



BOZO RESEARCH
CENTER INC.



最 終 報 告 書

3, 3'-チオビス (プロパン酸) の
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1116

2003 年 6 月 4 日

株式会社 **ボゾリサーチセンター**

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	8
緒 言	9
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び媒体	10
1) 被験物質	10
2) 媒体	10
2. 被験液の調製	11
1) 調製方法	11
2) 保存方法	11
3) 安定性	11
3. 対照物質	11
1) 陰性対照 (媒体対照)	11
2) 陽性対照	12
4. 使用細胞株	12
1) 供試ほ乳類培養細胞	12
2) 入手先及び入手年月日	13
3) 細胞の選択理由	13
4) 染色体構成	13
5) 増殖様式	13
6) 培養液	13

	頁
7) 培養条件	13
8) 細胞の保存	13
5. S9mix 及び培養液	14
1) S9 mix	14
2) 培養液	15
6. 試験方法	15
1) 識別方法	16
2) 細胞増殖抑制試験	16
3) 染色体異常試験	17
4) 標本の観察	18
5) 染色体異常の分類	18
6) 判定基準	19
試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験	21
1) 短時間処理法	21
2) 連続処理法	21
2. 染色体異常試験	22
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	22
2) 染色体構造異常	22
3) 倍数性細胞	22
考察	23
参考文献	24

Figures and Tables

Fig. 1-1 Cell growth in the cell-growth inhibition test treated with

Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [short-term treatment: +S9 mix]	27
Fig. 1-2 Cell growth and number of aberrations in the chromosome aberration test treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [short-term treatment: +S9 mix]	27
Fig. 2-1 Cell growth in the cell-growth inhibition test treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [short-term treatment: -S9 mix]	28
Fig. 2-2 Cell growth and number of aberrations in the chromosome aberration test treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [short-term treatment: -S9 mix]	28
Fig. 3-1 Cell growth in the cell-growth inhibition test treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [continuous treatment: 24 hr]	29
Fig. 3-2 Cell growth and number of aberrations in the chromosome aberration test treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [continuous treatment: 24 hr]	29
Fig. 4-1 Cell growth in the cell-growth inhibition test treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [continuous treatment: 48 hr]	30
Fig. 4-2 Cell growth and number of aberrations in the chromosome aberration test treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [continuous treatment: 48 hr]	30
Table 1-1 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [short-term treatment: +S9 mix]	31
Table 1-2 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [short-term treatment: -S9 mix]	32
Table 1-3 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [continuous treatment: 24 hr]	33
Table 1-4 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [continuous treatment: 48 hr]	34
Table 2-1 Chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [short-term treatment: +S9 mix]	35
Table 2-2 Chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with	

Propanoic acid. 3,3'-thiobis- [short-term treatment: S9 mix]	36
Table 2-3 Chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with	
Propanoic acid. 3,3'-thiobis- [continuous treatment: 24 hr]	37
Table 2-4 Chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with	
Propanoic acid. 3,3'-thiobis- [continuous treatment: 48 hr]	38

要 約

3, 3'-チオビス（プロパン酸）の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズハムスター培養細胞（CHL/IU）を用いて染色体異常試験を実施した。

最初に、細胞増殖抑制試験を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する約 1780 μ g/ml を最高試験濃度として行った。その結果、短時間処理法の、代謝活性化系及び非代謝活性化系及び連続処理法ともに最高試験濃度においても 50%細胞増殖抑制を示さなかった。したがって、染色体異常試験における最高試験濃度を両法ともに 1780 μ g/mL とし、以下 890、445、223 及び 111 μ g/mL の計 5 用量を設定し染色体異常誘発能を検討した。なお、溶媒には DMSO を用いた。

染色体異常試験の結果、短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化の両系ともに染色体の構造異常の出現率は全く増加せず、また倍数性細胞の増加も認められなかった。また、連続処理法においても、24 時間連続処理及び 48 時間連続処理の両系ともに染色体の構造異常の出現率は全く増加せず、また倍数性細胞の増加も認められなかった。一方、陽性対照群では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。

以上の結果から、3, 3'-チオビス（プロパン酸）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

厚生労働省医薬局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、3, 3'-チオビス（プロパン酸）の安全性試験の一環として、ほ乳類培養細胞（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。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び媒体

1) 被験物質

- 供給者 : 厚生労働省医薬局審査管理課 化学物質安全対策室
- 製造者 :
- 名称 : 3, 3'-チオビス (プロパン酸)
3, 3'-チオジプロピオン酸
Propanoic acid, 3,3'-thiobis-
- CAS番号 : 111-17-1
- 構造式 :
$$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \\ \diagup \\ \text{S} \\ \diagdown \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$$
- 示性式 : $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4\text{S}$
- ロット番号 :
- 純度 : 99.5%
- 性状 : 白色結晶粉末
- 分子量 : 178.21
- 融点 : 123~134°C
- 保存方法 : 冷暗所 (保存実測温度: 2~8°C)
- 安定性 : 実験終了後の被験物質を で分析した結果、品質に問題はなく、実験期間中は安定であった。(Attached Data 1)
- 有効期限 : 3箇年
- 取り扱い上の注意 : 吸湿により不安定になる。
- 保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び変異原性試験室 (被験物質一時保存庫・冷蔵)
- 返却 : 被験物質の残量はすべて試験委託者に返却した。
- 2) 媒体
- 名称 : ジメチルスルホキシド (以下 DMSO と略記する)

ロット番号 : KSR1871
規格 : 試薬特級
製造元 : 和光純薬工業株式会社
保存方法 : 室温
保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

媒体の選択理由: 被験物質は 50.0 mg/mL の濃度で注射用水には難溶で、178mg/ml の濃度で肉眼的には DMSO に溶解し、発泡、発熱、吸熱及び変色等の変化は認められなかった。従って DMSO を媒体として選択した。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 細胞増殖抑制試験

無菌的操作により 3, 3'-チオビス (プロパン酸) を秤取し、178 mg/mL (培地中の最終濃度: 1780 µg/mL) を最高用量として DMSO により溶解し、以下公比 2 で 6 段階希釈した計 7 濃度 (89.0、44.5、22.3、11.1、5.56、2.78 及び 1.39 mg/mL) を調製した。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果から、178 mg/mL を最高用量として DMSO により溶解し、以下公比 2 で 3 段階希釈した計 4 濃度 (89.0、44.5、22.3 及び 11.1 mg/mL) を調製した。

2) 保存方法

被験液は用時調製とし、保存は行わなかった。

3) 安定性

3, 3'-チオビス (プロパン酸) に DMSO を添加した際に、発泡、発熱、吸熱及び色調変化などは認められなかった。

3. 対照物質

1) 陰性対照 (媒体対照)

名称 : DMSO
ロット番号 : KSR1871
製造元 : 和光純薬工業株式会社
保存方法 : 室温

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

2) 陽性対照

陽性対照物質として、代謝活性化系ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化系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 : 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 (1~8℃)、遮光

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

名 称 : マイトマイシンC (以下 MMC と略記する)

ロット番号 : 319AJD

製 造 元 : 協和醗酵工業株式会社

力 価 : 2mg (力価) /瓶

保 存 方 法 : 室温、遮光

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

(2) 調製方法

CP は 0.75mg/mL(培地中の最終濃度: 15 µg/mL)、MMC は 0.0025mg (力価) /mL(培地中の最終濃度: 0.05 µg (力価) /mL)となるようにそれぞれ生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、Lot No. 9K93S) に溶解して調製した。なお、調製は用時とした。

