

最終報告書

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシドのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：4182（115-100）

平成12年7月13日

試験委託者
厚生省 生活衛生局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目次

1. 要約.....	3
2. 表題.....	4
3. 試験目的.....	4
11. 被験物質.....	6
12. 試験材料および方法.....	7
13. 試験結果.....	15
14. 考察および結論.....	16
15. 参考文献.....	17

Figures		F-1~5
Figure 1	Dose-survival curves of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment]	F-1
Figure 2	Dose-survival curve of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [continuous treatment]	F-2
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment:-S9]	F-3
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment:+S9]	F-4
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [continuous treatment:24h]	F-5

Tables		T-1~5
Table 1	Results of growth inhibition test on N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment]	T-1
Table 2	Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment : -S9]	T-2
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment : +S9]	T-3
Table 4	Results of growth inhibition test on N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [continuous treatment]	T-4
Table 5	Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [continuous treatment : 24h]	T-5

1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において、N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシドは染色体異常を誘起しないものと判断した。

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド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、試験用量を設定した。染色体異常試験では短時間処理法-S9 処理および+S9 処理で 10 mM 相当の濃度を含む 228, 455 および 910 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド処理群の場合、-S9 処理、+S9 処理の各用量群とも明確な染色体異常の誘発は認められなかった。従って、228, 455 および 910 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 用量を用いた連続処理法 24 時間処理での染色体異常試験を実施した。同試験法においても、N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド処理による染色体異常の誘発は認められなかった。

また、短時間処理法-S9 処理および連続処理法 24 時間処理の陽性対照物質マイトマイシン C (MMC) ならびに短時間処理法+S9 処理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. 表題

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシドのは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* における染色体異常誘発性を検討した。

11. 被験物質

11.1. 被験物質名

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド
【N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide】

11.2. ロット番号

11.3. 純度

20.0 wt%

11.4. 保管条件

冷暗所

11.5. 別名

TMAH

11.6. CAS 番号

75-59-2

11.7. 構造式又は示性式

$(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$

11.8. 分子量

91.03

11.9. 常温における性状

水溶液（無色透明な液体）

11.10. 溶媒に対する溶解度等

水とは任意に溶解する。

11.11. 安定性

安定

11.12. 取り扱い上の注意

強アルカリ（pH 約 14）

11.13. 残余被験物質の処理

被験物質の残余は、被験物質提供元に返却した。

12. 試験材料および方法

12.1. 試験細胞株

哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に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）を選択した。

CHL細胞は昭和59年11月15日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受け、一部についてはジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；Merck KGaA；純度99.7%以上；Lot No. K23082678 651）を容量比で10%添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞を融解し、3～5日ごとに継代したものを使用した。

なお、細胞増殖抑制試験で継代数8および15の細胞を、染色体異常試験では13および23の細胞を用いた。

12.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（IWAKI：旭テクノグラス株式会社；Lot No. 99560002【予備試験－短時間処理法】，18710【本試験－短時間処理法，予備試験－連続処理法】，19701【本試験－連続処理法】）に、メンブランフィルター（孔径0.45 μm：Featuring Corning and Coastar Products）を用いて濾過除菌した非働化（56℃，30分）済み仔牛血清（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1014735【予備試験－短時間処理法】，1019033【本試験，予備試験－連続処理法】）を最終濃度で10%になるよう添加した。調製後の培養液は使用時まで冷暗所（4℃）に保存した。

12.3. 培養条件

CO₂インキュベーター（Formaおよび三洋電機メディカシステム株式会社）を用い、CO₂濃度5%、37℃の条件で細胞を培養した。

12.4. S9 mix

製造後6ヵ月以内のS9 mix（キッコーマン株式会社；Lot No. CAM-396）を試験に使用した。

12.4.1. S9 の調製方法

調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質ならびに誘導方法を以下に示す。

a. ロット番号	RAA-396
b. 調製日	平成 11 年 1 月 22 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
c. 使用動物	ラット：Sprague-Dawley 系
d. 性/週齢	雄/7 週齢
e. 体重	207~252 g
f. 臓器	肝臓
g. 誘導物質	Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF)
h. 投与量	PB：30 mg/kg 1 回 (1 日目),
および	60 mg/kg 3 回 (2~4 日目)
投与回数	BF：80 mg/kg 1 回 (3 日目)
i. 投与方法	腹腔内投与
j. 蛋白含量	26.50 mg/mL

12.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す。

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

12.5. 被験物質液の調製

本被験物質は水溶液であり、かつ、溶液中で安定であることから被験物質を注射用水（株式会社 大塚製薬工場；Lot No. K8F80）を用いて希釈して調製原液とした。この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。ただし、原液中での被験物質濃度が 20.0 wt%であることを考慮して調製した。

