

N, N-ジメチルベンジルアミンの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：2714（115-055）

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	3
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 N,N-Dimethylbenzylamine [direct method]	16
Figure 2	Dose-survival curves of N,N-Dimethylbenzylamine [activation method]	17
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylbenzylamine [direct method : 24 hrs]	18
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylbenzylamine [direct method : 48 hrs]	19
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylbenzylamine [activation method : +S9]	20
Figure 6	Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylbenzylamine [activation method : -S9]	21
Table 1	Results of growth inhibition test on N,N-Dimethylbenzylamine [direct method]	22
Table 2	Results of growth inhibition test on N,N-Dimethylbenzylamine [activation method]	23
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N-Dimethylbenzylamine [direct method : 24 hrs]	24
Table 4	Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N-Dimethylbenzylamine [direct method : 48 hrs]	25
Table 5	Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N-Dimethylbenzylamine [activation method : +S9]	26
Table 6	Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N-Dimethylbenzylamine [activation method : -S9]	27

1. 要 約：

本試験条件下の *in vitro* 試験系において、N, N-ジメチルベンジルアミンには染色体異常を誘起する作用があるものと判断した。

すなわち、N, N-ジメチルベンジルアミン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、連続処理法 (24および48時間処理) で 75.0, 150, 300 および 600 $\mu\text{g/ml}$, 短時間処理法+S9で 188, 375, 750 および 1500 $\mu\text{g/ml}$, 同-S9で 375, 750, 1500 および 3000 $\mu\text{g/ml}$ のそれぞれ4用量について染色体異常を観察した。

その結果、短時間処理法+S9において染色体構造異常の明確な誘発傾向が観察された。また、連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンC (MMC) および短時間処理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： N，N-ジメチルベンジルアミンの哺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* における遺伝子突然変異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」ならびにOECD化学品ガイドライン 473（1983年5月26日）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」ならびにOECDのGLP（1982年）の基準を満たすものとした。
4. 試験番号： 2714（115-055）

9. 被 験 物 質：

- 1) 被験物質名 N, N-ジメチルベンジルアミン
- 2) CAS No. 103-83-3
- 3) ロット番号
- 4) 純 度 99.93 wt%
- 5) 製 造 元
- 6) 保管条件 冷暗所, 密封容器
- 7) 保管場所 安評センター被験物質保管庫
- 8) 別 名 N-ベンジルジメチルアミン
- 9) 化 学 名 N, N-ジメチルベンジルアミン
- 10) 化学構造
- CN(C)Cc1ccccc1
- 11) 分子式 $C_9H_{13}N$
- 12) 分子量 135.2
- 13) 物質の状態 液体
- 14) 色 無色又は淡黄色
- 15) 融 点 $-75^{\circ}C$
- 16) 沸 点 $180\sim 182^{\circ}C$

- 17) 溶解性 水に微溶，アルコールおよびエーテルに可溶
- 18) 安定性 水，熱および光に安定
- 19) 取扱上の注意 (1) 有害性を呈するため吸入したり，皮膚や粘膜への接触を防止するための個人保護具を着用した。
(2) 可燃性であるため火気，静電気，衝撃火花などによる着火源の生じないように注意した。
(3) 取扱い後は手洗い，洗顔を十分に行った。
- 20) 被験物質保管および
残余被験物質の処理 残余被験物質の全量を保管した。

10. 試験材料および方法：

1) 試験細胞株

染色体異常試験において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）を用いた。

CHL細胞は昭和59年11月15日に 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. 027I126178およびK20471078 404）を容量比で10%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，染色体異常試験で継代数7の細胞を用いた。

2) 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（LIFE TECHNOLOGIES社，米国；Lot No. 31P9051 および12N6256）に，メンブランフィルター（0.45 μ m：CORNING社，米国）を用いて加圧濾過除菌した非働化（56 $^{\circ}$ C，30分）済みの仔牛血清（LIFE TECHNOLOGIES社；Lot No. 45K0525）を最終濃度で10%になるよう添加した。
調製後の培養液を冷暗所（4 $^{\circ}$ C）に保存した。

3) 培養条件

CO₂ 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，CO₂濃度5%，37 $^{\circ}$ Cの条件で細胞を培養した。

細胞増殖抑制試験では，細胞培養用マルチプレート（12ウエル：住友ベークライト）を使用し，染色体異常試験では，細胞培養用プレート（ Φ 60mm：住友ベークライト）を使用した。

4) S 9 m i x

キッコーマン株式会社（千葉県野田市）からS 9 m i x（Lot No. CAM-331）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 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。製造後6ヵ月以内のS 9 m i xを使用した。

添付書類に記載してあるS 9のロット番号，誘導物質，誘導方法等およびS 9 m i xの組成を以下に示した。

- | | |
|-----------|--|
| a. ロット番号 | RAA-331 |
| b. 製造日 | 平成7年7月27日 |
| c. 使用動物 | ラット：Sprague-Dawley系 |
| d. 性 / 週齢 | 雄 / 7週齢 |
| e. 体重 | 184 ~ 213 g |
| f. 誘導物質 | Phenobarbital (PB) & 5,6-Benzoflavone (BF) |
| g. 投与量 | PB: 30 mg/kg 1回（1日目），60 mg/kg 3回（2～4日目） |
| および回数 | BF: 80 mg/kg 1回（3日目） |
| h. 投与方法 | 腹腔内投与 |
| i. 蛋白含量 | 26.7 mg/ml |

成分	S 9 m i x 1 m l 中の量
S 9	0.3 ml
M g C l ₂	5 μmol
K C l	33 μmol
G - 6 - P	5 μmol
N A D P	4 μmol
H E P E S 緩衝液	4 μmol

