

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：3181（115-069）

財 団 法 人  
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

## 目 次

1. 要 約	7 頁
2. 試 験 題 目	8
3. 試 験 目 的	8
4. 試 験 番 号	8
9. 被 験 物 質	9
10. 試 験 材 料 お よ び 方 法	10
11. 試 験 結 果	16
12. 考 察 お よ び 結 論	17
13. 参 考 と し た 資 料	18

## Figures, Tables および Appendices

Figure 1	Dose-survival curves of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [continuously exposure]	20
Figure 2	Dose-survival curves of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [short-term exposure]	21
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [continuously exposure : 24 hrs]	22
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [continuously exposure : 48 hrs]	23
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [short-term exposure : -S9]	24
Figure 6	Incidence of structural aberrations induced by 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [short-term exposure : +S9]	25

Table 1	Results of growth inhibition test on 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [continuously exposure]	26
Table 2	Results of growth inhibition test on 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [short-term exposure]	27
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [continuously exposure : 24 hrs]	28
Table 4	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [continuously exposure : 48 hrs]	29
Table 5	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [short-term exposure : -S9]	30
Table 6	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [short-term exposure : +S9]	31

## 1. 要 約 :

本試験条件下の *in vitro* 試験系において、2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸には染色体異常を誘起する作用がないものと判断した。

すなわち、2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の変異原性について、染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株 (CHL) を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った。

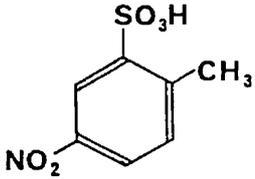
あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に、試験用量を設定した。すなわち、連続処理法 (24および48時間処理) ならびに短時間処理法 (-S9および+S9処理) で 550, 1100 および 2200  $\mu\text{g/ml}$  (10 mM 相当) のそれぞれ3用量について染色体異常を観察した。

その結果、被験物質処理群では連続処理法ならびに短時間処理法の各用量群とも明確な染色体異常の誘発は認められなかった。

また、連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンC (MMC) および短時間処理法 (+S9) の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。

2. 試験題目 : 2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
3. 試験目的 : 被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討するため、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号（昭和62年3月31日）の「新規化学物質に係る試験の方法について」ならびにOECD化学品ガイドライン 473（1983年5月26日）に従って、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。  
なお、試験の実施は環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号（昭和63年11月18日）の「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」ならびにOECDのGLP（1982年）の基準を満たすものとした。
4. 試験番号 : 3181（115-069）

## 9. 被 験 物 質 :

- 1) 被験物質名 2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸  
2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid
- 2) CAS No. 121-03-9
- 3) ロット番号
- 4) 純 度 79.60%
- 5) 不純物の名称 および濃度
- |      |        |                                 |       |
|------|--------|---------------------------------|-------|
| 水分   | 15.90% | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1.75% |
| NaCl | 0.01%  | 硫酸分                             | 2.74% |
- 6) 提 供 元
- 7) 保 管 条 件 室温
- 8) 化 学 構 造
- 
- 9) 分 子 量 217.2
- 10) 一 般 名 4-Nitro-2-toluenesulfonic acid  
5-Nitro-2-methylbenzenesulfonic acid
- 11) 物質の状態 淡黄色固体
- 12) 融 点 133.5°C
- 13) 溶 解 性 水溶性. アセトン, アルコール, エーテル, クロロホルムに可溶
- 14) 安 定 性 加熱すると激しく分解する. 強酸と接触すると分解する.
- 15) 被験物質保管および  
残余被験物質の処理 保管用被験物質 (約 1 g) 以外の残余被験物質は, 被験物質提供元へ返却した.

10. 試験材料および方法 :

## 1) 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株 (CHL細胞) を選択した。CHL細胞は昭和59年11月15日に から分与を受け、一部はジメチルスルホキシド (DMSO: GC用; MERCK 社; 純度 99.7%以上; Lot No. K21387978 513) を容量比で 10%添加した後、液体窒素中に保存し、残りは3~5日ごとに継代した。

なお、染色体異常試験では継代数5の細胞を用いた。

## 2) 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (LIFE TECHNOLOGIES 社; Lot No. 30P3066) に、メンブランフィルター (0.45 $\mu$ m: CORNING 社) を用いて加圧濾過除菌した非働化 (56 $^{\circ}$ C, 30分) 済み仔牛血清 (LIFE TECHNOLOGIES 社; Lot No. 39N9854) を最終濃度で 10%になるよう添加した。

調製後の培養液は使用時まで冷暗所 (4 $^{\circ}$ C) に保存した。

## 3) 培養条件

CO<sub>2</sub>インキュベーターを用い、CO<sub>2</sub>濃度5%, 37 $^{\circ}$ Cの条件で細胞を培養した。

## 4) S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン株式会社製 S9 mix (Lot No. CAM-350) を試験に使用した。S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質、誘導方法等ならびに S9 mix の組成を以下に示した。

a. ロット番号	RAA-350
b. 製造日	平成8年8月23日 (誘導物質投与開始後5日目)
c. 使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系
d. 性 / 週齢	雄 / 7週齢
e. 体重	203 ~ 254 g
f. 臓器	肝臓
g. 誘導物質	Phenobarbital (PB) 5,6-Benzoflavone (BF)
h. 投与量 および回数	PB: 30 mg/kg 1回 (1日目) 60 mg/kg 3回 (2~4日目) BF: 80 mg/kg 1回 (3日目)
i. 投与方法	腹腔内投与
j. 蛋白含量	27.3 mg/ml

成 分	S9 mix 1 ml 中の量
S 9	0.3 ml
MgCl <sub>2</sub>	5 μmol
KCl	33 μmol
G-6-P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES 緩衝液	4 μmol

