ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：2483（ 115－042 ）

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	4
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 Benzyltrimethylammoniumchloride [direct method]	16
Figure 2	Dose-survival curves of Benzyltrimethylammoniumchloride [activation method]	17
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by Benzyltrimethylammoniumchloride [direct method]	18
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by Benzyltrimethylammoniumchloride [activation method]	19
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by Benzyltrimethylammoniumchloride at the confirmatory test [activation method;+S9]	20
Figure 6	Incidence of structural aberrations induced by Benzyltrimethylammoniumchloride at the confirmatory test [activation method;+S9]	21

Table 1	Results of growth inhibition test on Benzyltrimethylammoniumchloride [direct method]	22
Table 2	Results of growth inhibition test on Benzyltrimethylammoniumchloride [activation method]	23
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzyltrimethylammoniumchloride [direct method : 24 hrs]	24
Table 4	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzyltrimethylammoniumchloride [direct method : 48 hrs]	25
Table 5	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzyltrimethylammoniumchloride [activation method : +S9]	26
Table 6	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Benzyltrimethylammoniumchloride [activation method : -S9]	27
Table 7	Results of the confirmative examination of Benzyltrimethylammoniumchloride [activation method : +S9]	28
Table 8	Results of the confirmative examination of Benzyltrimethylammoniumchloride [activation method : +S9]	29

1. 要　　約：

本試験条件下において，ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの染色体異常誘発性は疑陽性と判定した．

すなわち，ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド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，試験用量を設定した．直接法（24ならびに48時間処理）および代謝活性化法（+S9ならびに-S9処理）で 10mM 相当を含む 475，950 および 1900 μg/ml の３用量について顕微鏡観察を実施した．
その結果，直接法ならびに代謝活性化法 -S9処理で染色体異常の誘発は認められなかったが，代謝活性化法 +S9処理において構造異常の僅かな増加が観察された．２度の確認試験においても構造異常が 2.5～6.5％出現していることから，僅かながらも染色体構造異常を誘発するものと考えられた．
また，直接法の陽性対照物質マイトマイシンＣ(MMC) および代謝活性化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：　ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試　験　目　的：　染色体異常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」およびＯＥＣＤ化学品テストガイドライン473（1983年）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」およびＯＥＣＤのＧＬＰ（1982年）の基準を満たすものとした．

4. 試　験　番　号：　２４８３（115－042）

9. 被　験　物　質：

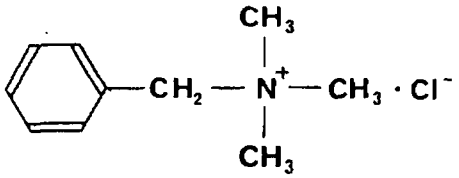
1) 被験物質名　　ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド
(Benzyltrimethylammoniumchloride)

2) ロット番号

3) 純　　度　　99.0%以上

4) 提　供　先

5) 化学構造



6) 分　子　式　　$C_{10}H_{16}NCl$

7) 分　子　量　　185.72

8) CAS No.　　５６－９３－９

9) 物質の状態　　白色粉末

10) 融　　点　　239℃

11) 被験物質保管および残余被験物質の処理　　試験終了後，残量全量にあたる 1.8 gを安評センターに保管した.

10. 試験材料および方法：

1) 試験細胞株

増殖速度，核型の安定性および既知変異原性物質に対する感受性，再現性等を考慮した結果，本染色体異常試験においてはチャイニーズ・ハムスターの肺から分離した線維芽細胞株（CHL細胞）を用いた．

上記の細胞株は昭和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. 027 I126178）を添加した後，液体窒素中に保存し，残りは３～５日ごとに継代した．

なお，染色体異常試験には継代数９の細胞を用いた．また，確認試験１回目には同45，確認試験２回目には同８の細胞を用いた．

2) 培養液の調製

Eagle-MEM 粉末培地（LIFE TECHNOLOGIES 社，米国：L-グルタミン含有；Lot No. 76P8541）１袋を約 800 ml の精製水で溶解した後，2.2 g の炭酸水素ナトリウム（関東化学株式会社，東京都中央区；Lot No. 604E1491）を加えた．１N塩酸を用いて pH を 7.2 に調整し，その後 1000 ml に定容した．なお，確認試験においては Eagle-MEM 液体培地（LIFE TECHNOLOGIES 社，Lot No. 31P9051）を使用した．メンブランフィルター（アクロキャップ™；0.2 μm：Gelman Sciences社，米国）を用いて加圧濾過除菌した後，あらかじめ非働化（56℃，30分）しておいた仔牛血清（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No.39N4920 あるいは 45K0525 ）を最終濃度10％になるよう加えた．冷暗所に調製後の培養液を保存した．

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．

4) Ｓ９ｍｉｘ

キッコーマン株式会社（千葉県野田市）からＳ９ｍｉｘ（Lot No. CAM-317，CAM-321 あるいは CAM-323）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．Ｓ９のロット番号，誘導物質及び誘導方法等は，添付書類によると次のとおりである．

	細胞増殖抑制試験	本　試　験
a. ロット番号	ＲＡＡ－３１７	ＲＡＡ－３２１
b. 製　造　日	平成６年10月27日	平成７年１月20日
c. 使用動物	ラット： Sprague-Dawley 系	同左
d. 性／週齢	雄／７週齢	同左
e. 体　　重	188 ～ 212 g	189 ～ 230 g
f. 誘導物質	Phenobarbital (PB) & 5,6-Benzoflabone (BF)	同左
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）	同左
h. 投与方法	腹腔内投与	同左
i. 蛋白含量	26.9 mg/ml	27.7 mg/ml

なお，確認試験（１回目，２回目）におけるＳ９は，a. ロット番号 RAA-323，b. 製造日；平成７年３月３日，c. 使用動物および d. 性／週齢；同上，e. 体重 196～226 g，f. 誘導物質，g. 投与量および回数ならびに h. 投与方法；同上，i. 蛋白含量 26.7 mg/ml であった．

