

M-1362

最 終 報 告 書

試験名：N-エチル-N-クロトノイル-2-トリイジンのほ乳類培養細胞を用いる
染色体異常試験

試験番号：M-1362

試験期間：2009年6月9日-2011年6月30日

試験実施施設

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

2. 目次

2. 目次	3
5. 要約	10
6. 緒言	12
7. 試験材料及び方法	13
7.1 被験物質及び溶媒	13
7.1.1 被験物質	13
7.1.2 溶媒	13
7.2 被験液の調製	14
7.2.1 調製方法	14
7.2.2 調製頻度	14
7.2.3 安定性	15
7.3 対照物質	15
7.3.1 陰性対照	15
7.3.2 陽性対照	15
7.4 使用細胞株	16
7.4.1 細胞株	16
7.4.2 細胞の選択理由	16
7.4.3 培養条件	16

7.4.4	性状検査	16
7.5	S9 mix 及び培養液の調製	17
7.5.1	S9 mix	17
7.5.2	培養液	17
7.6	試験方法 ¹⁻⁵⁾	18
7.6.1	識別方法	18
7.6.2	用量の設定	19
7.6.3	細胞増殖抑制試験	19
7.6.4	染色体異常試験	20
7.6.5	標本の観察	22
7.6.6	染色体異常の分類	22
7.6.7	判定基準	22
8.	試験結果	24
8.1	細胞増殖抑制試験	24
8.1.1	短時間処理法	24
8.1.2	連続処理法	24
8.2	染色体異常試験	25
8.2.1	短時間処理法	25
8.2.2	連続処理法	25
9.	考察	27
10.	参考文献	29

Photographs of Metaphase Chromosomes

- Photo.1 A metaphase chromosome from the negative control group
[Continuous treatment: 48hr]
- Photo.2 A metaphase chromosome from the 167 $\mu\text{g/mL}$ group with a
polyploid cells
[Continuous treatment: 48hr]



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

M-1362

- Fig. 1-2 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Fig. 1-3 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine
[Continuous treatment: 24hr]
- Fig. 1-4 Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine
[Continuous treatment: 48hr]

表

- Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine
[Short-term treatment: +S9 mix]
- Table 1-2 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine
[Short-term treatment: -S9 mix]
- Table 1-3 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine
[Continuous treatment: 24hr]
- Table 1-4 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine
[Continuous treatment: 48hr]

5. 要約

N-エチル-*N*-クロトノイル-2-トリイジン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 細胞株）を用いた染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 256.3 $\mu\text{g/mL}$ で、非代謝活性化では 512.5 $\mu\text{g/mL}$ で、更に連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 128.1 $\mu\text{g/mL}$ で 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では 183.0 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 311.8 $\mu\text{g/mL}$ 、更に連続処理法の 24 時間処理では 120.7 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 98.0 $\mu\text{g/mL}$ 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」との規定を参照し、更に各処理における 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量における抑制率と 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を勘案しながら、短時間処理法の代謝活性化及び非代謝活性化では 400 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 250 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を設定した。

染色体異常試験の結果、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）は、短時間処理法の代謝活性化では 400 $\mu\text{g/mL}$ では 4.5%、267 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0%、178 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、119 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0%及び 79.0 $\mu\text{g/mL}$ では 3.5%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、400 $\mu\text{g/mL}$ では 6.0%、267 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0%、178 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、119 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%及び 79.0 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%と 400 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示した。更に連続処理法の 24 時間処理では 250 $\mu\text{g/mL}$ では 2.5%、167 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、111 $\mu\text{g/mL}$ では 0%、74.1 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0%及び 49.4 $\mu\text{g/mL}$ では 0%と陰性の判定基準である 5%未満であった。また、48 時間処理では 250 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の細胞が観察されず UR (unreliable) と判定した。167 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0%、111 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0%、74.1 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%及び 49.4 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%と陰性の判定基準である 5%未満であった。短時間処理法の非代謝活性化において、疑陽性を示したが、細胞増殖率が十分に低い用量で認められたこと及び出現率が低いことから、短時間処理法での確認試験は難しいと判断し、連続処理法を実施することとした。その結果、TA 値の増加は認められなかったため、非特異的な異常と判断し、染色体構造異常は陰性と判定した。

一方、倍数性細胞の出現率は短時間処理法の代謝活性化では 400 $\mu\text{g/mL}$ では 4.0%、267 $\mu\text{g/mL}$ では 5.5%、178 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、119 $\mu\text{g/mL}$ では 0%及び 79.0 $\mu\text{g/mL}$ では 0%と 267 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示した。また、非代謝

活性化においては、400 µg/mL では 2.0%、267 µg/mL では 5.5%、178 µg/mL では 4.0%、119 µg/mL では 4.5% 及び 79.0 µg/mL では 0% と 267 µg/mL で疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示した。更に連続処理法の 24 時間処理では 250 µg/mL では 2.0%、167 µg/mL では 4.5%、111 µg/mL では 3.5%、74.1 µg/mL では 0% 及び 49.4 µg/mL では 0.5% と陰性の判定基準である 5% 未満であった。また、48 時間処理では 250 µg/mL では規定数の細胞が観察されず UR (unreliable) と判定した。167 µg/mL では 93.0%、111 µg/mL では 9.0%、74.1 µg/mL では 0.5% 及び 49.4 µg/mL では 1.5% と 167 µg/mL で陽性の判定基準である 10% 以上を、111 µg/mL で疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示した。短時間処理法において、疑陽性を示したが、細胞増殖率が十分に低い用量で認められたこと及び出現率が低いことから、短時間処理法での確認試験は難しいと判断し、連続処理法を実施することとした。その結果、48 時間処理において、倍数性細胞の用量依存的な増加が認められたことから陽性と判定した。

すべての処理法において、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、また試験施設の背景値と同様であった。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。

以上の結果から、*N*-エチル-*N*-クロトノイル-2-トルイジンは本試験条件下において染色体構造異常は誘発しないが、染色体数的異常は誘発すると結論した。

M-1362

6. 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*-エチル-*N*-クロトノイル-2-トリイジン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。

7. 試験材料及び方法

7.1 被験物質及び溶媒

7.1.1 被験物質

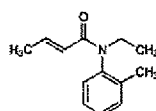
被験物質 *N*-エチル-*N*-クロトノイル-2-トルイジンは
 れた。被験物質情報 (Attached Data 1) は、
 の分析に基づくものである。

