1-ナフチル酢酸の
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

厚生省生活衛生局　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

緒　言 ---------- 2

材料および方法 ---------- 3

1. 使用した細胞 ---------- 3

2. 培養液の調製 ---------- 3

3. 培養条件 ---------- 3

4. 被験物質および陽性対照物質 ---------- 3

5. 被験物質の調製 ---------- 4

6. 試験条件 ---------- 5

7. 細胞増殖抑制試験 ---------- 5

7.1 処理条件 ---------- 5

7.2 標本作製法 ---------- 6

7.3 増殖抑制の指標とその結果 ---------- 6

8. 本試験の群構成 ---------- 6

8.1 直接法 ---------- 6

8.2 代謝活性化法 ---------- 7

8.3 追加試験（in vitro 小核試験） ---------- 7

9. 染色体標本作製法 ---------- 8

10. 染色体分析 ---------- 9

11. 小核標本作製法と観察 ---------- 9

12. 記録と判定 ---------- 10

結果および考察 ---------- 11

結　論 ---------- 12

特記事項 ---------- 12

文　献 ---------- 12

Tables 1～6，Figure 1

【要　　約】

1-ナフチル酢酸の染色体異常誘発能を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL）を用いて検討した。

1. 細胞増殖抑制試験

直接法48時間処理における約50%の増殖抑制を示す濃度は1.1 mg/mℓであった。また、代謝活性化法のS9mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ1.6 mg/mℓおよび1.7 mg/mℓであった。

以上の結果をもとに染色体異常試験において、直接法では1.1 mg/mℓ、代謝活性化法ではS9mix存在下および非存在下ともに1.7 mg/mℓの処理濃度をそれぞれ高濃度とし、それぞれその1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度として設定した。

2. 染色体異常試験

直接法により、CHL細胞を24時間処理したすべての処理群において、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。また、48時間処理した最高処理濃度（1.1 mg/mℓ）では、倍数性細胞の有意な増加が認められたが、その出現頻度は2%以下であり、判定は陰性であった。

一方、代謝活性化法においては、S9mix存在下および非存在下の最高処理濃度（1.7 mg/mℓ）で、観察した細胞のそれぞれ9%および7%（gapを含む）に染色体の構造異常が誘発され、判定は疑陽性であった。そこで、再現性を確認するために代謝活性化法のS9mix存在下および非存在下について、染色体異常誘発を精度よく反映できる*in vitro*小核試験による追加試験を実施したところ、S9mix存在下および非存在下の高濃度群（1.7 mg/mℓ）で小核の有意な増加が認められ、染色体異常誘発性に関して再現性が得られた。

誘発された染色体異常の要因に関しては、被験物質を添加すると培養液が黄色化することからpHの低下による影響も示唆された。

3. 結論

1-ナフチル酢酸は、今回実施した試験条件下で、試験管内のCHL細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

【緒　　言】

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、1-ナフチル酢酸の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞（CHL）を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

上記の試験は、「新規化学物質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）およびOECDガイドライン：473に準拠し、化学物質GLP（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

【材料および方法】

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク（JCRB）から入手（1988年2月、入手時：継代4代）したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

このCHL細胞株は、一般的に化学物質に対して検出感度が高いため常用されている。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清（FCS：JRH BIOSCIENCES、ロット番号：1C2073）を10%添加したイーグルMEM培養液を用いた。MEM培養液は、イーグルMEM培地「ニッスイ」①粉末（日水製薬(株)）9.4 gを1 ℓの蒸留水に溶解し、121 ℃で15分間、高圧蒸気滅菌したのち、L-グルタミン（滅菌済み、日水製薬(株)）300 mgと10% $NaHCO_3$溶液12.5 mℓを加えて調製した。2倍濃度のMEM培養液は、上記の培地9.4 gを500 mℓの蒸留水に溶解し、以下MEM培養液と同様に調製した。

