



BOZO RESEARCH
CENTER INC.



最 終 報 告 書

インデンのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験

M-1197

2006 年 9 月 29 日

株式会社 **ポリリサーチセンター**

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目 次

	頁
目 次	1
要 約	8
緒 言	9
試験材料及び方法	
1. 被験物質及び溶媒	10
1) 被験物質	10
2) 溶媒	11
2. 被験液の調製	11
1) 調製方法	11
2) 保存方法	11
3) 安定性	12
3. 対照物質	12
1) 陰性対照（溶媒対照）	12
2) 陽性対照	12
4. 使用細胞株	13
1) 供試は乳類培養細胞	13
2) 入手先及び入手年月日	13
3) 細胞の選択理由	13
4) 染色体構成	14
5) 増殖様式	14
6) 培養条件	14

	頁
5. S9mix 及び培養液	14
1) S9 mix	14
2) 培養液	15
6. 試験方法	16
1) 識別方法	16
2) 細胞増殖抑制試験	16
3) 染色体異常試験	17
4) 標本の観察	18
5) 染色体異常の分類	19
6) 判定基準	19
試験結果	
1. 細胞増殖抑制試験	21
1) 短時間処理法	21
2) 連続処理法	21
2. 染色体異常試験	22
1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察	22
2) 構造異常	22
3) 数的異常	22
考察	24
参考文献	25
Attached Data 1 化学物質等安全データシート (MSDS)	26
Attached Data 4 Background Data in the Testing Facility	33

Figures and Tables

Fig. 1-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with Indene

[short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 1-2 Results of the chromosome aberration test treated with Indene

[short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 2-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with Indene

[short-term treatment: -S9 mix]

Fig. 2-2 Results of the chromosome aberration test treated with Indene

[short-term treatment: -S9 mix]

Fig. 3-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with Indene

[continuous treatment: 24 hr]

Fig. 3-2 Results of the chromosome aberration test treated with Indene

[continuous treatment: 24 hr]

Fig. 4-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with Indene

[continuous treatment: 48 hr]

Fig. 4-2 Results of the chromosome aberration test treated with Indene

[continuous treatment: 48 hr]

Table 1-1 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Indene

[short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Indene

[short-term treatment: -S9 mix]

Table 1-3 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Indene

[continuous treatment: 24 hr]

Table 1-4 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Indene

[continuous treatment: 48 hr]

Table 2-1 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Indene

[short-term treatment: +S9 mix]

Table 2-2 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Indene

[short-term treatment: -S9 mix]

Table 2-3 Chromosome aberration in CHL/TU cells treated with Indene
[continuous treatment: 24 hr]

Table 2-4 Chromosome aberration in CHL/TU cells treated with Indene
[continuous treatment: 48 hr]

要 約

インデン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、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 1200 μ g/mL として、細胞増殖抑制試験を実施した。被験物質はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して試験を実施した。その結果、短時間処理法では 300 μ g/mL 以上の用量で、連続処理法では 150 μ g/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）は短時間処理の代謝活性化では 165.385 μ g/mL、非代謝活性化では 178.571 μ g/mL、連続処理法の 24 時間処理では 141.667 μ g/mL、48 時間処理では 98.077 μ g/mL と算出された。これより、最高用量を、短時間処理法では 300 μ g/mL を、連続処理法では 150 μ g/mL を最高用量として、以下公比 2 で希釈した各 5 試験用量を設定し染色体異常誘発能を検討した。

染色体異常試験の結果、短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに染色体の構造異常の出現率は増加せず、また倍数性細胞の増加も認められなかった。また、連続処理法においても、24 時間処理及び 48 時間処理ともに染色体の構造異常の出現率は増加せず、また倍数性細胞の増加も認められなかった。一方、陽性対照群では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。また、陰性対照群における数的異常（倍数体）の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、さらに試験施設の背景値と同様であった。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、インデンは、本試験条件下において染色体の構造異常及び数的異常の誘発能を有しないと判定した。

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、インデンの安全性試験の一環として、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。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドライン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

被験物質はより被験物質情報 (Attached Data 1～2、なおこれらの情報はにおける非 GLP 下での分析に基づくものである。) とともに供給された。

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 :

名称 : インデン、Indene

CAS 番号 : 95-13-6

構造式

又は示性式 : C_9H_8

純度 : 96.3%

不純物 : ベンゾニトリル 1.7%、他に 1%以上含まれる不純物はない。

性状 : 淡黄色または無色透明の液体

分子量 : 116

ロット番号 :

安定性 : 実験終了後の被験物質の分析を行う。結果を入手後、品質に問題がないか否かを判定し、実験期間中の安定性を確認した。

(Attached Data 3)

保存方法 : 冷暗所 (冷蔵庫) (保存期間中の実測温度 : $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$)

保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び第 1 研究棟被験物質調製室
取り扱い上の

注意 : 取扱い場所及び周囲の火気、静電気、衝撃火花などの着火源の存在を厳禁した。静電気対策を行い、作業服、安全靴は導電性の物を用いた。液の漏洩及び蒸気の発散を極力防止した。蒸気の発生する場所には局所排気装置などを設けた。接触・吸入の恐れがあるときは保護具を着用した。

返却 : 被験物質の残量はすべて試験委託者に返却した。

2) 溶媒

名 称 : ジメチルスルホキシド (DMSO)

ロット番号 : ELM5004

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 変異原室

溶媒の選択理由 : 被験物質情報で水に不溶、アルコール及びエーテルに可溶との情報が示された。アルコール及びエーテルは染色体異常試験に用いる溶媒として好ましくないため、供試前の溶媒検討を実施し被験物質がDMSOに120 mg/mLまで溶解することを確認し、DMSOを溶媒に用いることとした。

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 1.2000g 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 120.0 mg/mL 溶液 (プレートに 0.05 mL 添加した際の最終濃度: 1200 µg/mL) を調製した。次いで、120.0 mg/mL 溶液を公比 2 (各濃度の被験液 5 mL : 溶媒 5 mL) で順次 7 段階希釈し、60.00、30.00、15.00、7.500、3.750、1.875 及び 0.938 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

短時間処理法及び連続処理法ともに被験物質 0.0600g 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 30.0 mg/mL 溶液 (プレートに 0.05 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 2 (各濃度の被験液 1 mL : 溶媒 1 mL) で順次 5 段階希釈し、15.0、7.50、3.75、1.88 及び 0.938 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を調製した。このうち、短時間処理法では 30.0、15.0、7.50、3.75 及び 1.88 mg/mL の 5 濃度の被験液を用いた。連続処理法では 15.0、7.50、3.75、1.88 及び 0.938 mg/mL の 5 濃度の被験液を用いた。

