最 終 報 告 書

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide のほ乳類培養細胞を用いる
染色体異常試験

試験番号：6251 （ 115－159 ）

平成 15 年 12 月 26 日

試験委託者
厚生労働省　医薬局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目　次

1.　要約 6

13.　被験物質 10
14.　試験材料および方法 12
15.　試験結果 20
16.　考察および結論 22
17.　参考文献 23

Figures　F-1~3
Figure 1　Growth inhibition of CHL cell streated with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide [short-term treatment]　F-1
Figure 2　Incidence of structural aberrations induced by Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide [short-term treatment: –S9]　F-2
Figure 3　Incidence of structural aberrations induced by Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide [short-term treatment: +S9]　F-3

Tables T-1~3

Table 1 Results of growth inhibition test on Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide [short-term treatment] T-1

Table 2 Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide [short-term treatment: –S9] T-2

Table 3 Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide [short-term treatment: +S9] T-3

1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において，Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide は染色体異常を誘起するものと判断した.

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide の変異原性について染色体異常誘発性の有無を検討するため，チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株（CHL/IU）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った.

あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に，試験用量を設定した. 染色体異常試験では短時間処理法–S9 処理で 557，696，870 および 1088 μg/mL の 4 用量，+S9 処理で 357，446 および 557 μg/mL の 3 用量について顕微鏡観察を実施した.

その結果，Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide 処理群の場合，–S9 処理，+S9 処理とも溶媒対照と比較して統計学的に有意な染色体異常の誘発が認められ，かつ，試験用量に依存した増加であったことから陽性反応と判断した.

また，–S9 処理および+S9 処理の陽性対照物質であるマイトマイシン C（MMC）ならびにシクロホスファミド（CP）は，いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した.

13. 被験物質

13.1. 被験物質名

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide

13.2. ロット番号

13.3. 純度／含量

99.3 wt%

13.4. 不純物の名称および純度

4, 4'-オキシビス（ベンゼンスルホン酸）および4, 4'-オキシビス（ベンゼンスルホニルクロライド）を微量に含有する.

13.5. 提供元

13.6. 保存条件

室温保存

13.7. 保存場所

安評センター被験物質保管庫（C-3）

13.8. 略称

OBSH

13.9. 化学名

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide

13.10. CAS No.

80-51-3

13.11. 分子式

$C_{12}H_{14}N_4O_5S_2$

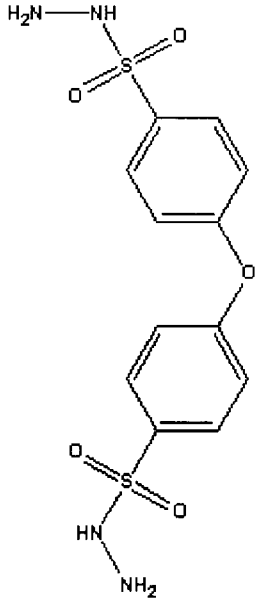
13.12. 分子量

358.40

13.13. 物質の状態

白色微粉末

13.14. 化学構造



13.15. 融点

161.5°C（社内法による）

13.16. 安定性

常温では安定であるが，炎・火花・高温体と接触した場合，分解を起こして燃焼する（分解温度，164°C）.

13.17. 溶解性

水：0.02 g/100 g，DMSO：易溶，7%塩酸：22.0 g/100 g，アセトン：反応する.

13.18. 取り扱い上の注意

酸化性物質や強酸との混合により，分解を起こして火災を発生する可能性がある．火気との接触は厳禁である.

衣服，履物，手袋等に付着した異物の混入を避けるため，清潔な服装で取り扱った.

13.19. 残余被験物質の処理

被験物質の一部（1 g）を保存した後，残りは被験物質提供元へ返却した.

14. 試験材料および方法

14.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから，試験細胞としてチャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞株（CHL/IU 細胞）を選択した．CHL/IU 細胞は昭和 59 年 11 月 15 日に国立衛生試験所（現 国立医薬品食品衛生研究所）から分与を受け，一部についてはジメチルスルホキシド（DMSO：GC 用；Merck KGaA；純度 99.7%以上；Lot No. K26414578 013）を容量比で 10%添加した後，液体窒素中に保存した．試験に際しては凍結した細胞を融解した後，3～5 日ごとに継代したものを使用した．

なお，プレ試験では継代数 4 の細胞を，細胞増殖抑制試験で同 10 の細胞を，染色体異常試験では同 12 の細胞を用いた．

14.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（IWAKI：旭テクノグラス株式会社；Lot No. 99560008）に非働化（56°C，30 分）済み仔牛血清（Invitrogen Corp.；Lot No. 297843【プレ試験】，353445）を最終濃度で 10%になるよう添加した．