3. 培養条件

2×10^4個のCHL細胞を、培養液5 mℓを入れたディッシュ（径6 cm、Corning）に播き、37 ℃のCO_2インキュベーター（5% CO_2）内で培養した。

4. 被験物質および陽性対照物質

［被験物質］（　　本実験データより）

（名　　称）1-ナフチル酢酸

（略　　号）NA

（CAS　No.）86-87-3

（ロット番号）

（分子式）$C_{12}H_{10}O_2$

（分子量）186.2

（純　　度）96.4%（不純物としてβ-ナフチル酢酸3.5%）

（性　　状）白色あるいは淡黄色粉末で、水に0.038 g/100 mℓまで可溶、ジメチルスルフォキシドには難溶、アセトンに易溶、融点

131.8℃の物質である。

（提　　供　　者）

（保　存　条　件）　室温遮光保存

（安　　定　　性）　有効期限3年

（溶媒中での安定性）　秦野研究所分析化学研究室で実施した溶媒中での安定性試験では、3.125～340 mg/mℓ の濃度範囲で4時間は安定であった（Appendix 1）。

［陽性対照物質］

1）直接法の試験に用いる物質

（化　　学　　名）　マイトマイシン C

（略　　号）　MC

（ロ　ッ　ト　番　号）　703 AJK

（製　　造　　者）　協和醗酵工業(株)

（保　存　条　件）　冷暗所保存

2）代謝活性化法の試験に用いる物質

（化　　学　　名）　シクロホスファミド

（略　　号）　CPA

（ロ　ッ　ト　番　号）　67F-0155

（製　　造　　者）　Sigma Chemical Co.

（保　存　条　件）　冷暗所保存

5．被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はアセトン（和光純薬工業(株)、ロット番号：DCK1899）を用いた。原体を溶媒に溶解して原液（増殖抑制試験では 380 mg/mℓ、染色体異常試験では 220 および 340 mg/mℓ、小核試験では 340 mg/mℓ）を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、全ての試験において培養液の 0.5%（v/v）になるように加えた。染色体異常試験および小核試験においては、直接法および代謝活性化法に用いた高濃度群と低濃度群について、被験物質調製液の含量測定を秦野研究所分析化学研究室において行った。その結果、調製液の濃度は、すべて許容範囲内（平均含量が添加量の 85% 以上）の値であった（Appendix 2、

3）。

6. 試験条件

直接法では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、ディッシュに培養液5 mℓと各濃度の被験物質調製液25 μℓを加え、24時間および48時間処理した。

代謝活性化法では、細胞を3日間培養したのち培養液を捨て、MEM培養液、2倍濃度のMEM培養液、およびS9 mixをそれぞれ4：1：1の割合で混合した溶液3 mℓをディッシュに加えた。また、S9 mix非存在下の処理群においては、MEM培養液3 mℓをディッシュに加え、さらに15 μℓの被験物質調製液を加えて6時間処理した。処理終了後、新鮮な培養液に交換し、さらに18時間培養した。S9 mixの調製は下記の組成で行った。

追加試験として実施した *in vitro* 小核試験についても上記と同様の試験条件で実施した。

S9*	3
20 mM HEPES (pH 7.2)	2
50 mM MgCl2	1
330 mM KCl	1
50 mM G-6-P	1
40 mM NADP	1
蒸留水	1
合計	10 mℓ

* S9 ： Sprague-Dawley系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを投与して調製したキッコーマン(株)のS9（ロット番号：RAA-281, 1992年8月製造およびロット番号：RAA-292, 1993年5月製造）を購入し、使用時まで－80℃の超低温槽内に保存した。

7. 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及ぼす影響を調べた。

7.1 処理条件

直接法では48時間処理群について、また、代謝活性化法ではS9mix存在下および非存在下の処理群について細胞増殖抑制試験を実施した。処理濃度は、直接法および代謝活性化ともに0.06 ～1.90 mg/mℓの範囲の濃度を用いた。ディッシュは1濃度について2枚用いた。

