

表 2-1-1 S9 mix 非存在下における2, 3, 4, 4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンの  
 復帰突然変異試験結果〔本試験1回目－直接法〕

用 量 〔 $\mu$ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	99	10	17	---	---
[ジメチル スルホキシド]	96	11	21	---	---
	107	10	17	---	---
	(101 $\pm$ 6)	(10 $\pm$ 1)	(18 $\pm$ 2)	---	---
31.3	115	8	---	---	---
	127	10	---	---	---
	90	10	---	---	---
	(111 $\pm$ 19)	(9 $\pm$ 1)	---	---	---
62.5	108	12	29	---	---
	100	11	24	---	---
	103	13	27	---	---
	(104 $\pm$ 4)	(12 $\pm$ 1)	(27 $\pm$ 3)	---	---
125	115	5	19	---	---
	124	14	18	---	---
	118	7	25	---	---
	(119 $\pm$ 5)	(9 $\pm$ 5)	(21 $\pm$ 4)	---	---
250	127	7	30	---	---
	105	6	21	---	---
	104	6	28	---	---
	(112 $\pm$ 13)	(6 $\pm$ 1)	(26 $\pm$ 5)	---	---
500	125	4*	24	---	---
	109	6*	23	---	---
	131	7*	20	---	---
	(122 $\pm$ 11)	(6 $\pm$ 2)	(22 $\pm$ 2)	---	---
1000	13*	0*	25	---	---
	23*	0*	36	---	---
	14*	0*	39	---	---
	(17 $\pm$ 6)	(0 $\pm$ 0)	(33 $\pm$ 7)	---	---
2000	---	---	15*	---	---
	---	---	19*	---	---
	---	---	24*	---	---
	---	---	(19 $\pm$ 5)	---	---
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	998	327	585	---	---
コロニー数	948	324	572	---	---
/プレート	984	328	642	---	---
	(977 $\pm$ 26)	(326 $\pm$ 2)	(600 $\pm$ 37)	---	---

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 2-1-2 S9 mix 非存在下における2, 3, 4, 4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンの  
 復帰突然変異試験結果〔本試験1回目-直接法〕

用 量 〔 $\mu$ g/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰性対照 〔ジメチル スルホキシド〕	---	---	---	21 21 18 ( 20 $\pm$ 2 )	9 8 10 ( 9 $\pm$ 1 )
1.56	---	---	---	21 17 13 ( 17 $\pm$ 4 )	13 12 9 ( 11 $\pm$ 2 )
3.13	---	---	---	24 16 20 ( 20 $\pm$ 4 )	14 16 13 ( 14 $\pm$ 2 )
6.25	---	---	---	19 32 27 ( 26 $\pm$ 7 )	7 15 18 ( 13 $\pm$ 6 )
12.5	---	---	---	24 34 22 ( 27 $\pm$ 6 )	16 13 18 ( 16 $\pm$ 3 )
25	---	---	---	30* 36* 23* ( 30 $\pm$ 7 )	13* 12* 17* ( 14 $\pm$ 3 )
50	---	---	---	30* 18* 28* ( 25 $\pm$ 6 )	0* 0* 0* ( 0 $\pm$ 0 )
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異 コロニー数 /プレート	---	---	---	329 242 272 ( 281 $\pm$ 44 )	228 215 239 ( 227 $\pm$ 12 )

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 2-2

S9 mix 存在下における2, 3, 4, 4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンの  
復帰突然変異試験結果〔本試験1回目一代謝活性化法〕

