M-1349

最 終 報 告 書

試験名：*N,N*-ジメチルアクリルアミドのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：M-1349

試験期間：2009 年 2 月 23 日-2010 年 2 月 26 日

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

4. 要約 10
5. 緒言 12

6. 試験材料及び方法 13
6.1 被験物質及び溶媒 13
6.1.1 被験物質 13
6.1.2 溶媒 13
6.2 被験液の調製 14
6.2.1 調製方法 14
6.2.2 調製頻度 14
6.2.3 安定性 15
6.3 対照物質 15
6.3.1 陰性対照 15
6.3.2 陽性対照 15
6.4 使用細胞株 16
6.4.1 細胞株 16
6.4.2 細胞の選択理由 16
6.4.3 培養条件 16
6.4.4 細胞の性状検査 16
6.5 S9 mix 及び培養液 17

6.5.1 S9 mix 17
6.5.2 培養液 17
6.6 試験方法 [1-5] 18
6.6.1 識別方法 18
6.6.2 用量の設定 19
6.6.3 細胞増殖抑制試験 19
6.6.4 染色体異常試験 20
6.6.5 標本の観察 22
6.6.6 染色体異常の分類 23
6.6.7 判定基準 23
7. 試験結果 24
7.1 細胞増殖抑制試験 24
7.1.1 短時間処理法 24
7.1.2 連続処理法 24
7.2 染色体異常試験 25
7.2.1 短時間処理法 25
7.2.2 連続処理法 25
7.2.3 確認試験（連続処理法・48 時間処理） 26
8. 考察 28
9. 参考文献 29

Photographs of Metaphase Chromosomes

Photo.1 A metaphase chromosome from the negative control group [Confirmation test: 48 hr]
Photo.2 A metaphase chromosome from the 1000 µg/mL group with the fragmentation [Confirmation test: 48 hr]
Photo.3 A metaphase chromosome from the 1000 µg/mL group with exchanges [Confirmation test: 48 hr]

図

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

Fig. 1-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Short-term treatment: –S9 mix]

Fig. 1-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Continuous treatment: 24 hr]

Fig. 1-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Continuous treatment: 48 hr]

Fig. 1-5 Results of the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Continuous treatment: 48 hr]

表

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Short-term treatment: +S9 mix]

Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Short-term treatment: –S9 mix]

Table 1-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Continuous treatment: 24 hr]

Table 1-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Continuous treatment: 48 hr]

Table 1-5 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Confirmation test: 48 hr]

4. 要約

N,N-ジメチルアクリルアミド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）を用いた染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 1000 μg/mL として、細胞増殖抑制試験を実施した。その結果、短時間処理法及び連続処理法の 24 時間処理では最高用量の 1000 μg/mL（10 mM 相当）においても 50%を超える細胞増殖抑制作用は認められなかった。連続処理法の 48 時間処理では 500 μg/mL において 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 291.7 μg/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ない場合は最高用量を 10 mM とし、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、短時間処理法及び連続処理法の 24 時間処理では 1000 μg/mL を最高用量とした。また、連続処理法の 48 時間処理では、500 μg/mL において 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められたものの、1000 μg/mL においても著しい細胞増殖率の低下が認められなかったことから、1000 μg/mL を最高用量とした。

染色体異常試験の結果、短時間処理法及び連続処理法の 24 時間処理においては、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）及び倍数性細胞の出現率は、すべての用量で陰性の判定基準である 5%未満であった。一方、連続処理法の 48 時間処理においては、最高用量の 1000 μg/mL のみで TA 値が陽性を示したため、最高用量を 1000 μg/mL として、以下、公比 1.25 で希釈した 800、640 及び 512 μg/mL の計 4 用量で確認試験を実施した。その結果、TA 値は 1000、800 及び 640 μg/mL で陽性、512 μg/mL で疑陽性を示し、用量依存性の増加が認められた。しかしながら、確認試験において陽性及び疑陽性を示した用量では、いずれも細胞増殖率が 20%以下を示し、連続処理法の 48 時間処理に比べて細胞増殖抑制作用が強く発現したこと及び連続処理法の 48 時間処理で陽性を示した最高用量の 1000 μg/mL においても細胞増殖率が 25%と低く、細胞増殖率が 32%を示した次用量の 500 μg/mL では陰性を示したことから、これらの染色体構造異常の誘発は、細胞毒性に伴う非特異的なものであることも否定出来ないものの、連続処理法の 48 時間処理と確認試験において、ある程度の再現性が認められていることから、総合判定を軽微な陽性と判断した。染色体異常誘発性の強さの指標値については、観察細胞の 20%に何らかの異常が見られる用量である D20 値[1)]は 0.68 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換（cte）を持つ細胞の出現率の比較値である TR 値[1)]は 21 であった。

また、倍数性細胞の出現率においては、いずれの処理法もすべての用量で陰性の判定基準である 5%未満であったため、陰性と判定した。

なお、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

倍数体の出現率は 5%未満で、陰性の判定基準内にあった。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ことから、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,N*-ジメチルアクリルアミドは本試験条件下において染色体数的異常誘発能は有さないが、軽微な染色体構造異常誘発能を有すると結論した。

5. 緒言

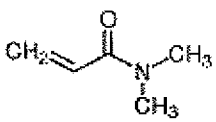
厚生労働省医薬食品局審査管理課　化学物質安全対策室の依頼により、*N,N*-ジメチルアクリルアミドの安全性評価の一環として、ほ乳類の培養細胞（CHL/IU）を用いる染色体異常試験を実施したので、その成績を報告する。

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

被験物質の純度等の特性は、　　非GLP下での分析に基づくものである（Attached Data 1）。

名称	:	*N,N*-ジメチルアクリルアミド、*N,N*-Dimethylacrylamide
CAS番号	:	2680-03-7
構造式又は示性式	:	
分子量	:	99.13
比重	:	0.9655
純度	:	99.9%
沸点	:	171～172°C
融点	:	-40°C以下
分配係数	:	3.22
性状	:	無色～微黄色透明液体
入手量	:	25 g
安定性	:	実験終了後に、株式会社ボゾリサーチセンターにおいて安定性を測定し、実験期間中の安定性を確認した（Attached Data 2）。
保存方法	:	密栓、冷暗所（保存期間中実測温度：3～8°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。
残余物の取り扱い	:	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、すべて株式会社ボゾリサーチセンターにおいて廃棄した。