7.2　標本作製法

培養終了後、培養液を捨てたのち、10% ホルマリン溶液を加え、細胞がディッシュに付着した状態で固定した。固定後、0.1% クリスタルバイオレット液で染色した。

7.3　細胞増殖の指標とその結果

被験物質の CHL 細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計（Monocellater、オリンパス光学工業(株)）を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、NA の約50% の増殖抑制を示す濃度を、50% をはさむ2濃度の値より算出したところ、直接法では 1.1 mg/mℓ であった。また、代謝活性化法の S9mix 存在下および非存在下における約 50% の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ 1.6 mg/mℓ および 1.7 mg/mℓ であった（Table 1、2、3 および Fig.1）。

8. 本試験の群構成

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、直接法では 1.1 mg/mℓ、代謝活性化法では 1.7 mg/mℓ とし、それぞれ高濃度群の 1/2 の濃度を中濃度、1/4 の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いた MC および CPA は、注射用水（大塚製薬工場(株)、ロット番号：K1G70 およびロット番号：K2L74）に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8.1　直接法

直接法では、3段階の被験物質処理濃度群に、対照群を含め下記の 11群を設け、各群 2 枚のディッシュを用いた。

群		濃度（mg/mℓ）	処理時間（hours）
1)	無処理対照	−	−
2)	溶媒対照	0	24
3)	NA	0.3	24
4)	NA	0.6	24
5)	NA	1.1	24
6)	陽性対照（MC）	0.00005	24

（前頁より続く）

	群	濃度（mg/mℓ）	処理時間（hours）
7）	溶媒対照	0	48
8）	NA	0.3	48
9）	NA	0.6	48
10）	NA	1.1	48
11）	陽性対照（MC）	0.00005	48

8.2　代謝活性化法

代謝活性化法では、3段階の被験物質処理濃度群に、対照群としてS9mixを加えない群を含め、下記の11群を設け、各群2枚のディッシュを用いた。

	群	濃度（mg/mℓ）	S9mixの有無	処理時間（hours）
1）	無処理対照	—	—	—
2）	溶媒対照	0	−	6-(18)
3）	NA	0.4	−	6-(18)
4）	NA	0.9	−	6-(18)
5）	NA	1.7	−	6-(18)
6）	陽性対照（CPA）	0.005	−	6-(18)
7）	溶媒対照	0	+	6-(18)
8）	NA	0.4	+	6-(18)
9）	NA	0.9	+	6-(18)
10）	NA	1.7	+	6-(18)
11）	陽性対照（CPA）	0.005	+	6-(18)

8.3　追加試験（*in vitro* 小核試験）

追加試験では、下記の3段階の被験物質処理濃度群に溶媒対照と陽性対照群を加え、代謝活性化法S9mix非存在下および存在下の10群を設けた。各群2枚のディッシュを用いた。

	群	濃度（mg/mℓ）	S9mixの有無	処理時間（hours）
1）	溶媒対照	0	−	6-(18)
3）	NA	0.4	−	6-(18)
4）	NA	0.9	−	6-(18)
5）	NA	1.7	−	6-(18)
6）	陽性対照（CPA）	0.005	−	6-(18)

（前頁より続く）

群	濃度（mg/mℓ）	S9mixの有無	処理時間（hours）
7） 溶媒対照	0	+	6-(18)
8） NA	0.4	+	6-(18)
9） NA	0.9	+	6-(18)
10） NA	1.7	+	6-(18)
11） 陽性対照（CPA）	0.005	+	6-(18)

9. 染色体標本作製法

1） 培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 μg/mℓ になるように培養液に加え、培養終了後、各群の細胞をリン酸緩衝液（Ca^{++}、Mg^{++}を含まない）で洗い、0.25% トリプシン溶液を用いてはがし、10 mℓ の遠沈管に集めた。

2） 1,000～1,200 rpm で5分間遠沈し、上清を捨てたのち、沈殿した細胞に3 mℓ の 0.075 M KCl 水溶液を加えることにより約30分間低張処理を行った。

