

M-1344

## 最終報告書

試験名 : N-エチル-1-アミノナフタレンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号 : M-1344

### 試験施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所  
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

### 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室  
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

株式会社ボゾリサーチセンター  
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

## 1. 目次

1. 目次 .....	2
2. 試験実施概要 .....	6
2.1 試験計画書.....	6
2.2 試験目的 .....	6
2.3 試験委託者.....	6
2.4 試験受託者.....	6
2.5 試験実施施設.....	6
2.6 被験物質 .....	6
4. 要約 .....	9
5. 緒言 .....	10
6. 試験材料及び方法.....	11
6.1 被験物質及び溶媒 .....	11
6.1.1 被験物質 .....	11
6.1.2 溶媒.....	11
6.2 被験液の調製.....	12
6.2.1 調製方法 .....	12
6.2.2 調製頻度 .....	13
6.2.3 安定性.....	13
6.3 対照物質 .....	13
6.3.1 陰性対照 .....	13
6.3.2 陽性対照 .....	13
6.4 使用細胞株.....	14
6.4.1 細胞株 .....	14
6.4.2 細胞の選択理由 .....	14
6.4.3 培養条件 .....	14
6.4.4 細胞の性状検査.....	14
6.5 S9 mix 及び培養液 .....	15
6.5.1 S9 mix .....	15
6.5.2 培養液 .....	16

6.6	試験方法 <sup>1-5)</sup>	16
6.6.1	識別方法	16
6.6.2	用量の設定	17
6.6.3	細胞増殖抑制試験	17
6.6.4	染色体異常試験	18
6.6.5	確認試験	19
6.6.6	標本の観察	20
6.6.7	染色体異常の分類	20
6.6.8	判定基準	21
7.	試験結果	22
7.1	細胞増殖抑制試験	22
7.1.1	短時間処理法	22
7.1.2	連続処理法	22
7.2	染色体異常試験	23
7.2.1	短時間処理法	23
7.2.2	連続処理法	24
7.3	確認試験	24
7.3.1	短時間処理法	24
8.	考察	25
9.	参考文献	26

## Figures and Tables

Fig. 1-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene  
[Short-term treatment: +S9 mix]

Fig. 1-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

Fig. 1-3

[Short-term treatment: -S9 mix]

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Confirmation test: +S9 mix]

Table 1-1

Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2

Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Short-term treatment: -S9 mix]

Table 1-3

Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Confirmation test: +S9 mix]

## Appendices

Appendix 1-1

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Short-term treatment: +S9 mix]

Appendix 1-2

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Short-term treatment: -S9 mix]

Appendix 1-3

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Continuous treatment: 24 hr]

Appendix 1-4

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Continuous treatment: 48 hr]

Appendix 2-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Short-term treatment: +S9 mix]

Appendix 2-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Short-term treatment: -S9 mix]

Appendix 2-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Continuous treatment: 24 hr]

- Appendix 2-4      Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene  
[Continuous treatment: 48 hr]
- Appendix 3-1      Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene  
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Appendix 3-2      Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene  
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Appendix 3-3      Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene  
[Confirmation test: +S9 mix]

## 2. 試験実施概要

### 2.1 試験計画書

試験番号 : M-1344  
試験表題 : *N*-エチル-1-アミノナフタレンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

### 2.2 試験目的

ほ乳類の培養細胞 (CHL/IU 細胞株) を用いて、本被験物質の染色体異常誘発能の有無を明らかにした。

### 2.3 試験委託者

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室  
〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

### 2.4 試験受託者

株式会社ボゾリサーチセンター  
〒151-0065 東京都渋谷区大山町 36-7

### 2.5 試験実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所  
〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

### 2.6 被験物質

製造者 : 東京化成工業株式会社  
名称 : *N*-エチル-1-アミノナフタレン  
受領日 : 2008年 11月 7日  
保存場所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室 冷蔵庫

#### 4. 要約

*N*-エチル-1-アミノナフタレ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・ハムスター肺由来線維芽細胞（CHL/IU 細胞株）を用いた染色体異常試験を実施した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）が、短時間処理法・代謝活性化では、すべての設定濃度で用量依存性を持って陽性を示したが、細胞増殖率が 50%以下で推移し、用量依存性が認められなかつたことから、より細胞増殖率の高い用量における染色体構造異常の誘発性を確認するために、確認試験（短時間処理法・代謝活性化）を実施することとし、10.0 µg/mL を最高用量として、以下、公比 2 で計 5 用量を設定した。

確認試験の結果、TA 値は、10.0 µg/mL では 37.0%、5.00 µg/mL では 16.5%、2.50 µg/mL では 2.5%、1.25 µg/mL では 0.5% 及び 0.625 µg/mL では 1.0% と 10.0 及び 5.00 µg/mL で陽性の判定基準である 10%以上を示した。50%以上の細胞増殖抑制が認められなかつた用量においては、陰性反応を示しており、50%以上の細胞増殖抑制が起こる用量でのみの陽性反応が認められたものの、染色体異常試験との間で再現性が認められ、かつ確認試験においては用量依存性が認められたことから、総合的に陽性と判定した。したがつて、短時間処理法の代謝活性化において、明らかに陽性の結果が得られたため、連続処理法は実施しなかつた。

なお、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても 5%未満であったことから、*N*-エチル-1-アミノナフタレンの染色体数的異常誘発性は陰性と判定した。

すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあつた。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。したがつて、試験は適切に実施されたと考えられた。

以上の結果から、*N*-エチル-1-アミノナフタレンは本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

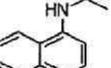
## 5. 緒言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、*N*-エチル-1-アミノナフタレンの安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。なお、本試験は以下の基準を遵守し、ガイドラインに準拠して実施した。

## 6. 試験材料及び方法

### 6.1 被験物質及び溶媒

#### 6.1.1 被験物質

製造者	:	
名称	:	<i>N</i> -エチル-1-アミノナフタレン
別称	:	<i>N</i> -エチル-1-ナフチルアミン
英語名称	:	<i>N</i> -Ethyl-1-aminonaphthalene
英語別称	:	<i>N</i> -Ethyl-1-naphthylamine
ロット番号	:	
CAS番号	:	118-44-5
構造式又は示性式	:	
分子量	:	171.24
密度	:	1.065
純度	:	98.6%
不純物	:	不明
沸点	:	150°C
融点	:	-70°C
性状	:	赤紫色透明液体
入手量	:	25 g
安定性	:	実験終了後、実験期間中の安定性は、株式会社ボゾリサーチセンターで確認した（Attached Data 2）。
保存方法	:	密栓、冷暗所（保存期間中の実測温度：3°C～6°C）
保存場所	:	御殿場研究所 被験物質保存室及び第1研究棟被験物質調製室 冷蔵庫
取り扱い上の注意	:	取り扱いは、適切な保護具を身につけ、粉塵やエアゾールが発生しないように取扱った。また、火気厳禁とした。
返却	:	被験物質の残余物は、実験終了後に安定性を確認し、その後、すべて返却した。

#### 6.1.2 溶媒

名称	:	ジメチルスルホキシド (DMSO)
ロット番号	:	LTF0010
規格	:	試薬特級

製造元 : 和光純薬工業株式会社  
保存方法 : 室温  
保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室  
溶媒の選択理由 : 供試前試験を実施し、被験物質は水にほとんど溶解しないこと、DMSO へ 175 mg/ mL 溶解することが確認されたため、溶媒として DMSO を用いることとした。

## 6.2 被験液の調製

### 6.2.1 調製方法

#### 1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.3500 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 175 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1750 µg/mL）を調製した。次いで、175 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL : 溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、87.5、43.8、21.9、10.9、5.47、2.73 及び 1.37 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

#### 2) 染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.3500 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 175 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：1750 µg/mL）を調製した。次いで、175 mg/mL 溶液を 32 倍希釈（被験液 0.5 mL : 溶媒 15.5 mL）し 5.47 mg/mL 被験液を調製した。次いで 5.47 mg/mL 被験液を公比 1.5（各濃度の被験液 2.0 mL : 溶媒 1.0 mL）で順次 4 段階希釈し、3.65、2.43、1.62 及び 1.08 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。更に、5.47 mg/mL 被験液を 4 倍希釈（被験液 2.0 mL : 溶媒 6.0 mL）して 1.37 mg/mL 被験液を調製した。次いで、1.37 mg/mL 被験液を公比 1.25（各濃度の被験液 4.0 mL : 溶媒 1.0 mL）で順次 5 段階希釈し、1.09、0.875、0.700、0.560 及び 0.448 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では 1.37、1.09、0.875、0.700、0.560 及び 0.448 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では 5.47、3.65、2.43、1.62 及び 1.08 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を用いた。

#### 3) 確認試験

被験物質 0.0200 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 10.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：100 µg/mL）を調製した。次いで、10.0 mg/mL 溶液を 10 倍希釈（被験液 1.0 mL : 溶媒 9.0 mL）し 1.00 mg/mL 被験液を調製した。更に、1.00 mg/mL 被験液を公比 2（各濃度の被験液 1.0 mL : 溶媒 1.0 mL）で順次 4 段階希釈し、0.500、0.250、0.125 及び 0.0625 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。