2) 保存方法

被験液は用時に調製し、保存は行わなかった。

3) 安定性

被験物質に DMSO を添加した際に、発泡、発熱、吸熱及び色調などの変化は認められなかった。

3. 対照物質

1) 陰性対照

溶媒として用いたジメチルスルホキシドを陰性対照物質とした。

名 称 : ジメチルスルホキシド (DMSO)

ロ ッ ト 番 号 : ELM5004

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 変異原室

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 : CKP7428

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 変異原室 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 : 434ADA

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 変異原室 発癌性物質室温保存庫

(2) 調製方法

CP をプラスチック遠沈管 (50 mL) に 0.0140 g 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、K4L74) を 20.0 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.9 mL に 0.1 mL を加えた時の最終濃度 : 14 µg/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、K4L74) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1.00 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.25 mL : 生理食塩液 4.75 mL) し、0.0500 及び 0.00250 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.9 mL に 0.00250 mg/mL 溶液を 0.1 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.05 µg/mL)。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて発癌物質として処分した。

(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) 供試ほ乳類培養細胞

細胞は、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。入手後液体窒素で凍結保存していた細胞を融解後、継代培養して試験に用いた。

2) 入手先及び入手年月日

元株細胞は、2001 年 12 月 26 日にヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。入手後、継代数の少ない細胞をジメチルスルホキシドを 10 vol% 添加した培養液に懸濁し、液体窒素中で保存した。この保存細胞を融解後、継代培養し細胞の性状検査を実施して性状などが適正であることを定期的に確認した後に試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験で 11 継代、染色体異常試験では短時間処理法で 15 継代、連続処理法で 19 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が入手時の情報で確認されている。

3) 細胞の選択理由

染色体数が少なく比較的大型で染色体異常の観察に適すること、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、バックグラウンドデータが豊富であることなどの理由から本細胞を選択した。

4) 染色体構成

試験に使用した細胞は、直近の定期性状検査において 70%の細胞が染色体数 25 本を示し、モードは 25 本で適切であった。

5) 増殖様式

試験に使用した細胞は、直近の定期性状検査においてプレート上で単層状に増殖し、倍加時間は 19.0 時間であった。これらは入手時の特性（単層状に増殖、倍加時間 18～20 時間）と同様であり適切な増殖様式であった。

6) 培養条件

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

5. S9 mix 及び培養液

1) S9 mix

S9 mix は、オリエンタル酵母工業株式会社より S9/コファクターC セット（ロット番号 C041224101）を購入し、用時に調製を行った。なお、製品分析書に記載された S9 及びコファクターC についての詳細情報及び保存条件を以下に記載した。

(1) S9

名 称 : S9

ロ ッ ト 番 号 : 04122410

製 造 日 : 2004 年 12 月 24 日

種 ・ 系 統 : ラット・SD 系

性 : 雄

週 齢 : 7 週齢

体 重 : 214.0±9.0 g

誘 導 物 質 : フェノバルビタール (PB) と 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+60mg/kg body weight

BF 1 日 80mg/kg body weight

保 存 方 法 : 冷凍 (−80℃)

使 用 期 限 : 2005 年 6 月 23 日

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室 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 : C04121409

製 造 日 : 2004 年 12 月 14 日

保 存 方 法 : 冷凍 (−80℃)

使 用 期 限 : 2005 年 6 月 13 日

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室 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		
		ジヌクレオチドリ酸(NADP)水溶液	0.67 mL	
		精製水	0.67 mL	

2) 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、Cat.No.11095-080) に、Life Technologies Inc.より購入し非働化 (56℃, 30 分) した仔牛血清(CS)を 10 vol%添加して調製した培養液(CS-MEM)を用いた。調製後の CS-MEM は冷蔵保存した。

(1) 仔牛血清

名 称 : Calf serum (CS)

ロ ッ ト 番 号 : 364570

製 造 元 : Life Technologies Inc.

保 存 方 法 : 冷凍 (−80℃)

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室 超低温フリーザー

(2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロ ッ ト 番 号 : 1239844、1249842

製 造 元 : Invitrogen Corporation

保 存 方 法 : 冷蔵

保 存 場 所 : 御殿場研究所 変異原室 冷蔵庫

6. 試験方法¹⁻⁴⁾

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・連続処理法	
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

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)を「NC」、被験物質処理群を濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルを使用機材等に貼付して識別した。

(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を使用機材等に貼付して識別した。

2) 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の処理濃度を設定するための予備試験として実施した。いずれの処理法においても最高用量を 1200 µg/mL (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 600、300、150、75.0、37.5、18.8 及び 9.38 µg/mL の計 8 用量を設定し、これに陰性対照を設けた。また、短時間処理法では代謝活性化と非代謝活性化で試験を実施した。

(1) 短時間処理法

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 2 枚とし、シャーレ 1 枚当たり 2×10^4 個の細胞(培養液 5.0 mL)を播種し 3 日間培養した後、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び DMSO 0.05 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 及び各濃度の被験液 0.05mL 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 0.05 mL を取り除き、DMSO 0.05mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.05 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。各群ともに添加後 6 時間培養し、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。培養終了後、培養液を取り除き生理食塩液で細胞を洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液で染色した。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）を用いて細胞の染色の濃淡から細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

(2) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し 3 日間培養した後、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、培養液 0.05 mL を取り除き、陰性対照群については DMSO 0.05mL を、被験物質処理群については、各濃度の被験液 0.05 mL を加え、24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。培養終了後、短時間処理法と同様に培養液の色、細胞の状態及び析出の有無を観察した後に、洗浄、固定、染色、細胞密度測定を行い、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

3) 染色体異常試験

(1) 用量設定の根拠

細胞増殖抑制試験において、短時間処理法では 300 µg/mL 以上の用量で、連続処理法では 150 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）は短時間処理の代謝活性化では 165.385 µg/mL、非代謝活性化では 178.571 µg/mL、連続処理法の 24 時間処理では 141.667 µg/mL、48 時間処理では 98.077 µg/mL と算出された。これより、最高用量を、短時間処理法では 300 µg/mL を、連続処理法では 150 µg/mL を最高用量として、以下公比 2 で希釈した各 5 試験用量を設定した。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

(2) 短時間処理法

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 4 枚とし、シャーレ 1 枚当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種し 3 日間培養した後、細胞に異常の

ないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では、陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び DMSO 0.05 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 及び各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL 及び CP 0.1 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 0.05 mL を取り除き、DMSO 0.05 mL を加えた。被験物質処理群については培養液 0.05 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.1 mL を取り除き、MMC 0.1 mL を加えた。各群ともに添加後 6 時間培養し、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加えて更に 18 時間培養した。なお、染色体観察用標本作製に際しては、細胞分裂を分裂中期で停止させるため標本作製約 2 時間前にコルセミド 0.1 mL（最終濃度：0.2 μ g/mL）を加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液で単離した細胞を遠心分離し、0.075M 塩化カリウム溶液で低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。スライドガラス 1 枚につき 2 箇所固定した細胞を滴下し、空気乾燥後 2%ギムザ液で染色標本作製した。染色体観察用標本は、1 枚のシャーレから 2 枚作製した。各処理群で残る 2 枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じ洗浄、固定、染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、6 時間の被験物質処理終了時及び 18 時間の培養終了時に、細胞増殖抑制試験と同様の方法で、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

