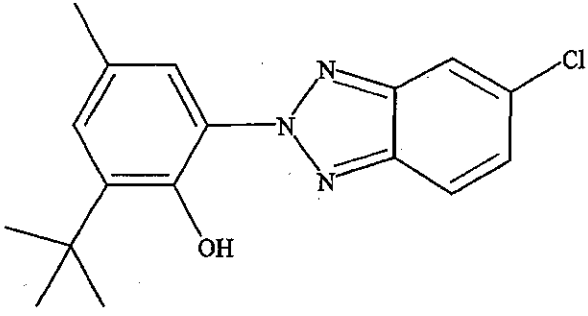


ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC命名法による)	ブメトリゾール		
別名	2-(2'-ヒドロキシ-3-tert-ブチル-5'-メチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール		
C A S 番号	3896-11-5		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)			
分子量	315.80		
試験に供した新規化学物質の純度	99.9%		
試験に供した新規化学物質のロット番号	01721IW4		
不純物の名称及び含有率	-		
蒸気圧	7.5×10E-7 Pa (20°C)		
対水溶解度	<1mg/L (20°C) EEC A6		
1-オクタノール/水分配係数	logPow>6 (20-25°C)		
融点	138-141°C		
沸点	-		
常温における性状	淡黄色粉末, 臭いなし		
安定性	常温・常圧で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	DMSO	5 mg/mL以下*	**
備考	* : 試験施設にて溶解度を確認 ** : 643.2 mg/mL DMSO懸濁液に発熱, 発泡は認められず。		

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

- 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
- 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 細胞の種類—培養条件

細胞名	CHL/IU	入手先	大日本製薬株式会社 ラボラトリープロダクツ部
種	チャイニーズハムスター	入手年月日	2000年 11月 28日
培養液	イーグルのMEM粉末を指定の調製方法に従って溶液とし、メンブランで濾過したもの	製造元	GIBCO
血清の種類と添加量	仔牛 10%	製造元 (Lot No.)	GIBCO (511116)
細胞周期	16.9 h	凍結条件	-196 °C
継代数	15	容器	プラスチックシャーレ
染色体数 (モード)	25本	培養条件	温度
			CO ₂ 濃度
備考	—		

3. S9 mix

(1) S9の入手方法等 (該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

自製・購入の別	1.自製 ○購入 (製造元: オリエンタル酵母工業株式会社)
製造年月日	2005年 1月 21日製造
購入の場合のLot No.	05012111
保存温度	-80 °C

(2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質			
種・系統	ラット, Crj:CD (SD)	名 称	Phenobarbital (PB) 5,6-Benzoflavone (BF)		
性	雄	投与方法	i.p.		
週 齢	7 週	投与期間及び投与量 (g / kg 体重)	1日目	PB	0.03 g/kg
体重 (匹数)	216.4 ± 8.9 g (45匹)		2,3,4日目	PB	0.06 g/kg
			3日目	BF	0.08 g/kg

(3) S 9 mixの組成

成分	S 9 mix 1mL中の量	成分	S 9 mix 1mL中の量
S9	0.3 mL	NADP	4 μ mol
MgCl ₂	5 μ mol	Na-リン酸緩衝液	— μ mol
KCl	33 μ mol	その他 (HEPES緩衝液*)	4 μ mol
グルコース-6-リン酸	5 μ mol	注射用水	総量を1mLとする.

*pH 7.2

(4) S 9 mixの処理条件(該当する番号を○で囲み, 必要事項を記入すること.)

① プレート法	2. 浮遊細胞法	3. その他 ()
S 9 量 (最終濃度)	5 %	
S 9 蛋白量 (最終濃度)	1.257 mg/mL	
処 理 時 間	6 h	
回 復 時 間	18 h	
備 考	—	

4. 被験物質溶液の調製 (被験物質溶液の性状及び純度換算の有無は該当するものを○で囲むこと.)

