

# 最終報告書

N,N-ジメチルメタンアミンのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：4174（115-092）

平成12年7月13日

試験委託者

厚生省 生活衛生局

財団法人

食品農医薬品安全性評価センター

## 目次

1. 要約 .....	3
2. 表題 .....	4
3. 試験目的 .....	4
11. 被験物質 .....	6
12. 試験材料および方法 .....	8
13. 試験結果 .....	15
14. 考察および結論 .....	17
15. 参考文献 .....	18

Figures		F-1～5
Figure 1	Dose-survival curves of N,N-Dimethylmethanamine [short-term treatment]	F-1
Figure 2	Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylmethanamine [short-term treatment : -S9]	F-2
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylmethanamine [short-term treatment : +S9]	F-3
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylmethanamine at the confirmative examination [short-term treatment : -S9]	F-4
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylmethanamine at the confirmative examination [short-term treatment : +S9]	F-5

Tables		T-1 ~5
Table 1	Results of growth inhibition test on N,N-Dimethylmethanamine [short-term treatment]	T-1
Table 2	Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N-Dimethylmethanamine [short-term treatment : -S9]	T-2
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with N,N-Dimethylmethanamine [short-term treatment : +S9]	T-3
Table 4	Results of the confirmative examination of N,N-Dimethylmethanamine [short-term treatment : -S9]	T-4
Table 5	Results of the confirmative examination of N,N-Dimethylmethanamine [short-term treatment : +S9]	T-5

## 1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において、N,N-ジメチルメタンアミンは染色体異常を誘起するものと判断した。

N,N-ジメチルメタン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、試験用量を設定した。染色体異常試験では短時間処理法-S9 ならびに+S9 処理とも 10 mM 相当の濃度を含む 148, 296 および 591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 3 用量について染色体異常の観察を実施した。

その結果、N,N-ジメチルメタンアミン処理群では-S9 処理で染色体構造異常の出現頻度が疑陽性 (±) となり、+S9 処理では高用量においてのみ陽性反応 (+) が認められた。従って、再現性あるいは用量依存性をみるため-S9 ならびに+S9 処理とも、303, 378, 473 および 591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 4 用量を用いて確認試験を実施した。いずれの試験系とも 378~591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の 3 用量について染色体異常の観察を行った結果、両処理群とも試験用量に依存した染色体構造異常の増加が観察された。

本被験物質処理により培養液の pH がアルカリ性を示していたが、森田らの報告<sup>1,2)</sup>ならびに染色体構造異常の誘発頻度の程度を考慮すると陽性反応と考えられた。すなわち、-S9 処理では pH の影響が無い用量で試験用量に依存した構造異常の誘発が認められていること、+S9 処理では pH の影響により構造異常の出現頻度が数%上昇したとしても処理群での構造異常出現頻度が 40%以上であることから本被験物質による構造異常誘発は陽性反応と判断した。

また、短時間処理法-S9 処理の陽性対照物質マイトマイシン C (MMC) ならびに短時間処理法+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) は、いずれも染色体構造異常を高頻度に誘発した。

2. 表題

N,N-ジメチルメタンアミンのは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試験目的

被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討した。

**11. 被験物質****11.1. 被験物質名**

N,N-ジメチルメタンアミン  
【N,N-Dimethylmethanamine】

**11.2. ロット番号****11.3. 純度**

30.8 wt%

**11.4. 保管条件**

直射日光を避け、冷暗所に保管

**11.5. 別名**

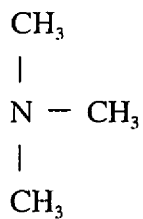
Trimethylamine

**11.6. 化学名**

N,N-ジメチルメタンアミン

**11.7. CAS 番号**

75-50-3

**11.8. 構造式又は示性式****11.9. 分子量**

59.11

**11.10. 不純物の名称及び濃度**

ジメチルアミン：10 ppm 以下

**11.11. 常温における性状**

30%水溶液

**11.12. 融点／沸点**

融点：5℃

沸点：32℃

**11.13. 溶媒に対する溶解度等**

水に易溶

**11.14. 安定性**

密閉状態，冷暗所保存では安定

**11.15. 蒸気圧**

49 kPa (20℃)

**11.16. 取り扱い上の注意**

適切な保護具を着用して取り扱った。火気に近づけなかった。

**11.17. 残余被験物質の処理**

被験物質の残余は，被験物質提供元に返却した。

## 12. 試験材料および方法

### 12.1. 試験細胞株

ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に広く使用されていることから、試験細胞株としてチャイニーズ・ハムスターの肺由来の線維芽細胞株 (CHL 細胞) を選択した。CHL 細胞は昭和 59 年 11 月 15 日に国立医薬品食品衛生研究所から分与を受け、一部についてはジメチルスルホキシド (DMSO : GC 用 ; Merck KGaA ; 純度 99.7% 以上 ; Lot No. K23082678 651) を容量比で 10% 添加した後、液体窒素中に保存した。試験に際しては凍結細胞を融解し、3~5 日ごとに継代したものを使用した。なお、試験に用いた細胞の継代数は細胞増殖抑制試験で 12、染色体異常試験で 14、確認試験で 21 であった。

### 12.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (IWAKI : 旭テクノガラス株式会社 ; Lot No. I8710 【予備試験, 本試験】, I9702 【確認試験】) に、メンブランフィルター (孔径 0.45  $\mu\text{m}$  : Featuring Corning and Costar Products) を用いて濾過除菌した非働化 (56 $^{\circ}\text{C}$ , 30 分) 済み仔牛血清 (GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 1019033) を最終濃度で 10% になるよう添加した。調製後の培養液は使用時まで冷暗所 (4 $^{\circ}\text{C}$ ) に保存した。

### 12.3. 培養条件

CO<sub>2</sub> インキュベーター (Forma および三洋電機メディカシステム株式会社) を用い、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37 $^{\circ}\text{C}$  の条件で細胞を培養した。

### 12.4. S9 mix

試製造後 6 ヶ月以内の S9 mix (キッコーマン株式会社 ; Lot No. CAM-401 【予備試験, 本試験】, CAM-408 【確認試験】) を試験に使用した。



## 12.4.1. S9 の調製方法

調製の際の動物種, 性, 臓器, 誘導物質ならびに誘導方法を以下に示す.