(3) 陽性対照物質の選択理由

CP 及び MMC は水溶性で調製が比較的容易であり、毒性試験のガイドラインに推奨されている陽性対照物質であることから選択した。

4. 使用細胞株

1) 供試ほ乳類培養細胞

細胞は、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。なお、入手後液体窒素で凍結保存していた細胞を解凍、再培養して用いた。

2) 入手先及び入手年月日

細胞は、2001年12月26日にヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。入手後、継代数の少ない細胞をDMSO（ロット番号KSH7174、試薬特級99%以上、和光純薬工業株式会社）を10 vol%添加した培養液で大量に液体窒素中で保存した。試験にはこの保存細胞を解凍し継代培養したものを、細胞の性状検査を実施して性状などが適正であることを確認した後に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験で5継代目、染色体異常試験では短時間処理法で11継代目の、連続処理法で21継代目の細胞を用いた。また、入手時の情報でマイコプラズマ陰性であることを確認した。

3) 細胞の選択理由

染色体数が少なく比較的大型で染色体異常の観察に適すること、自然発生の染色体異常発現率が低いこと、更に種々の化学物質に対して感受性が高くバックグラウンドデータが豊富であることなどの理由から本細胞を選択した。

4) 染色体構成

試験に使用した細胞の染色体数のモードは25本（ $n=20$ 、90%の細胞が25本）であり、適切であった。

5) 増殖様式

試験に用いた細胞は、プレート上で単層状に増殖し、使用細胞の倍加時間は17.6時間であった。これらは入手時の特性（単層状に増殖、倍加時間18~20時間）と同様に適切な増殖様式であった。

6) 培養液

培養液はMinimum Essential Medium（GIBCO™、Cat. No. 11095-080、Invitrogen Co.）を用いた。これに非働化（56℃、30分）した仔牛血清を10 vol%添加して培養液を調製した。調製後の培養液は冷蔵保存した。

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日ごとに継代した。

8) 細胞の保存

培養液にDMSO（JIS規格試薬特級99%以上、和光純薬工業株式会社）を10%を加え、液体窒素タンク（-196℃理論値）中で保存した。

5. S9 mix 及び培養液

1) S9 mix

S9 及び補酵素 (S-9/コファクターC セット、Lot No. C020412011、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。調製は用時に行った。

(1) S9

名 称 : S-9
 ロット番号 : 02041201
 製造日 : 2002年4月12日
 種・系統 : ラット・SD系
 性 : 雄
 週 齢 : 7週齢
 体 重 : 217.4±8.5 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℃設定の冷凍庫)

使用期限 : 2002年10月11日

保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

(2) 補酵素

名 称 : コファクターC
 ロット番号 : C02040801
 製造日 : 2002年4月12日
 保存方法 : 冷凍保存 (約-80℃設定の冷凍庫)
 使用期限 : 2002年10月7日
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

(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

2) 培養液

培養液は Minimum Essential Medium (GIBCO™、Cat. No. 11095-080、Invitrogen Co.) を用いた。これに非働化 (56℃, 30 分) した仔牛血清を 10 vol% 添加して培養液を調製した。調製後の培養液は冷蔵保存した。

(1) 仔牛血清

名 称 : Calf serum
 ロット番号 : 297843
 製造元 : Life Technologies Inc.
 保存方法 : 冷凍 (-10℃以下設定の冷凍庫)
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

(2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号 : 1127862
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存方法 : 冷蔵 (1~8℃)
 保存場所 : 御殿場研究所 変異原性試験室

6. 試験方法¹⁻⁷⁾

試験は以下のステージ順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法・連続処理法	
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 時間連続処理 48 時間連続処理

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系を「+」、非代謝活性化系を「-」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（媒体）対照群を「NC」、被験物質処理群を濃度の低い方から「1」、「2」、「3」、…の番号を明記したラベルで識別した。

(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、陽性対照群（Positive Control）は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」～「99」までの2桁の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで識別した。

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として実施した。いずれの処理法においても最高濃度を1780 µg/mLとし、以下公比2で890、445、223、111、55.6、27.8及び13.9 µg/mLの計8濃度とし、これに陰性（媒体）対照群を設けた。また、短時間処理法では代謝活性化系を用いる群と用いない群を設けた。

(1) 短時間処理法

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2枚とし、シャーレ1枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液5.0 mL）を播種し3日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化系による場合は培養液0.883 mLを取り除き、S9 mix 0.833 mL及び各濃度の被験液0.05 mLを加えた。陰性（媒体）対照群については、培養液0.883 mLを除きS9 mix 0.833 mL及びDMSO 0.05 mLを加えた。代謝活性化系によらない場合は、培養液0.05 mLを取り除き、各濃度の被験液0.05 mLを加えた。更に6時間培養した後、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液5.0 mLを加えて更に18時間培養した。培養終了後、培養液を除き生理食塩液で細胞を洗浄して10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。単層培養細胞密度計（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞の染色の濃淡から細胞密度を測定し、陰性（媒体）対照を100%とした50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、6時間の被験物質処理終了時及び18時間の培養終了時に、肉眼で析出の有無及び培養液の色を、倒立位相差顕微鏡で細胞の状態を確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

(2) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し3日間培養した後、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、培養液 0.05 mL を除き、各濃度の被験液 0.05 mL を、陰性（媒体）対照群については DMSO 0.05mL を加え、24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。培養終了後、短時間処理法と同様に培養液の色、細胞の状態及び析出の有無を観察した後に、固定、染色し、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

3) 染色体異常試験

(1) 用量設定の根拠

細胞増殖抑制試験の短時間処理法では代謝活性化系の有無にかかわらず、最高濃度の 1780 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても 50%細胞増殖抑制は認められなかった。さらに、連続処理法においても 24 及び 48 時間連続処理の 1780 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 50%細胞増殖抑制は認められなかった。このことから、毒性試験法ガイドラインに従って染色体異常試験の各処理法における最高濃度は 10mM に相当する 1780 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、3 濃度以上の染色体観察が可能となることを考慮して、以下公比 2 で 890、445、223 及び 111 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の計 5 用量を設定した。また、これに陰性（媒体）対照群及び陽性対照群を設けた。

(2) 短時間処理法

直径 60mm のシャーレ 4 枚を使用し、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、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化系では培養液 0.883 mL を除き、陰性（媒体）対照群については S9 mix 0.833 mL 及び DMSO 0.05 mL を、被験物質処理群については S9 mix 0.833 mL 及び各濃度の被験液 0.05 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 及び CP 0.1 mL を加えて 6 時間培養した。非代謝活性化系では、培養液 0.05 mL を除き、陰性（媒体）対照群については DMSO 0.05 mL を、被験物質処理群については各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.1 mL を除き、MMC 0.1 mL を加えて培養した。6 時間の培養後、培養液を除き生理食塩液で細胞を洗浄し、新たな培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。なお、染色体観察用のスライドガラス標本作製に際しては、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 0.1 mL（最終濃度：0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液で単離した細胞を遠心分離し、0.075M 塩化カリウム溶液で低張処理し、メチルアルコール・酢酸液（3:1）で固定した。その細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所点滴し、空気乾燥後 2%ギムザ液で染色標本作製した。スライド標本は、1 枚の

シャーレから 2 枚作製した。各処理群で残る 2 枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じ固定・染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、細胞増殖抑制試験と同様、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

(3) 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、倒立位相差顕微鏡で細胞に異常のないことを確認してから、培養液 0.05 mL を除き、各濃度の被験液 0.05 mL を、陰性（媒体）対照群については DMSO 0.05 mL をそれぞれ加え、24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。また陽性対照群については培養液 0.1 mL を除き、MMC 0.1 mL を加え、24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。なお、染色体観察用のスライドガラス標本作製は短時間処理法と同様に行った。各処理群で残る 2 枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じ固定・染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、被験物質処理終了時に、細胞増殖抑制試験と同様、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

