

最 終 報 告 書

2,6-ジメチルアニリンのほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：6872 (115-169)

平成 16 年 11 月 10 日

試験委託者
厚生労働省 医薬食品局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目次

1. 要約.....6

12. 被験物質.....	10
13. 試験材料および方法.....	12
14. 試験結果.....	19
15. 考察および結論.....	21
16. 参考文献.....	23

Figures		F-1~3
Figure 1	Dose-survival curves of Aniline, 2,6-dimethyl- [short-term treatment]	F-1
Figure 2	Incidence of structural aberrations induced by Aniline, 2,6-dimethyl- [short-term treatment : -S9]	F-2
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by Aniline, 2,6-dimethyl- [short-term treatment : +S9]	F-3

Tables		T-1~3
Table 1	Results of growth inhibition test on Aniline, 2,6-dimethyl- [short-term treatment]	T-1
Table 2	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Aniline, 2,6-dimethyl- [short-term treatment : -S9]	T-2
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with Aniline, 2,6-dimethyl- [short-term treatment : +S9]	T-3

1. 要約

本試験条件下の *in vitro* 試験系において、2,6-ジメチルアニリンは染色体異常を誘起するものと判断した。

2,6-ジメチルアニリ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/IU) 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 処理で 303, 606 および 1212 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) ならびに同+S9 処理で 633, 744 および 876 $\mu\text{g/mL}$ の 3 用量について顕微鏡観察を実施した。

その結果、2,6-ジメチルアニリン処理群の場合、短時間処理法-S9 処理および+S9 処理のいずれにおいても用量相関性を伴い、統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な染色体構造異常の誘発が認められたことから陽性反応と判断した。なお、数的異常については、統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められたが、背景データによる基準値内であったことから陰性反応と判断した。

また、短時間処理法-S9 処理の陽性対照物質であるマイトマイシン C (MMC) ならびに同+S9 処理の陽性対照物質シクロホスファミド (CP) 処理群では、染色体構造異常の出現頻度が上昇しており、陰性対照と比較して統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加を示した。

12. 被験物質

試験に使用した被験物質は から購入した。試験責任者は当該被験物質の受領から返却までの間の管理を行った。

12.1. 被験物質名

2, 6-ジメチルアニリン (英名 : Aniline, 2, 6-dimethyl-)

12.2. ロット番号

12.3. 純度

99.8%

12.4. 製造元

12.5. 保存条件

室温・遮光保存

12.6. 保存場所

安評センター被験物質保管庫 (C-3)

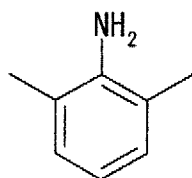
12.7. CAS No.

87-62-7

12.8. 化学名

Aniline, 2, 6-dimethyl-; 2, 6-Xylidine; 2-amino-1, 3-dimethylbenzene

12.9. 化学構造



12.10. 分子式

C₈H₁₁N

12.11. 分子量

121.18

12.12. 物質の状態

暗褐色澄明の液体

12.13. 残余被験物質の処理

被験物質の一部を保存した後，残りは安定性分析のため
へ返却した．

13. 試験材料および方法

13.1. 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/IU 細胞) を選択した。

CHL/IU 細胞は昭和 59 年 11 月 15 日に国立衛生試験所 (現 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. K26414578) 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した細胞を融解した後、3~5 日ごとに継代したものを使用した。

なお、細胞増殖抑制試験で継代数 15 の細胞を、染色体異常試験で継代数 17 の細胞を用いた。

13.2. 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地 (IWAKI : 旭テクノグラス株式会社 ; Lot No. 99560009) に非働化 (56°C, 30 分) 済み仔牛血清 (Invitrogen Corp. ; Lot No. 401294) 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°C) に保存した。

13.3. 培養条件

CO₂インキュベーター (三洋電機バイオメディカ株式会社) を用い、CO₂濃度 5%, 37°Cの条件で細胞を培養した。

13.4. S9 mix

製造後 6 カ月以内の S9 mix (キッコーマン株式会社 ; Lot No. CAM-476) を試験に使用した。使用時まで超低温フリーザーで保存 (-80°C) した。

13.4.1. 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等を以下に示した.

ロット番号	RAA-476
調製日	平成 15 年 1 月 17 日 (誘導物質投与開始後 5 日目)
使用動物	ラット : Sprague-Dawley 系
性/週齢	雄/7 週齢
体重	214~245 g
臓器	肝臓
誘導物質投与量 および投与回数	Phenobarbital(PB)および 5,6-Benzoflavone(BF) 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)
投与方法	腹腔内投与
蛋白含量	27.11 mg/mL

13.4.2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示した.

