



BOZO RESEARCH
CENTER INC.

最 終 報 告 書

シクロヘキセンの哺乳類の培養細胞を用いた染色体異常試験

M-1057

株式会社 ポリサーチセンター

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
要 約	5
緒 言	6
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び対照物質	7
1-1. 被験物質及び媒体	7
1-2. 被験液の調製	8
1-3. 対照物質	8
2. 使用細胞株	10
3. 試 葉	11
4. 試験方法	13
4-1. 識別方法	13
4-2. 細胞増殖抑制試験	13
4-3. 染色体異常試験	14
4-4. 追加確認試験	15
4-5. 標本の観察	15
5. 判定基準	16
6. 統計解析	17
試験結果	18
考 察	22

	頁
参考文献	23

Figures and Tables

Short-term Treatment with Metabolic Activation

Figure 1	Results of Short-term Treatment with Metabolic Activation	30
Table 1-1	Cell Growth Inhibition Ratio <+6-18>	31
Table 1-2	Results of Chromosomal Aberration Study <+6-18>	32

Short-term Treatment without Metabolic Activation

Figure 2	Results of Short-term Treatment without Metabolic Activation ..	33
Table 2-1	Cell Growth Inhibition Ratio <-6-18>	34
Table 2-2	Results of Chromosomal Aberration Study <-6-18>	35

24-hour Continuous Treatment

Figure 3	Results of 24-hour Continuous Treatment	36
Table 3-1	Cell Growth Inhibition Ratio <-24-0>	37
Table 3-2	Results of Chromosomal Aberration Study <-24-0>	38

48-hour Continuous Treatment

Figure 4	Results of 48-hour Continuous Treatment	39
Table 4-1	Cell Growth Inhibition Ratio <-48-0>	40
Table 4-2	Results of Chromosomal Aberration Study <-48-0>	41

要 約

チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU 細胞）を用いて、シクロヘキセンの染色体異常誘発能の有無を検討した。

第一に細胞増殖抑制試験として、シクロヘキセンの試験細胞に対する増殖抑制の有無を確認し、この結果を基に 50%細胞増殖抑制濃度の概略値を求め、染色体異常試験のための被験液の濃度範囲を設定した。第二に染色体異常試験として、短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化についてシクロヘキセンを 6 時間処理し、次いでシクロヘキセンを含む培養液を除去した後に新たな培養液中で 18 時間培養を行い染色体標本作製し顕微鏡下で観察した。また連続処理法では、シクロヘキセンを 24 時間及び 48 時間連続処理した後に染色体標本作製し顕微鏡下で観察した。結果の判定は、石館らの方法に従った。なお、判定に際しては統計学的処理を行わなかった。

＜細胞増殖抑制試験＞ シクロヘキセンの 39.1、78.1、156、313、625、1250、2500 及び 5000 μ g/mL における細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法及び連続処理法における 50%細胞増殖抑制濃度はいずれも 250～300 μ g/mL 程度であることが示された。この結果から染色体異常試験におけるシクロヘキセンの濃度は短時間処理法及び連続処理法ともに 400 μ g/mL を最高用量として公差 50 μ g/mL で希釈した計 7 濃度(100、150、200、250、300、350 及び 400 μ g/mL)を設定し実施した。

＜染色体異常試験＞ 短時間処理法及び連続処理法のいずれの処理方法によっても、シクロヘキセンを処理した全用量群において染色体の構造異常を有する細胞及び倍数性細胞の出現頻度の増加は認められず、また用量依存的な増加も認められなかった。

なお、短時間処理法及び連続処理法のいずれの処理方法においても、染色体の観察を行った 2 枚の培養器(シャーレ)間に異常細胞の出現頻度の著しい相違は認められず、培養条件等の試験環境においても異常は認められなかった。また、陽性対照物質を処理した群においては、顕著な染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加が認められた。これらの結果より試験は適切に実施されたことを確認した。

以上の結果から、シクロヘキセンは本試験条件下において染色体異常誘発能を有さないものと判定した。

緒 言

厚生省生活衛生局の依頼により、シクロヘキセンの哺乳類の培養細胞（CHL/TU 細胞）を用いた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及びガイドラインに準拠して実施した。

- ・「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」
（昭和59年3月31日；環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号連名基準）
一部改正（昭和63年11月18日；環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）
- ・「『新規化学物質等に係る試験の方法について』の一部改正等について」
（平成9年10月31日；環保安第287号環境庁企画調整局長、衛生第127号厚生省生活衛生局長、平成09・10・31基局第2号通商産業省基礎産業局長連名通知）
- ・“OECD Principles of Good Laboratory Practice” (as revised in 1997)
- ・“OECD Guidelines for Testing of Chemicals Section 4”(1997)

試験材料及び方法

1. 被験物質及び対照物質

1-1. 被験物質及び媒体

1-1-1. 被験物質

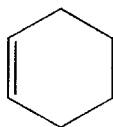
供給者 : 厚生省生活衛生局企画課 生活化学安全対策室

製造者 :

名称 : シクロヘキセン

CAS番号 : 110-83-8

構造式 :



ロット番号 :

純度 : 98.63%

ベンゼン : 0.799%、シクロヘキサノール : 0.526%、水分 : 0.003%

BHT(2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) : 0.01%(酸化防止剤)

性状 : 液体

比重 : 0.811 (20℃)

分子量 : 82.14

安定性 : 常温、常圧で安定

保存方法 : 冷暗所、密閉

保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所被験物質保存室及び
変異原性試験室

返却 : 被験物質の残量はすべて試験委託者に返却した。

1-1-2. 媒体

名称 : エタノール

ロット番号 : V7R1553

製造元 : ナカライテスク

保存方法 : 室温

保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

1-2. 被験液の調製

調製方法 : 無菌的操作によりシクロヘキセンを採取し、細胞増殖抑制試験は500mg/mL(培養液に添加した際の最終濃度: 5000 μ g/mL)を最高用量としてエタノールにより以下公比2で7段階希釈した計8濃度(①3.91、②7.81、③15.6、④31.3、⑤62.5、⑥125、⑦250及び⑧500mg/mL)を設定した。

染色体異常試験は、短時間処理法及び連続処理法いずれも40.0mg/mL(培養液に添加した際の最終濃度: 400 μ g/mL)を最高用量としてエタノールにより以下公差5mg/mLで6段階希釈した計7濃度(①10.0、②15.0、③20.0、④25.0、⑤30.0、⑥35.0及び⑦40.0mg/mL)を設定した。

なお、シクロヘキセンの秤取量は比重により換算し、濃度の記載について純度換算は行わなかった。

保存方法 : 被験液は用時調製とし、保存しなかった。

安定性 : シクロヘキセンにエタノールを添加した際、発泡、発熱、吸熱、着色は観察されず、媒体中の急速な分解は示唆されなかった。

1-3. 対照物質

1) 溶媒対照(陰性対照)

名称 : エタノール
 ロット番号 : V7R1553
 製造元 : ナカライテスク
 保存方法 : 室温
 保存場所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

2) 陽性対照

(1) 短時間処理法

代謝活性化法における既知陽性対照物質のシクロフォスファミドと非代謝活性化法における既知陽性対照物質のマイトマイシンCを用いた。

名 称 : シクロフォスファミド (CP)
ロット番号 : LEE7264
製 造 元 : 和光純薬工業株式会社
純 度 : 和光特級 (97.0%以上)
保 存 方 法 : 冷蔵、遮光
保 存 場 所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

名 称 : マイトマイシン C (MMC)
ロット番号 : 215AHD
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 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

