

M-1406

最 終 報 告 書

試験名：6H-ジベンゾ[c, e][1, 2]オキサホスホリン-6-オキシドの
ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：M-1406

試験期間：2010年3月12日-2011年6月30日

試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

2. 目次

2. 目次	3
5. 要約	11
6. 緒言	12
7. 試験材料及び方法	13
7.1 被験物質及び溶媒	13
7.1.1 被験物質	13
7.1.2 溶媒	13
7.2 被験液の調製	14
7.2.1 調製方法	14
7.2.2 調製頻度	14
7.2.3 安定性	14
7.2.4 濃度の確認	14
7.3 対照物質	15
7.3.1 陰性対照	15
7.3.2 陽性対照	15
7.4 使用細胞株	16
7.4.1 細胞株	16
7.4.2 細胞の選択理由	16

7.4.3	培養条件	16
7.4.4	性状検査	16
7.5	S9 mix 及び培養液の調製	17
7.5.1	S9 mix	17
7.5.2	培養液	18
7.6	試験方法 ¹⁻⁵⁾	18
7.6.1	識別方法	18
7.6.2	用量の設定	19
7.6.3	細胞増殖抑制試験	19
7.6.4	染色体異常試験	20
7.6.5	標本の観察	22
7.6.6	染色体異常の分類	22
7.6.7	判定基準	22
8.	試験結果	24
8.1	細胞増殖抑制試験	24
8.1.1	短時間処理法	24
8.1.2	連続処理法	24
8.2	染色体異常試験	25
8.2.1	短時間処理法	25
8.2.2	連続処理法	26
9.	考察	27
10.	参考文献	28



Fig. 1-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Short-term treatment: +S9 mix]

- Fig. 1-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 1-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Continuous treatment: 24hr]
- Fig. 1-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Continuous treatment: 48hr]

表

- Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Table 1-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Continuous treatment: 24hr]
- Table 1-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Continuous treatment: 48hr]

5. 要約

6H-ジベンゾ[c, e][1, 2]オキサホスホリン-6-オキシド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・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法では 2200 $\mu\text{g/mL}$ で、連続処理法では 1100 $\mu\text{g/mL}$ で 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では 1200.0 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 1457.5 $\mu\text{g/mL}$ 、更に連続処理法の 24 時間処理では 902.0 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 811.9 $\mu\text{g/mL}$ であった。これらの結果より、ガイドラインの規定を参照し、更に各処理における 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量における抑制率と 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を勘案しながら、短時間処理法及び連続処理法ともに、2200 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 2 で計 4 用量を設定することとした。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、短時間処理法及び連続処理法 48 時間処理ではすべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示した。一方、連続処理法 24 時間処理では、最高用量（2200 $\mu\text{g/mL}$ ）のみ疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示したが、同用量で処理時間の長い 48 時間処理において陰性の判定基準を満たしているため、確認試験は実施せず、陰性と判定した。

また、倍数性細胞の出現頻度は、短時間処理法及び連続処理法ともにすべての用量で陰性の判定基準である 5%未満であった。

なお、すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、6H-ジベンゾ[c, e][1, 2]オキサホスホリン-6-オキシドは本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数的異常は誘発しないと結論した。

M-1406

6. 緒言

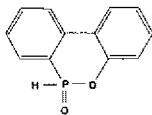
厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、6H-ジベンゾ[c, e][1, 2]オキサホスホリン-6-オキシドの安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。

M-1406

7. 試験材料及び方法

7.1 被験物質及び溶媒

7.1.1 被験物質

名称	:	6H-ジベンゾ[c, e][1, 2]オキサホスホリン-6-オキシド
英名称	:	6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide, 9,10-dihydro-9-oxa-10-phosphaphenanthrene10-oxide
CAS 番号	:	35948-25-5
構造式又は示性式	:	
分子量	:	216.17
純度	:	99.4%
融点	:	117.9°C
性状	:	白色粉末
入手量	:	25 g
安定性	:	実験終了後に、株式会社ボゾリサーチセンターにおいて安定性を測定し、実験期間中の安定性が確認された。
保存方法	:	冷暗所（許容範囲：1~10°C）（保存期間中の実測温度：3~6°C）
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室 冷蔵庫
返却	:	実験終了後、被験物質の残余物は、安定性を確認した後、すべて株式会社ボゾリサーチセンターにて廃棄した。

7.1.2 溶媒

名称	:	DMSO
ロット番号	:	PEH5762
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 遺伝毒性試験室
溶媒の選択理由	:	供試前試験を実施し、DMSO に対する溶解性を検討した。その結果、DMSO に対して、220 mg/mL の濃度で

溶解したため、DMSO を溶媒として用いることとした。

7.2 被験液の調製

7.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.4400 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 220 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2200 µg/mL）を調製した。次いで、220 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、110、55.0、27.5、13.8、6.88、3.44 及び 1.72 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

2) 染色体異常試験

被験物質 2.2000 g を 10 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 220 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2200 µg/mL）を調製した。次いで、220 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 3 段階希釈し、110、55.0 及び 27.5 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を調製した。