3） 低張処理後、低張液の上層にカルノア液（氷酢酸：メタノール＝1：3 v/v） 約6 mℓを加え、下方から静かにピペッティングしながら混和して固定し、その後 1,000～1,200 rpm で5分間遠沈した。

4） 遠沈後上清を除き、再び新鮮なカルノア液を加えて細胞をピペッティングにより再浮遊させ、1,000～1,200 rpm で5分間遠沈した。この操作を数回繰り返した。

5） 遠沈して得た白色の細胞塊に、0.2～0.5 mℓ のカルノア液を加え、十分に懸濁させた。

6） 細胞浮遊液の少量を、あらかじめ洗浄しておいたスライドグラス上に滴下し、そのまま風乾した。

7） スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。

8） スライドグラスのフロスト部分に鉛筆で、試験系識別番号、暗番号およびスライド番号を記入した。

9） 乾燥したスライドは、ギムザ原液（Merck） 4.5 mℓ を M/15 リン酸緩衝液（pH 6.8） 150 mℓ に希釈した染色液で約8分間染色後、蒸留水で軽くすすいで風乾した。

10） 染色したスライド標本は、暗番号順にスライドケースに入れ、ケースには試験系識別番号、標本作製の日付を明示して保存した。

10. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、複数の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。よく広がり、かつ染色体が散逸していない分裂中期像を探し、異常を有する細胞については、スライド上のその位置を顕微鏡のステージの位置で記録用紙に記録した。

染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験（MMS）分科会[1]による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞（polyploid）の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

11. 小核標本作製法と観察

1) ディッシュより細胞を剥離し、遠心して得られた細胞に3 mℓの0.15 M KCl水溶液を加えピペッティングし、約20分間低張処理した。
2) メタノール：氷酢酸（5：1）の固定液を低張液の上から加え、細胞を固定した。
3) 遠心して固定液を捨て、再び固定液を10 mℓ加えてピペッティング後、遠心した。
4) 場合によっては、3と同じ操作をもう一度行った。
5) 固定液を捨て、新たに少量の固定液を加えて細胞を浮遊させた。
6) パスツールピペットでピペッティング後、少量の細胞懸濁液をとり、スライド上に1滴滴下した。
7) 風乾した後、市販のギムザ液5 mℓをM/15リン酸緩衝液（pH 6.8）145 mℓに希釈した染色液で約10分間染色した。
8) 観察は、60倍以上の対物レンズ（接眼10倍）をつけた顕微鏡を用いて行った。
9) 細胞質を含み、細胞質周辺の明瞭な間期細胞1000個について観察し、小核をもった細胞を算定した。
10) 小核の判定基準は以下のように行った[2]。
    - 小核の直径が主核の1/3以下であること。
    - 光の屈折がなく、焦点をわずかにずらしても明瞭に小核と判定できること。
    - 小核の色調は主核と同じか、それより明るく見え、明らかに核由来と判定できること。
    - 主核に接し突起状に小核様のものがある場合は小核と見なさない。

・異常な多核や異型核が多くみられる場合や細胞融解がある場合は、その旨を記録しておく。

12. 記録と判定

無処理対照、溶媒および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーの Exact probability test 法により、溶媒対照群と被験物質処理群間および溶媒対照群と陽性対照群の有意差検定を行った。

被験物質の染色体異常誘発性についての最終判定は、石館ら[3]の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が 5% 未満を陰性、5% 以上 10% 未満を疑陽性、10% 以上を陽性とした。

小核試験に関しては、Kastenbaum & Bowman の方法（1970）[4] に従って有意差検定（$p<0.05$）を行い、小核誘発の判定を行った。

【結果および考察】

直接法による染色体分析の結果を Table 4 に示した。

NAを加えて24時間および48時間処理したほとんどの群で、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。なお、48時間処理した最高処理濃度群（1.1 mg/mℓ）では、倍数性細胞の出現頻度に有意な増加（p=0.00315）がみられたが、その頻度は5%以下であり、石館らの判定基準では陰性であった。

