2005年12月19日

ジエチルビフェニルの
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]

頁

要 約 ---------- 1

試験目的 ---------- 1

材料および方法 ---------- 2

1. 被験物質 ---------- 2

2. 陽性対照物質 ---------- 2

3. 細胞および培養条件 ---------- 2

4. S9 反応液 ---------- 3

5. 被験物質調製液の調製 ---------- 3

6. 細胞増殖抑制試験 ---------- 4

7. 染色体異常試験 ---------- 4

8. 染色体分析 ---------- 6

結果および考察 ---------- 7

参考文献 ---------- 8

Table 1 ---------- 9

Table 2 ---------- 10

Table 3 ---------- 11

Fig. 1 ---------- 12

[要　　約]

ジエチルビフェニルのチャイニーズ・ハムスター肺由来細胞（CHL/IU 細胞）を用いる染色体異常試験を実施し、陰性の結果を得た。

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、S9 mix 非存在下の短時間処理では 50%の増殖抑制濃度の約 1.5 倍の濃度を最高処理濃度とし、公比 1.5 で 5 段階の濃度群（0.0089、0.013、0.020、0.030、0.045 mg/mL）を設定し、染色体異常試験を実施した。また、S9 mix 存在下の短時間処理では 50%の増殖抑制濃度の約 2 倍の濃度（0.45 mg/mL）を最高処理濃度とし染色体異常試験を実施したが、0.11 mg/mL の濃度以外はすべて 50%以上の増殖率を示したことから、最高濃度を 1.8 mg/mL とし、公比 2 で 8 段階の濃度群（0.014、0.028、0.056、0.11、0.23、0.45、0.90、1.8 mg/mL）を設定し、染色体異常試験を再度実施した。細胞増殖率の測定および分裂指数の分析結果を基に、染色体分析を行う濃度群（S9 mix 非存在下:0.013、0.020、0.030 mg/mL、S9 mix 存在下:0.056、0.11、0.23 mg/mL）を決定し、染色体分析を実施した。その結果、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合いずれの処理群においても、染色体の構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的な有意差は認められなかった。

S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理において、陰性の結果が得られたことから、50%の増殖抑制濃度の 1.5 倍の濃度に相当する 0.045 mg/mL の濃度を最高処理濃度とし、公比 1.5 で 5 段階の濃度群（0.0089、0.013、0.020、0.030、0.045 mg/mL）を設定して連続処理法による染色体異常試験を実施した。染色体分析の結果、いずれの処理群（0.013、0.020、0.030 mg/mL）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な有意差は認められなかった。

以上の結果より、ジエチルビフェニルは、本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

[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、ジエチルビフェニルの染色体異常誘発作用を評価するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来細胞

(CHL/IU 細胞) を用いる染色体異常試験を実施した。なお、本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(昭和 62 年 3 月 31 日、環保業第 237 号、薬発第 306 号、62 基局第 303 号、一部改正平成 9 年 10 月 31 日、環保安第 287 号、衛生第 127 号、平成 09・10・31 基局第 2 号) 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) に基づき、「化学物質 GLP 」(平成 12 年 3 月 1 日改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号) を遵守して実施した。

[材料および方法]

1. 被験物質

被験物質であるジエチルビフェニル[略号:DEBP、英名:diethylbiphenyl、ロット番号:
、製造:]は淡黄色透明液体であり、
から提供を受けた。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、遮光して冷蔵(実測値:2～8℃)で保管した。

被験物質提供者において、実験終了後に返却した被験物質をガスクロマト法により非 GLP 下で分析した結果、被験物質は実験期間中安定であったことが確認された (Appendix 2)。なお、被験物質の関する資料(非 GLP データ)は、被験物質提供者の責任に基づき確認、提供された資料であることから、試験結果の信頼性を損なうものではないと判断した。

2. 陽性対照物質

陽性対照物質として用いたマイトマイシン C (MMC、ロット番号:353AJJ、協和醗酵工業) およびシクロホスファミド (CP、ロット番号:108H0568、Sigma Chemical) を日局注射用水 (ロット番号:K3G78 および K3K81、大塚製薬工場) に溶かし、用時調製して試験に用いた。

3. 細胞および培養条件

CHL/IU 細胞は染色体数のモードは 25 本で、染色体異常の検出感度にすぐれてい

ることから、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 月入手、入手時の継代数 4）し、継代後、液体窒素（-196℃）中に凍結保存（凍結保存時の継代数 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 2、4 および 6 代で試験に用いた。