### 6.2.2 調製頻度

用時に調製した。なお、残余被験液はすべて貯蔵し焼却処分した。

### 6.2.3 安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液の安定性情報をとした。

## 6.3 対照物質

### 6.3.1 陰性対照

溶媒として用いたジメチルスルホキシド（DMSO）を陰性対照とした。

### 6.3.2 陽性対照

1) シクロフオスファミドとマイトマイシンCを、代謝活性化系と非代謝活性化系の陽性対照としてそれぞれ用いた。

(1) シクロフオスファミド（以下CPと略記する）

ロット番号 : SDP4062  
製造元 : 和光純薬工業株式会社  
純度 : 生化学用（97.0%以上）  
保存条件 : 冷蔵、遮光  
保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 発癌性物質冷蔵保存庫

(2) マイトマイシンC（以下MMCと略記する）

ロット番号 : 525AHA  
製造元 : 協和醸酵工業株式会社  
力価 : 2 mg（力価）/瓶  
保存条件 : 室温、遮光  
保存場所 : 御殿場研究所 遺伝毒性試験室 発癌性物質室温保存庫

### 2) 調製方法

調製はすべて用時に行い、残余液はすべて一定期間貯蔵した後に焼却処分した。

#### (1) 染色体異常試験 短時間処理法 代謝活性化

CP 0.0140 g を  $\gamma$  線滅菌済プラスチック遠沈管（50 mL）に秤取した。これに生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K8H76）を 20 mL 加えて溶解し、0.70 mg/mL 溶液を調製した（培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた。この時の最終濃度は 14  $\mu$ g/mL）。

#### (2) 染色体異常試験 短時間処理法 非代謝活性化

MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K8H76）を注射筒で 2 mL 加えて溶解した（1 mg/mL）。次に、この溶

液を公比 20 で順次 2 段階希釈（溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL）し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した（培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 µg/mL）。

(3) 確認試験 短時間処理法 代謝活性化

CP 0.0140 g を  $\gamma$  線滅菌済プラスチック遠沈管（50 mL）に秤取した。これに生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K8H76）を 20 mL 加えて溶解し、0.70 mg/mL 溶液を調製した（培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた。この時の最終濃度は 14 µg/mL）。

3) 陽性対照物質の選択理由

前述（5-2）の遺伝毒性試験ガイドラインに使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

## 6.4 使用細胞株

### 6.4.1 細胞株

チャイニーズ・ハムスターの肺由来線維芽細胞（CHL/IU 細胞株）を用いた。細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手（2004 年 11 月 2 日）した。入手後、ジメチルスルホキシド（DMSO：試薬特級 99.0% 以上、和光純薬工業株式会社）を 10 vol% 添加した培養液に細胞を懸濁し、液体窒素中で大量に凍結保存した。試験に際しては、その一部を解凍後、再培養を開始し、継代培養を行ったものについて細胞の性状検査を定期的に実施して、適正であることが確認されたものを使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 17 繼代、染色体異常試験の短時間処理法では 21 繼代及び確認試験の短時間処理法では 3 繼代であった。

### 6.4.2 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常の発現率が低いこと、更に種々の化学物質に対して感受性が高く、バックグラウンドデータが豊富であること等の理由から本細胞を選択した。

### 6.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下で培養した。継代は 1~4 日ごとに行った。

### 6.4.4 細胞の性状検査

試験に使用する細胞は、染色体のモード数、倍加時間及びマイコプラズマ汚染の有無等について 2008 年 12 月 12 日～2008 年 12 月 18 日に定期検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。細胞は、30 繼代を越えない範囲で試験に供した。

## 6.5 S9 mix 及び培養液

## 6.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素（S9／コファクターC セット、オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：C081128091、C081219101）を混合し、S9 mix を調製した。調製は使用時に行った。

## 1) S9

名称	:	S9
ロット番号	:	08112809、08121910
製造日	:	2008年11月28日、2008年12月19日
種・系統	:	ラット・SD系
性	:	雄
週齢	:	7週齢
誘導物質	:	フェノバルビタール(PB)及び5,6-ベンゾフラボン(BF)
投与法	:	腹腔内投与
投与期間及び投与量：	PB 4日間	30+60+60+60 mg/kg body weight
	BF 1日	80 mg/kg body weight
保存方法	:	冷凍（超低温フリーザー）
使用期限	:	2009年5月27日、2009年6月18日（製造後6箇月）
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

## 2) 補酵素

名称	:	コファクターC
ロット番号	:	C08112609、C08121710
製造日	:	2008年11月26日、2008年12月17日
保存方法	:	冷凍（超低温フリーザー）
使用期限	:	2009年5月25日、2009年6月16日（製造後6箇月）
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

## 3) S9 mix の組成

S9	2 mL		
補酵素	4.7 mL	20mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
		50mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40mmol/L 酸化型ニコチンアミドアデニン ジヌクレオチドリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
		精製水	0.67 mL

### 6.5.2 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO<sup>TM</sup>、Cat.No. 11095-080) に、Invitrogen Corporation より購入し非効化 (56°C, 30 分) した牛血清 (BS) を 10 vol% 添加して調製した培養液 (BS-MEM) を用いた。調製後の BS-MEM は冷蔵保存した。

#### 1) 牛血清

ロット番号	:	616941
製造元	:	Invitrogen Corporation
保存方法	:	冷凍 (-80°C 設定の冷凍庫)
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 超低温フリーザー

#### 2) Minimum Essential Medium (MEM)

ロット番号	:	495144、510522
製造元	:	Invitrogen Corporation
保存方法	:	冷蔵
保存場所	:	御殿場研究所 遺伝毒性試験室 冷蔵庫

### 6.6 試験方法<sup>1-5)</sup>

試験は以下のステージ順に実施した。なお、染色体構造異常の出現頻度 (TA 値) がすべての設定濃度で用量依存性を持って陽性を示したが、細胞増殖率が 50%以下で推移し用量依存性が認められなかつたため、より細胞増殖率の高い用量における染色体構造異常の誘発性を確認することを目的として、確認試験（短時間処理法・代謝活性化）を実施した。ただし、短時間処理法の代謝活性化において、明らかに陽性の結果が得られたために連続処理法は実施しなかつた。

1. 細胞増殖抑制試験	短時間処理法 連続処理法	代謝活性化 非代謝活性化 24 時間処理 48 時間処理
2. 染色体異常試験	短時間処理法	代謝活性化 非代謝活性化
3. 確認試験	短時間処理法	代謝活性化

#### 6.6.1 識別方法

##### 1) 細胞増殖抑制試験

短時間処理法では代謝活性化を「+」、非代謝活性化を「-」とし、連続処理法では 24 時間処理を「24-」、48 時間処理を「48-」とした。更にこれに続けて陰性対照 (Negative Control) の場合は「NC」を、被験物質処理群の場合は濃度の高い方から「1」、「2」、「3」、…の枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

## 2) 染色体異常試験及び確認試験

細胞増殖抑制試験と同様に番号を明記したラベルで識別した。ただし、陽性対照（Positive Control）は「PC」とした。染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した「01」～「99」までの 2 枚の番号及びスライド枝番号を明記したラベルで使用機材等を識別した。

### 6.6.2 用量の設定

#### 1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を  $1750 \mu\text{g/mL}$  (10mM 相当) とし、以下公比 2 で希釀した 875、438、219、109、54.7、27.3 及び  $13.7 \mu\text{g/mL}$  の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

#### 2) 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では最低用量の  $13.7 \mu\text{g/mL}$ においても、50%を超えない細胞増殖抑制作用は認められなかつたが 36%の細胞増殖率が認められ、短時間処理法の非代謝活性化では  $54.7 \mu\text{g/mL}$  で 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では  $13.7 \mu\text{g/mL}$  以下、短時間処理法の非代謝活性化では  $40.7 \mu\text{g/mL}$  であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「50%以上の細胞毒性が認められる場合は、細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量を最高用量とする」との規定に従い、短時間処理法の代謝活性化では  $13.7 \mu\text{g/mL}$  を最高用量として、以下、公比 1.25 で計 6 用量を、短時間処理法の非代謝活性化では  $54.7 \mu\text{g/mL}$  を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を設定することとした。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

#### 3) 確認試験

染色体異常試験の短時間処理法・代謝活性化では、染色体構造異常の出現頻度（TA 値）がすべての設定濃度で用量依存性を持って陽性を示したが、細胞増殖率が 50%以下で推移し用量依存性が認められなかつたことから、より細胞増殖率の高い用量における染色体構造異常の誘発性を確認するために、確認試験（短時間処理法・代謝活性化）を実施することとし、 $10.0 \mu\text{g/mL}$  を最高用量として、以下、公比 2 で計 5 用量を設定することとした。いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

### 6.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するために予備試験として実施した。なお、以下の試験操作は、無菌環境下において、滅菌済の器具を用いて、無菌操作によって実施した。

#### 1) 短時間処理法

(1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは  $\gamma$  線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。

- (2) プレート当たり  $2 \times 10^4$  個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液（牛血清含）で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 培養終了後、細胞を生理食塩液及びメチルアルコール（純度 99%以上）で洗浄・固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。
- 2) 連続処理法
- (1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレは  $\gamma$  線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- (2) プレート当たり  $2 \times 10^4$  個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理とともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- (3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