6.1.2 溶媒

名称	:	注射用水
ロット番号	:	8I94N
規格	:	日本薬局方

製造元	:	株式会社大塚製薬工場
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	:	被験物質情報によると、水に可溶であると記されていたことから、実際に供試前試験を実施した。その結果、100 mg/ mL で溶解することが確認されたため、溶媒として注射用水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 0.1000 g を 10 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 0.500 mL 添加した際の最終濃度：1000 μg/mL）を調製した。次いで、10.0 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 7 段階希釈し、5.00、2.50、1.25、0.625、0.313、0.156 及び 0.0781 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 0.1000 g を 10 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 0.500 mL 添加した際の最終濃度：1000 μg/mL）を調製した。次いで、10.0 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 2 段階希釈し、5.00 及び 2.50 mg/mL の 3 濃度段階の被験液を調製した。

連続処理法では、被験物質 0.1000 g を 10 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 0.500 mL 添加した際の最終濃度：1000 μg/mL）を調製した。次いで、10.0 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 5 mL：溶媒 5 mL）で順次 3 段階希釈し、5.00、2.50 及び 1.25 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理では 10.0、5.00 及び 2.50 mg/mL の被験液を、48 時間処理では 10.0、5.00、2.50 及び 1.25 mg/mL の被験液を用いた。

確認試験（連続処理法・48 時間処理）では、被験物質 0.2000 g を 20 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 0.500 mL 添加した際の最終濃度：1000 μg/mL）を調製した。次いで、10.0 mg/mL 溶液を公比 1.25（各濃度の被験液 10 mL：溶媒 2.5 mL）で順次 3 段階希釈し、8.00、6.40 及び 5.12 mg/mL の 4 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、被験液が安定であることを確認した。

6.3 対照物質

6.3.1 陰性対照

溶媒として用いた注射用水を陰性対照とした。

6.3.2 陽性対照

1) 代謝活性化

名称	:	シクロフォスファミド（CP）
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）
保存方法	:	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) 非代謝活性化

名称	:	マイトマイシン C（MMC）
ロット番号	:	525AHA
製造元	:	協和醗酵工業株式会社
力価	:	2mg（力価）/瓶
保存方法	:	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

3) 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γ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）。

(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) 染色体異常試験 連続処理法

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4.900 mLに0.0025 mg/mL溶液を0.100 mL加えた。この時の最終濃度は0.050 μg/mL）。

(4) 確認試験（連続処理法・48時間処理）

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4.900 mLに0.0025 mg/mL溶液を0.100 mL加えた。この時の最終濃度は0.050 μg/mL）。

4) 陽性対照物質の選択理由

遺伝毒性試験ガイドライン（前述 5.2）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）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2004年11月2日に入手した。入手後、DMSOを10v/v%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3継代、染色体異常試験の短時間処理法では7継代、連続処理法では11継代、確認試験（連続処理法・48時間処理）では15継代であった。

6.4.2 細胞の選択理由

自然発生の染色体異常出現率が低いこと、種々の化学物質に対して感受性が高いこと、背景データも多いこと及びほ乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験に広く用いられていることから、本細胞株を選択した。

6.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO_2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

定期的に実施しておる性状検査において、プレート上で単層状に増殖すること、細胞倍加時間が15～20時間以内であること、染色体数の平均（モード）が25本であること及びマイコプラズマによる汚染がないことが確認されている細胞から、30代を越えない範囲で継代培養を行っているものを用いた。

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、ロット番号：C081219101、オリエンタル酵母工業株式会社）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	:	08121910
製造日	:	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 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	:	C08121710
製造日	:	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 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

Minimum Essential Medium （MEM） （GIBCO™、Cat.No.11095）に非働化（56℃、

30分）した牛血清（bovine serum、BS）を10 v/v%添加した培養液（BS-MEM）を用いた。調製後の培養液は冷蔵保存した。

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	:	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[1-5)]

試験は以下のステージ順に実施した。

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

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

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桁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。

3) 確認試験

染色体異常試験と同様にして識別した。

6.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 1000 μg/mL（10 mM 相当）とし、以下公比 2 で希釈した 500、250、125、62.5、31.3、15.6 及び 7.81 μg/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、短時間処理法及び連続処理法の 24 時間処理では最高用量の 1000 μg/mL（10 mM 相当）においても 50%を超える細胞増殖抑制作用は認められなかった。連続処理法の 48 時間処理では 500 μg/mL において 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 291.7 μg/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ない場合は最高用量を 10 mM とし、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、短時間処理法及び連続処理法の 24 時間処理では 1000 μg/mL を最高用量として、以下、公比 2 で計 3 用量を設定した。また、連続処理法の 48 時間処理では、500 μg/mL において 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められたものの、1000 μg/mL においても著しい細胞増殖率の低下が認められなかったことから、1000 μg/mL を最高用量として、以下、公比 2 で計 4 用量を設定した。これに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。更に、染色体異常試験の結果、連続処理法の 48 時間処理で、最高用量の 1000 μg/mL においてのみ、染色体構造異常を持つ細胞の出現率（TA 値）が、陽性の判定基準である 10%以上を示したことから、確認試験（連続処理法・48 時間処理）を実施することとし、最高用量を 1000 μg/mL として、以下、公比 1.25 で 800、640 及び 512 μg/mL の計 4 用量を設定した。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陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 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 2×10^4 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 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 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 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験

液 0.500 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観察し、細胞の状態を確認した。次いで、細胞を牛血清添加生理食塩液で洗浄し、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、陰性対照群及び被験物質処理群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 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 2×10^4 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 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 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

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、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 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 2×10^4 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 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続

き溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 1.333 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.500 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。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（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観察し、細胞の状態を確認した。次いで、牛血清を添加した生理食塩液で細胞を洗浄し、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、更に倒立位相差顕微鏡下で観察し、細胞の状態を確認した（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

(1) 24 時間処理と 48 時間処理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γ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 2×10^4 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 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL（最終濃度：0.050 μg/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) 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、1 日以上空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本を作製した。

(4) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、24 時間及び 48 時間の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で観察し確認した。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。

3) 確認試験（連続処理法・48 時間処理）

(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 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 2×10^4 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 0.500 mL を取り除き、溶媒 0.500 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.500 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.500 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.100 mL を取り除き MMC 0.100 mL（最終濃度：0.050 μg/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、48 時間培養した。

(3) 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。

(4) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養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で観察し確認した。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。

6.6.5 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。

6.6.6　　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もの（非染色部分が染色分体の同軸上にある）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。

染色分体型切断(ctb)：　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。

染色分体型交換(cte)：　四放射状交換など。

染色体型切断(csb)　：　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。

染色体型交換(cse)　：　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）

6.6.7　　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[1]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（+）

