9 mix]
Table 3-1	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 3-2	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Short-term treatment: -S9 mix]
Table 3-3	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Continuous treatment: 24 hr]
Table 3-4	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [Continuous treatment: 48 hr]
Table 3-5	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene [retest: +S9 mix]

M-1309

2. 試験実施概要

2.1 試験計画書

試験番号 : M-1309
試験表題 : β -プロモスチレンのは乳類培養細胞を用いる
染色体異常試験

2.2 試験目的

は乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞株）を用いて、本被験物質の染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

2.3 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

2.4 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

2.5 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

2.6 被験物質

製造者 : 東京化成工業株式会社
名称 : β -プロモスチレン
受領日 : 2008 年 1 月 24 日
保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室 冷蔵庫

4. 要約

β -ブロモスチレ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・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた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 1850 $\mu\text{g/mL}$ として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では 116 $\mu\text{g/mL}$ で、50%を超える細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（IC50、概略値）は、短時間処理法の非代謝活性化では 67.3 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 66.7 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 72.9 $\mu\text{g/mL}$ であった。一方、短時間処理法の代謝活性化では、最低用量の 14.5 $\mu\text{g/mL}$ においても 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。しかしながら、細胞増殖抑制率測定用標本を目視で観察した結果、14.5 $\mu\text{g/mL}$ では染色体観察用標本の作製並びに染色体観察が可能と推測される量の細胞が認められた。これらの結果より、ガイドラインに定められた「細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、染色体異常試験における各処理法の最高用量を短時間処理法の代謝活性化では 14.5 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 116 $\mu\text{g/mL}$ とした。

なお、染色体異常試験の短時間処理法・代謝活性化では、最高用量の 14.5 $\mu\text{g/mL}$ においても、細胞増殖抑制率がガイドラインに定められた 50%を下回らなかったため、28.9 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、再試験を実施した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、いずれの処理法においても陰性の判定基準である 5%未満であった。また、倍数性細胞の出現頻度も、いずれの処理法においても陰性の判定基準である 5%未満であった。

なお、全ての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、 β -ブロモスチレンは本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数的異常は誘発しないと結論した。

5. 緒言

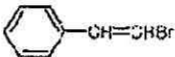
厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、 β -プロモスチレンの安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

M-1309

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

製造者	:	
名称	:	β-ブロモスチレン
英名称	:	beta-Bromostyrene
ロット番号	:	
CAS 番号	:	103-64-0
化学構造式	:	
分子量	:	183.05
密度	:	1.4246
純度	:	99.6 %
性状	:	淡黄色液体
入手量	:	25 g
安定性	:	実験終了後、試験受託者にて特性分析（試験番号：A-2153）を実施し、確認した（Attached Data 2）。
保存方法	:	冷蔵（保存期間中実測温度：3～11℃）、遮光、防湿
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室 冷蔵庫
取扱い上の注意	:	特になし
残余物の取り扱い	:	実験終了後、被験物質の残余物は全て実験期間中の安定性を確認するため、すべて β-ブロモスチレン（Lot No.TEYUC）の安定性試験（試験番号；A-2153）へ移管した。

6.1.2 溶媒

名称	:	ジメチルスルホキシド（DMSO）
ロット番号	:	LTF0010
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 遺伝毒性試験室
溶媒の選択理由	:	試験開始前に被験物質の溶媒に対する溶解性の検討を実施した結果、注射用水には 18.5 mg/mL で不溶、

DMSOには185 mg/mLで溶解することが確認されたため、DMSOを溶媒として使用することとした。

6.2 被験液の調製

6.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.3700g 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 185 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1850 µg/mL）を調製した。次いで、185 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、92.5、46.3、23.1、11.6、5.78、2.89 及び 1.45 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

2) 染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.3700g 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 185 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1850 µg/mL）を調製した。次いで、185 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 11 段階希釈し、92.5、46.3、23.1、11.6、5.78、2.89、1.45、0.723、0.361、0.181 及び 0.090 mg/mL の 12 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では、1.45 から 0.090 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では、11.6 から 0.723 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を用いた。

連続処理法では、被験物質 0.3700g 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 185 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1850 µg/mL）を調製した。次いで、185 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、92.5、46.3、23.1、11.6、5.78、2.89 及び 1.45 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理及び 48 時間処理ともに 11.6 から 1.45 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を用いた。

3) 再試験（短時間処理法 代謝活性化）

被験物質 0.3700g 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 185 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1850 µg/mL）を調製した。次いで、185 mg/mL 溶液を公比 4（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 3 mL）で順次 3 段階希釈し、46.3、11.6 及び 2.89 mg/mL の 3 濃度段階の被験液を調製した。さらに、2.89 mg/mL の溶液を公比 1.5（各濃度の被験液 2 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、1.93、1.28、0.856、0.571、0.381、0.254 及び 0.169 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。試験には 2.89 から 0.169 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を供した。

6.2.2 調製頻度

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。

6.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、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、被験液が安定であることを確認した。

6.3 対照物質

6.3.1 陰性対照

溶媒として用いたジメチルスルホキシド（DMSO）を陰性対照とした。

6.3.2 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 遺伝毒性試験室 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	:	500AFJ
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 遺伝毒性試験室 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の代謝活性化では、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、ロット番号：K7I92）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。短時間処理法の非代謝活性化では 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、ロット番号：K7I92）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）。

染色体異常試験の連続処理法では、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、ロット番号：K7I92）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 4.900 mL

に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 µg/mL)。

染色体異常試験の短時間処理法の代謝活性化(再試験)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、ロット番号: K8C00) 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。

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。

6.4 使用細胞株

6.4.1 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、入手後、液体窒素中で保存した細胞 (培地にジメチルスルホキシドを 10vol% 添加した) の一部を融解後、継代培養し、後述 (6.4.4) する細胞の性状検査を実施し、性状などが適正であることを定期的に確認した後に試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 21 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 6 継代、染色体異常試験の連続処理法では 10 継代、染色体異常試験の短時間処理法 (再試験) では 19 継代であった。

6.4.2 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、さらに種々の化学物質の染色体異常誘発性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。

6.4.3 培養条件

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

6.4.4 細胞の性状検査

細胞増殖抑制試験及び染色体異常試験に使用した細胞は、凍結保存から解凍し、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について 2007 年 12 月 22 日から 2007 年 12 月 28 日に定期検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。染色体異常試験 (再試験) に使用した細胞は、凍結保存から解凍し、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について 2008 年 5 月 9 日から 2008 年 5 月 15 日に定期検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。いずれの場合も、細胞は、30 継代を越えない範囲で試験に供した。

6.5 S9 mix 及び培養液

6.5.1 S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社より購入した 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る。

1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	07113009、08061303
製造日	:	2007年11月30日（ロット番号：07113009） 2008年6月13日（ロット番号：08061303）
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)
投与方法	:	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	:	2008年5月29日（製造後6箇月） （ロット番号：07113009） 2008年12月12日（製造後6箇月） （ロット番号：08061303）
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 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	:	070929、080605
製造日	:	2007年9月29日（ロット番号：070929） 2008年6月5日（ロット番号：080605）
保存方法	:	冷凍（超低温フリーザー）
使用期限	:	2008年3月28日（製造後6箇月）（ロット番号：070929） 2008年12月4日（製造後6箇月）（ロット番号：080605）
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 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、精製水に溶解、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。

6.5.2 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°C, 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	:	571834、616941
製造元	:	Invitrogen Corporation
保存方法	:	冷凍 (-80°C 設定の冷凍庫)
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号	:	366167、468587
製造元	:	Invitrogen Corporation
保存方法	:	冷蔵
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 冷蔵庫