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度
	ジメチルスルホキシド	株式会社同仁化学研究所	PU140	紫外外部吸収スペクトル用	100.0 %
溶媒選択の理由	ジメチルスルホキシド (DMSO) は, ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で一般的に用いられており, 良好な懸濁状態となるため.				
被験物質溶液の性状	溶解	懸濁	その他 ()		
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	タッチミキサーで攪拌することにより均一な懸濁状態とした.				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	— 時間 — 分 — °C 細胞増殖抑制試験, 染色体異常試験 (短時間処理法, 連続処理法) とも用時調製				
純度換算の有無	有		無		

5. 短時間処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2005年 4月 25日から 2005年 4月 26日	2005年 4月 25日から 2005年 4月 26日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 60 mm	直径 60 mm
	培 養 液 量	3.0 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	1	1
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/5mL	2.0×10^4 個/5mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.015 mL/培養器	0.015 mL/培養器
	S 9 mix 添加量		0.5 mL/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5 %
	S 9 蛋白の最終濃度		1.257 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
細胞増殖抑制測定法	血球計算盤を使用		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

代謝活性化法によらない場合 (6 - 18 h)		代謝活性化法による場合 (6 - 18 h)	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100	0	100
0.00625	95	0.00625	97
0.0125	94	0.0125	97
0.025	98	0.025	100
0.050 [†]	97	0.050 [†]	97
0.100 [†]	95	0.100 [†]	97
0.200 [†]	94	0.200 [†]	93
0.400 [†]	91	0.400 [†]	90
0.800 [†]	77	0.800 [†]	81
1.600 [†]	41	1.600 [†]	47
3.200 [†]	23	3.200 [†]	27

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。

細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記入すること。

[†]代謝活性化法によらない場合及び代謝活性化法による場合とも、0.050 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（白色、微細及び油膜状）が認められた。

(3) 染色体異常試験の条件

		代謝活性化法によらない場合	代謝活性化法による場合
試験実施期間		2005年 5月 9日から 2005年 5月 10日	2005年 5月 9日から 2005年 5月 10日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	円形プラスチックシャーレ
	大 き さ	直径 60 mm	直径 60 mm
	培 養 液 量	3.0 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2	2
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/5mL	2.0×10^4 個/5mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.015 mL/培養器	0.015 mL/培養器
	S 9 mix 添加量		0.5 mL/培養器
	S 9 の 最 終 濃 度		5 %
	S 9 蛋白の最終濃度		1.257 mg/mL
	処 理 時 間	6 h	6 h
	回 復 時 間	18 h	18 h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表1-1, 1-2による.)

6. 連続処理法による試験

(短時間処理法による試験で陰性と判定された場合に試験を実施すること.)

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

試験実施期間		2005年 4月 25日から 2005年 4月 26日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	
	大 き さ	直径 60 mm	
	培 養 液 量	5.0 mL/培養器	mL/培養器
	用量当たりの培養器数	1	
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/ 5mL	個/ mL
	前 培 養 日 数	3 日間	日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	0.025 mL/培養器	mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	h
	回 復 時 間	0 h	h
細胞増殖抑制 測定法	血球計算盤を使用		
備考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(24 - 0 h) 処理による場合		(- h) 処理による場合	
用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)	用量 (mg/mL)	細胞増殖率 (%)
0	100		
0.00625	98		
0.0125	97		
0.025	94		
0.050 [†]	92		
0.100 [†]	92		
0.200 [†]	90		
0.400 [†]	84		
0.800 [†]	56		
1.600 [†]	29		
3.200 [†]	8		

[備考] 括弧内には処理時間及び回復時間を記入すること。
 連続処理法は代謝活性化法によらない方法による。
 細胞増殖率は溶媒処理群を100%とし、濃度の低い順に記入すること。
[†]0.050 mg/mL以上の濃度で被験物質の析出（白色の微細及び油膜状の析出物）が認められた。

(3) 染色体異常試験の条件

試験実施期間		2005年 5月 12日から 2005年 5月 13日	年 月 日から 年 月 日
培 養 器	形 状	円形プラスチックシャーレ	
	大 き さ	直径 60 mm	
	培 養 液 量	5.0 mL/培養器	mL/培養器
	用量当たりの培養器数	2	
細 胞	播 種 細 胞 数	2.0×10^4 個/5mL	個/mL
	前 培 養 日 数	3 日間	日間
処 理 条 件	被 験 物 質 溶 液 添 加 量	0.025 mL/培養器	mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	h
	回 復 時 間	0 h	h
備考			

(4) 染色体異常試験結果 (別表2-1による.)

