パラアセトアルデヒドの チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる 染色体異常試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

目次

要約		1
試験	目的	1
試験	ガイドラインと GLP	2
材料	と方法	2
1.	被験物質	2
2.	陽性対照物質	2
3.	細胞と培養条件	2
4.	S9 反応液の調製	3
5.	被験物質調製液の調製	3
6.	細胞増殖抑制試験	3
7.	染色体異常試験	4
8.	染色体分析	5
試験	成績と考察	5
参考	文献	7
Figur	re	8
Table	es	9

要約

パラアセトアルデヒドのチャイニーズ・ハムスター雌肺由来細胞(CHL/IU 細胞)を用いる染色体異常 試験を実施し、その染色体異常誘発性を検討した。

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果をもとに、短時間処理における最高処理濃度を S9 mix 非存在下および S9 mix 存在下ともに 10 mmol/L(1.3 mg/mL)とし、公比 2 で計 4 段階の濃度群を設定し、染色体異常試験を実施した。

細胞増殖率および分裂指数の結果をもとに以下の観察対象群を決定し、染色体分析を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.33、0.65、1.3 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.33、0.65、1.3 mg/mL

その結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した高濃度群においてのみ構造異常を有する細胞の統計 学的に有意な増加(出現率:5.5%)が認められ、傾向性検定も有意となった。それ以外は、S9 mix 非存在 下および存在下で短時間処理したいずれの濃度群においても構造異常を有する細胞および倍数性細 胞の統計学的に有意な増加は認められなかった。

短時間処理では明らかな陽性結果が得られなかったことから、短時間処理と同様に最高処理濃度を 10 mmol/L(1.3 mg/mL)とし、公比 2 で計 5 段階の濃度群を設定して 24 時間連続処理による染色体異常試験を行った。

細胞増殖率および分裂指数の結果をもとに以下の観察対象群を決定し、染色体分析を行った。

24 時間連続処理: 0.33、0.65、1.3 mg/mL

その結果、24 時間連続処理した高濃度群において染色体の構造異常を有する細胞が統計学的に有意に増加(出現率:56.5%)し、傾向性検定も有意となった。倍数性細胞については、いずれの濃度群においても統計学的に有意な増加は認められなかった。

以上のように、高濃度のパラアセトアルデヒドで処理した場合、染色体の構造異常が誘発されたが、 今回の試験に用いたパラアセトアルデヒドは、不純物として、0.03 mg/mL 以上の濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られているアセトアルデヒドを 11.2%含んでいる。したがって、今回得られた試験結果は、アセトアルデヒトにより構造異常が誘発された可能性も考えられる。

以上の結果より、本試験に用いたパラアセトアルデヒドは、本試験条件において CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発するが、それは不純物であるアセトアルデヒドにより誘発された可能性も考えられた。

試験目的

OECD 既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、パラアセトアルデヒドの染色体 異常誘発作用を評価するため、CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

試験ガイドラインと GLP

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、一部改正 平成 17 年 4 月 1 日) および「OECD 化学物質試験法ガイドライン 473/ほ乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験」(1997 年 7 月 21 日採択) に準拠し、「化学物質 GLP」(平成 15 年 11 月 21 日、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、最終改正 平成 17 年 4 月 1 日)を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質であるパラアセトアルデヒド [別名: 2,4,6-トリメチル-1,3,5-トリオキサン、英名: 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxane、略称: PAA、CAS No.:123-63-7、分子式: $C_6H_{12}O_3$ 、分子量: 132.16、ロット番号: 含量: 88.5% (毛管カラム GC)]は、特異臭(芳香)のある無色澄明の液体である。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。被験物質は 使用時まで密閉容器に入れ、遮光条件下で室温保管した。

被験物質の安定性については、被験物質購入先において、実験終了後に返却した被験物質の含量を分析した結果、被験物質は実験期間中安定であることが確認された(Appendix 2、GLP 基準外)。なお、被験物質原体の安定性については GLP 基準下での確認はされていないが、化学的根拠に基づいた資料であることから、本試験の信頼性に影響しないと判断した。