6.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。確認試験は実施しなかった。

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. 染色体異常試験	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
	短時間処理法	代謝活性化 (再試験)

6.6.1 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 (Negative Control) の場合は「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。

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 (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。なお、短時間処理法・代謝活性化 (再試験) の識別方法は、染色体異常試験に準じて行った。

6.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を1850 µg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比2で希釈した925、463、231、116、57.8、28.9及び14.5 µg/mLの計8用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の非代謝活性化及び連続処理法では116 µg/mLで、50%を超える細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀、概略値) は、短時間処理法の非代謝活性化では67.3 µg/mL、連続処理法の24時間処理では66.7 µg/mL、48時間処理では72.9 µg/mLであった。一方、短時間処理法の代謝活性化では、最低用量の14.5 µg/mLにおいても50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。しかしながら、細胞増殖抑制率測定用標本を目視で観察した結果、14.5 µg/mLでは染色体観察用標本の作製並びに染色体観察が可能と推測される量の細胞が認められた。これらの結果より、ガイドラインに定められた「細胞増殖が明らかに50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、染色体異常試験における各処理法の最高用量を短時間処理法の代謝活性化では14.5 µg/mL、非代謝活性化、連続処理法の24時間処理及び48時間処理では116 µg/mLとした。さらに、染色体異常試験の短時間処理法・代謝活性化では、最高用量の14.5 µg/mLにおいても、細胞増殖抑制率がガイドラインに定めた50%を下回らなかったことから、短時間処理法の代謝活性化 (再試験) を実施することとし、28.9 µg/mLを最高用量とし、以下、公比1.5で希釈した計8用量を設定した。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

6.6.3 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処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (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、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、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。単層細胞密度測定装置（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、陰性対照群の値を 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。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

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及び陰性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (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、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、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。

6.6.4 染色体異常試験

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陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- (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、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 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。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、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（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.100 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。細胞点滴後、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（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、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、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対

照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。

- (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、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL（最終濃度：0.050 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、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 日以上空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- (4) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養の終了時に肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した。その後、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、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

3) 短時間処理法 代謝活性化（再試験）

6.6.4 染色体異常試験 1) 短時間処理法における試験方法に準じて実施した。

6.6.5 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。同時に倍数体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。また、染色体異常試験の短時間処理法・代謝活性化（再試験）では、設定した濃度のうち、3.81 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度では細胞増殖抑制作用が認められず、染色体異常誘発の可能性が低いと判断されたため、標本の作製及び観察を実施しないこととした。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、保存資料とする。

6.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数値異常に大別し、構造異常はさら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）

6.6.7 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石舘らの基準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。

異常細胞の出現率	判定基準
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。

7. 試験結果

7.1 細胞増殖抑制試験

7.1.1 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

代謝活性化では、全ての用量で 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）は算出できなかった。一方、非代謝活性化では、116 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で 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 67.3 $\mu\text{g/mL}$ だった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに全ての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 463 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともに 231 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で析出が認められた。被験物質用量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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 463 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量では、被験物質と思われる物質が多量に存在していたため観察不能であった。また、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 14.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.1.2 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 及び Table 1-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4 及び Table 1-4 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理法及び 48 時間処理法ともに 116 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で 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）はそれぞれ 66.7 $\mu\text{g/mL}$ 及び 72.9 $\mu\text{g/mL}$ だった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 463 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともに、231 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で析出が認められた。被験物質用量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 463 µg/mL 以上の用量では被験物質と思われる物質が多量に存在していたため、観察不能であった。また、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 231 µg/mL では細胞の剥離、死滅が認められたため TOX と判定し、116 から 14.5 µg/mL の用量では細胞の浮遊、形態変化が認められた。

7.2 染色体異常試験

7.2.1 短時間処理法

代謝活性化の結果を Fig. 2-1、Table 2-1 及び Table 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 2-2、Table 2-2 及び Table 3-2 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに全ての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、全ての用量で析出は認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化及び非代謝活性化ともに全ての用量で析出は認められなかった。被験物質用量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 14.5 µg/mL で細胞の浮遊、形態変化が認められた。一方、非代謝活性化では 14.5 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化では 14.5 µg/mL では 0%、7.23 µg/mL では 0%、3.61 µg/mL では 1.0%、1.81 µg/mL では 0% 及び 0.90 µg/mL では 1.0% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。また、非代謝活性化においては、116 µg/mL では 0.5%、57.8 µg/mL では 0%、28.9 µg/mL では 0%、14.5 µg/mL では 0% 及び 7.23 µg/mL では 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、代謝活性化では 14.5 µg/mL では 0.5%、7.23 µg/mL では 0%、3.61 µg/mL では 0%、1.81 µg/mL では 0% 及び 0.90 µg/mL では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。また、非代謝活性化においては、116 µg/mL では 1.0%、57.8 µg/mL では 0.5%、28.9 µg/mL では 0%、14.5 µg/mL では 0.5% 及び 7.23 µg/mL では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、

又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と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。

7.2.2 連続処理法

24 時間処理の結果を Fig. 2-3、Table 2-3 及び Table 3-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 2-4、Table 2-4 及び Table 3-4 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で析出は認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24 時間処理及び 48 時間処理ともに全ての用量で析出は認められなかった。被験物質用量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 時間処理ともに全ての用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染構造異常の出現率 (TA) は、24 時間処理では 116 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、57.8 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、28.9 $\mu\text{g/mL}$ では 0% 及び 14.5 $\mu\text{g/mL}$ では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。また、48 時間処理においては、116 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、57.8 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、28.9 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% 及び 14.5 $\mu\text{g/mL}$ では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、24 時間処理では 116 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、57.8 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、28.9 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% 及び 14.5 $\mu\text{g/mL}$ では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。また、48 時間処理においては、116 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、57.8 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、28.9 $\mu\text{g/mL}$ では 0% 及び 14.5 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と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。

7.2.3 短時間処理法（再試験）

代謝活性化の結果を Fig. 2-5、Table 2-5 及び Table 3-5 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、全ての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、全ての用量で析出は認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

全ての用量で析出は認められなかった。被験物質用量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、5.71 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現率 (TA) は、28.9 µg/mL では 1.5%、19.3 µg/mL では 0%、12.8 µg/mL では 0%、8.56 µg/mL では 1.5% 及び 5.71 µg/mL では 1.0% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、28.9 µg/mL では 0%、19.3 µg/mL では 0.5%、12.8 µg/mL では 0%、8.56 µg/mL では 0.5% 及び 5.71 µg/mL では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であったため、陰性と判定した。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と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。

8. 考察

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、いずれの処理法においても陰性の判定基準である 5%未満であった。また、倍数性細胞の出現頻度も、いずれの処理法においても陰性の判定基準である 5%未満であった。

全ての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。なお、染色体異常試験の連続処理法において、陽性対照群の染色体構造異常頻度が、試験施設の背景値に比べてやや高い値を示したことから、細胞の陽性対照物質への感受性が多少 hypersensitive な状態にあったと推測される。しかしながら、陰性対照群及び被験物質処理群では染色体構造異常頻度は陰性の範囲内にあったこと及び感受性が hypersensitive の状態においては、被験物質処理群の染色体構造異常が underestimation されることはないと考えられることから、被験物質の染色体構造異常誘発性の評価には問題はなく、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、 β -プロモスチレンは本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数的異常は誘発しないと結論した。

9. 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) : ほ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), 日本香粧品科学会誌, **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