7.2.2 調製頻度

用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

7.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液が安定であることを確認した。

7.2.4 濃度の確認

染色体異常試験の短時間処理法及び連続処理法に用いた最高濃度及び最低濃度の被験液について、株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所において吸光光度法により濃度の確認を実施した。その結果、表示値に対する濃度の割合は、短時間処理法の最高濃度で 105.0%、最低濃度で 102.9%であった。また、連続処理法では、最高濃度で 108.6%、最低濃度で 108.7%であり、いずれの場合も許容範囲内（表示値に対する割合：100 ± 10%以内）であった。分析方法の概略を以下に示す。

1) 標準物質

名称	:	6H-ジベンゾ[c, e][1, 2]オキサホスホリン-6-オキシド
ロット番号	:	HF2MD
保存方法	:	冷暗所（許容範囲：1～10°C）（保存期間中実測温度：2～8°C）
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び生化学部標準物質保存場所

2) 吸光光度法測定条件

測定波長 : 289 nm
 対照試料 : エタノール
 セル : 1 cm 石英
 ゼロ補正 : 測定実施前に、対照セル及びサンプルセルにエタノールを入れ、ゼロ補正を実施した。
 測定順序 :

注入順序	注入回数	注入内容
1	3	標準溶液 (システム適合性用)
2	3	標準溶液 (定量用)
3	1	測定実測試料 (27.5 mg/mL)
4	1	測定実測試料 (220 mg/mL)

7.3 対照物質

7.3.1 陰性対照

溶媒として用いた DMSO を陰性対照とした。

7.3.2 陽性対照

1) 代謝活性化

シクロフォスファミド (CP)

ロット番号 : SDP4062
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 純度 : 生化学用 (97.0%以上)
 保存方法 : 冷蔵、遮光
 保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 発癌性物質冷蔵保存庫

2) 非代謝活性化

マイトマイシン C (MMC)

ロット番号 : 540AHK
 製造元 : 協和醗酵キリン株式会社
 力価 : 2 mg (力価) / 瓶
 保存方法 : 室温、遮光
 保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 発癌性物質室温保存庫

3) 調製方法

調製はすべて用時に行い、残余液はすべて一定期間貯蔵した後に焼却処分した。

(1) 染色体異常試験 短時間処理法 代謝活性化

CP 0.0140 g を γ 線滅菌済プラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 : K9F98) を 20 mL 加えて溶解し、0.70 mg/mL 溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加

えた。この時の最終濃度は $14 \mu\text{g/mL}$)。

(2) 染色体異常試験 短時間処理法 非代謝活性化

MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 : K9F98) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次に、この溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、 0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は $0.075 \mu\text{g/mL}$)。

(3) 染色体異常試験 連続処理法

MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 : 9H76N) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次に、この溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、 0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は $0.050 \mu\text{g/mL}$)。

4) 陽性対照物質の選択理由

遺伝毒性試験ガイドライン (前述 6.2) に使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

7.4 使用細胞株

7.4.1 細胞株

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。細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから 2009 年 11 月 25 日に入手し、継代培養を行ったものについて細胞の性状検査を実施して、適正であることが確認されたものを試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験で 9 継代、染色体異常試験の短時間処理法で 13 継代、染色体異常試験の連続処理法で 17 継代であった。

7.4.2 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常の発現率が低いこと、更に種々の化学物質の染色体異常誘発性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等の理由から本細胞を選択した。

7.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、 CO_2 濃度 5% 、温度 37°C 、高湿度条件下で培養した。継代は 1~4 日ごとに行った。

7.4.4 性状検査

定期的に実施される性状検査において、プレート上で単層状に増殖すること、細胞倍加時間が $15\sim 20$ 時間以内であること、染色体数の平均 (モード) が 25 本であること及びマイコプラズマによる汚染がないことが確認された細胞から、30 代を越えない

範囲で継代培養を行っているものを用いた。

7.5 S9 mix 及び培養液の調製

7.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素 (S9/コファクターC セット、ロット番号: C091218101、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。調製は使用時に行った。

1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	09121810
製造日	:	2009 年 12 月 18 日
種・系統	:	ラット・SD 系
性	:	雄
週齢	:	7 週齢
誘導物質	:	フェノバルビタール (PB) 及び 5, 6-ベンゾフラボン (BF)
投与方法	:	腹腔内投与
投与期間及び投与量	:	PB 4 日間 30+60+60+60 mg/kg body weight BF 1 日 80 mg/kg body weight
保存方法	:	冷凍 (超低温フリーザー)
使用期限	:	2010 年 6 月 17 日
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) 補酵素

名称	:	コファクターC
ロット番号	:	C09121610
製造日	:	2009 年 12 月 16 日
保存方法	:	冷凍 (超低温フリーザー)
使用期限	:	2010 年 6 月 15 日
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

3) S9 mix の組成

S9	2 mL		
補酵素	4.7 mL	20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	1.34 mL
		50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330 mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40 mmol/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

7.5.2 培養液

Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No. 11095) に、非働化 (56°C, 30 分) した牛血清 (bovine serum、BS) を 10 v/v% 添加して調製した培養液 (BS-MEM) を用いた。調製後の BS-MEM は冷蔵保存した。