調製後の培養液は使用時まで冷暗所（4°C）に保存した．

14.3. 培養条件

CO_2 インキュベーター（三洋電機メディカシステム株式会社）を用い，CO_2 濃度 5%，37°C の条件で細胞を培養した．

14.4. S9 mix

製造後 6 ヵ月以内の S9 mix（キッコーマン株式会社；Lot No. CAM-461）を試験に使用した．

14.4.1. S9 の調製方法

S9 調製の際の動物種，性，臓器，誘導物質ならびに誘導方法等を以下に示した．

ロット番号	RAA-461
製造年月日	平成 14 年 3 月 28 日（誘導物質投与開始後 5 日目）
使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系
性／週齢	雄／7 週齢
体重	184～212 g
臓器	肝臓
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)
投与量および投与回数	PB： 30 mg/kg 1 回（1 日目）， 60 mg/kg 3 回（2～4 日目） BF： 80 mg/kg 1 回（3 日目）
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	25.76 mg/mL

14.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

S9	0.3	mL
$MgCl_2$	5	μmol/0.1 mL
KCl	33	μmol/0.1 mL
G-6-P	5	μmol/0.1 mL
NADP	4	μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液（pH 7.2）	4	μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1	mL

14.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に易溶であることから，被験物質を被験物質をモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO（Merck KGaA ; Lot No. K26414578 032）に溶解し，調製原液とした．この調製原液を使用溶媒を用いて順次希釈した後，速やかに処理を行った.

14.6. 対照群

14.6.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒で試験した.

14.6.2. 陽性対照（短時間処理法–S9 処理）

注射用水（日本薬局方注射用水：株式会社大塚製薬工場；Lot No. K1D78）5 mL に溶解したマイトマイシン C（MMC：協和醗酵工業株式会社；Lot No. 339AJH）を生理食塩液（日本薬局方生理食塩液：株式会社大塚製薬工場；Lot No. K1D74）を用いて希釈し，1 mL ずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた．

試験用量は，0.1 μg/mL とした．

14.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

注射用水（Lot No. K1D78）5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社；Lot No. 1013）を生理食塩液（Lot No. K1D74）を用いて希釈し，1 mL ずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた．

試験用量は 12.5 μg/mL とした．

14.7. プレ試験（有糸分裂指数計数）

14.7.1. 試験用量

被験物質の細胞毒性および細胞分裂に及ぼす影響に関する情報を得るため，ガイドライン上の限界用量 3584 μg/mL（10 mM 相当）を最高用量として，1075，323，96.8，29.0 μg/mL（公比 10/3）で試験を実施した．

14.7.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 1 ウエルを用いた．

試験系および連番を明記することにより各ウエルを識別した．

14.7.3. 短時間処理法+S9 処理

6 ウエルマルチプレートの各ウエルに乾熱滅菌済みのカバーグラス（24 × 24 mm）を入れ，その上に 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 2 mL（1.6×10^4 細胞）を播種し，3 日間培養した．培養終了後，培養液 333 μL を除き，333 μL の S9 mix を添加した後，溶媒あるいは被験物質液 20 μL を加えた．6 時間各物質に暴露させた後，各ウエルの培養液を除去し，ダルベッコリン酸緩衝液（Sigma Chemical Company；Lot No. 121K2349）を用いて細胞を洗浄した．新鮮な培養液 2 mL を加え，さらに 18 時間培養を続けた後に標本を作製した．

14.7.4. 連続処理法 24 時間処理

各ウエルに 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 2 mL を播種し，3 日間培養した．培養終了後，溶媒あるいは被験物質液 20 μL を加え，24 時間

各物質に暴露させた．以下の操作は 14.7.3.に記載した方法に準じた．

14.7.5. 析出等および細胞増殖抑制度の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した．また，被験物質処理 6 時間後および試験終了時に倒立位相差顕微鏡下で細胞増殖抑制度を観察した．増殖抑制度は下表に従って判定した．

細胞増殖抑制度	判　　定
0～10%未満	N（Normal）
10～40%未満	+
40～60%未満	++
60～90%未満	+++
90%～死滅	L（Lethal）