S9	0.3 mL
MgCl ₂	5 μmol/0.1 mL
KCl	33 μmol/0.1 mL
G-6-P	5 μmol/0.1 mL
NADP	4 μmol/0.1 mL
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)	4 μmol/0.2 mL
蒸留水	0.1 mL

13.5. 被験物質液の調製

本被験物質は DMSO に易溶であることからモレキュラーシーブを用いて脱水処理を行った DMSO (GC 用 ; Merck KGaA ; 純度 99.9% ; Lot No. K27073678) に溶解させ調製原液とした.

用量設定試験では使用直前に調製原液 (121.2 mg/mL 液) を準備した。この 121.2 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し 60.6, 30.3, 15.2, 7.58, 3.79, 1.89, 0.947, 0.473 および 0.237 mg/mL 液を調製した。

染色体異常試験では、使用直前に調製原液 (121.2 mg/mL 液) を準備した。短時間処理法-S9 処理においては、121.2 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し 60.6, 30.3 および 15.2 mg/mL 液を調製した。短時間処理法+S9 処理においては、121.2 mg/mL 調製原液を使用溶媒で順次希釈し 103, 87.6, 74.4, 63.3, 53.8 および 45.7 mg/mL 液を調製した。

調製後、速やかに処理を行った。

13.6. 対照群

13.6.1. 陰性 (溶媒) 対照

使用溶媒 (DMSO) で試験した。

13.6.2. 陽性対照 (短時間処理法-S9 処理)

注射用水 (日本薬局方注射用水 : 株式会社大塚製薬工場 ; Lot No. K1K76) 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. 339AJH) を生理食塩液 (日本薬局方生理食塩液 : 株式会社大塚製薬工場 ; Lot No. K1D74) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた。

試験用量は 0.1 µg/mL とした。

13.6.3. 陽性対照 (短時間処理法+S9 処理)

注射用水 (Lot No. K1K76) 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. 1013) を生理食塩液 (Lot No. K1D74) を用いて希釈し、1 mL ずつ分注した後凍結保存したものを試験に用いた。

試験用量は 12.5 µg/mL とした。

13.7. 細胞増殖抑制試験 (予備試験)

13.7.1. 試験用量

ガイドライン上定められた最高用量である 1212 µg/mL (10 mM 相当) を最高用量とし、以下 606, 303, 152, 75.8, 37.9, 18.9, 9.47, 4.73 および 2.37 µg/mL の 10 用量を細胞増殖抑制試験の用量とした。

13.7.2. 使用ウェル数および識別方法

1 用量当たり 2 ウェルを用いた.

試験番号, 処理法および連番を明記することにより各ウェルを識別した.

13.7.3. 短時間処理法-S9 処理

12 ウェルのプレート (細胞培養用マルチプレート 12F : 住友ベークライト株式会社) の各ウェルに培養液を用いて 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 13.7.5.記載の割合で被験物質等の処理を行った. 6 時間培養を続けた後, 各ウェルの培養液を除去し, ダルベッコリン酸緩衝液 (Sigma Chemical Company ; Lot No. 92K2322) を用いて細胞を洗浄した. 新鮮な培養液 500 μ L を加え, 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.

13.7.4. 短時間処理法+S9 処理

各ウェルに 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 1 mL を播種し, 3 日間培養した. 培養終了後, 13.7.5.記載の割合で被験物質等の処理を行った.

以下の操作は 13.7.3.に記載の方法に準じた.

13.7.5. 処理量一覧

	溶媒および被験物質		
	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	600 μ L	-	6 μ L
+S9 処理	500 μ L	100 μ L	6 μ L

13.7.6. 析出等の観察

各処理法において処理開始および処理終了時に析出等の有無を肉眼で観察した.

