

最 終 報 告 書

1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸のは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1272

目 次

	頁
目 次	1
試験実施概要	6
要 約	10
緒 言	12
試験材料及び方法	13
1. 被験物質及び溶媒	13
1) 被験物質	13
2) 溶媒	13
2. 被験液の調製	14
1) 調製方法	14
2) 調製頻度	15
3) 安定性	15
3. 対照物質	15
1) 陰性対照	15
2) 陽性対照	15
4. 使用細胞株	17
1) 細胞株	17
2) 細胞の選択理由	17
3) 培養条件	17
4) 細胞の性状検査	17
5. S9mix 及び培養液	18
1) S9 mix	18

	頁
2) 培養液	19
6. 試験方法	19
1) 識別方法	20
2) 用量の設定	20
3) 細胞増殖抑制試験	21
4) 染色体異常試験	22
5) 確認試験	24
6) 標本の観察	24
7) 染色体異常の分類	24
8) 判定基準	25
試験結果	26
1. 細胞増殖抑制試験	26
1) 短時間処理法	26
2) 連続処理法	26
2. 染色体異常試験	27
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	27
2) 構造異常	27
3) 数的異常	28
4) 培養液の pH	29
3. 確認試験	29
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	29
2) 構造異常	30
3) 数的異常	30
4) 培養液の pH	30
考察	32
参考文献	33

Figures and Tables

- Fig. 1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Continuous treatment: 24 hr]
- Fig. 1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Continuous treatment: 48 hr]
- Fig. 2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Fig. 2-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 2-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Continuous treatment: 24 hr]
- Fig. 2-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Continuous treatment: 48 hr]
- Fig. 2-5 Results of the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

[Confirmation test: +S9 mix]

Fig. 2-6 Results of the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

[Confirmation test: 48 hr]

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

[Short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

[Short-term treatment: -S9 mix]

Table 1-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

[Continuous treatment: 24 hr]

Table 1-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

[Continuous treatment: 48 hr]

Table 2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

[Short-term treatment: +S9 mix]

Table 2-2 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

[Short-term treatment: -S9 mix]

Table 2-3 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

[Continuous treatment: 24 hr]

Table 2-4 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

[Continuous treatment: 48 hr]

Table 2-5 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

[Confirmation test: +S9 mix]

- Table 2-6 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Confirmation test: 48 hr]
- Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Continuous treatment: 24 hr]
- Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Continuous treatment: 48 hr]
- Table 3-5 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Confirmation test: +S9 mix]
- Table 3-6 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Confirmation test: 48 hr]

試験実施概要

1. 試験計画書

試験番号 : M-1272

試験表題 : 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸のほ乳類培養細胞を用いる
染色体異常試験

2. 試験目的 : ほ乳類の培養細胞（CHL/IU 細胞株）を用いて、本被験物質の染色体
異常誘発能の有無を明らかにした。

3. 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

4. 試験受託者 : 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

5. 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

6. 被験物質

供給者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室

製造者 : 三菱ガス化学株式会社

名称 : 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸
1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

別名 : ピロメリット酸、
pyromellitic acid

受領日 : 2006 年 10 月 5 日

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

要 約

1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸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・ハムスター培養細胞（CHL/IU）を用いて染色体異常試験を実施した。

初めに、毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 2600 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は、短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化ともに 2600 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 1300 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、連続処理法の 24 時間処理では明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は求められなかった。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 2523.5 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 2321.4 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 1246.9 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、短時間処理法では培養液交換前の、連続処理法では被験物質処理終了時の観察において、培養液の色調が 650 $\mu\text{g/mL}$ で淡橙色、1300 $\mu\text{g/mL}$ で淡黄色、2600 $\mu\text{g/mL}$ で黄色への変化が認められたことから、被験物質によるこれらの用量域での培養液の pH 低下が疑われた。以上の結果より、染色体異常試験における最高用量は、短時間処理法では 50%以上の細胞増殖抑制を示す 2600 $\mu\text{g/mL}$ とし、培養液の pH 低下が染色体構造異常を誘発し偽陽性を生じる事実が報告されていることを勘案し、その影響を調べるため、用量間隔を公比 1.4 とし総計 5 段階の用量を設定した。また、連続処理法では、染色体異常試験の短時間処理法において、高用量では染色体の観察が行えなかったことから、24 時間処理では 1800 $\mu\text{g/mL}$ を、48 時間処理では 1650 $\mu\text{g/mL}$ をそれぞれ最高用量とし、培養液の pH 低下の染色体構造異常誘発への影響を調べるため、用量間隔をせばめ、総計 7 段階の用量を設定した。

染色体異常試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 1327 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 1200 $\mu\text{g/mL}$ で、染色体構造異常の出現率が 1 用量のみでそれぞれ陽性及び疑陽性を示した。そこで、用量依存性及び再現性を確認するために、代謝活性化では 1650 $\mu\text{g/mL}$ を、48 時間処理では 1400 $\mu\text{g/mL}$ をそれぞれ最高用量とし、確認試験を実施した。

確認試験の結果、代謝活性化では陰性を示したが、48 時間処理では 1300 $\mu\text{g/mL}$ で、染色体構造異常の出現率が 1 用量のみで陽性を示した。

各処理法の陰性対照群における染色体の構造異常及び倍数体の出現率は全て陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値と同様であった。更に、各処理法の陽性対照群における染色体構造異常の出現率は全て陽性の判定基準を超え、試験施設の背景値と同様の顕著な誘発が認められた。従って試験は適切に実施されたものと考えられた。

以上の結果から、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸は、本試験条件下において倍数体の誘発能は有さなかったが、染色体の構造異常誘発において、出現率に用量依存性は認められないものの再現性が認められた。しかしながら、異常細胞の出現率が陽性の判定基準を示した用量においては、培養液の著しい pH 低下が認められたことから、本被験物質による構造異常誘発は、培養環境に起因する非特異的なものであると判断した。

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、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸の安全性点検の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/TU）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。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドライン等に準拠して実施した。

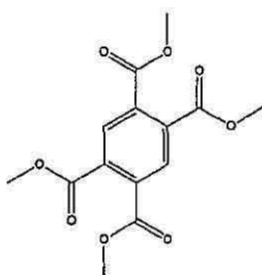
試験材料及び方法

1. 被験物質及び溶媒

1) 被験物質

被験物質情報 (Attached Data 1) は製造者における非 GLP 下での分析に基づくものである。

供給者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
 製造者 : 三菱ガス化学株式会社
 名称 : 1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸、
 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
 別名 : ピロメリット酸、pyromellitic acid
 CAS 番号 : 89-05-4
 構造式又は示性式 :



純度 : 99.9 %
 入手量 : 25g
 性状 : 白色粉末
 分子量 : 254.15
 ロット番号 :
 安定性 : 試験終了後に製造者において特性を測定し、その結果を入手して安定性を確認した。(Attached Data 2)。
 保存方法 : 室温 (保存期間中の実測温度 : 16~24℃)、暗所
 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
 残余物の取り扱い : 被験物質の残余物はすべて廃棄した。

2) 溶媒

名称 : DMSO

ロット番号 : SDP6175

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 : 試験開始前に被験物質の溶媒に対する溶解性の検討を実施した結果、注射用水には 26 mg/mL で不溶、DMSO には 260 mg/mL で溶解することが確認されたため、DMSO を溶媒として使用した。

2. 被験液の調製

1) 調製方法

(1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.5200 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 260.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2600 µg/mL）を調製した。次いで、260.0 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、130、65.0、32.5、16.3、8.13、4.06 及び 2.03 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 0.5200 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 260.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度：2600 µg/mL）を調製した。次いで、260.0 mg/mL 溶液を公比 1.4（各濃度の被験液 1.429 mL：溶媒 0.571 mL）で順次 4 段階希釈し、185.7、132.7、94.75 及び 67.68 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。

連続処理法では、被験物質 2.0000 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 200.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度：2000 µg/mL）を調製した。次いで、200.0 mg/mL 溶液を希釈し、180.0（200.0 mg/mL 溶液 0.900 mL：溶媒 0.100 mL）、165.0（200.0 mg/mL 溶液 0.825 mL：溶媒 0.175 mL）、150.0（200.0 mg/mL 溶液 0.750 mL：溶媒 0.250 mL）、135.0（200.0 mg/mL 溶液 0.675 mL：溶媒 0.325 mL）、120.0（200.0 mg/mL 溶液 0.600 mL：溶媒 0.400 mL）、105.0（200.0 mg/mL 溶液 0.525 mL：溶媒 0.475 mL）、

90.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.450 mL : 溶媒 0.550 mL) 及び 75.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.375 mL : 溶媒 0.625 mL) mg/mL の 9 濃度段階の被験液を調製した。このうち、24 時間処理では 180.0 から 90.0 mg/mL の被験液を、48 時間処理では 165.0 から 75.0 mg/mL の被験液を用いた。

(3) 確認試験

被験物質 2.0000 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 200.0 mg/mL 溶液 (プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度: 2000 µg/mL) を調製した。次いで、200.0 mg/mL 溶液を希釈し、180.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.900 mL : 溶媒 0.100 mL)、165.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.825 mL : 溶媒 0.175 mL)、150.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.750 mL : 溶媒 0.250 mL)、135.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.675 mL : 溶媒 0.325 mL)、120.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.600 mL : 溶媒 0.400 mL)、105.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.525 mL : 溶媒 0.475 mL)、90.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.450 mL : 溶媒 0.550 mL) 及び 75.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.375 mL : 溶媒 0.625 mL) mg/mL の 9 濃度段階の被験液を調製した。このうち、165.0 から 75.0 mg/mL の被験液を短時間処理法の代謝活性化の試験に用いた。また、200.0 mg/mL 溶液を希釈し、140.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.700 mL : 溶媒 0.300 mL)、130.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.650 mL : 溶媒 0.350 mL)、120.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.600 mL : 溶媒 0.400 mL)、110.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.550 mL : 溶媒 0.450 mL) 及び 100.0 (200.0 mg/mL 溶液 0.500 mL : 溶媒 0.500 mL) mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。このうち、140.0 から 100.0 mg/mL の被験液を連続処理法の 48 時間処理の試験に用いた。

2) 調製頻度

使用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

3) 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化は認められず、安定であることを確認した。

3. 対照物質

1) 陰性対照

溶媒として用いた DMSO を陰性対照物質とした。

2) 陽性対照

(1) 陽性対照物質として、代謝活性化ではシクロフォスファミドを、非代謝活性化では

マイトマイシンCを用いた。

名 称 : シクロフォスファミド (以下 CP と略記する)

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

名 称 : マイトマイシン C (以下 MMC と略記する)

ロット番号 : 480AEL

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

(2) 調製方法

染色体異常試験の短時間処理法では、CP 0.0140 g を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、K6G71) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度 : 14 μ g/mL) を調製した。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、K6G71) 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)。

染色体異常試験の連続処理法では、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、K6G71) 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 μ g/mL)。

確認試験の代謝活性化では、CP 0.0140 g を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、K6G71) を 20 mL 加えて

溶解し 0.70 mg/mL 溶液（培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度：14 $\mu\text{g/mL}$ ）を調製した。確認試験の 48 時間処理では、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、K6G72）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 $\mu\text{g/mL}$ ）。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

