2－ビニルピリジンの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：2711（ 115－052 ）

財　団　法　人
食　品　農　医　薬　品　安　全　性　評　価　セ　ン　タ　ー

目　　次

1.	要　　約	1 頁
2.	試　験　題　目	2
3	試　験　目　的	2
4.	試　験　番　号	2
9.	被　験　物　質	3
10.	試験材料および方法	5
11.	試　験　結　果	11
12.	考察および結論	13
13.	参考とした資料	14

Figures, Tables および Appendices

Figure 1	Dose-survival curves of 2-Vinylpyridine [direct method]	16
Figure 2	Dose-survival curves of 2-Vinylpyridine [activation method]	17
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by 2-Vinylpyridine [direct method : 24 hrs]	18
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by 2-Vinylpyridine [direct method : 48 hrs]	19
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by 2-Vinylpyridine [activation method : +S9]	20
Figure 6	Incidence of structural aberrations induced by 2-Vinylpyridine [activation method : -S9]	21
Table 1	Results of growth inhibition test on 2-Vinylpyridine [direct method]	22
Table 2	Results of growth inhibition test on 2-Vinylpyridine [activation method]	23
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Vinylpyridine [direct method : 24 hrs]	24
Table 4	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Vinylpyridine [direct method : 48 hrs]	25
Table 5	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Vinylpyridine [activation method : +S9]	26
Table 6	Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Vinylpyridine [activation method : -S9]	27

1. 要　　約：

本試験条件下の *in vitro* 試験系において，２－ビニルピリジンには染色体異常を誘起する作用があるものと判断した．

すなわち，２－ビニルピリジンの変異原性について，染色体異常誘発性の有無を検討するため，チャイニーズ・ハムスター肺線維芽細胞株（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を行った．
あらかじめ実施した細胞増殖抑制試験結果を基に，連続処理法24時間処理で 3.75，7.50，15.0 および 30.0μg/ml，同48時間処理で 1.88，3.75，7.50 および 15.0 μg/ml，短時間処理法+S9で 37.5，75.0，150 および 300μg/ml，同-S9で 15.0，30.0，60.0および 120μg/ml のそれぞれ４用量について染色体異常を観察した．
その結果，連続処理法ならびに短時間処理法のいずれにおいても染色体構造異常の明確な誘発傾向が観察された．
また，連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンＣ（MMC）および短時間処理法の陽性対照物質シクロホスファミド（CP）は，いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した．

2. 試　験　題　目：　２－ビニルピリジンの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試　験　目　的：　被験物質の *in vitro* における遺伝子突然変異誘発性を検討するため，環保業第237号，薬発第306号，62基局第303号（昭和62年３月31日）の「新規化学物質に係る試験の方法について」ならびにＯＥＣＤ化学品ガイドライン 473（1983年５月26日）に従って，哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した．
なお，試験の実施は環企研第233号，衛生第38号，63基局第823号（昭和63年11月18日）の「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第４条に規定する試験施設について」ならびにＯＥＣＤのＧＬＰ（1982年）の基準を満たすものとした．

4. 試　験　番　号：　２７１１（115－052）

9. 被　験　物　質：

1) 被験物質名　　２－ビニルピリジン

2) CAS No.　　１００－６９－６

3) ロット番号

4) 純　　度　　98.3%（その他，不純物として２－ピコリン 0.9%，２－エチルピリジン 0.4%および２－メチルビニルピリジン 0.4%を含む）

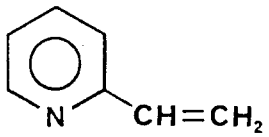
5) 製　造　元

6) 保管条件　　密封容器に入れ，－10℃以下の冷暗所に保管する．

7) 保管場所　　安評センター被験物質保管庫

8) 化　学　名　　2-Vinylpyridine

9) 構　造　式



10) 分　子　式　　C_7H_7N

11) 分　子　量　　105.14

12) 物質の状態　　液体

13) 色　　淡黄色

14) 臭　　特異臭

15) 沸　　点　　79～82℃／29 mmHg

16) 溶　解　性　　水にやや溶けにくい．
2.75 g/100 g (20℃)

17) 分配係数 (Octanol/Water)	1.54
18) 比　　重	0.976 (20℃)
19) 蒸 気 圧	10 mmHg (44.5℃)
20) 取り扱い上の注意	換気の良い場所で取り扱った．火気厳禁とした． 静電気対策としてアース取りを行った． 作業衣，作業靴は導電性のものを着用した． 皮膚，粘膜又は着衣に触れたり，目に入らないように適切な保護具を着用した．
21) 被験物質保管および 残余被験物質の処理	残余被験物質は全量保管した．

10. 試験材料および方法：

1) 試験細胞株

染色体異常試験において広く使用されていることから，試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株（ＣＨＬ細胞）を用いた．

ＣＨＬ細胞は昭和59年11月15日に国立衛生試験所から分与を受け，一部はジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；MERCK 社；独国，純度99.7％以上；Lot No. 027I126178 および K20471078 404）を容量比で 10％添加した後，液体窒素中に保存し，残りは３～５日ごとに継代した．

なお，染色体異常試験で継代数５の細胞を用いた．

2) 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（LIFE TECHNOLOGIES 社，米国；Lot No. 31P9051 および 12N6256）に，メンブランフィルター（0.45μm：CORNING 社，米国）を用いて加圧濾過除菌した非働化（56℃，30分）済みの仔牛血清（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 45K0525）を最終濃度で 10％になるよう添加した．

調製後の培養液を冷暗所（４℃）に保存した．

3) 培養条件

CO_2 インキュベーター（FORMA 社，米国あるいは三洋電機特機株式会社，大阪府守口市）を用い，CO_2 濃度５％，37℃の条件で細胞を培養した．

細胞増殖抑制試験では，細胞培養用マルチプレート（12ウエル：住友ベークライト）を使用し，染色体異常試験では，細胞培養用プレート（Φ60 mm：住友ベークライト）を使用した．

4) Ｓ９ｍｉｘ

キッコーマン株式会社（千葉県野田市）からＳ９ｍｉｘ（Lot No. CAM-331）を購入し，使用時まで超低温フリーザー（MDF-390AT；三洋電機特機株式会社）に－80℃で凍結保存した．製造後６ヵ月以内のＳ９ｍｉｘを使用した．