用 量 〔 $\mu\text{g}$ /プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	108	16	25	28	9
[ジメチル スルホキシド]	95	9	25	24	14
	90	10	16	28	17
	( 98 $\pm$ 9 )	( 12 $\pm$ 4 )	( 22 $\pm$ 5 )	( 27 $\pm$ 2 )	( 13 $\pm$ 4 )
156	139	9	36	33	14
	127	10	30	13	10
	112	1	28	29	9
	( 126 $\pm$ 14 )	( 7 $\pm$ 5 )	( 31 $\pm$ 4 )	( 25 $\pm$ 11 )	( 11 $\pm$ 3 )
313	104	5	24	16	12
	110	12	25	18	7
	99	8	14	17	15
	( 104 $\pm$ 6 )	( 8 $\pm$ 4 )	( 21 $\pm$ 6 )	( 17 $\pm$ 1 )	( 11 $\pm$ 4 )
625	113	16	32	25	6
	107	10	22	14	13
	118	6	31	19	11
	( 113 $\pm$ 6 )	( 11 $\pm$ 5 )	( 28 $\pm$ 6 )	( 19 $\pm$ 6 )	( 10 $\pm$ 4 )
1250	124	6	25	22	13
	101	5	25	17	7
	102	5	26	13	7
	( 109 $\pm$ 13 )	( 5 $\pm$ 1 )	( 25 $\pm$ 1 )	( 17 $\pm$ 5 )	( 9 $\pm$ 3 )
2500	76 *	9 *	14 *	9	6
	93 *	3 *	21 *	18	10
	95 *	3 *	16 *	14	9
	( 88 $\pm$ 10 )	( 5 $\pm$ 3 )	( 17 $\pm$ 4 )	( 14 $\pm$ 5 )	( 8 $\pm$ 2 )
5000	0 *	0 *	8 *	0 *	0 *
	0 *	0 *	9 *	0 *	0 *
	0 *	0 *	7 *	0 *	0 *
	( 0 $\pm$ 0 )	( 0 $\pm$ 0 )	( 8 $\pm$ 1 )	( 0 $\pm$ 0 )	( 0 $\pm$ 0 )
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu\text{g}$ /プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	422	173	448	270	65
コロニー数	444	164	408	266	77
/プレート	501	170	410	283	98
	( 456 $\pm$ 41 )	( 169 $\pm$ 5 )	( 422 $\pm$ 23 )	( 273 $\pm$ 9 )	( 80 $\pm$ 17 )

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

2-AA: 2-アミノアントラセン

表 3-1-1 S9 mix 非存在下における2, 3, 4, 4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンの復帰突然変異試験結果〔本試験2回目-直接法〕

用 量 〔μg/プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
陰性対照	114	15	13	---	---
[ジメチル スルホキシド]	95	15	13	---	---
	114	8	17	---	---
	( 108 ± 11 )	( 13 ± 4 )	( 14 ± 2 )	---	---
31.3	110	13	---	---	---
	108	16	---	---	---
	120	12	---	---	---
	( 113 ± 6 )	( 14 ± 2 )	---	---	---
62.5	122	9	20	---	---
	128	8	16	---	---
	59	12	20	---	---
	( 103 ± 38 )	( 10 ± 2 )	( 19 ± 2 )	---	---
125	37	10	19	---	---
	90	13	13	---	---
	102	8	20	---	---
	( 76 ± 35 )	( 10 ± 3 )	( 17 ± 4 )	---	---
250	101	5	13	---	---
	112	10	20	---	---
	110	14	24	---	---
	( 108 ± 6 )	( 10 ± 5 )	( 19 ± 6 )	---	---
500	119	3*	13	---	---
	124	7*	28	---	---
	117	4*	15	---	---
	( 120 ± 4 )	( 5 ± 2 )	( 19 ± 8 )	---	---
1000	133*	0*	16	---	---
	111*	0*	17	---	---
	87*	0*	13	---	---
	( 110 ± 23 )	( 0 ± 0 )	( 15 ± 2 )	---	---
2000	---	---	9*	---	---
	---	---	7*	---	---
	---	---	8*	---	---
	---	---	( 8 ± 1 )	---	---
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
μg/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異	1036	324	504	---	---
コロニー数	1083	300	555	---	---
/プレート	1124	318	536	---	---
	( 1081 ± 44 )	( 314 ± 12 )	( 532 ± 26 )	---	---

