

2004年10月27日

2-(ジ- α -プロピルアミノ)エタノールの
チャイニーズ・ハムスター培養細胞を
用いる染色体異常試験

厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室 委託

財団法人 食品薬品安全センター
秦野研究所

[目 次]

	頁
要 約	1
試験目的	2
材料および方法	2
1. 被験物質	2
2. 陽性対照物質	2
3. 細胞および培養条件	3
4. S9 反応液	3
5. 被験物質調製液の調製	3
6. 細胞増殖抑制試験	4
7. 染色体異常試験	4
8. 染色体分析	5
結果および考察	6
参考文献	8
Table 1	9
Table 2	10
Fig. 1	11

[要 約]

2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールのチャイニーズ・ハムスター肺由来細胞 (CHL/IU 細胞) を用いる染色体異常試験を実施し、陽性の結果を得た。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理 (6 時間処理後 18 時間の回復時間) した場合、濃度に依存して増殖率が低下し、50%の増殖抑制濃度はそれぞれ 0.94 mg/mL および 0.67 mg/mL と推定された。また、24 時間連続処理 (S9 mix 非存在下) した場合、50%の増殖抑制濃度は 0.29 mg/mL と推定された。

これらの結果に基づき、S9 mix 非存在下の短時間処理では 1.7 mg/mL (10 mmol/L) の濃度を最高処理濃度とし、5 段階の濃度群 (0.11、0.21、0.43、0.85、1.7 mg/mL、公比 2) を設定し、S9 mix 存在下の短時間処理では 50%の増殖抑制濃度の約 2 倍に相当する 1.3 mg/mL の濃度を最高処理濃度とし、5 段階の濃度群 (0.081、0.16、0.33、0.65、1.3 mg/mL、公比 2) を設定して染色体異常試験を実施した。

細胞増殖率の測定および分裂指数の分析結果を基に、染色体分析を行う濃度群 (S9 mix 非存在下:0.43、0.85、1.7 mg/mL、S9 mix 存在下:0.16、0.33、0.65、1.3 mg/mL) を決定し、染色体分析を実施した。その結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した高濃度群において、染色体の構造異常を有する細胞 (出現率:23.5%) の統計学的な有意差が認められた。また、中濃度群および高濃度群では倍数性細胞 (出現率:それぞれ 4.3%および 2.3%) の統計学的な有意差が認められた。S9 mix 存在下で短時間処理した場合においても、最低濃度を除く 3 濃度群で濃度に依存して構造異常を有する細胞が誘発された (出現率:7.0~96.0%)。また、0.33 mg/mL の濃度群でのみ倍数性細胞 (出現率:13.5%) の統計学的な有意差が認められた。

以上の結果より、2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールは、本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

[試験目的]

OECD 既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノールの染色体異常誘発作用を評価するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来細胞 (CHL/IU 細胞) を用いる染色体異常試験を実施した。なお、本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(昭和 62 年 3 月 31 日、環保業第 237 号、薬発第 306 号、62 基局第 303 号、一部改正平成 9 年 10 月 31 日、環保安第 287 号、衛生第 127 号、平成 09・10・31 基局第 2 号) および「OECD 化学物質試験法ガイドライン 473/ほ乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験」(1997 年 7 月 21 日採択) に基づき、「化学物質 GLP」(平成 12 年 3 月 1 日改正、環保安第 41 号、生衛発第 268 号、平成 12・02・14 基局第 1 号) を遵守して実施した。

[材料および方法]

1. 被験物質

被験物質である 2-(ジ-*n*-ブチルアミノ)エタノール [略称:DBAE、別名:*N,N*-ジ-*n*-ブチルエタノールアミン、英名:2-(di-*n*-butylamino)ethanol、CAS No.:102-81-8、分子量:173.30、ロット番号:、純度:99.8% (GC)] は弱いアミン臭のあるうすい黄色澄明の液体であり、から購入した後、密閉して遮光下で室温保管した。被験物質の物理化学的性状等を Appendix 1 に示す。また、被験物質は実験期間中安定であったことが被験物質提供者において確認された。