14.7.6. 標本の作製

染色体標本作製の 2 時間前に，最終濃度 0.2 μg/mL となるようコルセミド溶液（Invitrogen Corp. ; Lot No. 1102967）を添加し，細胞分裂を中期で停止させた．次いで，培養液を全量除いた後，37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 2 mL 加え，室温で 5 分間低張処理を行った．4°C に冷却した固定液（メタノール 3 容：酢酸 1 容）を静かに 16 滴加え，2 分程静置した．全ての溶液を除いた後，新しい固定液を 2 mL 加え，さらに 2 分間細胞を固定した．固定後，液を全量除いた後，カバーグラスを乾燥させ 0.1%クリスタルバイオレット液で 5 分間染色した．標本を水洗し，乾燥させた後，封入剤（パーマウント）を用いてスライドグラスに封入した．

14.7.7. 分裂細胞数の計数

各標本当たり，すなわち 1 用量当たり 500 個の細胞を顕微鏡下で観察し，有糸分裂細胞の出現数を計数し，有糸分裂指数（MI : Mitotic Index）を算出した．ただし，細胞毒性作用が非常に強く発現した用量群については観察対象から除いた．

14.8. 細胞増殖抑制試験（予備試験）

14.8.1. 試験用量

プレ試験の結果，短時間処理法+S9 処理の 1075 μg/mL では分裂中期像は観察されず有糸分裂指数は 0%であった．

本結果を参考に，細胞増殖抑制試験の用量として 1000 μg/mL を最高用量

とした8あるいは6用量（公比5/3）を設定した（下表参照）.

試験系	用量数	試験用量 (μg/mL)
短時間処理法–S9 処理	8	28.0～1000
短時間処理法+S9 処理	6	77.8～1000

14.8.2. 使用ウエル数および識別方法

1用量当たり2ウエルを用いた.

試験系および連番を明記することにより各ウエルを識別した.

14.8.3. 短時間処理法–S9 処理

12 ウエルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F：住友ベークライト株式会社）の各ウエルに培養液を用いて 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し，3 日間培養した．培養終了後，培養液 400 μL を除いた後，溶媒あるいは被験物質液 6 μL を加えた．6 時間培養を続けた後，各ウエルの培養液を除去し，ダルベッコリン酸緩衝液（Sigma Chemical Company ; Lot No. 22K2420）を用いて細胞を洗浄した．新鮮な培養液 500 μL を加え，さらに 18 時間培養を続けた.

14.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウエルに 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し，3 日間培養した．培養終了後，培養液 500 μL を除き，S9 mix を 100 μL 添加した後，溶媒あるいは被験物質液 6 μL を加えた.

以下の操作は 14.8.3.に記載の方法に準じた.

14.8.5. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した.

14.8.6. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各ウエルから培養液を除き，生理食塩液を用いて細胞を 1 回洗浄した．10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：和光純薬工業株式会社;Lot No. TCP8214）を加えて約 10 分間細胞を固定した後，0.1%クリスタル・バイオレット（関東化学株式会社 ; Lot No. 107D2074）水溶液で 10 分間染色した．各プレートを水洗した後，乾燥させた．各ウエルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を 4.0 mL 加え，5 分間放置した後，分光光度計（105-50 型：株式会社日立製作所）を用いて 580 nm

での吸光度を測定した．陰性対照群での吸光度に対する比（＝相対細胞増殖率）を各用量群について求めた．さらにプロビット法【+S9 処理】あるいは対数確率紙【–S9 処理】を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した．プロビット法での算出には 360～1000 μg/mL の 3 点を用いた．

14.9. 染色体異常試験

14.9.1. 試験用量

細胞増殖抑制試験結果を基に，各試験系それぞれ 7 または 10 用量（公比 1.25：下表参照）を本試験の用量に設定した．

試験	試験用量 (μg/mL)									
短時間処理法 –S9 処理	228	285	357	446	557	696	870	1088	1360	1700
短時間処理法 +S9 処理	285	357	446	557	696	870	1088	-	-	-

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した．

14.9.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた．

試験系および連番を明記することにより各プレートを識別した．

14.9.3. 短時間処理法–S9 処理

直径 60 mm のプレート（細胞培養用シャーレ：住友ベークライト株式会社）に 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 5 mL（4×10^4 細胞）を播種し，3 日間培養した．培養終了後，溶媒，被験物質処理群では培養液 2.0 mL を除いた後，溶媒，被験物質液 30 μL を加えた．ただし，陽性対照処理群では培養液 2.3 mL を除いた後，陽性対照物質溶液 300 μL を加えた．6 時間各物質に暴露させた後，各プレートの培養液を除去し，ダルベッコリン酸緩衝液（Sigma Chemical Company；Lot No. 22K2420）を用いて細胞を洗浄した．新鮮な培養液 3 mL を加え，さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した．

14.9.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞／mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し，3 日間培養した．培養終了後，溶媒，被験物質処理群では培養液 2.5 mL を除

き S9 mix を 500 μL 添加した後, 溶媒, 被験物質液 30 μL を加えた. ただし, 陽性対照処理群では培養液 2.8 mL を除き S9 mix を 500 μL 添加した後, 陽性対照物質溶液 300 μL を加えた.