1) 牛血清

ロット番号 : 731681
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存方法 : 冷凍 (-80°C 設定の冷凍庫)
 保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号 : 719708
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存方法 : 冷蔵
 保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 冷蔵庫

7.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下に示したステージの順に実施した。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法	代謝活性化
		非代謝活性化
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
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 時間処理 48 時間処理

7.6.1 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を「+」、非代謝活性化を「-」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対照 (Negative Control) の場合は「NC」を、被験物質処理群の場合は濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

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 (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使用機材等を識別した。

7.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 2200 µg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 1100、550、275、138、68.8、34.4 及び 17.2 µg/mL の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法では 2200 µg/mL で、連続処理法では 1100 µg/mL で 50% を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50% 細胞増殖抑制濃度 (概略値) は、短時間処理法の代謝活性化では 1200.0 µg/mL、非代謝活性化では 1457.5 µg/mL、更に連続処理法の 24 時間処理では 902.0 µg/mL、48 時間処理では 811.9 µg/mL であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50% 以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50% 以上抑制される用量を最高用量とする」との規定を参照し、更に各処理における 50% を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量における抑制率と 50% 細胞増殖抑制濃度 (概略値) を勘案しながら、短時間処理法及び連続処理法ともに、2200 µg/mL を最高用量として、以下、公比 2 で計 4 用量を設定することとした。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

7.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として実施した。なお、以下の無菌性を必要とする試験操作は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

1) 短時間処理法

(1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート (直径 60 mm) を用いた。プレートは各群 2 枚とした。

(2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞 (培養液 5.0 mL) を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。

(3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を牛血清添加生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。

- (4) 培養終了後、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度 99%以上）で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。
- 2) 連続処理法
- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群及び被験物質用量群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

7.6.4 染色体異常試験

以下の無菌性を必要とする試験操作は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 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 に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養

液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。

- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を牛血清添加生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075 M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所点滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞点滴後、1 日以上空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。
- (5) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

2) 連続処理法

- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは γ 線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- (2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL（最終濃度：0.050 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため 24 時間及び 48 時間の培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。その他は、短時間処理法と同様にして染色体標本を作製した。
- (4) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、24 時間及び 48 時間の培養の終了時に肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

7.6.5 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開し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。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。

7.6.6 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

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

- ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色分体型(csg)を含むギャップとは染色体又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。
- 染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸上から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もの。
- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
- 染色分体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色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。
- 染色分体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化(frg)など。

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。

倍数性 : polyploidy（核内倍加体：endoreduplication を含む）

7.6.7 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準¹⁾に従い染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率（%）によって以下のように判定した。

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 (+)

M-1406

構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合（TAG）と含まない場合（TA）とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

8. 試験結果

8.1 細胞増殖抑制試験

8.1.1 短時間処理法

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

1) 50%細胞増殖抑制濃度 (Appendix 2-1 及び Appendix 2-2)

代謝活性化及び非代謝活性化ともに 2200 µg/mL の用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は、代謝活性化では 1200.0 µg/mL、非代謝活性化では 1457.5 µg/mL だった。

2) 被験物質添加直後の観察 (Appendix 2-1 及び Appendix 2-2)

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 1100 µg/mL 以上の用量で黄色、550 µg/mL の用量で淡橙色の変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 2200 µg/mL の用量で析出物の固着が、1100 µg/mL の用量で析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の観察 (Appendix 2-1 及び Appendix 2-2)

代謝活性化及び非代謝活性化ともに 2200 µg/mL の用量で析出物の固着が、1100 µg/mL の用量で析出が認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 275 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊・形態変化が認められ、17.2 から 138 µg/mL の用量では異常は認められなかった。

8.1.2 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Appendix 1-3 及び Appendix 2-3 に、48 時間処理の結果を Appendix 1-4 及び Appendix 2-4 に示した。

1) 50%細胞増殖抑制濃度 (Appendix 2-3 及び Appendix 2-4)

24 時間処理法及び 48 時間処理法ともに 1100 µg/mL 以上の用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は、24 時間処理では 902.0 µg/mL、48 時間処理では 811.9 µg/mL だった。

2) 被験物質添加直後の観察 (Appendix 2-3 及び Appendix 2-4)

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 1100 µg/mL 以上の用量で黄色、550 µg/mL の用量で淡橙色の変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 2200 µg/mL の用量で析出物の固着が、1100 µg/mL の用量で析出が認められた。

3) 被験物質処理終了時の観察 (Appendix 2-3 及び Appendix 2-4)

24 時間処理及び 48 時間処理ともに 2200 µg/mL の用量で析出物の固着が、1100

μg/mLの用量で析出が認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24時間処理及び48時間処理ともに275 μg/mL以上の用量で細胞の浮遊・形態変化が認められ、17.2から138 μg/mLの用量では異常は認められなかった。

8.2 染色体異常試験

8.2.1 短時間処理法

代謝活性化の結果を Fig. 1-1、Table 1-1 及び Appendix 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2、Table 1-2 及び Appendix 3-2 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察 (Appendix 3-1 及び Appendix 3-2)

