

最 終 報 告 書

2, 4-ジメチルアニリンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験
(試験番号 : 01-170)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

陳 述 書

試験表題： 2, 4-ジメチルアニリンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号： 01-170

本試験は,OECD の試験法ガイドライン“OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 473, *In vitro* Mammalian Chromosomal Aberration Test(1997)” および OECD の GLP “OECD PRINCIPLES OF GOOD LABORATORY PRACTICE(1997)” に定める基準に準拠して実施した。

試験責任者



試験表題：2, 4-ジメチルアニリンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：01-170

試験委託者：

名 称 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター

所 在 地 東京都渋谷区西原 2-49-10

委託責任者

試験実施施設：

名 称 財団法人 畜産生物科学安全研究所

所 在 地 神奈川県相模原市橋本台 3-7-11

運営管理者

試験責任者

信頼性保証

責 任 者

試験期間：

試験開始日 平成 13 年 12 月 4 日

実験開始日 平成 13 年 12 月 9 日

実験終了日 平成 14 年 2 月 15 日

試験終了日 平成 14 年 3 月 20 日

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因：

本試験に関し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因はなかった。

資料の保管：

本試験における下記の資料は、最終報告書作成後 10 年間、財団法人 畜産生物科学安全研究所において保管する。その後の保管については、試験委託者と協議して決める。

1. 試験計画書
2. 被験物質に関する記録
3. 試験結果に関する記録
4. 信頼性保証に関する記録
5. 最終報告書

試験責任者，担当者および業務分担

[Redacted]

試験担当者およびその業務分担

実験操作

鏡検

データ整理

[Redacted]

目 次

要約	1 頁
試験目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 対照物質	3
3. 溶媒	3
4. 試験細胞株	3
5. 培養液	3
6. 培養条件	4
7. S9 mix	4
8. 細胞増殖抑制試験	4
1) 被験物質の供試液の調製	5
2) 細胞の処理	5
3) 細胞増殖率の測定	5
9. 染色体異常試験	6
1) 被験物質および陽性対照物質の用量	6
2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製	7
3) 細胞の処理	7
4) 試験群の構成および使用シャーレ数	8
5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定	8
6) 染色体の観察	9
7) 染色体異常の分類および集計	9
8) 試験結果の判定	10
結果	10
1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）	10
2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）	11
3. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）	11
4. 染色体異常試験（連続処理法：48 時間処理）	11
5. D ₂₀ 値	12

結論	13
参考文献	13

表：

表 1－1	2, 4－ジメチルアニリンの染色体異常試験結果 (短時間処理法：S9 mix 非存在下)	15
表 1－2	2, 4－ジメチルアニリンの染色体異常試験結果 (短時間処理法：S9 mix 存在下)	16
表 2－1	2, 4－ジメチルアニリンの染色体異常試験結果 (連続処理法：24 時間処理)	17
表 2－2	2, 4－ジメチルアニリンの染色体異常試験結果 (連続処理法：48 時間処理)	18

図：

図 1	構造異常を有する細胞の出現頻度	19
図 2	数的異常を有する細胞の出現頻度	21

写真

写真 1	23
写真 2	23

添付資料	染色体異常細胞の出現頻度：背景データ	24
------	--------------------------	----

要 約

2, 4-ジメチルアニリンの染色体異常誘発性の有無を検討するため、チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) を用いて *In vitro* における染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験に用いる用量を決定するため、短時間処理法および連続処理法ともに 37.5~1200 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で細胞増殖抑制試験を行った。その結果、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では 1200 $\mu\text{g/mL}$, S9 mix 存在下では 600 $\mu\text{g/mL}$ 以上で、また、連続処理法の場合は、24 時間処理では 1200 $\mu\text{g/mL}$, 48 時間処理では 300 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められた。

したがって、染色異常試験における用量は、短時間処理法の場合は、S9 mix 非存在下では 150, 300, 600, 800, 1000 および 1200 $\mu\text{g/mL}$, S9 mix 存在下では 75, 150, 300, 400, 500 および 600 $\mu\text{g/mL}$, 連続処理法の場合は、24 時間処理では 75, 150, 300, 600, 900 および 1200 $\mu\text{g/mL}$, 48 時間処理では 37.5, 75, 150, 300, 450 および 600 $\mu\text{g/mL}$ とした。

試験の結果、短時間処理法では S9 mix 非存在および存在下ともに、用量依存的な染色体構造異常細胞の増加が認められ、それぞれ 300~1000 $\mu\text{g/mL}$ および 75~400 $\mu\text{g/mL}$ での増加は統計学的に有意なものであった。

一方、連続処理法においては、24 時間処理の 150 および 300 $\mu\text{g/mL}$ で染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。また、48 時間処理では、用量依存的な染色体構造異常細胞の増加が認められ、75~300 $\mu\text{g/mL}$ での増加は統計学的に有意なものであった。

なお、短時間処理法 S9 mix 非存在下の 1200 $\mu\text{g/mL}$ および S9 mix 存在下の 500 $\mu\text{g/mL}$ 以上並びに連続処理法 24 時間処理の 600 $\mu\text{g/mL}$ 以上および 48 時間処理の 450 $\mu\text{g/mL}$ 以上では、細胞に対する毒性のため観察可能な分裂中期像は認められなかった。

以上の成績から、本実験条件下では、2, 4-ジメチルアニリンの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。計算された D_{20} 値は、短時間処理法 S9 mix 非存在下では 0.61 mg/mL, S9 mix 存在下では 0.078 mg/mL, 連続処理法 24 時間処理では 0.49 mg/mL, 48 時間処理では 0.067 mg/mL であった。

試験目的

この試験は、2, 4-ジメチルアニリンのほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を明らかにするために実施した。

材料および方法^{1, 2)}

1. 被験物質

名 称 : 2, 4-ジメチルアニリン

別 名 : 2, 4-キシリジン

CAS番号 : 95-68-1

ロット番号 :

純 度 : 99.1% (平成 13 年 10 月 2 日,)において分析)

入手先(製造元): 製造の試薬

入 手 日 : 平成 13 年 9 月 27 日

入 手 量 : 50 mL

物 性 等 :

化学名 2, 4-ジメチルアニリン (2, 4-Dimethylaniline)

分子式 $C_8H_{11}N$

分子量 121.18

性状(常温) 微黄色透明液体

融点 $14^{\circ}C$

比重 0.98

沸点 $214^{\circ}C$

蒸気圧 133Pa/ $52.6^{\circ}C$

溶解性 油溶性 (水に難溶。アルコール, エーテル, ベンゼンに可溶)

安 定 性 : 安定 [実験終了後, 残余被験物質を)において分析 (GC 法, 平成 14 年 2 月 5 日) した結果, 純度は 1 回目測定: 98.9%, 2 回目測定: 98.8% で, 実験期間中被験物質は安定であっ

たことを確認した。]

保管条件 : 冷暗所 (4℃), 密栓

2. 対照物質

陰性対照物質は、被験物質の溶媒として使用したジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業株式会社, ロット番号 DWP7008, 100%) を用いた。陽性対照物質は、連続処理法および短時間処理法 S9 mix 非存在下では 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG, Aldrich Chemical Company, ロット番号 00613PN, 純度 97%) を、短時間処理法 S9 mix 存在下では 3,4-Benzo[a]pyrene (B[a]P, Sigma Chemical Company, ロット番号 57F-3434, 純度 98%) を用いた。

3. 溶媒

被験物質は水に難溶であり、予備的検討の結果、DMSO に可溶であったことから、溶媒には DMSO を用いた。

陽性対照物質の MNNG および B[a]P の溶媒については、ジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬工業株式会社, ロット番号 ACH7185, 純度 99.9%) を用いた。

4. 試験細胞株

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 (元: 国立衛生試験所 変異原性部) から昭和 60 年 1 月 13 日に分与を受けたチャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞株 (CHL/IU) を使用した。供試細胞は、細胞懸濁液に 10vol% の割合で DMSO を添加し、液体窒素条件下で保存しておいたものを培養液に戻し、解凍後の継代数が 4 回までのものを使用した。

5. 培養液

Eagle-MEM 粉末培地 (Gibco Laboratories, ロット番号 1084659) を常法に従い調製し、これに非動化 (56℃, 30 分間加熱処理) 仔牛血清 (Gibco Laboratories, ロット番号 1101210) を 10% の割合で添加したものを用いた。

6. 培養条件

供試細胞は、CO₂インキュベーター(Napco 社)を用い、CO₂濃度 5%, 空気 95%, 温度 37°C, 加湿条件下で培養した。

7. S9 mix

S9 mix は、ラット肝臓のホモジネートの薬物代謝酵素分画 (S9) にコファクターを加えて凍結されたものをキッコーマン株式会社から購入 (細胞増殖抑制試験: ロット番号 CAM-447・2001 年 6 月 29 日製造・2001 年 7 月 19 日購入, 染色体異常試験: ロット番号 CAM-455・2001 年 11 月 22 日製造・2001 年 12 月 7 日購入, ロット番号 CAM-447) し、-80°C以下で保存したものを、使用時に冷水中で解凍して用いた。使用した S9 の製造法および S9 mix の 1 mL あたりの組成は、次のとおりである。

〔S9 製造法〕

A. 使用動物

- a) 種・系統: Sprague-Dawley 系ラット (日本エスエルシー株式会社)
- b) 性・週齢: 雄・7 週齢
- c) 体重: 211~241g (CAM-447), 204~232g (CAM-455)

B. 誘導法

- a) 誘導物質: phenobarbital (PB), 5, 6-benzoflavone (BF)
- b) 投与経路: 腹腔内投与
- c) 投与法 (投与開始日起算)
 - 1 日目-PB 30 mg/kg, 2, 3, 4 日目-PB 60 mg/kg
 - 3 日目-BF 80 mg/kg

C. 調製法

最終投与の翌日に肝臓ホモジネートを遠心分離(9000×g)し、その上清を採取

S9 mix 1 mL 当たりの組成

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol/0.1 mL
KCl	33 μmol/0.1 mL
G-6-P	5 μmol/0.1 mL
NADP	4 μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液	4 μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1 mL

8. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験における被験物質の適切な用量を検討するため、短時間処理法お

および連続処理法ともに 37.5, 75, 150, 300, 600 および 1200 $\mu\text{g/mL}$ の用量を用いて、次に記載する細胞増殖抑制試験を行った。試験には各用量について 2 枚のシャーレを使用した。

1) 被験物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を生理食塩液に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈して所定用量の供試液を調製した。被験物質の添加量は、各シャーレの培養液量の 0.5 vol% とした。

2) 細胞の処理

短時間処理法の場合、直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に 4×10^5 個/mL の細胞を含む培養液 5 mL を加え、培養開始 3 日後に S9 mix 非存在下の場合は各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO（陰性対照）または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。また、S9 mix 存在下の場合は各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除き、S9 mix 0.5 mL を加えた後、DMSO または被験物質の供試液各 0.015 mL をシャーレに加えた。培養 6 時間後に培養液を取り除き、新鮮培養液で細胞表面を 1 回洗浄し、新しい培養液 5 mL を加えて 18 時間培養した。一方、連続処理法の場合は、短時間処理法の場合と同様の方法で細胞を培養し、培養開始 3 日後に DMSO または被験物質の供試液各 0.025 mL を加えて 24 時間および 48 時間培養した。培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10 vol% ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後、水洗し、0.1 w/v% クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色した。水洗後、室温で一晩自然乾燥した。

3) 細胞増殖率の測定

上述の 8-2) で固定・染色した細胞は、染色の濃淡から細胞密度を単層培養細胞密度計（モノセレーター II, MI-60, オリンパス光学工業株式会社）を用いて測定し、陰性対照群の細胞増殖率を 100% とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

その結果は下表に示したとおり、短時間処理法の場合は、S9 mix 非存在下では 1200 $\mu\text{g/mL}$ 、S9 mix 存在下では 600 $\mu\text{g/mL}$ 以上で 50% を上回る細胞増殖抑制が認められ、50% 細胞増殖抑制用量は S9 mix 非存在下では 600~1200 $\mu\text{g/mL}$ の用

量域, S9 mix 存在下では 300~600 μ g/mL の用量域にあるものと判断された。連続処理法の場合は, 24 時間処理では 1200 μ g/mL, 48 時間処理では 300 μ g/mL 以上で 50%を上回る細胞増殖抑制が認められ, 50%細胞増殖抑制用量は 24 時間処理では 600 μ g/mL の近くに, 48 時間処理では 300 μ g/mL の近くにあるものと判断された。

〔短時間処理法〕

用 量 (μ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	S9 mix 非存在下			S9 mix 存在下		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
37.5	102	102	[102.0]	86	86	[86.0]
75	115	99	[107.0]	79	82	[80.5]
150	90	106	[98.0]	81	82	[81.5]
300	104	96	[100.0]	86	76	[81.0]
600	110	101	[105.5]	40	38	[39.0]
1200	48	31	[37.0]	16	17	[16.5]

[] : 平均値

〔連続処理法〕

用 量 (μ g/mL)	細胞増殖率 (%)					
	24 時間処理			48 時間処理		
0 (溶媒)	100	100	[100.0]	100	100	[100.0]
37.5	91	100	[95.0]	88	95	[91.5]
75	84	94	[89.0]	70	78	[74.0]
150	88	88	[88.0]	57	69	[63.0]
300	72	76	[74.0]	45	50	[47.5]
600	51	54	[52.5]	19	25	[22.0]
1200	15	13	[14.0]	3	12	[7.5]