## 5) 被験物質溶液の調製

被験物質を生理食塩液（株式会社 大塚製薬工場；Lot No. K6C82）に溶解させ調製原液（10 mM 相当）とした。この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。但し、本被験物質の純度は 95% 未満であるため、純度換算を行った。

## 6) 対照群

## a. 溶媒対照

使用溶媒の生理食塩液を容量比 10% 添加して試験した。

## b. 陽性対照（連続処理法）

注射用水（株式会社 大塚製薬工場；Lot No. K6F81）5 ml に溶解したマイトマイシン C（MMC：協和醗酵工業株式会社；Lot No. 103AFD）を生理食塩液（株式会社 大塚製薬工場；Lot No. K6C82）を用いて希釈した後、24時間処理で 0.05 μg/ml、48時間処理で 0.025 μg/ml の用量で試験した。

## c. 陽性対照（短時間処理法）

注射用水（Lot No. K6F81）5 ml に溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社；Lot No. 60113）を生理食塩液（Lot No. K6C82）を用いて希釈した後、12.5 μg/ml の用量で試験した。

## 7) 予備試験 (細胞増殖抑制試験)

## a. 試験用量

予備的な試験 (8.10, 27.0, 90.0, 300 および 1000  $\mu\text{g/ml}$  の5用量: 公比 10/3) の結果, 明確な細胞増殖抑制作用は観察されなかった. 本結果を参考に, 被験物質の調製原液 (10 mM 相当) の濃度を含む6用量 (公比5/3) を設定した. 各試験系での試験用量範囲を以下に示した.

1用量当たり2ウエルを用いた.

試 験	用量数	試験用量 ( $\mu\text{g/ml}$ )
連続処理法24時間処理	6	171 ~ 2200
連続処理法48時間処理	6	171 ~ 2200
短時間処理法 -S9処理	6	171 ~ 2200
短時間処理法 +S9処理	6	171 ~ 2200

## b. 連続処理法

細胞培養用マルチプレート (12ウエル: 住友ベークライト株式会社) の各ウエルに24時間処理の場合, 培養液を用いて  $8 \times 10^3$  細胞/ml に調製した細胞浮遊液 1 ml, 48時間処理の場合,  $4 \times 10^3$  細胞/ml に調製した細胞浮遊液 1 ml を播種した. 培養3日後に, 使用溶媒 (以下溶媒) あるいは被験物質溶液を 100  $\mu\text{l}$  加えた. さらに24あるいは48時間培養を続けた後に細胞生存率 (溶媒対照に対する比) を求めた.

## c. 短時間処理法

$8 \times 10^3$  細胞/ml に調製した細胞浮遊液 1 ml を各ウエルに播種した. 培養3日後に -S9処理の場合, 培養液 400  $\mu\text{l}$  を除き, 溶媒あるいは被験物質溶液 60  $\mu\text{l}$  を加え, +S9処理の場合は培養液 500  $\mu\text{l}$  を除き S9 mix 100  $\mu\text{l}$ , 溶媒あるいは被験物質溶液を 60  $\mu\text{l}$  加えてそれぞれ6時間培養した. 各ウエルの培養液を除去した後, ダルベッコリン酸緩衝液 (LIFE TECHNOLOGIES 社) を用いて細胞を洗浄した. 培養液 (500  $\mu\text{l}$ ) を新鮮なものに交換し, さらに18時間培養を続けた後に細胞生存率を求めた.

## d. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各プレートから培養液を除き、生理食塩液を用いて細胞を1回洗浄した。10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：和光純薬工業株式会社；Lot No. D1014）を加えて約10分間細胞を固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット（関東化学株式会社；Lot No. 607E4067）水溶液で10分間染色した。各プレートを水洗した後、十分乾燥させた。

各ウエルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を3あるいは4 ml 加え，5分間程度放置した後，580 nmでの吸光度を分光光度計（105-50型；株式会社日立製作所）を用いて測定した。溶媒対照群での吸光度に対する比（=細胞生存率）を各用量群について求めた。

## e. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1~2 および Table 1~2 に示した。

連続処理法，短時間処理法のいずれにおいても明確な細胞増殖抑制作用は観察されなかった。

なお，すべての試験用量で培養液の pH の低下が観察されたが，培養液交換時あるいは培養終了時には中性域に戻っていた。また，最高用量の 2200  $\mu$ g/ml では被験物質溶液添加直後培養液の白濁が認められたが，攪拌後消失した。

## 8) 本試験 (染色体異常試験)

## a. 試験用量

細胞増殖抑制試験結果を基に、各試験系それぞれ 10 mM 相当の用量を最高用量に計 3 用量 (公比 2 : 下表参照) を本試験の用量に設定した。

1 用量当たり 2 プレートを用いた。

試 験	試 験 用 量 (μg/ml)		
連続処理法 24時間処理	550,	1100,	2200
連続処理法 48時間処理	550,	1100,	2200
短時間処理法 -S9処理	550,	1100,	2200
短時間処理法 +S9処理	550,	1100,	2200

## b. 連続処理法

細胞培養用プレート (φ 60 mm : 住友ベークライト株式会社) に 24 時間処理の場合、培養液を用いて  $8 \times 10^3$  細胞/ml に調製した細胞浮遊液 5 ml ( $4 \times 10^4$  細胞)、48 時間処理の場合、 $4 \times 10^3$  細胞/ml に調製した細胞浮遊液 5 ml ( $2 \times 10^4$  細胞) を播種した。培養 3 日後に溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液 500 μl を加え、さらに 24 および 48 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