(3) 陽性対照物質の選択理由

毒性試験法ガイドライン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。

4. 使用細胞株

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入手（2004 年 11 月 2 日）し、継代数の少ないものを液体窒素中で保存し、これを融解し継代培養したものを使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 11 継代、染色体異常試験では短時間処理法で 17 継代、連続処理法で 21 継代、確認試験では 25 継代であった。また、元株細胞はマイコプラズマ陰性であることを入手時の情報で確認した。

2) 細胞の選択理由

自然発生染色体異常の発現率が低いこと、さらに種々の化学物質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。

3) 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂ 濃度 5%、温度 37℃、高湿度条件下で培養した。継代は 1～4 日ごとに行った。

4) 細胞の性状検査

試験に使用する細胞は凍結保存から解凍し、30 代を越えない範囲で継代培養を行っているものについて、染色体のモード数、倍加時間及びマイコプラズマ汚染の有無等の特性について定期的に検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。

5. S9 mix 及び培養液

1) S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社より購入した S9 と、自家調製を行ったコファクターを用時に混合して S9 mix を調製した。本試験に用いた S9 の製品分析書に示された情報、保存条件及び使用期限とコファクターの保存条件、使用期限及び S9 mix の組成は以下の通りであった。

(1) S9

名 称	: S9
ロット番号	: 06092907
製 造 日	: 2006 年 9 月 29 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 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	: 2007 年 3 月 28 日 (製造後 6 箇月)
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
ロット番号	: 061207
製 造 日	: 2006 年 12 月 7 日
保 存 方 法	: 冷凍 (超低温フリーザー)
使用期限	: 2007 年 6 月 6 日 (製造後 6 箇月)
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	20mmol/L	HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mmol/L	塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330mmol/L	塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mmol/L	グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40mmol/L	酸化型ニコチンアミド-アデニン	
			ジヌクレオチドリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
			注射用水 (精製水)	0.67 mL

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と同様になるように各成分の必要量を秤取し、注射用水に溶解、pH 調整、ろ過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

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℃, 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 : 542384、571834

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 : 1367407

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. 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
	連続処理法	24 時間処理 48 時間処理
3. 確認試験	短時間処理法	代謝活性化
	連続処理法	48 時間処理

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群(Negative Control)の場合は「NC」を、被験物質用量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、陽性対照群(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。なお、確認試験における識別方法は、染色体異常試験と同様な方法を用いた。

2) 用量の設定

(1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 2600 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 1300、650、325、163、81.3、40.6 及び 20.3 $\mu\text{g/mL}$ の計 8 用量を設定した。

(2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は、短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化ともに 2600 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 1300 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、連続処理法の 24 時間処理では明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は求められなかった。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 2523.5 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 2321.4 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 1246.9 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、短時間

処理法では培養液交換前の観察において、連続処理法では被験物質処理終了時の観察において、培養液色調の淡橙色変化が 650 $\mu\text{g/mL}$ で、淡黄色変化が 1300 $\mu\text{g/mL}$ で、黄色変化が 2600 $\mu\text{g/mL}$ で認められ、これらの用量域での被験物質による培養液の pH 低下が疑われた。以上の結果を総合的に勘案して、染色体異常試験における最高用量は、毒性試験法ガイドラインに従い、短時間処理法では 50%以上の細胞増殖抑制を示す 2600 $\mu\text{g/mL}$ とした。また、培養液の pH 低下は、染色体構造異常を誘発し偽陽性を生じることから、その影響を調べるため、用量間隔を公比 1.4 とし総計 5 段階の用量を設定した。さらに、染色体異常試験の短時間処理法の結果、1857 $\mu\text{g/mL}$ 以上では細胞毒性のため染色体標本の観察が出来なかったことから、被験物質に連続して暴露される連続処理法では、細胞毒性がさらに強まり染色体標本の観察は難しくなると推測されるため、連続処理法では最高用量を減じることとした。また、短時間処理法の代謝活性化では 1327 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の結果が得られ、その原因が被験物質による培養液の pH 低下にあると推測されたため、用量の間隔を狭め、24 時間処理では 1800、1650、1500、1350、1200、1050 及び 900 $\mu\text{g/mL}$ の計 7 段階の用量を、48 時間処理では 1650、1500、1350、1200、1050、900 及び 750 $\mu\text{g/mL}$ の計 7 段階の用量をそれぞれ設定し、pH の影響をさらに精査した。

(3) 確認試験

染色体異常試験の結果、短時間処理法の代謝活性化で 1327 $\mu\text{g/mL}$ においてのみ、連続処理法の 48 時間処理では 1200 $\mu\text{g/mL}$ においてのみ染色体構造異常の出現率が陽性の判定基準内の値を示した。そこで、毒性試験法ガイドライン及び試験計画書の 12-5-1.項の規定に従って、「出現率の用量依存性又は再現性」を確認するために確認試験を実施することとし、短時間処理の代謝活性化では 1327 $\mu\text{g/mL}$ の近傍の用量として 1350 $\mu\text{g/mL}$ を設定し、さらに等差で 1350 $\mu\text{g/mL}$ の上に 1650 及び 1500 $\mu\text{g/mL}$ の 2 用量、下に 1200、1050、900 及び 750 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量の計 7 用量を設けることとした。また、連続処理法の 48 時間処理では 1200 $\mu\text{g/mL}$ を中心として、等差で 1200 $\mu\text{g/mL}$ の上に 1400 及び 1300 $\mu\text{g/mL}$ の 2 用量、下に 1100 及び 1000 $\mu\text{g/mL}$ の 2 用量の計 5 用量を設けることとした。

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被験物質用量群、陰性対照群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- 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、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色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、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、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（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。

(2) 連続処理法

- ① 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質処理群、陰性対照群を設けた。プレートは各群 2 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。
- ② プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5 mL）を播種した。培養 3 日後に培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色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。

4) 染色体異常試験

(1) 短時間処理法

- ① 代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれに被験物質用量群、陰性対照群及び陽性対照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート（直径 60 mm）を

用いた。

- 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、代謝活性化では培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 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。非代謝活性化では培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群では培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。なお、陰性対照群及び被験物質用量群においては、溶媒または被験液を添加した直後に、細胞密度測定用のプレート（識別番号の枝番号④）より各々 150 μL の培養液を採取し、ISFET pH メーター（機器登録番号 2195）を用いて pH を測定した。いずれの場合も、その後 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及び培養液の色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 枚のプレートについて、染色体観察用標本作製のために培養終了約 2 時間前にコルセミド（ジメコルシン溶液、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 箇所滴下した。染色体標本はプレートあたり 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 枚のプレートは、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、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

(2) 連続処理法

- ① 24 時間処理及び 48 時間処理のそれぞれに被験物質用量群、陰性対照群及び陽性対照群を設けた。プレートは各群 4 枚とし、プラスチックプレート（直径 60mm）を用いた。
- 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 日後に培養液 0.050 mL を取り除き、陰性対照群では溶媒 0.050 mL を、被験物質用量群では各

濃度の被験液 0.050 mL を加えた。また、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。なお、陰性対照群及び被験物質用量群においては、溶媒または被験液を添加した直後に、細胞密度測定用のプレート (識別番号の枝番号④) より各々 150 μL の培養液を採取し、ISFET pH メーター (機器登録番号 2195) を用いて pH を測定した。いずれの場合も、その後 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、肉眼で被験物質の析出の有無及び培養液の色を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の培養状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様にして染色体標本作製した。
- ④ 残る各群 2 枚のプレートは、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、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。

5) 確認試験

確認試験は、試験計画書の「12-5. 確認・追加試験、12-5-1. 確認試験」の規定に従い、染色体異常試験に準ずる方法を用いて実施した。

6) 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。同時に染色体数 46～54 本を持つ細胞を倍数体とし、そ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。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とした。

7) 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、構造異常はさら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また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) 他。

(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。

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

8) 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 (+)

染色体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。

試験結果

1. 細胞増殖抑制試験

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

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は、短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化ともに 2600 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 1300 $\mu\text{g/mL}$ 以上であった。また、連続処理法の 24 時間処理では明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は求められなかった。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 2523.5 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 2321.4 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 1246.9 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

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すると、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 163 $\mu\text{g/mL}$ 以上において、細胞の浮遊・形態変化が認められた。また、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 2600 $\mu\text{g/mL}$ では、被験物質の析出のため細胞状態の観察が不可能であった。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに淡橙色変化が 650 $\mu\text{g/mL}$ で、淡黄色変化が 1300 $\mu\text{g/mL}$ で、黄色変化が 2600 $\mu\text{g/mL}$ で認められ、被験物質によるこれらの用量域での培養液の pH 低下が疑われた。肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化では 650 $\mu\text{g/mL}$ 以上で、非代謝活性化では 2600 $\mu\text{g/mL}$ で析出が認められた。

2) 連続処理法

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

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

明らかに 50%以上の細胞増殖抑制が認められる用量は、連続処理法の 24 時間処理では求められず、48 時間処理では 1300 $\mu\text{g/mL}$ であった。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、連続処理法の 48 時間処理では 1246.9 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

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すると、24 時間処理では

325 µg/mL 以上において、48 時間処理では 650 µg/mL 以上において、細胞の浮遊・形態変化が認められた。また、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 2600 µg/mL では、被験物質の析出のため細胞状態の観察が不可能であった。肉眼による培養液の色調の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに淡橙色変化が 650 µg/mL で、淡黄色変化が 1300 µg/mL で、黄色変化が 2600 µg/mL で認められ、被験物質によるこれらの用量域での培養液の pH 低下が疑われた。肉眼による被験物質の析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 2600 µg/mL で析出が認められた。

2. 染色体異常試験

短時間処理法の結果を Fig. 2-1、2-2、Table 2-1、2-2、3-1 及び 3-2 に、連続処理法の結果を Fig. 2-3、2-4、Table 2-3、2-4、3-3 及び 3-4 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

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すると、短時間処理法の代謝活性化では 947.5 µg/mL 以上で、非代謝活性化では 676.8 µg/mL 以上で、連続処理法の 24 時間処理では 900 µg/mL 以上で、48 時間処理では 750 µg/mL 以上で細胞の浮遊・形態変化が認められた。なお、短時間処理法の代謝活性化では 1857 µg/mL 以上で、非代謝活性化では 2600 µg/mL で被験物質の析出のため細胞状態の観察が不可能であった。肉眼による培養液の色調の観察では、短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化ともに、淡橙色変化が 676.8 µg/mL 以上で、淡黄色変化が 1327 µg/mL で、黄色変化が 1857 µg/mL 以上で認められ、連続処理法の 24 時間処理において、淡橙色変化が 900 µg/mL で、淡黄色変化が 1050 µg/mL 以上で、黄色変化が 1350 µg/mL 以上で認められ、被験物質によるこれらの用量域での培養液の pH 低下が疑われた。また、肉眼による被験物質の析出の観察では、短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化ともに 1857 µg/mL 以上で析出が認められた。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では、2600 µg/mL 及び 1857 µg/mL で細胞毒性のため分裂中期像の観察が行えず TOX と判定され、1327 µg/mL で 12.5% と、陽性の判定基準である 10% 以上を示し、947.5 µg/mL で 1.0% 及び 676.8 µg/mL で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。また、非代謝活性化では、2600 µg/mL 及び 1857 µg/mL で細胞毒性のため分裂中期像の観察が行えず TOX と判定され、1327 µg/mL で 1.0%、947.5 µg/mL で 0.5% 及び 676.8 µg/mL で 2.5% と陰性の判定基準である