	予備試験および本試験	確認試験
ロット番号	RAA-401	RAA-408
調製日	平成 11 年 4 月 9 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)	平成 11 年 6 月 25 日
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系	同左
性/週齢	雄/7 週齢	同左
体重	205~240 g	210~239 g
臓器	肝臓	同左
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)	同左
投与量 および 投与回数	PB: 30 mg/kg 1 回 (1 日目) 60 mg/kg 3 回 (2~4 日目) BF: 80 mg/kg 1 回 (3 日目)	同左
投与方法	腹腔内投与	同左
蛋白含量	24.20 mg/mL	25.90 mg/mL

## 12.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す.

S9	0.3 mL
KCl	33 $\mu$ mol
MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ mol
G-6-P	5 $\mu$ mol
NADP	4 $\mu$ mol
HEPES 緩衝液	4 $\mu$ mol

## 12.5. 被験物質液の調製

被験物質を生理食塩液（株式会社大塚製薬工場；Lot No. K8I84【予備試験，本試験】，K9B78【確認試験】）を用いて所定濃度に順次希釈した後，直ちに処理を行った。なお，本被験物質情報から揮発性が疑われたため，調製には蓋付きの試験管を用いた。ただし，原液中での被験物質濃度が30.8%であることを考慮して調製した。

### 12.5.1. 陰性（溶媒）対照

使用溶媒のみで試験した。

### 12.5.2. 陽性対照（短時間処理法）

-S9 処理（代謝活性化法によらない場合）の場合，注射用水（株式会社大塚製薬工場；Lot No. K8F80【本試験】，K8K78【確認試験】）5 mL に溶解したマイトマイシン C（MMC：協和醗酵工業株式会社；Lot No. 247AHK）を生理食塩液（株式会社大塚製薬工場；Lot No. K8I84）を用いて希釈した後，0.1 µg/mL の用量で試験した。

### 12.5.3. 陽性対照（短時間処理法）

+S9 処理（代謝活性化法による場合）の場合，注射用水（K8F80【本試験】，K8K78【確認試験】）5 mL に溶解したシクロホスファミド（CP：塩野義製薬株式会社；Lot No. 8016）を生理食塩液（Lot No. K8I84）を用いて希釈した後，12.5 µg/mL の用量で試験した。

## 12.6. 用量設定試験（予備試験）

### 12.6.1. 試験用量

予備的な試験（4.79, 16.0, 53.2, 177 および 591 µg/mL の 5 用量：公比 10/3）の結果，最高用量の 591 µg/mL において-S9 処理（処理後 6 時間時点での観察）では強度の，+S9 処理では弱い細胞増殖抑制作用がみられた。本結果を参考に，用量設定試験の用量として 10 mM 相当の用量を含む下記に示した 7 用量（公比 10/7）を設定した。

試験系	用量数	試験用量 (µg/mL)
短時間処理法-S9 処理	7	69.5 ~ 591
短時間処理法+S9 処理	7	69.5 ~ 591

### 12.6.2. 使用フラスコ数

1 用量当たり 2 個のフラスコを用いた。

### 12.6.3. 短時間処理法-S9 処理

細胞培養用フラスコ（培養面積 12.5 cm<sup>2</sup>：Becton Dickinson and Company）に培養液を用いて  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 2.5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 1 mL を除いた後、使用溶媒（以下溶媒）あるいは被験物質液を 150  $\mu$ L 加えた。本被験物質は揮発性物質の可能性が考えられたため、密栓したまま 6 時間培養を続けた後、各フラスコの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液（GIBCO Life Technologies, Inc；Lot No. 1022866）を用いて細胞を洗浄した。培養液（1.5 mL）を新鮮なものに交換し、さらに 18 時間培養を続けた後に細胞生存率（陰性対照に対する比）を求めた。

### 12.6.4. 短時間処理法+S9 処理

各フラスコに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 2.5 mL を播種し、3 日間培養した。培養終了後、培養液 1.0 mL を除き、S9 mix を 300  $\mu$ L 添加した後、溶媒あるいは被験物質液を 180  $\mu$ L 加えた。

以下の操作は 12.6.3. に記載の方法に準じた。

### 12.6.5. 50%細胞増殖抑制濃度の算出

細胞増殖抑制試験に供した各フラスコから培養液を除き、生理食塩液を用いて細胞を 1 回洗浄した。10%中性緩衝ホルマリン液（組織固定用：和光純薬工業株式会社；Lot No. ACG8912）を加えて約 10 分間細胞を固定した後、0.1%クリスタル・バイオレット（関東化学株式会社；Lot No. 607E4067）水溶液で 10 分間染色した。各フラスコを水洗した後、十分乾燥させた。各フラスコに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を 8.0 mL 加え、5 分間放置した後、580 nm での吸光度を分光光度計（105-50 型；株式会社 日立製作所）を用いて測定した。陰性対照群での吸光度に対する比（=細胞生存率）を各用量群について求めた。