代謝活性化法による染色体分析の結果を Table 5 に示した。

NAを加えてS9mix非存在下で6時間処理した中濃度群（0.9 mg/mℓ）および高濃度群（1.7 mg/mℓ）で、倍数性細胞の有意な増加（それぞれ p=0.0110 および p=0.0000159）が認められた。また、S9mix存在下の高濃度群（1.7 mg/mℓ）においても、倍数性細胞の有意な増加（それぞれ p=0.00200）が認められた。しかしながら、その出現頻度はいずれも5%未満であり、石館らの判定基準では陰性であった。一方、S9mix存在下および非存在下で6時間処理した最高処理濃度群（1.7 mg/mℓ）では、観察した細胞のそれぞれ9%および7%（gapを含む）に染色体異常が認められ、疑陽性の結果が得られた。そこで、代謝活性化法のS9mix存在下および非存在下の条件について、再現性のための追加試験として染色体異常を精度よく反映することができる*in vitro*小核試験を実施した（Table 6）。その結果、S9mix存在下および非存在下の高濃度群（1.7 mg/mℓ）において、小核の有意な増加か認められ、染色体異常の誘発性が確認された。

一方、本試験と並行して実施された5種類の検定菌を用いる復帰突然変異試験では、直接法、代謝活性化法のいずれの試験においても変異原活性は認められていない（食薬セ研第5-044号）。

培地のpHが低下すると染色体異常が誘発されることが報告[5]されている。細胞を用いる本実験では、NAを培養液に加えると培養液の色が黄色に変化することから、代謝活性化法と同一条件における処理直後と処理終了時のpHを測定した。その結果、S9mix非存在下における処理直後のpHは、5.92～6.54であり、処理終了後では5.13～6.57であった。また、S9mix存在下における処理直後のpHは、5.92～6.65であり、処理終了後では4.98～6.52であった。従って、本実験で誘発された染色体異常に関しては、NA添加による培地の酸性化による可能性と、NAそれ自身によるDNA傷害作用に起因する可能性の2通りが考えられる。

陽性対照として用いた直接法での MC 処理群、および S9mix 存在下での CPA 処理群では、染色分体交換（cte）や染色分体切断（ctb）などの構造異常をもつ細胞が高頻度に誘発された。

【結　　論】

1-ナフチル酢酸は、直接法により、24時間および48時間処理したすべての処理群において、染色体の構造異常の誘発作用は認められなかった。

一方、代謝活性化法における S9mix 存在下および非存在下の最高処理濃度（1.7 mg/mℓ）では、観察した細胞の9%および7%（gap を含む）に染色体異常が認められたため、染色体異常を精度よく反映する *in vitro* 小核試験を実施して再現性を調べたところ、その誘発性が確認された。

従って、NAは、上記の試験条件下で、試験管内の CHL 細胞に染色体異常を誘発すると結論した。

【特 記 事 項】

なお、本試験の実施にあたり、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態及び試験計画書からの逸脱はなかった。

【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、1988
2) 日本組織培養学会編：細胞トキシコロジー試験法、247-251、朝倉書店、1991
3) 石館　基　監修：〈改訂〉染色体異常試験データ集、エル・アイ・シー社、1987
4) Kastenbaum M. A., Bowman K. O.: Mutation Res. 9 : 527-549, 1970
5) Morita T., et al.:Mutation Res. 240 :195-206, 1990

Table 1 Inhibition of cell growth treated with 1-naphthyl acetate (NA) for 48 hours by direct method in CHL cells

Concentration of NA (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0.00	100,	100	100.0
0.06	120,	96	108.0
0.12	141,	97	119.0
0.24	139,	102	120.5
0.48	148,	112	130.0
0.95	65,	49	57.0
1.90	0,	0	0.0

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 2 Inhibition of cell growth treated with 1-naphthyl acetate (NA) for 6 hours with S9 mix by metabolic activation method in CHL cells