( ): 平均値±標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 3-1-2 S9 mix 非存在下における2, 3, 4, 4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンの  
 復帰突然変異試験結果[本試験2回目-直接法]

用 量 [ $\mu$ g/プレート]	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	---	---	---	37	8
[ジメチル スルホキシド]	---	---	---	32	16
	---	---	---	31	11
	---	---	---	( 33 $\pm$ 3 )	( 12 $\pm$ 4 )
1.56	---	---	---	27	6
	---	---	---	24	9
	---	---	---	22	14
	---	---	---	( 24 $\pm$ 3 )	( 10 $\pm$ 4 )
3.13	---	---	---	35	13
	---	---	---	21	24
	---	---	---	29	13
	---	---	---	( 28 $\pm$ 7 )	( 17 $\pm$ 6 )
6.25	---	---	---	25	19
	---	---	---	28	26
	---	---	---	29	16
	---	---	---	( 27 $\pm$ 2 )	( 20 $\pm$ 5 )
12.5	---	---	---	33	21
	---	---	---	41	24
	---	---	---	33	14
	---	---	---	( 36 $\pm$ 5 )	( 20 $\pm$ 5 )
25	---	---	---	27*	15*
	---	---	---	22*	16*
	---	---	---	22*	22*
	---	---	---	( 24 $\pm$ 3 )	( 18 $\pm$ 4 )
50	---	---	---	24*	12*
	---	---	---	12*	18*
	---	---	---	30*	19*
	---	---	---	( 22 $\pm$ 9 )	( 16 $\pm$ 4 )
陽性対照	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9-AA
$\mu$ g/プレート	0.01	0.5	0.04	0.1	80
復帰変異 コロニー数 /プレート	---	---	---	363	367
	---	---	---	380	406
	---	---	---	404	486
	---	---	---	( 382 $\pm$ 21 )	( 420 $\pm$ 61 )

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SA : アジ化ナトリウム

9-AA: 9-アミノアクリジン

表 3-2

S9 mix 存在下における2, 3, 4, 4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンの  
 復帰突然変異試験結果〔本試験2回目-代謝活性化法〕

用 量 〔 $\mu\text{g}$ /プレート〕	復帰変異コロニー数/プレート				
	塩基対置換型			フレームシフト型	
	TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
陰性対照	121	6	22	27	16
[ジメチル スルホキシド]	117	14	16	25	17
	110	14	24	35	17
	( 116 $\pm$ 6 )	( 11 $\pm$ 5 )	( 21 $\pm$ 4 )	( 29 $\pm$ 5 )	( 17 $\pm$ 1 )
156	120	7	28	30	18
	118	11	20	33	19
	107	11	21	23	22
	( 115 $\pm$ 7 )	( 10 $\pm$ 2 )	( 23 $\pm$ 4 )	( 29 $\pm$ 5 )	( 20 $\pm$ 2 )
313	105	10	20	21	15
	98	10	17	26	21
	118	6	12	26	17
	( 107 $\pm$ 10 )	( 9 $\pm$ 2 )	( 16 $\pm$ 4 )	( 24 $\pm$ 3 )	( 18 $\pm$ 3 )
625	126	14	16	30	20
	107	7	22	21	13
	107	13	16	28	16
	( 113 $\pm$ 11 )	( 11 $\pm$ 4 )	( 18 $\pm$ 3 )	( 26 $\pm$ 5 )	( 16 $\pm$ 4 )
1250	110	9	23	24	13
	115	9	15	29	12
	97	13	17	19	10
	( 107 $\pm$ 9 )	( 10 $\pm$ 2 )	( 18 $\pm$ 4 )	( 24 $\pm$ 5 )	( 12 $\pm$ 2 )
2500	89*	7*	11*	26*	9*
	72*	6*	9*	14*	9*
	66*	4*	13*	22*	9*
	( 76 $\pm$ 12 )	( 6 $\pm$ 2 )	( 11 $\pm$ 2 )	( 21 $\pm$ 6 )	( 9 $\pm$ 0 )
5000	2*	0*	8*	0*	1*
	22*	0*	10*	0*	0*
	15*	2*	7*	1*	0*
	( 13 $\pm$ 10 )	( 1 $\pm$ 1 )	( 8 $\pm$ 2 )	( 0 $\pm$ 1 )	( 0 $\pm$ 1 )
陽性対照	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
$\mu\text{g}$ /プレート	1	2	10	1	2
復帰変異	358	170	402	258	90
コロニー数	415	159	406	253	85
/プレート	404	172	503	260	91
	( 392 $\pm$ 30 )	( 167 $\pm$ 7 )	( 437 $\pm$ 57 )	( 257 $\pm$ 4 )	( 89 $\pm$ 3 )