4) 標本の観察

各濃度当たり 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た）。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。

5) 染色体異常の分類

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

(1) 構造異常

染色体構造が、その細胞が本来持っている固有の構造（核型）と異なる場合を構造異常と定義した。

ギャップ(g) : ギャップとは染色分体又は染色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) : 染色分体型切断と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、断片が

染色分体の同軸上から外れているもの、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)：染色分体型交換とは染色分体の切断端が同一染色分体内又は異なる染色分体間で再結合し、本来とは異なる構造を示す染色体と定義した。

染色体型切断(csb)：染色体型切断とは染色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、断片が染色分体の同軸上から外れているもの、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と定義した。

染色体型交換(cse)：染色体型交換とは染色体の切断端が同一染色体内又は異なる染色分体間で再結合するか、又は染色分体型交換が染色体複製を行った結果生じる、本来とは異なる構造を示す染色体と定義した。二動原体染色体などが含まれる。

その他(other)：以上のいずれにも属さない構造異常などを「その他」として分類した。断片化などが含まれる。

(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：polyploid（核内倍加体：endoreduplicationを含む）

6) 判定基準

2枚の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（媒体）対照群で異常細胞の出現頻度が5%未満であること、陽性対照群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、被験物質処理群の3用量以上における染色体標本の評価が可能であること及び培養条件など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^{1,2,3)}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。

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

染色体構造異常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^{2,3,4)}。

なお、判定に際しては統計学的手法を用いなかった。

試験結果

1. 細胞増殖抑制試験

1) 短時間処理法

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

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、代謝活性化系の有無にかかわらず最高試験濃度の 1780 µg/mL でも約 20%の増殖抑制しか認められず、50%抑制濃度は求められなかった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化系の有無にかかわらず、890 µg/mL 以上の用量群で被験物質処理終了時から培養液の色調が橙色から黄色に変化したが、被験物質の析出は認められなかった。この色調の変化は培養液を交換して 18 時間培養した時点においては認められなかった。また、用量群の細胞の状態を陰性（媒体）対照群と比較すると、1780 µg/mL 群に細胞の不連続性が非代謝活性化系では微量に、代謝活性化系では多数認められたが剥離・死滅した細胞は認められなかった。

2) 連続処理法

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

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに最高試験濃度の 1780 µg/mL でも約 20%の増殖抑制しか認められず、50%抑制濃度は求められなかった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24 時間及び 48 時間処理とも、培養液の色調が 890 µg/mL 以上の用量群で被験物質処理終了時から淡橙色から黄色に変化したが、被験物質の析出は認められなかった。この色調の変化は被験物質処理終了時においても同様に認められた。また、用量群の細胞の状態を陰性（媒体）対照群と比較すると、24 時間及び 48 時間処理とも 1780 µg/mL 群に細胞の不連続性がわずかに認められたが剥離・死滅した細胞は認められなかった。

2. 染色体異常試験

短時間処理法の結果を Fig. 1-2、2-2、Table 1-1、1-2、2-1 及び 2-2 に、連続処理法の結果を Fig. 3-2、4-2、Table 1-3、1-4、2-3 及び 2-4 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態は、細胞増殖抑制試験の場合とほぼ同様であった。すなわち、短時間処理法では代謝活性化系の有無にかかわらず 890 µg/mL 以上の用量群で、被験物質処理終了時から培養液の色調が橙色から黄色に変化したが、被験物質の析出は認められなかった。この色調の変化は培養液を交換して 18 時間培養した時点においては認められなかった。また、1780 µg/mL 群では、細胞の不連続性が非代謝活性化系ではわずかに、代謝活性化系ではかなり多く認められたが剥離・死滅した細胞は認められなかった。

連続処理法では 24 時間及び 48 時間処理とも、培養液の色調が 890 µg/mL 以上の用量群で被験物質処理終了時から淡橙色から黄色に変化したが、被験物質の析出は認められなかった。この色調の変化は被験物質処理終了時においても同様に認められた。また、用量群の細胞の状態を陰性（媒体）対照群と比較すると、24 時間及び 48 時間処理とも 1780 µg/mL 群に細胞の不連続性がわずかに認められ、細胞増殖抑制が 50% を越えた (Fig.3-2、4-2) が剥離・死滅した細胞は認められなかった。

2) 染色体構造異常

染色体構造異常の出現頻度は、短時間処理法の代謝活性化系では 1780 µg/mL 群で 0.0%、890 µg/mL 群で 0.0%、445 µg/mL 群で 0.0%、223 µg/mL 群で 0.0%、及び 111 µg/mL 群で 0.0% と陰性の判定基準である 5% を越えることはなかった。また、非代謝活性化系においても、1780 µg/mL 群で 0.5%、890 µg/mL 群で 0.0%、445 µg/mL 群で 0.0%、223 µg/mL 群で 0.5%、及び 111 µg/mL 群で 0.0% で陰性であった。

連続処理法の 24 時間処理では 1780 µg/mL 群で 1.5%、890 µg/mL 群で 1.0%、445 µg/mL 群で 1.5%、223 µg/mL 群で 1.0%、及び 111 µg/mL 群で 1.0% と陰性の判定基準である 5% を越えることはなかった。また、48 時間処理では、1780 µg/mL 群で 3.0%、890 µg/mL 群で 2.0%、445 µg/mL 群で 1.0%、223 µg/mL 群で 0.5%、及び 111 µg/mL 群で 0.5% で陰性であった。なお、TAG については 48 時間処理の 1780 µg/mL 群のみで 6.0% とやや高い値を示した。

3) 倍数性細胞

いずれの用量群にも 5% を越える倍数性細胞の出現頻度の増加は認められなかった。

考 察

染色体異常試験において、短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化の両系ともに染色体の構造異常の出現率は全く増加せず、倍数性細胞の増加も認められなかった。また、連続処理法でも、24時間連続処理及び48時間連続処理の両系ともに染色体の構造異常の出現率は増加せず、倍数性細胞の増加も認められなかった。なお、48時間連続処理では1780 µg/mL群でTAは陰性の判定基準である5%未満であったが、TAGは6.0%とやや高い値を示した。本被験物質は化学構造的にはジカルボン酸であり酸性物質と考えられる。事実、高用量では被験物質処理終了時から培養液における橙色から黄色への色調の変化が観察された。森田⁶⁾は培養液pHの染色体異常の出現率に及ぼす影響を調査した結果、低pH下で長時間培養を行うと染色体異常の出現率が増加すると報告している。従って、本被験物質によるTAGのわずかな増加はpHの低下の影響によるものと推察される。

一方、陰性（媒体）対照群における染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、いずれの処理法においても5%未満であった。また、陽性対照物質のCPあるいはMMCを処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。さらに、2枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

なお、本被験物質と類似の化学構造を持つ脂肪族ジカルボン酸では、citric acid、fumaric acid、L-glutamic acid、DL-malic acid、oxalic acid、succinic acid、D-tartaric acidは細菌を用いる復帰突然変異試験及びほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性との報告^{6,7)}が、またα-ketoglutaric acid、L-aspartic acidは、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性との報告⁶⁾がある。

以上の結果から、3, 3'-チオピス（プロパン酸）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) 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)
- 3) 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
- 4) Matsuoka, A., *et al.*: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, 66, 277-290 (1979)
- 5) 森田 健：染色体異常試験における培養環境の研究（非生理的 pH 環境における染色体異常の誘発）, *Environ. Mutagen Res.*, 19, 27-36 (1997)
- 6) 祖父尼俊雄監修：染色体異常試験データ集, 改訂 1998 年版, 株式会社エル・アイ・シー (1998)
- 7) 石館基監修：微生物を用いる変異原性試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー (1991)