13.7.7. 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ウェルから培養液を除いた. 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. TCE8600) 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. 107D2074) 水溶液で 10 分間染色した. 各ウェルを水洗した後, 乾燥させた. 各ウェルに色素溶出液 (30%エタノール, 1%酢酸水溶液) を 3.0~4.0 mL 加え, 5 分間放置した後, 分光光度計 (105-50 型 :

株式会社日立製作所) を用いて 580 nm での吸光度を測定した。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、さらにプロビット法を用いて 50%細胞増殖抑制濃度を算出した。算出には 75.8~1212 µg/mL の 5 点 (+S9 処理) を用いた。

なお、細胞生存率の平均値は各ウェルの四捨五入した値から求めた。

13.8. 染色体異常試験 (本試験)

13.8.1. 試験用量

細胞増殖抑制試験結果を基に、細胞の増殖を 50%以上抑制すると予想される用量あるいはガイドライン上の限界用量である 10 mM を最高用量とし 4~7 用量 (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	-	-	-	152	<u>303</u>	<u>606</u>	<u>1212</u>
短時間処理法+S9 処理	457	538	<u>633</u>	<u>744</u>	<u>876</u>	1030	1212

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。

13.8.2. 使用プレート数および識別方法

1 用量当たり 2 枚のプレートを用いた。

試験番号、処理法および連番を明記することにより各プレートを識別した。

13.8.3. 短時間処理法-S9 処理

直径 60 mm のプレート (細胞培養用シャーレ: 住友ベークライト株式会社) に 8×10^3 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞) を播種し、3 日間培養した。培養終了後、13.8.5.記載の割合で被験物質等の処理を行った。6 時間培養を続けた後、各プレートの培養液を除去し、ダルベッコリン酸緩衝液 (Sigma Chemical Company ; Lot No. 92K2356) を用いて細胞を洗浄した。新鮮な培養液 3 mL を加え、さらに 18 時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

13.8.4. 短時間処理法+S9 処理

各プレートに 8×10^3 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、13.8.5.記載の割合で被験物質等の処理を行った。

以下の操作は 13.8.3.に記載の方法に準じた。

13.8.5. 処理量一覧

	溶媒および被験物質			陽性対照物質		
	培養液	S9 mix	処理液	培養液	S9 mix	処理液
-S9 処理	3.0 mL	-	0.03 mL	2.7 mL	-	0.3 mL
+S9 処理	2.5 mL	0.5 mL	0.03 mL	2.2 mL	0.5 mL	0.3 mL

13.8.6. 析出等の観察

13.7.6.に準じた.

13.8.7. 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 (Invitrogen Corp. ; Lot No. 1133109) 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 (Invitrogen Corp. ; Lot No. 1138214) を用いてプレートから細胞を剥離し, 遠心管内の培養液に加えた. 細胞懸濁液を 1000 r/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. TP551574) を用いて希釈した 1.2%ギムザ染色液 (Merck KGaA ; Lot No. OB 132628) 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.

1 プレート当たり 3 枚の染色体標本作製した.

13.8.8. 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プレートについて, ATP フォトメーター (ルミテスター C-100LU: キューマン株式会社) を用いて細胞増殖に関するデータを採取した.

すなわち, 1% Tween 80 水溶液 2 mL を分注した小試験管に, 低張処理した細胞液を 50 µL 添加し攪拌してから約 20 分間静置した. 測定用チューブにこの混合液を 100 µL 分注し, ATP 測定用試薬キット (ルシフェール 250 :

キッコーマン株式会社)の発光試薬を 100 μ L 添加した後、相対発光量 (Relative Light Unit ; RLU) を測定した。陰性対照群における RLU に対する比 (=細胞生存率) を各用量群について求め、細胞増殖抑制制度とした。

13.8.9. 染色体の観察

すべての標本をコード化して観察した。

観察用量としては、短時間処理法-S9 のいずれの被験物質処理においても 13.8.8.の細胞生存率が陰性対照群の 50%以上であったので、10 mM を最高用量とした連続する 3 用量を選択した。同+S9 処理では、50%未満になる用量が複数あったので、その中で最も低い用量 (876 μ g/mL) を最高用量とした連続する 3 用量を選択した。

各プレート当たり 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 ($\times 600$) 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。

13.9. 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を、Fisher の直接確率計算法 (有意水準 0.05) を用いて検定した。また用量依存性については、Cochran Armitage の傾向検定 (有意水準 0.05) を用いて検定した。

陰性対照群と比較し被験物質処理群において有意差が認められ、かつ、試験用量に依存性が認められるか、あるいは再現性が確認された場合、陽性と判定した。ただし、最終的な判定は試験条件下での生物学的な妥当性も考慮して行った。

13.10. D_{20} 値ならびにTR値の算出法

D_{20} 値は分裂中期像の 20%にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であり、最小二乗法により算出した。TR値は一定濃度 (mg/mL) 当たりの交換型異常 (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。

14. 試験結果

14.1. 細胞増殖抑制試験

14.1.1. 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.