2. 陽性対照物質

S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理用の陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC、ロット番号:466AEE、協和醗酵工業)を用いた。また、S9 mix 存在下の短時間処理用の陽性対照物質としてシクロホスファミド(CP、ロット番号:091K1176、Sigma Chemical)を用いた。これらの陽性対照物質を日局注射用水(ロット番号:K6A81 および K6F74、大塚製薬工場)に溶かし、原液(MMC:20μg/mL、CP:1 mg/mL)を用時調製して試験に用いた。

3. 細胞と培養条件

CHL/IU 細胞は、染色体数のモードが 25 本で、我が国において染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手(1988年2月10日入手、入手時の継代数4)し、継代後、液体窒素(気相)中に凍結保存(現在の継代数23)した。その細胞(倍加時間約15時間、マイコプラズマの汚染なし)を、解凍後、継代9代(細胞増殖抑制試験)、2代および5代(染色体異常試験)で試験に用いた。

培養には、仔牛血清(CS、ロット番号:28019903、Cansera International)を10 vol%添加したイーグル

MEM 培養液(10%CS/MEM)を用い、CO₂ インキュベーター(5%CO₂、37℃、加湿条件下)内で培養した。 イーグル MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末(日水製薬)9.4 g に対して精製水を 1 L の割合で加えて溶解し、高圧蒸気滅菌(121 ℃、15 分)したものに、L-グルタミン(日水製薬)を約 0.3 g、 10 w/v%NaHCO₃ 水溶液を約 20 mL の割合となるように無菌的に混合して調製したものを用いた。

4. S9 反応液の調製

S9(ロット番号:RAA-541、2006年4月7日製造およびRAA-542、2006年4月21日製造、キッコーマン)は、フェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与した7週齢の雄Sprague-Dawley系ラットの肝臓から調製したものを購入し、使用時まで超低温槽 (-80°) に保管した。グルコース-6-リン酸 (G-6-P)、Sigma Chemical)、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 $(\beta$ -NADP、オリエンタル酵母工業)および KCl を超純水に溶かし、混合液として超低温槽 (-80°) に保管し、使用時はこれに S9、MgCl₂および HEPES (pH7.2) を加え、S9 mix とした。試験には、10%CS/MEM:S9 mix を 22:5 の割合で混和した S9 反応液 $(2.7 \text{ mL}/\overline{f}$ $(2.7 \text{ mL}/\overline{f}$ $(2.7 \text{ mL}/\overline{f}$ $(2.7 \text{ mL}/\overline{f}$ $(2.83 \text{ mmol/L MgCl}_2)$ を3.5 mmol/L MgCl₂、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度で水に溶解したことから、溶媒として日局注射用水(ロット番号: K6A81 および K6F74、大塚製薬工場)を用いた。なお、当該試験に用いた被験物質のロットの純度が 88.5%と低いことから、当該試験では純度換算し、本報告書中の濃度は純度換算後の値で表した。被験物質を必要量秤量し、溶媒を加えて溶解させ、原液(細胞増殖抑制試験および染色体異常試験ともに 13 mg/mL、純度換算前濃度:14.7 mg/mL)を用時調製し、それを溶媒で段階希釈して種々の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を10 vol%添加して処理を行った。

なお、被験物質調製液の調製時に、発熱、発泡および変色のような変化の無いことを目視により確認 した。

6. 細胞增殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖におよぼす影響を調べた。CHL/IU 細胞に 0.25%トリプシンを作用させ、4×10³ 個/mL の単一細胞浮遊懸濁液を調製し、その 5 mL (2×10⁴ 個)をプラスチックディッシュ(直径 6 cm)に播種した。培養開始 3 日目に、以下の手順で短時間処理および連続処理を行った。すべての処理条件において、試験法ガイドラインに従い10 mmol/L(1.3 mg/mL)の濃度を最高処理濃度とし、0.041~1.3 mg/mL の濃度範囲(公比 2)で処理を行った。各群 2 枚のディッシュを用いた。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理する場合、各ディッシュの培養液をそれぞれ 10%CS/MEM および S9 反応液と交換 (2.7 mL/ディッシュ)した後、溶媒 (陰性対照) または各濃度の被験物質調製液 $(300 \text{ }\mu\text{L})$ を各ディッシュに添加し 6 時間処理した。処理後、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS, Ca^{2+})