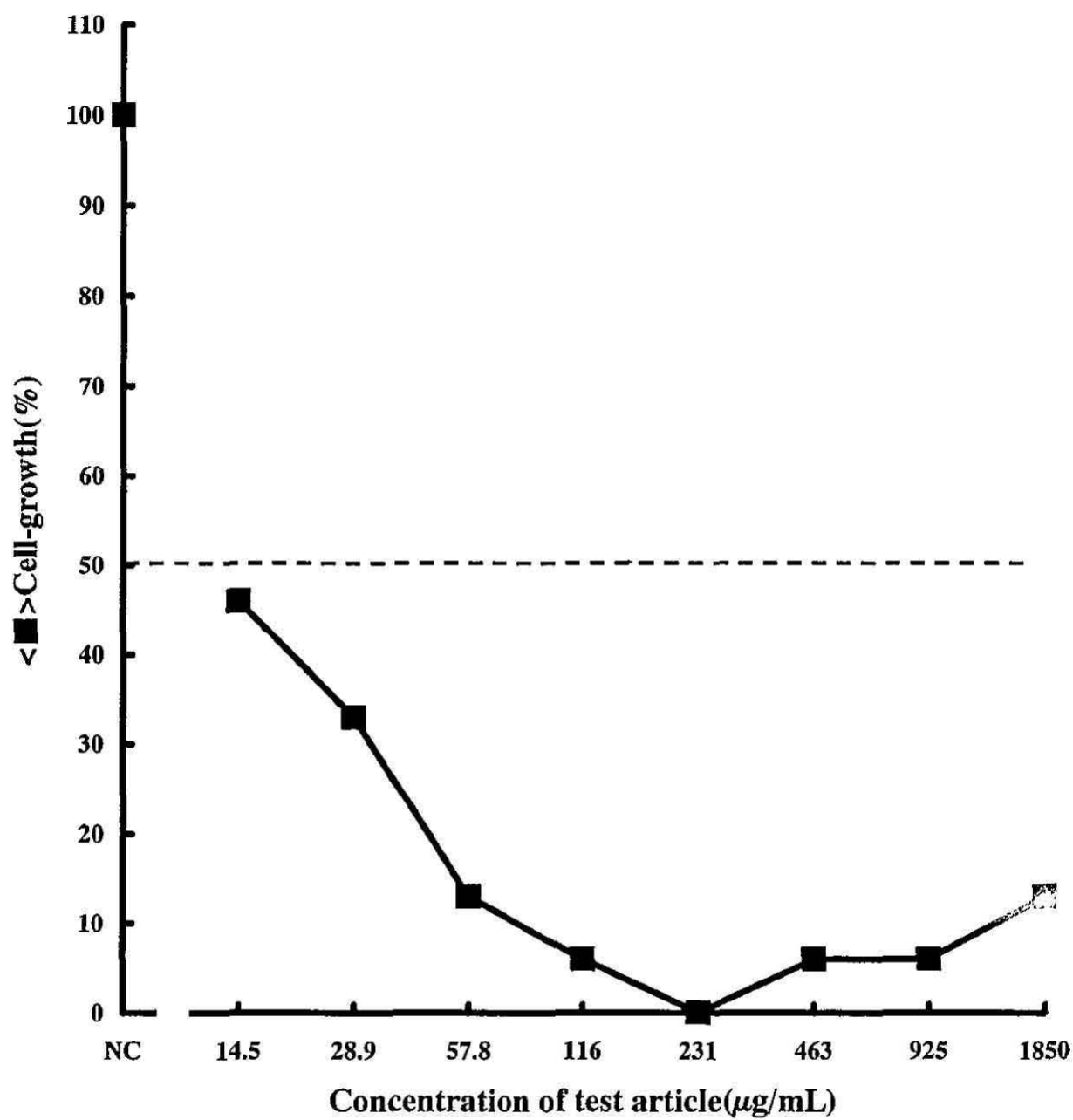


Fig. 1-1

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

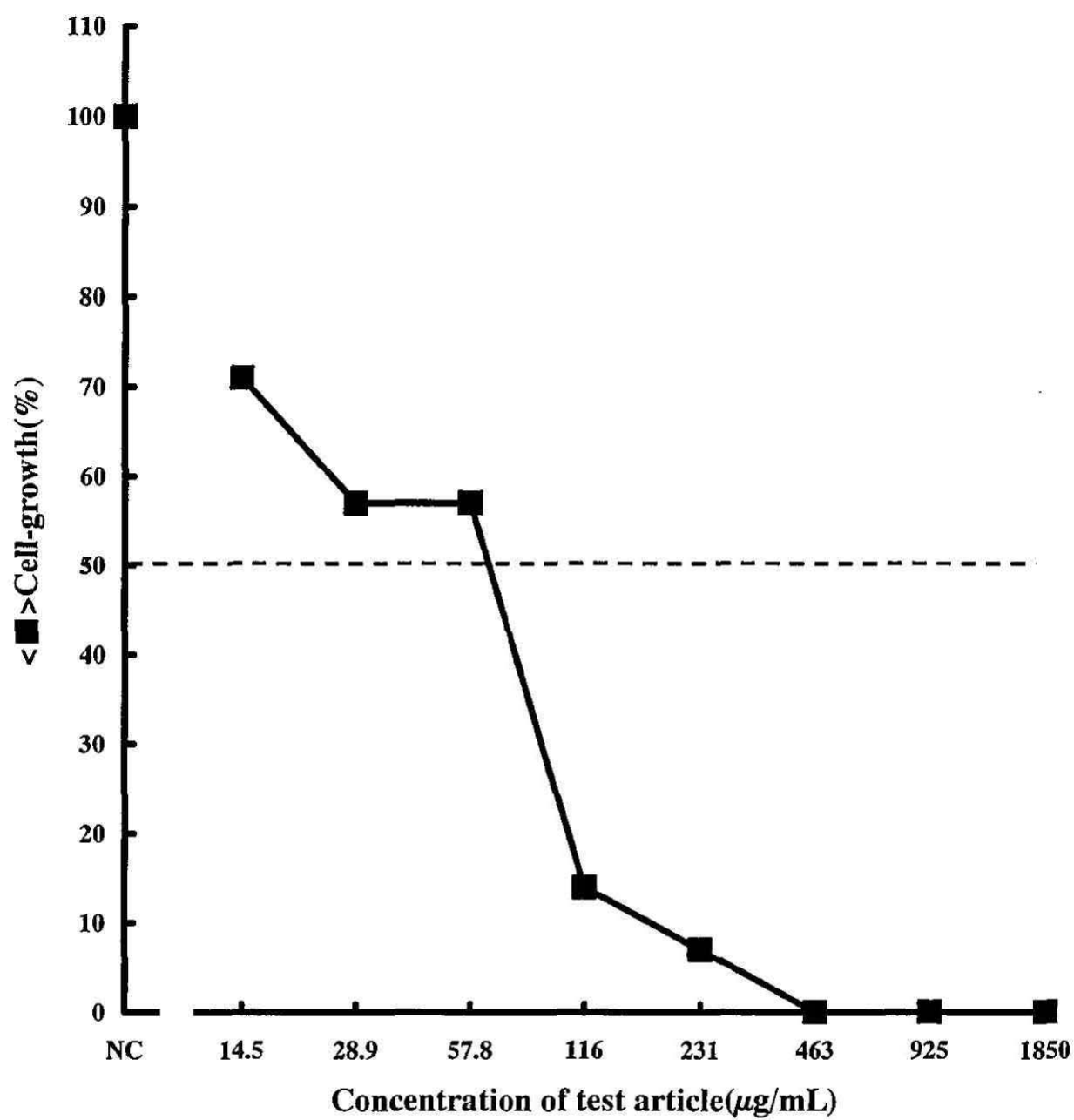


Fig. 1-2

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
[Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