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、CO_2 インキュベーター（5% CO_2、37℃）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）を処方に従って調製したものを用いた。

4. S9 反応液

S9（ロット番号:RAA-490、2003 年 9 月製造、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（β-$NADP^+$、オリエンタル酵母工業）および KCl を蒸留水に溶かし、混合液として超低温槽（-80℃）に保管し、使用時はこれに S9、$MgCl_2$ および HEPES (pH 7.2) を加え、S9 mix とした。試験には、10%CS/MEM:S9 mix を 25:5 の割合で混和した S9 反応液（3 mL/ディッシュ）を加えて処理を行った（各成分の最終濃度:5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-$NADP^+$、0.83 mmol/L $MgCl_2$、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性および懸濁性の予備検討の結果、被験物質は水に不溶であったが、ジメチルスルホキシド（DMSO）に本試験で必要な濃度で溶解したことから、DMSO（ロット番号:DWL9370、和光純薬工業）を溶媒（陰性対照）とし試験に用いた。被験物質を所定量秤量し、溶媒に溶解させて原液（細胞増殖抑制試験では 420 mg/mL、染色体異常試験では 90 mg/mL および 360 mg/mL）を用時調製した。それを溶媒で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 0.5 vol%添加して処理を行った。なお、被験物質を溶媒に溶解させた際、発熱、発泡、変色などの変化はなかった。

6. 細胞増殖抑制試験

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 細胞を、0.25%トリプシンを用いてはがした後、4×10^3個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL (2×10^4個) をディッシュ (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。なお、被験物質はプラスチックディッシュを溶解することから、本試験ではガラス製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 (3 mL/ディッシュ) と交換した後、溶媒 (陰性対照) または各濃度の被験物質調製液 (15 μL) を各ディッシュに添加し 6 時間処理した。その後、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS、Ca^{2+}および Mg^{2+}を含む) で洗浄し、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 (5 mL/ディッシュ) と交換した後、溶媒 (陰性対照) または各濃度の被験物質調製液 (25 μL) を各ディッシュに添加し 24 時間処理した。

いずれの処理条件においても、2.1 mg/mL (10 mmol/L) を最高処理濃度とし、0.016～2.1 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。なお、全ての処理条件において、処理開始時では 0.066 mg/mL 以上の濃度で、処理終了時では 0.13 mg/mL 以上の濃度で肉眼観察による沈殿が認められた。

培養終了後、培養液を捨て、0.02%EDTA 含有 PBS (Ca^{2+}およびMg^{2+}不含) をディッシュあたり 5 mL 加えて細胞をはがした。その細胞懸濁液 0.5 mL を ISOTON®II (Beckman Coulter) 9 mL に加え、コールターカウンター (Model D、Coulter Electronics) を用いてディッシュあたりの細胞数を測定し、被験物質処理群の陰性対照群に対する相対増殖率を求めた。

7. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験において、DEBP はすべての処理条件において CHL/IU 細胞の増殖を抑制し、各処理条件における 50%の増殖抑制濃度は、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合にはそれぞれ 0.030 mg/mL および 0.21 mg/mL、24 時間連

続処理した場合には 0.029 mg/mL と推定された（Figure 1）。

このことから染色体異常試験において、S9 mix 非存在下での短時間処理では、増殖率が急激に低下することを考慮して 50%の増殖抑制濃度の約 1.5 倍の濃度を最高処理濃度（0.045 mg/mL）とし、S9 mix 存在下での短時間処理では 50%の増殖抑制濃度の約 2 倍の濃度を最高処理濃度（0.45 mg/mL）とし、それぞれ公比 1.5 および公比 2 で計 5 濃度設定して試験を実施した。なお、S9 mix 存在下の短時間処理群については、最も低い増殖率（34%）を示した濃度群（0.11 mg/mL）ではディッシュ間のバラツキが認められ、それ以外の濃度群においては増殖抑制作用が弱く、増殖率が 50%を越えていたことから、1.8 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 2 で計 8 濃度を設定して再試験を実施した。連続処理群においては、50%の増殖抑制濃度の約 1.5 倍の濃度に相当する 0.045 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 1.5 で計 5 濃度を設定して試験を実施した。

