

M-1434

最 終 報 告 書

試験名：チオフェノールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：M-1434

試験期間：2010年11月15日-2011年3月29日

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

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

2. 目次

2.	目次	3
5.	要約	10
6.	緒言	11
7.	試験材料及び方法	12
7.1	被験物質及び溶媒	12
7.1.1	被験物質	12
7.1.2	溶媒	12
7.2	被験液の調製	13
7.2.1	調製方法	13
7.2.2	調製頻度	13
7.2.3	安定性	13
7.2.4	濃度の確認	13
7.3	対照物質	14
7.3.1	陰性対照	14
7.3.2	陽性対照	14
7.4	使用細胞株	15
7.4.1	細胞株	15
7.4.2	細胞の選択理由	16

7.4.3	培養条件	16
7.4.4	性状検査	16
7.5	S9 mix 及び培養液の調製	16
7.5.1	S9 mix	16
7.5.2	培養液	17
7.6	試験方法 ¹⁻⁵⁾	17
7.6.1	識別方法	18
7.6.2	用量の設定	18
7.6.3	細胞増殖抑制試験	19
7.6.4	染色体異常試験	20
7.6.5	標本の観察	21
7.6.6	染色体異常の分類	21
7.6.7	判定基準	22
8.	試験結果	23
8.1	細胞増殖抑制試験	23
8.1.1	短時間処理法	23
8.1.2	連続処理法	23
8.2	染色体異常試験	24
8.2.1	短時間処理法	24
8.2.2	連続処理法	24
9.	考察	26
10.	参考文献	27

図

- Fig. 1-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 1-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 1-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese

hamster cells treated with thiophenol
[Continuous treatment: 24hr]
Fig. 1-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese
hamster cells treated with thiophenol
[Continuous treatment: 48hr]

表

Table 1-1	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol [Short-term treatment: +S9 mix]
Table 1-2	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol [Short-term treatment: -S9 mix]
Table 1-3	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol [Continuous treatment: 24hr]
Table 1-4	Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol [Continuous treatment: 48hr]

5. 要約

チオフェノール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。

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法及び連続処理法の 24 時間処理では 18.8 $\mu\text{g/mL}$ で 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。連続処理法の 48 時間処理では、設定した最低用量の 9.38 $\mu\text{g/mL}$ で抑制率 64%を示し 50%を超えない値が得られなかった。50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は、短時間処理法の代謝活性化では 14.4 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 16.8 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 10.3 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では求めることが出来なかった。これらの結果より、短時間処理法では 20.0 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 2 で計 4 用量を、連続処理法では 20.0 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 2 で計 5 用量を、それぞれ設定した。

短時間処理法及び連続処理法ともに、すべての用量で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）及び倍数体の出現頻度ともに 5%未満を示した。

なお、すべ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、チオフェノール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を誘発しないと結論した。

6. 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、チオフェノール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-1434

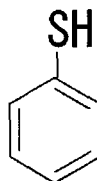
7. 試験材料及び方法

7.1 被験物質及び溶媒

7.1.1 被験物質

名称 : チオフェノール、thiophenol
官報公示整理番号 : 3-1092
CAS 番号 : 108-98-5

構造式又は示性式 :



分子量 : 110.19
性状 : 無色液体
入手量 : 20 g
純度 : 99.9%
安定性 : 実験終了後に、株式会社ボゾリサーチセンターにおいて安定性を測定し、実験期間中の安定性を確認した (Attached Data 4)。
保存方法 : 冷暗所 (冷蔵庫内、許容範囲: 1~10°C、保存期間中の実測温度: 2~8°C)、密栓、不活性状態 (窒素充填)
保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室、第1研究棟 被験物質調製室 冷蔵庫及び生化学部標準物質保存場所
返却 : 実験終了後、被験物質の残余物は、安定性を確認した後、すべて株式会社ボゾリサーチセンターにおいて廃棄した。

7.1.2 溶媒

名称 : ジメチルスルホキシド (DMSO)
ロット番号 : PEH5762
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 : 溶媒選択のための供試前試験において、被験物質は 120 mg/mL で DMSO に溶解したため、DMSO を溶媒として選択した。

7.2 被験液の調製

7.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.2400 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 120 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1200 µg/mL）を調製した。次いで、120 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、60.0、30.0、15.0、7.50、3.75、1.88 及び 0.938 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 0.0200 g を 10 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 2.00 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：20 µg/mL）を調製した。次いで、2.00 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 3 段階希釈し、1.00、0.500 及び 0.250 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を調製した。

連続処理法では、被験物質 0.0200 g を 10 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 2.00 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：20 µg/mL）を調製した。次いで、2.00 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 4 段階希釈し、1.00、0.500、0.250 及び 0.125 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。

7.2.2 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。

7.2.3 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、変化が認められなかったことから、被験液が安定であることを確認した。

7.2.4 濃度の確認

染色体異常試験の短時間処理法及び連続処理法に用いた最高濃度及び最低濃度の被験液について、株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所において HPLC 法により濃度の確認を実施した。その結果、表示値に対する濃度の割合は 95.2～104.0%（表示値に対する割合：100±5%以内）であり、いずれも許容範囲内であった（Attached Data 2 及び 3）。分析法の概略を次に示す。