提供さ
 非 GLP 下で

名称 : *N*-エチル-*N*-クロトノイル-2-トルイジン
 英名称 : *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine
 別称 : クロタミトン、Crotamiton

CAS 番号 : 483-63-6

構造式又は示性式 :



分子量 : 203.28
 密度 : 0.987
 純度 : >99.5%
 沸点 : 153~155°C
 性状 : 透明~淡黄色の油状液体
 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、実験期間中安定であったことを確認した (Attached Data 2)。
 保存方法 : 室温 (保存期間中の実測温度 : 16°C~24°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
 取り扱い上の注意 : 取扱いは、適切な保護具を身につけ、換気のよい場所で行い、漏れ、あふれ、飛散しないよう注意し、みだりに上記を発生させないようにした。また火気厳禁とした。
 返却 : 実験終了後、被験物質の残余物は、安定性を確認した後、すべて株式会社ボゾリサーチセンターにて廃棄した。

7.1.2 溶媒

名称 : ジメチルスルホキシド (DMSO)

ロット番号	:	LTF0010
規格	:	試薬特級
製造元	:	和光純薬工業株式会社
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、水に微溶で、アルコールに溶解性と記載されていたが、詳細が不明であったことから、供試前試験を実施した。その結果、DMSOに500 mg/mLで溶解することが確認されたため、溶媒としてDMSOを用いることとした。

7.2 被験液の調製

7.2.1 調製方法

1) 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.4100 g を 2 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 205.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：2050 µg/mL）を調製した。次いで、205.0 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、102.5、51.25、25.63、12.81、6.406、3.203 及び 1.602 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 0.2000 g を 5 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 40.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：400 µg/mL）を調製した。次いで 40.0 mg/mL 溶液を公比 1.5（各濃度の被験液 2.0 mL：溶媒 1.0 mL）で順次 4 段階希釈し、26.7、17.8、11.9 及び 7.90 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化及び非代謝活性化ともに 40.0、26.7、17.8、11.9 及び 7.90 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を用いた。

連続処理法では、被験物質 0.1250 g を 5 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 25.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：250 µg/mL）を調製した。次いで 25.0 mg/mL 溶液を公比 1.5（各濃度の被験液 2.0 mL：溶媒 1.0 mL）で順次 4 段階希釈し、16.7、11.1、7.41 及び 4.94 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を調製した。24 時間処理及び 48 時間処理ともに 25.0、16.7、11.1、7.41 及び 4.94 mg/mL の 5 濃度段階の被験液を用いた。

7.2.2 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。

7.2.3 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、被験液の安定性情報とした。その結果、安定性には問題ないことを確認した。

7.3 対照物質

7.3.1 陰性対照

溶媒として用いた DMSO を陰性対照物質とした。

7.3.2 陽性対照

- 1) シクロフォスファミドとマイトマイシン C を、代謝活性化系と非代謝活性化系の陽性対照としてそれぞれ用いた。

- (1) シクロフォスファミド（以下 CP と略記する）

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）
保存条件	:	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) マイトマイシン C（以下 MMC と略記する）

ロット番号	:	535AHF
製造元	:	協和醗酵キリン株式会社
力価	:	2 mg（力価）/瓶
保存条件	:	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

- 2) 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 K9B89）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 μ g/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 K9B89）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 $\mu\text{g/mL}$ 。

(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 K9B89）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 $\mu\text{g/mL}$ ）。

3) 陽性対照物質の選択理由

前述（6.2）の遺伝毒性試験ガイドライン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。

7.4 使用細胞株

7.4.1 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 細胞株）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、ジメチルスルホキシドを 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について細胞の性状検査を定期的に実施して、適正であることが確認されたものを試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 17 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 21 継代、染色体異常試験の連続処理法では 3 継代であった。

7.4.2 細胞の選択理由

自然発生染色体異常の発現率が低いこと、更に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、本細胞を選択した。

7.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂ 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。

7.4.4 性状検査

試験に使用する細胞は、凍結保存から解凍し、染色体のモード数、倍加時間及びマイコプラズマ汚染の有無等について 2009 年 5 月 8 日～2009 年 5 月 14 日に定期検査を実施し、正しい特性を有することを確認した。細胞は、30 継代を越えない範囲で試験に供した。

7.5 S9 mix 及び培養液の調製

7.5.1 S9 mix

S9 及び補酵素 (S9/コファクターC セット、ロット番号 C090313131、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	:	09031313
製造日	:	2009 年 3 月 13 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 9 月 12 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	:	C09031712
製造日	:	2009 年 3 月 17 日
保存方法	:	冷凍 (超低温フリーザー)
使用期限	:	2009 年 9 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	20 mmol/L HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	1.34 mL
		50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
		330 mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
		50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
		40 mmol/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

7.5.2 培養液

Invitrogen Corporation より購入した Minimum Essential Medium (MEM、GIBCO™、

Cat.No. 11095-080) に、Invitrogen Corporation より購入し非働化 (56°C, 30 分) した牛血清 (BS) を 10 v/v% 添加して調製した培養液 (BS-MEM) を用いた。調製後の BS-MEM 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 : 554263、571556
 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

7.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。なお、連続処理法において明らかな陽性結果が得られたため、確認試験及び追加試験は実施しなかった。

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

7.6.1 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、被験物質用量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。また、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。

7.6.2 用量の設定

1) 細胞増殖抑制試験

最高用量を 2050 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 1025、512.5、256.3、128.1、64.06、32.03 及び 16.02 $\mu\text{g/mL}$ 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、短時間処理法の代謝活性化では 256.3 $\mu\text{g/mL}$ において、非代謝活性化では 512.5 $\mu\text{g/mL}$ において、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 128.1 $\mu\text{g/mL}$ において 50% を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度(概略値)は、短時間処理法の代謝活性化では 183.0 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 311.8 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 120.7 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 48 時間処理では 98.0 $\mu\text{g/mL}$ 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」との規定を参照し、更に各処理における 50%を超える細胞増殖抑制作用が認められた用量における抑制率と 50%細胞増殖抑制濃度(概略値)を勘案しながら、短時間処理法では代謝活性化及び非代謝活性化ともに 400 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を、連続処理法では 24 時間処理及び 48 時間処理ともに 250 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 1.5 で計 5 用量を設定した。また、いずれの場合もこれに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

7.6.3 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被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。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 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 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 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 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 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) 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被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。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 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、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 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 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。

