

o-Acetoacetotoluidide の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：3649 (115-082)

財 団 法 人
食 品 農 医 薬 品 安 全 性 評 価 セ ン タ ー

目 次

		1~21
1. 要 約		7
2. 試 験 題 目		8
3. 試 験 目 的		8
4. 試 験 番 号		8
9. 被 験 物 質		10
10. 試 験 材 料 お よ び 方 法		11
11. 試 験 結 果		17
12. 考 察 お よ び 結 論		19
13. 参 考 と し た 資 料		20
Figures		F-1~7
Figure 1	Dose-survival curves of o-Acetoacetotoluidide [continuously treatment]	F-1
Figure 2	Dose-survival curves of o-Acetoacetotoluidide [short-term treatment]	F-2
Figure 3	Incidence of structural aberrations induced by o-Acetoacetotoluidide [continuously treatment : 24hrs]	F-3
Figure 4	Incidence of structural aberrations induced by o-Acetoacetotoluidide [continuously treatment : 48hrs]	F-4
Figure 5	Incidence of structural aberrations induced by o-Acetoacetotoluidide [short-term treatment : -S9]	F-5
Figure 6	Incidence of structural aberrations induced by o-Acetoacetotoluidide [short-term treatment : +S9]	F-6
Figure 7	Incidence of structural aberrations induced by o-Acetoacetotoluidide at the confirmatory study [continuously treatment : 24hrs]	F-7

Tables		T-1~7
Table 1	Results of growth inhibition test on o-Acetoacetotoluidide [continuously treatment]	T-1
Table 2	Results of growth inhibition test on o-Acetoacetotoluidide [short-term treatment]	T-2
Table 3	Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-Acetoacetotoluidide [continuously treatment: 24hrs]	T-3
Table 4	Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-Acetoacetotoluidide [continuously treatment: 48hrs]	T-4
Table 5	Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-Acetoacetotoluidide [short-term treatment: -S9]	T-5
Table 6	Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-Acetoacetotoluidide [short-term treatment: +S9]	T-6
Table 7	Results of the confirmative examination of o-Acetoacetotoluidide [continuously treatment: 24hrs]	T-7

1. 要 約 :

o-Acetoacetotoluidide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連続処理法24時間処理で 625, 1250, 2500 および 5000 μ g/mL, 同48時間処理で 450, 900, 1800 および 3600 μ g/mL, 短時間処理法-S9処理ならびに同+S9処理で 1250, 2500 および 5000 μ g/mLのそれぞれ3~4用量について顕微鏡観察を実施した。その結果、連続処理法および短時間処理法ともo-Acetoacetotoluidide処理群で染色体構造異常の僅かな誘発傾向が観察され、連続処理法24時間処理では染色体構造異常の出現頻度が陽性判定基準と同じ10%を示した。しかしながら、明確な用量依存性が認められなかったことから、連続処理法24時間処理では 1500, 2000, 2500, 3000 および 3500 μ g/mLの5用量を用いた確認試験を実施した。

確認試験の結果、僅かながらも染色体構造異常の出現頻度が増加しており、再現性が認められたことから陽性反応と判断した。

また、連続処理法の陽性対照物質マイトマイシンC (MMC) および短時間処理法+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。

従って、本試験条件下の *in vitro* 試験系において、o-Acetoacetotoluidideは染色体異常を誘起するものと判断した。

2. 試 験 題 目 :

o-Acetoacetotoluidideの哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

3. 試 験 目 的 :

被験物質の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討するため、「新規化学物質に係る試験の方法について」（環保業第237号，薬発第306号，62基局第303号昭和62年3月31日）ならびにOECD化学品ガイドライン 473（1983年5月26日）に従って，哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

なお，試験の実施は「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」（環企研第233号，衛生第38号，63基局第823号昭和63年11月18日）ならびにOECDのGLP（1982年）の基準を満たすものとした。

4. 試 験 番 号 :

3 6 4 9 (115-082)

9. 被 験 物 質 :

- 9.1 被験物質名 o-Acetoacetotoluidine
- 9.2 ロット番号
- 9.3 純 度 99.93 wt% (面積百分率法)
- 9.4 不純物の名称 および純度
アセト酢酸アニライド : 0.06%
アセト酢酸m-トルイダイド : 0.003%
- 9.5 提 供 元
- 9.6 別 名 Acetoaceto o-toluidine
- 9.7 化 学 名 o-Acetoacetotoluidine
- 9.8 CAS番号 93-68-5
- 9.9 化学構造
- Cc1ccccc1NC(=O)CC(=O)C
- 9.10 分 子 量 191.2
- 9.11 物質の状態 白色針状結晶
- 9.12 融 点 103.5°C
- 9.13 溶 解 性
水 (20°C) : 3 g/L
アセトン : 易溶
- 9.14 安 定 性 良好
- 9.15 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。

10. 試験材料および方法：

10.1 試験細胞株

哺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、一部はジメチルスルホキシド（DMSO：GC用；MERCK社；純度99.7%以上；Lot No. K21387978 513）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、染色体異常試験では継代数34、確認試験では同8の細胞を用いた。

10.2 培養液の調製

Eagle-MEM 液体培地（岩城硝子株式会社；Lot No. I7706 [本試験]，I8707 [確認試験]）に、メンブランフィルター（ $\phi 0.45 \mu\text{m}$ ：CORNING社）を用いて濾過除菌した非働化（56℃，30分）済み仔牛血清（LIFE TECHNOLOGIES社；Lot No. 48K6253 [本試験]，1007866 [確認試験]）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℃）に保存した。

10.3 培養条件

CO₂インキュベーターを用い、CO₂濃度5%、37℃の条件で細胞を培養した。

10.4 S9 mix

製造後6ヵ月以内のキッコーマン株式会社製 S9 mix（Lot No. CAM-374）を試験に使用した。S9 調製の際の動物種、性、臓器、誘導物質、誘導方法等ならびに S9 mix の組成を以下に示した。

a. ロット番号	RAA-374
b. 製造日	平成9年12月4日（誘導物質投与開始後5日目）
c. 使用動物	ラット：Sprague-Dawley系
d. 性／週齢	雄／7週齢
e. 体重	195～224 g
f. 臓器	肝臓
g. 誘導物質	Phenobarbital (PB) 5,6-Benzoflavone (BF)
h. 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）
i. 投与方法	腹腔内投与
j. 蛋白含量	25.2 mg/mL

成 分	S9 mix 1 mL中の量
S 9	0.3 mL
M g C l ₂	5 μ mol
K C l	33 μ mol
G - 6 - P	5 μ mol
N A D P	4 μ mol
H E P E S 緩衝液	4 μ mol

10.5 被験物質液の調製

溶解性を基に高濃度処理を実施するために、1%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム (CMC·Na; 和光純薬工業株式会社; Lot No. WTH1105) 水溶液を使用溶媒とした。被験物質を 1%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液に懸濁させ調製原液とした。この調製原液を使用溶媒を用いて所定濃度に希釈した後、直ちに処理を行った。