1) 測定対象標準物質

名称 : チオフェノール
 ロット番号 : 7U8SB
 保存方法 : 冷暗所(冷蔵庫内、許容値:1~10°C、実測値:2~8°C)、
密栓、不活性状態(窒素充填)
 保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室、生化学部標準物質保
存場所

2) HPLC 測定条件

カラム : YMC-Pack Pro C18 RS (4.6 mm I.D.×150 mm、
粒子径 5 µm、株式会社ワイエムシィ)
 カラム恒温槽設定温度 : 30°C
 移動相 : メタノール/20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 2.5) 混液
(6/4、v/v)
 流量 : 1.0 mL/min
 検出 : UV (測定波長 254 nm)
 試料注入量 : 10 µL
 オートサンプラー設定温度 : 10°C
 注入順序 :

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液-1 (システム適合性用)
2	3	標準溶液-1 (定量用)
3	1	各測定実測試料

標準溶液-1 及び測定実測試料の測定は、注入後 5 時間以内に実施した。なお、バリデーション試験で、オートサンプラー内における 5 時間保存後の安定性が確認されている。

7.3 対照物質

7.3.1 陰性対照

溶媒として用いた DMSO を陰性対照とした。

7.3.2 陽性対照

1) 代謝活性化

シクロフォスファミド (CP)

ロット番号	:	PEG0397
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

2) 非代謝活性化

マイトマイシン C (MMC)

ロット番号	:	547AIJ、550AJC
製造元	:	協和醗酵キリン株式会社
力価	:	2 mg (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

3) 調製方法

調製はすべて用時に行い、残余液はすべて一定期間貯蔵した後に焼却処分した。

(1) 染色体異常試験 短時間処理法 代謝活性化

CP 0.0140 g を γ 線滅菌済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: K0G97) を 20 mL 加えて溶解し、0.70 mg/mL 溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた。この時の最終濃度は 14 μ g/mL)。

(2) 染色体異常試験 短時間処理法 非代謝活性化

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: K0G97) 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 μ g/mL)。

(3) 染色体異常試験 連続処理法

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: K0G97) 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 μ g/mL)。

4) 陽性対照物質の選択理由

遺伝毒性試験ガイドライン (前述 6.2) 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。

7.4 使用細胞株

7.4.1 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 2009 年 11 月 25 日に入手し、継代培養を行ったものについて細胞の性状検査を実施して、適正であることが確認されたものを試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験で 21 継代、染色体異常試験の短時間処理法及び連続処理法でそれぞれ 3 継代及び 11 継代であった。

7.4.2 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常の発現率が低いこと、種々の化学物質に対して感受性が高いこと、背景データも多いこと及びほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験に広く用いられていることから、本細胞を選択した。

7.4.3 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。

7.4.4 性状検査

定期的実施される性状検査において、プレート上で単層状に増殖すること、細胞倍加時間が 15~20 時間以内であること、染色体数の平均（モード）が 25 本であること、マイコプラズマによる汚染がないこと及び染色体異常誘発物質に対する感受性が確認された細胞から、30 代を越えない範囲で継代培養を行っているものを用いた。

7.5 S9 mix 及び培養液の調製

7.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素（S9/コファクターC セット、ロット番号：C100910061、オリエンタル酵母工業株式会社）を混合し、S9 mix を調製した。調製は使用時に行った。

1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	10091006
製造日	:	2010 年 9 月 10 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（-80℃ 設定の冷凍庫）
使用期限	:	2011 年 3 月 9 日

M-1434

- 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C
- ロット番号 : C10090806
- 製造日 : 2010 年 9 月 8 日
- 保存方法 : 冷凍 (−80°C 設定の冷凍庫)
- 使用期限 : 2011 年 3 月 7 日
- 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 | 20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH 7.2) | 1.34 mL |
| | | 50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液 | 0.67 mL |
| | | 330 mmol/L 塩化カリウム水溶液 | 0.67 mL |
| | | 50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液 | 0.67 mL |
| | | 40 mmol/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 |

7.5.2 培養液

Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No. 11095) に、非働化 (56°C, 30 分) した牛血清 (bovine serum、BS) を 10 v/v% 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 : 731681
- 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 : 822962、838546
- 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

7.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下に示したステージの順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化
	連続処理法	非代謝活性化 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
	連続処理法	非代謝活性化 24 時間処理 48 時間処理

7.6.1 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、被験物質処理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。

7.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 1200 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 600、300、150、75.0、37.5、18.8 及び 9.38 $\mu\text{g/mL}$ の計 8 用量を設定し、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、短時間処理法及び連続処理法の 24 時間処理では 18.8 $\mu\text{g/mL}$ で 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。連続処理法の 48 時間処理では、設定した最低用量の 9.38 $\mu\text{g/mL}$ で抑制率 64%を示し 50%を超えない値が得られなかった。50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、短時間処理法の代謝活性化では 14.4 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 16.8 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 10.3 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では求めることが出来なかった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、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」との規定を参照し、更に各処理における 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量における抑制率と 50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) を勘案しながら、短時間処理法では