5) 被験物質溶液の調製

被験物質を DMSO (Lot No. K21387978 513) に溶解させ調製原液とした。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。

6) 対照群

a. 溶媒対照

使用溶媒の DMSO を容量比 0.5% 添加して試験した。

b. 陽性対照 (連続処理法)

注射用水 (株式会社 大塚製薬工場, 徳島県鳴門市; Lot No. K5C77) 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. 015AEB) を生理食塩液 (株式会社 大塚製薬工場; Lot No. K5C00) 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 (短時間処理法)

注射用水 (株式会社 大塚製薬工場) 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. 4024) を生理食塩液 (株式会社 大塚製薬工場) を用いて希釈した後, 12.5 μg/ml の用量で試験した。

7) 予備試験 (細胞増殖抑制試験)

a. 試験用量

予備的な試験を実施した結果を基に設定した細胞増殖抑制試験での試験用量を下表に示した。各試験それぞれ計 8 ~ 9 用量 (公比 5/3) を設定した。

1 用量当たり 2 ウエルを用いた。

試験	用量数	試験用量 (μg/ml)
連続処理法24時間処理	8	42.0 ~ 1500
連続処理法48時間処理	9	25.2 ~ 1500
短時間処理法+S9処理	8	70.0 ~ 2500
短時間処理法-S9処理	8	70.0 ~ 2500

b. 連続処理法

細胞培養用マルチプレート（12ウェル：住友ベークライト株式会社，東京都千代田区）の各ウェルに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 1 ml を，48時間処理の場合， 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日後に，使用溶媒（以下溶媒）あるいは被験物質溶液 $5 \mu\text{l}$ を添加し，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．

c. 短時間処理法

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 を各ウェルに播種した．培養3日後に +S9処理の場合，培養液 $500 \mu\text{l}$ を除き S 9 mix $100 \mu\text{l}$ ，溶媒あるいは被験物質溶液 $3 \mu\text{l}$ を添加し，-S9処理の場合は，培養液 $400 \mu\text{l}$ を除き溶媒あるいは被験物質溶液 $3 \mu\text{l}$ のみ添加した（S 9 mix は添加しない）．6時間培養した後，各ウェルから培養液を除去し，生理食塩液を用いて細胞を洗浄した．培養液（ $500 \mu\text{l}$ ）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を求めた．

d. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

各ウェルから培養液を除き，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. D1008）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．各ウェルを水洗した後，十分乾燥させた．その後，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（105-50型；株式会社日立製作所，東京都港区）を用いて 580 nm での吸光度を測定した．溶媒対照群での吸光度に対する比（=細胞生存率）を各群算出し，さらにプロビット法を用いて50%細胞増殖抑制濃度を算出した．

なお，算出には $70.0 \sim 324 \mu\text{g/ml}$ の4点（連続処理法24時間処理）， $25.2 \sim 1500 \mu\text{g/ml}$ の9点（同48時間処理）， $324 \sim 900 \mu\text{g/ml}$ の3点（短時間処理法+S9処理）および $324 \sim 900 \mu\text{g/ml}$ の3点（同-S9処理）を用いた．

e. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1~2 および Table 1~2 に示した．

プロビット法を用いて算出した50%細胞増殖抑制濃度は，連続処理法24時間処理で $265 \mu\text{g/ml}$ ，同48時間処理で $157 \mu\text{g/ml}$ ，短時間処理法+S9処理で $773 \mu\text{g/ml}$ ならびに同-S9処理で $745 \mu\text{g/ml}$ と算出された．

なお，各試験系列とも $900 \mu\text{g/ml}$ 以上の処理群で，被験物質溶液添加直後白濁が生じたが，攪拌後消失した．

8) 本試験（染色体異常試験）

a. 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5用量（公比2）を設定した。

1用量当たり、2プレートを用いた。

試 験	試 験 用 量 ($\mu\text{g/ml}$)				
連続処理法24時間処理	<u>75.0</u>	<u>150</u>	<u>300</u>	<u>600</u>	1200
連続処理法48時間処理	37.5	<u>75.0</u>	<u>150</u>	<u>300</u>	<u>600</u>
短時間処理法+S9処理	<u>188</u>	<u>375</u>	<u>750</u>	<u>1500</u>	3000
短時間処理法-S9処理	188	<u>375</u>	<u>750</u>	<u>1500</u>	<u>3000</u>

・下線を付した用量群について顕微鏡観察を実施した。

b. 連続処理法

細胞培養用プレート（ ϕ 60 mm：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）、48時間処理の場合、 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、被験物質溶液 25 μl あるいは陽性対照物質溶液 500 μl を加え、24および48時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

c. 短時間処理法

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+S9処理の場合、培養液 2.5 ml を除きS9 mix 500 μl 、溶媒、被験物質溶液 15 μl あるいは陽性対照物質溶液 300 μl を添加し、-S9処理の場合は、培養液 2 ml を除き溶媒、被験物質溶液 15 μl あるいは陽性対照物質溶液 300 μl のみ添加した（S9 mixは添加しない）。6時間培養した後、各プレートから培養液を除去し、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。

d. 標本の作製

染色体標本作製の2時間前に、最終濃度で $0.2 \mu\text{g/ml}$ 、すなわち培養液 1 ml 当たり $20 \mu\text{l}$ のコルセミド溶液 (LIFE TECHNOLOGIES 社; Lot No. 18P3150) 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 (LIFE TECHNOLOGIES 社; Lot No. 19K2942) 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. p. m. で5分間遠心分離することにより上清の培養液を除いた後、あらかじめ 37°C に保温しておいた 75 mM 塩化カリウム水溶液を約 5 ml 加え、 37°C で20分程度低張処理を行った。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回新鮮なものに交換した後、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、 $1/100 \text{ M}$ ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 7.2: MERCK 社; Lot No. 322S 601974) を用いて希釈した 1.2% ギムザ溶液で12分間染色した。スライドを軽く水洗した後、乾燥させた。

e. 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 ($\times 600$ 程度) で観察し、染色体の形態的变化、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。同時に、倍数性細胞の出現率を記録した。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。なお、染色体構造異常の出現総数としてはギャップのみ保有する細胞を含めた場合と、含めない場合とに区別して表示した。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。