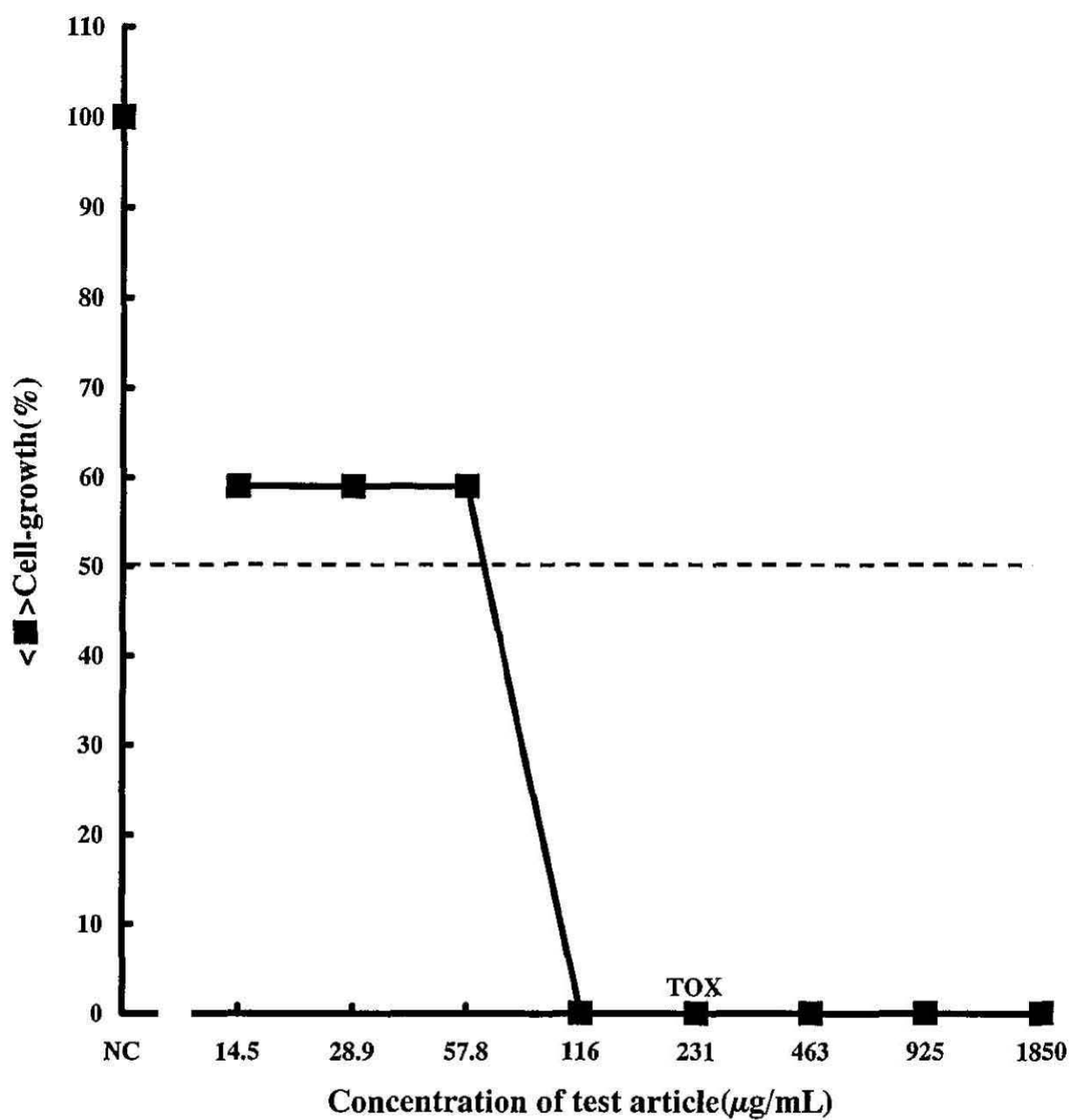


Fig. 1-3

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(DMSO)

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

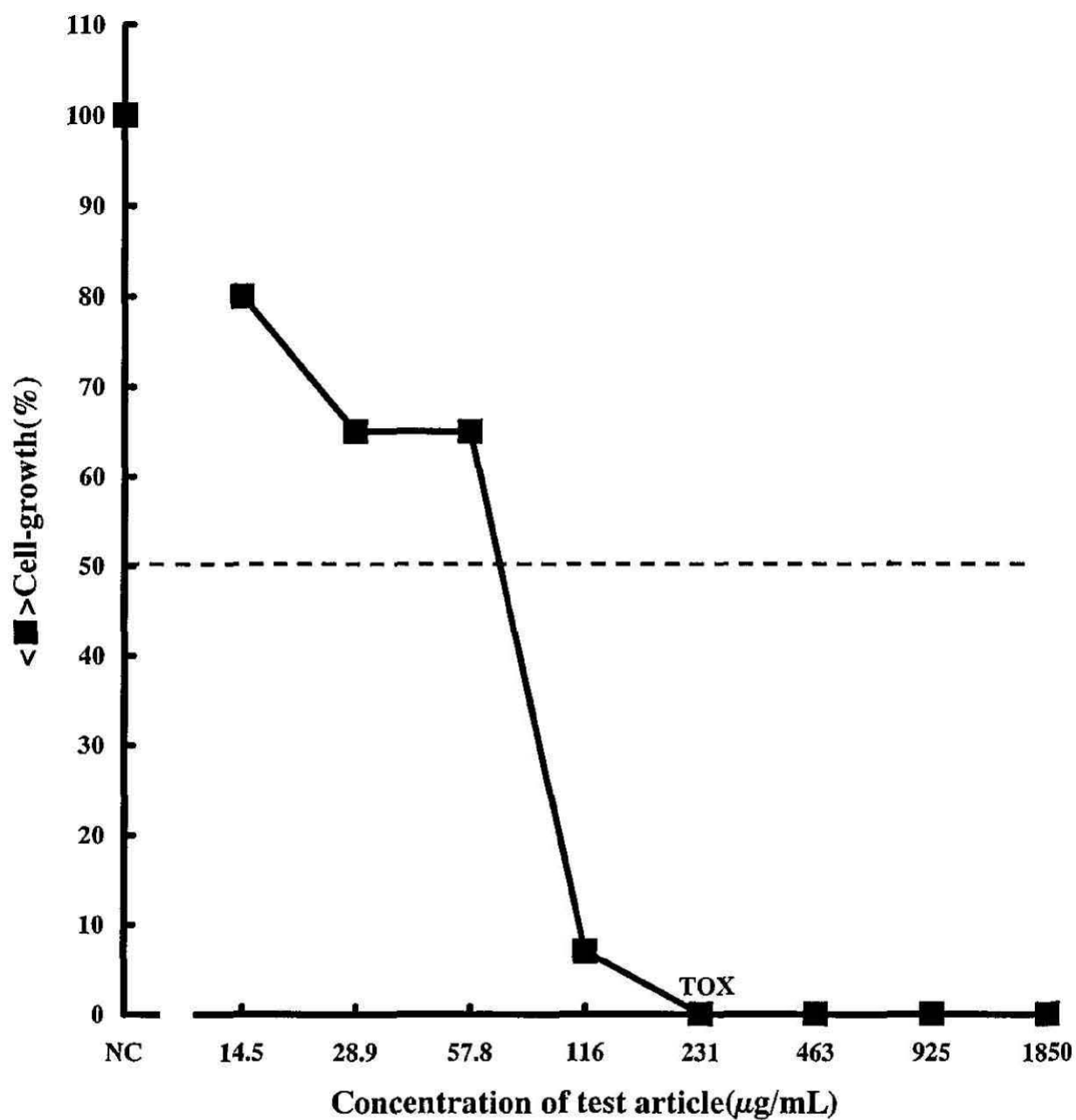


Fig. 1-4

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(DMSO)