5%未満を示した。連続処理法の24時間処理では、1800 µg/mL、1650 µg/mL、1500 µg/mL及び1350 µg/mLで細胞毒性のため分裂中期像の観察が行えず TOX と判定され、1200 µg/mLで2.5%、1050 µg/mLで1.5%及び900 µg/mLで1.0%と陰性の判定基準である5%未満を示した。また、48時間処理では、1650 µg/mL及び1500 µg/mLで細胞毒性のため分裂中期像の観察が行えず TOX と判定され、1350 µg/mLで37.0%と陽性の判定基準である10%以上を示したが、観察分裂中期像 (Cells observed) の数が不足で信頼性が得られる結果ではなかったため UR (unreliable) と判定され、1200 µg/mLで7.5%と疑陽性の判定基準である5%以上10%未満を示し、1050 µg/mLで1.5%、900 µg/mLで1.0%及び750 µg/mLで2.0%と陰性の判定基準である5%未満を示した。

各処理法ともに陰性対照群及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性及び陽性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ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。

3) 数的異常

倍数体の出現率は、短時間処理法の代謝活性化では、2600 µg/mL及び1857 µg/mLで細胞毒性のため分裂中期像の観察が行えず TOX と判定され、1327 µg/mLで2.5%、947.5 µg/mLで0%及び676.8 µg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満を示した。また、非代謝活性化では、2600 µg/mL及び1857 µg/mLで細胞毒性のため分裂中期像の観察が行えず TOX と判定され、1327 µg/mLで3.0%、947.5 µg/mLで0%及び676.8 µg/mLで0%と陰性の判定基準である5%未満を示した。連続処理法の24時間処理では、1800 µg/mL、1650 µg/mL、1500 µg/mL及び1350 µg/mLで細胞毒性のため分裂中期像の観察が行えず TOX と判定され、1200 µg/mLで0%、1050 µg/mLで1.0%及び900 µg/mLで0.5%と陰性の判定基準である5%未満を示した。また、48時間処理では、1650 µg/mL及び1500 µg/mLで細胞毒性のため分裂中期像の観察が行えず TOX と判定され、1350 µg/mLで1.0%と陰性の判定基準である5%未満を示したが、観察分裂中期像 (Cells observed) の数が不足で信頼性が得られる結果ではなかったため UR (unreliable) と判定され、1200 µg/mLで1.0%、1050 µg/mLで0%、900 µg/mLで0%及び750 µg/mLで0.5%と陰性の判定基準である5%未満を示した。

各処理法ともに陰性対照群における数的異常の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ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。

4) 培養液の pH

短時間処理法及び連続処理法ともに、溶媒または被験物質の添加直後に細胞増殖抑制率確認用のプレート 1 枚から培養液を 150 μL 採取し、pH を測定した。その結果、短時間処理法の代謝活性化における pH は、陰性対照群では 7.8、2600 $\mu\text{g/mL}$ では 4.3、1857 $\mu\text{g/mL}$ では 4.7、1327 $\mu\text{g/mL}$ では 5.5、947.5 $\mu\text{g/mL}$ では 6.3 及び 676.8 $\mu\text{g/mL}$ では 6.7 であった。また、短時間処理法の非代謝活性化における pH は、陰性対照群では 7.9、2600 $\mu\text{g/mL}$ では 4.4、1857 $\mu\text{g/mL}$ では 5.1、1327 $\mu\text{g/mL}$ では 5.9、947.5 $\mu\text{g/mL}$ では 6.4 及び 676.8 $\mu\text{g/mL}$ では 6.7 であった。連続処理法の 24 時間処理における pH は、陰性対照群では 8.1、1800 $\mu\text{g/mL}$ では 4.7、1650 $\mu\text{g/mL}$ では 5.1、1500 $\mu\text{g/mL}$ では 5.5、1350 $\mu\text{g/mL}$ では 5.5、1200 $\mu\text{g/mL}$ では 6.3、1050 $\mu\text{g/mL}$ では 6.2 及び 900 $\mu\text{g/mL}$ では 6.8 であった。さらに、48 時間処理における pH は、陰性対照群では 8.3、1650 $\mu\text{g/mL}$ では 5.2、1500 $\mu\text{g/mL}$ では 5.4、1350 $\mu\text{g/mL}$ では 5.8、1200 $\mu\text{g/mL}$ では 5.9、1050 $\mu\text{g/mL}$ では 6.2、900 $\mu\text{g/mL}$ では 6.4 及び 750 $\mu\text{g/mL}$ では 7.0 であった。

3. 確認試験

染色体異常試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 1327 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 1200 $\mu\text{g/mL}$ で、染色体構造異常の出現率が 1 用量のみでそれぞれ陽性及び疑陽性を示した。そこで、用量依存性又は再現性を確認するために、代謝活性化では 1650 $\mu\text{g/mL}$ を、48 時間処理では 1400 $\mu\text{g/mL}$ をそれぞれ最高用量とし、確認試験を実施した。

代謝活性化の結果を Fig. 2-5、Table 2-5 及び 3-5 に、48 時間処理の結果を Fig. 2-6、Table 2-6 及び 3-6 に示した。

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

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すると、代謝活性化では 1500 $\mu\text{g/mL}$ 以上で被験物質の析出のため細胞状態の観察が不可能であったが、750 $\mu\text{g/mL}$ 以上で細胞の浮遊・形態変化が、48 時間処理では 1000 $\mu\text{g/mL}$ 以上で細胞の浮遊・形態変化が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化において、淡橙色変化が 750 $\mu\text{g/mL}$ 以上で、淡黄色変化が 1200 $\mu\text{g/mL}$ 以上で、黄色変化が 1500 $\mu\text{g/mL}$ 以上で認められ、連続処理法の 48 時間処理において、淡橙色変化が 1000 $\mu\text{g/mL}$ で、淡黄色変化が 1100 $\mu\text{g/mL}$ で、黄色変化が 1200 $\mu\text{g/mL}$ 以上で認められ、被験物質によるこれらの用量域での培養液の pH 低下が疑われた。また、肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び 48 時間処理ともに析出は認められなかった。

2) 構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、代謝活性化では、1650 $\mu\text{g/mL}$ 及び 1500 $\mu\text{g/mL}$ で細胞毒性のため分裂中期像の観察が行えず TOX と判定され、1350 $\mu\text{g/mL}$ で 13.6% と陽性の判定基準である 10% 以上を示したが、観察分裂中期像 (Cells observed) の数が不足で信頼性が得られる結果ではなかったため UR (unreliable) と判定され、1200 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%、1050 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、900 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0% 及び 750 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。また、48 時間処理では、1400 $\mu\text{g/mL}$ で 41.0% と陽性の判定基準である 10% 以上を示したが、観察分裂中期像 (Cells observed) の数が不足で信頼性が得られる結果ではなかったため UR (unreliable) と判定され、1300 $\mu\text{g/mL}$ で 27.5% と陽性の判定基準である 10% 以上を示し、1200 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%、1100 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5% 及び 1000 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。

各処理法ともに陰性対照群及び陽性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性及び陽性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ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。

3) 数的異常

数的異常の出現率 (TA) は、代謝活性化では、1650 $\mu\text{g/mL}$ 及び 1500 $\mu\text{g/mL}$ で細胞毒性のため分裂中期像の観察が行えず TOX と判定され、1350 $\mu\text{g/mL}$ で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示したが、観察分裂中期像 (Cells observed) の数が不足で信頼性が得られる結果ではなかったため UR (unreliable) と判定され、1200 $\mu\text{g/mL}$ で 2.5%、1050 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%、900 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% 及び 750 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。また、48 時間処理では、1400 $\mu\text{g/mL}$ で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示したが、観察分裂中期像 (Cells observed) の数が不足で信頼性が得られる結果ではなかったため観察細胞数が不足で信頼性が得られず UR (unreliable) と判定され、1300 $\mu\text{g/mL}$ で 1.5%、1200 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、1100 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% 及び 1000 $\mu\text{g/mL}$ で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満を示した。

各処理法ともに陰性対照群における染色体構造異常の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (Attached Data 3) とほぼ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。

4) 培養液の pH

代謝活性化及び 24 時間処理ともに、被験物質の添加直後に細胞増殖抑制率確認用のプレート 1 枚から培養液を 150 μL 採取し、pH を測定した。その結果、短時間処理法の代謝活

性化における pH は、陰性対照群では 8.0、1650 $\mu\text{g/mL}$ では 4.9、1500 $\mu\text{g/mL}$ では 5.2、1350 $\mu\text{g/mL}$ では 5.5、1200 $\mu\text{g/mL}$ では 6.0、1050 $\mu\text{g/mL}$ では 6.1、900 $\mu\text{g/mL}$ では 6.4 及び 750 $\mu\text{g/mL}$ では 6.8 であった。また、48 時間処理における pH は、陰性対照群では 8.1、1400 $\mu\text{g/mL}$ では 5.8、1300 $\mu\text{g/mL}$ では 5.9、1200 $\mu\text{g/mL}$ では 6.3、1100 $\mu\text{g/mL}$ では 6.5 及び 1000 $\mu\text{g/mL}$ では 6.6 であった。

考 察

染色体異常試験において、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸は、短時間処理法の代謝活性化及び連続処理法の48時間処理で、染色体構造異常の出現率がいずれも1用量のみで、陽性及び疑陽性を示した。そこで、用量依存性又は再現性を確認するために、被験物質の用量間隔を狭めて、短時間処理法の代謝活性化及び連続処理法の48時間処理と同様な方法を用い確認試験を実施した。

確認試験において、代謝活性化では染色体構造異常の出現率は陰性を、48時間処理では1用量のみで陽性を示した。なお、染色体異常試験及び確認試験のいずれの処理法においても、倍数体の出現率は全て陰性の判定基準内にあった。

また、陰性対照群における染色体の構造異常及び倍数体の出現率は、いずれの処理法においても全て陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値と同様であった。更に、いずれの処理法においても陽性対照群における染色体構造異常の出現率は全て陽性の判定基準を超え、試験施設の背景値と同様に顕著な誘発が認められた。また、全ての処理法において、2枚のシャーレ間における染色体異常細胞の出現頻度に著しい差はなく、培養条件などの試験環境の異常も認められなかった。これらのことから、試験は適切に実施されたものと考えられた。

培養液のpH低下は染色体構造異常を誘発することが報告されている⁹⁾。1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸は、4個のカルボキシル基を持つことから、酸性物質で、培養液に添加した場合、pHを低下させると予測され、事実、細胞増殖抑制試験において培養液のpH指示薬が強い酸性反応を示した。そのため、染色体異常試験及び確認試験では、被験物質の添加直後にpHの測定を実施したが、いずれの場合も染色体構造異常の頻度を増加させた用量においては、pH6.0以下の強い酸性を示すことが確認された。したがって、本試験において認められた染色体構造異常頻度の増加は、被験物質がもたらした非生理的な培養環境か、あるいは被験物質そのものの染色体構造に及ぼす影響のいずれかに起因するものと推測される。

以上の結果から、1,2,4,5-ベンゼンテトラカルボン酸は、本試験条件下において倍数体の誘発能は有さなかったが、染色体の構造異常誘発において、出現率に用量依存性は認められないものの再現性が認められた。しかしながら、異常細胞の出現率が陽性の判定基準を示した用量においては、培養液の著しいpH低下が認められたことから、本被験物質による構造異常誘発は、培養環境に起因する非特異的なものであると判断した。