(2) 連続処理法

非代謝活性化法における既知陽性対照物質のマイトマイシン C を用いた。

名 称 : マイトマイシン C (MMC)
ロット番号 : 215AHD
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 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

(3) 調製方法

生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、Lot No.K8C74) により用時溶解し目的濃度に調製した。

(4) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験のガイドラインに準じて選択した。当該陽性対照物質は既知の染色体異常誘発物質であり、水溶性で調製が比較的容易である。

2. 使用細胞株

1) 供試哺乳類培養細胞

チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞 (CHL/TU 細胞)

2) 入手先及び入手年月日

入手先 ヒューマンサイエンス研究資源バンク

入手日 1997 年 10 月 22 日

3) 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常発現率が低く、種々の化学物質に対して感受性が高いことから選択した。

4) 染色体構成

入手時の染色体数のモードは 85%が 25 本(n=20)であり、使用細胞の非処理群における染色体数のモードは 87%が 25 本(n=800)であった。

5) 増殖様式

プレート上で単層状に増殖、入手時の情報における細胞倍加時間は 17.6 時間であり、使用細胞における測定値は 18.6 時間であった。

細胞は継代 12 回目(細胞増殖抑制試験)、14 回目(染色体異常試験 短時間処理法)、20 回目(染色体異常試験 連続処理法)に播種した。

6) 培養液

10%仔牛血清 (56℃、30 分、非働化) 含有 Eagle's MEM 培養液

7) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂濃度 5%、温度 37℃の高湿度条件下で培養し、3~4 日目に継代した。

8) 細胞の保存

超低温槽 (約-80℃) 又は液体窒素タンク (-196℃理論値) 中で保存した。

保存に関してはジメチルスルホキシド 10% (DMSO ; JIS 規格試薬特級 99%以上) を培養液に加えた。

3. 試 薬

1) S9

名 称 : S9 (Cofactor C set)
ロット番号 : 99111808
製 造 元 : オリエンタル酵母工業株式会社
製 造 日 : 1999 年 11 月 18 日
購 入 日 : 2000 年 3 月 3 日
種・系統 : ラット・SD 系
性 : 雄
週 齢 : 7 週齢
体 重 : 203.4 ± 8.6 g
誘 導 物 質 : フェノバルビタール (PB) & 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+60mg/kg body weight
BF 1 日間 80mg/kg body weight

保 存 方 法 : 冷凍保存 (約 -80°C)

保 存 場 所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

2) Cofactor

名 称 : Cofactor (Cofactor C set)
ロット番号 : C99111006
製 造 元 : オリエンタル酵母工業株式会社
保 存 方 法 : 冷凍保存 (約 -80°C)
保 存 場 所 : 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

3) S9 mix の組成

S9	2 mL		
Cofactor	4.7 mL	20mM HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mM 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330mM 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mM グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40mM 酸化型ニコチンアミド-アデニン ジヌクレオチドリル酸(NADP)水溶液	0.67 mL
		精製水	0.67 mL

4) 細胞培養液

10%仔牛血清 (56℃、30 分、非働化) 含有 Eagle's MEM 培養液

仔牛血清

名 称	: Calf serum
ロット番号	: 1026097
製 造 元	: Life Technologies inc.
保 存 方 法	: 冷凍保存
保 存 場 所	: 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

MEM

名 称	: Minimum Essential Medium(MEM), powder
ロット番号	: 1055692
製 造 元	: Life Technologies inc.
保 存 方 法	: 冷蔵保存
保 存 場 所	: 株式会社ボゾリサーチセンター御殿場研究所変異原性試験室

4. 試験方法¹⁻⁷⁾

4-1. 識別方法

1) 試験方法の識別

試験は以下の順に識別し実施した。

- | | | |
|--------------|-----------------|--------|
| (1) 細胞増殖抑制試験 | | 試験識別：1 |
| (2) 染色体異常試験 | 短時間処理法 代謝活性化 | 試験識別：2 |
| | 非代謝活性化 | 試験識別：3 |
| (3) 染色体異常試験 | 連続処理法 24 時間連続処理 | 試験識別：4 |
| | 48 時間連続処理 | 試験識別：5 |

2) 濃度の識別

(1) 細胞増殖抑制試験

溶媒対照群を「SC」(Solvent Control)、非処理群を「NT」(Non Treatment)とし、被験物質処理群の濃度の低い方から「1」「2」「3」「4」「5」「6」…と番号をつけた。ただし、短時間処理法の代謝活性化した場合は「+」、代謝活性化しない場合は「-」、連続処理法の 24 時間処理の場合は「24-」、48 時間処理の場合は「48-」をそれぞれ番号の前につけた。

(2) 染色体異常試験

被験物質を処理するシャーレは、細胞増殖抑制試験と同様に番号をつけた。ただし、溶媒対照群を「SC」(Solvent Control)、非処理群を「NT」(Non Treatment)、陽性対照群を「PC」(Positive Control)とした。染色体標本(スライド標本)は、試験番号と染色体観察コード表に従い「01」「02」「03」～「99」までの 2 桁の番号及びスライド枝番号を付けた。

4-2. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の処理濃度を設定するための予備試験（細胞増殖抑制試験）として実施した（試験識別：1）。

1) 短時間処理法

直径 60mm プラスチックシャーレ 1 枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0mL）を播種し 3 日間培養した後、新たな培養液 5.0mL に交換した。被験液の処理は 5000 μ g/mL

を最高濃度とし、以下公比 2 で希釈した計 8 段階の濃度を設定した。濃度あたり 2 枚のシャーレを準備し、代謝活性化による場合は、シャーレの培養液 0.883 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05mL 及び S9 mix 希釈液 0.833mL を加えた。また代謝活性化によらない場合は、シャーレの培養液 0.05mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05mL を加えた。よく混和した後 6 時間培養した。6 時間後シャーレの培養液を除き、生理食塩液で細胞を洗浄し、新しい培養液 5.0mL を加えさらに 18 時間培養を続けた。18 時間後にシャーレの培養液を除き生理食塩液で細胞表面を洗浄し、10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。細胞の染色の濃淡から単層培養細胞密度計（モノセレータ、販売：KS オリンパス光学工業株式会社、製造：東洋測器株式会社）を用いて細胞密度を測定した。この際、溶媒対照細胞の値を 100% とした。この結果を図示し被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

2) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し 3 日間培養した後、新たな培養液 5.0mL に交換した。被験液の濃度及びシャーレ数は短時間処理法と同条件とした。シャーレの培養液 0.05mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05mL を加え、24 時間及び 48 時間培養を続けた。短時間処理法と同様に固定、染色し被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

4-3. 染色体異常試験

1) 短時間処理法

直径 60mm のプラスチックシャーレ 1 枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0mL）を播種し 3 日間培養した後、新たな培養液 5.0mL に交換した。細胞増殖抑制試験で得られた 50%細胞増殖抑制濃度を基に最高濃度を $400 \mu\text{g/mL}$ に設定し、以下公差 $50 \mu\text{g/mL}$ で媒体により希釈した計 7 濃度の被験液濃度を設定した。濃度あたり 4 枚のシャーレを用意し、シャーレの培養液 0.883mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05mL 及び S9 mix 希釈液 0.833mL を加えた。これを 6 時間培養した（試験識別：2）。非処理群及び陰性対照として溶媒対照群、陽性対照としてシクロフォスファミド (CP : 0.015mg/mL) 処理群、マイトマイシン C (MMC : $0.05 \mu\text{g/mL}$) 処理群を設けた。また、すべての処理群について S9 mix を加えない群、すなわちシャーレの培養液 0.05mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05mL 加え、これを 6 時間培養する群を設けた（試験