#### 6.6.4 染色体異常試験

##### 1) 短時間処理法

- (1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレは  $\gamma$  線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用

いた。プレートは各群4枚とした。

- (2) プレート当たり $2 \times 10^4$ 個の細胞（培養液5.0mL）を播種した。培養3日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液0.883mLを取り除き、S9 mix 0.833mLに続き溶媒0.050mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.883mLを取り除き、S9 mix 0.833mLに続き各濃度の被験液0.050mLを加えた。陽性対照群については培養液0.933mLを取り除き、S9 mix 0.833mLに続きCP 0.100mL（最終濃度：14 μg/mL）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液0.050mLを取り除き、溶媒0.050mLを加えた。被験物質処理群については、培養液0.050mLを取り除き、各濃度の被験液0.050mLを加えた。陽性対照群については培養液0.150mLを取り除き、MMC 0.150mL（最終濃度：0.075 μg/mL）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6時間培養した。
- (3) 培養6時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液（牛血清含）で洗浄し、新しい培養液5.0mLを加え、更に18時間培養を続けた。
- (4) 各群2枚のプレート（枝番号-1及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約2時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 μg/mL、和光純薬工業株式会社）を0.1mL加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を0.075M塩化カリウム溶液で約15分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3:1液で固定した。固定した細胞をスライドガラス1枚につき2箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり2枚作製した。細胞滴下後、約1日空気乾燥し、2%ギムザ液で約15分間染色して染色体標本を作製した。
- (5) 残る各群2枚のプレート（枝番号-3及び-4）は、培養6時間後と同様の方法で18時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

## 2) 連続処理法

短時間処理法の代謝活性化において、明らかに陽性の結果が得られたために連続処理法は実施しなかった。

### 6.6.5 確認試験

#### 1) 短時間処理法

- (1) 陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径60mm）を用いた。プレートは各群4枚とした。

- (2) プレート当たり  $2 \times 10^4$  個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞に異常のないことを確認してから、陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 µg/mL）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- (3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液（牛血清含）で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- (4) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 µg/mL、和光純薬工業株式会社）を 0.1 mL 加えた。培養終了後、0.25% トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸 = 3 : 1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2% ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。
- (5) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡下で確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本を作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

#### 6.6.6 標本の観察

顕微鏡下でプレート当たり 100 個、各濃度当たり 200 個の染色体が良く展開した分裂中期像について、構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の出現数を記録した。なお、客観的に観察が行われるようにするため、染色体標本はすべて盲検法によって観察した。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本を保存資料とする。

#### 6.6.7 染色体異常の分類

染色体異常は構造異常と数的異常に大別し、構造異常は更に以下のように定義・分類した。

##### 1) 構造異常

染色体異常の種類は以下のように定義し分類した。

ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップと

は染色体又は染色分体の同軸上に断片がある（非染色部分が染色分体の同軸上にある）ものであって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるものと定義した。

- 染色分体型切斷(ctb) : 切断とは断片が染色分体の同軸上からはずれているもの及び非染色部位が染色分体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものと定義した。四放射状交換など。
- 染色分体型交換(cte) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものを染色体型切斷と定義した。
- 染色体型切斷(csb) : 二動原体染色体、環状染色体など。
- その他(other) : 断片化(frg)他。

## 2) 数的異常

染色体数が、その細胞が本来持っている固有の数（二倍体）と異なり、倍化した場合を数的異常と定義した。

倍数体 : polyploidy (核内倍加体 : endoreduplication を含む)

### 6.6.8 判定基準

判定に際しては統計学的手法を用いず、石館らの基準<sup>1)</sup>に従い染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率(%)によって以下のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5% 未満	陰性 (-)
5% 以上 10% 未満	疑陽性 (±)
10% 以上	陽性 (+)

染色体構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合 (TAG) と含まない場合 (TA) とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を陽性と判定した。

## 7. 試験結果

### 7.1 細胞増殖抑制試験

#### 7.1.1 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 Appendix 1-1 及び Appendix 2-1 に、非代謝活性化の結果を Appendix 1-2 及び Appendix 2-2 に示した。

##### 1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、代謝活性化では  $13.7 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は  $13.7 \mu\text{g}/\text{mL}$  以下であった。また、非代謝活性化では  $54.7 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は  $40.7 \mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

##### 2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化とともに、変化は認められなかった。被験物質の析出は、代謝活性化及び非代謝活性化とともに、 $219 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量で認められた。

##### 3) 被験物質処理終了時の観察

被験物質の析出は、代謝活性化及では  $219 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上で、非代謝活性化では  $438 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量で認められた。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、代謝活性化及び非代謝活性化とともに、 $438 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上で細胞の剥離・死滅が認められたため TOX と判定した。また、 $13.7 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

#### 7.1.2 連続処理法

連続処理法における 24 時間処理の結果を Appendix 1-3 及び Appendix 2-3 に、48 時間処理の結果を Appendix 1-4 及び Appendix 2-4 に示した。

##### 1) 50%細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制は、24 時間処理法では  $54.7 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は  $27.3 \mu\text{g}/\text{mL}$  であった。また、48 時間処理法では  $27.3 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度で 50%を超える細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は  $23.6 \mu\text{g}/\text{mL}$  であった。

##### 2) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理とともに、変化は認められなかった。24 時間処理及び 48 時間処理とともに、被験物質の添加に伴う析出は、 $219 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量で認められた。

##### 3) 被験物質処理終了時の観察

24 時間処理及び 48 時間処理とともに、被験物質の析出は、 $438 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上の用量で認められた。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  $219 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上で細胞の剥離・死滅が認められたため

TOX と判定した。また、27.3 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。48 時間処理では 219 µg/mL 以上で細胞の剥離・死滅が認められたため TOX と判定した。また、13.7 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

## 7.2 染色体異常試験

### 7.2.1 短時間処理法

代謝活性化の結果を Fig. 1-1、Table 1-1 及び Appendix 3-1 に、非代謝活性化の結果を Fig. 1-2、Table 1-2 及び Appendix 3-2 に示した。

#### 1) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、代謝活性化及び非代謝活性化とともに、変化は認められなかった。被験物質の析出は、代謝活性化及び非代謝活性化とともに、認められなかった。

#### 2) 被験物質処理終了時の観察

被験物質の析出は、代謝活性化及び非代謝活性化とともに、認められなかった。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、代謝活性化及び非代謝活性化とともに、すべての用量にわたり細胞の浮遊、形態変化が認められた。

#### 3) 染色体構造異常

構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化においては、13.7 µg/mL では 30.5%、10.9 µg/mL では 28.5%、8.75 µg/mL では 20.0%、7.00 µg/mL では 20.0%、5.60 µg/mL では 19.5% 及び 4.48 µg/mL では 18.5% とすべての被験物質処理群で陽性の判定基準である 10% 以上を示した。また、非代謝活性化においては、54.7 µg/mL では 0%、36.5 µg/mL では 2.5%、24.3 µg/mL では 0.5%、16.2 µg/mL では 0.5% 及び 10.8 µg/mL では 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。したがって、試験は適切に実施されたと考えられた。

#### 4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、代謝活性化においては、13.7 µg/mL では 0%、10.9 µg/mL では 1.5%、8.75 µg/mL では 1.5%、7.00 µg/mL では 2.0%、5.60 µg/mL では 0.5% 及び 4.48 µg/mL では 1.0% 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、54.7 µg/mL では 1.0%、36.5 µg/mL では 1.0%、24.3 µg/mL では 0.5%、16.2 µg/mL では 1.0% 及び 10.8 µg/mL では 1.0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値 (Attached Data 3) 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。

## 7.2.2 連続処理法

染色体異常試験 短時間処理法・代謝活性化において、明らかに陽性の結果が得られたために連続処理法は実施しなかった。

## 7.3 確認試験

### 7.3.1 短時間処理法

代謝活性化の結果を Fig. 1-3、Table 1-3 及び Appendix 3-3 に示した。

#### 1) 被験物質添加直後の観察

肉眼による培養液の色調の観察においては、変化は認められなかった。被験物質の析出は認められなかった。

#### 2) 被験物質処理終了時の観察

被験物質の析出は認められなかった。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、5 µg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

#### 3) 染色体構造異常

構造異常の出現率(TA)は、10.0 µg/mL では 37.0%、5.00 µg/mL では 16.5%、2.50 µg/mL では 2.5%、1.25 µg/mL では 0.5% 及び 0.625 µg/mL では 1.0% と 10.0 及び 5.00 µg/mL で陽性の判定基準である 10% 以上を示した。

なお、陰性対照群においては染色体構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値 (Attached Data 3) と同様であった。更に、陽性対照群においては著しい染色体構造異常の誘発が認められ、その出現率は陽性の判定基準内にあった。したがって、試験は適切に実施されたと考えられた。

#### 4) 染色体数的異常

数的異常(倍数体)の出現率は、10.0 µg/mL では 0%、5.00 µg/mL では 3.0%、2.50 µg/mL では 0%、1.25 µg/mL では 0.5% 及び 0.625 µg/mL では 0% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。