以下の操作は 14.9.3.に記載の方法に準じた.

14.9.5. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した.

14.9.6. 標本の作製

染色体標本作製の2時間前に最終濃度で0.2 μg/mL となるようコルセミド溶液（Invitrogen Corp. ; Lot No. 1121841）を添加し，細胞分裂を中期で停止させた．次いで，培養液を遠心管に全量移した後，0.25%トリプシン溶液（Invitrogen Corp. ; Lot No. 1121250）を用いてプレートから細胞を剥離し，遠心管内の培養液に加えた．細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後，37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え，37°C 中で 16 分間低張処理を行った．遠心分離により低張液を除いた後，4°C に冷却した固定液（メタノール 3 容：酢酸 1 容）で細胞を固定した．固定液を 3 回交換した後，新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし，脱脂洗浄済みのスライドガラス上に 1～2 滴ずつ滴下した．スライド標本を十分乾燥させ，1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液（pH 6.8：Merck KGaA ; Lot No. TP551574 147）を用いて希釈した 1.2%ギムザ染色液（Merck KGaA ; Lot No. 040428561）で 12 分間染色した．スライドを軽く水洗した後，乾燥させた．

1 プレート当たり 2～3 枚の染色体標本を作製した.

14.9.7. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に陰性対照，各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて，ATP フォトメーター（ルミテスターC-100LU：キッコーマン株式会社）を用いて細胞増殖に関するデータを採取した.

14.9.8. 染色体の観察

すべての標本をコード化した後，マスキング法で観察した.

各プレート当たり 100 個，すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下（× 600）で観察し，染色体の形態的変化としてギャップ（gap），染色分体切断（ctb），染色体切断（csb），染色分体交換（cte），染色体交換（cse）およびその他（oth）の構造異常に分類した．ただし，染色分体ある

いは染色体上に非染色性領域が存在し，染色体切断様の像が認められる場合，その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満，かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した．また，数的異常として 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し，倍数体等の出現数についても計数した．

14.10. 結果の解析

最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めない場合について行った．

異常細胞の出現頻度を，Fisher の直接確率計算法（有意水準 0.05）を用いて検定した．また用量依存性については，Cochran Armitage の傾向検定（有意水準 0.05）を用いて検定した．

陰性対照群と比較し被験物質処理群において有意差が認められ，かつ，試験用量に依存性が認められるか，あるいは再現性が確認された場合，陽性と判定した．ただし，最終的な判定は試験条件下での生物的な妥当性も考慮して行った．

陽性結果が得られたことから D_{20} 値（観察細胞の 20%に何れかの異常がみられる濃度）ならびに TR 値（単位濃度当たりの cte をもつ細胞の出現頻度の比較値）を算出した．

15. 試験結果

15.1. 細胞増殖抑制試験

15.1.1. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1 および Table 1 に示した.

50%細胞増殖抑制濃度は，短時間処理法–S9 処理で 1080 μg/mL，同+S9 処理で 824 μg/mL であった.

15.1.2. 析出等の観察

処理開始および処理終了時，pH の変動，析出等の特筆すべき変化は，いずれの試験用量においても観察されなかった.

15.2. 染色体異常試験

15.2.1. 短時間処理法–S9 処理

試験結果を Figure 2，Table 2 および Appendix 1 に示した.

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide 処理群での染色体構造異常は 557 μg/mL で 4.0%，696 μg/mL で 10.5%，870 μg/mL で 13.5%，1088 μg/mL で 3.0%を示し，統計学的に有意（$p \leq 0.05$）な増加と判定された．倍数体等の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照群と同等であり，明確な増加傾向は観察されなかった.

また，試験用量に依存した相対細胞増殖率の減少傾向が観察され，染色体異常評価群中の高用量である 1088 μg/mL での相対細胞増殖率は 18.0%であった．高用量群の 1360 および 1700 μg/mL での相対細胞増殖率はそれぞれ 9.1 および 3.0%であった.

一方，陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され，その出現頻度は 44.0%（$p \leq 0.05$）であった.

15.2.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 3，Table 3 および Appendix 2 に示した.