9) 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(+)

10) D_{20} 値ならびにTR値の算出法

D_{20} 値は分裂中期像の20%にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であり、最小二乗法により算出した。

TR値は一定濃度 (mg/ml) あたりの交換型異常 (cte) 出現数を示す比較値であり、染色分体交換の出現頻度 (%) を被験物質濃度 (mg/ml換算) で割ることにより算出した。

11. 試験結果：

1) 連続処理法24時間処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および 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), 含めない場合 (-gap) いずれも 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。

N, N-ジメチルベンジルアミンを 75.0, 150 および 300 $\mu\text{g/ml}$ で処理した場合の染色体構造異常出現頻度は, +gap で 0.0, 1.0 および 0.0%, -gap で 0.0, 1.0 および 0.0% であった。倍数性細胞の出現頻度はいずれの処理群とも 1.0% 以下であった。なお, 最高用量の 600 $\mu\text{g/ml}$ では被験物質 N, N-ジメチルベンジルアミンの影響により染色体観察に適した分裂像がほとんど見られなかった。

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 49.0% と顕著な増加を示した。

2) 連続処理法48時間処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 2 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 1.0% であり, 倍数性細胞の出現頻度についても 1.0% であった。

N, N-ジメチルベンジルアミン処理群での構造異常出現頻度は 75.0, 150 および 300 $\mu\text{g/ml}$ 処理でそれぞれ 0.5, 1.0 および 0.0% (+gap), -gap でも同じ出現頻度であった。倍数性細胞の出現頻度は各群とも 1.0% 以下であった。

なお, 最高用量の 600 $\mu\text{g/ml}$ では被験物質の影響により生存細胞はほとんど観察されなかった。

陽性対照では構造異常細胞が +gap で 41.0% 出現した。

3) 短時間処理法 + S 9 処理

試験結果を Figure 5, Table 5 および 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 0.5%, 倍数性細胞の出現頻度は 0.0% であった。

N, N-ジメチルベンジルアミンを 188, 375 および 750 $\mu\text{g/ml}$ で処理した場合の構造異常出現頻度は, +gap で 7.0, 54.5 および 57.5%, -gap でも同程度であった。倍数性細胞については, 各処理群それぞれ 5.5, 2.0 および 2.0% であった。

なお, 最高用量の 1500 $\mu\text{g/ml}$ 処理では分裂像はまったく観察されなかった。

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 82.0% の細胞に構造異常が認められた。

4) 短時間処理法 - S9 処理

試験結果を Figure 6, Table 6 および Appendix 4 に示した。

溶媒対照での構造異常出現頻度は +gap, -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は 0.0% であった。

N, N-ジメチルベンジルアミン処理群における構造異常出現頻度は 375, 750 および 1500 μ g/ml 処理の +gap でそれぞれ 0.0, 1.0 および 3.5%, -gap でも同程度であった。また、倍数性細胞の出現頻度は各処理群とも 3.0% 以下であった。

なお、最高用量の 3000 μ g/ml 処理では生存細胞はほとんど観察されなかった。

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。

上記 1) ~ 4) の各試験系において、300 μ g/ml 以上の用量で被験物質溶液添加後白濁が生じ、1200 μ g/ml 以上の用量では油滴状の被験物質が認められた。750 μ g/ml 以下では攪拌後白濁は消失したが、1200 μ g/ml 以上においては一部の被験物質がプレート底面に析出していた。

また、上記の結果から算出した D_{20} 値ならびに TR 値は次の通りであった。

試験系	D_{20} 値 (mg/ml)	TR 値
短時間処理法+S9処理	0.213	139

12. 考察および結論：

N, N-ジメチルベンジルアミンの変異原性，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連続処理法ならびに短時間処理法において，細胞の増殖が抑制される濃度まで検討した。

その結果，短時間処理法+S9において，用量に依存した染色体構造異常の明確な誘発傾向が観察された。同試験系では低用量の $188 \mu\text{g/ml}$ において倍数性細胞の出現頻度が僅かに高値を示したが，用量依存性は認められなかった。

また，変異原性の強さに関する相対的比較値である D_{20} 値および TR 値はそれぞれ 0.213 (mg/ml) および 139 と算出され，既知変異原性物質に比較して N, N-ジメチルベンジルアミンの変異原性が弱いことを示していた。

一方，溶媒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，本試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から，本試験条件下において N, N-ジメチルベンジルアミンの哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。

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., 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.