なお、陰性対照群においては染色体数的異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、試験施設の背景値 (Attached Data 3) 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。

## 8. 考察

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）が、短時間処理法・代謝活性化では、すべての設定濃度で用量依存性を持って陽性を示したが、細胞増殖率が 50%以下で推移し、用量依存性が認められなかつたことから、より細胞増殖率の高い用量における染色体構造異常の誘発性を確認するために、確認試験（短時間処理法・代謝活性化）を 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を最高用量として、以下、公比 2 で計 5 用量を設定し、実施した。

確認試験の結果、TA 値は、10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 37.0%、5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 16.5%、2.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 2.5%、1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 0.5% 及び 0.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 1.0% と 10.0 及び 5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で陽性の判定基準である 10%以上を示した。50%以上の細胞増殖抑制が認められなかつた用量においては、陰性反応を示しており、50%以上の細胞増殖抑制が起こる用量でのみの陽性反応が認められたものの、染色体異常試験との間で再現性が認められ、かつ確認試験においては用量依存性が認められたことから、総合的に陽性と判定した。

なお、倍数性細胞の出現率はいずれの処理法においても 5%未満であったことから、*N*-エチル-1-アミノナフタレンの染色体数的異常誘発性は陰性と判定した。

染色体構造異常誘発能の強さを、構造異常が 20%出現する推定被験物質濃度（ $\text{SD}_{20}$  値）を指標として検討したところ、 $\text{SD}_{20}$  値は 0.0054  $\text{mg}/\text{mL}$ 、単位用量当たりの染色分体交換（cte）を持つ細胞の出現頻度の比較値である TR 値<sup>1)</sup>は 2800 であった。

すべての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5%未満で、陰性の判定基準内にあつた。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。したがつて、試験は適切に実施されたと考えられた。

なお、*N*-エチル-1-アミノナフタレンの関連物質である 1-aminonaphthalene については、サルモネラ及び大腸菌を用いた復帰突然変異試験の代謝活性化において、陽性の結果が報告されている<sup>6)</sup>。また、1-aminonaphthalene の代謝産物である *N*-hydroxy-1-aminonaphthalene の復帰突然変異試験でも、陽性の結果が報告<sup>7)</sup>されている。1-aminonaphthalene の CHL/IU 細胞株を用いた染色体異常試験では、代謝活性化において陽性の結果が報告されている<sup>8)</sup>。更に、同様に *N*-エチル-1-アミノナフタレンの関連物質である 2-aminonaphthalene について、姉妹染色体交換の誘発が報告されている<sup>9)</sup>。

以上の結果から、*N*-エチル-1-アミノナフタレンは本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、染色体数的異常は誘発しないと結論した。

## 9. 参考文献

- 1) 石館基監修(1987) : <改訂>染色体異常試験データ集、pp. 19-24、エル・アイ・シー、東京
- 2) Ishidate M Jr. and Odashima S (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* – A screening for chemical carcinogens, Mutation Res., **48**, 337-354
- 3) Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M Jr. (1979): Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*, Mutation Res., **66**, 277-290
- 4) 石館 基 (1982) : ほ乳動物細胞を用いる検索と問題点(Screening Trial to Detect Possible Chemical Mutagens and/or Carcinogens in the Environment - Mammalian Cell Systems), 日本香粧品科学会誌, **6**, 31-43
- 5) Ishidate M Jr., Edited by Obe G and Natarajan AT (1989): Chromosomal Aberrations Basic and Applied Aspects, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 260-271
- 6) Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K., (1988).: Salmonella mutagenicity tests:IV:results from the testing of 300 chemicals. Environ Mol Mutagen, **11**(Suppl 12):1-157
- 7) Belman, S.; Troll, W.; Teebor, G.; Mukai, F. Cancer Res. (1968); The carcinogenic and mutagenic properties of N-hydroxy-aminonaphthalenes., **28**, 535-542.
- 8) 祖父尼俊雄監修(1998) : <改訂>染色体異常試験データ集、pp. 348、エル・アイ・シー、東京
- 9) Wang CY, Garner CD, Lee MS, Shirai T.(1981): O-esters of N-acylhydroxylamines: toxicity and enhancement of sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells., Mutat Res., **88**(1), 81-88.

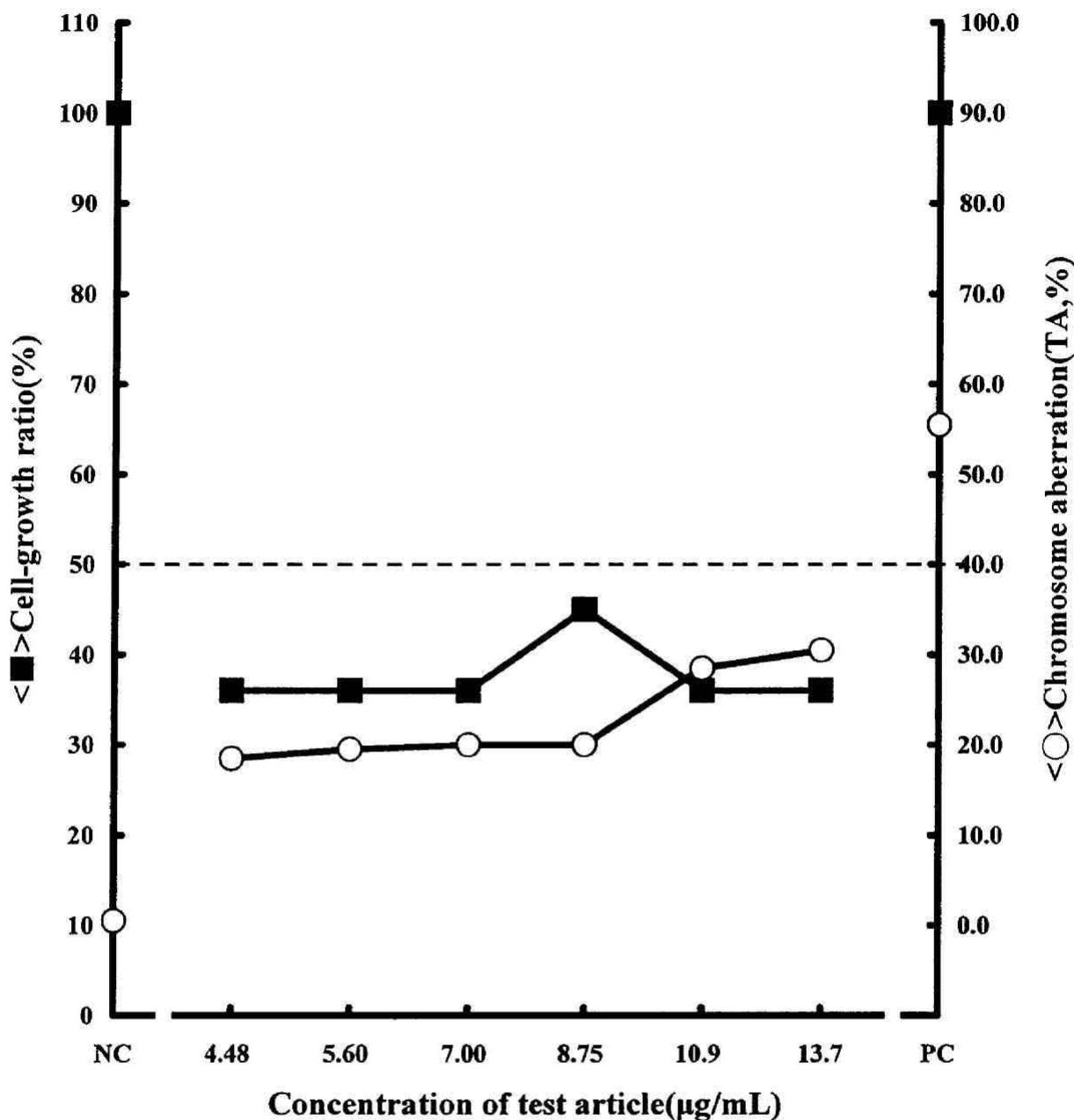


Fig. 1-1  
 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene  
 [Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14  $\mu\text{g/mL}$ )

