

食薬セ研第 12-1902 号

2002 年 4 月 12 日

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールの  
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

厚生労働省医薬局審査管理課 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
緒 言 -----	2
材料および方法 -----	3
1. 被験物質 -----	3
2. 陽性対照物質 -----	3
3. 細胞および培養条件 -----	3
4. S9 反応液 -----	3
5. 被験物質調製液の調製 -----	4
6. 細胞増殖抑制試験 -----	4
7. 染色体異常試験 -----	5
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]

2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールのチャイニーズ・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。

S9 mix 非存在下 (MEM 培地中) および存在下 (MEM 培地の代わりに S9 反応液を使用) で短時間処理 (6 時間処理後 18 時間の回復時間) した場合、3.2 mg/mL (10 mmol/L) の濃度においても増殖抑制作用は認められなかった。また、連続処理 (新鮮培地中で 24 時間処理) した場合においても、50%を越える増殖抑制作用は認められなかった。

これらの結果に基づき、3.2 mg/mL の濃度を最高処理濃度とし、4 段階の濃度群 (0.40、0.80、1.6、3.2 mg/mL、公比 2) を設定して短時間処理法による染色体異常試験を実施した。染色体分析に先立ち、細胞増殖率の測定および分裂指数の結果をもとに、染色体分析を行う濃度群を決定し、染色体分析を実施 (0.80、1.6、3.2 mg/mL) 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いずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。そこで、3.2 mg/mL の濃度を最高処理濃度とし、5 段階の濃度群 (0.20、0.40、0.80、1.6、3.2 mg/mL、公比 2) 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。細胞増殖率の測定および分裂指数の結果から、染色体分析を行う濃度群を決定し、染色体分析を実施 (0.80、1.6、3.2 mg/mL) した結果、いずれの処理群においても、構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。

以上の結果より、2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールは染色体異常を誘発しないと判断した。

## [緒 言]

化学物質の遺伝毒性を評価するための短期検索法の一つとして、哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験がある。染色体異常には、大別して構造異常（ギャップ、切断、交換）と数的異常（倍数性細胞、異数性細胞）があり、前者はDNA傷害、後者は細胞の分裂機構の異常などを反映している。

変異原物質の細胞内の標的（DNA または紡錘系など）に対する作用は、直接作用する場合と、代謝活性化されて変異原活性が現れる場合に大別される。しかしながら、試験管内の変異原性試験に用いる微生物や培養細胞では、代謝活性化能が無いかあるいはあっても活性が低いことから、代謝活性化後の化学物質の変異原活性を検出するために、一般的にはラットの肝臓から調製した肝ホモジネート 9000×g 上清（S9）を用いる。染色体異常試験においては、直接作用を検出するための処理系列として、S9 mix 非存在下での短時間処理に加えて連続処理があり、代謝活性化作用をみるための処理系列として S9 mix 存在下での短時間処理がある。

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、2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾー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）に準拠し、「化学物質 GLP」（昭和 59 年 3 月 31 日、環保業第 39 号、薬発第 229 号、59 基局第 85 号、改訂昭和 63 年 11 月 18 日、環企研第 233 号、衛生第 38 号、63 基局第 823 号、平成 12 年 3 月 1 日一部改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号）に基づいて実施した。

## [材料および方法]

### 1. 被験物質

被験物質である 2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾール [略称: HBBT、英名: 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole、CAS No.: 3846-71-7、ロット番号:                   製造:                   ] は淡黄色粉末固体であり、                   から提供された後、室温保管した。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。

### 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 (MC、ロット番号: 328AJF、協和醗酵工業) およびシクロホスファミド (CPA、ロット番号: 108H0568、Sigma Chemical) は日局注射用水 (ロット番号: K1C75 および K1F70、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、倍加時間約 15 時間、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°C) 中に凍結保存 (現在の継代数 21) した。その細胞 (マイコプラズマの汚染のないことを確認済み) を、解凍後、継代 10 代以内で試験に用いた。

培養には、仔牛血清 (CS、ロット番号: 28110754、Cansera International) を 10 vol% 添加したイーグル MEM 培養液 (10%CS/MEM) を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) 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を用いた。