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（Appendix 2-1 及び Appendix 2-2）

代謝活性化及び非代謝活性化ともに、すべての用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められず、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は算出出来なかった。

2) 被験物質添加直後の観察（Appendix 2-1 及び Appendix 2-2）

被験物質添加に伴う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もに、すべての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、すべての用量で析出は認められなかった。

3) 被験物質処理終了時の観察（Appendix 2-1 及び Appendix 2-2）

代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての用量で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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、すべての用量で異常は認められなかった。

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（Appendix 2-3 及び Appendix 2-4）

24 時間処理法では、すべての用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められず、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は算出出来なかった。一方、48 時間処理法では、500 μg/mL 以上の用量で 50%以上の細胞増殖抑制が認められ、50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は 291.7 μg/mL だった。

2) 被験物質添加直後の観察（Appendix 2-3 及び Appendix 2-4）

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、すべての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、すべての用量で析出は認められなかった。

3) 被験物質処理終了時の観察（Appendix 2-3 及び Appendix 2-4）

24 時間処理及び 48 時間処理ともに、すべての用量で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、24 時間処理では、すべての用量で異常は認められなかった。一方、48 時間処理では、500 μg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。7.81 から 250 μg/mL の用量では異常は認められなかった。

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（Appendix 3-1 及び Appendix 3-2）

被験物質添加に伴う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もに、すべての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、すべての用量で析出は認められなかった。

2)　被験物質処理終了時の観察（Appendix 3-1 及び Appendix 3-2）

代謝活性化及び非代謝活性化ともにすべての用量で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、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、すべての用量で異常は認められなかった。

3)　染色体構造異常（Table 1-1 及び Table 1-2）

構造異常の出現率（TA）は、代謝活性化においては、1000 μg/mL で 1.5%、500 μg/mL で 0%及び 250 μg/mL で 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、1000 μg/mL で 1.0%、500 μg/mL で 0%及び 250 μg/mL で 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構造異常の出現率は陰性の判定基準内にあり、又試験施設の背景値（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。従って、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（Table 1-1 及び Table 1-2）

数的異常（倍数体）の出現率は、代謝活性化においては、1000 μg/mL で 1.5%、500 μg/mL で 0.5%及び 250 μg/mL で 0.5%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、1000 μg/mL で 1.0%、500 μg/mL で 0%及び 250 μg/mL で 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、又試験施設の背景値（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

24 時間処理の結果を Fig. 1-3、Table 1-3 及び Appendix 3-3 に、48 時間処理の結果を Fig. 1-4、Table 1-4 及び Appendix 3-4 に示した。

1)　被験物質添加直後の観察（Appendix 3-3 及び Appendix 3-4）

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、すべての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に

伴う析出の観察では、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、すべての用量で析出は認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の観察（Appendix 3-3 及び Appendix 3-4）

24 時間処理及び 48 時間処理ともに、すべての用量で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、24 時間処理では、500 μg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。250 μg/mL の用量では異常は認められなかった。一方、48 時間処理では、250 μg/mL 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。125 μg/mL の用量では異常は認められなかった。

3) 染色体構造異常（Table 1-3 及び Table 1-4）

構造異常の出現率（TA）は、24 時間処理においては、1000 μg/mL で 1.0%、500 μg/mL で 0%及び 250 μg/mL で 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。一方、48 時間処理においては、1000 μg/mL で 38.0%と陽性の判定基準である 10%以上を示した。500 μg/mL で 4.5%、250 μg/mL で 0.5%及び 125 μg/mL で 1.0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。なお、48 時間処理の細胞増殖率は 1000 μg/mL で 25%、500 μg/mL で 32%であった。

また、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、又試験施設の背景値（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。従って、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（Table 1-3 及び Table 1-4）

数的異常（倍数体）の出現率は、24 時間処理においては、1000 μg/mL で 1.0%、500 μg/mL で 0.5%及び 250 μg/mL で 0.5%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、48 時間処理においては、1000 μg/mL で 0%、500 μg/mL で 0.5%、250 μg/mL で 0%及び 125 μg/mL で 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、又試験施設の背景値（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。

7.2.3 確認試験（連続処理法・48 時間処理）

結果を Fig. 1-5、Table 1-5 及び Appendix 3-5 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察（Appendix 3-5）

被験物質添加に伴う培養液の色調の観察においては、すべての用量で変化は認められなかった。また、肉眼による被験物質添加に伴う析出の観察では、すべての用量で析出は認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の観察（Appendix 3-5）

すべての用量で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、すべて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（Table 1-5）

構造異常の出現率（TA）は、1000 μg/mL で 42.0%、800 μg/mL で 33.5%、640 μg/mL で 16.0%と陽性の判定基準である 10%以上であり、512 μg/mL で 5.0%と疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満であった。なお、この時の細胞増殖率は 1000 μg/mL で 8%、800 μg/mL で 5%、640 μg/mL で 17%、512 μg/mL で 19%であった。

また、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、又試験施設の背景値（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。従って、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（Table 1-5）

数的異常（倍数体）の出現率は、1000 μg/mL で 0%、800 μg/mL で 0%、640 μg/mL で 0%及び 512 μg/mL で 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、又試験施設の背景値（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、短時間処理法及び連続処理法の24時間処理においては、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）及び倍数性細胞の出現率は、すべての用量で陰性の判定基準である5%未満であった。一方、連続処理法の48時間処理においては、最高用量の1000 μg/mLのみでTA値が陽性を示したため、最高用量を1000 μg/mLとして、以下、公比1.25で希釈した800、640及び512 μg/mLの計4用量で確認試験を実施した。その結果、TA値は1000、800及び640 μg/mLで陽性、512 μg/mLで疑陽性を示し、用量依存性の増加が認められた。しかしながら、確認試験において陽性及び疑陽性を示した用量では、いずれも細胞増殖率が20%以下を示し、連続処理法の48時間処理に比べて細胞増殖抑制作用が強く発現したこと及び連続処理法の48時間処理で陽性を示した最高用量の1000 μg/mLにおいても細胞増殖率が25%と低く、細胞増殖率が32%を示した次用量の500 μg/mLでは陰性を示したことから、これらの染色体構造異常の誘発は、細胞毒性に伴う非特異的なものであることも否定出来ないものの、連続処理法の48時間処理と確認試験において、ある程度の再現性が認められていることから、総合判定を軽微な陽性と判断した。染色体異常誘発性の強さの指標値については、観察細胞の20%に何らかの異常が見られる用量であるD20値[1)]は0.68 mg/mL、単位用量あたりの染色分体交換（cte）を持つ細胞の出現率の比較値であるTR値[1)]は21であった。