## c. 短時間処理法

培養液を用いて  $8 \times 10^3$  細胞/ml に調製した細胞浮遊液 5 ml ( $4 \times 10^4$  細胞) を細胞培養用プレートに播種した。培養 3 日後に -S9 処理の場合、培養液 2 ml を除き、溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液 300 μl を加え (S9 mix は添加しない)、+S9 処理の場合は培養液 2.5 ml を除き S9 mix 500 μl、溶媒、被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液 300 μl を加えてそれぞれ 6 時間培養した。各プレートの培養液を除去した後、ダルベッコリン酸緩衝液 (LIFE TECHNOLOGIES 社) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 ml を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

## d. 標本の作製

染色体標本作製の2時間前に、最終濃度で  $0.2 \mu\text{g/ml}$ 、すなわち培養液 1 ml 当たり  $20 \mu\text{l}$  のコルセミド溶液 (LIFE TECHNOLOGIES 社; Lot No. 22K5165) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25%トリプシン溶液 (LIFE TECHNOLOGIES 社; Lot No. 15N5367) を用いてプレートから細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r. p. m. で5分間遠心分離して培養液を除いた後、 $37^\circ\text{C}$  に保温しておいた  $75 \text{ mM}$  塩化カリウム水溶液を約 5 ml 加え、 $37^\circ\text{C}$  中で20分程度低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、 $4^\circ\text{C}$  に冷却した固定液 (メタノール3容: 酢酸1容) で細胞を固定した。固定液を3回交換した後、新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし、脱脂洗浄済みのスライドガラス上に1~2滴ずつ滴下した。スライド標本を十分乾燥させ、 $1/100 \text{ M}$  ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8: MERCK 社; Lot No. 322 S 601974) を用いて希釈した 1.2% ギムザ染色液 (MERCK 社; Lot No. 540074625) で12分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

## e. 染色体の観察

各プレート当たり 100個、すなわち1用量当たり 200個の分裂中期像を顕微鏡下 ( $\times 600$  程度) で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ (gap), 染色分体切断 (ctb), 染色体切断 (csb), 染色分体交換 (cte), 染色体交換 (cse) およびその他 (oth) の構造異常に分類した。同時に、倍数性細胞 ( $3n$  以上) の出現率を記録した。ただし、染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し、染色体切断様の像が認められる場合、その非染色性領域が当該染色体の分体幅と同程度以上、かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した。なお、ギャップのみ保有する細胞を含めた場合 (+gap) と、含めない場合 (-gap) とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した。

すべての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。

## 9) 結果の解析

各試験群の構造異常を有する細胞ならびに倍数性細胞の出現頻度を、下記に示す基準を用いて判断し、さらに再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めた場合について行った。なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

5%未満	----	陰性 (-)
5%以上~10%未満	----	疑陽性 (±)
10%以上	----	陽性 (+)

## 11. 試験結果：

## 1) 連続処理法24時間処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 1 に示した。

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸処理群での染色体構造異常ならびに倍数性細胞の出現頻度は、溶媒対照と同等であった。また、いずれの処理群においても分裂中期像の減少等の顕著な細胞毒性作用は観察されなかった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は +gap で 50.5% を示した。

## 2) 連続処理法48時間処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 2 に示した。

被験物質処理群での染色体構造異常ならびに倍数性細胞の出現頻度は、溶媒対照と同等であった。また、いずれの処理群においても顕著な細胞毒性作用は観察されなかった。

陽性対照では構造異常細胞が +gap で 46.0% 出現した。

## 3) 短時間処理法-S9処理

試験結果を Figure 5, Table 5 および Appendix 3 に示した。

被験物質処理群での染色体構造異常ならびに倍数性細胞の出現頻度は、溶媒対照と同等であった。また、いずれの処理群においても顕著な細胞毒性作用は観察されなかった。

一方、CP で処理した群では代謝活性化が行われないため、染色体異常の明確な誘発は認められなかった。

## 4) 短時間処理法+S9処理

試験結果を Figure 6, Table 6 および Appendix 4 に示した。

被験物質処理群での染色体構造異常ならびに倍数性細胞の出現頻度は、溶媒対照と同等であった。また、いずれの処理群においても顕著な細胞毒性作用は観察されなかった。

一方、代謝活性化を必要とする陽性対照物質 CP で処理した細胞では、多数の異常が出現し、+gap で 79.0% の細胞に構造異常が認められた。

なお、すべての試験用量で培養液の pH の低下が観察されたが、培養液交換時あるいは培養終了時には中性域に戻っていた。また、最高用量の 2200  $\mu$ g/ml では被験物質溶液添加直後培養液の白濁が認められたが、攪拌後消失した。

12. 考察および結論：

2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の変異原性，すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため，培養細胞（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

試験用量として細胞増殖抑制試験結果を基に連続処理法ならびに短時間処理法において，10 mM 相当の用量（2200  $\mu$ g/ml）まで検討した。

その結果，連続処理法（24および48時間処理）ならびに短時間処理法（-S9および+S9処理）の2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸処理群では明確な染色体異常の誘発は認められなかった。

一方，溶媒対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当センターの背景データの範囲内であり，本試験が有効であることを示していた。

以上の試験結果から，本試験条件下において2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸の哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し，陰性と判定した。

なお，類縁化合物であるメチル *p*-ニトロベンゼンスルホネートおよび *p*-トルエンスルホン酸の変異原性についての報告はなかった。

13. 参考とした資料 :

- Ishidate, M., Jr., and Odashima, S. : Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* -A screening for chemical carcinogens. *Mut. Res.*, 48 : 337~354, 1977.
- 石館 基 : 培養細胞を用いる染色体異常の検出法, *組織培養*, 5 : 115~122, 1979.
- Evans, H. J. : Cytological methods of detecting chemical mutagens. In A. Hollander (Ed.), *Chemical Mutagens*, Vol. 4 : 1~25, Plenum, New York, 1976.
- Matsuoka, A., *et al.* : Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mut. Res.*, 66 : 277~290, 1979.
- 石館 基 監修 : 〈改訂〉染色体異常試験データ集, エル・アイ・シー, 東京, 1987.
- Evans, H. J. and O' Riordan, M. L. : Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberration in mutagens tests, *Mut. Res.*, 31 : 135~148, 1975.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 22, 269~275, 1972.