12.6. 対照群

12.6.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒で試験した。

12.6.2. 陽性対照（短時間処理法-S9 処理）

注射用水（株式会社 大塚製薬工場；Lot No. K8F80）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；Lot No. 247AHK）を生理食塩液（Lot No. K8I84）を用いて希釈した後、0.1 µg/mL の用量で試験した。

12.6.3. 陽性対照（短時間処理法+S9 処理）

注射用水（Lot No. K8F80）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；Lot No. 8016）を生理食塩液（Lot No. K8I84）を用いて希釈した後、12.5 µg/mL の用量で試験した。

12.7. 用量設定試験（予備試験）

12.7.1. 試験用量

予備的な試験（6.48, 21.6, 72.0, 240 および 800 µg/mL の 5 用量：公比 10/3）の結果、-S9 処理（処理後 6 時間時点での観察）および+S9 処理の 800 µg/mL においても明確な細胞増殖抑制作用は観察されなかった。本結果を参考に、細胞増殖抑制試験の用量として下記に示した 10 mM 相当の濃度を含む 6 用量（公比 5/3）を設定した。

試験	用量数	試験用量 (µg/mL)
短時間処理法-S9 処理	6	70.8 ~ 910
短時間処理法+S9 処理	6	70.8 ~ 910

12.7.2. 使用ウエル数

1 用量当たり 2 ウエルを用いた。

12.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート（細胞培養用マルチプレート 12F：住友ベークライト株式会社）の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 400 μ L を除いた後、使用溶媒（以下溶媒）あるいは被験物質液を 60 μ L 加えた。6 時間培養を続けた後、各ウェルの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 1020975）を用いて細胞を洗浄した。培養液（500 μ L）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（陰性対照に対する比）を求めた。

12.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 500 μ L を除き、S9 mix を 100 μ L 添加した後、溶媒あるいは被験物質液を 60 μ L 加えた。

以下の操作は 12.7.3. に記載の方法に準じた。

12.7.5. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供し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。10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：和光純薬工業株式会社；Lot No. ACG8912）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；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。各ウェルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を 3.0 mL 加え、5 分間放置した後、580 nm での吸光度を分光光度計（105-50 型；株式会社 日立製作所）を用いて測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（=細胞生存率）を各用量群について求めた。

なお、細胞生存率の平均値は各ウェルの四捨五入する以前の値から求めた。

12.7.6. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1 および Table 1 に示した。

短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理では顕著な細胞増殖抑制作用は観察されなかった。

なお、被験物質暴露終了時、546 μ g/mL 以上において培養液の pH がアルカリ性を示していた。

12.8. 染色体異常試験（本試験）

12.8.1. 試験用量

細胞増殖抑制試験結果を基に、各試験系とも 3 用量（公比 2：下表参照）を本試験の用量に設定した。

試験	試験用量 (μg/mL)		
短時間処理法-S9 処理	228	455	910
短時間処理法+S9 処理	228	455	910

12.8.2. 試験プレート数

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

12.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート（細胞培養用シャーレ：住友ベークライト株式会社）に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 2 mL を除いた後、溶媒あるいは被験物質液または陽性対照物質溶液 300 μL を加えた。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1022866）を用いて細胞を洗浄した。培養液（3 mL）を新鮮なものに交換し、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

12.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 2.5 mL を除き S9 mix を 500 μL 添加した後、溶媒あるいは被験物質液または陽性対照物質溶液 300 μL を加えた。以下の操作は 12.8.3. に記載の方法に準じた。

12.8.5. 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となるようコルセミド溶液 (GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 1017694) 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 (GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 1022349) 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/min で5分間遠心分離して培養液を除いた後, 37°Cに保温しておいた75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を5 mL 加え, 37°C中で16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°C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 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8 : Merck KGaA ; Lot No. TP 334974 816) を用いて希釈した1.2%ギムザ染色液 (Merck KGaA ; Lot No. 840288308) 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.

12.8.6. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に陰性対照, 各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて, ATP フォトメーター (ルミテスター K-100 : キッコーマン株式会社) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した. なお, 細胞生存率の平均値は各プレートの四捨五入する以前の値から求めた.

12.8.7. 染色体の観察

各プレート当たり100個, すなわち1用量当たり200個の分裂中期像を顕微鏡下 (×600) で観察し, 染色体の形態的变化としてギャップ (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, 染色分体あるいは染色体上に非染色性領域が存在し, 染色体切断様の像が認められる場合, その非染色性領域が当該染色体の分体幅未満, かつ本来の位置からずれていない場合にのみギャップとして計数した. また, 数的異常として1用量当たり200個の分裂中期像を観察し, 倍数体等の出現数についても計数した.

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.