識別：3)。いずれも6時間の培養後、シャーレ内の培養液を除き生理食塩液で細胞を洗浄した後、新しい培養液 5mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた。標本は 2 枚のシャーレによりそれぞれ 2 枚の染色体観察用標本を作製した。その際、細胞分裂を分裂中期で停止させるため標本作製約 2 時間前にコルセミド (0.2 μ g/mL) を加えた。0.25%トリプシン溶液で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム水溶液で低張処理し、メチルアルコール・酢酸液(3:1)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 箇所水滴下し、染色体観察用スライド標本を作製した。標本は原則として 2 枚のシャーレからそれぞれ 2 枚のスライドを作製し、細胞毒性等によって観察対象細胞が不足すると考えられる場合は追加した。この後、空気乾燥しギムザ液で染色した。また、残る 2 枚のシャーレにより細胞増殖抑制試験に準じ標本を作製し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

短時間処理法と同じ条件で細胞を培養した。細胞増殖抑制試験で得られた 50%細胞増殖抑制濃度を基に最高濃度を 400 μ g/mL に設定し、以下公差 50 μ g/mL で媒体により希釈した計 7 濃度の被験液濃度を設定した。濃度当たり 4 枚のシャーレを用意し、シャーレの培養液 0.05mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05mL を加えた。これを 24 時間及び 48 時間培養した。非処理群、陰性対照として溶媒対照群及び陽性対照としてマイトマイシン C (MMC: 0.05 μ g/mL) 処理群を設けた。処理後 24 時間 (試験識別：4) 及び 48 時間 (試験識別：5) に標本を作製した。標本の作製は短時間処理法と同条件とした。また、短時間処理法同様、細胞増殖抑制についても測定した。

4-4. 追加確認試験

染色体異常試験の結果、追加確認試験 (試験識別：6～) を実施する必要が認められなかったため実施しなかった。

4-5. 標本の観察

顕微鏡下で各用量当たり 200 個 (シャーレ当たり 100 個) のよく広がっ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。同時に倍数体の数も記録した (3 倍体を含めた染色体数 37 本以上を倍数体として記録する)。なお、客観的な観察を行うため染色体標本はすべて盲検法により観察した。

染色体異常の種類は以下のように分類した。ただし、ギャップとは染色体また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と定義した。断片が染色分体の同軸上よりはずれているもの、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場合は切断と定義した。

構造異常

ギャップ	染色分体型(ctg)、染色体型(csg)を含む(g)
染色分体型切断	(ctb)
染色分体型交換	(cte)、四放射状交換など
染色体型切断	(csb)
染色体型交換	(cse)、二動原体染色体、環状染色体など
その他	断片化(frg)、他

数的異常

倍数体	polyploid、endoreduplication
-----	-----------------------------

5. 判定基準

2個の培養器(シャーレ)間で異常細胞の出現頻度に著しいばらつきがないこと、陰性対照群で異常細胞の出現頻度が5%未満であること、陽性対照でギャップ以外の異常細胞の出現頻度が10%以上であること及び培養条件等試験環境に異常が認められないことを本試験の成立条件とした。

石館らの判定基準^{1,4,6)}に従い、各実験群の異常細胞の出現率に対して以下のような判定基準を設けた。

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 (+)

染色体構造異常を有する細胞の出現率はギャップを含む場合(TAG)と含まない場合

(TA)について集計し、ギャップを含まない場合について判定した。異常細胞の出現に用量依存性又は再現性が認められた場合を染色体異常誘発能陽性と判定した^{2,4,6)}。

6. 統計解析

統計解析は実施しなかった。

試験結果

細胞増殖抑制試験

1) 短時間処理法

短時間処理法 代謝活性化の結果を Figure 1 及び Table 1-1、非代謝活性化の結果を Figure 2 及び Table 2-1 に示した。

(1) 培養終了時の観察結果

細胞培養終了時の倒立位相差顕微鏡による観察において、代謝活性化の有無に関わらず、被験物質の 313 μ g/mL 以上の処理群においてシャーレ底面に接着し増殖した細胞の不連続性が認められ、625 μ g/mL 以上においては顕著であった。また、5000 μ g/mL における細胞の生存はほぼ認められず、2500 μ g/mL 以上においてはシャーレ底面に結晶の析出が認められた。これらの結果より、被験物質による用量依存的な細胞毒性の発現が示された。なお、被験物質を処理した全用量群において培養液の色調に変化は認められなかった。

(2) 50%細胞増殖抑制濃度

50%細胞増殖抑制濃度の前後となる細胞増殖抑制を示す 2 濃度における直線から求めた短時間処理法における 50%細胞増殖抑制濃度は、代謝活性化は約 282 μ g/mL、非代謝活性化は約 258 μ g/mL であった。

2) 連続処理法

連続処理法 24 時間処理の結果を Figure 3 及び Table 3-1、48 時間処理の結果を Figure 4 及び Table 4-1 に示した。

(1) 培養終了時の観察結果

細胞培養終了時の倒立位相差顕微鏡による観察において、24 及び 48 時間処理のいずれにおいても、被験物質の 313 μ g/mL 以上の処理群においてシャーレ底面に接着し増殖した細胞の不連続性が認められ、625 μ g/mL 以上においては顕著であった。また、5000 μ g/mL における細胞の生存はほぼ認められず、2500 μ g/mL 以上においてはシャーレ底面に結晶の析出が認められた。これらの結果より、被験物質による用量依存的

な細胞毒性の発現が示された。なお、被験物質を処理した全用量群において培養液の色調に変化は認められなかった。

(2) 50%細胞増殖抑制濃度

50%細胞増殖抑制濃度の前後となる細胞増殖抑制を示す2濃度における直線から求めた連続処理法における50%細胞増殖抑制濃度は、24時間処理は約285 μ g/mL、48時間処理は約279 μ g/mLであることが示された。

2. 染色体異常試験

1) 短時間処理法

短時間処理法 代謝活性化の結果を Figure 1 及び Table 1-2、非代謝活性化の結果を Figure 2 及び Table 2-2 に示した。

(1) 被験物質処理濃度設定理由

細胞増殖抑制試験において代謝活性化及び非代謝活性化のいずれの処理方法においても、被験物質による50%細胞増殖抑制濃度は250~300 μ g/mL程度であることが推察されたため、観察可能な染色体標本の作製は困難であることが予測されるが細胞毒性の発現濃度域における染色体構造異常誘発能の検討が可能であり、明らかに50%以上の細胞増殖抑制の発現が期待できる濃度として400 μ g/mLを最高用量に設定し、細胞毒性の発現程度に若干の変動が認められる場合であっても観察可能な染色体標本の作製が可能であり、用量反応性の確認が期待できる濃度として100、150及び200 μ g/mLの3濃度を含み、公差50 μ g/mLにより希釈した計7濃度(100、150、200、250、300、350及び400 μ g/mL)を設定した。

(2) 染色体構造異常の出現

代謝活性化及び非代謝活性化のいずれの処理方法においても、被験物質を処理した全用量群において、5%を越える染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加は認められず、これらの用量依存的な増加も認められなかった。

(3) 倍数性細胞の出現

代謝活性化及び非代謝活性化のいずれの処理方法においても、被験物質を処理した全

用量群において、5%を越える倍数性細胞の出現頻度の増加は認められず、これらの用量依存的な増加も認められなかった。

2) 連続処理法

連続処理法 24 時間処理の結果を Figure 3 及び Table 3-2、48 時間処理の結果を Figure 4 及び Table 4-2 に示した。

(1) 被験物質濃度設定理由

細胞増殖抑制試験において 24 時間処理及び 48 時間処理のいずれの処理方法においても、被験物質による 50%細胞増殖抑制濃度は 250～300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度であることが推察されたため、短時間処理法と同様の理由により、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量として公差 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ により希釈した計 7 濃度 (100、150、200、250、300、350 及び 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を設定した。