7. 結果の判定及び参考事項

(1) 結果の判定

判 定 (いずれかを○で囲むこと.)		陽性		陰性			
<p>判定の理由</p> <p>本被験物質は、短時間処理法（代謝活性化によらない場合及び代謝活性化による場合）及び連続処理法（24時間処理）とも構造異常・数的異常の出現率は5%未満で、用量に伴う増加も認められなかった。</p> <p>なお、本試験で用いた陽性対照物質は明らかな陽性結果を示し、陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、背景データの範囲内にあり、試験条件を満たすものであったことから、試験系に影響した他の要因がなく、試験が適切に実施されたことが確認された。</p> <p>また、染色体異常試験と同時に行った各処理濃度における生細胞数の測定結果は、用量設定試験として実施した細胞増殖抑制試験の結果を再現し、染色体異常試験が適切な濃度で実施されたことを確認した。</p> <p>以上の結果より、本被験物質は陰性と判断した。</p>							
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
			+S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
		連続処理法	/	—	h処理	—	mg/mL
			/	—	h処理	—	mg/mL
	数的異常	短時間処理法	-S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
			+S9 mix	—	h処理	—	mg/mL
		連続処理法	/	—	h処理	—	mg/mL
			/	—	h処理	—	mg/mL

[備考] D₂₀値は分裂中期像20%に異常を誘発させるために必要な被験物質の推定用量であり、陽性と判定した試験系列について、異常のタイプ別に記入すること。

(2) 参考事項

[用量設定理由]

染色体異常試験の実施に先駆けて、試験濃度設定のために細胞増殖抑制試験を実施した。細胞増殖抑制試験の試験濃度は「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成15年11月21日）に基づき、10mM相当の3.200 mg/mLを最高濃度として、以下公比2で計10濃度を設定した。すなわち、0.00625, 0.0125, 0.025, 0.050, 0.100, 0.200, 0.400, 0.800, 1.600及び3.200 mg/mLとした。

細胞増殖抑制試験の結果から、Probit法で求めた被験物質の50 %細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では1.8649 mg/mL、代謝活性化による場合では2.0209 mg/mLであった。一方、連続処理法(24時間処理)では0.8366 mg/mLであった。このことから、染色体異常試験の試験濃度は、IC₅₀及び細胞の生存率を指標に、細胞増殖を50 %以上抑制する濃度を最高濃度とし、公比2により5段階設定した。すなわち、短時間処理法(代謝活性化によらない場合及び代謝活性化による場合)では、0.150, 0.300, 0.600, 1.200及び2.400 mg/mLとした。連続処理法(24時間処理)では、0.075, 0.150, 0.300, 0.600及び1.200 mg/mLとした。

[被験物質の析出]

被験物質の析出は、短時間処理法及び連続処理法とも、細胞増殖抑制試験では0.050 mg/mL以上の濃度において認められ、染色体異常試験ではすべての濃度において認められた。

[染色体異常の観察及び結果判定の方法]

1シャーレあたり100個、1濃度あたり200個の分裂中期像を観察した。染色体の異常については、数的異常として倍数体及び核内倍化を記録した。また、構造的異常として染色分体切断、染色分体交換、染色体切断、染色体交換及びその他に分類し、これらの異常を1つでも有する細胞を陽性細胞1個として記録した。

結果の判定は、石館の方法を用いて行った。

[備考] 「参考事項」の欄には、試験結果に対する試験責任者の見解等を記入すること。

別表 1-1-1 染色体異常試験の結果 (短時間処理法)