添付書類に記載してあるＳ９のロット番号，誘導物質，誘導方法等およびＳ９ｍｉｘの組成を以下に示した．

a.	ロット番号	ＲＡＡ－３３１
b.	製造日	平成７年７月27日
c.	使用動物	ラット： Sprague-Dawley 系
d.	性／週齢	雄／７週齢
e.	体重	184 ～ 213 g
f.	誘導物質	Phenobarbital (PB) & 5,6-Benzoflavone (BF)
g.	投与量および回数	PB: 30 mg/kg １回（１日目），60 mg/kg ３回（２～４日目） BF: 80 mg/kg １回（３日目）
h.	投与方法	腹腔内投与
i.	蛋白含量	26.7 mg/ml

成　分	S9mix 1ml 中の量
S9	0.3 ml
$MgCl_2$	5 μmol
KCl	33 μmol
G－6－P	5 μmol
NADP	4 μmol
HEPES緩衝液	4 μmol

5) 被験物質溶液の調製

被験物質を DMSO (Lot No. K21387978 513) に溶解させ調製原液とした．この調製原液を所定濃度に希釈した後，直ちに処理を行った．

6) 対照群

a. 溶媒対照

使用溶媒の DMSO を容量比 0.5%添加して試験した．

b. 陽性対照（連続処理法）

注射用水（株式会社　大塚製薬工場，徳島県鳴門市；Lot No. K5C77) 5 ml に溶解したマイトマイシンC（MMC：協和醗酵工業株式会社，東京都千代田区；Lot No. 015AEB) を生理食塩液（株式会社　大塚製薬工場；Lot No. K5C00) を用いて希釈した後，24時間処理で 0.05μg/ml，48時間処理で 0.025μg/ml の用量で試験した．

c. 陽性対照（短時間処理法）

注射用水（株式会社　大塚製薬工場）5 ml に溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社，大阪府大阪市；Lot No. 4024) を生理食塩液（株式会社　大塚製薬工場）を用いて希釈した後，12.5μg/ml の用量で試験した．

7) 予備試験（細胞増殖抑制試験）

a. 試験用量

予備的な試験を実施した結果を基に設定した細胞増殖抑制試験での試験用量を下表に示した．各試験それぞれ計８～９用量（公比 5/3) を設定した．

１用量当たり２ウエルを用いた．

試　験	用量数	試験用量 (μg/ml)
連続処理法24時間処理	8	16.8 ～ 600
連続処理法48時間処理	8	2.18 ～ 77.8
短時間処理法+S9処理	8	10.1 ～ 360
短時間処理法-S9処理	9	16.8 ～ 1000

b. 連続処理法

細胞培養用フラスコ（培養面積 25 cm^2：住友ベークライト株式会社，東京都千代田区）に24時間処理の場合，培養液を用いて８×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 5 ml を，48時間処理の場合，４×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 5 ml をそれぞれ播種した．培養３日後に，使用溶媒（以下溶媒）あるいは被験物質溶液 25μlを添加し，さらに24あるいは48時間培養を続けた後に細胞生存率（溶媒対照に対する比）を求めた．

c. 短時間処理法

培養液を用いて８×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 1 ml を各ウエルに播種した．培養３日後に +S9処理の場合，培養液 2.5 ml を除きＳ９ｍｉｘ 500μl，溶媒あるいは被験物質溶液 25μl を添加し，-S9処理の場合は，培養液 2 ml を除き溶媒あるいは被験物質溶液 15μl のみ添加した（Ｓ９ｍｉｘは添加しない）．６時間培養した後，各ウエルから培養液を除去し，生理食塩液を用いて細胞を洗浄した．培養液（500μl）を新鮮なものに交換し，さらに18時間培養を続けた後に細胞生存率を求めた．

d. 50％細胞増殖抑制濃度の算出

各フラスコから培養液を除き，生理食塩液を用いて細胞を１回洗浄した．組織固定用10％中性緩衝ホルマリン液（和光純薬工業株式会社，大阪府大阪市；Lot No. D1008）を加えて約10分間細胞を固定した後，0.1％クリスタル・バイオレット（関東化学株式会社，東京都中央区；Lot No. 607E4067）水溶液で10分間染色した．各フラスコを水洗した後，十分乾燥させた．その後，色素溶出液（30％エタノール，１％酢酸水溶液）を適量加え，５分間程度放置した後，分光光度計（105-50型；株式会社日立製作所，東京都港区）を用いて 580 nm での吸光度を測定した．溶媒対照群での吸光度に対する比（＝細胞生存率）を各群算出し，さらにプロビット法を用いて50％細胞増殖抑制濃度を算出した．

なお，算出には 16.8～46.7μg/ml の３点（連続処理法24時間処理），2.18～77.8μg/mlの８点（同48時間処理），77.8～360μg/ml の４点（短時間処理法+S9処理）および 77.8～216μg/ml の３点（同-S9処理）を用いた．

e. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1～2 および Table 1～2 に示した．

プロビット法を用いて算出した50％細胞増殖抑制濃度は，連続処理法24時間処理で 33.4μg/ml，同48時間処理で 7.90μg/ml，短時間処理法+S9処理で 147μg/ml ならびに同-S9処理で 109μg/ml と算出された．

なお，培養期間中，析出等の特筆すべき変化は観察されなかった．

8) 本試験（染色体異常試験）

a. 試験用量

本試験における試験用量を下表に示した.

細胞増殖抑制試験結果を基に，以下の５用量（公比２）を設定した.

１用量当たり，２フラスコを用いた.