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide 処理群での染色体構造異常は 357 μg/mL で 1.5%，446 μg/mL で 3.0%，557 μg/mL で 14.5%を示し，446 および 557 μg/mL では統計学的に有意（$p \leq 0.05$）な増加と判定された．倍数性細胞の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照群と同等であり，明確な増加傾向は観察されなかった.

また，試験用量に依存した相対細胞増殖率の減少傾向が観察され，染色

体異常評価群中の高用量である 557 μg/mL での相対細胞増殖率は 18.2%であった．高用量群の 696，870 および 1088 μg/mL での相対細胞増殖率はそれぞれ 4.8，3.3 および 2.4%であった．

15.2.3. D_{20} 値ならびに TR 値算出結果

本染色体異常試験結果から算出した D_{20} 値（mg/mL）ならびに TR 値（mg 当たり）は次の通りであった．

試験	異常の種類	D_{20} 値	TR 値
短時間処理法–S9 処理	構造異常	1.110	7.9
短時間処理法+S9 処理	構造異常	0.788	20.6

15.2.4. 析出等の観察

–S9 処理では処理開始および処理終了時のいずれにおいても 1360 μg/mL 以上の用量で白色粉末状の析出物が観察された．

16. 考察および結論

Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide の変異原性，すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため，培養細胞（CHL/IU）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した．

細胞増殖抑制試験結果を基に，短時間処理法–S9 処理ならびに同+S9 処理とも細胞の増殖が抑制される濃度まで検討した．

その結果，Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide 処理では–S9 処理，+S9 処理のいずれの試験系とも染色体構造異常の出現頻度は陰性対照に比較して統計学的に有意な増加を示した．また，用量依存性についても統計学的な有意が認められたことから陽性反応と判断した．

変異原性の強さに関する相対的比較値である D_{20} 値の最小値は 0.788（mg/mL）および TR 値の最大値は 20.6 とそれぞれ算出され，既知変異原性物質に比較して本被験物質の変異原性は弱いことを示していた．

また，本被験物質 Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide について，Ames 試験で陽性との報告[1)]があった．また，類縁体である β-phenylethylhydrazine sulfate についても Ames 試験で陽性[1)]であった．さらに，本被験物質について，ラットおよびマウスを用いた UDS 試験についても陽性結果との報告[2)]があった．

なお，短時間処理法の陰性対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当施設での背景データ（Appendix 3）の範囲内であり，本試験は適切な条件でなされたと判断された．

以上の試験結果から，本試験条件下において Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した．

17. 参考文献

1) 清水英佑，林和夫，竹村望：ヒドラジン化合物の突然変異誘起性に関する研究，とくに発がん性との関係について: Nippon Eiseigaku Zasshi. Japanese Journal of Hygiene 1978; 33: 474-85.

2) Genotoxicity of a Variety of Hydrazine Derivatives in the Hepatocyte Primary Culture/DNA Repair Test Using Rat and Mouse Hepatocytes. Japanese Journal of Cancer Research 1988; Feb. 79 (2): 204-11.