被験物質の名称: プメトリゾール

処理時間 (hr)	S9 mix	被験物質の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数 (出現頻度%)							細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)						
			観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	染色体交換	総異常数 (%)		ギヤップの出現数	観察細胞数	倍數体	その他	総異常細胞数 (%)		
6-18	-	陰性対照 (DMSO)	100	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0	0 (0)
6-18	-	0.150†	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0	0	0	1 (0.5)	0
6-18	-	0.300†	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0	0 (0)
6-18	-	0.600†	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0	0	0	0	0 (0)
6-18	-	1.200†	100	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	2
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	3 (1.5)	0
6-18	-	2.400†	100	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			200	0	1	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	2 (1.0)	0
6-18	-	陽性対照 (MMC)	100	32	39	0	0	0	0	0	55	0	0	0	0	0	0
			100	21	36	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0
			200	53	75	0	0	0	0	0	105 (52.5)	0	0	0	0	0	0 (0)

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethylsulfoxide
MMC; Mitomycin C

別表 2-1 染色体異常試験の結果 (連続処理法)

被験物質の名称: プメトリゾール

処理時間 (hr)	被験物質の用量 (mg/mL)	染色体構造異常の数 (出現頻度%)										細胞増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数 (出現頻度%)								
		観察細胞数	染色体切断	染色体交換	染色体切断	染色体交換	染色体交換	その他	総異常数 (%)	ギャップの出現数	倍數体		その他	総異常細胞数 (%)							
24-0	陰性対照 (DMSO)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
		100	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		200	0	1	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24-0	0.075†	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24-0	0.150†	100	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		100	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		200	1	0	0	0	1	0	0	2 (1.0)	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (1.0)	0	0
24-0	0.300†	100	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		200	0	1	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0
24-0	0.600†	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
		100	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
		200	1	0	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
24-0	1.200†	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
24-0	陽性対照 (MMC)	100	20	26	0	0	0	0	0	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		100	20	30	0	0	0	0	0	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		200	40	56	0	0	0	0	0	87 (43.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[備考]

1. 処理時間の欄には、処理時間一回復時間の順に記入すること。
2. 被験物質の用量は、低い方から順に記入すること。
3. 溶媒、陰性対照物質を括弧内に記入する。物質名を略称で記入した場合には、欄外にその名称を記入すること。
4. 各群のプレートごとのデータを1及び2行目に記入し、その合計を3行目に記入すること。
5. 被験物質の析出が認められた場合、その用量に†印を付すこと。
6. 細胞毒性のために染色体の観察が不能であった用量を表記する場合は、観察細胞数の欄にTOXを記入すること。
7. その他の欄を用いる場合は、その内容を欄外に記入すること。