試　験	試験用量（μg/ml）				
連続処理法24時間処理	3.75,	7.50,	15.0,	30.0,	60.0
連続処理法48時間処理	1.88,	3.75,	7.50,	15.0,	30.0
短時間処理法+S9処理	18.8,	37.5,	75.0,	150,	300
短時間処理法-S9処理	15.0,	30.0,	60.0,	120,	240

・下線を付した用量群について顕微鏡観察を実施した.

b. 連続処理法

細胞培養用フラスコ（培養面積 25 cm^2：住友ベークライト株式会社）に24時間処理の場合，培養液を用いて８×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 5 ml（４×10^4 細胞），48時間処理の場合，４×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 5 ml（２×10^4 細胞）を播種した．培養３日目に溶媒，被験物質溶液 25μl あるいは陽性対照物質溶液 500μl を加え，24および48時間培養を続けた後に染色体標本を作製した.

c. 短時間処理法

培養液を用いて８×10^3 細胞／mlに調製した細胞浮遊液 5 ml（４×10^4 細胞）をフラスコに播種した．培養３日目に +S9処理の場合，培養液 2.5 ml を除きＳ９ｍｉｘ 500μl，溶媒，被験物質溶液 15μl あるいは陽性対照物質溶液 300μl を添加し，-S9処理の場合は，培養液 2 ml を除き溶媒，被験物質溶液 15μl あるいは陽性対照物質溶液 300μl のみ添加した（Ｓ９ｍｉｘは添加しない）．６時間培養した後，各フラスコから培養液を除去し，生理食塩液を用いて細胞を洗浄した．新鮮な培養液 5 ml を加え，さらに18時間培養を続けた後に染色体標本を作製した.

d. 標本の作製

染色体標本作製の２時間前に，最終濃度で 0.2μg/ml，すなわち培養液 1 ml 当たり 20μl のコルセミド溶液（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 18P3150）を添加し，細胞分裂を中期で停止させた．次いで，培養液を遠心管に全量移した後，0.25％トリプシン溶液（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No.19K2942）を用いてプレートから細胞を剥離し，遠心管内の培養液に加えた．細胞懸濁液を 1000 r.p.m.で５分間遠心分離することにより上清の培養液を除いた後，あらかじめ37℃に保温しておいた 75 mM 塩化カリウム水溶液を約 5 ml 加え，37℃で20分程度低張処理を行った．遠心分離により低張液を除いた後，４℃に冷却した固定液（メタノール３容：酢酸１容）で細胞を固定した．固定液を３回新鮮なものに交換した後，新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし，脱脂洗浄済みのスライドガラス上に１～２滴ずつ滴下した．スライド標本を十分乾燥させ，1/100 Mナトリウム・リン酸緩衝液（pH 7.2：MERCK 社；Lot No. 322 S 601974）を用いて希釈した 1.2％ギムザ溶液で12分間染色した．スライドを軽く水洗した後，乾燥させた．

e. 染色体の観察

各フラスコあたり100個の分裂中期像を顕微鏡下（×600 程度）で観察し，染色体の形態的変化，すなわちギャップ（gap），染色分体切断（ctb），染色体切断（csb），染色分体交換（cte），染色体交換（cse）およびその他（oth）の構造異常に分類した．同時に，倍数性細胞の出現率を記録した．ただし，ギャップはその不連続部分（非染色性部位）が明確であり，当該染色体の分体幅と同程度以上，かつ本来の位置からずれていない場合にのみ計数した．なお，染色体構造異常の出現総数としてはギャップのみ保有する細胞を含めた場合と，含めない場合とに区別して表示した．
すべての標本をコード化した後，マスキング法で観察した．

9）結果の解析

構造異常のギャップのみ保有する細胞を異常細胞に含めた場合（+gap）と，含めない場合（-gap）とに区別して出現頻度を算出し，最終評価に際しては +gap での出現頻度を基に判定した．また，同一細胞に２種以上の異常型が出現した場合，それぞれの型の出現数を１個と記録した．
各試験群の構造異常を有する細胞ならびに倍数性細胞の出現頻度を，下記に示す基準を用いて判断し，さらに再現性あるいは用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した．
なお，統計学的手法を用いた検定は実施しなかった．

５％未満　　----　陰　性（－）
５％以上～10％未満　----　疑陽性（±）
10％以上　　----　陽　性（＋）

10) D_{20}値ならびにＴＲ値の算出法

D_{20}値は分裂中期像の20％にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であり，最小二乗法により算出した．

ＴＲ値は一定濃度（mg/ml）あたりの交換型異常（cte）出現数を示す比較値であり，染色分体交換の出現頻度（％）を被験物質濃度（mg/ml換算）で割ることにより算出した．

11. 試　験　結　果：

1) 連続処理法24時間処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 1 に示した.

溶媒対照における染色体構造異常を有する細胞の出現頻度は，ギャップのみ保有の細胞を含めた場合（+gap），含めない場合（-gap）いずれも 0.0%であり，倍数性細胞の出現頻度についても 0.5%であった.

２－ビニルピリジンを 3.75, 7.50 および 15.0μg/ml で処理した場合の染色体構造異常出現頻度は，+gapで 6.0, 13.5 および 61.5%，-gapで 3.0, 8.0 および 54.0%であった．倍数性細胞の出現頻度はいずれの処理群とも 3.0%以下であった.

なお，最高用量の 30.0μg/ml では被験物質２－ビニルピリジンの影響により分裂像の多くが細紛化（pulverization）を呈していた.

一方，陽性対照物質（MMC）で処理した細胞は，ギャップ（gap），染色分体切断（ctb）あるいは染色分体交換（cte）などの異常が多数観察され，その出現頻度は +gap で 53.5%と顕著な増加を示した.

2) 連続処理法48時間処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 2 に示した.

溶媒対照での構造異常出現頻度は +gap, -gap いずれも 0.0%であり，倍数性細胞の出現頻度についても 0.0%であった.

２－ビニルピリジン処理群での構造異常出現頻度は 1.88, 3.75 および 7.50μg/ml 処理でそれぞれ 1.5, 5.0 および 17.5%（+gap），-gap でも同程度であった．倍数性細胞の出現頻度は各群とも 0.5%であった.

なお，最高用量の 15.0μg/ml では被験物質の影響により分裂像の多くが細紛化を呈していた.

陽性対照では構造異常細胞が +gap で 50.5%出現した.

3) 短時間処理法＋Ｓ９処理

試験結果を Figure 5, Table 5 および Appendix 3 に示した.

溶媒対照での構造異常出現頻度は，+gap, -gap いずれも 0.0%，倍数性細胞の出現頻度についても 0.0%であった.

２－ビニルピリジンを 37.5, 75.0 および 150μg/ml で処理した場合の構造異常出現頻度は，+gap で 3.0, 7.5 および 64.0%，-gap でもほぼ同様の出現頻度であった．倍数性細胞については，いずれの処理群とも 0.5%であった.

なお，最高用量の 300μg/ml 処理では生存細胞はほとんど観察されなかった.

