

M-1347

最終報告書

試験名：m-ブロモフェノールのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：M-1347

報告日：2009年12月3日

試験施設

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

1. 目次

1.	目次	2
4.	要約	9
5.	緒言	10
6.	試験材料及び方法	11
6.1	被験物質及び溶媒	11
6.1.1	被験物質	11
6.1.2	溶媒	11
6.2	被験液の調製	12
6.2.1	調製方法	12
6.2.2	調製頻度	12
6.2.3	安定性	12
6.3	対照物質	13
6.3.1	陰性対照	13
6.3.2	陽性対照	13
6.4	使用細胞株	14
6.4.1	細胞株	14
6.4.2	細胞の選択理由	14
6.4.3	培養条件	14
6.4.4	細胞の性状検査	14
6.5	S9 mix 及び培養液	14

6.5.1	S9 mix	14
6.5.2	培養液	15
6.6	試験方法	16
6.6.1	識別方法	16
6.6.2	用量の設定	16
6.6.3	細胞増殖抑制試験	17
6.6.4	染色体異常試験	18
6.6.5	標本の観察	20
6.6.6	染色体異常の分類	20
6.6.7	判定基準	21
7.	試験結果	22
7.1	細胞増殖抑制試験	22
7.1.1	短時間処理法	22
7.1.2	連続処理法	22
7.2	染色体異常試験	23
7.2.1	短時間処理法	23
7.2.2	確認試験（短時間処理法 代謝活性化）	24
8.	考察	25
9.	参考文献	26

Photographs of Metaphase Chromosomes

- Photo.1 A metaphase chromosome from the negative control group
[Confirmation test: +S9 mix]
- Photo.2 A metaphase chromosome from the 300 µg/mL group with
chromatid exchanges
[Confirmation test: +S9 mix]



- Fig. 1-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese
hamster cells treated with *m*-Bromophenol
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 1-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese
hamster cells treated with *m*-Bromophenol
[Short-term treatment: -S9 mix]

M-1347

Fig. 1-3

Results of the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with *m*-Bromophenol
[Short-term treatment: +S9 mix]

表

Table 1-1

Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *m*-Bromophenol
[Short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2

Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *m*-Bromophenol
[Short-term treatment: -S9 mix]

Table 1-3

Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *m*-Bromophenol
[Confirmation test: +S9 mix]

4. 要約

m-プロモフェノール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。

初めに、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10 mM に相当する 1750 µg/mL として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化では 219 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 54.7 µg/mL 以上の用量で 50% を超える細胞増殖抑制作用が認められたため、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ない場合は最高用量を 10 mM とし、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」との規定に従い、染色体異常試験における最高用量を短時間処理法では 300 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 100 µg/mL とした。

染色体異常試験の結果、短時間処理法の非代謝活性化においては、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）及び倍数性細胞の出現率は、陰性の判定基準である 5% 未満であった。一方、短時間処理法の代謝活性化においては、TA 値は最高用量である 300 µg/mL のみが陽性を示し、59.3 から 200 µg/mL の用量で疑陽性を示したものの、疑陽性を示した用量に用量依存性の TA 値の増加が認められなかったため、最高用量を 300 µg/mL とし、公比 1.1 で確認試験を実施した。その結果、染色体構造異常の出現率は 300、273 及び 248 µg/mL で陽性、225、205 及び 186 µg/mL で疑陽性を示した。疑陽性の用量において一部 TA 値の逆転が見られたものの、用量の増加に伴う TA 値の上昇が認められると判断されたため、総合判定を陽性と判断した。染色体異常誘発性の強さの指標値については、観察細胞の 20% に何らかの異常が見られる用量である D20 値は 0.26 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換（cte）を持つ細胞の出現率の比較値である TR 値は 130 であった。また、倍数性細胞の出現率においては、陰性の判定基準である 5% 未満であった。なお、確認試験において総合的に陽性と判定されたため、連続処理法は実施しなかった。

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率は 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ことから、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、*m*-プロモフェノールは本試験条件下において染色体数的異常誘発能は有さないが、染色体構造異常誘発能は有すると結論した。

M-1347

5. 緒言

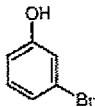
厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、*m*-ブロモフェノールの安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。

6. 試験材料及び方法

6.1 被験物質及び溶媒

6.1.1 被験物質

被験物質の純度等の特性は、非 GLP 下での分析に基づくものである (Attached Data 1)。

名称	:	<i>m</i> -ブロモフェノール、 <i>m</i> -Bromophenol
別称	:	3-ブロモフェノール、3-Bromophenol
CAS 番号	:	591-20-8
構造式又は示性式	:	
分子量	:	173.01
純度	:	96.9%
沸点	:	236°C
融点	:	30°C
性状	:	塊～黄色透明液体
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を確認した (Attached Data 2)。
保存方法	:	密栓、冷暗所 (保存期間中実測温度: 2～7°C)
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室、第 1 研究棟被験物質調製室 冷蔵庫及び生化学部標準物質保存場所
取扱い上の注意	:	取り扱いは、適切な保護具を身につけ、粉塵やエアゾールが発生しないよう取り扱った。また、火気厳禁とした。
残余物の取り扱い	:	被験物質の残余物は、実験終了後に安定性を確認し、その後、すべて株式会社ボゾリサーチセンターにおいて廃棄した。