また，Ｓ９ｍｉｘの組成を以下に示した．

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
精製水	残 量

5) 被験物質溶液の調製

生理食塩液（日本薬局方生理食塩液：株式会社　大塚製薬工場，徳島県鳴門市；Lot No. K4I95 あるいは K5B91）に被験物質を溶解して調製原液とした．調製原液を順次所定濃度に希釈した後，直ちに処理を行った．

6) 対照試験

a. 溶媒対照

使用溶媒の生理食塩液（Lot No. K4I95 あるいは K5B91）を容量比10％添加して試験した．

b. 陽性対照（直接法の場合）

注射用蒸留水（株式会社　大塚製薬工場；Lot No. K4E87）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. 968ADD）を生理食塩液（株式会社　大塚製薬工場，Lot No. K4A92）を用いて希釈した後，24時間処理で 0.05 μg/ml，48時間処理で 0.025 μg/ml の用量で試験した．

c. 陽性対照（代謝活性化法の場合）

注射用蒸留水（Lot No. K4E87 あるいは K4G76）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. 4016 あるいは 4024）を生理食塩液（Lot No. K4A92 あるいは K4I15）を用いて希釈した後，12.5 μg/ml の用量で試験した．

7) 細胞増殖抑制試験

a. 直接法

細胞培養用マルチプレート（12ウエル：住友ベークライト株式会社，東京都千代田区）のウエルに24時間処理の場合，培養液を用いて 6.8×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 1 ml を，48時間処理の場合，3.4×10^3 細胞／ml に調製した細胞浮遊液 1 ml をそれぞれ播種した．培養３日目に溶媒（溶媒対照群）あるいは被験物質溶液を100 μl 加え，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．

b. 代謝活性化法

培養液を用いて 6.8×10^3 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日目に +S9処理の場合，培養液 500 μl を除きＳ９ｍｉｘ 100 μl，溶媒あるいは被験物質溶液 60 μl を加え，-S9処理では培養液 400 μl を除き，次いで溶媒あるいは被験物質溶液 60 μlのみ加え（Ｓ９ｍｉｘは添加しない）６時間培養した．培養液を除去した後，生理食塩液を用いて細胞を洗浄した．新鮮な培養液 500 μlを加え，さらに18時間培養を続けた後に細胞生存率を求めた．

c. 試験用量

細胞増殖抑制試験における試験用量を下表に示した．

各試験それぞれ溶解限界濃度を含む７用量（公比 5/3）を設定した．あらかじめ予備的な試験を実施した結果を基に本用量を設定した．

試　験	用量数	試験用量（μg/ml）
直接法２４時間処理	7	88.6 ～ 1900
直接法４８時間処理	7	88.6 ～ 1900
代謝活性化法+S9処理	7	88.6 ～ 1900
代謝活性化法-S9処理	7	88.6 ～ 1900

8) 50%細胞増殖抑制濃度の算出

7) で処理を行った各プレートから培養液を除き，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. E1014）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．各プレートを水洗した後，十分乾燥させた．

各ウエルに色素溶出液（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（UV50-201；株式会社日立製作所，東京都千代田区）を用いて 580 nm での吸光度を測定した．各ウエルの吸光度から固定された細胞の色素量を溶媒対照の値に対する比（細胞生存率）として算出した．

9) 染色体異常試験

a. 直接法

直径 60 mm のプレート（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）を，48時間処理の場合，同様に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日目に溶媒または被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液 500 μlを加え，24および48時間後に染色体標本を作製した．

b. 代謝活性化法

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）をプレートに播種した．培養3日目に培養液 2.5 ml を除きＳ９ｍｉｘ 500 μl，溶媒または被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液 300 μl を加え6時間培養した．また対照として，溶媒または被験物質溶液あるいは陽性対照物質溶液のみを加えた群（培養液 2 ml を除去するのみでＳ９ｍｉｘは添加しない）についても同様に培養した．培養液を除去した後，生理食塩液を用いて細胞を洗浄した．新鮮な培養液 3 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．

c. 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3用量（公比2）を設定した．

試　験	試験用量（μg/ml）		
直接法24時間処理	475,	950,	1900
直接法48時間処理	475,	950,	1900
代謝活性化法+S9処理	475,	950,	1900
代謝活性化法-S9処理	475,	950,	1900

確認試験（１回目および２回目）の用量（公差 300）を以下に示した．

代謝活性化法+S9処理	1000,	1300,	1600,	1900

10）標本の作製

染色体標本作製の２時間前に，最終濃度で 0.2 μg/ml，すなわち培養液 1 ml 当たり 20 μlのコルセミド溶液（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 14P7346 あるいは 2076745）を添加し，細胞分裂を中期で停止させた．培養液の全量を遠心管に移した後，0.25％トリプシン溶液（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 16N8347 あるいは 21K1644）を用いてプレートより細胞を剥離させ，遠心管内の培養液に加えた．遠心分離（1000 r.p.m.，５分間）により上清をのぞき，回収した細胞にあらかじめ37℃に保温しておいた 75 mM 塩化カリウム水溶液をおよそ 5 ml 加え，37℃で15～20分間低張処理を行った．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，細胞に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 601868）を用いて希釈したギムザ溶液で12分程度染色した．スライドを軽く水洗した後，乾燥させた．

11）染色体の観察

各プレートあたり 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．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．

構造異常の観察と同時に，倍数性細胞の出現数についても記録した．

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．

12）プレート（ウエル）数および識別

細胞増殖抑制試験で用量当たり２ウエル，染色体異常試験で用量当り２枚のプレートを使用した．

油性ペンで番号等を明記することにより，各プレートを識別した．

13) 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（＋）

11. 試　験　結　果：

1) 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験結果を Figure 1, 2 および Table 1, 2 に示した.

直接法の高用量群で僅かな細胞増殖抑制が観察されたが，代謝活性化法では明確な抑制作用は見られなかった.