また，代謝活性化を必要とする陽性対照物質 CP で処理した細胞では，多数の異常が出現し，+gapで 51.5%の細胞に構造異常が認められた.

4) 短時間処理法－Ｓ９処理

試験結果を Figure 6, Table 6 および Appendix 4 に示した.

溶媒対照での構造異常出現頻度は +gap, -gap いずれも 0.5%であり，倍数性細胞の出現頻度も 0.5%であった.

２－ビニルピリジン処理群における構造異常出現頻度は 15.0, 30.0 および 60.0 μg/ml 処理でそれぞれ 5.5, 11.5 および 61.0% (+gap) を示した. また，倍数性細胞の出現頻度は各処理群とも 2.0%以下であった.

なお，最高用量の 120μg/ml 処理では生存細胞はほとんど観察されなかった.

一方， CP で処理した群では代謝活性化が行われないため，染色体異常の明確な誘発は認められなかった.

上記 1) ～4) の各試験系において，培養期間中析出等の特筆すべき変化は観察されなかった.

また，上記の結果から算出したD_{20}値ならびにＴＲ値は次の通りであった.

試　験　系	D_{20}値 (mg/ml)	ＴＲ値
連続処理法24時間処理	0.00557	2000
連続処理法48時間処理	0.00910	1667
短時間処理法+S9処理	0.0586	277
短時間処理法-S9処理	0.0227	550

12. 考察および結論：

２－ビニルピリジンの変異原性，すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため，培養細胞（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した．
細胞増殖抑制試験結果を基に連続処理法ならびに短時間処理法において，細胞の増殖が抑制される濃度まで検討した．
その結果，連続処理法ならびに短時間処理法の各試験系において，用量に依存した染色体構造異常の明確な誘発傾向が観察された．
また，変異原性の強さに関する相対的比較値であるD_{20}値およびＴＲ値はそれぞれ0.00557（mg/ml）および2000と算出され，既知変異原性物質に比較して２－ビニルピリジンの変異原性が中等度であることを示していた．
一方，溶媒対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当センターの背景データの範囲内であり，本試験は適切な条件でなされたと判断された．

以上の試験結果から，本試験条件下において２－ビニルピリジンの哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した．

13. 参考とした資料：

・Ishidate, M., Jr., and Odashima, S. : Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* -A screening for chemical carcinogens. Mut. Res., 48 : 337～354, 1977.

・石館　基：　培養細胞を用いる染色体異常の検出法，組織培養，5 : 115～122, 1979.

・Evans, H. J. : Cytological methods of detecting chemical mutagens. In A. Hollander (Ed.), Chemical Mutagens, Vol. 4 : 1～25, Plenum, New York. 1976.

・Matsuoka, A., *et al*.: Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. Mut. Res., 277～290, 1979.

・石館　基　監修：　染色体異常試験データ集，リアライズ，東京，1983.

・Evans, H. J. and O' Riordan, M. L. : Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests, Mut. Res., 31 : 135～148, 1975.

・Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research. Toxicol. Appl. Pharmacol., 22, 269～275. 1972.

Exp. No. 2711 (115-052)

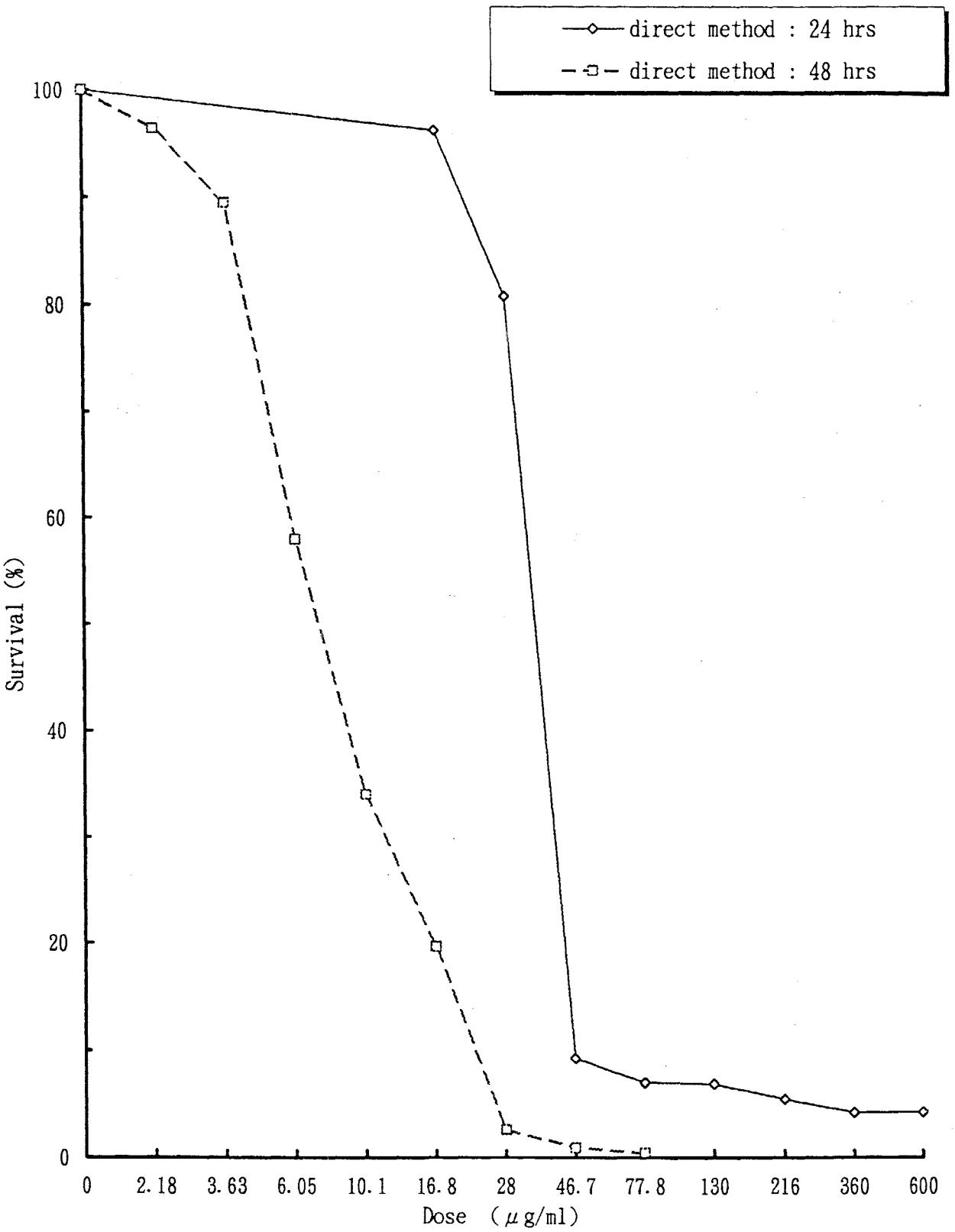


Figure 1. Dose-survival curves of 2-Vinylpyridine
[direct method]