10.6 対照群

10.6.1 溶媒対照

使用溶媒のみで試験した。

10.6.2 陽性対照 (連続処理法)

注射用水 (株式会社 大塚製薬工場; Lot No. K7C79 [本試験], K7F81 [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. 167BGD) を生理食塩液 (株式会社 大塚製薬工場; Lot No. M7F74 [本試験], M7H87 [確認試験]) を用いて希釈した後、24時間処理で 0.05 μg/mL, 48時間処理で 0.025 μg/mLの用量で試験した。

10.6.3 陽性対照 (短時間処理法)

注射用水 (Lot No. K7C79) 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. 70111) を生理食塩液 (Lot No. M7F74) を用いて希釈した後、12.5 μg/mLの用量で試験した。

10.7 予備試験（細胞増殖抑制試験）

10.7.1 試験用量

予備的な試験（24.3, 81.0, 270, 900 および 3000 $\mu\text{g/mL}$ の5用量：公比 10/3）の結果，連続処理法48時間処理の 900 $\mu\text{g/mL}$ および短時間処理法+S9処理の 3000 $\mu\text{g/mL}$ で中等度の細胞増殖抑制作用がみられ，連続処理法48時間処理の 3000 $\mu\text{g/mL}$ では細胞が死滅していた。

本結果を参考に，細胞増殖抑制試験の用量として下記に示した6～7用量（公比 5/3）を設定した。

1用量当たり2ウェルを用いた。

試 験	用量数	試験用量 ($\mu\text{g/mL}$)
連続処理法24時間処理	6	389 ~ 5000
連続処理法48時間処理	7	233 ~ 5000
短時間処理法-S9処理	6	389 ~ 5000
短時間処理法+S9処理	6	389 ~ 5000

10.7.2 連続処理法

細胞培養用マルチプレート（12ウェル：住友ベークライト株式会社）の各ウェルに24時間処理の場合，培養液を用いて 8×10^3 細胞/mLに調製した細胞浮遊液 1 mL，48時間処理の場合， 4×10^3 細胞/mLに調製した細胞浮遊液 1 mLを播種した。培養3日後に，使用溶媒（以下溶媒）あるいは被験物質液を 100 μL 加えた。さらに24あるいは48時間培養を続けた後に細胞生存率（溶媒対照に対する比）を求めた。

10.7.3 短時間処理法

8×10^3 細胞/mLに調製した細胞浮遊液 1 mLを各ウェルに播種した。培養3日後に-S9処理の場合，培養液 400 μL を除き，溶媒あるいは被験物質液 60 μL を加え，+S9処理の場合は培養液 500 μL を除き S9 mix 100 μL ，溶媒あるいは被験物質液を 60 μL 加えてそれぞれ6時間培養した。各プレートの培養液を除去した後，ダルベッコリン酸緩衝液（LIFE TECHNOLOGIES 社；Lot No. 1001406）を用いて細胞を洗浄した。培養液（500 μL ）を新鮮なものに交換し，さらに18時間培養を続けた後に細胞生存率を求めた。

10.7.4 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プレートから培養液を除き、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. TPJ9327）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。各プレートを水洗した後、十分乾燥させた。各ウェルに色素溶出液（30%エタノール，1%酢酸水溶液）を3 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。溶媒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。なお，算出には389~5000 $\mu\text{g/mL}$ の6点（連続処理法24時間処理），389~3000 $\mu\text{g/mL}$ の5点（同48時間処理），1800~5000 $\mu\text{g/mL}$ の3点（短時間処理法-S9処理）および389~5000 $\mu\text{g/mL}$ の6点（短時間処理法+S9処理）を用いた。

10.7.5 細胞増殖抑制試験結果

試験結果を Figure 1~2 および Table 1~2 に示した。

50%細胞増殖抑制濃度は，連続処理法24時間処理で1565 $\mu\text{g/mL}$ ，同48時間処理で940 $\mu\text{g/mL}$ ，短時間処理法-S9処理で3392 $\mu\text{g/mL}$ ，同+S9処理で3699 $\mu\text{g/mL}$ であった。なお，被験物質暴露終了時において，5000 $\mu\text{g/mL}$ では粉末状被験物質が培養液中に残存していた。

10.8 本試験（染色体異常試験）

10.8.1 試験用量

細胞増殖抑制試験結果を基に，各試験系それぞれ計4~5用量（公比2：下表参照）を本試験の用量に設定した。

1用量当たり2枚のプレートを用いた。

試 験	試 験 用 量 ($\mu\text{g/mL}$)				
連続処理法24時間処理	313,	<u>625,</u>	<u>1250,</u>	<u>2500,</u>	<u>5000</u>
連続処理法48時間処理	225,	<u>450,</u>	<u>900,</u>	<u>1800,</u>	<u>3600</u>
短時間処理法-S9処理	625,	<u>1250,</u>	<u>2500,</u>	<u>5000</u>	
短時間処理法+S9処理	625	<u>1250,</u>	<u>2500,</u>	<u>5000</u>	

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。

連続処理法24時間処理では染色体構造異常について1用量のみで陽性結果が得られたことから，確認試験を実施した。確認試験では1500，2000，2500，3000および3500 $\mu\text{g/mL}$ の5用量（公差数列）を設定した。

10.8.2 連続処理法

細胞培養用プレートに24時間処理の場合、培養液を用いて 8×10^3 細胞/mLに調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞)、48時間処理の場合、 4×10^3 細胞/mLに調製した細胞浮遊液 5 mL (2×10^4 細胞)を播種した。培養3日後に溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液 500 μ Lを加え、さらに24および48時間培養を続けた後に染色体標本作製した。

10.8.3 短時間処理法

培養液を用いて 8×10^3 細胞/mLに調製した細胞浮遊液 5 mL (4×10^4 細胞)を細胞培養用プレートに播種した。培養3日後に-S9処理の場合、培養液 2 mLを除き、溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液 300 μ Lを加え、+S9処理の場合は培養液 2.5 mLを除きS9 mix 500 μ L、溶媒、被験物質液あるいは陽性対照物質溶液 300 μ Lを加えてそれぞれ6時間培養した。各プレートの培養液を除去した後、ダルベッコリン酸緩衝液 (LIFE TECHNOLOGIES 社; Lot No. 1001406 [本試験], 1005028 [確認試験])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。

10.8.4 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 μ g/mL、すなわち培養液 1 mL当たり 20 μ Lのコルセミド溶液 (LIFE TECHNOLOGIES 社; Lot No. 1001347 [本試験], 1003385 [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 (LIFE TECHNOLOGIES 社; Lot No. 1001158 [本試験], 1008225 [確認試験])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 mM 塩化カリウム水溶液を 5 mL加え、37°C中で16分低張処理を行った。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 M ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH 6.8: MERCK 社; Lot No. S617674 520)を用いて希釈した 1.2%ギムザ染色液 (MERCK 社; Lot No. 640117324 [本試験], 640181939 [確認試験])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。