なお、被験物質に関する資料(非 GLP データ)は、被験物質提供者の責任に基づき確認、提供された資料であることから、試験結果の信頼性を損なうものではないと判断した。

2. 陽性対照物質

陽性対照物質として用いたマイトマイシン C (MMC、ロット番号:353AJJ、協和醗酵工業) およびシクロホスファミド (CP、ロット番号:108H0568、Sigma Chemical) を日局注射用水 (ロット番号:K2I79、大塚製薬工場) に溶かし、用時調製して試験に用いた。

3. 細胞および培養条件

CHL/IU 細胞は染色体数のモードは 25 本で、染色体異常の検出感度にすぐれていることから、染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手 (1988 年 2 月入手、入手時の継代数 4) し、継代後、液体窒素 (-196°C) 中に凍結保存 (凍結保存時の継代数 23) した。その細胞 (倍加時間約 15 時間、マイコプラズマの汚染なし) を、解凍後、継代 10 代で試験に用いた。

培養には、仔牛血清 (CS、ロット番号:18060874、Cansera International) を 10 vol% 添加したイーグル MEM 培養液 (10%CS/MEM) を用い、CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37°C) 内で培養した。イーグル MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」^① 粉末 (日水製薬) を処方に従って調製したものをを用いた。

4. S9 反応液

S9 (ロット番号:RAA-472、2002 年 10 月製造、キッコーマン) は、フェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボンを投与した 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットの肝臓から調製したものを購入し、使用時まで超低温槽 (-80°C) に保管した。グルコース-6-リン酸 (G-6-P、Sigma Chemical)、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (β-NADP⁺、オリエンタル酵母工業) および KCl を蒸留水に溶かし、混合液として超低温槽 (-80°C) に保管し、使用時はこれに S9、MgCl₂ および HEPES (pH 7.2) を加え、S9 mix とした。試験には、10%CS/MEM:S9 mix を 25:5 の割合で混和した S9 反応液 (3 mL/ディッシュ) を加えて処理を行った (各成分の最終濃度:5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-NADP⁺、0.83 mmol/L MgCl₂、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性および懸濁性の予備検討の結果、被験物質は水に不溶で、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解したことから、DMSO (ロット番号: DWL9370、和光純薬工業) を溶媒 (陰性対照) とし試験に用いた。被験物質を所定量秤量し、溶媒に溶解させて原液 (細胞増殖抑制試験および染色体異常試験とも 170 mg/mL) を用時調製した。それを溶媒で希釈して種々の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を 1 vol% 添加して処理を行った。なお、被験物質を溶媒に溶解させた際、発熱、発泡、変色などの変化はなかった。

6. 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖におよぼす影響を調べた。CHL/IU 細胞を、0.25%トリプシンを用いてはがした後、 4×10^3 個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL (2×10^4 個) をディッシュ (直径 6 cm) に播種した。培養開始 3 日目に、以下の手順で短時間処理および連続処理を行った。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理する場合、各ディッシュの培養液をそれぞれ 10%CS/MEM および S9 反応液 (3 mL/ディッシュ) と交換した後、溶媒 (陰性対照) または各濃度の被験物質調製液 (30 μ L) を各ディッシュに添加し 6 時間処理した。その後、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を含む) で洗浄し、10%CS/MEM (5 mL/ディッシュ) でさらに 18 時間培養した。また、連続処理する場合には、各ディッシュの培養液を 10%CS/MEM (5 mL/ディッシュ) と交換した後、溶媒 (陰性対照) または各濃度の被験物質調製液 (50 μ L) を各ディッシュに添加し 24 時間処理した。