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

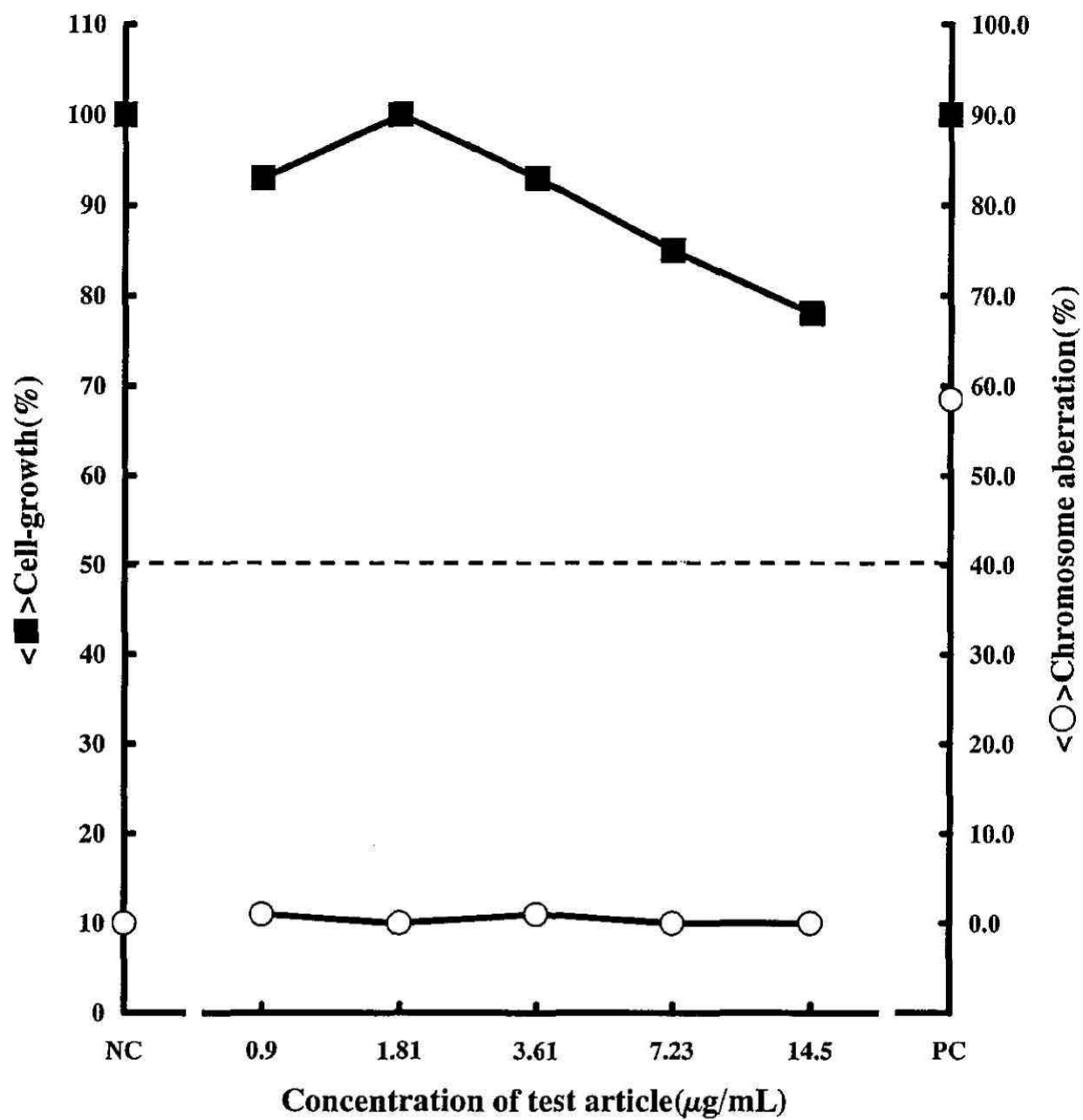


Fig. 2-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

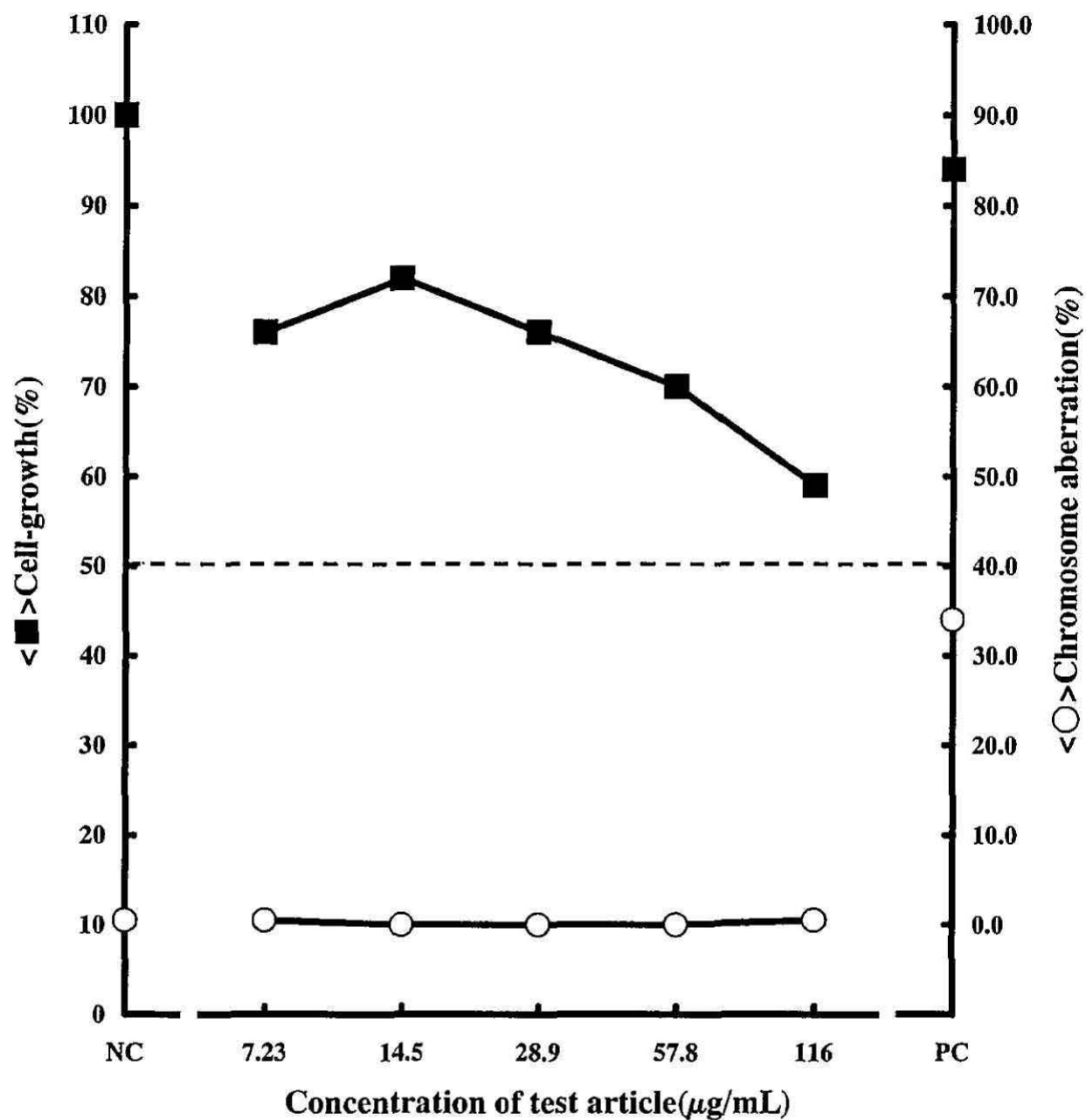


Fig. 2-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Short-term treatment : -S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