10.8.5 染色体の観察

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（×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。同時に、倍数性細胞（3n 以上）の出現率を記録した。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と同程度、かつ本来の位置からずれていない場合のみギャップとして計数した。なお、ギャップのみ保有する細胞を含めた場合（+gap）と、含めない場合（-gap）とに区別して染色体構造異常の出現頻度を表示した。

すべての標本をコード化した後、マスキング法で観察した。

10.9 結果の解析

各試験群の構造異常を有する細胞ならびに倍数性細胞の出現頻度を、下記に示す基準を用いて判断し、さらに再現性あるいは被験物質の用量に依存性が認められた場合に陽性と判定した。最終評価はギャップのみ保有する細胞を含めた場合について行った。なお、統計学的手法を用いた検定は実施しなかった。

5%未満	----	陰性（-）
5%以上～10%未満	----	疑陽性（±）
10%以上	----	陽性（+）

10.10 D_{20} 値の算出法

D_{20} 値は分裂中期像の20%にいずれかの異常を誘発するのに必要な被験物質濃度であり、最小二乗法により算出した。TR値は一定濃度（mg/mL）あたりの交換型異常（cte）出現数を示す比較値であり、染色分体交換の出現頻度（%）を被験物質濃度（mg/mL 換算）で割ることにより算出した。

11. 試験結果：

11.1 連続処理法24時間処理

試験結果を Figure 3, Table 3 および Appendix 1 に示した。

o-Acetoacetotoluidide処理群での染色体構造異常の出現頻度 (+gap) は、高用量の 2500 μ g/mLで10.0% (+) を示した。倍数性細胞の出現頻度は、溶媒対照と同等であった。

また、最高用量の 5000 μ g/mLでは被験物質o-Acetoacetotoluidideの影響により分裂中期像はまったく観察されなかった。

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+gapで51.5%を示した。

11.2 連続処理法48時間処理

試験結果を Figure 4, Table 4 および Appendix 2 に示した。

被験物質処理群での染色体構造異常の出現頻度は、1800 μ g/mLで5.0% (±) であった。倍数性細胞の出現頻度は、溶媒対照と同等であった。

3600 μ g/mLでは被験物質の影響により分裂中期像は観察されなかった。

陽性対照では構造異常細胞が+gapで50.0%出現した。

11.3 短時間処理法-S9処理

試験結果を Figure 5, Table 5 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の出現頻度は、試験用量に依存して増加する傾向が認められ、5000 μ g/mLでの出現頻度は9.0% (±) であった。倍数性細胞の出現頻度は、溶媒対照と同等であった。

一方、CP で処理した群では代謝活性化が行われなため、染色体異常の明確な誘発は観察されなかった。

11.4 短時間処理法+S9処理

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

被験物質処理群での染色体構造異常の出現頻度は、5000 μ g/mLにおいて5.0% (±) であった。倍数性細胞の出現頻度は溶媒対照と同等であった。

一方、代謝活性化を必要とする陽性対照物質 CP で処理した細胞では、多数の異常が出現し、+gapで89.5%の細胞に構造異常が認められた。

11.5 確認試験（連続処理法24時間処理）

染色体構造異常の出現頻度が1用量においてのみ陽性反応を示したことから、5用量（公差数列）を用いた確認試験を実施した。但し、被験物質の影響により3000 $\mu\text{g/mL}$ で染色体異常の観察可能な細胞数は180細胞のみであった。

試験結果を Figure 7, Table 7 および Appendix 5 に示した。

染色体構造異常の出現頻度は1500 $\mu\text{g/mL}$ で4.0%、2000 $\mu\text{g/mL}$ で8.5%（±）、2500 $\mu\text{g/mL}$ で2.5%、3000 $\mu\text{g/mL}$ で3.9%であり、概ね再現性が確認された。

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

試験系	D_{20} 値 (mg/mL)	TR値
連続処理法24時間処理	5.14	2.60

なお、暴露終了時、連続処理法ならびに短時間処理法+S9では最高用量で短時間処理法-S9では2500 $\mu\text{g/mL}$ 以上の用量で粉末状被験物質が培養液中に散在しているのが観察された。

12. 考察および結論：

o-Acetoacetotoluidideの変異原性，すなわち染色体異常誘発性の有無を検討するため，培養細胞（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験結果を基に連続処理法ならびに短時間処理法において，細胞の増殖が著しく抑制される濃度あるいは 5000 μ g/mLまで検討した。

その結果，連続処理法ならびに短時間処理法のいずれにおいても染色体構造異常の極僅かな誘発傾向が観察された。連続処理法24時間処理においては1用量においてのみ陽性と判定されたことから確認試験を実施した。その結果，明確な用量依存性は確認されなかったが，染色体構造異常の出現頻度が 2000 μ g/mLで8.5%を示したことから，本試験結果を考慮して陽性反応と判断した。

また，変異原性の強さに関する相対的比較値であるD₅₀値およびTR値はそれぞれ 5.14 (mg/mL) および 2.60と算出され，既知変異原性物質に比較してo-Acetoacetotoluidideの変異原性は弱いことを示していた。

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

なお，類縁化合物の変異原性についての報告はなかった。

以上の試験結果から，本試験条件下においてo-Acetoacetotoluidideの哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性は陽性と判定した。

13. 参考とした資料 :

- Ishidate, M., Jr., and Odashima, S. : Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* -A screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.*, 48 : 337~354, 1977.
- 石館 基 : 培養細胞を用いる染色体異常の検出法, *組織培養*, 5 : 115~122, 1979.
- Evans, H. J. : Cytological methods of detecting chemical mutagens. In A. Hollander (Ed.), *Chemical Mutagens*, Vol.4 : 1~25, Plenum, New York, 1976.
- Matsuoka, A., *et al.* : Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutat. Res.*, 66 : 277~290, 1979.
- 石館 基 監修 : 〈改訂〉染色体異常試験データ集, エル・アイ・シー, 東京, 1987.
- Evans, H. J. and O' Riordan, M. L. : Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberration in mutagens tests, *Mutat. Res.*, 31 : 135~148, 1975.
- Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 22, 269~275, 1972.