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化ともに1100 μg/mL以上の用量で黄色、550 μg/mLの用量で淡橙色の変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに2200 μg/mLの用量で析出物の固着が、1100 μg/mLの用量で析出が認められた。

2) 被験物質処理終了時の観察 (Appendix 3-1 及び Appendix 3-2)

代謝活性化及び非代謝活性化ともに2200 μg/mLの用量で析出物の固着が、1100 μg/mLの用量で析出が認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では550 μg/mL以上の用量で細胞の浮遊・形態変化が認められ、275 μg/mLでは異常は認められなかった。また、非代謝活性化ではすべての用量で細胞の浮遊・形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常 (Table 1-1 及び Table 1-2)

構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化においては、2200、1100、550 及び 275 μg/mL ではそれぞれ3.0、0、1.0 及び 0%と陰性の判定基準である5%未満であった。また、非代謝活性化においては、2200、1100、550 及び 275 μg/mL ではそれぞれ4.0、0、0.5 及び 1.0%と陰性の判定基準である5%未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数異常 (Table 1-1 及び Table 1-2)

数異常 (倍数体) の出現率は、代謝活性化においては、2200、1100、550 及び 275 μg/mL で全て0%と陰性の判定基準である5%未満であった。また、非代謝活性化においては、2200、1100、550 及び 275 μg/mL ではそれぞれ0.5、0.5、0 及び 0.5%と陰性の判定基準である5%未満であった。

なお、陰性対照群においては、染色体数異常の出現率は陰性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

8.2.2 連続処理法

24 時間処理の結果を Fig. 1-3、Table 1-3 及び Appendix 3-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4、Table 1-4 及び Appendix 3-4 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察 (Appendix 3-3 及び Appendix 3-4)

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 1100 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で黄色、550 $\mu\text{g/mL}$ の用量で淡橙色の変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 2200 $\mu\text{g/mL}$ の用量で析出物の固着が、1100 $\mu\text{g/mL}$ の用量で析出が認められた。

2) 被験物質処理終了時の観察 (Appendix 3-3 及び Appendix 3-4)

24 時間処理及び 48 時間処理ともに 2200 $\mu\text{g/mL}$ の用量で析出物の固着が、1100 $\mu\text{g/mL}$ の用量で析出が認められた。被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理及び 48 時間処理ともにすべての用量で細胞の浮遊・形態変化が認められた。

3) 染色体構造異常 (Table 1-3 及び Table 1-4)

構造異常の出現率 (TA) は、24 時間処理においては、2200 $\mu\text{g/mL}$ では 9.5%と疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示し、1100、550 及び 275 $\mu\text{g/mL}$ ではそれぞれ 0、0 及び 0.5%と陰性の判定基準である 5%未満であった。一方、48 時間処理においては、2200、1100、550 及び 275 $\mu\text{g/mL}$ ではそれぞれ 2.0、0.5、0 及び 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

4) 染色体数的異常 (Table 1-3 及び Table 1-4)

数的異常 (倍数体) の出現率は、24 時間処理においては、2200、1100、550 及び 275 $\mu\text{g/mL}$ ではそれぞれ 0、0.5、0 及び 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、48 時間処理においては、2200、1100、550 及び 275 $\mu\text{g/mL}$ ではそれぞれ 0、0、0 及び 1.0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。

なお、陰性対照群においては、染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあった。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

9. 考察

6H-ジベンゾ[c, e][1, 2]オキサホスホリン-6-オキシド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・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU）を用いた染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、短時間処理法及び連続処理法 48 時間処理ではすべての用量で陰性の判定基準である 5%未満を示した。一方、連続処理法 24 時間処理では、最高用量（2200 µg/mL）のみ疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示したが、同用量で処理時間のより長い 48 時間処理において陰性の判定基準を満たしているため、確認試験は実施せず、陰性と判定した。なお、24 時間処理での染色体異常は細胞増殖抑制率の高い濃度で検出されていることから、非特異的な染色体異常が考えられる。

また、倍数性細胞の出現頻度は、短時間処理法及び連続処理法ともにすべての用量で陰性の判定基準である 5%未満であった。

すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。従って、試験は適切に実施されたと考えられた。

なお、6H-ジベンゾ[c, e][1, 2]オキサホスホリン-6-オキシドは微生物を用いる復帰突然変異試験(Ames 試験)⁶⁾及び CHL 細胞を用いる染色体異常試験⁷⁾において、それぞれ陰性と報告されている。

以上の結果から、6H-ジベンゾ[c, e][1, 2]オキサホスホリン-6-オキシドは本試験条件下において染色体構造異常及び染色体数的異常は誘発しないと結論した。

10. 参考文献

- 1) 石館基監修 (1987) : <改訂>染色体異常試験データ集、pp.19-24、エル・アイ・シー、東京
- 2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* – A screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, 48, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M and Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutat. Res.*, 66, 277-290
- 4) 石館 基 (1982) : 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
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271
- 6) Hachiya, N. Evaluation of chemical genotoxicity by a series of short term tests. *Akita Igaku* 1987, 14 (2), 269-292.
- 7) Ryu, J. C.; Lee, S.; Kim, K. R.; Park, J. Evaluation of the genetic toxicity of synthetic chemicals (I). Chromosomal aberration test on Chinese hamster lung cells *in vitro*. *Environ. Mutag. Carcinog.* 1994, 14 (2), 138-144.