および Mg²⁺を含む)で細胞を洗浄し、10%CS/MEM(5 mL/ディッシュ)でさらに 18 時間培養した。また、連続処理する場合には、各ディッシュの培養液を 10%CS/MEM と交換(4.5 mL/ディッシュ)した後、溶媒(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液(500 μL)を各ディッシュに添加し 24 時間処理した。また、培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた結果、いずれの処理群においても沈殿は認められなかった。

培養終了後、10 vo‰ホルマリン溶液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計(Monocellater™、オリンパス販売)を用い、陰性(溶媒)対照群と比較した各被験物質処理群の相対増殖率を測定した。

7. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合には高濃度でやや増殖率が低下したが、S9 mix 存在下で短時間処理した場合には増殖率は低下しなかった。また、24 時間連続処理した場合には、濃度に依存して増殖率が低下したが、1.3 mg/mL の濃度においても 50%を超える増殖抑制作用は認められなかった(Figure 1)。

このことから S9 mix 非存在下および存在下での短時間処理ではともに試験法ガイドラインに従い 10 mmol/L(1.3 mg/mL)の濃度を最高処理濃度とし、公比 2 で計 4 濃度を設定して染色体異常試験を実施した。試験操作は、細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。被験物質処理群、陰性(溶媒)対照群と陽性対照群を設けた。1 濃度あたり 4 枚のディッシュ(ただし、陽性対照群では 2 枚)を用い、そのうちの 2 枚は染色体標本を作製し、別の 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。陽性対照群については、日局注射用水(ロット番号: K6A81、大塚製薬工場)を 10 vol%加えたのち、S9 mix 非存在下の短時間処理では、MMC(20 μg/mL)を最終濃度が 0.1 μg/mL となるように添加した。また、S9 mix 存在下の短時間処理では、CP(1 mg/mL)を最終濃度が 10 μg/mL となるように添加した。なお、MMC および CP は上記の濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。

短時間処理の結果、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ともに、明らかな陽性結果が得られなかったことから、24 時間連続処理による染色体異常試験を実施した。試験操作は、細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。被験物質処理群、陰性(溶媒)対照群と陽性対照群を設けた。各群 4 枚のディッシュ(ただし、陽性対照群では 2 枚)を用い、そのうちの 2 枚は染色体標本を作製し、別の 2 枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。陽性対照群については、日局注射用水(ロット番号:K6F74、大塚製薬工場)を 10 vol%加えたのち、MMC(20 μg/mL)を最終濃度が 0.05 μg/mL となるように添加した。なお、MMC はこの濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。

培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が $0.1~\mu g/mL$ となるように添加した。培養終了後、培養液を捨て、0.02~w/v% EDTA 含有 PBS $(Ca^2+および Mg^2+不含)$ をディッシュあたり 5~mL 加えてピペッティングにより細胞をはがし、細胞を遠沈管に移した。遠沈 $(1000\sim1500~rpm$ 、約 5~分)し、上清を捨てた後、3~mL の 0.075~mol/L KCI 水溶液を加え、約 30~分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 <math>(メタノール: 氷酢酸 = 3:1(v/v)) を約 6~mL 加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作を数回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、その少量

をスライドグラス(あらかじめフロスト部分に試験番号、コード番号およびスライド番号を記入)上に滴下し、 そのまま風乾した。1 ディッシュあたり6 枚のスライド標本を作製した。

作製したスライド標本を 3 vol%ギムザ液 (pH 6.8 の 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈調製)で染色後、水道水ですすいで風乾した。

8. 染色体分析

染色体分析に先立ち、1 枚のディッシュから得られた 1 枚の標本を用いて、濃度の高い方から分裂指数 (500 細胞/標本)を分析した。0.5%未満の分裂指数を示した場合は染色体分析不能と判断し、また、標本あたりの分析可能な分裂中期細胞が少ない場合にはその数を考慮して、分析可能な最高濃度群を決定することとした。

ディッシュ 1 枚から得られたスライド標本 4 枚を、4 人の観察者がそれぞれ処理条件の分からない状態で分析した。染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を探し、1 群あたり 200 個(100 細胞/ディッシュ、25 細胞/観察者)の分裂中期細胞(染色体数:23~27 本)について構造異常の種類と数を、1 群あたり 800 個(400 細胞/ディッシュ、100 細胞/観察者)の分裂中期細胞について倍数性細胞(染色体数が 38 本以上)の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。