6.1.2 溶媒

名称	:	ジメチルスルホキシド (DMSO)
ロット番号	:	LTF0010
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	:	被験物質情報によると、水には不溶であると記されていた。そこで、供試前試験を実施した結果、DMSOには 175 mg/mL で溶解することが確認されたことから、溶媒として DMSO を用いることとした。

6.2 被験液の調製

6.2.1 調製方法

以下の試験操作は、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) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.3500 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 175 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1750 µg/mL）を調製した。次いで、175 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、87.5、43.8、21.9、10.9、5.47、2.73 及び 1.37 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

短時間処理法では、被験物質 0.1500 g を 5 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 30.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：300 µg/mL）を調製した。次いで、30.0 mg/mL 溶液を公比 1.5（各濃度の被験液 2.0 mL：溶媒 1.0 mL）で順次 5 段階希釈し、20.0、13.3、8.89、5.93 及び 3.95 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化及び非代謝活性化ともに 30.0、20.0、13.3、8.89、5.93 及び 3.95 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を用いた。

確認試験（短時間処理法・代謝活性化）では、被験物質 0.3000 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 30.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：300 µg/mL）を調製した。次いで、30.0 mg/mL 溶液を公比 1.1（各濃度の被験液 5.0 mL：溶媒 0.5 mL）で順次 5 段階希釈し、27.3、24.8、22.5、20.5 及び 18.6 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を調製した。

6.2.2 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。

6.2.3 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。

6.3 対照物質

6.3.1 陰性対照

溶媒として用いたジメチルスルホキシド (DMSO) を陰性対照とした。

6.3.2 陽性対照

1) 代謝活性化

名称	:	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

名称	:	マイトマイシン C (MMC)
ロット番号	:	525AHA
製造元	:	協和醗酵工業株式会社
力価	:	2mg (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: K8H76) 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 μ 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: K8H76) 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 μ g/mL)。

(3) 確認試験 (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: K8H76) 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 μ 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 5.2）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。

6.4 使用細胞株

6.4.1 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 2004 年 11 月 2 日に入手した。入手後、DMSO を 10v/v% 添加した培養液に細胞を懸濁し、液体窒素中で大量に凍結保存した。試験に際しては、その一部を解凍後、再培養を開始し、継代培養を行ったものについて細胞の性状検査を定期的実施して、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は 9 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 13 継代、確認試験（短時間処理法・代謝活性化）では 17 継代であった。

6.4.2 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常出現率が低いこと、種々の化学物質に対して感受性が高いこと、背景データが多いこと及びほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験に広く用いられていることから、本細胞株を選択した。

6.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂ 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。

6.4.4 細胞の性状検査

定期的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 15~20 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。

6.5 S9 mix 及び培養液

6.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素 (S9/コファクター C セット、ロット番号: C08121910 及び C090213121、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	:	08121910、09021312
製造日	:	2008 年 12 月 19 日 (Lot No. 08121910)

		2009年2月13日 (Lot No.09021312)	
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	:	2009年6月18日 (製造後6箇月) (Lot No.08121910)	
		2009年8月12日 (製造後6箇月) (Lot No.09021312)	
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	:	C08121710、C09021211	
製造日	:	2008年12月17日 (Lot No.C08121710)	
		2009年2月12日 (Lot No.C09021211)	
保存方法	:	冷凍 (超低温フリーザー)	
使用期限	:	2009年6月16日 (製造後6箇月) (Lot No.C08121710)	
		2009年8月11日 (製造後6箇月) (Lot No.C09021211)	
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

6.5.2 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No.11095-080) に、Invitrogen Corporation より購入し非働化 (56°C, 30 分) した牛血清 (BS) を 10 vol% 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 : 616941

製造元 : Invitrogen Corporation
 保存方法 : 冷凍 (−80℃ 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 : 510522
 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

6.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。

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
3. 確認試験	短時間処理法	代謝活性化

6.6.1 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。

3) 確認試験

染色体異常試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。

6.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 1750 µg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 875、438、219、109、54.7、27.3 及び 13.7 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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 219 $\mu\text{g/mL}$ において、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 54.7 $\mu\text{g/mL}$ において 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 109.0 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 197.0 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 49.7 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 53.6 $\mu\text{g/mL}$ 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」との規定に従い、短時間処理法では、50%を超える十分な細胞増殖抑制作用を得るために、300 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 6 用量を、同様な理由で、連続処理法では 100 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を設定することとした。また、染色体異常試験の短時間処理法・代謝活性化の結果、最高用量の 300 $\mu\text{g/mL}$ では、染色体の構造異常を持つ細胞の総出現率（%）のうちギャップを含まない場合（TA）が陽性の判定基準にあったが、以下の 4 用量では TA は疑陽性の判定基準にあったものの、異常細胞の出現率に用量依存性が認められなかった。そこで、試験計画書の 12. 試験方法 12.5 確認・追加試験 12.5.1 確認試験の 2) 及び 3) 項に照らして、確認試験（短時間処理法・代謝活性化）を実施するために、最高用量を 300 $\mu\text{g/mL}$ として、以下、公比 1.1 で 273、248、225、205 及び 186 $\mu\text{g/mL}$ の計 6 用量を設定することとした。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。なお、連続処理法の用量設定は実施したが、確認試験において総合判定が陽性と判断されたため、連続処理法は実施しなかった。