染色体異常試験における試験操作は、細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。すべての処理系列で被験物質処理群、陰性（溶媒）対照群と陽性対照群を設けた。陽性対照群については、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では、MMC（20 μg/mL）および CP（1 mg/mL）を最終濃度がそれぞれ 0.1 μg/mL および 10 μg/mL となるように添加した。また、連続処理では、MMC（20 μg/mL）を最終濃度が 0.05 μg/mL となるように添加した。陽性対照については、染色体の構造異常が誘発されることが知られている濃度として上記濃度を選択した。1 濃度あたり 2 枚のディッシュを用いた。

培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 μg/mL となるように添加した。培養終了後、培養液を捨て、0.02%EDTA 含有 PBS（Ca^{2+}および Mg^{2+}不含）をディッシュあたり 5 mL 加えて細胞をはがし、15 mL の遠沈管に移した。陰性対照群と被験物質処理群については、0.5 mL の細胞懸濁液を 9 mL の ISOTON®II に加え、コールターカウンターを用いて細胞数の測定を行った。残りの細胞懸濁液については、遠沈（1000～1500 rpm、約 5 分）し、上清を捨て、3 mL の 0.075 mol/L KCl 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（メタノール:氷酢酸 = 3:1 (v/v)）を低張液の約 2 倍量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系識別番号、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 4～6 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、水道水で洗浄後、自然乾燥させた。試験計画番号、試験系識別番号および標本作製の日付を明示したスライドケースに、スライド標本をコード番号順に入れて保存した。

8. 染色体分析

染色体分析に先立って、各処理系列の相対増殖率および分裂指数を調べ、20%以上の相対増殖率で、かつ 2 ディッシュともに 0.5%以上の分裂指数の場合を観察可能と判断した。

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が分からない状態で分析した。染色体がよく拡がり、かつ散逸していない分裂中期細胞を捜し、1 群あたり 200 個（100 細胞/ディッシュ）の分裂中期細胞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）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 [1] による分類法に基づいて行った。ギャップについては、染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義し、構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

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（溶媒）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、フィッシャーの直接確率法により有意差の認められた処理条件については、コクラン・アーミテッジの傾向性検定 [3]（$p<0.01$、片側）により用量依存性の有無を検討した。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行った。

[結果および考察]

細胞増殖抑制試験の結果より、S9 mix 非存在下の短時間処理群では公比 1.5 で 5 濃度（0.0089、0.013、0.020、0.030、0.045 mg/mL）を設定し、S9 mix 存在下の短時間処理群では公比 2 で 8 濃度（0.014、0.028、0.056、0.11、0.23、0.45、0.90、1.8 mg/mL）を再設定して、染色体異常試験を実施した。

細胞増殖率の測定および分裂指数の分析を行った結果、染色体分析が可能な最高濃度（20%以上の増殖率でかつ 0.5%以上の分裂指数を示した濃度）は、S9 mix 非存在下の短時間処理では 0.030 mg/mL となったことから、その濃度を含め以下 3 濃度群を観察対象とした（Table 1)。一方、S9 mix 存在下の短時間処理では、処理開始時および処理終了時に肉眼観察により沈殿が観察された最低濃度の 0.23 mg/mL で最も強い増殖抑制作用（増殖率:33%）を示し、それ以上の濃度における増殖抑制作用は 0.23 mg/mL よりも弱く、一回目の試験と同じ結果が得られた（Table 2)。従って、染色体分析に際しては、最も強い増殖抑制作用を示した 0.23 mg/mL を含め以下 3 濃度群を観察対象とした。

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合、いずれの濃度群においても染色体の構造異常を有する細胞および倍数性細胞の統計学的な有意差は認められなかった（Tables 1、2)。

短時間処理法による試験で陰性の結果が得られたことから、細胞増殖抑制試験の結果に基づき 5 濃度（0.0089、0.013、0.020、0.030、0.045 mg/mL）を設定して 24 時間連続処理法による試験を実施した。染色体分析が可能な最高濃度は 0.030 mg/mL となったことから、その濃度を含め以下 3 濃度群を観察対象とし、染色体分析を行った。その結果、いずれの処理群においても染色体の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)。

陽性対照物質として用いた MMC は、S9 mix 非存在下で短時間処理および 24 時間連続処理した場合において染色体の構造異常を誘発し（Tables 1、3）、CP は S9 mix 存在下で短時間処理した場合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。

なお、DEBP 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で陰性の結果が得られている[4]。また、DEBP の基本骨格と考えられる biphenyl についてはマウス由来の S9 を用いた場合には染色体異常を誘発することが報告されているが、復帰突