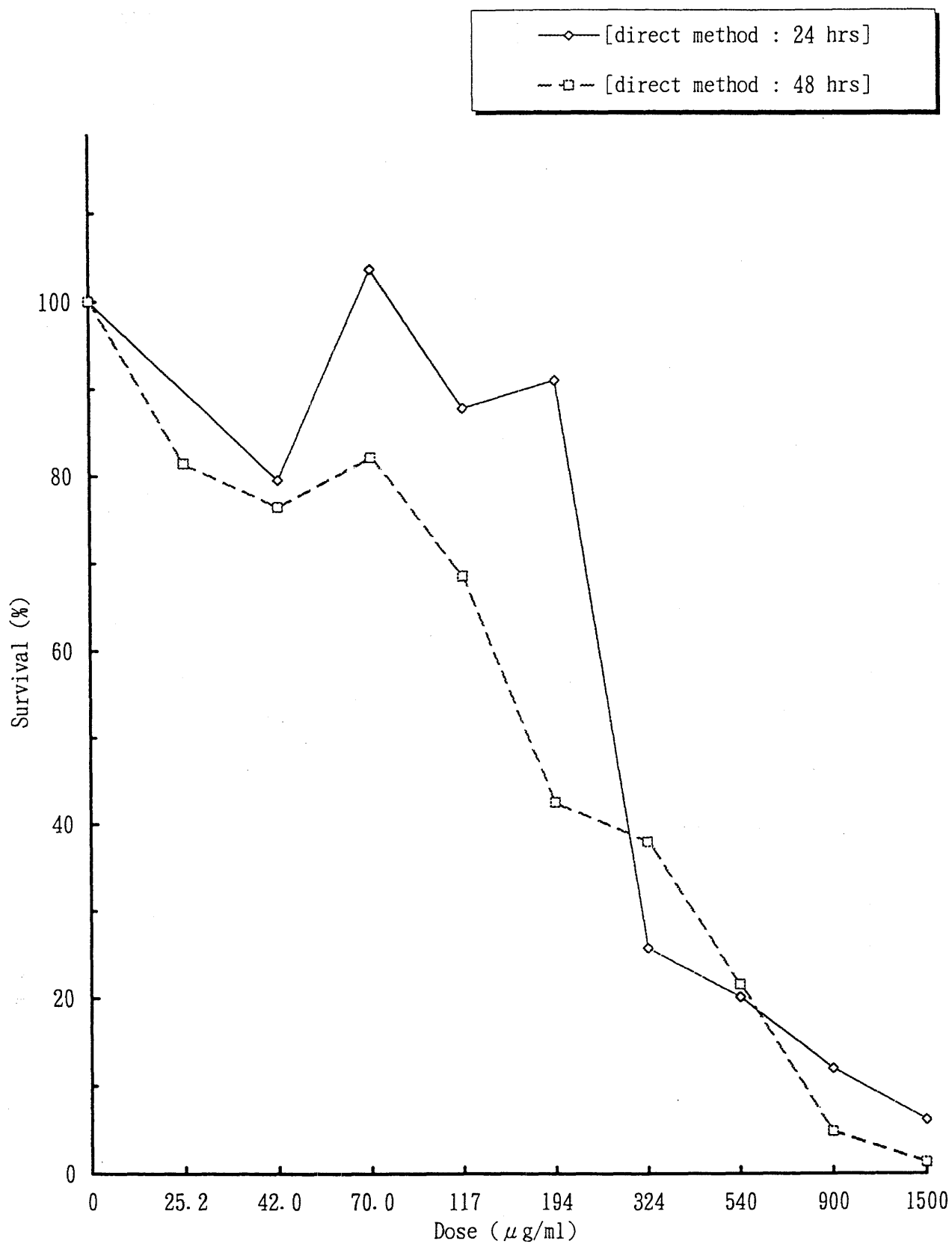


Figure 1. Dose-survival curves of N,N-Dimethylbenzylamine [direct method]