### 4. S9 反応液

S9 (ロット番号: RAA-440 および RAA-448、2001 年 2 月製造および 2001 年 7 月製造、キッコーマン) は、フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンとを投与した 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（ $-80^{\circ}\text{C}$ ）に保管した。グルコース-6-リン酸（G-6-P、Sigma Chemical）、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（ $\beta$ -NADP<sup>+</sup>、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（ $-80^{\circ}\text{C}$ ）に保管し、使用時はこれに S9、MgCl<sub>2</sub> および HEPES（pH 7.2）を加え、S9 mix とした。試験には、MEM（血清不含）:2×MEM（血清不含）:S9 mix を 14:8:5 の割合で混和した S9 反応液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  $\beta$ -NADP<sup>+</sup>、0.83 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、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、染色体異常試験で必要とされる濃度で、水、ジメチルスルホキシドおよびアセトンに不溶であることから、カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC Na、ロット番号:WTH1105、和光純薬工業）の 0.5 w/v% 水溶液を媒体（陰性対照）とし、使用時に乳鉢を用いて被験物質を 0.5% CMC Na に懸濁させ、試験に用いた。

## 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、 $4 \times 10^3$  個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL ( $2 \times 10^4$  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。

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血清を含まない培養液（それぞれ MEM および S9 反応液、2.7 mL/ディッシュ）と交換した後、媒体（陰性対照）または各濃度の被験物質調製液（0.3 mL、10 vol%）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<sup>2+</sup> および Mg<sup>2+</sup> を含む）で洗浄し、新鮮な培養液（10%CS/MEM）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新鮮な培養液（4.5 mL/ディッシュ）と交換した後、媒体（陰性対照）または各濃度の被験物質調製液（0.5 mL、10 vol%）を添加し 24 時間処理した。

いずれの処理条件においても、0.10～3.2 mg/mL (10 mmol/L) 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。

培養終了後、10 vol%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™、オリンパス光学工業) を用い、陰性対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測した。

## 7. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験において、HBBT は S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合、CHL/IU 細胞の増殖を抑制しなかった (Fig. 1)。また、24 時間連続処理した場合には、弱い増殖抑制作用が認められたが、3.2 mg/mL (10 mmol/L) の濃度においても 50%以上の増殖率を示した (Fig. 1)。

このことから染色体異常試験において、短時間処理群では 3.2 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 2 で計 4 濃度を設定して試験を実施した。また、連続処理群では 3.2 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 2 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いては 1 濃度あたり 4 枚のディッシュ (ただし、無処理対照群および陽性対照群では 2 枚) を用い、そのうちの 2 枚より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。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 (0.5 w/v% CMC Na) 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、MC (原液濃度: 20 µg/mL) および CPA (原液濃度: 1 mg/mL) を最終濃度がそれぞれ 0.1 µg/mL および 5 µg/mL となるように添加した。また、連続処理では、MC (原液濃度: 20 µg/mL) を最終濃度が 0.05 µg/mL となるように添加した。また、実験毎に無処理対照群も設けた。

染色体標本用のディッシュについては、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<sup>2+</sup> および Mg<sup>2+</sup> 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。遠沈 (1000～1500 rpm、5 分) し、上清を捨てた後、3 mL の 0.075 mol/L KCl 水溶液を加え、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、ピペッティングし遠沈した。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、空気乾燥した。

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 3vol%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、水ですすいで風乾した。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<sup>1)</sup>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（媒体）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<sup>2)</sup>（ $p < 0.01$ ）により有意差検定を実施した。また、コ克蘭・アーミテッジの傾向性検定<sup>3)</sup>（ $p < 0.01$ ）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、4 濃度 (0.40、0.80、1.6、3.2 mg/mL、公比 2) を設定して短時間処理法による試験を実施した。

染色体分析に先立ち、細胞増殖率および分裂指数の測定を行った結果 (Tables 1、2)、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 非存在下および存在下の短時間処理では、ともに 3.2 mg/mL となった。従って、染色体分析に際してはそれらの濃度を含め以下 3 濃度群を観察対象とし、染色体分析を行った。その結果、短時間処理したいずれの処理群においても染色体異常の有意な増加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 (0.20、0.40、0.80、1.6、3.2 mg/mL、公比 2) を設定して 24 時間連続処理法による試験を実施した。細胞増殖率および分裂指数の測定を行った結果 (Table 3)、染色体分析が可能な最高濃度は、3.2 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異常の有意な増加は認められなかった (Table 3)。