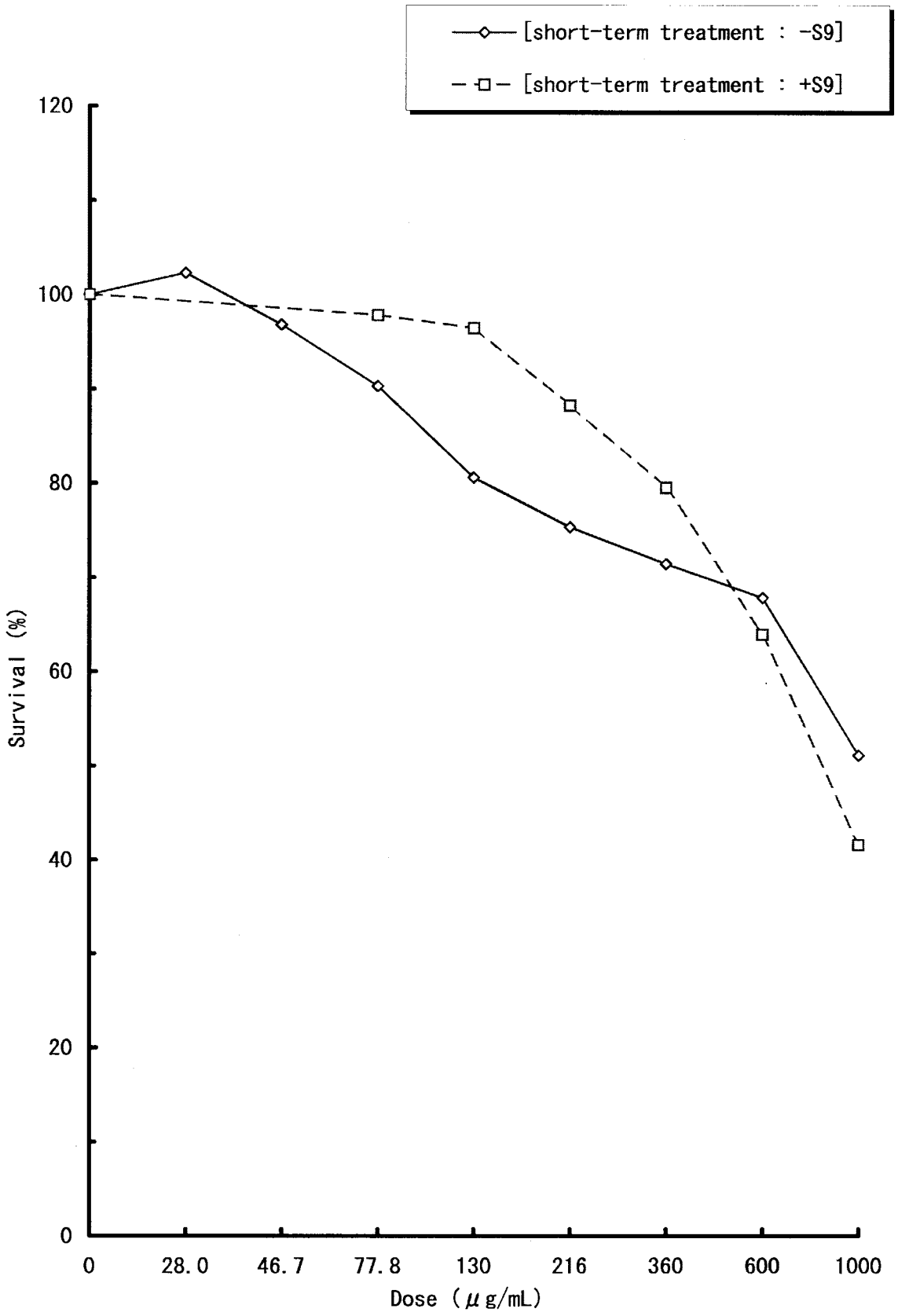


Figure 1. Growth inhibition of CHL cell streated with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide [short-term treatment]