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): 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) 森田 健 (1997): 染色体異常試験における培養環境の研究 (非生理的 pH 環境における染色体異常の誘発), *Environ. Mutagen Res.*, **19**, 27-36

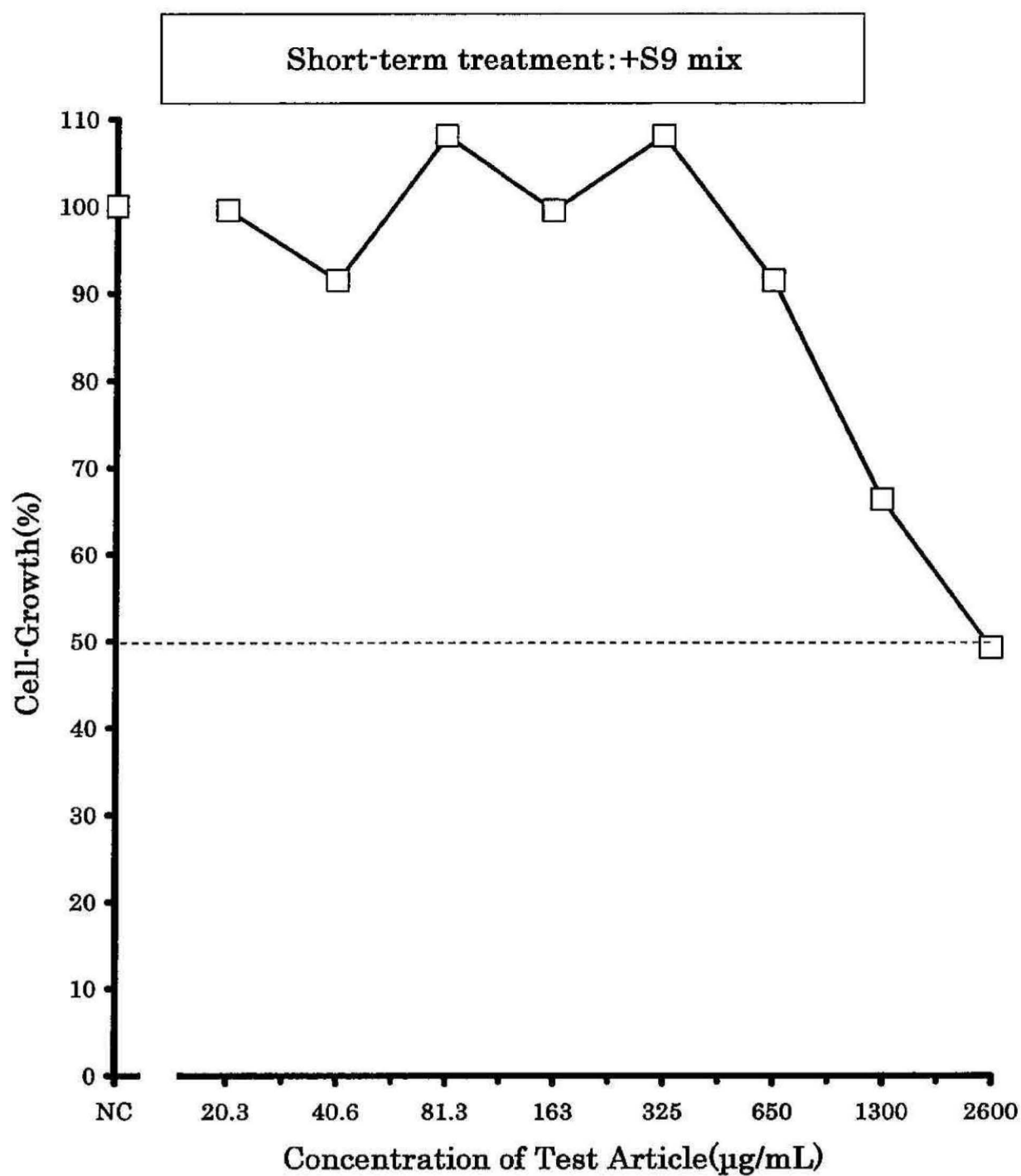


Fig.1-1 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

NC: Negative control

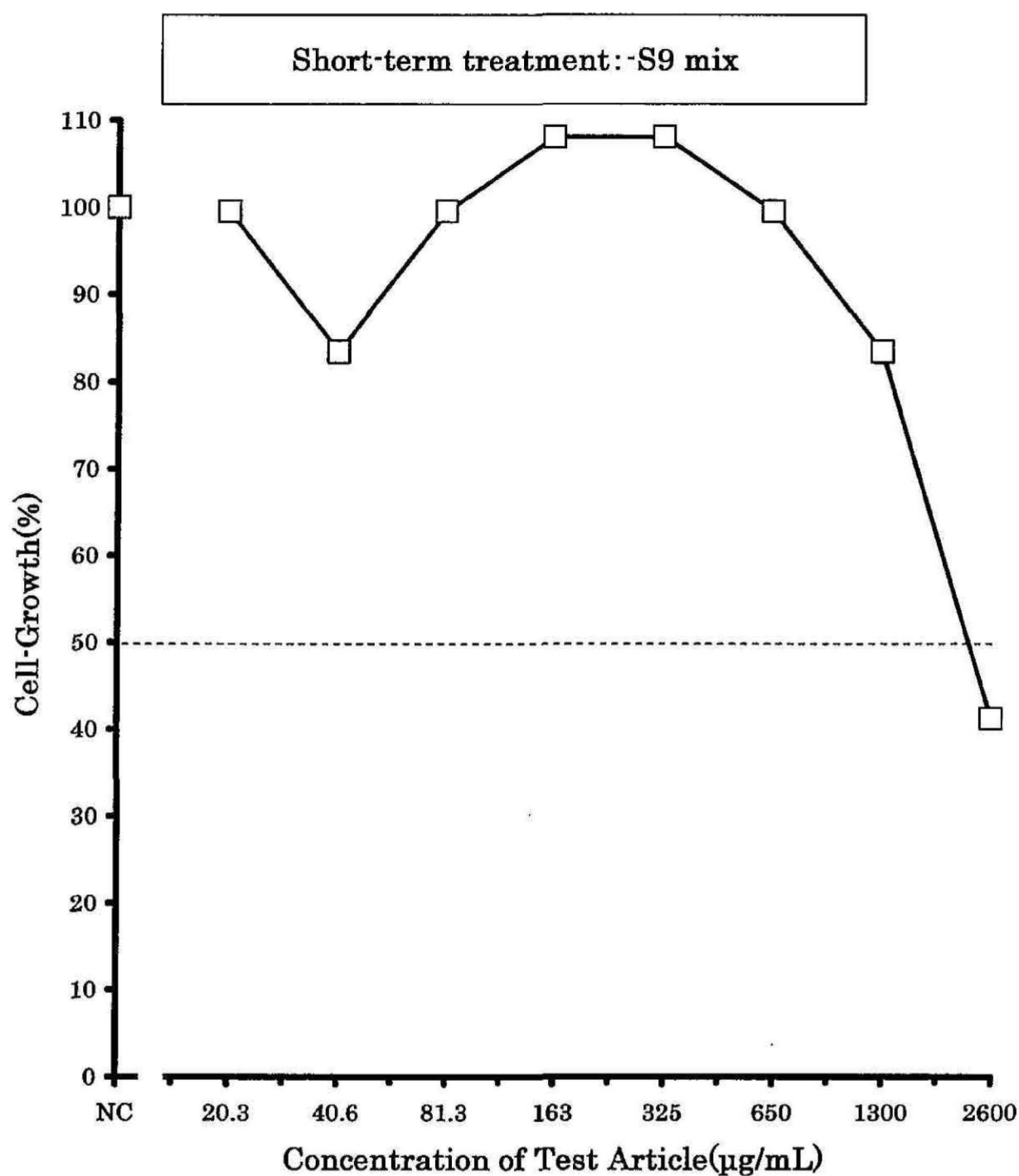


Fig.1-2 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

NC: Negative control

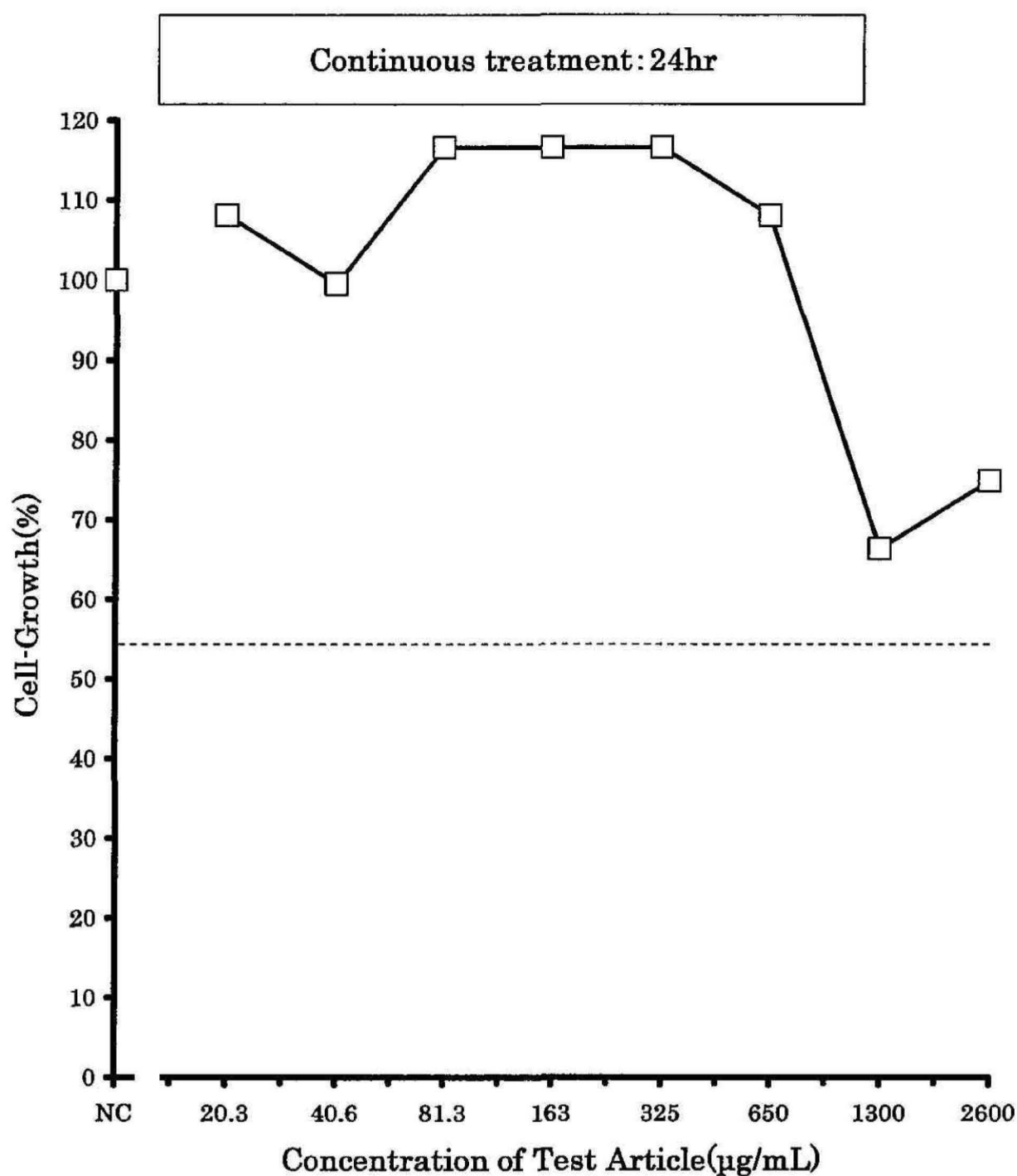


Fig.1-3 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

NC: Negative control

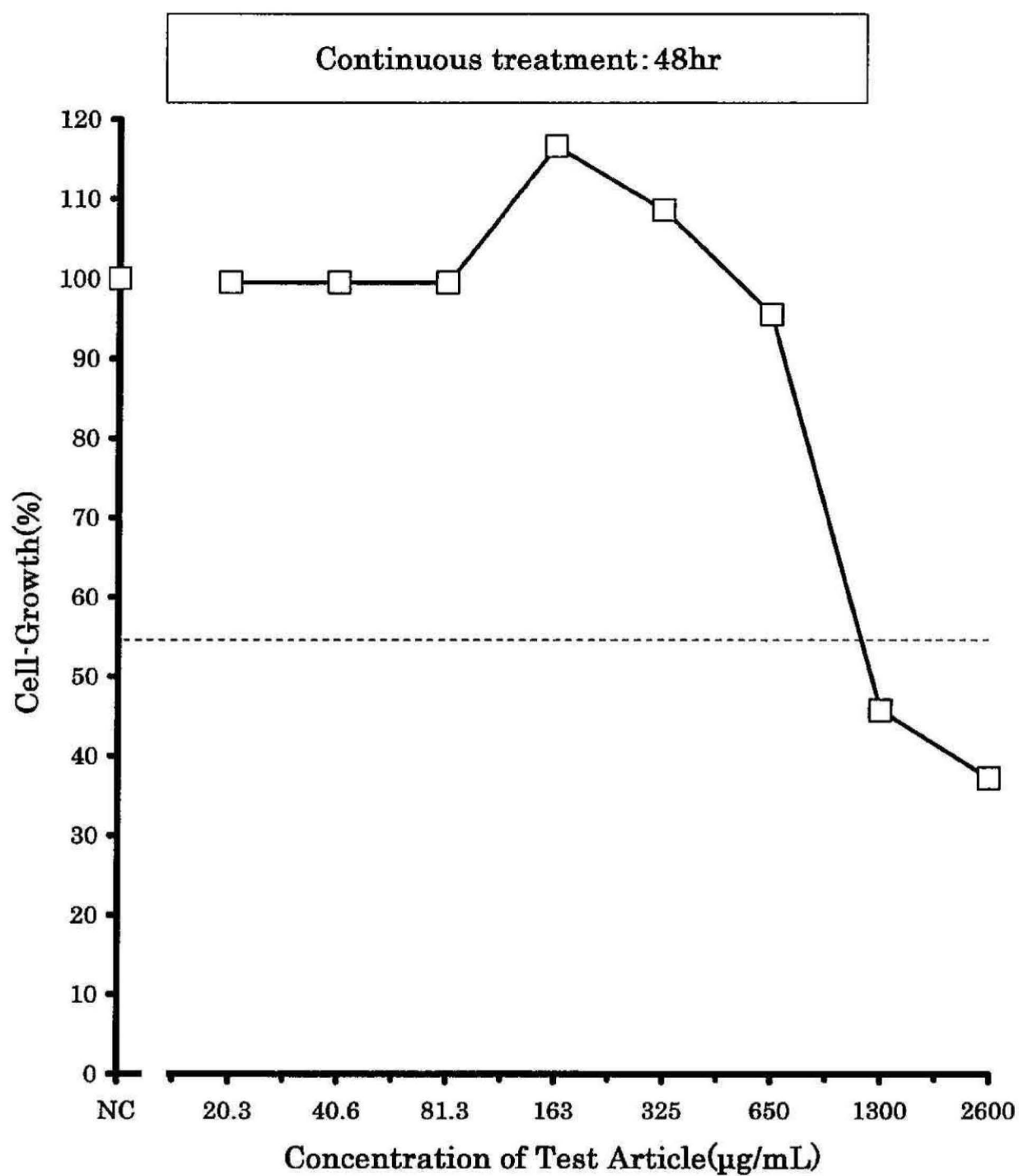