(2) 染色体構造異常の出現

24 時間処理及び 48 時間処理のいずれの処理方法においても、被験物質を処理した全用量群において、5%を越える染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加は認められず、これらの用量依存的な増加も認められなかった。

(3) 倍数性細胞の出現

24 時間処理及び 48 時間処理のいずれの処理方法においても、被験物質を処理した全用量群において、5%を越える倍数性細胞の出現頻度の増加は認められず、これらの用量依存的な増加も認められなかった。

3) 試験系の成立条件

染色体の観察を行った 2 枚の培養器 (シャーレ) 間に異常細胞の出現頻度の著しい増加は認められず、培養条件等の試験環境においても異常は認められなかった (Table 1-1～4-1 及び 1-2～4-2)。

陰性対照群において染色体構造異常の出現頻度は 5%未満であり、陽性対照群において顕著な染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加が認められた (Table 1-2～4-2 及び Figure 1～4)。

染色体観察用のスライド標本と同時に作製したシャーレ標本による細胞増殖抑制率の被験物質の濃度に対する推移は、細胞増殖抑制試験の結果と同様であった (Table 1-1～4-1 及び Figure 1～4)。

以上の結果より、本染色体異常試験の短時間処理法及び連続処理法は適切に実施されたものと判断した。

考 察

チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU 細胞）を用いて、シクロヘキセンの染色体異常誘発能の有無を検討した。

細胞増殖抑制試験の結果、いずれの処理方法においても 50%細胞増殖抑制濃度は 250～300 μ g/mL 程度であることが示された。これらの結果から、染色体異常試験はいずれの処理方法においても 400 μ g/mL を最高用量として公差 50 μ g/mL で 6 段階希釈した計 7 濃度（100、150、200、250、300、350 及び 400 μ g/mL）を設定した。

染色体異常試験の結果、いずれの処理方法においても、シクロヘキセンを処理した全用量群において染色体の構造異常を有する細胞及び倍数性細胞の 5%を越える出現頻度の増加は認められず、また用量依存的な増加も認められなかった。

またこのとき、染色体の観察を行った 2 枚の培養器(シャーレ)間に異常細胞の出現頻度の著しい相違は認められず、培養条件等の試験環境においても異常は認められなかった。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方法においても 5%未満であり、陽性対照物質を処理した群においては顕著な染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度の増加が認められた。これらの結果より、試験は適切に実施されたことを確認した。

以上の結果から、シクロヘキセンは本試験条件下において染色体異常誘発能を有さないものと判定した。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S.: Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354(1977)
- 2) Matsuoka, A., et al.: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, 66, 277-290(1979)
- 3) 石館 基 : 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(1982)
- 4) 石館基監修 : 染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー (1987)
- 5) M. Ishidate, Jr., Edited by G. Obe and A. T. Natarajan: Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271(1989)
- 6) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集: 厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q&A、サイエンティスト社、1992
- 7) Toshio Sofuni: *IN VITRO DETECTION OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS*, *In Vitro Methods of Toxicology*, CRC Press, 203-216(1992)