7.6.4 染色体異常試験

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 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 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 $\mu\text{g/mL}$ ）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 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 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 $\mu\text{g/mL}$) 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 $\mu\text{g/mL}$ 、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 箇所水滴下した。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)。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 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.100 mL を除き、MMC 0.100 mL (最終濃度: 0.050 $\mu\text{g/mL}$) 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、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 $\mu\text{g/mL}$ 、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 箇所水滴下した。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下で観察し確認した。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。

7.6.5 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。

7.6.6 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、構造異常はさら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（非染色部分が染色分体の同軸上にある）ものであって、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と定義した。
- 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と定義した。
- 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を染色体型切断と定義した。
- 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)など。

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。

- 倍数性 : polyploidy（核内倍加体：endoreduplication を含む）

7.6.7 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 (+)

染色体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。

8. 試験結果

8.1 細胞増殖抑制試験

8.1.1 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

細胞増殖抑制は、代謝活性化では 256.3 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 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 183.0 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、非代謝活性化では 512.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 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 311.8 $\mu\text{g/mL}$ であった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う肉眼による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、変化は認められなかった。被験物質の添加に伴う析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、1025 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質と思われる物質による析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、最高用量である 2050 $\mu\text{g/mL}$ で認められた。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、代謝活性化では全ての用量で、非代謝活性化では、64.06 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

8.1.2 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

細胞増殖抑制は、24 時間処理法では 128.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 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 120.7 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、48 時間処理法では 128.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で 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 98.0 $\mu\text{g/mL}$ であった。

2) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う肉眼による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、変化は認められなかった。被験物質の添加に伴う析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、1025 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で認められた。

3) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質と思われる物質による析出は、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、最高用量である 2050 $\mu\text{g/mL}$ で認められた。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、64.06 $\mu\text{g/mL}$

以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。48 時間処理では、32.03 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。

8.2 染色体異常試験

8.2.1 短時間処理法

代謝活性化の結果を Appendix 3-1、Fig. 1-1 及び Table 1-1 に、非代謝活性化の結果を Appendix 3-2、Fig. 1-2 及び Table 1-2 に示した。

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う肉眼による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、変化は認められなかった。被験物質添加に伴う析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに、認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質と思われる物質による析出は、代謝活性化及び非代謝活性化ともに認められなかった。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、代謝活性化では、すべての用量で細胞の浮遊、形態変化が認められた。非代謝活性化では、119 $\mu\text{g/mL}$ 以上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

染色体構造異常の出現率 (TA) は、短時間処理法の代謝活性化では 400 $\mu\text{g/mL}$ では 4.5%、267 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0%、178 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、119 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0% 及び 79.0 $\mu\text{g/mL}$ では 3.5% 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、400 $\mu\text{g/mL}$ では 6.0%、267 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0%、178 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、119 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% 及び 79.0 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5% と 400 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示した。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、短時間処理法の代謝活性化では 400 $\mu\text{g/mL}$ では 4.0%、267 $\mu\text{g/mL}$ では 5.5%、178 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%、119 $\mu\text{g/mL}$ では 0% 及び 79.0 $\mu\text{g/mL}$ では 0% と 267 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示した。また、非代謝活性化においては、400 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0%、267 $\mu\text{g/mL}$ では 5.5%、178 $\mu\text{g/mL}$ では 4.0%、119 $\mu\text{g/mL}$ では 4.5% 及び 79.0 $\mu\text{g/mL}$ では 0% と 267 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示した。

8.2.2 連続処理法

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

1) 被験物質添加直後の観察

被験物質添加に伴う肉眼による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、変化は認められなかった。被験物質添加に伴う析出は、24

時間処理及び48時間処理ともに、認められなかった。

2) 被験物質処理終了時の培養細胞の観察

被験物質と思われる物質による析出は、24時間処理及び48時間処理ともに認められなかった。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時間処理及び48時間処理ともに、74.1 µg/mL以上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

染色体構造異常の出現率 (TA) は、連続処理法の24時間処理では250 µg/mLでは2.5%、167 µg/mLでは0.5%、111 µg/mLでは0%、74.1 µg/mLでは1.0%及び49.4 µg/mLでは0%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、250 µg/mLでは規定数の細胞が観察されずUR (unreliable) と判定した。167 µg/mLでは2.0%、111 µg/mLでは1.0%、74.1 µg/mLでは0.5%及び49.4 µg/mLでは0.5%と陰性の判定基準である5%未満であった。

4) 染色体数的異常

数的異常 (倍数体) の出現率は、連続処理法の24時間処理では250 µg/mLでは2.0%、167 µg/mLでは4.5%、111 µg/mLでは3.5%、74.1 µg/mLでは0%及び49.4 µg/mLでは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、250 µg/mLでは規定数の細胞が観察されずUR (unreliable) と判定した。167 µg/mLでは93.0%、111 µg/mLでは9.0%、74.1 µg/mLでは0.5%及び49.4 µg/mLでは1.5%と167 µg/mLで陽性の判定基準である10%以上を、111 µg/mLで疑陽性の判定基準である5%以上10%未満を示した。

9. 考察

染色体異常試験の結果、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) は、短時間処理法の非代謝活性化では、疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示したが、細胞増殖率が十分に低い用量で認められたこと及び出現率が低いことから、短時間処理法での確認試験は難しいと判断し、連続処理法を実施することとした。その結果、24 時間処理及び 48 時間処理ともに、陰性の判定基準である 5%未満を示したため、総合的に陰性と判定した。

一方、倍数性細胞の出現率は連続処理法の 48 時間処理で陽性の判定基準である 10%を示し、かつ用量依存性が認められたため、総合的に陽性と判定した。連続処理法の 48 時間処理において陽性結果が得られたことから、染色体数的異常誘発能の強さを、数的異常が 20%出現する推定被験物質濃度 (PD₂₀ 値) を指標として検討したところ、PD₂₀ 値は 0.10 mg/mL であった。

全ての処理法において、陰性対照群においては染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現率は陰性の判定基準内にあり、また試験施設の背景値 (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。