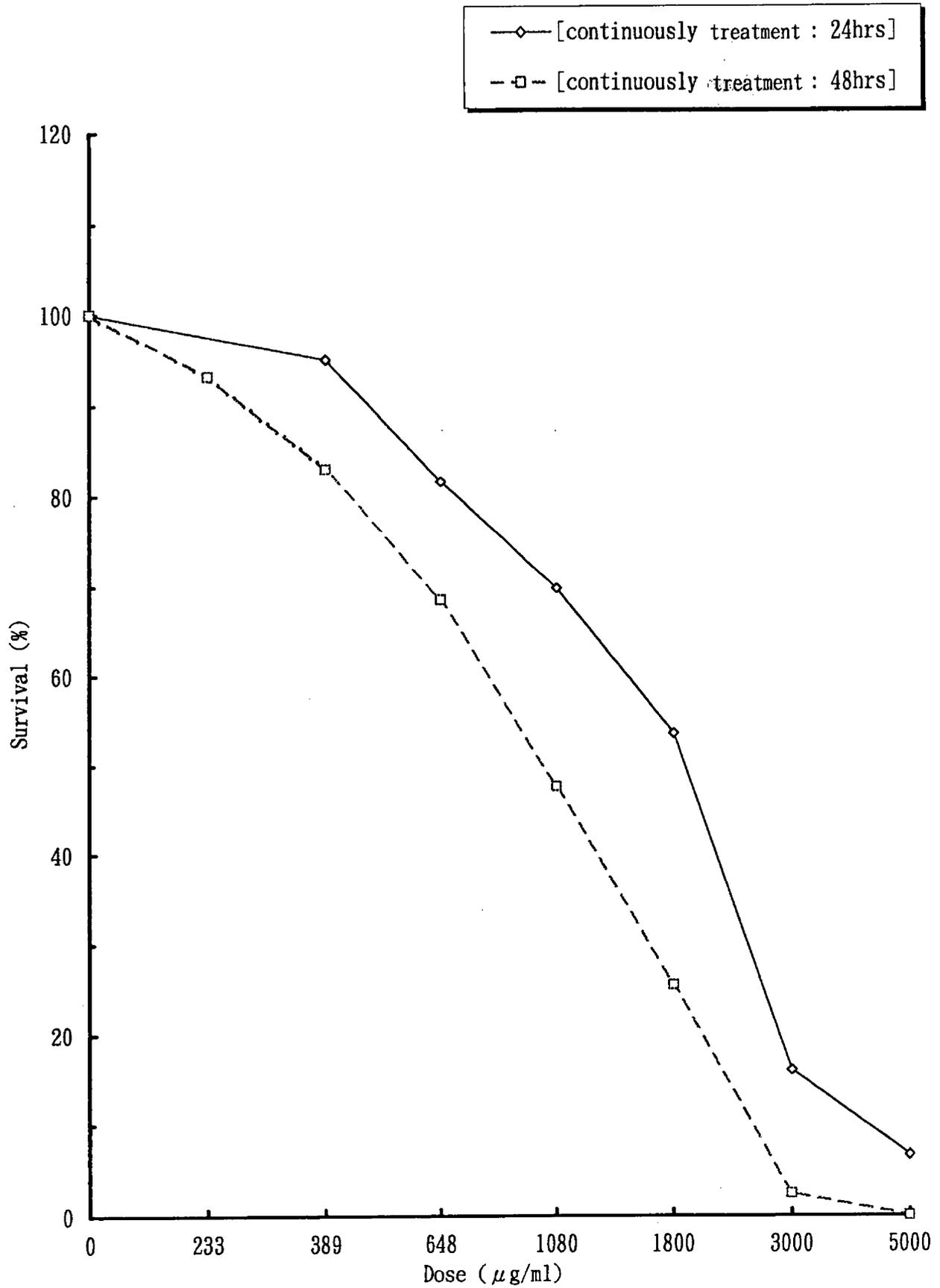


Figure 1. Dose-survival curves of o-Acetoacetotoluidide [continuously treatment]

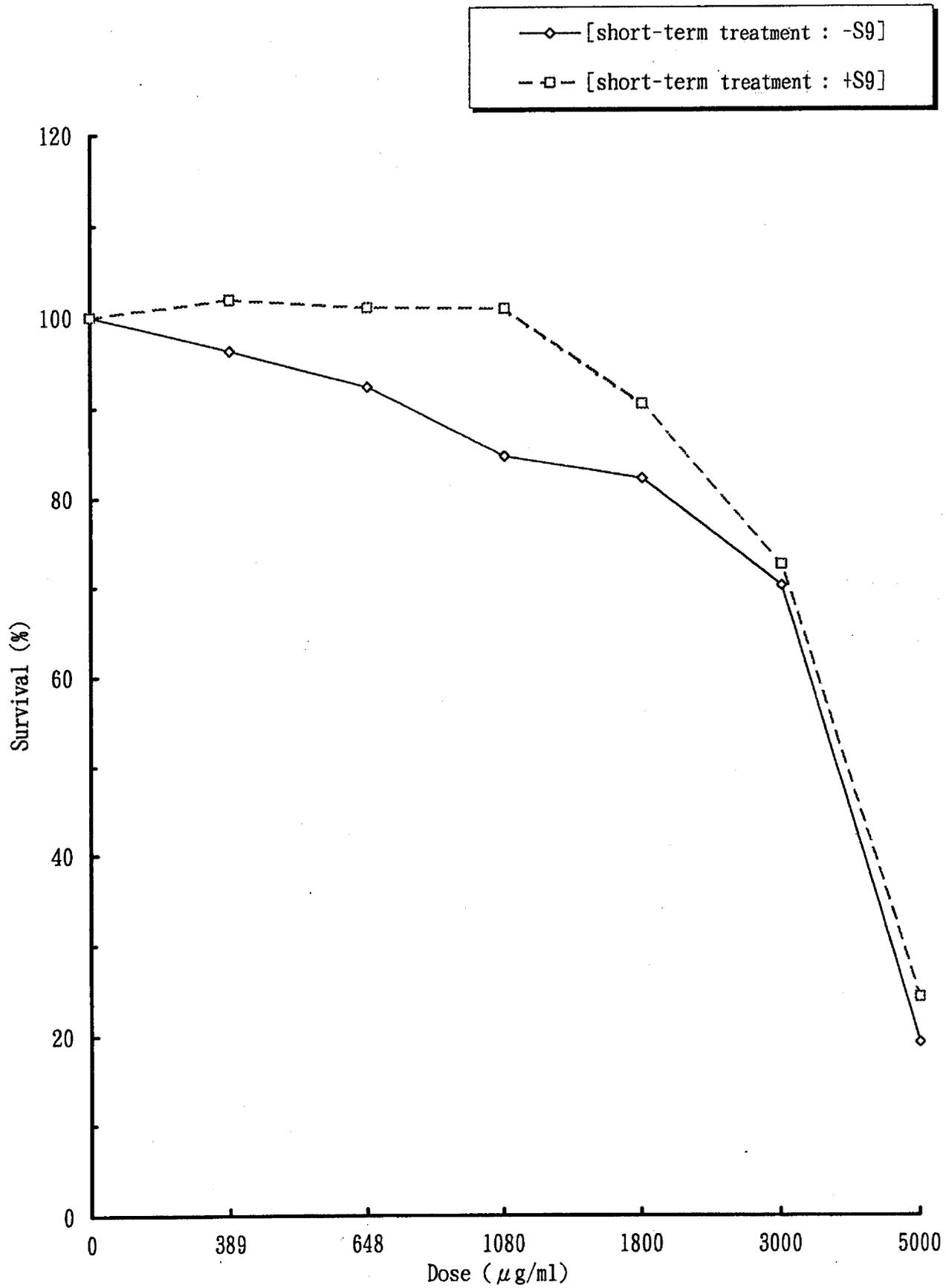


Figure 2. Dose-survival curves of o-Acetoacetotoluidide [short-term treatment]