12.9. 連続処理法

短時間処理法において陰性と判定されたことから、以下に示す代謝活性化によらない条件での連続処理法を実施した。

12.9.1. 陽性対照 (24 時間処理)

注射用水 (株式会社 大塚製薬工場; Lot No. K8K78) 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; Lot No. 247AHK) を生理食塩液 (株式会社 大塚製薬工場; Lot No. K8I84) を用いて希釈した後、0.05 µg/mL の用量で試験した。

12.9.2. 用量設定試験 (24 時間処理)

10 mM 相当の 910 µg/mL を最高用量とした計 6 用量 (公比 5/3) を細胞増殖抑制試験の用量とした。

1 用量当たり 2 ウエルを用いた。

各ウエルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、溶媒あるいは被験物質液 100 µL を加えた。さらに 24 時間培養を続けた後、各ウエルから培養液を除き、生理食塩液を用いて細胞を洗浄した。10% 中性緩衝ホルマリン液 (Lot No. KSQ9546) を加えて細胞を固定した後、0.1% クリスタル・バイオレット (Lot No. 607E4067) 水溶液で染色した。各プレートを水洗した後、乾燥させた。各プレートに色素溶出液を 2.0 mL 加えた後、分光光度計を用いて 580 nm での吸光度を測定した。吸光度を各用量群について求め、50% 細胞増殖抑制濃度を算出した。なお、細胞生存率の平均値は各ウエルの四捨五入する以前の値から求めた。

12.9.3. 細胞増殖抑制試験結果 (24 時間処理)

試験結果を Figure 2 および Table 4 に示した。

連続処理法 24 時間処理では顕著な細胞増殖抑制作用は観察されなかった。なお、被験物質暴露終了時、高用量の 910 µg/mL において培養液の pH がアルカリ性を示していた。

12.9.4. 染色体異常試験 (24 時間処理)

細胞増殖抑制試験結果を基に、228, 455 および 910 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 用量 (公比 2) を本試験の用量に設定した。1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。各プレートに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液 500 μL を加え、さらに 24 時間培養を続けた。

染色体標本作製の 2 時間前に、コルセミド溶液 (Lot No. 1019640) を添加した。次いで、0.25% トリプシン溶液 (Lot No. 1017538) を用いてプレートより細胞を剥離した。低張処理、固定処理した後、細胞浮遊液を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 1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (Lot No. TP 334974 816) を用いて希釈した 1.2% ギムザ染色液 (Lot No. 840288308) で染色した後、軽く水洗し、乾燥させた。

1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下で観察した。また、数的異常として 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

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。

また、染色体標本作製時に陰性対照、各被験物質処理群および陽性対照の各プレートについて、細胞増殖に関するデータを採取した。

12.10. 結果の解析

最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めない場合について行った。

異常細胞の出現頻度が 5% 未満を陰性、5% 以上 10% 未満を疑陽性、10% 以上、かつ再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合、陽性と判定した。

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

13. 試験結果

13.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Table 2 および Appendix 1 に示した。

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド処理群での染色体構造異常ならびに倍数性細胞の出現頻度は、陰性対照と同等であった。また、試験用量に依存した細胞生存率のわずかな減少傾向が観察された。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 66.0%を示した。

なお、被験物質暴露終了時に高用量の 910 µg/mL において培養液の pH が僅かにアルカリ性を示していた。

13.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Table 3 および Appendix 2 に示した。

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド処理群での染色体構造異常ならびに倍数性細胞の出現頻度は、陰性対照と同等であった。また、被験物質処理による強い細胞増殖抑制作用は観察されなかった。

一方、陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 74.0%であった。

なお、被験物質暴露終了時に高用量の 910 µg/mL において培養液の pH が僅かにアルカリ性を示していた。

13.3. 連続処理法 24 時間処理

試験結果を Table 5 および Appendix 3 に示した。

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド処理群での染色体構造異常ならびに倍数性細胞の出現頻度は、陰性対照と同等であった。また、被験物質処理による強い細胞増殖抑制作用は観察されなかった。

一方、陽性対照の MMC 処理群での染色体構造異常出現頻度は 31.5%であった。

なお、被験物質暴露終了時に高用量の 910 µg/mL において培養液の pH が僅かにアルカリ性を示していた。

14. 考察および結論

N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシドの変異原性, 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, 短時間処理法-S9 処理ならびに+S9 処理とも 10 mM 相当の 910 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで検討した.

その結果, N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシド処理では明らかな染色体異常の誘発は認められなかった. 従って, 連続処理法 24 時間処理による試験を実施したが, 同様に染色体異常の誘発は認められなかった. 本被験物質処理直後, 培養液の pH は 910 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でおよそ 9.6~9.7 を示したが, 暴露終了時では 7.8~8.0 にまで回復しており, 染色体異常試験結果ならびに森田らの報告¹⁾から試験系に影響をおよぼしたとは考えられなかった.