20.0 µg/mL を最高用量として、以下、公比 2 で計 4 用量を、連続処理法では 20.0 µg/mL を最高用量として、以下、公比 2 で計 5 用量を、それぞれ設定した。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。

7.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量設定のために実施した。無菌性が必要な実験操作は、滅菌済器具を用い、無菌環境下で実施した。

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陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。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、プレート数は各群 2 枚とした。
- (2) 2×10^4 細胞／プレート（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常がないことを倒立位相差顕微鏡下で確認し、下記の添加液量に相当する培養液を取り除いた。次に、代謝活性化については陰性対照群では S9 mix 0.833 mL と溶媒 0.050 mL を、被験物質処理群では、S9 mix 0.833 mL と各濃度の被験液 0.050 mL をそれぞれ加えた。非代謝活性化については陰性対照群では、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 をそれぞれ加えた。各群ともに添加後に肉眼で析出の有無及び培養液の色調変化を確認した。
- (3) 培養 6 時間後に、被験物質の析出の有無を肉眼で、細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で確認した。次に、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて、更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 培養終了後、6 時間培養後と同様の方法で、被験物質の析出の有無及び細胞の状態を確認した（参考データ）。次に、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度 99%以上）で洗浄、固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色し細胞密度測定用標本作製した。細胞密度を、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）で測定し、陰性対照群の値を 100%として、被験物質処理群の 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陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。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、プレート数は各群 2 枚とした。
- (2) 2×10^4 細胞／プレート（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常がないことを倒立位相差顕微鏡下で確認し、下記の添加液量に相当する培養液を取り除いた。次に、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群では、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 をそれぞれ加えた。各群ともに添加後に肉眼で析出の有無及び培養液の色調変化を確認し、24 時間又は 48 時間培養した。
- (3) 培養終了後に、被験物質の析出の有無を肉眼で、細胞の状態を倒立位相差顕微鏡

下で確認した。次に、短時間処理法と同様な方法で細胞密度測定用標本を作製し、被験物質処理群の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

7.6.4 染色体異常試験

無菌性が必要な実験操作は、滅菌済器具を用い、無菌環境下で実施した。

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、プレート数は各群 4 枚とした。
- (2) 2×10^4 細胞／プレート（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常がないことを倒立位相差顕微鏡下で確認し、下記の添加液量に相当する培養液を取り除いた。次に、代謝活性化については陰性対照群に S9 mix 0.833 mL と溶媒 0.050 mL を、被験物質処理群では、S9 mix 0.833 mL と各濃度の被験液 0.050 mL を、陽性対照群では S9 mix 0.833 mL と CP 0.100 mL（0.70 mg/mL 溶液）をそれぞれ加えた。非代謝活性化については陰性対照群では、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、陽性対照群では MMC 0.150 mL（0.0025 mg/mL 溶液）をそれぞれ加えた。各群ともに添加後に肉眼で析出の有無及び培養液の色調変化を確認し培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、被験物質の析出の有無を肉眼で、細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で確認した。細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて、更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 染色体観察用標本作製のため、培養終了の約 2 時間前に各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）にコルセミド（デメコルシン溶液、10 µg/mL、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 添加した。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥離、遠心分離後 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理、固定（メチルアルコール：酢酸＝3：1 液）し、細胞懸濁液を調製した。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。プレート当たり 2 枚の染色体標本を作製し、1 日以上空気乾燥した後、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体観察用標本を作製した。
- (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被験物質の析出の有無及び細胞の状態を確認した（参考データ）。次に、細胞増殖抑制試験と同様の方法で細胞密度測定用標本を作製し、細胞密度を単層細胞密度測定装置で測定した。

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、プレート数は各群 4 枚とした。
- (2) 2×10^4 細胞／プレート（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常

がないことを倒立位相差顕微鏡下で確認し、下記の添加液量に相当する培養液を取り除いた。次に、24時間処理及び48時間処理ともに陰性対照群では、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、陽性対照群では MMC 0.100 mL (0.0025 mg/mL 溶液) をそれぞれ加えた。各群ともに添加後に、肉眼で析出の有無及び培養液の色調変化を確認し、24時間及び48時間培養した。

- (3) 染色体観察用標本作製のため、培養終了の約2時間前に各群2枚のプレート(枝番号-1及び-2)にコルセミド(デメコルシン溶液、10 µg/mL、和光純薬工業株式会社)を0.1 mL添加した。その他は、短時間処理法と同様に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、培養終了後に、被験物質の析出の有無を肉眼で、細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で確認した。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。

7.6.5 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。

7.6.6 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もの(非染色部分が染色分体の同軸上にある)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。 |
| 染色分体型切断(ctb) | : | 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。 |
| 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。 |
| 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)など。

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、倍加した場合を数的異常と定義した。

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

7.6.7 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。

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 (+)

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。

8. 試験結果

8.1 細胞増殖抑制試験

8.1.1 短時間処理法

1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化 (Appendix 2-1) 及び非代謝活性化 (Appendix 2-2) とともに、18.8 µg/mL 以上の用量で 50%を超える細胞増殖抑制は認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は代謝活性化 (Appendix 2-1) では 14.4 µg/mL、非代謝活性化 (Appendix 2-2) では 16.8 µg/mL であった。