Fig.1-4 Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

NC: Negative control

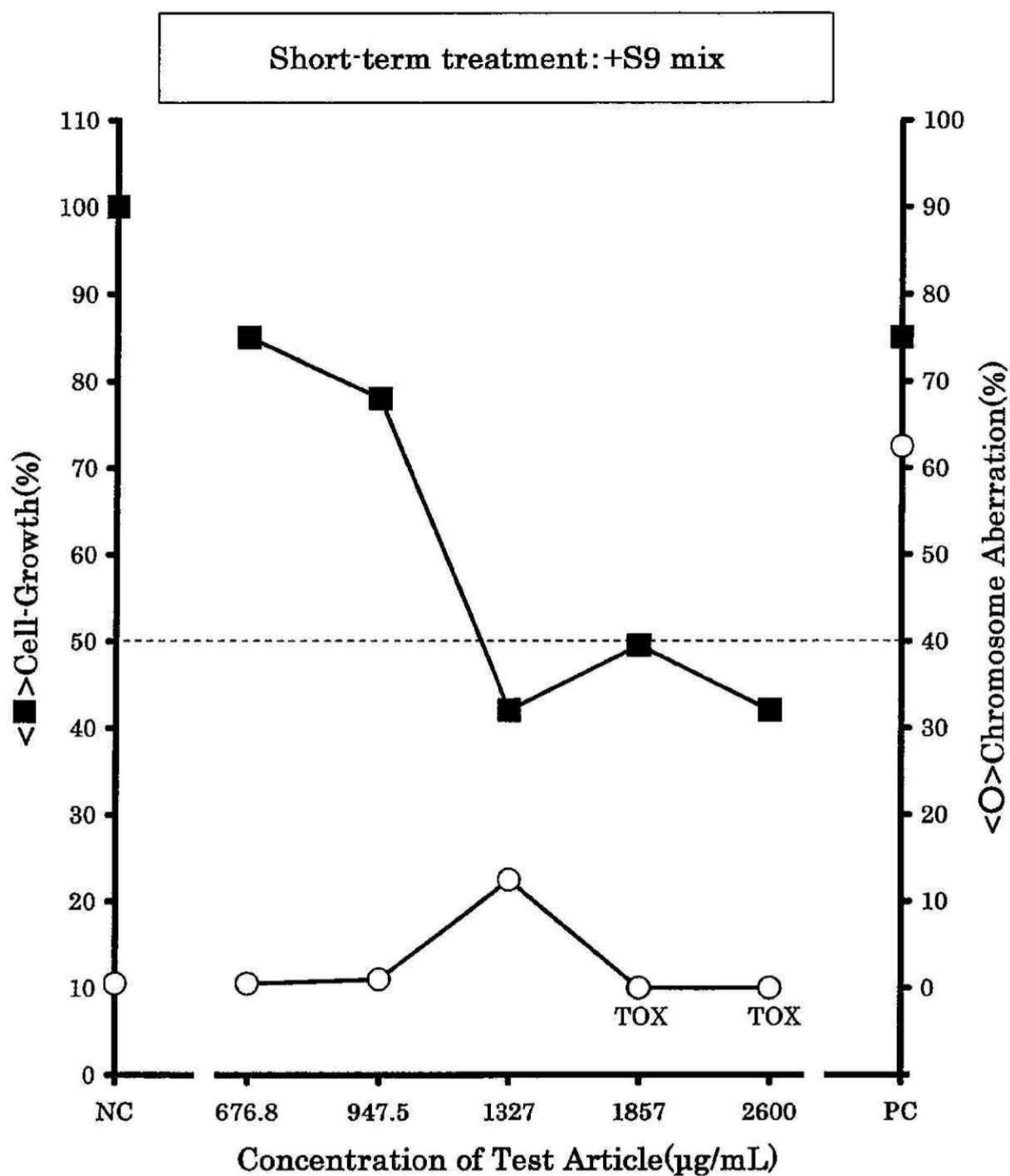


Fig.2-1 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

NC: Negative control PC: Positive control

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

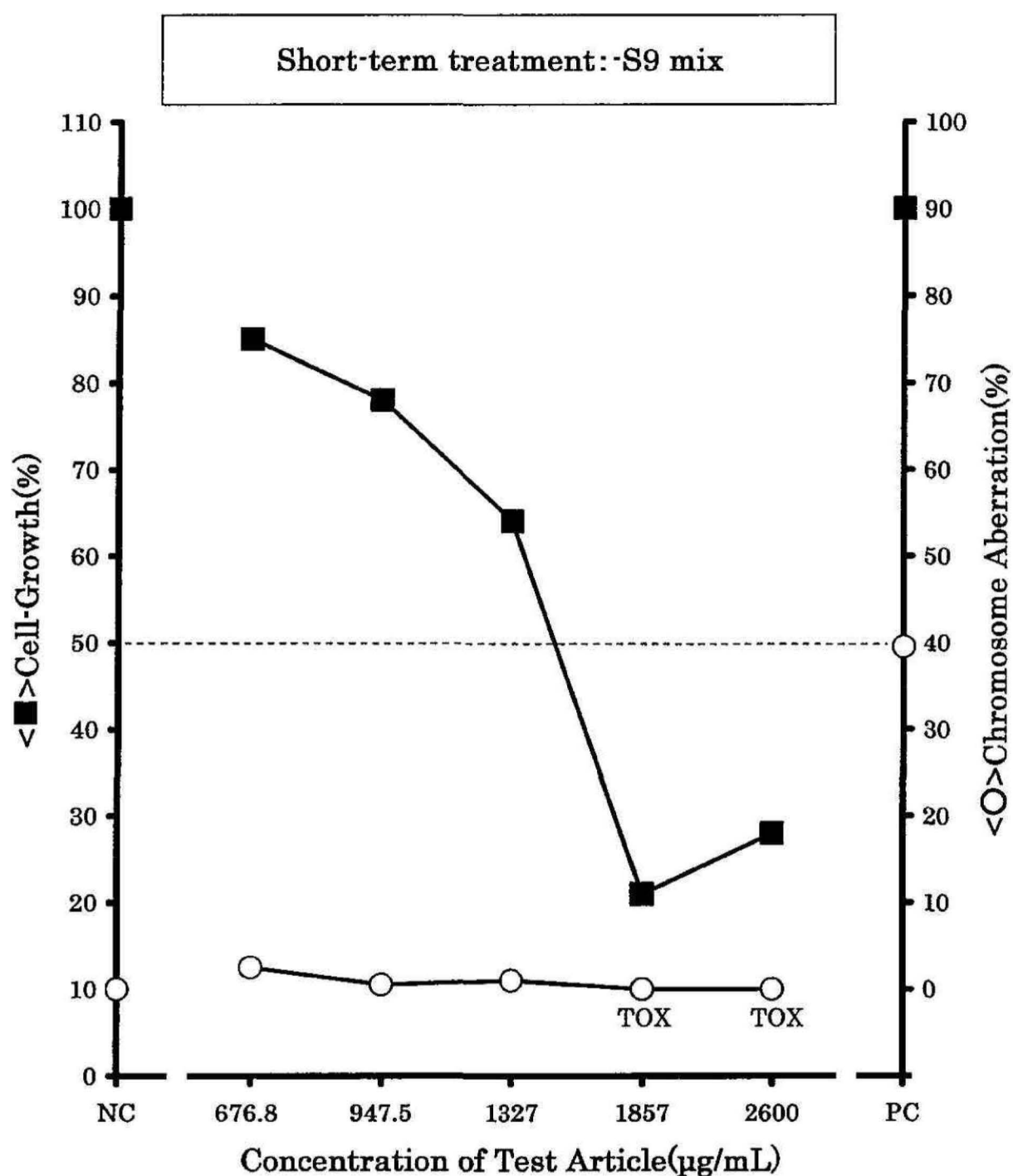


Fig.2-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

NC: Negative control PC: Positive control

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

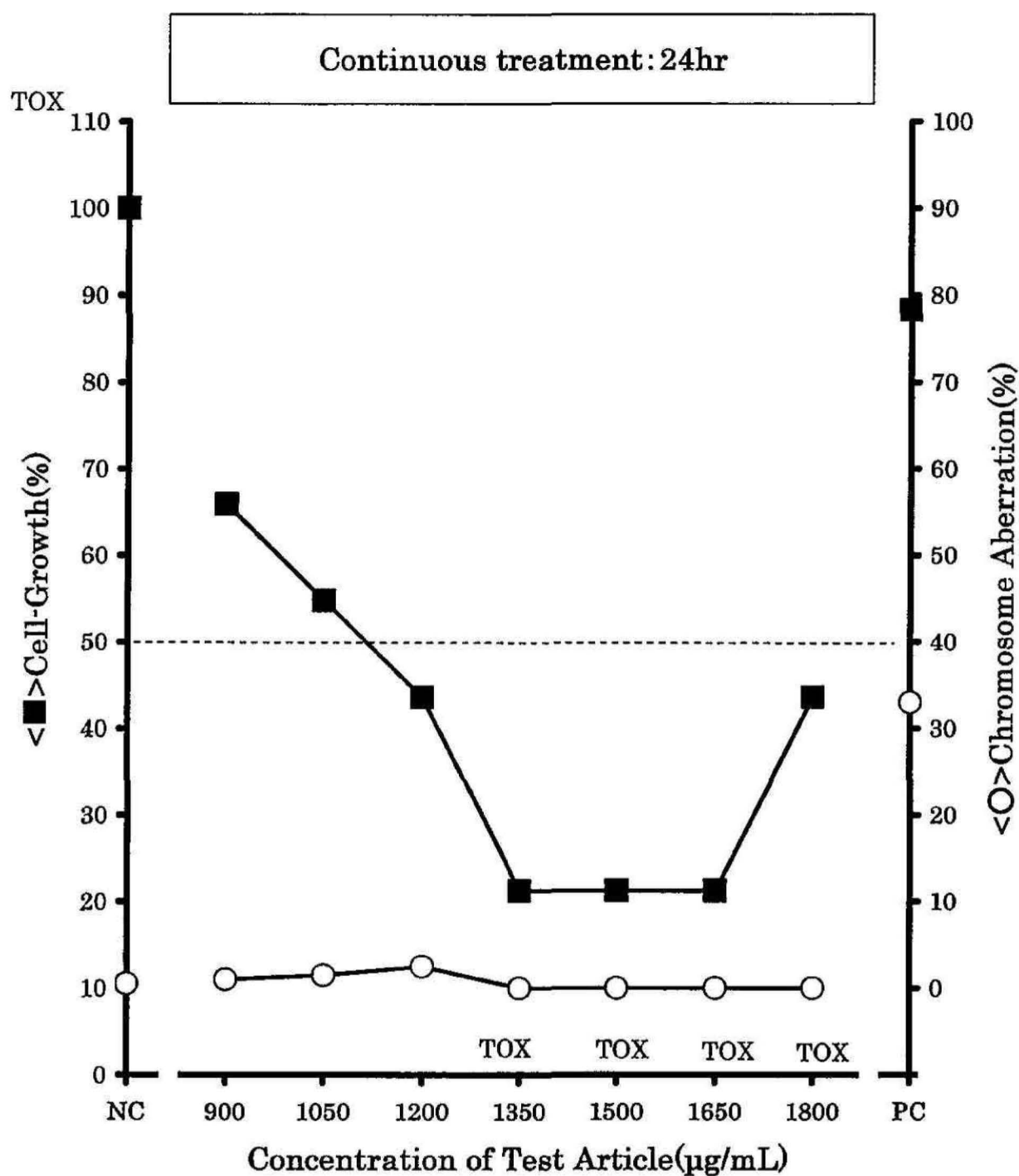


Fig.2-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

NC: Negative control PC: Positive control

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