なお、被験物質による処理開始時および処理終了時ともに、いずれの処理群においても沈殿が認められた。

陽性対照物質として用いた MC 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)、CPA 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、HBBT 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も陰性の結果が得られている<sup>4)</sup>。また関連物質である 2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-メチルフェノール (butylated hydroxytoluene)<sup>5)</sup>については復帰突然変異試験および染色体異常試験で陰性、*p-tert*-ブチルフェノール<sup>6)</sup>、2-*tert*-ブチルフェノール<sup>7)</sup>および 2,4-ジ-*tert*-ブチルフェノール<sup>8)</sup>については、復帰突然変異試験で陰性、染色体異常試験で陽性の結果が報告されている。これらのことから、*tert*-ブチルフェノールの染色体異常誘発活性が、他の置換基が結合することにより失われることが示唆された。

以上の結果より、HBBT 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」, サイエンス社, 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) 原 巧 他：「2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾールの細菌を用いる復帰突然変異試験」, 食薬セ研第 12-1898 号 (2002)
- 5) 祖父尼俊雄 監修：染色体異常試験データ集改定 1998 年版, エル・アイ・シー, 東京, p. 92 (1999)
- 6) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修：化学物質毒性試験報告, vol. 4, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p. 277 (1996)
- 7) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 監修：化学物質毒性試験報告, vol. 8, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p. 201 (2001)
- 8) 厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 監修：化学物質毒性試験報告, vol. 8, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京, p. 363 (2001)

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole (HBBT)\*\* for 6 h without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent <sup>2)</sup> cell growth (%)	Mitotic <sup>3)</sup> index (%)	Number of cells analysed	Number of structural aberrations							Others <sup>5)</sup>	Total number of cells with aberrations		Number <sup>6)</sup> of polyploid cells (%)	Trend test <sup>7)</sup>		
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>4)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL	
Non-treatment				—	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.00 )			
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.00 )			
						200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.00 )			
Negative <sup>1)</sup> 0		—	6 - (18)	100.0	—	100	1	0	2	0	0	0	3	0	3 ( 3.0 )	2 ( 2.0 )	0 ( 0.00 )			
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.00 )			
						200	1	0	2	0	0	0	3	0	3 ( 1.5 )	2 ( 1.0 )	0 ( 0.00 )			
HBBT	0.40 †	—	6 - (18)	107.0	—		not observed													
HBBT	0.80 †	—	6 - (18)	111.5	—	100	0	0	1	1	0	0	2	0	2 ( 2.0 )	2 ( 2.0 )	0 ( 0.00 )			
						100	2	0	0	1	0	0	3	0	3 ( 3.0 )	1 ( 1.0 )	1 ( 0.25 )			
						200	2	0	1	2	0	0	5	0	5 ( 2.5 )	3 ( 1.5 )	1 ( 0.13 )			
HBBT	1.6 †	—	6 - (18)	118.5	—	100	0	0	0	1	0	0	1	0	1 ( 1.0 )	1 ( 1.0 )	0 ( 0.00 )			
						100	0	1	1	0	0	0	2	0	2 ( 2.0 )	2 ( 2.0 )	1 ( 0.25 )			
						200	0	1	1	1	0	0	3	0	3 ( 1.5 )	3 ( 1.5 )	1 ( 0.13 )			
HBBT	3.2 †	—	6 - (18)	113.0	8.4, 8.0	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 ( 2.0 )	1 ( 1.0 )	1 ( 0.25 )			
						100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.25 )			
						200	2	1	0	0	0	0	3	0	3 ( 1.5 )	1 ( 0.5 )	2 ( 0.25 )			
MC	0.1 µg/mL	—	6 - (18)	—	—	100	4	34	61	0	1	10	110	0	61 ( 61.0 )	59 ( 59.0 )	0 ( 0.00 )			
						100	12	42	66	0	1	0	121	0	68 ( 68.0 )	63 ( 63.0 )	0 ( 0.00 )			
						200	16	76	127	0	2	10	231	0	129 ( 64.5 )	122* ( 61.0 )	0 ( 0.00 )			

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; TAG, total number of cells with aberrations including gaps; TA, total number of cells with aberrations excluding gaps; MC, mitomycin C.