また、倍数性細胞の出現率においては、いずれの処理法もすべての用量で陰性の判定基準である5%未満であったため、陰性と判定した。

なお、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率は5%未満で、陰性の判定基準内にあった。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ことから、試験は適切に実施されたと考えられた。

N,N-ジメチルアクリルアミドは、細菌を用いる復帰突然変異試験では、代謝活性化及び非代謝活性化条件下において、TA97、TA98、TA100、TA1535及びTA1537菌株で変異原性を示さないと報告されている[6)]。

以上の結果から、*N,N*-ジメチルアクリルアミドは本試験条件下において染色体数的異常誘発能は有さないが、軽微な染色体構造異常誘発能を有すると結論した。

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) Hashimoto K, Tanii H (1985): Mutagenicity of acrylamide and its analogues in Salmonella typhimurium., Mutation Res., **158**, 129-133

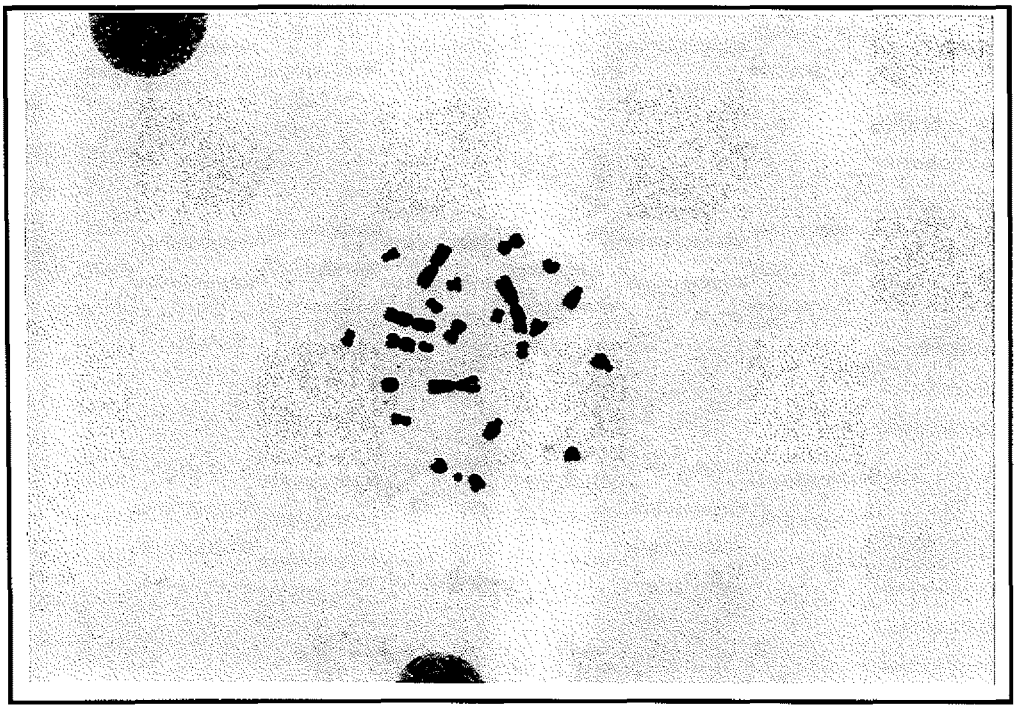


Photo. 1 A metaphase chromosome from the negative control group
[Confirmation test: 48 hr]

Photo. 2 A metaphase chromosome from the 1000 μg/mL group with the fragmentation
[Confirmation test: 48 hr]

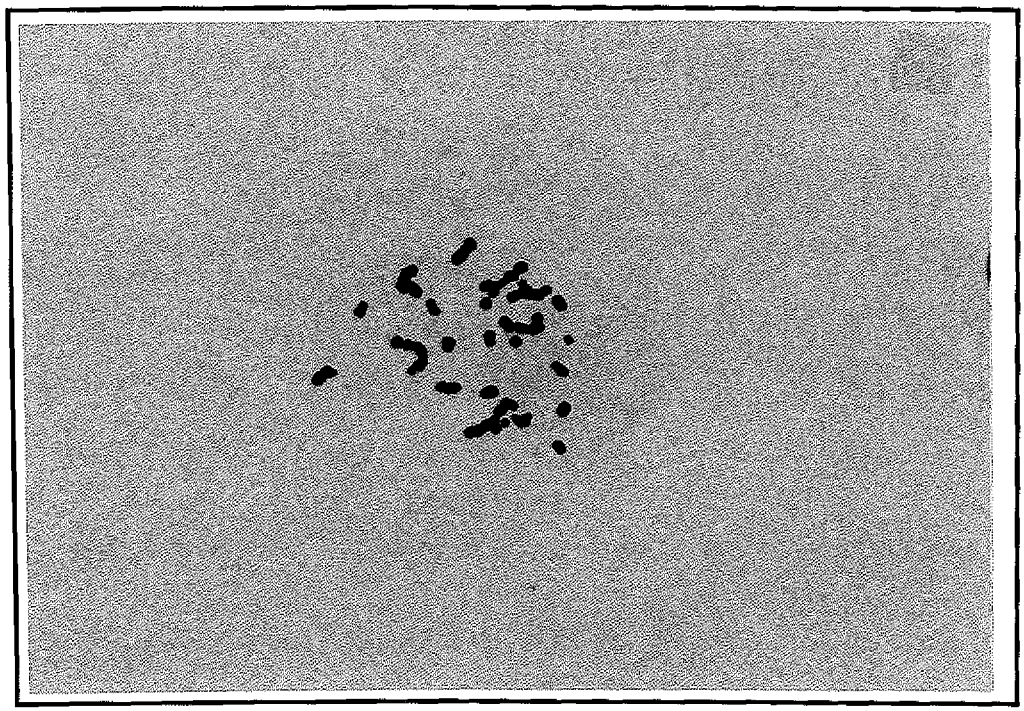


Photo. 3 A metaphase chromosome from the 1000 μg/mL group with exchanges

[Confirmation test: 48 hr]