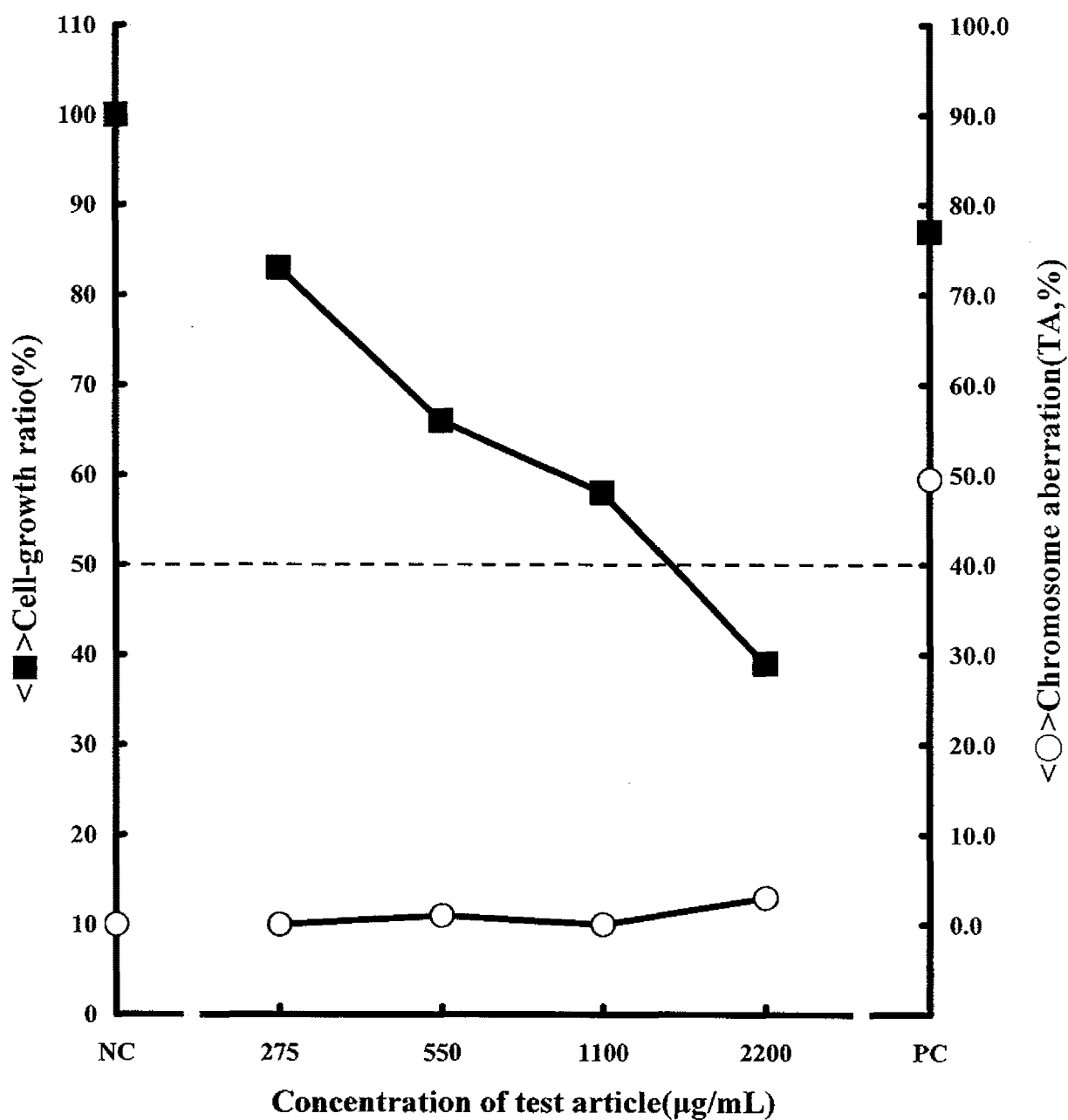


Fig. 1-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 µg/mL)