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変化は代謝活性化 (Appendix 2-1) 及び非代謝活性化 (Appendix 2-2) とともに、300 µg/mL 以上の用量で淡黄色の色調変化が認められた。また、析出が代謝活性化 (Appendix 2-1) 及び非代謝活性化 (Appendix 2-2) とともに、300 µg/mL 以上の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の観察

陰性対照群と被験物質処理群を比較すると、代謝活性化 (Appendix 2-1) 及び非代謝活性化 (Appendix 2-2) とともに、全ての用量で細胞の浮遊・形態変化が認められ、1200 µg/mL の用量で固着が認められた。

8.1.2 連続処理法

1) 50%細胞増殖抑制濃度

24 時間処理 (Appendix 2-3) では、18.8 µg/mL 以上の用量で、50%を超える細胞増殖抑制は認められ、50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は 10.3 µg/mL であった。48 時間処理 (Appendix 2-4) では設定した最低用量の 9.38 µg/mL で抑制率 64% を示し 50%を超えない値が得られなかったため、50%細胞増殖抑制濃度 (概略値) は求められなかった。

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変化は 24 時間処理 (Appendix 2-3) 及び 48 時間処理 (Appendix 2-4) とともに、300 µg/mL 以上の用量で淡黄色の色調変化が認められた。また、析出が 24 時間処理 (Appendix 2-3) 及び 48 時間処理 (Appendix 2-4) とともに、300 µg/mL 以上の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の観察

陰性対照群と被験物質処理群を比較すると、24 時間処理 (Appendix 2-3) では、75.0 µg/mL 以上の用量で細胞の剥離・死滅が、9.38 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊・形態変化が認められ、600 µg/mL 以上の用量で固着が認められた。48 時間処理 (Appendix 2-4) では、37.5 µg/mL 以上の用量で細胞の剥離・死滅が、9.38 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊・形態変化が認められ、600 µg/mL 以上の用量で固着が認められた。

8.2 染色体異常試験

8.2.1 短時間処理法

1) 被験物質添加直後の観察

代謝活性化 (Appendix 3-1) 及び非代謝活性化 (Appendix 3-2) とともに、被験物質添加に伴う培養液の色調の変化及び析出は認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の観察

陰性対照群と被験物質処理群を比較すると、代謝活性化 (Appendix 3-1) では 5.00 µg/mL 以上の用量で、非代謝活性化 (Appendix 3-2) では 10.0 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊・形態変化が認められ、代謝活性化 (Appendix 3-1) 及び非代謝活性化 (Appendix 3-2) とともに、析出は認められなかった。

3) 染色体構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化 (Table 1-1) においては、20.0、10.0、5.00 及び 2.50 µg/mL ではそれぞれ 4.0、1.0、0 及び 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、非代謝活性化 (Table 1-2) においては、20.0、10.0、5.00 及び 2.50 µg/mL ではそれぞれ 0、0、0.5 及び 1.0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

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、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) 染色体数異常

数異常 (倍数体) の出現率は、代謝活性化 (Table 1-1) においては、20.0、10.0、5.00 及び 2.50 µg/mL ではそれぞれ 0.5、0.5、0 及び 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、非代謝活性化 (Table 1-2) においては、20.0、10.0、5.00 及び 2.50 µg/mL ではそれぞれ 1.5、0.5、0 及び 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

なお、陰性対照群においては、染色体数異常の出現率は陰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。

8.2.2 連続処理法

1) 被験物質添加直後の観察

24 時間処理 (Appendix 3-3) 及び 48 時間処理 (Appendix 3-4) とともに、被験物質添加に伴う培養液の色調の変化及び析出は認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の観察

陰性対照群と被験物質処理群を比較すると、24 時間処理 (Appendix 3-3) 及び 48 時間処理 (Appendix 3-4) とともに、10.0 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊・形態変化が認められ、析出は認められなかった。

3) 染色体構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、24 時間処理 (Table 1-3) においては、20.0、10.0、5.00、2.50 及び 1.25 µg/mL ではそれぞれ 0.5、0.5、0、0 及び 0.5%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、48 時間処理 (Table 1-4) においては、20.0 µg/mL では規定数の細胞が観察出来ず UR (unreliable) と判定され、10.0、5.00、2.50 及び 1.25 µg/mL ではそれぞれ 0.5、0、0.5 及び 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

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、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 (Table 1-3) においては、20.0、10.0、5.00、2.50 及び 1.25 µg/mL ではそれぞれ 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、48 時間処理 (Table 1-4) においては、20.0 µg/mL では規定数の細胞が観察出来ず UR (unreliable) と判定され、10.0、5.00、2.50 及び 1.25 µg/mL ではそれぞれ 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

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った。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

9. 考察

チオフェノール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。

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、短時間処理法及び連続処理法のすべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示した。

また、倍数体の出現頻度は、短時間処理法及び連続処理法ともにすべての用量で陰性の判定基準である 5%未満であった。

すべ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。

なお、チオフェノールは微生物を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）⁶⁾において、S9±のネズミチフス菌 TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 で陰性と報告されている。

以上の結果から、チオフェノールは本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数異常を誘発しないと結論した。

10. 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, *Mutat. Res.*, 48, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M and Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutat. 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
- 6) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Vol. 15, pp. 155-175. Lyon, France: IARC Scientific Publications, 1977.