Concentration of NA (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0.00	100,	100	100.0
0.06	94,	100	97.0
0.12	98,	93	95.5
0.24	102,	87	94.5
0.48	98,	93	95.5
0.95	71,	70	70.5
1.90	45,	33	39.0

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 3 Inhibition of cell growth treated with 1-naphthyl acetate (NA) for 6 hours without S9 mix by metabolic activation method in CHL cells

Concentration of NA (mg/ml)	Cell growth (% of control)		
			Average
0.00	100 ,	100	100.0
0.06	103 ,	93	98.0
0.12	111 ,	105	108.0
0.24	107 ,	103	105.0
0.48	96 ,	100	98.0
0.95	88 ,	79	83.5
1.90	45 ,	39	42.0

Cell growth was measured by Monocellater™ (OLYMPUS)

Table 4 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 1-naphthyl acetate (NA)** by direct method

Group	Concent-ration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Judgement[5]	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control			200	1	0	0	3	0	0	0	4	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.75		
Solvent[1]	0	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1 (0.5)	0 (0.0)	0.63		
NA	0.3	24	200	0	1	0	3	0	0	0	4	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38	−	−
NA	0.6	24	200	0	2	1	0	0	1	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.50	−	−
NA	1.1	24	200	2	1	0	0	0	0	0	3	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.13	−	−
MC	0.00005	24	200	4	30	57	1	0	7	0	99	2	63 *(31.5)	61 *(30.5)	0.13	+	−
Solvent[1]	0	48	200	1	0	0	0	0	2	10	13	2	4 (2.0)	3 (1.5)	0.38		
NA	0.3	48	200	0	3	0	0	0	1	0	4	1	4 (2.0)	4 (2.0)	0.13	−	−
NA	0.6	48	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.75	−	−
NA	1.1	48	200	0	1	0	0	0	2	0	3	1	2 (1.0)	2 (1.0)	1.96 *[6]	−	−
MC	0.00005	48	200	7	20	52	14	5	9	10	117	20	61 *(30.5)	57 *(28.5)	0.13	+	−

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C. 1) Acetone was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10.
3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations.
4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).
6) Seven hundred and sixteen cells were analyzed. * : Significantly different from solvent control at $p<0.05$.
** : Purity was 96.4%, and β-naphthyl acetic acid (3.5%) was contained as impurity.

Table 5 Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with 1-naphthyl acetate (NA)** by metabolic activation method

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others[3]	No. of cells with aberrations		Polyploid[4] (%)	Judgement[5]	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul[2]	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	0	0	2	6	0	0	0	8	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0.25		
Solvent[1]	0	−	6 - (18)	200	2	1	0	1	0	2	0	6	1	5 (2.5)	3 (1.5)	0.25		
NA	0.4	−	6 - (18)	200	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50	−	−
NA	0.9	−	6 - (18)	200	0	3	1	2	0	0	0	6	2	6 (3.0)	6 (3.0)	1.38 *	−	−
NA	1.7	−	6 - (18)	200	2	11	12	1	0	1	0	27	0	14 *(7.0)	13 *(6.5)	2.75 *	±	−
CPA	0.005	−	6 - (18)	200	0	0	3	0	0	0	0	3	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	−	−
Solvent[1]	0	+	6 - (18)	200	1	2	0	2	0	1	0	6	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.25		
NA	0.4	+	6 - (18)	200	1	0	0	1	1	0	0	3	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.50	−	−
NA	0.9	+	6 - (18)	200	2	2	2	0	1	0	0	7	0	4 (2.0)	4 (2.0)	1.00	−	−
NA	1.7	+	6 - (18)	200	0	6	22	2	2	1	20	53	1	18 *(9.0)	18 *(9.0)	1.75 *	±	−
CPA	0.005	+	6 - (18)	200	9	68	185	1	1	8	10	282	0	126 *(63.0)	124 *(62.0)	0.13	+	−

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : fragment (deletion), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide. 1) Acetone was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10.
3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations.
4) Eight hundred cells were analyzed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).
* : Significantly different from solvent control at $p<0.05$. ** : Purity was 96.4%, and β-naphthyl acetic acid (3.5%) was contained as impurity.