DMSO; Dimethylsulfoxide
MMC; Mitomycin C

圖1 細胞增殖抑制試驗結果

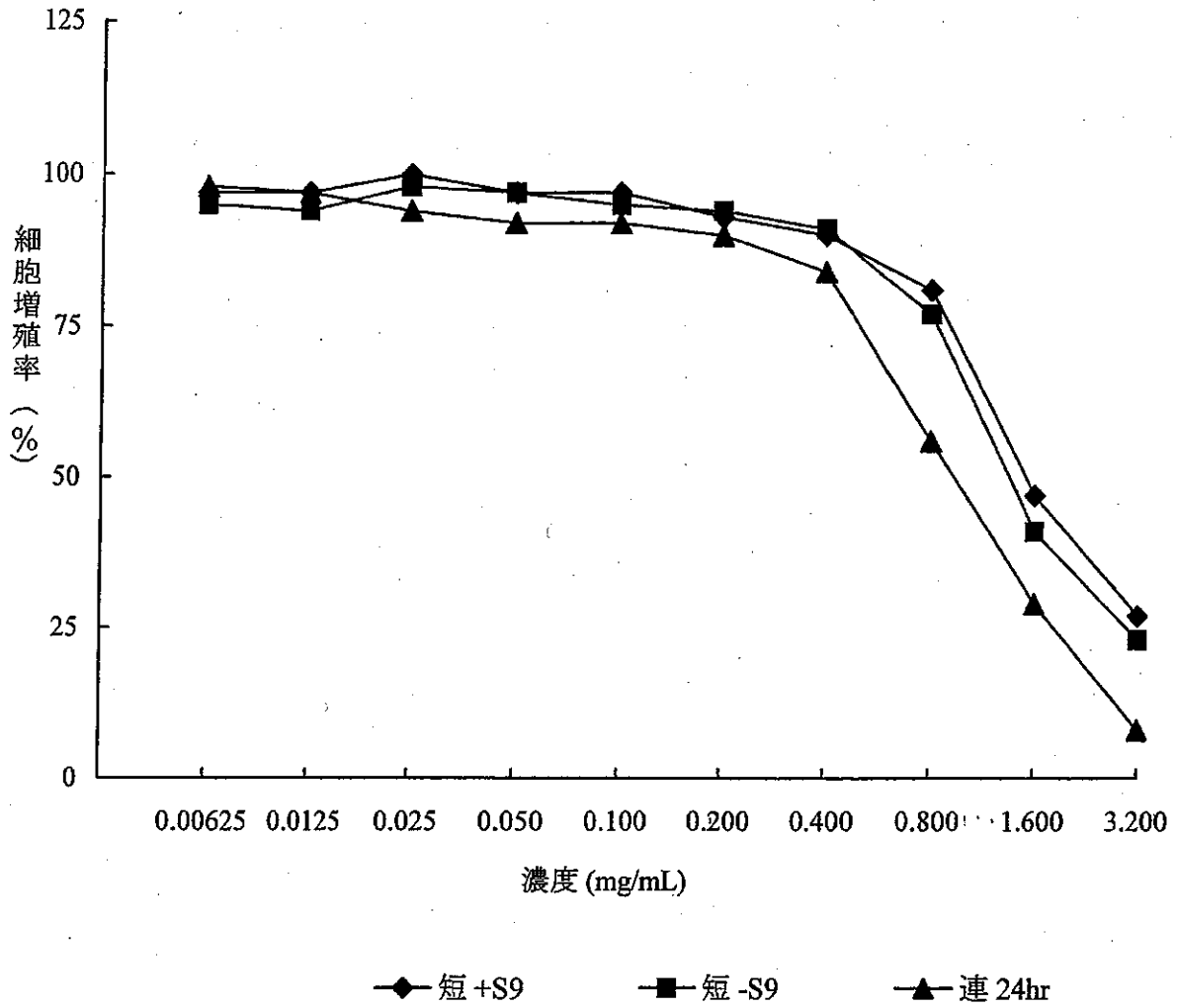