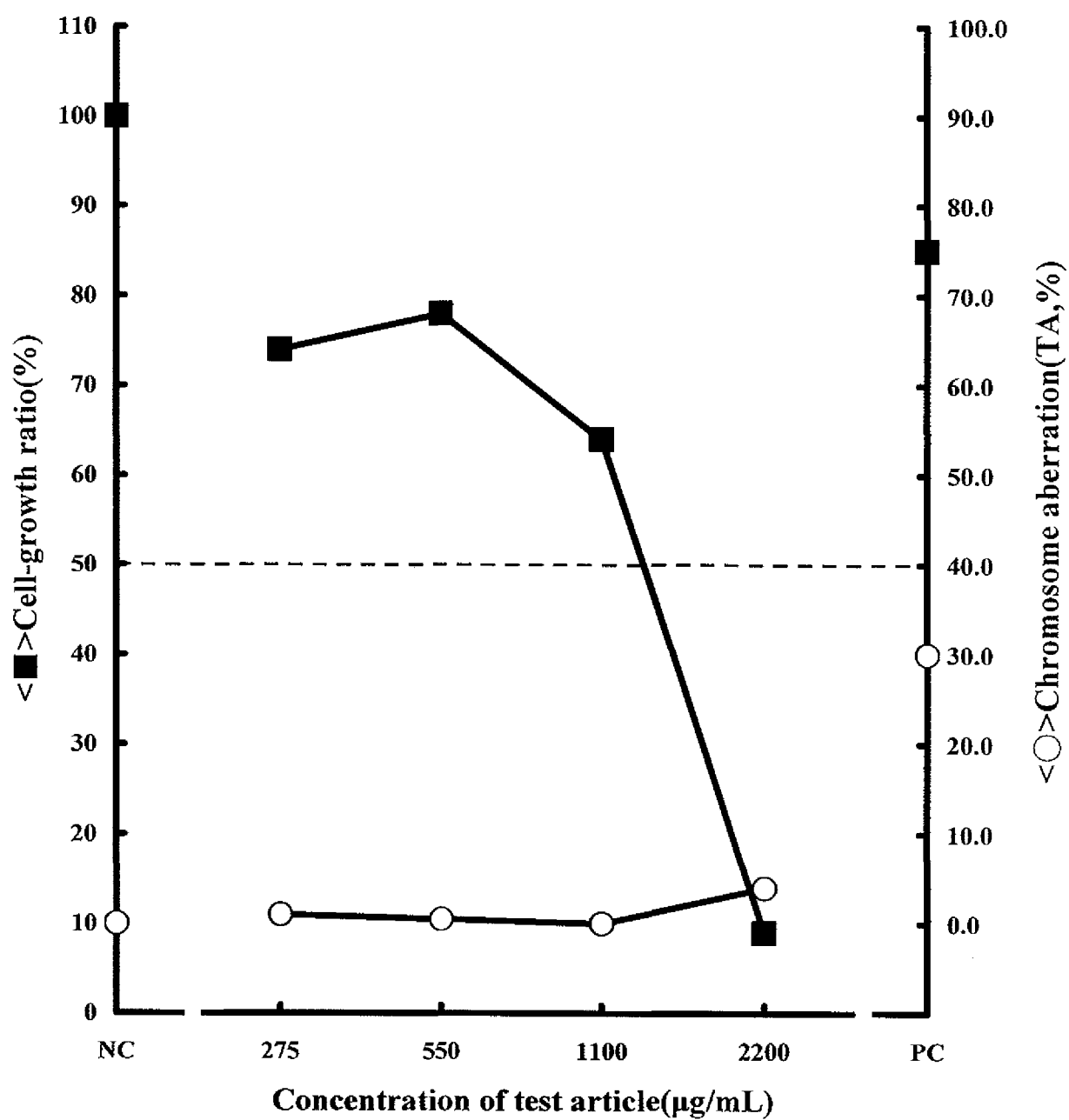


Fig. 1-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 µg/mL)