Table 6 Results of in vitro micronucleus test of Chinese hamster cells (CHL) treated with 1-naphthyl acetate (NA)** by metabolic activation method

Group	Concent-ration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of cells with MN	%	Judgement[2)]
Solvent[1)]	0	−	6-(18)	1000	3	0.3	
NA	0.4	−	6-(18)	1000	4	0.4	−
NA	0.9	−	6-(18)	1000	3	0.3	−
NA	1.7	−	6-(18)	1000	19	1.9 *	+
CPA	0.005	−	6-(18)	1000	5	0.5	−
Solvent[1)]	0	+	6-(18)	1000	11	1.1	
NA	0.4	+	6-(18)	1000	3	0.3	−
NA	0.9	+	6-(18)	1000	6	0.6	−
NA	1.7	+	6-(18)	1000	29	2.9 *	+
CPA	0.005	+	6-(18)	1000	44	4.4 *	+

Abbreviations : MN : micronuclei, MC : mitomycin C, CPA : cyclophosphamide.
1) Acetone was used as solvent.
2) Judgement was done by statistical method of Kastenbaum and Bowman (1970).
* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$.
** : Purity was 96.4%, and β-naphthyl acetic acid (3.5%) was contained as impurity.

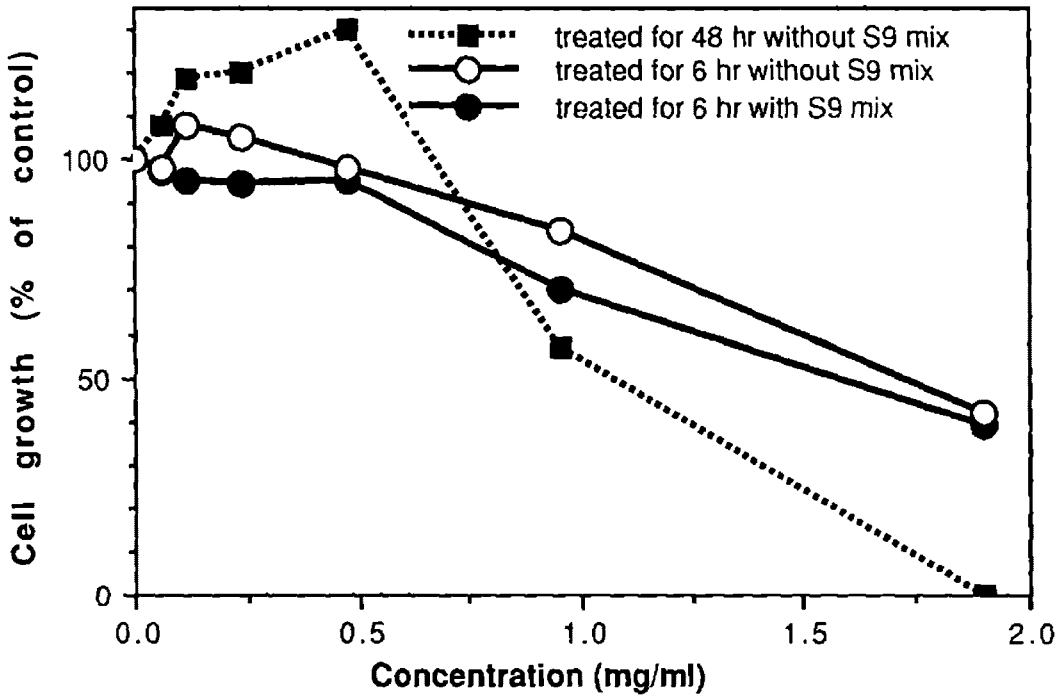

Fig.1 Inhibition of cell growth treated with 1-naphthyl acetate in CHL cells