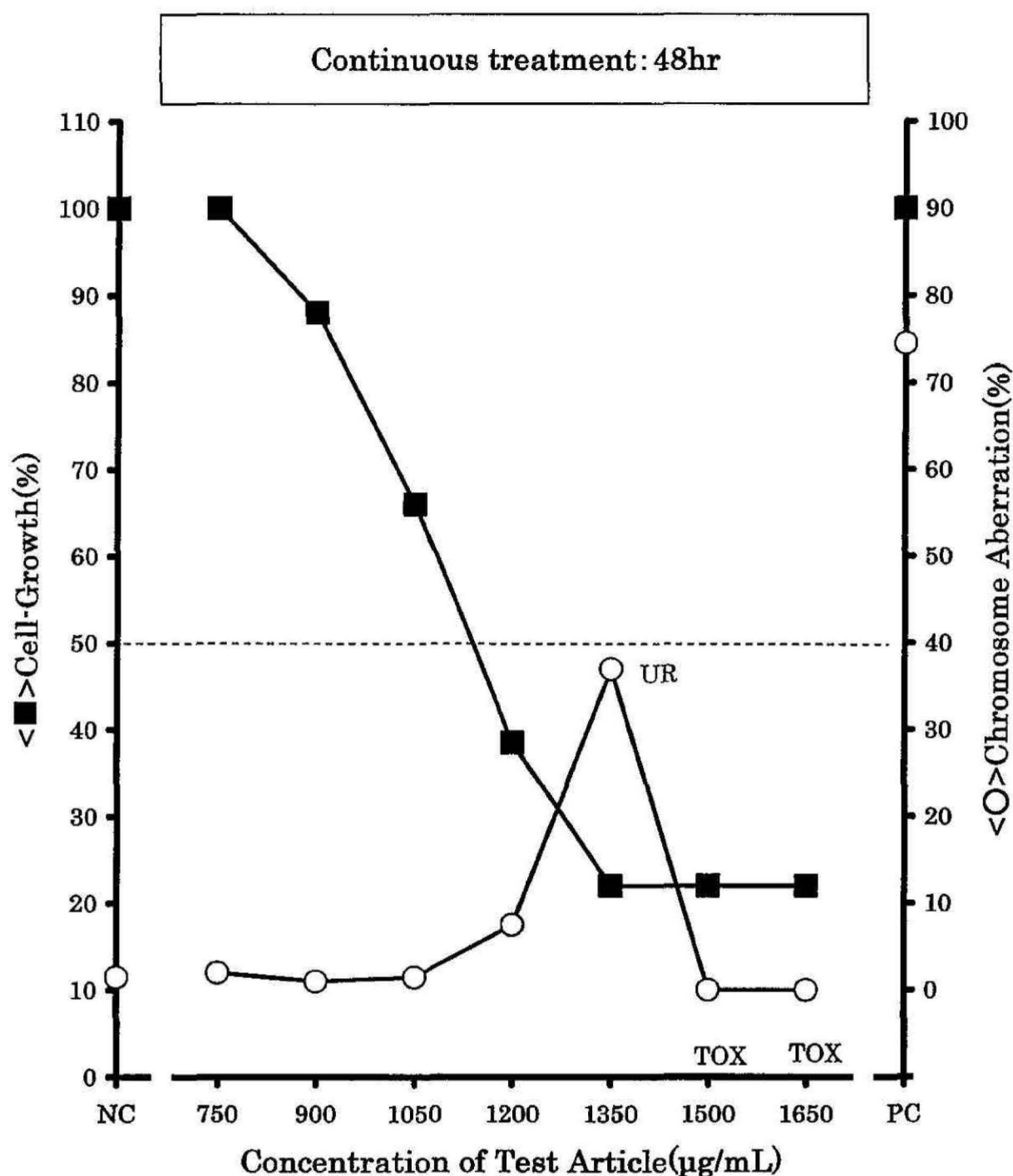


Fig.2-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

NC: Negative control PC: Positive control

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

UR: This value was judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.

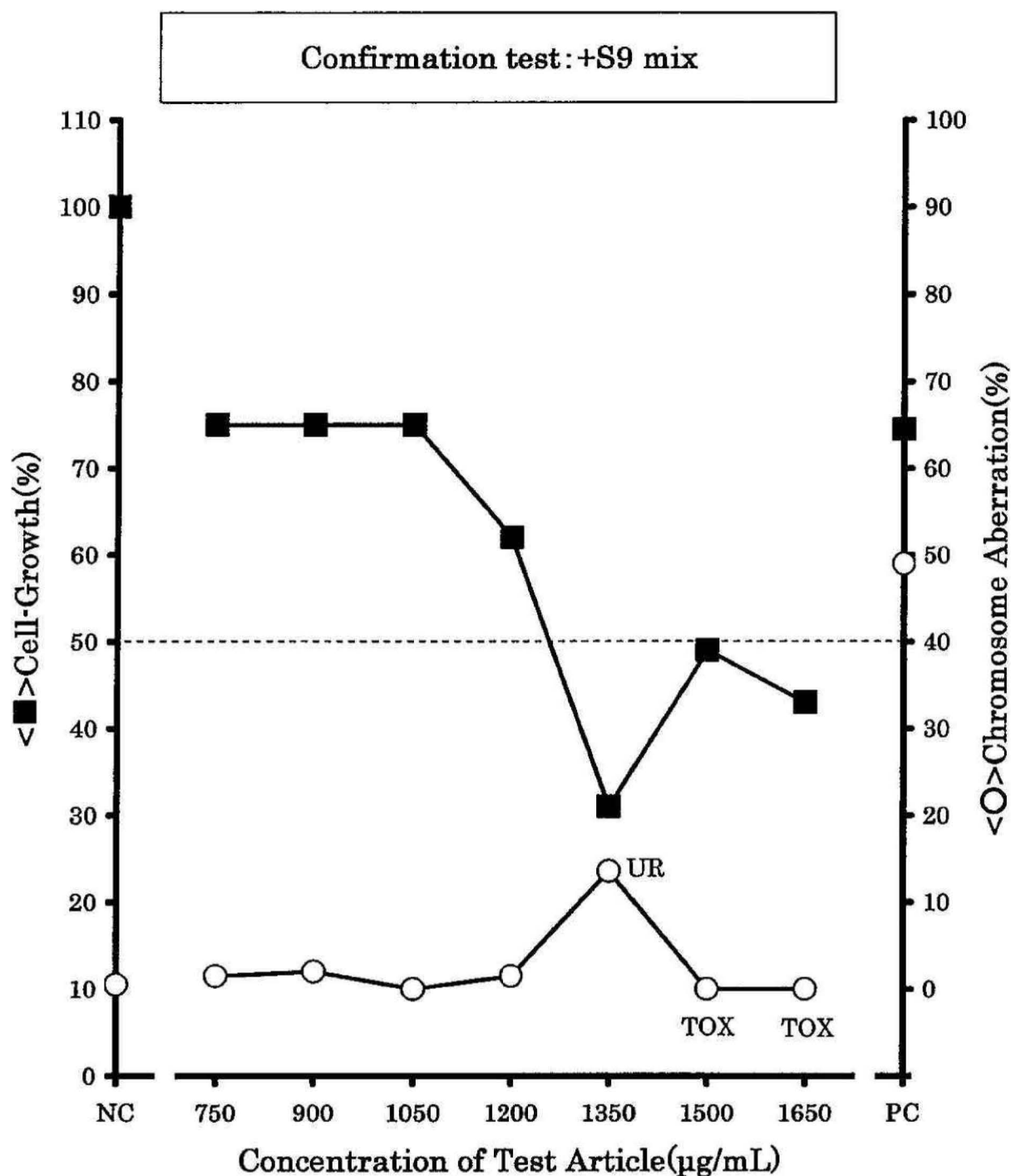


Fig.2-5 Results of the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

NC: Negative control PC: Positive control

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

UR: This value was judged to be unreliable since sufficient number of chromosomes could not be observed due to severe cytotoxicity.