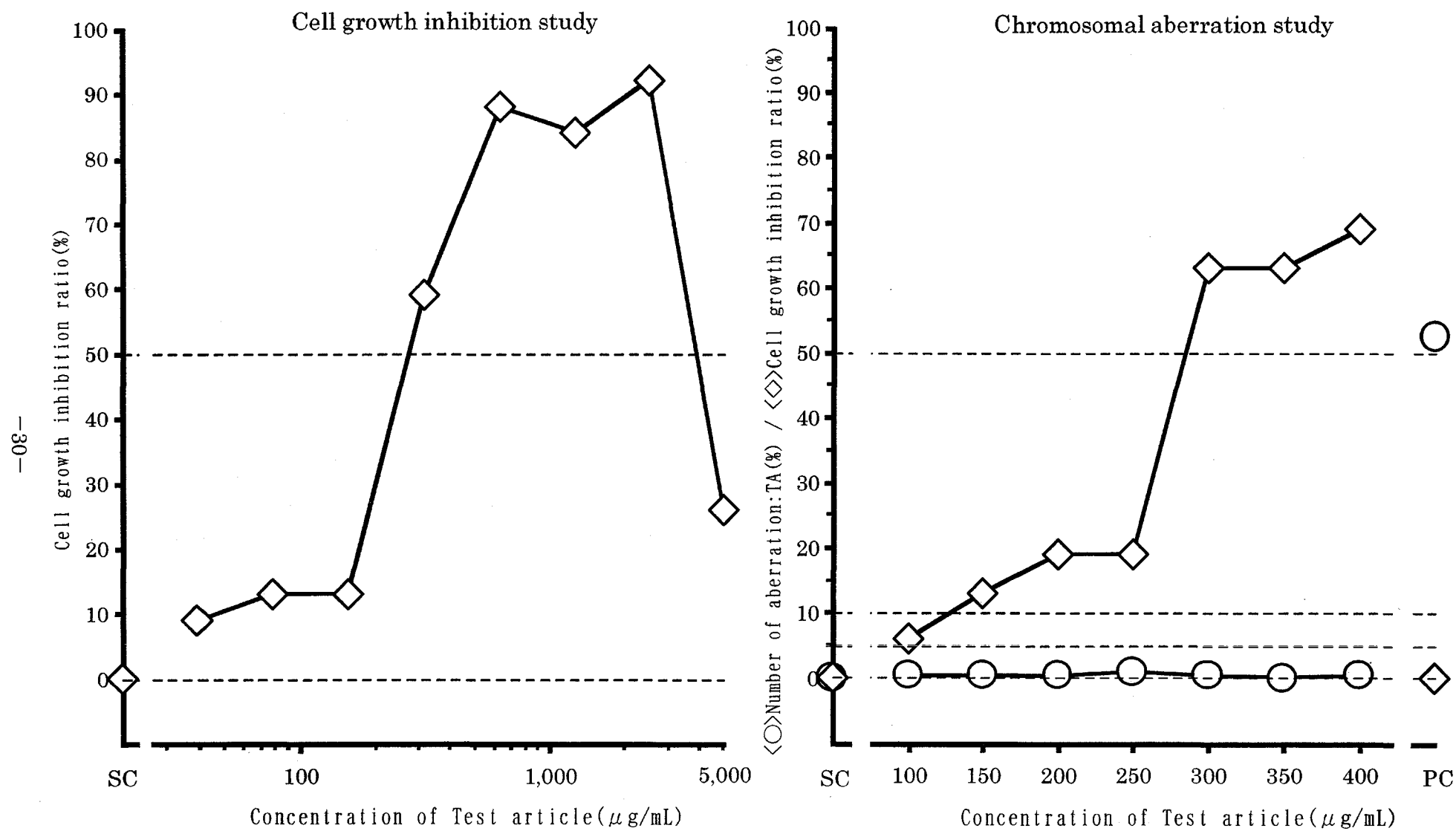


Figure 1 Results of Short-term Treatment with Metabolic Activation

Table 1-1 Cell Growth Inhibition Ratio <+ 6-18>

Study type		Cell growth inhibition study							Chromosomal aberration study						
S9 mix	Time (h)	Treatment and Concentration $\mu\text{g/mL}$	(Results are shown in the left panel of Figure 1)					Inhibition ratio (%)	Treatment and Concentration $\mu\text{g/mL}$	(Results are shown in the right panel of Figure 1)					Inhibition ratio (%)
			Measured value Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates /Crystals ^{d)}			Measured value Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates /Crystals ^{d)}	
+ 6-18	Test article	NT	91	91	—	Red	—	—	NT	100	94	—	Red	—	—
		0 (SC)	91	100	—	Red	—	—	0 (SC)	87	100	—	Red	—	—
			100 ^{a)}		—	Red	—	—		100 ^{a)}		—	Red	—	—
		39.1	91	91	—	Red	—	9	Test article	100	94	—	Red	—	6
			91		—	Red	—	9				—	Red	—	
		78.1	91	87	—	Red	—	13		150	87	—	Red	—	13
			83		—	Red	—	13				—	Red	—	
		156	83	87	—	Red	—	13		200	81	—	Red	—	19
			91		—	Red	—	13				—	Red	—	
		313	49	41	+	Red	—	59		250	81	—	Red	—	19
			33		+	Red	—	59				—	Red	—	
		625	16	12	++	Red	—	88		300	37	+	Red	—	63
			8		++	Red	—	88				+	Red	—	
		1250	16	16	+++	Red	—	84		350	37	+	Red	—	63
			16		+++	Red	—	84				+	Red	—	
		2500	8	8	+++	Red	+	92		400	31	+	Red	—	69
			8		+++	Red	+	92				+	Red	—	
		5000	74	74	TOX	Red	+	26		PC	100	100	—	Red	0
			74		TOX	Red	+	26					—	Red	

(Concentration of 50% cell growth inhibition ratio: about 282 $\mu\text{g/mL}$)Time(h): Treatment hours - Hours of incubation without test article. NT: Non Treatment SC: Solvent Control, (Ethanol) PC: Positive Control (Cyclophosphamide, 15 $\mu\text{g/mL}$)

Measured value a): One petri dish in the solvent control group was regarded as a control (100%).

Observation b): Results of observation of plate at the end of incubation of cell culture.

—: 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 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.

Inhibition ratio (%), When mean of measured value exceeded 100%, inhibition ratio was regarded as 0%.

c): Red was red~orange red colored.

d): Presence or absence of deposition of precipitates/crystals.

—: There was no deposition of precipitates/crystals.

+: Deposition of crystals was observed.

Table 1-2 Results of Chromosomal Aberration Study <+ 6-18>

(Results are shown in the right panel of Figure 1)

Study Number : M-1057

S9 mix	Time(h)	Conc (μ g/mL)	Cells observed	Polyploidy cells (%)	Judge	Number of aberration (%)							Judge	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other	TA		
+	6-18	NT	200	0.0		0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0		
			(100)	(0)		(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)		95-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		22-1
		SC	200	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		57-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		24-1
		100	200	0.0		0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5		
			(100)	(0)	-	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		07-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		85-1
		150	200	0.0		0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5		
			(100)	(0)	-	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		80-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		68-1
		200	200	0.0		0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5		
			(100)	(0)	-	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		58-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		16-1
		250	200	0.0		0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0		
			(100)	(0)	-	(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		84-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		73-1
		300	200	1.0		0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5		
			(100)	(1)	-	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		97-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		29-1
		350	200	0.0		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
			(100)	(0)	-	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		77-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		90-1
		400	200	0.0		0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5		
			(100)	(0)	-	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		11-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		03-1
		PC	200	0.0		0.5	37.5	51.5	0.5	0.0	0.0	52.5		
			(100)	(0)	-	(0)	(40)	(51)	(1)	(0)	(0)	(52)		65-1
			(100)	(0)		(1)	(35)	(52)	(0)	(0)	(0)	(53)		43-1

Time(h): Treatment hours - Hours of incubation without test article

(): number of observed.

NT: Non Treatment

SC: Solvent Control (Ethanol)

PC: Positive Control (Cyclophosphamide, 15 μ g/mL)

g : chromosomal or chromatid gap

ctb: chromatid breaks

cte: chromatid exchange

T A : number of cells with aberrations excluding gaps

csb: chromosomal breaks

cse: chromosomal exchange

TAG : total number of cells aberrations including gaps

TOX: Cell toxicity, which might have adversely affected chromosome analysis, was observed.