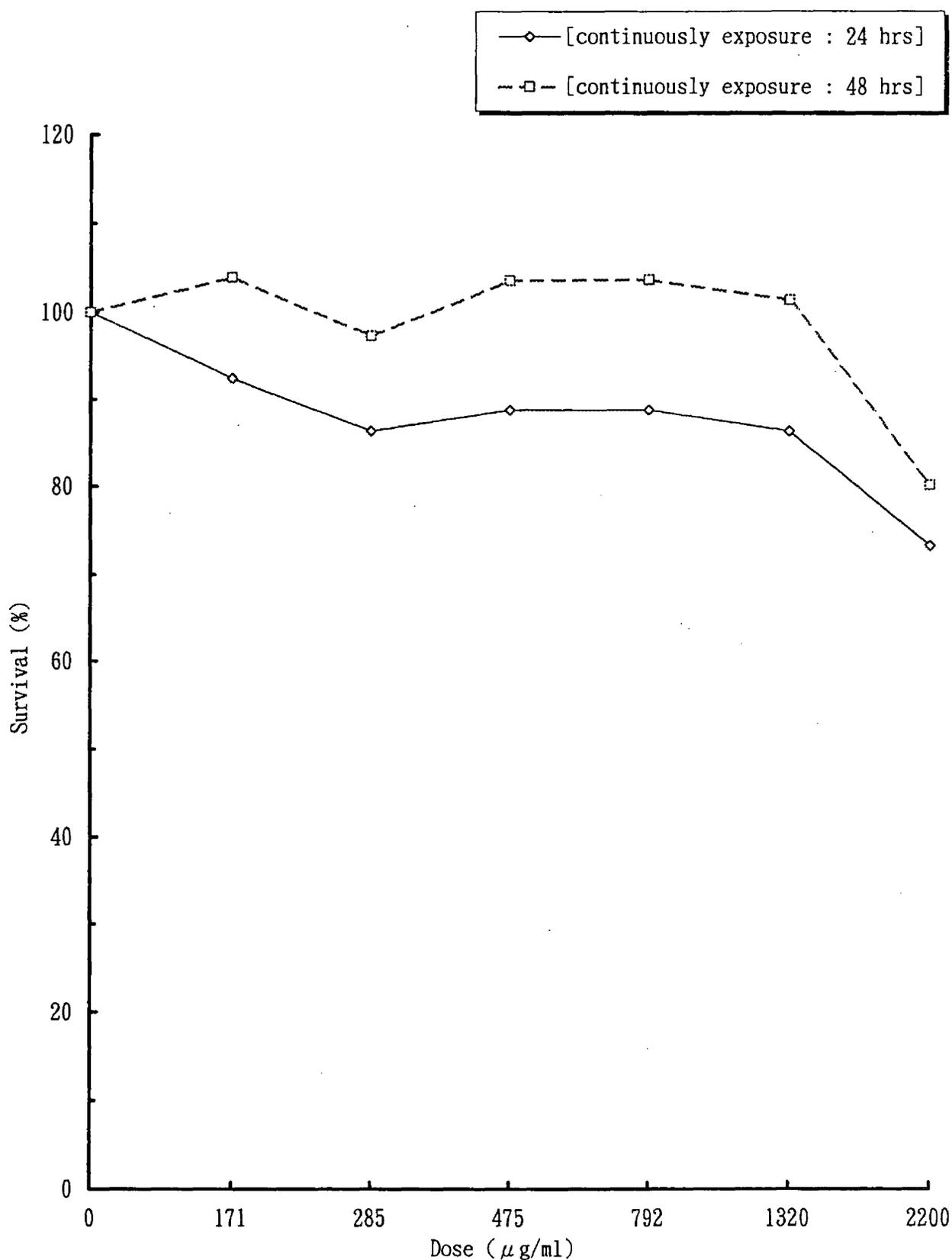


Figure 1. Dose-survival curves of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [continuously exposure]