( ): 平均値 $\pm$ 標準偏差

\* : 菌の生育阻害が認められた。

2-AA: 2-アミノアントラセン

## 要 約

2、3、4、4'-テトラヒドロキシベンゾフェノ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 2500  $\mu\text{g/mL}$  として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法の代謝活性化では 625  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量で、短時間処理法の非代謝活性化では 313  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量で、連続処理法の 24 時間処理では 313  $\mu\text{g/mL}$  以上の用量で、連続処理法の 48 時間処理では 39.1  $\mu\text{g/mL}$  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 464.273  $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 184.036  $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 205.955  $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 33.500  $\mu\text{g/mL}$  と算出された。これより、短時間処理法の代謝活性化では 625  $\mu\text{g/mL}$  を、短時間処理法の非代謝活性化では 313  $\mu\text{g/mL}$  を、連続処理法の 24 時間処理では 313  $\mu\text{g/mL}$  を、連続処理法の 48 時間処理では 39.1  $\mu\text{g/mL}$  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数的異常 (倍数体) の増加は認められなかったが、染色体構造異常の出現率が増加し、代謝活性化では疑陽性を、非代謝活性化では陽性を示した。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数的異常 (倍数体) の増加は認められなかったが、染色体構造異常の出現率が増加し、疑陽性を示した。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染色体数的異常 (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。

染色体異常試験において、染色体構造異常の出現率 (TA) が短時間処理法の代謝活性化では疑陽性、非代謝活性化では陽性の結果が得られたが、いずれも用量依存的な増加が認められなかったため確認試験を実施した。その結果、確認試験の代謝活性化においては、320 及び 400  $\mu\text{g/mL}$  で TA 値が疑陽性を示したが、用量依存性は認められなかった。染色体異常試験の代謝活性化においても 78.1~313  $\mu\text{g/mL}$  で TA 値は疑陽性を示し、明確な用量依存性は得られていなかったことから、再現性があることが確認された。一方、確認試験の非代謝活性化においては、TA 値は 9.88  $\mu\text{g/mL}$  では陰性、14.8  $\mu\text{g/mL}$  で疑陽性、22.2  $\mu\text{g/mL}$  で陽性、33.3  $\mu\text{g/mL}$  で陽性、50  $\mu\text{g/mL}$  で疑陽性を示した。22.2~50  $\mu\text{g/mL}$  では用量依存性は認められなかったも

のの、9.88~22.2 µg/mL ではTA 値の用量依存的な増加が認められた。これらの結果から総合的に判断すると、本被験物質の染色体構造異常誘発性は陽性であり、染色体構造異常の誘発能を有するものと判定された。一方、染色体数的異常（倍数体）の出現頻度の増加はいずれの処理法においても認められなかった。確認試験における陽性対照群では、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染色体数的異常（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、2、3、4、4'-テトラヒドロキシベンゾフェノン、本試験条件下において染色体数的異常（倍数体）の誘発能は有さないものの、弱い染色体の構造異常の誘発能を有するものと判定した。