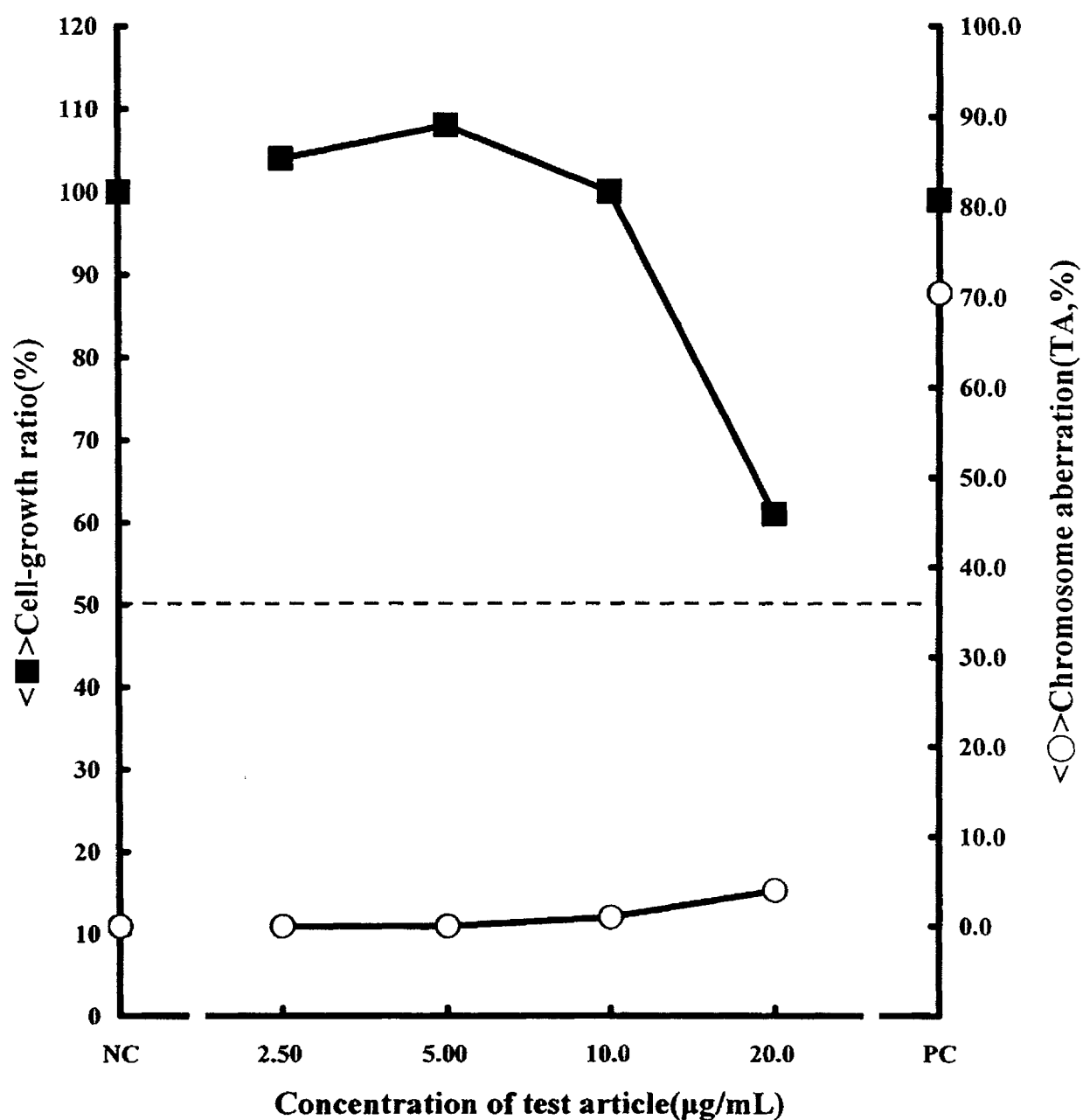


Fig. 1-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol

[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

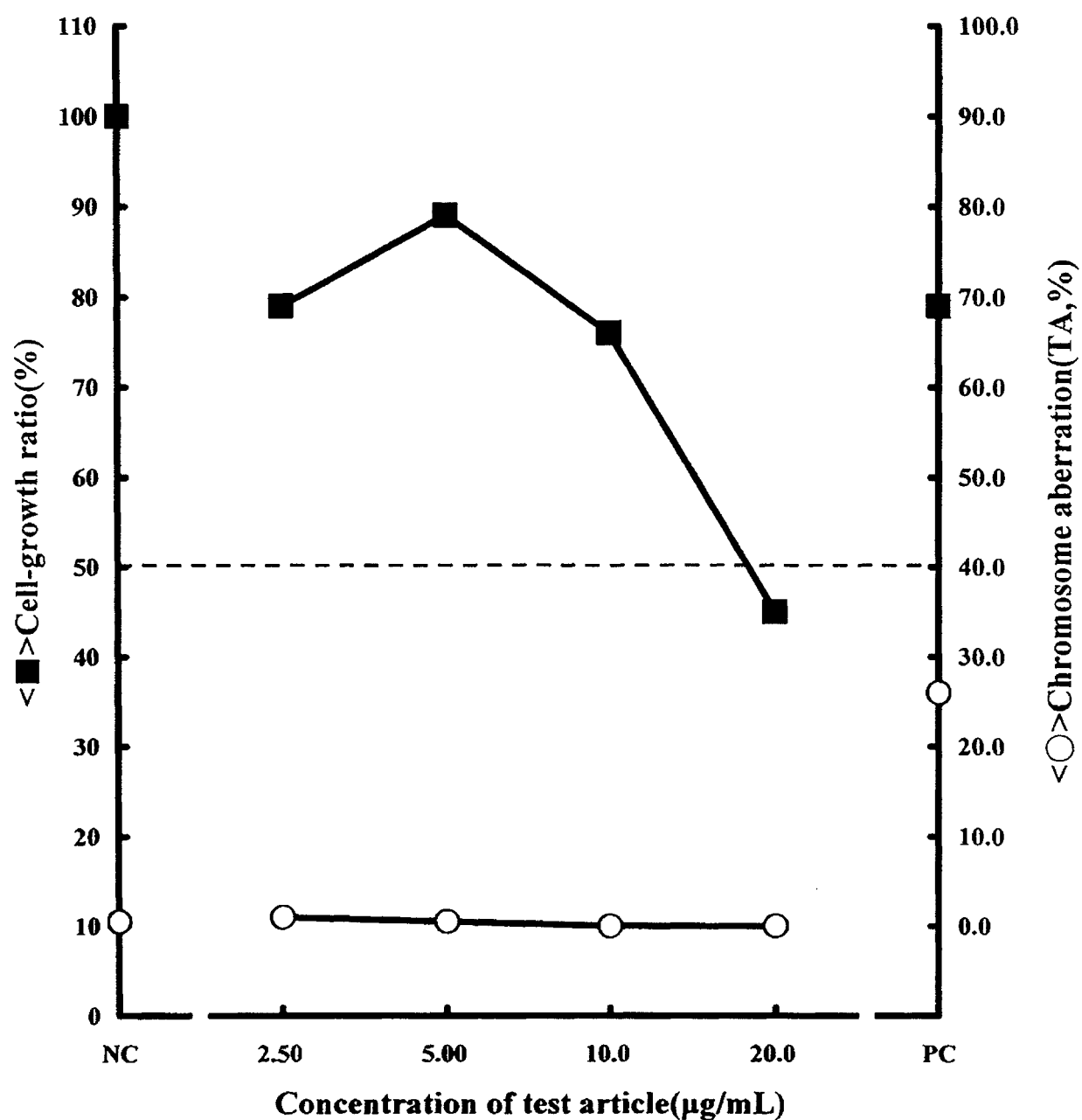


Fig. 1-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol
[Short-term treatment : -S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