[] : 平均値

9. 染色体異常試験

1) 被験物質および陽性対照物質の用量

細胞増殖抑制試験の結果から, 被験物質の用量は, 50%細胞増殖抑制用量の前後が含まれ, かつ, 3 用量以上のデータが得られることを考慮して設定した。すなわち, 短時間処理法の場合は S9 mix 非存在下では 1200 μ g/mL を最高用量とし, 以下公比 2 で 600, 300 および 150 μ g/mL の 4 用量, 並びに 600 μ g/mL と 1200 μ g/mL 間で細胞増殖率に急激な変化が認められたことを考慮して, 800 および 1000 μ g/mL を加えた計 6 用量とした。また, S9 mix 存在下では 600 μ g/mL を最高用量とし, 以下公比 2 で 300, 150 および 75 μ g/mL の計 4 用量, 並びに

50%細胞増殖抑制用量に近い用量と考えられる 400 および 500 $\mu\text{g/mL}$ を加えた計 6 用量とした。連続処理法の場合は 24 時間処理では 1200 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公比 2 で 600, 300, 150 および 75 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量、並びに細胞増殖抑制試験の結果から、1200 $\mu\text{g/mL}$ では細胞増殖率が低く、染色体標本の作製は難しいと判断されたため、600 $\mu\text{g/mL}$ と 1200 $\mu\text{g/mL}$ の中間量である 900 $\mu\text{g/mL}$ を加えた計 6 用量とした。48 時間処理では 600 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公比 2 で 300, 150, 75 および 37.5 $\mu\text{g/mL}$ の 5 用量、並びに 24 時間処理と同様、600 $\mu\text{g/mL}$ では染色体標本の作製は難しいと判断されたため、300 $\mu\text{g/mL}$ と 600 $\mu\text{g/mL}$ の中間量である 450 $\mu\text{g/mL}$ を加えた計 6 用量とした。陽性対照物質の MNNG は 2.5 $\mu\text{g/mL}$, B[a]P は 10 $\mu\text{g/mL}$ の用量を用いた。

2) 被験物質および陽性対照物質の供試液の調製

被験物質の供試液は、使用時に被験物質を DMSO に溶解して最高用量の供試液（原液）を調製した。次いで、原液の一部を DMSO で順次希釈し、所定用量の供試液を調製した。陽性対照物質の MNNG は 0.5 mg/mL , B[a]P は 2.0 mg/mL の供試液を調製した。

3) 細胞の処理

4 $\times 10^3$ 個/ mL の細胞を含む培養液 5 mL を直径 6 cm の円形プラスチック製シャーレ（Becton Dickinson 社）に加え、3 日間培養後、下記の方法で処理した。培養には 1 用量当たり 4 枚のシャーレを用い、そのうち 2 枚は染色体標本作製用に、残りの 2 枚は細胞増殖率測定用に使用した。但し、陽性対照群については細胞増殖率の測定は行わず、用いるシャーレは染色体標本作製用の 2 枚とした。

短時間処理法の S9 mix 非存在下の場合は、各シャーレとも 3 mL を残して培養液を取り除き、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液をそれぞれ 0.015 mL ずつ各シャーレに添加して培養した。また、S9 mix 存在下の場合は、各シャーレとも 2.5 mL を残して培養液を取り除いた後、S9 mix 0.5 mL を加え、続いて、DMSO、被験物質供試液および B[a]P の供試液をそれぞれ 0.015 mL ずつ各シャーレに添加して培養した。S9 mix 非存在および存在下のいずれの場合も、培養 6 時間後に培養液を取り除き、新鮮培養液で細胞表面を 1 回洗浄し、新しい培養液 5 mL を加え、さらに 18 時間培養した。

連続処理法の場合は、DMSO、被験物質供試液および MNNG の供試液をそれ

それ 0.025 mL ずつ各シャーレに加え、24 時間および 48 時間培養した。

4) 試験群の構成および使用シャーレ数

〔短時間処理法〕

用量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	使用シャーレ数	
	S9 mix 非存在下	S9 mix 存在下
0 (陰性対照) ^a	4	4
75	..	4
150	4	4
300	4	4
400	..	4
500	..	4
600	4	4
800	4	..
1000	4	..
1200	4	..
2.5 (陽性対照) ^b	2	..
10. (陽性対照) ^c	..	2

a : DMSO, b : MNNG, c : B[a]P, 使用シャーレ数 : 60

〔連続処理法〕

用量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	使用シャーレ数	
	24 時間処理	48 時間処理
0.0 (陰性対照) ^a	4	4
37.5	..	4
75.0	4	4
150.0	4	4
300.0	4	4
450.0	..	4
600.0	4	4
900.0	4	..
1200.0	4	..
2.5 (陽性対照) ^b	2	2

a : DMSO, b : MNNG, 使用シャーレ数 : 60

5) 染色体標本の作製および細胞増殖率の測定

標本作製の 2 時間前に、培養中の各シャーレにコルセミド (Gibco Laboratories, ロット番号 1081687) を最終濃度として $0.2\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。培養終了後、培養液を取り除き、0.2w/v% トリブシン水溶液 2 mL で処理して細胞をシャーレから剥離し、新鮮培養液 5 mL を入れた遠沈管に移し、1000 rpm, 5 分間遠心分離した。上清を捨て、細胞沈渣に低張液の 75mM 塩化カリウム水溶液 4 mL を加えて懸濁し、37°C で 15 分間低張処理した。低張処理後、用時調製

した冷却メタノール・酢酸 (3:1) 混合液 (v/v) 1 mL を添加して固定した。1000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を捨て、細胞沈渣を新しい固定液 4 mL で懸濁・固定した。この操作を 3 回繰り返した後、少量の固定液で適切な密度に細胞を懸濁し、スライドガラスの 2 ヶ所に 1 滴ずつ滴下し、室温で一晩自然乾燥した。乾燥後、Sørensen 緩衝液 (pH 6.8, 株式会社ヤトロン, ロット番号 1478) を用いて希釈した 1.4 vol% ギムザ液で約 15 分間染色した。水洗後、室温で乾燥して染色体標本とした。標本は、1 シャーレ当たり 3 枚作製した。

細胞増殖率の測定は、培養終了後、培養液を取り除き、生理食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、10vol%ホルマリン水溶液を加えて約 10 分間固定した。固定後水洗し、0.1 w/v% クリスタルバイオレット水溶液で約 10 分間染色し、水洗後乾燥した。単層培養細胞密度計 (モノセレーターII, MI-60, オリンパス光学工業株式会社) を用いて陰性 (溶媒) 対照群の細胞増殖率を 100% とした時の各用量群の細胞増殖率を求めた。

6) 染色体の観察

染色体の観察は、60 倍のノーカバー対物レンズを用いて総合倍率 600 倍で検鏡した。観察は標本をすべてコード化し、盲検法で行った。各用量とも、染色体が明瞭に識別でき、染色体の数が 25 ± 2 本の分裂中期像について、1 シャーレ当たり 100 個、すなわち 1 用量当たり 2 枚のシャーレの合計 200 個について観察した。

7) 染色体異常の分類および集計^{a)}

染色体異常の分類は、構造異常については、染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換 (二動原体、環状染色体など) およびその他 (断片化など) とした。数的異常については、倍数性細胞 (倍数体) のみを記録した。

ギャップ (染色分体型および染色体型) については、異常として記録したが、構造異常には含めなかった。ギャップは、染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を一つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は観察した細胞 200 個中に認められた異常細胞数を表示した。

8) 試験結果の判定

試験結果の判定に当たり、構造異常および倍数性細胞の出現頻度は、多試料 χ^2 検定を行って、有意差（有意水準 5%以下）が認められた場合は、Fisher の直接確率法を用いて陰性対照群と各用量群との間の有意差検定（有意水準は多重性を考慮して、5%または 1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻度が陰性対照群に比べ 2 用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められた場合、染色体異常誘発性は陽性と判定した。なお、単一用量でのみ有意な増加が認められた場合には、それに近い用量を用いて確認試験を行い、その結果、再現性が認められた場合には、染色体異常誘発性は陽性とした。陽性結果が得られた場合には、D₂₀ 値〔分裂中期像の 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 (mg/mL)〕を算出した。

結 果

1. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 非存在下）

結果は表 1-1 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0%と低値であった。被験物質群では 150, 300, 600, 800 および 1000 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 4.5, 14.0, 26.0, 24.5 および 18.5%の出現頻度で構造異常細胞が認められ、300~1000 $\mu\text{g/mL}$ での増加は陰性対照群と比較して統計学的に有意なものであった。また、150~600 $\mu\text{g/mL}$ では用量依存的な増加が認められた。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 98.5%であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

数的異常を示す倍数体は、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では 0~1.0%の範囲の低い出現頻度で認められた。

なお、1200 $\mu\text{g/mL}$ では、被験物質の細胞に対する毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

2. 染色体異常試験（短時間処理法：S9 mix 存在下）

結果は表 1-2 に示した。染色体の構造異常を有する細胞は、陰性対照群では認められなかった。被験物質群では 75, 150, 300 および 400 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 16.0, 41.5, 73.0 および 90.0% と用量に依存した出現頻度で構造異常細胞の増加が認められ、いずれの増加も陰性対照群との間に有意差が認められた。陽性対照群の B[a]P による染色体構造異常細胞の出現頻度は 63.0% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体の出現頻度は、陰性対照群では 0.5% と低値であった。被験物質群では 75 および 400 $\mu\text{g/mL}$ において 0.5% の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では倍数体は認められなかった。

なお、500 および 600 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

3. 染色体異常試験（連続処理法：24 時間処理）

結果は表 2-1 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.5% と低値であった。被験物質群では 75, 150 および 300 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 3.5, 12.0 および 11.5% であり、150 および 300 $\mu\text{g/mL}$ では陰性対照群と比べて有意な増加を示した。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 97.0% であり、顕著な染色体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群および陽性対照群では認められなかった。被験物質群では 150 および 300 $\mu\text{g/mL}$ で 0.5% の低い出現頻度で認められた。

なお、600, 900 および 1200 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

4. 染色体異常試験（連続処理法：48 時間処理）

結果は表 2-2 に示した。染色体の構造異常を有する細胞の出現頻度は、陰性対照群では 1.0% と低値であった。被験物質群では 37.5, 75, 150 および 300 $\mu\text{g/mL}$ でそれぞれ 5.0, 25.5, 33.0 および 44.5% と用量依存的な出現頻度の増加が認められ、75~300 $\mu\text{g/mL}$ における増加は統計学的に有意なものであった。陽性対照群の MNNG による染色体構造異常細胞の出現頻度は 93.0% であり、顕著な染色

体異常誘発が確認された。

倍数体については、陰性対照群では0.5%と低値であった。被験物質群では37.5 $\mu\text{g/mL}$ でのみ0.5%の低い出現頻度で認められた。陽性対照群では倍数体は認められなかった。

なお、450 および 600 $\mu\text{g/mL}$ では、細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

5. D_{20} 値⁴⁾

短時間処理法および連続処理法のいずれの方法においても染色体異常細胞の増加が認められたため、 D_{20} 値を算出した。

その結果は次表に示したとおりであり、短時間処理法および連続処理法のそれぞれ D_{20} 値は、いずれも S 値 (対象となった D_{20} 値のうち、相関係数 r が大きく、陰性対照群を含む群数 n が多いものほどより妥当性が高いとする考えに基づく指標) が小さいものを採用した。すなわち、短時間処理法の場合は S9 mix 非存在下では 0.61 mg/mL, S9 mix 存在下では 0.078 mg/mL, 連続処理法の場合は 24 時間処理では 0.49 mg/mL, 48 時間処理では 0.067 mg/mL であった。

	回帰曲線	D_{20} 値 ($\mu\text{g/mL}$)	S 値 $\left[S = \frac{D_{20}}{r} \times \frac{1}{n^2} \right]$
短時間処理法			
S9 mix 非存在下	$y = 0.0217957x + 4.39703$ ($r = 0.824382$)	715.873	24.1215
	$y = 22.7254x - 43.2169$ ($r = 0.915419$)	<u>605.032</u>	<u>18.3593</u>
S9 mix 存在下	$y = 0.229276x + 1.68399$ ($r = 0.99484$)	79.8864	3.21203
	$y = 92.6063x - 155.245$ ($r = 0.994308$)	<u>78.0493</u>	<u>3.13984</u>
連続処理法			
24 時間処理	$y = 0.036x + 2.4$ ($r = 0.852902$)	<u>488.889</u>	<u>35.8254</u>
	$y = 12.7894x - 18.7809$ ($r = 0.919341$)	1077.12	73.2265
48 時間処理	$y = 0.144667x + 5.52501$ ($r = 0.927215$)	100.058	4.31648
	$y = 38.2024x - 49.8318$ ($r = 0.982765$)	<u>67.2887</u>	<u>2.73875</u>

結 論

2, 4-ジメチルアニリンについて染色体異常誘発性の有無を調べるため, CHL/IU 細胞を用いた *In vitro* における染色体異常試験を実施した。その結果, 短時間処理法および連続処理法 48 時間処理において染色体構造異常細胞の用量依存的, かつ, 有意な増加が認められた。また, 連続処理法 24 時間処理においても染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。

なお, 陰性対照群では, 染色体異常細胞の出現頻度は背景データ (添付資料) の範囲内であった。陽性対照群においては明らかな染色体異常細胞の増加が認められ, その程度は, それぞれ背景データ (添付資料) の範囲内の陽性値を示すものであった。また, 細胞増殖抑制試験および染色体異常試験を通して雑菌の混入は認められなかった。以上により, 本試験は有効と判定した。

したがって, 本実験条件下では, 2, 4-ジメチルアニリンの CHL/IU 細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。また, 本被験物質の D_{20} 値は, 短時間処理法 S9 mix 非存在下では 0.61 mg/mL, S9 mix 存在下では 0.078 mg/mL, 連続処理法 24 時間処理では 0.49 mg/mL, 48 時間処理では 0.067 mg/mL であった。本試験結果は, CHL/IU 細胞において染色体異常を有する細胞の出現頻度が 5%以上 10%未満を疑陽性, 10%以上を陽性とする生物学的判断基準⁵⁾からみても明らかに陽性と判断されるものであった。

参考文献

- 1) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S. (1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.
- 2) Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). "Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutation Research*, 66, 277-290.
- 3) 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，東京，1988，pp. 16-37.

4) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 監修，“化審法毒性試験法の解説 改定版”，化学工業日報社，東京，1992，pp. 51-52.

5) 石館 基 監修，“改定増補 染色体異常試験データ集”，エル・アイ・シー，東京，1987，p. 19.

表 1-1 2, 4-ジメチルアニリンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色体分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	1	1	0	0	0	1	2		100	0	0	0
0	100	1	0	0	0	0	1	0	100.0	100	0	0	0
	200	2	1	0	0	0	2	2		200	0	0	0
		(1.0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(1.0)		(0)	(0)	(0)	
150	100	1	3	0	0	0	3	1	97.5	100	1	0	1
	100	5	4	0	0	0	6	0		100	0	0	0
	200	6	7	0	0	0	9	1		200	1	0	1
		(3.0)	(3.5)	(0)	(0)	(0)	(4.5)	(0.5)		(0.5)	(0)	(0.5)	
300	100	10	15	0	1	0	19	1	88.0	100	2	0	2
	100	2	8	1	0	0	9	2		100	0	0	0
	200	12	23	1	1	0	28	3		200	2	0	2
		(6.0)	(11.5)	(0.5)	(0.5)	(0)	(14.0)**	(1.5)		(1.0)	(0)	(1.0)	
600	100	10	20	1	0	0	21	0	85.0	100	1	0	1
	100	21	29	4	0	0	31	0		100	0	0	0
	200	31	49	5	0	0	52	0		200	1	0	1
		(15.5)	(24.5)	(2.5)	(0)	(0)	(26.0)**	(0)		(0.5)	(0)	(0.5)	
800	100	12	22	3	0	0	22	0	78.5	100	2	0	2
	100	13	27	0	0	0	27	0		100	0	0	0
	200	25	49	3	0	0	49	0		200	2	0	2
		(12.5)	(24.5)	(1.5)	(0)	(0)	(24.5)**	(0)		(1.0)	(0)	(1.0)	
1000	100	12	19	0	0	0	19	0	71.5	100	0	0	0
	100	10	18	1	0	0	18	0		100	0	0	0
	200	22	37	1	0	0	37	0		200	0	0	0
		(11.0)	(18.5)	(0.5)	(0)	(0)	(18.5)**	(0)		(0)	(0)	(0)	
1200 #	100	—	—	—	—	—	—	—	53.5	100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)		(—)	(—)	(—)	
陽性対照	100	49	99	2	0	0	99	0		100	0	0	0
2.5	100	47	96	10	0	0	98	4	—	100	0	0	0
	200	96	195	12	0	0	197	4		200	0	0	0
		(48.0)	(97.5)	(6.0)	(0)	(0)	(98.5)**	(2.0)		(0)	(0)	(0)	

陰性対照:ジメチルスルホキシド。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine。

**: $p < 0.01$ 。

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 1-2 2, 4-ジメチルアニリンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
0	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	0		200	1	0	1
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
75	100	3	15	0	0	0	16	0	84.0	100	1	0	1
	100	7	11	0	0	0	16	1		100	0	0	0
	200	10	26	0	0	0	32	1		200	1	0	1
		(5.0)	(13.0)	(0)	(0)	(0)	(16.0)**	(0.5)			(0.5)	(0)	(0.5)
150	100	10	39	1	0	0	42	1	85.0	100	0	0	0
	100	6	37	0	0	0	41	0		100	0	0	0
	200	16	76	1	0	0	83	1		200	0	0	0
		(8.0)	(38.0)	(0.5)	(0)	(0)	(41.5)**	(0.5)			(0)	(0)	(0)
300	100	36	68	3	0	0	72	1	78.0	100	0	0	0
	100	31	70	4	0	0	74	0		100	0	0	0
	200	67	138	7	0	0	146	1		200	0	0	0
		(33.5)	(69.0)	(3.5)	(0)	(0)	(73.0)**	(0.5)			(0)	(0)	(0)
400	100	54	86	5	0	0	90	2	67.0	100	1	0	1
	100	70	87	6	0	0	90	0		100	0	0	0
	200	124	173	11	0	0	180	2		200	1	0	1
		(62.0)	(86.5)	(5.5)	(0)	(0)	(90.0)**	(1.0)			(0.5)	(0)	(0.5)
500 #	100	—	—	—	—	—	—	—	40.5	100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)			(—)	(—)	(—)
600 #	100	—	—	—	—	—	—	—	17.5	100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)			(—)	(—)	(—)
陽性対照	100	20	63	1	0	0	67	0		100	0	0	0
10	100	11	58	1	0	0	59	2	—	100	0	0	0
	200	31	121	2	0	0	126	2		200	0	0	0
		(15.5)	(60.5)	(1.0)	(0)	(0)	(63.0)**	(1.0)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:ジメチルスルホキシド。

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

**:p<0.01.

#:細胞毒性のため,観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 2-1 2, 4-ジメチルアニリンの染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色体分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
	100	3	0	0	0	0	3	0	100.0	100	0	0	0
	200	3	0	0	0	0	3	1		200	0	0	0
		(1.5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1.5)	(0.5)			(0)	(0)	(0)
75	100	2	2	0	0	0	4	0		100	0	0	0
	100	1	2	0	0	0	3	0	95.0	100	0	0	0
	200	3	4	0	0	0	7	0		200	0	0	0
		(1.5)	(2.0)	(0)	(0)	(0)	(3.5)	(0)			(0)	(0)	(0)
150	100	7	5	0	0	0	11	2		100	0	0	0
	100	11	3	0	1	0	13	2	88.5	100	1	0	1
	200	18	8	0	1	0	24	4		200	1	0	1
		(9.0)	(4.0)	(0)	(0.5)	(0)	(12.0)	(2.0)			(0.5)	(0)	(0.5)
300	100	10	6	0	0	0	14	1		100	1	0	1
	100	5	4	0	1	0	9	0	79.0	100	0	0	0
	200	15	10	0	1	0	23	1		200	1	0	1
		(7.5)	(5.0)	(0)	(0.5)	(0)	(11.5)	(0.5)			(0.5)	(0)	(0.5)
600 #	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—	57.5	100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)			(—)	(—)	(—)
900 #	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—	36.5	100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)			(—)	(—)	(—)
1200 #	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—	12.5	100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)			(—)	(—)	(—)
陽性対照	100	29	98	2	0	0	98	2		100	0	0	0
	100	38	96	0	0	0	96	1	—	100	0	0	0
	200	67	194	2	0	0	194	3		200	0	0	0
		(33.5)	(97.0)	(1.0)	(0)	(0)	(97.0)	(1.5)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**:p<0.01.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 2-2 2, 4-ジメチルアニリンの染色体異常試験結果(連続処理法:48時間処理)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						キヤップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
	100	1	1	0	0	0	2	0	100.0	100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	2	0		200	1	0	1
		(0.5)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
37.5	100	5	3	1	1	0	7	0	93.5	100	0	0	0
	100	2	3	0	0	0	3	0		100	1	0	1
	200	7	6	1	1	0	10	0		200	1	0	1
		(3.5)	(3.0)	(0.5)	(0.5)	(0)	(5.0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
75	100	9	21	0	0	0	22	0	81.0	100	0	0	0
	100	17	24	0	0	0	29	1		100	0	0	0
	200	26	45	0	0	0	51	1		200	0	0	0
		(13.0)	(22.5)	(0)	(0)	(0)	(25.5)	** (0.5)			(0)	(0)	(0)
150	100	14	28	4	0	0	35	0	68.0	100	0	0	0
	100	12	28	1	1	0	31	0		100	0	0	0
	200	26	56	5	1	0	66	0		200	0	0	0
		(13.0)	(28.0)	(2.5)	(0.5)	(0)	(33.0)	** (0)			(0)	(0)	(0)
300	100	14	34	2	0	0	39	0	56.5	100	0	0	0
	100	12	46	1	0	0	50	1		100	0	0	0
	200	26	80	3	0	0	89	1		200	0	0	0
		(13.0)	(40.0)	(1.5)	(0)	(0)	(44.5)	** (0.5)			(0)	(0)	(0)
450 #	100	—	—	—	—	—	—	—	45.5	100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)			(—)	(—)	(—)
600 #	100	—	—	—	—	—	—	—	39.0	100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)			(—)	(—)	(—)
陽性対照	100	51	91	2	0	0	93	1		100	0	0	0
	100	63	93	6	1	0	93	0	—	100	0	0	0
	200	114	184	8	1	0	186	1		200	0	0	0
		(57.0)	(92.0)	(4.0)	(0.5)	(0)	(93.0)	** (0.5)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:ジメチルスルホキシド。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**:p<0.01.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

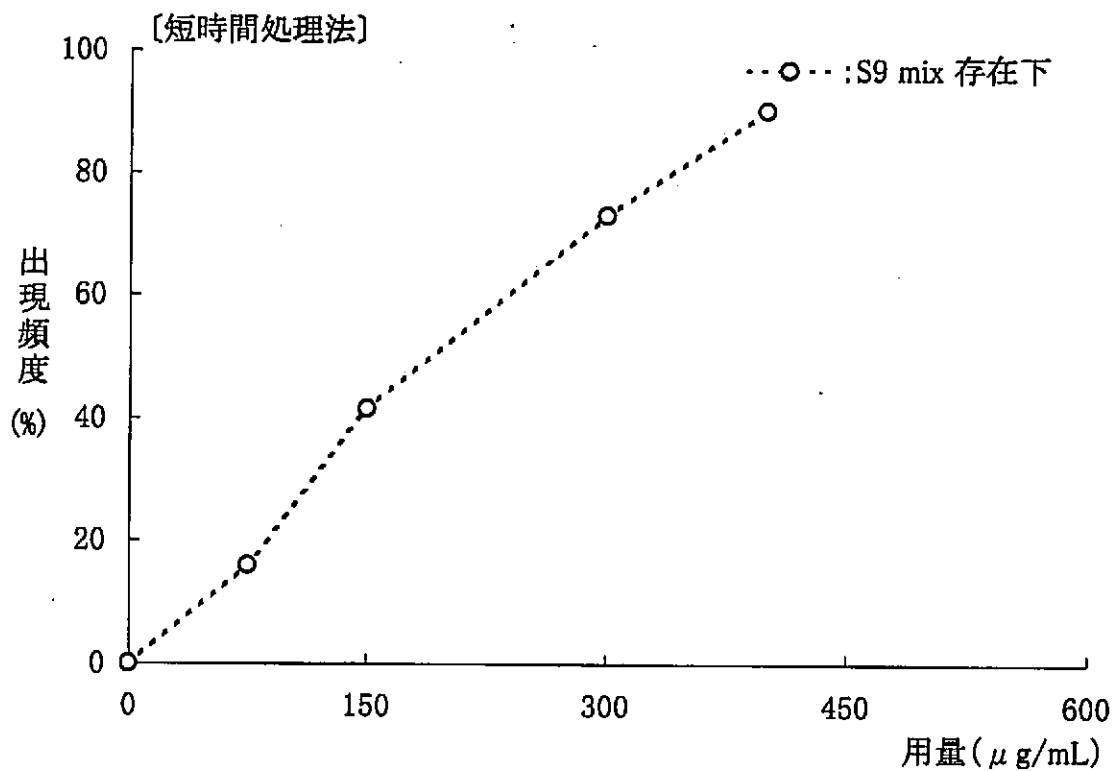
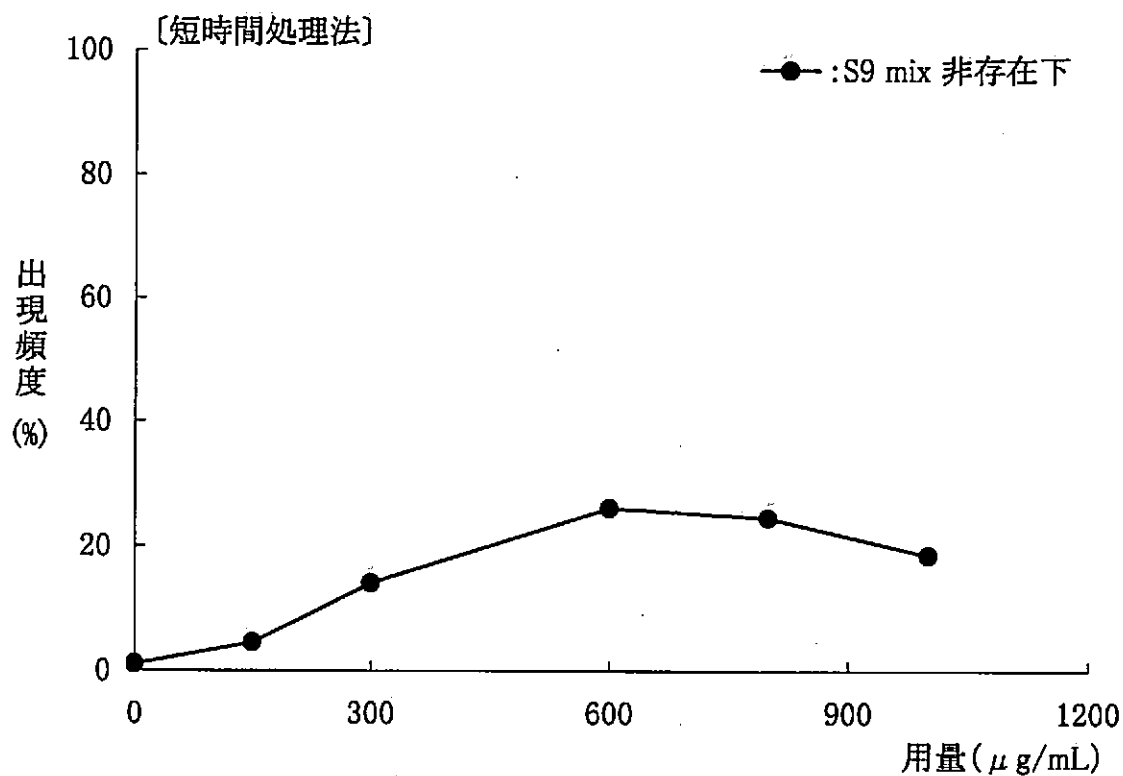