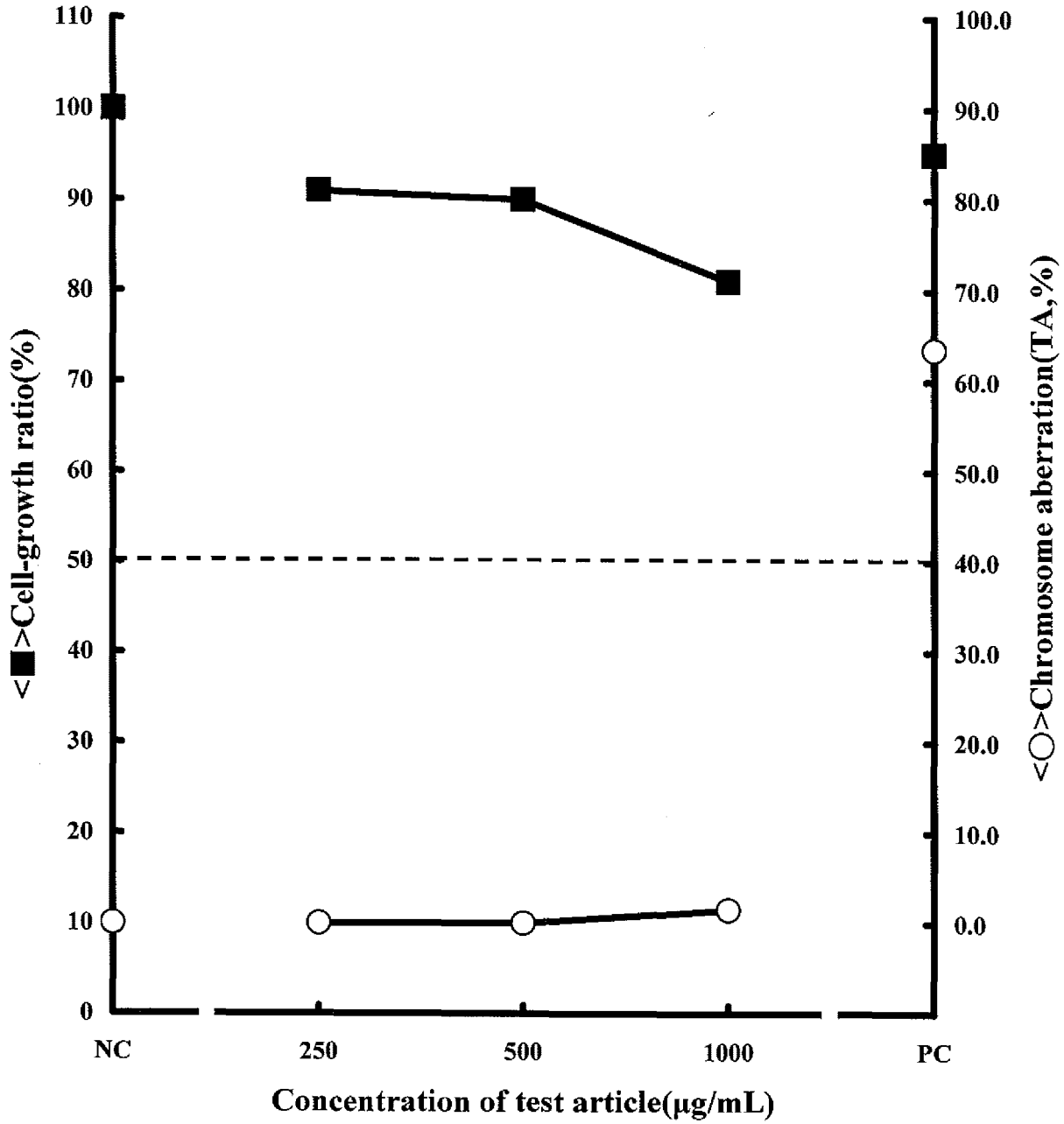


Fig. 1-1
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(water for injection)
PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 μg/mL)

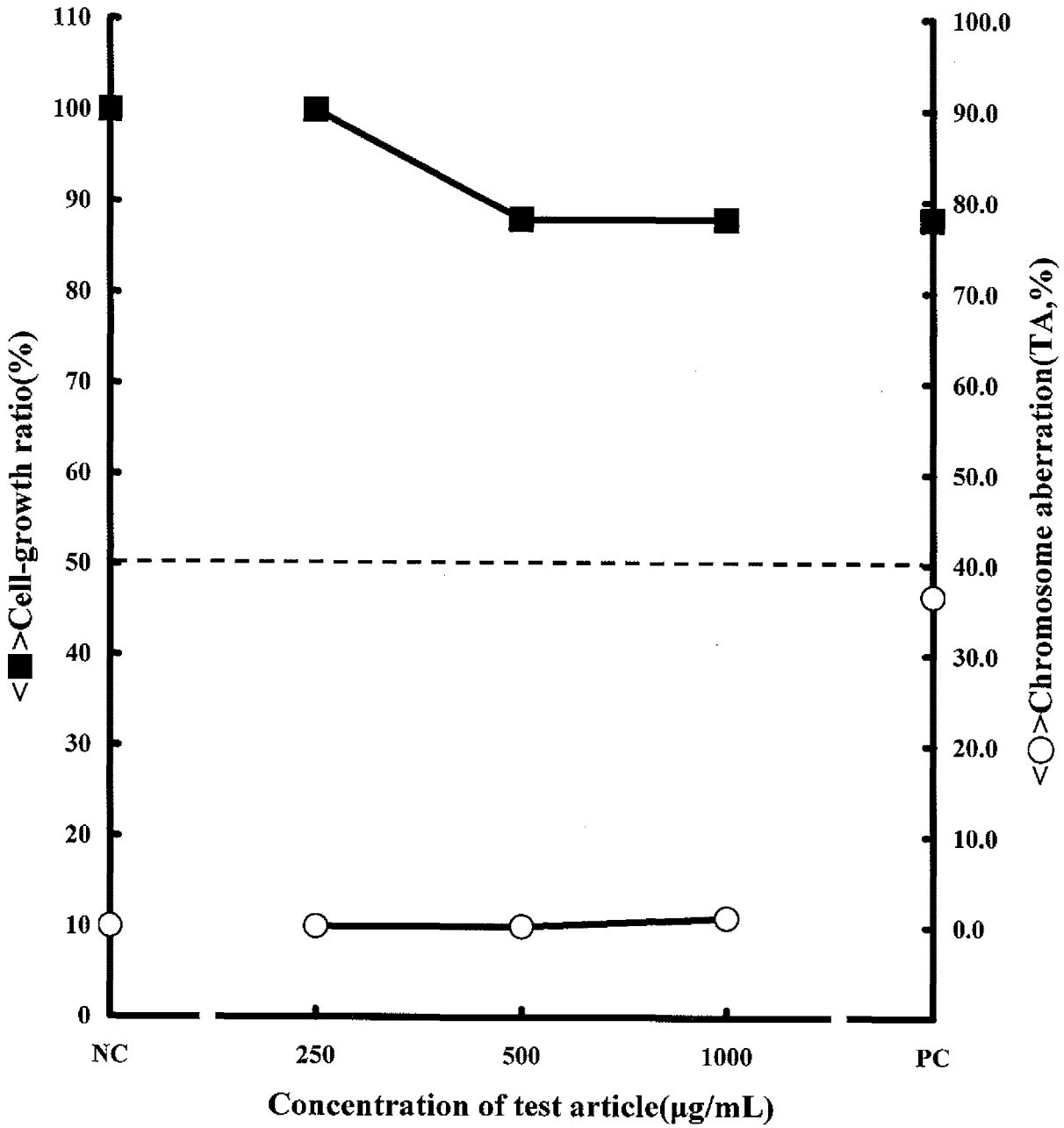


Fig. 1-2
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Short-term treatment: -S9 mix]