また, 類縁体である Tetramethylammonium bromide, Tetramethylammonium chloride, Tetramethylammonium iodide, Tetramethylammonium fluoride tetrahydrate, Tetramethylammonium hexafluorophosphate, Tetramethylammonium hydroxide pentahydrate および Tetramethylammonium tetrafluoroborate の変異原性に関する報告はなかった.

一方, 陰性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 N,N,N-トリメチルメタンアミンヒドロキシドのは乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陰性と判定した.

15. 参考文献

- 1) Morita, T., Watanabe, Y., Takeda, K. and Okumura, K. : Effects oh pH in the in vitro chromosomal aberration test, *Mutat. Res.*, 225 : 55~60, 1989
- 2) Morita, T., Nagaki, T. Fukuda, I. and Okumura, K. : Effects oh pH on the activity and stability of clastogens in the in vitro chromosomal aberration test with Chinese hamster ovary K1 cells, *Mutat. Res.*, 262 : 159~166, 1991

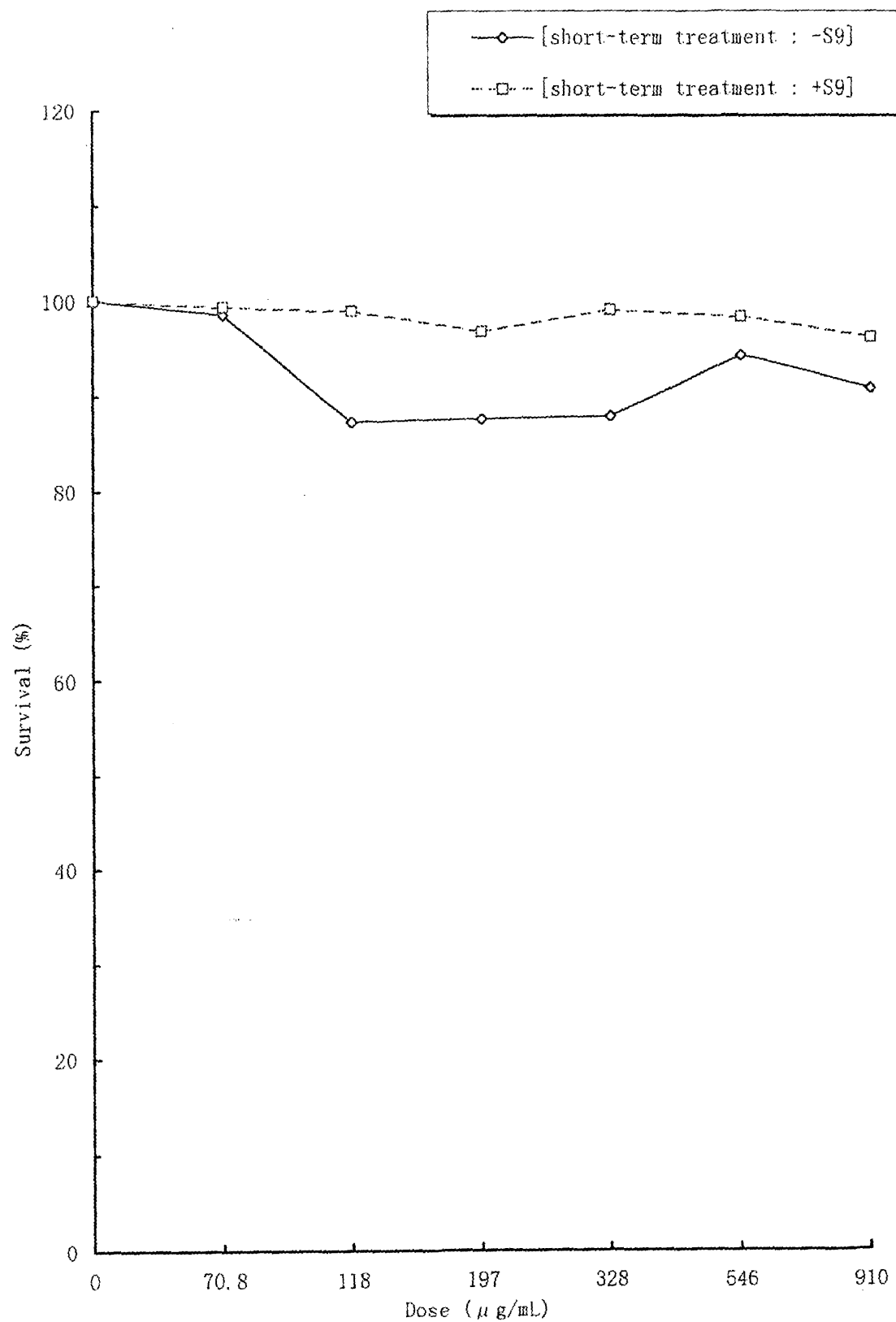


Figure 1. Dose-survival curves of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment]