図 1-1 構造異常を有する細胞の出現頻度

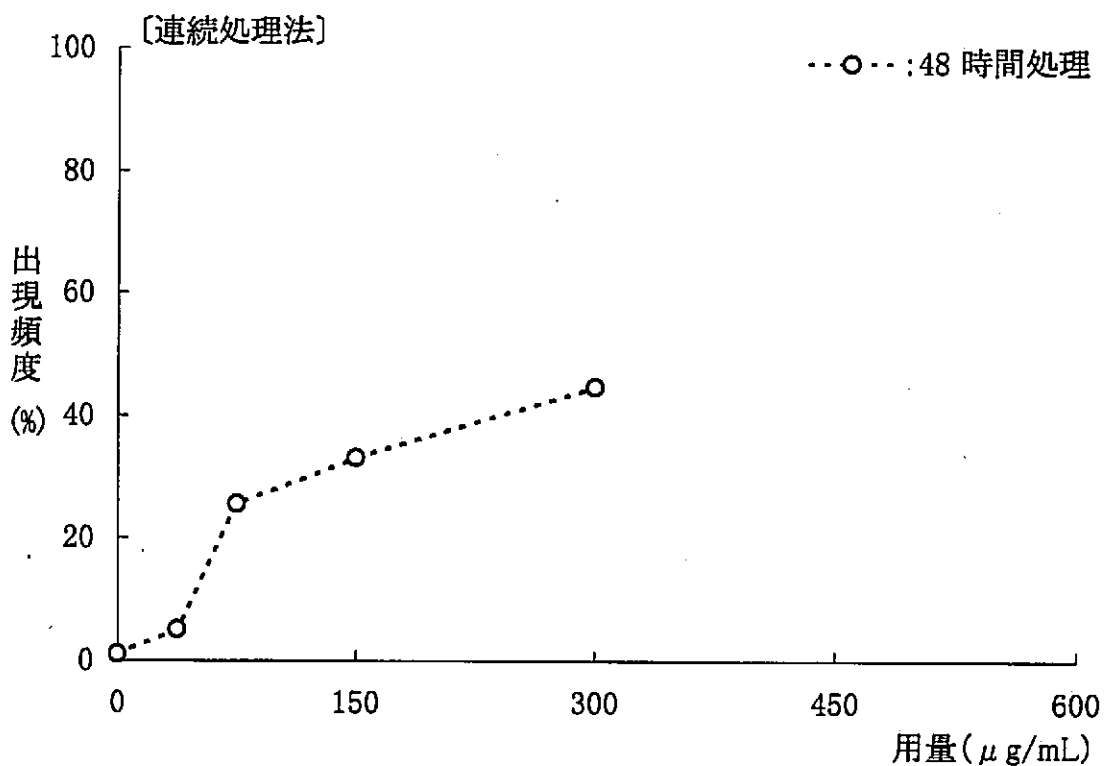
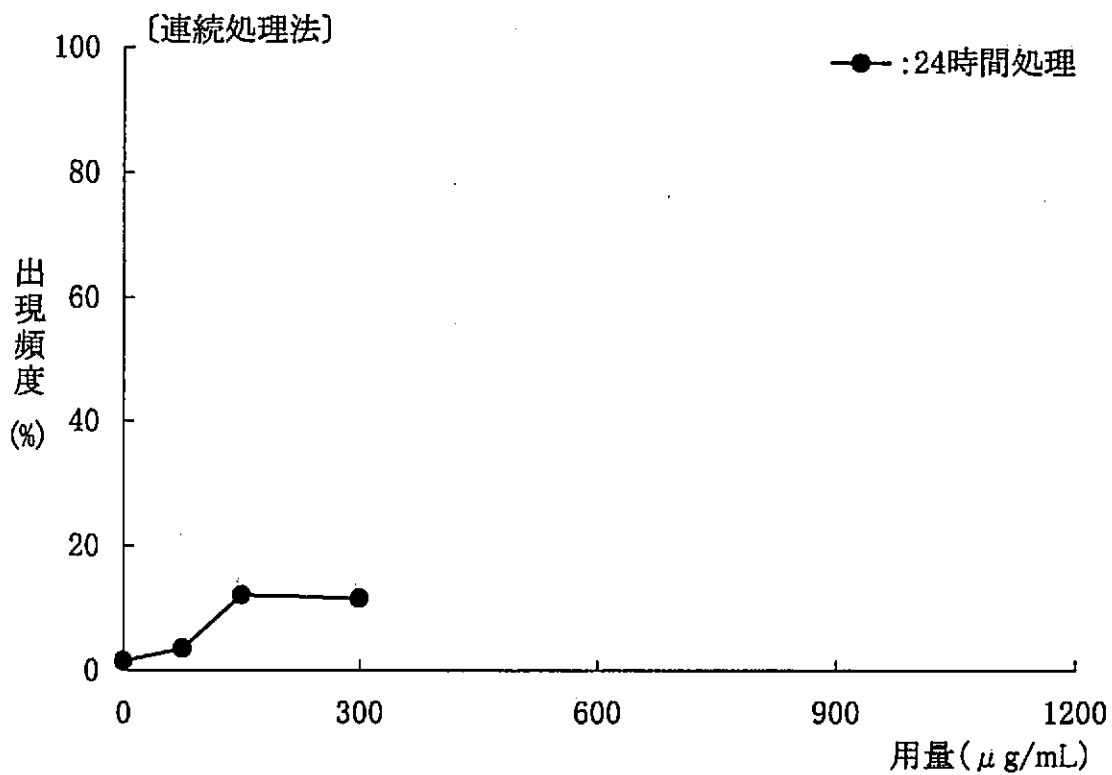


図 1-2 構造異常を有する細胞の出現頻度

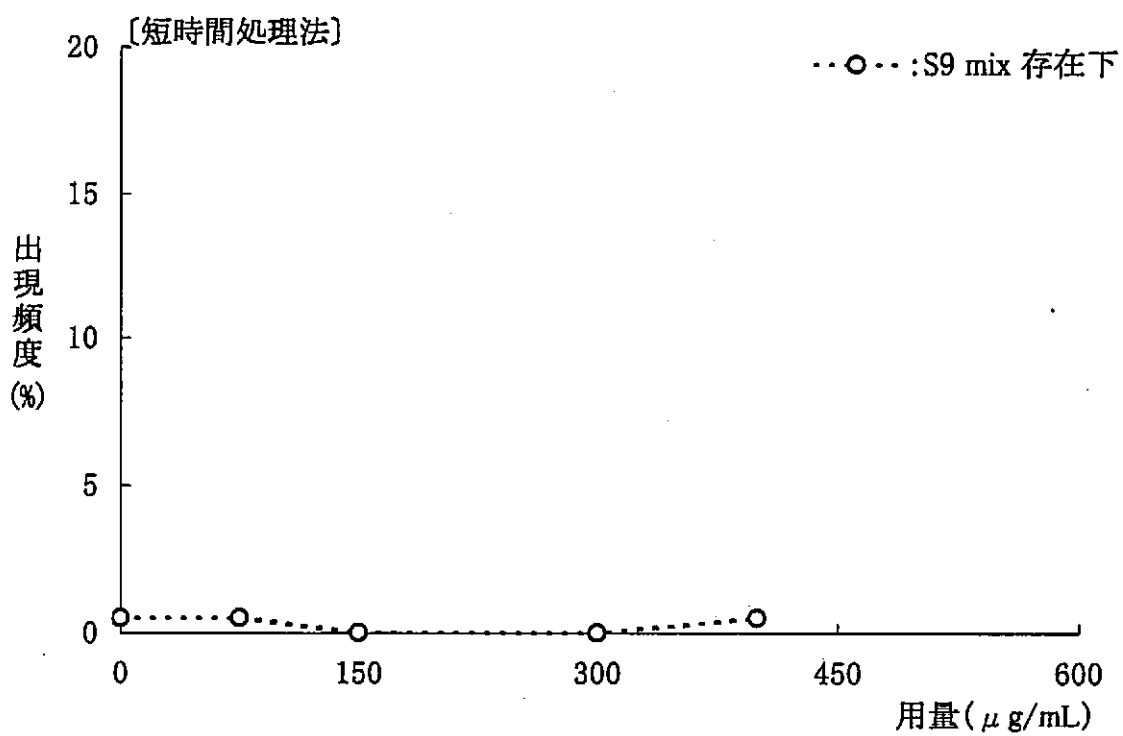
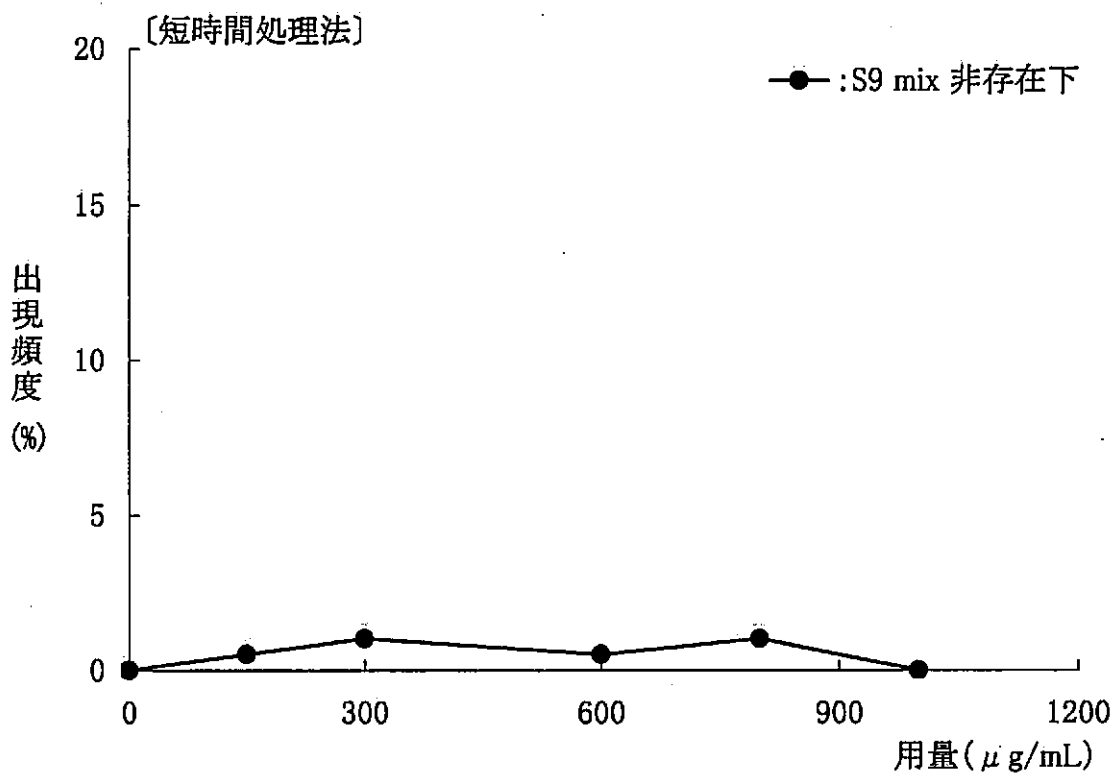