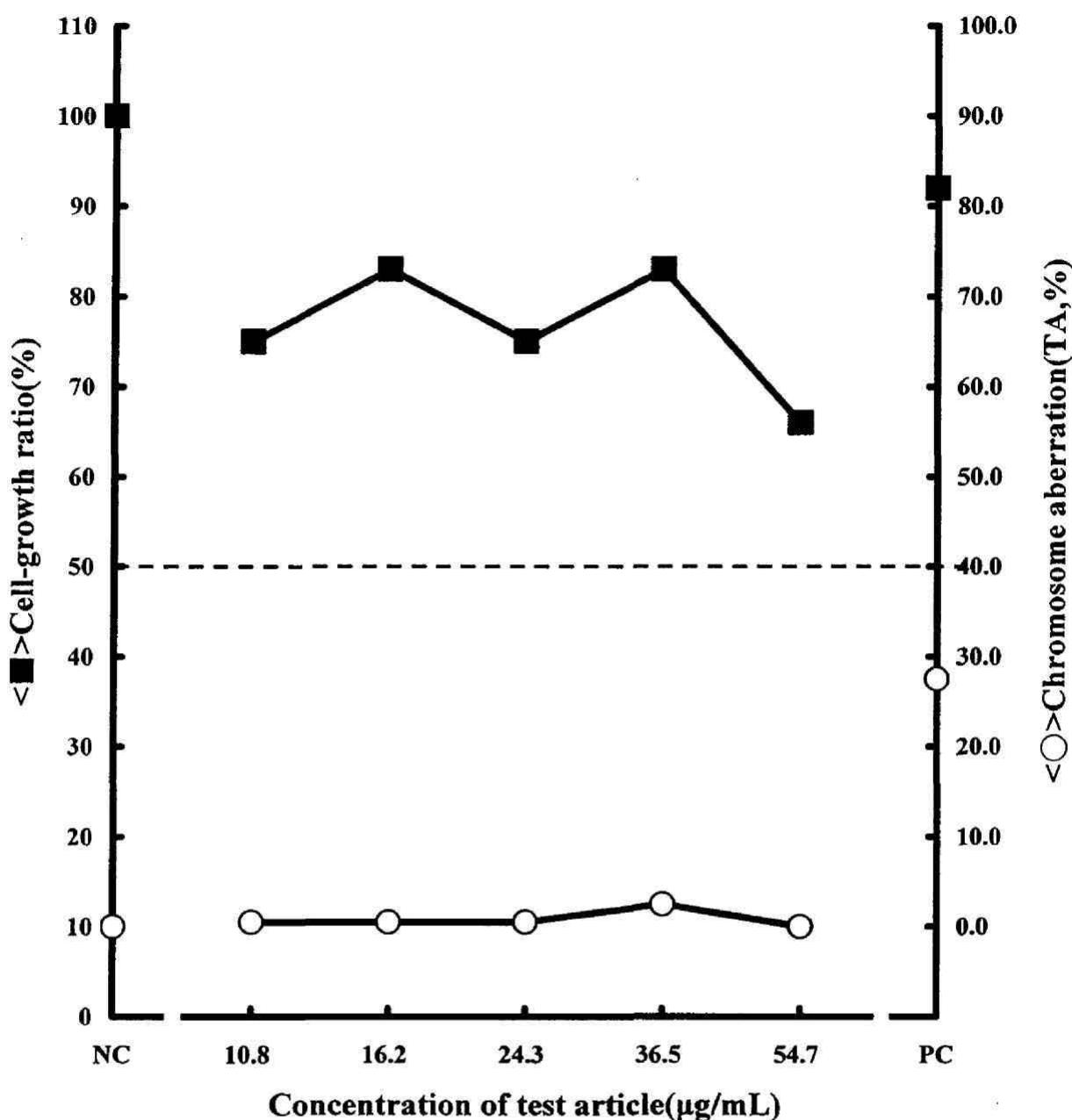


Fig. 1-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene  
 [Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075  $\mu\text{g/mL}$ )

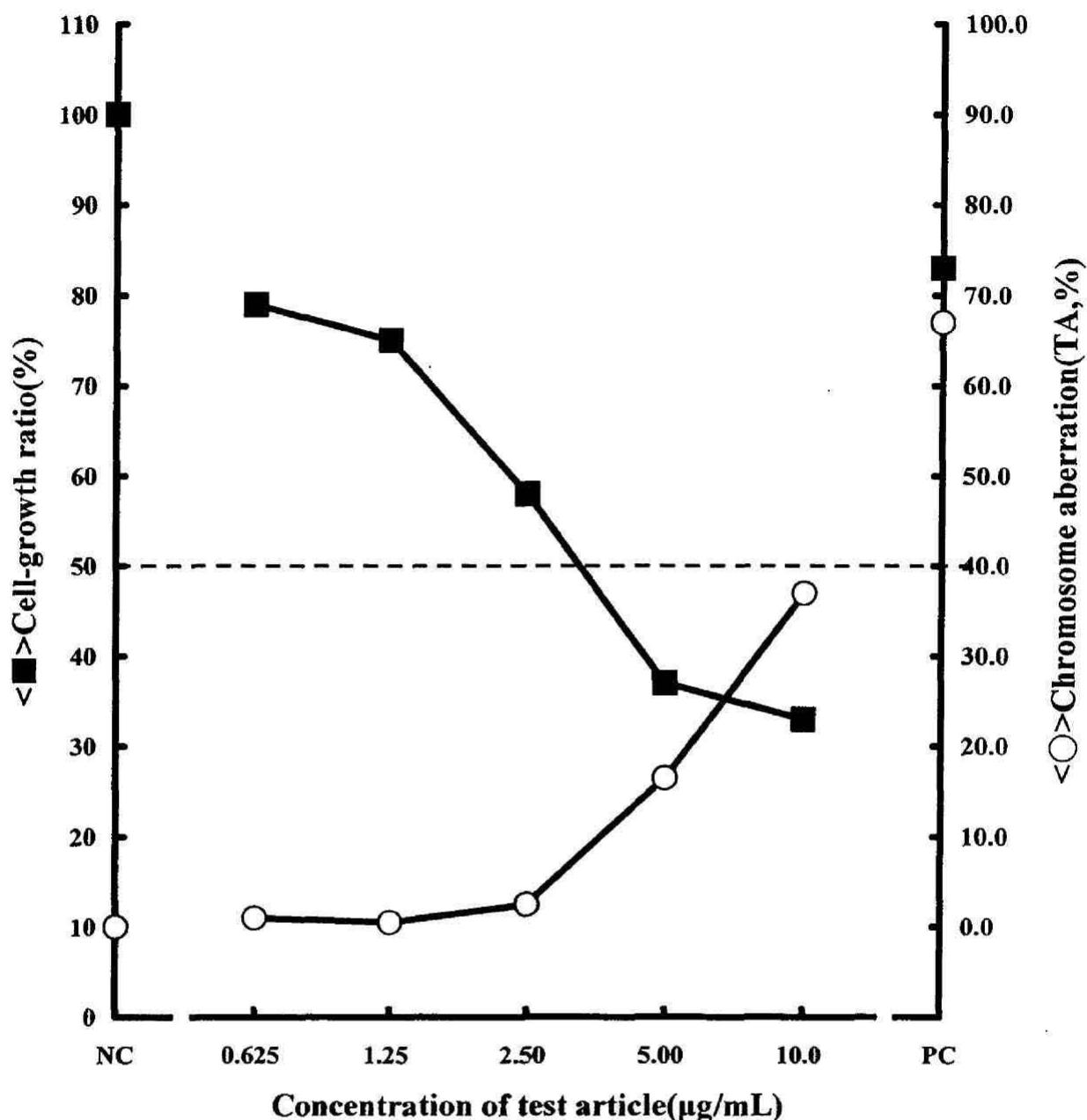


Fig. 1-3

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene  
[confirmation test : +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 μg/mL)

Table 1-1

Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with N-Ethyl-1-aminonaphthalene  
[Short-term treatment:+S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article ( $\mu$ g/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)							Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.			
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge- ment	Cells observed	Polyplid cells	other	Total (%)		
4.48	NC	100	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	100	100	0	0	76-1	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	83	100	0	0	11-1	
		200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
	7.00	100	100	1	16	0	0	0	17	0	17	+	33	100	2	0	2	58-1
		100	6	15	0	0	0	0	20	0	20	+	33	100	0	0	0	01-1
		200	7(3.5)	31(15.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	37(18.5)	0(0.0)	37(18.5)	-	(36)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	
	5.60	100	9	16	1	0	0	0	23	0	23	+	33	100	1	0	1	87-1
		100	1	16	0	0	0	0	16	0	16	+	33	100	0	0	0	82-1
		200	10(5.0)	32(16.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	39(19.5)	0(0.0)	39(19.5)	-	(36)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
6-18	+	94	94	3	16	0	2	0	20	0	20	+	33	94	0	0	0	62-1
		6	6	1	1	0	0	0	2	0	2	-	6	0	0	0	62-2	
		94	94	4	17	0	0	0	18	0	18	+	33	94	4	0	4	67-1
		6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	-	6	0	0	0	67-2	
		200	200	8(4.0)	34(17.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	40(20.0)	0(0.0)	40(20.0)	-	(36)	200	4(2.0)	0(0.0)	4(2.0)	
	-	97	97	1	17	0	0	0	17	0	17	+	50	97	1	1	2	83-1
		3	3	0	1	0	0	0	1	0	1	-	3	0	0	0	83-2	
		100	100	1	20	1	1	0	22	0	22	+	33	100	1	0	1	40-1
		200	200	2(1.0)	38(19.0)	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	40(20.0)	0(0.0)	40(20.0)	-	(45)	200	2(1.0)	1(0.5)	3(1.5)	
		100	100	3	21	0	0	0	23	0	23	+	33	100	1	0	1	70-1
	13.7	100	100	6	30	1	0	0	34	0	34	+	33	100	2	0	2	19-1
		200	200	9(4.5)	51(25.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	57(28.5)	0(0.0)	57(28.5)	-	(36)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	
		93	93	7	29	0	0	0	34	0	34	+	33	93	0	0	0	26-1
		7	7	0	1	0	0	0	1	0	1	-	7	0	0	0	26-2	
		55	55	4	11	0	0	0	15	0	15	+	33	55	0	0	0	32-1
	PC	45	45	2	10	0	0	0	11	0	11	-	45	0	0	0	32-2	
		200	200	13(6.5)	51(25.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	61(30.5)	0(0.0)	61(30.5)	-	(36)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		100	100	5	50	0	2	0	56	0	56	+	83	100	0	0	0	51-1
		100	100	8	51	0	0	0	55	0	55	-	100	100	1	0	1	30-1
		200	200	13(6.5)	101(50.5)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	111(55.5)	0(0.0)	111(55.5)	-	(100)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,