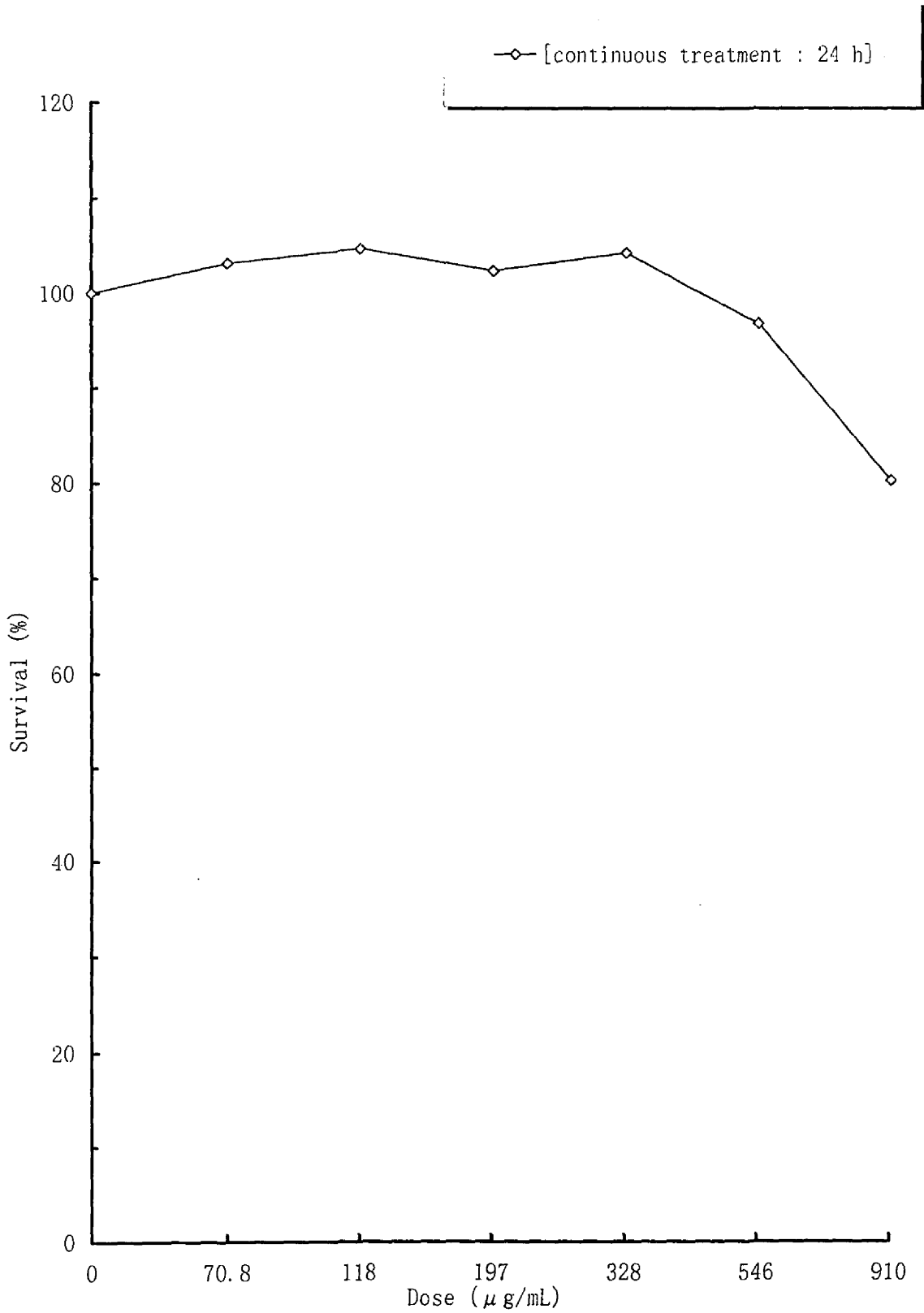


Figure 2. Dose-survival curve of N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [continuous treatment]