短時間処理法-S9 処理では, いずれの被験物質処理においても, 細胞生存率が陰性対照群の 50%以上であったので, 50%細胞増殖抑制濃度を算出できなかった. なお, 短時間処理法+S9 処理での 50%細胞増殖抑制濃度は, 1025 $\mu\text{g/mL}$ であった.

14.1.2. 析出等の観察

処理開始および処理終了時に被験物質の析出および培養液の pH 変化は認められなかった.

14.2. 染色体異常試験

14.2.1. 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.

2, 6-ジメチルアニリン処理群での染色体構造異常出現頻度は 303 $\mu\text{g/mL}$ で 4.0% ($p \leq 0.05$), 606 $\mu\text{g/mL}$ で 3.5% ($p \leq 0.05$), 1212 $\mu\text{g/mL}$ で 15.5% ($p \leq 0.05$) を示し, 試験用量に依存した有意な増加 ($p \leq 0.05$) が認められた. 倍数性細胞の出現頻度は 303 $\mu\text{g/mL}$ で 4.0% ($p \leq 0.05$), 606 $\mu\text{g/mL}$ で 3.0%, 1212 $\mu\text{g/mL}$ で 1.0%を示し, 試験用量に依存した増加は認められなかった. また, 試験用量に依存した細胞生存率の減少が観察され, 最高用量である 1212 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 52.4%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 41.5% ($p \leq 0.05$) であった.

14.2.2. 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.

2, 6-ジメチルアニリン処理群での染色体構造異常出現頻度は 633 $\mu\text{g/mL}$ で 4.5% ($p \leq 0.05$), 744 $\mu\text{g/mL}$ で 10.5% ($p \leq 0.05$), 876 $\mu\text{g/mL}$ で 37.5% ($p \leq 0.05$) を示し, 試験用量に依存した有意な増加 ($p \leq 0.05$) が認められた. 倍数性細胞の出現頻度は, 633 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%, 744 $\mu\text{g/mL}$ で 2.0%, 876 $\mu\text{g/mL}$ で 3.5% ($p \leq 0.05$) を示し, 試験用量に依存した有意な増加 ($p \leq 0.05$) が認めら

れた。また、試験用量に依存した細胞生存率の減少が観察され、染色体異常評価群中の高用量である 876 $\mu\text{g/mL}$ での細胞生存率は 37.9%であった。

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 38.5% ($p \leq 0.05$) であった。

14.2.3. 被験物質の析出等

処理開始および処理終了時に被験物質の析出および培養液の pH 変化は認められなかった。

14.3. D_{20} 値ならびにTR値算出結果

本染色体異常試験結果から算出した D_{20} 値 (mg/mL) ならびにTR値 (mg 当たり) は次の通りであった。

試験系	異常の種類	D_{20} 値	TR 値
短時間処理法-S9 処理	構造異常	1.71	9.90
短時間処理法+S9 処理	構造異常	0.756	38.8

15. 考察および結論

2, 6-ジメチルアニリンの変異原性, 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/IU) 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 処理では 10 mM (1212 $\mu\text{g/mL}$) ならびに同+S9 処理では細胞の増殖を 50%以上抑制した用量まで検討した.

染色体異常試験の結果, 2, 6-ジメチルアニリン処理では短時間処理法-S9 処理および同+S9 処理のいずれにおいても, 試験用量依存性を伴い, 統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な染色体構造異常の誘発が認められたことから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} 値の最小値は 0.756 (mg/mL) および TR 値の最大値は 38.8 (mg 当たり) とそれぞれ算出された. なお, 数値異常については, 統計学的に有意 ($p \leq 0.05$) な増加が認められたが, 背景データによる基準値内であったことから陰性反応と判断した.

本被験物質 2, 6-ジメチルアニリン (Aniline, 2, 6-dimethyl-) についてマウスを用いた小核試験で陰性^{1, 2)}, ラットあるいはマウスを用いた UDS 試験で陰性³⁾との報告があった. また, ラットを用いた ^{32}P -ポストラベル試験で, DNA 付加体の形成が確認され⁴⁾, BALB/c-3T3 細胞を用いたトランスフォーメーション試験で陽性との報告⁵⁾があった. さらに NTP データでは, 本被験物質がラット (雌雄) の 2 年間発がん試験 (混餌) で, 鼻腔に明確な腫瘍の形成を誘発することが示され⁶⁾, また, 遺伝毒性に関しては Ames 試験では陰性もしくは弱い陽性, 染色体異常試験では陽性, SCE 試験では陽性, ショウジョウバエを用いた優性致死試験では陰性結果が示されていた⁷⁾. また, 鼻腔に発がん性を示すことから, 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部のグループ (鈴木ら) がトランスジェニックマウスを用いて突然変異を検討したところ, 鼻腔細胞でのみ突然変異の蓄積を認めている (データ未発表). なお, 本被験物質の代謝物である N-ヒドロキシ-2, 6-ジメチルアニリンについて Ames 試験で陽性⁸⁾との報告があった.