また，被験物質処理時に特筆すべき変化は観察されなかった.

以上の結果を基に染色体異常試験の試験用量を設定した．直接法ならびに代謝活性化法とも 10 mM相当を高用量とした 475～1900 μg/ml の３用量について顕微鏡観察を実施した.

2) 染色体異常試験

a. 直接法24時間処理

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 3 および Table 3 に，各プレートの分析結果を 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) 2.5%，含めない場合(-gap) 1.5%であり，倍数性細胞の出現頻度についても 2.5%であった.

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドを 475, 950 および 1900 μg/ml で処理した場合の染色体構造異常出現頻度は，+gapで 0.5, 0.5 および 0.5%，-gapでも同程度であった．倍数性細胞の出現頻度は各群それぞれ 0.5, 0.0 および 0.5%であった.

なお，10 mM 相当の 1900 μg/ml 処理においても顕著な細胞毒性作用は観察されなかった.

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 71.0%と顕著な増加を示した.

b. 直接法48時間処理

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 3 および Table 4 に，各プレートの分析結果を Appendix 2 に示した.

溶媒対照での構造異常出現頻度は +gap および -gap それぞれ 0.5%および 0.0%であり，倍数性細胞の出現頻度については 0.5%であった.

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理群での構造異常出現頻度は 475, 950 および 1900 μg/ml 処理でそれぞれ 0.5, 0.5 および 0.5%(+gap)，-gap でも同程度であった．倍数性細胞の出現頻度は各群 3.0%以下であった.

なお，被験物質ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの影響により高用量の 1900 μg/ml で分裂中期像が大きく減少し，950 ならびに 475 μg/ml においても用量に依存した減少傾向が観察された.

陽性対照では構造異常細胞が +gap で 50.5%出現した.

c. 代謝活性化法（＋Ｓ９処理）

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 4 および Table 5 に，各プレートの分析結果を 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は 0.5%であった．

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドを 475，950 および 1900 μg/ml で処理した場合の構造異常出現頻度は，+gap で 1.5，4.0 および 5.0%，-gap において同頻度であった．倍数性細胞については，各群 3.5%以下の出現頻度であった．

なお，高用量の 1900 μg/ml 処理においても顕著な細胞毒性作用は観察されなかった．

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 43.5%の細胞に構造異常が認められた．

d. 代謝活性化法（－Ｓ９処理）

各用量における染色体異常出現頻度を Figure 4 および Table 6 に，各プレートの分析結果を Appendix 4 に示した．

溶媒対照での構造異常出現頻度は +gapで 1.5%，-gapで 0.5%であり，倍数性細胞の出現頻度も 0.5%であった．

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理群における構造異常出現頻度は 475，950 および 1900 μg/ml 処理でそれぞれで 0.5，2.0 および 0.5%(+gap)，-gap においても増加傾向は認められなかった．また，倍数性細胞はいずれの処理群とも 2.0%以下であった．

なお，1900 μg/ml 処理においても顕著な細胞毒性作用は観察されなかった．

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．

3) 確認試験

代謝活性化法 +S9処理で観察された染色体構造異常の出現は，10%を超えることはなく疑陽性（±）と判断されることから，1000，1300，1600 および 1900 μg/ml の４用量を用いた確認試験を実施した．

試験結果を Figure 5 および Table 7 に示した．

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド処理群での染色体構造異常出現頻度は 2.5～3.5%の範囲内であり，明確な用量反応相関性ならびに再現性が認められなかった．

そこで，同一の用量で再度確認試験を実施した結果，Figure 6 および Table 8 に示したように，1300 μg/ml 以上の用量で染色体構造異常の出現頻度が５%を超えており，疑陽性結果（±）が確認された．

12. 考察および結論：

ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの変異原性，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直接法ならびに代謝活性化法において，10 mM相当の 1900 μg/ml まで検討した．その結果，直接法および代謝活性化法 -S9処理の試験群においては，溶媒対照群に比較して染色体異常の明確な誘発は認められなかった．代謝活性化法 +S9処理での高用量において，僅かではあるが染色体構造異常の誘発傾向が観察された．高用量の 1900 μg/ml 処理群において疑陽性（±）と判定されたことから確認試験を実施した．構造異常の出現は確認試験１回目では 3.5%程度の誘発であったが，２回目では用量相関的な増加を示し，その出現頻度は最大で 6.5%（±）を示した．
一方，溶媒対照群あるいは陽性対照群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，本試験が有効であることを示していた．

以上の試験結果から，本試験条件下においてベンジルトリメチルアンモニウムクロリドの哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性に関し，疑陽性と判定した．

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., 66 : 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. 2483 (115-042)