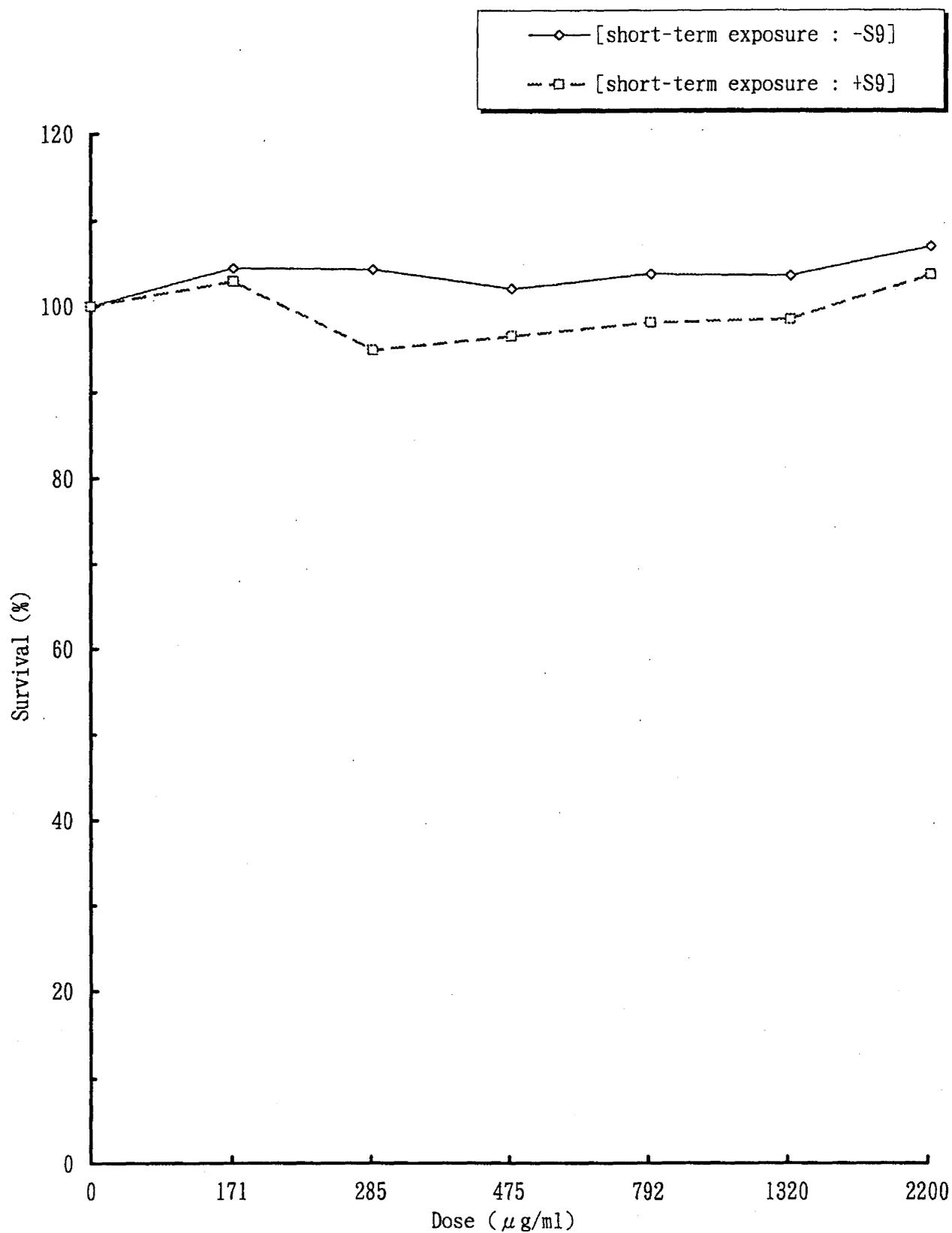


Figure 2. Dose-survival curves of 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [short-term exposure]

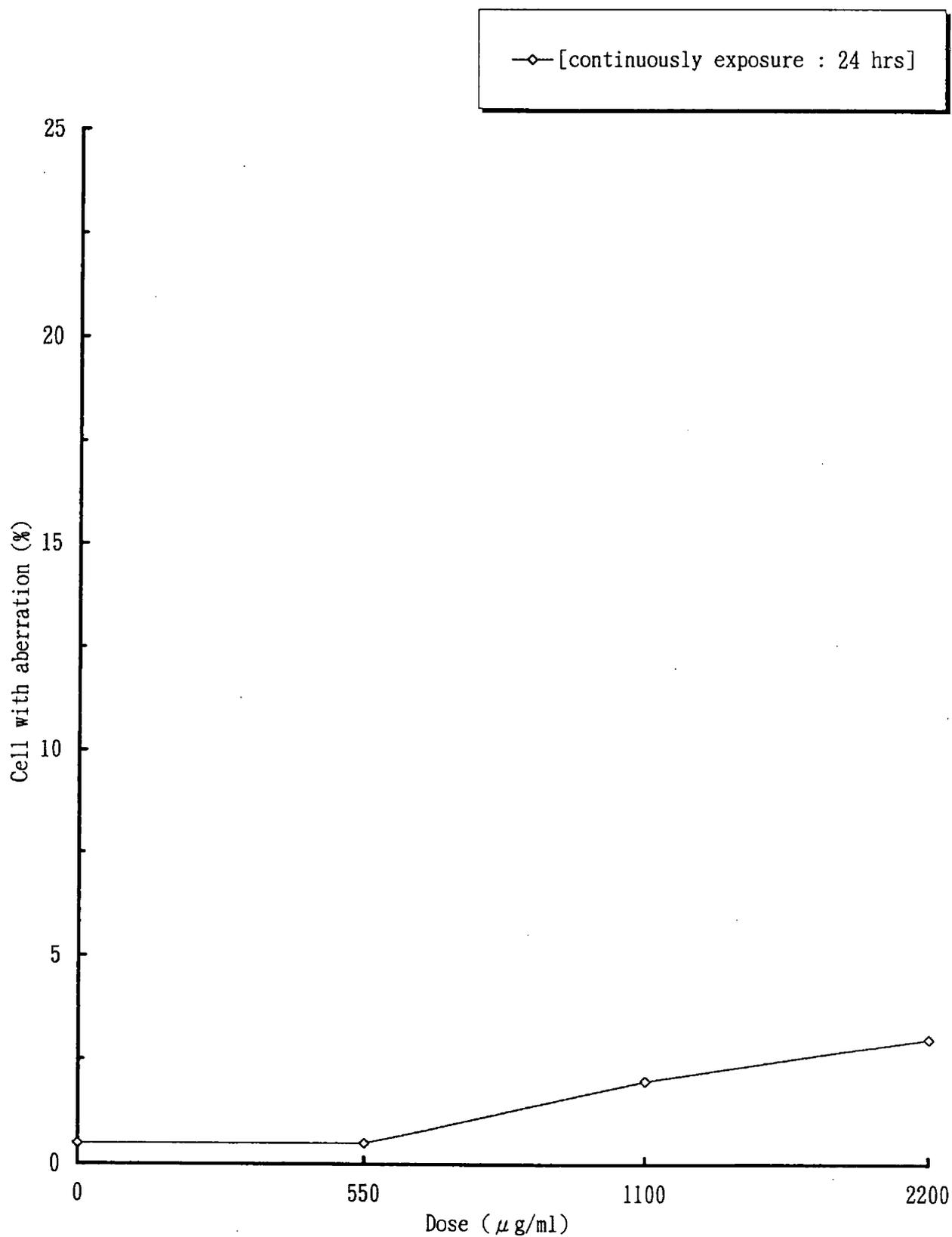


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid [continuously exposure : 24 hrs]