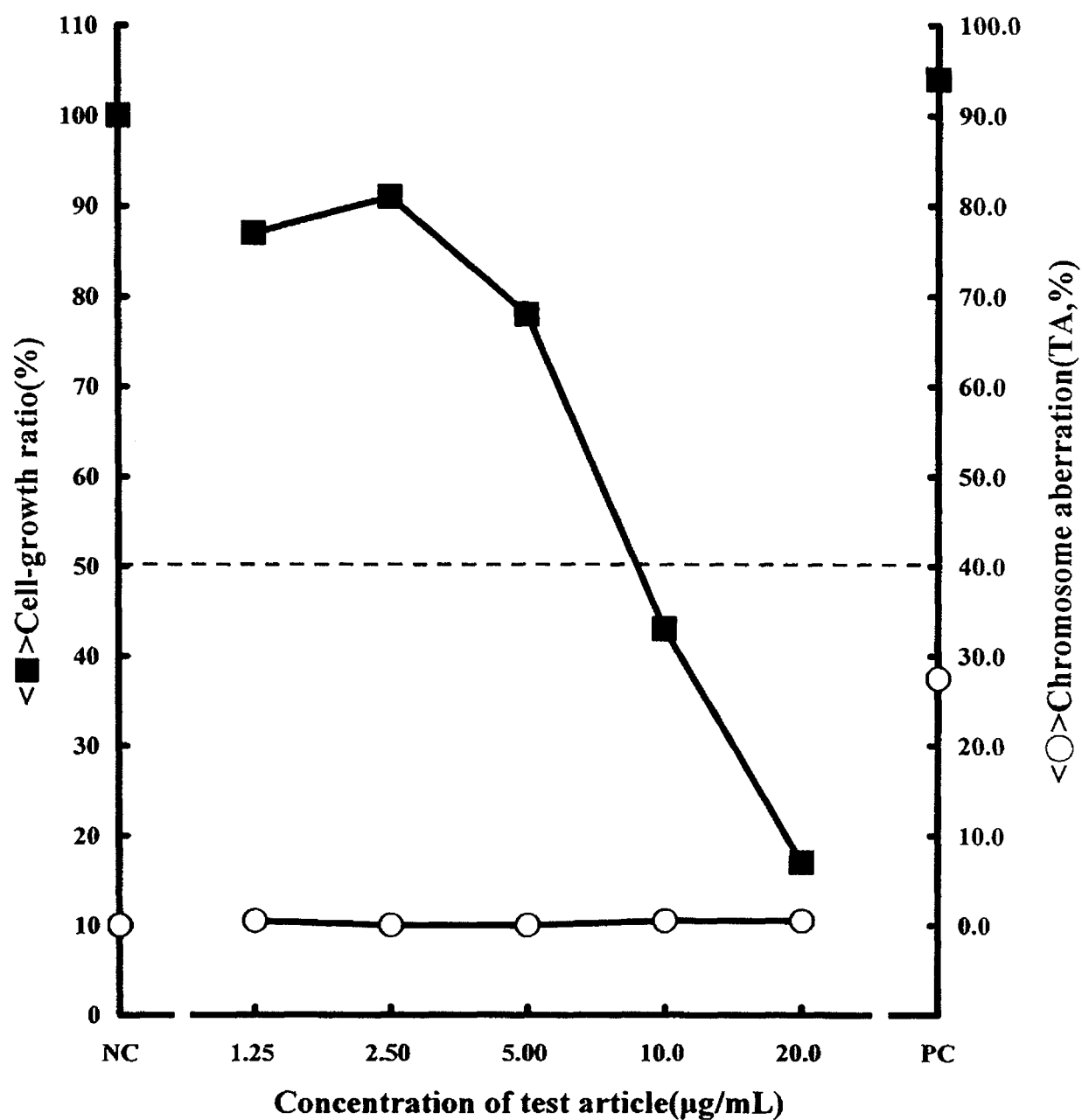


Fig. 1-3

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol
[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(DMSO)

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

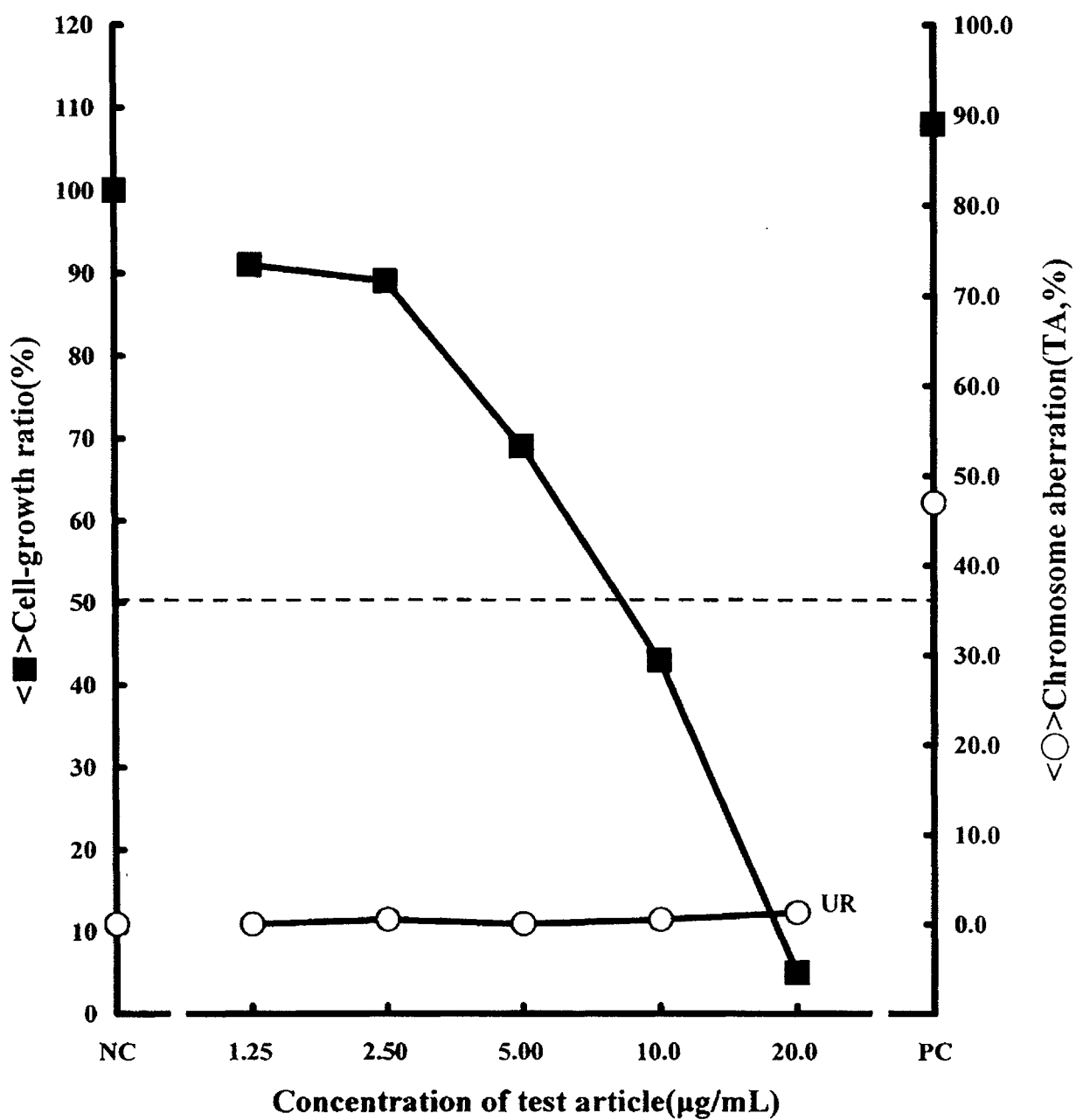


Fig. 1-4

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol

[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(DMSO)

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

UR: This value was judged to be unreliable since no sufficient number of chromosome could be observed due to severe cytotoxicity.