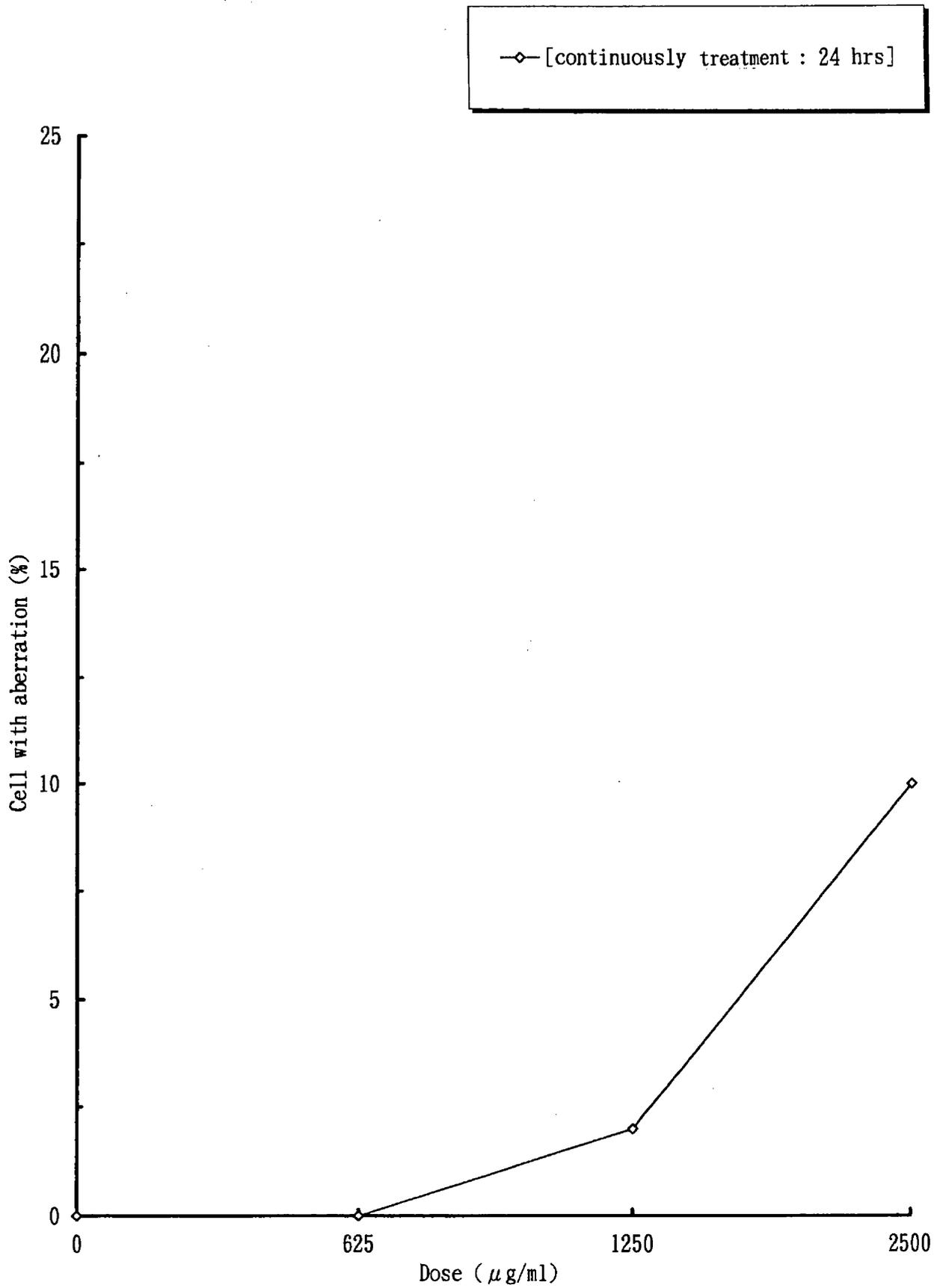


Figure 3. Frequency of structural aberrations induced by o-Acetoacetotoluidide [continuously treatment : 24hrs]