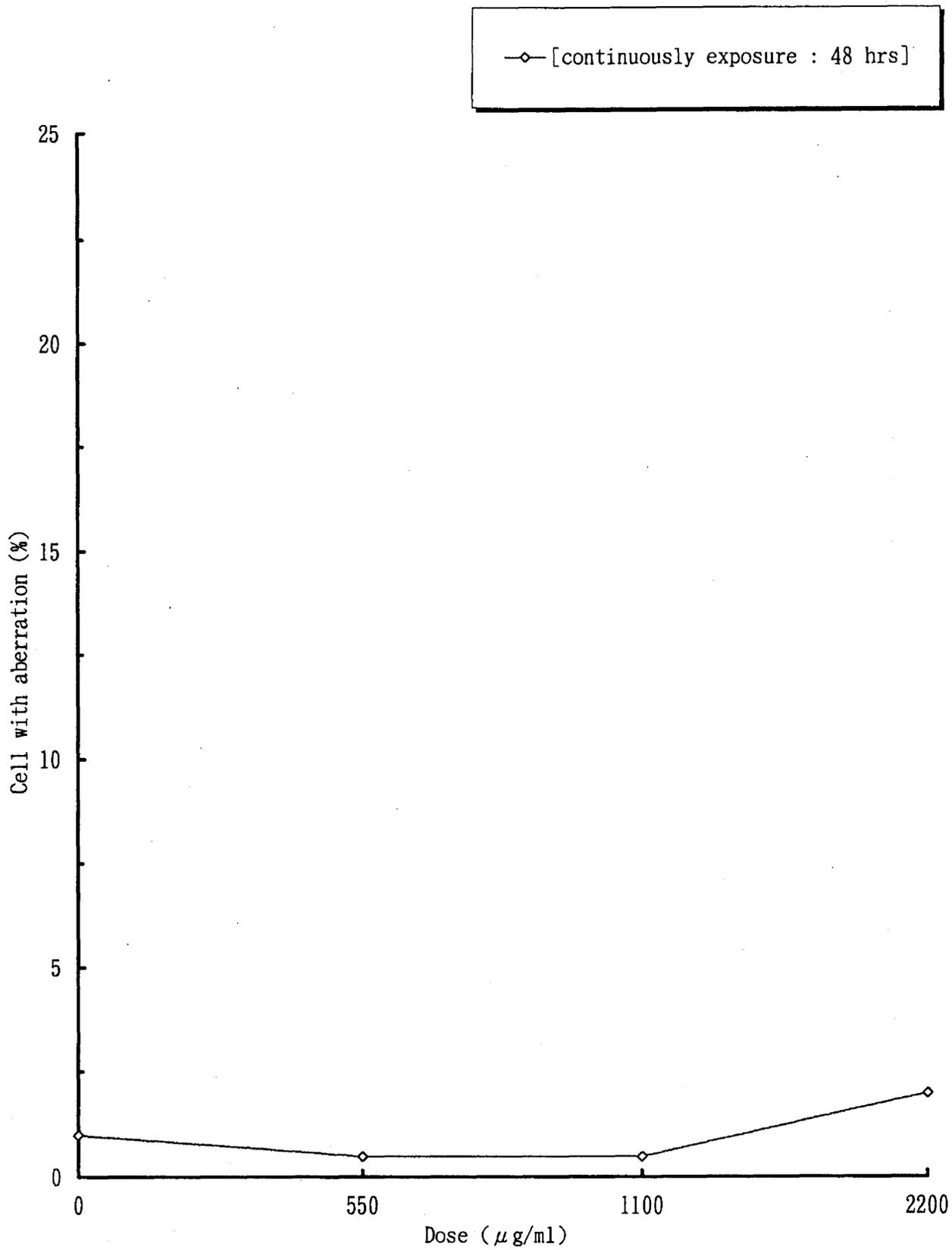


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by  
2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid  
[continuously exposure : 48 hrs]