なお、細胞生存率の平均値は各フラスコの四捨五入する以前の値から求めた。

### 12.6.6. 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1 および Table 1 に示した。

最高用量の 591  $\mu$ g/mL においても短時間処理法-S9 処理で 60%以上，同+S9 処理で 80%以上の細胞が生存していた。

なお、被験物質暴露終了時、290  $\mu$ g/mL 以上において培養液の pH がアルカリ性を示していた。

## 12.7. 本試験（染色体異常試験）

### 12.7.1. 試験用量

細胞増殖抑制試験結果を基に，各試験系それぞれ4用量（公比2：下表参照）を本試験の用量に設定した。

試験系	試験用量 (μg/mL)			
短時間処理法-S9 処理	73.9	148	296	591
短時間処理法+S9 処理	73.9	148	296	591

下線を付した用量について染色体異常の観察を実施した。

短時間処理法-S9 処理において染色体構造異常の出現に関し疑陽性と，同+S9 処理において1用量のみで陽性と判定されたことから，いずれの試験系とも303, 378, 473 および 591 μg/mL（公比1.25）の4用量を用いた確認試験を実施し，378～591 μg/mL の3用量について染色体異常の観察を実施した。

### 12.7.2. 試験フラスコ数

1用量当たり2個のフラスコを用いた。

### 12.7.3. 短時間処理法-S9 処理

細胞培養用フラスコ（培養面積 25 cm<sup>2</sup> : Becton Dickinson and Company）に  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL ( $4 \times 10^4$  細胞) を播種し，3日間培養した。培養終了後，培養液 2 mL を除いた後，溶媒，被験物質液または陽性対照物質溶液 300 μL を加えた。シリコン栓で密栓したまま6時間培養を続けた後，各フラスコの培養液を除去し，ダルベッコリン酸緩衝液（GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 1022866 【本試験】，1055820 【確認試験】）を用いて細胞を洗浄した。培養液（3 mL）を新鮮なものに交換し，さらに18時間培養を続けた後に染色体標本を作製した。

### 12.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各フラスコに  $8 \times 10^3$  細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を播種し，3日間培養した。培養終了後，培養液 2.5 mL を除き S9 mix を 500 μL 添加した後，溶媒，被験物質液または陽性対照物質溶液 300 μL を加えた。以下の操作は 12.7.3. に記載の方法に準じた。

#### 12.7.5. 標本の作製

染色体標本作製の2時間前に最終濃度で0.2 µg/mLとなるようコルセミド溶液 (GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 1017694 【本試験】, 1019640 【確認試験】) を添加し, 細胞分裂を中期で停止させた. 次いで, 培養液を遠心管に全量移した後, 0.25%トリプシン溶液 (GIBCO Life Technologies, Inc ; Lot No. 1022349 【本試験】, 1026529 【確認試験】) を用いてフラスコから細胞を剥離し, 遠心管内の培養液に加えた. 細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後, 37°Cに保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を 5 mL 加え, 37°C中で 16 分間低張処理を行った. 遠心分離により低張液を除いた後, 4°Cに冷却した固定液 (メタノール3容:酢酸1容) で細胞を固定した. 固定液を3回交換した後, 新しい固定液を適量加えて細胞浮遊液とし, 脱脂洗浄済みのスライドガラス上に1~2滴ずつ滴下した. スライド標本を十分乾燥させ, 1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8 : Merck KGaA ; Lot No. TP 334974 816) を用いて希釈した 1.2%ギムザ染色液 (Merck KGaA ; Lot No. 840288308) で 12 分間染色した. スライドを軽く水洗した後, 乾燥させた.

#### 12.7.6. 細胞増殖抑制度の測定

染色体標本作製時に陰性対照, 各被験物質処理群および陽性対照の各フラスコについて, ATP フォトメーター (ルミテスター K-100 : キッコーマン株式会社) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した.

なお, 細胞生存率の平均値は各フラスコの四捨五入する以前の値から求めた.

#### 12.7.7. 染色体の観察

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

すべての標本をコード化した後, マスキング法で観察した.

**12.8. 結果の解析**

最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めない場合について行った。異常細胞の出現頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満、かつ再現性が認められた場合に疑陽性、10%以上、かつ再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合、陽性と判定した。統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

**12.9.  $D_{20}$  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。

### 13. 試験結果

#### 13.1. 短時間処理法-S9 処理

試験結果を Figure 2, Table 2 および Appendix 1 に示した。

N,N-ジメチルメタンアミン処理群での染色体構造異常出現頻度は 148  $\mu\text{g/mL}$  で 0.5%, 296  $\mu\text{g/mL}$  で 5.0% (±), 591  $\mu\text{g/mL}$  で 7.0% (±) を示した。倍数性細胞の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照と同等であった。また、弱いながらも試験用量に依存した細胞増殖抑制作用が観察され、591  $\mu\text{g/mL}$  処理における細胞生存率は 61.1% であった。

一方、陽性対照物質 MMC で処理した細胞では染色体構造異常が多数観察され、その出現頻度は 51.5% を示した。

なお、被験物質暴露終了時、296  $\mu\text{g/mL}$  以上において培養液の pH がアルカリ性を示していた。

#### 13.2. 短時間処理法+S9 処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 2 に示した。

N,N-ジメチルメタンアミン処理群での染色体構造異常の出現頻度は、148  $\mu\text{g/mL}$  で 0.5%, 296  $\mu\text{g/mL}$  で 1.0%, 591  $\mu\text{g/mL}$  で 18.5% (+) を示した。倍数性細胞の出現頻度はいずれの用量とも陰性対照群と同等であった。また、試験用量に依存した細胞増殖抑制作用が観察され、591  $\mu\text{g/mL}$  処理における細胞生存率は 37.8% に減少していた。

一方、陽性対照の CP 処理群での染色体構造異常出現頻度は 73.0% であった。

なお、被験物質暴露終了時、296  $\mu\text{g/mL}$  以上において培養液の pH がアルカリ性を示していた。pH の変動、析出等の特筆すべき変化は観察されなかった。