## 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

代謝活性化では 625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 464.273  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。また非代謝活性化では 313  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 184.036  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

##### (2) 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を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化では 156  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で細胞の不連続性が認められ、1250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度では被験物質と思われる析出物のため細胞状態の観察が不可能であった。一方、非代謝活性化では 39.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。肉眼による培養液の色調の観察では、代謝活性化では 156  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で、非代謝活性化では 78.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で変化が認められた。肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに 2500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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

細胞増殖抑制は、24 時間処理では 313  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 205.955  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。48 時間処理では 39.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 33.500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

##### (2) 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を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、24 時間処理では 39.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。一方、48 時間処理では 19.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で細胞の不連続性が認められた。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78.1 µg/mL以上の濃度で変化が認められた。肉眼による被験物質の析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに2500 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、3-2に、連続処理法の結果をFig. 2-3、2-4、Table 2-3、2-4、3-3、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、被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、短時間処理法の代謝活性化においては156 µg/mLでは微少に、313 µg/mLでは半数に、625 µg/mLでは多数に細胞の不連続性が認められた。短時間処理法の非代謝活性化においては39.1 µg/mL及び78.1 µg/mLでは微少に、156 µg/mLでは半数に、313 µg/mLでは多数に細胞の不連続性が認められた。連続処理法の24時間処理においては、39.1 µg/mL及び78.1 µg/mLでは微少に、156 µg/mLでは半数に、313 µg/mLでは多数に細胞の不連続性が認められた。連続処理法の48時間処理においては、19.5 µg/mLでは微少に、39.1 µg/mLでは半数に細胞の不連続性が認められた。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では156 µg/mL以上の濃度で、非代謝活性化では78.1 µg/mL以上の濃度で、連続処理法の24時間処理では78.1 µg/mL以上の濃度で淡黄色から淡褐色の色調変化が認められた。肉眼による被験物質の析出の観察では、短時間処理法及び連続処理法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、短時間処理法の代謝活性化では625 µg/mLではTOX、313 µg/mLで7.5%、156 µg/mLで9.0%、78.1 µg/mLで9.5%及び39.1 µg/mLで3.0%と疑陽性の判定基準である5%以上10%未満から、陰性の判定基準である5%未満を示した。また、非代謝活性化においても、313 µg/mLでTOX、156 µg/mLで2.5%、78.1 µg/mLで4.0%、39.1 µg/mLで9.0%及び19.5 µg/mLで11.5%と、陽性の判定基準である10%以上から、陰性の判定基準である5%未満を示した。さらに、連続処理法の24時間処理では313 µg/mL、156 µg/mL及び78.1 µg/mLでTOX、39.1 µg/mLで5.5%及び19.5 µg/mLで5.0%と疑陽性の判定基準である5%以上10%未満を示した。また、48時間処理では、39.1 µg/mLで7.0%、19.5 µg/mLで2.5%、9.77 µg/mLで2.0%、4.88 µg/mLで1.0%及び2.44 µg/mL

で1.5%と疑陽性の判定基準である5%以上10%未満から、陰性の判定基準である5%未満を示した。なお、連続処理法の24時間処理の156 µg/mL及び78.1 µg/mLでは、観察細胞数が規定数に満たなかったためTOXと判定したが、TAはそれぞれ27.3及び14.0%を示し、それ以下の濃度を含めて用量依存的な出現率の増加が認められた。

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 5)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