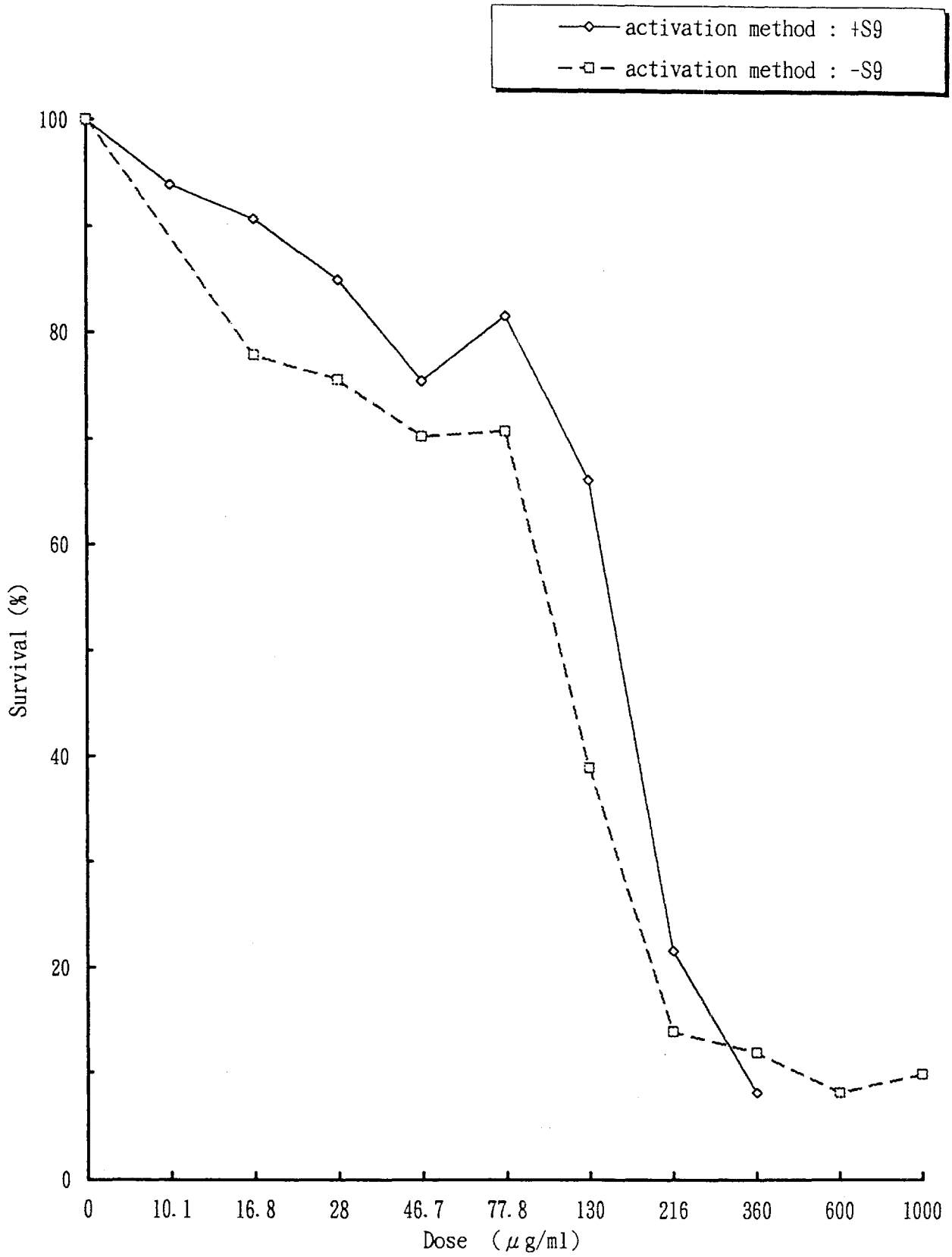


Figure 2. Dose-survival curves of 2-Vinylpyridine
[activation method]