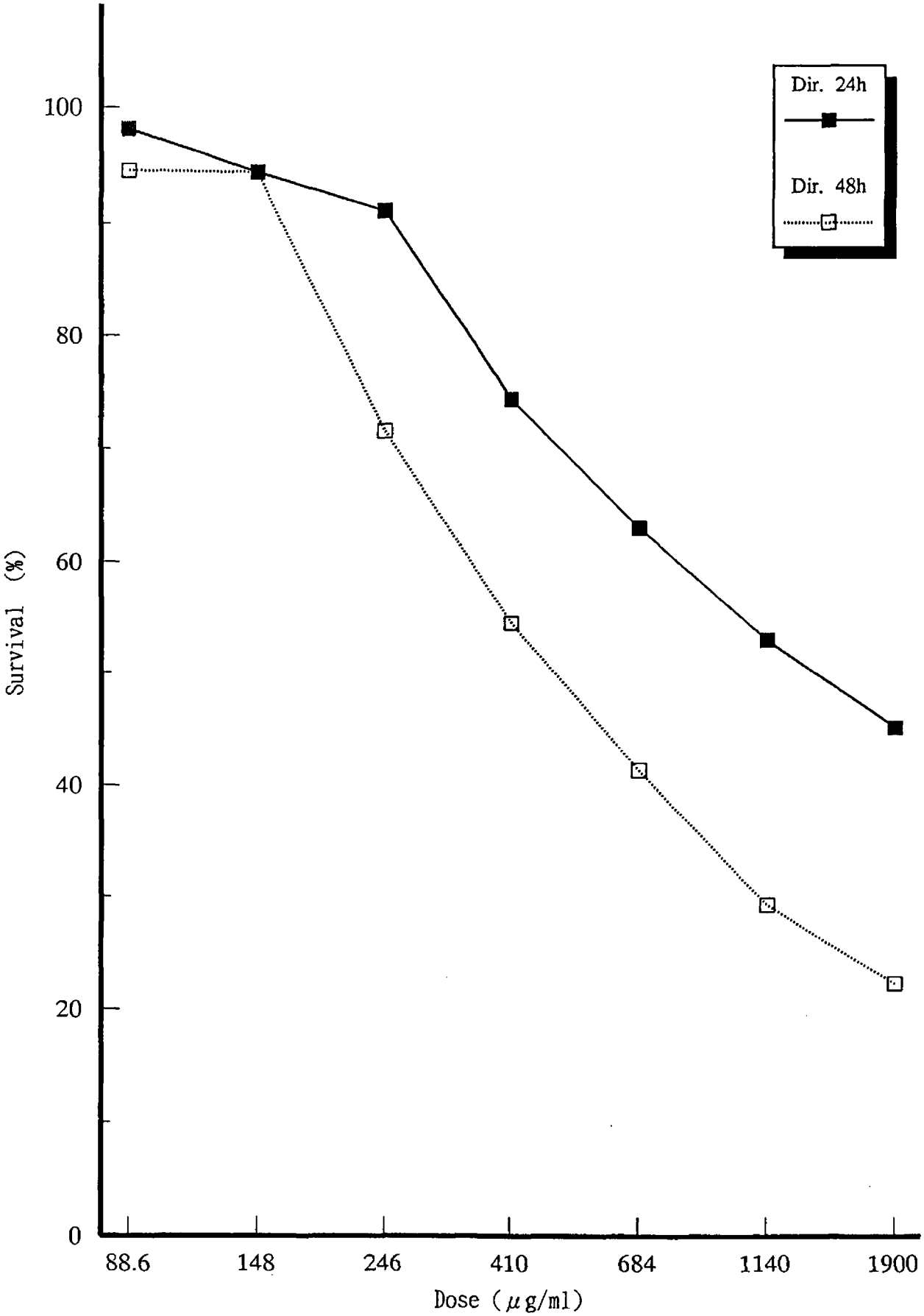


Figure 1. Dose-survival curves of Benzyltrimethylammoniumchloride [direct method]

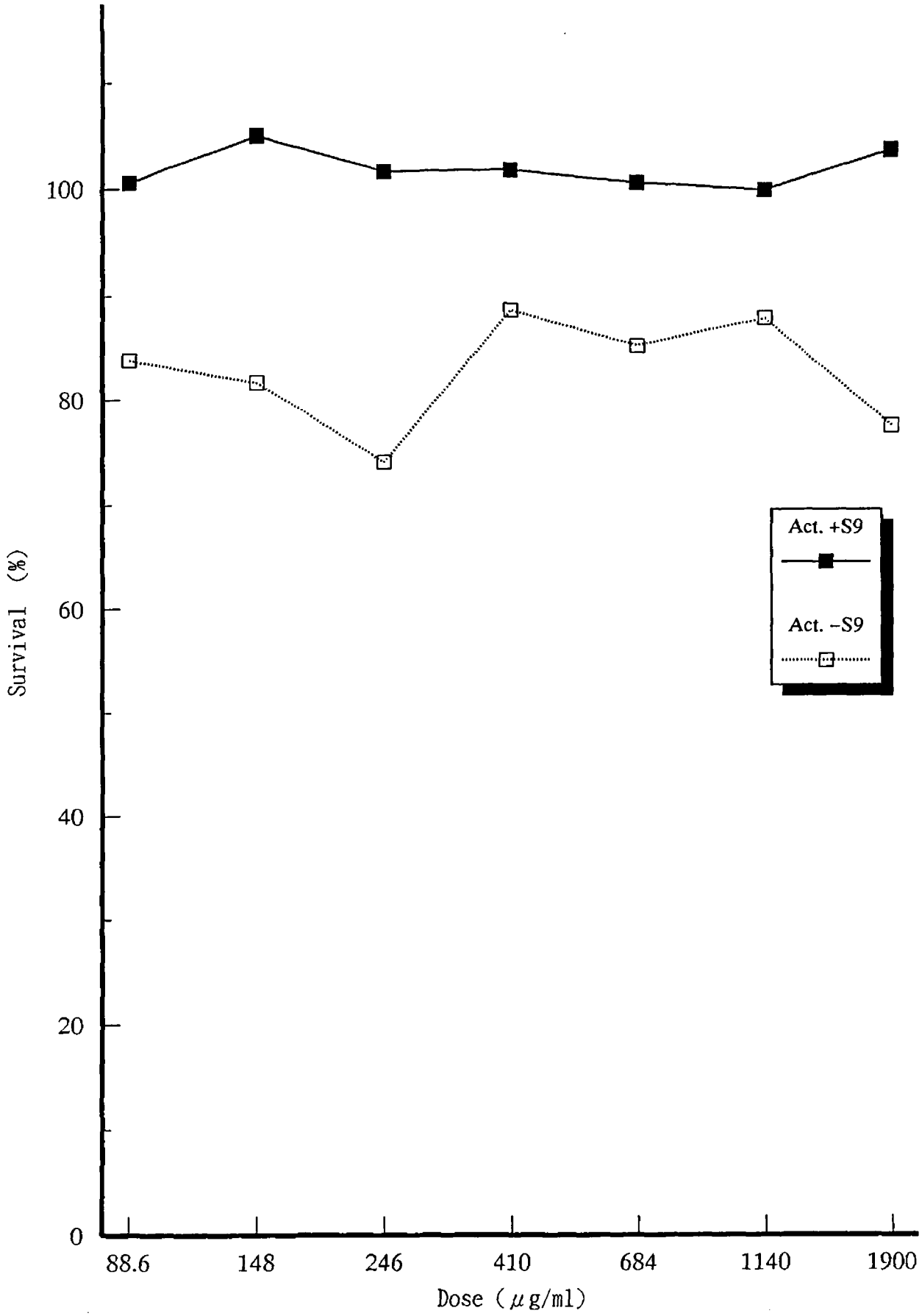


Figure 2. Dose-survival curves of Benzyltrimethylammoniumchloride [activation method]