染色体数的異常(倍数体)の出現率は、短時間処理法の代謝活性化では625 µg/mLでTOX、313 µg/mLで1.5%、156 µg/mLで3.5%、78.1 µg/mLで4.0%及び39.1 µg/mLで1.5%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、313 µg/mLでTOX、156 µg/mLで1.0%、78.1 µg/mLで0.5%、39.1 µg/mLで3.5%及び19.5 µg/mLで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313 µg/mL、156 µg/mL及び78.1 µg/mLでTOX、39.1 µg/mLで0%及び19.5 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、39.1 µg/mLで0.5%、19.5 µg/mLで0.5%、9.77 µg/mLで1.0%、4.88 µg/mLで0.5%及び2.44 µg/mLで0%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染色体数的異常(倍数体)の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 5)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. 確認試験

結果をFig. 2-5、2-6、Table 2-5、2-6、3-5、3-6に示した。

### 1) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質処理群の細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し、陰性対照群と比較すると、代謝活性化においては205 µg/mL及び256 µg/mLでは微少に、320 µg/mL、400 µg/mL及び500 µg/mLでは半数に細胞の不連続性が認められた。非代謝活性化においては14.8 µg/mL及び22.2 µg/mLでは微少に、33.3 µg/mL及び50 µg/mLでは半数に細胞の不連続性が認められた。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は全用量で、非代謝活性化においては33.3 µg/mL以上の用量で色調変化が認められた。肉眼による被験物質の析出の観察では、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500 µg/mLではTOX、400 µg/mLで5.0%、320 µg/mLで5.5%、256 µg/mLで2.5%及び205 µg/mLで3.5%と疑陽性の判定基準である5%以上10%未満から、陰性の判定基準である5%未満を示した。また、非代謝活性化においては、50 µg/mLで6.0%、33.3 µg/mLで10.5%、22.2 µg/mLで12.5%、14.8 µg/mLで7.5%、9.88 µg/mLで1.0%及び6.58 µg/mLで1.5%と、陽性の判定基準である10%以上から、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 5)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、代謝活性化では500 µg/mLでTOX、400 µg/mLで1.0%、320 µg/mLで2.0%、256 µg/mLで2.0%及び205 µg/mLで0.5%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、50 µg/mLで1.0%、33.3 µg/mLで0.5%、22.2 µg/mLで0.5%、14.8 µg/mLで0%、9.88 µg/mLで0%及び6.58 µg/mLで0%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染色体数的異常(倍数体)の出現率は各々陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値(Attached Data 5)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

被験物質は、染色体異常試験の短時間処理法・非代謝活性化において、19.5 µg/mLで構造異常を有する細胞の出現率 (TA) が陽性を示したが、連続処理法の24時間処理及び48時間処理の同一用量においては、TAはそれぞれ疑陽性及び陰性を示し、被験物質に対する暴露時間の経過とともに構造異常の出現率が増加する傾向は認められなかった。また、短時間処理法及び連続処理法ともに、19.5 µg/mL以外の用量において明確な用量依存性は認められないもののTAの増加が認められ、疑陽性を示した。これらの結果から総合的に判断すると、本被験物質の染色体構造異常誘発性は疑陽性であり、弱い構造異常の誘発能を有するものと判定された。一方、染色体数的異常 (倍数体) の出現頻度の増加はいずれの処理法においても認められなかった。

なお、陰性対照群における染色体の構造異常を有する細胞及び染色体数的異常 (倍数体) 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。

染色体異常試験において、短時間処理法の代謝活性化では疑陽性の、非代謝活性化では陽性の結果が得られたが、いずれの場合も構造異常を有する細胞の出現率 (TA) に用量依存的な増加が認められなかったため確認試験を実施した。

その結果、確認試験の代謝活性化においては、2用量で疑陽性を示したがTA値の用量依存的な増加は認められず、染色体異常試験の代謝活性化と同様な結果が得られ再現性が確認された。一方、確認試験の非代謝活性化においては、染色体異常試験で陽性を示した近傍の用量で試験を実施したが、低用量ではTA値の用量依存的な増加が認められたが、高用量では用量依存的な増加は認められず、D20値は求められなかった。以上の結果から判断すると、本被験物質の染色体構造異常誘発性は陽性であり、染色体構造異常の誘発能を有するものと判定された。一方、染色体数的異常 (倍数体) の出現頻度の増加はいずれの処理法においても認められなかった。確認試験における陽性対照群では、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染色体の構造異常を有する細胞及び染色体数的異常 (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、2、3、4、4'-テトラヒドロキシベンゾフェノン は、本試験条件下において