NC: Negative Control(water for injection)
PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 μg/mL)

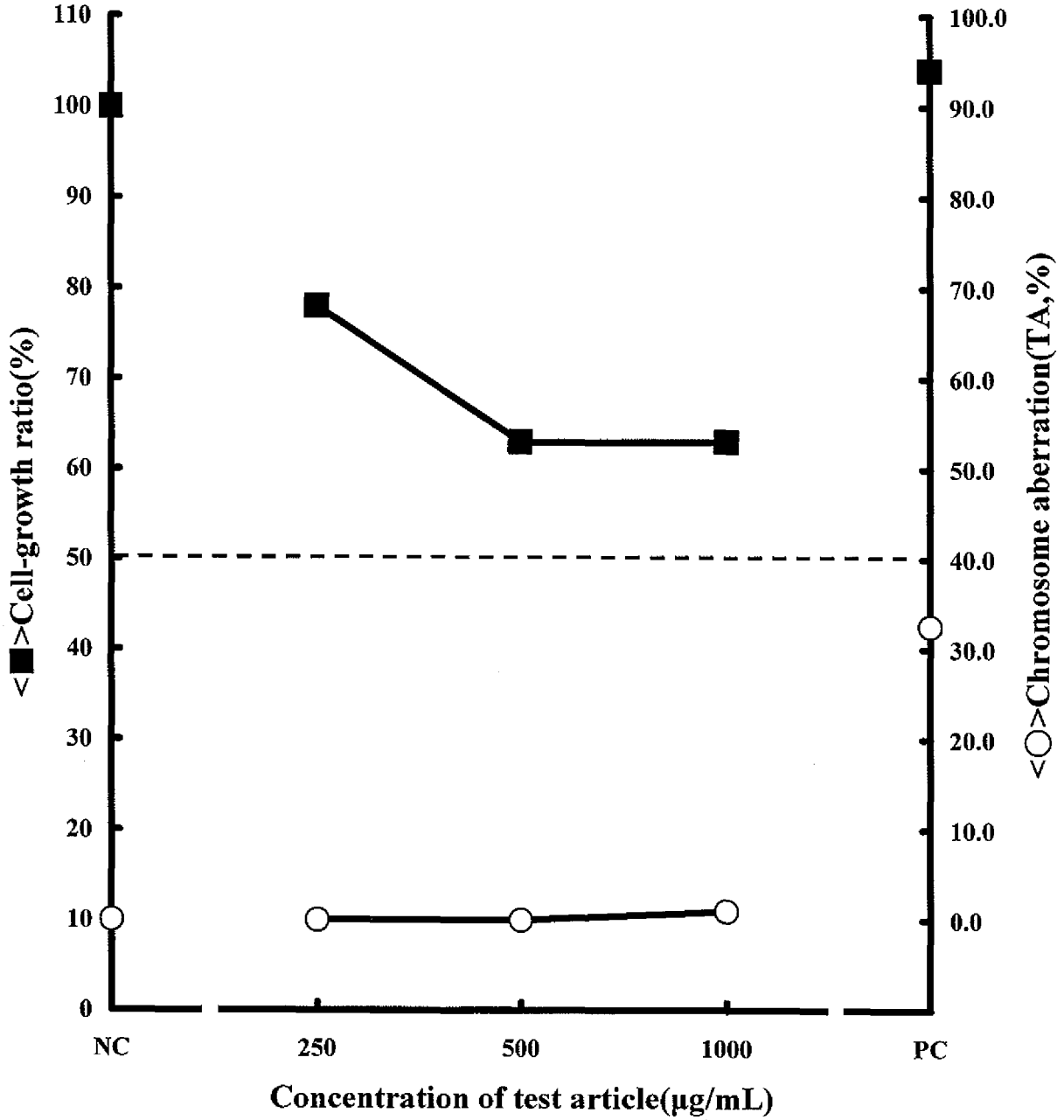


Fig. 1-3
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(water for injection)
PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 μg/mL)