図 2-1 数的異常を有する細胞の出現頻度

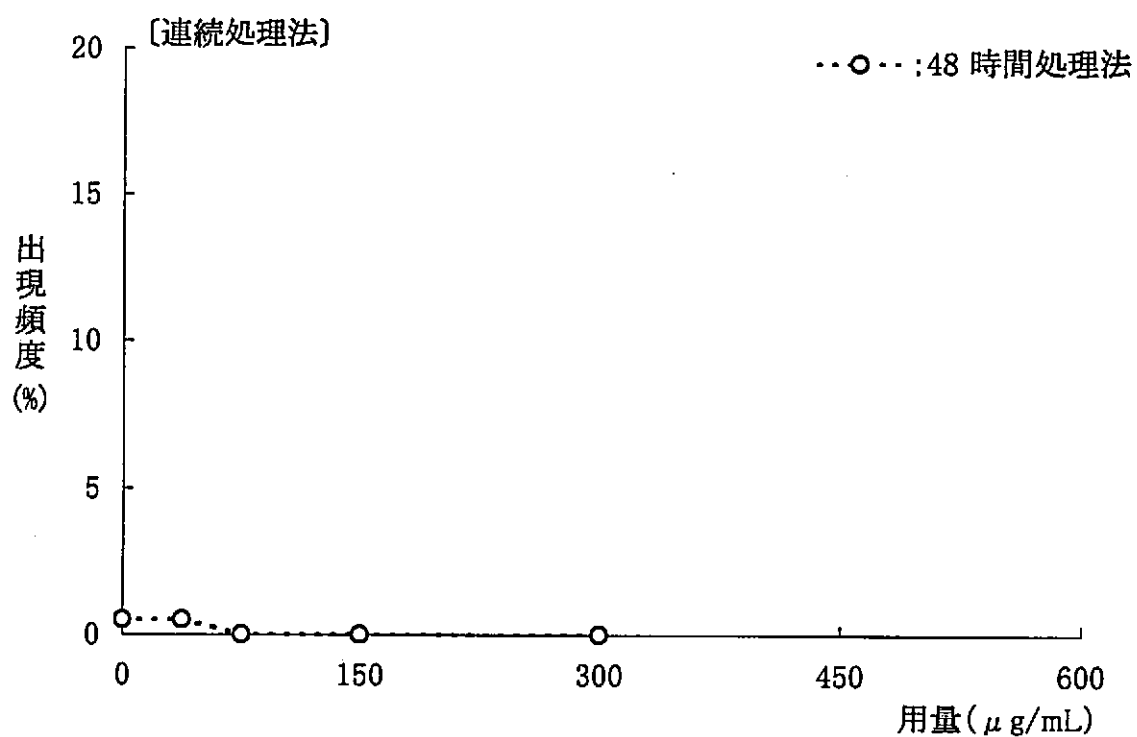
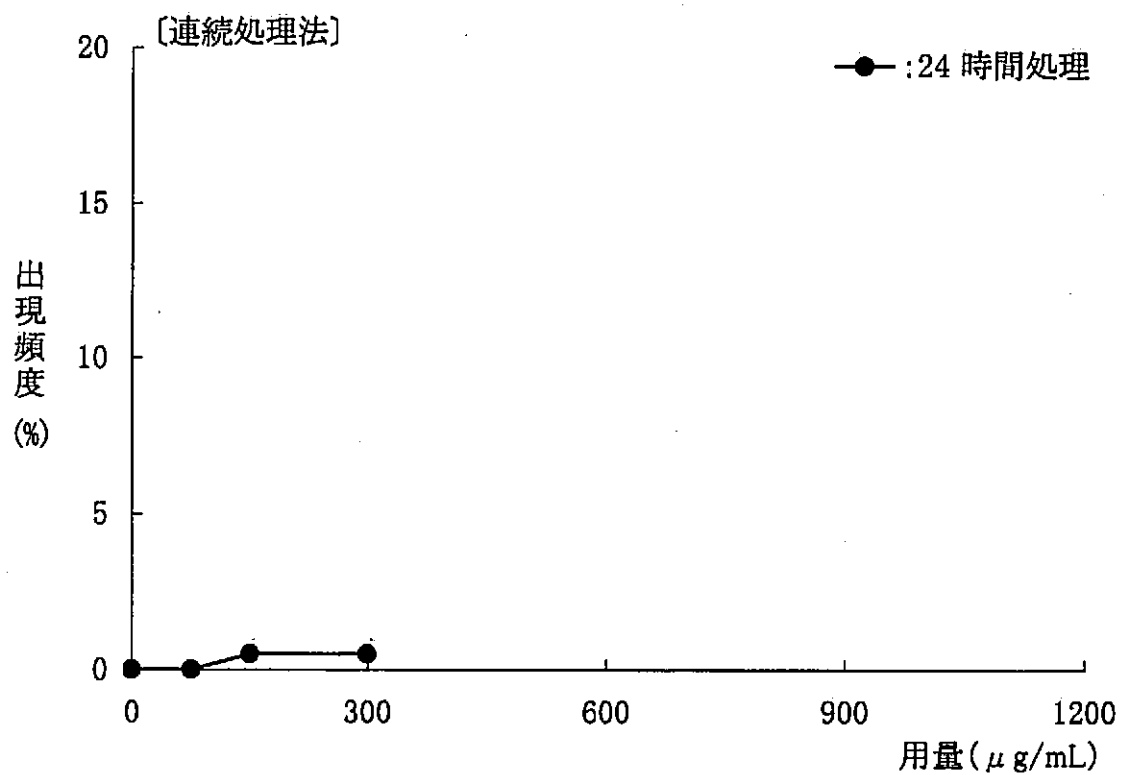


図 2-2 数的異常を有する細胞の出現頻度



写真 1. 陰性対照群 (ジメチルスルホキシド), 短時間処理法 S9 mix 存在下,
分裂中期像 (ギムザ染色, $\times 960$)

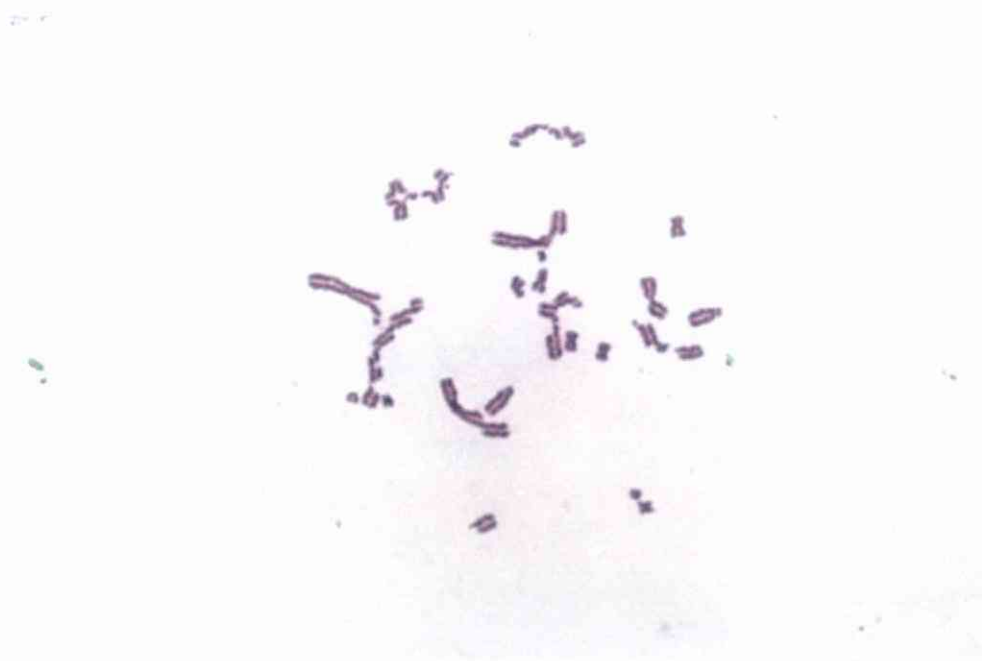


写真 2. 被験物質群 (400 μ g/mL), 短時間処理法 S9 mix 存在下,
染色分体型切断および交換がみられる分裂中期像
(ギムザ染色, $\times 960$)

添付資料

染色体異常細胞の出現頻度：背景データ


	陰性対照値 (%) (n:236)	陽性対照値 (%)	
		MNNG(n:102)	B[a]P(n:63)
構造異常細胞	0~2.5	68.0~100	24.0~75.5
数的異常細胞 (倍数体)	0~1.5	0~2.5	0~1.5

MNNG : 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (2.5 μ g/mL).

B[a]P : 3,4-Benzo[a]pyrene (10 μ g/mL).

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

既存化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2, 4-ジメチルアニリン		
別 名	2, 4-キシリジン		
構造式または示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)	$C_8H_{11}N$		
試験に供した既存 化学物質の純度	99.1%	試験に供した既存 化学物質の Lot.No.	
不純物の名称及び濃度	—		
C A S 番号	95-68-1		
分 子 量	121.18	蒸 気 圧	133Pa/52.6℃
融 点	14℃	分配係数	—
沸 点	214℃		
常温における性状	微黄色透明液体		
安 定 性	常温で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	水	難溶	—
	DMSO	可溶	安定
	エタノール	可溶	—
	その他()	—	—

DMSO : ジメチルスルホキシド

2.細胞の種類－培養条件

細胞名	CHL/IU	入手先	国立医薬品食品衛生研究所	
種	チャイニーズハムスター	入手年月日	昭和60年1月13日	
培養液	イーグルのMEM	製造元	Gibco Laboratories	
血液の種類と添加量	仔牛 10%	製造元(Lot No.)	Gibco Laboratories (1101210)	
細胞周期	約 16 h	凍結条件	液体窒素条件下	
継代数	4	培養条件	容器	プラスチックシャーレ
染色体数 (モード)	25 本		温度	37 ℃
			CO ₂ 濃度	5 %
備考				

3.S9 mix

(1) S9 mix の入手方法

自製・購入の別	1. 自製 ② 購入 (製造元 キッコーマン株式会社)
製造年月日	平成13年6月29日 (CAM-447), 11月22日 (CAM-455) 製造
購入の場合の Lot No.	CAM-447, CAM-455
保存温度	-80°C以下 (超低温槽 ウルトラディープ CF-41SD)

(2) S9 の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	PB および 5, 6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7 週	投与期間及び投与量 (mg/kg 体重)	PB 30 mg/kg 1 回
体重	211~241 (CAM-447) g 204~232 (CAM-455) g		PB 60 mg/kg 3 回 5, 6-BF 80 mg/kg 1 回

(3) S9 mix の組成

成分	S9 mix 1 mL 中の量	成分	S9 mix 1 mL 中の量
S9	0.3 mL	NADP	4 μmol
MgCl ₂	5 μmol	酸緩衝液(HEPES)	4 μmol
KCl	33 μmol	蒸留水	0.1 mL
グルコース-6-リン酸	5 μmol		

(4) S9 mix の処理条件

① プレート法 2. 浮遊細胞法 3. その他 ()	
S9 量 (最終濃度)	5.0 %
S9 蛋白量 (最終濃度)	1.33 mg/mL (CAM-447) , 1.27 mg/mL (CAM-455)
処 理 時 間	6 h
回 復 時 間	18 h
備 考	—

4. 被験物質溶液の調製

使 用 溶 媒	名 称	製造元	Lot No.	グレード	純度 (%)
	DMSO	和光純薬工業(株)	DWP7008	—	100
溶 媒 選 択 の 理 由	被験物質は水に難溶であり、予備的検討の結果、DMSOに可溶であったため、溶媒にはDMSOを用いた。				
被験物質溶媒の性状	③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	—				
溶媒の調製から使用 までの保存時間と温度	約 15 分, 20℃				
純 度 換 算 の 有 無	有 ④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		平成13年12月9日から 平成13年12月14日	平成13年12月9日から 平成13年12月14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 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	3 mL／培養器	2.5 mL／培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10 ³ 個／mL	4×10 ³ 個／mL
	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
	S9 mix 添 加 量		0.5 mL／培養器
	S9 の 最 終 濃 度		5.0 %
	S9 蛋白の最終濃度		1.33 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		単層培養細胞密度計を使用 10%ホルマリン水溶液固定 0.1%クリスタルバイオレット水溶液染色	
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 (6-18h)		代謝活性化法による場合 (6-18h)	
用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100.0	0 (溶媒)	100.0
37.5	102.0	37.5	86.0
75	107.0	75	80.5
150	98.0	150	81.5
300	100.0	300	81.0
600	105.5	600	39.0
1200	37.0	1200	16.5

(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		平成13年12月17日から 平成13年12月23日	平成13年12月17日から 平成13年12月23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 6 cm	直径 6 cm
	培養液量	3 mL/培養器	2.5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	4 枚	4 枚
細胞	播種細胞数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	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
	S9 mix 添加量		0.5 mL/培養器
	S9 の最終濃度		5.0 %
	S9 蛋白の最終濃度		1.27 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 による。)

6. 連続処理法における試験

(1) 細胞増殖抑制試験の条件

試 験 実 施 期 間		平成13年12月9日から 平成13年12月14日	平成13年12月9日から 平成13年12月15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 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	5 mL／培養器	5 mL／培養器
	用量当たりの培養器数	2 枚	2 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10 ³ 個／mL	4×10 ³ 個／mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.025 mL／培養器	0.025 mL／培養器
	処 理 時 間	24 h	48 h
	回 復 時 間	0 h	0 h
細 胞 増 殖 抑 制 測 定 法		単層培養細胞密度計を使用 10%ホルマリン水溶液固定 0.1%クリスタルバイオレット水溶液染色	
備 考			

(2) 細胞増殖抑制試験結果

(24-0h) 処理による場合		(48-0h) 処理による場合	
用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖率 (%)
0 (溶媒)	100.0	0 (溶媒)	100.0
37.5	95.0	37.5	91.5
75	89.0	75	74.0
150	88.0	150	63.0
300	74.0	300	47.5
600	52.5	600	22.0
1200	14.0	1200	7.5

(3) 染色体異常試験の条件

試 験 実 施 期 間		平成13年12月14日から 平成13年12月19日	平成13年12月14日から 平成13年12月20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 6 cm	直径 6 cm
	培 養 液 量	5 mL/培養器	5 mL/培養器
	用量当たりの培養器数	4 枚	4 枚
細 胞	播 種 細 胞 数	4×10^3 個/mL	4×10^3 個/mL
	前 培 養 日 数	3 日間	3 日間
処 理 条 件	被験物質溶液添加量	0.025 mL/培養器	0.025 mL/培養器
	処 理 時 間	24 h	48 h
	回 復 時 間	0 h	0 h
備 考			