6.6.3 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に予備試験として実施した。

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、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、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

顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、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下で観察し、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、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、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観察し、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。

6.6.4 染色体異常試験

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、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、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観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、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 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 0.075M 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 箇所水滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2% ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- (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、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した (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) 確認試験 (短時間処理法 代謝活性化)

- (1) 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、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、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。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観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、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 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 0.075M 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箇所へ滴下した。染色体標本はプレート当たり2枚作製した。細胞滴下後、約1日空気乾燥し、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、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した(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。

6.6.5 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。

6.6.6 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数異常に大別し、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、倍化した場合を数異常と定義した。

- | | | |
|-----|---|--|
| 倍数体 | : | polyploidy (核内倍加体: endoreduplicationを含む) |
|-----|---|--|

6.6.7 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 (+)

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。

7. 試験結果

7.1 細胞増殖抑制試験

7.1.1 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)

代謝活性化では、109 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 109.0 µg/mL であった。一方、非代謝活性化では、219 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 197.0 µg/mL であった。

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 219 µg/mL 以上の用量で変化が認められた。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 1750 µg/mL の用量で被験物質と思われる物質のシャーレ底面への固着が認められた。

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 1750 µg/mL の用量で被験物質と思われる物質のシャーレ底面への固着が認められた。被験物質用量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 109 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められ、13.7 から 54.7 µg/mL の用量では異常は認められなかった。

7.1.2 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 時間処理及び 48 時間処理ともに 54.7 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 49.7 µg/mL、48 時間処理では 53.6 µg/mL であった。

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 219 µg/mL 以上の用量で変化が認められた。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 1750 µg/mL の用量で被験物質と思われる物質のシャーレ底面への固着が認められた。

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 1750 µg/mL の用量で被験物質と思われる物質のシャーレ底面への固着が認められた。被験物質用量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時間処理では438から1750 µg/mLの用量で細胞の剥離、死滅が認められTOX、54.7から219 µg/mLの用量で細胞の浮遊、形態変化が認められ、13.7及び27.3 µg/mLの用量で異常は認められなかった。一方、48時間処理では219から1750 µg/mLの用量で細胞の剥離、死滅が認められTOX、54.7及び109 µg/mLの用量で細胞の浮遊、形態変化が認められ、13.7及び27.3 µg/mLの用量で異常は認められなかった。

7.2 染色体異常試験

7.2.1 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、代謝活性化では200 µg/mL以上の用量で、非代謝活性化では133 µg/mL以上の用量で変化が認められた。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、すべての用量で析出は認められなかった。

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すべての用量で析出は認められなかった。被験物質用量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59.3 µg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められ、39.5 µg/mLの用量では異常は認められなかった。一方、非代謝活性化では88.9 µg/mL以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められ、39.5及び59.3 µg/mLの用量では異常は認められなかった。

3) 染色体構造異常 (Fig. 1-1、Fig. 1-2、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、300 µg/mLで61.5%と陽性の判定基準である10%以上を示し、200 µg/mLで5.5%、133 µg/mLで8.0%、88.9 µg/mLで5.0%及び59.3 µg/mLで7.0%と疑陽性の判定基準である5%以上10%未満を示した。39.5 µg/mLでは3.0%と陰性の判定基準である5%未満であった。一方、非代謝活性化においては、300 µg/mLで4.0%、200 µg/mLで1.0%、133 µg/mLで1.5%、88.9 µg/mLで0%、59.3 µg/mLで1.0%及び39.5 µg/mLで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、又試験施設の背景値(Attached Data 3)と同様であった。更に、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 1-1 及び Table 1-2)

数的異常(倍数体)の出現率は、代謝活性化においては、300 µg/mLで0%、200 µg/mLで0.5%、133 µg/mLで1.0%、88.9 µg/mLで1.5%、59.3 µg/mLで0.5%及び39.5 µg/mL

で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、300 µg/mLで0.5%、200 µg/mLで1.0%、133 µg/mLで1.0%、88.9 µg/mLで1.5%、59.3 µg/mLで1.0%及び39.5 µg/mLで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り、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

7.2.2 確認試験 (短時間処理法 代謝活性化)

結果を Fig. 1-3、Table 1-3 及び Appendix 3-3 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察 (Appendix 3-3)

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、すべての用量で変化が認められた。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、すべての用量で析出は認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の観察 (Appendix 3-3)

すべての用量で析出は認められなかった。被験物質用量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、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 (Fig. 1-3 及び Table 1-3)

構造異常の出現率 (TA) は、300 µg/mLで44.0%、273 µg/mLで23.5%及び248 µg/mLで16.5%と陽性の判定基準である10%以上を示し、225 µg/mLで6.0%、205 µg/mLで7.5%及び186 µg/mLで5.5%と疑陽性の判定基準である5%以上10%未満を示した。

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、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、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)

数的異常 (倍数体) の出現率は、300 µg/mLで3.0%、273 µg/mLで0%、248 µg/mLで1.5%、225 µg/mLで2.5%、205 µg/mLで1.5%及び186 µg/mLで3.0%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り、又試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であったことから試験は適切に実施されたと考えられた。