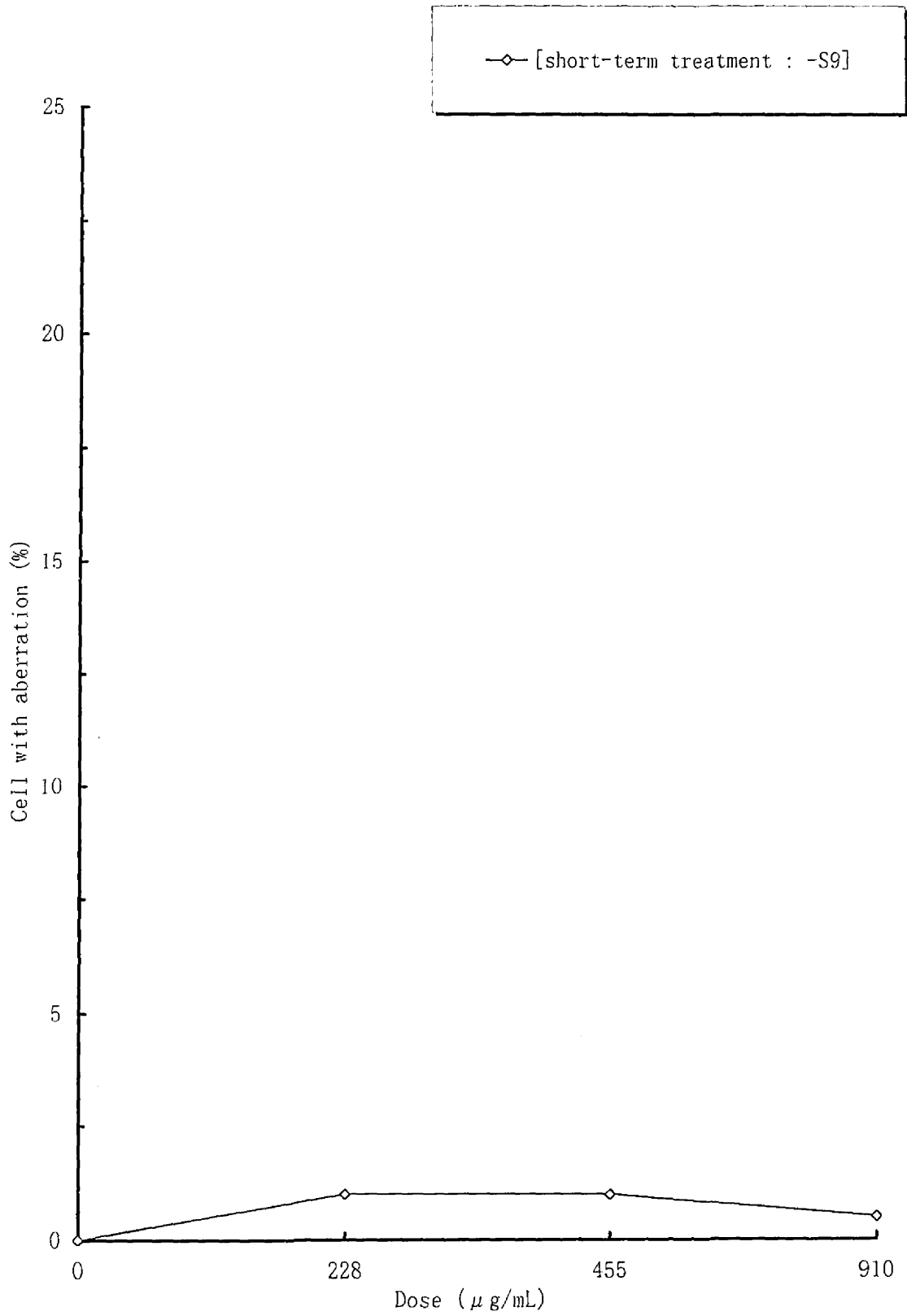


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment:-S9]