1) Carboxymethylcellulose sodium (0.5 w/v%) solution was used as vehicle and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 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 analysed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01.

\*, Significantly different from the negative control at p<0.01 by Fisher's exact probability test.

\*\*\*, Purity was 100 wt%, and water (0.01%) was contained as impurity.

†, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole (HBBT)\*\* for 6 h with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent <sup>2)</sup> cell growth (%)	Mitotic <sup>3)</sup> index (%)	Number of cells analysed	Number of structural aberrations							Others <sup>5)</sup>	Total number of cells with aberrations		Number <sup>6)</sup> of polyploid cells (%)	Trend test <sup>7)</sup>		
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul <sup>4)</sup>	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL	
Negative <sup>1)</sup>	0	+	6 - (18)	100.0	—	100	0	2	4	0	0	0	6	0	2 ( 2.0 )	2 ( 2.0 )	1 ( 0.25 )			
						100	2	0	0	0	0	2	0	2 ( 2.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.00 )				
						200	2	2	4	0	0	8	0	4 ( 2.0 )	2 ( 1.0 )	1 ( 0.13 )				
HBBT	0.40 †	+	6 - (18)	98.5	—	not observed														
HBBT	0.80 †	+	6 - (18)	95.0	—	100	0	1	0	1	0	0	2	0	2 ( 2.0 )	2 ( 2.0 )	1 ( 0.25 )			
						100	0	0	0	0	1	1	0	1 ( 1.0 )	1 ( 1.0 )	0 ( 0.00 )				
						200	0	1	0	1	1	3	0	3 ( 1.5 )	3 ( 1.5 )	1 ( 0.13 )				
HBBT	1.6 †	+	6 - (18)	95.5	—	100	0	0	1	3	0	0	4	0	2 ( 2.0 )	2 ( 2.0 )	0 ( 0.00 )			
						100	4	1	0	5	0	10	1	6 ( 6.0 )	2 ( 2.0 )	0 ( 0.00 )				
						200	4	1	1	8	0	14	1	8 ( 4.0 )	4 ( 2.0 )	0 ( 0.00 )				
HBBT	3.2 †	+	6 - (18)	97.0	6.2, 5.6	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.25 )			
						100	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.00 )				
						200	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.13 )				
CPA	5 µg/mL	+	6 - (18)	—	—	100	3	10	23	0	0	0	36	0	30 ( 30.0 )	28 ( 28.0 )	0 ( 0.00 )			
						100	2	19	24	0	0	0	45	0	36 ( 36.0 )	34 ( 34.0 )	0 ( 0.00 )			
						200	5	29	47	0	0	0	81	0	66 ( 33.0 )	62* ( 31.0 )	0 ( 0.00 )			

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; TAG, total number of cells with aberrations including gaps; TA, total number of cells with aberrations excluding gaps; CPA, cyclophosphamide.

1) Carboxymethylcellulose sodium (0.5 w/v%) solution was used as vehicle and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 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 analysed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01.

\*, Significantly different from the negative control at p<0.01 by Fisher's exact probability test.

\*\*\*, Purity was 100 wt%, and water (0.01%) was contained as impurity.

†, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert* -butylphenyl)benzotriazole (HBBT)\*\* for 24 h without S9 mi