ギャップおよび切断を除く染色体異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会 ¹¹による分類法に基づいて行った。染色分体幅より狭い非染色性部位をギャップ、それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

染色体の構造異常(ギャップを除く)を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性対照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法 $^{2)}$ (p<0.01、片側)により有意差検定を実施した。また、有意差の認められた処理条件についてはその用量依存性についてコクラン・アーミテッジの傾向性検定 $^{3)}$ (p<0.01、片側)を実施することとした。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を総合的に行った。

試験成績と考察

用量設定のために実施した細胞増殖抑制試験の結果をもとに、公比2で以下の濃度群を設定し、短時間処理による染色体異常試験を実施した。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.16、0.33、0.65、1.3 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.16、0.33、0.65、1.3 mg/mL

なお、沈殿の有無を肉眼で観察した結果、いずれの処理群においても培養液中に沈殿は認められ なかった。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析結果をもとに、観察対象群を以下のように決定し、染色体分析を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理:0.33、0.65、1.3 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:0.33、0.65、1.3 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合、高濃度群(1.3 mg/mL)においてのみ構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加(出現率:5.5%)が認められ、傾向性検定の結果も有意となった。それ以外は、構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的有意差は認められなかった(Table 1)。

S9 mix 存在下で短時間処理した場合には、いずれの濃度群においても構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的有意差は認められなかった(Table 2)。

以上のように、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合、明らかな陽性結果が得られなかったことから、細胞増殖抑制試験結果をもとに以下の濃度群(公比 2)を設け、24 時間連続処理による染色体異常試験を実施した。

24 時間連続処理:0.081、0.16、0.33、0.65、1.3 mg/mL

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析結果をもとに、観察対象群を以下のように決定し、染 色体分析を行った。

24 時間連続処理:0.33、0.65、1.3 mg/mL

染色体分析の結果、24時間連続処理した高濃度群(1.3 mg/mL)で構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加(出現率:56.5%)が認められ、傾向性検定も有意となった。それ以外は、構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった(Table 3)。

陽性結果が得られた S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理に関して D20 値 4 を求めたところ、それぞれ 5.3 mg/mL および 0.67 mg/mL となった。

なお、当該試験で使用したパラアセトアルデヒドについては、不純物としてアセトアルデヒドが 11.2%含まれている。アセトアルデヒドは S9 mix 非存在下で短時間処理した場合および連続処理した場合、0.03 mg/mL 以上の濃度で 16%以上の細胞に染色体の構造異常を誘発することが報告 5)されている。今回陽性結果の得られた 1.3 mg/mL は、純度換算しないと 1.47 mg/mL であり、その時のアセトアルデヒドの濃度は 0.16 mg/mL と推定され、被験物質であるパラアセトアルデヒドではなく、不純物であるアセトアルデヒドが染色体の構造異常を誘発した可能性も十分に考えられる。

パラアセトアルデヒドについては、当研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験(試験番号: M-05-132)で陰性の結果が得られている。また、ベンゼン環にメチル基の結合した 1,3,5-trimethylbenzene に関しては復帰突然変異試験、染色体異常試験ともに陰性の結果が報告 ⁶⁾されている。

陽性対照物質として用いた MMC は、S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理におい

て染色体の構造異常を誘発し(Tables 1、3)、CP は短時間処理のS9 mix 存在下において染色体の構造 異常を誘発した(Table 2)。これらの陽性対照物質の結果より、本実験系の成立が確認された。

以上の結果より、本試験に用いたパラアセトアルデヒドは本試験条件において CHL/IU 細胞に染色 体異常を誘発するが、それは不純物であるアセトアルデヒドにより誘発された可能性も考えられた。

参考文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編:「化学物質による染色体異常アトラス」, 朝倉書店, 東京(1988)
- 2) 吉村 功 編:「毒性・薬効データの統計解析,事例研究によるアプローチ」,サイエンティスト社,東京(1987)
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫 編集:「毒性試験講座 14, 毒性試験データの統計解析」, 地人書館, 東京 (1992)
- 4) 祖父尼俊雄 監修: 染色体異常試験データ集,株式会社エル・アイ・シー,東京, pp.19-20(1999)
- 5) 祖父尼俊雄 監修:染色体異常試験データ集,株式会社エル・アイ・シー,東京, p.27(1999)
- 6) 祖父尼俊雄 監修:染色体異常試験データ集,株式会社エル・アイ・シー,東京, p.517(1999)