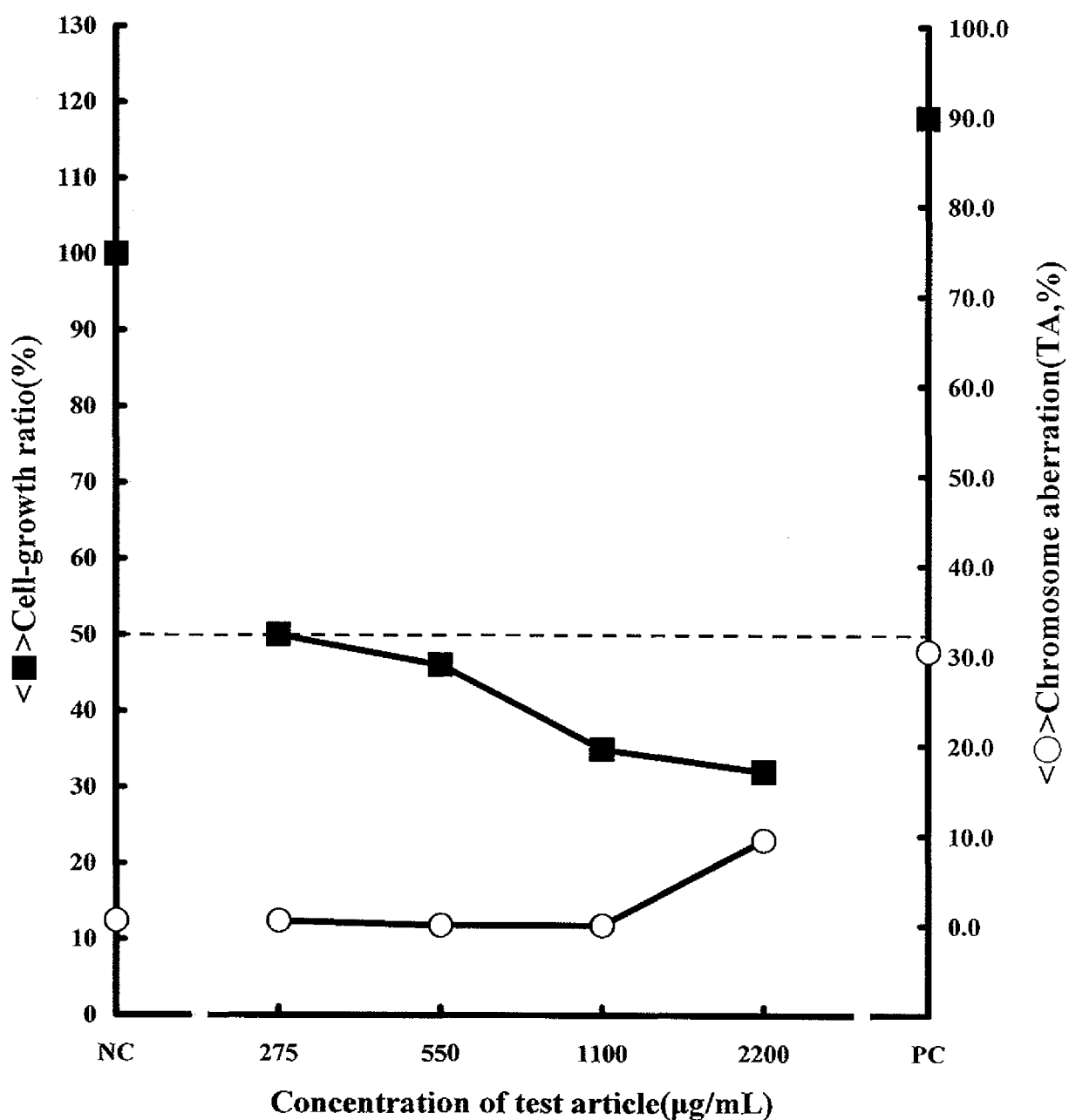


Fig. 1-3

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 µg/mL)

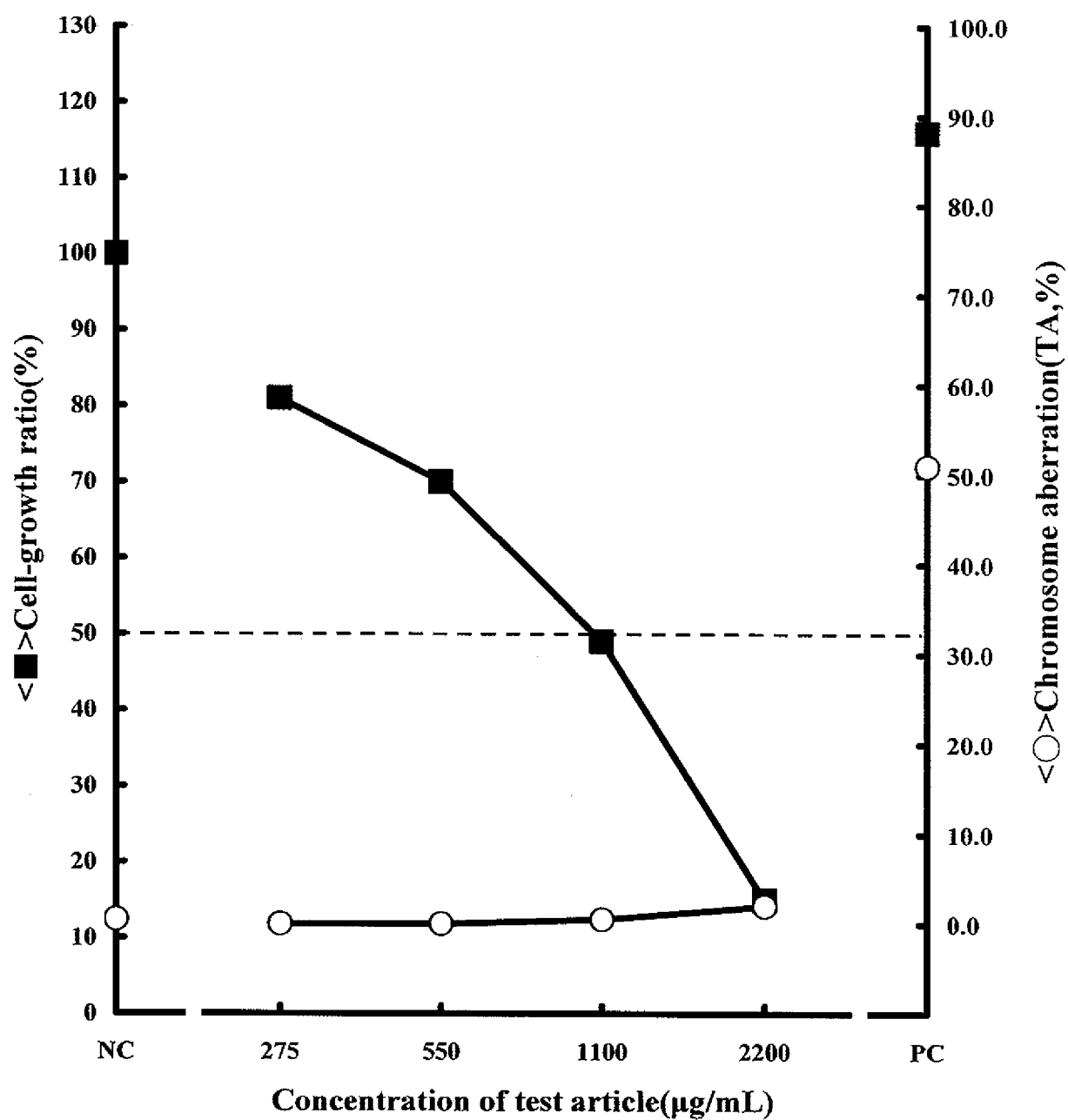


Fig. 1-4

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 µg/mL)