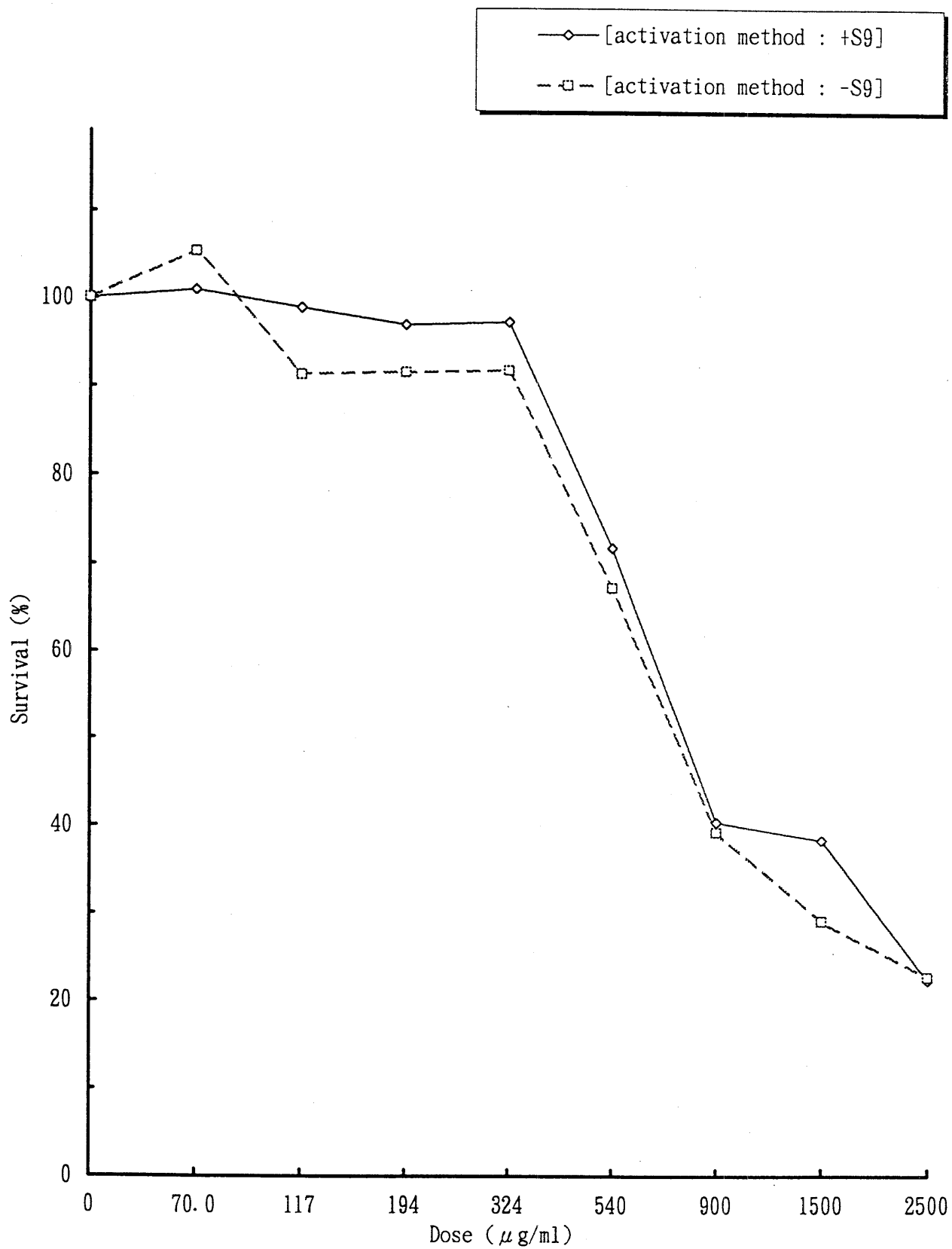


Figure 2. Dose-survival curves of N,N-Dimethylbenzylamine [activation method]

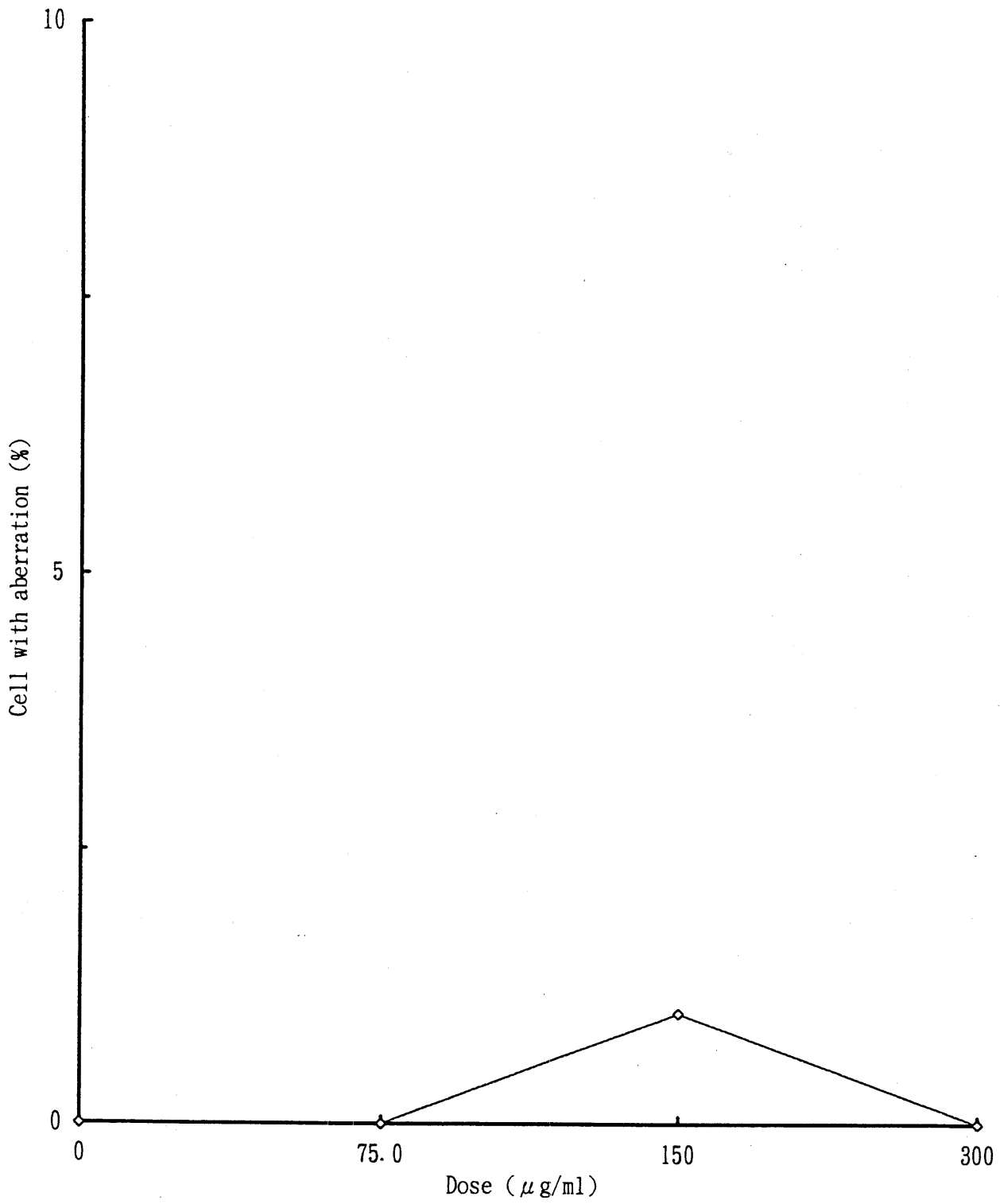


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylbenzylamine [direct method : 24hrs]