8. 考察

染色体異常試験の結果、短時間処理法の非代謝活性化においては、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) 及び倍数性細胞の出現率は、陰性の判定基準である 5%未満であった。一方、短時間処理法の代謝活性化においては、TA 値は最高用量である 300 $\mu\text{g/mL}$ のみが陽性を示し、59.3 から 200 $\mu\text{g/mL}$ の用量で疑陽性を示したものの、疑陽性を示した用量に用量依存性の TA 値の増加が認められなかったため、最高用量を 300 $\mu\text{g/mL}$ とし、公比 1.1 で確認試験を実施した。その結果、染色体構造異常の出現率は 300、273 及び 248 $\mu\text{g/mL}$ で陽性、225、205 及び 186 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性を示した。疑陽性の用量において一部 TA 値の逆転が見られたものの、用量の増加に伴う TA 値の上昇が認められると判断されたため、総合判定を陽性と判断した。染色体異常誘発性の強さの指標値については、観察細胞の 20%に何らかの異常が見られる用量である D20 値¹⁾は 0.26 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換 (cte) を持つ細胞の出現率の比較値である TR 値¹⁾は 130 であった。なお、倍数性細胞の出現率においては、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率は 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ことから、試験は適切に実施されたと考えられた。

なお、*m*-プロモフェノールの関連物質である 2,4,6-トリプロモフェノール及び 1,4-ジプロモベンゼンについては、CHL/IU 細胞を用いた染色体異常試験において、前者は代謝活性化及び非代謝活性化、後者は代謝活性化でそれぞれ陽性の結果が報告されている⁶⁾⁷⁾。

以上の結果から、*m*-プロモフェノールは本試験条件下において染色体数的異常誘発能は有さないが、染色体構造異常誘発能は有すると結論した。

9. 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, *Mutation Res.*, **48**, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, *Mutation Res.*, **66**, 277-290
- 4) 石館 基 (1982) : ほ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) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修 (1999) : 化学物質毒性試験報告 Vol.7, pp. 418-420, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京
- 7) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修 (1995) : 化学物質毒性試験報告 Vol.2, pp. 367-370, 化学物質点検推進連絡協議会, 東京

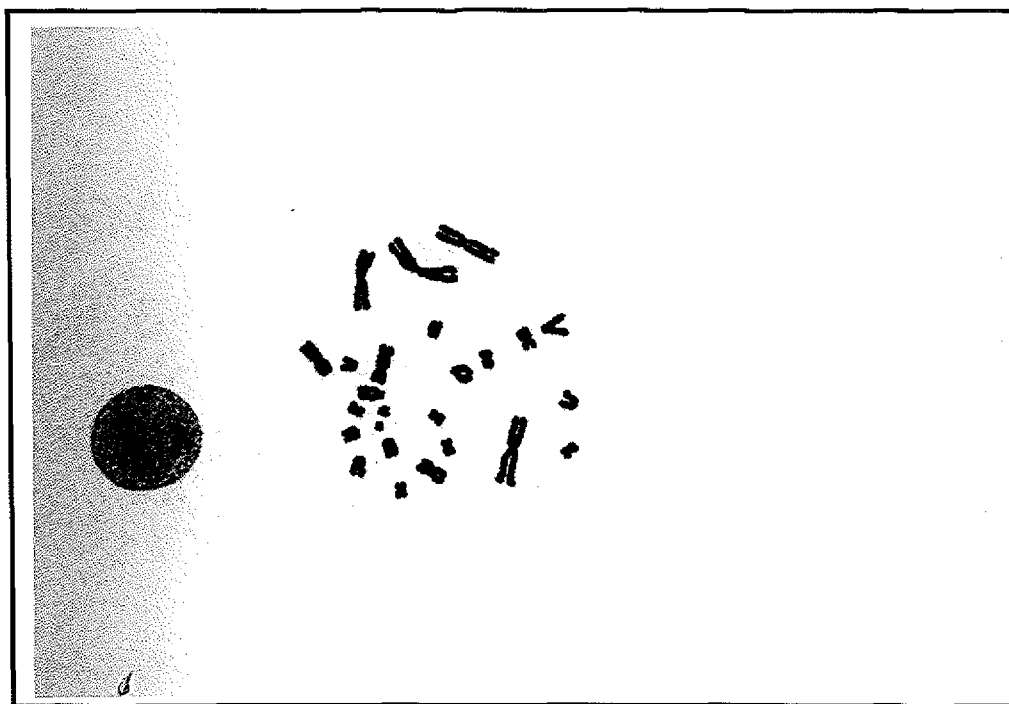


Photo. 1 A metaphase chromosome from the negative control group
[Confirmation test: +S9 mix]