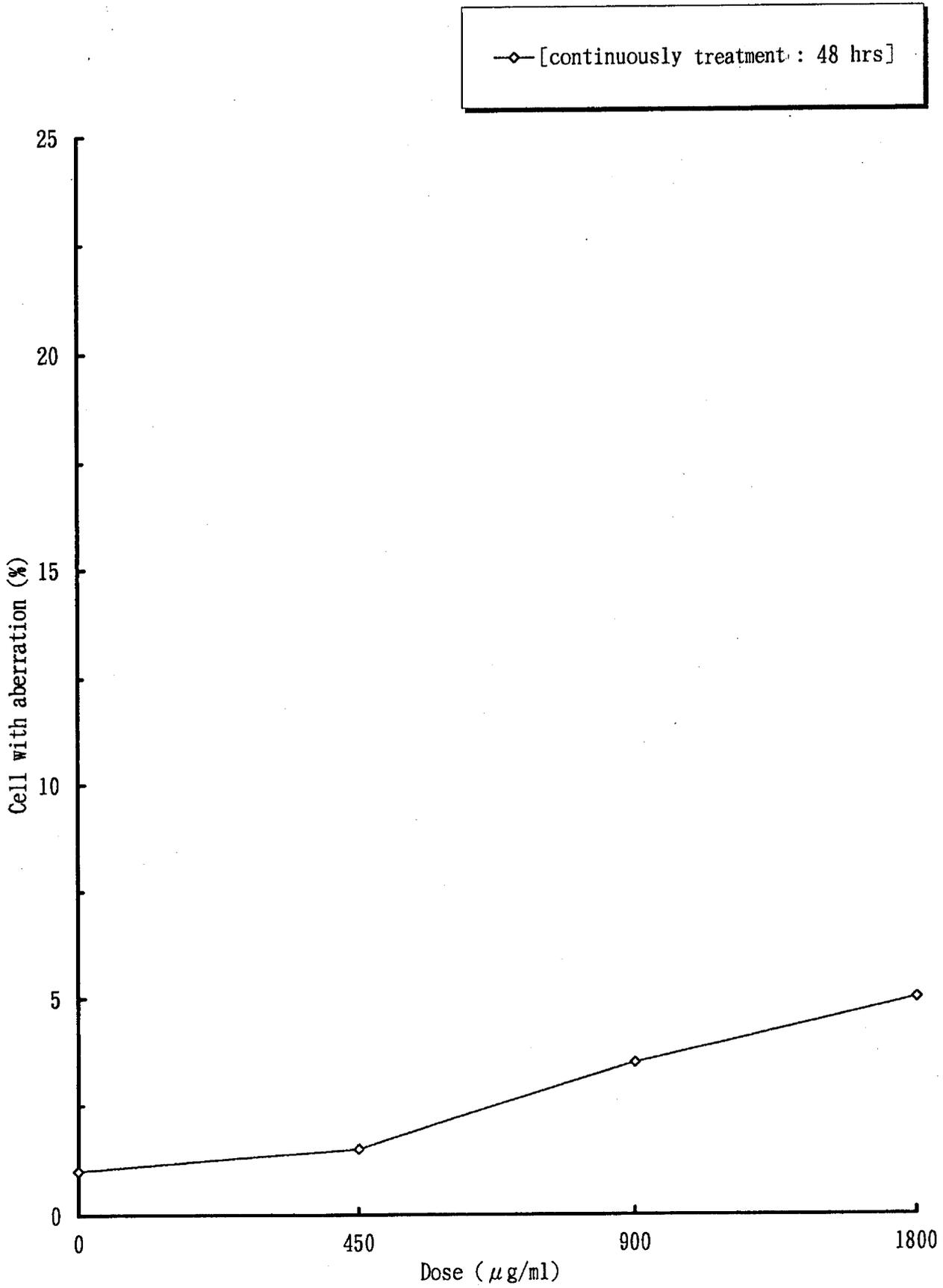


Figure 4. Frequency of structural aberrations induced by o-Acetoacetotoluidide [continuously treatment : 48hrs]

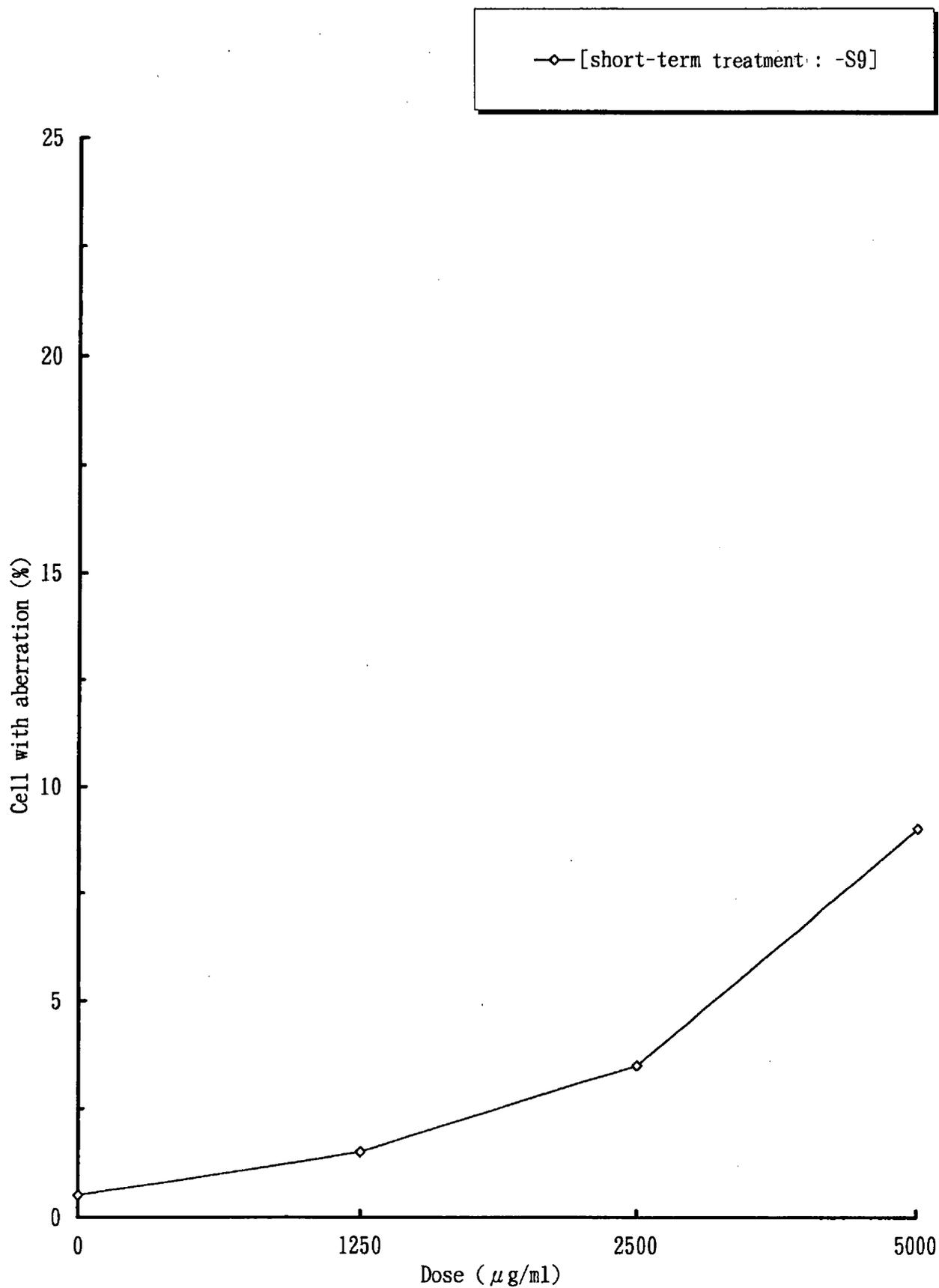


Figure 5. Frequency of structural aberrations induced by o-Acetoacetotoluidide [short-term treatment : -S9]

—◇— [short-term treatment : +S9]