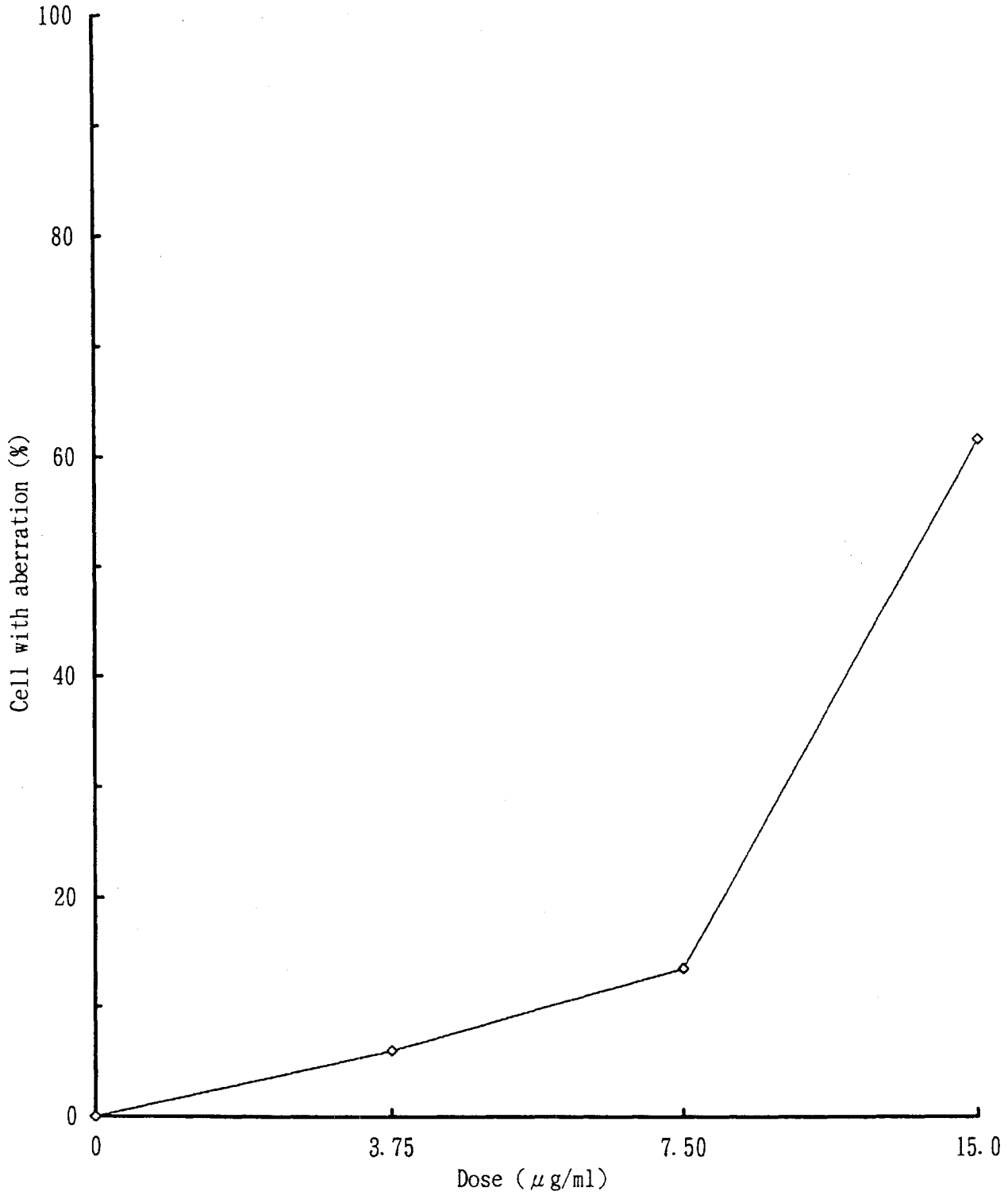


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by 2-Vinylpyridine [direct method : 24 hrs]

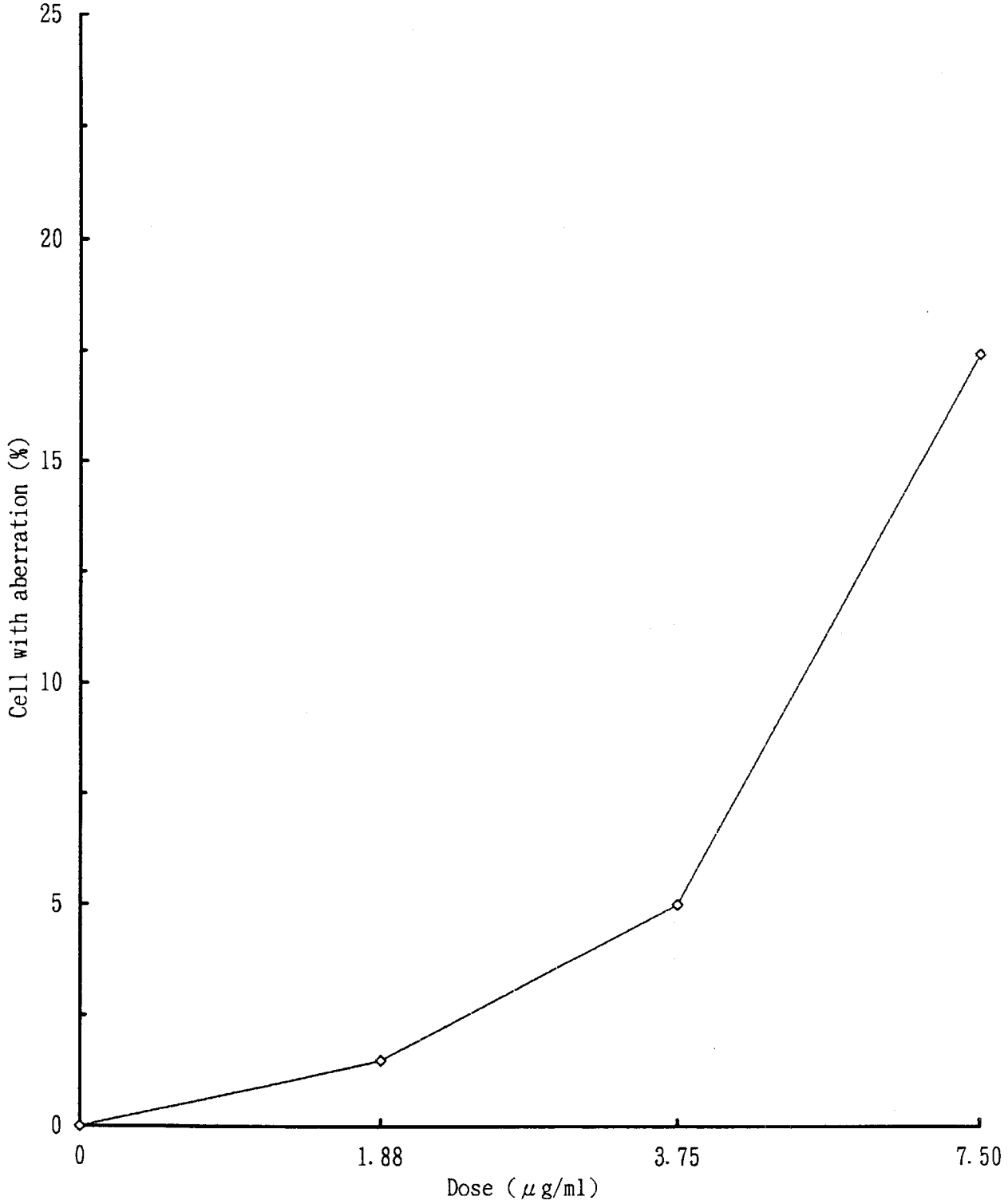


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by 2-Vinylpyridine [direct method : 48 hrs]