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

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.		
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)	Judge-ment
6-18	+	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	90-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	0	-	77-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		2.50	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	0	-	37-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	107	100	0	0	0	-	36-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(104)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		5.00	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	107	100	0	0	0	-	73-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	107	100	0	0	0	-	56-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(108)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		10.0	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	107	100	0	0	0	-	40-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	92	100	1	0	1	-	29-1
			200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	-	(100)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		20.0	100	0	4	0	0	0	4	0	4	-	64	100	0	0	0	-	08-1
			100	0	4	0	0	0	4	0	4	-	57	100	1	0	1	-	21-1
			200	0(0.0)	8(4.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	8(4.0)	0(0.0)	8(4.0)	-	(61)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		PC	100	5	69	0	0	0	71	0	71	+	99	100	0	0	0	-	54-1
			100	8	68	0	0	0	70	0	70	+	99	100	1	0	1	-	86-1
			200	13(6.5)	137(68.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	141(70.5)	0(0.0)	141(70.5)	+	(99)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		

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, 14µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol
[Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)								Judge-ment	Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	
6-18	-	NC	100	0	1	0	0	0	1	0	1	100	100	0	0	0	65-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0	97-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		2.50	100	1	0	0	0	0	1	0	1	84	100	0	0	0	07-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	73	100	0	0	0	92-1
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	(79)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		5.00	100	1	0	0	0	0	1	0	1	89	100	0	0	0	71-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	89	100	0	0	0	48-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(89)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		10.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	79	100	1	0	1	20-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	73	100	0	0	0	64-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(76)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
		20.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	47	100	2	0	2	49-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	42	100	1	0	1	63-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(45)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	
		PC	100	4	23	0	0	0	27	0	27	79	100	0	0	0	50-1
			100	3	22	0	0	0	25	1	26	79	100	0	0	0	02-1
			200	7(3.5)	45(22.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	52(26.0)	1(0.5)	53(26.5)	(79)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	

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, 0.075µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol
[Continuous treatment:24hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article ($\mu\text{g/mL}$)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	
24-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	46-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	108	100	0	0	0	89-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		1.25	100	0	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0	55-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	90	100	0	0	0	11-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(87)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		2.50	100	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0	52-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0	98-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(91)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		5.00	100	0	0	0	0	0	0	0	0	72	100	0	0	0	70-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	90	100	0	0	0	69-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(78)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		10.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	36	100	0	0	0	95-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	54	100	0	0	0	44-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(43)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		20.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	9	100	0	0	0	42-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	27	100	0	0	0	66-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(17)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		PC	100	3	24	0	0	0	27	0	27	108	100	0	0	0	78-1
			100	7	21	0	0	0	28	0	28	108	100	0	0	0	22-1
			200	10(5.0)	45(22.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	55(27.5)	0(0.0)	55(27.5)	(104)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	

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 $\mu\text{g/mL}$)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with thiophenol
[Continuous treatment:48hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)								Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.			
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g		TAG(%)	Judge-ment	Cells observed	Polyploid cells		other	Total (%)	Judge-ment
48-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	93-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	96	100	0	0	0	-	38-1	
			200	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)	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		1.25	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	89	100	0	0	0	-	16-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	89	100	0	0	0	-	74-1	
			200	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)	(91)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		2.50	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	89	100	0	0	0	-	43-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	86	100	0	0	0	-	12-1	
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(89)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
		5.00	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	63	100	0	0	0	-	94-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	73	100	0	0	0	-	85-1	
			200	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)	(69)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		10.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	39	100	0	0	0	-	32-1
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	46	100	0	0	0	-	75-1	
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(43)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)			
		20.0	48	0	0	0	0	0	0	0	0	UR	3	48	0	0	0	UR	80-1
			46	0	0	0	0	0	0	0	0		46	0	0	0	80-2		
			31	1	0	0	0	0	1	0	1		6	31	1	0	1		53-1
			27	0	1	0	0	0	1	0	1		27	2	0	2	53-2		
			152	1(0.7)	1(0.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.3)	0(0.0)	2(1.3)		(5)	152	3(2.0)	0(0.0)	3(2.0)		
		PC	100	12	40	0	0	0	49	0	49	+	103	100	0	0	0	-	58-1
			100	10	39	0	0	0	45	0	45		109	100	0	0	0	-	04-1
			200	22(11.0)	79(39.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	94(47.0)	0(0.0)	94(47.0)		(108)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

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, 0.050µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.