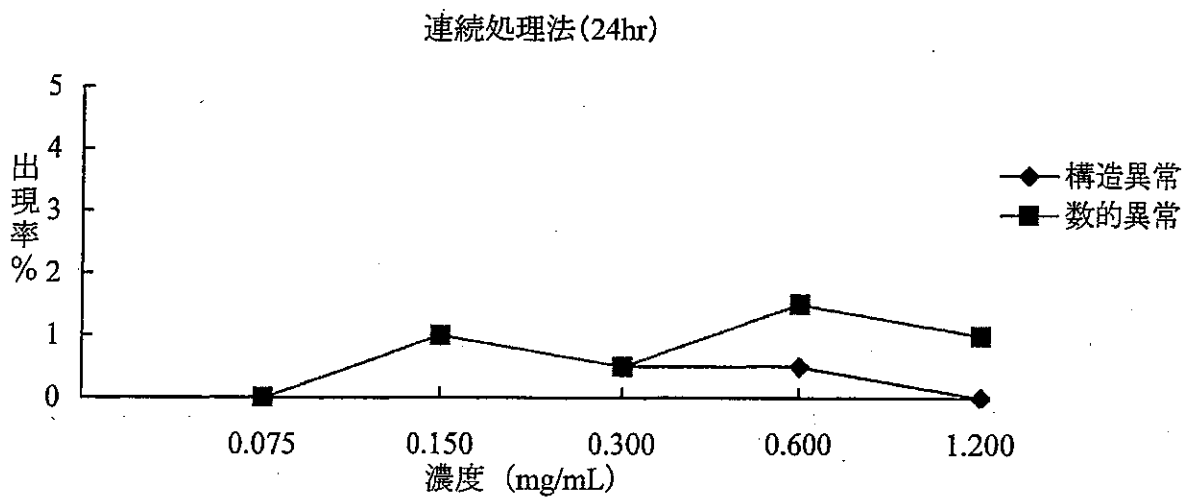
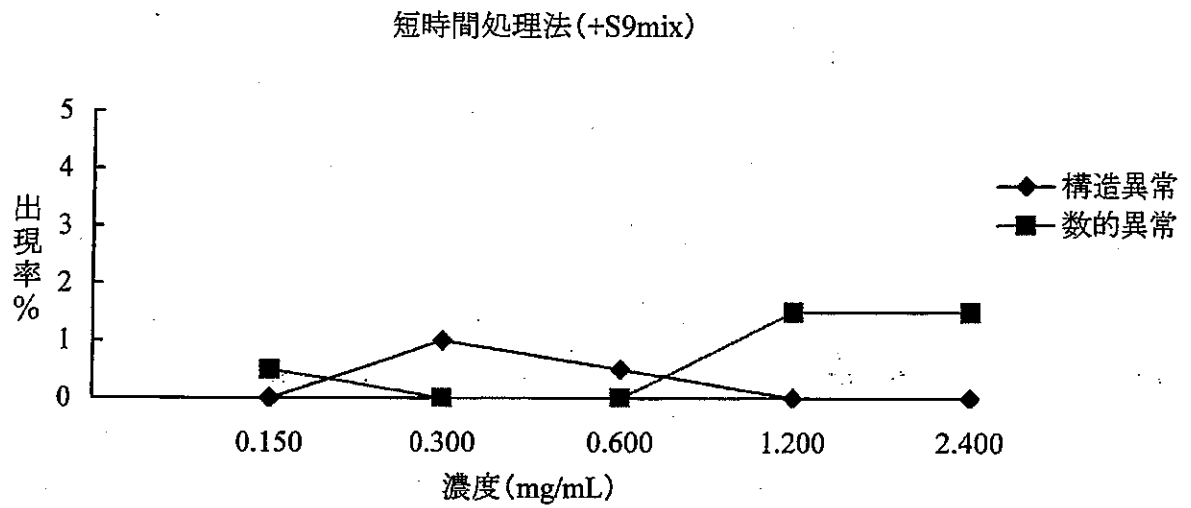
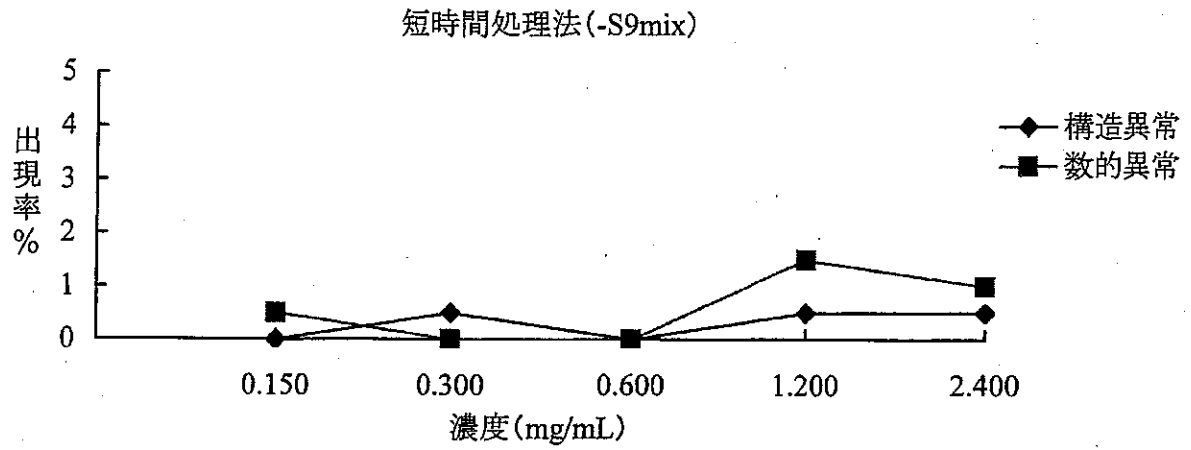