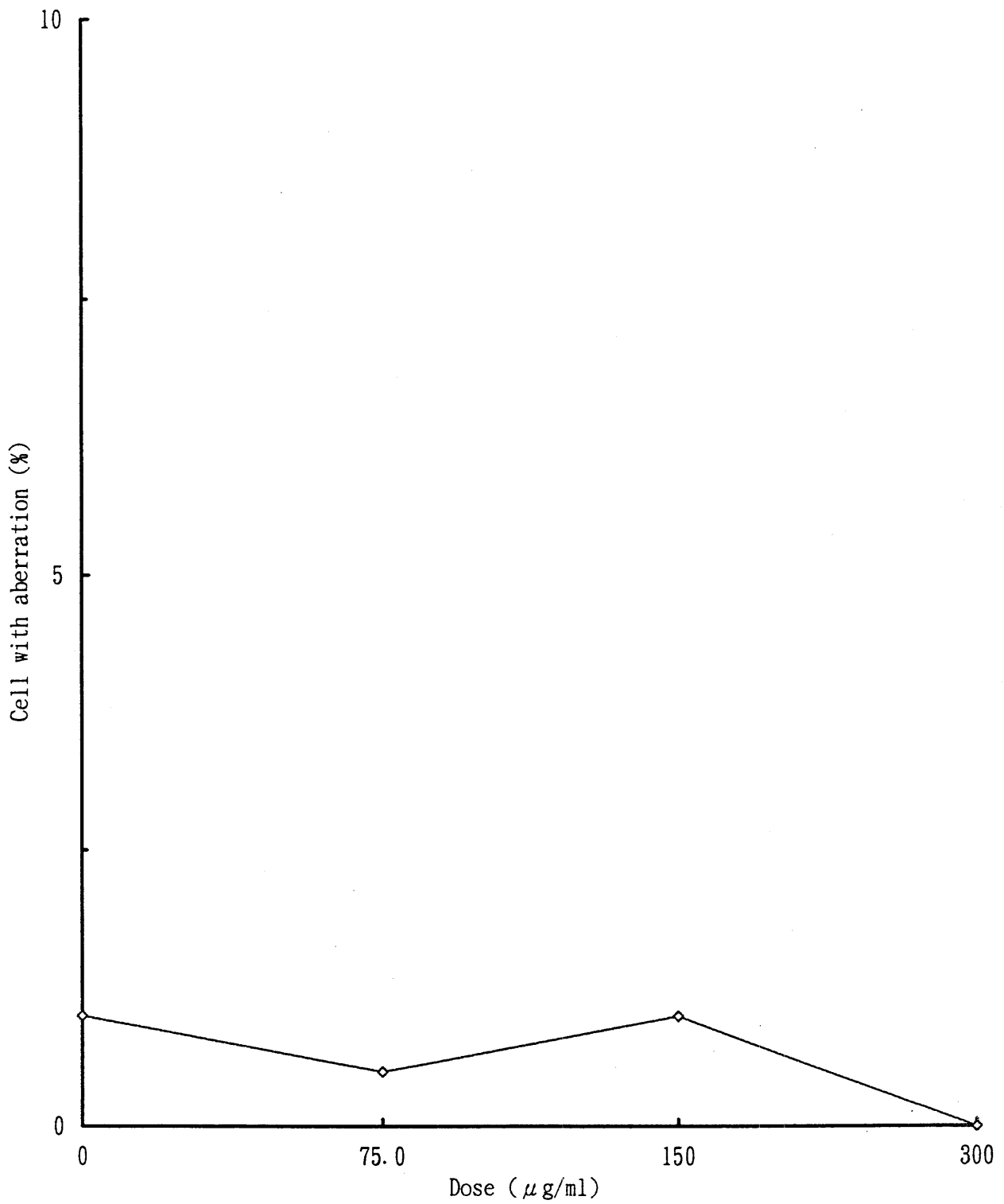


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylbenzylamine [direct method : 48hrs]