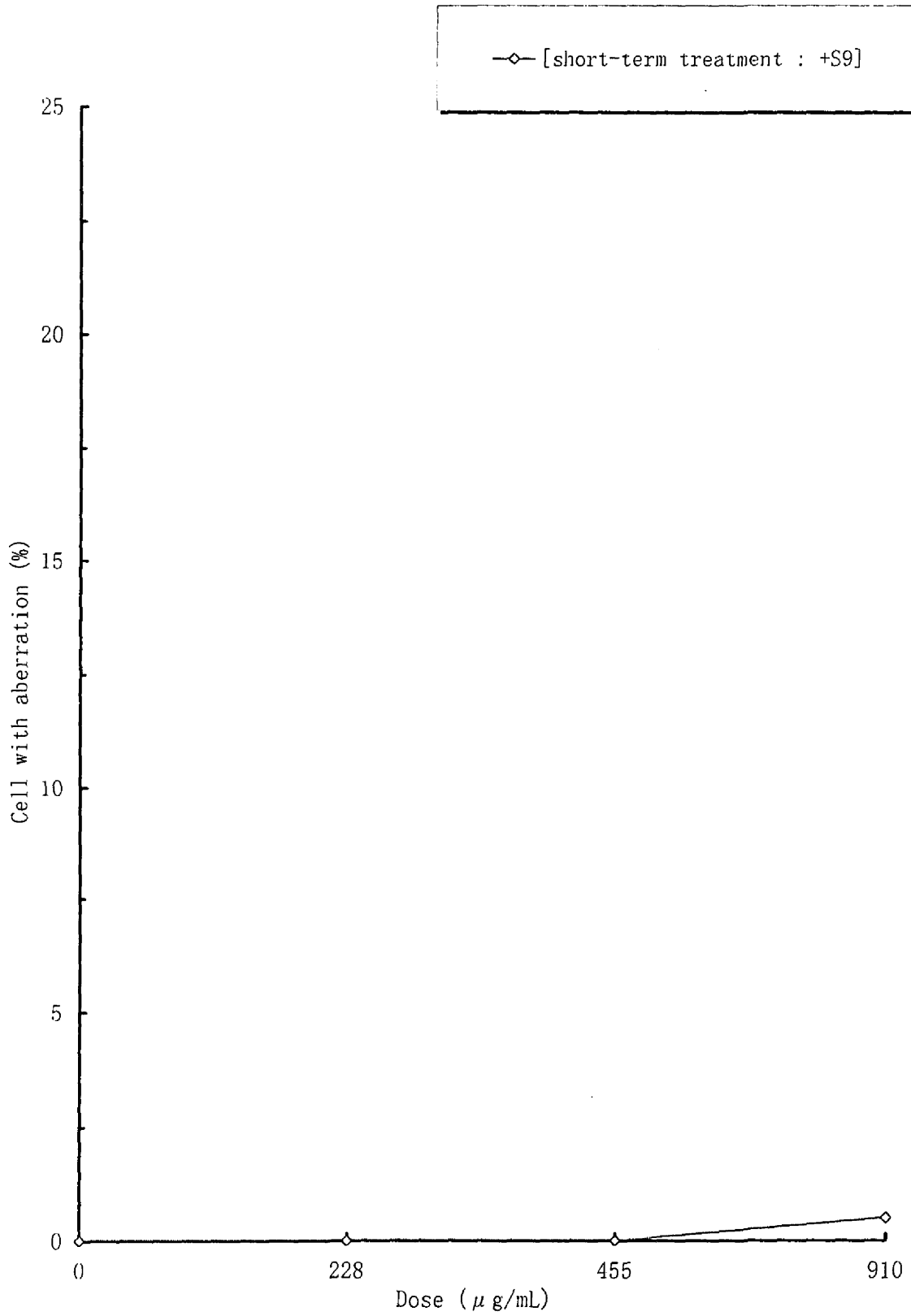


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment: +S9]