本被験物質に関する遺伝毒性試験の報告を調査したが、該当する文献は見当たらなかった。しかしながら、基本骨格である *o*-tolidine については、多くの遺伝毒性試験のデータが報告されている。マウスリンパ腫及びチャイニーズハムスター卵巣由来 (CHO) を用いた遺伝子突然変異試験では、代謝活性化の有無によらず陰性と報告されている^{6,7)}が、*In vitro* 及び *In vivo* 姉妹染色分体交換試験^{8,9)}、Fischer ラットの胚細胞 (RLV/1706) を用いた形質転換試験¹⁰⁾、*Escherichia coli* *polA* を用いた Rec assay¹¹⁾ 及び *In vivo* がん原性試験¹²⁾ においては、いずれも陽性と報告されている。また、CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験においては、短時間処理法 代謝活性化では構造異常について陽性、非代謝活性化では数的異常について陽性と報告されている¹³⁾。本被験物質の場合は、溶媒に完全に溶解しており、染色体標本の観察においても析出は全く認められなかったことから、アスベストなどに見られる針状結晶による細胞分裂の物理的阻害とは異なる数的異常誘発機構に起因するものと考えられる。本被験物質は、染色体異常試験における 48 時間処理のみにおいて顕著な数的異常誘発性を示したことから、その発現機構は、細胞周期及び細胞分裂に関連するタンパク質に影響している可能性が示唆されるが、非代謝活性化において陽性となった *o*-tolidine 同様に、詳細な発現機構については調べられていない。また、類似化合物である 4-chloro-*o*-tolidine では、V79 細胞の紡錘体への影響を調べているが、阻害作用は認められなかったと報告されている¹⁴⁾ことから、紡錘体形成の阻害とは別の機構による数的異常の誘発が生じ

M-1362

た可能性が示唆された。

以上の結果から、*N*-エチル-*N*-クロトノイル-2-トリイジンは本試験条件下において染色体構造異常誘発能は有しないが、染色体数的異常誘発能は有すると結論した。

10. 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) Tucker JD, Auletta A, Cimino MC, Dearfield KL, Jacobson-Kram D, Tice RR, and Carrano AV (1993): Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, **297** (2), 101-180
- 7) Neal SB and Probst GS. (1983): Chemically-induced sister-chromatid exchange *in vivo* in bone marrow of Chinese hamsters. An evaluation of 24 compounds., *Mutation Res.*, **113** (1), 33-44
- 8) Amacher D.E. and Turner G.N (1985): Tests for gene mutational activity in the L5178Y/TK assay system. In: Ashby, J. et al., eds, *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Report of the International Programme on Chemical Safety's Collaborative Study on *in vitro* assays, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 487-496 (IARC, 2000 から引用)
- 9) Fox M. and Delow G.F. (1985): Tests for mutagenicity activity at the HGPRT locus in Chinese hamster V79 cells in culture. In: Ashby, J. et al., eds, *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Report of the International Programme on Chemical Safety's Collaborative Study on *in vitro* assays, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 517-523 (IARC, 2000 から引用)
- 10) Heidelberger C, Freeman AE, Pienta RJ, Sivak A, Bertram JS, Casto BC, Dunkel VC, Francis MW, Kakunaga T, Little JB and Schechtman LM (1983): Cell transformation by chemical agents--a review and analysis of the literature. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, **114** (3), 283-385
- 11) Leifer Z, Kada T, Mandel M, Zeiger E, Stafford R and Rosenkranz HS (1981): An evaluation of tests using DNA repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. A report of the U.S. EPA's Gene-TOX Program., *Mutation Res.*, **87** (3), 211-297

- 12) Wyrobek AJ, Gordon LA, Burkhardt JG, Francis MW, Kapp RW Jr, Letz G, Malling HV, Topham JC, Whorton MD (1983): An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, **115** (1), 1-72
- 13) 祖父尼俊雄監修 (1998): <改訂>染色体異常試験データ集、pp. 497、エル・アイ・シー、東京
- 14) Göggelmann W, Bauchinger M, Kulka U and Schmid E (1996): Genotoxicity of 4-chloro-o-toluidine in *Salmonella typhimurium*, human lymphocytes and V79 cells, *Mutation Res.*, **370** (1), 39-47

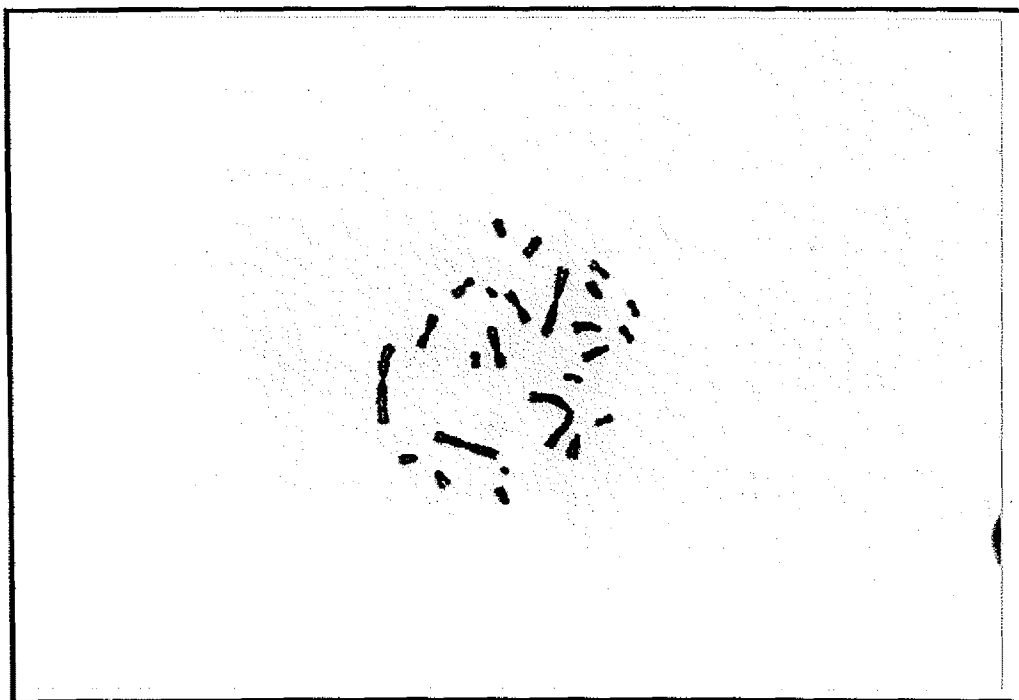


Photo. 1 A metaphase chromosome from the negative control group
[Continuous treatment: 48hr]