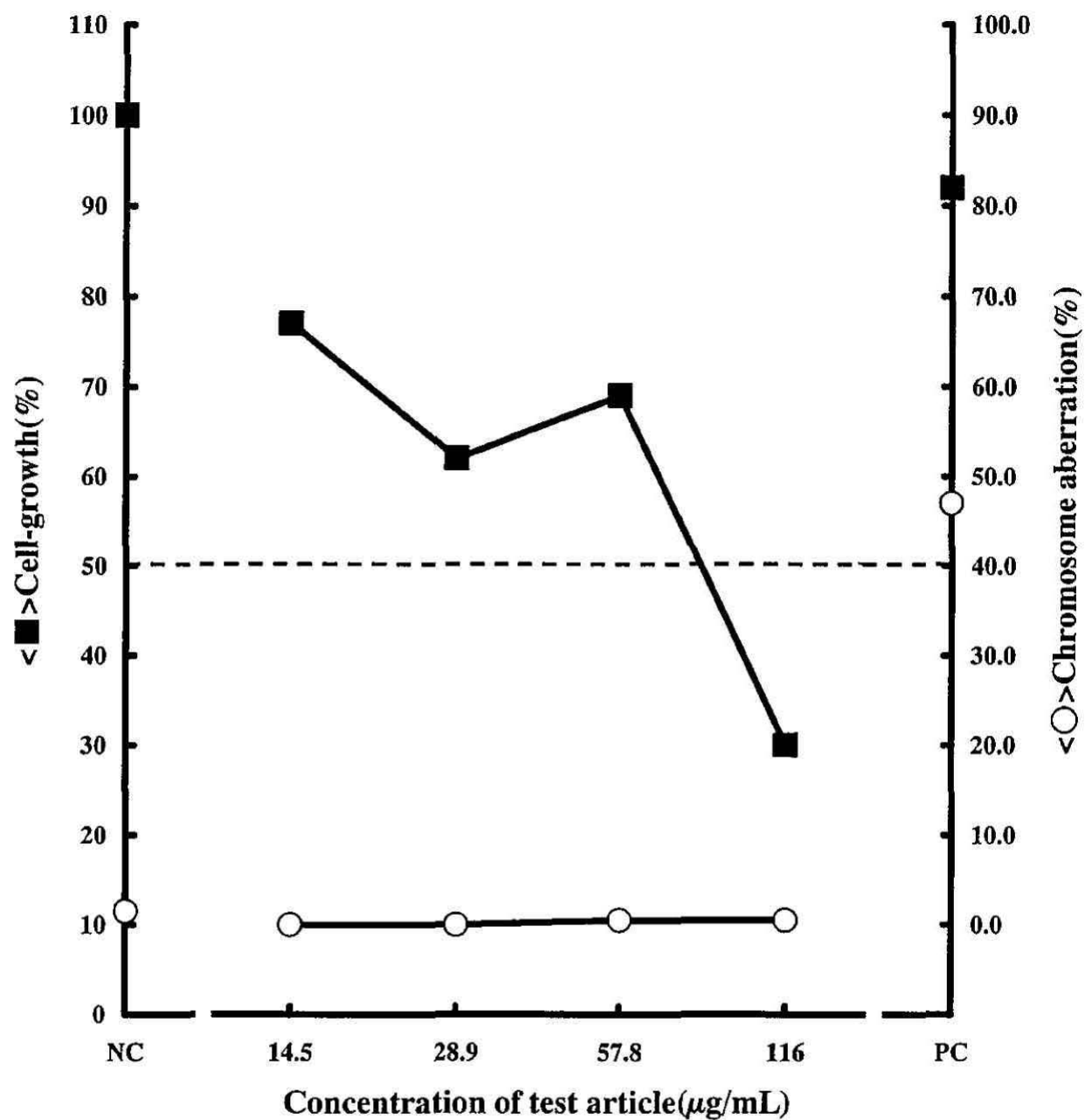


Fig. 2-3

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 µg/mL)

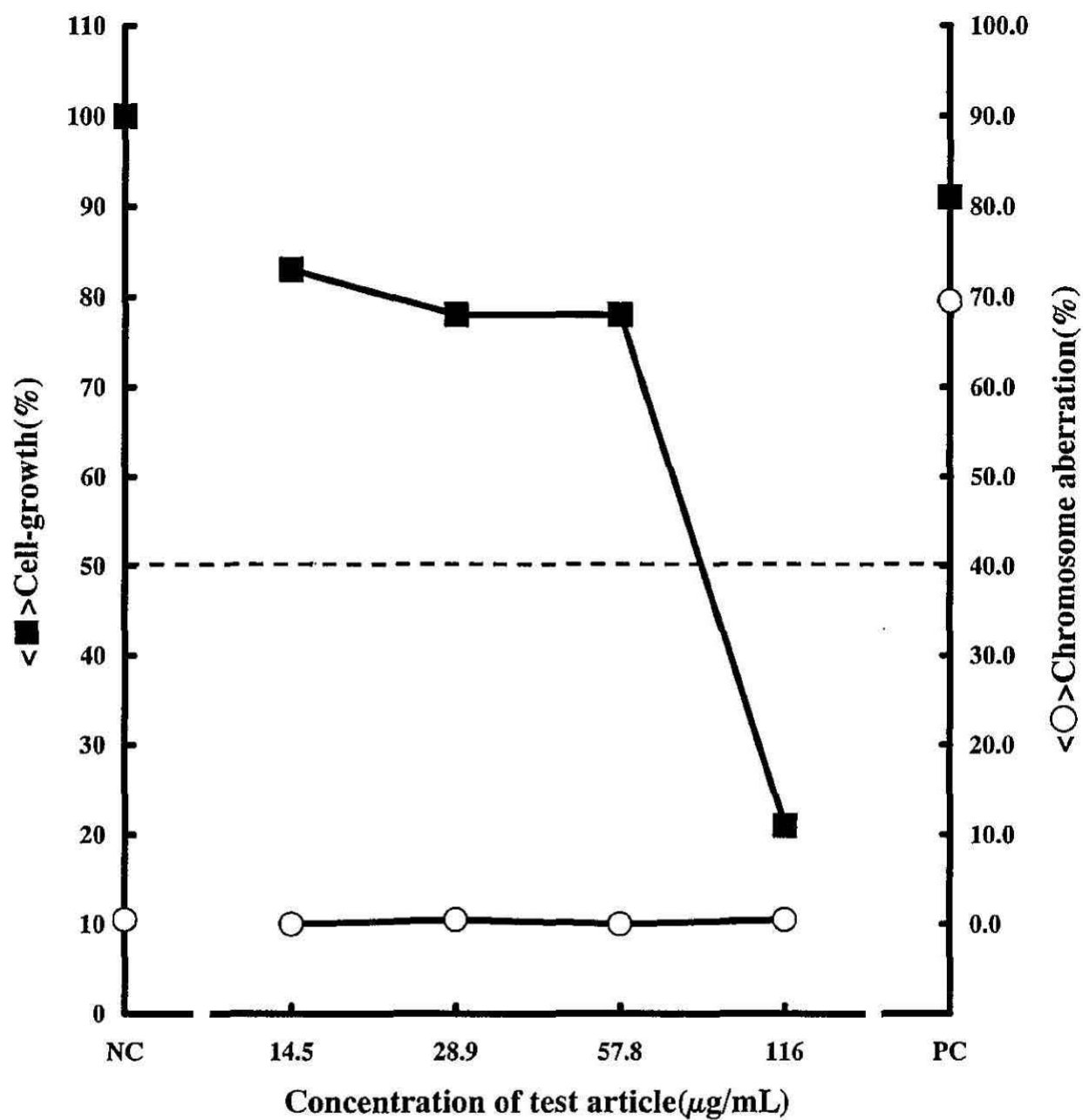


Fig. 2-4

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 µg/mL)