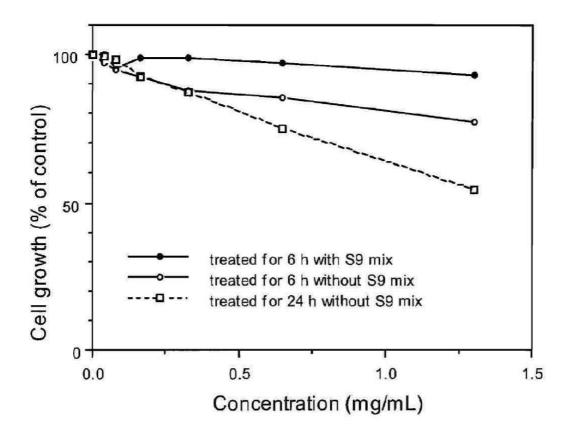


Figure 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxane

9

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxane (PAA) for 6 h without S9 mix

Group	Concen- ²⁾ tration (mg/mL)	S 9 mix		Concurrent 3) cell growth	Mitotic 4)	Number of cells	Number of structural aberrations					aberrat	tions	Others 6)	Number of c aberrati		Number 7) of polyploid	Trend	d test 8)
			(h)	(%)	(%)		gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁵⁾	total		+gap (%)	-gap (%)	cells (%)	-gap	POL
Negative 1)	0	-	6 - (18)	100	NA	100	1	0	0	0	1	0	2	1	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
			- 8 4			100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)		
						200	2	0	0	0	1	0	3	1	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0.0)		
PAA	0.16	-	6 - (18)	98	NA							not	observe	ed	*				
PAA	0.33	-	6 - (18)	95	NA	100	1	1	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	1 (0.3)		
						100	3	0	0	4	0	0	7	0	4 (4.0)	1 (1.0)	0 (0.0)		
						200	4	1	1	4	0	0	10	0	7 (3.5)	3 (1.5)	1 (0.1)		
PAA	0.65	-	6 - (18)	89	NA	100	2	1	0	0	0	0	3	0	3 (3.0)	1 (1.0)	1 (0.3)		
						100	0	1	1	0	0	0	2	1	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (0.3)		
						200	2	2	1	0	0	0	5	1	5 (2.5)	3 (1.5)	2 (0.3)	+	NA
PAA	1.3	=	6 - (18)	83	8.2, 7.4	100	0	2	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)		
			8 167		,	100	3	5	1	2	1	0	12	0	10 (10.0)	8 (8.0)	4 (1.0)		
						200	3	7	2	2	1	0	15	0	13 (6.5)	11*(5.5)	4 (0.5)		
MMC	0.1 μg/mL	=	6 - (18)	NA	NA	100	1	17	45	0	0	10	73	0	40 (40.0)	39 (39.0)	0 (0.0)		
						100	5	18	64	0	0	0	87	2	50 (50.0)	47 (47.0)	0 (0.0)		
						200	6	35	109	0	0	10	160	2	90 (45.0)	86 *(43.0)	0 (0.0)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Water for injection JP was used as a solvent and added at the level of 10 vol% per dish. 2) The concentration of PAA was adjusted for the purity (88.5%). 3) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. 4) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 5) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 6) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 7) Eight hundred cells were analyzed in each group. 8) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

^{*,} Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

10

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxane (PAA) for 6 h with S9 mix