圖2 用量反應曲線

Study No. 971124



被験物質名：ブメトリゾール (CAS No.3896-11-5)

試験系：チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CH1/U細胞)

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

東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

試験施設：株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

岐阜県羽島市福寿町間島6丁目104番地

試験目的：ブメトリゾールのほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験を行い、その染色体異常誘発性の有無について検討した。

準拠したガイドライン：

「OECD化学品テストガイドライン、473 In vitro 哺乳類動物細胞を用いる染色体異常試験」(1997年7月21日採択)、平成15年11月21日付(薬食発第1121002号：厚生労働省医薬食品局長、平成15・11・13製局第2号：経済産業省製造産業局長、環企発第031121002号：環境省総合環境政策局長連名通知)「新規化学物質等に係る試験の方法について」の別添「化学物質の慢性毒性試験、生殖能及び後世代に及ぼす影響に関する試験、催奇形性試験、変異原性試験、がん原性試験、生体内運命に関する試験及び薬理学的試験」

遵守したGLP：新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環企発第031121004号)並びにOECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE (OECD化学物質の安全性試験の実施に関する基準)

試験開始日：2005年 4月 1日

試験終了日：2006年 11月 13日

試験実施日：試験系細胞の再培養実施日 (実験開始日) 2005年 4月 15日

細胞増殖抑制試験

細胞播種日 2005年 4月 22日

検体液添加日 2005年 4月 25日

細胞数計測日 2005年 4月 26日

染色体異常試験

1) 短時間処理法

細胞播種日 2005年 5月 6日

検体液添加日 2005年 5月 9日

標本作製及び細胞数計測日 2005年 5月 10日

要 約

ブメトリゾールの染色体異常誘発性の有無を、ほ乳類の培養細胞(CHL/IU細胞)を用い、短時間処理法(6時間処理のS9 mix添加及びS9 mix無添加)と連続処理法(24時間処理)で検討した。

ブメトリゾールの試験濃度は、細胞増殖抑制試験の結果から、50%細胞増殖抑制濃度及び細胞の生存率を指標に、短時間処理法(S9 mix添加及びS9 mix無添加)では150, 300, 600, 1200及び2400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、連続処理法(24時間処理)では75, 150, 300, 600及び1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の公比2, 5段階を設定した。

試験の結果、連続処理法及び短時間処理法とも、数的及び構造的異常細胞の出現率は5%未満であった。

各試験系列で用いた陽性対照物質は、明らかな陽性結果を示し、陰性対照及び陽性対照における染色体異常誘発率は、当試験施設のバックグラウンドデータの範囲内であった。

以上の結果、本試験条件下において、ブメトリゾールに染色体異常誘発性はないと判定する。

Table 1. Cell growth inhibition test of bumetrizole in cultured CHL cells
-The short treatment method-

Test Substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Treated for 6 hr with S9 mix			Treated for 6 hr without S9 mix		
		No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Survival ratio ^{a)} (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	-	70	100	-	64	100	-
bumetrizole	6.25	68	97	-	61	95	-
	12.5	68	97	-	60	94	-
	25	70	100	-	63	98	-
	50*	68	97	-	62	97	-
	100*	68	97	-	61	95	-
	200*	65	93	2020.9	60	94	1864.9
	400*	63	90	-	58	91	-
	800*	57	81	-	49	77	-
	1600*	33	47	-	26	41	-
	3200*	19	27	-	15	23	-

a): (bumetrizole treated group / negative control) $\times 100$.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Table 2. Cell growth inhibition test of bumetrizole in cultured CHL cells
-The continuous treatment method-