いずれの処理条件においても、1.7 mg/mL (10 mmol/L) を最高処理濃度とし、0.013 ~ 1.7 mg/mL の濃度範囲 (公比 2) で処理を行った。各群 2 枚のディッシュを用いた。なお、処理開始時および処理終了時ともに沈殿は認められなかったが、0.21 mg/mL 以上の濃度では被験物質調製液を添加すると培養液の色が赤紫色に変化した。しかし、処理終了時には培養液の色の変化は認められなかった。

培養終了後、10 vol%ホルマリン溶液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層培養細胞密度計 (Monocellater™、オリンパス光学工業) を用い、陰性 (溶媒) 対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測した。

7. 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験において、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合、濃度に依存して増殖率の低下が認められ、50%の増殖抑制濃度はそれぞれ 0.94 mg/mL および 0.67 mg/mL と推定された (Fig. 1)。また、24 時間連続処理した場合、50%の増殖抑制濃度は 0.29 mg/mL と推定された (Fig. 1)。

このことから染色体異常試験において、S9 mix 非存在下の短時間処理群では 10 mmol/L の濃度である 1.7 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 2 で計 5 濃度設定し、S9 mix 存在下の短時間処理群では 50%の増殖抑制濃度の約 2 倍に相当する 1.3 mg/mL を最高処理濃度とし、公比 2 で計 5 濃度設定して染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験においては1濃度あたり4枚のディッシュ（陽性対照群では2枚）を用い、そのうちの2枚より染色体標本を作製し、別の2枚については単層培養細胞密度計により細胞増殖率を測定した。試験操作は、細胞増殖抑制試験とほぼ同様に行った。すべての処理系列で被験物質処理群、陰性（溶媒）対照群と陽性対照群を設けた。陽性対照群については、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では、MMC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および CP (1 mg/mL) を最終濃度がそれぞれ 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。

染色体標本用のディッシュについては、培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。培養終了後、培養液を捨て、0.02%EDTA 含有 PBS (Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含) をディッシュあたり 5 mL 加えて細胞をはがし、15 mL の遠沈管に移したのち、遠沈 (1000~1500 rpm、約 5 分) し、上清を捨て、3 mL の 0.075 mol/L KCl 水溶液を加え、約 30 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 (メタノール:氷酢酸 = 3:1 (v/v)) を低張液の約 2 倍量加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作を数回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、その少量をスライドガラス (あらかじめフロスト部分に試験系識別番号、コード番号およびスライド番号を記入) 上に滴下し、そのまま風乾した。1 ディッシュあたり 6 枚のスライド標本を作製した。

作製したスライド標本を 3 vol%ギムザ液 (pH 6.8 の 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈調製) で染色後、水ですすいで風乾した。試験計画番号、試験系識別番号および標本作製の日付を明示したスライドケースに、スライド標本をコード番号順に入れて保存した。

8. 染色体分析

染色体分析に先立って、各処理系列の相対増殖率および分裂指数を調べ、20%以上の相対増殖率で、かつ 2 ディッシュともに 0.5%以上の分裂指数の場合を観察可能と判断した。

ディッシュ 1 枚から得られたスライド標本 4 枚を、4 人の観察者がそれぞれ処理条件が分からない状態で分析した。染色体がよく拡がり、かつ散逸していない分裂中期細胞を捜し、1 群あたり 200 個 (100 細胞/ディッシュ) の分裂中期細胞について構造異常の種

類と数を、1 群あたり 800 個 (400 細胞/ディッシュ) の分裂中期細胞について倍数性細胞 (染色体数が 38 本以上) の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。ギャップを除く染色体異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会¹⁾による分類法に基づいて行った。ギャップについては、染色体分体幅よりも狭い非染色性部位と定義し、構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

構造異常 (ギャップを除く) を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性 (溶媒) 対照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法²⁾ ($p < 0.01$ 、片側) により有意差検定を実施した。また、コ克蘭・アーミテッジの傾向性検定³⁾ ($p < 0.01$ 、片側) により用量依存性の有無を検討した。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を行った。

[結果および考察]