類縁体である 2, 3-ジメチルアニリン, 2, 4-ジメチルアニリンおよび 2, 5-ジメチルアニリンについて Ames 試験で陽性⁹⁾との報告があった.

なお、短時間処理法の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施設での背景データ (Appendix 3) の範囲内であり、本試験は適切な条件でなされたと判断された。

以上の試験結果から、本試験条件下において 2, 6-ジメチルアニリンのほ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。

16. 参考文献

- 1) Parton JW, Probst GS, Garriott ML. Mutat Res 1988; 206: 281-3.
- 2) Parton JW, Beyers JE, Garriott ML, Tamura RN. Mutat Res 1990; 234: 165-8.
- 3) Mirsalis JC, Tyson CK, Steinmetz KL, Loh EK, Hamilton CM, Bakke JP, Spalding JW. Environ Mol Mutagen 1989; 14: 155-64.
- 4) Jeffrey AM, Luo FQ, Amin S, Krzeminski J, Zech K, Williams GM. Drug Chem Toxicol 2002; 25: 93-107.
- 5) Matthews EJ, Spalding JW, Tennant RW. Environ Health Perspect 101 Suppl 2 1993; 319-45.
- 6) National Toxicology Program. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser. 1990; 278: 1-138.
- 7) National Toxicology Program. 2,6-XYLIDINE. Available from URL: <http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm?objectid=071A7019-D98F-0BEA-F9A168FA705384FF>
- 8) Matilde Marques M, Gamboa da Costa G, Blankenship LR, Culp SJ, Beland FA. Mutat Res 2002; 506-507: 41-8.
- 9) Zimmer D, Mazurek J, Petzold G, Bhuyan BK. Mutat Res 1980; 77: 317-26.