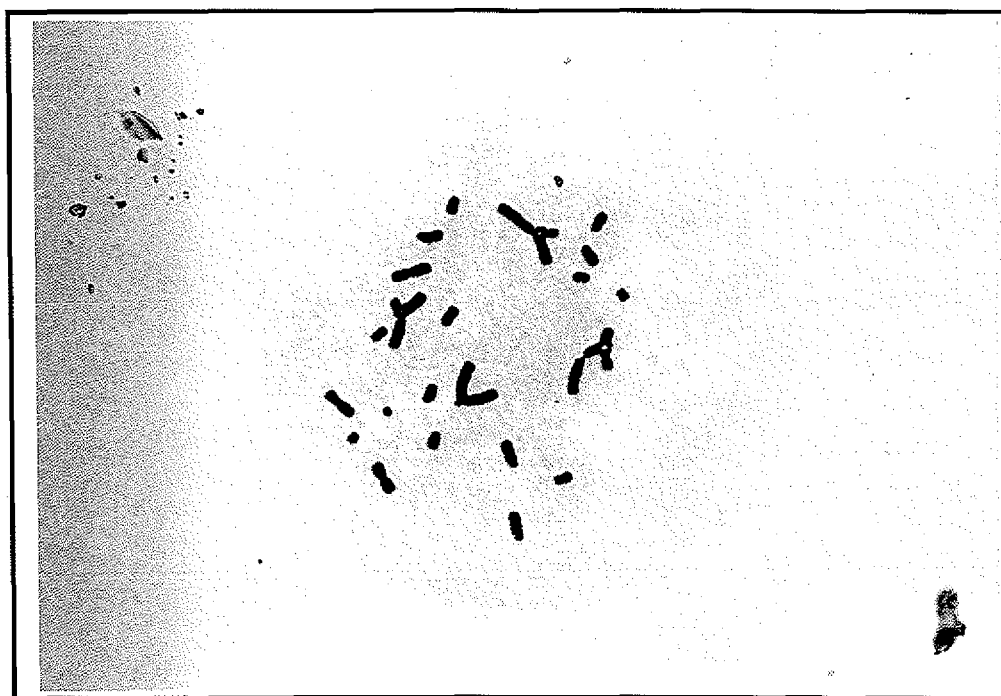


Photo. 2 A metaphase chromosome from the 300 µg/mL group with chromatid exchanges
[Confirmation test: +S9 mix]

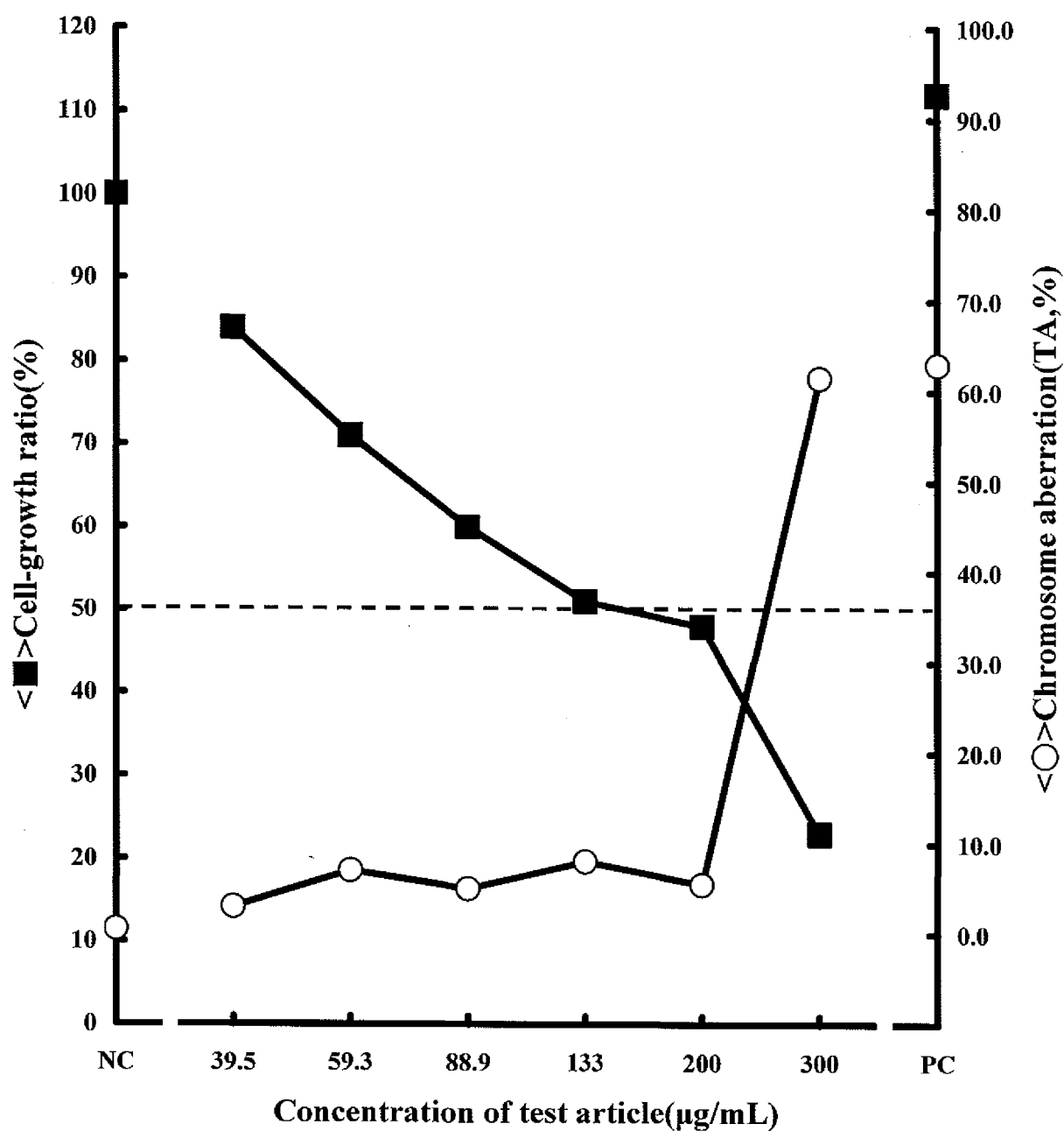


Fig. 1-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *m*-Bromophenol
 [Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