然変異試験および発がん試験は陰性と報告されている[5),6)]。また、エチル基が一つの4-ethylbiphenylについては染色体異常試験で陰性の結果が報告されている[7)]。これらのことから、biphenylを基本骨格とする化合物は代謝活性化能の違いによっては染色体異常誘発作用を示す可能性があるが、今回の試験条件下では染色体異常誘発作用を示さないと考えられる。

以上の結果より、DEBPは、本試験条件下でCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

[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) 須井 哉:「ジエチルビフェニルの細菌を用いる復帰突然変異試験」, 試験計画番号: M-03-085, (2004)

5) 祖父尼 俊雄 監修:「染色体異常試験データ集 改訂1998年版」, エル・アイ・シー, 東京, p. 77 (1999)

6) 労働省労働基準局安全衛生部化学物質調査課 監修:「労働安全衛生法有害性調査制度に基づく既存化学物質変異原性試験データ集」, 社団法人化学物質安全・情報センター, 東京, pp. 229-230 (1986).

7) 厚生省生活衛生局企画課生活安全対策室 監修:「化学物質毒性試験報告 Vol.7」, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, pp. 601-632 (1999).

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with diethylbiphenyl (DEBP) for 6 h without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent[2] cell growth (%)	Mitotic[3] index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations[4] gap	ctb	cte	csb	cse	mul	total	Others[5]	Number of cells with aberrations +gap (%)	-gap (%)	Number[6] of polyploid cells (%)
Negative[1]	0	−	6 - (18)	100	——	100	0	2	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)
						100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
						200	1	2	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	1 (0.1)
DEBP	0.0089	−	6 - (18)	95	——	not observed											
DEBP	0.013	−	6 - (18)	96	——	100	0	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	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
						200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.1)
DEBP	0.020	−	6 - (18)	90	——	100	0	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	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
						200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DEBP	0.030	−	6 - (18)	58	7.8, 4.8	100	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
						200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)
DEBP	0.045	−	6 - (18)	25	1.2, 0.2	not observed due to the small number of metaphases											
MMC	0.1 μg/mL	−	6 - (18)	——	——	100	0	19	35	1	0	0	55	0	40 (40.0)	40 (40.0)	1 (0.3)
						100	3	12	36	1	0	0	52	0	39 (39.0)	38 (38.0)	0 (0.0)
						200	3	31	71	2	0	0	107	0	79 (39.5)	78 *(39.0)	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; MMC, mitomycin C.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 0.5 vol% per dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations.

6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

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

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with diethylbiphenyl (DEBP) for 6 h with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent[2] cell growth (%)	Mitotic[3] index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations gap	ctb	cte	csb	cse	mul[4]	total	Others[5]	Number of cells with aberrations +gap (%)	-gap (%)	Number[6] of polyploid cells (%)
Negative[1]	0	+	6 - (18)	100	—	100	1	3	0	1	0	0	5	0	5 (5.0)	4 (4.0)	0 (0.0)
						100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
						200	2	3	0	1	0	0	6	0	6 (3.0)	4 (2.0)	1 (0.1)
DEBP	0.014	+	6 - (18)	101	—	not observed											
DEBP	0.028	+	6 - (18)	92	—	not observed											
DEBP	0.056	+	6 - (18)	94	—	100	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)
						100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	2 (0.5)
						200	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	2 (0.3)
DEBP[pe]	0.11	+	6 - (18)	48	12.4, 3.6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.8)
						100	0	0	0	1	1	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)
						200	0	0	0	1	1	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	3 (0.4)
DEBP[pbe]	0.23	+	6 - (18)	33	8.0, 4.2	100	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	3 (0.8)
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)
						200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	5 (0.6)
DEBP[pbe]	0.45	+	6 - (18)	46	11.4, 6.0	not observed due to the presence of precipitation and less cytotoxicity than that at 0.23 mg/mL											
DEBP[pbe]	0.90	+	6 - (18)	68	11.0, 9.8	not observed due to the presence of precipitation and less cytotoxicity than that at 0.23 mg/mL											
DEBP[pbe]	1.8	+	6 - (18)	57	6.8, 8.6	not observed due to the presence of precipitation and less cytotoxicity than that at 0.23 mg/mL											
CP	10 μg/mL	+	6 - (18)	—	—	100	1	10	13	2	0	10	36	0	25 (25.0)	24 (24.0)	0 (0.0)
						100	1	13	23	2	0	0	39	0	27 (27.0)	27 (27.0)	3 (0.8)
						200	2	23	36	4	0	10	75	0	52 (26.0)	51 *(25.5)	3 (0.4)

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; CP, cyclophosphamide.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 0.5 vol% per dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

pe, precipitation was observed at the end of the treatment by the naked eyes.

pbe, precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment by the naked eyes.