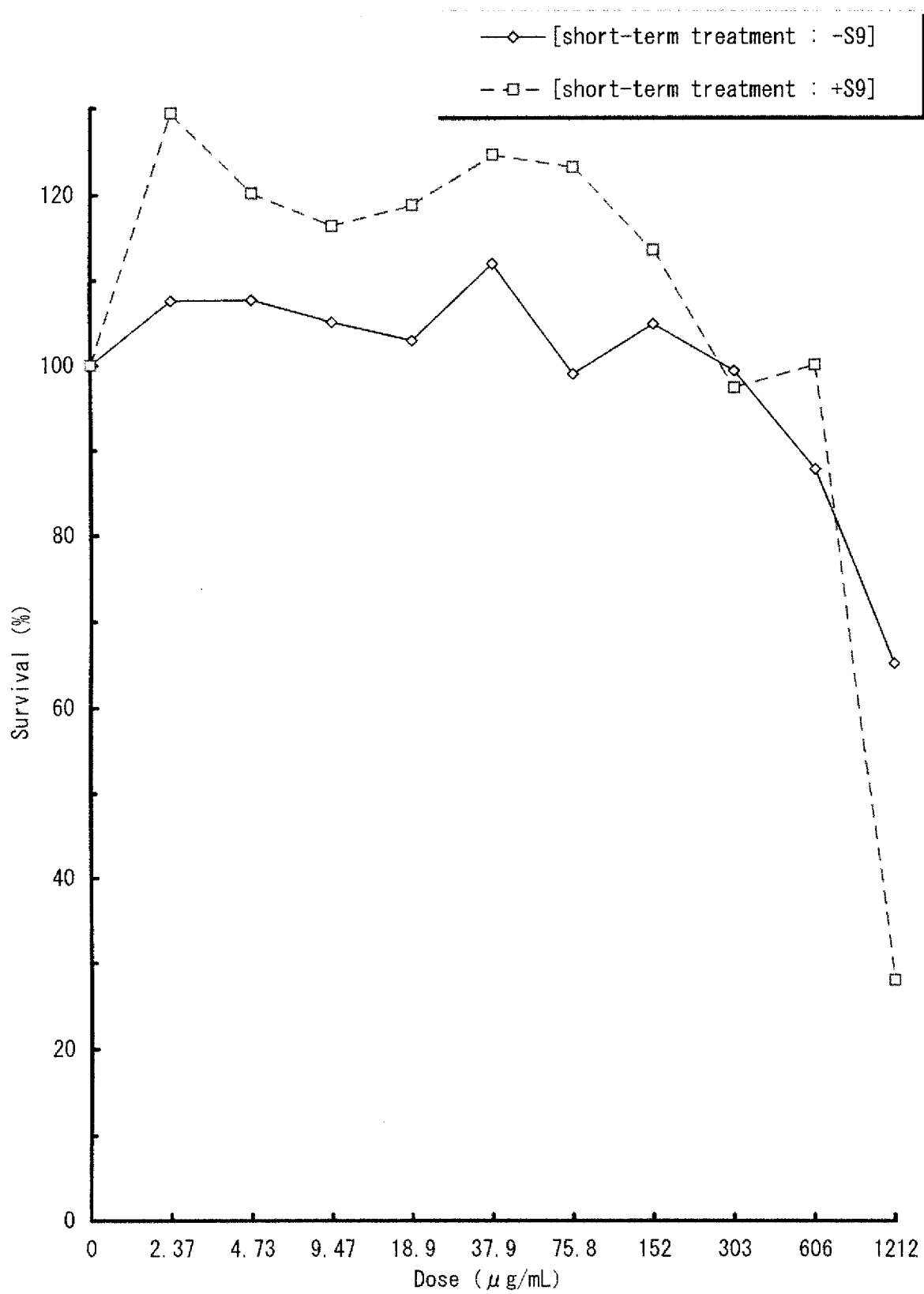


Figure 1. Dose-survival curves of Aniline, 2,6-dimethyl-
[short-term treatment]