(4) 染色体異常試験結果（別表2による。）

7. 結果の判定および参考事項

(1) 試験結果

判 定		<div>陽性</div> 陰性			
判定の理由 短時間処理法および連続処理法48時間処理において、染色体構造異常細胞の用量依存的、かつ、有意な増加が認められた。また、連続処理法24時間処理においても染色体構造異常細胞の有意な増加が認められた。 従って、本実験条件下において、本被験物質の染色体異常誘発性は陽性と判定した。					
D ₂₀ 値	構造異常	短時間処理法	－ S9 mix	6－18 h 処理	0.61 mg/mL
			＋ S9 mix	6－18 h 処理	0.078 mg/mL
		連続処理法	<div></div>	24－0 h 処理	0.49 mg/mL
				48－0 h 処理	0.067 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	<div></div>	－ h 処理	－ mg/mL
				－ h 処理	－ mg/mL

(2) 参考事項

1. 細胞の選択理由

供試細胞は、染色体が比較的大きいため標本観察が容易であり、また、染色体モードが25本と少なく、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において広く用いられているためこれを使用した。

2. 被験物質用量の設定理由

細胞増殖抑制試験の結果から、50%細胞増殖用量の前後が含まれ、かつ、3 用量以上のデータが得られることを考慮して設定した。すなわち、短時間処理法の場合、S9 mix 非存在下では 150, 300, 600, 800, 1000 および 1200 $\mu\text{g/mL}$, S9 mix 存在下では 75, 150, 300, 400, 500 および 600 $\mu\text{g/mL}$, また、連続処理法の場合は、24 時間処理では 75, 150, 300, 600, 900 および 1200 $\mu\text{g/mL}$, 48 時間処理では 37.5, 75, 150, 300, 450 および 600 $\mu\text{g/mL}$ のそれぞれ計 6 用量ずつを設定した。

3. 染色体異常の分類および集計

染色体異常の分類は、構造異常については染色分体型の切断と交換、染色体型の切断と交換（二動原体、環状染色体など）およびその他（断片化など）とした。数的異常については、倍数性細胞のみを記録した。ギャップ（染色分体型および染色体型）については、異常として記録したが構造異常には含めなかった。ギャップは染色分体幅よりも狭い非染色性部位とした。

染色体異常の集計については、上述に分類した異常を 1 つでも有する細胞は異常細胞として記録し、異常の種類別の集計を行った。構造異常および数的異常の総数は、観察した細胞200個中に認められた異常細胞数を表示した。

4. 試験結果の判定基準

試験結果の判定にあたっては、構造異常および倍数性細胞の出現頻度について多試料 χ^2 検定を行い、有意差（有意水準5%以下）を認めた場合は、Fisher の直接確立法により陰性（溶媒）対照群に対する各群の比較検定（有意水準は多重性を考慮して、5%または1%を処理群の数で割ったものを用いた。）を行った。その結果、被験物質群における染色体異常細胞の出現頻度が陰性（溶媒）対照群に比べ 2用量以上で有意に増加し、さらに用量依存性が認められる場合に、染色体異常誘発性は陽性とした。なお、単一用量でのみ有意な増加が認められた場合は、それに近い用量を用いて確認試験を行い、その結果、再現性のある結果が認められた場合は、染色体異常誘発性は陽性とした。

8. その他

試験実施施設	名 称	財団法人 畜産生物科学安全研究所	
	所 在 地	神奈川県相模原市橋本台三丁目7番11号	電話 042 (762) 2775 FAX 042 (762) 7979
試験責任者	職 氏 名	主任研究員	
	経験年数	17 年	
試験期間	平成13年12月4日 より 平成14年3月20日		
試験番号	01-170		

表 1-1 2, 4-ジメチルアニリンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix非存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	染色体構造異常の細胞数(%)							ギャップ*の細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
	観察 細胞数	染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照 0	100	1	1	0	0	0	1	2	100.0	100	0	0	0
	100	1	0	0	0	0	1	0		100	0	0	0
	200	2	1	0	0	0	2	2		200	0	0	0
		(1.0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	(1.0)	(1.0)			(0)	(0)	(0)
150	100	1	3	0	0	0	3	1	97.5	100	1	0	1
	100	5	4	0	0	0	6	0		100	0	0	0
	200	6	7	0	0	0	9	1		200	1	0	1
		(3.0)	(3.5)	(0)	(0)	(0)	(4.5)	(0.5)			(0.5)	(0)	(0.5)
300	100	10	15	0	1	0	19	1	88.0	100	2	0	2
	100	2	8	1	0	0	9	2		100	0	0	0
	200	12	23	1	1	0	28	3		200	2	0	2
		(6.0)	(11.5)	(0.5)	(0.5)	(0)	(14.0)**	(1.5)			(1.0)	(0)	(1.0)
600	100	10	20	1	0	0	21	0	85.0	100	1	0	1
	100	21	29	4	0	0	31	0		100	0	0	0
	200	31	49	5	0	0	52	0		200	1	0	1
		(15.5)	(24.5)	(2.5)	(0)	(0)	(26.0)**	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
800	100	12	22	3	0	0	22	0	78.5	100	2	0	2
	100	13	27	0	0	0	27	0		100	0	0	0
	200	25	49	3	0	0	49	0		200	2	0	2
		(12.5)	(24.5)	(1.5)	(0)	(0)	(24.5)**	(0)			(1.0)	(0)	(1.0)
1000	100	12	19	0	0	0	19	0	71.5	100	0	0	0
	100	10	18	1	0	0	18	0		100	0	0	0
	200	22	37	1	0	0	37	0		200	0	0	0
		(11.0)	(18.5)	(0.5)	(0)	(0)	(18.5)**	(0)			(0)	(0)	(0)
1200 #	100	—	—	—	—	—	—	—	53.5	100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)			(—)	(—)	(—)
陽性対照 2.5	100	49	99	2	0	0	99	0	—	100	0	0	0
	100	47	96	10	0	0	98	4		100	0	0	0
	200	96	195	12	0	0	197	4		200	0	0	0
		(48.0)	(97.5)	(6.0)	(0)	(0)	(98.5)**	(2.0)			(0)	(0)	(0)

陰性対照:ジメチルスルホキシド。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 1-2 2, 4-ジメチルアニリンの染色体異常試験結果(短時間処理法:S9mix存在下)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)					キヤップ*の細胞 出現数 (%)	増殖率 (%)	染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色体分体		染色体		その他			観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換							
陰性対照 0	100	0	0	0	0	0	0		100	1	0	1
	100	0	0	0	0	0	0		100	0	0	0
	200	0	0	0	0	0	0	100.0	200	1	0	1
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			(0.5)	(0)	(0.5)
75	100	3	15	0	0	0	16		100	1	0	1
	100	7	11	0	0	0	16		100	0	0	0
	200	10	26	0	0	0	32	84.0	200	1	0	1
		(5.0)	(13.0)	(0)	(0)	(0)	(16.0)**	(0.5)		(0.5)	(0)	(0.5)
150	100	10	39	1	0	0	42		100	0	0	0
	100	6	37	0	0	0	41		100	0	0	0
	200	16	76	1	0	0	83	85.0	200	0	0	0
		(8.0)	(38.0)	(0.5)	(0)	(0)	(41.5)**	(0.5)		(0)	(0)	(0)
300	100	36	68	3	0	0	72		100	0	0	0
	100	31	70	4	0	0	74		100	0	0	0
	200	67	138	7	0	0	146	78.0	200	0	0	0
		(33.5)	(69.0)	(3.5)	(0)	(0)	(73.0)**	(0.5)		(0)	(0)	(0)
400	100	54	86	5	0	0	90		100	1	0	1
	100	70	87	6	0	0	90		100	0	0	0
	200	124	173	11	0	0	180	67.0	200	1	0	1
		(62.0)	(86.5)	(5.5)	(0)	(0)	(90.0)**	(1.0)		(0.5)	(0)	(0.5)
500 #	100	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	40.5	200	—	—	—
		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)		(—)	(—)	(—)
600 #	100	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	17.5	200	—	—	—
		(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)		(—)	(—)	(—)
陽性対照 10	100	20	63	1	0	0	67		100	0	0	0
	100	11	58	1	0	0	59		100	0	0	0
	200	31	121	2	0	0	126	—	200	0	0	0
		(15.5)	(60.5)	(1.0)	(0)	(0)	(63.0)**	(1.0)		(0)	(0)	(0)

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:3,4-Benzo[a]pyrene.

**:p<0.01.

#:細胞毒性のため,観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 2-1 2, 4-ジメチルアニリンの染色体異常試験結果(連続処理法:24時間処理)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						キヤップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	1		100	0	0	0
0	100	3	0	0	0	0	3	0	100.0	100	0	0	0
	200	3	0	0	0	0	3	1		200	0	0	0
	(1.5) (0) (0) (0) (0) (1.5)						(0.5)	(0) (0) (0)					
75	100	2	2	0	0	0	4	0	95.0	100	0	0	0
	100	1	2	0	0	0	3	0		100	0	0	0
	200	3	4	0	0	0	7	0		200	0	0	0
(1.5) (2.0) (0) (0) (0) (3.5)						(0)	(0) (0) (0)						
150	100	7	5	0	0	0	11	2	88.5	100	0	0	0
	100	11	3	0	1	0	13	2		100	1	0	1
	200	18	8	0	1	0	24	4		200	1	0	1
(9.0) (4.0) (0) (0.5) (0) (12.0)**						(2.0)	(0.5) (0) (0.5)						
300	100	10	6	0	0	0	14	1	79.0	100	1	0	1
	100	5	4	0	1	0	9	0		100	0	0	0
	200	15	10	0	1	0	23	1		200	1	0	1
(7.5) (5.0) (0) (0.5) (0) (11.5)**						(0.5)	(0.5) (0) (0.5)						
600 #	100	—	—	—	—	—	—	—	57.5	100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
(—) (—) (—) (—) (—) (—)						(—)	(—) (—) (—)						
900 #	100	—	—	—	—	—	—	—	36.5	100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
(—) (—) (—) (—) (—) (—)						(—)	(—) (—) (—)						
1200 #	100	—	—	—	—	—	—	—	12.5	100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
(—) (—) (—) (—) (—) (—)						(—)	(—) (—) (—)						
陽性対照	100	29	98	2	0	0	98	2		100	0	0	0
2.5	100	38	96	0	0	0	96	1	—	100	0	0	0
	200	67	194	2	0	0	194	3		200	0	0	0
	(33.5) (97.0) (1.0) (0) (0) (97.0)**						(1.5)	(0) (0) (0)					

陰性対照:ジメチルスルホキシド.

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**: $p < 0.01$.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

表 2-2 2, 4-ジメチルアニリンの染色体異常試験結果(連続処理法:48時間処理)

被験物質 の用量 (μ g/mL)	観察 細胞数	染色体構造異常の細胞数(%)						ギャップの細胞		染色体の数的異常の細胞数(%)			
		染色分体		染色体		その他	総異常 細胞数	出現数 (%)	増殖率 (%)	観察 細胞数	倍数体	その他	総異常 細胞数
		切断	交換	切断	交換								
陰性対照	100	0	0	0	0	0	0	0	100.0	100	1	0	1
	100	1	1	0	0	0	2	0		100	0	0	0
	200	1	1	0	0	0	2	0		200	1	0	1
	(0.5) (0.5) (0) (0) (0) (1.0) (0)						(0.5) (0) (0.5)						
37.5	100	5	3	1	1	0	7	0	93.5	100	0	0	0
	100	2	3	0	0	0	3	0		100	1	0	1
	200	7	6	1	1	0	10	0		200	1	0	1
	(3.5) (3.0) (0.5) (0.5) (0) (5.0) (0)						(0.5) (0) (0.5)						
75	100	9	21	0	0	0	22	0	81.0	100	0	0	0
	100	17	24	0	0	0	29	1		100	0	0	0
	200	26	45	0	0	0	51	1		200	0	0	0
	(13.0) (22.5) (0) (0) (0) (25.5)** (0.5)						(0) (0) (0)						
150	100	14	28	4	0	0	35	0	68.0	100	0	0	0
	100	12	28	1	1	0	31	0		100	0	0	0
	200	26	56	5	1	0	66	0		200	0	0	0
	(13.0) (28.0) (2.5) (0.5) (0) (33.0)** (0)						(0) (0) (0)						
300	100	14	34	2	0	0	39	0	56.5	100	0	0	0
	100	12	46	1	0	0	50	1		100	0	0	0
	200	26	80	3	0	0	89	1		200	0	0	0
	(13.0) (40.0) (1.5) (0) (0) (44.5)** (0.5)						(0) (0) (0)						
450 #	100	—	—	—	—	—	—	—	45.5	100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
	(—) (—) (—) (—) (—) (—) (—)						(—) (—) (—)						
600 #	100	—	—	—	—	—	—	—	39.0	100	—	—	—
	100	—	—	—	—	—	—	—		100	—	—	—
	200	—	—	—	—	—	—	—		200	—	—	—
	(—) (—) (—) (—) (—) (—) (—)						(—) (—) (—)						
陽性対照	100	51	91	2	0	0	93	1	—	100	0	0	0
	100	63	93	6	1	0	93	0		100	0	0	0
	200	114	184	8	1	0	186	1		200	0	0	0
	(57.0) (92.0) (4.0) (0.5) (0) (93.0)** (0.5)						(0) (0) (0)						

陰性対照:ジメチルスルホキシド。

陽性対照:1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.