Exp. No. 2483 (115-042)

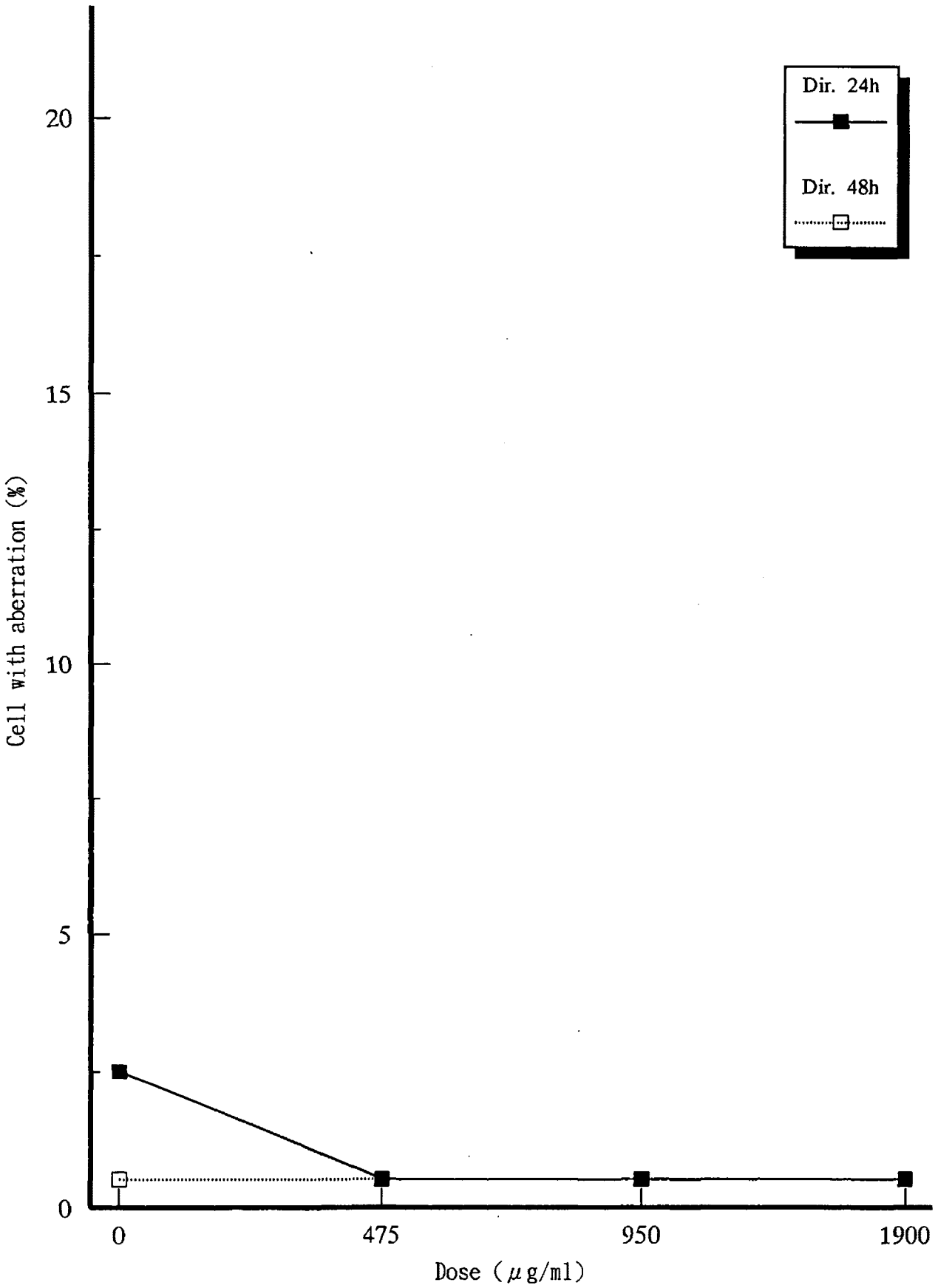


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by Benzyltrimethylammoniumchloride [direct method]