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (h)	Concurrent <sup>2)</sup> cell growth (%)	Mitotic <sup>3)</sup> index (%)	Number of cells analysed	Number of structural aberrations							Others <sup>5)</sup>	Total number of cells with aberrations		Number <sup>6)</sup> of polyploid cells (%)	Trend test <sup>7)</sup>	
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul	total		TAG (%)	TA (%)		TA	POL
Non-treatment					100	1	0	0	0	0	10	11	0	2 ( 2.0 )	1 ( 1.0 )	2 ( 0.50 )		
					100	2	1	0	0	0	0	3	0	3 ( 3.0 )	1 ( 1.0 )	1 ( 0.25 )		
					200	3	1	0	0	0	10	14	0	5 ( 2.5 )	2 ( 1.0 )	3 ( 0.38 )		
Negative <sup>1)</sup>	0	24	100.0	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.00 )		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.00 )			
					200	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.00 )			
HBBT	0.20 †	24	99.0	—									not observed					
HBBT	0.40 †	24	96.0	—									not observed					
HBBT	0.80 †	24	92.5	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.25 )		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.25 )			
					200	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	2 ( 0.25 )			
HBBT	1.6 †	24	91.5	—	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.00 )		
					100	0	3	0	0	0	0	3	0	3 ( 3.0 )	3 ( 3.0 )	3 ( 0.75 )		
					200	1	3	0	0	0	0	4	0	4 ( 2.0 )	3 ( 1.5 )	3 ( 0.38 )		
HBBT	3.2 †	24	82.5	6.8, 6.4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	2 ( 0.50 )		
					100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 1.0 )	1 ( 1.0 )	1 ( 0.25 )		
					200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	3 ( 0.38 )		
MC	0.05 µg/mL	24	—	—	100	3	19	52	0	0	0	74	1	51 ( 51.0 )	48 ( 48.0 )	1 ( 0.25 )		
					100	3	26	47	1	0	0	77	0	56 ( 56.0 )	54 ( 54.0 )	0 ( 0.00 )		
					200	6	45	99	1	0	0	151	1	107 ( 53.5 )	102 *( 51.0 )	1 ( 0.13 )		

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; TAG, total number of cells with aberrations including gaps; TA, total number of cells with aberrations excluding gaps; MC, mitomycin C.

1) Carboxymethylcellulose sodium (0.5 w/v%) solution was used as vehicle and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell confluency, representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 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 analysed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01.

\*, Significantly different from the negative control at p<0.01 by Fisher's exact probability test.

\*\*\*, Purity was 100 wt%, and water (0.01%) was contained as impurity.

†, Precipitation was observed at the beginning and the end of the treatment.

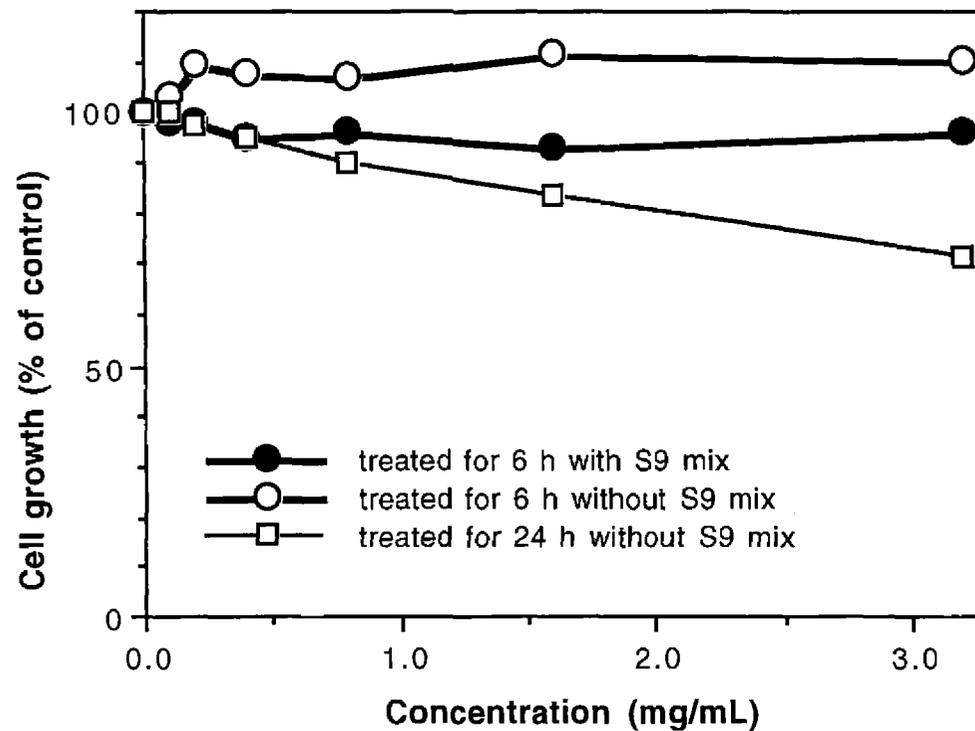


Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole

Precipitation was observed at all doses at the beginning and the end of the treatment.