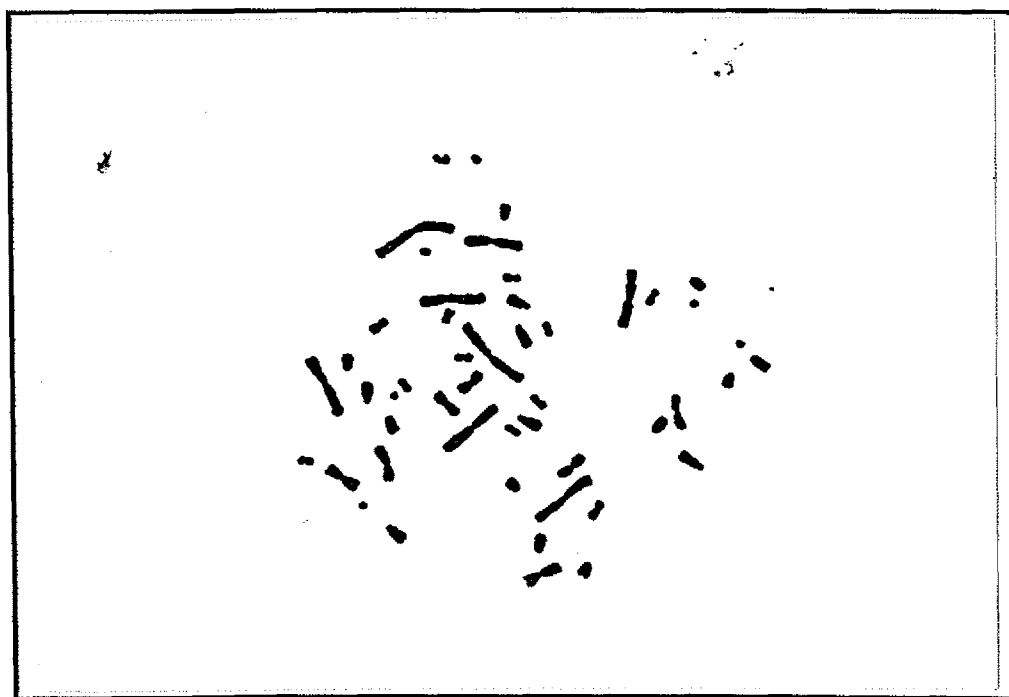


Photo. 2 A metaphase chromosome from the 167 µg/mL group with
a polyploid cells
[Continuous treatment: 48hr]

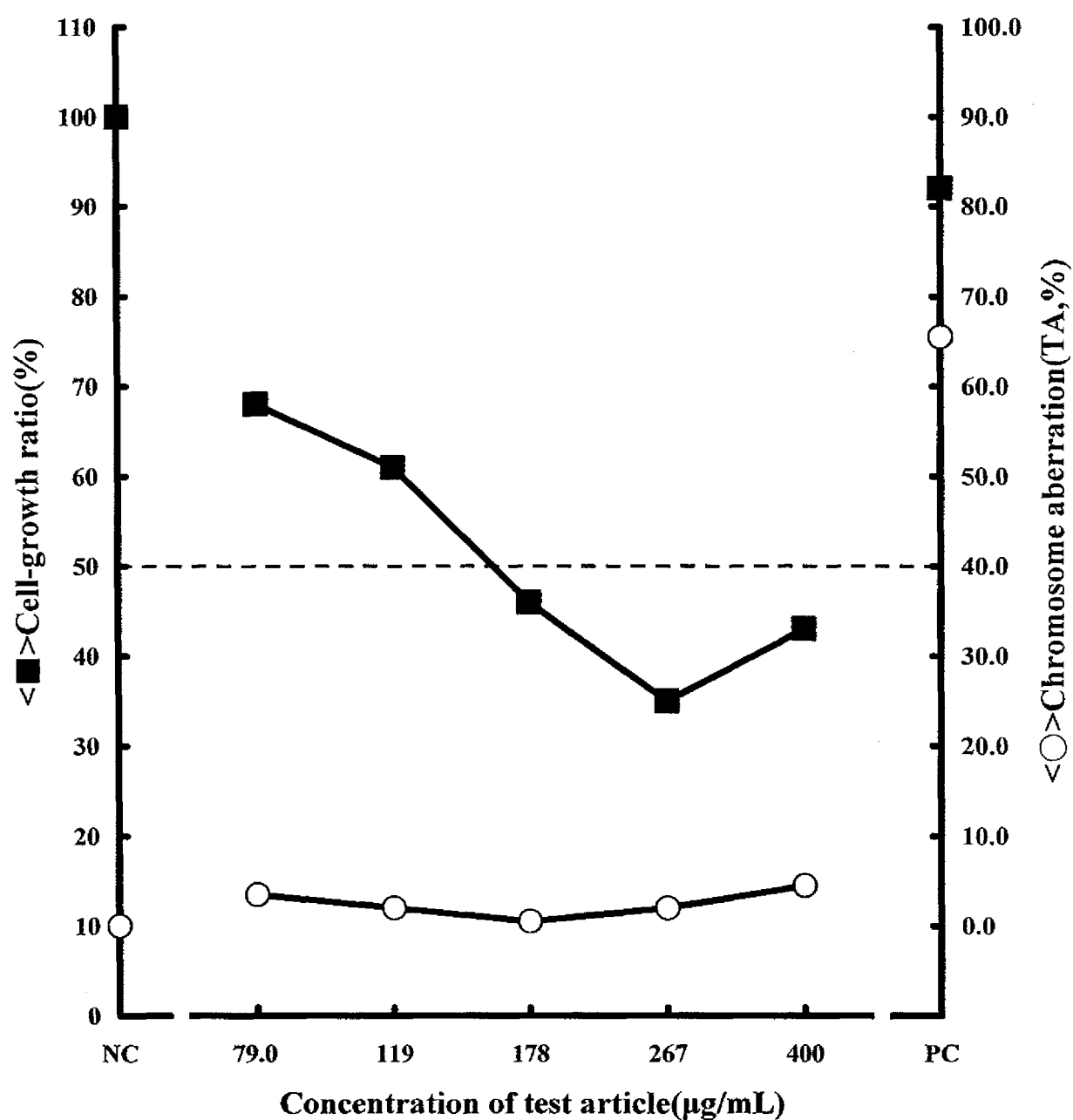


Fig. 1-1

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine

[Short-term treatment: +S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(cyclophosphamide : 14 µg/mL)