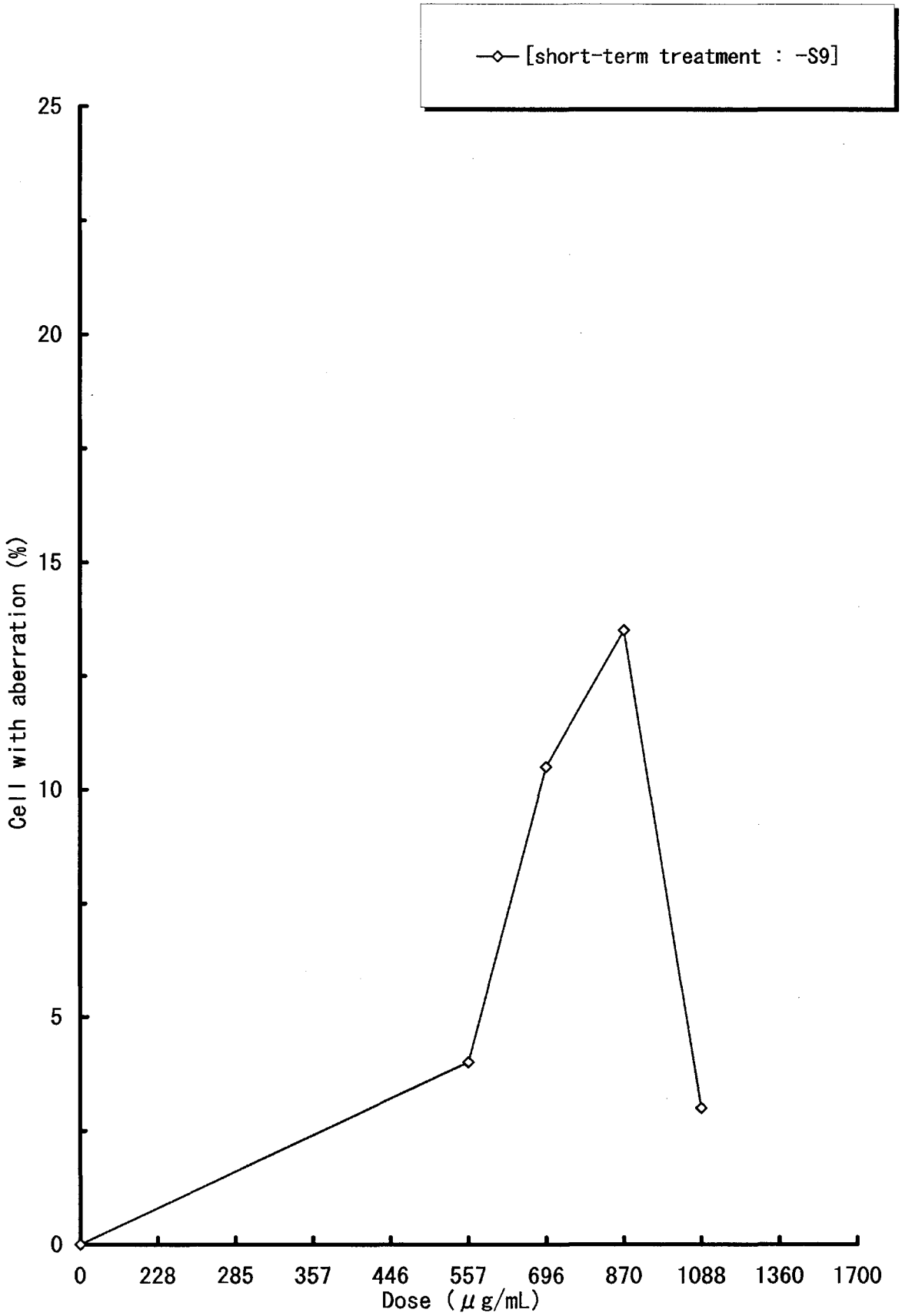


Figure 2. Incidence of structural aberrations induced by Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide [short-term treatment:-S9]