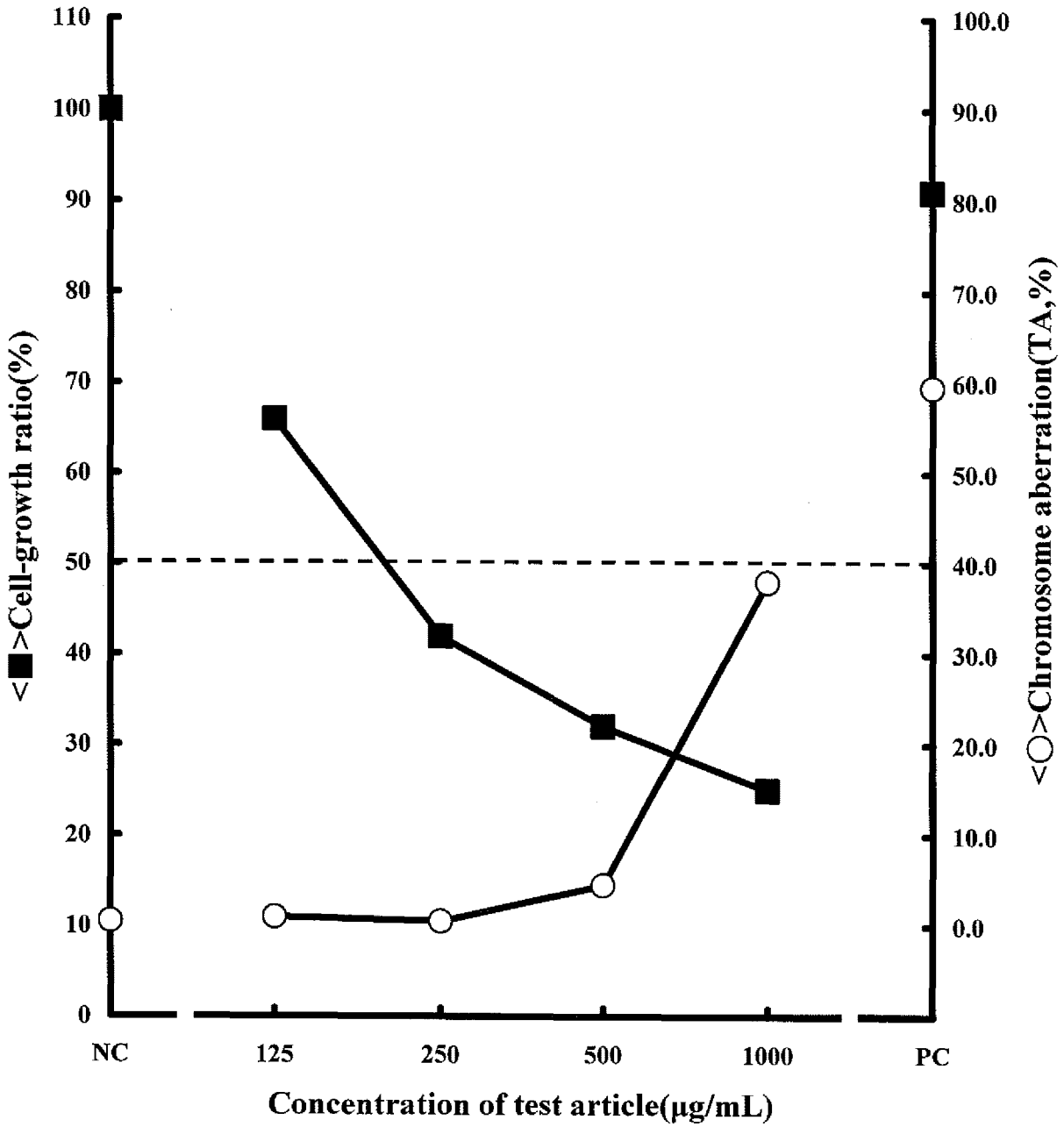


Fig. 1-4
Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(water for injection)
PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 μg/mL)

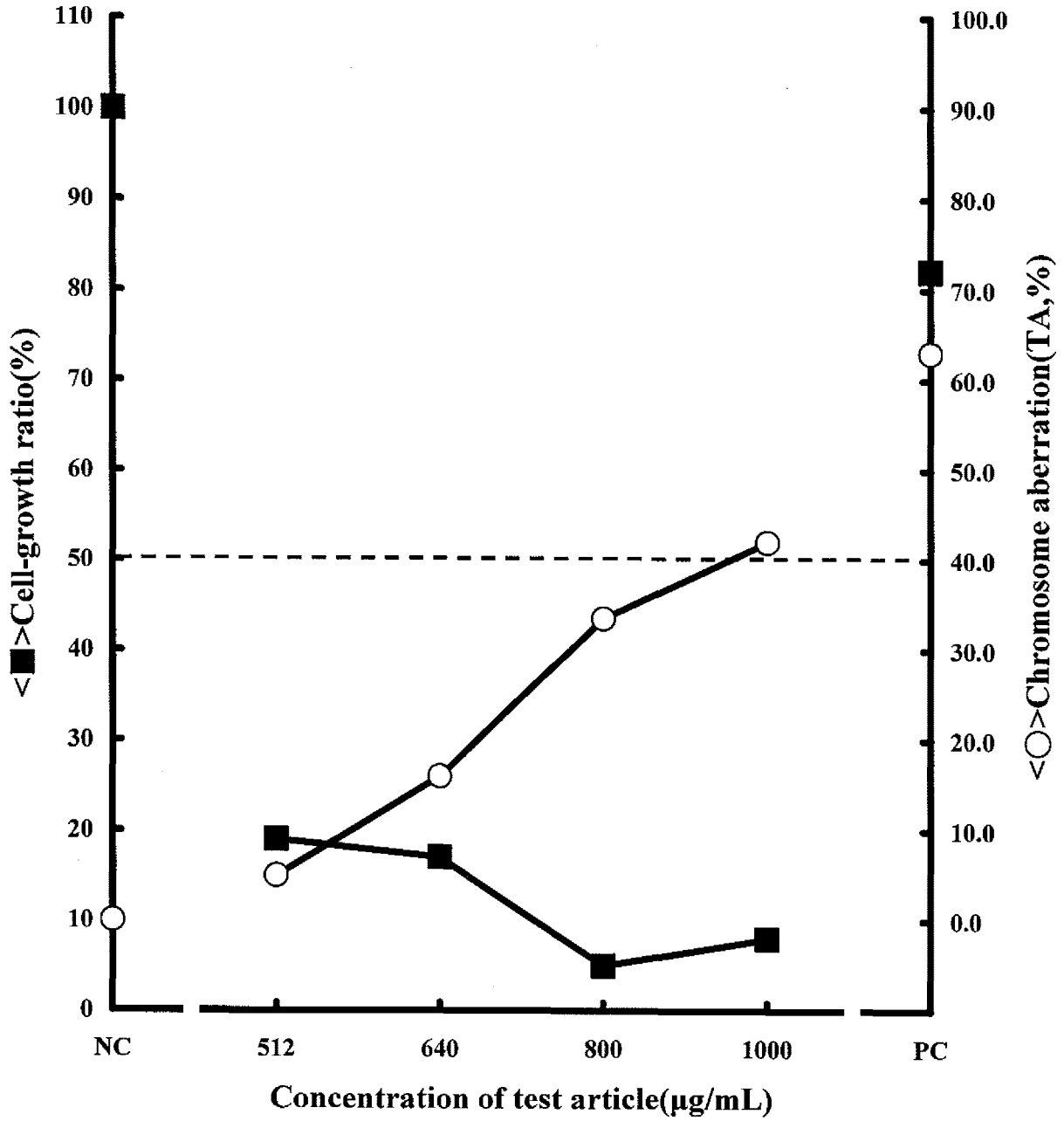


Fig. 1-5

Results of the confirmation test in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide

[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(water for injection)
PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 μg/mL)