other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 $\mu$ g/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio(%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with N-Ethyl-1-aminonaphthalene  
[Short-term treatment:S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article ( $\mu\text{g/mL}$ )	Number of cells with structural chromosome aberration (%)							Cell-growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.			
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge- ment	Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)		
6-18	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	1	0	1	59-1	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	1	1	95-1	
		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(100)	200	1(0.5)	1(0.5)	2(1.0)		
	10.8	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83	100	0	0	0	54-1	
		100	0	1	0	0	0	0	1	0	1	-	66	100	2	0	2	46-1
		200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(75)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
	16.2	100	0	1	0	0	0	0	1	0	1	83	100	1	0	1	65-1	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	83	100	1	0	1	48-1
		200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(83)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
	24.3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66	100	1	0	1	78-1	
		100	0	1	0	0	0	0	1	0	1	-	83	100	0	0	0	05-1
		200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(75)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
PC	36.5	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	83	100	1	1	2	27-1	
		100	3	0	0	1	0	4	0	4	-	83	100	0	0	0	98-1	
		200	4(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	5(2.5)	0(0.0)	5(2.5)	(83)	200	1(0.5)	1(0.5)	2(1.0)			
	54.7	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66	100	1	0	1	53-1	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	66	100	1	0	1	10-1
		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	(66)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
	PC	100	2	24	0	0	0	26	0	26	100	100	1	0	1	49-1		
		100	6	24	0	0	0	29	1	30	+	83	100	0	0	0	45-1	
		200	8(4.0)	48(24.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	55(27.5)	1(0.5)	56(28.0)	(92)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)			

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,  
other: including fragmentation

TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.075 $\mu\text{g/mL}$ )

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio(%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.

Table 1-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with N-Ethyl-1-aminonaphthalene  
[Confirmation test:+S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article ( $\mu$ g/mL)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)							Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.			
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)	Judge- ment	Cells observed	Polyplloid cells	other	Total (%)	Judge- ment	
6-18	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	0	0	0	23-1	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	117	2	0	2	99-1	
		200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	(100)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	
		100	0	1	0	0	0	0	1	0	1	-	90	100	0	0	36-1	
		100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	-	81	100	0	0	74-1	
	0.625	200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	-	(79)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	90	100	0	0	96-1	
		100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	-	72	100	1	0	1	75-1
	+	200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(75)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
		100	0	1	0	0	0	0	1	0	1	-	63	100	0	0	0	79-1
		100	1	4	0	0	0	0	4	0	4	-	63	100	0	0	0	28-1
		200	1(0.5)	5(2.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(2.5)	0(0.0)	5(2.5)	-	(58)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		100	1	7	0	0	2	9	0	9	9	-	45	100	4	0	4	39-1
PC	5.00	100	3	21	0	0	0	0	24	0	24	+	36	100	2	0	2	61-1
		200	4(2.0)	28(14.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	33(16.5)	0(0.0)	33(16.5)	33(16.5)	-	(37)	200	6(3.0)	0(0.0)	6(3.0)	
		70	5	19	0	0	4	24	0	24	36	-	70	0	0	0	63-1	
		30	6	10	0	1	0	11	0	11	-	-	30	0	0	0	63-2	
		54	7	14	0	0	3	17	0	17	+	-	54	0	0	0	81-1	
		46	6	13	0	0	8	22	0	22	-	-	46	0	0	0	81-2	
		200	24(12.0)	56(28.0)	0(0.0)	1(0.5)	15(7.5)	74(37.0)	0(0.0)	74(37.0)	74(37.0)	-	(33)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
	10.0	100	8	65	0	2	0	70	0	70	90	-	100	0	0	0	43-1	
		100	9	62	0	1	0	64	0	64	+	-	100	0	0	0	06-1	
		200	17(8.5)	127(63.5)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	134(67.0)	0(0.0)	134(67.0)	134(67.0)	-	(83)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	

g: chromatid or chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange,  
other: including fragmentation

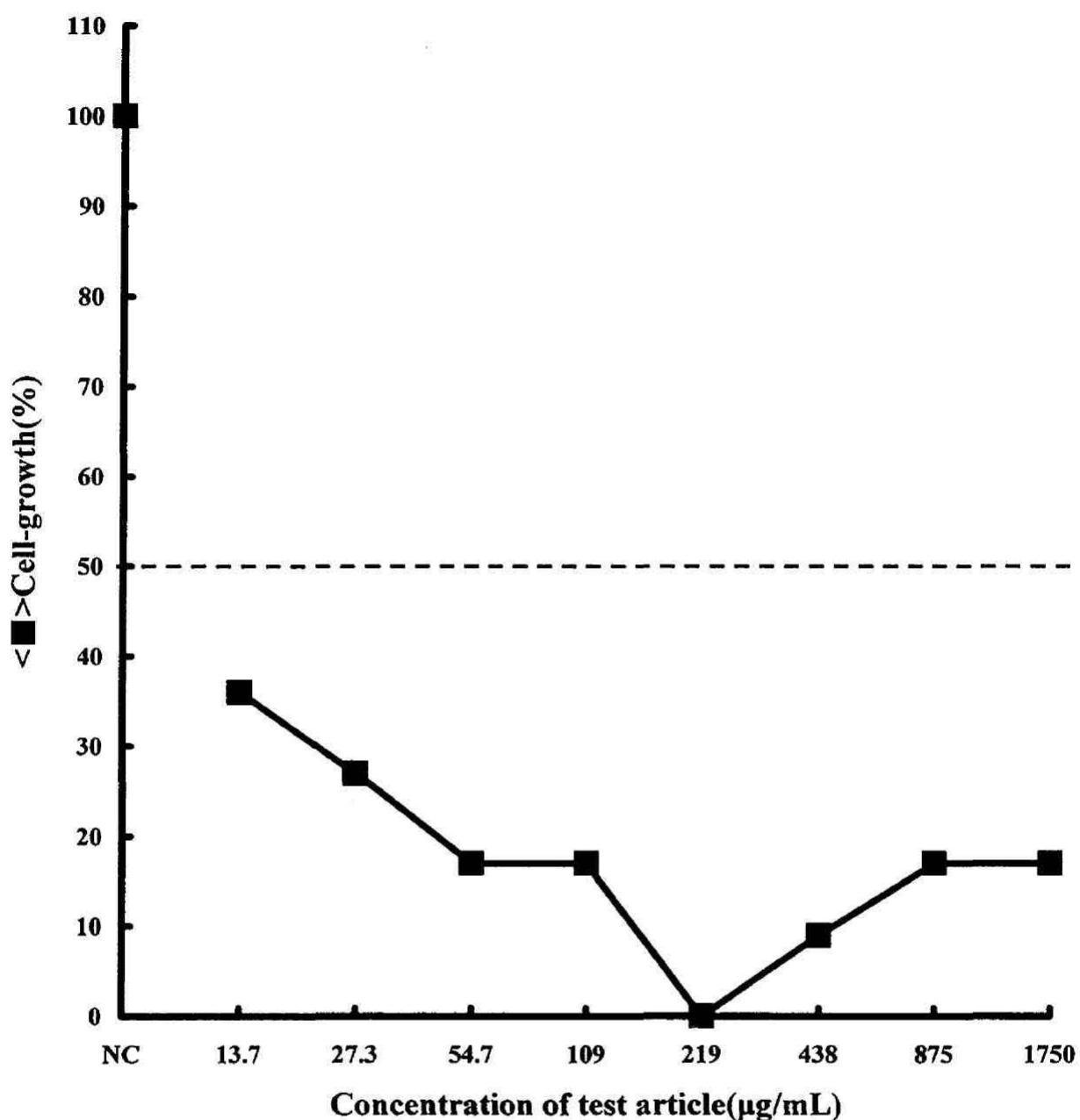
TA: total number of cells with aberration excluding gap, TAG: total number of cells with aberration including gap.

NC: Negative control (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 $\mu$ g/mL)

Each slide number indicates the code number for chromosome observation by blind method and does not necessarily represent corresponding plate number for each cell growth ratio(%).

Each value in parenthesis on cell-growth ratio(%) data showed mean of cell-growth ratio against the negative control.