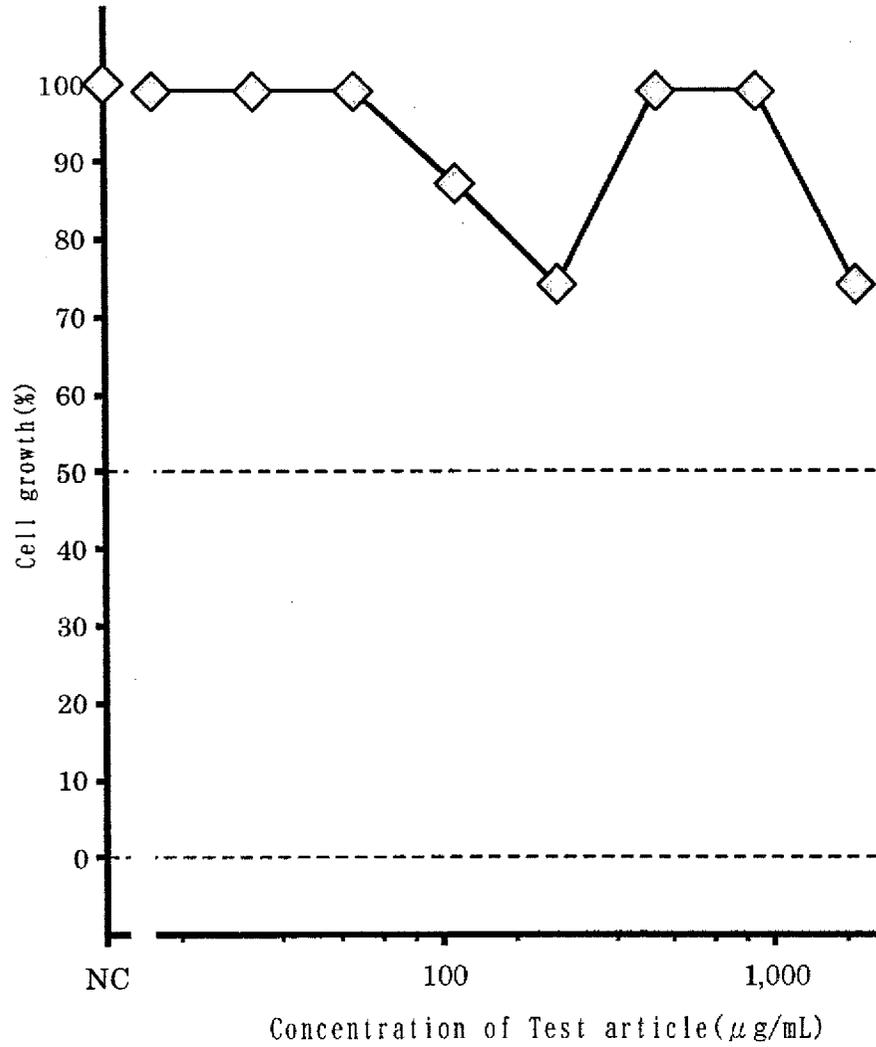


Fig. 1-1 Cell growth in the cell-growth inhibition test treated with Propanoic acid. 3,3'-thiobis- [short-term treatment: +S9 mix]

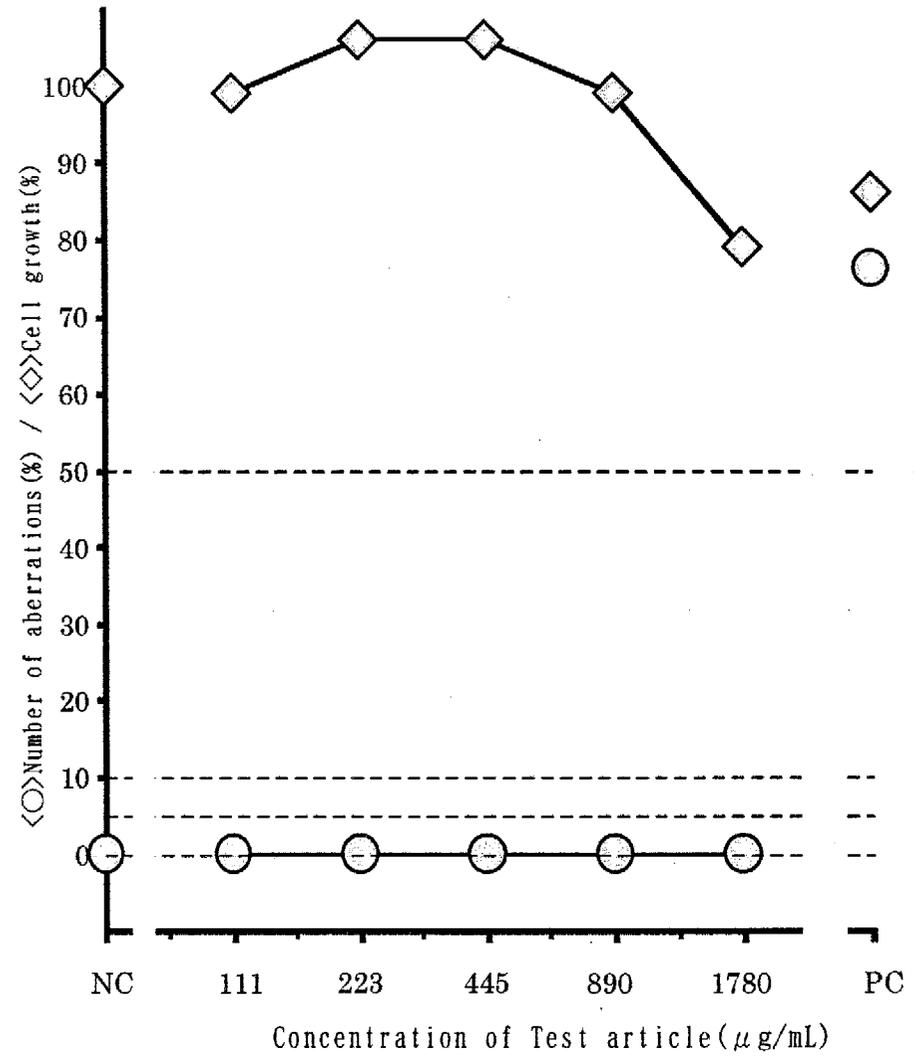


Fig. 1-2 Cell growth and number of aberrations in the chromosome aberration test treated with Propanoic acid. 3,3'-thiobis- [short-term treatment: +S9 mix]