#### 13.3. 確認試験 (短時間処理法-S9 処理)

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 3 に示した。

被験物質処理群での染色体構造異常は 378  $\mu\text{g/mL}$  で 9.0% (±), 473  $\mu\text{g/mL}$  で 22.5% (+) および 591  $\mu\text{g/mL}$  で 22.5% (+) であった。また、試験用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され、591  $\mu\text{g/mL}$  での細胞生存率は 6.4% であった。

陽性対照では構造異常細胞が 40.0% 出現した。

なお、被験物質暴露終了時、303  $\mu\text{g/mL}$  以上において培養液の pH がアルカリ性を示していた。

#### 13.4. 確認試験（短時間処理法+S9 処理）

試験結果を Figure 5, Table 5 および Appendix 4 に示した。

被験物質処理群での染色体構造異常は 378  $\mu\text{g/mL}$  で 2.0%, 473  $\mu\text{g/mL}$  で 5.5% (±) および 591  $\mu\text{g/mL}$  で 45.0% (+) であった。また、試験用量に依存した細胞生存率の減少傾向が観察され、591  $\mu\text{g/mL}$  での細胞生存率は 16.7% であった。

陽性対照では構造異常細胞が 63.0% 出現した。

なお、被験物質暴露終了時、303  $\mu\text{g/mL}$  以上において培養液の pH がアルカリ性を示していた。

#### 13.5. $D_{20}$ 値および TR 値算出結果

染色体異常試験および確認試験結果から算出した  $D_{20}$  値 (mg/mL) および TR 値は次の通りであった。

試験系	異常の種類	$D_{20}$ 値	TR 値
本試験：短時間処理法+S9 処理	構造異常	0.726	25.4
確認試験：短時間処理法-S9 処理	構造異常	0.508	43.3
確認試験：短時間処理法+S9 処理	構造異常	0.474	67.7



#### 14. 考察および結論

N,N-ジメチルメタンアミンの変異原性、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、短時間処理法（-S9 および+S9 処理）において 10 mM 相当の 591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  まで検討した。

その結果、N,N-ジメチルメタンアミン処理群では-S9 処理では染色体異常の僅かな誘発が認められ、+S9 処理では高用量の 591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  においてのみ染色体構造異常の明確な誘発が観察された。これら染色体異常の誘発は疑陽性との判定あるいは 1 用量のみでの陽性反応であることから、再現性あるいは用量依存性を見るために確認試験を実施した。確認試験の結果、-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても染色体構造異常の出現に明確な用量依存性が認められた。

本被験物質処理直後、培養液の pH は 591  $\mu\text{g}/\text{mL}$  でおよそ 8.9~9.0 を示したが、暴露終了時では 8.2~8.6 であった。森田らの報告<sup>1,2)</sup>によると、今回の pH の変動では-S9 処理においては試験系に影響をおよぼさないこと、+S9 処理では極僅かに染色体構造異常を誘発することが示されている。-S9 処理では pH の影響が無い用量で試験用量に依存した構造異常の誘発が認められていること、+S9 処理では pH の影響により構造異常の出現頻度が数%上昇したとしても処理群での構造異常出現頻度が 40%以上であることから本被験物質による構造異常誘発は陽性反応と判断した。

変異原性の強さに関する相対的比較値である  $D_{20}$  値は 0.474 (mg/mL)、TR 値は 67.7 と算出され、既知変異原性物質に比較して N,N-ジメチルメタンアミンの変異原性は弱いことを示していた。

本被験物質（N,N-ジメチルメタンアミン）の変異原性に関する報告はなかったが、類縁体である Dimethylamine については Ames 試験で疑陽性<sup>3)</sup>、Dimethylamine hydrochloride では染色体異常試験で陰性<sup>4)</sup>、Methylamine ではマウスリンフォーマ試験で陽性<sup>5)</sup>との報告があった。

一方、陰性対照あるいは陽性対照での染色体異常出現頻度はいずれも当センターの背景データの範囲内であり、本試験が有効であることを示していた。

以上の試験結果から、本試験条件下において N,N-ジメチルメタンアミンのは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。

15. 参考文献

- 1) Morita, T., Watanabe, Y., Takeda, K. and Okumura, K. : Effects of pH in the in vitro chromosomal aberration test, *Mutat. Res.*, 225 : 55~60, 1989
- 2) Morita, T., Nagaki, T. Fukuda, I. and Okumura, K. : Effects of pH on the activity and stability of clastogens in the in vitro chromosomal aberration test with Chinese hamster ovary K1 cells, *Mutat. Res.*, 262 : 159~166, 1991
- 3) Green, NR., and Savage, JR. : Screening of safrole, eugenol, their ninhydrin positive metabolites and selected secondary amines for potential mutagenicity. *Mutat. Res.*, 57, 115-122, 1978
- 4) Motoi, I., Jr. and Shigeyoshi, O. : Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro-a screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.*, 48, 337-354, 1977
- 5) William, J., C. and Briann, M. : Mutagenicity of methylisocyanate and its reaction products to cultured mammalian cells. *Mutat. Res.*, 174(4), 285-293, 1986