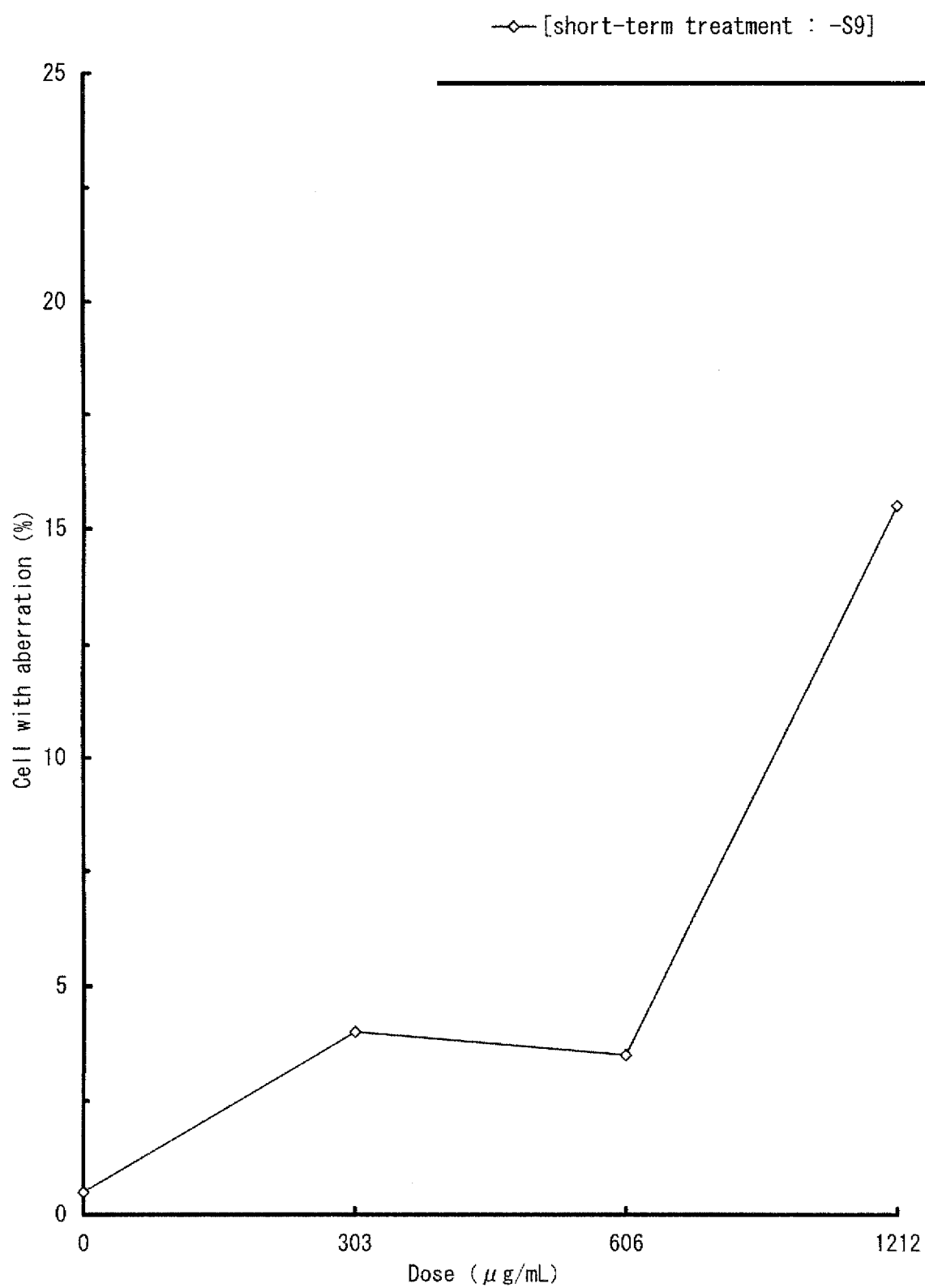


Figure 2. Incidence of structural aberrations induced by Aniline, 2,6-dimethyl- [short-term treatment:-S9]