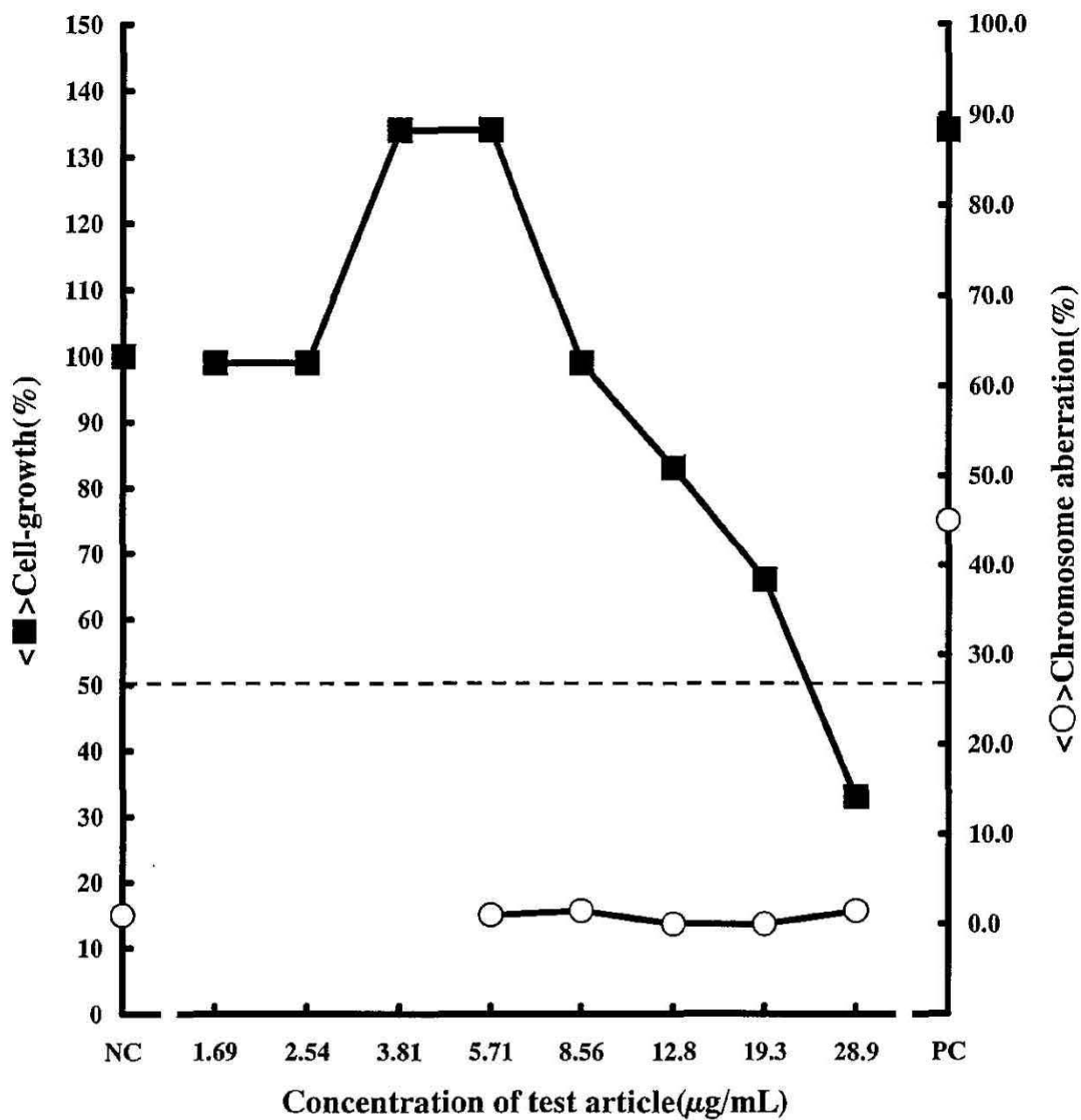


Fig. 2-5

Results of the chromosome aberration test (retest) in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
[retest: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

Table 1-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		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)}	
							1)	2)	
+	6-18	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				87		-	-	-	-
		Test article	14.5	49	46	++	-	-	-
				37		++	-	-	-
			28.9	24	33	++	-	-	-
				37		++	-	-	-
			57.8	12	13	+++	-	-	-
				12		+++	-	-	-
			116	0	6	+++	-	-	-
				12		+++	-	-	-
			231	0	0	+++	-	-	+
				0		+++	-	-	+
			463	0	6	g)	-	+	+
12	g)	-		+		+			
925	0	6	g)	-	+	+			
	12		g)	-	+	+			
1850	12	13	g)	-	+	+			
	12		g)	-	+	+			
Concentration of 50% cell-growth inhibition : below						14.5	$\mu\text{g/mL}$		

NC: Negative Control(DMSO)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾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

+

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 1-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[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)} 1) 2)	
-	6-18	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				100		-	-	-	-
		Test article	14.5	71	71	+	-	-	-
				71		+	-	-	-
			28.9	57	57	++	-	-	-
				57		++	-	-	-
			57.8	71	57	++	-	-	-
				42		++	-	-	-
			116	14	14	++	-	-	-
				14		++	-	-	-
			231	14	7	+++	-	-	+
				0		+++	-	-	+
			463	0	0	g)	-	+	+
				0		g)	-	+	+
			925	0	0	g)	-	+	+
				0		g)	-	+	+
			1850	0	0	g)	-	+	+
				0		g)	-	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition :						67.3	μg/mL		

NC: Negative Control(DMSO)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾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

+ : Presence of precipitates

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 1-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
[Continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	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)}		
							1)	2)	
-	24-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
			100		-	-	-	-	
		Test article	14.5	59	59	+	-	-	-
				59		+	-	-	-
			28.9	59	59	+	-	-	-
				59		+	-	-	-
			57.8	59	59	+	-	-	-
				59		+	-	-	-
			116	0	0	+++	-	-	-
				0		+++	-	-	-
			231	0	0	TOX	-	-	+
				0		TOX	-	-	+
			463	0	0	g)	-	+	+
				0		g)	-	+	+
			925	0	0	g)	-	+	+
				0		g)	-	+	+
			1850	0	0	g)	-	+	+
				0		g)	-	+	+

Concentration of 50% cell-growth inhibition :	66.7	$\mu\text{g/mL}$
---	------	------------------

NC: Negative Control(DMSO)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test solutions and ²⁾ 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.