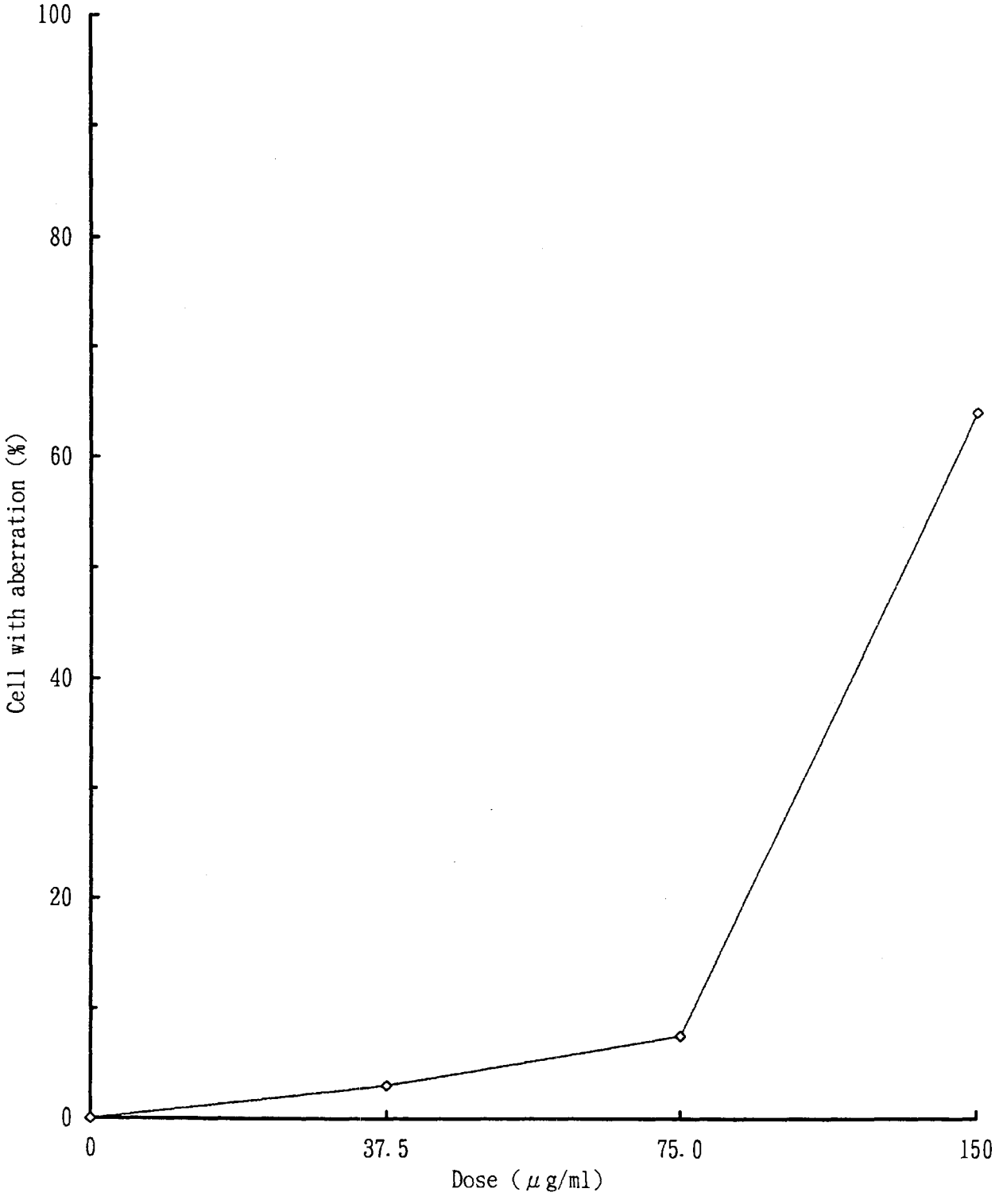


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by 2-Vinylpyridine [activation method : +S9]