(3) 連続処理法

短時間処理法と同様に細胞を播種し 3 日間培養した後、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、陰性対照群については、培養液 0.05 mL を取り除き、DMSO 0.05 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.05 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.05 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.1 mL を取り除き、MMC 0.1 mL を加えた。各群ともに添加後 24 時間あるいは 48 時間培養を続けた。なお、染色体観察用標本は短時間処理法と同様に作製した。各処理群で残る 2 枚のシャーレは、細胞増殖抑制試験に準じて洗浄、固定、染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を測定した。また、被験物質処理終了時に、細胞増殖抑制試験と同様の方法で、析出の有無、培養液の色及び細胞の状態を確認した。

4) 標本の観察

各濃度当たり 200 個（シャーレ当たり 100 個）のよく広がっ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。同時に数的異常（倍数体）の数も記録し

た。染色体数 46 本以上を持つ細胞を倍数体とし、8 倍体も観察対象として含め、その出現数を記録した。なお、客観的な観察を行うため染色体観察用標本はすべて盲検法により観察した。

5) 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常は更に以下のように定義・分類した。

(1) 構造異常

染色体構造が、その細胞が本来持っている固有の構造（核型）と異なる場合を構造異常と定義した。

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（非染色部分が染色分体の同軸上にある）ものであって、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と定義した。

染色分体型切断(ctb) : 切断とは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と定義した。

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を染色体型切断と定義した。

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 : polyploid（核内倍加体：endoreduplication を含む）

6) 判定基準

石館らの判定基準^{1,2,3)}に従い、各試験群の異常細胞の出現率に対して以下のような判定

基準を設けた。

<u>異常細胞の出現率</u>	<u>判定基準</u>
5% 未満	陰 性 (－)
5% 以上 10% 未満	疑陽性 (±)
10% 以上	陽 性 (+)

染色体構造異常を有する細胞の出現率はギャップを含む場合(TAG)と含まない場合(TA)について集計し、ギャップを含まない場合について判定を行った。異常細胞の出現に用量依存性又は再現性が認められた場合を染色体異常誘発能陽性と判定した^{2,3,4)}。

なお、判定に際しては統計学的手法を用いなかった。

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. 2-1 及び Table 1-2 に示した。

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

代謝活性化では 300 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 165.385 $\mu\text{g/mL}$ であった。また非代謝活性化では 300 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 178.571 $\mu\text{g/mL}$ であった。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

代謝活性化の有無にかかわらず、培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。被験物質処理群の細胞の状態を陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 37.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められ、600 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では細胞の剥離・死滅が認められた。一方、非代謝活性化では 18.8 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められ、300 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では細胞の剥離・死滅が認められた。

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

(1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理では 150 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 141.667 $\mu\text{g/mL}$ であった。48 時間処理では 150 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度は 98.077 $\mu\text{g/mL}$ であった。。

(2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

24 時間及び 48 時間処理とも、培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。被験物質処理群の細胞の状態を陰性対照群と比較すると、24 時間処理及び 48 時間処理ともに 18.8 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で細胞の不連続性が認められ、300 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では細胞の剥離・死滅が認められた。

2. 染色体異常試験

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

1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態は、細胞増殖抑制試験の場合とほぼ同様であった。すなわち、短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化ともに培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。また、用量群の細胞の状態を陰性対照と比較すると、細胞の不連続性が代謝活性化では 150 µg/mL 以上で多数、37.5 µg/mL 以上で微少に認められたが剥離・死滅した細胞は認められなかった。一方、非代謝活性化では 300 µg/mL で剥離・死滅した細胞が、150 µg/mL で多数、37.5 µg/mL 以上では微少に認められた。

連続処理法では 24 時間及び 48 時間処理とも、培養液の色調の変化及び被験物質の析出は認められなかった。また、用量群の細胞の状態を陰性対照と比較すると、24 時間及び 48 時間処理とも 75.0 µg/mL 以上で細胞の不連続性が多数、18.8 µg/mL 以上で微少に認められたが剥離・死滅した細胞は認められなかった。

2) 構造異常

構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化では 300 µg/mL では TOX、150 µg/mL で 1.0%、75.0 µg/mL で 0%、37.5 µg/mL で 0% 及び 18.8 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も、300 µg/mL で TOX、150 µg/mL で 0%、75.0 µg/mL で 1.0%、37.5 µg/mL で 0.5% 及び 18.8 µg/mL で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。さらに、連続処理法の 24 時間処理では 150 µg/mL で 1.0%、75.0 µg/mL で 0.5%、37.5 µg/mL で 0%、18.8 µg/mL で 0.5% 及び 9.38 µg/mL で 1.0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。また、48 時間処理では、150 µg/mL で 0%、75.0 µg/mL で 0.5%、37.5 µg/mL で 0%、18.8 µg/mL で 0% 及び 9.38 µg/mL で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

各処理法ともに陰性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 4) 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。

3) 数的異常

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 300 µg/mL で TOX、150 µg/mL で 0%、75.0 µg/mL で 0%、37.5 µg/mL で 0% 及び 18.8 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 TOX、

150 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、37.5 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% 及び 18.8 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。さらに、連続処理法の 24 時間処理では 150 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、37.5 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%、18.8 $\mu\text{g/mL}$ で 0% 及び 9.38 $\mu\text{g/mL}$ で 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。また、48 時間処理では、150 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5%、75.0 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、37.5 $\mu\text{g/mL}$ で 0%、18.8 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% 及び 9.38 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

各処理法ともに陰性対照群における倍数体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 4) 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。

考 察

染色体異常試験において、短時間処理法では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに染色体の構造異常の出現率は増加せず、倍数性細胞の増加も認められなかった。また、連続処理法でも、24 時間連続処理及び 48 時間連続処理ともに染色体の構造異常の出現率は増加せず、倍数性細胞の増加も認められなかった。

一方、陰性対照群における染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、いずれの処理法においても 5%未満であった。また、陽性対照物質の CP あるいは MMC を処理した細胞では、染色体構造異常の顕著な誘発が認められた。更に、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。