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

+ : Presence of precipitates

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 1-4

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		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)}	
							1)	2)	
-	48-0	Test article	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				99		-	-	-	-
			14.5	84	80	++	-	-	-
				76		++	-	-	-
			28.9	69	65	++	-	-	-
				61		++	-	-	-
			57.8	69	65	++	-	-	-
				61		++	-	-	-
			116	7	7	+++	-	-	-
				7		+++	-	-	-
			231	0	0	TOX	-	-	+
				0		TOX	-	-	+
			463	0	0	g)	-	+	+
				0		g)	-	+	+
			925	0	0	g)	-	+	+
				0		g)	-	+	+
			1850	0	0	g)	-	+	+
				0		g)	-	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition :						72.9	$\mu\text{g/mL}$		

NC: Negative Control(DMSO)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾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.

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

+ : Presence of precipitates

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 2-1

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		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)}	
								1) 2)	
+	6-18	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				100		-	-	-	-
		Test article	0.90	100	93	-	-	-	-
				85		-	-	-	-
			1.81	100	100	-	-	-	-
				100		-	-	-	-
			3.61	100	93	-	-	-	-
				85		-	-	-	-
		7.23	85	85	-	-	-	-	
			85		-	-	-	-	
		14.5	71	78	+	-	-	-	
			85		+	-	-	-	
PC		100	100	-	-	-	-		
		100		-	-	-	-		

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 $\mu\text{g/mL}$)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test solutions and ²⁾ 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.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-2

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Short-term treatment: -S9 mix]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		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)}	
								1)	2)
-	6-18	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				88		-	-	-	-
		Test article	7.23	66	76	-	-	-	-
				77		-	-	-	-
			14.5	77	82	+	-	-	-
				77		+	-	-	-
			28.9	66	76	+	-	-	-
				77		+	-	-	-
			57.8	66	70	+	-	-	-
				66		+	-	-	-
		116	55	59	++	-	-	-	
			55		++	-	-	-	
		PC		88	94	-	-	-	-
				88		-	-	-	-

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 $\mu\text{g/mL}$)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test solutions and ²⁾ 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.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-3

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Continuous treatment: 24hr]

Chromosome aberration test										
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		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)}		
								1)	2)	
-	24-0	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-	
				85		-	-	-	-	
		Test article	14.5	71	77	+	-	-	-	-
				71		+	-	-	-	
			28.9	57	62	+	-	-	-	-
				57		+	-	-	-	
			57.8	57	69	+	-	-	-	-
				71		+	-	-	-	
			116	28	30	++	-	-	-	-
				28		++	-	-	-	-
		PC		85	92	-	-	-	-	-
				85		-	-	-	-	-

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 $\mu\text{g/mL}$)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾ immediately after addition of the test solutions and ²⁾ 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.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-4

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene

[Continuous treatment: 48hr]

Chromosome aberration test									
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		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)}	
							1)	2)	
-	48-0	0 (NC)		100 ^{a)}	100	-	-	-	-
				118		-	-	-	-
		Test article	14.5	90	83	+	-	-	-
				90		+	-	-	-
			28.9	90	78	+	-	-	-
				81		+	-	-	-
			57.8	81	78	+	-	-	-
				90		+	-	-	-
			116	18	21	++	-	-	-
				27		++	-	-	-
		PC		99	91	-	-	-	-
				99		-	-	-	-

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 $\mu\text{g/mL}$)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾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.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-5

Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
[retest: +S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		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)}
								1) 2)
+	6-18	0 (NC)		100 ^{a)} 99	100	- -	- -	- -
		Test article	1.69	99 99	99	- -	- -	- -
			2.54	99 99	99	- -	- -	- -
			3.81	133 133	134	- -	- -	- -
			5.71	133 133	134	+ +	- -	- -
			8.56	99 99	99	+ +	- -	- -
			12.8	66 99	83	+ +	- -	- -
			19.3	66 66	66	++ ++	- -	- -
			28.9	33 33	33	++ ++	- -	- -
		PC		133 133	134	- -	- -	- -

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 $\mu\text{g/mL}$)

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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed ¹⁾immediately after addition of the test solutions and ²⁾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.

e) - : No changes of color

f) - : Absence of precipitates/crystals

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
[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	0	0	0	0	0.0	0.0	—	55-1 33-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		0.90	200	0.0	—	1	2	0	0	0	0	1.0	1.5	—	10-1 95-1
			(100)	(0)		(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		1.81	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	59-1 01-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		3.61	200	0.0	—	0	1	1	0	0	0	1.0	1.0	—	98-1 84-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		7.23	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	60-1 20-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		14.5	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	89-1 30-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		PC	200	0.0	—	0	17	107	2	1	0	58.5	58.5	+	99-1 57-1
			(100)	(0)		(0)	(10)	(55)	(0)	(1)	(0)	(61)	(61)		
			(100)	(0)		(0)	(7)	(52)	(2)	(0)	(0)	(56)	(56)		

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.

NC: Negative control (DMSO)

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

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
[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	0.5	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	29-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		7.23	200	0.0	—	1	0	1	0	0	0	0.5	1.0	—	96-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
		14.5	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	36-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		28.9	200	0.0	—	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—	90-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		57.8	200	0.5	—	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—	82-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		116	200	1.0	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	47-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		PC	200	0.0	—	0	12	58	0	0	0	34.0	34.0	+	09-1
			(100)	(0)		(0)	(6)	(28)	(0)	(0)	(0)	(33)	(33)		
			(100)	(0)		(0)	(6)	(30)	(0)	(0)	(0)	(35)	(35)		

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.

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 beta-Bromostyrene
[Continuous treatment:24hr]

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				
-	24-0	NC	200	0.0	—	0	2	1	0	0	0	1.5	1.5	—	07-1 35-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
		14.5	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	41-1 64-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		28.9	200	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	17-1 63-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		57.8	200	0.0	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	05-1 12-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		116	200	0.5	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	78-1 75-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		PC	200	0.5	—	0	15	83	0	0	0	47.0	47.0	+	11-1 39-1
			(100)	(1)		(0)	(7)	(44)	(0)	(0)	(0)	(50)	(50)		
			(100)	(0)		(0)	(8)	(39)	(0)	(0)	(0)	(44)	(44)		

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.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 μ g/mL)

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
[Continuous treatment:48hr]

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				
-	48-0	NC	200	1.5	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	61-1 13-1
			(100)	(2)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		14.5	200	0.5	—	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—	15-1 65-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		28.9	200	0.0	—	1	1	0	0	0	0	0.5	1.0	—	45-1 66-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
		57.8	200	0.0	—	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—	87-1 71-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		116	200	0.0	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	06-1 44-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		PC	200	0.0	—	1	22	129	0	4	0	69.5	69.5	+	62-1 49-1
			(100)	(0)		(1)	(11)	(63)	(0)	(1)	(0)	(68)	(68)		
			(100)	(0)		(0)	(11)	(66)	(0)	(3)	(0)	(71)	(71)		

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.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050 μ g/mL)

Table 3-5 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with beta-Bromostyrene
[Retest:+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	1	0	1	0	0	1.0	1.0	-	85-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(2)	(2)		
		5.71	200	0.0	-	0	1	2	0	0	0	1.0	1.0	-	04-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		8.56	200	0.5	-	1	2	0	0	1	0	1.5	2.0	-	26-1
			(100)	(1)		(1)	(2)	(0)	(0)	(1)	(0)	(3)	(4)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		12.8	200	0.0	-	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	-	80-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		19.3	200	0.5	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	19-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		28.9	200	0.0	-	0	2	1	0	0	0	1.5	1.5	-	34-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
		PC	200	0.5	-	0	19	78	2	0	0	45.0	45.0	+	14-1
			(100)	(1)		(0)	(14)	(44)	(1)	(0)	(0)	(53)	(53)		
			(100)	(0)		(0)	(5)	(34)	(1)	(0)	(0)	(37)	(37)		

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.

NC: Negative control (DMSO)

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