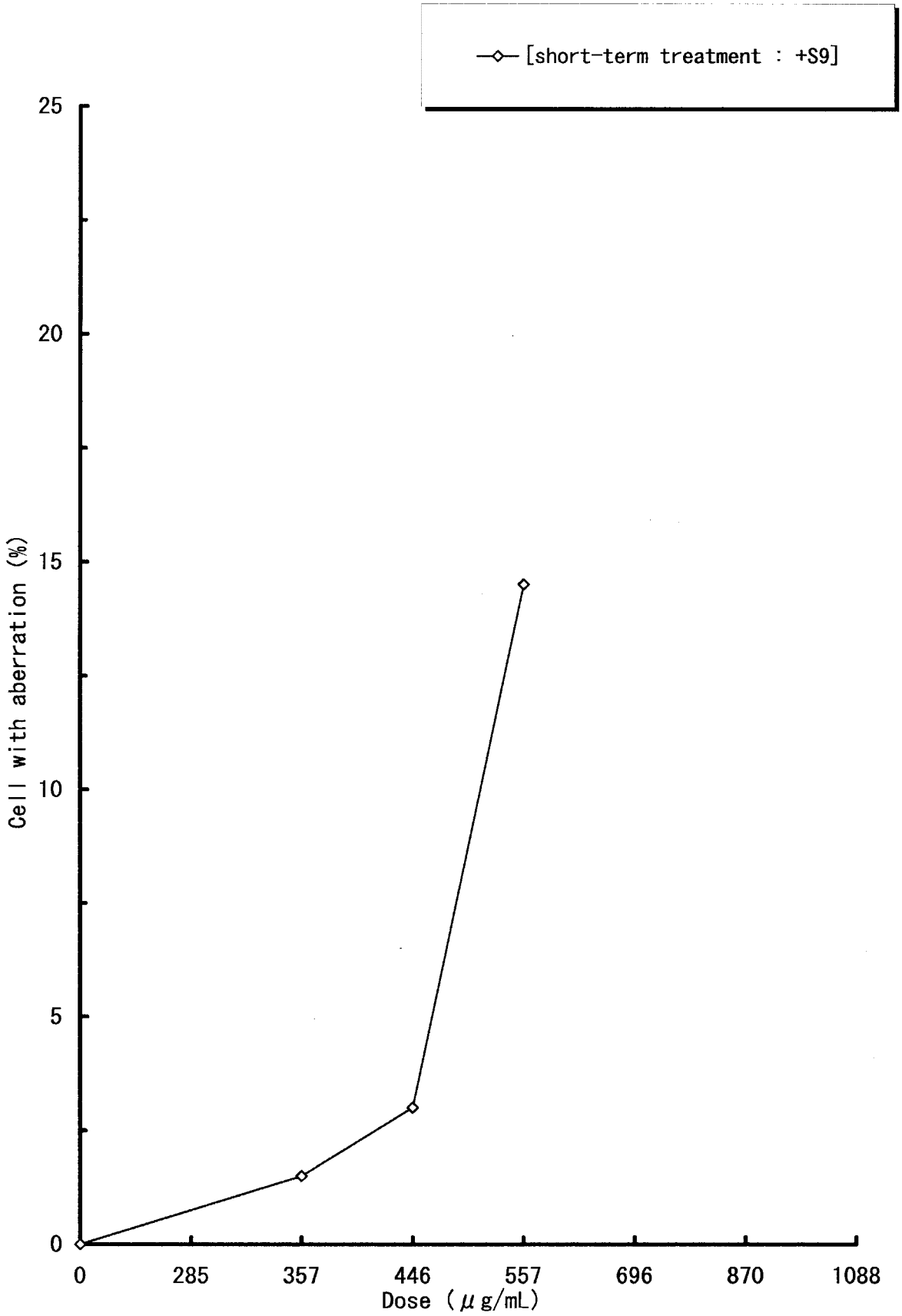


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide [short-term treatment:+S9]

Table 1. Results of growth inhibition test on Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide [short-term treatment]

Exp. No. 6251 (115-159)

[short-term treatment : -S9]

Compound	Dose (μg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	28.0	103.3 101.2	[102.3]
	46.7	97.5 96.1	[96.8]
	77.8	89.8 90.8	[90.3]
	130	81.7 79.4	[80.6]
	216	74.8 75.8	[75.3]
	360	70.0 72.8	[71.4]
	600	68.1 67.5	[67.8]
	1000	56.1 46.0	[51.1]

[short-term treatment : +S9]

Compound	Dose (μg/mL)	Relative cell growth (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	77.8	96.9 98.7	[97.8]
	130	94.1 98.7	[96.4]
	216	87.8 88.6	[88.2]
	360	80.3 78.7	[79.5]
	600	62.0 65.7	[63.9]
	1000	41.5 41.7	[41.6]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[short-term treatment : -S9] ———1080 (μg/mL)
[short-term treatment : +S9] ——— 824 (μg/mL)

a): Negative control

Table 2. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide [short-term treatment : -S9]

Exp. No. 6251 (115-159)

Compound	Dose (μg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)		Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
DMSO a)	0	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	#	200	1 (0.5)	
Test substance	557	6	47.7	200	5	4	4	0	0	0	8 (4.0)	*	200	1 (0.5)	
	696	6	37.7	200	7	14	11	1	0	0	21 (10.5)	*	200	4 (2.0)	Positive
	870	6	33.1	200	5	19	11	0	0	0	27 (13.5)	*	200	0 (0.0)	
	1088	6	18.0	200	7	4	3	0	0	0	6 (3.0)	*	200	2 (1.0)	
	1360 d)	6	9.1	Toxic											
	1700 d)	6	3.0	Toxic											
MMC b)	0.1	6	57.2	200	10	38	78	0	0	0	88 (44.0)	*	200	0 (0.0)	

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap
$p \leq 0.05$ Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)
* $p \leq 0.05$ Significant difference from the negative control group (Fisher's exact test)
a): Negative control
b): Positive control (Mitomycin C)
d): Visible precipitation was shown at the end of exposure period

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzensulfonic acid, 4,4'-oxybis-, dihydrazide [short-term treatment : +S9]

Exp. No. 6251 (115-159)

Compound	Dose (μg/mL)	Time of exposure (h)	Relative cell growth (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)		Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	Final judgement
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
DMSO a)	0	6	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0 (0.0)	#	200	2 (1.0)	
Test substance	357	6	58.7	200	0	1	2	0	0	0	3 (1.5)		200	3 (1.5)	
	446	6	46.9	200	1	1	5	0	0	0	6 (3.0)	*	200	2 (1.0)	Positive
	557	6	18.2	200	2	10	23	0	0	0	29 (14.5)	*	200	0 (0.0)	
	696	6	4.8	Toxic											
	870	6	3.3	Toxic											
	1088	6	2.4	Toxic											
CP b)	12.5	6	85.4	200	4	19	55	0	0	0	66 (33.0)	*	200	1 (0.5)	

Abbreviation: ctb; chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others
-gap: total number of cells with aberrations except gap
$p \leq 0.05$ Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)
* $p \leq 0.05$ Significant difference from the negative control group (Fisher's exact test)
a): Negative control
b): Positive control (Cyclophosphamide)