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Short-term treatment: +S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)										Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge- ment		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	
6-18	+	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	04-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	0	92-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		275	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	87	100	0	0	0	17-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	79	100	0	0	0	16-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(83)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		550	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	62	100	0	0	0	70-1
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	70	100	0	0	0	45-1
			200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	-	(66)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		1100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	74	100	0	0	0	24-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	41	100	0	0	0	22-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(58)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		2200	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	41	100	0	0	0	95-1
			100	3	4	0	0	0	5	0	5	-	37	100	0	0	0	68-1
			200	3(1.5)	5(2.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	6(3.0)	0(0.0)	6(3.0)	-	(39)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		PC	100	5	48	0	0	0	50	0	50	+	83	100	0	0	0	89-1
			100	3	48	0	0	0	49	0	49	+	91	100	0	0	0	53-1
			200	8(4.0)	96(48.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	99(49.5)	0(0.0)	99(49.5)	+	(87)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.		
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge- ment	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)	Judge- ment
6-18	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	52-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		90	100	0	0	0		- 69-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		275	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	81	100	1	0	1	93-1	
			100	0	1	0	0	0	1	0	1		59	100	0	0	0		- 43-1
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		(74)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		550	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	77	100	0	0	0	97-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		72	100	0	0	0		- 14-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(78)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		1100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	59	100	1	0	1	51-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		63	100	0	0	0		- 10-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(64)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		2200	100	2	4	0	0	0	5	0	5	-	4	100	0	0	0	84-1	
			100	0	3	0	0	0	3	0	3		13	100	1	0	1		- 36-1
			200	2(1.0)	7(3.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	8(4.0)	0(0.0)	8(4.0)		(9)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		PC	100	5	26	0	0	0	29	0	29	+	81	100	0	0	0	03-1	
			100	5	26	0	0	0	31	0	31		81	100	0	0	0		- 18-1
			200	10(5.0)	52(26.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	60(30.0)	0(0.0)	60(30.0)		(85)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Continuous treatment:24hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)										Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.	
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge- ment		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)		Judge- ment
24-0	-	NC	100	0	1	0	0	0	1	0	1		100	100	0	0	0		35-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	55-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		275	100	0	1	0	0	0	1	0	1		64	100	0	0	0		61-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	35	100	0	0	0	-	31-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(50)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		550	100	0	0	0	0	0	0	0	0		42	100	0	0	0		19-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	49	100	0	0	0	-	33-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(46)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		1100	100	0	0	0	0	0	0	0	0		21	100	1	0	1		02-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	49	100	0	0	0	-	37-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(35)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		2200	90	4	9	0	0	0	11	0	11		28	90	0	0	0		26-1
			10	0	1	0	0	0	1	0	1			10	0	0	0		26-2
			100	3	4	0	0	0	7	0	7	±	35	100	0	0	0	-	47-1
			200	7(3.5)	14(7.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	19(9.5)	0(0.0)	19(9.5)		(32)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		PC	100	5	27	0	0	0	31	0	31		121	100	0	0	0		28-1
			100	4	28	0	0	0	30	0	30	+	114	100	1	0	1	-	48-1
			200	9(4.5)	55(27.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	61(30.5)	0(0.0)	61(30.5)		(118)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 6H-Dibenz[c,e][1,2]oxaphosphorin-6-oxide
[Continuous treatment:48hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)									Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.		
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Judge- ment	Cells observed	Polyploid cells	other		Total (%)	Judge- ment
48-0	-	NC	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	100	100	0	0	0	96-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		109	100	0	0	0	-	54-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		275	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	89	100	1	0	1	42-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		80	100	1	0	1	-	50-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(81)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		550	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	73	100	0	0	0	11-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		73	100	0	0	0	-	44-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		(70)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		1100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	46	100	0	0	0	73-1	
			100	0	1	0	0	0	1	0	1		56	100	0	0	0	-	15-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(49)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		2200	53	0	0	0	0	0	0	0	0	-	19	53	0	0	0	49-1	
			47	1	0	0	0	0	1	0	1			47	0	0	0	49-2	
			88	1	2	0	0	0	3	0	3		13	88	0	0	0	-	20-1
			12	0	0	0	0	0	0	0	0			12	0	0	0	20-2	
			200	2(1.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	0(0.0)	4(2.0)		(15)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		PC	100	6	45	0	0	0	49	0	49	+	123	100	0	0	0	59-1	
			100	11	46	0	0	0	53	0	53		120	100	1	0	1	-	74-1
			200	17(8.5)	91(45.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	102(51.0)	0(0.0)	102(51.0)		(116)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,
other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050µg/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio (%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.