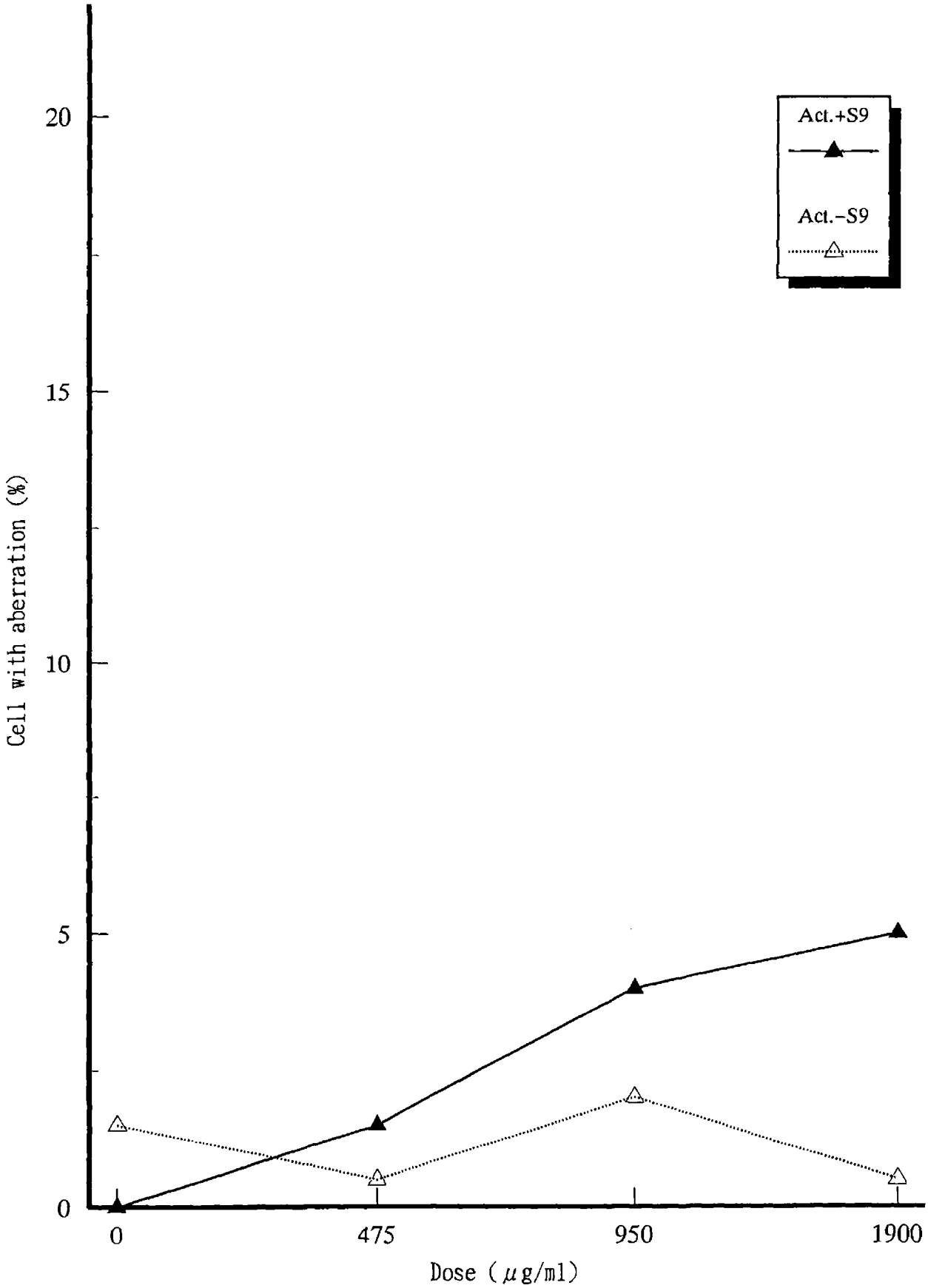


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by Benzyltrimethylammoniumchloride [activation method]