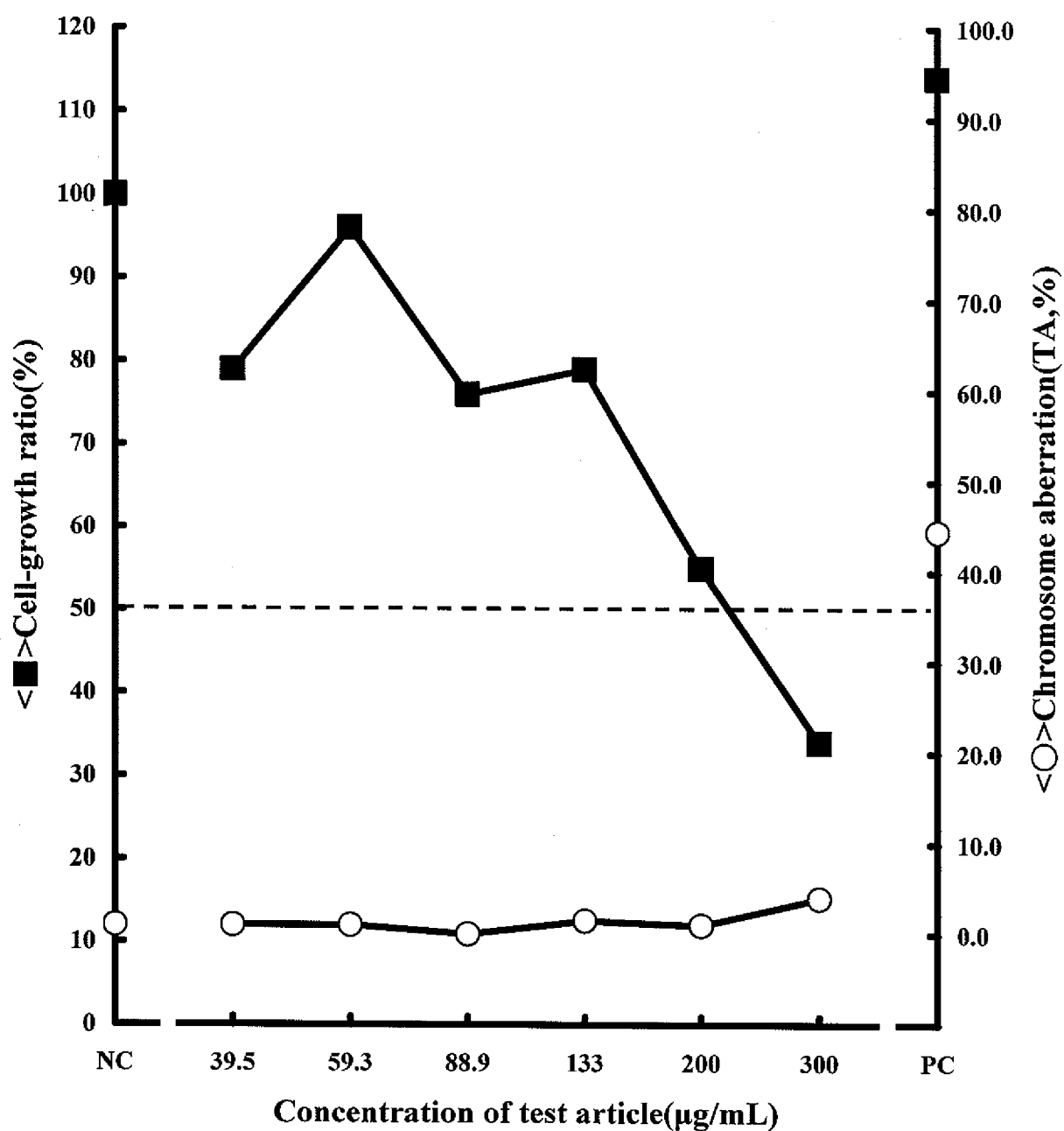


Fig. 1-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *m*-Bromophenol
 [Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