染色体数的異常（倍数体）の誘発能は有さないものの、弱い染色体構造異常の誘発能を有するものと判定した。

Table 1-1 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone  
[short-term treatment: +S9 mix]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>
+	6-18	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	—	—	—
			100		—	—	—
		19.5	83	83	—	—	—
			83		—	—	—
		39.1	83	83	—	—	—
			83		—	—	—
		78.1	100	92	—	—	—
			83		—	—	—
		156	66	75	+	Light-yellow	—
			83		+	Light-yellow	—
		313	66	66	+	Orange	—
			66		+	Orange	—
		625	33	33	++	Light-brown	—
			33		++	Light-brown	—
		1250	33	33	g)	Brown	—
			33		g)	Brown	—
2500	133	125 <sup>h)</sup>	g)	Brown	+		
	116		g)	Brown	+		
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					464.273	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 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
- g) Condition of cells could not be observed due to severe precipitate of the test article.
- h) These values are unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

Table 1-2 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment:-S9 mix]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>
-	6-18	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-
			83		-	-	-
		19.5	66	72	-	-	-
			66		-	-	-
		39.1	66	72	+	-	-
			66		+	-	-
		78.1	66	72	++	Light-yellow	-
			66		++	Light-yellow	-
		156	50	55	++	Orange	-
			50		++	Orange	-
		313	33	27	+++	Orange	-
			16		+++	Orange	-
		625	16	17	+++	Light-brown	-
			16		+++	Light-brown	-
		1250	16	17	+++	Brown	-
			16		+++	Brown	-
		2500	50	55 <sup>g)</sup>	+++	Brown	+
			50		+++	Brown	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition: 184.036 $\mu\text{g/mL}$							

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 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  
 + : Presence of precipitates  
 g) These values are unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.



Table 1-3 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 24hr]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>
—	24	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	—	—	—
			100		—	—	—
		19.5	71	71	—	—	—
			71		—	—	—
		39.1	71	64	+	—	—
			57		+	—	—
		78.1	57	57	++	Light-yellow	—
			57		++	Light-yellow	—
		156	57	57	++	Orange	—
			57		++	Orange	—
		313	42	35	+++	Orange	—
			28		+++	Orange	—
		625	42	42	+++	Light-brown	—
			42		+++	Light-brown	—
		1250	42	50	+++	Brown	—
			57		+++	Brown	—
		2500	150	150 <sup>g)</sup>	+++	Brown	+
			150		+++	Brown	+

Concentration of 50% cell-growth inhibition: 205.955  $\mu\text{g/mL}$

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 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  
 + : Presence of precipitates  
 g) These values are unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

Table 1-4 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 48hr]

Cell-growth inhibition test							
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>		
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>
-	48	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-
			92		-	-	-
		19.5	53	55	+	-	-
			53		+	-	-
		39.1	46	48	+	-	-
			46		+	-	-
		78.1	38	40	+	Light-yellow	-
			38		+	Light-yellow	-
		156	30	31	++	Orange	-
			30		++	Orange	-
		313	23	24	+++	Orange	-
			23		+++	Orange	-
		625	23	24	+++	Light-brown	-
			23		+++	Light-brown	-
		1250	30	31	+++	Brown	-
			30		+++	Brown	-
		2500	99	95 <sup>g)</sup>	+++	Brown	+
			84		+++	Brown	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition:					33.500	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 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  
 + : Presence of precipitates  
 g) These values are unreliable since adherence of precipitation at the bottom of the plastic plate inhibited accurate measurement of the cell density.