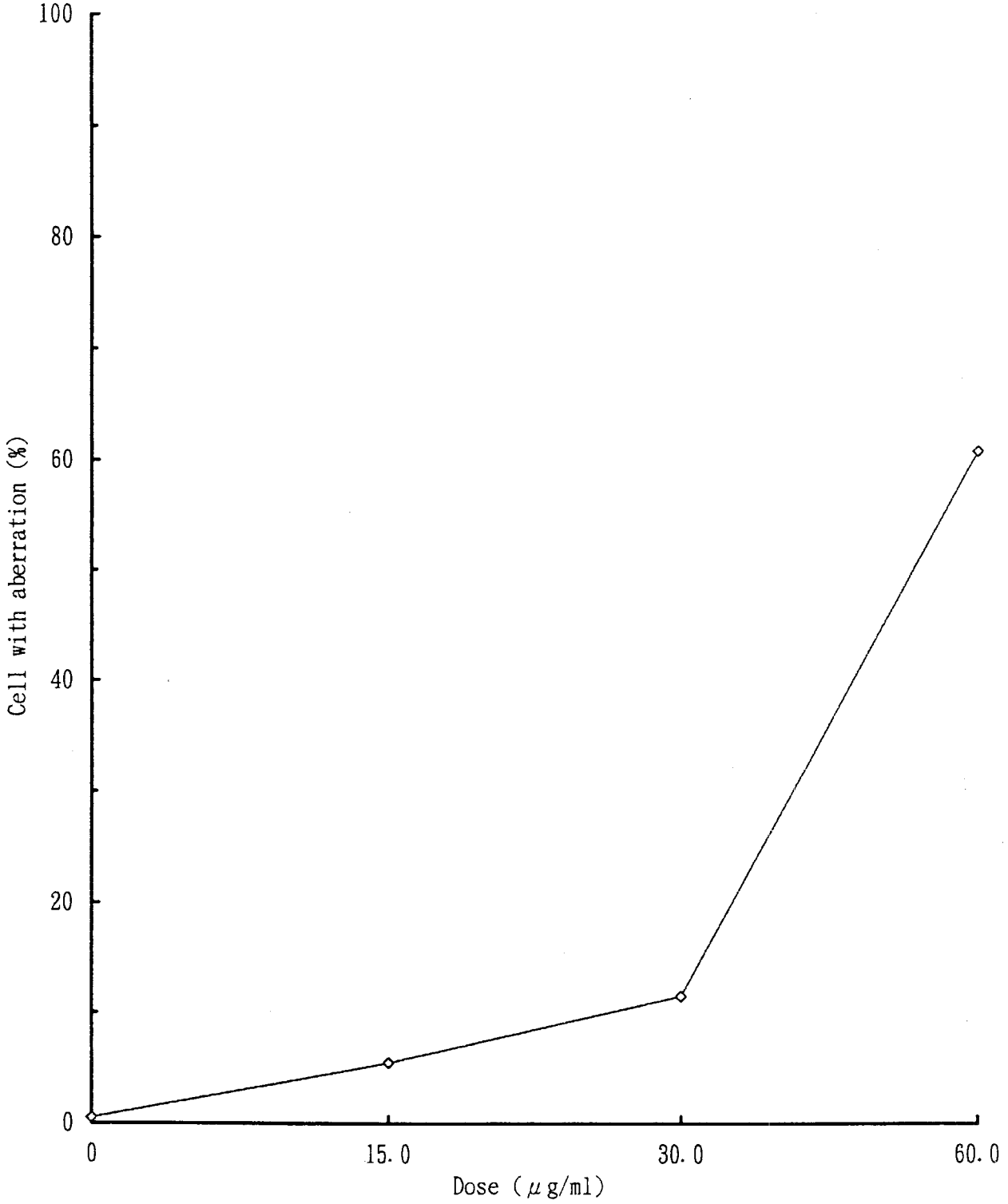


Figure 6. Incidence of structural aberrations induced by 2-Vinylpyridine [activation method : -S9]

Table 1. Results of growth inhibition test on 2-Vinylpyridine [direct method]

[direct method : 24 hrs]			
Compound	Dose (μg/ml)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100	[100.0]
2-Vinylpyridine	16.8	96 96	[96.1]
	28.0	80 81	[80.7]
	46.7	10 8	[9.3]
	77.8	6 8	[7.0]
	130	6 8	[6.9]
	216	6 5	[5.5]
	360	5 4	[4.2]
	600	4 4	[4.3]

[direct method : 48 hrs]			
Compound	Dose (μg/ml)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100	[100.0]
2-Vinylpyridine	2.18	97 96	[96.4]
	3.63	88 91	[89.4]
	6.05	61 55	[58.0]
	10.1	32 36	[34.0]
	16.8	20 19	[19.7]
	28.0	3 3	[2.6]
	46.7	1 1	[0.9]
	77.8	0 1	[0.4]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[direct method : 24 hrs] ——— 2-Vinylpyridine 33.4 (μg/ml)
[direct method : 48 hrs] ——— 2-Vinylpyridine 7.90 (μg/ml)

a) : Solvent control

Exp. No. 2711 (115-052)

Table 2. Results of growth inhibition test on 2-Vinylpyridine [activation method]

[activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/ml)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100	[100.0]
2-Vinylpyridine	10.1	91 96	[93.9]
	16.8	88 93	[90.7]
	28.0	84 86	[85.0]
	46.7	82 69	[75.5]
	77.8	79 84	[81.7]
	130	65 67	[66.2]
	216	22 21	[21.6]
	360	10 7	[8.1]

[activation method : -S9]

Compound	Dose (μg/ml)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100	[100.0]
2-Vinylpyridine	16.8	82 74	[77.8]
	28.0	78 73	[75.6]
	46.7	71 70	[70.3]
	77.8	72 70	[70.8]
	130	43 35	[39.0]
	216	12 16	[13.9]
	360	11 13	[11.9]
	600	9 7	[8.2]
	1000	10 9	[9.9]

50% Growth inhibition dose was as follows:
[activation method : +S9] ——— 2-Vinylpyridine 147 (μg/ml)
[activation method : -S9] ——— 2-Vinylpyridine 109 (μg/ml)

a): Solvent control

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Vinylpyridine [direct method : 24 hrs]

Exp. No. 2711 (115-052)

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 −	0.0 −	0.5 −	−
2-Vinylpyridine	3.75	200	6	4	2	0	0	0	6.0 ±	3.0 −	3.0 −	±
	7.50	200	16	13	6	0	0	0	13.5 +	8.0 ±	0.5 −	+
	15.0	200	53	75	60	0	0	11	61.5 +	54.0 +	1.5 −	+
	30.0	Toxic										
MMC b)	0.05	200	19	57	71	0	0	0	53.5 +	49.5 +	1.0 −	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Solvent control
b): Positive control (Mitomycin C)

Table 4. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Vinylpyridine [direct method : 48 hrs]

Exp. No. 2711 (115-052)

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 −	0.0 −	0.0 −	−
2-Vinylpyridine	1.88	200	2	2	2	0	0	0	1.5 −	1.0 −	0.5 −	−
	3.75	200	7	4	3	0	0	0	5.0 ±	3.0 −	0.5 −	±
	7.50	200	16	17	25	0	0	1	17.5 +	14.5 +	0.5 −	+
	15.0	Toxic										
MMC b)	0.025	200	16	44	70	0	1	0	50.5 +	46.0 +	0.5 −	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a) : Solvent control
b) : Positive control (Mitomycin C)

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Vinylpyridine [activation method : +S9]

Exp. No. 2711 (115-052)

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 −	0.0 −	0.0 −	−
2-Vinylpyridine	37.5	200	0	1	6	0	0	0	3.0 −	3.0 −	0.5 −	−
	75.0	200	3	4	11	0	0	1	7.5 ±	7.0 ±	0.5 −	±
	150	200	46	74	83	0	0	7	64.0 +	58.0 +	0.5 −	+
	300	Toxic										
CP b)	12.5	200	19	43	88	0	1	0	51.5 +	49.5 +	1.0 −	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Solvent control
b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 6. Chromosome aberration test on CHL cells treated with 2-Vinylpyridine [activation method : -S9]

Exp. No. 2711 (115-052)

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	200	0	1	0	0	0	0	0.5 −	0.5 −	0.5 −	−
2-Vinylpyridine	15.0	200	7	3	1	0	1	0	5.5 ±	2.0 −	1.5 −	±
	30.0	200	15	11	6	1	0	0	11.5 +	8.0 ±	1.5 −	+
	60.0	200	54	81	66	0	0	3	61.0 +	52.0 +	2.0 −	+
	120	Toxic										
CP b)	12.5	200	0	4	1	0	0	0	2.5 −	2.5 −	0.5 −	−

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Solvent control
b): Positive control (Cyclophosphamide)