細胞増殖抑制試験の結果より、公比 2 で 5 濃度 (S9 mix 非存在下: 0.11、0.21、0.43、0.85、1.7 mg/mL、S9 mix 存在下: 0.081、0.16、0.33、0.65、1.3 mg/mL) 設定し、短時間処理法による試験を実施した。

細胞増殖率の測定および分裂指数の分析を行った結果 (Tables 1、2)、染色体分析が可能な最高濃度 (20%以上の増殖率でかつ 0.5%以上の分裂指数を示した濃度) は、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ともに設定した最高濃度であった。従って、S9 mix 非存在下の短時間処理群については最高濃度を含め以下 3 濃度群を観察対象とした。一方、S9 mix 存在下の短時間処理群については最高濃度群では細胞毒性のた

め分析可能な分裂中期像が少ないことから、最高濃度を含め以下4濃度群を観察対象とした。染色体分析を行った結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合、構造異常を有する細胞については、高濃度群で統計学的に有意に増加（出現率:23.5%）し、陽性の結果が得られた（Table 1）。また、倍数性細胞については中濃度群および高濃度群で統計学的に有意に増加（出現率はそれぞれ 4.3%および 2.3%で）し、陽性の結果が得られた（Table 1）。また、S9 mix 存在下で短時間処理した場合には、濃度に依存して構造異常を有する細胞が増加（出現率:2.5%~96.0%）し、陽性の結果が得られた（Table 2）。また、倍数性細胞については、0.33 mg/mL の濃度群で統計学的に有意な増加（出現率:13.5%）が認められた（Table 2）。濃度依存性は認められなかったが、誘発された倍数性細胞の出現率が明らかに高いこと、S9 mix 非存在下でも倍数性細胞が誘発されていること、高濃度群では構造異常の出現率が高いことから、細胞死または細胞周期の遅延により倍数性細胞が検出されない可能性が考えられることから、陽性と判断した。

以上のように、陽性の結果が得られたことから、 D_{20} 値⁴⁾を求めたところ、構造異常については、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではそれぞれ 1.7 mg/mL および 0.26 mg/mL となった。倍数性細胞については、S9 mix 非存在下の短時間処理では 13 mg/mL となったが、S9 mix 存在下の短時間処理については、負の値となったことから対象外とした。

陽性対照物質として用いた MMC は、S9 mix 非存在下で短時間処理した場合において染色体の構造異常を誘発し（Table 1）、CP は S9 mix 存在下で短時間処理した場合において染色体の構造異常を誘発した（Table 2）。これらの陽性対照物質の結果より、本実験系の成立が確認された。

DBAE を培養液に添加すると、培養液の色が桃色ないし赤紫に変化したことから、被験物質を添加（0.43~1.7 mg/mL）して培養液（S9 mix 非存在下）の pH を調べた結果、pH8.81~9.27 であった。Morita ら⁵⁾は塩基性条件下で CHO-K1 細胞を培養した場合、S9 mix 非存在下では高塩基性条件下で培養しても構造異常を誘発しないが、S9 mix 存在下では pH10.4 ないし 10.8 で構造異常を誘発することを示した。DBAE を添加した場合、培養液の pH は 10 未満であることや、S9 mix 非存在下でも染色体の構造異常が誘発されていることから、今回の試験結果に培養液の高塩基性下の影響はないものと考えられ

る。

DBAEについては、当研究所で実施した細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性の結果が得られている⁶⁾。DBAEの窒素に水素が結合した dibutylamine やニトロ基の結合した dibutylnitrosamine では染色体異常試験で疑陽性の結果が得られている^{7),8)}。これらのことから、DBAEの窒素に結合する分子種によって染色体異常誘発作用が大きく異なることが示された。

以上の結果より、DBAEは、本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

[参考文献]