**:p<0.01.

#:細胞毒性のため、観察可能な分裂中期像は認められなかった。

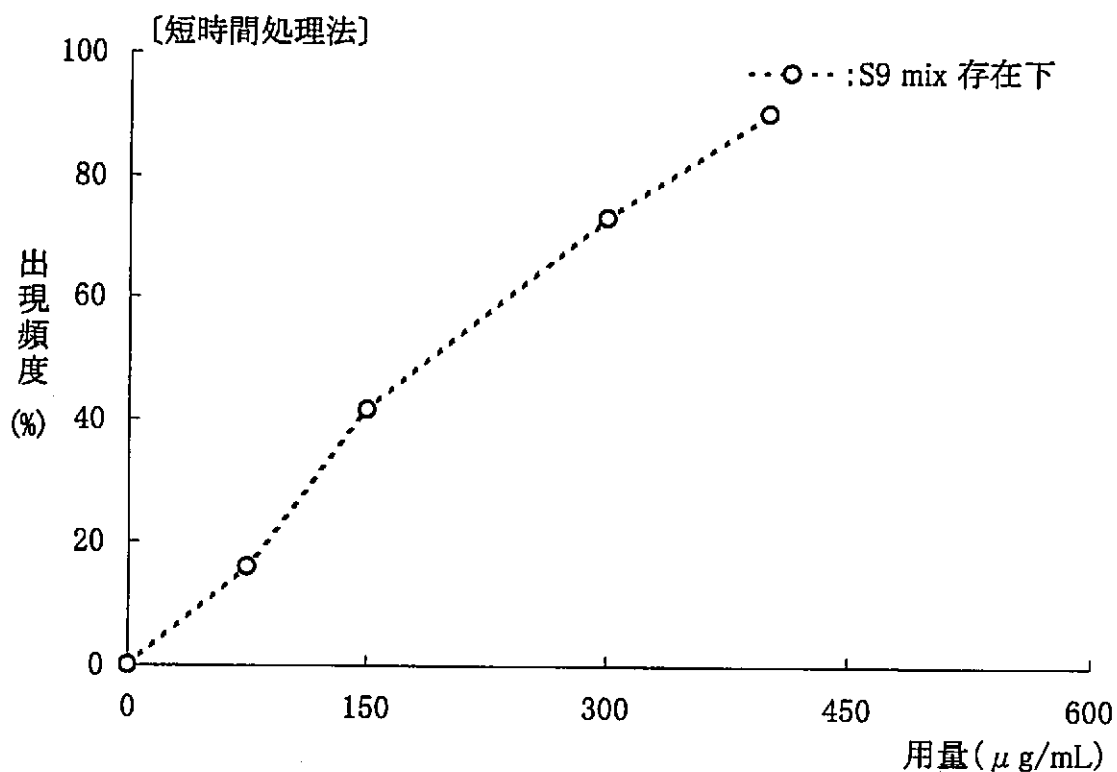
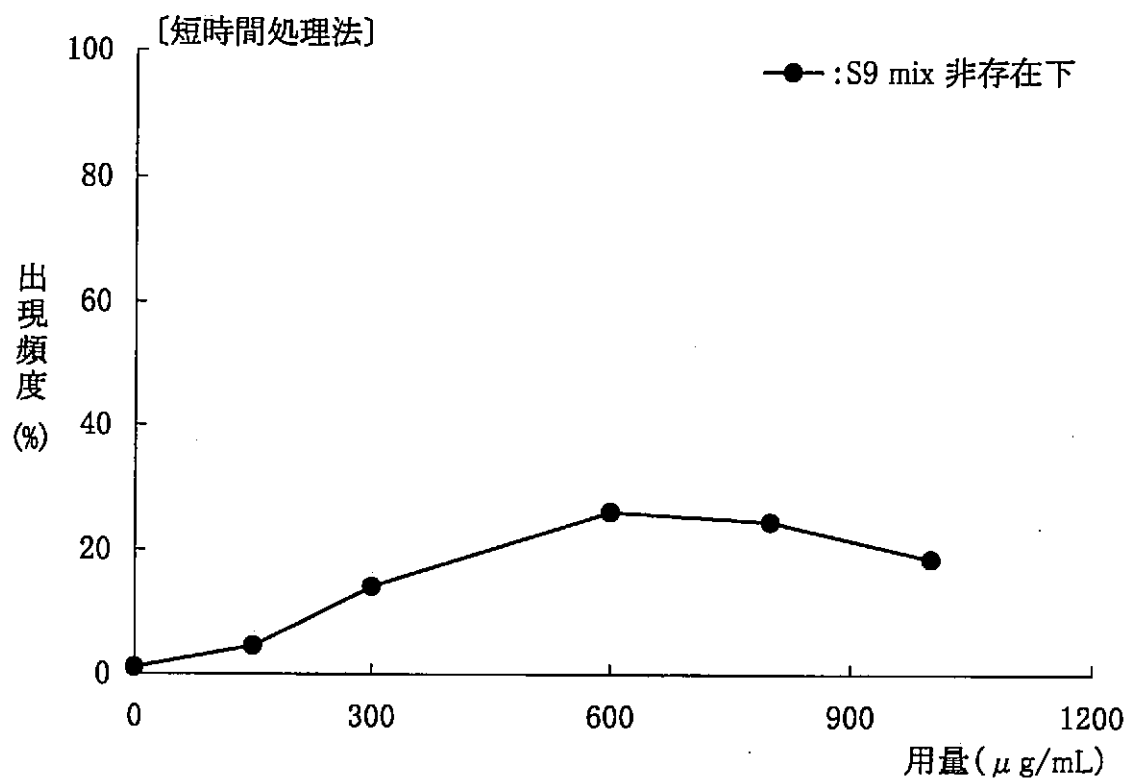


図 1-1 構造異常を有する細胞の出現頻度

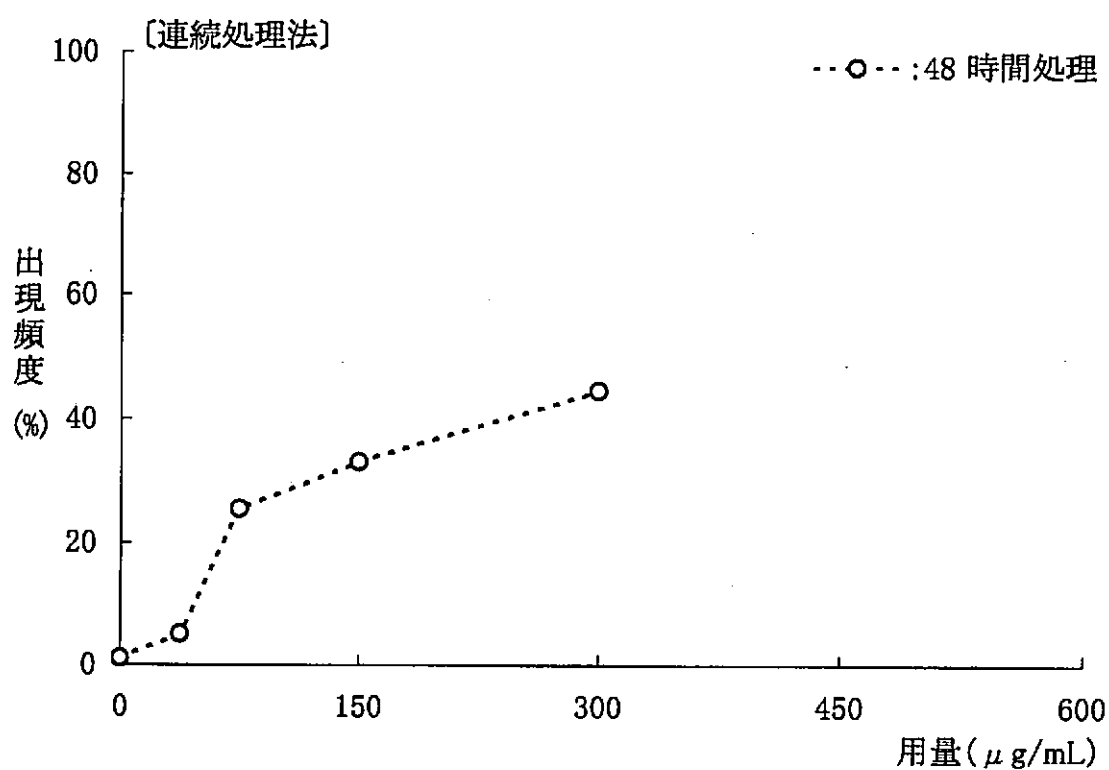
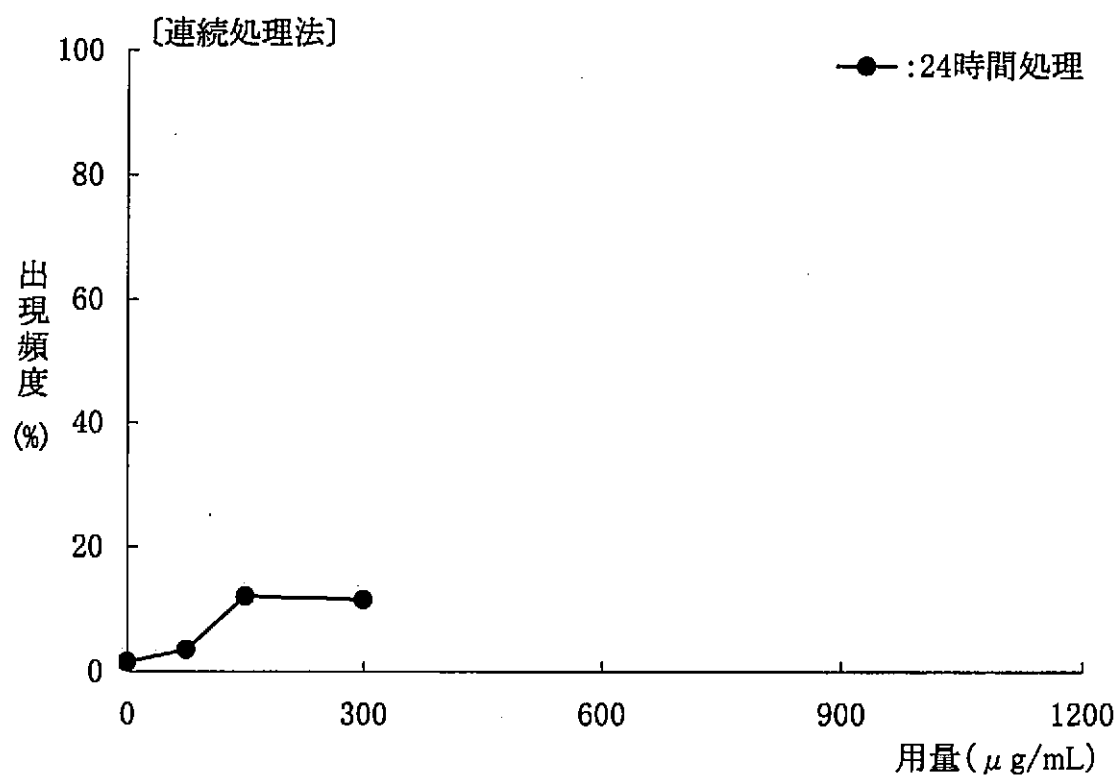