以上の結果から、インデンは、本試験条件下において染色体異常誘発能を有さないものと判定した。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S.: Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, 48, 337-354 (1977)
- 2) 石館基監修：染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー (1987)
- 3) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会 変異原性試験検討グループ編集：厚生省医薬品毒性試験法ガイドラインに基づく変異原性試験 Q&A、サイエンティスト社、1992
- 4) Matsuoka, A., *et al.*: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro, *Mutation Res.*, 66, 277-290 (1979)
- 5) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編：化学物質による染色体異常アトラス、朝倉書店、1988
- 6) Assinder, S.J. & Upshall, A. : Paramorphogenic and genotoxic activity of Triton X-100 and sodium dodecyl sulphate in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.*, 142, 179-181 (1985)
- 7) McGregor, D.B. *et al.*: Responses of the L5178Y tk⁺/tk⁻ mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 12, 85-154 (1988)

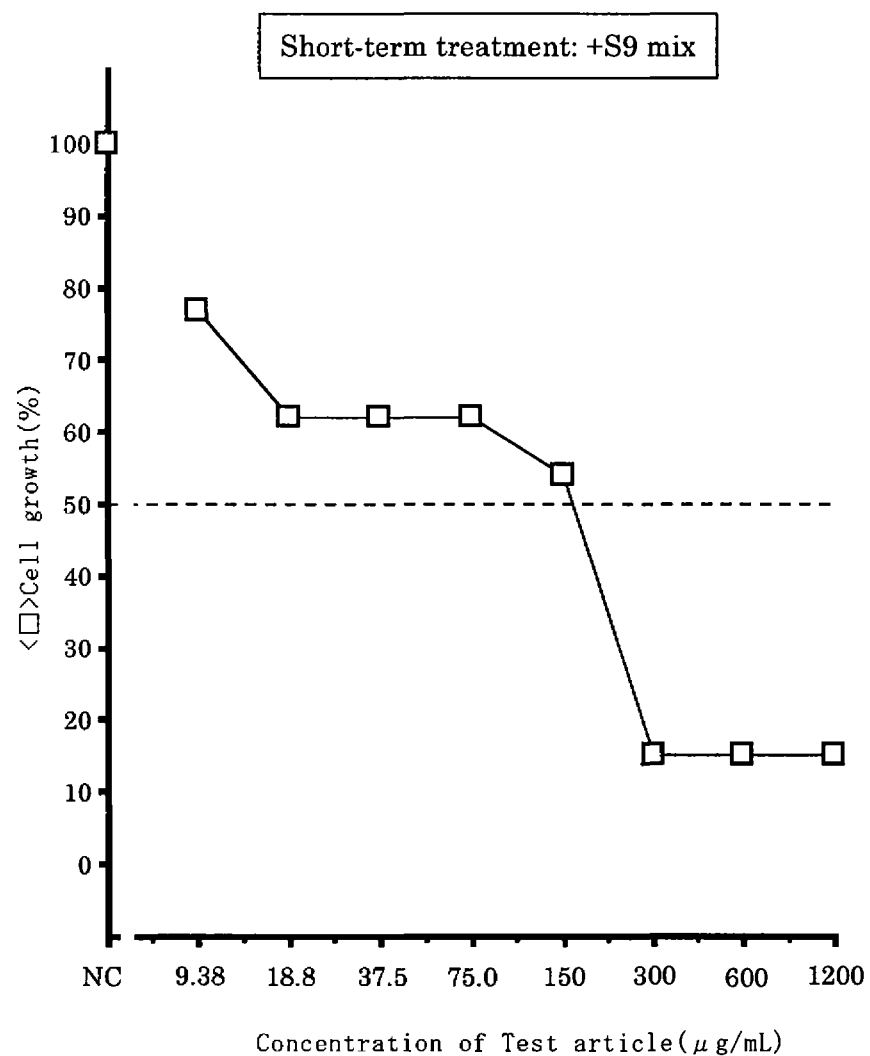


Fig. 1-1 Results of the cell-growth inhibition test treated with Indene

NC:negative control

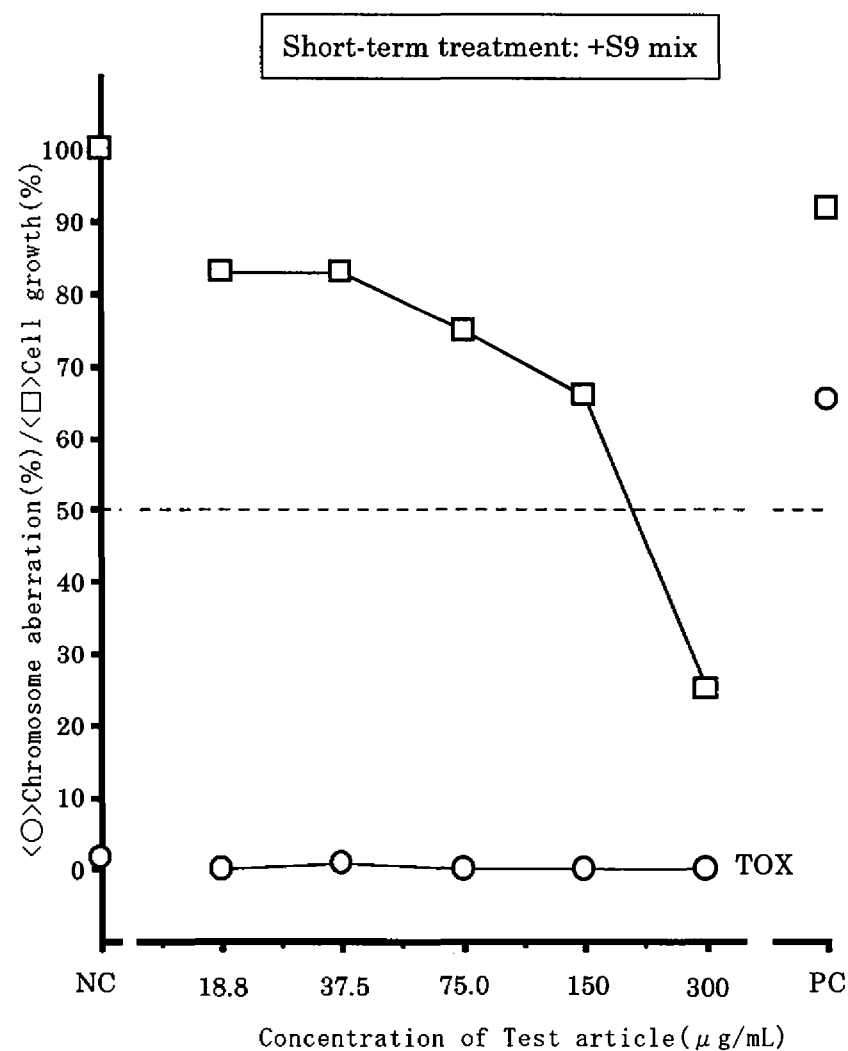


Fig. 1-2 Results of the chromosome aberration test treated with Indene

□:cell-growth ○:chromosome aberration

NC:negative control PC:positive control

TOX:cytotoxicity resulting in disturbance of chromosome analysis

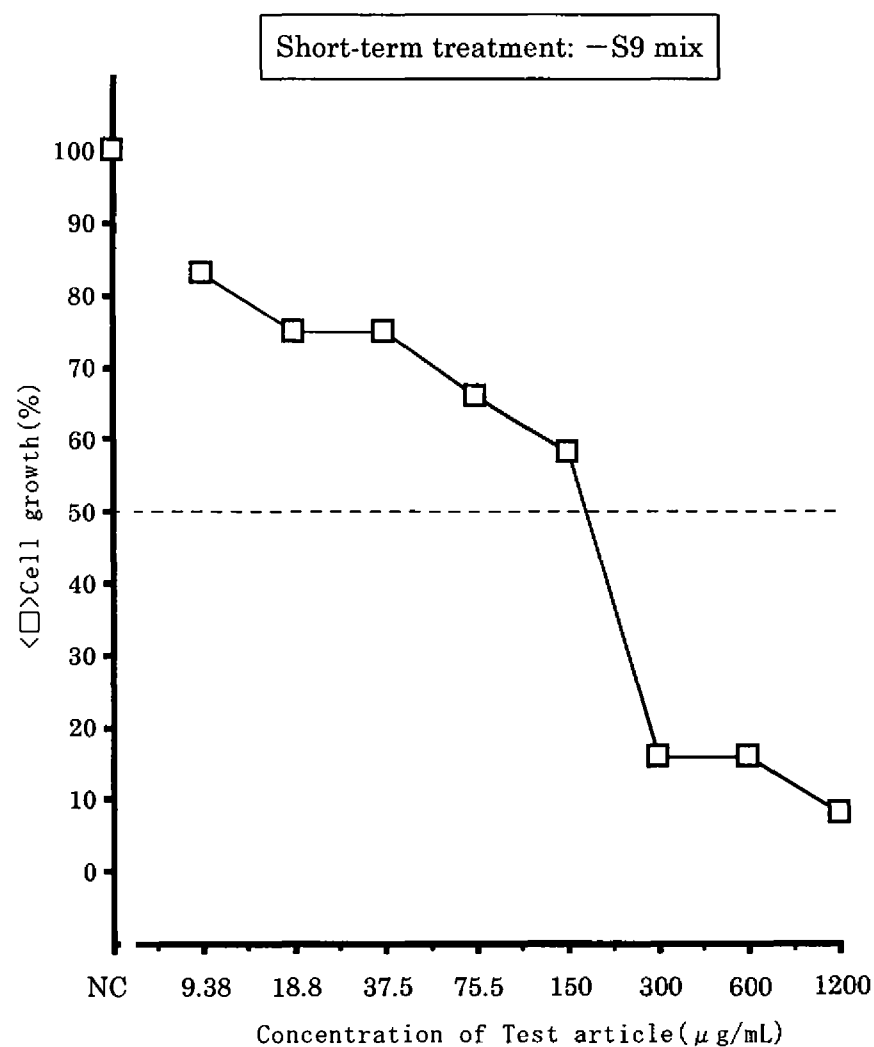