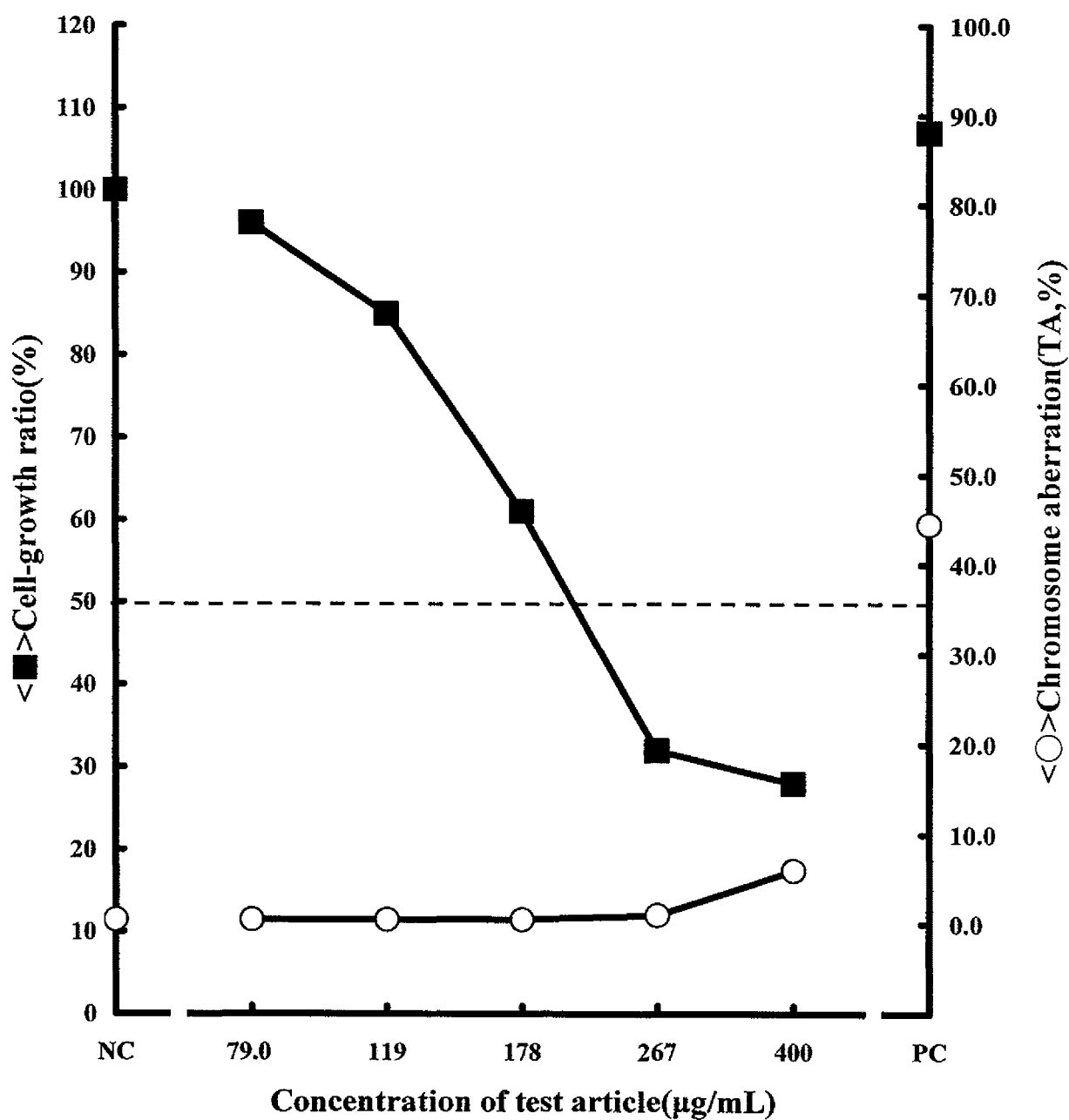


Fig. 1-2

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine

[Short-term treatment:-S9 mix]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.075 µg/mL)

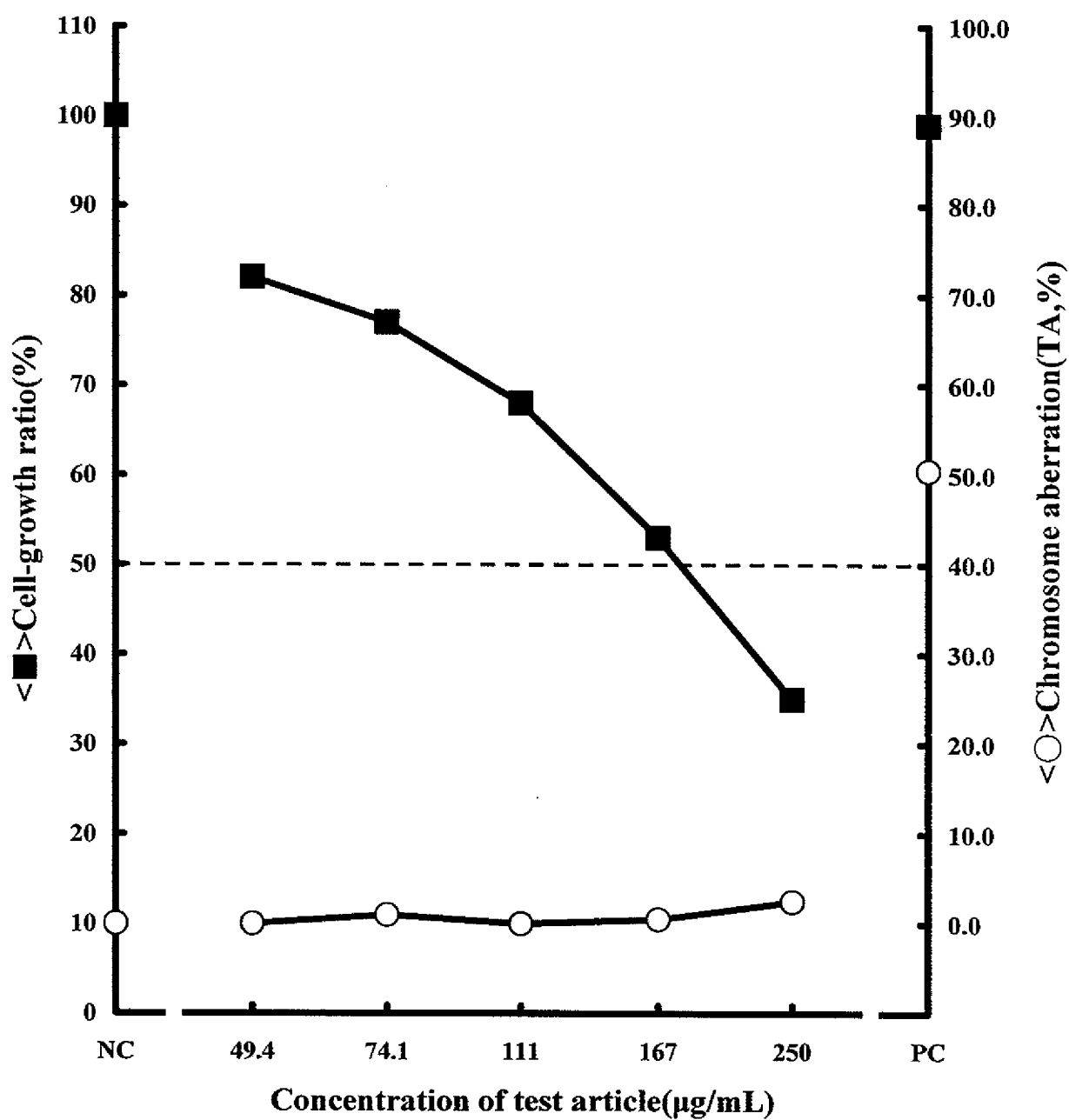


Fig. 1-3

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine

[Continuous treatment: 24hr]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 µg/mL)