*, 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 diethylbiphenyl (DEBP) for 24 h without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (h)	Concurrent[2] cell growth (%)	Mitotic[3] index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others[5]	Number of cells with aberrations		Number[6] of polyploid cells (%)
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul[4]	total		+gap (%)	-gap (%)	
Negative[1]	0	24	100	——	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
					200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.3)
DEBP	0.0089	24	102	——	not observed											
DEBP	0.013	24	100	——	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
					100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
					200	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.1)
DEBP	0.020	24	91	——	100	0	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	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
					200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DEBP	0.030	24	58	1.2, 1.6	100	0	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	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
					200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DEBP	0.045	24	21	Tox, Tox	not observed due to the small number of metaphases											
MMC	0.05 μg/mL	24	——	——	100	2	17	49	3	0	0	71	0	49 (49.0)	48 (48.0)	0 (0.0)
					100	2	23	51	3	1	0	80	0	49 (49.0)	48 (48.0)	2 (0.5)
					200	4	40	100	6	1	0	151	0	98 (49.0)	96 *(48.0)	2 (0.3)

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; MMC, mitomycin C; Tox, cytotoxic.

1) Dimethyl sulfoxide was used as a solvent and added at the level of 0.5 vol% per dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

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

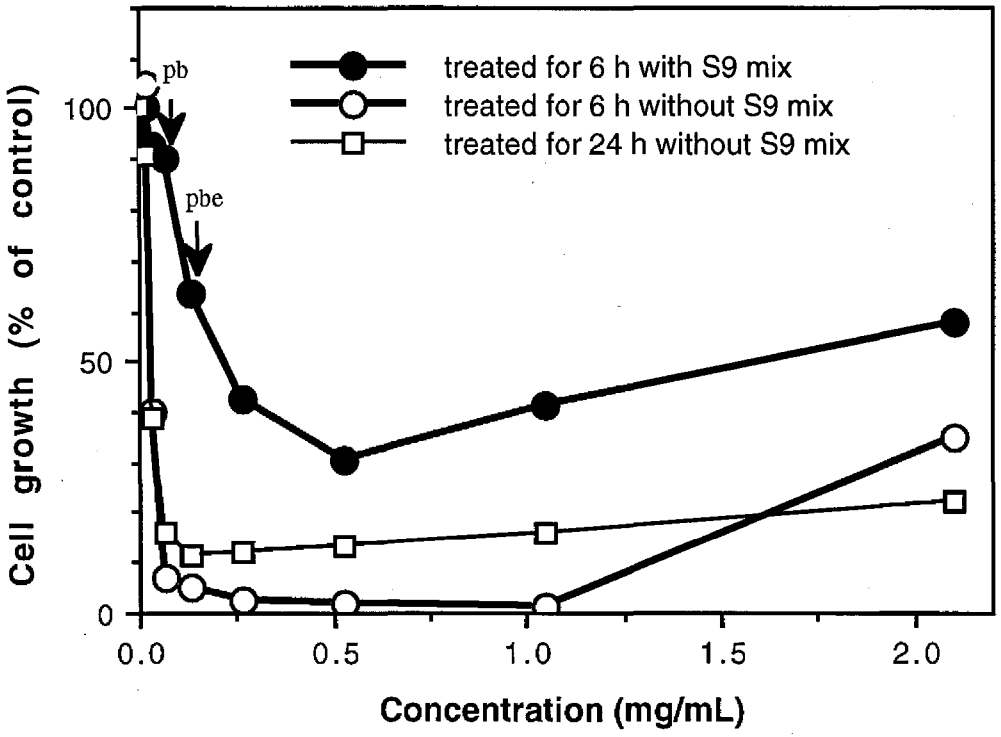

Figure1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with diethylbiphenyl

pb: Precipitation was observed at the beginning of the treatment at 0.066 mg/mL or more in all treatment systems by the naked eyes.

pbe: Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment at 0.13 mg/mL or more in all treatment systems by the naked eyes.