Fig. 2-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with Indene

NC:negative control

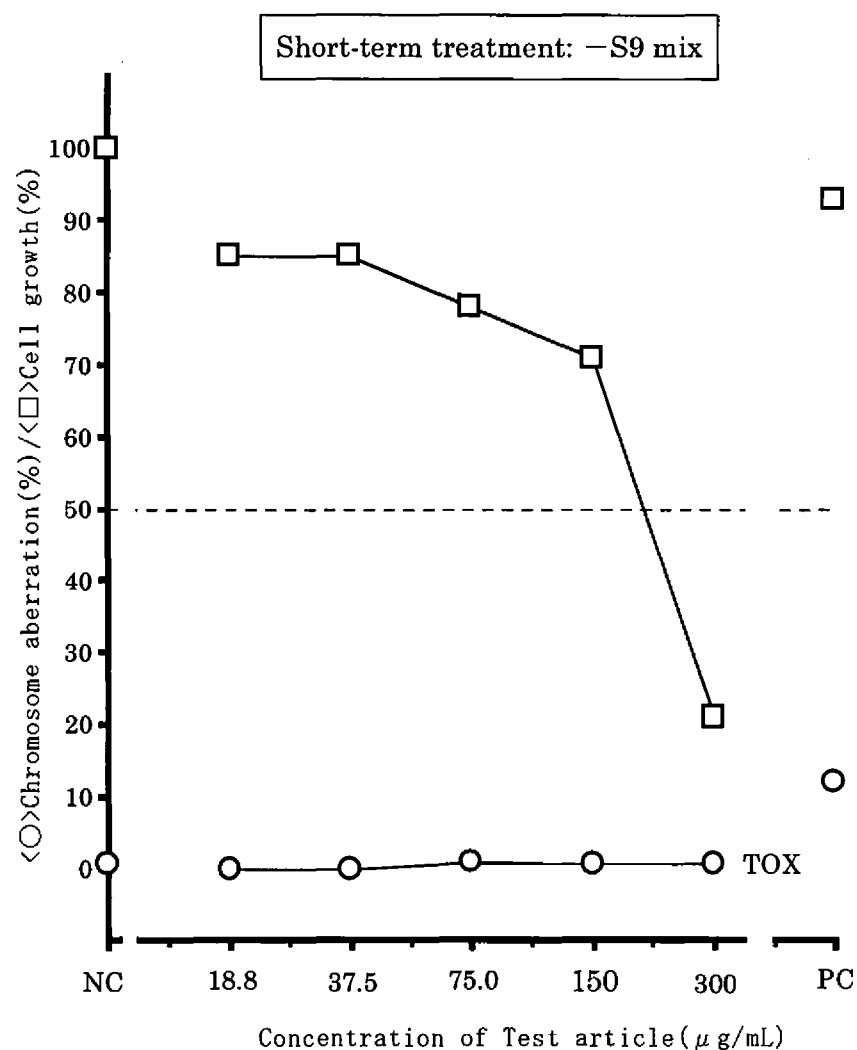


Fig. 2-2 Results of the chromosome aberration test treated with Indene

□:cell-growth ○:chromosome aberration

NC:negative control PC:positive control

TOX:cytotoxicity resulting in disturbance of chromosome analysis

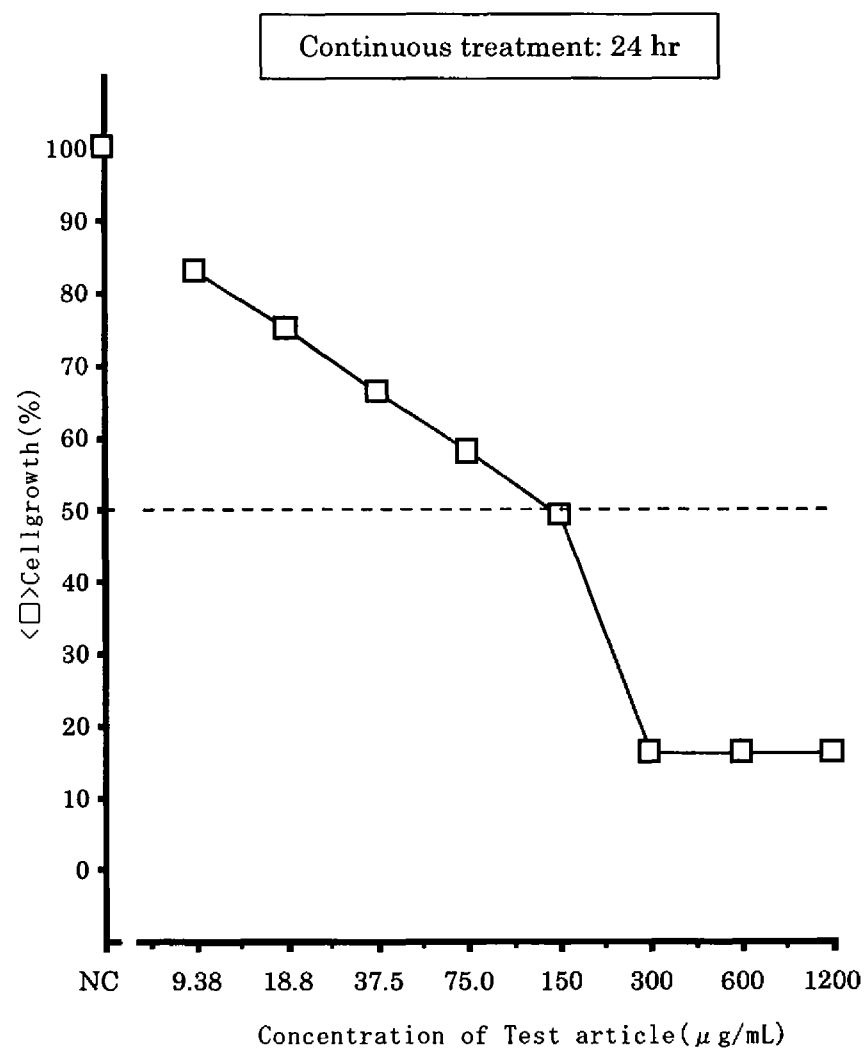


Fig. 3-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with Indene
NC:negative control

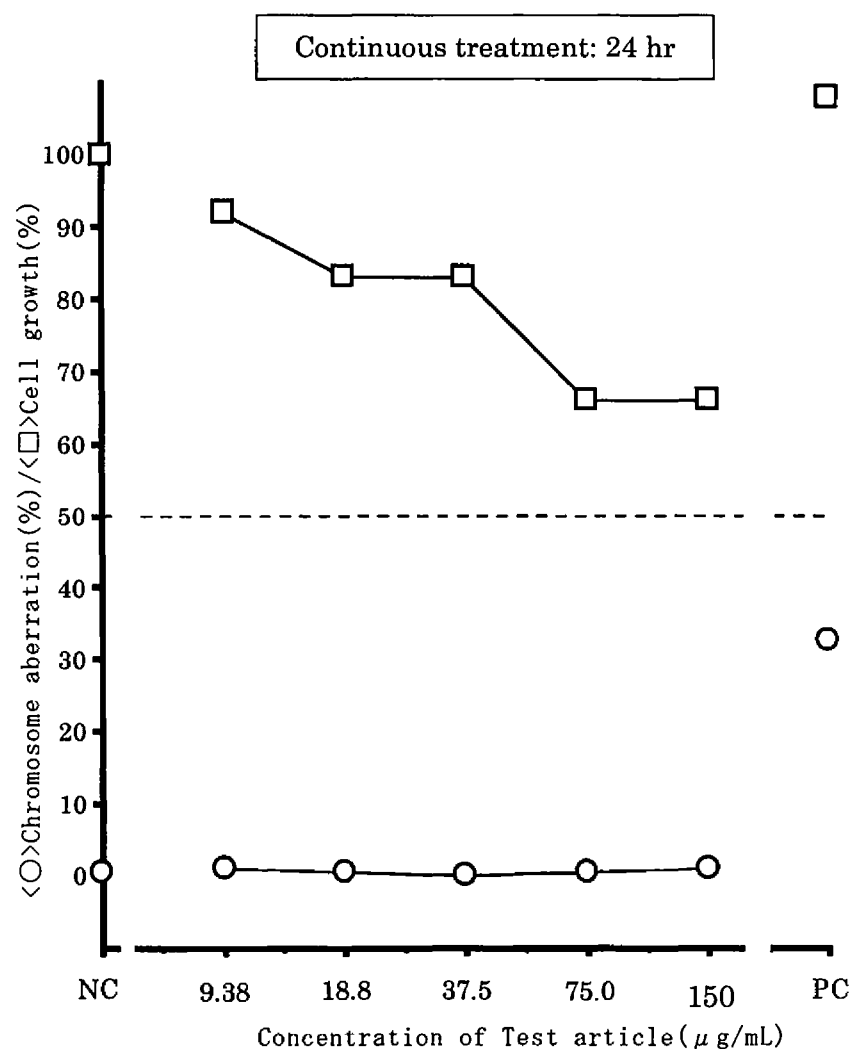


Fig. 3-2 Results of the chromosome aberration test treated with Indene
 $\square$:cell-growth $\circ$:chromosome aberration
 NC:negative control PC:positive control