- 1) 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)
- 2) 吉村 功 編：「毒性・薬効データの統計解析、事例研究によるアプローチ」, サイエンティスト社, 東京 (1987)
- 3) 吉村 功, 大橋靖夫 編集：「毒性試験講座 14、毒性試験データの統計解析」, 地人書館, 東京 (1992)
- 4) 石館 基 監修：「〈改訂〉染色体異常試験データ集」, エル・アイ・シー, 東京 (1987)
- 5) Morita, T., *et al.*: “Effects of pH in the in Vitro Chromosomal Aberration Test”, *Mutation Res.*, 225 : 55 - 60 (1989)
- 6) 原 巧：「2-(ジ-n-ブチルアミノ)エタノールの細菌を用いる復帰突然変異試験」, 試験計画番号:M-02-084, (2003)
- 7) 祖父尼 俊雄 監修：「染色体異常試験データ集 改訂 1998 年版」, エル・アイ・シー, 東京, p. 165 (1999)
- 8) 祖父尼 俊雄 監修：「染色体異常試験データ集 改訂 1998 年版」, エル・アイ・シー, 東京, p. 166 (1999)

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-(di-n -buthylamino) ethanol (DBAE)** for 6 h without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾		
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL	
Negative ¹⁾	0	—	6 - (18)	100	—	100	0	0	0	0	1	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)			
						100	1	0	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)			
						200	1	0	0	1	1	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	2 (0.3)			
DBAE	0.11	—	6 - (18)	102	—	not observed														
DBAE	0.21	—	6 - (18)	100	—	not observed														
DBAE	0.43	—	6 - (18)	85	—	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.8)			
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)			
						200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	5 (0.6)			
DBAE	0.85	—	6 - (18)	73	—	100	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	13 (3.3)			
						100	0	4	0	0	0	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	21 (5.3)			
						200	0	4	1	0	0	0	5	0	5 (2.5)	5 (2.5)	34 *(4.3)			
DBAE	1.7	—	6 - (18)	44	3.8, 2.0	100	2	20	22	1	0	0	45	0	27 (27.0)	25 (25.0)	11 (2.8)	+	+	
						100	4	18	19	7	0	0	48	0	25 (25.0)	22 (22.0)	5 (1.7)			
						200	6	38	41	8	0	0	93	0	52 (26.0)	47 *(23.5)	16 *(2.3) ⁸⁾			
MMC	0.1 µg/mL	—	6 - (18)	—	—	100	4	28	41	3	1	0	77	0	50 (50.0)	49 (49.0)	1 (0.3)			
						100	5	24	43	2	0	0	74	0	50 (50.0)	47 (47.0)	0 (0.0)			
						200	9	52	84	5	1	0	151	0	100 (50.0)	96 *(48.0)	1 (0.1)			

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; POL, polyploid; MMC, mitomycin C.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side). 8) Six hundred and ninety-nine cells were analyzed.

*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

**, Purity was 99.8 % (GC).

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with 2-(di-n -butylamino) ethanol (DBAE)** for 6 h with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (h)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾		
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL	
Negative ¹⁾	0	+	6 - (18)	100	—	100	0	0	0	1	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)			
						100	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)				
						200	1	0	0	1	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	1 (0.1)				
DBAE	0.081	+	6 - (18)	95	—	not observed														
DBAE	0.16	+	6 - (18)	91	—	100	2	2	0	0	0	0	4	0	4 (4.0)	2 (2.0)	0 (0.0)			
						100	1	2	1	0	0	0	4	0	4 (4.0)	3 (3.0)	1 (0.3)			
						200	3	4	1	0	0	0	8	0	8 (4.0)	5 (2.5)	1 (0.1)			
DBAE	0.33	+	6 - (18)	85	—	100	0	11	4	0	0	0	15	0	9 (9.0)	9 (9.0)	59 (14.8)			
						100	1	4	1	0	0	0	6	0	6 (6.0)	5 (5.0)	49 (12.3)			
						200	1	15	5	0	0	0	21	0	15 (7.5)	14 *(7.0)	108 *(13.5)			
DBAE	0.65	+	6 - (18)	67	4.4, 3.2	100	0	25	24	1	0	0	50	0	33 (33.0)	33 (33.0)	4 (1.0)	+	-	
						100	5	30	8	2	0	0	45	0	30 (30.0)	27 (27.0)	1 (0.3)			
						200	5	55	32	3	0	0	95	0	63 (31.5)	60 *(30.0)	5 (0.6)			
DBAE	1.3	+	6 - (18)	50	1.6, 0.8	100	4	142	95	0	0	340	581	0	95 (95.0)	95 (95.0)	0 (0.0)			
						100	2	159	106	4	0	290	561	0	97 (97.0)	97 (97.0)	0 (0.0)			
						200	6	301	201	4	0	630	1142	0	192 (96.0)	192 *(96.0)	0 (0.0)			
CP	10 µg/mL	+	6 - (18)	—	—	100	2	23	37	6	0	0	68	0	44 (44.0)	44 (44.0)	2 (0.5)			
						100	3	28	34	2	1	10	78	0	41 (41.0)	39 (39.0)	0 (0.0)			
						200	5	51	71	8	1	10	146	0	85 (42.5)	83 *(41.5)	2 (0.3)			