Table 2-1 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment:+S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>	
+	6-18	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	—	—	—	
			99		—	—	—	
		Test article	39.1	83	83	—	—	—
				83		—	—	—
			78.1	83	83	—	—	—
				83		—	—	—
			156	83	83	+	Light-yellow	—
				83		+	Light-yellow	—
		313	66	66	++	Orange	—	
			66		++	Orange	—	
		625	33	33	+++	Light-brown	—	
			33		+++	Light-brown	—	
		PC	83	83	—	—	—	
			83		—	—	—	

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 appproximately 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 2-2 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment:-S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>	
-	6-18	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-	
			100		-	-	-	
		Test article	19.5	80	80	-	-	-
				80		-	-	-
			39.1	80	70	+	-	-
				60		+	-	-
			78.1	60	60	+	Light-yellow	-
				60		+	Light-yellow	-
		156	60	60	++	Orange	-	
			60		++	Orange	-	
		313	20	30	+++	Orange	-	
			40		+++	Orange	-	
		PC	80	80	-	-	-	
			80		-	-	-	

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 2-3 Cell-growth ratio in CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 24hr]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>	
-	24	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-	
			100		-	-	-	
		Test article	19.5	79	79	-	-	-
				79		-	-	-
			39.1	59	59	+	-	-
				59		+	-	-
			78.1	59	59	+	Light-brown	-
				59		+	Light-brown	-
		156	59	59	++	Light-brown	-	
			59		++	Light-brown	-	
		313	39	39	+++	Light-brown	-	
			39		+++	Light-brown	-	
		PC	100	100	-	-	-	
			100		-	-	-	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05 $\mu\text{g/mL}$ )

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 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 CHL/IU cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [continuous treatment: 48hr]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>	
-	48	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	-	-	-	
			100		-	-	-	
		Test article	2.44	100	100	-	-	-
				100		-	-	-
			4.88	89	89	-	-	-
				89		-	-	-
			9.77	89	89	-	-	-
				89		-	-	-
		19.5	70	65	+	-	-	
			59		+	-	-	
		39.1	50	55	++	-	-	
			59		++	-	-	
		PC	89	89	-	-	-	
			89		-	-	-	

NC : Negative Control(dimethylsulfoxide)

PC : Positive Control(mitomycin C, 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

- 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 2-5 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment:+S9 mix]

Confirmation test								
Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>	
+	6-18	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	—	—	—	
			125		—	—	—	
		Test article	205	74	66	+	Light-brown	—
				74		+	Light-brown	—
			256	74	66	+	Light-brown	—
				74		+	Light-brown	—
			320	99	77	++	Light-brown	—
				74		++	Light-brown	—
			400	74	66	++	Brown	—
				74		++	Brown	—
		500	74	66	++	Brown	—	
			74		++	Brown	—	
		PC	99	88	—	—	—	
			99		—	—	—	

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

Table 2-6 Cell-growth ratio in the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with 2,3,4,4'-tetrahydroxybenzophenone [short-term treatment:-S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration (µg/mL)	Cell-growth ratio		Observation <sup>c)</sup>			
S9 mix	time (hr)		Plate 1 and 2	Mean <sup>b)</sup> (%)	Condition of cells <sup>d)</sup>	Color of medium <sup>e)</sup>	Precipitates /Crystals <sup>f)</sup>	
—	6-18	0(NC)	100 <sup>a)</sup>	100	—	—	—	
			100		—	—	—	
		Test article	6.58	83	83	—	—	—
				83		—	—	—
			9.88	83	83	—	—	—
				83		—	—	—
			14.8	83	75	+	—	—
				66		+	—	—
			22.2	66	66	+	—	—
				66		+	—	—
		33.3	50	58	++	Light-brown	—	
			66		++	Light-brown	—	
		50	66	58	++	Light-brown	—	
			50		++	Light-brown	—	
		PC	83	83	—	—	—	
			83		—	—	—	

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