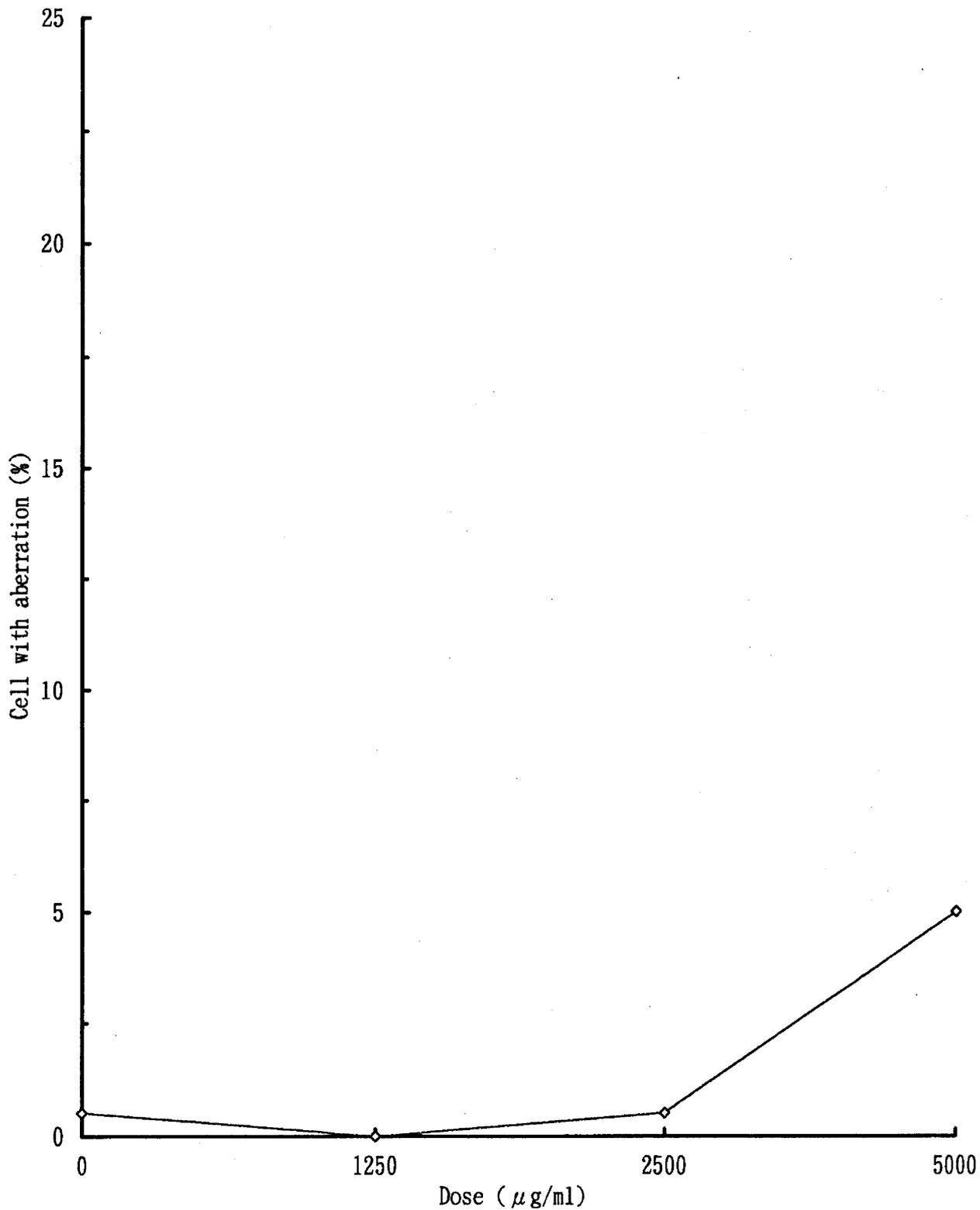


Figure 6. Frequency of structural aberrations induced by o-Acetoacetotoluidide [short-term treatment : +S9]

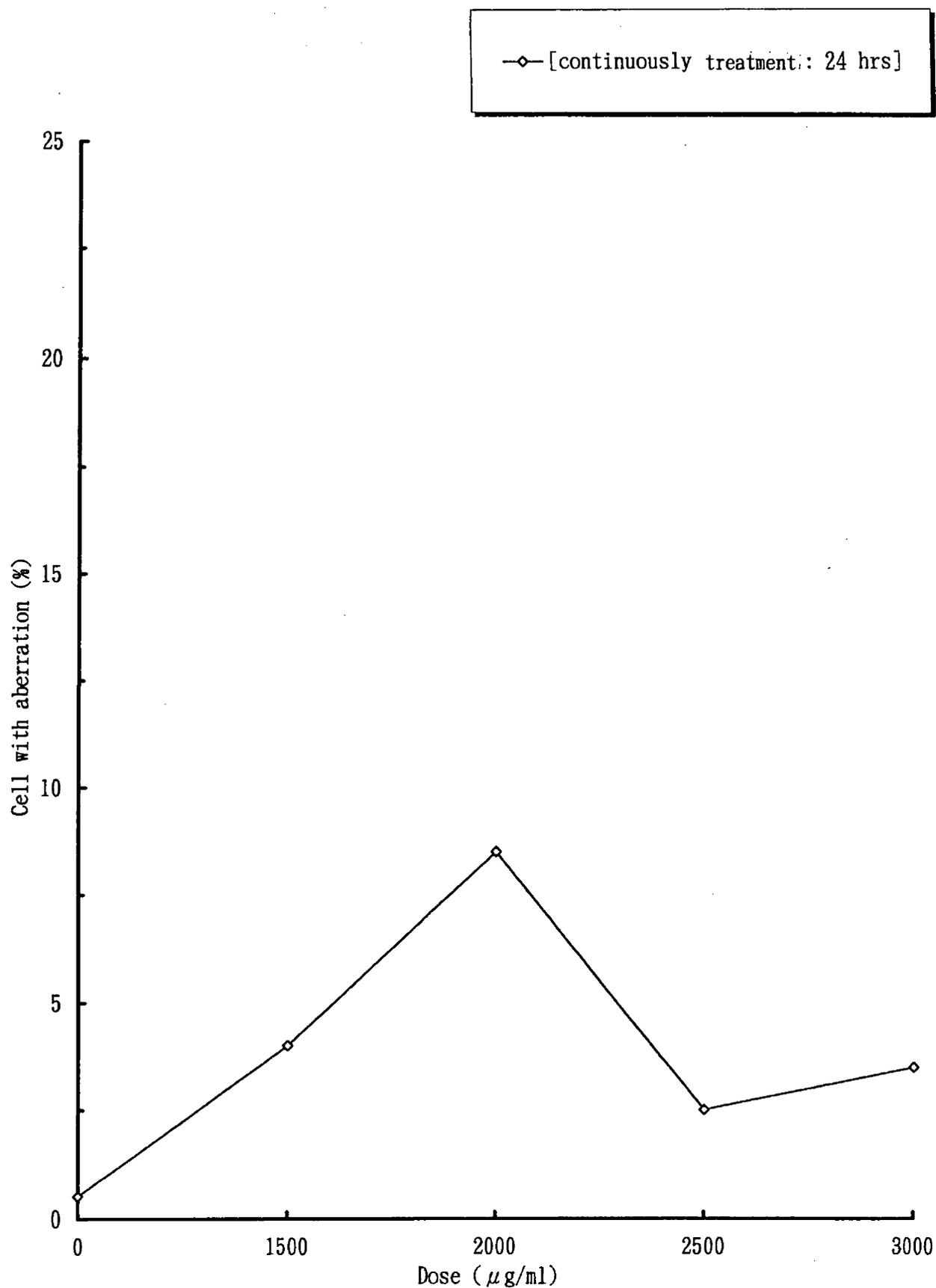


Figure 7. Frequency of structural aberrations induced by o-Acetoacetotoluidide at the confirmatory study [continuously treatment : 24hrs]