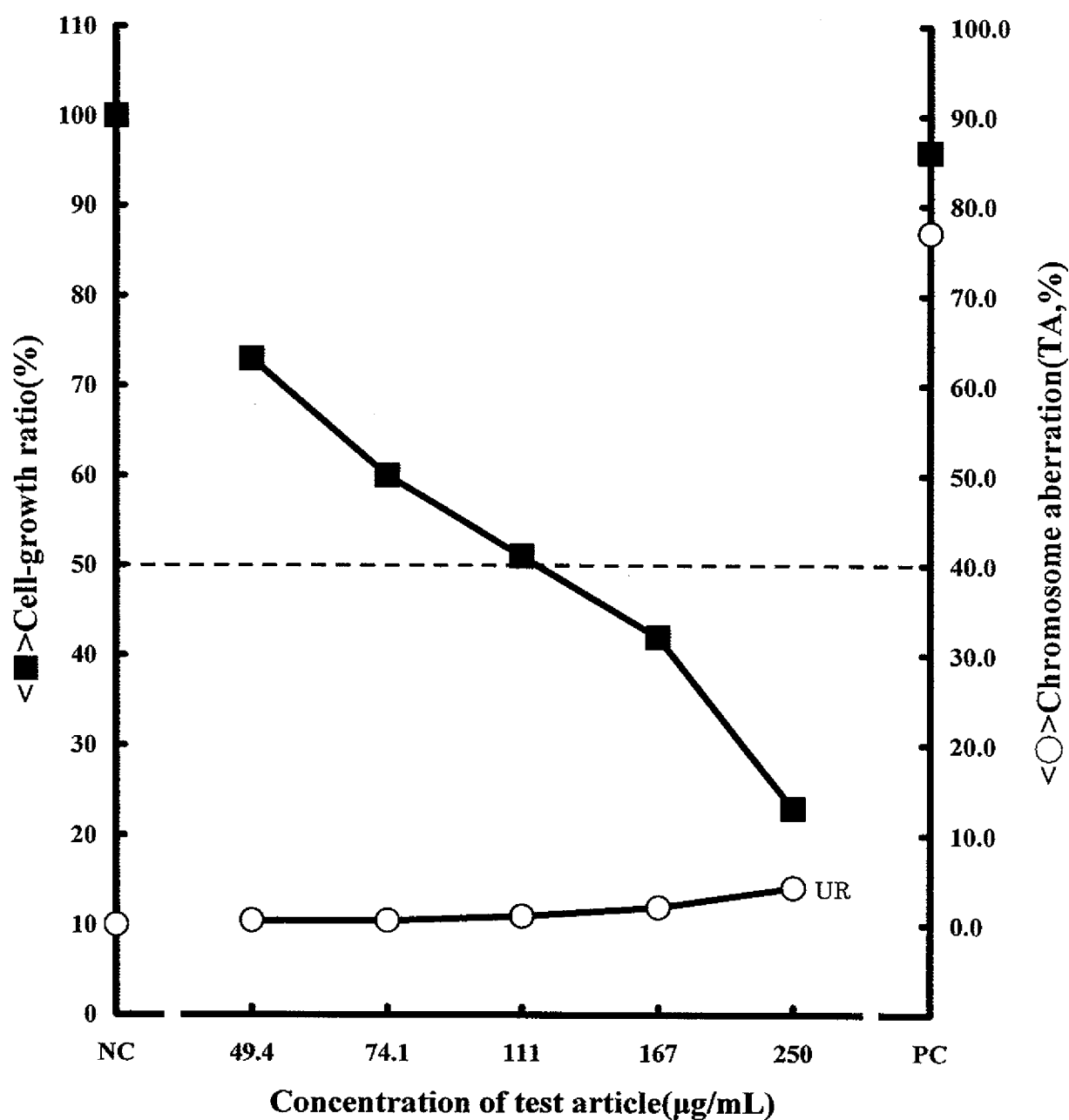


Fig. 1-4

Results of the chromosome aberration test in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine

[Continuous treatment: 48hr]

NC: Negative Control(DMSO)

PC: Positive Control(mitomycin C : 0.050 µg/mL)

UR: This value was judged to be unreliable since no sufficient number of chromosome could be observed due to severe cytotoxicity.

Table 1-1 Chromosome aberration in cultured Chinese hamster cells treated with *N*-ethyl-*o*-crotonotoluidine
[Short-term treatment; +S9 mix]

Time (h)	S9 mix	Conc. of test article ($\mu\text{g/mL}$)	Number of cells with structural chromosome aberration (%)								Judge- ment	Cell- growth ratio (%)	Number of cells with numerical chromosome aberration (%)				Slide No.
			Cells observed	ctb	cte	csb	cse	other	TA(%)	g	TAG(%)		Cells observed	Polyploid cells	other	Total (%)	
6-18	+	NC	100	0	0	0	0	0	0	0		100	100	0	0	0	80-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	-	99	100	0	0	0	83-1
			200	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)	
		79.0	100	1	4	0	0	0	5	0	5	64	100	0	0	0	84-1
			100	1	1	0	0	0	2	0	2	71	100	0	0	0	97-1
			200	2(1.0)	5(2.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	7(3.5)	0(0.0)	7(3.5)	(68)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		119	100	0	1	0	0	0	1	0	1	57	100	0	0	0	78-1
			100	0	3	0	0	0	3	0	3	64	100	0	0	0	68-1
			200	0(0.0)	4(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	0(0.0)	4(2.0)	(61)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		178	100	0	1	0	0	0	1	0	1	35	100	0	0	0	19-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	57	100	1	0	1	44-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	(46)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	
		267	100	0	1	0	0	0	1	0	1	35	100	5	0	5	04-1
			100	0	3	0	0	0	3	0	3	35	100	6	0	6	12-1
			200	0(0.0)	4(2.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	0(0.0)	4(2.0)	(35)	200	11(5.5)	0(0.0)	11(5.5)	
		400	100	1	2	0	0	0	3	0	3	21	100	4	0	4	48-1
			100	2	4	0	0	0	6	0	6	64	100	4	0	4	08-1
			200	3(1.5)	6(3.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	9(4.5)	0(0.0)	9(4.5)	(43)	200	8(4.0)	0(0.0)	8(4.0)	
		PC	100	0	61	0	0	0	61	0	61	92	100	1	0	1	90-1
			100	0	70	0	0	0	70	0	70	92	100	0	0	0	52-1
			200	0(0.0)	131(65.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	131(65.5)	0(0.0)	131(65.5)	(92)	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 (DMSO)