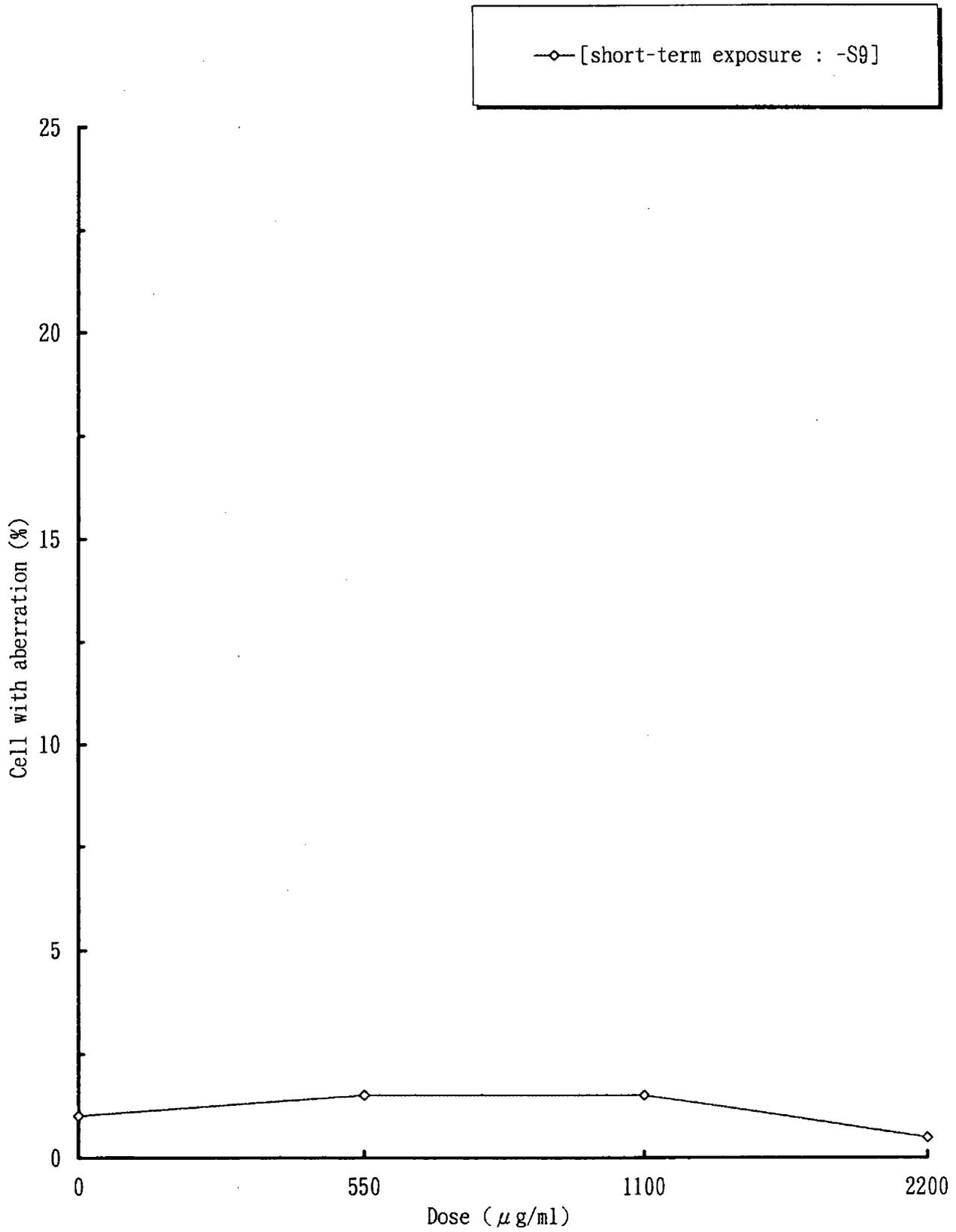


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid [short-term exposure : -S9]