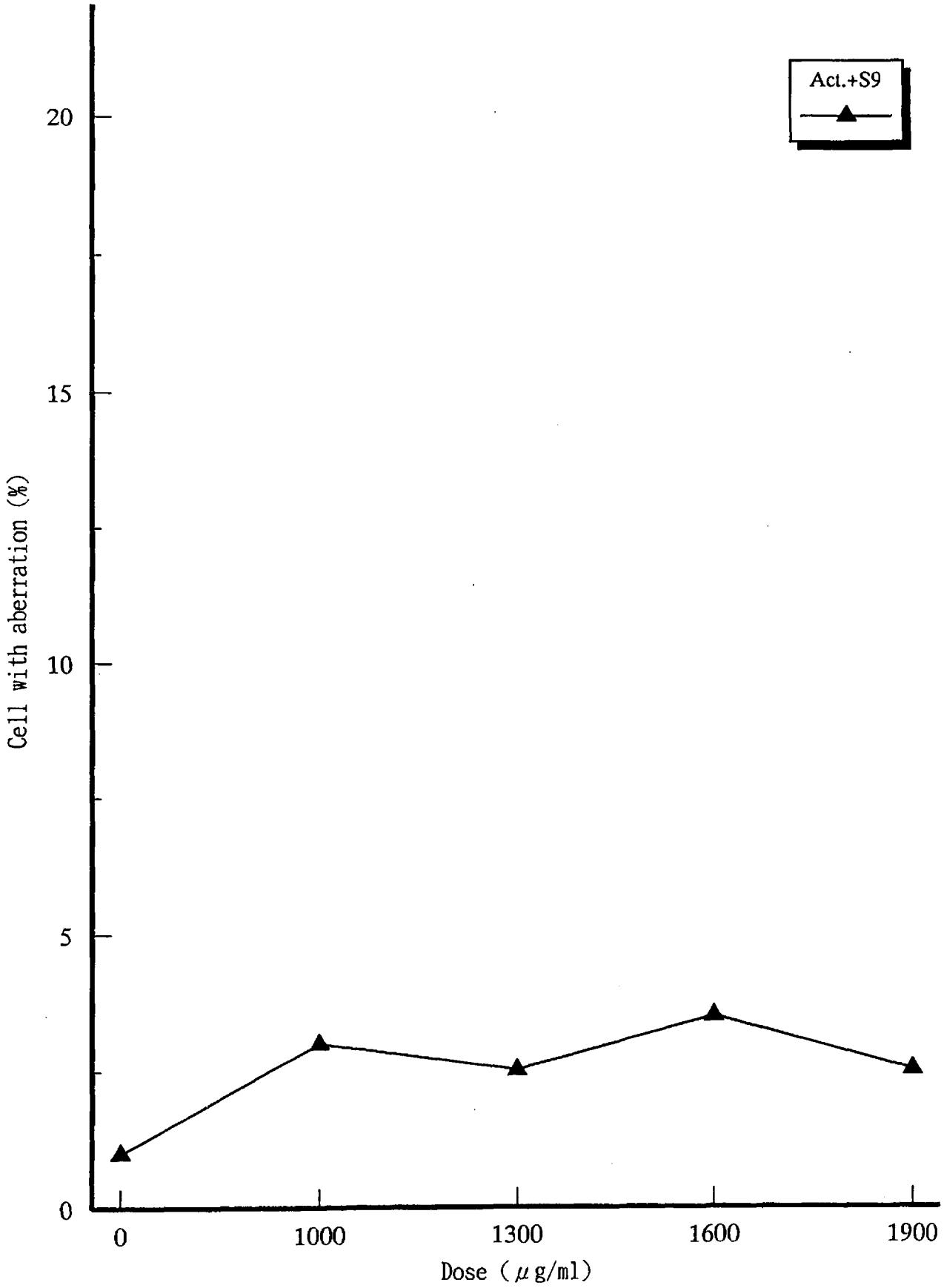


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by Benzyltrimethylammoniumchloride at the confirmatory test [activation method : +S9]

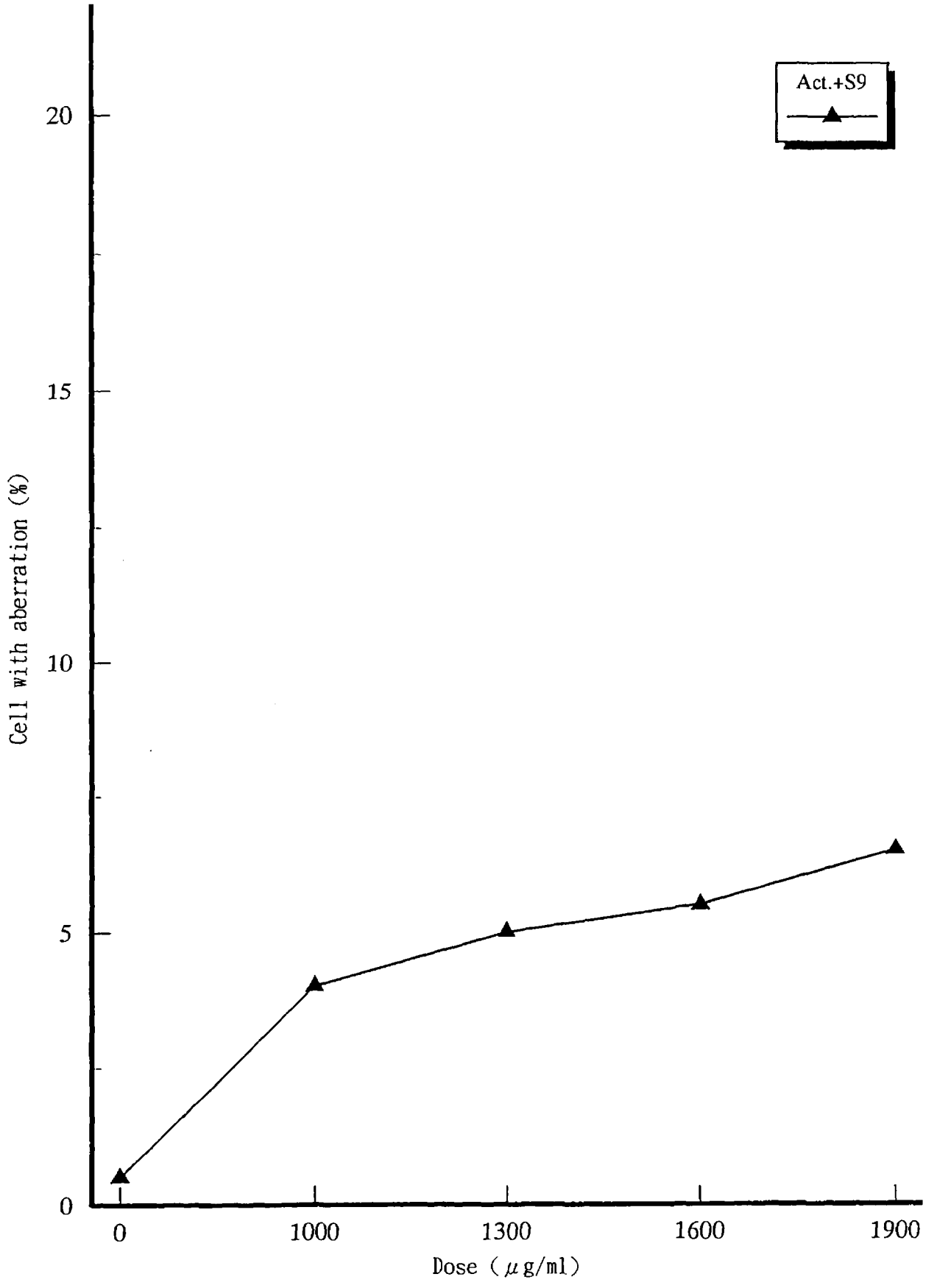


Figure 6. Incidence of structural aberrations induced by Benzyltrimethylammoniumchloride at the confirmatory test [activation method : +S9]

Table 1. Results of growth inhibition test on Benzyltrimethylammoniumchloride [direct method]

24 h treatment				48 h treatment			
Dose (μg/ml)	Survival (%)		[Mean]	Dose (μg/ml)	Survival (%)		[Mean]
0	100.0	100.0	[100.0]	0	100.0	100.0	[100.0]
88.6	97.9	98.3	[98.1]	88.6	95.5	93.5	[94.5]
148	94.6	93.9	[94.3]	148	94.9	93.7	[94.3]
246	91.2	90.7	[91.0]	246	72.4	70.6	[71.5]
410	70.0	78.6	[74.3]	410	54.8	54.1	[54.4]
684	61.9	64.1	[63.0]	684	41.5	41.1	[41.3]
1140	51.2	54.6	[52.9]	1140	28.5	29.9	[29.2]
1900	44.8	45.5	[45.1]	1900	22.7	21.7	[22.2]

50% Growth inhibition dose was as follows:

24 h treatment -------- 1311 (μg/ml)

48 h treatment -------- 585 (μg/ml)

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

With S9 mix				Without S9 mix			
Dose (μg/ml)	Survival (%)		[Mean]	Dose (μg/ml)	Survival (%)		[Mean]
0	100.0	100.0	[100.0]	0	100.0	100.0	[100.0]
88.6	100.2	100.9	[100.6]	88.6	83.5	84.1	[83.8]
148	105.1	104.9	[105.0]	148	78.5	84.9	[81.7]
246	101.7	101.4	[101.6]	246	72.7	75.4	[74.1]
410	101.8	101.6	[101.7]	410	82.9	94.4	[88.6]
684	100.2	100.9	[100.5]	684	79.0	91.3	[85.2]
1140	99.9	99.6	[99.8]	1140	84.3	91.3	[87.8]
1900	105.4	101.7	[103.6]	1900	74.5	80.6	[77.5]

50% Growth inhibition dose was as follows:

With S9 mix ---------- Not inhibited

Without S9 mix -------- Not inhibited

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

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge-ment
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline #	0	200	2	1	1	1	0	0	2.5 -	1.5 -	2.5 -	—
Test sub.	475	200	0	0	0	1	0	0	0.5 -	0.5 -	0.5 -	—
	950	200	1	0	0	0	0	0	0.5 -	0.0 -	0.0 -	—
	1900	200	0	0	0	1	0	0	0.5 -	0.5 -	0.5 -	—
MMC ##	0.05	200	25	76	1	97	1	0	71.0 +	69.0 +	1.0 -	+

#: Solvent control ##: Positive control (mitomycin C)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange oth: Others

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

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge-ment
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline #	0	200	1	0	0	0	0	0	0.5 -	0.0 -	0.5 -	−
Test sub.	475	200	1	1	0	1	0	0	0.5 -	0.5 -	0.5 -	−
	950	200	1	0	0	0	0	0	0.5 -	0.0 -	1.5 -	−
	1900	200	0	0	0	1	0	0	0.5 -	0.5 -	3.0 -	−
MMC ##	0.025	200	15	45	1	66	3	0	50.5 +	47.5 +	0.5 -	+

#: Solvent control ##: Positive control (mitomycin C)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange oth: Others

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

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge-ment
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline #	0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	0.5 -	−
Test sub.	475	200	0	0	0	3	0	0	1.5 -	1.5 -	0.0 -	−
	950	200	1	4	0	5	1	1	4.0 -	4.0 -	3.5 -	−
	1900	200	3	3	0	9	0	0	5.0 ±	5.0 ±	2.5 -	±
CP ##	12.5	200	7	36	0	61	2	1	43.5 +	42.0 +	0.5 -	+

#: Solvent control ##: Positive control (cyclophosphamide)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange oth: Others

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

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge-ment
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth				
Saline #	0	200	2	0	0	0	1	0	1.5 -	0.5 -	0.5 -	—
Test sub.	475	200	1	0	0	0	0	0	0.5 -	0.0 -	0.0 -	—
	950	200	3	1	0	0	0	0	2.0 -	0.5 -	1.0 -	—
	1900	200	1	0	0	0	0	0	0.5 -	0.0 -	2.0 -	—
CP ##	12.5	200	0	1	0	1	0	0	1.0 -	1.0 -	0.0 -	—

#: Solvent control ##: Positive control (cyclophosphamide)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange oth: Others

Table 7. Results of the confirmative examination of Benzyltrimethylammoniumchloride [activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with aberrations							Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge-ment
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth	pol				
Saline #	0	100	1	0	0	1	0	0	0	1.0 -	0.5 -	0.0 -	−
		100	0	0	0	0	0	0	0				
Test sub.	1000	100	0	1	0	2	0	0	1	3.0 -	3.0 -	1.0 -	−
		100	0	2	0	2	1	0	1				
	1300	100	1	0	0	2	0	0	0	2.5 -	2.0 -	1.0 -	−
		100	0	0	0	2	0	0	2				
	1600	100	1	0	0	1	0	0	0	3.5 -	3.0 -	0.0 -	−
		100	1	2	0	4	0	0	0				
	1900	100	0	0	1	1	0	0	2	2.5 -	2.0 -	1.0 -	−
		100	1	0	0	1	1	0	0				
CP ##	12.5	100	13	22	0	69	2	0	2	74.0 +	72.5 +	1.5 -	+
		100	13	21	0	68	1	0	1				

#:Solvent control ##: Positive control (cyclophosphamide)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange
oth: Others pol: Polyploid cell

Table 8. Results of the confirmative examination of Benzyltrimethylammoniumchloride [activation method : +S9]

Compound	Dose (μg/ml)	Number of cells	No. of cells with aberrations							Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judge-ment
			gap	ctb	csb	cte	cse	oth	pol				
Saline #	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0.5 -	0.5 -	0.0 -	−
		100	0	0	0	1	0	0	0				
Test sub.	1000	100	0	1	0	3	0	0	0	4.0 -	4.0 -	0.0 -	−
		100	1	1	0	5	0	0	0				
	1300	100	1	2	0	7	0	0	1	5.0 ±	4.5 -	0.5 -	±
		100	1	0	0	2	0	0	0				
	1600	100	0	0	0	5	0	0	0	5.5 ±	5.5 ±	0.0 -	±
		100	1	2	0	5	0	0	0				
	1900	100	0	0	0	4	0	0	1	6.5 ±	6.5 ±	1.0 -	±
		100	0	2	0	8	0	1	1				
CP ##	12.5	100	6	21	0	60	0	0	1	63.0 +	62.0 +	1.0 -	+
		100	5	16	0	56	0	0	1				

#:Solvent control ##: Positive control (cyclophosphamide)

ctb: Chromatid break csb: Chromosome break cte: Chromatid exchange cse: Chromosome exchange
oth: Others pol: Polyploid cell