PC: Positive control (cyclophosphamide, 14 $\mu\text{g/mL}$)

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*-ethyl-*o*-crotonotoluidine
[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	0	0	0	-	59-1	
			100	0	1	0	0	0	1	1	2	-	99	100	0	0	0	-	02-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	2(1.0)		(100)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		79.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	0	0	0	-	46-1	
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	92	100	0	0	0	-	87-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(96)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
		119	100	0	0	0	0	0	0	0	0	92	100	4	0	4	-	67-1	
			100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	78	100	5	0	5	-	11-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)		(85)	200	9(4.5)	0(0.0)	9(4.5)	
		178	100	1	0	0	0	0	1	0	1	-	64	100	4	0	4	-	36-1
			100	0	0	0	0	0	0	1	1	-	57	100	4	0	4	-	17-1
			200	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	2(1.0)		(61)	200	8(4.0)	0(0.0)	8(4.0)	
		267	100	0	2	0	0	0	2	0	2	-	28	100	7	0	7	-	45-1
			100	0	0	0	0	0	0	1	1	-	35	100	4	0	4	±	16-1
			200	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	1(0.5)	3(1.5)		(32)	200	11(5.5)	0(0.0)	11(5.5)	
		400	100	2	6	0	0	0	8	0	8	±	35	100	2	1	3	-	31-1
			100	0	4	0	0	0	4	0	4	±	21	100	1	0	1	-	23-1
			200	2(1.0)	10(5.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	12(6.0)	0(0.0)	12(6.0)		(28)	200	3(1.5)	1(0.5)	4(2.0)	
		PC	100	4	52	0	0	0	56	0	56		114	100	0	0	0	-	79-1
			100	2	31	0	0	0	33	0	33	+	99	100	0	0	0	-	29-1
			200	6(3.0)	83(41.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	89(44.5)	0(0.0)	89(44.5)		(107)	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 (DMSO)

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*-ethyl-*o*-crotonotoluidine
[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	1	0	1	-	51-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	88	100	0	0	0	-	53-1
			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	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	
	-	49.4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	72	100	0	0	0	-	56-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	83	100	1	0	1	-	99-1
			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)	-	(82)	200	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	
	-	74.1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	72	100	0	0	0	-	34-1
			100	2	0	0	0	0	2	0	2	-	72	100	0	0	0	-	77-1
			200	2(1.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(1.0)	0(0.0)	2(1.0)	-	(77)	200	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	-	
	-	111	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	66	100	3	0	3	-	82-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	61	100	3	1	4	-	70-1
			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)	-	(68)	200	6(3.0)	1(0.5)	7(3.5)	-	
	-	167	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	55	100	4	0	4	-	60-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	44	100	5	0	5	-	25-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(53)	200	9(4.5)	0(0.0)	9(4.5)	-	
	-	250	100	0	2	0	0	0	2	1	3	-	33	100	1	0	1	-	98-1
			100	0	3	0	0	0	3	0	3	-	33	100	3	0	3	-	01-1
			200	0(0.0)	5(2.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(2.5)	1(0.5)	6(3.0)	-	(35)	200	4(2.0)	0(0.0)	4(2.0)	-	
	-	PC	100	4	47	0	0	0	51	0	51	+	94	100	0	0	0	-	09-1
			100	1	49	0	0	0	50	0	50	+	93	100	3	0	3	-	05-1
			200	5(2.5)	96(48.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	101(50.5)	0(0.0)	101(50.5)	+	(99)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)	-	

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 (DMSO)

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*-ethyl-*o*-crotonotoluidine
[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	74-1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	112	100	0	1	1	-	47-1
			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)	0(0.0)	-	(100)	200	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)	
		49.4	100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	79	100	3	0	3	-	49-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	75	100	0	0	0	-	69-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(73)	200	3(1.5)	0(0.0)	3(1.5)		
		74.1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	66	100	0	0	0		57-1
			100	0	1	0	0	0	1	0	1	-	62	100	0	1	1	-	32-1
			200	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(0.5)	0(0.0)	1(0.5)	-	(60)	200	0(0.0)	1(0.5)	1(0.5)		
		111	100	0	2	0	0	0	2	0	2	-	54	100	12	1	13		95-1
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	-	54	100	5	0	5	±	96-1
			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)	-	(51)	200	17(8.5)	1(0.5)	18(9.0)		
		167	100	2	0	0	0	0	2	0	2	-	45	100	91	1	92		21-1
			100	1	1	0	0	0	2	0	2	-	45	100	90	4	94	+	81-1
			200	3(1.5)	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	4(2.0)	0(0.0)	4(2.0)	-	(42)	200	181(90.5)	5(2.5)	186(93.0)		
		250	56	0	3	0	0	0	3	0	3		24	56	25	0	25		35-1
			44	0	2	0	0	0	2	0	2		44	44	15	0	15		35-2
			21	0	1	0	0	0	1	0	1	UR	24	21	12	0	12	UR	10-1
			21	0	0	0	0	0	0	0	0		21	21	9	0	9		10-2
			142	0(0.0)	6(4.2)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	6(4.2)	0(0.0)	6(4.2)		(23)	142	61(43.0)	0(0.0)	61(43.0)		
		PC	100	5	73	0	0	0	78	0	78		99	100	0	0	0		26-1
			100	4	72	0	0	0	76	0	76	+	104	100	1	0	1	-	85-1
			200	9(4.5)	145(72.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	154(77.0)	0(0.0)	154(77.0)		(96)	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 (DMSO)

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.

UR: These values were judged to be unreliable since no sufficient number of chromosomes could be observed due to severe cytotoxicity.