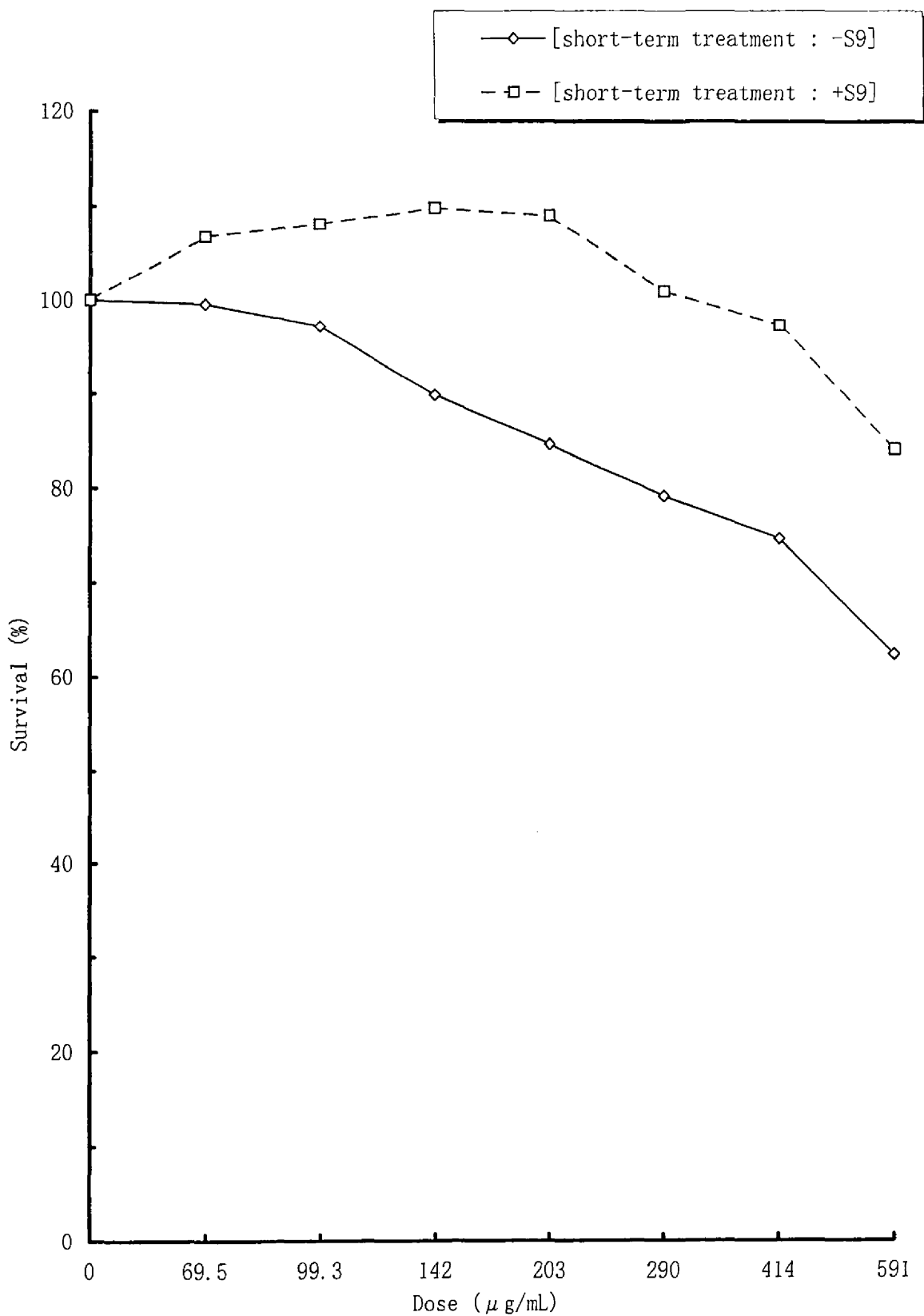
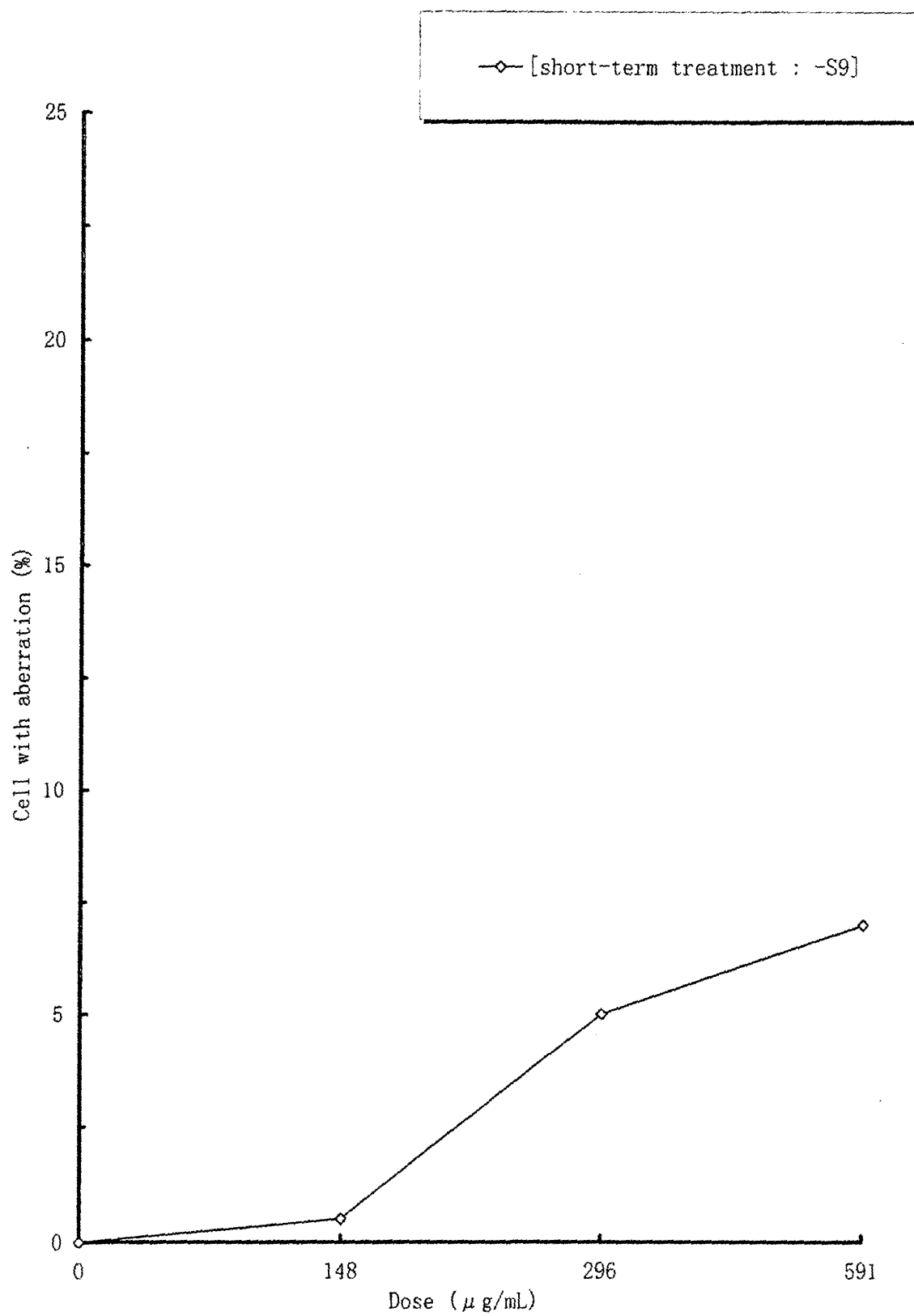