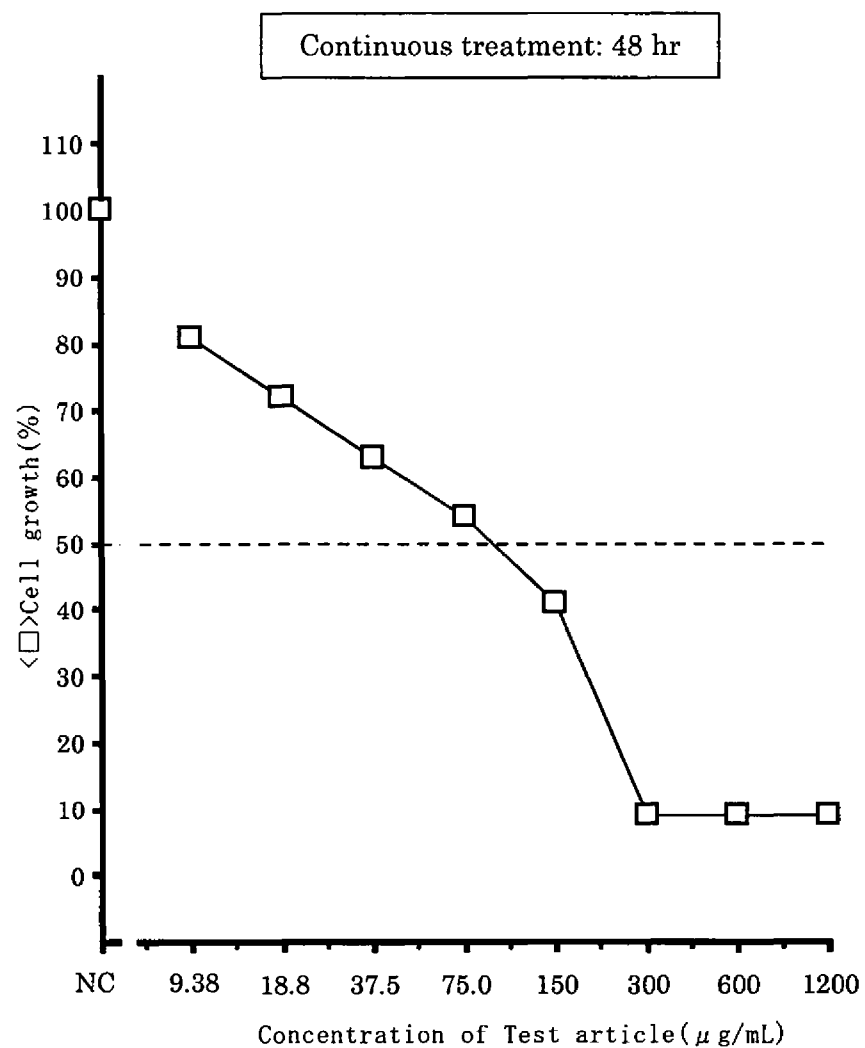


Fig. 4-1 Results of the cell- growth inhibition test treated with Indene
NC:negative control

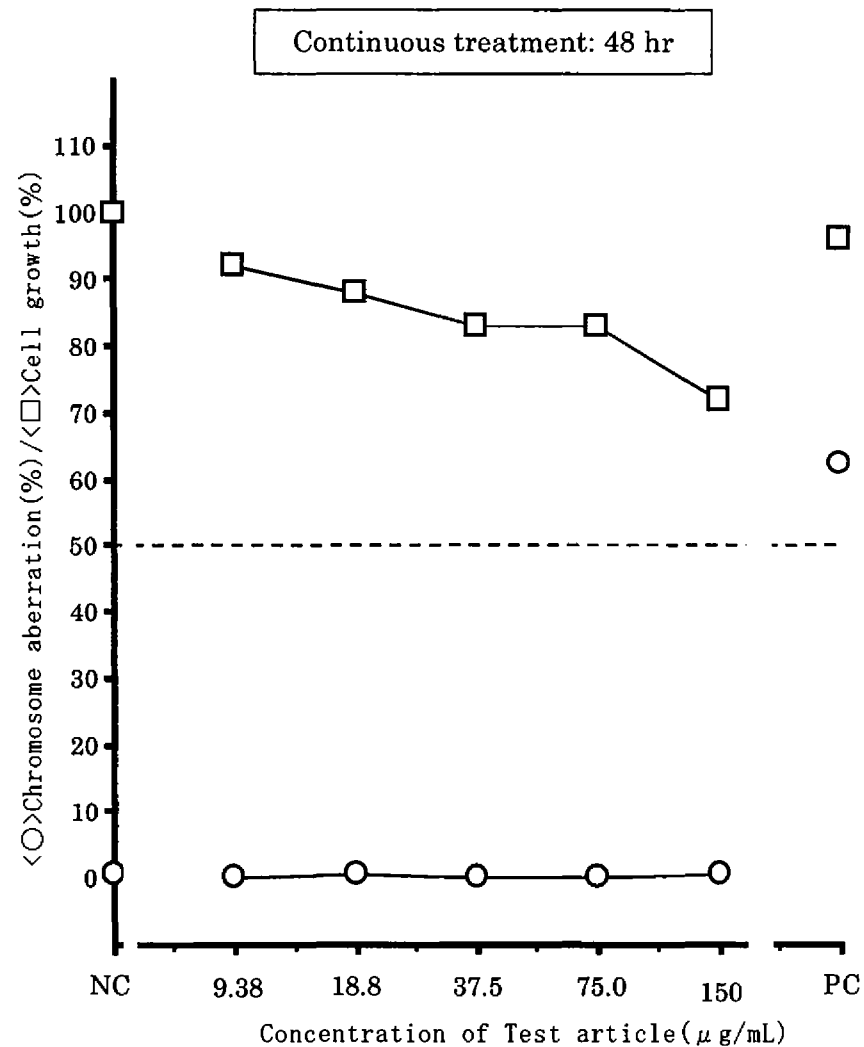


Fig. 4-2 Results of the chromosome aberration test treated with Indene
 :cell-growth :chromosome aberration
 NC:negative control PC:positive control

Table 1-1 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Indene
[short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell- growth inhibition test					Chromosome aberration test						
S9 Time mix (hr)	Cell growth ratio		Observation ^{c)}			Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell growth ratio		Observation ^{c)}					
	Plate 1 and 2		Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}		Precipitates /Crystals ^{f)}	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)} 85	100	-	-	-	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	-	-	-	-
		9.38	71	77	-	-	-	Test article	18.8	83	83	-	-	-
			71	-	-	-	-							
			57	62	-	-	-							
			57	62	+	-	-							
			57	62	+	-	-							
			57	62	+	-	-							
			57	62	++	-	-							
			42	54	++	-	-							
			14	15	++	-	-							
			14	15	TOX	-	-							
			14	15	TOX	-	-							
			14	15	TOX	-	-							
			14	15	TOX	-	-							
			1200	14	15	TOX	-							
14	15	TOX	-	-										
PC														
Concentration of 50% cell growth inhibition: 165.385 μ g/mL														

+ 6-18	Test article	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	-	-	-	0 (NC)	100 ^{a)} 100	100	-	-	-	-
		9.38	71	77	-	-	-	Test article	18.8	83	83	-	-	-
			71	-	-	-	-							
			57	62	-	-	-							
			57	62	+	-	-							
			57	62	+	-	-							
			57	62	+	-	-							
			57	62	++	-	-							
			42	54	++	-	-							
			14	15	++	-	-							
			14	15	TOX	-	-							
			14	15	TOX	-	-							
			14	15	TOX	-	-							
			14	15	TOX	-	-							
			1200	14	15	TOX	-							
14	15	TOX	-	-										
PC														
Concentration of 50% cell growth inhibition: 165.385 μ g/mL														

NC: Negative Control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 μ g/mL)

a): This 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 surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e): - : No changes of color

f): - : Absence of precipitates/crystals

Table 1-4 Cell growth ratio in CHL/IU cells treated with Indene
[continuous treatment: 48hr]