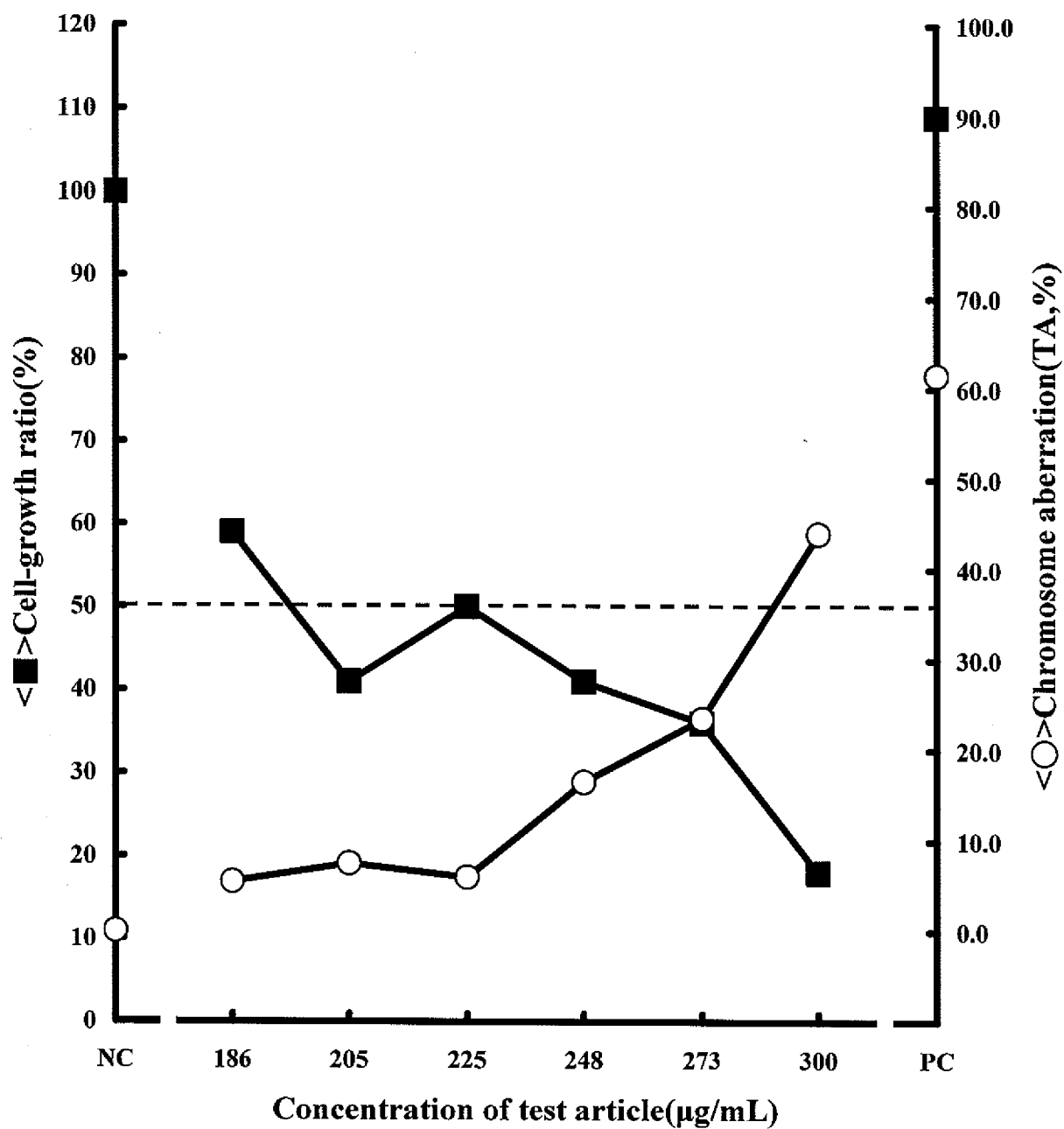


Fig. 1-3

Results of the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with *m*-Bromophenol

[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

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

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *m*-Bromophenol
[Short-term treatment: +S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (µg/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)								Judge-ment	Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	
6-18	+	NC	100	0	0	0	0	0	0	0		100	100	0	0	0	77-1
			100	0	1	0	0	0	1	1	2	-	108	100	0	0	-
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	2(1.0)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	52-1
		39.5	100	0	2	0	0	0	2	1	3		83	100	0	0	85-1
			100	4	2	0	0	0	4	0	4	-	91	100	0	0	-
			200	4(2.0)	4(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	6(3.0)	1(0.5)	7(3.5)		(84)	200	0(0.0)	0(0.0)	13-1
		59.3	100	5	8	0	0	0	11	0	11		74	100	0	0	72-1
			100	1	2	0	0	0	3	1	4	±	74	100	1	0	-
			200	6(3.0)	10(5.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	14(7.0)	1(0.5)	15(7.5)		(71)	200	1(0.5)	0(0.0)	79-1
		88.9	100	1	5	0	0	0	6	0	6		58	100	1	0	49-1
			100	2	4	0	0	0	4	1	5	±	66	100	2	0	-
			200	3(1.5)	9(4.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	10(5.0)	1(0.5)	11(5.5)		(60)	200	3(1.5)	0(0.0)	36-1
		133	100	1	5	0	0	0	5	0	5		49	100	1	0	75-1
			100	3	7	1	0	0	11	1	12	±	58	100	1	0	-
			200	4(2.0)	12(6.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	16(8.0)	1(0.5)	17(8.5)		(51)	200	2(1.0)	0(0.0)	48-1
		200	100	3	6	0	0	0	7	1	8		41	100	1	0	65-1
			100	0	4	0	0	0	4	1	5	±	58	100	0	0	-
			200	3(1.5)	10(5.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	11(5.5)	2(1.0)	13(6.5)		(48)	200	1(0.5)	0(0.0)	37-1
		300	69	18	38	1	0	4	47	1	48		24	69	0	0	34-1
			31	5	20	1	0	0	21	0	21			31	0	0	34-2
			67	11	32	2	0	2	37	0	37	+	24	67	0	0	-
			33	2	17	0	0	1	18	0	18			33	0	0	98-2
			200	36(18.0)	107(53.5)	4(2.0)	0(0.0)	7(3.5)	123(61.5)	1(0.5)	124(62.0)		(23)	200	0(0.0)	0(0.0)	98-2
		PC	100	9	58	0	0	0	63	0	63		108	100	0	0	92-1
			100	7	60	1	1	0	63	0	63	+	124	100	0	0	-
			200	16(8.0)	118(59.0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	126(63.0)	0(0.0)	126(63.0)		(112)	200	0(0.0)	0(0.0)	73-1