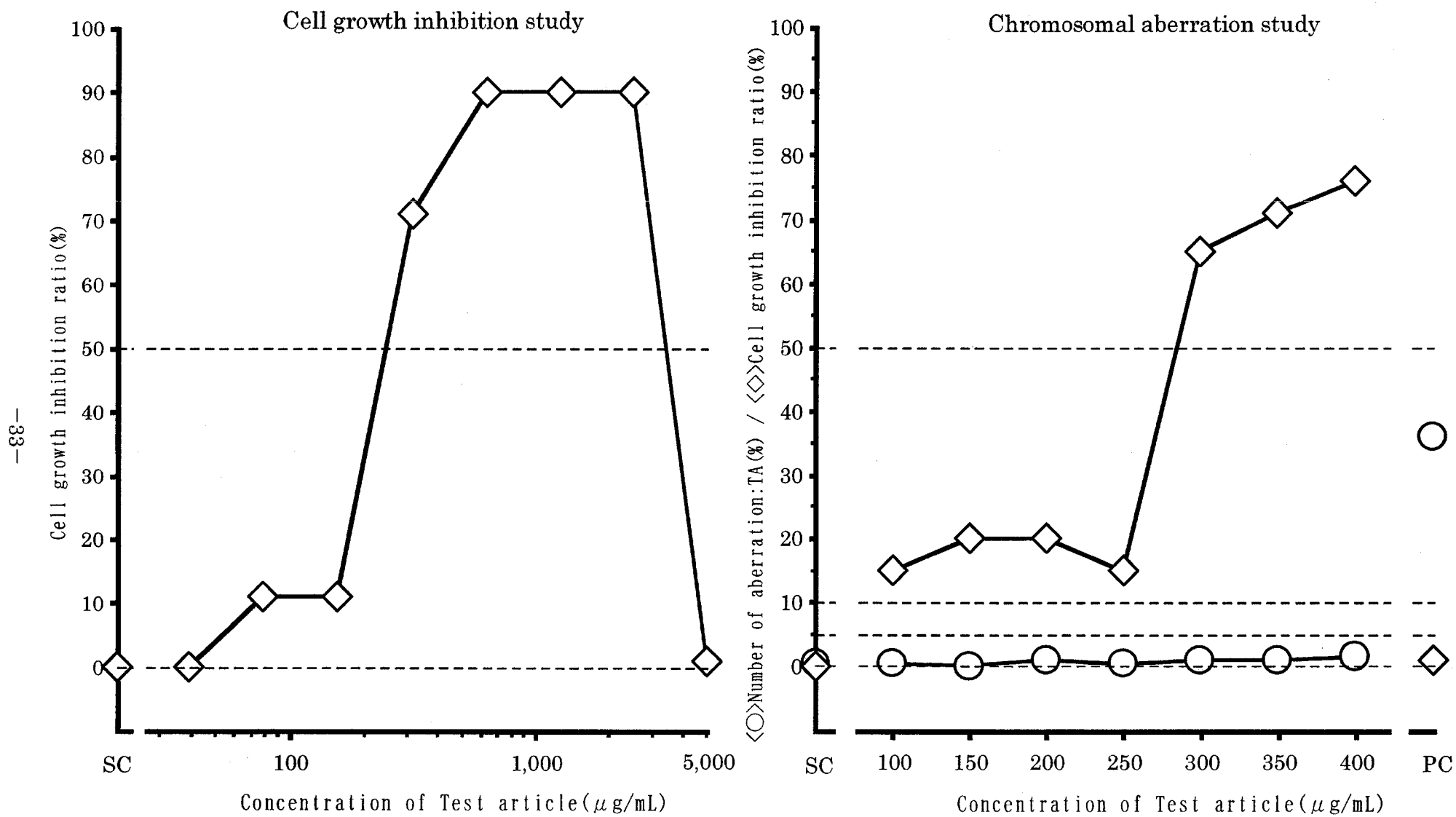


Figure 2 Results of Short-term Treatment without Metabolic Activation

Table 2-1 Cell Growth Inhibition Ratio <-- 6-18>

Study type		Cell growth inhibition study							Chromosomal aberration study								
		Treatment and Concentration μg/mL	(Results are shown in the left panel of Figure 2)					Treatment and Concentration μg/mL	(Results are shown in the right panel of Figure 2)								
S9 mix	Time (h)		Measured value		Observation				Measured value		Observation						
			Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates /Crystals ^{d)}	Inhibition ratio (%)				Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates /Crystals ^{d)}	Inhibition ratio (%)
6-18	Test article	NT	99	99	—	Red	—	—	NT	99	99	—	Red	—	—	—	—
		0 (SC)	100 ^{a)}	100	—	Red	—	—	0 (SC)	100 ^{a)}	100	—	Red	—	—	—	—
			99	100	—	Red	—	—		99	100	—	Red	—	—	—	
		39.1	99	104	—	Red	—	0	39.1	99	104	—	Red	—	0		
			109	104	—	Red	—	109		104	—	Red	—	109	104		
		78.1	89	89	—	Red	—	11	78.1	89	89	—	Red	—	11		
			89	89	—	Red	—	89		89	—	Red	—	89	89		
		156	89	89	—	Red	—	11	156	89	89	—	Red	—	11		
			89	89	—	Red	—	89		89	—	Red	—	89	89		
		313	29	29	+	Red	—	71	313	29	29	+	Red	—	71		
			29	29	+	Red	—	29		29	+	Red	—	29	29		
		625	10	10	++	Red	—	90	625	10	10	++	Red	—	90		
			10	10	++	Red	—	10		10	++	Red	—	10	10		
		1250	10	10	+++	Red	—	90	1250	10	10	+++	Red	—	90		
			10	10	+++	Red	—	10		10	+++	Red	—	10	10		
2500	10	10	+++	Red	+	90	2500	10	10	+++	Red	+	90				
	10	10	+++	Red	+	10		10	+++	Red	+	10	10				
5000	99	99	TOX	Red	+	1	5000	99	99	TOX	Red	+	1				
	99	99	TOX	Red	+	99		99	TOX	Red	+	99	99				
		PC	99	99	—	Red	—	1	PC	99	99	—	Red	—	—	1	
			99	99	—	Red	—		99	99	—	Red	—	—			

Concentration of 50% cell growth inhibition ratio: about 258 μg/mL

(Concentration of 50% cell growth inhibition ratio: about 258 $\mu\text{g/mL}$)Time(h): Treatment hours - Hours of incubation without test article. NT: Non Treatment SC: Solvent Control, (Ethanol) PC: Positive Control (Mitomycin C, 0.05 $\mu\text{g/mL}$)

Measured value a): One petri dish in the solvent control group was regarded as a control (100%).

Observation b): Results of observation of plate at the end of incubation of cell culture.

—: 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 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.

Inhibition ratio (%), When mean of measured value exceeded 100%, inhibition ratio was regarded as 0%.

c): Red was red~orange red colored.

d): Presence or absence of deposition of precipitates/crystals.

—: There was no deposition of precipitates/crystals.

+: Deposition of crystals was observed.

Table 2-2 Results of Chromosomal Aberration Study <-6-18>

(Results are shown in the right panel of Figure 2)

Study Number : M-1057

S9 mix	Time(h)	Conc (μ g/mL)	Cells observed	Polyploidy cells (%)	Judge	Number of aberration (%)							Judge	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other	TA	TAG	
-	6-18	NT	200	0.0		0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	79-1 94-1
			(100)	(0)		(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		SC	200	0.0		0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	42-1 48-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		100	200	0.0	-	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	96-1 49-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		150	200	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	83-1 40-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		200	200	0.5	-	0.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	1.0	1.0	53-1 75-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
			(100)	(1)		(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(2)	(2)	
		250	200	0.5	-	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	50-1 47-1
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
		300	200	0.0	-	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	51-1 02-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)	
		350	200	0.0	-	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	06-1 86-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
		400	200	0.0	-	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.5	1.5	26-1 98-1
			(100)	(0)		(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)	
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	
		PC	200	0.0	-	0.5	23.0	32.5	0.0	0.0	0.0	36.0	36.0	19-1 08-1
			(100)	(0)		(1)	(22)	(31)	(0)	(0)	(0)	(34)	(34)	
			(100)	(0)		(0)	(24)	(34)	(0)	(0)	(0)	(38)	(38)	

Time(h): Treatment hours - Hours of incubation without test article (): number of observed.

SC: Solvent Control (Ethanol)

PC: Positive Control (Mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

ctb: chromatid breaks

cte: chromatid exchange

csb: chromosomal breaks

cse: chromosomal exchange

TOX: Cell toxicity, which might have adversely affected chromosome analysis, was observed.