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; POL, polyploid; CP, cyclophosphamide.

1) Dimethyl sulfoxide was used as solvent and added at the level of 1 vol% per dish. 2) Cell confluency representing cytotoxicity, was measured with a Monocellater™. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side). 8) Seven hundred and sixty cells were analyzed.

*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

** , Purity was 99.8 % (GC)

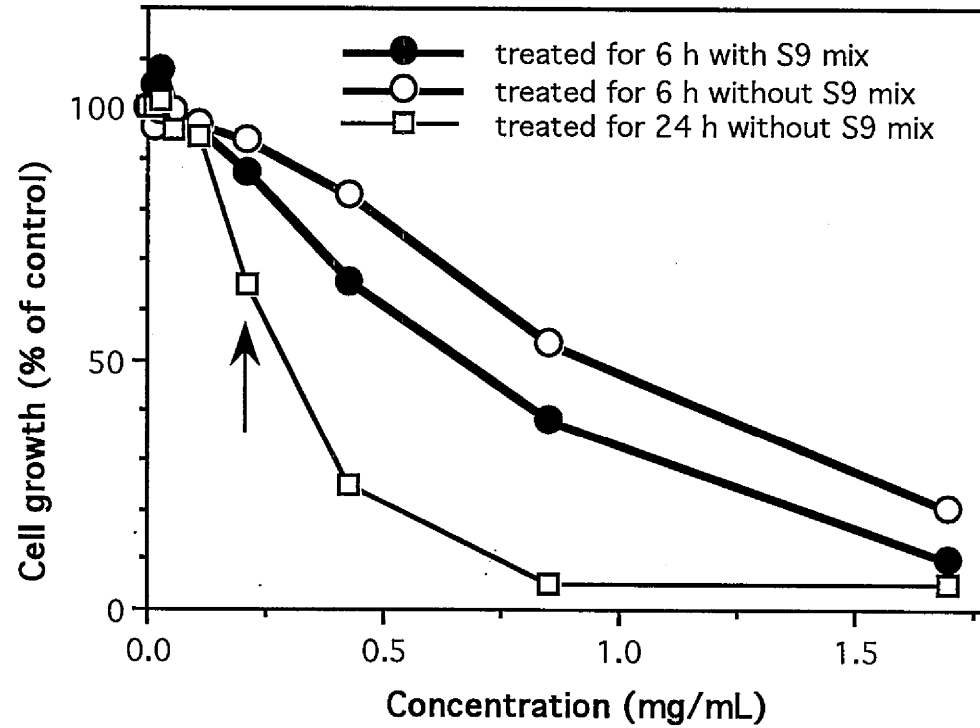


Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with 2-(di-*n*-butylamino)ethanol

Color of the medium changed to purplish red by addition of the test article at 0.21 mg/mL (arrow) or more.