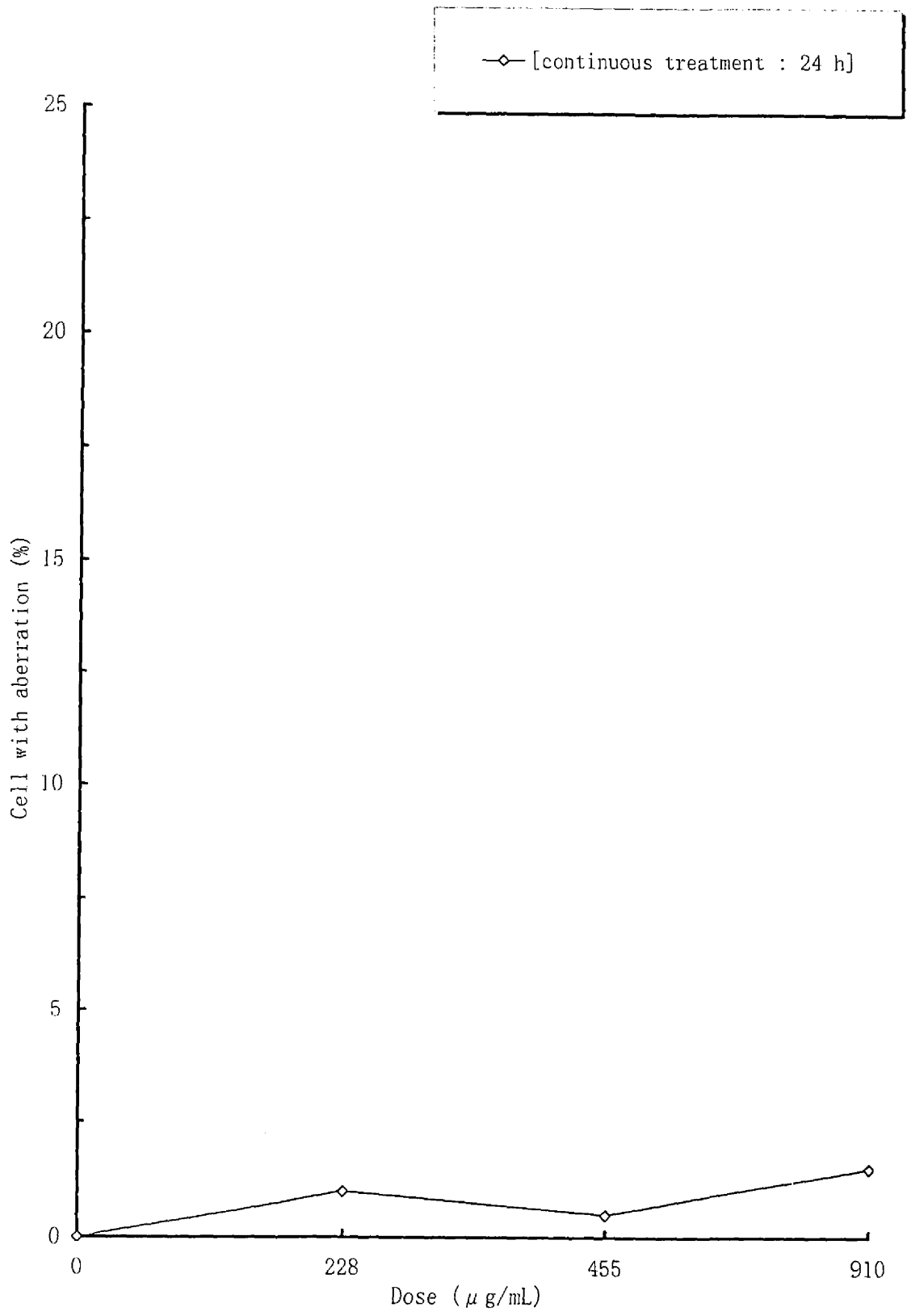


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [continuous treatment:24h]

Table 1. Results of growth inhibition test on N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [short-term treatment]

Exp. No. 4182 (115-100)

[short-term treatment : -S9]				[short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]
D. W. a)	0	100.0 100.0	[100.0]	D. W. a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	70.8	98.9 98.2	[98.6]	Test substance	70.8	100.2 98.5	[99.4]
	118	89.7 84.7	[87.2]		118	99.0 98.7	[98.9]
	197	89.8 85.3	[87.6]		197	98.3 95.2	[96.8]
	328	89.2 86.5	[87.9]		328	100.0 97.9	[99.0]
	546	94.0 94.4	[94.2]		546	98.1 98.3	[98.2]
	910	88.5 93.1	[90.8]		910	96.1 96.1	[96.1]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[short-term treatment : -S9] ——— Not inhibited

[short-term treatment : +S9] ——— Not inhibited

a): Negative control

Table 2. Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide
[short-term treatment : -S9]

Exp. No. 4182 (115-100)

Compound	Dose (μ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
D. W. a)	0	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	-
Test substance	228	110.1	200	3	1	1	0	0	0	1.0 -	0.5 -	-
	455	83.6	200	0	1	1	0	0	0	1.0 -	0.0 -	-
	910	78.5	200	1	1	0	0	0	0	0.5 -	1.0 -	-
MBC b)	0.1	63.8	200	11	52	122	0	0	0	66.0 +	0.5 -	+

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

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide
[short-term treatment : +S9]

Exp. No. 4182 (115-100)

Compound	Dose (μ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
D.W. a)	0	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0.0 -	1.0 -	-
Test substance	228	97.2	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.5 -	-
	455	106.4	200	1	0	0	0	0	0	0.0 -	1.0 -	-
	910	95.6	200	0	1	1	0	0	0	0.5 -	0.5 -	-
CP b)	12.5	74.5	200	12	52	140	0	0	1	74.0 +	0.0 -	+

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

a): Negative control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 4. Results of growth inhibition test on N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide [continuous treatment]

Exp. No. 4182 (115-100)

[continuous treatment : 24 h]			
Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]
D. W. a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	70.8	103.3 102.8	[103.1]
	118	104.1 105.0	[104.6]
	197	101.7 102.6	[102.2]
	328	104.3 103.7	[104.0]
	546	96.5 96.6	[96.6]
	910	78.4 81.8	[80.1]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[continuously treatment : 24 h] ——— >910 μ g/mL

a): Negative control

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N,N-Tetramethylammonium hydroxide
[continuous treatment : 24 h]

Exp. No. 4182 (115-100)

Compound	Dose (μ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
D.W. a)	0	100.0	200	2	0	0	0	0	0	0.0 -	0.5 -	-
Test substance	228	97.7	200	0	1	1	0	0	0	1.0 -	0.5 -	-
	455	93.8	200	1	1	0	0	0	0	0.5 -	1.0 -	-
	910	89.0	200	0	0	3	0	0	0	1.5 -	0.5 -	-
MMC b)	0.05	60.1	200	14	21	54	0	0	0	31.5 +	0.5 -	+

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

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)