NT: Non Treatment

g : chromosomal or chromatid gap

T A : number of cells with aberrations excluding gaps

TAG : total number of cells aberrations including gaps

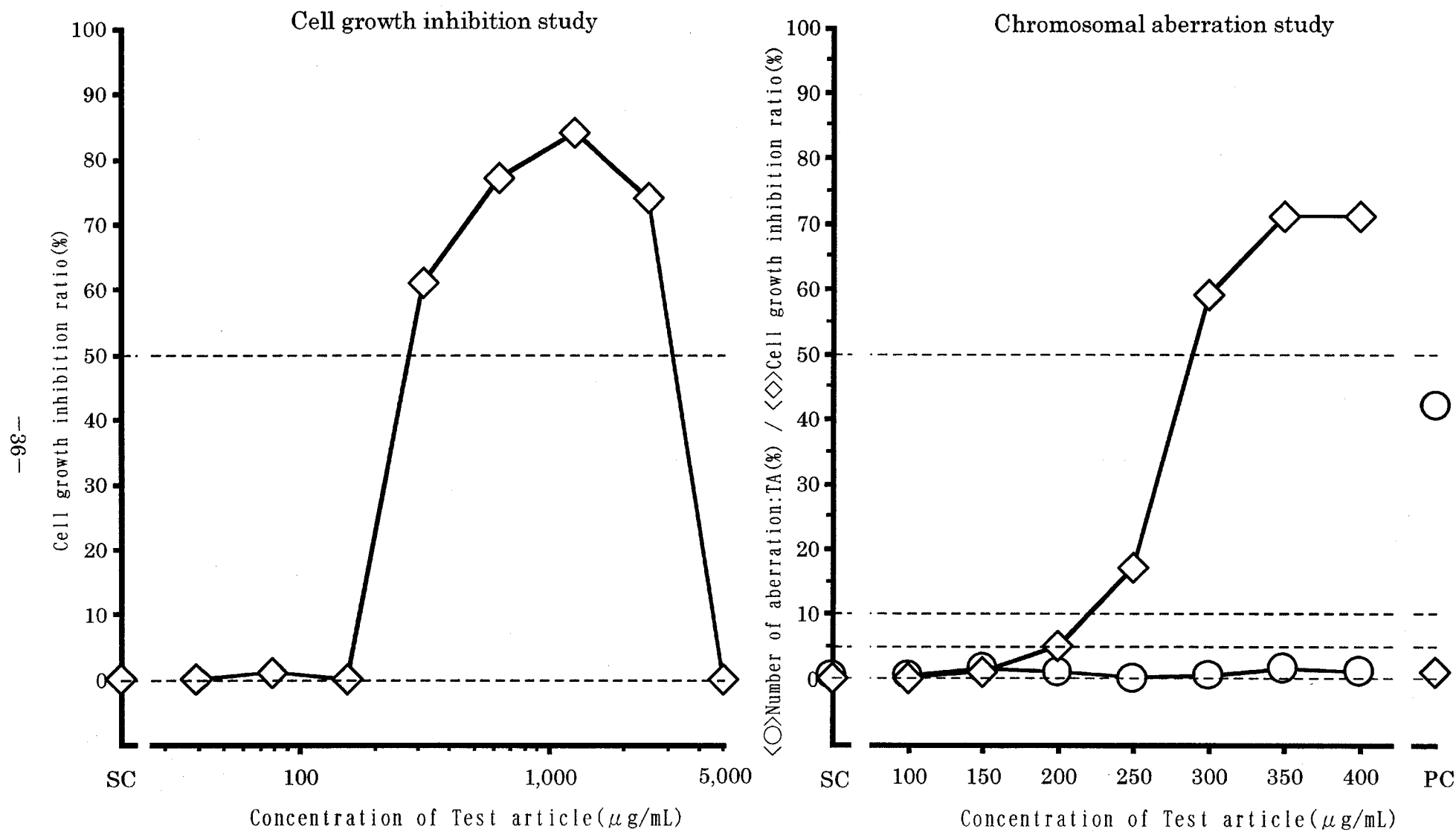


Figure 3 Results of 24-hour Continuous Treatment

Table 3-1 Cell Growth Inhibition Ratio <- 24-0>

Study type		Cell growth inhibition study							Chromosomal aberration study							
S9 mix	Time (h)	Treatment and Concentration $\mu\text{g/mL}$	(Results are shown in the left panel of Figure 3)					Treatment and Concentration $\mu\text{g/mL}$	(Results are shown in the right panel of Figure 3)							
			Measured value		Observation				Measured value		Observation					
			Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates /Crystals ^{d)}	Inhibition ratio (%)			Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates /Crystals ^{d)}	Inhibition ratio (%)
24-0	Test article	NT	99	99	—	Red	—	—	NT	91	95	—	Red	—	—	—
		0 (SC)	100 ^{a)}	100	—	Red	—	—	0 (SC)	100 ^{a)}	96	—	Red	—	—	
			99	99	—	Red	—	91		96	—	Red	—			
		39.1	106	103	—	Red	—	0	100	108	104	—	Red	—	0	
			99	99	—	Red	—	99		99	—	Red	—			
		78.1	99	99	—	Red	—	1	150	99	99	—	Red	—	1	
			99	99	—	Red	—	99		99	—	Red	—			
		156	106	103	—	Red	—	0	200	99	95	—	Red	—	5	
			99	99	—	Red	—	91		95	—	Red	—			
		313	39	39	+	Red	—	61	250	83	83	—	Red	—	17	
			99	99	+	Red	—	41	41	+	Red	—	59			
		625	33	23	++	Red	—	77	300	41	41	+	Red	—	59	
			13	16	+++	Red	—	24		29	+	Red	—	71		
		1250	19	16	+++	Red	—	84	350	24	29	++	Red	—	71	
			13	26	+++	Red	+	74		400	24	29	++	Red	—	71
		2500	26	26	+++	Red	+	74	5000		33	29	++	Red	—	71
			26	106	103	TOX	Red	+		0	PC	99	99	—	Red	—
		5000	99	99	TOX	Red	+	0		99		99	—	Red	—	1

Concentration of 50% cell growth inhibition ratio: about 285 $\mu\text{g/mL}$.

Time(h): Treatment hours - Hours of incubation without test article. NT: Non Treatment SC: Solvent Control, (Ethanol) PC: Positive Control (Mitomycin C, 0.05 $\mu\text{g/mL}$)

Measured value a): One petri dish in the solvent control group was regarded as a control (100%).

Observation b): Results of observation of plate at the end of incubation of cell culture.

—: 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 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.

Inhibition ratio (%), When mean of measured value exceeded 100%, inhibition ratio was regarded as 0%.

c): Red was red~orange red colored.

d): Presence or absence of deposition of precipitates/crystals.

—: There was no deposition of precipitates/crystals.

+: Deposition of crystals was observed.

Table 3-2 Results of Chromosomal Aberration Study <- 24-0>

(Results are shown in the right panel of Figure 3)

Study Number : M-1057

S9 mix	Time(h)	Conc (μ g/mL)	Cells observed	Polyploidy cells (%)	Judge	Number of aberration (%)							Judge	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other	TA		
-	24-0	NT	200	0.0		0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		14-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		27-1
		SC	200	0.0		0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		81-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		05-1
		100	200	0.0	-	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	-	89-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		31-1
		150	200	1.0	-	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.5		
			(100)	(1)		(0)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	-	76-1
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		38-1
		200	200	0.0	-	0.0	1.0	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0		
			(100)	(0)		(0)	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(2)	-	37-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		04-1
		250	200	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	45-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		01-1
		300	200	0.0	-	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	-	93-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		66-1
		350	200	0.0	-	0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0	1.5		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	-	09-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)		64-1
		400	95	0.0	TOX	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	1.1		
			(40)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	TOX	35-1
			(24)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)		35-2
			(15)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		20-1
			(16)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		20-2
		PC	200	0.0	-	0.0	28.5	40.0	0.5	0.0	0.0	42.0		
			(100)	(0)		(0)	(31)	(44)	(1)	(0)	(0)	(45)	+	61-1
			(100)	(0)		(0)	(26)	(36)	(0)	(0)	(0)	(39)		69-1

Time(h): Treatment hours - Hours of incubation without test article (): number of observed.

SC: Solvent Control (Ethanol)

PC: Positive Control (Mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

ctb: chromatid breaks

cte: chromatid exchange

csb: chromosomal breaks

cse: chromosomal exchange

TOX: Cell toxicity, which might have adversely affected chromosome analysis, was observed.