Figure 1. Dose-survival curves of N,N-Dimethylmethanamine [short-term treatment]



Incidence of structural aberrations induced by  
N,N-Dimethylmethanamine [short-term treatment:-S9]

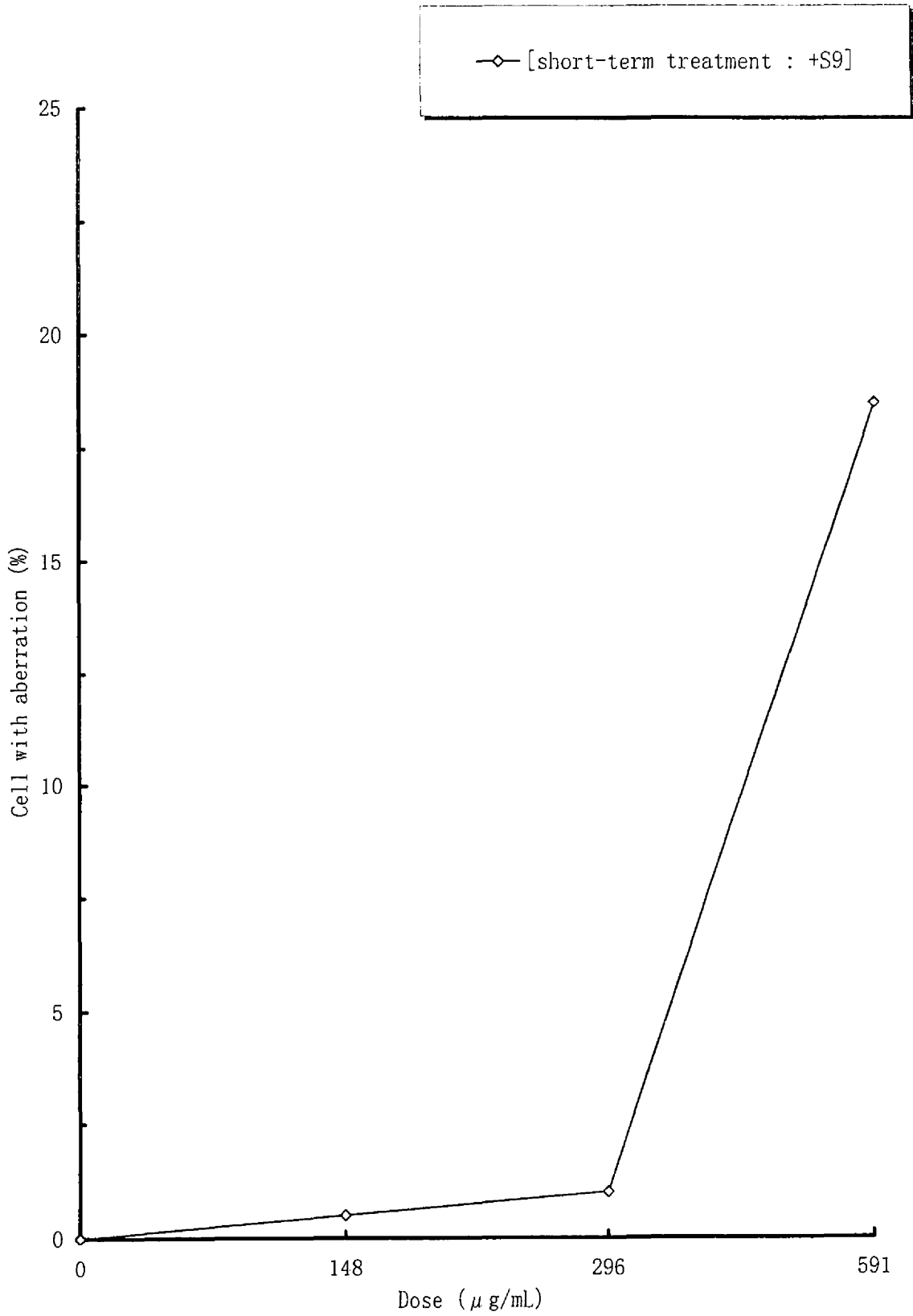


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylmethanamine [short-term treatment:+S9]