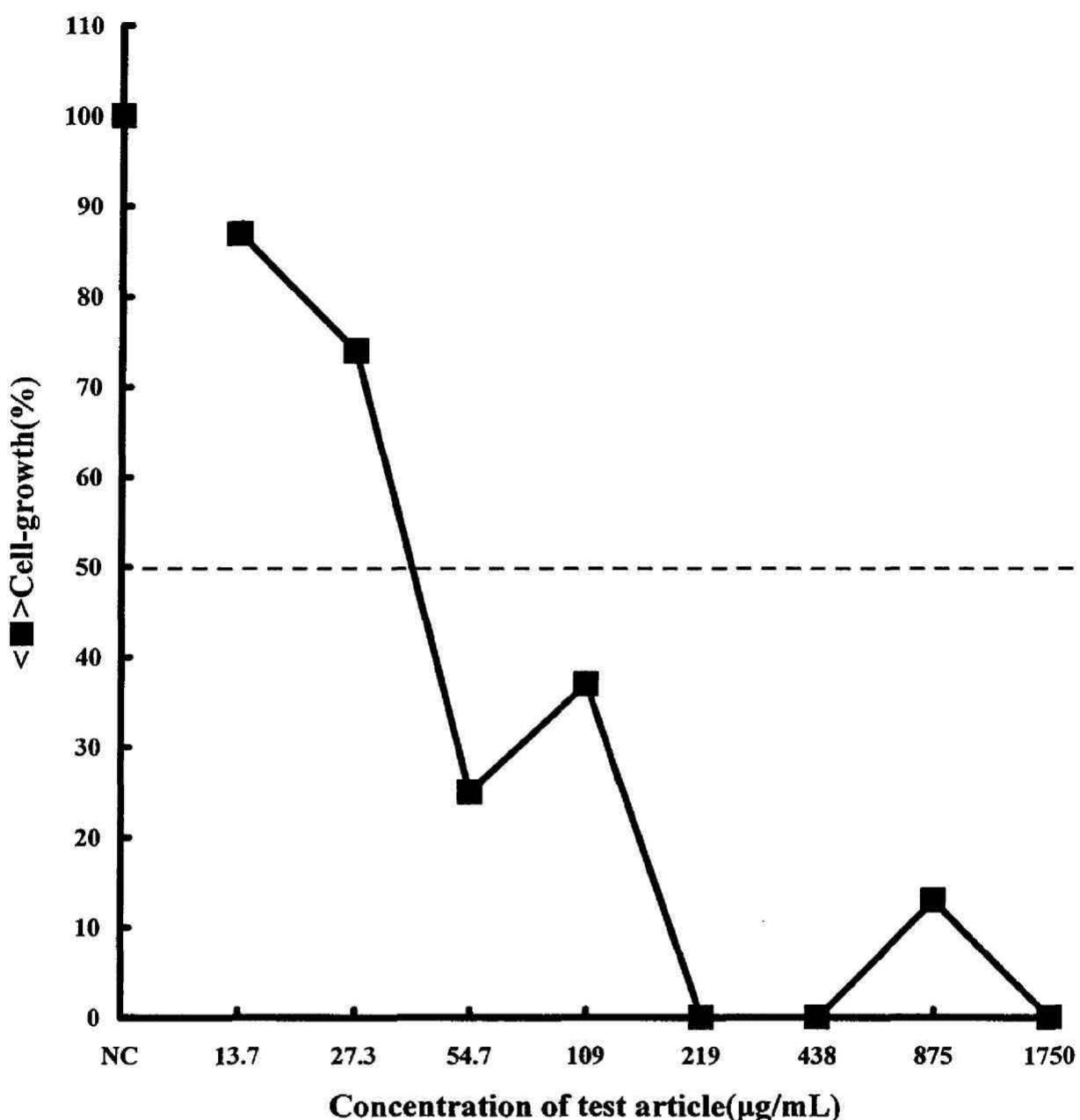
#### Appendix 1-1

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-

aminonaphthalene

[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)