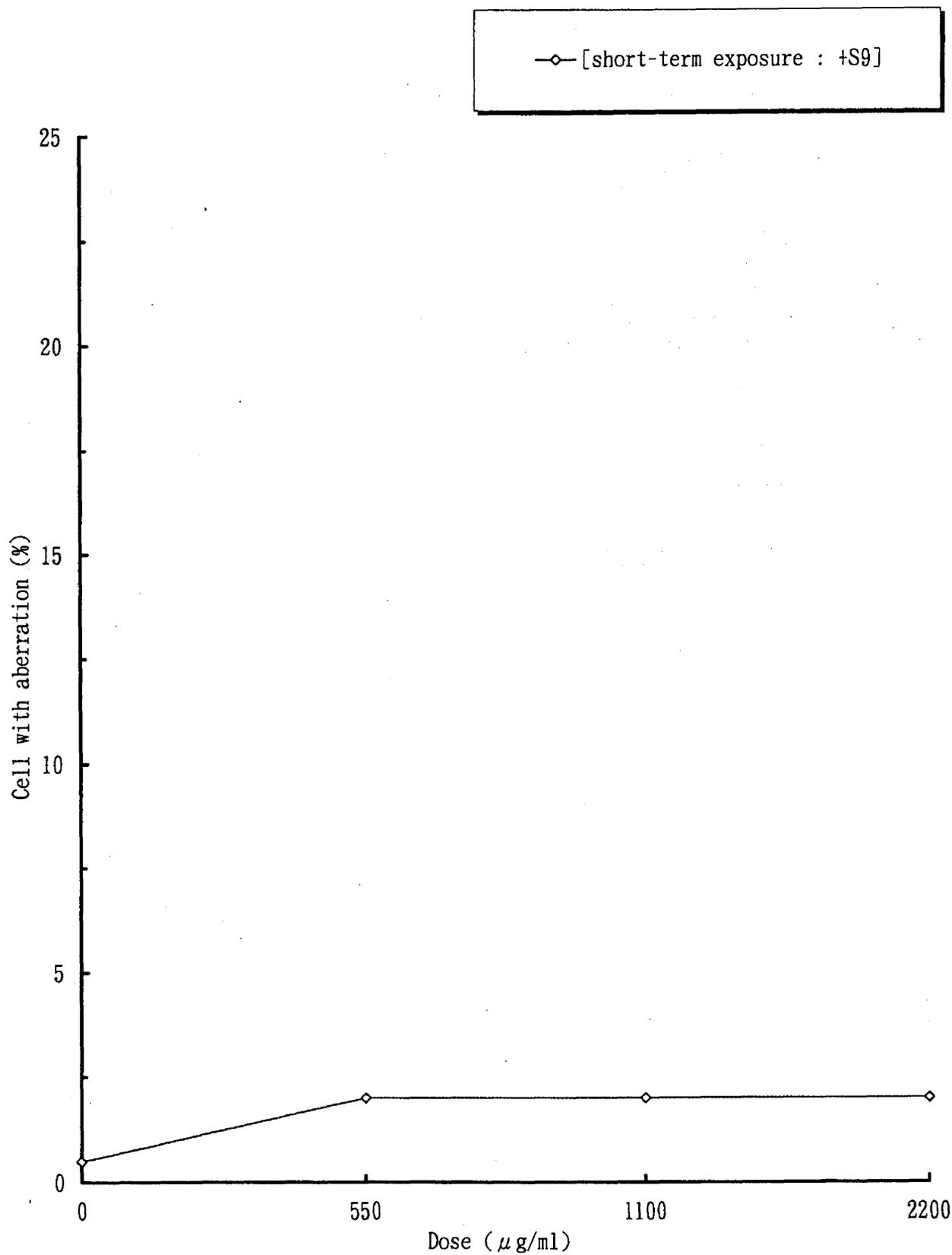


Figure 6. Incidence of structural aberrations induced by 2-Methyl-5-nitro-benzensulfonic acid [short-term exposure : +S9]

Table 1. Results of growth inhibition test on 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [continuously exposure] Exp. No. 3181 (115-069)

Compound	[continuously exposure : 24 hrs]			[continuously exposure : 48 hrs]		
	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Survival (%)	[ Mean ]	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Survival (%)	[ Mean ]
Saline a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]
test sub.	171	93.2 91.4	[ 92.3 ]	171	103.6 104.3	[ 103.9 ]
	285	87.0 85.7	[ 86.3 ]	285	99.5 94.9	[ 97.2 ]
	475	90.6 86.9	[ 88.8 ]	475	105.6 101.6	[ 103.6 ]
	792	88.8 88.7	[ 88.7 ]	792	104.6 102.7	[ 103.7 ]
	1320	88.1 84.6	[ 86.3 ]	1320	100.0 102.9	[ 101.5 ]
	2200	71.5 75.0	[ 73.2 ]	2200	79.3 81.1	[ 80.2 ]

50% Growth inhibition dose was as follows:  
 [continuously exposure : 24 hrs] ——— Not inhibited  
 [continuously exposure : 48 hrs] ——— Not inhibited

a): Solvent control

Table 2. Results of growth inhibition test on 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [short-term exposure] Exp. No. 3181 (115-069)

[short-term exposure : -S9]				[continuously exposure : 48 hrs]			
Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Survival (%)	[ Mean ]	Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Survival (%)	[ Mean ]
Saline a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]	Saline a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]
test sub.	171	104.1 104.7	[ 104.4 ]	test sub.	171	100.5 105.1	[ 102.8 ]
	285	105.0 103.4	[ 104.2 ]		285	96.4 93.1	[ 94.8 ]
	475	100.4 103.4	[ 101.9 ]		475	98.3 94.3	[ 96.3 ]
	792	104.4 102.7	[ 103.5 ]		792	96.6 99.2	[ 97.9 ]
	1320	103.1 103.6	[ 103.4 ]		1320	97.1 99.4	[ 98.3 ]
	2200	110.0 103.6	[ 106.8 ]		2200	104.2 102.9	[ 103.5 ]

50% Growth inhibition dose was as follows:  
 (short-term exposure : -S9) ——— Not inhibited  
 (short-term exposure : +S9) ——— Not inhibited

a): Solvent control

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid  
[direct method : 24 hrs]

Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Number of Cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
Saline a)	0	200	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	1.0	-
test sub.	550	200	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	0.5	-
	1100	200	3	0	1	0	0	0	2.0	0.5	1.5	-
	2200	200	3	0	2	1	0	0	3.0	1.5	1.0	-
MMC b)	0.05	200	23	39	74	2	1	0	50.5	47.5	0.5	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others

a): Solvent control

b): Positive control (Mitomycin C)

Table 4. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid  
[continuously exposure : 48 hrs]

Exp. No. 3181 (115-069)

Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Number of Cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
Saline a)	0	200	1	0	0	0	1	0	1.0	0.5	0.0	-
test sub.	550	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	1.0	-
	1100	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-
	2200	200	1	2	1	0	0	0	2.0	1.5	1.0	-
MMC b)	0.025	200	13	34	68	0	1	0	46.0	43.0	0.5	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others  
a): Solvent control  
b): Positive control (Mitomycin C)

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid  
[activation method : -S9] Exp. No. 3181 (115-069)

Compound	Dose ( $\mu$ g/ml)	Number of Cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
Saline a)	0	200	1	1	1	0	0	0	1.0	1.0	0.5	-
test sub.	550	200	1	0	1	1	0	0	1.5	1.0	0.0	-
	1100	200	1	2	0	0	0	0	1.5	1.0	0.5	-
	2200	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	1.0	-
CP b)	12.5	200	1	1	0	0	0	0	1.0	0.5	0.0	-

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others

a): Solvent control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 6. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Methyl-5-nitro-benzenesulfonic acid [short-term exposure : tS9] Exp. No. 3181 (115-069)

Compound	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	Number of Cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
Saline a)	0	200	1	0	1	0	0	0	0.5	0.5	0.0	-
test sub.	550	200	0	2	3	0	0	0	2.0	2.0	1.5	-
	1100	200	1	0	2	1	0	0	2.0	1.5	0.0	-
	2200	200	2	0	2	0	0	0	2.0	1.0	0.0	-
CP b)	12.5	200	18	43	145	2	1	0	79.0	78.0	0.0	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others

a): Solvent control

b): Positive control (Cyclophosphamide)