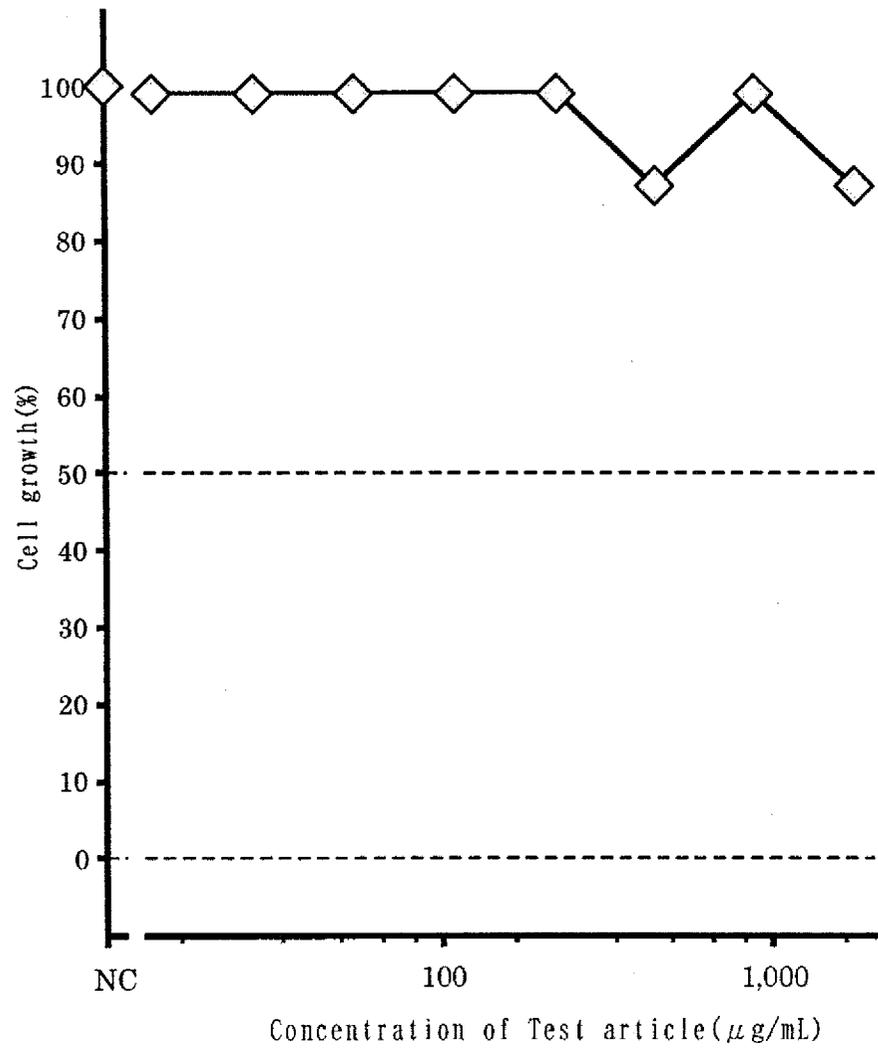


Fig. 2-1 Cell growth in the cell-growth inhibition test treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [short-term treatment: -S9 mix]

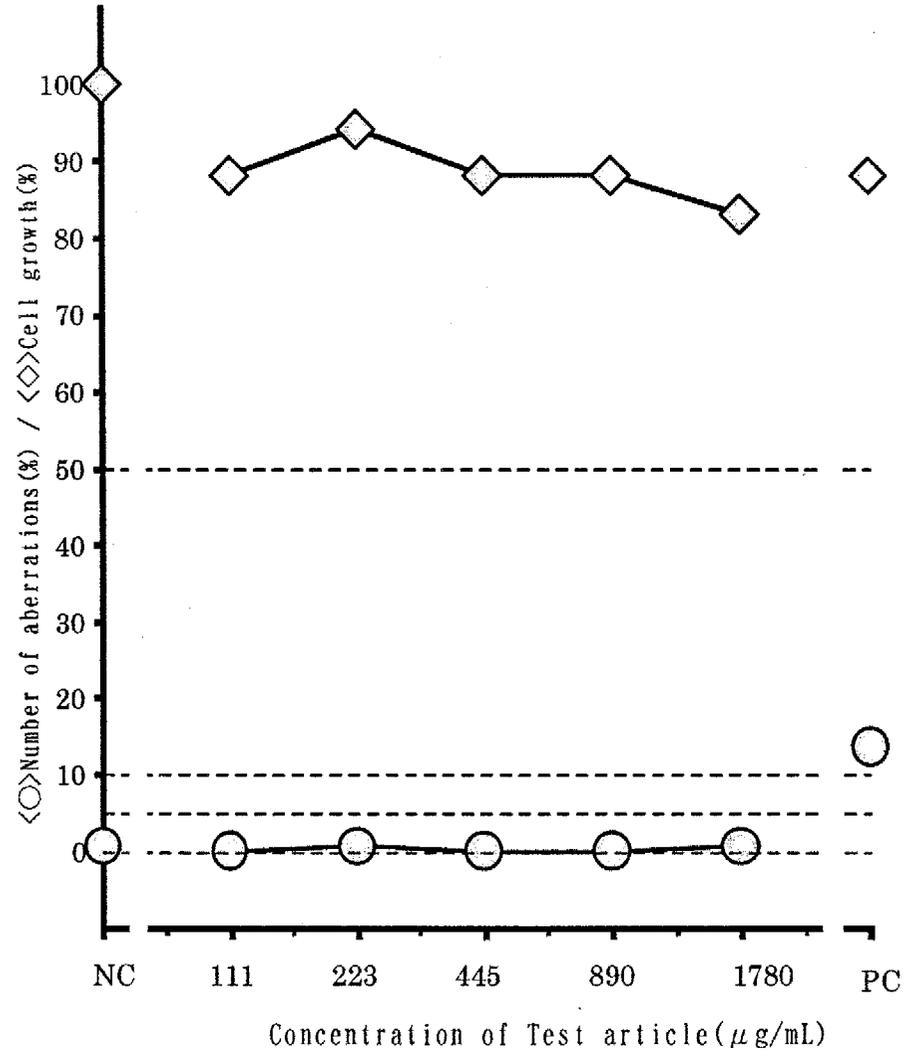


Fig. 2-2 Cell growth and number of aberrations in the chromosome aberration test treated with Propanoic acid, 3,3'-thiobis- [short-term treatment: -S9 mix]

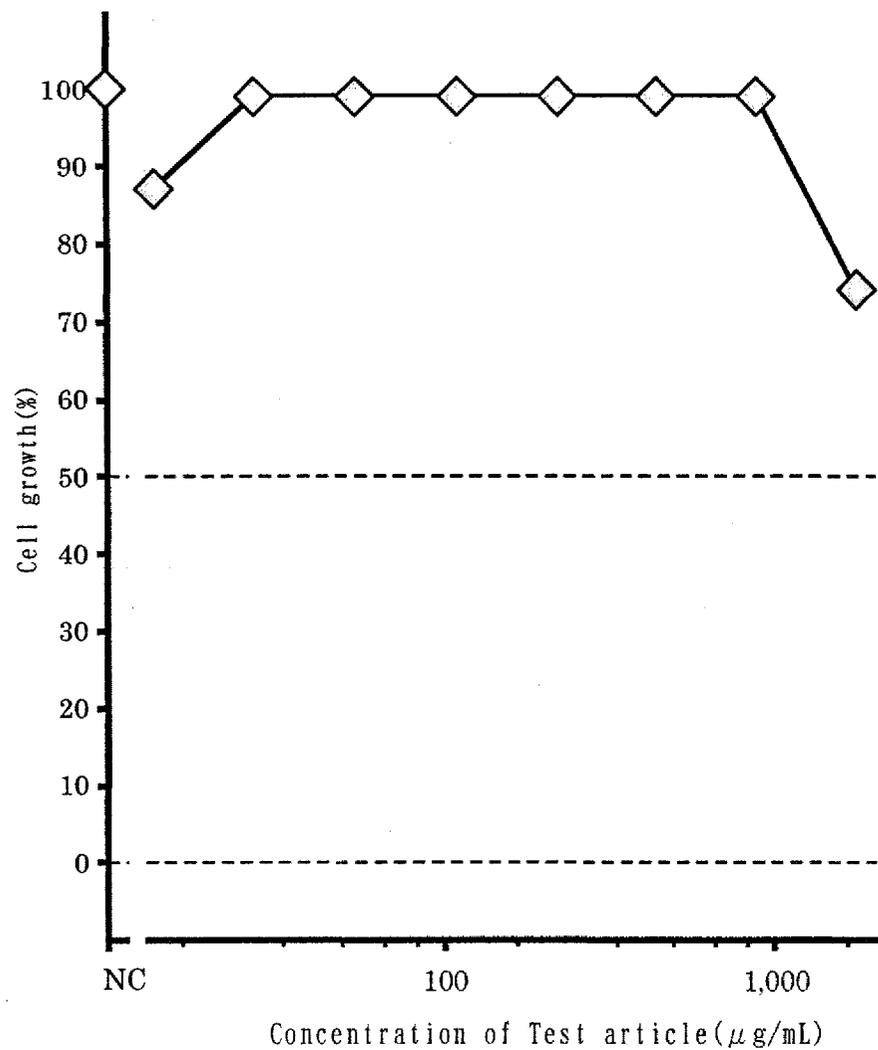


Fig. 3-1 Cell growth in the cell-growth inhibition test treated with Propanoic acid. 3,3'-thiobis- [continuous treatment: 24hr]