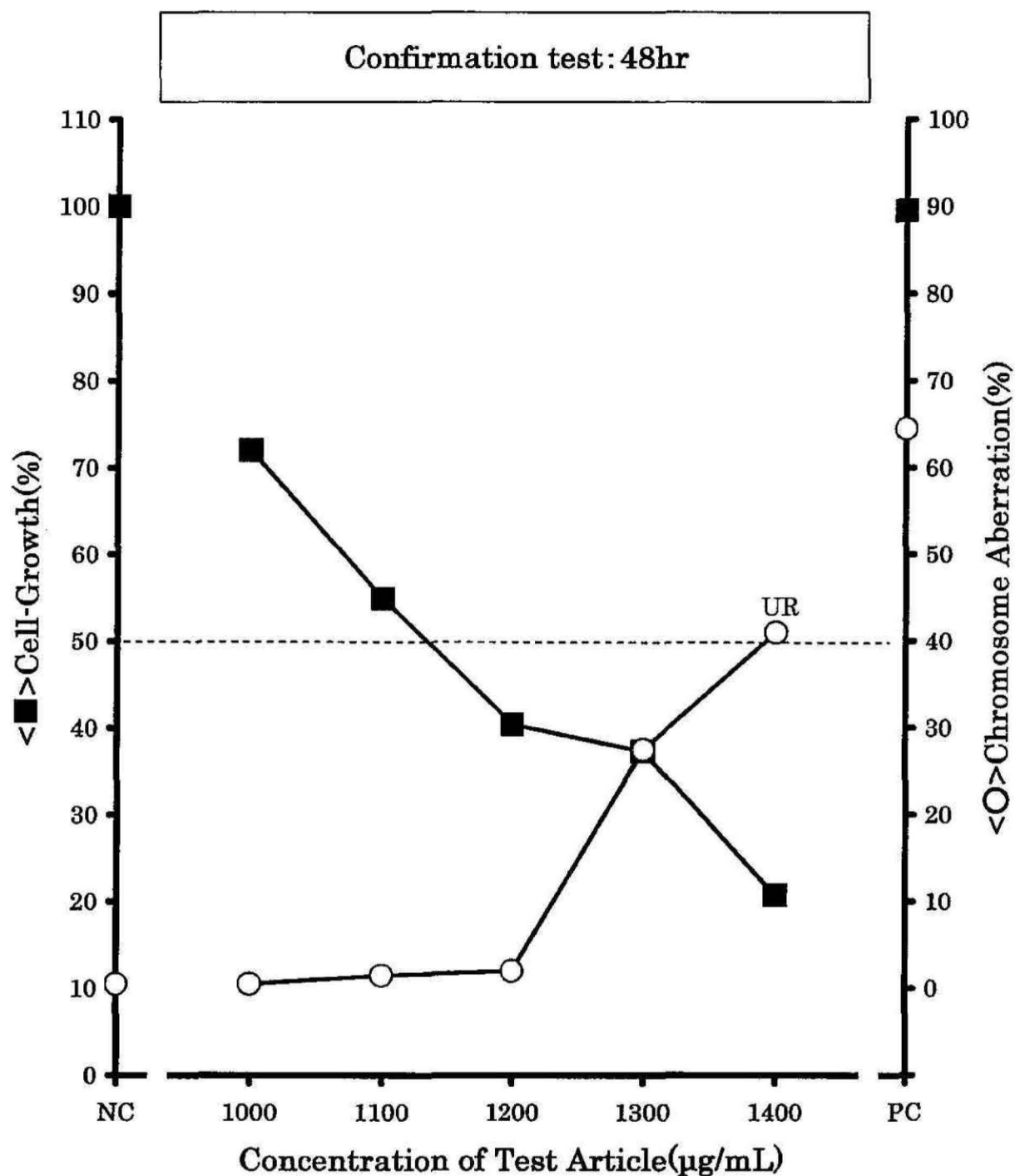


Fig.2-6 Results of the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid

NC: Negative control PC: Positive control

UR: This value was judged to be unreliable since sufficient number of chromosomes could not be observed due to severe cytotoxicity.

Table 1-1 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{a)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{d)}	
+	6-18	Test article	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
				99		—	—	—
			20.3	99	99	—	—	—
				99		—	—	—
			40.6	99	91	—	—	—
				83		—	—	—
			81.3	116	108	—	—	—
				99		—	—	—
			163	99	99	—	—	—
				99		—	—	—
			325	116	108	+	—	—
				99		+	—	—
			650	83	91	+	Light-orange	+
				99		+	Light-orange	+
			1300	66	66	++	Light-yellow	+
				66		++	Light-yellow	+
			2600	49	49	g)	Yellow	+
				49		g)	Yellow	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition:						2523.5	µg/mL	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 1-2 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Short-term treatment:-S9 mix]

Cell-growth inhibition test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	6-18	Test article	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
				99		—	—	
			20.3	99	99	—	—	—
				99		—	—	
			40.6	83	83	—	—	—
				83		—	—	
			81.3	99	99	—	—	—
				99		—	—	
			163	116	108	+	—	—
				99		+	—	—
			325	116	108	+	—	—
				99		+	—	—
			650	99	99	+	Light-orange	—
				99		+	Light-orange	—
			1300	83	83	++	Light-yellow	—
				83		++	Light-yellow	—
			2600	49	41	g)	Yellow	+
				33		g)	Yellow	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition:						2321.4	µg/mL	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 1-3 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test									
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}				
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}		
—	24	Test article	0(NC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
					99	100	—	—	—
			20.3	116	108	—	—	—	
				99		—	—	—	
			40.6	99	99	—	—	—	
				99		—	—	—	
			81.3	116	117	—	—	—	
				116		—	—	—	
			163	116	117	—	—	—	
				116		—	—	—	
			325	116	117	+	—	—	
				116		+	—	—	
			650	99	108	+	Light-orange	—	
				116		+	Light-orange	—	
			1300	66	66	++	Light-yellow	—	
				66		++	Light-yellow	—	
			2600	66	75	g)	Yellow	+	
				83		g)	Yellow	+	
Concentration of 50% cell-growth inhibition: above 2600.0 µg/mL									

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 1-4 Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{d)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{d)}
—	48	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			99		—	—	—
		20.3	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		40.6	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		81.3	99	99	—	—	—
			99		—	—	—
		163	116	117	—	—	—
			116		—	—	—
		325	108	109	—	—	—
			108		—	—	—
		650	99	95	++	Light-orange	—
			91		++	Light-orange	—
		1300	41	46	++	Light-yellow	—
			50		++	Light-yellow	—
		2600	41	37	g)	Yellow	+
			33		g)	Yellow	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					1246.9	µg/mL	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 2-1 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Short-term treatment: +S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
+	6-18	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			100		—	—	—
		Test article	85	85	—	Light-orange	—
			85		—	Light-orange	—
			71	78	+	Light-orange	—
			85		+	Light-orange	—
			42	42	++	Light-yellow	—
			42		++	Light-yellow	—
			42	50	g)	Yellow	+
			57		g)	Yellow	+
			42	42	g)	Yellow	+
			42		g)	Yellow	+
		PC	85	85	—	—	—
			85		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates/crystals

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 2-2 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Short-term treatment: S9 mix]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	6-18	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			100		—	—	—
		Test article	676.8	85	+	Light-orange	—
			85		+	Light-orange	—
			947.5	78	++	Light-orange	—
			71		++	Light-orange	—
			1327	64	++	Light-yellow	—
			71		++	Light-yellow	—
			1857	21	++	Yellow	+
			28		++	Yellow	+
			2600	28	g)	Yellow	+
			28		g)	Yellow	+
		PC	100	100	—	—	—
			100		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

+ : Presence of precipitates/crystals

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 2-3 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Continuous treatment: 24hr]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)		Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)			Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	24	0(NC)		100 ^{a)}	100	—	—	—
				79		—	—	
		Test article	900	59	66	+	Light-orange	—
				59		+	Light-orange	—
			1050	39	55	+	Light-yellow	—
				59		+	Light-yellow	—
			1200	39	44	+	Light-yellow	—
				39		+	Light-yellow	—
			1350	19	21	++	Yellow	—
				19		++	Yellow	—
			1500	19	21	++	Yellow	—
				19		++	Yellow	—
			1650	19	21	+++	Yellow	—
				19		+++	Yellow	—
			1800	39	44	+++	Yellow	—
				39		+++	Yellow	—
		PC		79	88	—	—	—
				79		—	—	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05µg/mL)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

 + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

 ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

 +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-4 Cell-growth ratio in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Continuous treatment: 48hr]

Chromosome aberration test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	48	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			100		—	—	—
		750	100	100	+	Light-orange	—
			100		+	Light-orange	—
			88		+	Light-orange	—
			88		+	Light-orange	—
		900	66	66	+	Light-yellow	—
			66		+	Light-yellow	—
		1050	44	39	++	Light-yellow	—
			33		++	Light-yellow	—
		1200	22	22	+++	Yellow	—
			22		+++	Yellow	—
		1350	22	22	+++	Yellow	—
			22		+++	Yellow	—
		1500	22	22	+++	Yellow	—
			22		+++	Yellow	—
		1650	22	22	+++	Yellow	—
			22		+++	Yellow	—
		PC	100	100	—	—	—
			100		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05µg/mL)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

 + : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

 ++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

 +++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 2-5 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Confirmation test: +S9 mix]

		Confirmation test						
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	
+	6-18	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—	
			100		—	—	—	
		Test article	750	75	75	+	Light-orange	—
				75		+	Light-orange	—
			900	75	75	+	Light-orange	—
				75		+	Light-orange	—
			1050	75	75	++	Light-orange	—
				75		++	Light-orange	—
			1200	62	62	+++	Light-yellow	—
				62		+++	Light-yellow	—
			1350	37	31	+++	Light-yellow	—
				25		+++	Light-yellow	—
			1500	49	49	g)	Yellow	—
				49		g)	Yellow	—
			1650	49	43	g)	Yellow	—
				37		g)	Yellow	—
			PC	87	75	—	—	—
				62		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

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

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

+++ : There was discontinuity among most of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.