Table 1. Results of growth inhibition test on o-Acetoacetotoluidide [continuously treatment]

Exp. No. 3649 (115-082)

[continuously treatment : 24hrs]				[continuously treatment : 48hrs]			
Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Survival (%)	[Mean]
1%CMC-Na a)	0	100.0 100.0	[100.0]	1%CMC-Na a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	389	98.7 91.5	[95.1]	Test substance	233	93.4 93.2	[93.3]
	648	82.2 81.2	[81.7]		389	83.6 82.5	[83.1]
	1080	68.5 71.1	[69.8]		648	68.8 68.3	[68.5]
	1800	53.3 54.0	[53.6]		1080	47.8 47.4	[47.6]
	3000	16.6 15.4	[16.0]		1800	25.0 26.1	[25.5]
	5000 d)	6.3 6.8	[6.6]		3000	2.9 1.9	[2.4]
					5000 d)	0.0 0.0	[0.0]

50% Growth inhibition dose was as follows:

[continuously treatment : 24hrs] ——— 1565 ($\mu\text{g/ml}$)
 [continuously treatment : 48hrs] ——— 940 ($\mu\text{g/ml}$)

a): Solvent control

d): Visible precipitation was occurred at the end of treatment period

Table 2. Results of growth inhibition test on o-Acetoacetotoluidide [short-term treatment] Exp. No. 3649 (115-082)

Compound	[short-term treatment : -S9]			[short-term treatment : +S9]			
	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Survival (%)	[Mean]	Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Survival (%)	[Mean]
1%CMC-Na a)	0	100.0 100.0	[100.0]	1%CMC-Na a)	0	100.0 100.0	[100.0]
Test substance	389	98.1	[96.2]	Test substance	389	101.7	[101.8]
		94.2				101.9	
Test substance	648	92.9	[92.2]	Test substance	648	100.8	[100.8]
		91.5				100.9	
Test substance	1080	84.7	[84.6]	Test substance	1080	100.7	[100.7]
		84.5				100.7	
Test substance	1800	81.5	[82.1]	Test substance	1800	90.4	[90.3]
		82.7				90.1	
Test substance	3000	68.7	[70.0]	Test substance	3000	73.8	[72.4]
		71.2				70.9	
Test substance	5000 d)	20.1	[19.2]	Test substance	5000 d)	25.1	[24.2]
		18.3				23.3	

50% Growth inhibition dose was as follows:

[short-term treatment : -S9] ——— 3392 ($\mu\text{g/ml}$)[short-term treatment : +S9] ——— 3699 ($\mu\text{g/ml}$)

a): Solvent control

d): Visible precipitation was occurred at the end of treatment period

Table 3. Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-Acetoacetotoluide
[continuously treatment : 24 hrs]

Exp. No. 3649 (115-082)

Compound	Dose (μ g/ml)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
1% CMC-Na a)	0	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	0.5 -	-
Test substance	625	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.0 -	0.0 -	-
	1250	200	0	3	1	0	0	0	2.0 -	2.0 -	0.0 -	-
	2500	200	2	6	13	0	0	0	10.0 +	9.0 \pm	0.0 -	+
	5000 d)	Toxic										
MNC b)	0.05	200	4	44	81	0	0	0	51.5 +	51.5 +	0.5 -	+

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

a): Solvent control

b): Positive control (Mitomycin C)

d): Visible precipitation was occurred at the end of treatment period

Exp. No. 3649 (115-082)

Table 4. Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-Acetoacetotoluidide
[continuously treatment : 48 hrs]

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations							Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth					
1% CMC*Na a)	0	200	0	1	0	0	0	1	0	1.0 -	1.0 -	0.5 -	-
Test substance	450	200	0	3	0	1	0	0	0	1.5 -	1.5 -	0.0 -	-
	900	200	0	2	4	1	0	0	0	3.5 -	3.5 -	0.0 -	-
	1800	200	0	4	7	0	0	0	0	5.0 \pm	5.0 \pm	0.5 -	\pm
	3600 d)	Toxic											
MNC b)	0.025	200	5	44	78	1	1	0	0	50.0 +	50.0 +	1.0 -	+

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

a): Solvent control

b): Positive control (Mitomycin C)

d): Visible precipitation was occurred at the end of treatment period

Table 5. Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-Acetoacetotoluidide
[short-term treatment : -S9]

Exp. No. 3649 (115-082)

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations							Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth	oth				
1% CHC-Na a)	0	200	0	0	1	0	0	0	0	0.5	0.5	0.5	-
Test substance	1250	200	0	2	1	0	0	0	0	1.5	1.5	0.5	-
	2500 d)	200	0	4	4	0	0	0	0	3.5	3.5	0.5	-
CP b)	5000 d)	200	1	10	11	0	0	0	0	9.0 \pm	8.5 \pm	0.0	\pm
	12.5	200	0	4	1	0	0	0	0	2.5	2.5	0.5	-

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

a): Solvent control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

d): Visible precipitation was occurred at the end of treatment period

Table 6. Chromosome aberration test on CHL cells treated with o-Acetoacetotoluicide
 [short-term treatment : +S9] Exp. No. 3649 (115-082)

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
1% CMC-Na a)	0	200	0	0	0	0	1	0	0.5 -	0.0 -	-	
Test substance	1250	200	0	0	0	0	0	0	0.0 -	0.5 -	-	
	2500	200	0	0	1	0	0	0	0.5 -	0.5 -	-	
	5000 d)	200	1	6	8	0	0	0	5.0 \pm	0.5 \pm	\pm	
CP b)	12.5	200	11	58	177	0	1	0	89.5 +	0.0 -	+	

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

a): Solvent control

b): Positive control (Cyclophosphamide)

d): Visible precipitation was occurred at the end of treatment period

Table 7. Results of the confirmative examination of o-acetoacetotoluicide
[continuously treatment : 24 hrs]

Exp. No. 3649 (115-082)

Compound	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	Number of Cells	Number of cells with structural aberrations						Total (+gap) (%)	Total (-gap) (%)	Polyploid cells (%)	Final judgement
			gap	ctb	cte	csb	cse	oth				
1% CMC-Na a)	0	200	1	0	0	0	0	0	0.5 -	0.0 -	0.5 -	-
Test substance	1500	200	1	5	3	0	0	0	4.0 -	3.5 -	0.0 -	-
	2000	200	1	11	6	0	0	0	8.5 \pm	8.0 \pm	0.0 -	\pm
	2500	200	0	2	3	0	0	0	2.5 -	2.5 -	0.0 -	-
	3000	180	0	3	4	0	0	0	3.9 -	3.9 -	0.0 -	-
	3500 d)	Toxic										
MNC b)	0.05	200	12	56	85	0	0	0	57.0 +	56.0 +	0.5 -	+

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

a): Solvent control

b): Positive control (Mitomycin C)

d): Visible precipitation was occurred at the end of treatment period