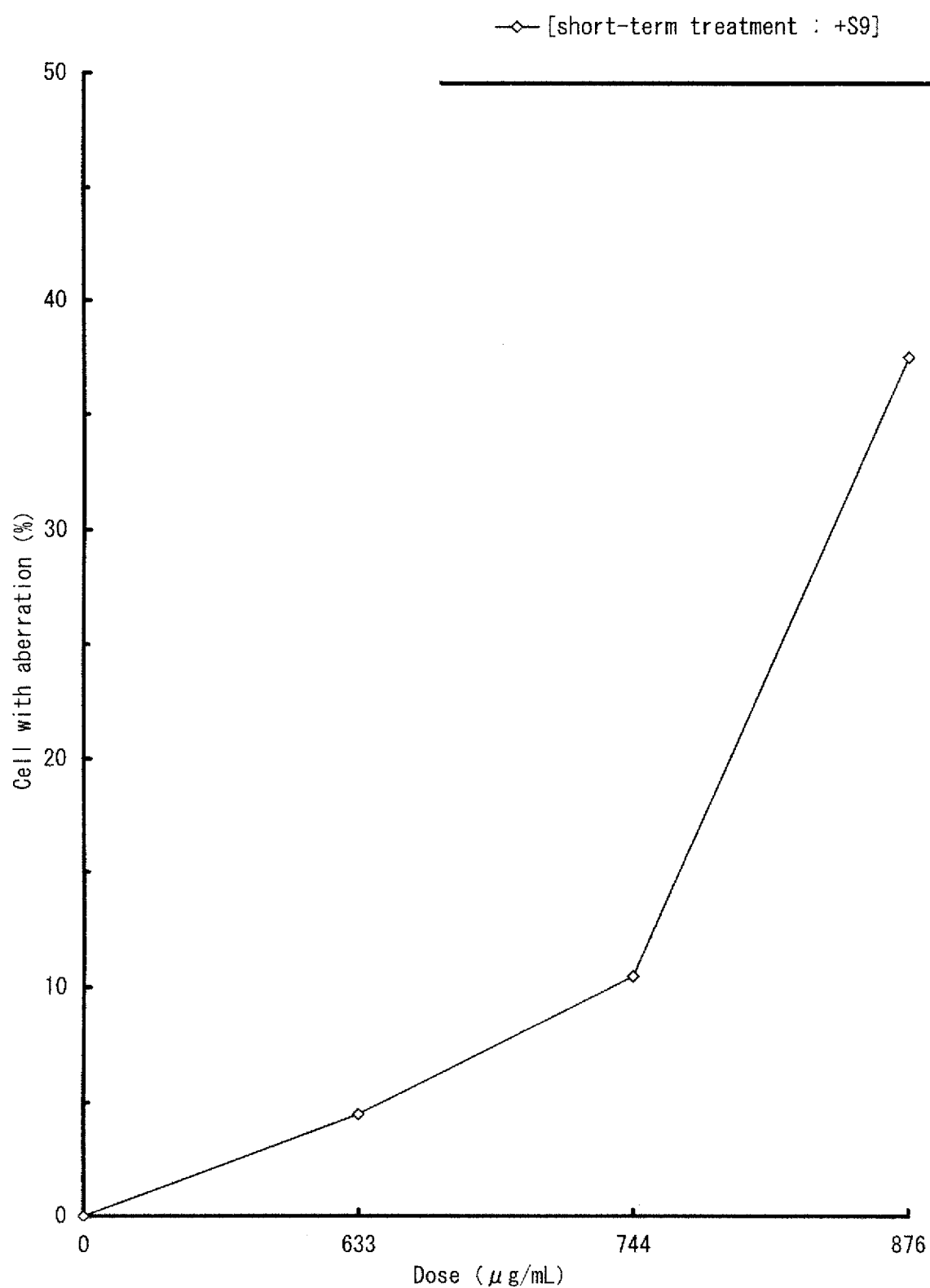


Figure 3. Incidence of structural aberrations induced by Aniline, 2,6-dimethyl- [short-term treatment: +S9]

Table 1. Results of growth inhibition test on Aniline, 2,6-dimethyl- [short-term treatment]

Exp. No. 6872 (115-169)

[short-term treatment : -S9]				[short-term treatment : +S9]			
Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose (μ g/mL)	Survival (%)	[Mean]
DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]	DMSO a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	2.37	105.2 110.0	[107.6]	Test substance	2.37	126.7 132.0	[129.4]
	4.73	106.4 108.9	[107.7]		4.73	120.9 119.5	[120.2]
	9.47	106.6 103.6	[105.1]		9.47	117.9 114.8	[116.4]
	18.9	102.7 103.1	[102.9]		18.9	120.2 117.3	[118.8]
	37.9	114.3 109.6	[112.0]		37.9	123.1 126.0	[124.6]
	75.8	102.2 95.8	[99.0]		75.8	123.6 122.8	[123.2]
	152	104.3 105.5	[104.9]		152	112.3 114.9	[113.6]
	303	102.1 96.8	[99.5]		303	99.3 95.6	[97.5]
	606	84.7 91.0	[87.9]		606	103.0 97.2	[100.1]
	1212	70.3 60.4	[65.4]		1212	30.4 25.6	[28.0]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[short-term treatment : -S9] >1212 (μ g/mL)[short-term treatment : +S9] 1025 (μ g/mL)

a): Negative control

Table 2. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Aniline, 2,6-dimethyl-
[short-term treatment : -S9]

Exp. No. 6872 (115-169)

Compound	Dose (μ g/mL)	Time of exposure (h)	Cell survival (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap(%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
DMSO a)	0	6	100.0	200	1	1	0	0	0	0	1 (0.5)	#	200	1 (0.5)	
Test substance	303	6	92.3	200	2	4	5	0	0	0	8 (4.0)	*	200	8 (4.0)	*
	606	6	94.4	200	1	4	3	0	0	1	7 (3.5)	*	200	6 (3.0)	Positive
	1212	6	52.4	200	5	13	24	0	0	1	31 (15.5)	*	200	2 (1.0)	
MMC b)	0.1	6	92.1	200	8	34	72	0	0	0	83 (41.5)	*	200	1 (0.5)	

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

#: $p \leq 0.05$ Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

*: $p \leq 0.05$ Significant difference from control (Fisher's exact test)

a): Negative control

b): Positive control (Mitomycin C)

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with Aniline, 2,6-dimethyl-
[short-term treatment : +S9]

Exp. No. 6872 (115-169)

Compound	Dose (μ g/mL)	Time of exposure (h)	Cell survival (%)	Number of cells analyzed	Number of cells with structural aberrations						Number of cells with aberrations -gap (%)	Number of cells analyzed for polyploid	Number of polyploid cells (%)	Final judgement	
					gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
DMSO a)	0	6	100.0	200	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	#	200	1 (0.5)	#
Test substance	633	6	61.1	200	1	3	5	0	0	1	9 (4.5)	*	200	4 (2.0)	* Positive
	744	6	61.1	200	3	2	20	0	0	0	21 (10.5)	*	200	4 (2.0)	
	876	6	37.9	200	10	29	68	0	0	0	75 (37.5)	*	200	7 (3.5)	
	1030	6	29.2	NE c)											
CP b)	12.5	6	100.4	200	5	16	68	0	1	0	77 (38.5)	*	200	0 (0.0)	

Abbreviation: ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, oth: others

-gap: total number of cells with aberrations except gap

#: $p \leq 0.05$ Significant difference by trend test (Cochran-Armitage trend test)

*: $p \leq 0.05$ Significant difference from control (Fisher's exact test)

a): Negative control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

c): Not examined