NT: Non Treatment

g : chromosomal or chromatid gap

TA : number of cells with aberrations excluding gaps

TAG : total number of cells aberrations including gaps

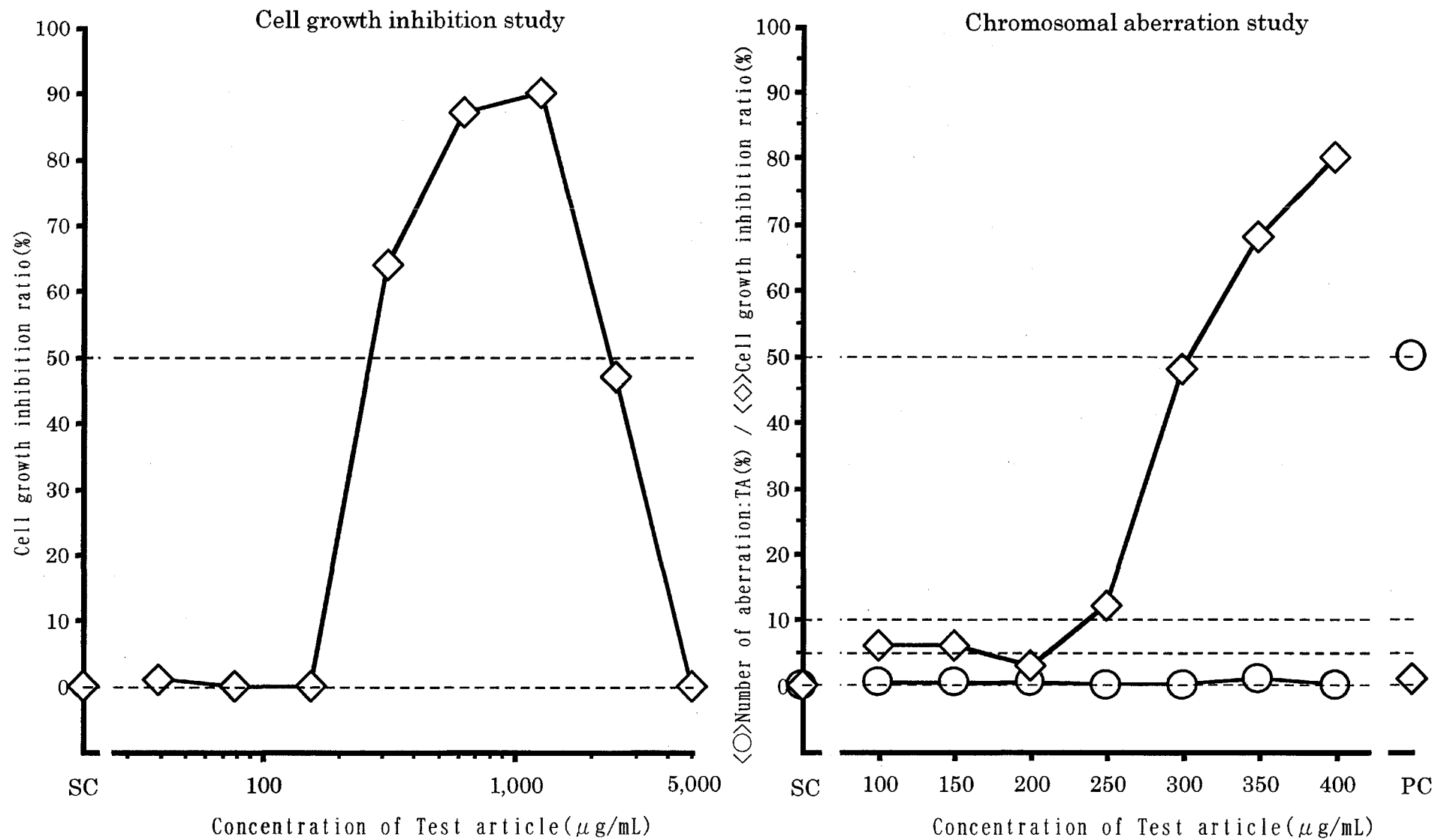


Figure 4 Results of 48-hour Continuous Treatment

Table 4-1 Cell Growth Inhibition Ratio <- 48-0>

Study type		Cell growth inhibition study						Chromosomal aberration study											
S9 mix	Time (h)	Treatment and Concentration μ g/mL	(Results are shown in the left panel of Figure 4)					Treatment and Concentration μ g/mL	(Results are shown in the right panel of Figure 4)										
			Measured value		Observation				Measured value		Observation								
			Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates /Crystals ^{d)}	Inhibition ratio (%)				Plate 1 and 2	Mean	Condition of cells ^{b)}	Color of medium ^{c)}	Precipitates /Crystals ^{d)}	Inhibition ratio (%)		
48-0	Test article	NT	99	99	—	Red	—	—	NT	99	99	—	Red	—	—	—	—	—	
		0 (SC)	99	100	—	Red	—	—	99	103	—	Red	—	—	—	—	—		
			100 ^{a)}															105 ⁿ⁾	
		39.1	99	99	—	Red	—	1	99	94	94	—	Red	—	6	94	94		
			99															94	
		78.1	106	106	—	Red	—	0	106	94	94	—	Red	—	6	94	94		
			106															94	
		156	106	110	—	Red	—	0	106	94	94	—	Red	—	6	94	94		
			113															94	
		313	39	36	+	Red	—	64	39	94	94	—	Red	—	6	94	94		
			33															94	
		625	13	13	++	Red	—	87	29	32	+	Red	—	68	35	32	+	Red	—
			13																
		1250	6	10	+++	Red	—	90	17	20	++	Red	—	80	23	20	++	Red	—
			13																
		2500	53	53	+++	Red	+	47	23	20	++	Red	—	80	23	20	++	Red	—
			53																
		5000	126	123	TOX	Red	+	0	23	20	++	Red	—	80	23	20	++	Red	—
119	20																		
PC	99	99	—	Red	—	1	99	94	94	—	Red	—	6	94	94	—	6		
	99																	94	

Concentration of 50% cell growth inhibition ratio: about 279 μ g/mL

(Concentration of 50% cell growth inhibition ratio: about 279 $\mu\text{g/mL}$)Time(h): Treatment hours - Hours of incubation without test article. NT: Non Treatment SC: Solvent Control, (Ethanol) PC: Positive Control (Mitomycin C, 0.05 $\mu\text{g/mL}$)

Measured value a): One petri dish in the solvent control group was regarded as a control (100%).

Observation b): Results of observation of plate at the end of incubation of cell culture.

—: 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 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.

Inhibition ratio (%), When mean of measured value exceeded 100%, inhibition ratio was regarded as 0%.

c): Red was red~orange red colored.

d): Presence or absence of deposition of precipitates/crystals.

—: There was no deposition of precipitates/crystals.

+: Deposition of crystals was observed.

Table 4-2 Results of Chromosomal Aberration Study <- 48-0>

(Results are shown in the right panel of Figure 4)

Study Number : M-1057

S9 mix	Time(h)	Conc (μ g/mL)	Cells observed	Polyploidy cells (%)	Judge	Number of aberration (%)							Judge	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other	TA		
-	48-0	NT	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)		0.0 (0) (0)	1.0 (2) (0)	0.5 (1) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	1.0 (2) (0)		87-1 71-1
		SC	200 (100) (100)	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 (0) (0)		67-1 82-1
		100	200 (100) (100)	1.0 (1) (1)	-	0.0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	-	30-1 70-1
		150	200 (100) (100)	0.5 (1) (0)	-	0.0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	0.5 (1) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	-	62-1 32-1
		200	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0.0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	-	88-1 18-1
		250	200 (100) (100)	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 (0) (0)	-	15-1 34-1
		300	200 (100) (100)	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 (0) (0)	-	59-1 25-1
		350	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	1.0 (1) (1)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	1.0 (1) (1)	-	10-1 63-1
		400	111 (29) (38) (39) (5)	0.0 (0) (0) (0) (0)	TOX	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)	0.0 (0) (0) (0) (0)	0.0 (0) (0) (0) (0)	TOX	12-1 12-2 72-1 72-2
		PC	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	0.0 (0) (0)	33.0 (37) (29)	46.5 (50) (43)	0.5 (1) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	50.0 (53) (47)	+	39-1 74-1

Time(h): Treatment hours - Hours of incubation without test article (): number of observed.
 SC: Solvent Control (Ethanol) PC: Positive Control (Mitomycin C, 0.05 μ g/mL)
 ctb: chromatid breaks cte: chromatid exchange
 csb: chromosomal breaks cse: chromosomal exchange
 TOX: Cell toxicity, which might have adversely affected chromosome analysis, was observed.

NT: Non Treatment
 g : chromosomal or chromatid gap
 TA : number of cells with aberrations excluding gaps
 TAG : total number of cells aberrations including gaps