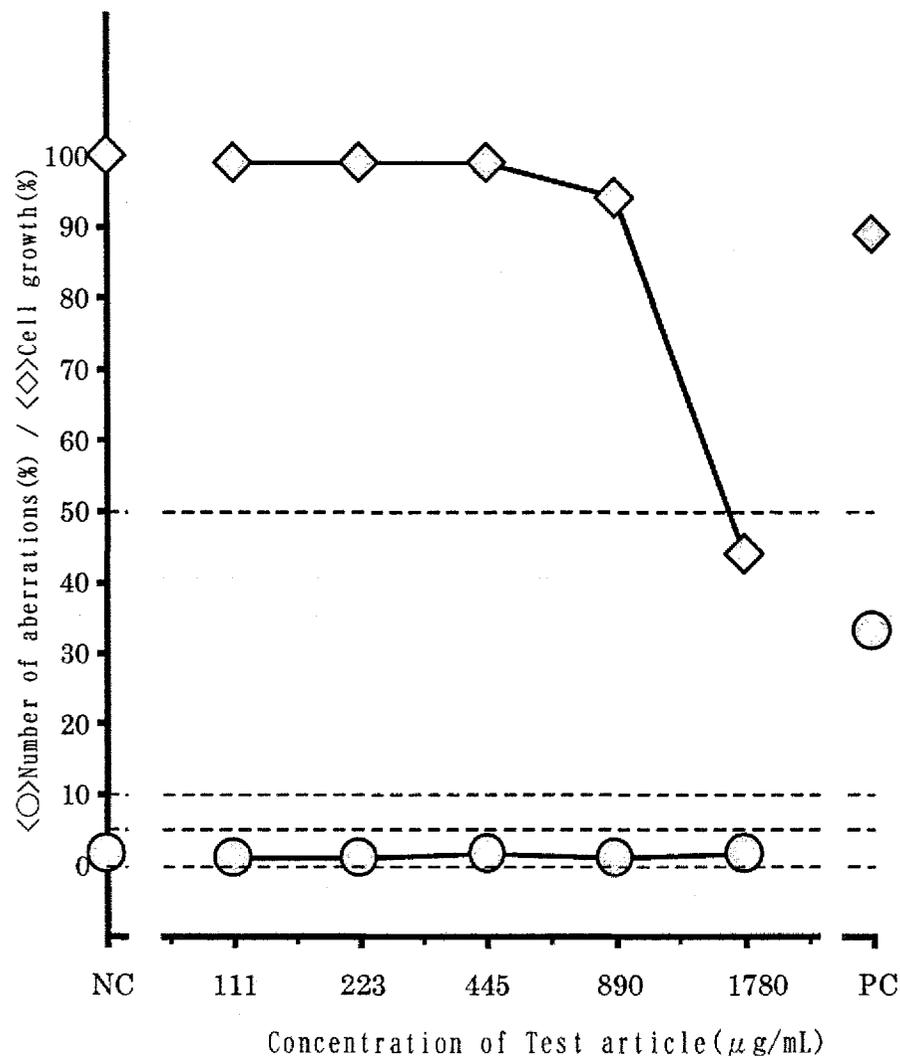


Fig. 3-2 Cell growth and number of aberrations in the chromosome aberration test treated with Propanoic acid. 3,3'-thiobis- [continuous treatment: 24hr]

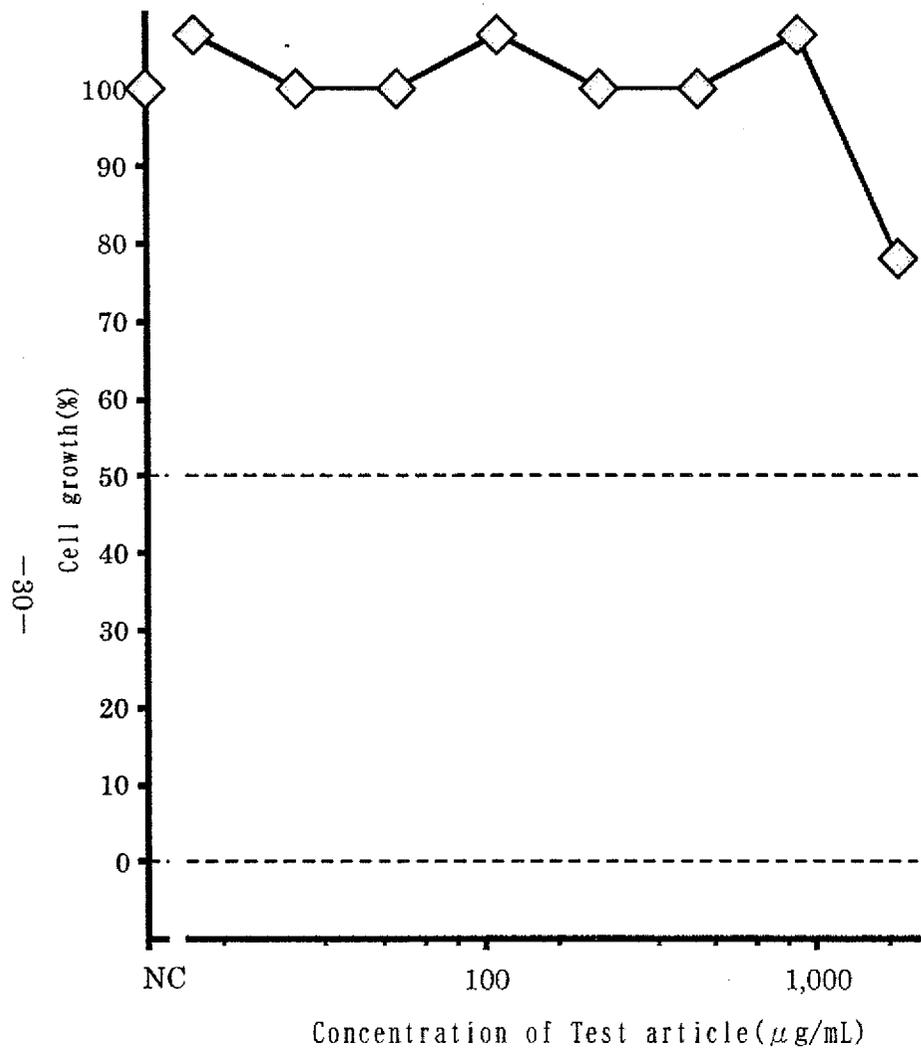


Fig. 4-1 Cell growth in the cell-growth inhibition test treated with Propanoic acid. 3,3'-thiobis- [continuous treatment: 48hr]