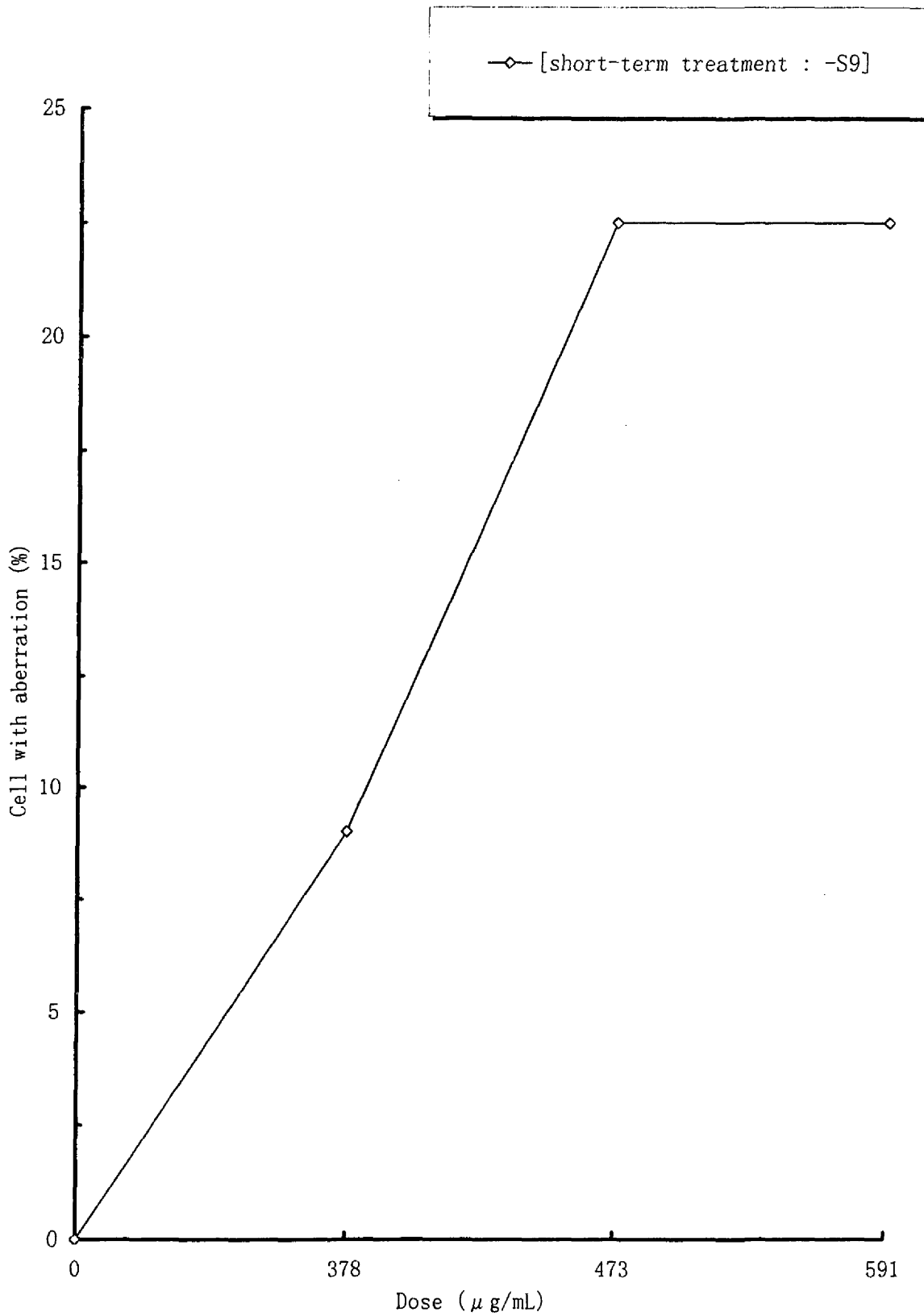


Figure 4. Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylmethanamine at the confirmative examination [short-term treatment:-S9]