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Short-term treatment:+S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/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 (%)	Judge-ment	
6-18	+	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	100	1	0	1		10-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	2	0	2	-	55-1
			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)		(100)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)		
		250	100	0	0	0	0	0	0	0	0		91	100	0	0	0		85-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	91	100	1	0	1	-	41-1
			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)		(91)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		500	100	0	0	0	0	0	0	0	0		99	100	1	0	1		37-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	81	100	0	0	0	-	04-1
			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)		(90)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		1000	100	0	0	0	0	0	0	1	1		81	100	1	0	1		12-1
			100	1	2	0	0	0	3	1	4	-	81	100	2	0	2	-	31-1
			200	1(0.5)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(1.5)	2(1.0)	5(2.5)		(81)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)		
		PC	100	8	59	0	0	0	63	0	63		99	100	0	0	0		26-1
			100	7	62	0	3	0	64	0	64	+	91	100	0	0	0	-	72-1
			200	15(7.5)	121(60.5)	0(0.0)	3(1.5)	0(0.0)	127(63.5)	0(0.0)	127(63.5)		(95)	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 (water for injection)
PC: Positive control (cyclophosphamide, 14μg/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,N*-Dimethylacrylamide
[Short-term treatment:-S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/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 (%)	Judge-ment	
6-18	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	100	1	0	1		03-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	1	0	1	-	58-1
			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)		(100)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		250	100	0	0	0	0	0	0	0	0		92	100	0	0	0		80-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	107	100	0	0	0	-	94-1
			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)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		500	100	0	0	0	0	0	0	0	0		92	100	0	0	0		32-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	84	100	0	0	0	-	19-1
			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)		(88)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		1000	100	0	2	0	0	0	2	0	2		84	100	1	0	1		68-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	92	100	1	0	1	-	15-1
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		(88)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		PC	100	7	32	0	0	0	36	0	36		84	100	0	0	0		75-1
			100	7	31	0	2	0	37	0	37	+	92	100	0	0	0	-	16-1
			200	14(7.0)	63(31.5)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	73(36.5)	0(0.0)	73(36.5)		(88)	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 (water for injection)
PC: Positive control (mitomycin C, 0.075μg/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,N*-Dimethylacrylamide
[Continuous treatment:24hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/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 (%)	Judge-ment	
24-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	100	100	0	0	0	-	77-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		92	100	0	0	0		13-1
			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)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	78	100	1	0	1	-	84-1
			100	0	0	0	0	0	0	1	1		71	100	0	0	0		38-1
			200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)		(78)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		500	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	57	100	0	0	0	-	14-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		64	100	0	1	1		79-1
			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)		(63)	200	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)		
		1000	100	1	1	0	0	0	2	0	2	-	64	100	1	0	1	-	54-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0		57	100	1	0	1		61-1
			200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		(63)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		
		PC	100	4	24	0	1	0	29	0	29	+	100	100	1	0	1	-	97-1
			100	3	34	0	0	0	36	0	36		100	100	0	0	0		53-1
			200	7(3.5)	58(29.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	65(32.5)	0(0.0)	65(32.5)		(104)	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 (water for injection)

PC: Positive control (mitomycin C, 0.050μg/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 1-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Continuous treatment:48hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/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 (%)	Judge-ment	
48-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	100	0	0	0		63-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	96	100	0	0	0	-	47-1
			200	1(0.5)	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)		
		125	100	0	1	0	0	0	1	0	1		63	100	0	0	0		98-1
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	66	100	0	0	0	-	06-1
			200	1(0.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		(66)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		250	100	1	0	0	0	0	1	0	1		43	100	0	0	0		90-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	39	100	0	0	0	-	48-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(42)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		500	100	2	2	0	1	1	4	1	5		29	100	0	0	0		42-1
			100	2	3	0	0	0	5	0	5	-	33	100	1	0	1	-	50-1
			200	4(2.0)	5(2.5)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	9(4.5)	1(0.5)	10(5.0)		(32)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		
		1000	100	12	23	0	0	13	40	1	41		26	100	0	0	0		25-1
			100	14	14	0	0	14	36	1	37	+	23	100	0	0	0	-	76-1
			200	26(13.0)	37(18.5)	0(0.0)	0(0.0)	27(13.5)	76(38.0)	2(1.0)	78(39.0)		(25)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		PC	100	10	55	0	6	0	61	1	62		89	100	1	0	1		28-1
			100	11	56	0	6	0	58	2	60	+	89	100	1	0	1	-	46-1
			200	21(10.5)	111(55.5)	0(0.0)	12(6.0)	0(0.0)	119(59.5)	3(1.5)	122(61.0)		(91)	200	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)		

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 (water for injection)
PC: Positive control (mitomycin C, 0.050μg/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 1-5 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N,N*-Dimethylacrylamide
[Confirmation test:48hr]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article (μg/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 (%)	Judge-ment	
48-0	-	NC	100	0	0	0	0	0	0	0	0		100	100	0	0	0		96-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	107	100	0	0	0	-	39-1
			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)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		512	100	1	5	0	0	1	6	0	6		25	100	0	0	0		05-1
			100	1	3	0	0	0	4	0	4	±	14	100	0	0	0	-	02-1
			200	2(1.0)	8(4.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	10(5.0)	0(0.0)	10(5.0)		(19)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		640	100	8	15	0	0	1	17	0	17		25	100	0	0	0		20-1
			100	6	8	0	1	3	15	0	15	+	11	100	0	0	0	-	45-1
			200	14(7.0)	23(11.5)	0(0.0)	1(0.5)	4(2.0)	32(16.0)	0(0.0)	32(16.0)		(17)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		800	100	13	14	1	1	10	30	0	30		3	100	0	0	0		92-1
			76	10	13	0	0	13	26	0	26		7	76	0	0	0		43-1
			24	3	6	0	0	5	11	0	11	+		24	0	0	0	-	43-2
			200	26(13.0)	33(16.5)	1(0.5)	1(0.5)	28(14.0)	67(33.5)	0(0.0)	67(33.5)		(5)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		1000	100	16	17	0	0	21	43	0	43		3	100	0	0	0		36-1
			93	15	12	7	0	21	40	0	40		14	93	0	0	0		88-1
			7	0	0	0	0	1	1	0	1	+		7	0	0	0	-	88-2
			200	31(15.5)	29(14.5)	7(3.5)	0(0.0)	43(21.5)	84(42.0)	0(0.0)	84(42.0)		(8)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		
		PC	100	10	55	0	10	1	64	0	64		85	100	1	0	1		66-1
			100	11	55	1	7	0	62	1	63	+	85	100	0	0	0	-	24-1
			200	21(10.5)	110(55.0)	1(0.5)	17(8.5)	1(0.5)	126(63.0)	1(0.5)	127(63.5)		(82)	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 (water for injection)
PC: Positive control (mitomycin C, 0.050μg/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.