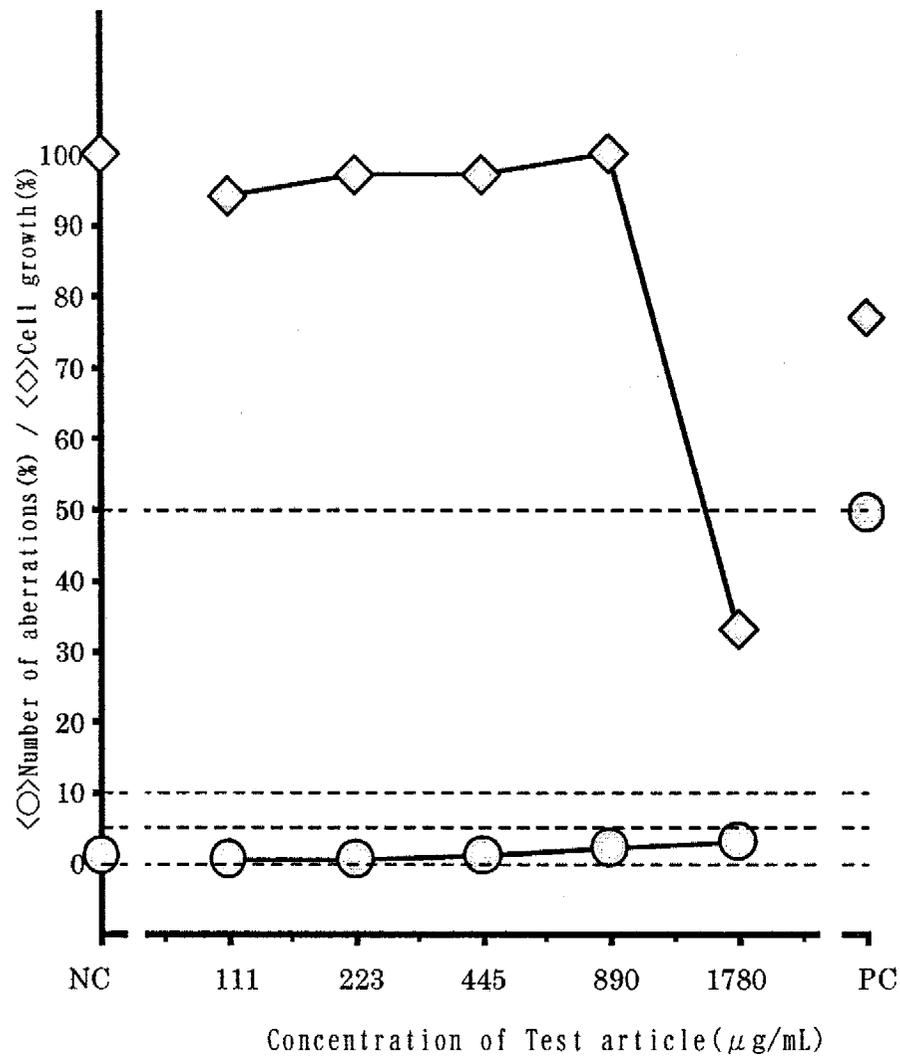


Fig. 4-2 Cell growth and number of aberrations in the chromosome aberration test treated with Propanoic acid. 3,3'-thiobis- [continuous treatment: 48hr]

Table 1-1 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with Propanoic acid. 3,3'-thiobis-
[short-term treatment: +S9 mix]

Study type	Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell-growth inhibition test					Precipitates /Crystals ^{e)}	Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test					
		Plate 1 and 2	Mean (%)	Condition of cells ^{c)}	Observation ^{b)} Color of medium ^{d)}	Plate 1 and 2			Mean (%)	Condition of cells ^{c)}	Observation ^{b)} Color of medium ^{d)}			
+ 6-18	0 (NC)	100 ^{a)} 99	100	—	Red	—	0 (NC)	100 ^{a)} 87	100	—	Red	—		
	Test article	13.9	99 99	99	—	Red	—	Test article	111	99 87	99	—	Red	—
		27.8	99 99	99	—	Red	—		223	99 74	106	—	Red	—
		55.6	99 99	99	—	Red	—		445	99 99	106	—	Red	—
		111	99 74	87	—	Red	—		890	99 87	99	—	Orange	—
		223	74 74	74	—	Red	—		1780	74 74	79	+++	Yellow	—
		445	99 99	99	—	Red	—		PC	87 74	86	—	Red	—
		890	99 99	99	—	Orange	—							
		1780	74 74	74	+++	Yellow	—							
						+++	Yellow		—					

Concentration of 50% cell growth inhibition: over 1780 μ g/mL

NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)

PC: Positive control (cyclophosphamide 15 μ g/mL)

a): One plate in the negative control group was measured as a 100% growth.

b): Observation of plate at the end of treatment

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

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

d): Red: red to orange-red.

e): —: Absence of precipitates/crystals

Table 1-2 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with Propanoic acid. 3,3'-thiobis-
[short-term treatment: -S9 mix]

Study type	Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell-growth inhibition test					Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test						
		Cell growth ratio		Observation ^{b)}				Cell growth ratio		Observation ^{b)}				
S9 Time mix (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%)	Condition of cells ^{c)}	Color of medium ^{d)}	Precipitates /Crystals ^{e)}	Plate 1 and 2	Mean (%)	Condition of cells ^{c)}	Color of medium ^{d)}	Precipitates /Crystals ^{e)}			
- 6-18	0 (NC)	100 ^{a)} 99	100	-	Red	-	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	-	Red	-		
	Test article	13.9	99 99	99	-	Red	-	Test article	111	88 88	88	-	Red	-
		27.8	99 99	99	-	Red	-		223	100 88	94	-	Red	-
		55.6	99 99	99	-	Red	-		445	88 88	88	-	Red	-
		111	99 99	99	-	Red	-		890	88 88	88	-	Orange	-
		223	99 99	99	-	Red	-		1780	88 77	83	+	Yellow	-
		445	99 74	87	-	Red	-		PC	88 88	88	-	Red	-
		890	99 99	99	-	Orange	-							
		1780	74 99	87	+	Yellow	-							
		PC												

Concentration of 50% cell growth inhibition: over 1780 μ g/mL

NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)

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

a): One plate in the negative control group was measured as a 100% growth.

b): Observation of plate at the end of treatment

c): -: 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.

d): Red: red to orange-red.

e): -: Absence of precipitates/crystals

Table 1-3 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with Propanoic acid. 3,3'-thiobis-
[continuous treatment: 24hr]

Study type	Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell-growth inhibition test					Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test					
		Cell growth ratio		Condition of cells ^{c)}	Observation ^{b)}			Cell growth ratio		Observation ^{b)}			
S9 Time mix (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%)			Color of medium ^{d)}	Precipitates /Crystals ^{e)}	Plate 1 and 2	Mean (%)		Color of medium ^{d)}	Precipitates /Crystals ^{e)}	
- 24-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	Red	-	0 (NC)	100 ^{a)}	100	-	Red	-	
	Test article		99		-	Red	-		99		-	Red	-
		13.9	74	87	-	Red	-						
			99		-	Red	-						
		27.8	99	99	-	Red	-						
			99		-	Red	-						
		55.6	99	99	-	Red	-						
			99		-	Red	-						
		111	99	99	-	Red	-						
			99		-	Red	-						
		223	99	99	-	Red	-						
			99		-	Red	-						
		445	99	99	-	Red	-						
			99		-	Red	-						
890	99	99	-	Light orange	-								
	99		-	Light orange	-								
1780	74	74	+	Yellow	-								
	74		+	Yellow	-								
PC													

Concentration of 50% cell growth inhibition: over 1780 μ g/mL

NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)

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

a): One plate in the negative control group was measured as a 100% growth.

b): Observation of plate at the end of treatment

c): -: 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.

d): Red: red to orange-red.