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 *m*-Bromophenol
[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	-	84-1	
			100	2	0	0	0	0	2	0	2	-	141	100	0	0	0	-	60-1
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		39.5	100	2	0	0	0	0	2	1	3	100	100	0	0	0	-	99-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	91	100	0	0	0	-	02-1
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	1(0.5)	3(1.5)		(79)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		59.3	100	1	0	0	0	0	1	0	1	124	100	1	0	1	-	76-1	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	108	100	1	0	1	-	71-1
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		(96)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		88.9	100	0	0	0	0	0	0	0	0	91	100	1	0	1	-	25-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	91	100	2	0	2	-	64-1
			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)		(76)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)		
		133	100	0	2	0	0	0	2	0	2	83	100	1	0	1	-	45-1	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	108	100	1	0	1	-	66-1
			200	1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)		(79)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		200	100	1	0	0	1	0	2	0	2	66	100	1	0	1	-	82-1	
			100	0	0	0	0	0	0	1	1	-	66	100	1	0	1	-	42-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	2(1.0)	1(0.5)	3(1.5)		(55)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		300	100	2	1	0	0	0	3	1	4	33	100	1	0	1	-	05-1	
			100	1	4	0	0	0	5	1	6	-	49	100	0	0	0	-	86-1
			200	3(1.5)	5(2.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	8(4.0)	2(1.0)	10(5.0)		(34)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		PC	100	5	35	0	0	0	37	0	37	141	100	0	0	0	-	18-1	
			100	8	48	0	0	0	52	0	52	+	133	100	0	0	0	-	32-1
			200	13(6.5)	83(41.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	89(44.5)	0(0.0)	89(44.5)		(114)	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, 0.075 $\mu\text{g/mL}$)

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 *m*-Bromophenol
[Confirmation test:+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	-	43-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	0	-	19-1
			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)	0(0.0)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		186	100	2	2	0	0	0	4	0	4	±	63	100	3	2	5		63-1
			100	0	7	0	0	0	7	0	7	±	54	100	0	1	1	-	15-1
			200	2(1.0)	9(4.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	11(5.5)	0(0.0)	11(5.5)		(59)	200	3(1.5)	3(1.5)	6(3.0)		
		205	100	4	8	0	0	0	9	0	9	±	36	100	0	2	2		51-1
			100	2	6	0	0	0	6	1	7	±	45	100	1	0	1	-	53-1
			200	6(3.0)	14(7.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	15(7.5)	1(0.5)	16(8.0)		(41)	200	1(0.5)	2(1.0)	3(1.5)		
		225	100	1	7	0	0	0	7	0	7	±	45	100	1	2	3		50-1
			100	0	5	1	0	0	5	1	6	±	54	100	2	0	2	-	01-1
			200	1(0.5)	12(6.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	12(6.0)	1(0.5)	13(6.5)		(50)	200	3(1.5)	2(1.0)	5(2.5)		
		248	100	3	15	1	0	0	17	0	17	+	45	100	0	2	2		44-1
			100	3	14	1	0	0	16	0	16	+	36	100	1	0	1	-	12-1
			200	6(3.0)	29(14.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	33(16.5)	0(0.0)	33(16.5)		(41)	200	1(0.5)	2(1.0)	3(1.5)		
		273	100	2	23	0	0	1	24	0	24		27	100	0	0	0		33-1
			91	9	18	1	0	0	22	0	22		45	91	0	0	0		14-1
			9	0	1	0	0	0	1	0	1	+		9	0	0	0	-	14-2
		300	200	11(5.5)	42(21.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	47(23.5)	0(0.0)	47(23.5)		(36)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
			68	11	36	1	0	1	39	0	39		18	68	0	0	0		68-1
			32	4	8	0	0	0	10	0	10			32	0	1	1		68-2
		PC	60	6	22	0	0	0	25	0	25	+	18	60	0	5	5	-	96-1
			40	2	13	0	0	1	14	0	14			40	0	0	0		96-2
			200	23(11.5)	79(39.5)	1(0.5)	0(0.0)	2(1.0)	88(44.0)	0(0.0)	88(44.0)		(18)	200	0(0.0)	6(3.0)	6(3.0)		
		PC	100	7	60	0	1	0	62	1	63		99	100	0	0	0		35-1
			100	9	58	0	0	0	61	0	61	+	118	100	0	0	0	-	97-1
			200	16(8.0)	118(59.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	123(61.5)	1(0.5)	124(62.0)		(109)	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.