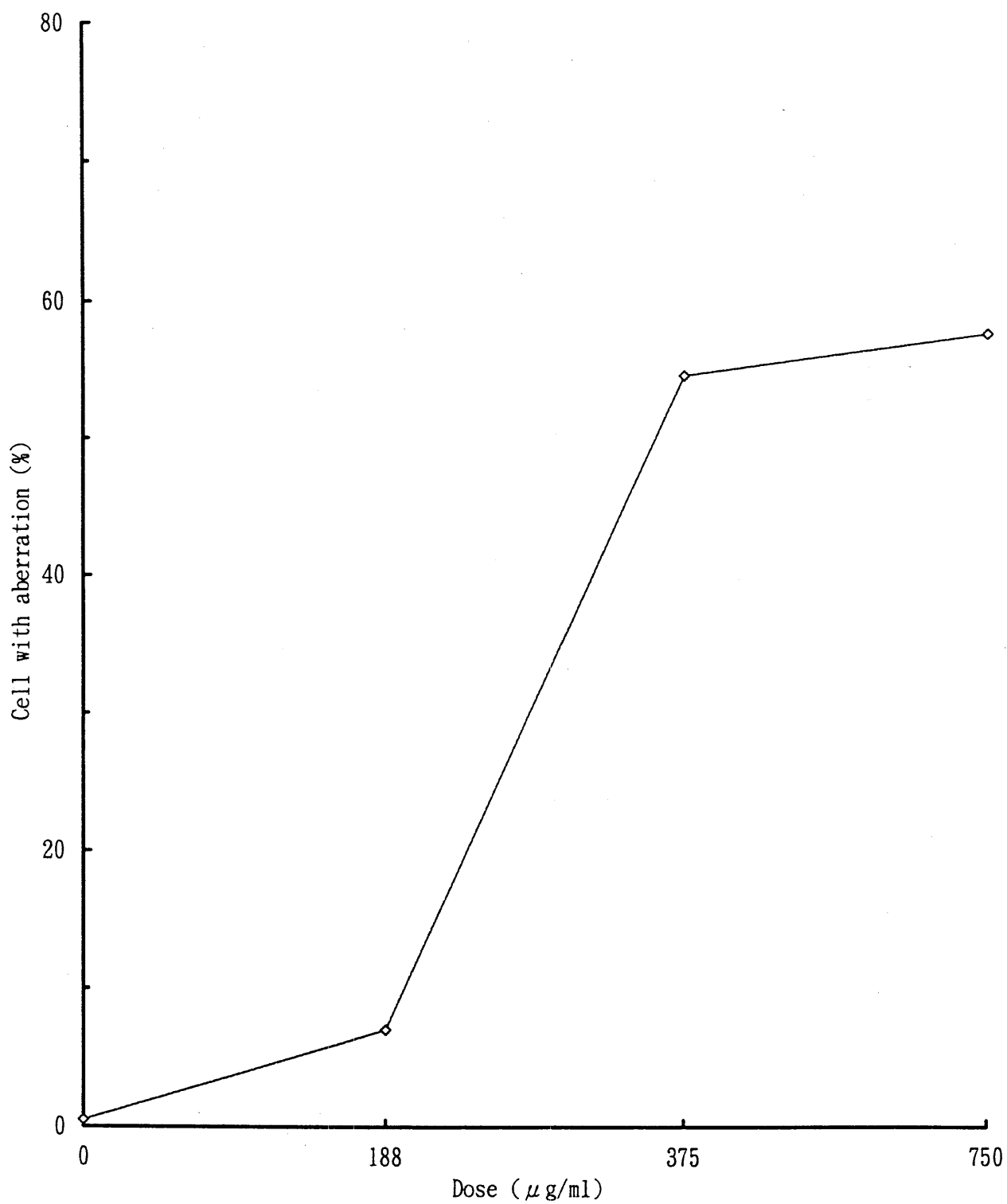


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylbenzylamine [activation method : +S9]

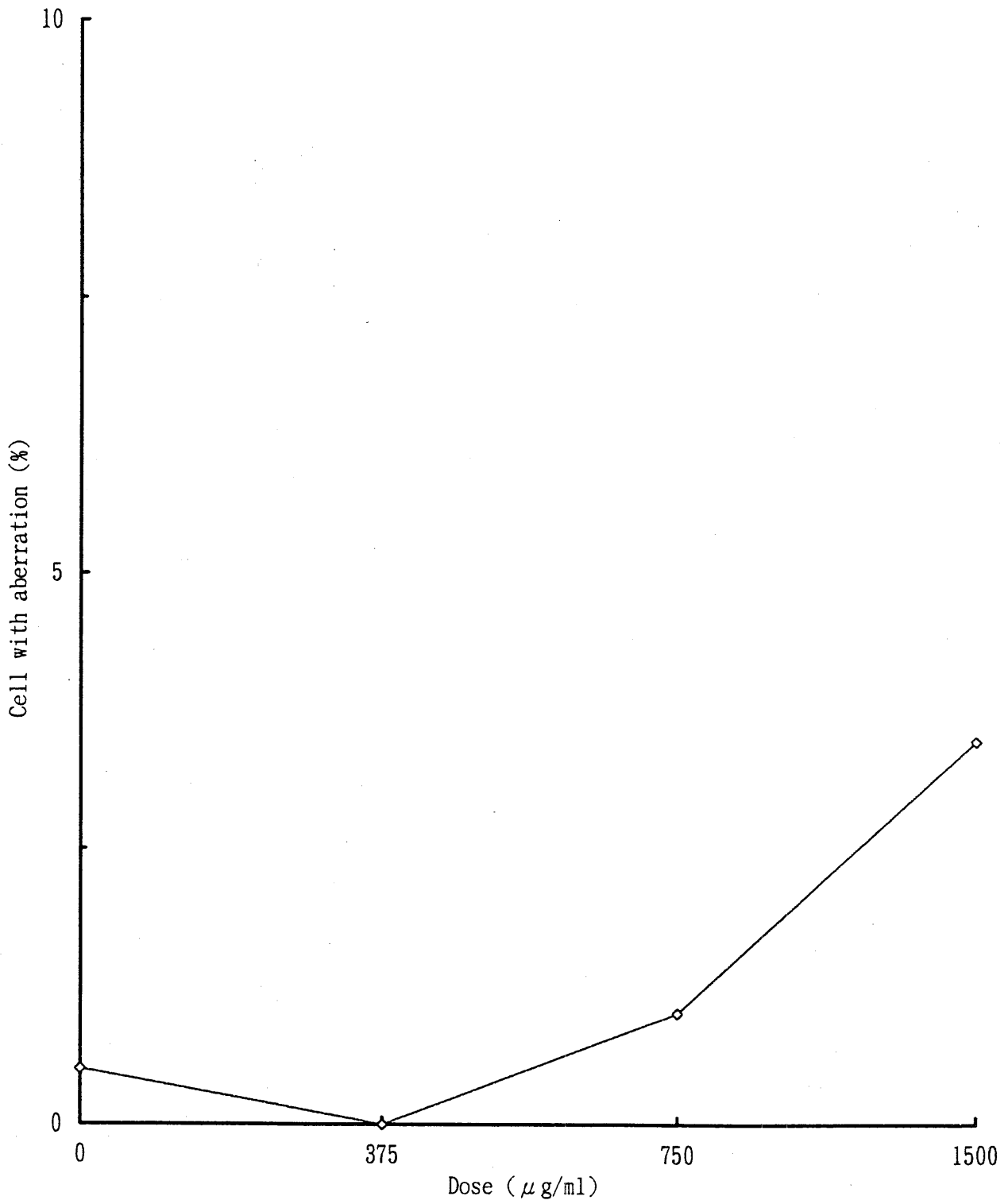


Figure 6. Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylbenzylamine [activation method : -S9]