e): -: Absence of precipitates/crystals

Table 1-4 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with Propanoic acid. 3,3'-thiobis-
[continuous treatment: 48hr]

Study type	Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell-growth inhibition test					Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test					
		Cell growth ratio		Observation ^{b)}				Cell growth ratio		Observation ^{b)}			
S9 Time mix (hr)		Plate 1 and 2	Mean (%)	Condition of cells ^{c)}	Color of medium ^{d)}	Precipitates /Crystals ^{e)}	Plate 1 and 2	Mean (%)	Condition of cells ^{c)}	Color of medium ^{d)}	Precipitates /Crystals ^{e)}		
48-0	0 (NC)	100 ^{a)}	100	—	Red	—	0 (NC)	100 ^{a)}	100	—	Red	—	
		100		—	Red	—		100		—	Red	—	
	Test article	13.9	114	107	—	Red	—	Test article	94	94	—	Red	—
			100		—	Red	—						
		27.8	100	100	—	Red	—		100	97	—	Red	—
			100		—	Red	—						
		55.6	100	100	—	Red	—		94	97	—	Red	—
			100		—	Red	—						
		111	114	107	—	Red	—		100	100	—	Light orange	—
			100		—	Red	—						
		223	100	100	—	Red	—		100	100	—	Light orange	—
			100		—	Red	—						
		445	100	100	—	Red	—		33	33	++	Yellow	—
			100		—	Red	—						
		890	114	107	—	Light orange	—		33	33	++	Yellow	—
100			—	Light orange	—								
1780	71	78	+	Yellow	—	77	77	—	Red	—			
	85		+	Yellow	—								
PC													

Concentration of 50% cell growth inhibition: over 1780 μ g/mL

NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)

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

a): One plate in the negative control group was measured as a 100% growth.

b): Observation of plate at the end of treatment

c): —: 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.

d): Red: red to orange-red.

e): —: Absence of precipitates/crystals

Table 2-1 Chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with Propanoic acid.3,3'-thiobis-
[short-term treatment:+S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberrations						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	-	16-1		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0)	
			111	200	200	0.5	-	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	-	65-1
					(100)	(1)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			223	200	200	1.0	-	2	0	0	0	0	0	0.0	1.0	-	69-1
					(100)	(2)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			445	200	200	0.5	-	3	0	0	0	0	0	0.0	1.5	-	72-1
					(100)	(0)		(3)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			890	200	200	1.5	-	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	-	77-1
					(100)	(2)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			1780	200	200	2.5	-	2	0	0	0	0	0	0.0	1.0	-	98-1
					(100)	(3)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			PC	200	200	0.5	-	7	24	146	0	1	1	76.0	76.5	+	38-1
					(100)	(0)		(3)	(10)	(82)	(0)	(1)	(1)	(85)	(85)		
			(100)	(1)		(4)	(14)	(64)	(0)	(0)	(0)	(67)	(68)		05-1		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
TA: total number of cells with aberrations excluding gap. TAG: total number of cells with aberrations including gaps,
NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)
PC: Positive control (cyclophosphamide, 0.05 μ g/mL)

Table 2-2

Chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with Propanoic acid.3,3'-thiobis-
[short-term treatment:-S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberrations						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	6-18	NC	200	0.5		3	1	0	0	0	0	0.5	2.0		
			(100)	(1)	(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		23-1	
			(100)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)		87-1	
		111	200	2.0		1	0	0	0	0	0	0.0	0.5		
			(100)	(3)	-	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		11-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		17-1
		223	200	0.0		2	1	0	0	0	0	0.5	1.5		
			(100)	(0)	-	(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)		33-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		40-1
		445	200	0.5		1	0	0	0	0	0	0.0	0.5		
			(100)	(0)	-	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		30-1
			(100)	(1)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		52-1
890	200	0.5		1	0	0	0	0	0	0.0	0.5				
	(100)	(0)	-	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		48-1		
	(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		44-1		
1780	200	1.0		1	1	0	0	0	0	0.5	1.0				
	(100)	(2)	-	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		10-1		
	(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		95-1		
PC	200	0.5		7	4	21	0	2	0	13.5	17.0				
	(100)	(0)	-	(3)	(1)	(10)	(0)	(0)	(0)	(11)	(14)		55-1		
	(100)	(1)		(4)	(3)	(11)	(0)	(2)	(0)	(16)	(20)		59-1		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
TA: total number of cells with aberrations excluding gap, TAG: total number of cells with aberrations including gaps,
NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)
PC: Positive control (mitomycin C, 15 μ g/mL)

Table 2-3 Chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with Propanoic acid.3,3'-thiobis-
[continuous treatment:24hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberrations						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
-	24-0	NC	200	0.5	-	6	1	0	0	2	0	1.5	4.5	-	43-1 03-1
			(100)	(0)		(3)	(1)	(0)	(0)	(1)	(0)	(2)	(5)		
			(100)	(1)		(3)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(4)		
		111	200	1.0	-	3	0	1	0	1	0	1.0	2.5	-	41-1 86-1
			(100)	(2)		(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)		
		223	200	0.0	-	2	0	1	1	0	0	1.0	2.0	-	53-1 91-1
			(100)	(0)		(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)		
		445	200	1.0	-	6	1	0	0	2	0	1.5	4.5	-	92-1 12-1
			(100)	(1)		(4)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(5)		
		890	200	0.5	-	3	0	2	0	0	0	1.0	2.5	-	88-1 45-1
(100)	(0)		(2)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)				
1780	200	0.5	-	4	0	2	0	1	0	1.5	3.5	-	50-1 99-1		
	(100)	(1)		(3)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(4)				
PC	200	0.0	-	10	17	54	0	1	0	33.0	36.0	+	71-1 06-1		
	(100)	(0)		(8)	(9)	(23)	(0)	(0)	(0)	(29)	(34)				
PC	200	0.0	-	10	17	54	0	1	0	33.0	36.0	+	71-1 06-1		
	(100)	(0)		(2)	(8)	(31)	(0)	(1)	(0)	(37)	(38)				

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange.
TA: total number of cells with aberrations excluding gap, TAG: total number of cells with aberrations including gaps,
NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)
PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 2-4 Chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with Propanoic acid.3,3'-thiobis-
[continuous treatment:48hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberrations						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.	
						g	ctb	cte	csb	cse	other					
-	48-0	NC	200	0.0	-	5	0	2	0	0	0	1.0	3.5	-	81-1 31-1	
			(100)	(0)		(3)	(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(5)			
			111	200	200	0.5	-	2	1	0	0	0	0.5	1.5	-	58-1 09-1
					(100)	(0)		(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			223	200	200	0.0	-	5	0	0	0	1	0.5	3.0	-	75-1 27-1
					(100)	(0)		(3)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)		
			445	200	200	0.5	-	1	1	1	0	0	1.0	1.5	-	90-1 78-1
					(100)	(1)		(1)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			890	200	200	0.5	-	3	0	2	0	2	2.0	3.5	-	56-1 35-1
					(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(2)		
			1780	200	200	0.0	-	6	3	3	0	0	3.0	6.0	-	73-1 24-1
					(100)	(0)		(4)	(1)	(1)	(0)	(0)	(1)	(3)		
	PC	200	200	0.0	-	11	23	85	3	2	49.5	52.0	+	37-1 97-1		
			(100)	(0)		(8)	(17)	(45)	(1)	(1)	(0)	(53)			(56)	
		200	(100)	(0)		(3)	(6)	(40)	(2)	(1)	(0)	(46)	(48)			

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
TA: total number of cells with aberrations excluding gap, TAG: total number of cells with aberrations including gaps,
NC: Negative control (dimethyl sulfoxide)
PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)