Study type		Treatment and Concentration (μ g/mL)	Cell- growth inhibition test					Treatment and Concentration (μ g/mL)	Chromosome aberration test									
S9 Time mix (hr)	Cell growth ratio		Observation ^{c)}			Cell growth ratio			Observation ^{c)}									
	Plate 1 and 2		Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}	Plate 1 and 2		Mean ^{b)} (%)	Condition of cells ^{d)}	Color of medium ^{e)}	Precipitates /Crystals ^{f)}						
48	Test article	0 (NC)	100 ^{a)} 99	100	-	-	-	0 (NC)	100 ^{a)} 92	100	-	-	-					
		9.38	81 81	81	-	-	-	Test article	9.38	92 84	92	-	-	-				
			72 72	72	+	-	-					+	-	-				
		18.8	63 63	63	+	-	-					18.8	84 84	88	+	-	-	
			63 63	63	+	-	-								+	-	-	
		37.5	45 63	54	++	-	-					37.5	76 84	83	+	-	-	
			63 63	54	++	-	-								+	-	-	
		75.0	36 45	41	++	-	-					75	84 76	83	++	-	-	
			45 45	41	++	-	-								++	-	-	
		150	9 9	9	TOX	-	-					150	69 69	72	++	-	-	
			9 9	9	TOX	-	-								++	-	-	
		300	9 9	9	TOX	-	-					PC	92 92	96	-	-	-	
			9 9	9	TOX	-	-								-	-	-	
		Concentration of 50% cell growth inhibition: 98.077 μ g/mL																

NC: Negative Control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/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 surviving cells.

TOX : Most of the cells were peeled off from the surface of plates or died and there were almost no surviving cells.

e): - : No changes of color

f): - : Absence of precipitates/crystals

Table 2-1 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Indene
[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	—	0	1	2	0	0	0	1.5	1.5	—	85-1 05-1
			(100) (100)	(0) (0)		(0) (0)	(0) (1)	(1) (1)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(1) (2)	(1) (2)		
		300	4	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	47-1 47-2 15-1 15-2
			(3)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(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)		
		150	200	0.0	—	0	1	2	0	0	0	1.0	1.0	—	41-1 71-1
			(100) (100)	(0) (0)		(0) (0)	(0) (1)	(1) (1)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(1) (1)	(1) (1)		
		75.0	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	55-1 94-1
			(100) (100)	(0) (0)		(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)		
		37.5	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	10-1 14-1
			(100) (100)	(0) (0)		(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)		
		18.8	200	0.0	—	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	—	76-1 29-1
			(100) (100)	(0) (0)		(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)		
		PC	200	0.0	—	3	17	123	0	1	1	65.5	66.0	+	03-1 86-1
			(100) (100)	(0) (0)		(1) (2)	(9) (8)	(61) (62)	(0) (0)	(0) (1)	(0) (1)	(62) (69)	(62) (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.

TOX: cell toxicity was observed.

NC: Negative control

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 μ g/mL)

Table 2-2 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Indene
[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	-	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	-	74-1 92-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		300	0	0.0	TOX	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	TOX	59-1 59-2 79-1 79-2
			(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)		
		150	200	0.5	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	32-1 78-1
			(100)	(1)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		75.0	200	0.0	-	2	2	0	0	0	0	1.0	2.0	-	20-1 93-1
			(100)	(0)		(1)	(2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2)	(3)		
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		37.5	200	0.5	-	1	0	1	0	0	0	0.5	1.0	-	56-1 27-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
			(100)	(1)		(1)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(2)		
		18.8	200	1.0	-	1	0	1	0	0	0	0.5	1.0	-	62-1 37-1
			(100)	(1)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
			(100)	(1)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		PC	200	0.0	-	4	6	19	0	0	0	12.0	13.5	+	34-1 40-1
			(100)	(0)		(4)	(2)	(10)	(0)	(0)	(0)	(12)	(15)		
			(100)	(0)		(0)	(4)	(9)	(0)	(0)	(0)	(12)	(12)		

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.

TOX: cell toxicity was observed.

NC: Negative control

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 2-3 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Indene
[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	0	0	1	0	0.5	0.5	-	87-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)		
		150	(100)	(0)	-	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	49-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		75.0	200	0.0	-	0	0	0	0	1	0	0.5	0.5	-	91-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		(100)	(100)	(0)	-	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(1)	(1)	-	16-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
-	24-0	37.5	200	1.0	-	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	-	52-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		(100)	(100)	(2)	-	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	-	04-1
			(100)	(2)		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)		
		18.8	200	0.0	-	1	0	1	0	0	0	0.5	1.0	-	31-1
			(100)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)		
		(100)	(100)	(0)	-	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	-	53-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
-	24-0	9.38	200	0.0	-	0	1	1	0	0	0	1.0	1.0	-	21-1
			(100)	(0)		(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		(100)	(100)	(0)	-	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)	-	69-1
			(100)	(0)		(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(0)	(1)	(1)		
		PC	200	0.0	-	6	11	54	0	1	0	32.5	35.0	+	84-1
			(100)	(0)		(2)	(6)	(22)	(0)	(1)	(0)	(29)	(30)		
		(100)	(100)	(0)	-	(4)	(5)	(32)	(0)	(0)	(0)	(36)	(40)	+	42-1
			(100)	(0)		(4)	(5)	(32)	(0)	(0)	(0)	(36)	(40)		

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

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)

Table 2-4 Chromosome aberration in CHL/IU cells treated with Indene
[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 (1) (0)	-	(0) (0)	(0) (0)	(1) (1)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.5 (0) (1)	0.5 (0) (1)	-	77-1 23-1
		150	200 (100) (100)	0.5 (1) (0)	-	(1) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	-	63-1 88-1
		75.0	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	(0) (2)	(0) (1)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.5 (0) (1)	1.5 (0) (3)	-	28-1 90-1
		37.5	200 (100) (100)	0.0 (0) (0)	-	(1) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.0 (0) (0)	0.5 (1) (0)	-	22-1 17-1
		18.8	200 (100) (100)	0.5 (1) (0)	-	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.0 (0) (0)	0.0 (0) (0)	-	48-1 39-1
		9.38	200 (100) (100)	0.5 (0) (1)	-	(0) (1)	(0) (0)	(1) (1)	(0) (0)	(0) (0)	(0) (0)	0.5 (0) (1)	1.0 (0) (2)	-	50-1 19-1
		PC	200 (100) (100)	0.5 (0) (1)	-	(5) (4) (1)	(33) (17) (16)	(93) (44) (49)	(0) (0) (0)	(2) (0) (2)	(0) (0) (0)	62.5 (61) (64)	63.0 (62) (64)	+	07-1 82-1

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

PC: Positive control (mitomycin C, 0.05 μ g/mL)