	[direct method : 24 hrs]			[direct method : 48 hrs]		
	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Survival (%)	[Mean]	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0	[100.0]	DMSO a)	0	[100.0]
test sub.	42.0	82.3 76.7	[79.5]	test sub.	25.2	[81.4]
	70.0	101.8 105.4	[103.6]		42.0	[76.4]
	117	78.7 96.7	[87.7]		70.0	[82.1]
	194	88.3 93.5	[90.9]		117	[68.5]
	324	28.9 22.4	[25.6]		194	[42.4]
	540	16.0 24.3	[20.2]		324	[37.9]
	900	9.4 14.8	[12.1]		540	[21.6]
	1500	5.1 7.3	[6.2]		900	[4.9]
					1500	[1.3]

50% Growth inhibition dose was as follows:
 [direct method : 24 hrs] ——— test sub. 265 ($\mu\text{g/ml}$)
 [direct method : 48 hrs] ——— test sub. 157 ($\mu\text{g/ml}$)

a): Solvent control

Table 2. Results of growth inhibition test on N,N-Dimethylbenzylamine [activation method]

[activation method : +S9]			[activation method : -S9]		
Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Survival (%)	[Mean]	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	100.0	[100.0]	DMSO a)	100.0	[100.0]
test sub.	102.6 99.3	[101.0]	test sub.	102.7 108.1	[105.4]
0			0		
117	96.6 101.3	[99.0]	117	87.9 95.0	[91.4]
194	95.1 99.1	[97.1]	194	87.6 95.8	[91.7]
324	94.3 100.6	[97.5]	324	98.3 85.5	[91.9]
540	75.1 68.8	[71.9]	540	69.1 65.6	[67.4]
900	42.3 38.6	[40.4]	900	36.1 42.4	[39.2]
1500	39.1 37.7	[38.4]	1500	30.6 27.9	[29.2]
2500	21.7 23.2	[22.5]	2500	20.9 24.8	[22.9]

50% Growth inhibition dose was as follows:
 [activation method : +S9] ——— test sub. 773 ($\mu\text{g/ml}$)
 [activation method : -S9] ——— test sub. 745 ($\mu\text{g/ml}$)

a): Solvent control

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N-Dimethylbenzylamine
[direct method : 24 hrs]

Exp. No. 2714 (115-055)

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Number of Cells	No. of cells with structural aberrations							Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth	oth				
DMSO a)	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	1.0 -	-
test sub.	75.0	200	0	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	0.5 -	-
	150	200	0	1	1	0	0	0	0	1.0 -	1.0 -	1.0 -	-
	300	200	0	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	0.0 -	-
	600	Toxic											
MTC b)	0.05	200	14	43	74	1	0	0	0	49.0 +	47.0 +	0.5 -	+

ctb: Chromatid break cte: Chromatid exchange csb: Chromosome break cse: Chromosome exchange oth: others
a): Solvent control
b): Positive control (Mitomycin C)

Table 4. Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N-Dimethylbenzylamine
[direct method : 48 hrs] Exp. No. 2714 (115-055)

Compound	Dose (μ g/ml)	Number of Cells	No. of cells with structural aberrations							Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
DMSO a)	0	200	0	2	0	0	0	0	0	1.0	1.0	1.0	-
test sub.	75.0	200	0	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	0.0	-
	150	200	0	1	1	0	0	0	0	1.0	1.0	0.5	-
	300	200	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	1.0	-
	600	Toxic											
MMC b)	0.025	200	9	24	59	1	1	1	0	41.0	39.0	0.5	+

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

a): Solvent control

b): Positive control (Mitomycin C)

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N-Dimethylbenzylamine
[activation method : +S9]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Number of Cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	200	0	0	1	0	0	0	0.5 -	0.5 -	0.0 -	-
test sub.	188	200	2	2	11	0	1	0	7.0 \pm	6.5 \pm	5.5 \pm	\pm
	375	200	10	23	104	0	1	0	54.5 +	53.0 +	2.0 -	+
	750	200	13	46	104	1	1	5	57.5 +	56.5 +	2.0 -	+
	1500	Toxic										
CP b)	12.5	200	15	51	152	0	1	1	82.0 +	80.5 +	0.0 -	+

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

a): Solvent control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 6. Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N-Dimethylbenzylamine
[activation method : -S9] Exp. No. 2714 (115-055)

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Number of Cells	No. of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
DMSO a)	0	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-
test sub.	375	200	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	-
	750	200	2	0	0	0	0	0	1.0	0.0	1.0	-
	1500	200	4	2	3	0	0	0	3.5	2.0	3.0	-
	3000	Toxic										
CP b)	12.5	200	1	0	0	0	0	0	0.5	0.0	0.0	-

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

a): Solvent control

b): Positive control (Cyclophosphamide)