図 1-2 構造異常を有する細胞の出現頻度

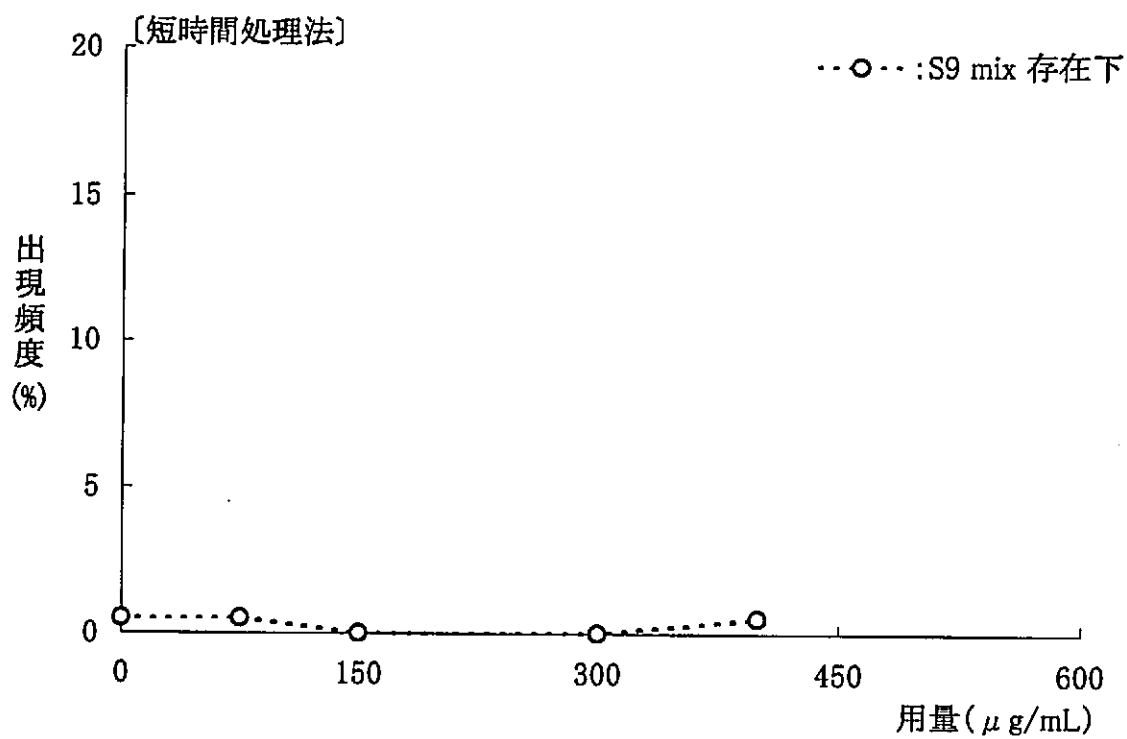
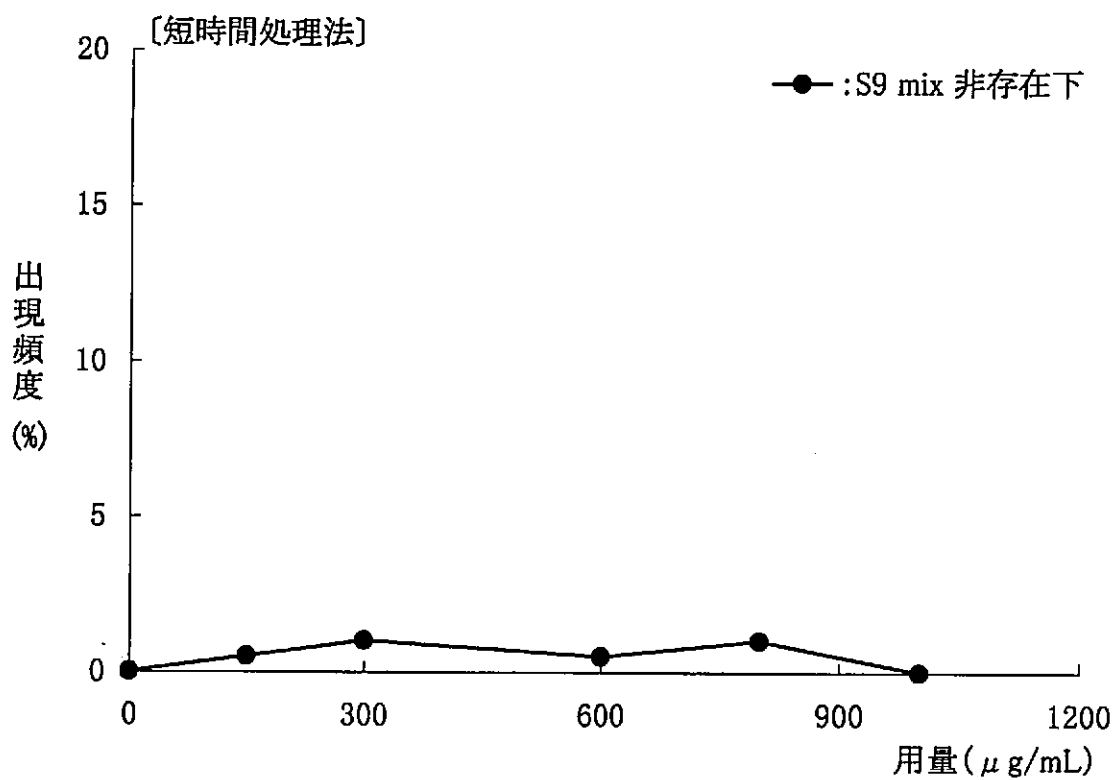


図 2-1 数的異常を有する細胞の出現頻度

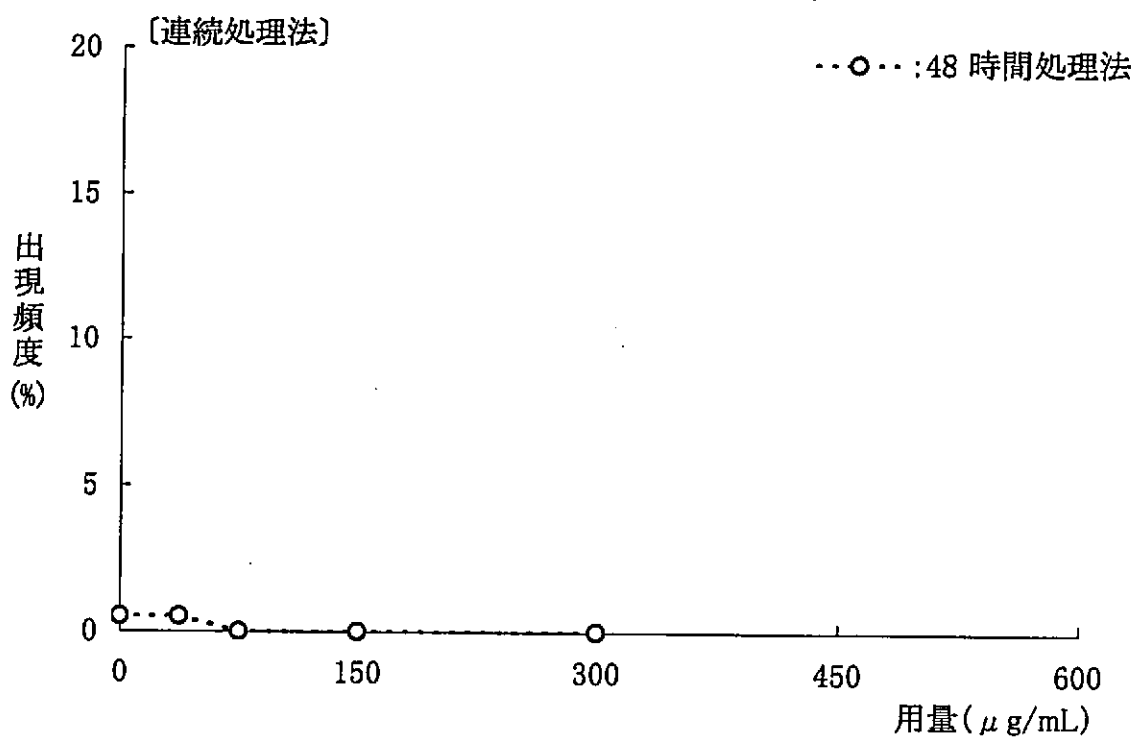
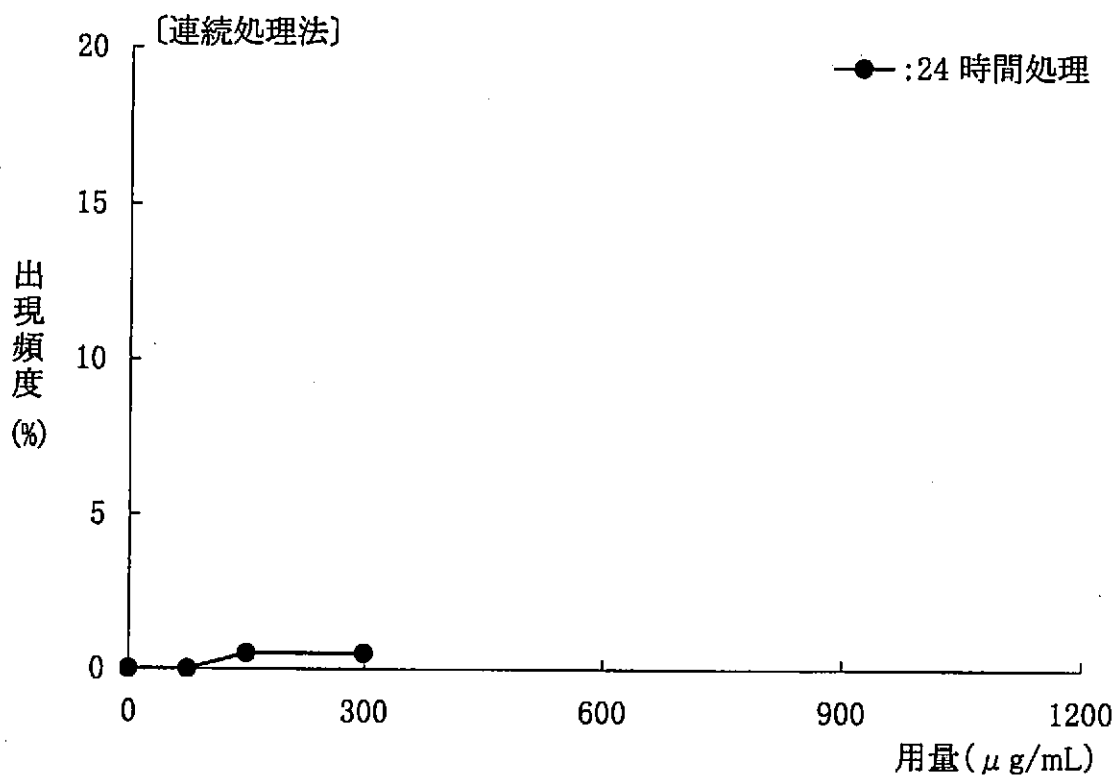


図 2-2 数的異常を有する細胞の出現頻度

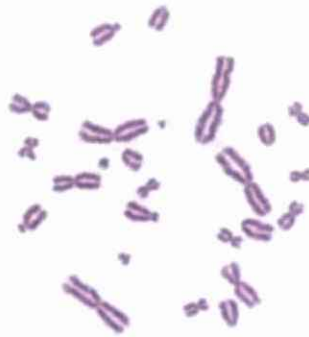


写真 1. 陰性対照群 (ジメチルスルホキシド), 短時間処理法 S9 mix 存在下,
分裂中期像 (ギムザ染色, $\times 960$)



写真 2. 被験物質群 (400 $\mu\text{g/mL}$), 短時間処理法 S9 mix 存在下,
染色分体型切断および交換がみられる分裂中期像
(ギムザ染色, $\times 960$)

ROBUST SUMMARY TEMPLATE

GENETIC TOXICITY IN VITRO (NON-BACTERIAL IN VIOTRO TEST)

TEST SUBSTANCE

2,4-Dimethylaniline (CAS No. 95-68-1)

Source : XXXXXXXXXX — purity : 99.1% ; Stability during use confirmed by GC.

METHOD

- Method/guideline : OECD Test Guidelines 473
- Test type : Chromosomal aberration test
- GLP : Yes (OECD)
- Year : 2002
- Species/Strain : Chinese hamster lung (CHL/IU) cells
- Metabolic activation : with and without S9 mix
- Statistical methods : Multi-sample χ^2 test at $p < 0.05$ and Fisher's exact test at $p < 0.05$ or $p < 0.01$

REMARKS FIELD FOR TEST CONDITIONS

- Study Design :
 - Concentration : without S9 mix (24 hr continuous treatment) :
0, 150, 300, 600, 800, 1000, 1200 $\mu\text{g/mL}$
without S9 mix (48 hr continuous treatment) :
0, 75, 150, 300, 400, 500, 600 $\mu\text{g/mL}$
without S9 mix (6 hr short-term treatment) :
0, 75, 150, 300, 600, 900, 1200 $\mu\text{g/mL}$
with S9 mix (6 hr short-term treatment) :
0, 37.5, 75, 150, 300, 450, 600 $\mu\text{g/mL}$
- Plates/test : 4 (2:Chromosome analysis, 2:Cell Growth rate)
- Solvent : dimethyl sulfoxide
- Positive controls : without S9 mix : 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine
with S9 mix : 3,4-Benzo[a]pyrene

RESULTS

- Cytotoxic concentration : Cytotoxicity was observed at 1200 $\mu\text{g/mL}$ without S9 mix and at 500 and 600 $\mu\text{g/mL}$ with S9 mix in 6 hr short-term treatment, and observed at 600, 900 and 1200 $\mu\text{g/mL}$ after 24 hr continuous treatment and at 450 and 600 $\mu\text{g/mL}$ after 48 hr continuous treatment without S9 mix.
- Genotoxic effects : positive in the short-term and continuous treatment with or without S9 mix

REMARKS FIELD FOR RESULTS

After 6 hr short-term treatment, structural chromosomal aberrations excluding gaps were induced at 300 $\mu\text{g/mL}$ (14.0%), 600 $\mu\text{g/mL}$ (26.0%), 800 $\mu\text{g/mL}$ (24.5%) and 1000 $\mu\text{g/mL}$ (18.5%) without S9 mix, and at 75 $\mu\text{g/mL}$ (16.0%), 150 $\mu\text{g/mL}$ (41.5%), 300 $\mu\text{g/mL}$ (73.0%) and 400 $\mu\text{g/mL}$ (90.0%) with S9 mix, respectively. Structural chromosomal aberrations excluding gaps were induced at 150 $\mu\text{g/mL}$ (12.0%) and 300 $\mu\text{g/mL}$ (11.5%) after 24 hr continuous treatment, and at 75 $\mu\text{g/mL}$ (25.5%), 150 $\mu\text{g/mL}$ (33.0%) and 300 $\mu\text{g/mL}$ (44.5%) after 48 hr continuous treatment without S9 mix, respectively.

D₂₀ value : 0.61 mg/mL (6 hr short-term treatment without S9 mix).

0.078 mg/mL (6 hr short-term treatment with S9 mix).

0.49 mg/mL (24 hr continuous treatment without S9 mix).

0.067 mg/mL (48 hr continuous treatment without S9 mix).

D₂₀ value is concentration (mg/mL) of the test substance where 20% of metaphases show structural chromosome aberrations.

CONCLUTIONS

This chemical induced structural chromosomal aberrations in CHL/IU cells after short-term and continuous treatment with or without metabolic activation.

DATA QUALITY

- Reliabilities : valid without restriction

REFERENCES (Free Text)

Ishidate, M.Jr. and odashima, S.(1977). Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro, a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48, 337-354.

Matsuoka, A. Hayashi, M. and Ishidate, M.Jr.(1979). Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro. *Mutation Research*, 66, 277-290.