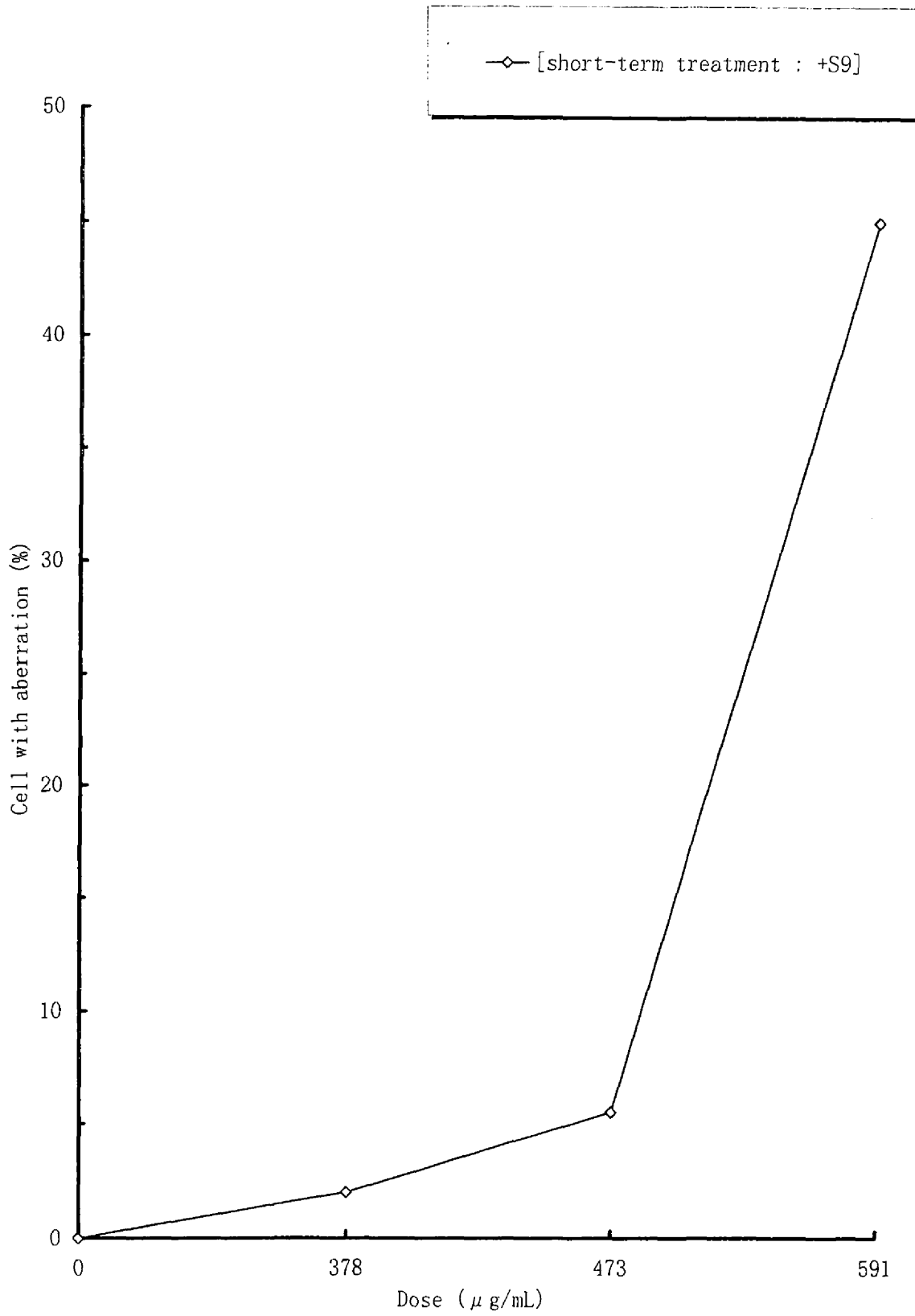


Figure 5. Incidence of structural aberrations induced by N,N-Dimethylmethanamine at the confirmative examination [short-term treatment:+S9]

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

Exp. No. 4174 (115-092)

[short-term treatment : -S9]				[short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose ( $\mu$ g/mL)	Survival (%)	[ Mean ]	Compound	Dose ( $\mu$ g/mL)	Survival (%)	[ Mean ]
Saline a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]	Saline a)	0	100.0 100.0	[ 100.0 ]
Test substance	69.5	98.3 100.9	[ 99.6 ]	Test substance	69.5	107.0 106.5	[ 106.8 ]
	99.3	94.6 99.7	[ 97.2 ]		99.3	111.2 105.0	[ 108.1 ]
	142	91.0 88.6	[ 89.8 ]		142	109.4 110.2	[ 109.8 ]
	203	84.6 84.6	[ 84.6 ]		203	111.6 106.4	[ 109.0 ]
	290	77.7 80.6	[ 79.2 ]		290	97.5 104.3	[ 100.9 ]
414	73.0 76.3	[ 74.7 ]	414	102.1 92.5	[ 97.3 ]		
591	64.8 59.9	[ 62.4 ]	591	88.5 79.8	[ 84.2 ]		

50% Growth inhibition dose was as follows:

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

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

a): Negative control



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

Exp. No. 4174 (115-092)

Compound	Dose ( $\mu$ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline a)	0	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.5 -	-
Test substance	148	103.1	200	0	0	1	0	0	0	0.5 -	3.0 -	-
	296	83.2	200	3	5	6	0	0	0	5.0 $\pm$	2.0 -	$\pm$
	591	61.1	200	3	4	11	0	0	0	7.0 $\pm$	1.5 -	$\pm$
MMC b)	0.1	79.6	200	13	34	90	0	1	0	51.5 +	0.0 -	+

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

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

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

Exp. No. 4174 (115-092)

Compound	Dose ( $\mu$ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline a)	0	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	-
Test substance	148	72.6	200	1	0	1	0	0	0	0.5 -	1.5 -	-
	296	66.5	200	3	1	2	0	0	0	1.0 -	1.5 -	-
	591	37.8	200	7	10	30	0	0	0	18.5 +	1.5 -	+
CP b)	12.5	61.8	200	3	44	142	0	1	0	73.0 +	1.0 -	+

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

a): Negative control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

Table 4. Results of the confirmative examination of N,N-Dimethylmethanamineineine  
[short-term treatment : -S9]

Exp. No. 4174 (115-092)

Compound	Dose ( $\mu$ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline a)	0	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.5 -	-
Test substance	378	42.2	200	3	7	17	0	0	0	9.0 $\pm$	2.5 -	$\pm$
	473	23.0	200	5	15	41	0	0	0	22.5 +	3.5 -	+
	591	6.4	200	4	14	35	0	0	0	22.5 +	4.0 -	+
MMC b)	0.1	58.9	200	6	35	69	0	0	0	40.0 +	1.5 -	+

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

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

Table 5. Results of the confirmative examination of N,N-Dimethylmethanamine  
[short-term treatment : +S9]

Exp. No. 4174 (115-092)

Compound	Dose ( $\mu$ g/mL)	Cell Survival (%)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
				gap	ctb	cte	csb	cse	oth			
Saline a)	0	100.0	200	1	0	0	0	0	0	0.0 -	1.5 -	-
Test substance	378	52.4	200	1	1	4	0	0	0	2.0 -	2.0 -	-
	473	42.1	200	0	2	9	0	0	0	5.5 $\pm$	4.0 -	$\pm$
	591	16.7	200	7	29	80	0	1	0	45.0 +	1.5 -	+
CP b)	12.5	53.9	200	11	34	121	0	0	0	63.0 +	1.0 -	+

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

a): Negative control

b): Positive control (Cyclophosphamide)