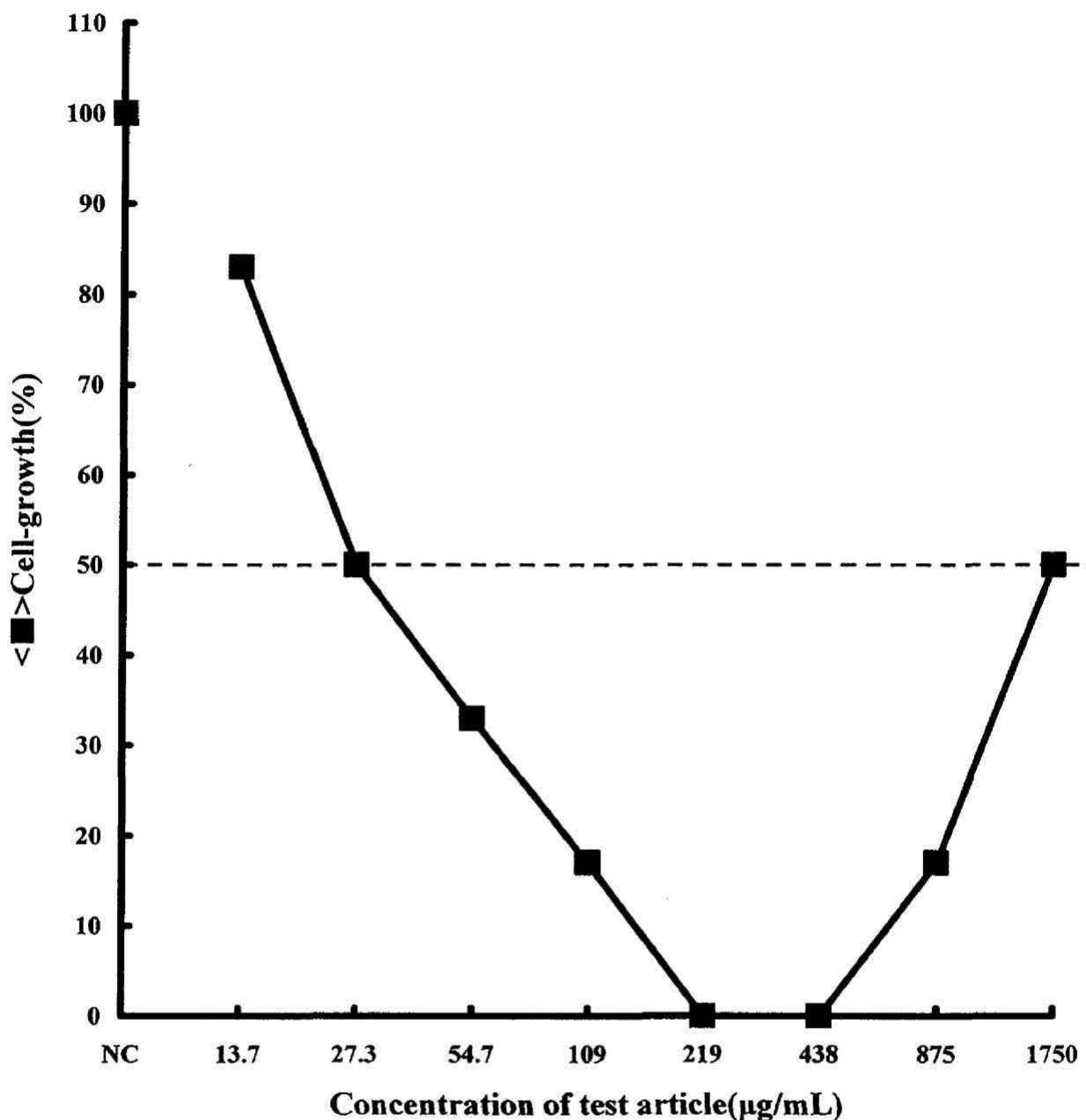
#### Appendix 1-2

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-

aminonaphthalene

[Short-term treatment : -S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

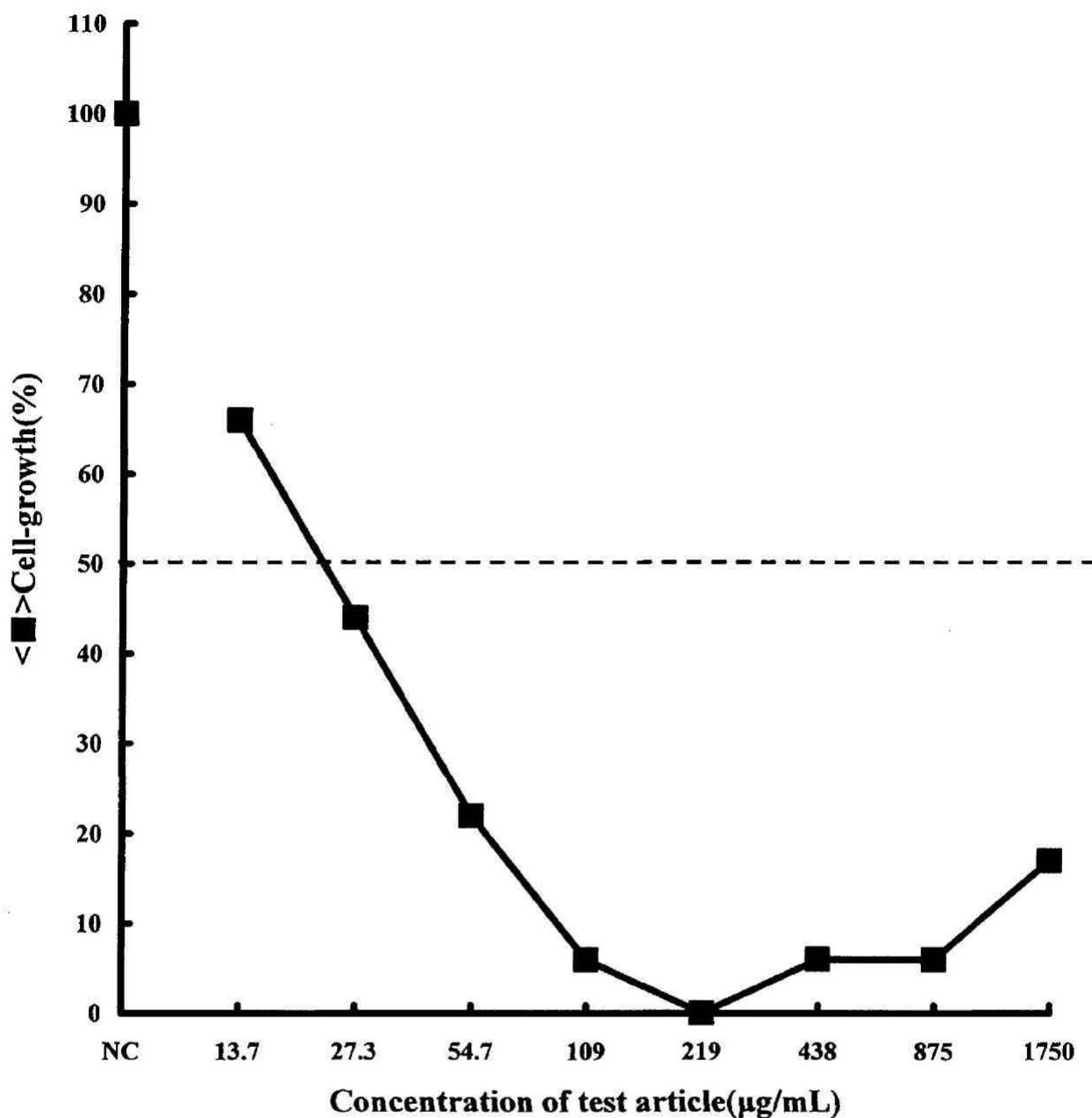


#### Appendix 1-3

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(DMSO)

**Appendix 1-4**

Results of the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(DMSO)

## Appendix 2-1

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[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	Test article	0 (NC)	100 <sup>a)</sup> 83	100	- -	- -	- -	
			13.7	33 33	36	++ +	- -	- -	
			27.3	16 33	27	++ ++	- -	- -	
			54.7	16 16	17	++ ++	- -	- -	
			109	16 16	17	++ ++	- -	- -	
			219	0 0	0	+++ +++	- -	+	+
			438	0 16	9	TOX TOX	- -	+	+
			875	16 16	17	TOX TOX	- -	+	+
			1750	16 16	17	TOX TOX	- -	+	+
							Concentration of 50% cell-growth inhibition : below 13.7 $\mu\text{g/mL}$		

NC: Negative Control(DMSO)

- 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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>at the end of treatment.
- d)
  - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
  - ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
  - +++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- TOX : There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.
- e) - : No changes of color
- f) - : Absence of precipitates/crystals
- + : Presence of precipitates

## Appendix 2-2

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[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	Test article	0 (NC)	100 <sup>a)</sup> 99	100 -	- -	- -	- -
			13.7	99 74	87 ++	- -	- -	- -
			27.3	74 74	74 ++	- -	- -	- -
			54.7	25 25	25 ++	- -	- -	- -
			109	25 49	37 ++	- -	- -	- -
			219	0 0	0 +++	- -	+	- -
			438	0 0	TOX TOX	- -	+	+
			875	25 0	13 TOX	- -	+	+
			1750	0 0	TOX TOX	- -	+	+
							+	+

Concentration of 50% cell-growth inhibition : **40.7**  $\mu\text{g/mL}$

NC: Negative Control(DMSO)

- 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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>at the end of treatment.
- d) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.  
++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.  
+++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- TOX : There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.
- e) - : No changes of color
- f) - : Absence of precipitates/crystals  
+ : Presence of precipitates

## Appendix 2-3

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[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	Test article	0 (NC)	100 <sup>a)</sup> 99	100	-	-	-
			13.7	66 99	83	-	-	-
			27.3	66 33	50	++	-	-
			54.7	33 33	33	++	-	-
			109	0 33	17	+++	-	-
			219	0 0	0	TOX	-	+
			438	0 0	0	TOX	-	+
			875	33 0	17	TOX	-	+
			1750	66 33	50	TOX	-	+
						TOX	-	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition :						27.3	$\mu\text{g/mL}$	

NC: Negative Control(DMSO)

- 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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>at the end of treatment.
- d)
  - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
  - + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
  - ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
  - +++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- TOX : There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.
- e) - : No changes of color
- f) - : Absence of precipitates/crystals
- + : Presence of precipitates

## Appendix 2-4

Cell-growth ratio in the cell-growth inhibition test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Continuous treatment:48hr]

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>	
-	48-0	Test article	0 (NC)	100 <sup>a)</sup> 99	100	- -	- -	- -
			13.7	66 66	+ +	- -	- -	- -
			27.3	44 44	++ ++	- -	- -	- -
			54.7	22 22	++ ++	- -	- -	- -
			109	11 0	+++ +++	- -	- -	- -
			219	0 0	TOX TOX	- -	+	-
			438	11 0	TOX TOX	- -	+	+
			875	11 0	TOX TOX	- -	+	+
			1750	22 11	TOX TOX	- -	+	+
Concentration of 50% cell-growth inhibition : <b>23.6</b> $\mu\text{g/mL}$								

NC: Negative Control(DMSO)

- 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) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>at the end of treatment.
- d)
  - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
  - + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
  - ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
  - +++ : Most of the cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- TOX : There existed few cells attached to the surface of the plate and almost all cells were detached and/or dead.

- e) - : No changes of color
- f) - : Absence of precipitates/crystals
- + : Presence of precipitates

## Appendix 3-1

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Short-term treatment: +S9 mix]

Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Chromosome aberration test			
			Condition of cells <sup>b)</sup>	Color of medium <sup>c)</sup>	Observation <sup>a)</sup>	
S9 mix	time (hr)	Precipitates/Crystals <sup>d)</sup>	1)	2)		
+	6-18	0 (NC)	-	-	-	-
		4.48	-	-	-	-
			+	-	-	-
		5.60	+	-	-	-
			+	-	-	-
		7.00	+	-	-	-
			+	-	-	-
		8.75	+	-	-	-
			+	-	-	-
		10.9	+	-	-	-
			+	-	-	-
		13.7	+	-	-	-
			+	-	-	-
		PC	-	-	-	-

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14  $\mu\text{g/mL}$ )

- a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.
- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.  
+ : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) - : No changes of color
- d) - : Absence of precipitates/crystals

## Appendix 3-2

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene

[Short-term treatment:-S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Observation <sup>a)</sup>			Precipitates/Crystals <sup>d)</sup>		
S9 mix	time (hr)		Condition of cells <sup>b)</sup>	Color of medium <sup>c)</sup>		1)	2)	
-	6-18	0 (NC)	-	-	-	-	-	
		Test article	-	-	-	-	-	
			+	-	-	-	-	
		10.8	+	-	-	-	-	
			+	-	-	-	-	
		16.2	+	-	-	-	-	
			+	-	-	-	-	
		24.3	+	-	-	-	-	
			+	-	-	-	-	
		36.5	++	-	-	-	-	
			++	-	-	-	-	
		54.7	++	-	-	-	-	
			++	-	-	-	-	
PC			-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075  $\mu\text{g/mL}$ )

a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.

- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.
- + : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- ++ : Approximately half of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) - : No changes of color
- d) - : Absence of precipitates/crystals

## Appendix 3-3

Results of observation in the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-Ethyl-1-aminonaphthalene  
[confirmation test: +S9 mix]

Chromosome aberration test								
Study type		Treatment and Concentration (μg/mL)	Condition of cells <sup>b)</sup>	Color of medium <sup>c)</sup>	Observation <sup>a)</sup>		Precipitates/Crystals <sup>d)</sup>	
S9 mix	time (hr)				1)	2)		
+	6-18	0 (NC)	-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	
		0.625	-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	
		1.25	-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	
		2.50	-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	
		5.00	+	-	-	-	-	
			+	-	-	-	-	
		10.0	+	-	-	-	-	
			+	-	-	-	-	
		PC	-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 μg/mL)

a) Condition of cells was observed at the end of treatment. Color of medium was observed immediately after addition of the test solutions. Precipitates/crystals were observed <sup>1)</sup>immediately after addition of the test solutions and <sup>2)</sup>at the end of treatment. Upper and lower columns in each observation indicate the result of plate digit numbers 3 and 4, respectively.

- b) - : Most of the cells were attached to the surface of plates and grew as a monolayer. Their shape was normal.  
+ : A small number of cells were detached from the surface of the plate and floated in the culture medium. The shape of attached cells was also altered.
- c) - : No changes of color
- d) - : Absence of precipitates/crystals