Group	Concen- 2) tration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure	Concurrent 3) cell growth	Mitotic 4) index		Number of structural aberrations					aberrat	ions	Others 6)	Number of aberra		Number 7) of polyploid	Trend	test 8)
			(h)	(%)	(%)	analyzed	gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁵⁾	total	-	+gap (%)	-gap (%)	cells (%)	-gap Po	POL
Negative 1)	0	4	6 - (18)	100	NA	100	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (0.3)		
						100	0	1	2	0	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)		
						200	0	2	3	0	0	0	5	0	5 (2.5)	5 (2.5)	2 (0.3)		
PAA	0.16	+	6 - (18)	99	NA							r	ot obse	rved					
PAA	0.33	+	6 - (18)	97	NA	100	0	1	0	0	0	0	1	1	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)		
						100	0	4	1	0	0	0	5	0	5 (5.0)	5 (5.0)	0 (0.0)		
						200	0	5	1	0	0	0	6	1	6 (3.0)	6 (3.0)	1 (0.1)		
PAA	0.65	+	6 - (18)	94	NA	100	1	2	0	0	0	0	3	2	3 (3.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
		+		90	9.2, 7.0	100	0	1	1	0	1	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)		
						200	1	3	1	0	1	0	6	2	6 (3.0)	5 (2.5)	0 (0.0)	NA	NA
PAA	1.3		6 - (18)			100	2	3	2	0	0	0	7	1	7 (7.0)	5 (5.0)	1 (0.3)		
						100	0	2	2	1	0	0	5	0	4 (4.0)	4 (4.0)	2 (0.5)		
						200	2	5	4	1	0	0	12	1	11 (5.5)	9 (4.5)	3 (0.4)		
CP	10 μg/mL	+	6 - (18)	NA	NA	100	2	25	52	0	1	0	80	1	48 (48.0)	46 (46.0)	0 (0.0)		
						100	5	21	50	0	1	0	77	0	48 (48.0)	45 (45.0)	1 (0.3)		
						200	7	46	102	0	2	0	157	1	96 (48.0)	91 *(45.5)	1 (0.1)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; etb, chromatid break; ete, chromatid exchange; esb, chromosome break; ese, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

¹⁾ Water for injection JP was used as a solvent and added at the level of 10 vol% per dish. 2) The concentration of PAA was adjusted for the purity (88.5%). 3) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. 4) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 5) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 6) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number structural aberrations. 7) Eight hundred cells were analyzed in each group. 8) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

^{*,} Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2,4,6-trimethyl-1,3,5-trioxane (PAA) for 24 h without S9 mix

Group	Concen-2) tration (mg/mL)	Time of exposure	Concurrent 3) cell growth	Mitotic ⁴⁾ index (%)	Number of cells	Number of structural aberrations							Others 6)		cells with	Number 7) of polyploid	Trend	l test ⁸⁾
		(h)	(%)		analyzed	gap	ctb	cte	csb	cse	mul 5)	total	-	+gap (%)	-gap (%)	cells (%)		POL
Negative 1)	0	24	100	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.0)		W 1000 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
Trace of All the Control of the					100	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	1 (0.3)		
					200	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	5 (0.6)		
PAA	0.081	24	100	NA	SOURCE STATE OF THE STATE OF TH			- 100			not	observ	red		11242			
PAA	0.16	24	95	NA							not	observ	red					
PAA	0.33	24	86	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)		
					100	0	0	1	0	0	0	1	2	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)		
					200	0	0	1	0	0	0	1	2	1 (0.5)	1 (0.5)	3 (0.4)		
PAA	0.65	24	76	NA	100	1	1	1	1	0	0	4	0	4 (4.0)	3 (3.0)	2 (0.5)		
					100	2	4	2	0	0	0	8	0	7 (7.0)	6 (6.0)	0 (0.0)		
					200	3	5	3	1	0	0	12	0	11 (5.5)	9 (4.5)	2 (0.3)	-1-	NA
PAA	1.3	24	57	5.2, 1.8	100	3	23	59	1	1	0	87	2	51 (51.0)	51 (51.0)	3 (0.8)		
					100	4	45	69	1	0	0	119	2	64 (64.0)	62 (62.0)	0 (0.0)		
					200	7	68	128	2	1	0	206	4	115 (57.5)	113 *(56.5)	3 (0.4)		
MMC	0.05 μg/mL	24	NA	NA	100	9	29	60	0	0	0	98	0	59 (59.0)	53 (53.0)	1 (0.3)		
					100	2	21	60	0	0	0	83	0	58 (58.0)	57 (57.0)	0 (0.0)		
					200	11	50	120	0	0	0	181	0	117 (58.5)	110 *(55.0)	1 (0.1)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

¹⁾ Water for injection JP was used as a solvent and added at the level of 10 vol% per dish. 2) The concentration of PAA was adjusted for the purity (88.5%). 3) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a MonocellaterTM. 4) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 5) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 6) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 7) Eight hundred cells were analyzed in each group. 8) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

^{*,} Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.