Test Substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	No. of cells ($\times 10^4/\text{plate}$)	Treated for 24 hr		IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
			Survival ratio ^{a)} (%)		
Negative control (Dimethyl sulfoxide)	—	63	100	100	—
bumetrizole	6.25	62	98		
	12.5	61	97		
	25	59	94		
	50*	58	92		
	100*	58	92		
	200*	57	90		836.6
	400*	53	84		
	800*	35	56		
	1600*	18	29		
	3200*	5	8		

a): (bumetrizole treated group / negative control) $\times 100$.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Table 3. Chromosomal aberration test of bumetizole in cultured CHL cells
 — The short treatment method —

Test substance	Concentration (µg/mL)	With (+) or without (-) S9 mix	No. of metaphase examined	No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Numerical aberration		Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)			
						Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)			No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)	Judgement ^{b)}							
								gap	cb	cte	cse	fig			(+g)	(-g)					
Negative control	—	+	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	150*	+	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	96
	300*	+	200	0	0	0	—	0	1	0	0	2	2	1.0	1.0	—	—	—	—	—	91
bumetizole	600*	+	200	0	0	0	—	0	1	0	0	0	1	0.5	0.5	—	—	—	—	—	85
	1200*	+	200	3	0	1.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	51
	2400*	+	200	3	0	1.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34
Dimethylnitrosamine	500	+	200	0	0	0	—	0	66	0	124	2	0	145	145	72.5	72.5	72.5	72.5	+	85
Negative control	—	—	200	0	0	0	—	0	1	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	—	—	—	100
	150*	—	200	1	0	0.5	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95
	300*	—	200	0	0	0	—	0	1	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	—	—	—	95
bumetizole	600*	—	200	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	89
	1200*	—	200	3	0	1.5	—	0	1	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	—	—	—	48
	2400*	—	200	2	0	1.0	—	0	0	0	1	0	0	1	0.5	0.5	—	—	—	—	34
Mitomycin C	0.1	—	200	0	0	0	—	0	53	0	75	0	0	105	105	52.5	52.5	52.5	52.5	+	88

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) × 100.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%); ±: equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): cb: chromatid break; cse: chromosome exchange; cte: chromosome exchange; fig: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) × 100.

e): (bumetizole treated group or positive control / negative control) × 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.

Table 4. Chromosomal aberration test of bumetizole in cultured CHL cells
— The continuous treatment method —

Test substance	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Time of treatment (hr)	No. of metaphase examined	Numerical aberration				Structural aberrations										Survival ratio ^{e)} (%)						
				No. of Polyploid cells	No. of endoreduplication cells	Incidence ^{a)} (%)	Judgement ^{b)}	Types ^{c)} and numbers (cumulative)			No. of cells with chromosome aberration		Incidence ^{d)} (%)	Judgement ^{b)}										
								gap	ctb	csb	cte	cse			fig	(+g)	(-g)							
Negative control	—	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
	75*	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97
	150*	24	200	2	0	1.0	—	0	1	0	0	1	0	2	2	1.0	1.0	—	—	—	—	—	—	92
bumetizole	300*	24	200	1	0	0.5	—	0	0	0	1	0	0	1	1	0.5	0.5	—	—	—	—	—	—	88
	600*	24	200	3	0	1.5	—	0	1	0	0	0	0	1	1	0.5	0.5	—	—	—	—	—	—	62
	1200*	24	200	2	0	1.0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34
Mitomycin C	0.05	24	200	0	0	0	—	0	40	0	56	0	0	87	87	43.5	43.5	—	—	—	—	—	—	88

Negative control: Dimethyl sulfoxide.

a): (Numerical aberration cells / observed metaphase cells) \times 100.

b): Judged on the basis of incidence as; —: negative (less than 5.0%); \pm : equivocal (5.0% or higher to less than 10.0%); +: positive (10.0% or higher).

c): ctb: chromatid break; csb: chromosome break; cte: chromatid exchange; cse: chromosome exchange; fig: fragmentation.

d): (Cells with structural chromosome aberration / observed metaphase cells) \times 100.

e): (bumetizole-treated group or positive control / negative control) \times 100.

(+g): Total aberrant cells including the gap; (-g): total aberrant cells excluding the gap.

*: White oily membrane-like precipitations and white fine precipitations were noted in culture fluid.