Table 2-6 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Confirmation test: 48hr]

		Confirmation test					
Study type	Treatment and	Cell-growth ratio		Observation ^{c)}			
S9 mix	time (hr)	Concentration (µg/mL)	Plate 1 and 2	Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}
—	48	0(NC)	100 ^{a)}	100	—	—	—
			93		—	—	—
		1000	73	72	+	Light-orange	—
			66		+	Light-orange	—
		1100	53	55	+	Light-yellow	—
			53		+	Light-yellow	—
		1200	39	40	+	Yellow	—
			39		+	Yellow	—
		1300	39	37	+	Yellow	—
			33		+	Yellow	—
		1400	20	21	++	Yellow	—
			20		++	Yellow	—
		PC	99	99	—	—	—
			93		—	—	—

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05µg/mL)

a) The plate in the negative control group was regarded as a 100% growth.

b) The mean showed as a growth ratio against the negative control value.

c) Observation of plate at the end of treatment

d) — : Most of the cells were attached to the surface of plates and their shape was normal.

+ : There was discontinuity among a small number of surviving cells.

++ : There was discontinuity among approximately half of the surviving cells.

e) — : No changes of color

f) — : Absence of precipitates/crystals

Table 3-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Short-term treatment: +S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	NC	200	2.0	—	2	0	0	0	1	0	0.5	1.5	—	30-1 33-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(3)		(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)		
		2600	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	34-1 34-2 47-1 47-2
			(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)	(0)	(0)	(0)		
		1857	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	28-1 28-2 18-1 18-2
			(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)	(0)	(0)	(0)		
		1327	200	2.5	—	11	14	16	0	0	1	12.5	17.0	+	69-1 94-1
			(100)	(1)		(6)	(9)	(5)	(0)	(0)	(1)	(12)	(16)		
			(100)	(4)		(5)	(5)	(11)	(0)	(0)	(0)	(13)	(18)		
		947.5	200	0.0	—	1	1	1	0	0	0	1.0	1.5	—	54-1 62-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		676.8	200	0.0	—	3	0	1	0	0	0	0.5	2.0	—	98-1 58-1
			(100)	(0)		(2)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)		
		PC	200	0.0	—	5	25	114	0	0	0	62.5	63.0	+	40-1 02-1
			(100)	(0)		(3)	(8)	(50)	(0)	(0)	(0)	(56)	(57)		
			(100)	(0)		(2)	(17)	(64)	(0)	(0)	(0)	(69)	(69)		

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, 14 μ g/mL)

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

Table 3-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Short-term treatment:-S9 mix]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	6-18	NC	200	0.0	—	2	0	0	0	0	0	0.0	1.0	—	09-1 52-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		2600	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	96-1 96-2 37-1 37-2
			(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)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1857	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	17-1 17-2 61-1 61-2
			(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)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1327	200	3.0	—	2	1	0	0	0	1	1.0	2.0	—	86-1 67-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	(1)		
			(100)	(5)		(2)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(3)		
		947.5	200	0.0	—	0	0	0	0	1	0	0.5	0.5	—	95-1 66-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		676.8	200	0.0	—	1	3	0	0	2	0	2.5	3.0	—	81-1 73-1
			(100)	(0)		(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(3)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(2)	(0)	(3)	(3)		
		PC	200	1.0	—	1	27	61	0	0	0	39.5	39.5	+	29-1 79-1
			(100)	(2)		(1)	(14)	(28)	(0)	(0)	(0)	(38)	(38)		
			(100)	(0)		(0)	(13)	(33)	(0)	(0)	(0)	(41)	(41)		

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 μ g/mL)

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

Table 3-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Continuous treatment:24hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	24-0	NC	200	0.0	—	0	0	1	0	0	0	0.5	0.5	—	46-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		1800	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	70-1
			(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)	(0)	(0)	(0)		
		1650	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	42-1
			(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)	(0)	(0)	(0)		
		1500	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	22-1
			(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)	(0)	(0)	(0)		
		1350	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	90-1
			(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)	(0)	(0)	(0)		
		1200	200	0.0	—	0	3	3	0	0	0	2.5	2.5	—	50-1
			(100)	(0)		(0)	(3)	(3)	(0)	(0)	(0)	(5)	(5)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1050	200	1.0	—	1	2	1	0	0	0	1.5	2.0	—	75-1
			(100)	(0)		(0)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(2)		(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
		900	200	0.5	—	1	0	1	0	1	0	1.0	1.5	—	04-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(0)	(2)	(2)		
		PC	200	0.0	—	3	14	57	0	0	1	33.0	34.0	+	97-1
			(100)	(0)		(1)	(8)	(32)	(0)	(0)	(0)	(35)	(36)		
			(100)	(0)		(2)	(6)	(25)	(0)	(0)	(1)	(31)	(32)		

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, 0.05 μ g/mL)

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

Table 3-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Continuous treatment:48hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	48-0	NC	200 (100) (100)	0.5 (0) (1)	—	(1) (1) (0)	(1) (1) (0)	(0) (0) (0)	(1) (1) (0)	(1) (1) (0)	(0) (0) (0)	1.5 (3) (0)	2.0 (4) (0)	—	84-1 20-1
			0 (0) (0) (0)	0.0 (0) (0) (0)	TOX	(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) (0) (0)	0.0 (0) (0) (0)	TOX	57-1 57-2 99-1 99-2
			0 (0) (0) (0)	0.0 (0) (0) (0)	TOX	(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) (0) (0)	0.0 (0) (0) (0)	TOX	88-1 88-2 64-1 64-2
		1650	100 (0) (0) (53) (47)	1.0 (0) (0) (0) (1)	UR	(2) (0) (0) (2) (0)	(17) (0) (0) (5) (12)	(23) (0) (0) (13) (10)	(0) (0) (0) (0) (0)	(0) (0) (0) (0) (0)	(5) (0) (0) (5) (0)	37.0 (0) (0) (20) (17)	37.0 (0) (0) (20) (17)	UR	56-1 56-2 08-1 08-2
			200 (100) (100)	1.0 (1) (1)	—	(1) (1) (0)	(8) (3) (5)	(7) (2) (5)	(1) (0) (1)	(0) (0) (0)	(3) (0) (3)	7.5 (5) (10)	7.5 (5) (10)	±	48-1 49-1
			200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	—	(1) (1) (0)	(1) (1) (0)	(2) (0) (0)	(0) (0) (0)	(0) (0) (0)	(0) (0) (0)	1.5 (1) (2)	2.0 (2) (2)	—	14-1 03-1
		900	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	—	(1) (1) (0)	(1) (1) (0)	(1) (1) (0)	(0) (0) (0)	(0) (0) (0)	(0) (0) (0)	1.0 (2) (0)	1.5 (3) (0)	—	51-1 82-1
			200 (100) (100)	0.5 (1) (0)	—	(0) (0) (0)	(1) (1) (0)	(2) (0) (2)	(0) (0) (0)	(0) (0) (0)	(0) (1) (1)	2.0 (1) (3)	2.0 (1) (3)	—	23-1 10-1
			200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	—	(4) (3) (1)	(52) (27) (25)	(130) (69) (61)	(4) (2) (2)	(0) (0) (0)	(2) (1) (1)	74.5 (77) (72)	75.0 (78) (72)	+	68-1 05-1

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 (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

UR: These values were judged to be unreliable since sufficient number of chromosomes could not be observed due to severe cytotoxicity.

Table 3-5 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Confirmation test: +S9 mix]

S9 mix	Time (h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
+	6-18	NC	200	0.5	—	1	0	1	0	0	0	0.5	1.0	—	89-1 91-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1650	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	07-1 07-2 85-1 85-2
			(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)	(0)	(0)	(0)		
		1500	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	31-1 31-2 77-1 77-2
			(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)	(0)	(0)	(0)		
		1350	44	0.0	UR	0	3	1	0	0	2	13.6	13.6	UR	65-1 65-2 35-1 35-2
			(22)	(0)		(0)	(3)	(0)	(0)	(0)	(2)	(5)	(5)		
			(22)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1200	200	2.5	—	3	0	1	0	0	2	1.5	3.0	—	15-1 01-1
			(100)	(4)		(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(2)	(3)	(4)		
			(100)	(1)		(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)		
		1050	200	1.5	—	1	0	0	0	0	0	0.0	0.5	—	27-1 38-1
			(100)	(1)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(2)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		900	200	0.5	—	0	4	1	0	0	0	2.0	2.0	—	24-1 80-1
			(100)	(0)		(0)	(3)	(1)	(0)	(0)	(0)	(3)	(3)		
			(100)	(1)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		750	200	1.0	—	0	2	2	0	0	0	1.5	1.5	—	76-1 59-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(2)	(2)		
			(100)	(2)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		PC	200	0.0	—	2	20	91	0	0	0	49.0	49.0	+	16-1 45-1
			(100)	(0)		(1)	(12)	(53)	(0)	(0)	(0)	(57)	(57)		
			(100)	(0)		(1)	(8)	(38)	(0)	(0)	(0)	(41)	(41)		

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, 14 μ g/mL)

TOX: Chromosome observation could not be done because of severe cytotoxicity.

UR: These values were judged to be unreliable since sufficient number of chromosomes could not be observed due to severe cytotoxicity.

Table 3-6 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with 1,2,4,5-benzenetetracarboxylic acid
[Confirmation test:48hr]

S9 mix	Time(h)	Conc. (μ g/mL)	Cells observed	Polyploid cells (%)	Judge.	Number of aberration						TA (%)	TAG (%)	Judge.	Slide No.
						g	ctb	cte	csb	cse	other				
—	48-0	NC	200	0.0	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	74-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1400	100	0.0	UR	1	28	8	1	0	7	41.0	42.0	UR	39-1
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(0)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(45)	(0)		(0)	(11)	(6)	(1)	(0)	(5)	(21)	(21)		
			(55)	(0)		(1)	(17)	(2)	(0)	(0)	(2)	(20)	(21)		
		1300	200	1.5	—	1	30	26	0	2	8	27.5	28.0	+	43-1
			(100)	(2)		(1)	(19)	(15)	(0)	(1)	(3)	(31)	(32)		
			(100)	(1)		(0)	(11)	(11)	(0)	(1)	(5)	(24)	(24)		
		1200	200	0.0	—	1	2	2	0	0	0	2.0	2.5	—	25-1
			(100)	(0)		(1)	(2)	(2)	(0)	(0)	(0)	(4)	(5)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		1100	200	0.5	—	2	0	1	1	1	0	1.5	2.5	—	92-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(1)	(1)	(1)	(0)	(3)	(4)		
			(100)	(1)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		1000	200	0.0	—	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	—	87-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		PC	200	0.5	—	3	20	115	1	0	1	64.5	64.5	+	63-1
			(100)	(0)		(1)	(7)	(54)	(0)	(0)	(1)	(59)	(59)		
			(100)	(1)		(2)	(13)	(61)	(1)	(0)	(0)	(70)	(70)		

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, 0.05 μ g/mL)

UR: These values were judged to be unreliable since sufficient number of chromosomes could not be observed due to severe cytotoxicity.